Osaka University Knowledge Archive

Title	Rat-liver-type phosphofructokinase mRNA : structure, tissue distribution and regulation
Author(s)	堀田, 紀久子
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38130
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

氏　　名	堀　田　紀久子（ほった　きくこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　10665　号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	Rat-liver-type phosphofructokinase mRNA; structure, tissue distribution and regulation **（肝型ホスホフルクトキナーゼ mRNA の構造，組織分布と発現調節に関する研究）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松沢　佑次 （副査） 教　授　田中　武彦　　教　授　岡田伸太郎

論　文　内　容　の　要　旨

（目　　的）

ホスホフルクトキナーゼ（以下PFK）は種々のエフェクターにより活性調節を受けるアロステリック酵素である。PFKには3種のアイソザイム（肝型，筋型，血小板型）が存在している。肝型 PFK は肝解糖系の重要な律速酵素であり，その活性はインスリン等のホルモンにより調節を受けることが知られている。今回我々は，肝における PFK の構造と活性調節を分子生物学的に解明するため，まず，肝型PFK の全長 cDNA をクローニングした。ついで，糖尿病における肝型 PFKmRNA レベルを，他の解糖系律速酵素（グルコキナーゼ（以下 GK），L 型ピルビン酸キナーゼ（以下 LPK））と比較検討した。

（方法ならびに成績）

(1) 構造；既知の配列をもとに，マウス肝型 PFK の cDNA の約 450bp の cDNA 断片を RT-PCR 法にて増幅した。これをプローブとしラット肝 cDNA ライブラリーをスクリーニングし，互いにオーバーラップする 8 個のクローンを得た。これらのクローンの塩基配列を決定した。－5 から 4 の CCGUC AUGG は Kozak のリボゾーム結合部位のコンセンサス配列（CC（A／G）CCAUG（G））とよく一致した。これらのクローンは 780 アミノ酸をコードしており，66 塩基の 5’非翻訳領域とポリA シグナル（AATAAA）とポリ A を含んでいた。ラット肝型 PFK の翻訳開始領域を含む 20 塩基をプライマーとしてプライマー伸長法を行なった結果，これらのクローンはラット肝型 PFK の全長を含むと判断した。ラット肝型 PFK は，マウス肝型，ヒト肝型 PFK と翻訳領域の塩基配列で 94 %，88 %のホモロジー，アミノ酸配列では 99 %，94 %のホモロジーを有していた。ラット肝型，マウス肝型，ヒト肝型，ヒト筋型，家兎筋型 PFK の活性部位のアミノ酸は良く保存されていたが，ATP 阻害部位に関しては肝型と筋型で異なるアミノ酸（Asn75，Gln620）が認められた。

(2) 組織分布；ラットの種々の組織より RNA を抽出し，ラット肝PFKcDNA の KpnI／EcoRI 断片をプローブとし，ノザン分析を行なった。ラット肝型 PFK は心筋，筋ではほとんど発現せず，それ以外の組織で発現していた。特に，副腎，脂肪組織で高い発現が認められた。

(3) 発現調節；ラットを 72 時間絶食後，高炭水化物食（81 %デキストリン，10 %カゼイン，2 %脂肪）を摂取させ，経時的にラットを屠殺し，肝を摘出した。LiCl 法により，RNA を抽出し，PFK，GK，LPK，アクチンの mRNA 量をドットブロット法にて定量した。また，ストレプトゾトシン（50mg／kg）にて糖尿病ラットを作成し，中間型イン

スリン（50U／kg），速効型インスリン（2U／kg）を皮下注射し，PFK，GK，LPK，アクチンのmRNA量の経時的変化を同様に測定した。GK，LPKのmRNA量は72時間絶食にて著明に減少し，（GKは検出不能，LPKは自由摂食コントロールの0.1±0.1倍），再摂食にて増加した（GKは4時間でコントロールの10.5±1.3倍，LPKは24時間で11.4±1.5倍）。これに対し肝型PFKは，mRNA量はほとんど変化が見られなかった（絶食でコントロールの1.0±0.2倍，24時間で1.4±0.2倍）。また，糖尿病状態ではGK，LPKのmRNAは著明に減少し（GKは健常コントロールの0.03±0.05倍，LPKは0.1±0.1倍），インスリン治療にて増加した（GKは治療6時間で無治療コントロールの37.6±9.9倍，LPKは16時間で6.3±1.4倍）。PFKの場合，mRNA量はほとんど変化しなかった（糖尿病状態は健常コントロールの0.9±0.2倍，インスリン治療後16時間で無治療コントロールの1.4±0.2倍）。

（総　括）

(1) ラット肝型PFKcDNAの全長をクローニングし全塩基配列を決定し，その一次構造を分析した。種族，アイソザイムは異なってもPFKの活性部位のアミノ酸はよく保存されていた。ATP阻害部位に関しては肝型と筋型で異なる配列（Asn75，Gln620）があり，ATP阻害のアロステリック効果の差と関連している可能性が示唆された。

(2) ラット肝型PFKは筋，心筋では発現がほとんど認められず，それ以外の組織で広く発現が認められた。

(3) 絶食，再摂食および糖尿病のインスリン治療により，ラット肝のGKやLPKのmRNA量は著しく変化したのに対して，PFKのmRNA量の変化は少なかった。肝解糖系においてPFKはGKやLPKに比べてmRNA量による活性調節を受けにくいことが示唆された。また，肝型PFK自身の活性調節においても，基質およびアロステリックエフェクターレベルの調節に比べ，mRNAレベルでの調節を受けにくいことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

肝型ホスホフルクトキナーゼ（PFK）は種々のエフェクターにより調節を受けるアロステリック酵素で，肝解糖系の律速酵素の1つである。現在まで，本酵素の調節機構について分子生物学的レベルでの検討はほとんどなされていない。本研究では，ラット肝型PFKcDNAをはじめてクローニングし，その全一次構造を解明し，一次構造とアロステリック調節との関連性を明らかにした。また，肝型PFKmRNAは骨格筋，心筋以外の組織で広く認められ，摂食状況や糖尿病状態およびインスリン補充による調節をほとんど受けないことを明らかにした。

本研究は，ラット肝型PFKcDNAをはじめてクローニングし，これに基づいて本酵素の調節機構を明らかにしたものであり，解糖系の分子生物学的解明に貢献するものである。よって，博士（医学）の学位に値すると判断される。