

Title	白筋・赤筋・心筋のphosphofructokinase
Author(s)	團野, 迪樹
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31698
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	團 野 迪 樹
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 3695 号
学位授与の日付	昭和 51 年 7 月 28 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	白筋・赤筋・心筋の phosphofructokinase
論文審査委員	(主査) 教授 西川 光夫 (副査) 教授 神前 五郎 教授 田中 武彦

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

機能を異にする筋肉組織で、解糖系の中位で作動する代謝律速酵素 P F K がどのように作動しているかを、雄性家兔を用いて検討してみた。

〔方法ならびに成績〕

I. 筋弛緩剤の投与と白筋・赤筋・心筋の P F K

家兔の一群は、断頭後、脱血死させ（収縮筋）、他の一群は、筋弛緩剤（2.5% 3-o-toloxyl-1, 2-propanediol 溶液）約 40ml を 30 分にわたり持続静注し、しかる後脱血死させた（弛緩筋）。そして筋肉を採取し、10 倍容の抽出液 A [Tris-HCl buffer (20mM), mercaptoethanol (MSH) (10mM), pH 8.0] 中で磨碎し、その 8,000×g, 10 分の遠沈上清を上清酵素とした。またその沈渣をいま一度 10 倍容の抽出液 B [K₂HPO₄ (50mM), MSH (10mM), KF (30mM)] 中で磨碎し、その 8,000×g, 10 分の遠沈上清を沈殿酵素とした。

被験筋としては、背筋、腓腹筋、ヒラメ筋、横隔膜筋、心筋を用いたが、aldolase の活性は前の筋肉ほど高く、逆にコハク酸脱水素酵素は後の筋肉ほど高くなっていたが、P F K にはかかる規則性は認められず、①上清酵素の活性は背筋で最も高く、ヒラメ筋で最も低かった。また収縮筋と弛緩筋を比較した場合、②背筋、腓腹筋には収縮筋で沈殿酵素が認められ、一方③心筋では、上清酵素と沈殿酵素との活性値の合計が、収縮筋で著明に減少していた。

II 筋抽出液の P F K の電気泳動像

臓器抽出液を電気泳動で展開してみたところ、肝臓にはⅣ型、腎臓にはⅢ型とⅡ型の酵素が認め

られたが、筋肉組織では均しく I 型とみなし得る酵素が検出された。

III pHと背(白)筋・心筋のPFK

白筋と心筋の酵素を、部分精製(比活性、約5倍)し、pHを異にする Tris-maleate (20mM), MSH (10mM), buffer 中で透析し(4℃, 90分)て、後8,000×g, 10分の遠沈を行い、その上清と沈殿について活性値を求めた。その結果は、酵素はpH 8.5の透析試料では上清中に存在していたが、透析液のpHが7.5を割ると沈殿を始め、pH 5.5では殆ど全部の酵素が沈殿した。そしてこの間の白筋酵素と心筋酵素には差異は認められなかった。

次に両酵素をpH 5.5の上記のbufferにsuspendし、何が酵素を可溶に出来るかをみたが、その結果は、ATP, SO_4^{--} , PO_4^{--} のいずれかの添加が必要であった。その際、白筋ではATPが2mM, MgSO_4 が10mMを、一方心筋ではATPが4mM, MgSO_4 は30mMの濃度を必要とした。

IV 収縮心筋のPFKとATP

ATP (2mM) 非添加・添加の抽出液Aで、心筋を磨碎し、上清酵素の活性値を求めたところ、非添加では、収縮筋では低値の、弛緩筋では高値の活性が検出されたが、添加により、収縮筋でも弛緩筋とほぼ同程度の高活性値が得られた。

V 白筋のPFKと活性修飾蛋白

(1) 阻害剤のcitrateをligandにしたaffinity column chromatographyを案出した。このcolumnに、白筋と心筋の部分精製酵素(上記)は、同じ条件下で吸着・溶出されたが、肝臓酵素は吸着されなかった。その際、白筋より得た未吸着蛋白の添加により、白筋と心筋の吸着酵素(比活性、約150倍精製)及び市販のPFKの活性は著明に上昇したが、心筋の未吸着蛋白の添加では上昇は認められなかった。

(2) 市販のPFK 4mgを(1)phosphate buffer (100mM), MSH (30mM), pH 8.0 (2)同上buffer, pH 6.8 (3) (2)+citrate (5mM)のいずれかで透析し、そしてその透析液を溶出液に用いて、Bio-Gel A 1.5mのcolumn chromatographyで展開してみた(4℃)ところ、(1)に比べ(2)では、活性が低く、分布も広がり、概して低分子化していく傾向が認められた。(3)では活性は消失した。

しかし(2)、(3)の場合、予めATPを終濃度2mMになるように受け皿の試験管に加え、30℃, 30分加温して測定すると、低分子分画で活性が現われた。

また(3)のbufferにATP (2mM)を加え、室温(18℃)で透析し、そして室温で展開すると、より高いpeakがより高分子分画に現われた。

(3) 市販のPFK 4mgをphosphate buffer (100mM), MSH (30mM), pH 7.2の中で、4℃, 60分透析した。

そしてこの透析液で溶出して求めたBio-Gel column chromatogramと、透析時に活性修飾蛋白(4000 γ)を添加し、同様の操作をして求めたpatternを比較してみると、この蛋白の添加により、PFKの低分子化していく傾向は抑制を受けた。

[総括]

(1) 家兎筋の粗抽出液中のPFKの挙動は筋肉の種類で異なっていた(Iの成績)。

- (2) そのため、それが組織内の内部環境の違いによるものか、酵素自体の質的差異によるものかを調べてみたところ、環境の差異によっていると結論が得られた（Ⅱ－Ⅴの成績）。
- (3) 白筋には PFKの解離を防ぐ修飾蛋白が存在していた（Ⅴの成績）。

論文の審査結果の要旨

機能を異にする筋肉組織で PFKがどのように作動しているかは興味深い。

著者は、家兎筋を用い、粗抽出液中の PFKをみているが、挙動が筋肉の種類で異っていたので、それが内部環境の違いによるものか、酵素精製を進めながら検索を進めている。

その結果、電気泳動像や affinity chromatography では質的に差がなく、個々の筋肉組織内の pH や ATP濃度などの違いが、粗抽出液中の PFKの挙動の違いに現れたものと結論づけている。

その際、白筋内には活性を修飾する蛋白が存在していて、それが白筋の phasic な機能を発揮させている一つの因子となっている点を見い出している。

よって生理化学上新知見を加えたものとして、学位論文として価値あるものと認める。