

- μ : Gaussian 平均
- σ : Gaussian 標準偏差

開確率は、イベントリストから、以下の関数で自動で求めた。

$$NP_o = \frac{T_o}{T_o + T_c} \dots \dots \dots (3)$$

- NP_o : 開確率
- T_o : 観測総開時間
- T_c : 観測総閉時間

第3節 試薬

クロペラスチン (Cloperastine hydrochloride)、ATP·2Na (Adenosine-5'-triphosphoric acid disodium salt)、GTP (Guanosine-5'-triphosphate Sodium salt)、スピペロン (Spiperone)、サーモリジン (Thermolysin Bacillus Type X)、8-OH-DPAT (8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin hydrobromide) は、SIGMA (St.Louis, MO, USA) より購入した。EGTA (O, O'-Bis(2-aminoethyl) ethylenglycol-N, N, N'-tetraacetic acid)、プロネース (Pronase)、テルチアピン (Tertiapin) は、それぞれ同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan)、Calbiochem (San Diego, CA, USA)及びペプチド研究所(Osaka, Japan)より購入した。

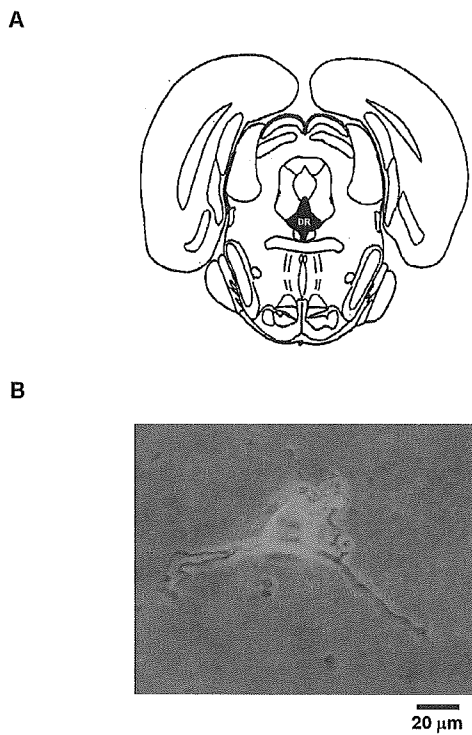


Fig. 2.1. Acutely dissociated dorsal raphe(DR) neurons of rat.
 A: Location of the dorsal raphe in rat brainstem. B: Representative dorsal raphe neuron acutely dissociated from young Wistar rat.

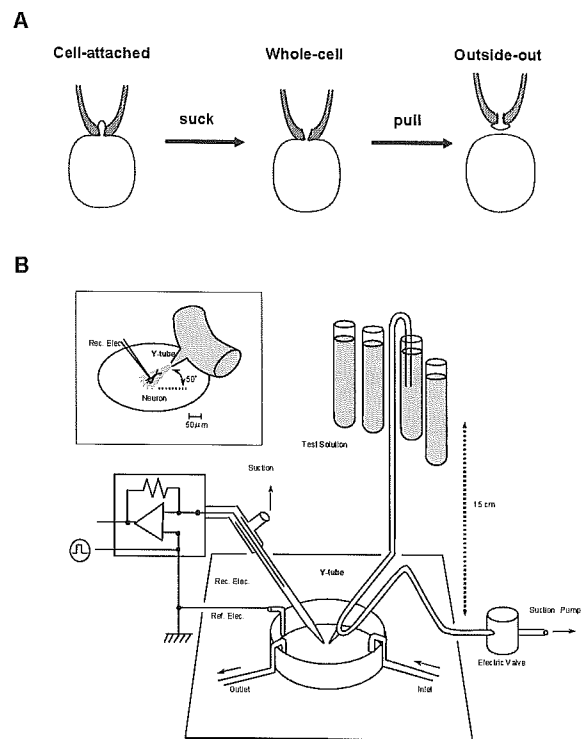


Fig. 2.2. Patch clamp recording and rapid drug application systems.
 A: Process to make outside-out mode of patch clamp. B: Schematic diagram of patch clamp recording and the "Y-tube" method for rapid drug application. Inset; Expanded picture around the neuron recording.

第1節 本章の目的

「細胞膜にはイオンチャネルが存在し、そのイオンチャネルのゲートが開いた時にイオンがイオンチャネルを通り、細胞膜を横切って移動することで、静止膜電位や活動電位、シナプス後電位などの膜電位が発生する」との考えは、二人のノーベル賞受賞者ホジキン博士とハックスレー博士により 1950 年代に提唱された。この考えは、彼らが膜の電氣的等価回路モデルを考案したことで、イオンの流れを電氣的に取り扱うことができるようになり、興奮膜の動的キネティックスの理解が進むとともに発展してきた。しかし、イオンチャネルの存在と、その開閉がイオンの流出入を制御するとの考えは、あくまでも現象を理論的によく説明するための仮定でしかなかった。1991年にドイツのネーアー博士とザックマン博士がパッチクランプ法の開発でノーベル医学生理学賞に輝いたのは、そのイオンチャネルの開閉を単一イオンチャネル電流として可視的に計測し、これまでの考えが基本的に正しいことを証明したこと、また、イオンチャネルの開閉を単一イオンチャネルのレベルで詳細に解析する手法と理論的背景を提供したことによるところが大きい。パッチクランプ法がこのような優れた特徴をもつことから、1970年代末から1980年代にその技術が確立されて以来これまでに、数多くの研究がなされてきている。にも関わらず、GIRK チャネルの開閉については、特に native の細胞において、殆ど詳細が知られていない。そこで、本章では、クロベラスチンによる GIRK チャネル電流の抑制メカニズムを検討するに先立ち、ラット縫線核より急性単離したニューロンに細胞膜パッチクランプ法を適用して、特異的 5-HT_{1A} 受容体アゴニストにより活性化する単一 GIRK チャネル電流の特性を検討した。

第2節 実験成績

第1項 ラット縫線核ニューロンにおける 8-OH-DPAT 誘発単一イオンチャネル電流の解析

GIRK チャネルが G_{i/o} 蛋白質の β γ サブユニットにより活性化されることを考慮し、最初に inside-out 様式にて単一チャネル電流の記録を試みた。しかし、inside-out 様式では他の脳領域の急性単離ニューロンの場合と同様に殆ど記録が得られなかった。そこで、outside-out 様式での記録を試みた。その結果、保持電位 (V_H) を -80mV に固定し 100 mM K⁺ を含む細胞外液を投与すると、矩形波状の内向き電流が観察された (Fig. 3.1.Ba)。そこで、特異的 5-HT_{1A} 受容体アゴニストである 8-OH-DPAT (3×10⁻⁹M) を急速投与したところ、矩形波状の内向き電流の発現が急速に増加した (Fig. 3.1.Bb)。

保持電位を -100~0mV の種々の電位に固定した時、8-OH-DPAT 非存在下および存在下の矩形波電流 (Fig. 3.2.A,B) の振幅は、いずれも膜電位に依存して変化した。各膜電位における短形波電流の振幅頻度分布を Fig. 3.2.C に示す。振幅頻度分布を式 (2) のガウス関数でフィットさせ、平均振幅(ピーク電流値)を算出した。8-OH-DPAT 存在下および非存在下の各膜電位における平均振幅の平均値と標準誤差をその膜電位に対してプロットした電流 - 電圧 (i-V) 関係を Fig. 3.2.D に示す。8-OH-DPAT 存在下および非存在下のそれぞれのプロットを最小二乗法にて 1 次直線回帰式にフィットしたとき、それぞれの電流 - 電圧直線が電圧軸と交差する電位、つまり逆転電位はコントロールで 4.48 mV、8-OH-DPAT 存在下で -3.69 mV であった。これらは、Nernst の式より算出した K⁺ の平衡電位 (0 mV) と良く一致した。また、それぞれの電流 - 電圧直線の傾きから計算されるコンダクタンスは、コントロールで 22.74 pS、8-OH-DPAT 存在下で 22.71 pS と同じであった。保持電位 -80 mV のとき、S/N 比 (signal/noise ratio) の良い 8-OH-DPAT 誘発単一イオンチャネル電流が安定して得られたことから、以下の実験は保持電位 -80mV で行った。

8-OH-DPAT 非存在下に記録された単一イオンチャネル電流のイベントリストから横軸を開時間の対数として頻度分布をとると、Fig. 3.3.Aa のようになった。この分布は、2 次の指数関数でよくフィットされた。このフィッティングから計算した短い成分と長い成分の平均開時間 (τ_{e1} と τ_{e2}) の 12 例平均はそれぞれ、0.52±0.04 mS と 1.49±0.21mS であった。同様に、閉時間の対数値を横軸として頻度分布を取ると、3 次の指数関数でよくフィットされた (Fig. 3.3.Ba)。短い成分、中間成分および長い成分の平均閉時間 (τ_{c1}、τ_{c2} 及び τ_{c3}) は、1.06±0.14 mS、18.37±3.05 mS と 69.78±9.48 mS であった。また、単一イオンチャネルの平

均開確率は 0.03 ± 0.01 であった (Fig. 3.3.C)。

同様に、8-OH-DPAT 投与後 30 秒から 60 秒の間に記録された単一チャンネル電流の開時間頻度分布をとると、Fig. 3.3.Ab のようになった。この分布も、2 次の指数関数でよくフィットされた。このフィッティングから計算した、平均開時間 τ_{o1} と τ_{o2} の 12 例平均はそれぞれ、 0.59 ± 0.04 mS と 1.67 ± 0.15 mS であった。閉時間頻度分布は 3 次の指数関数でよくフィットされ、平均閉時間 τ_{c1} 、 τ_{c2} 及び τ_{c3} はそれぞれ、 1.24 ± 0.19 mS、 7.47 ± 0.64 mS と 29.90 ± 2.34 mS であった。単一イオンチャンネルの平均開確率は 0.08 ± 0.01 であった。

