The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ラットに於ける二つの型のPyruvate Kinaseの結晶化とその性質臓器分布について
Author(s)	原納, 優
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29124
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【33】

氏名・(本籍)	原(はら) 納(のう) 優(ゆたか)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1168 号
学位授与の日付	昭和42年3月28日
学位授与の要件	医学研究科生理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ラットに於ける二つの型の Pyruvate Kinase の結晶化とその性質臓器分布について**
論文審査委員	(主査) 教授 須田 正巳 (副査) 教授 阿部 裕 教授 田中 武彦

論文内容の要旨

〔目　　的〕

さきに我々の研究室ではラット生体には大別して二種類の Pyruvate Kinase 活性が存在することを報告した。即ち電気泳動的に筋肉 Pyruvate Kinase (Type Mと呼ぶ) に類似したものと，主に肝臓に存在し，食餌，ホルモンによる調節を受ける肝臓型 Pyruvate Kinase (Type L と呼ぶ) とである。この Type L は飢餓時，高蛋白食時，アロキサン糖尿症等の gluconeogenetic state で減少し，高含水炭素食時等のglycolytic state で増加する。本研究はこの二種類の酵素を単離精製し，酵素化学的，免疫化学的および蛋白化学的諸性質を明らかにし，更にホルモン，食餌条件に対しこの二種類の Pyruvate Kinase が異なった応答の仕方を示すことに対する生理的な意味を与えることである。

〔方法ならびに成績〕

① 筋肉 Pyruvate Kinase の結晶化及び家兎抗筋肉 Pyruvate Kinase の作製

Sprague Dawley 系ラットの筋肉約 3 Kg より硫安分画，アセトン処理，Phospho-cellulose を用い，電気泳動的，超遠心的に単一の標品を得た。これを家兎に Freund complete adjuvant と共に注射し，1 ml 当り 45units の筋肉 Pyruvate Kinase を完全に中和し，免疫電気泳動上抗原と唯一つの沈降線を生じる抗体を得た。この抗体は肝臓の Type M, および脳，心，腎，白血球，脂肪組織のPyruvate Kinase 活性を90%以上中和し，Ouchterlony の gel diffusion analysis に於いて各々 fuse する事から，これらの臓器の Pyruvate Kinase は同一抗原性を有するものと考えられる。

② 肝臓型 Pyruvate Kinase の結晶化と抗血清の作製

肝粗酵素抽出液の澱粉ブロック電気泳動像では四つの Pyruvate Kinase 活性の Peak を示し，最も陰極に近いものは易動度が筋肉 Pyruvate Kinaseに類似し，事実抗筋肉 Pyruvate Kinase 血清により完全に中和された。その他の Peak はこれにより中和されず，ラットを 68%デキストソン，15%庶糖，

10%カゼイン食で2—3日飼育すると肝臓全 Pyruvate Kinase活性の70〜90%に迄増大する。(高蛋白食，糖尿症時では20〜40%) この酵素は非常に不安定であるが，蛋白濃度を高めること，および基質である ADP, PEP, SH 保護剤として mercaptoethanol 或いは Cleland's Reagent を共存させることにより安定化されることを知った。従ってこれらの保護剤の存在下に精製を行ない，硫安分画，アセトン処理 DEAE-Sephadex, phospho-cellulose を用いて結晶化に成功した。この酵素は電気泳動的，超遠心的に単一であり，家兎に免疫し 1 ml 当り 24 units の Type L 活性を中和するが Type M とは全く反応しない抗体を得た。この抗体は肝粗酵素電気泳動像の Type M 以外の三つの Peak をほぼ完全に中和する。このうち陽極に近いものが大半を占め，他の二つの小 Peak はこれに近いものと考えられる。又この抗体は赤血球 Pyruvate Kinase 活性もほぼ完全に中和する。

③ 肝臓 Type M の精製

肝臓上清 Pyruvate Kinase 中10〜40%を占め，熱処理，アセトン分画，により部分精製した酵素は筋肉 Pyruvate Kinase とほぼ同じ titer の抗 Type M Pyruvate Kinase 血清により中和され，ゲル内沈降線も fuse することにより筋肉のそれと同一抗原性を有しているものと考えられる。

④ 両結晶化酵素の主な相異点

両型酵素の主な特徴は右表の通りである。

肝臓 Type M は ADP に対する Km が筋肉 Pyruvate Kinase の約6倍である点を除いてほぼ後者に類似の Kinetics, ATP 阻害，PCMB 阻害態度を示した。Type L は phosphoenolpyruvate に対し基質による活性化の像を示し，ADP に対しても 0.2 mM 以上で基質によって阻害され，種々の P. E. P 濃度における，Lineweaver Burks Plot は複雑な態度を示した。分子量は沈降平衡法により求め，沈降定数は 20°C に於ける濃度 0 の値を extrapolate して求めた。

	肝 臓 型 P. K.	筋 肉 型 P. K.
分 布	肝臓，赤血球	骨格筋，心筋，脳，脂肪組織，腎肝臓，白血球
分 子 量	20.8300	250000
沈降定数	$S^{20}_{0}=10.1$	$S^{20}_{0}=8.0$
結 晶 形	菱 面 体	針 状
抗 筋 P. K. 血 清	中和されない	中和される
抗 肝臓型 P. K. 血清	中和される	中和されない
硫安分画	25〜45%	45〜65%
DEAE-cellulose 溶出濃度	0.1〜0.2 MKCl	0.02 MKCl
P.E.P. に対する Kmapp.	0.83×10^{-3}M	0.075×10^{-3}M
ADP に 対 す る K m	0.1×10^{-3}M	0.27×10^{-3}M
ATP に対する Kiapp.	0.15×10^{-3}M	3.5×10^{-3}M
PCMBに対するKiapp. (3分 Preincubation)	7.42×10^{-7}M	2.5×10^{-5}M
肝臓の両型酵素が誘導される条件	高含水炭素食インシュリン投与	再生肝，肝癌

〔総　　括〕

ラット筋肉より筋 Pyruvate Kinase を精製結晶化し，又高含水炭素食餌により誘導した肝臓型 Pyruvate Kinase をも結晶化した。後者は ATP に鋭敏に反応して律速されるが筋肉型は約20倍も感度が低い。筋肉が肝臓より ATP 濃度が高い事実とよく対応している。両者は免疫学的に異なり，L型

に属するものは肝臓 Type L および赤血球の P. K であり，M 型酵素は広く分布し骨格筋，心筋，脳，脂肪組織，腎臓，白血球に存在する。肝臓 Type M も酵素化学的に筋 P. K. に類似し又免疫化学的にこれと同一であった。

論文の審査結果の要旨

Pyruvate Kinase は肝臓の様に，解糖作用と，糖新生を同時に行なう重要な機能を果している臓器では，糖の代謝調節上，その律速に関与する最も重要な key enzyme のひとつである。本論文に於いて，著者は，この点に注目して，本酵素の活性変動を肝臓と筋肉について測定し，肝臓のPyruvate Kinase がホルモンおよび食餌性の変化に応答することが明らかとなったので肝臓内の本酵素の性質を研究する方向に転じ，次の様な新しい知見を得た。ラット筋肉より筋肉型酵素を，肝臓より肝臓型酵素を単離結晶化し，両型 Pyruvate Kinase の酵素化学的，免疫学的，および蛋白化学的諸性質を検討し，両型が存在することに対する生理的意味を明らかにした。筋肉型は各臓器に広範囲に分布し，殆んど変動しないが，肝臓に於いては，細胞の未分化度に比例して筋肉型が多く含まれていた。肝臓型は肝臓および赤血球に分布し，肝臓のL型酵素は ATP に対して，筋肉型に比して，より鋭敏に阻害され，基質である Phosphoenol-pyruvate に対して，親和性がより小さく，高濃度で活性化される。両型の酵素は免疫学的にも，各々の抗体に対して交叉反応を示さず，アミノ酸分析の結果からも，メチオニン，トリプトファン含量に於いてことなることから，全く異種の蛋白であることが明らかとなった。

以上の知見は Pyruvate Kinase の生理化学的意義を酵素分子レベルで解明したものであって学位論文として推薦するに値するものである。