



Title	ラット脳各種ATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用
Author(s)	宮本, 健志
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第11272号
Issue Date	2014-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k11272
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/58182
Type	theses (doctoral)
File Information	Takeshi_Miyamoto.pdf



[Instructions for use](#)

博士論文

ラット脳各種ATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用

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

宮本 健志

ラット脳各種 ATPase 活性に対する静脈麻酔薬の作用

宮本 健志

抄録：静脈麻酔薬の各種 ATPase に対する作用の報告は多いが、作用機構の詳細については未だ不明な点が多い。ATPase には P 型 ATPase, V 型 ATPase, F 型 ATPase などが存在し、活性発現に Mg^{2+} (Mg) を必要とするが、役割や性質の不明な Mg-ATPase は多数報告されている。本研究ではラット脳に存在する Mg-ATPase を分析するとともに、静脈麻酔薬の作用を検討した。

ラット全脳から、Pottorf の方法に従って、形質膜 (PII) とミクロソーム (PIII) 分画を得た。Mg-ATPase 活性の至適 pH は PII が約 9.4, PIII は約 7.4 であった。PII の Mg-ATPase 活性は F 型 ATPase の阻害剤である NaN_3 によって約 80% 抑制され、PIII の Mg-ATPase 活性は P 型 ATPase 及び V 型 ATPase の阻害剤である Na_3VO_4 及び Bafilomycin A1 によってそれぞれ約 10% 及び 30% 抑制された。ウエスタンブロッティングの結果からも、F 型 ATPase は PII に、V 型 ATPase は PIII に最も多く検出された。上記阻害剤で抑制されない Mg-ATPase 活性を Basal Mg-ATPase とし、各阻害剤の存在下で各 ATPase を分別して静脈麻酔薬の影響を調べた。Propofol は V 型 ATPase 活性、PII 及び PIII Basal Mg-ATPase 活性を濃度依存的に抑制したが、F 型 ATPase 活性は 80% 程度活性化した。Pentobarbital はすべての ATPase 活性を濃度依存的に抑制した。Thiopental もすべての ATPase 活性を抑制したが、その程度は各 ATPase によって異なった。

以上の結果から、静脈麻酔薬はラット脳 Mg-ATPase 活性を基本的に抑制するが、Propofol はミトコンドリアに特異的な作用を及ぼすことが示唆された。

キーワード：静脈麻酔薬, F 型 ATPase, V 型 ATPase, Basal Mg^{2+} -ATPase

緒 言

生体には P 型 (P-ATPase), V 型 (V-ATPase), F 型 (F-ATPase) などの様々な ATP 加水分解酵素が存在する。

ミトコンドリアの F_1F_0 -ATP 合成酵素は、ミトコンドリアの呼吸時にミトコンドリア内膜に生じる H^+ の電気化学的な勾配を利用して、ADP と無機リンから ATP を合成する¹⁻³⁾。 F_1 は膜外に球形で存在し ATP 合成の触媒作用が起こる場所であるが、脚を通じて膜に存在する H^+ チャネルを含む F_0 領域と結合している。損傷の無い F_1F_0 -ATP 合成酵素は、ATP の合成及び逆反応として加水分解 (F-ATPase) を行う事ができる⁴⁾。

液胞型 (H^+) -ATPase (V-ATPase) は真核生物細胞の細胞内小器官を酸性化する重要な役割を担っている⁵⁻⁸⁾。V-ATPase は 2 つの機能的な領域により構成されている。 V_1 領域はヌクレオチドに結合する部位を有し、 V_0 領域は細胞膜を超えた H^+ の輸送に関与している。V-ATPase はミトコンドリアや葉緑体、細菌などの F-ATPase¹⁻³⁾ と全体的な構造や個々のサブユニットの配列の相同性に関して類似している。

P 型は、ATP 加水分解反応中に無機リン酸が ATPase に直接共有結合したリン酸化反応中間体 (EP) を形成する特徴を有している。
 Na^+, K^+ -ATPase (Na, K -ATPase) ,
 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATPase (Ca -ATPase)⁹⁾,

H⁺,K⁺-ATPase (H,K-ATPase) の3種類が確立されており、詳細な構造や機能に至るまで研究がすすんでいる。

上記の ATPase はいずれも活性発現に Mg²⁺ (Mg) を必要とする。これは ATP の γ 位に Mg が結合した Mg-ATP が ATPase 酵素の基質になりうるためである。興味深いことには、Smagina らはウサギ胃粘膜ミクロソーム分画で Mg 及び K⁺ 存在下で発現する ATPase 活性には、Na,K-ATPase、H,K-ATPase や F-ATPase ではない、50%弱の Basal Mg-ATPase 活性が含まれる事を報告¹⁰⁾している。さらに、Auland ら¹¹⁾はヒト赤血球 ghosts から、Na,K-ATPase や Ca-ATPase ではない、2種類の Mg-ATPase を精製している。これら以外にも上記の ATPase とは分別される Mg で活性化される Basal Mg-ATPase 活性は各種報告¹²⁻¹⁴⁾されているが、その役割や性質に関して詳細は明らかになっていない。

静脈麻酔薬を含む全身麻酔薬の作用機序に関する研究は、生体膜脂質に対する作用を重視するリピド説と、特定の機能性タンパク質に対する作用を重視するタンパク説に大きく分けられるが、そのメカニズムは確定していない。Franks ら¹⁵⁾は全身麻酔薬が非特異的にタンパク質に作用するが、臨床濃度では中枢神経系の比較的限定された一部のタンパク質に作用し、その結果麻酔状態が引き起こされると推測している。全身麻酔薬の作用機序の解明を目的にさまざまなタンパク質に対する麻酔薬の作用が検討された。GABA_A 受容体¹⁶⁾、Ca,Mg-ATPase¹⁷⁻²¹⁾、Na,K-ATPase²²⁻²⁴⁾、protein kinase C²⁵⁾をはじめ全身麻酔薬によって影響を受けるタンパク質は多数存在しているが、その作用の様式には不明な点も多い。我々は過去に揮発性麻酔薬である diethylether, isoflurane, sevoflurane 及び静脈麻酔薬である pentobarbital, thiopental, propofol が Na,K-ATPase に及ぼす影響²⁶⁾、propofol の Na,K-ATPase 活性や Ca-ATPase 活性の抑制機構^{27,28)}、スピンラベル剤

を使用した揮発性麻酔薬及び静脈麻酔薬のリポソーム膜への影響²⁹⁾等の研究を行っている。これらの研究から、各種麻酔薬が Na,K-ATPase 活性や Ca-ATPase 活性を濃度依存的に抑制する結果が得られており、麻酔薬が ATPase 反応機構に直接的な影響を及ぼしていると考えている。

本研究では Mg-ATPase 活性の阻害剤に対する応答性などを指標に、ラット脳に存在する Mg-ATPase を分別し、各種 Mg-ATPase 活性に対する静脈麻酔薬の作用を調べ、過去の研究結果等と比較検討を行った。

材 料 と 方 法

1. ラット脳からの F-ATPase、V-ATPase 及び Basal Mg-ATPase の部分精製

ラット全脳をホモジェネートし調整し膜分画の部分精製を行った。ラット全脳は結合組織を取り除いた後に細切りにし、さらにミキサーにかけてホモジェネートを得た。次に Pottorf³⁰⁾の方法に従って、ホモジェネートを 2,000×g、15 分の遠心を行って得られた沈渣を細胞微細破砕物 (PI) とした。その上清をさらに 20,000×g、30 分の遠心にかけて得られた沈渣を形質膜 (PII) 分画とした。その上清をさらに 100,000×g、75 分の遠心で得られた沈渣をミクロソーム (PIII) 分画とし、上清を (SN-III) とした (Fig.1)。

