Glucokinase, Hexokinase の分離, および糖質代謝における意義

吉利 和 織田 敏次 岡 博 兼子 俊男*

Glucose あるいはその他の hexose が生体に利用されるためには、それらの糖がまずリン酸化されることが必要である。このリン酸化は一般に hexokinase とよばれる酵素によつて触媒される。酵母の hexokinase や、高等動物でも筋や脳の hexokinase については比較的早くからその性質が明らかとなつていたが、肝について生体全体の糖質代謝において重要な役割をはたす臓器でありながら十分な知見が得られていない。肝は他の臓器と異なり、hexokinase の逆反応を触媒する glucose-6-phosphatase の活性が高いということもあつて、肝の hexokinase の性質や、その意義についてはまだ不十分な点が残されている。Slein, Cori ら¹⁾は、1950 年に肝には主に glucose のリン酸化を触媒する酵素のあることを示し、これに glucokinase の名称を与えているが、glucose-6-phosphatase が存在するために、その活性などを正確に知ることはできないと述べている。しかし、Crane, Sols ら²⁾は glucose-6-phosphatase は microsome 分画にあるので、肝の homogenate を 100,000 g で超遠心した上清には glucose-6-phosphatase の活性はなく、この上清は肝組織 1 g 当り毎分 0.4~0.6 μ mole の glucose をリン酸化し、他の組織に存在する hexokinase とは glucose に対する K_m が異なることを明らかにした。さらに 1960 年に、DiPietro, Weinhouse ら³⁾は、Crane, Sols らの報告を発展させ、肝の glucose をリン酸化する酵素を直接測定する方法を確立し、次いで、Vinuela, Sols ら⁴⁾は硫安分画法で肝における glucose をリン酸化する酵素として、glucose に対する K_m 値の低い

hexokinase と、 K_m 値の高い glucokinase とを分離し、またその両酵素の活性測定法を確立した。

著者⁵⁻⁷⁾も Vinuela らの方法に従つて、hexokinase, glucokinase の活性を測定し、かつ、両者を DEAE cellulose column で分離して、両酵素の性質について 2, 3 の検討を加え、また糖尿病肝におけるこれら酵素の変動や、肝 glycogen 合成との関連を検討しているが、ここでは主に両酵素の活性測定法および chromatography による分離法について述べ、また glucokinase の肝糖質代謝における意義について考察を行なうこととする。以下、本文中に使用した hexokinase, glucokinase の名称は Vinuela, Sols らの定義に従つたものである。

I. Glucokinase, hexokinase 活性の測定法

DiPietro, Weinhouse³⁾による活性の測定法は、hexokinase, glucokinase の和を測定したものであるが、Vinuela, Sols ら⁴⁾は両者の活性を同時に別々に測定する方法を発表し、著者もこの方法に従つて酵素活性を測定した。シロネズミを断頭屠殺し、ただちに肝静脈より 0.15 M KCl, 0.05 M EDTA, 0.05 M $MgCl_2$ (pH 7.0) の永冷緩衝液 30 ml で肝を灌流虚血したのち切除し、秤量後、同じ緩衝液の 3 倍量で homogenize し、 1×10^4 g 15 分冷凍遠心後に上清をとり、これを再び 10×10^4 g 30 分超遠心分離を行なつた上清を試料とする。この試料には glucose-6-phosphatase 活性は認められない。

測定法の原理は反応によつて生成する glucose-6-phosphate に NADP の存在で glucose-6-phosphate dehydrogenase を作用させ、生成する $NADPH_2$ の量から酵素活性を計算する。測定は 25°C で実施した。

Assay mixture

0.25 M glycylglycine buffer (pH 7.5)	0.3 ml
1 % NADP	0.1 ml

* Y. Yoshitoshi, B. Oda, H. Oka, K. Kaneko: 東京大学吉利内科。

0.1 M MgCl ₂	0.05 ml
0.5 u/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase	0.05 ml
30 mM ATP	0.1 ml
sample	0.02 ml

これに

Cuvette A	500 mM acetylglucosamine	0.1 ml
Cuvette B	1/200 M glucose	0.1 ml
Cuvette C	1 M glucose	0.1 ml

を加える。

試料を加えて反応を start させ、5分後から1分間隔で10分間340 m μ の吸収の増加を読みとる。cuvette BとAの差は hexokinase 活性を示し、cuvette CとBの差は glucokinase 活性を示す。6-phosphogluconate $\rightarrow$ ribulose-5-phosphate の反応が同時に couple するため、得られた NADPH₂ の値の半分が glucokinase, hexokinase の活性を示すことになる⁹⁾。本法は活性の測定が product formation に依存しているので高濃度の substrate に影響されず、かつ生成された glucose-6-phosphate は glucose-6-phosphate dehydrogenase によつて速かに除去されるために product inhibition や他の酵素による competitive action が問題にならない点、非常に優れている。また、この条件下では optical density の変化は測定中直線的である。

著者がシロネズミの各組織で glucokinase と hexokinase の活性を測定した結果は図1に示すとおりで、この成績から glucokinase が肝に特異的に存在する glucose の phosphorylating enzyme であることがわかり、またその生成物は glucose-6-phosphate であることも明らかにされている⁹⁾。

図1. シロネズミ各臓器の hexokinase 活性

II. Glucokinase と hexokinase の分離

Vinuela, Sols ら⁴⁾は 8×10^4 g 20分間遠心した肝上清から硫酸分画によつて glucokinase, hexokinase を分離して、その2,3の性質について報告したが(表1), 著者らは DEAE cellulose column を用いて両者を分

表1. Hexokinase と glucokinase の性質

	Hexokinase (20 to 50% fraction)	Glucokinase (60 to 75% fraction)
Km for glucose	0.01 mM	10 mM
Km for ATP-Mg/Ki for 1,5-anhydroglucitol-6-P	6	<0.1
Inhibition by glucose-6-P	+	-
Km for glucose/Ki for N-acetylglucosamin	0.02	15
Rate of fructose phosphorylation to the 6-phosphate, at 0.1 M concentration relative to glucose	1.5	0.1
ability to phosphorylate mannose	+	+

(Vinuela, Sols らより引用)

離した。活性測定の場合と同様に処置して得た上清を試料として DEAE cellulose column 1×12 cm に吸着させ、 10^{-4} M の EDTA を含む 5×10^{-4} M Tris 緩衝液で溶出し、緩衝液中の食塩濃度を step wise に上昇させて両酵素の分離を行なつた。この際、上清をあらかじめ透析すると hexokinase 活性にはほとんど変化を認めないが、glucokinase 活性は24時間の透析で40%前後の活性低下を示す。透析に際して cystein をあらかじめ加えるなどの処置を行なつてもこの活性低下は防げない。

未透析および透析後の試料について得たクロマトグラムを図2および図3に示す。

図2に示すように、最初に hexokinase, 次いで glucokinase の分画が流出する。透析後の試料では第2の山、すなわち glucokinase の活性が低下している。また図3にみられるようにアロキサン糖尿病ネズミ肝では glucokinase の山が低下している。

活性の回収率は hexokinase で50~60%, glucokinase では30%前後である。後者の活性の回収率の低いのは操作中における活性の低下が後者でより大であることを示すものであろう。

図 2. 肝 hexokinase と glucokinase の分離 (正常ネズミ)

図 3. フロキサソ糖尿病ネズミの肝 hexokinase と glucokinase の分離

III. Hexokinase および glucokinase の性質

上記の方法で分画した hexokinase および glucokinase を用いてそれぞれ glucose に対する K_m 値を求めると, hexokinase は 0.05 mM, glucokinase は 16 mM であった(図 4). また alloxan が hexokinase 活性を阻害することが知られているが, 図 5 に示すように 10^{-3} M の高濃度では両酵素の活性をいずれも阻害するが, 10^{-4} M 以下の濃度では阻害が認められず, 両酵素の間に差は認められなかった. したがって, フロキサソ糖尿病ネズミの肝で glucokinase のみ特異的に低下するのはフロキサソの直接的作用ではない. また後に述べるように, 糖尿病ネズミの肝で低下している glucokinase 活性はイン

シュリン投与により正常化するが, インシュリンを *in vitro* に反応液中に添加した場合には 1 μ U/ml ~ 10 μ U/ml の濃度では活性の変化は認められなかった. なお, 正常肝の種々な抽出液や, 各種の nucleotide の添加も効果なく, 正常肝上清と糖尿病肝上清とを混合して活性を測定した場合も, それぞれの活性の総和が得られるの

図 4. Hexokinase, glucokinase の glucose に対する K_m 値

図 5. Hexokinase と glucokinase の alloxan による阻害

みであり、糖尿病肝で低下している glucokinase の活性を *in vitro* で activate するものは認められなかつた。肝の糖質代謝には電解質が関与することが知られているので、反応液中の Na, K の濃度を種々変化させてみたが、この場合も活性に対する大きな影響は認められなかつた。

このように糖尿病で低下している glucokinase 活性を *in vitro* で上昇させる activator は現在まで認められていないが、Ilyin ら¹⁰⁾は 2-deoxy-glucose を用いる方法で hexokinase を測定し（この場合の hexokinase は glucokinase をも含めているものと考えられる）、糖尿病肝の homogenate にインシュリンと insulinase の inhibitor を加えることにより、hexokinase 活性が一部回復することを報告している。インシュリンが *in vitro* で効果があるとすれば興味のあることである。

VI. Glucokinase, hexokinase の肝糖質代謝における意義

以上のように、肝には glucose phosphorylate する酵素として、hexokinase と glucokinase の両者がある。シロネズミの胎児肝では 17 日目では hexokinase のみが存在し、生後 12 日の肝では hexokinase と glucokinase の活性比は 0.64:0.36 であるが、生後 20 日ではこの比が逆転し、0.3:0.7 となり、以後成熟シロネズミ肝のパターンに近づく¹¹⁾。そして hexokinase は glucose に対する K_m が低く、すなわち親和性が高い。

一方、glucokinase は glucose に対する K_m が高く、すなわち親和性が低い。このようにいずれも同一の反応を触媒する酵素であるが、glucose に対する K_m 値が非常に異なり、また hexokinase は glucose-6-phosphate により阻害されるが、glucokinase は阻害されないという点も異なる。また glucokinase は絶食やアロキサンによるインシュリン欠乏によりその活性は著減^{8, 4, 6)}、アロキサン糖尿病ネズミにインシュリンや経口糖尿病治療剤である biguanide を投与することにより回復する。この間、hexokinase の活性はほぼ不変である（図 6）。

筋の hexokinase の活性も図 7 に示すようにアロキサン糖尿病では軽度減少するのみである。絶食による

図 6. 肝 glucokinase と hexokinase に対するインシュリン、biguanide の効果
D.M.+DMB Dimethyl biguanide 300 mg/kg 投与 2 時間後
D.M.+insulin. insulin 3 u/kg 皮注 2 時間後

図 7. 正常および糖尿病ネズミの筋 hexokinase

glucokinase 活性の低下は glucose の経口投与によつて、4 時間以内に正常のレベルまで回復するが¹⁰⁾, fructose, galactose, mannose の投与では一部回復するにすぎない。このような glucose 投与による glucokinase 活性の回復は、同時に puromycin あるいは ethionine を投与すると認められず、また ethionine と同時に methionine を投与すると一部活性が回復する。インシュリンの注射を継続するとアロキサン糖尿病でも glucokinase 活性は正常に近く保たれるが、注射中止後約 96 時間で糖尿病のレベルに戻る。これらのことは glucokinase の形成が glucose とインシュリンに依存することを示している。

肝の glycogen の合成には、高い血糖レベルの必要なことはすでに 1929 年、Cori ら¹¹⁾によつて指摘されており、Soskin ら¹²⁾はイヌの肝を用いて低い血糖レベルでは肝は glucose を放出し、高い血糖レベルでは glucose をとり込むことを明らかにした。一方 Cahill ら¹³⁾は、肝細胞が glucose に対して自由透過性であることを明らかにし、かつ glucose の肝細胞内外への移動が約 150 mg/dl のレベルを境としておこることを報告している。また、Spiro は¹⁴⁾シロシネズミの肝 slice による glucose-U-¹⁴C の glycogen への incorporation に対する glucose 濃度の影響をみて glucose utilization に対する平均 Km を 5.9×10^{-3} M と計算している。これらの事実と、前述の glucokinase のもつ性質とを考慮すると、肝における glucose からの glycogen 合成への第 1 の step が主として glucokinase に依存しているのではないかと考えられる。また glucokinase は 21~23°C で肝組織 1g あたり、毎分 1 μ mole の glucose を phosphorylate し、37°C では 2 μ mole の glucose を phosphorylate するが、これは肝における glucose からの glycogen の最大合成能が肝組織 1g あたり、毎分 0.4~1 μ mole であることを十分説明するものである。

Figuerola ら¹⁵⁾は肝の homogenate を用いて glucose-¹⁴C から ¹⁴CO₂ および glycogen への ¹⁴C とりこみをみたが、hexokinase を過剰に加えた場合、¹⁴CO₂ へのとりこみは増加するが、glycogen へのとりこみはしない。また glucose-6-phosphate を添加しても glycogen への ¹⁴C のとりこみは抑制されない。

彼らは以上のことから glucose から glycogen を合成する経路には glucose-6-phosphate を経ない別の経路があるのではないかと推測している。しかし、肝には glucose を phosphorylate する酵素として、hexokinase

と glucokinase の 2 者があることを考慮すれば、この成績は hexokinase は嫌氣的解糖に、より密接な酵素であり、glucokinase は glycogen 合成により密接に関係する酵素であるという仮説によつても説明できるのではないだろうか。もちろん両酵素とも glucose-6-phosphate を生成物とするものであり、いかなる機構により、glycogen 合成系が glucokinase に、解糖系が hexokinase に依存しうるのであるのか、むずかしい問題ではあるが、今後さらに検討すべき点であろう。著者らもこの問題について現在実験を行なっている。最近 Steiner ら¹²⁾がアロキサン糖尿病ネズミにインシュリンを注射した後、経時的に glycogen 量、glycogen synthetase、glucokinase の活性を追求した成績では、肝 glycogen の増加に直接関係するのは注射後 40 分より増加する glycogen synthetase の活性の上昇であり、glucokinase 活性の上昇は時間的にこれよりもおそく、glucokinase の上昇による glucose-6-phosphate の増加が glycogen synthetase 活性を上昇させるものではないことを示している。したがつて、肝の glycogen 合成がインシュリンや食餌による血糖上昇によつてコントロールされる機構については、さらに研究が進められなければならない。

最後に、高等動物では血糖を一定に調節する機構があり、これに肝が重要な役割を果していることはすでに知られていることであるが、現在まで、どこで、またいかなる chemoreceptor がこの血糖の変化を感知し、それに反応するかは知られていない。ところで、glucokinase は、前にも述べたように glucose に対する Km 値は 10~20 mM である。すなわち 200~400 mg/dl を中心とする glucose の濃度の変化は glucokinase の活性を変化させることとなる。肝細胞が glucose に対し自由透過性であること、および生体では小腸上部で吸収された glucose は門脈を通つて第 1 に肝に達するといふことを考えると glucokinase が単にそれ自体によつて glucose をリン酸化し、肝での利用を高めるといふ以外に、もつと大きな役割を生体の血糖調節の上に果している可能性も考えられる。たとえば Antoniadis らは血中のインシュリンには筋ではインシュリン作用のない結合インシュリンと筋への glucose uptake を促進する遊離インシュリンがあり、空腹時には大部分が結合インシュリンの状態にあり、糖摂取後の血糖上昇によりこの結合インシュリンから遊離インシュリンが分離して筋への glucose のとりこみ促進し、血糖を下げると報告し、この解離には肝が関与しているのではないかと推論しているが、血

238 : PC 1175, 1963. 5) 兼子 : 日内誌, 52 : 1054, 1963. 6) 吉利, 織田, 小田, 岡, 兼子 : Proceedings of Symposium on Chemical physiology & Pathology, 3 : 197, 1963. 7) 吉利, 織田, 岡, 兼子 : 糖尿病, 7 : 1964, (in press). 8) Glock, G. E. & McLean, P. : Biochem. J., 55 : 400, 1953. 9) Dipiertro, D. L., Sharma, C. & Weinhouse, S. : Biochemistry, 1 : 455, 1962. 10) Sharma, C., Manjeshwar, R. & Weinhouse, S. : J. Biol. Chem., 238 : 3840, 1963. 11) Ballard, F. J. & Oliver, I. T. : Biochem. J., 90 : 261, 1964. 12) Steiner, O. F. & King, J. : J. Biol. Chem., 239 : 1292, 1964. 13) Cori, C. F. & Cori, G. T. : J. Biol. Chem., 85 : 275, 1929~30. 14) Soskin, S., Essex, H., Herrick, J. P. & Mann, F. C. : Am. J. Physiol., 124 : 558, 1938. 15) Cahill, G. F. Jr., Ashmore, J., Earle, A. S. & Zottu, S. : Am. J. Physiol., 192 : 491, 1958. 16) Spiro, R. : J. Biol. Chem., 233 : 546, 1959. 17) Figueroa, E., Pfeifer, A. & Niemeyer, H. : Nature, 193 : 382, 1962. 18) Ilyin, V. S. & Titova, G. V. : Dokl., Akad. Nauk SSSR, 141 : 227, 1961. (Cabib, E. : Ann. Rev. of Biochem., 32 : 321, 1963 より引用).

V. 結 語

肝には glucose をリン酸化する酵素として glucose に対する親和性の高い hexokinase と、親和性の低い glucokinase がある。後者の活性は糖摂取およびインシュリンに依存する。両者は DEAE cellulose column chromatography により分離しうる。glucokinase はとくに肝の糖質代謝に重要な意義をもつものと考えられる。

文 献

- 1) Slein, M. W., Cori, G. T. & Cori, C. F. : J. Biol. Chem., 186 : 763, 1950. 2) Crane, R. K. & Sols, A., in S. P. Colowick & N. O. Kaplan (Editors) : Methods in enzymology, vol I. Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 277. 3) Dipietro, O. L. & Weinhouse, S. : J. Biol. Chem., 235 : 2542, 1960. 4) Vinuela, E., Salas, M. & Sols, A. : J. Biol. Chem.