Fig. 3.3.Bc に示すように、8-OH-DPAT により τ_{c2} と τ_{c3} が有意に短縮され、開確率 (Fig. 3.3.Cc) が有意に増加したが、平均開時間は変化しなかった。また、開時間および閉時間の各成分が全体に占める割合 (ratio of proportion) も変化しなかった (Fig. 3.3.Ad, Bd)。

10^{-8} M の 8-OH-DPAT を投与した場合、単一イオンチャンネル電流の重量が激しく、解析が困難であった。そこで、以下の実験では 3×10^{-9} M の 8-OH-DPAT を用いた。

第 2 項 8-OH-DPAT 誘発単一イオンチャンネル電流の薬理的性質

1) 8-OH-DPAT 誘発単一イオンチャンネル電流に対するスピペロンの作用

8-OH-DPAT の作用が 5-HT_{1A} 受容体を介することを確認するために、8-OH-DPAT 誘発単一イオンチャンネル電流に対するスピペロン (5-HT_{1A} および 5-HT₂ 受容体拮抗薬) の作用を検討した。8-OH-DPAT 3×10^{-9} M を 60 秒間投与し、8-OH-DPAT により単一イオンチャンネル電流が増加することを確認した後、スピペロン 10^{-7} M と 8-OH-DPAT 3×10^{-9} M を 60 秒間同時投与した。単一イオンチャンネル電流解析には投与開始後 30 秒から 60 秒の間の記録を用いた。その結果、スピペロン 10^{-7} M は、8-OH-DPAT により増加したチャンネルの開確率を 0.10 ± 0.02 から 0.06 ± 0.01 に有意に抑制した (Fig. 3.4.F)。前項と同様に、平均開時間、平均閉時間、電流振幅に対する作用を解析した結果、平均電流振幅、平均開時間および閉時間成分の割合には有意な影響を与えなかった (Fig. 3.4)。しかし、中間および長い閉時間成分の平均閉時間 τ_{c2} と τ_{c3} が有意に延長した (Fig. 3.4.D)。

2) K⁺チャンネルブロッカー・Ba²⁺の作用

本実験に用いた細胞内外液のイオン組成と Fig. 3.2.D に示す電流-電圧関係から、8-OH-DPAT が K⁺チャンネルを開口することが示唆されるが、非選択的陽イオンチャンネルであっても逆転電位はほぼ 0 mV になるであろう。そこで、K⁺チャンネルブロッカーである Ba²⁺ の作用を検討した。その結果、Ba²⁺ 3×10^{-6} M は、8-OH-DPAT により増加したイオンチャンネルの開確率を 0.10 ± 0.01 から 0.06 ± 0.01 に有意に抑制した (Fig. 3.5.F)。前項と同様に、平均開時間、平均閉時間、電流振幅に対する作用を解析した結果、平均電流振幅、平均開時間および閉時間成分の割合には有意な影響を与えなかった (Fig. 3.5)。しかし、中間および長い閉時間成分の平均閉時間 τ_{c2} と τ_{c3} に延長傾向がみられた。

Ba²⁺ は、GIRK チャンネルのフィルターに結合して K⁺ の透過をブロックすることが示唆されている^{11,12}。そこで、バースト解析を行った。しかし、Table. 2. に示すように、Ba²⁺ はバーストパラメータに影響を与えなかった。

3) GIRK チャンネルブロッカー・テルチアピンの作用

8-OH-DPAT が誘発する単一チャンネル電流が GIRK チャンネルであることを確認するために、テルチアピン 3×10^{-7} M の作用を検討した。その結果、テルチアピンは、8-OH-DPAT により増加したチャンネルの開確率を 0.06 ± 0.01 から 0.04 ± 0.01 に抑制する傾向を示した (Fig. 3.6.F)。前項と同様に、平均開時間、平均閉時間、電流振幅に対する作用を解析した結果、スピペロンおよび Ba²⁺ とは異なり、長い閉時間成分の平均閉時間に短縮傾向が見られた (Fig. 3.6)。また、長い閉時間成分の割合は有意に増加し、短い閉時間成分の割合は減少した。一方、平均閉時間と平均電流振幅には有意な影響を与えなかった。

テルチアピンは、GIRK チャンネルの細胞外領域に作用して GIRK 電流を抑制すると考えられている。そこで Ba²⁺ の作用と比較す

るため、テルチアピンの作用についてもバースト解析を試みた。Table. 2.に示すように、テルチアピンも Ba^{2+} 同様バーストパラメーターに影響を与えなかった。

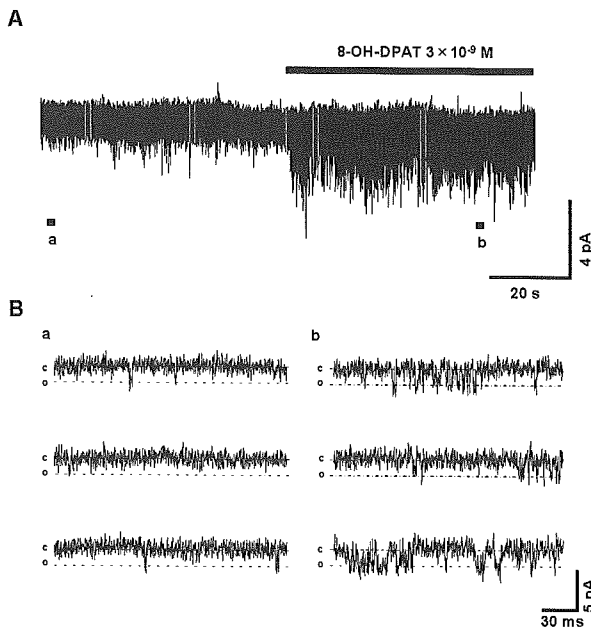


Fig. 3.1. Single channel current in the presence of 8-OH-DPAT.

A: Effect of 8-OH-DPAT on single channel current. 8-OH-DPAT (3×10^{-9} M) was applied during a period indicated by the solid line. Recording was performed in an external solution containing 100 mM K^+ at a V_H of -80 mV. B: Expanded current traces of (a) and (b) indicated in A. "c" and "o" indicate closed and open states.

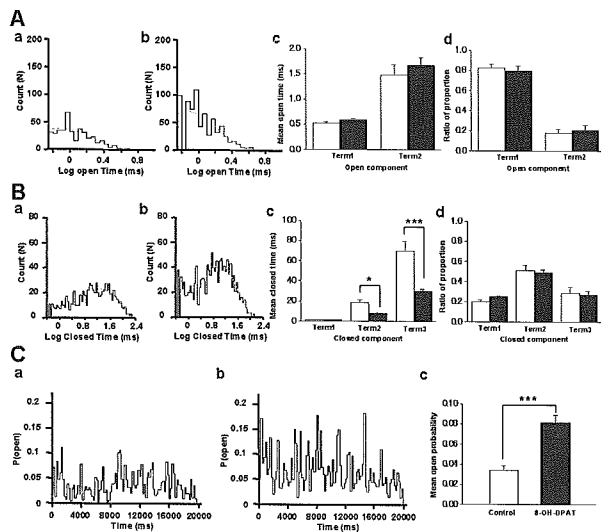


Fig. 3.3. Single channel properties of current in the absence or presence of 8-OH-DPAT.

A: Open time. Distributions of open time in the absence (a) or presence (b) of 8-OH-DPAT were fitted with two logarithmic exponential functions (dotted lines). Data were obtained from the record shown in Fig.3.1. c and d indicate the mean of mean open times, and their ratios of proportions of two components (term1 and term2), respectively. Blank and filled columns indicate the result in the absence and presence of 8-OH-DPAT, respectively. B: Closed time. Distributions of closed time in the absence (a) or presence (b) of 8-OH-DPAT were fitted with three logarithmic exponential functions (dotted lines). Data were obtained from the record shown in Fig.3.1. c and d indicate the mean of mean closed times, and their ratios of proportions of three components (term1, term2 and term3), respectively. Blank and filled columns indicate the result in the absence and presence of 8-OH-DPAT, respectively. C: Distributions of open probabilities of channel in the absence or presence of 8-OH-DPAT were shown in a and b. c indicates the mean of mean open probability. All data in (c) and (d) are represented as the mean \pm S.E.M. of 12 neurons. #: $P < 0.05$. ***: $P < 0.005$.

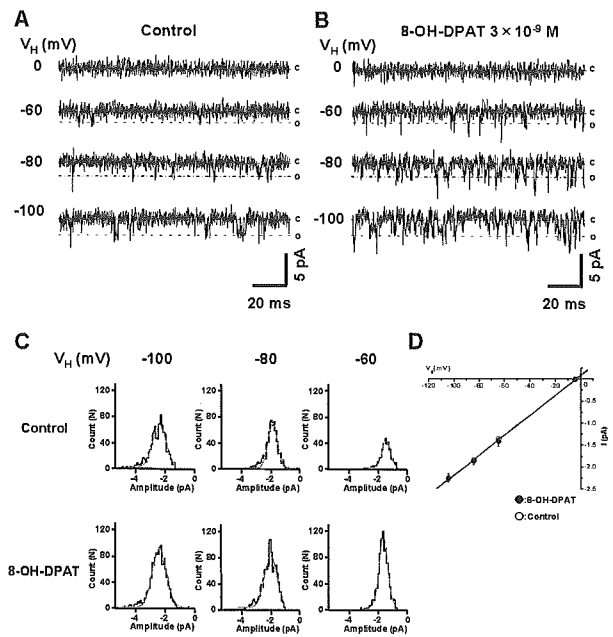


Fig. 3.2. Current-voltage relationship for single channel currents in the absence or presence of 8-OH-DPAT.

