

学 位 論 文 題 名

ベンゾジアゼピン系薬物がウサギ脳

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

【緒言】ベンゾジアゼピン系薬物（BZ）は歯科麻酔の臨床において静脈内鎮静法の使用薬として従来より頻用されてきた。BZ の特異的作用部位として中枢神経系における  $\text{GABA}_A$  受容体がよく知られているが、BZ のもたらす種々の作用の違いが  $\text{GABA}_A$  受容体に対する作用のみで説明しうるのか否かについては十分解明されたとは言えない。一方、最近、BZ は  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase 活性を阻害するという報告がなされた。  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase は動物細胞の形質膜に存在し広範な機能を担う酵素であり、BZ による  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase 活性の阻害が多様な生理作用に変化を引き起こしている可能性があるが、その詳細は明らかではない。さらに、最近、末梢神経系に存在するBZ 結合タンパク質（peripheral-type benzodiazepine receptor : PBR）が発見され、そのサブユニットにはアデニンヌクレオチドキャリアタンパク質が含まれることが明らかにされた。BZ のPBR と  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase 結合部位はアデニンヌクレオチドの結合部位の近傍に存在するなどの共通性があるが、  $\text{GABA}_A$  受容体のBZ 結合部位とはその構造が異なっている可能性がある。以上のことから、BZの  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase 活性抑制機構をより詳細に検討することと、  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase のBZ 結合部位が  $\text{GABA}_A$  受容体のBZ 結合部位と異なっている可能性を検討することを目的として本研究を行った。

【材料と方法】実験にはJørgensen らの方法に準じてウサギ全脳から精製した  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase を用い、BZ であるミダゾラム、ジアゼパム、フルニトラゼパムの  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase 活性（全活性）、部分反応である  $\text{Na}^+$  -ATPase 活性（ $\text{Na}^+$  活性）及びリン酸化反応中間体（EP）形成に対する作用を調べた。また、BZ の濃度を希釈した際の  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  -ATPase 活性阻害が可逆的であるか否かを調べるために活性回復実験を行っ

た。さらに $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性, EP 量及び $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性の回復実験に対する GABA<sub>A</sub> 受容体における BZ 拮抗薬フルマゼニルの影響について検討した。

【結果と考察】 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の ATP の加水分解過程は $\text{Na}^+$  のみの存在下で進行する前半の過程と、 $\text{K}^+$  が関与する後半の過程に分けて考えることができる。前半の過程では、 $\text{Na}^+$  の存在下で ATP を結合した後 ATP を加水分解して、生じたリンを結合したリン酸化反応中間体 (EP) を形成して ADP は遊離し、EP はゆっくりと分解してリンを遊離した後に再び次の ATP と結合することが出来る。ATPase 活性という点から反応全体をみると、 $\text{Na}^+$  のみの存在下で ATP が加水分解されることから部分反応である  $\text{Na}^+$ -ATPase 活性と呼ばれる。一方、 $\text{K}^+$  が存在すると $\text{Na}^+$  によって形成された EP に  $\text{K}^+$  が結合し、EP の分解の速度は 10 倍程度速くなる。その後酵素に結合した  $\text{K}^+$  が遊離すると、新たな ATP と結合することができる。この場合の ATPase 活性の反応全体をみると、 $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の両方を必要とすることから全活性である  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性と呼ばれる。本研究では、このような反応過程に対する BZ の作用を検討した。そこで、3 種類の BZ はいずれも濃度依存性に全活性、 $\text{Na}^+$  活性及び EP 形成を阻害し、全活性の 50% 阻害濃度 ( $\text{Ki}_{0.5}$ ) は、ジアゼパム、ミダゾラム、フルニトラゼパムの順にそれぞれ 0.6 mM, 0.42 mM, 0.25 mM であった。 $\text{Ki}_{0.5}$  の値は 3 種類の BZ いずれにおいても EP 形成 > 全活性 >  $\text{Na}^+$  活性の順であった。これらの結果は、ATPase 反応の最初の段階である EP 形成が最も阻害されにくいことを示唆し、BZ は  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 反応過程のうち EP 形成以降の過程を主に抑制することを示唆した。本研究において使用した BZ の比較的低濃度域においては、EP 形成までは進行するが  $\text{K}^+$  非存在下の EP の自然分解の過程が影響されて活性が低下し、 $\text{K}^+$  が存在すると EP の分解の速度を高めることによって BZ の影響が低下するものと推定された。しかし、BZ の濃度がさらに高くなると  $\text{K}^+$  存在下でも EP 分解の速度の低下を補えなくなり、さらには EP 形成の抑制も生じてくるものと考えられた。また 0.2 mM 及び 0.25 mM フルニトラゼパム存在下では、全活性は低下するが  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の ATP に対する親和性が増加した。この濃度域のフルニトラゼパムは  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の ATP に対する親和性を増大させると同時に、EP 分解の速度を低下させ ATPase 活性を抑制すると考えられた。また、ATP に対する親和性が増大すると、EP 形成も進行しやすくなるので、ATP に対する親和性の増大が

