

1999年11月23日
独立行政法人 理化学研究所

アルコールの新たな生体内標的チャネルを発見

- 飲酒時に脳機能が変化するメカニズム -

新潟大学・脳研究所（田中隆一所長）と理化学研究所・脳科学総合研究センター（伊藤正男所長）の共同研究グループは、エタノールが細胞膜に存在する G 蛋白質活性化型カリウムチャネル（以下「GIRK チャネル」という。）の開口を直接活性化することを明らかにした。GIRK チャネルは脳と心臓（心房）に存在し、神経細胞の興奮性や心拍数の制御において重要な働きをすることが知られているが、今回の研究により、飲酒時に達する血中エタノール濃度においてチャネルの開口が起こることが明らかになった。また、GIRK チャネルに変異を有するマウスを用いた行動解析によって、エタノールによる GIRK チャネルの開口が鎮痛作用に深く関わっていることも裏付けた。これらのことは、今後の脳機能とアルコールとの関係の解明のみならず、アルコール中毒等の治療薬や全く新たな鎮痛薬の開発、さらにはアルコール飲用によるストレス解消の分子メカニズムの解明につながるものと期待され、今後の研究に極めて大きなインパクトを与えるものと考えられる。

本研究の成果の詳細は、平成 11 年 12 月 1 日に発行される Nature Neuroscience 誌 12 号で発表される。

1. 背景

アルコール（エタノール）は、古くから飲用され広く親しまれている。その作用は脳機能のほか、心臓、肝臓などの末梢臓器の機能にも関わる。かつては細胞膜脂質への非特異的な作用と考えられていたが、最近ではいくつかのイオンチャネル（細胞膜に存在し、イオンが細胞内外へ移動する時の通り道となる部分）の機能への影響が見いだされてきている。しかしながら、様々なエタノール作用を説明する機序はまだ不十分であった。

これまでに、エタノールが神経細胞発火の減少、膜の過分極、内向き整流性^{*1}のカリウム電流の増強などの生理作用を有することが知られていたが、そのメカニズムはわかっていなかった。新潟大学・脳研究所・分子神経病理学（小林 徹:医学博士）と理化学研究所・脳科学総合研究センター（BSI）・情動機構研究チーム（池田和隆:BSI 研究員、医学博士）らは、これらの現象が GIRK チャネルを含む内向き整流性カリウム（IRK）チャネルの特徴であることに着目した。GIRK チャネルは数種のタイプがあり、脳内に広く分布するとともに、心房にも多く存在し、いろいろな G 蛋白質^{*2}共役型受容体（例えばドーパミンやアドレナリンなどの受容体）の活性化を介して、神経細胞の興奮性や心拍数の抑制の調節に重要な働きをする分子である。

2. 手法と成果

(1) 手法

まず、研究対象チャネルのマウス cDNA を単離し、それらを用いて mRNA を合成した。

合成 mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に微量注入してチャネル蛋白質を発現させ、膜電位固定法を用いてアルコールに対する卵母細胞の応答を電気生理学的に測定した。GIRK チャネルがエタノールによって直接開口制御されるかを検討するために、通常 GIRK チャネルの機能を制御している G 蛋白質の阻害剤を用いた実験を行うとともに、単一チャネルの解析を行った。さらに、アミノ酸配列が一つ変異した GIRK チャネルを持つウィーバーマウスを用いた行動及び生理学的解析によって、エタノールの GIRK チャネルに対する効果の生体レベルでの意義を検討した。

(2) 成果

1) エタノールによる GIRK チャネルの開口

アフリカツメガエル卵母細胞蛋白質発現系を用い、エタノールに対する卵母細胞の応答を電気生理学的に測定し、エタノールが脳タイプの GIRK1/2 チャネルと心臓タイプの GIRK1/4 チャネルを活性化することを見いだした。この活性化は飲酒時に達する血中エタノール濃度で起こった。この活性化された電流は、IRK ファミリーに特徴的な内向き整流性を示しかつそれらのチャネルブロッカーであるバリウムイオンで消失した。また、このエタノール効果はチャネルの発現量に比例した。一方、同じチャネルファミリー内で類似構造を示す IRK3 チャネルには影響しなかった。炭素数の異なる一連の直鎖アルコールが各タイプの GIRK チャネルに対して特徴的な作用を示したので、アルコールは細胞膜脂質の乱れを引き起こすのではなく、GIRK チャネルに直接作用する可能性が考えられた。この可能性を検討するために、通常 GIRK チャネルの開口制御をしている G 蛋白質の機能を、百日咳毒素などの阻害剤を用いて阻害した。G 蛋白質機能阻害下においてもエタノールは GIRK チャネルを活性化させた。さらに、単一イオンチャネルの解析から、エタノールが細胞内のセカンドメッセンジャーを介さずに GIRK チャネルの開口を増加させることがわかり、エタノールが GIRK チャネルの開口を直接制御することが明らかになった。

2) 生体内におけるエタノールの GIRK 効果

ウィーバーマウスは GIRK2 チャネル内に一つのアミノ酸配列変異を持つ。今回、この変異 GIRK2 チャネルに対するエタノールの作用を調べたところ、エタノールはこのチャネル活性に影響しなかった。そこで、この変異 GIRK チャネルをもつウィーバーマウスにおいて各種のエタノール効果を行動生理学的に解析したところ、このマウスではエタノールの鎮痛効果が選択的に減弱していることが明らかになった。この結果から、生体内でのエタノール効果のうち少なくとも鎮痛効果に GIRK チャネルは深く関わっていることを裏付けた。また、エタノールの徐脈効果には、エタノールによる心臓タイプ GIRK1/4 チャネルの開口が関与していると考えられた。

