

コイ筋肉ホスホリラーゼキナーゼのカルシウムとその他の因子による活性化

誌名	日本水産學會誌
ISSN	00215392
巻/号	531
掲載ページ	p. 151-157
発行年月	1987年1月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



コイ筋肉ホスホリラーゼキナーゼのカルシウムとその他の
因子による活性化*1

川田 倫夫, 柴田 猛

(1986年6月6日受理)

Stimulation of Carp Muscle Phosphorylase Kinase by Calcium
and Other Factors

Michio Kawada*2 and Takeshi Shibata*2

In order to obtain further information on the regulation of the glycogen-degradating metabolism in fish skeletal muscle, the activation by calcium ion and other substances, autocatalytic reaction and limited proteolysis of carp muscle phosphorylase kinase (EC. 2.7.1.38) were studied.

It was shown that the activation pattern of the carp enzyme by calcium ion and calmodulin was the same as that of rabbit enzyme, suggesting the presence of calcium regulation mechanism in the fish muscle.

The activation by glycogen of the fish enzyme was very low; and also the extent of activation by the procedures of auto-catalytic reaction and limited proteolysis of the fish enzyme were less than that of rabbit enzyme. That the fish enzyme obtained by the limited proteolysis with trypsin lost the response to calcium sensibility and γ -subunit of the enzyme was susceptible to the limited proteolysis, differed from that of rabbit enzyme.

魚類筋肉におけるグリコーゲン分解代謝過程の詳細を知るために、コイ筋肉のホスホリラーゼおよびホスホリラーゼキナーゼのリン酸化と活性化の関係を検討した。^{1,2)}その結果、各酵素のリン酸化と活性化の程度がウサギのそれぞれの酵素の場合と異なった。特にホスホリラーゼキナーゼは cAMP-プロティンキナーゼによってリン酸化はされるが、全く活性化されず、それらに並行関係が存在しなかった。哺乳類酵素に存在するリン酸化一脱リン酸化による調節機構がコイ筋肉において欠いていることを示唆した。ホスホリラーゼキナーゼの生理的条件下における活性化の調節作用として、筋肉収縮と関連した Ca^{2+} の作用がある。³⁻⁷⁾もしこの調節作用が哺乳類と同様に魚類筋肉にも存在するならば、このキナーゼのリン酸化と Ca^{2+} による活性化の二つの異なった調節機構の獲得は別々にあり、生物の酵素進化の面から興味のある問題を提出するであろう。

この報文は、コイ筋肉ホスホリラーゼキナーゼ (EC. 2.7.1.38: 以下本酵素と呼ぶ) の活性化に及ぼす Ca^{2+} やその他の活性化因子の効果と限定分解酵素の Ca^{2+} の効果の変化について検討したので、ウサギの場合と比較

した結果を述べる。

実験方法

コイおよびウサギ筋肉からの本酵素の精製法、活性の測定法、蛋白質の定量法、電気泳動法はすでに前報に述べた。⁸⁾なお、基質はすべてウサギのホスホリラーゼを用いた。

遊離カルシウム濃度の測定 低濃度の Ca^{2+} (10^{-8} ~ 10^{-4} M) を用いる実験は Ca^{2+} -EGTA 緩衝液を使用し、 Ca^{2+} と EGTA の結合定数を 5×10^{-5} M⁹⁾ として遊離の Ca^{2+} 濃度を決定した。なお、反応液中の緩衝液は 20 mM Tris-maleate (pH 6.8) を用いた。

トリプシンはベーリンガー製、大豆トリプシン・インヒビターは SIGMA 製、カルモジュリン (AMANO) は和光純薬の製品を使用した。カルモジュリンの電気泳動は Shenolikar らの方法¹⁰⁾に従い、10% スラブゲルを用いて 8 M 尿素の存在下で行った。

結果

Ca^{2+} 濃度依存性 Ca^{2+} による本酵素の活性化に必要な

*1 魚類筋肉グリコーゲン分解系酵素に関する研究—IV. (Studies on Glycogen-degradating Enzymes in Fish Skeletal Muscle—IV.). 本論文は著者の一人 (川田) の学位論文 (北海道大学, 1985) の一部である。

*2 北海道大学水産学部生物化学講座 (Laboratory of Biochemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato, Hakodate 041, Japan).

