



Title	ラット脳各種ATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用
Author(s)	宮本, 健志; 出山, 義昭; 吉村, 善隆 他
Citation	北海道歯学雑誌, 38(1), 28-39
Issue Date	2017-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67304
Type	journal article
File Information	38_01_03_Miyamoto.pdf



原 著

ラット脳各種ATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用

宮本 健志¹⁾ 出山 義昭²⁾ 吉村 善隆²⁾ 鈴木 邦明²⁾ 藤澤 俊明¹⁾

抄 録：静脈麻酔薬のATPase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。ATPaseにはF型ATPase（ミトコンドリアATP合成酵素）、P型ATPase、V型ATPase等が存在し、活性発現にMg²⁺（Mg）を必要とするが、役割や性質の不明なMg-ATPaseも多数報告されている。本研究ではラット脳に存在するMg-ATPaseを分析するとともに、静脈麻酔薬の作用を検討した。

ラット全脳から、Pottorfの方法に従って、形質膜（PII）とミクロソーム（PIII）分画を得た。Mg-ATPase活性の至適pHはPIIが約9.4、PIIIは約7.4であった。PIIのMg-ATPase活性はF型ATPaseの阻害剤であるNa₃N₃によって約80%抑制され、PIIIのMg-ATPase活性はP型ATPase及びV型ATPaseの阻害剤であるNa₃VO₄及びbafilomycin A1によってそれぞれ約10%及び30%抑制された。ウエスタンブロッティングの結果からも、F型ATPaseはPIIに、V型ATPaseはPIIIに最も多く検出された。上記阻害剤で抑制されないMg-ATPase活性をBasal Mg-ATPaseとし、各阻害剤の存在下で各ATPaseを分別して静脈麻酔薬の影響を調べた。PropofolはV型ATPase活性、PII及びPIII Basal Mg-ATPase活性を濃度依存的に抑制したが、F型ATPase活性は80%程度活性化した。PentobarbitalはすべてのATPase活性を濃度依存的に抑制した。ThiopentalもすべてのATPase活性を抑制したが、その程度は各ATPaseによって異なった。

以上の結果から、静脈麻酔薬はラット脳Mg-ATPase活性を基本的に抑制するが、propofolはミトコンドリアに特異的な作用を及ぼす事が示唆された。

キーワード：静脈麻酔薬、F型ATPase、V型ATPase、basal Mg²⁺-ATPase

緒 言

生体にはP型（P-ATPase）、V型（V-ATPase）、F型（F-ATPase）などの様々なATP加水分解酵素が存在する。

ミトコンドリアのF₁F₀-ATP合成酵素は、ミトコンドリアの呼吸時にミトコンドリア内膜に生じるH⁺の電気化学的な勾配を利用して、ADPと無機リンからATPを合成する¹⁻³⁾。F₁は膜外に球形で存在しATP合成の触媒作用が起こる場所であるが、脚を通じて膜に存在するH⁺チャネルを含むF₀領域と結合している。損傷の無いF₁F₀-ATP合成酵素は、ATPの合成及び逆反応として加水分解（F-ATPase）を行う事ができる⁴⁾。

液胞型（H⁺）-ATPase（V-ATPase）は真核細胞生物の細胞内小器官を酸性化する重要な役割を担っている⁵⁻⁸⁾。V-ATPaseは2つの機能的な領域により構成されている。V₁領域はヌクレオチドに結合する部位を有し、V₀領域は細胞膜を超えたH⁺の輸送に関与している。V-ATPaseはミ

トコンドリアや葉緑体、細菌などのF-ATPase¹⁻³⁾と全体的な構造や個々のサブユニットの配列の相同性に関して類似している。

P型は、ATP加水分解反応中に無機リン酸がATPaseに直接共有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。Na⁺、K⁺-ATPase（Na、K-ATPase）、Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase（Ca-ATPase）⁹⁾、H⁺、K⁺-ATPase（H、K-ATPase）の3種類が確立されており、詳細な構造や機能に至るまで研究がすすんでいる。

上記のATPaseはいずれも活性発現にMg²⁺（Mg）を必要とする。これはATPのγ位にMgが結合したMg-ATPがATPase酵素の基質になりうるためである。

興味深いことには、Smaginaらはウサギ胃粘膜ミクロソーム分画でMg及びK⁺存在下で発現するATPase活性には、Na、K-ATPase、H、K-ATPaseやF-ATPaseではない、50%弱のBasal Mg-ATPase活性が含まれる事を報告¹⁰⁾している。さらに、Aulandら¹¹⁾はヒト赤血球ghostsから、Na、

¹⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学分野 歯科麻酔学教室（主任：藤澤俊明 教授）

²⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学分野 細胞分子薬理学教室（主任：鈴木邦明 教授）

K-ATPaseやCa-ATPaseではない、2種類のMg-ATPaseを精製している。これら以外にも上記のATPaseとは分別されるMgで活性化されるBasal Mg-ATPase活性は各種報告¹²⁻¹⁴⁾されているが、その役割や性質に関して詳細は明らかになっていない。

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ら¹⁵⁾は全身麻酔薬が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¹⁶⁾、Ca, Mg-ATPase¹⁷⁻²¹⁾、Na, K-ATPase²²⁻²⁴⁾、protein kinase C²⁵⁾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。我々は過去に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に及ぼす影響²⁶⁾、propofolのNa, K-ATPase活性やCa-ATPase活性の抑制機構^{27, 28)}、スピラベル剤を使用した揮発性麻酔薬及び静脈麻酔薬のリボソーム膜への影響²⁹⁾等の研究を行っている。これらの研究から、各種麻酔薬がNa, K-ATPase活性やCa-ATPase活性を濃度依存的に抑制する結果が得られており、麻酔薬がATPase反応機構に直接的な影響を及ぼしていると考えている。

本研究ではMg-ATPase活性の阻害剤に対する応答性などを指標に、ラット脳に存在するMg-ATPaseを分別し、各種Mg-ATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用を調べ、過去の研究結果等と比較検討を行った。

方 法

1. ラット脳からのF-ATPase, V-ATPase及びBasal 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Pottorf³⁰⁾の方法に従って、ホモジェネートを2,000×g、15分の遠心を行って得られた沈渣を細胞微細破砕物 (PI) とした。その上清をさらに20,000×g、30分の遠心にかけて得られた沈渣を形質膜 (PII) 分画とした。その上清をさらに100,000×g、75分の遠心で得られた沈渣をミクロソーム (PIII) 分画とし、上清を (SN-III) とした (図1)。

なお、ラットは北海道大学大学院歯学研究所・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。

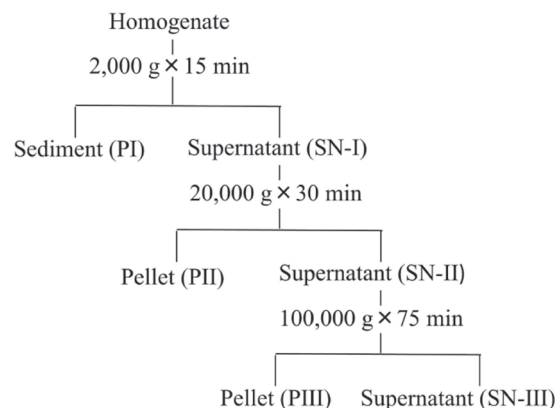


図1 ラット脳から各膜分画の部分精製法

2. Mg-ATPase活性の測定

Mg-ATPase活性は、ATP加水分解の結果生成された無機リン量をChifflet法³¹⁾に従って定量することにより測定した。各ATPase活性の測定は、以下の組成の反応液で行った。

