

Title	バクテリオロドプシンの分子構造およびプロトンポンプ機能に及ぼす揮発性麻酔薬の影響：麻酔の作用機序に関して
Author(s)	西村, 信哉
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35296
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	にし 西	むら 村	しん 信	や 哉
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	7 6 8 4	号	
学位授与の日付	昭和 62 年 3 月 26 日			
学位授与の要件	医学研究科外科系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当			
学位論文題目	バクテリオロドプシンの分子構造およびプロトンポンプ機能に及ぼす揮発性麻酔薬の影響——麻酔の作用機序に関して——			
論文審査委員	(主査) 教授 吉矢 生人 (副査) 教授 吉田 博 教授 田川 邦夫			

論文内容の要旨

〔目 的〕

全身麻酔薬の分子レベルでの作用機序に関しては未だ不明な点が多い。膜脂質に及ぼす影響については多くの報告があるが、膜蛋白質に及ぼす影響を調べた知見は少ない。バクテリオロドプシンは高度好塩菌である *Halobacterium halobium* の形質膜に形成される紫膜を構成する単一の膜蛋白質である。バクテリオロドプシンは、(1)レチナールを発色団としてもち可視部に吸収を有する、(2)光照射により駆動されるプロトンポンプ機能をもつ、(3)紫膜上で二次元六方格子状に結晶配列をとる、といった特徴を有している。分離精製が容易で分子構造および物性について最もよく研究されている膜蛋白質であるバクテリオロドプシンに注目し、バクテリオロドプシンの分子構造とプロトンポンプ機能に及ぼす揮発性麻酔薬の影響を調べた。

〔方法および成績〕

- (1) 紫膜の精製：Becher & Cassimの方法に従い、*Halobacterium halobium* R 1 M 1 株の細胞膜より分離精製した。以下の実験は暗赤色光下にて行った。
- (2) 可視吸収スペクトルおよび可視円二色性 (CD) スペクトル測定：紫膜を 25mM トリス緩衝液に懸濁し、密封可能な測定用セルを利用して行った。560nm に吸収極大をもつバクテリオロドプシンの吸収スペクトルは濃度依存的に 510nm に等吸収点をもちながら短波長変移し 480nm に吸収極大が生じた。ハロセン 16mM では 380nm の吸収極大が生じた。バクテリオロドプシンの CD スペクトルは 530nm に正の、605nm に負の吸収極大を持つ negative CD couplet pattern を示す。麻酔薬濃度の上昇に従い負の楕円率が減少し正の吸収極大が 480nm に変移していった。

- (3) レチナール異性体分析：Groenendijkらの方法によりレチナールオキシムの形で抽出し高速液体クロマトグラフ（HPLC）にて行った。また鈴木の方法でレチナールの形で抽出してHPLCで分析も行った。暗順応下では、紫膜は、all-transおよび13-cisレチナールの等モル混合物である。麻酔薬濃度の上昇に従い13-cisレチナールが減少し、all-transレチナールが増加した。すなわち、麻酔薬によって13-cisからall-transレチナールへ異性化が生じた。
- (4) X線回析：メトキシフルレンを作用させた紫膜をX線回析用キャピラリー（1 mm ϕ ）に封入しサンプルとした。銅特性X線（1.54 Å）をエリオットのトロイダルカメラに入射し、回析パターンを宇宙線観測用フィルムに記録した。麻酔薬によって回析パターンが不鮮明になった。X線ビームの照射されたサンプルは白く変色していた。
- (5) 青膜の作成：紫膜懸濁液を陽イオン交換樹脂カラムに通過させ脱イオンした。紫膜の表層に結合している陽イオンを取り除くと吸収極大が560nmから605nmに長波長変移して青膜となる。揮発性麻酔薬はこの青膜の吸収極大を濃度依存的に短波長へと変移させた。この青膜の吸収スペクトル変化は紫膜に比べ低濃度で効果があり、麻酔薬に対する感受性増大が認められた。青膜でのレチナールの異性体比は、all-trans : 13-cis = 3 : 2であり、麻酔薬投与により紫膜と同様にall-transレチナールが増加した。
- (6) バクテリオロドプシンの磷脂質ベシクルへの組み込み：Rackerのオクチルグルコサイド希釈法によって大豆磷脂質ベシクルにバクテリオロドプシンを組み込んだ。光照射によりバクテリオロドプシンはベシクル外側から内側へとプロトンを能動輸送する。
- (7) バクテリオロドプシンのプロトンポンプ機能の測定：(6)で作成したバクテリオロドプシを組み込んだベシクル懸濁液の光照射によるpH変化を連続的に測定した。バリノマイシン非存在下においては、麻酔薬の低濃度領域ではプロトンポンプ機能は増大、高濃度領域では抑制と二相性を示した。バリノマイシン存在下においては、濃度依存的にプロトンポンプ機能は抑制され、同時に測定したベシクル懸濁液の吸収スペクトルと良い相関を示した。

[総 括]

バクテリオロドプシンをモデル膜蛋白質として膜蛋白質におよぼす揮発性麻酔薬の影響を検索した。

- (1) バクテリオロドプシンの560nmの吸収極大はレチナールとそれを取り囲む溶媒としてのオプシンの分子間相互作用による。吸収スペクトル変化は、麻酔薬がこの蛋白質の分子構造に影響し、レチナールとの相互作用を変えたためと考えられる。CDスペクトルの変化はレチナール周囲の蛋白質構造の変化によってもたらされたと考えられる。麻酔薬によって生じるレチナールの異性化も蛋白質構造の変化を示唆する。これらの結果より、揮発性麻酔薬は可逆的かつ非特異的にバクテリオロドプシンの疎水性部分に結合し疎水的相互作用を弱め分子構造変化をもたらしたと考えられる。
- (2) 揮発性麻酔薬は可逆的にバクテリオロドプシンのプロトンポンプ機能を抑制し、この抑制作用は吸収スペクトルから得られた分子構造変化と良い相関があった。

揮発性麻酔薬は非特異的に膜蛋白質の疎水的部分に作用して構造変化をもたらし膜機能を抑制すると考えられる。

論文の審査結果の要旨

膜蛋白質の分離精製が容易でないため膜蛋白質に及ぼす麻酔薬の影響についての報告は少ない。本研究はバクテリオロドプシンをモデル膜蛋白質として用い、バクテリオロドプシンの分子構造、プロトンポンプ機能に及ぼす揮発性麻酔薬の影響を検索し、揮発性麻酔薬が分子構造を変化させその構造変化が機能の抑制を引き起こすことを明らかにした。この結果は揮発性麻酔薬が膜蛋白質に直接影響を与える可能性を示唆しており、全身麻酔の作用機序の解明にとって価値ある論文として認める。