

氏 名 (本籍) しね ば りゅう さぶ ろう
 標 葉 隆 三 郎

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 第 1 8 6 6 号

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 6 2 年 2 月 2 5 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 5 3 年 3 月
 東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Protein phosphatases of rat liver particulate fraction I.
 Characterization of phosphorylase phosphatases and
 glycogen synthase phosphatases associated with rat liver
 particulate fraction
 Protein phosphatases of rat liver particulate fraction II.
 Particulate-associated protein phosphatases of rat ascites
 hepatoma AH-13: Isolation and characterization of a novel
 glycogen synthase phosphatase (Phosphatase N)
 (ラット肝顆粒画分プロテインホスファターゼ)
 1. ラット肝顆粒結合性ホスホリラーゼホスファターゼとグリコー
 ゲン合成酵素ホスファターゼの性状
 2. ラット腹水肝癌AH-13顆粒結合性プロテインホスファターゼ
 (ホスファターゼN)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 森 昌 造 教 授 多 田 啓 也

 教 授 林 典 夫

論 文 内 容 要 旨

糖代謝の調節に重要な役割を演ずる酵素の多くは、プロテインキナーゼによるリン酸化とプロテインホスファターゼによる脱リン酸により活性の調節を受けており、したがってこれらの機構の解明は、生理学的見地からも病理学的見地からも、重要かつ緊急なことがらに属する。本研究においてはまず、ラット肝の顆粒画分に存在するプロテインホスファターゼを、グリコゲン合成酵素D (ラット肝)、ホスホリラーゼ_a (ウサギ骨格筋)を基質として、またカラムクロマトグラフィーを主要な分画手段として検索、主に分子種の面からその実体を明らかにした。また腹水肝癌AH-13と比較することにより、顆粒画分ホスファターゼの癌性変化をも調べた。

まず顆粒画分のプロテインホスファターゼの実体について述べると、正常ラット肝にはP₁、P₂、M₁と名付けた3種類の分子種が見いだされ、中ではP₁とP₂がホスホリラーゼ_a、M₁がグリコゲン合成酵素に対する特異性が高かった。P₁、P₂は 1) 活性がMg²⁺、Mn²⁺により強く阻害される。2) 活性が蛋白性のホスファターゼ特異的インヒビター2により阻害されるが、その程度はP₂がP₁よりもはるかに大きい。3) 分子量(ゲルろ過)はP₁ 5万、P₂ 3万、4) P₁をトリプシンで処理するとP₂に変わる、5) P₁とP₂とでラット肝ホモジネートにホスホリラーゼホスファターゼ活性の大部分を占める、等々の特徴を示した。また以上の成果からP₁、P₂のうちではP₁が無傷の、そして生理的に重要な分子種であると推測された。一方、グリコゲン合成酵素に特異性の高いM₁には、1) Mn²⁺により強く促進されるがMg²⁺には促進されない、2) 上のインヒビター2により阻害されない、3) 分子量はゲルろ過で約7万、4) グリコゲンやホスホリラーゼ_aにより強く阻害される、等の特徴が見られた。M₁は、ラット肝ホモジネートのグリコゲン合成酵素ホスファターゼ活性の50%以下を占めるに過ぎないが、50%以上を占めるIAには、グリコゲンの阻害が見られていない。

以上のごとく肝顆粒画分のプロテインホスファターゼの実体が、主に分子種の見地から明らかになったので、次にこれと対比させつつ、ラット腹水肝癌AH-13の顆粒画分のプロテインホスファターゼにつき調べた。

上清画分ではわれわれはすでに、肝癌でIAが新しいホスファターゼ分子種Hに置換された像を見てきているが、顆粒画分においても変化はかなり激烈であり、正常肝にも存在するが決して豊富ではなかったNという分子種が肝癌で著明に増加していた。このホスファターゼには、1) Mn²⁺、Mg²⁺により強く阻害される、2) ATPやNaFにより強く阻害される、3) インヒビター2により阻害される、4) 分子量はゲルろ過で約5万である、5) グルコース6リン酸の存在化、グリコゲンにより強く阻害される、等の特徴がある。なおDEAEセルロース、セファロース4

