

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592301

研究課題名(和文)細胞膜マイクロドメインを用いた麻酔薬作用機序の解明

研究課題名(英文)Anesthetic effect on dynamics of membrane microdomains in living cells

## 研究代表者

小野 純一郎(Ono, Junichiro)

香川大学・医学部附属病院・その他

研究者番号：90363217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜マイクロドメインはコレステロール、飽和リン脂質、スフィンゴ脂質、各種受容体が集積する膜ドメインである。機能的にはシグナル伝達の主座であり、揮発性麻酔薬作用のターゲットでもある。この研究では、揮発性麻酔薬がそのドメインの動態にどのような影響を与えるかを検討した。その結果、細胞膜の流動性は揮発性麻酔薬によって均一に変化するのではなく、流動性が高まる部分(非マイクロドメイン領域)と変化しない部分(マイクロドメイン領域)に分かれる。

研究成果の概要(英文)：Lipid rafts are membrane microdomains which abundantly contain sphingolipids, sterols, and receptor proteins. Lipid rafts has crucial role in the signal transduction. Volatile anesthetics with high affinity to lipid distribute in the lipid bilayer. Therefore, it is likely that lipid rafts is target of volatile anesthetic action. The objective of this study is to determine whether the dynamics of lipid raft is affected by volatile anesthetics.

研究分野：麻酔科学

キーワード：マイクロドメイン 揮発性麻酔薬 麻酔メカニズム FRAP解析 TIRFM解析

## 1. 研究開始当初の背景

現在の揮発性麻酔薬メカニズム研究の動向は、GABA、nACh、NMDA といった個々の受容体について分子レベルで展開され、揮発性麻酔薬は各種受容体機能に影響を与えていることが次々と明らかにされている。しかし、揮発性麻酔薬は作用部位が非特異的であることから、個々の受容体研究が進んでも、受容体機能相関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、揮発性麻酔薬の主な分布領域である細胞膜脂質についての知見が蓄積され、麻酔メカニズム研究の停滞を突破できそうな糸口が見えてきた。それが 1988 年に始めて提唱された「マイクロドメイン」という概念である。これは Singer-Nicolson の脂質二重膜モデルを発展させたもので、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（マイクロドメイン）が各所に散在し、そこには受容体タンパク質までも内含し、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という考え方である。さらにマイクロドメインは生成・移動・消滅をダイナミックに繰り返し、その中に含まれる受容体タンパク質は周囲の脂質成分によって機能的影響を受けると考えられている。このようなマイクロドメインという概念を麻酔メカニズムという視点で捉えると、非常に魅力的かつ有望なマテリアルと言える。Meyer-Overton 以来、先達の研究から得た知見として、揮発性麻酔薬は脂質二重膜の境界脂質部分を中心に広く分布し、溶け込んだ麻酔薬分子が受容体タンパク質機能を修飾していることはほぼ間違

いない。とするならば、受容体タンパク質を内包する脂質マイクロドメインの解析は麻酔メカニズムを知るうえで非常に自然かつ妥当な着眼点である。

## 2. 研究の目的

揮発性麻酔薬作用により細胞膜マイクロドメインの動態変化が起きるかどうかを検証した。蛍光標識を利用したライブセル・イメージング技術を用いて、麻酔状態におけるマイクロドメインを視覚化し、動態解析を行うことが研究の目的である。

## 3. 研究の方法

実験対象：ラット胎仔大脳皮質初代継代神経細胞および株化細胞 (Hela, HEK293t) を用いた。動物実験に先立ち、香川大学動物実験委員会の許可を得て香川大学動物実験規則に則って実験を行った。

### 1) 蛍光タンパク質によるマイクロドメインの標識

この課題で用いるバイオイメージング手法では、マイクロドメインに蛍光標識(タグ)を付けて目に見える形にすることが必須となる。当初の計画では無毒化ライセインを遺伝子導入する予定であったが、予備実験段階で導入効率の低さが問題となり、タグ・タンパク質を用いた標識方法に変更した。原理としては、特定の受容体などの遺伝子に蛍光タンパク質の遺伝子を付加した遺伝子を作成し、リポフェクション法により細胞に遺伝子を導入して強制発現させる。蛍光標識にはハロタグを用いた。マイクロドメイン標識には、GPI アンカータンパク質にハロタグタンパク質を付けた遺伝子を設計した。

非マイクロドメイン標識にはハロタグ遺伝子を付けたトランスフェリン受容体（共に連携研究者、鈴木辰吾博士による）を用いて行った。これにより、マイクロドメイン領域、非マイクロドメイン領域を個別に識別することができる。また、マイクロドメイン、非マイクロドメイン両方に発現している PDGF 受容体もハロタグ遺伝子で標識した。

