

氏名	馬屋原 宏 まやはら ひろし
学位の種類	医学博士
学位記番号	論医博第846号
学位授与の日付	昭和55年7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	Ultracytochemical localization of ouabainsensitive, potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity in the rat kidney (ラット腎におけるウワバイン感受性, カリウム依存性パラニトロ フェニルホスファターゼ活性の超微局在)
論文調査委員	(主査) 教授 濱島義博 教授 吉田 修 教授 小川和朗

論文内容の要旨

Na の能動輸送に関係する Na-K-ATPase の腎臓内局在に関しては、微細生化学的方法を用いた直接的研究や、単一尿細管剝離法などの生理学的方法を用いた間接的研究があるが、結果は確定していない。本研究では、細胞化学的方法を用い、光学および電子顕微鏡レベルにおいて、in situ に本酵素の腎臓内局在を明らかにすることを試みた。

現在のところ、Na-K-ATPase の局在を ATP を基質として細胞化学的に検出する方法は確立されていない。今回用いた細胞化学的方法は、本研究に先立って我々の研究室で開発されたもので、その原理は、Na-K-ATPase が示すウワバイン感受性、カリウム依存性のパラニトロフェニルホスファターゼ (K-NPPase) 活性を検出するものである。

ラット腎を厚さ 1 mm 以下のスライスとし、2%パラホルムアルデヒドと、0.5%グルタルアルデヒドの混液により、0~4℃において60分間固定したのち、光顕用には 10~14 μm の凍結切片、電顕用には 40~50 μm の Vibratome 切片を作製し、K-NPPase 活性検出のための浸漬液により室温で5~15分間浸漬した。反応後、光顕用切片は黄色硫化アンモニウムによる発色、水洗後、グリセリンゼリーに封入して検鏡した。電顕用切片は、オスミウム酸による後固定を経て、常法によりエポン包埋し、超薄切片作製後酢酸ウラニルによる単染色を行い、電顕的に観察した。光顕では、強い K-NPPase 活性が皮質の遠位曲尿細管および集合管、髓質外層のヘンレ係蹄上行脚太い部に認められた。一方近位曲尿細管は、その初節が弱陽性を示したが、第2節および第3節には活性はほとんど認められなかった。腎小体、血管、ヘンレの係蹄細い部および髓質部集合管には活性は認められなかった。電顕的には、近位曲尿細管、遠位曲尿細管、皮質部集合管およびヘンレ係蹄上行脚太い部における K-NPPase 活性は、すべて上皮細胞の基底陷入膜および側面膜に局限して認められ、管腔側の原形質膜には活性は認められなかった。強拡大では、反応産物は原形質膜の細胞質側に附着して観察された。対照として浸漬液に 10 mM のウワバインを加えた場合には、K-NPPase 活性は一部抑制され、浸漬液から K を除去した場合には、活性はほとんど消失

した。

以上の結果から、つぎのことが判明した。(1)正常ラット腎における Na-K-ATPase の (従って Na の能動輸送の) 主要な局在部位は、ヘンレ係蹄上行脚太い部、遠位曲尿細管および皮質部集合管である。(2)近位曲尿細管初節にも、弱い能動輸送が局在する。(3)これらの細胞においては、能動輸送は基底陥入膜および側面膜に限局しており、管腔側には存在しない。(4)ヘンレ係蹄細い部および髓質部集合管には、正常では Na の能動輸送は認められない。

論文審査の結果の要旨

本論文は、著者らが最近開発した新しい細胞化学的方法 (DM-SO を用いたくえん酸鉛法) を用いて、ラット腎に於るウワバイン感受性、K-依存性パラニトロフェニルホスファターゼ活性 (K-NPPase) の局在を光顕および電顕レベルで検出したものである。

K-NPPase 活性は、ヘンレ係蹄上行脚太い部、遠位曲尿細管及び皮質部集合管の上皮の側面膜及び基底陥入膜に強陽性、近位曲尿細管初節に弱陽性、糸球体、ヘンレ係蹄細い部及び髓質部集合管に陰性であった。

Na の能動輸送に関係する Na-K-ATPase が K-NPPase 活性を示すことは生化学的研究により確立されており、本論文で明らかにされた K-NPPase 活性の局在部位は Na の能動輸送の局在部位を示すものと考えられる。従来より Na-K-ATPase や能動輸送の腎尿細管内局在は、単一尿細管剥離法などの困難で再現性の乏しい方法により検出されてきたのに対し、本論文に用いられた細胞化学的方法は、比較的容易かつ再現性が高く、得られた結果は最近の対向流増幅理論から予想される Na-K-ATPase の局在部位ともよく一致している。

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。