総 説

食餌性フルクトースとインスリンによる 肝L型ピルビン酸キナーゼの誘導機構†

野 口 民 夫

大阪大学医学部栄養学教室

Mechanisms of Induction of L-type Pyruvate Kinase by Dietary Fructose and Insulin

Tamio NOGUCHI

*Department of Nutrition and Physiological Chemistry, Osaka University
Medical School, Kita-ku, Osaka 530*

肝臓のエネルギー代謝は食餌条件の変化により種々の影響をうける¹⁾。グルコースを主成分とする高炭水化物食の摂取は解糖と脂肪合成を促進するが、絶食はこれらの代謝を抑制し、糖新生を高める。また、高タンパク食の摂取はアミノ酸代謝や糖新生を促進する。肝臓におけるこのような代謝の変化は、いわば生体全体のエネルギー代謝の中心臓器としての肝臓に課せられた適応的变化であるが、そのためには各代謝系の律速酵素の活性が食餌条件に応じて巧妙に制御されていなければならない。この制御には分単位で達成されるものもあれば、数時間以上かかる場合もある。また、酵素活性の変化を惹起するものは食餌条件に対応して分泌の変化するホルモンや基質とその代謝産物などが挙げられる。

ピルビン酸キナーゼは解糖系の重要な酵素で、肝臓ではグルコースとフルクトースの両方の代謝の律速酵素となっている(図1)。田中らはラットでこの酵素には組織分布を異にする4種のアイソザイム(L型, R型, M₁型, M₂型)が存在し、肝臓ではL型(LPK)が主要アイソザイムになっていることを見だした²⁾⁻⁵⁾。彼らはまた、肝LPK活性は高炭水化物食(以下、高炭水化物中の炭水化物はデキストリンを意味する)で増加するが、糖尿病になると著明に減少し、これにインスリンを投与すると酵素活性は正常値にまで回復することを報告している(表1)²⁾³⁾。高炭水化物食でインスリン分泌が

促進されることはよく知られているので⁶⁾、これらの結果は高炭水化物食によるLPK活性の上昇がインスリンの作用によることを示唆している。事実、初代培養肝細胞でもインスリンはLPK活性を上昇させることが報告されている⁷⁾。一方、高フルクトース食は高グルコース食と異なり糖尿病でもLPK活性を著明に増加させる(表1)⁸⁾⁹⁾。興味あるのはアセチルCoAカルボキシラーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、マリックエンザイム、ATPクエン酸リアーゼなどの脂質合成系酵素の活性がLPKと同様に糖尿病でインスリン¹⁰⁾の他に、高フルクトース食で増加することである¹¹⁾⁻¹⁴⁾。糖尿病患者にスクロースを与えると血中トリグリセリド値が上昇することはよく知られているが¹⁵⁾、これは上記のフルクトースによるLPKや脂質合成系酵素の活性上昇に起因するところが大きいといえる。そのなかでもLPKはフルクトース代謝の律速酵素であることを考えるとその役割は非常に重要である。

1. 食餌性フルクトースとインスリンはともにLPKのmRNA量を増加させる

それでは、食餌性フルクトースとインスリンはどのようにしてLPK活性を上昇させるのであろうか? この間に答えるために、まずLPKの抗体をウサギで作製し、免疫滴定法によって酵素タンパク量を測定した。なお、以下の実験はすべてストレプトゾシンで糖尿病にしたSD系雄性ラットを用いて行なった。その結果、インスリンとフルクトースによる酵素活性の上昇は酵素タ

† 本総説は昭和61年度奨励賞の対象となったものである。

図 1. 肝臓におけるグルコースとフルクトースの代謝経路

表 1. 高炭水化物食, インスリン, 高フルクトース食の LPK 活性に及ぼす影響

Treatment	No. of rats	Enzyme activity (U/mg protein)
Normal		
Lab. chow	3	1.205±0.089
High dextrin (1 day)	3	2.392±0.287
Diabetic		
High dextrin	3	0.589±0.089
High dextrin + Insulin (2 days)	3	2.868±0.234
Diabetic		
Lab. chow	3	0.136±0.028
High glucose (3 days)	3	0.312±0.123
High fructose (3 days)	3	1.065±0.135

ンパク量の変化に起因することが明らかになった¹⁶⁾。次に, LPK の mRNA 活性をウサギ網状赤血球の無細胞タンパク合成系を使って測定したところ, インスリンとフルクトースはともに酵素活性の変化を十分説明しうる以上に mRNA 活性を上昇させるという結果がえられた¹⁶⁾。このとき, 遺伝子発現過程から予期されるように, mRNA 活性の変化が酵素活性の変化に先行した。

mRNA 活性の変化は酵素における活性化, 不活性化のように, その量が変化しなくても起こりうることが考えられる。それゆえ, mRNA の量が測定できなければ, mRNA 活性の変化の機序は解明できない。特異的な mRNA の定量は相補的な配列をもつ DNA (cDNA) とのハイブリッド形成を利用して行なわれるので, 次に

LPK の cDNA の単離をクローニング法により試みた。そのためには, LPK の mRNA の純度が可能な限り高い mRNA 標品を用いるほうが容易であろうと考えられるので, 肝ポリソームの免疫沈降法により LPK mRNA の部分精製を行なった。えられた mRNA 標品は無細胞タンパク合成系で測定して, 約 6.5% の純度を示した¹⁷⁾。これは約 20 倍精製されたことを意味する。この mRNA 標品を用い, 常法により二重鎖 cDNA を合成し, プラスミドベクターの pBR322 の PstI 部位に組み込んで, 大腸菌 HB101 を形質転換した。えられたコロニーのうち, LPK の cDNA を含むコロニーの同定はまず M₂ 型アイソザイムの cDNA を用いて行なった。この cDNA は筆者らがクローニングしたもので, ゆるやかな条件では L 型の mRNA とハイブリッドを形成する¹⁸⁾。これで陽性と判定されたクローンはハイブリッドセレクトィッドトランスレーション法¹⁹⁾ならびに塩基配列の解析から LPK の cDNA クローンであることを確認した¹⁷⁾²⁰⁾。図 2 に 3 個のクローンの制限酵素地図と塩基配列決定の方向および範囲を示す²⁰⁾。以下の実験では主に pLPK1 か pLPK14 の cDNA を ³²P で標識し, これと mRNA とのハイブリッド形成を利用して mRNA 量を測定した。図 3 には, このようにして測定した LPK の mRNA 量の変化とすでに述べた活性の変化を同時に示してあるが, 両者が並行して変動していることが認められる¹⁷⁾。すなわち, 高炭水化物食やインスリンによる mRNA 活性の増加が mRNA 量の増加によることを示している。同様な結果はフルクトースの場合にもえられた²¹⁾。したがって, インスリンと食餌性フルクトースの作用点とともに翻訳以前の段階であることが判明した。

図 2. LPK cDNA の制限酵素地図と塩基配列決定のストラテジー
太い実線は翻訳配列を、細い実線は非翻訳配列を示す。

図 3. LPK mRNA の活性と量に及ぼす高炭水化物食、糖尿病およびインスリンの影響

2. フルクトースとインスリンは核内での反応に影響を与えるが、両者の作用機構は異なる

食餌性フルクトースとインスリンによる LPK mRNA の増加の機序を検討するために、まず両者による mRNA 増加の時間経過を調べた (図 4)²¹⁾²²⁾。フルクトースの場合は摂取直後から 8 時間位まで、ほぼ直線的に増えるのに対し、インスリンの場合は投与後 6 時間までは大きな変化は認められず、それから急激に増加して約 16 時間で最高値に達した。このようにインスリンとフルクトースによる LPK mRNA の増加の時間経過には明らかな差異が認められ、両者の作用機構が異なることが示唆された。この実験は全細胞 RNA を用いて、ドットプロット法により行なったものであるが、mRNA の生成過程を考えると、いわゆる成熟した mRNA とその核内に

おける前駆体の経時変化を比べることは、インスリンとフルクトースの作用点が核にあるかどうかの情報をもたらすことが期待される。そこで、いわゆるノーザンブロット法で LPK の成熟 mRNA とその前駆体を解析した。これは RNA の大きさとその量が同時に調べられる方法である。図 5 にフルクトースの場合を示す²¹⁾。全細胞 RNA では約 3.6 kb と 2.1 kb の大きさの 2 本のバンドが検出され、これらのバンドの濃度は時間の経過とともに並行して増加した。その後の mRNA²¹⁾²³⁾²⁴⁾ や遺伝子²⁴⁾の構造解析から、2.1 kb のバンドは数種類の mRNA からなり、これらの大きさの異なる mRNA 種はすべて成熟 mRNA で同じ翻訳配列を含むが、3' の非

図 4. フルクトース摂取後、およびインスリン投与後の LPK mRNA レベルの変化

図5 フルクトース摂取後の全細胞、および核内の LPK mRNA のノーザン分析
C は肝臓の全ポリ(A) RNA を示す。

翻訳配列の長さだけが異なること、およびこれらの mRNA は同一遺伝子から合成され、ポリ(A)配列が付加する位置の違いで生ずることが解明されている。細胞質 mRNA は全細胞 mRNA の 90% 以上をしめるので、これらの成熟 mRNA は細胞質に分布するものと考えられる。一方、核内の RNA では成熟 mRNA より大きな RNA 種が数種類検出された。これらの RNA 種は LPK mRNA の前駆体と考えられ、その量の変化は成熟 mRNA 量の変化に先行した。インスリン投与後の成熟 mRNA とその前駆体の変化も、フルクトースの場合と同様の結果がえられた(図6)²²⁾。以上の結果は食餌性フルクトースとインスリンはともに何らかの方法で核内での反応過程に影響を与え、核内の mRNA 前駆体を増加させることにより細胞質の mRNA を上昇させるが、両者の作用機構は異なることを示していると考えられる。

3. インスリンは LPK 遺伝子の転写を促進するが、フルクトースは影響を与えない

核内での mRNA 前駆体の増加の機構には、次のような可能性が考えられる。①遺伝子の転写を促進する。② mRNA 前駆体を安定化する(分解を抑制する)。これらの可能性を調べるために、転写速度に及ぼす影響を単離核を用いて検討した。すなわち、種々の処理を行なったラットの肝臓から核を調製し、³²P-UTP 存在下で RNA 合成を行なわせ、³²P-RNA から LPK の RNA を cDNA を用いて分離したのち、その放射活性を測定し、この値を全 RNA に取り込まれた放射活性で補正して転写速度を求めた。この反応系では、転写の新たな開始反応はほとんど起こらず、合成途中の RNA 鎖の伸長反応が進むだけである。したがって、ここで求めた値は肝臓を摘出した時点において、LPK の mRNA 合成に関与してい

図6 インスリン投与後の全細胞、および核内の LPK mRNA のノーザン分析
C は肝臓の全ポリ(A) RNA を示す。

た RNA ポリメラーゼの相対的な分子数を意味するといえる。このような方法で求めた転写速度に対するインスリンの影響を表2に示す²²⁾。インスリン投与後3時間では、LPK の転写速度は上昇傾向にはあるが有意な変化とは認められない。しかし、6時間では3倍、16時間では6倍と有意に増加している。インスリン処理後16時間の核の反応系に RNA ポリメラーゼ II の特異的阻害剤である α アマニチンを加えると転写速度は著明に抑制された。これは多くの mRNA と同様に LPK の転写も RNA ポリメラーゼ II で触媒されることを示す。

一方、フルクトースは mRNA の変化に先行して核内の mRNA 前駆体を著明に増加させたにもかかわらず、表3に示すように転写速度に対しては2時間、6時間とも影響を与えなかった²²⁾。以上の結果からインスリンは LPK 遺伝子の転写を促進するが、フルクトースは転写には影響を与えず、核内の mRNA 前駆体を安定化することで LPK の誘導効果を示すと考えられる。

4. インスリンの作用はタンパク合成を必要とする

図4と表2から明らかなように、インスリンの LPK に対する作用が現れるには少なくとも3時間のラグタイムを必要とした。インスリンが細胞膜表面のレセプターに結合した結果生じた信号がタンパク合成を必要とせずに、直接 LPK 遺伝子に作用するならば、このラグタイムは長すぎるように思える。そこで、インスリンの LPK に対する作用はタンパク合成を必要とするのではないかと考えて、タンパク合成阻害剤のシクロヘキシミドの影響を調べてみた。この阻害剤をインスリン投与4時間後に与えると、インスリンによる転写の促進と mRNA の増加の両方が著明に抑制された(表4)²²⁾。

表 2. インスリンによる LPK 遺伝子の転写の促進

Treatment	Input of [³² P]RNA (cpm × 10 ⁻⁶)	[³² P]RNA hybridized to		Synthesis rate (ppm)
		pLPK1 (cpm)	pBR322 (cpm)	
Insulin 0 h	3.26 ± 0.11	548 ± 110	335 ± 67	123 ± 81
3 h	2.73 ± 0.16	618 ± 173	274 ± 13	241 ± 108
6 h	3.39 ± 0.81	909 ± 317	285 ± 60	362 ± 106
16 h	4.72 ± 0.69	2,212 ± 1,099	367 ± 62	762 ± 456
Insulin 16h + α-amanitin	1.54 ± 0.29	472 ± 135	275 ± 30	231 ± 79

表 3. LPK 遺伝子の転写に及ぼす食餌性フルクトースの影響

Treatment	Input of [³² P]RNA (cpm)	[³² P]RNA hybridized to		Synthesis rate (ppm)
		pLPK1 (cpm)	pBR322 (cpm)	
Experiment 1				
Control	2.7 × 10 ⁶	177 ± 8	94 ± 15	56 ± 14
Fructose (2 h)	2.7 × 10 ⁶	176 ± 48	100 ± 15	50 ± 10
Experiment 2				
Control	6.7 × 10 ⁶	206 ± 23	112 ± 27	25 ± 11
Fructose (6 h)	6.7 × 10 ⁶	232 ± 48	151 ± 35	39 ± 8

表 4. LPK mRNA の誘導に対するグルカゴンとシクロヘキシミドの影響

Treatment	Amount of mRNA hybridized (fold change)	Rate of mRNA synthesis (ppm)
Experiment 1		
Control	1.00 ± 0.11	15, 13
Insulin (12 h)	9.50 ± 2.64	215, 484
Insulin (12 h) + Glucagon (12 h)	3.21 ± 2.44	79, 26
Glucagon (12 h)	0.54 ± 0.22	12, 6
Insulin (12 h) + Cycloheximide (8 h)	2.04 ± 0.70	19, 23
Experiment 2		
Control	1.00 ± 0.01	Not determined
Fructose (6 h)	6.05 ± 2.78	Not determined
Fructose (6 h) + Glucagon (6 h)	1.45 ± 0.53	Not determined
Experiment 3		
Control	Not determined	56 ± 14
Glucagon (1 h)	Not determined	66 ± 20

5. フルクトースとインスリンの作用はグルカゴンで拮抗される

グルカゴンは一般にインスリンに対する拮抗ホルモンとして知られているので²⁵⁾, LPK の場合も同様である

かを調べてみた。表4に示すように、インスリンと同時にグルカゴンを与えるとインスリンの効果は著明に抑制された²³⁾。また、グルカゴンは食餌性フルクトースによる LPK の mRNA の増加をも抑制した。グルカゴンは

