

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10514

研究課題名(和文) 生体膜マイクロドメインと膜受容体の可視化による揮発性麻酔薬の作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of action of volatile anesthetics by visualization of membrane microdomains and receptors

研究代表者

小野 純一郎 (Ono, Junichiro)

香川大学・医学部・協力研究員

研究者番号：90363217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は生細胞を用いたライブセルイメージング法(FRAP法)による揮発性麻酔薬の作用機序の研究である。細胞膜をマイクロドメインと非マイクロドメインという機能的成分に分類し、各々に対する蛍光標識を作成して、共焦点レーザー走査型顕微鏡で側方拡散の動態解析を行った。その結果、非マイクロドメインの蛍光標識(トランスフェリン受容体、膜貫通型タンパク質)の流動性のみがイソフルランによって増加した。膜貫通型タンパク質の側方拡散はシグナル伝達に影響を与えるため、揮発性麻酔薬による側方拡散促進は、薬物作用機序の一部を担っている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanism of action of volatile anesthetics using live cell imaging. Especially, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) enables characterization of quantitative dynamic properties in living cells. We visualized membrane microdomains and receptors using HaloTag fusion proteins for the FRAP analysis. The fluidity of HaloTag fused transferrin receptors, a marker of the non-microdomain fraction, was augmented by isoflurane exposure. Whereas, no significant difference was detected in the HaloTag fused GPI anchor proteins. Since lateral diffusion of transmembrane proteins such as transferrin receptors influences signal transduction, it is considered that enhanced lateral diffusion by volatile anesthetics may contribute to the mechanism of action.

研究分野：麻酔科学

キーワード：揮発性麻酔薬 作用機序 ライブセルイメージング FRAP解析 マイクロドメイン 膜流動性 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

揮発性麻酔薬の詳細な作用メカニズムは不明である。今日までの知見によれば、麻酔薬分子が膜受容体タンパク質に結合し、タンパク質の構造変化を引き起こすことで神経シグナル伝達を修飾すると考えられている。したがって、現在の揮発性麻酔薬メカニズム研究は、GABA<sub>A</sub>、nACh、NMDA といった個々の受容体タンパク質への作用について分子レベルで展開されており、揮発性麻酔薬は各種受容体機能に影響を与えている事実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、受容体同士の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。

2. 研究の目的

本研究は揮発性麻酔薬の作用機序を新たな切り口で解明することを目的としている。これまでの研究報告では、人工膜を用いた実験系によって膜脂質あるいは個々の受容体タンパク質の機能解析が行われてきた。しかし、本研究では細胞膜脂質と受容体タンパク質を合わせて1つの機能コンプレックスとして捉える「脂質マイクロドメイン(以下マイクロドメイン)」という概念にスポットを当てたものである。マイクロドメインは高密度のコレステロールとスフィンゴ脂質、受容体タンパク質を内包していることから、近年では細胞外から細胞内へのシグナル伝達において重要な役割を持つことが示唆されている。特にマイクロドメインの流動性が、受容体を介したシグナル伝達に影響を与える報告が出ている(引用文献)。また、マイクロドメインだけでなく、膜受容体の流動性がシグナル伝達に影響を及ぼすという報告もある(引用文献)。こうした事実から、マイクロドメインの流動性が揮発性麻酔薬の作用機序に関係しているのではないかと仮説を立てた。マイクロドメインという新しい切り口で揮発性麻酔薬の作用機序に迫った報告はこれまでに見られていない。

3. 研究の方法

まず始めに細胞膜成分の蛍光標識の設計を行った。それぞれの成分に特異的に発現しているタンパク質に対して蛍光標識である HaloTag® 遺伝子を付加した。マイクロドメイン成分の特異的マーカーとして GPI アンカータンパク質を、非マイクロドメイン成分の特異的マーカーにはトランスフェリン受容体 (TfR) を用いた。

次に、この蛍光標識を強制発現させた生細胞にイソフルランを投与し、蛍光顕微鏡下に動態測定を行った。本課題の特徴は、生細胞を用いていることである。生きた細胞を用いてリアルタイムに動態測定を行う方法をライブセルイメージングと呼ぶ。この手法を用

いることで、より臨床像に近い麻酔作用を視覚でき、且つ動態解析によって数値化が可能になると考えた。これまでにライブセルイメージングを用いて揮発性麻酔薬の作用機序を調べた報告は見当たらない。ライブセルイメージングには幾つかの手法があり、本課題では多分子観察の目的で FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) を用い、一分子観察の目的で TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) を用いた。また、麻酔薬投与の on/off による蛍光標識の動態変化を、1個の生細胞で継続的に観察する目的で、Y字型マイクロ流路デバイスを用いた実験も行った。