EP 形成がBZ の影響を受けにくい理由になっていると推定された。次に、全活性が阻害される濃度のBZ で処理した後にBZ を希釈したところ、3種類のBZ いずれにおいても活性は回復したが、最大でもフルニトラゼパムの約50%であり、BZ による活性阻害は部分的に可逆的であった。BZ による全活性に対する作用は薬物の濃度に依存するのみならず、薬物とのプレインキュベーションの時間にも依存しており、このことが活性の回復が不完全である理由の一つであると推定された。また、BZ の $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性抑制濃度は、本研究において全活性及び $\text{Na}^+$  活性、EP 形成に対する作用も含めていずれも臨床的に使用される濃度に比較して約100倍高い濃度が必要であることが明らかになった。このことから、その作用は副作用あるいは中毒により関連するものと考えられた。さらに、 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase のBZ 結合部位がGABA<sub>A</sub> 受容体のBZ 結合部位と異なっている可能性を検討するために、GABA<sub>A</sub> 受容体におけるBZ 拮抗薬フルマゼニルの作用を調べた。その結果、フルマゼニルはフルニトラゼパムによる $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性の抑制に対しては全く拮抗せず、EP 形成の抑制に対してもほぼ拮抗しなかった。活性回復実験においてもジアゼパムではほぼ促進せず、ミダゾラムにおいてはほとんどの測定点において有意な回復の促進を示したがその程度は小さかった。以上の結果と、フルマゼニルがBZ の構造類似体としてGABA<sub>A</sub> 受容体においてBZ に対して拮抗作用を示すことを考え合わせると、BZ の $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase に対する結合部位は、GABA<sub>A</sub> 受容体のBZ の結合部位とは、その構造が異なるものと推定された。

【結論】ジアゼパム、ミダゾラムとフルニトラゼパムの3種類のBZ はおもにEP 形成以降の過程を抑制することによって、濃度依存的に $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性を抑制した。これらの活性の抑制は部分的に可逆的であるが、活性抑制の濃度が高いため副作用あるいは中毒により関連するものと推定された。フルニトラゼパムを用いた実験では、活性の抑制と同時にATP に対する親和性を増大させた。またBZ の $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase への結合部位の構造は、GABA<sub>A</sub> 受容体のBZ 結合部位の構造とは異なるものと推定された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 章  
副 査 教 授 福 島 和 昭  
副 査 教 授 赤 池 忠

学 位 論 文 題 名

## ベンゾジアゼピン系薬物がウサギ脳 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase に及ぼす影響

主査、副査が口頭にて論文審査を行った。論文提出者に研究内容の概要の説明を求めた。提出者は以下の内容を明快に説明した。

本研究では、BZ の特異的作用部位として中枢神経系におけるGABAA 受容体がよく知られている。一方、BZ はNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性を阻害するという報告がなされている。このNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性の阻害が多様な生理作用に変化を引き起こしている可能性があるが、その詳細は明らかではない。さらに、最近、末梢神経系に存在するBZ 結合タンパク質 (peripheral-type benzodiazepine receptor: PBR) が発見され、そのサブユニットにはアデニンヌクレオチドキャリアタンパク質が含まれることが明らかにされた。BZ のPBR とNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 結合部位はアデニンヌクレオチドの結合部位の近傍に存在するなどの共通性がある。GABAA 受容体のBZ 結合部位とはその構造が異なっている可能性がある。以上のことから、BZのNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性抑制機構をより詳細に検討することと、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase のBZ 結合部位がGABAA 受容体のBZ 結合部位と異なっている可能性を検討することを目的として本研究を行った。

実験にはJørgensenらの方法に準じてウサギ全脳から精製したNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase を用い、BZ であるミダゾラム、ジアゼパム、フルニトラゼパムのNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性 (全活性)、部分反応であるNa<sup>+</sup>-ATPase 活性 (Na<sup>+</sup> 活性) 及びリン酸化反応中間体 (EP) 形成に対する作用を調べた。また、BZ の濃度を希釈した際のNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性阻害が可逆的であるか否かを調べるために活性回復実験を行った。さらにNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性、EP 量及びNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 活性の回復実験に対するGABAA 受容体におけるBZ 拮抗薬フルマゼニルの影響について検討した。

その結果、Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaseの反応過程に対するBZ の作用を検討したところ、3種類のBZ はいずれも濃度依存性に全活性、Na<sup>+</sup> 活性及びEP 形成を阻害し、全活性の50%阻害濃度 (KI0.5)は、ジアゼパム、ミダゾラム、フルニトラゼパムの順にそれぞれ0.6 mM, 0.42 mM, 0.25 mMであった。KI0.5 の値は3種類のBZ いずれにおいてもEP 形成>全活性> Na<sup>+</sup> 活性の順であった。

これらの結果は、ATPase 反応の最初の段階であるEP 形成が最も阻害されにくいことを示唆し、BZ はNa<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase 反応過程のうちEP 形成以降の過程を主に抑制することを示唆した。本研究において使用したBZ の比較的低濃度域においては、EP 形成までは進行するがK<sup>+</sup> 非存在下のEP の自然分解の過程が影響されて活性が低下し、K<sup>+</sup> が存在するとEP の分解の速度を高めることによってBZ の影響が低下す

るものと推定された。しかし、BZ の濃度がさらに高くなると $K^+$  存在下でもEP 分解の速度の低下を補えなくなり、さらにはEP 形成の抑制も生じてくるものと考えられた。また0.2 mM 及び0.25 mM フルニトラゼパム存在下では、全活性は低下するが $Na^+, K^+$ -ATPase のATP に対する親和性が増加した。この濃度域のフルニトラゼパムは $Na^+, K^+$ -ATPase のATP に対する親和性を増大させると同時に、EP 分解の速度を低下させATPase 活性を抑制すると考えられた。また、ATP に対する親和性が増大すると、EP 形成も進行しやすくなるので、ATP に対する親和性の増大がEP 形成がBZ の影響を受けにくい理由になっていると推定された。次に、全活性が阻害される濃度のBZ で処理した後にBZ を希釈したところ、3種類のBZ いずれにおいても活性は回復したが、最大でもフルニトラゼパムの約50%であり、BZ による活性阻害は部分的に可逆的であった。BZ による全活性に対する作用は薬物の濃度に依存するのみならず、薬物とのプレインキュベーションの時間にも依存しており、このことが活性の回復が不完全である理由の一つであると推定された。また、BZ の $Na^+, K^+$ -ATPase 活性抑制濃度は、本研究において全活性及び $Na^+$  活性、EP 形成に対する作用も含めていずれも臨床的に使用される濃度に比較して約100倍高い濃度が必要であることが明らかになった。このことから、その作用は副作用あるいは中毒により関連するものと考えられた。さらに、 $Na^+, K^+$ -ATPase のBZ 結合部位がGABAA 受容体のBZ 結合部位と異なっている可能性を検討するために、GABAA 受容体におけるBZ 拮抗薬フルマゼニルの作用を調べた。その結果、フルマゼニルはフルニトラゼパムによる $Na^+, K^+$ -ATPase 活性の抑制に対しては全く拮抗せず、EP 形成の抑制に対してもほぼ拮抗しなかった。活性回復実験においてもジアゼパムではほぼ促進せず、ミダゾラムにおいてはほとんどの測定点において有意な回復の促進を示したがその程度は小さかった。以上の結果と、フルマゼニルがBZ の構造類似体としてGABAA 受容体においてBZ に対して拮抗作用を示すことを考え合わせると、BZ の $Na^+, K^+$ -ATPase に対する結合部位は、GABAA 受容体のBZ の結合部位とは、その構造が異なるものと推定された。

【結論】ジアゼパム、ミダゾラムとフルニトラゼパムの3種類のBZ はおもにEP 形成以降の過程を抑制することによって、濃度依存的に $Na^+, K^+$ -ATPase 活性を抑制した。これらの活性の抑制は部分的に可逆的であるが、活性抑制の濃度が高いため副作用あるいは中毒により関連するものと推定された。フルニトラゼパムを用いた実験では、活性の抑制と同時にATP に対する親和性を増大させた。またBZ の $Na^+, K^+$ -ATPase への結合部位の構造は、GABAA 受容体のBZ 結合部位の構造とは異なるものと推定された。

このような趣旨の論文に対し、次のような質問がなされた。1) 使用した薬物濃度と臨床濃度の関係について 2) ATP濃度と活性の二重逆数プロットを示した、Figureの表示法と解析の意味について 3) 高濃度の薬物による、膜のタンパク質の立体構造の変化の有無について 4) 3種の薬物の中、BZ による回復の程度が低い理由について 等、これらの質問に対し、申請者は明快な回答を行い、関連分野についても広く詳細な理解があることを認めれた。以上の結果を総合し、合格とした。