

網赤血球の成熟過程におけるエネルギー代謝の変換

第二編

網赤血球の成熟過程におけるエネルギー代謝とヌクレオチド代謝の関係

岡山大学医学部病理学教室 (指導 妹尾左知丸教授)

林 健 二

〔昭和43年1月10日受稿〕

哺乳類網赤血球は生理的に核の脱出を起した赤芽球の細胞質であり、赤芽球乃至一般の細胞の細胞質にみられる全ての細胞質内小器官を有しDNA, RNAの新たな合成は行われぬ^{1,2)}までも、蛋白合成(ヘモグロビン合成)^{3,4)}、エネルギー代謝^{5,6)}等の代謝は十分行われている。然し網赤血球の成熟と共にこれらの全ての細胞質内オルガネラは消失し、これらのオルガネラに依存する全ての機能が失われる。即ちこの核を失った細胞質は所謂成熟と云うその代謝系に画期的な変換が行われる。之等の中エネルギー代謝に関する最も大きな変化はミトコンドリアの崩壊消失に伴う呼吸系、TCA サイクルの消失であり、酸化的磷酸化反応は失われてエネルギー代謝は専ら解糖系へと大きな変換を起す⁷⁾。之等の現象は核の支配を離れた細胞質の運命と伝う問題と共に cell differentiation と specialization の mechanism という観点からも非常に興味ある又重要な問題を含んでいる。網赤血球の成熟過程におけるエネルギー代謝に関しては、例えば O₂ uptake は細胞の好塩性に平行しているという Warburg の研究⁸⁾ 以来、解糖系の諸酵素、TCA サイクルの諸酵素、呼吸系酵素等は次第に低下し^{7,9)}、glycine, formate 等の低分子化合物からの purine 核の de novo 合成能も低下することが報告されている^{10,11,12)}。一方成熟赤血球のエネルギー代謝に関しては例えば Bishop¹³⁾、Lachhein et al.¹⁴⁾ は保存血において glucose を除くと hypoxanthine が生成することを報告し、同様な報告は網赤血球においても Schweiger et al.¹⁵⁾、Miyahara et al.¹⁶⁾ 等によつてもなされている。又赤血球の解糖について Tsuboi¹⁷⁾ は解糖の速度が細胞の adenine nucleotide level と平行している事を、また Nakao et al.¹⁸⁾ は adenine 存在下で inosine を加えると解糖の速度が速くなることを報告している。ま

た Lowy et al.¹⁹⁾、Whittam²⁰⁾、Gabario et al.²¹⁾ は inosine 等の nucleotides は glucose の代りに解糖系の基質として有効である事を報告して居り、成熟赤血球の解糖系はその nucleotide 代謝と密接な関係があることが示唆されている。著者は第一編²²⁾において、網赤血球の成熟過程では nucleotide level が次第に低下して hypoxanthine が生成され、この反応はミトコンドリアを block する agents で更に促進されることを報告しエネルギー代謝と nucleotide 代謝が密接な関係がある事を報告した。

本編においては更にこの二者の代謝系の関係を明らかにし、網赤血球の成熟過程において全 nucleotides の大部分を占める adenine nucleotides が次第に分解減少していく途中で、その pentose 部分が glucose と同様に有効に解糖系の基質として再利用されていく事を明らかにし、またこの過程はいかなる mechanism によつて起つているのかについて考察を加えた。

実験材料及び実験方法

網赤血球の preparation および incubation の方法：実験に供する網赤血球の preparation 並びに incubation の方法は第一編に報告した方法²²⁾ に準じて行われた。但し incubation のための cell suspension の構成は washed and packed cell 1 容に対し正常家兎血清 1 容、及び 8 容の塩類溶液 (90 mM NaCl, 700 μM KCl, 150 μM CaCl₂, 91 μM MgCl₂, 20 mM phosphate buffer, pH 7.40 を含む) の割合であつた。また基質実験のための基質には glucose, adenosine-5'-phosphate (ADP), inosine-5'-monophosphate (IMP), inosine, ribose-5-phosphate (R-5-P) 及び hypoxanthine を用いた。また呼吸阻害剤として antimycin A, amytal, 酸化的磷酸化反応の共駆阻害

