



Title	Na, K-ATPase活性のフッ素による阻害
Author(s)	沖野, 雄一郎
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第11253号
Issue Date	2014-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k11253
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/56152
Type	theses (doctoral)
File Information	Yuichiro_Okino.pdf



[Instructions for use](#)

博士論文

Na,K-ATPase 活性のフッ素による阻害

平成 26 年 3 月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

沖野 雄一郎

【抄録】

う蝕予防に使用されるフッ化物はその毒性が問題とされるが、急性毒性の機構に関しては不明な点が多い。そこで、動物細胞に普遍的に存在して細胞機構の調節に関与する Na,K-ATPase に対するフッ素 (F) の作用を検討した。材料はラット脳由来精製 Na,K-ATPase を用い、各種条件下での ATPase 活性とリン酸化反応中間体 (EP) 量を測定し、F の作用を調べた。① F は Na,K-ATPase 活性とその部分反応である Na-ATPase 活性と K-pNPPase 活性を濃度依存的に阻害した。アルミニウム (Al) が F と共存すると F による阻害を増強させたが、作用は 100 μ M で飽和した。② F 濃度を希釈すると Na,K-ATPase 活性の一部は可逆的に回復したが、Al が共存すると完全に不可逆的となった。またこの Al の作用には Na,K-ATPase 活性に不可欠なマグネシウムが必要だったが、他の 2 価金属であるカルシウムあるいはマンガンも同様の作用を示した。③ EP 形成量も F 濃度に依存して減少し、Al が共存すると EP 形成抑制に必要な F 濃度を低下するとともに EP 量も減少させた。しかし、活性が完全に抑制される F 濃度でも 50% 以上の EP が残存した。④ 以上の Al による作用は Al のキレート作用を示す deferoxamine によって低下した。以上の結果は、① F は濃度依存的に Na,K-ATPase 活性と EP 形成を阻害する、② Al は Na,K-ATPase の F に対する親和性を増大させる、③ Na,K-ATPase 活性の F による阻害にはアルミニウムの関与しない可逆的阻害とアルミニウムの関与する不可逆的な阻害がある、④ 不可逆的な阻害にはフッ素とアルミニウムの共存と 2 価金属イオンの存在が必須である、⑤ 存在する半分のサブユニットしかリン酸化されず、半分はリン酸化されない half of the site reactivity の存在、が示唆された。

キーワード

- ① Na,K-ATPase、② フッ素、③ アルミニウム、④ リン酸化反応中間体、⑤ half of the site reactivity

【緒言】

フッ化物 (F) は腐蝕予防に広く応用されているが、急性毒性及び慢性毒性が制限要素となり応用の範囲が限定されている。F の急性毒性に関しては、フッ化ナトリウム (NaF) の成人に対する致死量が約 5 g、小児では約 0.5 g 程度と推定されている。初期症状は F の小腸粘膜に対する局所作用であるとされ、やがて全身的に中枢神経系の症状、循環器系の抑制から心不全、そして呼吸抑制により死亡する場合があるとされるが、具体的なタンパク質等のターゲットに関しては明らかではない^{1,2)}。

F は不可逆的に Na,K-ATPase 活性を抑制するとの報告は古くからあったが³⁻⁶⁾、その抑制機構の詳細については不明であった。しかし Sternweis と Gilman が、F がアデニル酸シクラーゼ活性を促進する際にアルミニウム (Al) が必要であることを報告したこと⁷⁾がきっかけとなり、Robinson らは Na,K-ATPase 活性抑制機構を再検討し、Al の共存により Na,K-ATPase 活性の抑制が不可逆的になることを見出した⁸⁾。我々は、Na,K-ATPase 活性の抑制が F の急性中毒の一因となる可能性があると考えた。本研究では、F の Na,K-ATPase 阻害機構の解明を目的に、まず Na,K-ATPase 活性及び部分反応である Na-ATPase と K-pNPPase 活性に対する NaF とフッ化カリウム (KF) の作用を検討し、次いで Na,K-ATPase が ATP 加水分解反応中に形成するリン酸化反応中間体 (EP) に対する F の作用を検討した。また、F の作用に及ぼす Al の影響について詳細に解析した。

【材料と方法】

1. ラット脳からの Na,K-ATPase の精製

Jorgensen の方法⁹⁾を改良した方法に準じて、ラット脳より得られた膜分画から Na,K-ATPase の精製を行った。膜分画をタンパク質量 1 mg 当たり 0.55 mg の sodium dodecyl sulfate (SDS) にて処理¹⁰⁾した後、グリセロールの密度勾配遠心にかけて分画した¹¹⁾。得られた酵素標品の比活性は、21.9-43.1 nmol Pi / min / mg protein であった。

2. ATP 加水分解活性測定

Na,K-ATPase 活性測定は、1.5 μ g のラット脳由来精製 Na,K-ATPase、25 mM sucrose、0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、50 mM tris-HCl (pH 7.4)、160 mM NaCl、16 mM KCl、5 mM MgCl₂ を含んだ反応液 250 μ l に、最終濃度 5 mM となる ATP-tris を 50 μ l 加えて反応を開始し、37°C で 30 分間インキュベーションした後 300 μ l の 12 % SDS を添加して反応を停止した。酵素反応の結果生じた無機リンを Chifflet 法¹²⁾に従って、HITACHI U-2000 分光光度計にて 850 nm で定量し ATPase 活性を測定した。Na,K-ATPase の特異的な阻害剤である 1 mM ouabain 存在下で検出される値をブランクとして差し引いた。Na,K-ATPase 活性測定の反応液から 16 mM KCl を除いて 12.2 μ g のラット脳由来精製 Na,K-ATPase を用いて同様に

ATPase 活性を測定した結果を Na-ATPase 活性とした。ただし Na-ATPase 活性は ATP 加水分解活性が低いため、インキュベーション時間は 60 分間とした。Na-ATPase 活性は 12 % SDS 存在下で検出される値をブランクとして差し引いた。

ATPase 活性に対する NaF あるいは KF の作用を調べる実験では、反応液に各種濃度の NaF あるいは KF を添加し、上記の方法で ATPase 活性を測定した。

また、Al の効果を調べるために種々の濃度の AlCl_3 及び Al のキレーターである deferoxamine を添加して、同様に ATPase 活性を測定した。

3. K-*p*NPPase 活性の測定

パラニトロフェニルリン酸 (*p*NPP)加水分解は、9.1 μg の精製酵素、25 mM sucrose、0.1 mM EDTA、50 mM tris-HCl (pH 7.4)、20 mM KCl、5 mM MgCl_2 を含む 200 μl の反応液に各種濃度の KF の有無で、最終濃度 16 mM となる *p*NPP-tris を 200 μl 加えて反応を開始し、37°C で 30 分間インキュベーションした後に 1.25 % Na_2CO_3 と 2 % SDS を含む 1 ml の溶液を添加して反応を停止した。酵素反応の結果生じたパラニトロフェノール (*p*NP)を 420 nm の吸光度で定量して比活性を計算した¹³⁾。

4. 希釈実験

NaF による ATPase 活性の阻害が不可逆的になる条件を調べるための希釈実験は、14.9 μg の精製酵素と 25 mM sucrose、0.1 mM EDTA、50 mM tris-HCl (pH 7.4)、160 mM NaCl、16 mM KCl 及び 5 mM MgCl_2 を含む溶液を基本溶液とし、NaF 添加の有無で行った。コントロールは、基本溶液を室温で 30 分インキュベーション後、基本溶液の各組成の濃度を変えずに酵素濃度のみ 10 倍に希釈してから上記の 2 で記載したように Na,K-ATPase 活性を測定した。NaF、Al、deferoxamine 及び 2 価金属イオンの作用を調べる実験においては、基本溶液に 2.5 mM NaF、各種濃度の AlCl_3 、deferoxamine、 MgCl_2 、 MnCl_2 、 CaCl_2 及び BeSO_4 を添加して 30 分インキュベーション後、基本溶液の組成以外の添加物の濃度を 10 倍に希釈してから Na,K-ATPase 活性を測定した。

5. リン酸化反応中間体量の測定

リン酸化反応中間体 (EP) 量の測定は以下のように行った^{14,15)}。18.6 μg の Na,K-ATPase と 25 mM sucrose、0.1 mM EDTA、25 mM tris-HCl (pH 7.4)、40 mM NaCl、1 mM MgCl_2 及び 20 μM ^{32}P -ATP を加えた 50 μl の溶液で 37 °C で反応を行った。F、F+Al 及び 2 価金属イオンの効果を調べる実験においては各実験において示した濃度の NaF、 AlCl_3 及び 2 価金属イオンを添加して測定を行った。反応は 5 μl の ^{32}P -ATP を加えて開始し、10 秒後に 3 mM ATP-2Na を含む 5 % trichloroacetic acid (TCA) 5 ml を加えて反応を停止した。変性させた EP はガラスファイバーフィルターに

て捕捉した後、1 N 塩酸、10 mM リン酸、10 mM ポリリン酸を含む溶液 10 ml にて 3 回洗浄した。その後、Aloka LSC-5100 液体シンチレーションカウンターを用い、 $E^{32}P$ 量を測定した。

6. 試薬

実験にはすべて特級試薬を使用した。

7. データ処理

結果は、1 つの測定条件に対して 3 点測定した平均値と標準偏差で示した。また統計学的検定は Student's *t*-test により行い、コントロールに対して有意水準 $p < 0.05$ を*、 $p < 0.01$ を**で示した。

【結果】

1. NaF 濃度に依存した Na,K-ATPase 活性の阻害と Al の影響

Na,K-ATPase 活性は NaF の濃度に依存して阻害され、最終濃度 5 mM でほぼ 100 % の活性が阻害され、Hill plot から求めた 50 % 阻害濃度 ($K_{i0.5}$) は 1.38 mM であった (Fig.1a 及び Table 1)。

次に最終濃度 0、2、10、100、200 μ M の $AlCl_3$ 存在下での Na,K-ATPase 活性阻害の NaF 濃度依存性を調べた (Fig.1a)。本研究で用いた濃度 (0-200 μ M) の Al 単独では Na,K-ATPase 活性の阻害作用はほぼ観察されなかった (結果は示さない)。Al 存在下では存在する Al 濃度に依存してより低濃度の NaF で活性が抑制され、最終濃度 100 μ M のとき F 濃度 1.25 mM で活性がほぼ 0 になった。Al の効果は 100 μ M で飽和し、さらに濃度を上げて同じ結果であった。 $K_{i0.5}$ は Al 非添加の 1.38 mM から 100 μ M の Al 存在下の 0.34 mM まで Al 濃度依存的に顕著な減少を示した (Table 1)。

また F と同じ第 17 族元素のハロゲンであるヨウ素 (I) を用いて、F と同様の作用があるかを調べた。Al の有無にかかわらず I 濃度を増加させても Na,K-ATPase 活性は全く阻害されなかった (結果は示さない)。

