

第 5 章 アニサチンの GABA_A レセプターチャネル複合体に対する 作用機構

アニサチンはモクレン科に属する *Illicium anisatum* (シキミ) に含有する有毒成分である (Kouno et al., 1989; Lane et al., 1952)。アニサチンの作用性に関する研究は生化学的および電気生理学的手法を用いて行われてきた。ネコの神経を用いた実験で、アニサチンの類縁化合物であるシキミンはピクロトキシンが示す作用と類似していることが示された (Curtis et al., 1973)。カエルの神経を用いた実験では、アニサチンは GABA 誘導性の脱分極を抑制し、ラット脳における結合実験では GABA のアゴニストであるムシモールの結合を阻害しなかった (Kudo et al., 1981)。これらのことからアニサチンの作用点は GABA 作動性神経であり、アニサチンは GABA の作用を阻害する化合物であることが推察された (Shinozaki et al., 1981)。GABA の作用を阻害するという点において、アニサチンはピクロトキシニンやディルドリン等と類似の作用を示すと言えるが、その詳細な作用機構は不明である。また、パッチクランプ法を用いたシキミ抽出物の GABA_A レセプターに対する作用に関する研究において、同抽出物は GABA 誘導性イオン電流を抑制した (Ikeda et al., 1998)。これまでにアニサチンに関するイオンチャネルレベルでの研究は行われておらず、本章ではラットの DRG ニューロンを用いてアニサチンの GABA_A レセプターにおける作用機構を、ホールセルパッチクランプ法およびシングルチャネルパッチクランプ法を用いて検討した。

結果

1. アニサチンによる電流抑制

Fig. 24 はアニサチンの GABA 誘導性電流に対する抑制を示している。A は測定したイオン電流の図で、細胞の膜電位を -60 mV に固定して GABA を処理すると、内向き電流が発生した。電流は 30 μ M の GABA を 5 sec 細胞に処理して誘導した。GABA のみを処理したコントロール (a) と比較して、 1 μ M のアニサチンを GABA と同時処理するとイオン電流は抑制され (b)、処理後に外液からアニサチンを除いても抑制から回復しなかった (c)。B にこの時の経時変化を示した。アニサチン同時処理をするとイオン電流は次第に抑制され、抑制が定常状態を示すまでに 5 - 10 分間要した。さらに、この抑制は数分間アニサチンを含まない溶液に交換しても回復しなかったことから、アニサチンによる抑制は不可逆的であることが判明した。

次に、アニサチンが作用を示すために、チャネルの活性化が必要であるか否かを調べるため、 1 μ M のアニサチンを 60 sec 前処理し、その直後の GABA 処理により誘導された電流を測定した (Fig. 25)。Fig. 25A は測定したイオン電流を示している。a はコントロールで 30 μ M の GABA を処理したときに測定されたもの、b はアニサチン処理直後に測定したイオン電流で、 30 μ M の GABA 処理により誘導した。Fig. 25B にその時の経時変化を示した。アニサチン処理前の電流の大きさを 100 % とすると、処理後の電流の大きさは 104.2 ± 3.2 % であった (Fig. 25C, $n=5$)。アニサチン処理前後で電流の大きさを比較すると、有意差は認められなかったことから ($P < 0.05$)、アニサチンが作用を示すためには、GABA によるチャネルの活性化が必要であることが判明した。Fig. 26 にアニサチンによる電流抑制の薬量作用曲線を示した。イオン電流は所定濃度のアニサチンと 30 μ M の GABA を 5 sec 同時処理して測定し、作用が定常状態を示した時をそのアニサチン濃度での抑制度とした。アニサチンは濃度依存的にイオン電流を抑制し、 IC_{50} 値は 1.10 ± 1.40 μ M、ヒル定数は 0.73 ± 0.13 であった。

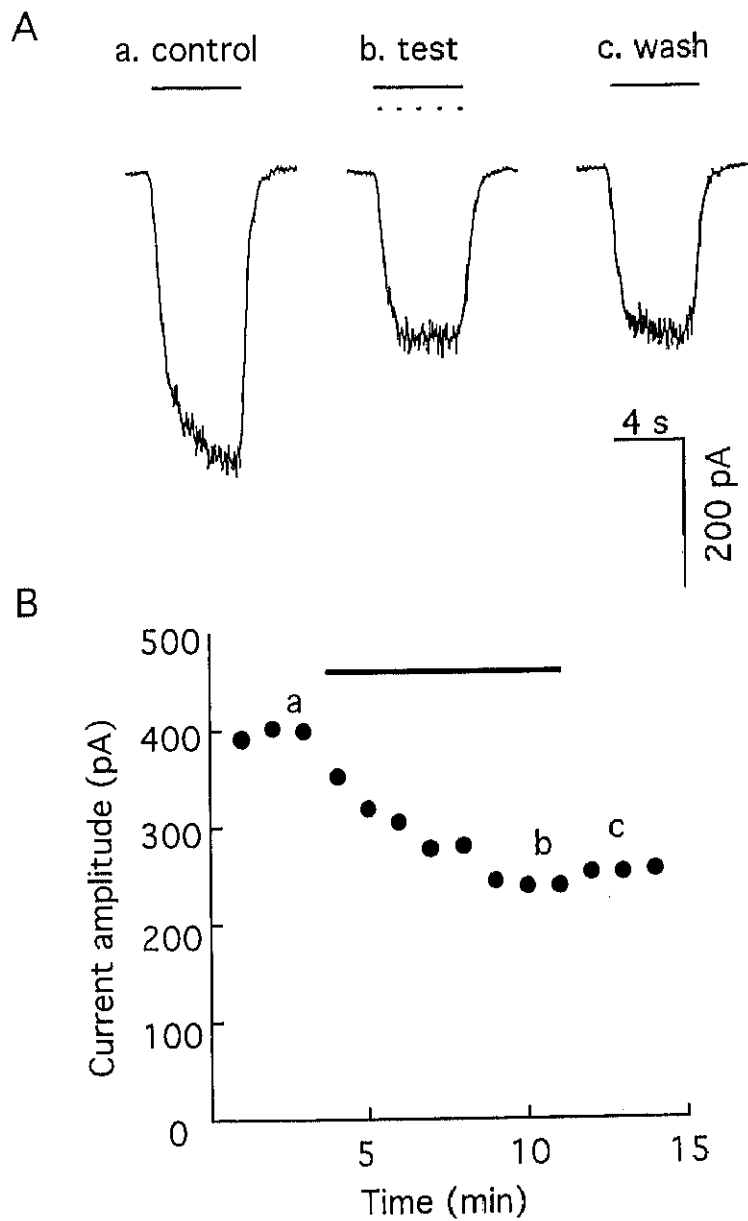


Fig. 24. Suppression of anisatin on GABA-induced chloride currents. A: Current records in response to 5 s application of 30 μ M GABA with and without anisatin. a, GABA alone (solid bar); b, co-application of GABA and anisatin (broken bar); c, GABA alone. B: Time course of the changes on peak current amplitude repeated applications with (dotted line) and without (solid line) anisatin. The peak amplitude of current gradually decreases during repeated co-applications. No recovery was observed even after anisatin-free applications of 30 μ M GABA alone. Letters a to c correspond to those in A.

