

## 成長に伴う鶏肝ヘキソキナーゼおよび解糖系の変動

鈴木和彦・中島伸佳

### Summary :

Glucose is the major energy source for living organisms. The adaptive development of utilization of glucose plays a crucial role in growing chick. No change in glycolysis in liver was observed during first 3 days after hatching. Then it gradually increased stepwise. The  $K_m$  for hexokinase in liver of chicken is 0.102 mM for glucose. The activity of hexokinase in liver responded quickly to feeding. On the 4th day the activity of hexokinase in liver attained the same level to the value of 10th day.

### 緒 言

鶏はふ化後2日間は、卵黄嚢に残存する卵黄の脂肪を主なエネルギー源とする。その後の餌付けにより主なエネルギー源は餌中の糖質に変わる。鶏は一般に、ふ化後3日目に餌を与えるので直接、成長に伴う遺伝子の発現に対する、餌の影響を調べることができる。鶏では肝グルコキナーゼ (EC 2.7.1.2) が存在せず<sup>1)</sup> 餌中の糖質にいかに対応・成長するかは興味ある点である。本報告では成長に伴う肝解糖系の酵素活性の変動を示すとともに、解糖系の初発段階である肝ヘキソキナーゼ (EC 2.7.1.1) の変動とその性質について若干の知見を得たので報告する。

### 実験材料および方法

#### (1) 実験材料

実験にはZ8種白色レグホンの雄ヒナをもちいた。ヒナはふ化直後のものを石井ふ卵場より購入した。水はふ化直後より、餌はふ化後3日目より、自由に摂取させ飼育した。餌は日本農産工業のネオ特性チックフードを与えた。ヒナは午前10時に屠殺し実験に供した。鶏の肝ヘキソキナーゼの $K_m$ 値は同種のヒナの2ヶ月齢 (体重 729 g) の肝臓、100,000 × g 上清を酵素液として決定した。

#### (2) 実験方法

①肝解糖系活性の測定：ヒナ肝は0.9% KC1 で10%ホモジネートを作成し100,000×g, 0℃で30分間、遠心しその上清を酵素液とした。肝解糖系活性の測定にはぶどう糖 (400mM) を基質とし Lea と Weberの

方法<sup>2)</sup>により反応を行い、生成した乳酸を Hohorst の方法<sup>3)</sup>により測定した。

②肝ヘキソキナーゼの測定：肝ヘキソキナーゼはぶどう糖を基質とし生成したグルコース6リン酸を DiPietro と Weinhouse の方法<sup>4)</sup>により測定を行った。対照には ATP を用いず、ぶどう糖のかわりに N-acetyl-glucoseamine を用いた。 $K_m$  値は Lineweaver-Burk の方法により決定した。たん白質の測定はビウレット法<sup>5)</sup>によった。

### 結 果

図1はヒナの成長曲線と肝臓の体重100gあたりの重量の変化を示した。体重は餌を与える3日目まで徐々に低下しその後、直線的に増加を示した。体重に対する肝重量は3日目までは変化しないが、その後5日まで増加し、ふたたび6日目よりほぼ直線的に増加した。この6日目あたりの肝重量の伸びの低下は糖質の代謝活性とほぼ符合していた。

図2はヒナの成長に伴う解糖系の変動を示した。この肝解糖系活性の変動は3日目まで、6日目まで8日以後というように段階的に上昇した。これはヒナの、外環境である餌中の糖質に対するふ化後の適応の仕方を示すものと考えられる。

図3は鶏肝ヘキソキナーゼ活性のグルコース濃度についての Lineweaver-Burk プロットを示したものである。図3が示すように鶏肝ヘキソキナーゼの $K_m$ 値は、0.102 mMでありラットのヘキソキナーゼの約  $1/10$  の基質親和性をもつことが分かった。鶏にはこの図が

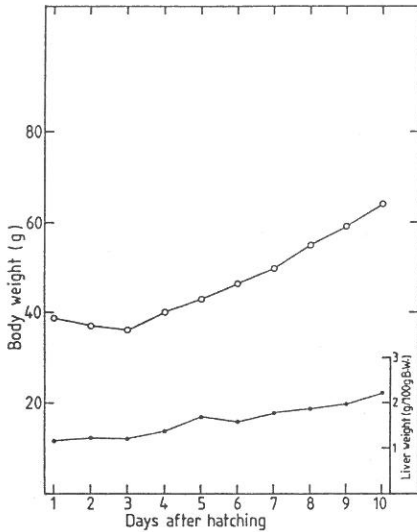


Fig. 1. Changes in body and relative liver weights after hatching. Open circles: Change in body weight. Filled circles: Change in relative liver weight.

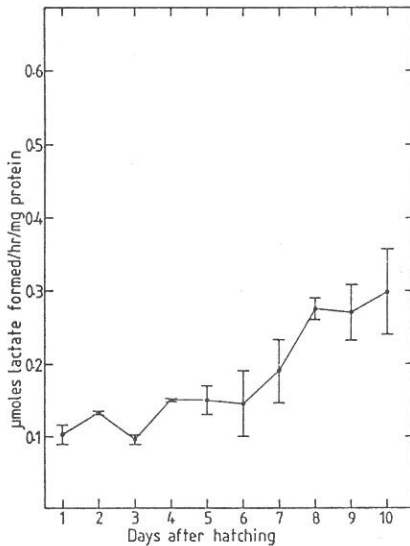


Fig. 2. Development of glycolysis in liver, after hatching.

示すようにグルコースに対する $K_m$ 値が高いグルコキナーゼは存在しなかった。図4はヒナの成長に伴う肝ヘキソキナーゼの活性変動を示した。肝ヘキソキナー

ゼは肝解糖系の場合とは異なり、4日目にはほぼ10日目の活性に上昇し7日目までにやや低下しその後また活性が回復することが分かった。したがって肝ヘキソキナーゼ活性は、肝解糖系の変動とは必ずしも一致しなかった。またふ化後10日目までにはグルコキナーゼと思われる活性は認められなかった。

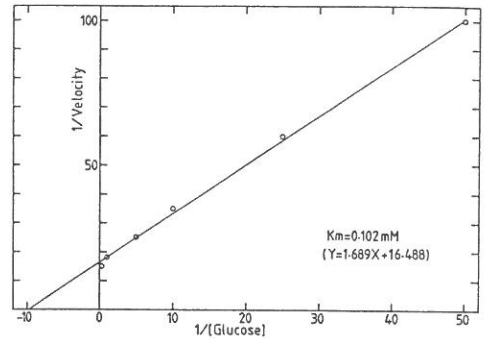


Fig. 3. Relationship between reciprocal of glucose concentration and reciprocal of its velocity of phosphorylation by hexokinase.

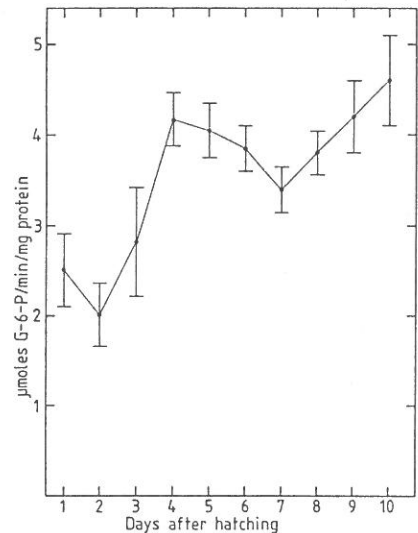


Fig. 4. Development of hexokinase in liver, after hatching.

## 考 察

糖質は地球上でもっとも多量に存在するエネルギー源である。従ってふ化直後のヒナがどのように餌中の糖質に適応していくかは興味ある点である。本報告で

みられたように、ふ化直後の鶏ヒナのヘキソキナーゼ活性は餌を与え始めた次の日からほぼ10日目の活性に上昇した。しかし解糖系の活性は解糖系の初発段階であるヘキソキナーゼ活性とは平行せず段階的に上昇した。ラットではWeinhouse<sup>1)</sup>らWalker<sup>6)</sup>らおよびSolsらによりKm値の高いヘキソキナーゼの存在が示されグルコキナーゼとなづけられた。鶏の肝ヘキソキナーゼのKm値は0.102 mMでラットのグルコキナーゼ(Km = 10 mM)とラットのヘキソキナーゼ(Km = 0.01 mM)の中間の基質親和性を示した。グルコキナーゼの進化を考える上で興味ある知見である<sup>2)</sup>グルコキナーゼは膵臓ランゲルハンス島β細胞ならびに肝臓のみに見出されている<sup>8)</sup>最近MagnusonとSheltonは肝と膵β細胞グルコキナーゼの調節メカニズムの違いを研究し両遺伝子が互いに異なるプロモーターを用いていることを明らかにした<sup>9)</sup>そして別のRNA スプライス部位が用

いられているので酵素たん白質の分子量が肝で52087, β細胞で50066 Daとなることを示した。また成熟動物では肝グルコキナーゼは主にインシュリンとグルコースにより維持され、遺伝子転写の段階で作用すると考えられている。しかし成長途上では甲状腺ホルモンおよびグルココルチコイドも関与しているといわれておりその遺伝子レベルの変化が興味ある点である。このように成長途上では酵素の発現機構が成熟動物と異なる可能性がある。鶏などの鳥類はふ化後すぐに餌を食べ始めるので栄養素の遺伝子発現への影響を解析することは、ほ乳動物より容易であるかもしれない。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、数々のご指導を賜りました、徳島大学医学部栄養化学教室、名取靖雄教授に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Sols, A., Salas, M. and Viñuela, E.: Induced biosynthesis of liver glucokinase. *Advances in Enzyme Regulation*, 2, 177-188, 1964.
- 2) Lea, M. and Weber, G.: Role of enzyme in homeostasis. VIII Inhibition of the activity of glycolytic enzymes by free fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 243, 1096-1102, 1968.
- 3) Hohorst, H. J.: L-(+)-lactate determination with lactic dehydrogenase and DPN. p.266-270 in *Methods of Enzymatic Analysis* (H. U. Bergmeyer, ed.), Academic Press, New York (1965).
- 4) DiPietro, D. L. and Weinhouse, S.: Hepatic glucokinase in the fed, fasted, and alloxan-diabetic rats. *J. Biol. Chem.*, 235, 2542-2545, 1960.
- 5) Gornall, A. G., Bardawill, C. S., and David, M. M.: Determination of serum proteins by means of biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 117, 751-766, 1949.
- 6) Walker, D. G. and Parry, M. J.: Glucokinase I. Liver, p.381-388, in *Methods in Enzymology vol. IX*, (Wood W. A. ed.), Academic Press, New York and London, (1966).
- 7) Lawrence, G. M. and Trayer, I. P.: Hexokinase isoenzymes: Antigenic cross-reactivities and amino acid compositional relatedness. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79B, 233-238, 1984.
- 8) Magnuson, M. A., Andreone, T. L., Printz, R. L., Koch, S. and Granner, D. K.: Rat glucokinase gene: Structure and regulation by insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 4838-4842, 1989.
- 9) Magnuson, M. A. and Shelton, K. D.: An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic β-cell. *J. Biol. Chem.*, 264, 15936-15942, 1989.

平成3年3月25日受付

平成3年5月16日受理