

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
Туре	theses (doctoral)
File Information	Yuichiro_Okino.pdf



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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。①F 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 (AI)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 μM 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。③EP形成量もF濃度に依存して減少し、AI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

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

【緒言】

フッ化物(F)はう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5g、小児では約0.5g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 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-*p*NPPase 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 1に、最終濃度 5 mM となる ATP-trisを 50 μ 1加えて反応を開始し、37℃で 30 分間インキュベーションした後に 300 μ 1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 AlCl₃ 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-pNPPase 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 μ gの精製酵素、25 mM sucrose、 0.1 mM EDTA、50 mM tris-HCl (pH 7.4)、20 mM KCl、5 mM MgCl₂を含む 200 μ l 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 μ l 加えて反応を開始し、37℃で 30 分間インキュベーションした後に 1.25 % Na₂CO₃ 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 μ g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 MgCl₂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 AlCl₃、 deferoxamine、MgCl₂、MnCl₂、CaCl₂及び BeSO₄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 μ gの Na,K-ATPase と25 mM sucrose、0.1 mM EDTA、25 mM tris-HCl (pH 7.4)、40 mM NaCl、1 mM MgCl₂及び 20 μ M ³²P-ATP を加えた 50 μ 1の溶液で 37 ℃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、AlCl₃及び 2 価金属イオンを添加して測定を行った。反応は 5 μ 1 の³²P-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 はグ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、E³²P 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AI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 (Ki_{0.5})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 AlCl₃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も同じ結果であった。Ki_{0.5} 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℃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 存在下の測定値をブランクとして差し引いた。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、Ki_{0.5} 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、Ki_{0.5} 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 10μ M の Al の作用は消失した。Al が 100μ 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 µM(△)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 µM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(\bigcirc)、2(\bigcirc)、10(\triangle)、100(\triangle)、200 μ M(\blacksquare)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、Ki_{0.5}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、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、200 μ M まで Al の濃度を上げても 100 μ M 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AI 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、Ki_{0.5} 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 μ M 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 μ M で 飽和した。Ki_{0.5} は Al 非添加の 3.15 mM から 100 μ M 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 μ g 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 μ M (■)の AlCl₃ 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 μ M 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 μ M とほぼ同じ結果になった。Ki_{0.5} は Al 非添加の 3.15 mM から 100 μ M 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 μ M まで Al の濃度を上げても 100 μ M の Al と同様 の値であった。**p<0.01、*p<0.05

	Deferoxamine (–)
Al (μM)	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 µM(△)の AlCl₃を含む 反応液で、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</p>

5.KF 濃度に依存した K-pNPPase 活性の阻害とAIの影響

Na,K-ATPase は、K 結合酵素の状態では部分反応として *p*NPP 加水分解活性 (K-*p*NPPase 活性)を示す¹⁹⁾。K-*p*NPPase 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、Ki_{0.5} は 0.50 mM であった(Fig.4a、Table 3)。 KF による K-*p*NPPase 活性阻害に対する Al の作用を調べた(Fig.4a)。 K-*p*NPPase 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。Ki_{0.5} 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 *p*NPP-tris を加えて反応を開始し、37℃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 (*p*NP)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、Ki_{0.5} 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 (μM)	Ki _{0.5} (mM)	Ki _{0.5} (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 Ki_{0.5} (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 (△)の AlCl₃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に増大したが、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 MgCl₂、 MnCl₂、CaCl₂、BeSO₄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 μ M 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 μ M 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 AlCl₃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。



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 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、5 mM MgCl₂、2.5 mM NaF存在下で、100 μ M AlCl₃ 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 μ M AlCl₃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 μ g のNa,K-ATPaseと25 mM sucrose、0.1 mM EDTA、25 mM tris-HCl (pH 7.4)、40 mM NaCl、1 mM MgCl₂及び 20 μ M ³²P-ATP を加えた 50 μ 1 の溶液で 37 ℃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 AlCl₃ を添加 して測定を行った。反応は 5 μ 10 ³²P-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 はグラスファ 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、E³²P 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 E P 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に 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)。





2 価金属として 1 mM MgCl₂ (■)、CaCl₂ (図)、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 (\blacksquare)、CaCl₂ (\bigotimes)、MnCl₂ (\square)、BaSO₄ (\boxdot) のいずれか用いたことと、3.1 μ g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-*p*NPPase 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-*p*NPPase 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 Ki_{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-*p*NPPase 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-*p*NPPase 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-*p*NPPase 活性と Na,K-ATPase 活性に関しては Yoshida ら⁵⁰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⁴⁴も行っており、K-*p*NPPase 活性についても Yoshida ら⁵⁵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、AI 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 AIの影響

Na,K-ATPase 活性、Na-ATPase 活性及び K-*p*NPPase 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)、Ki_{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 という比較的低濃度で 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-*p*NPPase 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 まで上げても 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 Al³⁺は主 に AlF₄-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 AlF₄-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(αβ)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 AIF₄-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-*p*NPPase 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⁷¹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 (AIF_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、AlF₄⁻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 AlF₄⁻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AI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AI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AIの関与する不 可逆的阻害と、AI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AI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AIは必要ではない、あるいはAI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AI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AI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 $10 \mu g/1$ 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 μ 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Mg>>Mn>Ca=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Mg>Ca>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Mg>>Mn>Ca>>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51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 AlF₄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 苅 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.
- Opit LJ, Potter H, Charnock JS: The effect of anions on (Na⁺+K⁺)-activated ATPase. Biochim Biophys Acta 120: 159-161, 1966.
- 5) Yoshida H, Nagai K, Kamei M, Nakagawa Y: Irreversible inactivation of (Na⁺-K⁺)-dependent ATPase and K⁺-dependent phosphatase by fluoride. Biochim Biophy Acta 150: 162-164, 1968.

- 6) Robinson JD: Functionally distinct classes of K⁺ sites on the (Na⁺-K⁺)-dependent ATPase. Biochim Biophy Acta 384: 250-264, 1975.
- 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.
- 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.
- 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, Torrigllia 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.
- 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: ³²P-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.
- 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, Carteels R: AlF₄ 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.
- 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(α β)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.
- 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 Ca²⁺-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 大学院歯学研究科ロ腔健康科学講座予防歯科学教室およびロ腔病態学講座細胞 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-pNPPase 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.