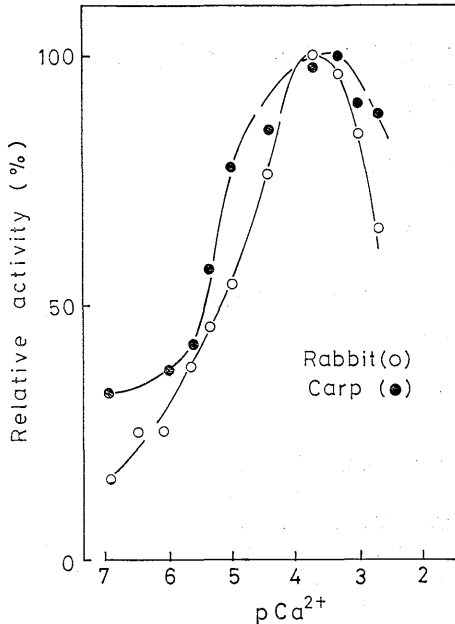


Fig. 1. Effect of Ca^{2+} on phosphorylase kinase activity.

Enzyme activity was assayed in the reaction mixture (pH 6.8) containing 20 mM Tris-maleate, 20 μM phosphorylase b, 3 mM ATP, 10 mM MgCl_2 and varying amounts of EGTA and CaCl_2 to provide free Ca^{2+} concentrations as described in the figure.

な濃度は筋肉内の生理的 Ca^{2+} 濃度に近いことから筋肉タイプの本酵素の重要な特徴とされている。^{4,6,7)}

コイとウサギの本酵素について活性化に対する Ca^{2+} 濃度依存性を pH 6.8 で検討した結果を Fig. 1 に示した。両者ともに 10^{-7} ~ 10^{-4} M の Ca^{2+} 濃度範囲内で顕著な活性化がみられ、最大活性は 0.2 mM 付近の濃度で得られ、それ以上の濃度では抑制された。また活性の半減期(最大活性の 50% を示す濃度)はコイでは 5.9×10^{-6} M, ウサギでは 6.3×10^{-6} M であった。この濃度は筋肉収縮のおこる範囲に近い。例えば、もし休止状態の Ca^{2+} 濃度を 10^{-7} M, 活動状態の濃度を 10^{-4} M とし、この変化がおこるとすると、本酵素の活性化はコイの場合には約 4 倍、ウサギでは約 6 倍の活性化がおこると想像される。また、図に示さなかったが、cAMP-プロテインキナーゼで処理してリン酸化したときの本酵素は、ウサギの場合だけ未処理のものよりも活性化されたが、 Ca^{2+} 濃度依存性は両種の本酵素ともに変化しなかった。

生理的条件下での調節が行われるために、 Ca^{2+} による調節が可逆的でなければならない。筋小胞体の Ca^{2+} の筋肉収縮における能動輸送が考えられるからである。⁸⁾ この結果を既に述べたが(前報⁹⁾の Fig. 7 を参



Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis (10%) of β -subunit of carp phosphorylase kinase in the presence of 8 M urea.

(A), bovine brain calmodulin (10 μg). 180 μg of the carp enzyme were incubated in 10 mM EGTA (B) or 10 mM CaCl_2 (C) in the presence of 8 M urea for 5 min at 40°C . Electrophoresis was carried out as described in "Experimental methods." Protein were stained with Brilliant Blue.

照), Ca^{2+} の存在下で活性は時間に比例して増加するが、反応開始 5 分後に EGTA を添加すると活性の抑制がみられ、10 分後に再び過剰の Ca^{2+} を加えると活性の回復がみられた。このように生理濃度の範囲で活性化され、しかも、この反応が可逆的であることから、コイの本酵素にとっても、 Ca^{2+} は筋肉細胞の重要な調節因子であることが示唆される。

カルモジュリンの効果 本酵素の構成サブユニットである β -サブユニットが Ca 結合蛋白カルモジュリンと一致し、Ca 調節がその蛋白によることが知られている。^{10,11,12)} コイの本酵素にもカルモジュリンが含まれることが確かめられた。すなわち、Shenolikar らの方法¹⁰⁾ に従って 8 M 尿素の存在下で、 Ca^{2+} の存在・非存在のもとで電気泳動を行った結果を Fig. 2 に示した。対照として牛脳カルモジュリンを用いたが、 Ca^{2+} の存在では β -サブユニットの解離はみられなかったが、EGTA により Ca^{2+} をキレートすると、その解離がみられた。このことはウサギの本酵素の場合¹⁰⁾と一致し、またその移動度も牛脳のカルモジュリンのそれと一致した。

