



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	石川, 一郎; 出山, 義昭; 吉村, 善隆 他
Citation	北海道歯学雑誌, 31(2), 44-51
Issue Date	2010-12-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/45798
Type	journal article
File Information	02_ishikawa.pdf



原 著

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

石川 一郎 出山 義昭 吉村 善隆 鈴木 邦明

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能の調節に関与する Na, K-ATPase に対するフッ素 (F) の作用を検討した。材料にはブタ腎臓のミクロソームと精製した Na, K-ATPase を用いて、種々条件下での ATPase 活性に対する NaF 及び KF の作用を調べた。1. NaF は Na^+ と K^+ 存在下の Na, K-ATPase 活性を抑制したが K^+ 非存在下の Na-ATPase 活性を抑制しなかった。2. NaF と KF は Na, K-ATPase 活性を濃度に依存して抑制し、50 % 阻害濃度 ($\text{Ki}_{0.5}$) は約 1.4 mM であった。0.25 mM F 存在下での活性抑制は約 10 % であり、2.5 mM ではほぼ完全に抑制された。F による $\text{Ki}_{0.5}$ はアルミニウム (Al) 存在下で Al の濃度に依存して減少し、Al のキレート剤である deferoxamine 存在下では増加した。3. 2.5 mM の NaF あるいは KF 存在下でプリインキュベーションした後に 10 倍に希釈してから Na, K-ATPase 活性を測定すると約 50 % の Na, K-ATPase 活性が不可逆的に抑制されたが、deferoxamine 存在下では活性は抑制されなかった。4. 7.5 μM 以上の Al が共存すると 2.5 mM F 存在下の活性はほぼ不可逆的に抑制された。この抑制にはマグネシウム、カルシウム、マンガンなどの 2 価金属イオンの共存が必要であった。リンは F による不可逆的な抑制に影響を与えなかった。以上の結果は、F による Na, K-ATPase 活性阻害には Al と 2 価金属イオンが必要であり、F と Al の複合体は 2 価金属存在下で Na, K-ATPase に不可逆的に結合して、ATPase 活性を阻害することを示唆する。

キーワード：フッ素、アルミニウム、Na, K-ATPase、酵素活性阻害

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、小児においては 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¹⁾。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 が不可逆的に Na, K-ATPase 活性を抑制するとの報告は古くからあったが^{3,4)}、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⁵⁾、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⁵⁾ ことがきっかけとなり、Robinson らは F による 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いだした⁶⁾。我々は、F の急性中毒

のターゲットに Na, K-ATPase がなりうるのではないかと考えて、Na, K-ATPase 活性とその部分反応である Na-ATPase 活性に対する NaF とフッ化カリウム (KF) の作用を調べている際に、NaF は KF と同様に Na, K-ATPase 活性を抑制するが Na-ATPase 活性を抑制しないことを見いだした。この結果は、F による Na, K-ATPase の ATPase 活性の抑制にはカリウム (K) が必要であることを示唆する。反応機構上極めて興味深いことから文献検索を進めたところ上記の Robinson ら⁶⁾ の報告を見いだし、Al の作用を詳細に解析した。

Na, K-ATPase は、ほぼすべての動物細胞の形質膜に存在し、細胞内の ATP 1 分子の加水分解に共役して 3 個の Na^+ を細胞内から細胞外へ、2 個の K^+ を細胞外から細胞内へ電気化学的勾配に逆らって輸送し、Na ポンプ、あるいは Na, K ポンプとよばれる機能を担う膜タンパク質である⁷⁻⁹⁾。その機能は、細胞の体積や細胞内外の浸透圧及びイオン勾配の維持という基本的な機能から、神経や筋肉の興奮性の維持、腎尿管における水と Na の再吸収、小腸におけるグルコースやアミノ酸の吸収など分化した機能

にも及ぶ⁷⁻⁹⁾ことから、F の急性中毒のターゲットの一つになりうると推測した。

Na, K-ATPase は Na^+ 、 K^+ 及び Mg^{2+} の各イオンが適切な量比で存在する際に最大の ATP 加水分解活性を示し Na, K-ATPase 活性とよばれる。一方、 Na^+ と Mg^{2+} のみが存在し、 K^+ が存在しない場合にも Na, K-ATPase 活性の 10 % 程度の ATP 加水分解活性を示す。この活性を部分反応の Na-ATPase 活性とよぶ⁷⁻⁹⁾。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 Na-ATPase 活性に対する F の作用を検討し、次いで F による Na, K-ATPase 活性の阻害が不可逆になるための Al や 2 価金属イオンの作用を詳細に解析した。

