

Title	酵素カラムと高速液体クロマトグラフを用いたフルクトース-2, 6-ビスリン酸の定量法
Author(s)	小郷, 克幸
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/33331">http://hdl.handle.net/11094/33331</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名・(本籍)	小 郷 克 幸
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 9 8 4 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 生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	酵素カラムと高速液体クロマトグラフを用いたフルクトース-2,6-ビスリン酸の定量法
論文審査委員	(主査) 教授 萩原 文二 (副査) 教授 田川 邦夫 教授 山野 俊雄

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

解糖系の調節酵素ホスホフルクトキナーゼ (PFK) の活性化因子は、1980年に発見され、これがフルクトース-2,6-ビスリン酸 (F26P<sub>2</sub>) であると同定された。その後の研究で、この物質の増減が、グルカゴンなどのホルモンの影響を受け、解糖又は糖新生の動向を支配する重要な因子であることが明らかとなった。F26P<sub>2</sub>量の測定は従来PFKの活性化の度合から間接的になされていたが、PFKの活性が種々の陰イオンや化合物によっても大きく影響を受けるので、絶対量を正確に求めることは困難であった。本研究では、F26P<sub>2</sub>の正確な測定を行なう目的で、高速液体クロマトグラフ、固定化酵素カラムおよび過酸化水素電極を組み合わせた系を検討した。

### 〔方法ならびに成績〕

フルクトース-2,6-ビスリン酸 (F26P<sub>2</sub>) の測定は、①弱酸による加水分解でフルクトース-6-リン酸 (F6P) に変える段階と②生じたF6Pを高速液体クロマトグラフ、固定化酵素カラムおよび過酸化水素電極を組み合わせた系で測定する段階からなる。後者において、高速液体クロマトグラフの分離カラムを通過したF6Pは、三種の酵素カラムにより、その約50%が過酸化水素に変換される。生じた過酸化水素は、白金電極上で酸化され電解電流をモニターすることで定量できる。

### 1. 固定化酵素カラム

Controlled Pore Glass (200—400mesh, Pore size 500 Å) をアミノプロピル化した後、ジアゾ法により酵素を共有結合させ、これを内径1mmのポリエチレンチューブに充てんし、固定化酵素カラムとした。固定化された酵素は、ホスホグルコースイソメラーゼ、アルカリホスファターゼ、グル

コースオキシダーゼであった。カラム内の酵素量は、通過する基質が完全に反応するのに必要な量に対して十分過剰であった。実際に、上記三種の酵素カラムの特性を検討したところ、ともに基質がカラムを通過する間に酵素反応が完了していることが明らかとなった。

## 2. フルクトース-6-リン酸の測定

上記の固定化酵素カラムを高速液体クロマトグラフにおける分離カラム（陰イオン交換AX-300）の流路後方にとりつけ（順に、ホスホグルコースイソメラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ）、F6P標準試料を注入し、生成する過酸化水素を電極で検出した。その結果、10 nmol以下のF6P量で測定電流と良好な直線関係が得られた。この場合の検出限界（S/N=2）は、2 pmolであった。

## 3. フルクトース-2,6-ビスリン酸の測定

フルクトース-2,6-ビスリン酸（F26P<sub>2</sub>）を上記のフルクトース-6-リン酸（F6P）測定系に直接には適用出来ないので、F26P<sub>2</sub>を弱酸で加水分解し、それにより生じたF6Pを測定した。生体中には、F26P<sub>2</sub>の100倍程度のF6P、グルコース-6-リン酸（G6P）が存在し、あらかじめこれらの物質を除かなければならない。本研究では、試料をミニカラム（陰イオン交換、30mm×4φ）に吸着させ、50mM NaClを含む20mM Tris-Clバッファ（pH 7.5）で洗浄することでF6P、G6Pを除いた。次に、10mM HClをカラムに流し、10分間放置すると、F26P<sub>2</sub>はカラム中でそのほぼ全量が加水分解されてF6Pに変化する。このプレカラムを上記のF6P測定高速液体クロマトグラフ系に連結すると、プレカラム中のF6Pは溶離されて検出される。F26P<sub>2</sub>の標準試料を用いたところ、ほぼ100%の回収率が得られた。またF6P、G6P、FDPのみを含む試料で同様の操作を行なったところ、検出されなかったことから、これらの物質による測定値の誤差は無視できることがわかった。また、生体試料として、ラット肝の抽出液を適用し良好な結果が得られた。

### 〔総括〕

液体クロマトグラフに固定化酵素カラムと過酸化水素電極を組み合わせることにより、フルクトース-6-リン酸（F6P）の超微量定量が可能となった。このシステムでは、F6P量は10nmol以下で、シグナル値と良好な直線関係が得られ、検出限界は2 pmolであった。

ホスホフルクトキナーゼ活性化因子であるフルクトース-2,6-ビスリン酸（F26P<sub>2</sub>）の新しい定量法として、試料中のF26P<sub>2</sub>をプレカラムに吸着させ、種々の操作を経て、ミニカラムに吸着したままF6Pに変化させ、これを上記のF6P測定系に連結する方法を試みた。その結果、F26P<sub>2</sub>の微量定量が十分可能となった。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は、従来微量定量が困難であった糖誘導体の新しい測定方法に関するものである。これは、高速液体クロマトグラフに三種の固定化酵素カラムおよび電気化学検出器を結びつけたもので、その

検出感度も高い。本装置によって、糖代謝の分野で最近注目されているフルクトース-2,6-ビスリン酸の微量定量が可能となり、今後、各種方面の研究に寄与するものと思われる。