

論 文 内 容 要 旨

PRIP 遺伝子欠損マウスにおける 全身麻酔薬作用の解析研究

主指導教員：岡田 貢 教授

(口腔健康発育歯科障害者歯科)

副指導教員：兼松 隆 教授

(基礎生命科学部門細胞分子薬理学)

副指導教員：吉子 裕二 教授

(基礎生命科学部門硬組織代謝生物学)

林内 優樹

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

論文内容要旨

論文題目

PRIP 遺伝子欠損マウスにおける全身麻酔薬作用の解析研究

学位申請者 林内 優樹

抑制性神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) に結合する GABA_A 受容体は、中枢神経系における抑制性神経伝達を担う主要な受容体で、19 種類のサブユニット (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π , ρ 1-3) の組み合わせからなるヘテロ 5 量体構造をとる。この受容体はイオンチャネル内蔵型の受容体であり、哺乳類の中枢神経系には、 α : β : γ 各サブユニットが 2 : 2 : 1 の割合で構築されたものが最も多い。GABA が α サブユニットと β サブユニットとの境界に結合すると、受容体のコンホメーション変化が起こり、チャネルが開口して、細胞外から塩素イオンが細胞内に流入する。現在使用されている全身麻酔薬は、GABA_A 受容体の機能を増強することで麻酔効果をもたらすものが多く、受容体サブユニット構成の違いは、全身麻酔薬の薬理学的特性に大きな影響を及ぼす。

イノシトール 1,4,5-三リン酸結合性タンパク質として見出された Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) は、GABA_A receptor associated protein (GABARAP) や GABA_A 受容体の β サブユニットに結合して GABA_A 受容体の細胞内輸送に関与する。本研究では、*Prip* 遺伝子欠損 (*Prip*-KO) マウスを用いて、GABA_A 受容体に作用部位を持つ全身麻酔薬と GABA_A 受容体の形質膜発現との関係を検討した。

Prip-KO マウスにおける抑制性と興奮性神経系の神経活動性の不調和の程度を調べるために、先ず局所麻酔薬による痙攣誘発実験を行い検討した。リドカイン塩酸塩を用いて痙攣閾値を測定した結果、野生型マウスと *Prip*-KO マウス間で有意な差を認めなかった。次に、*Prip*-KO マウスにおける全身麻酔薬の麻酔作用について、麻酔薬投与後に起こる正向反射消失を指標に検討した。プロポフォールとペントバルビタールを腹腔内投与し、正向反射消失時間を測定したところ、野生型マウスと比較して *Prip*-KO マウスでプロポフォール投与時に睡眠時間の短縮が認められた。そこで、肝臓における薬物代謝酵素 (cytochrome P450 ; CYP) の発現量に変化が見られるかを検討した。プロポフォールとペントバルビタールの代謝に関与する薬物代謝酵素 (CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4) の発現量をウエスタンブロット法にて解析した結果、両遺伝子マウス間で有意な差を認めなかった。よって、プロポフォール投与時に見られた睡眠時間の短縮は、薬物代謝酵素の発現量の差によるものでは

別紙様式 2

ないことが明らかとなった。

PRIP は GABA_A 受容体の細胞内輸送を調節する分子であり, *Prip*-KO マウスでは, GABA_A 受容体のサブユニットの形質膜発現量に変化していると考えられる. そこで, GABA_A 受容体の薬物標的部位が異なる麻酔薬を用いて, *Prip* 遺伝子欠損がもたらす麻酔薬反応性について検討した. 麻酔薬は, GABA_A 受容体 α サブユニットに主に作用部位を持つペントバルビタール, β サブユニットに作用部位を持つプロポフォール ($\beta 3$ サブユニット特異的) とエトミデート ($\beta 2$ および $\beta 3$ サブユニット特異的) を用いた. プロポフォールとエトミデート腹腔内投与時に, *Prip*-KO マウスで睡眠時間の短縮が認められた. 正向反射消失が全身麻酔薬の意識消失作用により生じたことを確認するため, 全身麻酔投与時のマウスの脳波と筋電位を測定した. 脳波の周波数解析においても, *Prip*-KO マウスにおける意識消失時間の短縮が確認された. これは, 正向反射解析により得られた睡眠時間短縮と同程度であった.

Prip-KO マウスの脳における GABA_A 受容体のサブユニット構成の違いを検討するために, ウェスタンブロット解析を行った. 大脳皮質と視床領域を含む全脳から細胞抽出液分画と形質膜分画を遠心分画法で調整した. 細胞抽出液分画での GABA_A 受容体各サブユニットのタンパク質発現量は, 野生型と *Prip*-KO マウス間で著明な差を認めなかった. しかし, 形質膜分画における GABA_A 受容体 $\beta 3$ サブユニットの発現量は, 野生型に比べて *Prip*-KO マウスで有意に減少していた. また, 全身麻酔薬の構成要素である鎮痛作用・不動化に PRIP が与える影響についても検討した. 赤外線による投射熱刺激を与え, 掉尾反射の潜時を測定することで, 脊髄における反射経路の抑制程度を調べた. 実験結果では, プロポフォール投与により掉尾反射潜時の延長が認められたが, 野生型と *Prip*-KO マウスで有意な差は認められなかった.

Prip-KO マウスでは, 脳において $\beta 3$ サブユニット含有 GABA_A 受容体の形質膜での発現が減少していたため, $\beta 3$ サブユニットに作用部位を持つエトミデートやプロポフォールで麻酔作用の減弱が認められた. PRIP は GABA_A 受容体の細胞内輸送過程において, リン酸化 Akt (活性型) を受容体にリクルートして β サブユニットのリン酸化を促し GABA_A 受容体を形質膜へ発現させる分子である. *Prip*-KO マウスではその過程の変調により $\beta 3$ サブユニット含有 GABA_A 受容体形質膜発現量が減少したものと考えられる. しかしながら, $\beta 2$ と $\beta 3$ サブユニットの違いによる受容体の形質膜発現制御機構に差がある理由は明らかとなっておらず, 今後検討する必要がある. 本研究において, PRIP は, $\beta 3$ サブユニットに依存した GABA_A 受容体の細胞内輸送調節機構に関与し, 抑制性神経伝達機構を制御する分子であることが明らかとなった.