4. 研究成果

マイクロドメイン標識は、GPI アンカードメインに対して蛍光標識タンパク質 HaloTag® を付加した (GPI-Halo)。非マイクロドメイン標識は、トランスフェリン受容体に対して HaloTag® を付加した (TfR-Halo)。HaloTag® 部分は細胞外に向けて発現するように設計した。こうすることで細胞膜上に発現しているタンパク質のみを標識することができた。(図1)。

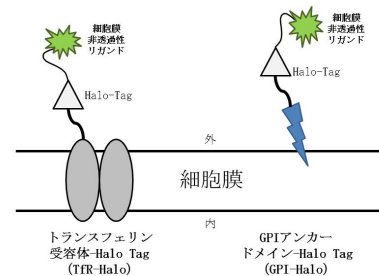


図1 生体膜の蛍光標識

この2種類の蛍光標識遺伝子を培養細胞 (HEK293T) あるいは脳組織から採取した神経細胞内にリポフェクション法で導入し、細胞膜表面で発現して蛍光を発するように調整した。細胞表面上に浮かぶ蛍光の側方拡散を調べることでその流動性をうかがい知ることができる。標識を発現させた細胞に対して、イソフルラン(0.8, 2mM)を30分間作用させ、その直後に蛍光の側方拡散を共焦点レーザー走査型顕微鏡で測定し、蛍光粒子の動態解析を行った。この解析方法をFRAP (fluorescence recovery after photobleaching) と呼ぶ。FRAPの原理は、蛍光発光している生細胞膜の任意の円形領域(直径1μm)に強いレーザーを照射する。す

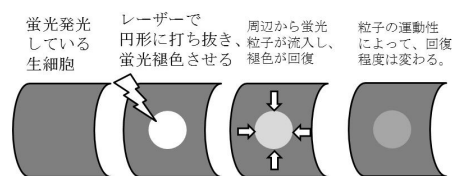


図2 FRAPの概念図 時間経過

るとその領域の蛍光が褪色するが、周囲から蛍光粒子が流入し、褪色が回復していく(図2)。

この時の蛍光強度の回復過程を解析することで、蛍光標識の拡散速度や動的成分比といった運動性を知ることができる(図3)。

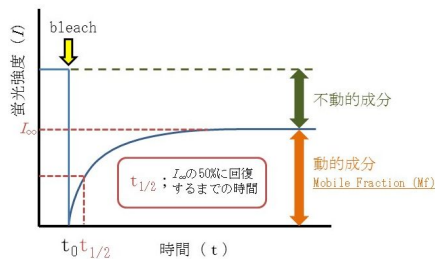


図3 FRAP解析の原理

実験結果は、イソフルラン作用後に蛍光標識の流動性が変化した(=増加した)のは非マイクロドメイン標識(TfR-Halo)だけであり、マイクロドメイン標識(GPI-Halo)は変化しなかった(図4)。

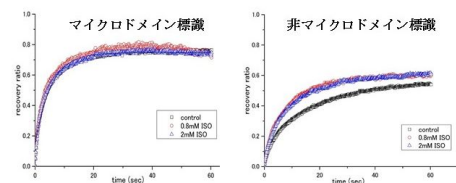
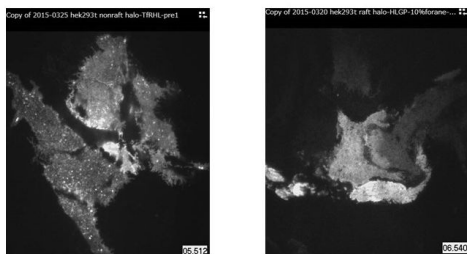


図4 イソフルラン曝露後の蛍光強度の回復過程 (FRAP解析)

非マイクロドメインの蛍光標識の拡散速度は、イソフルラン作用後に実に2倍に増加した。この結果から、細胞膜成分の流動性はイソフルランによって均一に変化するのではなく、流動性が高まる成分(非マイクロドメイン成分)と変化しない成分(マイクロドメイン成分)に分けられることが分かった(平成27年、日本麻酔科学会第62回学術集会にて発表)。

次に、麻酔作用下の蛍光分子の動態変化を1分子レベルで解析するために、全反射照明蛍光顕微鏡(TIRF; Total Internal Reflection Fluorescence)を用いて実験を試みた。細胞表面に光る数百個の蛍光輝点映像を、コンピューター上で輝点追跡ソフトウェアによって追跡し、その動態解析を行うという計画だった。結論から言うとTIRFによる一分子解析は上手くいかなかった。最大の理由は、細胞表面の蛍光粒子が、追跡可能な



