



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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13056号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13056
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70757
Type	doctoral thesis
File Information	Mizushi_Koga.pdf



博士論文

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

平成 30 年 3 月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

古賀 瑞之

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もあると推測される。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も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ので、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。著者らの 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 MgCl₂ を含む反応液に, 各種濃度の ATP を加えて反応を開始し, 37°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, 2.5, 1.25 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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

Phenobarbital 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(Fig. 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(Fig.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(Fig.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(Fig.2-a, b, c). 5 mM ATP 存在下のラット脳 Na,K-ATPase 活性は pentobarbital (Fig.2-a, ▲)あるいは phenobarbital (Fig.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(Fig.2-a, 2-b, △). また, thiamylal は 2.5 あるいは 5 mM ATP と, Na,K-ATPase 活性を濃度依存性に減少させた

(Fig.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).

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 (Fig. 3-a, ○, Table 1). Pentobarbital (Fig. 3-a, △) あるいは phenobarbital (Fig. 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 (Fig. 3-a, ○) と比較して増加し, $K_{0.5}$ も 6.6 及び 5.7 mM であった (Table 1). 2.5 mM ATP 存在下 (Fig. 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 (Table 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 (Fig. 4-a, ○, Table 1). Pentobarbital (Fig. 4-a, △) あるいは phenobarbital (Fig. 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 (Fig. 4-a, ○) と比較して増加したが、 $K_{0.5}$ も 4.8 及び 4.0 mM と増加した (Table 1). 2.5 mM ATP 存在下 (Fig. 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 (Table 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 (Fig. 5-a, ○, Table 1). Pentobarbital (Fig. 5-a, △) あるいは phenobarbital (Fig. 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 (Fig. 5-a, ○) と比較して、pentobarbital (Fig. 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 (Fig. 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 (Table 1). 2.5 mM ATP 存在下 (Fig. 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 $2.2 \mu\text{M}$ に対して 2.2 及び $2.7 \mu\text{M}$ であった (Table 2)。

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 Figs. 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。Table 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 は、 Na^+ に対する $K_{0.5}$ の値を減少し、 K^+ 及び Mg^{2+} に対する $K_{0.5}$ の値に増加傾向を示した。

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 活性を濃度依存性に 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 活性を濃度依存性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(Fig. 2)。一方、5 mM ATP 存在下では、thiamylal は Na,K-ATPase 活性を濃度依存性に抑制したが(Fig. 2-c), pentobarbital と phenobarbital はラット脳 Na,K-ATPase 活性を濃度依存性に促進し (Fig. 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 (Fig. 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、2.5 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 (Fig. 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 (Fig. 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 (Table 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, 戸苅彰文編, 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, Cu mMins 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

Table 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

Figs. 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 $K_{0.5}$ を低下し, K^+ に対する $K_{0.5}$ を増加させた.

Table 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

Figs. 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 $K_{0.5}$ を低下し, K^+ に対する $K_{0.5}$ を増加させた.

Table 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+} (μM)
添加なし	7.0	4.0	2.8
pentobarbital	5.3	5.6	3.3
phenobarbital	5.7	4.0	3.3

Figs. 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

下し, pentobarbital では K^+ に対する $K_{0.5}$ を増加させた.

Fig. 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 MgCl₂ 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.

Fig. 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

Fig. 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 (Fig. 2-a), 0, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5, 10 mM の phenobarbital (Fig. 2-b) あるいは 0, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1 mM の thiamylal (Fig. 2-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 2.5 (Figs. 2-a △, 2-b □, 2-c ◇)あるいは 5 mM (Figs. 2-a

▲, 2-b ■, 2-c ◆)で行った.

Fig. 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

Fig. 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 (Fig. 3-a) あるいは 2.5 mM (Fig. 3-b) で行った.

Fig. 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

Fig. 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 (Fig. 4-a)

あるいは 2.5 mM (Fig. 4-b) で行った.

Fig. 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

Fig. 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 μM 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 (Fig. 5-a) あるいは 2.5 mM (Fig. 5-b) で行った.

