

ホスホフルクトキナーゼの活性調節

—フルクトース 2,6-ビスリン酸とリボース 1,5-ビスリン酸を主点として—

Regulation of phosphofructokinase activation: Focusing on fructose 2,6-bisphosphate and ribose 1,5-bisphosphate

三井 由香

長野保健医療大学 共通教養センター

要旨: ホスホフルクトキナーゼ (6-ホスホフルクト 1-キナーゼ、PFK-1、EC 2.7.1.11) は解糖系の律速酵素である。PFK-1 が律速酵素であるのは、様々な調節因子の細胞内濃度の変化によって、その活性が調節されるためである。特に肝臓では、栄養状態の変動によるインスリンやグルカゴンなどのホルモンに導かれた調節を受ける。研究の初期には AMP、フルクトース 6-リン酸、フルクトース 1,6-ビスリン酸による活性化、ATP やクエン酸による阻害など、糖代謝の代謝中間体による調節が明らかにされた。続いて代謝中間体ではない、解糖系の活性化のみに働くフルクトース 2,6-ビスリン酸 (Fru-2,6-P₂) が発見された。その後、低酸素状態により極めて短時間で急激に増加する活性化因子である、リボース 1,5-ビスリン酸 (Rib-1,5-P₂) の産生が脳で見いだされ、次いでマクロファージで示された。Fru-2,6-P₂ は多くの組織で産生と分解にかかわる酵素の存在が示され、その活性調節機構はアイソザイムにより異なるが、低酸素刺激や栄養状態の変化による複数のプロテインキナーゼ、ホスファターゼの活性化を介してリン酸化・脱リン酸化により調節される。一方 Rib-1,5-P₂ は低酸素刺激により脳では 5 秒以内、マクロファージでは 30 秒をピークとして急激に産生され、PFK-1 を素早く活性化するため、解糖系活性化のトリガーとしての役割が示唆されている。Rib-1,5-P₂ の産生にかかわる酵素は、マクロファージにおいてリン酸化による活性化が示されたが、いまだ不明な点が多い。この総説では、PFK-1 の活性化にかかわる因子のうち、主に Fru-2,6-P₂ と Rib-1,5-P₂ について解説する。

キーワード: ホスホフルクトキナーゼ、フルクトース 2,6-ビスリン酸、リボース 1,5-ビスリン酸

ABSTRACT: Phosphofructokinase (6-phosphofructo-1-kinase, PFK-1, EC 2.7.1.11) is a rate-limiting enzyme in glycolysis. PFK-1 is a rate-limiting enzyme because changes in the intracellular concentrations of various regulatory factors regulate its activity. The liver, in particular, is subject to hormone-induced regulation, such as insulin and glucagon, due to fluctuations in nutritional status. Early on, regulation by intermediate metabolites of glucose metabolism was known, including activation by AMP, fructose 6-phosphate, fructose 1,6-bisphosphate, and inhibition by ATP and citrate. Subsequently, activation by fructose 2,6-bisphosphate (Fru-2,6-P₂), which is not an intermediate metabolite but only activates the glycolytic system, was clarified. Later, the production of Ribose 1,5-bisphosphate (Rib-1,5-P₂), an activator that rapidly increases and quickly disappears upon hypoxia, was found in the brain, followed by macrophages. Fru-2,6-P₂ is known to be produced by enzymes involved in its synthesis and degradation in many tissues. Fru-2,6-P₂ has been shown to be made and degraded by enzymes in many tissues. Its activity is regulated by phosphorylation and dephosphorylation via the activation of multiple protein kinases and phosphatases by hypoxic stimuli and changes in nutritional status. However, the regulatory mechanism differs among isoenzymes. On the other hand, Rib-1,5-P₂ is rapidly produced by hypoxic stimuli within 5 seconds in the brain and peaking at 30 seconds in macrophages. It rapidly activates PFK-1, suggesting its role as a trigger for the activation of the glycolytic system. The enzyme involved in the production of Rib-1,5-P₂ has been shown to be activated by phosphorylation in macrophages, but much remains unknown. This review will focus mainly on Fru-2,6-P₂ and Rib-1,5-P₂ among the factors involved in PFK-1 activation.

Key words: phosphofructokinase, fructose 2,6-bisphosphate, ribose 1,5-bisphosphate

1. 糖代謝と解糖系

糖質はタンパク質、脂質と並び、三大栄養素の一つであり、ヒトにとっては最も使いやすいエネルギー源である。そのため通常は全摂取エネルギーの60%近くも、ヒトは糖質から摂取している。それにもかかわらず、体内に糖質は体重の1%未満しか存在しない。1%未満の糖には、血糖やグリコーゲンなどのエネルギー源だけでなく、核酸に含まれるリボースやデオキシリボース、分泌されるムチン、軟骨組織や細胞表面のプロテオグリカンなども含まれる。関節において糖は、水分を保持してスムーズな動きに役立つ。細胞表面の糖鎖は、水分保持だけではなく細胞間の識別やシグナル伝達にも関与している。それらをすべて含めても体重の1%に満たない。

糖は極めて使い勝手がよいので、摂取した糖は、まずはATP源として消費され、二酸化炭素と水に分解される。残りを糖のまま蓄えたくても、多糖であるグリコーゲンは、多くは保管できない。細胞内は水分が豊富である。糖は親水性のため、グリコーゲンは分子内に水を抱き込みかさばってしまうためである。そのため糖を多く摂取した際には、ヒトはそれを中性脂肪に変換して脂肪細胞に貯えることになる。中性脂肪は水とはなじまず、コンパクトな高エネルギー源として貯えることができる。かくして貯蔵多糖はわずかとなる。

しかし糖質は、あらゆる細胞にとって大変使いやすいエネルギー源であることに変わりはない。特に脳などの神経細胞は、飢餓時以外は糖質しかATP合成には使わない。また赤血球などミトコンドリアを持たない細胞にはトリカルボン酸回路や電子伝達系は存在せず、アミノ酸代謝や脂肪酸の β 酸化経路は使えない。そのため解糖系のみでATPを産生している。骨格筋でも激しい活動時に駆動される速筋線維である、II B型の筋線維は、主として素早いATP産生ができる解糖系のみでATPを供給し、その場合はピルビン酸から乳酸をつくる。乳酸は血液で肝臓に運ばれ、糖新生経路で再びグルコースに再合成されて血糖として血液に供給され、神経、赤血球、筋などの栄養源となる。他のほとんどの細胞では、解糖系により産生されたピルビン酸は

ミトコンドリアに供給されて、酸化的リン酸化により多くのATPが得られる。糖代謝の入り口である解糖系は、すべての細胞にとって、なくてはならない経路である。解糖系は細胞質にある。それは解糖系の酵素が細胞質に存在するためである。ミトコンドリアを持たない細胞はあっても、細胞質を持たない細胞はない。従って、解糖系はすべての細胞が持つ必須の経路である。

1-1. 解糖系の確立

解糖系は多くの研究者によって1940年頃までに、ほぼ現在の経路が確立された。特に解明に大きな功績のあった研究者の名を取って、Embden-Meyerhof pathwayと呼ばれる。解糖系はグルコースがピルビン酸、または乳酸になるまでの経路であるが、ピルビン酸になるまでは10種類、乳酸になるまでは11種類の酵素が関わる反応である。この過程でATPが産生される。解糖系では、グルコース1 molからATPは2 mol産生されるが、ミトコンドリアがあり、かつ酸素供給が十分であればピルビン酸はミトコンドリアに入り、トリカルボン酸回路、さらに電子伝達系を経て酸化的リン酸化により、合計29.5または31 molのATPを産生することができる。多くの細胞はミトコンドリアを持つので、血液による酸素供給さえ十分であれば、ミトコンドリアにおいて多くのATPを産生できる。図1に、解糖系と糖新生系、それにかかわる酵素を示す。

1-2. ホスホフルクトキナーゼは解糖系の律速酵素である

解糖系の酵素の多くは両方向性に触媒するが、ヘキソキナーゼ (EC 2.7.1.1)、ホスホフルクトキナーゼ (6-ホスホフルクト1-キナーゼ、PFK-1、EC 2.7.1.11)、ピルビン酸キナーゼ (EC 2.7.1.40) によって触媒される反応は、一方のみ不可逆反応である。これらの酵素による反応は解糖系の律速段階となり得るが、とりわけPFK-1は、解糖系全体の律速段階として重要であると考えられている。PFK-1は、フルクトース6リン酸 (Fur-6-P) の1位の炭素にATPのリン酸基を転移させて、フルクトース1,6-ビスリン酸 (Fur-1,6-P₂) とADPを生成する。この反応は不可逆反応であり、PFK-1は逆向きの反応は触媒しない。逆向き

