

秋田医学 (Akita J. Med.), 17, 943~957, 1990.

哺乳動物細胞フルクトース・ビスホスファターゼのアイソザイムに関する研究
—その諸性質と臓器分布—

水 沼 秀 夫*

Studies on Isoenzymes of Mammalian Fructose 1,6-Bisphosphatase
—Properties and Distribution in Organs—

Hideo MIZUNUMA*

Abstract : In order to clarify the relationship between the distribution of fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) and its isoenzymes in various organs. Several FBPase isoenzymes were first purified and then analysed by raising specific antibodies to them. Purified enzymes from the rat skeletal muscles and liver were found to be different isoenzyme forms. The subunit molecular mass of the muscle enzyme was 5,000–6,000 less than that of the liver enzyme. The FBPase isoenzyme from rat small intestinal mucosa differed from the liver and muscle isoenzyme types, although its subunit molecular mass was the same as that of the liver enzyme. The liver type of the enzyme subunit was detected in the liver, kidney, lung, pancreas, and testis, while the muscle type was detected only in the pancreas in addition to the skeletal muscle. Both types of the enzyme subunit were found in the pancreas, but no FBPase was detected in the soleus muscle. FBPase was present in the fetal rat liver at least as early as the 14th day of gestation. In agreement with the increase in immunological staining density, the level of enzyme activity in the fetal liver doubled every 24 hours. The muscle enzyme was not detected until the fetus reached the 19th day of gestation. FBPase levels in fetal muscle also increased with increasing age of animals. FBPase was observed in a mouse thymic lymphoma cell line, WEHI7.1, whereas only a trace amount of activity was detected in normal thymus tissues. The WEHI7.1 enzyme differed from the liver, intestinal and muscle types of the enzyme. Although a trace amount of FBPase activity was detected in the human promyelocytic cell line, HL-60, treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D₃ caused a marked induction of the liver type of enzyme.

*秋田大学医学部生化学第二講座
(主任 : 田島陽太郎教授)

Second Department of Biochemistry,
Akita University School of Medicine,
Akita, 010 Japan

Keywords: Fructose 1, 6-bisphosphatase,
Isoenzyme

はじめに

フルクトース・ビスホスファターゼ (Fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase; EC 3. 1. 3. 11) (FBPase) は、ピルビン酸からグルコースを合成する糖新生経路の速度を調節する4つの調節酵素のうちの1つで、肝、腎に高い活性で存在する。本酵素は、糖新生能はないと考えられている筋肉にも低活性レベルで存在するが、その生理的役割は不明である。筋肉のFBPase は肝や腎の酵素とは異なるアイソザイムである¹⁾⁻³⁾。

FBPase アイソザイムに焦点を当てた研究はこれまで極めて少なく、FBPase 酵素研究は肝酵素を使つての試験管内での Kinetic な酵素活性調節機構解析や一次構造、高次構造の解析が中心であった。筋型酵素に関しても1970年代に肝酵素と同様な内容の研究が幾つか行なわれたのみで、論文の数は肝型酵素に比べると非常に少ない。肝、腎、筋以外の臓器におけるFBPaseの有無やそのアイソザイム型、更に、FBPase アイソザイムは何種類あるかといった問題や胎仔発生過程における出現時期などについてはこれまで系統的に行なわれた研究がなく、断片的な知識しか知られていなかった。

しかし、次の2つの事実が明らかになったことにより、これらの問題は非常に興味深いものになった：1) 著者らは小腸粘膜にもFBPaseが存在することを示し、マウスから精製してその性質を調べた結果、それまで知られていた肝型、筋型とは異なる新しいアイソザイムであることを示したこと⁴⁾。そして、小腸FBPaseのアイソザイム型には種特異性があり、マウス、ラット、ハムスターの小腸FBPaseは小腸固有の型であるが、ウサギ、モルモットでは小腸FBPaseは肝型であること^{5),6)}；2) FBPaseは分子量36,000～38,000の同一のサブユニットから成るホモテトラマーであるが、ラットの肝FBPaseは従来知られていたFBPaseよりもサブユニット分子量が大きい(Mr=40,000～42,000)ことが示され、ブタ腎やウサギ肝FBPaseのカルボキシル末端のアミノ酸よりも先でラット肝FBPaseではペプチドが延長され、この部分がcyclicAMP依存性のタンパクキナーゼによってリン酸化を受けることが見出されたこと^{7),8)}。そして、他の既知哺乳類FBPaseには、この延長部分は存在しないから、cyclicAMP依存性タンパクキナーゼによってリン酸化を受けないこと。

従つて、動物細胞において、FBPaseのアイソザイムにはどんなものがあるか、またそれらの分布やその酵素的、分子的性質を調べることは、FBPase酵素の分子進化やFBPaseの糖新生調節以外の生理的役割を知るう

えで大きな手がかりになるとともに、FBPase アイソザイム遺伝子の構造や発現調節機構を知る研究への基礎データとして重要である。本研究では、ラット及び培養株細胞を用いてFBPase アイソザイムに関する酵素タンパクレベルでの解析を系統的に行なつた。

実験材料及び実験方法

試薬：フルクトース 1,6-ニリン酸 Na 塩、グルコース 6-ニリン酸脱水素酵素、ホスホグルコイソメラーゼは Boehringer 社；5'-AMP Na 塩は興人社；Freund の完全、不完全アジュバントは Difco 社；Immobilon 膜は Millipore 社；NADP⁺ Na 塩、ウシ血清アルブミンは Sigma 社；Immunoblot アッセイシステムは BioRad 社；Dulbecco の改変 Eagle 培地、RPMI1640 培地、ウシ胎児血清は Flow 社製のものを用了。その他の試薬は全て特級を使った。

動物および株細胞：動物は Wister 系ラットを用い、一晚雌雄ラットを一緒にケージに入れ、受精が確認された日を妊娠0日目と見なした。WEHI7.1細胞は10%の非働化ウシ胎児血清と10mM HEPESを加えた Dulbecco 改変 Eagle 培地で、HL-60細胞は10%非働化ウシ胎児血清と10mM HEPESを加えた RPMI1640 培地で、5% CO₂-95% air の下で37℃で培養した。

酵素活性の測定：FBPase 活性は、文献4)～6)に記載された方法に従つて、340nmでNADP⁺還元速度を30℃で分光光学的に測定することによって求めた。酵素活性は、毎分1μmolのフルクトース1,6-ニリン酸を加水分解する酵素量を1単位と定義する。タンパク濃度はウシ血清アルブミンを標準タンパクとして Bradford の方法⁹⁾により定量した。

抗血清の作成：ラット肝型、筋型、マウス肝型、小腸型FBPaseに対する抗血清は、それぞれ文献6)に記載されている様に Freund の完全及び不完全アジュバントを使つて、ウサギに注射して作成した。

イムノプロットティング：SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、Laemmliの方法¹⁰⁾、エレクトロプロットティングは、Townbinらの方法¹¹⁾に従つて行なつた。プロットされた膜を抗FBPase血清とインキュベーションした後、Hawkesらの方法¹²⁾に従つて、西洋ワサビペルオキシダーゼを結合したヤギ抗ウサギIgGでFBPaseを検出した。

ラット筋型 FBPass の精製：全ての操作は特に断りのない限り 0-5℃で行なった。

1. 抽出：ラット筋肉を細切し、10mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA, 1 mM フェニルメチルスルホニルフロリドを含む、3倍容の 0.25M ショ糖溶液中でホモジナイズした後、40,000 × g で 30 分間遠心し、上清を回収した。

2. 熱処理：終濃度 10mM の 2-メルカプトエタノールを加えて、90℃の湯浴で良く攪拌しながら抽出液を加熱した。60℃に達したら、氷浴中で急速に冷やしてから 15 分間遠心し、上清を集めた。

3. DEAE セルロース・クロマトグラフィー：熱処理抽出液を氷冷蒸留水で 2 倍に希釈し、pH7.3 に合わせた後、1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 緩衝液で平衡化した DEAE セルロースカラム (2.2 × 10cm) に吸着させ、平衡化に用いた緩衝液で十分に洗浄した。同じ緩衝液に溶解した 0-0.2 M NaCl 濃度勾配で溶出し、FBPass 活性を含む画分を集め、1 mM EDTA と 0.05% 2-メルカプトエタノールを含む 10 mM マロン酸緩衝液中で 4℃、6 時間透析した。

