

(様式第 5 号)

広角 X 線散乱を用いた全身麻酔が脂質膜構造に及ぼす影響
Wide angle x-ray diffraction reveals the influence of general anesthetics on membrane structure and, its implication to cell toxicity.

木下祥尚・川口翼・山口晋平

Masanao Kinoshita, Tsubasa, Kawaguchi, Shinpei, Yamaguchi

九州大学理学研究院化学部門生体分析化学研究室

Department of Chemistry, Graduate School of Science, Kyushu University

- ※ 1 先端創生利用（長期タイプ）課題は、実施課題名の末尾に期を表す（Ⅰ）、（Ⅱ）、（Ⅲ）を追記してください。
- ※ 2 利用情報の公開が必要な課題は、本利用報告書とは別に利用年度終了後 2 年以内に研究成果公開（論文（査読付）の発表又は研究センターの研究成果公報で公表）が必要です（トライアル利用を除く）。
- ※ 3 実験に参加された機関を全てご記載ください。
- ※ 4 共著者には実験参加者をご記載ください（各実験参加機関より 1 人以上）。

1. 概要（注：結論を含めて下さい）

生体に対して麻酔薬を効率的に作用させるため、麻酔作用発現の機序に関する研究が幅広く行われてきた。しかし、多くの先行研究ではタンパク質と麻酔薬の相互作用に着目しており、タンパク質を取り巻く脂質膜におよぼす影響は十分わかっていない。本研究では広角 X 線散乱(WAXD)を用いて、代表的吸引麻酔薬が脂質膜の構造に及ぼす影響について調査した。その結果、麻酔薬存在下における WAXD プロファイルは非存在下のプロファイルとおおむね一致していたが、飽和濃度に近い 13 mM まで添加したとき膜法線方向に対する脂質炭素鎖の傾きがわずかに増加することを示唆する結果を得た。この結果を基に我々は以下のようなモデルを推察している。1)麻酔薬が脂質の頭部に結合することで、頭部の有効断面積が増加する。2)有効断面積の増加が頭部直下の疎水性領域に過剰スペースを形成する。3)この過剰スペースを補填するために炭素鎖の傾きが増加する。今後は小角 X 線散乱により、麻酔薬が脂質頭部に結合することを証明する。

(English)

While there are many researched on the interaction between anesthetic molecules and proteins, their impact on the lipid membrane is not sufficiently understood. In the present study, we addressed influence of representative general anesthetics on the chain packing in lipid membranes. As a result, exogenous addition of halothane an isoflurane (final conc. 13 mM) slightly enhances the tilt angle of lipid carbon chains to the bilayer normal. Base on this result, a possible scenario is as follows; 1) anesthetic molecules interact with the lipid headgroup and enhance effective size of the headgroup. 2) Increase in the effective size causes excess space immediately below the headgroup. 3) The carbon chains tilt to fill the excess space. As a future work, we will obtain a direct evidence to reveal the interaction between anesthetic molecules and lipid headgroup.

2. 背景と目的

生体に対して麻酔薬を効率的に作用させるためには、麻酔作用発現の機序に関する知見が不可欠である。現在、麻酔の作用機序に関して「タンパク質仮説」と「脂質仮説」の二つのモデルが提唱されている。前者のタンパク質仮説では、麻酔薬がナトリウムチャンネルに直接作用することでチャンネル電流をブロックし、その結果、神経伝達を阻害することが提唱されている[1]。一方、膜タンパク質の活性は、周囲の膜環境に強く依存することが知られている。それゆえ、後者の脂質仮説では麻酔薬が脂質膜の物性を変化させることで、間接的に、チャンネルの活性を阻害することが提唱されている[2]。

これまでの先行研究ではタンパク質仮説に着目したものが多く、麻酔薬が脂質膜に及ぼす影響に関する研究は立ち遅れたままである。本研究では広角 X 線散乱を利用することで、代表的吸引麻酔薬であるハロタン(Hal)やイソフルラン(Iso)が脂質炭素鎖の充填構造に及ぼす影響について調査した。ここで得られた結果は、二つの仮説の正当性を判断する上で不可欠な情報である。