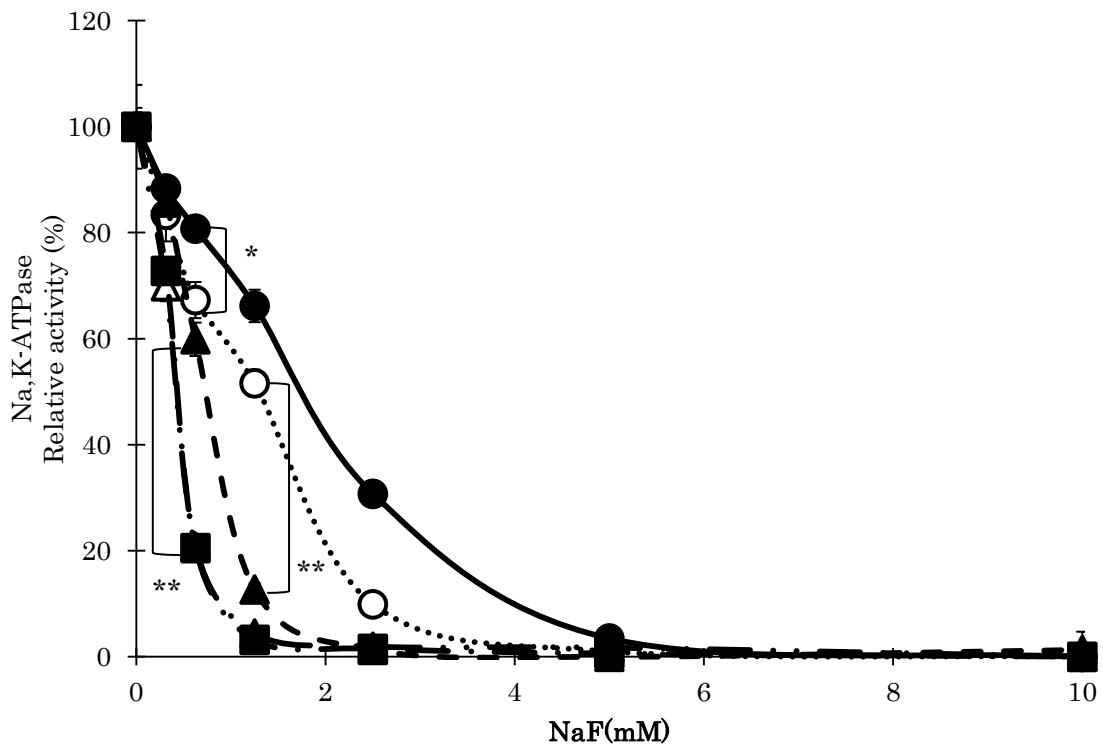


Fig.1a Na,K-ATPase 活性の NaF による阻害と Al の影響

1.5 μ g の精製したラット脳 Na,K-ATPase に、最終濃度 25 mM sucrose、0.1 mM EDTA、50 mM tris-HCl (pH 7.4)、160 mM NaCl、16 mM KCl、5 mM MgCl₂、0 (●)、2 (○)、10 (▲)、100 (△)、200 μ M (■)の AlCl₃ を含む反応液に最終濃度 0、0.31、0.63、1.25、2.5、5、10 mM の NaF を添加した上で、最終濃度 5 mM となる ATP を加えて反応を開始し、37°C で 30 分間インキュベーションした後に 12% SDS を添加して反応を停止した。酵素反応の結果生じた無機リンを Chifflet 法を用いて測定した。1 mM ouabain 存在下の測定値をblankとして差し引いた。Al 非存在下では Na,K-ATPase 活性は F 濃度に依存して抑制され、 $K_{i0.5}$ は 1.38 mM であった。Al 存在下では非存在下と比較してより低濃度の NaF で活性が抑制され、 $K_{i0.5}$ は Al 非添加の 1.38 mM から 100 μ M の Al 存在下の 0.34 mM まで Al 濃度依存的に顕著な減少を示したが、200 μ M まで Al の濃度を上げてても 100 μ M の Al と同様の値であった。** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

	NaF		KF
	Ki _{0.5} (mM)		Ki _{0.5} (mM)
Al (μ M)	Deferoxamine (-)	Deferoxamine (+)	Deferoxamine (-)
0	1.38	2.00	1.46
2	1.28	2.09	1.35
10	0.71	1.98	0.71
100	0.34	1.53	0.36
200	0.37	-	0.37

Table 1 Na,K-ATPase 活性の F による阻害の Ki_{0.5} (deferoxamine の影響)

2. Al 存在下の F による Na,K-ATPase 活性阻害に対する deferoxamine の影響

Al に対するキレート作用を示す deferoxamine¹⁶⁻¹⁸⁾は、最終濃度 1.5 mM までは Na,K-ATPase 活性及び活性測定方法に顕著な影響を及ぼさなかった(結果は示さない)。

Al 存在下での F による Na,K-ATPase 活性阻害に対する deferoxamine の影響を調べた(Fig.1b 及び Table 1)。Deferoxamine 非添加(Fig.1a)と比較して F による活性阻害に対する 2 及び 10 μ M の Al の作用は消失した。Al が 100 μ M では F による Na,K-ATPase 活性阻害を増強したが、deferoxamine 非添加と比較して作用の程度は減少した。

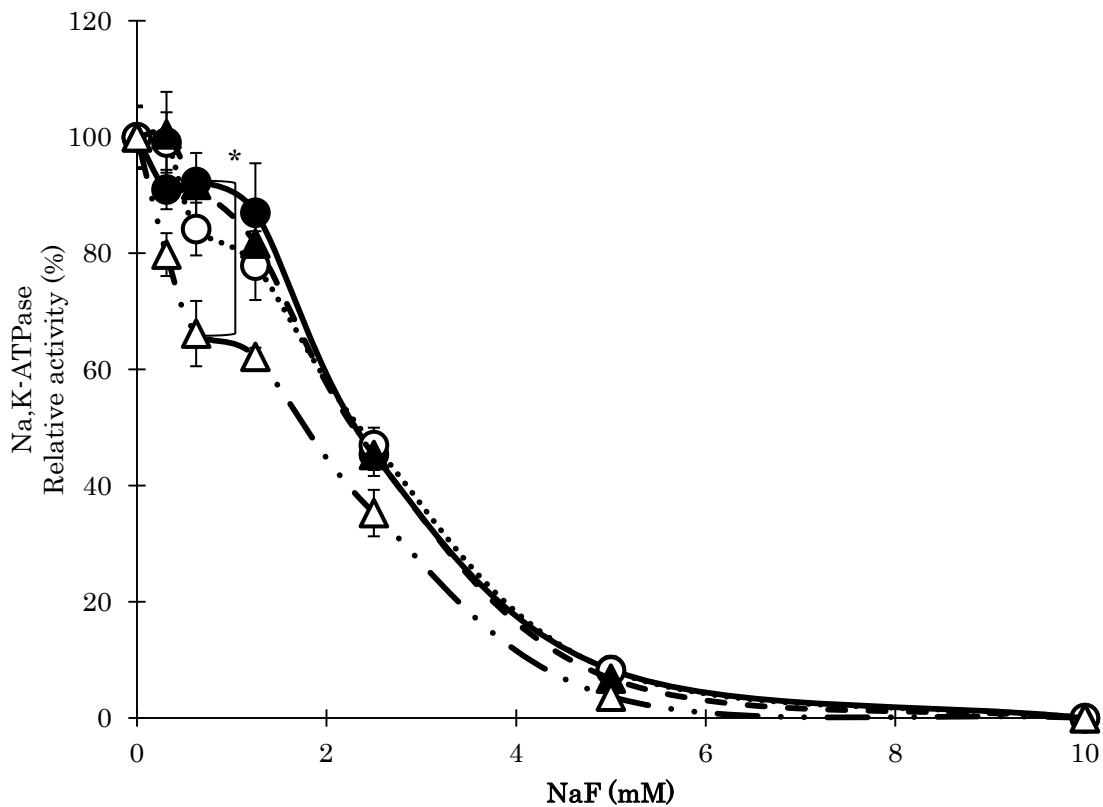


Fig.1b deferoxamine 存在下での Na,K -ATPase 活性の NaF による阻害と Al の影響
 1 mM deferoxamine 存在下、0 (●)、2 (○)、10 (▲)、100 μ M (Δ)の AlCl₃ を含む
 反応液で、Fig.1a と同様の方法で Na,K-ATPase 活性阻害に対する NaF の濃度依存
 性を測定した。Deferoxamine 非添加の Fig.1a と比較すると、Na,K-ATPase 活性抑制に
 より高濃度の NaF を必要とした。Ki_{0.5} は 0 から 10 μ M の Al までは同じ値だが、100 μ
 M では減少した。*p<0.05

3.KF 濃度に依存した Na,K-ATPase 活性の阻害と Al の影響

Na,K-ATPase 活性は KF の濃度に依存して阻害され、最終濃度 5 mM でほぼ 100 %
 の活性が抑制された (Fig.2)。Ki_{0.5} は 1.46 mM であった (Table 1)。KF による
 Na,K-ATPase 活性阻害に対する Al の作用を調べた(Fig.2)。Na,K-ATPase 活性は存
 在する Al 濃度に依存してより低濃度の KF で阻害され、最終濃度 100 μ M のとき F
 濃度 1.25 mM で活性がほぼ 0 になった。Ki_{0.5} は Al 非添加の 1.46 mM から 100 μ M
 の Al 存在下の 0.36 mM まで Al 濃度依存的に顕著な減少を示したが、その効果は 100
 μ M の Al で飽和した (Table 1)。

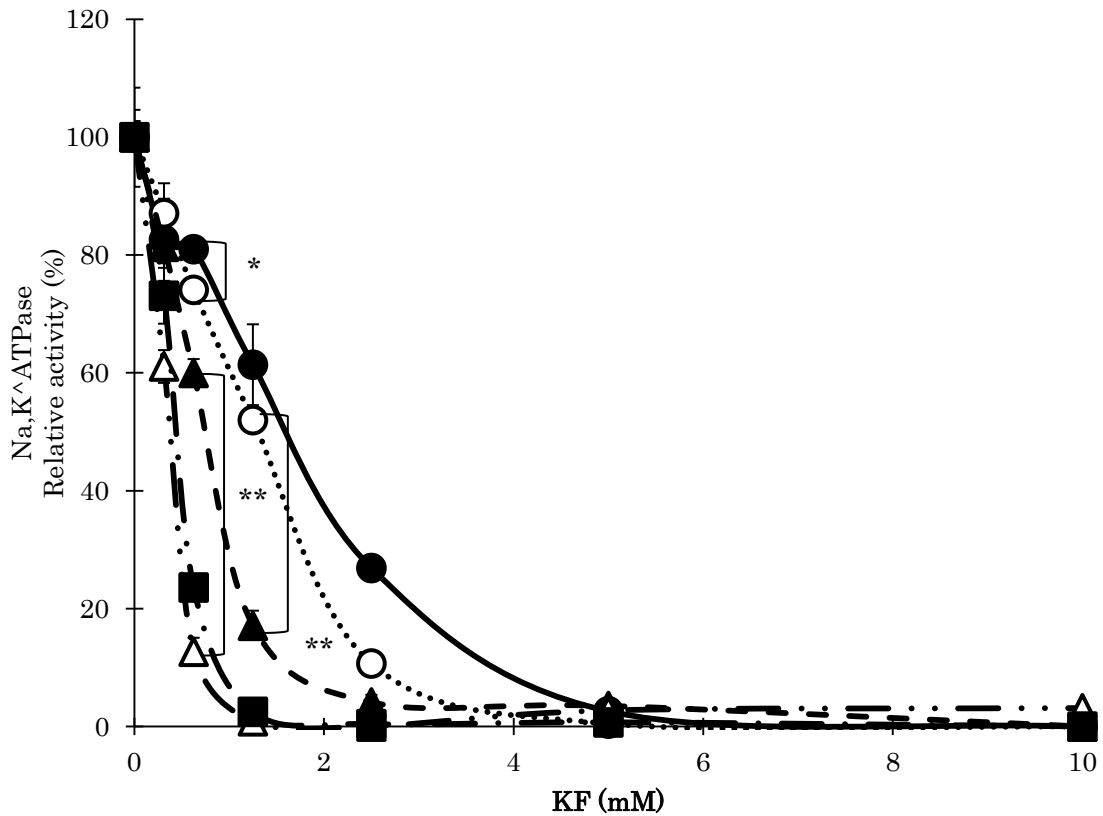


Fig.2 Na,K-ATPase 活性の KF による阻害と Al の影響

KFを用いて、0 (●)、2 (○)、10 (▲)、100 (△)、200 μM (■)の AlCl₃を含む反応液で、Fig.1a 同様に Na,K-ATPase 活性の KF による阻害を測定した。Al 非存在下では Na,K-ATPase 活性は KF 濃度に依存して抑制され、 $K_{i0.5}$ は 1.46 mMであった。Al 存在下では非存在下と比較してより低濃度の KF で活性が抑制され、 $K_{i0.5}$ は Al 非添加の 1.46 mM から 100 μM の Al 存在下の 0.36 mM まで Al 濃度依存的に顕著な減少を示したが、200 μM まで Al の濃度を上げて 100 μM の Al と同様の値であった。
** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

4.NaF 濃度に依存した Na-ATPase 活性の阻害と Al の影響

Na,K-ATPase 活性の部分反応である Na-ATPase 活性は、NaF 濃度に依存して阻害され、最終濃度 10 mM で 70 %程度活性が阻害され、 $K_{i0.5}$ は 3.15 mM であった (Fig.3a、Table 2)。NaF による Na-ATPase 活性阻害に対する Al の影響を調べた (Fig.3a)。Al 存在下では Al 濃度に依存してより低濃度の F で活性が抑制され、最終濃度 100 μM のとき F 濃度 10 mM で活性がほぼ 0 になった。Al の作用は 100 μM で飽和した。 $K_{i0.5}$ は Al 非添加の 3.15 mM から 100 μM の Al 存在下の 0.64 mM まで Al 濃度依存的に顕著な減少を示した (Table 2)。

