

#### 第 4 章 デイルドリンおよびピクロトキシニンの GABA<sub>A</sub> レセプター チャンネル複合体におけるシングルチャンネルイオン電流に対する作用機構

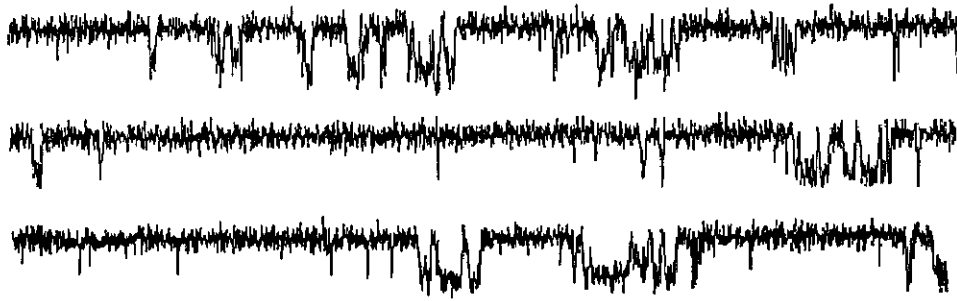
デイルドリンは GABA 誘導性イオン電流を抑制し (Bloomquist et al., 1986)、GABA<sub>A</sub> レセプターおよびキイロシヨウジョウバエ RDL-GABA レセプターにおいて、ピクロトキシニンと結合部位を共有し、類似の作用機構を示した (Lawrence and Casida, 1984; Woodward et al., 1992; Tokutomi et al., 1994; Nagata and Narahashi, 1995)。またホールセルパッチクランプ法による電気生理学的実験結果からも、デイルドリンとピクロトキシニンは相互作用を示すことが明らかになった (Nagata and Narahashi, 1994)。ノイズ解析法を用いた実験から、デイルドリンは単一チャンネルの開確率を減少させると報告された (Bermudez et al., 1991)。しかし、ノイズ解析法はホールセルイオン電流のゆらぎ成分 (ノイズ) を解析することにより、シングルチャンネルレベルで起きている現象を解明する手法であり、シングルチャンネルのパラメータのうち、コンダクタンスと開確率については推定できるが、より詳細なバースト解析やサブコンダクタンス解析などは、データの性質上行うことができない。従って、本研究ではシングルチャンネルパッチクランプ法を用いて、より詳細なシングルチャンネルパラメータについて解析した。前章では、フィプロニルの GABA<sub>A</sub> レセプターに対する作用を調べたが、本章では、フィプロニルと作用点を共有している可能性のあるデイルドリンおよびピクロトキシニンの、シングルチャンネルレベルでの作用機構を解明することを目的に、アウトサイドアウトのシングルチャンネルパッチクランプ法を用いて GABA<sub>A</sub> レセプターに対する作用を調べた。

## 結果

膜電位を  $-60$  mV に固定した outside-out のパッチ膜において、 $10$   $\mu$ M の GABA を外液に溶解してパッチ膜に処理すると、Fig. 13A と類似の内向きシングルチャネルイオン電流が発生した (Fig. 20A)。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を解析した結果、メインコンダクタンスの電流振幅は、 $25.6 \pm 0.9$  pS ( $n=10$ ) であった。Fig. 20 に  $0.1$   $\mu$ M のディルドリン (B)、又は  $0.4$   $\mu$ M のピクロトキシニン (C) を  $10$   $\mu$ M の GABA と同時処理したとき観察されたイオン電流を示した。 $0.1$   $\mu$ M のディルドリンと  $10$   $\mu$ M の GABA を同時処理したときのメインコンダクタンスの電流振幅は  $25.9 \pm 1.5$  pS であった。 $0.4$   $\mu$ M のピクロトキシニンと  $10$   $\mu$ M の GABA を同時処理したときのメインコンダクタンスの電流振幅は  $26.7 \pm 1.3$  pS であった。従って、ディルドリンおよびピクロトキシニン処理により GABA 誘導性シングルチャネルイオン電流の振幅は変化しなかった。サブコンダクタンスの発生頻度も GABA 単独の場合と同様に低かったことから、ディルドリンおよびピクロトキシニンによる作用はシングルチャネル電流のコンダクタンスの大きさや、サブコンダクタンスの発生頻度の変化ではないことが判った。

