

# 糖新生系と解糖系に關与する諸酵素の 研究に關する最近の知見

—(1) phosphoenolpyruvate carboxykinase の活性化に關与する諸因子—

福 留 祥 子

phosphoenolpyruvate carboxykinase (以下 PPCK と稱す)は糖新生系の obligatory enzyme であり、この経路の調節を行う位置にある。この酵素が phosphoenolpyruvate の合成期に最大の活性を示すには2つの metal ion の存在を必要とする<sup>1)2)3)</sup>。Mg は存在する nucleotide(GTP, IMP) の濃度に近い量を要し、 $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  のような2価の transition element はより低い濃度でこの酵素を活性化することが分っている<sup>4)</sup>。rat liver cytosol 中の各 ion の濃度は Mg 1260  $\mu M$ , Fe 185  $\mu M$ , Mn 1.8  $\mu M$ <sup>5)</sup>であり、Co は全肝細胞内濃度として1  $\mu M$  である<sup>6)</sup>。この内、Co は PPCK の生理学的 activator として作用するには不充分である<sup>4)</sup>。

tryptophan やその代謝産物である quinolinate は PPCK の位置で糖新生系を阻害する<sup>7)8)9)10)</sup>が、Snoke 等は quinolinate による阻害には  $Fe^{2+}$  の存在が必要であり、この場合、 $Mn^{2+}$  では阻害効果はないと述べている<sup>4)</sup>。in vivo でこの酵素を quinolinate が阻害することや rat liver cytosol 中に  $Fe^{2+}$  が比較的豊富なことなどから  $Fe^{2+}$  は rat liver では PPCK の活性に最も影響を与える transition metal ion であると云える。以上の反応はいずれも rat liver cytosol 中の PPCK に対して認められるものであるが、精製 PPCK に対しては transition metal ion の作用の様相は同じではない。この場合、 $Mn^{2+}$  では活性化するが  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  では活性化しない<sup>11)</sup>。

Bentle 等<sup>12)</sup>は rat liver cytosol 中の PPCK の精製の過程で phosphoenolpyruvate 合成の  $Fe^{2+}$  による刺激の喪失を認め、精製過程において PPCK と分離し、ferrous ion による phosphoenolpyruvate 合成を左右する因子が cytosol 中に含まれていることを明らかにしている。

Table 1 では、cytosol に30  $\mu M$  の  $Fe^{2+}$ 、あるいは  $Mn^{2+}$  を添加すればそれぞれコントロールの277, 219%の PPCK の活性化が見られる。これに対し精製 PPCK では  $Fe^{2+}$  で42%の強い阻害を認めるが  $Mn^{2+}$  では243%と余り変化がない。 $Fe^{2+}$ での42%という強い阻害は PPCK の精製の結果としてもたらされた phosphoenolpyruvate 合成に対する  $Fe^{2+}$  の刺激の喪失の上に、反応液中に含まれる phosphate と  $Fe^{2+}$  の相互作用の結果生じたものである。ところがこれに cytosol を添加すると反応液中の phosphate の阻害を解除した上に精製 PPCK の capability は元に戻る。この cytosol 中の phosphoenolpyruvate 合成に対する  $Fe^{2+}$  の刺激を左右する

TABLE I 12)

Comparison of activation of P-enolpyruvate carboxykinase by  $Mn^{2+}$  or  $Fe^{2+}$  after incubation of divalent metal cations with either cytosol or purified enzyme for 10 min at 0°

The incubation medium contained 0.75 mM sodium phosphate. The final incubation volume was 0.2 ml; 0.1 ml was used to initiate the enzymatic reaction in the assay medium that routinely contained 3 mM  $MgCl_2$  and 2 mM ITP.

Additions	Specific activity <i>nmol P-enol-pyruvate/min</i> × <i>mg</i>	% of control
Cytosol	45	100
+ 30 $\mu M$ $FeCl_2$	124	277
+ 30 $\mu M$ $MnCl_2$	98	219
Purified enzyme	3,770	100
+ 30 $\mu M$ $FeCl_2$	1,580	42
+ 30 $\mu M$ $MnCl_2$	9,160	243
+ 47 $\mu g$ of cytosol	4,680*	124
+ 47 $\mu g$ of cytosol + 30 $\mu M$ $FeCl_2$	11,300*	300

\* Corrected for the P-enolpyruvate carboxykinase activity in the cytosol and thus represents the specific activity of the purified enzyme only.

