

# *Aplysia kurodai* 神経節細胞の GABA<sub>A</sub>-receptor activity に対する pentobarbital と diazepam の効果

染井 宏祐, 大江 政彦, 枋内 明啓, 依田 淳一  
山内 禎, 三浦 廣行\*, 石川 富士郎\*

岩手医科大学歯学部口腔生理学講座

(主任代理: 佐藤 匡 助教授)

岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座\*

(主任: 石川 富士郎 教授)

(受付: 1996 年 6 月 14 日)

(受理: 1996 年 7 月 25 日)

**Abstract** : We investigated the effect of pentobarbital and diazepam on activities of GABA-receptor, using current clamp and voltage clamp methods. Perfusion of GABA was applied to the ganglion cells of *Aplysia kurodai* to induce the activities of GABA-receptor. GABA<sub>A</sub>-receptor was used in this studies. The GABA-induced H<sub>Cl</sub>-type response was suppressed by picrotoxin and bicuculline which had been antagonist of GABA<sub>A</sub>-receptor. The GABA-receptor of this type is called the GABA<sub>A</sub>-receptor. We used to do this experiment GABA<sub>A</sub>-receptor. Both pentobarbital and diazepam with the lower concentration (10<sup>-6</sup> M) enhanced Cl<sup>-</sup>-dependent hyperpolarizing response to GABA. However, pentobarbital and diazepam with the concentration of above 10<sup>-5</sup> M suppressed Cl<sup>-</sup>-dependent hyperpolarizing response to GABA. The mode of suppression was studied by plottings dose-inhibition curve for GABA<sub>A</sub>-type of receptor activities. The curve showed no shift in either direction with increase in GABA. These findings indicated that pentobarbital and diazepam suppressed the GABA<sub>A</sub>-receptor with noncompetitive mode.

These results suggest that neither pentobarbital nor diazepam compete with GABA for common binding site of the receptor, but it bind to a certain allosteric site, which controls the opening ionic channel, particularly for Cl<sup>-</sup>.

**Key words** : GABA<sub>A</sub>-receptor, pentobarbital, diazepam

## 緒 言

GABA<sub>A</sub>-receptor の Cl<sup>-</sup> チャネルは種々の薬物によってアロステリックに調節されており, diazepam のような抗不安薬, barbiturates のような催眠導入薬, さらには picrotoxin や penicillin のような痙攣を引き起こすような薬

物など, 中枢神経作用薬が結合する部位を持っている<sup>1)</sup>。

Benzodiazepine や barbiturates は Cl<sup>-</sup> チャネルに対して促進的に作用し, 一方, picrotoxin や penicillin は抑制的に作用することが知られている<sup>2)</sup>。枋内は<sup>3)</sup>, 歯科臨床で頻

Effect of pentobarbital and diazepam on GABA-activated Cl<sup>-</sup> conductance observed in *Aplysia kurodai* ganglion cells.

Kohsuke SOMEI, Masahiko OOE, Akihiro TOCHINAI, Junichi YODA, Tei YAMAUCHI, Hiroyuki MIURA\*, and Fujiro ISHIKAWA\*

(Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

繁に使用されている局所麻酔薬の lidocaine が, *Aplysia kurodai* の ganglion cell の GABA<sub>A</sub>-receptor activity を dose-dependent に抑制し, さらにその抑制が抗痙攣薬の diazepam の投与により回復することなどから, lidocaine による GABA<sub>A</sub>-receptor activity の抑制が痙攣を引き起こすと推定している。

また, 痙攣モデルとしてしばしば lidocaine の全身投与が行われることなどからも明らかに, 抑制性伝達物質の中でも特に GABA が最も痙攣の発現と関わりを持つと推定されている<sup>4)</sup>。さらに GABA<sub>A</sub>-receptor の Cl<sup>-</sup> チャネルの周囲に抗痙攣薬や痙攣薬の作用部位が存在することからも<sup>1)</sup>, 著者らは lidocaine によって引き起こされる痙攣のメカニズムの一つとして GABA<sub>A</sub>-receptor activity の抑制を考えてきた。

栃内<sup>3)</sup>は lidocaine の投与による GABA<sub>A</sub>-receptor に対する阻害様式を解析し, lidocaine は noncompetitive に GABA<sub>A</sub>-receptor activity を阻害することを見出した。また, diazepam の前投与によって lidocaine の阻害効果が著しく抑制された知見などから, diazepam と lidocaine との結合部位が部分的に拮抗する可能性を示唆した。

また, Mathers and Barker<sup>5)</sup> は mouse および chick の spinal cord の培養細胞を用いた実験で, benzodiazepine や barbiturates によって Cl<sup>-</sup> コンダクタンスの増大が発現することを報告し, このコンダクタンスの増大は使用した薬物の濃度に依存せず, あらゆる濃度で増大効果を見ている。

一方, Olsen<sup>6)</sup> や Macdonald et al.<sup>6)</sup> は Cl<sup>-</sup> コンダクタンスの増大が benzodiazepine や barbiturates の低濃度領域で起こることを報告しており, Cote and Wilson<sup>7)</sup> は著者らと同じ *Aplysia californica* の ganglion cell の GABA<sub>A</sub>-receptor activity が pentobarbital により常に抑制されたことを報告している。

本研究では barbiturate 系の pentobarbital と benzodiazepin 系の diazepam の 2 種類の

薬物が, どのような機序によって GABA<sub>A</sub>-receptor activity を変化させるか, 著者らが従来から receptor 解析に使用している *Aplysia kurodai* の ganglion cell に存在する GABA<sub>A</sub>-receptor の activity を指標として単一細胞レベルで検討したので報告する。

## 材 料 と 方 法

### 1. 実験材料

#### (1) 標本の作製

海産軟体動物 *Aplysia kurodai* の腹部神経節を体外に摘出し, 灌流装置に固定してから, 結合組織を実体顕微鏡下で丁寧に剥離し, 個々の神経細胞を露出し, おのおのが灌流液に直接, 接触するようにした。

