



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Na, K-ATPase活性の基質阻害に対するバルビツール酸系薬物の作用
Author(s)	古賀, 瑞之; 鈴木, 邦明; 長谷, 由里 他
Citation	北海道歯学雑誌, 38(2), 203-210
Issue Date	2018-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68806
Type	journal article
File Information	38_02_10_Koga.pdf



原 著

Na, K-ATPase活性の基質阻害に対するバルビツール酸系薬物の作用

古賀 瑞之¹⁾ 鈴木 邦明²⁾ 長谷 由里¹⁾ 渋谷真希子¹⁾
 木村 幸文¹⁾ 藤澤 俊明¹⁾

抄 録：バルビツール酸系薬物の作用機序は、GABA_A受容体への作用を除き、不明な点が多い。Na, K-ATPaseは神経細胞の興奮性の維持を担う酵素であり、バルビツール酸系薬物の作用に関連する可能性があると推測される。しかし、バルビツール酸系薬物のNa, K-ATPase活性に対する報告は少ないので、ラット及びウサギ脳ミクロソームのNa, K-ATPaseを使用し、本研究を行った。バルビツール酸系薬物として、pentobarbital, phenobarbital及びthiamylalを使用した。Na, K-ATPase活性のATP濃度依存性を測定すると、2.5 mMで最大活性を示し、5 mM ATPでは基質阻害により活性は低下した。5 mM ATP存在下では、pentobarbitalとphenobarbitalはNa, K-ATPase活性を濃度依存的に促進したが、2.5 mM ATP存在下ではその作用は認められなかった。すなわち、pentobarbitalとphenobarbitalには基質阻害を抑える作用が認められた。Thiamylalは5 mM あるいは2.5 mM ATP存在下のいずれの場合もNa, K-ATPase活性を抑制した。5 mM ATP存在下では、pentobarbitalとphenobarbitalはNa, K-ATPaseのNa⁺に対する親和性を増加させ、K⁺に対する親和性を減少させた。これらの結果は、基質阻害下では、pentobarbitalとphenobarbitalはNa, K-ATPaseの構造をE1型に変化し、ATPに対する親和性を増加させることにより活性を促進することを示唆した。

キーワード：バルビツール酸系薬物, Na, K-ATPase活性, 基質阻害

緒 言

バルビツール酸系薬物は中枢神経系に鎮静、催眠、抗痙攣作用などの臨床効果を示す薬物である¹⁾。主な作用機序は、GABA_A受容体のピクログリシン結合部位への結合によって生じるCl⁻チャネルの開閉時間延長であり、Cl⁻流入の増強により形成される過分極である。しかし、イオンチャネル型グルタミン酸受容体であるAMPA受容体の阻害や、麻酔用量でのNa⁺チャネルの阻害も報告されている¹⁻³⁾。また、これら以外の生体膜に存在する各種受容体、イオンチャネル、酵素への影響についても報告があるが、GABA_A受容体に対する作用を除き、作用機構は明らかになっていない^{2, 3)}。

Na, K-ATPaseは、ほぼすべての動物細胞の形質膜に存在し、神経系においては細胞の興奮性の維持に関与する酵素である。常時機能する酵素であるため、生体のエネルギー消費に占めるNa, K-ATPaseによる消費の割合は高く、安静時の全細胞の消費エネルギーの3割、神経系においては7割をNa, K-ATPaseが消費すると計算されている⁴⁻⁸⁾。Na, K-ATPaseの反応はPost-Albersの反応機構で説明さ

れ、ATPの加水分解の過程でATPのγ位のリン酸を酵素に結合したリン酸化反応中間体(EP)を形成することが特徴である^{5, 6, 8, 9)}。Na, K-ATPaseは、ATPの加水分解に伴うNa⁺とK⁺の輸送の過程で、その分子構造とNa⁺とK⁺に対する親和性を変化させる。Na, K-ATPaseのNa⁺あるいはATPと親和性の高い状態をE1、K⁺あるいは無機リンと親和性の高い状態はE2と標記される。

Na, K-ATPaseは、神経細胞の興奮性の維持に関与する酵素であり、バルビツール酸系薬物の神経系に対する作用に関連する可能性があると推測されるが、Na, K-ATPase活性に対するバルビツール酸系薬物の作用の研究は少ない。そこで、ラット脳Na, K-ATPase活性に対するバルビツール酸系薬物の作用を検討したところ、pentobarbitalとphenobarbitalは濃度依存性にNa, K-ATPase活性を促進した。川田らは¹⁰⁾バルビツール酸系薬物がNa, K-ATPase活性を阻害すると報告しているため、結果の相違の理由を検討したところ、Na, K-ATPase活性がATPによる基質阻害を受けている場合に、バルビツール酸系薬物が活性を促進する可能性が考えられた。

