

平成22年 4月 1日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号：20791078
 研究課題名（和文）
 生体膜マイクロドメインを用いた揮発性麻酔薬の作用機序の解明
 研究課題名（英文）
 Analysis of lipid microdomain under volatile anesthesia

研究代表者

小野 純一郎 (ONO JUNICHIRO)
 香川大学・医学部附属病院・助教・
 研究者番号：90363217

研究成果の概要（和文）：

マウスに全身麻酔薬を投与し、脳細胞のマイクロドメイン分析を行なった。イソフルランもしくはミダゾラムを投与したマウス的大脑から脳細胞マイクロドメインを抽出し、コレステロール量とタンパク量を測定した。イソフルラン群のコレステロール量は、対照群の1.24倍、タンパク量は3.10倍に増加した。一方、ミダゾラム群のコレステロール量は1.07倍、タンパク質は1.45倍に増加した。

研究成果の概要（英文）：

Microdomain in lipid bilayer may contribute to the mechanisms of volatile anesthesia. Isoflurane upregulated amount of cholesterol and protein contained in microdomain fraction extracted from mice brain. Total protein was particularly increased in isoflurane anesthesia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：麻酔学、揮発性麻酔薬、作用機序、マイクロドメイン

1. 研究開始当初の背景

揮発性麻酔薬は、世界中の多くの手術患者に日常的に投与されている薬物にもかかわらず、その作用機序は未だ不明のままという稀有な薬物である。また、その作用機序の研究

では手法や着想が停滞しており、解明には程遠いのが現状である。現在の揮発性麻酔薬の作用機序研究は、GABA、nACh、NMDAといった個々の受容体タンパクレベルを中心に展開されている。しかし、揮発性麻酔薬の主な分

布領域が脂質二重膜であること、受容体タンパク質機能が周囲の脂質成分に大きく影響を受けていることを鑑みれば、脂質二重膜への作用研究は麻酔メカニズム解明にとって受容体タンパク質研究と同様に重要なものである。脂質二重膜自体の研究はこの10年間で大きく進歩し、タンパク質周囲の脂質成分が単なる支持構造だけでなく、受容体機能を大きく修飾する性質を持つことが分かってきた。この脂質-タンパク質コンプレックスの機能単位は「マイクロドメイン」と呼ばれる。これは Singer-Nicolson の脂質二重膜モデルを発展させた概念である。生体膜の脂質成分は従来考えられていたような均一・一様なものではなく、スフィンゴ脂質とコレステロールが濃縮された領域が各所に散在し、機能的にもその領域を介してシグナル伝達や物質の膜輸送が行われていることが明らかになってきた。マイクロドメインの中には受容体タンパク質も含まれ、それを支える脂質成分によって受容体機能が影響を受けると考えられている。この概念を麻酔メカニズムという視点で捉えると、脂質膜は揮発性麻酔薬の単なる分布領域となるだけでなく、脂質膜への作用を介して受容体タンパク質機能を修飾している可能性を示唆している。つまり、揮発性麻酔薬の作用は受容体タンパク質だけでなく、周囲の脂質を含むマイクロドメインそのものに及ぶと考えるのが自然である。これを証明するために、生体膜に揮発性麻酔薬を作用させたときのマイクロドメインの動態解析を行うのがこの研究の目的である。これまでは脂質二重膜が持つ非可溶性・低分子という性質から、そのダイナミズムと制御メカニズムを詳細に研究することは技術的側面から不可能であった。しかし、この数年で脂質成分を特異的に標識するプローブが開発され、脂質膜の流動性を保持したままマイクロドメインを可視化できるようになった。脂質マイクロドメインの動態解析を進展させてゆけば、麻酔の圧拮抗現象、各受容体タンパク質への親和性の差、年齢による麻酔薬感受性の差など、今まで説明不可能だった現象を説明できるようになるかもしれない。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、「揮発性麻酔薬の作用を生細胞を使って視覚化する」ことである。麻酔状態でのマイクロドメイン解析は、従来のように麻酔メカニズムを脂質あるいはタンパク質単独として扱うのではなく、マイクロドメインとして総括的に捉えられるという点でこれまでの麻酔メカニズム研究にはない意義を持つ。技術的に脂質膜の可視化は近年やっと可能になり、さらにここ2,3年で生体膜を試料として使用できるようになっ