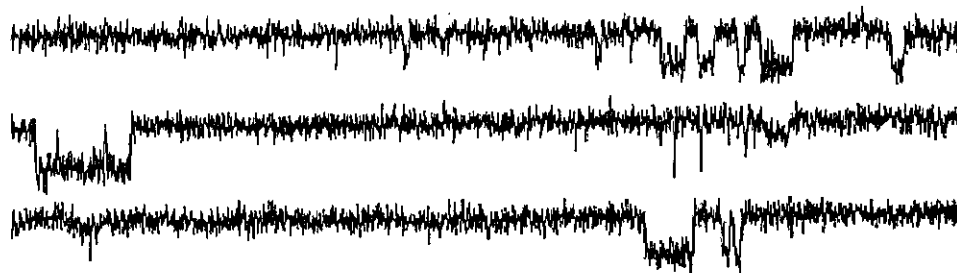
Fig. 21 に GABA のみを処理した対照区 (A)、ディルドリン処理 (B)、およびピクロトキシニン処理区 (C)、の GABA 誘導性イオン電流の開時間分布図を示した。開時間分布図において、3 つの指数関数の重ねあわせにより近似曲線を得た。この分布図から GABA<sub>A</sub> レセプターは少なくとも 3 つの開状態 ( $O_1$ 、 $O_2$ 、 $O_3$ ) を持つことが示唆された。 $10$   $\mu$ M の GABA のみを処理したときの平均開時間は  $2.5$  msec であり、各成分 ( $O_1$ 、 $O_2$ 、 $O_3$ ) の開時間 ( $\tau_1$ 、 $\tau_2$ 、 $\tau_3$ ) と全体に占める割合 ( $p_1$ 、 $p_2$ 、 $p_3$ ) はそれぞれ、 $0.3$  msec ( $35.7\%$ )、 $1.1$  msec ( $31.2\%$ )、 $3.5$  msec ( $33.1\%$ ) であった (Fig. 21A)。GABA  $10$   $\mu$ M とディルドリン  $0.1$   $\mu$ M を同時処理したときの平均開時間は  $1.3$  msec で、各成分 ( $O_1$ 、 $O_2$ 、 $O_3$ ) の開時間 ( $\tau_1$ 、 $\tau_2$ 、

A. 10  $\mu\text{M}$  GABA



50 msec  
5 pA

B. 10  $\mu\text{M}$  GABA + 0.1  $\mu\text{M}$  dieldrin



C. 10  $\mu\text{M}$  GABA + 0.4  $\mu\text{M}$  picrotoxinin

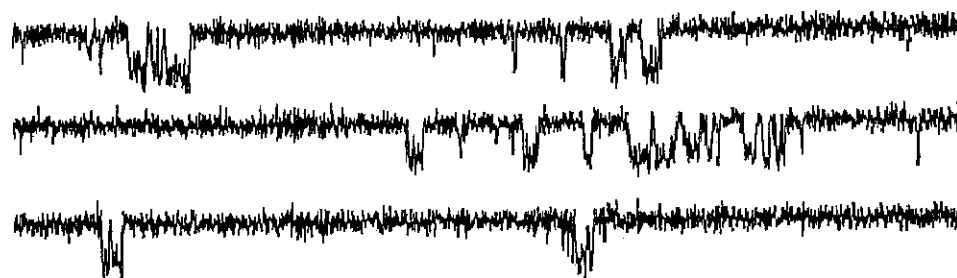


Fig. 20. Single-channel currents induced by application of 10  $\mu\text{M}$  GABA (A), and co-application of 10  $\mu\text{M}$  GABA and 0.1  $\mu\text{M}$  dieldrin (B), co-application of 10  $\mu\text{M}$  GABA and 0.4  $\mu\text{M}$  picrotoxinin (C) to outside-out membrane patches clamped at a membrane potential -60 mV. Currents were filtered at 1 kHz. Currents occurred during brief isolated openings or during longer openings interrupted by short closures or gaps.

