方がよいようである。より弱くしか認められなかったマイクロゾームについても勿論同様である。しかしミトコンドリアがコハク酸、グルタミン酸等からの水素の伝達系として硝酸塩の還元に関与する事は明らかであって、粒子単独の活性が水素供与体としてアルデヒドに代り得るという前報記載の観察⁽³⁾もこの事を支持するものと思われる。

抽出液の吸収スペクトルは可視部には 3 吸収が見られる。この中長波長側のものは精製酵素には認められない点から酵素そのものには関係ないと思われる。しかし廿日鼠及び鶏のものと比較した場合非常に似てはいるが、各抽出液にそれぞれ特異的な面も観察され各動物肝臓細胞質の特徴を示していると思われる。唯これが 2 次的に酵素作用に関係があるかどうかは明らかではない。又 $410\text{m}\mu$ の吸収は或る程度強いものが測定されるが、血色素関連物質もこの位置に吸収を持つ上に抽出液の吸光度が透析によってかなり減少する事から、吸収総てが酵素に由来するものではない事は明らかであるが、全く無関係か否かについては今後の研究に俟つ。

総 括

牛肝臓組織を等張蔗糖溶液を用いて分別遠心分離によってミトコンドリア、マイクロゾーム及び細胞質部に分別しその硝酸還元酵素の活性を測定し細胞内分布を検討した。その結果粒子にも極めて弱い活性が認められたが、大部分は細胞質に溶存している事が判明した。更に二、三の補足実験を行った。

本研究に用いた費用の一部は文部省科学研究助成補助金によった。又 FMN, FAD は名城大学農学部近藤弘、名古屋大学医学部奥田潤両氏より恵贈された。記して感謝する。

(1) F. Bernheim, M. Dixon : <i>Biochem. J.</i> , 22, 125 (1928).	(6) 大村浩久 : <i>Enzymologia</i> , 印刷中.
(2) 江上不二夫, 鈴木 旺, 丹羽 允, 佐藤 了 : 日化, 71, 226 (1950).	(7) M. Dixon, S. Thurlow : <i>Biochem. J.</i> , 18, 989 (1924).
(3) 大村浩久, 高橋平八郎 : <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 23, 83 (1959).	(8) 大村浩久 : <i>Bull. Agr. Chem. Soc. Japan</i> , 22, 387 (1958).
(4) W. C. Schneider : <i>J. Biol. Chem.</i> , 176, 259 (1948).	(9) 大村浩久 : 九大農学芸誌, 16, 517(1958).
(5) 大村浩久 : 九大農学芸誌, 14, 423(1954).	(10) 大村浩久 : 九大農学芸誌, 投稿中.
	(11) 大村浩久 : 九大農学芸誌, 16, 225(1957).
	(12) 大村浩久 : 九大農学芸誌, 投稿中.

ヘキソキナーゼに関する研究 (第 1 報)*

じゃがいもヘキソキナーゼの調製

井上 吉之 (京都大学農学部生物化学研究室), 伊藤 達郎 (滋賀大学農学部)

昭和 33 年 12 月 4 日 受理

ヘキソキナーゼは Meyerhof⁽¹⁾ によってパン酵母から発見、命名された酵素であり、次式の反応を触媒する。

パン酵母ヘキソキナーゼはすでに結晶化され⁽³⁾, 動物ヘキソキナーゼについても多数の研究がなされて来たが、植物ヘキソキナーゼについては研究も少く、その性質もいまだ明らかではない。植物ヘキソキナーゼは最初うれんそう⁽⁴⁾にその存在が予想され、緑豆ミトコンドリア⁽⁵⁾, 小麦⁽⁶⁾, えんどう⁽⁷⁾で証明された。じゃがいもヘキソキナーゼについては Griffiths⁽⁸⁾, Kotel'nikova⁽⁹⁾ がその存在を証明したが、共にアピラーゼの妨害が強力なためヘキソキナーゼ活性が得られ難いと報告しており、また Kotel'nikova⁽⁹⁾ はヘキソキナーゼ活性は硫酸 0.3 飽和の沈澱にのみあるらしいと報告している。Meeuse⁽¹⁰⁾, Saltman⁽⁶⁾ の部分的な報告もある。

じゃがいもヘキソキナーゼの検討にあたってアピラーゼの混在が大きな障害となることはすでに指摘^(8,9) され

* Studies on Hexokinase. Part I. Preparation of Potato Hexokinase.