てきた。現在のところ麻酔状態下の生体膜を可視化するという手法によって揮発性麻酔薬の作用機序を報告した論文は皆無であるが、この研究は既成の技術の応用であるためスピードが要求される。脂質特異的プローブの開発は日本が世界をリードする分野でもあり、是非ともその技術を応用発展させてゆきたい。予想される結果は、麻酔薬により細胞膜の流動性が変化し、それに伴いマイクロドメインの数・分布などが変化する可能性がある。現在までの熱力学的研究では、揮発性麻酔薬によって細胞膜の流動性が上がるということは分かっているが、それが脂質二重膜全体に起こる事象なのか、あるいは局所に限られるのかは不明である。脂質流動性の変化がマイクロドメインにどのような影響を与えるかも不明である。生きた細胞膜の機能ドメインに対する麻酔薬の影響を解析することは、停滞している麻酔メカニズム研究に進歩をもたらす可能性がある。現在の揮発性麻酔薬の作用機序研究の首座は、かつての細胞膜脂質から受容体タンパク質レベルで展開されている。しかし、揮発性麻酔薬は多受容体作用性であることから、個々の受容体研究が進んでも、受容体関連の知見が不足しているために生体総和としての麻酔状態を一元的に説明できないジレンマに陥っている。一方、この10年間で受容体タンパク質周囲の境界脂質がシグナル伝達にも大きな影響を与えることが分かってきた。このように、受容体タンパク質と境界脂質を包括的機能単位として捉えたものを「細胞膜マイクロドメイン」と呼ぶ。この概念では、脂質とタンパク質を統合して扱うため、現在の麻酔メカニズム研究のジレンマをブレイク・スルーする可能性を秘めている。

3. 研究の方法

全身麻酔下における脳内マイクロドメイン分析に際して、一連の研究過程を「生化学的分析」と「細胞生物学的分析」の2段階に分けて計画した。生化学的分析は脳細胞をホモジナイズし、ショ糖密度勾配遠心法によってマイクロドメインを分離精製して分析を行なうものである。この方法は、生体膜構造を界面活性剤により破壊してしまうため、極めて人工的な系であり、前述したようなマイクロドメインのダイナミズムを直接的に解析することは不可能である。しかし、手技的にも簡便で、マイクロドメイン内の脂質やタンパク質の定量・定性的分析に適しており、研究全体に占める意味は大きい。生化学的分析はまた、細胞膜構造そのものが壊れるため、細胞膜上のマイクロドメイン分布や細胞膜表面だけに発現しているマイクロドメインの定量・定性分析には不向きである。そこで細胞生物学的分析を行なう意義がある。細胞

生物学的分析は、培養した中枢神経生細胞を利用し、マイクロドメインに多く含まれるスフィンゴミエリンをライセニンという物質で特異的に標識することで細胞膜上のマイクロドメイン分布を調べることが可能である。

平成 20 年から生化学的分析に着手した。対照群・吸入麻酔薬群・静脈麻酔薬群の三群に分けたマウスの脳からマイクロドメインを抽出する系を確立し、脂質解析とタンパク質解析を行った。以下に具体的実験方法を示す。

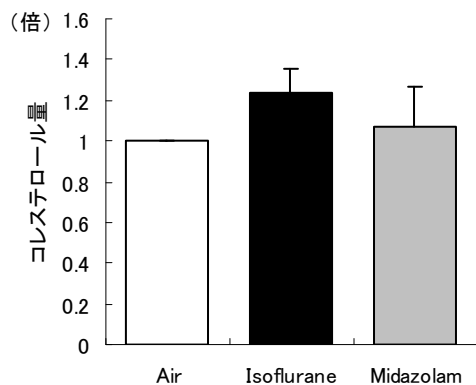
(1) 生後 10 週齢のマウスを 3 群に分け、各々の薬物を投与した。各群は空気 6 時間、イソフルラン 1% で 6 時間、ミダゾラム 25mg/kg を腹腔内投与し 1 時間待つ。

(2) 大脳を摘出し、ショ糖密度勾配遠心法によりマイクロドメイン分画を抽出

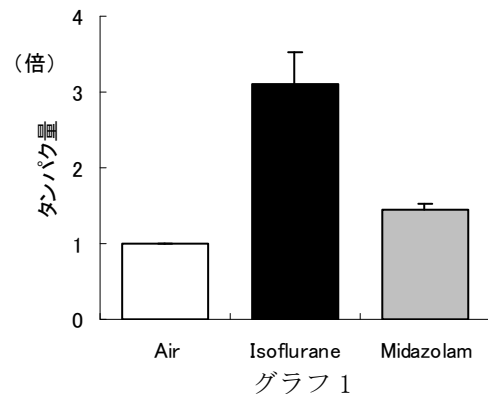
(3) マイクロドメイン分画について、脂質分析とタンパク分析を行なった。

4. 研究成果

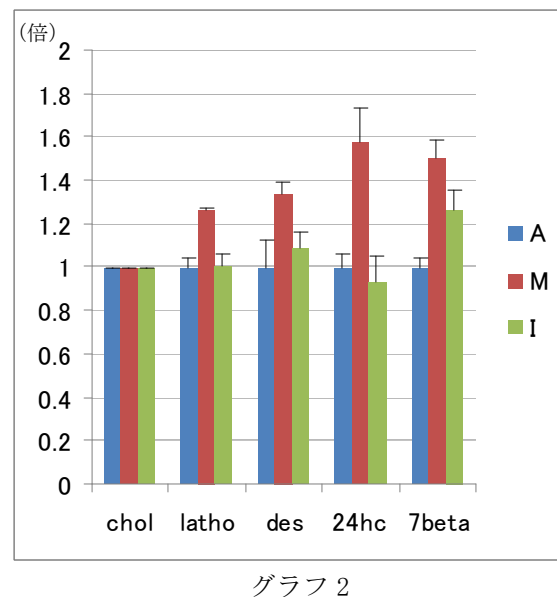
生化学的分析のうち、コレステロール定量とタンパク定量の結果をグラフ 1 に示す。イソフルラン群のコレステロール量は、対照群の 1.24 倍、タンパク量は 3.10 倍に増加した。一方、ミダゾラム群のコレステロール量は 1.07 倍、タンパク質は 1.45 倍に増加した。しかし、今回行なった実験では、生体マウスへの薬物投与では個体間のデータのバラつきが大きくなる傾向にある。このため、性状がより均一な培養細胞を用いた実験系に切り替えようとしている。生物学的解析はスフィンゴミエリン標識のためライセニンを用いることになるが、ライセニンは通常細胞毒性を持つため、そのままでは生細胞に使用することは難しい。このため、遺伝子組換え技術による無毒化ライセニンが必要となるが、現在無毒化ライセニンの抽出作業に取り掛かっている。



グラフ 1



一方、GC/MS によりマイクロドメイン分画中のステロール分析を行ったので下のグラフ 2 に示す。ミダゾラム群において、コレステロール代謝産物である 24 ハイドロキシコレステロールあるいは 7β ハイドロキシコレステロールが増加していた。この分析はデータ数が各群 2~3 であるため、更にデータ数を増やさなければいけない。



以上の結果から、イソフルランを投与した場合、マイクロドメイン近傍のタンパク量が増加している可能性がある。コレステロール量は 1.2 倍程度しか増加していないが、タンパク量は約 3 倍になっていることから、イソフルラン投与をきっかけに、マイクロドメイン近傍で受容体タンパク質などの膜タンパク質が増加している可能性がある。実際にどのようなタンパク質が増加しているのかを解

析するためにウエスタン解析を行う必要がある。特に麻酔と関係することが判明している、GABA 受容体、NMDA 受容体、Ach 受容体、オピオイド受容体などの発現をタンパクレベルと mRNA レベルで詳細に解析していきたいと考えている。これまでに得られた成果は、全てマウスの whole body に対して麻酔薬を投与した結果であり、脳内で薬物に対する反応が起こる過程には様々な修飾因子が関係してくる。このため、培養した脳細胞を用いるなど、できるだけシンプルな実験系を用いて今回の結果を再確認する必要がある。傾向の確認が行なえれば、次は細胞生物学的分析へと移行していく。スフィンゴミエリンプロームの1つであるライセニンには細胞毒性を持つため、無毒化したライセニンをミュータント cDNA を用いて大腸菌に生成させ、それを抽出する。無毒化ライセニンと揮発性麻酔薬を培養した脳細胞に作用させ、段階的各濃度で電子顕微鏡下に観察する。細胞膜上のクラスター化したコレステロールがマイクロドメイン領域として識別されることが予想されるが、麻酔薬の作用後にクラスター数の減少などの変化が起きるかどうかなを見てみたい。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 純一郎 (ONO JUNICHIRO)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：90363217

(2) 研究協力者

鈴木 辰吾 (SUZUKI SHINGO)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任
講師
研究者番号：50451430