



Title	白ネズミの組織におけるPhosphofructokinaseの分子多様性について
Author(s)	安, 斗宣
Citation	大阪大学, 1971, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30628
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

【2】

氏名・(本籍)	安	斗	宣
学位の種類	医	学	博 士
学位記番号	第	2 3 3 3	号
学位授与の日付	昭 和 46 年 5 月 31 日		
学位授与の要件	医学研究科外科系		
	学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	白ネズミの組織における Phosphofructokinase の		
	分子多様性について		
論文審査委員	(主査)		
	教 授 芝 茂		
	(副査)		
	教 授 須田 正己	教 授 田中 武彦	

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

解糖系には三つの律速酵素—Hexokinase, Phosphofructokinase (P F K)と Pyruvate kinase がある。Hexokinase については4種類の酵素が見い出され、Pyruvate kinase については田中らによりL型及びM型の存在が見い出された。したがって残る一つの律速酵素P F Kについても分子多様性の存在が予想される。本研究は TEAE - Cellulose Column Chromatography を用いて Rat 組織におけるP F Kの分子多様性の存在を明らかにした。

〔方法ならびに成績〕

動物は癌移植には Donryn 系、その他の実験には S. D. 系 Rat を用いた。通常の活性の測定は pH 8.0においてATP, F 6 P, Mg 存在下生じたF D PをAldolase, Triosephosphate isomerase, Glycerophosphate dehydrogenaseをcoupleさせて340m μ でのD P N Hの吸収の減少を追う方法によった。実験は特別に記載しない限り4℃で行なった。

(1) P F Kの精製とその抗血清の作製

I型P F Kは筋肉より、II型及びIV型は吉田腹水肝癌A H 130より精製した。

(I) Rat 筋肉を0.03MK F - 1 m M E D T Aでhomogenize 10000 $\times$ g 30分遠心上清を硫酸分画、D E A E - Cellulose Columr Chromatography, 硫酸分画、D E A E - Cellulose Column Chromatographyの後 Sephadex G200 を通し約250倍精製、比活性は約150であった。これを Freundの complete adjuvant と共に家兎に免疫して抗筋肉P F K血清即ちI型抗体を得た。

(II) A H 130細胞を分離後0.04M Tris P - 1 m M E D T A, pH 8.0でhomogenize, 60000 $\times$ g 1時間遠心上清を硫酸分画、熱処理、アセトン分画の後T E A E - Gellulose Column Chromatographyを行い、II型及びIV型 Peakを集め他の混在を除く為少なくとも2回以上のRechr -

omatographyを行なった。共に約300倍精製、比活性は約80であった。これを Freund の complete adjuvant と共にモルモットに注射してそれぞれⅡ型及びⅣ型抗体を得た。

(2) T E A E - Cellulose Column Chromatography

各臓器の粗抽出液を Sephadex G25に通し、T E A E - Cellulose Column (1.8×1.8cm) に apply, 0.025 Mより0.05MのpH 8.0の Tris HCl Buffer と0.025Mより0.2Mの硫酸との linear gradient elutionを行なった。筋肉の場合には一つの Peakで最も早く溶出されたのでⅠ型、肝臓の場合にも一つの Peakであるが最も遅く溶出されたのでⅣ型と名づけた。A H 130の場合には三つの Peakに分離され、溶出順序に従いⅡ型、Ⅲ型及びⅣ型と名づけた。なおA H 130のⅡ型及びⅣ型の Peakを Rechromatographyを行なうと単一の Peakとなり相互転換などはみられなかった。

(3) 各型の臓器分布

(2)で述べた方法と後述する免疫学的成績とにより各型の臓器分布をみた。Ⅰ型は比較的分布が狭く筋肉、心臓及び脳、Ⅱ型は脳、脾臓、腎臓及び睾丸、Ⅲ型は脾臓、胃、腎臓及び睾丸、Ⅳ型は肝臓と多分腎臓及び赤血球に存在する。一方各種の移植性癌細胞にはⅡ型、Ⅲ型及びⅣ型が共に分布している。

(4) 各型の免疫学的相違

抗体による中和実験は適量の抗血清と酵素(1分間340m μ でのO. D. 0.3の減少に相当する量)を Buffer にて0.5mlとし、37°C 5分間 incubate し15000×g 20分の遠心上清0.2mlを測定に供した。対照としては抗血清の代りに正常血清を用いた。

(I) Ⅰ型抗体による阻害態度

Ⅰ型である筋肉活性は少量の抗血清によって完全に阻害されたが、Ⅳ型酵素は大過剰の抗血清で始めて阻害された。Ⅱ型及びⅢ型酵素は反応しなかった。

(II) Ⅱ型抗体による阻害態度

Ⅱ型酵素はすみやかに反応するが、Ⅰ型酵素は全く反応しなかった。Ⅳ型酵素は中等度でもって反応した。

(III)Ⅳ型 抗体による阻害態度

Ⅳ型抗体は特異的でⅣ型酵素にのみ反応し他の型に対しては全く阻害を示さなかった。

以上要約すると現在までの所、免疫学的にはⅡ型及びⅢ型の異同は明らかではなく、Ⅰ型、Ⅱ及びⅢ型、Ⅳ型と三つのグループに識別出来た。

(5) 反応動力学的相違

反応動力学的な測定はpH 7.1のImidazol HCl Bufferを用いて行なった。現在まで各型に対する詳細な検討を行っていないが、基質に対するK_m、阻害剤に対する態度には大きな相違が認められなかった。しかし cyclic AMP, AMP及びADPなどのNucleotideによる活性化がⅣ型では最も大きくⅡ型は殆んどみられなかった。Ⅰ型は中等度活性化された。

〔総括〕

1. 白ネズミの組織においてT E A E - Celluloseを用いてクロマトグラフィー的に4種類のPFK

の存在を明らかにした。

2. 免疫学的には現在までの所、I型、II及びIII型、IV型と三つのグループに分類出来た。
3. 反応動力学的には Nucleotide による活性化の程度に差があった。

論文の審査結果の要旨

高等動物の組織の解糖系には3つの律速酵素がある。そのうち Hexokinase 及び Pyruvate kinase に関して分子多様性の存在がみい出され代謝調節上の意義についても可なり明らかにされている。よって残る一つの律速酵素 Phosphofructokinase についても分子多様性が当然予想されたが未だ解明されていない。本研究は白ネズミの組織において T E A E - Cellulose Column を用いてクロマトグラフィー的に4種類の Phosphofructokinase が存在し、免疫学的には現在までのところそれらが3つのグループに分類され、明らかに異っていることを明らかにした。そして動力学的な検討を行いATP 阻害、Nucleotide による活性化及びその pH 依存性に関して明らかに相違がみられた。これらの Is-ozyme の生理学的意義については未だ充分明らかでないが、Phosphofructokinase の解糖系律速段階に占める重要性より考えて各臓器の解糖調節機構の解明に重要な知見を与えるものと思われる。