局所麻酔薬、ジブカインの Na^+ , K^+ 輸送 ATP 分解酵素に対する影響

工 藤 元 義

北海道大学歯学部口腔外科学第一講座 (指導 富田喜内教授)

北海道大学歯学部歯科薬理学講座 (指導 飯田正一教授)

[受付 : 昭和60年9月3日]

Dibucaine induced changes in Na^+ , K^+ -ATP ase : Influence on the interaction between substrates and enzyme

Motonori Kudoh

*Department of Oral Surgery I, School of Dentistry, Hokkaido
University, Nishi 7, Kita, 13, Kitaku, Sapporo, 060*

(Director : Prof. Kinai Tomita)

*Department of Pharmacology, School of Dentistry, Hokkaido
University, Nishi 7, Kita 13, Kitaku, Sapporo, 060*

(Director : Prof. Shoich Iida)

[Accepted for publication : September 3, 1985]

Key words : Na^+ , K^+ -dependent ATPase, local anesthetics, dibucaine

Abstract : Na^+ , K^+ -dependent ATPase is an intrinsic enzyme embeded in the plasma membranes. The function of the enzyme is to replace intracellular sodium ions with extracellular potassium ions using the free energy of ATP hydrolysis in animal cells. In this paper, the effect of dibucaine (D) on the enzyme was investigated. The p-NPPase and Na^+ , K^+ -ATPase activities of the enzyme were measured in various concentrations of D. The apparent affinities of the D-treated enzyme for ATP, Na^+ , Mg^{2+} and K^+ were examined. Low concentrations of D inhibited the enzyme slightly, whereas higher concentrations inhibited the enzyme greatly. The apparent affinities of the enzyme for ATP, Mg^{2+} and K^+ were changed by the treatment with high concentrations of D. The apparent affinity for K^+ was only slightly changed by the treatment with low concentrations of D. The enzyme treated with high concentrations of D in the presence of K^+ was shown to be slightly inhibited with the increase in the apparent affinity for ATP.

The results were as follows : D is bound to the enzyme and causes a decrease in the p-NP-Pase and Na^+ , K^+ -ATPase activities. At least two apparently different D-binding sites, high and low exist. K^+ inhibits D-binding to low-affinity sites. The inhibitory effects of D is possibly due to interference with the interaction between the enzyme protein and the phospholipids.

緒 言

細胞内液の K^+ 濃度は、細胞外液よりはるかに高く、逆に細胞内液の Na^+ 濃度は、細胞外液より著しく低くなっている。このようなカチオンの

不均一な分布は、いくつかの重要な生理機能の発現に不可欠なものであり、この濃度勾配が生体内で維持されているのは、濃度勾配に逆らったカチオン輸送系が存在するためである。この Na^+ を汲み出し K^+ を汲み入れるカチオンの能動輸送系は、 Na^+ ポンプと呼ばれ、本体は細胞内外にまたがり、細胞膜に埋め込まれている Na^+ , K^+ 輸送

ATP 分解酵素 (Na^+ , K^+ -ATPase)である¹⁻¹⁰⁾。

局所麻酔薬は、過去一世紀にわたり広く使われてきた¹¹⁾。最近の神経生理学、薬理学の進歩に伴い作用機序の解明も進み、局所麻酔薬は細胞膜と反応し、伝導阻害を発生すると考えられている^{12,13)}。しかしこの分子機構の詳細は未だ不明である。そこで局所麻酔薬の作用機構を分子レベルで理解する為の一手段として、細胞膜に存在し、 Na^+ と K^+ の能動輸送を行う Na^+ , K^+ -ATPase に対する局所麻酔薬ジブカイン (以下Dと略す) の作用を解析することを試みた。

Na^+ , K^+ -ATPase は、1957年 Skou¹⁴⁾ によって、カニの末梢神経ミクロソーム分画に初めて見出された。それ以来、脳、腎臓、赤血球など、 Na^+ と K^+ の能動輸送を行う生体膜に分布し¹⁵⁾、生理学的には、細胞膜の内側に存在する1分子のATPの加水分解と共役し、3分子の Na^+ を細胞外に、2分子の K^+ を細胞内に輸送していることが知られている^{1-10,16-18)} (Fig. 1)。この酵素は、 Mg^{2+} , Na^+ 及び K^+ の三者が共存するとき最大の活性を示し¹⁴⁾、強心配糖体によって細胞外部から特異的に阻害される¹⁻¹⁰⁾。

Na^+ , K^+ -ATPase の反応機構は、酵素タンパクのアスパラギン酸残基が ATP によってリン酸化されたリン酸化反応中間体 (以下 EP と略す) の発見により、その詳細が研究され、その結果 Albers, Post らの反応仮説が広く認められている¹⁻¹⁰⁾。この反応仮説を簡単に模式化したものを Fig. 2 に示してある。

Na^+ , K^+ -ATPase は、ATP と Na^+ に親和性を持つ分子形態 E_1 及び Pi と K^+ に親和性を持

Fig. 1 Scheme of the sodium ion pump in the plasma membranes of animal cells. (Reproduced from reference 45)

つ分子形態 E_2 の二つの分子形態 (コンフォメーション) をとることが知られている^{1-10,19-28)}。酵素分子が、 Na^+ 及び Mg^{2+} の存在下で ATP によりリン酸化されると、 NaE_1P が形成される²⁹⁾。 NaE_1P から細胞外へ Na^+ を遊離し、 E_2P が形成される^{29,30)}。 E_2P が細胞外 K^+ と結合し続いて脱リン酸化され KE_2 が形成される³⁰⁾。 KE_2 が ATP と結合すると、 KE_1ATP が形成され、 KE_1ATP が細胞内 Na^+ と結合し、 K^+ を細胞内へ遊離することにより反応のサイクルが一回転する^{8-10,21)}。 KE_2 が先に細胞内 Na^+ と結合すると、 KE_2 から NaE_1 が形成され、 K^+ を細胞内へ遊離することになる。すなわち、酵素は NaE_1P

Fig. 2 Hypothetical reaction sequence of Na^+ , K^+ -ATPase.

