

学位論文題名

ラット脳カルシウム依存ATPase活性の静脈麻酔薬による抑制

学位論文内容の要旨

緒言

静脈麻酔薬を含む全身麻酔薬の作用機序に関する研究は、生体膜脂質に対する作用を重視するリピド説と、特定の機能性タンパク質に対する作用を重視するタンパク説に大きく分けられるが、そのメカニズムは確定していない。本研究では、Ca, Mg-ATPase 活性に対するpropofolの作用と、他の静脈麻酔薬としてpentobarbitalとthiopentalの作用を調べた。

材料と方法

1. ラット脳からのCa-ATPase 及びCa, Mg-ATPase の部分精製

ラット全脳ホモジェネートを調整し膜分画の部分精製を行った。ラット全脳から得たホモジェネートを二回の遠心を行って得られた沈渣を膜分画とした(P I)。また、同様にして得られたホモジェネートを、Pottorf の方法に従って形質膜(P II) 及びミクロソーム(P III) 分画に部分精製した。

2. ATPase 活性の測定

Ca-ATPase 活性及びCa, Mg-ATPase 活性は、ATP 加水分解の結果生成された無機リン量をChifflet法に従って分光光度計を用い850nmで測定した。

3. ウエスタンブロッティングによるPMCA (plasma membrane Ca-ATPase) の検出

発現タンパク質の解析のため、通法に従い電気泳動を行った。1次抗体としてウサギ由来の抗PMCA1~3 及びマウス由来の抗PMCA4抗体を、2次抗体としてPMCA1~3にはヤギ由来抗ウサギIg-HRPを、PMCA4にはウサギ由来抗マウス Ig1-HRPを用いた。ウエスタンブロッティングは、SDS-PAGE ゲル中のタンパク質をPVDF 膜に転写することによって行った。ペルオキシダーゼ反応はWestern Lighting Plus-ECLを用い、発光をフィルムへの感光によって検出した。

結果

1. ラット脳膜分画Ca-ATPase に対するpropofol の作用

Ca-ATPase 活性は、Ca 濃度に依存して増加し1 mM でほぼ飽和した。Ca-ATPase 活性に対するpropofolの影響を調べるところ、濃度に依存してCa-ATPase 活性を阻害した。

が、1.03 mM でも完全には阻害せず、30%以上活性が残存した。

種々濃度の propofol 存在下での Ca-ATPase 活性の Ca 濃度依存性を調べ、Lineweaver-Burk の二重逆数プロットを行った。Vmax は、propofol 濃度が上昇するにつれて低下した。Km は propofol 濃度 0.4 mM まではほぼ一定であったが、それ以上の濃度では低下した。

2. 形質膜分画とミクロソーム分画の Ca で活性化される ATPase 活性の相違

Pottorf の方法に従って PII と PIII の分画を得て、ウエスタンブロッティングを行ったところ、いずれも PMCA のアイソザイムである 1~4 を含むことを確認した。次に 2 mM Mg 存在下での ATPase 活性の Ca 濃度依存性を調べたところ PII、PIII とも Ca の濃度に依存して活性は増加し、100 μ M で最大となった。PII、PIII とも PMCA 阻害剤である vanadate および SERCA (sarcoendoplasmic reticulum Ca-ATPase) 阻害剤である thapsigargin の濃度に依存して活性は抑制された。PII、PIII の Ca, Mg-ATPase 活性の pH 依存性を調べたところ両活性とも中性 pH で最大活性を示した。

3. ラット脳 Ca, Mg-ATPase 活性に対する静脈麻酔薬の作用

Propofol は低濃度で PII の活性をわずかに増加させたが、高濃度では抑制に転じた。PIII は propofol 濃度に依存して活性が低下した。PII、PIII とも 1.05 mM では完全に活性を抑制した。Pentobarbital と thiopental はいずれも濃度に依存して PII、PIII の Ca, Mg-ATPase 活性を抑制した。

考察

1. ラット脳 Ca-ATPase 活性の propofol による阻害様式

Propofol は濃度に依存して PI の Ca-ATPase 活性を阻害したが、1.03 mM でも完全には阻害せず、30%以上活性が残存した。この結果はこの Ca-ATPase が均一では無いことを示唆する。種々濃度の propofol 存在下で Ca-ATPase 活性の Ca 濃度依存性を調べたところ、Vmax は propofol 濃度に依存して低下し、Km も高濃度の propofol で減少した。長谷らは propofol は混合阻害の様式で Na, K-ATPase 活性を抑制すると結論し、50% 阻害濃度は 0.26 mM であり今回の Ca-ATPase の場合に類似していた。これらの結果は propofol は膜分画に存在する ATPase を類似した様式で阻害することを示唆する。

2. ラット脳の Ca, Mg-ATPase 活性の静脈麻酔薬による阻害

ウエスタンブロッティングによりいずれも PMCA の 1~4 のアイソザイムを含んでいた。また、ATPase 活性の Ca 濃度依存性と pH 依存性は Ca, Mg-ATPase の特徴を示した。さらに、vanadate と thapsigargin によって阻害されたことは、PII と PIII はいずれも PMCA と SERCA の混合であることを示す。一方、Mg-ATPase 活性の pH 依存性は PII と PIII で異なったことから、PII と PIII は性質の異なる分画であると考えた。

PⅡと PⅢの Ca, Mg-ATPase 活性に対する propofol、pentobarbital、thiopental の作用を調べたところ、いずれの麻酔薬も濃度に依存して Ca, Mg-ATPase 活性を抑制した。50%阻害濃度は、Na, K-ATPase に対する 50%阻害濃度と類似していた。これらの結果は、propofol、pentobarbital 及び thiopental は、類似した機構で Ca, Mg-ATPase 及び Na, K-ATPase 活性を抑制することを示唆する。

3. 臨床的な propofol 濃度との比較

臨床的に麻酔状態を得るために必要な propofol 濃度はヒト血清で8~180 μ Mと様々な報告がある。これらの濃度では ATPase 活性を完全に阻害するにはいたらないことから、ATPase は全身麻酔薬の作用には関係しないと評価されることが多い。しかし、薬物の作用が起こる用量で作用点となるタンパク質の機能が完全に抑制される必要はないと考えられ、propofol による Ca, Mg-ATPase 活性の阻害が麻酔作用に関与する可能性があると考えられる。

結論

Propofol、pentobarbital 及び thiopental は Na, K-ATPase 活性阻害と類似した濃度と様式で Ca-ATPase 活性及び Ca, Mg-ATPase 活性を阻害したことから、これらの麻酔薬の直接の作用点は生体膜であり、その作用の結果として膜タンパク質の機能に影響を与えたものと推測した。

学位論文審査の要旨

主査	特任教授	福島和昭
副査	教授	鈴木邦明
副査	教授	船橋誠

学位論文題名

ラット脳カルシウム依存ATPase活性の静脈麻酔薬による抑制

審査は審査担当者が一同に会して約 1 時間半かけて行った。まず申請者に本論文の概要の説明を求め、口頭試問形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

【緒言】 静脈麻酔薬を含む全身麻酔薬の作用機序に関する研究は、生体膜脂質に対する作用を重視するリピド説と、特定の機能性タンパク質に対する作用を重視するタンパク説に大きく分けられるが、そのメカニズムは確定していない。本研究では、Ca, Mg-ATPase 活性に対する propofol の作用と、他の静脈麻酔薬として pentobarbital と thiopental の作用を調べた。

【材料と方法】 ラット全脳のホモジェネートを調整し膜分画の部分精製を行った。ラット全脳から得たホモジェネートを二回の遠心を行って得られた沈渣を膜分画とした (P I)。また、同様にして得られたホモジェネートを、Pottorf の方法に従って形質膜 (P II) 及びミクロソーム (P III) 分画に部分精製した。Ca-ATPase 活性及び Ca, Mg-ATPase 活性は、ATP 加水分解の結果生成された無機リン量を Chifflet 法に従って分光光度計を用い 850 nm で測定した。ウエスタンブロッティングによる PMCA の解析は、通法に従い電気泳動を行った。ペルオキシダーゼ反応は Western Lighting Plus-ECL を用い、発光をフィルムへの感光によって検出した。

【結果・考察】

Propofol は濃度に依存して P I の Ca-ATPase を阻害したが、1.03 mM でも完全には阻害せず、30%以上活性が残存した。この結果はこの Ca-ATPase が均一では無いことを示唆する。種々濃度の propofol 存在下で Ca-ATPase 活性の Ca 濃度依存性を調べたところ、 V_{max} は propofol 濃度に依存して低下し、 K_m も高濃度の propofol で減少した。

ウエスタンブロッティングにより PII と PIII はいずれも PMCA の 1～4 のアイソザイムを含んでいた。また、ATPase 活性の Ca 濃度依存性と pH 依存性は Ca, Mg-ATPase の特徴を示した。さらに、vanadate と thapsigargin によって阻害されたことから、PII と PIII はいずれも PMCA と SERCA の混合であることを示す。一方、Mg-ATPase 活性の pH 依存性は PII と PIII で異なったことから、PII と PIII は性質の異なる分画であると考えた。

PII と PIII の Ca, Mg-ATPase 活性に対する propofol、pentobarbital、thiopental の作用を調べたところ、いずれの麻酔薬も濃度に依存して Ca, Mg-ATPase 活性を抑制した。Propofol は低濃度で PII の活性をわずかに増加させたが、高濃度では抑制に転じた。PIII は propofol 濃度に依存して活性が低下した。PII、PIII とともに 1.05 mM では完全に活性を抑制した。Pentobarbital と thiopental はいずれも濃度に依存して PII、PIII の Ca, Mg-ATPase 活性を抑制した。50%阻害濃度は、Na, K-ATPase に対する 50%阻害濃度と類似していた。これらの結果は、propofol、pentobarbital 及び thiopental は、類似した機構で Ca, Mg-ATPase 及び Na, K-ATPase 活性を抑制することを示唆する。

臨床的に麻酔状態を得るために必要な propofol 濃度はヒト血清で 8～180 μ M と様々な報告がある。これらの濃度では ATPase 活性を完全に阻害するにはいたらないことから、ATPase は全身麻酔薬の作用には関係しないと評価されることが多い。しかし、薬物の作用が起こる用量で作用点となるタンパク質の機能が完全に抑制される必要は無いと考えられ、propofol による Ca, Mg-ATPase 活性の阻害が麻酔作用に関与する可能性はあると考えられる。

各審査委員が行った主な質問は、以下の通りである。

- 1) GABA_A 受容体の働きとその機序について
- 2) 生体内での Ca 濃度と今回の実験での Ca 濃度との違いについて
- 3) Ca, Mg-ATPase の阻害剤について
- 4) propofol の代謝について
- 5) Ca, Mg-ATPase の阻害が麻酔状態に与える影響について
- 6) 本研究の今後の方向性について。

これらの質問に対して、論文申請者から明快な回答と説明が得られ、さらに今後の研究の発展性についても明確な計画を持っていると判定した。

審査委員は全員、本研究が学位論文として十分値し、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。