

氏 名 (本籍)                    <sup>か</sup>加            <sup>とう</sup>藤            <sup>せい</sup>晴            <sup>いち</sup>一

学 位 の 種 類                    医            学            博            士

学 位 記 番 号                    医            第            1 8 0 5            号

学 位 授 与 年 月 日                昭 和 6 1 年 9 月 1 0 日

学 位 授 与 の 要 件                学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                        昭 和 5 4 年 3 月  
   東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目                    Kinetic Characterizations of the Microsomal  
   Glucose-6-Phosphate Transport System in  
   Rat Liver.  
   (ラット肝ミクロゾーム膜グルコース-6-磷酸  
   輸送系の質的解析)

(主 査)

論 文 審 査 委 員    教 授 多 田 啓 也            教 授 立 木            蔚

   教 授 林            典 夫

## 論文内容要旨

糖新生の最終段階を触媒し、かつKeyenzymeである肝Glucose-6-phosphatase (G 6 Pase)はミクロゾームに内在し、従ってG 6 Pase が酵素活性を発現するには基質Glucose-6-P(G 6 P)を細胞質からミクロゾーム内腔に運ぶG 6 P輸送系の存在が必要である、との仮説が1975年Arion等により提唱された。1984年、私はミクロゾームによるG 6 P取り込みを filtration 法を用いて検索し、ラット肝及びヒト肝ミクロゾーム膜におけるG 6 P輸送系の存在を証明した。また、G 6 Pase 欠損症である糖原病Ia型とほぼ同一の臨床像を呈する糖原病Ib型は、このG 6 P輸送系の先天的障害によることを直接的に証明した。今回このG 6 P取り込み法に改良を加え、kinetic study 及び阻害実験を行ない、ラット肝ミクロゾーム膜G 6 P輸送系の質的解析を試みいくつかの知見を得た。

### ＜方 法＞

肝ミクロゾーム分画は、Albino Wistar ラット (約250 g) を48時間絶食後エーテル麻酔下に肝を採取し、Kamath 等の方法で作成した。G 6 P取り込み法は、40mM cacodylate buffer (pH 6.5)、ミクロゾーム蛋白150-200  $\mu$ g を含む反応液にトレーサーとして [ $^{14}$ C] -G 6 P 0.5  $\mu$ Ci を含む0.2-0.5mM G 6 P、及び阻害実験では更に適当濃度の阻害物質を加え0.5mlの系とし、33 $^{\circ}$ C、30秒間インキュベートした。次に0 $^{\circ}$ Cの0.25M sucrose (50mM Tris-Cl buffer, pH7.5, 25mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>含む) で反応を停止し、Whatman GF/Fフィルター上にミクロゾームを回収後同液で2度洗滌し、フィルターを風乾後その放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。阻害物質は添加前にpH6.5前後に、また反応系は mannitol にて280mOsmに調製した。阻害実験は、1) Glucose, Galactose 及びFructose, 2) Pi, PPi 及びCarbamyl-P, 3) 六炭糖リン酸化合物 (8種), 4) 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) 及び 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (SITS), 5) Phlorizin等について行なった。

### ＜結 果＞

ラット肝ミクロゾームのG 6 P取り込みは、Michaelis-Menten 型の saturation kinetics を示した。Lineweaver-Burk プロットから算出されたG 6 P輸送系のMichaelis 定数 (Kt) は $1.12 \pm 0.09$  mM, 最大速度 (Jmax) は $25.0 \pm 0.07$  nmol $\cdot$ 30S $^{-1}$   $\cdot$  mg protein $^{-1}$  (n = 5) であった。

次に上記の阻害基質を用い、G 6 P輸送系におけるG 6 P取り込みの阻害実験を行なった。3種の六炭糖では共に100mM添加まで阻害を認めなかった。P<sub>i</sub>は100mMでみかけのK<sub>t</sub>のみが上昇した。六炭糖酸化合物はすべて拮抗阻害を示し、Dixon プロットより算出された阻害定数 (K<sub>i</sub>) は、Galactose-6-P < 2-Deoxy-D-G 6 P < Fructose-6-P < Fructose-1-P < Mannose-6-P < Fructose-1,6-diP < Glucose-1-Pの順に増大し、12mMから77mMの範囲であった。Glucose-6-Sulfate も拮抗阻害であったが、K<sub>i</sub>値は147mMと高値であった。P<sub>i</sub>及びCarbamyl-Pでも拮抗阻害を認め、K<sub>i</sub>値は各々31mM, 32mMで2-Deoxy-D-G 6 PとFructose-6-Pの間に位置した。DIDS及びSITSのK<sub>i</sub>値は各々7.5 μ M, 12.6 μ Mで強い拮抗阻害を示したが、Phlorizinは濃度 (1 - 4 mM) を上昇させるにつれ、みかけのK<sub>t</sub>は増大しJ<sub>max</sub>は逆に減少するいわゆる混合型阻害を示した。

