

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16445

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬の膜電位依存性イオンチャネルの制御に関わる分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the regulation of voltage-gated ion channels by volatile anesthetics

研究代表者

福島 豊 (Fukushima, Yutaka)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：10422891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、全身麻酔薬がGABAA受容体チャネルをはじめとするリガンド依存性イオンチャネルに対して直接作用を及ぼすことはアミノ酸レベルで明らかにされているが、膜電位依存性イオンチャネルに対する揮発性麻酔薬の作用機構は十分には明らかにされていない。我々は、パッチクランプ法や部位特異的変異導入法、コンピューターシミュレーション法を用いて、デスフルランとセボフルランのヒトKv1.5(hKv1.5)チャネルの制御に関わる分子機構を検討した。デスフルランとセボフルランはともに、hKv1.5チャネルのポア領域に存在するアミノ酸に直接作用して、open-channelブロック作用を呈することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

hKv1.5チャネルは、6回膜貫通型の構造をとり、5番目(S5)と6番目(S6)の膜貫通領域の間にイオンが通るポアが形成される。これらの基本構造は他の膜電位依存性イオンチャネルと同様であるため、得られた知見は吸入麻酔薬の膜電位依存性イオンチャネルへの作用機構を理解する上で貴重な情報を提供すると期待される。さらに、全身麻酔薬の麻酔作用や全身作用の発現に関わるイオンチャネルは、GABAA受容体チャネルをはじめとするリガンド依存性イオンチャネルのみならず、膜電位依存性イオンチャネルも重要な標的分子であるという知見は、新たな全身麻酔薬の開発においても重要な情報となり、麻酔科学の発展にも寄与できる。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have detected the putative binding sites for volatile anesthetics on ligand-gated ion channels, such as GABAA receptor. However, there is only a limited information concerning the molecular basis underlying the functional effect of volatile anesthetics on voltage-gated potassium channels, which play key roles in regulating membrane potential, excitability and cellular functions in various cell types. We investigated molecular and cellular mechanisms underlying modulatory effect of desflurane and sevoflurane on the human voltage-gated Kv1.5 (hKv1.5) channel, using multiple experimental approaches, including patch-clamp technique, site-direct mutagenesis and computer docking simulation. We found that desflurane and sevoflurane at clinically relevant concentrations produce an open-channel blocking action on hKv1.5 channel, probably through direct interaction with specific amino acids located within the pore region of hKv1.5 channel.

研究分野：麻酔学

キーワード：Kv1.5チャネル 吸入麻酔薬 デスフルラン セボフルラン 膜電位依存性イオンチャネル 作用機構 標的分子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜タンパク質であるイオンチャネルはその構造的・機能的特徴により、リガンド依存性イオンチャネルと膜電位依存性イオンチャネルの2種類に分類され、いずれも神経や心臓などの興奮性の制御に重要なはたらきをなしている。以前は、麻酔薬の作用部位は非特異的な膜脂質であるという Meyer-Overton の法則に基づいた考え方が主流であったが、近年になり、全身麻酔薬はリガンド依存性イオンチャネル、受容体、種々のシグナル分子などの特定のタンパク質に作用して、麻酔作用や全身作用を及ぼすことが明らかにされつつある。これまで、全身麻酔薬がリガンド依存性イオンチャネルである GABA<sub>A</sub> 受容体チャネルに対して直接作用を及ぼすことはアミノ酸レベルで明らかにされているが、膜電位依存性イオンチャネルに対する作用機構は十分には明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

膜電位依存性イオンチャネルであるヒト Kv1.5 (hKv1.5) チャネルを用いて、吸入麻酔薬の膜電位依存性イオンチャネルの制御に関わる分子機構を解明することを目的とする。hKv1.5 チャネルは、6回膜貫通型の構造をとり、5番目(S5)と6番目(S6)の膜貫通領域の間にイオンが通るポアが形成される。これらの基本構造は他の膜電位依存性イオンチャネルと同様であるため、得られた知見は吸入麻酔薬の膜電位依存性イオンチャネルへの作用機構を理解する上で貴重な情報を提供すると期待される。

### 3. 研究の方法

部位特異的変異導入法を用いて、hKv1.5 チャネルのポア領域を形成するアミノ酸のうち13箇所の変異体(T462C、H463C、T479A、T480A、R487V、A501V、I502A、V505A、I508A、A509G、L510A、V512A、V516A)を作成した。野生型及び変異体 hKv1.5 チャネルを Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞に発現させ、ホールセルパッチクランプ法を用いて、デスフルランとセボフルランの野生型及び変異体 hKv1.5 チャネルに対する作用を評価した。

次に、Molecular Operating Environment (MOE) プログラム(株式会社モルシス)を用いて、hKv1.5 チャネルと相同性の高い Kv1.2 チャネルの結晶構造を鋳型に、開口状態の hKv1.5 チャネルの homology model をコンピュータ上で構築した。コンピュータドッキングシミュレーション法を用いて、構築した hKv1.5 チャネルの homology model とデスフルランとセボフルランの結合状態を予測した。

### 4. 研究成果

デスフルランとセボフルランはともに、弱い脱分極刺激で hKv1.5 電流の増加作用を、強い脱分極刺激で抑制作用を示した。デスフルラン、セボフルランによる hKv1.5 電流の抑制は、脱分極刺激の開始時にはほとんど認めなかったが、脱分極刺激中に進行する特徴を呈した。また、チャネルの脱活性化(開状態から閉状態への移行)を反映する tail current の減衰の時定数は、デスフルラン、セボフルランの存在下でより大きくなった。このことは、これらの薬剤の存在下では、チャネルの脱活性化過程が遅延することを示す。これらの脱分極刺激中に進行する抑制やチャネルの脱活性化の遅延から、デスフルラン、セボフルランは hKv1.5 チャネルの開状態において抑制作用を発揮する、open-channel blocker として作用すると考えられた。

過去の研究では、hKv1.5 チャネルに対し open-channel blocker として作用する様々な薬剤がチャネルのポア領域に作用することが報告されている。このため、hKv1.5 チャネルのポア領域に位置するアミノ酸を対象に、部位特異的変異導入法を用いて変異体を作成し、デスフルランとセボフルランの作用を野生型と変異体チャネルとの間で比較した。hKv1.5 チャネルのポア内腔に面するアミノ酸の変異体である T480A、V505A、I508A において、デスフルランとセボフルランの抑制作用が減弱した(図1)。このことから、Thr480、Val505、Ile508 がデスフルランとセボフルランの作用アミノ酸であると推

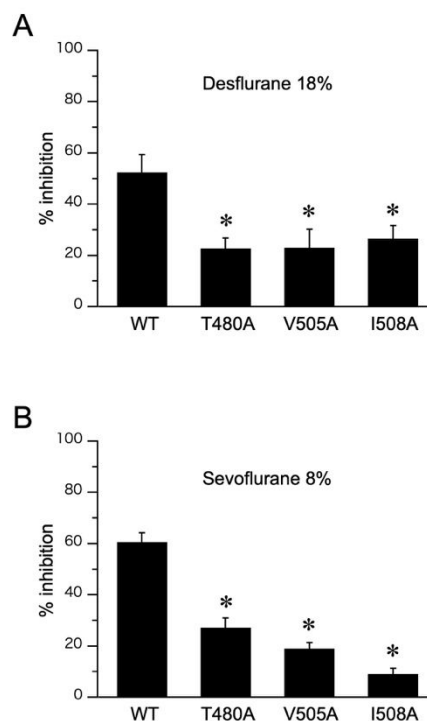


図1 野生型及び変異体hKv1.5電流に対するデスフルラン、セボフルランの作用  
A) デスフルラン投与時のhKv1.5電流の抑制率  
B) セボフルラン投与時のhKv1.5電流の抑制率

定された。

コンピュータドッキングシミュレーションでは、デスフルラン、セボフルランは hKv1.5 チャネルのポア内腔に安定して位置すると予測された。この位置のデスフルラン、セボフルランは Thr479、Thr480、Val505 および Ile508 と隣接していた ( 図 2 )

これらの結果はデスフルランとセボフルランは hKv1.5 チャネルのポア領域に位置するアミノ酸である Thr480、Val505、Ile508 に作用してその抑制作用を発揮することを示唆する。

A

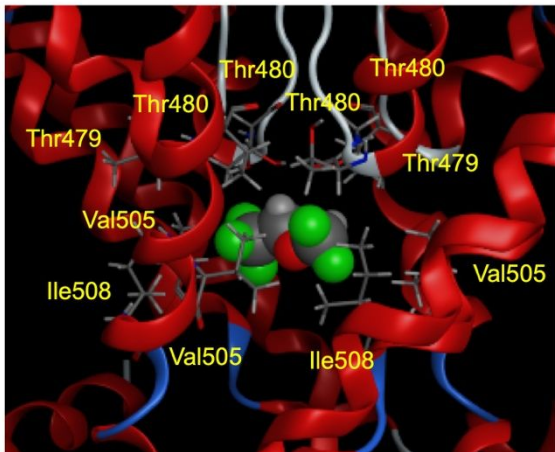
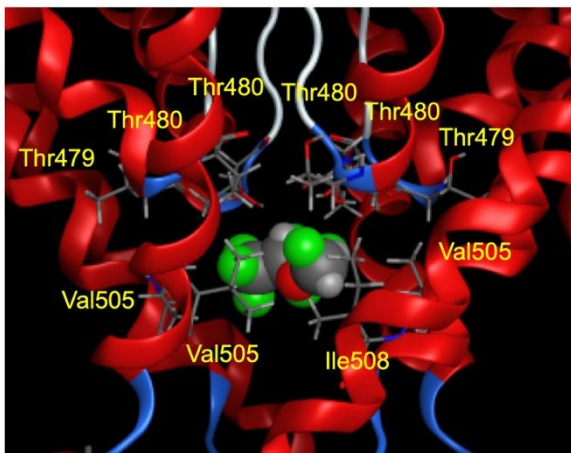


図2 hKv1.5チャネルとデスフルラン及びセボフルランのドッキングシミュレーション  
A) デスフルランとhKv1.5チャネルの結合予測  
B) セボフルランとhKv1.5チャネルの結合予測

B



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukushima Yutaka, Kojima Akiko, Mi Xinya, Ding Wei Guang, Kitagawa Hirotoishi, Matsuura Hiroshi	4. 巻 177
2. 論文標題 Open channel blocking action of volatile anaesthetics desflurane and sevoflurane on human voltage gated K v 1.5 channel	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 3811 ~ 3827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/bph.15105	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kojima Akiko, Fukushima Yutaka, Itoh Hideki, Imoto Keiji, Matsuura Hiroshi	4. 巻 883
2. 論文標題 A computational analysis of the effect of sevoflurane in a human ventricular cell model of long QT syndrome: Importance of repolarization reserve in the QT-prolonging effect of sevoflurane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173378 ~ 173378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2020.173378	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuura Hiroshi, Kojima Akiko, Fukushima Yutaka, Xie Yu, Mi Xinya, Sabirov Ravshan Z., Okada Yasunobu	4. 巻 9
2. 論文標題 Positive Inotropic Effects of ATP Released via the Maxi-Anion Channel in Langendorff-Perfused Mouse Hearts Subjected to Ischemia-Reperfusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 597997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.597997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 福島 豊, 小嶋 亜希子	4. 巻 45
2. 論文標題 揮発性麻酔薬の作用に関わる分子メカニズム	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床麻酔	6. 最初と最後の頁 17 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小嶋 亜希子, 福島 豊, 今宿 康彦, 北川 裕利, 松浦 博	4. 巻 68
2. 論文標題 麻酔薬の心臓洞房結節自動能に対する制御機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 麻酔	6. 最初と最後の頁 1280-1288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima Akiko, Fukushima Yutaka, Ito Yuki, Ding Wei-Guang, Kitagawa Hirotooshi, Matsuura Hiroshi	4. 巻 71(4)
2. 論文標題 TRPC channel blockers improve ventricular contractile functions after ischemia/reperfusion in a Langendorff-perfused mouse heart model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 248 ~ 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/FJC.0000000000000566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福島 豊, 小嶋 亜希子, 石原 真理子, 清水 盛浩, 湯浅 真由美, 北川 裕利
2. 発表標題 デスフルランはヒト心筋の膜電位依存性カリウムチャネルに対して異なった抑制作用を発揮する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小嶋 亜希子, 伊藤 有紀, 福島 豊, 今宿 康彦, 北川 裕利
2. 発表標題 セボフルランのIKsチャネル抑制作用は、サブユニットをコードするKCNE1遺伝子の一塩基多型D85Nにより増強し、セボフルランによるQT延長作用を増強する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤崎 史弥, 小嶋 亜希子, 河島 愛莉奈, 竹田 叶佳, 福島 豊, 北川 裕利
2. 発表標題 Oxygen reserve index (ORi)モニタリングによる、体位変換前の吸入酸素濃度とBMIが無呼吸中の全身酸素予備能に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 盛浩, 小嶋 亜希子, 石原 真理子, 福島 豊, 北川 裕利
2. 発表標題 プロポフォールによるHCN2チャンネルおよびHCN4チャンネルの抑制作用は交感神経緊張時に減弱する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福島 豊, 小嶋 亜希子, 清水 盛浩, 石原 真理子, 高橋 完, 北川 裕利
2. 発表標題 揮発性麻酔薬は膜電位依存性ヒトKv1.5(hKv1.5)チャンネルに対してそのポア領域のアミノ酸に直接作用して抑制作用を発揮する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小嶋 亜希子, 伊藤 有紀, 福島 豊, 今宿 康彦, 高橋 完, 北川 裕利
2. 発表標題 IKsチャンネルのサブユニットをコードするKCNE1遺伝子の一塩基多型D85Nはプロポフォール感受性を増強し、プロポフォール投与中のQT延長の危険因子となりうる
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原 真理子, 小嶋 亜希子, 湯浅 真由美, 清水 盛浩, 福島 豊, 北川 裕利
2. 発表標題 デクスメドトミジンは心臓洞房結節細胞のイミダゾリン受容体に直接作用して徐脈作用を引き起こす
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水 盛浩, 小嶋 亜希子, 石原 真理子, 福島 豊, 高橋 完, 北川 裕利
2. 発表標題 プロポフォルによるHCN4チャネルの抑制作用は交感神経緊張時に減弱する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 デスフルランは膜電位依存性ヒトKv1.5 (hKv1.5) 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。
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福島 豊, 小嶋 亜希子, 清水 盛浩, 石原 真理子, 高橋 完, 北川 裕利
2. 発表標題 揮発性麻酔薬は膜電位依存性ヒトKv1.5 (hKv1.5) チャネルに対してそのポア領域のアミノ酸に直接作用して抑制作用を発揮する。
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------