A: Representative current traces at various holding potentials (V_H s) in the external solution containing 100 mM K^+ . "c" and "o" indicate the closed and open states. All traces were recorded from the same patch. B: Representative current traces in the presence of 8-OH-DPAT 3×10^{-9} mM at various V_H s. Current recordings were made from the same patch shown in A. C: Histograms of single-channel current amplitude in the absence or presence of 8-OH-DPAT. Gray lines were fitted by equation (2) in the method. D: Statistic analysis of current-voltage relationships. Each point represents the mean \pm S.E.M of 3 neurons.

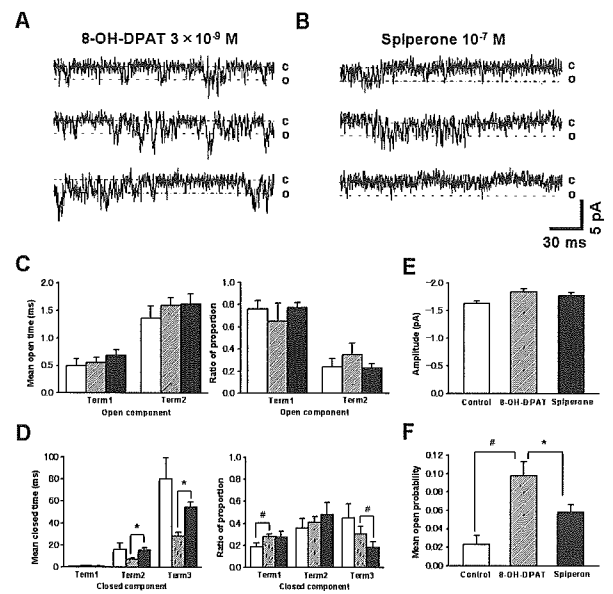


Fig. 3.4. Effect of spiperone on single channel current in the presence of 8-OH-DPAT.

A: Representative current traces in the presence of 8-OH-DPAT 3×10^{-9} M. B: Representative current trace in the presence of 8-OH-DPAT and spiperone 10^{-7} M. Data were obtained from the same patch shown in A. C: Mean open times and ratios of proportion of two open components in the absence of 8-OH-DPAT (blank column), in the presence of 8-OH-DPAT (gray column) and in the presence of both 8-OH-DPAT and spiperone (filled column). D: Mean closed times and Ratios of proportion of three closed components in the absence of 8-OH-DPAT (blank column), in the presence of 8-OH-DPAT (gray column) and in the presence of both 8-OH-DPAT and spiperone (filled column). E: Single-channel current amplitude in each condition shown under the columns. F: Open probability of channels in each condition shown under the columns. All data in C to F are represented as the mean \pm S.E.M. of 3 neurons. #: $P < 0.1$. *: $P < 0.05$.

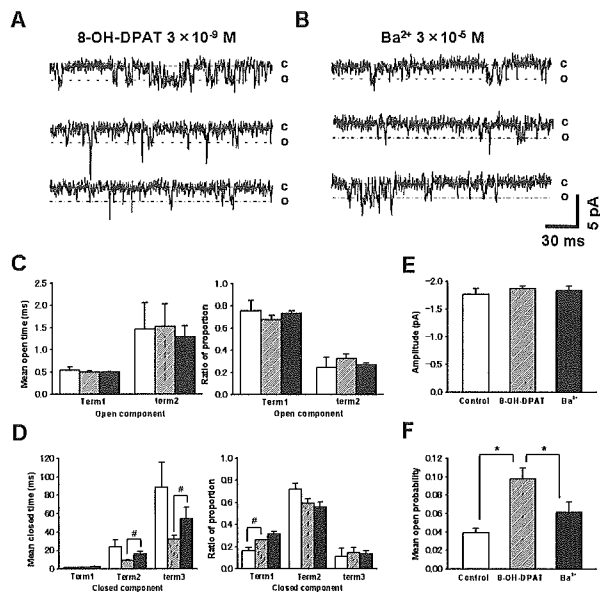


Fig. 3.5. Effect of Ba²⁺ on single channel current in the presence of 8-OH-DPAT.

A: Representative current traces in the presence of 8-OH-DPAT 3×10^{-9} M. B: Representative current trace in the presence of 8-OH-DPAT and Ba²⁺ 3×10^{-5} M. Data were obtained from the same patch shown in A. C: Mean open times and ratios of proportion of two open components in the absence of 8-OH-DPAT (blank column), in the presence of 8-OH-DPAT (gray column) and in the presence of both 8-OH-DPAT and Ba²⁺ (filled column). D: Mean closed times and Ratios of proportion of three closed components in the absence of 8-OH-DPAT (blank column), in the presence of 8-OH-DPAT (gray column) and in the presence of both 8-OH-DPAT and Ba²⁺ (filled column). E: Single-channel current amplitude in each condition shown under the columns. F: Open probability of channels in each condition shown under the columns. All data in C to F are represented as the mean \pm S.E.M. of 3 neurons. #: $P < 0.1$. *: $P < 0.05$.

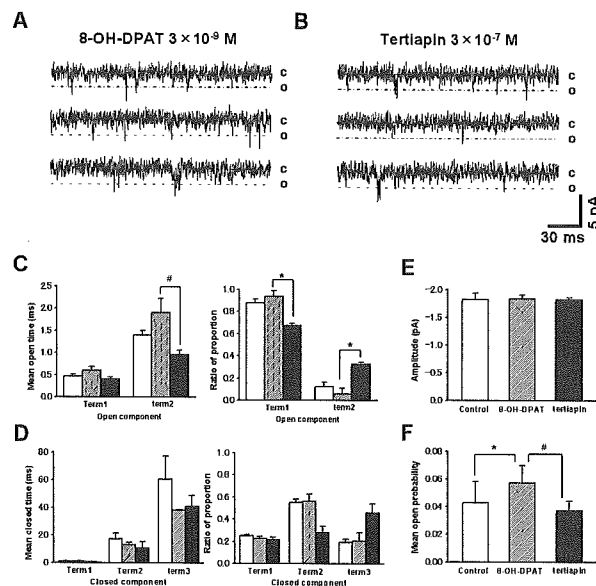


Fig. 3.6. Effect of tertipin on single channel current in the presence of 8-OH-DPAT.

A: Representative current traces in the presence of 8-OH-DPAT 3×10^{-9} M. B: Representative current trace in the presence of 8-OH-DPAT and tertipin 3×10^{-7} M. Data were obtained from the same patch shown in A. C: Mean open times and ratios of proportion of two open components in the absence of 8-OH-DPAT (blank column), in the presence of 8-OH-DPAT (gray column) and in the presence of both 8-OH-DPAT and tertipin (filled column). D: Mean closed times and Ratios of proportion of three closed components in the absence of 8-OH-DPAT (blank column), in the presence of 8-OH-DPAT (gray column) and in the presence of both 8-OH-DPAT and tertipin (filled column). E: Single-channel current amplitude in each condition shown under the columns. F: Open probability of channels in each condition shown under the columns. All data in C to F are represented as the mean \pm S.E.M. of 3 neurons. #: $P < 0.1$. *: $P < 0.05$.

Table 1. Summary of analysed parameters showing the effect of three reagents on the single channel current in the presence of 8-OH-DPAT.

Parameter	Spiperone		Ba ²⁺		Tertipin	
	8-OH-DPAT	Spiperone	8-OH-DPAT	Ba ²⁺	8-OH-DPAT	Tertipin
Amp (pA)	-1.84 \pm 0.06	-1.77 \pm 0.05	-1.87 \pm 0.05	-1.84 \pm 0.08	-1.89 \pm 0.08	-1.83 \pm 0.04
NP(o)	0.1 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01	0.1 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
OT1 (ms)	0.55 \pm 0.09	0.68 \pm 0.11	0.5 \pm 0.01	0.49 \pm 0.02	0.61 \pm 0.08	0.41 \pm 0.04
OT2 (ms)	1.59 \pm 0.14	1.62 \pm 0.10	1.52 \pm 0.52	1.3 \pm 0.24	1.91 \pm 0.32	0.97 \pm 0.10
OP1	0.65 \pm 0.11	0.78 \pm 0.04	0.67 \pm 0.04	0.73 \pm 0.02	0.94 \pm 0.05	0.68 \pm 0.02
OP2	0.35 \pm 0.11	0.23 \pm 0.04	0.33 \pm 0.04	0.27 \pm 0.02	0.09 \pm 0.05	0.33 \pm 0.02
CT1 (ms)	1.09 \pm 0.23	1.03 \pm 0.14	1.9 \pm 0.56	2.38 \pm 0.37	1.36 \pm 0.22	0.73 \pm 0.10
CT2 (ms)	7.05 \pm 1.53	15.59 \pm 2.19	9.04 \pm 0.67	16.36 \pm 2.34	12.97 \pm 2.07	10.84 \pm 4.45
CT3 (ms)	27.06 \pm 3.86	54.19 \pm 4.62	31.93 \pm 3.74	54.43 \pm 12.22	38.06 \pm 6.60	40.79 \pm 8.29
CP1	0.28 \pm 0.02	0.28 \pm 0.05	0.26 \pm 0.02	0.32 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02	0.21 \pm 0.03
CP2	0.41 \pm 0.05	0.48 \pm 0.11	0.59 \pm 0.05	0.56 \pm 0.05	0.56 \pm 0.06	0.28 \pm 0.05
CP3	0.31 \pm 0.07	0.18 \pm 0.06	0.15 \pm 0.05	0.14 \pm 0.03	0.21 \pm 0.07	0.46 \pm 0.09
n	3		3		3	

#: $P < 0.1$. *: $P < 0.05$.