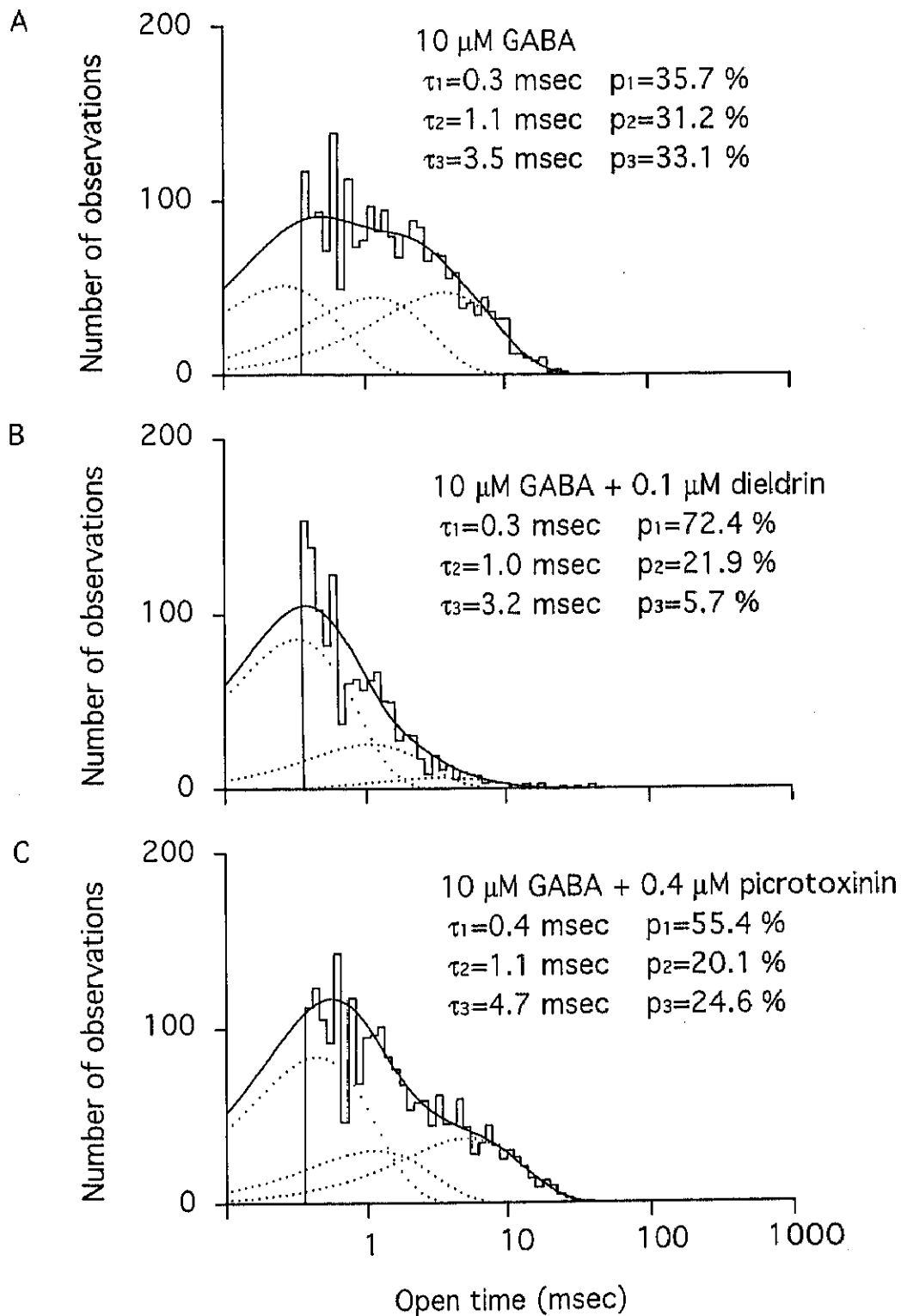


Fig. 21. Open time distributions for currents induced by 10  $\mu\text{M}$  GABA (A), co-application of 10  $\mu\text{M}$  GABA and 0.1  $\mu\text{M}$  dieldrin (B), and co-application of 10  $\mu\text{M}$  GABA and 0.4  $\mu\text{M}$  picrotoxinin (C). The best fit of three exponential functions is shown.  $\tau$ : time constant,  $p$ : proportion. See text for further explanation.

$\tau_3$ ) と全体に占める割合 ( $p_1, p_2, p_3$ ) はそれぞれ、0.3 msec (72.4 %), 1.0 msec (21.9 %), 3.2 msec (5.7 %) であった (Fig. 21B)。GABA 10  $\mu$ M とピクロトキシニン 0.4  $\mu$ M を同時処理したときの平均閉時間は 2.6 msec で、各成分 ( $O_1, O_2, O_3$ ) の閉時間 ( $\tau_1, \tau_2, \tau_3$ ) と全体に占める割合 ( $p_1, p_2, p_3$ ) はそれぞれ、0.4 msec (55.4 %), 1.1 msec (20.1 %), 4.7 msec (24.6 %) であった (Fig. 21C)。ディルドリンあるいはピクロトキシニンを処理した場合、それぞれの成分の閉時間 ( $\tau_1, \tau_2, \tau_3$ ) に大きな差は認められなかったが、 $\tau_1$  の全体に占める割合 ( $p_1$ ) が増加した。また、ディルドリン処理により平均の閉時間が減少した。

