



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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	堀 田 紀久子
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 PFK mRNA 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%のホモジニー、アミノ酸配列では99%, 94%のホモジニーを有していた。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量をドットプ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 (2 U/kg) を皮下注射し, PFK, GK, LPK, アクチンの mRNA 量の経時的变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。今まで, 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。