第 5 回 日本臨床薬理学会 1984年11月29日 東京 シンポジウムⅡ

5. ベンゾジアゼピン受容体と GABA 受容体の共軛とその意義

栗山 欣 弥*

田 口 淳 一*

友 納 昭 一*

大 熊 誠 太 郎*

はじめに：ベンゾジアゼピン受容体 (BZP-R) の研究は、1977 年に二つの研究グループがラット脳に [^3H] diazepam の特異的結合部位を見出した時に始まる¹⁾²⁾。その後この BZP-R への結合の強度と BZP の主要な薬理作用、すなわち、筋弛緩、抗けいれん、抗不安などの作用強度との間に有意な相関性があること³⁾、この BZP-R の密度は、大脳皮質、小脳、扁桃核、海馬、視床下部など、本薬物の薬理作用と密接に関係すると考えられる脳内部位に高いことなどが知られるようになって来た。

BZP-R に関する最近の重要な問題の一つは、この受容体が、脳内で抑制性伝達物質の候補として重要視されている γ -アミノ酪酸 (GABA) の受容体と機能的のみならず受容体分子のレベルにおいても共軛 (coupling) を有することである。従って本項では、BZP-R および GABA 受容体 (GABA-R) の生化学的および薬理学的性質について述べると共に、BZP-R と GABA-R の共軛機構とその意義について解説を試みることとする。

I) ベンゾジアゼピン受容体 (BZP-R)

BZP-R 結合は高親和性、飽和性であり、脳の場合、シナプス膜分画に最も高い結合能が見出される³⁾。この結合は、立体構造特異性を有すること、in vivo における BZP の薬理作用の強度との間に密接な相関関係を有すること、GABA-R のア

ゴニストにより増強されること、電気生理学的に抑制性の後シナプス膜を通過することが知られている陰イオン、たとえば、 Cl^- , Br^- , I^- などにより増強されることが知られている¹⁾²⁾³⁾。GABA による過分極が Cl^- のコンダクタンス変化に基づいていることを考え合わせると、GABA-R と BZP-R はシナプス膜上のきわめて隣接した部位に存在し、ともに共通の Cl^- コンダクタンス変化機構 (Cl^- ionophore) と共軛していると考えられる。

BZP-R が発見された初期の頃には単一の受容体と考えられていたが、1979 年に新しい BZP の一つとして triazolopyridazine (CL 218872 : TPZ) が開発され、その diazepam に対する結合様式の解析から、BZP-R には二つの種類があると考えられるようになって来た⁴⁾。すなわち、type 1 (TPZ に高い親和性を有する) と type 2 (TPZ に対する親和性が低い) とに分けることが行われ、大脳皮質では BZP-R の 60%、小脳では 90% が type 1 であるといわれている。Type 1 の受容体は BZP の抗不安作用に関与するのに対し、type 2 は BZP に対する耐性発現にかかわっている可能性が示唆されているが、その詳細は現時点では明かではない。

BZP-R のサブタイプについて無視出来ない問題は、BZP-R の中で GABA-R と共軛したものと、しないものがあるのではないかの考え方である。一般には上記の BZP-R の type 1 は GABA-R との共軛を持たず、BZP に対して低親

* 京都府立医科大学薬理学教室
〒602 京都市上京区河原町広小路

和性の type 2 が GABA-R と共軛しているといわれている⁵⁾。

BZP-R の内在性リガンド (生理的作働物質) の候補物質としては, 従来考えられて来た inosine, hypoxanthine, nicotinamide などのプリン化合物に代って, ethyl- β -carboline-3-carboxylate (β -CCE), β -hydroxymethyl- β -carboline (3-HMC), thromboxane A₂ などが最近注目を集めるようになって来た^{6,7)}。3-HMC は β -CCE より安定な誘導体であり, ラットに投与すると, 用量依存的に入眠の潜時 (sleep latency) を増加させると共に, 睡眠に影響しない低用量で BZP 系薬物の催眠作用に拮抗するという報告がある。

最近 BZP-R に高い親和性を有し, BZP 系薬物の薬理作用に拮抗する薬物, すなわち, BZP-R の拮抗薬として Ro 15-1788⁸⁾ や CGS 8216⁹⁾ が開発された。Ro 15-1788 を BZP 系薬物に対して依存性を示す動物に投与すると, 振戦や痙攣などの激しい禁断症状がみられること, また BZP 系薬物の過量投与により昏睡状態となった患者に投与すると著明な覚醒および呼吸機能の回復がみられた, などの報告がみられる。

II) GABA 受容体 (GABA-R)

脳シナプス膜には Na⁺ 非依存性, 高親和性, および飽和性の特異的 GABA 結合があり, この結合は低濃度の GABA 拮抗薬 bicuculline で阻害されることから, シナプス膜の GABA-R への結合を反映するものと考えられている¹⁰⁻¹⁶⁾。GABA-R の特異的結合は高親和性 (K_D: 2.2 nM) と低親和性 (K_D: 60 nM) の二つの結合部位よりなっている。GABA-R は bicuculline または bicuculline methochloride に対する感受性の面から, GABA_A 受容体 (bicuculline 感受性) と GABA_B 受容体 (bicuculline 非感受性であるが baclofen に感受性を持つもの) に大別されている⁷⁾。GABA_A 受容体は BZP-R の type 2 と共軛すると考えられており, その作働薬として GABA 以外に, muscimol, THIP, isoguvacine, P₄S などの存在が知られている。THIP は作用も強く, 血液脳関門を通り易いので現在臨床的にも

