— 原 著 —

赤血球内 2,3-Bisphosphoglycerate 代謝の調節*

林 伸幸

日本医科大学第1生化学教室 (主任: 宿谷良一教授)

2,3-Bisphosphoglycerate metabolism in human erythrocytes

Influence of erythrocyte aging

Nobuyuki Hayashi

The First Department of Biochemistry, Nippon Medical School

Factors involved in the regulation of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism were studied with the erythrocytes separated according to the cell-age. The results obtained are as follows:

1) The concentration of 2,3-bisphosphoglycerate was found to be higher in younger than in older erythrocytes. This finding was more prominent in the circulating erythrocytes of anemic patients.

2) Changes in the 2,3-bisphosphoglycerate concentration depending on the erythrocyte-age was also found in the erythrocytes incubated *in vitro* with IPP medium (inosine, pyruvate and phosphate) at a low pyruvate concentration.

3) A cell free system consisting of fructose 1,6-bisphosphate as a substrate, NAD^+ , pyruvate, potassium fluoride and hemolysate was designed to measure the formations of 2,3-bisphosphoglycerate and of glycolytic intermediates.

4) In the cell free system, the hemolysates of younger erythrocytes were more active in forming 2,3-bisphosphoglycerate and less active in forming 3- and 2-phosphoglycerates than those of older erythrocytes. This suggests that phosphoglycerate kinase and bisphosphoglycerate synthase catalyzed-reactions are partly responsible for changes in the concentration of 2,3-bisphosphoglycerate depending on the erythrocyte-age.

Key words: 2,3-bisphosphoglycerate, erythrocyte aging, inosine-pyruvate-phosphate, glycolysis, crossover point

結 言

2,3-bisphosphoglycerate (以下 2,3-DPG と略す) は赤血球内解糖反応系側路で生成される特異的の中間体である。またその濃度はヘモグロビン (以下 Hb と略す) とほぼ等モル存在し, allosteric effector として Hb の酸素結合機能の調節にあずかっている。したがってその濃度の動揺は Hb の生理機能に大きな影響を与える。2,3-DPG 量の変動する生理的, ならびに病的条件がいろいろ知られている¹⁾。例えば hypoxic な状態²⁻⁴⁾, すなわち貧血性諸疾患^{5,6)}, 心および

肺疾患による呼吸機能不全⁷⁻¹⁰⁾, あるいは高地移住¹¹⁻¹³⁾などは上昇する例である。また一方, 健康人の血球では加齢とともに 2,3-DPG 濃度が低下する^{14,15)}。このような赤血球内 2,3-DPG 濃度の変動を支配する要因については著しく多くの研究報告があるにもかかわらず, いまだ十分理解されていない。主たる要因として赤血球内 pH の変動による phosphofructokinase (以下 PFK と略す) 活性の変化¹⁶⁾, および Hb と 2,3-DPG との結合による遊離 2,3-DPG 濃度の変化¹⁷⁾が考えられているが, これだけで 2,3-DPG 変動のすべてを説明することはできない。

Present address: The First Department of Biochemistry, Nippon Medical School, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

* 本論文は学位論文である。

著者は今回、貧血患者にみられる赤血球内 2,3-DPG 濃度の上昇が特に細胞年齢の若い赤血球に著明であること、また正常赤血球でも *in vitro* の条件下で若い赤血球ほど 2,3-DPG 生成能が高いことを見出した。この結果に基づいて赤血球内 2,3-DPG 濃度を支配する要因を明らかにすることを目的として、赤血球溶血液を用いて試験管的 2,3-DPG 生成系を設定し、赤血球加齢と 2,3-DPG 生成量との関係を解糖系各種中間体の動態とともに検討した。以下にこれらの結果について報告する。

研究材料および方法

(1) 血液試料

新鮮血は研究室の健康成人男子より、肘静脈穿刺により採取した。抗凝固剤にはヘパリンを用いた。患者血液は日本医科大学付属病院第3内科に入院中の貧血を呈する患者より同様の方法で採取した。疾患の内訳は原発性肝癌2例、転移性肝癌1例、肝硬変2例、肺癌2例、鉄欠乏性貧血1例、慢性骨髄性白血病1例の計9例であった。保存血液は同院血液室より、期限切れとなった日本薬局方保存血の提供を受け、期限切れ当日より5日以内に使用した。

(2) 試薬

glycerol 3-phosphate dehydrogenase (以下 GDH と略す, ウサギ筋肉), triosephosphate isomerase (以下 TIM と略す, ウサギ筋肉), aldolase (ウサギ筋肉), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (以下 GAPDH と略す, 酵母), 3-phosphoglycerate kinase (以下 PGK と略す, 酵母), lactate dehydrogenase (以下 LDH と略す, ブタ心筋), pyruvate kinase (以下 PK と略す, ウサギ筋肉), enolase (ウサギ筋肉), adenosine 5'-diphosphate (以下 ADP と略す), fructose 1,6-bisphosphate (以下 FDP と略す), phosphoenolpyruvate (以下 PEP と略す), glucose 6-phosphate (以下 G 6-P と略す) および 3-phosphoglycerate (以下 3-PG と略す) は Boehringer Mannheim 社, adenosine 5'-triphosphate (以下 ATP と略す) は Sigma 社, potassium pyruvate は和光純薬工業, nicotinamide adenine dinucleotide (以下 NAD^+ と略す) およびその reduced form (NADH) はオリエンタル酵母工業より購入した。その他の試薬はすべて市販の特級品を用いた。

(3) 実験方法

1) 赤血球浮遊液および溶血液の調製

血液試料を 3,000 rpm, 5 分遠沈して血漿を分離し、赤血球層を生理食塩水で 3 回洗浄して、この間に buffy coat を除き赤血球浮遊液とした。次いで洗浄赤血球に等量の溶血用緩衝液 (0.13 M KCl, 0.015 M MgCl_2 を含む 10 mM potassium phosphate 緩衝液, pH 7.4) を加え、ドライアイス-アセトン中で凍結、融解を 3 回繰り返して溶血し、105,000×g, 90 分遠沈した後、得られた上清を溶血液として使用した。

2) Murphy 法¹⁹⁾による赤血球の分別

血液を 3,000 rpm, 5 分遠沈し、得られた赤血球に再び血漿を加えて約 80% の赤血球浮遊液とした後、1.6×7.5 cm のプラスチック製遠沈管に入れ、アングルローター (日立 RPR 18 B) により、10,000 rpm, 60 分遠沈し、これをさらに水平ローター (国産 Model H-103 RS) で 3,000 rpm, 15 分遠沈して分離層を水平にした。遠沈後直ちに血漿成分をパスツールピペットで除去し、ついで血球層をペリスタポンプ (LKB VARIOPERPEX II) により上層より慎重に吸引し、五つの分画 (各 20%) に分別採取した。このうち上層より 1, 3, 5 番目の分画をそれぞれ低比重 (T), 中間比重 (M), 高比重 (B) 赤血球とし、これらを生理食塩水にて 3 回洗浄した後、実験に使用した。

3) Inosine-pyruvate-phosphate (IPP) 系による 2,3-DPG 生成反応の測定

Deuticke らの方法¹⁹⁾に従って調製した IPP 溶液 (inosine 10 mM, pyruvate 10 mM, orthophosphate 50 mM, NaCl 75 mM, pH 7.4), または IP 溶液 (inosine 10 mM, orthophosphate 50 mM, NaCl 85 mM, pH 7.4) を洗浄赤血球に hematocrit 値が約 15% となるように加え、37°C にて所要時間 incubate した後、2,3-DPG 値を測定した。

4) 溶血液解糖反応系活性の測定

前述の方法で調製した溶血液 2.0 ml に、100 mM HEPES 緩衝液, pH 7.0~7.8, 0.5 ml および所定の添加物 0.5 ml を加え全量を 3.0 ml とし、37°C で所要時間 incubate した。添加物としては、20 mM FDP 0.1 ml, 60 mM pyruvate 0.1 ml, 10 mM NAD^+ + 1.2 M nicotinamide 0.1 ml, 600 mM potassium fluoride (以下 KF と略す) 0.1 ml, 300 mM potassium phosphate 緩衝液, pH 7.0~7.8, 0.1 ml を用いた。

5) 解糖系酵素活性, 中間体濃度および ATP, ADP 濃度の測定

PGK, 2,3-DPG synthase, 2,3-DPG phosphatase の活性および ADP は Beutler の方法²⁰⁾, FDP, DHAP, GAP は Michal らの方法²¹⁾, 3-PG は Czok の方法²²⁾, pyruvate, PEP, 2-PG は Czok らの方法²³⁾, lactate は Gutmann らの方法²⁴⁾, 2,3-DPG および ATP は Sigma Technical Bulletin に記載された方法^{25,26)}によりそれぞれ測定した。各物質の濃度は、赤血球反応系では $\mu\text{mol/g}\cdot\text{Hb}$, 溶血液反応系では $\mu\text{mol/ml}$ reaction mixture で表した。

6) その他

反応液中の Hb 濃度は CN-met Hb 法により, 540nm でのミリモル吸光係数を 11.0, Hb 分子量を 64,500 として算出した。また赤血球内 Hb の酸素結合能 (P_{50} 値) の測定は HEM-O-SCAN, Oxygen Dissociation Analyser (AMINCO 社製) で, 分光学的測定は日立 Model 200 Spectrophotometer, さらに pH の測定は Beckman SS-1 pH-メーターによった。

結 果

1. 循環赤血血球の 2,3-DPG 濃度と赤血球加齢との関係

健常人 (3 例) および諸種の原因で貧血を呈する患者 (9 例) の末梢血赤血球を採取し, その加齢にしたがった分別は Murphy の赤血球比重差に基づく遠心分別法¹⁹⁾により行った。すなわち低比重 (T, 若い赤血球群), 中等度比重 (M), 高比重 (B, 加齢の進んだ赤血球群) の 3 群に分別した。Fig. 1-A~C は, 各群の血球内 2,3-DPG, ATP ならびに Hb の P_{50} 値を測定した結果である。図中斜線部分は健常人の全血について従来報告されている正常範囲である。Fig. 1 A から 2,3-DPG 濃度について次の 2 点に分かる。① 健常人の赤血球の 2,3-DPG 濃度は従来指摘されているように赤血球加齢によって異なり, 高比重血球ほど低い。② 患者赤血球では低比重および中等度比重赤血球の 2,3-DPG 濃度が著しく上昇しているが, 高比重赤血球では大部分正常範囲にある。一方 Fig. 1 B のように赤血球内 ATP 濃度は比重を異にした赤血球の間で, また患者と健常人の間でも特定の差異はない。しかし, 2,3-DPG で調節される Hb の P_{50} 値は Fig. 1 C に示すように患者赤血球の低, 中比重成分で高い値を示し, 2,3-DPG 濃度の変化とほぼ平行して変化することが分かる。

Fig. 2 は, Fig. 1 A に示した赤血球内 2,3-DPG 濃度と被検者の全血の Hb 濃度との関係を, 各比重赤

Fig. 1 Concentrations of 2,3-DPG(A) and ATP (B), and oxygen affinity of hemoglobin, P_{50} , (C) in the density-separated erythrocytes from normal persons and patients with anemia

Erythrocytes were separated into three fractions, low (T), middle (M) and high (B) density fractions as described in methods. Open circle, patients; closed circle, normal persons. Shaded area indicates the normal range of each item.

血球ごとに求めたものである。図の回帰係数から分かるように, 低および中等度比重赤血球では, 2,3-DPG 濃度が Hb 濃度の低下と逆相関して著明に上昇するのに反して, 高比重赤血球では 2,3-DPG 濃度の変化は少なく, Hb 濃度とほとんど相関しないことが分かる。

以上の結果から赤血球内 2,3-DPG 濃度を上昇させる機能は若い赤血球ほど著明である反面, 老化赤血球ではほとんど失われていること, そしてこの関係が貧血患者の赤血球では強調されることが分かる。

2. IPP 系による赤血球内 2,3-DPG 濃度の上昇と赤血球加齢との関係

赤血球内 2,3-DPG 濃度を上昇させる手段として, 赤血球浮遊液に IPP を添加する方法¹⁹⁾が知られている。この反応系では, inosine が血球膜を透過して ribose 1-phosphate を生じ, pentose phosphate 経路を経て F 6-P ないしは GAP となって解糖系に流入し, 2,3-DPG 生成の基質となると考えられる。

Fig. 2 Concentrations of 2,3-DPG in the density-separated erythrocytes as a function of hemoglobin concentration in the whole blood
T: top, M: middle, B: bottom erythrocyte fractions. Open circle, patients; closed circle, normal persons. Shaded area indicates the normal range of hemoglobin concentration in the whole blood.

Fig. 3 Changes in the 2,3-DPG concentration in the erythrocytes incubated with the inosine-pyruvate-phosphate medium
Erythrocytes from freshly drawn blood were incubated with IPP (solid line) or IP (dashed line) as described in methods.

Fig. 4 Effect of pyruvate on the 2,3-DPG formation in the erythrocytes incubated with inosine and phosphate
Erythrocytes from freshly drawn blood were used. Conditions were the same as those in Fig. 3, except varying concentration of pyruvate.

Osaki ら²⁷⁾は保存血について、この系による 2,3-DPG 濃度上昇の至適条件を検討している。著者は上述の 2,3-DPG 生成機能にみられる加齢差を IPP 系で検討する目的から、改めて新鮮血赤血球について以下の

実験を行った。

Fig. 3 は健康人新鮮血赤血球について IPP 系で観察された 2,3-DPG 増加の時間曲線である。図のように 2,3-DPG 量は時間とともにほぼ直線的に上

Table 1 Changes in the concentration of 2,3-DPG in the density-separated erythrocytes incubated with the inosine-pyruvate-phosphate medium

Pyruvate	2,3-DPG ($\mu\text{mol/g}\cdot\text{Hb}$)		
	T	M	B
1 mM	32.8	26.4	21.9
10 mM	33.4	32.4	31.1

Erythrocytes were separated into three fractions having low (T), middle (M) and high (B) density as described in methods. Each erythrocyte fraction was incubated for 90 min with the inosine-pyruvate-phosphate medium at 1 mM and 10 mM pyruvate.

昇する。この反応系における pyruvate の機能は、LDH 反応を介して GAPDH 反応に NAD^+ を供給することと考えられる。Fig. 4 はこの反応系における 2,3-DPG 生成の pyruvate 濃度依存性を測定した結果である。pyruvate 濃度増加に伴って 2,3-DPG 濃度は上昇し、pyruvate 約 5 mM 以上では NAD^+ 量の供給は飽和域に達していることが分かる。

pyruvate 濃度 10 mM および 1 mM、すなわち NAD^+ 供給が飽和域にある場合と不飽和域にある場合について、2,3-DPG 生成量と赤血球加齢の関係を健康人の赤血球について検討した。Table 1 に示した結果から分かるように、 NAD^+ 供給が十分である時、すなわち NAD^+ 量が 2,3-DPG の生成反応系の律速段階になっていない時には、各比重の赤血球の間では 2,3-DPG 量に差異が著しく小さくなるが、 NAD^+ 量が不十分の時には赤血球の加齢の差が明らかに現れて、低比重赤血球ほど 2,3-DPG 生成量が多いことが分かる。

IPP 系を用いた以上の実験結果は 赤血球加齢差に

基づいて 2,3-DPG 生成能に違いの起こる要因として、LDH 反応と GAPDH 以下の反応が関与している可能性を示唆している。この差を解析する目的から、次に溶血液による 2,3-DPG 生成反応系を設定して検討した。

3. 溶血液による 2,3-DPG 生成と赤血球加齢との関係

(1) 反応系の設定

Table 2 は保存血より調製した溶血液の $105,000 \times \text{g}$ 上清を用い、2,3-DPG の生成条件を検討した結果である。表から以下の諸点が分かる。① 溶血液の $105,000 \times \text{g}$ 上清は NAD^+ 存在下に G 6-P ないしは FDP から lactate を生成する活性を保持している (tube No. 2,5)。しかしこの条件下で 2,3-DPG 濃度は上昇しない。② 前記の lactate 生成反応は enolase の阻害剤である KF (20 mM) の添加により完全に阻害されるが (tube No. 3,6)、この場合も 2,3-DPG 濃度は上昇しない。③ KF (20 mM) と pyruvate (2 mM) が共存すると、lactate の生成と同時に 2,3-DPG 濃度も上昇する (tube No. 8)。また、この場合の lactate 生成は、KF 添加により解糖系が阻害されているから、添加した pyruvate が溶血液中の LDH の作用により直接 lactate に変換されたためと考えられる。これらの結果は、すべて新鮮血溶血液を用いても同様であった。以下の実験では溶血液に FDP, NAD^+ , KF および pyruvate を添加した 2,3-DPG 生成反応系 (tube No. 8) を用いた。

Fig. 5 はこの反応系における lactate 生成 (Fig. 5 A) および 2,3-DPG 増加 (Fig. 5 B) の時間曲

Table 2 Effect of additions on lactate and 2,3-DPG formations in hemolysates

Additions	Final concentration (mM)	Tube number							
		1	2	3	4	5	6	7	8
G 6-P	2.0	—	+	+	—	—	—	—	—
FDP	0.7	—	—	—	+	+	+	+	+
NAD^+	0.3	—	+	+	—	+	+	+	+
KF	20.0	—	—	+	—	—	+	—	+
Pyruvate	2.0	—	—	—	—	—	—	+	+
Δ Lactate*		0	0.91	0.06	0.17	1.04	0	1.32	1.30
2,3-DPG*		0.02	0.18	0.16	0.11	0.04	0.06	0.27	1.06

Each of additions in 0.5 ml was added to a mixture of 2.0 ml of hemolysates and 0.5 ml of 100 mM HEPES, pH 7.4. The mixture was incubated at 37°C under the aerobic conditions.

* $\mu\text{mol/ml}$ of reaction mixture at 120 min

Fig. 5 Time course of lactate (A) and 2,3-DPG (B) formation in hemolysates

The reaction mixture in a total volume of 3.0 ml consisted of 2.0 ml of hemolysates, 0.5 ml of 100 mM HEPES, pH 7.4, and 0.1 ml each of 20 mM FDP, 10 mM NAD^+ containing 1.2 M nicotinamide, 600 mM KF, 60 mM potassium pyruvate and water. The mixture was incubated at 37°C under the aerobic conditions.

線である。図のように両者の値は反応後約1時間まで上昇し、以後一定値、 $\Delta\text{lactate}=1.2\ \mu\text{mol/ml}$ 、 $\Delta 2,3\text{-DPG}=0.96\ \mu\text{mol/ml}$ に達する。

Table 3 は反応の開始時および 120 分後における解糖系中間代謝物質の定量結果である。120 分の反応の間に、FDP、DHAP および GAP が減少し、反面 3-PG、2-PG および 2,3-DPG に著明な増量がみられる。FDP、DHAP および GAP の減少量の和は (FDP は 2 当量として計算)、3-PG、2-PG および 2,3-DPG の増加量の和に等しい。このことは、本反応系で基質として添加した FDP が、DHAP、GAP を経て GAPDH 反応により 1,3-DPG となり、次いで 3-PG、2-PG または 2,3-DPG に変換されることを示している。一方、**Fig. 5** の時間曲線から、本反応系は 2 時間後には一応平衡状態に達していると予想される。この状態における各中間代謝物質濃度から質量作用比を求めたものが **Table 4** である。それぞれ各反応の平衡

Table 3 Concentration of fructose 1,6-bisphosphate into various glycolytic intermediates in the reaction medium (fructose 1,6-bisphosphate, NAD^+ , pyruvate, KF and hemolysate)

Intermediates	0 min nmol/ml	120 min nmol/ml
FDP	826.5	2.7
DHAP	42.1	5.9
GAP	16.6	4.7
3-PG	113.6	808.1
2-PG	48.2	104.4
PEP	45.5	37.5
Pyruvate	1,627.5	133.8
Lactate	2,146.7	3,456.7
2,3-DPG	69.3	1,031.8
ADP/ATP	3.10	1.86
$\text{NAD}^+/\text{NADH}^*$	—	1,388

The reaction was carried out under the same conditions as those described in Fig. 5.

* calculated from the $[\text{lactate}]/[\text{pyruvate}]$ ratio (28)

定数に近似的な値が得られ先の予想は支持される。また、本反応系における lactate の生成反応は、 NAD^+ を介して GAPDH 反応と共役している。したがって平衡状態では lactate 生成量は GAPDH 反応による 1,3-DPG の生成量にほぼ等しいはずである。2,3-DPG の実測値から考えて、この反応系では生成された 1,3-DPG の大部分が Rapoport-Luebering 経路³⁰⁾へ流入していることが分かる。

以上、ここに設定した溶血液による 2,3-DPG 生成

Table 4 Mass action ratios of the glycolytic reactions occurring in the medium (fructose 1,6-bisphosphate, NAD^+ , pyruvate, KF and hemolysate)

	Mass action ratio	Equilibrium constant*
$\frac{[\text{GAP}][\text{DHAP}]}{[\text{FDP}]}$	1.03×10^{-5}	1.3×10^{-4}
$\frac{[\text{GAP}]}{[\text{DHAP}]}$	8.0×10^{-1}	5×10^{-2}
$\frac{[\text{GAP}]^2}{[\text{FDP}]}$	8.2×10^{-6}	6.5×10^{-6}
$\frac{[\text{3-PG}][\text{ATP}][\text{NADH}]}{[\text{GAP}][\text{ADP}][\text{P}_i]**[\text{NAD}^+]}$	3.1×10^4	2×10^5
$\frac{[\text{2-PG}]}{[\text{3-PG}]}$	1.3×10^{-1}	1.8×10^{-1}

Mass action ratios were calculated from the concentrations of the intermediates estimated at 120 min of the reaction shown in Table 3.

* cited from reference No. 29

** The concentration of inorganic phosphate in the reaction mixture at 120 min was estimated to be $6.7\ \mu\text{mol/ml}$.

Table 5 Lactate and 2,3-DPG formation in hemolysates of the density-separated erythrocytes

	T	M	B
Δ Lactate*	1.23	1.48	1.28
Δ 2,3-DPG*	1.11	0.80	0.65
Δ Lactate/ Δ 2,3-DPG	0.90	0.54	0.50

Erythrocytes were separated into three fractions, having low (T), middle (M) and high (B) density as described in methods. The reaction was carried out under the same conditions as those described in Fig. 5.

* $\mu\text{mol/ml}$ of reaction mixture at 120 min

反応系により測定される 2,3-DPG 濃度は、赤血球内解糖系の FDP から 2-PG に至る主経路および 2,3-DPG に至る側路について各代謝物質間の平衡状態時の濃度であると考えられる。なお、本反応液中の DPG phosphatase 活性は、KF 添加の条件下では $0.1 \mu\text{mol/ml/h}$ (37°C , pH 7.4) 以下で、この値は 2,3-DPG 生成量に比してわずかで無視した。

(2) 赤血球加齢との関係

前記の 2,3-DPG 生成反応系を用いて、赤血球の加齢に伴う 2,3-DPG 生成機能の差異を検討した。

Table 5 は保存血赤血球を比重差別に分別し、それぞれの血球成分から調製した溶血液を前述と同様の条件下で incubate し、lactate および 2,3-DPG 生成量を測定した結果である。表のごとく、lactate 生成量は各比重差間で、ほとんど差がなく一定であるのに対して、2,3-DPG 生成量には著明な差異がみられ低比重赤血球ほど高値を示した。

各比重差血球成分について反応 120 分後の中間代謝物質濃度を定量し、高比重赤血球における各物質の濃度を 100% とし、これと低、中比重赤血球における値とを比較する、いわゆる crossover plot を行った。Fig. 6 がその結果であるが、図のように GAP—3-PG 間に明らかな crossover point が認められた。すなわち、crossover point より上位の代謝物質、FDP, DHAP, GAP は低比重赤血球ほど多く蓄積するが、これより下位の 3-PG, 2-PG ではこの関係が逆転して、低比重赤血球ほど減少していることが分かる。この結果は GAPDH 反応で生成した 1,3-DPG の 2,3-DPG あるいは 3-PG の方向への流れが赤血球加齢に依存していることを示唆している。

(3) 2,3-DPG 生成に及ぼす pH の影響

溶血液反応系による 2,3-DPG 生成が pH でいかなる影響を受けるかを検討した。Fig. 7 は pH 7.0

Fig. 6 Relative concentration of the glycolytic intermediates formed in the hemolysates from each of three density-separated erythrocyte fractions (a crossover plot)

The reactions were carried out under the same conditions as those in Fig. 5. Symbols —○—, —●— and —□— represent low, middle and high density erythrocyte fractions, respectively.

Fig. 7 Effect of pH on the relative concentrations of glycolytic intermediates formed in the hemolysates. The reactions were carried out under the same conditions as those described in Fig. 5, except the pH. —●—: pH 7.0, —○—: pH 7.6

および pH 7.8 で反応を行い、120 分後に中間代謝物濃度を測定して crossover plot を行ったものである。GAP—3-PG 間に crossover point が認められる。2,3-DPG 生成量は pH 7.0 で $1.02 \mu\text{mol/ml}$, pH 7.8 で $1.18 \mu\text{mol/ml}$ であった。この事実は 2,3-DPG 生成反応系は pH が変化した時にも血球加齢の場合と同様に変化しえることを示している。

考 察

2,3-DPG の生成および分解は, Rapoport-Luebering 経路⁸⁰⁾ (Fig. 8) で行われ, それぞれ DPG synthase および DPG phosphatase によって触媒される. 現在ではこの二つの酵素活性は単一の蛋白質に依存すると考えられている^{81,82)}.

hypoxic な状態にある個体では赤血球内の2,3-DPG 濃度が上昇し, これに伴って Hb の P_{50} 値も高値を示す^{5,8,88)}. このことは生体の適応反応として知られている. しかしながら, 今回著者は貧血患者赤血球について検討し, その結果 2,3-DPG の上昇が特に流血中の比較的若い赤血球に著明であり, その反面加齢の進んだ赤血球では少ないことを示した. すなわち, 2,3-DPG 調節機構には血球加齢に伴う変化のあることが示唆される.

一方, Deuticke らによる IPP 系¹⁹⁾ は *in vitro* で赤血球内 2,3-DPG 濃度を上昇させる手段として知られているが, この系による 2,3-DPG 生成速度も若い赤血球ほど大きいことが明らかとなった. また, この反応系で 2,3-DPG 生成量に関して pyruvate 濃度が不飽和の条件下で赤血球加齢の影響が大きく, 飽和条件下では著しく小さいことが観察された. したがって, 加齢に伴う 2,3-DPG 生成量の変化は, LDH または解糖系における GAPDH 以下の

反応が加齢に依存して変化することによって考えられる.

そこで著者はこの点を明らかにする目的から, 次に赤血球内解糖反応経路の一部を取り出し, 2,3-DPG 生成条件を設定して以後の解析を試みた. この反応系は溶血液に FDP を基質として加え, これに NAD^+ および pyruvate を添加するとともに, KF によって enolase 反応を阻害して 2,3-DPG を生成する系である. しかし, この反応系は前述の赤血球を用いた IPP 系と異なり短時間内に平衡に達した. したがって解析にはすべて平衡時における中間体濃度を用いた. この結果, 溶血液反応系における 2,3-DPG 生成量にも赤血球の加齢依存性のあることが認められ, 同時に FDP から 2-PG に至る反応系の中間代謝物質量に関しては GAP-3-PG 間に加齢差に基づく crossover point が認められた. このことは GAPDH 反応以下に赤血球加齢依存性のあることを示唆している.

GAP-3-PG 間には GAPDH 反応 ($\text{GAP} \rightarrow 1,3\text{-DPG}$) に加えて PGK 反応 ($1,3\text{-DPG} \rightarrow 3\text{-PG}$) が含まれ, また側路として DPG synthase 反応 ($1,3\text{-DPG} \rightarrow 2,3\text{-DPG}$) が存在する. これらの反応の生成物のうち, 1,3-DPG の生成量は Table 5 の結果にみられるように, この生成反応と共役した LDH 反応による lactate 生成量が一定であったことから赤血球加齢

によって影響されないと考えられる. これに対して Table 3 の結果から, 2,3-DPG 量と (3-PG + 2-PG) 量とは加齢の影響を受け, 若い赤血球では 2,3-DPG 量が多く, 加齢の進んだ赤血球では (3-PG + 2-PG) 量が多いことが分かる. したがって赤血球加齢に伴う 2,3-DPG 生成量の差異には, 解糖系の分岐点にあたる 1,3-DPG から 3-PG (主経路) および 1,3-DPG から 2,3-DPG (Rapoport-Luebering 経路) への反応が重要な役割を持ち, 血球年齢が若いほど主経路に比べて Rapoport-Luebering 経路への代謝の流れが大きいことが結論される. 一方, 反応の pH 条件を変えることによって, 2,3-DPG 生成量の差異および GAP-3-PG 間における crossover point の出現がみられたが, この場合は pH が両経路への基質の分配に影響を与えるものと考えられる. この結果からも赤血球内 2,3-DPG 濃度の調節には解糖系の

Fig. 8 Glycolytic pathway within erythrocytes

分岐点が重要な役割を果たすことが示された。

さらに著者は両経路への反応を触媒する PGK および DPG synthase について血球加齢差が認められるか否かを比重差別に分別した赤血球について測定したが、両者の活性は標準測定条件下でそれぞれ 1.77 mmol/h/ml red cell および 30.6 μ mol/h/ml red cell であり、血球加齢による差は認められなかった。しかしながら、これらの測定値は酵素の最大活性値を示すものであって、*in situ* での両酵素反応の速さを表すことにはならない。むしろ血球加齢に伴う両酵素の基質、あるいは阻害物質に対する反応性 (K_m 値、あるいは K_i 値) の変化などを考慮しなければならない。先に Minakami ら³⁰⁾、および Williamson³⁵⁾は ouabain による赤血球解糖系の抑制の際に GAP-3-PG 間に crossover point がみられること、およびこれが ADP/ATP 比の減少による PGK 反応の速度低下によることを報告している。しかし今回用いた各比重赤血球間には ADP/ATP 比に有意の差を認めなかった。

Rose ら³⁶⁾は *in vitro* で赤血球を FDP および triose phosphate が蓄積する条件におき、これに NADH の酸化剤として pyruvate を加えると GAP からの代謝の流れが 3-PG へゆくことなく、ほとんど 2,3-DPG へ向かうことを示しているが、この現象は今回の溶血液反応系での実験結果と類似しており興味深い。今回の結果も合わせて、赤血球内の 2,3-DPG 濃度の調節には、単に解糖系上位の PFK 反応による調節やデオキシ Hb と 2,3-DPG との結合量変化のほかに、LDH 反応、GAPDH 反応および 1,3-DPG を基質とする DPG synthase, PGK 反応が関連することが分かる。実験結果は、これらの反応が赤血球の加齢に依存していることを明らかにしたが、その依存性はこれらの酵素分子の触媒機能、酵素量あるいは赤血球内環境の変化などに関連するものと推測される。

結 論

赤血球内 2,3-DPG の代謝調節、特に 2,3-DPG 濃度と血球加齢との関係について、比重差に基づいて分別した赤血球およびその溶血液を用いて検討し、下記の結論を得た。

1) 貧血患者赤血球にみられる 2,3-DPG 濃度の上昇、およびそれに伴うヘモグロビンの P_{50} 値の増加は血球年齢の若い赤血球ほど著明である。

2) Deuticke らの inosine, pyruvate および phosphate 系による正常赤血球内 2,3-DPG 生成反応も若い赤血球ほど大きい。

3) 溶血液による 2,3-DPG 生成は FDP を基質とし、 NAD^+ , pyruvate および KF 存在下に測定される。

4) 溶血液反応系による 2,3-DPG 生成反応では、若い赤血球ほど 2,3-DPG 量が多く生成され、3-PG および 2-PG 量は少ない。

5) 解糖系の分岐点に当たる PGK 反応および DPG synthase 反応のバランスが赤血球内 2,3-DPG 濃度の調節点となり、若い赤血球ほど 2,3-DPG 生成経路への基質の流入が大である。

稿を終るにあたり、終始、直接の御指導を賜りました第 1 生化学教室岡崎太郎助教授、ならびに御助言、御助力をいただきました後藤至孝講師、二村真秀博士をはじめ教室員各位に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Bunn, H.F., Forget, B.G., and Ranney, H.M.: Human hemoglobins. W.B. Sanders, Philadelphia, 1977.
- 2) Oski, F.A., Gottlieb, A.J., Delivoria-Papadopoulos, M., and Miller, W.W.: Red-cell 2,3-diphosphoglycerate levels in subjects with chronic hypoxemia. N. Engl. J. Med., **280**, 1165~1166, 1969.
- 3) Duhm, J., and Gerlach, E.: On the mechanisms of the hypoxia-induced increase of 2,3-diphosphoglycerate in erythrocytes; Studies on rat erythrocytes in vivo and on human erythrocytes in vitro. Pflugers Arch., **326**, 254~269, 1971.
- 4) Keitt, A.S., Hinkes, C., and Block, A.J.: Comparison of factors regulating red cell 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) in acute and chronic hypoxemia. J. Lab. Clin. Med., **84**, 275~280, 1974.
- 5) Torrance, J., Jacobs, P., Restrepo, A., Eschbach, J., Lenfant, C., and Finch, C.A.: Intraerythrocytic adaptation to anemia. N. Engl. J. Med., **283**, 165~169, 1970.
- 6) Koch, H.-H., and Schröter, W.: Kompensatorische Veränderungen der erythrocytären 2,3-Diphosphoglyceratkonzentration bei Anämien und Polyglobulien. Mschr. Kinderheilk., **121**, 392~394, 1973.
- 7) Valeri, C.C.R., and Fortier, N.L.: Red-cell 2,3-diphosphoglycerate and creatine levels in patients with red-cell mass deficits or with cardiopulmonary insufficiency. N. Engl. J. Med., **281**, 1452~1455, 1969.
- 8) Woodson, R.D., Torrance, J.D., Shappell, S.D., and Lenfant, C.: The effect of cardiac disease on hemoglobin-oxygen binding. J. Clin. Invest., **49**, 1349~1356, 1970.

- 9) Ravin, M.B., Drury, W.L., Keitt, A.S., and Daicoff, G. : Red-cell 2,3-diphosphoglycerate in surgical correction of cyanotic congenital heart disease. *Anesth. Analg.*, **52**, 599~604, 1973.
- 10) Flenley, D.C., Fairweather, L.J., Cooke, N.J., and Kirby, B.J. : Changes in haemoglobin binding curve and oxygen transport in chronic hypoxic lung disease. *Br. Med. J. [Clin. Res.]*, **I** (5958), 602~604, 1975.
- 11) Lenfant, C., Torrance, J., English, E., Finch, C.A., Reynafarje, C., Ramos, J., and Faura, J. : Effect of altitude on oxygen binding by hemoglobin and on organic phosphate levels. *J. Clin. Invest.*, **47**, 2652~2656, 1968.
- 12) Eaton J.W., Brewer, G.J., and Grover, R.F. : Role of red cell 2,3-diphosphoglycerate in the adaptation of man to altitude. *J. Lab. Clin. Med.*, **73**, 603~609, 1969.
- 13) Lenfant, C., and Sullivan, K. : Adaptation to high altitude. *N. Engl. J. Med.*, **284**, 1298~1309, 1971.
- 14) Bunn, H.F., May, M.H., Kocholaty, W.F., and Shields, C.E. : Hemoglobin function in stored blood. *J. Clin. Invest.*, **48**, 311~321, 1969.
- 15) Haidas, S., Labie, D., and Kaplan, J.-C. : 2,3-Diphosphoglycerate content and oxygen affinity as a function of red cell age in normal individuals. *Blood*, **38**, 463~467, 1971.
- 16) Jacobasch, G., Minakami, S., and Rapoport, S.M. : Glycolysis of the erythrocyte. "Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes" (Yoshikawa, H., and Rapoport, S.M. eds.), p. 55~92, University of Tokyo Press, Tokyo, 1974.
- 17) Oski, F.A., Gottlieb, A.J., Miller, W.W., and Delivoria-Papadopoulos, M. : The effects of deoxygenation of adult and fetal hemoglobin on the synthesis of red cell 2,3-diphosphoglycerate and its in vivo consequences. *J. Clin. Invest.*, **49**, 400~407, 1970.
- 18) Murphy, J.R. : Influence of temperature and method of centrifugation on the separation of erythrocytes. *J. Lab. Clin. Med.*, **82**, 334~341, 1973.
- 19) Deuticke, B., Duhm, J., and Dierkesmann, R. : Maximal elevation of 2,3-diphosphoglycerate concentrations in human erythrocytes ; Influence on glycolytic metabolism and intracellular pH. *Pflugers Arch.*, **328**, 15~34, 1971.
- 20) Beutler, E. : Red cell metabolism ; A manual of biochemical methods. 2nd ed., Grune & Stratton, New York, 1975.
- 21) Bergmeyer, H.U. : Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 3, p. 1314~1319, Academic Press, New York, 1974.
- 22) Bergmeyer, H.U. : Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 3, p. 1424~1428, Academic Press, New York, 1974.
- 23) Bergmeyer, H.U. : Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 3, p. 1446~1451, Academic Press, New York, 1974.
- 24) Bergmeyer, H.U. : Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 3, p. 1464~1468, Academic Press, New York, 1974.
- 25) The ultraviolet determination of 2,3-diphosphoglyceric acid (2,3-DPG). *Sigma Tech. Bulletin*, No. 35-UV, 1980.
- 26) The ultraviolet determination of adenosine 5'-triphosphate (ATP). *Sigma Tech. Bulletin*, No. 366-UV, 1977.
- 27) Oski, F.A., Travis, S.F., Miller, L.D., Delivoria-Papadopoulos, M., and Cannon, E. : The in vitro restoration of red cell 2,3-diphosphoglycerate levels in banked blood. *Blood*, **37**, 52~58, 1971.
- 28) Racker, E. : Crystalline alcohol dehydrogenase from bakers' yeast. *J. Biol. Chem.*, **184**, 313~319, 1950.
- 29) Minakami, S., and Yoshikawa, H. : Studies on erythrocyte glycolysis. II. Free energy changes and rate limiting steps in erythrocyte glycolysis. *J. Biochem. (Tokyo)*, **59**, 139~144, 1966.
- 30) Rapoport, S., and Luebering, J. : Glycerate-2,3-diphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **189**, 683~694, 1951.
- 31) Sasaki, R., Ikura, K., Sugimoto, E., and Chiba, H. : Purification of bisphosphoglyceromutase, 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase and phosphoglyceromutase from human erythrocytes ; Three enzyme activities in one protein. *Eur. J. Biochem.*, **50**, 581~593, 1975.
- 32) Chiba, H., and Sasaki, R. : Functions of 2,3-bisphosphoglycerate and its metabolism. "Current Topics in Cellular Regulation" (Horecker, B.L., and Stadtman, E.R. eds.), Vol. 14, p. 75~116, Academic Press, New York, 1978.
- 33) Lian, C.-Y., Roth, S., and Harkness, D.R. : The effect of alteration of intracellular 2,3-DPG concentration upon oxygen binding of intact erythrocytes containing normal and mutant hemoglobins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 151~158, 1971.
- 34) Minakami, S., and Yoshikawa, H. : Studies on erythrocyte glycolysis. III. The effects of active cation transport, pH and inorganic phosphate concentration on erythrocyte glycolysis. *J. Biochem. (Tokyo)*, **59**, 145~150, 1966.
- 35) Williamson, J.R. : General features of metabolic control as applied to the erythrocyte. "Advances in Experimental Medicine and Biology" (Brewer, G.J. ed.), Vol. 6, p. 117~136, Plenum Press, New York, 1970.
- 36) Rose, I.A., and Warms, J.V.B. : Control of red cell glycolysis ; The cause of triose phosphate accumulation. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4009~4015, 1970.

(受付: 1982 年 11 月 26 日)