4. ホスホセルロース・クロマトグラフィー：透析した溶出液を 1 mM EDTA を含む 10mM マロン酸緩衝液 (pH 6.7) で平衡化したホスホセルロースカラム (2.2 × 5cm) に吸着させ、同じ緩衝液 100ml で洗浄し、引き続き同じ緩衝液に 150mM NaCl を溶解した液で洗った。溶出は 0.5mM フルクトース 1,6-ニリン酸, 150mM NaCl, 1 mM EDTA を含む 10 mM マロン酸緩衝液 (pH 6.7) で行ない、酵素活性を含む画分を 20%グリセロール, 1 mM EDTA, 1 mM ジチオスレイトールを含む 10 mM マロン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 1 晩透析した。

5. ブルーセファロース・クロマトグラフィー：透析した溶出液を 1mM EDTA, 1 mM ジチオスレイトールを含む 10 mM マロン酸緩衝液 (pH 6.0) で平衡化したブルーセファロースカラム (2.2 × 10cm) に吸着させ、同じ緩衝液で十分洗浄した後、0.1 mM AMP, 0.05 mM フルクトース 1,6-ニリン酸, 1 mM EDTA を含む 10 mM マロン酸緩衝液 (pH 6.0) で溶出した。酵素活性を含む画分を濃縮し、適当な緩衝液で透析して、精製標品とした。

ラット肝 FBPass は文献 13)、マウス肝 FBPass は文献 14)、マウス小腸 FBPass は文献 4) に従って精製した。

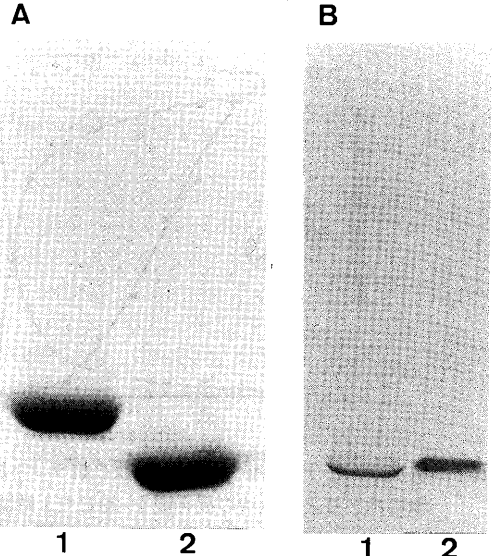


図1 ラット筋 FBPass の SDS-PAGE 及びイムノプロット

(A)10%ゲルで SDS-PAGE した後、Coomassie blue での染色像。レーン1、精製肝 FBPass；レーン2、精製筋 FBPass。

(B)SDS-PAGE 後、Immobilon 膜に転写したイムノプロット像。レーン1、筋粗抽出液；レーン2、精製筋 FBPass

結果

1. ラット筋酵素の性質

ラット筋 FBPass のサブユニット分子量

精製したラット筋 FBPass は、SDS-PAGE で単一のバンドを示し、肝酵素よりも大きな移動度を示した (図1A)。分子量マーカーを用いてサブユニット分子量を求めると 37,500 の値が得られた。この値は他の既知 FBPass と一致する値であった。一方、ラット肝酵素のサブユニット分子量は 43,000 で、既に報告されている様に^{7),15),16)}、他の既知 FBPass より幾分か大きい値であった。精製筋酵素が肝酵素よりも小さいということ及びこの小さいサイズは精製過程で大きい分子の加水分解によって生じたのではないことを示すために、ラット筋肉の粗抽出液と精製酵素を同時に SDS-PAGE し、イムノプロットを行なった。プロットした膜を抗筋 FBPass 抗体とインキュベーションすると、粗抽出液中の酵素も精製酵素も同じ位置に検出された (図1B)。この結果は、大きな筋酵素が精製の過程で組織内プロテアーゼによって消化を受けて小さな分子 (サブユニット分子量 37,500) に変わったのではないということ強く

(156)

FBPase アイソザイム

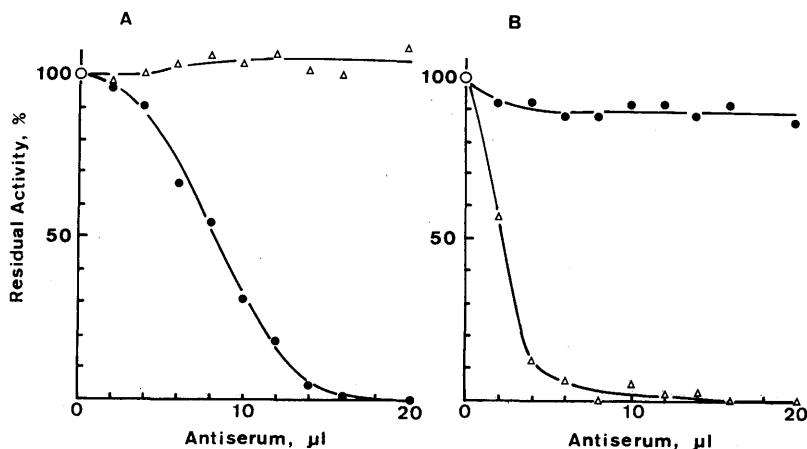


図2 抗ラット筋 FBPase 抗体 (A) 及び抗ラット肝 FBPase 抗体 (B) による筋及び肝 FBPase の免疫滴定
臓器抽出液と抗血清の混合液を 30℃ で 1 時間、さらに 4℃ で 17 時間インキュベーションした後、40,000 ×
g で 15 分間遠心した上清に残存する酵素活性を測定。

●, 筋肉; △, 肝臓。

示唆する。

抗筋 FBPase 抗体と抗肝 FBPase 抗体による免疫滴定

ラット筋と肝の粗抽出液中の FBPase 活性の抗筋型酵素抗体と抗肝型酵素抗体による阻害を Tejwani ら¹⁷⁾ によって記載された方法に従って調べた (図 2)。両酵素の抗原性は明らかに互いに異なっていた。即ち、筋酵素は抗肝型酵素抗体によって殆ど沈降しなかった (図 2 B)。逆に、肝酵素は抗筋型酵素抗体によって殆ど沈降しなかった (図 2 A)。この結果はウサギ^{11,2)} やニワトリ³⁾ で既に知られている様に、ラットにおいても筋酵素は肝酵素とは免疫学的に異なるアイソザイムであることを示す。

1 次元ペプチドマッピング

筋 FBPase と肝 FBPase をそれぞれ黄色ブドウ球菌 V8 プロテアーゼ、キモトリプシン、パパインによって部分加水分解をし、加水分解物を SDS-PAGE によって分析した (図 3)。筋酵素の泳動パターンは肝酵素のそれとは非常に異なっていた。筋酵素は肝酵素よりも V8 プロテアーゼに抵抗性があり、パパインに対しては感受性が強い様に見える。

スブチリシンによる消化

ウサギ FBPase をスブチリシンとインキュベーションすると、酵素活性の至適 pH の中性からアルカリ側

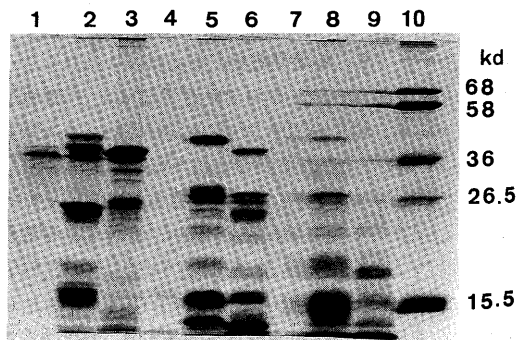


図3 ラット筋及び肝 FBPase の 1 次元ペプチドマッピング

精製筋及び肝 FBPase を 0.5% SDS 存在下、pH6.8 でプロテアーゼにより 37℃ で 30 分消化後、15%ゲルで SDS-PAGE。FBPase に対するプロテアーゼの割合 (W/W) は次の通り: 1/5, 黄色ブドウ球菌 V8 プロテアーゼ: 1/30, キモトリプシン: 1/800, パパイン。レーン 1, V8 プロテアーゼのみ; レーン 2, V8 プロテアーゼで消化した肝酵素; レーン 3, V8 プロテアーゼで消化した筋酵素; レーン 4, キモトリプシンのみ; レーン 5, キモトリプシンで消化した肝酵素; レーン 6, キモトリプシンで消化した筋酵素; レーン 7, パパインのみ; レーン 8, パパインで消化した肝酵素; レーン 9, パパインで消化した筋酵素; レーン 10, 分子量マーカータンパク。

