

Aluminium-dependent inhibition of Na, K-ATPase activity by fluoride

(フッ素によるアルミニウムに依存した Na, K-ATPase 活性の抑制)

学位論文内容の要旨

【目的】

う蝕予防に使用されるフッ化物はその毒性が問題とされるが、急性毒性の機構に関しては不明な点が多い。フッ素 (F) は動物細胞に普遍的に存在して細胞機能の調節に関与する Na, K-ATPase を阻害する。そこで、Na, K-ATPase が F による急性毒性のターゲットである可能性を考えて、F の Na, K-ATPase 活性阻害機構を検討した。

【材料と方法】

ブタ腎臓膜分画の Na, K-ATPase を用いて、種々条件下での ATPase 活性に対する NaF 及び KF の作用を調べた。ATPase 活性は、生じた無機リンを Chifflet 法により定量して測定した。

【結果と考察】

1. フッ素による Na, K-ATPase の ATP 加水分解活性阻害におけるカリウム要求性：

NaF は K^+ 非存在下の Na-ATPase 活性を抑制しなかったが、 K^+ 存在下の Na, K-ATPase 活性を KF と同様の濃度依存性で抑制した。また、KF は 1.5 mM までは Na-ATPase 活性を 10 倍程度促進したが、2.5 mM では逆に減少に転じた。この結果は、1.5 mM までは、F による活性阻害よりも、KF が解離して生じた K^+ による Na, K-ATPase 活性としての ATP 加水分解活性 (ATPase 活性) 促進が上回ること、2.5 mM になると K^+ による ATPase 活性の促進効果は上限に達し、F による ATPase 活性抑制効果が顕著になることを示唆する。これらの結果は、F は Na, K-ATPase による K^+ の関与する Na, K-ATPase 活性は抑制するが、Na-ATPase 活性は抑制しないことを示唆する。F は Na, K-ATPase の ATP 加水分解反応中の K^+ が結合

した反応中間体に結合して Na,K-ATPase 活性を抑制するものと推測される。

2. フッ素による Na,K-ATPase 活性阻害のアルミニウム要求性：

NaF 及び KF による Na,K-ATPase 活性阻害の $K_{i0.5}$ 値は共存する Al の濃度に依存して 2 μ M から 100 μ M までは減少したが、100 μ M では効果は飽和して 400 μ M まで Al 濃度を上げてても $K_{i0.5}$ 値はほぼ一定であった。この結果は、Al が Na,K-ATPase の F に対する親和性を増大することを意味する。

一方、Al は F による Na,K-ATPase 活性阻害を不可逆的にする上で有効であった。また、Al のキレーターである deferoxamine の共存により不可逆的な阻害は観察されなかった。これらの結果は、F は Al と結合して、すなわち、フッ化アルミニウム (AlF_3) として高い親和性で Na,K-ATPase に結合し、ひとたび結合すると解離しにくいいため不可逆的に Na,K-ATPase 活性を抑制する、として説明することが出来る。Robinson らは、 AlF_3 の立体構造は P_i の立体構造に類似しており、 AlF_3 は Na,K-ATPase の反応中に形成されるリン酸化反応中間体の P_i の類似体として結合すると推定している。また、この反応にはリン酸化反応中間体の形成の場合と同様に Mg の存在が必要であると報告した。

本研究においても、F と Al による不可逆的な阻害には Mg の存在が必要であり、しかもその濃度依存性は Na,K-ATPase のリン酸化反応中間体形成における Mg 依存性と類似していた。この Mg の役割は同程度の濃度の Ca や Mn によって置き換えが可能であった。しかし、本来の Na,K-ATPase のリン酸化反応中間体形成あるいは Na,K-ATPase 活性における Mg の役割は、部分的にしか Ca や Mn によって置き換えることはできず、場合によっては Ca や Mn は Mg の作用と拮抗する。

