HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	血液の解糖作用に及ぼす温度の影響
Author(s)	竹原, 一郎
Citation	低温科學. 生物篇, 16, 77-82
Issue Date	1958-12-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17610
Type	departmental bulletin paper
File Information	16_p77-82.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Ichiro TAKEHARA 1958 Effect of Temperature on Glycolysis of Rabbit Blood. *Low Temperature Science, Ser. B, 16.* (With English résumé p. 81)

血液の解糖作用に及ぼす温度の影響*

竹　原　一　郎
(低温科学研究所　生物学部門)

(昭和 33 年 7 月受理)

I. まえがき

前に，過冷却状態 (−5°C) で保存した血液の解糖作用を，通常の +5°C で保存した血液のそれと比較し，その結果を報告した[1]。その中で，保存温度によつて生ずる顕著な相異は，第一に −5°C で，保存血の焦性ブドー酸は保存最初の 1 週間に急速に減少し，その後又，徐々に増加する。一方 +5°C では，この初めの減少は僅かしか起らないで，その後の増加の程度は −5°C の場合に比べはるかに著しいこと。第二に，保存 1 週間後，血液を 37°C で incubate すると，−5°C で保存した血液の乳酸生成速度，即ち解糖の活性が採血直後の血液の約 2 倍位増加する。しかし +5°C の保存血ではこのような増加は見られないことの 2 点であつた。これらの結果は，解糖作用の或る反応段階の活性化エネルギーが他の反応のそれに比べ非常に大きいか，或いは温度の低下に伴なつて，その活性化エネルギーが大きくなる反応段階があるとすれば，一応の説明が得られると考えた。ここでは，このような予想の下で行つた 2，3 の実験の結果について述べる。

II. 実験の方法

採血法，保存法，及び乳酸，焦性ブドー酸，ヘモグロビンの定量は前報[1]に同じ。酵素液は，血液を 0.9% の食塩水で 3〜4 回洗滌し，測定すべき酵素反応によつて，脱イオン水，0.4% nicotinamide 水溶液，又は 10^{-2} M Iodoacetc acid 水溶液を，大体初めの血液の容積になるまで加えて溶血し，遠心分離した後，上清の Haemolysate を用いた。

酵素活性は次に示す組成の反応混液で測定し，ヘモグロビンの単位量当りで表わした。

1) アルドラーゼ

HDP** (≒ 10^{-1} M)	0.1 cc
Hydrazine (0.56 M, pH 8.6)	0.2 cc
Tris-HCl 緩衝液 (0.2 M, pH 8.6)	0.7 cc
Haemolysate (10^{-2} M Iodoacetic acid で溶血)	1.0 cc

* 北海道大学低温科学研究所業績　第 439 号
** HDP: Fructose-1, 6-diphosphate

2) 3-PG*⟶焦性ブドー酸

3-PG* (≒ 2×10^{-2} M)	0.1 cc
$MgSO_4$ (0.1 M)	0.1 cc
KCl (2.0 M)	0.1 cc
Tris-HCl 緩衝液 (0.2 M, pH 7.5)	0.1 cc
Haemolysate (脱イオン水で溶血)	1.6 cc

3) HDP⟶乳酸

HDP (≒ 8×10^{-2} M)	0.2 cc
燐酸緩衝液 (0.2 M, pH 7.0)	0.2 cc
$MgCl_2$ (4×10^{-2} M)	0.2 cc
Haemolysate (0.4% nicotinamide で溶血)	1.4 cc

4) 焦性ブドー酸の還元

焦性ブドー酸 (≒ 4×10^{-2} M)	0.1 cc
HDP (≒ 10^{-1} M)	0.02 cc
NaF (4×10^{-2} M)	0.1 cc
arsenate (3×10^{-2} M, pH 7.5)	0.2 cc
Tris-HCl 緩衝液 (2×10^{-1} M, pH 7.5)	0.48 cc
DPN* (5.8 mM)	0.1 cc
Haemolysate (0.4% nicotinamide で溶血)	1.0 cc

