

氏名(本籍)	しょうのまりこ 庄野真理子(広島県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博乙第1,171号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Na ⁺ -pump in the Plasma Membrane of the Marine Raphidophycean <i>Heterosigma akashiwo</i> (海産ラフィド藻 <i>Heterosigma akashiwo</i> の細胞膜に局在する Na ⁺ -pump)
主査	筑波大学教授 理学博士 藤伊正
副査	筑波大学教授 理学博士 猪川倫好
副査	筑波大学教授 理学博士 鎌田博
副査	筑波大学助教授 理学博士 沼田治

論 文 の 要 旨

本論文では海産藻類の細胞内 Na⁺の排除の機構を明らかにすることを目的とし、海産ラフィド藻 *H. akashiwo* の細胞膜に存在する Na⁺-ATPase を精製しその特性を明らかにしている。

まず最初に *H. akashiwo* 細胞を、Yeda Press で破碎した後遠心分画を行い、その上清を sucrose 不連続密度勾配遠心かけ、0.7 M-1.0 M の sucrose の界面を集めて純度の高い Plasma Membrane fraction (P. M. fraction) を得ている。

さらにそこに存在する Na⁺-ATPase の活性に対する至適 Na⁺濃度、K⁺濃度および至適 pH を求め、Na⁺-ATPase は 5 mM の Mg²⁺存在下で、Na⁺濃度100-150 mM、K⁺濃度10 mM の組み合わせのとき最大の活性を示し、動物の Na⁺/K⁺-ATPase と極めて類似した値であることを示した。至適 pH は8.0以上。また Na⁺に対する Km 値は約12 mM、ATP に対する Km 値は約800 μM であることを明らかにした。

P. M. fraction は ATP 存在下で、140kDa のリン酸化反応中間体を形成する。Mg²⁺を加えた反応液中に1価カチオン (Na⁺, K⁺, Li⁺, Rb⁺, Cs⁺, NH₄⁺) をそれぞれ加え、Na⁺にのみ特異的に中間体が形成されることを確認している。また、Na⁺を加えた反応液中にさまざまな2価カチオンを加え、Mn²⁺>Ca²⁺>Mg²⁺の順で中間体形成活性が強いことを明らかにした。Na⁺とMg²⁺を加えて形成させた中間体に、さまざまな1価カチオンを加えて脱リン酸化を行わせたところ Na⁺とLi⁺以外の1価カチオンを加えた場合、中間体が脱リン酸化されることを示した。また、リン酸化に対する ATP の Km 値は1 μM 以下であることを明らかにしている。本論文ではこれらの結果を基に Na⁺-ATPase の reaction scheme を提唱している。

次に P. M. fraction を detergent で可溶化し、リン脂質を加えてリポゾームに組み込み、²²Na を含む100 mM の NaCl と 5 mM の MgCl₂ を含んだ反応液に ATP を加え、リポゾーム内に取り込まれた²²Na を測定している。²²Na の取り込みは ATP に依存しており、その Km 値は Na⁺-ATPase の ATP に対する Km とよく一致した。また²²Na の輸送活性は P-type ATPase の阻害剤バナジン酸で阻害され、プロトノフォアでは阻害されなかった。P. M. fraction で見られる ATP 依存性の Na⁺輸送活性は、同じ P. M. fraction に Na⁺により活性の上昇する ATPase が存在することや、Na⁺依存的に140 kDa のリン酸化反応中間体が形成され、それが K⁺等の1価カチオンにより脱リン酸化されることと合わせて、同じ分子による反応であることが強く示唆されることを示している。

さらに細胞膜から界面活性剤 Sucrose monolaurate (SM-1200) を用いて ATPase 分子を可溶化し、140 kDa のリン酸化反応中間体の形成能を指標として精製を行っている。Sephacryl S-300によるゲル濾過後活性を示した画分を DEAE-sepharose, FPLC を用いた Mono Q カラムにかけ、Mono Q カラムからの 0.35 M-0.45 M の NaCl 溶出画分に 140 kDa のリン酸化反応中間体形成能を認めた。Mono Q 溶出画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後、銀染色を行ったところリン酸化反応中間体が形成された画分に 140 kDa のバンドが認められた。また、このバンドと溶出パターンが一致する他のバンドは認められず、精製された 140 kDa の分子は Na^+ -ATPase であり、この分子は動物の Na^+ , K^+ -ATPase と異なり単一のポリペチドからなる分子であることが示唆された。

以上の実験より、アカシラの細胞膜上に存在する Na^+ -ATPase は動物の細胞膜上に存在する Na^+ / K^+ -ATPase と生化学的反応性において極めて類似しており、機能的にも類似した Na^+ -transporting ATPase であることを示した。

審 査 の 要 旨

本研究は植物界において Na^+ -pump 分子の存在を示した最初の報告である。これまで藻類の細胞膜に、動物の細胞膜上に存在する Na^+ / K^+ -ATPase と同様の機能を持つ ATPase が存在するのではないか、という傍証が数種の藻類を用いた研究により報告されてきたが、ある特定の ATPase 分子がその機能を果たしていることが本論文により明らかとなった。このことは、海産藻類の細胞内 Na^+ 排除の機構を明らかにしていくうえで極めて重要な研究であると評価される。またその ATPase 分子の反応機構が動物の Na^+ / K^+ -ATPase と類似していることから、ATPase 分子の進化をたどるうえにおいても興味深い研究であると考えられる。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。