HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Na,K-ATPase活性のフッ素による阻害
Author(s)	沖野, 雄一郎; 出山, 義昭; 吉村, 善隆; 鈴木, 邦明; 本多, 丘人
Citation	北海道歯学雑誌, 44, 37-48
Issue Date	2023-09-15
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/90490
Type	article
File Information	44_07.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道歯誌　44：37－48，2023.

原　著

Na,K-ATPase活性のフッ素による阻害

沖野　雄一郎[1)]　出山　義昭[2)]　吉村　善隆[2)]　鈴木　邦明[2)]　本多　丘人[1)]

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（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 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，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，③Na,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，フッ素，アルミニウム，リン酸化反応中間体，half 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-*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．

[1)] 〒060-8586　北海道札幌市北区北13条西７丁目
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（主任：本多　丘人　准教授）
[2)] 〒060-8586　北海道札幌市北区北13条西７丁目
北海道大学大学院歯学研究科　口腔病態学講座　細胞分子薬理学教室（主任：鈴木　邦明　教授）

2．ATP加水分解活性測定

Na, K-ATPase活性測定は，1.5 μg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 $MgCl_2$を含んだ反応液250 μlに，最終濃度5 mMとなるATP-trisを50 μl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 μl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 μg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℃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℃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，$E^{32}P$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（$Ki_{0.5}$）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 μM 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 μM）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 μM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 μM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 μM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

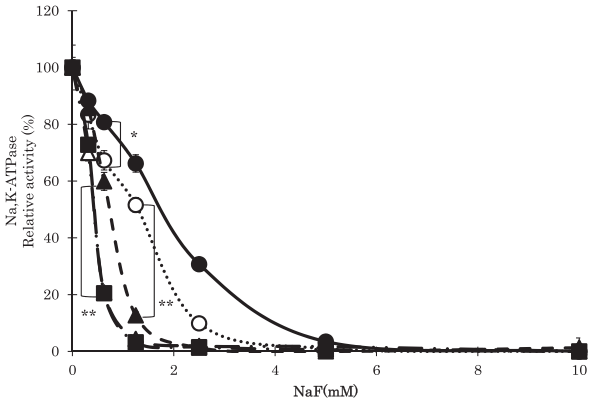

Fig. 1a　Na,K-ATPase活性のNaFによる阻害とAlの影響

1.5 μg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 $MgCl_2$，0(●)，2(○)，10(▲)，100 (△)，200 μM(■) の$AlCl_3$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 μM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 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

	NaF		KF
	$Ki_{0.5}$ (mM)		$Ki_{0.5}$ (mM)
Al（μM）	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）

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）．

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deferoxamine[16–18] 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. 1 a）と比較してFによる活性阻害に対する2及び10 μMのAlの作用は消失した．Alが100 μM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．

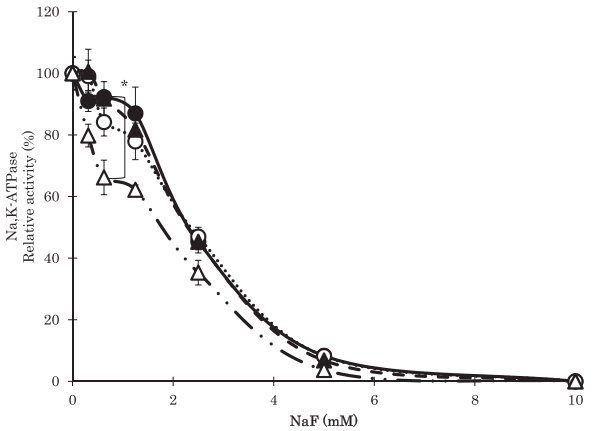

Fig. 1b　deferoxamine存在下でのNa,K -ATPase活性のNaFによる阻害とAlの影響

1 mM deferoxamine存在下，0(●)，2(○)，10(▲)，100 μM(△)の$AlCl_3$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 μMでは減少した．*p<0.05