これまでにいくつかのイオンチャネルに対するエタノールの効果が報告されてきたが、これらのエタノールの効果にはアゴニストや膜の脱分極によるチャネルの活性化が前提であった。しかし、今回の結果から、GIRKチャネルは、種々のG蛋白質共役型受容体の活性化やG蛋白質を介する細胞内情報伝達系に関係なく、エタノールのみで活性化されることが明らかになった。GIRKチャネルはエタノールの重要な標的であると考えられる。

3. 今後への期待

本研究は、アルコールの作用を解明する上で極めて重要な知見であり、脳機能との関係をはじめ今後のアルコール研究において大きなインパクトを与えるものとして期待される。

エタノール効果におけるGIRKチャネルの役割を今後更に検討することで、アルコール中毒や離脱、依存症の病態においてもGIRKチャネルの関与が示される可能性があり、これら病態の治療薬開発に繋がると期待される。またGIRKチャネルに働く全く新たな鎮痛薬の可能性も考えらる。さらにアルコール飲用によるストレス解消の分子メカニズムの解明が期待される。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所 脳科学総合研究センター(BSI)
情動機構研究チーム

BSI 研究員、医学博士

池田 和隆

Tel : 048-462-1111 ex 6436

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

吉垣

Tel : 048-467-9271 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@postman.riken.go.jp

※1 内向き整流性

細胞内に向かってイオンが流れやすい性質のこと。ただしカリウムイオンの場合、細胞内の方がカリウムイオンの濃度が高いため、チャネルが開くとカリウムイオンは細胞内から外へ流れて行くことになる。

※2 G蛋白質(GTP結合蛋白質)

受容体が受けた情報を細胞内に伝達する役割を果たす蛋白質の一種。通常は受容体に情報物質が結合するとその情報がG蛋白質に伝えられ、さらにG蛋白質がチャネルや酵素などの機能を制御するという経路になっている。

	血中濃度 (%)	酒量	酔いの状態
爽快期	0.02~0.04	ビール<大びん>(~1本) 日本酒(~1合) ウイスキー・シングル(~2杯)	さわやかな気分になる 皮膚が赤くなる 陽気になる 判断力が少しにぶる
ほろ酔い期	0.05~0.10	ビール(1~2本) 日本酒(1~2合) ウイスキー・シングル(3杯)	ほろ酔い気分になる 手の動きが活発になる 抑制がとれる(理性が失われる) 体温が上がる 脈が速くなる
酩酊初期	0.11~0.15	ビール(3本) 日本酒(3合) ウイスキー・ダブル(3杯)	気が大きくなる 大声でがなりたてる 怒りっぽくなる 立てばふらつく
酩酊期	0.16~0.30	ビール(4~6本) 日本酒(4~6合) ウイスキー・ダブル(5杯)	千鳥足になる 何度も同じことをしゃべる 呼吸が速くなる 吐き気・おう吐がおこる
泥酔期	0.31~0.40	ビール(7~10本) 日本酒(7合~1升) ウイスキー・ボトル(1本)	まともに立てない 意識がはっきりしない 言語がめちゃめちゃになる
昏睡期	0.41~0.50	ビール(10本以上) 日本酒(1升以上) ウイスキー・ボトル(1本以上)	ゆり動かしても起きない 大小便はたれ流しになる 呼吸はゆっくりと深い 死亡

(出展) アルコール健康医学協会ホームページより

図1、GIRKチャネルは酩酊期よりも酒量が増すと開口すると考えられる。

G I R Kチャネルの構造

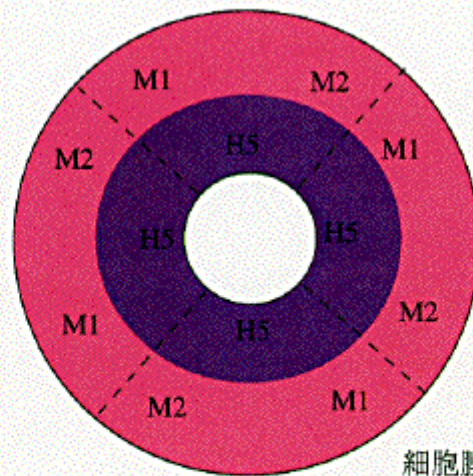
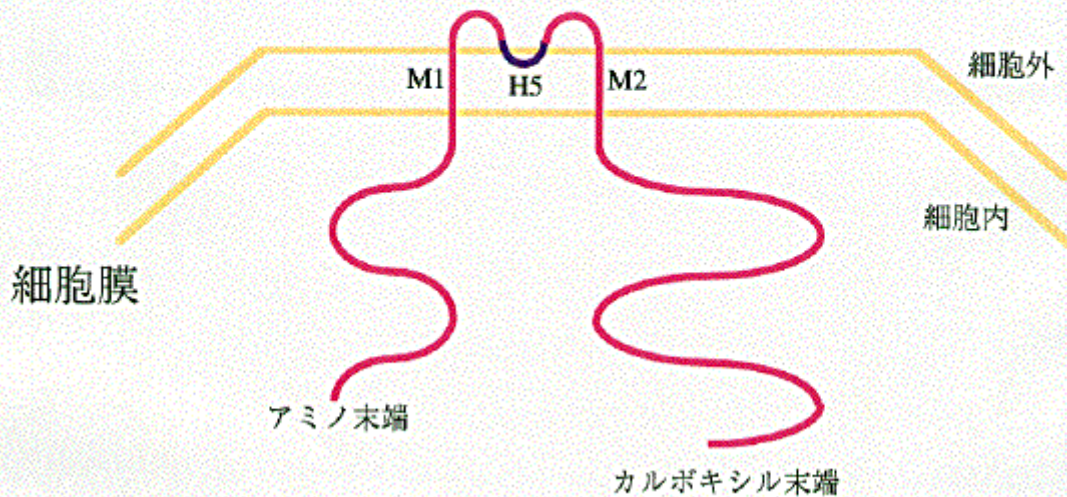