Deferoxamine 存在下で Na-ATPase 活性の NaF による阻害実験を行ったところ、Al

存在下でも、Na-ATPase 活性の阻害に、より高濃度の NaF を必要とした(Fig.3b)。

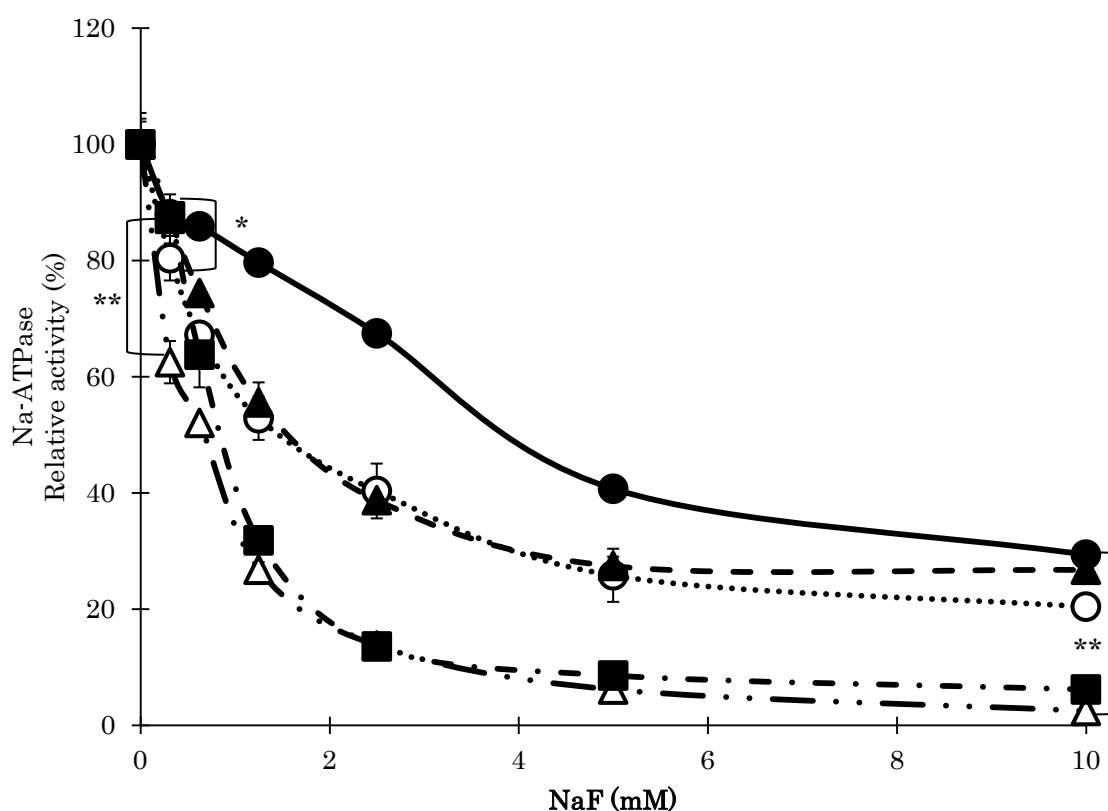


Fig.3a Na-ATPase 活性の NaF による阻害と Al の影響

12.2 μg の精製したラット脳 Na,K-ATPase を使用したこと、Na,K-ATPase 活性測定の際の反応液の組成から KCl を除いたことと、インキュベーション時間を 60 分間とした以外は Fig.1a 同様の方法で測定した活性を Na-ATPase 活性とし、0 (●)、2 (○)、10 (▲)、100 (△)、200 μM (■) の AlCl_3 を含む反応液で測定した。ブランクには ouabain のかわりに 12% SDS を用いた。Al 存在下では非存在下と比較してより低濃度の F で活性が抑制され、最終濃度 100 μM のとき F 濃度 10 mM で活性がほぼ 0% になった。しかし Al 濃度をこれ以上高くしても 100 μM とほぼ同じ結果になった。 $K_{i0.5}$ は Al 非添加の 3.15 mM から 100 μM の Al 存在下の 0.64 mM まで Al 濃度依存的に顕著な減少を示したが、200 μM まで Al の濃度を上げても 100 μM の Al と同様の値であった。** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

Deferoxamine (-)	
Al (μ M)	Ki _{0.5} (mM)
0	3.15
2	1.52
10	1.73
100	0.64
200	0.78

Table 2 Na-ATPase 活性の F による阻害の Ki_{0.5}

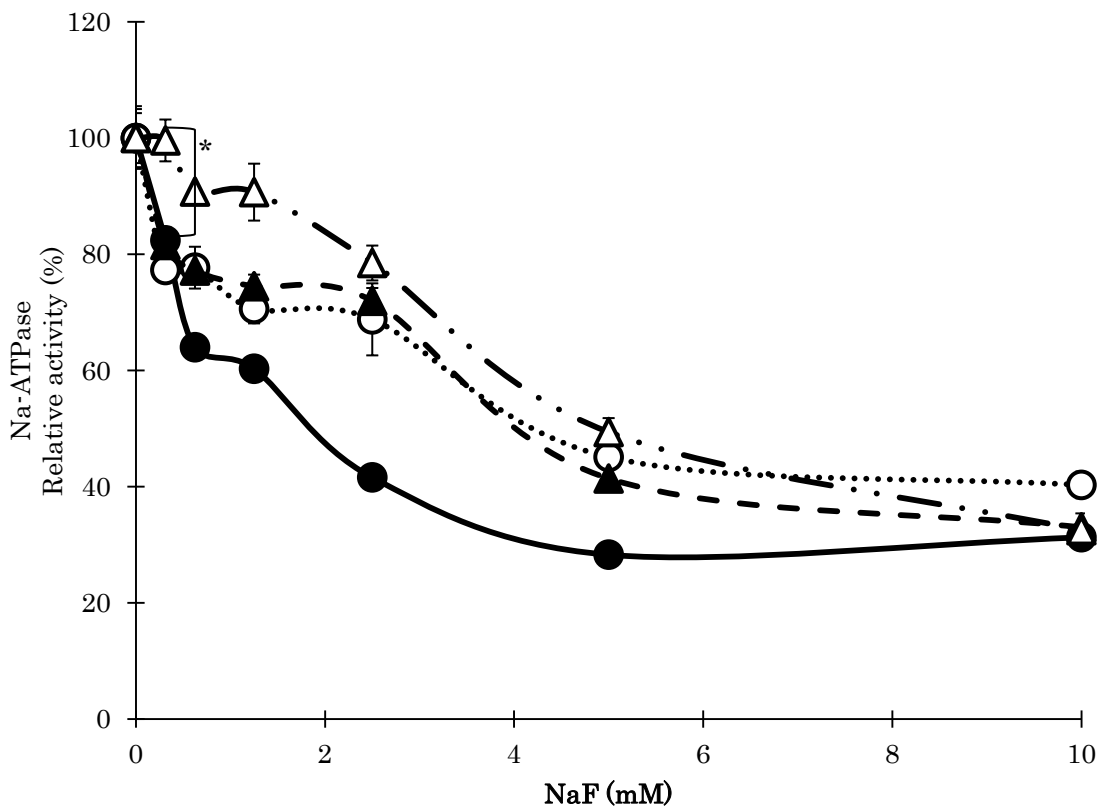


Fig.3b Deferoxamine 存在下での Na-ATPase 活性の NaF による阻害と Al の影響

1 mM deferoxamine 存在下、0 (●)、2 (○)、10 (▲)、100 μ M (Δ)の AlCl₃を含む反応液中で、Fig.3a と同様の方法で Na-ATPase 活性阻害に対する NaF の濃度依存性を測定した。Deferoxamine 非添加の Fig.3a と比較すると、Al が共存しても活性は完全には抑制されず、また、Al の濃度が高い方が活性抑制により高濃度の NaF を必要とした。*p<0.05

5. KF 濃度に依存した K-pNPPase 活性の阻害と Al の影響

Na,K-ATPase は、K 結合酵素の状態では部分反応として pNPP 加水分解活性 (K-pNPPase 活性)を示す¹⁹⁾。K-pNPPase 活性は、KF 濃度に依存して阻害され、最終濃度 2.5 mM で活性がほぼ 100 %阻害され、 $K_{i0.5}$ は 0.50 mM であった (Fig.4a、Table 3)。KF による K-pNPPase 活性阻害に対する Al の作用を調べた (Fig.4a)。K-pNPPase 活性は存在する Al 濃度に依存してより低濃度の KF で活性が抑制され、最終濃度 100 μ M のとき KF 濃度 0.63 mM で活性がほぼ 0 になった。 $K_{i0.5}$ は Al 非添加の 0.50 mM から 100 μ M の Al 存在下の 0.07 mM まで Al 濃度依存的に顕著な減少を示した (Table 3)。

Deferoxamine 存在下で K-pNPPase 活性の KF による阻害実験を行ったところ、Al 濃度に関係なく KF による活性抑制の程度がほぼ同じであった(Fig.4b、Table 3)。

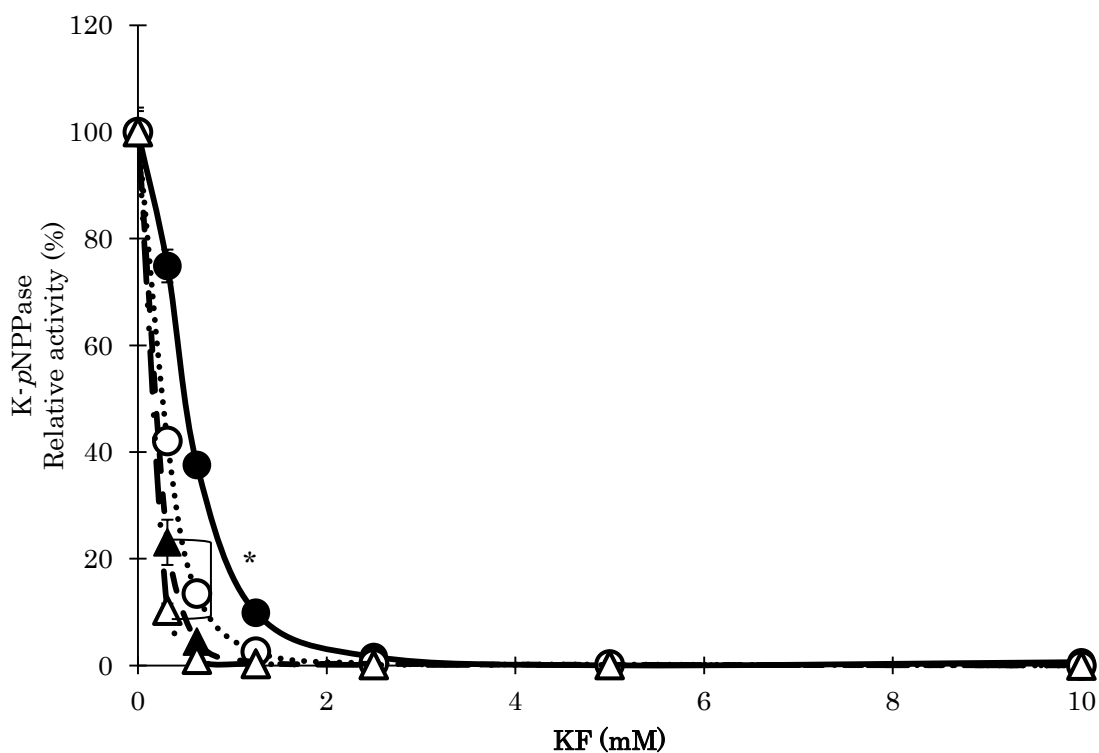


Fig.4a K-pNPPase 活性の KF による阻害と Al の影響

0 (●)、2 (○)、10 (▲)、100 μ M (△)の AlCl₃ の有無で、9.1 μ g の精製した Na,K-ATPase に、最終濃度 25 mM sucrose、0.1 mM EDTA、50 mM tris-HCl (pH 7.4)、20 mM KCl、5 mM MgCl₂を含む反応液に 0、0.31、0.63、1.25、2.5、5、10 mM の KF を添加した上で、16 mM となる pNPP-tris を加えて反応を開始し、37°C で 30 分間インキュベーションした後に 1 ml の 1.25 % Na₂CO₃ と 2 % SDS を含む溶液を添加して反応を停止した。酵素反応の結果生じたパラニトロフェノール (pNP) を 420 nm の吸光度で

定量して活性を測定し、比活性を計算した。F 濃度に依存して活性は阻害され、最終濃度 2.5 mM でほぼ 100 %の活性が抑制された。Al 存在下ではより低濃度で活性が抑制され、 $K_{i0.5}$ は Al 非添加の 0.50 mM から 100 μ M の Al 存在下の 0.07 mM まで Al 濃度依存的に顕著な減少を示した。* $p < 0.05$

	Deferoxamine (-)	Deferoxamine (+)
Al (μ M)	$K_{i0.5}$ (mM)	$K_{i0.5}$ (mM)
0	0.50	0.53
2	0.28	0.53
10	0.14	0.50
100	0.07	0.54

Table 3 K-pNPPase 活性の KF による阻害の $K_{i0.5}$ (deferoxamine の影響)

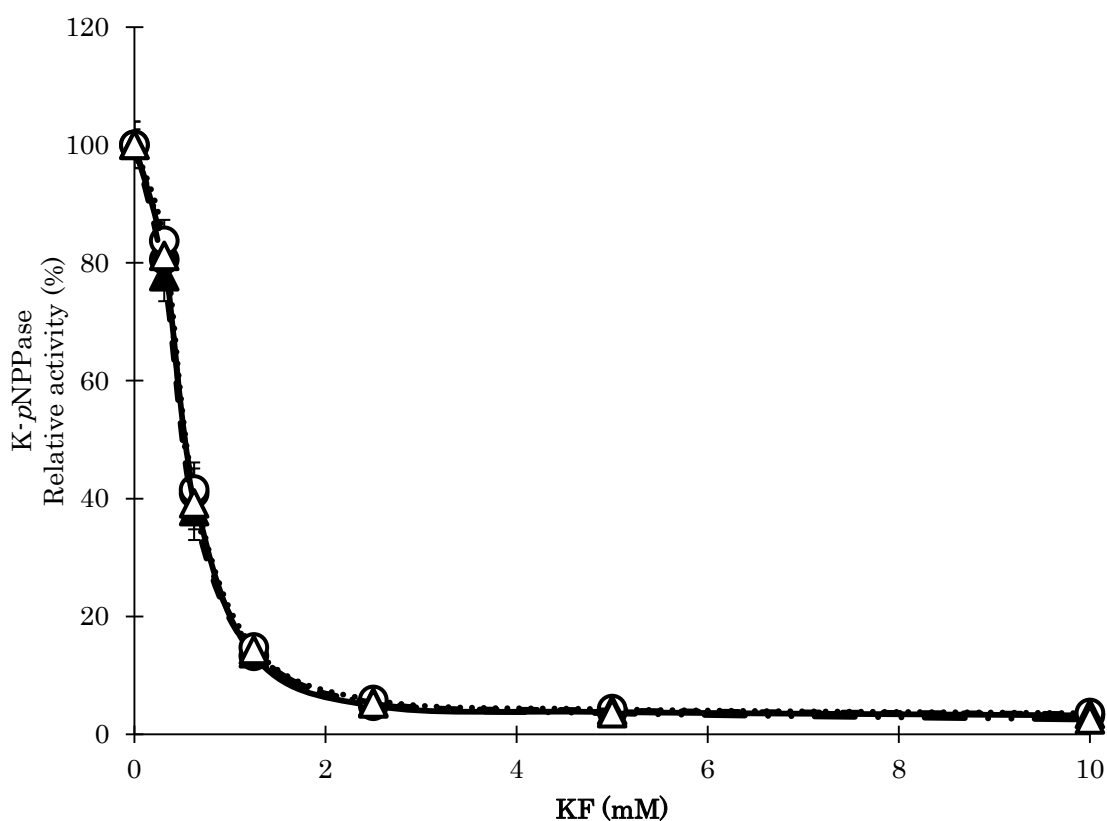


Fig.4b deferoxamine 存在下での K-pNPPase 活性の KF による阻害と Al の影響

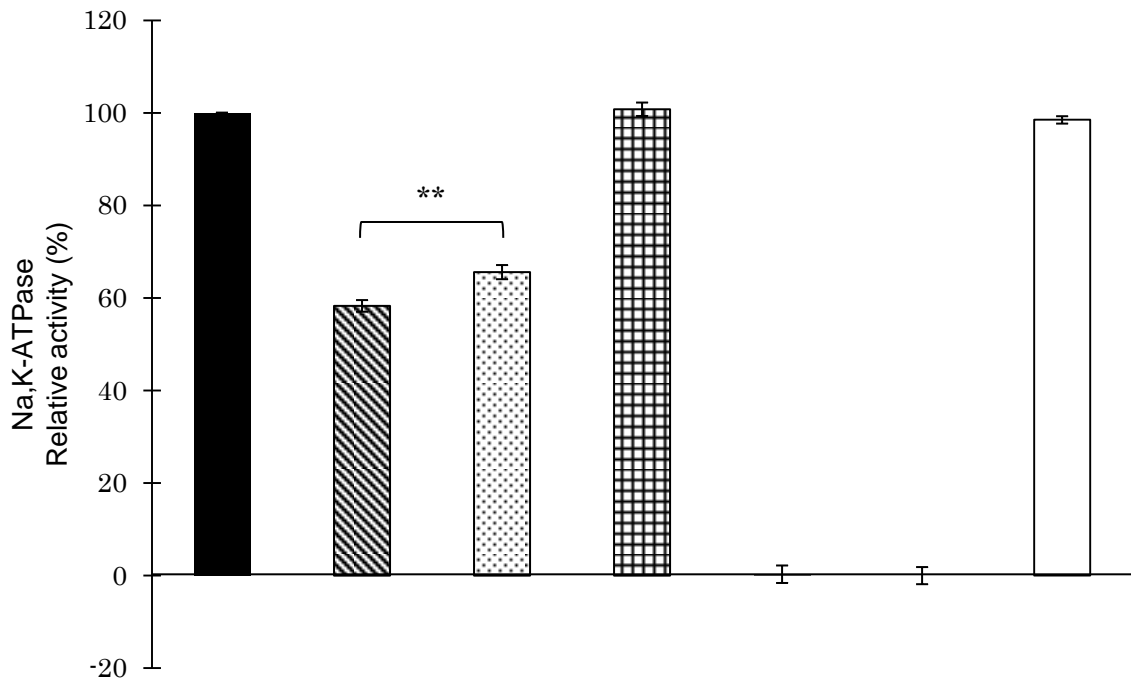
1 mM deferoxamine 存在下、0 (●)、2 (○)、10 (▲)、100 μ M (Δ)の $AlCl_3$ を含む反応液で、Fig.4aと同様の方法でK-pNPPase 活性阻害に対するKFの濃度依存性を測定した。Deferoxamine 存在下では、KFによる活性阻害に対するAlの増強効果は消失した。

6.F による不可逆的な Na,K-ATPase 活性阻害の Al と 2 価金属イオン要求性

2.5 mM の NaF 存在下で Na,K-ATPase をプレインキュベーションした後に、希釈により NaF の濃度を 0.25 mM に下げて活性を測定すると、観察される活性はコントロールの約 60 %であった (Fig.5)。プレインキュベーションの際に 0.1 mM の Al が共存すると希釈しても活性は回復せず、ほぼ 100 %の活性が不可逆的に抑制された。Al が存在しても F が存在しないとき、また F と Al が共存しても Mg が存在しないときは、不可逆的な活性の阻害は観察されなかった。Deferoxamine は F と Mg 存在下の希釈による活性の可逆性を軽度増大したが、F と Mg に Al が共存すると無効であった。

Mg の役割を他の 2 価金属でも代用が可能か否かを調べるために、5 mM の $MgCl_2$ 、 $MnCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、 $BeSO_4$ 存在下での希釈実験を行った (Fig.6)。その結果、Mn、Ca、Be も Mg と同様に、F と Al による Na,K-ATPase 活性阻害を不可逆的にする作用を有することが示され、その程度は $Mg > Mn > Ca = Be$ であった。

また F による Na,K-ATPase 活性の阻害に Al の共存が必須であるか否かを確認するために、各種濃度の deferoxamine 存在下、Al 非添加で、Na,K-ATPase 活性の NaF による阻害を調べた (Fig.7)。2 μM 以上の deferoxamine が存在すると、Na,K-ATPase 活性抑制に必要な NaF の濃度を増加させたが、deferoxamine 濃度を 1.5 mM まであげても NaF による Na,K-ATPase 活性抑制を消失させることはできなかった (Table 4)。また、2.5 mM の NaF 及び様々な濃度の deferoxamine 存在下で Na,K-ATPase をプレインキュベーションした後に、希釈により NaF の濃度を 0.25 mM に下げて活性を測定した (Fig.8)。1.5 μM 以上の deferoxamine が存在すると不可逆的阻害がある程度消失した。一方、0.1 mM の $AlCl_3$ が共存すると deferoxamine を添加しても不可逆的阻害は消失しなかった。



(%)	100	58.3	65.6	100.8	0.3	0.0	98.5
Mg	+	+	+	+	+	+	-
F	-	+	+	-	+	+	+
Al	-	-	-	+	+	+	+
deferoxamine	-	-	+	-	-	+	-

Fig.5 F による Na,K-ATPase 活性の不可逆的阻害における Mg と Al の必要性

14.9 μ g の Na,K-ATPase を 25 mM sucrose、0.1 mM EDTA、50 mM tris-HCl (pH 7.4)、160 mM NaCl、16 mM KCl 存在下で、5 mM MgCl₂、2.5 mM NaF、0.1 mM AlCl₃、deferoxamine の有無で室温にて 30 分間インキュベーション後、10 倍希釈した。その後 Fig.1 と同様に、Na,K-ATPase 活性を測定した。NaF を添加していないサンプルを control とした。2.5 mM の NaF 存在下で Na,K-ATPase をプレインキュベーションした後に、希釈により NaF の濃度を 0.25 mM に下げて活性を測定すると、観察される活性は control の約 60 %であった。プレインキュベーションの際に 100 μ M の Al と Mg が共存すると希釈後の活性はほぼ 100 %不可逆的に抑制された。**p<0.01

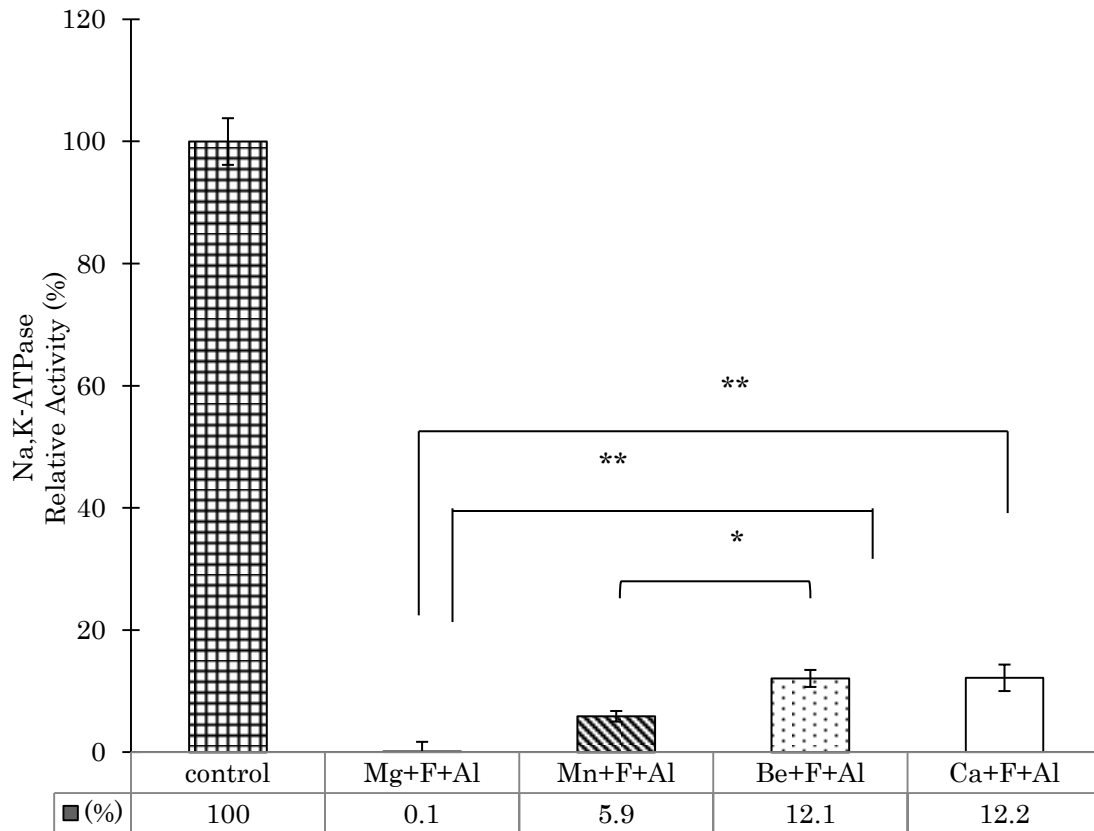


Fig.6 F による Na,K-ATPase 活性の不可逆的阻害の 2 価金属イオン要求性

14.9 μ g の Na,K-ATPase を 25 mM sucrose、0.1 mM EDTA、50 mM tris-HCl (pH 7.4)、160 mM NaCl、16 mM KCl、2.5 mM NaF、100 μ M AlCl₃ 及び 5 mM MgCl₂、CaCl₂、MnCl₂、BaSO₄ の有無で室温で 30 分間インキュベーション後、10 倍希釈してから、Na,K-ATPase 活性を測定した。5 mM MgCl₂ 存在下、NaF と AlCl₃ 非存在下の希釈後の活性を 100 % とすると、5 mM MgCl₂、NaF と AlCl₃ 存在下の活性はほぼ 0 % となった。同様の効果は CaCl₂、MnCl₂、BaSO₄ でも認められ、その程度は Mg > Mn > Ca = Be であった。**p < 0.01、*p < 0.05

