

Title	腎不全時のピルビン酸キナーゼの合成動態
Author(s)	今井, 圓裕
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/35560">https://doi.org/10.18910/35560</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

氏名・(本籍)	いま 井 園 裕
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 7 5 7 6 号
学位授与の日付	昭 和 62 年 3 月 12 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	腎不全時のピルビン酸キナーゼの合成動態
論文審査委員	(主査) 教 授 鎌田 武信 (副査) 教 授 田中 武彦 教 授 園田 孝夫

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目 的]

慢性腎不全時には種々の代謝異常が認められるが、その一因として酵素の活性異常が知られている。従来、腎不全時の酵素活性異常は活性レベルの測定により検討され、酵素合成面からの検討はなされておらず、また、その機序についての検討も不十分である。本研究は、解糖系の律速酵素の一つである Pyruvate kinase (PK) を用いて、腎不全時の酵素活性異常の機序を酵素合成面より解明しようとしたものである。

### [方 法]

#### 1) 腎不全ラット作製, および飼育

腎不全ラット (U) は SD 系雄性ラット (120-130 g) を用いて、左腎 $\frac{3}{4}$ 切除し、2週間後右腎全摘し作製した。対称 (C) は、sham operation をおこなった同週齢ラットを使用した。いずれも、2ヶ月間 ad libitum にて、標準飼料を投与した。その後、ラットを代謝ケージに移し、7日間24%カゼイン食にて pair feeding し、18時間絶食後屠殺した (絶食群)。また、絶食後50%ブドウ糖加12%カゼイン食にて、24時間 refeeding した後屠殺した (refed 群)。屠殺後直ちに、肝、腓腹筋を採取し、急速に凍結した。U の血清クレアチニン、BUN は、C に比し、有意に上昇していた。

#### 2) PK 酵素活性測定

筋  $M_1$ -PK 酵素活性は、2, 4-dinitrophenylhydrazone 法にて 1 mM fructose 1, 6-bisphosphate 存在下にて測定した。肝 L-PK 活性は、同方法にて、過剰の  $M_1$ -PK 抗体下にて測定した。また、inhibitor の存在による活性低下を検討するために、immunotitration assay を行った。

### 3) PKmRNA レベルの測定

肝, 腓腹筋より total cellular RNA を phenol/chloroform 法にて抽出後, dot blot hybridization 法にて mRNA レベルを測定した。L-PKmRNA の cDNA は, pLPK-1 (Noguchi, T. et al : J. Biol. Chem. 258 : 15220, 1983) を使用し, Nick translation により [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP でラベルした。M<sub>1</sub>-PKmRNA の cDNA は crosshybridization する pM<sub>2</sub>PK-33 (Noguchi, T. et al : J. Biol. Chem. 259:2651, 1984) を用いた。

### 4) PKmRNA の定性的検討

PKmRNA の定性的検討は, total cellular RNA の Northern blot analysis にて行った。

### 5) その他の assay

血漿 insulin, glucagon は, RIA にて測定した。glucagon の抗体は OA-123 を用いた。

#### [結 果]

- 1) 筋 M<sub>1</sub>-PK 活性は, 絶食および, refed 条件下で, C, U 間に差がなかった。筋 M<sub>1</sub>-PKmRNA レベルも C, U 間に差を認めなかった。筋 M<sub>1</sub>-PKmRNA は, 腎不全ラットで mRNA の size に変化がなく intact であり, 従来報告されているような RNase による傷害を認めなかった。
- 2) 肝 L-PK 活性は, 絶食および, refed 条件下で, C 群に比し, U 群で低下した。Immunotitration assay にて, C と U は同一の equivalence point を持つため, 酵素活性の低下は酵素量の減少に起因すると考えられた。
- 3) 肝 L-PKmRNA レベルは, 絶食時 C, U 間で差がなかった。しかし, refeeding 後の肝 L-PKmRNA の induction は U 群で低下し, 肝 L-PKmRNA レベルは血清クレアチニン値と有意の負の相関を示し ( $P < 0.005$ ), 腎不全の重症度に応じて抑制された。また腎不全ラットでは, 肝 L-PKmRNA レベルの量的減少は認めるも mRNA の size に変化を認めず, 従来報告されているような RNase による傷害を認めなかった。
- 4) Refeeding 後の, L-PKmRNA レベルは血漿 insulin レベルと相関を認めず, 血漿 glucagon レベル ( $P < 0.005$ ) および glucagon/insulin 比 ( $P < 0.05$ ) と負の相関を認めた。

#### [総 括]

- 1) 腓腹筋の M<sub>1</sub>-PK 活性および M<sub>1</sub>-PKmRNA レベルは腎不全による影響を受けなかった。
- 2) 腎不全時には, 肝の L-PK 活性が低下しており, この原因として酵素量の減少が認められた。
- 3) Refeeding 後の L-PKmRNA レベルは, 腎不全時低下を認め, translation 以前のレベルでの肝 L-PK 合成抑制が考えられた。
- 4) この L-PKmRNA レベル低下には, 腎不全時の高 glucagon 血症の関与が示唆された。

## 論文の審査結果の要旨

腎不全時の糖代謝異常の一因として解糖系酵素活性の異常が知られているが, 従来これは uremic

toxinsによる酵素活性抑制に起因するとされていた。本研究では、解糖系律速酵素である pyruvate kinaseが腎不全時に受ける影響を mRNA レベルではじめて検討し、肝L型 pyruvate kinase活性低下が、mRNA レベルの減少に基く翻訳以前の合成低下に起因する酵素蛋白の減少によることを明らかにした。これは腎不全時の酵素活性の低下が、酵素活性抑制以外に酵素合成低下という別の因子を考慮すべきであるとするもので、腎不全時の病態解明上高く評価される。