

研究者：沖野雄一郎（所属：北海道大学病院予防歯科）

研究題目：Na, K-ATPase に対するフッ素，ベリリウム及びアルミニウムの作用

目的：

フッ素（F）はう蝕予防に用いられるが，急性・慢性毒性が制限要素となって応用範囲が限定されており，ベリリウム（Be）はその毒性から輸入歯科技工物への混入が問題になった。生体内に普遍的に存在して細胞の基本的な機能を担う酵素である Na, K-ATPase を F と Be は類似した作用で阻害すること，また F とアルミニウム（Al）が共存すると F の作用が増強されるという報告があることから，Na, K-ATPase 活性の抑制が F と Be による毒性の一因となる可能性があると考えた。本研究では F と Be 及び Al の Na, K-ATPase に対する作用を詳細に検討した。

対象および方法：

ラット脳から精製した酵素 Na, K-ATPase を用い，ATP 加水分解により生じた無機リンを Chifflet 法で定量することにより活性を，次いで Na, K-ATPase が ATP 加水分解反応中に形成するリン酸化反応中間体（EP）量を ^{32}P -ATP を用いて測定し，Na, K-ATPase 活性及び EP 形成量に対する NaF, BeSO_4 と AlCl_3 の影響を検討した。

結果および考察：

F は Na, K-ATPase 活性を濃度依存的に阻害し最終濃度 5 mM でほぼ 100% の活性を抑制した（図 1）。50% 阻害濃度（ $\text{Ki}_{0.5}$ ）は 1.38 mM であった。Al 存在下では存在する Al 濃度に依存してより低濃度の F で活性が抑制され，最終濃度 100 μM のとき F 濃度 1.25 mM で活性がほぼ 0 になり，Al の効果は 100 μM で飽和した（図 1）。EP 形成量も F の濃度に依存して減少し，Al が共存すると EP 形成抑制に必要な F 濃度を低下するとともに EP 量も減少させた。しかし，活性が完全に抑制される F 濃度でも 50% 以上の EP が残存した（図 2）。

一方，Be は濃度依存的に Na, K-ATPase 活性（ $\text{Ki}_{0.5}$ は 0.63 mM）及び EP 形成量を減少させ，活性も EP 形成も 5 mM でほぼ 100% 阻害した（図 3）。F の場合に観察された Al の作用は Be の作用に対して見られなかった。さらに Be は Na, K-ATPase に対する F の作用を増強した Al と同様な作用を示した（図 5）。以上の結果は，Al は F の Na, K-ATPase 活性の阻害を増強し Be も Al と同様な作用を示すことと，F と Be の Na, K-ATPase 活性に対する作用機構は異なることを示唆する。

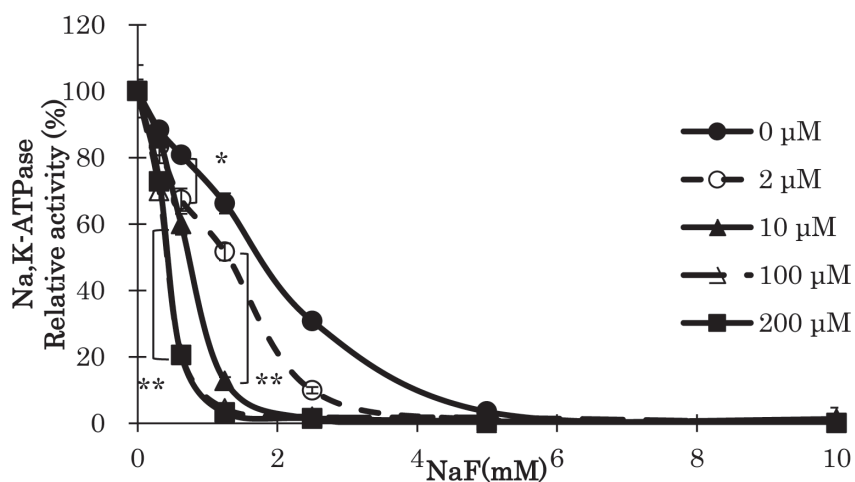


図1 Na, K-ATPase 活性の NaF による阻害と Al の影響

Al 非存在下では Na, K-ATPase 活性は F 濃度に依存して抑制され, $K_{i0.5}$ は 1.38 mM であった。Al 存在下では非存在下と比較してより低濃度の NaF で活性が抑制され, $K_{i0.5}$ は Al 非添加の 1.38 mM から 100 μ M の Al 存在下の 0.34 mM まで Al 濃度依存的に顕著な減少を示したが, 200 μ M まで Al の濃度を上げて 100 μ M の Al と同様の値であった。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

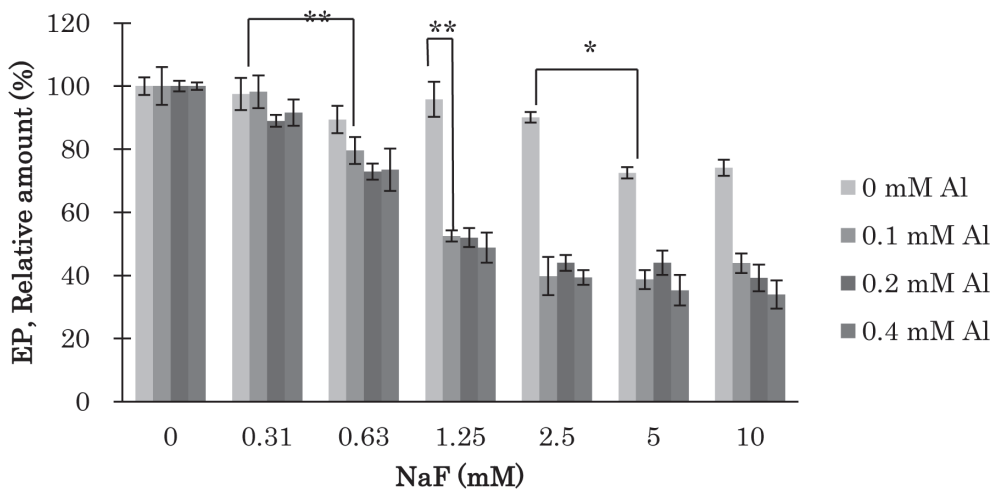


図2 EP 形成量に対する F と Al の影響

Al 非存在下では 5 mM の F で EP 形成量が 30% 程度減少し, それ以上 F の濃度を上げて 5 mM 以上でも変わらなかった。一方, Al 存在下では非存在下と比較してより低濃度の F で EP 形成が抑制された。Al 濃度が 0.1 mM のとき F 濃度 2.5 mM で 60% 程度減少したが, 0.4 mM まで Al の濃度を上げて 0.1 mM の Al と結果は同様であった。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

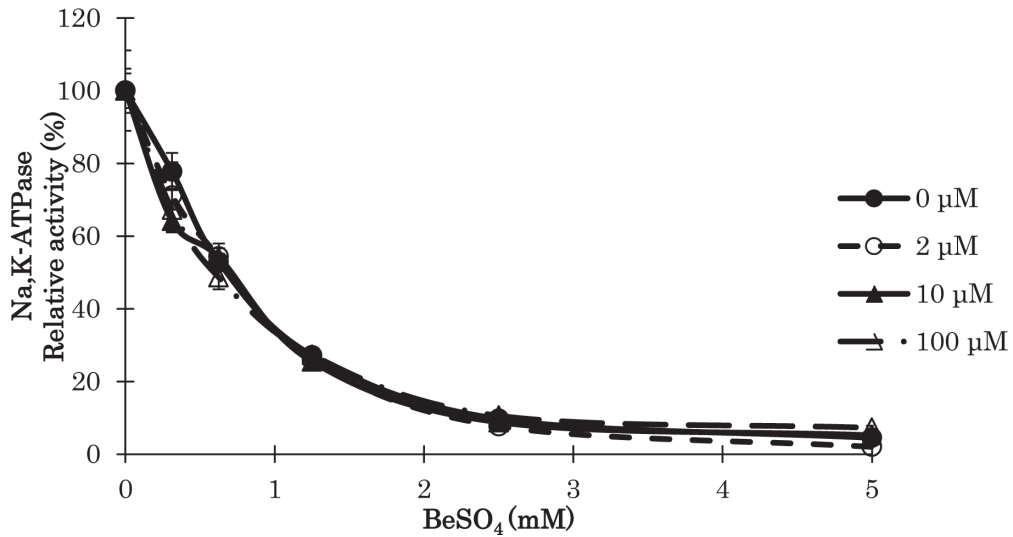


図3 Na, K-ATPase 活性の BeSO₄ による阻害の Al の影響
 すべての Al 濃度において BeSO₄ 濃度に依存して活性が阻害されていき、最終濃度 5 mM ではほぼ 100% の活性が抑制された。Al 存在下では非存在下と比較して差が認められなかった。Al 濃度を上昇させても非存在時と変わりなかった。Ki_{0.5} もすべての Al ではほぼ同じ値を示した。

