



Title	ラット脳カルシウムATPase活性の静脈麻酔薬による抑制
Author(s)	田仲, 宏光; 出山, 義昭; 吉村, 善隆 他
Citation	北海道歯学雑誌, 32(2), 222-229
Issue Date	2012-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/48717
Type	journal article
File Information	21-tanaka_gencho.pdf



原 著

ラット脳カルシウムATPase活性の静脈麻酔薬による抑制

田仲 宏光¹⁾ 出山 義昭²⁾ 吉村 善隆²⁾ 鈴木 邦明²⁾ 福島 和昭¹⁾

抄 録：全身麻酔薬の作用を受ける機能性タンパク質としてGABA受容体、アセチルコリン受容体などの報告があるが、これらに対する作用のみで全身麻酔作用のすべてを説明することはできないと考えられている。本研究はラット脳に存在するカルシウム (Ca) で活性化されるATPaseが、静脈麻酔薬の直接の作用点となり得るかを検討することを目的に行なった。ラット脳のホモジェネートから調整した膜分画 (P I) 及び、Pottorfの方法に従って調整した形質膜 (P II) 及びミクロソーム (P III) 分画のCaで活性化されるATPaseに対するpropofol, pentobarbitalとthiopentalの作用を調べた。P I にはCaの濃度に依存して活性化されるATPaseが存在し1 mM以上のCaではほぼ飽和した (Ca-ATPase活性)。P I のCa-ATPase活性はpropofol濃度に依存して抑制され50%阻害濃度 ($K_{i0.5}$) は0.25 mMであった。Propofol存在下でCa-ATPase活性のCa濃度依存性を調べると、存在するpropofol濃度に依存して最大活性とCaに対する K_m は低下した。P II 及びP III には、ウェスタンブロッティング及び酵素学的性質からCa,Mg-ATPaseであるPMCA (plasma membrane Ca-ATPase) 及びSERCA (sarcoendoplasmic reticulum Ca-ATPase) の存在が明らかになった。P II 及びP III のCa,Mg-ATPase活性はいずれも類似した濃度依存性でpropofol, pentobarbitalとthiopentalによって阻害され、その $K_{i0.5}$ はそれぞれ0.35, 3 及び1.5 mMであった。本研究で調べたCa-ATPase及びCa,Mg-ATPase活性のpropofol, pentobarbitalとthiopentalによる活性阻害濃度は、同じ生体膜に存在する酵素であるNa,K-ATPase活性の阻害濃度と類似していた。以上の結果から、ラット脳に存在するCaで活性化されるATPase活性の静脈麻酔薬による阻害は特異的なものではなく、麻酔薬の生体膜を構成する脂質とタンパク質に対する作用の結果として、ATPaseタンパク質の機能が影響を受け抑制されたものと推測した。

キーワード：静脈麻酔薬, Ca,Mg-ATPase, 生体膜

緒 言

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ビド説と、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 et al¹⁾は全身麻酔薬は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²⁾, Ca,Mg-ATPase^{3,4)}, Na,K-ATPase⁵⁻⁷⁾, protein kinase C⁸⁾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。一方、麻酔薬の作用部位として想定さ

れているイオンチャネルや受容体などの生体高分子の多くは膜タンパク質であることから、麻酔作用における生体膜脂質の役割は常に考慮されなければならないと考えられる。

我々は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活性に及ぼす影響⁹⁾, propofolのNa,K-ATPase活性の抑制機構¹⁰⁾, 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の研究¹¹⁾などから、リビド説を支持する結果を得ている。そこで、本研究では麻酔薬の作用機構をさらに明らかにすることを目的に、膜タンパク質であるCaで活性化されるATPaseに対する静脈麻酔薬の作用を調べた。

Ca,Mg-ATPaseは、細胞内のCa濃度が上昇すると、ATPの加水分解エネルギーを用いてCaの能動輸送を行なうCa-ポンプ機能を担う酵素である。細胞外へCaを排出す

札幌市北区北13条西7丁目

¹⁾北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座歯科麻酔学教室

²⁾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

指導：福島和昭 教授 (北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座)

鈴木邦明 教授 (北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座)

