



Title	Direct Inhibition of Microtubule-based Kinesin Motility by Local Anesthetics
Author(s)	宮本, 善一
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41818">https://hdl.handle.net/11094/41818</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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	みやもと よし かず 宮 本 善 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 3 2 3 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Direct Inhibition of Microtubule-based Kinesin Motility by Local Anesthetics (局所麻酔薬による微小管モーター蛋白キネシン運動能の直接阻害作用)
論文審査委員	(主査) 教授 真下 節  (副査) 教授 柳田 敏雄 教授 吉矢 生人

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

局所麻酔薬は神経細胞の速い軸索輸送を用量依存性・可逆的に抑制することが知られているが、その作用機序は明らかではない。速い軸索輸送を担う微小管モーター蛋白キネシンスーパーファミリーは、小胞や細胞内小器官に結合し、軸索を構成する微小管に沿って滑り運動することにより輸送を行う。本研究は、局所麻酔薬がキネシン運動能に及ぼす直接作用を蛋白質分子レベルで明らかにし、局所麻酔薬による速い軸索輸送抑制の機序を解明することを目的とした。

#### 【方法ならびに成績】

##### (1) in vitro motility assay

キネシン及び微小管構成蛋白チューブリンはウシ脳から抽出精製した。チューブリンに蛍光色素 tetramethylrhodamine をラベルし、重合させて蛍光微小管を作成した。キネシン分子をカバーガラス表面にまばらに吸着させ、その上に蛍光微小管・ATPを含むbuffer (pH7.4、イオン強度100mM)を灌流した。蛍光微小管がカバーガラス表面を滑り運動する様子を落射型蛍光顕微鏡下に観察・記録した。

局所麻酔薬非存在下で半数以上の微小管に滑り運動が認められる系に、リドカイン50mMあるいはテトラカイン5mMを溶解したbufferを灌流すると、全ての微小管の滑り運動が即座に停止した。再び局所麻酔薬を含まないbufferで灌流すると、最初とほぼ同じ割合の微小管が滑り運動を再開した。局所麻酔薬の灌流前後で微小管の滑り運動速度に差は認められなかった。対象となった微小管の長さについても差は認められなかった。QX-314 (リドカインの常時荷電体) 50mMについても、リドカイン50mMとほぼ同様の結果が得られた。

##### (2) 1分子運動アッセイ

近年、エバネッセント照明によるガラス表面の局所照明を応用した全反射型蛍光顕微鏡により、水溶液中で蛍光標識した蛋白質1分子を可視化することが可能となった。大腸菌にヒトキネシン (uhK560Cys) を発現させ、蛍光色素 Cy 3 を導入した (uhK560Cys-Cy 3)。微小管は蛍光色素 Cy 5 で標識した。シリコンコートした石英ガラス表面に蛍光微小管を吸着させ、その上に蛍光キネシン・ATPを含むbuffer (pH7.4、イオン強度29mM)を灌流した。蛍光キネシン1分子が微小管上を滑り運動する様子を全反射型蛍光顕微鏡下に観察・記録し、種々の濃度のテトラカイン (局所麻酔薬) を存在下におけるキネシン1分子の挙動 (結合レート・滑走距離・滑走速度) を解析した。

テトラカインは、個々のキネシン分子の微小管上滑走距離を用量依存性に抑制した。滑走距離に対するテトラカインの  $K_i$  は 5.1mM で、この濃度では微小管に結合しても滑り運動しないキネシン分子が大半となった。微小管に対するキネシン分子の結合率については、局所麻酔薬の有無による差は認められなかった。

### (3) ATPase 活性測定

キネシンは、ATP 加水分解の化学エネルギーにより運動するモーター蛋白である。modified Malachite-Green method を用い、局所麻酔薬存在下・非存在下におけるキネシン ATPase 活性を測定した。buffer 条件は 1 分子運動アッセイと同じとした。

用いた全ての局所麻酔薬は、キネシン運動能を阻害する濃度において、キネシン ATPase 活性に影響を与えなかった。

#### 【総括】

*in vitro* motility assay の系にて、局所麻酔薬はキネシン運動能を直接阻害すること、この阻害作用は完全に可逆的であることが示された。リドカインの常時荷電体である QX-314 がリドカインと同等の作用を示したことから、この作用は主に局所麻酔薬の荷電型によるものと考えられた。

キネシン 1 分子の動態解析により、局所麻酔薬はキネシン分子が微小管上を滑走する距離を用量依存性に抑制すること、キネシン分子と微小管との結合率を妨げないことが示された。

キネシン運動能を阻害する濃度の局所麻酔薬存在下でもキネシン ATPase 活性は影響を受けないことから、この阻害作用はキネシンの運動サイクルのうち、ATP 加水分解以降の段階を阻害することによるものであることが示唆された。

本実験においてキネシン運動能を阻害した局所麻酔薬濃度は、これまでに神経細胞の速い軸索輸送を抑制すると報告されている局所麻酔薬濃度とよく一致した。したがって、キネシン運動能の直接阻害作用が、局所麻酔薬による軸索輸送阻害作用の主因であることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

局所麻酔薬には本来の神経遮断作用以外に、神経細胞の軸索輸送阻害をはじめとする様々な作用の存在が知られているが、その作用メカニズムがまだ明らかではない。速い軸索輸送を担うのは微小管モーター蛋白キネシンスーパーファミリーである。キネシンは小胞や細胞内小器官に結合し、軸索を構成する微小管に沿って滑り運動することにより輸送を行うことが知られている。本研究は、モーター蛋白キネシンの *in vitro* motility assay 及び最新の生物物理学的手法である 1 分子運動アッセイを用い、キネシン運動能に対する局所麻酔薬の直接作用を蛋白質 1 分子レベルで明らかにし、局所麻酔薬による軸索輸送抑制のメカニズムを解明することを目的としたものである。

キネシンは元来少数分子で機能する蛋白質であるため、多分子系での計測では薬物の影響を定量することは困難である。そのため、*in vitro* motility assay では微小管の滑り運動が認められる下限にキネシン分子数をコントロールし、この条件において局所麻酔薬はその荷電型がキネシン運動能を直接・可逆的に阻害することを見いだした。さらに 1 分子運動アッセイにより、局所麻酔薬は個々のキネシン分子の微小管上の滑走距離を用量依存性に抑制すること、微小管に対するキネシン分子の結合率には影響を与えないことを明らかにした。また、局所麻酔薬存在下においてもキネシン ATPase 活性は影響を受けないことから、この阻害作用はキネシンの運動サイクルのうち ATP 加水分解以降の段階を阻害することによるものであることを示した。本研究においてキネシン運動能を阻害した局所麻酔薬の濃度は、これまでに神経細胞の速い軸索輸送を抑制すると報告されている濃度とよく一致した。従って、局所麻酔薬による軸索輸送阻害作用は、キネシン運動能の直接阻害作用によるものであることが明らかとなった。

本研究は、局所麻酔薬のキネシン運動能直接阻害作用を、最新の生物物理学的手法を用いて蛋白質 1 分子レベルで詳細に解明したものであり、この阻害作用が局所麻酔薬による軸索輸送阻害作用の主因であることを示した重要な知見である。さらに、軸索輸送阻害作用以外の局所麻酔薬による副作用にもモーター蛋白の関与する現象が多いことから、それらの作用メカニズムをモーター蛋白分子の直接的な抑制作用として一元的に説明し得る可能性を示したものであり、今後の局所麻酔薬の作用メカニズムに関する研究に極めて大きく貢献するものである。よって本論文を学位に値するものと認める。