図2、G I R Kチャネルは細胞膜を2回貫通し (M1, M2)、H5と呼ばれる部位が膜に食い込む構造を取っている。H5部位はイオンを通す中心部を形成する。チャネルは4つのサブユニットが合わさって (4量体で) 機能する。サブユニットにはG I R K1~4の4種類があり、脳タイプはG I R K1/2、心臓タイプはG I R K1/4の組み合わせのチャネルが機能する。

GIRKチャネルの脳内分布

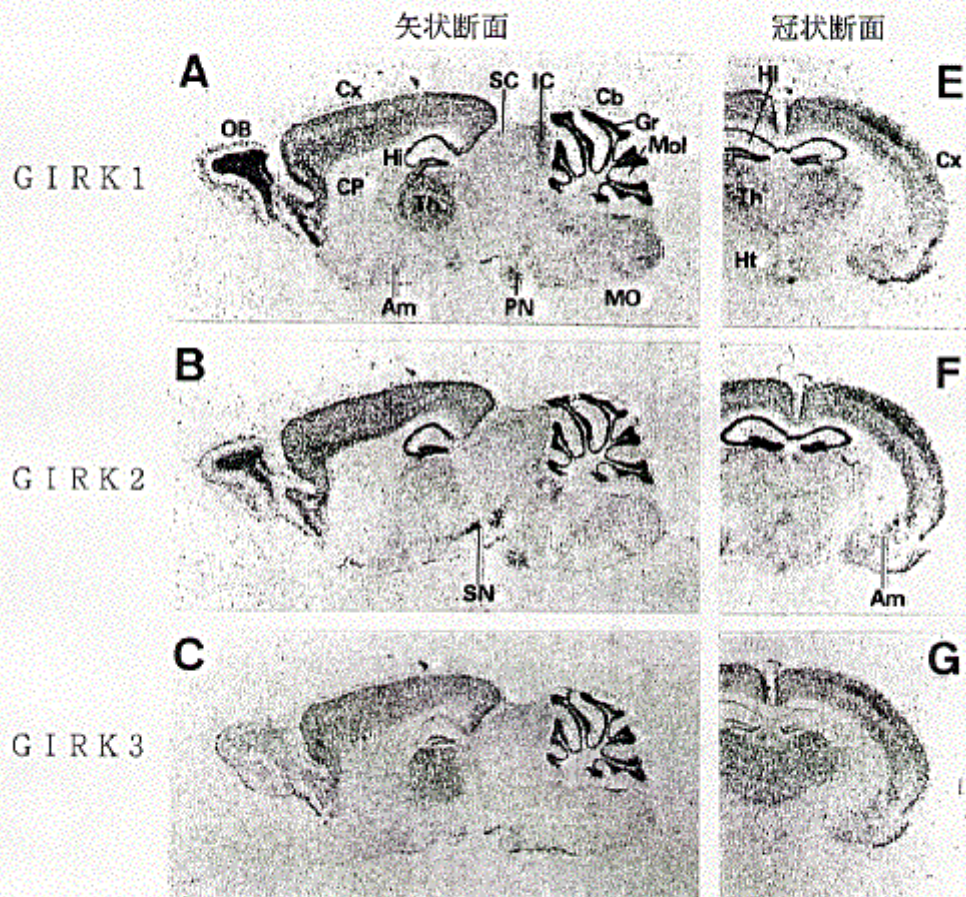


図3、GIRKチャネルは脳内に広く分布する。GIRK1～3は脳で、GIRK1、4は心臓で発現する。

GIRKチャネルの作用機序

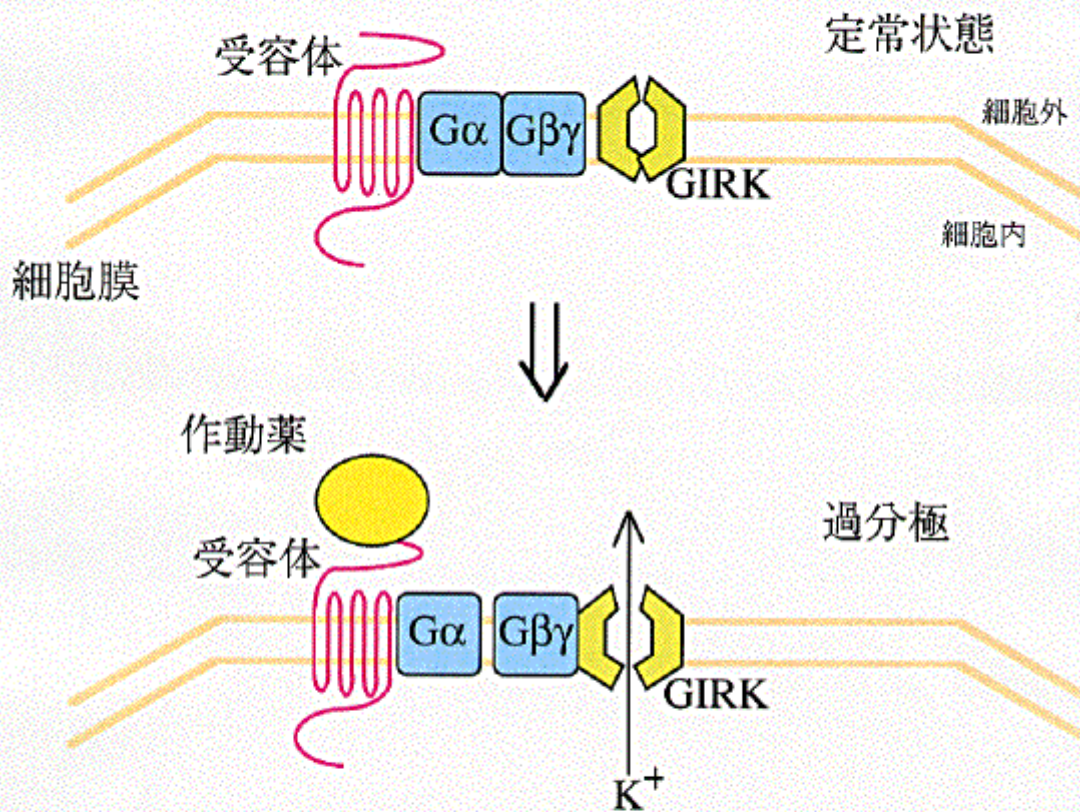


図4、オピオイド、M₂ムスカリニック、D₂ドパミン、α₂アドレナリン受容体などのG_{i/o}。蛋白質共役型の膜7回貫通型受容体が活性化すると、そのG蛋白質のβγサブユニットが遊離してGIRKチャネルを開口させる。GIRKチャネルの開口によりカリウムイオンは外向きに流れ、細胞膜が過分極になり、細胞の活動性が抑えられる。

今回行った実験の種類 (図5)