#### (2) 灌流液

灌流液は Sato et al.<sup>9)</sup> によって創製された *Aplysia kurodai* 用の人工血液 (Na<sup>+</sup> 587, K<sup>+</sup> + 12, Cl<sup>-</sup> 671, Ca<sup>2+</sup> 14, Mg<sup>2+</sup> 52 mM/L) を用い, Tris buffer と HCl で pH 7.4 に調製して用いた。

#### (3) 使用薬物

GABA, acetylcholine (ACh)-chloride, picrotoxin, bicuculine, そして K-citrate は Sigma Chemical (St, Louis, IL, U. S. A) より購入し, pentobarbital-sodium は東京化成より購入した。また, diazepam は武田薬品工業 (Osaka Japan) より供与を受けた。

#### (4) 実験装置

本実験に使用した電気回路は次の三要素より成る。a) voltage probing unit (膜電位検出部), b) current probing unit (膜電流検出部), c) voltage または current clamp unit (膜電位または膜電流固定部), b), c) の要素に含まれる operational amplifier は, いずれも Tektronix 製, AM501 型 (open loop gain × 10,000) 出力 ± 40 V を使用した。また, 膜電位記録のための preamplifier は WPI 製, 701 型 (gain × 1, × 5; 入力インピーダンス 20,000 MΩ 以上; 実効入力容量補償回路付) を使用した。Command signal 発生装置は日本光電製,

SEN-103 型の刺激装置を使用した。最終出力である膜電位と膜電流は、陰極線オシロスコープ (Tektronix 製 PN 333-1425 型) およびインクライター (渡辺測器製 WTR 331 型) で同時記録した。

## 2. 実験方法

### (1) 灌流方法

灌流液の温度は 15°C に保ち、標本の置かれている灌流プールの実効容積は 0.2 ml で、これを一定流速 0.08 ml/sec で灌流した。

また、薬物を投与する場合には、*Aplysia kurodai* 用人工血液で必要な濃度に希釈して作り、灌流装置を通じて投与した。

本実験では、著者が先の実験<sup>10)</sup>で acetylcholine 投与の際に用いた式  $T = 15 \times 2^{-\log(A)}$  に基づいて GABA の投与時間を決定した。そして GABA の投与時間 (T, 秒) を上記の式より求め、各 GABA 濃度 (A, mM) に対する最大の応答を測定した。また、各濃度の pentobarbital や diazepam を同一の細胞に経時的に投与して濃度効果を調べる場合には、各薬物の累積効果を防止するため各薬物投与後、5 分から 10 分間、細胞を人工血液でリンスした後に GABA 応答を調べ、コントロールと等しくなったことを確認してから種々の薬物を投与した。

### (2) GABA に対する単一細胞の応答の記録

*Aplysia kurodai* 神経節内の一つの細胞に 2 本のガラス微小電極を刺入し、1 本は膜電位の記録に使用し、他方は細胞膜を横切って電流を流すために使用した。電極内に充填する電解質は通常 3 M KCl を使用するが、本実験では Cl<sup>-</sup> 電流を測定することおよび細胞内に Cl<sup>-</sup> が漏洩することを防ぐために 1.8 M K-citrate を使用した。電極抵抗は 5-10 MΩ で先端の直径は 0.5 μm 以下であった。

#### a) 膜電流固定法

GABA によって引き起こされる細胞応答の大きさの判定には、receptor activity で発生するイオン透過性の増大を指標とし、これを細胞膜のコンダクタンス増加量  $\Delta G = G_{\text{GABA}} - G_0$  と

して測定した<sup>11)</sup>。G<sub>0</sub>, G<sub>GABA</sub> はそれぞれ静止膜および GABA に応答中の膜コンダクタンスとした。GABA 投与で引き起こされる  $\Delta G$  が pentobarbital や diazepam 投与でどのように変化するかを概略的に観察する場合には、 $\Delta G$  の測定法として電流固定法を用いた。

#### b) 膜電位固定法

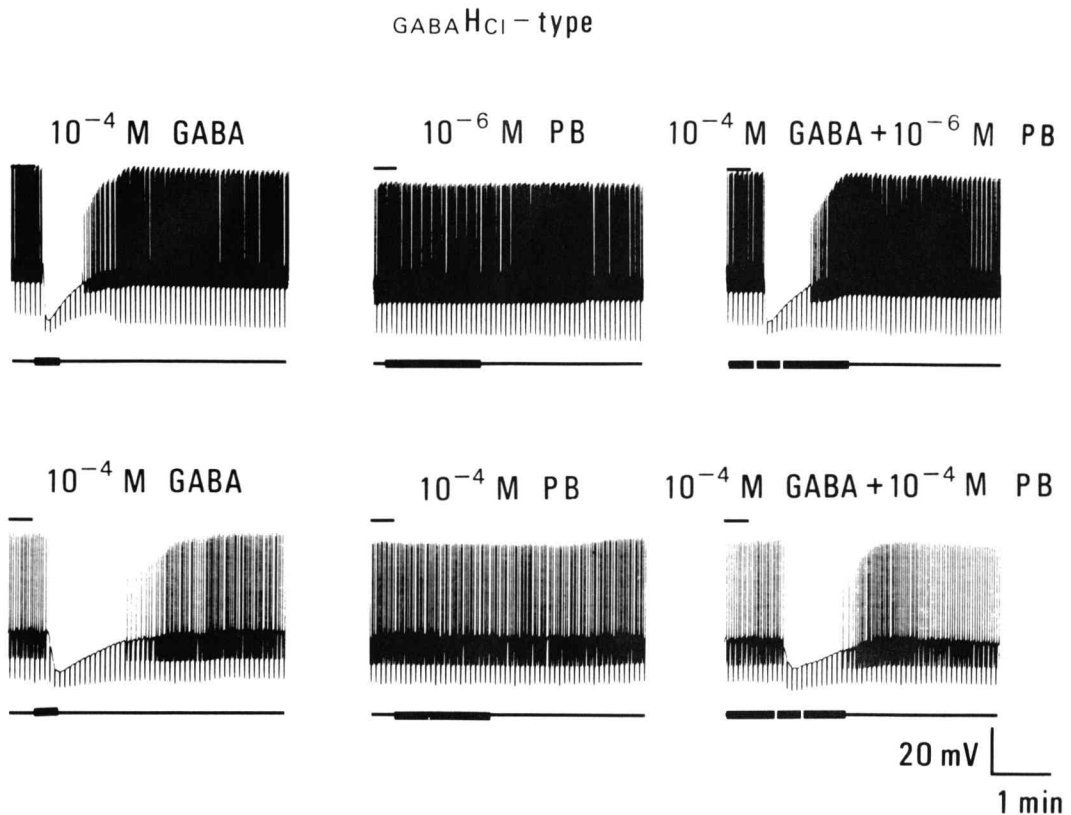
一般に GABA で引き起こされる膜コンダクタンスの変化 ( $\Delta G$ ) は、静止膜電位 (E<sub>0</sub>) によって多少影響されるために、 $\Delta G$  の測定中に膜電位変化 ( $\Delta E$ ) が常に 0 になるように膜電位固定法を用いた。この方法で  $\Delta G$  を測定するために小さな電圧 signal ( $\Delta V$ ) を operational amplifier の commander に入れ、それを発生させるに要する膜電流の値  $\Delta I$  を測定した<sup>12)</sup>。また、この方法を用いて GABA 投与前 ( $\Delta I_0$ ) と GABA 応答中の最大値  $\Delta I_{\text{GABA}}$  を比較することにより、GABA で引き起こされた  $\Delta G$  を求めた。

### (3) GABA<sub>A</sub>-receptor の同定

Frazier et al.<sup>13)</sup> の命名を参考にして GABA 投与で過分極性応答を引き起こす細胞を H 型とし (Fig. 1), 逆に脱分極性応答を引き起こす細胞を D 型とした (Fig. 2)。H 型の応答は receptor membrane の Cl<sup>-</sup> の透過性増大によるもので、著者らの研究室では H<sub>Cl</sub> 型の receptor を持つ細胞 (Frazier et al.<sup>13)</sup> の分類の RB, RC グループの集団が最も多く観察された。) と名付けた。

一方、D 型の応答を示す GABA-receptor も一部観察されたが、この応答は主として receptor membrane に対する Na<sup>+</sup> の透過性増大によるもので D<sub>Na</sub> 型の receptor を持つ細胞、または D<sub>Na</sub> 型の応答をする細胞と名付けた。しかし、D<sub>Na</sub> 型は数が少なく、本実験で調べた結果 Frazier et al.<sup>13)</sup> の分類の L<sub>8</sub> の下部で L<sub>9</sub> の右側にわずかに存在するだけであった。

本実験では、H<sub>Cl</sub> 型を持つ細胞を局在性で見当をつけ、次いで GABA を投与しその応答とそれに関与するイオン種が Cl<sup>-</sup> であることを確認するために、low-Cl<sup>-</sup> の *Aplysia kurodai* 人



**Fig.1.** Effects of pentobarbital (PB) on  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-induced response of the H<sub>Cl</sub>-type. Responses to  $10^{-4}$ M GABA are shown on the left as controls. The middle column shows the effect of PB ( $10^{-6}$  and  $10^{-4}$ M) on the resting membranes. Responses to GABA mixed with PB are shown on the right. All records in each row were obtained from the same cell. The horizontal bar on the left shoulder of each trace indicates extracellular potential level in virtually ground. The downward lines appearing periodically from the base line are the index of membrane resistance, measured by constant current method. The thick portions of the bottom line indicates the time of drug administration. The upper part of the spike discharge was clipped.

工血液の NaCl を sodium propionate で置換して応答がないことを確認した。さらに GABA 応答の逆転電位の変動を Nernst の式より得られた理論値と比較して、Cl<sup>-</sup> の平衡電位 (-70 mV) とほぼ等しく、また、GABA<sub>A</sub> アンタゴニストの picrotoxin や bicuculine の投与で、この応答が阻害されることなどを確認してから実験を行った。

## 結 果

### 1. 静止膜におよぼす pentobarbital, diazepam の効果

$10^{-8}$ M から  $10^{-3}$ M pentobarbital と  $10^{-6}$ M から  $10^{-4}$ M diazepam をそれぞれ 30 秒から 5 分間単独で投与し、静止膜に及ぼす効果を観察すると pentobarbital では多くの細胞 (80 個中 76 個) は、細胞の種類や receptor の種類を問わず、静止電位および静止膜抵抗には何の変化も観測できなかった (Fig.1)。

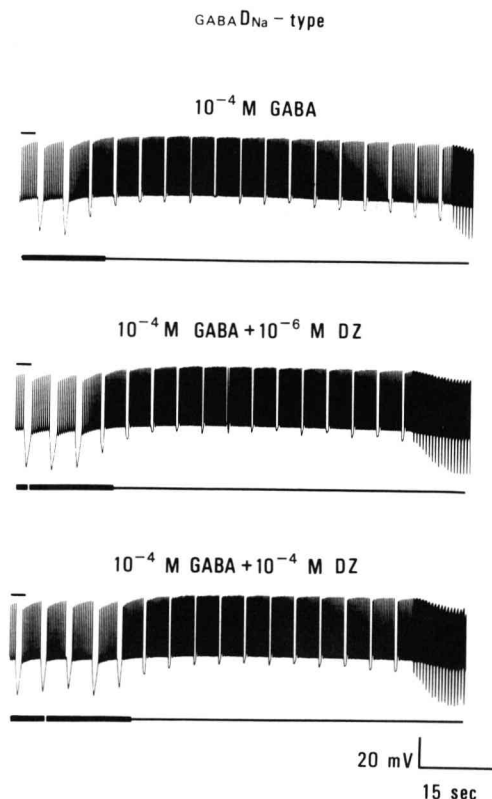


Fig.2. Effects of diazepam (DZ) on the GABA-induced responses of the D<sub>Na</sub>-type. Response to  $10^{-4}$ M GABA is shown on the upper as control. Responses to GABA mixed with DZ are shown on the middle and lower trace. Other nomenclatures are the same as those of Fig.1.

