

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590702

研究課題名(和文) 赤血球膜Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの簡易活性測定法開発と臨床検査への応用研究課題名(英文) Development of a simple activity measurement method for erythrocyte membrane-derived Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase for its application in medical technology.

研究代表者

三村 邦裕 (MIMURA, Kunihiro)

千葉科学大学・危機管理学部・教授

研究者番号：40439039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は赤血球膜蛋白から高純度のNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseを得るためにWGA-Agaroseゲルを用いて夾雑物の分離を行った。その結果、0.03M GlcNAcを用いて溶出したピークを目的物質として捉えることができた。この蛋白質を検証するためにSDS-PAGEを用いたNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseサブユニット構造の解析を行った。鍍銀染色の結果、分子量97kDa付近にBF1、BF2、BF3ともに目的とするバンドが確認できた。さらに我々がブタ腎から単離したNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseと比較検討した結果、溶出ピークは一致していた。これにより簡易的に赤血球膜からNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの単離法が確立できた。

研究成果の概要(英文)：To isolate high-purity erythrocyte membrane-derived Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, WGA-agarose column chromatography was used to remove impurities. The target protein was obtained as a peak eluted by 0.03 M GlcNAc. To verify the identity of this protein, the subunit structure of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase was analyzed by SDS-PAGE. We confirmed the presence of bands corresponding to a molecular weight of approximately 97kDa by Silver impregnation stain. Further, we compared the erythrocyte membrane-derived protein with the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase isolated and purified from pig kidney. As a result the positions of elution peak was corresponding. Thus, we successfully established a simple method to isolate Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from erythrocyte membrane.

研究分野：臨床検査

キーワード：赤血球膜タンパク Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase ナトリウムポンプ HPLC C12E8

## 1. 研究開始当初の背景

Skou (Skou, J.C. Biochim. Biophys. Acta, 1957) によって発見された  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase は、細胞膜に存在する内在性膜蛋白質である。この蛋白質は、ATP の加水分解反応と直接共役させて、細胞からの  $\text{Na}^+$  汲出しと  $\text{K}^+$  取込みのイオン能動輸送を担っている。こうして形成される細胞膜を隔てた  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の電気化学勾配は、神経細胞の活動電位、腎尿細管細胞の  $\text{Na}^+$  再吸収、腸の栄養成分の吸収、 $\text{Ca}^{2+}$  代謝など多くの生理機能を司っている。

この活性で利用されるエネルギーは基礎代謝の 40% を占め、脳に至っては 70% も消費している。この機能と代謝から生体にとって重要なポンプであるばかりか、生活習慣病との関連も深いことが推察される。しかし、この蛋白質は生体膜に埋まっているという特性から、単離することが難しく、その活性測定も煩雑で容易でないために多くの研究者が疾患と  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性との関係の解明を試みているが未だにその関連性が確立されていない。また  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 発見以前から、強心薬として使われてきた強心配糖体の一種であるウアバインは、高親和性 ( $K_d = \sim 0.1 \mu\text{M}$ ) で結合し、ATPase 反応とイオン輸送を完全に阻害する。このように、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase とウアバインの結合は極めて特異的であり、しかも、極めて強く、一旦結合したウアバインはゲルクロマトグラフィのカラム通過中も解離せず、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Ouabain 複合体として溶出する。体内に存在するウアバイン様物質(内因性ウアバイン)は本態性高血圧症を引き起こすとの説が提唱された (Schoner, W et al. J. Cell Physiol. 2007.)。またウアバインは  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 抑制と同時に活性酸素種 (ROS) を発生させ、インスリン分泌の抑制をもたらすこと (Kajikawa, M. et al. Diabetes. 2002.) や  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の Bgl -RELP 遺伝子多型と 1 型糖尿病患者の神経障害発症との関連が知られており、糖尿病の発症機序にも関連があると考えられる。

そこで我々は以下の点を明らかにしたい。

### (1) $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 分子 (E) の精製法と ATPase 比活性の同時測定

Jorgensen (Jorgensen, P. L, Methods Enzymol. 1988.) は、ブタ腎細胞のミクロゾーム画分を、微妙な条件で SDS 処理を施した後、蔗糖密度勾配ゾーナル超遠心することにより、純度 95% 含む細胞膜断片を、膜結合型精製標品 (膜 E 標品) として単離する事に成功した。この方法が最も有効な精製法とされ、世界中で使われてきた。我々は、この ATPase の機能単位を明らかにするために、この膜  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 標品を界面活性剤 (octaethyleneglycol dodecylether、略称  $\text{C}_{12}\text{E}_8$ ) で可溶化し、得られた可溶化  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase に酸性リン脂質 (ホスファチジ