より $E_2 P$ のステップで Na^+ を細胞外へ遊離し, KE_1 , ATP から NaE_1 ATP 又は KE_2 から NaE_1 形成のステップで K^+ を細胞内へ遊離する¹⁻¹⁰⁾。

ここで, KE_2 は合成基質であるパラニトロフェニルリン酸 (以下 PNPP と略す) を Mg^{2+} 存在下で加水分解 (K 依存 pNPPase) することが知られている^{1-6,8-10,31,32)}。この K 依存 pNPPase (以下 PNPPase と略す) 反応は, 測定が容易であり, 反応過程を直接肉眼で観察することができる。さらに, この反応系中に ATP が共存すると, KE_2 より KE_1 ATP が形成され又 Na^+ が反応系中に存在すると, KE_2 から NaE_1 が形成されるため, 共に反応が阻害される。 Na^+ と ATP の共存下では, NaE_1 ATP が形成され, 続いて $NaE_1 P$ 次ぎに $E_2 P$ が形成され, 新たに KE_2 が形成されるために反応が活性化される^{1,31,34)}。このように, PNPPase 反応は, 全反応である Na^+ , K^+ -ATPase 反応の全ての基質により活性の調節を受ける。

本研究は, 細胞膜から高度に精製した Na^+ , K^+ -ATPase に及ぼす D の作用を解析するため, Na^+ , K^+ -ATPase の部分反応である PNPPase を用いることにより行った。

材料及び方法

使用した Na^+ , K^+ -ATPase は, 林³⁵⁾らの方法により, 豚の腎臓のヘンレの係蹄部から精製したものである。精製した酵素の ATPase 活性は, 4.0mM ATP, 5.0mM $MgCl_2$, 16mM KCl, 160mM NaCl, 60mM Imidazol-HCl 存在下, pH 7.4, 37°C において, 500~700 μ mol/mg・protein/h であった。

蛋白量の定量は, 牛アルブミンをスタンダードとして, Bradford の方法³⁶⁾で行った。

PNPP 加水分解反応は, 37°C, pH 7.4, 60mM Imidazol-HCl 緩衝液中で行い, 最終反応液は, 0.7ml とした。酵素蛋白量は, 1.0~7.5 μ g 使用し, 基質濃度は, 40mM KCl, 10mM $MgCl_2$, 16mM PNPP とした。これら基質濃度は, KCl, $MgCl_2$, PNPP の三基質のうち, 二基質の濃度を固定し, 残る一基質の濃度依存性を調べることに由り決定した。

Fig. 3 A working hypothesis of PNPP hydrolysis. k' , k'' , K_1 and K_2 are dissociation constants for corresponding partial reactions. The step of PNPP hydrolysis with rate constant k_3 is assumed to be irreversible and other steps are assumed to be in rapid equilibrium.

PNPPase 活性の測定は, pH 7.4 Imidazol-HCl 緩衝液と酵素の混合液を 37°C 5 分間プリインキュベーションした後, 基質である K^+ , Mg^{2+} , PMPP を加え反応を開始し, 反応に直線性のある時間内に 4% SDS・2.5% Na_2CO_3 ・2% Tris (2:1:1) の混合液を 1ml 加え反応を停止することにより行った。ブランクは, 同一条件で酵素を含まないものとした。

PNPPase 活性は, PNPP の加水分解により遊離した PNP の量とし, 1mM PNP が 420nm 吸光度 13.3 を示すことにより定量した。

Na^+ , K^+ -ATPase 反応は, 37°C, pH 7.4, 60mM Imidazol-HCl 緩衝液中で行い, 最終反応液は 0.2ml とし, 使用した酵素蛋白量は, 0.28 μ g である。基質濃度は, 5mM $MgCl_2$, 16mM KCl, 160mM NaCl, 4mM ATP とした。

Na^+ , K^+ -ATPase 活性の測定は, pH 7.4, 60mM Imidazol-HCl 緩衝液と酵素の混合液を 37°C, 5 分間プリインキュベーションし, 基質を加え反応を開始し, 一定時間後 10% Trichloroacetic acid を 0.2ml 加え反応を停止し, ATP から遊離した無機リンの量を Martin-Doty 法³⁷⁾にて定量して求めた。ブランクは, 同一条件で, ウバイン (強心配糖体) 添加酵素のものとした。

反応測定は、反応曲線が直線を与えるような観測時間域で行った。

ジブカイン処理（以下D処理と略す）は、pH 7.4, 60mM Imidazol-HCl 緩衝液と酵素液中に、Dを0～1mM 加え37°C 5分間プリインキュベーションすることにより行った。ここで、Dを反応開始する基質液中にも加え、処理濃度と最終反応条件でのD濃度は一致させた。

Mg^{2+} と PMPP に対する酵素の見掛けの解離定数は、PNPP の加水分解反応が Mg^{2+} と PNPP をランダムに結合し、Fig. 3 に示した機構³¹⁾ であるとされていることより、40mM KCl 存在下で、 Mg^{2+} と PNPP 濃度を広く変えた時の PNPPase 活性から Cornish-Bowden の direct linear plot³³⁾ をコンピューターを用いて求めた³⁴⁾。 Na^+ ポンプの他の基質である ATP 及び Na^+ に対する見掛けの親和性は、PNPPase に及ぼすそれらの阻害効果から推定した。

試薬及び測定機器

関東化学社製、Disodium p-nitrophenyl phosphate 及び協和発酵社製、ATP Na_2 をそれぞれ Tris 型 Dowex 50W-X4を通し、Tris 塩とした後用いた。ジブカインは、帝国化学産業社の塩酸ジブカイン（製造番号 EEH 51631）を用いた。その他の一般試薬は、関東化学社、和光純薬社の特級試薬を使用し、使用したカチオンは、いずれも Cl^- 型である。分光光度計は、日立 UV-Vis Spectrophotometer 139, 日立701A System photometer, 日立557 Double beam Spectrophotometer を使用した。

結 果

基質濃度の PNPPase 活性に与える効果

PNPPase 活性が最大反応速度（以下、 $V_{\max}$ と略す）を与える Mg^{2+} , K^+ 及び PNPP 濃度を決定するために、三者のうち二者を十分高濃度に保ち、他の濃度を広く変え、イオン強度をコリン塩酸を用いて一定にし活性を測定した。

Fig. 4 は、酵素蛋白量3.3 μg , 10mM MgCl_2 , 16mM PNPP, 60mM Imidazol-HCl 存在下 pH 7.4, 37°C での PNPPase 活性に及ぼす K^+ 濃度

Fig. 4 Dependence of the PNPPase activity on the KCl concentration.

Fig. 5 Dependence of the PNPPase activity on the MgCl_2 concentration.

依存性を示したものである。 K^+ の PNPPase 活性化効果は、単純な Michaelis-Menten タイプとはならず、活性はシグモイダルに増加し、30mM で飽和した。最大活性の半分の活性を与える K^+ 濃度（以下、 $K_{0.5}$ と略す）は、4.0mM であった。 $V_{\max}$ は600 (57.5 $\mu\text{mol}/\text{mg} \cdot \text{protein}/\text{h}$) に達した。

Fig. 5 は、酵素蛋白量3.3 μg , 40 mM KCl, 16mM PNPP, 60mM Imidazol-HCl 存在下 pH 7.4, 37°C での Mg^{2+} 濃度依存性を示したものである。 Mg^{2+} 濃度の増加と共に活性は増加し、10mM でほぼ飽和した。 Mg^{2+} に対する $K_{0.5}$ は 2.2mM であった。

Fig. 6 は、酵素蛋白量3.3 μg , 40 mM KCl, 10mM MgCl_2 , 60mM Imidazol-HCl 存在下 pH 7.4, 37°C での PNPP 濃度依存性を示したものである。PNPP 濃度の増加と共に活性は Michaelis-

Fig. 6 Dependence of the PNPPase activity on the PNPP concentration.

Fig. 7 The effect of dibucaine on the PNPPase activity.

Menten タイプに従い増加し、12mM で飽和した。PNPP に対する $K_{0.5}$ は 2.0mM であった。

これらの結果は、 K^+ が Na^+ ポンプに共同的 (cooperative) に結合すること、しかし PNPP の結合では共同性が存在しないとする報告⁵⁾ と一致した。以下の実験では、10mM Mg^{2+} 、40mM K^+ 及び 16mM PNPP 存在下での活性を標準として、D 有無での実験を行った。

ジブカインの PNPPase 活性と Na^+ , K^+ -ATPase 活性に及ぼす効果

Na^+ , K^+ -ATPase は、存在する基質により異なった分子形態をとることが明らかにされてきている¹⁹⁻²⁸⁾。そこで、酵素を PNPPase 反応に必須の Mg^{2+} と K^+ の有無で、種々の濃度の D で前処理し、PNPP を加え反応を開始し活性を測定した。

Fig. 7 は、D 処理酵素の PNPPase 活性を示したものである。(●) は、 Mg^{2+} と K^+ 非存在下、(○) は、10mM $MgCl_2$ と 40mM KCl 存在下で処理した標品の PNPPase 活性を示している。

Table 1 The effect of ligands on the PNPPase activity of dibucaine-treated enzyme

E	100
E + D	14
E + K + D	76
E + K + Mg + D	74
E + K + PNPP + D	73
E + Mg + D	42
E + Mg + PNPP + D	38
E + PNPP + D	18

K^+ と Mg^{2+} 非存在下で D 処理した標品では、D 濃度の増加と共に活性の強い低下が認められ、D に対する $K_{0.5}$ は 0.35mM で、1.0mM 処理酵素の活性は、約 15% に低下した。 K^+ と Mg^{2+} 存在下で処理した標品では、D に対する $K_{0.5}$ は 2.5mM 以上であり、1.0mM D 処理酵素でも活性は、約 75% 残存していた。すなわち、D は見掛けの上で、 K^+ と Mg^{2+} を結合している酵素には機能的に結合しにくいことを示唆している。

上述の実験で、活性の保護効果が K^+ と Mg^{2+} 共存下で観察された。この保護効果が何によるかを更に詳細に調べたものが、Table 1 に示してある。実験は、酵素液中に K^+ , Mg^{2+} 及び PNPP を単独あるいは組み合わせ添加後、1.0mM D 処理し、残る基質を加え反応を開始することにより行った。その結果、無処理酵素の活性を 100 とすると、基質非存在下で D 処理した酵素の活性は 14 であり、 K^+ 存在下で処理した酵素は、 Mg^{2+} , PNPP の有無に拘わらず 75 前後の活性を示し、 K^+ 非存在、 Mg^{2+} 存在下での活性は PNPP の有無に依存せず 40 前後であり、 K^+ と Mg^{2+} 非存在下では PNPP の有無にほとんど依存しない低い値 18 を示した。従って、先の K^+ と Mg^{2+} 共存下での保護効果は K^+ によって生じるものであり、 Mg^{2+} による付加効果は無く、PNPP はほとんど保護作用を示さないことが明らかにされた。

PNPPase 活性は、D 処理の際に K^+ が存在すると顕著に保護された。そこで、 K^+ の有無で D 処理した標品の Na^+ , K^+ -ATPase 活性を調べた。Table 2 は、1.0mM D 処理酵素の PNPPase 活性と Na^+ , K^+ -ATPase 活性を比較したものである。ここで、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は、反応開始

Table 2 The PNPPase and Na^+ , K^+ -ATPase activity of dibucaine-treated enzyme

	PNPPase	Na^+ , K^+ -ATPase
E	100	100
E + K^+ + D	80	30
E + D	20	2

後10分間における活性値10点を調べ、時間経過と活性発現の割合より求めた。無処理酵素の活性を100とすると、PNPPase 活性は、 K^+ 存在下でD処理した酵素では、約80であり、非存在下で処理したものでは、約20であった。無処理酵素の Na^+ , K^+ -ATPase 活性を100とすると、 K^+ 存在下でD処理したものは約30であり、非存在下では2と低下していた。D処理により酵素の部分反応であるPNPPase 活性が低下し、 K^+ がこれに対して保護効果を示した。しかし Na^+ ポンプの全反応である Na^+ , K^+ -ATPase 反応に対する K^+ の保護効果は低いことが観察された。これらのことは、 Na^+ , K^+ -ATPase 反応におけるDの阻害が、PNPPase 反応以外の部位にも生じていることを示唆している。

ジブカイン処理酵素の基質に対する親和性

前述したように、D処理によって、見掛けのPNPPase 活性及び Na^+ , K^+ -ATPase 活性が共に阻害を受けることが明らかになった。この阻害の機構として、D結合により酵素活性が完全に消失し観察される活性はDの結合していないものである可能性と、結合の結果、活性が皆一様に低下するとした二つの可能性が考えられる。前者の場合には、D処理酵素の Mg^{2+} と PNPP に対する見掛けの解離定数（以下 K_d と略す）に変化は無

く、後者の場合には、変化が生じて良いはずである。そこで、 Mg^{2+} と PNPP 濃度を広く変え、その際の PNPPase 活性から見掛けの K_d を求めた。Table 3はその結果を示したものである。

無処理酵素では、 KMgE_2 PNPP 及び KE_2 PNPP からの Mg^{2+} 解離の見掛けの K_d 値は共に約1 mM であり、 KMgE_2 PNPP 及び KE_2 PNPP からの PNPP 解離の見掛けの K_d 値は共に約7 mM であった。 K^+ 非存在下D処理酵素では、D濃度の増加と共に最大反応速度 ($V_{\max}$) の低下が認められたが、見掛けの K_d 値の変化は、無処理酵素と比較し、ほとんど観察されなかった。しかし、1.0mM D処理酵素では、 $V_{\max}$ の低下と共に、 KMgE_2 PNPP からの Mg^{2+} の見掛けの K_d 値が約 $1/3$ に減少し、 KMgE_2 からの Mg^{2+} の見掛けの K_d 値が約1.5倍に、又 KE_2 PNPP からの PNPP の見掛けの K_d 値が約2倍に増加していることが観察された。一方、 K^+ 存在下で1.0 mM D処理した酵素では、約80%活性が残存し、見掛けの K_d 値は無処理酵素のものにほぼ一致し、 K^+ 非存在下で、1.0mM D処理酵素にみとめられた K_d 値の変化と強い活性の低下は観察されなかった。

D処理濃度に依存して、活性の低下及び Mg^{2+} と PNPP に対する親和性の変化が観察されたことより、 Na^+ ポンプのエネルギー源である ATP 細胞内外に輸送される Na^+ と K^+ に対する親和性について、 K^+ の有無でD処理した標品を用いて調べた。

ATP に対する親和性

Fig. 8は、 K^+ 非存在下で、無処理酵素 (●) と0.5mM (◎) 及び1.0mM (○) D処理酵素の

Table 3 Apparent dissociation constants^a for Mg^{2+} and PNPP, the PNPPase reaction of dibucaine-treated enzyme. ^aUnits in mM

DmM	E + D				E + K^+ + D	
	0	0.5	0.64	0.7	1.0	1.0
K Mg E ₂ PNPP→Mg : K ₁	1.07±0.01	1.06±0.09	1.21	1.14	0.32±0.04	1.19±0.06
K Mg E ₂ →Mg : K'	0.96±0.01	0.96±0.03	1.11	0.88	1.60±0.34	0.90±0.12
K Mg E ₂ PNPP→PNPP : K ₂	7.65±0.91	8.06±1.32	7.79	6.51	5.43±1.74	5.98±0.89
K E ₂ PNPP→PNPP : K''	6.75±0.88	7.57±0.94	5.11	5.77	13.48±2.51	5.24±0.77
V max = k_3 Et (relative)	1288±20	1022±33	783±16	491±27	212±10	978±54

Fig. 8 Dependence of the PNPPase activity on the ATP concentration. In the absence of KCl, the enzyme was treated with 0.5mM D (◐) and 1.0mM D (○) without D (●).

Fig. 9 Dependence of the PNPPase activity on the ATP concentration. In the presence of KCl, the enzyme was treated with 0.5mM D (◐) and 1.0mM D (○) without D (●).

PNPPase 活性に及ぼす ATP の濃度依存性を調べ、横軸に ATP 濃度、縦軸にそれぞれの条件での V_{max} に対する相対値をとって比較したものである。右棒グラフは、各条件での処理酵素の標準状態での相対活性を示している。無処理酵素の活性は、ATP 濃度の増加と共に低下し、50%阻害を示す ATP 濃度 ($K_{0.5}$) は約 2.5mM であった。0.5mM D 処理酵素の活性は、無処理酵素の活性低下と一致していた。一方 1.0mM D 処理酵素の活性は、ATP 濃度の増加に前者ほど影響を受けず、 $K_{0.5}$ は 4.0mM 以上であった。

Fig. 9 は、 K^+ 存在下で無処理酵素 (●) と

0.5mM (◐) 及び 1.0mM (○) D 処理酵素の PNPPase 活性に及ぼす ATP 濃度依存性を示している。無処理酵素の活性は、ATP 濃度の増加と共に低下し、 $K_{0.5}$ は約 2.8mM であった。0.5mM 処理酵素の活性は、 K^+ 非存在下でのものと同様に、無処理酵素の阻害パターンにほぼ一致し、低下していた。これに比較し、1.0mM 処理酵素は、ATP 濃度の増加と共に強い活性の低下を示し、 $K_{0.5}$ は約 1.3mM であった。 K^+ 存在下で 1.0mM D 処理した酵素は、 K^+ 非存在下で同濃度処理した酵素とは逆に ATP に対する親和性の増加を示していた。

Fig. 10 Dependence of the PNPPase activity on the NaCl concentration. In the absence of KCl, the enzyme was treated with 0.5mM D (◐) and 1.0mM D (○) without D (●).

Fig. 11 Dependence of the PNPPase activity on the NaCl concentration. In the presence of KCl, the enzyme was treated with 0.5mM D (◐) and 1.0 mM D (○) without D (●).

Fig. 12 Dependence of the PNPPase activity on the KCl concentration. The enzyme was treated with 0.5 mM D (◐) and 1.0mM D (○) without D (●).

Na^+ に対する親和性

Fig. 10は、 K^+ 非存在下で、無処理酵素 (●) と 0.5 mM (◐) 及び 1.0 mM (○) D 処理酵素の PNPPase 活性に及ぼす Na^+ 濃度依存性を示したものである。無処理酵素の活性は、 Na^+ 濃度の増加と共に低下し、 $K_{0.5}$ は約 90 mM であった。0.5mM 及び 1.0mM 処理酵素の Na^+ による阻害パターンは無処理酵素のものにほぼ一致した。

Fig. 11は、 K^+ 存在下で、無処理酵素 (●) と 0.5 mM (◐) 及び 1.0 mM (○) D 処理酵素の PNPPase 活性に及ぼす K^+ の濃度依存性を示したものである。 K^+ 非存在下でのものと同様、無処理酵素の活性は Na^+ 濃

度の増加と共に低下し、 $K_{0.5}$ は約 80 mM であった。0.5mM 及び 1.0mM D 処理酵素の阻害パターンは、無処理酵素のものにほぼ一致した。従って、D 処理の際の K^+ の有無に依存せず、D 処理酵素の Na^+ に対する親和性には変化が認められなかった。

K^+ に対する親和性

Fig 12は、無処理酵素 (●) と 0.5mM (◐) 及び 1.0mM (○) D 処理酵素の PNPPase 活性に及ぼす K^+ の濃度依存性を示したものである。 K^+ 濃度の増加と共に、反応は活性化され、 $K_{0.5}$ は、D 濃度 0, 0.5, 1.0mM でそれぞれ 4.4, 5.0,

Fig. 13 The protective effect of K^+ and Na^+ on the inhibition of D.

6.2mM であった。 $K_{0.5}$ はD濃度の増加と共にわずかに増加することが示された。

ジブカインの阻害に及ぼす K^+ と Na^+ の効果
 Na^+ , K^+ -ATPase は, Na^+ 結合型と K^+ 結合型では分子形態が異なっていることが明らかにされている¹⁹⁻²⁸⁾。Dによる活性の低下に対する K^+ の保護効果がこのイオンに特異的なものなのか否かを調べるために, K^+ と Na^+ の濃度を広く変え, D処理酵素の残存活性を測定した。反応は, 種々の濃度の KCl 又は NaCl を加えた酵素液に 1.0mM Dを加え, 最終反応条件は同一になるように基質を添加することにより開始した。

Fig. 13から明らかなように K^+ (○) 濃度の増加と共に, 残存活性が増加し, 無処理酵素の約80%を示した。 K^+ に対する $K_{0.5}$ は2.1mM であり, V_{max} は685であった。一方, Na^+ (●) 濃度の増加に対し 残存活性はシグモイダルに増加した。 Na^+ に対する $K_{0.5}$ は21.2mM であり, V_{max} は664であった。これらの結果は, Dの阻害に対する保護効果は K^+ のほうが Na^+ より10倍高く, Na^+ による保護にはより大きな協同性のあることを示している。

考察及び結論

局所麻酔薬と生体膜の相互作用は, 電気生理学的手法¹³⁾, スピンラベル³⁸⁾, 核磁気共鳴³⁹⁾を用いることによって研究されてきているが, 機能の明らかになった膜構成成分と局所麻酔薬の相互作用についての分子薬理学的研究は, 開始されてまもない。形質膜の重要成分である Na^+ , K^+ -ATPase

Fig. 14 Hypothetical scheme on the activity of dibucaine-treated enzyme. See "Discussion" for details.

と局所麻酔薬の相互作用に関しては, 現在の所, Roufogalis⁴⁰⁾ が粗 Na^+ , K^+ -ATPase を用いて, 局所麻酔薬テトラカインが見掛けの上で K^+ と競合すると報告しているのみである。

本研究では, 局所麻酔薬の作用機構を分子レベルで理解するための一手段として, 膜に存在し, その分子的機構の解明が最も進んでいる Na^+ , K^+ -ATPase の酵素反応に対する局所麻酔薬ジブカインの作用を解析した。 Na^+ , K^+ -ATPase の部分反応である PNPPase 活性が, D処理酵素に依存し低下することが観察された。活性低下の理由として, 二つの説明が可能である。その一つは, Fig. 14上段の左右に示したように, 酵素はDと結合すると完全に活性を失うとするもので, 処理後の残存活性はD非結合酵素によるものである。他は, Fig. 14下段に示したように, Dが酵素に結合したことにより 酵素活性が見掛けの上で低下したとするものである。低濃度 (0 ~ 0.7mM) D処理では, K_d の変化を伴わずに V_{max} が減少した。しかし1.0mM D 処理では, V_{max} の減少のみならず, Mg^{2+} と PNPP に対する K_d の変化も観察された (Table 3)。この結果は, D結合によって活性が完全に失活したとするよりも D結合によっても活性が残存するとした Fig. 14の下段のモデルでより良く説明できる。又酵素へのDの結合部位については, 以下のように考えられる。

前述した通り, 低濃度D処理では V_{max} の減少が, 高濃度D処理で初めて V_{max} と親和性の

Fig. 15 Biochemical properties of dibucaine-treated enzyme. See "Discussion" for details.

変化が観察され、 K^+ 存在下では高濃度処理にも拘わらず ATP に対する親和性の増加とわずかな V_{max} の変化が観察されたのみである。これらの結果は、Dは少なくとも二つの異なった高低親和性部位に結合していること及び見掛けの上で K^+ 結合酵素ではDの低親和性部位が消失し、従ってこの部位に結合が生じないことを示唆している。

Fig. 15はD結合 Na^+ , K^+ -ATPase の酵素学的性質を示したものであり、以下のように説明される。

Dは Na^+ , K^+ -ATPase 分子の少なくとも二箇所、異なった親和性で結合する。高親和性部位へのDの結合は見掛けの上で K^+ に対する親和性と V_{max} を減少し、 Mg^{2+} , Na^+ 及び ATP に対する親和性には影響を与えない (Fig. 15上段)。

D濃度の増加と共に低親和性部位へDの結合が生じると、PNPPの有無により Mg^{2+} に対する親和性が増加又は減少し、 K^+ 及び ATP に対する親和性の低下と強い V_{max} の減少が生じる (Fig. 15中段)。

K^+ の共存により、高濃度D存在下でも Mg^{2+} に対する親和性の変化及び V_{max} の大きな減少は生じない。ATP に対する親和性が未処理標品よりも高いことは、 K^+ 共存下でのDの結合によ

って生じる Na^+ , K^+ -ATPase の性質が、低濃度D存在下で生じるものとも異なることを示している (Fig. 15下段)。

K^+ の保護効果は、前述の Roufogalis のテトラカインの作用と類似している。

D処理標品の Na^+ , K^+ -ATPase 活性が PNPPase 活性よりも強い低下を示した (Table 2)。 Na^+ , K^+ -ATPase のリン脂質を除くか Phospholipase で分解すると、D処理と同様に、PNPPase 活性に比べ Na^+ , K^+ -ATPase 活性の強い低下が報告されている^{41,42)}。この結果は、 Na^+ , K^+ -ATPase のリン脂質部位にDが結合し、機能的なリン脂質と蛋白の相互作用を妨げることを示唆している。

K^+ と Na^+ における保護効果の差は、トリプシン分解、ケイ光強度変化で検出されている¹⁹⁻²⁸⁾ K^+ 型と Na^+ 型の分子形態に対するDの結合様式の差を示唆している。

近年、 Na^+ , K^+ -ATPase と同様にその分子的機構の解明が最も進んでいるものに Ca^{2+} の輸送を行っている筋小胞体の Ca^{2+} ポンプ、胃の粘膜上皮に存在し H^+ と K^+ の輸送を行う H^+ - K^+ ポンプがある。これら三種類のポンプの機構は、互いに多くの点で良く似ているとされている⁴³⁾。 Ca^{2+} ポンプが存在する筋小胞体膜に局所麻酔薬が作用することにより、ポンプの活性を阻害していること、この阻害はポンプの蛋白成分あるいは蛋白を取り巻くリン脂質とこの薬物との相互作用による結果であるとの報告⁴⁴⁾がある。これらの研究で用いられた局所麻酔薬の濃度は、局所麻酔薬として投与されるよりも低いことから局所麻酔薬がポンプの機能に大きな影響を与えることは確実である。

リン脂質を含む膜蛋白の構造及びその分子的機構の解明が進むにつれ、局所麻酔薬が膜蛋白に様々な影響を与えていることが明らかにされると思われる。今後、これらの活性変化がポンプ分子のいかなる部位への結合に基づくものかを研究し、局所麻酔薬とポンプの相互作用の分子的機作を更に明らかにする必要がある。

謝辞：稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、終始有益な御助言と御支援を賜った本学口腔外科学第一講座、富田喜内教授並びに本学歯科薬理講座、

飯田正一教授又直接、実験の御指導いただいた本学歯科薬理学講座、谷口和弥助教授に深く感謝いたします。又終始御支援をしていただいた、田巻照房技官、並びに鈴

木邦明助手を初め本学歯科薬理学講座諸兄に深く感謝いたします。なお、本研究の一部は、昭和59、60年度科学研究費補助金（奨励研究（A））による。

抄録：局所麻酔薬の作用機構を分子レベルで理解するための一手段として、細胞膜に存在し、その分子的機構の解明が最も進んでいる Na^+ , K^+ -ATPase の酵素反応に対する局所麻酔薬ジブカイン（D）の作用を解析した。

その結果、Dは Na^+ , K^+ -ATPase の少なくとも二つの異なった高低親和性部位に結合し、活性を低下させる。見掛けの上で、 K^+ 結合酵素では低親和性部位が消失し、この部位に結合が生じない。D処理標品の Na^+ , K^+ -ATPase 活性は PNPPase 活性よりも強い低下を示した。このようなことから、Dは Na^+ , K^+ -ATPase のリン脂質部位に結合し、機能的リン脂質と蛋白の相互作用を妨げることが示唆された。

文 献

- Glynn, I. M. and Karlish, S. J. D.: Sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.* **37**: 13-55, 1975.
- Schwartz, A., Lindenmayer, G. E. and Allen, J. C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase, pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.* **27**: 3-134, 1975.
- Albers, R. W.: The (sodium plus potassium)-transport ATPase, *The Enzymes of Biological Membrane* (Martonosi, A., eds.), pp. 283-301, Plenum Press, New York, 1975.
- Cavieres, J. D.: The sodium pump in human red cells, *Membrane Transport in Red Cells* (Ellory, J. C., Lew, V. L., eds.), pp. 1-37, Academic Press, London, 1977.
- Robinson, J. D. and Flashner, M. S.: The (Na^+ , K^+)-ATPase, *Enzymatic and Transport Properties*. *Biochem. Biophys. Acta.* **549**: 145-176, 1979.
- 金澤 徹：カチオンの輸送，生体膜の構造と機能（殿村雄治，佐藤 了 編）。講談社サイエンス・フイック，pp. 110-176, 1979.
- Post, R. L.: A perspective on sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase, *Cation Flux Across Biomembranes* (Mukohata, Y., Parker, L., eds.), pp. 3-19, Academic Press, New York, 1979.
- 谷口和弥： Na^+ ポンプのメカニズム。生物物理 **21**: 145-156, 1979.
- 谷口和弥： Na^+ , K^+ -ATPase (Na^+ ポンプ) のエネルギー変換のメカニズム。日薬理誌 **83**: 193-206, 1984.
- Cantley, L. C.: Structure and mechanism of the (Na^+ , K^+)-ATPase, *Current Topics in Bioenergetics*, pp. 201-237, Academic Press, New York, 1981.
- Liljestrand, G.: The historical development of local anesthesia. *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*. section 8., pp. 1-38, Pergamon Press, Oxford, 1971.
- Fink, B. R.: *Molecular Mechanism of Anesthesia*, *Progress in Anesthesiology*, vol 2, Raven Press, New York, 1980.
- 樽崎敏夫：麻酔薬，分子薬理学（吉田 博，田中正三），pp. 193-210, 朝倉書店，東京，1979.
- Skou, C. J.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochem. Biophys. Acta.* **23**: 394-401, 1957.
- Bonting, S. L.: *Membrane and Ion Transport* (Bittar, E. E., eds.), pp. 257-363, Willey Interscience, London, 1970.
- Kanike, K., Lindenmayer, G. E., Wallick, E. T., Lane, L. K. and Schwartz, A.: Specific sodium binding to a purified Na^+ , K^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* **251**: 4194-4195, 1976.
- Matsui, H., Hayasi, Y., Homareda, H. and Kimimura, M.: Ouabain sensitive ^{42}K -binding to Na^+ , K^+ -ATPase purified from canine kidney outer medulla. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**: 373-380, 1977.
- Yamaguchi, M. and Tonomura, Y.: Simultaneous binding of three Na^+ and two K^+ ions to Na^+ , K^+ -ATP dependent ATPase and changes in its affinities for the ions induced by the formation of a phosphorylated intermediated. *J. Biochem.* **86**: 509-523, 1979.
- Jørgensen, P. L. and Peterson, J.: Purification and characterization of (Na^+ , K^+)-ATPase. V. Conformational changes in the enzyme. Transitions between the Na-form and the K-form studied with tryptic digestion as a tool. *Biochem. Biophys. Acta.* **401**: 399-415, 1975.
- Jørgensen, P. L. and Peterson, J.: Na^+ ,

- K^+ -ATPase structure and function (Skou, J. C. Norby, J. G., eds), pp.143-155, Academic Press, New York, 1979.
- 21) Glynn, I. M., Karlsh, S. J. D. and Yates, D. W.: Na^+ , K^+ -ATPase structure and function (Skou, J. C., Norby, J. D., eds), pp. 102-113, Academic Press, New York, 1979.
- 22) Karlsh, S. J. D.: Na^+ , K^+ -ATPase structure and function (Skou, J. C., Norby, J. G., eds), pp.116-128, Academic Press, New York, 1979.
- 23) Taniguchi, K., Suzuki, K. Simizu, J. and Iida, S.: ATP dependent reversible conformational change of Na^+ , K^+ -ATPase modified with N-[p-(2-benzimidazolyl) phenyl] maleimide. J. Biochem. 88 : 609-612, 1980.
- 24) Taniguchi, K., Suzuki, K. and Iida, S.: Conformational change accompanying transition of ADP-sensitive phosphoenzyme to potassium-sensitive phosphoenzyme of (Na^+ , K^+)-ATPase modified with N-[p-(2-benzimidazolyl) phenyl] maleimide. J. Biol. Chem. 257 : 10659-10667, 1982.
- 25) Taniguchi, K., Suzuki, K. and Iida, S.: Stopped flow measurement of conformational change induced by phosphorylation in Na^+ , K^+ -ATPase modified with N-[p-(2-benzimidazolyl) maleimide. J. Biol. Chem. 258 : 6927-6931, 1983.
- 26) Taniguchi, K., Suzuki, K. and Iida, S.: Conformational transition between ADP-sensitive phosphoenzyme and potassium-sensitive phosphoenzyme. Curr. Top. Membranes Transp. 19 : 477-480, 1983.
- 27) Taniguchi, K., Suzuki, K., Kai, D., Matsuoka, I., Tomita, K. and Iida, S.: Conformational change of sodium and potassium dependent Adenosine Triphosphatase : Conformational evidence for the Post-Albers Mechanism in Na^+ and K^+ dependent hydrolysis of ATP. J. Biol. Chem. 260 : Jan / Feb, 1985.
- 28) Taniguchi, K., Suzuki, K. Kai, D., Kudo, M., Tomita, K. and Iida, S.: ATP hydrolysis in the presence of Na^+ with or without K^+ occurs accompanying conformational changes via $\text{E} \cdot \text{ATP}$, E_1P , E_2P and E_2 in sequence. in the Sodium Pump. in press, The Company of Biologist Ltd, U. K. 1985.
- 29) Taniguchi, K. and Post, R. L.: Synthesis of adenosine triphosphate and exchange between inorganic phosphate and adenosine triphosphate in sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 250 : 3010-3018, 1975.
- 30) Post, R. L., Toda, G. and Rogers, F. N.: Phosphorylation by inorganic phosphate of the sodium plus potassium ion transport adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 250 : 691-701, 1975.
- 31) Post, R. L., Hegyvary, C. and Kume, S.: Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 247 : 6530-6540, 1972.
- 32) Taniguchi, K., Tazawa, H. and Iida, S.: In Cation Flux Across Biomembranes., pp. 41-47, Academic Press, New York, 1979.
- 33) Eisenthal, R. and Cornish-Bowden, A.: Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods. Biochem. J. 139 : 715-720, 1974.
- 34) 谷口和弥: Na^+ , K^+ -ATPase (Na^+ ポンプ) へのリガンド結合の熱力学的パラメーター. 生体の科学 32 : 42-50, 1981.
- 35) Hayashi, Y., Kimimura, M., Homareda, H. and Matsui, H.: Purification and characteristics of (Na^+ , K^+)-ATPase from canine kidney by zonal centrifugation in sucrose density gradient. Biochem. Biophys. Acta. 482 : 185-196, 1977.
- 36) Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248-254, 1976.
- 37) Martin, B. J. and Doty, M. D.: Determination of inorganic phosphate. Anal. Chem. 21 : 965-967, 1949.
- 38) Rosenberg, P. H., Jansson, S. E. and Gripenberg, J.: Effect of halothane, tiopental and lidocaine on fluidity of synaptic plasma membranes and artificial phospholipid membranes. Anesthesiology. 46 : 322-326, 1977.
- 39) Culis, P. R. and Verkleij, A. J.: Modulation of membrane structure by Ca^{2+} and dibucaine as detected by ^{31}P NMR. Biochem. Biophys. Acta. 552 : 546-551, 1979.
- 40) Roufogalis, B. D.: Comparative studies on the membrane actions of depressant drugs, the rule of lipophilicity in inhibition of brain sodium and potassium-simulated ATPase. J. Neurochem. 24 : 51-61, 1975.
- 41) Taniguchi, K. and Tonomura, Y.: Inactivation of Na^+ - K^+ -dependent ATPase by phospholipase treatment and its reactivation by phospholipids. J. Biochem. 19 : 543-557, 1971.
- 42) Ottolenghi, P.: The relipidation of delipidated Na^+ , K^+ -ATPase. Eur. J. Biochem. 99 : 113-131, 1979.

- 43) Stekhoven, F. S. and Bonting, S. L. : Transport adenosine triphosphatases, properties and functions. *Physiol. Rev.* **61** : 1-76, 1981.
- 44) Herbette, L., Messineo, F. C. and Katz, A. M. : The interaction of drugs with the sarcoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **22** : 413-434, 1982.
- 45) Post, R. L., Toda, G., Kume, S. and Taniguchi, K. : Synthesis of adenosine triphosphatase by way of potassium-sensitive phosphoenzyme of sodium, potassium, adenosine triphosphatase. *J. Supramol Struct* **3** : 479-497, 1975.