

新 創
薬
127

京大附図

肝臓マンナン結合タンパク質の 生物学的意義に関する研究

森 和 俊

目 次

序論	1
第1章 肝臓におけるマンナン結合タンパク質の局在性	5
第1節 肝実質細胞と肝非実質細胞におけるマンナン結合タンパク質の分布	6
第2節 肝実質細胞内マンナン結合タンパク質の精製とその性質	9
第3節 肝非実質細胞に存在するレセプター・マンナン結合タンパク質の性質	11
第4節 考察	18
実験の部	21
第2章 肝臓マンナン結合タンパク質およびその内在性リガンドの細胞内分布	25
第1節 肝臓中のマンナン結合タンパク質に対する内在性阻害物質の阻害様式	26
第2節 肝臓マンナン結合タンパク質の細胞内分布	26
第3節 ミクロソームにおける肝臓マンナン結合タンパク質の存在様式	32
第4節 肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドの細胞内分布	35
第5節 考察	38
実験の部	42

第3章	肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンド の単離とその性質	45
第1節	内在性リガンドの単離	45
第2節	内在性リガンドの糖鎖構造	51
第3節	内在性リガンドの代謝的性質	57
第4節	内在性リガンドの同定	60
第5節	考察	66
実験の部		69
総括および結論		75
謝辞		82
文献		83

序 論

近年、動物体内に糖タンパク質の糖鎖の微細な構造を識別し、これに結合するレクチン様物質が存在することが明らかにされ、糖タンパク質の血流から細胞内への取り込み、あるいは、糖タンパク質の細胞内輸送などの高次の細胞機能に参与することが示されている^{1,2)}。このように動物レクチンの研究は、生体内に広く分布している糖タンパク質の糖鎖の存在意義を解明するうえで重要な知見を与えつつある。

川崎らは、糖タンパク質の糖鎖の非還元末端のマンノース(以下Manと略す)およびN-アセチルグルコサミン(以下GlcNAcと略す)残基を特異的に認識し、カルシウム依存的に結合するレクチンを動物体内に初めて見だし³⁾、このレクチンがこれらの糖鎖と類似の構造をもつ酵母マンナンと強く結合することからマンナン結合タンパク質と名付けている⁴⁾。マンナン結合タンパク質はこれまで肝臓³⁻⁶⁾、血清⁷⁻¹⁰⁾、リンパ節¹¹⁾より単離され、その生化学的諸性質が明らかにされている。なお同様のレクチンの単離とその性質は、その後他の研究者らによっても報告されている¹²⁻¹⁷⁾。

本研究は、肝臓より単離されたマンナン結合タンパク質(肝臓マンナン結合タンパク質)の細胞生物学的諸性質を解明することを目的として行ったものである。

筆者はまず、肝臓マンナン結合タンパク質の存在する細胞の同定を行った。ラット肝臓をコラーゲナーゼ灌流法により実質細胞と非実質細胞に分け、これらの細胞(群)におけるマンナン結合活性の分布を調べた。その結果、肝臓中には2種類のマンナン結合タンパク質が存在することを見いだした¹⁸⁾。すなわち、両細胞をそれぞれ可溶化して

細胞に含まれる全マンナン結合活性を測定すると、実質細胞は非実質細胞の約26倍高い値を示した。また、肝実質細胞から得られたマンナン結合タンパク質の量は肝臓全体から調製した場合とほぼ同様であった。従って、肝臓マンナン結合タンパク質は実質細胞に由来することが明らかとなった。なお、実質細胞表面にはマンナン結合活性が存在せず、また、実質細胞はマンナンを細胞内に取り込む活性をもたないことから、肝臓マンナン結合タンパク質は細胞内に存在すると考えられた。一方、非実質細胞にはマンナンを特異的に細胞内に取り込む機構が存在し、細胞表面にマンナン結合活性が検出された。この取り込み機構に関与するレセプター・マンナン結合タンパク質は、肝臓マンナン結合タンパク質といくつかの点で類似した性質を示したが、その結合活性は肝臓マンナン結合タンパク質に対する抗体で中和されず、両者は免疫化学的に異なる分子であった。このように肝臓中には、実質細胞に局在する肝臓マンナン結合タンパク質と、非実質細胞に局在するレセプター・マンナン結合タンパク質の2種類のマンナン結合タンパク質が存在することが明らかになった。

次に、肝実質細胞内に存在することが示された肝臓マンナン結合タンパク質の細胞内分布および存在様式を調べた。予備実験の結果、肝臓中には肝臓マンナン結合タンパク質に対する拮抗的阻害物質、すなわち内在性リガンドの存在が明らかにされていたので、まずマンナンをSepharose 4Bに結合させたアフィニティーカラムを用いて肝臓マンナン結合タンパク質と内在性リガンドを分離したのち、両者の細胞内分布を調べた¹⁹⁾。マンナン結合タンパク質の分布は小胞体のマーカー酵素であるグルコース 6-ホスファターゼ活性の分布とよい一致を示し、粗面ミクロソーム画分に全活性の約50%が回収された。ゴルジ