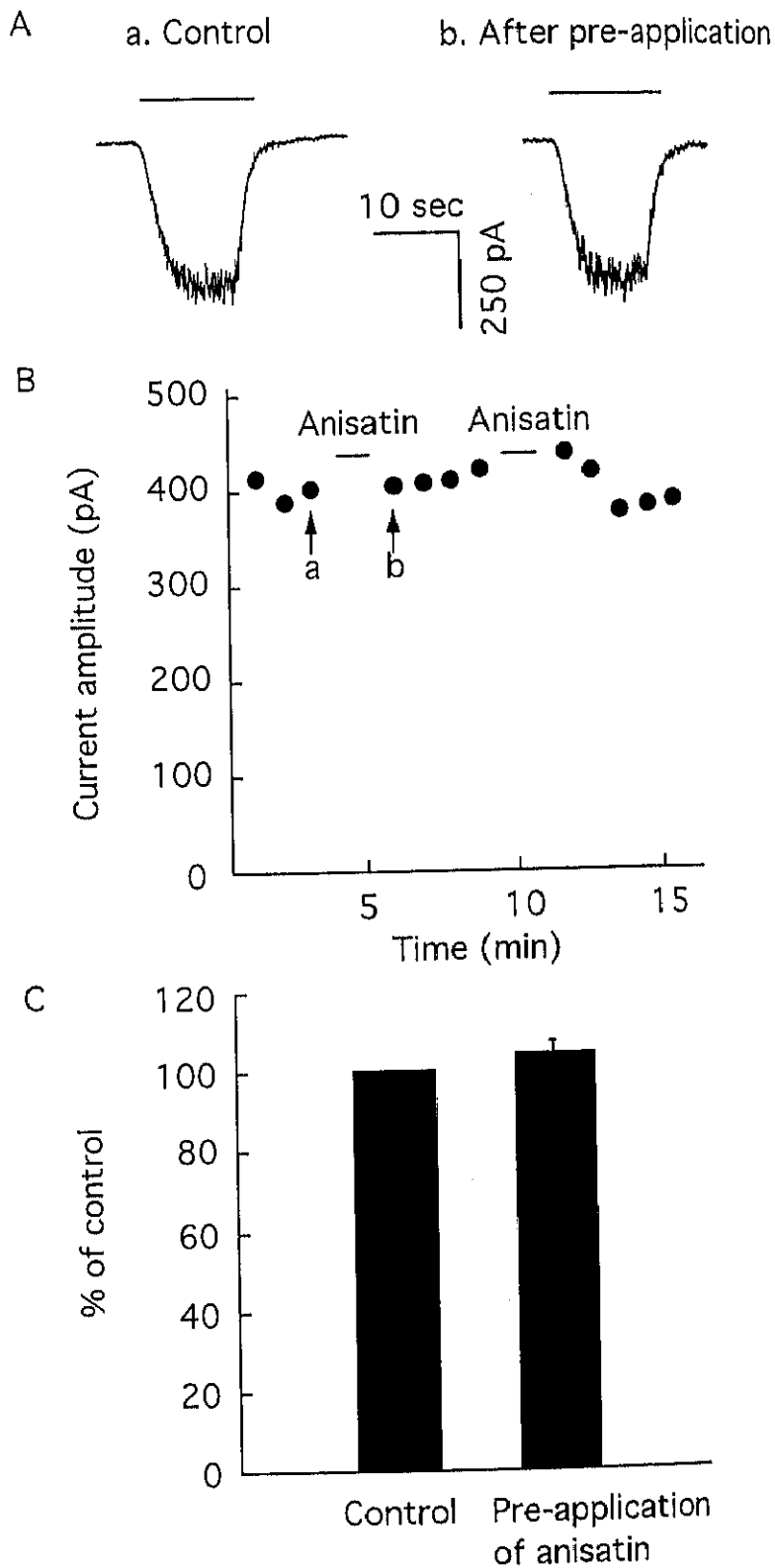


Fig. 25. Pre-application of anisatin alone does not suppress the GABA-induced currents. A: Pre-application of 1 μ M anisatin alone for 60 sec does not affect on 30 μ M GABA-induced currents. B: Time course of the changes in current amplitude during the experiment shown in A. Letters a and b correspond to those in A. C: The ratios of after (pre-application of anisatin)/before (control) is 104.2 ± 3.2 ($n=5$).

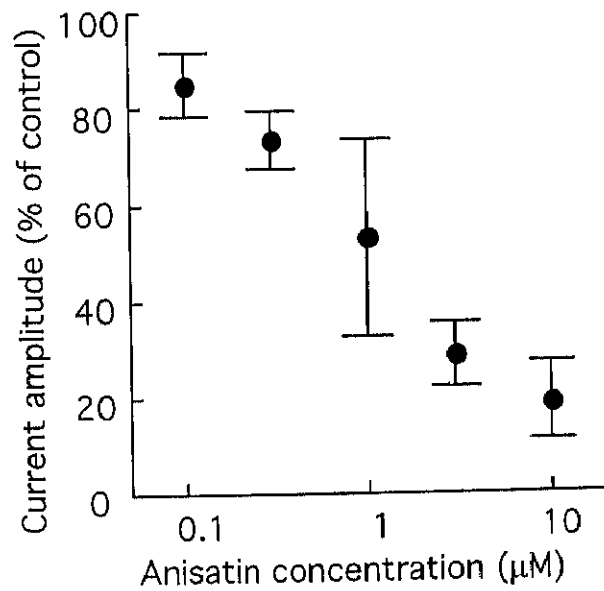


Fig. 26. Dose-response relationship for suppression of GABA-induced peak currents by anisatin. Currents were induced by 5 s applications of 30 μM GABA. Currents were suppressed by anisatin in a dose-dependent manner with an IC_{50} of 1.10 ± 1.40 μM. The Hill co-efficient was estimated to be 0.75 ± 0.13 . Mean \pm S.D. $n=4-8$.