さらに、外から加えられた外因性カルモジュリンによっても活性化することが報告されている。^{10,13)} ここでは

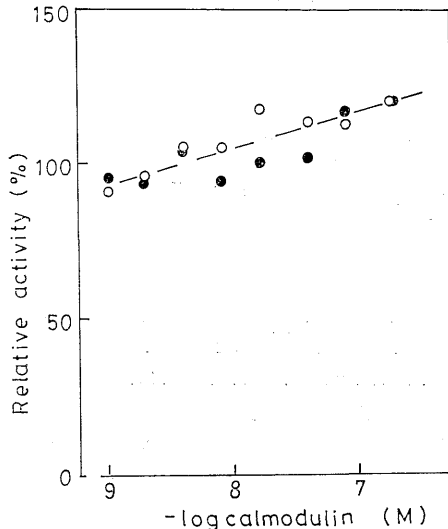


Fig. 3. Effect of bovine brain calmodulin on phosphorylase kinase activity.

Enzyme assays were carried out at pH 8.2 in the standard condition except that various calmodulin concentrations were used. (A), carp enzyme; (A), rabbit enzyme.

牛脳カルモジュリンを用いて両種の本酵素に対する効果を比較検討した。その結果を Fig. 3 に示した。生理的条件に近いカルモジュリン濃度である 1-160 nM の範囲で、コイとウサギの本酵素はその濃度に依存した僅かながらの活性増加をみせた。この条件では、ともに 1.2 倍の活性化でコイとウサギの本酵素に対する外因性カルモジュリンの効果も同じであった。

グリコーゲンの効果 本酵素の活性の測定時にグリコーゲンが存在すると、活性の増加がおこることが報告されている。¹⁴⁾ この点についてグリコーゲン濃度の影響を比較した。その結果を Fig. 4 に示した。グリコーゲンの濃度に依存した活性の増加は、ウサギの場合において特に著しかった。2% のグリコーゲン濃度でコイでは 1.3 倍の活性増加がみられたが、ウサギの場合には 3.5 倍となった。ウサギの場合のグリコーゲンの活性化は本酵素とグリコーゲンの結合によると報告されている。^{15,16)} しかし、コイの場合に活性化が余り大きくないのは、既に述べたように、¹⁷⁾ グリコーゲンと本酵素の親和力が小さいためと推定された。

自己触媒による活性化 ウサギの本酵素は cAMP-プロテインキナーゼが存在しなくても、自己触媒的に活性化される性質をもつことが報告されている。^{15,13)} すなわち、ATP-Mg²⁺ と予め保温することにより活性化される。コイの本酵素が cAMP-プロテインキナーゼにより活性化されなかったことから、²⁾ この自己触媒作用の有無をコイの本酵素について検討した。その結果を

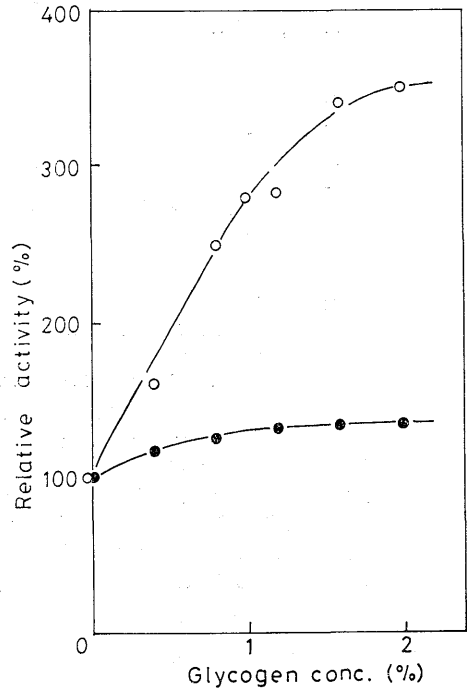


Fig. 4. Activation of phosphorylase kinase by glycogen.

Activation mixture contained 42 mM Tris, 42 mM β -glycerophosphate, 0.2 mM CaCl_2 , 3 mM ATP, 10 mM MgCl_2 , 250 unit/ml of rabbit phosphorylase b and various concentrations of glycogen as indicated in the figure at pH 6.8. Reaction was started by the addition of phosphorylase kinase at 30°C. After 5 min, aliquots were drawn and diluted with 0.1 M maleate, 20 mM NaF and 50 mM 2-mercaptoethanol buffer (pH 6.5) at 0°C and phosphorylase a activity was assayed.