装置にもかなりのマンナン結合タンパク質が存在したが、リソソームおよび原形質膜のマンナン結合活性は非常に低かった。従って、マンナン結合タンパク質は粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内膜系に広く分布しているが、粗面小胞体に多量かつ高濃度に存在していることが明らかになった。また、マンナン結合タンパク質はこれらのオルガネラの内腔側に、膜にゆるく結合する形で存在していることも示された。内在性リガンドの細胞内分布はマンナン結合タンパク質の分布とほぼ一致し、粗面ミクロソームに約50%が存在するほか、滑面ミクロソーム、ゴルジ装置にも存在した。すなわち、これらの膜系においてマンナン結合タンパク質は内在性リガンドと結合した状態で存在していることが示唆された。一方、リソソームにはマンナン結合タンパク質は検出されなかったが、マンナン結合タンパク質に対する阻害物質が高度に濃縮されていた。

次に、肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドを単離してその性質を調べ、同定を行った。粗面ミクロソームあるいは初代培養肝細胞の抽出物を、マンナン結合タンパク質をSepharose 4Bに結合させたアフィニティークラムにかけることにより、内在性リガンドの30~40%を単離することができた。種々のアイソトープで標識した初代培養肝細胞から単離した内在性リガンドの性質を調べたところ、これらの内在性リガンドは $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ および $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ を主成分とする高マンノース型糖鎖を含む糖タンパク質であり、その約2/3は約45分の比較的速い半減期をもつことが明らかになった。粗面ミクロソームの内在性リガンドをSDS電気泳動にかけて分析したところ、主要な8本のバンドを示した。これらのバンドの分子量と、種々の特異的抗体との反応性から、8本のバンドのうち5本は、 α_1 -マクログロブリン、

α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -酸性糖タンパク質などの血清糖タンパク質の細胞内前駆体であり、1本はリソソーム酵素である β -グルクロニダーゼと同定された。

最近の研究によると、糖タンパク質の糖鎖の細胞内プロセッシング反応は、その糖タンパク質の細胞内輸送、特に粗面小胞体よりゴルジ装置、ゴルジ装置よりリソソーム顆粒への輸送に重要な役割をもつことが示されている²⁰⁻²⁴⁾。本研究結果は、これらのオルガネラには糖タンパク質の生合成中間体と高い親和性をもち結合する内在性のレクチンが含まれることを初めて明らかにしたものであり、肝臓マンナン結合タンパク質がこれらのオルガネラにおいて、糖タンパク質の細胞内輸送の際のキャリアーとして、あるいは、糖鎖のプロセッシング反応における調節タンパク質として重要な意味をもつことを強く示唆している。

以下、これらの研究について詳述する。

第 1 章 肝臓におけるマンナン結合タンパク質の局在性

肝臓は、物質代謝とその調節の大部分を担う中枢的器官であり、大きく分けて、その肝機能を司る肝実質細胞と肝非実質細胞(類洞内皮細胞、Kupffer細胞および脂肪摂取細胞を含む)から成る²⁵⁾。

肝臓は糖タンパク質の糖鎖部分を認識して細胞内に特異的に取り込む作用をもつことがよく知られている²⁾。たとえば、複合型糖鎖をもつ血清糖タンパク質の非還元末端のシアル酸残基をはずし、ガラクトース残基を露出させたのち血中にもどしてやるとすみやかに肝実質細胞内に取り込まれ代謝される²⁶⁾。また、リソソーム酵素のような高マンノース型糖鎖をもつ糖タンパク質を血中に投与すると、すみやかに肝臓内へ、この場合は非実質細胞に取り込まれる^{27, 28)}。これらはいずれも細胞表面に存在する動物レクチンの働きによるものである。さらに肝臓からは、マンノース 6-リン酸を認識するレクチン^{29, 30)}やL-フコースを認識するレクチン^{31, 32)}も単離されている。

水野らは、高マンノース型糖タンパク質と類似の糖鎖構造をもつ酵母マンナンをSephrose 4Bに結合させたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、ラット肝臓よりマンナン結合タンパク質を単離し、その生化学的諸性質を調べ次の諸点を明らかにしている⁵⁾。すなわちラット肝臓のマンナン結合タンパク質(肝臓マンナン結合タンパク質)は、分子量194,000で分子量32,000の単一サブユニット6個から成り、そのアミノ酸組成はグリシンに富む。肝臓マンナン結合タンパク質は糖タンパク質糖鎖の非還元末端のマンノースおよびN-アセチルグルコサミン残基を同一部位で認識する。肝臓マンナン結合タンパク質と