ルセリン、PS) を添加することにより、可溶化状態で HPLC カラム内でも ATPase 活性を発現させることに成功した。さらに、低角レーザー光散乱法 (HPGC/LALLS 法) で、分子量と ATPase 活性の同時測定を行った結果、可溶化 ATPase は、Protomer の 2 量体である ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )<sub>2</sub>-Diprotomer (D) および、より高次なオリゴマー体 (H) から成り、これらのオリゴマー成分は解離・会合平衡系を構成していた。この平衡は基質 ( $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$ ) に依存して偏倚しオリゴマー構造変換を引き起こした。また酢酸イオンの同族分子である短鎖脂肪酸 (プロピオン酸など) の存在下で、安定な四量体、( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )<sub>4</sub>-Tetraprotomer (T, 分子量  $6.01 \times 10^5$ ) を単離・同定することに成功した (Mimura, K. et al. Biochemistry 2008.)。  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の活性測定方法は HPLC のカラム中で ATPase 活性を発現させる。活性発現に必要なリガンド (ATP,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) を添加した溶出緩衝液でカラムを 20 分で平衡化し、そこに  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase を添加して、カラムを通過中に遊離する Pi 量から ATPase 比活性を測定する。

### (2) 骨粗鬆症と $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase との関連性

岩田らは V 型 ATPase の  $\text{Na}^+$  の膜内輸送機構を解明した。またこれは骨代謝の破骨細胞の膜にも存在しており骨粗鬆症に関与していることが明らかになった (Mizutani K. et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2011.)。さらに  $\text{K}^+$ -Klotho は  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase と複合体を形成し、遠位尿細管などにおけるカルシウム輸送や上皮小体における副甲状腺ホルモンの分泌そしてビタミン D 合成に関与しており、 $\text{K}^+$ -Klotho が体液カルシウムの低下を感知すると  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase を細胞表面に動員して活性化させ、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  交換輸送が働きカルシウム濃度を増加させることが解明された (Nabeshima Y et al. Science. 2007.)。このように骨代謝と  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性とは重要な関係にあり、その実態を解明することは病態解析からも重要である。それらと新規開発する  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性値との比較検討を行うことで新たな骨粗鬆症の指標を解析する。

## 2. 研究の目的

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の細胞膜上の分布密度は、腎尿細管上皮細胞 ( $\sim 4 \times 10^4$  個/細胞) に比べ、赤血球では低い ( $\sim$  約 300 個/細胞)。しかし、腎生検は侵襲性が高く、酵素精製目的には適さない。従って、赤血球から、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の機能単位である、Tetraprotomer (T 標品) を単離する方法を開発し、確立させることができれば侵襲性の少ない簡易臨床検査法に繋がる。この研究により明らかにしようとすることは、得られた T 標品の定量と活性値を測定することがで

きれば、糖尿病、骨粗鬆症の早期診断の臨床検査法確立が期待できることである。

(1) WGA-Agarose ゲルによる赤血球膜蛋白の夾雑物除去:

赤血球膜には表在膜蛋白質であるスペクトリン、アンキリン、バンド 4.1 蛋白質また内在性膜蛋白質としてグリコホリンやバンド 3 蛋白質がある。Na<sup>+</sup>と K<sup>+</sup>を能動輸送する Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase、グルコース輸送蛋白や Ca<sup>2+</sup>-ATPase なども含まれる。そのため、赤血球膜から選択的に Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase を単離する必要がある。そこでまず我々はレクチンアフィニティクロマトグラフィを利用して目的物質を高度に精製、濃縮することを試みる。レクチンは糖鎖に親和性を持つ蛋白質の総称である。生体成分には多くの糖鎖が結合しているためにレクチンアフィニティカラムを利用することで分離が可能となる。WGA(Wheat Germ Lectin)は N-結合型糖鎖の -マンノシル残基と親和性がある。そのため Bisect 型糖鎖やシアル酸クラスター構造とも反応するため Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase との糖鎖とも反応することが推察される。結合した後、阻害糖である GlcNAc (N-Acetyl-D-glucosamine)を用いて結合力を弱めることにより分離が可能となる。