材 料 と 方 法

1. ミクロソームと Na, K-ATPase の精製

Jorgensen の方法¹⁰⁾によって、豚腎臓から赤外髄質を切り出したのち 2 回の遠心分離操作を行ってミクロソームを得た。さらに、ミクロソームを Hayashi¹¹⁾ら及び Taniguchi¹²⁾らの方法に従ってデオキシコール酸処理後にヨウ化ナトリウム処理を行い、精製 Na, K-ATPase を得て実験に使用した。

2. ATPase 活性の測定

Na, K-ATPase 活性の測定は、Na, K-ATPase と、最終濃度 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 を含む反応液に、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¹³⁾を用いて定量し 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 活性測定の実験液から 16 mM KCl を除いて同様に ATPase 活性を測定した結果を Na-ATPase 活性とした。

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、0℃ で 15 分ブリンキュベーションした後に、上記の方法で ATPase 活性を測定した。また、Al の効果をみるためには種々の濃度の AlCl_3 及び Al のキレート剤である deferoxamine を添加して、同様に ATPase 活性を測定した。

3. 希釈実験

NaF 及び KF による阻害が不可逆になる条件を調べるための希釈実験は、ミクロソームと 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て行った。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、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。Al の効果を調べる実験は、基本溶液に 2.5 mM NaF か 2.5 mM KF、及び各種濃度の AlCl_3 か deferoxamine を添加して同様に行った。また、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 か 2.5 mM KF、及び各種濃度の MgCl_2 , CaCl_2 あるいは MnCl_2 を添加した。同様に、リン酸 (Pi) の効果を調べる実験においては、2.5 mM NaF か 2.5 mM KF、及び各種濃度の KH_2PO_4 存在下でインキュベーションした後、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。

4. 試 薬

ATP は ATP- (tris)₂ (SIGMA, St. Louis, MO) を、それ以外のすべての試薬は特級あるいは生化学用試薬を使用した。

5. データと統計処理

結果は、1 つの測定条件に対して 3 点あるいは 6 点測定した平均値と SD を示した。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. フッ素濃度に依存した ATPase 活性の阻害

Na, K-ATPase 活性は存在する NaF と KF の濃度に依存して阻害され、50 % 阻害濃度 ($\text{Ki}_{0.5}$) はいずれも約 1.4 mM であった (図 1)。0.25 mM では活性は 90 % 程度残存し、2.5 mM では 90 % 程度の活性が抑制された。Na-ATPase 活性に対して、NaF は最終濃度を 2.5 mM まで上げて ATPase 活性を抑制しなかった (図 2)。一方 KF は、1.5 mM までは濃度に依存して Na-ATPase 活性を 10 倍程度増加させたが、2.5 mM では減少に転じた (図 2)。

2. フッ素による $\text{Ki}_{0.5}$ 値のアルミニウム濃度に依存した減少

種々濃度の Al 存在下で Na, K-ATPase 活性阻害の NaF (図 3) と KF (図 4) の濃度依存性を調べた。いずれの場合も、阻害の $\text{Ki}_{0.5}$ は Al 非添加の約 1.4 mM から 100 μM の Al 存在下の約 0.2 mM までその濃度に依存して減少したが、400 μM まで Al の濃度を上げて 100 μM の Al と同様の結果であった。一方、1 mM の deferoxamine 存在下では NaF 及び KF とも $\text{Ki}_{0.5}$ 値は増加した (結果は示さない)。これらの結果を定量的に解析するために Hill プロットした結果を、表に示した。NaF 及び KF いずれの場合も、 $\text{Ki}_{0.5}$ 値に相当する $[\text{S}_{0.5}]$ 値は Al 非存在下の 1.3 ~ 1.4 mM から Al の濃度に依存して減少し、100 μM 以上では 0.2 mM でほぼ一定になった。Hill 係数は、Al の存在により増加したが、顕著な濃度依存性は示さなかった。

