

ウサギ脳 Na, K-ATPase に対する  
カリウム同族体とシスプラチンの作用

学位論文内容の要旨

【緒言】

Na,K-ATPase は動物細胞の形質膜に存在しており、ATP の加水分解エネルギーを用いて細胞内外の  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  を能動輸送し、その濃度勾配を維持する酵素である。その機能により、細胞体積及び浸透圧の調節など細胞の基本的な機能を維持している。Na,K-ATPase の反応機構は、Post-Albers の機構として知られている。まず、Na,K-ATPase は ATP と結合したのちに、これを分解して ADP を放出し、リン酸化反応中間体: (Na)E1P を形成する。E1P は  $\text{Na}^+$  を細胞外へ放出した後に  $\text{K}^+$  に親和性の高い E2P となる。 $\text{K}^+$  が存在しない場合には、E2P はゆっくりと加水分解されて  $\text{P}_i$  を遊離する Na-ATPase と呼ばれる部分反応を示す。 $\text{K}^+$  が存在すると E2P に結合してその脱リン酸化の速度を増加する。その結果、ATPase 反応全体の速度が Na-ATPase の 10 倍程度増加する。 $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の両イオンが存在した状態での ATPase 活性が Na,K-ATPase 活性である。 $\text{K}^+$  と結合した酵素は KE2 と呼ばれ、この状態ではパラニトロフェニルリン酸を分解する部分活性(以下 p-NPPase)を示す。反応機構のなかで  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の役割は全く異なっており、 $\text{Na}^+$  は前半のリン酸化反応中間体の形成に不可欠であり、 $\text{K}^+$  は後半の脱リン酸化の過程を促進する。

Na,K-ATPase 反応において、 $\text{K}^+$  同族体である  $\text{Li}^+$ 、 $\text{Rb}^+$ 、 $\text{Cs}^+$ 、ならびに  $\text{K}^+$  類似作用を持つといわれている  $\text{NH}_4^+$  も  $\text{K}^+$  と同様の作用を示すが詳細については明らかではない。 $\text{Li}^+$  については、部分的に  $\text{Na}^+$  類似作用を示すという報告もある。Na,K-ATPase は  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の輸送に関与しているが、必要な場合は  $\text{Li}^+$ 、 $\text{Rb}^+$ 、 $\text{Cs}^+$ 、 $\text{NH}_4^+$  などの微量元素の輸送を行いその生理機能あるいは解毒などに関与する可能性もあると考えられている。そこで、本研究ではこれらの点について詳細に検討した。また、シスプラチンは頭頸部腫瘍にも効果的な白金系抗癌剤であるが、その副作用である腎毒性が投与量の規制因子となっている。腎毒性は、Na,K-ATPase 活性の抑制が一因との報告もあり、シスプラチンが Na,K-ATPase 活性を抑制することも知られている。しかし、 $\text{K}^+$  同族体や  $\text{NH}_4^+$  による

ATPase 活性ならびに *p*-NPPase 活性におけるシスプラチンの作用についての報告はみられない。同様に、Na<sup>+</sup>を Li<sup>+</sup>に置き換えた場合の ATPase 活性に対するシスプラチンの作用に関する報告もみられないことから本研究を行った。

#### 【方法】

酵素は、Jorgensen の方法に基づく Post の簡便法で精製したウサギ脳の Na,K-ATPase を用いた。ATPase 活性は、加水分解の結果生じたリンを Chifflet 法で定量し、*p*-NPPase 活性は酵素反応の結果生じたパラニトロフェノールを定量し活性を測定した。

#### 【結果と考察】

反応機構のなかで K<sup>+</sup>は脱リン酸化の促進により活性速度を増加する。そこで各 40mM 濃度の K<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>、Rb<sup>+</sup>、Cs<sup>+</sup>と NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の ATPase 活性に対する効果を調べたところ、いずれも程度の差はあるものの活性化効果を示した。次に、これらのイオンが 40mM の K<sup>+</sup>存在下でも相加的に活性を増加できるか否かを調べたが、いずれも増強効果はなかった。この結果から、これらのイオンはいずれも K<sup>+</sup>と同様の機構で ATPase を活性化するものと考えられた。次にこれらのイオンによる ATPase 活性化効果を詳細に調べるため、各イオンの濃度依存性に関する実験を行った。いずれのイオンもその濃度に依存して ATPase 活性を促進したが、最大活性化レベルと Na,K-ATPase に対する親和性はイオンによって異なっていた。そこで、これらの結果を Cornish-Bowden の direct linear plot を用いて解析し、酵素との親和性を示す km 値と最大反応速度 V<sub>max</sub> を求めた。その結果、親和性は Rb<sup>+</sup>>K<sup>+</sup>>Cs<sup>+</sup>>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>>Li<sup>+</sup>の順で、最大活性化レベルは K<sup>+</sup>>Cs<sup>+</sup>>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>>Rb<sup>+</sup>>Li<sup>+</sup>の順であった。

