



Title	The $\beta$ -lactam antibiotics, penicillin-G and cefoselis have different mechanisms and sites of actions at GABAA receptors
Author(s)	杉本, 匡弘
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43784">https://hdl.handle.net/11094/43784</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について〈/a〉をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	杉本匡弘
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16876 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学位論文名	The $\beta$ -lactam antibiotics, penicillin-G and cefoselis have different mechanisms and sites of actions at GABA <sub>A</sub> receptors. ( $\beta$ ラクタム系抗生物質(ペニシリンG、セフォセリス)のGABA <sub>A</sub> 受容体への作用メカニズム)
論文審査委員	(主査) 教授 真下 節  (副査) 教授 三木 直正 教授 吉矢 生人

## 論文内容の要旨

## 【目的】

抗生物質が、中枢神経系の副作用として痙攣を引き起こしうることは、よく知られている。特にペニシリンは、これまでの長い臨床使用の間に多数の痙攣合併症の報告があり、その代表的な存在である。ペニシリンが中枢神経系に作用して痙攣を引き起こすメカニズムはこれまで比較的よく研究され、主にGABA<sub>A</sub>受容体により制御されている抑制性の神経伝達を阻害することにより作用をあらわしてることが明らかにされている。ペニシリンと同じ $\beta$ ラクタム系抗生物質に属し、もう一つの大きな流れを占めるセファロsporin系抗生物質も、GABAによって誘発された電流を抑制することが明らかにされている。しかしながら、GABA<sub>A</sub>受容体へのこれら抗生物質の詳細な作用メカニズム及び作用する分子部位は不明なままである。

本研究では、代表的な $\beta$ ラクタム系抗生物質である、ペニシリン系のペニシリンG(PCG)と、最近開発され臨床使用において痙攣が多く発生したセフェム系抗生物質のセフォセリス(CFSL)のGABA<sub>A</sub>受容体への作用を、Xenopus 卵母細胞上に発現させた野生型及び変異型マウスGABA<sub>A</sub>受容体を用いて解析・検討した。

## 【方法ならびに成績】

Xenopus 卵母細胞に注入する $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ 、及び、 $\gamma 2s$ 各GABA<sub>A</sub>受容体サブユニットcDNAは、卵母細胞において安定した受容体発現を促進するために、アフリカツメガエル(Xenopus laevis)の $\beta$ グロブリン蛋白をmulticloning siteの両側に挿入した改造型pBluescript(pBluescriptMX)プラスミド内にサブクローニングを行った。大腸菌内で増殖させたプラスミドDNAを、Qiagenプラスミド精製キットを用いて精製抽出し、制限酵素( $\beta 2$ 、及び、 $\beta 2Y256F$ はBgl I;  $\alpha$ 、及び、 $\gamma 2s$ はPvu IIを使用)によって切断することにより各cDNAテンプレートを作成した。さらにAmbion T3 RNAメッセージ作成キットを用いてcDNAの翻訳を行いmRNAの合成を行った。

GABA<sub>A</sub>受容体 $\beta 2$ サブユニットの第256番アミノ酸チロシンのフェニルアラニンへの点変異( $\beta 2Y256F$ ; 代表的な非競合的阻害薬であるpicrotoxinの阻害効果を廃絶)はStratageneのQuik Change™ Site-Directed Mutagenesisキットを用いて作成した。挿入された点変異はDNAシーケンサーにて変異配列の確認を施行した。

マウスGABA<sub>A</sub>受容体は、それぞれをコードする各サブユニット( $\alpha 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 2Y256F$ 及び $\gamma 2$ ) mRNAを希望の組み合わせ( $\alpha 1\beta 2\gamma 2s$ 、 $\alpha 1\beta 2Y256F\gamma 2s$ )ごとにXenopus 卵母細胞に注入し、24-72時間培養することにより

卵細胞上に recombinant 受容体を発現させた。そして、 $\alpha 1\beta 2\gamma 2s$ 、 $\alpha 1\beta 2Y256F\gamma 2s$  受容体に対する PCG 及び CFSL の作用を 2 電極電位固定法を用いて調査した。

結果であるが、PCG、と CFSL はともに GABA によって誘発された電流を濃度依存性に抑制した。 $\alpha 1\beta 2\gamma 2s$  サブユニット GABA<sub>A</sub>受容体に対する IC<sub>50</sub>は、PCG 557.1±125.4 μM、CFSL185.0±26.6 μM であった。PCG の作用は非競合的阻害であり、CFSL は競合的阻害を示した。

$\beta 2$ サブユニットの第256番目のアミノ酸であるチロシンをフェニルアラニンへ点変異して得られた  $\beta 2Y256F$  (代表的な非競合的阻害薬である picrotoxin の阻害効果を廃絶) を組み込んだ  $\alpha 1\beta 2Y256F\gamma 2s$  受容体においては、CFSL (189±26.6 μM) の IC<sub>50</sub>は変化しなかったが、PCG (IC<sub>50</sub>=28.4±1.42mM) はその阻害効果を著しく低下させた。

#### 【総括】

本研究は GABA<sub>A</sub>受容体の点突然変異手技を用いた抗生物質作用部位検討の最初の報告である。電気生理学的実験より PCG と CFSL はともに GABA<sub>A</sub>受容体機能を阻害するが、その作用メカニズムは異なるであろうこと、すなわち PCG は非競合的、CFSL は競合的なメカニズムを示すことが明らかにされた。さらに、PCG は点突然変異実験による検討によって、イオンチャンネルを形成する M2膜貫通部位の picrotoxin 作用部位近傍に作用点が存在することが推測された。

#### 論文審査の結果の要旨

抗生物質が、中枢神経系の副作用として痙攣を引き起こしうることは、よく知られている。特にペニシリンは、これまでの長い臨床使用の間に多数の痙攣合併症の報告があり、その代表的な存在である。ペニシリンが中枢神経系に作用して痙攣を引き起こすメカニズムはこれまで比較的よく研究され、主に GABA<sub>A</sub>受容体により制御されている抑制性の神経伝達を阻害することにより作用をあらわしてくることが明らかにされている。ペニシリンと同じβラクタム系抗生物質であるセファロスポリン系抗生物質も、GABA によって誘発された電流を抑制することが明らかにされている。しかしながら、GABA<sub>A</sub>受容体へのこれら抗生物質の詳細な作用メカニズム及び作用する分子部位は不明なままであった。

本研究では、GABA<sub>A</sub>受容体へのβラクタム系抗生物質、ペニシリン G (PCG) 及びセフォセリス (CFSL) の作用を、Xenopus 卵母細胞上に発現させたマウス GABA<sub>A</sub>受容体を用いて解析・検討した。

本実験より PCG、CFSL はともに GABA<sub>A</sub>受容体機能を阻害するが、その作用メカニズムは異なるであろうこと、すなわち PCG は非競合的、CFSL は競合的なメカニズムを示すことが明らかにされた。さらに、PCG は点突然変異実験による検討によって、イオンチャンネルを形成する M2膜貫通部位の picrotoxin 作用部位近傍に作用部位が存在することが推測された。

本研究は、ペニシリン系抗生物質の痙攣誘発作用の分子レベルでのメカニズム解明に寄与するものであり、また、安全な薬剤設計開発に役立つものと考えられ、学位に値すると考えられる。