

平成 22 年 3 月 12 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791062
 研究課題名 (和文) アセチルコリン受容体における光学活性麻酔薬の作用機構の解明
 研究課題名 (英文) Molecular recognition of barbiturate enantiomers in agonist binding site of nicotinic acetylcholine receptor

研究代表者
 尾崎将之 (OZAKI MASAYUKI)
 滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
 研究者番号：50389459

研究成果の概要：我々は、計算機を用いた分子シミュレーションにより光学異性バルビツレートのアセチルコリン受容体結合部位を探索し、(R),(S)の結合様式から結合部位における光学異性麻酔薬の分子認識の特性を解明した。アセチルコリン受容体の構造は 2BG9(Protein Data Bank) を用いた。麻酔薬は (R)-pentobarbital((R)-PB),(S)-pentobarbital((S)-PB), barbital(Barb)を用いた。結合探索と結合エネルギーの計算は MOE2007.9(CCG, Canada)で作動する ASEDock2005(Ryoka System)を用いた。(R)(S)-PB はいずれも膜界面に接する部位に結合した。Barb は細胞外開口部に結合した。(R)-PB と(S)-PB の結合様式を比較すると、バルビツール酸の骨格構造はほぼ重なり、アルキル部分が重ならなかった。このことから、主たる結合力はバルビツール酸の骨格構造であり、アルキル基部分の結合への寄与は小さいものと推定された。光学異性体をもつ麻酔薬の中には不斉炭素から離れた構造が受容体との結合に深く関与するものがあり、それらの麻酔薬ではキラリティは麻酔効果に影響しないことが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,500,000	240,000	2,740,000

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：光学異性体、バルビツレート、アセチルコリン受容体、ドッキングシミュレーション、分子認識

1. 研究開始当初の背景

(1) 一般に光学異性麻酔薬は異性体間で麻酔の効果が異なると考えられているが、光学異性アルコールの 2-ヘキサノール、2-ヘプタノールでは(R)と(S)で差がないという報告がなされた(Anesth Analg 2006 103: 81-84.)。このことから光学異性による麻酔効果の差は必ずしも大きくない可能性が推定された。

(2) 近年神経伝達物質受容体の三次元構造が

解明されつつある。また、計算機科学の進歩から、構造既知のタンパクへの小分子結合の様子がドッキングシミュレーションにより予測できるようになってきている。2005 年に構造が解明されたアセチルコリン受容体に対して光学異性麻酔薬分子の結合をシミュレーションさせることにより(R)と(S)の特異性を説明できるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

光学異性麻酔薬の結合様式・結合エネルギーを(R)と(S)各々について求め、作用の特異性又は非特異性を示す機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ニコチン性アセチルコリン受容体の三次元構造をもとに、計算機シミュレーションの手法を用いて光学異性麻酔薬の結合部位を探索し、その結合様式・結合エネルギーを求めた。閉状態のアセチルコリン受容体の構造は Protein Data Bank (PDB)の 2BG9 を用いた。欠損する水素原子を付加し、水素原子の位置を最適化して完全な立体構造を得た。この構造を鋳型に用いてドッキングに使用した。計算化学システムとして Molecular Operating Environment 2007.0902 (MOE 2007.0902, Chemical Computing Group, カナダ) を演算、表示、解析に用いた。ドッキングは MOE 上で開発されたプログラム ASEDock 2005 (菱化システム, 東京)でおこなった。力場と部分電荷は MMFF94x を用いた。MOE を用いて相対的結合エネルギー、静電エネルギー、ファンデルワールスエネルギー、溶媒和エネルギーを計算した。水素原子を補った 2BG9 を鋳型に用いて、ニコチン分子の結合部位を探索した。得られたニコチン-アセチルコリン受容体複合体の構造を、X 線構造解析で得られたニコチン-ABP 複合体の 3 次元構造 1UW6 と比較し、ASEDock 2005 の再現性を検証した。

(2) アセチルコリン受容体の機能を抑制する amobarbital, amylobarbitol, (R/S)- pentobarbital, (R/S)- isobarbital (図 1) を用いて、リガンドの光学異性を保存した状態で結合部位を探索した。

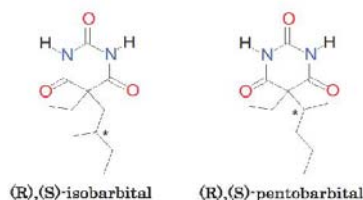


図 1 Barbitol and asymmetric carbon(*)