- 1、アフリカツメガエル卵母細胞発現系
- 2、単一チャネル解析
(パッチクランプ法)
- 3、動物行動実験

アフリカツメガエル卵母細胞発現系

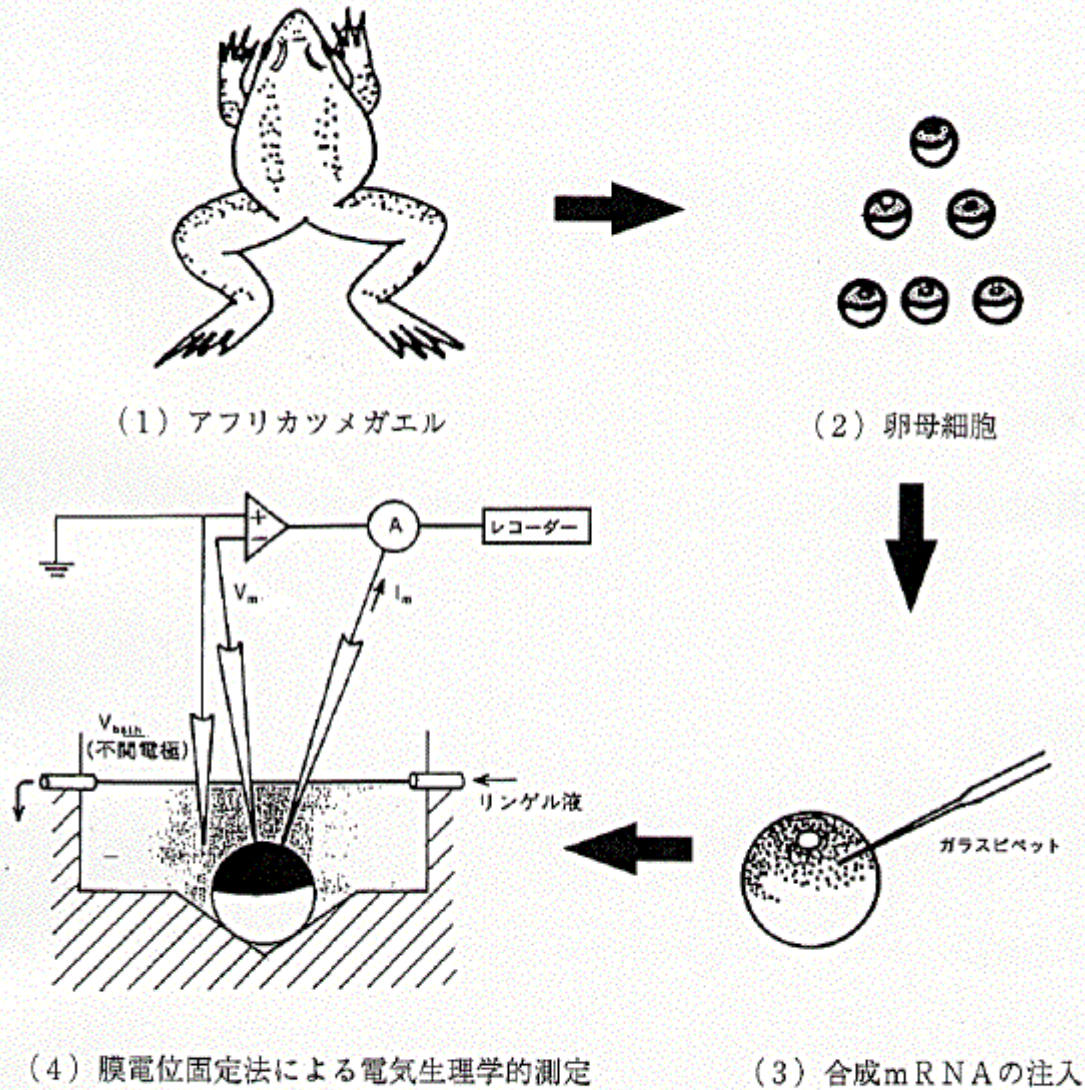


図6、アフリカツメガエル(1)より卵母細胞(2)を採取し、イオンチャネルのcDNAをもとに生体外で合成したmRNAを注入し(3)、細胞膜上に発現したチャネルの機能を電気生理学的解析装置(4)で解析する。

エタノールはG I R Kチャンネルを開く

脳タイプG I R Kチャンネル

エタノール



心臓型G I R Kチャンネル

エタノール



I R Kチャンネル

エタノール



図7、G I R Kチャンネルはエタノールによって開口する。G I R Kチャンネルと類似のI R Kチャンネルはエタノールによって開口しない。

直鎖アルコールの G I R Kチャネル開口効果

	脳タイプ	心臓タイプ