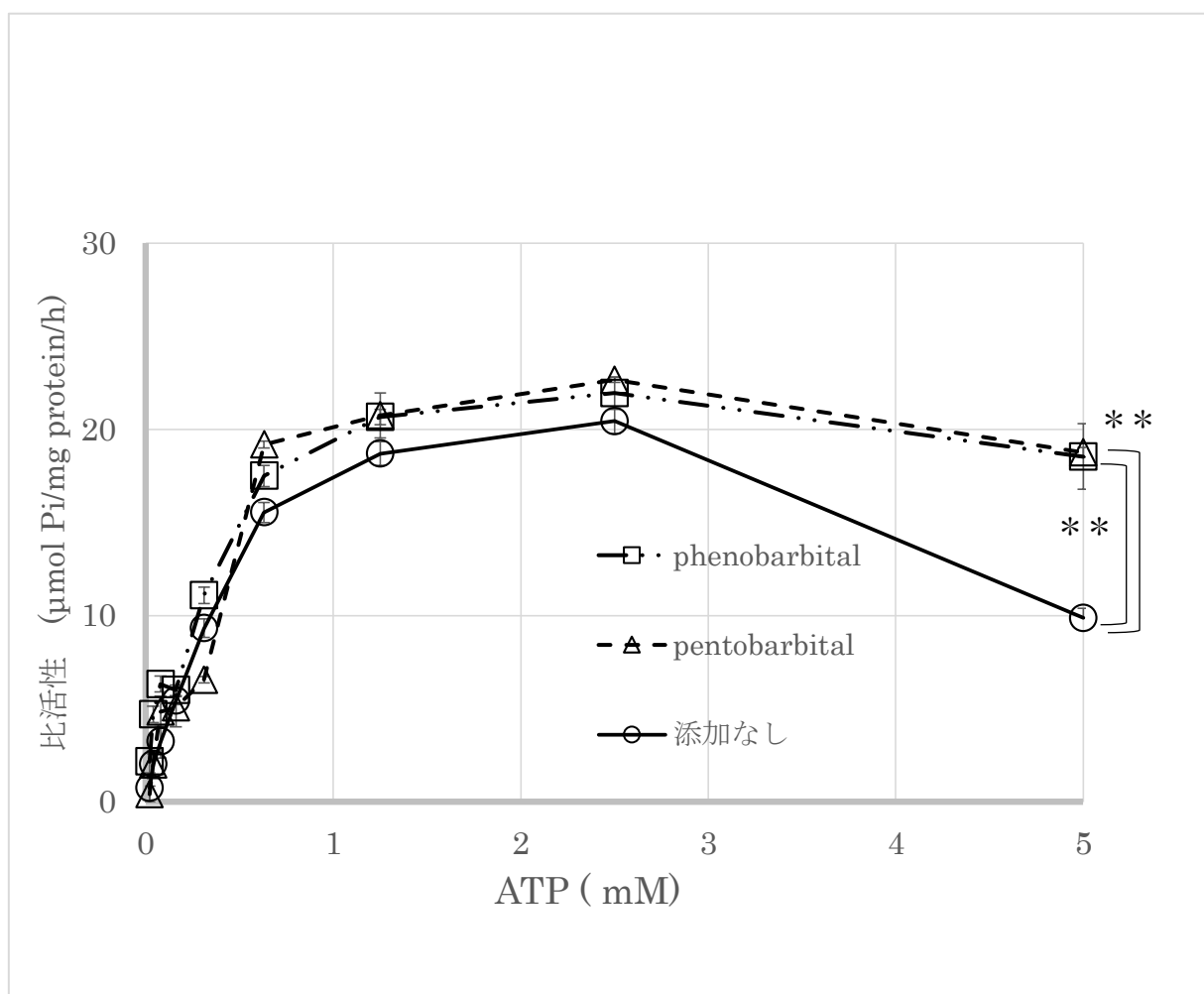


Fig. 1

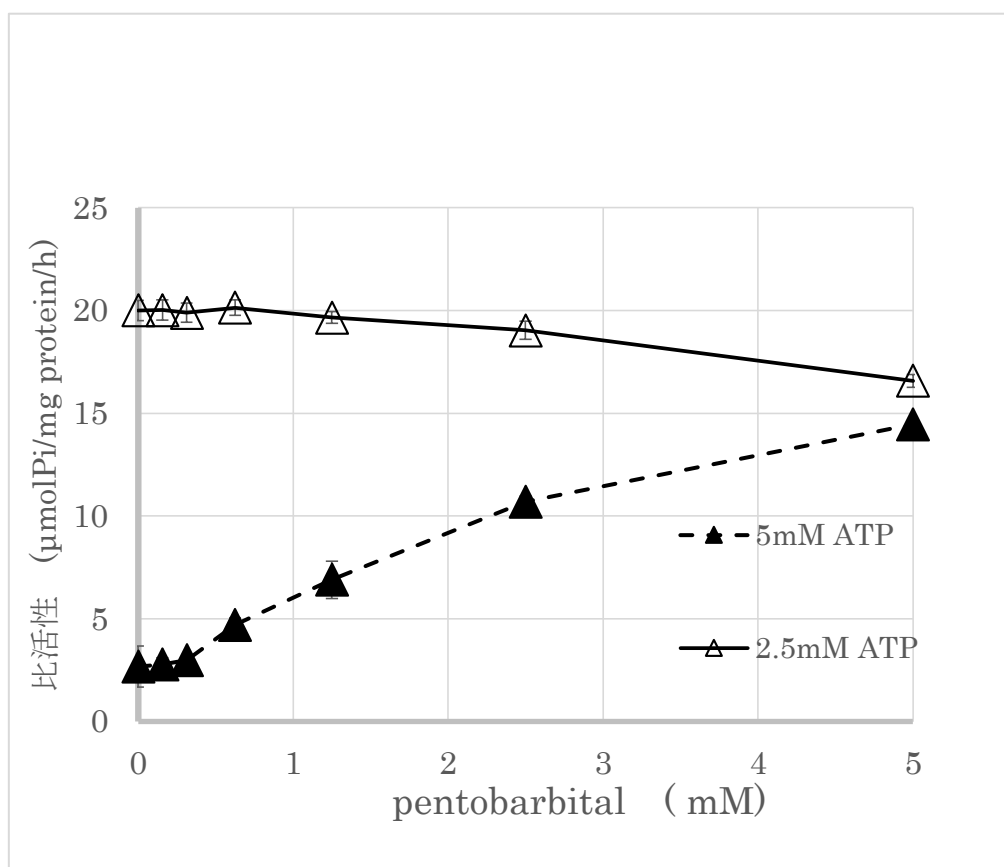


Fig. 2-a

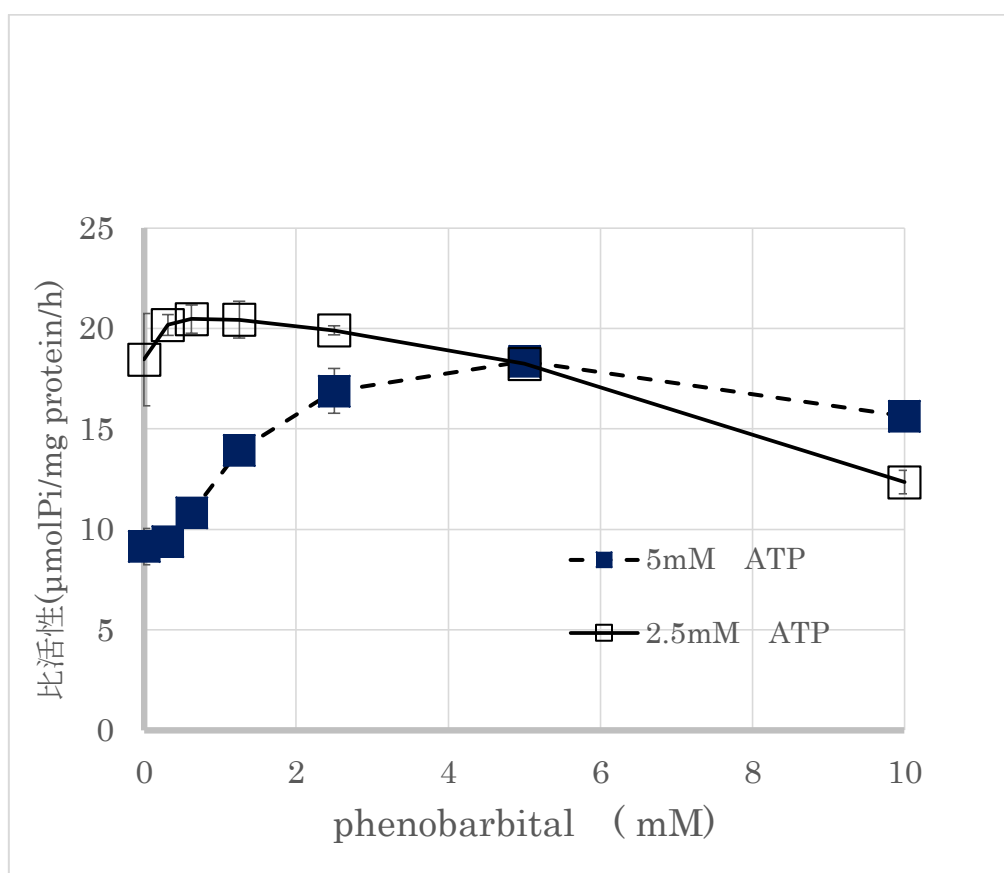


Fig. 2-b

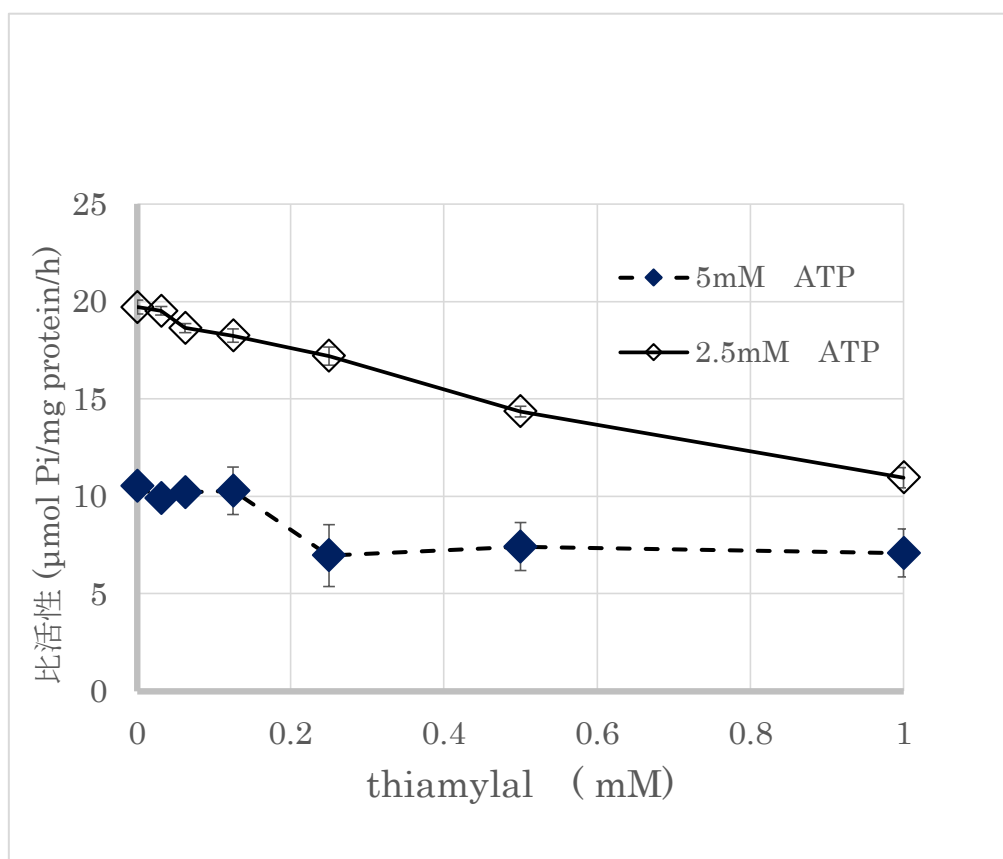


Fig. 2-c

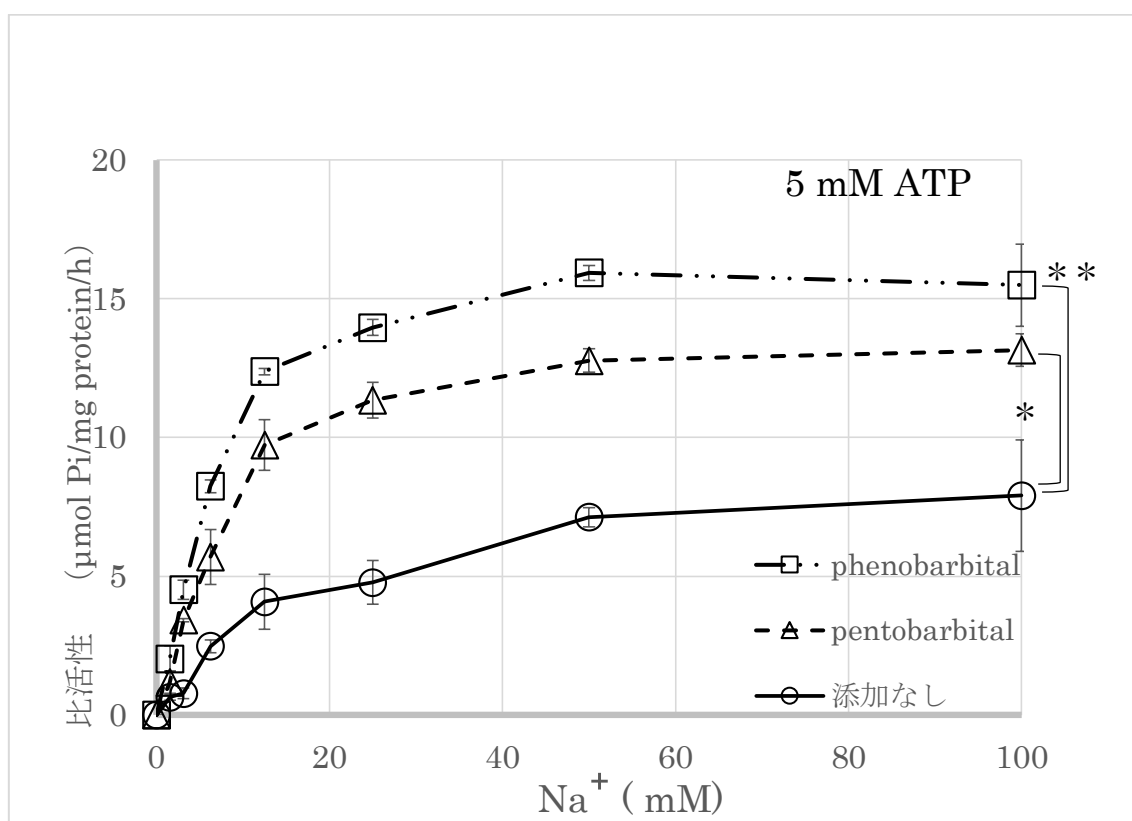