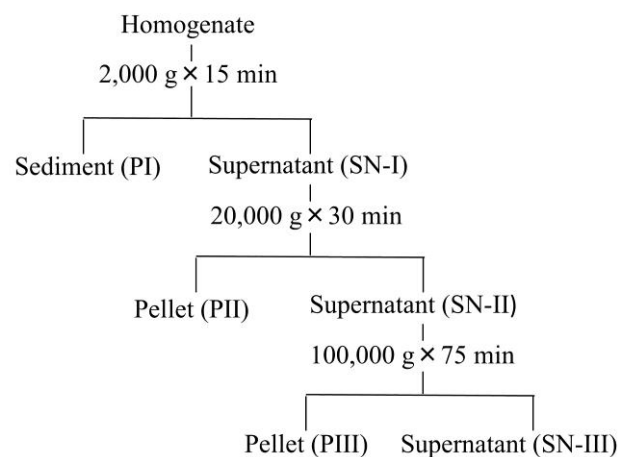


Fig.1 ラット脳から各膜分画の部分精製法

なお、ラットは北海道大学大学院歯学研究科・歯学部動物実験委員会が定めた「動物実験に関する指針」に基づいて取り扱った。

2. Mg-ATPase 活性の測定

Mg-ATPase 活性は、ATP 加水分解の結果生成された無機リン量を Chifflet 法³¹⁾に従って定量することにより測定した。各 ATPase 活性の測定は、以下の組成の反応液で行った。

(1) PII および PIII 分画 Mg-ATPase の pH 依存性と Mg 濃度依存性

14.13 μg の PII 分画もしくは 15.24 μg の PIII 分画と最終濃度にして 25 mM sucrose, 1 mM EGTA-tris, 3.3 mM MgCl_2 に各種 pH の 50 mM tris-HCl もしくは 50 mM tris-酢酸緩衝液を添加した溶液に 5 mM ATP 添加後に 0.3 ml となる反応液で酵素活性反応を行い、pH 依存性を測定した。

Mg 濃度依存性に関しては、PII 及び PIII それぞれの至適 pH で各種濃度の MgCl_2 を添加し、上記と同様の溶液構成にて酵素活性反応を行った。

(2) 各種阻害剤及び静脈麻酔薬の PII 及び PIII 分画 Mg-ATPase 活性に対する影響

14.13 μg の PII 分画と最終濃度が 25 mM sucrose, 50 mM tris-HCl 緩衝液 (pH 9.36), 1 mM EGTA-tris, 1 mM MgCl_2 および各種濃度の阻害剤及び静脈麻酔薬を添加した溶液に、5 mM ATP 添加後に 0.3 ml となる反応液で酵素反応を行った。

15.24 μg の PIII 分画と 25 mM sucrose, 50 mM tris-酢酸緩衝液 (pH 7.43), 1 mM EGTA-tris, 2.7 mM MgCl_2 および各種濃度の阻害剤及び静脈麻酔薬を添加した溶液に、5 mM ATP 添加後に 0.3 ml となる反応液で酵素反応を行った。

すべての実験で反応液を 37°C, 10 分間プレインキュベーション後、5 mM ATP 50 μl を加えて反応を開始し、30 分後 12% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 300 μl を加えて反応を停止した。生成された無機リンは、HITACHI U-2000 分光光度計を用い 850 nm で測定した。

静脈麻酔薬が活性に与える影響は、すべての試薬と酵素を加えた溶液に濃度を変えた種々の静脈麻酔薬を加え、反応を行って測定した。

3. ウエスタンブロッティングによる F-ATPase 及び V-ATPase の検出

発現タンパク質の解析は 10 %ゲルを用いた SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって行った。2-メルカプトエタノールと SDS によりタンパク質を処理し電気泳動を行った。ウエスタンブロッティングは、SDS-PAGE ゲル中のタンパク質を PVDF メンブレン (Immobilon-P Transfer Membrane IPVH00010, Millipore Corporation) に転写することによって行った。抗体は、1次抗体としてウサギ由来の Anti ATP synthase, H^+ transporting, mitochondrial F1 complex, δ subunit (F-ATPase) (CUSABIO CSB-PA002355GA01HU, Lot CPAM061199), マウス由来の Anti V-ATPase C1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-376227, Lot #K2311) を、2次抗体として F-ATPase には Anti-rabbit IgG-HRP (from goat) (Zymax, Lot 20671300) を、V-ATPase には Anti-Mouse IgG2b-HRP (from rabbit) (ZYMED, Lot 20873015) を用いた。またペルオキシダーゼ反応は Western Lighting Plus-ECL (Perkin Elmer, NEL104001EA) を用い、発光をフィルムへの感光によって検出した。

4. データ処理

結果は一つの測定条件に対して triplicate で測定し、平均値と標準偏差を示した。

結 果

1. ラット脳 PII 及び PIII 分画 Mg-ATPase 活性の pH 依存性と Mg 濃度依存性

ラット脳 PII 及び PIII 分画の Mg で活性化される ATPase 活性の pH 依存性を調べた (Fig.2)。

PII 分画の Mg-ATPase 活性は pH の上昇に伴

って増大し pH 9.4 付近で最も高い活性を示したが、PIII 分画の Mg-ATPase 活性は pH 7.4 付近に最大活性を示した。

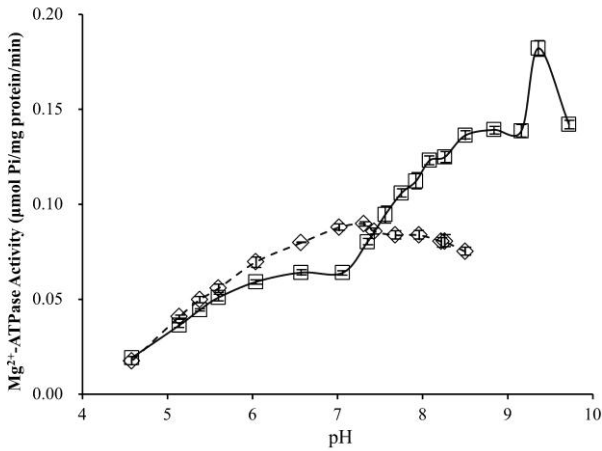


Fig.2 PII 及び PIII Mg-ATPase 活性の pH 依存性

14.13 µg の PII 分画 (□) もしくは 15.24 µg の PIII 分画 (◇) と最終濃度にして 25 mM sucrose, 1 mM EGTA-tris, 3.3 mM MgCl₂ に各種 pH の 50 mM tris-HCl もしくは 50 mM tris-酢酸緩衝液を添加した溶液 250 µl を 37°C で 10 分間プレインキュベーションした。その後、5 mM ATP 溶液 50 µl を添加し、37°C で 30 分間インキュベーション後に 12% SDS 300 µl を加えて反応を停止した。Mg-ATPase 活性は、ATP 加水分解の結果生成された無機リン量を Chifflet 法に従って定量することにより測定した。結果は平均値±標準偏差(n=3)で表記した。

次に至適 pH 下における、各分画の Mg-ATPase 活性の Mg 濃度依存性を測定した (Fig.3)。

最大活性値 (Vmax) は PII が 0.23 µmol Pi/mg protein/min, PIII が 0.12 µmol Pi/mg protein/min であり、PII は PIII に比べて約 2 倍近く高い Vmax 値を示した。また、Hill プロットから算出した 50%活性化濃度 (K_{0.5} 値) は PII が 4.96×10^{-6} M で、PIII が 9.87×10^{-5} M であり、K_{0.5} 値は PII が PIII に比べて、1/20 程度低値であった。

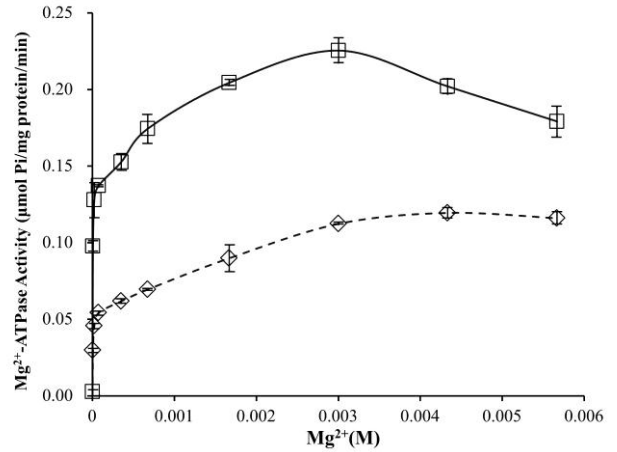


Fig.3 PII 及び PIII Mg-ATPase 活性の Mg 濃度依存性

PII (□) の測定では、14.13 µg の PII 分画と最終濃度にして 25 mM sucrose, 50 mM tris-HCl 緩衝液 (pH 9.36), 1 mM EGTA-tris に各種濃度の Mg を添加した溶液を使用した。PIII (◇) の測定には、15.24 µg の PIII 分画と最終濃度にして 25 mM sucrose, 50 mM tris-酢酸緩衝液 (pH 7.43), 1 mM EGTA-tris に各種濃度の Mg を添加した溶液 250 µl を使用した。Mg 添加後 37°C 下で約 10 分間プレインキュベーションを行い、5 mM ATP 溶液 50 µl を添加し反応を開始した。以後の手順は、Fig.2 と同様である。結果は平均値±標準偏差 (n=3) で表記した。

2. 各種阻害剤の PII 及び PIII 分画 Mg-ATPase 活性に対する影響

最大の活性を示す至適条件下におけるラット脳 PII 及び PIII 分画 Mg-ATPase 活性に対して各種阻害剤を作用させ影響を調べた (Fig.4)。

Tetramisole は最終濃度を 1.25 mM まであげても、両分画の Mg-ATPase 活性は全く抑制されなかった。

LaCl₃ (La) は 500 µM 以下では両分画の Mg-ATPase 活性の抑制は認められなかったが、1 mM まで増加させると PIII Mg-ATPase 活性では 30%程度の抑制が認められた。

100 µM の Na₃VO₄ (vanadate) は PII Mg-ATPase 活性を全く抑制しなかったが、PIII

Mg-ATPase 活性を 10%程度抑制した。

N,N'-dicyclohexyl carbodiimide (DCCD) は濃度に依存して PII Mg-ATPase 活性を抑制し、250 μM では約 80 %の活性を抑制し、PIII Mg-ATPase 活性を 1 mM で約 30 %抑制した。

NaN_3 (Azide) は、PIII では 1 mM で約 15 %の PIII Mg-ATPase 活性を抑制したが、PII では 250 μM の Azide により約 80%の PII Mg-ATPase 活性の抑制が認められた。

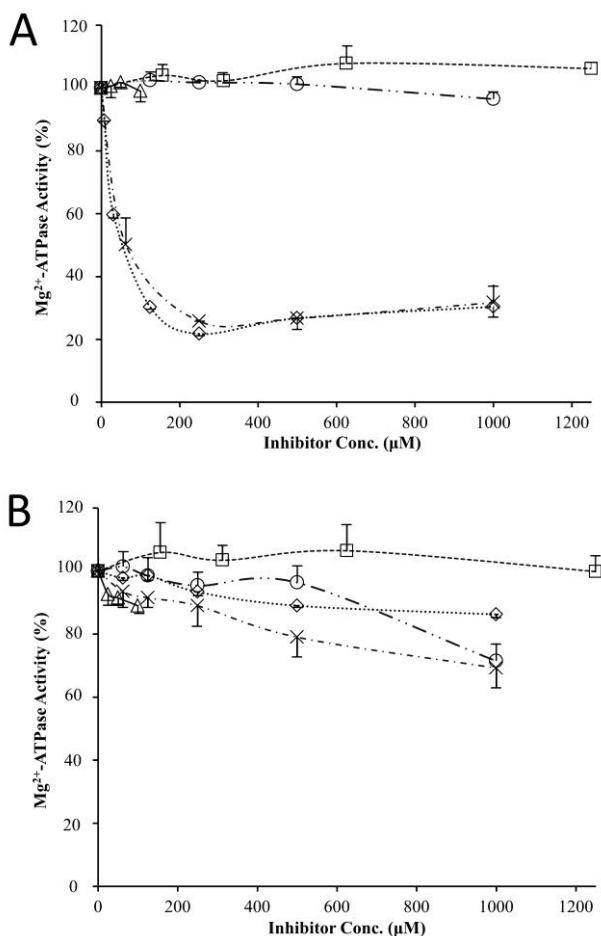


Fig.4 PII Mg-ATPase (A) 及び PIII Mg-ATPase (B) 活性に対する各種阻害剤の影響

PII (A) の測定には、14.13 μg の PII 分画と最終濃度にして 25 mM sucrose, 50 mM tris-HCl 緩衝液 (pH 9.36), 1 mM EGTA-tris, 1 mM MgCl_2 の溶液を使用した。PIII (B)の測定には、15.24 μg の PIII 分画と最終濃度にして 25 mM sucrose, 50 mM tris-酢酸緩衝液 (pH 7.43), 1 mM EGTA-tris, 2.7 mM MgCl_2 の溶液を使用

した。上記溶液に各種濃度の tetramisole (□), LaCl_3 (○), vanadate (Δ), DCCD (×), azide (\diamond) を添加し総量を 250 μl とし、37°Cで約 10 分間プレインキュベーションを行った。その後 5 mM ATP 溶液 50 μl を添加し反応を開始した。以後の手順は、Fig.2 と同様である。結果は阻害剤非添加時の活性を 100 (%) とした相対数値を平均値±標準偏差 (n=3) で表記した。

PII 及び PIII 分画の Mg-ATPase 活性に対する oligomycin A 及び bafilomycin A1 の影響を調べた (Fig.5)。Oligomycin A は PIII Mg-ATPase 活性を全く抑制しなかったが、PII Mg-ATPase 活性を濃度に依存して抑制し 10 μM の oligomycin A で約 60%の活性を抑制した。

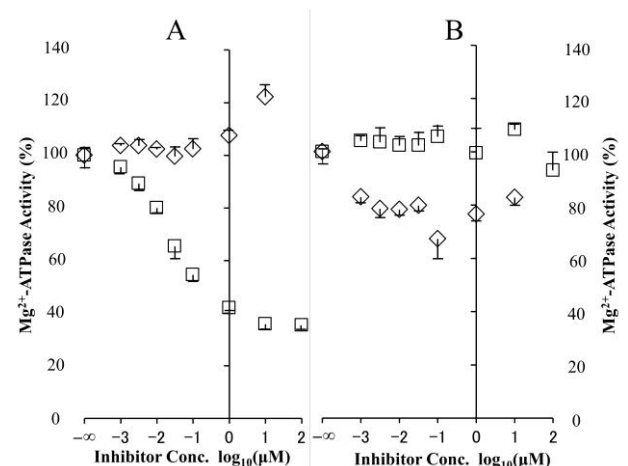


Fig.5 PII Mg-ATPase 活性 (A) 及び PIII Mg-ATPase 活性 (B) に対する oligomycin A (□) 及び bafilomycin A1 (◇) の影響

Fig.4と同様に PII 及び PIII 溶液を作成後、各種濃度の oligomycin A (□) もしくは bafilomycin A1 (◇) を添加し、37°Cで約 10 分間プレインキュベーションを行った。その後 5 mM ATP 溶液 50 μl を添加し反応を開始した。以後の手順は、Fig.2 と同様である。なお、oligomycin A 及び bafilomycin A1 は DMSO に溶解したものを使用し、反応溶液中における DMSO 濃度は 10%であった。結果は阻害剤非添加時の活性

を 100 (%) とした相対数値を平均値 ± 標準偏差 (n=3) で表記した。

Bafilomycin A1 は, PII Mg-ATPase 活性を全く抑制しなかったが, PIII Mg-ATPase 活性を 0.1 μ M bafilomycin A1 で約 30 %抑制した。