## 2) 麻酔薬作用方法

麻酔薬は揮発性麻酔薬イソフルランと静脈麻酔薬ミダゾラムを用いた。イソフルランについては、まずイソフルラン飽和培養液を作成する。このときのモル濃度は過去にガスクロマトグラフィ測定によって 8mM になることを確認している。この飽和溶液を 10 倍希釈 (0.8mM)、4 倍希釈 (2mM) して、後述の動態解析実験の 30 分前に作用させる。イソフルラン含有培養液を培養容器内に入れる際は、培養容器内に気相が残らないように充填したあと上からガラス蓋をのせて密封し、蒸発による麻酔薬濃度の低下を最小限に抑えた。静脈麻酔薬ミダゾラムを作用させるときは、培養液中濃度を 60  $\mu$ M、120  $\mu$ M に設定し、2 時間作用させたのち動態解析実験を行った。

## 3) FRAP 法によるマイクロドメイン動態の解析

光褪色後蛍光回復法 (Fluorescence Recovery after Photobleaching; FRAP) 法は、バイオイメージングの 1 手法である。ターゲットとなる分子に蛍光標識を施し、その蛍光褪色後の回復スピードを計測することで、目的分子の拡散速度や動的成分比率を算出することができる。

分子の動態を解析したい細胞の領域に強いレーザーを短時間照射し、分子の機能を壊さずに蛍光のみを褪色 (ブリーチ) させる。目的とする分子が動かなければ、蛍光強度は回復しない。動的な分子であれば褪色した周辺の分子が拡散により褪色部に流入してきて蛍光強度が回復する。共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡で測定した蛍光強度を時系列に沿ってプロットし、フィッティング解析を行うと拡散速度や動的成分を算出することができる。算出するパラメーターとしては、t-half 値、動的成分率である。この解析によって分子の流動性を知ることができ、標識を施した分子の流動性が麻酔薬によって変化したかどうか分かる。

## 4) TIRFM による一粒子動態解析

全反射蛍光顕微鏡 (Total internal reflection fluorescence microscope; TIRFM) は、エバネッセント光という特殊な条件下で作り出される光をもとに、これまでの光学顕微鏡の解像度をはるかに超えた観察が可能な顕微鏡である。この顕微鏡を用いると、蛍光標識されたマイクロドメイン 1 粒子の動態を追跡することが可能となる。蛍光標識されたマイクロドメイン TIRFM で観察しながらビデオ撮影する。この動画をビデオトラッキング・ソフトにかけ、マイクロドメインの拡散係数を算出する。

## 4. 研究成果

### 1) FRAP 解析

HEK293t 細胞にイソフルランを作用させたとき; マイクロドメインはイソフルランによって流動性が変化することはなか

った。一方、非マイクロドメインはイソフルランによって流動性が高まり、t-half 値が短縮した。( Fig. 1, 2, 3)( Table. 1)

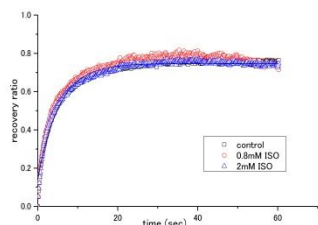


Fig. 1. Fluorescence Recovery of GPI-HaloTag mutants in Living Cells

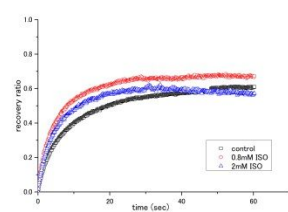


Fig. 2. Enhanced Mobility of PDGF-HaloTag in Living Cells

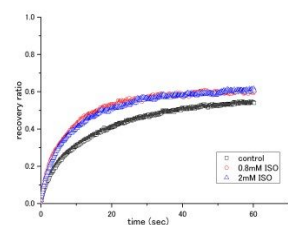


Fig. 3. Enhanced Mobility of TfR-HaloTag in Living Cells

$t_{1/2}$ (sec)	control	0.8mM ISO	2mM ISO
GPI-Halo	3.84 ± 1.06	3.46 ± 1.44	3.77 ± 1.39
PDGF-Halo	7.97 ± 2.74 <sup>#</sup>	4.27 ± 1.03 <sup>*</sup>	4.11 ± 1.00 <sup>*</sup>
TfR-Halo	12.43 ± 2.53 <sup>#</sup>	6.68 ± 1.76 <sup>**</sup>	7.40 ± 2.62 <sup>**</sup>
# p<0.05 ; vs GPI control, * p<0.05 ; vs PDGF control, ** p<0.05 ; vs TfR control			
Mobile ratio	control	0.8mM ISO	2mM ISO
GPI-Halo	0.75 ± 0.08	0.77 ± 0.14	0.74 ± 0.94
PDGF-Halo	0.58 ± 0.09	0.67 ± 0.06 <sup>*</sup>	0.59 ± 0.07
TfR-Halo	0.50 ± 0.17 <sup>#</sup>	0.60 ± 0.09 <sup>**</sup>	0.63 ± 0.15 <sup>**</sup>
# p<0.05 ; vs GPI control, * p<0.05 ; vs PDGF control, ** p<0.05 ; vs TfR control			

