The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	吸入麻酔薬イソフルランの酵母細胞への作用機序の研究
Author(s)	高津, 芙美
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61651
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　高津芙美　）	
論文題名	吸入麻酔薬イソフルランの酵母細胞への作用機序の研究

論文内容の要旨

＜目的＞

全身麻酔は現代の医療において、外科的手術の際には必要不可欠である。麻酔薬は生体内に取り込まれると意識消失、不動化、自律神経の抑制など多様な作用をもたらす。これまで吸入麻酔薬が中枢神経系の多くの領域で神経伝達を阻害することが報告されており、最終的な作用部位はシナプス膜であるという説が最も有力である。しかし麻酔薬がどのようにしてシナプス膜に作用しているのか、その細胞レベルでの作用機序には未だ不明な点が多く、特に吸入麻酔薬の作用機序は事実上ほぼ不明であるとされている。現在提唱されている仮説は大きく膜脂質説と膜タンパク質説に分けられる。膜脂質説では麻酔薬が神経細胞内の脂質に非特異的に作用して膜構造を変化させ、麻酔作用を引き起こすとされる。しかし膨大な量のターゲットが存在するにも関わらず、麻酔作用という特異的な作用が生じるのはなぜかを説明できないとされる。一方、膜タンパク質説では麻酔薬が$GABA_A$受容体に代表される膜タンパク質に直接結合し、膜の働きを抑制するとされる。しかしながら化学構造が大きく異なる麻酔薬でも同じような全身麻酔作用を生じることや、単一のタンパク質への影響のみで麻酔薬がもつ様々な作用を説明することは不可能であるといわれている。このような状況を鑑み、従来とは全く異なったアプローチをとることによりブレークスルーがもたらされる可能性を考えた。

出芽酵母は生命現象の基本的な分子機構が真核生物でも概ね保存されていること、また詳細な分子機構の解明が容易であるということから、真核生物の様々な実験系のモデルとして用いられる。これまで出芽酵母は吸入麻酔薬のひとつであるイソフルラン処理により増殖が阻害され、細胞膜上に存在するアミノ酸トランスポーターの過剰発現によりその増殖阻害が回復するという報告がなされている。そして今回、出芽酵母の細胞膜上に存在するBap2をはじめとするトランスポーターが、イソフルラン処理によりエンドサイトーシスされ液胞へ輸送されることを見出した。本研究ではその詳細な機序を解析することで、イソフルランが膜タンパク質や細胞膜にどのような影響を与えるかを理解し、ヒトにおける麻酔薬の作用機序を解明する手がかりを得ることを目的とした。

＜方法＞

これまでの報告では気相にてイソフルラン処理を行っていたが、本研究では液相でイソフルラン処理を行うことで、実際に細胞が生体内で麻酔薬に暴露される環境により近づけることを試みた。イソフルランは常温において液体であるが高い揮発性を持つため、通常の培養環境では一定濃度を細胞に暴露させることが困難であった。そこでシリンジと専用のキャップを用いて密閉環境を作り出すことで、十分な濃度のイソフルラン暴露を可能とする環境下で酵母を液体培養する実験系を確立した。出芽酵母BY4741株のゲノム上の*BAP2*やその他の因子にGFPを付加し、蛍光顕微鏡にてその局在を観察した。またエンドサイトーシス関連遺伝子など各種の欠失株や発現抑制株を作製し、イソフルラン処理によるBap2の局在への影響を観察した。さらにウェスタンブロッティングにてSch9のリン酸化およびBap2のユビキチン化を確認した。

＜結果＞

出芽酵母に対し液相にてイソフルラン処理を行うと、細胞の生育はイソフルラン濃度依存的に阻害され、イソフルラン濃度が0.08%のときに非添加時の約半分の細胞数となった。次に細胞膜上のトランスポーターが局在の点で影響を受けている可能性を調べるため、イソフルラン処理を行いいくつかのトランスポーターの局在の変化を観察した。アミノ酸トランスポーターBap2はイソフルラン非存在下では細胞膜に局在したが、イソフルラン処理により