(3) MOE-Ligand Interaction を用いて、(R/S)-isobarbital の barbitol-site 間の相互作用を表示した。

(4) 不斉炭素に結合する置換基の結合へエネルギーへの寄与。不斉炭素に結合する3つの基 (Ri: i=1, 2, 3) を水素に置き換えた構造の結合エネルギーを算出し、本来の構造の結合エネルギーとこの水素置換構造の結合エネルギーの差を計算した。すなわち、 $d(Ri)=U_{total}(barb)-U_{total}(Ri=H)$ として計算を行い、不斉炭素まわりの各置換基の結合への寄

与を推定した。

4. 研究成果

(1) ASEDock 2005 の複合体構造予測の信頼性は、59 の既知複合体構造を用いて、複合体結合予想と既知構造との比較により確かめられている。98%の複合体で RMSD 2Å 以内に結合することが報告されている(一般に、redock 計算では RMSD が 2Å 以内であれば再現性は良好であるとされる)。本研究では、ASEDock 2005 の有効性を確認するために、アセチルコリン受容体へのニコチン分子の結合部位を探索し、X 線構造解析の結果と比較した。ASEDock 2005 で得られたニコチン結合部位を図 2 右に示す。参考に図2左にアセチルコリン受容体の細胞外領域と構造が一致するアセチルコリン結合タンパク (AChBP) とニコチンの複合体の X 線構造と比較する。ニコチンはいずれも・・・サブユニット間の agonist binding site に結合していることわかる。2BG9 の分解能は 4Å に過ぎず、ドッキングの精度を評価に必ずしも適切な構造ではないが、ニコチン結合部位がほぼ再現できたと考え、ASEDock2005 は有効な探索手段であることが確認できた。

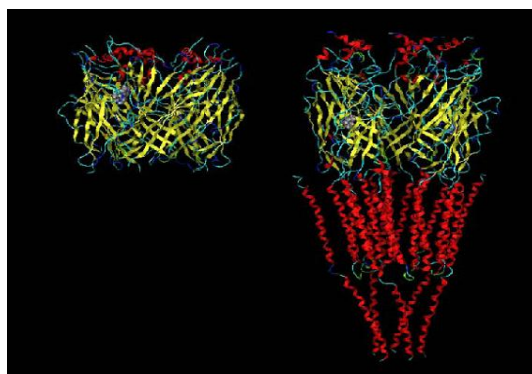


図 2 Agonist Bindings of ASEDock 2005 Simulation and X-ray Crystallography Experiment

(2) (R)/(S)-isobarbital, (R)/(S)-pentobarbital のいずれのバルビタルも agonist binding site に結合した。(R),(S)-isobarbital の結合を図 3a, b に示す。比較のため isobarbital の R 体, S 体それぞれの結合結果を取り出し、重ねて示す(図 3c)。R 体, S 体のバルビタル環がほぼ重なり合う位置に結合していることがわかる。さらに、R 体, S 体の結合エネルギーとその内訳を比較すると対掌体間で有意な差(エネルギー計算の精度は数 kcal mol⁻¹)はなかった。また、pentobarbital についても同様の結合エネルギーであった(表 1)。isobarbital の結合はいずれの対掌体でも、バルビタル環に対する結合が主たる相互作用であると推定された。

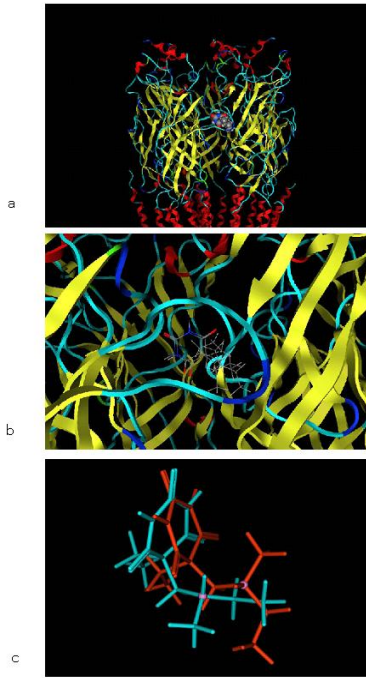


図3 (a)(b) (R)/(S) isobar binding to agonist site, (c) isobarbital binding rings bind in overlapped manner.