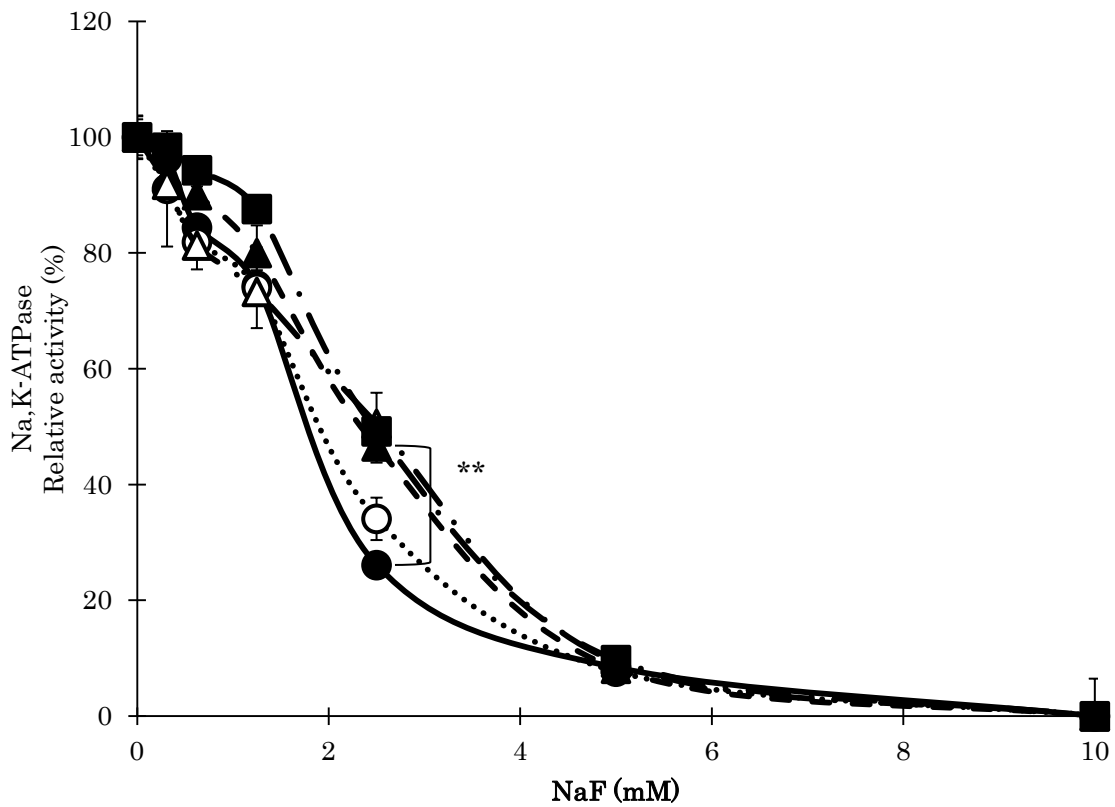


Fig.7 Na,K-ATPase 活性の NaF による阻害に対する deferoxamine の影響

種々の濃度の deferoxamine (0 (●)、0.0002 (◆)、0.002 (○)、0.02 (◇)、1.5 mM (×))を含む反応液で、Fig.1a と同様の方法で Na,K-ATPase 活性の NaF 濃度依存性を測定した。Deferoxamine が 0.002 mM 以上だと NaF による Na,K-ATPase 阻害に必要な濃度を増加させた。**p<0.01

Deferoxamine (mM)	Ki _{0.5} (mM)
0	1.61
0.0002	1.63
0.002	2.47
0.02	2.69
1.5	2.50

Table 4 Na,K-ATPase 活性の NaF による阻害の Ki_{0.5} (deferoxamine の影響)

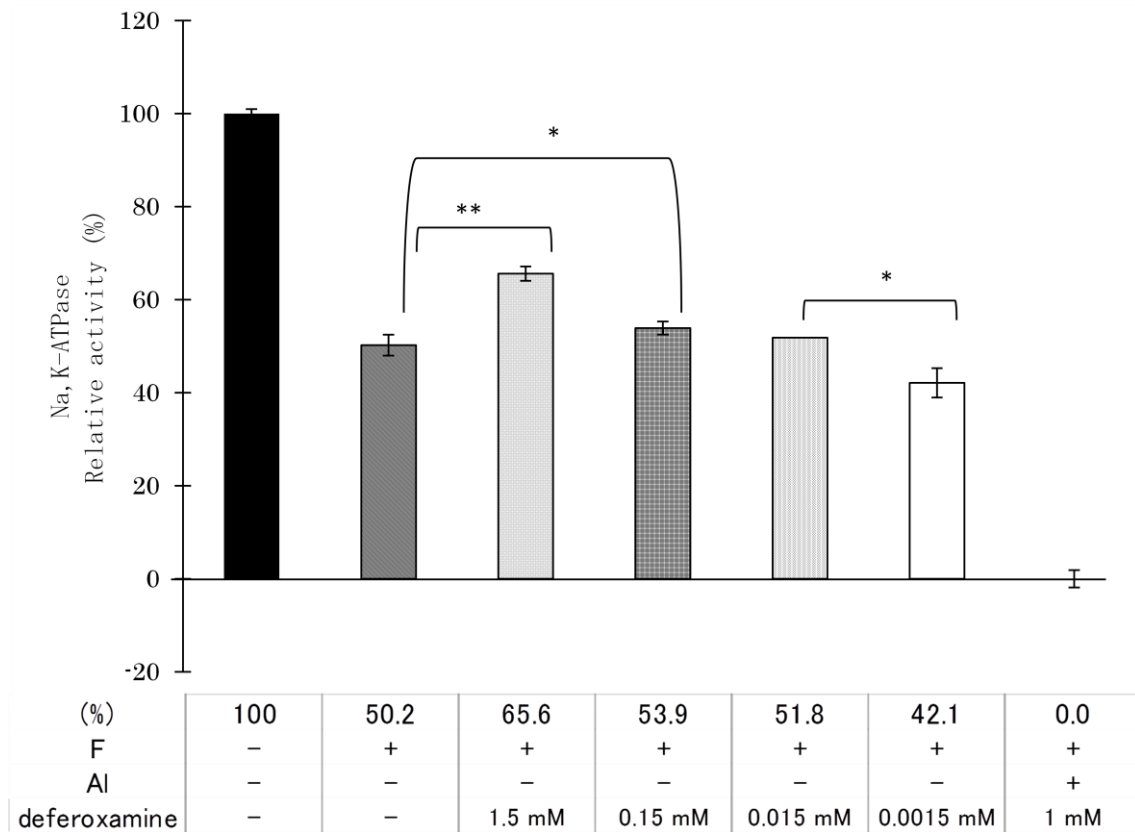


Fig.8 FによるNa,K-ATPase活性の不可逆的阻害に対する deferoxamine の影響

14.9 μg のNa,K-ATPaseを25 mM sucrose、0.1 mM EDTA、50 mM tris-HCl (pH 7.4)、160 mM NaCl、16 mM KCl、5 mM MgCl_2 、2.5 mM NaF存在下で、100 μM AlCl_3 の有無で種々の濃度の deferoxamine 存在下で室温にて30分間インキュベーション後、10倍希釈した。その後、Fig.1aの説明に記載したのと同様に、Na,K-ATPase活性を測定した。NaFを添加していないサンプルをcontrolとした。2.5 mM NaF存在下でインキュベーション後希釈すると活性は50%不可逆的に阻害された。これに対して0.015 mM以上の deferoxamine を加えると不可逆的阻害がある程度消失したが、0.0015 mM以下ではほとんど効果を認めなかった。100 μM AlCl_3 が共存すると deferoxamine を添加しても不可逆的阻害が消失しなかった。** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

7. EP形成量に対するFとAlの影響

FがNa,K-ATPase反応過程のどの段階においてその活性を抑制するかを明らかにすることを目的に、ラット脳Na,K-ATPaseのEP形成が最大となる40 mM NaCl存在下のEP形成量を100%として、F及びF+AlのEPに対する効果を調べた (Fig.9)。Al非存在下では、Fの濃度に依存してEP形成量が減少し、5 mM以上で約30%減少した。一方、Al存在下では非存在下と比較してより低濃度のFでEP形成が抑制され、Al濃度が0.1 mMのときF濃度2.5 mMで40%程度減少した。しかし、Fの濃度をさらに

上げてもそれ以上 EP 形成を抑制することはできず、Al の濃度を 0.1 mM から 0.4 mM まで上げても EP 形成の抑制量は顕著には変わらなかった。

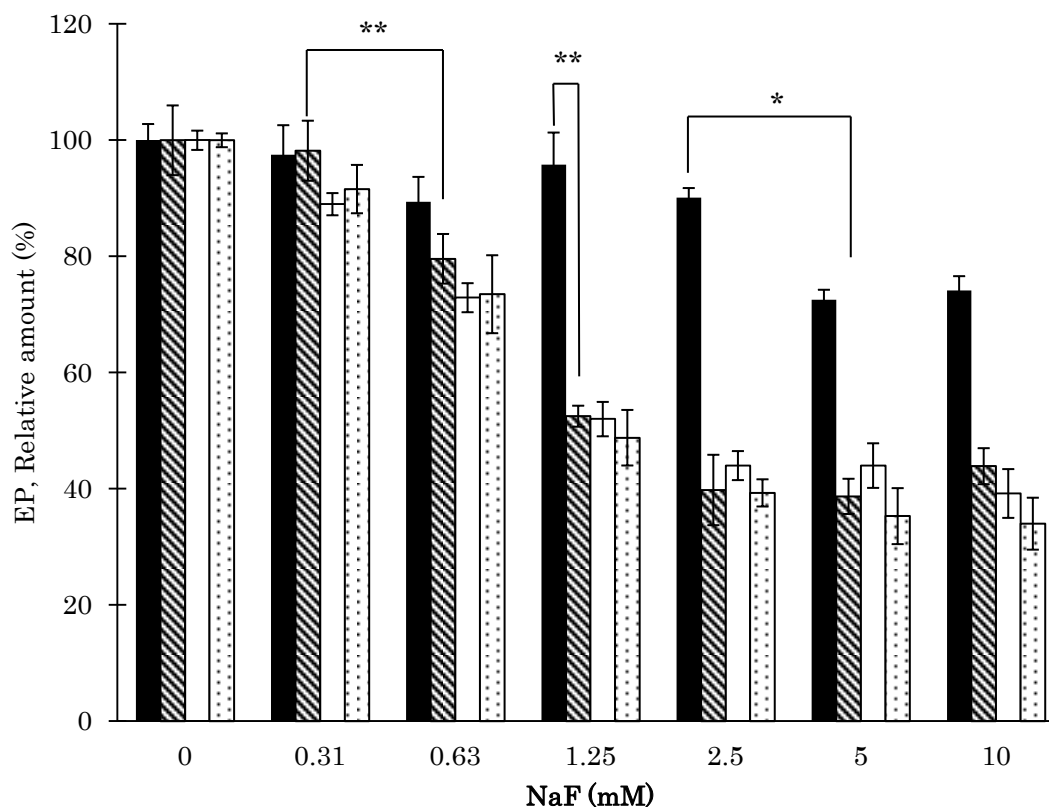


Fig.9 EP 形成量に対する F と Al の影響

18.6 μg の Na,K-ATPase と 25 mM sucrose、0.1 mM EDTA、25 mM tris-HCl (pH 7.4)、40 mM NaCl、1 mM MgCl_2 及び 20 μM ^{32}P -ATP を加えた 50 μl の溶液で 37 $^\circ\text{C}$ で EP 形成反応を行った。F または F+Al の効果を調べる実験においては、図中に示した濃度 (0 (■)、0.1 (▨)、0.2 (□)、0.4 (◻) mM) の NaF 及び AlCl_3 を添加して測定を行った。反応は 5 μl の ^{32}P -ATP を加えて開始し、10 秒後に 3 mM ATP-2Na を含む 5% TCA 5 ml を加えて反応を停止した。変性させた EP はガラスファイバーフィルターにて捕捉した後、1 N 塩酸、10 mM リン酸、10 mM ポリリン酸を含む溶液 10 ml にて 3 回洗浄した。その後、Aloka LSC-5100 液体シンチレーションカウンターを用い、 E^{32}P 量を測定した。Al 非存在下では 5 mM の F で EP 形成量が 30% 程度減少し、それ以上 F の濃度を上げても変わらなかった。一方、Al 存在下では非存在下と比較してより低濃度の F で EP 形成が抑制された。Al 濃度が 0.1 mM のとき F 濃度 2.5 mM で 60% 程度減少したが、0.4 mM まで Al の濃度を上げても 0.1 mM の Al と結果は同様であった。** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$