メタノール	開く	開く
エタノール	開く	開く
プロパノール	開く	開く
ブタノール	開く	抑制
ペンタノール	抑制	抑制

図8、脳タイプ（G I R K 1 / 2）、心臓タイプ（G I R K 1 / 4）の両者とも直鎖アルコールにより開閉が影響される。脳タイプと心臓タイプでブタノールの効果は反対である。

エタノールはG蛋白質を介さずに GIRKチャンネルを開く

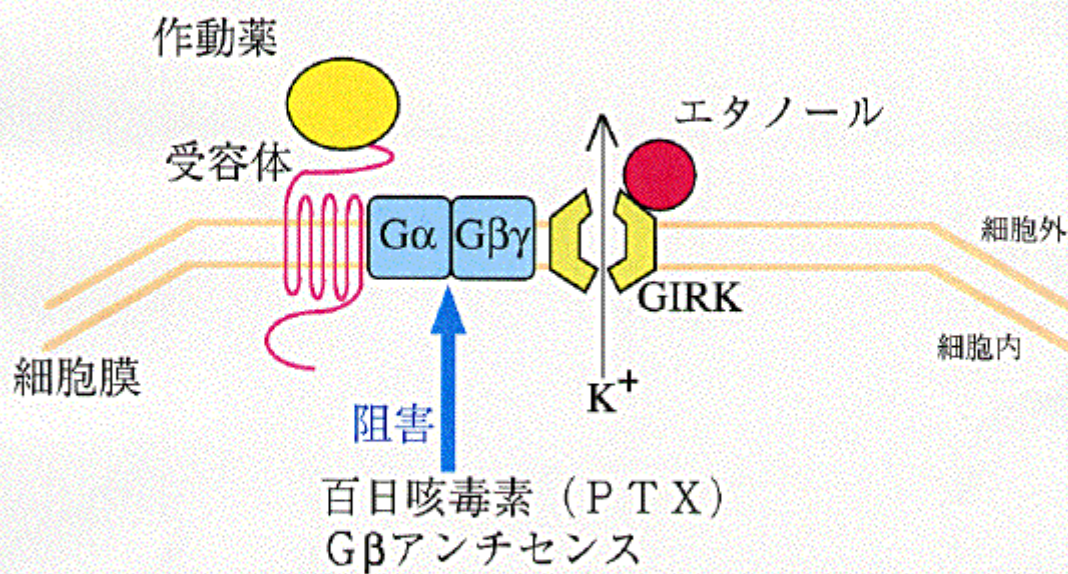
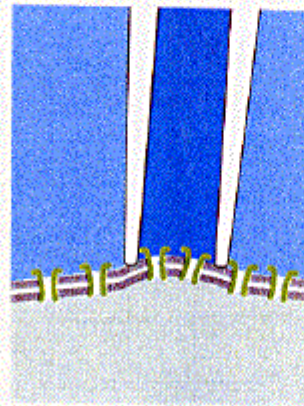
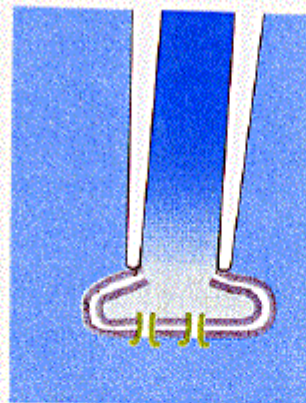


図9、百日咳毒素 (PTX) やG蛋白質ベータサブユニットのアンチセンスは $G\beta\gamma$ 蛋白質の機能を阻害する。このような阻害下においても、エタノールは GIRKチャンネルを開口させる。

単一チャネルの解析法 (パッチクランプ法)



セルアタッチ法

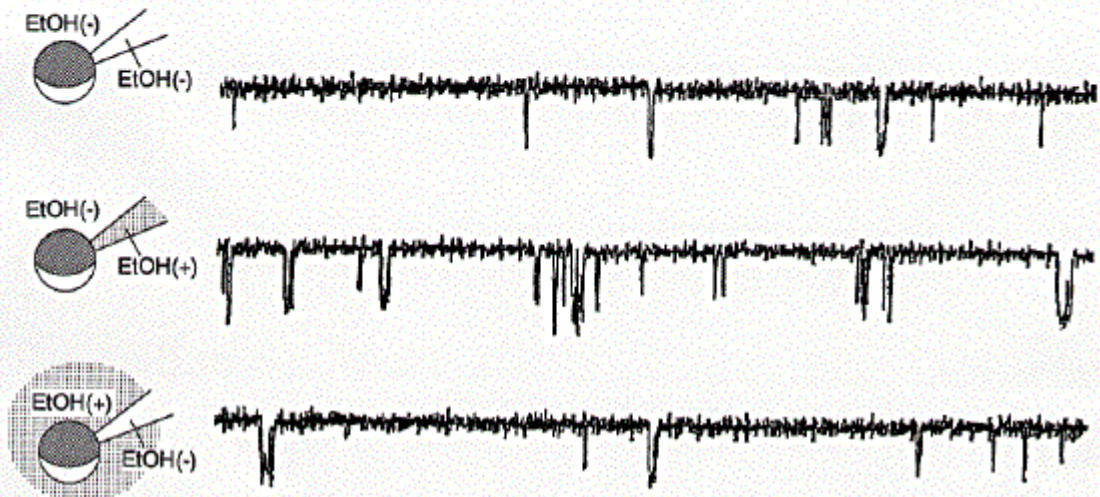


アウトサイドアウト法

図10、パッチクランプ法にはいくつかの方法があるが、今回はセルアタッチ法とアウトサイドアウト法を用いた。セルアタッチ法ではガラス電極内液にエタノールを混入し、アウトサイドアウト法では外液中にエタノールを混入する。

単一GIRKチャネルの エタノールによる直接開口

セルアタッチ法



アウトサイドアウト法

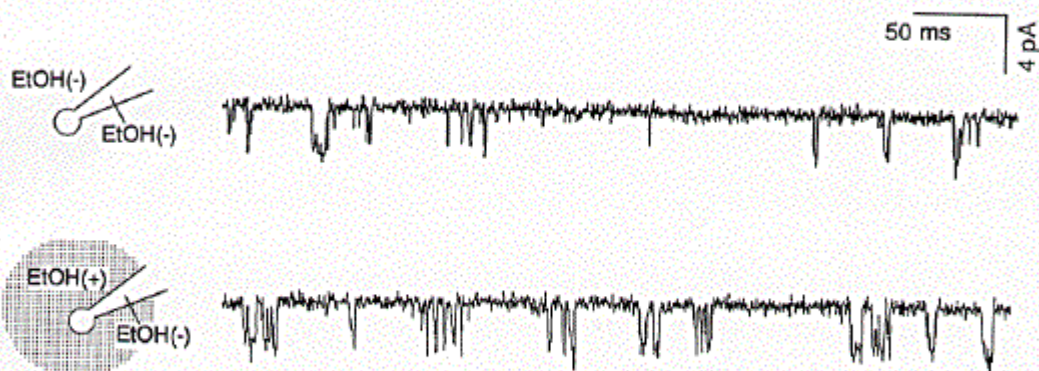


図11、1つのGIRKチャネルが開口すると決まった大きさの電流がチャネルを流れるので、記録線が下向きにずれる。エタノールの投与によりチャネルの開口頻度が増す。

ウィーバーミュータントGIRK チャンネルはエタノールに非感受性

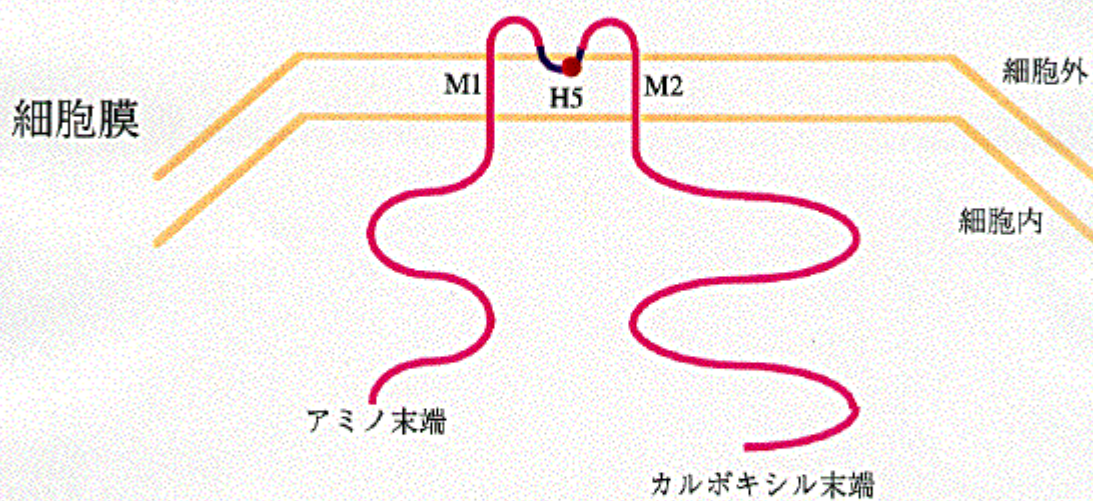


図12、ウィーバーミュータントマウスは、変異した脳タイプGIRKチャンネルを持つ。この変異チャンネルはGIRK2サブユニットのチャンネル形成部(H5)に1つのアミノ酸変異を有する(赤丸部位)。

