The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The β-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	https://hdl.handle.net/11094/43784
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【79】

氏　　名	杉本匡弘（すぎもと まさひろ）
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 β-lactam antibiotics, penicillin-G and cefoselis have different mechanisms and sites of actions at $GABA_A$ receptors. （βラクタム系抗生物質（ペニシリンG、セフォセリス）の$GABA_A$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$GABA_A$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に属し、もう一つの大きな流れを占め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、$GABA_A$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β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$GABA_A$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$GABA_A$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α1、β2、及び、γ2s各$GABA_A$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βグロブリン蛋白をmulticloning siteの両側に挿入した改造型pBluescript（pBluescriptMXT）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（β2、及び、β2Y256FはBgl I；α、及び、γ2s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。

$GABA_A$受容体β2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（β2Y256F；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 TM Site-Directed Mutagenesisキットを用いて作成した。挿入された点変異はDNAシークエンサーにて変異配列の確認を施行した。

マウス$GABA_A$受容体は、それぞれをコードする各サブユニット（α1、β2、β2Y256F及びγ2）mRNAを希望の組み合わせ（α1β2γ2s、α1β2Y256Fγ2s）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、α1β2γ2s、α1β2Y256Fγ2s 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。α1β2γ2s サブユニット $GABA_A$受容体に対する IC_{50}は、PCG 557.1±125.4μM、CFSL185.0±26.6μM であった。PCG の作用は非競合的阻害であり、CSFI は競合的阻害を示した。

β2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β2Y256F（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α1β2Y256Fγ2s 受容体においては、CSFL（189±26.6μM）の IC_{50}は変化しなかったが、PCG（IC50=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 $GABA_A$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 CFSI はともに $GABA_A$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 $GABA_A$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、$GABA_A$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、$GABA_A$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 $GABA_A$受容体を用いて解析・検討した。

本実験より PCG、CFSL はともに $GABA_A$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。