

(78)

氏名(生年月日)	イ トウ エイ コ 伊 東 栄 子
本 籍	
学位の種類	医学博士
学位授与の番号	乙第1156号
学位授与の日付	平成3年2月15日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	ヒト血漿中に見出された Na^+ , K^+ -ATPase 活性化因子の精製および生化学的 特性
論文審査委員	(主査) 教授 降矢 熒 (副査) 教授 内山 竹彦, 浜野 恭一

論文内容の要旨

目的

Na^+ , K^+ /transporting ATPase EC, 3.6.1.37(以下 Na^+ , K^+ -ATPase と略す)は細胞膜貫通蛋白であり, 細胞内に流入する Na イオンの汲み出しを行っており, 細胞の機能を維持するために必要不可欠な酵素である。アルコールを長期間採取した動物では, 対照と比較し, この Na^+ , K^+ -ATPase 活性が, 骨格筋, 赤血球, 脳, 肝臓で増加すること, アルコール性肝炎患者の赤血球膜 Na^+ , K^+ -ATPase の活性が, 正常人に比べ有意に高いという報告がある。今回, 著者は, アルコール性肝炎患者に見られる赤血球膜 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の亢進が血漿中に含まれるタンパク質性活性化因子に基づくと想定し, 活性化因子を精製し, その生化学的特性を検討した。

方法

本学消化器内科に入院したアルコール性肝炎患者から得たヘパリン血を遠心法により血漿と赤血球を分離し, Hanahan らの方法を用い赤血球膜を調整した。対照として, 正常人ヘパリン血から調整した赤血球膜と血漿を用いた。 Na^+ , K^+ -ATPase 活性測定は中尾らの方法に準じた。 Na^+ , K^+ -ATPase 活性化因子の生化学的性質を調べるために, 血漿を1) 透析, 2) 加熱処理, 3) アセトン処理, 4) 過塩素酸処理し, Na^+ , K^+ -ATPase 活性測定系に添加し, 活性化効果を調べた。加熱処理血漿に含まれる活性化因子の精製には Blue-Sepharose CL-6B, DEAE-Toyoparl 650s, Sephacryl S-200カラムクロマトグラフィーを用いた。精製した活

性化因子を抗原としてウサギ背部皮下に注射し抗体を作製した。プロテアーゼ活性の測定は Siegelman らの方法に準じた。 Na^+ , K^+ -ATPase 活性化に対するプロテアーゼインヒビターの効果も調べた。

結果及び考察

1) 正常人及びイヌ腎由来 Na^+ , K^+ -ATPase は, 血漿添加により活性化し, 患者血漿のほうがその効果は高く, Na^+ , K^+ -ATPase 活性化因子が血漿中に存在することが示された。血漿を加熱処理, 酸処理を行っても, 活性化因子としての作用は失われなかった。

2) 精製した活性化因子の分子量は, SDS-PAGE 法では28Kd, SDS 非存在化での PAGE 分析により59 Kd, ゲル濾過法では58Kd と算出された。このタンパク質の抗体は Na^+ , K^+ -ATPase の活性化を抑制したことから, SDS-PAGE 上28Kd タンパクが活性化因子であることが明らかになった。活性化因子は, 血漿中で28Kd の単量体が水素結合などの弱い結合により, 二分子結合した二量体として存在していると考えられる。

3) 精製した活性化因子にプロテアーゼ活性が認められ, 精製度の上昇に伴い低分子量タンパクが出現した。活性化因子を37°C に温置すると, 次第にタンパク帯は消え, 同時に Na^+ , K^+ -ATPase 活性化能が減少した。このタンパク帯の消失は, DFP により抑制され, 28Kd タンパクは混在しているプロテアーゼにより加水分解される, あるいは28Kd タンパク自身がプロテアーゼであると考えられた。

4) プロテアーゼインヒビターは、血漿添加による Na^+ , K^+ -ATPase の活性化を抑制した。この事は、活性化因子そのものがプロテアーゼである可能性を示唆する。従って、血漿中に存在するプロテアーゼにより、 Na^+ , K^+ -ATPase 分子の一部が切断され、この酵素の

活性化が起こると考えられる。

5) アルコール性肝炎患者の赤血球膜にみられる Na^+ , K^+ -ATPase 活性の上昇は、血漿中に存在するプロテアーゼにより、部分的に説明され得るものと考えられる。

論文審査の要旨

本論文は、ヒト血漿中に Na^+ , K^+ -ATPase の活性化因子が存在することを証明し、この活性化因子を正常人血漿から精製し、単量体の分子量が28Kdである耐熱性タンパク質であることを明らかにしたものである。この活性化因子の作用がプロテアーゼ阻害剤により抑制されることから、それ自身がプロテアーゼである可能性を示唆するものであり、学術上価値あるものと認める。

主論文公表誌

ヒト血漿中に見出された Na^+ , K^+ -ATPase 活性化因子の精製および生化学的特性
東京女子医科大学雑誌 第60巻 第12号
1048-1058頁（平成2年12月25日発行）

副論文公表誌

1) Aspartate aminotransferase and lactate dehydrogenase in human erythrocytes (ヒト赤血球のアスパラギン酸アミノトランスフェラー

ゼと乳酸脱水素酵素)

東女医大誌 50 (1) : 73-83, 1980

2) ヒト赤血球アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの部分的精製
東女医大誌 50 (6) : 487-493, 1980

3) In vivo におけるヒト血漿アルブミンの非酵素的糖付加反応と蛍光一健常者と糖尿病患者との比較—

日栄・食糧会誌 43 (1) : 17-22, 1990