

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659698

研究課題名(和文) 吸入麻酔薬は本当に受容体結合薬物であるのか：ホタル発光酵素のカロリメトリー

研究課題名(英文) Are inhalation anesthetics really receptor-binding drugs? : calorimetry of firefly luciferase

研究代表者

松木 均 (Matsuki, Hitoshi)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：40229448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ホタル発光酵素ルシフェラーゼ(FFL)が示す高い麻酔薬感受性を明らかにするために、FFLとリガンド間の相互作用様式を熱量測定で調査した。示差走査熱量測定の結果から、麻酔薬と拮抗阻害剤(脂肪酸)はFFLの構造安定化に全く正反対に作用し、FFLの麻酔薬感受性は基質(ATP)あるいは脂肪酸存在下では非存在下の場合より顕著に大きくなることを見出した。等温滴定熱量測定の結果は、麻酔薬と脂肪酸のFFLへの結合様式は熱力学的には全く異なっていることを示した。これらの熱的データをX線結晶構造解析データと比較し、FFLに麻酔薬結合部位の存在する可能性は極めて低いことを結論づけた。

研究成果の概要(英文)：Interaction modes of ligands with firefly luciferase (FFL) were investigated by calorimetry to clarify the high anesthetic sensitivity of FFL. Results of differential scanning calorimetry of FFL solutions revealed that the effect of an anesthetic chloroform on the structural stability of FFL is in direct opposition to that of the competitive inhibitor decanoic acid, and that the anesthetic sensitivity of FFL is markedly enhanced in the presence of the substrate (ATP) or decanoic acid as compared with that in the absence of the ligand. Results of isothermal titration calorimetry showed that the binding mode of an anesthetic halothane with FFL is quite different from that of decanoic acid thermodynamically. Comparing these thermal results with the structural data obtained by X-ray crystallography, we concluded that the possibility that there exist the anesthetic binding sites in FFL is very low.

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：ルシフェラーゼ 吸入麻酔薬 脂肪酸 アデノシン3リン酸 示差走査熱量測定 等温滴定熱量測定 特異的および非特異的相互作用 誘導適合

1. 研究開始当初の背景

麻酔薬の作用機序は、未だに不明である。過去より、麻酔理論は、麻酔薬が膜タンパク質に特異的に結合しその作用を発現とするタンパク質受容体仮説と、膜脂質に非特異的に結合することで膜タンパク質に二次的に影響をおよぼし発現とする脂質膜仮説の議論が続けられてきた。最近の麻酔理論は、過去に支持されてきた脂質膜仮説への反動やタンパク質・遺伝子工学技術の進歩を背景にタンパク受容体仮説が隆盛となり、麻酔作用はある特定の膜内受容体に結合する受容体薬物であるという見解が一般に受け入れられている。しかし、麻酔薬が一般の薬物に比べ 1000 倍以上大きな有効作用濃度を持ち且つその分子形状に構造特異性が全く見られないことを考える時、麻酔薬は本当に受容体薬物なのだろうか。

そもそも、このタンパク受容体仮説の起源は、ホタル発光酵素ルシフェラーゼ (FFL) というタンパク質が示した高い麻酔薬感受性にある。FFL は 1965 年、米国ユタ大学の上田により臨床濃度の麻酔薬により阻害を受ける初めてのタンパク質として見出された。上田は、吸入麻酔薬は FFL に非拮抗的に結合することを示したが、1984 年に英国インペリアルカレッジの Franks と Lieb が FFL に吸入麻酔薬が基質ルシフェリンと拮抗的に結合することを主張し、これが麻酔作用のタンパク受容体仮説の端緒となった。1990 年代に入り、上田らは FFL への麻酔薬結合の非拮抗性を主張、対する Franks と Lieb は拮抗性を主張し、両者の論争が続けられたが、FFL に対する麻酔薬の作用様式は最終的な結論が出されず、現在に至る。

2. 研究の目的

麻酔薬は FFL の構造を不安定化する一方で、麻酔薬の結合部位があると報告されている牛血清アルブミンの構造は逆に安定化することが知られている。このようなタンパク質の種類に依存した麻酔薬の結合によるタンパク質の構造変化の不一致は、タンパク質に対する麻酔薬の作用様式をさらに混迷させている。本研究においては、FFL と麻酔薬の相互作用から生じる微小な熱エネルギー変化を、リガンド効果の比較研究と言う観点から高精度な熱量測定で追跡し、FFL への麻酔薬の本質的な相互作用様式、すなわち FFL は本当に麻酔薬の結合部位を有しているのかどうか、その解明を目的とした。

