

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670683

研究課題名(和文) 麻酔作用における脂質仮説の検証

研究課題名(英文) The verification for the lipid hypothesis of the inhalational anesthetics

研究代表者

三田 建一郎(Mita, Kenichiro)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：30529342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：麻酔薬の作用機序の仮説の一つである脂質仮説の検証に挑んだ。測定が困難な側方圧の代わりに膜張力を用い、張力を変化させることによってイオンチャネルの活性が変化するか定量的測定を目的とした。

当初リポソームパッチ法による測定を予定していたが、膜面積の変化をとらえることができず膜張力の計測は困難と判断した。次に脂質バブル法を用いることとした。本方法の習熟およびイオンチャネル電流計測までは可能となったが、この方法も形成される脂質二重膜の膜面積および膜を形成する脂質分子数を一定に保つことができず、正しい膜張力を測定することができず、イオンチャネル電流変化の定量的測定までは到達することができなかった。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of the anesthetic drugs to human body have not been elucidated for the long time. Until now, many hypotheses have been advocated. One popular hypothesis is the lipid theory. No one could confirm its validity. We challenged to test the assumption that the anesthetics exert their actions to ion channels mediated by pressures laterally. We decided to use the tension force of the lipid bilayer membrane as a substitute for lateral pressure. We tried to measure the tension force by several ways, but unfortunately we could not measure it and observe the currents of the ion channels.

研究分野：麻酔科学

キーワード：イオンチャネル 吸入麻酔薬 脂質仮説 側方圧

1. 研究開始当初の背景

これまで吸入麻酔薬の作用として様々な仮説が立てられてきたが、明らかになったものはない。現在、麻酔薬が細胞膜に溶け込み、膜の側方圧を変化させることによってイオンチャンネルに影響を与えるという脂質仮説が有力とされているが、これまで膜とチャンネルとの相互作用を測定する具体的方法がなく、その真偽を確かめる方法がなかった。それは、実際に側方圧を直接測定することは非常に困難であるためであり、仮説を検証するためには様々な方法で多角的に行う必要がある。

所属研究室では、吸入麻酔薬と同じハロゲン化合物である 2,2,2-trifluoroethanol (TFE) が膜内環境を変化させ、KcsA チャンネル(代表的 K チャンネル)の立体構造変化を引き起こし、チャンネルの開確率を増大させることを明らかにした(Imai et al, JBC, 2012) (図 1)。また、細胞内の膜外領域が膜の物理化学的性質に対するセンサーとなり、チャンネル開閉に大きな影響を与えることも明らかとなった(Iwamoto and Oiki, PNAS, 2013)。これらの結果は、ハロゲン化合物や膜張力による側方圧の変化をチャンネル機能の変化として捉えられることを示し、側方圧とチャンネルとの関係を分子レベルで検証する有力な方法を手に入れることができたと考えられた。

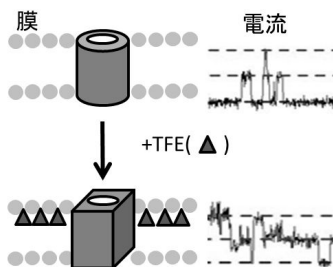


図 1 TFE がチャンネル活性に与える影響

一方、様々な存在するチャンネルの中で、K チャンネルはあらゆる細胞膜に普遍的に存在するチャンネルであり、静止膜電位形成に深く関わっている。特定の刺激(膜電位、リガンド、メカノストレスなど)でチャンネルは開閉するが(ゲート機能)、K チャンネルが開き続けることにより膜電位は安定し活動電位が生じにくくなるため、K チャンネルは意識の鎮静に非常に大きく関与していると考えられる。詳細な立体構造が明らかになっている代表的 K チャンネルの KcsA チャンネルは、全てのチャンネルに共通するコアとなる構造だけを持つ。このため、KcsA チャンネルのゲート機能と膜との関係を明らかにすることは、意識を鎮静させる薬である麻酔薬のメカニズムを明らかにすることに直結することである。

2. 研究の目的

本研究では、KcsA チャンネルを使用し、リポソームパッチ法で電流計測する(図 2)。この方法は、膜の張力変化と TFE はそれぞれ独立のメカニズムで側方圧を変化させることができ、さらに側方圧の変化を膜内蛍光指標によって視覚化させることができると考えられる非常にユニークな方法である。

この方法を用い、膜の側方圧とチャンネルのゲート機能との相互作用を多角的に評価し、脂質仮説を検証する。また、ゲート機能への影響が、膜外領域の有無により変化するのが、定量的に評価する。吸入麻酔薬のメカニズムとして提唱されている膜の側方圧の変化がイオンチャンネルに影響を与えるとする脂質仮説の真偽を確かめる。

3. 研究の方法

脂質仮説の真偽を確かめるということは、すなわち、膜の側方圧を変化させ、それに伴いチャンネルのゲート機能が変化するののかということを確認することである。

イオンチャンネルの研究分野では、従来パッチクランプ法が用いられてきた。この方法は、細胞を使用するため、細胞膜にもともと存在する別のイオンチャンネルや細胞内に存在するタンパク質等の影響を取り去ることができないという重大な欠点が存在する。一方、リポソームパッチ法は、精製した目的のイオンチャンネルを人工的に作成したリポソーム(脂質二重膜であるので、擬似細胞膜として扱える)に組み込むため、不純物に影響されない非常に純粋な系で、膜とチャンネルとの相互作用を調べる実験が可能となる。この方法で単一チャンネル電流記録を行うが、従来のパッチクランプ法のようにリポソーム膜にガラス管微小ピペットを密着させて電流計測を行うので、ギガ・オーム(10^9)以上のシールが可能となり、チャンネル電流の高精度な測定が可能となる。また、この方法では、リポソームを作成する脂質は自由に設定できるため、特定の脂質とチャンネルへの効果を比較検討することができる。

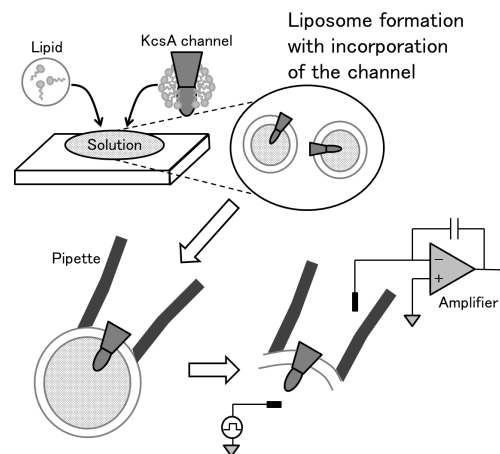


図 2 リポソームパッチ法

一方、膜の張力と側方圧は同じものではないが、両者は関連しており、張力は側方圧を修飾していると考えられる(図3)。側方圧は現在のところ実際に測定することは困難であるので、今回の実験では張力をその代用のひとつとする。ガラスピペットに圧ポンプを組み込むことにより、ピペット内の圧力を自由に設定しながらチャンネル電流を測定することができる。ピペット内の圧は、パッチした膜の曲率を変化させ、Laplaceの法則により圧力と膜の曲率半径から張力を算出することができるので、膜の張力とチャンネル電流を同時に測定することが可能となる。今回のような実験を行う場合、リポソームパッチ法以外に適切な方法がなく、この方法を用いて行う。

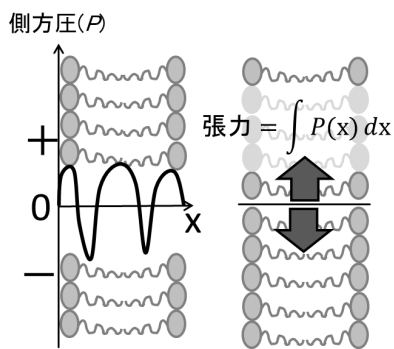


図3 側方圧と張力の関係

イオンチャンネルは、あらゆる細胞に存在し静止膜電位形成にかかわっている K チャンネルで、中でも代表的 K チャンネルである KcsA チャンネルを用いる。これは放線菌由来の K チャンネルで、初めて原子分解能の立体構造が明らかになったチャンネルである。2 回膜貫通型膜タンパク質で、K チャンネルだけでなく Na チャンネルや Ca チャンネルなどを含め、チャンネルとして共通するコアとなる構造だけを持つ。

4. 研究成果

本研究では、麻酔薬のメカニズムとして提唱されている脂質膜の資質仮説を検証することである。すなわち、膜の側方圧を変化させた時にイオンチャンネルのゲーティングがどのように変化するのかを定量的に測定することである。側方圧を直接測定することはできないため、膜にかかる張力を代用することを考えた。

(1) リポソームパッチ法による実験

リポソームパッチ法では微小ガラス管を用いる方法であり、ガラス管先端が非常に細い。顕微鏡でガラス管内を確認しようとしたが、管内に張られた脂質膜があまりにも微小すぎて、膜の変化を確認することはできな

かった。これは、膜の側方圧の代用として膜張力を使用する計画だったが膜の変化を確認することができなければ定量的評価ができないことを意味する。そのため、リポソームパッチ法に代わる方法を新たに用いる必要があった。

(2) 脂質バブル法による実験

そこで、次に所属研究室で最近新たに開発された脂質バブル法を用いることとした(Iwamoto and Oiki, Scientific reports, 2015)。二本のガラス管先端に脂質懸濁液を含む電解質水溶液を満たし、有機溶媒中に脂質一重膜よりなる脂質バブルを形成させる。そして、二つのバブル同士を接着させることにより脂質二重膜を形成する方法である。リポソームパッチ法のようなガラス管内に形成される二重膜と比較してガラス管先端に形成されるバブル同士からできあがる二重膜は面積が広く、顕微鏡での観察が容易となる。バブルの直径を測定することにより、形成される二重膜の曲率を求めることができ、そこから膜張力を求めることができることを考えた。

まず、この方法の実験システムを構築し技術を習熟することができるよう努めた。形成するバブルは、直径は非常に計測しやすいという利点がある一方、大きい分だけ非常に安定性が低く、簡単に割れてしまうという欠点がある。しかし、形成するバブルの大きさを自由に变化させることができるまで技術を習得できた。次にバブル内の水溶液に可溶化したイオンチャンネルを入れ、イオンチャンネルを脂質二重膜内に組み込ませ、チャンネル電流を計測できるようにする必要があったが、安定したチャンネル電流を計測できるようになった。

ところが、実際には二つのバブルの直径をどのように変化させてみても算出される二重膜の曲率はほとんど変わることがなかった。これは実験で膜張力を有意に変化させることができず、イオンチャンネルへの影響を定量的に数値として捉えることが困難であることを意味する。

そこで、薬剤が確実に脂質二重膜に入り込む方法で、しかも水溶液側からではなくイオンチャンネルの側方から影響を与えることができる方法を模索した。(水溶液側からでは薬剤がイオンチャンネル分子の膜外領域に結合するなどチャンネル活性を変化させる可能性も考えられ、本研究の目的と異なる結果を導く可能性がある。)上記のように脂質バブル法は、有機溶媒中に脂質一重膜によって区画された水溶液を含んだバブルを形成させる方法である。このため、脂質溶媒中に薬剤(脂溶性に限る)を還流させることにより、水溶液を介さずに直接脂質二重膜に薬剤を組み込ませることができると考えられた。

時間経過と共にバブル内の脂質二重膜に薬剤が組み込まれ、その時のイオンチャンネル

電流を測定しようとしたが、水溶液に含まれている脂質懸濁液由来の脂質が次々に組み込まれてしまうことが明らかとなった。一定の分子数からなる脂質平面ではなく、分子数が増えることで脂質面積が大きくなってしまふことを意味し、求めた曲率から算出される張力は正しい数値ではないことが明らかとなった。そこで、膜の組成を変えることによって膜張力がどのように変わるのかどうかを検証し、測定方法を確立することができるようになった。

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)

Yuka Matsuki, Masayuki Iwamoto, Kenichiro Mita, Kenji Shigemi, Shigeki Matsunaga, and Shigetoshi Oiki. Rectified Proton Grothuss Conduction Across a Long Water-Wire in the Test Nanotube of the Polytheonamide B Channel. J Am Chem Soc. 査読有 138(12):4168-77. DOI: 10.1021

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

三田 建一郎(MITA, Kenichiro)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：30529342

(3)連携研究者

老木 成稔(OIKI, Shigetoshi)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：10185176