(1) PIIおよびPIII分画Mg-ATPaseのpH依存性とMg濃度依存性

14.13 μgのPII分画もしくは15.24 μgのPIII分画と最終濃度にして25 mM sucrose, 1 mM EGTA-tris, 3.3 mM MgCl₂に各種pHの50 mM tris-HClもしくは50 mM tris-酢酸緩衝液を添加した溶液に5 mM ATP添加後に0.3 mlとなる反応液で酵素活性反応を行い、pH依存性を測定した。

Mg濃度依存性に関しては、PII及びPIIIそれぞれの至適pHで各種濃度のMgCl₂を添加し、上記と同様の溶液構成にて酵素活性反応を行った。

(2) 各種阻害剤及び静脈麻酔薬のPII及びPIII分画Mg-ATPase活性に対する影響

14.13 μgのPII分画と最終濃度にして25 mM sucrose, 50 mM tris-HCl 緩衝液 (pH 9.36), 1 mM EGTA-tris, 1 mM MgCl₂および各種濃度の阻害剤及び静脈麻酔薬を添加した溶液に、5 mM ATP添加後に0.3 mlとなる反応液で酵素反応を行った。

15.24 μgのPIII分画と25 mM sucrose, 50 mM tris-酢酸緩衝液 (pH 7.43), 1 mM EGTA-tris, 2.7 mM MgCl₂および各種濃度の阻害剤及び静脈麻酔薬を添加した溶液に、5 mM ATP添加後に0.3 mlとなる反応液で酵素反応を行った。

すべての実験で反応液を37℃で10分間プレインキュベーション後、5 mM ATP 50 μlを加えて反応を開始し、30分後12% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) 300 μl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850 nmで測定した。

静脈麻酔薬が活性に与える影響を調べた実験では、すべ

で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、反応を行った。

3. ウェスタンブロッティングによるF-ATPase及びV-ATPaseの検出

発現タンパク質の解析は10 %ゲルを用いたSDS -ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (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 ATP synthase, H^+ transporting, mitochondrial F1 complex, δ subunit (F-ATPase) (CUSABIO CSB-PA002355GA01HU, Lot CPAM061199), マウス由来のAnti V-ATPase C1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-376227, Lot #K2311) を、2次抗体としてF-ATPaseにはAnti-rabbit IgG-HRP (from goat) (Zymax, Lot 20671300) を、V-ATPaseにはAnti-Mouse IgG2b-HRP (from rabbit) (ZYMED, Lot 20873015) 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、平均値と標準偏差を示した。

結 果

1. ラット脳PII及びPIII分画Mg-ATPase活性のpH依存性とMg濃度依存性

ラット脳PII及びPIII分画のMgで活性化されるATPase活性のpH依存性を調べた (図2)。

PII分画のMg-ATPase活性はpHの上昇に伴って増大しpH 9.4付近で最も高い活性を示したが、PIII分画のMg-ATPase活性はpH 7.4付近に最大活性を示した。

次に至適pH下における、各分画のMg-ATPase活性のMg濃度依存性を測定した (図3)。

最大活性値 (V_{max}) はPIIが $0.23 \mu\text{mol Pi/mg protein/min}$, PIII が $0.12 \mu\text{mol Pi/mg protein/min}$ であり、PIIはPIIIに比べて約2倍近く高い V_{max} 値を示した。また、Hillプロットから算出した50%活性化濃度 ($K_{0.5}$ 値) はPIIが $4.96 \times 10^{-6} \text{ M}$ で、PIII が $9.87 \times 10^{-5} \text{ M}$ であり、 $K_{0.5}$ 値はPIIがPIIIに比べて、1/20程度低値であった。

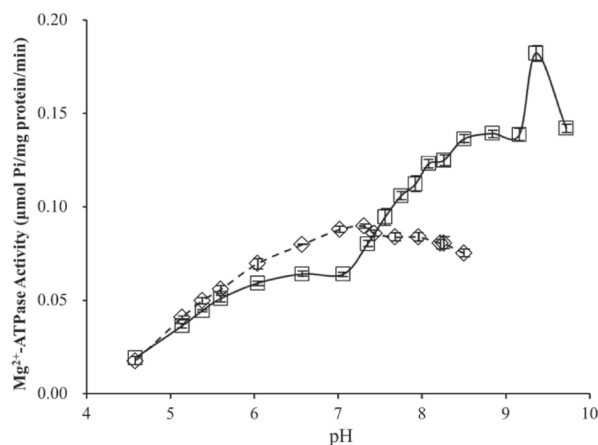


図2 PII及びPIII Mg-ATPase活性のpH依存性

PII分画 (□) もしくはPIII分画 (◇) にsucrose, EGTA-tris, MgCl_2 (最終濃度3.3 mM) 及び各種pHの緩衝液を添加した溶液をプレインキュベーション後、ATP溶液を添加し30分間反応を行った。Mg-ATPase活性は、ATP加水分解の結果生成された無機リン量をChifflet法に従って定量することにより測定した。

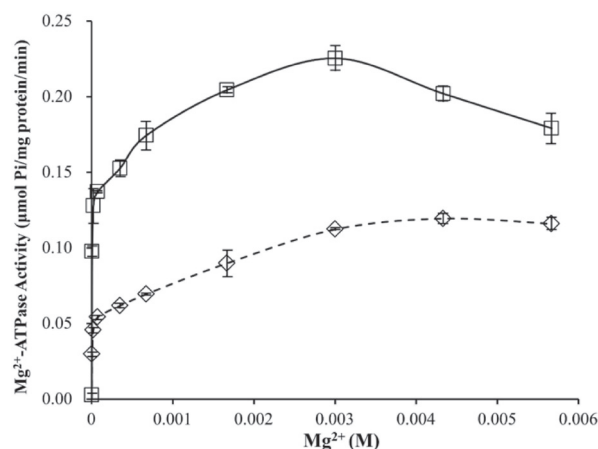


図3 PII及びPIII Mg-ATPase活性のMg濃度依存性

PII分画 (□), sucrose, tris-HCl 緩衝液 (pH 9.36), EGTA-tris に各種濃度のMgを添加した溶液と、PIII分画 (◇), sucrose, tris-酢酸緩衝液 (pH 7.43), EGTA-trisに各種濃度のMgを添加した溶液を使用した。ATP溶液で30分間反応後、無機リン量を定量しMg-ATPase活性を測定した。

2. 各種阻害剤のPII及びPIII分画Mg-ATPase活性に対する影響

最大の活性を示す至適条件下におけるラット脳PII及びPIII分画Mg-ATPase活性に対して各種阻害剤を作用させ影響を調べた (図4)。

Tetramisoleは最終濃度を1.25 mMまであげても、両分画のMg-ATPase活性は全く抑制されなかった。

LaCl_3 (La) は500 μM 以下では両分画のMg-ATPase活性の抑制は認められなかったが、1 mMまで増加させるとPIII Mg-ATPase活性では30%程度の抑制が認められた。

