



Title	担癌生体肝臓および癌細胞のピルビン酸キナーゼM型について
Author(s)	谷内, 孝次
Citation	大阪大学, 1973, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31135
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

[1]

氏名・(本籍)	谷 内 孝 次
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 2 8 4 3 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 5 月 10 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	担癌生体肝臓および癌細胞のピルビン酸キナーゼM型について
論文審査委員	(主査) 教 授 田 中 武 彦 (副査) 教 授 須 田 正 己 教 授 清 水 信 夫

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

解糖系律速酵素の一つであるピルビン酸キナーゼ (PK) にはL型、M₁型、M₂型のアイソザイムの存在することが知られている。このM₁型(筋肉PK)、M₂型(肝及び他の臓器に広く分布している)は免疫学的に類似しておりまた電気泳動的に分離できなかったのが従来M型と呼ばれていた。肝臓には肝特有なL型とM₂型が存在し、前者はホルモン・食飼等において誘導されるが、後者はされない。さらにまた従来M₁型・M₂型の分離ができないため担癌生体肝臓及び増殖の早い癌細胞・胎児肝・再生肝において増加するPKが抗筋肉PK血清で中和されるのでこれは単にM型であると考えられていた。

このM型酵素を電気泳動・反応動力学的方法及び免疫学的方法を用いてL型・M₁型・M₂型の諸性質と比較検討しアイソザイムの型を決めるとともに、担癌生体肝臓における酵素の増加が潜在酵素の活性化によるのか酵素合成速度の増大によるのかを明らかにし、さらにheterogeneousな組織である肝臓におけるこのアイソザイムの細胞レベルでの局在性を蛍光抗体法を用いて免疫組織化学的に明らかにする。

〔方法ならびに成績〕

実験動物には通常S.D.系ラットを用い、実験癌にはWalker carcinosarcomaをS.D.系♀ラット大腿筋内に移植・継代したもの、吉田腹水肝癌AH130をドンリュウ系♂ラットに継代したものを使用した。

PK活性はADP, phosphoenolpyruvate(PEP) 存在下に生成したpyruvateを2,4-dinitrophenylhydrazineとし、アルカリ液中で発色させ測定した。肝臓におけるM₂型・L型の分別測定は試料全活性中抗筋肉PK血清で中和されるものをM₂型、残りをL型とした。反応動力学的性質を調べる場合は、ADP, PEP存在下に乳酸脱水酵素(LDH)を共転させNADHの減少を測定した。

PKの分子多様性を調べるにはアクリルアミドゲル電気泳動によった。

M₂型の合成速度の測定は腹腔内に¹⁴C-アミノ酸を注射し、2時間後、肝臓をとり出し抽出液中のPKを抗体により特異的に沈降せしめて、抗原-抗体複合物へのアイソトープのとり込みを測定する方法によった。

M₂型の細胞レベルでの局在性は蛍光抗体法を利用して免疫組織化学的に調べた。

(1) PKの分子多様性

担癌肝及び癌細胞のPK電気泳動パターンを正常肝臓・筋肉のそれと比較した。

正常肝臓には陽極側に最も速く移動するL型と最も遅く移動するM₂型が存在する。一方筋肉にはL型とM₂型の中間に位置するM₁型が存在する。Walker肉腫、AH130細胞においてはM₂型に相当する位置にのみ活性をみとめた。また担癌肝ではL型が減少し、M₂型が増加する。

(2) AH130よりのPK-M型の精製と反応動力学的性質の比較検討

AH130細胞を分離後その抽出液上清を硫酸分画(50~70%)、DEAE-Sephadex A-50クロマトグラフィー、Sephadex G-200ゲルクロマトグラフィーにより170倍精製し、電気泳動的超遠心分析的に均一な標品を得た。この肝癌酵素を正常肝より部分精製したM₂型と反応動力学的に比較したが、PEPに対するK_m, fructose-1,6-diphosphateによる活性化、ATP, alanineによる阻害等においてはほとんど相違が見られなかった。

これらのことからM₂型とAH130のPK-M型は同じ酵素であると思われる。

(3) M₁型とM₂型の免疫学的比較

抗M₁血清は家兎より、抗M₂血清はニワトリよりそれぞれ得た。

上記AH130より精製したM₂型は抗M₁血清に対しOuchterlonyゲル内沈降反応では筋肉より精製したM₁型とスパーを形成する。一方抗M₂血清によるM₁型、M₂型のtitration curveではM₂型を完全に中和するがM₁型に対して10~20%の残存活性を示す。

これにより免疫学的に両酵素は共通抗原決定群を有するが、M₁型にはさらに異なる決定群の存在することが明らかになった。

(4) 担癌肝におけるM₂型酵素の量的変化

¹⁴C-アミノ酸を正常及び担癌動物(Walker肉腫、11日目)の腹腔内に注射し、2時間後のM₂型へのとり込みを調べた。

M₂型へのとりこみは担癌肝では正常肝の約9倍、またM₂型比放射能/総タンパク比放射能の割合を比べると前者は後者の3.2倍であった。このことから担癌肝でのM₂型の活性増加は酵素蛋白の合成速度増大による酵素量の増加によるものであることが明らかとなった。

(5) 肝内におけるM₂型の細胞レベルにおける局在性

蛍光抗体間接法を用い調べた。

正常肝臓と担癌肝(Walker肉腫、2週目)を比較すると、前者では点在して実質細胞に蛍光陽性が強くみられるのに対し、後者では一様に実質細胞が強く蛍光陽性であった。M₂型が増加する条件下にある再生肝、胎児肝等においても同様の結果が得られた。

即ちM₂型酵素の増加は肝実質細胞内において起ることが明らかとなった。

〔総括〕

担癌生体肝臓及び癌細胞におけるピルビン酸キナーゼ M 型は M₂ 型であることが電気泳動的・反応動力学的に明らかとなった。

また従来免疫学的に M₁ 型と区別できないとされていた M₂ 型はその抗血清により区別されうることが明らかとなった。

さらに担癌生体肝臓における M₂ 型の増加は酵素蛋白の de novo 合成速度の増大によることが明らかとなった。

この増加は肝実質細胞内において起ることを免疫組織化学的に明らかにした。

論文の審査結果の要旨

ピルビン酸キナーゼには現在までのところ L 型, M₁ 型, M₂ 型が基本的なアイソザイムとして知られている。

本論文はがん細胞において分布し担がん生体において増加するピルビン酸キナーゼは M₂ 型であることを明らかにした。さらに担がん生体におけるピルビン酸キナーゼの上昇は de novo の合成の促進でありこの増加は肝実質細胞内で起きていることを蛍光抗体法により証明した。以上の点が本論文における新知見であり学位論文として価値があるものと認めたい。