Amp: amplitude, NP(o): open probability, OT1: mean open time of component 1, OT2: mean open time of component 2, OP1: proportion of component 1 in the distribution of open time, OP2: proportion of component 2 in the distribution of open time, CT1: mean closed time of component 1, CT2: mean closed time of component 2, CT3: mean closed time of component 3, CP1: proportion of component 1 in the distribution of closed time, CP2: proportion of component 2 in the distribution of closed time, CP3: proportion of component 3 in the distribution of closed time.

Table 2. Burst analysis of the single channel current in the presence of 8-OH-DPAT with or without blockers.

Parameter	Ba ²⁺		tertapiin	
	8-OH-DPAT	with Ba ²⁺	8-OH-DPAT	With tertapiin
Burst duration (ms)	182.7 \pm 2.36	267.3 \pm 48.17	168.5 \pm 31.92	178.0 \pm 19.92
Events in burst	32.2 \pm 3.31	33.13 \pm 6.92	24.83 \pm 2.89	21.93 \pm 2.38
Burst frequency (Hz)	350.7 \pm 14.21	316.3 \pm 47.57	364.0 \pm 8.02	369.0 \pm 26.13
n	3		3	

本研究において、8-OH-DPAT はシングルチャネルコンダクタンス、逆転電位および平均開時間を変えないことなく、コンダクタンス 22.7 pS の単一イオンチャネルの開確率を上昇させることが明らかとなった。今回の結果は、心筋において GIRK チャネル電流のノイズ解析から得られた「 $G_{\beta\gamma}$ が GIRK チャネルのゲート機構を変えずに開口できるチャネルの数を増加させる」との報告⁶⁾とよく一致した。また、逆転電位および Ba^{2+} の作用からこのチャネルが K^+ チャネルであることが示された。GIRK チャネルであることを示すには、内向き整流性であることを示す必要があるが、Native の興奮膜においては膜電位依存性 K^+ チャネルなども存在するため、0 mV 以上ではこれらのチャネルが開口し、明確な内向き整流を示すことができなかった。しかし、テルチアピンが 8-OH-DPAT 誘発単一 K^+ チャネル電流を抑制したことから、今回解析したチャネルは、GIRK チャネルであることが示唆された。

本研究で得られたシングルチャネルコンダクタンスは、以前に cell-attached パッチクランプ法によりラットの縫線核ニューロンで報告されたセロトニン存在下のシングルチャネルコンダクタンスの一つと一致した¹⁹⁾。Cell-attached 様式の場合、電極内液にセロトニンを溶解してギガオーム ($G\Omega$) シールを形成し、単一イオンチャネル電流を計測する (Fig. 2.2.A)。この方法では、観察される単一イオンチャネル電流がセロトニンにより誘発される電流か否かはわからない。本研究においては、8-OH-DPAT 非存在下に 40 pS と 94 pS の単一イオン電流も観察されることがあった。これらは、報告された他の二つのシングルチャネルコンダクタンスとよく一致する。しかし、8-OH-DPAT はこれらのチャネルの活性に影響せず、またテルチアピンもこれらのチャネルに対して影響しなかった (data not shown)。よって、先の報告における中および大コンダクタンスのチャネルは、GIRK チャネルではないと推察される。

また、本研究結果から得られたコンダクタンスは、大脳皮質錐体ニューロン、大脳基底核ニューロンおよび青斑核ニューロンで報告された GIRK チャネル電流のコンダクタンス (Table. 3.) とよく一致した。再構成 Kir3.2 および Kir3.2/3.3 ヘテロチャネルのコンダクタンスとも近かった。しかし、ラット心筋細胞のシングルチャネルコンダクタンス (44.2 pS) より明らかに小さい値を示した。また、小脳顆粒細胞で得られたコンダクタンスや再構成 Kir3.1/3.2 ヘテロチャネルのコンダクタンスより小さい値を示した。本研究で得られた平均開時間 (0.59 ± 0.04 mS と 1.67 ± 0.15 mS) は、再構成 Kir3.2 チャネルで報告されている平均開時間 0.5 mS および Kir3.2/3.3 ヘテロチャネルで報告されている平均開時間 1.3 mS とよく一致した。その他、Kir3.1/3.2 チャネル、KirNB チャネルとも近い値を示した。閉時間に関する報告は少なく^{14,15,16,17,18)}、考察することは難しいが、2 または 3 個の閉時間成分があるという意味では一致した^{19,20)}。In situ hybridization 法による検討では、縫線核に Kir3.2 (GIRK2) および Kir3.3 (GIRK3) が発現するが、Kir3.1 (GIRK1) は少なく、心筋に多い Kir3.4 (GIRK4) は発現しないことが示唆されている²¹⁾。このことは、シングルチャネルコンダクタンスや平均開時間の結果をよく説明するように思われる。

スピペロンは、開時間を変えずに τ_{e2} と τ_{e3} を延長して開確率を減少させた。このことは、8-OH-DPAT が平均開時間を変えないことなく τ_{e2} と τ_{e3} を短縮して開確率を上昇させたことと逆の結果であった。この結果は、スピペロンが 5-HT_{1A} 受容体拮抗薬として作用したことを示唆する。また、セロトニンは 8-OH-DPAT と同様に 21.3 pS の単一イオンチャネル電流を惹起した (data not shown)。これらをあわせて考えると、8-OH-DPAT は 5-HT_{1A} 受容体を介して GIRK チャネルの開確率を増加したと考えられる。

テルチアピンのシングル GIRK チャネル電流に対する作用は、Kir3.4 を主体とするウサギ心筋ミオサイトにおいて報告されている¹⁴⁾。Kitamura ら (1999) の報告では、テルチアピンはシングルチャネル電流のコンダクタンス及び二つの平均開時間に影響しないという。また、ノイズ解析から速いシングルチャネルキネティクスに影響しないことを予測している。今回の結果は、電流振幅と平均開時間に影響が無かった点で彼らの報告と一致するが、長い開時間成分を短縮する傾向にあった点では異なる。また、心筋においては、今回と同じ濃度のテルチアピンが開確率を $82 \pm 10\%$ 抑制している。よって、ニューロンは心筋よりテルチアピンに対して感受性が低いことが示唆される。これらのことから、心筋とニューロンではテルチアピンの作用に若干の違いがある可能性が考えられた。

Ba^{2+} は、内向き整流性 K^+ チャネルのポアに結合し K^+ の流入をブロックすることが示唆されている^{11,12)}。しかし、単一チャネル

レベルでの詳細な検討は無く、今回その詳細が初めて明らかとなったと言える。提唱されているメカニズムから考えると、平均開時間に影響しなかったのは意外である。

本研究では、Ba²⁺がバーストを起こす可能性を仮定して、バースト解析を行った。しかし、Ba²⁺は少なくとも今回の実験条件下ではバーストを起こしていないと考えられた。

Table 3. Previously reported single GIRK channel activities in various preparations

Cell	Method	Agonist	Conductance (pS)	Mean open time (ms)	Mean closed time (ms)	subtype
Dorsal raphe neurons	Outside-out	5-HT	20 and 33 and 67 ³⁰⁾			
Neocortical pyramidal cells	Whole-cell	Badenon	25.0 ± 0.89			Kir3.1/3.2 and/or Kir3.1/3.3 ³¹⁾
Locus coeruleus neurons	Inside-out	GTP	30	0.47 and 3.25	0.312 and 6.13	Kir3 ³²⁾
Cerebellar granule neurons	Inside-out	Badenon and ATP	34	0.5 and 2.3		Kir3.2, Kir3.1/3.2, Kir3.1/3.3 and Kir3.2/3.3 ³³⁾
Hypocampal basket neurons	Inside-out	Substance P	23	1.1 ± 0.16		Kir3.1/3.3 ³⁴⁾
rabbit cardiac myocytes	Cell-attached	Ach	44.2	0.69 and 3.89		Kir3.1/3.4 ³⁵⁾
CHO-K1 cells	Inside-out	Gβγ subunit	31	1.3		Kir3.2/3.3 ³⁶⁾
Oocytes	Cell-attached	Colonyect Gβγ subunit	30 ± 2	0.1 and 0.5		Kir3.2 ³⁷⁾
Oocytes	Inside-out	Gβγ subunit	37	1.4		Kir3.1/3.2 ³⁸⁾
Oocytes	Inside-out	Gβγ subunit		0.81 and 5.0	0.51, 3.97, 35.7, 238 and 142	Kir3.1/3.5 ³⁹⁾
				0.71 and 2.86	0.62, 4.5, 31.4, and 220	Kir3.1/3.4 ⁴⁰⁾

第4章 5-HT_{1A}受容体作動薬誘発シングル GIRK チャネル電流に対するクロペラスチンの作用

第1節 本章の目的

Whole-cell 様式のパッチクランプ法を用いた当研究室の研究では、細胞外 pH が 7.4 の時に比べ、クロペラスチンの pKa に近い pH 9.0 とした時、クロペラスチンのセロトニン誘発 GIRK チャネル活性化電流の抑制作用が強く、また、電極内から細胞内にクロペラスチンを投与すると、経時的にセロトニン誘発 GIRK チャネル活性化電流が抑制される。これらのことなどから、分子型のクロペラスチンが細胞膜を透過して細胞内側から GIRK チャネルを抑制する可能性が示唆されている。前章において、8-OH-DPAT がコンダクタンス 22.7 pS のシングル GIRK チャネル電流の開確率を増加させることが示唆されたことから、本章ではこれを指標に GIRK チャネル電流に対するクロペラスチンの抑制作用を単一チャネルレベルで詳細に検討した。

第2節 実験成績

1) 細胞外から投与したクロペラスチンの作用

8-OH-DPAT 3×10⁻⁹ M を 60 秒間投与し、8-OH-DPAT によりシングルチャネル電流が増加することを確認した後、クロペラスチン 10⁻⁶ M と 8-OH-DPAT 3×10⁻⁹ M を 60 秒間同時投与した。シングルチャネル電流解析には、投与開始後 30 秒から 30 秒間の記録を用いた。その結果、Fig. 4.1.F に示すように、クロペラスチンは 8-OH-DPAT により増加したシングルチャネル電流の発現を抑制し、開確率は 0.07 ± 0.01 から 0.05 ± 0.01 に有意に減少した。電流振幅には有意な影響は見られなかったが、短い成分の平均開時間が有意に短縮され、長い成分の平均開時間も短縮傾向が見られた。短い開時間成分の割合は有意に減少し、長い開時間成分の割合は増加した。一方、短い閉時間成分と中間の閉時間成分に有意な影響は見られなかったが、長い閉時間成分が有意に延長した。閉時間成分の割合には有意な差は見られなかった。

ホールセルモードにおける記録では、クロペラスチンの前処置後もクロペラスチンとセロトニンの同時投与によりセロトニン誘発 GIRK チャネル活性化電流の不活性化キネティクスが速くなる。このことから、クロペラスチンがオープンチャネルブロックを起こす可能性も考えられた。そこで、バースト解析を行ったが、Table.5. に示すように、クロペラスチンはバーストパラメーターに影響を与えなかった。

2) 細胞内から投与したクロペラスチンの作用

細胞内からの薬物の作用を検討するためには、inside-out 様式が適しているが、前章でも述べたように、急性単離縫線核ニューロンにおいては、他の急性単離中枢ニューロンの場合と同様に inside-out 様式でのシングルイオンチャネル電流記録は困難であった。そこでまず、クロペラスチンが細胞内から GIRK チャネルの開口を抑制するかを明確にするために、電極内液に 10^{-6} M のクロペラスチンを溶解し、outside-out 様式で 8-OH-DPAT の作用を検討した。outside-out 様式の細胞膜パッチを形成後、クロペラスチンを細胞膜直下まで十分浸透させるために 3 分間この状態を維持した。その後、100 mM K^{+} を含む細胞外液を細胞外から急速投与し、0 秒後から 60 秒間単一イオンチャネル電流を記録した後、8-OH-DPAT 3×10^{-9} M を細胞外から急速投与した。その結果、8-OH-DPAT による明らかなシングルイオンチャネル電流の増加は観察されなかった。

8-OH-DPAT 投与開始後 30 秒後から 30 秒間の記録を解析した結果を Fig. 4.2 と Table. 4. に示す。いずれのパラメーターに関しても有意な変化は見られなかった。

次に、 10^{-6} M のクロペラスチンを電極内液に溶解し、同様に 8-OH-DPAT の作用を検討した。細胞内クロペラスチン存在下に 8-OH-DPAT を投与した時のシングルイオンチャネル電流の解析結果を Fig 4.3. と Table. 4. に示す。その結果、8-OH-DPAT によりシングルイオンチャネル電流の開確率に増加傾向がみられた。平均電流振幅と平均開時間に有意な変化はなかったが、3 つの閉時間成分のうち中間成分の平均閉時間が有意に短縮し、長い閉時間成分の平均閉時間に短縮傾向が見られた。

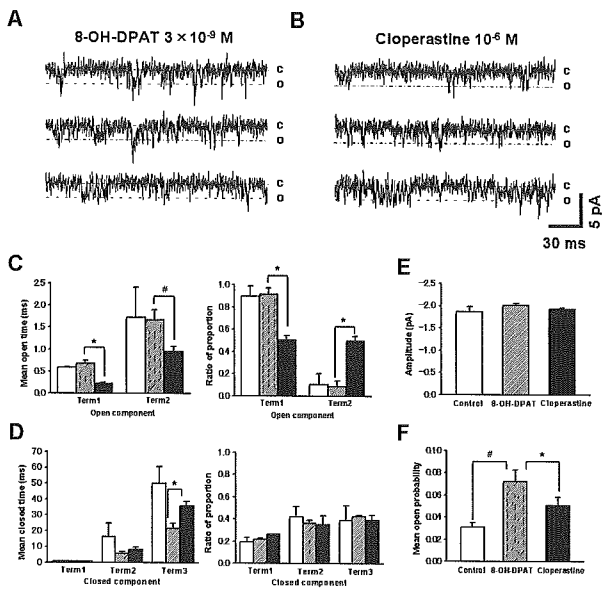


Fig. 4.1. Effect of cloperastine on single channel current in the presence of 8-OH-DPAT.

A: Representative current trace in the presence of 8-OH-DPAT 3×10^{-9} M. B: Representative current trace in the presence of 8-OH-DPAT and cloperastine 10^{-6} M. Data were obtained from the same patch shown in A. C: Mean open times and ratios of proportion of two open components in the absence of 8-OH-DPAT (blank column), in the presence of 8-OH-DPAT (gray column) and in the presence of both 8-OH-DPAT and cloperastine (filled column). D: Mean closed times and Ratios of proportion of three closed components in the absence of 8-OH-DPAT (blank column), in the presence of 8-OH-DPAT (gray column) and in the presence of both 8-OH-DPAT and cloperastine (filled column). E: Single-channel current amplitude in each condition shown under the columns. F: Open probability of channels in each condition shown under the columns. All data are represented as the mean \pm S.E.M. of 3 neurons. #: $P < 0.1$. *: $P < 0.05$.

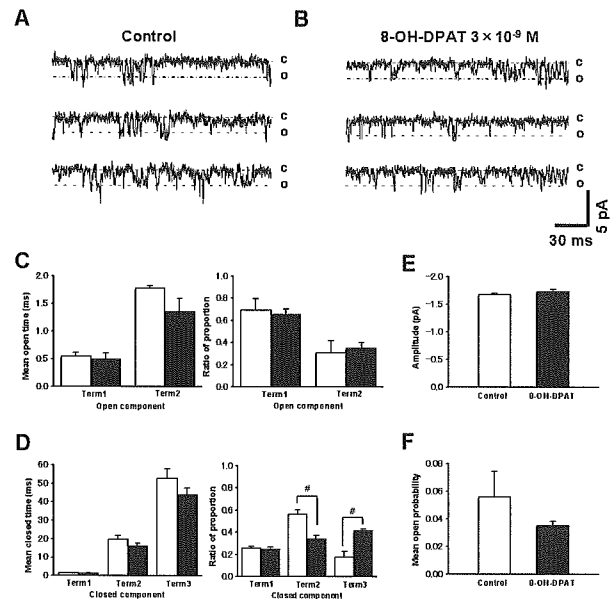


Fig. 4.2. Effect of intracellular cloperastine 10^{-6} M on single channel current in the presence of 8-OH-DPAT.

A: Representative current trace in the absence of 8-OH-DPAT 3×10^{-9} M but in the presence of intracellular cloperastine 10^{-6} M. B: Representative current trace in the presence of 8-OH-DPAT and intracellular cloperastine. Data were obtained from the same patch shown in A. C: Mean open times and Ratios of proportion of two open components. Blank and filled columns indicate the result in the absence and presence of 8-OH-DPAT, respectively. D: Mean closed times and Ratios of proportion of three closed components in the presence of intracellular cloperastine with or without 8-OH-DPAT. E: Open probability of channels in the presence of intracellular cloperastine with or without 8-OH-DPAT. All data are represented as the mean \pm S.E.M. of 3 neurons. #: $P < 0.1$. *: $P < 0.05$.

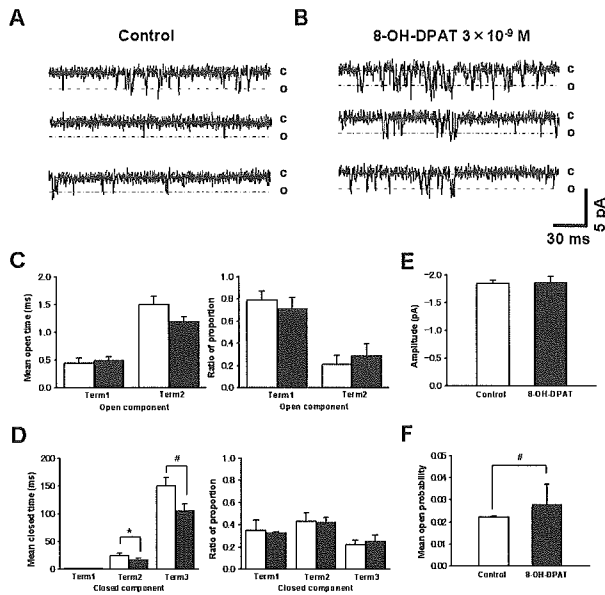


Fig. 4.3. Effect of intracellular cloperastine 10^{-6} M on single channel current in the presence of 8-OH-DPAT.

A: Representative current trace in the absence of 8-OH-DPAT 3×10^{-9} M but in the presence of intracellular cloperastine 10^{-6} M. B: Representative current trace in the presence of 8-OH-DPAT and intracellular cloperastine. Data were obtained from the same patch shown in A. C: Mean open times and Ratios of proportion of two open components. Blank and filled columns indicate the result in the absence and presence of 8-OH-DPAT, respectively. D: Mean closed times and Ratios of proportion of three closed components. E: Single-channel current amplitude in the presence of intracellular cloperastine with or without 8-OH-DPAT. F: Open probability of channels in the presence of intracellular cloperastine with or without 8-OH-DPAT. All data are represented as the mean \pm S.E.M. of 3 neurons. #: $P < 0.1$. *: $P < 0.05$.