剤として 2,4-dinitrophenol (2,4-DNP), 阻害剤として oligomycin を用い, それらの解糖系中間代謝物の変化に対する影響をみた。

実験結果の分析法: 第一編において記載した如く 37°C で incubate した後各実験群の incubation mixture 0.5ml を分離し, 網赤血球の成熟, RNA の変化は前報の方法²²⁾により, U-V absorbing materials の変化は 260 m μ における吸収の変化により追跡した。

解糖系中間代謝物の変化については, glucose とその磷酸化合物及び fructose とその磷酸化合物は anthrone reaction²³⁾ によつて, inosine, R-5-P 等の pentose 化合物は orcinol 反応²³⁾ によつて, また乳酸は Barker and Summerson の方法²⁴⁾ によつて測定し, 夫々の incubation 前の値と incubation 後の値を計算しそれらの差を per ml cell suspension で現した。

実験結果

網赤血球の成熟の途中で, 人為的にミトコンドリアの機能を種々の呼吸阻害剤や共軛阻害剤等で阻止した場合, Fig. 1, Fig. 2 に示される様に nucleotide 代謝並に解糖系に多大の変化をひきおこした。nucleotide 代謝に対する影響は Fig. 1 に示される如く, 阻害剤が存在しない場合には U-V absorbing materials 含量は増加し, また pentose 化合物が増加するにもかかわらず, 阻害剤を加えて incubate した場合には U-V absorbing materials, pentose 化合物は著明に減少し Hypoxanthine が多量に蓄積して E252/E262 が増した¹⁶⁾。また解糖系に対するこれら agents の作用は Fig. 2 に示される如く阻害剤を加えない control の場合の glucose 消費量 (1.12 m moles/ml cell suspension) を 100% とすると呼吸阻害剤や共軛阻害剤を加えて incubate した全ての場

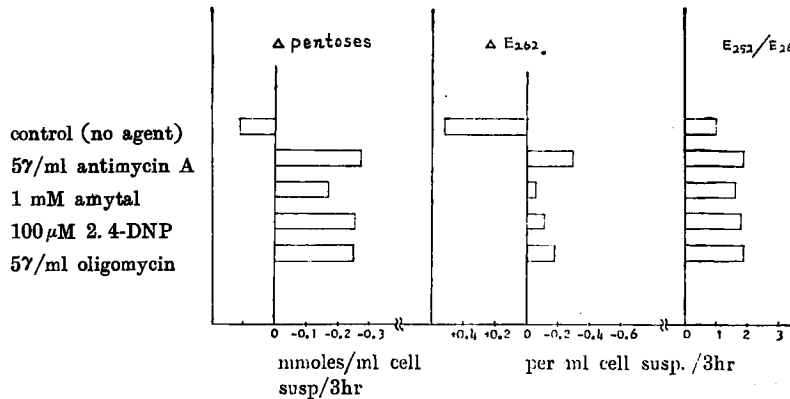
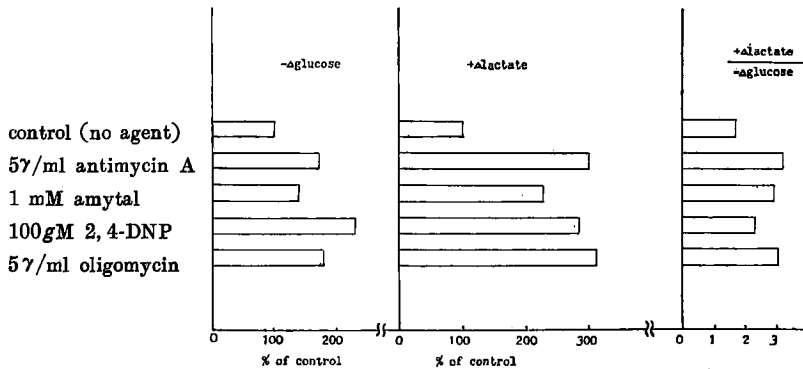


