

令和元年9月2日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10511

研究課題名(和文) 光学異性ブピバカインのチャネル結合と開閉動態の解明 -局麻中毒治療の新戦略-

研究課題名(英文) Study on bupivacaine enantiomer binding site of KcsA channel and its open-close modification

研究代表者

瀬戸 倫義 (Seto, Tomoyoshi)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：10335177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：KcsAチャネルを用いて、高濃度中毒域におけるチャネル開閉動態の抑制メカニズムを解明した。1分子電流計測からKcsAの開閉を測定した。ブピバカインを加え、振幅解析、開閉遷移解析を行った。(1)ブピバカインは濃度依存性にコンダクタンスを漸減し、(2)平均開時間を減少させた。(3)平均閉時間は一定値にとどまり濃度依存性しなかった。ドッキング計算からブピバカインは(1)イオン伝導路に結合することが判明した。イオン伝導路への結合はコンダクタンスの漸減を説明でき、ブピバカインは開状態の伝導路をふさぎ、平均開時間の減少を説明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブピバカインの副作用-心毒性・循環虚脱は心筋カリウムチャネルの抑制が関与する。中毒域におけるチャネル開閉動態の抑制メカニズムを開閉動態から解明した。対掌体ブピバカインの結合様式を求め、ブピバカイン結合による開閉動態修飾を説明し、「なぜ、(S)-ブピバカインは(R)-に比べて循環虚脱を起こしにくいのか？」という問題を解明した。

研究成果の概要(英文)：We used KcsA channels to elucidate the inhibitory mechanism of channel gating in high intoxication zone. The opening and closing of KcsA were measured from single molecule current measurement. Bupivacaine was added and amplitude analysis and open-close transition analysis were performed. (1) Bupivacaine reduced the conductance in a concentration-dependent manner, and (2) decreased the mean opening time. (3) The average closing time remained constant and was not concentration dependent. Docking calculations revealed that bupivacaine (1) bound to the ion conduction cavity. Binding to the ion conduction pathway could explain the gradual decrease in conductance, and bupivacaine could open-channel block and explain the decrease in mean open time.

研究分野：麻酔メカニズム

キーワード：KcsA(E71A) bupivacaine enantiomer molecular docking open channel block conductance mean open time

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 局所麻酔薬は主に神経伝導の興奮性細胞膜の電位感受性ナトリウムチャンネルに作用し、知覚神経及び運動神経の刺激伝導ブロックにより作用発現するとされる[1]。プピバカインは長時間作用性の局所麻酔薬で、すぐれた分離麻酔作用(運動神経遮断が弱く、痛覚遮断に選択的な作用)を持つ局所麻酔薬として広く臨床に用いられている[2]。
- (2) 局所麻酔薬の副作用として、中枢抑制、循環抑制がある[2]。プピバカインの中毒は、一度心抑制が起こると持続も長く、循環虚脱からの蘇生も困難であるとされる。血中濃度の上昇により、初期には中枢症状が観察され、次に、不整脈・循環虚脱へとつづく心抑制性がみられる。はじめは心拍数、心拍出量の低下がおこり、一回拍出量、左室圧が保たれることから、刺激伝導系のナトリウムチャンネルの抑制が主たる役割を担うとされる[3]。
- (3) つづく高濃度の中毒域では、一回心拍出量・左心室圧の低下が見られ、心筋自体の活動抑制が起こるとされる[3]。高度中毒域では心電図上にQT延長が生じ、心筋の再分極相の活動電位、すなわち、Kチャンネルの抑制が関与するものと推定される[4]。プピバカインは光学異性がみられ、R体、S体の光学異性体が知られている。麻酔作用(痛覚遮断、運動神経遮断作用)は光学異性体による作用差が認められる[4]。心血管系副作用は、ラセミ体のプピバカインやR体よりも、S体で心毒性及び中枢毒性が低いことが確認されている[2]。(S)-プピバカイン(レボプピバカイン)は、従来のラセミ体プピバカインと同等の麻酔作用を持ちながら、中枢神経系、心血管系への副作用が少なく、作用/副作用比の点からより安全な局所麻酔薬である。[1]日臨麻会誌 30 535(2010) [2]日薬理誌 133159(2009) [3]循環制御 23 404(2002) [4]Basic Clin Pharmacol Toxicol doi: 10.1111/bcpt.12146 (2013)。

### 2. 研究の目的

高度中毒域における局所麻酔中毒の循環虚脱にKチャンネル抑制が関与する。KcsAチャンネルを用いて、立体構造と光学異性プピバカインの結合様式から、プピバカインの開閉動態修飾を解明し、「なぜ、レボプピバカインは高度局所麻酔中毒域において循環虚脱を起こしにくいのか?」という問題を解明し、局所麻酔中毒の軽減・治療戦略を探る。

### 3. 研究の方法

- (1) KcsAは福井大学医学部形態機能医科学講座 老木成稔博士より提供を受けた。POPE, POPG混合物をDDM HEPES緩衝液で可溶化し、POPE/POPGベジクルに再構成した。小孔にPOPE/POPG脂質2重膜を貼ったテフロン隔膜を測定チャンパーにはさみ、実体顕微鏡下に目視で観察しながら脂質2重膜を作成し、これに再構成KcsAを融合させ、単チャンネル測定に供した。電圧クランプ下に1分子開閉電流を記録した。測定条件は電圧クランプを-100mVとし、フィルターをBessel filter, 1kHzとした。開閉電流を解析した。
- (2) 開電流のピーク値と持続時間からコンダクタンス(面積あたりのK<sup>+</sup>の移動速度)、平均開確率を求めた(新パッチクランプ実験法 2001)。開閉動態をマルコフ過程と考え、開存(閉存)時間のヒストグラムを解析した。開閉の遷移速度定数から反応モデルを検討し、開閉素過程を明らかにした。同様にプピバカイン存在下に開閉動態を解析した。
- (3) プピバカイン高度中毒領域とされる250 micro Mまでの濃度依存性を測定した。コンダクタンスの濃度依存性から麻酔薬結合による開口大きさがどのように変化するかを解析した。開閉の遷移速度定数を解析しプピバカインでどのように開閉素過程が修飾されるかを明らかにした。遷移速度定数の濃度依存性から、プピバカインが関与する開閉反応モデルを検討した。
- (4) 次に、(R)-プピバカイン、(S)-プピバカインにおけるチャンネル開閉を測定し、光学異性体の作用を比較した。濃度依存性を測定し、麻酔薬のKcsAチャンネルへの作用特性を測定した。開閉動態解析 開閉の遷移速度定数からR体、S体による作用が開閉素過程のいずれに、どのような修飾作用を及ぼし、開閉反応スキームを修飾するのかを解析した。
- (5) KcsAの開構造をホモロジーモデルから求め、(R)、(S)-プピバカインの結合部位、結合様式を分子ドッキングから求めた。KcsA構造におけるプピバカインの結合部位の知見からR体、S体による開閉素過程の修飾作用を解明した。

### 4. 研究成果

- (1) POPE/POPGベジクル再構成のKcsA(E71A)を共同研究者から提供を受け、平面膜法により1分子開閉K電流を記録した。単チャンネル解析により、コンダクタンス(面積あたりのK<sup>+</sup>の移動速度)、平均開確率(開口率)を求めた。KcsA(E71A)にはHigh Po mode, Flicker mode, Low Po modeの特徴的なチャンネルモードが存在する。KcsA/POPG/POPE膜の再構成ごとに異なる割合のmodeが生じ、時間とともにmodeが変化する。注意深く観察すると膜の膜薄化に伴

- ってmodeが移る。再現性をもってプピバカインの 効果を見るためには一定のmodeの下に計測を行う必要があり、プピバカイン濃度変化をさせる間modeが安定している必要がある。隔膜の穴を小さくし、プレコーティングを行い、膜の膜被薄化速度を緩め、mode変化が起こらない条件を探った。膜被薄化プロセスの安定化条件を試行錯誤した。その結果、薄膜化速度を遅くすることで脂質膜の寿命をのばし、解析に十分な開閉 事象を得ることができると分かった。薄膜化速度は、隔壁の脱脂、溶液・脂質の異物除去、隔壁のプレコーティング、隔壁穴の形、隔壁穴の円滑さ、エッジ の性状によって決まることがわかった。
- (2) 薄膜化にともない開閉モードの遷移とは別に多チャンネル開閉と推定される電流が観測された。単チャンネル計測になるように、十分薄いチャンネル濃度での膜融合を試みた。しかし、多チャンネル開閉が高頻度で観測された。チャンネル濃度を薄くしても高頻度で再現したので、KcsA-KcsA の会合によって多チャンネル化するのではないかと考えた。チャンネル会合による多チャンネルの協奏的開閉と推定される雪崩現象によって単チャンネル単モード計測が妨げられた。
  - (3) ラセミプピバカインを両チャンバーに加え、コンダクタンス、平均開確率の濃度依存性を求めた。一つの単チャンネルパッチを用いてプピバカイン濃度依存性の計測を試みた。しかし、膜寿命が短く、プピバカイン濃度を変えて計測することができなかつた。同一チャンネルパッチの計測ではないがプピバカインは濃度依存性にコンダクタンスを漸減し、更に平均開時間を減少させた。平均閉時間は一定値にとどまり濃度依存しなかつた。プピバカイン結合によって開状態が短く、すなわち開状態の不安定化を起こすことでチャンネル抑制が起こっていることをつきとめた。プピバカインは濃度依存性にコンダクタンスを漸減し、更に平均開時間を減少させた。平均閉時間は一定値にとどまり濃度依存しなかつた。プピバカイン結合によって開状態が短く、すなわち開状態の不安定化を起こすことでチャンネル抑制が起こっていることをつきとめた。
  - (4) KcsA における(R), (S)-プピバカインの結合部位、結合様式を ASEDock で計算した。開状態の KcsA ドッキング計算によりプピバカインは 1)イオン伝導路 2)Cytoplasmic Domain(CPD) Bulge 3)CPD end に結合することが判明した。イオン伝導路への結合は、伝導路の閉塞をもたらすことから、コンダクタンスの漸減を説明することができる。また、イオン伝導路の結合部位ではプピバカインの不斉炭素に結合する H が Val 106 に配位することが判明し、Val 106 が対掌体を識別していることが判明した。プピバカイン結合し開状態伝導路をふさぐことから、プピバカイン結合により平均開時間の減少を説明することができた。
  - (5) 開閉動態には3つのモード(High Po, Low Po, flicker)の存在知られ、解析には単一モードにおける解析が必要である。再構成膜の薄膜化速度を遅くし、解析に 十分な開閉事象を得ることができる。薄膜化にともない開閉モードの遷移とは別に多チャンネル開閉と推定される電流が観測された。単チャンネル計測になるように、チャンネル濃度を薄くしたが、多チャンネルの競争的な開電流が高頻度で再現した。KcsA-KcsAの会合によって多チャンネル化するのではないかと考え、平面膜内のKcsA会合を調べるために、KcsA-KcsAのタンパク-タンパクドッキングを行った。その結果KcsAチャンネルは会合して2量体をつくると-84 kcal mol<sup>-1</sup>安定することが判った。再構成膜のKcsAは会合し、単チャンネル単モードの計測を困難にしているのではないかと示唆された。単チャンネルの膜融合になるように、十分に薄いチャンネル濃度での膜融合が必要だとわかった。またKcsA-KcsAの会合を抑制する物質を導入すれば単チャンネル計測が可能になると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

瀬戸倫義、 麻酔メカニズム論 覚知消失標的チャンネル GABA<sub>A</sub> 受容体にプロポフォル、セボフルラン、バルピツール酸の共通結合部位が見つかった、Anet, 査読無, 23 16-22 2019

