



# Liver glycogen phosphorylase kinase partial purification and characterization

酒井, 國安

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1980-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0303

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000303>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍） さか い くに やす （ 兵 庫 県 ）  
 学 位 の 種 類 医 学 博 士  
 学 位 記 番 号 医 博 い 第 295 号  
 学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当  
 学位授与の日付 昭和55年 3 月31日  
 学位論文題目 **Liver Glycogen Phosphorylase Kinase**  
**PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION**  
 肝臓 glycogen phosphorylase kinase の分離精製並びに  
 性質について

審 査 委 員 主査 教授 西 塚 泰 美  
 教授 杉 山 武 敏 教授 木 幡 陽

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 序 文

肝臓は日常繰り返される摂食と絶食に伴ってグリコーゲン合成およびグルコース産生の代謝パターンを急速に変化させ、血糖値の維持に中心的な役割を果たしている。多くのホルモンの作用によってこの代謝パターンの変化が巧妙に調節されているが、その詳細は尚不明な点が多い。

肝臓のグリコーゲン分解系の研究から Sutherland は Cyclic AMP を発見したが、その後グリコーゲン代謝の調節機構はより解析の容易な骨格筋を用いて詳しく解明され、ホルモン作用のモデルとなっている。今日、肝臓における調節機構は骨格筋と同一のものであると類推されているがその証明はなされていない。ことにグリコーゲンの分解を触媒する Phosphorylase (Ph) を活性化する肝臓 Phosphorylase kinase (Ph Kinase) の酵素化学的性質および活性調節機序は骨格筋の酵素の場合と異なってほとんど解明されていない。

今日、肝臓 Ph Kinase の活性調節機序は次のように推測されている。第 1 にはリン酸化・脱リン酸化によるもの、すなわち、肝臓 Ph Kinase はグルカゴンおよびエピネフリンに反応して活性化された Cyclic AMP 依存性蛋白質リン酸化酵素 (A-Kinase) によって活性化され、Phosphoprotein phosphatase によって不活性化されるというものである。第 2 には  $\text{Ca}^{2+}$  によるアロステリック効果によるもの、すなわち、最近注目されているようにエピネフリンの  $\alpha$  作用に反応して増加した細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  によって肝臓 Ph Kinase は Cyclic AMP・A-kinase 系を介することなく直接活性化されるというものである。

そこで、本研究においては肝臓 Ph Kinase の実体を明らかにし、ひいてはグリコーゲン代謝の調

節機構を詳しく解明する目的から、家兎肝臓より Ph Kinase を部分精製し、その酵素化学的性質および活性化様式について既に詳細に解析の進められている骨格筋 Ph Kinase と比較検討した。

## 実験方法

### Ph Kinase の活性測定

基質として用いた Ph b は家兎骨格筋より結晶化によって分離精製した。Ph Kinase の酵素活性は〔 $\gamma$ - $^{32}$ P〕ATP から Ph b に取り込まれたリン酸の放射能を測定することにより行った。他の実験方法の記載は省略した。

## 実験結果

### I 肝臓 Ph Kinase の精製

家兎オスを Nembutal で麻酔し頸静脈より脱血後、迅速に肝臓を摘出して細切し Waring Blendor でホモジネートにした。このホモジネートを低速遠心後更に超遠心にて上清の細胞質可溶性画分を求めこれを粗抽出液とした。この粗抽出液を直接 DEAE Sephadex (A-50) のカラムにかけ、硫酸の段階的濃度勾配により Ph Kinase を溶出した。Ph Kinase フラクシオンの45%硫酸分画を行い、硫酸の沈査を遠心にて集め、透析後 Sepharose CL-6B のカラムでゲル濾過を行った。ゲル濾過では Ph Kinase は分子量の大きいフラクシオン (Kinase I) と小さいフラクシオン (Kinase II) の2峰性に溶出された。Kinase I は Ph Kinase 活性に障碍となる蛋白質を吸着させるために更に Phosphocellulose にかけ、非吸着部分を集めた。一方、Kinase II は Cibacron blue Sephadex のアフィニティ・カラムクロマトを行い、塩化カリの段階的濃度勾配によって溶出した。最終的に Kinase I および II をそれぞれ限外濾過によって濃縮し酵素標品とした。以上の精製操作で Ph Kinase の蛋白質あたりの比活性、および酵素活性の回収率は、それぞれ Kinase I では約70倍・約17%, Kinase II では約130倍・約5%であった。精製酵素は50%エチレングリコール溶液にしてマイナス20℃保存で数か月間安定であり以下の実験に用いた。