もっとも興味を持たれている GABA 作働薬である。THIP は抗けいれん作用の外に, naloxone 非感受性の鎮痛作用, 降圧作用, 食欲抑制作用などを持つことが報告されている。

GABA-R は脳シナプス膜を Nonidet P-40 のような detergent によって処理することにより可溶化される¹¹⁾。この可溶化された GABA-R は, シナプス膜上の GABA-R とほぼ同一の薬理学的性質を有するのみならず, BZP 類に対する特異的結合能を持っている^{11,12)}。

GABA-R は BZP-R との複合体として可溶化されるが, この両受容体は蛋白としての性質を持ち, 分子量を算出すると Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィでは 26 万~27 万, ショ糖密度勾配遠心法では約 24 万と推定される¹¹⁾。更にこの可溶化分画に対して ³H-flunitrazepam による光親和性標識を行ったのち, SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行うと, BZP-R として分子量約 48,500 の蛋白が標識される^{11,13)}。

GABA-R は通常の蛋白精製に用いられる技法, 例えば DEAE Sepharose CL-6B や hydroxylapatite によるカラムクロマトグラフィなどでは純化精製が困難である¹²⁾。先に述べた GABA-R と BZP-R が同一蛋白分子上に存在することを利用して, BZP affinity column chromatography による精製を行う^{13,14)}。BZP の一種である 1012-S を用い, 1012-S-acetamide adipic hydrazide Sepharose 4 B の affinity column を作成して可溶化した GABA-R の純化精製を行った結果は Tab. に示す通りである。本法でラット脳より最高精製率 4576 倍の分画を得たが, これらの精製受容体蛋白を SDS ポリアクリルアミド電気泳動に適用すると, 二つの主要なバンド, すなわち, 先に述べた ³H-flunitrazepam により光親和性標識される分子量約 48,500 の蛋白の外に, ³H-flunitrazepam で標識されない分子量約 55,000 のバンドの存在が確認された。

上記の結果を総合すると, ラット脳のシナプス膜に存在する GABA-R/BZP-R の複合体は分子量 250,000~270,000 の蛋白であり, しかも分子

量 55,000 と 48,500 のサブユニットより成るが、後者のサブユニットのみが BZP-R を有するものと考えられる。

III) GABA-R と BZP-R の共軛とその意義

種々のバルビツール酸誘導体や抗不安作用を持つピラゾロピリジン化合物 (etazolate など) は、脳シナプス膜への BZP 結合を増強し、この効果は Cl^- 依存性で、GABA による BZP-R 結合増強作用に相加的あるいは相乗的であるといわれている⁷⁾。更にこれらの薬物は、 Cl^- の存在下で GABA-R の結合をも増強させる。従って先述の諸成績と共にこれらの報告を考え合せると、GABA-R は GABA_A -R, BZP-R の type 2, Cl^- ionophore およびバルビツール酸誘導体/ピクロトキシン作用部位の四者よりなる複合体であるとの考え方の妥当性が浮上する訳である。このような GABA-R·BZP-R· Cl^- ionophore 複合体のモデルを中心において、BZP 系薬物やバルビツール酸誘導体の中枢作用を説明することの妥当性については多少の疑義が残されているが、これらの薬物の中枢作用発現機構に脳内の GABA 作働性ニューロンの機能増強が関与していることは間違

Fig. 純化精製 GABA 受容体の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) パターンと ^3H -flunitrazepam による photoaffinity labeling.¹³⁾¹⁴⁾

Tab. 1012-S-Acetamide AdipicHydrazide Sepharose 4B アフィニティカラムクロマトグラフィーによる可溶化ラット脳 GABA 受容体の純化精製¹³⁾¹⁴⁾

	Volume (ml)	Protein Content (mg)	^3H -Muscimol Binding (at 10 nM)			^3H -Flunitrazepam Binding (at 1 nM)		
			Specific Binding (pmol/mg prot.)	Purification Fold	Total Binding (pmol)	Specific Binding (pmol/mg prot.)	Purification Fold	Total Binding (pmol)
Solubilized fraction	180	162.57	0.22	1.0	35.32	0.38	1.0	61.97
Run-through	240	156.23 (96.0%)	0.04	0.1	5.74 (16.0%)	0	0	0
NaCl (50 mM)	100	0	0	0	0	0	0	0
1012-S (1 mM)	40	0.03 (0.1%)	348.23	1604.7	9.05 (25.6%)	0.65	1.7	0.01 (0.1%)
I No. 8-11 II No. 12-15 III No. 16-17	8	0.02	344.93	1589.5	5.17	0.06	0.2	0.01
	8	0.01	993.00	4576.0	2.98	1.66	4.4	0.01
	4	0.02	383.33	1766.5	0.69	3.89	10.2	0.01
NaSCN (1-2 M)	40	0.19 (0.1%)	73.71	339.6	14.08 (39.9%)	0.03	0.1	0.01 (0.1%)
[No. 7-9	6	0.01	410.00	1889.4	3.69	0	0	0]
Recovery		156.45 (96.2%)			29.18 (82.6%)			0.18 (0.3%)

