



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ラット脳各種ATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	宮本, 健志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11272号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56314
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Miyamoto_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 宮本 健志

学 位 論 文 題 目

ラット脳各種ATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用

生体には各種 ATP 加水分解酵素が存在する。F 型(F-ATPase)はミトコンドリア内膜に存在し、ATP 合成機能を司っているが、ATP 加水分解に伴うプロトン能動輸送機能を有している。V 型(V-ATPase)は細胞内小器官や破骨細胞に存在し、ATP 加水分解反応に伴い H^+ の能動輸送を行う事で、pH の調整や特殊酸性環境を作り出す役割を担っている。V-ATPase は F-ATPase と全体的な構造や性質が類似している。P 型(P-ATPase)は、ATP 加水分解反応中に無機リン酸が酵素に結合したリン酸化反応中間体(EP)を形成する特徴を有している。上記の ATPase はいずれも活性発現に Mg^{2+} (Mg) を必要とするが、これらとは分別される Basal Mg-ATPase 活性も各種報告されてはいるが、詳細は不明である。また、静脈麻酔薬の各種 ATPase 活性に対する作用の報告は多いが、作用機構の詳細については不明な点が多い。そこで本研究では Mg-ATPase 活性の阻害剤に対する応答性を指標に、ラット脳に存在する Mg-ATPase を分別し、各種 Mg-ATPase に対する静脈麻酔薬の作用を検討した。

本研究では、Pottorfらの手法を用いて、ラット脳から形質膜分画(PII)及びミクロソーム分画(PIII)を得た。PII分画もしくはPIII分画と至適濃度の $MgCl_2$ に至適pHの緩衝液を添加した溶液よりMg-ATPase活性を測定した。また、ウエスタンブロッティングによりF-ATPase及びV-ATPaseの検出を行った。

PII Mg-ATPase活性はpH 9.4付近で最大活性を示したが、PIII Mg-ATPase活性はpH 7.4付近に最大活性を示した。50%活性化Mg濃度はPIIが 4.96×10^{-6} Mで、PIII が 9.87×10^{-5} Mであった。

各種阻害剤の影響としては、P 型 ATPase 共通の阻害剤 Na_3VO_4 (vanadate) は、PIII Mg-ATPase 活性のみ 10 %程度抑制した。形質膜 Ca-ATPase (PMCA) 等の阻害剤 $LaCl_3$ (La)は、PIII Mg-ATPase 活性のみ約 30 %程度抑制した。F-ATPase 等の阻害剤 NaN_3 (Azide)は、PIII Mg-ATPase 活性を約 15 %抑制し、PII Mg-ATPase 活性を約 80%抑制した。 H^+ 輸送型 ATPase 阻害剤 N,N'-dicyclohexyl carbodiimide (DCCD) は PII Mg-ATPase 活性を約 80 %抑制し、PIII Mg-ATPase 活性を約 30 %抑制した。F-ATPase 阻害剤 oligomycin A は PII Mg-ATPase 活性のみを濃度依存性に約 60%程度抑制し、V-ATPase 阻害剤 bafilomycin A1 は、PIII Mg-ATPase

活性のみを約 30 %抑制した。したがって、PII の DCCD, Azide 感受性 Mg-ATPase は F-ATPase であり、PIII の DCCD 感受性 Mg-ATPase は V-ATPase であると考えられた。ウエスタンブロッティングの結果からも、F-ATPase は PII 分画に、V-ATPase は PIII 分画に最も多く検出された。

また、PIII Mg-ATPase 活性に感受性を有する 3 種阻害剤 (Vanadate, La, bafilomycin A1) の阻害作用は相加的であり、PIII Mg-ATPase 活性は 3 種類以上の酵素が混合したものであると考察された。

各種阻害剤を用いて、静脈麻酔薬の各種 ATPase 活性に対する影響を検討した。PII 分画で、azide 添加により抑制される活性を F-ATPase 活性、抑制されない活性を PII Basal Mg-ATPase 活性とした。また PIII 分画で、bafilomycin A1 の添加により抑制される活性を V-ATPase 活性とし、bafilomycin A1 及び vanadate を作用させても残存する ATPase 活性を PIII Basal Mg-ATPase 活性とした。

Propofol (2,6-diisopropylphenol) は、V-ATPase 活性、PII 及び PIII Basal Mg-ATPase 活性を濃度依存的に抑制した。50%抑制濃度 (K_i 値) は V-ATPase 活性が 0.53 mM, PII Basal Mg-ATPase 活性は 0.54 mM, PIII Basal Mg-ATPase 活性は 0.64 mM であった。ところが、F-ATPase 活性に対しては 0.6 mM 程度まで濃度依存的に 80 % 程度の活性増強が認められた。これは propofol の F-ATPase 酵素への直接的な作用によるものではなく、F-ATPase が付着するミトコンドリア内膜に対する作用で H^+ 透過性が亢進するなどの現象が起こり、ATPase 活性が亢進しているものと推察した。

Pentobarbital はすべての ATPase 活性を濃度依存的に抑制した。 K_i 値は V-ATPase は 7.29 mM, PII Basal Mg-ATPase は 8.04 mM, PIII Basal Mg-ATPase は 7.32 mM であった。

Thiopental では各種 ATPase 活性に対する影響に差異を認めた。V-ATPase 活性に対しては最も感受性が高く、5 mM 程度で約 80 % の ATPase 活性の抑制を認めた。ところが、F-ATPase 活性及び PII Basal Mg-ATPase 活性に対しては、10 mM 程度まで濃度を上げて約 40 % 程度の活性抑制しか認められず、PIII Basal Mg-ATPase 活性に対しては、10 mM までの濃度ではほとんど活性に影響を与えなかった。

臨床的に麻酔状態を得るために必要な propofol 濃度は 8~180 μ M, pentobarbital が 50 μ M, thiopental が 25 μ M であると報告されている。これらの濃度では、Basal Mg-ATPase 活性は十分に阻害されない事が分かり、Basal Mg-ATPase は静脈麻酔薬の麻酔作用には関係しないと評価するのが妥当と考えられた。

また、高用量の propofol を長時間使用した場合まれに、propofol infusion syndrome という致死的な疾患の発生が報告されている。詳細な原因は不明であるが、propofol によるミトコンドリアの脂質代謝障害や電子伝達系の阻害作用な

どが考えられている．今回我々の研究からも，propofol のミトコンドリアに対する特異的な薬理学的作用が観察された．

以上の結果から，ラット脳には P-ATPase，V-ATPase，F-ATPase や Basal Mg-ATPase が存在し，静脈麻酔薬はこれらの ATPase 活性を基本的に抑制するが，propofol は F-ATPase 活性を特異的に促進した．このことから，propofol のミトコンドリアに対する特異的な薬理学的作用が示唆された．