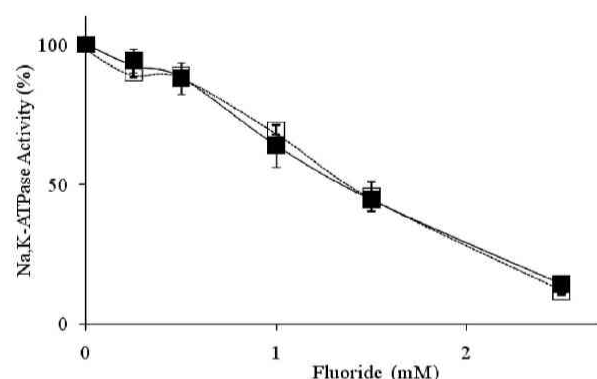


図. 1 Na, K-ATPase 活性の NaF 及び KF 濃度依存性

フッ素による Na, K-ATPase 酵素活性の阻害実験は、精製した Na, K-ATPase に、最終濃度 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 を含む反応液に各種濃度の NaF (□) あるいは KF (■) を添加し 0℃ で 15 分プリインキュベーションした後 5 mM ATP の添加により反応を開始し、37℃ で 30 分インキュベーションした後 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 の方法を用いて測定した。1 mM ouabain 存在下の値をブランクとして差し引いた。NaF と KF はいずれもその濃度に依存して Na, K-ATPase 活性を抑制し、活性の 50 % 阻害濃度 ($K_{i0.5}$) は約 1.3~1.4 mM であった。

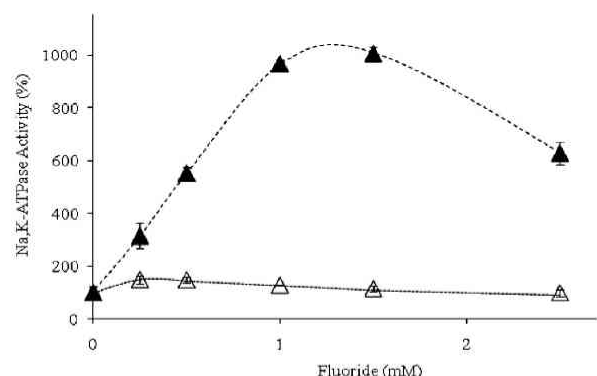


図. 2 Na-ATPase 活性の NaF 及び KF 濃度依存性

図. 1 と同様の方法で、反応液の組成から KCl を除いて測定した活性を Na-ATPase 活性とした。フッ素による活性阻害実験は、反応液に各種濃度の NaF (△) あるいは KF (▲) を添加して行った。NaF は 2.5 mM まで濃度を上げて Na-ATPase 活性を抑制しなかったが、KF は 1.5 mM までは濃度に依存して Na-ATPase 活性を促進し、2.5 mM 以上では活性は濃度に依存して低下した。

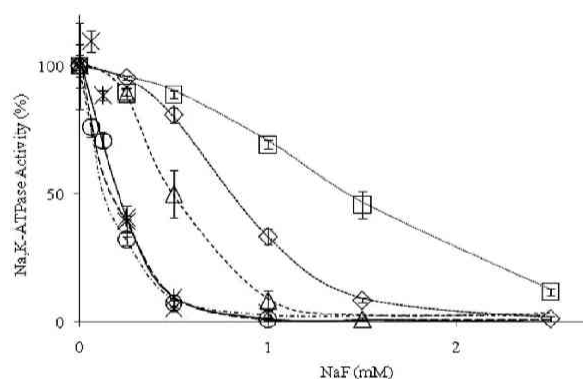


図. 3 Na, K-ATPase 活性の NaF による阻害に対する AlCl₃ の作用

NaF による Na, K-ATPase 活性阻害の測定を、各種濃度の AlCl₃ 0 μM (□), 2 μM (◇), 10 μM (△), 100 μM (×), 200 μM (*), 400 μM (○) を含む反応液で、図. 1 と同様の方法で行った。 $K_{i0.5}$ は AlCl₃ 非添加の約 1.4 mM から 100 μM の AlCl₃ 存在下の約 0.2 mM まで、その濃度に依存して減少した。

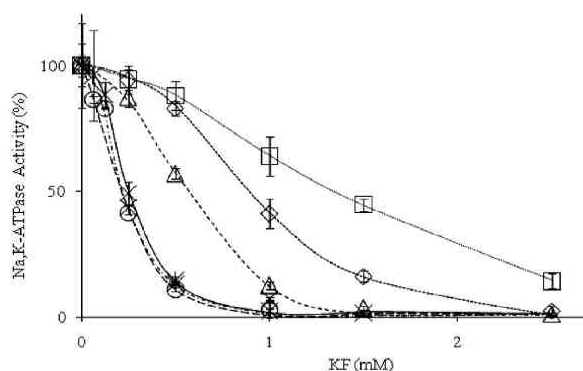


図. 4 Na, K-ATPase 活性の KF による阻害に対する AlCl₃ の作用

KF を用いて種々濃度 AlCl₃ 0 μM (□), 2 μM (◇), 10 μM (△), 100 μM (×), 200 μM (*), 400 μM (○) 存在下で、図. 3 と同様の実験を行った。 $K_{i0.5}$ は AlCl₃ 非添加の約 1.3 mM から 100 μM の AlCl₃ 存在下の約 0.2 mM まで、その濃度に依存して減少した。