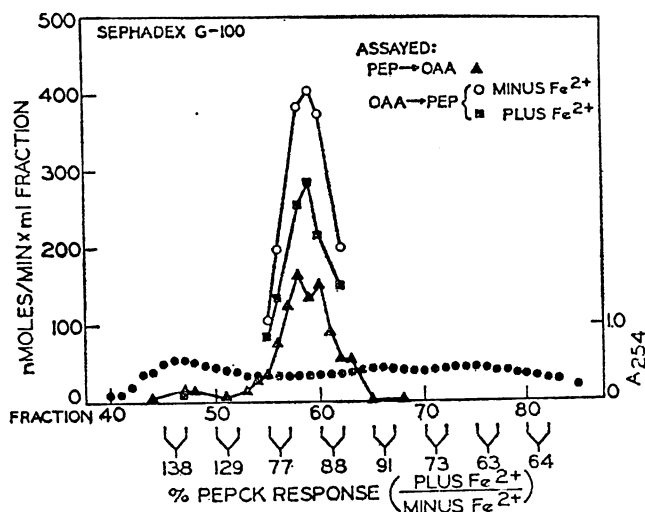


FIG. 1.12) Sephadex G-100 chromatography of a 45 to 70%  $(NH_4)_2SO_4$  fraction of fasted rat liver cytosol on a column (5.3 cm<sup>2</sup> × 100 cm) equilibrated with 50 mM Tris-Chloride, pH 7.0. The sample was extensively dialyzed versus the column buffer containing 2 mM dithiothreitol. A 4-ml sample was applied, 4.7-ml fractions were collected, and the protein monitored at 254 nm (●). Each fraction was made 2 mM in dithiothreitol. The applied sample, assayed with the column fractions, was stimulated to 310% of the control by  $Fe^{2+}$  when assaying P-enolpyruvate (PEP) synthesis. The values below the *abscissa* show the effect upon P-enolpyruvate formation after incubating 75  $\mu l$  of the indicated combined fractions with 2.6  $\mu g$  of purified P-enolpyruvate carboxykinase (PEPCK) with and without 30  $\mu M$   $Fe^{2+}$ .

因子を彼らは硫安分画, Sephadex G-100 による分画の2段階処理により分離し, この因子を PPCK の ferroactivator と名称した。

Fig 1 は Sephadex G-100 chromatography による PPCK の elution profile である。Sephadex G-100 に使用したサンプルの活性はコントロールの310%の値を示している。Sephadex G-100 による分画で ferroactivator は PPCK と分離したことになる。

Bentle 等は ferroactivator が Fe を含んでいるかもしくは Fe と結合出来る蛋白質の有する一般的な固有性であるかどうかを調べているが, phosvitin (egg), transferrin (human), bovin serum albumin (Pent ex Fraction V), Hemoglobin (human), Ferritin (horse spleen) などの蛋白質にはいずれも ferroactivator の示す作用を認めていない。煮沸, perchloric acid あるいは barium-zinc で破壊されること, 又, Sephadex G-100 の elution profile などのデータ<sup>12)</sup>はこの ferroactivator がかなり大きな分子量の蛋白質であることを示唆している。rat liver cytosol PPCK の分子量は74500<sup>13)</sup>であり, 他種動物のそれは平均70000<sup>13)</sup>であるので精製 PPCK がその活性化に ferroactivator を要するという事はそれ故にこの PPCK から 1 サブユニットが除去された結果ではないことが分る。

rat liver PPCK の細胞内分布はその90%が cytosol 中に存在するが<sup>14)</sup>, 同様に ferroactivator もそのほとんどが cytosol に存在する (Table 2)。この事実は ferroactivator が糖新生

TABLE II<sup>12)</sup>  
Subcellular distribution of *P-enolpyruvate carboxykinase*  
ferroactivator activity in rat liver

Tissue fraction	Activity	
	<i>units/μg protein<sup>a</sup></i>	<i>units/g liver</i>
Homogenate	0.164 ± 0.020 <sup>b</sup>	14,500 ± 2,800
Cytosol	0.176 ± 0.030	12,500 ± 3,200
Mitochondria	0.151 ± 0.008	280 ± 20
Microsomes	Not detectable	

<sup>a</sup> Explicitly, homogenate and mitochondrial data are expressed as: units/μg of soluble protein after freezing and thawing, in sequence, three times.

<sup>b</sup> Numbers in parentheses represent the number of samples.

<sup>c</sup> Standard deviation.