次に、K<sup>+</sup>同族体と NH<sub>4</sub><sup>+</sup>が *p*-NPPase においても、K<sup>+</sup>と同様の役割を担えるのかを調べるため、各イオンの効果を調べた。最大活性化レベルは異なるものの NH<sub>4</sub><sup>+</sup>、Rb<sup>+</sup>、Cs<sup>+</sup>は K<sup>+</sup>と同様に *p*-NPPase を活性化した。しかし、Li<sup>+</sup>ではほとんど活性化効果はみられなかった。そこで、ATPase 活性と同様に各イオンの濃度依存性に関する実験を行い、親和性を示す km 値と最大反応速度 V<sub>max</sub> を求めた。その結果、親和性は K<sup>+</sup>>Rb<sup>+</sup>>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>>Cs<sup>+</sup>>Li<sup>+</sup>の順で、最大活性化レベルは Rb<sup>+</sup>>K<sup>+</sup>>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>>Cs<sup>+</sup>>Li<sup>+</sup>の順であった。なお、これらの実験の *p*-NPPase 活性は、いずれも Na,K-ATPase の特異的阻害剤であるウアインによって阻害されたので、測定された活性は Na,K-ATPase の部分反応である。

ATPase 反応において、K<sup>+</sup>非存在下でも Na,K-ATPase 活性の 10%程度の活性が観察され Na-ATPase 活性と呼ばれている。この Na<sup>+</sup>を他のイオンに置き換えても活性はみられなかったが、Li<sup>+</sup>だけは ATPase に対する親和性はかなり低いものの、その濃度に依存して活性を促進した。

Na,K-ATPase 活性及び *p*-NPPase 活性のシスプラチンによる阻害については、いくつ

か報告があるが、 $K^+$ 同族体による Na,K-ATPase 活性に対するシスプラチンの作用については全く報告がない。これらの関係を詳しく調べるために実験を行った。Na,K-ATPase 反応の  $K^+$ の代わりに  $K^+$ 同族体および  $NH_4^+$ を用いた ATPase 活性は、いずれも添加したシスプラチンの濃度に依存して抑制された。次に  $K^+$ 同族体および  $NH_4^+$ を用いた p-NPPase 活性に対するシスプラチンの効果ならびに、 $Na^+$ および  $Li^+$ によって活性化される ATPase 活性に対するシスプラチンの効果も調べたが、いずれもシスプラチンの濃度に依存して活性は抑制された。

これらの結果は、シスプラチンが輸送するイオンにかかわらず、Na,K-ATPase の機能を阻害することを示唆するものである。

これまでの実験でシスプラチンによる ATPase あるいは p-NPPase 活性の抑制は、シスプラチンの濃度だけではなく、シスプラチンと Na,K-ATPase のプレインキュベーションの時間にも依存して低下していた。シスプラチンはその構造中の塩素が、水または水酸基へ変化して抗腫瘍効果を示すといわれており、その変化は時間に依存すると考えられている。そこで、シスプラチンによる活性抑制が、シスプラチンの構造変化によるものか、時間に依存したものかを確認することを目的として水和時間の違いによる Na,K-ATPase への効果を調べた。冷凍保存したシスプラチン水溶液の解凍直後、24 時間後、96 時間後の溶液を用いて活性阻害実験を行ったところ、シスプラチンの濃度に依存して活性は抑制されたが、水和時間の違いによる顕著な影響は観察されなかった。p-NPPase 活性においても水和時間の違いによる顕著な影響は観察されなかった。

このことから、時間に依存した活性抑制は、シスプラチンの水和による構造変化に要する時間ではなく、Na,K-ATPase とシスプラチンの結合に要する時間によるものと推定された。

#### 【結論】

Na,K-ATPase 反応において  $K^+$ 同族体や  $NH_4^+$ は  $K^+$ 同様の役割を担うが、 $Li^+$ のみは  $K^+$ と  $Na^+$ の中間的な役割を担うイオンであること、シスプラチンはこれらのイオンに依存した Na,K-ATPase による活性を  $K^+$ の場合と同様に抑制することを明らかにした。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則  
副 査 教 授 鈴 木 邦 明  
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

## ウサギ脳 Na, K-ATPase に対する カリウム同族体とシスプラチンの作用

Na, K-ATPase は動物細胞の形質膜に存在しており、ATP の加水分解エネルギーを用いて  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  を能動輸送し、その濃度勾配を維持する酵素である。Na, K-ATPase の反応機構は、Post-Albers の機構として知られている。まず、Na, K-ATPase は ATP と結合した後に ADP を放出し、リン酸化反応中間体: (Na)E1P を形成する。E1P は  $\text{Na}^+$  を細胞外へ放出した後に  $\text{K}^+$  に親和性の高い E2P となる。 $\text{K}^+$  が存在しない場合には、E2P はゆっくりと加水分解されて  $\text{P}_i$  を遊離する Na-ATPase と呼ばれる部分反応を示す。 $\text{K}^+$  が存在すると E2P に結合して脱リン酸化の速度を 10 倍程度増加する。 $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  が存在した状態が Na, K-ATPase 活性である。 $\text{K}^+$  と結合した酵素は KE2 と呼ばれ、この状態ではパラニトロフェニルリン酸を分解する部分反応 (以下 p-NPPase) を示す。

Na, K-ATPase 反応において、 $\text{K}^+$  同族体である  $\text{Li}^+$ 、 $\text{Rb}^+$ 、 $\text{Cs}^+$ 、ならびに  $\text{K}^+$  類似作用を持つ  $\text{NH}_4^+$  は、 $\text{K}^+$  と同様の作用を示すが詳細については明らかではない。 $\text{Li}^+$  については、部分的に  $\text{Na}^+$  類似作用を示すという報告もある。Na, K-ATPase は  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の輸送に関与しているが、必要な場合は微量元素の輸送を行いその生理機能あるいは解毒などに関与する可能性もあると考えられている。そこで、本研究ではこれらの点について詳細に検討した。また、シスプラチンによる腎毒性は Na, K-ATPase 活性の抑制が一因との報告もあり、シスプラチンが Na, K-ATPase 活性を抑制することも知られている。しかし、 $\text{K}^+$  同族体や  $\text{NH}_4^+$  による ATPase 活性ならびに p-NPPase 活性におけるシスプラチンの作用についての報告はみられないことから本研究を行った。

酵素は、Jorgensen の方法で精製したウサギ脳の Na, K-ATPase を用いた。ATPase

活性は、加水分解の結果生じたリンを定量し、*p*-NPPase 活性は酵素反応の結果生じたパラニトロフェノールを定量し活性を測定した。

反応機構のなかで  $K^+$  は脱リン酸化の促進により活性速度を増加する。そこで  $K^+$ 、 $Li^+$ 、 $Rb^+$ 、 $Cs^+$  と  $NH_4^+$  の ATPase 活性に対する効果を調べたところ、程度の差はあるもののいずれも活性化効果を示した。次に、これらのイオンが  $K^+$  存在下でも相加的に活性を増加できるか否かを調べたが、いずれも増強効果はなかった。この結果から、 $K^+$  と同様の機構で ATPase を活性化するものと考えられた。次に各イオンの濃度依存性に関する実験を行ったところ、いずれのイオンもその濃度に依存して ATPase 活性を促進したが、最大活性化レベルと Na, K-ATPase に対する親和性はイオンによって異なっていた。

$K^+$  同族体と  $NH_4^+$  が *p*-NPPase 活性においても、 $K^+$  と同様の役割を担えるのかを調べたところ、 $Li^+$  以外のイオンでは活性化効果がみられた。

$K^+$  非存在下の Na-ATPase 活性における  $Na^+$  を他のイオンに置き換えても活性はみられなかったが、 $Li^+$  だけはその濃度に依存して活性を促進した。

Na, K-ATPase 反応の  $K^+$  の代わりに  $K^+$  同族体および  $NH_4^+$  を用いた ATPase 活性や *p*-NPPase 活性ならびに、 $Na^+$  および  $Li^+$  による ATPase 活性に対するシスプラチンの効果も調べたが、いずれもシスプラチンの濃度に依存して活性は抑制された。これらの結果は、シスプラチンが輸送するイオンにかかわらず、Na, K-ATPase の機能を阻害することを示唆するものである。

これまでの実験でシスプラチンによる活性の抑制は、シスプラチンの濃度だけではなく、シスプラチンと Na, K-ATPase のプレインキュベーションの時間にも依存していた。シスプラチンはその構造中の塩素が、水または水酸基へ変化して抗腫瘍効果を示すといわれており、その変化は時間に依存すると考えられている。そこで、シスプラチンによる活性抑制が、シスプラチンの構造変化によるものか、時間に依存したものかを確認することを目的として水和時間の違いによる Na, K-ATPase 活性ならびに *p*-NPPase 活性への効果を調べたが、水和時間の違いは観察されなかった。このことから、時間に依存した活性抑制は、シスプラチンの水和による構造変化に要する時間ではなく、Na, K-ATPase とシスプラチンの結合に要する時間によるものと推定された。

以上より、Na, K-ATPase 反応において  $K^+$  同族体や  $NH_4^+$  は  $K^+$  と同様の役割を担うが、 $Li^+$  のみは  $K^+$  と  $Na^+$  の中間的な役割を担うイオンであること、シスプラチンはこれらのイオンに依存した Na, K-ATPase による活性を  $K^+$  の場合と同様に抑制することを明らかにした。