Bのクロマトグラフィーで、少なくとも部分精製は可能であった。この酵素はAH-13では動物へ移植後の日数で大きく変化し、癌細胞の対数増殖期にはきわめて活性が高いが、増殖速度の低下と平行に低下した。またDAB誘発肝癌においても再生肝においても増殖期にはきわめて高い値を示した。

英国のCohenらは、組織の、顆粒画分のプロテインホスファターゼは彼らのいうタイプIに属し、蛋白性のインヒビターや産物に阻害される分子種とのべているが、われわれは、タイプIに属するにせよ、顆粒画分のプロテインホスファターゼの構成はきわめて複雑であることを明らかにした。複雑なだけでなく、 P_1 と M_1 はそれぞれ、生理的なホスホリラーゼホスファターゼ、合成酵素ホスファターゼの資格を備えており、癌で増加する分子種Nは、その出現が組織の増殖性活性と密接に相関している。今後はこれらの点を、さらに深く追求したいと思っている。

審 査 結 果 の 要 旨

糖代謝調節上重要な、いくつかの酵素が、プロテインキナーゼによるリン酸化と、プロテインホスファターゼによる脱リン酸化により活性の調節をうけていることが判明している。

本研究では、脱リン酸化を触媒するプロテインホスファターゼについて、ラット肝およびラット腹水肝癌A H-13を用いて、カラムクロマトグラフィーを主要な分画手段として検索し、主に分子種の面から、顆粒画分について調べた論文である。

研究結果として、正常ラット肝顆粒画分には、 P_1 、 P_2 、 M_1 と名づけられた3種類の分子種がみだされ、 P_1 と P_2 はホスホリラーゼaに、また M_1 はグリコーゲン合成酵素Dに基質特異性が高いことがわかった。

P_1 と P_2 の諸性質については、①活性が Mg^{2+} や Mn^{2+} により強く阻害されること。②活性がプロテインホスファターゼインヒビター2により阻害されること。③ゲルろ過による分子量が、 P_1 50,000、 P_2 30,000と推測され、トリプシン処理により、 P_1 から P_2 へ変わることなどが示された。また、活性については、ラット肝ホモジネートのホスホリラーゼホスファターゼ活性の大部分を占め、 P_1 がより生理的に重要な分子種と推測している。

一方、 M_1 は Mn^{2+} により強く活性化され、 Mg^{2+} では活性化されないこと。ゲルろ過による分子量約70,000と推定され、インヒビター2には阻害されず、グリコーゲンやホスホリラーゼaによって強く阻害されるなどの特徴を有していることを見出ししている。

さらに、ラット腹水肝癌A H-13の顆粒画分についての検索では、ホスファターゼNという分子種が正常肝に比して著明に増加し、ホスファターゼNは、① Mn^{2+} や Mg^{2+} により強く阻害される。②ATPやNaFにより強く阻害される。③インヒビター2に阻害される。④分子量約50,000と推定され、Glucose-6-phosphateの存在下でグリコーゲンにより強く阻害されるなどの特徴を有し、部分精製が可能であることが示された。ホスファターゼNは、再生肝やDAB誘発肝癌においてもみとめられ、その酵素活性は細胞移植後の日数で大きく変動することが示された。

以上の結果を総合すると、本研究では、顆粒画分のプロテインホスファターゼの分子多様性が示され、その中で P_1 と M_1 が生理的に重要な分子種であることが明らかにされ、さらに、Nが癌で増加し、癌組織の増殖性活性と相関することが示唆されている。本論文の内容は、糖代謝および癌の増殖を生化学的に解析する上で極めて独創性に富み、欧米および本邦でこのような報告は少なく、よって学位授与に値する論文である。