

学位論文題名

チロシンホスファターゼ阻害薬の
 Na^+, K^+ -ATPaseに対する作用

学位論文内容の要旨

Na^+, K^+ -ATPase は全ての哺乳動物の細胞膜に存在しており、ATP 加水分解のエネルギーを使って K^+ を細胞の外から内側へ取り込み、 Na^+ を細胞の内から外側へ汲みだしている。この細胞膜を介する輸送系は動物細胞の重要な機能の維持に関与している。 Na^+, K^+ -ATPase の反応機構および活性調節に関しては多くの報告があるが、プロテインキナーゼ及びホスファターゼなどによる調節に関しては報告が少ない。そこで本研究は、動物細胞の組織から調製した Na^+, K^+ -ATPase に各種チロシンホスファターゼ阻害薬を作用させたのちに活性を測定することにより、チロシンリン酸化の関与を推定した。また、ウェスタンブロット法にて Na^+, K^+ -ATPase の α サブユニットのチロシンリン酸化を検討した。

Na^+, K^+ -ATPase 研究に用いられている標品は種々の程度に他のタンパク質を混在している。その中には、 Na^+, K^+ -ATPase の活性調節に関与している物質が含まれている可能性もあると考えられることから、その点を利用したのが本研究である。もし、 Na^+, K^+ -ATPase 活性を測定するサンプル中にチロシンホスファターゼが含まれており、そのチロシン脱リン酸化により Na^+, K^+ -ATPase 活性の調節に関与しているのなら、チロシンホスファターゼ阻害薬によってチロシンホスファターゼが阻害されると、 Na^+, K^+ -ATPase 活性にも影響が出ると推定される。そこで、ラット脳のホモジェネートを用いて dephostatin と 3,4-dephostatin とプレインキュベーションした際の Na^+, K^+ -ATPase 活性への効果を調べると、濃度に依存し Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害し、 IC_{50} は dephostatin では $9 \mu\text{M}$ 、3,4-dephostatin では $20 \mu\text{M}$ 程度であった。

dephostatin と 3,4-dephostatin のチロシンホスファターゼ活性阻害の IC_{50} は $8 \mu\text{M}$ と $18 \mu\text{M}$ とされており、両阻害薬がチロシンホスファターゼ活性を阻害した結果として Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害したと考えることができる。

もし Na^+, K^+ -ATPase 活性の抑制が、チロシンホスファターゼを介するものであ

るのなら、 Na^+ , K^+ -ATPase の精製を進め共存するチロシンホスファターゼが減少すると、チロシンホスファターゼ阻害薬による Na^+ , K^+ -ATPase 活性の抑制も低下すると予想される。そこでラット脳のホモジェネート、ミクロソームと精製 Na^+ , K^+ -ATPase 標品で 3, 4-dephostatin による阻害を調べたところ、精製が進むにつれ濃度に依存した Na^+ , K^+ -ATPase 活性の抑制は減少し、見かけの IC_{50} 値も増加した。この結果は、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の抑制が共存するチロシンホスファターゼ活性の阻害に基づくものであるという予想を支持すると同時に、チロシンホスファターゼ阻害薬が直接 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を抑制するのではないということを示している。