Fig. 1. Effects of respiratory inhibitors and uncouplers for oxidative phosphorylation on the nucleotide metabolism by rabbit reticulocyte suspension (RC: 80% of whole red cells) *in vitro*



Eig. 2. Effects of respiratory inhibitors and uncouplers for oxidative phosphorylation on the glycolysis by rabbit reticulocyte suspension (RC; 79% of whole red cells) *in vitro*
cell counts: $71 \times 10^4 / \text{mm}^3$ incubation mixture. HK=9%

合において glucose 消費量は 150~230% まで増加した。乳酸生成量は control の場合 (2m moles/ml cell suspension) を 100% とした時, 阻害剤を加えて incubate したものでは約 200~300% に増加し著しい解糖速度の促進が起つた。この場合における生成乳酸量に対する消費された glucose の比は, control では約 1.7 であるが, 呼吸阻害剤, 共軛阻害剤を加えたものでは, 2.2~3 となり, glucose 以外の物質からも乳酸が生成されている事が示唆された。そしてこの場合, Fig. 1 に示されている様にこれら agents で U-V-absorbing 物質及び pentose 化合物が active に代謝されている事からこれら nucleotides の pentose 部分から乳酸が生成されている事が示唆された。

そこで種々の nucleotides, nucleoside, Ribose-5-phosphate 等の pentose 化合物を網赤血球の suspension に添加し glucose を添加して incubate した場合の網赤血球の成熟と乳酸生成を比較した。その結果は Table I に示される如く, glucose の代りに ADP 加えて incubate したものでは, RNA の減少, 乳酸生成共に energy 源を全く加えなかつたものと殆んど同じで, 外から加えた ADP そのものは glucose に代り得なかつた。R-5-P は cell suspension から減少していくが 3 時間の incubation では ADP と同様殆んど energy 源として利用されなかつた。ところ

が IMP, inosine を加えたものでは, それら化合物の pentose 部分は active に代謝され RNA の減少, 乳酸生成が著明に増大し, 特に inosine を添加したものは, glucose を添加したものよりも RNA の減少, 乳酸生成共に大であつた。そこで網赤血球の成熟及び乳酸生成能を glucose 存在下と inosine 存在下とで比較すると Table II に示される様な結果を得た。即ち一定量の glucose 存在下において添加する inosine の濃度を変えても, また逆に一定濃度の inosine の存在下で添加する glucose の濃度を変えても, 乳酸生成並びに RNA の減少は殆んど変わらず, 網赤血球は inosine の pentose 部分も glucose もほぼ同等に網赤血球の成熟過程におけるエネルギー源として利用される事が明らかにされた。しかしこの場合 inosine の pentose 部分の消費量は共存する glucose 量が多ければそれだけ減少し, 逆に glucose の消費量は inosine の濃度が高くなつてもあまり影響を受けなかつた。また fructose レベルは添加する inosine の濃度が高くなると増大し, 添加した glucose によつては変化しなかつた。glucose と inosine がほぼ同濃度に共存する系に antimycin A を加えて incubate し, そのミトコンドリアの機能を block して人為的に解糖だけを行う成熟赤血球の代謝系と同一条件にした場合, RNA の減少は阻害されたが

Table 1. The metabolism of adenine nucleotides and its decomposed compounds and RNA degradation by reticulocyte suspension (RC: 86% of whole red cells) *in vitro*