3. 研究の方法

高純度の FFL 試薬を Sigma 社から購入し、Gly-Gly 緩衝溶液 (0.1 M, pH 7.8) 中に溶解して調製した FFL 溶液 (1 mg ml⁻¹; 濃度約 4.8 μM) に対して、麻酔薬、FFL の基質である ATP および FFL の拮抗阻害剤として報告されている脂肪酸をリガンドとして添加し、以下の実験を行った。

(1) 3 種類の熱量測定 (巨視的検討)

FFL の構造安定性 (フォールディングあるいはアンフォールディング) へのリガンド効果を示差走査熱量 (DSC) 測定で、FFL とリガンドの結合様式 (結合熱、結合定数、結合数) を等温滴定熱量 (ITC) 測定で、FFL の体積挙動 (熱膨張率、変性体積) へのリガンド効果を圧力摂動熱量 (PPC) 測定で調査した。

(2) 構造データとの照合 (微視的検討)

熱量測定により得られたデータをタンパク質データバンク (PDB) 上の構造生物学的データと比べ合わせ、FFL とリガンド間に働く巨視的な相互作用と FFL へのリガンド結合の微視的描写との照合を図ることで、特異的な結合部位存在の有無を考察した。

4. 研究成果

タンパク質の熱量測定では検出に mg オーダーの高濃度試料が必要とされるが、FFL の場合、その低い水溶性とリガンド添加時に生ずる諸問題 (局所的変性や有機溶剤の影響など) のため、FFL の熱量測定は困難さを伴う。まず、FFL とリガンドの溶解性と各種種類の熱量測定における検出感度を考慮して予備的な実験を行い、使用するリガンド (吸入麻酔薬および脂肪酸) を選択した。測定に先立ち、高純度試薬中のタンパク質濃度を 280 nm の吸光度測定からモル吸光係数を用いて約 30% と決定した。

(1) DSC 測定による FFL の構造安定性へのリガンド効果の比較研究

DSC 測定から得られたリガンド (麻酔薬 (クロロホルム)、拮抗阻害剤 (デカン酸)、基質 (ATP)) 存在下における DSC サーモグラムを図 1 に示す。リガンド非存在下、FFL 水溶液の DSC サーモグラムには、約 38 に熱変性に対応した吸熱ピークを観測した。ミリモル量のクロロホルム添加により、変性温度 (T_D) 値および変性エンタルピー (ΔH_D) 値は濃度依存的に低下した (図 1 (a))。他方、デカン酸の場合、マイクロモル量の添加により、クロロホルムとは逆に T_D 値および ΔH_D 値は増加した (図 1 (b))。FFL の発光反応には ATP が必要とされるので、ATP の効果を調べてみたところ、マイクロモル量の ATP 添加により、 T_D 値および ΔH_D 値共に増加し、デカン酸の場合とほぼ同様な効果が見られた (図 1 (c))。

次に FFL 溶液中に ATP (1 mM) 共存させた条件下で、両リガンドに対して同様な実験を行った。クロロホルムの場合、ATP 存在下においては ATP 非存在下の半分程度の濃度で ΔH_D 値が非存在下の場合と同等まで小さくなり、さらに興味深いことに T_D 値は ATP 非存在下の場合とは逆に濃度依存的に増加した (図 1 (d))。他方、デカン酸では、 T_D 値および ΔH_D 値共にコントロールと比べてあまり変化が見られなかった (図 1 (e))。続いて、一定のデカン酸存在下 (200 μM) において、

クロロホルムを添加してみたところ、リガンド非存在下の場合と比較して、低濃度のクロロホルム添加で T_D 値は増加、 ΔH_D 値は減少となり、ATP 存在下における場合と類似した結果が得られた (図 1 (f))。