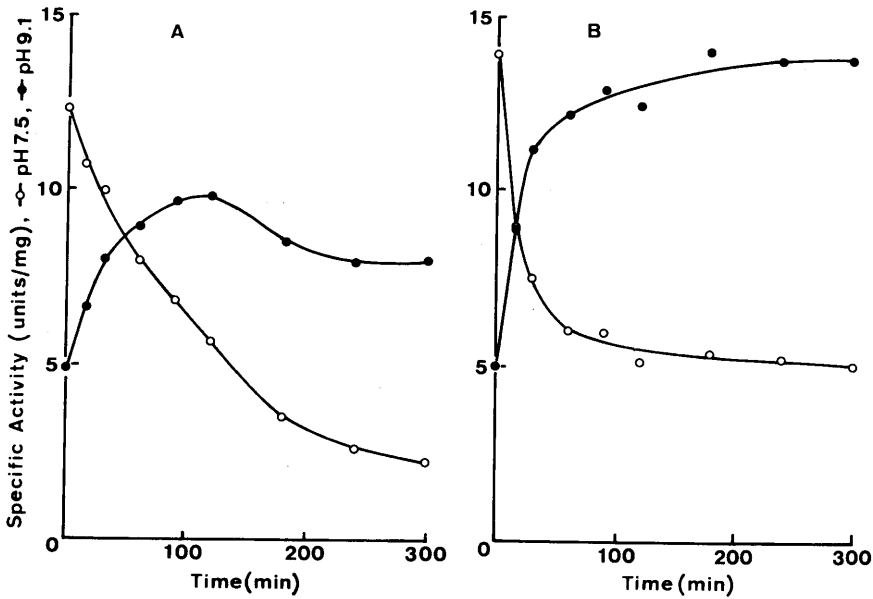


図4 スブチリシン消化による筋及び肝 FBPase 活性の変化

pH6.8, 37°CでFBPaseをスブチリシン(スブチリシン:FBPase=1:200, w/w)とインキュベーションし, pH9.1(●)とpH7.5(○)で酵素活性測定。(A)筋FBPase, (B)肝FBPase。

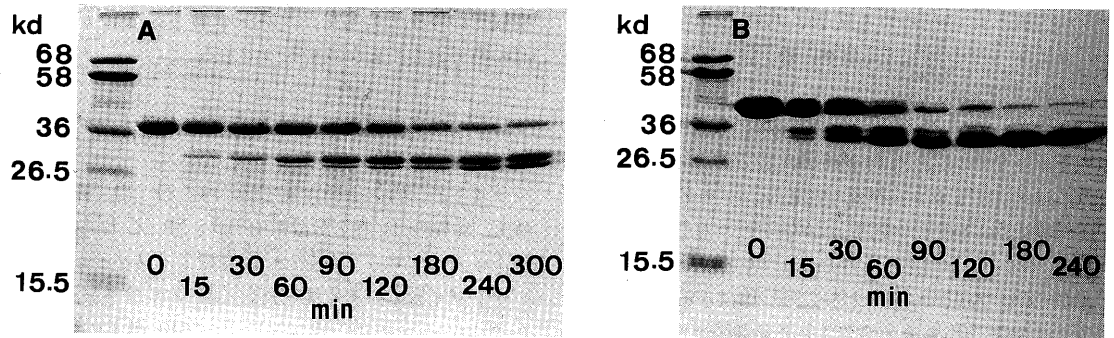


図5 スブチリシンとのインキュベーションによるラット筋及び肝FBPaseのサブユニット構造の変化

図4と同サンプルを15%ゲルでSDS-PAGE後, Coomassie blueで染色。(A)筋FBPase, (B)肝FBPase。左側のレーンは分子量マーカータンパクを示す。

への移動とアロステリック阻害剤AMPに対する感受性の喪失が観察された^{17),18)}。この触媒活性の変化は, 酵素サブユニット($M_r=36,000$)の分子量約30,000と約6,500の2つのペプチドへの切断が関係している¹⁹⁾。ラット筋FBPaseも肝FBPaseもスブチリシンとのインキュベーションによってpH9.1での活性が上昇したが, 活性化の程度は筋酵素のほうが小さかった(図4)。図5に示す様に, スブチリシン消化の間のサブユニット

構造の変化は筋酵素と肝酵素とは異なり, ラット筋酵素では分子量約30,000と約27,500の2つのペプチドが生じ(図5A), 肝酵素の消化では, 分子量約34,000と約31,000のペプチドに加えて, 無傷のサブユニットよりもやや小さいサブユニット($M_r=40,000$)が観察された(図5B)。また図5のパターンはウサギ肝酵素のものとは異なっていた。ウサギ肝酵素は分子量約30,000のペプチドのみを生じた^{18),19)}。ラット筋酵素も

(158)

FBPase アイソザイム

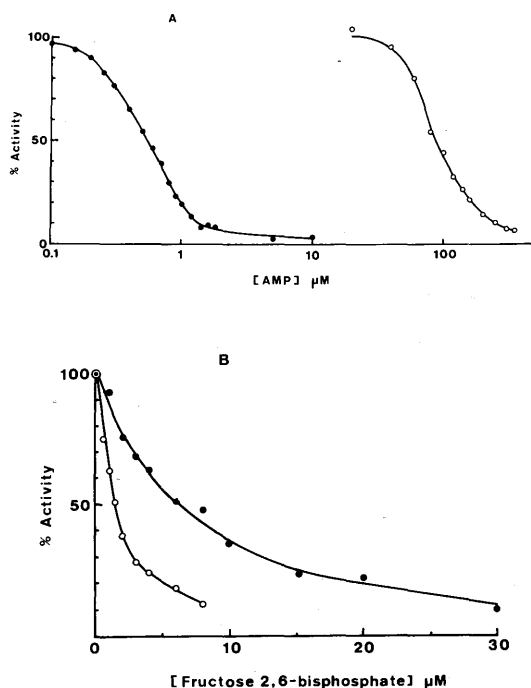


図6 AMP, フルクトース 2,6- ニリン酸による筋及び肝 FBPase 活性の阻害

(A) AMP による阻害, (B) フルクトース 2,6- ニリン酸による阻害。●, 筋 FBPase ; ○, 肝 FBPase。

ウサギ, ニワトリ, ヘビ筋 FBPase とは異なっていた。それらはスブチリシンで消化したとき, ウサギ肝酵素と同じ結果を生じた¹⁹⁾。

AMP 及びフルクトース 2,6-ニリン酸による阻害

他の動物種の筋酵素で報告された結果^{1), 20), 22)} と一致して, ラット筋酵素も AMP に対して極めて感受性が高かった (図 6 A)。筋酵素活性の 50% を阻害する AMP 濃度は $0.54 \mu\text{M}$ であった。それに対して肝酵素の場合は $85 \mu\text{M}$ であった。

FBPase のもう一つの阻害剤であるフルクトース 2,6-ニリン酸もラット筋 FBPase を阻害した (図 6 B)。部分精製マウス筋酵素で以前報告した²³⁾ 様に, ラット精製酵素でも筋酵素は肝酵素よりもこの物質に対する感受性が低かった。ラット筋酵素と肝酵素の活性を 50% 阻害するフルクトース 2,6-ニリン酸濃度はそれぞれ約 $6.3 \mu\text{M}$ と $1.5 \mu\text{M}$ であった。

2. ラット小腸酵素の性質

ラット小腸酵素のサブユニット分子量

精製したラット小腸 FBPase の SDS-PAGE の結果は 2 本のバンドを示し, 一方は肝型アイソザイムの泳動位置に相当し, もう一方は筋型アイソザイムの泳動位置に一致した (図省略)。精製標品によって, 2 つのバンドの相対量が異なるので, 恐らく筋酵素の泳動位置に相当するバンドは精製途上で, 混在するプロテアーゼによって部分加水分解を受けたものであり, 無傷の小腸酵素は肝型酵素と同じサブユニット分子量をもっていると考えられる。

抗筋 FBPase 抗体及び抗肝 FBPase 抗体による免疫滴定

図 7 に示す様に, 未変性状態でラット小腸 FBPase は抗肝型抗体にも抗筋型抗体にも非常に良く反応した。しかし, 小腸酵素は両抗体によって完全には沈降せず, 10 ~ 20% の活性は上清に残ったままであった。

AMP による阻害

ラット小腸酵素の AMP に対する感受性は筋酵素とも肝酵素とも異なる感受性を示し, 酵素活性の 50% 阻害濃度は約 $12 \mu\text{M}$ であった (図 8)。この結果は, 免疫滴定の結果とともに, ラット小腸 FBPase が小腸固有の型であることを示すものである。

3. ラット各種臓器における FBPase アイソザイムの分布

ラット肝, 腎, 小腸粘膜, 筋, 脳, 心, 肺, 膵, 脾, 睾丸, 胎盤の 11 種の臓器粗抽出液を用いて SDS-PAGE 後, イムノプロットを行ない, 肝型アイソザイムと筋型アイソザイムの分布を調べた。

