

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：13401
 研究種目：若手研究 B
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791691
 研究課題名（和文） 揮発性麻酔薬のターゲットとしてのカリウムチャネルとその分子機構
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of potassium channel to target of volatile anesthesia
 研究代表者
 松木 悠佳（MATSUKI YUKA）
 福井大学・医学部・助教
 研究者番号：10464083

研究成果の概要（和文）：

K チャネルの共通部分のみを持つチャネルを対象とした。KcsA チャネル 1 分子電流記録から、酸性 pH でほぼ 100% の開口率であり、pKa5.2、Hill 係数 2.2 であった。さらに、pH 4.0, 5.25, 5.5 の開時間と閉時間を解析した。開時間は 1 成分あり、pH による変化はなかった。閉時間は 3 成分あり、pH が高くなるにつれて遅い成分が増えた。次に、揮発性麻酔薬を用いた脂質平面膜法の確立を試みた。脂質平面膜に K チャネルを埋め込み、電流記録を行った後、アクリル板で完全に密閉できた。

研究成果の概要（英文）：

We prepared E71A mutant of KcsA channel. Channels were reconstruct into the planar lipid bilayer membrane and single-channel current were recorded. The P_{open} was plotted against pH and was fitted with the Hill equation, yielding a pKa of 5.2 and $nH = 2.2$. Open and closed dwell-time distributions of the E71A mutant at various pH conditions. Data were obtained at pH 4.0, pH 5.0, and pH 5.5 for the E71A mutant, respectively. The slowest component of the closed dwell-time appeared as the pH increased. Next, I tried to establish the planar lipid membrane method using a volatile anesthesia. After embedding potassium channels in the planar lipid membrane and was subjected to a current recording potassium channels, it was completely sealed by using an acrylic plate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000 円	1,020,000 円	4,420,000 円

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

1. 研究開始当初の背景

麻酔のメカニズムに関する未解決の課題は「麻酔薬がなぜ様々な生物種で効くのか」である。このような生物種を問わない麻酔作用の普遍性は分子レベルでどのように説明できるのか。本研究ではカリウムチャネルが

ユビキタスに存在することとすべてのカリウムチャネル分子が共通のポア構造をもつことに着目し、「麻酔薬の未知のターゲットの 1 つが特定の分子種に依存しない、カリウムチャネルに共通な立体構造である」という新しい仮説を立てた。

2. 研究の目的

イオンチャンネルと麻酔薬に対する直接作用を明らかにするために脂質平面膜法という単純な実験系を立ち上げ揮発性麻酔薬の実験を確立する。

(1) 脂質平面膜における単一チャンネル電流記録と解析を行う。

(2) 揮発性麻酔薬を用いた脂質平面膜法を確立する。

3. 研究の方法

まずは、カリウムチャンネルの基本的な構造を持った KcsA カリウムチャンネルを使用し、変異体である E71A 変異体 KcsA カリウムチャンネルの作成を試みる。その後、この変異体チャンネルを使用し、脂質平面膜法を用いた単一チャンネル電流記録と解析を行う。次に、揮発性麻酔薬を用いた脂質平面膜測定法の確立をめざす。

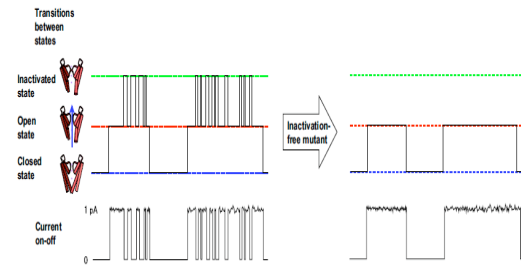
4. 研究成果

(1) KcsA カリウムチャンネル変異体の作成

私達の仮説を検証するにはカリウムチャンネルの共通部分のみを持つチャンネルを対象とする必要があり、この条件を満たすのが KcsA カリウムチャンネルであった。このチャンネルは、構造に関する情報量が多く、脂質平面膜の中でも安定に機能でき、またゲーティングに関して詳しい構造情報も蓄積している。また、KcsA チャンネルは、他のカリウムチャンネルと同様のイオン選択性などの基本特性を示す。