いない事実と思われる。GABA によるシナプス膜の Cl^- 透過性の亢進に伴う過分極はピクロトキシンにより拮抗されるが、BZP 系薬物により逆に促進されるという電気生理学的観察の結果は、このような GABA-R 複合体モデルの妥当性を支持するものであろう¹⁰⁾。

おわりに：中枢神経系における重要な抑制性神経伝達物質の一つとして知られる GABA の受容体とベンゾジアゼピン受容体が、 Cl^- ionophore を介して機能的な、そしておそらくは分子上の共軌を介して複合体を形成していることは間違いない事実と考えられる。これらの知見は、単にベンゾジアゼピン誘導体やバルビツール酸誘導体の作用機構の説明に役立つのみならず、最近 GABA 受容体やベンゾジアゼピン受容体の異常が関与するとされる多くの脳神経疾患、例えば、ハンチントン舞踏病、脳虚血性疾患、あるいはけいれん性疾患の診断と治療の進展に新しい視点を与えるものと期待される。

文 献

- 1) Braestrup, C. and Squires, R. F. : Specific benzodiazepine receptors characterized by affinity of [^3H] diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74** : 3805-3809 (1977).
- 2) Möhler, H. and Okada, T. : Benzodiazepine receptor : demonstration in the central nervous system. *Science*, **198** : 849-851 (1977).
- 3) Kuriyama, K. and Ueno, E. : Endogenous modulating mechanism of cerebral benzodiazepine receptor : Roles of membrane phospholipids. *Molecular Pharmacology of Neurotransmitter Receptors* (Segawa, T., Kuriyama, K. and Yamamura, H. I., Eds.), Raven Press, New York, pp. 221-231 (1983).
- 4) Klepner, C. A., Lippa, A. S., Benson, D. I. et al. : Resolution of two biochemically and pharmacologically distinct benzodiazepine receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **11** : 457-462 (1979).
- 5) Gee, K. W., Ehlert, F. J. and Yamamura, H. I. : Differential effect of gamma-aminobutyric acid on benzodiazepine receptor subtypes labeled by [^3H] propyl-beta-carboline-3-carboxylate in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **225** : 132-137 (1983).
- 6) 栗山欣弥, 西村千尋 : 睡眠障害とくに不眠症の治療 b) 睡眠薬としてのベンゾジアゼピン—その作用機序に関する最近の話題—。治療学, **11** : 87-94 (1983).
- 7) 栗山欣弥, 大熊誠太郎 : ベンゾジアゼピン受容体と GABA 受容体. 蛋白質核酸酵素29:臨時増刊・神経生化学(上), 黒川正則, 宮本英七(編), 共立出版, pp 1317-1327 (1984).
- 8) Möhler, H. and Richards, J. G. : Agonist and antagonist benzodiazepine receptor interaction in vitro. *Nature*, **294** : 763-765 (1981).
- 9) Czernik, A. J., Petyack, B., Kalinsky, H. J. et al. : CGS 8216 : Receptor binding characteristics of a potent benzodiazepine antagonist. *Life Sci.*, **30** : 363-372 (1982).
- 10) 栗山欣弥, 西村千尋 : GABA レセプター研究に関する最近の話題—神経化学的観点を中心として—。生体の科学, **33** : 211-219 (1982).
- 11) Ito, Y. and Kuriyama, K. : Some properties of solubilized GABA receptor. *Brain Res.*, **236** : 351-363 (1982).
- 12) Kuriyama, K. and Ito, J. : Some characteristics of solubilized and partially purified cerebral GABA and benzodiazepine receptors. *CNS Receptors- From Molecular Pharmacology to Behavior*, Mandel, P. and DeFeudis, F. V. (Eds.), Raven Press, New York, pp 59-70 (1983).
- 13) Kuriyama, K. and Taguchi, J. : Purification of gamma-aminobutyric acid (GABA) and benzodiazepine receptors from rat brain using benzodiazepine- affinity column chromatography. *Neurotransmitter Receptors* (Kito, S. et al., Eds.), Plenum. Co., New York., pp. 221-233 (1984).
- 14) Taguchi, J. and Kuriyama, K. : Purification of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor from rat brain by affinity column chromatography using a new benzodiazepine, 1012-S, as an immobilized ligand, *Brain Res.*, **323** : 219-226 (1984).
- 15) Kuriyama, K., Yoneda, Y., Taguchi, J. et al. : Properties of purified gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor and modulation of GABA receptor binding by membrane phospholipids. *Neuropharmacology*, **23** : 839-840 (1984).
- 16) 栗山欣弥, 田口淳一, 大熊誠太郎 : GABA レセプター. 神経精神薬理, **51** : 887-896(1983).