

小角 X 線散乱を用いた脂質ラフト様秩序膜に対する局所麻酔薬の結合様式 SAXD reveals binding mode of anesthetic molecules in raft-like ordered membranes

木下祥尚*, 千歳傑, 松森信明*

九州大学理学研究院化学部門生体分析化学研究室

〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744

Masanao KINOSHITA*, Takeshi CHITOSE and Nobuaki MATSUMORI*

Bioanalytical Chemistry Lab., Department of Chemistry, Graduate School of Science,
Kyushu University

744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka, 810-0395, Japan

1 はじめに

麻酔薬の作用機構は現在でも十分解明されておらず、様々な仮説が提唱されている。例えば、幅広く支持されているタンパク質仮説では、麻酔薬がイオンチャンネルに直接作用することで不活性化し、その結果、神経伝達を阻害するという機構が提唱されている。一方で、チャンネルの活性はそれを取り巻く脂質膜の物性にも依存する。実際、麻酔に關与する幾つかのナトリウムチャンネルは、細胞膜に存在する秩序的膜領域「脂質ラフト」に選択的に取り込まれ、機能することが報告されている(図 1a)[1]。この様な先行研究を基に、我々は、局所麻酔薬が脂質ラフトの膜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のではないかと考えている。近年、我々は代表的局所麻酔薬(図 1a)がラフト様/非ラフト様人工相分離に及ぼす影響を調査した。その結果、ジブカインやテトラカインはラフト様秩序膜を効率的に乱すことで相分離を阻害するのに対し、リドカインが相分離に与える影響は小さいことがわかった[2](図 1b)。我々は、この違いが脂質膜に対する麻酔薬の結合様式の差異に起因するのではないかと推測している。本研究では、小角 X 線散乱(SAXD)を用いることでこれらの局所麻酔薬がラフト様秩序膜のどの位置に結合するかについて調査した。

2 実験

脂質ラフトの主要成分であるスフィンゴミエリン(SM C18:0)とコレステロール(chol)を混合した乾燥脂質フィルムを 100 mM 局所麻酔薬溶液に懸濁することで、マルチラメラベシクル(MLV)を作製した。このとき SM と chol の混合比は 7:3 mole/mole とし、脂質の最終濃度は 30 w%とした。作製した MLV はカプトンフィルムを用いて M4 サイズのワッシャー内に封入した。SAXD 測定は Photon factory BL-10Cで行った。波長(1 Å)やカメラ長(540 mm)はベヘン酸銀を用いて校正し、すべての SAXD 測定は 25°Cで行った。試料からの散乱は PILATUS3 2M を用いて検出し、得られた Debye-Scherrer パターンは Fit 2D を用いて 1次元化した(図 2)。1次元化した SAXD プロファイルを式 1 でフィッティングすることで、脂質二重層膜の法線(z 軸)方向の電子密度プロファイルを再構成した。

$$\rho(z) = \frac{2}{L} \sum_{h=1}^{h_{max}} \exp(i\varphi(h)) |F_{obs}(h)| \cos\left(\frac{2\pi h z}{L}\right) \quad (式 1)$$

$\rho(z)$ は膜の法線に沿った電子密度、 z は二重層膜の中心位置($z=0$)からの距離を表す。 h は散乱ピークの次数、 L は脂質膜のラメラ周期、 F_{obs} は構造因子を表す。また位相の符号 $\exp(i\varphi(h))$ は過去の文献で報告された値を用いた[3]。

3 結果および考察

図 3 に示したのは、局所麻酔薬存在下における SM/chol 混合膜の電子密度プロファイルである。比較のため麻酔薬を含まない場合の電子密度プロファイルを、それぞれのプロファイルに重ねて示した。このとき、脂質膜の中心($z=0$)と層間水の中心の電子密度は、麻酔薬に依存しないと仮定した。この仮定の合理性は、以下の事実より支持される。1) 以前より、様々な脂質膜をもちいて局所麻酔薬の結合部位に関する検討がなされているが、膜中心部分($z=0$)に麻酔薬が局在することを示す報告はない。2) 我々の研究により、水層における麻酔薬濃度は脂質膜中に比べて、はるかに小さい($< 1/1,000$)ことが示されている[2]。