エタノールが引き起こす生理現象

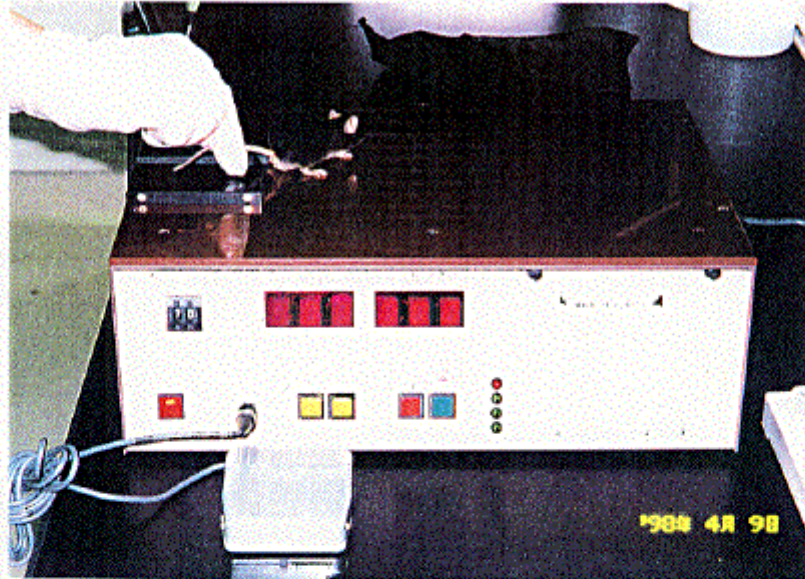
(図13)

ウィーバー
マウスでは

- | | |
|------------------|-------|
| ・ 体温低下 | 正常 |
| ・ 徐脈 | 正常 |
| ・ 運動量上昇
(低濃度) | 正常 |
| ・ 鎮静 (高濃度) | 正常 |
| ・ 鎮痛 | 著明に減弱 |

鎮痛効果の測定法

テイルフリック法



ホットプレート法

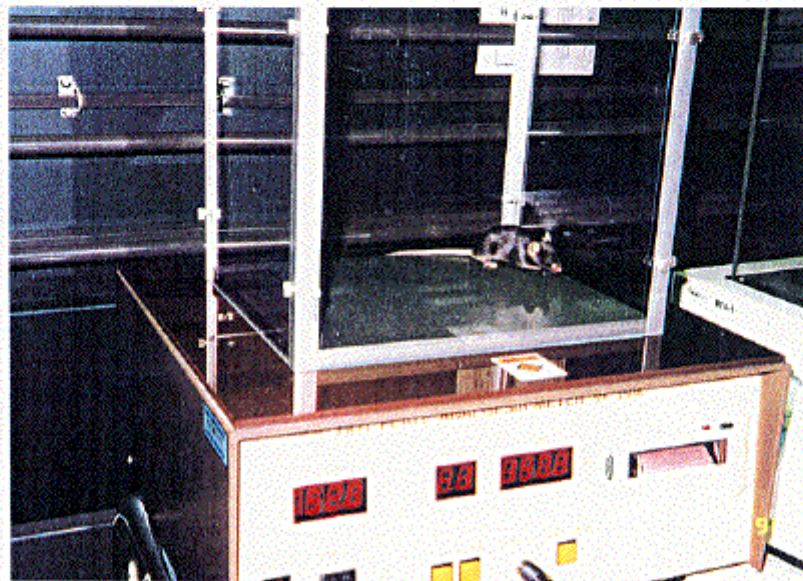


図14、テイルフリック法ではマウスの尾に熱線をあて、尾をよけるまでの時間を測定する。ホットプレート法ではマウスを熱い金属板の上に載せ、飛び上がるまでの時間を測定する。