また、上記濃度の diazepam 投与ではすべての細胞 (40 個) で何の変化も観察されなかった (Fig.3)。

## 2. GABA<sub>A</sub>-receptor activity におよぼす pentobarbital の効果

$10^{-4}$ M GABAを30秒間投与すると、この型の receptorを持つ細胞は、5mVから10mV におよぶ過分極を示し、同時に膜抵抗は著明に減少した (Fig.1)。このような GABA 応答を数多くの細胞より記録し、おのおのをコントロールとした。次に  $10^{-8}$ M から  $10^{-3}$ M pentobarbital を GABA を投与する前に 5 分間、前投与し、十分インキュベートした後に、 $10^{-4}$ M GABA を投与すると  $10^{-6}$ M pentobarbital の前投与で

$10^{-4}$ M GABA 応答はやや増強された (Fig.1)。また、膜コンダクタンスを測定するとコンダクタンスの増大 ( $\Delta G$ ) はコントロールの約 130% となり、30% 増大していることが分かった。そして pentobarbital の濃度を  $10^{-4}$ M にすると GABA 応答は逆に抑制された (Fig.1)。コンダクタンスの測定を行うとコントロールの約 70% に減少することが分かった。

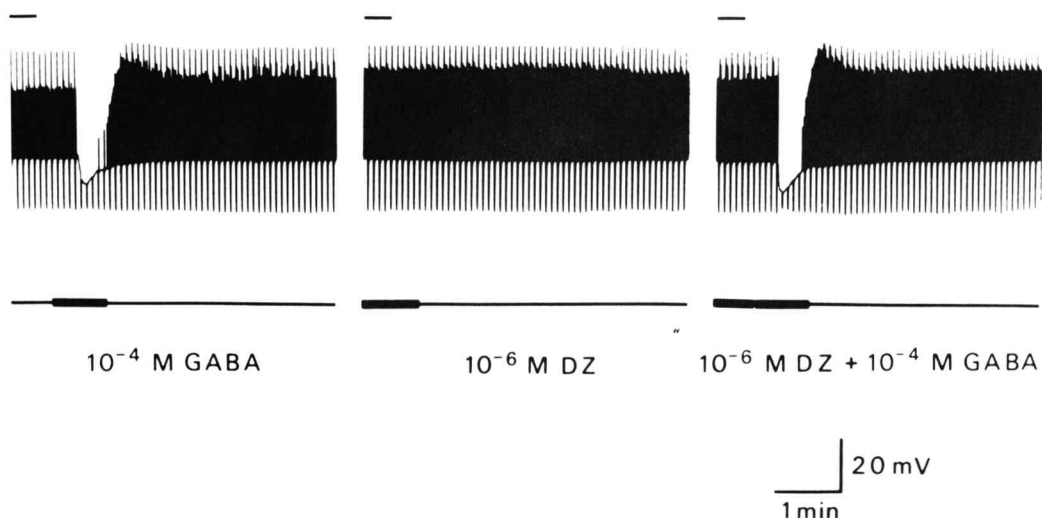
次に種々の濃度の pentobarbital を同一細胞に順次前投与し、pentobarbital によるこの種の GABA 応答 ( $\Delta G$ ) に対する増強および阻害効果を定量的に調べた。Fig.4 の縦軸は一定濃度の GABA を単独で投与し、作用させた時の応答 ( $\Delta G$ ) をコントロール (100%) とし、その細胞に種々の濃度の pentobarbital を前投与してから、一定濃度の GABA を投与したときの応答の大きさをコントロールに対する相対値 (%) で表わした<sup>14)</sup>。

GABA の濃度を  $10^{-4}$ M より  $10^{-3}$ M まで高くした時の曲線の推移を各々 7 個から 8 個の細胞について調べてみたが、曲線は左右方向に有意の推移を示さなかった ( $P < 0.05$ , Fig.4)。すなわち GABA<sub>A</sub>-receptor activity に対する pentobarbital の阻害様式は、noncompetitive と見なすことが出来る。しかし、pentobarbital の低濃度  $10^{-6}$ M では GABA 応答は  $112 \pm 8\%$  ( $N = 18$ ) となり、GABA 応答が増強されていた。

## 3. GABA<sub>A</sub>-receptor に対する diazepam の効果

$10^{-4}$ M GABA を投与し膜抵抗減少の過分極性応答を示した細胞に対して、 $10^{-6}$ M diazepam を 5 分間前投与してから  $10^{-4}$ M GABA を投与すると、GABA 応答はコントロールに比べて過分極の大きさおよび応答の最大値での抵抗変化も小さくなり、GABA 応答は増強することが観察された (Fig.3)。しかし、D<sub>Na</sub> 型 GABA-receptor に  $10^{-6}$ M、 $10^{-4}$ M の diazepam を投与しても、この型の GABA 応答には何等の変化も示さなかった (Fig.2)。

次に diazepam を高濃度にし、 $10^{-5}$ M

GABA<sub>HCl</sub>-type

**Fig.3.** Effects of diazepam (DZ) on the GABA-induced response of the H<sub>Cl</sub>-type. Response to  $10^{-4}$ M GABA is shown on the left as control. The middle trace shows the effect of  $10^{-6}$ M DZ on the resting membrane. Response to GABA mixed with DZ is shown on the right. Other nomenclatures are the same as those of Fig.1.

diazepamを前投与してからGABA濃度を $3 \times 10^{-5}$  Mから $10^{-3}$  Mに変化させて投与したときの応答を、定量的に調べた。Fig.5の縦軸はGABAの相対応答、横軸にGABAの濃度を対数でプロットした。GABA単独投与で得られた曲線を基準とし、GABA濃度を $3 \times 10^{-5}$  Mから $10^{-3}$  Mの高濃度になると、GABA応答は濃度依存性に大きくなった。GABA応答を増大する濃度 $10^{-6}$  M diazepamを5分間、前投与してから種々の濃度のGABAを投与すると曲線はGABA単独投与で得られた曲線より上方に位置し、GABA応答は常に増強することが認められた。また、使用GABA濃度が最高濃度の $10^{-3}$  Mの時にGABA応答に対する増大効果が最高となり、GABA単独投与で得られた応答に比べ約50%も増大していることが分かった。次に $10^{-4}$  M diazepamを5分間、前投与し、GABA応答を調べてみると曲線はGABA単独投与で得られた曲線より下方に位置し、使用したGABA最高濃度の $10^{-3}$  Mで抑制が最大となり、GABA単独投与で得られ

た応答を約40%抑制した。

これらの結果からdiazepamはGABA応答に対して低濃度域では増強し、高濃度域では抑制的に作用した。

## 考 察

*Aplysia kurodai* 神経節細胞のGABA<sub>A</sub>-receptor activityに対するpentobarbitalとdiazepamの効果を調べた。pentobarbitalはbarbiturate系薬物の一つで臨床的に鎮静、催眠、全身麻酔そして抗痙攣に対して使用されている。しかし、Rogawski and Porter<sup>15)</sup>はpentobarbitalについては抗痙攣用量でも強力に中枢神経を抑制するため痙攣の治療に対しては不適當であると報告している。一方、Olsen<sup>1)</sup>やMacdonald et al.<sup>7)</sup>は低濃度のpentobarbitalによりGABA-activated Cl<sup>-</sup>コンダクタンスの増強が起こることを報告している。本実験ではGABA<sub>A</sub>-receptor activityに対する種々の濃度のpentobarbitalの効果を調べ、抗痙攣用量の $10^{-6}$  M pentobarbitalを前投与するとGABA<sub>A</sub>-

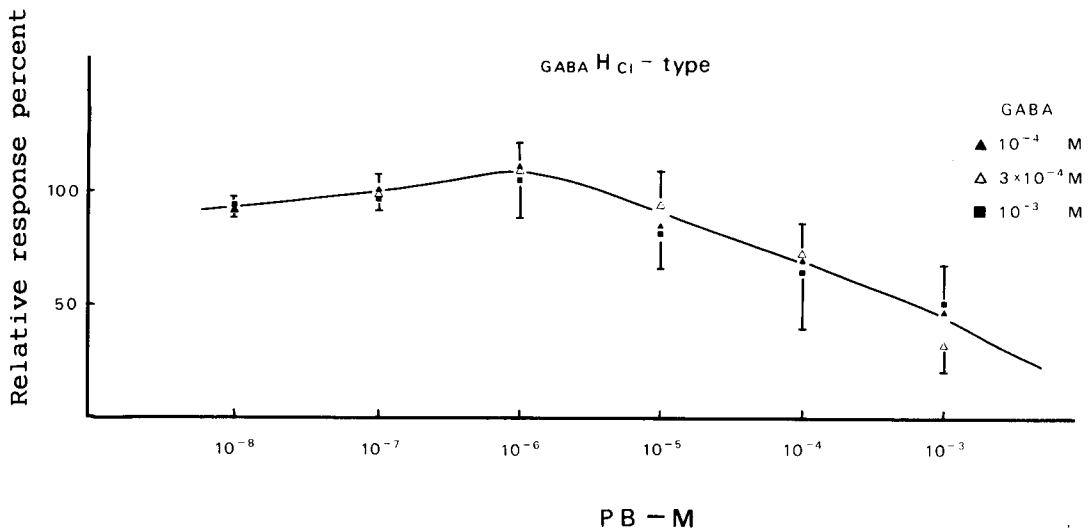


Fig.4. Dose-inhibition curve with pentobarbital (PB) obtained from the HCl-type of receptor membranes. A conductance increase ( $\Delta G$ ) produced by a given concentration of GABA was taken as 100% and its relative changes at pentobarbital concentrations were expressed in % on the ordinate. All  $\Delta G$ 's were measured by "modulated resting clamp" method. The curve was drawn from the average of 30 cells measured at a given concentration of PB with different GABA concentrations. Different symbols for each point shown on the right, indicate the GABA concentrations. Each point indicates the average change in  $\Delta G$  measured from 5 cells at a given concentration of GABA, with a vertical bar indicating S.D..

receptor activityが増強していることが分かった。また、pentobarbitalの濃度を $10^{-6}$  Mよりさらに低濃度の $10^{-7}$  M,  $10^{-8}$  MにしたときにはGABA<sub>A</sub>-receptor activityに対してほとんど何の変化も認められなかった (Fig.4)。

これらの結果より pentobarbital の前投与による GABA<sub>A</sub>-receptor activity の増強は比較的低濃度の $10^{-6}$  Mで起こることが示唆された。Cote and Wilson<sup>8)</sup>は *Aplysia californica* の GABA-activated Cl<sup>-</sup>コンダクタンスが pentobarbital で抑制されることを報告しているが、この時使用した pentobarbital の濃度が濃く $10^{-4}$  M以上であることから GABA 応答に対する増強が見られなかったものと考えられる。

また、pentobarbital の濃度を高くしたときに見られる阻害様式は、dose-inhibition curves<sup>14)</sup>より noncompetitive であることが分かった。そのことより、pentobarbital は

GABA<sub>A</sub>-receptor の activation によって開く Cl<sup>-</sup>チャンネルと GABA の結合部位を機能的に仲介する部位、あるいはその近傍にあるアロステリック部位に結合して receptor activity を間接的に阻害しているものと考えられる。

さらに diazepam については dose-inhibition curve の解析より<sup>3)</sup>、阻害様式は noncompetitive であることから、diazepam の結合部位も pentobarbital と同じように Cl<sup>-</sup>チャンネルと GABA の結合部位を機能的に仲介する部位、あるいはその近傍にあるアロステリック部位に結合して receptor activity を間接的に阻害しているものと推測される。しかし、pentobarbital と diazepam の結合部位が共有する部位か、否かについては本研究からは明らかにすることはできなかった。

染井<sup>10)</sup>は cholinergic な3つの receptor activity に対する barbiturates (pentobarbital & phenobarbital) の阻害効果について報告し、

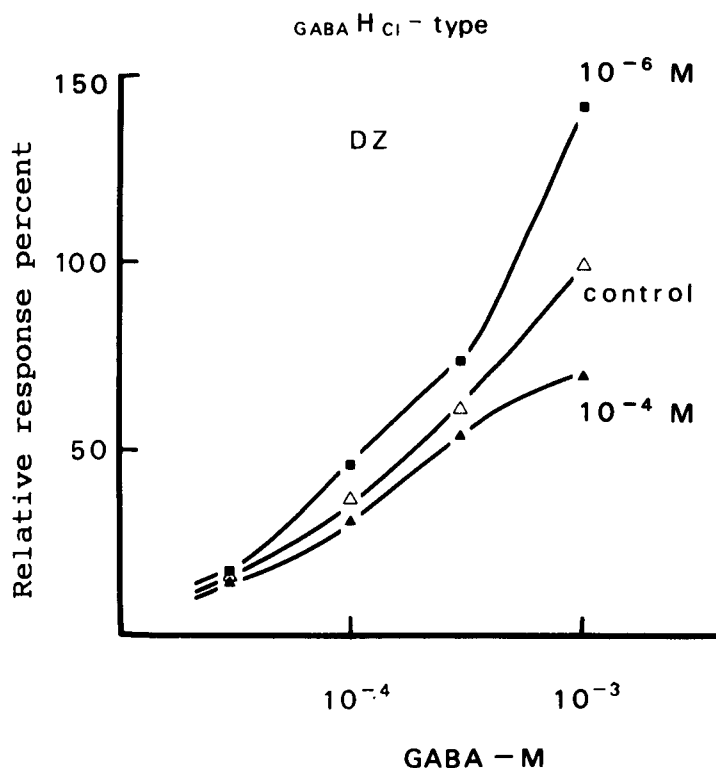


Fig.5. Dose-response curve with diazepam (DZ) obtained from the  $H_{Cl}$ -type of receptor membrane. A conductance increase ( $\Delta G$ ) produced by a given  $10^{-3}M$  GABA was taken as 100% and its relative changes at the concentrations of  $10^{-6}M$  and  $10^{-4}M$  DZ were expressed in % on the ordinate.

GABA<sub>A</sub>-receptorと同じacetylcholine (ACh)投与で膜の $Cl^-$ 透過性増大による過分極性応答を引き起こす型( $A_{Ch}H_{Cl}$ )でも, GABA<sub>A</sub>-receptorとほぼ同じ阻害効果および阻害様式を示すことを報告している。本実験ではGABA<sub>A</sub>-receptor activityを増強させる $10^{-6}M$  pentobarbitalの投与を行ったところ,  $A_{Ch}H_{Cl}$ 型では多少の増強 $104 \pm 5\%$  ( $N=5$ )が見られた (Fig.6)。しかし, 他の型のACh-receptor,  $Na^+$ 透過性増大で脱分極する $D_{Na}$ 型および $K^+$ 透過性増大で過分極する $H_K$ 型では何等の変化も観察されないことを確認した。このことから低濃度( $10^{-6}M$ )のpentobarbitalやdiazepamの増強作用は $Cl^-$ チャンネルに特異的な作用である可能性がある。しかし, この点に関しては $Cl^-$ チャンネルを有している種々のreceptorに

ついて, 定量的な検討を行うことが必要である。

最近, GABA<sub>A</sub>-receptorのサブタイプの解析が行われ, GABA<sub>A</sub>-receptorには $Cl^-$ チャンネルを取り囲むようにして $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ の3種類のサブユニットが存在することが明らかになった<sup>16)</sup>。そのうち,  $\alpha$ ,  $\beta$ サブユニットにはGABAとbarbituratesが結合する部位があり<sup>17)</sup>, また,  $\gamma$ サブユニットにはbenzodiazepineが結合する部位があると推定されている<sup>18)</sup>。その結果, pentobarbitalの投与で起こる $Cl^-$ コンダクタンスの増大は, それらのサブユニットの一つにpentobarbitalが結合すると, GABAに対する親和性が強まるためではないかと考えられている<sup>19)</sup>。しかし, 本実験ではGABAの低濃度域においてpentobarbitalやdiazepamによる



## ACh HCl - type

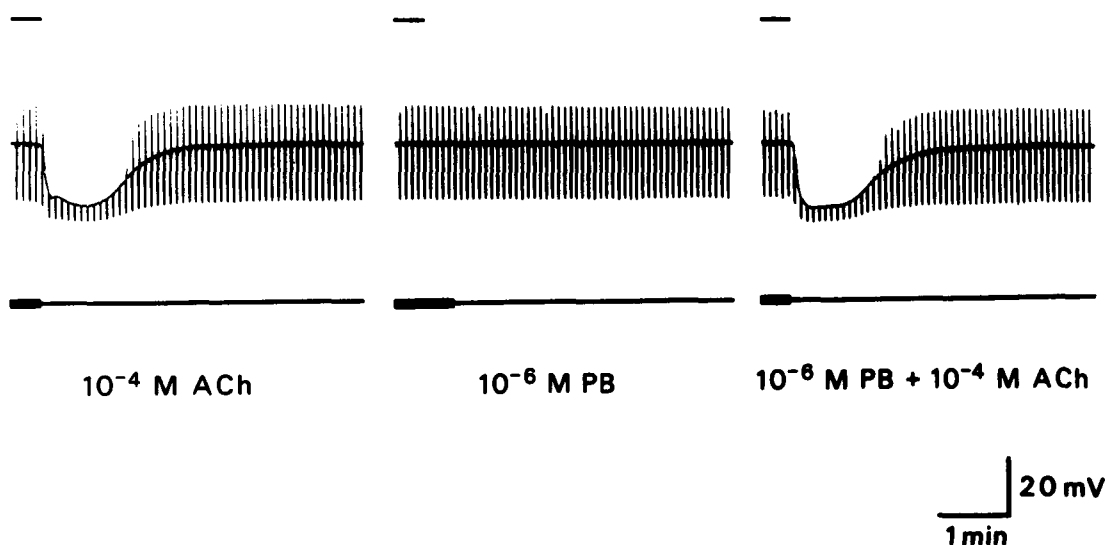


Fig.6. Effects of pentobarbital (PB) on the acetylcholine (ACh)-induced response of the H<sub>Cl</sub>-type. Response to  $10^{-4}$ M ACh is shown on the left as control. The middle trace is shown the effect of  $10^{-6}$ M PB on the resting membrane. Response to ACh mixed with PB is shown on the right. Other nomenclatures are the same as those of Fig.1.

増強がほとんどなく、むしろ GABA の高濃度で増強されることなどから、pentobarbital や diazepam が GABA に対する親和性を左右しているとは考えにくい。

また、dose-inhibition curve の解析から noncompetitive であることが示唆され、GABA と pentobarbital は別々の結合部位 ( $\alpha$  か  $\beta$  の何れか) を持ち、間接的に GABA の結合を阻害しているものと考えられる。しかし、この著者らの考察は Nicoll et al.<sup>18)</sup> が GABA と barbiturates は同じサブユニットに結合するのではないかと考えている仮説とは一致しない。また、柄内<sup>3)</sup>は diazepam の結合部位に関して、GABA の結合部位とは異なることを示唆しており、Nicoll et al.<sup>18)</sup> の  $\gamma$  サブユニットに結合するのではないかとという仮説を支持する結果を得ている。

さらに、著者が既に報告しているように<sup>10)</sup> ACh HCl 型に対する pentobarbital の投与で、

GABA<sub>A</sub>-receptor と同じような阻害効果や阻害様式、そして増強が得られたのは、Cl<sup>-</sup> チャネルを取り巻く GABA<sub>A</sub>-receptor のサブユニットと nicotinic-receptor サブユニットの構造が極めて類似している<sup>20)</sup> ために起こったものと考えられる。また、本実験で使用した diazepam は細胞内のある種の蛋白質リン酸化酵素の酵素活性を抑制する作用もあり、また、pentobarbital も protein kinase C との干渉作用を有することがウシガエル交感神経節<sup>21)</sup> や、rat の olfactory cortex<sup>22)</sup> におけるシナプス伝達の実験で報告されている。さらに麻酔薬の作用が細胞内の second messenger system で修飾されるかもしれないとの報告もあり<sup>23)</sup>、GABA の投与で desensitization (protein kinase C の酵素活性が高まり  $\gamma$  サブユニットに phosphorylation が起こった結果生じる)<sup>7)</sup> が起こりやすいことなどから、diazepam や pentobarbital の投与により細胞内の蛋白質リン酸化酵素の一つであ

る protein kinase C の酵素活性が抑制され, desensitization が遅れたために GABA<sub>A</sub>-receptor activity の増強が発現したとも考えられる。

これまで Maciver et al.<sup>24)</sup> や著者ら<sup>25)</sup> は, 麻酔薬の投与によって, 細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度に変化が起こることから, receptor やイオンチャネルなどについて細胞レベルで麻酔薬の作用機序の解明を行ってきた。しかし, 最近このような分子レベルでの作用についての報告が相次いであるところから, 今後, 麻酔や痙攣の本態を明らかにするためには, 細胞内情報伝達系との関与について詳細な検討を行う必要があると考えられる。

## 結 語

*Aplysia kurodai* の 2 種の GABA-receptor のうち, 痙攣の発現と密接に関わりがあると考えられている H<sub>Cl</sub> 型 GABA-receptor (GABA<sub>A</sub>-receptor) に対する pentobarbital と diazepam の効果を, receptor membrane のイオン透過性増大を指標として調べた結果を得た。

1. Pentobarbital, diazepam は, 低濃度域 (10<sup>-6</sup> M) では, 共に GABA-receptor activity を増強し, 高濃度域 (10<sup>-5</sup> M 以上) では receptor activity を阻害した。

2. 同じ Cl<sup>-</sup> チャネルを形成している ACh H<sub>Cl</sub> 型の応答も低濃度域では増強し, 高濃度域では阻害された。

3. Pentobarbital, diazepam による GABA<sub>A</sub>-receptor activity に対する阻害様式を dose-inhibition curve で調べると, ともに noncompetitive であることが分かった。

以上の結果より, pentobarbital および diazepam は GABA<sub>A</sub>-receptor の近傍に独立した結合部位をもち, アロステリックな効果として, イオンチャネル開口機構を間接的に増強あるいは阻害するものと推論される。

## 文 献

- 1) Olsen, R. W., Bureau, M. H., Endo, S., and Smith, G. : The GABA<sub>A</sub> receptor family in the mammalian brain. *Neurochem. Res.* 16 : 317-325, 1991.
- 2) Study, R. E., and Barker, J. L. : Diazepam and (-)pentobarbital ; fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of  $\gamma$ -aminobutyric acid responses in cultured central neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 : 7180-7184, 1981.
- 3) 栃内明啓 : GABA<sub>A</sub>-receptor の機能に対する lidocaine の阻害効果ならびに阻害様式, 岩医大歯誌, 19 : 169-178, 1994.
- 4) Macnamara, J. O. : Role of neurotransmitters in seizure mechanism in the kindling model of epilepsy. *Fed. Proc.* 43 : 2516, 1984.
- 5) Mathers, D. A., and Barker, J. L. : (-)-pentobarbital opens ion channels of long duration in cultured mouse spinal neurons. *Science* 209 : 507-509, 1980.
- 6) Olsen, R. W. : GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. *J. Neurochem.* 37 : 1-13, 1981.
- 7) Macdonald, R. L., Rogers, C. J., and Twyman, R. E. : Barbiturates regulation of kinetic properties of the GABA<sub>A</sub> receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *J. Physiol.* 417 : 483-500, 1989.
- 8) Cote, I. L., and Wilson, W. A. : Effects of barbiturates on inhibitory and excitatory responses to applied neurotransmitters in *Aplysia*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214 : 161-165, 1980.
- 9) Sato, M., Austin, G., Yai, H., and Maruhashi, J. : The ionic permeability changes during acetylcholine-induced responses of *Aplysia* ganglion cells. *J. Gen. Physiol.* 51 : 321-345, 1968.
- 10) 染井宏祐 : 種々の ACh-receptor の機能に対する pentobarbital- および phenobarbital-sodium の阻害効果ならびに阻害様式の比較, 日本生理誌, 43 : 529-541, 1981.
- 11) Ono, H., Sato, M., and Maruhashi, J. : The cholinergic excitatory and inhibitory postsynaptic responses of *Aplysia* ganglion cells during and after lithium-Ringer perfusion. *J. Neurobiol.* 5 : 43-63, 1974.
- 12) Matsumoto, M., Sasaki, K., Somei, K., and Sato, M. : Effects of onium derivatives on Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, and K-dependent acetylcholine receptors. *Jpn. J. Physiol.* 30 : 729-742, 1980.
- 13) Frazier, W. T., Kandel, E. R., Kupfermann, I., Waziri, R., and Coggeshall, R. E. : Morphological and functional properties of identified neurons in the abdominal ganglion of *Aplysia californica*.

- nica. *J. Neurophysiol.* 30 : 1288–1351, 1967.
- 14) Matsumoto, M., Sasaki, K., Somei, K., and Sato, M. : Dose-inhibition curve and its application to the analysis of ACh-receptor activity. *Jpn. J. Physiol.* 30 : 743–750, 1980.
  - 15) Rogawski, M. A., and Porter, R. J. : Anti-epileptic drugs pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol. Rev.* 42 : 223–286, 1990.
  - 16) Schofield, R. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A., Seeburg, P. H., and Barnard, E. A. : Sequence and functional expression of the GABA-A receptor shows a ligand-gated receptor superfamily. *Nature* 328 : 221–227, 1987.
  - 17) Olsen, R. W., and Tobin, A. : Molecular biology of GABA<sub>A</sub> receptors. *FASEB* 4 : 1469–1480, 1990.
  - 18) Nicoll, R. A., and Dutor, P. : Physiological roles of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors in synaptic transmission in the hippocampus. In: Barnard, E. A., and Costa, E. (eds.), *The allosteric modulation of amino acid receptors and its therapeutic implication*. Raven, New York. pp.195–204, 1989.
  - 19) Pritchett, D. B., Sontheimer, H., Shivers, B. D., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P. R., and Seeburg, P. H. : Importance of a novel GABA<sub>A</sub> receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 388 : 582–585, 1989.
  - 20) Changeux, J. P., Giraudat, J., and Dennis, M. : The nicotinic acetylcholine receptor : molecular architecture of a ligand regulation ion channel. *Trends. Pharmacol. Sci.* 8 : 459–465, 1987.
  - 21) Nara, K., Yamauchi, T., Tochitani, A., Yoda, J., Ooe, M., Suzuki, T. A., and Somei, K. : Phorbol 12, 13-dibutyrate enhances pentobarbital suppressing action on synaptic transmission in bullfrog sympathetic ganglion. *Jpn. J. Physiol.* 46 (Supplement) : (in press) 1996.
  - 22) Mcgovern, J., and Scholfield, C. N. : Phorbol ester and lignocaine or pentobarbitone interactions at presynaptic axons. *Neuroreport* 3 : 139–142, 1992.
  - 23) Wafford, K. A., Burnett, D. M., Leidenheimer, N. J., Burt, D. R., Wang, J. B., Kofuji, P., Dunwiddie, T. V., Harris, R. A., and Sikela, J. M. : Ethanol sensitivity of the GABA<sub>A</sub> receptor expressed in xenopus oocytes requires eight amino acids contained in the  $\gamma_{2L}$  subunit. *Neuron* 7 : 27–33, 1991.
  - 24) Maciver, M. B., Tanelian, D. L., and Mody, J. : The mechanisms for anesthetic-induced enhancement of GABA<sub>A</sub>-mediated neuronal inhibition. *Ann. NY. Acad. Sci.* 625 : 91–96, 1991.
  - 25) 染井宏祐, 加藤一郎, William K Riker, 依田淳一, 村田広紀, 奈良一彦, 鈴木 隆 : Ca<sup>2+</sup>-activated GK+に対する局所麻酔剤の効果, 岩医大歯誌, 20 : 26–33, 1995.