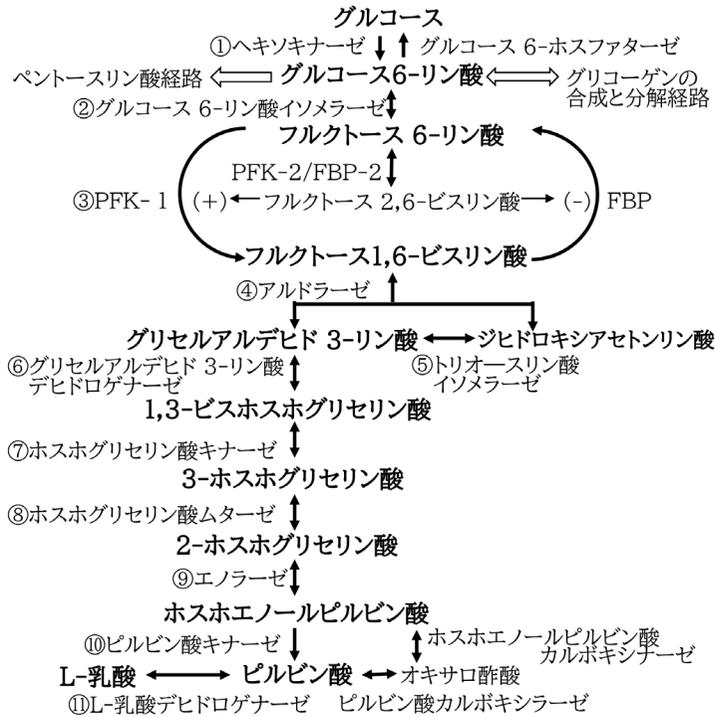


図1 解糖系と糖新生系、およびその関連経路と酵素（解糖系の酵素には番号を振ってある）
 PFK-1, 6-phosphofructo-1-kinase: FBP, Fructose 1,6-bisphosphatase:
 PFK-2/FBP-2, 6-ホスホフルクト 2-キナーゼ/フルクトース 2,6-ビス
 ホスファターゼ

の反応である $Fru-1,6-P_2$ を $Fru-6-P$ に代謝するのは、肝と腎における糖新生の酵素である、フルクトース 1,6-ビスホスファターゼ (FBP) による。

PFK-1 は典型的なアロステリック酵素であり、様々な調節因子によってその活性が調節されることが明らかになっている。アロステリック酵素の最大の特徴は、酵素タンパク質が外界の変化を知覚できる受容体に相当する部分を持ち、その変化に対応して活性調節ができるということにある⁽¹⁾。そのため、食物摂取や代謝、身体活動によって刻々と変化する血液中や細胞内の様々な状態に対応して、酵素活性を調節し、解糖系の流れを変化させることができる。その結果、柔軟で正確な恒常性の維持に役立つ。まさに解糖系の key enzyme と言える。

1-3. PFK-1 の活性調節因子

PFK-1 を活性化する因子は、 $Fru-6-P$ 、 $Fru-1,6-P_2$ 、AMP、ADP⁽²⁻⁴⁾、フルクトース 2,6-ビスリン酸 ($Fru-2,6-P_2$)⁽⁵⁻¹²⁾、リボース 1,5-ビスリン酸 ($Rib-1,5-P_2$)⁽¹³⁻²⁰⁾ が知られている。また PFK-1 活性を阻害する因子は、高濃度 ATP、クエン酸⁽²⁻⁴⁾ である。これらの活性調節因子に関しては、後に詳説する。

1-4. PFK-1 のアイソザイム

哺乳類の PFK-1 は、四量体のタンパク質であり、PFK-M (骨格筋型)、PFK-L (肝型)、PFK-P (血小板型) がある。骨格筋は PFK-M のみを発現し、他の組織は 3 つの PFK アイソフォームのすべてを、異なった比率で発現する⁽²¹⁾。ヒト組織では、それらは単に 2 つまたは 3 つのホモ四量体アイソザイムの組み合わせではなく、ホモ四量体とヘテロ四量体の複雑な混合物となる。

各組織のアイソザイムは、速度論的、調節的特性が異なるが、それはサブユニット組成が異なるためである⁽²¹⁾。ATPによる阻害とFru-2,6-P₂による活性化は、PFK-1オリゴマー立体構造の調節による。高濃度ATPは四量体から二量体へ解離させることでPFK-1を阻害し、Fru-2,6-P₂はPFK-1の四量体構造を安定化させることによりATP阻害を解除する⁽²²⁾。Fernandesらは、PFK-1欠損*Saccharomyces cerevisiae*において発現させた、組み換えヒトPFK-1アイソザイムの解析から、アロステリックな調節因子に対する各アイソザイムの感受性が異なることを報告している。ATP阻害に対しては、PFK-Mが最も耐性があり、次いでPFK-L、そしてPFK-Pが最も強くATP阻害を受ける（それぞれ23%、31%、50%の特異性定数の減少）。またFru-2,6-P₂によるアロステリック制御に対する感度は、PFK-MがPFK-LやPFK-Pよりも低い（アロステリック定数 $[K_{0.5}^{ATP+F26P2}/K_{0.5}^{ATP}]$ は、それぞれ1.10、0.92、0.54）⁽²³⁾。骨格筋PFK-1以外は3つのアイソザイムの混合であるため、その組成、比率の違いによって、阻害因子や活性化因子に対する反応性などの違いが生じる。なお、細菌のPFK-1は哺乳類のPFK-1の約半分の分子量である。哺乳類のPFK-1は、祖先の原核生物遺伝子の重複、タンデム融合、および分岐に由来する。その結果哺乳類のPFK-1には、阻害特性を示すATP結合部位、活性化に働くFru-2,6-P₂結合部位などのアロステリック部位が存在するようになった⁽²⁴⁾。

2. 解糖系と糖新生系の調節： PFK-1とFBPの活性調節因子

2-1. 代謝中間体による調節：ATP、ADP、

AMP、クエン酸、Fru-6-P、Fru-1,6-P₂

先述のように、PFK-1活性は様々な因子により調節される。古くは基質や生成物など、代謝中間体による調節が明らかにされた。PFK-1は基質であるFru-6-Pによってアロステリックに活性化される。またATPは低濃度でPFK-1を活性化し、高濃度では阻害と、二相性の効果をもたらす⁽²⁻⁴⁾。基質でもあるATPにより、PFK-1が阻害されることはどのような意味を持つのだろうか。ATPはPFK-1の基質である一方で、解糖系の生成物でもある。解糖系を進めるということは、ATP合成を行うことに他ならない。従って、ATPは最終生成物としてPFK-1を阻害すると考えられる。クエン酸は解糖系の先のトリカルボン酸回路の代謝産物であり、クエン酸濃度の高い場合はPFK-1活性が阻害され、これも負のフィードバックとなる。高濃度ATPによるPFK-1活性阻害は、AMPやADPにより、全体的または部分的に解除される⁽²⁻⁴⁾。AMPやADPはATP分解産物であり、その蓄積はATP需要が充進していることを意味する。従ってこれらにより高濃度ATPによるPFK-1活性阻害が解除され、解糖系が進むことは合理的であるといえる。

一方で、これらの調節因子は、FBPに対しては逆の作用をもたらす。すなわち高濃度のATPやクエン酸はPFK-1を阻害するが、FBPを活性化し、AMPはPFK-1を活性化するが、FBPを阻

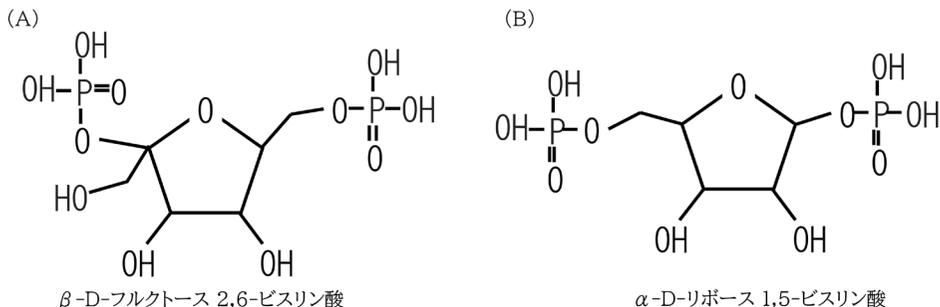


図2 (A) フルクトース 2,6-ビスリン酸と、(B) リボース 1,5-ビスリン酸
どちらも6-ホスホフルクト 1-キナーゼの重要な活性化因子である。

害する⁽²⁵⁾。このようにして、解糖系と糖新生系が同時に働かないように調節されている。もしも解糖系と糖新生系が同時に働いた場合は、合成した ATP を浪費して熱を産生するのみの無益回路となってしまう⁽²⁶⁾。同じ調節因子が、逆方向に触媒する二つの酵素のうち一方を促進し、他方を抑制するのは、無益回路が生じないようにするうえで意義が大きい。