(2) C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> による Size Exclusion Chromatography (SEC):

非イオン性の界面活性剤である C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> を用いて WGA-Agarose クロマトグラフィで溶出した Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase を TSKgel G4000SW XL と G3000 SWXL とを直列につなぎ合わせ、溶出を行う。この緩衝液にはプロピオン酸カリウムを含んでいるため界面活性剤を含んでいるにも関わらず Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase は会合する方向に進み、Oligomer 構造確認が可能となる。そのため赤血球膜における Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の構造解析が同時に可能となる。

(3) SDS による Size Exclusion Chromatography(SEC):

C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>-SEC で溶出した Oligomer 構造である Tetraprotomer、Diprotomer、Protomer を分取し、それを Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter にて濃縮し、その後 SDS を作用させてクロマトグラフィを行い、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 分子の Subunit 構造である、の検出を試みる。

(4) 赤血球 T (Tetraprotomer) 標品の純度検定:

ブタ腎に関しては、従来の大規模(ゾーナル超遠心)法で、単離 T 標品が得られている。それらの ATPase 比活性や溶出パターンと赤血球膜から得られたものとの比較を行う。このことでこの蛋白質以外の夾雑 ATPase 蛋白質の混在程度の指標を得ることができる。また電気泳動を行い、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 1 抗

体を用いて ELISA 法で SDS-SEC にて溶出した蛋白質を確認する。このような方法を用いて本研究で得られる赤血球からの T 標品単離、微量法の妥当性を評価する。

(5) 骨粗鬆症患者の Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性値と病態との関連の検証:

破骨細胞から出される骨代謝マーカーの酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRACP-5b) を高速液体クロマトグラフィ (HPLC) で分離し、それらと新規開発する赤血球 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性値との相関を見出すことで新たな骨粗鬆症の指標を検討する。また糖尿病患者や骨粗鬆症患者からの T 標品抽出し、その活性値と病態との関係を見出す。

### 3. 研究の方法

(1) 赤血球膜ゴーストの作成

赤血球膜ゴーストの作成では、ヒト全血 10mL を 3,000rpm、10 分、4 の条件で 1 回洗浄し、赤血球浮遊液を作成した。この赤血球浮遊液に 10 倍量の H<sub>2</sub>O を加え赤血球を溶血させた。次に 436,000g、5 分、0 の条件で超遠心を 3 回繰り返し洗浄を繰り返した。上清を除去した沈査に 1mL の保存バッファーに溶解し 0 で保存した。以上の操作により赤血球膜ゴーストを作成した。

(2) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の単離

作成した赤血球膜ゴーストに pH5.6 の C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 溶液を加え、436,000g、5 分、0 の条件で超遠心し、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase を赤血球膜から可溶化した。その後 WGA アガロスクロマトグラフィを行い、GlcNAc が入っていない緩衝液により Flow-Through(FT)を単離し、0.03M の GlcNAc により Binding Fraction (BF)1・BF2、0.3M の GlcNAc により BF3 を単離した。そして、それぞれ Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units に分注し、7,200rpm、10 分、4 の条件で濃縮した。

(3) C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> による Size Exclusion Chromatography(SEC)と SDS による SEC

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase と適比の C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> とプロピオン酸カリウムを加えた溶出緩衝液を用いて TSKgel G4000SWXL と G3000 SWXL のカラムを用いて HPLC を行った。また SDS を用いて Subunits 構造の確認を行った。C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>-SEC で溶出した Tetraprotomer、Diprotomer、Protomer のそれぞれが同じ、の Subunits を持つことが確認できれば目的蛋白質を分離したこととなる。

(4) 赤血球 T (Tetraprotomer) 標品の純度検定

ブタ腎尿細管上皮から得られた Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase T 標品を用いて、C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>-SEC および SDS-SEC を行うことで、赤血球から得られ

た  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の溶出ピークや溶出位置を比較して純度の検定を行った。また FT、BF1、BF2、BF3 を使用して、SDS-PAGE を行い、鍍銀染色でもって蛋白質の泳動位置を確認した。同時に SDS-SEC で溶出した蛋白質を SDS-PAGE し、ウエスタンブロッティングの後、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 抗体を用いて ELISA 法で確認した。