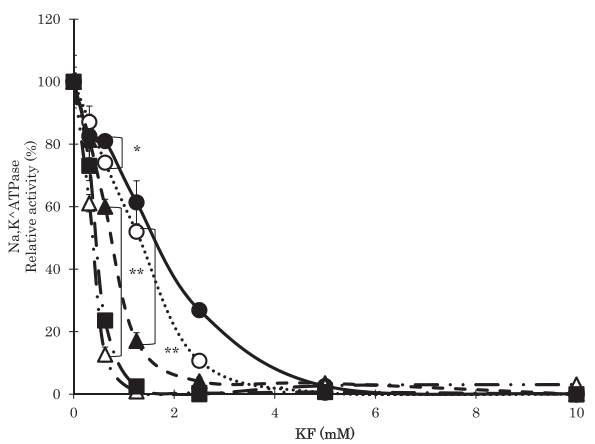

Fig. 2　Na,K-ATPase活性のKFによる阻害とAlの影響

KFを用いて，0(●)，2(○)，10(▲)，100(△)，200 μM (■)の$AlCl_3$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 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の濃度を上げても100 μMのAlと同様の値であった．**p<0.01，*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

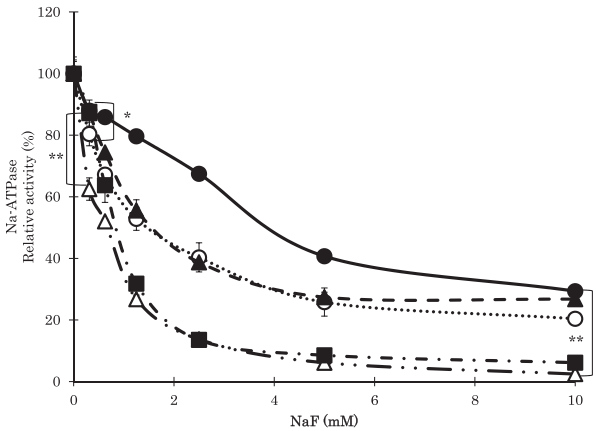

Fig. 3a　Na-ATPase活性のNaFによる阻害とAlの影響

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．Ki$_{0.5}$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

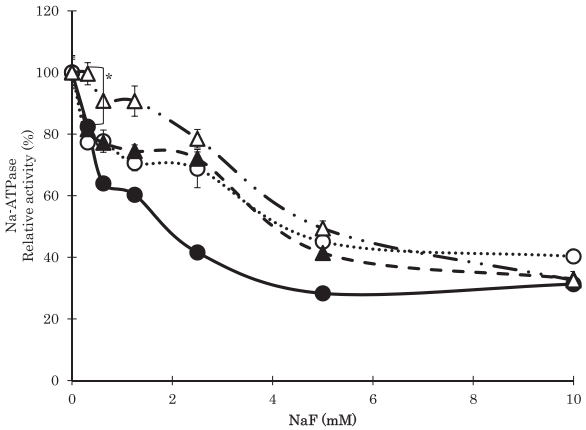

Fig. 3b　Deferoxamine存在下でのNa-ATPase活性のNaFによる阻害とAlの影響

1 mM deferoxamine存在下，0 (●)，2 (○)，10 (▲)，100 μM (△) のAlCl$_3$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

	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$_{0.5}$

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 μM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 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，その効果は100 μMのAlで飽和した (Table 1)．

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，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 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．Ki$_{0.5}$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)．

5．KF濃度に依存したK-*p*NPPase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*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 μM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 μM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-*p*NPPase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)．

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

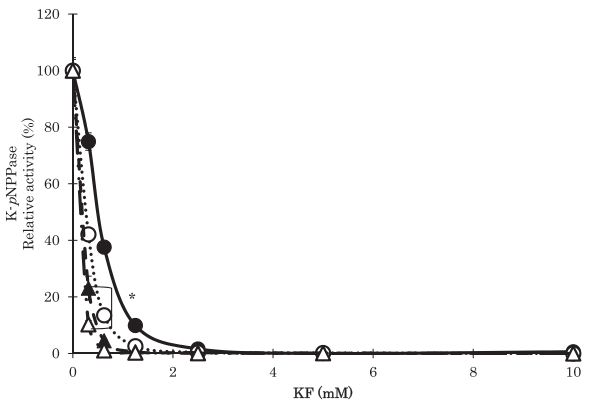

Fig. 4a　K-*p*NPPase活性のKFによる阻害とAlの影響

0（●），2（○），10（▲），100 μM（△）の$AlCl_3$の有無で，9.1 μg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 $MgCl_2$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 % Na_2CO_3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 μM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