また、Robinson らは、 AlF_3 が P_i と同様に作用することを示す実験結果として、F と Al による不可逆的な Na,K-ATPase 活性の抑制が P_i の存在によって阻害されると報告しているが、我々の結果では P_i の添加は不可逆的な阻害に影響を与えなかった。我々の結果は、多くの点で Robinson の報告と一致するが異なる点も多く、Na,K-ATPase の反応機構を基にした今後の研究が必要である。

NaF あるいは KF の Na,K-ATPase 活性阻害実験において、積極的には Al を添加していないのに F の濃度に依存した活性の低下が観察された。これは、ガラス器具、使用する水や試薬などから混入する Al の作用として考えることが出来る。しかし、deferoxamine 存在下でも濃度依存的な活性抑制を完全に押さえることは出来なかった。deferoxamine は鉄及び Al のキレーターとされているが、我々の実験系において、混入する Al のうちどの程

度が遊離 Al として存在するのかを検討する必要がある。

一方、希釈実験においては、deferoxamine はほぼ完全な効果を示した。両者の違いについては、F の Na, K-ATPase 活性阻害を不可逆にするには Al のみが有効であるが、活性を可逆的に抑制するだけなら Al は必要ではない、あるいは Al 以外の金属イオンでも代用できると説明することも可能性であろう。Robinson らはベリリウムも Al と類似した、しかし完全に同じではない作用を示すと報告しており、今後の詳細な研究が必要である。

3. フッ素の毒性とアルミニウムの生体に対する作用：

NaF の経口投与による致死量は 5 g 程度とされている。100 % 吸収したとし、全血液量を 5 l と仮定して血中濃度を計算すると 23.8 mM となる。今回の活性阻害実験においては積極的に Al を添加しなくても 2.5 mM の F によって Na, K-ATPase 活性はほぼ完全に抑制される。さらに、生体に広く存在するとされる Al が共存すると、1 mM の NaF によってもほぼ完全に阻害される。組織内濃度は血中濃度よりはかなり低いと予想されるが、ほぼすべての細胞に存在し重要な機能を担う Na, K-ATPase が急性毒性のターゲットとなる可能性は十分あると考えられる。

Al は自然界に広く存在する元素である。生体にも広く存在するとされているが必須の微量元素とは考えられていない。生体内分布の測定は極めて困難とされ、その機能あるいは病態における作用も明らかではない。骨疾患、貧血、認知症、骨格筋疾患を悪化させるとの記載もあるが、詳細は不明である。本研究において、Al は 2 μ M という低濃度でも作用した。Al の生体内における作用に関連する可能性があり、新たな研究が必要である。

【結論】

フッ素による Na, K-ATPase 活性阻害にはカリウムが必要であり、アルミニウムは Na, K-ATPase のフッ素に対する親和性を増大する。フッ素による Na, K-ATPase 活性の不可逆的な阻害にはアルミニウムと 2 価金属イオンが必要である。フッ素とアルミニウムの複合体は 2 価金属存在下で Na, K-ATPase に不可逆的に結合して、ATPase 活性を阻害することを示唆する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 船 橋 誠

学 位 論 文 題 名

Aluminium-dependent inhibition of Na, K-ATPase activity by fluoride

(フッ素によるアルミニウムに依存した Na, K-ATPase 活性の抑制)

審査は、全審査委員出席のもと行い、まず学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

う蝕予防に使用されるフッ化物はその毒性が問題とされるが、急性毒性の機構に関しては不明な点が多い。フッ素 (F) は動物細胞に普遍的に存在して細胞機能の調節に関与する Na, K-ATPase を阻害する。そこで、Na, K-ATPase が F による急性毒性のターゲットである可能性を考えて、F の Na, K-ATPase 活性阻害機構を調べることを目的に本研究を行った。

実験には、ブタ腎臓膜分画の Na, K-ATPaseを用いて、種々条件下での ATPase 活性に対する NaF 及び KF の作用を調べた。ATPase 活性は、生じた無機リンを Chifflet 法により定量して測定し、以下のような結果を得た。

1. F による Na, K-ATPase の ATPase 活性阻害におけるカリウム (K) 要求性 :

NaF は K^+ 非存在下の Na-ATPase 活性を抑制しなかったが、 K^+ 存在下の Na, K-ATPase 活性を KF と同様の濃度依存性 ($K_{i0.5}=1.4$ mM) で抑制した。また、KF は 1.5 mM までは Na-ATPase 活性を 10 倍程度促進したが、2.5 mM では逆に減少に転じた。この結果は、1.5 mM までは、F による活性阻害よりも、KF が解離して生じた K^+ による ATPase 活性促進が上回ること、2.5 mM になると F による ATPase 活性抑制効果が顕著になることを示唆する。これらの結果は、F は Na, K-ATPase による K^+ の関与する Na, K-ATPase 活性は抑制するが、Na-ATPase 活性は抑制しないことを示唆する。

2. Fによる $K_{i0.5}$ 値のアルミニウム (Al)濃度に依存した減少 :

NaF 及び KF による Na, K-ATPase 活性阻害の $K_{i0.5}$ 値は、共存する Al の濃度に依存して 2 μ M から 100 μ M まで減少した。一方、Al のキレーターである

deferoxamine の共存により $K_{i0.5}$ 値は増加した。この結果は、Al が Na, K-ATPase の F に対する親和性を増大することを示唆する。

3. F による不可逆的な Na, K-ATPase 活性阻害の Al 要求性：

Al は F による Na, K-ATPase 活性阻害を不可逆的にする上で有効であった。また、deferoxamine の共存により不可逆的な阻害は観察されなかった。これらの結果は、F は Al と結合して高い親和性で Na, K-ATPase に結合し、ひとたび結合すると解離しにくいため不可逆的に Na, K-ATPase 活性を抑制する、として説明することが出来る。

4. F と Al による不可逆的な Na, K-ATPase 活性阻害の 2 価金属イオン要求性：

F と Al による不可逆的な阻害には マグネシウム (Mg) の存在が必要であり、その濃度依存性は Na, K-ATPase のリン酸化反応中間体形成における Mg 依存性と類似していた。この Mg の役割は同程度の濃度の カルシウム (Ca) やマンガン (Mn) によって置き換えが可能であった。しかし、本来の Na, K-ATPase 活性における Mg の役割は、部分的にしか Ca や Mn によって置き換えることはできず、場合によっては Ca や Mn は Mg の作用と拮抗する。Na, K-ATPase の反応機構を基にした今後の研究が必要である。

以上の結果をまとめると、F による Na, K-ATPase 活性阻害には K が必要であり、Al は Na, K-ATPase の F に対する親和性を増大する。F による Na, K-ATPase 活性の不可逆的な阻害には Al と 2 価金属イオンが必要である。F と Al の複合体は 2 価金属存在下で Na, K-ATPase に不可逆的に結合して、ATPase 活性を阻害することを示唆する。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容ならびにそれに関連のある学術について口頭により質疑および試問が行われた。主な試問内容としては、

- 1) 活性測定時の反応液の、Na、K、Mg イオンの濃度の決定理由
- 2) Hill プロットの解釈、特に Hill 係数について
- 3) F による阻害を不可逆的にするのに必要な 2 価金属イオンと、Na, K-ATPase 活性の発現に必要な 2 価金属イオンとの関係について
- 4) Al と F の生体毒性に関する見解
- 5) 開業臨床医として、う蝕予防のための F の使用を、今回の研究成果をもとにどのように考えるか

などがあり広範囲にわたった。いずれの質問に対しても学位申請者から適切かつ明快な回答が得られた。また、今後の研究の方向性と将来の展望などについても明確な方針が示された。

本論文の内容は高いレベルにあり、今後のこの分野の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。加えて、試問の結果より学位申請者は専攻分野の専門領域のみならず関連分野についても十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士(歯学)の学位を授与されるのにふさわしいと認められた。