100 μM の Na_3VO_4 (vanadate) はPII Mg-ATPase活性を

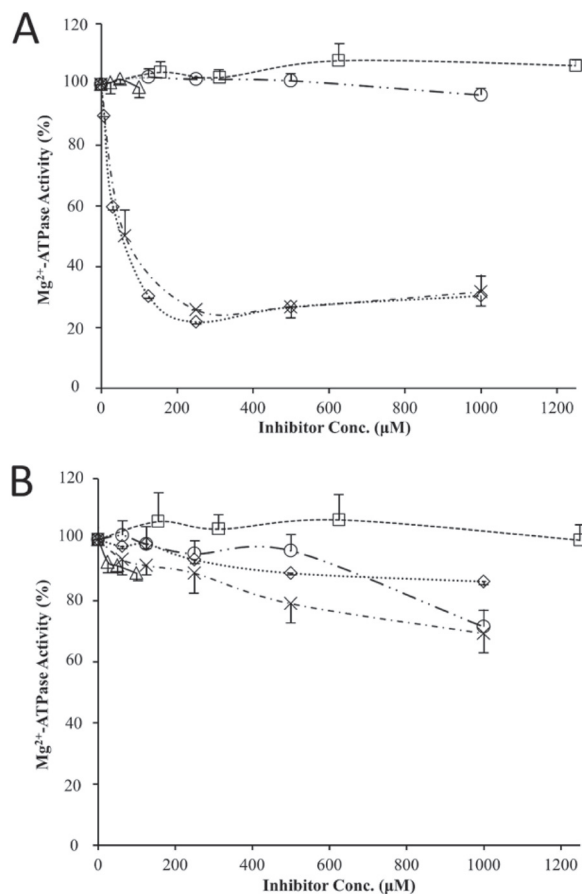


図4 PII Mg-ATPase (A) 及びPIII Mg-ATPase (B) 活性に対する各種阻害剤の影響

PII分画にsucrose, tris-HCl 緩衝液 (pH 9.36), EGTA-tris, MgCl₂ (最終濃度1 mM) を添加した溶液と, PIII分画にsucrose, tris-酢酸緩衝液 (pH 7.43), EGTA-tris, MgCl₂ (最終濃度2.7 mM) を添加した溶液を使用した。上記溶液に各種濃度のtetramisole (□), LaCl₃ (○), vanadate (△), DCCD (×), azide (◇) を添加しATP溶液で30分間反応後, 無機リン量を定量しMg-ATPase活性を測定した。結果は阻害剤非添加時の活性を100 (%) とした相対数値で表記した。

全く抑制しなかったが, PIII Mg-ATPase活性を10%程度抑制した。

N, N'-dicyclohexyl carbodiimide (DCCD) は濃度に依存してPII Mg-ATPase活性を抑制し, 250 μMでは約80 %の活性を抑制し, PIII Mg-ATPase活性を1 mMで約30 %抑制した。

NaN₃ (azide) は, PIIIでは1 mMで約15 %のPIII Mg-ATPase活性を抑制したが, PIIでは250 μMのazideにより約80%のPII Mg-ATPase活性の抑制が認められた。

PII及びPIII分画の Mg-ATPase活性に対するoligomycin A及びbafilomycin A1の影響を調べた (図5)。Oligomycin AはPIII Mg-ATPase活性を全く抑制しなかったが, PII Mg-ATPase活性を濃度に依存して抑制し10 μMのoligomycin Aで約60%の活性を抑制した。

Bafilomycin A1は, PII Mg-ATPase活性を全く抑制しな

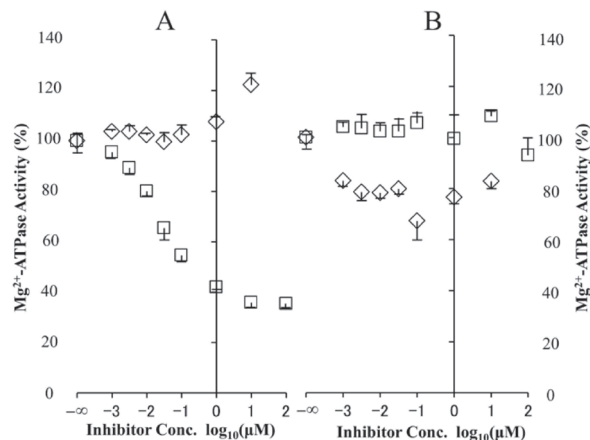


図5 PII Mg-ATPase活性 (A) 及びPIII Mg-ATPase活性 (B) に対するoligomycin A (□) 及び bafilomycin A1 (◇) の影響

図4と同様にPII及びPIII溶液を作成後, 各種濃度のoligomycin A (□) もしくは bafilomycin A1 (◇) を添加し, ATP溶液で30分間反応を行い, 無機リン量を定量しMg-ATPase活性を測定した。なお, oligomycin A及びbafilomycin A1はDMSOに溶解したものを使用し, 反応溶液中におけるDMSO濃度は10%とした。結果は阻害剤非添加時の活性を100 (%) とした相対数値で表記した。

かったが, PIII Mg-ATPase活性を0.1 μM bafilomycin A1で約30 %抑制した。

続いて, PIII Mg-ATPase活性に関して感受性の認められた上記各種阻害剤に関して, 相互作用に関する実験を行った (図6)。

Vanadate (100 μM), La (2 mM), bafilomycin A1 (0.1 μM) それぞれ単独では8.1%, 34.3%, 30.8%の抑制であっ

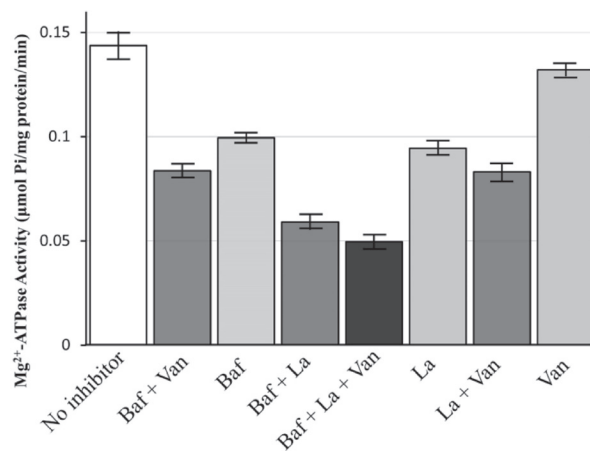


図6 PIII Mg-ATPase活性に対する各種阻害剤の相互作用

図4と同様にPIII溶液を作成後, 最終濃度にして100 μM vanadate (Van), 2 mM La (La), 0.1 μM bafilomycin A1 (Baf) となるように, それぞれの阻害剤を単独もしくは複合して添加し, ATP溶液で30分間反応を行い, 無機リン量を定量しMg-ATPase活性を測定した。なお, bafilomycin A1はDMSOに溶解したものを使用したため, すべての反応溶液中のDMSO濃度は10%に統一した。

