

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：11101
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659735
 研究課題名（和文） 受容体の膜へのトラフィック制御を標的とした新たな麻酔薬作用の探索
 研究課題名（英文） Research of novel regulatory mechanism of general anesthetics through receptor trafficking
 研究代表者 上野伸哉 (UENO SHINYA)
 弘前大学 医学(系)研究科(研究院)・教授
 研究者番号：00312158

研究成果の概要（和文）：

Phospholipase C related, but catalytically inactive protein-1 (PRIP-1)は、GABA-A 受容体トラフィックおよび受容体リン酸化に重要な役割を果たす。本研究において、PRIP-1 KO マウスにおいて GABA-A 受容体分布異常と麻酔薬作用発現の関連を明らかとした。今回の結果は、受容体トラフィックが麻酔薬効果を制御しうることを初めて示したものである。

研究成果の概要（英文）：

Phospholipase C related, but catalytically inactive protein-1 (PRIP-1) plays a critical role in trafficking and phosphorylation of GABA-A receptor. We found that PRIP-1 KO mice showed abnormal distribution of GABA-A receptor, and that efficacy of general anesthetics in KO mice reduced in comparison to wild type. These results suggest that receptor trafficking is involved in the regulation of anesthetic action.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：神経科学、薬理学、情報伝達、麻酔薬作用機序、タンパク輸送

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔薬の標的として、GABA-A 受容体をはじめとした神経伝達受容体があきらかとされてきたが、麻酔薬の標的とする受容体の細胞内分布、トラフィックと麻酔薬作用との関連は明らかでなかった。

2. 研究の目的

- (1) 麻酔薬の標的受容体の輸送および分布変化への効果を明らかとする。
- (2) 標的受容体の輸送、分布変化を可視化するシステムを構築する

3. 研究の方法

- (1) 全身麻酔薬の主要な作用機序の 1 つとして、中枢神経に発現する GABA-A 受容体の作用増強が知られている。GABA-A 受容体の輸送（トラフィック）、リン酸化を制御する

PRIP-1 の欠損動物を用い、正常動物と GABA-A 受容体分布変化、麻酔薬効果を比較することにより新規の麻酔薬作用機序を明らかとする。GABA-A 受容体増強効果をもち、個体レベルにおいて鎮静、抗けいれん作用を持つベンゾジアゼピンに対する感受性を、電撃ショック誘発性けいれんを指標に、PRIP-1 欠損マウスと野生型 (WT) とを比較する。細胞レベルにおいては、海馬、大脳皮質スライスを作製し、スライスパッチ法を適用する。神経細胞における GABA 応答をシナプス直下と、シナプス外に分け、薬理的にその応答を分離し、PRIP-1 欠損による GABA-A 受容体分布の変異を探索する。また、GABA-A 受容体のサブタイプごとの発現量を RT-PCR および Western blot により mRNA およびタンパクレベルで定

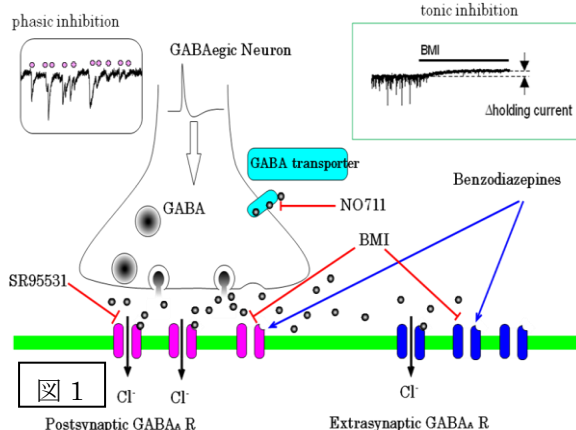
量し、欠損動物およびWT間で比較する。
 (2) 受容体トラフィックを可視化するために、GABA-A受容体サブユニットに標識物質を結合させた結合タンパクを作製する。これらを、発現ベクターへ導入し、HEK293細胞を用いた強制発現系を確立し、パッチクランプ法を用い、GABA-A受容体機能の解析および、標識物質を利用して、細胞内での受容体トラフィック、輸送過程の可視化を可能とする。標識物質としては、EGFP, Ds-RED, SNAP, Halo-tag等があり、実際の蛍光強度、細胞内の移動、細胞質内なのか、形質膜上にあるかを識別できるかどうかを解析する。