表1 Total binding energy (U_{total}) and its breakdown of isobarbital enantiomer

	U_{total} U_{solv}	U_{ele}	U_{vdw}	U_{lig}
(R)-isobar	-152.65 50.48	-55.52	-12.95	-134.66
(S)-isobar	-150.60 51.87	-55.39	-14.30	-132.78

Total binding energy (U_{total}) and its breakdown of pentobarbital enantiomer

	U_{total} U_{solv}	U_{ele}	U_{vdw}	U_{lig}
(R)-pentobar	-149.60 48.09	-47.93	-15.58	-134.19
(S)-pentobar	-150.91 45.48	-48.41	-14.95	-133.62

$$U_{total} = U_{ele} + U_{vdw} + U_{lig} + U_{solv} \text{ (kcal mol}^{-1}\text{)}$$

(3) isobarbital と結合部位の分子間相互作用を明らかにするために、isobarbital と結合部位のアミノ酸残基との相互作用を MOE-Ligand Interactions によって図 4 に示す。R 体、S 体いずれもバルビタル環の NH も結合部位の Asp152 に水素結合している。R 体ではさらに、Tyr190 が水素結合している。一般には水素結合はファンデルワールス相互作用より強い結合力であるとされ、バルビタル環は強く結合部位に結合している。このことから isobarbital の主たる結合は水素結合によるものと推定される。

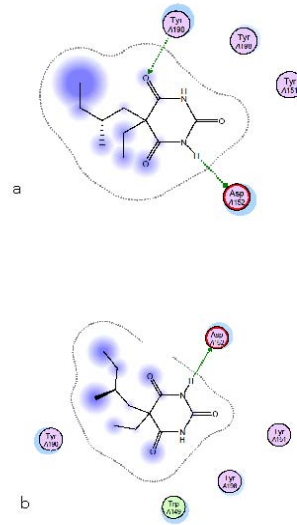


図 4 a, Binding interactions of (R)-isobarbital, b (S)-isobarbital (MOE-interactions)

(4) 図 5 に(R)-isobarbital の不斉炭素周りの結合基を示す。不斉炭素まわりの各置換基の結合への寄与を $\Delta U(R_i)$ で表 2 に示す。

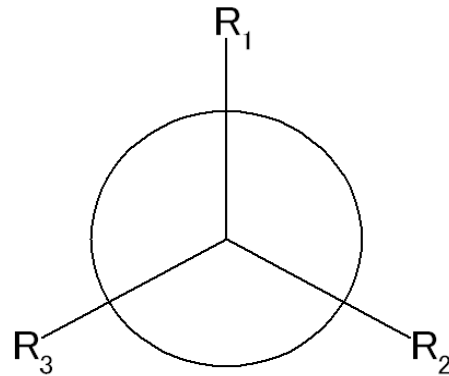


図5 (R)-isobarbital binding groups around asymmetric carbon
 $R_1 = C_4H_2O_3N_2(C_2H_5)-CH_2-$ (barbital ring)
 $R_2 = CH_3CH_2-$
 $R_3 = CH_3-$
 Binding strength: $R_1 \gg R_2 > R_3$ or $R_1 \gg R_2 = R_3$

表2 Energy Contribution of R_i Group Binding (ΔU / kcal mol⁻¹)

	(R)			(S)		
	R_1	R_2	R_3	R_1	R_2	R_3
Isobarbital	-146	+4	+4	-149	+4	+6
Pentobarbital	-146	+6	+4	-146	+8	+4

R_i group contribution $\Delta U(R_i)$ is estimated by energy difference between R_i -barbital and its hydrogen-substituted.
 $\Delta U(R_i) = U_{total}(R_i) - U_{total}(R_i=H)$

isobarbital, pentobarbital のいずれも R_2 , R_3 に比べて R_1 、すなわちバルビタル環の寄与が圧倒的に大きいことが定量的にわかる。 $(\Delta U(R_1) \gg \Delta U(R_2) = \Delta U(R_3))$ 不斉炭素周りのエチル基、メチル基はファンデル相互作用しているが、これらの基から生ずるファンデル相互作用は弱く、

R2, R3による不斉炭素周りの分子配向への影響は小さいことが示唆される。すなわち、isobarbital, pentobarbital の対掌体の結合はバルビタル環で、不斉炭素による分子配向寄与は小さいことがわかった。