たが、vanadate + Laでは42.2%, vanadate + bafilomycin A1では41.9%, La + bafilomycin A1では59.0%, vanadate + La + bafilomycin A1では65.5%であり、この3種阻害剤の阻害作用は相加的であった。

3. ウエスタンブロッティングによるV-ATPase及びF-ATPaseの検出

ラット脳ホモジネート、PI, PII, PIII及びSN-IIIにおけるV-ATPase及びF-ATPaseの存在を確定させるためにウエスタンブロッティングを行った(図7)。

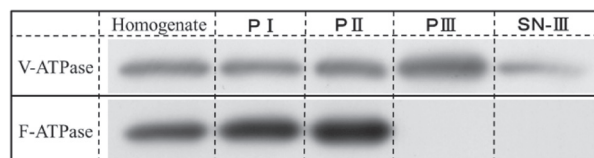


図7 ウエスタンブロッティングによるF-ATPase及びV-ATPaseの検出

1次抗体としてF-ATPaseには、ウサギ由来のAnti ATP synthase, H^+ transporting, mitochondrial F1 complex, δ subunit, V-ATPaseにはマウス由来のAnti V-ATPase C1を使用した。2次抗体としてF-ATPaseにはAnti-rabbit IgG-HRP(from goat)を、V-ATPaseにはAnti-Mouse IgG2b-HRP (from rabbit)を用いた。

V-ATPaseは、すべての分画に存在したが、同じタンパク質量に対して存在する割合は、ホモジネートを1.00とすると、PIが0.99, PIIが1.01, PIIIが1.34, SN-IIIが0.49であり、V-ATPaseの精製率(存在率)はPIII分画が最も高かった。F-ATPaseは、ホモジネート、PI, PII分画にのみ存在が認められ、PIII及びSN-III分画には検出されなかった。同じタンパク質量に対して存在する割合は、ホモジネートを1.00とすると、PIが1.22, PIIが1.37であり、F-ATPaseの精製率(存在率)はPII分画が最も高かった。

4. F-ATPase活性, V-ATPase活性, 及びBasal Mg-ATPase活性に対する静脈麻酔薬の影響

図8に各種ATPaseの測定法の模式図を記した(図8)。

F-ATPase活性は最も精製率の高かったPII分画を用いて、500 μ M azideの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活性として測定を行った。V-ATPase活性は最も精製率の高かったPIII分画を用いて、0.1 μ M bafilomycin A1の添加により抑制される活性をV-ATPase活性とした。PIII分画で0.1 μ M bafilomycin A1及び100 μ M 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。

各種ATPase活性に対する2,6-diisopropylphenol (propofol)の影響を図9に示した。

PropofolはV-ATPase活性, PII及びPIII Basal Mg-ATPase活性に対しては濃度依存的にATPase活性を抑制した。

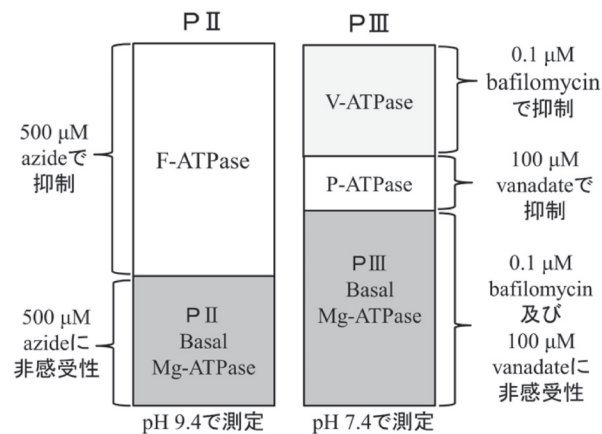


図8 各種ATPase測定法の概念図

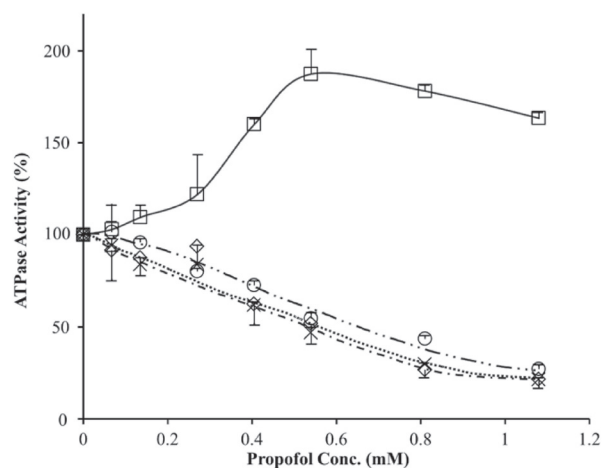


図9 各種ATPase活性に対するpropofolの影響

PII分画にsucrose, tris-HCl 緩衝液 (pH 9.36), EGTA-tris, $MgCl_2$ を加えた溶液に、最終濃度にして0.5 mM azideを添加したものと添加していないものを準備した。また、PIII分画にsucrose, tris-酢酸緩衝液 (pH 7.43), EGTA-tris, $MgCl_2$, vanadate (最終濃度100 μ M)を加えた溶液に、最終濃度にして0.1 μ M bafilomycin A1を添加したものと添加していないものを準備した。上記溶液に各種濃度のpropofolを添加後、ATP溶液で30分間反応を行い、無機リン量を定量し各種ATPase活性を測定した。なお、propofolはDMSOに溶解したものを使用し、すべての反応溶液中におけるDMSO濃度は10%に統一した。PII測定においてazide添加群と非添加群の差をF-ATPase活性($\square$)とし、azide添加群をPII Basal Mg-ATPase活性($\times$)とした。またPIII測定においてbafilomycin A1添加群と非添加群の差をV-ATPase活性($\diamond$)とし、bafilomycin A1添加群をPIII Basal Mg-ATPase活性($\circ$)とした。結果は、propofol非添加時の活性を100(%)とした相対数値で表記した。

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%程度の活性の増強が認められた。

各種ATPase活性に対するpentobarbitalの影響を図10に示した。

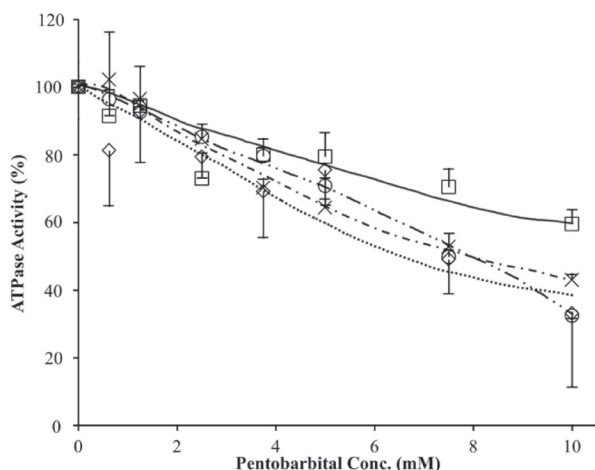


図10 各種ATPase活性に対するpentobarbitalの影響

図9と同様の手順で溶液作製を行った。上記溶液に各種濃度のpentobarbitalを添加後、ATP溶液で30分間反応を行い、無機リン量を定量し各種ATPase活性を測定した。なお、pentobarbitalはDMSOに溶解したものを使用し、すべての反応溶液中におけるDMSO濃度は10%に統一した。結果は、F-ATPase活性(□)、PII Basal Mg-ATPase活性(×)、V-ATPase活性(◇)、PIII Basal Mg-ATPase活性(○)を、pentobarbital非添加時の活性を100(%)とした相対数値で表記した。