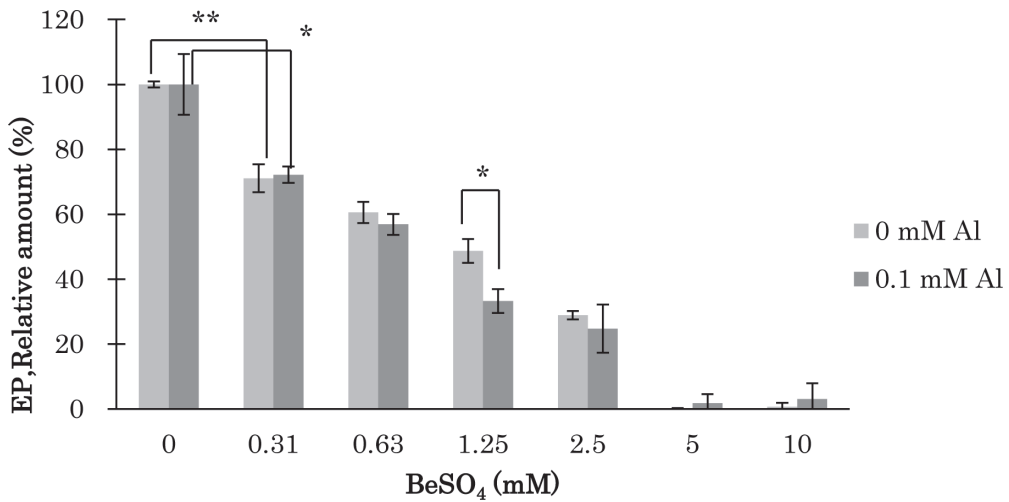


図4 EP 形成量に対する Be と Al の影響
 Al 非存在下では Be が 5 mM で EP が形成されなかった。一方、Al 存在下では非存在下と比較してより低濃度の Be で活性が抑制され、Al 濃度が 0.1 mM のとき Be 濃度 1.25 mM で有意に減少し、Be が 5 mM で EP が形成されなかった。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

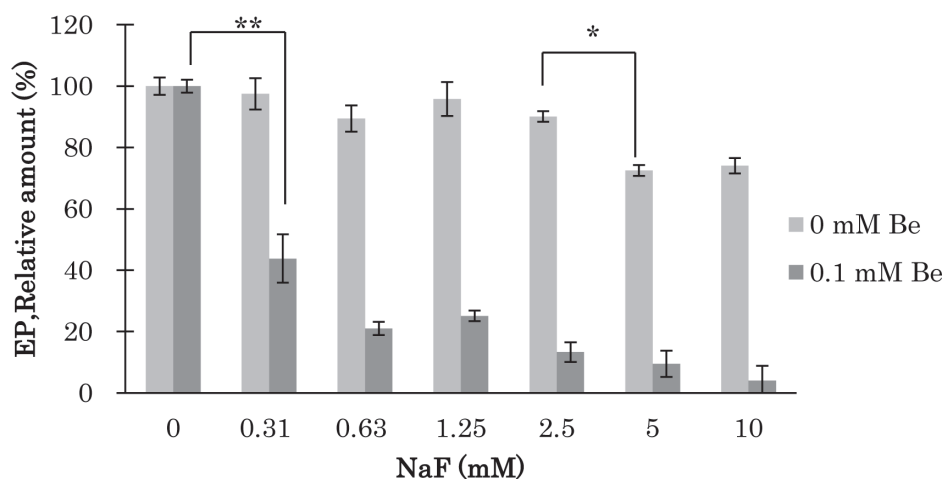


図5 EP形成量に対するFとBeの影響

Be非存在下ではFが5 mMでEP形成量が30%程度減少し、それ以上濃度を上げて変わらなかった。一方、Be存在下では非存在下と比較してより低濃度のFで活性が抑制され、F濃度10 mMでEPは形成されなかった。** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

成果発表：

- 1) ○沖野雄一郎，出山義昭，吉村善隆，鈴木邦明：Na, K-ATPase 活性のフッ素及びアルミニウムの作用：第28回北海道薬物作用談話会，（平成26年7月19日），（口頭発表）
- 2) ○沖野雄一郎，出山義昭，吉村善隆，鈴木邦明：Na, K-ATPase 活性及びそのリン酸化反応中間体量に対するフッ素の作用：第56回歯科基礎医学会学術大会・総会，（平成26年9月25～27日），（ポスター発表）現在，学術雑誌投稿準備中