光学異性バルビツールの R 体、S 体の結合を比較すると、バルビツール骨格はほぼ重なり、 $\Delta U(R_i)$ の計算結果が $\Delta U(R1) \gg \Delta U(R2) = \Delta U(R3)$ であること、さらに結合エネルギーは (R)-pentobarbital \approx (S)-pentobarbital、(R)-isobarbital \approx (S)-isobarbital であることから、構造適合性、すなわち、結合エネルギーによる R 体と S 体との分子識別は弱いことが示された。従来、対掌体は鍵と鍵穴の関係を示し、all or nothing の結合を示すと考えられていた。しかし、今回のシミュレーション結果から、不斉炭素周りのひとつの結合要素(この研究ではバルビタル環)が支配的な場合には、結合に対する光学異性の効果は相対的に小さくなることが示された。いままで、光学異性体の概念は、結合様式が排他的にことなることで機能識別がなされる通説で説明されていたが、光学異性体でも主な結合要素が1つのばあいは、ほぼ結合定数、結合様式も重なる例を提示することができた。このようなタイプの対掌体の組では、異性体間の薬理作用の差は小さくとどまると示唆された。

(5) 本研究では対掌体の分子識別を結合構造から解析したが、一方で薬物の作用から対掌体の識別を機能識別として考えることができる。アセチルコリン受容体の機能はイオン伝導で、バルビタルはその抑制作用を示す。バルビタルの作用をイオンチャンネルのゲート開閉への機能修飾と考えると、コンダクタンスや平均開口率の変化に相当する。すなわち、イオン伝導路の抵抗変化や開構造-閉構造間のエネルギー差の変化に相当する。反応速度論から考えると、一対の対掌体で 1:10 のイオンの伝導率の差がもたらされ、かつ伝導率が変化しないと仮定すると、開構造と閉構造エネルギー差が $1.37 \text{ kcal mol}^{-1}$ の増加したことに相当する。バルビツレート結合による開閉構造のわずかなエネルギー変化が大きな機能識別をおこすことが反応速度論から推定される。ともすれば、鍵と鍵穴の関係という構造識別概念が先行し、構造識別で機能を推定しがちである。本研究は機能識別には触れていないが、このようにほんのわずかなエネルギー差で機能識別がおこり、おおきな役割となる点を指摘しておく。

対掌体の機能識別を扱った研究結果から分子デバイスレベルでの麻酔作用部位の特性を推定できる。対掌体が知られる麻酔薬は Isoflurane, etomidate, barbital, alcohol, neurosteroid が知られ、いずれの対掌体間の麻酔作用の差は小さいと報告されている。本研究はバルビタルについての研究であるが、相互作用レベルの考察は吸入麻酔薬についても適応できる。吸入麻酔薬は一般に疎水性分子が多く、

主な相互作用はファンデルワールスと水素結合が関与している。エーテル系の吸入麻酔薬(トキシフルラン、イソフルラン、エンフルラン、セボフルラン、デスフルラン)はファンデルワールス相互作用と水素結合相互作用が結合に関与する。強い相互作用の水素結合が主な結合基となると考えられる。したがって、本研究の isobarbital 同様にエーテル系吸入麻酔薬は光学異性識別の弱い結合に分類されるものと考えられる。イソフルランの光学異性体効果の差が比較的小さく、また、2-Butanol, 2-Pentanol の対掌体による MAC の有意差もおだやかである。吸入麻酔薬とその結合部位の組み合わせは、いずれも、光学異性体であろうとも対掌体の機能識別が弱い特性を持つと考えられる。すなわち、麻酔の作用部位は分子デバイスレベルで弱い識別能しかもたない、別の言い方でいうと非特異的、あるいは結合様式が分子の形に依存しないような性格が推定される。

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 5 件)

① Masayuki Ozaki and Tomoyoshi Seto, Structure-Stereoselectivity Relationship of Barbiturate Enantiomers Analyzed by Docking Simulation, Abstracts of American Society of Anesthesiologists 2009 Annual Meeting, 2009, 査読あり

② Masayuki Ozaki and Tomoyoshi Seto, Noble Gas Anesthetics and Immobilizers Show Different Binding Distributions to KcsA Channel, Abstracts of 2009 Annual Biophysical Society Meeting, 2009, 査読あり

