Studies on Hexokinase and Glucokinase in Rat Liver

II. Effects of Thyroid and Pituitary Hormones on the Enzyme Activity

Noriyasu MORI

(The Second Department of Medicine, Gifu University School of Medicine)

It was reported by the present author in the preceding paper that the increase in liver glucokinase (GK) activity in steroid-diabetic rats is presumed to arise through an over-secretion of insulin and also that cortisol does not inhibit the GK-inducing effect of insulin. The present work was undertaken to investigate possible effects of hypophysectomy, thyroidectomy, and thyroxine, ACTH and growth hormone administration on the GK and hexokinase (HK) activity of rat liver, and also to know whether or not administration of each of these hormones yields an antagonizing action on the GK-inducing effect of insulin.

1. Upon administration of thyroxine to normal rats, the liver HK activity was increased significantly, but the GK activity remained unchanged.

2. Following thyroidectomy, the GK activity showed a significant decrease, while the HK activity remained unaltered. When T_4 was administered to such ectomized animals, the GK activity showed a tendency to restoration.

3. Growth hormone administration to normal rats did not bring any significant change in the activity of these two enzymes.

4. In the liver of hypophysectomized rats, the GK activity was significantly lower than normal. After growth hormone or ACTH administration to these animals, no tendency to the recovery of this enzyme activity was observed.

5. The decreased level of the liver GK activity in alloxan-diabetic animals was raised almost to the normal by insulin treatment, but simultaneous administration of T_4 or of growth hormone together with insulin did not bring any enhancement in the increase. This result may indicate the fact that neither T_4 nor growth hormone blocks the GK-inducing effect of insulin.

(See pp. 982~989)

白鼠肝 Hexokinase, Glucokinase に関する研究

第二編 甲状腺ホルモンおよび下垂体ホルモンの影響について

岐阜大学医学部第二内科 (担当: 早瀬正二教授)

森 矩 尉

本論文の要旨は第40回日本内分泌学会総会 (昭和42年, 名古屋にて発表)

(昭和44年9月1日受付)

白鼠肝 Hexokinase, Glucokinase 活性の変動を下垂体摘出群, 甲状腺摘出群, 両群に growth hormone, thyroxin 単独および insulin 併用投与群につき検討し, insulin-dependent である GK 活性に両ホルモンが如何なる影響を及ぼすかについて調べた. thyroxin 投与でHK活性は有意に上昇し, growth hormone 投与では HK, GK 活性共に不変であった. 又 insulin による GK 活性上昇を growth hormone, thyroxin 共に阻害効果を示さなかった.

緒 言

甲状腺ホルモンの糖代謝におよぼす影響については, このホルモンがブドウ糖の腸管よりの糖吸収を促進し¹⁾, 糖尿病を悪化させ, 犬では脾の部分摘除に thyroxin を投与すると糖尿病を起こすことが知られている²⁾. 又 Smith 等³⁾はラットに thyroxin 投与で筋肉中の Hexokinase (以下 HK と略す) 活性の上昇を述べている. 一方 growth hormone の酵素に対する作用はその成長, 促進作用に関連して磷酸と蛋白代謝に関係する諸酵素について主に研究され⁴⁾⁵⁾⁶⁾, 一方糖代謝におよぼす影響については, Houssay 動物として有名な脳下垂体を摘出すると insulin 感受性が高まり, 脾摘除により起した糖尿病が軽快するといわれており, 又最近 growth hormone 投与で insulin 過分泌の存在することが報告されている⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾. この様に糖代謝と脳下垂体ホルモンおよび甲状腺ホルモンが密接な関係を示していることが明らかとされて来ると共に, これらホルモンが insulin-antagonist の一つとしても注目されて来た¹²⁾¹³⁾. 著者は前編でステロイド糖尿ラットでは insulin 過分泌を介して肝GK活性の上昇がくるものと推論し, 又 cortisol は insulin によるGK活性の誘導効果を阻害しないことを報告した. 本研究ではこの HK, Glucokinase (以下GKと略す) におよぼす growth hormone, thyroxin (以下 T₄と略す) の影響を調べ, さらに insulin によるGK活性上昇効果にこれらのホルモン投与が拮抗作用を示すか否かについても検討した.

I. 実験動物ならびに測定方法:

1. 実験動物

体重200g前後の雄純系 Wistar rat を実験に供した. 飼料はオリエンタル固型飼料 (CE II 型) を用い, 実験前12時間絶食し水は自由に与えた.

2. 動物の処置

A. 脳下垂体摘出白鼠

シオノギ製薬研究所 (大阪) に依頼し外聴道法で下垂体摘出を行なった. 実験終了後解剖し肉眼的に下垂体の残存を認めないものを測定に用いた.

B. 甲状腺摘出白鼠

エーテル麻酔下で前頸部に切開を加え甲状腺摘出を行なった。実験終了後解剖し残存甲状腺重量が1.4~3.5mg以下のものを測定に用いた。

C. アロキサン糖尿病白鼠

alloxan monohydrate (Sigma chemical Co.) を145mg/kg 宛筋注し2週間後尿糖陽性のものを使用した。

D. Growth hormone 投与白鼠

0.5 U.S.P. Growth hormone (Raben type) units per mg (N.B.C) を用いた。(U.S.P.: United states pharmacopeia)

E. T_4 投与白鼠

L-Thyroxin Sodium 30 γ 宛1日1回正常白鼠に筋注した。

F. 甲状腺摘出後 T_4 投与白鼠

甲摘後3日目より T_4 30r 宛7日間毎7日筋注したものを実験に供した。

3. 酵素活性の測定

HK, GK は Glucose-6-phosphate dehydrogenase-dependent spectrophotometric method を用い、Vinuela 等の変法に従った。単位は室温 (21.0~24.0°C) で1分間に1 μ mole の glucose の phosphorylation を肝1.0g 湿重量, total liver 当り, 100g body weight 当りにつき算出し統計的処理を行ない有意差の検討を行なった。血糖は Hagedorn-Jensen 法で測定した。

II. 実験成績:

1. 正常および甲状腺摘出白鼠肝 HK, GK 活性におよぼす T_4 の影響について

Table 1 に示された様に甲状腺摘出群では、体重の減少、血糖値の低下がみられ、酵素活性では、HK

Table 1. Effect of thyroxine and thyroidectomized on the activities of hexokinase and glucokinase in the livers

Treatment	Body weight	Liver weight	Blood sugar	per g. of liver		per whole liver		per 100g. body weight	
				HK	GK	HK	GK	HK	GK
Normal (4)	190.0 ±7.1	8.1 ±0.9	114.6 ±10.8	0.14 ±0.02	1.20 ±0.52	1.12 ±0.14	9.48 ±3.52	0.60 ±0.08	4.96 ±1.80
Normal+Thyroxine (3)	173.3 ±26.2	6.9 ±0.8	121.4 ±8.7	0.28 ** ±0.02	1.01 ±0.24	2.00 ** ±0.32	7.16 ±2.32	1.16 ** ±0.02	4.06 ±0.83
Thyroidectomized (3)	153.3 ±41.1	7.0 ±0.9	82.7 ** ±7.4	0.14 ±0.04	0.66 * ±0.04	0.96 ±0.28	4.68 * ±0.79	0.66 ±0.14	3.16 ±0.50
Thyroidectomized + Thyroxine (3)	153.3 ±9.4	6.5 ±0.7	128.3 ±2.7	0.18 ±0.04	0.88 ±0.30	1.18 ±0.14	10.64 ** ±2.02	0.78 ±0.14	7.50 ** ±2.12

Each value indicate mean±SD

*: $P<0.05$

** : $P<0.01$

** : $P<0.01$ (for thyroidectomized rats)

(): indicates number of rats

は著変を示さなかったが、GK活性値の有意の低下 ($P<0.05$) を示した。この摘出群に術後3日目より T_4 30 γ 宛7日間筋注すると、HK, GK 共に活性増加の傾向を示した。一方正常群に T_4 30 γ 宛1週間筋注すると、体重、血糖値は不変であるが、HK 活性値の有意の上昇 ($P<0.01$) を示したが、GK 活性値は不変であつた。HKは T_4 に良く反応していることを示している。

2. アロキサン糖尿病白鼠肝 HK, GK 活性におよぼす T_4 と Insulin の影響について

内因性 insulin 欠乏と考えられるアロキサン糖尿病白鼠肝を用い、 T_4 と insulin のHKおよびGK 活性値におよぼす影響について調べた。アロキサンで著減したGK活性は insulin で復活がみられたが、ア

ロキサン筋注14日目より T_4 30 γ 宛3日間筋注すると、HK 活性は正常と比べて著変ないが(0.10 ± 0.04), GK 活性は著減のままであり (0.11 ± 0.04), アロキサン群と比較すると更に活性低下の傾向を示すのがみられた。このような動物に insulin 4U/日 と T_4 30 γ を併せ3日間筋注すると低下した GK 活性値の復活がみられ、しかもアロキサン筋注群に insulin 投与した場合と同程度の活性復活を示している。(Fig. 1)

Fig. 1. Effect of thyroxine and growth hormone on liver glucokinase induction by insulin in alloxan diabetic rats (hexokinase and glucokinase activity is expressed as moles of TPNH formed per minute gram liver)

3. 正常および下垂体摘出白鼠におよぼす Growth Hormone, ACTH の影響について

下記処置群について体重、肝重量、血糖値および酵素活性を調べた。

1. 下垂体摘出後10日目
2. 下垂体摘出後7日目より growth hormone 3.0mg 宛毎日10日間筋注
3. 正常白鼠に growth hormone 3.0mg 宛10日間筋注
4. 下垂体摘出後7日目より ACTH 2.0U 宛10日間筋注
5. 下垂体摘出後7日目より growth hormone 3.0mg と ACTH 2.0U 宛10日間併せ筋注

正常および下垂体摘出動物の10日間の体重の増加率を百分率で表はすと、正常群では $+41.7 \pm 18.1\%$ であり、下垂体摘出群では全く体重の増加がみられない。又正常動物に growth hormone を投与しても体重増加はわずかに認められたにすぎないが (5.0 ± 1.3)、下垂体摘出群に growth hormone を投与すると正常群ほどでないが体重増加がみられた (18.2 ± 1.1)。酵素活性については、Table 2 に示される様に、下垂体摘出でHK活性は著変しないが、GK活性は有意に低下し ($P < 0.01$)、total liver, 100g body weight でも著減がみられ、growth hormone 投与でわずかに活性値の回復がみられたが有意ではない。一方正常白鼠に growth hormone を投与すると、HK活性もGK活性も共にやや低下の傾向を示したが有意の変化ではない。次に下垂体摘出白鼠に摘出術後7日目より ACTH 2U 宛10日間筋注すると体重、血糖および肝重量は有意に上昇したが、HKおよびGK活性は著変しなかつた。又摘出動物に growth hormone 3.0mg と ACTH 2U 宛10日間併せ筋注すると、体重、肝重量は更に有意の上昇を示し ($P < 0.01$)、又血糖値もやや増加の傾向を示したが、HKおよびGK活性は不変であつた。

4. アロキサン糖尿病白鼠におよぼす Growth hormone と Insulin の影響について

内因性 insulin 欠乏と考えられるアロキサン糖尿病白鼠を用い、growth hormone と insulin のHKおよびGK活性におよぼす影響について調べてみた。アロキサン筋注後尿糖陽性のものに14日目より growth

Table 2. Effect of growth hormone and ACTH on the activities of hexokinase and glucokinase in the liver of normal and hypophysectomized rats

Treatment	Body weight	Liver weight	Blood sugar	per g. of liver		per whole liver		per 100g. body weight	
				HK	GK	HK	GK	HK	GK
Normal (4)	197.5 ±22.8	8.8 ±1.1	130.3 ±6.3	0.16 ±0.04	0.84 ±0.22	1.34 ±0.24	7.04 ±2.22	0.70 ±0.18	3.50 ±0.84
Normal+Growth hormone (4)	227.5 ±10.9	7.6 ±0.7	138.2 ±7.0	0.12 ±0.02	0.74 ±0.04	0.96 ±0.14	5.68 ±0.64	0.42 ±0.16	2.50 ±0.40
Hypophysectomized (5)	150.0	4.7 ±0.2	102.3 ±4.4	0.18 ±0.06	0.22 ** ±0.12	0.80 * ±0.28	1.06 ** ±0.58	0.54 ±0.18	0.70 ** ±0.38
Hypox.+Growth hormone (4)	195.0 ±8.7	5.2 ±0.3	118.0 ±10.0	0.14 ±0.02	0.34 ±0.02	0.72 * ±0.12	1.74 ±0.14	0.38 ±0.08	0.90 ±0.08
Hypox.+ACTH	166.7 ±4.7	5.0 ±0.1	137.7 ±3.9	0.10 ±0.02	0.26 ±0.06	0.54 ±0.10	1.34 ±0.30	0.04 ±0.04	0.80 ±0.20
Hypox.+GH+ACTH	196.7 ** ±4.7	6.2 ** ±0.2	141.3 ±6.6	0.12 ±0.02	0.24 ±0.02	0.78 ±0.18	1.32 ±0.10	0.40 ±0.10	0.68 ±0.04

Each value indicate Mean±SD

() : indicates number of rats

* : P<0.05 **P<0.01

hormone 3.0, 6.0mg 宛3日間筋注すると、体重 (161.0 ± 8.5 , 170.0 ± 7.8) 肝重量 (8.2 ± 1.0 , 8.0 ± 0.5) 共に著変ないが血糖側はやや増加を示した。酵素活性は正常群に比しHK活性は著変しないが、GK活性の著しい低下を示したが、アロキサン群と比較するとHK活性は不変であるが、GK活性は有意でないが活性低下を示している。(Fig. 1) しかし growth hormone の投与量の間には活性値の差はみられなかつた。次にアロキサン処置後14日目より growth hormone 3.0, 6.0mg と insulin 4.0U 3日間併せ筋注すると、アロキサン群に比し体重 (175.0 ± 8.7 , 164.0 ± 25.5), 肝重量 (9.2 ± 1.1 , 8.0 ± 0.9) は有意差を認めないが血糖値の低下がみられ (175.0 ± 8.7 , 164.0 ± 23.3), HK活性は有意の変動を示さなかつたがGK活性は有意 ($P < 0.01$) に活性復活を示している。しかし growth hormone の投与量によつて差はみられなかつた。アロキサンに insulin 投与した場合に比べて有意の差はみられなかつた。

考 察

Growth hormone, T_4 および ACTH の解糖系諸酵素活性におよぼす影響については古くから多くの報告があるが³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾, 肝 HK, GK 活性についての報告は極めて少ない¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。そこでこれらのホルモンのHKおよびGK活性におよぼす効果について考察を加え、併せてこれらホルモンとインスリンの関係を少しく述べてみよう。

1. 甲状腺ホルモンの影響

甲状腺ホルモン投与ではGK活性には著変をみないが、HK活性の上昇がみられ、甲状腺摘出ではGK活性の著明な低下がみられる (Table 1)。このホルモン欠乏状態でのみGK活性が変動することは、甲状腺ホルモンがこの酵素に直接影響するのではなく機能低下の結果他の因子を介している可能性が考えられる。すなわち甲状腺機能低下においては腸管の糖吸収は低下し、血糖値も低下を示しこの時 insulin の必要量も少ないものと考えられる。すでに述べて来た絶食時の本酵素活性の低下を考慮すれば、この場合の活性低値も腸管の吸収障害に起因する二次的な変化も重要な因子と考えられる。一方肝HK活性が T_4 投与で上昇することは興味深い。このように T_4 投与でHK活性の上昇することは、Smith 等³⁾ は白鼠筋で、Nishikawa 等¹⁸⁾¹⁹⁾ は腸粘膜で認めているがその作用機序については未だ分らない。近年インスリン測定が可能となり、thyroxin 投与または甲状腺機能亢進症での insulin 分泌亢進を認める報告がみられる。²⁰⁾²¹⁾ 著者のこれまでの成績からも insulin-dependent のGK活性は thyroxin 投与で活性上昇を認めてもよいようであるが、Table 1 に示されたように正常白鼠に thyroxin 投与で活性上昇は認められなかつた。これは何らかの

insulin 効果の阻害因子が働くためか、あるいはまた、Cohen²²⁾, Elgee²³⁾ 等のような insulin 破壊促進によるものであろうか。

2. 下垂体ホルモンの影響

正常白鼠に growth hormone 投与を行なっても肝 HK, GK 活性は著変を示さないが、下垂体摘出では GK 活性の著減がみられた。この摘出白鼠で GK 活性の低下がみられることは、growth hormone による蛋白同化作用の欠除と共に TSH 欠除による腸管の糖吸収低下の結果、insulin 必要量の減少によるものか、又 ACTH を介す副腎系の作用の欠除による二次的なものと考えられる。次に内因性 insulin 欠乏と考えられるアロキサン糖尿病白鼠に growth hormone を投与すると GK 活性の低下がみられることは、このホルモンの insulin 欠乏時には糖尿状態の増悪に作用する可能性を示している。最近 growth hormone 投与についても insulin 過分泌が認められるとの報告が多くみられるようになった⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。従つて growth hormone 投与でも GK 活性値の上昇の可能性が考えられるが、Table 2 に示された様に、正常群と比較し有意の変化を示さなかつた。また下垂体摘出動物で低下している GK 活性に対して、growth hormone, ACTH 両ホルモンの単独又は併用投与でもその活性回復のみられない成績より、このホルモン以外の因子、例えば TSH などがより重要な因子である可能性が考えられる。又下垂体摘出動物の術後の食餌摂取が充分でないことも大きな要因であろう。又下垂体摘出動物での HK 活性は一般に低下の傾向を示している点も注目される。

3. Insulin による GK 誘導効果と Growth hormone, T₄ の関係

前編で cortisol は insulin による GK 活性の誘導効果を阻害しないことを報告したが、Fig. 1 にみられるように、T₄ 投与も growth hormone 投与ともに insulin による本酵素活性上昇効果を阻害しなかつた。growth hormone, T₄ は insulin 拮抗ホルモンのうちに数えられるが、いずれも insulin による GK 誘導効果には阻害に働かないものと思われる。

結 語

糖利用の第一段階を受け持つ Hexokinase, Glucokinase 活性におよぼす脳下垂体摘出、甲状腺摘出の影響、thyroxin, ACTH および growth hormone の影響とこれらホルモンと insulin の関係について調べた。

- 1) 正常白鼠に thyroxin 投与で HK 活性は有意に上昇したが、GK 活性は不変であつた。
- 2) 甲状腺摘出を行なうと GK 活性は有意に低下を示したが、HK 活性は不変であつた。摘出動物に T₄ を投与すると、HK, GK 活性の復活の傾向がみられた。
- 3) 正常白鼠に growth hormone 投与では、HK, GK 活性は共に有意の変化をみなかつた。
- 4) 脳下垂体摘出白鼠肝 GK 活性は有意に低下し、この動物に growth hormone, ACTH を投与しても GK 活性の復活はみられなかつた。
- 5) アロキサン糖尿病動物に insulin 投与を加えると GK 活性の上昇をみるが、この条件で T₄ 又は growth hormone を insulin 投与に加えても、本酵素活性上昇の程度は変らなかつた。T₄ も growth hormone も共に insulin による GK 誘導効果を阻害しないと考えられる結果をえた。

終りに臨み、御校閲を賜つた早瀬正二教授、御助言を賜つた木島滋二前教授、長崎大学法医学教室須山弘文教授に深謝するとともに、終始御指導御鞭撻を賜つた京都大学老年医学教室竹内三郎助教授に深謝する。また法医学教室沢田英夫助教授の御教示、御助言に感謝する。

文 献

- 1) ALTHAUSEN, T.L. and M. STOCKHOLM : Amer. J. Physiol., 123 : 577, (1938).
- 2) HOUSSAY, B.A. : Rec. Progr. Hormone Res., 2 : 277, (1948).
- 3) SMITH, R.H. and H.G.

- WILLIAMS-ASHMANN : Biochem. Biophys. Acta., 7 : 295, (1951). 4) GESCHWIND, I.I.,
C.H. LI and H.M. EVANS : Arch. Biochem. Biophys., 31 : 168, (1951). 5) BARTLETT,
P.D. and M. GLYNN : J. Biol. Chem., 187 : 261, (1950). 6) KORNER, A. : Biochem. J.,
73 : 61, (1959). 7) ZOHND, G.R., J. STEINKE and A.E. RENOLD : Proc. Soci. Exp. Biol.
Med., 105 : 455, (1960). 8) IKKOS, D. and R. LUFT : Lancet, 2 : 897, (1967). 9)
CAMPBELL, J., K.S. RASTOGI and H.R. HAUSLER : Endocrinology, 79 : 749, (1966). 10)
CAMPBELL, J. and K.S. RASTOGI : Diabetes, 15 : 30, (1966). 11) RANDLE, P.L. and
F.G. YOUNG : J. Endocrin., 13 : 335, (1956). 12) RABINOWITZ, D., T.J. MERIMEE and
J.A. BURGESS : Diabetes, 15 : 905, (1966). 13) YOUNG, F.G. : Endocrinology, 73 : 654,
(1963). 14) HARARY, I. : Biochem. Biophys. Acta. 29 : 647, (1958). 15) GLOCK,
G.E., McLEAN and J.K. WHITHAEAD : Biochem. J., 63, 520, (1956). 16) SPIRO,
M.J., and E.G. BALL : J. Biochem. Chem., 231 : 31, (1958). 17) COLOWICK, S.P., G.T.
CORI and M.W. SLEIN : J. Biol. Chem., 168 : 583, (1947). 18) NISHIKAWARA, M.I. :
Endocrinology, 68 : 850, (1961). 19) NISHIKAWARA, M.I. and E. GABRIELSON :
Endocrinology, 68 : 855, (1961). 20) BULFOUR, W.M. : Amer. J. Med., 7 : 596, (1949).
21) 三宅 儀 : 糖尿病, 4 : 37, (1961). 22) COEN, A.H. : Amer. J. Physiol., 188 : 287,
(1957). 23) ELGEE, N.T. and R.H. WILLIAMS : Amer. J. Physiol., 180 : 13, (1955).