

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870274

研究課題名(和文) 麻酔薬の細胞膜を介したカリウムチャネル制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation mechanism of potassium channel gating by general anesthetic in the membrane

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：2,2,2-トリフルオロエタノール(TFE)は、CF<sub>3</sub>基を有する最も単純なアルコールであり、生体中に存在するタンパク質の構造の安定化または変性を促進させる。一方で、吸入麻酔薬の原料として広く用いられている。吸入麻酔薬類似物質であるTFEのKチャネルに対する作用を電気生理学的手法で測定した。用いたKチャネルはKcsAチャネルであり、KcsAチャネルのゲート開閉は細胞内のpHセンサーで制御されており、酸性のpHで開く。脂質平面膜でチャネルの開閉電流を計測した。TFE濃度依存性にKチャネルの開確率が上昇するチャネルと開確率が低下するチャネルが存在した。

研究成果の概要(英文)：2,2,2-trifluoroethanol (TFE) is the simplest alcohol having a CF<sub>3</sub> residue. It is known to stability or modification of proteins structure. On the other hand, TFE is widely used as materials of inhalation anesthesia. The KcsA potassium channel was reconstituted into the planar lipid bilayer membrane and the gating behavior was recorded in various TFE conditions. Potassium channels regulate ion conduction by means of two gates located in series along the ion permeation pore. KcsA potassium channel is a pH-dependent channel and shows the following gating kinetics. When cytoplasmic face is exposed to acidic pH, the helix gate opens (activation) and then the filter gate closes (inactivation) subsequently. At the steady state the open probability of the KcsA channel is very low because of the low open probability of the filter gate. Open probability of KcsA channel increased or decreased on TFE concentration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：麻酔学

### 1. 研究開始当初の背景

麻酔作用の普遍性を分子レベルで説明するため、本研究では麻酔薬がカリウムチャンネルに作用し、ブロックではなくカリウムチャンネル活性を高めるといふ仮説をたてた。その理由として、1つは麻酔は神経細胞の興奮性を抑制するが、カリウムチャンネルを活性化させることで静止膜電位を安定化させる機能があること、もう1つはカリウムチャンネルがあらゆる細胞や生物種に存在しており、すべてのカリウムチャンネル分子が普遍的な構造をもつことである。一方、すべてのチャンネルはリン脂質に埋め込まれており、チャンネルは脂質から様々な影響を受けている。麻酔薬は疎水性であるため、脂質に溶け込みチャンネルを取り囲んでその機能を修飾すると考えられる。麻酔薬が細胞膜に溶け込んで作用するという古典的な概念と、どんな神経細胞にも存在するカリウムチャンネルの立体構造が普遍的であるという事実は、普遍的な麻酔作用の分子機構に対する私達の仮説のよりどころである。

### 2. 研究の目的

すでに麻酔薬類似物質を用いた予備実験でカリウムチャンネル普遍構造に対する影響の手掛かりを得ており、この実験をさらに展開して様々な麻酔薬の効果を電気生理学的に定量的に解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

麻酔薬類似物質を用いた脂質平面膜法によるカリウムチャンネルの電流記録と解析を行う。

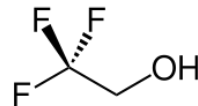
2,2,2-トリフルオロエタノール(以下 TFE)は、CF<sub>3</sub>基を有する最も単純なアルコール(図1)であり、生体中に存在するタンパク質の構造の安定化または変性を促進させる共溶媒として知られている。一方で、吸入麻酔薬の原料として広く用いられている。

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る。KcsA カリウムチャンネルは、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。構造に関する情報が多く、人工膜の中でも安定に機能でき、ゲーティング(チャンネルの開閉機構)に関して詳しい構造情報が最も蓄積している。また、薬物や脂質との相互作用の研究にも広く用いられている。KcsA カリウムチャンネルには、フィルターゲートとヘリックスゲートの二つが並列に存在している(図2)。この両方が開いた時にチャンネルはイオンを通過できるが、どちらか一方のゲートが閉じるとイオンは通過できない。フィルターゲートは速い開閉を行うが、ヘリックスゲートは

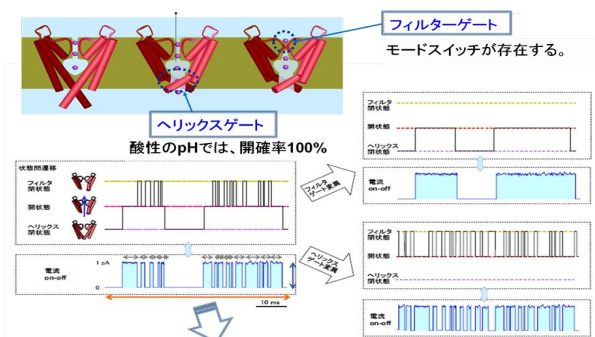
遅い開閉をする。フィルターゲートにはモードスイッチが存在しており、様々なモードがある。ヘリックスゲートは酸性の pH で開確率がほぼ 100%となるが、中性では開確率は 0%となるという特徴がある。