続いて, PIII Mg-ATPase 活性に関して感受性の認められた上記各種阻害剤に関して、相互作用に関する実験を行った (Fig.6)。

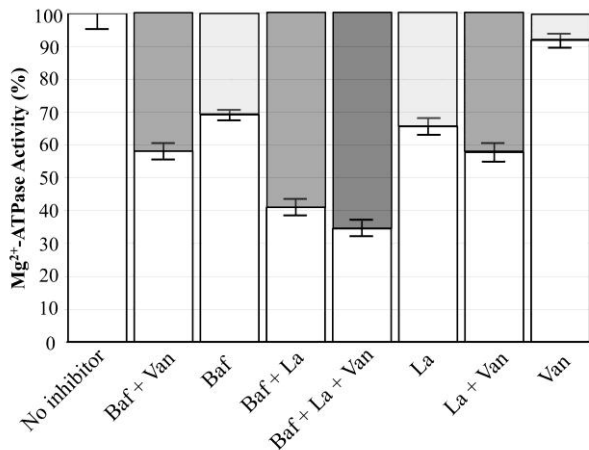


Fig.6 PIII Mg-ATPase 活性に対する各種阻害剤の相互作用

Fig.4と同様にPIII溶液を作成後、最終濃度にして100 μ M vanadate (Van), 2 mM La (La), 0.1 μ M bafilomycin A1 (Baf)となるように、それぞれの阻害剤を単独もしくは複合して添加し溶液総量を250 μ lとし、37°Cで約10分間プレインキュベーションを行った。その後5 mM ATP溶液を50 μ l添加し反応を開始した。以後の手順は、Fig.2と同様である。なお、bafilomycin A1はDMSOに溶解したものを使用したため、すべての反応溶液中のDMSO濃度は10%に統一した。結果は平均値 ± 標準偏差 (n=3) で表記した。

Vanadate (100 μ M), La (2 mM), bafilomycin A1 (0.1 μ M) それぞれ単独では 8.1%, 34.3%, 30.8%の抑制であったが, vanadate + La では 42.2%, vanadate + bafilomycin A1 では 41.9%, La + bafilomycin A1 では 59.0%, vanadate + La

+ bafilomycin A1 では 65.5%であり, この3種阻害剤の阻害作用は相加的であった。

3. ウェスタンブロッティングによる V-ATPase 及び F-ATPase の検出

ラット脳ホモジネート, PI, PII, PIII 及び SN-III における V-ATPase 及び F-ATPase の存在を確定させるためにウェスタンブロッティングを行った (Fig.7)。

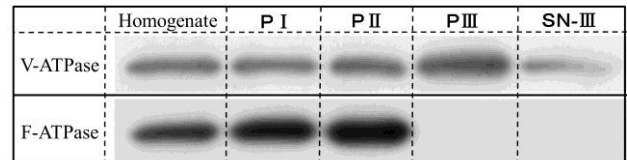


Fig.7 ウェスタンブロッティングによる F-ATPase 及び V-ATPase の検出

1次抗体としてF-ATPaseには、ウサギ由来のAnti ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, δ subunit, V-ATPaseにはマウス由来のAnti V-ATPase C1を使用した。2次抗体としてF-ATPaseにはAnti-rabbit IgG-HRP (from goat)を、V-ATPaseにはAnti-Mouse IgG2b-HRP (from rabbit)を用いた。

V-ATPaseは、すべての分画に存在したが、同じタンパク質量に対して存在する割合は、ホモジネートを1.00とすると、PIが0.99, PIIが1.01, PIIIが1.34, SN-IIIが0.49であり、V-ATPaseの精製率(存在率)はPIII分画が最も高かった。

F-ATPaseは、ホモジネート, PI, PII分画にのみ存在が認められ、PIII及びSN-III分画には検出されなかった。同じタンパク質量に対して存在する割合は、ホモジネートを1.00とすると、PIが1.22, PIIが1.37であり、F-ATPaseの精製率(存在率)はPII分画が最も高かった。

4. F-ATPase 活性, V-ATPase 活性, 及び Basal Mg-ATPase 活性に対する静脈麻酔薬の影響

Fig.8に各種ATPaseの測定法の模式図を記した (Fig.8)。

F-ATPase活性は最も精製率の高かったPII分画を用いて、500 μ M azideの添加により抑制され

る活性を F-ATPase 活性, 抑制されない活性を PII Basal Mg-ATPase 活性として測定を行った. V-ATPase 活性は最も精製率の高かった PIII 分画を用いて, 0.1 μ M bafilomycin A1 の添加により抑制される活性を V-ATPase 活性とした. PIII 分画で bafilomycin A1 及び vanadate を作用させても残存する ATPase 活性を, PIII Basal Mg-ATPase 活性とした.

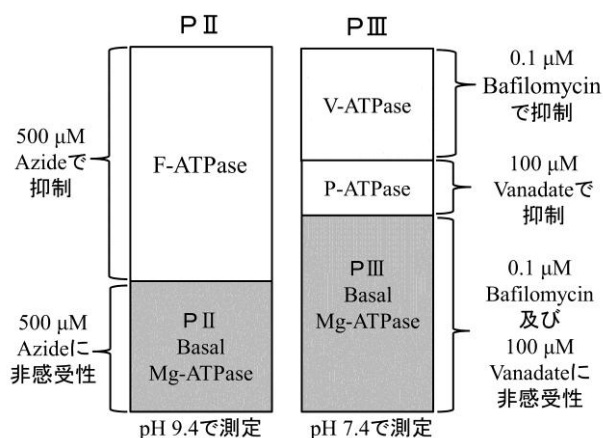


Fig.8 各種 ATPase 測定法の概念図

各種 ATPase 活性に対する 2,6-diisopropylphenol (propofol) の影響を Fig.9 に示した.

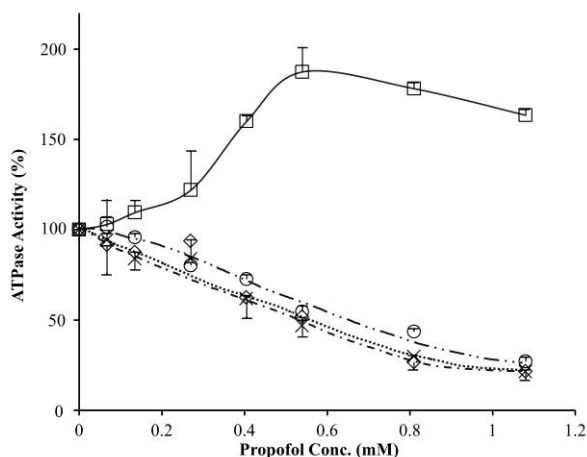


Fig.9 各種 ATPase 活性に対する propofol の影響

14.13 μ g の PII 分画と最終濃度にして 25 mM sucrose, 50 mM tris-HCl 緩衝液 (pH 9.36), 1 mM EGTA-tris, 1 mM $MgCl_2$ を加えた溶液に, 0.5 mM azide を添加したものと添加していないものを準備した. また, 15.24 μ g の PIII 分画と最終濃度にして 25 mM sucrose, 50 mM tris-酢酸緩衝液 (pH 7.43), 1 mM

EGTA-tris, 2.7 mM $MgCl_2$, 100 μ M vanadate 溶液に, 0.1 μ M bafilomycin A1 を添加したものと添加していないものを準備した. 上記溶液に各種濃度の propofol を添加し溶液総量を 250 μ l とし, 37°C で約 10 分間プレインキュベーションを行った. その後 5 mM ATP 溶液 50 μ l を添加し反応を開始した. 以後の手順は, Fig.2 と同様である. なお, propofol は DMSO に溶解したものを使用し, すべての反応溶液中における DMSO 濃度は 10% に統一した. PII 測定において azide 添加群と非添加群の差を F-ATPase 活性 (\square) とし, azide 添加群を PII Basal Mg-ATPase 活性 (\times) とした. また PIII 測定において bafilomycin A1 添加群と非添加群の差を V-ATPase 活性 (\diamond) とし, bafilomycin A1 添加群を PIII Basal Mg-ATPase 活性 (\circ) とした. 結果は, propofol 非添加時の活性を 100 (%) とした相対数値を平均値 \pm 標準偏差 (n=3) で表記した.

