

脳 hexokinase に関する研究

第 1 編

家兎大脳皮質の hexokinase について

(本文の要旨は第30回日本生化学会総会において発表した)

岡山大学医学部第1(陣内)外科教室(指導:陣内教授)

医学士 山 田 孝 彦

[昭和33年11月17日受稿]

第1章 緒言ならびに文献

単糖類は hexokinase により Mg ion の存在下で ATP からその terminal phosphate をうけとり、磷酸 ester 化されてはじめて代謝の流れに入る。Meyerhof¹⁾ は筋肉抽出液による乳酸の生成の研究中、glucose を醗酵する能力の弱くなった老化抽出液に、酵母の自己消化液よりえた蛋白部分を activator として加えると、glucose ははるかに大なる速度で醗酵し、その一部は磷酸 ester 化されることを見出し、この activator を hexokinase と名づけた。その後1935年、Euler²⁾ は酵母抽出液による糖の醗酵の dehydrogenase 系の研究で、ATP から hexose に磷酸を移す酵素の存在を指摘し、これが Mg ion で活性化されることをみ、その際 Robinson の ester (glucose-6-phosphate) が生成されることを示した。同年 Meyerhof³⁾ も、以前彼がえた activator がこの heterophosphatase と同じ酵素作用をもつことを認めている。

動物についての実験では、Meyerhof¹⁾ は新鮮な筋肉抽出液なら酵母の activator を加えなくても glucose が附磷されることをみている。また Kalcker⁴⁾ は腎などの組織 homogenate による呼吸にさいし、無機磷酸の存在で glucose が磷酸 ester 化されることをみ、その後、呼吸や醗酵に際して無機磷酸は一度 ATP の形でとりいれられることが明らかにされ^{5), 6)}、動物組織も酵母と同様な mechanism で glucose が附磷されることが明らかになった。

さて、脳に hexokinase の存在することは、すでに1947年 Colowick ら⁷⁾、および1950年 Sleim ら⁸⁾ が報告しているところである。その後 Long⁹⁾ は、種々の臓器の hexokinase について検索をおこない、hexokinase 活性におよぼす温度、Na ion, K ion, Mg ion, ATP および fluoride 濃度の影響などを

追求するほか、ネズミの種々の臓器について hexokinase 活性を比較し、脳は各臓器のうちでもつとも高い活性を示すことを報告している。すなわち脳の hexokinase 活性を100とすれば、結腸63、心臓53、胃53、睪丸51、小腸43、盲腸39、子宮31、脾31、腎29、筋肉27、脾23、肺16、肝5の比であり、脳の糖代謝の特異性の一端がうかがえるのである。

また最近、脳 hexokinase が他の臓器の hexokinase にくらべ色々異つた性質を有することが明らかにされている。すなわち Sols ら¹⁰⁾ は、一般臓器の hexokinase は基質に対する specificity が高く、基質に対する酵素が分離しており、たとえば肝や筋肉では glucose および fructose に対してそれぞれ glucokinase および fructokinase が特異的に作用するのであるが、脳ではこれらと異なり specificity が低く、glucose, fructose および mannose のいずれも基質となりうるし、また酵素を分離していてもそれぞれの部分に分離することができないことを報告している。また附磷の位置をみると肝や筋肉では glucose は C-6、fructose は C-1 であるが、脳では酵母 hexokinase のごとく glucose, fructose, mannose のいずれも C-6 である¹¹⁾。

一方 Crane および Sols¹¹⁾ は、低濃度の磷酸緩衝液をもちいて作ったウシ脳 homogenate の hexokinase のうち、約90%は15,000 gの遠沈で沈澱し、残りの約10%は上清中に見出され、ここに2種類の異つた性質を有する hexokinase が存在することを報告しており、Weil-Malherbe および Bone¹²⁾ は、ヒトの赤血球から脳、筋肉および酵母の hexokinase 活性を増加せしめる活性因子を分離している。