成功例: 蛍光粒子が明確な輝点として識別できる

失敗例: 細胞表面がベタッと均一に光っており、蛍光標識を輝点として識別できない

図5 全反射照明蛍光顕微鏡で見た細胞表面の蛍光

輝点として安定的に検出できなかったためである。蛍光標識が「輝点」として検出できる細胞と、そうでない細胞の違いは、導入した標識遺伝子の発現量の違いであろうと推測している。発現過多だと細胞膜が光りすぎて輝点が見えなくなるため、適量な発現量でなければならない(図5)。強制発現系では遺伝子発現量の調節が難しい。それは取り込み側の細胞の生育状態が大きく影響することが原因と考えられた。輝点が見える適量な発現量を実験のたびに再現することが非常に難しく、安定した実験系を確保できなかったために、TIRFによる一分子解析は一旦保留とした。

全身麻酔の必須条件として、可逆性がある。麻酔から覚めることは当たり前と認識されるが、この可逆性が確実に担保されない臨床的には使用できない非常に重要な性質である。麻酔作用の可逆性を1細胞レベルで、しかも生細胞で調べた報告はないため、TIRF実験で使用する予定だった「Y字型マイクロ流体デバイス」を用いて調べた。Y字型マイクロ流体デバイスは、半導体技術を用いてシリコンで断面200μm四方のY字型微細流路を形成したものである(図6)。

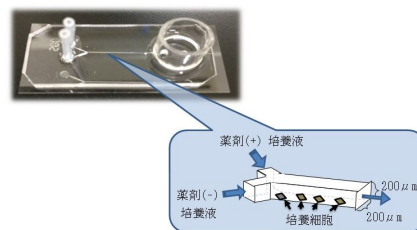
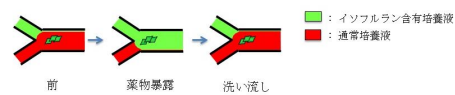


図6 Y字型マイクロ流体デバイス

このY字流路の中で細胞を培養し、培養液中に揮発性麻酔薬を溶かし込んで作用させると、1つの細胞で麻酔作用の前後の変化を見ることができる。培養液を流す際、マイクロシリンジポンプを用いて層流(接した2層の液体が互いに混ざり合うことなく流れる物理現象のこと)をデバイス内に形成する。この実験では、GFPで標識したインスリン受容体安定発現CHO-K1細胞を用いた。インスリン受容体はTfRと同じく、1回膜貫通型タンパク質である。TfR-Haloで見られた流動性の増加が、同じ膜貫通タンパク質であるインスリン受容体でも見られるかどうかを実証するのがもう1つの目的であった(図7)。



特定の1~数細胞に対して薬物作用のon/off実験が可能

図7 マイクロ流体デバイスを用いた薬物作用のon/off実験

図7の如く、イソフルランを細胞に暴露した前後でFRAP測定を経時的に行い、受容体の側方拡散速度の変化を調べた。

実験の結果は、イソフルラン暴露により、インスリン受容体の側方拡散速度が増加し、その後のイソフルラン洗い流し処置によ



て元のレベルまで回復した(図8)。

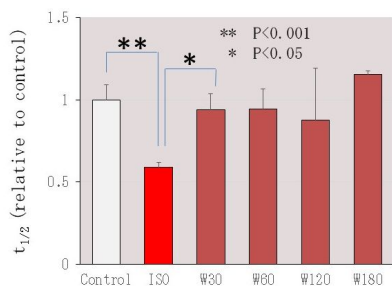


図8 イソフルラン暴露前後のインスリン受容体のt-half変化

この結果から、イソフルラン暴露によってトランスフェリン受容体で見られた現象と同じく、インスリン受容体の側方拡散速度が上昇することが確認できた。また、洗い流し処置で拡散速度への影響が可逆的に回復した。(平成29年、日本麻酔科学会第64回学術集会にて発表)。

この課題で行った一連の研究結果をまとめると、「揮発性麻酔薬が生きた細胞膜へ作用する時、膜成分の拡散速度に与える影響は不均一かつ可逆的である」。研究当初の予測として、イソフルラン作用時にはマイクロドメイン標識の流動性に変化が起これと予想していた。ところが、変化が見られたのは非マイクロドメイン標識だけであった。流動性の変化に違いが生じた理由は、両者の細胞膜への陥入形式の違いにあると考察している。マイクロドメイン標識は脂質係留型であり、非マイクロドメイン標識は膜貫通型である。膜タンパク質は自由に側方拡散できるわけではなく、裏打ちタンパク質すなわちサイトスケルトンによって制御されている。今回の二者のうち、膜貫通型タンパク質の拡散の方が、サイトスケルトンによってより強く制限されている。揮発性麻酔薬はこうしたサイトスケルトンタンパク質にも作用して、その脱重合を促進するという報告も見られることから、両者のイソフルランへの反応の違いは、サイトスケルトンによる拡散制御の違いによるものと考えられる。

