

氏名	中村重信 なかむらしげのぶ
学位の種類	医学博士
学位記番号	論医博第629号
学位授与の日付	昭和51年1月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	<b>Studies on Mammalian Plasma Membranes—Effect of Sodium Deoxycholate on 5′-Nucleotidase—</b> (哺乳動物細胞膜の研究 —デオキシコール酸ソーダの5′-ヌクレオチダーゼに及ぼす影響について—)
論文調査委員	(主査) 教授 沼正作 教授 村地孝 教授 早石修

## 論文内容の要旨

従来 5′-nucleotidase に関する研究は三つの目的を持って行われて来た。第一は 5′-nucleotidase が細胞膜に局在するところから肝細胞等の細胞膜マーカーエンザイムとして用いられている。第二は 5′-nucleotidase がヌクレオチドの利用，代謝の上に重要な意味を持つため，第三は肝疾患等の患者血清中で 5′-nucleotidase 活性が上昇することから，種々の検索が進められて来た。本研究は上記三方向の研究を関連させる一環として，細胞膜上の 5′-nucleotidase 活性とデオキシコール酸にて可溶化した場合の 5′-nucleotidase 活性の変化について検討を行った。

ラット肝臓を 1mM 重曹中でホモゲナイズし，1,500×g にて10分遠沈し，沈渣を d = 1.22 の蔗糖溶液に懸濁し，d = 1.18，d = 1.16 の蔗糖液を重層し，66,000×g で60分遠沈した。最上層に浮上した白層を採取し，更に 1mM 重曹中にて二度遠沈し，細胞膜標品とした。本標品には intact bile canaliculi を含んでおり，5′-nucleotidase 活性はホモジエネートに比し，20～30倍の比活性上昇をみた。本膜標品より，硫酸処理，熱処理，アガロースクロマト，DEAE クロマトにより65倍の比活性上昇をみた。細胞膜の 5′-nucleotidase の諸性質は精製後透析した 5′-nucleotidase 標品と同様であった。5′-nucleotidase 活性は 5′-AMP より生じた磷酸の定量及び <sup>14</sup>C-5′-AMP より生じた <sup>14</sup>C-adenosine を Dowex-1 カラムにて分離して放射能より定量した。いづれの測定法を用いた場合も同じ活性値を示した。蔗糖密度勾配法にて遠沈を行うと精製透析標品も，細胞膜いづれを用いても沈渣にのみ 5′-nucleotidase 活性を認めた。両標品を 0.4% デオキシコール酸中にて遠沈を行うと，7S 部分にのみ 5′-nucleotidase 活性がみられた。5′-AMP と 5′-CMP に対する活性は同じ比率で認められた。精製透析標品を 10mMATP-0.4% デオキシコール酸中で遠沈した場合も同様に 7S に 5′-nucleotidase 活性がみられた。細胞膜を phospholipase C にて処理した標品をデオキシコール酸の存在しない条件で遠沈するとやはり 7S に 5′-nucleotidase 活性がみられた。デオキシコール酸存在下と非存在下で Km を求めるとそれぞれ  $4.7 \times 10^{-5} \text{M}$ ， $1.4 \times 10^{-5} \text{M}$  であった。最大活性はデオキシコール酸濃度の上昇に随って上昇し，NaCl では本効果は認められなかった。コール酸等

他の胆汁酸による 5'-nucleotidase 活性上昇も認められた。基質特異性は 5'-mononucleotide に限られ、5'-ATP, 5'-ADP, 2'-AMP, 3'-AMP,  $\beta$ -glycerophosphate, 3', 5'-cyclic AMP は基質としなかった。細胞膜、精製透析標品いずれも 5'-UMP>5'-AMP>5'-GMP>5'-IMP の順に活性が高いが、デオキシコール酸存在下では 5'-AMP>5'-CMP>5'-UMP>5'-GMP となり基質特異性の変化を示した。至適 pH は  $10^{-5}$ M の基質濃度では 7.9 でデオキシコール酸による変化はなかったが、最大活性はデオキシコール酸存在下、非存在下では 8.5 と 7.6 であった。熱に対する態度はデオキシコール酸存在下では 60° 5 分で 38%、非存在下では 94% の失活を示した。5'-nucleotidase は 5'-ATP, 5'-ADP, adenosine, 3'-AMP によって拮抗阻害を受けた。この阻害は精製酵素へのデオキシコール酸添加又は細胞膜の phospholipase C 処理によっても阻害率に変化はなかった。

以上より、5'-nucleotidase がデオキシコール酸にて可溶化された場合と細胞膜上あるいは透析により aggregate した場合の反応とは酵素学的に差があることを明らかにした。閉塞性黄疸等ではデオキシコール酸と同時に 5'-nucleotidase が上昇することが知られており、細胞膜の血中への可溶性にデオキシコール酸がどのように関係しているかを現在検索している。

#### 論文審査の結果の要旨

5'ヌクレオチダーゼは細胞膜に局在することが知られており、肝疾患等の診断の目的にも用いられている。本酵素を肝細胞膜より精製し、単一蛋白にまで純化し、精製透析酵素と細胞膜上の酵素の性質が同様であることを確めた。精製標品は磷脂質と糖を含んでおり、透析標品は巨大分子を形成し、デオキシコール酸可溶化により沈降速度 7S と分子量 15 万を示すことを認めた。可溶化により  $K_m$  は約 3 倍に、至適 pH はアルカリ側に移動し、60°C 5 分の熱処理により失活の程度が約 3 倍に上昇し、最大活性を示す基質は 5'UMP より、5'AMP に変化することを明らかにした。精製酵素標品は 5'AMP とアデノシンの間に交換反応を示すが、可溶化により交換反応の速度が減少することを認め、精製酵素を透析した場合または細胞膜そのものは可溶化した場合に比して 5'ヌクレオチダーゼはより自由度が低いいため異った性質を示すと推断した。

以上の研究は黄疸の際のデオキシコール酸上昇や老化による細胞膜変化の研究に対する実験手法を提供し、諸種疾患の診断や、細胞老化の機序の解明に寄与するところが多いと考える。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。