エタノールはオピオイド鎮痛薬と同様に
GIRKチャネルを開口させる

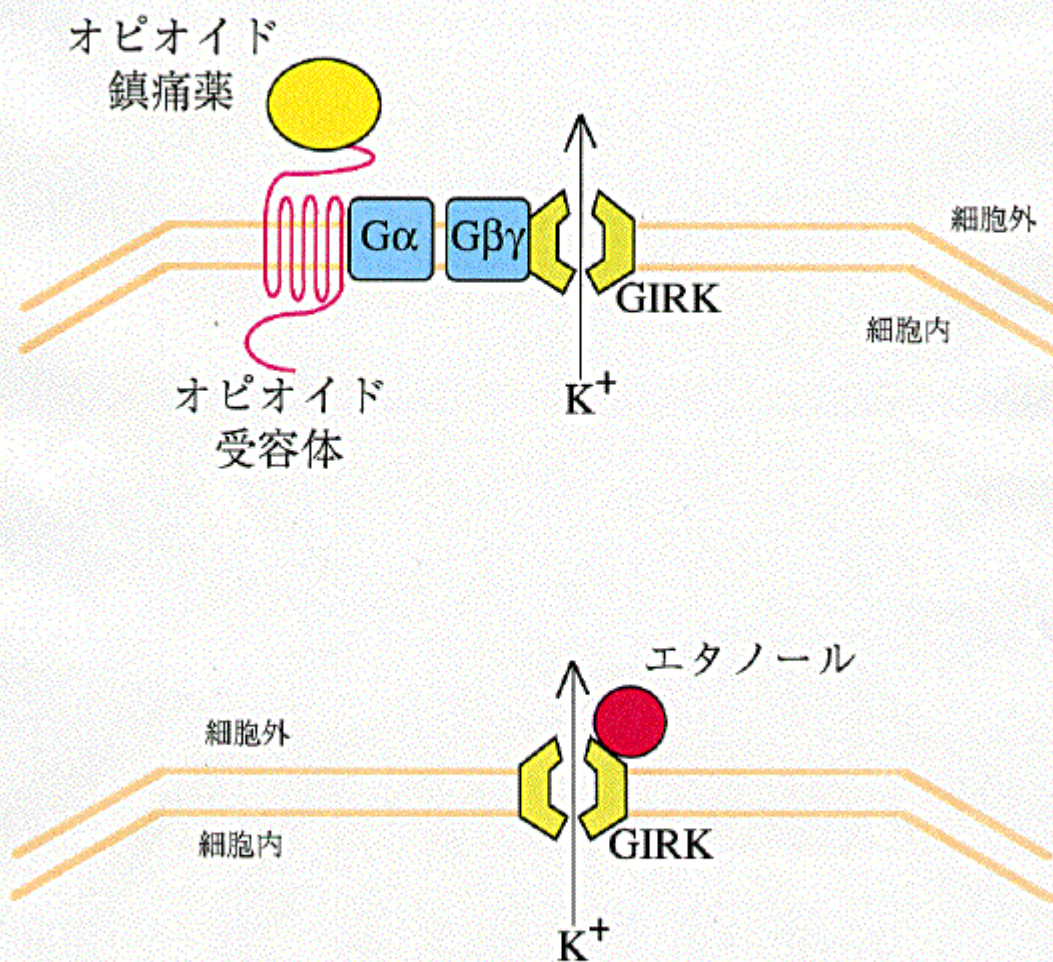


図15、オピオイド鎮痛薬は受容体、G蛋白質を介してGIRKチャネルを開口させるが、エタノールは直接GIRKチャネルを開口させることで鎮痛を引き起こす。

鎮痛を引き起こす脳内経路

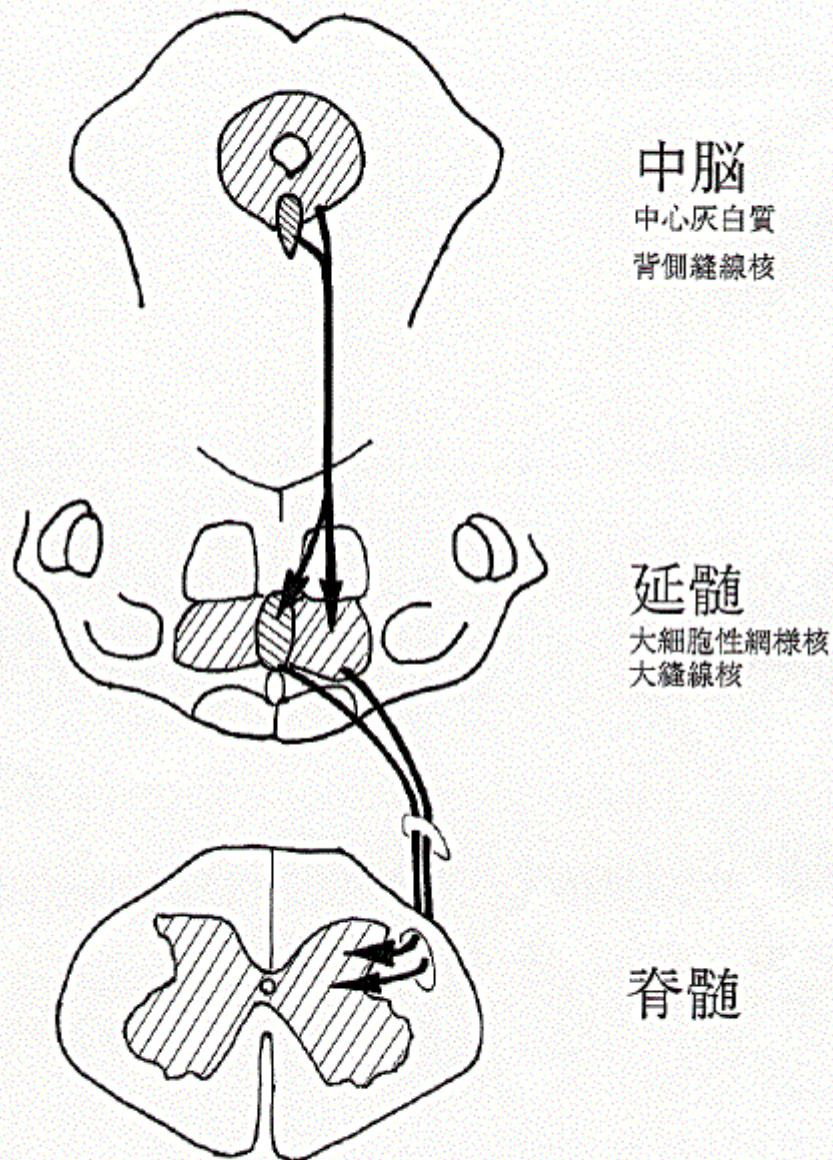


図16、脳内には上記の下行性鎮痛経路が存在する。モルヒネなどのオピオイド鎮痛薬はこの鎮痛経路を活性化することで鎮痛を引き起こすと考えられている。エタノールはオピオイド鎮痛薬と同様にGIRKチャネルを開くことより、上記の鎮痛経路を活性化する可能性が考えられる。