

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07334

研究課題名(和文) 遺伝コード拡張法を用いたアセチルコリン受容体の構造変化の研究

研究課題名(英文) Structural study of nicotinic acetylcholine receptors using the genetic code expansion

研究代表者

坂田 宗平 (Sakata, Souhei)

大阪医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：40528006

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)：パンクロニウムは筋弛緩薬の一つであり、筋に発現しているアセチルコリン受容体(nAChR)をブロックする。これまでパンクロニウムは細胞外のリガンド結合サイトに拮抗的に作用すると想定されていたが詳細な検討はされてこなかった。本研究では当初、遺伝コード拡張法を用いてパンクロニウムが結合するか検索する予定であったが、研究の過程でより簡便にキメラタンパク質を作成することで結合部位を調べることが可能であることを発見し、結合部位を調べたところ、膜貫通部分もしくは細胞内部分がパンクロニウムの感受性に重要であることを発見した。本研究はパンクロニウムがnAChRの拮抗薬ではないことを示した初めての研究である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでパンクロニウムがnAChRをブロックするメカニズムは不明瞭であったが、本研究ではキメラタンパク質を用いて、パンクロニウムはリガンド結合サイトとは異なる場所に結合してnAChRの機能を阻害していることを明らかにした。本研究はパンクロニウムの作用機序を明らかにした初めての研究である。今後、同じ方法により他の筋弛緩薬の作用機序が明らかになることが期待される。

パンクロニウムは筋弛緩薬の一つであり、筋弛緩薬は全身麻酔に必須である。今後、多くの筋弛緩薬の作用機序が解明されれば、新たな筋弛緩薬の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pancuronium works as a muscle relaxant by blocking the nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) expressed in the skeletal muscles. Early studies suggested that pancuronium is the antagonist of nAChR, however, several data contradict the competitive binding of pancuronium. Although I was planning to search the pancuronium binding site by the genetic code expansion methods, I changed the methods to use the chimeric subunits, which I found in the process of this study, because this is more convenient than the genetic code expansion methods. My study demonstrated that pancuronium sensitivity is not responsible for the extracellular region that has the ligand binding site but for the transmembrane and/or the intracellular regions. This is the first evidence that shows that pancuronium is not an antagonist but an allosteric modulator.

研究分野：生理学

キーワード：アセチルコリン受容体 筋弛緩薬 パンクロニウム キメラタンパク質

1. 研究開始当初の背景

筋弛緩薬は手術時などに骨格筋を弛緩させる役割があり、全身麻酔の際には欠かせないものである。古くは毒矢の成分であるクラレより精製された d-ツボクラリンなどが使用されていたが、後年、より副作用のない薬剤の開発が行われ、コレステロール骨格を持つアミノステロイド類であるパンクロニウム、ベクロニウム、ロクロニウムなどが合成された。これらの筋弛緩薬は筋に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を阻害し、運動神経の興奮を筋に伝達させないようにすることで、その機能を発揮する。筋弛緩薬が nAChR を阻害するメカニズムは、d-ツボクラリンについては放射性ラベルを利用した実験などにより良く調べられており、nAChR の細胞外部分に存在するアセチルコリン結合サイトに拮抗的に作用することが明らかになっている。一方、他の筋弛緩薬については詳しくは調べられていない。筋弛緩薬には作用機序の異なる 2 タイプのものが存在し、筋弛緩薬が筋の脱分極誘導するものと脱分極を誘導しないものに分けられる。このうち d-ツボクラリンやパンクロニウムなどのアミノステロイドが分類される非脱分極性の筋弛緩薬については、放射性ヨウ素を用いたリガンドであるアセチルコリンとの拮抗実験により、nAChR のアセチルコリン結合サイトに結合することが示されている。この実験は単に筋弛緩薬がアセチルコリン結合サイトに結合する可能性を示したものであり、筋弛緩薬は nAChR の複数の場所に結合し、アセチルコリン結合サイト以外の場所への結合が阻害効果を発揮している可能性を考慮していない。実際、後年の研究により nAChR の複数の場所に筋弛緩薬が結合し得ることが示されている。前述のように d-ツボクラリンについてはアセチルコリン結合サイトに結合し、それが nAChR の機能阻害に関連していることが示されている一方、他の非脱分極性筋弛緩薬についてはアセチルコリン結合サイトへの結合が機能阻害に関連していないことを示すデータもあり、d-ツボクラリンとは作用機序が異なる可能性も示唆されているが、未だ詳細な検討は行われていない。

2. 研究の目的

筋弛緩薬は臨床医学で重要な役割を果たしているにもかかわらず、その作用機序が不明なものが多い。特に非脱分極性の筋弛緩薬については、nAChR のアセチルコリン結合サイトに作用するとされているがそれとは矛盾するデータもあり、この点をはっきりさせることは筋弛緩薬の作用機序を知る最初の一步となる。そこで本研究では非脱分極性の筋弛緩薬の一つであるパンクロニウムが、nAChR のどの部分に結合するのか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

当初、遺伝コード拡張法を用いて非天然アミノ酸(人工アミノ酸)を部位特異的に導入することにより、結合サイトを検索することを計画した。通常、リガンドであるアセチルコリンが結合すると、nAChR は構造変化を起こしチャネルゲートが開いてイオンが透過する。パンクロニウムによる阻害は、パンクロニウムが結合することで nAChR の構造変化を妨げていることが想定される。そこで nAChR が動作する際、大きく構造が変化すると考えられるところにクロスリンクする機能を持つ非天然アミノ酸を導入し、その部分の構造が変化しないように“ロック”することで実際に nAChR の機能が阻害されれば、その部位にパンクロニウムが結合する可能性を見出すことができる。いわば“ロック”機能を持つ非天然アミノ酸をパンクロニウムに見立てて、パンクロニウムの結合サイトを検索することを考えた。しかしながら、研究の過程でより簡便な方法でパンクロニウムの結合サイトを大まかに調べる方法があることを発見したため、まずはこの方法を試すことにした。研究の過程で発見したため“研究成果”の項にて、その経緯も含めて述べる。

4. 研究成果

nAChR は五量体を形成し、リガンド作動性のイオンチャネルとして機能する。一般に筋は速筋と遅筋に分けられるが、これまでの我々の研究により、速筋と遅筋では nAChR のサブユニット構成が異なっており、速筋の nAChR は 2 つのサブユニットおよび、サブユニットが 1 つずつの組み合わせで構成されている一方、遅筋では 2 つの と 2 つの サブユニットと 1 つの サブユニットで構成された nAChR が発現していることが示された(図 1)。以降、速筋で発現しているタイプを δ タイプ、遅筋で発現しているタイプを ϵ タイプと呼ぶこと

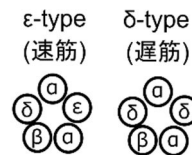


図 1、速筋および遅筋における nAChR のサブユニット構成

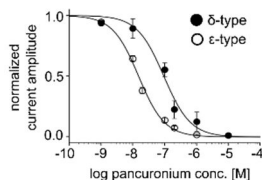


図 2、 δ タイプと ϵ タイプのパンクロニウムに対するアフィニティー

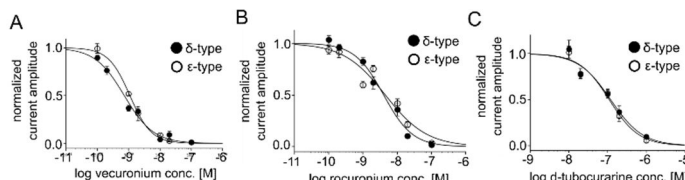


図 3、 δ タイプと ϵ タイプのベクロニウム(A)、ロクロニウム(B)、d-ツボクラリン(C)に対するアフィニティー

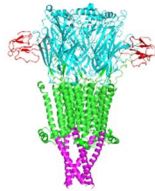


図4. nAChRの構造。
シアン：細胞外部分、
緑：膜貫通部分、
マゼンダ：細胞内部分

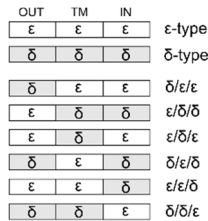


図5. キメラサブユニットの構造。
"OUT", "TM", "IN"はそれぞれ、
細胞外部分、膜貫通部分、細胞内部分
を表す。

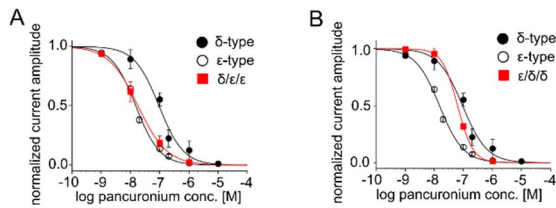


図6. δ/ε/ε (A)および、ε/δ/δ (B)のパンクロニウムに対するアフィニティー。

一に近かった(図6)。これらの結果は、パンクロニウムによる機能障害は細胞外部分ではなく、膜貫通部分もしくは細胞内部分が重要であることを明示しており、これまで想定されてきたパンクロニウムはnAChRに対して拮抗的に作用するという考えは誤りであることを示している。本研究ではさらに膜貫通部分、および細胞内部分のどちらがパンクロニウム感受性に重要であるか調べるため、膜貫通部分のみがタイプのもの(/ /)、逆にタイプのもの(/ /)を作成し調べたところ、 / / はタイプ、 / / はタイプとタイプの間のアフィニティーを示した(図7)。この結果は膜貫通部分もパンクロニウムに対するアフィニティーに関与していることを示唆している。さらに同様に細胞内部分のみがタイプのもの(/ /)、反対にタイプのもの(/ /)を作成して、細胞内部分の関与を調べたところ / / はタイプとタイプの間のアフィニティー、 / / はタイプのアフィニティーを示し、細胞内部分もアフィニティーに関与している可能性を見出した(図8)。

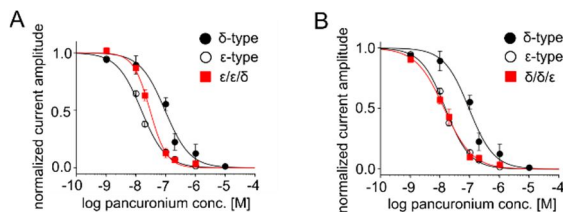


図8. ε/ε/δ (A)および、δ/δ/ε (B)のパンクロニウムに対するアフィニティー。

一般にイオンチャネルの阻害剤にはイオンの通り道であるイオン透過を物理的に塞ぐことで阻害効果をもたらす低分子がすることが知られている。上述のとおりパンクロニウムによる阻害はnAChRの膜貫通部分と細胞内部分が関与していることが明らかになり、特定の結合サイトに結合するのではなく、イオン透過を塞ぐ形で機能している可能性も考えられた。もしこのような形で機能するならば、イオン電流に整流性が見られることが知られている。実際にパンクロニウム存在下でイオン電流を計測したところ、整流性は見られなかった(図9)。このことはパンクロニウムはイオン透過路を物理的に塞ぐことで阻害効果を発揮するのではなく、ある特定の領域に結合して、nAChRの動作を阻害する可能性を示している。

本研究ではnAChRのキメラサブユニットを作成することで、これまで詳細に検討されていなかったパンクロニウムがnAChRを阻害するメカニズムを調べることに成功した。その結果、これまでパンクロニウムはnAChRに対して拮抗的に作用すると想定されてきたが、それが正しくないことを明確に示した。この点は大きな成果と言える。その一方、パンクロニウムの結合サイトを明示することはできなかったが、パンクロニウムはイオン透過路を塞ぐいわゆるポアブロッカーではないこと、また膜貫通部分と細胞内部分がパンクロニウムの感受性に関与していることが示された。コレステロールの結合サイトを調べた過去の研究では、コレステロー

にする。この2つのタイプのnAChRに対してパンクロニウムの効果を調べたところ、タイプの方がタイプに対して、およそ10倍ほどパンクロニウムが効きやすいことが明らかになった(図2)。(本研究とは別の研究として、この発見をさらに詳細に調べてFrontiers of Physiology誌に論文を掲載した。)また大変興味深いことにこの効きの違いはパンクロニウムのみで見られ、他の非脱分極性の筋弛緩薬、d-ツボクラリン、ベクロニウム、ロクロニウムでは見られなかった(図3)。本研究ではこのパンクロニウムの効きがタイプとタイプで異なることを利用して、当初の目的であるパンクロニウムの結合サイトを調べることを考えた。nAChRはおおまかに細胞外部分、膜貫通部分、細胞内部分から構成されている(図4)。細胞外部分にパンクロニウムが結合するかどうか確かめるために、サブユニット由来の細胞外部分を持ちながらサブユニット由来の膜貫通部分と細胞内部分をもつキメラサブユニット(/ /)を作成した(図5)。“研究開始当初の背景”で述べたとおり、もし細胞外部分にパンクロニウムが結合するならば、ε/d/dのパンクロニウムに対するアフィニティーはタイプとタイプの間で、 / / のパンクロニウムに対するアフィニティーはタイプとタイプの間で、 / / はタイプ、 / / はタイプのアフィニティーを示した(図6)。

この結果は膜貫通部分もパンクロニウムに対するアフィニティーに関与していることを示唆している。さらに同様に細胞内部分のみがタイプのもの(/ /)、反対にタイプのもの(/ /)を作成して、細胞内部分の関与を調べたところ / / はタイプとタイプの間のアフィニティー、 / / はタイプのアフィニティーを示し、細胞内部分もアフィニティーに関与している可能性を見出した(図8)。

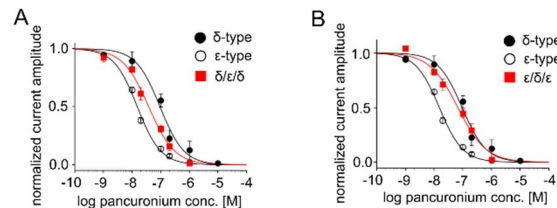


図7. δ/ε/δ (A)および、ε/δ/ε (B)のパンクロニウムに対するアフィニティー。

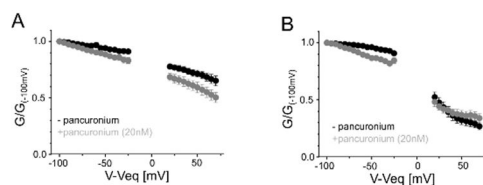


図9. εタイプ (A)およびδタイプ (B)の整流性。縦軸の値が大きいほど、イオン電流が通りやすいことを示している。εタイプとδタイプのいずれにおいてもパンクロニウム存在下と非存在下を比較して、顕著な違いがない。

ルは膜貫通部分の細胞内部分に近いところに結合することが報告されている。パンクロニウムはコレステロール骨格を持ちコレステロールと構造が良く似ていること、また本研究結果で膜貫通部分と細胞内部分がパンクロニウム感受性に関与していることが示されたことを考え合わせると、パンクロニウムもコレステロールと同様に膜貫通部分の細胞内部分に近いところに結合し、nAChRを阻害する機能を発揮していることが想像される。今後の研究により、パンクロニウムの結合サイトが明らかになることを期待している。なお、本研究成果は論文として投稿し、現在査読待ちである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawai T, Miyata H, Nakanishi H, Sakata S, Morioka S, Sasaki J, Watanabe M, Sakimura K, Fujimoto T, Sasaki T, Ikawa M, and Okamura Y	4. 巻 116
2. 論文標題 Polarized PtdIns(4,5)P2 distribution mediated by a voltage-sensing phosphatase (VSP) regulates sperm motility	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci USA	6. 最初と最後の頁 26020 - 26028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1916867116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita M, Egashira Y, Nakamura S, Sakata S and Ono F	4. 巻 13
2. 論文標題 Receptor subunit compositions underly distinct potencies of a muscle relaxant in fast and slow muscle fibers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers of Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2022.1026646	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坂田宗平、寺井千史、小野富三人
2. 発表標題 Nav1.4ノックアウトゼブラフィッシュの解析
3. 学会等名 第113回近畿生理学談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田宗平、小野富三人
2. 発表標題 筋弛緩剤バンクロニウムは筋肉型アセチルコリン受容体に対してアロステリックモジュレーターとして働く
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 寺井千史、小野富三人、坂田宗平
2. 発表標題 筋肉型電位依存性ナトリウムチャネルをノックアウトしたゼブラフィッシュの筋収縮の解析
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 Sakata S, Ono F
2. 発表標題 Transcriptome on zebrafish fast- and slow-twitch fiber
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Terai C, Ono F, Sakata S
2. 発表標題 Generation and analysis of scn4aa and scn4ab double knock-out zebrafish
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakata S, Ono F
2. 発表標題 The actions of nondepolarizing neuromuscular blocking agents at zebrafish muscle nicotinic acetylcholine receptor isoforms
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Terai C, Ono F, Sakata S
2. 発表標題 Analysis of scn4aa and scn4ab double-knock out zebrafish
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田宗平、小野富三人
2. 発表標題 ゼブラフィッシュの速筋および遅筋における網羅的な遺伝子発現解析
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakata S, Terai-Akiyama C, Ono F
2. 発表標題 Muscle contraction without the action potential in zebrafish larva
3. 学会等名 The 39th Congress of International Union of Physiological Sciences (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田宗平、秋山(寺井)千史、小野富三人
2. 発表標題 筋型電位依存性ナトリウムチャンネル(Nav1.4)をノックアウトしたゼブラフィッシュの解析
3. 学会等名 第114回近畿生理談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋山(寺井)千史、小野富三人、坂田宗平
2. 発表標題 電位依存性ナトリウムチャネルをロックアウトしたゼブラフィッシュの解析
3. 学会等名 第100回日本生理学会大会
4. 発表年 2023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