多くの細胞でBap2が典型的な液胞局在のパターンを示した。その他のトランスポーターもBap2より効率は落ちるがイソフルラン処理により液胞に局在する現象がみられた。このように、イソフルランがいくつかのトランスポーターの動態に影響することが明らかとなった。エンドサイトーシス欠損*Δend3*株ではその現象がみられず、Bap2の液胞への輸送はエンドサイトーシスによるものであると考えられた。これまで細胞増殖のマスター制御因子であるTORC1の抑制作用をもつラパマイシン処理によりBap2の分解が促進されることが知られている。そこでラパマイシン処理後にBap2の局在を観察したところ、液胞へ輸送される現象がみられ、エンドサイトーシスが促進されていることが確認された。イソフルランはBap2のエンドサイトーシスおよび分解を促進することから、ラパマイシンと同様にTORC1を抑制してこれらの現象を制御している可能性を検討した。しかしながらTORC1の基質であるSch9はラパマイシン処理では脱リン酸化されるのに対し、イソフルラン処理では影響を受けず、この場合のBap2のエンドサイトーシスにはTORC1とは別の制御機構が関与すると考えられた。

細胞膜上のトランスポーターや受容体タンパク質の多くは、栄養飢餓や細胞ストレスなどの環境の変化に応じてユビキチンリガーゼRsp5の働きによりユビキチン化を受け、エンドサイトーシスされることで量的調節される。そこでRsp5の発現抑制株を作製しイソフルラン処理を行ったところ、Bap2は液胞へ移行せず細胞膜に局在した。このことからイソフルラン処理によるBap2のエンドサイトーシスはRsp5依存的であることがわかった。また、イソフルラン処理時にはBap2のユビキチン化が起こっていることも確認された。Rsp5はトランスポーターをユビキチン化する際、各種アダプタータンパク質によりそれぞれのトランスポーターの元へリクルートされるモデルが提唱されている。そこでイソフルラン処理によるBap2のエンドサイトーシスに関わるアダプタータンパク質を同定する目的で、各種アダプタータンパク質の欠失株を作製しスクリーニングを行った。その結果Art2欠失株で、イソフルラン処理後もBap2のエンドサイトーシスが抑制された。Art2の局在を観察したところ、イソフルラン処理により細胞質から細胞膜近辺へ集積することも明らかとなった。この変化はイソフルラン処理後30分経過してから観察され、増加傾向にあった。

＜考察＞

本研究では吸入麻酔薬の作用機序の解明を目指し、イソフルランを酵母細胞に対し液相で作用させる実験系を確立することで細胞膜上のアミノ酸トランスポーターがユビキチン化依存的に液胞へエンドサイトーシスされることを見出した。これは従来知られているTORC1による制御ではなく別の機序がはたらいていると考えられる。今回イソフルランがアダプタータンパク質Art2を介してBap2のエンドサイトーシスを促進することが判明した。Art2の細胞膜近辺への集積にはイソフルラン処理開始から30分程度を要し、この間イソフルラン処理により生じるBap2の何らかの構造変化が重要であると考えられる。今後、今回見出したArt2依存的なエンドサイトーシスを指標に、イソフルランがBap2の二次構造、三次構造にどのような変化を及ぼすのかを調べることが可能になったと思われる。また今回の結果ではイソフルラン処理によりエンドサイトーシスされるトランスポーターによりその程度が異なることもわかった。今後はこれらのトランスポーターの特徴を比較し、なかでもBap2がイソフルランにより最も影響を受ける理由を解明することで、イソフルランが膜タンパク質に与える変化を解明できるかもしれない。それに基づき、ヒトのシナプス膜においてイソフルランが様々な受容体や電位依存型チャネルなどにどのような変化を与えるかを解明するために行うべきアプローチが得られることが期待される。例えば$GABA_A$受容体がイソフルランの影響により活性化状態になっている可能性なども想定される。その原理が将来的に、より便利で安全な麻酔薬開発の基盤とされることを期待したい。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　高津　芙美　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	野田　健司
	副 査	教授	西村　理行
	副 査	准教授	中澤　敬信
	副 査	講師	相川　友直

論文審査の結果の要旨

本研究は吸入麻酔薬イソフルランの生体への作用機序を探求することを目的とし、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデルとした解析を行った。

0.08%イソフルラン処理により酵母細胞の増殖は低下し、その際、細胞膜中の中性アミノ酸トランスポーターBap2 がエンドサイトーシスされ液胞へと輸送される現象を見出した。Bap2 のエンドサイトーシスはユビキチン E3 リガーゼに依存しており、実際 Bap2 のイソフルラン処理に依存したユビキチン化も観察され、Art2　Rsp5 が関わるその機構も解析した。これらのことはイソフルランが Bap2 自身またはその膜環境に何らかの影響を与え、その変化を Art2 が直接あるいは間接的に検知していることを示唆している。今後、その影響の実態をさらに追求することで、吸入麻酔薬がヒトの中枢神経において与える影響を解析する手がかりが得られることが期待される。以上の結果は博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。