



Characterization of subtype of the GABA receptors in *Ascaris* muscle preparation by binding assay and binding of PF1022A, a new anthelmintic, on the receptors

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 陳, 文旭 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1502

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 225号	学位授与年月日	平成 7年12月22日
氏 名	陳 文 旭		
論文題目	<p>Characterization of subtype of the GABA receptors in <i>Ascaris</i> muscle preparation by binding assay and binding of PF1022A, a new anthelmintic, on the receptors (ブタ回虫筋標本の GABA 受容体のサブタイプの binding assay による追求とその受容体に対する PF1022A の結合)</p>		

博士(医学) 陳 文 旭

論文題目

Characterization of subtype of the GABA receptors in *Ascaris* muscle preparation by binding assay and binding of PF1022A, a new anthelmintic, on the receptors

(ブタ回虫筋標本の GABA 受容体のサブタイプの binding assay による追求とその受容体に対する PF1022A の結合)

論文の内容の要旨

目的：現在繁用されている抗線虫性の駆虫薬は、piperazine, ivermectin, milbemycin D などほとんどが線虫の γ -aminobutyric acid (GABA) 機構に作用する。これらの GABA 機構作用性駆虫薬のうち、piperazine 以外は低濃度で GABA 機構を促進し、一方、高濃度では acetylcholine (ACh) の遊離を促進し、作用が拮抗関係にあることが報告されている。PF1022A は最近我が国で、開発中の抗線虫薬である。広東住血線虫の自動運動を指標とした *in vitro* 実験でこの新駆虫薬は GABA 機構の促進と ACh の遊離抑制作用を有し、piperazine と同様に相乗的に虫体に麻痺を生ずることを Terada (1992) が報告している。そこで、本研究では、ブタ回虫 (以下、回虫) 筋の膜蛋白標本を用いて、放射性リガンドの binding assay により、piperazine を対照薬として、PF1022A が GABA 受容体に結合するか否かを検討した。先ず回虫筋の GABA 受容体のサブタイプについて追求し、ついで、回虫筋の GABA 受容体へのリガンドの結合に対する PF1022A などの影響を検討した。

方法：膜蛋白分画は回虫筋を氷冷下、湿重量の 20 倍の 50 mM Tris/HCl (pH 7.4) 中でミンス後、Potter-Elvehjem 型ホモジナイザーで調整したホモジネートから常法による高速遠心分離法により得た。放射性リガンドとして、GABA_A 受容体については [methyl-³H]-bicuculline を、GABA_B 受容体については [butyl-4-³H]-baclofen を、また両方の受容体については [2, 3-³H (N)]-GABA を用いた。binding assay は 5.0 ml の Tris/HCl 中で膜蛋白をいろいろな濃度のリガンドと共に 25°C で 1 時間 incubate することにより行った。その後、GF/B の glass filter で濾過し、filter に残留している膜蛋白を氷冷した buffer で 3 回洗浄後、液体シンチレーション用の cocktail で溶出して、radioactivity を、液体シンチレーションカウンターで計測した。ここで得られる値を全結合とした。同様の incubation を 10⁻⁶ M の antagonist の存在下で行って得られる結合を非特異的結合とし、全結合から非特異的結合を引いた値を特異的結合とした。特異的結合を Scatchard plot により換算し、Bmax と Kd 値を得た。つぎに、あるリガンドの一定濃度と各種濃度の agonist や antagonist, PF1022A などの存在下における結合を調べ、リガンドの結合を 50% 阻害する濃度 (IC₅₀) を求め、Cheng & Prusoff の方法により Ki 値を算出して、作用の強さを比較した。

結果および考察：1. 回虫筋の膜蛋白にリガンドとして用いた GABA および bicuculline が結合した。Scatchard plot は直線性を示し、それぞれの Kd 値および Bmax 値は 540 nM, 4.92 pmol/mg protein および 1.96 nM, 0.84 pmol/mg protein であった。これらの結果から、回虫筋に GABA 受容体が存在することが明らかである。2. 宿主の哺乳動物の GABA 受容体には GABA_A と GABA_B の 2 つのタイプの存在が知られている。そして、哺乳動物の GABA_A 受容体には、本来の agonist の GABA 以外に antagonist の bicuculline やその他の薬物が結合してアロステリックな影響を及ぼす

ことが知られている。一方、回虫筋については、電気生理学的な研究などから、従来は GABA_A 受容体の存在が推測されていた。そこで、つぎに、回虫筋の GABA 受容体のサブタイプについて追求した。リガンド・GABA の結合に対して GABA_A 受容体の agonist の GABA、muscimol, gabazine および isoguvacine が強く抑制した。GABA_A 受容体の antagonist については、thiomuscimol が bicuculline よりも強く抑制した。つぎに、リガンド・bicuculline の結合についてみると antagonist については GABA をリガンドとした場合とは逆に、bicuculline が thiomuscimol よりも強く抑制した。また、agonist については GABA などの各種 agonist の阻害作用は GABA をリガンドとした時よりも弱かった。また、GABA および bicuculline のいずれをリガンドとした結合に対しても、Cl⁻ channel inhibitor の picrotoxin は弱い抑制作用を示した。つぎに、GABA_A 受容体のリガンドの baclofen の結合に対しては GABA_A 受容体の antagonist の thiomuscimol は影響しなかったが、GABA_B 受容体の agonist の baclofen および GABA_B 受容体の antagonist の phaclofen が強い抑制作用を示した。ところが、GABA_A 受容体の agonist の 5-aminovaleic acid も GABA_A および GABA_B の両方の受容体の agonist となる GABA も全く影響しなかった。この結果は、回虫筋におけるリガンド・baclofen の結合は GABA_B 受容体への特異的な結合ではない可能性を示唆している。以上のリガンドを用いての binding assay により、回虫筋の GABA 受容体のサブタイプは GABA_A タイプであることを証明することができた。3. つぎに、回虫筋の膜蛋白におけるリガンドの結合に対する PF1022A について検討した。リガンド・GABA 結合に対して PF1022A は 10^{-10} M から 10^{-5} M にかけて用量依存的に抑制効果を示した。そして、K_i 値で比較すると、リガンドの GABA および bicuculline の結合に対する抑制効果は、GABA_A 受容体の各種の agonist とほぼ同じ強さであった。しかも、回虫筋において GABA 受容体の agonist として作用することが報告されている piperazine よりも、PF1022A の作用は著しく強かった。一方、リガンド・baclofen の結合に対しても PF1022A は高濃度 (10^{-5} M) で弱い抑制作用を示した。しかし、リガンド・baclofen の結合自体が GABA_B 受容体への特異的な結合ではない可能性が高いことから、この結合は非特異的なものと推測された。