Propofol は V-ATPase 活性, PII 及び PIII Basal Mg-ATPase 活性に対しては濃度依存的に ATPase 活性を抑制した. 50% 抑制濃度 (K_i 値) は V-ATPase 活性が 0.53 mM, PII Basal Mg-ATPase 活性は 0.54 mM, PIII Basal Mg-ATPase 活性は 0.64 mM であった. ところが, F-ATPase 活性に対しては 0.6 mM 程度まで濃度依存的に 80% 程度の活性の増強が認められた.

各種 ATPase 活性に対する pentobarbital の影響を Fig.10 に示した.

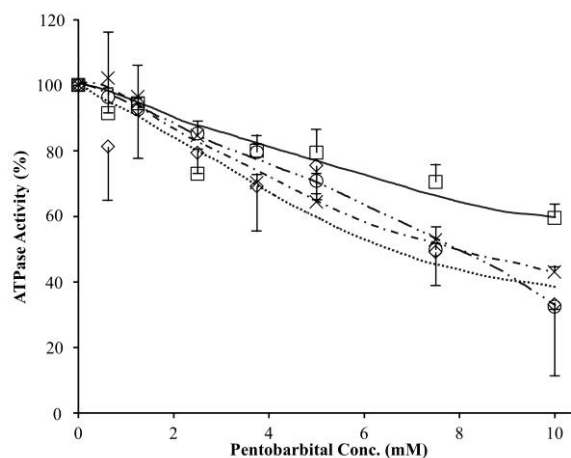


Fig.10 各種 ATPase 活性に対する pentobarbital の影響

Fig.9と同様の手順で溶液の作製を行った。上記溶液に各種濃度のpentobarbitalを添加し溶液総量を250 μ lとし、37°Cで約10分間プレインキュベーションを行った。なお、pentobarbitalはDMSOに溶解したものを使用し、すべての反応溶液中におけるDMSO濃度は10%に統一した。その後5 mM ATP溶液50 μ lを添加し反応を開始した。以後の手順は、Fig.2と同様である。Fig.9と同様の手法で、F-ATPase活性(\square)、PII Basal Mg-ATPase活性(\times)、V-ATPase活性(\diamond)、PIII Basal Mg-ATPase活性(\circ)を測定した。結果は、pentobarbital非添加時の活性を100(%)とした相対数値を平均値 \pm 標準偏差(n=3)で表記した。

PentobarbitalはすべてのATPase活性を濃度依存的に抑制した。Ki値はV-ATPaseは7.29 mM、PII Basal Mg-ATPaseは8.04 mM、PIII Basal Mg-ATPaseは7.32 mMであった。

各種ATPase活性に対するthiopentalの影響をFig.11に示した。

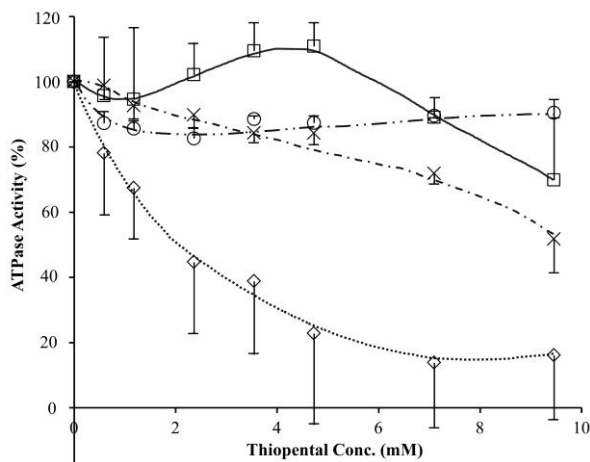


Fig.11 各種ATPase活性に対するthiopentalの影響

Fig.9と同様の手順で溶液の作製を行った。上記溶液に各種濃度のthiopentalを添加し溶液総量を250 μ lとし、37°Cで約10分間プレインキュベーションを行った。その後5 mM ATP溶液50 μ lを添加し反応を開始した。以後の手順は、Fig.2と同様である。Fig.9と同様の手法で、F-ATPase活性(\square)、PII Basal Mg-ATPase活性(\times)、V-ATPase活性(\diamond)、PIII Basal Mg-ATPase活性(\circ)を測定した。結果は、thiopental非添加時の活性を100(%)とした相対数値を平均値 \pm 標準偏

差(n=3)で表記した。

Thiopentalでは各種ATPase活性に対する影響に差異を認めた。V-ATPase活性に対しては最も感受性が高く、5 mM程度で約80%のATPase活性の抑制が認められた(Ki値は1.91 mM)。ところが、F-ATPase活性及びPII Basal Mg-ATPase活性に対しては、10 mM程度まで濃度を上げて約40%程度の活性抑制しか認められなかった。さらにPIII Basal Mg-ATPase活性に対しては、10 mMまでの濃度ではほとんど活性に影響を与えなかった。

考 察

1. ラット脳に存在するMg-ATPase活性に関して

本研究では、Pottorfらの手法を用いて、ラット脳ホモジネートから各分画の抽出を行った。Pottorfらによると、PII分画には形質膜Ca-ATPase(PMCA)に富んだ形質膜分画が抽出され、PIII分画には筋小胞体Ca-ATPase(SERCA)に富んだミクロソーム分画が抽出されると述べている。本研究はMg単独で活性化されるMg-ATPase活性を調べたが、PIIとPIII分画では、それぞれ活性の至適pHやMgに対する親和性の異なるMg-ATPase活性が検出された。これらのMg-ATPaseの性質を明らかにすべく、まず各種阻害剤のMg-ATPase活性に対する影響を検討した。

PII分画のMg-ATPase活性はpH 9.4付近で最も高い活性を示したことから、アルカリ性フォスファターゼ(ALP)によるATP加水分解を測定している可能性を考えて、ALPの阻害剤であるtetramisoleの影響を調べたが、PII及びPIIIのATPase活性はtetramisoleに対し感受性を示さなかった。したがってPIIとPIII Mg-ATPase活性がALPによるものである可能性は否定された。

VanadateはP型ATPaseに共通する阻害剤と考えられている。そこでvanadateのMg-ATPaseに対す

る作用を調べたが、PIII Mg-ATPase 活性のみ 10 % 程度の抑制が認められた。このことから、PII Mg-ATPase 活性は P 型の ATPase によるものではなく、PIII Mg-ATPase 活性は一部分 P 型の ATPase 活性が含まれる可能性が示唆された。

比較的低濃度 (50 μ M) の la によりラット脳シナプトソームの形質膜 Ca-ATPase (PMCA) が 80 % 弱抑制されることが報告¹²⁾されている。La の Mg-ATPase に対する作用を調べたところ PII Mg-ATPase 活性は抑制されなかったが、PIII Mg-ATPase 活性は 1 mM の La により 30 % 程度抑制された。しかし、50 μ M 程度では活性抑制が起こっておらず、また vanadate とは相加的な抑制であることから、La により抑制される PIII Mg-ATPase 活性は PMCA ではないと考えられる。

DCCD は F-ATPase, V-ATPase, 一部の P-ATPase などの H⁺輸送型 ATPase を阻害^{32, 33)}する事が報告されている。この DCCD により Mg-ATPase 活性が PII は約 80%, PIII は約 30% 抑制されたことから、F-ATPase や V-ATPase である可能性が示唆された。そこで F-ATPase の特異的阻害剤である oligomycin A^{4, 33)} と V-ATPase の特異的阻害剤である bafilomycin A1³⁴⁾ の作用を測定した。

Oligomycin A は PIII Mg-ATPase には非感受性であったが、PII Mg-ATPase 活性を抑制した。また、F-ATPase の別の阻害剤である azide^{32, 35)} も PII Mg-ATPase を抑制し、azide と DCCD の抑制曲線は類似したものであった。したがって、PII の DCCD 感受性 Mg-ATPase は F-ATPase である可能性が高いと考えられた。

