

学位論文題名

Na^+ , K^+ -ATPase 活性の
チロシンホスファターゼによる調節

学位論文内容の要旨

本研究では、ホスファターゼおよびキナーゼによる Na^+ , K^+ -ATPase のリン酸化および脱リン酸化による活性調節に焦点を当て、種々のキナーゼやホスファターゼの阻害剤の存在下で Na^+ , K^+ -ATPase 活性を測定することにより、活性調節にキナーゼやホスファターゼが関与している可能性を検討することを試みた。

まず、生体における基質がはっきりせず、リン酸エステル結合であれば脱リン酸化し、特異性はきわめて低いと考えられているアルカリ性ホスファターゼの阻害剤である levamisole と tetramisole のラット腎臓ミクロソームの Na^+ , K^+ -ATPase に対する作用、セリン/スレオニンホスファターゼ阻害剤である okadaic acid のラット腎臓ミクロソームおよび脳ホモジェネートの Na^+ , K^+ -ATPase 活性に対する作用を調べたが、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性には変化がみられなかった。 Na^+ , K^+ -ATPase 活性がセリン/スレオニンホスファターゼによって調節を受けているという報告もあるが、本研究で影響が見られなかったのは、動物種、臓器、細胞の違いから存在するセリン/スレオニンホスファターゼの種類が異なっているために、今回の実験系では Na^+ , K^+ -ATPase 活性調節に関与するセリン/スレオニンホスファターゼが存在しないか、あるいは実験系がその作用を検出するには不適當であった可能性などが考えられる。

次に、チロシンキナーゼ阻害剤である genistein と herbimycin A のラット脳ホモジェネートとミクロソームの Na^+ , K^+ -ATPase 活性に対する作用を調べたところ、genistein ではチロシンキナーゼ活性が十分に阻害される広い濃度範囲にわたって、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性に対する影響はみられなかったが、herbimycin A では軽度の Na^+ , K^+ -ATPase 活性減少傾向が見られた。genistein および herbimycin A が Na^+ , K^+ -ATPase によるイオン流量を減少させることから、チロシンキナーゼが Na^+ , K^+ -ATPase 活性を促進するという報告もあるが、種々のチロシンキナーゼの水晶体 Na^+ , K^+ -ATPase に対する効果を比較した結果

から、キナーゼの種類により Na^+, K^+ -ATPase の活性化、抑制に対する作用は異なることを指摘した報告も見られる。本研究結果では、チロシンキナーゼ阻害剤の顕著な作用は検出されなかったが、genistein および herbimycin A により阻害されるチロシンキナーゼが Na^+, K^+ -ATPase 活性の調節に関与していない可能性、 Na^+, K^+ -ATPase はすでに十分リン酸化されていて genistein および herbimycin A の効果が見られなかった可能性が考えられる。

さらにチロシンホスファターゼ阻害剤である dephostatin のブタ腎臓ミクロソームの Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する効果を調べたところ、活性は dephostatin の濃度に依存して低下し 50 %活性阻害濃度は $5 \mu\text{M}$ であった。さらにミクロソームをデオキシコール酸で可溶化後に、ヨウ化ナトリウム処理とグリセロール処理を行った精製 Na^+, K^+ -ATPase を用いて同様の実験を行ったところ、同様に濃度に依存して Na^+, K^+ -ATPase 活性は抑制されたが、みかけの 50 %活性阻害濃度は $15 \mu\text{M}$ と増加した。共同研究者である佐藤が、ラット脳および腎臓のホモジネート、ミクロソームと精製 Na^+, K^+ -ATPase を用いて、チロシンホスファターゼの阻害剤である dephostatin、3,4- dephostatin、phenylarsine などで処理することにより、濃度に依存して Na^+, K^+ -ATPase 活性が抑制されること、 Na^+, K^+ -ATPase の精製が進むとその作用が低下することを見出したので、佐藤の結果と合わせて、ラットとブタの種差、あるいはその臓器の違いにかかわらず、チロシンホスファターゼが Na^+, K^+ -ATPase 活性の調節に関与していると結論した。

チロシンホスファターゼ阻害剤によって共存するチロシンホスファターゼ活性が阻害され、その結果として Na^+, K^+ -ATPase 活性が抑制されるのなら、 Na^+, K^+ -ATPase のチロシンリン酸化レベルが変化していると考えられるのでウェスタンブロット法によりその可能性を調べた。まず、ブタ腎臓ミクロソームおよび精製 Na^+, K^+ -ATPase の $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ サブユニットを検出し、リン酸化チロシンに対する抗体を用いて両サブユニットのチロシンリン酸化レベルに対する dephostatin による前処理の効果を調べたところ、 $\alpha 1$ サブユニットのチロシンリン酸化量は、dephostatin による前処理によっていずれも増加したが、 $\beta 1$ サブユニットのチロシンリン酸化は dephostatin 処理の有無にかかわらず検出されなかった。この結果は、dephostatin によりチロシンホスファターゼ活性が阻害されると、 Na^+, K^+ -ATPase の触媒サブユニットである $\alpha 1$ サブユニットのチロシンリン酸化レベルが増加して Na^+, K^+ -ATPase 活性が抑制されることを強く示唆しており、 Na^+, K^+ -ATPase の活性調節サブユニットである $\beta 1$ はチロシンホスファターゼによる活性調節には関与していないことを示唆している。

