

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08850

研究課題名（和文）CBB法を用いたイオンチャネルに対する麻酔薬の作用機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the effect of anesthetics on ion channels using the CBB method

研究代表者

松木 悠佳（Yuka, Matsuki）

福井大学・学術研究院医学系部門・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）：CBB法を用いて、KcsAチャネルの1分子チャネル電流記録の方法を確立した。また、薬物を油相から吹きかける方法を、油に溶解しやすくチャネルにも影響するカプサイシンで試みた。カプサイシンを投与するとKcsAチャネルの活性が濃度依存的に抑制された。また同様の方法で、セボフルランを投与し、チャネルへの影響を検討した。セボフルランの濃度が高いと、脂質二重膜が割れることが多かったが、KcsAチャネルに対しては、チャネルを閉じさせる傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の方法では、薬物を投与する場合に液相しか外界と交通がないため液相から薬物を投与しなければならなかった。そのため、揮発性麻酔薬の実験でも、水溶液中でバブリングにより膜やチャネルに麻酔薬を到達させており、間接的な投与方法であった。しかし、CBB法は、二重膜を形成している油相が外界と交通しているため、バブリングなどを用いず油相に溶かした薬物を直接投与できる。このことは、膜に対する薬物の直接的な濃度を知ることができる。

研究成果の概要（英文）：Using the CBB method, we established a method of single-molecule current recording of KcsA channels. In addition, in order to establish a method of spraying drugs from oil, we tried capsaicin, which is easily soluble in oil and affects channels. Administration of capsaicin dose-dependently inhibited KcsA channel activity. In a similar manner, sevoflurane was also administered to examine the effects on channels. Since sevoflurane is volatile, the hexadecane containing sevoflurane filled in the pipette was covered with nanopure water to prevent volatilization from the spray pipette. High concentrations of sevoflurane often disrupted the lipid bilayer, but tended to close the KcsA channel.

研究分野：イオンチャネル

キーワード：脂質二重膜

### 1. 研究開始当初の背景

生体膜は、多種類のリン脂質で構成され、その中にチャネルや受容体などの膜タンパク質が存在している。麻酔薬は、チャネルそのものに作用する説や膜を介して作用するという説がある。チャネルに対する薬物の作用機序に関する実験はほとんどがパッチクランプ法によるものであるが、多種多様なチャネルや膜脂質組成が存在する生体膜に薬物を投与しても真の作用点を厳密に同定できず、薬物の作用機序を正しく評価できない。これを解決するために我々が選んだ実験手法は、組成が分かった環境でターゲットとするチャネルに対する作用を直接評価できる CBB 法である。

生体膜は、脂質二重膜でできており、その中に分布する膜タンパク質が、細胞内外へ物質移動を担う。生体膜を凍結切断すると、2つに割れ、切断面は生体膜の膜脂質の2つの層の間になる(図1)。二重膜は水溶液中に存在しており、切断すると膜の内部は、空気に暴露される(図1;薄い灰色)。空気は疎水性である。実際、空気と水との界面にリン脂質を入

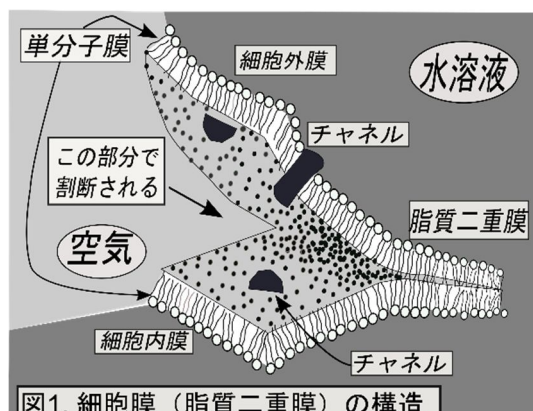


図1. 細胞膜 (脂質二重膜) の構造

入ると、図2-Aのように単分子層になり、尾部を空気に向ける。油も疎水性であるため、空気を油に置き換えても同じ現象が起こる。また、2枚の単分子層を張り合わせることで二重膜を形成することが原理的に可能である。そこで、この性質を利用した新しい液滴接触二重膜法 (Contact Babble Bilayer 法; CBB 法) を開発した。この方法では、あらかじめリン脂質が含まれた油中に水滴 (図2-B;濃い灰色) を混入し、リン脂質の疎水性部位を油に向けて整理させる。このリン脂質同士を近づけることで、人工的な脂質二重膜を形成させる (図2-C)。