The data show the changes during 3 hr-incubation at 37°C. Cell counts; 66×10^4 per mm^3 incubation mixture, Hk (hematokrit); 9%

substrate added	incub. time (hr)	Δ glucoses (mmoles/ml cell susp.)	Δ fructoses (mmoles/ml cell susp.)	Δ pentoses (mmoles/ml cell susp.)	+ Δ lactate (mmoles/ml cell susp.)	- Δ RNA ($\mu\text{g}/\text{ml}$ cell susp.)
none	1	-0.174	-0.565	+0.070	0.373	13.7
	2	-0.392		+0.116	0.607	31.0
	3	-0.592	+0.170	+0.179	0.706	43.7
5 mM ADP	1		+0.171	+0.100	0.070	9.4
	2	+0.150	-0.168		0.373	21.2
	3	+0.004	-0.027	+0.230	0.583	
6 mM IMP	1	+0.125	-0.414	-0.210	0.583	18.9
	2	-0.111	-0.358	-0.540	1.053	32.5
	3	-0.323	-0.230	-0.650	1.381	55.7
5 mM inosine	1		+0.161	-0.200	0.884	13.7
	2	-0.130	+0.217	-0.479	1.381	34.2
	3		+0.199	-0.640	1.826	59.2
5 mM R5P	1	-0.198	-0.019	-0.185	0.491	12.2
	2	-0.280	+0.104	-0.200	0.583	29.2
	3	-0.457	+0.047	-0.400		44.7
5 mM glucose	1		-0.427	+0.017	0.443	20.2
	2	-1.170	-0.565	+0.123	1.053	41.7
	3	-2.32	-0.565	+0.182	1.521	57.2

Table 2. The effects of inosine and glucose on the lactic acid formation and reticulocyte maturation (RC; 67.1% of whole cells) *in vitro*

The data show the changes during 3 hr incubation at 37°C. Cell counts: $72 \times 10^4/\text{mm}^3$ incubation mixture, Hk=8.5%

glucose conc (mM)	inosine conc (mM)	Δ glucose mmoles/ml cell susp.	Δ fructose mmoles/ml cell susp.	Δ pentose mmoles/ml cell susp.	+ Δ lactate mmoles/ml cell susp.	- Δ RNA $\mu\text{g}/\text{ml}$ cell susp.
3.50	10.98	-1.06	+1.61	-0.37	3.62	13.0
3.50	5.98	-1.07	+0.76	-1.00	3.64	14.0
3.50	3.48		+0.38	-0.70	3.81	14.1
3.50	0.98	-1.14	0.0	-0.50	3.45	15.5
11.00	5.98	-1.14	+0.65	-0.17	3.81	14.1
6.00	5.98	-1.16	+0.69	-0.47	3.72	13.0
2.00	5.98	-1.29	+0.72	-0.91	3.90	13.0
1.00	5.98	-0.39	+0.79	-0.95	3.90	15.0
1.00	0.98	-0.50	-0.03	-0.41	2.29	12.0
* 6.00	5.68	-2.01	+0.55	-1.42	8.52	9.8

* The cell suspension was contained 5 γ /ml antimycin A.

Table 3. The competition of glucose and inosine in their consumption and lactic acid formation by mature red cells *in vitro*.

The data show the changes during 3 hr-incubation at 37°C. Cell counts; 117×10^4 per mm^3 incubation mixture, Hk; 9%

glucose conc. (mM)	inosine conc. (mM)	Δ glucoses (mmoles/ml cell susp.)	Δ fructoses (mmoles/ml cell susp.)	Δ pentoses (mmoles/ml cell susp.)	+ Δ lactate (mmoles/ml cell susp.)
4.1	10.9	-0.33	+0.86	-2.56	2.65
4.1	5.9		+0.42	-1.54	2.60
4.1	1.9	-0.47	-0.40	-1.25	1.34
4.1	0.9	-0.59	-0.80	-0.29	1.24
6.6	5.9	-0.93	+0.46	-1.26	2.54
4.1	5.9		+0.44	-1.35	2.33
1.7	5.9	-0.46	+0.42	-1.85	2.47
1.6	5.9	-0.44	+0.41	-1.71	2.62

glucose 消費量は約 2 倍に増加し, inosine の pentose 部分の消費量は glucose のそれよりも高く約 3 倍に増加した。またこの時の乳酸生成量は 2.3 倍に増加した。一方ミトコンドリアが完全に消失し, 解糖だけ行う成熟赤血球についての glucose と inosine を添加した時のエネルギー代謝は Table III に示される様に, 乳酸生成量は一定濃度の glucose が存在していても inosine を加えると更に乳酸生成量は増加

