The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ニワトリ肝ホスホフルクトキナーゼに関する研究，とくに寒冷失活，カイネティクス，アロステリックな性質について
Author(s)	河野，典夫
Citation	大阪大学，1978，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/31912
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

【41】

氏名・(本籍)	河野典夫（こうのぶのりお）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4183 号
学位授与の日付	昭和53年3月18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	**ニワトリ肝ホスホフルクトキナーゼに関する研究，とくに寒冷失活，カイネティクス，アロステリックな性質について**
論文審査委員	(主査) 教授 西川 光夫 (副査) 教授 田中 武彦　教授 和田 博

論文内容の要旨

〔目　的〕

ニワトリ肝から単離・結晶化した解糖系の律速酵素ホスホフルクトキナーゼ（PFK）は，低温度下で活性低下するという新しい特性を示すことを見い出した。そこで本酵素の物理学的および反応速度論的性質と温度との関連性を明らかにする目的で，以下の項目について分析を行なった。1）寒冷失活を招く条件　2）熱活性化を招く条件　3）寒冷失活・熱活性化に伴う酵素蛋白の構造変化　4）PFK反応温度と反応速度との関連とくにアレニウスのプロットおよびフルクトース-6-P，ATPに対するKmとATP阻害に対する温度の影響。

〔方法ならびに成績〕

ニワトリ肝からPFKを単離し，比活性134 u/mg蛋白の結晶酵素をえた。精製酵素の単一性はポリアクリルアマイド・ゲル電気泳動，SDSゲル電気泳動および沈降平衡超遠心によって証明し，以下の実験に供した。

0.05Mグリシルグリシン，8 mMリン酸カリウム，2 mM硫安，25mMジチオスレイトール，1 mM EDTA，pH8.0溶液中で0.01mg/mℓ濃度のPFKを0℃に静置すると，2時間後には80%の酵素活性が失われる（寒冷失活）。寒冷失活したPFK溶液を25～37℃に加温すると酵素活性は回復する（熱活性化）。

1）ⅰ．PFKはpH 7.4～8.8で最も安定であるが，溶液pHがこの領域より酸性あるいはアルカリ性になるにつれて寒冷失活は促進される。

ⅱ．PFK溶液の蛋白濃度が低い程，寒冷失活は進行する。

ⅲ．寒冷失活は一価の陰イオン（I^-, Br^-）の存在下では促進するが，SO_4^{--}またはリン酸イオンにより阻止される。

ⅳ．クエン酸，ATP，ADPは寒冷失活を促進するが，フルクトース-6-P，フルクトース-1，6-P，グルコース-6-P，サイクリックAMPは抑制する。

ⅴ．グリセロールは寒冷失活を抑制する。

2）熱活性化に際して，本酵素活性は，フルクトース-1,6-Pあるいはジチオスレイトールの単独添加によって部分的には回復するが，完全回復には両者の同時添加が必要である。フルクトース-1,6-Pの他にフルクトース-6-P，グルコース-6-P，サイクリックAMPにも熱活性化の促進効果が認められる。

3）庶糖濃度勾配遠沈およびゲル沪過の分析結果によると，寒冷失活したPFKは約100,000の分子量，一方寒冷失活していないPFKは約400,000の分子量を有する。したがって寒冷失活とは，最大の比活性を示す分子量約400,000の形のPFKが，低温暴露によって酵素活性を有しない分子量約100,000のプロトマーに解離することに基づく酵素活性の低下現象といえる。逆に熱活性化の際には，プロトマーが会合してテトラマーを形成することが証明された。さらに，フルクトース-1,6-Pはプロトマーの会合する段階を促進し，ジチオスレイトールは形成したテトラマーの酸化を防止して最大比活性を有する活性型に変換させる段階に関与していることを示す成績がえられた。

4）ⅰ．ＰＦＫ反応のアレニウス・プロットは15～16℃で屈曲する２直線を描く。高温度および低温度域の活性化エネルギーは，各々11,000calおよび16,400calである。

ⅱ．６～25℃の温度下で測定したPFK反応の初速度から求めたフルクトース-6-Pに対するKmは0.051mMと一定であったが，ATPに対するKmには，20℃以上域では0.041mM，13℃以下域では0.012mMと差異を認めた。ATP阻害の程度は温度変化によって変動しなかった。これらの成績から，PFKの活性型（テトラマー）にも温度変化に伴って２つの異なったコンフォメーションの存在することが強く示唆される。

〔総　　括〕

ニワトリ肝ＰＦＫは，酵素溶液を０℃に冷却すると酵素活性が低下する。この寒冷失活と呼ばれる新しい現象は，酵素が４個のプロトマーに解離することに起因するもので，その過程は，温度，pH，蛋白濃度，イオンの種類と濃度，解糖中間体，ヌクレオタイドの影響を受ける。一方，この過程は可逆的変化であり，解離したプロトマーは加温によって再び会合して酵素活性も回復する。また活性型であるテトラマーにも２種以上のコンフォーマーの存在することを，カイネティクスの分析により明らかにした。

論文の審査結果の要旨

本研究では，肝から初めてホスホフルクトキナーゼを単離・結晶化したにとどまらず，寒冷失活と

いうまったく新しい性質を見い出し，本酵素の蛋白構造と反応速度論的性質との関連性とくに寒冷暴露による4個のプロトマーへの解離現象を明確に証明している。寒冷失活現象は，本研究の発表を契機にその後他種動物についても研究されるに至った。さらに先天性ホスホフルクトキナーゼ欠損症の病態解明に不可欠な要素をなす本酵素の基本的な性質を明かにした点は，本論文の評価を一層高めるものである。