る形質膜Ca,Mg-ATPase (PMCA, plasma membrane Ca-ATPase)と、小胞体にCaを取り込む小胞体Ca,Mg-ATPase (SERCA, sarcoendoplasmic reticulum Ca-ATPase)の二つに大きく分類される。Ca,Mg-ATPaseの機能は多岐にわたり、細胞内の情報伝達や細胞の興奮性の維持など神経細胞の重要な機能を担うことから、麻酔作用に関連する可能性がある。従来PMCAの研究には赤血球が、SERCAの研究には骨格筋の筋小胞体膜が多く用いられ、分離・精製の困難さから脳の酵素が麻酔薬の研究対象として用いられることは少なかった¹²⁻¹⁷⁾。全身麻酔薬の作用の標的は中枢神経系であると考えられることから、本研究ではラット脳のCa,Mg-ATPaseに対する静脈麻酔薬の作用を調べ、リポド説を支持する我々のNa,K-ATPaseに対する作用の結果と比較し考察した。

材 料 と 方 法

1. ラット脳からのCa-ATPase及びCa,Mg-ATPaseの部分精製

ラット全脳ホモジェネートを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。次にホモジェネートを10,500×g, 35分の遠心を行って上清を得、さらにこの上清を18,000×g, 45分の遠心を行って得られた沈渣を膜分画とした (P I)。また、同様にして得られたホモジェネートを、Pottorf¹⁸⁾の方法に従って形質膜 (P II) 及びミクロソーム (P III) 分画に部分精製した。ホモジェネートを2,000×g, 15分の遠心を行って得られた上清をさらに20,000×g, 30分の遠心にかけて得られた沈渣を形質膜 (P II) 分画とした。またその上清を100,000×g, 75分で得られた沈渣をミクロソーム (P III) 分画とした (図1)。

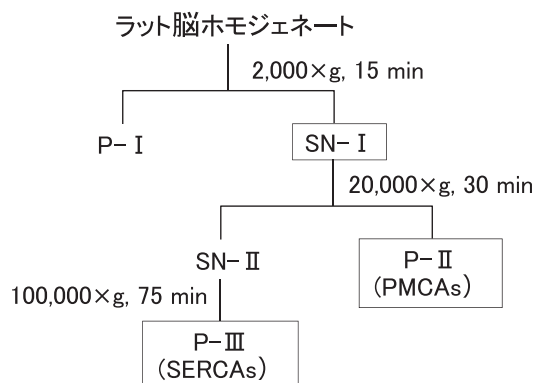


図1 ラット脳の形質膜分画 (P II) とミクロソーム分画 (P III) の分離・精製手順

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. ATPase活性の測定

Ca-ATPase活性及びCa,Mg-ATPase活性は、ATP加水分解の結果生成された無機リン量をChifflet¹⁹⁾法に従って定量することにより計測した。Ca-ATPase活性は30.87 μ gの酵素と0.1 mM EDTAを含む25 mM sucrose, 50 mM tris-HCl (pH7.4), 及び5 mM ATPを加えた300 μ lの溶液で反応を行った。Ca,Mg-ATPase活性は、7.95 μ gの酵素と25 mM sucrose, 50 mM tris-HCl (pH7.4), 5 mM Na₃N, 2 mM MgCl₂, 100 μ M CaCl₂, 100 mM KCl, 100 μ M BAPTA, 500 μ M ouabainおよび5 mM ATPを加えた300 μ lの溶液で反応を行った。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。37℃, 10分間インキュベーション後、ATP 50 μ lを加えて反応を開始し、15分後12% SDS 300 μ l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850nmで測定した。

3. ウェスタンブロッティングによるPMCAの検出

発現タンパク質の解析は10%ゲルを用いた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。ウェ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-PMCA1-3 ATPase antibody (Affinity BioReagents PA1-914, PA1-915, PA1-916), マウス由来のAnti-PMCA4 ATPase antibody (Affinity BioReagents MA1-914) を、2次抗体としてPMCA1-3にはAnti-rabbit Ig-HRP (from goat) (Santa Cruz Biotechnology, Lot C082) を、PMCA4にはAnti-mouse Ig1-HRP (from rabbit) (ZYMED, Lot 30879229) 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で測定した平均値と標準偏差を示した。多くの測定点では標準偏差はシンボルの大きさの範囲に入った。

結 果

1. ラット脳膜分画Ca-ATPaseに対するpropofolの作用

ラット脳膜分画 (P I) のCaで活性化されるATPase活性の検出を試みた。種々濃度のCa存在下でATPase活性を測定したところ、活性はCa濃度に依存して増加し1 mMでは飽和した (図2)。活性がほぼ最大となる1 mMのCa存在下でのCa-ATPase活性に対するpropofolの影響を調べた。

(図3). Propofolは濃度に依存してCa-ATPase活性を阻害したが, 1.03 mMでも完全には阻害せず, 30%以上の活性が残存した. 抑制される活性のうち50%は約0.2 mMで抑制された.