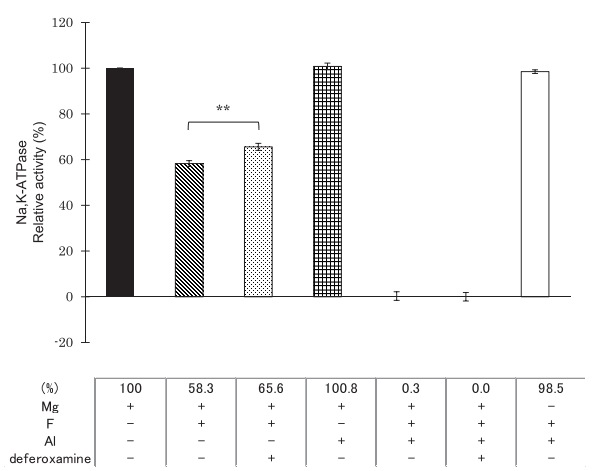

Fig. 5　FによるNa,K-ATPase活性の不可逆的阻害におけるMgとAlの必要性

14.9 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存在下で，5 mM $MgCl_2$，2.5 mM NaF，0.1 mM $AlCl_3$，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 μM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

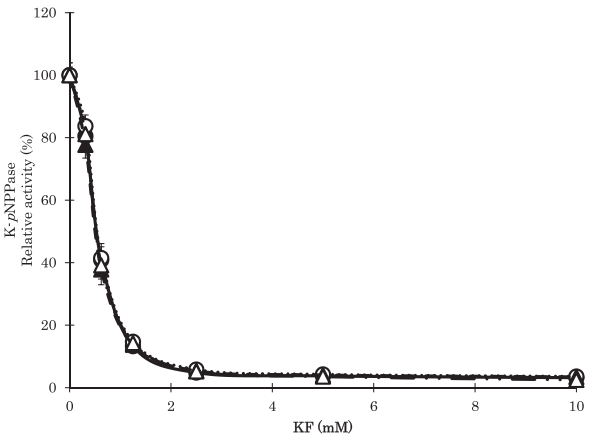

Fig. 4b　deferoxamine存在下での K-*p*NPPase活性のKFによる阻害とAlの影響

1 mM deferoxamine存在下，0（●），2（○），10（▲），100 μM（△）の $AlCl_3$を含む反応液で，Fig.4aと同様の方法でK-*p*NPPase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．

	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-*p*NPPase活性のKFによる阻害の$Ki_{0.5}$（deferoxamineの影響）

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$MgCl_2$，$MnCl_2$，$CaCl_2$，$BeSO_4$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

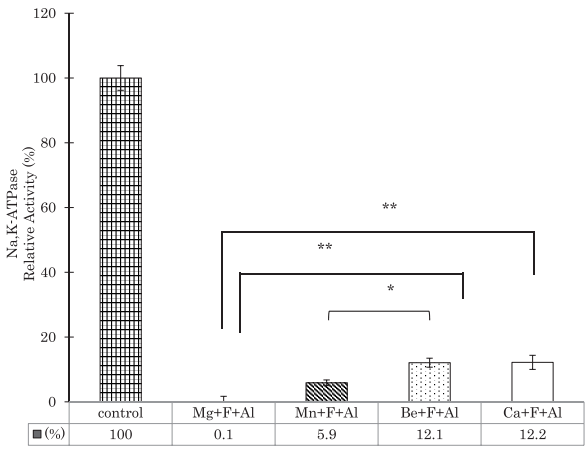

Fig. 6　FによるNa,K-ATPase活性の不可逆的阻害の２価金属イオン要求性

14.9 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，2.5 mM NaF，100 μM $AlCl_3$及 び5 mM $MgCl_2$，$CaCl_2$，$MnCl_2$，$BaSO_4$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 $MgCl_2$存在下，NaFと$AlCl_3$非存在下の希釈後の活性を100 %とすると，5 mM $MgCl_2$，NaFと$AlCl_3$存在下の活性はほぼ0 %となった．同様の効果は$CaCl_2$，$MnCl_2$，$BaSO_4$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