アニサチンと GABA を繰り返し同時処理することにより、アニサチンによる抑制は進行したことから、チャンネルが繰り返し開くことによって増強される可能性も示された (Fig. 24)。さらにアニサチンが作用を示すためには、GABA によるチャンネルの活性化が必要であった (Fig. 25)。GABA によるチャンネルの活性化がアニサチンの作用を促進する可能性を検討するため、アニサチンと GABA を長時間 (30 sec) 同時処理した (Fig. 27)。アニサチンを同時処理すると GABA 単独の場合と比較して経時的に電流は減少した (Fig. 27A)。電流の下降相を一次の指数関数曲線で近似したところ、GABA 単独の場合の τ 値は 24.6 ± 8.6 sec ($n=4$) であったのに対し、 $1 \mu\text{M}$ のアニサチンを同時処理した場合は 17.9 ± 5.4 sec ($n=4$) であった (Fig. 27B)。このことから、アニサチンによる作用は処理頻度依存的に進行し、チャンネルが開くことにより促進される可能性が示された。

アニサチンによる電流抑制は、チャンネルの活性化に伴って促進され、アニサチンがオープンチャンネルブロッカーである可能性が示された。この可能性を検討するため、アニサチンによる抑制作用の電位依存性を調べた (Fig. 28)。GABA とアニサチン $1 \mu\text{M}$ を同時処理している間に、膜電位を -120 mV から $+30$ mV まで 10 mV ずつ段階的に電位変化させて電流を記録した。GABA 単独処理により測定された電流を ○、GABA とアニサチンを同時処理したときに測定された電流を ● で示した。アニサチンはイオン電流を抑制したが、反転電位は対照区で -7.5 ± 13.3 mV であり、アニサチンを同時処理した場合には、 0.0 ± 12.8 mV であった。処理区と対照区で反転電位に有意差が認められなかったことから、電流抑制は電位依存性を示さず、アニサチンはオープンチャンネルブロッカーではないことが明らかになった ($p < 0.05$, $n=4$)。

2. シングルチャンネル電流に対するアニサチンの作用

膜電位を -60 mV に固定した outside-out のパッチ膜において、 $10 \mu\text{M}$ の GABA を処理すると、内向きのシングルチャンネル電流が観察された (Fig. 29A)。電流の発生頻度は GABA を繰り返し処理することによって減少したため、解析には

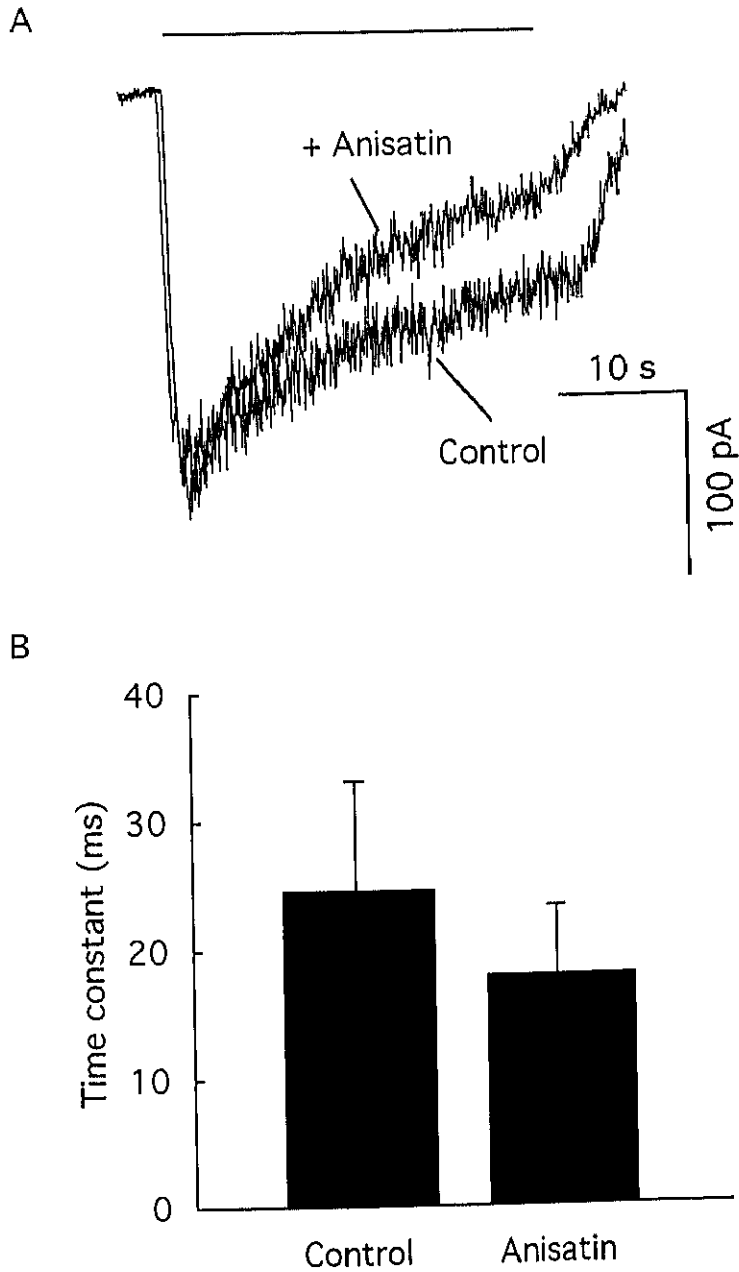


Fig. 27. The effect of prolonged co-application (30 s) of 1 μ M anisatin and 30 μ M GABA. (A) Currents induced by GABA alone and co-application of GABA and anisatin. Co-application caused accelerated desensitization of current. (B) The time constant was shortened by 1 μ M anisatin from 24.6 ± 8.6 sec to 17.9 ± 5.4 sec ($n=4$).