表. Hill プロット

図 3, 図 4 の結果から Hill 係数 (n) と 50% 阻害濃度 [$S_{0.5}$] を計算し表に示した。

		NaF		KF	
		Hill 係数 (n)	[$S_{0.5}$]	Hill 係数 (n)	[$S_{0.5}$]
Al (μ M)	0	2.04	1.42	2.09	1.34
	2	2.99	0.74	3.05	0.88
	10	3.29	0.48	2.91	0.51
	100	3.54	0.22	1.65	0.19
	200	3.1	0.23	2.65	0.24
	400	2.48	0.18	2.64	0.22

3. フッ素による不可逆的な Na, K-ATPase 活性阻害のアルミニウム要求性

2.5 mM の NaF 存在下で Na, K-ATPase をプリ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 50 % であった (図 5)。プリインキュベーションの際に 50 μ M の Al が共存すると希釈後の活性は約 10 % であり約 90 % の活性が不可逆的に抑制されたが、deferoxamine が共存するとコントロールと同程度の活性が観察

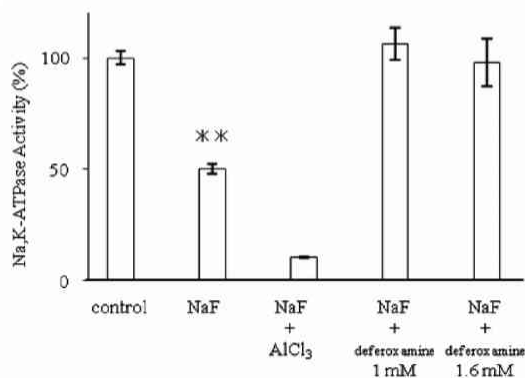


図 5 NaF による Na, K-ATPase 活性の不可逆的な阻害に対する AlCl₃ と deferoxamine の作用

ミクロソームを 25 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, 50 mM tris-HCl (pH 7.4), 160 mM NaCl, 16 mM KCl, 5 mM MgCl₂ 存在下で、2.5 mM NaF, 0.05 mM AlCl₃, 1 あるいは 1.6 mM の deferoxamine の有無で室温で 30 分インキュベーション後、10 倍に希釈した。その後、図 1 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、活性は約 50 % となった。2.5 mM NaF と 0.05 mM の AlCl₃ が共存すると 90 % の活性が不可逆になった。これに対して deferoxamine を加えると不可逆的な阻害はほぼ消失した。**p < 0.01

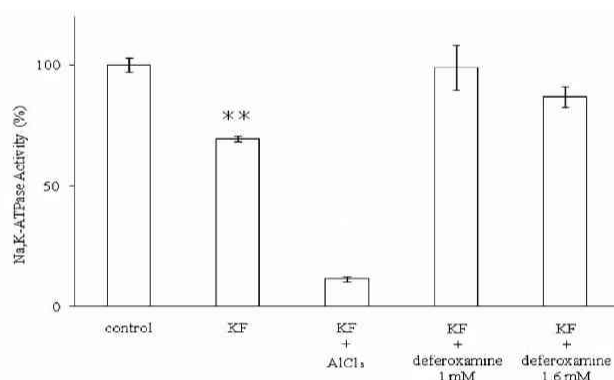


図 6 KF による Na, K-ATPase 活性の不可逆的な阻害に対する AlCl₃ と deferoxamine の作用

図 5 と同様の実験を 2.5 mM KF を用いて行った。Na, K-ATPase 活性の不可逆的な阻害は KF 単独では約 40 %、AlCl₃ を加えると約 90 % であった。deferoxamine が存在すると不可逆的な阻害はほぼ消失した。**p < 0.01

された (図 5)。NaF の代わりに KF を使用してもほぼ同様の結果が得られた (図 6)。F による Na, K-ATPase 活性阻害を不可逆的にする Al の濃度を調べるために、Al の濃度を変えて図 5 及び図 6 と同様の実験を行った (図 7)。その結果、50 μ M の Al で十分な効果が得られることが明らかになった。NaF に関して、さらに Al の濃度を広く変えて調べたところ、7.5 μ M の Al でもその効果は十分であった (結果は示さない)。