4. 研究成果

(1) PRIP-1欠損動物におけるGABA-A受容体分布異常

PRIP-1はIP3結合タンパクとして発見されクローニングされたタンパクである。さらに、two-hybridization studyにより、GABA-A受容体サブユニットとの結合が示され、さらに、GABARAPをはじめとしたGABA-A受容体制御タンパクとの関連が示された。いままでの知見によりPRIP-1の機能として、GABA-A受容体のトラフィック、リン酸化に関わることが示唆されている。まず、PRIP-1欠損動物におけるGABA-A受容体の分布異常の有無を探索した。GABA-A受容体の分布はシナプス直下に存在するものと、シナプス外(extrasynaptic)に存在する受容体に大別され、いずれの部位の受容体も抑制効果を伝えている。シナプス部分のGABA-A受容体を介した応答はスライスパッチ法によりIPSCとして観察されphasic inhibition、一方extrasynapticのGABA-A受容体を介した応答はtonic inhibitionとして観察される(図1)。

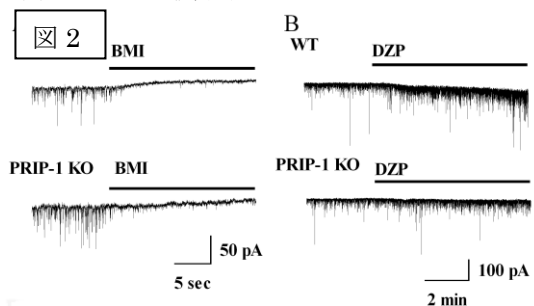
Synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors



PRIP-1欠損動物において、この両成分を電気生理学的に観察した。するとWTと比較して、PRIP-1欠損動物において、tonic inhibitionの応答の減弱、すなわちシナプス外に移動すべきGABA-A受容体の減少が起こっていると考えられた。対照的に、phasic inhibition

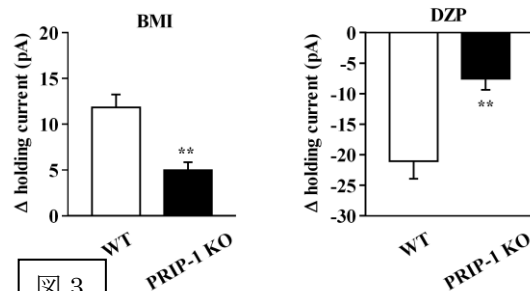
の頻度、ピーク電流値はWTとKO動物群間に統計学的有意差はなく、シナプス部へのGABA-A受容体集積に関しては、異常がないことが示唆された(図2)。また、GABA-A受容体サブユニットの発現変化をmRNAおよびタンパクレベルにおいて比較すると、PRIP-1KO動物群においてbeta3サブユニットの増強傾向および、gamma2サブユニット減少傾向が見られたが、統計学的有意差は見られなかった。タンパク発現量に関して、細胞全分画と膜分画に分けて解析においても有意差はあきらかではなかった。以上より、GABA-A受容体の発現量に有意な差はないが、受容体の膜上での分布、すなわちシナプス直下とシナプス外に存在する受容体量がノックアウトマウスにおいて変異していることを支持するデータであった。

(2) PRIP-1欠損動物におけるベンゾジアゼピン



ン(BZP)系薬物効果の減弱

電撃ショック誘発性けいれん発症に対し、BZP投与による抑制効果を観察した。WTとPRIP-1欠損動物を比較すると、KO動物において、BZP効果の減弱が見られた。PRIP-1欠損動物はBZPの感受性が低いことが明らかになった。BZPはGABA-A受容体に結合しGABAの効果を増強させる。そこでスライスパッチ法により細胞レベルでのBZPのGABA-A受容体への効果を解析した。BZPの増強効果は、



phasic inhibitionへは両群間に有意差はなかったが、tonic inhibitionの増強効果は、PRIP-1欠損動物群において著しく減弱していた(図3)。

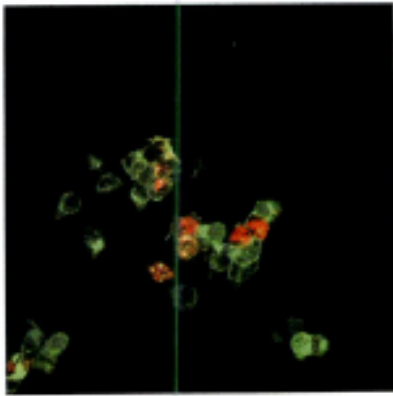
つまりPRIP-1欠損動物において、GABA-A受容体の分布異常に加えてBZP系薬物効果の減弱が存在する。麻酔薬の効果発現に標的受容体のトラフィックおよび分布が大きく関わっていることが示唆された。以上の知見を