また、bafilomycin A1 は oligomycin A とは逆に、PII Mg-ATPase 活性には非感受性であったが、PIII Mg-ATPase 活性を 30 % 程度抑制したことから、PIII の DCCD 感受性 Mg-ATPase は V-ATPase である可能性が高いと考えられた。高濃度 (100 μ M 以上) の bafilomycin A1 は P-ATPase も抑制する³⁴⁾と報告されているが、ここでの抑制は非常に低濃度 (0.1 μ M) の bafilomycin A1 で起こっており、V-ATPase

活性が特異的に抑制されているものと考えられた。

F-ATPase 及び V-ATPase の存在を確定するために、ウエスタンブロッティングを行ったが、F-ATPase は PII に、V-ATPase は PIII に最も多く検出され、ATPase 活性の実験結果を支持するものであった。

PIII Mg-ATPase に対する各阻害剤 (bafilomycin A1, vanadate, La) の相互作用を調べた実験では、これら 3 種類の阻害剤の阻害作用はいずれも相加的であった。これらの阻害剤はそれぞれ別の Mg-ATPase を抑制していると考えられ、PIII Mg-ATPase 活性は 3 種類以上の酵素が混合したものであると考察された。

また、azide, bafilomycin A1, vanadate は F, V, P-ATPase 活性をほぼ完全に消失させる阻害剤³⁴⁾であり、これらの阻害剤を作用させても残存する酵素活性は F, V, P-ATPase 活性の部分反応ではなく、これらとは分別される酵素活性 (Basal Mg-ATPase 活性) と考えられる。そこで、F-ATPase, V-ATPase, P-ATPase 及び Basal Mg-ATPase を上記阻害剤で区別し、各種 ATPase 活性に対する静脈麻酔薬の影響をさらに検討した。

2. ラット脳各種 ATPase に対する麻酔薬の影響に関して

(1) propofol の作用

我々は過去にラット脳の同じ膜分画を使用して、Na, K-ATPase 活性に対する propofol の作用²⁷⁾や Ca-ATPase 活性に対する propofol, pentobarbital, thiopental の作用²⁸⁾を検討している。これによると propofol は混合阻害の様式で Na, K-ATPase 活性を抑制し、Ki 値は 0.26 mM であり、1.03 mM 濃度ではほぼ完全な阻害が起こっている。また、イヌ腎ミクロソームに存在する Na, K-ATPase に対して propofol を作用させた研究²²⁾でも、0.8 mM の propofol で約 90 % 程度活性が抑制 (Ki 値は 0.13 mM) されており、概ね類似した結果が報告されている。

Ca-ATPase に関する我々の研究では、

Na,K-ATPaseと同様に Propofol 1.03 mM でほぼ完全に抑制し、 K_i 値は 0.35 mM であった。また、PII の Ca-ATPase では 0.2 mM 以下の低濃度の propofol でわずかに活性化が認められた。ヒト赤血球から精製された PMCA とウサギ骨格筋から抽出した SERCA に対して同様に propofol を作用させた研究¹⁷⁾でも、0.4 mM 程度の propofol でほぼ完全に活性が抑制されている。揮発性麻酔薬 halothane に [¹⁴C] を標識としてラベルした研究によると、halothane が SERCA (SR 膜) に飽和的に結合し、酵素形態に何らかの変化を与え、酵素機能に影響を与えている可能性が報告¹⁹⁾されている。この結合は酵素の非極性部位に起こっており¹⁸⁾、Lopez らは propofol も同様に Ca-ATPase の非極性部位に直接作用する事で、同様の影響を与えている可能性を示唆¹⁷⁾している。

興味深いことに Lopez らの研究¹⁷⁾では、SERCA は 0.1 mM 以下の低濃度の propofol により活性化されており、活性化は低温になる程強まり、16 °C 下では 50 % 程度の増強が起こっている。また、SERCA に対する臨床濃度では活性化され、高濃度では抑制されるという 2 相性の影響は、halothane でも報告¹⁹⁾されている。Ca-ATPase が十分な活性を保つには、触媒反応中に酵素の回転運動を制限しないような、膜の流動性が必要である。全身麻酔薬の中には、細胞膜にあるアシル鎖領域の流動性を増加させるものがあり、このような低濃度の麻酔薬による SERCA の活性化には、この膜の流動性の増加が関与している²⁰⁾と Kutchai らは考えている。

今回我々は propofol の F-ATPase, V-ATPase 及び Basal Mg-ATPase 活性に対する作用を調べたが、V-ATPase, PII 及び PIII Basal Mg-ATPase は Na,K-ATPase や Ca-ATPase と類似した抑制を認めたが、 K_i 値は Na,K-ATPase や Ca-ATPase より若干高かった。ところが、F-ATPase では興味深い事に 0.6 mM 程度まで 80 % 程度活性の増加が認められた。この活性化は SERCA で起こっている活性化

に比べて、はるかに高濃度で起こっている。Rigoulet らによって行われた研究でも、同様に 0.4 mM 以下の propofol がラット肝の F-ATPase 活性を約 2 倍程度増強するという結果³⁶⁾が得られている。Propofol による ATP 加水分解率の増加とともに、ミトコンドリアの膨張の程度が減少し、膜内外の塩濃度勾配が低下する現象が起こっていた。Rigoulet らは、protonophoric な性質により酸化的リン酸化反応が抑制されるとともに、ミトコンドリア内膜の透過性亢進やプロトンポンプ (電子伝達系) の低能率化が起こることで膜内外の電位差が減少していると述べている。今回我々は F-ATPase と同一の祖先から派生し、相同性が高く性質が類似した V-ATPase に対する propofol の影響を同時に測定することができたが、上記のとおり F-ATPase と V-ATPase では全く異なる結果が得られた。この結果から、propofol が F-ATPase 酵素に直接的に結合するなどの作用をしているのではなく、F-ATPase が付着するミトコンドリア内膜に対して何らかの影響を及ぼすことにより、特異的に ATPase 活性が亢進しているものと考えられた。また、F-ATPase や V-ATPase の H⁺ 輸送機構は回転モータ型であり、Ca-ATPase のような P-ATPase とは異なっている。したがって、F-ATPase 活性が亢進する機序に関しては、ミトコンドリア内膜の流動性が増加することによるものではなく、ミトコンドリア内膜の H⁺ 透過性が亢進する現象が起こり、*in vitro* 微小環境下において ATPase 活性が最も活発に起こる至適 pH が維持されているものと推察された。確定的な機序は不明ではあるが、propofol がミトコンドリアに対して特異的な薬理的性質を有していることは間違いなく、更なる研究が必要である。

(2) Pentobarbital の作用

我々の以前の研究では、pentobarbital はウサギ脳 Na,K-ATPase を濃度依存的に抑制し、 K_i 値は 4.54 mM²⁶⁾であった。また、ラット脳 Ca-ATPase でも濃度依存的な抑制を認め、 K_i 値は 3.0 mM²⁸⁾であった。

今回我々の実験結果では、pentobarbital はすべての ATPase 活性を濃度依存的に抑制した。Ki 値は F-ATPase 活性が 10 mM 以上で、V-ATPase、PII 及び PIII Basal Mg-ATPase は 7~8 mM 程度と、いずれの ATPase も Na,K-ATPase や Ca-ATPase に比べて pentobarbital に対して低感受性であった。

マウスの線維芽細胞 (LM) の形質膜を用いた実験²³⁾では、Na,K-ATPase 活性は pentobarbital により 2 相性 (0.25 mM と 2.5 mM) に活性化されており、0.25 mM では約 20 % 程度活性化されていたが、10 mM 程度の高濃度になると 50 % 程度抑制が認められた。ところが同じ LM の Basal Mg-ATPase は、pentobarbital 0~10mM の範囲で、全く影響を受けなかったと報告されている。この活性化は負に荷電された barbiturate が、細胞膜表面の膜電位に変化を与え、膜の流動化 (Fluidization) が起こっている為であろうと Sweet らは考えている²³⁾。しかし、我々の研究では、LM の Na,K-ATPase で認められた 2 相性の活性化は起こらず、また Basal Mg-ATPase 活性は PII, PIII とともに抑制される結果となった。

(3) Thiopental の作用

我々の以前の研究では、thiopental はウサギ脳 Na,K-ATPase を濃度依存的に抑制し、Ki 値は 2.34 mM²⁶⁾であった。また、ラット脳 Ca-ATPase でも濃度依存的な抑制を認め、Ki 値は 1.5 mM²⁸⁾であった。ヒト胎盤の合胞体栄養細胞層形質膜から精製した Na,K-ATPase に対して thiopental を作用させた研究²⁴⁾では、1.2 mM の thiopental で 50 % 近い抑制が認められ、我々の研究と近似した値であった。

今回の研究では、thiopental はすべての ATPase 活性を抑制したものの、その程度は各 ATPase 活性で異なり、9.5 mM まで濃度をあげても 50 % 以上の抑制を認めたのは V-ATPase のみであり、Ki 値は 1.91 mM と Na,K-ATPase や Ca-ATPase と類似していた。他の ATPase は thiopental に対し、いずれも低感受性であり、PIII Basal Mg-ATPase はほとんど抑制が認められなかった。同じ barbiturates であ

る pentobarbital と比較して、このような差異が生じる結果となった事は興味深い。

(4) 麻酔薬が ATPase へ与える影響と麻酔作用や副作用との関連性

全身麻酔薬の作用機序に関してはさまざまな説があり、現在までにその確定的なメカニズムは明らかではない。その中で、全身麻酔作用は神経細胞の脂質二重膜に作用するのか、膜タンパク質に直接作用するのかという議論¹⁵⁾がある。Franks and Lieb らは、全身麻酔薬は基本的には非特異的にタンパク質に作用し、臨床濃度で阻害される限定された一部のタンパク質の変化によって麻酔状態が引き起こされると推測している。GABA_A受容体¹⁶⁾、Ca,Mg-ATPase¹⁷⁻²¹⁾、Na,K-ATPase²²⁻²⁴⁾、protein kinase C²⁵⁾をはじめ臨床濃度の全身麻酔薬によって影響を受けるタンパク質は多数存在しているが、これらが特異的に全身麻酔薬の作用する受容体であると特定するには至っていない。そこで、今まではほとんど研究も行われていない Basal Mg-ATPase に対する静脈麻酔薬の作用を今回検討した。

臨床的に麻酔状態を得るために必要な propofol 濃度はヒト血清で 8~180 μM^{15, 37, 38)}とさまざまな報告がある。また、ヒトにおける EC₅₀ 値は pentobarbital が 0.050 mM で thiopental が 0.025 mM であると報告¹⁵⁾されている。これらの濃度では、Basal Mg-ATPase 活性は十分に阻害されない事が今回の研究から明らかになった。以前の我々の研究でも、同一の検体や薬剤を使用しているが、Ca-ATPase 活性、Na,K-ATPase 活性に対する影響と比較しても、Basal Mg-ATPase 活性は静脈麻酔薬に対して比較的低感受性であった。麻酔効果の作用点という観点から見れば、Basal Mg-ATPase はこれら静脈麻酔薬の作用には関係しないと評価するのが妥当かもしれない。

ところで、propofol は麻酔深度の調節が容易で安定した鎮静効果が得られることから、全身麻酔の導入や維持だけではなく、ICU における長時間の鎮静管理にも頻用されている。しかし高用量の

propofol を長時間使用した場合に、低頻度ではあるが代謝性アシドーシス、徐脈性不整脈や横紋筋融解症などの症状が発現し致死的となり得る propofol infusion syndrome (PRIS) が報告^{39,40)}されている。この疾患の詳細な原因は不明であるが、propofol によるミトコンドリアの脂質代謝障害や電子伝達系の阻害作用^{39,40)}、あるいはアポトーシス作用^{41, 42)}による可能性が報告されている。Propofol は小分子量の両親媒性物質であることから、細胞膜および細胞質いずれの領域へも広く分布し、細胞内小器官であるミトコンドリアへも分布すると推定される。*in vitro* では、propofol はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化および電子伝達系を抑制^{43,44)}することや、膜電位を低下することが以前から報告されている。また、アポトーシスという細胞死のメカニズムが確立され、ミトコンドリアが内因性経路として反応の要であることが明らかになった。Propofol は、ミトコンドリア膜の透過性を亢進させ、ミトコンドリア内のシトクロム c を細胞質内へ漏出させることで、内因性経路を活性化しアポトーシスを誘導するとの報告⁴²⁾がなされている。今回我々の研究からも、propofol のミトコンドリアに対する特異的な薬理学的作用が観察された。Propofol は現在臨床において頻用されている静脈麻酔薬であるだけに、PRIS のような副作用を引き起こすメカニズムに関しては早急な解明が必要であり、今後の大きな研究課題である。

結 論

ラット脳にはすでに知られている活性発現に Mg を必要とする P-ATPase, V-ATPase, F-ATPase が存在するが、それらとは性質の異なる Basal Mg-ATPase が存在する。静脈麻酔薬はこれらの Mg で活性化される ATPase に対して基本的に抑制するが、propofol は F-ATPase 活性を特異的に促進した。これら ATPase 活性に対する静脈麻酔薬の作用

と麻酔作用や副作用との関連性にはさらなる検討が必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々のご援助、ご協力いただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Weber J, Senior AE: Catalytic mechanism of F1-ATPase. *Biochim Biophys Acta*,1319:19-58,1997.
- 2) Cross RL, Duncan TM: Subunit rotation in FOF1-ATP synthases as a means of coupling proton transport through F0 to the binding changes in F1. *J Bioenerg Biomembr*,28:403-408,1996.
- 3) Pedersen PL: Frontiers in ATP synthase research: understanding the relationship between subunit movements and ATP synthesis. *J Bioenerg Biomembr*,28:389-395,1996.
- 4) Lutter R, Saraste M, van Walraven HS, Runswick MJ, Finel M, Deatherage JF, Walker JE: F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem J*,295:799-806,1993.
- 5) Stevens TH, Forgac M: Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol*,13:779-808,1997.
- 6) Kane PM, Stevens TH: Subunit composition, biosynthesis, and assembly of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J Bioenerg Biomembr*,24:383-393,1992.
- 7) Sze H, Ward JM, Lai S: Vacuolar H⁽⁺⁾-translocating ATPases from plants: structure, function, and isoforms.

J Bioenerg Biomembr,24:371-381,1992.

8) Gluck SL: The structure and biochemistry of the vacuolar H⁺ ATPase in proximal and distal urinary acidification. J Bioenerg Biomembr,24:351-359,1992.

9) Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E: The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. Arch Biochem Biophys,476:65-74,2008.

10) Smagina M, Dolgova N, Rubtsov A, Lopina O: Mg-ATPase from microsomal fraction of rabbit gastric mucosa is ecto-ATP-diphosphohydrolase. Ann N Y Acad Sci,986:658-659,2003.

11) Auland ME, Morris MB, Roufogalis BD: Separation and characterization of two Mg(2+)-ATPase activities from the human erythrocyte membrane. Arch Biochem Biophys,312:272-277,1994.

12) Michaelis EK, Michaelis ML, Chang HH, Kitos TE: High affinity Ca²⁺-stimulated Mg²⁺-dependent ATPase in rat brain synaptosomes, synaptic membranes, and microsomes. J Biol Chem,258:6101-6108,1983.

13) Gorini A, Canosi U, Devecchi E, Geroldi D, Villa RF: ATPases enzyme activities during ageing in different types of somatic and synaptic plasma membranes from rat frontal cerebral cortex. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,26:81-90,2002.