Fig. 5 に示した。予め保温を pH 6.8 と pH 8.2 とし、 Ca^{2+} の存在・非存在で行った。希釈により反応を停止させ、酵素活性をすべて pH 6.8 で測定した。結果によれば、pH 6.8 で予め保温を行うと活性の増加がみられず、 Ca^{2+} の効果も小さく、 Ca^{2+} が存在しないと僅かながら活性の低下がみられた。また pH 8.2 の場合には、前とは異なり、活性増加の傾向を示し、 Ca^{2+} の存在下で 1.7 倍、非存在下では 1.2 倍の増加となった。ウサギにおいては、pH 6.8 で自己触媒作用がおこり、条件により異なるが、活性化も 5~60 倍の範囲内でおこる。Wang ら¹⁰⁾ は cAMP-プロテインキナーゼ反応よりも活性化されることから、自己触媒作用は重要な調節機構であると示唆している。しかし、コイの場合は pH 8.2 でやや活性化するだけでその程度も小さかった。また自己触媒作用はリン酸化を伴うが、この実験ではこの点を検討しなかったので、追跡すべき問題を

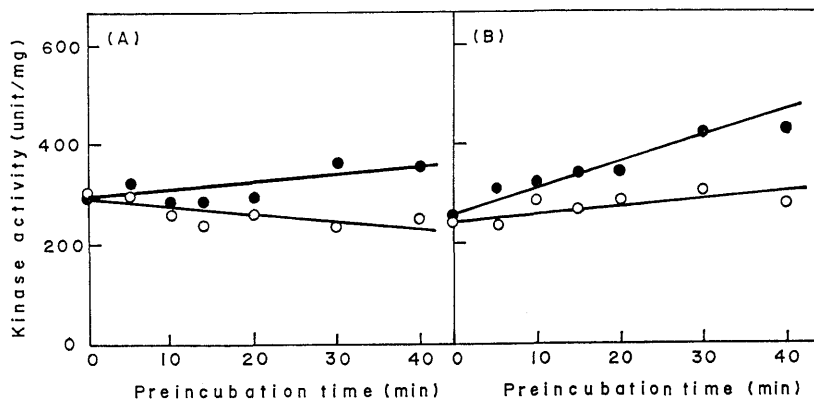


Fig. 5. Autoactivation of carp phosphorylase kinase.

Activation mixture contained 42 mM Tris, 42 mM β -glycerophosphate, 3 mM ATP, 10 mM $MgCl_2$ and 0.44 mg/ml of phosphorylase kinase in the presence of 0.2 mM $CaCl_2$ (●) or 0.2 mM EGTA (○) at pH 6.8 (A) and pH 8.2 (B) at 20°C. At intervals, aliquots were removed and diluted with 50 mM β -glycerophosphate, 2 mM EDTA, 10 mM mercaptoethanol and 10% glycerol buffer (pH 6.8) at 0°C and enzyme activity was assayed at pH 6.8 at 30°C in the standard conditions.

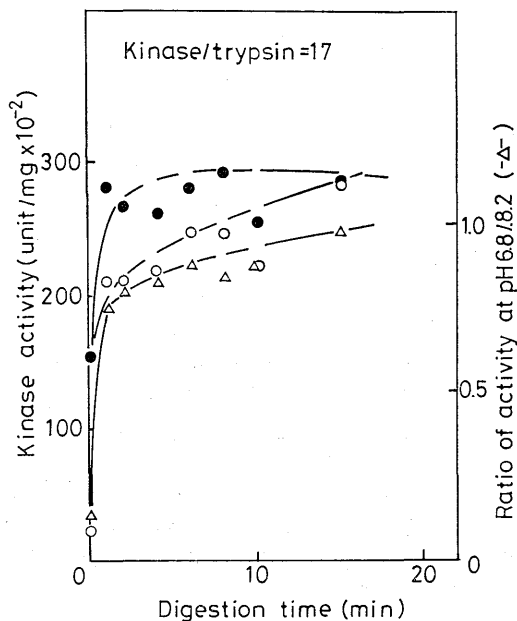


Fig. 6. Activation of rabbit phosphorylase kinase by trypsin.