3. 実験内容 (試料、実験方法、解析方法の説明)

代表的リン脂質dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC; Avanti Polar Lipid Inc, Alabaster AL)を水中に懸濁することで脂質多重層膜リポソーム(multilamellar vesicle; MLV)を作製した。次に、MLVをポリカーボネートフィルタ(Φ 100 nm)を用いて抽出することで、単層膜リポソーム(large unilamellar liposome; LUV)を作製した。その試料に対して最終濃度が13 mMになるように外部から麻酔薬を作用させたのち、試料をガラスキャピラリ(Φ 2 mm)に封入した。MLVとは異なりLUVを用いることで外部から添加した麻酔薬は全ての膜表面と相互作用することができる。ビームラインの試料周辺は [3]に従いセットアップした(図1)。まず、一定温度/流量の窒素ガスを吹きかけることで、試料の温度を調節した。次に、試料に対し波長1.55 ÅのX線を照射し、散乱パターンを冷却CCDカメラ(Saturn A200, Rigaku, Tokyo, Japan)を用いて検出した。得られたDebye-ScherrerパターンはFit 2Dを用いて一次元化した。また、得られたデータの解析にはOrigin Proを用いた。カメラ長($L_c=150.0$ mm)は、面間隔が既知であるコレステロールやシリコン結晶の散乱パターンを基に決定した。

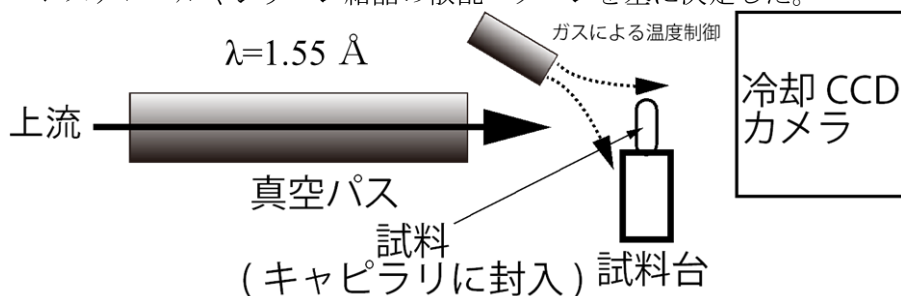


図 1. 試料周辺のセットアップの概略図

4. 実験結果と考察

図 2a は麻酔薬非存在下での DPPC 二重層膜の広角 X 線散乱(WAXD)パターンである。2.37 nm^{-1} (peak 1)と 2.42 nm^{-1} (peak 2)の位置に現れたピークは脂質炭素鎖の充填構造に由来する散乱であり、ゲル相を形成する脂質膜から得られるパターンと一致している。図 2b と c には、それぞれ 13 mM Hal と Iso 存在下における DPPC 膜の広角散乱プロファイルを示した。その結果、麻酔薬非存在下のプロファイル(図 2a)とおおむね一致した。一方、ピーク分離により詳細なピーク位置を調査したところ、麻酔薬存在下では peak 2 がわずかに広角側にシフトしていることがわかった(Table 1)。peak 2 の位置は脂質膜の垂直方向に対する炭素鎖の傾きに対応しており、この結果は麻酔薬存在下で脂質炭素鎖の傾きが増加することを示している(図 3)。以前、我々は小角 X 線散乱により、Hal が DPPC と類似したリン脂質(sphingomyelin)の頭部に結合することを明らかにした[4]。麻酔薬が結合すると脂質頭部の有効断面積が増加するため、直下の疎水部に過剰なスペースが生じる(アンブレラ効果)。この過剰スペースを補うために炭素鎖の傾きが増加するのではないかと我々は推測している。