肝型アイソザイムの検出

図 9 に示した様に, 肝型抗体と反応する FBPase タンパクバンドは, 調べた 11 種の臓器のうち, 肝, 腎, 膵, 睾丸, 肺の抽出液で検出された。肺抽出液のバンドは非常に薄い, 陽性であった。全てのバンドは転写膜上で精製肝酵素と同じ移動度であった。腎抽出液の FBPase のバンドは, 肝抽出液のものよりも濃く染まった (図 9, レーン 2 及び 3)。FBPase の染色の濃さは腎 > 肝 > 睾丸 > 膵 > 肺の順であった。小腸粘膜, 筋, 脳, 心, 脾, 胎盤の各抽出液の泳動レーンには抗肝 FBPase 抗体によって肝 FBPase の位置に陽性のバンドは検出されなかった。肝 (レーン 2), 腎 (レーン 3), 脳 (レ

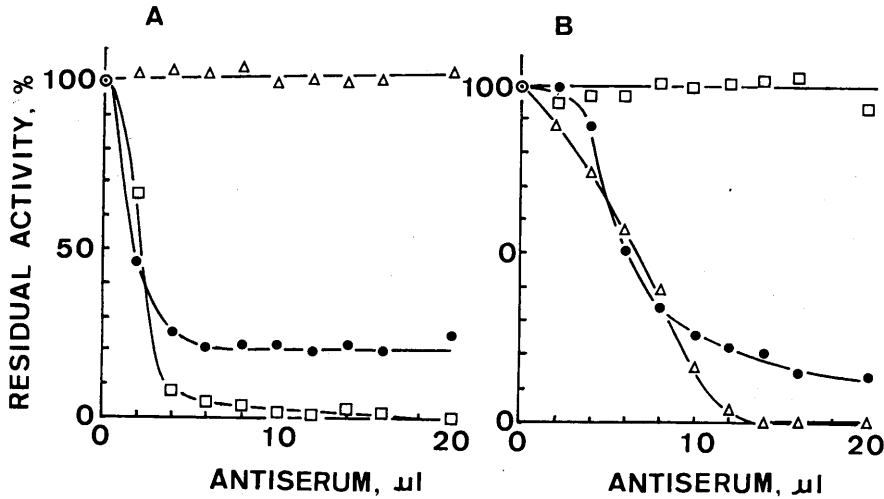


図7 抗ラット肝 FBPase 抗体 (A) 及び抗ラット筋 FBPase 抗体 (B) による小腸 FBPase の免疫滴定
図2と同様にして測定を行なった。

●, 小腸粘膜; □, 肝臓; △, 筋肉。

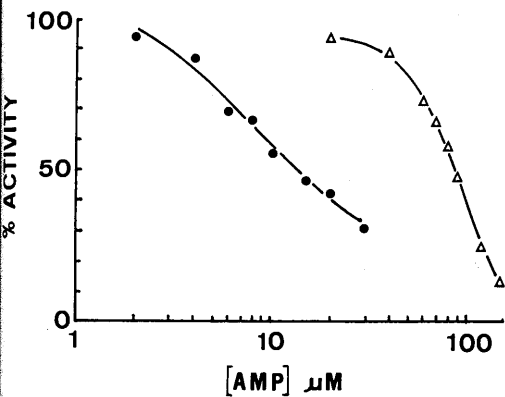


図8 AMP による小腸 FBPase 活性の阻害

●, 小腸 FBPase; △, 肝 FBPase。

ン6), 脾 (レーン9), 胎盤 (レーン12) の小分子量域に陽性バンドが観察された。現在, この理由は不明であるが, 試料調製の途上で生じた, 組織内プロテアーゼによる FBPase 加水分解物によるものであるかもしれない。脳には FBPase の存在が報告されており^{24,25)}, これらが加水分解を受けて抗肝 FBPase 抗体と反応するようになったのかもしれない。また胎盤にも未知の FBPase アイソザイムが存在し, 同様に抗肝型抗体と反応するようになったのかもしれない。

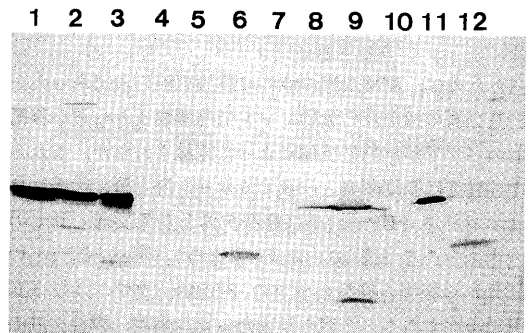


図9 抗ラット肝 FBPase 抗体によるラットの各種臓器抽出液のイムノプロット

各 300 μ g (但し, 肝と腎は 25 μ g) タンパクを含む臓器抽出液を SDS-PAGE 後, Immobilon 膜に 50V で3時間転写し, FBPase を Hawkes らの方法¹²⁾ により検出した。レーン1, 精製ラット肝 FBPase (25ng); レーン2, 肝; レーン3, 腎; レーン4, 小腸粘膜; レーン5, 筋; レーン6, 脳; レーン7, 心臓; レーン8, 肺; レーン9, 脾; レーン10, 脾臓; レーン11, 睪丸; レーン12, 胎盤。

筋型アイソザイムの検出

抗ラット筋 FBPase 抗体を用いたときの図9と同じ11種の臓器抽出液のイムノプロットの結果が図10である。精製筋 FBPase と同じ泳動位置にバンドが検出

(160)

FBPase アイソザイム

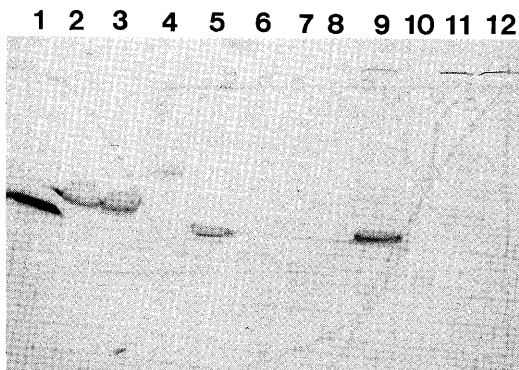


図10 抗ラット筋 FBPase 抗体によるラットの各種臓器抽出液のイムノプロット

各 300 μ g タンパクを含む臓器抽出液を SDS-PAGE 後、図9と同様にして FBPase を検出した。レーン1, 精製ラット筋 FBPase (25ng); レーン2, 肝; レーン3, 腎; レーン4, 小腸粘膜; レーン5, 筋; レーン6, 脳; レーン7, 心臓; レーン8, 肺; レーン9, 脾; レーン10, 脾臓; レーン11, 睪丸; レーン12, 胎盤。

されたのは、筋抽出液の他には脾抽出液のみであった。肝及び腎の抽出液の泳動レーンで筋酵素よりも遅い移動度のバンドが抗筋型抗体によって認識されたが、これらの移動度は肝型酵素と一致するから、肝と腎に大量に存在する肝型 FBPase が抗筋型抗体と交叉反応したものと考えられる (図10, レーン2と3)。図9と図10の結果から肝型と筋型の両方の FBPase サブユニットが脾に存在することが明らかとなった。実際、脾抽出液のイムノプロットを抗肝型抗体と抗筋型抗体の混合物でインキュベーションしたとき、精製肝酵素と筋酵素の移動度にそれぞれ一致する2つの FBPase バンドが検出された (図省略)。

骨格筋における FBPase の分布

抗筋型 FBPase 抗体によるイムノプロット法を用いてラットの幾つかの骨格筋における FBPase の分布を調べた (図11)。ヒラメ筋を除いて、調べた全ての骨格筋がほぼ同量の酵素タンパクをもっていた。ヒラメ筋では酵素タンパクが検出されなかった (図11, レーン8)。この結果はヒラメ筋では FBPase 活性が検出されなかったという Challis らの報告²⁶⁾と一致する。