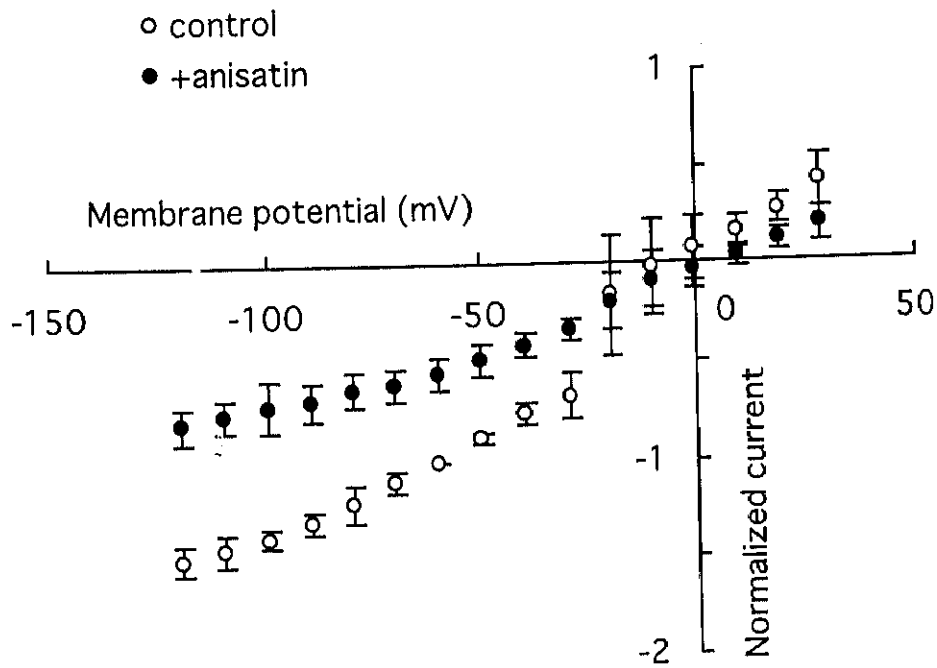
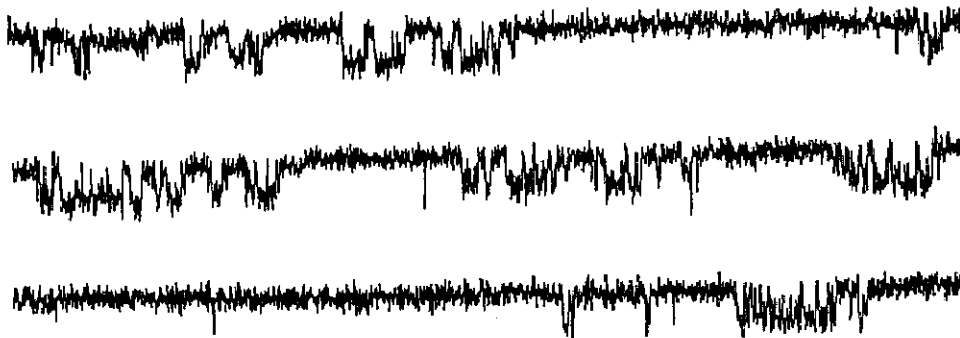


Fig. 28. Current-voltage relationships for GABA-induced peak currents with (closed circle) or without (open circle) anisatin. The reversal potentials at the control and presence of anisatin were estimated -7.5 ± 13.3 mV and 0.0 ± 12.8 mV, respectively. (mean \pm S.D., $n=4$).

A. 10 μM GABA



50 msec
5 pA

B. 10 μM GABA + 1 μM anisatin



Fig. 29. Single-channel currents induced by application of 10 μM GABA (A), and co-application of 10 μM GABA and 1 μM anisatin (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.

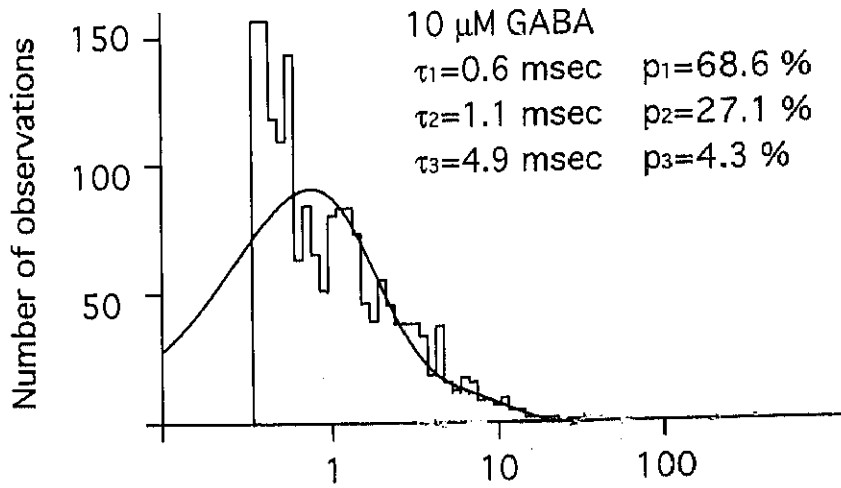
パッチ膜作成後約 20 分までのものを用いた。

Fig. 29B に $1 \mu\text{M}$ のアニサチンと $10 \mu\text{M}$ の GABA を同時処理したときのイオン電流を示した。このとき観察されたイオン電流のコンダクタンスは約 26 pS であり、アニサチンはコンダクタンスの値を変化させなかった。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、アニサチ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判った。

Fig. 30 にアニサチン処理区 (B) と未処理区 (A) 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。 $10 \mu\text{M}$ の GABA のみを処理したときの平均開時間は 2.1 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、 0.6 msec (56.2%)、 1.1 msec (30.8%)、 4.9 msec (13.0%) であった。また GABA $10 \mu\text{M}$ とアニサチン $1 \mu\text{M}$ を同時処理したときの平均開時間は 2.2 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、 0.5 msec (57.6%)、 1.4 msec (14.6%)、 3.6 msec (27.8%) となった。アニサチン処理と未処理の場合で 3 つの成分の開時間および平均開時間に大きな差は認められなかった。

Fig. 31 にアニサチン処理区 (B) と未処理区 (A) の GABA 誘導性イオン電流の閉時間分布を示した。この分布図から GABA_A レセプターは 4 つの閉状態 (C_1 , C_2 , C_3 , C_4) 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閉時間は 14.3 msec であり、各成分 (C_1 , C_2 , C_3 , C_4) の開時間 (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、 0.2 msec (61.5%)、 1.1 msec (15.1%)、 3.6 msec (10.7%)、 37.0 msec (12.7%) であった。一方、GABA $10 \mu\text{M}$ とアニサチン $1 \mu\text{M}$ を同時処理したときの平均閉時間は 19.5 msec であり、各成分 (C_1 , C_2 , C_3 , C_4) の開時間 (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、 0.2 msec (48.7%)、 1.4 msec (19.0%)、 13.7 msec (13.8%)、 43.8 msec

A



B

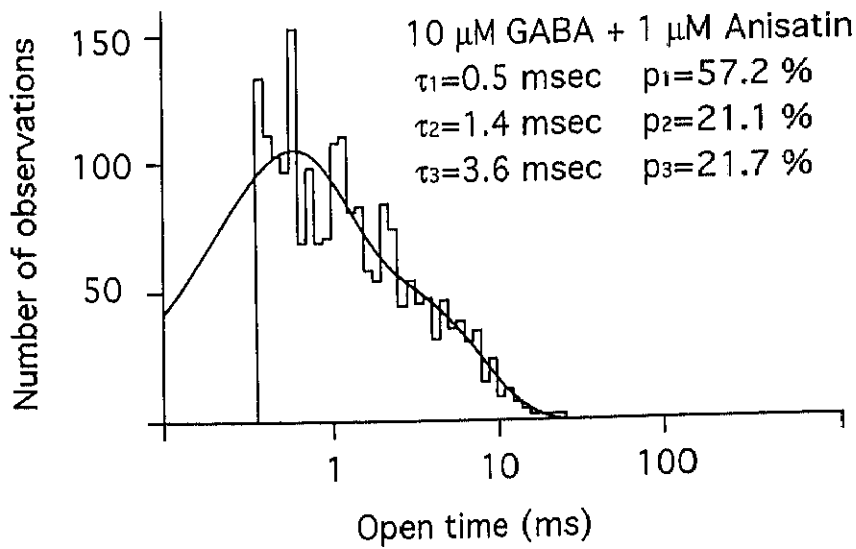


Fig. 30. Open time distributions for currents induced by 10 μ M GABA (A), and co-application of 10 μ M GABA and 1 μ M anisatin (B). The distributions are shown on a logarithmic time axis. The best fit of three exponential functions is shown. τ : time constant, p : proportion. See text for further explanation.