では次に、膜タンパク質の流動性が麻酔メカニズムとどのように関係しているのかを考察する。今日までの理解として、揮発性麻酔薬の作用機序は麻酔薬分子が受容体タンパク質へ結合することによってシグナル伝達に変化することによって考えられている。薬物分子が受容体の構造変化をもたらすことでシグナル伝達に影響を与えるという古典的な概念以外にも、近年ではシグナル伝達に影響を及ぼす様式が分かっている。それが「膜受容体の側方拡散」である(引用文献, )。これらの報告に共通する概念として、膜に存在する受容体は、シグナル伝達を行う際には、一定時間拡散を止めて適切な場所に留まっている必要であるということである。この概念は揮発性麻酔薬の作用機序を考察する上で非常によく馴染むものである。上述した今回の研究結果を当てはめて

考えると、揮発性麻酔薬は膜貫通タンパク質の流動性を高めることによって、シグナル伝達を抑制している可能性が浮かび上がってくる。

揮発性麻酔薬の用量反応曲線から得られる Hill 係数を算出すると、約 20 という値が得られる。Hill 係数は、その反応に関係する系の個数を意味するものであり、20 もの値になると揮発性麻酔薬による全身麻酔には非常に多数の系が関与していると解釈する。揮発性麻酔薬は分子量 200 程度の低分子かつ単純な化学構造を持つ有機溶媒であり、その分布に際しては単純な物理的法則に従った溶解度に依存する。つまり麻酔薬分子は非特異的に脂質二重膜の様々な場所に入り込み、その結果として、多種多様な受容体の側方拡散を促進している可能性がある。揮発性麻酔薬は多部位作用性であり、受容体へ直接結合して作用を及ぼす系もあれば、酵素系の抑制を引き起こす系への作用もあるだろう。同時並行的に起こる複数の作用のうち、応募者が提唱する受容体の側方拡散によるシグナル伝達の修飾、という要素も加えられるのではないだろうか。

今後の研究の展開として、TIRF を用いた一分子観察、麻酔薬作用時のサイトスケルトンと膜流動性の関連性、膜受容体の拡散がシグナル伝達へ及ぼす影響、加圧時の膜受容体の側方拡散について調べていきたい。

なお、上述の結果を基に下記の論文を発表している。

本課題では生細胞を使用して麻酔状態下における膜成分の流動性を調べたり、1 細胞レベルでイソフルランの膜への可逆的影響を調べたが、こうした報告はこれまでに存在しないことから非常に有意義な研究になった。また、受容体の側方拡散に影響を及ぼすことでシグナル伝達を修飾するという新しい切り口で麻酔メカニズムを提唱できたことで、当初の目標を達成できたと自己評価している。

#### <引用文献>

Suzuki KG、他 5 名、GPI-anchored receptor clusters transiently recruit Lyn and G alpha for temporary cluster immobilization and Lyn activation: single-molecule tracking study 1、J Cell Biol、177、2007、717-30

Kabayama K、他 8 名、Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance、Proc Natl Acad Sci U S A、104(34)、2007、13678-83

Bannai H、他 7 名、Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABA<sub>A</sub>R diffusion dynamics、Neuron、62、2009、670-82

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1件)

Junichiro Ono, Satoko Fushimi, Shingo Suzuki, Kiyoshi Ameno, Hiroshi Kinoshita, Gotaro Shirakami, Kazuya Kabayama,  
EFFECT OF THE VOLATILE ANESTHETIC AGENT  
ISOFLURANE ON LATERAL DIFFUSION OF CELL  
MEMBRANE PROTEINS, FEBS Open Bio, 査読  
有、 May 2018、  
DOI:10.1002/2211-5463.12443

[学会発表](計2件)

小野純一郎、佐野愛、白神豪太郎、新井健太、木村啓志、樺山一哉、イソフルランは生細胞のインスリン受容体の流動性に可逆的变化を与える、日本麻酔科学会第64回学術集会(2017)

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、日本麻酔科学会第62回学術集会(2015)

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・協力研究員  
研究者番号：90363217

(2)研究分担者

樺山 一哉 (KABAYAMA, Kazuya)  
大阪大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：00399974

(3)連携研究者

鈴木 辰吾 (SUZUKI, Shingo)  
香川大学・医学部・准教授  
研究者番号：50451430