③ 尾崎将之、瀬戸倫義、野坂修一、ニコチン性アセチルコリン受容体における光学異性バルビツレートの結合様式、日本麻酔・薬理学会誌 20 巻 49-52 頁、2009 年、査読なし

④ 瀬戸倫義、尾崎将之、今井隆志、谷口吉弘、野坂修一、全身麻酔のメカニズムに関する新しい知見と考え方、麻酔 57, 4-21, 2008 年、査読あり

⑤ Seto T, Isogai H, Ozaki M, Nosaka S., Noble gas binding to human serum albumin using docking simulation: nonimmobilizers and anesthetics bind to different sites., Anesthesia and Analgesia 107: 1223-8., 2008, 査読あり

[学会発表] (計 13 件)

① Masayuki Ozaki and Tomoyoshi Seto, Structure-Stereoselectivity Relationship of Barbiturate Enantiomers Analyzed by Docking Simulation, American Society of Anesthesiologists 2009 Annual Meeting, 2009, New Orleans

③ Masayuki Ozaki and Tomoyoshi Seto, Noble Gas Anesthetics and Immobilizers Show Different Binding Distributions to KcsA Channel, 2009 Annual Biophysical Society Meeting, 2009, Boston

④ 尾崎将之, 瀬戸倫義, 野坂修一
ヒト心房カリウムイオンチャンネル Kv1.5
におけるセボフルランの結合部位
第 26 回麻酔メカニズム研究会プログラム
2009 年大阪市

⑤ 瀬戸倫義, 尾崎将之, 野坂修一
K⁺ channel (KcsA) における希ガス麻酔薬と
nonimmobilizer の結合部位とその分布
-Prefilter 水結合部位と脂質結合部位への
結合-
第 26 回麻酔メカニズム研究会プログラム
2009 年大阪市

⑥ 尾崎将之, 瀬戸倫義
Molecular recognition of barbiturate
enantiomer in agonist binding site of
nicotinic acetylcholine receptor
46 回日本生物物理学会年会 2008 年福岡市

⑦ 尾崎将之, 瀬戸倫義
Molecular Recognition of Barbiturate
Enantiomers in Agonist Binding Site of
Nicotinic Acetylcholine Receptor
第 36 回構造活性相関シンポジウム 2008 年
神戸市

⑧ 尾崎将之, 瀬戸倫義, 野坂修一
アセチルコリン受容体アゴニスト結合部位
における光学異性バルビツレートの分子認識
第 25 回麻酔メカニズム研究会 2008 年 大
阪市

⑨ 瀬戸倫義, 尾崎将之, 野坂修一
麻酔薬と nonimmobilizer のタンパク質に対
する相互作用の相違について
-希ガス麻酔薬(Xe)と nonimmobilizer(Ne)は
KcsA に異なる結合を示す-

第 25 回麻酔メカニズム研究会 2008 年 大
阪市

⑩ 尾崎将之 瀬戸倫義 野坂修一
ニコチン性アセチルコリン受容体における
光学異性バルビツレートの結合様式
第 30 回日本麻酔・薬理学会 学術大会 2008
年京都市

⑪ 尾崎将之, 瀬戸倫義, 野坂修一
ニコチン性アセチルコリン受容体における
光学異性バルビツレートの麻酔効果と結合
様式の関係
日本麻酔科学会第 55 回大会 2008 年横浜市

⑫ 瀬戸倫義, 今井隆志, 尾崎将之, 北川裕利,
野坂修一
KcsA カリウムチャンネルにおける麻酔薬結
合部位の探索
- 麻酔薬による心筋虚血保護メカニズムへ
の示唆 -
第 24 回麻酔メカニズム研究会 2007 年大阪
市

⑬ 瀬戸倫義, 尾崎将之, 川人道夫, 北川裕利,
野坂修一
吸入麻酔薬による心筋虚血保護の分子メカ
ニズムの解明
- KcsA カリウムイオンチャンネルにおける麻
酔薬結合部位の探索から -
日本麻酔科学会第 54 回大会 2007 年札幌市

[その他]

ホームページ等

麻酔メカニズム研究会

<http://www.shiga-med.ac.jp/~anesmech/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 将之 (OZAKI MASAYUKI)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50389459

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

瀬戸 倫義 (SETO TOMOYOSHI)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：10335177