酵素の反応速度と基質濃度の関係は、酵素反応の解析に

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 特任教授)

においては必須の実験項目である。ほとんどの場合は基質の濃度を変化させながら酵素活性を測定すると、基質の濃度に依存して活性は増大したのちに最大活性を示す飽和曲線となる。しかし、酵素の種類によって、ある基質濃度で最大活性を示したのち、それ以上基質の濃度を上昇させると活性が低下する現象が観察され、基質阻害と呼ばれている。基質阻害にはさまざまな原因が推測されているが、それ自体が研究対象とされることは少ない。著者のNa, K-ATPase活性の測定においても、頻繁に基質阻害が観察されていたが、細胞内のATP濃度は一般に数mMとされていることから、細胞内のATP濃度でNa, K-ATPase活性が基質阻害を受けることも可能であると推測される。

本研究の目的は、Na, K-ATPase活性のATPによる基質阻害に対するバルビツール酸系薬物の作用とその機序を明らかにすることである。

材 料 と 方 法

1. 材料

ラット及びウサギ脳ホモジェネートから、2段階の遠心分離操作によってマイクロソームを調整して、含まれるNa, K-ATPaseの活性を測定した¹⁰⁾。

2. 方法

Na, K-ATPase活性測定はATPの加水分解反応によって生じた無機リンをChifflet法¹¹⁾を用いて定量し、その値から測定条件に応じたブランクの値を差し引いてATPase活性を計算した。タンパク質量をLowry法¹²⁾に従って定量し、ATPase活性は比活性 ($\mu\text{mol Pi/mg protein/h}$) で示した。

1) ATP濃度依存性に対する作用

0.75 μl のラット脳マイクロソーム、最終濃度25 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, 50 mM tris-HCl (pH 7.4), 160 mM NaCl, 16 mM KCl, 5 mM MgCl_2 を含む反応液に、各種濃度のATPを加えて反応を開始し、37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベーションした。インキュベーションの時間は、ATPの分解量の増加によって基質濃度が低下しすぎることを防ぐために、最終濃度が5, 25, 125 mMの場合は60分、0.63, 0.31, 0.16 mMでは40分、0.078, 0.039, 0.02 mMでは20分とし、その後、12% SDSを添加して反応を停止した。Na, K-ATPaseの特異的阻害薬である5 mM ouabain存在下で測定されるPiの量から、各濃度ATP存在下でのブランクを計算した。最終濃度2.5 mMのpentobarbitalあるいは3 mM phenobarbitalを添加して同様の実験を行い、Na, K-ATPase活性のATP濃度依存性に対する作用を検討した。また、4 μl のウサギ脳マイクロソームを用いて同様の実験を行った。

2) Na, K-ATPase活性に対するバルビツール酸系薬物の濃度依存性

上記1)のATP濃度依存性に対する作用の実験に記載したと同様の反応液に、最終濃度0, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5 mMのpentobarbital, 0, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 mMのphenobarbitalあるいは0, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mMのthiamylalを添加した反応液を用いて、ATPase活性の測定を行い、Na, K-ATPase活性に対するpentobarbital, phenobarbitalあるいはthiamylalの作用を検討した。ATPの最終濃度は2.5あるいは5 mMで行い、また、3 μl のウサギ脳マイクロソームを用いた実験も行った。

3) Na, K-ATPase活性の Na^+ 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用

上記1)及び2)の実験に記載したと同様の反応液において、160 mM NaClの代わりに最終NaCl濃度を0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mMと変化させてNa, K-ATPase活性を測定し、活性の Na^+ 濃度依存性を検討した。 Na^+ を加えない測定値をブランクとした。同様の実験を、2.5 mM pentobarbitalあるいは3 mMのphenobarbital存在下でも行い、 Na^+ 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用を検討した。また、4 μl のウサギ脳マイクロソームを用いた実験も行った。

4) Na, K-ATPase活性の K^+ 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用

上記1)及び2)の実験に記載したと同様の反応液において、16 mM KClの代わりに最終KCl濃度を0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 mMと変化させてNa, K-ATPase活性を測定し、活性の K^+ 濃度依存性を検討した。 K^+ を加えない測定値をブランクとした。同様の実験を、2.5 mM pentobarbitalあるいは3 mMのphenobarbital存在下でも行い、 K^+ 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用を検討した。また、4 μl のウサギ脳マイクロソームを用いた実験も行った。

5) Na, K-ATPase活性の Mg^{2+} 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用

上記1)及び2)の実験に記載したと同様の反応液において、5 mM MgCl_2 の代わりに遊離 Mg^{2+} 濃度が0, 0.53, 1.16, 2.83, 10.08 μM となる MgCl_2 を添加してNa, K-ATPase活性を測定し、活性の Mg^{2+} 濃度依存性を検討した。 Mg^{2+} を加えない測定値をブランクとした。同様の実験を、2.5 mM pentobarbitalあるいは3 mMのphenobarbital存在下でも行い、 Mg^{2+} 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用を検討した。また、4 μl のウサギ脳マイクロソームを用いた実験も行った。

3. 試薬

Pentobarbitalナトリウム塩 とthiamylalはSigma-Aldrich社 (St. Louis, MO), phenobarbitalナトリウム塩は和光純薬社 (大阪) から購入した. その他の試薬はすべて特級を使用した.

4. データ処理

Na, K-ATPase活性は1つの測定条件に対し3点または6点測定した平均値と標準偏差で示した. また, 統計的検定はStudent's t-testにより行い, コントロールに対して有意水準 $p < 0.05$ を*, $p < 0.01$ を**で示した.

結 果

1. Na, K-ATPase活性のATP濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用

バルビツール酸系薬物非存在下のラット脳Na, K-ATPase活性は, ATP濃度に依存して2.5 mMまでは増加したが, 5 mMで活性は減少して基質阻害を示した (図1, ○). 2.5 mMのpentobarbital存在下 (△) あるいは3 mM phenobarbital存在下 (□) でも, 2.5 mM ATPまで活性は増加したが, 5 mM ATPでの活性の低下は, バルビツール酸系薬物非存在下より有意に小さかった. ウサギ脳Na, K-ATPase活性もラット脳Na, K-ATPase活性と同様の傾向を示した (結果は示さない).

2. Na, K-ATPase活性に対するバルビツール酸系薬物の作用

ラット脳Na, K-ATPase活性は, 5 mM ATP存在下では2.5 mM ATPよりも活性が低下し, バルビツール酸系薬物が活性の低下を抑制した. 一方, 2.5 mM ATPではバルビツール酸系薬物の効果は見られなかった (図1). そこで, 5 mM ATPあるいは2.5 mM ATP存在下で, Na, K-ATPase活性のバルビツール酸系薬物濃度依存性を測定した (図2). 5 mM ATP存在下のラット脳Na, K-ATPaseは2.5 mM ATP存在下よりも低い比活性を示した (図2-A, B, C). 5 mM ATP存在下のラット脳Na, K-ATPase活性はpentobarbital (図2-A, ▲) あるいはphenobarbital (図2-B, ■) の濃度に依存して増加したが, 2.5 mM ATP存在下では, 活性増加の作用は見られなかった (図2-A, 2-B, △). また, thiamylalは2.5あるいは5 mM ATPとも, Na, K-ATPase活性を濃度依存性に減少させた (図2-C). ウサギ脳Na, K-ATPase活性もラット脳Na, K-ATPase 活性と同様の傾向を示した (結果は示さない).

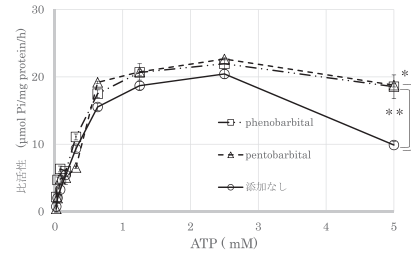


図1 ラット脳Na, K-ATPase活性のATP濃度依存性に対するpentobarbitalとphenobarbitalの作用

0.75 μ lのラット脳マイクロソーム, 最終濃度25 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, 50 mM tris-HCl (pH 7.4), 160 mM NaCl, 16 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ を含む反応液に, 各種濃度のATPを加えて, 材料と方法に記載した方法で, Na, K-ATPase活性のATP濃度依存性を測定した (○). 最終濃度2.5 mMのpentobarbital (△) あるいは3 mM phenobarbital (□) を添加して同様の実験を行い, Na, K-ATPase活性のATP濃度依存性に対する作用を検討した.

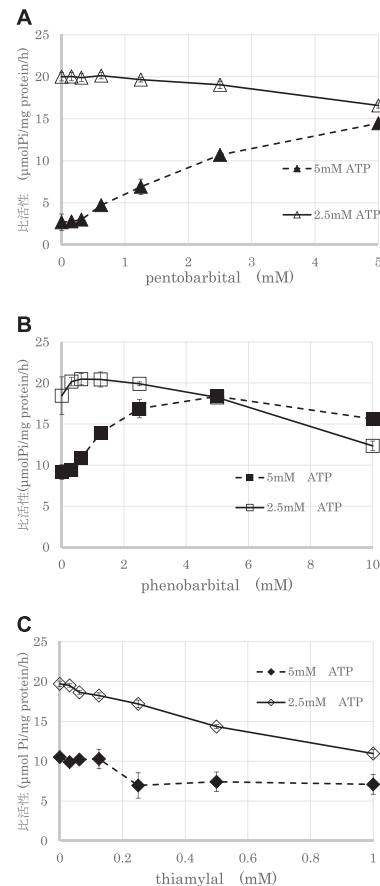


図2 ラット脳Na, K-ATPase活性のバルビツール酸系薬物濃度依存性に対するATP濃度の影響

図1のATP濃度依存性に対する作用の実験に記載したと同様の反応液に, 最終濃度0, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5 mMのpentobarbital (A), 0, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 mMのphenobarbital (B)あるいは0, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mMのthiamylal (C)を添加した反応液を用いて, ATPase活性の測定を行い, Na, K-ATPase活性に対するpentobarbital, phenobarbitalあるいはthiamylalの作用を検討した. ATPの最終濃度は25 (A:△, B:□, C:◇) あるいは5 mM (A:▲, B:■, C:◆) で行った.

3. Na, K-ATPase活性の Na^+ , K^+ および Mg^{2+} 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用

バルビツール酸系薬物がNa, K-ATPase活性の5 mM ATP存在下の基質阻害を軽減する理由を検討することを目的に, Na, K-ATPase活性の Na^+ , K^+ および Mg^{2+} 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用を検討した。

1) Na^+ 濃度依存性

5 mM ATP存在下のラット脳Na, K-ATPase活性は Na^+ 濃度に依存して増加し, 50%活性化濃度 ($K_{0.5}$) は13.1 mMであった (図3-A, ○, 表1)。Pentobarbital (図3-A, △) あるいはphenobarbital (図3-A, □) 存在下でも活性は Na^+ 濃度に依存して増加した。最大活性は非存在下 (図3-A, ○) と比較して増加し, $K_{0.5}$ も6.6及び5.7

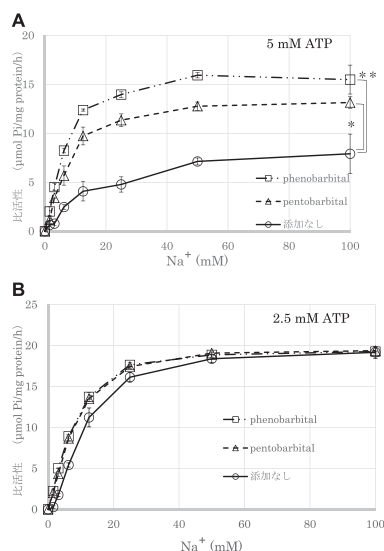


図3 Na, K-ATPase活性の Na^+ 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用

図1と2の実験に記載したと同様の反応液において, 最終 Na^+ 濃度を0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mMと変化させてNa, K-ATPase活性を測定し, 活性の Na^+ 濃度依存性を検討した (○)。同様の実験を, 2.5 mM pentobarbital (△) あるいは3 mMのphenobarbital (□) 存在下でも行い, Na^+ 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用を検討した。ATP濃度は5 mM (A) あるいは2.5 mM (B) で行った。

表1 5 mM ATP存在下, ラット脳Na, K-ATPase活性の Na^+ , K^+ , Mg^{2+} に対する50%活性化濃度とpentobarbital及びphenobarbitalの作用

	Na^+ (mM)	K^+ (mM)	Mg^{2+} (μM)
添加なし	13.1	3.6	2.5
pentobarbital	6.6	4.8	3.6
phenobarbital	5.7	4.0	2.9

図3-A, 4-A及び5-Aの結果からHill plotにより計算して求めた Na^+ , K^+ , Mg^{2+} に対する50%活性濃度 ($K_{0.5}$) を表にまとめた。Pentobarbitalとphenobarbitalは, Na^+ に対する $K_{0.5}$ を低下させ, K^+ に対する $K_{0.5}$ を増加させた。

mMであった (表1)。2.5 mM ATP存在下 (図3-B) でも, Na, K-ATPase活性は Na^+ 濃度に依存して増加したが, pentobarbitalあるいはphenobarbitalの存在による最大活性の増加は見られなかった。一方, K 0.5はpentobarbitalあるいはphenobarbital非存在下の10.4 mMから7.1及び6.7 mMと減少した (表2)。

2) K^+ 濃度依存性

5 mM ATP存在下のラット脳Na, K-ATPase活性は K^+ 濃度に依存して増加し, $K_{0.5}$ は3.6 mMであった (図4-A, ○, 表1)。Pentobarbital (図4-A, △) あるいはphenobarbital (図4-A, □) 存在下でも活性は K^+ 濃度に依存して増加した。最大活性は非存在下 (図4-A, ○) と比較して増加したが, $K_{0.5}$ も4.8及び4.0 mM

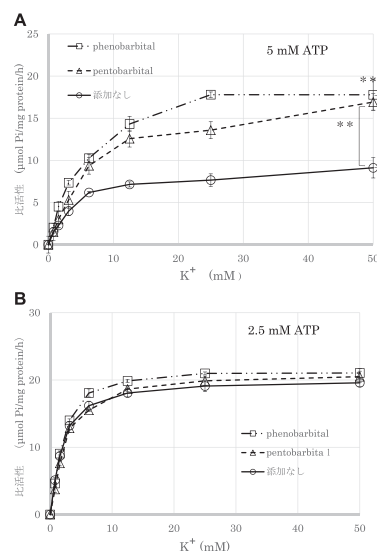


図4 Na, K-ATPase活性の K^+ 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用

図1と2の実験に記載したと同様の反応液において, 最終 K^+ 濃度を0, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50 mMと変化させてNa, K-ATPase活性を測定し, 活性の K^+ 濃度依存性を検討した (○)。同様の実験を, 2.5 mM pentobarbital (△) あるいは3 mMのphenobarbital (□) 存在下でも行い, K^+ 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用を検討した。ATP濃度は5 mM (A) あるいは2.5 mM (B) で行った。

表2 2.5 mM ATP存在下, ラット脳Na, K-ATPase活性の Na^+ , K^+ , Mg^{2+} に対する50%活性化濃度とpentobarbital及びphenobarbitalの作用

	Na^+ (mM)	K^+ (mM)	Mg^{2+} (μM)
添加なし	10.4	1.8	2.2
pentobarbital	7.1	2.3	2.2
phenobarbital	6.7	1.9	2.7

図3-B, 4-B及び5-Bの結果からHill plotにより計算して求めた Na^+ , K^+ , Mg^{2+} に対する $K_{0.5}$ を表にまとめた。Pentobarbitalとphenobarbitalは, Na^+ に対する $K_{0.5}$ を低下させ, K^+ に対する $K_{0.5}$ を増加させた。

と増加した (表 1). 2.5 mM ATP 存在下 (図 4-B) でも, Na, K-ATPase 活性は K^+ 濃度に依存して増加したが, pentobarbital あるいは phenobarbital の存在による最大活性の増加は見られなかった. 一方, $K_{0.5}$ は pentobarbital あるいは phenobarbital 非存在下の 1.8 mM から 2.3 及び 1.9 mM と増加した (表 2).

3) Mg^{2+} 濃度依存性

5 mM ATP 存在下のラット脳 Na, K-ATPase 活性は Mg^{2+} 濃度に依存して増加し, $K_{0.5}$ は 2.5 μ M であった (図 5-A, ○, 表 1). Pentobarbital (図 5-A, △) あるいは phenobarbital (図 5-A, □) 存在下でも活性は Mg^{2+} 濃度に依存して増加した. 最大活性は非存在下 (図 5-A, ○) と比較して, pentobarbital (図 5-A, △) 存在下では有意な差は認められなかったが, phenobarbital 存在下 (図 5-A, □) では増加した. $K_{0.5}$ は 3.6 及び 2.9 μ M となり, 非存在下と比較してわずかに増加した (表 1). 2.5 mM ATP 存在下 (図 5-B) でも, Na, K-ATPase 活性は Mg^{2+} 濃度に依存して増加したが, pentobarbital あるいは phenobarbital の存在による最大活性の増加は見られなかった. 一方, $K_{0.5}$ は pentobarbital あるいは phenobarbital 非存在下の 2.2 μ M に対して 2.2 及び 2.7 μ M であった (表 2).

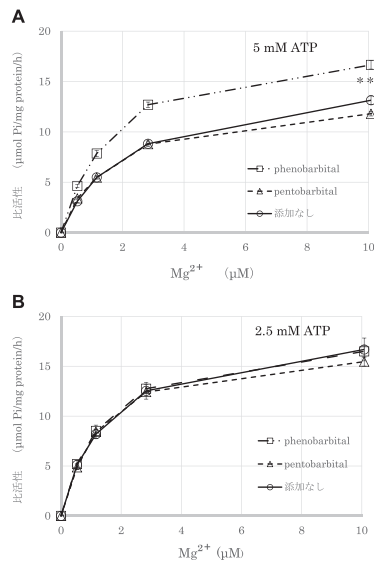


図 5 Na, K-ATPase 活性の Mg^{2+} 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用

図 1 と 2 の実験に記載したと同様の反応液において, 最終 Mg^{2+} 濃度を 0, 0.53, 1.16, 2.83, 10.08 μ M と変化させて Na, K-ATPase 活性を測定し, 活性の Mg^{2+} 濃度依存性を検討した (○). 同様の実験を, 2.5 mM pentobarbital (△) あるいは 3 mM の phenobarbital 存在下 (□) でも行い, Mg^{2+} 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用を検討した. ATP 濃度は 5 mM (A) あるいは 2.5 mM (B) で行った.

4) ウサギ脳 Na, K-ATPase 活性の Na^+ , K^+ および Mg^{2+} 濃度依存性に対するバルビツール酸系薬物の作用

ラット脳 Na, K-ATPase 活性の図 3-5 の B と同様の実験を, ウサギ脳マイクロソームを使用して行った. 表 3 に 2.5 mM ATP 存在下 Na, K-ATPase の Na^+ , K^+ および Mg^{2+} 濃度依存性の測定から求めた $K_{0.5}$ の値を示した. ラット脳 Na, K-ATPase 活性と同様に, pentobarbital あるいは phenobarbital では, Na^+ に対する $K_{0.5}$ の値は減少し, K^+ 及び Mg^{2+} に対する $K_{0.5}$ の値は増加傾向を示した.

表 3 2.5 mM ATP 存在下, ウサギ脳 Na, K-ATPase 活性の Na^+ , K^+ , Mg^{2+} に対する 50 % 活性化濃度と pentobarbital 及び phenobarbital の作用

	Na^+ (mM)	K^+ (mM)	Mg^{2+} (μ M)
添加なし	7.0	4.0	2.8
pentobarbital	5.3	5.6	3.3
phenobarbital	5.7	4.0	3.3

図 3-B, 4-B 及び 5-B と同様の実験をウサギ脳 Na, K-ATPase を使用して行い, 得られた結果から Hill plot により計算して求めた Na^+ , K^+ , Mg^{2+} に対する $K_{0.5}$ を表にまとめた. Pentobarbital と phenobarbital は, Na^+ に対する $K_{0.5}$ を低下させ, pentobarbital では K^+ に対する $K_{0.5}$ を増加させた.

考 察

全身麻酔薬が Na, K-ATPase 活性を阻害するという報告は多数ある^{10, 13-20)}. 川田らは, 全身麻酔薬及びその関連薬のウサギ脳 Na, K-ATPase 活性に対する作用を広範に検討し, それらが濃度依存的に Na, K-ATPase 活性を抑制すると報告した¹⁰⁾. バルビツール酸系薬物では pentobarbital と thiopental について検討し, いずれも Na, K-ATPase 活性を濃度依存的に抑制したと報告している¹⁰⁾. また, 長谷らは静脈麻酔薬 propofol のラット脳 Na, K-ATPase 活性の阻害機構を解析し, propofol は Na, K-ATPase 活性を濃度依存的に 1.03 mM で完全に抑制したと報告している²⁰⁾. このように, 全身麻酔に関連する薬物は Na, K-ATPase 活性を濃度依存的に抑制すると考えられてきた. 本研究においても, 2.5 mM ATP 存在下では pentobarbital, phenobarbital および thiamylal いずれも濃度依存的に Na, K-ATPase 活性を抑制した (図 2). 一方, 5 mM ATP 存在下では, thiamylal は Na, K-ATPase 活性を濃度依存的に抑制したが (図 2-C), pentobarbital と phenobarbital はラット脳 Na, K-ATPase 活性を濃度依存的に促進し (図 2-A, B). ウサギ脳 Na, K-ATPase も同様な結果を示した. 川田らの報告をはじめ, バルビツール酸系薬物を含む全身麻酔に関連する薬物が Na, K-ATPase 活性を促進するという報告はみられないことから, さらに検討を行った.

酵素活性の基質濃度依存性を測定すると, 一般的には基質濃度に依存して活性が増加し最大活性を示す濃度に対

する飽和曲線となる。しかし、ある基質濃度で最大活性を示したのち、それ以上基質の濃度を上昇させると活性が低下する現象が観察されることもあり、基質阻害と呼ばれている²¹⁾。基質阻害には、基質によって引き起こされるサブユニット間での相互作用、基質結合部位が1箇所ではないと推測される場合、アロステリックな阻害など、さまざまな原因が推測されているが、それ自体が研究対象とされて報告されることは少ない。著者らのNa, K-ATPase活性の測定においても、しばしば基質阻害が観察されていたが、文献的な考察を行ってもその理由は不明のままであった。本研究では5 mM ATP存在下で基質阻害が観察され、pentobarbitalとphenobarbital存在下では基質阻害の軽減が示された(図1)。また、5 mM ATP存在下ではpentobarbitalとphenobarbitalの濃度に依存してNa, K-ATPase活性が増加したが、25 mM ATPではむしろ活性が減少することから、pentobarbitalとphenobarbitalの濃度に依存したNa, K-ATPaseの活性化は、基質阻害がかかった状況での活性化と解釈される(図2-A, B)。また、この現象はウサギのNa, K-ATPase活性においても観察された。しかし、thiamylalでは、基質阻害の軽減は観察されなかった(図2-C)。これらの結果は、同じバルビツール酸系薬物であっても、pentobarbitalとphenobarbitalはNa, K-ATPase活性のATPによる基質阻害を軽減できるが、thiamylalにはその作用がないことを示唆する。

バルビツール酸自体はマロン酸と尿素が縮重合したマロリル尿素であり中枢神経作用を示さないが、その誘導体であるバルビツール酸系薬物は、以下のような構造活性相関を示す¹⁻³⁾。バルビツール酸環の5位がアルキル基に置換されると鎮静催眠作用が生じ、さらにフェニル基が導入されると抗痙攣作用が生じる。Pentobarbitalは前者に、phenobarbitalは後者に属する。2位に酸素が結合しているものをオキシバルビツール酸、イオウが結合しているものをチオバルビツール酸と呼ぶが、チオバルビツール酸は脂溶性が高く容易に血液脳関門を通過するため、作用の発現が速くなる。Pentobarbitalとphenobarbitalは前者に、thiamylalは後者に属する。これらの点から、Na, K-ATPase活性のATPによる基質阻害の軽減には、オキシバルビツール酸であることが必要であると示唆される。チオバルビツール酸のほうがタンパク質結合率が高いこと³⁾などが要因となる可能性があるが、本研究では明らかにすることができなかった。

Na, K-ATPaseはATP加水分解の過程で、反応性の大きく異なる2種類の状態であるE1とE2を形成することが特徴である^{5, 6)}。E1はNa⁺やATPに対して親和性の高い分子構造であり、E2はK⁺や無機リンに対して親和性の高い分子構造である。本研究においてpentobarbitalとphenobarbitalは、Na⁺に対する親和性を増加し、K⁺に対する親和性を低下させた(表1-3)。すなわち、pentobarbitalと

phenobarbitalは、Na, K-ATPaseの分子構造と反応性をE1側にシフトする。その結果、ATPに対する親和性も増加することが、基質阻害を軽減する機序に関連すると示唆される。Na, K-ATPaseのE1型とE2型は、各種の陽イオンあるいは陰イオンによっても変換可能であることが明らかにされているので、バルビツール酸系薬物によって変換されることも可能であると推測される²²⁾。

結 語

Na, K-ATPase活性のATPによる基質阻害下において、pentobarbitalとphenobarbitalはNa, K-ATPaseの分子構造をE1型に変化させることによりその活性を促進すること、また、thiamylalにはその作用がないことが示唆された。

参 考 文 献

- 1) 兼松 隆:催眠薬および鎮静薬. 大谷啓一, 鈴木邦明, 戸荻彰文編, 現代歯科薬理学. 第5版, 150-156, 医歯薬出版, 東京, 2013.
- 2) Miller RD eds (武田純三他, 監訳): Miller's Anesthesia 6th edition (ミラー麻酔科学). 258-264, メディカル・サンエンス・インターナショナル, 東京, 2007.
- 3) 小谷順一郎: 静脈麻酔. 福島和昭, 原田 純, 嶋田昌彦, 一戸達也, 丹羽 均編, 歯科麻酔学 第7版. 284-297, 医歯薬出版, 東京, 2011.
- 4) Skou JC: The influence of some cations on the adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochem Biophys Act 23: 394-401, 1957.
- 5) Glynn IM: The Na⁺, K⁺-transporting adenosine triphosphatase. In the Enzymes of Biological Membranes, edited by Martonosi AN, Vol 3, 35-114, Plenum Press, New York and London, 1985.
- 6) Lingrel JB, Kuntzweiler TA: Na⁺, K⁺-ATPase. J Biol Chem 269: 19659-19662, 1994.
- 7) 鈴木邦明: Na, K-ATPase, 日薬理誌, 129: 219-222, 2007.
- 8) 鈴木邦明, 渋谷真希子, 長谷由里, 平沖敏文, 木村幸文, 藤澤俊明: 全身及び局所麻酔薬の作用機序. 北海道歯誌, 37: 116-123, 2017.
- 9) Taniguchi K, Post RL: Synthesis of adenosine triphosphate and exchange between inorganic phosphate and adenosine triphosphate in sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. J Biol Chem 250: 3010-3018, 1975.
- 10) 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.

- 11) 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 ATPase. *Anal Biochem* 168 : 1-4, 1988.
- 12) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951.
- 13) Israel Y, Kalant H, Laufer I : Effect of ethanol on Na, K, Mg-stimulated microsomal ATPase activity. *Biochem Pharmacol* 14 : 1803-1814, 1965.
- 14) Mietani W, Ueda I : Microsomal ATPase of rabbit brain and effects of general anesthetics. *Biochem Pharmacol* 16 : 1370-1374, 1967.
- 15) Akera T, Brody TM : Inhibition of brain sodium- and potassium-stimulated adenosine triphosphatase activity by chlorpromazine free radical. *Mol Pharmacol* 4 : 600-612, 1968.
- 16) Travor AJ, Cummins JT : Properties of sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase of rabbit brain - effect of cyclopropane and other agents modifying enzyme activity. *Biochem Pharmacol* 18 : 1157-1167, 1969.
- 17) Ueda I, Wada T, Ballinger CM : Sodium- and potassium-activated ATPase of beef brain - effects of some tranquilizers. *Biochem Pharmacol* 20 : 1697-1700, 1971.
- 18) 谷脇明宏 : ドロペリドールによるラット脳Na⁺, K⁺-ATPase活性阻害機構に関する研究. *北海道歯誌*, 21 : 256-265, 2000.
- 19) 飯田 彰 : ベンゾジアゼピン系薬剤がウサギ脳Na⁺, K⁺-ATPaseに及ぼす影響. *北海道歯誌*, 21 : 266-276, 2000.
- 20) Hase Y, Deyama Y, Yoshimura Y, Suzuki K, Fukushima K : Mechanism for propofol inhibition of Na, K-ATPase activity in rat brain. *Hokkaido J Dent Sci* 32 : 147-155, 2012.
- 21) 井上國世 : 阻害と活性化. 井上國世編, 初めての酵素化学, シーエムシー出版, 東京, 2016.
- 22) Suzuki K, Post RL : Equilibrium of phosphointermediates of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase - Action of sodium ion and Hofmeister effect. *J Gen Physiol* 109 : 537-554, 1997.

ORIGINAL

The effects of barbiturates on substrate inhibition of Na, K-ATPase activity

Mizushi Koga¹⁾, Kuniaki Suzuki²⁾, Yuri Hase¹⁾, Makiko Shibuya¹⁾, Yukifumi Kimura¹⁾
and Toshiaki Fujisawa¹⁾

ABSTRACT : Reaction mechanism of barbiturates has widely been explored but not as much for GABA_A receptors. Na, K-ATPase is the enzyme responsible for the maintenance of neuronal excitability and may be related to the reaction of barbiturates. As there are few reports about the effect of barbiturates on Na, K-ATPase activity, we studied the effects of thiamylal, pentobarbital, and phenobarbital on Na, K-ATPase activity using extracts of rat and rabbit brains. Na, K-ATPase activity increased depending on the ATP concentration and showed the maximum activity at 2.5 mM, but it decreased at 5 mM ATP by substrate inhibition. Pentobarbital and phenobarbital reduced this decrease of activity by substrate inhibition depending on their concentrations at 5 mM ATP, but not at 2.5 mM. This suggests that pentobarbital and phenobarbital suppresses the substrate inhibition of Na, K-ATPase activity by ATP. Thiamylal simply decreased Na, K-ATPase activity depending on its concentration at both 5 and 2.5 mM ATP without any suppression of substrate inhibition. Pentobarbital and phenobarbital increased the affinity of Na, K-ATPase for Na⁺ and decreased for K⁺ at 5 mM ATP. These results suggest that under the condition of substrate inhibition by ATP, pentobarbital and phenobarbital increases Na, K-ATPase activity by changing the conformational state to E1 conformation and increased in the affinity for ATP.

Key Words : barbiturates, Na, K-ATPase activity, substrate inhibition

¹⁾Dental Anesthesiology, Department of Oral Pathobiological Science, 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, Department of Oral Pathobiological Science, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Specially Appointed Prof. Kuniaki Suzuki), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan