多和肉腫細胞からの Phosphofructokinase の精製と反応機構について

平 山 け い

城西歯科大学口腔生化学講座（主任：山田正三教授）

〔受付：昭和58年12月17日〕

Purification and reaction mechanism of phosphofructokinase from ascites Tawa sarcoma cells

Kei Hirayama

Department of Oral Biochemistry, Josai Dental University
1-1, Keyakidai, Sakado, Saitama 350-02

(Chief: Prof. Shozo Yamada)

[Accepted for publication: December 17, 1983]

Key words: phosphofructokinase / Tawa sarcoma / blue dextran Sepharose / ping-pong mechanism

Abstract: Phosphofructokinase (ATP: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase, EC 2.7.1.11) from ascites Tawa sarcoma cells was purified to yield a homogeneous preparation of specific activity 84 units/mg of protein.

The sodium dodecyl sulfate-treated purified enzyme migrated as a single band in 5 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis with an apparent molecular weight of $92,000 \pm 3,000$ for the protomer.

The Lineweaver-Burk plots of initial velocity kinetics were linear and gave a series of apparently parallel lines.

The product inhibitions were as follows: the noncompetitive inhibition by ADP *versus* ATP was completely overcome by saturating concentration of fructose-6-P. Fructose-1, 6-P₂ was a competitive inhibitor *versus* ATP. ADP was a competitive inhibitor *versus* fructose-6-P. The noncompetitive inhibition by fructose-1, 6-P₂ *versus* fructose-6-P was completely overcome by saturating concentrations of ATP.

The results are in accordance with a ping-pong reaction mechanism in ATP is the first, fructose-6-P is the second substrate to bind, and ADP dissociates itself from the enzyme before fructose-6-P is bound to the enzyme.

緒 言

Phosphofructokinase (ATP: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase, EC 2. 7. 1. 11.) は、解糖系における律速酵素であり、fructose-6-phosphate + ATP → fructose-1, 6-diphosphate + ADP の 2 基質、2 生成物反応を触媒する酵素である。本酵素の反応機構は、Cleland の定義¹⁻³⁾に従い、基本的には sequential 型と ping-pong 型

の 2 つの反応機構が考えられる。

腹水腫瘍細胞の phosphofructokinase (以下 PFK と略記) の反応速度の解析から⁴⁻⁶⁾ ping-pong 機構に従って 2 状態間を転移する分子にアロステリックエフェクターが関与し、さらに 2 状態間の遷移現象が加わるという複雑な反応機構が報告されている。

Uyeda らは⁷⁾、ウサギ骨格筋の PFK を用いて、ATP が第 1 基質、fructose-6-phosphate (以下 F6P と略記) が、第 2 基質となる ping-pong

機構を報告している。一方、ラット肝臓 PFK は、Brand ら⁸⁾によれば、F6P が第1基質、Mg-ATP が第2基質となり、Mg-ADP, fructose-1, 6-P₂の順序で生成物が遊離する ordered sequential 機構を報告している。ヒツジ心筋では、fructose-6-sulfate を基質とした時に、第1基質が Mg-ATP, 第2基質が fructose-6-sulfate となる ordered 機構を Martensen らが報告している⁹⁾。

多和肉腫は、Donryu ラットに自然発生したもので、背部皮下ならびに縦隔洞に結節型腫瘍として発見されたものである。移植第2代目の皮下結節型腫瘍が、腹水型腫瘍に転換され腹水型腫瘍として累代移植されている¹⁰⁾。この糖質代謝の特性を解明するために、解糖系の律速酵素である PFK を取り上げた。腹水型多和肉腫からの PFK を単一に精製し、その反応機構について検討を加え、興味ある知見を得たので、結果を報告する。

材料および方法

1. 腫瘍細胞

実験には、松本実験動物より購入した Donryu ラットの雄で体重が 80~120g のものを用了。実験期間中、日本クレアラット固型飼料 (CA-1) と水道水を自由に与え飼育した。用いた多和腫瘍細胞は、大阪歯科大学生化学教室より恵与を受けたもので、当教室で継代移植しているものである。

ラット腹腔内に移植した約 10⁷ 個の細胞は、移植後 4 日で純培養状態に達する。この時期の腫瘍細胞を集めた。集められた腫瘍細胞は、生理食塩水で 2 回洗浄後、低張処理により赤血球を溶血除去した。得られた洗浄腫瘍細胞は、-80°C に凍結保存した。

2. 酵素の精製

精製操作は、すべて 4°C 下で行った。腫瘍細胞 (10~30g) は、1 mM EDTA を含む 3 倍量の 100 mM リン酸緩衝液 pH 8.0 に懸濁した後、Virtis homogenizer を用い 20,000rpm で 3 分間ホモジナイズした。15,000×g で 30 分間遠心して粗酵素抽出液を得た。粗抽出液にたいし 0.1 倍量の 2% 硫酸プロタミンを、ゆるく攪拌しながら徐々に加え、20 分間平衡に保った。10,000×g で 30

分間遠心し、核酸を除去した。得られた上清は、35~60% 飽和の硫酸分画を行なった。上清 100ml に対し 19.5g の固型硫酸アンモニウムをゆっくりと加え、30 分間攪拌の後、2.0M-NaOH で pH を 8.0 に調整し、さらに 1 時間攪拌した。15,000×g で 30 分間遠心し上清を得た。この上清 100ml に対し 17.0g の硫酸アンモニウムをゆっくりと加え、30 分間攪拌の後、先と同様に pH を 8.0 に調整し、さらに 1 時間攪拌し、15,000×g で 30 分間遠心して硫酸沈殿を得た。この沈殿を 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 10 mM (NH₄)₂ SO₄ および 2 mM 2-メルカプトエタノールを含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 [Buffer A] 少量で溶解し、同 buffer で平衡化した Sephadex G-25 column (1.6×10cm) により脱塩をした。脱塩後タンパク部分は、直ちに、Buffer A で平衡化した blue-dextran Sepharose column (0.9×6cm) に吸着させた。blue-dextran Sepharose は、Ryan らの方法¹¹⁾に従い Sepharose-4B を CN·Br で活性化し、blue-dextran を coupling して作製した。サンプルを吸着させた blue-dextran column は、50 mM KCl を含む Buffer A で 280nm の吸収が 0 になるまで洗浄した。次に 0.3 mM ATP を流し PFK を特異的に溶出した。得られた PFK 活性部分は、コロジオンバックで 1.0 ml に濃縮し、10 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 で透析を行なった。得られた精製酵素は、-80°C に凍結保存し、使用時に溶解して用いた。これを PFK 精製酵素標品とした。

3. Assay 方法

PFK 活性の測定は、Brand ら⁸⁾の方法に準じて行なった。

I. Standard Assay (Assay I)

精製過程および初速度解析の assay には、すべてこの反応溶液を用いた。Standard assay の反応組成は、50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0, 3 mM MgCl₂, 5.0 mM 2-メルカプトエタノール, 0.34 mM NADH, 1.0 mM F6P, 0.6 mM ATP, 3.3 μg/ml aldolase, 1.48 μg/ml α-glycerophosphate dehydrogenase, 0.2 μg/ml triosephosphate isomerase および酵素を加え総量 2.0 ml とした。

30°C で340nm における NADH の吸収の減少を測定し、1分間に FDP が1 μ mol 生成する量を1 unit とした。

II. ADP Inhibition Assay (Assay II)

ADP による生成物阻害の解析のための assay には、ATP と F6P を除いては Assay I と同じ反応組成のものを使用した。ATP, F6P, ADP は、結果および Fig. 6 ~ 8 で示した濃度を加え、酵素を加えることにより反応を開始した。

III. FDP Inhibition Assay (Assay III)

FDP による生成物阻害の解析には、次の反応溶液を用いた。50mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0, 3.0mM MgCl₂, 5.0mM 2-メルカプトエタノール, 20mM KCl, 0.34mM NADH, 0.5mM PEP, 1.8 μ g/ml pyruvate kinase, 8.3 μ g/ml LDH を加え、ATP, F6P, FDP は、結果および Fig. 9 ~ 11 で示した濃度のものを加え、酵素を加えることにより反応を開始した。

酵素活性測定には、Shimazu 分光光度計 UV-210A を使用した。

4. SDS-polyacrylamide gel 電気泳動

PFK 3 μ g と marker protein (DNA-polymerase) 5 μ g は1% 2-メルカプトエタノールおよび2% SDS を含む100mM リン酸緩衝液 pH 7.2 中に30°C で2時間恒温に保ち、SDS 化を行なった。5% SDS-polyacrylamide gel (0.1% SDS) 電気泳動は、Weber ら¹²⁾の方法に従って行ない5 mA/tube で4時間泳動した。gel は、C.B.B. (0.25% in 45% ethanol, 9% acetic acid) で1時間染色し、methanol-acetic acid-D.W (1 : 2 : 17) で脱色した。操作は、室温で行なった。

5. 試薬

NADH, ATP, ADP は Sigma 社製を、F6P FDP, aldolase, α -glycerophosphate dehydro-

genase, triosephosphate isomerase は Böeringer-Mannheim 社製を、Sephacrose-4B, Sephadex G-25, blue-dextran は、Pharmacia 社製を用いた。その他の試薬は、和光純薬工業特級を使用した。

結 果

1. Phosphofructokinase の精製

多和肉腫細胞 (10g) からの PFK の精製過程は、Table 1 に示した通りである。硫酸分画(35~60%)での PFK は、比活性 0.268unit/mg で精製率は3.81倍にすぎないが、blue-dextran Sepharose column にかけることにより、比活性は、83.7unit/mg で1190倍に精製され、さらに回収率は、59%と高い値を示している。blue-dextran Sepharose column からの PFK は、0.3 mM ATP を流すことにより、シャープに特異的に溶出する。その溶出曲線を Fig. 1 に示した。PFK 活性部分は、コロジオンバックで濃縮後、10mM 2-メルカプトエタノール, 1 mM EDTA を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 pH 8.0 で透析し、-80°C に凍結保存した。上記保存条件下で本酵素は、約1カ月間安定であるが、凍結融解を繰り返すと失活する。

blue-dextran Sepharose column からの PFK は、SDS-polyacrylamide gel 電気泳動において単一のタンパクバンドを示している (Fig. 2)。また DNA-polymerase (α , β , β') を marker protein とした時、SDS-polyacrylamide gel 電気泳動において、PFK のサブユニットの分子量は、92,000 $\pm$ 3,000 と推定された (Fig. 3)。

2. 初速度解析

ATP が阻害を示さない範囲の濃度、すなわち ATP 濃度が 0.2mM 以下¹³⁾において、酵素反応

Table 1 Summary of purification of ascites Tawa sarcoma cells Phosphofructokinase

Procedure	Activity (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Fold	Recovery
crude extract	51.2	727.3	0.0704	1.0	100
protamine sulfate fractionation	48.8	266.0	0.183	2.61	95.3
ammonium sulfate fractionation (35-60%)	40.6	151.3	0.268	3.81	79.3
blue-dextran sepharose column	30.4	0.363	83.7	1190	59.4

Fig. 1 Elution pattern of phosphofructokinase on Blue Dextran-Sephadex 4B column. Protein fraction (5.0ml) obtained by Sephadex G-25 gel filtration was applied to Blue Dextran-Sephadex column (0.9×6cm) equilibrated with Buffer A. After washing of the column with 100 ml of the same buffer containing 50 mM KCl, the enzyme was eluted with 0.3mM ATP. The flow rate was 20ml/h and 1 ml fractions were collected.

Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified phosphofructokinase. The purified enzyme (3 μg) was applied. Gel concentration was 5 % with 8-cm length. A constant current of 5 mA per column was applied for 4 hr at 25°C.

初速度の解析を行なった。基質 ATP および F6P 各々の濃度と反応初速度との関係は、Michaelis-Menten の図式に従う。Fig. 4 および 5 に示したようにこの時の Lineweaver-Burk plot は、両者

Fig. 3 Molecular weight determination of phosphofructokinase (PFK) protomers with 5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Reference proteins are : DNA-polymerase ($z=39,000$, $\alpha=42,000$, $x=100,000$, $\beta=140,000$, $\beta'=180,000$). The molecular weight of the polypeptide chains of phosphofructokinase is extrapolated to be $92,000 \pm 3,000$.

Fig. 4 Plots of reciprocal of initial reaction velocity *versus* the reciprocal of ATP concentration. Fructose-6-P (F6P) was kept constant concentrations. ($\blacktriangle-\blacktriangle$, 0.05mM; $\bullet-\bullet$, 0.07mM; $\triangle-\triangle$, 0.2 mM; $\circ-\circ$, 0.4 mM F6P). The inset shows replots of intercepts. Assay I was used and other experimental details are described under "Method".

とも明らかな平行線を示している。このことは本酵素が、基本的には、ping-pong 機構に従うこと

Fig. 5 Plots of reciprocal of initial reaction velocity *versus* the reciprocal of fructose-6-P(F6P) concentration. ATP was kept constant concentrations. (Δ - Δ , 0.025 mM; $\bullet$ - $\bullet$, 0.03 mM; $\circ$ - $\circ$, 0.06 mM; $\times$ - $\times$, 0.25 mM ATP.) The inset shows replots of intercept. Assay I was used.

Fig. 6 Product inhibition by ADP with ATP as variable substrate and a nonsaturating concentration of fructose-6-P (50 μ M) as fixed substrate. Plots of reciprocal of initial reaction velocity with respect to the reciprocal of the concentration of ATP in the presence and absence of ADP. ADP was kept constant at the indicated concentrations. Assay II was used. The inset shows replots of intercepts.

を示唆している。またこの図の切片の再プロットより求めた K_m 値は, $K_{ATP}=98\mu M$, $K_{F6P}=141\mu M$ であった。

Fig. 7 Product inhibition by ADP with ATP as variable substrate and a saturating concentration of fructose-6-P (1.0 mM) as fixed substrate. Assay II was used.

Fig. 8 Product inhibition by ADP with fructose-6-P(F6P) as variable substrate and a saturating concentration of ATP (0.6 mM) as fixed substrate. Assay II was used. The inset shows replots of slopes.

3. 生成物阻害形式

1) ADP 阻害

ATP を可変基質とした時, F6P の濃度を飽和 (1.0mM), 不飽和 (50 μ M) にそれぞれ固定し, 両者について測定を行なった。0~0.5mM 濃度の ADP を加えたとき, 基質 ATP に対する反応初速度を測定した。Fig. 6 に示したように, F6P の濃度が不飽和のときの基質 ATP に対する反応初速度の両逆数プロットは, y 軸上に収束し non-competitive inhibition を示している。この時の阻害定数は, ADP の濃度に対する切片の再プロットから 0.31mM と求められた。しかしながら,

Fig. 9 Product inhibition by fructose-1,6-P₂ (FDP) with ATP as variable substrate and a nonsaturating concentration of fructose-6-P (50 μ M) as a fixed substrate. Plots of reciprocal of initial reaction velocity versus the reciprocal of the concentration of ATP in the presence and absence of FDP. Assay III was used. The inset shows replots of slopes.

Fig. 10 Product inhibition by fructose-1,6-P₂ (FDP) with fructose-6-P (F6P) as variable substrate and a nonsaturating concentration of ATP (30 μ M) as a fixed substrate. Assay III was used. The inset shows replots of intercepts.

F6P の濃度を飽和にしたとき、ADP による阻害はまったく見られなかった (Fig. 7)。

一方、F6P を可変基質とした時、ATP の濃度を飽和 (0.6mM)、不飽和 (30 μ M) にそれぞれ固定し、両者について測定を行なった。基質 F6P

Fig. 11 Product inhibition by fructose-1,6-P₂ (FDP) with fructose-6-P (F6P) as variable substrate and a saturating concentration of ATP (0.6 mM) as a fixed substrate. Assay III was used.

Table 2 Product inhibition experiments

Product	Variable Substrate			
	ATP		F6P	
	F6P	ATP	F6P	ATP
	sat.	unsat.	sat.	unsat.
ADP	no inhibition	noncomp. comp.	comp.	comp.
FDP	comp.	comp.	no inhibition	noncomp.

に対する反応初速度の測定は、0~0.5mM ADP を加えたときについて行なった。ATP の濃度が飽和 (Fig. 8)、不飽和にかかわらず ADP は、competitive inhibition を示した。この時の阻害定数は、ADP 濃度に対する傾斜の再プロットから、ATP 飽和濃度のとき0.48mM、ATP 不飽和のとき0.21mM と求められた。

2) FDP 阻害

ATP を可変基質とした時、F6P の濃度を 1.0 mM および 50 μ M に固定し、それぞれについて測定を行なった。ATP に対する反応初速度の測定は、0~3.0mM の FDP を加えたときについて行なった。F6P の濃度が飽和、不飽和 (Fig. 9)にかかわらず、FDP は、competitive inhibition を示した。この時の阻害定数は、FDP 濃度に対する傾斜の再プロットから F6P 飽和のとき 3.0 mM、不飽和のとき 2.2mM と求められた。

一方, F6P を可変基質とした時に, ATP の濃度を飽和, 不飽和でそれぞれ一定にし, 各々について F6P に対する反応初速度の測定を行なった。FDP は, 0~3.0mM の範囲内で加え測定をした。Fig. 10 に示したように ATP が不飽和濃度のとき両逆数プロットは, Y 軸上に収束し, non-competitive inhibition を示している。このときの阻害定数は, FDP 濃度に対する切片の再プロットより, 3.7mM と求められた。しかしながら, ATP を飽和濃度まで上げて加えた時, Fig. 11 に示したように阻害は, まったく見られなかった。生成物阻害の結果を Table 2 にまとめた。

考 察

多和肉腫からの PFK を比活性が84unit/mg に精製した。回収率は, 59 % と高い値を示している。また, この精製酵素標品は, SDS-polyacrylamide gel 電気泳動において単一のタンパクバンドを示している。従来の DEAE-cellulose や Sepharose 2B, 4B 等を用いた精製方法^{4, 8, 14, 15)}では, その操作の繁雑さから高回収率は望めなかったが, 今回 blue-dextran Sepharose を用いて PFK を特異的に溶出することにより, 高回収率で単一にまで精製することが出来た。また, NH_4^+ , SO_4^{2-} イオンによる PFK の安定化^{16, 17)}に着目し, blue-dextran Sepharose column に使用した buffer 中に 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加え, PFK の失活を防いだことも高回収率を得る1つの要因となっている。

SDS-polyacrylamide gel 電気泳動により, 本酵素のサブユニットの分子量は, $92,000 \pm 3,000$ と推定された。この値は, human muscle の 80,000 または $85,000^{18, 19)}$, rat liver の $82,000 \pm 2,000^{8, 14)}$ 等と比較して約10,000高い値となっている。一方, Sephadex G-200 クロマトグラフィを用いて本酵素の分子量の測定を試みた。種々の溶出 buffer 条件下で行なったが, PFK のゲル中での aggregate により^{8, 20)} PFK は, void volume とほぼ等しい位置またはそれより後に溶出され, ゲル濾過法による分子量の測定は, 不可能であった。

初速度の解析における両逆数プロットは, ATP, F6P 両者とも直線を示し, さらに明らか

な平行線を示している (Fig. 4, 5)。このことは, 本酵素反応が ping-pong 機構に従っていることを示唆している。

生成物阻害実験において, ADP は, ATP を可変基質とした時に, FDP の濃度が不飽和の場合 noncompetitive inhibition を示すが (Fig. 6), F6P の濃度が飽和のとき阻害は示さなかった (Fig. 7)。また ADP は, F6P を可変基質とした時は, ATP の濃度にかかわらず competitive inhibition を示した。一方, FDP は, ATP を可変基質とした時, F6P 濃度の飽和, 不飽和にかかわらず competitive inhibition を示した。また, F6P を可変基質とした時, FDP は, ATP の濃度が不飽和の時は noncompetitive inhibition を示すが (Fig. 10), ATP を飽和濃度にしたとき阻害は見られなかった (Fig. 11)。これらの結果を解析すると以下ようになる。

1. ATP の結合する E (Enzyme) と ADP の結合する E·P とは可逆的に転換を行なうので, ADP は noncompetitive inhibitor となる。しかし, この時 F6P が飽和濃度であった場合, E·P の取り合いの際に, ADP は F6P に対して充分無視出来るので阻害作用はなくなる。

2. ADP は, ATP の濃度には関係なく F6P と E·P を取り合うので competitive inhibitor となる。

3. FDP は, F6P の濃度にかかわらず, ATP と E を取り合うので competitive inhibitor となる。

4. FDP は, F6P の結合する E·P とは可逆的に転換するので, ATP の濃度が不飽和の時

Fig. 12

noncompetitive inhibitor となる。しかし、ATP を飽和濃度にした時は、E の取り合いの際に FDP は ATP に対してまったく無視出来るので、阻害作用はなくなる。

以上のように生成物阻害形式の解析から、多和肉腫からの PFK の反応機構は、Fig. 12 に示したように、第1基質は ATP であり、第2基質である F6P が酵素に結合する前に第1生成物である ADP が生成し、次に F6P が結合し、第2生成物 FDP が生成するという ping-pong 機構に従っていることが明らかになった。

結 論

多和肉腫細胞の糖質代謝の特性を解明するために、解糖系の律速酵素である PFK を取り上げ、その反応機構について検討を加え以下のような結論を得た。

1. 多和肉腫細胞からの phosphofructokinase を blue-dextran Sepharose column クロマトグラフィーを用いて1190倍に精製した。このときの比活性は、83.7 unit/mg であった。精製酵素は、

SDS-polyacrylamide gel 電気泳動において単一のタンパクバンドを示した。

2. 本酵素のサブユニットの分子量は、SDS-polyacrylamide gel 電気泳動により $92,000 \pm 3,000$ と推定された。

3. 本酵素の ATP に対する K_m 値は $9.8 \times 10^{-5} M$ であった。また F6P に対する K_m 値は、 $1.4 \times 10^{-4} M$ であった。

4. 初速度解析および生成物阻害形式の解析から多和肉腫細胞からの本酵素は、Cleland の定義に従い、第1基質 ATP が酵素に結合し、第2基質である F6P が結合する前に第1生成物 ADP が生成し、次に第2基質 F6P が結合し、第2生成物 FDP が生成するという ping-pong 機構に従う酵素反応機構であることが明らかとなった。

謝辞：稿を終えるにあたり、本研究に終始懇切なる御指導ならびに御校閲を賜りました城西歯科大学口腔生化学講座山田正三教授に深く感謝致します。

本論文の要旨は、第25回歯科基礎医学会総会（1983年10月）において発表した。

抄録：多和肉腫細胞からの phosphofructokinase を比活性が83.7unit/mg に精製した。精製酵素は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一のタンパクバンドを示した。