カリウムチャンネルは2種類のゲート（フィルタゲートとヘリックスゲート）が直列に存在し、単一チャンネル電流記録でみるゲーティング現象はどちらのゲートで起こっている現象かわからない。そのため片方のゲートを開放して、もう片方のゲートの開閉を観察できる変異体を用いゲーティング機構を明らかにする必要があった。KcsA カリウムチャンネルのフィルタゲートが開いたまま固定されている変異体 (E71A) を用いたチャンネルを作成した (図1)。このチャンネルを用いることで、フィルタゲートの影響を受けることなく、ヘリックスゲートのみの挙動を観察できる。

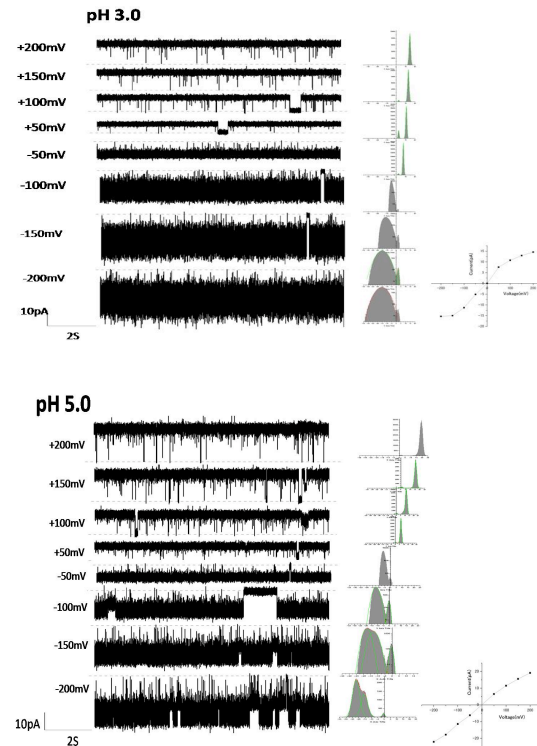
(図1; E71A 変異体 KcsA カリウムチャンネルの作成)



(2) 脂質平面膜法による単一チャンネル電流記録と解析

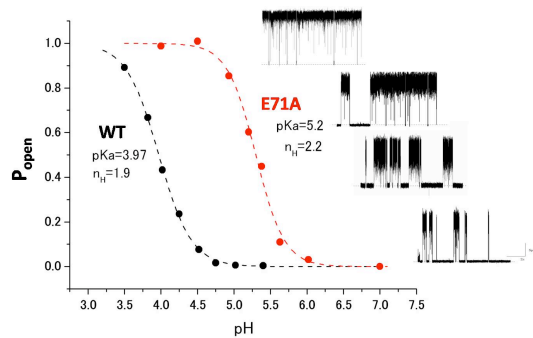
上記の E71A 変異体 KcsA カリウムチャンネルを用いて、脂質平面膜法による単一チャンネル電流記録を行った。

(図2; pH3.0 と pH5.0 での E71A 変異体 KcsA カリウムチャンネル単一チャンネル電流記録と電流電圧曲線)



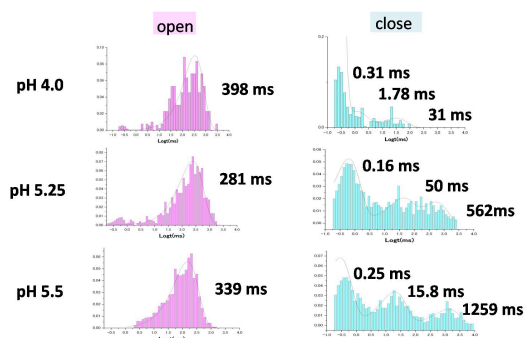
E71A 変異体 KcsA カリウムチャンネル 1 分子電流記録から、酸性の pH ではほぼ 100% の開口率であることが分かった。Negative potentials では、フリッカーゲーティングが観察された。

(図3; 野生型 KcsA カリウムチャンネルと E71A 変異体 KcsA カリウムチャンネル単一チャンネルでの開確率の pH 依存性)