論文として公表した（雑誌論文の No. 1, 3 に示す）。

(3) 受容体移動の可視化への試み

脳内で主に存在する GABA-A 受容体は、 $\alpha 1$, $\beta 2$, $\gamma 2$ の 3 種のサブユニットがそれぞれ 2:2:1 の組み合わせにより 5 量体としてチャンネルを形成する。まず、これらの 3 種のサブユニットを哺乳動物発現用ベクター pCDNA3.1 のマルチクローニングサイトに導入し、ヒト由来 HEK293 細胞にトランスフェクションし、パッチクランプ法にて GABA 応答を確認した。さらに、各サブユニットに SNAP タグを導入したプラスミドを作製し、発現実験を行い、GABA-A 受容体の機能を持ち、そのタグを利用して受容体が形質膜部位に

図 4 発現: $\alpha 1$, $\beta 2$, SNAP- $\gamma 2$
green: anti- $\alpha 1$
Red: SNAP



存在することを、コンフォーカル顕微鏡で確認した（図 4 中の赤色蛍光部分）。さらに細胞内での移動を可視化するために研究を継続中である。同時に、神経細胞におけるシナプスの存在するスパインの形態認識をお子に論文として公表した（論文 No. 2）。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1. Zhu, G. Yoshida, S. Migita, K. Yamada, J. Mori, F. Tomiya, M. Wakabayashi, K. Kanematsu, T. Hirata, M. Kaneko, S. Ueno, S. Okada, M.,

Dysfunction of extrasynaptic GABAergic transmission in phospholipase C-related, but catalytically inactive protein 1 knockout mice is associated with an epilepsy phenotype. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012. 340(3): p. 520-528. 査読あり

DOI: 10.1124/jpet.111.182386

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/quer>

y.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22128345

2. Nishijima, H. Arai, A. Kimura, T. Mori, F. Yamada, J. Migita, K. Wakabayashi, K. Baba, M. Ueno, S. Tomiya, M.,

Drebrin immunoreactivity in the striatum of a rat model of levodopa-induced dyskinesia. *Neuropathology*, 2012. 査読あり

DOI: 10.1111/neup.12009 [Epub ahead of print]

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/quer>y.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23241013

3. Migita, K. Tomiya, M. Yamada, J. Fukuzawa, M. Kanematsu, T. Hirata, M. Ueno, S.,

Phenotypes of pain behavior in phospholipase C-related but catalytically inactive protein type 1 knockout mice. *Mol Pain*, 2011. 7: p. 79-86. 査読あり

DOI: 10.1186/1744-8069-7-79

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/quer>y.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22008183

〔学会発表〕（計 22 件）

① 右田啓介、富山誠彦、山田順子、二階堂義和、兼松隆、平田雅人、上野伸哉

PRIP-1 ノックアウトマウスの痛覚異常は脊髄における GABA 作動性シナプス伝達異常が関与している

第 35 回日本神経科学大会（名古屋）平成 24 年 9 月 18-21（2012）

② 二階堂義和、太田純子、右田啓介、山田順子、柴佑子、榎方哲也、廣田和美、兼松隆、平田雅人、上野伸哉

PRIP-1 KO マウスにおけるプロポフォールの麻酔効果導入の遅延と効果維持の低下

第 19 回日本静脈麻酔学会（札幌）平成 24 年 9 月 29（2012）

③ Nikaido Y, Yamada J, Migita K, Shiba Y, Kushikata T, Hirota K, Kanematsu T, Hirata M, Ueno S.

Delayed induction of anesthesia by propofol in mice deficient in phospholipase C-related but catalytically inactive protein type-1.

8th FENS Forum of Neuroscience (Spain, Barcelona) July 14-18 (2012)

④ Yamada J, Migita K, Shiba Y, Kanematsu T, Hirata M, Ueno S.

TONIC GABAERGIC TRANSMISSION IN BLA NEURONS.

III International symposium "Interaction of nervous and immune systems in health and disease" (Saint Petersburg, Russia) June. 7-11 (2011).

⑤ Yamada J., Migita K., Shiba Y, Kanematsu T, Hirata M, Ueno S.
Dysfunction of tonic GABAergic transmission in PRIP-1 KO mice.
The 10th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscle Sciences (Gyeongju Republic, Korea) Feb. 17-19 (2011)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~neuropsychiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 伸哉 (UENO SHINYA)

弘前大学 医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：00312158

(2) 研究分担者

二階堂 義和 (NIKAIDO YOSHIKAZU)

弘前大学 医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号：50613478

(3) 連携研究者

福澤 雅志 (FUKUZAWA MASASHI)

弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号：10231557

山田 順子 (YAMADA JUNKO)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号：30334965

右田 啓介 (MIGITA KEISUKE)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号：10352262

富山 誠彦 (TOMIYAMA MASAHIKO)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・客員
研究員
研究者番号：40311542