Activation mixture contained 50 mM β -glycerophosphate, 0.42 mg/ml of phosphorylase kinase and 25 μ g/ml of trypsin at pH 6.8 and was incubated at 25°C for 10 min. Aliquots were removed from the reaction mixture were diluted with 50 mM β -glycerophosphate, 2 mM EDTA, 10 mM mercaptoethanol and 10% glycerol buffer (pH 6.8) containing 500 μ g/ml of soybean trypsin inhibitor. Then the enzyme activity was assayed at pH 6.8 (○) and pH 8.2 (●). (-Δ), ratio of activity at pH 6.8 to that at pH 8.2.

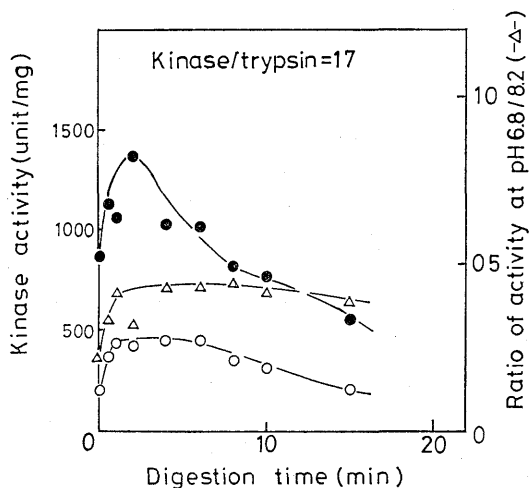


Fig. 7. Activation of carp phosphorylase kinase by trypsin.

Activation mixture contained 50 mM β -glycerophosphate, 0.84 mg/ml of phosphorylase kinase and 50 μ g/ml of trypsin at pH 6.8 and was incubated for 10 min at 20°C. Other experimental conditions were the same as in described in Fig. 6. Enzyme activity at pH 6.8 (○) and that at pH 8.2 (●). (-Δ), ratio of activity at pH 6.8 to that at pH 8.2.

残している。

トリプシンによる限定分解 ウサギの本酵素は筋肉細胞内に存在する KAF^{4,20,21} という蛋白分解酵素やトリプシン²²により活性化されることが報告されている。ここではコイの本酵素を限定分解し、その触媒的性質の変化やサブユニットの分解をウサギのそれと比較検討し

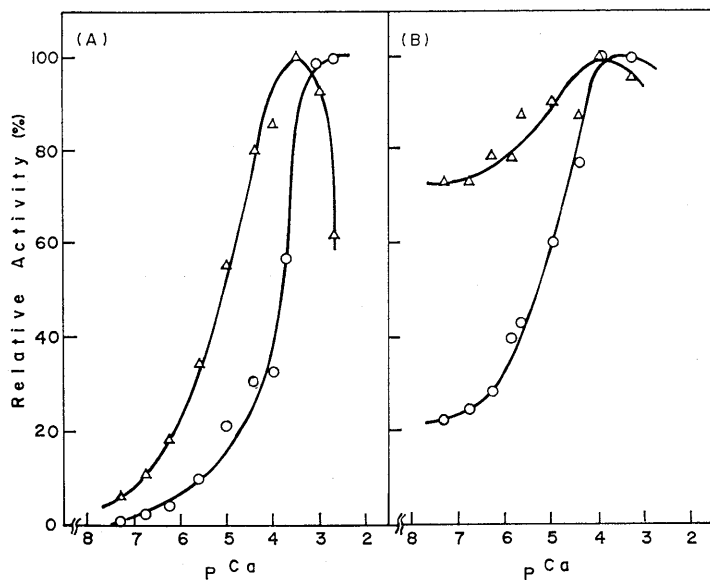


Fig. 8. Effect of Ca^{2+} on trypsin-digested phosphorylase kinase.

After digestion of both phosphorylase kinases by trypsin for 10 min under the same conditions as described in Fig. 6 (rabbit) and Fig. 7 (carp), enzyme assays were carried out at pH 6.8 in various Ca^{2+} concentrations as indicated in the figure. (○), activity before trypsin treatment; (△), activity after trypsin treatment. (A), rabbit enzyme; (B), carp enzyme.

た。

本酵素に対して重量比で 1/17 のトリプシンを加え、一定反応時間後に大豆トリプシンインヒビターを添加して反応を停止させ、そのときの活性化と活性比の変化を Fig. 6 と Fig. 7 に示した。ウサギの本酵素を分解した場合、pH 6.8 および pH 8.2 のいずれの条件で活性を測定しても、消化時間と共に酵素活性は増加した。pH 6.8 では約 14 倍、pH 8.2 では 1.4 倍と、pH 6.8 の方が著しかった。また活性比 (pH 6.8/pH 8.2) については 0.13 から 0.99 までに上昇した。これらのことは Cohen,²²⁾ Hayakawa ら²³⁾の結果と一致する。それに対して、コイの本酵素においては消化分解に伴い、pH 6.8 の活性が 2.3 倍に、pH 8.2 の活性は 1.6 倍に増加したが、pH 6.8 での活性の増加はウサギの場合の 1/6 と小さかった。消化時間が長くなるにつれて、いずれの pH においても活性の低下がみられ、pH 8.2 の活性は、2 分以後特に低下が著しかった。活性化は 0.22 から 0.44 と増加したが、0.44 の値がそのまま維持され、ウサギの値よりも小さかった。図に示さなかったが、コイにおける消化反応に伴う活性の低下が、加えるトリプシンの量に関係していると考えられたので、トリプシン量を 1/34 としたところ、両 pH における活性の低下は、少なくとも 20 分までの消化時間では認められなかった。しかし、活性比は 0.5 以上にならず、1/17 量のトリプシンを加えたとき同じ活性比を示した。これ

らの結果から、コイとウサギの本酵素は、蛋白分解酵素に対する抵抗性とその分解様式にも違いがあることを示唆された。

限定分解酵素の Ca^{2+} 濃度依存性 限定分解をうけた本酵素が比活性や活性比が変化したことから、触媒的性質も変化するのではないかと考えられたので、その触媒的性質の特徴の一つである Ca^{2+} 濃度依存性について検討した。前述の方法で限定分解した本酵素の Ca^{2+} 濃度依存性を検討した結果を Fig. 8 に示した。対照としてトリプシン未処理のものも同時に示した。ウサギにおいては限定分解を行うと明らかに Ca^{2+} 濃度の影響をうけ、最大活性とその半減期 ($\text{C}_{0.5}$) の活性を示す Ca^{2+} 濃度は未処理のものよりも左側に移動し、より低い濃度の Ca^{2+} により影響をうけ易いことを示している。 $\text{C}_{0.5}$ は未処理のものよりも 20 倍小さくなった。限定分解をうけることにより Ca 感受性が移動する傾向は Cohen の報告²²⁾ と類似していた。次にコイの本酵素を限定分解すると、 Ca^{2+} 濃度依存性は小さくなり、低い Ca^{2+} 濃度においても比較的高い活性を保持し、 Ca^{2+} 濃度を増加してもその変化は小さかった。また最大活性および $\text{C}_{0.5}$ を示す濃度は未処理の場合と全く一致した。従ってコイの本酵素の限定分解による Ca^{2+} 濃度依存性にウサギとの違いがみられた。

トリプシンによるサブユニットの分解 トリプシンによる本酵素の限定分解による活性変化をサブユニットの

Table 1. Comparison of regulatory properties of phosphorylase kinases

	Carp	Dogfish*	Rabbit
Factors involved in hormonal control			
Activation by cAMP-dependent protein kinase			
Increased activity at pH 6.8 (-fold)	1.2-1.3		3-4
Phosphorylation of subunit			
α subunit	Yes	No	Yes
β subunit	Yes	No	Yes
Inactivation by protein phosphatase	No	No	Yes
Factor involved in neural control			
Ca^{2+} requirement for activity	Yes	Yes	Yes
Ca^{2+} -dependent reversal of inactivation by EGTA	Yes	Yes	Yes

*: described in reference (27).

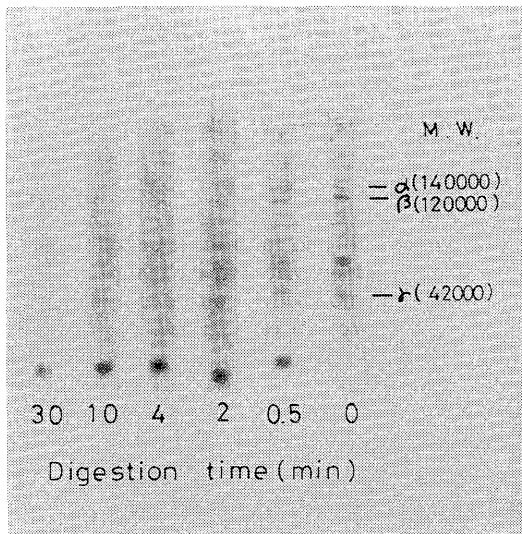


Fig. 9. Limited proteolysis of subunits of carp phosphorylase kinase by trypsin.

Carp phosphorylase kinase (1.68 mg/ml) was subjected to limited proteolysis by trypsin 50 μ g/ml at pH 6.8. Incubation temperature was 20°C. At intervals, aliquots were directly added into SDS solution. Electrophoresis was performed on 5% gel in the presence of SDS. 42 μ g of protein were applied to each gel.

機能との関連性で検討を試みた。ウサギの本酵素においては、 α および β と呼ばれる調節サブユニットが、蛋白分解酵素によって限定分解を受けると、 γ -サブユニット（触媒サブユニット）への抑制作用を失うことにより活性化されると説明されている。^{22,23} 前述の条件で、コイの本酵素をトリプシンで限定分解を行い、サブユニット成分の経時的变化を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により検索した。その結果を Fig. 9 に示した。図にみられるように、コイにおいても α と β 成分の分解がみられ、特に α 成分は β 成分に比べて速やかに分解された。30 分後には α 成分がほとんど消失した。しかし、

コイにおいて γ 成分にも分解がみられた。 γ 成分はウサギの場合には分解を受けないと報告されている。^{22,23} 30 分後に残存したバンドは主として 120000, 76000 と 35500 の三成分で、各成分の分解物と推定されるが、120000 の成分は β 成分のもの一致しているため、 α 成分の分解物か、残存した β 成分かは判断出来なかった。この限定分解酵素はほとんど活性を残していなかった。また、 α 成分の分解がおこる初期に急激な活性化がみられる点ではツノザメの結果²⁴と共通しており、コイにおいても α 成分が活性の抑制を担う調節サブユニットに相当することが示唆された。しかしながら、ツノザメの γ 成分は限定分解を受けないと報告されており、²⁴ この点はコイの場合と異なっていた。

コイでは分解に伴い Ca^{2+} に対する濃度依存性がなくなるのは Ca^{2+} との結合に関与する δ サブユニットとの関連性が考えられたが、このサブユニットは電気泳動において最も速く移動するために、その分解の有無について明らかにし得なかった。しかし γ と δ 成分は γ - δ 複合体を形成していると報告されており、²⁵ γ 成分の限定分解で δ 成分を解離させ Ca^{2+} 依存性を消失させることが、カルモジュリンの二元機能説²⁶から推定される。ウサギの場合は限定分解によっても γ - δ 複合体が残存して Ca^{2+} 依存性を示していると推定される。

考 察

これまでコイの本酵素のリン酸化とカルシウム調節について述べてきたが、ウサギとツノザメの場合とは異なる様式を示した。それを要約すると Table 1 に示される。ウサギの場合、リン酸と脱リン酸化により、酵素の活性型と不活型の間で相互転換がおこなわれる。しかしコイの本酵素はリン酸化が一部みられるが活性化がおこらない。またホスファターゼを用いた脱リン酸化も効果がなかった。ツノザメ酵素はリン酸化と脱リン酸化の両反応ともおこらないと報告されている。²⁷ しかし、 Ca^{2+} による調節は三者に共通して観察され、活性化の程度は

異なるが同様のパターンを示した。これらの事実から考慮すれば、本酵素の調節機構の獲得にも進化的な発展があったことが想像され、 Ca^{2+} 調節が最も原始的な調節作用となり、つづいてリン酸化による、より複雑な調節機構が獲得されたのであろう。

コイの本酵素は白色の骨格筋から得られたにも拘らず、本酵素のある性質は哺乳類の心筋 (例えば、pH 8.2/pH 6.8 の活性比, サブユニットの分子量)²⁵⁾ や赤色筋 (α サブユニットの分子量)²⁹⁾ に、ある点では哺乳類の平滑筋 (活性比の高いこと, トリプシンの限定分解パターン)³⁰⁾ のものに似ており、哺乳類の酵素のように明瞭な組織的に分化された性質がみられない。このことは活性が比較的哺乳類に比べて低いことに由来するかも知れないが、またサブユニット間の相互作用の違いや、あるいは、魚類骨格筋の哺乳類とは異なった分化様式も推定され、追求すべき問題である。

文 献

- 1) 川田倫夫, 柴田 猛: 日水誌, **52**, 1401-1407 (1986).
- 2) 川田倫夫, 柴田 猛: 日水誌, **52**, 1409-1416 (1986).
- 3) E. G. Krebs, D. G. Graves, and E. H. Fischer: *J. Biol. Chem.*, **234**, 2867-2873 (1959).
- 4) W. L. Meyer, E. H. Fischer, and E. G. Krebs: *Biochemistry*, **3**, 1033-1039 (1964).
- 5) E. Ozawa, K. Hosoi, and S. Ebashi: *J. Biochem.*, **61**, 531-533 (1967).
- 6) C. O. Brostrom, F. L. Hunkeler, and E. G. Krebs: *J. Biol. Chem.*, **246**, 1961-1967 (1971).
- 7) E. Ozawa: *J. Biochem.*, **71**, 321-331 (1972).
- 8) 川田倫夫, 柴田 猛: 日水誌, **50**, 287-292 (1984).
- 9) Y. Ogawa: *J. Biochem.*, **64**, 255-257 (1968).
- 10) S. Shenolkar, P. T. W. Cohen, A. C. Nairn, and S. V. Perry: *Eur. J. Biochem.*, **100**, 329-337 (1979).
- 11) P. Cohen: *Eur. J. Biochem.*, **111**, 563-574 (1980).
- 12) P. Cohen, A. Burchell, J. G. Foulkes, P. T. W. Cohen, T. C. Vanaman, and A. C. Nairn: *FEBS Lett.*, **92**, 287-293 (1979).
- 13) P. Cohen, C. Picton, and C. B. Klee: *FEBS Lett.*, **104**, 25-30 (1979).
- 14) E. G. Krebs, D. S. Love, G. E. Bratvold, K. A. Trayser, W. L. Meyer, and E. H. Fischer: *Biochemistry*, **3**, 1022-1033 (1964).
- 15) R. J. Delange, R. G. Kemp, W. D. Riley, R. A. Cooper, and E. G. Krebs: *J. Biol. Chem.*, **243**, 2200-2208 (1968).
- 16) R. F. Steiner and L. Marshall: *Biochim. Biophys. Acta*, **707**, 38-45 (1982).
- 17) 伊藤文能, 柴田 猛: 北大水産彙報, **35**, 83-96 (1984).
- 18) D. A. Walsh, J. P. Perkins, C. O. Brostrom, E. S. Ho, and E. G. Krebs: *J. Biol. Chem.*, **246**, 1968-1976 (1971).
- 19) J. H. Wang, J. T. Stull, T. S. Huang, and E. G. Krebs: *J. Biol. Chem.*, **251**, 4521-4527 (1976).
- 20) R. B. Huston and E. G. Krebs: *Biochemistry*, **7**, 2116-2122 (1968).
- 21) G. I. Drummond and L. Duncan: *J. Biol. Chem.*, **243**, 5532-5538 (1968).
- 22) P. Cohen: *Eur. J. Biochem.*, **34**, 1-14 (1973).
- 23) T. Hayakawa, J. P. Perkins, and E. G. Krebs: *Biochemistry*, **12**, 574-580 (1973).
- 24) E. H. Fischer, H. E. Blum, B. Byers, C. Heizmann, G. W. Kerrick, P. Lehky, D. A. Malencik, and S. Pociwong: in "Metabolic Interconversion of Enzymes, 1975" (ed. by S. Shaltiel) Springer-Verlag, New York, 1975, pp. 1-9.
- 25) K.-F. J. Chan and D. J. Graves: *J. Biol. Chem.*, **257**, 5948-5955 (1982).
- 26) Z. Hessova, M. Varsanyi, and L. M. G. Heilmeyer: *Eur. J. Biochem.*, **146**, 107-115 (1985).
- 27) S. Pociwong, H. Blum, D. Malencik, and E. M. Fischer: *Biochemistry*, **20**, 7219-7226 (1981).
- 28) R. H. Cooper, H. S. Sul, and D. A. Walsh: *J. Biol. Chem.*, **256**, 8030-8038 (1981).
- 29) S. W. Tam, R. K. Sharma, and J. H. Wang: *J. Biol. Chem.*, **257**, 14907-14913 (1982).
- 30) S. Nikolopoulos and T. G. Sotiropoulos: *Eur. J. Biochem.*, **151**, 467-473 (1985).