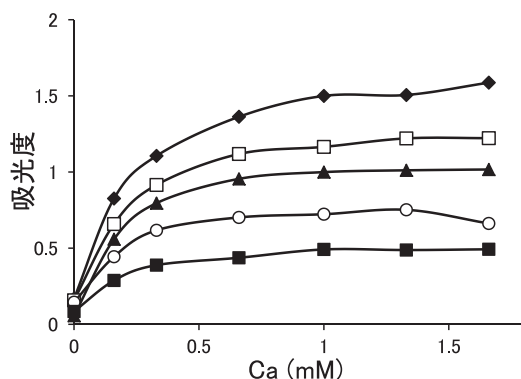


図2 Ca-ATPase活性のCa濃度依存性に対するpropofolの影響
PropofolによるCa-ATPase活性の阻害実験は, 精製したCa-ATPaseに, 最終濃度25 mM sucrose, 50 mM tris-HCl (pH7.4) を含む反応液に各種濃度のpropofol 0 (◆), 0.2 (□), 0.4 (▲), 0.5 (○), 0.6 mM (■) を添加し, 0℃で10分プリインキュベーションした後5 mM ATPの添加により反応を開始し, 37℃で30分インキュベーション後に12% SDSを添加して反応を停止した. 酵素反応の結果生じた無機リンをChiffletの方法を用いて測定した. Ca-ATPase活性はCa濃度に依存して増加し, 約1 mMで飽和した.

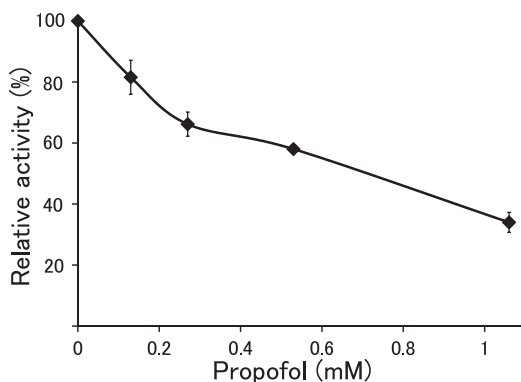


図3 Ca-ATPase活性のpropofol濃度依存

PropofolによるCa-ATPase活性阻害の計測を, 各種濃度のpropofolを含む反応液に1 mM CaCl_2 を添加し, 図2と同様の方法で行った. Propofolは濃度に依存してCa-ATPase活性を抑制したが, 完全に阻害することはできなかった. 阻害可能な活性の50%阻害濃度 ($\text{Ki}_{0.5}$) は約0.2 mMであった.

50%阻害濃度である0.2 mM及び0.4, 0.5, 0.6 mMのpropofol存在下でのCa-ATPase活性のCa濃度依存性を調べたところ, 最大活性 (V_{max}) はpropofolの濃度に依存して低下した(図2). 得られた結果からLineweaver-Burkの二重逆数プロットを行い V_{max} と K_m を計算した結果を表1に示した. Propofol濃度が増加すると V_{max} は低

下した. K_m はpropofol濃度0.4 mMまではほぼ一定であったが, それ以上の濃度では低下した.

表1. Lineweaver-Burkの二重逆数プロット

Propofol (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol Pi/min}$)	K_m (mM)
0	1.73	0.18
0.2	1.38	0.17
0.4	1.16	0.17
0.5	0.79	0.12
0.6	0.54	0.14

図1の結果から V_{max} と K_m を計算し, 表に示した.