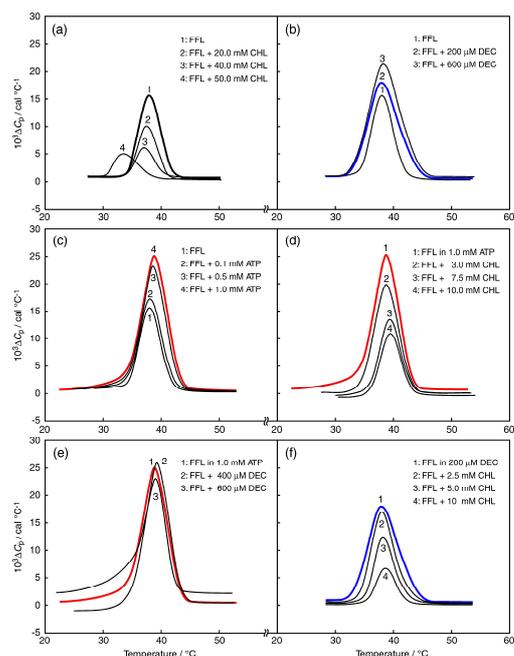


図 1 リガンド存在下における FFL 水溶液の DSC サーマグラム。

DSC 測定の結果からは、麻酔薬と拮抗阻害剤 (脂肪酸) では FFL の構造安定化に全く正反対に作用すること、FFL の麻酔薬感受性は基質 (ATP) あるいは脂肪酸存在下においては非存在下の場合とは著しく変化すること (大きくなる) こと、脂肪酸と ATP は FFL に類似した構造安定化と麻酔薬感受性変化をもたらすこと、といった重要な事実が熱的観点から明らかとなった。

(2) ITC 測定による FFL へのリガンド結合様式の比較研究

ITC 測定は、25°C 一定下、FFL 溶液にリガンド溶液を一定量 (6 μl) ずつ滴下し、タンパク質とリガンド結合に伴う熱量を測定した。ここで、タンパク質およびリガンドの希釈熱については補正を行った。結果の ITC サーマグラムを図 2 に示す。最初にクロロホルム溶液で滴定してみたところ、発生熱量が小さく結合熱は装置の検出感度以下となり、観測不能であったため、疎水性が大きなハロセン溶液で滴定した。FFL とハロセンの結合は発熱反応 ($\Delta H < 0$) となり、麻酔薬濃度依存的に熱量が飽和した (図 2 (a))。他方、FFL とデカン酸の結合は逆に吸熱反応 ($\Delta H > 0$) を示し、その熱量はある濃度範囲において飽和した (図 2 (b))。また、ハロセンに対しては FFL 濃度変化の実験を試みたが、FFL の低水溶性と熱量計感度から、限られた FFL 濃度範囲以外では測定できなかった。一般に麻酔

薬の結合は弱いことに起因して結合数の決定は困難であるため、本研究では ITC 装置付属ソフト (Origin) は使用せずに、ITC データを熱力学的に解析し、Scatchard プロットから結合定数 (K_a) と結合数 (n) を求めた。決定した熱力学量を表 1 に示す。

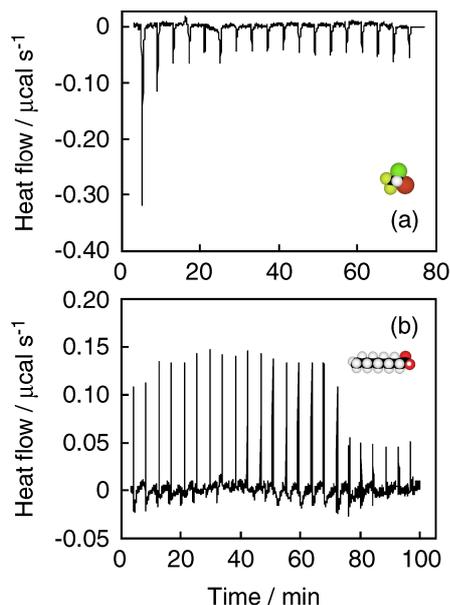


図 2 FFL へのリガンド結合における ITC サーマグラム。

ITC 測定の結果からは、麻酔薬と脂肪酸共に FFL に強く結合するが、脂肪酸は低い結合数 (ほぼ一対一) でより特異的に結合すること、麻酔薬と脂肪酸の結合様式は熱力学的観点からは全く異なっていることを実験的に初めて示すことができた。特に後者の結論からは、脂肪酸の結合と共に自由エネルギー (ΔG) が大きく減少し、大きなエントロピー変化 (ΔS) を伴う構造変化が起こっていることが示唆され、後述する誘導適合を示す構造データとよい一致がみられた。

表 1 FFL とリガンドの結合熱力学量

Ligands	n	K_a	ΔG	ΔH	ΔS
		M^{-1}	$kJ mol^{-1}$	$kJ mol^{-1}$	$J K^{-1} mol^{-1}$
ハロセン	4.5	3.2×10^5	-3.1	-0.67	103
デカン酸	0.73	2.1×10^6	-35.9	13.7	167

