

学 位 論 文 題 名

揮発性麻酔薬の Na^+, K^+ -ATPase と
アルカリ性ホスファターゼにおよぼす影響に関する研究

学位論文内容の要旨

【目 的】

近年、全身麻酔薬は形質膜の脂質に対して非特異的に作用するのではなく、タンパク質に対して作用すると考える説が有力であるが、全身麻酔薬によって影響を受けるタンパク質は多数存在し、その作用様式には不明な点も多い。そこで、揮発性麻酔薬のタンパク質におよぼす作用を解明するための一助として、活性発現に脂質が必須である Na^+, K^+ -ATPase と、活性発現に脂質を必要としないアルカリ性ホスファターゼ(ALP)に対する揮発性麻酔薬の作用について比較検討した。

【材料と方法】

Na^+, K^+ -ATPase はウサギ全脳より得られたミクロソーム分画から Jorgensen らの方法に準じて分離精製を行った。ALP は遺伝子が異なり、酵素学的性質も異なる腎臓型、胎盤型、小腸型を購入して用いた。揮発性麻酔薬はハロタン、セボフルラン、イソフルラン、エンフルラン、ジエチルエーテル、トリクロルエチレン、クロロホルムを購入して用いた。実験はまず、7種類の各揮発性麻酔薬による、 Na^+, K^+ -ATPase 活性、および各 ALP 活性に対する阻害について調べた。 Na^+, K^+ -ATPase 活性測定は ATP 加水分解の結果、生成された無機リン量を定量し、ALP 活性測定は生成されたパラニトロフェノール量を定量して測定した。次に、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を 0.8%、0.1%、0.03% と濃度を変えて加えて、イソフルラン、ハロタン、クロロホルムによる小腸型 ALP 活性阻害に対する影響について調べた。さらに、小腸型 ALP に SDS を加えることにより、実際にサブユニット間の相互作用に変化が生じているか否かを調べるために、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて小腸型 ALP の見かけの分子量を測定した。

【結 果】

1. ウサギ脳 Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する揮発性麻酔薬の作用

実験に用いたすべての揮発性麻酔薬は、濃度に依存して Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害した。トリクロルエチレン、クロロホルムではともに 1% で、ハロタン、ジエチルエーテルでは、それぞれ 2%、10% で活性を完全に阻害した。イソフルラン、セボフルラン、およびエンフルランにおいては濃度依存性に活性を阻害したが、10% でも完全には阻害せず、

イソフルラン、エンフルランで約 15%、セボフルランで約 40%活性が残存した。

2. ALP 活性に対する揮発性麻酔薬の作用

1) 腎臓型 ALP 活性に対する作用

トリクロルエチレンでは 10%でも活性の阻害は観察されず、ハロタン、セボフルラン、イソフルラン、エンフルラン、ジエチルエーテルにおいてもほとんど活性は阻害されなかった。また、クロロホルムでは活性が低下したが高濃度においても約 75%活性が残存した。

2) 胎盤型 ALP 活性に対する作用

胎盤型 ALP に対しては、イソフルラン、トリクロルエチレンでは 10%でも活性を阻害しなかった。ハロタン、セボフルラン、エンフルラン、クロロホルムにおいても顕著な阻害は観察されず、約 90%活性が残存した。ジエチルエーテルにおいては活性の低下が観察されたが 10%でも 75%活性が残存した。

3) 小腸型 ALP 活性に対する作用

実験に用いた揮発性麻酔薬のうちジエチルエーテルを除くすべての揮発性麻酔薬が濃度に依存して小腸型 ALP 活性を阻害した。エンフルラン、クロロホルムは 2%で、ハロタン、イソフルランは 4%でそれぞれ活性を完全に阻害した。トリクロルエチレンとセボフルランも濃度依存性に活性を阻害したが完全には阻害せず、10%でそれぞれ約 10%と約 20%活性が残存した。ジエチルエーテルではほとんど活性は阻害されず、10%でも約 90%活性が残存した。

3. 揮発性麻酔薬による小腸型 ALP 阻害に対する SDS の影響

イソフルランは 4%で活性をほぼ 100%阻害していたが、0.8%の SDS を加えると活性の阻害は観察されず、0.1%、0.03%の SDS 添加でも阻害されなかった。ハロタン、クロロホルムの場合も SDS の添加によって小腸型 ALP に対する作用の濃度依存性は大きく変化し、0.8%、0.1%、および 0.03%の SDS 添加によって、最大でもそれぞれ 20%、30%程度しか活性は低下しなかった。

4. ゲルろ過クロマトグラフィー

SDS 非存在下でゲルろ過クロマトグラフィー後に小腸型 ALP 活性を測定し、標準タンパク質を用いて作成した検量線から小腸型 ALP の見かけ上の分子量を算定すると 63.6 K Da であった。同様に 0.03%の SDS 存在下での小腸型 ALP の見かけ上の分子量を算定すると 58.4 K Da であった。

【考 察】

ALP は PI アンカリングタンパク質として膜の外側に結合して存在し、SDS 存在下でも酵素活性はほとんど変化しないという報告からも、活性発現に脂質を必要としない。本研究において活性発現に脂質を必要としない小腸型 ALP 活性がイソフルラン、ハロタン、セボフルラン、エンフルラン、トリクロルエチレン、クロロホルムによって阻害されたことから、揮発性麻酔薬の作用発現には必ずしも脂質の存在を必要とせず、タンパク質に対して直接作用することが示唆された。すでに脂質を必要としない水溶性のホタルの発光酵素ルシフェラーゼが種々の全身麻酔薬により阻害されるという報告もあり、これらの結果

は全身麻酔薬がタンパク質に対して直接的に作用している可能性を強く示唆している。一方で、実験に用いた揮発性麻酔薬は濃度依存性に Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害し、 Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する IC_{50} 値と MAC 値との間に強い相関関係が見られたことより、揮発性麻酔薬の直接の作用点はタンパク質であるとしても、周囲にある脂質は麻酔薬が溶解し、タンパク質に対して作用する場として機能している可能性があり、膜タンパク質周囲の脂質成分（境界脂質）の麻酔薬による極めて小さな構造変化が膜タンパク質機能に影響を与えている可能性が示唆される。

小腸型 ALP はジエチルエーテル以外の揮発性麻酔薬によって阻害されたのに対して、アイソザイムである腎臓型および胎盤型 ALP は、すべての揮発性麻酔薬によりほとんど活性が阻害されなかった。これらの結果は、全身麻酔薬のタンパク質に対する作用はアイソザイム程度のタンパク質の構造の違いによっても影響されることを示唆する。

ALP の基本構造は 2 つのサブユニット構造からなるダイマーであり、これが活性発現の基本単位とされている。SDS はサブユニット間の相互作用に影響を与えることが知られている界面活性剤であり、また小腸型 ALP を SDS によって処理すると酵素特異的阻害剤に対する反応性が変化し、それは SDS 存在下で小腸型 ALP の構造がダイマーからモノマーに解離することによるとの報告がある。このことから、SDS を添加することにより揮発性麻酔薬による阻害様式が変化したのは、SDS を加えることにより、サブユニット間の相互作用に変化が生じたことによる可能性が考えられた。そこで、小腸型 ALP に SDS を加えることにより、実際にサブユニット間の相互作用に変化が生じるか否かを、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて調べた。小腸型 ALP の見かけ上の分子量は SDS 非存在下では 63.6 K Da、0.03% SDS 存在下では 58.4 K Da であった。この結果は小腸型 ALP は本来モノマーとして機能しており、0.03% SDS 存在下でも同様であることを示唆する。したがって、SDS 存在下で揮発性麻酔薬による阻害様式が変化したのはダイマーからモノマーになることによる変化ではないと推定され、モノマー同士のゆるやかな相互作用に対する影響や SDS によるモノマーの表面構造の変化によって揮発性麻酔薬の作用が影響を受ける可能性が示唆された。

【結 論】

揮発性麻酔薬のタンパク質に及ぼす作用を解明するための一助として、活性発現に脂質が必須である Na^+, K^+ -ATPase と、活性発現に脂質を必要としない ALP に対する揮発性麻酔薬の作用を比較検討し、以下の結論を得た。

(1) 揮発性麻酔薬は Na^+, K^+ -ATPase 活性を濃度依存性に阻害した。さらに、揮発性麻酔薬はその活性に脂質を必要としない小腸型 ALP を抑制したことから、その作用発現には必ずしも脂質を必要とせず、タンパク質に対して直接作用することが示唆された。

(2) 揮発性麻酔薬は腎臓型および胎盤型 ALP は阻害しなかったが小腸型 ALP を阻害したことから、揮発性麻酔薬の作用はアイソザイム程度のタンパク質の構造の違いによって影響されることが示唆された。

(3) SDS 存在下では揮発性麻酔薬による小腸型 ALP 活性の阻害作用は消失した。SDS によって引き起こされる変化によっても影響されることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 章

副 査 教 授 福 島 和 昭

副 査 教 授 福 田 博

学 位 論 文 題 名

揮発性麻酔薬の Na^+ , K^+ -ATPase と

アルカリ性ホスファターゼにおよぼす影響に関する研究

主査、副査が口頭にて論文審査を行った。論文提出者に研究内容の概要の説明を求めた。提出者は以下の内容を明快に説明した。

本研究では、揮発性麻酔薬のタンパク質におよぼす作用を解明するための一助として、活性発現に脂質が必須である Na^+ , K^+ -ATPaseと、活性発現に脂質を必要としないアルカリ性ホスファターゼ(ALP)に対する揮発性麻酔薬の作用について比較検討した。

Na^+ , K^+ -ATPaseはウサギ全脳より得られたミクロソーム分画からJorgensenらの方法に準じて分離精製を行った。ALPは腎臓型、胎盤型、小腸型を購入して用いた。揮発性麻酔薬はハロタン、セボフルラン、イソフルラン、エンフルラン、ジエチルエーテル、トリクロルエチレン、クロロホルムを購入して用いた。実験は7種類の各揮発性麻酔薬による、 Na^+ , K^+ -ATPase活性、および各ALP活性に対する阻害について調べた。さらに、実際にサブユニット間の相互作用に変化が生じているか否かを調べるために、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて小腸型ALPについて、見かけの分子量を測定した。

その結果、1. ウサギ脳 Na^+ , K^+ -ATPase活性に対する揮発性麻酔薬の作用については

実験に用いたすべての揮発性麻酔薬は、濃度に依存して Na^+ , K^+ -ATPase活性を阻害した。

2. ALP活性に対する揮発性麻酔薬の作用で

1) 腎臓型ALP活性に対する作用についてはトリクロルエチレンでは高濃度でも活性の阻害は観察されず、クロロホルムでは活性が低下したが高濃度においても約75%活性が残存し、他の7揮発性麻酔薬においてもほとんど活性は阻害されなかった。

2) 胎盤型ALP活性に対する作用についてはイソフルラン、トリクロルエチレンでは高濃度でも活性を阻害しなかった。ジエチルエーテルにおいては活性の低下が観察されたが高濃度でも75%活性が残存した。他の4揮発性麻酔薬においても顕著な阻害は観察されず、約90%活性が残存した。

3) 小腸型ALP活性に対する作用については

実験に用いた揮発性麻酔薬のうちジエチルエーテルを除くすべての揮発性麻酔薬が濃度に依存して小腸型ALP活性を阻害した。

3. 揮発性麻酔薬による小腸型ALP阻害に対するSDSの影響

イソフルランは4%で活性をほぼ100%阻害していたが、低濃度の0.03—0.8%のSDS添加では阻害されなかった。ハロタン、クロロホルムの場合も低濃度の0.03—0.8%のSDS添加によっては大きな阻害はみられなかった。