結論：今回の binding assay の結果から、つぎの2つの結論を得ることができた。第1に、回虫筋に GABA 受容体があり、サブタイプとしては哺乳動物の GABA_A タイプに相当することを実証できた。第2に新しい抗線虫薬・PF1022A が線虫類の GABA_A 受容体に結合して虫体に麻痺を引き起こすことを直接的に証明できた。

論文審査の結果の要旨

PF1022A は現在わが国で開発中の抗生物質性抗線虫薬で、従来の駆虫薬と比べ、その由来や化学構造がユニークである。その作用機序として GABA 機構の促進と ACh 機構の抑制により相乗的に作用し、虫体を麻痺させることが知られている。現在使用されている多くの抗線虫薬は piperazine 以外は GABA 機構と ACh 機構のいずれにも促進的に作用し、両作用は線虫の運動に対する影響において互いに拮抗的である。従って、作用機序からみても、PF1022A は従来の抗線虫薬より優れている。また、中枢への移行が少なく、LD₅₀ 値も高く、従って安全性の高い薬物と思われ、今後の開発が期待されている。

今回申請者は、PF1022A の GABA 機構への作用機序を明らかにするために、GABA 受容体に対する PF1022A の結合を ³H-リガンドを用いた receptor binding assay 法により検討した。

^3H -リガンドとして、 ^3H -GABA、 ^3H -methylbucuculline および ^3H -butybaclofen を用い、先ず、ブタ回虫筋膜蛋白標本の GABA 受容体のサブタイプを調べ、ついで、回虫筋の GABA 受容体へのリガンドの結合に対する PF1022A などの影響を検討した。その結果、以下のことが明らかにされた。

1. 回虫筋の膜蛋白標本においては、 ^3H -GABA と GABA_A受容体の antagonist の ^3H -methylbucuculline が高い親和性を示し、GABA_B受容体の agonist の ^3H -butybaclofen の親和性は低かった。従って、ブタ回虫の GABA 受容体は GABA_A受容体であり、GABA_B受容体は存在しないと考えられた。

2. GABA_A受容体の agonist の muscimol や isoguvacine および PF1022Aなどは ^3H -GABA と ^3H -methylbucuculline の結合を強く阻害した。従って、PF1022Aは GABA_A受容体に高い親和性を持ち結合すると考えた。これらの結果より、PF1022Aは GABA 受容体に結合して抗線虫作用を発現することが強く示唆された。

抗寄生虫薬の作用機序研究に receptor binding assay の技術を応用したのは、本研究がはじめてである。によりブタ回虫の GABA 受容体のサブタイプが明らかにされた。また線虫類の自動運動に対する作用の研究から推測されていた PF1022Aの GABA 機構に対する作用が GABA 受容体への結合を介するものであることがはじめて証明された。本研究は抗寄生虫薬の作用機序の解明に新しい技術を導入し、良い成果をあげており、その独創性が評価された。

申請者の発表に対し、次のような質疑がなされた。

- 1) ブタの回虫筋を用いたのはなぜか
- 2) nonspecific binding はどのように測定したか
- 3) ^3H -GABA と ^3H -methylbucuculline の最大結合量 B_{MAX} が異なるのはなぜか
- 4) ^3H -GABA の結合の K_d 値は1つだけか
- 5) bicuculline の ^3H -GABA の結合に対する抑制が弱いのはなぜか
- 6) PF1022Aと piperazine の GABA 受容体に対する親和性の差は抗寄生虫作用と対応するか
- 7) 回虫筋には GABA_B受容体はないという報告はあるか
- 8) PF1022Aの GABA_B受容体に対する作用は明らかにされているか
- 9) PF1022Aは GABA_A受容体に結合すると、なぜ抗寄生虫作用を発現するのか
- 10) ヒトの回虫にも GABA_B受容体はないか
- 11) ブタ回虫と広東血線虫の GABA 受容体の相違について
- 12) PF1022Aは他の寄生虫にも有効か
- 13) PF1022Aの副作用はどうか
- 14) PF1022Aはヒトの寄生虫にも有効か

これらの質問に対する申請者の解答はおおむね適切であり、本論文は博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 橋 本 久 邦

副査 教授 金 子 榮 蔵 副査 教授 佐 野 基 人

副査 助教授 梅 村 和 夫 副査 助教授 小 出 幸 夫