

Title	Pyruvate Kinaseの糖代謝系路における役割、並びにラット諸臓器中のアイソザイムとしてのPyruvate Kinaseについて
Author(s)	森, 亮介
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29035
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名・(本籍)	森 亮 介 もり りょう すけ
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 841 号
学位授与の日付	昭和 41 年 1 月 27 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	Pyruvate Kinase の糖代謝系路における役割、並びにラット 諸臓器中のアイソザイムとしての Pyruvate Kinase について
論文審査委員	(主査) 教授 水野祥太郎
	(副査) 教授 須田 正巳 教授 荻原 文二

論 文 内 容 の 要 旨

〔I〕目 的

glucose と pyruvate の間のいわゆる Emden-Meyerhof の糖代謝系路には ① hexokinase, glucokinase, (glucose · 6 · phosphatase) ; ② phosphofructokinase, (fructose · 1, 6 · diphosphatase) ; ③ pyruvate kinase, (Utter系路) があり, それぞれ一方向へのみの反応を司っている (但し括弧内は合成方向への酵素)。pyruvate より glucose への合成反応がおこなわれる際, 前 2 者 (①, ②) の反応が大きく代謝調節をうける事実についてはすでによく知られているが, pyruvate kinase についてはまだ報告されていない。pyruvate が glucose への合成系路に入るための最初の反応は従来 pyruvate kinase の単純な逆反応によると考えられていたが, その反応は ATP 形成の方向へいちじるしく傾いており (phosphoenolpyruvate + ADP $\xrightleftharpoons[k_2]{k_1}$ pyruvate + ATP - 4700 cal, $K = \frac{k_1}{k_2} = 6.6 \times 10^8$, pH 7.4), pyruvate の磷酸化の方向へは事実上進み難い。しかし最近 pyruvate から oxaloacetate を経て phosphoenolpyruvate に至る Utter系路 (phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate carboxylase) が発見され, この難点は解決された。Utter 系路が促進されている条件下で pyruvate kinase が充分作動していると, Utter 系によって形成された phosphoenolpyruvate が再び pyruvate に戻ってしまう。このような回路の空転を防ぐために pyruvate kinase が代謝調節の重要な位置を占めているであろうとの見地から, 以下述べるような実験を行なった。

〔II〕実験方法並びに成績

体重 150~250g の雄のラット (呑竜系白ねずみ) をそのまま, 或いは適宜処置を加えた後, 所定のカゼイン合成食餌または固形食餌で 3 日間飼育したものを使用した。これらのラットから肝臓, 大腿筋肉などをとり出してホモジナイズし 105,000 × g 60 分間遠心沈澱し, 上清を酵素液として用いた。酵素活性値測定は Boyer, Kimberg らの方法を一部改良した方法で行なった。酵素活性の単位は

1 分間に形成される pyruvate の μmole 数で表わし、比活性は蛋白質 (Biuret 法で定量) 1 mg あたりの酵素単位量で表わした。電気泳動の条件は澱粉を支持体とし、M/20 phosphate buffer (M/1000 EDTA を含む) pH8.0, $\tau/2$ 0.31 ; 電圧 10V/cm 13時間泳動とした。以上の方法により次表の如き結果を得た。酵素活性値は正常動物を10%カゼイン食で飼育した場合の活性値を 100%として表わした。動物体内で盛んに gluconeogenesis が行なわれている状態すなわち高蛋白食摂取, 絶食(飢餓), 糖尿病 (インスリン欠乏) などの場合には肝臓における pyruvate kinase 活性レベルは低下していた。糖尿病においてインスリンが pyruvate kinase 活性レベル維持に重要な役割を果たしていることは、右の表から明らかである。正常動物に対するグルココルチコイドの影響はあまり鋭敏なものでなく、25 mg/day を2日間筋肉内注射して始めて活性レベルの低下がみられた。Wagle, Ashmore (1963) は糖尿病ラットの肝臓ホモジネートで CO_2 の oxaloacetate へのとり込みが正常ラットの約 7.3 倍に増加し、phosphoenolpyruvate carboxylase の活性レベルが同じく 3 倍に達すると述べている。表にみられるように pyruvate kinase の活性レベルは糖尿病で 21.4%まで低下しており、このようないわゆるシーソー現象によってこれらの反応の両方向への相対比は約 10~15 倍の振巾をもって変化していることになる。筋肉では肝臓と全く様相を異にしており、既述の各種条件による影響をうけることなく、その活性レベルはほとんど変化しなかった。すなわち両臓器に由来する酵素は基質特異性が同じで、同一反応を司りながら、しかも両者は全く異なつたかたちで代謝調節をうけていることが判った。このような事実から本酵素におけるアイソザイムの存在が予想された。そこで脳、心臓、腎臓、筋肉など各種の臓器について電気泳動を行なった。その結果脳、心臓、筋肉は単一の分画よりなる泳動像を示し(筋肉型)、腎臓、肝臓は少なくとも4つの分画よりなる泳動像を示した(肝臓型)。筋肉の pyruvate kinase が各種の条件においてその活性レベルを変化しなかった如く、筋肉型の泳動像もまたその形を変えなかった。これに反して、肝臓の pyruvate kinase レベルを変化させるような条件下では肝臓型の泳動像はその形を変えることが明らかとなった。一方反応動力学的に両 pyruvate kinase の基質である phosphoenolpyruvate に対する特性を調べたところ、肝臓の pyruvate kinase の K_m は筋肉のその10倍であった。このようにラット諸臓器における pyruvate kinase の活性レベルの各種条件に対する動態、その電気泳動像の様相、並びに K_m を検索した結果、本酵素は肝臓型と筋肉型に大別されるところのアイソザイムであることが証明された。

treatment	activity(%)
non-protein diet	78.0
high protein diet	38.2
fasted for 48 hrs	47.3
diabetic	21.4
diabetic + insulin	105.0
diabetic + hydrocortison	29.7
hydrocortison	51.7
normal	100.0

論文の審査結果の要旨

この論文の内容は大別すれば、ふたつの部分からなる。ひとつは肝臓と筋肉における pyruvate

kinase が代謝調節上、まったく異質の応答をする事実を明らかにしている。つぎは肝臓・筋肉・脳・腎臓などの臓器に分布する pyruvate kinase の electrochemical な性質、反応動力学的性質の分析から、糖合成系をもつ臓器では肝臓型、解糖系のみをもつ臓器では筋肉型、というふたつの型のアイソザイム（同位酵素）が存在することを証明している。

glucose-6-phosphatase と glucokinase, hexokinase あるいは phosphofructokinase と fructose-1, 6-diphosphatase が糖代謝系路で律速にあずかる酵素として代謝調節に関与していることはすでによく知られている。さらに最近の報告によれば血糖維持作用の中心臓器である肝臓では gluconeogenic, あるいは glycolytic な状態に応じてピルビン酸から燐エノールピルビン酸に至る Utter 系酵素の活性レベルもそれぞれ上昇、あるいは下降する。

ここで著者は糖の合成分解にあずかる律速酵素としての pyruvate kinase と Utter 系酵素との相関関係については、何ら報告されていない点に注目し、pyruvate kinase の活性レベルの変動を、糖新生条件あるいは糖分解条件下において観察したのである。

著者の実験によって明らかにされたことは、肝臓の pyruvate kinase は、筋肉の同じ反応をする酵素とは異質であって糖新生時には活性が著明に低下し、したがって形成された燐エノールピルビン酸がふたたびピルビン酸に逆戻りしないようになっており、一方糖分解条件では、その活性が上昇してグルコースから生じた燐エノールピルビン酸をピルビン酸に変化させ ATP の産生を容易にするように働いていることが示されている。筋肉型および肝臓型の pyruvate kinase の相違は、電気化学的・反応動力学的性質の相違にもあらわれていることは、この酵素が臓器分布の上で異質のアイソザイムとして存在し、その臓器の生理的特質を反映しているものと考えてよい。

このような知見はオリジナルなものであって学位論文として、価値あるものと認められる。