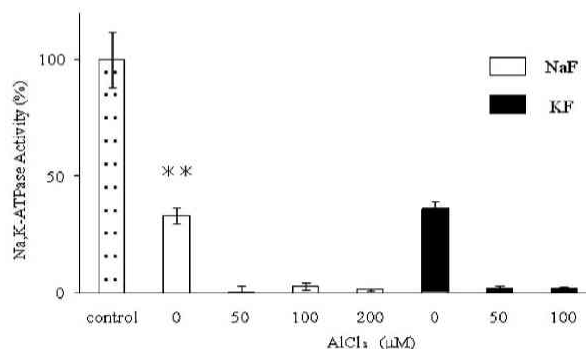


図 7 NaF と KF による不可逆的な Na, K-ATPase 活性阻害の AlCl₃ 濃度依存性

図 5 及び図 6 と同様の実験を AlCl₃ 濃度を広く変えて行った。NaF, KF 及び AlCl₃ 非存在下の control の活性を 100 % とすると、NaF あるいは KF のみでも活性は 60 % 以上抑制された。さらに 50 μ M 以上の AlCl₃ が共存すると活性は不可逆的に抑制された。**p < 0.01

4. フッ素による不可逆的な Na, K-ATPase 活性阻害の 2 価金属イオン要求性

予備的な希釈実験において、F と Al による不可逆的な Na, K-ATPase 活性阻害には、マグネシウム (Mg) が必要であることを見いだしたので、Mg 濃度を広く変えて 2.5 mM NaF 及び 0.1 mM AlCl₃ 存在下での希釈実験を行った (図 8)。その結果、Mg 非存在下では希釈後の活性はコントロールと同程度であったが、共存する Mg 濃度の増加に伴って活性は阻害され、0.5 mM 以上では 90 % 以上の活性が不可逆的に抑制された。活性が 50 % 不可逆に阻害されるための Mg 濃度は約 0.05 mM であった。Mg の役割を他の 2 価金属でも代用可能か否かを調べるために、5 mM 及び 0.05 mM の MgCl₂, CaCl₂ 及び MnCl₂ 存在下での希釈実験を行った (図 9)。その結果、Ca, Mn も Mg と同様に、F と Al による Na, K-ATPase 活性阻害を不可逆にする作用を有することが示された。

5. フッ素とアルミニウムによる不可逆的な Na, K-ATPase 活性阻害に対するリン酸の影響

Robinson らは F と Al による不可逆的な Na, K-ATPase 活性阻害は Pi によって抑制されると報告した⁶⁾。そこで、種々濃度の Pi の存在下で、希釈実験を行った (図 10)。そ

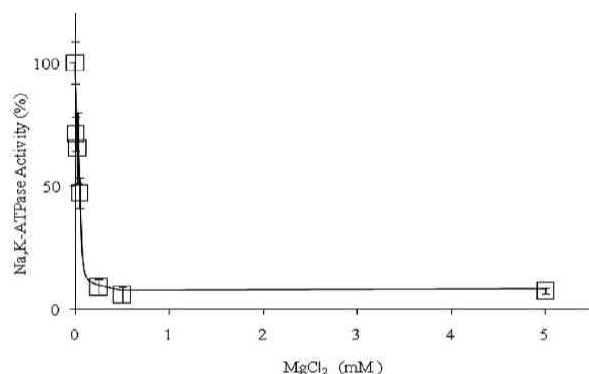


図. 8 NaF 及び AlCl_3 存在下の不可逆的 Na, K-ATPase 活性阻害の Mg 濃度依存性

ミクロソームと 25 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, 50 mM tris-HCl (pH 7.4), 160 mM NaCl, 16 mM KCl, 2.5 mM NaF, 0.1 mM AlCl_3 及び 0.0005 から 5 mM MgCl_2 を含む反応液を室温で 30 分インキュベーション後, 10 倍に希釈した. 図 1 の説明と同様に, Na, K-ATPase 活性を測定した. 5 mM MgCl_2 存在下, NaF 及び AlCl_3 非存在下の希釈後の活性を 100 % とすると, NaF と AlCl_3 及び 5 mM あるいは 0.5 mM MgCl_2 存在下の活性は 10 % 以下くらいまで不可逆的に抑制された. MgCl_2 の濃度が 0.25, 0.05, 0.005, 0.0005 mM と減少すると濃度に依存して活性は回復した.