PentobarbitalはすべてのATPase活性を濃度依存的に抑制した。Ki値はV-ATPaseは7.39 mM、PII Basal Mg-ATPaseは8.04 mM、PIII Basal Mg-ATPaseは7.32 mMであった。

各種ATPase活性に対するthiopentalの影響を図11に示した。

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活性の抑制が認められた(Ki

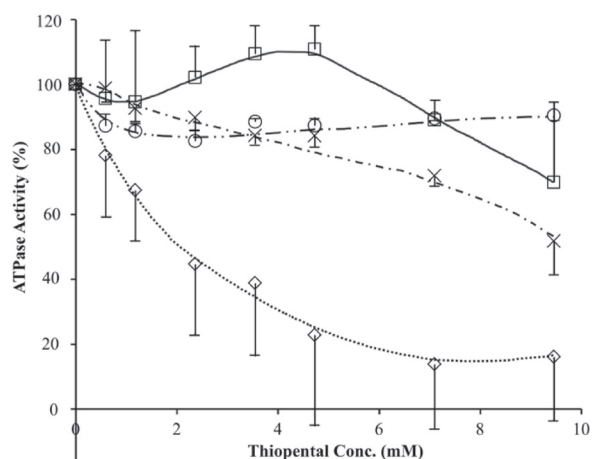


図11 各種ATPase活性に対するthiopentalの影響

図9と同様の手順で溶液の作製を行った。上記溶液に各種濃度のthiopentalを添加後、ATP溶液で30分間反応を行い、無機リン量を定量し各種ATPase活性を測定した。結果は、F-ATPase活性(□)、PII Basal Mg-ATPase活性(×)、V-ATPase活性(◇)、PIII Basal Mg-ATPase活性(○)を、thiopental非添加時の活性を100(%)とした相対数値で表記した。

値は1.91 mM)。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なかった。さらに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。

考 察

1. ラット脳に存在するMg-ATPase活性に関して

本研究では、Pottorfらの手法を用いて、ラット脳ホモジネートから各分画の抽出を行った。Pottorfらによると、PII分画には形質膜Ca-ATPase (PMCA) に富んだ形質膜分画が抽出され、PIII分画には筋小胞体Ca-ATPase (SERCA) に富んだミクロソーム分画が抽出されると述べている。本研究はMg単独で活性化されるMg-ATPase活性を調べたが、PIIとPIII分画では、それぞれ活性の至適pHやMgに対する親和性の異なるMg-ATPase活性が検出された。これらのMg-ATPaseの性質を明らかにすべく、まず各種阻害剤のMg-ATPase活性に対する影響を検討した。

PII分画のMg-ATPase活性はpH 9.4付近で最も高い活性を示したことから、アルカリ性フォスファターゼ (ALP) によるATP加水分解を測定している可能性を考えて、ALPの阻害剤であるtetramisoleの影響を調べたが、PII及びPIIIのATPase活性はtetramisoleに対し感受性を示さなかった。したがってPIIとPIII Mg-ATPase活性がALPによるものである可能性は否定された。

VanadateはP型ATPaseに共通する阻害剤と考えられている。そこでvanadateのMg-ATPaseに対する作用を調べたが、PIII Mg-ATPase活性のみ10%程度の抑制が認められた。このことから、PII Mg-ATPase活性はP型のATPaseによるものではなく、PIII Mg-ATPase活性は一部分P型のATPase活性が含まれる可能性が示唆された。

比較的低濃度 (50 μ M) のLaによりラット脳シナプトソームの形質膜Ca-ATPase (PMCA) が80%弱抑制されることが報告¹²⁾ されている。LaのMg-ATPaseに対する作用を調べたところPII Mg-ATPase活性は抑制されなかったが、PIII Mg-ATPase活性は1 mMのLaにより30%程度抑制された。しかし、50 μ M程度では活性抑制が起こっておらず、またvanadateとは相加的な抑制であることから、Laにより抑制されるPIII Mg-ATPase活性はPMCAではないと考えられる。

DCCDはF-ATPase、V-ATPase、一部のP-ATPaseなどのH⁺輸送型ATPaseを阻害^{32, 33)} する事が報告されている。このDCCDによりMg-ATPase活性がPIIは約80%、PIIIは約30%抑制されたことから、F-ATPaseやV-ATPaseである可能性が示唆された。そこでF-ATPaseの特異的阻害剤であるoligomycin A^{4, 33)} とV-ATPaseの特異的阻害剤であるbafilomycin A1³⁴⁾ の作用を測定した。

Oligomycin AはPIII Mg-ATPaseには非感受性であったが、PII Mg-ATPase活性を抑制した。また、F-ATPaseの別の阻害剤であるazide^{32, 35)}もPII Mg-ATPaseを抑制し、azideとDCCDの抑制曲線は類似したものであった。したがって、PIIのDCCD感受性Mg-ATPaseはF-ATPaseである可能性が高いと考えられた。

また、bafilomycin A1はoligomycin Aとは逆に、PII Mg-ATPase活性には非感受性であったが、PIII Mg-ATPase活性を30 %程度抑制したことから、PIIIのDCCD感受性Mg-ATPaseはV-ATPaseである可能性が高いと考えられた。高濃度(100 μ M以上)のbafilomycin A1はP-ATPaseも抑制する³⁴⁾と報告されているが、ここでの抑制は非常に低濃度(0.1 μ M)のbafilomycin A1で起こっており、V-ATPase活性が特異的に抑制されているものと考えられた。

F-ATPase及びV-ATPaseの存在を確定するために、ウエスタンブロッティングを行ったが、F-ATPaseはPIIに、V-ATPaseはPIIIに最も多く検出され、ATPase活性の実験結果を支持するものであった。

PIII Mg-ATPaseに対する各阻害剤(bafilomycin A1, vanadate, La)の相互作用を調べた実験では、これら3種類の阻害剤の阻害作用はいずれも相加的であった。これらの阻害剤はそれぞれ別のMg-ATPaseを抑制していると考えられ、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。

また、azide, bafilomycin A1, vanadateはF, V, P-ATPase活性をほぼ完全に消失させる阻害剤³⁴⁾であり、これらの阻害剤を作用させても残存する酵素活性はF, V, P-ATPase活性の部分反応ではなく、これらとは分別される酵素活性(Basal Mg-ATPase活性)と考えられる。そこで、F-ATPase, V-ATPase, P-ATPase及びBasal Mg-ATPaseを上記阻害剤で区別し、各種ATPase活性に対する静脈麻酔薬の影響をさらに検討した。

