

Title	PURIFICATION AND IDENTIFICATION OF INTERMEDIATE CATABOLIC PRODUCTS IN THE IN VIVO DEGRADATION OF PIG LIVER PHOSPHOFRUCTOKINASE
Author(s)	戸田, 年総
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/2300">https://hdl.handle.net/11094/2300</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	と 戸	だ 田	とし 年	みさ 総
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	第	7591	号	
学位授与の日付	昭和62年3月18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	ブタ肝細胞内における肝型ホスホフルクトキナーゼの生理的分解中間体の精製および同定			
論文審査委員	(主査) 教授	堀尾 武一		
	(副査) 教授	佐藤 了	教授	中川 八郎

### 論文内容の要旨

#### <背景および目的>

高齢者に多いインスリン非依存性Ⅱ型糖尿病は、白内障、動脈硬化症、末梢神経障害、骨塩減少症等の老年期疾患の危険因子となっている。Ⅱ型糖尿病の病因は明らかでないが、自然発症Ⅱ型糖尿病ラット肝においてもアロキサン糖尿病ラット肝と同様に、ホスホフルクトキナーゼ(PFK)活性が低く、それは酵素量の低下によること、およびアロキサン糖尿病ラット肝におけるPFK量の低下は分解速度の昂進によることが明らかにされている。本研究では、内分泌系や代謝調節系がヒトに比較的近いブタの肝細胞内におけるPFK分解酵素を同定し、その調節機構を明らかにする為の基礎研究として、ブタ肝細胞内における肝型PFKの生理的分解中間体の精製および同定を試みた。

#### <方法および結果>

ブタ肝2kgより肝型PFK1.3mgを精製し、SDS電気泳動後の銀染色にて単一の80KDaポリペプチドであることを確認した。この精製酵素0.65mgにてウサギを免疫し、ポリクローナル抗体を得た。この抗体は肝型PFKとのみ反応し、筋型PFKとは反応しなかった。プロテインAセファロースカラムにて精製されたIgG成分150mgを8mlのアフィゲル10に共有結合させ、ゲル容積1ml当り7UのPFK吸着能を有する免疫親和カラムを得た。プロテアーゼ阻害剤(PMSF, antipain, leupeptin, pepstatin, EDTA)を含む緩衝液中でブタ肝100gを破碎・遠心分離し、上清をこの免疫親和カラムに通して、免疫交差性蛋白質2mgを得た。これを調製用二次元電気泳動にてさらに分離し、約30個のポリペプチドスポットを得た。そのうち、84, 68, 64, 56, および51KDaのポリペプチドが、ウエスタンブロットにて抗PFK抗体と強く反応した。これら5種の免疫交差性ポリペプチド、および先に精製された80KDa

酵素を個々に<sup>125</sup>Iにて標識し、グルタミン酸のC端側で特異的に切断するプロテアーゼV 8で処理後、生じた放射活性ペプチド断片をSDS電気泳動とオートラジオグラフィにて分析した。その結果これら6種の免疫交差性ポリペプチドの何れからも、24, 8, および5.5KDaの断片が検出され、さらに51KDa以外の5種のポリペプチドからは、14および6.5KDaの放射活性断片も共通して検出され、一次構造上の相似性が示された。また、ポリクローナル抗体をセルロースアセテート膜二次元電気泳動にて分画し、ニトロセルロース膜に転写後、個々の標識ポリペプチドを特異的に吸着させてオートラジオグラフィを行った結果、等電点5.3, 5.7, 6.0, および6.3のIgG成分が、上記6種いずれのポリペプチドをも吸着した事から、これらの免疫交差性ポリペプチドは共通のエピトープ構造を有する事が確認された。抽出後の非生理的切断の可能性を調べる為、標識P F K (84KDa)共存下、先と同じ操作(抽出と免疫親和クロマト)を実施し、SDS電気泳動およびオートラジオグラフィにて、放射活性P F K分解生成物の有無を調べた結果、84KDaのバンドのみが検出され、この操作中の切断はないと判断された。以上の結果、84KDaの肝型P F Kは肝細胞内において限定的に切断され、68, 64, 56および51KDaの中間産物を経て分解されることが明らかになった。なお、抗原とした80KDaの酵素は、84KDaのP F Kが精製の過程で活性を保持したまま非生理的修飾または切断を受けたものであった。

#### 論文の審査結果の要旨

細胞内に存在する個々の種類の蛋白質の量的レベルは、合成速度と分解速度のバランスによって決定されると思われる。近年、遺伝子の発現から完全な蛋白質の生成に至る一連の過程での調節機構の詳細が次第に明らかにされつつあるが、蛋白質の分解過程とその調節機構についてはまだ十分な研究がなされていない。

本論文において、戸田年総君は、インスリン非依存性糖尿病のラットの肝臓では、解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ(P F K)の分解速度が昂進することに着目し、本酵素の細胞内分解機構を免疫学的手法を用いて解析した。

その結果、合成された分子量8.4万のP F Kは、細胞内において分子量8.0万、6.8万、6.4万、5.6万および5.1万のポリペプチドに順次分解されてゆくことを見出した。この研究成果は、細胞内蛋白質分解機構の解明、および、特に高齢者に多いインスリン非依存性糖尿病の病因の解明のために重要な手がかりを与えるものであると判断される。

よって、本論文は、理学博士の学位論文として十分価値あるものと認める。