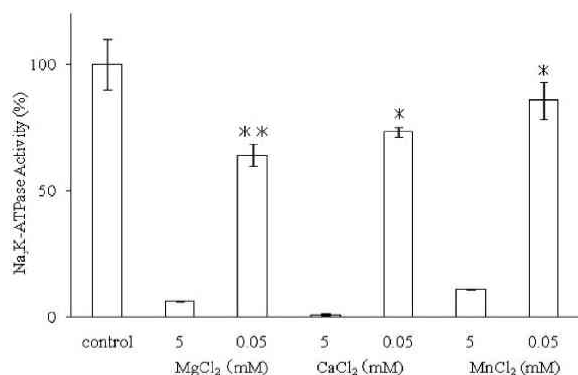


図. 9 フッ素による不可逆的阻害の 2 価金属要求性

ミクロソームを 25 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, 50 mM tris-HCl (pH 7.4), 160 mM NaCl, 16 mM KCl, 2.5 mM NaF, 0.1 mM AlCl_3 及び 0.05 あるいは 5 mM の MgCl_2 , CaCl_2 及び MnCl_2 の有無で室温で 30 分インキュベーション後, 10 倍に希釈してから Na, K-ATPase 活性を測定した. 5 mM MgCl_2 存在下, NaF 及び 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 10 % 以下まで不可逆的に抑制された. しかし Mg 濃度が 0.05 mM になると活性の抑制は 40 % 程度であった. 同様の効果は, CaCl_2 及び MnCl_2 においても観察された. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

の結果, Robinson らの報告とは異なり, P_i が濃度依存的に不可逆的な阻害を回復するという結果は得られなかった.

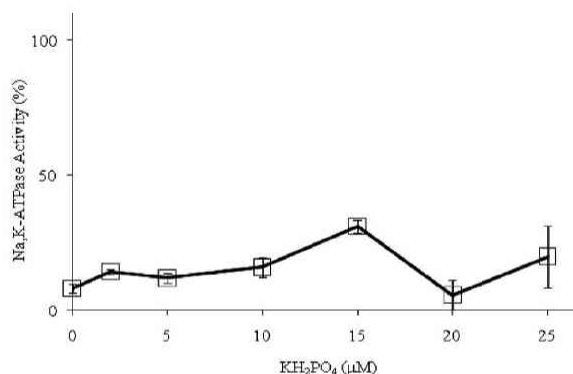


図. 10 フッ素による不可逆的阻害に対する無機リンの作用

ミクロソームを 50 mM tris-HCl (pH 7.4), 160 mM NaCl, 16 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 2.5 mM NaF, 0.1 mM AlCl_3 , 及び 2 から 25 μM KH_2PO_4 の有無で室温で 30 分インキュベーション後 10 倍に希釈してから Na, K-ATPase 活性を測定した. フッ素による不可逆的な活性阻害の, 共存するリンの濃度に依存した回復は見られなかった.

考 察

1. フッ素による Na, K-ATPase の ATP 加水分解活性阻害におけるカリウム要求性

NaF は K^+ 非存在下での Na-ATPase 活性を抑制しなかった (図 2) が, K^+ 存在下での Na, K-ATPase 活性を KF と同様の濃度依存性で抑制した (図 1). また, KF は 1.5 mM までは Na-ATPase 活性を 10 倍程度促進したが, 2.5 mM では逆に減少に転じた. この結果は, 1.5 mM までは, F による活性阻害よりも, KF が解離して生じた K^+ による Na, K-ATPase 活性としての ATP 加水分解活性 (ATPase 活性) 促進が上回ることで, 2.5 mM になると K^+ による ATPase 活性の促進効果は上限に達し, F⁻ による ATPase 活性抑制効果が顕著になることを示唆する. これらの結果は, F は Na, K-ATPase による K^+ の関与する Na, K-ATPase 活性は抑制するが, Na-ATPase 活性は抑制しないことを示唆する. F は Na, K-ATPase の ATP 加水分解反応中の K^+ が結合した反応中間体に結合して Na, K-ATPase 活性を抑制するものと推測される. Robinson らも F による Na, K-ATPase の ATP 加水分解活性阻害には K が必要であると報告している⁶⁾.

