

Title	筋ホスホフルクトキナーゼ欠損症における赤血球変異酵素のキネティクス分析
Author(s)	清水, 孝郎
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/33313">https://hdl.handle.net/11094/33313</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

[16]

氏名・(本籍)	し 清	みず 水	たか 孝	お 郎
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	5989	号	
学位授与の日付	昭和58年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科 内科系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	筋ホスホフルクトキナーゼ欠損症における赤血球変異酵素の キネティクス分析			
論文審査委員	(主査) 教授 垂井清一郎			
	(副査) 教授 田中 武彦 教授 萩原 文二			

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

筋ホスホフルクトキナーゼ (PFK) 欠損症 (糖原病Ⅶ型) は1965年に当教室で初めて見いだされた。本症は筋症状に加え溶血性貧血を伴う。当教室ではその病態解析および酵素免疫学的分析を通じて正常赤血球PFKが筋型及び筋型以外のサブユニットからなるハイブリッド酵素であり、さらに筋型以外のサブユニットとして肝型が有力である事を示してきた。本研究においては、本症症例赤血球変異酵素のキネティクスを正常赤血球PFK及び正常肝PFKと対比して分析し、変異酵素のキネティクス特性を明らかにした。

### 〔方法ならびに成績〕

対象は本症を発見する端緒となった第1家系の44才男性と、最近筋PFK欠損を確認した本邦第2家系の16才女性である。

#### (1) 赤血球PFK活性と赤血球解糖中間体

PFK活性はカップリング酵素を用いて、NADHの減少を分光光度計で測定した。赤血球PFK活性は本症第1家系症例、第2家系症例でそれぞれ、正常対照の40、48%に減少していた。赤血球解糖中間体濃度を測定したところ、両家系ともPFKステップ以後の中間体は減少しており、in vivoにおけるPFKステップでの解糖障害が証明された。

#### (2) 赤血球PFKの基質親和性

赤血球PFKはヘパリン採血後、セルロースカラムを通して白血球、血小板を除去し、DEAE—セルロース・バッチ法、硫酸塩析にて部分精製した。以下の検索にはこの標本を用いた。ATPに

対する  $K_m$  ( $\mu M$ ) は正常赤血球 PFK, 本症第 1 家系症例赤血球 PFK, 第 2 家系症例赤血球 PFK の 3 標本においてそれぞれ, 30, 21, 20 と算出され, Fructose 6-Phosphate (F6P) に対する  $K_m$  ( $\mu M$ ) はそれぞれ, 42, 43, 45 と算出された。

### (3) 赤血球 PFK の ATP 阻害

部分精製 PFK 標本を 50mM TRIS/P (pH 8.0), 1 mM 硫酸, 1 mM EDTA, 4 mM DTT にて透析後, 脱塩したカップリング酵素を用いて測定した。ATP は PFK の基質であると同時にアロステリック阻害効果を示し, pH 7.4, 1 mM F6P の多件下で 2 mM ATP は PFK 反応を約 80% 阻害した。ATP 濃度を变化させた場合の 50% 反応阻害濃度 ( $K_i$ , mM) はそれぞれの標本において, 1.0, 1.0, 1.1 であり, PFK 間で近似した値を示した。

### (4) 各種代謝物質の PFK 反応に対する効果

測定は ATP 阻害を受ける条件下 (pH 7.4, ATP 1 mM) で透析 PFK 標本を用いて行なった。正常赤血球 PFK 反応は, 3-Phosphoglycerate (3 PGA) によって強く阻害された。しかし本症症例の赤血球 PFK 反応はあまり阻害を受けず, その阻害効果は 2 家系間で同程度であった。3 PGA に対する  $K_i$  (mM) は, それぞれの標本において 0.2, 1.9, 2.1 と算出された。クエン酸についても同様の成績が得られ, その  $K_i$  はそれぞれ, 0.3, 1.1, 1.2 と算出された。2-Phosphoglycerate, Phosphoenolpyruvate についても同様の成績が得られた。他の解糖中間体, アデニンスクレオチドの効果には PFK 間で特に差を認めなかった。PFK 変異酵素のキネティックスの家系間における類似性は, Pyruvate kinase 変異酵素のキネティックスが家系間で異なる場合が多いことと対照的である。

### (5) 赤血球 PFK 反応の pH 依存性

pH 曲線は Potassium phosphate, TRIS/HCl, Glycylglycine 緩衝液を用い pH 6.0—9.2 の範囲で測定した。PFK 反応はいずれも pH 6.2 から 7.6 にかけて著しく増大した。全体の pH 依存性は PFK 間で特に差を認めなかった。

### (6) 正常肝 PFK との比較

正常肝 PFK は熱処理後に赤血球 PFK と同手順で部分精製し, 実験に供した。肝 PFK の ATP に対する  $K_m$  は  $23 \mu M$ , F6P に対する  $K_m$  は  $45 \mu M$ , ATP に対する  $K_i$  は 1.1 mM と算出され, 本症症例のいずれの赤血球 PFK にも類似した値が得られた。肝 PFK の 3 PGA に対する  $K_i$  は 1.8 mM, クエン酸に対する  $K_i$  は 1.2 mM と算出され, さらに他の代謝物質の効果についても本症症例の赤血球 PFK と近似した値が得られた。肝 PFK の pH 依存性も赤血球 PFK と特に差を認めなかった。

### [総括]

筋 PFK 欠損症 (2 家系 2 症例) の赤血球 PFK を部分精製して酵素反応キネティックスを分析し, 正常赤血球 PFK, 正常肝 PFK と比較して以下の結論を得た。

1. 本症の赤血球 PFK 活性は正常対照の 1/2 に減少していた。PFK ステップ以後の赤血球解糖中間体は減少しており, in vivo における本酵素段階での解糖障害が証明された。
2. 本症の赤血球 PFK は正常赤血球 PFK と異なるキネティックスを示した。この相違は, 3 PGA, 2-Phosphoglycerate, Phosphoenolpyruvate, クエン酸による PFK 反応阻害において明らかで

ある。

3. 本症の赤血球PFKキネティクスは2家系間で一致した。この事は本症赤血球におけるPFK欠損形態の類似性を示しており、Pyruvate kinase欠損症の欠損形態とは明らかに異なっている。つまり、本症の赤血球に残存するPFK活性は筋型以外のサブユニットに由来すると考えられる。
4. 本症の赤血球PFKキネティクスは正常肝PFKのキネティクスと一致した。この事から、本症赤血球に残存するPFK活性が肝型サブユニットに由来する事がキネティクスの面から示唆された。

### 論文の審査結果の要旨

本論文は、筋ホスホフルクトキナーゼ (PFK) 欠損症の赤血球に残存するPFKのキネティクスを2家系間で比較し、両者が一致するのみならず、正常肝PFKとも一致する事を明らかにした。赤血球PFKサブユニットの構成は従来、酵素免疫学的手法、物理化学的手法を用いて追求されていたが、本論文は酵素アイソザイムのキネティクス特性の差異を巧みにとらえて、比較的簡便に且つ明確に、赤血球PFKが筋型及び肝型サブユニットから構成される事を示唆した点で意義が大きい。