

第 3 章 フィプロニルの GABA_A レセプターチャネル複合体に対する 作用機構

これまで報告された研究結果から、フィプロニルは GABA による伝達作用を阻害するが、電気生理学的側面からみたフィプロニルのイオンチャネルに対する作用の詳細は未だ不明である。ピクロトキシニンおよびディルドリンの作用において、パッチクランプ法を用いた実験から、チャネルの活性化により抑制作用が促進されるが (Dillon et al., 1995; Nagata and Narahashi, 1994)、フィプロニルの抑制作用とチャネルの活性化との関係に関する報告はない。フィプロニルの結合部位についてはディルドリンおよびピクロトキシニンと同一であるか否かは、両説を支持する結果が報告されているため未だに結論づけられていない (Cole et al., 1995; Hosie et al., 1995; Kamijima and Casida, 2000; Wolff and Wingate, 1998)。

本章ではラット DRG ニューロンを用いて以下の点について実験を行った。フィプロニルの GABA 誘導性イオン電流に対する抑制作用を検討し、IC₅₀ 値を推定した。ディルドリンやピクロトキシニンとの作用の類似性を検討するため、チャネルの活性化とフィプロニルの作用との関係を調べた。また、シングルチャネルイオン電流に対するフィプロニルの抑制作用を検討し、開時間、閉時間、およびバースト持続時間等の各種パラメータを比較した。最後に、フィプロニルの結合部位を探索するため、フィプロニルとピクロトキシニンとの間の相互作用を調べた。

結果

1. フィプロニルの GABA 誘導性イオン電流に対する作用

GABA 誘導性イオン電流に対するフィプロニルの作用を、ホールセルパッチクランプ法で調べた (Fig. 6)。GABA 誘導性イオン電流は、細胞膜電位を -60 mV に固定し 300 μ M の GABA を 10 msec と短時間、 1 分間隔で繰り返し処理することにより測定した (Fig. 6A)。GABA 処理により、チャンネルが開口し Cl^- の細胞外流出に伴う内向きイオン電流が発生した。この GABA 誘導性イオン電流は、細胞をホールセルの状態にしてから約 60 分間安定して観察された。

Fig. 6B にフィプロニル処理により変化した電流ピーク値の経時変化を示した。図中に示した a、b、および c は、A 図に示したイオン電流 a、b、および c に対応している。フィプロニル 1 μ M を外液に溶解して細胞に処理すると、イオン電流抑制は処理時間経過と共に強く現れ、処理前の 66.1 ± 8.1 % となった。外液をフィプロニルを含まない標準外液に交換した後、継続してイオン電流を測定したところ、抑制されたイオン電流は対照区の水準にまで回復した。このことから、フィプロニルによる電流抑制は可逆的であることが判明した。フィプロニルによる電流抑制および抑制からの回復は定常状態に至るまで約 10 分間を要した。

次に、GABA 処理によるチャンネルの活性化がフィプロニルによる電流抑制に与える影響を調べた。ここで、活性化チャンネルとは GABA 処理によりチャンネルが開閉を繰り返しイオン電流が観察されるチャンネルを示し、静止状態のチャンネルとは GABA 処理をしていないためチャンネルは通常閉じている状態であり、この場合イオン電流は観察されない。GABA 誘導性イオン電流は、 300 μ M の GABA を 10 msec 細胞に処理して測定した。Fig. 7 に示した二種のプロトコールのうち、一方は対照区を測定した後、GABA 処理を継続した状態でフィプロニルを外液に処理して電流抑制の経時変化を測定した (Fig. 7, Aa と Ab, B に○で示した；プロトコール 1)。他方は対照区を測定した後、GABA 処理を中断した状態で 15

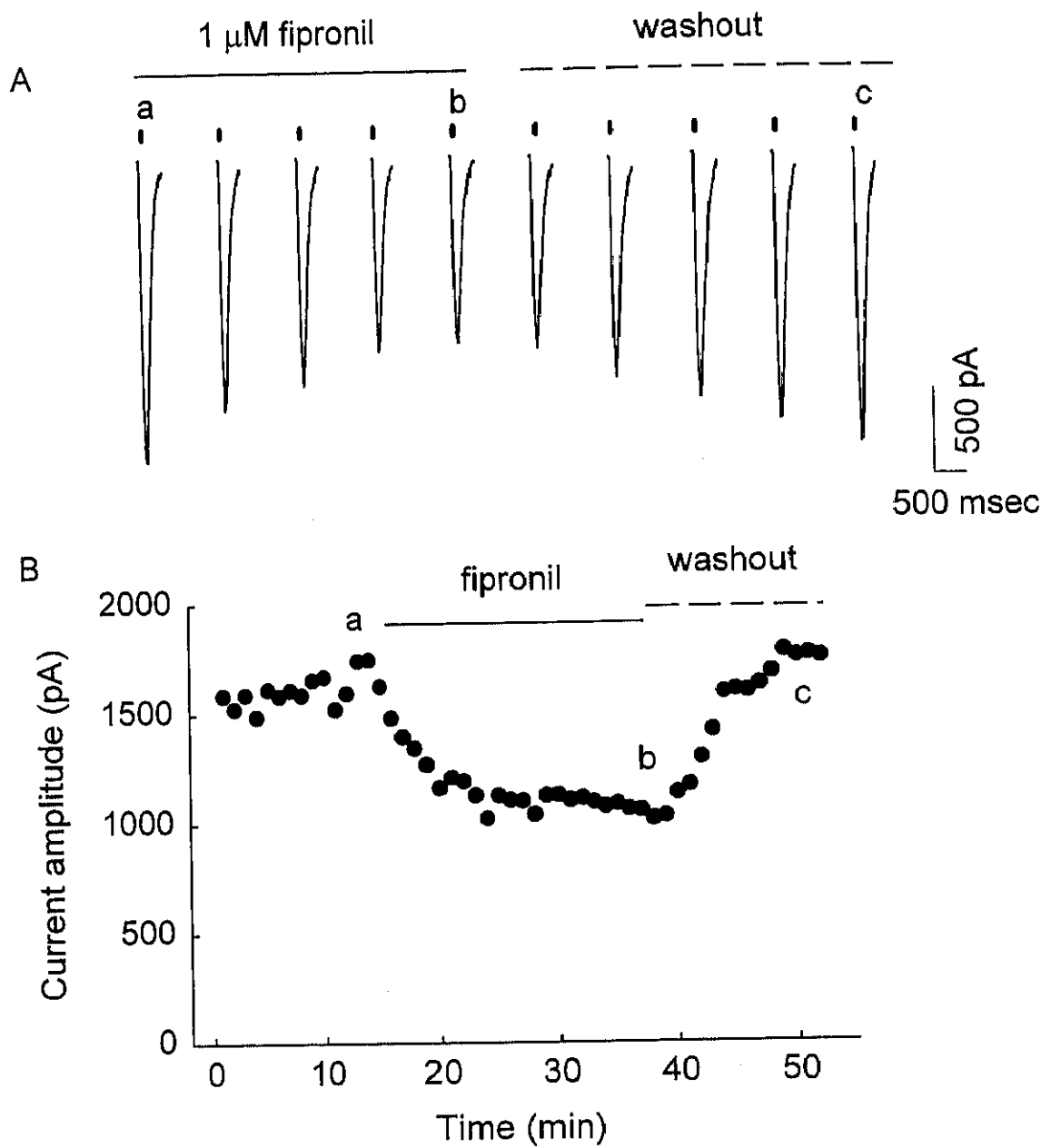


Fig. 6. Suppression of GABA-induced currents by fipronil. (A) Current records in response to 10 msec application of 300 μ M GABA before, during and after application of 1 μ M fipronil in the bath. Currents evoked by every 5th test pulses are shown during perfusion of 1 μ M fipronil; and currents evoked by every 3rd test pulses are shown during washout of fipronil. (B) Time course of changes in peak current amplitude before, during and after application of 1 μ M fipronil. Letters a to c correspond to indicated current traces in A.

分間フィプロニルを処理した後、GABA 処理により電流を測定した (Fig. 7, Ac と Ad, B に●で示した; プロトコール 2)。プロトコール 2 において、フィプロニル 15 分処理後のイオン電流は対照区の $68.4 \pm 9.3\%$ ($n=3$) に抑制された (d●)。プロトコール 1 の b○のイオン電流は、対照区の $66.1 \pm 8.1\%$ ($n=5$) に抑制された。d●の抑制度はプロトコール 1 における b○のものと同様と比較すると有意差は認められなかった ($p < 0.05$)。このことから、フィプロニルの作用は静止状態のチャンネルにおいても同様に観察されることが示された。

Fig. 8 に静止状態のチャンネルにおけるフィプロニルの薬量作用曲線を示した。イオン電流は $300 \mu\text{M}$ の GABA を 10 msec 細胞に処理して誘導し、フィプロニルによる電流抑制は外液にフィプロニルを所定濃度溶解して調べた。フィプロニルは GABA 誘導性イオン電流を濃度依存的に抑制し、半抑制濃度である IC_{50} 値は $1.66 \pm 0.18 \mu\text{M}$ 、ヒル係数は 1.23 ± 0.14 であった ($n=5$)。

2. フィプロニルの抑制作用におけるチャンネルの活性化の影響

Fig. 7 のプロトコール 2 において、d●で示したイオン電流はフィプロニル前処理により抑制されたことから、フィプロニルは静止状態のチャンネルに作用し、イオン電流を抑制することが示された。静止状態のチャンネルと活性化チャンネルにおけるフィプロニルの作用を比較するため、両状態のチャンネルに対するフィプロニルの作用を検討した。Fig. 9 にフィプロニルと静止状態のチャンネル (A) および活性化状態のチャンネル (B) との相互作用を表した模式図を示した。R は静止状態のチャンネル、G は GABA 分子、 R^*G は GABA が結合したことにより活性化されたチャンネル、FR はフィプロニルが作用した静止状態のチャンネル、 FR^*G はフィプロニルが作用した活性化チャンネルを示す。 k_{+1} および k_{-1} はそれぞれ静止状態のチャンネルにおける薬剤の結合速度 (association rate) および解離速度 (dissociation rate) を表す。 k'_{+1} および k'_{-1} はそれぞれ活性化チャンネルにおける薬剤の結合速度および解離速度を表す。このモデルに従うと、チャンネルが GABA により活性化されていない場合、フィプロニルは静止状態のチャンネルに