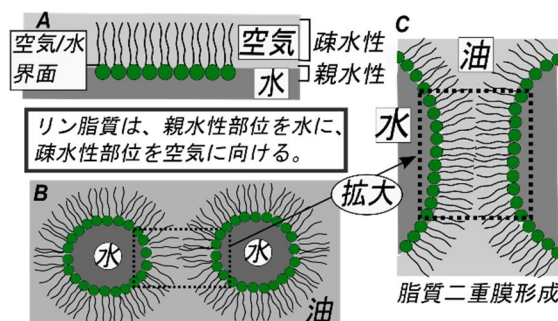


図2. リン脂質の性質と脂質二重膜の作成

この膜にチャネルを埋め込むことで、生体膜と同様にチャネルは機能できるので、チャネル機能を不確定要素の無い状態で精密に解析できる。また、二重膜が形成された膜疎水性内部には油を介した外界との交通ができる (図2;薄い灰色)。

本研究で対象として選んだチャネルはカリウムチャネル (Kチャネル) の一種である KcsA カリウムチャネルである。Kチャネルはあらゆる細胞膜に普遍的に存在し、静止膜電位の形成に深く関わっている。特定の刺激 (膜電位や機械刺激等) でチャネルは開閉するが、Kチャネルが開き続けることで膜電位は安定し活動電位が生じにくくなるため、Kチャネルは麻酔作用に深く関与していることが予想される。KcsA カリウムチャネルは立体構造やイオン透過や開閉機構が最もよく解析されている。また構造が単純であるにも関わらず、他のKチャネルに共通したポア構造 (イオンが透過する部位) を持つため、代表的なチャネルとして広く解析されている。KcsA カリウムチャネルは生理的条件の他、高い電圧や高い温度などの非生理的条件でも実験できる

ため、チャンネルの生物物理学的特性を発見できる。従って、KcsA カリウムチャンネルで麻酔薬の効果を検討すれば、他のチャンネルへの作用機序を考える際にも、間違いなく重要な手掛かりとなり、得られた成果はイオンチャンネル一般に波及する。

## 2. 研究の目的

本研究では、新たに開発した液滴接触二重膜法（CBB法）で、制御された脂質組成を用いて人工膜を作成し、目的とするチャンネルだけを埋め込み、チャンネル電流を記録する。そこに、油相から濃度調節した薬物を吹きかけ、電流記録を行い、ゲーティング機構（チャンネルの開閉機構）を解析する。薬物のチャンネルに対する効果と膜を介する効果を純粋な系で定量的に評価する。麻酔薬についてもチャンネルに対する効果と膜を介する効果を同様に評価する。

## 3. 研究の方法

### (1) イオンチャンネル機能計測方法の確立

CBB法を用いて、KcsA カリウムチャンネル機能計測方法を確立する。スライドガラスに油相としてヘキサデカンを満たす。油相にはあらかじめリン脂質が分散している。ガラス電極（ピペット）に電解質溶液を満たし、先端を油相に入れ、圧力をかけてバブルを吹き出す。リン脂質が油水界面に分配し、単分子層が形成される。2つのバブルを

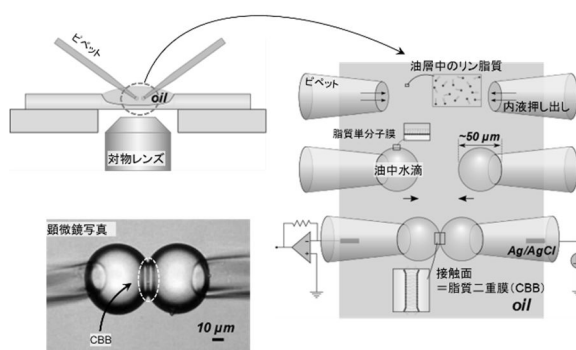


図 3

接触させて脂質二重層を形成する。CBB法は何度も施行済みであり、安定してチャンネル電流記録を測定できるようになりつつある。具体的にチャンネル機能とは、ゲーティング機能である。これは、定常状態でのチャンネルの開確率、開・閉状態寿命、不活性化速度のことを指し、それぞれについて詳細に計測し検討する。(図3)

### (2) カプサイシンの KcsA カリウムチャンネルのゲーティング機能に対する濃度依存性効果の評価

まずは、油に容易に溶解するカプサイシンを用いる。濃度調節したカプサイシンをあらかじめヘキサデカンに溶解する。CBB法でチャンネルが入った脂質二重膜に向けて、油相から細いピペットを用いてカプサイシンを吹きかける。カプサイシンは脂溶性であるため、容易に油相から脂質二重膜へと分配する。カプサイシンを濃度依存性に吹きかけたときの、チャンネル機能を計測する。(図4)