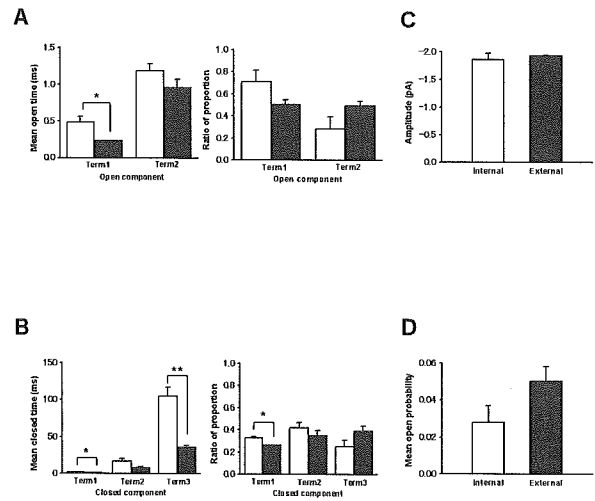


Fig. 4.4. Comparing the effect of internally applied cloperastine with that of externally applied one on single channel current in the presence of 8-OH-DPAT.

A: Mean open times and ratios of proportion of two open components. Blank and filled columns indicate the effect of cloperastine applied internally and externally, respectively. B: Mean closed times and ratios of proportion of three closed components. C: Single-channel current amplitude in the presence of 8-OH-DPAT after internal or external application of cloperastine. D: Open probability of channels in the presence of 8-OH-DPAT and intracellular or extracellular cloperastine. All data are represented as the mean \pm S.E.M. of 3 neurons.

Table 4. Summary of analysed parameters showing the effect of cloperastine on the single channel current in the presence of 8-OH-DPAT.

Parameter	Extracellular Cloperastine 10^{-6} M		Intracellular Cloperastine 10^{-6} M		Intracellular Cloperastine 10^{-6} M	
	8-OH-DPAT	Cloperastine	Control	8-OH-DPAT	Control	8-OH-DPAT
Amp (pA)	-2.02 \pm 0.01	-1.93 \pm 0.02	-1.67 \pm 0.03	-1.72 \pm 0.04	-1.66 \pm 0.06	-1.86 \pm 0.12
NP(o)	0.07 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.06 \pm 0.02	0.04 \pm 0	0.02 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01 #
OT1 (ms)	0.68 \pm 0.06	0.23 \pm 0.02	0.55 \pm 0.07	0.49 \pm 0.11	0.45 \pm 0.09	0.49 \pm 0.07
OT2 (ms)	1.67 \pm 0.24	0.96 \pm 0.11	1.79 \pm 0.05	1.34 \pm 0.26	1.20 \pm 0.15	1.19 \pm 0.09
OP1	0.92 \pm 0.06	0.5 \pm 0.04	0.69 \pm 0.11	0.65 \pm 0.05	0.70 \pm 0.08	0.71 \pm 0.11
OP2	0.08 \pm 0.06	0.5 \pm 0.04	0.31 \pm 0.11	0.35 \pm 0.05	0.21 \pm 0.08	0.29 \pm 0.11
CT1 (ms)	0.71 \pm 0.13	0.69 \pm 0.08	1.33 \pm 0.12	1.10 \pm 0.23	1.4 \pm 0.26	1.59 \pm 0.20
CT2 (ms)	5.90 \pm 1.1	0.36 \pm 1.64	10.45 \pm 2.35	15.6 \pm 1.70	24.39 \pm 5.1	16.40 \pm 4.04
CT3 (ms)	21.65 \pm 3.34	36.90 \pm 2.71	52.5 \pm 5.42	43.49 \pm 3.06	140.6 \pm 15.45	104.9 \pm 12.79 #
CP1	0.21 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01	0.24 \pm 0.03	0.35 \pm 0.09	0.33 \pm 0.01
CP2	0.34 \pm 0.03	0.35 \pm 0.06	0.60 \pm 0.04	0.34 \pm 0.03 #	0.43 \pm 0.08	0.42 \pm 0.05
CP3	0.42 \pm 0.02	0.39 \pm 0.04	0.18 \pm 0.05	0.42 \pm 0.01 #	0.22 \pm 0.04	0.25 \pm 0.06
n	3		3		3	

#: $P < 0.1$. *: $P < 0.05$.

Amp: amplitude, NP(o): open probability, OT1: mean open time of component 1, OT2: mean open time of component 2, OP1: proportion of component 1 in the distribution of open time, OP2: proportion of component 2 in the distribution of open time, CT1: mean closed time of component 1, CT2: mean closed time of component 2, CT3: mean closed time of component 3, CP1: proportion of component 1 in the distribution of closed time, CP2: proportion of component 2 in the distribution of closed time, CP3: proportion of component 3 in the distribution of closed time.

Table 5. Burst analysis of the single channel current in the presence of 8-OH-DPAT with or without cloperastine.

Parameter	Cloperastine	
	8-OH-DPAT	With Cloperastine
Burst duration (ms)	131.7 \pm 25.72	162.6 \pm 43.34
Events in burst	22.47 \pm 1.73	21.6 \pm 2.01
Burst frequency (Hz)	398.6 \pm 28.47	382.0 \pm 18.55
n	3	

Table 6. Summary of the effect of externally applied various re agents on the single channel current in the presence of 8-OH-DPAT.

	Cloperastine		Spiperone		Ba ²⁺		Tertiapin	
Amplitude	→		→		→		→	
Mean open probability	↓		↓		↓		↓	
Mean open or closed time	τ	p	τ	p	τ	p	τ	p
Shorter open component	↓	↓	→	→	→	→	→	↓
Longer open component	↘	↑	→	→	→	→	↘	↑
Shorter closed component	→	→	→	→	→	→	→	→
Middle closed component	→	→	↑	→	↗	→	→	→
Longer closed component	↑	→	↑	↘	↗	→	→	→

τ : mean open or closed time. p: proportion. ↑ : increased. ↓ : decreased. ↗ : tended to increase.

↘ : tended to decrease → : not affected.

第3節 考察

本研究では、中枢性鎮咳薬クロペラスチンの作用メカニズムを outside-out 様式のパッチクランプ法を用いて電気生理学的に詳細に検討した。まず、細胞外より投与したクロペラスチンの 8-OH-DPAT 誘発シングル GIRK チャネル電流に対する作用の解析から、クロペラスチンは単純に開確率を減少するのではなく、チャネルの開時間を短縮させ、閉時間を延長させることが明らかとなった。このことは、G_{βγ}サブユニットがチャネルのゲート機構を変えずに開口できるチャネルの数を増やすとの報告⁶⁾や前章で得られたスピペロンの作用様式とは異なることを意味する。つまり、クロペラスチンは G 蛋白質と GIRK チャネルとの相互作用を阻害しているのではないと考えられた。また、クロペラスチンの作用様式は、前章で検討した Ba²⁺およびテルチアピンとも異なることが明らかとなった (Table. 6.)。

本研究はまた、細胞内からクロペラスチンを作用させても、GIRK チャネル電流が抑制されることを示す。当研究室の whole-cell 様式における検討においても、電極内から投与したクロペラスチンがセロトニン誘発 GIRK チャネル活性化電流を抑制することが示されている。しかし whole-cell 様式の場合、細胞外から投与した時にほぼ完全に GIRK チャネル活性化電流を抑制する 10⁻⁵ M をパッチ後 30 分以上作用させても約 50%の抑制しか示さなかった。このため、クロペラスチンが細胞内から作用するかは不確実な部分が残されていた。本研究結果は、細胞内から投与したクロペラスチン 10⁻⁵ M が完全に GIRK チャネル電流を抑制することを示す。Whole-cell 様式にて電極内から薬物を作用させる場合には、細胞膜直下まで薬物が十分に拡散するにはかなりの時間がかかるのかもしれない。また、whole-cell 様式での検討では、GIRK チャネルと PIP₂の結合にクロペラスチンが影響する可能性も示唆されている。仮にこれが正しいとすると、GIRK チャネルの PIP₂結合部位は、膜貫通領域 2 (TM2 領域) より C 末端側で、細胞膜内側に近い細胞内領域にある (Fig. 1.1) ため、whole-cell 様式ではこの領域までクロペラスチンが到達しにくかった可能性も考えられる。Outside-out 様式では、細胞膜が電極内液に直接接しているため、クロペラスチンが良く作用したのと考えられ、本様式を用いた利点と考えられる。

ところで、クロペラスチン 10⁻⁶ M の作用は、細胞内から投与した時の方が強かった。電極内液の pH は 7.2 であるので、この事実は、外から与えたクロペラスチンが細胞膜を透過した後、イオン型となって細胞質側から GIRK チャネルを抑制する可能性を示唆する。細胞外から与えた時と細胞内から与えたときのクロペラスチンの作用を比較すると、細胞内から与えた方が開確率が小さく、閉時間も延長している反面、開時間の短い成分には影響を与えていない。バースト解析からは、細胞外のクロペラスチンがチ

