Osaka University Knowledge Archive

Title	ラットL型ピルビン酸キナーゼc DNAのクローニングとそれから導かれる全アミノ酸配列
Author(s)	井上, 裕康
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35287
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【2】

氏名・(本籍)	井上裕康（いのうえ ひろやす）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7641 号
学位授与の日付	昭和62年3月26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	**ラットL型ピルビン酸キナーゼcDNAのクローニングとそれから導かれる全アミノ酸配列**
論文審査委員	(主査) 教授 田中 武彦 (副査) 教授 谷口 直之　教授 吉川 寛

論文内容の要旨

［目　的］

解糖系律速酵素ピルビン酸キナーゼには，L，R，M_1，M_2型の4種類のアイソザイムが存在し，組織特異的に存在し，組織特異的に発現しているが，酵素学的性質も，発現している組織の生理学的特性に応じて異なっている。例えばL型は主に肝臓に局在し，cAMP依存性タンパク質燐酸化酵素によって，活性調節を受けている（kmが増大する）。

また，M_1型は筋肉，脳に局在するが，低いkm値を持ち，唯一のアロステリック効果を持たない酵素である。ところでネコM_1型酵素はX線立体構造解析の結果から，A，B，Cの三つのドメインに分かれ，Aドメインに基質結合部位が，Cドメインに四量体形成に関与する部位などがそれぞれ同定されているが，最近，この酵素の全一次構造が決定された。本研究の目的は，未だ決定されていないL型酵素の全一次構造を，このcDNAをクローン化し塩基配列を決めることで明らかにし，以上のようなアイソザイムの酵素学的知見をもとに，他のアイソザイムと比較検討することにある。

［方法及び成績］

高炭水化物食を与えたラットからマグネシウム沈澱法でポリゾームを抽出し，抗L型酵素抗体を用いた免疫沈澱法でL型酵素mRNAを濃縮した。これを鋳型にして常法によりcDNAを作り，pBR322をベクターとしてクローニングを行った。スクリーニングにより3個のクローンが得られ，cDNAインサートの制限酵素地図を作った結果，お互いに重複していて全体で約2,200塩基の長さを持っていた。いくつかの制限酵素によって作った断片をM13ファージに組み込み，ジデオキシ法により全体の塩基配列を決定した。その中に1629塩基の翻訳領域があったが，全アミノ酸残基数は543で，分子量は58793

ダルトンと見積られた。これはL型酵素の電気泳動による分子量測定の結果とほぼ一致した。

L型のN末端のアミノ酸は修飾を受けているため同定されていない。HumbleはcAMP存在性タンパク質燐酸化酵素の基質となる部分をCNBr分解物より単離し，エドマン法によりアミノ酸配列を決定しているが，これは開始コドンの次の配列と完全に一致した（2番目から34番目）。このことから，開始コドンのメチオニンが翻訳後除かれずにアセチル化などの修飾を受けると考えられる。ところでM_1やM_2型の一次構造と比較すると，L型はN末側に13残基長く，ここに燐酸化されるセリンがあり，M_1，M_2型は燐酸化されないという事実に合致する。

鶏M_1型とのホモロジーをみると，A，B，Cのドメインはそれぞれ81%，53%，60%であり，Aドメインが特に高かった。MuirheadはAドメインの中に7個の活性中心に関係深い配列を見いだしているが，鶏M_1型，猫M_1型，ラットM_1，M_2型ではそれが完全に一致しているのに対し，L型はそのうちの一つにかなり配列の違いがみられた。これはL型特有の酵素的性質を反映しているかも知れない。また，Cドメイン中にはサブユニット間の結合に関与する部分が同定されているが，この配列においてL型はM_1型よりM_2型とホモロジーが高い（それぞれ69%，79%）。その配列の中で特に，鶏，猫，ラットM_1型の間，ラットM_2，L型の間でそれぞれ共通であるが，その両者の間では異なるアミノ酸がいくつか見いだされ，その部分がアロステリック効果と関係していると考えられる。

［総　括］

L型酵素のcDNAクローニングを行い，タンパク質をコードする全塩基配列を決定した。その塩基配列からは543個のアミノ酸配列が導かれ，開始コドンのMetは修飾を受け除去されないと考えられた。M_1，M_2型の一次構造と比較するとL型はN末端側に13残基長く，そこにcAMP依存性タンパク質燐酸化酵素によって燐酸化される部位があった。また，Aドメインが特にホモロジーが高いが，活性中心に関与する残基の一つに違いが見られ，これはL型特有の酵素的性質に関係するかも知れない。サブユニット間の結合に関与する残基については，L型はM_1型よりM_2型とホモロジーが高く，このアミノ酸配列がM_1型にはなくM_2およびL型の持つ性質であるアロステリック効果に関係していることが示唆された。

論文の審査結果の要旨

解糖系律速酵素であるピルビン酸キナーゼには，ほ乳類ではL，R，M_1，M_2の4種類のアイソザイムが存在し，組織特異的に発現している。このうちL型は肝臓に主に存在しホルモンや食餌条件により変動している。本研究はこの作用機構の分子的メカニズムを解析することを最終目標にしてなされたものであるがL型酵素のクローニングに初めて成功し，また未だ明らかとなっていなかった全一次構造をcDNAの塩基配列を決めることで決定したものである。以上の成果は学位を授与するに値すると評価される。