

# 江口博人 論文内容の要旨

## 主 論 文

ACETAZOLAMIDE ACTS DIRECTLY ON THE HUMAN SKELETAL MUSCLE CHLORIDE CHANNEL  
(アセタゾラミドはヒト骨格筋電位依存性クロライドチャンネルに直接的作用をもつ)  
江口博人、辻野彰、貝原宗重、林日出喜、調漸、谷山紘太郎、江口勝美  
Muscle & Nerve 34: 292-297, 2006

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：江口勝美教授)

### 緒言

先天性筋緊張症は、骨格筋電位依存性クロライドチャンネル(C1C-1)遺伝子の遺伝子変異により、ミオトニアを起こす。電気生理学的には、C1C-1の筋細胞膜コンダクタンスの低下により、膜電位の再分極障害を起こし、筋細胞膜が持続した過興奮状態を形成したものであると考えられている。

炭酸脱水素酵素(CA)の阻害薬であるアセタゾラミド(AZM)はミオトニア、てんかん発作、周期性四肢麻痺などの神経筋疾患に対し有効であるとされているが、その機序は解明されていない。

今回、AZMのC1C-1に及ぼす作用機序をパッチクランプ法にて電気生理学的に検討した。

### 対象と方法

1) C1C-1発現ベクター(pRc/CMV)とGFP発現ベクター(pEGFP-N1)を、リポフェクタミンを用いてヒト胎児腎臓細胞(HEK293T細胞)に導入し、遺伝子導入後24~36時間後に以下の条件で、パッチクランプ法によるwhole-cell recordingを施行した。細胞外液(NaCl 140mM; CsCl 4mM; MgCl<sub>2</sub> 1mM; CaCl<sub>2</sub> 1.5mM; HEPES 5mM; pH 7.2; 温度 35°C)、細胞内液(CsCl 4mM; CsOH 4mM; L-glutamic acid 100mM; EGTA 5mM; MgATP 2mM; HEPES 5mM; pH 7.2)

2) 100 μMのAZMを加えた細胞外液を還流させ、AZMの作用が最大となる還流開始4分後に記録を行った。膜電位は、-40mVの保持電位から-160~+120mVのステップパルスを加え、2ms後(瞬時)と200ms後(定常)の電流を測定し、+80mVにおける開口確率(P<sub>o</sub>)を解析した。

3) 対照薬としてフェニトイン、メキシレチンを使用した。

### 結果

1) C1C-1におけるクロライド電流は、過分極側では内向きの不活性化電流が、脱分極側では外向きの活性化電流が認められた。AZMは、内向き・外向きの瞬時電流も増大させたが、定常電流には影響を及ぼさなかった。 2) AZMはP<sub>o</sub>を過分極側へ偏

位させ、これにより  $V_{1/2}$  は  $-35.44\text{mV}$  減少した。結果的に AZM は静止膜電位 ( $-80\text{mV}$ ) 付近での ClC-1 のクロライド電流を増加させた。この変化は AZM に対して濃度依存性を示した。3) AZM の効果として細胞内 CA を阻害することによる細胞内酸性化の影響を考慮し、緩衝剤として細胞内液に高濃度 HEPES ( $30\text{mM}$ ) を使用した。その結果、 $V_{1/2}$  の減少は  $-8.60\text{mV}$  と大幅に縮小したことから、AZM の効果は、細胞内酸性化と関連していることが推測された。4) 対照薬である  $100\mu\text{M}$  のフェニトイン、メキシレチンには ClC-1 に対する直接的な作用は認めなかった。

## 考察

今回の実験では、AZM は細胞内の pH を低下させることで、直接的に静止膜電位付近での ClC-1 のクロライド電流を増加させることが示唆された。これによって、AZM はミオトニアにおける筋細胞膜の易興奮性を抑制するのかもしれない。さらに、AZM の ClC-1 のチャンネル開閉機構に及ぼす詳細な機序を検討するためには、シングルチャンネル解析が必要である。

CA は、二酸化炭素と水から重炭酸イオンと水素イオンの合成、また逆方向の分解を触媒する。この反応は細胞膜のイオン伝達、ガス交換、呼吸、骨代謝、神経伝達、細胞成長、再生と多くの過程に関与している。これまで 14 種類のアイソザイムの CA が特定されており、それぞれが様々な組織分布、細胞内局在を呈することで、多様な作用を示している。実際、AZM は、脳組織の細胞外 pH を低下させるが、細胞内 pH は、視床では上昇し、海馬では低下することが報告されている。AZM は細胞膜透過性の CA 阻害剤であるが、HEK293T 細胞は細胞質内に CA II を持ち、細胞外の CA IV は持たない。今回の実験では、細胞質内の CA II を阻害することによって、細胞内 pH の低下を引き起こしたことが考えられる。しかしながら、骨格筋では、細胞外に CA IV が存在するが、細胞内には、CA III がタイプ 1 線維、CA II がタイプ 2 線維にしか認められないので、実際の骨格筋に対する作用機序は複雑であると考えられる。