2. 形質膜分画とミクロソーム分画のCaで活性化されるATPase活性の相違

Pottorf⁽¹⁸⁾の方法(図1)に従ってPⅡとPⅢの分画を調整し, PMCAとSERCAを含むCa,Mg-ATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用を検討することとした. まず, PⅡとPⅢのCaで活性化されるATPase活性の性質を調べた. 両分画のウエスタンブロッティングを行ったところ, いずれもPMCAのアイソザイムである1-4を含むことを確認した(図4). 次にCa,Mg-ATPase活性は, Mg存在下で観察されるATPase活性にCaを添加するとさらに増加する活性と定義されることから, 2 mM Mg存在下でのATPase活性のCa濃度依存性を調べた. その結果PⅡ, PⅢともCaの濃度に依存して活性は増加し, 100 μM で最大となったがより高濃度では逆に阻害された(図5). 次に100 μM Ca及び2 mM Mg存在下のATPase活性(Ca,Mg-ATPase)に対する, PMCA阻害剤であるvanadateの作用を調べた(図6). PⅡ, PⅢともvanadateの濃度に依存して活性は抑制されたが, PⅢのほうがより高濃度のvanadateを必要とした. さらに, Ca,Mg-ATPaseに対する, SERCA阻害剤であるthapsigarginの作用を調べた(図7). PⅡ, PⅢともthapsigarginの濃度に依存して活性は抑制されたが, PⅢのほうがより高濃度を必要とした. また, 20%の活性はthapsigarginでは抑制されなかった. さらに, PⅡ, PⅢの

	PMCA1	PMCA2	PMCA3	PMCA4
PⅡ	→	→	→	→
PⅢ	→	→	→	→

図4 PⅡ, PⅢ各分画におけるPMCA1~4のウエスタンブロッティングの結果

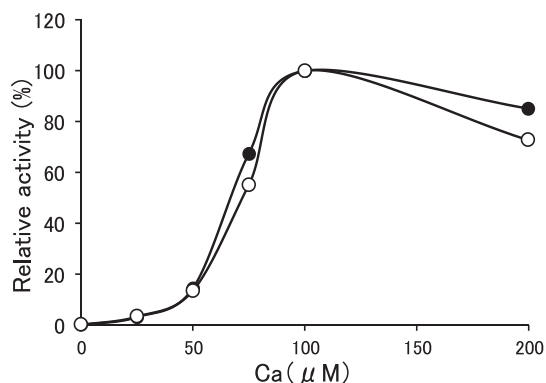


図5 Ca,Mg-ATPase活性のCa濃度依存性

Ca,Mg-ATPase活性は、精製したP II (●), P III (○) の分画に、最終濃度25 mM sucrose, 50 mM tris-HCl (pH7.4), 5 mM Na_3N , 2 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 100 μM BAPTA, 500 μM ouabainを含む反応液に、各濃度のCaを添加し、図2と同様の方法でCa,Mg-ATPase活性を測定した。P II, P IIIともにCa,Mg-ATPase活性はCa濃度100 μM までは濃度に依存して増加したが、それ以上の濃度では活性の低下が認められた。

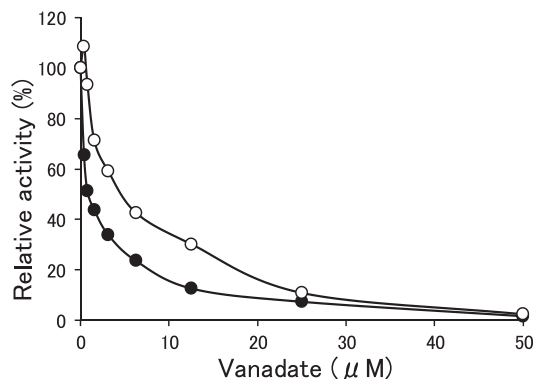


図6 Ca,Mg-ATPase活性のvanadate濃度依存性

図5の組成に100 μM CaCl_2 を加えた反応液に、各種濃度のvanadateを添加して、図1と同様の方法でCa,Mg-ATPase活性を測定した。P II (●), P III (○) 両分画はvanadate濃度依存的に抑制され、50 μM で完全に阻害された。

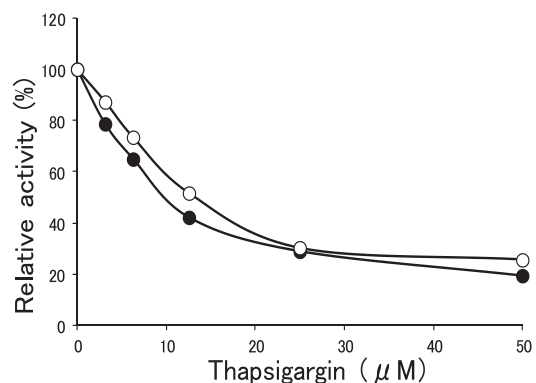


図7 Ca,Mg-ATPase活性のthapsigargin濃度依存性

図6と同様の反応液と方法で、各種濃度のthapsigarginを添加してCa,Mg-ATPase活性を測定した。P II (●), P III (○) 両分画はthapsigargin濃度依存的に抑制されたが、抑制は不完全で、P IIで約20%, P IIIで約25%の活性が残存した。