#### 4. 研究成果

本研究の結果から、赤血球膜から  $\text{C}_{12}\text{E}_8$  溶液を使って可溶化を行い、WGA アガロースカラムを用いたクロマトグラフィを実施し GlcNAc を用いて溶出することで  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase を分離することに成功した(図1)。

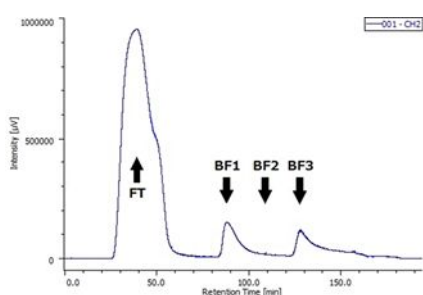


図1 WGA-agarose ゲルクロマトグラフィの溶出結果

さらに分離した  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の純度測定のため、ブタ腎からの精製標品との比較検討から、また電気泳動の結果からこの溶出物質は、精製された蛋白質であることが確認できた。この方法は短時間にそして簡易的に赤血球膜から  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase を単離できる新たな開発である。また単離した蛋白質にリン脂質や  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ そして  $\text{Mg}^{2+}$ を加えることで活性化が起こり、その量ばかりでなく活性値を同時測定できることを検証した。

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase はヒト細胞の全てに存在することから侵襲性の少ない簡易的な方法を見いだすために我々は赤血球膜に注目した。しかし赤血球膜には  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase の絶対量が少なく、定量化、活性値の測定には不向きと考えられてきた。一方で大量に存在する細胞は腎尿細管であることは周知となっているが、生体から腎生検を行うには大きな危険が伴う。本研究で開発された方法を用いることで、多くの検体からの情報をさらに追加することで高血圧、糖尿病、骨粗鬆症などの生活習慣病に対し、臨床的有用性のある臨床検査法となることが確認された。

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計8件)

松村聡, 三村邦裕, 赤血球膜  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 活性の簡易測定法開発について, 第16回日本検査血液学会学術集会, 2015年7

月11日~2015年7月12日, 愛知県名古屋市

松村聡, 三村邦裕, HPLC を用いた酒石酸抵抗性ホスファターゼ活性測定法(第二法), 第61回日本臨床検査医学会学術集会, 2014年11月22日~2014年11月25日, 福岡県福岡市

松村聡, 三村邦裕, HPLC を用いた酒石酸抵抗性ホスファターゼ活性測定法, 第60回日本臨床検査医学会学術集会, 2013年10月31日~2013年11月3日, 兵庫県神戸市

松村聡, 石島道邦, 鈴木悦, 三村邦裕, 臨床検体を用いた酒石酸抵抗性ホスファターゼアイソザイムの検討と評価, 第50回関東甲信支部医学検査学会, 2013年10月5日~2013年10月6日, 東京都新宿区

松村聡, 東克巳, 三村邦裕, 血糖値と血小板活性化の関係について, 第14回日本検査血液学会学術集会, 2013年7月27日~2013年7月28日, 福岡県福岡市

森田千奈, 松村聡, 藤谷登, 三村邦裕, HPLC を用いた酒石酸抵抗性酸ホスファターゼアイソザイムの測定法の開発, 第9回東京都医学検査学会, 2013年2月17日, 東京都

劉維琴, 松村聡, 藤谷登, 三村邦裕, 血糖値上昇による血小板機能への影響について, 第9回東京都医学検査学会, 2013年2月17日, 東京都

松村聡, 井上聡子, 三村邦裕, 運動負荷による骨代謝マーカーの変動について, 第59回日本臨床検査医学会学術集会, 2012年11月29日~2012年12月2日, 京都市京都市

〔図書〕(計4件)

三村邦裕 他, 医歯薬出版, 最新臨床検査学講座 血液検査学, 2015, (in press)

三村邦裕 他, 医歯薬出版, 最新臨床検査学講座 検査機器総論, 2015, 1-5, 25-32, 96-131

松村聡 他, 医歯薬出版, 最新臨床検査学講座 検査機器総論, 2015, 122-131

三村邦裕 他, 近代出版, メディカルサイエンス臨床化学検査学, 2014, 148-153

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

三村邦裕 (MIMURA Kunihiro)

千葉科学大学 危機管理学部・教授

研究者番号: 40439039

(2) 研究分担者

松村聡 (MATSUMURA Satoshi)

千葉科学大学 危機管理学部・講師

研究者番号: 30406805