酵素活性測定の温度範囲は大体 40°C から −5°C までで，ここで測定した氷点下での酵素活性の値は，すべて過冷却状態でのものである。反応混液の −5°C での過冷却は非常に安定している。−10°C でのそれは不安定であるが，時に過冷却状態を保つことも可能であつた。

III. 実験の結果と考察

先ず活性化エネルギーを調べたが，酵素活性の測定法その他の関係で，解糖の各段階の酵素について，その値を得ることは出来なかつた。従つて測定されたものは，第1表に示すように，幾つかの段階の酵素反応を含むものであるが，他に比べてはるかに大きな活性化エネルギーをもつ酵素反応があるかどうかという，この報文の目的は或る程度達せられると思う。

第1図Aにアルドラーゼを示したが

第1表 解糖作用の活性化エネルギー

反応系	活性化エネルギー (cal.)	温度範囲
血液*	21000	37°～−5°
HDP→乳酸	20000	30°～−10°
3-PG→焦性ブドー酸	14000～15000	30°～10°
	25000～28000	10°～−5°
焦性ブドー酸の還元	15000～18000	37°～−5°
アルドラーゼ	18000～21000	37°～−5.5°

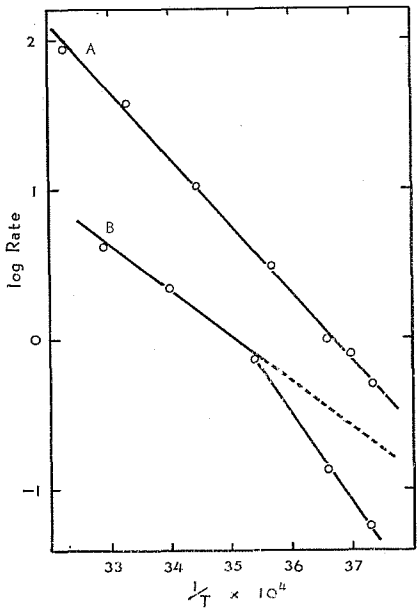
* 保存と同じ条件 (血液：ACD 液＝4：1)

* 3-PG： 3-Phosphoglycerate
DPN： Diphosphopyridine nucleotide

3-PG⟶焦性ブドー酸反応以外は何れも，測定した温度範囲で，Arrhenius の式

$$d\ln K/dT = \Delta H/RT^2$$

に従い，他の多くの例に見るような，低温で次第に活性化エネルギーが増大するということは起らなかつた。それら直線の傾斜から計算した活性化エネルギーは，15000 cal. から 20000 cal. 程度であつた。その中でアルドラーゼのそれが最も大きく，しかも血液そのままで得られた解糖作用全体の活性化エネルギーと大体一致している。このことは，アルドラーゼの turn-over number が，現在知られている限りでは，解糖の酵素の中最も小さい値であること，及びアルドラーゼ反応の平衡恒数が温度に非常に影響されることなどと関連して，解糖作用におけるアルドラーゼの役割を示す興味ある結果と思われる。



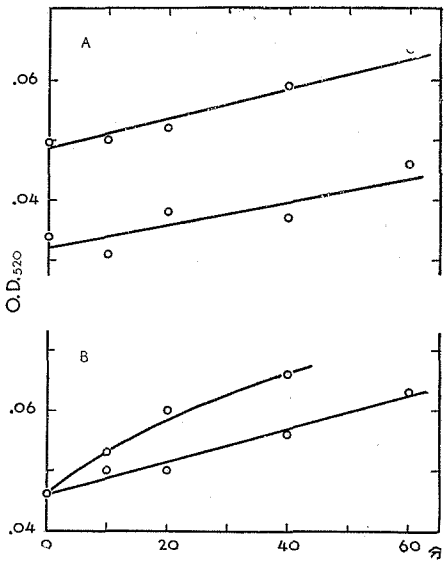
第1図　酵素活性に及ぼす温度の影響
A：アルドラーゼ
B：3-PG→焦性ブドー酸

一方第1図Bに見るように，3-PG⟶焦性ブドー酸の活性化エネルギーは +10°C あたりから大きく変化する。何故このようなことが起るかについてはここでは触れないが，この結果から，保存初期における焦性ブドー酸の急速な減少の原因は非常によく説明出来ると思う。即ち，焦性ブドー酸の還元反応は −5°C まで一定の活性化エネルギーをもつて進行するにも拘らず，焦性ブドー酸生成反応のそれは，上に見たように，+10°C 附近から約 10000 cal. も増大する。従つて血液を低温においた時，焦性ブドー酸の還元がその生成を上廻ることになつて，焦性ブドー酸が急速に減少するものと考えられる。しかしながら，3-PG⟶焦性ブドー酸の反応を含む HDP⟶乳酸，及び解糖作用全体の活性化エネルギーが，同じ温度範囲で一定であるところを見ると，このような一部分の活性化エネルギーの増大は，解糖反応全体のそれには全く影響しないようである。活性化エネルギーは反応の条件に非常に影響される事実[2),3),4),5)]からすれば，ここで見たような 3-PG ⟶焦性ブドー酸の活性化エネルギーの変化は intact の血球内で起つていないとも考えられる。或いは，系全体の温度係数が，最も大きな活性化エネルギーをもつ反応によつて決定されるものではないという[6)]ことの為とも思われるが，何れにしても，低温でどうしてこのような活性化エネルギーの大きな変化が起るかという点を明らかにしなければ，決定的なことは言われない。

又前報[1)]で，低温において或る酵素の活性化エネルギーが増すと，そこで中間体の蓄積が起り，血液を 37°C で incubate した時，それが急速に代謝されて，解糖の活性が一時的に増大

すると考えたが，今までに行つたペーパークロマトグラフィーによる定性的な検索の結果では中間体の存在は認められていない。しかし，それが全く起らないかどうかは未だ検討の余地があるものと思われる。例えば，第2図に示す実験の結果はそれを暗示しているように思う。

3-PG⟶焦性ブドー酸の反応混液に基質である3-PGを加えなくとも，焦性ブドー酸の生成は僅か起る。今 −5°C と +5°C に1週間保存した血液について，この基質を加えない場合の焦性ブドー酸生成の活性を比較して見ると，第2図から明らかなように，−5°C の保存血ではその活性が保存前の2〜3倍増加している。しかし +5°C の保存血ではこの活性の増加は見られない。これは −5°C が +5°C に比べ反応速度がより大きく低下するから，保存中に中間体の蓄積が起り，それが基質となるため反応速度が一時的に増大すると考えられる。同じ現象は保存血をそのまま incubate した時にも見られるが，実際にそれが中間体の蓄積によるものかどうかは更に検討して見なければならない。



第2図　基質無添加の場合の焦性ブドー酸生成に及ぼす保存温度の影響

A：+5°C，1週間保存
B：−5°C，1週間保存
夫々下の曲線は保存前の対照
横軸は 30°C における incubation 時間
縦軸は焦性ブドー酸定量の吸光度

次に血液を −5°C で保存中，解糖の或る段階の酵素活性に変化が起きないかどうかを調べた。第2表に示すように，アルドラーゼと焦性ブドー酸還元の活性には殆んど変化がないが，3-PG⟶焦性ブドー酸の活性は約1.5倍増加する。しかし +5°C で保存した血液でも −5°C のそれをやや上廻る活性の増加が見られ，保存温度による相異は起らない。

第2表　保存前後の酵素活性の変化

	1週間保存後の活性 / 保存前の活性	
	保存温度 −5°C	保存温度 +5°C
アルドラーゼ	1.2	—
	0.99	—
焦性ブドー酸の還元	1.27	—
	1.05	—
	0.9	—
3-PG→焦性ブドー酸	1.54	
	1.44	1.68
	1.76	1.80

以上述べた結果から，−5°C 1週間保存の血液に起る解糖の活性増大を説明することは出来なかつたが，測定した活性化エネルギーの中，3-PG⟶焦性ブドー酸の反応だけが低温で増大すること。しかも同じ反応が保存中にその活性を増すことは，低温で血球内に代謝の不均衡の起る可能性を暗示する興味ある結果と思う。

摘　要

解糖作用の活性化エネルギーと保存中の酵素活性の変化を幾つかの段階で測定した。解糖作用全体，HDP⟶乳酸，アルドラーゼ，及び焦性ブドー酸の還元反応の活性化エネルギーは測定した温度範囲 (40°～－5°C) で Arrhenius の式に従い，夫々 21000 cal., 20000 cal., 18000～21000 cal., 15000～18000 cal. であつた。しかし 3-PG⟶焦性ブドー酸の反応のみは，大体＋10°C より温度が低くなると Arrhenius の式から大きく離れる。そして，その活性化エネルギーは，30°～10°C の温度範囲で 14000～15000 cal. であり，10°～－5°C の間では 25000～28000 cal. であつた。

保存中の酵素活性の中，アルドラーゼと焦性ブドー酸の還元反応は，－5°C 1 週間では，殆んどその活性に変化はないが，3-PG⟶焦性ブドー酸の反応は，－5°C でも＋5°C でも，1.5～1.8 倍の増加を示した。

以上の結果から前報の一部を説明した。

御指導くださつた青木先生，御校閲くださつた朝比奈先生に感謝する。

文　献

1) 竹原一郎 1956 氷点下におけるウサギの血液の解糖作用. 低温科学, 生物篇, ***14***, 37.
2) Kistiakowsky, G. B. and R. Lumry 1949 Anomalous temperature effects in the hydrolysis of urea by urease. J. Am. Chem. Soc., ***71***, 2006.
3) Malmström, B. G. 1955 The temperature dependence of the enolase reaction with different activating metal ions. Biochim. Biophys. Acta, ***18***, 285.
4) Westhead, E. W. and B. G. Malmström 1957 The temperature dependence of the alkaline-phosphatase reaction in mixed solvents. Biochim. Biophys. Acta, ***26***, 202.
5) Westhead, E. W. and B. G. Malmström 1957 The chemical kinetics of the enolase reaction with special reference to the use of mixed solvents. J. Biol. Chem., ***222***, 655.
6) Bull, H. B. 1951 Physical Biochemistry. John Wiley & Sons (New York).

Résumé

In previous experiments, it was found that a rapid fall in pyruvate occured during the lst week of storage at －5°C and that, when returned to 37°C, the glycolytic activity of 7-day-old blood preserved at －5°C was about twice as great as that of fresh blood. In order to interpret these results, the activation energies of the glycolytic enzymes as well as the change of the enzyme activities during the storage were examined.

For reaction of whole blood glycolysis, HDP⟶lactate, pyruvate reduction, and of aldolase, the Arrhenius plots were linear within the temperature range from ＋40°C to －5°C and the activition energies calculated from these slopes were 21000 cal., 20000 cal., 15000–18000 cal., and 18000–21000 cal., respectively. In the case of 3-PG⟶pyruvate

reaction, on the contrary, application of the Arrhenius equation gave rise to non-linear plot indicating increasing activation energies as the temperature was lowered. The activation energy was 14000–15000 cal. within the temperature range from +30°C to +10°C, and 25000–28000 cal. within +10°C to −5°C.

After a week of storage at −5°C as well as at +5°C, 3-PG⟶pyruvate reaction activity was 1.4–1.8 times as great as that of fresh blood, but at −5°C storage, the activity of pyruvate reduction and of aldolase was unchangeable.

From these result, a possible interpretation was offered about the rapid decrease of pyruvate during the storage at −5°C. No pertinent explanation could, however, be put upon the enhancement of glycolytic activity of 7-day-old blood preserved at −5°C.