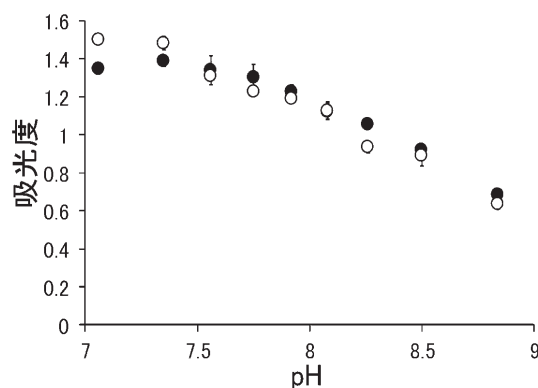


図8 Ca,Mg-ATPase活性のpH依存性

図6と同様の反応液と方法で、pHを広く変えてにおけるCa,Mg-ATPase活性を測定した。P II (●), P III (○) の至適pHは中性であった。

Ca,Mg-ATPase活性のpH依存性を調べたところ両活性とも中性pHで最大活性を示した(図8)。

3. ラット脳Ca,Mg-ATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用

上記の性質を示すCa,Mg-ATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用を調べた。Propofolは低濃度でP IIの活性をわずかに増加させたが、高濃度では抑制に転じた。P IIIはpropofol濃度に依存して活性が低下した。P II, P IIIとも1.05 mMでは完全に活性を抑制し50%阻害濃度は0.35 mMであった(図9)。Pentobarbital (図10) と thiopental (図11) はいずれも濃度に依存してP II, P IIIのCa,Mg-ATPase活性を抑制し、50%阻害濃度は、それぞれ3及び1.5 mM程度であった。

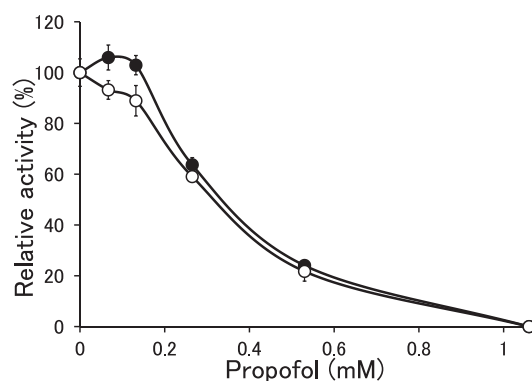


図9 Ca,Mg-ATPase活性のpropofol濃度依存性

図6と同様の反応液と方法で、各種propofol濃度におけるCa,Mg-ATPase活性を測定した。P II (●), P III (○) 両分画のCa,Mg-ATPase活性はpropofol濃度依存的に抑制され、1.05 mMではほぼ完全に抑制した。50%阻害濃度($K_{i0.5}$)は約0.35 mMであった。

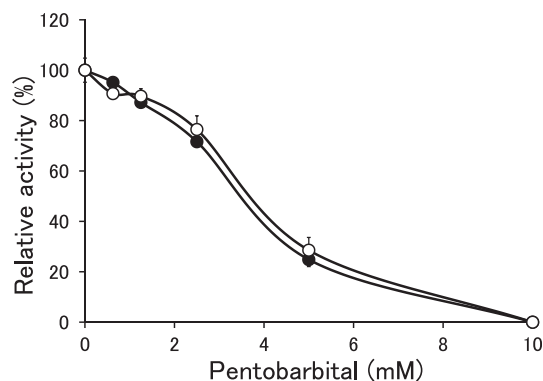


図10 Ca,Mg-ATPase活性のpentobarbital依存性

図6と同様の反応液と方法で、各pentobarbital濃度におけるCa,Mg-ATPase活性を測定した。P II (●), P III (○) 両分画のCa,Mg-ATPase活性はpentobarbital濃度依存的に抑制され、10 mMではほぼ完全に抑制した。50%阻害濃度 ($K_{i0.5}$) は約3 mMであった。