2. ラット脳各種ATPaseに対する麻酔薬の影響に関して

(1) propofolの作用

我々は過去にラット脳の同じ膜分画を使用して、Na, K-ATPase活性に対するpropofolの作用²⁷⁾やCa-ATPase活性に対するpropofol, pentobarbital, thiopentalの作用²⁸⁾を検討している。これによるとpropofolは混合阻害の様式でNa, K-ATPase活性を抑制し、 K_i 値は0.26 mMであり、1.03 mM濃度ではほぼ完全な阻害が起こっている。また、イヌ腎ミクロソームに存在するNa, K-ATPaseに対してpropofolを作用させた研究²²⁾でも、0.8 mMのpropofolで約90 %程度活性が抑制(K_i 値は0.13 mM)されており、概ね類似した結果が報告されている。

Ca-ATPaseに関する我々の研究では、Na, K-ATPaseと同様にpropofol 1.03 mMではほぼ完全に抑制し、 K_i 値は0.35

mMであった。また、PIIのCa-ATPaseでは0.2 mM以下の低濃度のpropofolでわずかに活性化が認められた。ヒト赤血球から精製されたPMCAとウサギ骨格筋から抽出したSERCAに対して同様にpropofolを作用させた研究¹⁷⁾でも、0.4 mM程度のpropofolではほぼ完全に活性が抑制されている。揮発性麻酔薬halothaneに¹⁴Cを標識としてラベルした研究によると、halothaneがSERCA(SR膜)に飽和的に結合し、酵素形態に何らかの変化を与え、酵素機能に影響を与えている可能性が報告¹⁹⁾されている。この結合は酵素の非極性部位に起こっており¹⁸⁾、Lopezらはpropofolも同様にCa-ATPaseの非極性部位に直接作用する事で、同様の影響を与えている可能性を示唆¹⁷⁾している。

興味深いことにLopezらの研究¹⁷⁾では、SERCAは0.1 mM以下の低濃度のpropofolにより活性化されており、活性化は低温になる程強まり、16 $^{\circ}$ C下では50 %程度の増強が起こっている。また、SERCAに対する臨床濃度では活性化され、高濃度では抑制されるという2相性の影響は、halothaneでも報告¹⁹⁾されている。Ca-ATPaseが十分な活性を保つには、触媒反応中に酵素の回転運動を制限しないような、膜の流動性が必要である。全身麻酔薬の中には、細胞膜にあるアシル鎖領域の流動性を増加させるものがあり、このような低濃度の麻酔薬によるSERCAの活性化には、この膜の流動性の増加が関与している²⁰⁾とKutchaiらは考えている。

今回我々はpropofolのF-ATPase, V-ATPase及びBasal Mg-ATPase活性に対する作用を調べたが、V-ATPase, PII及びPIII Basal Mg-ATPaseはNa, K-ATPaseやCa-ATPaseと類似した抑制を認めたが、 K_i 値はNa, K-ATPaseやCa-ATPaseより若干高かった。ところが、F-ATPaseでは興味深い事に0.6 mM程度まで80 %程度活性の増加が認められた。この活性化はSERCAで起こっている活性化に比べて、はるかに高濃度で起こっている。Rigouletらによって行われた研究でも、同様に0.4 mM以下のpropofolがラット肝のF-ATPase活性を約2倍程度増強するという結果³⁶⁾が得られている。PropofolによるATP加水分解率の増加とともに、ミトコンドリアの膨張の程度が減少し、膜内外の塩濃度勾配が低下する現象が起こっていた。Rigouletらは、protonophoricな性質により酸化的リン酸化反応が抑制されるとともに、ミトコンドリア内膜の透過性亢進やプロトンポンプ(電子伝達系)の低能率化が起こることと膜内外の電位差が減少していると述べている。今回我々はF-ATPaseと同一の祖先から派生し、相同性が高く性質が類似したV-ATPaseに対するpropofolの影響を同時に測定することができたが、上記のとおりF-ATPaseとV-ATPaseでは全く異なる結果が得られた。この結果から、propofolがF-ATPase酵素に直接的に結合するなどの作用をしているのではなく、F-ATPaseが付着するミトコンドリア内膜に対して何らかの影響を及ぼすことにより、

特異的にATPase活性が亢進しているものと考えられた。また、F-ATPaseやV-ATPaseのH⁺輸送機構は回転モータ型であり、Ca-ATPaseのようなP-ATPaseとは異なっている。したがって、F-ATPase活性が亢進する機序に関しては、ミトコンドリア内膜の流動性が増加することによるものではなく、ミトコンドリア内膜のH⁺透過性が亢進する現象が起こり、*in vitro*微小環境下においてATPase活性が最も活発に起こる至適pHが維持されているものと推察された。確定的な機序は不明ではあるが、propofolがミトコンドリアに対して特異的な薬理学的性質を有していることは間違いなく、更なる研究が必要である。

(2) Pentobarbitalの作用

我々の以前の研究では、pentobarbitalはウサギ脳Na, K-ATPaseを濃度依存的に抑制し、Ki値は4.54 mM²⁶⁾であった。また、ラット脳Ca-ATPaseでも濃度依存的な抑制を認め、Ki値は3.0 mM²⁸⁾であった。今回我々の実験結果では、pentobarbitalはすべてのATPase活性を濃度依存的に抑制した。Ki値はF-ATPase活性が10 mM以上で、V-ATPase、PII及びPIII Basal Mg-ATPaseは7~8 mM程度と、いずれのATPaseもNa,K-ATPaseやCa-ATPaseに比べてpentobarbitalに対して低感受性であった。

マウスの線維芽細胞 (LM) の形質膜を用いた実験²³⁾では、Na, K-ATPase活性はpentobarbitalにより2相性 (0.25 mMと2.5 mM) に活性化されており、0.25 mMでは約20%程度活性化されていたが、10 mM程度の高濃度になると50%程度抑制が認められた。ところが同じLMのBasal Mg-ATPaseは、pentobarbital 0~10mMの範囲で、全く影響を受けなかったと報告されている。この活性化は負に荷電されたbarbiturateが、細胞膜表面の膜電位に変化を与え、膜の流動化 (fluidization) が起こっている為であろうとSweetらは考えている²³⁾。しかし、我々の研究では、LMのNa, K-ATPaseで認められた2相性の活性化は起こらず、またBasal Mg-ATPase活性はPII, PIIIともに抑制される結果となった。

(3) Thiopentalの作用

我々の以前の研究では、thiopentalはウサギ脳Na, K-ATPaseを濃度依存的に抑制し、Ki値は2.34 mM²⁶⁾であった。また、ラット脳Ca-ATPaseでも濃度依存的な抑制を認め、Ki値は1.5 mM²⁸⁾であった。ヒト胎盤の合胞体栄養細胞層形質膜から精製したNa, K-ATPaseに対してthiopentalを作用させた研究²⁴⁾では、1.2 mMのthiopentalで50%近い抑制が認められ、我々の研究と近似した値であった。

今回の研究では、thiopentalはすべてのATPase活性を抑制したものの、その程度は各ATPase活性で異なり、9.5 mMまで濃度をあげても50%以上の抑制を認めたのはV-ATPaseのみであり、Ki値は1.91 mMとNa, K-ATPaseやCa-ATPase