Fig. 22 に GABA のみを処理した対照区 (A)、ディルドリン処理区 (B)、およびピクロトキシニン処理区 (C)、の GABA 誘導性イオン電流閉時間分布図を示した。閉時間分布図において、4 つの指数関数の重ねあわせとして近似曲線を得た。従って、GABA<sub>A</sub> レセプターは 4 つの閉状態 ( $C_1, C_2, C_3, C_4$ ) を持つことが示唆された。10  $\mu$ M の GABA のみを処理したときの平均の閉時間は 15.9 msec であり、各成分 ( $C_1, C_2, C_3, C_4$ ) の閉時間 ( $\tau_1, \tau_2, \tau_3, \tau_4$ ) 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 (28.8 %), 1.6 msec (28.5 %), 4.8 msec (19.6 %), 33.5 msec (23.2 %) であった (Fig. 22A)。GABA 10  $\mu$ M とディルドリン 0.1  $\mu$ M を同時処理したときの平均閉時間は 61.4 msec で、各成分 ( $C_1, C_2, C_3, C_4$ ) の閉時間 ( $\tau_1, \tau_2, \tau_3, \tau_4$ ) と全体に占める割合 ( $p_1, p_2, p_3, p_4$ ) はそれぞれ、0.5 msec (56.0 %), 3.8 msec (22.4 %), 32.8 msec (10.0 %), 200 msec (11.6 %) であった (Fig. 22B)。GABA 10  $\mu$ M とピクロトキシニン 0.4  $\mu$ M を同時処理したときの平均閉時間は 33.5 msec であり、各成分 ( $C_1, C_2, C_3, C_4$ ) の閉時間 ( $\tau_1, \tau_2, \tau_3, \tau_4$ ) 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 (56.0 %), 3.8 msec (30.4 %), 46.0 msec (19.7 %), 141.2 msec (10.5 %) であった (Fig. 22C)。平均閉時間はディルドリンおよびピクロトキシニンを処理した結果延長し、3 つの遅い閉時間 ( $\tau_2, \tau_3, \tau_4$ ) はディルドリンおよびピクロトキシニン処理により延長した。

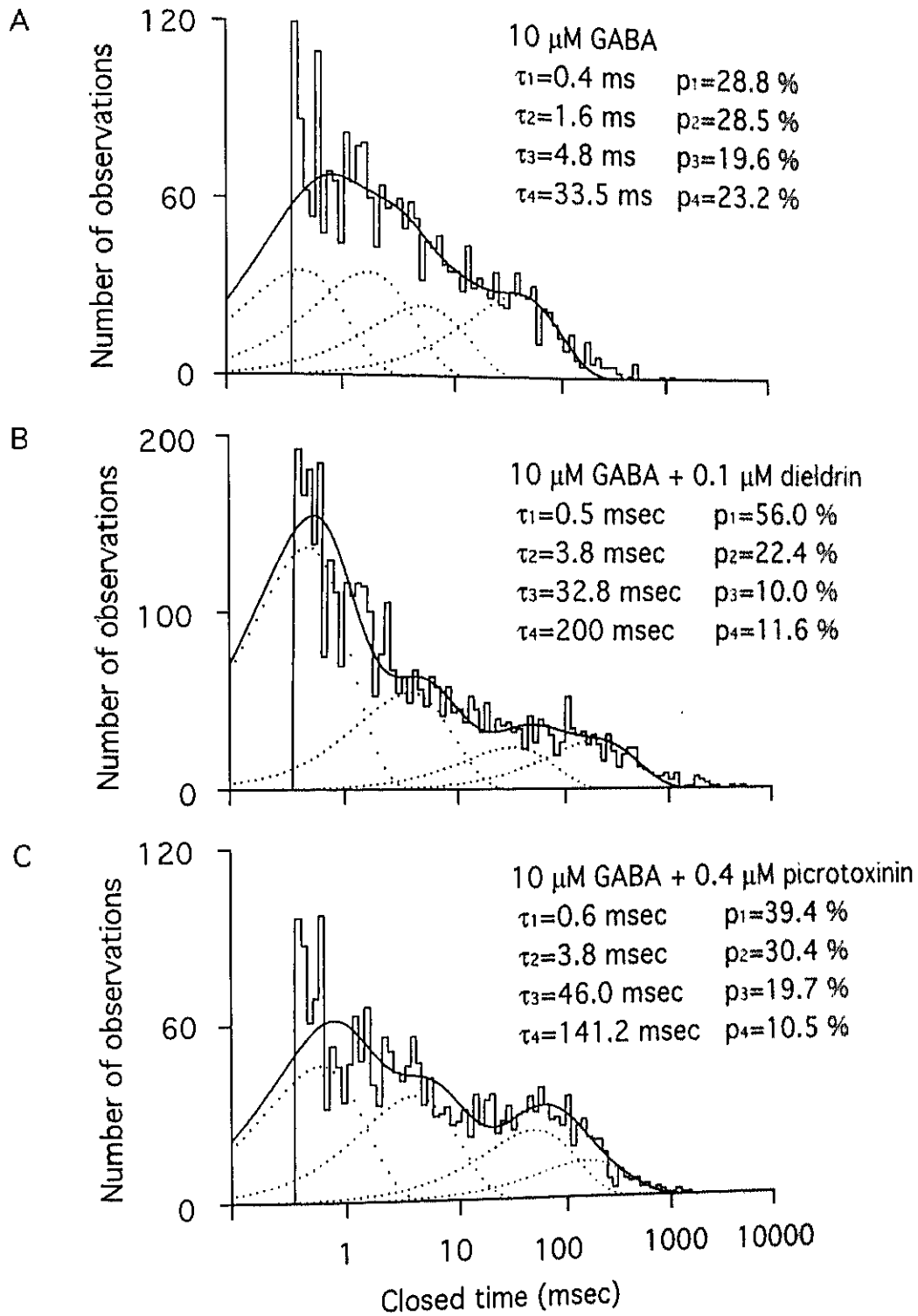


Fig. 22. Closed time distributions for currents induced by 10  $\mu\text{M}$  GABA (A), co-application of 10  $\mu\text{M}$  GABA and 0.1  $\mu\text{M}$  dieldrin (B), and co-application of 10  $\mu\text{M}$  GABA and 0.4  $\mu\text{M}$  picrotoxinin (C). The best fits of four exponential functions are shown.  $\tau$ : time constant,  $p$ : proportion. See text for further explanation.

Fig. 23 に GABA のみを処理した対照区 (A)、ディルドリン処理区 (B)、およびピクロトキシニン処理区 (C)、の GABA 誘導性イオン電流バースト持続時間分布図を示した。バースト持続時間分布図において、3 つの指数関数の重ねあわせとして近似曲線を得たことから GABA<sub>A</sub> 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  $\mu\text{M}$  の GABA のみを処理したときの平均バースト持続時間は 9.7 msec であり、各成分 ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ) のバースト持続時間 ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ) と全体に占める割合 ( $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_3$ ) はそれぞれ、0.4 msec (35.1 %), 7.2 msec (45.8 %), 26.0 msec (19.1 %) であった (Fig. 23A)。GABA 10  $\mu\text{M}$  とディルドリン 0.1  $\mu\text{M}$  を同時処理したときの平均バースト持続時間は 5.0 msec であり、各成分 ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ) のバースト持続時間 ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ) と全体に占める割合 ( $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_3$ ) はそれぞれ、0.4 msec (54.8 %), 6.0 msec (33.8 %), 24.9 msec (11.4 %) であった (Fig. 23B)。GABA 10  $\mu\text{M}$  とピクロトキシニン 0.4  $\mu\text{M}$  を同時処理したときの平均バースト持続時間は 7.9 msec であり、各成分 ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$ ) のバースト持続時間 ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ) と全体に占める割合 ( $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_3$ ) はそれぞれ、0.4 msec (59.9 %), 5.9 msec (27.5 %), 26.7 msec (12.6 %) であった (Fig. C)。各成分のバースト持続時間 ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ) には大きな差は認められなかったが、ディルドリンを処理した場合、平均のバースト持続時間が減少した。

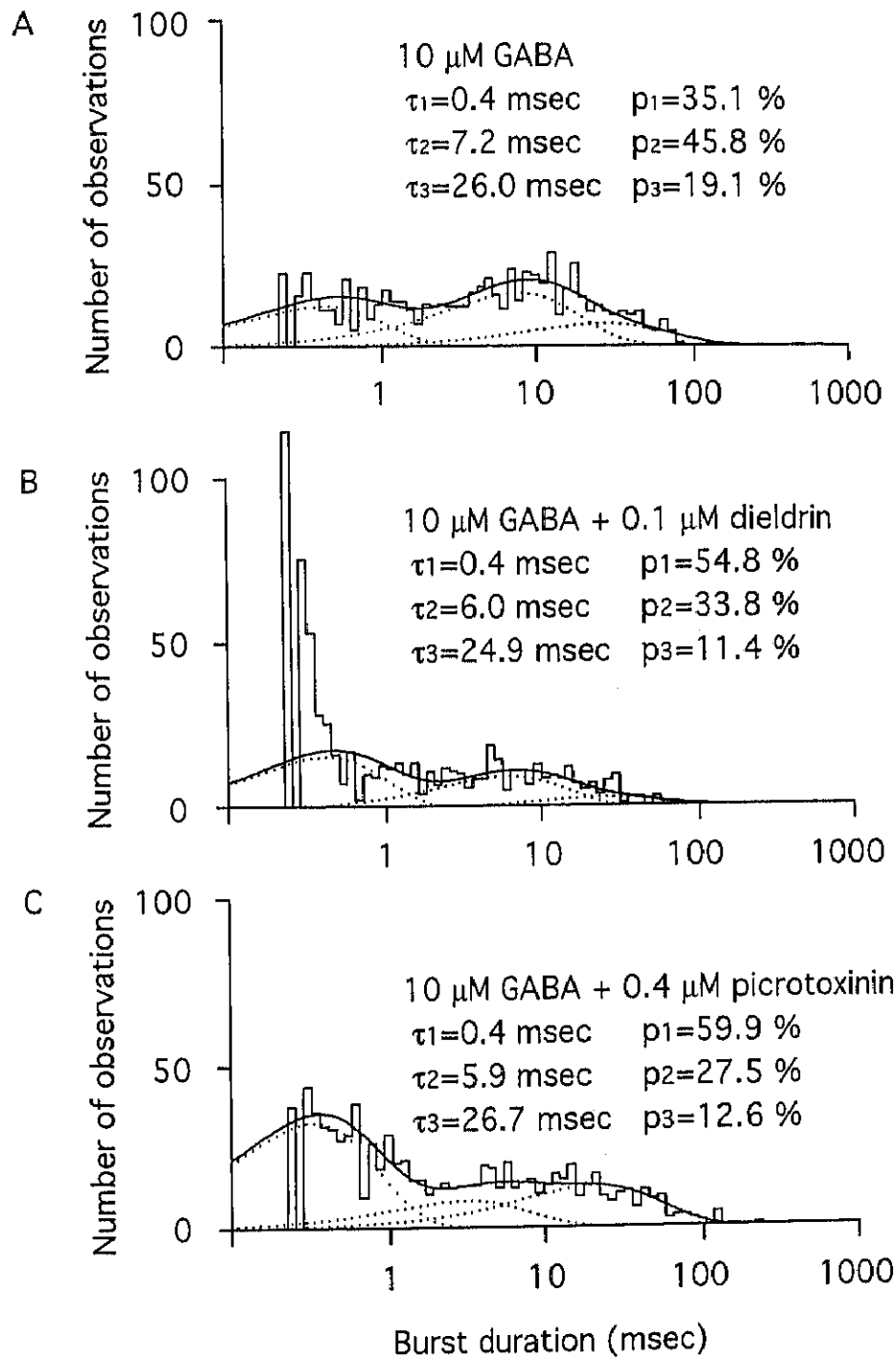


Fig. 23. Distributions of burst duration for currents induced by 10  $\mu\text{M}$  GABA (A), and co-application of 10  $\mu\text{M}$  GABA and 0.1  $\mu\text{M}$  dieldrin (B), and co-application of 10  $\mu\text{M}$  GABA and 0.4  $\mu\text{M}$  picrotoxinin (C). The burst was defined as repeated openings separated by a closure no longer than 5 msec. The best fit of three exponential functions is shown.  $\tau$ : time constant,  $p$ : proportion. See text for further explanation.



## 考察

メインコンダクタンスを解析した結果、ディルドリンあるいはピクロトキシニン処理によりシングルチャネルのメインコンダクタンスは変化しなかった。このことから、ディルドリンおよびピクロトキシニンはメインコンダクタンスに影響を与えないと言える。また、サブコンダクタンスの発生頻度も GABA 単独処理の場合と同様に低かったことから、両薬剤による電流抑制機構はシングルチャ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と考えられる。

各種パラメーターについて考察すると、開時間については、0.1  $\mu\text{M}$  のディルドリン、あるいは 0.4  $\mu\text{M}$  のピクロトキシニンを 10  $\mu\text{M}$  の GABA と同時処理したとき (Fig. 21B, C) の 3 つの開時間定数 ( $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ) は、対照区 (Fig. 21A) と比較すると類似の値を取ったが、それぞれの時定数が占める割合 ( $p_1$ ,  $p_2$ ,  $p_3$ ) は異なった。ディルドリンおよびピクロトキシニンを処理した場合に共通して見られた変化は、 $\tau_1$  の全体に占める割合である  $p_1$  が増加し、 $\tau_2$ 、および  $\tau_3$  の割合である  $p_2$  および  $p_3$  が減少したことである。この現象はピクロトキシニンにおける場合よりも、ディルドリンを処理した場合に顕著に見られた。平均開時間を比較した場合も、ピクロトキシニン処理による平均値の減少はみられなかったが、ディルドリン処理により平均開時間は約半分となった。以上のことから、ディルドリンは開時間を減少させることが判明した。ピクロトキシニンの開時間に与える影響については、平均開時間は変化しなかったが、 $\tau_2$  および  $\tau_3$  成分の割合である  $p_2$  および  $p_3$  が増加したことから、ピクロトキシニンの作用においても開時間を減少させる傾向にあると言える。

閉時間について考察すると、GABA 誘導性シングルイオン電流の閉時間は 4 つの時定数を持つ現象として解析された (Fig. 22)。時定数のみ比較すると、ディルドリンおよびピクロトキシニンを処理した場合対照区と比較して  $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ,  $\tau_4$  の値が長くなった。この現象について、 $\tau_2$ ,  $\tau_3$ ,  $\tau_4$  が延長したと解釈することも

できるが、それぞれの時定数が占める割合を考慮すると、対照区における  $p_1$  と  $p_2$  の合計がディルドリンおよびピクロトキシニン処理区における  $p_1$  におよそ相当する。さらに対照区の  $\tau_3$ 、および  $\tau_4$  は、ディルドリンおよびピクロトキシニン処理の  $\tau_2$ 、および  $\tau_3$  にそれぞれ相当する。以上のように考えると、ディルドリンおよびピクロトキシニン処理により長い閉時間成分が出現した可能性が示された。

バースト持続時間に与えるディルドリンおよびピクロトキシニンの影響は、各成分のバースト持続時間 ( $\tau_1$ 、 $\tau_2$ 、 $\tau_3$ ) には大きな差は認められなかったが、 $\tau_1$  の割合である  $p_1$  が増加した。特に、ディルドリンを処理した場合平均バースト持続時間の減少も観察されたことから、ディルドリン処理によりバースト持続時間は減少することが判明した。この主な原因は、 $\tau_1$  成分の割合  $p_1$  の増加に伴ったものと考えられる。バースト持続時間の短縮は開時間の短縮によるものであることが示唆された。

ピクロトキシニンのシングルチャネルイオン電流に対する作用がいくつか報告されている。Twyman et al. (1989) はマウス脊椎神経を使った実験で、ピクロトキシニンは、開時間を減少させバーストあたりの平均開時間と開いた回数を減少させることにより、GABA 誘導性イオン電流を抑制することを示した。一方、Newland and Cull-Candy (1992) はラットの感覚神経細胞を用いて、ピクロトキシニンは開時間とバースト持続時間にはほとんど影響を及ぼさないが、閉時間を延長することにより開頻度を減少させることを示した。これら過去の研究におけるピクロトキシニンのシングルチャネルイオン電流に対する作用の相違は、用いた細胞に存在している GABA<sub>A</sub> レセプターのサブタイプの違いによるものであると考えられる。

本章において、ディルドリンは開時間を減少させたことから開いているチャネルに対して閉じる方向に作用し、閉時間を延長したことから閉じた状態で安定化させることが示された。ピクロトキシニンは開時間を減少させる傾向にあったが、最も顕著に現れたのはチャネル閉時間の延長であった。従って、ピク

ロトキシニン<sup>1</sup>はチャンネルを閉じた状態で安定化させることが示唆された。以上のことから、ディルドリンは GABA<sub>A</sub> レセプターシングルチャンネル電流をピク  
ロトキシニンと類似の様式で修飾することが示された。