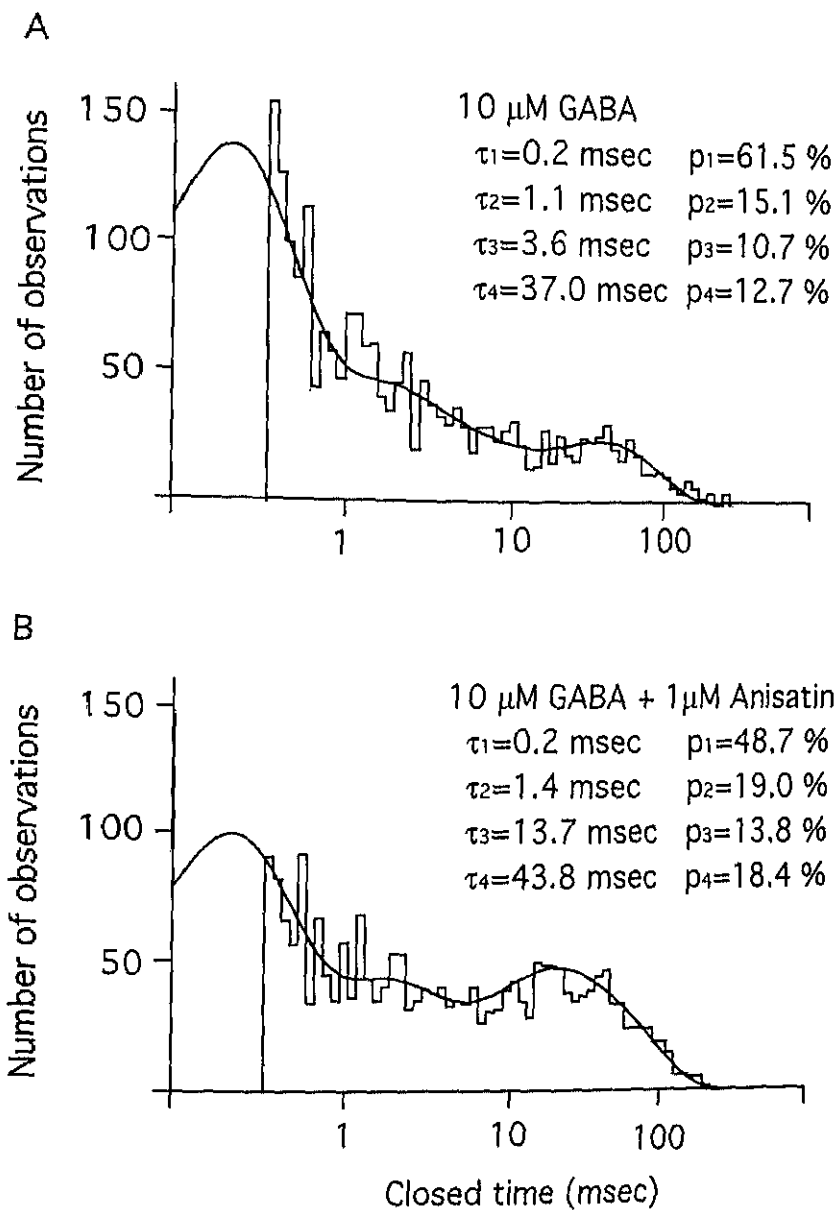


Fig. 31. Closed time distributions for currents induced by 10 μ M GABA (A), and co-application of 10 μ M GABA and 1 μ M anisatin (B). The distributions are shown on a logarithmic time axis. The best fits of four exponential functions are shown. τ : time constant, p : proportion. See text for further explanation.

(18.4 %)であった。これら4つの成分の閉時間をアニサチン処理と未処理の場合で比較すると、2つの遅い成分 τ_3 、 τ_4 はアニサチンを処理した場合に長くなり、平均閉時間も延長した。

Fig. 32 にアニサチン処理 (B) と未処理 (A) の場合の 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 μ 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 (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、0.3 msec (67.5 %)、8.4 msec (23.8 %)、37.5 msec (8.7 %) であった。また、バーストあたりの平均開回数は4で、平均開時間は0.8 msec となった。一方、GABA 10 μ M とアニサチン 1 μ M を同時処理したときの平均のバースト持続時間は6.6 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) と全体に占める割合 (p_1 、 p_2 、 p_3) はそれぞれ、0.4 msec (62.3 %)、3.6 msec (19.7 %)、18.7 msec (18.0 %) であった。バーストあたりの平均開回数は2回で、平均開時間は0.8 msec となった。アニサチン処理と未処理の場合でバースト持続時間を比較すると、2つの遅い成分はアニサチンを処理すると短くなり約半分値、また平均バースト持続時間も短くなった。従って、アニサチンはバーストあたりの開時間を変化させずに開回数を減少させ、バースト持続時間を減少させた。

3. アニサチン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アニサチンの結合部位を検討するため、アニサチンとピクロトキシニンとの間の相互作用を調べた。アニサチン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。アニサチンとピクロトキシニンが同一の結合部位に作用するか否かを検討するため、両化合物を同時に処理した場合とピクロトキシニン単独処理の場合とでイオン電流の動態を比較した。イオン電流は30 μ M の GABA