次に、この阻害が脳以外でも起こるのか調べる為、ラット腎臓のホモジェネートをサンプルとして、チロシンホスファターゼ阻害薬の効果を調べたところ、ラット腎臓ホモジェネートの Na^+ , K^+ -ATPase 活性も各阻害薬の濃度に依存して阻害され、 IC_{50} は dephostatin、phenylarsine、3, 4-dephostatin、4-bromotetramisole の順に $5\ \mu\text{M}$ 、 $11\ \mu\text{M}$ 、 $20\ \mu\text{M}$ 以上、 $125\ \mu\text{M}$ 以上であった。phenylarsine と 4-bromotetramisole のチロシンホスファターゼ阻害の IC_{50} 値はそれぞれ $18\ \mu\text{M}$ と 0.1mM とされ、ホモジェネートの Na^+ , K^+ -ATPase 活性抑制もチロシンホスファターゼ活性の阻害に基づくものであると考えても矛盾しない。もし、共存するチロシンホスファターゼ活性が阻害薬によって抑制された結果としてラット腎臓ホモジェネートの Na^+ , K^+ -ATPase 活性が阻害されるのなら、 Na^+ , K^+ -ATPase の精製度を高めてチロシンホスファターゼが除かれると阻害薬による Na^+ , K^+ -ATPase 活性抑制も軽減されると考えられる。そこで、ミクロソーム分画を用いて同様の実験を行った。ミクロソームの Na^+ , K^+ -ATPase 活性も各阻害薬の濃度に依存し阻害され、 IC_{50} は dephostatin、phenylarsine、4-bromotetramisole の順にそれぞれ、 $2\ \mu\text{M}$ 、 $13\ \mu\text{M}$ 、 $125\ \mu\text{M}$ 以上であり、ホモジェネートと同様に 4-bromotetramisole の場合は 50%以上の活性抑制は得られなかった。次に、精製 Na^+ , K^+ -ATPase を用いて同様の実験を行った。その結果、dephostatin および phenylarsine 存在下での Na^+ , K^+ -ATPase 活性の抑制は見られなかった。この結果も、チロシンホスファターゼによって Na^+ , K^+ -ATPase 活性が調節されている可能性を支持し、また、ラットの脳と腎臓共通の機構であることを示唆する。ラット以外の動物でも同様に観察されるのか確かめることを目的に、ブタ腎臓のサンプルを用いて同様の実験を行った。まず、ブタ腎臓のミクロソームを用いて dephostatin、3, 4-dephostatin、4-bromotetramisole および phenylarsine の効果を調べた。ミクロソームでは各阻害薬の濃度に依存して阻害され、 IC_{50} は dephostatin、3, 4-dephostatin、phenylarsine、4-

bromotetramisole の順にそれぞれ、 $5\mu\text{M}$ 、 $38\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 以上、 $62\mu\text{M}$ 以上であり、4-bromotetramisole の場合は 20%以上の活性抑制は得られなかった。

次に、精製 Na^+ , K^+ -ATPase を用いて同様の実験を行ったところ、いずれの阻害薬によっても濃度に依存し Na^+ , K^+ -ATPase 活性が低下する傾向を示したが、3,4-dephostatin、phenylarsine、4-bromotetramisole では 20%程度の活性の減少にとどまった。dephostatin による IC_{50} は $7\mu\text{M}$ であった。基本的にラット腎臓と脳の場合と類似し、ブタ腎臓でも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ことが示唆されたが、それぞれの阻害薬による IC_{50} 値がラットの場合と異なること、精製 Na^+ , K^+ -ATPase でも dephostatin による阻害は強く見られることなどから、種の違いによる関与するチロシンホスファターゼの違いを反映している可能性がある。

Na^+ , K^+ -ATPase は本来の ATPase 活性以外に、ナトリウムイオン非存在下、カリウムイオン存在下で部分反応であるパラニトロフェニルリン酸 (*p*-NPP) の加水分解活性を示す。そこで、*p*-NPP 分解 (*p*-NPPase) 活性に対するチロシンホスファターゼ阻害薬の効果を調べた。まず、ブタ腎臓のミクロソームを用いて dephostatin、3,4-dephostatin、4-bromotetramisole および phenylarsine の効果を調べた。ミクロソームの *p*-NPPase 活性は各阻害薬の濃度に依存して阻害されたが、最大阻害の程度は阻害薬によって異なり、3,4-dephostatin、dephostatin、phenylarsine、4-bromotetramisole の順にそれぞれ、40%、20%、15%、10%程度であった。次に、精製 Na^+ , K^+ -ATPase を用いて同様の実験を行ったところ 4-bromotetramisole による阻害はほとんど認められなかった。一方、dephostatin、phenylarsine、3,4-dephostatin では、濃度に依存し *p*-NPPase 活性は低下し、最大阻害は 40 から 50%程度であった。チロシンホスファターゼ阻害薬は、*p*-NPPase 活性も濃度依存的に抑制することが示されたが、 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の場合と異なり精製 Na^+ , K^+ -ATPase を用いると逆に抑制が増強された。チロシン残基に依存しないホスファターゼ阻害効果が出ている可能性もあり、今後の検討が必要である。以上のことから、ラットの腎臓と脳およびブタの腎臓において、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考えられるが、もし、 Na^+ , K^+ -ATPase 分子のチロシン残基の脱リン酸化により調節されるのなら、dephostatin の有無で Na^+ , K^+ -ATPase のチロシンリン酸化レベルが変化する可能性がある。そこで、ウェスタンブロット法によりラット腎臓ホモジェネートとミクロソームの Na^+ , K^+ -ATPase α 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。その結果、 Na^+ , K^+ -ATPase の α 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。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 α 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する。