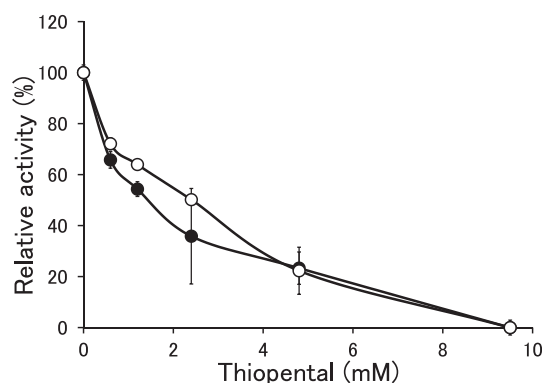


図11 Ca,Mg-ATPase活性のthiopental依存性

図6と同様の反応液と方法で、各thiopental濃度におけるCa,Mg-ATPase活性を測定した。P II (●), P III (○) 両分画のCa,Mg-ATPase活性はthiopental濃度依存的に抑制され、10 mMではほぼ完全に抑制した。50%阻害濃度 ($K_{i0.5}$) は約1.5 mMであった。

考 察

1. ラット脳Ca-ATPase活性のpropofolによる阻害様式

ラット脳膜分画には、最大活性に1 mM Caを必要とするCa-ATPase活性が存在した (図2)。この活性は必要とするCa濃度が高すぎることと、至適pHがアルカリ性であることから、従来研究対象となっているPMCAやSERCAとは異なった¹⁸⁾。小畑²⁰⁾らは骨芽細胞様細胞の膜分画にCa及びMgで活性化されるアルカリ性至適pHのCa-ATPase活性を報告した。また、同様の活性はマクロファージ様の細胞にも存在することから、このラット脳のCa-ATPaseも同様の活性と推測される。PMCAやSERCAに比較して高いCa濃度を必要とすることから、Caの輸送能力も高い可能性があると考え、このCa-ATPase活性に対するpropofolの作用を調べた。

Propofolは1.03 mMでも完全には活性を阻害せず、30%以上活性が残存するというこの結果は、このCa-ATPase

が均一では無いことを示唆する。種々濃度のpropofol存在下でCa-ATPase活性のCa濃度依存性を調べたところ、 V_{max} はpropofol濃度に依存して低下し、 K_m も高濃度のpropofolで減少するという結果は、阻害様式が混合阻害であることを示唆する。長谷ら¹⁰⁾は同じ膜分画に存在するNa,K-ATPase活性に対するpropofolの作用を詳細に検討し、propofolは混合阻害の様式でNa,K-ATPase活性を抑制すると結論した。また、50%阻害濃度は0.26 mMであり今回のCa-ATPaseの場合に類似していた。これらの結果はpropofolは膜分画に存在するATPaseを類似した様式で阻害することを示唆する。

2. ラット脳のCa,Mg-ATPase活性の静脈麻酔薬による阻害

ラット脳膜分画PIのCa-ATPase活性はPMCAやSERCAとは異なることから、Pottorf¹⁸⁾の方法によって形質膜分画 (P II) とミクロソーム分画 (P III) を分離精製した。Pottorfの方法はP IIとP IIIを分離する方法であり、Ca,Mg-ATPaseのうちPMCAとSERCAを分離する方法ではない。P IIとP IIIの性質を調べたところいずれもPMCAの1から4のアイソザイムを含んでいた (図4)。また、ATPase活性のCa濃度依存性 (図5) とpH依存性 (図8) がCa,Mg-ATPaseの特徴を示した。さらに、P IIとP IIIはいずれもPMCA阻害剤であるvanadate (図6) とSERCA阻害剤であるthapsigargin (図7) によって阻害された。これらの結果は、P IIとP IIIはいずれもPMCAとSERCAの混合であることを示す。一方、P IIとP IIIのCa,Mg-ATPase活性のベースとなるMg-ATPase活性のpH依存性はP IIとP IIIで異なったことから、P IIとP IIIは性質の異なる分画であると考えた。

P IIとP IIIのCa,Mg-ATPase活性はpropofol (図9)、pentobarbital (図10)、thiopental (図11) の濃度に依存して抑制された。50%阻害濃度はそれぞれ0.35, 3及び1.5 mMであり、以前報告されているNa,K-ATPaseに対する50%阻害濃度と類似していた^{9, 21, 22)}。これらの結果は、propofol, pentobarbital及びthiopentalは、類似した機構でCa,Mg-ATPase及びNa,K-ATPase活性を抑制することを示唆する。Ca,Mg-ATPaseもタンパク質としての麻酔薬の直接の作用点ではなく、Na,K-ATPaseと同様に、脂溶性の高い麻酔薬が脂質二重層膜である生体膜の構造を変化させたことにより、生体膜構成タンパク質にもその結果が及んで抑制されたものと推測された。

これまでにも、吸入麻酔薬並びに静脈麻酔薬がCa,Mg-ATPase活性を阻害するとの報告^{3, 4)}もあり、今回の実験においてもpropofolをはじめとした静脈麻酔薬でその阻害が確認出来た。今回の研究では、PMCAとSERCAを分離して作用を見ることは出来なかったが、今後の課題である。

3. 臨床的なpropofol濃度との比較

今回の実験により、Ca,Mg-ATPase活性は約1.03 mMのpropofolにより、完全に阻害された。また、Na,K-ATPase活性のpropofolによる完全阻害にも1.03 mMを必要とすると報告されている¹⁰⁾。一方、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 μ M²³⁻²⁵⁾と様々な報告がある。これらの濃度ではCa,Mg-ATPase活性あるいはNa,K-ATPase活性を完全に阻害するにはいたらないことから、ATPaseは全身麻酔薬の作用には関係しないと評価されることが多い。しかし、Na,K-ATPaseを作用点とするジギタリスなどの強心作用薬の臨床濃度ではNa,K-ATPase活性阻害は軽度であり、Na,K-ATPase活性が完全に阻害される濃度では重篤な中毒あるいは致死量となるように、薬物の作用が起こる用量で作用点となるタンパク質の機能が完全に抑制される必要は無いと考えられる。そのような点から、propofolによるCa,Mg-ATPase活性の阻害が麻酔作用に関与する可能性はあると考えられる。

Haseら¹⁰⁾は100 μ M程度のpropofolが30%のNa,K-ATPase活性を抑制すること、Higuchiら²⁶⁾は同程度のpropofolが過分極作動性カチオンチャネル(Hyperpolarization activated cation channel, Hチャネル)の過分極作動性内向き電流を10から20%抑制することを報告している。また、Franksら⁴⁾は臨床濃度のhalothane, isoflurane, 亜酸化窒素がCa,Mg-ATPaseを約30%抑制すると報告している。これらの報告は本研究の結果と考察を支持するものであるが、得られた結果を確立するためには、Ca,Mg-ATPaseの部分的な阻害でも全身麻酔作用を引き起こすことを直接に証明することが必要である。

結 論

Propofol, pentobarbital及びthiopentalはNa,K-ATPase活性阻害と類似した濃度と様式でCa-ATPase活性及びCa,Mg-ATPase活性を阻害したことから、これらの麻酔薬の直接の作用点は生体膜であり、その作用の結果として膜タンパク質の機能に影響を与えたものと推測した。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々の御援助、御協力をいただきました本学大学院歯学研究科口腔病態学講座の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Franks NP, Lieb WR : Molecular and cellular mechanisms of general anesthesia. *Nature* 367 : 607-614, 1994.
- 2) Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasvowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, and Harrison NL :

Sites of alcohol and volatile anesthetics action on GABA_A and glycine receptors. *Nature* 389 : 385-389, 1997.

- 3) Kosk-Kosicka D, and Roszczynska G : Inhibition of plasma membrane Ca²⁺ - ATPase activity by volatile anesthetics. *Anesthesiology* 79 : 774-780, 1993.
- 4) 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.
- 5) Ueda I : Effects of diethyl ether and halothane on firefly luciferin bioluminescence. *Anesthesiology* 26 : 603-606, 1965.
- 6) Ueda I, Kamaya H : Kinetic and thermodynamic aspects of the mechanism of general anesthesia in a model system of firefly luminescence in vitro. *Anesthesiology* 38 : 425-436, 1973.
- 7) Franks NP, Lieb WR : Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 310 : 599-601, 1984.
- 8) 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.
- 9) Kawada I, Suzuki K, Matsumoto A and Fukusima K : Diverse Inhibitory Effects of General Anesthetics on Na⁺, K⁺ - ATPase Activity in Rabbit Brain. Taniguchi K, Kaya S, Na/K-ATPase and Related ATPase, 701-704, ELSEVIER, Amsterdam, 2000.
- 10) Hase Y, Suzuki K, Fujisawa T, Fukushima K : Inhibition mechanism of Na,K-ATPase activity in rat brain by propofol. *J Pharmacol Sci* 39 : pp120, 2011.
- 11) 渋谷真希子, 平沖敏文, 木村邦衛, 堤 耀廣, 鈴木邦明, 福島和昭 : リボ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.
- 12) Raeymaekers L, Wuytack F : Ca²⁺ pumps in smooth muscle cells. *J Muscle Res Cell Motil* 14 : 141-157, 1993.
- 13) Lehotsky J : Plasma membrane Ca (2+)-pump functional specialization in the brain. Complex of isoform expression and regulation by effectors. *Mol Chem Neuropathol* 25 : 175-187, 1995.
- 14) Penniston JT, Enyedi A : Modulation of the plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Membr Biol* 165 : 101-109, 1998.
- 15) Carafoli E, Brini M : Calcium pumps : structural basis for and mechanism of calcium transmembrane

