

氏 名	上 野 聰 樹 うえ の さと き
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 第 589 号
学位授与の日付	昭 和 56 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学位論文題目	ULTRACYTOCHEMICAL LOCALIZATION OF OUABAIN-SENSITIVE. POTASSIUM-DEPEN- DENT P-NITROPHENYLPHOSPHATASE AC- TIVITY IN THE GUINEA PIG RETINA (モルモット網膜におけるウワバイン感受性, カリウム依存性パラナ イトロフェニルフォスファターゼ活性の電子顕微鏡組織化学的局在) (主 査)
論文調査委員	教 授 小 川 和 朗 教 授 濱 島 義 博 教 授 塚 原 勇

論 文 内 容 の 要 旨

能動輸送に関係する Na-K-ATPase の網膜電気活動における重要性が多く、生理学的および生化学的研究により示唆されてきたが、その局在、特に細胞内微細局在についてはまったく明らかにされず、その解明が待たれるところであった。現在のところ、組織化学的に ATP を基質として Na-K-ATPase 活性を検出しようとする試みは、いずれも失敗に終わっている。このような状況を打開するため、Ernst は Na-K-ATPase 複合体のしめす K-依存性フォスファターゼ活性をパラナイトロフェニルりん酸を基質として検出する Sr-Pb 2段階法を発表した。しかしながら、この方法には2つの重大な欠陥が存在するため、その後、馬屋原らによりクエン酸鉛 1段階法が開発され良好な結果が得られている。本研究の目的はこの新たに開発された方法をもちい、Na-K-ATPase の部分反応であるウワバイン感受性、K-依存性パラナイトロフェニルフォスファターゼ (K-NPPase) 活性の網膜における微細局在を in situ に検出することにある。

成熟モルモットを2%パラフォルムアルデヒドおよび0.25%グルタルアルデヒド混合液により5分間灌流固定した。直ちに眼球を摘出し、凍結ミクロトームあるいはビブラトームをもちいて10~50 μ の切片とした。これらの切片を馬屋原らの浸漬液中で5~25分間浸漬した。対照としては浸漬液より基質またはKを除去したもの、阻害剤としてウワバイン(10 mM)またはPCMB-S(1 mM)を添加したもの等をもちいた。さらに比較のため、クエン酸鉛法により非特異的アルカリフォスファターゼ(ALPase), Mg-ATPase 活性も検出した。その後通常の方法にて光顕および電顕的に観察した。

視細胞においては、K-NPPase活性は内節、核周囲細胞膜、シナプス膜に陽性であったが、外節では陰性であった。就中、シナプス膜には反応産物が強陽性にみられた。ニューロンおよび神経節細胞のシナプス膜にも反応は強陽性であったが、核周囲部細胞膜では弱陽性であった。神経節細胞の軸索である視神経線維の反応は中等度陽性であった。ミューラー細胞においては K-NPPase 活性は全細胞膜で陽性であったが、特に内網状層における突起部に強い活性がみられた。これら細胞膜にみられる活性はウワバイン添

加により1部抑制され、K-除去の場合にはほとんど消失した。PCMB-S 添加、基質除去によっては、反応はまったくみられない。

これら細胞膜にみられる反応以外に、ミューラー細胞では小胞体、ゴルジ装置、核膜にも反応産物が認められた。膜の活性とは異なり、これらの反応はウワバイン不感受性、K-非依存性であった。このような反応産物は神経細胞においては認められなかった。

以上の結果からつぎのことが判明した。(1)生理学的研究により示唆された、視細胞内節能動輸送説を支持する結果をえた。(2)ニューロンにおいては、樹状突起および軸索に Na-K-ATPase 活性が強い。(3)ミューラー細胞における Na-K-ATPase の主要な局在部位は内網状層における突起部である。(4)ミューラー細胞には Na-K-ATPase の部分反応と異なる K-非依存性 NPPase が局在する。

論文審査の結果の要旨

Na-K-ATPase による Na および K イオンの能動輸送が網膜電気活動に重要な関連性をもつと示唆されているが、本酵素の局在、特に細胞内微細局在については現在までまったく不明であった。本研究は Na-K-ATPase の部分反応である K-NPPase 活性を電顕組織化学的に検出することにより、網膜 Na-K-ATPase 活性の局在を in situ に観察したものである。

これから、(1)視細胞における Na-K-pump site は内節より近位であり、特にシナプス部に活性が強い。(2)ニューロンにおいては樹状突起および軸索に活性が強い。(3)ミューラー細胞における最強活性部位は内網状層突起部であるという興味ある結果が判明した。これらは複雑に混在する網膜各構成細胞間の Na および K イオンの流れを解明するための重要な基本的事実と考えられる。

さらに、本研究でミューラー細胞 ER に限局して K-非依存性 NPPase 活性が局在することを著者らが発見したが、この酵素はミューラー細胞の重要な指標酵素となりうるもので、今後の研究に貢献するところ大である。

したがって、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。