まず細胞膜上に存在するチャンネル蛋白質を可溶化して抽出する(図3)。電解質を隔てた隔壁に二重膜を張る(POPE:POPG=3:1)。そこに KcsA カリウムチャンネルを投与するが、チャンネルの向きが逆向きになる場合もあるため、チャンネルの向きをそろえるため電解質で隔てた隔壁の片側を酸性、片側を中性とする。ヘリックスゲートが中性では開確率はほぼ 0%となるという特徴を利用して、チャンネルが一方のみのフィルターゲートの挙動を解析できる。ボルテージクランプ法でチャンネル電流を記録する。その後 TFE 濃度を変化させ、KcsA カリウムチャンネルの開閉動態を解析する。

(図1)

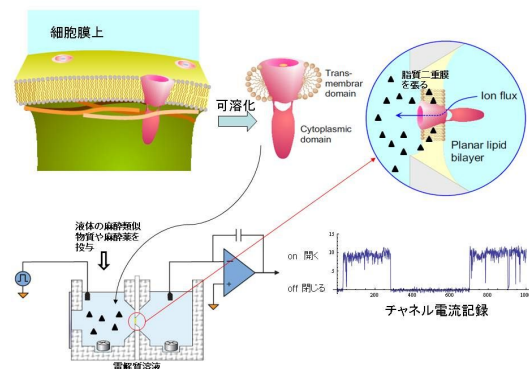


(図2)



開確率とは、全体の時間(←)分の開いている時間(⇔)で表す(%).  
コンダクタンスとは、電流量の大きさ(↓)を表す。

(図3)



#### 4. 研究成果

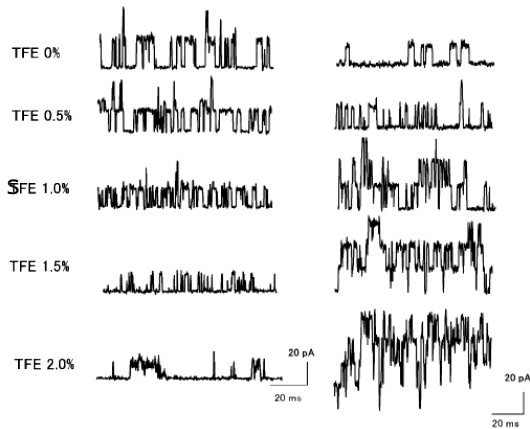
カリウムチャンネルには、同一の活性化条件でも開確率の異なる状態があり、相互に遷移する。これをモード遷移と呼ぶ。今回の実験でもモードが異なるチャンネルが観察された(図4)。TFE をカリウムチャンネルの電流が記録できた状態で投与した。TFE はカリウムチャンネルに作用したが、チャンネルのモードの違いによって、その作用の仕方が異なった。TFE 濃度依存性に、カリウムチャンネルの開確率が上昇するチャンネルと、下降するチャンネルが存在した(図5)。TFE 濃度依存性にチャンネルの開確率が上昇したチャンネルは、チャンネルのコンダクタンスも上昇した(図6)。

(図4) カリウムチャンネルのモード



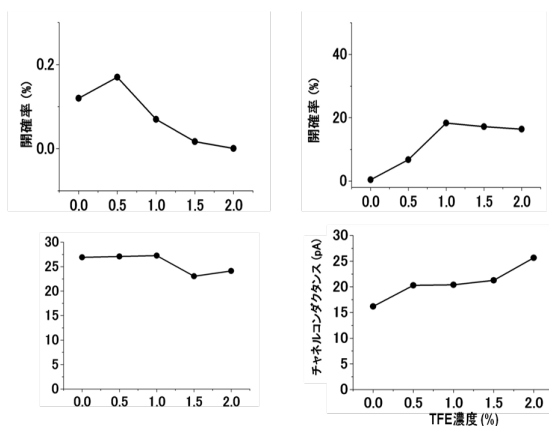
(図5)

TFE 濃度によるカリウムチャンネル電流記録



(図6)