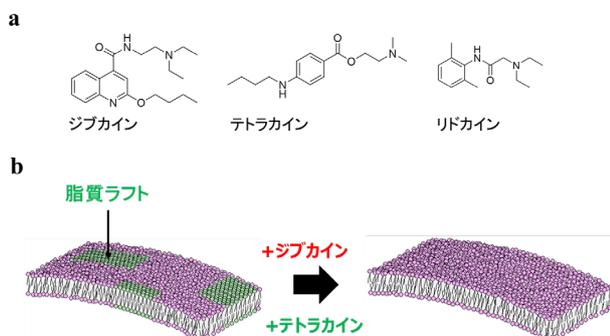


図 1: (a)本研究で用いた局所麻酔薬の構造と(b)ラフト様/非ラフト様相分離に対する局所麻酔薬の影響。

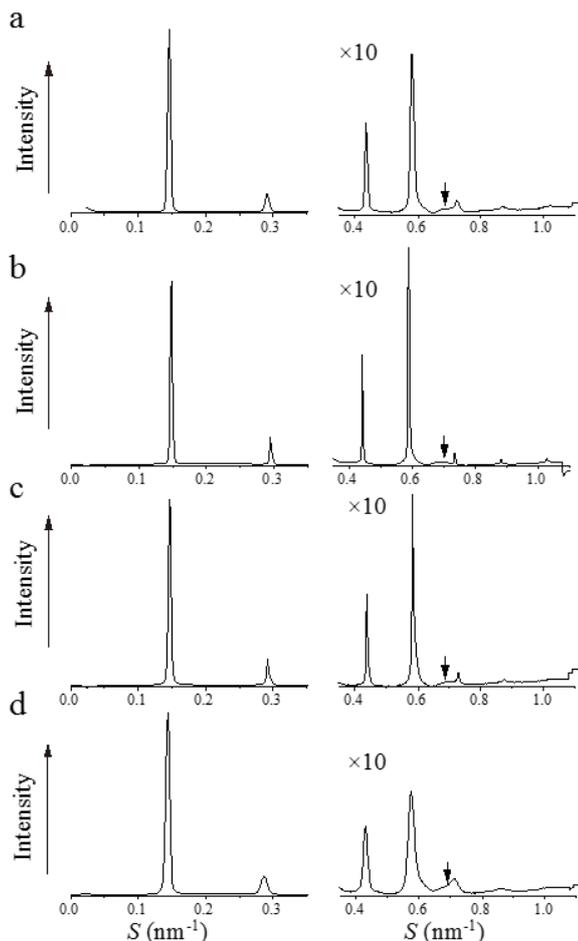


図 2: (a)局所麻酔薬非存在下、100 mM (b) ジブカイン、(c) テトラカインおよび(d)リドカイン存在下における SM/chol 混合膜の SAXD プロファイル。矢印はカプトンに起因する散乱。 $S=2\sin\theta/\lambda$

これらの仮定のもとで電子密度プロファイルを作成し、比較すると、ジブカインやテトラカイン存在下では $z=\pm 0.9$ nm の位置に電子密度の増加が確認できるのに対し(図 3 矢印)、リドカイン存在下では脂質頭部付近の電子密度が増加していることがわかる。電子密度の増加は局所麻酔薬の存在に起因しており、この結果はジブカインやテトラカインは脂質膜の奥深くに結合するのに対し、リドカインは膜表面付近に局在していることを示している。

さらに本研究で得られた結合様式の違いをもとに、§1 で述べた局所麻酔薬のラフト阻害能の差について合理的に説明することができる。つまり、ジブカインやテトラカインは脂質膜疎水部の深くに侵入することで脂質炭素鎖間に生じる van der Waals 相互作用を阻害し、その結果、脂質の充填構造を効率的に乱すことができる。一方、リドカインは膜表面に局在しているため、炭素鎖間に生じる相互作用への寄与が小さく、それゆえ膜の秩序に顕著な変化を与えないと推測できる。

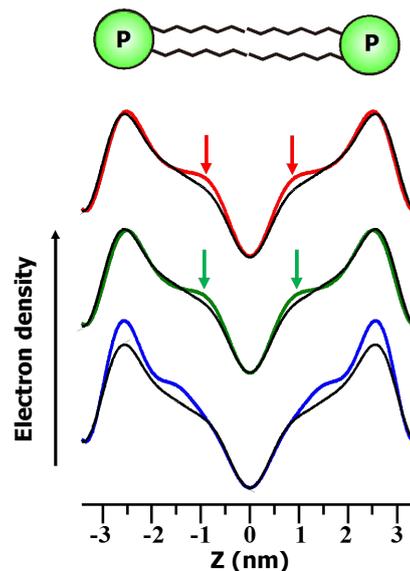


図 3: 100 mM (赤) ジブカイン、(緑) テトラカインおよび(青)リドカイン存在下における SM/chol 混合膜の電子密度プロファイル。麻酔薬を含まない場合のプロファイルをそれぞれのプロファイルに重ねて示した(黒線)。矢印は麻酔薬の存在による電子密度の上昇を示している。

4 まとめ

本研究では、小角 X 線散乱により脂質ラフトを模倣した秩序的な脂質膜に対する局所麻酔薬の結合様式を調査した。その結果、ジブカインやテトラカインは脂質膜の膜奥深くに結合するのに対し、リドカインは膜表面付近に局在していることが明らかになった。また、結合様式に基づき、これら局所麻酔薬が有するラフト形成阻害能の差を合理的に説明することが可能になった。一方、生体膜に存在する脂質ラフトには複数の膜タンパク質や糖脂質などが含まれることが知られており、その構造は人工膜系に比べて複雑である。それゆえ、生体膜系でも人工膜と同様の結果が得られるかどうかについては、さらなる検討が必要である。

謝辞

SAXD 測定に使用した X 線の波長、カメラ長、検出器および試料周辺は高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設清水伸隆教授にセットアップしていただきました。心よりお礼を申し上げます。

参考文献

- [1] W.G. Hill *et al.*, *J. Biol. Chem.* **282**, 37402 (2007).
- [2] M. Kinoshita *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta. –Gen. Sub.* (in press).
- [3] T.J. McIntosh *et al.*, *Biochemistry* **31**, 2012 (1992)

*kinoshi@chem.kyushu-univ.jp;
*matsumori@chem.kyushu-univ.jp