と類似していた。他のATPaseはthiopentalに対し、いずれも低感受性であり、PIII Basal Mg-ATPaseはほとんど抑制が認められなかった。同じbarbituratesであるpentobarbitalと比較して、このような差異が生じる結果となった事は興味深い。

(4) 麻酔薬がATPaseへ与える影響と麻酔作用や副作用との関連性

全身麻酔薬の作用機序に関してはさまざまな説があり、現在までにその確定的なメカニズムは明らかではない。その中で、全身麻酔作用は神経細胞の脂質二重膜に作用するのか、膜タンパク質に直接作用するのかという議論¹⁵⁾がある。Franks and Liebらは、全身麻酔薬は基本的には非特異的にタンパク質に作用し、臨床濃度で阻害される限定された一部のタンパク質の変化によって麻酔状態が引き起こされると推測している。GABA_A受容体¹⁶⁾、Ca, Mg-ATPase¹⁷⁻²¹⁾、Na, K-ATPase²²⁻²⁴⁾、protein kinase C²⁵⁾をはじめ臨床濃度の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、これらが特異的に全身麻酔薬の作用する受容体であると特定するには至っていない。そこで、今までほとんど研究も行われていないBasal Mg-ATPaseに対する静脈麻酔薬の作用を今回検討した。

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 μM^{15, 37, 38)}とさまざまな報告がある。また、ヒトにおけるEC₅₀値はpentobarbitalが0.050 mMでthiopentalが0.025 mMであると報告¹⁵⁾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今回の研究から明らかになった。以前の我々の研究でも、同一の検体や薬剤を使用しているが、Ca-ATPase活性、Na, K-ATPase活性に対する影響と比較しても、Basal Mg-ATPase活性は静脈麻酔薬に対して比較的低感受性であった。麻酔効果の作用点という観点から見れば、Basal Mg-ATPaseはこれら静脈麻酔薬の作用には関係しないと評価するのが妥当かもしれない。

ところで、propofolは麻酔深度の調節が容易で安定した鎮静効果が得られることから、全身麻酔の導入や維持だけではなく、ICUにおける長時間の鎮静管理にも頻用されている。しかし高用量のpropofolを長時間使用した場合に、低頻度ではあるが代謝性アシドーシス、徐脈性不整脈や横紋筋融解症などの症状が発現し致死的となり得るpropofol infusion syndrome (PRIS) が報告^{39, 40)}されている。この疾患の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^{39, 40)}、あるいはアポトーシス作用^{41, 42)}による可能性が報告されている。Propofolは小分子量の両親媒性物質であることから、細胞膜および細胞質いずれの領域へも広く分布し、細胞内小器官であるミトコンドリアへも分布すると推定される。*in vitro*では、propofolはミトコンドリアにおける酸化

的リン酸化および電子伝達系を抑制^{43, 44)}することや、膜電位を低下することが以前から報告されている。また、アポトーシスという細胞死のメカニズムが確立され、ミトコンドリアが内因性経路として反応の要であることが明らかになった。Propofolは、ミトコンドリア膜の透過性を亢進させ、ミトコンドリア内のシトクロムcを細胞質内へ漏出させることで、内因性経路を活性化しアポトーシスを誘導するとの報告⁴²⁾がなされている。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。Propofolは現在臨床において頻用されている静脈麻酔薬であるだけに、PRISのような副作用を引き起こすメカニズムに関しては早急な解明が必要であり、今後の大きな研究課題である。

結 論

ラット脳にはすでに知られている活性発現にMgを必要とするP-ATPase、V-ATPase、F-ATPaseが存在するが、それらとは性質の異なるBasal Mg-ATPaseが存在する。静脈麻酔薬はこれらのMgで活性化されるATPaseに対して基本的に抑制するが、propofolはF-ATPase活性を特異的に促進した。これらATPase活性に対する静脈麻酔薬の作用と麻酔作用や副作用との関連性にはさらなる検討が必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々のご援助、ご協力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の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Weber J, Senior AE : Catalytic mechanism of F1-ATPase. *Biochim Biophys Acta*, 1319 : 19-58, 1997.
- 2) Cross RL, Duncan TM : Subunit rotation in F0F1-ATP synthases as a means of coupling proton transport through F0 to the binding changes in F1. *J Bioenerg Biomembr*, 28 : 403-408, 1996.
- 3) Pedersen PL : Frontiers in ATP synthase research : understanding the relationship between subunit movements and ATP synthesis. *J Bioenerg Biomembr*, 28 : 389-395, 1996.
- 4) Lutter R, Saraste M, van Walraven HS, Runswick MJ, Finel M, Deatherage JF, Walker JE : F1F0-ATP synthase from bovine heart mitochondria: development of the purification of a monodisperse oligomycin-sensitive ATPase. *Biochem J*, 295 : 799-

- 806, 1993.
- 5) Stevens TH, Forgacs M : Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 13 : 779-808, 1997.
- 6) Kane PM, Stevens TH : Subunit composition, biosynthesis, and assembly of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J Bioenerg Biomembr*, 24 : 383-393, 1992.
- 7) Sze H, Ward JM, Lai S : Vacuolar H⁽⁺⁾-translocating ATPases from plants : structure, function, and isoforms. *J Bioenerg Biomembr*, 24 : 371-381, 1992.
- 8) Gluck SL : The structure and biochemistry of the vacuolar H⁺ ATPase in proximal and distal urinary acidification. *J Bioenerg Biomembr*, 24 : 351-359, 1992.
- 9) Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E : The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells : structure, function and regulation. *Arch Biochem Biophys*, 476 : 65-74, 2008.
- 10) Smagina M, Dolgova N, Rubtsov A, Lopina O : Mg-ATPase from microsomal fraction of rabbit gastric mucosa is ecto-ATP-diphosphohydrolase. *Ann N Y Acad Sci*, 986 : 658-659, 2003.
- 11) Auland ME, Morris MB, Roufogalis BD : Separation and characterization of two Mg⁽²⁺⁾-ATPase activities from the human erythrocyte membrane. *Arch Biochem Biophys*, 312 : 272-277, 1994.
- 12) Michaelis EK, Michaelis ML, Chang HH, Kito TE : High affinity Ca²⁺-stimulated Mg²⁺-dependent ATPase in rat brain synaptosomes, synaptic membranes, and microsomes. *J Biol Chem*, 258 : 6101-6108, 1983.
- 13) Gorini A, Canosi U, Devecchi E, Geroldi D, Villa RF : ATPases enzyme activities during ageing in different types of somatic and synaptic plasma membranes from rat frontal cerebral cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 26 : 81-90, 2002.
- 14) McConnell EJ, Wagoner MJ, Keenan CE, Raess BU : Inhibition of calmodulin-stimulated (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity by dimethyl sulfoxide. *Biochem Pharmacol*, 57 : 39-44, 1999.
- 15) Franks NP, Lieb WR : Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature*, 367 : 607-614, 1994.
- 16) Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, Mascia MP, Valenzuela CF, Hanson KK, Greenblatt EP, Harris RA, Harrison NL : Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A)

- and glycine receptors. *Nature*, 389 : 385-389, 1997.
- 17) Lopez MM, Kosk-Kosicka D : Entropy-driven interactions of anesthetics with membrane proteins. *Biochemistry*, 36 : 8864-8872, 1997.
 - 18) Lopez MM, Kosk-Kosicka D : How do volatile anesthetics inhibit Ca(2+)-ATPases? *J Biol Chem*, 270 : 28239-28245, 1995.
 - 19) Kosk-Kosicka D, Fomitcheva I, Lopez MM, Eckenhoff RG : Heterogeneous halothane binding in the SR Ca2+-ATPase. *FEBS Lett*, 402 : 189-192, 1997.
 - 20) Kutchai H, Geddis LM, Jones LR, Thomas DD : Differential effects of general anesthetics on the quaternary structure of the Ca-ATPases of cardiac and skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry*, 37 : 2410-2421, 1998.
 - 21) 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.
 - 22) Kutchai H, Geddis LM, Farley RA : Effects of general anaesthetics on the activity of the Na,K-ATPase of canine renal medulla. *Pharmacol Res*, 40 : 469-473, 1999.
 - 23) Sweet WD, Schroeder F : Charged anaesthetics alter LM-fibroblast plasma-membrane enzymes by selective fluidization of inner or outer membrane leaflets. *Biochem J*, 239 : 301-310, 1986.
 - 24) Mazzanti L, Rabini RA, Staffolani R, Benedetti G, Cester N, Lenaz G : Modifications induced by general anesthetics on Na⁺/K⁺ ATPase obtained from human placenta. *Biochem Biophys Res Commun*, 173 : 1248-1251, 1990.
 - 25) 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.
 - 26) 川田 達 : 全身麻酔薬および関連薬がウサギ脳Na⁺, K⁺-ATPaseに及ぼす影響に関する研究. *北海道歯誌*, 20 : 39-50, 1999.
 - 27) Hase Y, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Fukushima K : Mechanism for propofol inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat brain. *北海道歯誌*, 32 : 147-155, 2012.
 - 28) 田仲宏光, 出山義昭, 吉村善隆, 鈴木邦明, 福島和昭 : ラット脳カルシウムATPase活性の静脈麻酔薬による抑制. *北海道歯誌*, 32(2) : 222-229, 2012.
 - 29) 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ナラベル剤のESRスペクトルと全身麻酔薬の影響. *北海道歯誌*, 25 : 68-76, 2004.
 - 30) 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.
 - 31) 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.
 - 32) Wolvetang EJ, Wanders RJ, Schutgens RB, Berden JA, Tager JM : Properties of the ATPase activity associated with peroxisome-enriched fractions from rat liver : comparison with mitochondrial F1F0-ATPase. *Biochim Biophys Acta*, 1035 : 6-11, 1990.
 - 33) Uchida E, Ohsumi Y, Anraku Y : Purification and properties of H⁺-translocating, Mg²⁺-adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 260 : 1090-1095, 1985.
 - 34) Bowman EJ, Siebers A, Altendorf K : Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85 : 7972-7976, 1988.
 - 35) Kakinuma Y, Ohsumi Y, Anraku Y : Properties of H⁺-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 256 : 10859-10863, 1981.
 - 36) Rigoulet M, Devin A, Averet N, Vandais B, Guerin B : Mechanisms of inhibition and uncoupling of respiration in isolated rat liver mitochondria by the general anesthetic 2,6-diisopropylphenol. *Eur J Biochem*, 241 : 280-285, 1996.
 - 37) Morgan DJ, Campbell GA, Crankshaw DP : Pharmacokinetics of propofol when given by intravenous infusion. *Br J Clin Pharmacol*, 30 : 144-148, 1990.
 - 38) 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.
 - 39) 佐藤美菜子, 岡崎 薫 : Propofol Infusion Syndrome (PRIS). *臨床麻酔*, 30 : 669-680, 2006.
 - 40) 岡崎 薫 : Propofol Infusion Syndrome. *臨床麻酔*, 33 : 329-348, 2009.

- 41) 土屋正彦：静脈麻酔薬，特にプロポフォールの抗酸化保護作用とアポトーシス作用. *Anesth 21 Cent*, 14 : 11-21, 2012.
- 42) Hsing CH, Chen YH, Chen CL, Huang WC, Lin MC, Tseng PC, Wang CY, Tsai CC, Choi PC, Lin CF : Anesthetic propofol causes glycogen synthase kinase-3-beta-regulated lysosomal/mitochondrial apoptosis in macrophages. *Anesthesiology*, 116 : 868-881, 2012.
- 43) Branca D, Roberti MS, Lorenzin P, Vincenti E, Scutari G : Influence of the anesthetic 2,6-diisopropylphenol on the oxidative phosphorylation of isolated rat liver mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 42 : 87-90, 1991.
- 44) Schenkman KA, Yan S : Propofol impairment of mitochondrial respiration in isolated perfused guinea pig hearts determined by reflectance spectroscopy. *Crit Care Med*, 28 : 172-177, 2000.

ORIGINAL

Effects of intravenous anesthetics on the activities of various ATPases in rat brain

Takeshi Miyamoto¹⁾, Yoshiaki Deyama²⁾, Yoshitaka Yoshimura²⁾, Kuniaki Suzuki²⁾
and Toshiaki Fujisawa¹⁾

ABSTRACT : This study examined whether the activity of magnesium-dependent ATPase (Mg^{2+} -ATPase) in rat brains is a target for intravenous anesthetics. The effects of propofol, pentobarbital, and thiopental on magnesium-dependent ATPase in the plasma membrane fraction (PII) and microsomal fraction (PIII) isolated from rat brains homogenates by the method of Pottorf were examined.

The optimal pH values for Mg^{2+} -ATPase activities in PII and PIII were 9.4 and 7.4, respectively. The Mg^{2+} -ATPase activity of PII was inhibited by about 80% by NaN_3 (sodium azide), an inhibitor of F-type ATPase. The Mg^{2+} -ATPase activity of PIII was inhibited by about 30% by the V-type ATPase inhibitor bafilomycin, and by about 10% by the P-type ATPase inhibitor vanadate. Western blotting analysis revealed that the largest amount of F-type ATPase was detected in PII, and the largest amount of V-type ATPase was detected in PIII. We defined all ATPase activity that was insensitive to the above inhibitors as basal Mg^{2+} -ATPase activity.

In the presence of these inhibitors, we examined the effects of intravenous anesthetics on the activities of various ATPases. Propofol inhibits V-type ATPase activity, PII basal Mg^{2+} -ATPase activity, and PIII basal Mg^{2+} -ATPase activity in a dose-dependent manner; however, F-type ATPase activity was uniquely stimulated about 80% by propofol at concentrations below 0.6 mM. Pentobarbital inhibited all types of ATPases in a dose-dependent manner. Thiopental inhibited all types of ATPases to varying degrees.

These results suggest that intravenous anesthetics basically inhibit Mg^{2+} -dependent ATPase activities in rat brains, but propofol shows specific effects on mitochondrial ATPase activity.

Key Words : intravenous anesthetics, F-type ATPase, V-type ATPase, basal Mg^{2+} -ATPase

¹⁾Dental Anesthesiology, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Toshiaki Fujisawa), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

²⁾Molecular Cell Pharmacology, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Kuniaki Suzuki), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan