

Na⁺-K⁺-ATPase 活性に及ぼす PCMB の効果

川崎医科大学附属川崎病院 眼科

(主任: 山本覚次教授)

錦織 敏治, 五島紳一郎, 花房 路子

(昭和59年2月14日受付)

The Effect of PCMB on Na⁺-K⁺-ATPase Activity

Toshiharu Nishikiori, Shinichiro Goto
and Michiko Hanafusa

Department of Ophthalmology, Kawasaki Hospital
Kawasaki Medical School

(Accepted on February 14, 1984)

グルタチオンの酸化に適切な薬物である P-chloromercuribenzoic acid (PCMB) を 10⁻⁴M で作用させ, Tyrode's solution で5時間培養後のブタ水晶体の Na⁺-K⁺-ATPase 活性, Na⁺/K⁺ratio, ATP 含量並びにグルタチオンについて測定した.

結果は次のとおりである.

- 1) 10⁻⁴M PCMB を作用させた場合, インキュベーション5時間後には Na⁺/K⁺ratio は 0.21 から 0.67 まで上昇した.
- 2) ブタ水晶体の Na⁺-K⁺-ATPase 活性は牛水晶体のそれに比べて高く, 両者の間には明らかに有意差が認められた ($p < 0.1\%$).
- 3) 10⁻⁴M PCMB を5時間作用させると, ブタ水晶体の Na⁺-K⁺-ATPase 活性は 36% 抑制された.
- 4) 10⁻⁴M PCMB を5時間作用させると, ブタ水晶体の GSH 含量は 16% 抑制された.
- 5) 10⁻⁴M PCMB を5時間作用させると, ブタ水晶体の ATP 含量は 6% 抑制され, 一方 ADP 含量は 27% 抑制された.

The Na⁺-K⁺-ATPase activity, Na⁺/K⁺ ratio, ATP content and glutathione (GSH) in pig lenses were measured at 5 hours after incubation in Tyrode's solution containing 10⁻⁴M P-chloromercuribenzoic acid (PCMB), a reagent which appears to be suitable for the specific oxidation of GSH.

The results were as follows.

- 1) The Na⁺/K⁺ ratio in the pig lenses had increased by 0.21 to 0.67 at 5 hours after incubation with 10⁻⁴M PCMB.
- 2) The Na⁺-K⁺-ATPase activity in the pig lenses was consistently higher than that in bovine lenses and the activities in the two groups showed a statistically significant difference ($p < 0.1\%$).
- 3) The Na⁺-K⁺-ATPase activity in the pig lenses was inhibited by 36 per cent at 5 hours after incubation with 10⁻⁴M PCMB.

4) The concentration of GSH in the pig lenses was inhibited by 16 per cent at 5 hours after incubation with 10^{-4} M PCMB.

5) The concentration of ATP in the pig lenses was inhibited by 6 per cent, whereas that of ADP was inhibited by 27 per cent at 5 hours after incubation with 10^{-4} M PCMB.

Key Words ① $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ② GSH ③ Crystalline Lens

I. 緒 言

SH 基酸化剤である PCMB (P-chloromercuribenzoic acid) と diamide の薬理作用は、PCMB が膜非透過型で膜 SH 基を直接酸化するのに対し¹⁾, diamide は水晶体内部の GSH を酸化型とし、酸化型グルタチオンが膜内側から作用して膜 SH 基を酸化することによって考えられている²⁾。これらの SH 基酸化剤は $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性にも影響を及ぼすことは申すまでもなく、従来より水晶体内部のイオンバランスの調整に本酵素が重要視されてきた。また、実験的白内障並びに人老人性白内障水晶体でも GSH 含量が早期より減少することが知られている³⁾。しかしこれ程に Na^+/K^+ ratio を逆転させる作用の強い PCMB が本酵素、GSH および ATP に及ぼす影響については著者の知る限りでは、ほとんど報告がなされていない。今回、これらの問題について検討し若干の知見を得たので報告する。

II. 実験材料並びに方法

岡山市内の屠殺場にて得た牛並びに豚水晶体を本実験に用いた。尚、牛水晶体は湿重量 2~2.2 g, 豚水晶体は湿重量 400~450 mg のものを使用した。コントロールとして Tyrode 液で水晶体をインキュベーションし、PCMB は 10^{-4} M 濃度で作用させた。測定については Na^+ , K^+ 含量, glutathione 含量, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性および ATP, ADP, AMP 含量について測定した。おのおのの測定条件は下記に示す通りである。

1) Na^+ , K^+ の測定

得られた試料に蒸留水 2 ml 加え、テフロンホモジナイザーにてホモジナイズしたのち

12,000 rpm, 30 min, 4°C で遠沈したのち上清を flame photometer (Instrumentation Laboratory Inc.) にて測定した。 Na^+ , K^+ の単位は mEq/kg lens wet weight で表記した。

2) Glutathione の測定

水晶体を 0.002M EDTA を加えた 10% TCA 5 ml に入れ、 N_2 ガス気流下にテフロンホモジナイザーにてホモジナイズし、3,000 rpm, 10 min 遠沈したのち上清を回収し、沈渣を更に上記の条件で 2 回 washing した。その上清を DTNB 法にて測定した。

3) $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 活性の測定

豚水晶体, 牛水晶体は 40m mol Hepes buffer それぞれ 1 ml, 20 ml 加えたのち、テフロンホモジナイザーにてホモジネートした。その Suspension 0.1 ml を Table 1 に示す反応液に加え、 37°C 1 時間インキュベーションしたのち、反応を停止し ATP より加水分解により遊出した無機リンを、無機リン定量試薬ゲタミナー-IP-S (協和メディクス) を用い日立分光光度計にて波長 550 nm の吸光度で測定した。

Table 1. Substrate media for the assay of ATPase activity

	(A)	(B)
ATP	2	2
Mg^{2+}	1.88	1.88
Na^+	82	82
K^+	33	33
EDTA	0.54	0.54
Hepes	40	40
Ouabain	—	0.84
H_2O	0.5 ml	—
pH 7.5		

(m mol/L)

4) ATP, ADP, AMP の測定

水晶体を 2 ml 6% HClO₄ でホモジナイズしたのち, 12,000 rpm, 30 min, 4°C で遠沈し除蛋白後, 上清を 1.75 M K₃PO₄ で pH 8.2 に調整し, 3,000 rpm, 10 min 遠沈したのち上清 10 μl を液体クロマトグラフィー (Waters) に注入して測定した。

液体クロマトグラフィーの条件はさきに報告したとおりである⁴⁾。

III. 実験結果

豚水晶体の Na⁺, K⁺ 含量は Fig. 1 に示す如くインキュベーション前では Na⁺ は 14.8 ± 3.6 mEq/kg lens wet weight (以下単位省略, mean ± SD) で K⁺ は 68.9 ± 2.8 であるのに対し 10⁻⁴M PCMB を作用させ 5 時間インキュベーション後では, Na⁺, K⁺ 含量はそれぞれ 38.7 ± 3.5, 56.6 ± 4.5 と, 明らかに有意な Na⁺ の上昇, K⁺ の減少が認められた (P < 0.1%)。しかし Tyrode 液で 5 時間インキュベーションした群とインキュベーション前の群との間には Na⁺, K⁺ 含量は差が認められなかった。尚, 正常水晶体の Na⁺/K⁺ ratio は 0.21 であるのに対し 10⁻⁴M PCMB 作用後の Na⁺/K⁺ ratio は 0.68 で 3 倍以上の上昇が認められた。次に Na⁺-K⁺-ATPase 活性の species による差についてみると Table 2 に示す如く牛水晶体と豚水晶体とでは Na⁺-K⁺-ATPase 活性値に差が認められた。即ち牛水晶体では Na⁺-K⁺-ATPase 活性値は total ATPase 活性値の約 30% であるのに対して, 豚水晶体では約 41% で

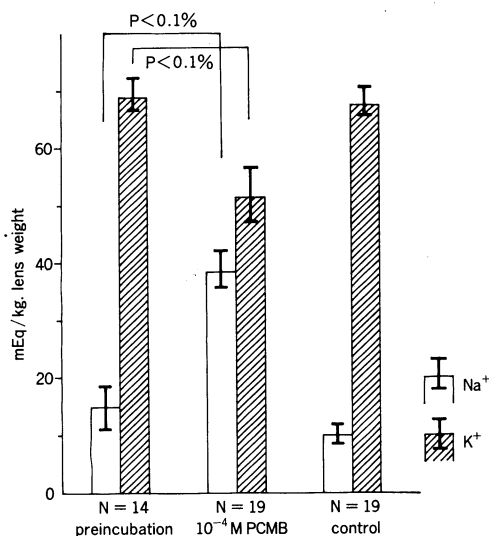


Fig. 1. Effect of 10⁻⁴MPCMB on the content of sodium and potassium ions of pig lens (after 5hrs incubation at 37°C)

Statistical differences have been evaluated between preincubation and 10⁻⁴MPCMB group (Student's t-test)

あり, また, 水晶体当たりの本酵素活性値からみても 両群の間には有意な差が認められた (P < 0.1%)。このため, より酵素活性の高い豚水晶体について PCMB を作用させて検討を行った。10⁻⁴M PCMB を作用させインキュベーション 5 時間後の Na⁺-K⁺-ATPase 活性に及ぼす影響について検討した結果は Table 3 に示す通りである。即ちインキュベーション前群とコントロール群 (Tyrode 液で 5 時間インキュベーション) には Na⁺-K⁺-ATPase 活性は

Table 2. Adenosine triphosphatase activity in pig and bovine lenses

	No.	μ mol Pi liberated/lens/hr at 37°C			
		Total	Mg ²⁺ -ATPase	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase as part of the total (%)
Bovine Lens	10	2.31 ± 0.30 (1.78-2.73)	1.63 ± 0.25 (1.30-1.99)	0.69 ± 0.13 (0.48-0.86)	29.8 ± 4.5 (25.5-38.8)
Pig Lens	10	2.82 ± 0.21 (2.42-3.01)	1.63 ± 0.15 (1.31-1.78)	1.18 ± 0.26 (0.81 ± 1.62)	41.6 ± 6.9 (31.2-55.9)

(Student's t-test)

Table 3. Effect of 10^{-4} M PCMB on Na^+ - K^+ -ATPase activities in pig whole lens (after 5 hrs incubation at 37°C)

	ATPase activity		
	total	Na^+/K^+	Mg^{++}
($\mu\text{MPi}/\text{lens}/\text{hour}/37^\circ\text{C}$)			
preincubation n=10	2.82 ± 0.21	1.18 ± 0.26	1.63 ± 0.15
10^{-4} M PCMB n=10	2.59 ± 0.30	0.74 ± 0.30 $p < 1\%$	1.79 ± 0.30
Control n=10	2.92 ± 0.51	1.11 ± 0.27	1.81 ± 0.31

Data are expressed as Mean \pm SD.
Statistical differences have been evaluated between preincubation and 10^{-4} M PCMB group. (Student's t-test)

それぞれ 1.18 ± 0.26 , 1.11 ± 0.27 $\mu\text{mole Pi}/\text{Lens}/\text{hour}$ と有意差が認められなかった。しかし 10^{-4} M PCMB を作用させた群では 0.74 ± 0.30 $\mu\text{mole Pi}/\text{Lens}/\text{hour}$ と平均で 38% の酵素活性の減少率が認められた ($P < 1\%$)。しかし、 Mg^{2+} -ATPase 活性については従来からの

Table 4. Effect of 10^{-4} MPCMB on the content of glutathione of Pig Lens (after 5 hrs incubation at 37°C)

	m mole/100g Lens Wet Weight
preincubation N=19	1.564 ± 0.159
10^{-4} M PCMB N=20	1.337 ± 0.173

$p < 0.1\%$

Data are expressed as Mean \pm SD.
Statistical differences have been evaluated between preincubation and 10^{-4} M PCMB group. (Student's t-test)

Table 5. Effect of 10^{-4} M PCMB on the content of free adenine nucleotides of Pig Lens (after 5 hrs incubation at 37°C in Tyrode's solution)

	μ mole/100g lens wet weight		
	ATP	ADP	AMP
Control N=12	183.05 ± 12.56	55.12 ± 8.61	11.93 ± 5.48
PCMB N=19	172.90 ± 12.18	40.10 ± 6.53	8.44 ± 4.41

] p 5%] p 0.1%] N. S

Data are expressed as Mean \pm SD.
Statistical differences have been evaluated between control and PCMB group. (Student's t-test) N. S: not significant

報告と同様で、 Na^+/K^+ ratioの上昇後も低下が認められなかった³⁾。また、SH 基は水晶体の蛋白質、酵素ならびに膜蛋白質の正常性を保つ生理的役割もっているが、Table 4 に示す如く、正常豚水晶体では還元型グルタチオン含量は約 1.564 ± 0.159 m mole/100 g lens wet weight 存在していたが、 10^{-4} M PCMB を作用させた5時間後では 1.337 m mole/100 g lens wet weight と明らかに有意な

低下を認めたものの ($P < 0.1\%$)、正常値の約 16% の減少にとどまった。また、以前報告したように牛水晶体では PCMB 24時間作用させたのちの前後極部の ATP 含量は著明に減少したが⁵⁾、豚水晶体では Table 5 に示す如く5時間後では ATP 含量は約 6% 減少したにすぎなかった。しかし、ADP の減少率は約 27% で有意な低下が認められた ($P < 0.1\%$)。

IV. 考 案

PCMB は diamide と同様、SH 基酸化剤であるが、牛水晶体中での Na^+ , K^+ に対する影響は PCMB の方がより強力であることはさきに報告した通りである⁵⁾。今回実験に用いた豚水晶体でも同様で Na^+/K^+ ratio は 10^{-4} M PCMB を作用させ5時間インキュベーション

した後には、水晶体中の Na^+/K^+ ratio は約 0.7 までに上昇した。正常な cation transport を維持するためには GSH が必要で、GSH は水晶体の膜 ATPase の SH グループに対して保護作用を有しているものと考えられている³⁾。しかし今回の実験結果では、 Na^+/K^+ ratio はすでに 0.7 までに上昇していたにもかかわらず、水晶体中の GSH 量は僅か 16% の減少を認めたにすぎない。このことは従来より白内障早期

より GSH 量は減少し, Na⁺/K⁺ ratio の上昇とよく相関するとする諸説と異なる結果である。例えば同じ GSH 酸化剤である tertiary butyl hydroperoxide (TBHP) を用いた報告では, インキュベーション30分後には GSH 量はすでに 30% 減少したとされている⁹⁾。PCMB を作用させた場合, Na⁺/K⁺ ratio のバランスが急速に崩れるにもかかわらず, GSH 量が減少しない理由としては, 両者の酸化機構の作用が異なることも考えられる。また, GSH の動態とともに cation transport の重要な役割を担っている Na⁺-K⁺-ATPase 活性は PCMB を作用させることにより約 36% の低下を認めたが, 本酵素がどの程度失活すると水晶体中のイオンバランスの変動を来すかについては, *in vivo* と *in vitro* のデータでは異なると思われる。がしかし Kinoshita らによる *in vitro* で ouabain を作用させた水晶体では本酵素活性が約 50% 低下すると Na⁺, K⁺ のバランスは逆転するとしている⁷⁾。また, X-ray による *in vivo* での実験では X-ray 照射 3 週後で 37% の本酵素活性の低下が認められるが, この時点ではまだ Na⁺, K⁺ の動態には変動がなく, 本酵素活性が 50% 失活した時点で Na⁺, K⁺ が逆転するとされている⁹⁾。遺伝性白内障水晶体として有名な中野マウスでもほぼ同様な値でイオンバランスが崩壊すると報告されている⁹⁾。これらのことから考えると *in vivo* でも *in vitro* でも本酵素が約 50% 失活するとイオンバランスの崩壊が生じると考えられる。Na⁺-K⁺-ATPase 活性が 36% 程度の失活でイオンバランスが崩れるか否かには問題がある。この点については GSH, ATPase は水晶体での分布は上皮, 皮質に高濃度に存在する一方核には少なく, 特に上皮で高濃度に存在することから考えると, 今回 Whole Lens を用いたため, みかけ上減少率が低く出た可能性もある。更に Na⁺-K⁺-ATPase は ATP と密接な関係にあるが, 豚水晶体では ATP 含量は僅か 6% 程度減少したにすぎなかったが, 一方 ADP は約 27% の減少が認められた。この理由として ATPase 活性が失活したため ATP が ADP に転換され

なくなったためであろうと推測される。ATP は早期より減少しないことからその重要性が疑問視されているが⁹⁾, 水晶体での高エネルギーを必要とするリン酸受容体, 例えば ATPase, hexokinase 等で使用される ATP 量は総 ATP 量の約 10% 程度であることから考えると 6% の減少は能動輸送に及ぼす影響として意義ある減少と考えられる。以上は PCMB の前極側の active transport に及ぼす影響についてみたものであるが後極に及ぼす影響についても無視できないものがある。従来より水晶体の後極部には ATPase 活性が存在しないため passive transport 機構しか存在しないと考えられているが, 岩田ら¹⁰⁾によると, PCMB を後極側から作用させた場合で, 前極側と同様に Na⁺/K⁺ ratio を逆転させ得ると報告している。牛水晶体では PCMB を作用させると ATP 含量は前極部のみならず後極部でも著明に減少しており PCMB による解糖系障害が後極部にも作用することが考えられた⁹⁾。

今回の実験結果では PCMB が GSH, Na⁺-K⁺-ATPase 活性に及ぼす影響は存外少ないにもかかわらず, Na⁺, K⁺ のバランスを早期より崩す理由として従来より考えられている前極部の active transport 機構への影響のみならず, 後極部に対する影響, 更には膜 SH 基の酸化による membrane permeability への影響も重要な作用と考えられる。

V. 結 語

SH 基酸化剤である PCMB を豚水晶体に作用させ, Na⁺, K⁺, GSH, Na⁺-K⁺-ATPase 活性ならびに free adenine nucleotides (ATP, ADP, AMP) 含量の動態について検討し, 次の結果を得た。

1) 10⁻⁴M PCMB でインキュベート 5 時間後には Na⁺/K⁺ ratio は 0.7 近くまで上昇した。

2) 牛水晶体と豚水晶体では Na⁺-K⁺-ATPase 活性は豚水晶体で高値を示し, 両群の間には明らかに有意差が認められた ($P < 0.1\%$)。

- 3) 10^{-4} M PCMB でインキュベート 5 時間後には $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 活性は約 36% 減少した。後には ATP 含量は約 6% 減少した。一方 ADP は約 27% の減少を認めた。
- 4) 10^{-4} M PCMB でインキュベート 5 時間後には GSH は約 16% の減少が認められた。擱筆にあたり恩師山本覚次教授の御指導、御校閲に深く感謝します。
- 5) 10^{-4} M PCMB でインキュベート 5 時間

文 献

- 1) Epstein, D. L. and Kinoshita, J. H.: The effect of diamide on lens glutathione and lens membrane function. *Invest. Ophthalmol.* 9: 629-638, 1970
- 2) Zipper, H. and Mawe, R. C.: The exchange and maximal net flux of glucose across the human erythrocyte. II. The effect of two sulphhydryl enzyme inhibitors, chlormerodrin and P-chloromercuribenzenesulfonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 356: 207-218, 1974
- 3) 岩田修造: 老人性白内障とグルタチオン. *代謝* 17: 53-64, 1980
- 4) 錦織敏治: 老人性白内障の代謝異常について 第 2 報. 老人性白内障水晶体の ATP と $\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATPase}$ 活性について. *日眼* 86: 1379-1386, 1982
- 5) 錦織敏治: 老人性白内障の代謝異常について 第 3 報. 水晶体内部の $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ 比の分布とその異常について. *眼紀* 34: 830-837, 1983
- 6) Giblin, F. J., Chakrapani, B. and Reddy, V. N.: Glutathione and lens epithelial function. *Invest. Ophthalmol.* 15: 381-393, 1976
- 7) Kinoshita, J. H.: Mechanisms initiating cataract formation (Proctor Lecture). *Invest. Ophthalmol.* 13: 713-724, 1974
- 8) Matsuda, H., Giblin, F. J. and Reddy, V. N.: The effect of X-irradiation on Na-K ATPase and cation distribution in rabbit lens. *Invest. Ophthalmol. vis. Sci.* 22: 180-185, 1982
- 9) Iwata, S. and Kinoshita, J. H.: Mechanism of development of hereditary cataract in mice. *Invest. Ophthalmol.* 10: 504-512, 1971
- 10) 堀内正人, 岩田修造: 水晶体の前極および後極部位に対する薬物の影響. 第 8 回水晶体研究会抄録集 26, 1981