4. ゲルろ過クロマトグラフィー

SDS非存在下でゲルろ過クロマトグラフィー後に小腸型ALP活性を測定し、小腸型ALPの見かけ上の分

子量を算定すると63.6 K Daであった。同様に0.03%のSDS存在下での小腸型ALPの見かけ上の分子量を算定すると58.4 K Daであった。

本研究において活性発現に脂質を必要としない小腸型ALP活性がイソフルラン、ハロタン、セボフルラン、エンフルラン、トリクロルエチレン、クロロホルムによって阻害されたことから、揮発性麻酔薬の作用発現には必ずしも脂質の存在を必要とせず、タンパク質に対して直接作用することが示唆された。

小腸型ALPはジエチルエーテル以外の揮発性麻酔薬によって阻害されたが、アイソザイムである腎臓型および胎盤型ALPは、すべての揮発性麻酔薬によりほとんど活性が阻害されなかったことから、全身麻酔薬のタンパク質に対する作用はアイソザイム程度のタンパク質の構造の違いによっても影響されることが示唆された。

ALPの基本構造は2つのサブユニット構造からなるダイマーであり、これが活性発現の基本単位とされている。サブユニット間の相互作用に影響を与える、SDSを添加することにより揮発性麻酔薬による阻害様式が変化した。これはサブユニット間の相互作用に変化が生じたことによる可能性を示唆していると考えられたので、実際にサブユニット間の相互作用に変化が生じるか否かについて、小腸型ALPにSDSを加えることにより、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて調べた。小腸型ALPの見かけ上の分子量はSDS非存在下では63.6 K Da、0.03% SDS存在下では58.4 K Daであった。この結果は小腸型ALPは本来モノマーとして機能しており、0.03% SDS存在下でも同様であることを示唆する。したがって、SDS存在下で揮発性麻酔薬による阻害様式が変化したのはダイマーからモノマーになることによる変化ではなく、モノマー同士のゆるやかな相互作用に対する影響やSDSによるモノマーの表面構造の変化によって揮発性麻酔薬の作用が影響を受ける可能性が示唆された。

これらの事実から、揮発性麻酔薬のタンパク質に及ぼす作用を解明するための一助として、活性発現に脂質が必須であるNa⁺,K⁺-ATPaseと、活性発現に脂質を必要としないALPに対する揮発性麻酔薬の作用を比較検討し、以下の結論が得られた。

(1) 揮発性麻酔薬はNa⁺,K⁺-ATPase活性を濃度依存性に阻害した。さらに、揮発性麻酔薬はその活性に脂質を必要としない小腸型ALPを抑制したことから、その作用発現には必ずしも脂質を必要とせず、タンパク質に対して直接作用することが示唆された。

(2) 揮発性麻酔薬は腎臓型および胎盤型ALPは阻害しなかったが小腸型ALPを阻害したことから、揮発性麻酔薬の作用はアイソザイム程度のタンパク質の構造の違いによって影響されることが示唆された。

(3) SDS存在下では揮発性麻酔薬による小腸型ALP活性の阻害作用は消失した。SDSによって引き起こされる変化によっても影響されることが示唆された。

このような趣旨の論文に対し、次のような質問がなされた。1) ジエチルエーテルのみが小腸型ALPに影響を及ぼさなかった理由について 2) 小腸型ALPのみを抑制して、腎臓型ALP、胎盤型ALPを抑制しない理由について 3) ALPを用いて揮発性麻酔薬の作用機序を調べようとする着想に至った背景について 4) 神経組織におけるALPの存在の有無について 等、これらの質問に対し、申請者は明快な回答を行い、関連分野についても広く詳細な理解があることを認めれた。以上の結果を総合し、合格とした。