するが, 逆に一定濃度の inosine 存在下で更に添加する glucose の濃度を上げて増加しなかつた。またその時の両基質の競争的消費は網赤血球の場合と異つて, glucose 消費量は同時に添加する inosine の濃度を高くすると減少し, 逆に inosine の消費量は glucose 濃度が高くなると阻害された。

考 察

著者は第一編で網赤血球の成熟過程では次第に酸溶性 nucleotides が減少するがその中でも主に ATP level が次第に低下すると共に hypoxanthine の蓄積が起り, この現象はミトコンドリアの機能を block する agents, 例えば, antimycin A, 2,4-dinitrophenol で更に促進されることを報告した。そしてこれらの現象から網赤血球の成熟に伴つて起る nucleotides の減少はミトコンドリアの機能の漸次的な低下によつて excess の purine nucleotides が分解して hypoxanthine になる事が示唆された。

本編において網赤血球の成熟過程で次第に分解減少する nucleotides, 主として purine nucleotides は hypoxanthine になり残りの pentose 部分はその成熟過程で glucose と殆んど同様に解糖系の基質として有効に再利用されることが明らかとなつた。また purine nucleotides が成熟赤血球の乳酸生成の基質になり得るとい報告は Lowy et al.¹⁹⁾, Gabrio et al.²¹⁾, Whittam²⁰⁾, Lionetti et al.²⁵⁾等によつてなされているが, この事実は成熟赤血球ばかりでなく網赤血球

でも行われることが証明された。

Fig. 1, 及び Fig. 2 において網赤血球の成熟過程でまだミトコンドリアが active に働いている時期に人為的にミトコンドリアでの ATP 合成を block する様な種々の呼吸阻害剤や共転阻害剤を加えて incubate すると $+\Delta$ lactate/ $-\Delta$ glucose ratio が増大すると共に ATP, ADP, AMP 等の nucleotides の分解が起り hypoxanthine の生成が促進されるがその時 release される pentose は蓄積しないで著明に消費され乳酸の生成を伴う事からも上記のことは十分に推定されるところである。この事実は antimycin A 等で呼吸を阻害した場合、細胞はミトコンドリアで合成できなくなった ATP を解糖系でかせぐべく解糖の速度が早くなると考えられ、Table 2 及び 3 に示される如く非常に利用され易い nucleotides の pentose 部分を解糖系の基質として利用するものと考えられる。また外から加えた種々の nucleotides, nucleosides, pentose が glucose の代わりに energy 代謝の基質になり得るか否かの実験は Table I に示される如く IMP, inosine は非常に有効に網赤血球の成熟並びに乳酸生成に利用されたが、ADP, AMP, R-5-P は殆んど利用されなかつた。しかしこれらの利用されなかつた物質は、真に利用されていないのではなく、これら磷酸化合物は中尾によつて報告されている²⁰⁾ 如く細胞内にどり込まれにくいためであるとも考えられる。

nucleotides の分解経路に関与する諸々の酵素については全て現在まで成熟赤血球を用いて報告されて居り^{27,28)}、網赤血球の成熟過程に伴つて減少する nucleotides も成熟赤血球の場合と同様な分解経路をとるものと考えられ、purine nucleotides からの hexose-phosphate, triose-phosphate の合成は、adenylic acid deaminase^{29,30)}、5'-nucleotidase, purine nucleoside phosphorylase^{31,32)}、phosphoribomutase³³⁾、ribose-5-phosphate isomerase³⁴⁾、ribose-5-phosphate-3-epimerase³⁵⁾、transketolase^{36,37)}、transaldolase³⁶⁾ によつて媒介されると考えられる。

網赤血球の成熟過程に伴う nucleotides の分解減少の mechanism は次の様に考えられ、即ちこの過程はミトコンドリアの漸次的な分解が起り呼吸能の低下と共に相対的に解糖能が増大していく過程であるので、解糖系による乳酸の生成は次第に増加してくる。この乳酸の生成能が漸次的に増大するにつれて起る pH の酸性側への移行は解糖系の hexokinase に比べて、adenylic acid から pentose サイ

クルの間に介在する種々の酵素の optimum pH が酸性側にある事を考える時、網赤血球の成熟に伴つて起る相対的な乳酸生成による pH の低下は purine nucleotides, nucleosides の分解を促進させるであろうという事は十分に考えられるところである。

Table 1, 2 及び 3 に示された如く inosine の pentose 部分は、極めて有効に energy 源として利用されるので網赤血球の成熟に伴う乳酸生成能の相対的な増大による pH の低下は、生理的な範囲内で pH が低下すればするだけ、glucose を分解する hexokinase 反応の速度を低下させ、一方では purine nucleotides の分解を促進させ、それによつて release される pentose-phosphate は極めて active に代謝されて乳酸生成に関与するようになると考えられる。(Table 2 及び 3)

上記の様な考察は Overgaard-Hansen の Ehrlich ascites tumor cell suspension に glucose を加えた場合呼吸が一過性に低下するが、それは glucose 添加による hexokinase 反応の活性化によつて生成される H⁺ によつて pH が低下し、この pH の低下が nucleotides を hypoxanthine まで分解する反応を活性化するという報告³⁸⁾ によつて支持される。また Dishe et al.³⁹⁾、Bishop^{40,41)} 等の保存血における ATP level の低下が乳酸生成による pH の低下に原因するという報告によつても支持される。

結 論

1. 家兎網赤血球の成熟過程における酸溶性 nucleotides 代謝と energy 代謝との関係を追求し次の様な結論を得た。
2. 網赤血球の成熟に伴つて起る酸溶性 nucleotides の分解は呼吸阻害剤である antimycin A, amytal, 酸化的磷酸化反応の共転阻害剤である 2,4-dinitrophenol, oligomycin 等によつて促進される。
3. この様な条件下においては hypoxanthine の蓄積が増大するが release された pentose-phosphate は active に代謝されて乳酸を生成する。
4. 網赤血球の成熟、RNA の減少、乳酸は glucose の代わりに外から inosine monophosphate や inosine を加えると極めて活発に亢進する。しかし、adenosine diphosphate や ribose-5-phosphate はこの様な反応には直接関与しなかつた。
5. 網赤血球の成熟に伴う酸溶性 purine nucleotides はその分解の途中で遊離された pentose phosphate が glucose よりも active に解糖系の基質とし

て利用される様になる。

稿を終るに臨み、御こん切なる御指導、御校閲を

賜った恩師妹尾左知丸教授に深甚の謝意を捧げます。また本実験に際して常に御厚意ある御指導、御協力をいただいた宮原正信助手に深甚の謝意を捧げます。

文 献

- 1) Pinheiro, P., Leblond, C. P. and Droz, B.: Synthetic capacity of reticulocytes as shown by radioautography after incubation with lebled precursors of protein and RNA. *Exptl. Cell Res.*, **31**, 517, 1963.
- 2) Seno, S., Miyahara, M., Ochi, O., Matsuoga, K., Toyama, Y. and Shibata, T.: Does reticulocyte synthesize RNA? *Acta Med. Oayama*, **17**, 253, 1963.
- 3) Holloway, B. W. and Ripley, S. H.: Nucleic acid content of reticulocytes and its relation to uptake of radioactive leucine *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **196**, 695, 1952.
- 4) Rabinovitz, M. and Olson, M. E.: Evidence for a ribonucleoprotein intermediate in the synthesis of globin by reticulocytes. *Exptl. Cell Res.*, **10**, 747, 1955.
- 5) Spicer, S. S., Hannah, C. H. and Clark, A. M.: Studies *in vitro* on methemoglobin reduction in dog erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **177**, 217, 1949.
- 6) Hofmann, E. C. G. and Rapoport, S.: Der Einfluss der Hämolyse auf die Atmung von Reticulocyten. *Biochem. Z.*, **326**, 499, 1955.
- 7) Rubinstein, D., Ottolenghi, P. and Denstedt, O. F.: The metabolism of the erythrocyte. XIII. Enzyme activity in the reticulocyte. *Can. J. Biochem., Physiol.*, **34**, 222, 1956.
- 8) Warburg, O., Kubowitz, F. and Christian, W.: Über die Wirkung von Phenylhydroxyamin auf den Stoffwechsel der roten Blutzellen. *Biochem. Z.*, **242**, 170, 1931.
- 9) Tada, K., Watanabe, Y. and Fujiwara, T.: The enzyme activities and coenzyme contents in the reticulocytes of rabbits. *Tohoku J. Expt. Med.*, **75**, 384, 1961.
- 10) Lowy, B. A. and Williams, M. K.: The presence of a limited portion of the path way *de novo* purine nucleotide biosynthesis in the rabbit erythrocyte *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **235**, 2924, 1960.
- 11) Lowy, B. A., Cook, J. L. and London, I. M.: The biosynthesis of purine nucleotide *de novo* in the rabbit reticulocytes *in vitro*. *I. Biol. Chem.*, **236**, 1442, 1961.
- 12) Lowy, B. A., Williams, M. K. and London, I. M.: Enzymatic deficiencies of purin nucleotide synthesis in the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1622.
- 13) Bishop, C.: Factors in the *in vitro* maintenance of the nucleotide pattern of whole human blood. *Transfusion*, **1**, 355, 1961.
- 14) Lachhein, L., Grade, K. and Matthies, H.: Der Ribosstoffwechsel und ATP-Gehalt normaler und methämoglobinhaltiger kernloser Erythrozyten. *Acta Biol. Med. Germ.*, **7**, 434, 1961.
- 15) Schweiger, H. G. and Rapoport, S.: Der N-Stoffwechsel bei der Erythrocythenreifung: Die N-Bilanz unter endogenen Bedingungen. *Z. Physiol. Chem.*, **313**, 97, 1958.
- 16) Miyahara, M., Seno, S., Hayashi, K. and Ochi, O.: Accumulation of hypoxanthine in reticulocytes affected by 2,4-dinitrophenol and antimycin A. *Biochim. Biophys. Acta*, **95**, 598, 1965.
- 17) Tsuboi, K. K.: Limiting role of adenine nucleotide in the glycolysis of the human erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, **240**, 582, 1965.
- 18) Nakao, M., Nakao, T., Tachibana, M. and Yoshikawa, H.: Phosphorus metabolism in human erythrocyte. III. Regeneration of adenosine triphosphate in long-stored erythrocyte by incubation with inosine and adenine. *J. Biochem.*, **47**, 661, 1960.
- 19) Lowy, B. A., Jaffe, E. R., Vanderhoff, G. A., Crook, L. and London, I. M.: The metabolism of purine nucleotides by the human erythrocytes *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **230**, 409, 1958.

- 20) Whittam, R.: The support of active potassium transport in human red cells by nucleosides and deoxynucleosides. *J. Physiol.*, **154**, 608, 1960.
- 21) Gabrio, B. W. and Finch, C. A.: Effect of adenosine on biochemical lesion of stored erythrocytes. *Fed. Proc.*, **13**, 51, 1954.
- 22) 林健二: 網赤血球の成熟過程におけるエネルギー代謝の変換. I. 網赤血球の成熟と酸溶性ヌクレオチドの変化. 岡山医学会雑誌: 投稿中.
- 23) Ashwell, G.: Colorimetric analysis of sugars. in Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.: *Methods in enzymology*, Vol. 3, Academic Press, New York, 1955 p. 73.
- 24) Barker, S. B. and Summerson, W. H.: The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.*, **138**, 535, 1941.
- 25) Lionetti, F. J. and Fortier, N. L.: Turnover of esters produced from inosine in human erythrocyte ghosts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**, 15, 1963.
- 26) 中尾真: 赤血球のヌクレオチド及び核酸の代謝とその生理的意義. *Acta Haem. Jap.*, **24**, 637, 1964.
- 27) Bishop, C.: Overall red cell metabolism, in Bishop, C. and Surgenor, D. M., *The red blood cell*, Academic Press, New York, 1964, p. 147.
- 28) Dische, Z.: The pentose phosphate metabolism in red cells, in Bishop, C. and Surgenor, D. M., *The red blood cell*, Academic Press, New York, 1964, p. 189.
- 29) Conway, E. J. and Cooke, R.: LIX. The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues. *Biochem. J.*, **39**, 479, 1939.
- 30) Askari, A. and Franklin, J. E.: Effects of monovalent cations and ATP on erythrocyte AMP deaminase. *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 162, 1965.
- 31) Sandberg, A. A., Lee, G. R., Cartwright, G. E. and Wintrobe, M. M.: Purine nucleoside phosphorylase activity of blood. I. Erythrocytes. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1823, 1955.
- 32) Huennekens, F. M., Nurk, E. and Gabrio, B. W.: Erythrocyte metabolism. I. Purine nucleoside phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, **221**, 971, 1956.
- 33) Guarino, A. J. and Sable, H. Z.: Studies on phosphomutases. II. Phosphoribomutase and phosphoglucomutase. *J. Biol. Chem.*, **215**, 515, 1955.
- 34) Urivetsky, M. and Tsuboi, K. K.: Enzymes of the human erythrocyte. Pentose phosphate isomerase, purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**, 1, 1963.
- 35) Dickens, F. and Williamson, D. H.: Pentose phosphate isomerase and epimerase from animal tissues. *Biochem. J.*, **64**, 567, 1956.
- 36) Dische, Z., Shigeura, H. T. and Landoberg, E.: Mechanisms in the interconversion of ribose 5-phosphate and hexose 6-phosphate in human hemolyzates. I. Sedoheptulose and triose phosphates as intermediates in the conversion of ribose 5-phosphate to hexose 6-phosphate in human hemolyzates. *Arch. Biochem. Biophys.*, **89**, 124, 1960.
- 37) Dische, Z. and Igals, D.: Mechanisms in the interconversion of ribose 5-phosphate and hexose 6-phosphate in human hemolyzates. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 201, 1961.
- 38) Overgaard-Hansen, K.: Metabolic regulation of the adenine nucleotide pool. I. Studies on the transient exhaustion of the adenine nucleotides by glucose in Ehrlich Ascites Tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **104**, 330, 1965.
- 39) Dische, Z. and Rand, C.: Zur Frage der Differenz zwischen Zuckerschwind und Milchsäurebildung bei der Blutglykolyse. *Biochem. Z.*, **276**, 132, 1935.
- 40) Bishop, C.: Differences in the effect of lactic acid and neutral lactate on glycolysis and nucleotide pattern in incubated whole human blood. *Transfusion*, **2**, 256, 1962.
- 41) Bishop, C.: Maintenance of ATP level of incubated human red cells by controlling the pH. *Transfusion*, **2**, 408, 1962.

The Transformation of Energy Metabolism during the Maturation of Reticulocytes

2. The Relationship between Nucleotide Metabolism and Energy Metabolism during the Maturation of Reticulocytes

By

Kenji HAYASHI

Department of Pathology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan
(Director; Prof. Satimaru Seno)

The present paper reported the relationship between nucleotide metabolism and energy metabolism during the maturation of rabbit reticulocytes and the following results were obtained:

1. The gradual degradation of adenine nucleotides during the maturation of reticulocytes was stimulated by the respiratory inhibitors, antimycin A and amytal, or an uncoupler of oxidative phosphorylation, 2,4-dinitrophenol and an inhibitor, oligomycin.
 2. In these conditions the pentose moieties of adenine nucleotides were metabolized rapidly with the very large accumulation of hypoxanthine and lactic acid.
 3. The processes of maturation of reticulocytes, RNA decreases and the glycolysis were promoted by adding inosine and also by inosine monophosphate as well as by glucose. The exogenous adenosine diphosphate and ribose-5-phosphate were hardly utilized for reticulocyte maturation.
 4. The data suggest that pentose moieties of adenine nucleotides are reutilized effectively than glucose during the reticulocyte maturation.
-