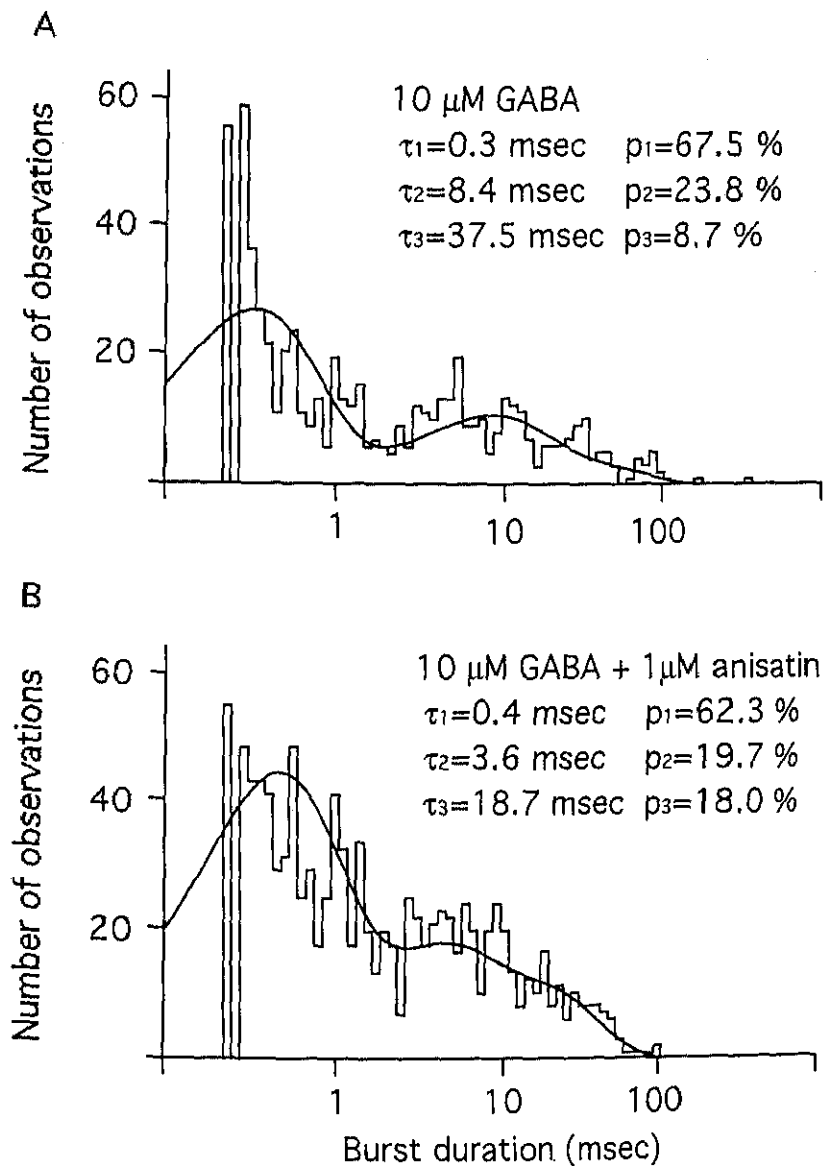


Fig. 32. Distributions of burst duration for currents induced by 10 μ M GABA (A), and co-application of 10 μ M GABA and 1 μ M anisatin (B). The burst was defined as repeated openings separated by a closure no longer than 5 msec. The distribution are shown on a logarithmic time axis. The best fit of three exponential functions is shown. τ : time constant, p : proportion. See text for further explanation.

を 5 sec 細胞に処理することにより誘導し、アニサチンおよびピクロトキシニンは GABA と混合して処理した。Fig. 33 にアニサチン 1 μM 存在下 (○)、またはアニサチンが存在しない状態でのピクロトキシニンの薬量作用曲線 (●) を示した。アニサチンおよびピクロトキシニンが存在しない状態でのイオン電流の大きさを 100 % としてそれぞれの電流の大きさを標準化した。ピクロトキシニンは GABA 誘導性イオン電流を濃度依存的に抑制し、 IC_{50} 値は $0.42 \pm 0.04 \mu\text{M}$ であった。アニサチン 1 μM (約 IC_{50} 値) を加えてピクロトキシニンの作用を測定した結果、ピクロトキシニンの濃度が低い場合はアニサチンはイオン電流を約 50 % 抑制した。しかし、ピクロトキシニンが高濃度の場合、アニサチンによる作用はほとんどみられず、ピクロトキシニン単独の場合と同等の抑制度を示した。このことから、アニサチンはピクロトキシニンと相互作用を示し、アニサチンとピクロトキシニンは結合部位を共有していることが示唆された。

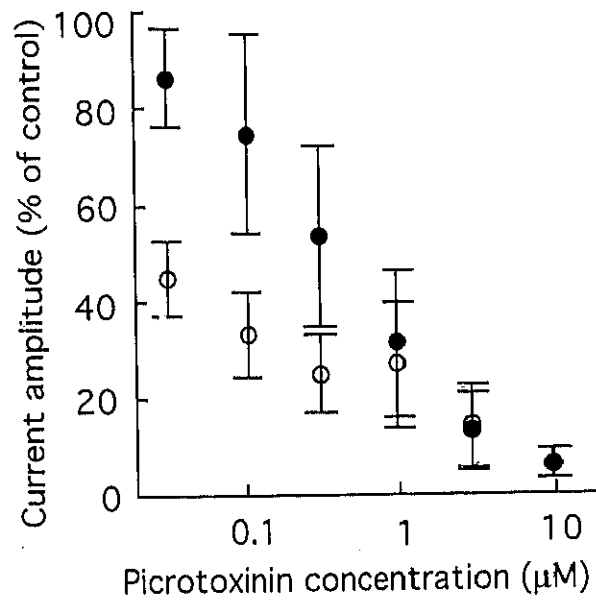


Fig. 33. The effect of 1 μM anisatin on picROTOXININ suppression of 30 μM GABA-induced chloride current. The EC₅₀ value of picROTOXININ are 0.42±0.04 μM (n=3-7).

考察

1. アニサチンによる GABA 誘導性イオン電流の抑制

アニサチンの抑制作用について3つの説明が考えられる。1) アニサチンがアゴニスト (GABA) と同一の部位に結合しアゴニストの作用を競合的に阻害する、2) チャンネルが開いているとき (確率は低いが開じている場合にも) にアニサチンはチャンネル内部に入り、内部に存在する結合部位に結合してチャンネル孔を通過するイオンの流れを物理的に阻害するオープンチャンネルブロッカーとしての作用、3) アニサチンがチャンネルに結合することによりチャンネルの開閉機構に影響を与えてチャンネルが開くことを阻害する。1) の可能性について検討すると、アニサチンはピクロトキシニンと相互作用を示し、ピクロトキシニン結合部位に作用することが示唆されたことから (Fig. 33)、アニサチンが GABA の作用を競合的に阻害する可能性は低い。過去の研究でアニサチンは GABA 結合部位に結合して GABA と同様の作用を示す化合物、ムシモールの結合を阻害したと報告されたが (Matsumoto and Fukuda, 1983)、本研究の結果からはアニサチンは GABA やムシモールの結合部位には作用しないことが示唆された。さらに、最近報告された結合実験によりアニサチンはピクロトキシニン結合部位に作用することが示された (Kakemoto et al., 1999)。2) についてはアニサチンはシングルイオン電流の開時間を変化させず、バースト持続時間を減少させた (Fig. 30, 32)。典型的なオープンチャンネルブロッカーの作用は、シングルイオン電流のバースト状態を引き起こすことから、アニサチンの作用はオープンチャンネルブロッカー的ではなかった。このことは、アニサチンの作用が電位依存性を示さなかったことから裏付けられた。アニサチンと作用点を共有している可能性のあるピクロトキシニンの GABA_A レセプターにおける作用は、GABA 処理頻度依存性を示し、GABA がレセプターに結合してタンパクの形状変化により促進した (Yoon et al., 1993)。

本章でのアニサチンの抑制作用も処理頻度依存的に促進し、両薬剤が類似の作用機構を持っている可能性が示唆された。以上のことより、上述した 3) の

メカニズムによりアニサチンの抑制作用は引き起こされると考えた。アニサチンは植物のシキミに含有している有毒成分である (Kouno et al., 1989)。シキミ抽出物の GABA 誘導性イオン電流の抑制作用は GABA の GABA 認識部位における親和性低下が原因であると示唆された (Ikeda et al., 1998)。アニサチンがシキミ抽出物と類似の作用を示すのであれば、アニサチンの結合に伴って GABA の親和性が低下し、その結果チャネルの開閉機構に影響を及ぼしてチャネル開口を阻害した可能性もある。

GABA_A レセプターにおいて 2 つの短い閉時間は GABA がレセプターに結合した状態でチャネルが閉じることにより引き起こされる (Macdonald and Twyman, 1992)。アニサチン処理により 2 つの短い閉時間は変化しなかったことから、アニサチンはこの状態には影響を及ぼさないと考えられる。遅いタイムコンスタントを持つ 2 つの成分はアニサチン処理により有意に長くなったことから、アニサチンの抑制作用は GABA_A レセプターにおいて開頻度を低下させたためであることが示された。

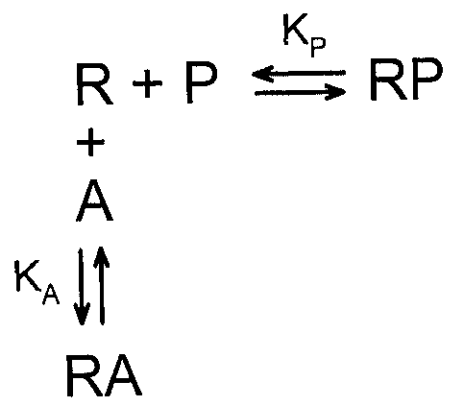
O₁ と B₁ のタイムコンスタントは互いに類似した値だったので、B₁ は単一の O₁ で構成され、B₂ と B₃ は複数の O₂ と O₃ で構成されていることが示唆された。バースト持続時間はアニサチンによって短くなった。これはアニサチン処理によりバーストあたりの平均の開時間は変化しなかったが、閉じた回数は減少したことから、バーストあたりの開いた回数の減少によるものと考えられる。ピクロトキシンも同様にバーストあたりの平均開時間と開いた回数を減少させることにより GABA 誘導性イオン電流を抑制する (Twyman et al., 1989)。バーストあたりの開いた回数を減少させることによってバースト持続時間を短くするという点においてはアニサチンとピクロトキシンの電流抑制のメカニズムは類似している。しかし、ピクロトキシンは平均開時間を減少させるのでこの 2 つの化合物の作用機構は完全に同一のものではないことが示された。すでに述べたように、殺虫剤のディルドリンは GABA_A レセプターおよび RDL-GABA レセプターに作用し、ピクロトキシンと同じ部位に結合した (Bloomquist et al., 1992; Casida and Lawrence, 1985; Eldefrawi and Eldefrawi, 1987; Matsumura and

Ghiasuddin, 1983; Nagata and Narahashi, 1994)。ゴキブリの神経細胞においてノイズ解析法を用いた実験が行われ、ディルドリンは平均の開時間を変えずチャネルの開頻度を低下させた (Bermudez et al., 1991)。従って、アニサチンとディルドリンの作用は類似しており、両薬剤の詳細な解析による作用機構の比較は今後の課題となる。

2. アニサチンの結合部位

アニサチンとピクロトキシニンの相互作用を検討した結果、両化合物は結合部位を共有している可能性が示された (Fig. 33)。この結果の有意性を Fig. 18 と同様に、2つのモデル (1 サイトモデルと 2 サイトモデル) を用いて再検討した (Fig. 34)。1 サイトモデルではアニサチン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 サイトモデルではアニサチン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 はアニサチンおよびピクロトキシニンが結合するレセプターを示す。A はアニサチン分子を、P はピクロトキシニン分子を表す。RA はアニサチンが結合した GABA_A レセプターを表し、この状態の GABA_A レセプターはアニサチン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。RPA はアニサチン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には、アニサチン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、2 サイトモデルにのみ示されている。RPA はアニサチンとピクロトキシニン両方により抑制を受けている GABA_A レセプターの状態を示す。また、K_A および K_P はそれぞれ、アニサチンおよび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アニサチン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 とアニサチンが結合した RA の二種類である。2 サイト

1 site model



2 site model

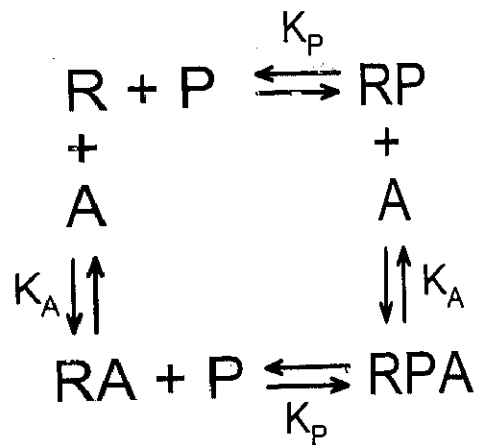


Fig. 34. One-site model and two-site model for interactions of anisatin (A) and picrotoxinin (P) with the GABA_A receptor (R). RA, anisatin-bound receptor; RP, picrotoxinin-bound receptor; RPA, picrotoxinin- and anisatin-bound receptor; K_A and K_P, the equilibrium dissociation constants for anisatin and picrotoxinin binding, respectively.