8. Deferoxamine 存在下の EP 形成量に対する F と Al の影響

1 mM の deferoxamine 存在下で、0.1 mM の Al の有無で EP 形成に対する F の効果を調べた (Fig.10)。Deferoxamine 存在下では Al の有無にかかわらず 5 mM の F までは EP 形成量の減少は認めず、F 濃度 10 mM で形成量が 30 %程度減少した。また、F 濃度 10 mM では、Al 存在下での EP 形成量が非存在下に比べて有意に減少した。

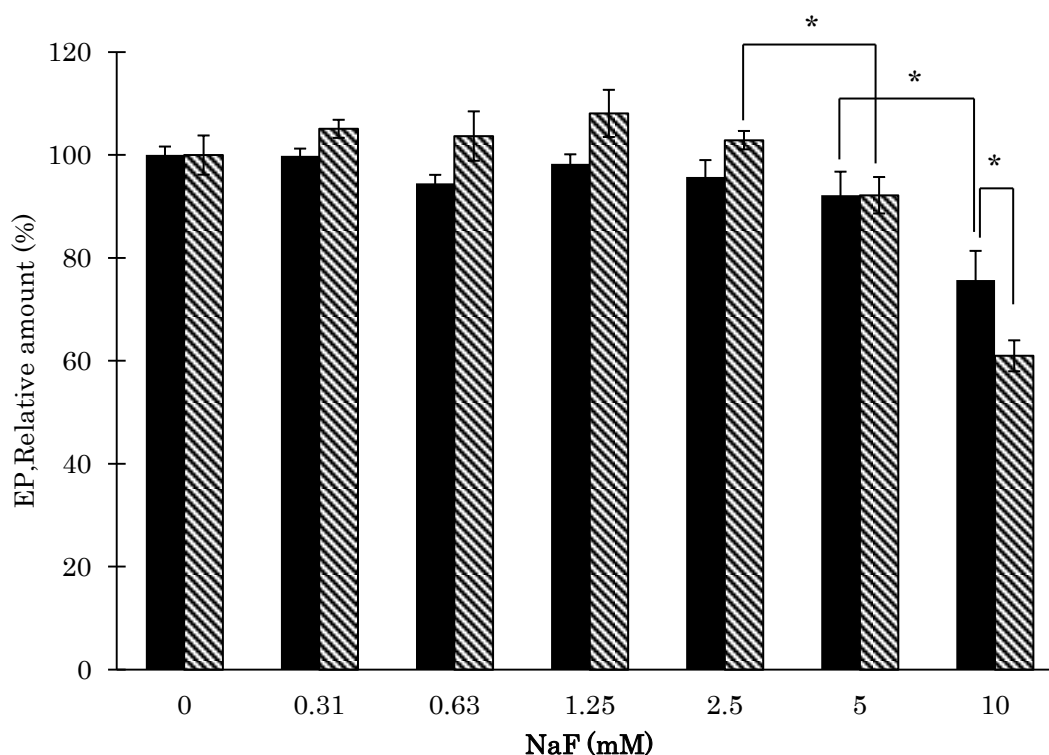


Fig.10 F 及び Al 存在下の EP 形成量に対する deferoxamine の影響

1 mM deferoxamine 存在下、0.1 mM の Al の有 (■) 無 (▨) で、Fig.9 と同様の方法で EP 形成量を測定した。Al 存在の有無にかかわらず 2.5 mM までは EP 形成量の減少は認めないが、F 濃度 10 mM では形成量が 30 %程度減少した。* $p < 0.05$

9. F による EP 形成阻害、Na,K-ATPase 活性阻害及び Na-ATPase 活性阻害に対する 2 価金属イオンの影響

2 価金属として Mg、Ca、Mn、Be を用いて、EP 形成量 (Fig.11)、Na,K-ATPase (Fig.12) 及び Na-ATPase 活性 (Fig.13) に対する影響を調べた。F 非存在下では Mg 存在下で形成される EP 形成量と比較して、Mn 及び Ca では約 25%、Be ではほとんど形成されなかった。Mg 及び Ca 存在下で形成された EP は F の濃度に依存して軽度減少し、Mn 存在下で形成された EP は顕著に減少した。F 非存在下の Na,K-ATPase 活性は、Mg 存在下の活性と比較して、Mn 存在下では約 20%であり、Ca 及び Be では

ほとんど検出されなかった。Mg 及び Mn 存在下の Na,K-ATPase 活性は F 濃度に依存して低下し 5 mM の F 存在下ではほぼ消失した(Fig.12)。一方、F 非存在下の Na-ATPase 活性は、Mg 存在下の活性と比較して Ca 存在下で 80%、Mn 存在下では約 50%あり、Be ではほとんど検出されなかった。Mg 及び Ca 存在下の Na-ATPase 活性は F 濃度に依存し低下したが 10 mM の F 存在下でも 50%程度残存し、Mn 存在下の Na-ATPase 活性は F 濃度が増加しても顕著な減少は示さなかった (Fig.13)。

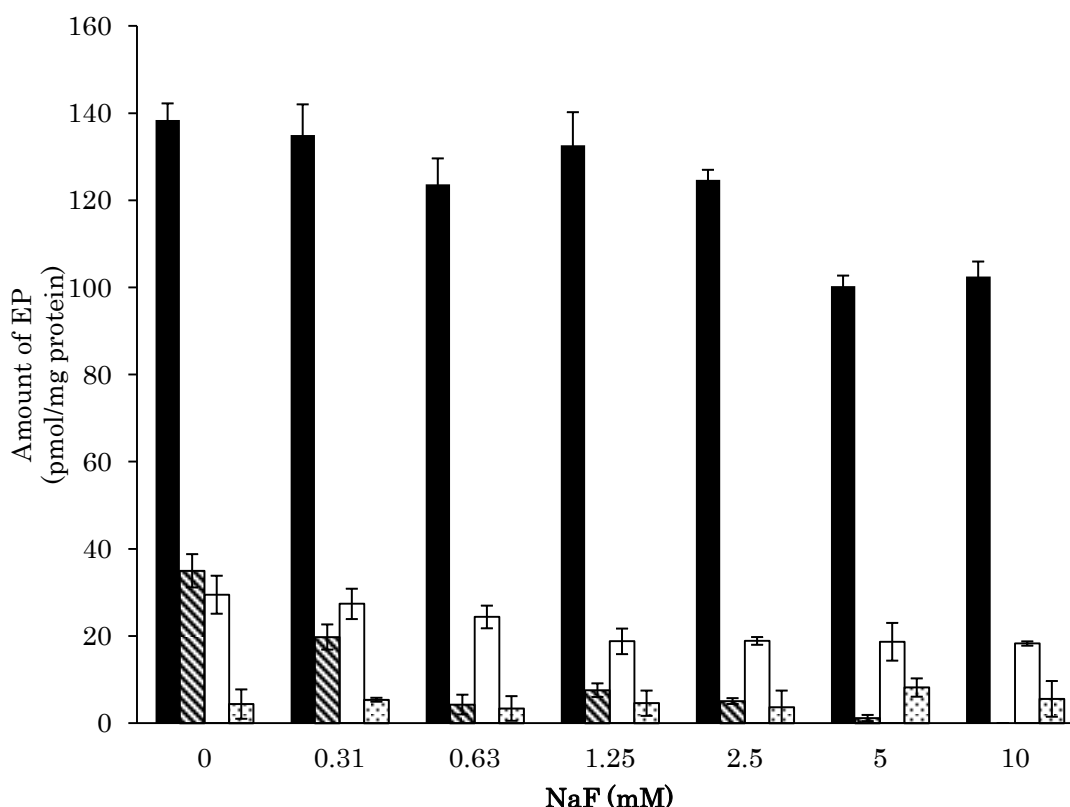


Fig.11 F による EP 形成阻害に対する 2 価金属イオンの影響

2 価金属として 1 mM MgCl₂ (■)、CaCl₂ (▨)、MnCl₂ (□)、BaSO₄ (◻) を用いた以外は Fig.9 と同様に、EP 形成量の NaF 濃度依存性を測定した。F 非存在下の EP 形成量は Mg>>Mn>Ca>>Be の順であった。Mg と Ca 存在下で形成された EP は F 濃度に依存して軽度に減少したが、Mn では顕著に減少した。

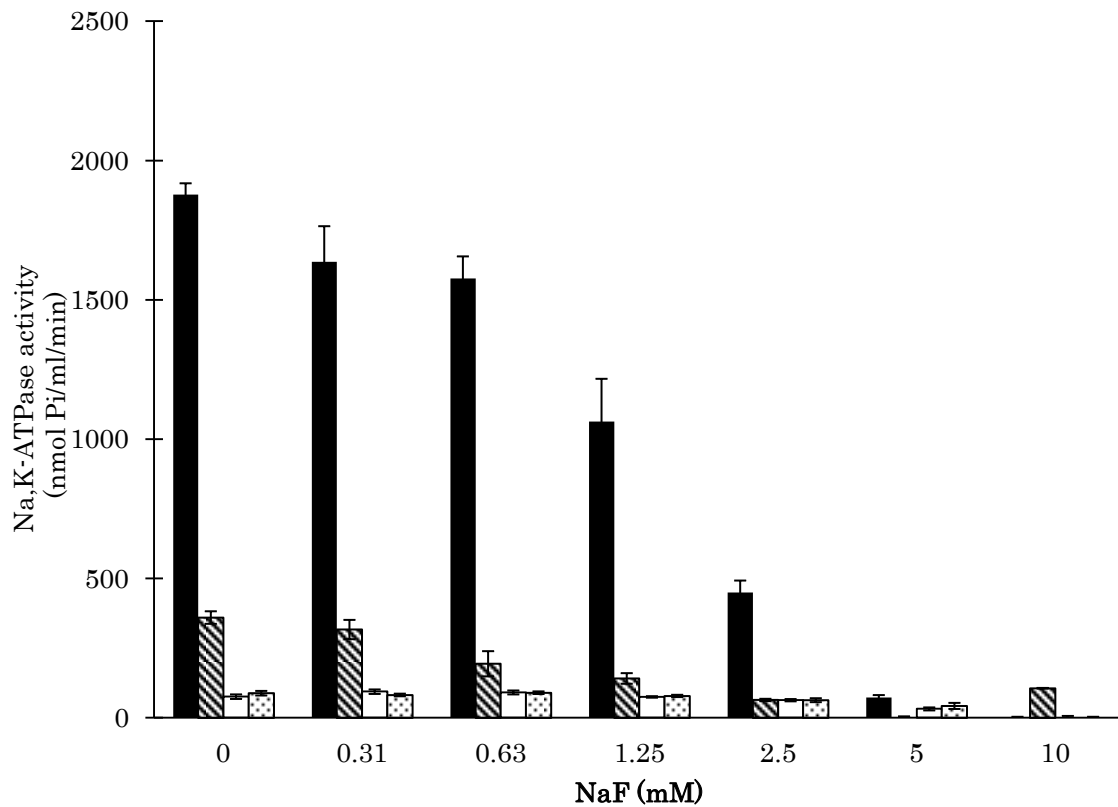


Fig.12 Na,K-ATPase 活性の NaF による阻害に対する 2 価金属イオンの影響

2 価金属として 5 mM MgCl₂ (■)、CaCl₂ (▨)、MnCl₂ (□)、BaSO₄ (◻) のいずれかを用いたことと、3.1 μg の精製したラット脳 Na,K-ATPase を使用した以外は、Fig.1a と同様の方法で Na,K-ATPase 活性を測定した。F 非存在下の活性は Mg>>Mn>Ca=Be の順で検出された。Mg 及び Mn 存在下の活性は F 濃度に依存して低下し、5 mM の F ではほぼ検出されなかった。