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）

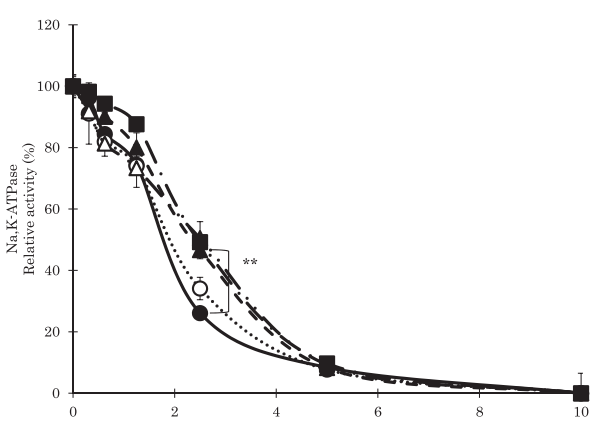

Fig. 7　Na,K-ATPase活性のNaFによる阻害に対するdeferoxamineの影響

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

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．

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．

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

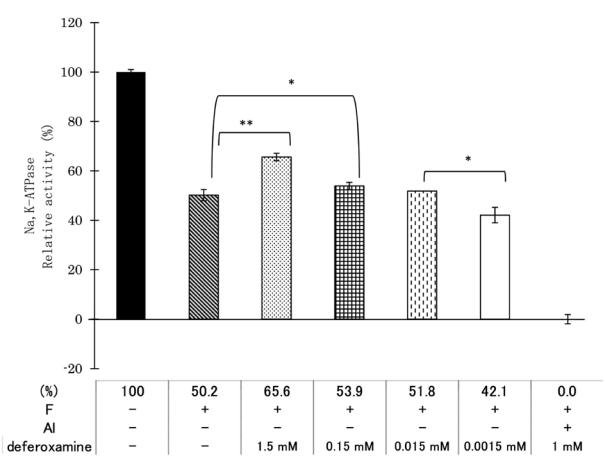

Fig. 8　FによるNa,K-ATPase活性の不可逆的阻害に対するdeferoxamineの影響

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

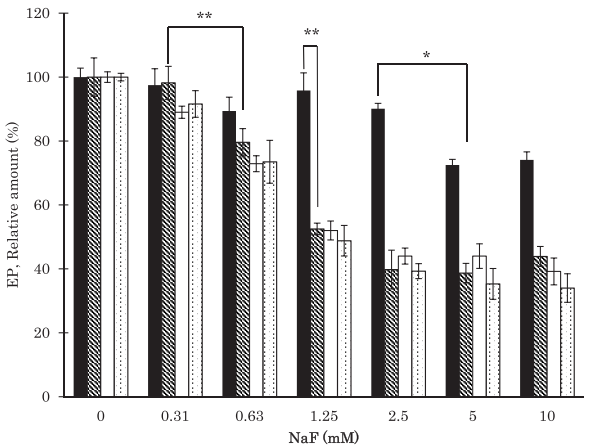

Fig. 9　EP形成量に対するFとAlの影響

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 ℃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，$E^{32}P$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

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．

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，

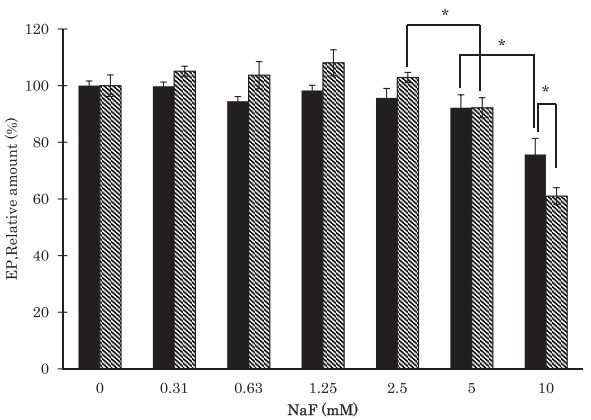

Fig. 10　F及びAl存在下の EP形成量に対するdeferoxamineの影響

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

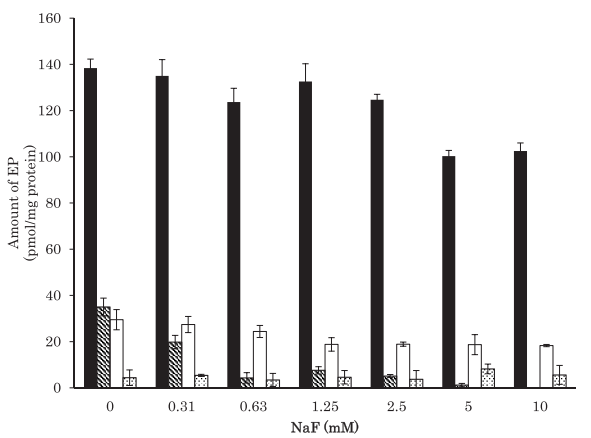

Fig. 11　FによるEP形成阻害に対する2価金属イオンの影響

2価金属として1 mM $MgCl_2$（■），$CaCl_2$（▧），$MnCl_2$（□），$BeSO_4$（⊡）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．