2-2. Fru-2,6-P₂

2-2-1. Fru-2,6-P₂ の発見

PFK-1 活性は、ATP やクエン酸で阻害され、AMP や Fru-6-P、また Fru-1,6-P₂ など活性促進を受けることが明らかとなり、当初はこれら代謝中間体の濃度変化のみにより PFK-1 活性を説明することが試みられてきた。しかしそれだけでは細胞内で解糖系が進行する理由を説明できなかった。それは ATP 阻害が強すぎるためである。生きている細胞、特に肝臓では飢餓状態であっても、ATP 濃度は 2.5-3.0 mM で一定のままであり、ほぼ変化しない。これでは Fru-6-P 20-40 μM の生理的濃度、pH 7.25 の生理的 pH の下では、他の既知の正の活性化因子存在下であっても、強すぎる ATP 阻害のために、精製された PFK-1 はほとんど活性を示せなかった^(27,28)。それでも実際には生体内で解糖系は進行している。そのため、未知の調節因子の存在の可能性も視野に入れて、研究が進められていた。

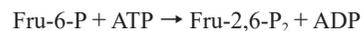
このような中で 1980 年、Uyeda ら⁽⁵⁾と、海を隔てて Shaftingen ら⁽⁶⁾、Pilks ら⁽⁷⁾の 3 つのグループがそれぞれ独立に、強力な PFK-1 の活性化因子を発見した。その因子は酸に不安定であり、0.01 M の HCl で 10 分間インキュベートすると完全に破壊され、Fru-6-P と有機リン酸が等量産生された。このことから Schftingen らは、PFK-1 の活性化因子は Fru-2,6-P₂ であることを示唆した⁽⁶⁾。その後、Uyeda らは化学分析、合成、および ¹³C NMR 分光法により、この PFK-1 活性化因子は、フルクトースの 2 位と 6 位の炭素にリン酸の結合した、β-D-Fru-2,6-P₂ であることを示した⁽⁸⁾。Fru-2,6-P₂ は、AMP と相乗的に働き、PFK-1 の ATP による阻害を解除した。これにより Fru-2,6-P₂ と AMP による PFK-1 の活性化は、肝臓における解糖系の進行を説明するのに十分である

と結論付けられた⁽⁸⁾。現在 Fru-2,6-P₂ は、多くの組織において最も強力な PFK-1 活性化因子であることが示されている⁽⁹⁻¹²⁾。

2-2-2. Fru-2,6-P₂ を合成し、分解する酵素の発見

次に Fru-2,6-P₂ を合成する酵素が一斉に探索され、この分野を研究する 3 つのグループは、ほぼ同時にこの酵素を発見した⁽²⁹⁻³⁴⁾。この酵素は二機能性酵素であり、Fru-2,6-P₂ の合成を行うキナーゼの部分と、分解を行うホスファターゼの部分の両方を合わせ持つ。合成は、PFK-1 と同様に Fru-6-P と ATP を基質として行われる。PFK-1 は Fru-6-P の 1 位の炭素にリン酸基を導入して Fru-1,6-P₂ とするために PFK-1 と呼ばれるが、この酵素は 2 位の炭素にリン酸基を導入して Fru-2,6-P₂ とすることから PFK-2 と呼ばれる。分解は Fru-2,6-P₂ の 2 位の炭素からリン酸基を取り除き、Fru-6-P と無機リン酸に分解するため、分解を行う酵素は FBP-2 と呼ばれる。

Fru-2,6-P₂ の合成 (PFK-2)



Fru-2,6-P₂ の分解 (FBP-2)



当初は合成と分解の酵素をそれぞれ単一に精製する試みがなされたが、どうしても両活性は分離できなかった。その結果ラット肝において、最終精製標品として両活性を有する、分子量 55 kDa の 2 つのサブユニットからなるタンパク質が得られ、この酵素は PFK-2 活性および FBP-2 活性を持つ二機能性酵素であることが示唆された⁽³⁵⁾。精製された酵素をトリプシン処理すると、キナーゼ活性のみが失われ⁽³⁶⁾、ATP アナログの 8-azido-ATP、また Fru-6-P アナログの N-プロモアセチルエタノールアミンで精製酵素をラベルするとキナーゼ活性のみが消失した⁽³⁷⁾。これらのことから、この酵素はキナーゼおよびホスファターゼ活性ドメインが、サブユニットの異なる領域に局在する二機能性酵素、6-ホスホフルクト 2-キナーゼ/フルクトース 2,6-ビスホスファターゼ (PFK-2/FBP-2) であると結論付けられた。

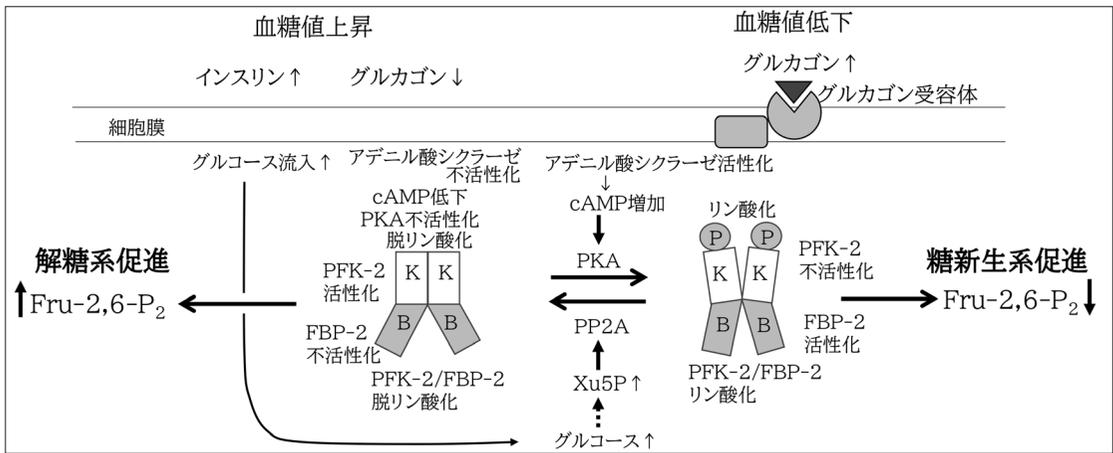


図3 肝臓における Fru-2,6-P₂による解糖および糖新生の制御

[血糖値低下時]：空腹時、血糖値が低下するとグルカゴン分泌が増加し、細胞内のcAMP濃度が上昇する。これにより活性化されたPKAは、PFK-2/FBP-2をリン酸化する。リン酸化によりキナーゼ(PFK-2、図のK)は不活性化され、ホスファターゼ(FBP-2、図のB)は活性化される。そのためFru-2,6-P₂の分解が進み、PFK-1は活性化されず、FBPの阻害が解除され、糖新生が促進される。

[血糖値上昇時]：栄養状態がよく、血糖値が上昇または十分な値である時にはグルカゴンレベルは低下するため、PFK-2/FBP-2のリン酸化は生じない。細胞内へのグルコース流入の増加により、キシルロース 5-リン酸依存性プロテインホスファターゼ2Aの活性化を介して、PFK-2/FBP-2の脱リン酸化をもたらす。脱リン酸化によりキナーゼは活性化され、Fru-2,6-P₂の合成が進む。そのためPFK-1が活性化され、解糖系が促進される。

略号：cAMP, サイクリックAMP；PKA, プロテインキナーゼA；PFK-1, 6-ホスホフルクト-1-キナーゼ；PFK-2/FBP-2, 6-ホスホフルクト-2-キナーゼ/フルクトース2,6-ビスホスファターゼ(K：PFK-2領域, B：FBP-2領域)；Fru-2,6-P₂, フルクトース2,6-ビスリン酸；PP2A, プロテインホスファターゼ2A；Xu5P, キシルロース5-リン酸；FBP, フルクトース1,6-ビスホスファターゼ；Ⓚ, リン酸

2-2-3. 肝臓の PFK-2/FBP-2 の活性調節 (図3)

肝臓の PFK-2/FBP-2 は、リン酸化されるとキナーゼ活性が低下し、ホスファターゼ活性が出現する⁽³⁴⁾。その結果 Fru-2,6-P₂ の分解が進み、PFK-1 は活性化されないため解糖系は進まず、逆に FBP 阻害因子である Fru-2,6-P₂^(38,39) 濃度が低下するため糖新生が進む。生体内ではグルカゴンによりこの現象が生じることとなる。

空腹で血糖値が低下しているとき、グルカゴン分泌が促進される。グルカゴンはアデニル酸シクラーゼの活性化により細胞内サイクリックAMP (cAMP) 濃度を上昇させる。これによりcAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) が活性化され、PKA により PFK-2/FBP-2 の N 末端 Ser32 がリン酸化される。するとキナーゼ (PFK-2) の阻害とホスファターゼ (FBP-2) の活性化^(32,35,40-42) が生じ Fru-2,6-P₂ 濃度が低下する。これにより解糖系の阻害と糖新生系の促進となり、グルコースを血液中へ放出して血糖値低下を改

善する。こうして血糖値維持のための負のフィードバック調節が行われる。

逆に栄養状態がよく、十分な血糖値であるときは血中のグルカゴンレベルは低下するため細胞内 cAMP 濃度は減少し、PKA の活性化は生じない。その結果 PFK-2/FBP-2 の新たなリン酸化がおこらない。しかし脱リン酸化なしでもキナーゼ活性は増加するのだろうか。この疑問に対する、広く受け入れられていた仮説は、グルコースの細胞内流入の増加により、PFK-2/FBP-2 の基質である Fru-6-P が増加するため、というものだった⁽²⁷⁾。たしかに PFK-2/FBP-2 は基質である Fru-6-P 濃度上昇によりアロステリックに調節され、キナーゼ活性は上昇し、ホスファターゼ活性は阻害を受ける⁽³⁴⁾。しかし Fru-6-P の、PFK-2/FBP-2 に対する Km は <15 μM である。空腹時の肝臓と食事をした後の肝臓の両方で、Fru-6-P の濃度は 20-50 μM であり⁽²⁷⁾、空腹時であっても Km を下回らない。つまり Fru-6-P 濃度変化だけ

では PFK-2/FBP-2 のキナーゼの活性化を説明することは不可能であった。その後、肝臓において、PFK-2/FBP-2 の Ser32 を優先的に脱リン酸化するキシルロース 5-リン酸依存性タンパク質ホスファターゼ 2A が見つかった。詳しいメカニズムは不明だが、この酵素は細胞内グルコース濃度上昇により細胞内に増加したキシルロース 5-リン酸により活性化されて、PFK-2/FBP-2 を脱リン酸化する。すなわちキシルロース 5-リン酸は、グルコースシグナル伝達物質として機能する。これにより PFK-2 の活性化が生じ、Fru-2,6-P₂ の産生が増加して解糖系が促進される流れが示された⁽⁴³⁻⁴⁶⁾。

2-2-4. PFK-2/FBP-2 のアイソザイム

肝臓型、骨格筋型、心筋型^(47,48)、精巢型⁽⁴⁹⁾、脳型、胎盤型⁽⁵⁰⁾ が見ついている。哺乳類の PFK-2/FBP-2 アイソザイムは、*PFKFB1*~4 までの、異なる 4 つの遺伝子によってコードされている⁽⁵¹⁾。すべての PFK-2/FBP-2 アイソザイムは、サブユニットの分子量が 51-60kDa の、ホモ 2 量体である⁽²⁷⁾。これらのアイソザイムの一次構造は、キナーゼとホスファターゼの両方のドメインが高度に保存されていて、N 末端側に PFK-2、C 末端側に FBP-2 ドメインが存在する⁽⁵²⁾。しかし N 末領域と C 末領域に局在する、リン酸化部位である調節ドメインは、アイソザイムにより異なる。肝臓と骨格筋のアイソザイムは、同じ遺伝子である *PFKFB1* の選択的スプライシングから生じるが、骨格筋アイソザイムは肝臓のアイソザイムとは異なり、PKA によるリン酸化部位を欠いている。*PFKFB4* によってコードされる精巢アイソザイムには調節領域はない。さらにアイソザイム間で、キナーゼとホスファターゼの相対的な活性が大きく異なる。*PFKFB3* によってコードされるアイソザイムである脳型、胎盤型は、キナーゼ/ホスファターゼ活性比が高い特徴があり、脳型は 3.1⁽⁵³⁾、胎盤型の構成型酵素と誘導型の酵素では 700 を超えている^(51,54)。このアイソザイムが発現する組織では Fru-2,6-P₂ の産生が支持され、解糖速度が向上する。一方で *PFKFB1* によってコードされる肝臓型のキナーゼ/ホスファターゼ活性比は 1.2-2.5^(55,56)、骨格筋型は 0.4⁽⁵⁷⁾ であり、骨格筋型はホスファターゼ活性が

高い。*PFKFB2* による心筋型は 1.8⁽⁵⁸⁾ と、およそ同程度のキナーゼ/ホスファターゼ活性を持つ。*PFKFB4* による精巢型は、ヒトでは 0.9⁽⁵⁴⁾ ほどであり、これも同程度である。ただしこれらのアイソザイムは組織に単一ではなく、様々な組織に様々なアイソザイムが混在している⁽⁵²⁾。PFK-2/FBP-2 のアイソザイムが複数あるのは、変動する栄養状態、それに伴うホルモン状態の下で、各組織において解糖や、糖新生を調節する必要に応じて、多様化が必要であったためと考えられる。

肝臓アイソザイムは前述のように、PKA によって PFK-2 ドメインに隣接する N 末端の Ser32 がリン酸化され⁽⁵⁹⁾、PFK-2 の不活性化⁽⁶⁰⁻⁶²⁾ と FBP-2 の活性化⁽⁶²⁻⁶⁴⁾ をもたらす (図 3)。一方、心臓アイソザイムは肝臓のものとは逆に、リン酸化によりキナーゼ活性が上昇する。心臓アイソザイムは C 末端にリン酸化部位を複数持っており、PKA (Ser466)、プロテインキナーゼ C (PKC) (Thr475)⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾、インスリン刺激性プロテインキナーゼ (Ser466 および Ser483)⁽⁶⁸⁾、また低酸素により増加する AMP で活性化される、AMP 依存性プロテインキナーゼによっても、Ser466 がリン酸化される^(69,70)。このように心臓アイソザイムは、様々なシグナル伝達により活性化された複数のプロテインキナーゼでリン酸化を受ける。多くの経路から伝達される情報が、Fru-2,6-P₂ 分子に収束して⁽⁵²⁾ 心筋の解糖系を調節する仕組みとなっている。

癌細胞では好氣的条件下でさえ酸化的リン酸化によってではなく、解糖系によって ATP を得ていることが知られ、正常細胞よりもはるかに高い解糖系速度を示す⁽⁷¹⁾。これを発見者の名からワールブルグ効果と呼ぶ。癌細胞では誘導型の *PFKFB3* と *PFKFB4* の過剰発現が高い解糖を支えており、癌治療の面から注目されている⁽⁷²⁻⁷⁷⁾。

2-3. Rib-1,5-P₂

2-3-1. Rib-1,5-P₂ の発見

脳はエネルギー源として、飢餓時以外はグルコースのみを利用する。従って梗塞などの脳虚血が起きた時には、解糖系が大幅に促進すると考えられる。実際脳は、低酸素又は無酸素状態にしたときには解糖系代謝は数倍に促進される。

それにもかかわらず、Fru-2,6-P₂ レベルはほとんど変動しないため^(13,77)、脳では PFK-1 の活性調節は Fru-2,6-P₂ のレベルの変化にはよらないのではないかと考えられていた。

そのような中で、1990 年 Ogushi らにより、脳虚血時に急激に脳内で増加する別の活性化因子が発見された。ラット脳では断頭による脳虚血開始後、5 秒で Fru-6-P の総含有量が 4 倍低下し、Fru-1,6-P₂ は 5.6 倍増加して、解糖系の急激な増加が見られた。これは PFK-1 の活性化と一致していた。このとき活性化因子は、虚血開始後 2-5 秒以内に形成されて、20 秒で消失し、解糖系と PFK-1 活性化の時間経過に対応していた。この活性化因子は、化学的および酵素学的方法によって Rib-1,5-P₂ と同定された⁽¹³⁾。Guha らは、グルコース -1,6-ビスリン酸合成酵素が、Rib-1,5-P₂ も合成することを報告している⁽⁷⁸⁾。この合成酵素は脳と網膜に広く、しかし不均一な分布が見られ、海馬錐体ニューロン層と網膜の内側網状層において最高レベルで存在する⁽⁷⁹⁾。脳にこの酵素が存在する事実は、脳で Rib-1,5-P₂ が産生されることと合致する。その後 Ishikawa らは、Rib-1,5-P₂ が肝と筋の精製 PFK-1 を活性化することを示した。Rib-1,5-P₂ の K_{0.5} は、ラット脳が 64 nM で最も感受性が高く、次がウサギ筋 (84 nM)、ラット肝 (230 nM) であった。これらの組織において、最も強い PFK-1 活性化因子は Fru-2,6-P₂ であり (K_m はそれぞれ 9 nM、10 nM、8.6 nM)、Rib-1,5-P₂ は 2 番目に強い PFK-1 活性化因子である⁽¹⁴⁾。また Rose らは、赤血球の PFK-1 を Rib-1,5-P₂ が活性化することを報告している⁽¹⁵⁾。

2-3-2. 他の組織における Rib-1,5-P₂ の作用

(1) 唾液腺

ラット顎下腺⁽¹⁶⁾と、ウシ耳下腺⁽¹⁷⁾の PFK-1 に対する Rib-1,5-P₂ と、Fru-2,6-P₂ の効果が検討されている。ラット顎下腺においてはグルコースが主要なエネルギー源として利用されている^(80,81)。ラット顎下腺の部分精製 PFK-1 に対して Rib-1,5-P₂ は、高濃度 ATP による阻害を解除し、Fru-6-P に対する親和性を高めた。その効果は AMP により増強された。また Rib-1,5-P₂ は、クエン酸による PFK-1 阻害効果を抑制した。ラット顎下腺 PFK-1 の活性化には、Rib-1,5-P₂ は Fru-

2,6-P₂ よりも低濃度で有効であった⁽¹⁶⁾。

ウシ耳下腺部分精製 PFK-1 に対しても、Rib-1,5-P₂ は高濃度 ATP による阻害を解除し、Fru-6-P に対する親和性を高めた。その効果は AMP 存在下で増強された。また Rib-1,5-P₂ は、クエン酸による PFK-1 の阻害効果を抑制し、PFK-1 の熱安定性を高めた。Rib-1,5-P₂ は 120-240 nM 程度でウシ耳下腺部分精製 PFK-1 を活性化し、Fru-2,6-P₂ (5-10 μM 程度で活性化) よりも低濃度で有効であった⁽¹⁷⁾。

ラット顎下腺とウシ耳下腺においては、Rib-1,5-P₂ は最も強力な PFK-1 の活性化因子であり、次が Fru-2,6-P₂ であった。Rib-1,5-P₂ の活性化効果は Fru-2,6-P₂ によるものほとんど同様であったが、作用濃度が Fru-2,6-P₂ よりも低いことから、さらに重要な調節因子である可能性が考えられる。これは脳⁽¹³⁾、骨格筋、肝臓⁽¹⁴⁾においては、Fru-2,6-P₂ が最も強力な活性化因子であり、Rib-1,5-P₂ はその次であることは異なる。

(2) 肝臓と腎臓：解糖系と糖新生系

肝臓と腎臓には、解糖系だけではなく糖新生系も存在する。PFK-1 は解糖系の律速酵素であるが、PFK-1 の反対方向を触媒する FBP は、糖新生系の律速酵素である。Fru-2,6-P₂ は、PFK-1 を活性化し⁽⁵⁻⁷⁾、FBP を阻害する^(38,39) ことで、解糖系を促進し、糖新生系を阻害する。Rib-1,5-P₂ についても、肝臓と腎臓における、PFK-1 と FBP に対する効果が検討されている。

① 肝臓

肝臓の重要な働きの一つが血糖値を一定に保つことである。肝臓において、栄養状態を反映したホルモンの作用により PFK-2/FBP-2 の活性調節を介して Fru-2,6-P₂ 量の増減をもたらすことで解糖系と糖新生を調節する仕組みを先に示した (図 3)。Rib-1,5-P₂ は、Fru-2,6-P₂ に見られるような肝 PFK-1 の活性化と FBP の阻害を引き起こせるのかどうか検討されている。

Sawada ら⁽¹⁸⁾は、Rib-1,5-P₂ は肝臓から精製した PFK-1 と FBP に対して Fru-2,6-P₂ と同様の働きを示すことを明らかにした。Rib-1,5-P₂ は AMP と相乗的に働いて肝 PFK-1 の高濃度 ATP による阻害を緩和し、Fru-6-P に対する PFK-1 の親和性を高めた。FBP に対しては、Rib-1,5-P₂ は AMP と相乗的に阻害した。これらのことから Sawada

らは、Rib-1,5-P₂が肝臓のFru-6-P/Fru-1,6-P₂サイクルの強力な調節因子であることを示唆した。

② 腎臓

腎臓は、肝臓と共に糖新生のできる臓器である^(82,83)。しかし生理的条件下では、糖新生により血糖値を上昇させる効果はほとんどが肝臓によるもので、腎臓の血糖値への貢献度は10～15%以下であり、それほど重要な意味を持たないのではないかと考えられてきた⁽⁸⁴⁾。しかし長期絶食により肝臓とほぼ同じ程度の貢献度を示すようになり⁽⁸⁵⁾、腎臓における糖新生は、g組織当たりでは肝臓とほぼ同じであることが示されている^(86,87)。Rib-1,5-P₂は腎臓から精製したPFK-1を活性化し⁽¹⁹⁾、腎臓から精製したFBPを阻害する⁽⁸⁸⁾ことが示された。Rib-1,5-P₂は、AMPと相乗的に働き、ラット腎PFK-1の高濃度ATPによる阻害を解除し、Fru-6-Pに対する親和性を増加させた⁽¹⁹⁾。ラット腎FBPに対しては、Rib-1,5-P₂はFBPのFru-1,6-P₂に対する親和性を低下させた。この阻害効果はAMP存在下で増強された。Fru-2,6-P₂もFBPを阻害するが、Fru-2,6-P₂による阻害は基質であるFru-1,6-P₂が低濃度の場合には有効であるが、高濃度では阻害が回復する。しかしRib-1,5-P₂によるFBPの阻害は、基質濃度を増加させても回復しなかった。ラット腎FBPに対して、Rib-1,5-P₂はFru-2,6-P₂よりも強力な阻害因子であるようだ⁽⁸⁸⁾。

(3) マクロファージ

マクロファージは嫌気性解糖系に切り替えることによって、低酸素状態に対応できることが知られる。Kawaguchiら⁽²⁰⁾は培養細胞のマクロファージにおいて、低酸素を開始してから30秒以内という極めて短い時間でRib-1,5-P₂が生成され、それによりPFK-1の活性化が起こり、その結果解糖系が活性化されたことを報告した。この間Fru-2,6-P₂は減少しており、解糖系の活性化には関与しない。低酸素マクロファージにおいてRib-1,5-P₂は、リボースリン酸ピロホスホキナーゼ(5-ホスホリボシル-1-ピロリン酸合成酵素；PRPP合成酵素、EC2.7.6.1)と、新しい酵素であるPRPPピロホスファターゼの2つの酵素により、以下の2段階の経路で合成されることを示した。

PRPP合成酵素



PRPPピロホスファターゼ



さらに、PKCに結合するジアシルグリセロールの競合物質であるカルホスチンCの存在、またホスファチジル4,5-ビスリン酸からのジアシルグリセロールの生成を阻害する1-オクタデシル-2-メチル-*rac*-グリセロール-3-ホスホコリンの存在により、PRPP合成酵素とPRPPピロホスファターゼの活性化、ならびにRib-1,5-P₂産生の増加を防止した。これにより上記の酵素の活性化は、低酸素時のマクロファージにおけるホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼCの活性化を介して作用するPKCによって引き起こされたことを示した。

2-3-3. Rib-1,5-P₂合成酵素と産生刺激

現在までにおいて、脳⁽¹³⁾とマクロファージ⁽²⁰⁾では、虚血や低酸素刺激により、Rib-1,5-P₂が実際に産生されることが確かめられている。Rib-1,5-P₂合成酵素としてGuhaら⁽⁷⁸⁾により提案されたグルコース1,6-ビスリン酸合成酵素は、脳に分布していることが示された⁽⁷⁹⁾。低酸素時のマクロファージにおいてはPRPP合成酵素とPRPPピロホスファターゼの2つの酵素の働きによりRib-1,5-P₂が合成されること、またこれらの酵素が低酸素刺激により活性化されたPKCを介してリン酸化され、活性化されることも示された⁽²⁰⁾。しかし脳とマクロファージ以外の組織では、このような機序や、低酸素などの刺激で産生が増加するかどうか不明である。In vitro解析では、骨格筋⁽¹⁴⁾、肝^(14,18)、腎⁽¹⁹⁾、顎下腺⁽¹⁶⁾、耳下腺⁽¹⁷⁾、赤血球⁽¹⁵⁾のPFK-1はRib-1,5-P₂で活性化され、肝⁽¹⁸⁾と腎⁽⁸⁸⁾のFBPはRib-1,5-P₂で阻害された。顎下腺と耳下腺では、Rib-1,5-P₂がFru-2,6-P₂以上に低濃度で有効な、強力なPFK-1の活性化因子であった^(16,17)。しかしそれらの組織におけるRib-1,5-P₂合成酵素の存在や、合成経路は明らかになっていない。さらなる研究の必要がある。

Rib-1,5-P₂は哺乳類のみならず、古細菌、細菌、真核生物と、生命の3つの主幹すべてにその代謝経路がみられ、Rib-1,5-P₂を産生または利

用する酵素、関連する働きを持つ酵素は生物界で非常に多く見つかっている⁽⁸⁹⁾。古くは1953年 Klenow により、リボース 1-リン酸とグルコース 1,6-ビスホスファターゼ存在下でホスホグルコムターゼ (EC. 5.5.2.2) により *in vitro* で Rib-1,5-P₂ が合成されることが報告された⁽⁹⁰⁾。Rib-1,5-P₂ は特に古細菌において良く研究されており、古細菌ではペントースリン酸経路やペントースビスリン酸経路の代謝中間体として Rib-1,5-P₂ が存在する^(91,92)。古細菌の異化作用においては、Rib-1,5-P₂ は解糖と糖新生の中間体であり^(93,94)、核酸塩基部分はホスホリボシル化によってリサイクルされ⁽⁹⁵⁾、核酸塩基のサルベージ回路の代謝中間体⁽⁹³⁾となる。また大腸菌では Rib-1,5-P₂ は、メチルホスホネートなどのホスホネート異化の中間体⁽⁹⁶⁾となる。Rib-1,5-P₂ は古細菌や細菌において、大変汎用性の高い化合物であることが指摘されている⁽⁸⁹⁾。脊椎動物の Rib-1,5-P₂ 合成酵素としては、先に述べたようにグルコース 1,6-ビスリン酸合成酵素について報告がある^(78,97,98)。この酵素の遺伝子は分析したすべての組織で発現していたが、特に脳組織で最も豊富に発現していた。グルコース 1,6-ビスリン酸合成酵素は、脊椎動物に限定されているようである⁽⁹⁹⁾。ホスホグルコムターゼもヒトにおいて発現しているが、速度論的分析から、グルコース 1,6-ビスリン酸合成酵素が、おそらくヒト組織の Rib-1,5-P₂ 供給源である⁽⁹⁹⁾。