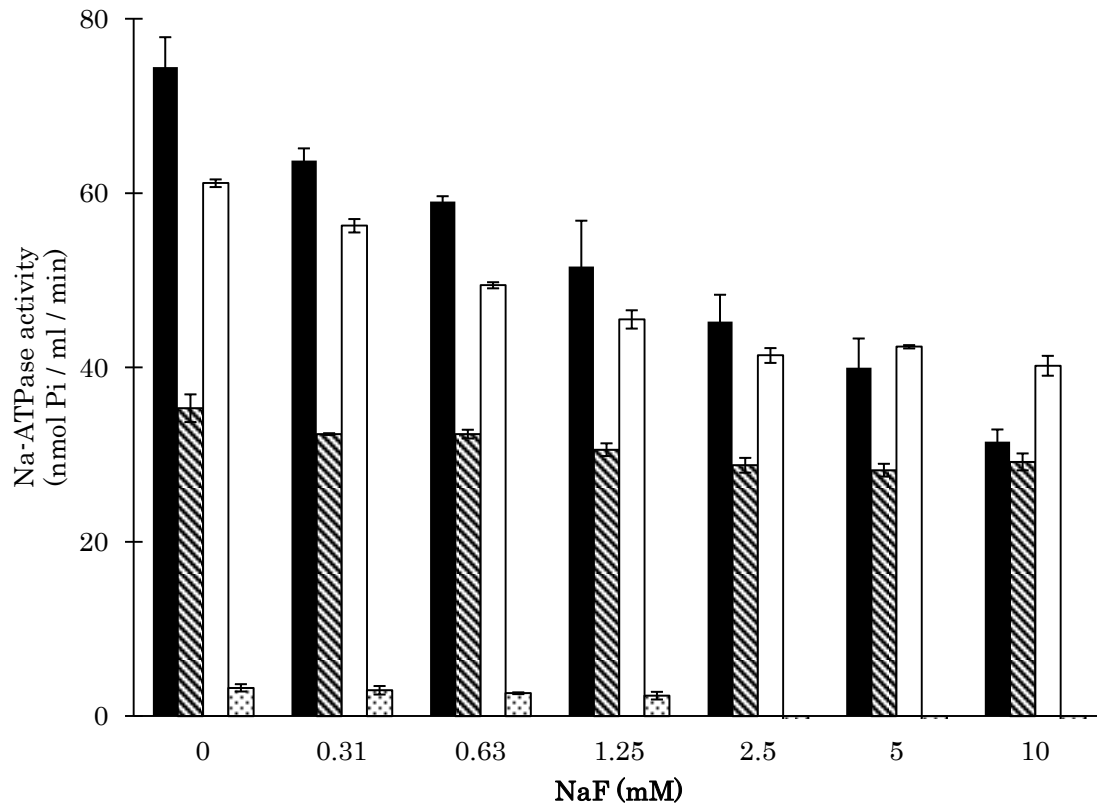


Fig.13 Na-ATPase 活性の NaF による阻害に対する 2 価金属イオンの影響

2 価金属として 5 mM MgCl₂ (■)、CaCl₂ (▨)、MnCl₂ (□)、BaSO₄ (◻) のいずれかを用いたことと、24.4 μg の精製酵素を使用した以外は Fig.3a と同様の方法で Na-ATPase 活性を測定した。F 非存在下の活性は Mg>Ca>Mn の順に検出され、Be 存在下ではほとんど検出されなかった。

【考察】

1. F 濃度に依存した ATPase 活性の阻害

Na,K-ATPase 活性の抑制は NaF あるいは KF で同様に観察されたので(Fig.1a、2、Table 1) Na や K による影響はなく、F による阻害であった。また Na,K-ATPase 活性及び部分反応である Na-ATPase 活性と K-pNPPase 活性すべてが抑制されたことから(Fig.1a、2、3a、4a)、F は Na,K-ATPase 反応サイクルの特定の反応中間体に結合するのではなく、どの中間体にも影響しうるということが明らかになった。ただし阻害の程度は異なり、Na,K-ATPase 活性、Na-ATPase 活性及び K-pNPPase 活性は、それぞれ 5 mM の F で 100 %、10 mM で 70 %程度、2.5 mM で 100 %活性が阻害された。また $K_{i_{0.5}}$ は Na,K-ATPase 活性では 1.38-1.46 mM、Na-ATPase 活性では 3.15 mM、K-pNPPase 活性では 0.50 mM であった。これらの結果から F に対する感受性は、K-pNPPase 活性>Na,K-ATPase 活性>Na-ATPase 活性の順であることが本実験より明らかになった。K-pNPPase 活性と Na,K-ATPase 活性に関しては Yoshida ら⁵⁾も同様の結果を得ている。

活性抑制が F に特異的であるのかを明らかにするため、F と同じ第 17 族元素のハロゲンである I を用いて Na,K-ATPase 活性の阻害を調べたが、全く阻害されなかった。同様の報告は Opit ら⁴⁾も行っており、K-pNPPase 活性についても Yoshida ら⁵⁾が同様の報告を行っていることから、ハロゲンにおける ATPase 活性阻害作用は F に特異的なものであると示唆された。

Na,K-ATPase は ATP 加水分解中にリン酸化反応中間体(EP)を形成するのが特徴である。F が直接結合する Na,K-ATPase 反応中間体の候補として、F の EP に対する作用を調べたところ、F の濃度に依存して EP 形成量は減少したが、Al 非存在下では F が 5 mM でも EP 形成量の減少は 30 %程度であり、完全には形成阻害されなかった(Fig.9)。

2.F による酵素活性阻害に対する Al の影響

Na,K-ATPase 活性、Na-ATPase 活性及び K-pNPPase 活性すべてが、Al 存在下において F の濃度に依存して酵素活性は低下し(Fig.1a、2、3a、4a)、 $K_{i_{0.5}}$ は Al 濃度の増加に伴って減少した (Table 1-3)。これらの結果は Al が Na,K-ATPase の F に対する親和性を増大させることを示唆する。Al のこの効果は 100 μ M という比較的 low 濃度で飽和した。Al による F の作用の増強については、Sternweis ら⁷⁾によるアデニル酸シクラーゼ活性、Robinson ら⁸⁾や Murphy ら²⁰⁾による Na,K-ATPase 活性及び Missiaen ら²¹⁾による陽イオン輸送 ATPase 活性での報告がある。また Na,K-ATPase 活性において Al 濃度が 100 μ M で飽和することは石川ら²²⁾により報告されており、本実験結果と一致する。また、Na-ATPase 活性と K-pNPPase 活性については今回の報告が初めてである。

F と Al の EP 形成に対する効果を調べたところ、Al 存在下では非存在下と比較して

より低濃度の F で EP 形成量が抑制され、Al 濃度が 0.1 mM のとき F 濃度 2.5 mM で 40 %程度減少した (Fig.9)。また、Al 濃度を 0.4 mM まで上げて 0.1 mM の Al と同様の結果であった。Goldstein の報告²³⁾によると、本実験で用いた F 濃度下では Al^{3+} は主に AlF_4^- として存在している。Al の添加により EP 形成量の抑制が増加したことから、F+Al つまり AlF_4^- が EP 形成を強く阻害することを示唆する。

本研究において、Na,K-ATPase 活性抑制と EP 形成抑制における F の濃度依存性が一致したことから、F は EP 形成を抑制することにより Na,K-ATPase 活性を抑制することが示唆された。しかし、活性が 100 %阻害される F と Al 濃度において、EP 形成量は 40 %程度残存していた。この結果は、実験条件下において形成された EP は脱リン酸化してリンを放出することができない、すなわち、EP は形成されているが ATPase 活性は検出することができないとする機構で説明することが可能である。Na,K-ATPase は分子量約 11 万の α サブユニットと約 5 万の β サブユニットから構成されている。 α サブユニットには ATP 及び Na^+ 、 K^+ の結合部位があり²⁴⁾、このサブユニットが酵素機能を担うが、単独では酵素活性が発現せず β サブユニットの共存が必要である。従って、Na,K-ATPase としての最小単位は ($\alpha \beta$) であるが²⁵⁾、機能的な単位としては ($\alpha \beta$)₂ 量体²⁶⁾、あるいは ($\alpha \beta$)₄ 量体²⁷⁾ 説も唱えられている。Taniguchi らは Na,K-ATPase は 4 量体であり、存在する半分の α サブユニットしかリン酸化されず、半分はリン酸化されていない (half of the site reactivity) ことを示唆している²⁸⁾。彼らは ATP 存在下で半分しかリン酸化が生じないのは、非リン酸化触媒鎖に ATP か、または ADP が酸に不安定な状態で結合しているからではないかと推定した。類似した機構で我々の実験結果を解釈すると、F+Al つまり AlF_4^- が結合したサブユニットは EP を形成できないだけでなく、EP を形成しているもう半分のユニットにも影響を与えてその脱リン酸化を抑制する、すなわち ATPase 活性を抑制するとして解釈することが可能である。

3. Deferoxamine 存在下での F による ATPase 活性阻害の Al による影響

Al のキレーターである deferoxamine 存在下では、F による Na,K-ATPase 活性、K-pNPPase 活性及び EP 形成を抑制する Al の効果を減少させた (Fig.1b、4b) (Table 1、3)。また Al 非存在下においても deferoxamine 存在下で F による活性抑制が減少することから、Sternweis ら⁷⁾ の報告のように、ガラス器具を使用する実験系においては、Al のコンタミが F の効果に影響を及ぼすことを考慮しなければならない。しかし一方で、Na-ATPase 活性においては異なる結果となり、deferoxamine 存在下での活性阻害により高濃度の NaF を必要とした (Fig.3b)。Al と deferoxamine の複合体が F の効果を抑制する作用を示したと考えることもできるが今後の課題である。

Deferoxamine は F と Al による EP 形成の抑制も軽減し (Fig.9,10)、Al は F による EP 形成と ATPase 活性の抑制を促進するという結果を支持した。以上の結果も、F と Al が結合してフッ化アルミニウム (AlF_4^-) となり高い親和性で ATPase と結合すると解

離しにくくなるため、EP 形成と活性を抑制するとして説明することができる。Missiaen らは Na,K-ATPase と同じ P 型 ATPase である形質膜の Ca-ATPase についても同様の報告をしている²¹⁾。Robinson ら⁸⁾や Bigay ら³⁰⁾、Blackmoore ら³¹⁾は、 AlF_4^- の立体構造はリン酸の立体構造に類似していると報告し、Robinson らは AlF_4^- は Na,K-ATPase の反応中に形成される EP に類似体として結合すると推定している⁶⁾。この類似体は Danko らにより Ca-ATPase 立体構造解析研究³¹⁾、Cornelius らにより Na,K-ATPase の立体構造解析研究に応用されている³²⁾。

NaF や KF の ATPase 活性阻害実験において、積極的には Al を添加していないのに F 濃度に依存した活性の低下が観察された (Fig.1a、2、3a、4a)。これは、実験に用いたガラス器具、水や試薬などから混入した Al の作用として考えることができる。しかし、deferoxamine 存在下でも濃度依存的な活性抑制を完全に抑えることができなかった (Fig.1b、3b、4b)。また EP 形成量の実験からも同様のことが示された (Fig.10)。Na,K-ATPase の F による阻害は、Fig.5 の希釈実験で示されたように Al の関与する不可逆的阻害と、Al の関与しない阻害の2つの様式が存在する可能性がある。両者の違いについて、F の Na,K-ATPase 活性阻害を不可逆的にするには Al の共存が必要であるが、活性を可逆的に抑制するだけなら Al は必要ではない、あるいは Al 以外の金属イオンでも代用できると説明することも可能である。Robinson ら⁸⁾や Missiaen ら²¹⁾は Be も Al と類似した作用を示すと報告している。また第 2 属元素である Be と第 13 族元素の Al とは性質が類似しているという報告もある³³⁾。今後詳細な研究が必要である。