14) McConnell EJ, Wagoner MJ, Keenan CE, Raess BU: Inhibition of calmodulin-stimulated (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity by dimethyl sulfoxide. Biochem Pharmacol,57:39-44,1999.

15) Franks NP, Lieb WR: Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. Nature,367:607-614,1994.

16) Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL: Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on

GABA(A) and glycine receptors. Nature,389:385-389,1997.

17) Lopez MM, Kosk-Kosicka D: Entropy-driven interactions of anesthetics with membrane proteins. Biochemistry,36:8864-8872,1997.

18) Lopez MM, Kosk-Kosicka D: How do volatile anesthetics inhibit Ca(2+)-ATPases? J Biol Chem,270:28239-28245,1995.

19) Kosk-Kosicka D, Fomitcheva I, Lopez MM, Eckenhoff RG: Heterogeneous halothane binding in the SR Ca²⁺-ATPase. FEBS Lett,402:189-192,1997.

20) Kutchai H, Geddis LM, Jones LR, Thomas DD: Differential effects of general anesthetics on the quaternary structure of the Ca-ATPases of cardiac and skeletal sarcoplasmic reticulum. Biochemistry,37:2410-2421,1998.

21) Franks JJ, Horn JL, Janicki PK, Singh G: Halothane, isoflurane, xenon, and nitrous oxide inhibit calcium ATPase pump activity in rat brain synaptic plasma membranes. Anesthesiology,82:108-117,1995.

22) Kutchai H, Geddis LM, Farley RA: Effects of general anaesthetics on the activity of the Na,K-ATPase of canine renal medulla. Pharmacol Res,40:469-473,1999.

23) Sweet WD, Schroeder F: Charged anaesthetics alter LM-fibroblast plasma-membrane enzymes by selective fluidization of inner or outer membrane leaflets. Biochem J,239:301-310,1986.

24) Mazzanti L, Rabini RA, Staffolani R, Benedetti G, Cester N, Lenaz G: Modifications induced by general anesthetics on Na⁺/K⁺ ATPase obtained from human placenta. Biochem Biophys Res Commun,173:1248-1251,1990.

25) Slater SJ, Cox KJ, Lombardi JV, Ho C, Kelly MB, Rubin E, Stubbs CD: Inhibition of protein kinase C by alcohols and anaesthetics. Nature,364:82-84,1993.

26) 川田 達: 全身麻酔薬および関連薬がウサギ脳 Na⁺, K⁺-ATPase に及ぼす影響に関する研究. 北海

- 道歯誌,20:39-50,1999.
- 27) Hase Y, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Fukushima K: Mechanism for propofol inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat brain. 北海道歯誌,32:147-155,2012.
- 28) 田仲 宏光, 出山 義昭, 吉村 善隆, 鈴木 邦明, 福島 和昭: ラット脳カルシウム ATPase 活性の静脈麻酔薬による抑制. 北海道歯誌,32:222-229,2012.
- 29) 渋谷 真希子, 平沖 敏文, 木村 邦衛, 堤 耀廣, 鈴木 邦明, 福島 和昭: リポソーム中に存在するスピラベル剤の ESR スペクトルと全身麻酔薬の影響. 北海道歯誌,25:68-76,2004.
- 30) Pottorf WJ, De Leon DD, Hessinger DA, Buchholz JN: Function of SERCA mediated calcium uptake and expression of SERCA3 in cerebral cortex from young and old rats. Brain Res,914:57-65,2001.
- 31) 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 ATPases. Anal Biochem,168:1-4,1988.
- 32) Wolvetang EJ, Wanders RJ, Schutgens RB, Berden JA, Tager JM: Properties of the ATPase activity associated with peroxisome-enriched fractions from rat liver: comparison with mitochondrial F1F0-ATPase. Biochim Biophys Acta,1035:6-11,1990.
- 33) Uchida E, Ohsumi Y, Anraku Y: Purification and properties of H⁺-translocating, Mg²⁺-adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem,260:1090-1095,1985.
- 34) Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K: Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. Proc Natl Acad Sci USA,85:7972-7976,1988.
- 35) Kakinuma Y, Ohsumi Y, Anraku Y: Properties of H⁺-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem,256:10859-10863,1981.
- 36) Rigoulet M, Devin A, Averet N, Vandais B, Guerin B: Mechanisms of inhibition and uncoupling of respiration in isolated rat liver mitochondria by the general anesthetic 2,6-diisopropylphenol. Eur J Biochem,241:280-285,1996.
- 37) Morgan DJ, Campbell GA, Crankshaw DP: Pharmacokinetics of propofol when given by intravenous infusion. Br J Clin Pharmacol,30:144-148,1990.
- 38) Kazama T, Ikeda K, Morita K: The pharmacodynamic interaction between propofol and fentanyl with respect to the suppression of somatic or hemodynamic responses to skin incision, peritoneum incision, and abdominal wall retraction. Anesthesiology,89:894-906,1998.
- 39) 佐藤 美菜子, 岡崎 薫: Propofol Infusion Syndrome (PRIS). 臨床麻酔,30:669-680,2006.
- 40) 岡崎 薫: Propofol Infusion Syndrome. 臨床麻酔,33:329-348,2009.
- 41) 土屋 正彦: 静脈麻酔薬, 特にプロポフォールの抗酸化保護作用とアポトーシス作用. Anesth 21 Cent,14:11-21,2012.
- 42) Hsing CH, Chen YH, Chen CL, Huang WC, Lin MC, Tseng PC, Wang CY, Tsai CC, Choi PC, Lin CF: Anesthetic propofol causes glycogen synthase kinase-3beta-regulated lysosomal/mitochondrial apoptosis in macrophages. Anesthesiology,116:868-881,2012.
- 43) Branca D, Roberti MS, Lorenzin P, Vincenti E, Scutari G: Influence of the anesthetic 2,6-diisopropylphenol on the oxidative phosphorylation of isolated rat liver mitochondria. Biochem Pharmacol,42:87-90,1991.
- 44) Schenkman KA, Yan S: Propofol impairment of mitochondrial respiration in isolated perfused guinea pig hearts determined by reflectance spectroscopy. Crit Care Med,28:172-177,2000.

Effects of intravenous anesthetics on the activities of various ATPases in rat brain

Takeshi Miyamoto

Abstract: The effects of general anesthetics on functional proteins remain to be clarified. This study examined whether the activity of magnesium-dependent ATPase (Mg^{2+} -ATPase) in the rat brain is a target for intravenous anesthetics. The effects of propofol, pentobarbital, and thiopental on magnesium-dependent ATPase in the plasma membrane fraction (PII) and microsomal fraction (PIII) isolated from rat brain homogenates by the method of Pottorf were examined.

The optimal pH values for Mg^{2+} -ATPase activities in PII and PIII were 9.4 and 7.4, respectively. The Mg^{2+} -ATPase activity of PII was inhibited by about 80% by NaN_3 (sodium azide), an inhibitor of F-type ATPase. The Mg^{2+} -ATPase activity of PIII was inhibited by about 30% by the V-type ATPase inhibitor bafilomycin, and by about 10% by the P-type ATPase inhibitor vanadate. Western blotting analysis revealed that the largest amount of F-type ATPase was detected in PII, and the largest amount of V-type ATPase was detected in PIII. We defined all ATPase activity that was insensitive to the above inhibitors as basal Mg^{2+} -ATPase activity. In the presence of these inhibitors, we examined the effects of intravenous anesthetics on the activities of various ATPases. Propofol inhibits V-type ATPase activity, PII basal Mg^{2+} -ATPase activity, and PIII basal Mg^{2+} -ATPase activity in a dose-dependent manner; however, F-type ATPase activity was uniquely stimulated by about 80% by propofol at concentrations below 0.6 mM. Pentobarbital inhibited all types of ATPases in a dose-dependent manner. Thiopental inhibited all types of ATPases to varying degrees.

Key words: intravenous anesthetics, F-type ATPase, V-type ATPase, basal Mg^{2+} -ATPase