マンナンとの結合の解離定数は $1.6 \times 10^{-8} \text{M}$ であり、また α -マンノシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、カテプシンDなどの高マンノース型糖鎖をもつリソソーム酵素に高い結合親和性を示す($K_i = 10^{-6} \sim 10^{-9} \text{M}$)^{33, 34)}。肝臓マンナン結合タンパク質とリガンドとの結合にはカルシウムイオンを必要とする($K_m = 0.2 \text{mM}$)。この結合物は中性および弱アルカリ性条件下では安定であるが、酸性側では不安定であり、結合物をpH5.0で30分間室温に放置すると、ほぼ完全に解離する。

筆者はまず、この肝臓マンナン結合タンパク質が肝臓中のどの細胞に由来するかを明らかにすることを目的として、ラット肝臓をコラーゲナーゼ灌流法により肝実質細胞と肝非実質細胞に分け、これらの細胞(群)におけるマンナン結合タンパク質の分布を調べた。その結果、肝臓には2種類のマンナン結合タンパク質が存在することを見いだした。1つは肝実質細胞内に存在し、従来肝臓全体より単離されていた肝臓マンナン結合タンパク質であり、もう1つは肝非実質細胞に存在し、マンナンや、マンノースおよびN-アセチルグルコサミン残基を非還元末端にもつ糖タンパク質を細胞内に取り込む時のレセプターとして機能するマンナン結合タンパク質であった。

第1節 肝実質細胞と肝非実質細胞におけるマンナン結合タンパク質の分布

単離した肝実質細胞と肝非実質細胞をそれぞれ37°Cでマンナンとインキュベートし、細胞内への取り込み活性を測定すると、Table 1に示すように、非実質細胞はマンナンをよく取り込んだが、実質細胞はほとんど取り込まなかった。これに対し、両細胞をガラクトース残基

TABLE 1
 UPTAKE OF GLYCOPROTEINS BY HEPATOCYTES
 AND SINUSOIDAL CELLS

Glycoprotein	Units/10 ⁷ cells ^a	
	Hepatocytes	Sinusoidal cells
¹²⁵ I-labeled asialo-orosomuroid	266 ± 63 (3)	<3 (3)
¹²⁵ I-labeled mannan	<3 (3)	120 ± 41 (10)

Note. Hepatocytes (0.2-1 × 10⁶ cells) and sinusoidal cells (0.35-2.0 × 10⁶ cells) were incubated separately with 1.5 μg of labeled ligands at 37°C for 60 min. After the incubation, uptake of ligands was assayed as described under Materials and Methods. In these experiments, uptake is used to denote cell-associated material; no distinction is made between binding and endocytosis. Each value represents the mean of several experiments ± SD; the numbers of experiments are indicated in parentheses.

^a One unit is defined as a nanogram of ¹²⁵I-labeled ligand incorporated in the standard assay.

を非還元末端にもつアシアロオロソムコイドと37°Cでインキュベートすると、すでに知られているように、実質細胞はアシアロオロソムコイドを効果的に取り込んだが、非実質細胞はほとんど取り込まなかった。このように実質細胞と非実質細胞には、それぞれ糖特異性の異なるレセプター分子が存在すること³⁵⁾を確かめることができた。

そこで次に、実質細胞と非実質細胞をトリトン X-100で可溶化したのち、細胞に存在する全マンナン結合活性を測定した。Table 2 に示すように、この場合はマンナンの取り込み活性の結果とは逆に、実質細胞が非実質細胞の約26倍のマンナン結合活性を示した。肝臓中の実質細胞数は非実質細胞数の約2倍であること³⁶⁾から、肝臓のマンナン結合活性の98%以上は実質細胞に存在することが明らかになった。

次に両細胞を、エンドサイトーシスが起らない温度とされている4°Cでマンナンとインキュベートし、細胞表面に存在するマンナン結合活性を測定した。Table 2 に示すように、実質細胞の表面にはマンナ

TABLE 2
MANNAN-BINDING ACTIVITY IN HEPATOCYTES
AND SINUSOIDAL CELLS

Binding capacity	Units/10 ⁷ cells ^a	
	Hepatocytes	Sinusoidal cells
Total binding capacity ^b	211 ± 48 (5)	8.1 ± 0.9 (5)
Surface binding capacity ^c	<1.0 (2)	2.3 (2)
Isolated binding protein ^d	286 [136%] ^e	0.9 [11%] ^e

Note. Each value represents the mean of several experiments ± SD; the numbers of experiments are indicated in parentheses.

^a One unit is defined as a nanogram of ¹²⁵I-labeled mannan bound in the standard assay.

^b Hepatocytes (0.2-1 × 10⁶ cells) or sinusoidal cells (1-5 × 10⁶ cells) were used for the binding assay in the presence of Triton X-100 as described under Materials and Methods.

^c The binding activity associated with the surface of the cells was estimated by incubating the intact cells at 4°C for 60 min (see Text).

^d Hepatocytes (1.6 × 10⁸ cells) and sinusoidal cells (2.1 × 10⁸ cells) were extracted separately with the extraction buffer containing Triton X-100. From the extracts, binding protein was isolated by affinity chromatography on a Sepharose 4B-mannan column (see text and Table 3).

^e Figures in brackets indicate the overall recovery from the original cells.

ン結合活性は検出されなかった。この結果は、実質細胞はマンナンを取り込む活性をもたないことともよく一致しており、この細胞が含むマンナン結合タンパク質のほとんどすべては細胞内に存在することを示している。一方、非実質細胞の表面にはこの細胞の全マンナン結合活性の約1/4の活性が検出された。この活性はマンナンの特異的な取り込み機構に関与するレセプターを示すものと考えられる。

以上のことから、実質細胞と非実質細胞にはともにマンナン結合タンパク質が存在し、それらは機能的に異なるものであることが示された。

第2節 肝実質細胞内マンナン結合タンパク質の精製とその性質

肝実質細胞内に存在するマンナン結合タンパク質は肝臓中のマンナン結合活性の大部分を担うと考えられたので、次に、肝実質細胞を出発材料として、肝臓全体からの場合と同様の方法によりマンナン結合タンパク質を単離精製した。その結果をTable 3に示す。約35gの肝臓から単離した実質細胞より約83 μ gの精製マンナン結合タンパク質が得られた。その比活性は110U/ μ gタンパク質であり、肝臓全体から精製された肝臓マンナン結合タンパク質の比活性とほぼ同じ値を示した。水野らは約1gの肝臓から66%の回収率で3 μ gの肝臓マンナン結合タンパク質を単離しており⁵⁾、収量ならびに収率の点で肝臓全体から精製しても肝実質細胞から精製してもほぼ同様の結果を得たことになる。なお、1回目のアフィニティークロマトグラフィーにおいて回収率が100%を越えているが、これは後述するように、肝細胞中には肝臓マンナン結合タンパク質に対する阻害物質が存在し、この阻害物質が精製過程で除かれたためである。

TABLE 3
PURIFICATION OF BINDING PROTEIN FROM HEPATOCYTES

Fraction	Total protein (mg)	Total activity ($10^{-4} \times$ units) ^a	Specific activity (units/ μ g protein) ^a	Yield (%)	Purification
Triton X-100 extract	1184	1.38	0.012	100	1
Eluate, affinity column 1	6.61	2.10	3.18	152	265
Eluate, affinity column 2	0.235	1.40	59.6	101	4970
Eluate, affinity column 3	0.083	0.907	109.3	66	9110

Note. Approximately 1.6×10^9 cells isolated from five male Wistar rats were used for the preparation of the Triton X-100 extract. More than 90% of the binding activity detectable in the cells was recovered in the initial Triton X-100 extract.

^a One unit is defined as a nanogram of 125 I-labeled mannan bound in the standard assay with 300 ng of 125 I-labeled mannan used per tube, for comparison with the previous data on whole rat livers (Table I in Ref. (5)).

次に、肝実質細胞から得られたマンナン結合タンパク質と肝臓全体から得られた肝臓マンナン結合タンパク質の性質を比較検討した。両タンパク質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて分析した結果をFig.1に示す。2-メルカプトエタノール存在下(還元条件)では両者はともに32KDaの位置にシングルバンドを示した。2-メルカプトエタノール非存在下(非還元条件)では、32KDa、61KDa、89KDaの位置にバンドを示した。61KDa、89KDaのバンドは32KDaのサブユニットのそれぞれ2量体、3量体であると考えられる。このように還元条件、

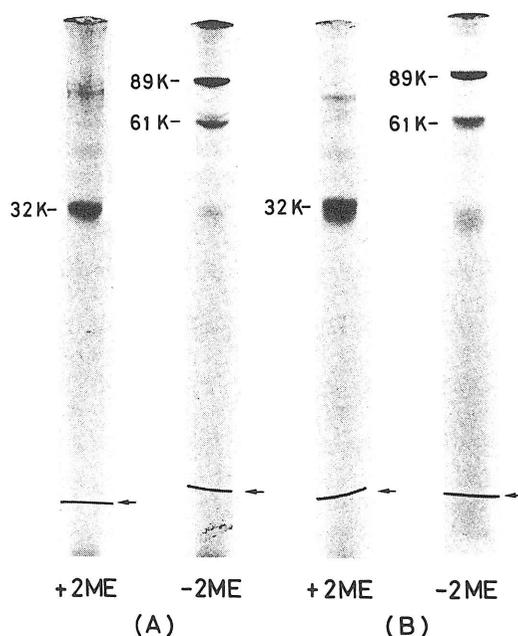


FIG. 1. Polyacrylamide gel electrophoresis of the binding proteins in sodium dodecyl sulfate. Each 10 μ g of binding protein isolated from hepatocytes (A) or from whole livers (B) was subjected to electrophoresis in 10% polyacrylamide gel according to the procedure of Weber and Osborn (22). Protein bands were stained with Coomassie brilliant blue G-250 in 10% trichloroacetic acid. +2ME or -2ME means that the protein had been reduced with β -mercaptoethanol prior to electrophoresis or had not, respectively. The arrows denote the migration of the marker dye.

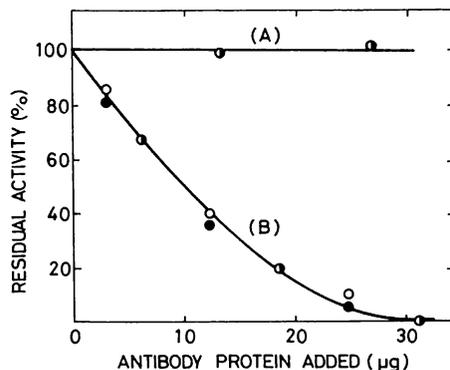


FIG. 2. Antibody titration of the binding proteins. In a total volume of 0.5 ml, mannan-binding proteins from whole livers (●) and hepatocytes (○), each corresponding to 0.35 μg of protein, were incubated with increasing amounts of the rabbit antiserum IgG produced against the mannan-binding protein isolated from whole livers in the binding assay mixture with the labeled mannan omitted. After 30 min at room temperature, the binding capacity was determined with the addition of ¹²⁵I-labeled mannan. (A) Preimmune serum IgG was incubated with binding proteins; (B) antiserum IgG produced against the mannan-binding protein from rat livers was used.

非還元条件いずれにおいても両者は全く同一の挙動を示した。さらに肝臓全体から得られた肝臓マンナン結合タンパク質に対する抗体とインキュベートすると、Fig. 2 に示すように、両者のマンナン結合活性は同じ量の抗体により同様に阻害された。

以上の結果から、従来肝臓全体から得られていたマンナン結合タンパク質のほとんどすべてが肝実質細胞に由来することが明らかとなった。

第 3 節 肝非実質細胞に存在するレセプター・マンナン結合タンパク質の性質

肝非実質細胞は肝実質細胞に比べ、細胞 1 個あたりでは約 1/26 のマ

マンナン結合活性しか示さなかった。しかし、非実質細胞の体積は実質細胞の体積の約1/27であること³⁶⁾から、細胞体積あたりでは両者はほぼ同等のマンナン結合活性をもつと考えられる。非実質細胞の示すマンナン結合活性は、マンナンを細胞内に取り込むレセプターを表わすと考えられたので、このレセプターの性質を検討し、肝臓マンナン結合タンパク質との関係を調べた。

1. 速度論的性質

まず、肝非実質細胞によるマンナンの取り込みの速度論的性質を調べた。その結果をFig.3に示す。非実質細胞を¹²⁵I-マンナンと37°Cでインキュベートするとマンナンの取り込みは時間とともに増加したが、約60分後にはプラトーに達した。4°Cでインキュベーションすると、細胞に結合したマンナンの量は30分から90分の間あまり変化せず、37°Cでのプラトーの値の2%程度であった。なお、マンナンの取り込みにはカルシウムイオンが必要であり、このためインキュベーション

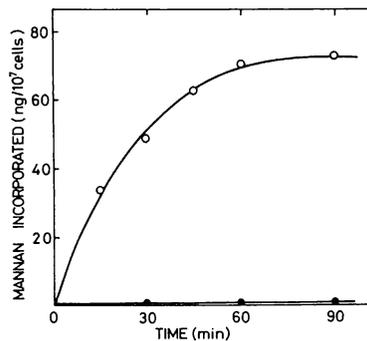


FIG. 3. Time course of uptake of ¹²⁵I-labeled mannan into sinusoidal cells. Sinusoidal cells (1.5×10^6 cells/tube) were incubated with $1.5 \mu\text{g}$ of ¹²⁵I-labeled mannan in the standard assay mixture at 37°C (○) or at 4°C (●). After incubation, the ligands associated with cells were assayed as described under Materials and Methods. Each value represents the mean of duplicate determinations.

ンメディウムに20mM EDTAを加えると、マンナン取り込み活性はほとんど消失した。

4℃で細胞に結合したマンナンは、細胞を20mM EDTAで4℃、5分間処理することによりその70%以上が遊離したことから、細胞表面に結合したマンナンを表わすと考えられた。一方、37℃で結合したマンナンは、細胞を同様のEDTA処理してもほとんど変化せず、細胞内に取り込まれたマンナンを表わすものと考えられた。

次に取り込みのリガンド濃度依存性を調べた。Fig.4に示すように、マンナンの取り込みは加えたりガンド量の増加に伴い増加したが、やがて飽和に達した。この結果を、Fig.5に示すようにLineweaver-Burk plotにより解析すると、マンナンの最大取り込みの半分を与えるリガンド濃度(K_{uptake} 値)は $7.4 \times 10^{-8} \text{M}$ ($3 \mu\text{g}/\text{ml}$)であり、飽和状態のとき 10^7 個細胞あたり60分間に200~300ngのマンナンが取り込まれた。この最大取り込み量は、 10^7 個の非実質細胞表面に検出されるマンナ

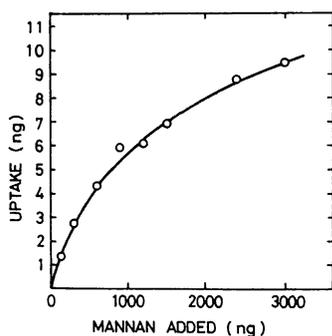


FIG. 4. Concentration dependence of uptake of ^{125}I -labeled mannan by sinusoidal cells. Sinusoidal cells (1.3×10^6 cells/tube) were incubated in the standard assay mixture (0.5 ml) with increasing amounts of ^{125}I -labeled mannan. After 60 min at 37°C , the cell-associated ligands were assayed as described under Materials and Methods. Each value represents the mean of duplicate determinations.

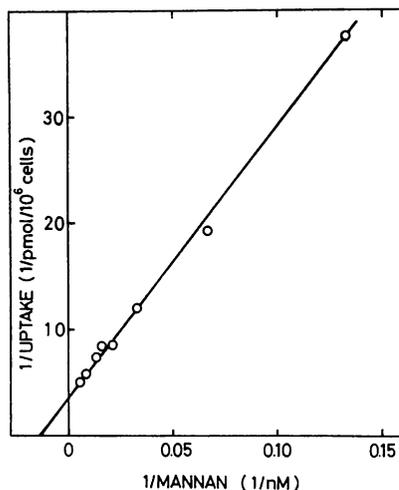


FIG. 5. Double reciprocal plot of the uptake curve.

ン結合活性(2.3U)の約100倍に相当した。この結果はマンナン・レセプターはリサイクリングしていることを示している。すなわち、マンナンを結合したレセプターは被覆陥凹(coated pit)に集合したのち、被覆小胞(coated vesicle)に組み込まれて細胞内に入るが、その後、マンナンがリソソームに運ばれるのに対し、レセプターは原形質膜にもどって再利用されていると考えられる。また、マンナンの最大取り込み速度は 10^7 個細胞あたり1分間に120~240 fmol(細胞1個あたり1分間に7,000~14,000分子)であった。

2. 取り込みの特異性

このレセプターの糖特異性を、 ^{125}I -マンナンの取り込みに対する単糖による阻害実験により調べた。その結果をTable 4に示す。阻害はマンノースで最も強く、それに続いて、L-フコース、N-アセチルマンノサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノサミン、グルコースにより阻害されたが、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、マンノース 6-リン酸、およびD-フコースによっては阻害されなかった。従って、このレセプターとリガンドとの結合には4位の水酸基が

TABLE 4
SPECIFICITY OF UPTAKE AS MEASURED BY AN INHIBITION ASSAY

Compound	Inhibition of uptake (%)	Compound	Inhibition of uptake (%)
Mannose	82	Glucosamine	0
L-Fucose	74	N-Acetylgalactosamine	0
N-Acetylmannosamine	68	Galactosamine	0
N-Acetylglucosamine	44	Mannose 6-phosphate	0
Mannosamine	28	Fucose	0
Glucose	25	Lyxose	32
Galactose	0	Arabinose	37

Note. The assay was carried out as described under Materials and Methods in the presence of 0.8×10^6 cells and 10 mM of the inhibitors listed in the table. Values are the means of two experiments. Control uptake was measured in the absence of added inhibitors. Sugars are of the D-configuration unless otherwise stated.

equatorialであることが必須であり、2位の水酸基がaxialであると結合がより強くなると考えられる。リキソースとアラビノースは、その2位、3位および4位の水酸基がそれぞれマンノース、L-フコースと同じ立体配置をとっている5炭糖であるが、これらの単糖によってもマンナンの取り込みが同様に阻害されることから、上記の考えは支持されている。また、マンノースの6位にリン酸基が結合するとレセプターにより認識されにくくなることも明らかになった。N-アセチルマンノサミンやマンノサミンは通常の動物由来の糖タンパク質の構成成分としては存在しないため、このレセプター・マンナン結合タンパク質は、マンノース、L-フコースおよびN-アセチルグルコサミンを含む糖タンパク質を認識対象にしていると考えられる。また、レセプター・マンナン結合タンパク質はL-フコースに対し高い親和性をもつが、これは肝臓マンナン結合タンパク質の場合⁵⁾に比べ特徴的であった。

TABLE 5

COMPARISON OF SPECIFICITY FOR GLYCOPROTEINS BETWEEN BINDING TO THE MANNAN-BINDING PROTEIN AND UPTAKE BY SINUSOIDAL CELLS

Ligand	Activity (relative to ¹²⁵ I-labeled mannan)	
	Binding by mannan-binding protein	Uptake by sinusoidal cells
¹²⁵ I-labeled mannan	1.00 ^a	1.00 ^b
¹²⁵ I-labeled asialoorosomuroid	0.04	0.02
¹²⁵ I-labeled agalactoorosomuroid	0.04	0.49
¹²⁵ I-labeled ahexasaminoorosomuroid	0.01	0.46
¹²⁵ I-labeled Man ₃₃ -bovine serum albumin	0.69	2.92
¹²⁵ I-labeled GlcNAc ₄₃ -bovine serum albumin	1.18	6.56

Note. Sinusoidal cells ($0.5-1.5 \times 10^6$ cells) and the mannan-binding protein (0.3-1.3 μ g) were incubated with 1.5 μ g of ¹²⁵I-labeled ligands in the respective standard assay mixtures. After 60 min at 37°C (for sinusoidal cells) or 15 min at room temperature (for the binding protein), uptake or binding activities were determined as described under Materials and Methods. Each value represents the mean of duplicate determinations.

^a 275 ng of ¹²⁵I-labeled mannan was bound per microgram of protein under the conditions.

^b 93 ng of ¹²⁵I-labeled mannan was incorporated per 10^7 cells under the conditions.

次に種々の糖タンパク質の非実質細胞内への取り込みを調べた。その結果をマンナンの取り込みと比較してTable 5 に示す。単糖による阻害実験から予想されたように、非実質細胞は非還元末端にマンノースまたはN-アセチルグルコサミンをもつ糖タンパク質をよく取り込んだが、ガラクトースを非還元末端にもつ糖タンパク質は取り込まなかった。

Table 6 は、非実質細胞に取り込まれた糖タンパク質の間で競合実験を行った結果を示したものである。マンノースを非還元末端にもつ糖タンパク質とN-アセチルグルコサミンを非還元末端にもつ糖タンパク質は、相互に取り込みを阻害しており、このレセプター・マンナン結合タンパク質は、マンノースとN-アセチルグルコサミンを同一部位で認識していることを示している。

TABLE 6
COMPETITIVE UPTAKE BETWEEN VARIOUS GLYCOPROTEINS

Ligand	Inhibitor	Uptake (% of control)
¹²⁵ I-labeled mannan	None	100
	Agalactoorosomuroid	17
¹²⁵ I-labeled agalactoorosomuroid	None	100
	Mannan	8
¹²⁵ I-labeled ahexasaminoorosomuroid	None	100
	Mannan	13
	Agalactoorosomuroid	12
¹²⁵ I-labeled Man ₃₃ -bovine serum albumin	None	100
	GlcNAc ₄₃ -bovine serum albumin	37
	Mannan	41
	Agalactoorosomuroid	42
¹²⁵ I-labeled GlcNAc ₄₃ -bovine serum albumin	None	100
	Man ₃₃ -bovine serum albumin	0
	Mannan	32
	Agalactoorosomuroid	16

Note. To the standard incubation mixture containing 1×10^6 cells, were added the ¹²⁵I-labeled ligands (1.5 μ g) and unlabeled inhibitor glycoproteins (50 μ g) listed below, and uptake activity was measured as described under Materials and Methods. Each value represents the mean of duplicate determinations.

3. 免疫化学的性質

非実質細胞に存在するレセプター・マンナン結合タンパク質の単離を、実質細胞からマンナン結合タンパク質を単離する場合と同様の手法により試みた。その結果をTable 2に示す。マンナン-Sepharose 4Bを用いたアフィニティーカラムにより、実質細胞からは136%の収率でマンナン結合タンパク質が得られたが、非実質細胞からは11%のマンナン結合タンパク質しか単離されなかった。非実質細胞から得られたマンナン結合タンパク質はその活性が低いため、これ以上の精製は不可能であった。このわずかに得られたマンナン結合タンパク質(おそらくレセプター・マンナン結合タンパク質)のマンナン結合活性は、肝臓マンナン結合タンパク質に対する抗体によりほとんど障害されな

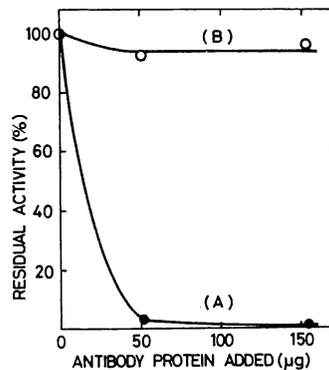


FIG. 6. Antibody titration of the binding protein and endocytosis. (A) Mannan-binding protein isolated from whole livers (40 units) was incubated with increasing amounts of the Fab fragment of antiserum IgG produced against the mannan-binding protein isolated from whole livers. After 30 min, the binding activity remaining was determined as described in Fig. 2. (B) Approximately 1×10^6 sinusoidal cells, containing 0.8 units of mannan binding activity, were incubated with the Fab fragment of antiserum IgG in the standard assay mixture. After 30 min at 37°C, ^{125}I -labeled mannan was added to the mixture and uptake activity was determined as described under Materials and Methods. The Fab fragment obtained from preimmune serum did not show any effect on either binding or endocytosis.