Al は自然界に広く存在する元素である。生体にも広く存在するとされており、血清中では $10 \mu\text{g/l}$ 程度とされる。Al 濃度は肺、骨、筋肉中で高いとされているが、必須の微量元素とは考えられていない³⁴⁾。また、生体内分布の測定は極めて困難とされ、その機能あるいは病態における作用も明らかではない。骨疾患、貧血、認知症、骨格筋疾患を悪化させるとの記載もあるが、詳細は不明である¹⁾。本研究では、Al 濃度が $2 \mu\text{M}$ という低濃度でも F の作用を増強した。Al の生体内における作用に関連する可能性もあり、新たな研究が必要である。

4.F による不可逆的な Na,K-ATPase 活性阻害における Al と 2 価金属イオン要求性

Na,K-ATPase 活性の F による阻害の 2 価金属イオンの影響は $\text{Mg} \gg \text{Mn} > \text{Ca} = \text{Be}$ であった (Fig.12)。Yoshida ら⁵⁾、Robinson ら⁸⁾、Murphy ら²⁰⁾も、F による Na,K-ATPase 活性阻害には Mg が必要であると報告している。一方 Na-ATPase 活性の F による阻害の 2 価金属イオンの影響は $\text{Mg} > \text{Ca} > \text{Mn}$ で Be ではほとんど検出されなかった (Fig.13)。また F による EP 形成量阻害の 2 価金属イオンの影響は $\text{Mg} \gg \text{Mn} > \text{Ca} \gg \text{Be}$ であり (Fig.11)、Na,K-ATPase 活性と類似した結果 (Fig.12) が得られた。F による不可逆的な Na,K-ATPase 活性阻害においても 2 価金属イオンが必要であり、Mn、Ca、Be も Mg と

同様に F と Al による Na,K-ATPase 活性抑制を不可逆的にする作用を有していた (Fig.6)。本実験で使用した酵素を用いて、Na,K-ATPase 活性と Na-ATPase 活性の 2 価金属要求性を測定したところ、同様の結果が得られた (結果は示さない)。F と Al の関与する活性阻害の 2 価金属要求性が、ATPase 活性における 2 価金属要求性と 同じなのかどうかについて、今後検討する必要がある。

5.F 毒性と Al の生体に対する作用

70 kg の成人が死に至るフッ化物摂取量は、NaF で 5-10 g とされている³⁵⁾。100 % 吸収したとし、全血液量を 5 l と仮定して血中濃度を計算すると約 23.8-47.6 mM となる。今回の活性阻害実験においては積極的に Al を添加しなくても 5 mM の F によって Na,K-ATPase 活性はほぼ完全に阻害された (Fig.1a, 2)。さらに、生体に広く存在するとされている Al が共存すると、2.5 mM の F によって、ほぼ完全に抑制された (Fig.5, 6)。組織内濃度は血中濃度よりはかなり低いと予想されるが、ほぼすべての細胞に存在し重要な機能を担う Na,K-ATPase が急性毒性のターゲットになりうる可能性が十分あると考えられる。

【結論】

F による Na,K-ATPase 活性阻害には Mg をはじめとする 2 価金属が必要であり、Al は Na,K-ATPase 活性の F に対する親和性を増大させる。また、F による Na,K-ATPase 活性阻害には Al が関係しない可逆的な阻害と、Al の関与する不可逆的な阻害の 2 つの様式が存在する。F による不可逆的な阻害には Al と 2 価金属の共存が必須である。F と Al の複合体はリン酸に類似した AlF_4^- の形をとり、Na,K-ATPase に不可逆的に結合し、ATPase 活性を阻害することが示唆された。

【参考文献】

- 1) グットマン・ギルマン: 薬理書 (第 11 版、下巻). 2143-2145, 廣川書店, 東京, 2007.
- 2) 篠田 壽: う蝕予防薬. 加藤 有三, 篠田 壽監修, 大谷 啓一, 鈴木 邦明, 戸 莉 彰史編集, 現代歯科薬理学第 5 版, 380-389, 医歯薬出版, 東京, 2012.
- 3) Kirschner LB: Fluoride inhibition of sodium extrusion from swine erythrocytes and its metabolic correlates. Arch Biochem Biophys 106: 57-64, 1964.
- 4) Opit LJ, Potter H, Charnock JS: The effect of anions on $(\text{Na}^+\text{+K}^+)\text{-activated ATPase}$. Biochim Biophys Acta 120: 159-161, 1966.
- 5) Yoshida H, Nagai K, Kamei M, Nakagawa Y: Irreversible inactivation of $(\text{Na}^+\text{-K}^+)\text{-dependent ATPase}$ and $\text{K}^+\text{-dependent phosphatase}$ by fluoride. Biochim Biophys Acta 150: 162-164, 1968.

- 6) Robinson JD: Functionally distinct classes of K^+ sites on the (Na^+-K^+) -dependent ATPase. *Biochim Biophys Acta* 384: 250-264, 1975.
- 7) Sternweis PC, Gilman AG: Aluminum: A requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4888-4891, 1982.
- 8) Robinson JD, Davis RL, Steinberg M: Fluoride and beryllium interact with the $(Na+K)$ -dependent ATPase as analogs of phosphate. *J Bioenerg Biomembr* 18: 521-531, 1986.
- 9) Jorgensen PL: Purification of Na,K-ATPase: enzyme sources, preparative problems and preparation from mammalian kidney. *Methods Enzymol* 156: 29-43, 1988.
- 10) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
- 11) Vasallo PM, Post RL: Calcium ion as a probe of the monovalent cation center of sodium, potassium ATPase. *J Biol Chem* 261: 16957-16962, 1986.
- 12) Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S: A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPase. *Anal Biochem* 168: 1-4, 1988.
- 13) Suzuki K, Taniguchi K, Iida S: The acceleration of Na^+,K^+ -ATPase activity by ATP and ATP analogues. *J Biol Chem* 262: 11752-11757, 1987.
- 14) Post RL, Sen AK: ^{32}P -labeling of $(Na+K)$ -ATPase intermediate. *Methods Enzymol* 10, 773-776, 1967.
- 15) Kaya S, Tsuda T, Hagiwara K, Fukui T, Taniguchi K: Pyridoxal 5'-phosphate probes at lys-480 can sense the binding of ATP and the formation of phosphoenzymes in Na^+,K^+ -ATPase. *J Biol Chem* 269: 7419-7422, 1994.
- 16) Keberle H: The Biochemistry of Desferrioxamine and its Relation to Iron Metabolism. *Ann NY Acad Sci* 119: 758-768, 1964.
- 17) Blackmore PF, Bocckino SB, Waynick LE, Exton JH: Role of a guanine nucleotide-binding regulatory protein in the hydrolysis of hepatocyte phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate by calcium-mobilizing hormones and the control of cell calcium. Studies utilizing aluminum fluoride. *J Biol Chem* 260: 14477-14483, 1985.
- 18) Ott ML: Desferrioxamine. FREE RADICAL BIO MED 311C, Chemistry /Botany, Department of Chemistry, University of Iowa, Iowa City, IA 52242, 12. February 2001.
- 19) Post RL, Hegyvary C, Kume S: Activation by adenosine triphosphate in the

- phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 247: 6530–6540, 1972.
- 20) Murphy AJ, Hoover JC: Inhibition of the Na,K-ATPase by Fluoride. *J Biol Chem* 267: 16995–17000, 1992.
- 21) Missiaen L, Wuytack F, Smedt HD, Vrolix M, Carteeels R: AlF_4^- reversibly inhibits P^- -type cation-transport ATPases, possibly by interacting with the phosphate-binding site of the ATPase. *Biochem J* 253: 827–833, 1988.
- 22) 石川 一郎, 出山 義昭, 吉村 善隆, 鈴木 邦明: フッ素によるアルミニウムに依存した Na,K-ATPase 活性の抑制, *北海道歯誌* 31: 45–51, 2010.
- 23) Goldstein G: Equilibrium Distribution of Metal-Fluoride Complexes. *Anal Chem* 36, 243–244, 1964.
- 24) Lingrel JB, Kuntzweiler T: Na^+, K^+ -ATPase. *J Biol Chem* 269: 19659–19662, 1994.
- 25) 誉田 晴夫: Na^+/K^+ -ATPase とオリゴマイシンの相互作用, *杏林医学会雑誌* 38:29–36, 2007.
- 26) Almeida WI, Martins OB, Carvalho-Alves PC: Self-association of isolated large cytoplasmic domain of plasma membrane H^+ -ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*: role of the phosphorylation domain in a general dimeric model for P-ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1769–1776, 2006.
- 27) Taniguchi K, Kaya S, Abe K, Mårdh S: The oligomeric nature of Na/K-transport ATPase. *J Biochem* 129: 335–342, 2001.
- 28) 谷口 和弥, 嘉屋 俊二, 横山 毅, 阿部 一啓: Na ポンプのリン酸化・脱リン酸化反応中間体に化学量論的に結合する ATP と ADP/Pi の発見と $(\alpha \beta)_4$ 量体によるエネルギー共役仮説, *日本薬理学雑誌* 114: 179–184, 1999.
- 29) Bigay J, Deterre P, Pfister C, Chabre M: Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the gamma-phosphate of GTP in its binding site. *FEBS Lett*, 191: 181–185, 1985.
- 30) Blackmore PF, Exton JH: Studies on the Hepatic Calcium-mobilizing Activity of Aluminum Fluoride and Glucagon. *J Biol Chem* 261: 11056–11063, 1986.
- 31) Danko S, Yamasaki K, Daiho T, Suzuki H: Distinct natures of beryllium fluoride-bound, aluminum fluoride-bound, and magnesium fluoride-bound stable analogues of an ADP-insensitive phosphoenzyme intermediate of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: changes in catalytic and transport sites during phosphoenzyme hydrolysis. *J Biol Chem* 279: 14991–14998, 2004.
- 32) Cornelius F, Mahmmoud YA, Toyoshima C: Metal fluoride complexes of Na,K-ATPase. Characterization of fluoride-stabilized phosphoenzyme analogues and their interaction with cardiotonic steroids. *J Biol Chem* 286: 29882–29892,

2011.

- 33) The nature of the chemical bond and the structure of molecules and crystals : an introduction to modern structural chemistry, 65-107, Cornell University Press, NY, 1960.
- 34) 米谷 民雄: アルミニウム. 桜井 弘, 田中 英彦編集 生体微量元素, 235-237, 廣川書店, 東京, 1994.
- 35) 小林 清吾: フッ化物の応用. 米満 正美, 小林 清吾, 宮崎 秀夫, 川口 陽子編, 新予防歯科学第3版, 89-114, 医歯薬出版, 東京, 2007.

【謝辞】

本稿を終えるにあたり、本研究に数々の御援助、御協力いただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座予防歯科学教室および口腔病態学講座細胞分子薬理学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

【Abstract】

Fluoride (F) has been widely applied to the prevention of dental caries, but the range of application is limited because of acute toxicity. Moreover, the detailed toxicity mechanism is unclear. In this study, we consider that Na,K-ATPase from rat brain is the target of acute toxicity of F, and we investigate the effects of F on Na,K-ATPase activities and the amount of phosphorylated intermediate (EP). ① F inhibited Na,K-ATPase activity, Na-ATPase activity and K-*p*NPPase activity depending on concentrations investigated. It was also found that aluminum (Al) increased the inhibition of ATPase activity by fluoride depending on the Al concentration and the optimum concentration was 100 μ M Al. ② Activities were recovered to some extent by dilution, but not in the presence of both F and Al. This Al action required Mg^{2+} , and the effect of Mg^{2+} could be replaced with Mn^{2+} or Ca^{2+} . ③ The amount of EP decreased depending on F concentrations investigated and Al further enhanced the inhibition of EP formation. However, while the activity was inhibited almost completely, about half of EP formation was remained. ④ Deferoxamine decreased the effect of Al. These results suggest that ① F inhibited Na,K-ATPase activity by decreasing EP formation depending on its concentration, ② Al increased the affinity of F for Na,K-ATPase, ③ There are two inhibition mechanisms by F ; inhibition of Na,K-ATPase activity by F alone is reversible, but the inhibition in the presence of F, Al and divalent metals is irreversible.