これらの事実から脳 hexokinase の研究は、脳の生化学にとつてきわめて重要なものの1つと考えられている¹³⁾。

さて、私どもの教室においては脳、とくに脳細胞の代謝について一連の研究がなされているが、私はこれらの研究の一環として脳 hexokinase におよぼす fluoride, Ca ion 濃度の影響および脳に遊離して存在するアミノ酸として知られている glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ -aminobutyric acid の影響および TCA cycle の member の一つである α -ketoglutaric acid の影響を検索し、若干の知見をうることができたので報告する。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

実験動物として体重約3kgの健康な成熟家兎をもちい、実験前24時間は絶食せしめた。

第2節 実験系に附加する物質

- 1) 塩化カルシウム 和光純薬製品特級
- 2) 弗化ナトリウム 片山薬品製品を数回再結晶をおこなったものももちいた。
- 3) L-Glutamic acid 和光純薬製品
- 4) L-Glutamine Nutritional Biochemical Corp. 製品
- 5) L-Aspartic acid 和光純薬製品特級
- 6) L-Asparagine 和光純薬製品特級
- 7) γ -Aminobutyric acid 第1化学製品を数回再結晶してもちいた (m.p. 202°C)
- 8) α -Ketoglutaric acid Nutritional Biochemical Corp. 製品

第3節 脳 homogenate の作成法

家兎を出刃庖丁にて正中断頭し、ただちに大脳半球をとり出し、氷冷後すみやかに附着せる軟膜をはがし、皮質を白質からできるだけきれいに掻きとり、その1.5gを10倍容の1% KCl 中で3分間 homogenize した。さらにガーゼ片で濾過した後使用した。

一部の実験で家兎の心筋を使用したが生筋についてもこれに準じておこなった。

第4節 hexokinase 活性の測定法

1) 測定法の原理

Long⁹⁾ の方法に準じておこなった。これは hexokinase による glucose の減少を直接定量する方法で、この際生成した糖の磷酸 ester を Ba(OH)₂-ZnSO₄ 混液により蛋白と一緒に沈澱させ、その上清の糖を定量するものである。

2) 実験系

0.01M glucose 0.5ml
0.02M NaATP 0.4ml
0.2 M MgCl₂ 0.1ml

1 M NaF 0.1ml

0.2 M Tris.-HCl 緩衝液 (pH 7.0) 0.5ml

3) 実施法

原則として Tumberg 管をもちい上記実験系試薬をとり、これに脳 homogenate 1.0ml を加え、好氣的に38°Cに20分間 incubate した。incubate 終了後、0.3N Ba(OH)₂ および 5% ZnSO₄ 各3cc を加えてはげしく振盪し反応を中止するとともに除蛋白し、遠沈濾過した。濾液 2cc について Nelson¹⁴⁾ の方法で glucose を比色定量し、これより利用された量を計算し、hexokinase 活性とした。

第3章 実験成績

上記の方法により家兎大脳皮質の hexokinase 活性におよぼす fluoride, Ca ion, glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ -aminobutyric acid および α -ketoglutaric acid の影響をしらべつぎのごとき成績をえた。

1) 標準実験系の hexokinase 活性

第1表に示すごとく initial glucose は平均 79.5 μ M/1.5g tissue, final glucose は平均 40.7 μ M である。すなわち最初に存在した glucose の約49%が消費されたことになる。

第1表 標準実験系の脳 hexokinase 活性

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	72.0	34.5	37.5	52.0%
2	82.0	40.5	41.5	50.6%
3	91.0	50.5	40.5	44.5%
4	78.5	42.5	36.0	45.8%
5	79.5	40.5	39.0	49.0%
6	77.0	37.0	40.0	51.9%
7	77.0	36.0	41.0	53.2%
8	79.5	44.0	35.5	44.6%
平均	79.5	40.7	38.7	48.9%

(単位 μ M/1.5g 脳皮質)