2. フッ素による Na, K-ATPase 活性阻害のアルミニウム要求性

NaF 及び KF による Na, K-ATPase 活性阻害の $\text{K}_{0.5}$ 値は共存する Al の濃度に依存して 2 μM から 100 μM までは減少したが, 100 μM では効果は飽和して 400 μM まで Al 濃度を上げて $\text{K}_{0.5}$ 値はほぼ一定であった (図 3 と 4 及び表). この結果は, Al が Na, K-ATPase の F に対する親和性を増大することを意味する. 一方, Al は F による Na, K-ATPase 活性阻害を不可逆的にする上で有効であっ

た (図 5-7). また, Al のキレーターである deferoxamine の共存により不可逆的な阻害は観察されなかった (図 5, 6). これらの結果は, F は Al と結合して, すなわち, フッ化アルミニウム (AlF_3) として高い親和性で Na, K-ATPase に結合し, ひとたび結合すると解離しにくいことため不可逆的に Na, K-ATPase 活性を抑制する, として説明することが出来る. Missiaen らは Na, K-ATPase と同じく 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¹⁴⁾. Robinson らは, AlF_3 の立体構造は P_i の立体構造に類似しており, AlF_3 は Na, K-ATPase の反応中に形成されるリン酸化反応中間体の P_i の類似体として結合すると推定している⁶⁾. また, この反応にはリン酸化反応中間体の形成の場合と同様に Mg の存在が必要であると報告した⁶⁾. 本研究においても, F と Al による不可逆的な阻害には Mg の存在が必要であり, しかもその濃度依存性 (図 8) は Na, K-ATPase のリン酸化反応中間体形成における Mg 依存性と類似していた. この Mg の役割は同程度の濃度の Ca や Mn によって置き換えが可能であった (図 9). しかし, 本来の Na, K-ATPase のリン酸化反応中間体形成あるいは Na, K-ATPase 活性における Mg の役割は, 部分的にしか Ca や Mn によって置き換えることはできず, 場合によっては Ca や Mn は Mg の作用と拮抗する⁷⁻⁹⁾. また, Robinson らは⁶⁾, AlF_3 が P_i と同様に作用することを示す実験結果として, F と Al による不可逆的な Na, K-ATPase 活性の抑制が P_i の存在によって阻害されると報告しているが, 我々の結果では P_i の添加は不可逆的な阻害に影響を与えなかった (図 10). 我々の結果は, 多くの点で Robinson の報告と一致するが異なる点も多く, Na, K-ATPase の反応機構を基にした今後の研究が必要である.

NaF あるいは KF の Na, K-ATPase 活性阻害実験において (図 1-4), 積極的に Al を添加していないのに F の濃度に依存した活性の低下が観察された. これは, ガラス器具, 使用する水や試薬などから混入する Al の作用として考えることが出来る. しかし, deferoxamine 存在下でも濃度依存的な活性抑制を完全に押さえることは出来なかった (結果において文章で記載). deferoxamine は鉄及び Al のキレーターとされているが, 我々の実験系において, 混入する Al のうちの程度が遊離 Al として存在するのかを検討する必要がある. 一方, 希釈実験においては, deferoxamine はほぼ完全な効果を示した (図 5, 6). 両者の違いについては, F の Na, K-ATPase 活性阻害を不可逆にするには Al のみが有効であるが, 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ろう. Robinson らはベリリウムも Al と類似した, しかし完全に同じではない作用を示すと報告しており⁶⁾, 今後の詳細な研究が必要である.

3. フッ素の毒性とアルミニウムの生体に対する作用

NaF の経口投与による致死量は 5 g 程度とされている^{1,2)}. 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 23.8 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 2.5 mM の F によって Na, K-ATPase 活性はほぼ完全に抑制される (図 1-4). さらに, 生体に広く存在するとされる Al が共存すると, 1 mM の NaF によってもほぼ完全に阻害される (図 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となる可能性は十分あると考えられる.

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いるが必須の微量元素とは考えられていない. 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⁾. 本研究において, Al は 2 μM という低濃度でも作用した. Al の生体内における作用に関連する可能性があり, 新たな研究が必要である.

結 論

フッ素による Na, K-ATPase 活性阻害にはカリウムが必要であり, アルミニウムは Na, K-ATPase のフッ素に対する親和性を増大する. フッ素による Na, K-ATPase 活性の不可逆的な阻害にはアルミニウムと 2 価金属イオンが必要である. フッ素とアルミニウムの複合体は 2 価金属存在下で Na, K-ATPase に不可逆的に結合して, ATPase 活性を阻害することを示唆する.