Seto T, Kato M, Koyano K, Molecular Discrimination of Barbitol Enantiomer at Propofol Binding Site of Human beta3 Homomeric GABA<sub>A</sub> Receptor, Chem-Bio Informatics J, 査読有, 18 154-163 2018 doi.org/10.1273/cbij.18.154

Ding W-G, Tano A, Mi X, Kojima A, Seto T, Matsuura H, Identification of verapamil binding sites within human Kv1.5 channel using mutagenesis and docking simulation, Cell Physiol Biochem, 査読有, 52 302-314 2019 doi.org/10.33594/000000022

Kojima A, Fukushima Y, Ito Y, Ding WG, Ueda R, Seto T, Kitagawa H, Matsuura H, Interactions of Propofol With Human Voltage-gated Kv1.5 Channel Determined by Docking Simulation and Mutagenesis Analyses, J Cardiovasc Pharm, 査読有, 71 10-18

2018 doi.org/10.1097/FJC.0000000000000538

Bai JY, Ding WG, Kojima A, Seto T, Matsuura H Putative binding sites for arachidonic acid on the human cardiac Kv 1.5 channel, Brit J of Pharm, 査読有, 172 5281-5292 2015 doi.org/10.1111/bph.13314

[学会発表](計 12 件)

瀬戸倫義, QT 延長症候群患者における安全な麻酔薬選択の指標、日本麻酔科学会、2019

瀬戸倫義, リアノジン 1 受容体における揮発性麻酔薬結合部位と CICR 活性化メカニズムの解明、日本麻酔科学会、2018

福島豊、小嶋亜希子、石原真理子、清水盛浩、瀬戸倫義、北川裕利、デスフルランは膜電位依存性ヒト Kv1.5 ( hKv1.5 ) チャネルを構成するアミノ酸に直接作用して抑制作用を発揮する、日本麻酔科学、2018

Seto T, Koyano K, Enantiomeric Molecular Recognition of Barbitals in Propofol Binding Site of GABAA Receptor, Chemo-Bio Informatics, 2017

瀬戸倫義, 吸入麻酔薬の GABA<sub>A</sub>R の機能修飾は propofol 結合部位単独で起こるのではない - MAC と結合エネルギーの相関から -, 日本麻酔科学会、2017

瀬戸倫義, 小谷野賢, GABA<sub>A</sub> 受容体 Barbiturate 結合部位における対掌体分子識別の解明、日本麻酔科学会、2017

石川ゆうこ、澤田規、湯浅真由美、瀬戸倫義、高橋完、北川裕利、重水による心筋虚血再灌流傷害保護効果の検討、日本麻酔科学、2017

福島豊、小嶋亜希子、石原真理子、清水盛浩、瀬戸倫義、北川裕利、デスフルランによるヒト Kv1.5 チャネルの作用に関わる分子機構、日本麻酔科学会、2017

小嶋亜希子、瀬戸倫義、伊藤有紀、福島豊、高橋完、北川裕利、プロポフォルと膜電位依存性 hKv1.5 チャネルの相互作用に関わる分子基盤、日本麻酔科学会、2016

瀬戸倫義、ブピバカインの KcsA チャネル開閉動態修飾について -局所麻酔薬の心毒性の解明へ-, 日本麻酔科学会、2016

小嶋亜希子、福島豊、伊藤有紀、瀬戸倫義、高橋完、北川裕利、血清アルブミンはプロポフォルの hKv1.5 チャネルに対する open-channel block 作用を維持したまま抑制作用を減弱させる、日本麻酔科学会、2016

Seto T, Open-channel block site of bupivacaine in KcsA(E71A) channel, 9th International Conference on Mechanisms of Anesthesia, 2015

[その他]

滋賀医科大学 最新研究の紹介

<https://www.shiga-med.ac.jp/research-and-collaboration/priority-projects-and-research-results/latest-research-papers#20190403>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名： 加藤 捻

ローマ字氏名： KATO MINORU

所属研究機関名： 立命館大学

部局名： 生命科学部

職名： 教授

研究者番号(8桁)： 00241258

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。