Fig. 3-a

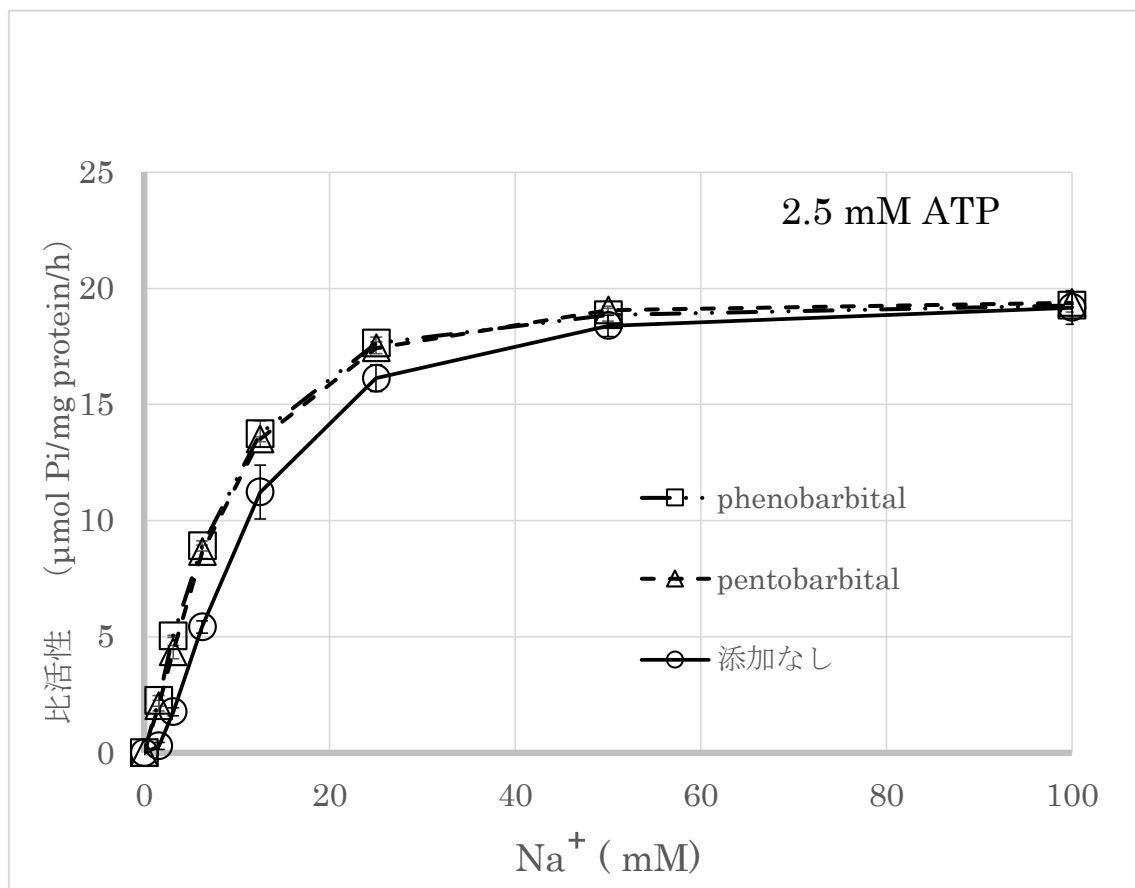


Fig. 3-b

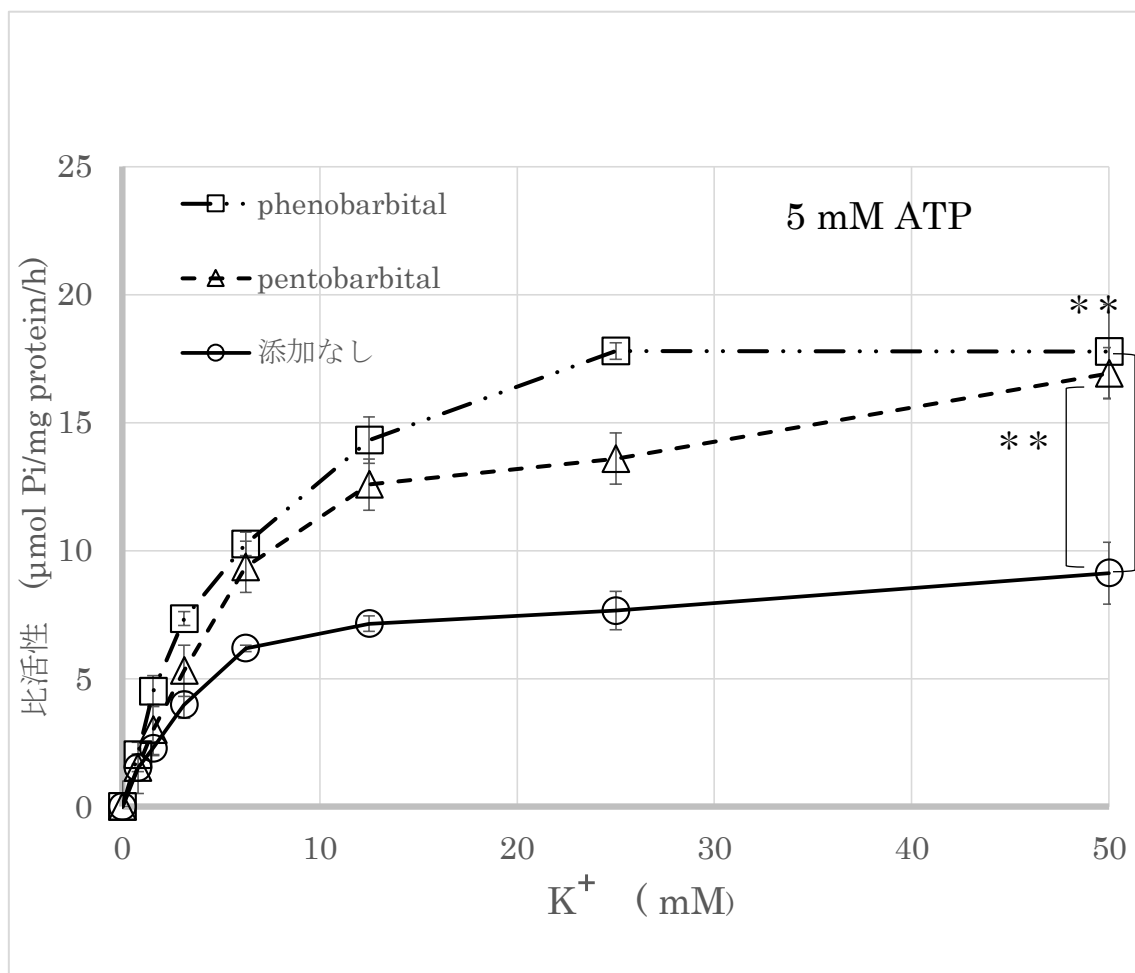


Fig. 4-a

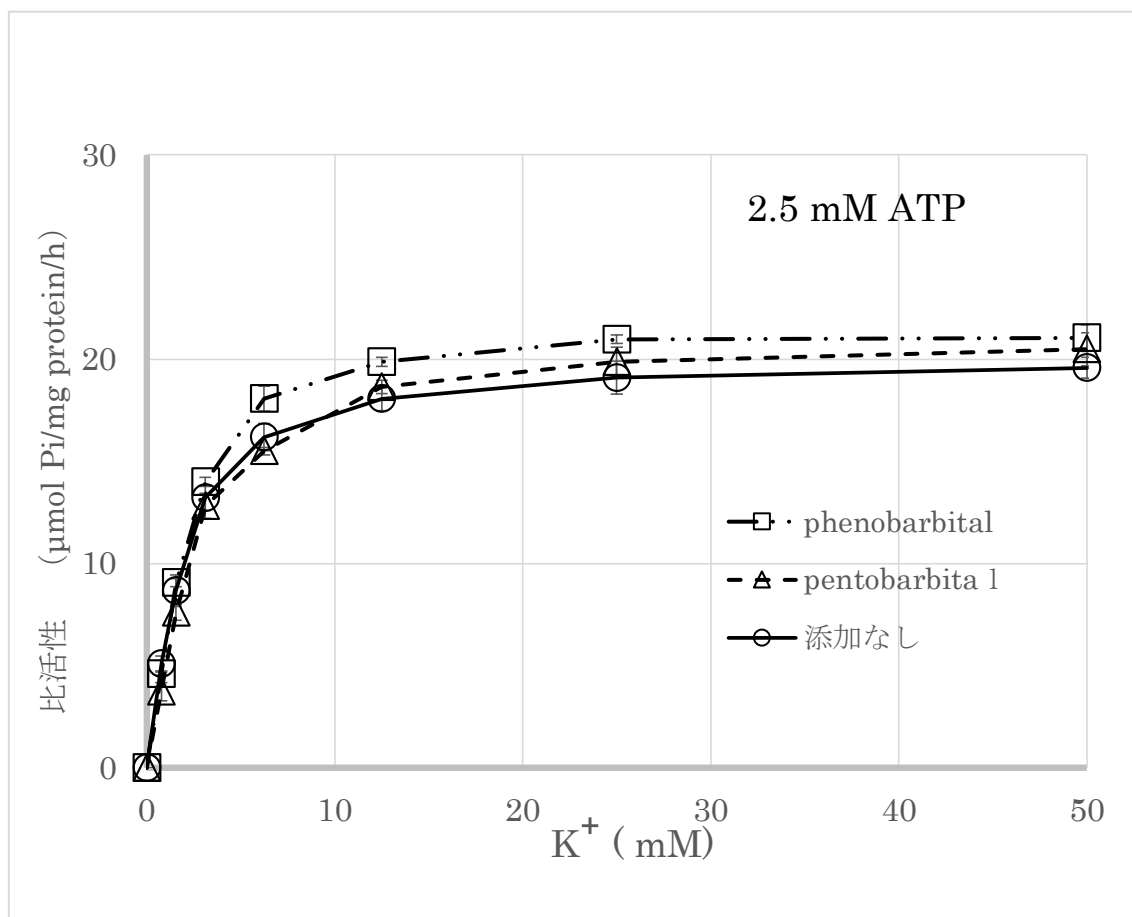


Fig. 4-b

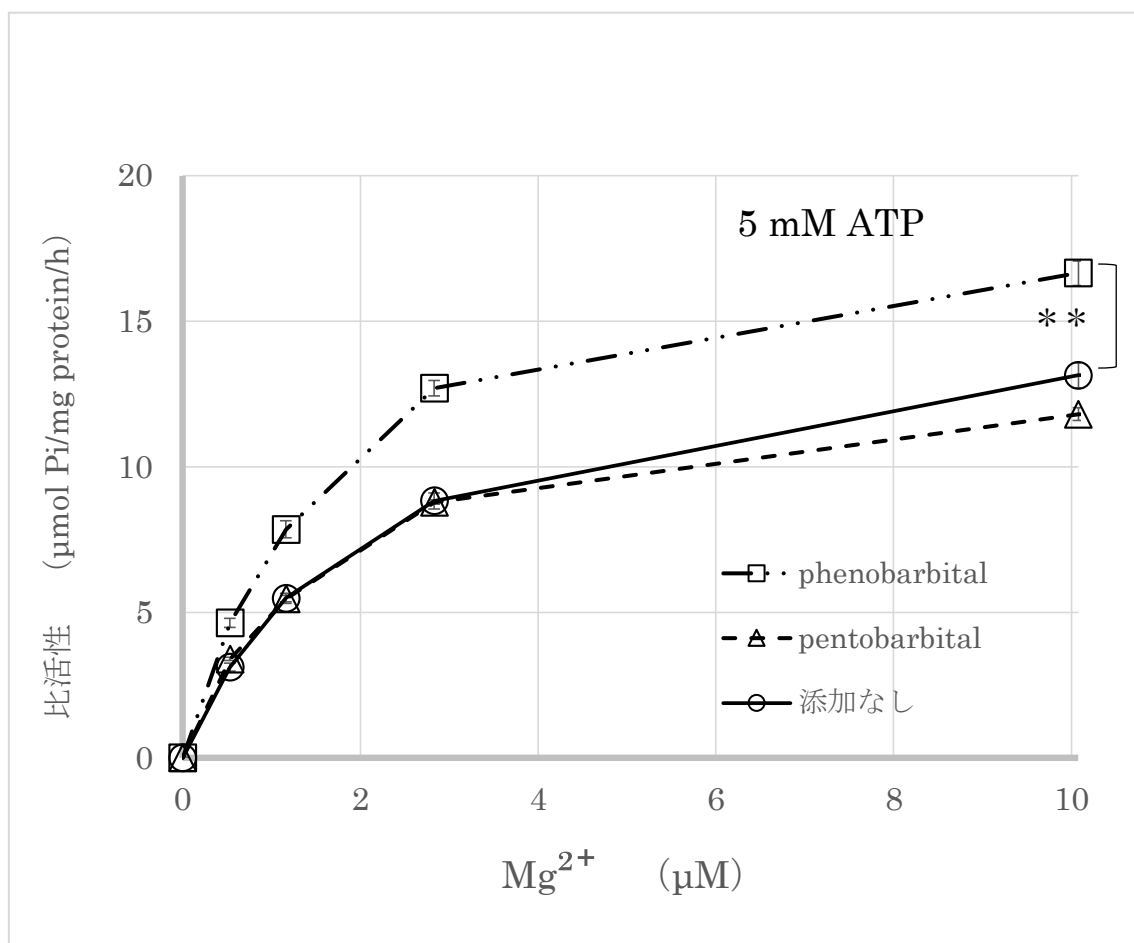


Fig. 5-a

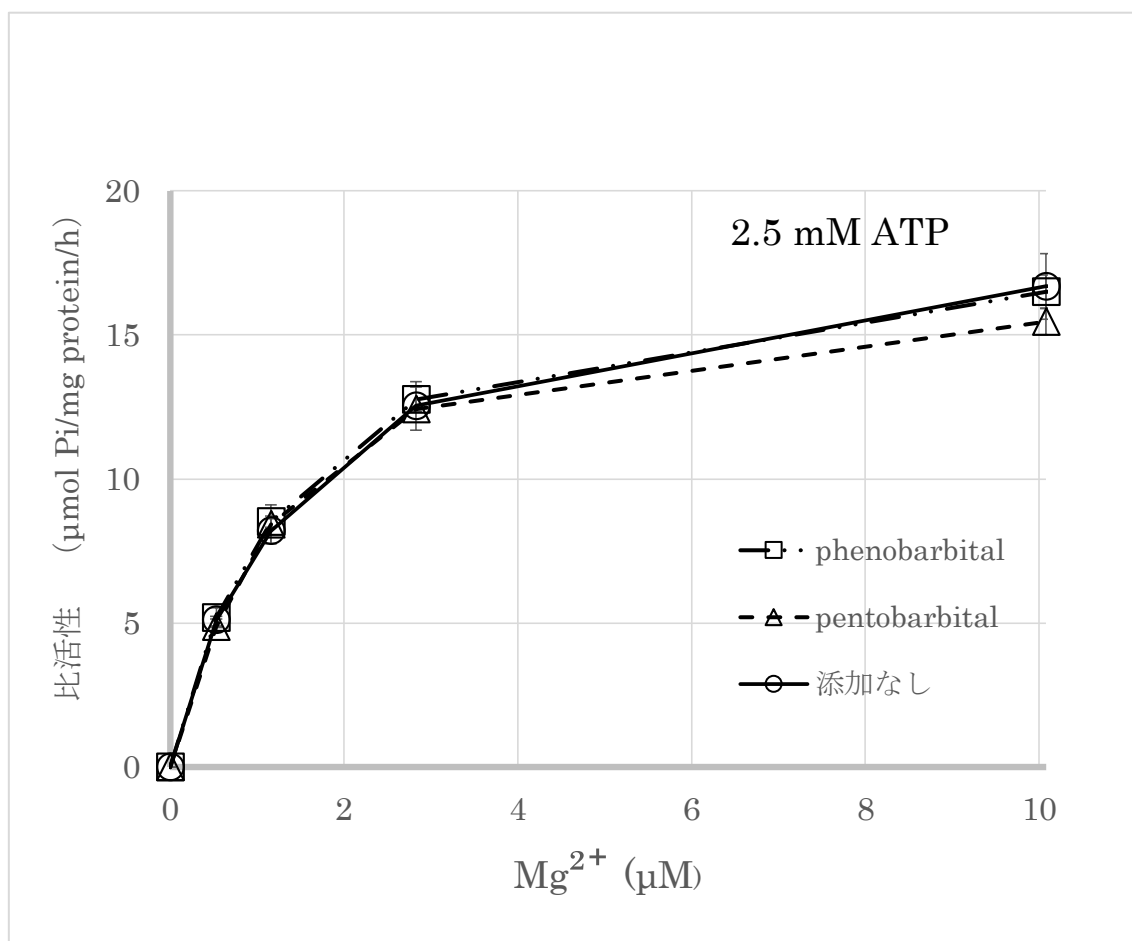


Fig. 5-b

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⁾

¹⁾Dental Anesthesiology, Faculty of Dental Medicine, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Toshiaki Fujisawa)
Kita13 Nishi7 Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

²⁾Molecular Cell Pharmacology, Faculty of Dental Medicine, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Kuniaki Suzuki)

Reaction mechanism of barbiturates is remained to be elucidated except for GABA_A receptors. Na,K-ATPase is the enzyme responsible for maintenance of neuronal excitability and may be possible to relate to the reaction of barbiturates. As there are a 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 the extracts of rat and rabbit brain. 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 the activity by substrate inhibition depending on their concentrations at 5 mM ATP, but not at 2.5 mM, suggesting that pentobarbital and phenobarbital suppress 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 increase Na,K-ATPase activity by changing the conformational state to E1 conformation and increase in the affinity for ATP.

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