野生型 KcsA カリウムチャンネルの pKa は 3.97、Hill 係数は 1.9 であった。一方、E71A 変異体 KcsA カリウムチャンネル単一チャンネルの pKa は 5.2、Hill 係数は 2.2 であった。この結果は、フィルタゲートの状態がヘリックスゲートの状態に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

(図 4; E71A 変異体 KcsA カリウムチャンネルの pH 変化による開時間と閉時間)



膜電位は 200mV で行い、それぞれ pH4.0, pH5.25, pH5.5 の開時間と閉時間を解析した。ゲーティングキネティクス解析は、QUB を用いて行った。

(www.qub.buffalo.edu)

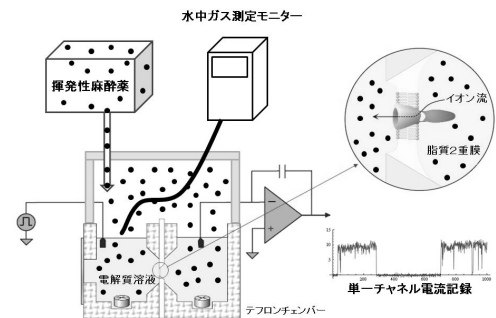
開時間は 1 成分あり、pH を変化させてもあまり変化なかった。閉時間は、それぞれの pH で 3 成分あり、pH が高くなるにつれて、遅い成分が増えることが分かった。

(3)揮発性麻酔薬を用いた脂質平面膜法の確立

脂質平面膜法は、パッチクランプ法に比べて装置が小型である。そのため、密閉することも可能である。揮発性麻酔薬を使用したカ

リウムチャンネルの電流記録を行うためには、揮発性麻酔薬が外部に漏れないように完全に密閉すること、揮発性麻酔薬濃度を測定できるようにすることが必要であった。まずは、脂質平面膜法を密閉するために、透明なアクリル板を用いて密閉できるような箱を作成した。脱脂綿に揮発性麻酔薬をしみこませ、箱の内部に設置し、ガス測定モニターを用いて揮発性麻酔薬の濃度測定を行った。

(図 5; 揮発性麻酔薬を使用した脂質平面膜法の模式図)



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. 図表から学ぶ麻酔の知識力 UP セミナー「腎機能障害をもつ患者の術前評価」, 松木悠佳, オペナリーシング 28(3), 126-129 (2013) 査読無
2. 水中毒患者のカテコラミン不応性ショックにバゾプレッシンが著効した一症例, 松木悠佳, 信川泰成, 安田善一, 村上剛, 高倉康, 重見研司, 日本集中治療医学雑誌 20: 97-98 (2013) 査読有
3. 心電図モニタ, 松木悠佳, オペナリーシング臨時増刊号, 10-16 (2012) 査読無
4. Heart failure associated with pregabalin use, Y. Matsuki, M. Morikawa, T. Nishimoto, M. Mizogami, K. Shigemi, Pain Physician 15(4), E537-538 (2012) 査読有
5. Suspected respiratory depression associated with use of transdermal

- fentanyl patch, Y. Matsuki, M. Mizogami, M. Tabata, Y. Matsuki, Y. Yasuda, K. Shigemi, Pain Physician 15(4), E536-537 (2012) 査読有
6. Muscle rigidity associated with pregabalin, Y. Matsuki, M. Tabata, Y. Nobukawa, M. Sakai, M. Mizogami, K. Shigemi, Pain Physician 15(3), E349-351 (2012) 査読有
 7. デジタル処理による動脈圧波形の歪みの補正, 三田建一郎, 佐藤倫祥, 清水久美子, 次田佳代, 松木悠佳, 田畑麻里, 信川 泰成, 上田雅史, 林和子, 廣瀬宗孝, 重見 研司, 麻酔・集中治療とテクノロジー2009, 56-59 (2012) 査読有
 8. 座位での後頭蓋窩手術において経食道心エコーで早期に空気塞栓を検出し得た 1 症例, 松木悠佳, 次田佳代, 信川泰成, 田畑麻里, 村上剛, 重見研司, 日本臨床麻酔学会誌 31(7), 996-998 (2011) 査読有
 9. 麻酔科領域でのデクスメトミジン使用の今後, 安田善一, 佐上佑介, 小畑友里江, 松木悠佳, 次田佳代, 信川泰成, 田畑麻里, 村上剛, 重見研司, 臨床麻酔臨床麻酔 35 (7) , 1137-1143 (2011) 査読無
 10. 整形外科病棟の麻酔看護「TIVA による全身麻酔の特徴と病棟管理のポイント」, 松木悠佳, 整形外科看護 16 (9) , 16-22, (2011) 査読無
- [学会発表] (計 24 件)
1. Proton permeation and pH-dependent gating of the polytheonamide B channel, 松木悠佳, 岩本真幸, 老木成稔, 第 90 回日本生理学会学術集会 2013. 3. 29, 東京
 2. プレガバリン内服によると思われる心不全を来した 1 症例, 松木悠佳, 溝上真樹, 信川泰成, 上田雅史, 安田善一, 村上剛, 重見研司, 東海・北陸ペインクリニック学会第 20 回北陸地方会 2013. 3. 10, 金沢
 3. 麻酔情報管理システム (AIMS) による術前診療支援機能構築の試み, 村上剛, 次田佳代, 小畑友里江, 神澤聖一, 三田建一郎, 松木悠佳, 内田整, 重見研司 第 30 回日本麻酔集中治療テクノロジー学会 2012. 12. 8, 鹿児島
 4. 福井大学附属病院緩和ケアチームにおける神経ブロック適応症例の検討, 溝上真樹, 松木悠佳, 重見研司, 小坂浩隆, 西本武史, 片山寛次, 森川美羽, 中澤雅子, 佐藤義高, 青木芳隆, 久保博子, 北山富士子, 高野智早, 小林美貴, 成瀬廣亮, 第 18 回福井県緩和医療研究会 2012. 11. 10, 福井
 5. 術中血圧管理とカリウム値補正に難渋した脳出血患者の一症例, 西川雄大, 信川泰成, 松木悠佳, 上田雅史, 高倉康, 重見研司, 日本麻酔科学会東海・北陸支部第 10 回学術集会 2012. 9. 1, 名古屋
 6. 副鼻腔根本術における声門下分泌物ドレナージ機能付きテーパ型気管チューブの使用が肺酸化能に及ぼす影響, 小上瑛也, 松木悠佳, 下弘一, 溝上真樹, 高倉康, 重見研司, 日本麻酔科学会東海・北陸支部第 10 回学術集会 2012. 9. 1, 名古屋
 7. カリウムチャンネルモデルを用いた神経細胞へのカルシウムイオンの直接効果, 松木悠佳, 三田建一郎, 岩本真幸, 老木成稔, 重見研司, 日本麻酔科学会東海・北陸支部第 10 回学術集会 2012. 9. 1, 名古屋
 8. 神経障害性疼痛患者に対するプレガバリンの副作用は腎機能低下症例に多い, 松木悠佳, 田畑麻里, 坂井美賀子, 信川泰成, 上田雅史, 木下義和, 安田善一, 溝上真樹, 村上剛, 重見研司, 日本ペインクリニック学会第 46 回大会 2012. 7. 6, 松江
 9. 全身麻酔中に不測の心室細動を起こした 1 症例, 信川泰成, 安田善一, 松木

- 悠佳, 村上剛, 高倉康, 重見研司, 第 20 回日本集中治療医学会東海北陸地方会 2012. 6. 23, 富山
10. 心電図 QT 時間へのマグネシウムイオンの直接効果—カリウムチャネルモデルを用いて—, 松木悠佳, 岩本真幸, 三田建一郎, 老木成稔, 重見研司, 日本麻酔科学会第 59 回学術集会 2012. 6. 8, 神戸
 11. フェンタニル貼付剤による呼吸抑制が疑われた症例, 松木悠佳, 田畑麻里, 坂井美賀子, 溝上真樹, 信川泰成, 上田雅史, 安田善一, 村上剛, 重見研司, 第 19 回日本ペインクリニック学会北陸地方会 2012. 3. 11, 福井県吉田郡
 12. 劇症型心筋炎に対しポリメチルペンテン膜の人工肺を用いた PCPS が有効であった一症例, 松木悠佳, 信川泰成, 安田善一, 久保由香, 村上究, 荒川健一郎, 林昌浩, 村上剛, 重見研司, 第 39 回日本集中治療医学会学術集会 2012. 3. 1, 幕張
 13. 神経筋疾患患者でのスガマデックスの使用経験, 松木悠佳, 第 1 回北陸麻酔・集中治療研究会 2011. 11. 25, 金沢
 14. レジオネラ肺炎に PMX-DHP・CHDF が著効した一症例, 信川泰成, 次田佳代, 松木悠佳, 安田善一, 村上剛, 高倉康, 重見研司, 第 15 回北陸急性血液浄化療法談話会 2011. 11. 26, 金沢
 15. 突然の換気不能で発症したラテックスによるアナフィラキシーショックの 1 例, 安田善一, 佐藤倫祥, 次田佳代, 佐上祐介, 松木悠佳, 信川泰成, 村上剛, 重見研司, 日本臨床麻酔学会第 31 回大会 2011. 11. 5, 宜野湾
 16. 術中の声門下分泌物ドレナージ機能付き気管チューブの使用が副鼻腔根本術における術後合併症に及ぼす影響, 松木悠佳, 廣瀬宗孝, 田畑麻里, 信川泰成, 下弘一, 安田善一, 村上剛, 重見研司, 日本臨床麻酔学会第 31 回大会 2011. 11. 3, 宜野湾
 17. KcsA カリウムチャネルの pH 依存性のマグネシウムイオンの効果, 松木悠佳, 岩本真幸, 清水啓史, 老木成稔, 中部日本生理学会第 58 回学術集会 2011. 11. 1, 福井
 18. チューブエクステンジャーを介して経口から経鼻にチューブ交換した小下顎症の一症例, 次田佳代, 佐上祐介, 松木悠佳, 信川泰成, 田畑麻里, 安田善一, 村上剛, 重見研司, 日本小児麻酔学会第 17 回大会 2011. 9. 23, 大阪
 19. 連続的動脈圧心拍出量測定システムを使用し安全に管理しえた拡張相肥大型心筋症患者の麻酔経験, 小畑友里江, 佐上祐介, 次田佳代, 松木悠佳, 村上剛, 重見研司, 日本麻酔科学会東海・北陸支部第 9 回学術集会 2011. 9. 10, 名古屋
 20. 気道刺激により容易に肺水腫を来し抜管に難渋した小児の一症例, 佐上祐介, 安田善一, 次田佳代, 松木悠佳, 信川泰成, 重見研司, 日本麻酔科学会東海・北陸支部第 9 回学術集会 2011. 9. 10, 名古屋
 21. インフルエンザ重症肺炎に対し PMX-DHP・CHDF が著効した一症例, 信川泰成, 次田佳代, 松木悠佳, 安田善一, 村上剛, 重見研司, 第 19 回日本集中治療医学会東海北陸地方会 2011. 6. 18, 名古屋
 22. カテコラミン不応性の敗血症性ショックにバソプレッシン持続投与が有効であった 1 症例, 松木悠佳, 次田佳代, 片岡誠, 信川泰成, 石本雅幸, 安田善一, 村上剛, 重見研司, 第 19 回日本集中治療医学会東海北陸地方会 2011. 6. 18, 名古屋
 23. 耳鼻科領域での声門下分泌物の量の比較, 松木悠佳, 次田佳代, 信川泰成, 田畑麻里, 廣瀬宗孝, 重見研司, 日本麻酔科学会第 58 回学術集会 2011. 5. 19, 神戸
 24. メラノーマ細胞における細胞膜透過性ペプチドを用いたがん性疼痛治療薬の開発, 田畑麻里, 廣瀬宗孝, 上田康陽, 松木悠佳, 次田佳代, 重見研司 日本麻酔科学会第 58 回学術集会 2011. 5. 19, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松木 悠佳 (MATSUKI YUKA)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：10464083