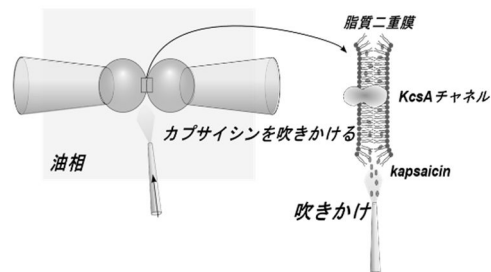


図 4

### (3) 麻酔薬の濃度依存性効果の評価

カプサイシンでの結果をふまえ、麻酔薬で同様の実験を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) イオンチャンネル機能計測方法の確立

CBB法を用いて、KcsA カリウムチャンネル機能計測方法を確立した。あらかじめアゾレクチンを溶かしたヘキサデカンの中で、ガラス電極(ピペット)に電解質溶液を満たし、先端を油相に入れ、圧力をかけてバブルを吹き出す。そこにKcsAチャンネルを濃度を調節して一分子だけ二重膜にはいるようにした。安定して1分子チャンネル計測ができるようになった。

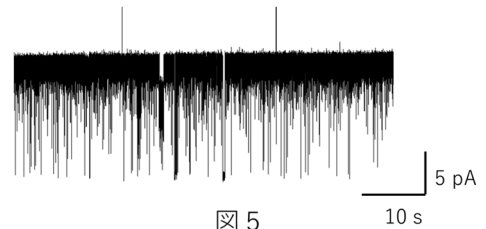


図 5

##### (2) カプサイシンの KcsA カリウムチャンネルのゲーティング機能に対する濃度依存性効果の評価

カプサイシンを二重膜に吹きかけると、チャンネル活性を抑制し、吹きかけをやめるとチャンネルが活性化した。可逆的な変化が見られた。(図 6.左) また、カプサイシンを濃度依存性に吹きかけ、チャンネル

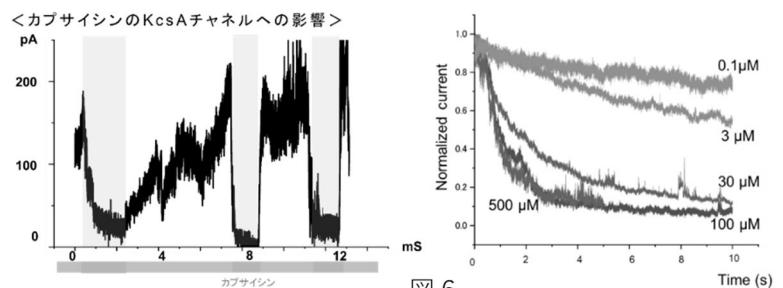


図 6

の活性変化を観察した。濃度依存性にチャンネル活性が抑制された。(図 6.右)

##### (3) 麻酔薬の濃度依存性効果の評価

セボフルランを濃度調節し、ヘキサデカンに溶解した。セボフルランは揮発性であるため、ヘキサデカンに溶解したあと、ガラスピペットにセボフルランを溶解したヘキサデカンを充填したあと上部をナノピュア水で満たし揮発しないようにした。

チャンネルが入った脂質二重膜に向けて、油相から細いピペットを二つ用いて、セボフルランを充填したヘキサデカンと対照としてヘキサデカンを吹きかけた。麻酔薬は脂溶性であるため、容易に油相から脂質二重膜へと分配する。セボフルランをチャンネルにふきかけたところ、活性が抑制された。

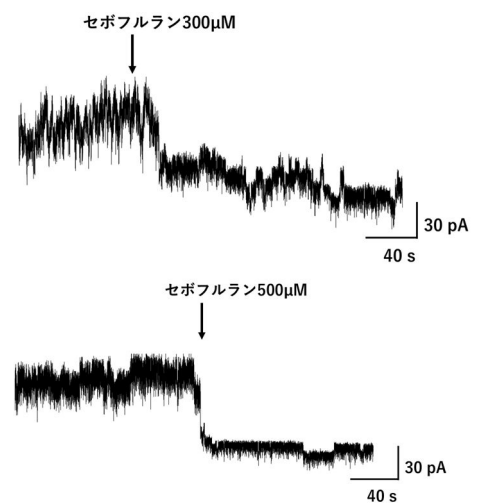


図 7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松木悠佳
2. 発表標題 Relationship between polytheonamide B channel activity and the thickness of lipid bilayers
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuka Matsuki
2. 発表標題 The dipole potential probed by hydrophobic ions using the contact bubble bilayer method
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松木悠佳
2. 発表標題 Dipole Potential Evaluated by Hydrophobic Ions using the Contact Bubble Bilayer Method
3. 学会等名 Federation of the Asia and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------