阻害剤を用いた実験結果から、種々の精製度の Na^+, K^+ -ATPase 標品にはチロシンホスファターゼが共存している可能性が高いと考えられるため、*p*-NPP を基質として、チロシンホスファターゼ活性を測定した。ブタ腎臓のミクロソームの *p*-NPP 加水分解活性は、dephostatin と 3,4-dephostatin の濃度に依存して約 40 %、phenylarsine では約 20 %低下したが、4-bromotetramisole ではほとんど変化しなかった。次に、ブタ腎臓の精製 Na^+, K^+ -ATPase を用いて同様の実験を行ったところ、*p*-NPP 加水分解活性は dephostatin、3,4-dephostatin、および phenylarsine の濃度に依存して抑制されたが、抑制の程度は dephostatin と 3,4-dephostatin では 20 %、phenylarsine では 10 %程度であった。4-bromotetramisole による抑制は見られなかった。ブタ腎臓の精製 Na^+, K^+ -ATPase 標品中に共存する dephostatin、3,4-dephostatin および phenylarsine によって阻害される *p*-NPP 加水分解活性、すなわちチロシンホスファターゼ活性はミクロソームに比べて減少した。当然のことではあるが、 Na^+, K^+ -ATPase の精製に伴い共存するチロシンホスファターゼは減少したことを示し、同時に精製 Na^+, K^+ -ATPase ではチロシンホスファターゼ阻害剤の Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する影響が低下することとも一致する。 Na^+, K^+ -ATPase は完全に膜から可溶化してしまうと失活する酵素である。現在知られている最高精製度の標品でも膜断片に存在すると考えられており、精製度にかかわらず Na^+, K^+ -ATPase の周囲には膜が存在する状況は変わらないと考えられる。各精製段階でのチロシンホスファターゼと Na^+, K^+ -ATPase の会合状態は不明であるが、精製度が低い場合 Na^+, K^+ -ATPase と共存するチロシンホスファターゼによって活性が調節されるものと推定される。

これらの結果から、ラットの腎臓と脳、あるいはブタ腎臓に含まれるチロシンホスファターゼで、 Na^+, K^+ -ATPase の精製を進めていくと減少するものが Na^+, K^+ -ATPase の活性調節に関与している可能性があると考え、抗チロシンホスファターゼ抗体を用いて、各組織のホモジェネート、ミクロソームおよび精製 Na^+, K^+ -ATPase に混在するチロシンホスファターゼの検出を試みたところ、PTP1C/SHP1 以外の CD45、KAP、LAR、PTP1B、PTP1D/SHP2、RPTP β 、SIRP α 1 がラットの脳と腎臓およびブタの腎臓のホモジェネートに存在し、精製を進めると減少した。ラットの脳と腎臓およびブタの腎臓に共通して検出されたのは、CD45 と LAR であった。プロテインキナーゼの関与も当然考えられることから、抗プロテインキナーゼ抗体を用いてサンプル中のキナーゼの検出も試みたところ、PKC α 、PKC δ 、PKC ϵ は検出されたが、PKC γ とチロシンキナーゼである ZAP70 kinase は検出されなかった。

以上をまとめると、チロシンホスファターゼ阻害剤がブタ腎臓 Na^+, K^+ -ATPase 活性を抑制し、阻害剤存在下では Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットのチロシンリン酸化が増加していた。また、 Na^+, K^+ -ATPase と共存するチロシンホスファターゼが検出され、精製に伴って減少した。これらのことから、 Na^+, K^+ -ATPase 活性がチロシンホスファターゼによる脱リン酸化によって調節されていると結論した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 農 夫 男

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Na⁺, K⁺-ATPase 活性の チロシンホスファターゼによる調節

審査は井上、鈴木及び田村の各審査担当者が学位申請者に対して提出論文の内容並びに関連事項について、口頭試問により行われた。始めに学位申請者に対し、本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

Na⁺, K⁺-ATPase のリン酸化、脱リン酸化による活性調節に焦点を当て、各種キナーゼ、ホスファターゼの阻害剤存在下で Na⁺, K⁺-ATPase 活性を測定することで、活性調節にキナーゼ、ホスファターゼが関与する可能性を検討した。

まず、ラット腎臓、脳のホモジェネート、ミクロソームを用いてアルカリ性ホスファターゼ阻害剤である levamisole、tetramisole、セリンスレオニンホスファターゼ阻害剤である okadaic acid、チロシンキナーゼ阻害剤である genistein、herbimycin A の Na⁺, K⁺-ATPase に対する作用を調べたところ、顕著な作用は検出されなかった。

次にチロシンホスファターゼ阻害剤である dephostatin のブタ腎臓ミクロソームの Na⁺, K⁺-ATPase に対する効果を調べた結果、活性は dephostatin の濃度依存的に低下し、50% 活性阻害濃度は 5 μM であった。さらに精製 Na⁺, K⁺-ATPase を用いて同様の実験を行ったところ、同様に濃度に依存して活性は抑制されたが、みかけの 50% 活性阻害濃度は 15 μM と増加したことからチロシンホスファターゼが Na⁺, K⁺-ATPase 活性の調節に関与していると結論した。

チロシンホスファターゼ阻害剤によって共存するチロシンホスファターゼ活性が阻害され、その結果 Na⁺, K⁺-ATPase 活性が抑制されるなら、Na⁺, K⁺-ATPase のチロシンリン酸化レベルが変化していると考えられるためウェスタンブロット法によりその可能性を調べた。まず、ブタ腎臓ミクロソーム、精製 Na⁺, K⁺-ATPase の α1、β1 サブユニットを検出し、チ

ロシンリン酸化レベルに対する dephostatin 前処理の効果を調べたところ、 $\alpha 1$ のチロシンリン酸化量は dephostatin による前処理によって増加したが、 $\beta 1$ では dephostatin 処理の有無に関わらず検出されなかった。この結果は、dephostatin によりチロシンホスファターゼ活性が阻害されると $\alpha 1$ のチロシンリン酸化レベルが増加して Na^+, K^+ -ATPase 活性が抑制されることを強く示唆しており、 $\beta 1$ はチロシンホスファターゼによる活性調節に関与していないことを示唆する。

これらの結果から、種々の精製度の Na^+, K^+ -ATPase 標品にチロシンホスファターゼの共存が考えられるため、*p*-NPP を基質としてチロシンホスファターゼ活性を測定した。ブタ腎臓ミクロソーム、精製 Na^+, K^+ -ATPase を用いて調べたところ、共に dephostatin、3, 4-dephostatin 及び phenylarsine の濃度に依存して抑制された。抑制の程度は精製標品に比べミクロソームの方が大きかった。これは Na^+, K^+ -ATPase の精製に伴い共存するチロシンホスファターゼが減少したことを示し、精製 Na^+, K^+ -ATPase ではチロシンホスファターゼ阻害剤の Na^+, K^+ -ATPase 活性に対する影響が低下することとも一致する。

このことから標品に含まれるチロシンホスファターゼで、精製を進めると減少するものが活性調節に関与している可能性を考え、標品中に混在するチロシンホスファターゼの検出を試みたところ、CD45、KAP、LAR、PTP1B、PTP1D/SHP2、RPTP β 、SIRP $\alpha 1$ が存在し、精製を進めると減少した。すべてに共通して検出されたのは CD45 と LAR であった。プロテインキナーゼの関与も考えられることからキナーゼを検出したところ、PKC α 、PKC δ 、PKC ϵ が検出された。

以上をまとめると、チロシンホスファターゼ阻害剤がブタ腎臓 Na^+, K^+ -ATPase 活性を抑制し、阻害剤存在下で α サブユニットのチロシンリン酸化が増加していた。また、 Na^+, K^+ -ATPase と共存するチロシンホスファターゼが検出され、精製に伴い減少した。以上から、 Na^+, K^+ -ATPase 活性がチロシンホスファターゼによる脱リン酸化によって調節されていると結論した。

試問では本論文の内容、その関連する基礎的背景、実験の内容、方法に関して、幅広く申請者の考えについて質疑応答がなされた。これらに対して申請者は最近の関連した文献、本研究から得た知見を引用して適切な回答を行った。

本研究は、 Na^+, K^+ -ATPase の活性がチロシンホスファターゼによる脱リン酸化によって調節されることを、種々のキナーゼ、ホスファターゼ阻害剤を精製度の異なる Na^+, K^+ -ATPase 標品に作用させることにより見出し、具体的に活性を調節している可能性があるチロシンホスファターゼを検出するとともに、 Na^+, K^+ -ATPase の α サブユニットがチロシンホスファターゼ阻害剤である dephostatin 存在下でリン酸化されることも示している。十分かつ適切な実験を行い、結果を導きだしており、非常に有意義な論文であると考えら

れる。今後の展望としてチロシンのリン酸化部位の特定やチロシンキナーゼによる調節の可能性を検討する旨が報告された。

以上より、審査委員は全員、本研究が学位論文に十分値し、申請者が博士（歯学）の学位授与に相応しいと認定した。