以上の結果から、 Na^+ , K^+ -ATPase の活性調節にチロシンホスファターゼが関与しており、チロシン残基がリン酸化されると ATPase 活性が抑制されると結論した。

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

チロシンホスファターゼ阻害薬の Na^+, K^+ -ATPaseに対する作用

審査は、井上、鈴木およ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なら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 の反応機構、活性調節に関して多くの報告があるが、キナーゼ及びホスファターゼ等による調節に関しては報告が少い為、 Na^+, K^+ -ATPase 活性のリン酸化、脱リン酸化による調節を検討することを本研究の目的とした。

ラット脳ホモジェネートで dephostatin と 3,4-dephostatin の Na^+, K^+ -ATPase 活性への効果を調べると、濃度依存的に活性を阻害し、 IC_{50} は dephostatin で $9 \mu\text{M}$ 、3,4-dephostatin では $20 \mu\text{M}$ 程度であった。dephostatin と 3,4-dephostatin のチロシンホスファターゼ活性阻害の IC_{50} は $8 \mu\text{M}$ と $18 \mu\text{M}$ とされており、両阻害薬がチロシンホスファターゼ活性を阻害した結果 Na^+, K^+ -ATPase 活性を阻害したと考えられた。

又ラット脳各精製段階の標品で 3,4-dephostatin による阻害を調べたところ、精製が進むにつれ見かけの IC_{50} 値が増加したことから ATPase 活性の抑制が共存するチロシンホスファターゼ活性の阻害に基づくもので、阻害薬が直接 Na^+, K^+ -ATPase 活性を抑制するのではないことを示した。ラット腎臓のホモジェネートにおいては IC_{50} は phenylarsine、4-bromotetramisole で $11 \mu\text{M}$ 、 $125 \mu\text{M}$ 以上でそれぞれのチロシンホスファターゼ阻害の IC_{50} 値に類似しホモジェネートの場合もチロシンホスファターゼ活性の阻害に基づくと考えられた。

もし共存するチロシンホスファターゼ活性が阻害薬により抑制された結果としてラット腎臓ホモジェネートの ATPase 活性が阻害されるなら、精製度を高めチロシンホスファターゼが除かれると阻害薬による Na^+, K^+ -ATPase 活性抑制も軽減されると考えられるがマイクロソームで IC_{50} 値は増加し、精製標品では dephostatin、phenylarsine 存在下での活性の抑制は見られず、この結果からもチロシンホスファターゼにより Na^+, K^+ -ATPase 活性が調節されている可能性を示した。

一方ブタ腎臓でもチロシンホスファターゼが Na^+, K^+ -ATPase 活性の調節に関与することを示したが、 IC_{50} 値がラットの場合と異なること、精製標品でも dephostatin による阻害は強く見られることから種の違いにより関与するチロシンホスファターゼが違う可能性が考えられた。

Na^+, K^+ -ATPase は ATPase 活性以外に、 Na イオン非存在下、 K イオン存在下で部分反応の *p*-NPP の加水分解活性を示しその活性も検討した。ブタ腎臓のマイクロソームの *p*-NPPase 活性は濃度に依存し阻害され精製標品では 4-bromotetramisole による阻害は殆どみられず、他の 3 種類では最大阻害は 40～50%程度で *p*-NPPase 活性も濃度依存的に抑制することを示したが、精製標品で抑制が増強しチロシン残基に依存しないホスファターゼ阻害効果が出ている可能性も考えられた。

ウェスタンブロット法で Na^+, K^+ -ATPase α 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 Na^+, K^+ -ATPase α サブユニットのチロシンリン酸化量は、dephostatin による前処理により増加することを示した。

試問では、本論文の内容とその関連事項について、チロシンホスファターゼ阻害薬を各動物組織から調整した Na^+, K^+ -ATPase に作用させた活性測定の結果やリン酸化との関連についての質疑応答がなされた。これらに対して申請者は本研究から得た知見について適切な回答を行った。

本研究は、 Na^+, K^+ -ATPase 活性の調節にチロシンホスファターゼの脱リン酸化が関与していることを示唆した最初の報告である。

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。