3. Fru-2,6-P₂ と Rib-1,5-P₂ の展望

Rib-1,5-P₂ は古細菌、細菌、真核生物の生命の3つの主幹すべてが持っている⁽⁸⁹⁾。一方で、PFK-2/FBP-2 を持ち、Fru-2,6-P₂ を PFK-1 の調節代謝産物として使用することは、真核生物特有の現象であるようだ⁽⁵¹⁾。Fru-2,6-P₂ は、すべての哺乳類、動植物界全体、菌類に存在するが、細菌にはみられない。そのため大腸菌は PFK-2 活性を発現せず、Fru-2,6-P₂ を持たない。それにもかかわらず、興味深いことに大腸菌の PFK-1 は、哺乳類の PFK-1 と同じアロステリックメカニズムで、Fru-2,6-P₂ によって活性化され⁽⁵¹⁾、さらに大腸菌の FBP は、Fru-2,6-P₂ によって阻害される⁽¹⁰⁰⁾。哺乳類 PFK-1 に対して Rib-1,5-P₂ は、

Fru-2,6-P₂ の競合阻害剤であり、同じアロステリックサイトに競合して結合することが示唆されている⁽¹⁴⁾。それならば大腸菌 PFK-1 は Rib-1,5-P₂ によって活性化を受けるかどうか、また FBP は Rib-1,5-P₂ によって阻害されるかどうかを検討する価値があるだろう。大腸菌に Fru-2,6-P₂ は存在しないが、Rib-1,5-P₂ は存在する。また大腸菌において Rib-1,5-P₂ は、別の酵素であるホスホグルコムターゼの活性化因子としての働きも持つ。大腸菌ホスホグルコムターゼの活性は、Rib-1,5-P₂ またはデオキシリボース 1,5-ビスリン酸の存在によって 10 倍刺激される⁽¹⁰¹⁾。

他にも PFK-1 以外の酵素で、Fru-2,6-P₂ によって活性化される酵素が知られている。植物ではピロリン酸依存性 Fru-6-P ホスホトランスフェラーゼ (PF6P) が Fru-2,6-P₂ によって活性化を受けるが⁽¹⁰²⁾、ジャガイモと緑豆の PF6P に対する Rib-1,5-P₂ の効果が検討されており、Fru-2,6-P₂ の方が Km は低いものの、Rib-1,5-P₂ も PF6P を活性化した⁽¹⁴⁾。またトリパノソーマ科では、解糖経路のほとんどはグリコソーム内に区画化されており、そこで PFK-1 は Fru-2,6-P₂ に対して非感受性である。対照的に、サイトゾルのピルビン酸キナーゼが Fru-2,6-P₂ によって刺激される⁽¹⁰³⁾。トリパノソーマ科ピルビン酸キナーゼを Rib-1,5-P₂ は活性化するののかも検討する価値がある。

Rib-1,5-P₂ の産生とそれに伴う解糖系の促進は、脳とマクロファージでは時間経過が極めて早い。ラット脳において、Rib-1,5-P₂ は虚血から 5 秒以内に合成され、20 秒で消失した。それと同じ時間経過で PFK-1 の活性化を介して解糖系が促進された⁽¹³⁾。マクロファージにおいても、Rib-1,5-P₂ の細胞内濃度は低酸素の 30 秒後に最大レベルまで上昇し、PFK-1 の活性化を介して 1 分以内に解糖系が活性化された⁽²⁰⁾。その間 Fru-2,6-P₂ の濃度は上昇しない。ラット脳においては、Rib-1,5-P₂ が消失した後に、ゆっくり Fru-2,6-P₂ が上昇し始め、第二段階の解糖の上昇が始まる⁽²⁷⁾。Rib-1,5-P₂ は PFK-1 の急激な活性化に働き、続く Fru-2,6-P₂ による緩やかな活性化へのトリガーとなるようだ⁽²⁷⁾。なぜ PFK-1 はこのような二段階の活性化を経るのかは不明である。

Rib-1,5-P₂ の産生刺激は、現在分かっている限りでは虚血や低酸素などの酸素欠乏であるが、

Fru-2,6-P₂ の産生刺激は単一ではない。アイソザイムにより異なるが、Fru-2,6-P₂ 産生酵素の PFK-2/FBP-2 は、低酸素のみならず、栄養状態の変化、それに伴うインスリンやグルカゴンなどのホルモンの変化などにより、AMP 依存性プロテインキナーゼ、PKC、PKA、インスリン依存性プロテインキナーゼ、キシルロース 5-リン酸依存性タンパク質ホスファターゼといった、様々なプロテインキナーゼやホスファターゼによりリン酸化と脱リン酸化を受け、活性が調節されることが明らかになっている。Fru-2,6-P₂ は極めて幅広い外部環境や内部環境の変化に対応して、PFK-1 と FBP の活性調節により解糖系と糖新生を調節することができるようだ。

一方で、Rib-1,5-P₂ は脳とマクロファージ以外でも産生されるのかどうか、やはり解糖系活性化のトリガーとして極めて短時間で産生されるのか、また酸素欠乏のほかにも産生刺激となる因子があるのかどうか。今後の研究に期待される。

4. 結論

様々な外部環境や内部環境の変化が Fru-2,6-P₂ に収束して、解糖系と糖新生のバランスをとる機構は、真核細胞以降に獲得した非常に精巧な制御方法である。一方で、生命の歴史の初期のころから存在する古細菌や細菌も持つ、起源の古い化合物である Rib-1,5-P₂ もまた、哺乳類の PFK-1 や FBP に対してもレギュレーターとなり、数秒のうちに解糖を促進し、糖新生の調節にも寄与する可能性があるというのは、極めて興味深いことである。Rib-1,5-P₂ の産生とその役割については今だ不明な点が多いが、今後の解明に期待したい。

文 献

- (1) Bacon, F: On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 1965; 12.1: 88-118.
- (2) Lowry, Oliver H., and Janet V. Passonneau: Kinetic evidence for multiple binding sites on phosphofructokinase. *J Biol Chem*, 1966; 241.10: 2268-2279.
- (3) Garland, P. B., P. J. Randle, and E. A. Newsholme: Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation. *Nature*, 1963; 200.4902: 169-170.
- (4) Passonneau, Janet V., and Oliver H. Lowry: The role of phosphofructokinase in metabolic regulation. *Advances in enzyme regulation*, 1964; 2: 265-274.
- (5) Furuya, E., Uyeda, K: An activation factor of liver phosphofructokinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1980, 77.10: 5861-5864.
- (6) E. Van Schaftingen, L. Hue, and H. G. Hers: Fructose 2, 6-bisphosphate, the probably structure of the glucose-and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase. *Biochem J*, 1980, 192.3: 897-901.
- (7) Pilkis, S. J., El-Maghrabi, M. R., Pilkis, J., Claus, T. H., et al.: Fructose 2, 6-bisphosphate. A new activator of phosphofructokinase. *J Biol Chem*, 1981; 256(7): 3171-3174.
- (8) Uyeda, K., Furuya, E. and A. Dean Sherry: The structure of "activation factor" for phosphofructokinase. *J Biol Chem*, 1981; 256.16: 8679-8684.
- (9) Uyeda, K., Furuya, E., and Luby, L. J.: The effect of natural and synthetic D-fructose 2, 6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases. *J Biol Chem*, 1981; 256(16): 8394-8399.
- (10) Hers, H. G. Van Schaftingen, E: Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *Biochem J*, 1982; 206: 1-12.
- (11) Pilkis, S. J., Claus, T. H., Kurland, I. J. et al.: 6-Phosphofructo-2- kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Annu Rev Biochem*, 1995; 64: 799-835.
- (12) Okar, D. A., Lange, A. J., Manzano, A., et al.: PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2, 6-bisphosphate. *Trends Biochem Sci*, 2001; 26(1): 30-35.
- (13) Ogushi, S., Lawson, J. W., Dobson, G. P. et al.: A new transient activator of phosphofructokinase during initiation of rapid glycolysis in brain. *J Biol Chem*, 1990; 265(19): 10943-10949.
- (14) Ishikawa, E., Ogushi, S., Ishikawa, T. et al.: Activation of mammalian phosphofructokinases by ribose 1, 5-bisphosphate. *J Biol Chem*, 1990; 265(31): 18875-18878.
- (15) Rose, I. A., Warms, J. V.: Glucose-and mannose-1,

- 6-P2 as activators of phosphofructokinase in red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1974; 59(4): 1333-1340.
- (16) 川島晴夫, 三井由香: ラット顎下腺 phosphofructokinase の Ribose 1,5-Bisphosphate による活性化. *日大口腔科学*, 1993; 19(1): 1-8.
- (17) 小高昇平, 三井由香: Ribose 1,5-Bisphosphate によるウシ耳下腺 Phosphofructokinase 活性化: Fructose 2,6-Bisphosphate との比較. *日大口腔科学*, 1994; 20: 397-405.
- (18) Sawada, M., Mitsui, Y., Sugiya, H., et al.: Ribose 1, 5-bisphosphate is a putative regulator of fructose 6-phosphate/fructose 1, 6-bisphosphate cycle in liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000; 32(4): 447-454.
- (19) Ozeki, T., Mitsui, Y., Sugiya, H., et al.: Ribose 1, 5-bisphosphate regulates rat kidney cortex phosphofructokinase. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1999; 124(3): 327-332.
- (20) Kawaguchi, T., Veech, R. L., Uyeda, K: Regulation of energy metabolism in macrophages during hypoxia: roles of fructose 2, 6-bisphosphate and ribose 1, 5-bisphosphate. *J Biol Chem*, 2001; 276(30): 28554-28561.
- (21) Dunaway, G. A., Kasten, T. P., Sebo, T., et al.: Analysis of the phosphofructokinase subunits and isoenzymes in human tissues. *Biochem J*, 1988; 251(3): 677-683.
- (22) Zancan, P., Marinho-Carvalho, M. M., Faber-Barata, J., et al.: ATP and fructose-2, 6-bisphosphate regulate skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase by altering its quaternary structure. *IUBMB life*, 2008; 60(8): 526-533.
- (23) Fernandes, P. M., Kinkad, J., McNae, I., et al.: Biochemical and transcript level differences between the three human phosphofructokinases show optimisation of each isoform for specific metabolic niches. *Biochem J*, 2020; 477(22): 4425-4441.
- (24) Li, Y., Rivera, D., Ru, W., et al.: Identification of allosteric sites in rabbit phosphofructo-1-kinase. *Biochemistry*, 1999; 38(49): 16407-16412.
- (25) Hauri, D. C., Shen, P., Arkin, A. P., et al.: Steady-state measurements on the fructose 6-phosphate/fructose 1, 6-bisphosphate interconversion cycle. *J Phys Chem B*, 1997; 101(19): 3872-3876.
- (26) 渡邊房男, 西敏夫, 古谷榮助: フルクトース 2, 6 二磷酸による糖代謝調節. *化学と生物*, 1991; 29(1): 13-21.
- (27) Uyeda, K: Short-and Long-Term Adaptation to Altered Levels of Glucose: Fifty Years of Scientific Adventure. *Annu Rev Biochem*, 2021; 90: 31-55.
- (28) Reinhart, G. D., Lardy, H. A: Rat liver phosphofructokinase: kinetic activity under near-physiological conditions. *Biochemistry*, 1980; 19(7): 1477-1484.
- (29) Furuya E, Uyeda K: A novel enzyme catalyzes the synthesis of activation factor from ATP and D-fructose-6-P. *J Biol Chem*, 1981; 256: 7109-12.
- (30) Van Schaftingen E, Hers HG: Phosphofructokinase 2: the enzyme that forms fructose 2,6-bisphosphate from fructose 6-phosphate and ATP. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981; 101:1078-84.
- (31) El-Maghrabi MR, Claus TH, Pilkis J, et al.: Partial purification of a rat liver enzyme that catalyzes the formation of fructose 2,6-bisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1981; 101:1071-77.
- (32) van Schaftingen E, Davies DR, Hers HG: Fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver. *Eur J Biochem*, 1982; 124:143-49.
- (33) El-Maghrabi MR, Claus TH, Pilkis J, et al.: Regulation of rat liver fructose 2,6- bisphosphatase. *J Biol Chem*, 1982; 257:7603-7.
- (34) Furuya E, Yokoyama M, Uyeda K: An enzyme that catalyzes hydrolysis of fructose-2,6- bisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982; 105: 264-70.
- (35) Sakakibara, R., Kitajima, S., Uyeda, K: Differences in kinetic properties of phospho and dephospho forms of fructose-6-phosphate, 2-kinase and fructose 2, 6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, 1984; 259(1): 41-46.
- (36) Sakakibara, R., Kitajima, S., Uyeda, K: Limited proteolysis and photoaffinity labeling with 8-azido-ATP of fructose-6-phosphate, 2-kinase and fructose-2, 6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, 1984; 259(13), 8366-8371.
- (37) Sakakibara, R., Kitajima, S., Hartman, F. C., et al.: Hexose phosphate binding sites of fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2, 6-bisphosphatase. Interaction with N-bromoacetyethanolamine phosphate and 3-bromo-1, 4-dihydroxy-2-butanone 1, 4-bisphosphate. *J Biol Chem*, 1984; 259(22): 14023-14028.
- (38) Meek, D. W., and H. G. Nimmo: The interaction of fructose 2, 6-bisphosphate with an allosteric site of rat liver fructose 1, 6-bisphosphatase. *FEBS letters*, 1983; 160.1-2: 105-109.
- (39) Nilsson Ekdahl, Kristina, and Pia Ekman: The effect of fructose 2, 6 - bisphosphate and AMP on the activity of phosphorylated and unphosphorylated

- fructose - 1, 6 - bisphosphatase from rat liver. FEBS letters 1984; 167.2: 203-209.
- (40) Laloux, M., Van Schaftingen, E., François, J., HERS, H. G: Phosphate dependency of phosphofructokinase 2. Eur J Biochem, 1985; 148(1): 155-159.
- (41) Pilkis, S. J., Walderhaug, M., Murray, K., et al.: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2, 6-bisphosphatase from rat liver. J Biol Chem, 1983; 258(10): 6135-6141.
- (42) Murray, K. J., El-Maghrabi, M. R., Kountz, P. D., et al.: Amino acid sequence of the phosphorylation site of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase. J Biol Chem, 1984; 259(12): 7673-7681.
- (43) Nishimura M, Fedorov S, Uyeda K: Glucose-stimulated synthesis of fructose 2,6-bisphosphate in rat liver. Dephosphorylation of fructose 6-phosphate, 2-kinase: fructose 2,6-bisphosphatase and activation by a sugar phosphate. J Biol Chem, 1994; 269: 26100-6.
- (44) Nishimura M, Uyeda K: Purification and characterization of a novel xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase catalyzing dephosphorylation of fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2,6-bisphosphatase. J Biol Chem, 1995; 270: 26341-46.
- (45) Strack S, Chang D, Zaucha JA, et al.: Cloning and characterization of B δ , a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A. FEBS Letters., 1999; 460: 462-66.
- (46) Liu YQ, Uyeda K: A mechanism of regulation of hepatic Fru 2,6-P₂ concentration upon refeeding: involvement of xylulose 5-P and cyclic-AMP. Biochem Biophys Res Commun, 1996; 221:554-58.
- (47) Kitamura, K., Uyeda, K: Purification and characterization of myocardial fructose-6-phosphate, 2-kinase and fructose-2, 6-bisphosphatase. J Biol Chem, 1988; 263(18): 9027-9033.
- (48) Sakakibara, R., Uyeda, K: Differences in the allosteric properties of pure low and high phosphate forms of phosphofructokinase from rat liver. J Biol Chem, 1983; 258(14): 8656-8662.
- (49) Hasemann, C. A., Istvan, E. S., Uyeda, K., et al.: The crystal structure of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase reveals distinct domain homologies. Structure, 1996; 4(9): 1017-1029.
- (50) Sakakibara, R., Kato, M., Okamura, N., et al.: Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase. J Biochem, 1997; 122(1): 122-128.
- (51) Okar, D. A., Lange, A. J., Manzano, À., et al.: PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2, 6-bisphosphate. Trends Biochem Sci, 2001; 26(1): 30-35.
- (52) Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D., et al.: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. Biochem J, 2004; 381(3): 561-579.
- (53) Ventura F, Rosa JL, Ambrosio S, et al.: Bovine brain 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. Evidence for a neural-specific isozyme. J Biochem. 1992; Sep 5;267(25): 17939-43.
- (54) Sakakibara, R., Kato, M., Okamura, N., et al.: Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase. J Biochem, 1997; 122(1): 122-128.
- (55) Kountz, P. D., El-Maghrabi, M. R., Pilkis, S. J.: Isolation and characterization of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase from bovine liver. Arch Biochem Biophys, 1985; 238(2): 531-543.
- (56) Pilkis, S. J., Claus, T. H., Kurland, I. J., et al.: 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. Annu Rev Biochem, 1995; 64(1): 799-835.
- (57) Kitamura, K., Uyeda, K., Kangawa, K., et al.: Purification and characterization of rat skeletal muscle fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2, 6-bisphosphatase. J Biol Chem, 1989; 264(17): 9799-9806.
- (58) Kitamura, K., Uyeda, K: The mechanism of activation of heart fructose 6-phosphate, 2-kinase: fructose-2, 6-bisphosphatase. J Biol Chem, 1987; 262(2): 679-681.
- (59) Murray KJ, El-Maghrabi MR, Kountz PD, et al.: Amino acid sequence of the phosphorylation site of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. J Biol Chem, 1984; Jun 25; 259(12): 7673-81.
- (60) Van Schaftingen E, Davies DR, Hers HG: Inactivation of phosphofructokinase 2 by cyclic AMP - dependent protein kinase. Biochem Biophys Res Commun, 1981; Nov 16; 103(1): 362-8.
- (61) El-Maghrabi MR, Claus TH, Pilkis J, et al.: Regulation of 6-phosphofructo-2-kinase activity by cyclic AMP-dependent phosphorylation.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1982; Jan;79(2): 315-9.
- (62) Sakakibara R, Kitajima S, Uyeda K: Differences in kinetic properties of phospho and dephospho forms of fructose-6-phosphate, 2-kinase and fructose 2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, 1984; Jan 10; 259(1): 41-6.
- (63) van Schaftingen E, Davies DR, Hers HG: Fructose-2,6-bisphosphatase from rat liver. *Eur J Biochem*, 1982; May; 124(1): 143-9.
- (64) El-Maghrabi MR, Claus TH, Pilkis J, et al.: Regulation of rat liver fructose 2,6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, 1982; Jul 10; 257(13): 7603-7.
- (65) Kitamura, K., Kangawa, K., Matsuo, H., et al.: Phosphorylation of myocardial fructose-6-phosphate, 2-kinase: fructose-2, 6-bisphosphatase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. Activation by phosphorylation and amino acid sequences of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*, 1988; 263(32): 16796-16801.
- (66) Rider MH, Vandamme J, Lebeau E, et al.: The two forms of bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase result from alternative splicing. *Biochem J*, 1992; 285(2): 405-411.
- (67) Rider MH, van Damme J, Vertommen D, et al.: Evidence for new phosphorylation sites for protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase in bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Letters*. 1992 Sep 28; 310(2): 139-42.
- (68) Deprez, J., Vertommen, D., Alessi, D. R., et al.: Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem*, 1997; 272(28): 17269-17275.
- (69) Hardie, D. G., Carling, D., Carlson, M: The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem*, 1998; 67(1): 821-855.
- (70) Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., et al.: Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current Biology*, 2000; 10(20), 1247-1255.
- (71) Warburg, Otto: On the origin of cancer cells. *Science*, 1956; 123(3191): 309-314.
- (72) Shi, L., Pan, H., Liu, Z., et al.: Roles of PFKFB3 in cancer. *Signal Transduct Target Ther*, 2017; 2(1): 1-10.
- (73) Kotowski, K., Rosik, J., Machaj, F., et al.: Role of PFKFB3 and PFKFB4 in cancer: genetic basis, impact on disease development/progression, and potential as therapeutic targets. *Cancers*, 2021; 13(4), 909.
- (74) Bartrons, R., Rodríguez-García, A., Simon-Molas, H., et al.: The potential utility of PFKFB3 as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*, 2018; 22(8): 659-674.
- (75) Bartrons, R., Simon-Molas, H., Rodríguez-García, A. et al.: Fructose 2, 6-bisphosphate in cancer cell metabolism. *Frontiers in Oncology*, 2018; 8, 331.
- (76) Ros, S., Schulze, A: Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2, 6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer Metabolism*, 2013; 1(1): 1-10.
- (77) Ueda, H., Hashimoto, T., Furuya, E., et al.: Changes in aerobic and anaerobic ATP-synthesizing activities in hypoxic mouse brain. *J Biochem*, 1988; 104.1: 81-86.
- (78) Guha SK, Rose ZB: The enzymic synthesis of ribose-1,5-bisphosphate: studies of its role in metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 1986; 250: 513-518.
- (79) Yip, V., Pusateri, M. E., Carter, J., et al.: Distribution of the glucose-1, 6-bisphosphate system in brain and retina. *J Neurochem*, 1988; 50(2): 594-602.
- (80) Williamson, D. H., Bates, M. W., Page, M. A., et al.: Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues. *Biochem J*, 1971; 121(1): 41-47.
- (81) Thompson, M. P., Williamson, D. H.: Metabolic interactions of glucose, acetoacetate and adrenaline in rat submaxillary gland in vitro. *Biochem J*, 1975; 146(3): 635-644.
- (82) Benoy, Marjorie Pickard, and Kenneth Allan Caldwell Elliott: The metabolism of lactic and pyruvic acids in normal and tumour tissues: Synthesis of carbohydrate. *Biochem J*, 1937; 31.8: 1268-1275.
- (83) Smith, O. K., and C. N. H. Long: Renal gluconeogenesis in eviscerated diabetic rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1971; 68.7: 1618-1622.
- (84) Pogson, C. I., et al.: *Gluconeogenesis: Its Regulation in Manmalian Species* ed. by RW Hanson and MY Mehlman. 1976: 335.
- (85) Owen, O. E., Felig, P., Morgan, A. P., et al.: Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. *J Clin Invest*, 1969; 48.3: 574-583.

- (86) Bowman, R. H.: Gluconeogenesis in the isolated perfused rat kidney. *J Biol Chem*, 1970; 245:7: 1604-1612.
- (87) 坪内博仁, 中川八郎: 腎臓の糖新生とその特異性. *臨床化学*, 1978; 第7巻, 第2号: 101-109.
- (88) Ozaki, I., Mitsui, Y., Sugiya, H., et al.: Ribose 1, 5-bisphosphate inhibits fructose-1, 6-bisphosphatase in rat kidney cortex. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2000; 125(1): 97-102.
- (89) Hove-Jensen, B., Brodersen, D. E., Manav, M. C.: The prodigal compound: return of ribosyl 1, 5-bisphosphate as an important player in metabolism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2019; 83(1): e00040-18.
- (90) Klenow, H.: Some properties of the phosphoribomutase reaction. *Arch Biochem Biophys*, 1953; 46(1): 186-200.
- (91) Atomi, H., Fukui, T., Kanai, T. et al.: Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea*, 2004; 1(4), 263-267.
- (92) Fukui, Toshiaki, Atomi, H., Kanai, T., et al.: Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res*, 2005; 15(3), 352-363.
- (93) Aono R, Sato T, Imanaka T, et al.: A pentose bisphosphate pathway for nucleoside degradation in Archaea. *Nature Chemical Biology*, 2005; 11: 355-360.
- (94) Sato T, Atomi H, Imanaka T: Archaeal type III RuBisCOs function in a pathway for AMP metabolism. *Science*, 2007; 315: 1003-1006.
- (95) Jensen, K. F., Dandanell, G., Hove-Jensen, B., et al.: Nucleotides, nucleosides, and nucleobases. *EcoSal Plus*, 2008; 3.1.
- (96) Hove-Jensen B, Rosenkrantz TJ, Haldimann A, et al.: *Escherichia coli* phnN, encoding ribose 1,5-bisphosphokinase activity (phosphoribosyl diphosphate forming): dual role in phosphonate degradation and NAD biosynthesis pathways. *J Bacteriol*, 2003; 185: 2793-2801.
- (97) Rose IA, Warms JV, Kaklij G: A specific enzyme for glucose 1,6-bisphosphate synthesis. *J Biol Chem*, 1975; 250: 3466-3470.
- (98) Ueda M, Hirose M, Sasaki R, et al.: Regulation of glucose 1,6-bisphosphate level in liver. III. Purification and properties of bovine glucose 1,6-bisphosphate synthase. *J Biochem*, 1978; 83: 1721-1730.
- (99) Maliekal P, Sokolova T, Vertommen D, et al.: Molecular identification of mammalian phosphopentomutase and glucose-1,6-bisphosphate synthase, two members of the α -D-phosphohexomutase family. *J Biol Chem*, 2007; 282: 31844-31851.
- (100) Marcus, Frank, Ida Edelstein, and Judith Rittenhouse: Inhibition of *Escherichia coli* fructose-1, 6-bisphosphatase by fructose 2, 6-bisphosphate. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984; 119.3: 1103-1108.
- (101) Hammer-Jespersen K, Munch-Petersen A: Phosphodeoxyribomutase from *Escherichia coli*. Purification and some properties. *Eur J Biochem*, 1970; Dec;17(3): 397-407.
- (102) STITT, MARK: Fructose 2, 6-Bisphosphate: Methods in plant biochemistry. 3. Academic Press, 1990; 87-92.
- (103) Van Schaftingen, E., Opperdoes, F. R., HERS, H. G.: Stimulation of *Trypanosoma brucei* pyruvate kinase by fructose 2, 6-bisphosphate. *Eur J Biochem*, 1985; 153(2): 403-406.