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）．

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

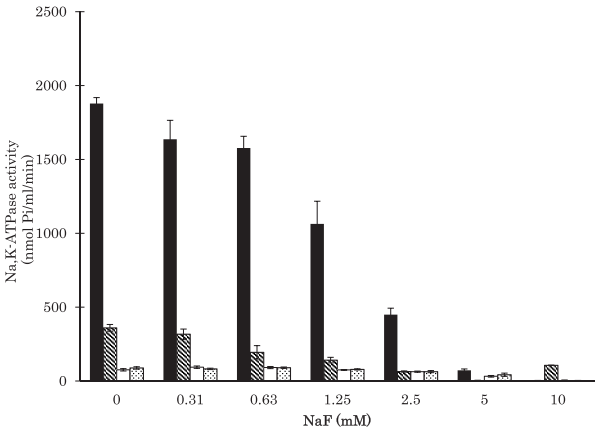

Fig. 12　Na,K-ATPase活性のNaFによる阻害に対する２価金属イオンの影響

2価金属として5 mM $MgCl_2$（■），$CaCl_2$（▨），$MnCl_2$（□），$BeSO_4$（⊡）のいずれか用いたことと，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．

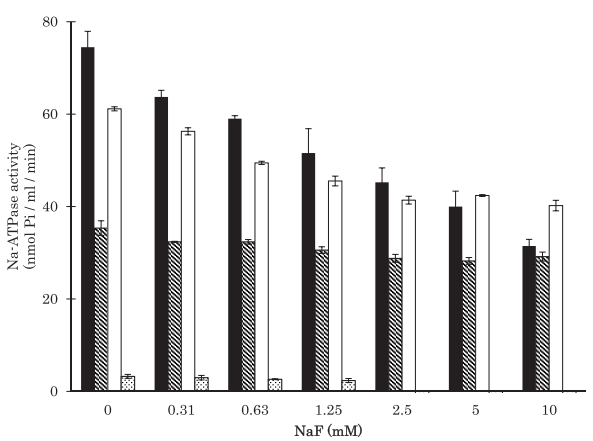

Fig. 13　Na-ATPase活性のNaFによる阻害に対する2価金属イオンの影響

２価金属として5 mM $MgCl_2$（■），$CaCl_2$（▨），$MnCl_2$（□），$BeSO_4$（⊡）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．

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[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-*p*NPPase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-*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 μM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 μM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（α β）であるが[25]，機能的な単位としては（α β）2量体[26]，あるいは（α β）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-*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[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10μg/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 μM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．

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．

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.

4）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.

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, 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.

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, Carteels 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（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.
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.

Hokkaido J. Dent. Sci., 44 : 37−48, 2023.

ORIGINAL

Inhibition of Na,K-ATPase activity by fluoride.

Yuichiro Okino[1], Yoshiaki Deyama[2], Yoshitaka Yoshimura[2]
Kuniaki Suzuki[2] and Okahito Honda[1]

ABSTRACT : Fluoride (F) has been widely applied for 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 a 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). F inhibited Na,K-ATPase activity, Na-ATPase activity, and K-*p*NPPase activity depending on the 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 μM Al. 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+}. 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 the EP formation remained. Deferoxamine decreased the effect of Al. These results suggest the following. F inhibited Na,K-ATPase activity by decreasing EP formation depending on its concentration, and Al increased the affinity of F for Na,K-ATPase. 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.

Key Words : Na,K-ATPase, fluoride, aluminum, phosphorylated intermediate, deferoxamine

[1] Preventive Dentistry, Department of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Assoc. Prof. Okahito Honda) Kita 13 Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan
[2] Molecular Cell Pharmacology, Department of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Prof. Kuniaki Suzuki) Kita 13 Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan