



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 沖 野 雄 一 郎

主査 教 授 鈴 木 邦 明
審 査 担 当 者 副査 准教授 本 多 丘 人
副査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Na,K-ATPase 活性のフッ素による阻害

審査は、主査、副査全員の出席の下に、先ず申請者が提出論文の概要の説明を行った後に、その内容および関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は以下のとおりである。

【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、EP量を ^{32}P -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 μM 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 μM で飽和した。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活性に必須なマグネシウム（Mg）も必要であった。

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も、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 の Al 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。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。

【考察】

Na,K-ATPase 活性は存在する Al 濃度に依存して、また F 濃度に依存して低下することから、Al は Na,K-ATPase の F に対する親和性を増大させることが示唆された。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阻害されず、Al 存在下でも約半分しか阻害できなかった。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とから、F が結合して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ことが示唆された。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。

各審査委員が行った主な質問事項は以下の通りである。

1. 酵素の精製に脳を使った理由、1 回あたりに使用する量は何匹程度に相当するのか、また精製時に密度勾配遠心をかけた際、どの部分を採取するのか、
2. 歯科で使用される F 濃度、また F により生じる為害性について、
3. Al を使用した理由、また唾液中や生体内における Al 濃度について、
4. deferoxamine について、Al 以外の金属との関連について、
5. 活性と EP との関係について、
6. Half of the sites reactivity について、

いずれの質問についても、申請者から得られた回答や説明は、専門的知識に基づいた的確なものであった。また関連分野についても十分な学識を有していることが示された。従って、審査委員全員は申請者が博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認めた。