### II 肝臓 Ph Kinase の同定

Ph の活性を測定することによって、肝臓 Ph Kinase が Ph b をリン酸化すると並行して Ph が活性化されることを確認した。また、ブタ肝臓より分離精製した不活性型の肝臓 Ph を基質として用いた場合にも、肝臓 Ph Kinase による肝臓 Ph のリン酸化と活性化が並行することを認めた。この場合 SDS ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動によって、肝臓 Ph Kinase が骨格筋 Ph Kinase と同じように Ph b のサブユニットをリン酸化していることを確認した。またリン酸化された Ph b をトリブシン消化した後、フィンガー・プリント法を用いてリン酸化部位が肝臓と骨格筋 Ph Kinase で同一であることを確認した。

### III 肝臓 Ph Kinase の性質

Kinase I の分子量は Sepharose CL-6B のゲル濾過により約130万、一方 Kinase II は Sephadex G 200 のゲル濾過により約11万と推定された。Kinase I は骨格筋 Ph Kinase とほぼ同じ分子量を示し、Sephacrose CL-6B のゲル濾過では両者の溶出容量は一致した。沈降係数はグリセロール密度勾配遠心法を用いて、Kinase I では 22 S, Kinase II では 4.9 S であった。

肝臓 Ph Kinase (Kinase I および II) の至適 pH は 7 で、骨格筋とは異なり pH 6 から pH 11 にわたる幅広い範囲で比較的高い活性を示した。肝臓 Ph Kinase の ATP に対する  $K_m$  は  $3 \times 10^{-5}$  M, また Ph b に対する  $K_m$  は  $0.3 \text{ mg/mI}$  であり、それぞれ骨格筋 Ph Kinase に比してほぼ 1 桁低い値を示した。肝臓 Ph Kinase の肝臓 Ph に対する  $K_m$  は  $0.08 \text{ mg/mI}$  であった。

肝臓 Ph Kinase 活性は塩化ナトリウムによって強い阻害を受けたが、塩化カリでは 1 M まで全く影響を受けなかった。また硫安の影響は低濃度で活性の促進、高濃度では阻害の 2 相性を示した。また肝臓 Ph Kinase は温度に対して強い感受性を示し、 $40^\circ\text{C}$ 、3 分間で約半分の活性を失った。

#### IV 肝臓 Ph Kinase の活性化様式の検索

肝臓 Ph Kinase は EGTA を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  をキレートした場合、約 60 から 70% の活性が抑制されたが、一方同じ条件下で骨格筋 Ph Kinase の活性はこれまでの報告通りほぼ完全に抑制された。尚 pH 6.8 において肝臓 Ph Kinase の  $\text{Ca}^{2+}$  に対する  $K_a$  は  $3 \times 10^{-7}$  M で既に報告のある骨格筋の活性化型 Ph Kinase とほぼ等しい値を示した。

骨格筋 Ph Kinase は既に報告のあるように A-kinase によってリン酸化されその結果著明に活性化されるが、同じ条件下で肝臓 Ph Kinase は A-kinase によって全くリン酸化も活性化もされなかった。この肝臓 Ph Kinase が既にリン酸化された活性型であるのか、検索を試みたが不明であった。

ところで、Kinase II はリソゾームのプロテアーゼの内、おそらくカテプシン B によって精製途上にもたらされる Kinase I の分解産物であると推定された。また  $\text{Ca}^{2+}$  依存性プロテアーゼ、あるいはトリプシンによっても Kinase I から Kinase II と区別され得ない分解産物が生成する。このような限定分解によって骨格筋 Ph Kinase は著明に活性化されることがよく知られているが、一方 Kinase I は、いずれのプロテアーゼによる限定分解の場合も高々 60% の活性上昇が認められたに過ぎなかった。

#### 考察並びに結語

肝臓 Ph Kinase はこれまで精製が困難であったために粗抽出液の段階で解析されるにとどまっていた。今回初めて比較的高度に部分精製され、肝臓 Ph Kinase は分子量において骨格筋とはほぼ同じではあるが、至適 pH, ATP および Ph b に対する  $K_m$ , また A-kinase,  $\text{Ca}^{2+}$  および限定分解による活性化様式などの性質において骨格筋 Ph Kinase と大きく異なることを明確にした。

骨格筋 Ph Kinase は、リン酸化反応、 $\text{Ca}^{2+}$  によるアロステリック効果、およびプロテアーゼによる限定分解、のいずれによっても活性化されることが知られている。一方上述のように肝臓 Ph Kinase は、A-kinase によってもリン酸化されず、 $\text{Ca}^{2+}$  に対する依存性も 100% ではなく、また限定分解による活性化も低かった。これらの相違点から、肝臓 Ph Kinase には骨格筋 Ph Kinase とは全く別の活性化様式が存在する可能性も示唆される。しかし、肝臓の粗抽出液において Sutherland 以来繰り返し報告されているように Ph Kinase 活性は Cyclic AMP によって程度は低いが促進された。

現在の時点では、精製途上ある種の細胞内因子が解離したために、すでに Kinase I がある程度限定分解を受けたものであるか、あるいは、すでにリン酸化されて活性型になっているために、肝臓

Ph Kinase の活性化様式に変化をきたしている可能性は否定できない。

骨格筋 Ph Kinase と同じように、肝臓 Ph Kinase においてもその構造と機能の密接な関連を明らかにすることが、ホルモン作用によるグリコーゲン代謝の調節機構を解明する上で極めて重要であると思われる。

## 論文審査の結果の要旨

グリコーゲンの代謝の研究は生化学の歴史そのものであり、古く Meyerhof の解糖の研究に発し、その後、Cori 夫妻による骨格筋のホスホリラーゼの発見へうけつがれた。ついで、ホルモンによる血糖の上昇、すなわちグリコーゲン・ホスホリラーゼの活性の調節機序の解析は Sutherland へ受けつがれて、1958 年、Cyclic AMP が肝臓において発見され、ついで 1968 年、Krebs によって Cyclic AMP 依存性プロテインキナーゼが再び骨格筋に見出された。こうして一応ホルモンの作用機構が解明されたとして現在、この機構が教科書に記載されている。したがって歴史的にみれば、グリコーゲンの分解のホルモン調節の機構は、最初骨格筋、ついで肝臓、そして再び骨格筋での知見が結びあわせられ、説明がつけられているのであって、アドレナリンやグルカゴンによる血糖上昇、すなわち肝臓のグリコーゲン分解機序が骨格筋の場合と同一であるか否かは誰も証明していない事柄である。

ところで 1973 年、神戸大学医学部附属病院、小児科に入院したある種の糖原病患者について、開腹し、肝臓の生検材料について一連の酵素化学的解析が実施されたが、その際、肝臓のホスホリラーゼ・キナーゼがほとんど完全に欠損しているにかかわらず、グルカゴンにより正常の血糖上昇を認めるという、従来の教科書の知見からでは理解し難い現象に遭遇した。この事実は今では全世界で 20 例をこえる報告となっているが、肝臓におけるグリコーゲン分解の調節が骨格筋の場合とは異なっていることを示唆している。

このような事情に注目した本申請者は、肝臓のグリコーゲン分解の鍵を握るホスホリラーゼ・キナーゼの研究を主テーマとして取りあげ、兔の骨格筋より本酵素を部分精製し、解析した。肝臓におけるこの酵素は骨格筋の場合と異なり、含量がきわめて少なく、また蛋白分解酵素の作用で破壊され易いため、非常に重要な酵素でありながら、今日まで解析されていない。本研究者は種々の吟味の末、Blue-Sephadex カラムによるアフィニティクロマトグラフィーにより、本酵素の部分精製に成功し、その性質を骨格筋の酵素と対比しつつ詳細な解析を実施した。その結果、肝臓の酵素は予想に反して、骨格筋の酵素のように活性型、不活性型が存在するという知見は得られず、またカルシウムによっても、Cyclic AMP によっても、試験管内ではほとんど調節をうけないことが判明した。すなわち、肝臓のグリコーゲン代謝、そのホルモンによる調節機構は現在の教科書の記述とは異なり、骨格筋の場合とは全く異なっているという、重要な問題を提起したこととなる。

きわめて最近にいたり、このような問題提起は多くの解析からうけ入れられる趨勢にあり、例えばカテコラミンの  $\alpha$ -作用、バゾプレシン、アンギオテンシン等のホルモンによる血糖上昇、肝臓のグ

リコーゲンの分解は Cyclic AMP とは全く関係がなく、別の機構によるものであることが、ほぼ承認されている。

現在の時点で、肝臓のグリコーゲン分解、とくにホスホリラーゼ活性がホルモンによってどのように調節されているかは全く謎につつまれているが、血糖の調節という古い課題は現在もっとも新しい課題として存続している。本研究者はこのような領域で肝臓の酵素をはじめて解析し、重要な問題を提出したものであり、学術上の価値は非常に大きいと認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。