なお、DSC および ITC 測定に引き続いて、FFL 水溶液の PPC 測定を実施したところ、FFL 濃度 5 mg ml⁻¹ においても PPC サーマグラム上には DSC サーマグラム上において観測された明瞭な熱変性ピークを観測することはできなかった。FFL 試料中のタンパク質含有量および FFL の水への低溶解性を考慮し、PPC 測定では変性ピークを観測すること困難であると判断し、これ以上の PPC 測定は中止した。

(3) 巨視的および微視的な FFL へのリガンド結合データの整合性検討

FFL のリガンド感受性変化について、現在までに得られている X 線結晶構造解析データとの比較により検討した。図 3 にリガンド非存在下および存在下において決定された FFL および長鎖脂肪酸アシル化補酵素合成酵素 (LC-FACS) の結晶構造を示す。

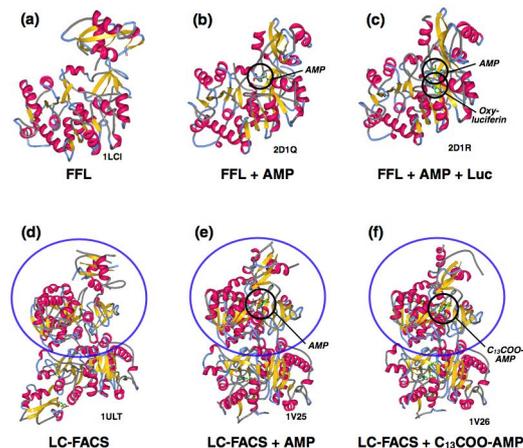


図 3 FFL および LC-FACS のリガンド非存在下および存在下における結晶構造：上段は FFL、下段は LC-FACS。ここで、LC-FACS は二量体で構造決定されているためモノマー部分を円周内に示した。

FFL に基質が結合すると FFL の立体構造が大きく変化する。基質が無い場合、FFL は上部 C 末端側の小ドメインと下部 N 末端側の大ドメイン間に大きくくぼみが存在する開口 (オープン) 型であり、このくぼみ部分に還元型ルシフェリンと ATP の結合部位がある (図 3 (a))。ATP 添加後の FFL-AMP 複合体では、上部 C ドメインが下部 N ドメイン間に向かって大きくくぼみを塞ぐ方向に動き (誘導適合) 閉口 (クローズド) 型となる (図 3 (b))。さらにルシフェリン添加後は、その閉口構造を維持した状態のままである (図 3 (c))。LC-FACS は FFL と同じくアデニル酸形成酵素の一員であり、ATP や長鎖脂肪酸 (例えばミリスチン酸) の結合により、FFL と同様な誘導適合を起こす (図 3 (d) - (f))。

上記の結果を、本研究の DSC および ITC 測定で得られた結果と比較した。リガンド非存在下、開口型構造の FFL に麻酔薬を添加した場合、FFL の麻酔薬感受性は低いことから、構造変化を誘起せずに FFL を不安定化すると考えられる。他方、ATP や脂肪酸を添加した場合には、これら物質は基質結合部位に結合し、FFL を閉口型構造へ変化させ、FFL を熱的に安定化すると考えられる。ITC 測定の結果は、麻酔薬と脂肪酸の FFL への結合が本質的に異なる (異なる部位に結合する) ことを明示している。これに対して、一定量の ATP や脂肪酸存在下においては、FFL はすでに閉口型構造であり、その高い麻酔薬感受性は閉

口型構造への結合様式に起因すると言える。また、ATP および脂肪酸はどちらも化学量論的に FFL に結合し、脂肪酸の結合のみでも FFL は閉口型構造へと変化するものと考えられ、結果、麻酔薬感受性が向上すると推察される。

以上のように、FFL への麻酔薬の結合様式は、基質である ATP や拮抗阻害剤である脂肪酸のもとには明らかに異なる。これまで麻酔薬は基質ルシフェリン (多環芳香族基を有する脂肪酸) と拮抗阻害すると言われて来たが、本研究の結果をその有効作用濃度と考え合わせると、FFL に麻酔薬が特異的に結合する部位の存在する可能性は低いことを示している。今後は FFL のリガンド感受性についての熱的研究をさらに推し進め、ATP や脂肪酸存在下において FFL が示す高い麻酔薬感受性の理由を調査すると同時に、FFL には麻酔薬結合部位は存在しないことを提言していく予定である。

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 14 件)

N. Tamai, T. Izumikawa, S. Fukui, M. Uemura, M. Goto, H. Matsuki, S. Kaneshina, How does acyl-chain length affect thermotropic phase behavior of saturated diacylphosphatidylcholine-cholesterol binary bilayers?, *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes*, 査読有, 1812, 2013, 2513-2523

松木 均, 後藤優樹, 玉井伸岳, 生体膜脂質の膜状態 - 圧力研究から見えてくる構造機能相関 -, *高圧力の科学と技術*, 査読有, 23, 2013, 30-38

H. Matsuki, M. Goto, K. Tada, N. Tamai, Thermotropic and barotropic phase behavior of phosphatidylcholine bilayers, *International Journal of Molecular Sciences*, 査読有, 14, 2013, 2282-2302

M. Goto, A. Wilk, K. Kataoka, S. Chodankar, N. Tamai, M. Fukui, J. Kohlbrecher, H. Ito, H. Matsuki, Study on the subgel-phase formation using an asymmetric phospholipid bilayer membrane by high-pressure fluorometry, *Langmuir*, 査読有, 28, 2012, 12191-12198

N. Tamai, Y. Nambu, S. Tanaka, M. Goto, H. Matsuki, S. Kaneshina, Volumetric characterization of ester- and ether- linked lipid bilayers by pressure perturbation calorimetry and densitometry. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 査読有, 92, 2012, 232-239

など

〔学会発表〕(計 42 件)

黒葛和信, 玉井伸岳, 大前英司, 松木 均, 球状タンパク質への麻酔薬の結合様式：等温滴定型熱量計を用いた比較研究, 第 6 回日本

生物物理学会中国四国支部大会(とりぎん文化会館(鳥取県鳥取市), 2014年5月17日)

松木 均, 黒葛和信, 後藤優樹, 玉井伸岳, 西本真琴, 牛血清アルブミンへの麻酔薬効果: DSC, ITC および PPC 測定による比較研究, 第49回熱測定討論会(千葉工業大学津田沼キャンパス(千葉県習志野市), 2013年11月2日)

西本真琴, 矢野華奈子, 後藤優樹, 玉井伸岳, 松木 均, ホタル発光酵素ルシフェラーゼへの麻酔薬効果: DSC 測定による構造安定性の評価, 第49回熱測定討論会(千葉工業大学津田沼キャンパス(千葉県習志野市), 2013年11月2日)

西田直哉, 大前英司, 松木 均, ホタルルシフェラーゼを用いた麻酔薬相互作用様式の解明, 特殊環境微生物セミナー2013(広島大学学士会館(広島県東広島市), 2013年10月11日)

松木 均, 西本真琴, 後藤優樹, 玉井伸岳, 麻酔作用のタンパク質受容体仮説の源泉: ホタル発光酵素ルシフェラーゼ, 第5回日本生物物理学会中国四国支部大会(ベネッセハウス(香川県直島町), 2013年5月25日)など

〔図書〕(計 7件)

M. Nishimoto, M. Yamanaka, H. Matsuki, Interaction of anesthetics with globular proteins, Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science, (Ed. H. Ohshima), Wiley STM, 2015, 掲載決定

M. Yamanaka, H. Maekawa, T. Yasui, H. Matsuki, Thermodynamic analysis of partial molar volume in biocolloidal systems, Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science, (Ed. H. Ohshima), Wiley STM, 2015, 掲載決定

松木 均, 玉井伸岳, 生体物質および生物への高圧力の影響とその作用メカニズム 第3節 脂質, 進化する食品高圧加工技術 - 基礎から最新の応用事例まで -, (重松 亨, 西海理之 監修), エヌ・ティー・エス社, 2013, 288(51-63)

M. Nishimoto, M. Yamanaka, H. Matsuki, Interaction of serum albumin with anesthetics, Serum Albumin: Structure, Functions and Health Impact, (Eds. R. J. Alekseev, A. L. Rebane), Nova Science Publishers, 2012, 177(41-68)など

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.tokushima-u.ac.jp/A1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松木 均 (MATSUKI HITOSHI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号: 40229448

(2) 研究分担者

玉井 伸岳 (TAMAI NOBUTAKE)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 00363135

後藤 優樹 (GOTO MASAKI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号: 30507455

西本 真琴 (NISHIMOTO MAKOTO)

和歌山工業高等専門学校・物質工学科・助教

研究者番号: 70609057