HEK293t 細胞にミダゾラムを作用させたとき ; マイクロドメイン、非マイクロドメイン共にミダゾラムによって流動性が変化することはなかった ( Table. 2 )。イソフルランを作用させたときは非マイクロドメイン ( TfR-Halo ) で流動性の変化がみられたが、ミダゾラムではその変化が見られなかった。

$t_{1/2}$ (sec)	control	60mM MDZ	120mM MDZ
GPI-Halo	3.84 ± 1.06	3.50 ± 1.06	3.77 ± 1.39
TfR-Halo	12.43 ± 2.53 <sup>#</sup>	13.32 ± 1.45 <sup>#</sup>	10.51 ± 3.51 <sup>#</sup>
# p<0.05 ; vs GPI-Halo			
Mobile ratio	control	60mM MDZ	120mM MDZ
GPI-Halo	0.75 ± 0.08	0.72 ± 0.14	0.76 ± 0.07
TfR-Halo	0.50 ± 0.17 <sup>*</sup>	0.51 ± 0.09 <sup>*</sup>	0.48 ± 0.06 <sup>*</sup>
* p<0.05 ; vs GPI-Halo			

神経細胞にイソフルランを作用させたとき ; マイクロドメイン、非マイクロドメイン共に一般的に HEK293t 細胞より速い動態を示した。また、イソフルランを作用させたときは、HEK293t 細胞と同様に、非マイクロドメイン領域の流動性が高まった。( Table. 3 )

$t_{1/2}$ (sec)	control	0.8mM ISO	2mM ISO
GPI-Halo	1.69 ± 0.75	1.47 ± 0.65	1.71 ± 1.02
TfR-Halo	2.89 ± 0.97 <sup>#</sup>	1.39 ± 0.43 <sup>*</sup>	1.37 ± 0.49 <sup>*</sup>
# p<0.05 ; vs GPI control, * p<0.05 ; vs TfR control			
Mobile ratio	control	0.8mM ISO	2mM ISO
GPI-Halo	0.66 ± 0.08	0.64 ± 0.09	0.61 ± 0.12
TfR-Halo	0.60 ± 0.18 <sup>#</sup>	0.42 ± 0.17	0.48 ± 0.14
# p<0.05 ; vs GPI control			

## 2) TIRFM 解析

一粒子動態解析においても、FRAP 解析と同様の結果が得られた。すなわち、イソフルランによって非マイクロドメイン領域の流動性が高まった ( Fig. 4 )。

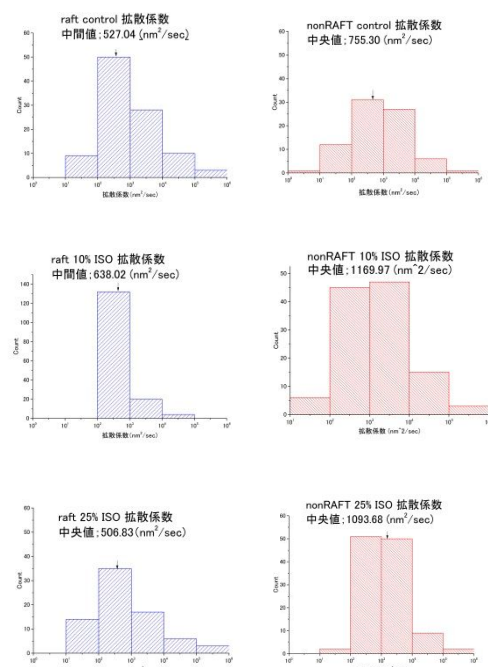


Fig. 4 イソフルラン作用時の TIRF 解析

## 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

小野純一郎、白神豪太郎．イソフルランが生細胞の脂質ラフトの動態に与える影響、第62回日本麻酔科学会学術集会、2015年5月29日、神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

## 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・麻酔学講座・協力研究員

研究者番号・90363217

### (2) 連携研究者

鈴木 辰吾 (SUZUKI SHINGO)

香川大学・医学部・神経機能形態学・助教

研究者番号・50451430