TFE 濃度によるカリウムチャンネル開確率とコンダクタンス



#### 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)

1. Risk factors related to accidental intravascular injection during caudal anesthesia, K.Fukazawa, Y.Matsuki, H.Ueno, T.Hosokawa, M.Hirose, J Anesth 28(6), 940-943(2014) 査読有  
DOI:10.1007/s00540-014-1840-8
2. 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, 麻酔・集中治療とテクノロジー2013, 99-104(2014) 査読無
3. 難治性慢性痛における心理療法的アプローチの有用性~積極的傾聴と痛みを受容~, 坂井 美賀子, 廣瀬 宗孝, 田畑 麻里, 松木 悠佳, 重見 研司, ペインクリニック, 35(9), 1227-1230(2014) 査読有
4. 図表から学ぶ麻酔の知識力 UP セミナー「術後せん妄」, 松木 悠佳, OPE NURSING29(9), 83-85(2014) 査読無
5. 執刀前・中・後の合併症 術中の体温管理, 松木 悠佳, OPE NURSING29(7), 42-51 (2014) 査読無
6. Formation of a fibrin net on the polypropylene membrane oxygenator used for percutaneous cardiopulmonary support in a patient with acute myocarditis, Y.Matsuki, Y.Matsuki, Y.Yasuda, K.Takakura, K.Shigemi, J Clin Anesth, 26(4), 338-339(2014) 査読有  
DOI:10.1016/j.clinane.2014.03.002
7. Effect of removal of subglottic blood during endoscopic sinus surgery, Y.Matsuki, K.Takakura, K.Shigemi, Anaesth Pain & Intensive Care, 18(2), 167-171(2014) 査読有
8. 長期少量ジスチグミン臭化物内服中にコリン作動性クレーゼよりに高度徐脈に陥った一症例, 松木 悠佳, 信川 泰成, 安田 善一, 村上 剛, 高倉 康, 重見 研司, 循環制御, 34(1-3), 78-81(2014) 査読有
9. 耳鼻咽喉科 顔面神経が術野にある場合, 松木 悠佳, OPE NURSING28(10), 59-62(2013) 査読無
10. 整形外科 脊椎手術, 松木 悠佳, OPE NURSING28(10), 55-58(2013) 査読無
11. 整形外科 四肢手術, 松木 悠佳, OPE NURSING28(10), 52-54(2013) 査読無
12. Successful treatment of severe legionella pneumonia and acute kidney injury with polymyxin B-immobilized fiber column direct hemoperfusion, Y.Nobukawa, Y.Matsuki, Y.Yasuda, M.Mizogami, K.Takakura, K.Shigemi, Anaesth Pain & Intensive Care, 17(1), 88-90(2013) 査読有

〔学会発表〕(計 24 件)

1. ポリセオアミド B チャンネルのゲーティング機構, 松木 悠佳, 岩本 真幸, 松永茂樹, 老木 成稔, 第 92 回日本生理学会大会, 神戸国際会議場(神戸), 2015.3.21
2. 全身麻酔中にフェンタニルとレミフェンタニルを併用したときのプロポフォール esTEC 相互作用, 松木 悠佳, 長田 理, 畔柳 綾, 重見 研司, 日本臨床麻酔学会第 34 回大会, グランドプリンスホテル新高輪(東京), 2014.11.3
3. チャンネル内の水素結合鎖を介するプロトン透過の整流性, 松木 悠佳, 岩本 真幸, 松永 茂樹, 老木 成稔, 第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌プリンスホテル(札幌), 2014.9.25
4. 麻酔薬の細胞膜を介したカリウムチャンネル制御機構の解明, 松木 悠佳, 三田建一郎, 岩本 真幸, 重見 研司, 老木成稔, 日本麻酔科学会東海・北陸支部第 12 回学術集会, 金沢市文化ホール(金沢), 2014.9.13
5. 初診時症状による神経障害性疼痛患者のプレガバリン鎮痛効果, 松木 悠佳, 石本 雅幸, 塩濱 恭子, 松木 泰成, 上田 雅史, 木下 義和, 安田 善一, 溝上 真樹, 重見 研司, 日本ペインクリニック学会第 48 回大会, 京王プラザホテル(東京), 2014.7.25
6. 虚血再灌流による局所麻酔薬の心毒性増強: Peroxynitrite と Cardiolipin の仮説的関与, 松木 悠佳, 溝上 真樹, 信川 泰成, 重見 研司, 土屋 博紀, 日本麻酔科学会第 61 回学術集会, パシフィコ横浜(横浜), 2014.5.17
7. 心電図 QT 時間における K チャンネルへの Mg イオンの効果とその分子機構, 松木 悠佳, 三田 建一郎, 岩本 真幸, 重見 研司, 老木 成稔第 34 回日本循環制御医学会総会, AOSSA(福井), 2013.6.7
8. 心毒性をもつ局所麻酔薬の機序的膜相互作用は心筋虚血様酸性条件で増強される, 松木 悠佳, 溝上 真樹, 重見 研司, 土屋 博紀, 日本麻酔科学会第 60 回学術集会, 札幌プリンスホテル(札幌), 2013.5.24

## 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