10% 脳 homogenate 1.0ml ; 0.01M glucose 0.5ml ; 0.2M Tris. 0.5ml ; 0.2M MgCl₂ 0.1ml ; 0.02M ATP 0.4ml ; 1M NaF 0.1ml ; H₂O 0.4ml ; pH 7.0, 38°C, incubation 20分

2) fluoride の影響

NaF 0.13, 0.25, 0.50, 0.75 および 1M について脳 hexokinase におよぼす影響をしらべたが、第2表のごとく (5例平均), 0.50Mで最大阻害を示すことがわかった。0.50Mをこえると再び阻害の度が減少

する。

第2表 Fluoride 濃度の影響

NaF濃度 (M)	initial glucose	final glucose	glucose used
0.00	45.9	7.9	38.0
0.13	45.9	8.2	37.7
0.25	45.9	11.8	34.1
0.50	45.9	17.8	28.1
0.75	45.9	15.6	30.3
1.00	45.9	14.0	31.9

(単位 μ M/1.5g 脳皮質)

10% 脳 homogenate 0.8ml ; 0.01M glucose 0.2ml ; 0.38M NaHCO_3 0.2ml ; 0.06M ATP 0.2ml ; 0.08M MgCl_2 0.2ml ; 0.1M glutamic acid 0.2ml ; NaF 0.2ml ; pH 7.0, 38°C, incubation 20分

3) Ca ion の影響

0.03, 0.05, 0.10 および 0.20M の CaCl_2 の脳 hexokinase におよぼす影響をしらべた。第3表のごとく(5例平均), Ca ion濃度を増すにしたがい hexokinase 活性は抑制される。

第3表 Ca^{++} 濃度の影響

CaCl_2 濃度 (M)	initial glucose	final glucose	glucose used
0.00	81.9	40.9	41.0
0.03	81.9	47.3	34.6
0.05	81.9	48.5	33.4
0.10	81.9	53.4	28.5
0.20	81.9	54.6	27.3

CaCl_2 0.4ml 加, 他は第1表に同じ

第4表 Glutamic acid の hexokinase 活性におよぼす影響

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	77.0	19.0	58.0	75.3%
2	79.5	21.5	58.0	71.6%
3	82.0	25.0	57.0	69.5%
4	84.0	28.5	55.5	66.0%
5	85.0	26.5	58.5	68.8%
6	76.5	22.5	54.0	70.5%
7	78.0	27.0	51.0	65.3%
8	81.5	20.0	61.5	75.4%
平均	80.4	23.7	56.6	70.3%

0.2M glutamic acid 0.1ml 加, 他は第1表に同じ

4) glutamic acid の影響

0.2M glutamic acid を附加して hexokinase 活性におよぼす影響をしらべたが, 第4表のごとく消費率は平均70%であり, 標準系の49%に比べいじりしい促進を示している。

5) glutamine の影響

0.2Mの glutamine の影響をしらべたが, 第5表に示すごとくであり, 標準系の glucose 消費に比してやや促進を示している。

第5表 Glutamine の hexokinase 活性におよぼす影響

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	79.5	44.5	35.0	44.0%
2	77.7	36.4	41.3	53.1%
3	75.0	33.5	41.5	55.3%
4	78.0	39.0	39.0	50.0%
5	80.5	45.0	39.5	49.0%
6	79.0	33.0	46.0	58.2%
7	81.5	40.5	41.0	50.3%
8	82.0	38.0	44.0	53.6%
平均	79.1	38.8	40.9	51.6%

0.2M glutamine 0.1ml 加, 他は第1表に同じ

6) aspartic acid の影響

0.2M aspartic acid を附加し hexokinase 活性を測つたがほとんど影響をみなかつた(第6表)。

第6表 Aspartic acid の hexokinase 活性におよぼす影響

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	77.0	41.5	35.5	46.1%
2	77.7	37.8	39.9	51.3%
3	80.5	40.5	40.0	49.7%
4	79.0	50.0	29.0	36.7%
5	82.0	45.5	36.5	44.5%
6	78.5	39.5	39.0	49.5%
7	81.0	47.0	34.0	41.9%
8	82.0	42.5	39.5	48.1%
平均	79.7	43.0	36.6	45.9%

0.2M aspartic acid 0.1ml 加, 他は第1表に同じ

7) asparagine の影響

0.2M asparagine についてしらべたが, glutamic acid 同様著明な hexokinase 活性を示し, glucose 消費率は平均73.5%であつた(第7表)。

第7表 Asparagine の hexokinase 活性
におよぼす影響

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	79.5	19.5	60.0	75.4%
2	77.7	13.8	63.9	82.2%
3	81.0	20.0	61.0	75.3%
4	83.0	25.5	57.5	69.2%
5	80.5	26.0	54.5	67.7%
6	78.5	18.0	60.5	77.0%
7	81.0	21.5	59.5	73.4%
8	77.5	24.0	53.0	68.3%
平均	79.8	21.0	58.7	73.5%

0.2M asparagine 0.1ml を附加した他は第1表に同じ

8) γ -aminobutyric acid の影響

0.001, 0.005, 0.025, 0.1, 0.2 Mの γ -aminobutyric acid について脳および心筋の hexokinase におよぼす影響を検索した. 脳の場合は 0.025Mで約

第8表A 脳 hexokinase に対する
 γ -Aminobutyric acid 濃度の影響

γ -A.B.A.濃度 (M)	initial glucose	final glucose	glucose used
.000	78.4	40.7	37.7
.001	78.4	35.9	42.5
.005	78.4	35.0	43.4
.025	78.4	33.5	44.9
.100	78.4	33.8	44.6
.200	78.4	33.5	44.9

第1表の実験系に γ -aminobutyric acid 0.1ml を附加

第8表B 0.2M γ -Aminobutyric acid の影響

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	77.7	35.7	42.0	54.0%
2	77.0	35.5	41.0	53.8%
3	80.0	41.0	39.0	48.2%
4	79.5	28.5	51.0	64.1%
5	81.5	34.2	47.3	58.0%
6	72.5	29.5	43.0	59.7%
7	78.0	33.0	45.0	57.6%
8	81.0	29.5	51.5	63.5%
平均	78.4	33.3	44.9	57.2%

第8表Aに同じ

7%の促進を示すが, それ以上濃度を増してもほとんど進まない(第8表A)。しかし心筋についての実験では γ -aminobutyric acid の濃度を増すにしたがって, hexokinase 活性も次第に促進され, 0.1M に至れば約2倍になる(第9表)。第8表Bは0.2M γ -aminobutyric acid についての実験例を個々に記したものである。

9) α -ketoglutaric acid の影響

0.2M α -ketoglutaric acid は脳の hexokinase 活性をいちじるしく阻害する(第10表)。

第9表 心筋 hexokinase に対する
 γ -Aminobutyric acid 濃度の影響

γ -A.B.A.濃度 (M)	initial glucose	final glucose	glucose used
.000	76.2	63.7	12.5
.001	76.2	57.4	18.8
.005	76.2	55.2	21.0
.025	76.2	53.1	23.1
.100	76.2	52.2	24.0
.200	76.2	52.0	24.2

脳 homogenate の代りに 25%心筋 homogenate 1.0ml, 他は第8表Aに同じ

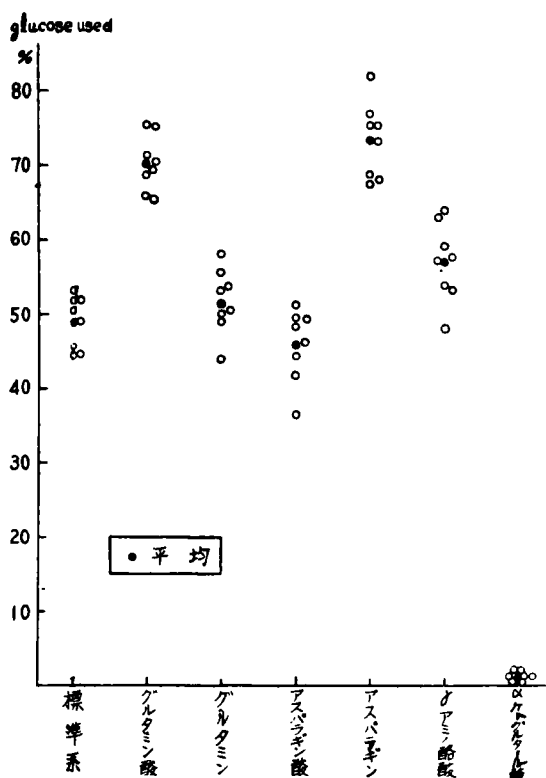
第10表 α -Ketoglutaric acid の hexokinase
活性におよぼす影響

例数	initial glucose	final glucose	glucose used	
1	79.5	69.3	10.2	1.2%
2	77.7	67.9	9.8	1.2%
3	82.0	73.5	8.5	1.0%
4	79.0	72.0	7.0	0.8%
5	81.5	69.5	12.0	1.4%
6	76.5	66.5	10.0	1.3%
7	79.5	71.5	8.0	1.0%
8	83.0	72.5	10.5	1.2%
平均	79.8	70.3	9.2	1.1%

0.2M α -ketoglutaric acid 0.1ml 附加, 他は第1表に同じ

10) 以上の各附加物質の脳 hexokinase におよぼす影響を図示すれば第1図のごとくである. すなわち asparagine および glutamic acid はきわめて促進的にはたらき, γ -aminobutyric acid はこれにつづく. glutamine もやや促進的に作用するが aspartic acid はほとんど影響をあたえない. α -ketoglutaric acid はきわめて阻害的に作用する。

第1図 家兔大脳皮質 hexokinase におよぼすアミノ酸の影響



第4章 総括ならびに考按

脳 hexokinase 活性におよぼす fluoride, Ca ion, glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ-aminobutyric acid および α-ketoglutaric acid の影響をしらべ、fluoride は hexokinase 活性を阻害すること、Ca ion も同じく活性を阻害すること、glutamic acid および asparagine はいちじるしく活性を促進せしめること、glutamine と aspartic acid はほとんど影響を与えないこと、γ-aminobutyric acid は軽度に活性を促進すること、α-ketoglutaric acid はきわめて阻害的に作用することを明らかにした。

まず fluoride の影響であるが、fluoride が phosphate splitting enzymes を阻害することは衆知のところであり、hexokinase 活性の測定にさいしては G-6-P の加水分解を防ぎ、一方 ATP-ase の活性を阻害するわけであり、NaF を 0.13, 0.25, 0.50, 0.75, 1 M と順次濃度を高めていくと 0.50M で hexokinase 活性が最小になる。しかしさらに濃度を増すと阻害の度が次第に回復してくる。Long⁹⁾ は KF の腎、膵および小腸粘膜の hexokinase におよぼす影響をしらべて、腎 hexokinase は 0.05M の KF で最

大に促進し、さらに濃度を増すと再び活性が低下してくること、膵 hexokinase はこれと逆に 0.05M までは次第に活性が低下するが、0.075M にすると再び活性を増して加えない場合よりも活性が強くなること、小腸粘膜では 0.015M~0.03M で最大の活性を示し、以後徐々に減少することを明らかにしている。すなわち組織の種類により hexokinase 活性におよぼす fluoride の影響は異なるのであるが、脳 hexokinase に対しては膵 hexokinase のごとく作用するようである。

Ca ion が磷酸代謝を抑制することは以前から知られているところであり、Ashford¹⁵⁾ は 1928 年脳の糖代謝の研究にこれをもちいている。私も塩化カルシウムをもちいて脳 hexokinase におよぼす作用をしらべてみたが、この阻害作用も Ashford の実験と同一機序によるものとおもわれる。なお、これは in vitro において磷酸が Ca ion と不溶性の磷酸カルシウムを作ることからも容易に理解される。一方杉田¹⁶⁾ も同じ目的で脳および肝の組織呼吸におよぼす影響をしらべ、少量の 1.2% 塩化カルシウムで脳では 22%、肝では 71.7% 阻害されることを観察している。

glutamic acid は hexokinase 活性を促進するが、これは glutamic acid が transamination により α-ketoglutaric acid となり、さらに TCA cycle 内で oxydative phosphorylation により ATP を生成し、この ATP が実験系の hexokinase 活性を高めるためではないかと考えられる。しかし実験系中に NaF が高濃度に存在しているのに TCA cycle が活潑に回転しているとは考えられず、α-ketoglutaric acid が酸化されるとしてもかえって阻害的に作用するのでこの考えはあてはまらなくなる。

また asparagine も著明に hexokinase 活性を高めるが glutamic acid 同様その作用機序は不明である。

つぎに γ-aminobutyric acid は実験成績に示したごとく脳および心筋の hexokinase 活性を促進するが、その促進の率が脳ではわずかであり心筋ではいちじるしい。γ-aminobutyric acid は脳に多量に常在し他の組織ではごく微量かあるいは全く存在しないと考えられている¹⁷⁾。したがって γ-aminobutyric acid が脳 hexokinase に対して促進の率が少ないのは、脳に存在している γ-aminobutyric acid がすでに促進的に働いていて常に高い活性を保っており、さらに γ-aminobutyric acid を附加しても少量ですぐ最大活性に達するのではないかと考えられる。この間

題について教室の森¹⁸⁾は, γ -aminobutyric acid と化学構造類似物質をもちいて hexokinase 活性におよぼす影響をしらべ, $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ の radical を有する物質が hexokinase 活性を高めることを明らかにしている。

一方教室の山本¹⁹⁾は, 脳に遊離に存在する種々のアミノ酸の解糖作用におよぼす影響をしらべ, glutamic acid などが脳の解糖を促進する作用のあることを見出し, 脳 hexokinase に関する私の研究とよく似た成績を得ている。しかしこれらの作用機序についてはさらに今後の研究にまたねばならない。

第5章 結 論

家兎大脳皮質の hexokinase 活性を Long⁹⁾ の方法によつて測定し, これにおよぼす fluoride, Ca ion, glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ -aminobutyric acid および α -keto-

glutaric acid の影響をしらべ, つぎの成績をえた。

1) fluoride によつては, 0.5Mで最大の活性阻害を示し, さらに濃度を増すとかえつて阻害の度を減じてくる。

2) Ca ion によつては濃度を増すにつれ活性が阻害される。

3) asparagine, glutamic acid を附加すればいちじるしい活性の促進がみられる。

4) γ -aminobutyric acid は脳 hexokinase を軽度促進し, 心筋 hexokinase に対しては著明な促進がみられる。

5) α -ketoglutaric acid は活性をいちじるしく抑制する。

(文献後掲)

欄筆するに臨み懇切なる御指導と御校閲を賜つた陣内教授に感謝の意を表する。

Studies on Brain Hexokinase.

The First Dept. of Surgery, Okayama University, Medical School. (Director : Prof. Dr. Jinnai)

By Takahiko YAMADA

Part I. On hexokinase in the cerebral cortex of rabbits.

The hexokinase activity in the cerebral cortex of normal rabbits was measured by Long's method and the influences of fluoride, Ca ion, glutamic acid, glutamine, aspartic acid, asparagine, γ -aminobutyric acid and α -ketoglutaric acid upon the hexokinase activity were also evaluated. The results were as follows:

- 1) The fluoride shows the maximum inhibition to the hexokinase activity at 0.5M of its concentration, and the inhibition rather decreases at higher concentration.
- 2) Ca ion shows an increasing inhibition as its concentration increases.
- 3) When asparagine or glutamic acid is added, the activity is markedly accelerated.
- 4) γ -Aminobutyric acid accelerates slightly the activity of the cerebral hexokinase and markedly that of the heart muscle hexokinase.
- 5) α -Ketoglutaric acid markedly inhibits the activity.