チャンネルポアをブロックする可能性は、否定的である。このため、この点の違いについては、もう少し検討を加える必要があるだろう。

今後は、さらにクロベラスチンのシングル GIRK チャンネル電流抑制作用に対する PIP_2 の影響の検討や、キメラチャンネルおよび点変異ミュータントを用いた検討を加え、クロベラスチンの作用部位を特定していく必要がある。また、局所麻酔薬であるプリピバカインが GIRK チャンネルの PIP_2 結合部位に拮抗するとの報告²⁷⁾があり、プリピバカインの作用と比較することも有用かもしれない。クロベラスチンの結合部位が特定できれば、GIRK チャンネルとクロベラスチンのドッキングシュミレーションなどにより、より選択的な GIRK チャンネルブロッカーの構造設計が可能になると期待される。また、本実験に用いたクロベラスチンはラセミ体である。今後、鏡像異性体を合成し、その作用を検討することも選択的 GIRK チャンネルブロッカーの開発には必要である。

一方、心筋にも GIRK チャンネル($K_{ir}3.4$)が存在する。心筋の GIRK チャンネルを抑制すると心拍数の増加を起し、心毒性の原因となると考えられる。このため、 $K_{ir}3.4$ チャンネルに対する作用を検討し、 $K_{ir}3.2$ 及び $K_{ir}3.3$ に選択性の高い GIRK チャンネルブロッカーの開発が望まれる。

以上まとめると、本研究はクロベラスチンの GIRK チャンネル抑制メカニズムの詳細を明らかにし、クロベラスチンの作用部位が細胞内側にある可能性も強く示唆した。本研究は、今後の選択的 GIRK チャンネルブロッカー開発の上で重要な基礎知見を提供するものと言える。

第5章 総括および結論

GIRK チャンネルは、中枢神経系に広く分布し、神経伝達の調節を介して様々な生理・薬理機能と関わっていると考えられる。近年、当研究室では、作用機序が解明されていない中枢性鎮咳薬の研究に端を発し、調べたすべての中枢性鎮咳薬がセロトニン誘発 GIRK チャンネル活性化電流を抑制することを見出した。その中で最も強い活性を示したクロベラスチンは、脳梗塞後の排尿障害も改善することを各種実験動物モデルで明らかにした。このように、GIRK チャンネルの抑制剤が排尿障害治療薬ともなる可能性があるが、GIRK チャンネルの鎮咳作用や排尿障害改善作用との関連については、不明な点が多く残されている。クロベラスチンの GIRK チャンネル抑制メカニズムについても明らかにされていない。現在、有効な GIRK チャンネルブロッカーは、ハチ毒でペプチドのテルチアピンしかなく、そのテルチアピンも他の K_{ir} チャンネルを抑制するなど、真に選択的な GIRK チャンネルブロッカーとは言えない。このようなことから、GIRK チャンネルの役割の解明、GIRK チャンネルをターゲットにした医薬品の開発の上で、選択的かつ活性の強い GIRK チャンネルブロッカーの開発が望まれる。そこで本研究では、クロベラスチンの GIRK チャンネル抑制メカニズムを解明することを目的として、第一に、ラット縫線核急性単離ニューロンを用い、 5-HT_{1A} 受容体アゴニスト $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$ によるシングル GIRK チャンネル電流のキネティクスとその薬理的性質について outside-out パッチクランプ法により電気生理学的に詳細に検討した。続いて、クロベラスチンのシングル GIRK チャンネル電流に対する作用を検討し、スピペロン、 Ba^{2+} およびテルチアピンの作用と比較した。その結果、以下の成績を得た。1) ラット縫線核急性単離ニューロンにおいて $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$ は、 5-HT_{1A} 受容体を介してコンダクタンス 22.7 pS の K^+ チャンネルを活性化させた。この電流をテルチアピンが抑制したことから、GIRK チャンネル電流であることが示唆された。2) クロベラスチンは、短い開時間成分を短縮し、3 つの開時間成分のうち、最も長い開成分を延長したが、単一チャンネル電流振幅には影響を与えなかった。3) クロベラスチンの $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$ 誘発単一 GIRK チャンネル電流に対する抑制様式は、開時間を変えずに閉時間を延長したスピペロン、開時間と閉時間に有意な影響を与えなかった Ba^{2+} 、および 2 つの開時間成分の存在比を変えたテルチアピンとは異なることが明らかとなった。4) 細胞内から作用させたクロベラスチンは、 $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$ による単一 GIRK チャンネル電流の開確率の増加を強く抑制した。この時 $8\text{-OH}\cdot\text{DPAT}$ は開時間成分に影響を与えず、平均閉時間を短縮した。以上の結果は、クロベラスチンの GIRK チャンネル抑制作用が、オープンチャンネルブロックによるものではない可能性、ならびに、 $G_{\beta\gamma}$ サブユニットと GIRK チャンネルとの相互作用の阻害によるものでもない可能性を示唆する。また、クロベラスチンは細胞膜を透過して細胞内側から GIRK チャンネルを抑制する可能性が示唆される。本知見は、より選択的な GIRK チャンネルブロッカーの開発、ひいては GIRK チャンネルをターゲットとした新規医薬品の開発の上で重要な基礎知見を与えるものと考えられる。

参考文献

- 1) Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.*, 20, 91 (1997)
- 2) Doyle, D.A., Morais, Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., MacKinnon, R., The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, 280, 69-77 (1998)
- 3) Lee, H.M., Tsai, K.J., Lin, C.H., Huang, C.L., Tung, C.S., Arecoline desensitizes carbachol-stimulated phosphatidylinositol breakdown in rat brain cortices. *J. Neurochem.*, 70, 1189-98 (1998)
- 4) Lopes, C.M., Zhang, H., Rohacs, T., Jin, T., Yang, J., Logothetis, D.E., Alterations in conserved Kir channel-PIP₂ interactions underlie channelopathies. *Neuron*, 34, 933-44 (2002)
- 5) Shyng, S.L., Cukras, C.A., Harwood, J., Nichols, C.G., Structural determinants of PIP₂ regulation of inward rectifier K_{ATP} channels. *J. Gen. Physiol.*, 116, 599-608 (2000)
- 6) Hosoya, Y., Yamada, M., Ito, H., Kurachi, Y., A functional model for G protein activation of the muscarinic K⁺ channel in guinea pig atrial myocytes. Spectral analysis of the effect of GTP on single-channel kinetics. *J. Gen. Physiol.*, 108, 485-95 (1996)
- 7) Kanjhan, R., Coulson, E.J., Adams, D.J., Bellingham, M.C., Tertiapin-Q blocks recombinant and native large conductance K⁺ channels in a use-dependent manner. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 314, 1353-61, Epub. (2005)
- 8) Dascal, N., Signalling via the G protein-activated K⁺ channels. *Cell. Signal*, 9, 551-73, Review. (1997)
- 9) Nishida, M., MacKinnon, R., Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell*, 111, 957-65 (2002)
- 10) Murase, K., Randic, M., Shirasaki, T., Nakagawa, T., Akaike, N., Serotonin suppresses N-methyl-D-aspartate responses in acutely isolated spinal dorsal horn neurons of the rat. *Brain. Res.*, 525, 84-91 (1990)
- 11) Alagem, N., Dvir, M., Reuveny, E., Mechanism of Ba²⁺ block of a mouse inwardly rectifying K⁺ channel: differential contribution by two discrete residues. *J. Physiol.*, 534, 381-93 (2001)
- 12) Lancaster, M.K., Dibb, K.M., Quinn, C.C., Leach, R., Lee, J.K., Findlay, J.B., Boyett, M.R., Residues and mechanisms for slow activation and Ba²⁺ block of the cardiac muscarinic K⁺ channel, Kir3.1/Kir3.4. *J. Biol. Chem.*, 275, 35831-9 (2000)
- 13) Penington, N.J., Kelly, J.S., Fox, A.P., Unitary properties of potassium channels activated by 5-HT in acutely isolated rat dorsal raphe neurones. *J. Physiol.*, 469, 407-26 (1993)
- 14) Kitamura, H., Yokoyama, M., Akita, H., Matsushita, K., Kurachi, Y., Yamada, M., Tertiapin potently and selectively blocks muscarinic K⁺ channels in rabbit cardiac myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293, 196-205 (2000)
- 15) Grigg, J.J., Kozasa, T., Nakajima, Y., Nakajima, S., Single-channel properties of a G-protein-coupled inward rectifier potassium channel in brain neurons. *J. Neurophysiol.*, 75, 318-28 (1996)
- 16) Yakubovich, D., Pastushenko, V., Bitler, A., Dessauer, C.W., Dascal, N., Slow modal gating of single G protein-activated K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.*, 524, 737-55 (2000)
- 17) Jelacic, T.M., Kennedy, M.E., Wickman, K., Clapham, D.E., Functional and biochemical evidence for G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels composed of GIRK2 and GIRK3. *J. Biol. Chem.*, 275, 36211-6 (2000)
- 18) Han, J., Kang, D., Kim, D., Properties and modulation of the G protein-coupled K⁺ channel in rat cerebellar granule neurons: ATP versus phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Physiol.*, 550, 693-706, Epub. (2003)
- 19) Kim, D., Pleumsamran, A., Cytoplasmic unsaturated free fatty acids inhibit ATP-dependent gating of the G protein-gated K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.*, 115, 287-304 (2000)