モデルにおいて、アニサチンとピクロトキシニンと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。そのため、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ピクロトキシニンが結合した RP、アニサチンが結合した RA、およびピクロトキシニンおよびアニサチンが結合した RPA 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 レセプターのうち、アニサチンやピクロトキシニンにより抑制された GABA_A レセプターの割合 (RP、RA、RPA) 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 (3)、2 サイトモデルにおける抑制度を表す式は (4) に示した。

$$RP+RA=R_T([P]/K_p+[A]/K_A)/(1+[P]/K_p+[A]/K_A) \quad (3)$$

$$RP+RA+RPA=R_T([P]/K_p+[A]/K_A+[P][A]/K_pK_A)/(1+[P]/K_p+[A]/K_A+[P][A]/K_pK_A) \quad (4)$$

R_T は全 GABA_A レセプターを表し、この場合測定している細胞の膜上に存在する全ての GABA_A レセプターを示す。[P]と[A]はピクロトキシニンおよびアニサチンの濃度を示す。ピクロトキシニン存在下におけるアニサチンによる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. 35)。実線は 1 サイトモデルから得られた等式 1 を示し、破線は 2 サイトモデルから得られた等式 2 を示している。K_A の値はアニサチンの IC₅₀ 値で Fig. 26 で得られた値から 1.1 μM とした。K_p の値はピクロトキシニンの IC₅₀ 値で Fig. 33 で得られた値、0.42 μM とした。これらの値を用いて、式 3、4 により Fig. 35 に示した fitting 曲線を得た。実測値 (●) はピクロトキシニン濃度が低いとき 2 サイトモデルから得られた fitting 曲線に近く、ピクロトキシニン濃度が高いときは 1 サイトモデルから得られた fitting 曲線に近かった。アニサチンとピクロトキシニンの作用は GABA と同時処理して測定した。また、これら薬剤の処理時間は 5 sec と長いことから、アニサチンおよびピクロトキシニンは主に活性化チャンネルに作用していると考えられた。ピクロトキシニン低濃度と高濃度の時でアニサチンとの相互作用に違いが生じた原

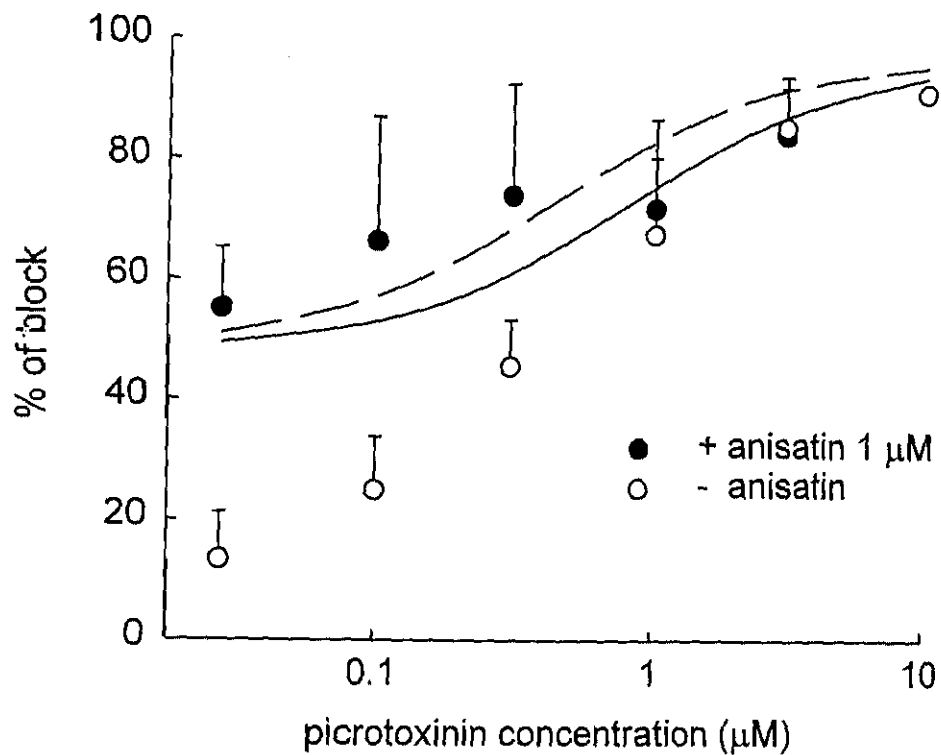


Fig. 35 The effect of picROTOXIN on anisatin suppression of GABA-induced currents. Dose-response relationships for picROTOXIN suppression of GABA-induced currents were determined in the absence (open circles) and the presence (closed circles) of 1 μ M anisatin. Dose-response relationship in the presence of anisatin were fitted by two equations described in the text. Solid line depicts the fit of data with a logistic eq. 3 (one-site model). Dotted line depicts the fit of data with a logistic eq. 4 (two-site model). The K_P and K_A values were set to 0.42 and 1.1 μ M, respectively.

因について、ピクロトキシニンの GABA_A レセプターにおける作用性が低濃度と高濃度の時で異なるためであると考えた。

3章の考察で述べたが、ピクロトキシニンは GABA_A レセプター上に2カ所結合部位を持つ可能性が示されており (Li and Pearce, 2000; Yoon et al., 1993)、それらの結合部位はチャンネル孔の浅い部分と深部であると推察した。活性化チャンネルにおいてはそのどちらの結合部位にもピクロトキシニンは作用すると考えられる。さらに、ピクロトキシニンが低濃度の時、ピクロトキシニンは主に容易に接近できる浅部の結合部位に作用し、濃度が高くなるに従いピクロトキシニンは細胞内部に侵入し、徐々に深部の結合部位に対して結合を開始すると考えられる。

以上の様に考察すると、ピクロトキシニンが低濃度の時はアニサチンはピクロトキシニン深部結合部位に作用し、両化合物は異なる結合部位に作用するという2サイトモデルが適合した。一方、ピクロトキシニンが高濃度の時は、深部結合部位においてもピクロトキシニンは結合するため、同部位でアニサチンとピクロトキシニンは競合する。従って、両化合物は同一部位に結合すると仮定した1サイトモデルに適合した。Fig. 33においてピクロトキシニン濃度が高いとき、アニサチンによる抑制が低濃度側と比較してほとんど見られなかった理由は、深部結合部位でピクロトキシニンと競合していたためであると考えられる。これらのことから、アニサチンとピクロトキシニンは深部結合部位において作用点を共有している可能性が示された。

Fig. 19で1 μM および3 μM の2点から推定したピクロトキシニンの IC_{50} 値は2.8 μM であった。本章において推定した IC_{50} 値と差が生じた主な原因として、実験条件の違いが考えられる。Fig. 19ではGABAを10 msec処理することによりピクロトキシニンの電流抑制度を測定した。一方、Fig. 33においてはGABAを5 sec細胞に処理することによりピクロトキシニンの抑制度を測定した。ピクロトキシニンの作用はGABAによるチャンネルの活性化により促進され、活性化チャンネルにおいて IC_{50} は小さな値を取ることが示されている (Dillon et al., 1995)。Fig. 33の実験条件は活性化チャンネルに対するピクロトキシニンの作用であ

り、 Fig. 19 は静止状態のチャネルに対する作用であることから、Fig. 33 で測定された IC_{50} 値は Fig. 19 によるものよりも小さな値をとったと考えた。