### ＜考 案＞

Kinetic study により、ラット肝ミクロゾーム膜G 6 P輸送系のKinetic parameters (K<sub>t</sub>及びJ<sub>max</sub>) を決定した。

この輸送系におけるG 6 P取り込みは、8種の六炭糖リン酸化合物、P<sub>i</sub>及びCarbamyl-Pにより拮抗阻害を受けることが確認されたが、K<sub>i</sub>値は最低のGalactose-6-Pでも12mMとK<sub>t</sub>値の10倍以上であった。また、Glucose はじめ六炭糖は阻害効果を示さなかった。以上より、この輸送系はG 6 Pに対し高い立体特異性を有すると考えられた。次に、P<sub>i</sub>単独でも六炭糖リン酸と同程度の阻害効果を示すこと、及びGalactose-6-Pに比較しGlucose-6-sulfateのK<sub>i</sub>値は約12倍と高値であった事実より、輸送系の基質 (G 6 P) 認識には陰イオン特にリン酸イオンの存在が重要であると考えられた。糖部分に関しては、リン酸イオンに較べ重要性は低い六炭糖-6-リン酸のK<sub>i</sub>値に差異がみられ (Galactose-6-P < 2-Deoxy-D-G 6 P < Fructose-6-P < Mannose-6-P)、ピラノース環C-2のH基、OH基が意味を持つと推測された。赤血球膜陰イオン輸送系の実験的阻害剤であるDIDS及びSITSが示した強い阻害性が、G 6 P輸送系の基質結合部位に対する直接的作用であるか否かは明らかでないが、ベンゼンスルホン酸のK<sub>i</sub>値が12mMと高いことから、スルホン酸イオンの他にチオシアン基も関与している可能性が考えられた。更に、諸家によって試算されている糖代謝中間体等の細胞内濃度に比較し、今回用いた阻害基質のK<sub>i</sub>値が10<sup>1</sup> ~ 10<sup>9</sup> 倍と高い事実は、ラット肝ミクロゾーム膜G 6 P輸送系が in vivo における生理的濃度下で、種々の代謝中間体による制御を受けている可能性が低いことを示唆している、と考えられた。

## 審査結果の要旨

糖新生の最終段階を觸媒し、且 key enzyme である肝 glucose-6-phosphatase (G 6 P ase) はミクロゾームに内在し、したがって G 6 P ase が活性を発現するには基質 Glucose-6-P (G 6 P) を細胞質からミクロゾーム内腔に運ぶ G 6 P 輸送系の存在が必要であるとの假説が 1975 年 Arion 等により提唱された。1978 年成沢らにより糖原病 Ib 型の病因がミクロゾーム膜における G 6 P 輸送機構の障害に基づくことが明らかにされた。

本研究は、五十嵐らが開発した方法を用い、ラット肝ミクロゾーム膜における G 6 P 輸送系の質的解析を行なったものである。

ラット肝ミクロゾームにおける G 6 P の取り込みは、Michaelis-Menton 型の saturation kinetics を示した。Lineweaver-Burk プロットから算出された G 6 P 輸送系の Michaelis 定数 ( $K_t$ ) は  $1.12 \pm 0.09$  mM, 最大速度 ( $J_{max}$ ) は  $25.0 \pm 0.07$  nmoles/mg protein であった。G 6 P 輸送系における G 6 P 取り込みは、8 種の六炭糖リン酸化合物、 $P_1$  及び carbamyl-P により拮抗阻害を受けることが示されたが、 $K_1$  値は最低の galactose-6-P でも 12mM と  $K_t$  値の 10 倍以上であった。またグルコースをはじめ六炭糖は阻害効果を示さなかった。以上によりこの輸送系は G 6 P に対し立体特異性を有すると考えられた。次に  $P_1$  単独でも六炭糖リン酸と同程度の阻害効果を示すこと、また galactose-6-P に比較し glucose-6-sulfate の  $K_1$  値が約 12 倍と高値であった事実より、輸送系の基質 (G 6 P) 認識には陰イオン特にリン酸イオンの存在が重要であると考えられた。糖部分に関してはリン酸イオンに比べ重要性は低い、六炭糖-6-リン酸の  $K_1$  値に差異がみられ (galactose-6-P < 2-deoxy-D-G6P < fructose-6-P < mannose-6-P), ピラノース環 C-2 の H 基, OH 基が意味を持つと推測された。

諸家によって試算されている糖代謝中間体の細胞内濃度に比較し今回用いた阻害基質の  $K_1$  値が  $10 \sim 10^3$  倍と高いことから、ラット肝ミクロゾーム膜の G 6 P 輸送系が in vivo における生理的濃度下で種々の代謝中間体による制御を受けている可能性は低いものと推測された。

本研究は、肝ミクロゾーム膜におけるグルコース-6 リン酸輸送系に関して種々の新知見を見出したものであり、医学博士の授与に値するものと評価された。