謝 辞

本稿を終えるにあたり, 本研究に数々の御援助, 御協力を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) グッドマン・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. 小椋秀亮監修, 加藤有三, 篠田壽, 大谷啓一編集, 現代歯科薬理学第4版, 492-500, 医歯薬出版, 東京, 2005.
- 3) Yoshida H, Nagai K, Kamei M, Nakagawa Y: Irreversible inactivation of (Na^+-K^+) -dependent ATPase and K^+ -dependent phosphatase by fluoride. *Biochim Biophys Acta* 150: 162-164, 1968.
- 4) Robinson JD: Functionally distinct classes of K^+ sites on the (Na^+-K^+) -dependent ATPase. *Biochim*

- Biophys Acta 384 : 250-264, 1975.
- 5) 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.
 - 6) 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.
 - 7) Kaplan JH: Biochemistry of the Na, K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71 : 511-535, 2002.
 - 8) Lopina OD: Na⁺, K⁺-ATPase: structure, mechanism, and regulation. *Membr Cell Biol* 13 : 721-744, 2000.
 - 9) Horisberger JD : Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. *Physiol* 19 : 377-387, 2004.
 - 10) Jorgensen PL: Purification of Na, K-ATPase. Enzyme sources, preparative problems and preparation from mammalian kidney. *Meth Enzymol* 156 : 29-42, 1988.
 - 11) Hayashi Y, Kimimura M, Homareda H, Matsui H: Purification and characteristics of (Na⁺, K⁺)-ATPase from canine kidney by zonal centrifugation in sucrose density gradient. *Biochim Biophys Acta* 482 : 185-196, 1977.
 - 12) Taniguchi K, Suzuki K, Iida S : Conformational Change Accompanying Transition of ADP-sensitive Phosphoenzyme to Potassium-sensitive Phosphoenzyme of (Na⁺,K⁺)-ATPase Modified with N- [p- (2-benzimidazolyl) phenyl] maleimide. *J Biol Chem* 257 : 10659-10667, 1982.
 - 13) Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S: A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPase. *Anal Biochem* 168 : 1-4, 1988.
 - 14) Missiaen L, Wuytack F, Smedt HD, Vrolix M, Casteels 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.

ORIGINAL

Aluminium-dependent inhibition of Na, K-ATPase activity by fluoride

Ichirou Ishikawa, Yoshiaki Deyama, Yoshitaka Yoshimura and Kuniaki Suzuki

ABSTRACT : The effects of NaF and KF on Na, K-ATPase and Na-ATPase activities and the effects of aluminum and divalent cations on the irreversible inhibition of Na, K-ATPase activity by NaF and KF was examined to elucidate the inhibition mechanism of Na, K-ATPase by fluoride. The ATP hydrolytic activity of microsomes from pig kidneys and Na, K-ATPase purified from microsomes was determined by measuring the inorganic phosphate released from ATP by the Chifflet method. 1) NaF and KF inhibited Na, K-ATPase activity depending on concentrations investigated, and the concentration of half the maximal inhibition was about 1.3 to 1.4 mM; NaF at less than 2.5 mM of final concentration did not inhibit Na-ATPase activity; KF at less than 1.5 mM increased the Na-ATPase activity, but decreased the activity at higher than 2.5 mM concentrations. These results suggest that fluoride inhibits Na, K-ATPase activity by binding to the K^+ -bound reaction intermediate of the Na, K-ATPase enzyme, while it does not inhibit the Na-ATPase activity. It was also found that aluminum ions increased the inhibition of ATPase activity by fluoride depending on the Al ion concentration. 2) Na, K-ATPase was preincubated in the presence of 2.5 mM NaF or KF, and with or without aluminum, divalent cations, inorganic phosphate, and the aluminum chelater deferoxamine. After preincubation, the enzyme solution was diluted ten times and the Na, K-ATPase activity was measured to test the reversibility of the inhibition. After the enzyme pretreated with fluoride was diluted, almost 50 % of the activity was inhibited. The inhibition increased to 90 % when preincubation was performed with fluoride plus more than $7.5 \mu\text{M}$ of aluminum ions, but no inhibition by fluoride was observed in the presence of deferoxamine. The irreversible inhibition requires Mg^{2+} , depending on the Mg^{2+} concentration, and the effect of Mg^{2+} was achieved when replaced with Mn^{2+} or Ca^{2+} . The presence of orthophosphate did not affect the irreversible inhibition by fluoride, inconsistent with the report by Robinson et al. These results suggest that irreversible inhibition by fluoride requires aluminum and divalent cations and that the complex of fluoride and aluminum binds to Na, K-ATPase irreversibly in the presence of divalent cations.

Key Words: Na, K-ATPase, fluoride, aluminum, inhibition of enzyme activity