By Yoshiyuki INOUE (Biochemical Laboratory, Department of Agriculture, Kyoto University) and Tatsuro ITO (Faculty of Liberal Arts and Education, Shiga University).

略号 : ATP ; アデノシン三リン酸, ADP ; アデノシン二リン酸, AMP ; アデノシンモノリン酸, ATPase ; アデノシントリフォスファターゼ.

ている通りであるが、本実験においてはこの妨害酵素を完全に除去することが出来た。またヘキソキナーゼの硫酸分別について検討した結果、本酵素は2種類でグルコキナーゼとフラクトキナーゼに区別し得ることを知ったので報告する。

実験材料および方法

供試じゃがいも(品種, 男爵)は当農場産を使用したが一部分は市販品も用いた。グルコース(市販注射用), フラクトース(ライト社)は他の還元糖の混在しないものを供試し, ATP・Na 塩は家兎筋肉から調製した純度 89~92% のものを用いた。ヘキソキナーゼの反応条件は Cori⁽¹¹⁾, Long⁽¹²⁾, Staub⁽¹³⁾, Saltman⁽⁶⁾ の方法を参考としてヘキソース 4×10^{-3} M, ATP 5×10^{-3} M (又は 10^{-2} M), MgCl_2 5×10^{-3} M, KF 5×10^{-2} M, 緩衝液 0.05 M トリス(ハイドロキシメチル)アミノメタン(pH 7.5), 温度 37° とした。この組成から ATP だけを除いたものを同時に反応させてヘキソキナーゼ以外の原因による還元糖の変化と区別した。反応停止は Ba(OH)_2 — ZnSO_4 ⁽¹⁴⁾ によって除蛋白と同時にヘキソースモノリン酸を沈澱除去し濾液中の未反応ヘキソースを定量することによってヘキソキナーゼ活性を測定した。アピラーゼの反応条件は本実験には Rosenthal⁽¹⁵⁾ の方法が適当であったのでこれを参考として ATP 5×10^{-3} M (又は 10^{-2} M), pH 7.5, 37° で行い、ヘキソキナーゼ反応と条件を一致させるため MgCl_2 5×10^{-3} M を添加した。反応停止には5倍容量の 5% CCl_3COOH を用い、濾液中の無機リンおよび酸不安定リン(水解条件: 1 N HClO_4 , 100° , 7 分間)の定量により活性を測定した。pH 測定はアンチモン電極, 還元糖定量は Somogyi⁽¹⁶⁾—Nelson⁽¹⁴⁾ 法, ケトース定量は Roe 新法⁽¹⁷⁾, 燐定量は Allen 法⁽¹⁸⁾, 蛋白定量は Lowry 法⁽¹⁹⁾ によって行った。ただし Roe 新法による比色の際フィルターは主波長 440 m μ を使用した。原報⁽¹⁷⁾の 520 m μ を使用しなかった理由は 440 m μ の方が標準曲線がシャープでヘキソキナーゼ活性を確認し易かったためである。定量は一般に 10~60 μg の範囲で行ったが、200~250 μg 附近でも Lambert-Beer の法則に従う。

実験結果および考察

1. 加熱処理によるアピラーゼの不活性化 アピラーゼは $\text{ATP} \rightarrow \text{AMP} + 2\text{H}_3\text{PO}_4$ の反応⁽²⁰⁾ によって ATP を消費し、ヘキソキナーゼ反応を妨害する。一般にアピラーゼをも含めて ATPase を阻害する目的には F^- ⁽²¹⁾ が使用され、 CH_3COONa ⁽²²⁾ も用いられたが、じゃがいもアピラーゼにおいてはこれらの阻害剤のみによ

って有効な阻害を期待することが出来なかったので加熱処理について検討した。水冷したじゃがいも塊茎の搾汁 200 ml を遠心分離し、上澄液に 1 N KOH を加えて pH 7.5 とし、トルエンを過剰に加えた後湯浴中

第1図 アピラーゼ不活性化に対する加熱処理の効果

図中の数字は加熱時間(分)。反応液 2.0 ml 中抽出液 0.2 ml (アピラーゼ反応), 0.4 ml (ヘキソキナーゼ反応)。

—○— アピラーゼ —×— ヘキソキナーゼ

第2図 アセトン 35~55% 割分の加熱処理

反応液 2.0 ml 中アセトン割分の粉末 200 mg (ヘキソキナーゼ反応), 4.0 ml 中 20 mg (アピラーゼ反応)。

—○— ヘキソキナーゼ —●— アピラーゼ

図中の数字は加熱時間(分)を示す。

第 3 図 A 硫酸分別劃分のグルコースに対する活性
反応時間 15 分, 各劃分の反応液中の蛋白当りの相対的な活性は 0.3~0.5 飽和を 1.0 として 0.3~0.5 飽和 0.4, 0.5~0.7 飽和 0.5 である。

第 3 図 B 硫酸分別劃分のフラクトースに対する活性
反応液中の蛋白当りの相対的な活性は 0.3~0.5 飽和を 1.0 として 0.5~0.7 飽和 0.7 である。

第 4 図 硫酸再分別キナーゼのフラクトースおよびグルコースに対する活性
反応液量 2.0 ml, 蛋白量 1.0 mg/ml
—○— フラクトース
—●— グルコース

で 50° に保つ. 一定時間ごとに酵素液の一部をとり氷冷し, 最後に遠心分離して上澄液を反応に供した. その結果は第 1 図に示した通りであり, アピラーゼは 20 分間の加熱によって完全に失活し, 10 分加熱後のヘキソキナーゼは未処理のものより高い活性を示す. 第 1 図では 20 分加熱後のヘキソキナーゼを測定しなかったが第 2 図 (アセトン分別酵素) に示したごとく 20 分処理においても活性は高められる.

2. 硫酸劃分のグルコースとフラクトースに対する活性 ジャガイモ 1 kg を約 1 時間氷冷後すり卸し, 搾汁を遠心分離した上澄液に 1 N KOH を添加して pH 7.5 とし, 50° に 10 分間加熱後氷冷し, pH 5.2 とする. 遠心分離した上澄液 500 ml に氷冷飽和硫酸溶液を加えて 0.3 飽和とし, 自然濾過する. 以下同様に処理して結局 0~0.3, 0.3~0.5, 0.5~0.7 飽和の各劃分を得る. 0.7 飽和以上では沈澱を生じない. 透析はいままでのところ不可能である.

各飽和度の湿沈澱 0.2 g を秤取し, トリス緩衝液 1.0 ml に溶解し, これを 2 分して夫々グルコースおよびフラクトースに対する活性を測定した. その結果は

第 3 図 A および B に示した通りである. 第 3 図 A と B の比較からジャガイモヘキソキナーゼは硫酸飽和度によってグルコースとフラクトースに対する活性比を異にし, グルコースに対しては 0~0.3 飽和画分が, またフラクトースに対しては 0.3~0.5 飽和画分が最高活性を示す. この結果はジャガイモヘキソキナーゼがグルコキナーゼとフラクトキナーゼに区別されることを示唆する.

3. フラクトースのみに活性なキナーゼの調製 第 4 図に示したごとく硫酸再分別によってグルコースに対しては不活性でフラクトースのみに活性なキナーゼを得ることが出来る. すなわちジャガイモ塊茎 1.3 kg の搾汁を pH 7.5, 50°, 10 分間加熱処理後硫酸分別する. 第 1 回分別は固形硫酸を用い 0.4~0.75 飽和として褐色の湿沈澱 6 ml を得る. これを水 94 ml に溶解後飽和硫酸溶液を加えて 0.5~0.65 飽和で再分別し白色の湿沈澱 1 ml を得る. この沈澱のキナーゼ活性は第 4 図に示した通りフラクトースのみに反応する.

一般にヘキソキナーゼが (1) 調製法のちがいによって各糖基

質に対する活性比を異にする場合 (第 3 図), (2) 抽出液等ではいずれの糖にも反応するが精製後はその一方の糖のみに反応する場合 (第 4 図), (3) 反応液が 2 種の糖基質を含み且つ酵素が各糖基質で飽和された状態のもとで反応を行った場合, 一方の糖の反応が他方の糖の存在によって阻害されない場合はヘキソキナーゼは 2 種類である⁽¹¹⁾. 本実験の結果はこの (1) と (2) に該当し, 従ってジャガイモヘキソキナーゼはグルコキナーゼとフラクトキナーゼに区別される.

4. 加熱処理—硫酸分別によるアピラーゼの除去 硫酸分別と加熱処理を併用し得ることはこれまでの実験で示した通りであるが, これによってアピラーゼを完全に除くことが出来る. 塊茎 1 kg から抽出液 500 ml を得, これを pH 7.5, 50°, 10 分間加熱処理した後 pH 5.2 とし, 硫酸飽和溶液を用いて 0.5~0.65 飽和で分別し, 遠心分離して 8.8 g の湿沈澱を得る. これを 100 ml の氷冷水に溶解し, 同じ飽和度で再分別して 3.1 g の

第1表 ジャがいもフラクトキナーゼの部分精製

	液量 (湿沈澱量) ml (g)	全蛋白 g	単位活性度*	比活性	全酵素量 単位	収量 %
抽出液	500	1.4	0.13	1	182	100
第1回塩析物	100(8.8)	0.35	0.34	2.6	119	67
第2回塩析物	35(3.1)	0.15	0.57	4.4	86	47

* 標準反応条件 (フラクトース $4 \times 10^{-3}M$, ATP $5 \times 10^{-3}M$, $MgCl_2$ $5 \times 10^{-3}M$, KF $5 \times 10^{-2}M$, pH 7.5, 37°, 15 分間) のもとで反応液 1.0ml あたりフラクトースの $1 \mu M$ が磷酸化された場合を1単位とし, Specific activity は 単位/mg 蛋白 とする.

第5図 加熱処理, 硫酸再分別によるアピラーゼの除去

A: 第1回硫酸分別 B: 第2回硫酸分別
 ○ フラクトキナーゼ ● アピラーゼ

コキナーゼとフラクトキナーゼに区別される。

(3) 加熱処理と硫酸分別の併用はアピラーゼ除去, 両キナーゼの分別にとって有効な方法である。

- (1) O. Meyerhof : *Biochem. Z.*, 183, 176 (1927).
- (2) S. P. Colowick, H. M. Kalcker : *J. Biol. Chem.*, 137, 789 (1941); 148, 117 (1943).
- (3) L. Berger, M. W. Slein, S. P. Colowick, C. F. Cori : *J. Gen. Physiol.*, 29, 379 (1946); M. Kunitz, M. R. McDonald : *ibid.*, 29, 393 (1946); K. Bailey, E. C. Webb : *Biochem. J.*, 42, 60 (1948).
- (4) J. Bonner, S. G. Wildman : *Arch. Biochem.*, 10, 497 (1946).
- (5) J. Bonner, A. Millerd : *Arch. Biochem. Biophys.*, 42, 135 (1953).
- (6) P. Saltman : *J. Biol. Chem.*, 200, 145 (1953).
- (7) A. Sols : *Biochim. Biophys. Acta*, 19, 378 (1956).
- (8) M. Griffiths : *Arch. Biochem.*, 20, 451 (1949).
- (9) A. V. Kotelnikova : *Doklady Akad. Nauk. S. S. S. R.*, 78, 737 (1951); *C. A.*, 45, 10311c (1951).
- (10) J. D. Meeuse, O. Eijk, H. E. Latuasan : *Biochim. Biophys. Acta*, 8, 478 (1952).
- (11) M. W. Slein, G. T. Cori, C. F. Cori : *J. Biol. Chem.*, 186, 763 (1950).
- (12) C. Long : *Biochem. J.*, 50, 407 (1952).
- (13) A. Staub, C. S. Vestling : *J. Biol. Chem.*, 191, 395 (1951).
- (14) N. Nelson : *J. Biol. Chem.*, 153, 375 (1944).
- (15) O. Rosenthal, C. S. Rogers, H. M. Vars, C. C. Ferguson : *ibid.*, 186, 669 (1950).
- (16) M. Somogyi : *ibid.*, 195, 19 (1952).
- (17) J. H. Roe, J. H. Epstein, N. P. Goldstein : *ibid.*, 178, 839 (1949).
- (18) R. J. L. Allen : *Biochem. J.*, 34, 858 (1940).
- (19) O. H. Lowry, N. J. Roseburgh, A. L. Farrand, R. J. Randall : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
- (20) H. M. Kalcker : *ibid.*, 153, 355 (1944).
- (21) S. Ochoa : *ibid.*, 141, 245 (1941).
- (22) H. A. Padykula, E. Herman : *J. Histochem. Cytochem.*, 3, 161 (1955).

湿沈澱を得る。第1回および第2回分別の沈澱 0.2 g を 1.0 ml の緩衝液に溶解し, フラクトキナーゼおよびアピラーゼ活性を測定した結果は第5図AおよびBの通りであり, 再分別後にはアピラーゼ活性は全く認められない。

この部分精製されたフラクトキナーゼについて比活性, 収量等を求めた結果は第1表の通りである。

要 約

(1) ジャがいも塊茎のヘキソキナーゼ調製について検討したが, 加熱処理 (pH 7.5, 50°, 20 分間) は妨害酵素アピラーゼを不活性化する。

(2) 硫酸分別の結果からジャがいもヘキソキナーゼはグル