本酵素のサブユニットの分子量は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により $92,000 \pm 3,000$ と推定された。

初速度解析の結果 Lineweaver-Burk プロットは、平行線を示し、本酵素の反応機構は、ping-pong 機構に従うことが示唆された。また生成物阻害形式の解析より、本酵素の反応機構は、第1基質 ATP が酵素に結合し、第1生成物 ADP が生成し、次に第2基質 fructose-6-P が結合し、第2生成物 fructose-1,6- P_2 が生成するという ping-pong 機構に従うことが明らかとなった。

文 献

- 1) Cleland, W. W.: The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products (I). *Biochim. Biophys. Acta* **67**: 104-137, 1963.
- 2) Cleland, W. W.: The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products (II). *Biochim. Biophys. Acta* **67**: 173-187, 1963.
- 3) Cleland, W. W.: The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products (III). *Biochim. Biophys. Acta* **67**: 188-196, 1963.
- 4) Sumi, T. and Ui, M.: Purification and some properties of phosphofructokinase from ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **268**: 354-363, 1972.
- 5) Sumi, T. and Ui, M.: Allosteric properties of enzymes with ping-pong mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **276**: 12-18, 1972.
- 6) Sumi, T. and Ui, M.: Kinetic studies on phosphofructokinase from ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **276**: 19-30, 1972.
- 7) Uyeda, K.: Studies on the reaction mechanism of skeletal muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* **245**: 2268-2275, 1970.
- 8) Brand, I. A. and Söling, H. D.: Rat liver phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* **249**: 7824-7831, 1974.

- 9) Martensen, T. M. and Mansour, T. E. : Studies on heart phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* **251** : 3664-3670, 1976.
- 10) Tawa, T., Sakaki, T., Yokota, Y., Yamada, S. and Shimada, S. : A new spontaneous transplantable tumor in Donryu rat. *Gann* **56** : 75-76, 1965.
- 11) Ryan, L. D. and Vestling, C. S. : Rapid purification of lactate dehydrogenase from rat liver and hepatoma, a new approach. *Arch. Biochem. Biophys.* **160** : 279-284, 1974.
- 12) Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244** : 4406-4412, 1969.
- 13) 平山けい, 中川博仁, 中川 宏, 小林裕幸, 山田正三 : Phosphofructokinase の ATP による活性調節について. *城歯大紀要* **11** : 226-231, 1982.
- 14) Reinhart, G. D. and Lardy, H. A. : Rat liver phosphofructokinase : Kinetic activity under near-physiological conditions. *Biochemistry* **19** : 477-484, 1980.
- 15) Khoja, S. M., Beach, N. L. and Kellett, G. L. : The isolation and characterization of rat small intestine. *Biochem. J.* **211** : 373-379, 1983.
- 16) Foe, L. G. and Trujillo, J. L. : Activation of phosphofructokinase by divalent anions. *Arch. Biochem. Biophys.* **211** : 373-379, 1983.
- 17) Habison, A., Kubicek, C. P., and Rohr, M. : Partial purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Aspergillus niger*. *Biochem. J.* **209** : 669-676, 1983.
- 18) Cottreau, D., Levin, M. J. and Kahn, A. : Purification and partial characterization of different forms of phosphofructokinase in man. *Biochim. Biophys. Acta* **568** : 183-194, 1979.
- 19) Kahn, A., Cottreau, D. and Meienhofer, M. C. : Purification of F₄ phosphofructokinase forms. *Biochim. Biophys. Acta* **611** : 114-126, 1980.
- 20) Reinhart, G. D. and Lardy, H. A. : Rat liver phosphofructokinase : Use of fluorescence polarization to study aggregation at low protein concentration. *Biochemistry* **19** : 1484-1490, 1980.