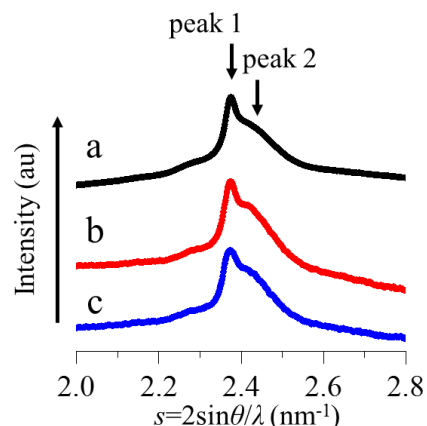


図 2. (a)麻酔薬非存在下および(b)13 mM Hal、(c)13 mM Iso を外部から添加したとき DPPC 二重層膜の広角 X 線散乱プロファイル。

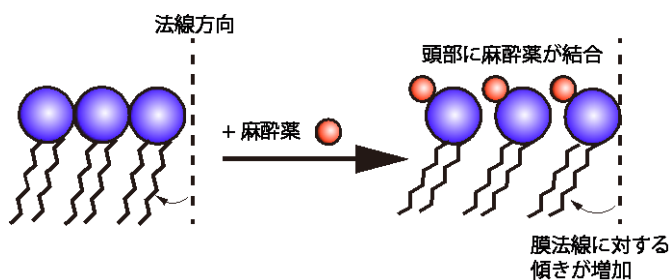


図 3. 麻酔薬添加による脂質炭素鎖の充填構造の変化。

表 1. ピーク位置

	peak1	peak2
contl.	2.37 (nm^{-1})	2.42
Hal	2.37	2.44
Iso	2.37	2.44

5. 今後の課題

DPPC 膜に対し Hal や Iso を加えることで peak 2 がわずかに広角側にシフトすることがわかった。しかし、そのシフトはきわめて小さく、現在その有意性について検討を行っている。また優位性が確認できた場合は、小角散乱を用いた電子密度再構成により、Hal や Iso が DPPC 頭部と相互作用することを証明する。

6. 参考文献

- [1] P. Tang *et al.* Large-scale molecular dynamics simulations of general anesthetic effects on the ion channel in the fully hydrated membrane: The implication of molecular mechanisms of general anesthesia. *Proc. Natl. Acade. USA* 2012. 99, 16035–16040.
- [2] R. S. Cantor, The lateral pressure profile in membranes: A physical mechanism of general anesthesia. *Biochemistry* 1997, 36, 2339–2344.
- [3] M. Kinoshita *et al.* Kinetics for the subgel phase formation in DPPC/DOPC mixed bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 2010. 163, 712-719.
- [4] T. Kawauchi. 脂質膜系に対する吸入麻酔薬剤の影響。Master thesis 2018.

7. 論文発表・特許 (注：本課題に関連するこれまでの代表的な成果)

- ・ M. Kinoshita *et al.* Kinetics for the subgel phase formation in DPPC/DOPC mixed bilayers. *Chem. Phys. Lipids* 2010. 163, 712-719.
- ・ R. Ohtani, T. Tokita, K. Iwata, M. Kinoshita *et al.* The impact of metal complex lipids on viscosity and curvature of hybrid liposomes. *Chem. Commun.* 2017, 53(99), 13249-13252.
- ・ M. Kinoshita *et al.* Mechanism of the local anesthetic-induced disruption of raft-like phase separation. *under revision.*

8. キーワード (注：試料及び実験方法を特定する用語を 2～3)

吸入麻酔薬、脂質膜、炭素鎖充填構造

9. 研究成果公開について (注：※2に記載した研究成果の公開について①と②のうち該当しない方を消してください。また、論文(査読付)発表と研究センターへの報告、または研究成果公報への原稿提出時期を記入してください(2018年度実施課題は2020年度末が期限となります)。

長期タイプ課題は、ご利用の最終期の利用報告書にご記入ください。

② 研究成果公報の原稿提出

(提出時期：2019年12月)