



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Na, K-ATPase活性のフッ素による阻害 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	沖野, 雄一郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11253号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56151
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuichiro_Okino_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(歯学)

氏 名 沖野 雄一郎

学 位 論 文 題 名

Na,K-ATPase 活性のフッ素による阻害

【目的】フッ素 (F)はう蝕予防に用いられるが、急性・慢性毒性が制限要素となり応用範囲が限定される。生体内に普遍的に存在し細胞の基本的な機能を担うNa,K-ATPaseをFは阻害するという報告があることから、本研究は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Fとアルミニウム (Al)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とAlの作用を検討した。

【材料と方法】ラット脳由来の精製Na,K-ATPaseを用い、ATP加水分解により生じた無機リンをChifflet法で定量することにより活性を、リン酸化反応中間体 (EP)量を³²P-ATPを用いて測定した。

【結果】FはNa,K-ATPase活性を濃度依存的に阻害し、最終濃度5 mMでほぼ100%の活性を抑制した。Al存在下では存在するAl濃度に依存してより低濃度のFで活性が抑制され、最終濃度100 μ MのときF濃度1.25 mMで活性がほぼ0になり、Alの効果は100 μ Mで飽和した。Na,K-ATPase活性の部分反応であるNa-ATPase活性はF濃度依存的に阻害され、最終濃度10 mMで70%程度活性が阻害された。Al存在下ではAl濃度に依存してより低濃度のFで活性が抑制され、最終濃度100 μ MのときF濃度10 mMで活性がほぼ0になり、Alの作用は100 μ Mで飽和した。また部分反応であるK-*p*NPPase活性もF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、Al存在下ではAl濃度に依存してより低濃度のFで活性が抑制され、最終濃度100 μ MのときF濃度0.63 mMで活性がほぼ0になった。次に活性阻害が不可逆的になるための条件を調べるために希釈実験を行った結果、F濃度を希釈すると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になった。このAlの作用にはNa,K-ATPase活性に必須なMgも必要であり、他の2価金属(Mn、Ca)でもある程度可能だった。

またFがNa,K-ATPase反応過程のどの段階でその活性を抑制するかを解明することを目的に、FとAlのEPに対する作用を調べた。Al非存在下では、F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 で約 40 %減少した。しかし、F 濃度をさらに上げて、また Al 濃度を 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。

次に Al のキレーターである deferoxamine を用いて同様の実験を行った。まず Al 存在下での F による Na,K-ATPase 活性阻害を調べた結果、deferoxamine 非添加と比較して F による活性阻害に対する 2 と 10 μ M の Al の作用は消失させ、100 μ M では F による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。一方部分反応である Na-ATPase 活性では、deferoxamine 非存在下と比べ Al 存在下でも活性阻害により高濃度の F を必要とした。K-*p*NPPase 活性では、Al 濃度に関係なく F による活性抑制の程度がほぼ同じであった。EP 形成に対しては deferoxamine 存在下では Al 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なかった。

最後に F による EP 形成阻害と活性阻害に対する 2 価金属イオン (Mg、Ca、Mn、Be) の影響を調べた。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 と Ca 存在下で形成された EP は F 濃度に依存して軽度減少し、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 存在下ではほぼ消失した。一方 F 非存在下の Na-ATPase 活性は、Mg 存在下の活性と比較して Ca 存在下で 80 %、Mn 存在下では約 50 %あり、Be ではほとんど検出されなかった。Mg 及び Ca 存在下の Na-ATPase 活性は F 濃度に依存し低下したが 10 mM の F 存在下でも 50 %程度残存し、Mn 存在下の Na-ATPase 活性は F 濃度が増加しても顕著な減少は示さなかった。

【考察】F はすべての活性を阻害したことから、Na,K-ATPase 反応サイクルの特定の反応中間体に結合するのではなく、どの中間体にも影響しうることが明らかになった。ただし阻害の程度は異なり、K-*p*NPPase 活性>Na,K-ATPase 活性>Na-ATPase 活性の順であることが明らかになった。また活性抑制が F に特異的であるのかを明らかにするため、F と同じハロゲンであるヨウ素を用い Na,K-ATPase 活性阻害を調べたが、全く阻害されなかったことからハロゲンにおける活性阻害作用は F に特異的なものであると示唆された。Al 存在下では F 濃度に依存してすべての酵素活性は低下したこの結果は、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。

Na,K-ATPase は ATP 加水分解中に 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 濃度に依存して EP 形成量は減少したが、完全には形成阻害されず、Al 存在下でも約半分しか阻害できなかった。本研究より 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。この結果はリン酸と類似した構造をとるフッ化アルミニウムが結合し、リン酸化されないサブユニットが、残り半分のリン酸化されたサブユニットにも影響して脱リン酸化を抑制する、すなわち活性が抑制されるという機構で説明することが可能である。

また Na,K-ATPase の F による阻害は、希釈実験で示されたように Al の関与しない可逆的阻害と Al の関与する不可逆的阻害の 2 つの様式が存在することが示唆された。さらに Na,K-ATPase 反応には Mg をはじめとする 2 価金属が必要であることも示唆された。

【結語】F による Na,K-ATPase 活性阻害には 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 による活性阻害には Al が関係しない可逆的阻害と、Al の関与する不可逆的阻害の 2 つの様式が存在する。さらに F による不可逆的阻害には 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形をとり、Na,K-ATPase に不可逆的に結合し、活性阻害することが示唆された。