4. ラット肝型, 筋型 FBPase の胎仔発生過程における出現時期とアイソザイム型

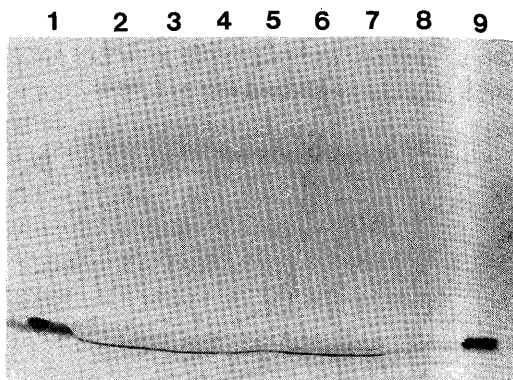


図11 ラット各種骨格筋抽出液のイムノプロット

各 150 μ g タンパクを含む各種筋抽出液を SDS-PAGE 後、図9と同様にして抗ラット筋 FBPase 抗体により FBPase を検出した。レーン1と9, 精製筋 FBPase (25ng); レーン2, 上腕三頭筋; レーン3, 大胸筋; レーン4, 背最長筋; レーン5, 横隔膜; レーン6, 大腿直筋; レーン7, 腓腹筋; レーン8, ヒラメ筋。

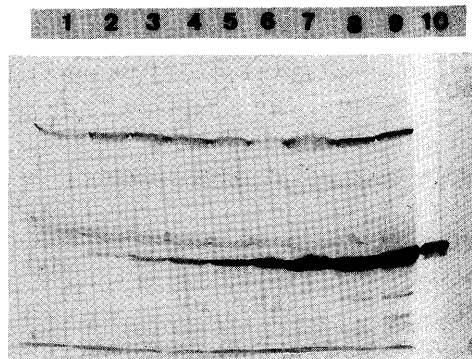


図12 抗ラット肝 FBPase 抗体による胎仔及び新生仔ラット肝抽出液のイムノプロット

各 200 μ g タンパクを含む胎仔及び新生仔ラット肝抽出液を SDS-PAGE 後、図9と同様にして FBPase を検出した。レーン1, 妊娠13日目; レーン2, 14日目; レーン3, 15日目; レーン4, 16日目; レーン5, 17日目; レーン6, 18日目; レーン7, 20日目; レーン8, 22日目; レーン9, 生後5日目; レーン10, 精製成体ラット肝 FBPase (25ng)。

胎仔肝 FBPase の検出

ラット胎仔及び新生仔肝抽出液 (タンパク量各 200 μ

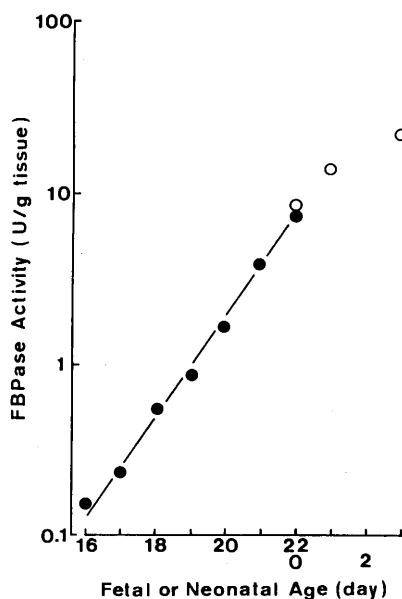


図13 胎仔及び新生仔ラットの発生・発達に伴う肝FBPase 活性の変化

●, 胎仔肝 ; ○, 新生仔肝。

g) を SDS-PAGE 後, 抗肝型抗体を用いてイムノブロットを行なった。図 12 で明らかな様に, FBPase のバンドは妊娠 14 日目の胎仔肝で既に検出可能であった。妊娠の進行につれて, FBPase 酵素の染色度は増大した。膜上に FBPase のバンドの他に大きい分子量の位置に濃く染色したバンドが観察されたが, これは FBPase に比べて大過剰に存在する組織タンパクによる抗肝型抗体との非特異的な反応によるものと考えられる。このタンパクやこの反応の性質については全く不明であるが, このバンドは少タンパク量でプロットしたときには検出されなかった (図 9, レーン 2)。胎仔及び新生仔肝 FBPase サブユニットの大きさは成体肝 FBPase と同じであった。従って, このこと及び胎仔肝 FBPase が抗肝型抗体と良く反応することは, 胎仔肝 FBPase が成体肝酵素と同じアイソザイムであることを強く支持する。胎仔発達におけるイムノブロットでの酵素の染色度増大と平行して, 胎仔肝 FBPase 活性は増加し, 誕生まで 24 時間毎に約 2 倍になった (図 13)。

胎仔筋 FBPase の検出

胎仔及び新生仔筋抽出液 (タンパク量各 200 μ g) について抗肝型抗体を用いてイムノブロットを行なった (図 14)。胎仔が妊娠 19 日目に達するまで筋酵素のパ

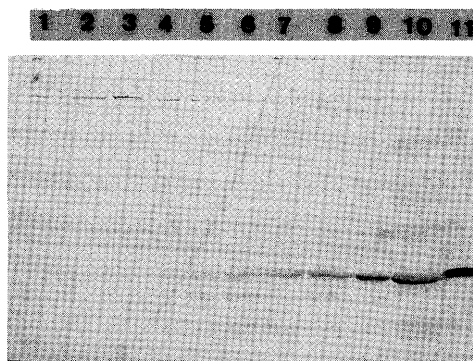


図14 抗ラット筋 FBPase 抗体による胎仔及び新生仔ラット筋抽出液のイムノブロット

各 200 μ g タンパクを含む胎仔及び新生仔ラット筋抽出液を SDS-PAGE 後, 図 9 と同様にして FBPase を検出した。レーン 1, 妊娠 14 日目; レーン 2, 15 日目; レーン 3, 16 日目; レーン 4, 17 日目; レーン 5, 18 日目; レーン 6, 19 日目; レーン 7, 20 日目; レーン 8, 22 日目; レーン 9, 生後 5 日目; レーン 10, 成体; レーン 11, 精製成体ラット筋 FBPase (25ng)。

ンドは検出されなかった。これはこの時期まで筋酵素が発現しなかったか, または筋肉中の FBPase 量が極めて低いためこの時期まで検出されなかったことによるが, 恐らく後者の理由によるものと考えられる。胎仔筋 FBPase も新生仔筋 FBPase もサブユニットの大きさは成体筋 FBPase のものと同じであった。胎仔筋中の FBPase も胎仔の妊娠日数増加につれて染色度が増加した。

5. 株細胞における FBPase の存在とそのアイソザイム型

WEHI7.1 細胞

マウス胸腺腫由来の株細胞 WEHI7.1 に対するグルココルチコイドの作用についての研究途上, この細胞に FBPase 活性が存在することを見出した。この細胞には 11.5 ± 0.8 munits/mg cytosol protein (平均値 \pm S.E.M.) (n=6) の FBPase 活性が存在し, この値はラット筋肉中の FBPase 活性 (8.1 munits/mg cytosol protein) とほぼ同じレベルであった。一方, 正常の BALB/c マウス胸腺には痕跡程度の活性しか存在しなかった (0.3 munits/mg cytosol protein : 5 匹づつ

(162)

FBPase アイソザイム

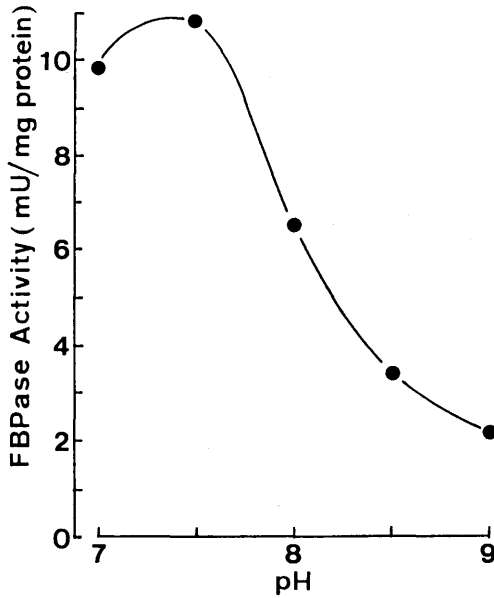


図15 WEHI7.1 細胞 FBPase 活性の pH 依存性

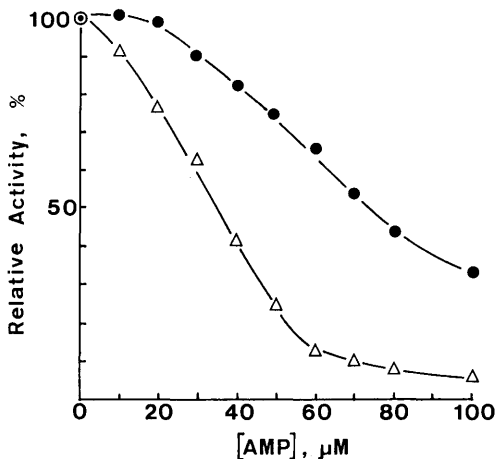


図16 WEHI7.1 FBPase 活性の AMP による阻害

●, WEHI7.1 FBPase ; △, マウス肝 FBPase

の 2 グループの平均値)。

a. WEHI7.1 細胞 FBPase の至適 pH : FBPase は、アイソザイム型に関係なく、pH 7.5 付近に至適 pH をもっており^{4), 14), 27), 28)}, WEHI7.1 FBPase も約 pH 7.5 で最大活性が観察された (図 15)。

b. AMP による阻害 : 図 16 に示したように、

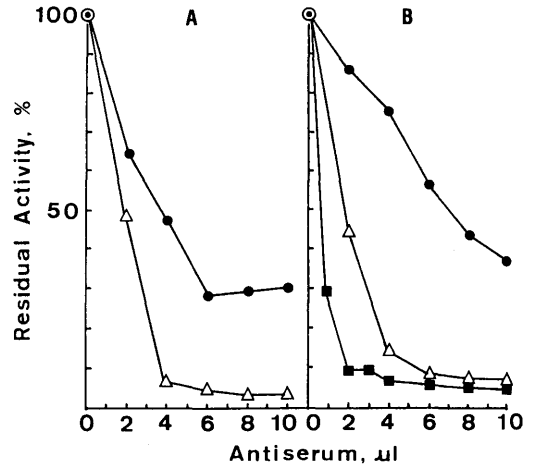


図17 抗マウス肝 FBPase 抗体 (A) 及び抗マウス小腸 FBPase 抗体 (B) による WEHI7.1 FBPase の免疫滴定

図 2 と同様にして測定を行なった。

●, WEHI7.1 ; △, 肝臓 ; ■, 小腸粘膜。

AMP は WEHI7.1 FBPase 活性を阻害した。AMP に対する FBPase の感受性はアイソザイム型によって異なっており、粗抽出液中のアイソザイム型を知るための指標となる⁶⁾。WEHI7.1 FBPase 活性を 50% 阻害する AMP 濃度は約 73 μM で、マウスの肝酵素での約 35 μM よりも約 2 倍大きく、筋型 (1 μM⁴⁾) や小腸型 (6.8 μM⁶⁾) よりも 1 桁大きかった。

c. 抗マウス肝型抗体と抗マウス小腸型抗体による免疫滴定 : WEHI7.1 FBPase は抗マウス肝 FBPase 抗体と交叉反応した。しかし、その抗体に対する親和性はマウス肝酵素よりも低く、更に肝酵素が 4 μl の抗血清で完全に沈降したのに対して、WEHI7.1 酵素活性の約 30% が過剰量の抗肝 FBPase 抗体の存在下でも沈降しなかった (図 17A)。WEHI7.1 FBPase は抗マウス小腸 FBPase 抗体によっても沈降した。しかし、その抗体に対する WEHI7.1 酵素の親和性は肝酵素、小腸酵素との親和性よりも低かった (図 17B)。

d. イムノプロットング : WEHI7.1 FBPase サブユニットの大きさを肝酵素サブユニットの大きさと比較するためにイムノプロットングを行なった。等しい量の活性を含む部分精製 WEHI7.1 FBPase と精製マウス肝 FBPase の標品を SDS-PAGE 後、Immobilon 膜にプロットし、抗マウス肝 FBPase 抗体で検出した

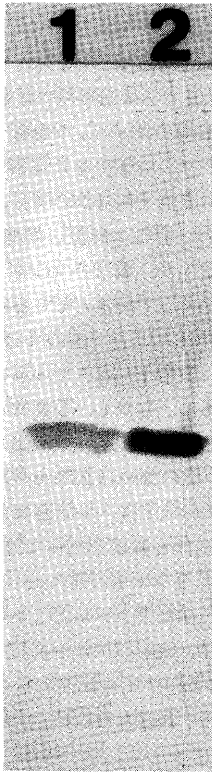


図 18 WEHI7.1 FBPase のイムノブロット

各 0.9 munit の活性を含む部分精製 WEHI7.1 FBPase 及び精製マウス肝 FBPase を SDS-PAGE 後、図 9 と同様にして抗マウス肝 FBPase 抗体により FBPase を検出した。レーン 1, WEHI7.1 FBPase ; レーン 2, マウス肝 FBPase。

ところ、両酵素は同じ移動度の位置に検出されたが、染色度は WEHI7.1 酵素の方が肝酵素よりもずっと低かった (図 18)。両酵素のサブユニット分子量は分子量マーカータンパクを使って、37,500 と求められた。

これらの結果から、WEHI7.1 FBPase は肝型とも小腸型とも異なるアイソザイムであり、また、AMP の感受性が筋型とは大きく違っているから、筋型とも異なるアイソザイムであることが分かった。

HL-60 細胞

ヒト前骨髄性白血病株細胞である HL-60 には殆ど痕跡程度にしか FBPase 活性は見られない [2.2 ± 0.1 munits/mg cytosol protein (平均値 \pm S.E.M.)]

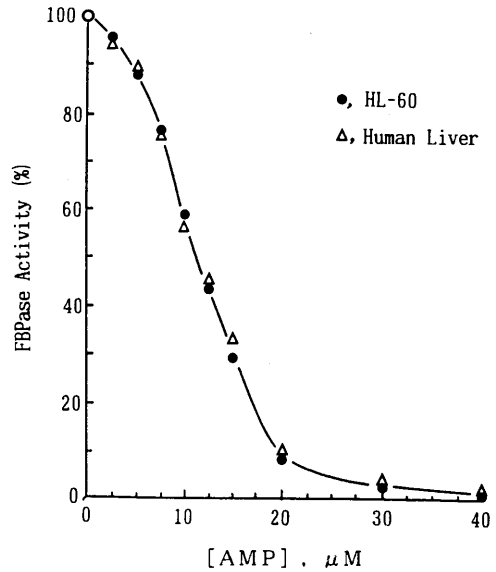


図 19 HL-60 細胞 FBPase 活性の AMP による阻害
●, HL-60 ; △, ヒト肝。

($n=4$)] が、1,25-ジヒドロキソビタミンD₃ (活性型ビタミンD₃) を加えて培養すると FBPase 活性が著しく誘導され、96 時間後に 141.4 ± 6.0 munits/mg cytosol protein (平均値 \pm S.E.M.) ($n=4$) に達した。誘導された HL-60 細胞 FBPase 活性はヒト肝 FBPase と全く同じ AMP 阻害曲線を示し (図 19), 更に HL-60 FBPase は抗ラット肝 FBPase 抗体と良く反応した (データ省略) から、活性型ビタミンD₃ によって誘導された HL-60 FBPase は肝型であると考えられる。

考 察

ラット筋 FBPase

ラット筋 FBPase は次の点でラット肝酵素と区別することができた: (1) サブユニット分子量 (図 1 A); (2) 免疫学的反応性 (図 2); (3) 黄色ブドウ球菌 V₈ プロテアーゼ、キモトリプシン、パペインによる消化物の 1 次元ペプチドマッピング (図 3); (4) スブチリシン消化による酵素活性変動 (図 4, 5); (5) AMP, フルクトース 2,6-二リン酸に対する感受性 (図 6)。これらの結果はラットにおいて筋 FBPase は肝酵素とは異なるアイソザイムであることを示す。これはウサギ¹⁾ やニワトリ³⁾ の場合と同様であった。

スブチリシンによる消化の結果については、ラット筋酵素はウサギやニワトリやヘビの筋酵素¹⁹⁾ とは異なっている。スブチリシンによって酵素にニックが入って

S-サブユニット ($M_r=30,000$) や S-ペプチド ($M_r=6,000$) と呼ばれる断片が生成した後、ラット筋酵素の S-サブユニットは、更に修飾を受け、約 27,500 の分子量のペプチドを生成した (図 5A)。この結果は S-サブユニットと S-ペプチドヘニックが入れられた後に、ラット筋酵素と他の動物の筋酵素との間にコンホメーションの違いがあることを示唆している。また、このことは pH9.1 での筋酵素のこのプロテアーゼによる活性化の程度が肝酵素よりも小さいという事実 (図 4) とも関連しているのかもしれない。なお、アルカリ pH でのウサギ筋酵素のスプチリンによる活性化の度合いはウサギ肝酵素と殆ど同じであると報告されている¹⁹⁾。

ラット小腸 FBPase

ラットで筋 FBPase のサブユニット分子量が肝酵素と異なること、また小腸 FBPase の大きさは肝酵素と同じであることは非常に興味深い。Rittenhouse ら⁸⁾ はラット肝酵素のサブユニットが大きいことは肝 FBPase 遺伝子の終末コドンでの変異の存在を反映していることを示唆した。ラット筋酵素のサブユニット分子量が哺乳動物のラット肝以外の既知 FBPase と同じ大きさであるという事実はこの示唆を支持する。小腸酵素は、肝酵素と同様の遺伝子変異によるペプチド鎖の延長部分を持っているものと思われる。全ての動物種において小腸 FBPase が小腸型であるわけではなく、種によっては肝型であるという事実⁶⁾ を考え合わせると、FBPase の分子進化の過程で原 FBPase から肝型と筋型とに分化した後、肝 FBPase 遺伝子に変異が起こり、その後肝型から小腸型が分かれたと考えることが可能である。

図 9, 10 で示されるようにラット小腸粘膜の FBPase はイムノブロットで抗肝型抗体でも抗筋型抗体でも検出されなかった。この結果もラットの小腸 FBPase は肝型、筋型とは異なる小腸型であるということを支持する。小腸酵素のイムノブロット (図 9, 10) と免疫滴定 (図 7) の結果は互いに矛盾しているように見えるが、これは FBPase がイムノブロットでは変性状態で、免疫滴定では酵素タンパクが未変性状態であるため、抗肝型及び抗筋型抗体との反応性が異なることによるものと思われる。変性させた肝 FBPase で作った抗体は免疫滴定で未変性肝 FBPase を沈降させなかった (未発表)。

ラット各種臓器の FBPase

従来から FBPase は肝、腎、筋を中心に研究されてきたが、ラット臓器について検索すると肝型酵素が脾、睾丸、肺にも存在することが示された。このことは次の

2つの規準によって支持される；(1) SDS-PAGE でこれらの臓器のタンパクが精製肝酵素と同じ移動度を示すこと；(2) これらの臓器のタンパクが肝 FBPase と免疫学的に関連していること。

ラット脾には上と同じ規準によって判断すると、筋型 FBPase も存在することが分かった。調べた限りでは、脾は肝型と筋型の両サブユニットをもつ唯一の臓器である。インスリンやグルカゴンを分泌して血糖値を調節しているこの臓器の機能と何らかの関係があるのか興味深い。現在のところ、脾には肝型と筋型の両 FBPase 自身が存在しているのか、或は各々のタイプのサブユニットから成るハイブリッド酵素として存在しているのかは不明であるが、ハイブリッド型の FBPase は現在まで知られていない。臓器下レベルでの脾における FBPase の分布も不明である。しかし、予備的な観察では脾には両タイプの酵素サブユニットが検出されている。

近年、哺乳動物の脳に FBPase の存在が報告された^{24), 25)}。当研究においては、小腸酵素と同様にイムノブロットで抗肝型抗体と抗筋型抗体では脳 FBPase は検出されなかった。ラット脳 FBPase のサブユニット分子量が肝型酵素の様に大きいかどうか興味深い。小腸酵素や脳酵素の様に、抗肝型抗体や抗筋型抗体で検出されない FBPase アイソザイムが他にも存在するかどうかは今後の研究を待たねばならない。

ラット胎仔 FBPase

図 12 に示された様に、ラット胎仔肝には少なくとも妊娠 14 日目には既に FBPase が存在している。Greengard はラット肝の殆どの酵素類は発生・発達の間蓄積する時期によって3つの群、即ち、妊娠 16-22 日の胎仔後期群、新生仔群、哺乳仔後期群に区別されると考えた²⁶⁾。この分類によれば、肝 FBPase は“胎仔後期群”に属すると考えられる。一方、他の糖新生調節酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼやチロシンアミノ転移酵素は誕生後に誘導され、胎仔ラット肝には極めて少ない活性しか存在しない³⁰⁾⁻³³⁾。子宮内への dibutyryl cyclicAMP の注入で直ちにこれら2酵素は誘導される³⁴⁾⁻³⁷⁾ から、胎仔ラット肝がこの2つの糖新生酵素の合成能力を持っていることは明らかである。従って、FBPase 発現時期との違いは合成を誘導する引き金に違いがあることによるのかもしれない。

株細胞 FBPase

FBPase は幾つかの正常臓器細胞の他に、ある種の株化腫瘍細胞にも存在するか、または、発現可能であるこ

とが分かった。FBPase は house keeping タンパクとは異なり、がん化によって減少・消失し、その減少の度合いは腫瘍の成長速度に反比例する³⁸⁾ ことが一般に受け入れられている。ところが、WEHI7.1 細胞では FBPase 活性は正常胸腺細胞よりも極めて高い。腫瘍組織において、ある種の酵素の異所性産生が生じることが知られている。別のマウス胸腺腫株細胞 S49 では FBPase 活性は観察されなかった(未発表)から、WEHI7.1 における FBPase の発現は、この異所性産生の 1 例であるかもしれない。WEHI7.1 FBPase は肝型、小腸型、筋型とは異なるアイソザイムである(図 15-17)。WEHI7.1 酵素は抗肝 FBPase 抗体と交叉反応をした(図 16,17)のに対して、脳 FBPase は抗肝 FBPase 抗体とは反応しないと報告されている²⁰⁾ から、WEHI7.1 FBPase は脳 FBPase と異なる酵素であると考えられる。WEHI7.1 FBPase が WEHI7.1 型に特異的な遺伝子から生じたのか、あるいは転写後または翻訳後のプロセッシングによる肝型または小腸型遺伝子からの修飾生成物であるのかは不明である。

Solomon ら³⁹⁾ は、HL-60 細胞を活性型ビタミンD₃によって処理すると FBPase の mRNA が誘導されるが、誘導されたタンパクは FBPase 活性を持たないと報告し、FBPase 活性発現には mRNA 誘導以外の機構も必要であるのかも知れないと述べた。本研究では活性型ビタミンD₃は HL-60 で FBPase の活性を著しく増加させた。この違いの原因は不明である。

正常細胞マクロファージや単球には FBPase の mRNA が存在する³⁹⁾。HL-60 は活性型ビタミンD₃によって単球-マクロファージ様細胞に分化する⁴⁰⁻⁴²⁾ので、この分化に伴う結果として FBPase が合成誘導されたという可能性も考えられる。しかし、Solomon ら³⁹⁾は HL-60 を単球-マクロファージ様細胞に分化させるもう一つの薬剤である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) によっては FBPase mRNA は誘導されないことを報告している。著者も PMA で FBPase 活性が誘導されないことを確認しているので、HL-60 細胞が分化すれば、必ず FBPase 合成誘導が生ずるわけではない。FBPase の合成は活性型ビタミンD₃添加後、僅か6時間で検出される(未発表)から、活性型ビタミンD₃の FBPase 遺伝子への直接的作用によるものと推定される。少なくとも分化の結果として合成誘導されるのではないらしい。

本研究で見出された2つの株細胞での FBPase 発現は FBPase 酵素発現機構、酵素量調節機構、アイソザイム分化の解明に極めて好都合な系である。現在、これ

らを使って FBPase の turnover 調節に関与する分子や要因の分析、FBPase 遺伝子構造の解析を進めている。

結 論

本研究によって、FBPase アイソザイムに関して以下の点が明かとなった。

1. ラットの筋 FBPase は肝型とは異なるアイソザイムであり、サブユニット分子量はラット肝型より 5000 ~ 6000 小さく、既知 FBPase と同じ大きさである。
2. ラット小腸 FBPase は肝型、筋型とは異なる小腸固有の型であり、サブユニット分子量は肝型と同じで、他の既知 FBPase よりも大きいと考えられる。
3. ラットの臓器には肝、腎、肺、脾、睪丸に肝型酵素が存在する。
4. 筋型サブユニットは、筋の他に脾でのみ検出され、脾には肝型、筋型の両サブユニットが存在する。
5. ラットの種々の筋のなかで、ヒラメ筋には FBPase が存在しない。
6. ラット胎仔肝では FBPase は他の糖新生調節酵素と異なり、妊娠 14 日目で既に存在し、妊娠の進行につれて活性量、酵素量が増加する。
7. ラット胎仔筋 FBPase は妊娠 19 日目で検出されるようになり、胎仔の成長につれて酵素量が増加する。
8. マウス胸腺腫由来の WEHI7.1 株細胞には FBPase が存在し、そのアイソザイム型はマウスで知られている肝型、小腸型、筋型の何れとも異なる。一方、正常マウスの胸腺には痕跡程度の活性しか存在しない。
9. ヒト前骨髄性白血病株細胞 HL-60 には通常痕跡程度しか FBPase 活性は存在しないが、活性型ビタミンD₃で処理すると、肝型 FBPase が著しく誘導される。

文 献

- 1) Fernando, J., Enser, M., Pontremoli, S. & Horecker, B. L.: Purification and properties of rabbit muscle fructose 1,6-diphosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 126, 599-606, 1968.
- 2) Enser, M., Shapiro, S. & Horecker, B. L.: Immunological studies of liver, kidney, and muscle fructose 1,6-diphosphatases. Arch. Biochem. Biophys. 129, 377-383, 1969.
- 3) Olson, J. P. & Marquardt, R. R.: Avian fructose-1,6-diphosphatases. I. Purification and comparison of physical and immunological properties of the liver and breast muscle

- enzymes from chicken (*Gallus Domesticus*).
Biochim. Biophys. Acta 268, 453-467, 1972.
- 4) Mizunuma, H. & Tashima, Y.: Fructose 1, 6-bisphosphatase of the small intestine—Purification and comparison with liver and muscle fructose 1, 6-bisphosphatases. J. Biochem. 84, 327-336, 1978.
 - 5) Mizunuma, H., Hasegawa, M. & Tashima, Y.: Properties of rabbit intestinal fructose 1, 6-bisphosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 201, 296-303, 1980.
 - 6) Mizunuma, H. & Tashima, Y.: Evidence for the intestinal type of fructose 1,6-bisphosphatase in mouse, rat, and golden hamster. Arch. Biochem. Biophys. 217, 512-516, 1982.
 - 7) Hosey, M. M. & Marcus, F.: Fructose-bisphosphatase as a substrate of cyclic AMP-dependent protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 91-94, 1981.
 - 8) Rittenhouse, J., Chatterjee, T., Marcus, F., Reardon, I. & Henrikson, R. L.: Amino acid sequence of the COOH-terminal region of fructose-1,6-bisphosphatases in relation to cyclic AMP-dependent phosphorylation. J. Biol. Chem. 258, 7648-7652, 1983.
 - 9) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976.
 - 10) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685, 1970.
 - 11) Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets—procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354, 1979.
 - 12) Hawkes, R., Niday, E. & Gordon, J.: A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. Anal. Biochem. 119, 142-147, 1982.
 - 13) Marcus, F., Rittenhouse, J., Chatterjee, T. & Hosey, M. M.: Fructose-1,6-bisphosphatase from rat liver. In Wood, W. A. (ed.): Methods in Enzymology Vol. 90, pp352-357, Academic Press, New York, 1982.
 - 14) Tashima, Y., Mizunuma, H. & Hasegawa, M.: Purification and properties of mouse liver fructose 1,6-bisphosphatase. J. Biochem. 86, 1089-1099, 1979.
 - 15) Claus, T. H., Schlumpf, J., El-Maghrabi, M. R., McGrane, M. & Pilkis, S. J.: Glucagon stimulation of fructose 1,6-bisphosphatase phosphorylation in rat hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100,716-723,1981.
 - 16) Meek, D. W. & Nimmo, H. G.: Effects of phosphorylation on the kinetic properties of rat liver fructose 1,6-bisphosphatase. Biochem. J. 222, 125-130, 1984.
 - 17) Traniello, S., Melloni, E., Pontremoli, S., Sia, C. L. & Horecker, B. L.: Rabbit liver fructose 1,6-bisphosphatase—Properties of the native enzyme and their modification by subtilisin. Arch. Biochem. Biophys. 149, 222-231, 1972.
 - 18) Dzugaj, A., Chu, D. K., El-Dorry, H. A., Horecker, B. L. & Pontremoli, S.: Isolation of the S-peptide formed on digestion of fructose 1,6-bisphosphatase with subtilisin and its non-covalent association with the enzyme protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 638-646, 1976.
 - 19) MacGregor, J. S., Hannappel, E., Xu, G.-J., Pontremoli, S. & Horecker, B. L.: Conservation of primary structure at the proteinase-sensitive site of fructose 1,6-bisphosphatases. Arch. Biochem. Biophys. 217, 652-664, 1982.
 - 20) Rosenmann, E., Gonzalez, A. M., Hein, S. & Marcus, F.: Carp (*Cyprinus Carpio*) muscle fructose 1,6-bisphosphatase—purification and some properties. Comp. Biochem. Physiol. 58B, 291-295, 1977.
 - 21) Opie, L. H. & Newsholme, E. A.: The inhibition of skeletal-muscle fructose 1,6-diphosphatase by adenosine monophosphate. Biochem. J. 104, 353-360, 1967.
 - 22) Marquardt, R. R. & Olson, J. P.: Comparative enzymatic properties of avian liver and skeletal muscle D-fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase. Can. J. Biochem. 53, 1214-1219,

- 1975.
- 23) Mizunuma, H. & Tashima, Y.: Effect of Mn^{2+} on fructose 2,6-bisphosphate inhibition of mouse liver, intestinal, and muscle fructose 1,6-bisphosphatases. *Arch. Biochem. Biophys.* 226, 257-264, 1983.
 - 24) Majumder, A. L. & Eisenberg, F.: Unequivocal demonstration of fructose 1,6-bisphosphatase in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 74, 3222-3225, 1977.
 - 25) Liu, F. & Fromm, H. J.: Purification and characterization of fructose-1,6-bisphosphatase from bovine brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 260, 609-615, 1988.
 - 26) Challiss, R. A. J., Arch, J. R. S. & Newsholme, E. A.: The rate of substrate cycling between fructose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate in skeletal muscle. *Biochem. J.* 221, 153-161, 1984.
 - 27) Tashima, Y., Tholey, G., Drummond, G., Bertrand, H., Rosenberg, J. S. & Horecker, B. L. : Purification and properties of a rabbit kidney fructose diphosphatase with neutral pH optimum. *Arch. Biochem. Biophys.* 149, 118-126, 1972.
 - 28) Krebs, H. A. & Woodford, M.: Fructose 1,6-diphosphatase in striated muscle. *Biochem. J.* 94, 436-445, 1965.
 - 29) Greengard, O.: The developmental formation of enzymes in rat liver. in Litwack, G. (ed.) : *Biochemical Actions of Hormones*, Vol. 1, pp. 53-87, Academic Press, New York, 1970.
 - 30) Ballard, F. J. & Hanson, R. W.: Phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate carboxylase in developing rat liver. *Biochem. J.* 104, 866-871. 1967.
 - 31) Holt, P. G. & Oliver, I. T.: Factors affecting the premature induction of tyrosine aminotransferase in foetal rat liver. *Biochem. J.* 108, 333-338, 1968.
 - 32) Yeung, D., Stanley, R. S. & Oliver, I. T.: Development of gluconeogenesis in neonatal rat liver—effect of triamcinolone. *Biochem. J.* 105, 1219-1227, 1967.
 - 33) Yeoh, G. C. T., Bennett, F. A. & Oliver, I. T.: Hepatocyte differentiation in culture—appearance of tyrosine aminotransferase. *Biochem. J.* 180, 153-160, 1979.
 - 34) Greengard, O.: Enzymic differentiation in mammalian liver. *Science* 163, 891-895, 1969.
 - 35) Hanson, R. W., Fisher, L., Ballard, F. J. & Reshef, L.: The regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in fetal rat liver. *Enzyme* 15, 97-110, 1973.
 - 36) Mencher, D., Shouval, D. & Reshef, L.: Premature appearance of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase in fetal rats, not mediated by adenosine 3', 5'-monophosphate. *Eur. J. Biochem.* 102, 489-495, 1979.
 - 37) Ruiz-Bravo, N. & Ernest, M. J.: Induction of tyrosine aminotransferase mRNA by glucocorticoids and cAMP in fetal rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 365-368, 1982.
 - 38) Weber, G.: Molecular correlation concept. in Busch, H. (ed.): *The Molecular Biology of Cancer*, pp. 487-521, Academic Press, New York, 1974.
 - 39) Solomon, D. H., Raynal, M., -C., Tejwani, G. A. & Cayre, Y. E. : Activation of the fructose 1,6-bisphosphatase gene by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 during monocytic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6904-6908, 1988.
 - 40) Muraio, S., Gemmell, M. A., Callahan, M. F., Anderson, N. L. & Huberman, E. : Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 and phorbol-12-myristate-13-acetate. *Cancer Res.* 43, 4989-4996, 1983.
 - 41) Bar-Shavit, Z., Teitelbaum, S. L., Reitsma, P., Hall, A., Pegg, L. E., Trail, J. & Kahn, A. J. : Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D_3 . *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 80, 5907-5911, 1983.
 - 42) Koeffler, H. P.: Induction of differentiation of human acute myelogenous leukemia cells—therapeutic implications. *Blood* 62, 709-721, 1983.