系の調節に重要な役割りを演ずることを示すものと考えられる。又, kidney, erythrocytes, adipose tissue, brain にも ferroactivator が存在する<sup>12)</sup>ということは糖新生系の調節物質として ferroactivator が広く分布し機能していると考えてよい。

fed rat と fasted rat と比較すると, liver cytosol PPCK は後者が前者の2.5倍増の活性を示す<sup>14)15)</sup>のに対して ferroactivator の増減は認められない<sup>12)</sup>。fasted rat の場合, glucose への pyruvate の変換には pyruvate kinase の阻害が重要な因子となると Friedman 等は述べている。同時に, 糖新生系酵素である pyruvate kinase, PPCK をコントロールすることが重要であると解される。PPCK に関しては, starvation と refeeding cycle の間に明らかに酵素合

成の変化が認められる<sup>16)17)18)19)20)</sup>。又, Ui 等<sup>21)</sup>は isolated perfused liver を使用して glucagon 処理を行うことにより [<sup>14</sup>C] lactate plus [<sup>14</sup>C] pyruvate から control の3倍量の [<sup>14</sup>C] glucose 合成を認めているが, PPCK の活性化を認めたことから糖新生系に対する glucagon の主たる作用部位は PPCK であるとしている。しかしながら, この PPCK を直接 active form へ変換する effector は明確ではない。Mn<sup>2+</sup> は PPCK を単独に活性化するが, intact liver ではこの酵素活性に最も大きな影響を与える transition metal ion は Fe<sup>2+</sup> である<sup>4)</sup>。Fe<sup>2+</sup> は単独では PPCK を活性化しない。Bantle 等は, PPCK ferroactivator が Fe<sup>2+</sup> による phosphoenol-pyruvate 合成の刺激, すなわち PPCK の活性化に必要な因子であると述べている<sup>12)</sup>。in vitro でのこの PPCK に対する ferroactivator の作用は in vivo での PPCK 活性をコントロールする生理学的な役割りを示唆するものと考えられる。それ故に, この PPCK ferroactivator の精製, 生化学的性質, in vivo での他の因子との相互関係などの解明が待たれる。

#### 引用文献

- 1) Foster, D. O., Lardy, H. A., Ray, P. D., and Johnston, J. B. (1967) *Biochemistry* 6, 2120-2128.
- 2) Holten, D. D., and Nordlie, R. C. (1965) *Biochemistry* 4, 723-731.
- 3) Utter, M. F., and Kolenbrander, H. M. (1972) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed) Vol. 6, pp. 117-168, Academic Press, New York.
- 4) Snoke, R. E., Johnston, J. B., and Lardy, H. A. (1971) *Eur. J. Biochem.* 24, 342-346.
- 5) Thiers, R. E., and Vallee, B. L. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 911-920.
- 6) Bowen, H. J. M., ed (1966) in *Trace Elements in Biochemistry*, p. 75, Academic Press, New York.
- 7) Ray, P. D., Foster, D. O., and Lardy, H. A. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 3904-3908.
- 8) Veneziale, C. M., Walter, P., Kneer, N., and Lardy, H. A. (1967) *Biochemistry* 6, 2129-2138.
- 9) Söling, H. D., Willms, B., Kleineke, J., and Gehloff, M. (1970) *Eur. J. Biochem.* 16, 289-302.
- 10) Williamson, D. H., Mayor, F., and Veloso, D. (1971) in *Regulation of Gluconeogenesis* (Söling, H. D., and Willms, B., eds) pp. 92-102, Academic Press, New York.
- 11) Bantle, L. A., and Lardy, H. A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2916-2921.
- 12) Bantle, L. A., Snoke, R. E., and Lardy, H. A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 2922-2928.
- 13) Ballard, F. J., and Hanson, R. W. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5625-5630.
- 14) Hanson, R. W., and Garber, A. J. (1972) *Am. J. Clin. Nutr.* 25, 1010-1021.
- 15) Shrago, E., Lardy, H. A., Nordlie, R. C., and Foster, D. O. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3188-3192.
- 16) Friedman, B., Goodman, E. H., Jr., Saunders, H. L., Kostos, V., and Weinhouse, S. (1971) *Metabolism* 20, 2-12.
- 17) Lardy, H. A., Foster, D. O., Shrago, E., and Ray, P. D. (1964) *Adv. Enzyme Regul.* 2, 39-47.
- 18) Lardy, H. A., Foster, D. O., Young, J. W., Shrago, E., and Ray, P. D. (1965) *J. Cell. Comp. Physiol.* 66 (Suppl.), 39-53.
- 19) Hopgood, M. F., Ballard, F. J., Reshef, L., and Hanson, R. W. (1973) *Biochem. J.* 134, 445-453.
- 20) Ballard, F. J., Hopgood, M. F., Reshef, L., and Hanson, R. W. (1974) *Biochem. J.* 140, 531-538.
- 21) Williams, J. A., Kemp, J., and Woodbury, D. M. (1974) *Life Sci* 15, 741-749.