- 20) Nemeč, J., Wickman, K., Clapham, D.E., $G_{\beta\gamma}$ binding increases the open time of I_{KACH} : kinetic evidence for multiple $G_{\beta\gamma}$ binding sites. *Biophys. J.*, 76, 246-52 (1999)
- 21) Karschin, C., Dissmann, E., Stuhmer, W., Karschin, A., IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K^+ channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J. Neurosci.*, 16, 3559-70 (1996)
- 22) Larkman, P.M., Kelly, J.S., The use of brain slices and dissociated neurones to explore the multiplicity of actions of 5-HT in the central nervous system. *J. Neurosci. Methods.*, 59, 31-9 (1995)
- 23) Takigawa, T., Alzheimer, C., Variance analysis of current fluctuations of adenosine- and baclofen-activated GIRK channels in dissociated neocortical pyramidal cells. *J. Neurophysiol.*, 82, 1647-50 (1999)
- 24) Bajic, D., Koike, M., Albsoul-Younes, A.M., Nakajima, S., Nakajima, Y., Two different inward rectifier K^+ channels are effectors for transmitter-induced slow excitation in brain neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99, 14494-9, Epub. (2002)
- 25) Kofuji, P., Davidson, N., Lester, H.A., Evidence that neuronal G-protein-gated inwardly rectifying K^+ channels are activated by $G_{\beta\gamma}$ subunits and function as heteromultimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92, 6542-6 (1995)
- 26) Velimirovic, B.M., Gordon, E.A., Lim, N.F., Navarro, B., Clapham, D.E., The K^+ channel inward rectifier subunits form a channel similar to neuronal G protein-gated K^+ channel. *FEBS. Lett.*, 379, 31-7 (1996)
- 27) Zhou, W., Arrabit, C., Choe, S., Slesinger, P.A., Mechanism underlying bupivacaine inhibition of G protein-gated inwardly rectifying K^+ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 6482-7, Epub. (2001)

(本内容は、投稿論文として準備中である)

Inhibition of the GABA_B receptor-mediated inwardly rectifying K⁺ current by centrally acting antitussives in rat dorsal raphe neurons

Tetsuya Shirasaki, Keisuke Abe, Fumio Soeda and Kazuo Takahama

Department of Environmental and Molecular Health Sciences, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, 5-1 Oe-Honmachi, Kumamoto 862-0973, Japan

Running Title

Inhibition of GABA_B responses by antitussives

27 pages and 5 figures

Correspondence:

Kazuo Takahama, Ph.D., Professor

Department of Environmental and Molecular Health Sciences

Graduate School of Pharmaceutical Sciences

Kumamoto University

5-1 Oe-Honmachi, Kumamoto, 862-0973 JAPAN

Phone and Fax: +81-96-371-4334

e-mail: takahama@gpo.kumamoto-u.ac.jp

Abstract

The effect of centrally acting antitussives (CAATs) on the inwardly rectifying K⁺ currents mediated by GABA_B receptors in acutely dissociated dorsal raphe nucleus (DRN) neurones of rats was studied using nystatin-perforated patch and conventional whole-cell patch recording configurations under voltage-clamp conditions. Dextromethorphan (DM) rapidly and reversibly inhibited the K⁺ currents induced by 3×10⁻⁵ M baclofen in a concentration-dependent manner with a half-maximum inhibitory concentration of 8.23×10⁻⁶ M. The inhibitory effect of DM was voltage-independent. DM caused a suppression of the maximum response of the baclofen concentration–response curve, thus suggesting a non-competitive type of inhibition. In neurones perfused intracellularly with a pipette-solution containing the nonhydrolysable GTP analog GTPγS, baclofen activated K⁺ currents in an irreversible manner. DM suppressed the current irreversibly activated by intracellular GTPγS even in the absence of the agonist. Cloperastine and naltriben also inhibited the inwardly rectifying K⁺ currents activated by baclofen with a half-maximum inhibitory concentration of 1.36×10⁻⁶ M and 4.36×10⁻⁵ M, respectively. These results suggest that CAATs may inhibit the G-protein-gated

inwardly rectifying K⁺ channels coupled with the GABA_B receptor in the central nervous system.

Keywords: Cloperastine; Dextromethorphan; Dorsal raphe nucleus; Dissociated neurone; GABA_B receptor; GIRK channels; Naltriben; Non-opioid antitussive

Abbreviations: CAATs, centrally acting antitussives; CGP34358, 3-aminopropyl(diethoxymethyl)phosphinic acid; DM, dextromethorphan; DRN, dorsal raphe nucleus; EGTA, ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; GIRK, G protein-gated K⁺ channel; GTPγS, guanosine 5'-o-(3-thiotriphosphate); *I*_{Bac}, baclofen-induced GIRK channel current; *I*_{5-HT}, 5-HT_{1A} receptor-mediated GIRK channel current; NTS, nucleus tractus solitarius; PTX, pertussis toxin; V_H, holding potential

Introduction

It is well known that centrally acting antitussives (CAATs) act to cough center in the brainstem and elevate the cough threshold (Benson *et al.*, 1953; Tortella *et al.*, 1989). However, the mechanism remains largely unknown. We recently revealed that dextromethorphan (DM), one of the most widely used non-narcotic antitussives (Tortella *et al.*, 1989) inhibited rapidly and reversibly the inwardly rectifying K⁺ currents mediated by 5-HT_{1A} receptor in the DRN neurons (Ishibashi *et al.*, 2000). Since the 5-HT_{1A} receptors in raphe nuclei works as the autoreceptor and negatively regulate serotonin (5-HT) neurons (Blier *et al.*, 1987; Innis *et al.*, 1987; Sharp *et al.*, 1989; Sotelo *et al.*, 1990; Zifa *et al.*, 1992), inhibition of the inwardly rectifying K⁺ currents may increase the serotonergic tone in the brainstem. Indeed, DM increases the release of 5-HT from the nucleus tractus solitarius (NTS), an important relay center in the modulation of cough (Kamei *et al.*, 1992).

5-HT neurons in raphe nuclei project not only to brainstem but also to virtually all regions of the brain, being involved in a large number of physiological functions (Jacobs *et al.*, 1992; Leibowitz *et al.*, 1998). The electrical activity of 5-HT neurons is under a fine control exerted by different neurotransmitters including 5-HT itself, noradrenaline, dopamine, histamine, glutamate, γ -aminobutyric acid (GABA),

glycine and several neuropeptides (Adell *et al.*, 2002; Jacobs *et al.*, 1992). The inhibitory neurotransmitter GABA plays an essential role in the regulation of 5-HT neurons, operating through local GABAergic interneurons as well as distal GABAergic afferents that project to the raphe nuclei (Gervasoni *et al.*, 2000). Both GABA_A and GABA_B receptors are present in the raphe (Bischoff *et al.*, 1999; Bowery *et al.*, 1987; Chu *et al.*, 1990) and their stimulation appears to inhibit firing activity of 5-HT neurons (Gallager *et al.*, 1976; Innis *et al.*, 1987). Extra- and intracellular recordings have provided evidence that stimulation of GABA_B receptors, as well as 5-HT_{1A} receptors, hyperpolarizes 5-HT neurons through the opening of a voltage dependent, pertussis toxin-sensitive, inwardly rectifying potassium channel coupled to a G protein (GIRK channel) (Colmers *et al.*, 1988; Innis *et al.*, 1987; Innis *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). Recent immunohistochemical studies have demonstrated the co-existence of GABA_B receptor-like immunoreactivity with serotonergic cell markers in single raphe neurons (Varga *et al.*, 2002; Wirtshafter *et al.*, 2001). In accordance with that, microdialysis studies have shown that the infusion of the GABA_B receptor agonist baclofen in the DRN diminishes the release of 5-HT (Tao *et al.*, 1996).

In the raphe nuclei, Kir3.1(GIRK1), Kir3.2(GIRK2) and Kir3.3(GIRK3) subunits are

present (Chen *et al.*, 1997; Karschin *et al.*, 1996). These subunits are assembled into hetero tetramer to compose the functional channels (Jelacic *et al.*, 2000; Mark *et al.*, 2000; Torrecilla *et al.*, 2002). At the present, it is unclear whether 5-HT_{1A} receptors in the DRN share the same GIRK channels with GABA_B receptors. In the present study, therefore, we investigated the effect of CAATs on the GIRK channel currents induced by baclofen to examine how GABA_B receptor-mediated mechanisms are affected by CAATs using nystatin-perforated and conventional whole-cell recording techniques in acutely dissociated rat DRN neurones.

Methods

Preparation

Animals were treated in accordance with the Guidelines of the Japanese Pharmacological Society and Kumamoto University for the Care and Use of Laboratory Animals.

Neurones were acutely dissociated from the DRN of rats as described previously (Ishibashi *et al.*, 2000; Shirasaki *et al.*, 2004). Briefly, ten- to sixteen-day-old Wistar rats were decapitated under pentobarbital sodium anaesthesia. The brain was quickly removed from the skull and was sliced at a thickness of 400 μm with a

microslicer (DTK-1000, Dosaka, Kyoto, Japan). Following 60 min maintenance in the Krebs's solution saturated with 95% O₂ and 5% CO₂ at room temperature (21–24°C), the slices were treated with pronase (125 µg / ml) at 31°C for 15–30 min and subsequently with thermolysin (125 µg / ml) at 31°C for 15–30 min. After the enzyme treatment, the DR regions were identified in a 35 mm culture dish (Primaria 3801, Becton Dickinson, NJ, USA) coated with silicone (Silicone, Shin-Etsu, Tokyo, Japan) under a binocular microscope, and dissected out with a micro feather knife (Feather No.715, Osaka, Japan). The dissected pieces were gently triturated in a new dish filled with a HEPES-buffered external solution by the use of fire-polished fine pipettes under a phase-contrast microscope.

Solutions

The Krebs's solution consisted of (mM): NaCl 109.5, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgCl₂ 1.3, CaCl₂ 2.5, NaHCO₃ 15.5 and glucose 11.5, saturated with 5% CO₂-95% O₂ gas. The ionic composition of the HEPES-buffered external solution was (mM): NaCl 131.7, KCl 5, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 2.5, glucose 11.5 and HEPES 10. External solution containing 20 mM K⁺ (20K external solution) was prepared by replacing NaCl in the HEPES-buffered external solution with equimolar KCl. The pH was adjusted to 7.4