LPK の転写速度の基礎値に対しては影響を与えなかったので、このグルカゴンの作用は転写後の段階で働いているものと思われる。

6. 食餌性フルクトースとインスリンの作用は他のホルモンを介さない肝臓に対する直接作用である

上記5の結果は食餌性フルクトースが血中グルカゴン値を下げることに作用しているのではないかという疑問を投げかける。というのは血中グルカゴン値が糖尿病で高いことはよく知られているからである²⁵⁾。そこで、食餌性フルクトースの血中グルカゴン値に及ぼす影響を調べてみたが、フルクトースはグルコースとともに糖尿病ラットのグルカゴン値を著明に上昇させた(表5)²²⁾。これはヒトでの観察結果²⁵⁾に一致する。したがって、上記の可能性は否定できるが、インスリンとグルカゴン以外の他のホルモンがフルクトースの作用を媒介している可能性は残る。可能性として考えられるホルモンはグルココルチコイドと甲状腺ホルモンである。これ

表 5. フルクトース摂取後の血中グルカゴンレベルの変化

Treatment	No. of rats	Plasma glucagon (pg/ml)
Control	3	183±59
Fructose 1 h	3	500±90
2 h	2	263, 323
6 h	3	346±213
Glucose 2 h	3	369±55

図 7. 食餌性フルクトースとインスリンによる LPK mRNA の誘導に対する副腎摘出の影響

らのホルモンはまたインスリンの作用にも影響しているかもしれないので、フルクトースとインスリンの両方の作用に対する影響を検討した。図7にグルココルチコイドの影響を除くために副腎を摘出したラットを用いて実験した結果を示すが、糖尿病だけのラットと同様にインスリンとフルクトースは LPK の mRNA を増加させた²²⁾。

甲状腺ホルモンに関しては甲状腺を摘出するのが容易でないので、血中の T_3 と T_4 の値を測定した。すでに報告されているように²⁶⁾、糖尿病になると血中の T_3 と T_4 のレベルは正常の 1/3~1/4 に低下したが、このレベルは一夜絶食にしても、フルクトースを与えても影響されなかった(表6)²²⁾。インスリンを投与すると T_3 と T_4 の値は正常値に回復することが報告されているが²⁶⁾、その回復は LPK に対する作用に比べるとずっと遅い。また、糖尿病ラットに T_3 を投与しても LPK の mRNA レベルは影響されなかった²²⁾。以上の結果は食餌性フルクトースの作用がホルモンを介さない肝臓に対する直接作用であることを示唆する。また、インスリンの作用はグルカゴンによって抑制される以外は他のホルモンによって影響されないと考えられる。

7. グリセロールもフルクトース作用を示す

フルクトースが肝臓に直接作用するとすれば、肝細胞内で働いている物質もフルクトースなのか、それとも他の関連物質(たとえば、代謝産物)なのだろうかという疑問が生じてくる。この疑問に答えるために、種々の糖および糖誘導体を含む食餌を与え、LPK mRNA に対する影響を検討した。調べた糖質はガラクトース、マンノース、キシロース、ソルビトール、キシリトール、グリセロールである。これらのうちで、LPK mRNA の上昇作用がみられたのはグリセロールのみであった(表7)²¹⁾。食餌性グリセロールが糖尿病ラットで LPK の酵素活性上昇作用を示すことは Takeda らによって報告さ

表 6. 血中 T_3 と T_4 レベルに及ぼす食餌性フルクトースの影響

Treatment	T_3 (ng/dl)	T_4 (μ g/dl)
Normal		
Control (3)	98.5±6.4	4.25±0.43
Diabetic		
Control (3)	35.3±2.9	1.20±0.20
Starved (2)	30.9, 39.7	0.90, 1.50
Fructose 2 h (3)	34.3±3.9	1.13±0.45
6 h (3)	36.0±3.1	1.67±0.47

() は使用したラットの匹数を示す。

表 7. 食餌性グリセロールによる LPK mRNA の増加

Treatment	No. of rats	Radioactivity (cpm)
Starved	6	71±15
Fructose (6 h)	5	415±94
Glycerol (6 h)	5	787±490

れていたが²⁷⁾, この結果はそれをさらに発展させたことになる。したがって, 肝細胞内での直接の作用物質はフルクトースそのものよりも, むしろフルクトースとグリセロールの両方に由来する物質 (たとえば, 共通の代謝産物) や両者がともに影響を与えるような物質と考えるほうが妥当と思われる。

8. 考 察

以上の結果をまとめたのが図 8 である。インスリンによる LPK mRNA の誘導は少なくとも 3 時間のラグタイムを必要とし, タンパク合成阻害剤で抑制されたが, これはホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) に対するインスリンの作用とは対照的である。PEPCK は糖新生の律速酵素でピルビン酸キナーゼの逆反応を触媒する。この酵素に対するインスリンの作用は LPK に対する作用とは反対に抑制的ではあるが, その作用, すなわち遺伝子の転写の抑制は 15 分以内に認められ, かつタンパク合成阻害剤で抑えられない²⁸⁾。LPK と PEPCK は同一肝細胞内に存在するので, インスリンは同じ細胞内の両酵素の遺伝子に働き, LPK には促進的に, PEPCK には抑制的に作用することになる。インスリンが肝細胞膜表面のレセプターに結合することがこれらの反応の引き金になるが, 以後の遺伝子までの情報伝達の結果がなぜ反対の反応を引き起こすのか興味のある問題である。LPK の場合は情報伝達過程にタンパク合成が含まれると思われる。そのタンパク質はおそらく短い半減期をもつものと予想され, LPK 遺伝子に直接に作用するものと推論される。とすればレセプター以後のインスリンの情報が最初にこのタンパク質の合成を促し, その結果生じたタンパク質が LPK の遺伝子に作用すると解釈できる。遺伝子の転写活性を調節する部位 (シス作用因子) が一般にその遺伝子の 5' 上流に存在することが報告されている^{29)~33)}。この部位に作用する因子 (トランス作用因子) は特異的なタンパク質と考えられているが³⁴⁾, まだ同定された例はない。ただ, ステロイドホルモンの場合はホルモン・レセプター複合体がこのトランス作用因子に属し, これが作用する遺伝子の部位も, いくつかの系で同定されている³⁵⁾。したが

図 8. 食餌性フルクトースとインスリンによる LPK の誘導機構

って, 上記の LPK 遺伝子に対するインスリン作用の仮説を検証する一つの方法は, まず遺伝子のインスリン反応性を有する部位 (塩基配列) を同定し, 次にこの部位と特異的に反応する (結合する) タンパク質を検索することであろうと思われる。

一方, 食餌性フルクトースの場合はフルクトースが直接肝臓に作用し, 何らかの方法で LPK の核内 RNA 前駆体を安定化することが示唆された。このフルクトースの作用はグリセロールでも観察されたので, フルクトースそのものの作用というよりも, フルクトースとグリセロールに由来する共通の何かが肝細胞内で作用しているのではないかと推測される。この点で興味あるのは, LPK のほかに脂質合成系酵素の ATP ケン酸リアーゼやアセチル CoA カルボキシラーゼの活性が糖尿病動物でグリセロール食により上昇することが報告されていることである。これらの酵素の活性がインスリンやフルクトース食でも増加することはすでに述べたが, これらの酵素の間に共通の誘導機構が存在するのかもしれない。

本研究は大阪大学医学部栄養学教室で行なわれたもので, この間終始かわらぬ励ましとご指導をいただいた田中武彦教授, 共同で研究を進めてきた井上裕康氏, 種々のご援助をいただいた栄養学教室の皆様にご心から感謝いたします。また, cDNA クローニングのご教授をいただいた大阪大学細胞工学センター松原謙一教授, 中村祐輔博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Mayes, P.A.: Harper's Review of Biochemistry, 257 (1985), Lange Medical Publications (Los Altos, U.S.A.)
- 2) Tanaka, T., Harano, Y., Morimura, H. and

- Mori, R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **21**, 55 (1965)
- 3) Tanaka, T., Harano, Y., Sue, F. and Morimura, H.: *J. Biochem.*, **62**, 71 (1967)
- 4) Imamura, K. and Tanaka, T.: *J. Biochem.*, **71**, 1043 (1972)
- 5) Imamura, K. and Tanaka, T.: *Methods Enzymol.*, **90**, 150 (1982)
- 6) Granner, D.K.: Harper's Review of Biochemistry, 587 (1985), Lange Medical Publications (Los Altos, U.S.A.)
- 7) Miyana, O., Nagano, M. and Cottam, G.L.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 10617 (1982)
- 8) Sillero, A., Sillero, M.A.G. and Sols, A.: *Eur. J. Biochem.*, **10**, 351 (1969)
- 9) Weber, G.: *Adv. Enzyme Regul.*, **7**, 15 (1969)
- 10) Nepokroeff, C.M., Lakshmanan, M.R., Ness, G.C., Nuesing, R.A., Kleinsek, D.A. and Porter, J.W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**, 340 (1974)
- 11) Kornacker, M.S. and Lowenstein, J.M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 490 (1964)
- 12) Kornacker, M.S. and Lowenstein, J.M.: *Biochem. J.*, **95**, 832 (1965)
- 13) Fitch, W.M., Hill, R. and Chaikoff, I.L.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 2811 (1959)
- 14) Fukuda, H., Iritani, N. and Tanaka, T.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **29**, 691 (1983)
- 15) Houtsmuller, A.J.: The Roles of Fats in Human Nutrition, 231 (1975), Academic Press (New York)
- 16) Noguchi, T., Inoue, H. and Tanaka, T.: *Eur. J. Biochem.*, **128**, 583 (1982)
- 17) Noguchi, T., Inoue, H., Chen, H.-L., Matsubara, K. and Tanaka, T.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 15220 (1983)
- 18) Noguchi, T., Inoue, H., Nakamura, Y., Chen, H.-L., Matsubara, K. and Tanaka, T.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 2651 (1984)
- 19) Ricciardi, R.P., Miller, J.S. and Roberts, B.E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4927 (1979)
- 20) Inoue, H., Noguchi, T. and Tanaka, T.: *Eur. J. Biochem.*, **154**, 465 (1986)
- 21) Inoue, H., Noguchi, T. and Tanaka, T.: *J. Biochem.*, **96**, 1457 (1984)
- 22) Noguchi, T., Inoue, H. and Tanaka, T.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 14393 (1986)
- 23) Marie, J., Simon, M.-P., Lone, Y.-C., Cognet, M. and Kahn, A.: *Eur. J. Biochem.*, **158**, 33 (1986)
- 24) Yamada, K., Noguchi, T., Inoue, H., Matsuda, T. and Tanaka, T.: in preparation
- 25) Unger, R.H. and Orci, L.: *Physiol. Rev.*, **56**, 778 (1976)
- 26) Gavin, L.A., McMahon, F.A. and Moeller, M.: *Diabetes*, **30**, 694 (1981)
- 27) Takeda, Y., Inoue, H., Honjo, K., Tanioka, H. and Daikuhara, Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, **136**, 214 (1967)
- 28) Sasaki, K., Cripe, T.P., Koch, S.R., Andreone, T.L., Petersen, D.D., Beale, E.G. and Granner, D.K.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 15242 (1984)
- 29) Edlund, T., Walker, M.D., Barr, P.J. and Rutter, W.J.: *Science*, **230**, 912 (1985)
- 30) Stuart, G.W., Searle, P.F. and Palmiter, R.D.: *Nature*, **317**, 828 (1985)
- 31) Casanova, J., Copp, R.P., Janocko, L. and Samuels, H.H.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 11744 (1985)
- 32) Wynshaw-Boris, A., Short, J.M., Loose, D.S. and Hanson, R.W.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 9714 (1986)
- 33) Short, J.M., Wynshaw-boris, A., Short, H.P. and Hanson, R.W.: *J. Biol. Chem.*, **261**, 9721 (1986)
- 34) Dynan, W.S. and Tjian, R.: *Nature*, **316**, 774 (1985)
- 35) Ringold, G.M.: *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **25**, 529 (1985)

(昭和62年2月20日受理)