- transport. *Curr Opin Chem Biol* 4 : 152-161, 2000.
- 16) Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L : Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 32 : 279-305, 2002.
 - 17) Strehler EE, Treiman M : Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr Mol Med* 4 : 323-335, 2004.
 - 18) 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.
 - 19) 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.
 - 20) 小畑 真, 出山義昭, 吉村善隆, 福島和昭, 鈴木邦明 : 骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) のカルシウム依存 ATPase の部分精製. 北海道歯誌 27 : 104-111, 2006.
 - 21) 今渡隆成, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明, 福島和昭 : 杯性腫細胞株P19EC細胞の静脈麻酔薬による細胞死に関する研究. 北海道歯誌 29 : 61-68, 2008.
 - 22) 小野智史 : 揮発性麻酔薬のNa⁺, K⁺-ATPaseとアルカリ性ホスファターゼにおよぼす影響に関する研究. 北海道歯誌 21 : 245-255, 2000.
 - 23) Cockshott ID : Propofol ('Diprivan') pharmacokinetics and metabolism-an overview. *Postgrad Med J* 61 : 45-50, 1985.
 - 24) Shafer A, Doze VA, Shafer SL, White PF : Pharmacokinetics and pharmacodynamics of propofol infusions during general anesthesia. *Anesthesiology* 69 : 348-356, 1988.
 - 25) 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.
 - 26) Higuchi H, Funahashi M, Miyawaki T, Mitoh Y, Kohjitani A, Shimada M, Matsuo R : Suppression of the hyperpolarization-activated inward current contributes to the inhibitory actions of propofol on rat CA1 and CA3 pyramidal neurons. *Neuroscience Research* 45 : 459-472, 2003.

ORIGINAL

Inhibition of calcium-dependent ATPase activity in rat brain
by intravenous anestheticsHiromitsu Tanaka¹, Yoshiaki Deyama², Yoshitaka Yoshimura²,
Kuniaki Suzuki² and Kazuaki Fukushima¹

ABSTRACT : The functional protein affected by general anesthetics has remained to be clarified. This study examined whether the calcium-dependent ATPase activity in rat brain may be a target for intravenous anesthetics. The effects of propofol, pentobarbital, and thiopental on Ca-dependent ATPase were in the membrane fraction (P I) or plasma membrane (P II) and microsomal (P III) fractions isolated from the homogenate of rat brain by the method of Prottorf.

The P I displays ATPase activity (Ca-ATPase) which is saturated with approximately 1 mM Ca and was inhibited by propofol in a concentration dependent manner and the half maximal inhibition concentration ($K_{i0.5}$) was 0.2 mM. The Ca-concentration dependence of Ca-ATPase was measured in the presence of various concentrations of propofol. The maximum activity and the K_m values with Ca decreased with increasing propofol concentrations. Plasma membrane Ca,Mg-ATPase (PMCA) I to IV and sarcoendoplasmic reticulum ATPase (SERCA) were detected with western blotting and by the enzymatic characteristics in P II and P III. The Ca,Mg-ATPase activities in P II and P III were inhibited by propofol, pentobarbital and thiopental a concentration dependently and the $K_{i0.5}$ were about 0.35, 3, and 1.5mM, respectively. The $K_{i0.5}$ values of Ca,Mg-ATPase for propofol, pentobarbital, and thiopental were similar to those of Na,K-ATPase activity previously determined in our laboratory. All of these ATPase are present in biomembranes, the inhibition of the Ca dependent ATPase was assumed to have been the result of the general action of anesthetics to the biomembranes and not of a selective action point of the intravenous anesthetics examined here.

Key Words : Intravenous anesthetic, Ca,Mg-ATPase, membrane

¹Department of Dental Anesthesiology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Nishi 7, Kita 13, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

²Department of Molecular Cell Pharmacology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Nishi 7, Kita 13, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

Director: Prof. Kazuaki Fukushima. (Department of Dental Anesthesiology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine)

Director: Prof. Kuniaki Suzuki. (Department of Molecular Cell Pharmacology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine)