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［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	古賀, 瑞之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13056号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70756
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mizushi_Koga_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　古賀　瑞之

学　位　論　文　題　名

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

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． 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．また、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．

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．主な作用機序は，$GABA_A$ 受容体のピクロトキシン結合部位への結合によって生じる Cl^-チャネルの開口時間延長であり，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．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．

Na,K-ATPase は，前述のとおり、神経細胞の興奮性維持に関与するため，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． 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に関しては、川田らの、活性阻害の報告があるが、いまだ十分明らかにされていない．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 活性を促進するという相反する結果を得た．こ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．Na,K-ATPase を含め、多くの酵素の反応速度と基質濃度の関係は，酵素反応の解析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．

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．

研究材料であるラット脳の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．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 法に従って定量し，ATPase 活性は比活性（μmol Pi/mg protein/h）で示した．主な検討項目は，1)ATP 濃度依存性に対する作用，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，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，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とした．データ処理については，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 $p<0.05$ を有意差ありとした．

その結果、Na,K-ATPase 活性の ATP 濃度依存性を測定すると，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．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．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ず、むしろ活性が抑制された．すなわち，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． 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．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．バルビツール酸系薬物は，以下のような構造活性相関を示す．すなわち、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．

pentbarbital と phenobarbital の基質阻害抑制効果の機序解明を試みたところ、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．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り、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．したがって、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と考えられた．

以上、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．