

平成 23 年 4 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591802

研究課題名 (和文) 麻酔薬によるイオンチャンネル機能修飾メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Mechanisms of functional modification of ion channel by anesthetics

研究代表者

瀬戸 倫義 (SETO TOMOYOSHI)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：10335177

研究成果の概要 (和文)：

麻酔薬(Xe, Kr, Ar)では、(A)脂質結合部位、(B)Pre-filter water site、(C)ヘリクス間、(D)C末端部位、(E)ゲートに結合した。Xeは脂質結合部位に分布した。これは、タンパク-水界面と脂質-水界面の接点であり、Xeによるイオンチャンネルの機能修飾解明の上で重要な結合部位であると考えられる。キャビティ内のPre-filter water siteは、K⁺の脱水過程に関与する構造化水の位置である。Xeの結合はイオンの脱水過程を修飾する可能性を示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Anesthetics (Xe, Kr, Ar) bound to (A) lipid binding site, (B) pre-filter water site, (C) inter-helix site, (D) C-terminal domain, and (E) gate. Xenon distributed to lipid binding site. This binding site is in between protein-water and lipid-water interfaces. Pre-filter water site is structured water site which involves dehydration process of potassium ion. These xenon binding site are suggested to have important contributions to modification of KcsA function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：KcsA、平面膜法、ドッキングシミュレーション、麻酔薬結合部位、麻酔メカニズム

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身麻酔メカニズム研究において非特異説と特異説の間で長い論争が続いている。最近、神経受容体の特定部分に結合して作用を発揮するという特異説が有力であり、学会の趨勢は、全身麻酔薬は神経イオンチャンネルに特異説に収束しつつある(MAC2005, Nara)。さらに、JW Sleightは2007年4月、International Anesthesia Research Society

の教育講演で、麻酔薬の分子ターゲットの機能修飾からニューロンレベルの機能修飾を説明することが重要であることを主張した。(2) 分子ターゲットタンパク質が明確に特定されていない現状では、有力な分子ターゲットあるいはその類縁のイオンチャンネルを材料に研究を進めることが妥当である。(3) 放線菌カリウムチャンネルKcsAは、麻酔分子ターゲットとして有望視されるTREK1と

類縁のタンデムポア型カリウムイオンチャンネルである。さらに大腸菌に発現させての大量精製法が確立し、2次構造はもとより、3.2Åの分解能でイオンポア、イオン選択アミノ酸配列の立体構造が明らかになっている。(Doyle DA Science (1998)) さらに、KcsAチャンネルは、平面膜パッチクランプによる単一イオンチャンネル解析もなされ、構造生物学と電気生理学によってもっとも精密に研究がなされているイオンチャンネルである。現在では、チャンネル開閉の作動原理、イオン透過の分子メカニズムが解明されている。空洞内の構造化されたK⁺と水和水からの開口部の構造化されたK⁺と水分子の関与によるイオン移動が詳細にわかっている。(Doeme C Biophys J (2003))

(4) KcsAの構造を用いたドッキングシミュレーションから麻酔薬の結合部位を予測し、電気生理学の平面脂質膜法からKcsAの単一イオンチャンネルの開閉動態を精密に計測すれば、麻酔薬分子の開閉動態への効果から麻酔薬によるチャンネル機能修飾が精密に説明できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、麻酔薬がどのようにKcsAチャンネル機能を修飾をするのかにせよ、麻酔薬によるイオンチャンネル機能修飾の分子メカニズムの解明を行う。

本研究は、3つの研究からなる。(1)脂質平面膜法の電気生理学的測定から単一チャンネルの開閉動態をとらえ、麻酔薬によるチャンネル開閉動態の変化を1分子レベルで明らかにする。(2)KcsAの立体構造からドッキングシミュレーションを用いて、チャンネル開口作用点(麻酔薬結合部位)を明らかにする。(3)得られた麻酔薬-KcsA複合体の構造を用いて、1分子開閉動態と開口作用点の構造を比較し、チャンネル開閉の修飾メカニズムを動態・構造の関連において解明する。

3. 研究の方法

(1)KcsAチャンネル POPE/POPG膜に再構成したKcsAを福井大学 老木博士より提供をうけた。

(2)電気生理実験

図1のごとく測定チャンバーを作成し、顕微鏡下に直径約100umの隔壁小孔にDOPG/DOPE(またはPOPG/POPE)脂質二重膜を形成し、gramicidin A(gA)/decane(またはKcsA

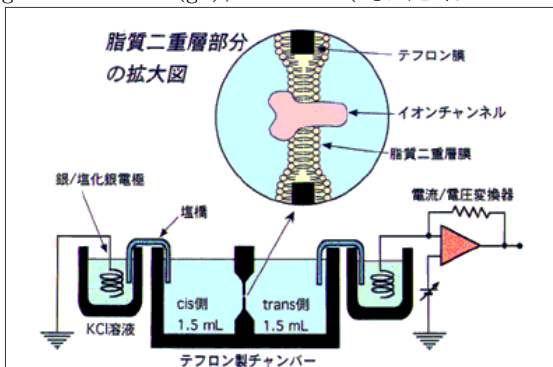


図1 脂質平面膜法の概念図

/POPE/POPG)を吹きつけ、脂質二重膜にgAチャンネル導入した。両チャンバーに150mVの電位差をかけ(voltage clamp)極微小電流を測定した。電流はAxopatch 200Bを用いて増幅し、Digidata 1322Aを介して取得した。信号取得・処理はpClamp10 (Molecular Device, USA)を用いて行った。チャンネルの開閉電流を記録し、開閉率、コンダクタンス(面積あたりのK⁺の移動速度)、開閉の遷移速度定数(どのように開閉状態が飛び移るか)を解析した。

(3)現有ワークステーションを使用し、KcsAに対して吸入麻酔薬のドッキングシミュレーションで結合部位を調べた。巨大なタンパク質におけるドッキング計算を効率的に行うために、プログラムはASEDock2005を使用した(菱化システム後藤博士、東海大学平山博士提供)。

はじめに、ASEDock2005の有効性を確認するために既知の麻酔薬タンパク質複合体(例えば、Propofol-albumin, Franks NP, J Biol Chem, 275 38731-8, 2000)のタンパク立体構造を鋳型に用いてASEDockからプロポフォル結合部位を求め、この結合部位を実験結果と比較してASEDock2005の有効性を確認した。計算に用いる力場はMMFF94xを使用し、部分電荷の割り当てをMMFF94xの基準で行った。探索空間の分子に力を及ぼす残基の相互作用を考慮して、相互作用カットオフを0.85 nmとした。KcsA構造はProtein Data Bankから1K4C, 3EFFを用いた。麻酔薬結合部位と結合様式を計算するためにASEDock2005で麻酔薬-KcsA複合体の立体構造を求めた。

4. 研究成果

(1)gAチャンネル

(2)KcsA単チャンネル解析 100umの隔壁小孔にPOPG/POPE二重膜を作成し、KcsA/POPE/POPGをチャンバーの隔壁二重膜に融合させ、Kイオンチャンネル1分子開閉電流を測定した。この段階でKcsAベジクルの隔壁膜への癒合がうまくゆかずKcsA開閉電流は検出できなかった。そこでPOPG/POPE二重膜の形成を安定化させるために、隔壁小孔の大きさ、形状、支持体の材料を変え、安定な脂質二重膜の形成を探索した。KcsAチャンネルを使い尽くしたが、いまだKcsA開閉が捉えられていない。大量のKcsAを用意し、実験条件を探る必要がある。

(3)セボフルレンの結合部位は、Kイオンの再水和過程に関与する構造化水の部位に結合することがわかった。(「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」第24回麻酔メカニズム)機能修飾が水とを介して寄与が推定される。

(4)貴ガスの結合部位 (a)2つのKcsA構造を用いた結果より、麻酔薬(Xe, Kr, Ar)では、

(A)脂質結合部位, (B)Pre-filter water site, (C)ヘリクス間、(D)C 末端部位(CTD), (E)ゲートに結合した。(b) Xe, Kr, Ar の結合エネルギーは-8~-3 kcal mol⁻¹、Ne, He は-2 kcal mol⁻¹ を示した。(c) 熱力学によると A と B の結合部位があり、その結合分布比が 10:1 を示す場合の結合エネルギー差は 1.37 kcal mol⁻¹ である。最安定の結合部位から 1.37 kcal mol⁻¹ までの結合部位を解析すると、結合分布は Ne, He は大きく広がり、エネルギー準位の差も小さく、位置特異性の小さな結合分布を示した。(d)結合分布はファンデルワールス相互作用と水和で決定された。

キャビティ内の Pre-filter water site は、K⁺の脱水和過程に関与する構造化水の位置である。Xe の結合はイオンの脱水和過程を修飾する可能性を示唆する。

脂質において麻酔薬 (Xe, Kr, Ar) は脂質-水界面に分布し、nonimmobilizer (Ne, He) は脂質コア領域に分布する特徴が指摘されている。(Chipot C) Xe は脂質結合部位に分布した。これは、タンパク-水界面と脂質-水界面の接点であり、Xe によるイオンチャンネルの機能修飾解明の上で重要な結合部位であると考えられる。近年、アセチルコリン受容体の機能が脂質組成に依存し、そのメカニズムは脂質結合部位でのチャンネルタンパク-脂質相互作用が関与していることが明らかになってきた。脂質頭部に分布する麻酔薬は、脂質結合部位の相互作用を修飾する可能性を示唆するものである。

電気生理学的単チャンネルの解析から、イオン開閉の動態が解明されている。麻酔薬は閉状態と開状態の両者に結合して開閉動態を修飾していると考えられるが、開状態の立体構造は不明である。本研究の結果から少なくとも閉状態への結合分布の違いが、なんらかの機能修飾をもたらすのではないかと推定される。

希ガス麻酔薬はイオンチャンネルの水界面である脂質頭部結合部位に作用して機能修飾をする可能性を示唆される。希ガス麻酔薬は水界面、脂質-タンパク相互作用、イオンの脱水和、CTD 結合を介してチャンネルの開閉動態を修飾をしている可能性がある。

貴ガス麻酔薬と nonimmobilizer は開閉動態に異なるに影響を及ぼす可能性が示唆された。

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 4 件)

① Ozaki M, Seto T Structure-Stereoselectivity Relationship of

Barbital Enantiomers Analysed by Docking Simulation, *Anesthesiology*, Abs issue, A655, 2009, 査読有

② Ozaki M, Seto T Noble gas anesthetics and nonimmobilizers show different binding distributions to KcsA channel, *Biophys J*, 40a, 2009, 査読有

③ Ozaki M, Seto T, Nosaka S 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、*Pharmacoaesthesiology*, 20, 49-52, 2009, 査読有

④ Seto T, Isogai H, Ozaki M, Nosaka S Noble gas binding to human serum albumin using docking simulation *Anesth&Analg*, 107, 1223-1229, 2008, 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① Seto T, Ozaki M Enantiomeric Molecular Recognition of Barbitals in Agonist Binding Site of Nicotinic Acetylcholine Receptor, *Chem-bioinformatics Society*, 2010.9.15-17, Tokyo

② Seto T, Ozaki M, Nosaka S Molecular Recognition of Anesthetics in Binding Site: "Shape or Size, that is a question.", 8th International Conference on Mechanisms of Anesthesia, 2010.7.15-18, Toronto

③ Ozaki M, Seto T, Nosaka S Molecular Mechanisms of the Effect of Sevoflurane on the Potassium Channel Kv1.5 of the Atrium, 8th International Conference on Mechanisms of Anesthesia, 2010.7.15-18, Toronto

④ Ozaki M, Seto T, Nosaka S Steric Molecular Recognition of Barbiturate Enantiomers in the Agonist Binding Site of the Nicotinic Acetylcholine Receptor, 8th International Conference on Mechanisms of Anesthesia, 2010.7.15-18, Toronto

⑤ 瀬戸倫義 神経科学から麻酔の3要素を考える麻酔における意識の定義を見つける、日本麻酔科学会 第57回学術集会、2010.6.4、福岡市

⑥ Seto T Anesthetic Binding Site of

Ion-channel, The 47th Annual Meeting of the Society of Biophysical Society of Japan, 2009.11.1, Tokushima

- ⑦ Seto T Biophysics of General Anesthesia, The 47th Annual Meeting of the Society of Biophysical Society of Japan, 2009.11.1, Tokushima
- ⑧ 瀬戸倫義、尾崎将之、野坂修一 希ガス麻酔薬と nonimmobilizer は K⁺ channel(KcsA)に異なる結合分布を示す、日本麻酔科学会 第 56 回学術集会、2009.8.18、神戸市
- ⑨ 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 immobilizer 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、2009.7.18、豊中市
- ⑩ Ozaki M, Seto T, Noble gas anesthetics and immobilizers show different binding distributions to KcsA channel, Biophysical Society Annual Meeting 53rd Annual Meeting, 2009.3.1, Boston

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬戸 倫義 (SETO TOMOYOSHI)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：10335177

(2) 研究分担者

尾崎 将之 (OZAKI MASAYUKI)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：50389459

川人 道夫 (KAWAHITO MICHIO)
滋賀医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：20378467

野坂 修一 (NOSAKA SHUICHI)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：80237833