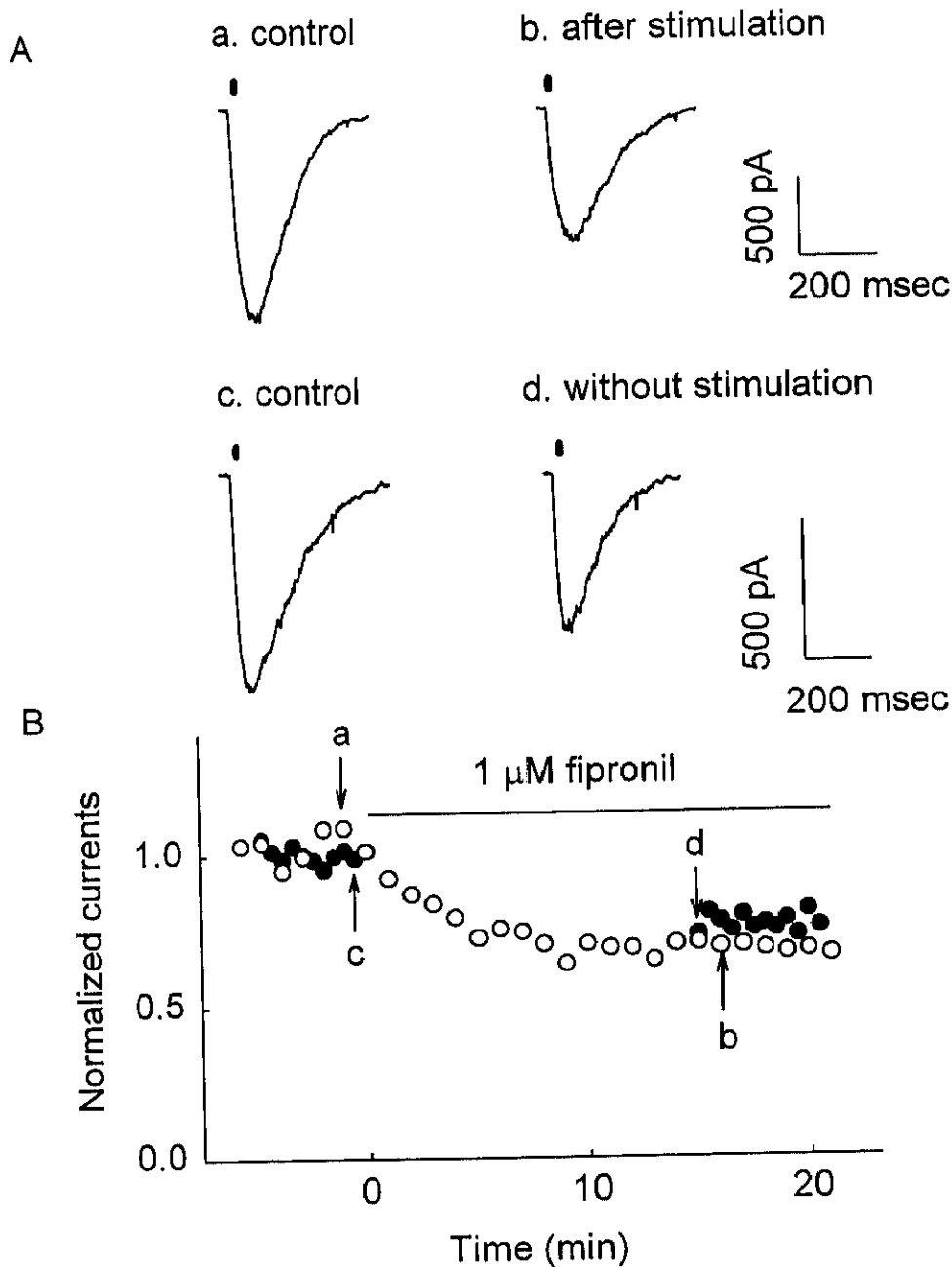


Fig. 7. Pre-application of fipronil suppresses the GABA-induced currents without receptor activation. Fipronil at $1 \mu\text{M}$ was superfused through bathing solution for 15 min with or without channel activation by GABA pulses. (A) Current records in response to 10 msec application of $300 \mu\text{M}$ GABA. a, control for b; b, current was recorded after 15-min application of fipronil with repeated GABA pulse applications; c, another control for d; d, current was recorded after 15-min pre-application of fipronil without GABA pulse application. (B) Time course of changes in current amplitude during the experiment shown in A. Letters a to d correspond to those in A. Open circles, repeated GABA pulse applications during fipronil superfusion. Closed circles, without repeated GABA applications during fipronil superfusion.

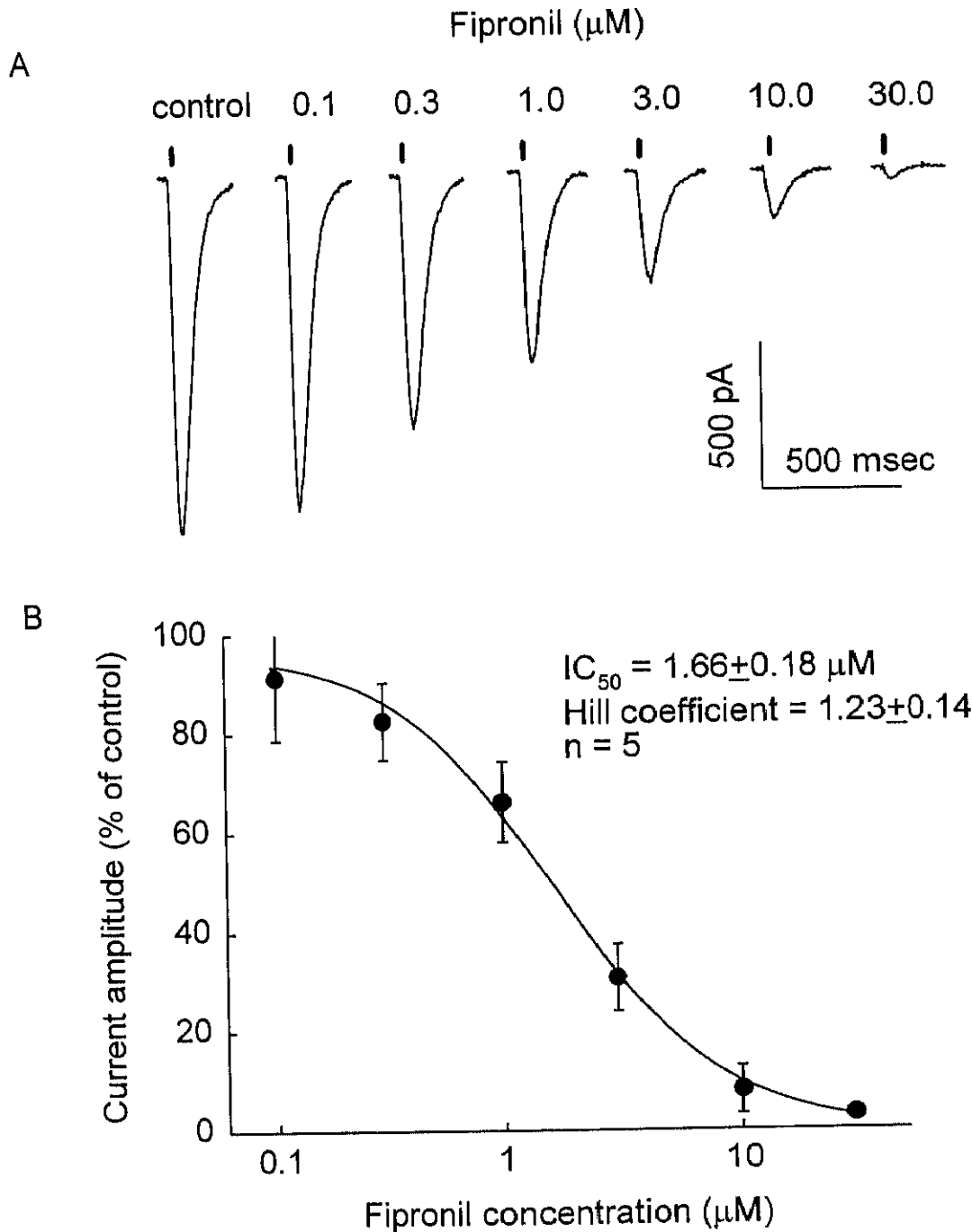


Fig. 8. Dose-response relationship for the suppression of the resting GABA_A receptor by bath application of fipronil. (A) The currents induced by 10 msec applications of $300 \mu\text{M}$ GABA were suppressed by various concentrations of fipronil. (B) This inhibition was concentration dependent with an IC_{50} of $1.66 \pm 0.18 \mu\text{M}$ and a Hill coefficient of 1.23 ± 0.14 . Mean \pm S.D. ($n=5$).

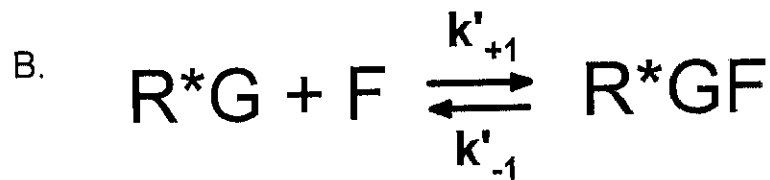
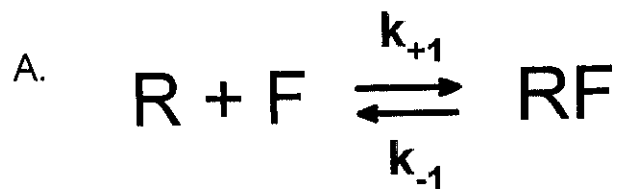


Fig. 9. Fipronil interaction with resting (A) or activated (B) GABA_A receptors. R, resting receptor; G, GABA; R*G, the receptor bound and activated by GABA; F, fipronil; RF, the fipronil-bound resting receptor; R*GF, the fipronil-bound activated receptor; k_{+1} and k_{-1} , drug association and dissociation rates, respectively, without GABA; and k'_{+1} and k'_{-1} , drug association and dissociation rates, respectively, with GABA.

作用すると考える。

静止状態のチャンネルにおけるフィプロニルの作用を調べるために、300 μM の GABA を 10 sec 間隔で 10 msec 処理し、1、3、10、30 μM のフィプロニルは外液に溶解して処理した。短時間 GABA 処理により誘導した電流はフィプロニル処理時間経過に伴って次第に減少し、またフィプロニル濃度が高くなると電流抑制は強く現れた (Fig. 10A)。このことから、フィプロニルの静止状態のチャンネルに対する抑制作用はフィプロニル処理時間と濃度に依存して進行することが判明した。結合速度と解離速度を求めるために、電流のピーク値の変化をフィプロニル処理時間に対してプロットし、一次の指数関数曲線で近似した (Fig. 10A)。 τ の値は 1、3、10 および 30 μM のフィプロニルを処理したときそれぞれ、74.9 \pm 13.9、45.0 \pm 4.5、34.9 \pm 1.4、および 27.4 \pm 0.68 sec であった。電流抑制作用の時定数 (τ) は $1/(k_{+1}[F]+k_{-1})$ で表され、 $[F]$ はフィプロニル濃度を表している。速度定数 ($1/\tau$) はフィプロニルの濃度に対して一次関数的に増加した (Fig. 10B)。この結果を Fig. 9A に示したモデルに従って解析した結果、結合速度 (k_{+1}) は 673 \pm 220 $\text{M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、解離速度 (k_{-1}) は 0.018 \pm 0.0035 sec^{-1} 、相関係数 (r) は 0.84 であった。

次に活性化チャンネルにおけるフィプロニルによる電流抑制を検討するため、フィプロニルと 30 μM の GABA を 30 秒間細胞に同時処理した。対照区として計測した、30 μM の GABA 処理により誘導されたイオン電流は、処理時間の経過と共に抑制された (Fig. 11Aa)。この現象は GABA_A レセプター等のリガンド作動性のイオンチャンネルにおいてしばしば観察されるイオン電流の脱感作作用であると考えられる。脱感作作用はアゴニスト (GABA) の長時間処理、あるいは高濃度のアゴニスト処理によって引き起こされることから、対照区 (Fig. 11Aa) で観察された緩やかなイオン電流の減少は、30 秒間の GABA 処理により引き起こされた脱感作作用と考えた。対照区で観察された脱感作作用は各種濃度のフィプロニルを同時処理した際にも生じたと考えられることから、対照

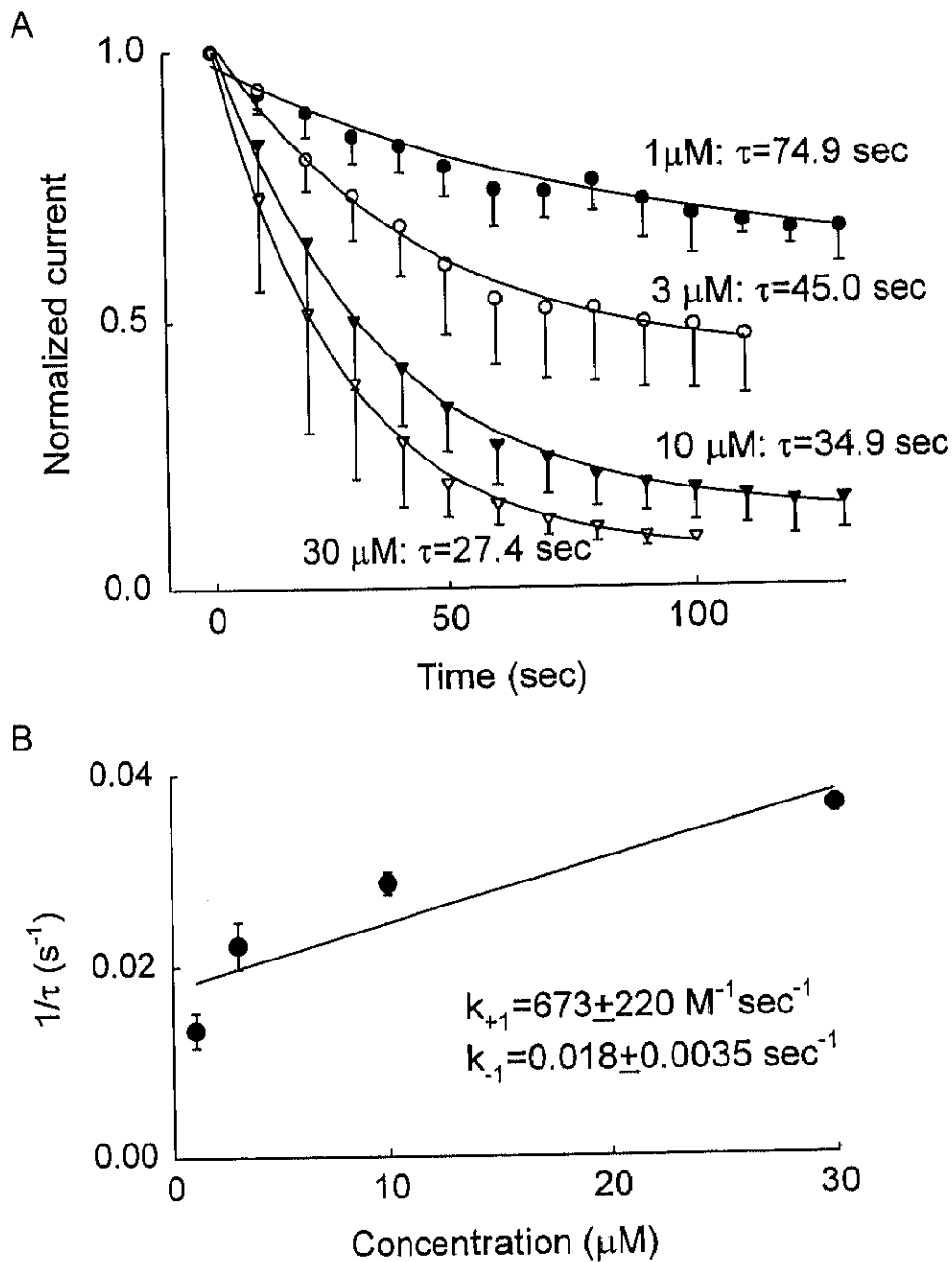
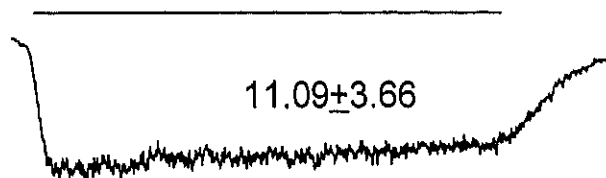


Fig. 10. Kinetics of fipronil suppression of the resting receptor. GABA pulses (300 μM, 10 msec) were applied every 10 sec to monitor the change in current amplitude. (A) Time course of decrease in peak current amplitude by bath application of fipronil at 1, 3, 10, and 30 μM for 100-150 sec. The plots are fitted with a single exponential function. (B) The reciprocal of the time constants obtained from a single exponential fitting is plotted as a function of fipronil concentration. The solid line represents the relation $1/\tau = k_{+1} [F] + k_{-1}$. $r=0.84$. $k_{+1}=673 \pm 220 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. $k_{-1}=0.018 \pm 0.0035 \text{ sec}^{-1}$. $K_d=26 \text{ μM}$.

A

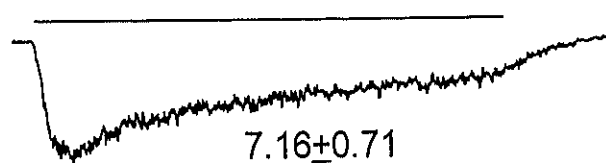
a 30 μ M GABA



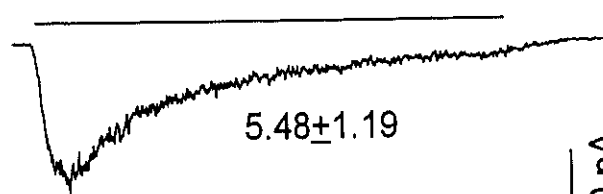
b 30 μ M GABA + 1 μ M fipronil



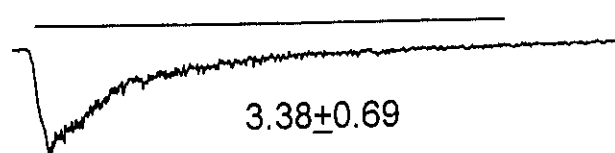
c 30 μ M GABA + 3 μ M fipronil



d 30 μ M GABA + 10 μ M fipronil



e 30 μ M GABA + 30 μ M fipronil



500 pA
10 sec

B

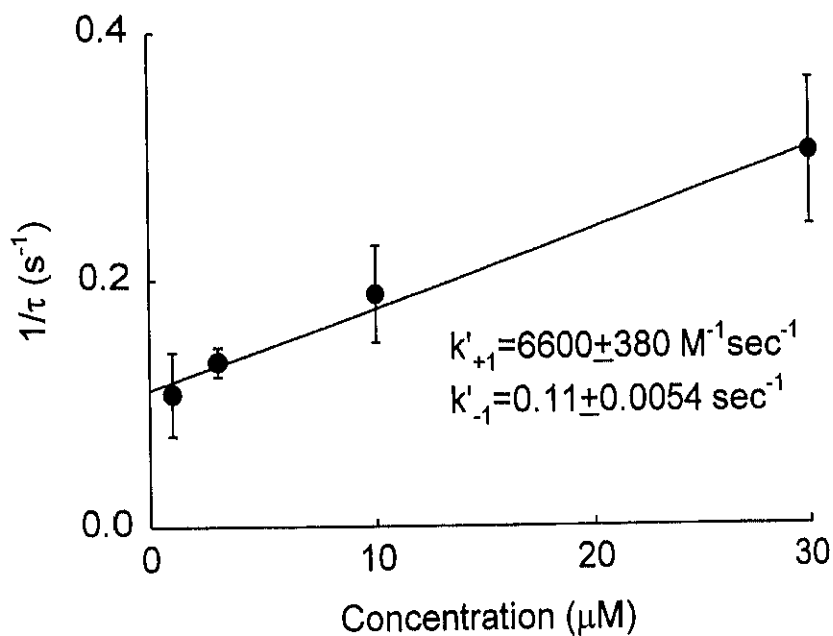


Fig. 11. Effects of fipronil at various concentrations on the decay phase of currents induced by long applications of GABA. (A) GABA 30 μM was applied for 30 sec to induce currents, and was co-applied with various concentrations of fipronil. The decay phase of currents was fitted with a single exponential function to obtain time constants. (B) The reciprocal of the time constants ($1/\tau$) plotted as a function of fipronil concentration. Data points are best fitted to the solid line according to the equation $1/\tau = k'_{+1}[F] + k'_{-1}$, $r = 0.995$ gives a significant level of $P < 0.05$. $k'_{+1} = 6600 \pm 380 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$; $k'_{-1} = 0.11 \pm 0.0054 \text{ sec}^{-1}$; the calculated $K_d = 17 \mu\text{M}$.

区における脱感作作用をそれぞれの処理区電流に加算した。フィプロニルと 30 μM GABA の同時処理においては処理時間の経過と共に抑制が強くなり、また高濃度のフィプロニル同時処理においても抑制は強く現れた (Fig. 11Ab-e)。電流の下降相は指数関数に従って減衰したことから、フィプロニルと GABA の同時処理により得られた電流の下降相は、指数関数曲線で近似して解析した。

フィプロニル 1、3、10 および 30 μM を GABA と同時処理したとき、 τ の値はそれぞれ、 11.09 ± 3.66 、 10.10 ± 3.83 、 7.16 ± 0.71 、 5.48 ± 1.19 、および 3.38 ± 0.69 sec であった。電流抑制の時定数 (τ) は $1/(k'_{+1}[F]+k'_{-1})$ で表される。時定数の逆数 ($1/\tau$) はフィプロニルの濃度に対して直線的に増加した (Fig. 11B)。これらのデータを Fig. 9B に示したモデルを用いて解析した結果、結合速度 (k'_{+1}) は $6600 \pm 380 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 、解離速度 (k'_{-1}) は $0.11 \pm 0.0054 \text{ sec}^{-1}$ となった。相関係数 r は 0.995 で、95 %信頼区間で検定したところ回帰は有意と判断された。不活性チャンネルにおける場合と比較すると、GABA によるチャンネル活性化により、フィプロニルの結合速度は 9.8 倍、解離速度は 6.2 倍に増加した。

活性化チャンネルにおけるフィプロニルの IC_{50} 値を求めるため、フィプロニルと 30 μM の GABA を 30 秒間細胞に同時処理した (Fig. 11A)。GABA およびフィプロニル処理後 25 秒の時点で、フィプロニルによる電流抑制が定常状態を示した。この時点の電流減少は、フィプロニルと GABA を同時処理したことから、主に活性化チャンネルのフィプロニルによる電流抑制と考えられる。対照区 (Fig. 11Aa) における 25 秒後の時点の電流を 100 % として、処理区 (各種濃度のフィプロニルと GABA の同時処理; Fig. 11Ab-e) における 25 秒後の電流の相対値を求めた。フィプロニルは GABA 誘導性イオン電流を濃度依存的に抑制し、 IC_{50} 値は $1.61 \pm 0.14 \mu\text{M}$ 、ヒル係数は 0.96 ± 0.06 であった ($n=3-5$) (Fig. 12)。

3. GABA 誘導性シングルチャンネルイオン電流

膜電位を -60 mV に固定したアウトサイドアウトのパッチ膜において、GABA 処理をしない状態では内向きのシングルチャンネル電流は観察されなかったが、

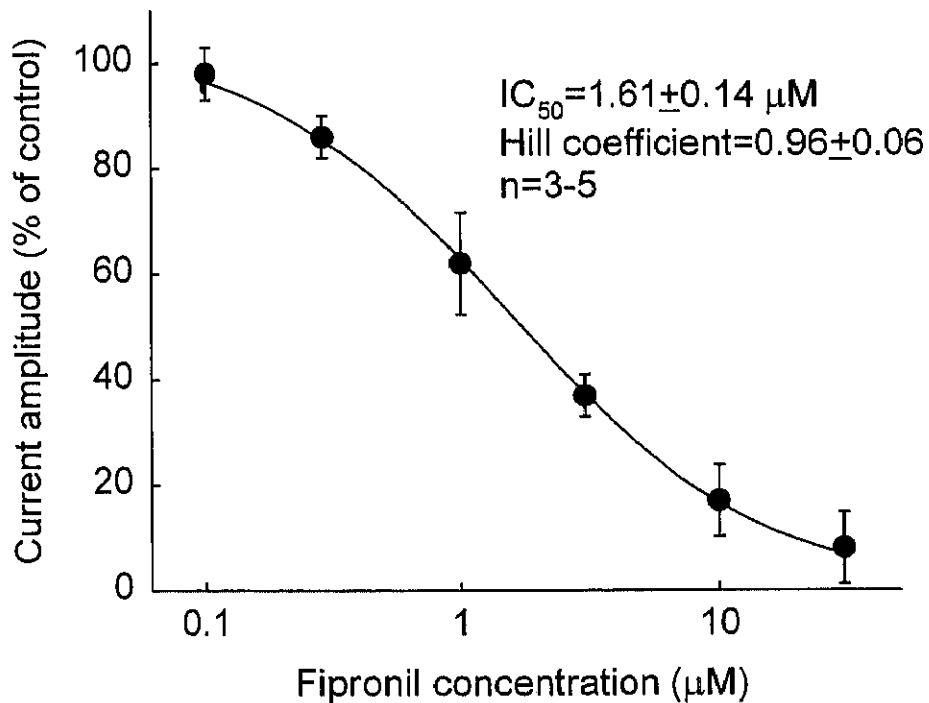


Fig. 12. Dose-response relationship for the fipronil suppression of the activated GABA_A receptors. Currents were induced by 30 sec co-application of 30 µM GABA and fipronil, and measured at 25 sec from the beginning of co-application. Fipronil suppressed the GABA-induced currents in a dose-dependent manner with an IC₅₀ estimated to be 1.61 ± 0.14 µM and a Hill coefficient of 0.96 ± 0.06. Mean ± S.D. (n=3-5).

まれに自発的なチャンネル開口と考えられる短い時間の電流が観察された。10 μM の GABA を外液を通してパッチ膜に処理すると、内向きのシングルチャンネル電流が発生した (Fig. 13A)。シングルチャンネル電流は単独の開状態あるいはバーストを形成した状態で観察された。パッチ膜に GABA 処理することにより発生したシングルチャンネル電流は、再度 GABA 処理をすることで再発し、シングルチャンネル電流は約 10 分間持続した。GABA の繰り返し処理により、チャンネル活性の減退に伴う電流発生頻度の低下が見られたため、チャンネル活性が持続しているもののみを解析した。

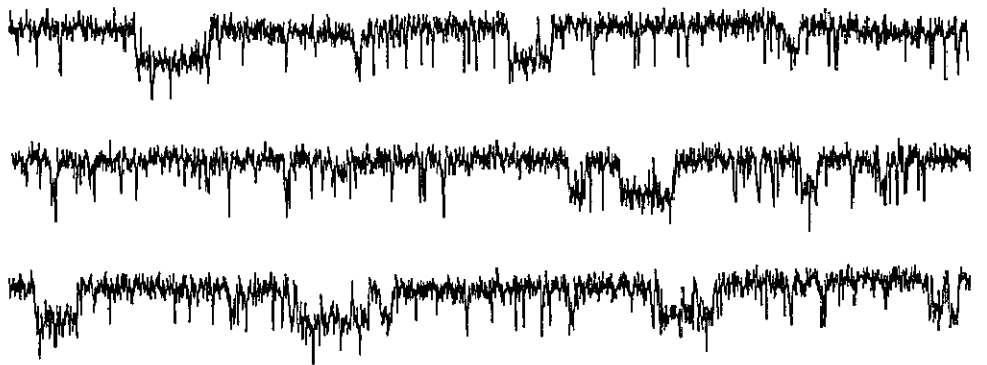
GABA のチャンネルコンダクタンスは少なくとも 4 つの段階が知られており、それらは 26 pS のメインコンダクタンスと 11、19、44 pS のサブコンダクタンスである (Sakmann et al., 1983; Bormann et al., 1987; Macdonald et al., 1989; Macdonald and Twyman, 1992)。本研究においてはサブコンダクタンスはまれにしか観察されなかったため、26 pS のメインコンダクタンスのみを解析した。4 つの異なるパッチ膜から観察された電流を解析した結果、メインコンダクタンスは 27.2 ± 4.3 pS であった。

4. シングルチャンネル電流に対するフィプロニルの作用

Fig. 13B に 10 μM のフィプロニルと 10 μM の GABA を同時処理したときのイオン電流を示した。サブコンダクタンスの発生は GABA 単独処理の場合と同様にほとんど観察されなかった。メインコンダクタンスを解析した結果、 26.1 ± 4.1 pS であった。フィプロニル処理によりシングルチャンネルのメインコンダクタンスは変化しなかったことから、フィプロニルはメインコンダクタンスに影響しないことが判明した。これらのことから、本章でみられたフィプロニルによるホールセル電流抑制は、シングルチャンネル電流のコンダクタンスレベルや、サブコンダクタンスの発生頻度の変化ではないことが示された。

Fig. 14 にフィプロニル未処理の対照区 (A) とフィプロニル処理区 (B) との場合の GABA 誘導性イオン電流の開時間分布を示した。この分布図から GABA_A

A. 10 μ M GABA



50 msec

B. 10 μ M GABA + 10 μ M fipronil

5.0 pA

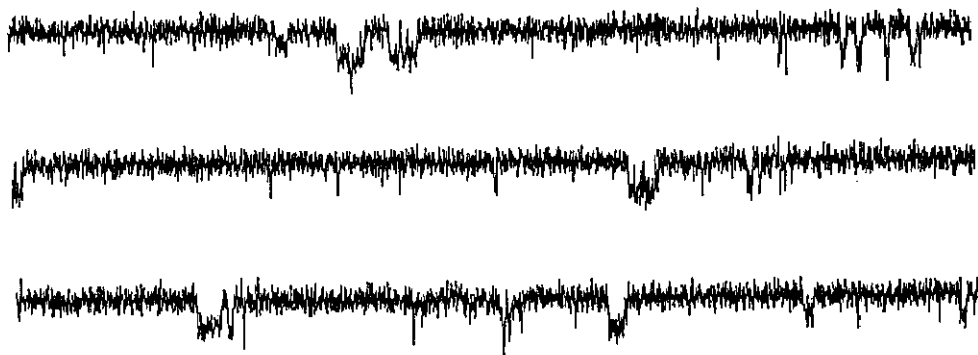


FIG. 13. Single-channel currents induced by application of 10 μ M GABA (A), and co-application of 10 μ M GABA and 10 μ M fipronil (B), to outside-out membrane patches clamped at a membrane potential of -60 mV. Currents were filtered at 1 kHz. Currents occurred during brief isolated openings or during longer openings interrupted by short closures or gaps.

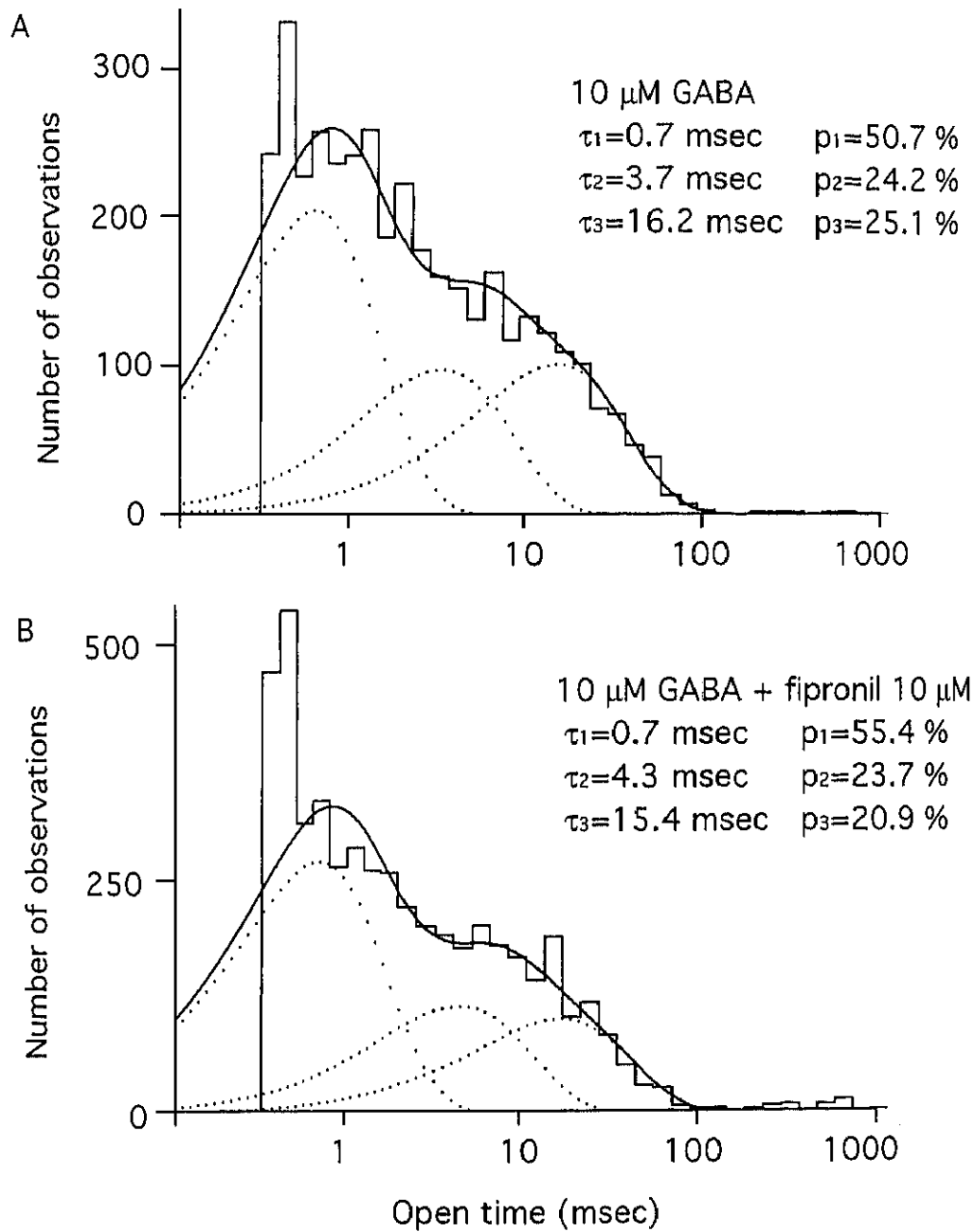


Fig. 14. Open time distributions for currents induced by 10 μM GABA (A), and co-application of 10 μM GABA and 10 μM fipronil (B). The distributions are shown on a logarithmic time axis. The best fits of three exponential functions are shown. τ : time constant, p : proportion. See text for further explanation.

レセプターは少なくとも3つの開状態 (O_1 , O_2 , O_3) を持つことが示唆された。10 μM の GABA のみを処理したときの平均開時間は 11.4 msec であり、各成分 (O_1 , O_2 , O_3) の開時間 (τ_1 , τ_2 , τ_3) と全体に占める割合 (p_1 , p_2 , p_3) はそれぞれ、0.7 msec (50.7 %), 3.7 msec (24.2 %), 16.2 msec (25.1 %) であった。一方、GABA 10 μM とフィプロニル 10 μM を同時処理した場合、平均開時間は 7.8 msec であり、各成分 (O_1 , O_2 , O_3) の開時間 (τ_1 , τ_2 , τ_3) と全体に占める割合 (p_1 , p_2 , p_3) はそれぞれ、0.7 msec (55.4 %), 4.3 msec (23.7 %), 15.4 msec (20.9 %) であった。フィプロニルを処理した場合、それぞれの成分の開時間に大きな差は認められなかったが、平均の開時間はフィプロニル処理により減少した。

Fig. 15 にフィプロニル未処理の対照区 (A) とフィプロニル処理区 (B) との場合の GABA 誘導性イオン電流の開時間分布を示した。この分布図から GABA_A レセプターは4つの開状態 (C_1 , C_2 , C_3 , C_4) を持つことが示唆された。10 μM の GABA のみを処理したときの平均閉時間は 29.7 msec であり、各成分 (C_1 , C_2 , C_3 , C_4) の閉時間 (τ_1 , τ_2 , τ_3 , τ_4) と全体に占める割合 (p_1 , p_2 , p_3 , p_4) はそれぞれ、0.6 msec (40.3 %), 4.5 msec (10.8 %), 41.5 msec (38.8 %), 101.1 msec (10.1 %) であった。これに対して、GABA 10 μM とフィプロニル 10 μM を同時処理したときの平均閉時間は 52.8 msec であり、各成分 (C_1 , C_2 , C_3 , C_4) の閉時間 (τ_1 , τ_2 , τ_3 , τ_4) と全体に占める割合 (p_1 , p_2 , p_3 , p_4) はそれぞれ、0.4 msec (45.3 %), 3.1 msec (10.2 %), 44.0 msec (30.6 %), 160.8 msec (13.8 %) であった。最も遅い成分 (τ_4) と平均の閉時間はフィプロニル処理により延長したことから、フィプロニルはチャンネルが開く頻度を減少させることが明らかとなった。

Fig. 16 にフィプロニル未処理の対照区 (A) とフィプロニル処理区 (B) の GABA 誘導性イオン電流のバースト持続時間分布を示した。この分布図から GABA_A レセプターは少なくとも3つのバースト状態 (B_1 , B_2 , B_3) を持つことが示唆された。10 μM の GABA のみを処理したときの平均バースト持続時間は 21.6 msec であり、各成分 (B_1 , B_2 , B_3) のバースト持続時間 (τ_1 , τ_2 , τ_3) と全

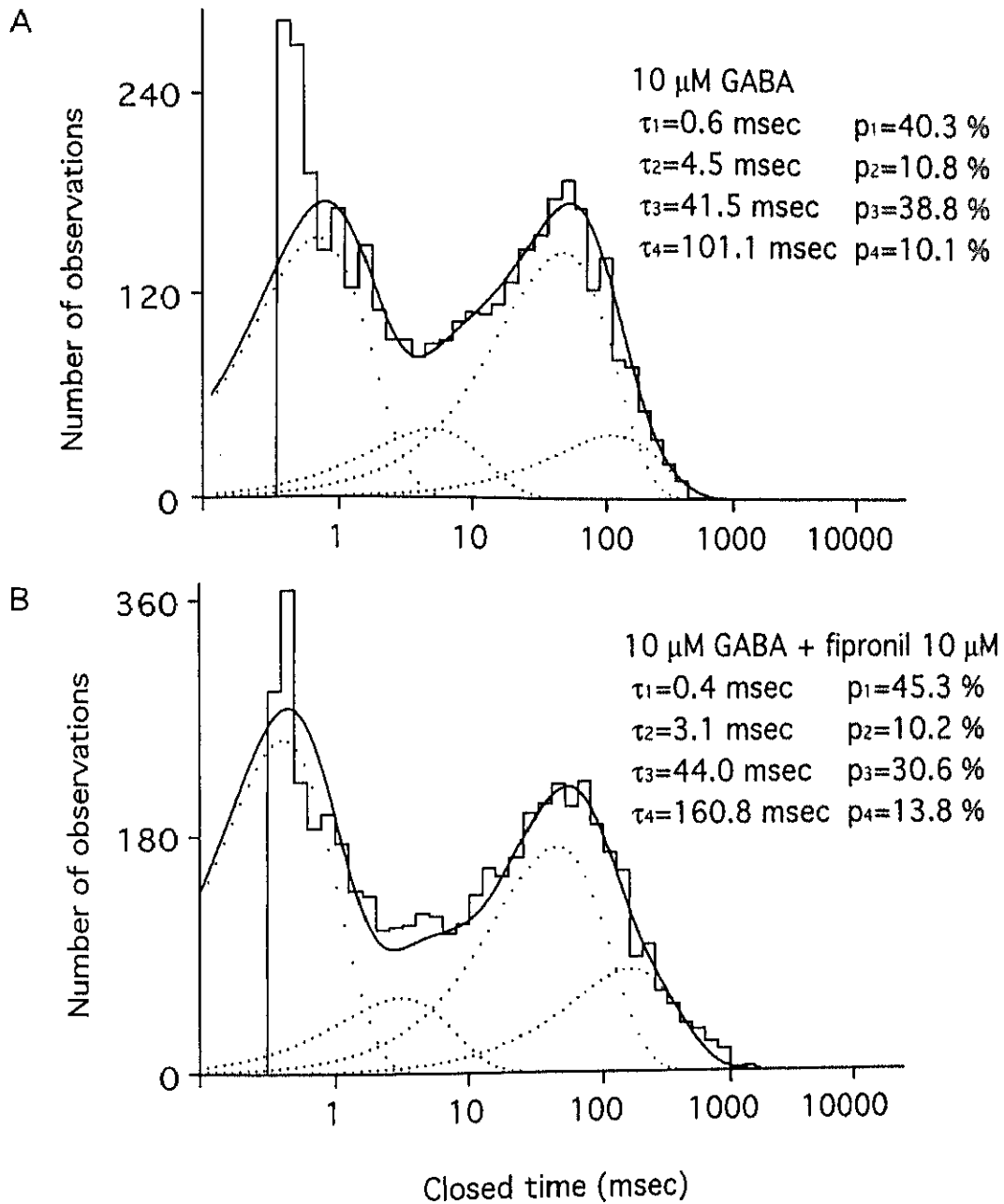


Fig. 15. Closed time distributions for currents induced by 10 μ M GABA (A), and co-application of 10 μ M GABA and 10 μ M fipronil (B). The distributions are shown on a logarithmic time axis. The best fits of four exponential functions are shown. τ : time constant, p : proportion. See text for further explanation.

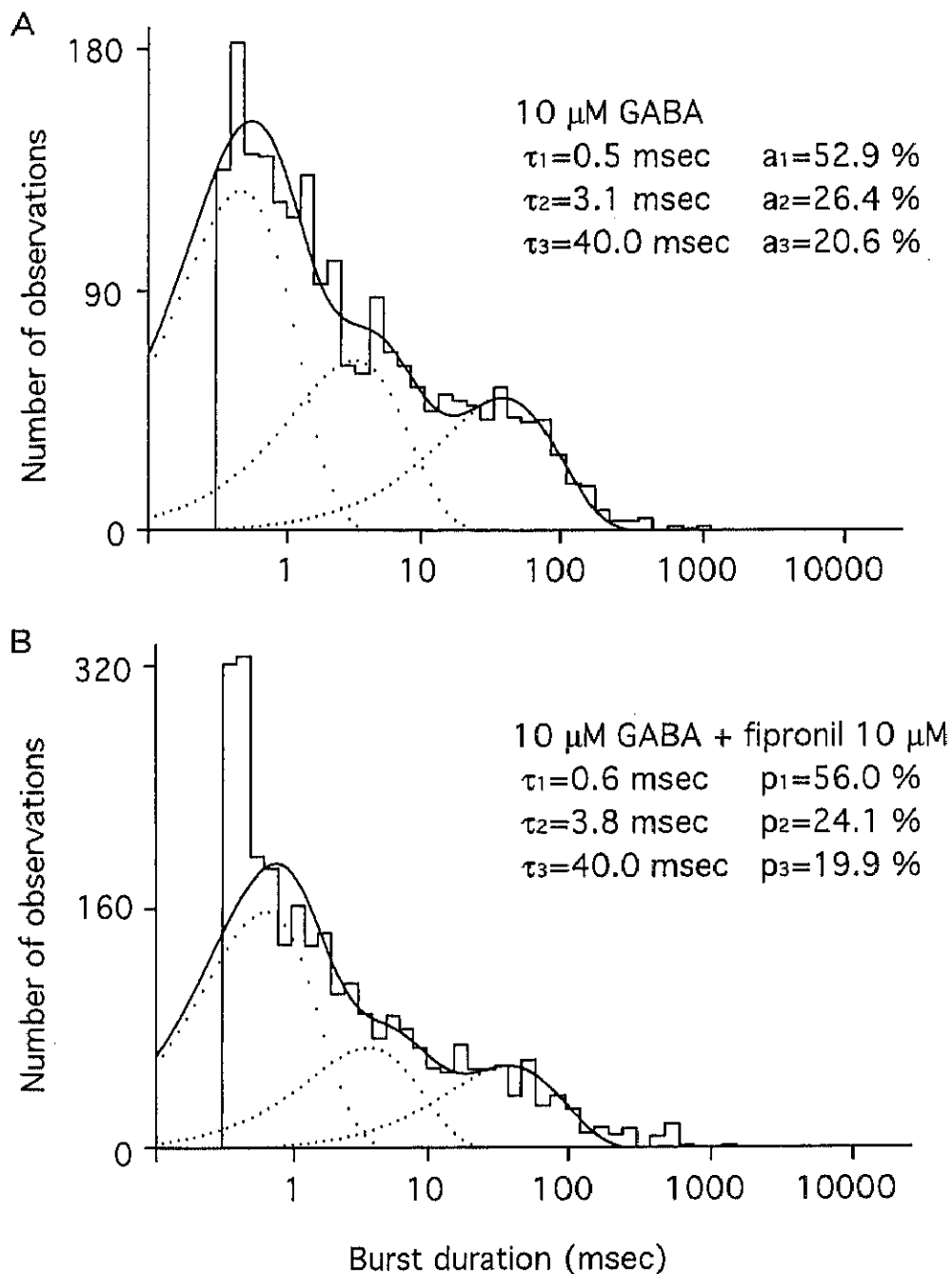


Fig. 16. Distributions of burst duration for currents induced by 10 μ M GABA with a critical gap length of, $t_c=3.3$ msec (A), and those by co-application of 10 μ M GABA and 10 μ M fipronil with a critical gap length of $t_c=6.9$ msec (B). The distributions are shown on a logarithmic time axis. The best fits of three exponential functions are shown. τ : time constant, p : proportion. See text for further explanation.

体に占める割合 (p_1 , p_2 , p_3) はそれぞれ、0.5msec (52.9 %), 3.1 msec (26.4 %), 40.0 msec (20.6 %) であった。また、パーストあたりの平均閉回数は 2 ± 1.4 と推定された。これに対して、10 μ M とフィプロニル 10 μ M を同時処理したときの平均パースト持続時間は 15.7 msec であり、各成分 (B_1 , B_2 , B_3) のパースト持続時間 (τ_1 , τ_2 , τ_3) と全体に占める割合 (p_1 , p_2 , p_3) はそれぞれ、0.6 msec (56.0 %), 3.8 msec (24.1 %), 40.0 msec (19.9 %) であった。また、パーストあたりの平均閉回数は 2 ± 1.9 と推定された。各成分のパースト持続時間 (τ_1 , τ_2 , τ_3) およびその分布割合 (p_1 , p_2 , p_3) をそれぞれ比較すると大きな差は認められなかったが、平均パースト持続時間は減少した。しかし、パーストあたりの平均閉回数はフィプロニル処理により変化しなかった。

5. フィプロニルとピクロトキシニンとの間の相互作用

GABA_A レセプターにおけるフィプロニルの結合部位を検討するため、フィプロニルとピクロトキシニンとの間の相互作用を調べた。方法はフィプロニルとピクロトキシニンを同時処理し、フィプロニル単独で処理した場合と電流抑制度を比較した。イオン電流は 300 μ M の GABA を 10 msec 細胞に処理して誘導した。Fig. 17A にピクロトキシニン 1 μ M 存在下 (●) とピクロトキシニンが存在しない状態でのフィプロニルの薬量作用曲線 (○) を、Fig. 17B にピクロトキシニン 3 μ M 存在下 (●) とピクロトキシニンが存在しない状態でのフィプロニルの薬量作用曲線 (○) を示した。ピクロトキシニンが存在しない状態でのフィプロニルの薬量作用曲線 (○) は Fig. 8 に示したものと同一で、IC₅₀ 値は $1.66 \pm 0.18 \mu$ M、ヒル係数は 1.23 ± 0.14 であった (Fig. 8B)。

ピクロトキシニン存在下でのフィプロニルの作用を調べるため、各種濃度のフィプロニルはピクロトキシニンと混合して外液に溶解し細胞に処理した。ピクロトキシニン 1 μ M 又は 3 μ M 単独処理において、電流抑制が定常状態を示すまでに約 5 分間要した。ピクロトキシニン 1 μ M 又は 3 μ M による電流抑制度

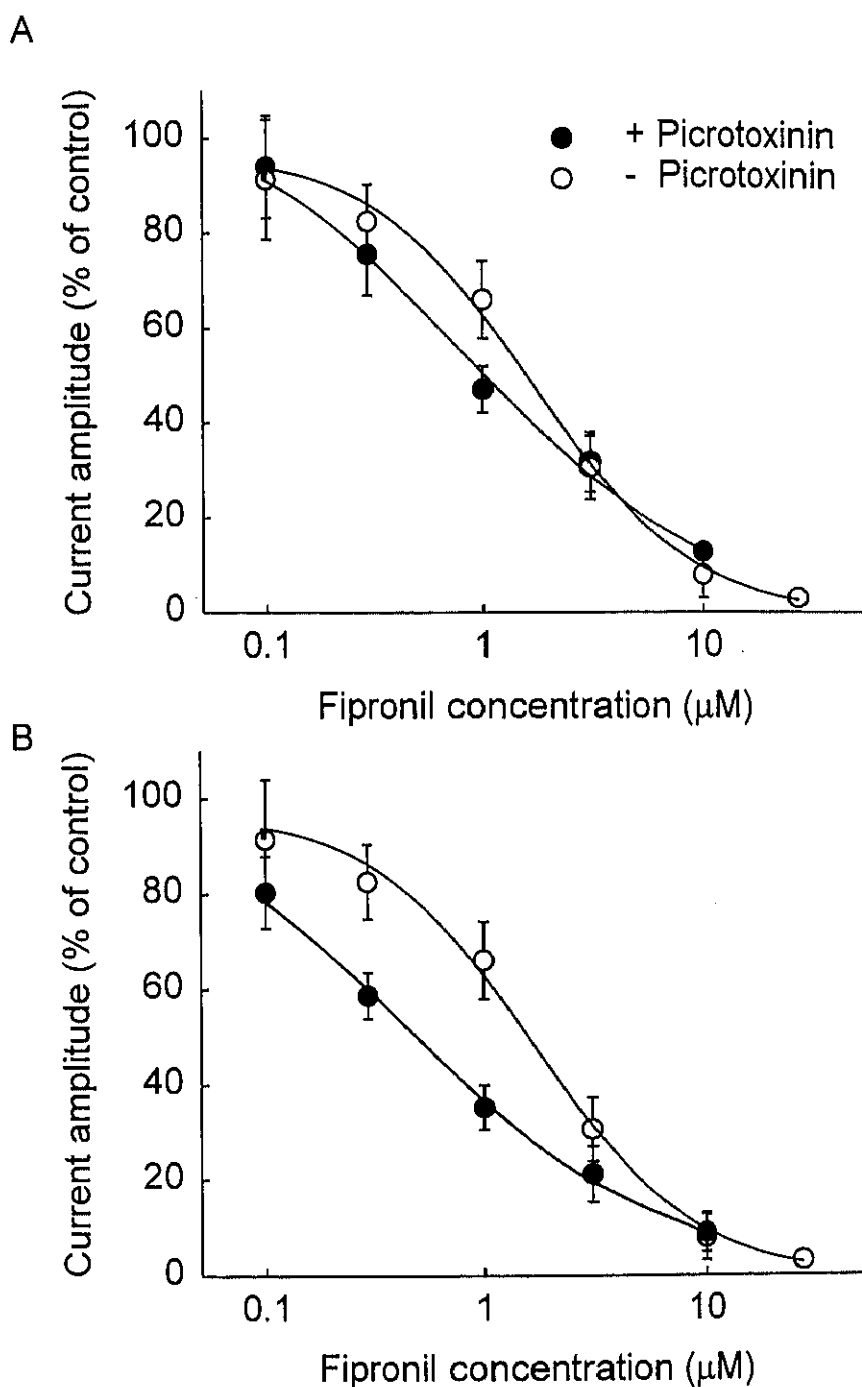


Fig. 17. The effect of picROTOXIN on fipronil suppression of GABA-induced currents. Dose-response relationships for fipronil suppression of GABA-induced currents were determined in the absence (open circles) of picROTOXIN and the presence (closed circles) of 1 μM (A) and 3 μM (B) picROTOXIN. The currents for the presence of various concentration of fipronil and 1 or 3 μM picROTOXIN were normalized by the control in the presence of 1 or 3 μM picROTOXIN. The IC_{50} values of fipronil without picROTOXIN and with picROTOXIN at 1 or 3 μM were $1.66 \pm 0.18 \mu\text{M}$, and $0.89 \pm 0.18 \mu\text{M}$, or $0.49 \pm 0.040 \mu\text{M}$, respectively. Hill coefficients of fipronil without picROTOXIN and with picROTOXIN at 1 or 3 μM were 1.23 ± 0.14 , and 0.81 ± 0.10 , or 0.79 ± 0.040 , respectively.

は、それぞれ処理前の、 $34.0 \pm 9.7\%$ ($n=4$)、 $51.8 \pm 12.1\%$ ($n=4$) であった。●で示したピクロトキシニン存在下におけるフィプロニルの薬量作用曲線は、ピクロトキシニンのみの処理により抑制された電流の大きさを 100 %として、各種濃度のフィプロニルとピクロトキシニン同時処理により抑制された電流の大きさを標準化した。フィプロニルはピクロトキシニン $1\ \mu\text{M}$ 存在下で GABA 誘導性イオン電流を濃度依存的に抑制し、 IC_{50} 値は $0.89 \pm 0.18\ \mu\text{M}$ 、ヒル係数は 0.81 ± 0.09 ($n=4$)、ピクロトキシニン $3\ \mu\text{M}$ 存在下において、 IC_{50} 値は $0.49 \pm 0.040\ \mu\text{M}$ 、ヒル係数は 0.79 ± 0.040 ($n=4$) であった。

フィプロニルおよびピクロトキシニンは共に GABA_A レセプターに作用し、GABA 誘導性イオン電流を抑制する化合物である。両化合物が異なる部位に結合する場合、ピクロトキシニンが結合している GABA_A レセプターに対してもフィプロニルは結合して電流を抑制する。従って、フィプロニルによる電流抑制はピクロトキシニンの有無により変化しないため、フィプロニルの IC_{50} 値も変化しない。一方、ピクロトキシニンを一定濃度加えた状態でフィプロニルの IC_{50} 値を評価した場合、両化合物が同一部位に結合すると仮定すると、ピクロトキシニンが結合したレセプターにはフィプロニルは結合できないことから、フィプロニルによる電流抑制はピクロトキシニンにより妨げられる。そのため、ピクロトキシニン存在下でのフィプロニルの IC_{50} 値は高濃度側に移動すると考えられる。フィプロニル単独で処理した場合には、フィプロニルの IC_{50} 値は $1.66\ \mu\text{M}$ であり、ピクロトキシニン $1\ \mu\text{M}$ 又は $3\ \mu\text{M}$ を同時に処理したときはそれぞれ、 $0.89\ \mu\text{M}$ 、 $0.49\ \mu\text{M}$ であった。ピクロトキシニンが存在することによりフィプロニルの IC_{50} 値が高濃度側に移動しなかったことから、フィプロニルとピクロトキシニンは互いに独立した部位に結合する可能性が示された。

考察

1. フィプロニルによる GABA 誘導性イオン電流抑制

フィプロニルは GABA 誘導性イオン電流を抑制した。フィプロニルによる抑制はフィプロニルの処理時間に依存して進行し、その効果は可逆的であった。フィプロニルによるイオン電流の抑制は Cl⁻の取り込み実験 (Cole et al., 1993)、アフリカツメガエル卵母細胞にキイロショウジョウバエの GABA レセプター (RDL-GABA レセプター) を発現させた培養細胞を用いた実験 (Buckingham et al., 1994; Hosie et al., 1995)、キイロショウジョウバエの培養細胞に RDL-GABA レセプターを発現させた実験 (Millar et al., 1994) 等により報告されている。また、本章で観察された抑制はフィプロニル単独処理により (GABA 処理なしで) 示されたことから、フィプロニルが電流を抑制するためにはチャンネルが GABA 処理により活性化する必要がなく、フィプロニルは静止状態のチャンネルにも作用すると言える。ピクロトキシニンの作用機構を電気生理学的に検証した実験においてもこれと類似した結果が報告されている (Inoue and Akaike, 1988; Newland and Cull-Candy 1992; Dillon et al., 1995)。

Fig. 9 のモデルを用いた解析の結果、活性化チャンネルにおける結合速度と解離速度は、静止状態のチャンネルのそれらと比較するといずれも有意に増加した。これらのことから、チャンネルの活性化はフィプロニルの GABA_A レセプターからの結合と解離を促進すると考えられる。しかし、フィプロニルのレセプターに対する親和性を示す指標となる IC₅₀ 値は、活性化チャンネルと静止状態のチャンネルでその差が小さかったことから、GABA_A レセプターにおけるフィプロニルの結合部位への親和性はチャンネルの活性化により変化しないと考えられる。

ピクロトキシニンによる電流抑制の結合速度と解離速度を、活性化チャンネルと静止状態のチャンネルの両方で測定し比較した研究によると、活性化チャンネルにおいてはピクロトキシニンの結合速度は 100 倍に、解離速度は 10 倍になり、チャンネルの活性化はピクロトキシニンの結合と解離を促進すると報告した (Dillon et al., 1995)。従って、フィプロニルとピクロトキシニンの結合部位に対

する結合と解離に関する性質は類似していると言える。一方、Dillon et al. (1995) はチャンネルの活性化によりピクロトキシニンの結合部位に対する親和性が強くなることを示唆し、ピクロトキシニンとフィプロニルは親和性に関して異なる性質を持つことが示された。従って、チャンネル活性化に伴うチャンネルタンパク質の立体構造変化がピクロトキシニンの結合部位に対する親和性に影響したが、フィプロニルに関してはその影響は小さかったと考えられる。

静止状態のチャンネルに対するフィプロニルの抑制を調べた結果から、外液に処理したフィプロニル濃度が高濃度になるに伴い $1/\tau$ の値が小さくなる現象がみられ、高濃度のフィプロニルによる抑制の速さは低濃度の時と比較すると相対的に遅くなった (Fig. 10A)。この現象には様々な要因が関与していると考えられるが、一つはチャンネルの自発的開口がある。GABA_A レセプターにおいて静止状態でのチャンネルの自発的開口現象が報告されており (Macdonald and Twyman, 1992)、本研究で記録されたシングルチャンネル電流においても、GABA 未処理の状態で自発的な短い開口に伴うイオン電流が観察された。フィプロニルの作用はチャンネル開口により促進されることから、GABA 未処理下における自発的なチャンネル開口によっても、フィプロニルによる電流抑制が促進された可能性がある。しかし、フィプロニル濃度が高くなるに従って、この自発的な開口も抑制されたことから、抑制速度が低濃度側に比べ遅くなったと考えた。

ピクロトキシニンの電流抑制機構に関する最近の報告によると、ピクロトキシニンは GABA_A レセプター上にピクロトキシニンに対して高親和性と低親和性を示す 2 カ所の結合部位を持つことを示唆した (Li and Pearce, 2000)。また、ピクロトキシニンは GABA 処理頻度依存性を示す結合部位と、示さない結合部位の 2 カ所を持つという報告もある (Yoon et al., 1993)。これらの報告は、いずれもピクロトキシニンの結合部位が GABA_A レセプター上に 2 カ所存在することを示唆した。フィプロニルによる電流抑制と抑制からの回復速度は活性化チャンネルにおいて促進された。この結果は、上述の高親和性結合部位に対するピクロトキシニンの作用と類似しているが、低親和性結合部位での作用では説明できない。従って、フィプロニルの結合部位はピクロトキシニンの低親和性結

合部位とは異なる可能性が示唆された。また、活性化チャネルにおいて作用が促進する性質は GABA 処理頻度依存的であるといえることから、フィプロニルの結合部位はピクロトキシニンの GABA 処理頻度依存性を示す結合部位である可能性が示された。

2. シングルチャネルイオン電流に対する作用機構

GABA 誘導性シングルチャネルイオン電流のメインコンダクタンスに関して、GABA 単独処理の場合と GABA とフィプロニルを同時に処理した場合を比較すると有意な差は認められなかったことから、フィプロニルはメインコンダクタンスに影響しないと言える。また、サブコンダクタンスの発生も GABA 単独処理の場合と同様、フィプロニルを同時に処理した場合においてもほとんど観察されなかったことから、本章で示されたフィプロニルによるホールセル電流抑制は、シングルチャネル電流のメインコンダクタンスや、サブコンダクタンス発生頻度の変化ではなかった。

チャネルの開時間を解析した結果、フィプロニルを処理した場合、それぞれの開成分 (O_1 , O_2 , O_3) で開時間 (τ_1 , τ_2 , τ_3) およびその分布割合 (p_1 , p_2 , p_3) が大きく変化しなかったが、平均の開時間はフィプロニル処理により減少した。この原因は、Fig. 14B に示した開時間ヒストグラムでフィプロニル同時処理により出現した短い開時間成分 (0.33-0.6 msec) の存在であると考えた。すなわち、短い開成分が出現したことにより平均開時間は減少するが、データの fitting を行う際に短い成分が一部 fitting 曲線から外れてしまったことから、それぞれの開成分で開時間およびその分布割合が対照区 (Fig. 14A) と比較して大きく変化しなかったと考えた。平均開時間は fitting 曲線外の事象も含まれるため、同値はフィプロニル処理により減少した。以上のことからフィプロニルはチャネル開時間を減少させる傾向にあることが示唆された。

バースト持続時間を解析した結果から、各成分のバースト持続時間 (τ_1 , τ_2 , τ_3) およびその分布割合 (p_1 , p_2 , p_3) は、フィプロニル処理区と対照区で大き

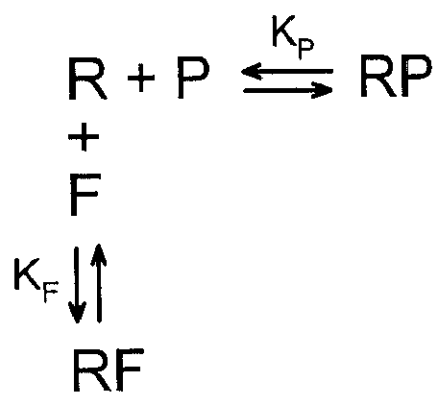
な差はなく、バーストあたりの平均閉回数の差も認められなかった。しかし、平均のバースト持続時間は開時間を比較した場合と同様にフィプロニル処理により減少した。平均バースト持続時間減少の主な原因は、開時間の場合と同様に短いバースト成分の存在が考えられる。この短いバースト成分 (0.33-0.6 msec) は開時間ヒストグラムに見られた短いバースト成分 (0.33-0.6 msec) と類似した分布を示していることから、同じ成分である可能性が高い。従って、平均バースト持続時間が減少した主な原因は、短い成分によるバースト持続時間の減少に伴うものであると考えた。

Grolleau and Sattelle (2000) はキイロシヨウジョウバエの RDL-GABA レセプターを培養細胞に発現させた系を用いた実験で、フィプロニルは遅い開時間成分を短くすることを報告した。本章においてもフィプロニルは平均開時間を短くすることが示され、フィプロニルは開いているチャンネルにも作用してチャンネルを閉じさせる作用があると考えられる。また、フィプロニル処理により閉時間が延長したことから、開チャンネルおよび閉チャンネルに作用してチャンネルを閉じた状態で安定化させる作用があると言える。

3. 結合部位

フィプロニルの結合部位について、二つの説がある。フィプロニルはピクロトキシニンやディルドリンと同一部位に結合するとする共有説と (Cole et al., 1995; Hosie et al., 1995)、これに反し、フィプロニルとピクロトキシニンあるいはディルドリンは別の部位に結合するという独立説である (Wolff and Wingate, 1998; Kamijima and Casida, 2000)。フィプロニルの結合部位を検証するため、フィプロニルとピクロトキシニンを同時処理して両化合物の GABA_A レセプターにおける相互作用を調べた (Fig. 17)。ピクロトキシニンはフィプロニルの IC₅₀ 値を高濃度側に移動させなかったことから、両化合物はそれぞれ独自の結合部位を持つことが示唆された。この結果の有意性を再検討するため、GABA_A レセプターにおけるフィプロニルとピクロトキシニンとの間の相互作用を、1 サイトモデルと 2 サイトモデルの 2 つのモデルを用いて検討した (Fig. 18)。1 サイト

1 site model



2 site model

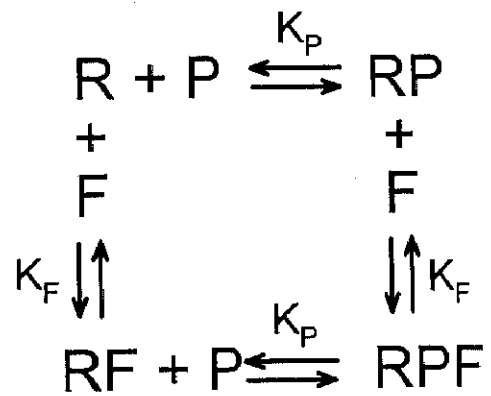


Fig. 18. One-site model and two-site model for interactions of fipronil (F) and picrotoxinin (P) with the GABA_A receptor (R). RF, fipronil-bound receptor; RP, picrotoxinin-bound receptor; RPF, picrotoxinin- and fipronil-bound receptor; K_F and K_P, the equilibrium dissociation constants for fipronil and picrotoxinin binding, respectively.

トモデルではフィプロニルとピクロトキシニンが同一の部位に結合すると仮定している。2 サイトモデルではフィプロニルとピクロトキシニンが異なる部位に結合すると仮定している。R はフィプロニルおよびピクロトキシニンが結合するレセプターを示す。F はフィプロニル分子を、P はピクロトキシニン分子を示す。RF はフィプロニルが結合した GABA_A レセプターを表し、この状態の GABA_A レセプターはフィプロニルにより抑制を受けている。RP はピクロトキシニンが結合した GABA_A レセプターを表し、この状態の GABA_A レセプターはピクロトキシニンにより抑制を受けている。RPF はフィプロニルとピクロトキシニンが結合した GABA_A レセプターを示し、この状態の GABA_A レセプターが存在するためにはフィプロニルとピクロトキシニンの結合部位が独立している必要があることから、両化合物が独自の結合部位を持つ 2 サイトモデルにのみ示されている。RPF はフィプロニルとピクロトキシニン両方により抑制を受けている。また、 K_f または K_p はそれぞれ、フィプロニルまたはピクロトキシニンの GABA_A レセプターに対する平衡解離定数 (equilibrium dissociation constant) を示し、この値には IC₅₀ 値を用いた。

1 サイトモデルではピクロトキシニンとフィプロニルは同一部位で競合するため、同時に両化合物がレセプターに結合することはない。そのため、1 サイトモデルでは抑制される GABA_A レセプターの状態は、ピクロトキシニンが結合した RP およびフィプロニルが結合した RF の二種類である。2 サイトモデルにおいて、フィプロニルとピクロトキシニンはそれぞれ独自の結合部位を持つため、同時にそれぞれの結合部位に結合することが可能である。従って、2 サイトモデルでは抑制される GABA_A レセプターの状態は、RP、RF、さらにピクロトキシニンおよびフィプロニルが結合した RPF の三種類が考えられる。これらのことから、測定される全体の GABA_A レセプター (R_T) のうち、フィプロニルやピクロトキシニンが結合した GABA_A レセプターの割合 (RP、RF、RPF) を解析することによりモデルを検証した。1 サイトモデルにおける抑制度を表す式は (1)、2 サイトモデルにおける抑制度を表す式は (2) に示した。

$$RP+RF=R_T([P]/K_p+[F]/K_f)/(1+[P]/K_p+[F]/K_f) \quad (1)$$

$$RP+RF+RPF=R_T([P]/K_p+[F]/K_f+[P][F]/K_pK_f)/(1+[P]/K_p+[F]/K_f+[P][F]/K_pK_f) \quad (2)$$

R_T は測定している細胞の膜上に存在する全 GABA_A レセプターを示す。[P] と [F] はピクロトキシニンとフィプロニルの濃度を示す。K_f の値はフィプロニルの IC₅₀ 値で Fig. 8 で得られた値を用い、1.66 μM とした。ピクロトキシニン 1 μM 又は 3 μM は電流を 34.0 % 又は 51.8 % に抑制したことから、この 2 点を直線で結んだとき 50 % 抑制度を示す濃度を K_p 値とし、2.8 μM と定めた。ピクロトキシニン存在下におけるフィプロニルの濃度依存的な電流抑制は 1 サイトモデルから得られた等式 1 と、2 サイトモデルから得られた等式 2 より解析した (Fig. 19)。破線は 1 サイトモデルから得られた等式 1 を示し、実線は 2 サイトモデルから得られた等式 2 を示している。Fig. 19 から、実験値は 2 サイトモデルから得られた理論曲線に近いことからフィプロニルとピクロトキシニンは異なる部位に結合する可能性が示された。モデルを用いた解析結果からも、フィプロニルとピクロトキシニンが同一の部位に結合する可能性は低かった。

フィプロニルの結合部位を探索した最近の研究によると、ラット α1 サブユニットの M2 に位置する 257 番目のアミノ酸がフィプロニルの結合に関与しているが、これに加えて 272 番目のアミノ酸も関与している可能性を示した (Perret et al., 1999)。ラット α1 サブユニットの 257 番目のアミノ酸は、ディルドリンとピクロトキシニンの抵抗性に関与しているキイロショウジョウバエ RDL-GABA レセプターの 302 番目のアミノ酸に相当することから、フィプロニルはこれらの化合物と結合部位を共有すると言える。一方で、272 番目のアミノ酸もフィプロニルの結合に関与したことから、フィプロニルの結合には 2 カ所のアミノ酸が関与している可能性が示された。しかし本研究において、静止状態のチャネルおよび活性化チャネルにおけるヒル定数は、それぞれ 1.23 および 0.96 と推定された (Fig. 8, 12)。ヒル定数はレセプターあたりに結合する化合物の分子数を推定する上で指標となる数値であることから、フィプロニルはレセプター

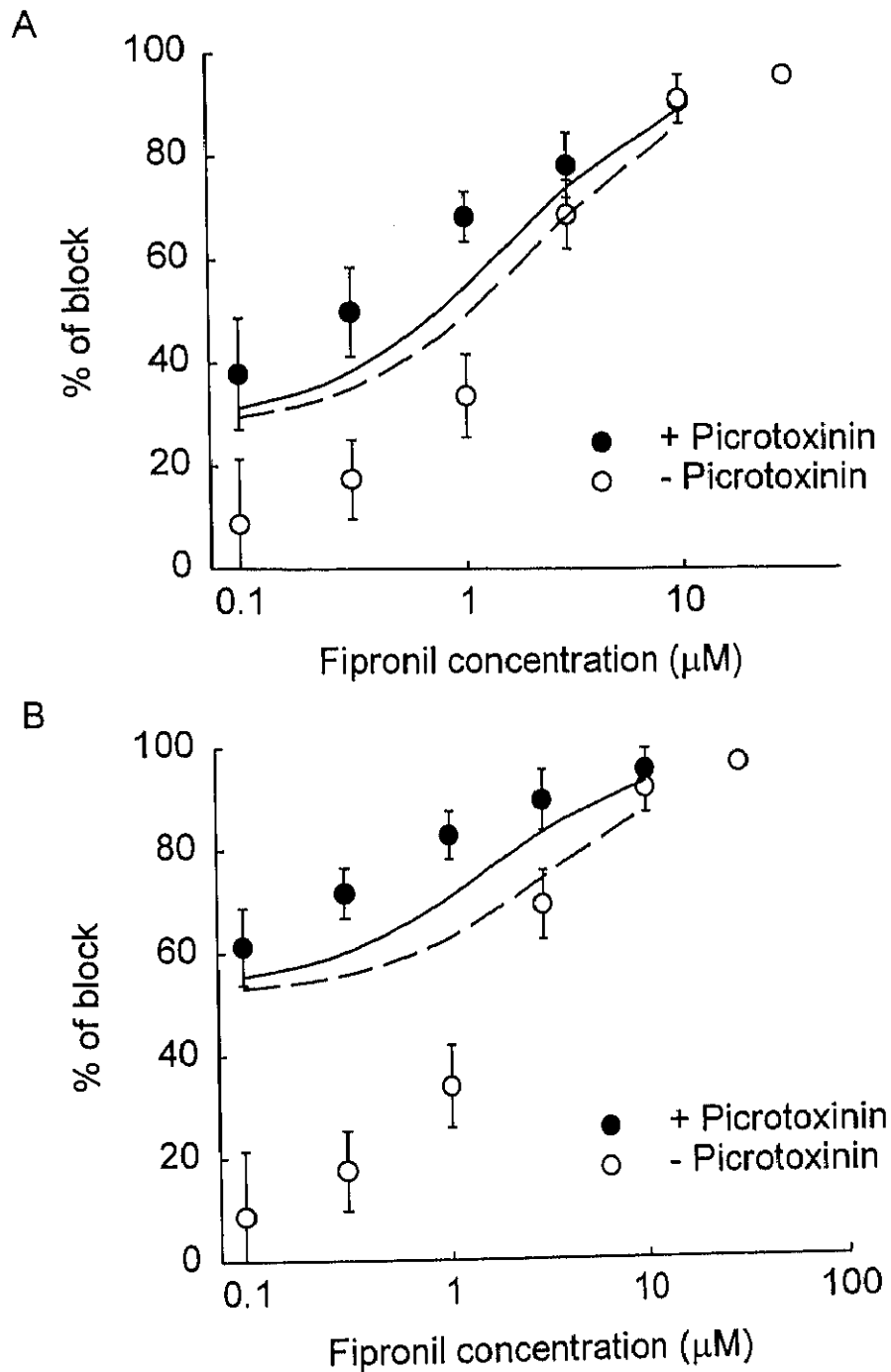


Fig. 19. The effect of picrotoxinin on fipronil suppression of GABA-induced currents. Dose-response relationships for fipronil suppression of GABA-induced currents were determined in the absence (open circles) of picrotoxinin and the presence (closed circles) of 1 μ M (A) and 3 μ M (B) picrotoxinin. Dose-response relationships in the presence of picrotoxinin were fitted by two equations described in the text. Dotted line depicts the fit of data with a logistic eq. 1 (one-site model). Solid line depicts the fit of data with a logistic eq. 2 (two-site model). The K_p and K_f values were set to 2.8 and 1.66 μ M, respectively.

あたり 1 分子結合すると考えた。

フィプロニルの結合部位について、二つの説がある。フィプロニルはピクロトキシニンやディルドリンと同一部位に結合するとする共有説と (Cole et al., 1995; Hosie et al., 1995)、これに反し、フィプロニルとピクロトキシニン又はディルドリンは別の部位に結合するという独立説である (Wolff and Wingate, 1998; Kamijima and Casida, 2000)。

本章でフィプロニルとピクロトキシニンの相互作用を検討した結果、フィプロニルはピクロトキシニンと結合部位を共有しないことが示された (Fig. 17, 19)。電流抑制度は短時間の GABA 処理により測定し、この場合、静止状態の GABA_A レセプターにおいて化合物の抑制作用は評価された。つまり、Fig. 17, 19 に示したフィプロニルとピクロトキシニンの相互作用は、静止状態のレセプターにおけるものだと言える。

ピクロトキシニンは GABA_A レセプター上に作用性の異なる 2 カ所の結合部位を持ち (Li and Pearce, 2000; Yoon et al., 1993)、これら 2 つの結合部位は GABA 処理頻度依存性を示す結合部位と示さない結合部位であった (Yoon et al., 1993)。チャンネルの活性化によりフィプロニルの作用は促進したことから、GABA 処理頻度依存性を示すピクロトキシニン結合部位に、フィプロニルは作用する可能性がある。また、これら 2 つの結合部位はピクロトキシニンに対して高親和性と低親和性を示す結合部位であることを示唆した (Li and Pearce, 2000)。本研究で得られたフィプロニルの作用は、高親和性結合部位に対するピクロトキシニンの作用と類似しているが、低親和性結合部位での作用では説明できない。従って、フィプロニルの結合部位はピクロトキシニンの高親和性結合部位と同一である可能性が高い。ピクロトキシニンの結合部位のうち、高親和性結合部位に対するピクロトキシニンの結合と解離はチャンネルの活性化により促進されるが、低親和性結合部位における作用はチャンネルの活性化に影響されない。この現象に対する 1 つの説明として、高親和性結合部位はチャンネル内孔の深い場所 (細胞内部に近い位置) に位置し、低親和性結合部位はチャンネル内孔の比較的浅い場所 (細胞表面) に位置すると仮定する。また、GABA 処理頻度依存性に関

して異なる性質を示す 2 つのピクロトキシニン結合部位の存在も、同様にしてチャンネル内孔における位置の違いで説明できる。

ここで、フィプロニルとピクロトキシニンを同時処理したときの静止状態の GABA_A レセプターにおける両化合物の電流抑制について考察する。静止状態の GABA_A レセプターにおいてチャンネルは閉じていると考えられることから、ピクロトキシニンは主に細胞表面に近い結合部位に作用して抑制を示すと考える。フィプロニルは GABA_A レセプター上に結合部位を 1 か所持つことがヒル定数値から示唆され、また、その結合部位はピクロトキシニンの高親和性結合部位 (GABA 処理頻度依存的な結合部位) と同一である可能性が、抑制機構の類似性から示された。

Fig. 19 に示した 2 つのモデルを使った解析により、フィプロニルとピクロトキシニンの結合部位は異なることが示された。その原因は上述した理由により、フィプロニルとピクロトキシニンを同時処理したとき、静止状態の GABA_A レセプターにおいてフィプロニルはチャンネル内孔に位置する結合部位に結合し、ピクロトキシニンは主に細胞表面に位置する結合部位に結合して、作用を示したためと考えた。以上のことから、フィプロニルはピクロトキシニンの 2 か所の結合部位のうち、孔の浅い部分には結合しないが深部に存在する結合部位に作用し、深部結合部位で両化合物は作用点を共有していると考察した。