かった。さらに、非実質細胞によるマンナンの取り込みは、肝臓マンナン結合タンパク質に対する抗体あるいはそのFabフラグメントにより阻害されなかった。これらの結果をFig.6に示す。すなわち、肝臓マンナン結合タンパク質のマンナン結合活性(40U)は抗体のFabフラグメント50 μ gにより完全に阻害された。ところが一方、0.8Uのマンナン結合活性を示す非実質細胞によるマンナンの取り込みは、150 μ gの抗体のFabフラグメントを加えてもほとんど阻害されなかった。

以上の結果より、非実質細胞に存在するレセプター・マンナン結合タンパク質は、肝臓マンナン結合タンパク質とは免疫化学的に区別されることが明らかになった。

第4節 考察

肝臓マンナン結合タンパク質は、当初その糖特異性から、血流中から高マンノース型糖タンパク質を肝非実質細胞内に取り込むレセプター分子ではないかと推論されていた⁵⁾。しかし、この章で示したように、細胞を可溶化して全マンナン結合活性を測定すると、実質細胞が非実質細胞の約26倍の活性を示したこと(Table 2)、肝臓中には実質細胞が非実質細胞の約2倍存在すること³⁶⁾、肝臓全体からの場合と同様の手法により精製を行ったところ、1回のアフィニティークロマトグラフィーで実質細胞からは136%の収率でマンナン結合タンパク質が得られたのに対し、非実質細胞からは11%のマンナン結合タンパク質しか得られなかったこと(Table 2)から、肝臓全体より精製した肝臓マンナン結合タンパク質は、ほとんどすべて実質細胞に由来することが明らかになった。また、実質細胞に存在するマンナン結合タン

パク質はほとんどすべてが細胞内に存在していることが示された。

一方、非実質細胞にもマンナン結合タンパク質が存在し、このものはマンノースおよびN-アセチルグルコサミンを非還元末端にもつ糖タンパク質を特異的に細胞内に取り込むレセプターとして機能していることが示された。肝非実質細胞に属する細胞の中で、Kupffer細胞はマクロファージの一種であるが³⁶⁾、他の組織中のマクロファージにも糖タンパク質を細胞内に取り込む機構が存在することが報告されている^{37,38)}。肺胞マクロファージに存在するレセプターの糖特異性は、L-フコース=マンノース>N-アセチルグルコサミン=グルコース》ガラクトースの順と報告されており³⁸⁾、これは肝非実質細胞に存在するレセプターの糖特異性とよく一致している。これらの知見は非実質細胞群に含まれるレセプター・マンナン結合タンパク質の細胞局在性を考えるうえで興味深いものである。

非実質細胞に存在するレセプター・マンナン結合タンパク質は、いくつかの点で実質細胞に存在する肝臓マンナン結合タンパク質と類似の性質を示した。すなわち、マンナンの最大取り込みの半分を与えるリガンド濃度(K uptake値)は $7.4 \times 10^{-8} \text{M}$ であり(Fig.5)、肝臓マンナン結合タンパク質とマンナンとの結合の解離定数(Kd) $1.6 \times 10^{-8} \text{M}$ に近いこと、リガンドとの結合にカルシウムイオンを必要とすること、糖特異性において4位の水酸基がequatorial、2位の水酸基がaxialに位置していると親和性が高いこと(Table 4)などである。

しかし、レセプター・マンナン結合タンパク質と肝臓マンナン結合タンパク質には明らかな差異が見られた。第一に、肝臓マンナン結合タンパク質に対する抗体あるいはそのFabフラグメントにより、非実質細胞によるマンナンの取り込みや、非実質細胞から部分精製された

レセプター・マンナン結合タンパク質のマンナン結合活性はほとんど阻害されなかった(Fig.6)。第二に、レセプター・マンナン結合タンパク質は、肝臓マンナン結合タンパク質に比べ、L-フコースに高い親和性を示した (Table 4)。第三に、種々の糖タンパク質に対する特異性に差が見られた。すなわち、肝臓マンナン結合タンパク質は、マンナンや、マンノースあるいはN-アセチルグルコサミンを牛血清アルブミンに結合させたneoglycoprotein に高い親和性を示すが、アガラクトオロソムコイドやアヘキソサミノオロソムコイドのような複合型糖鎖をもつ糖タンパク質には、その非還元末端がN-アセチルグルコサミンやマンノースであってもほとんど結合しなかった。これに対し、レセプター・マンナン結合タンパク質は、アガラクトオロソムコイドやアヘキソサミノオロソムコイドをマンナンの場合の約半分程度取り込み、neoglycoprotein の場合はマンナンの場合の数倍取り込んだ(Table 5)。第四に、非実質細胞を出発材料とし、実質細胞からの場合と同様の手法によりマンナン結合タンパク質の単離を試みたが、わずかの結合タンパク質しか得られなかった(Table 2)。

以上の本章に示した結果から、肝臓内には2種類のマンナン結合タンパク質が存在すると結論することができた。すなわち、1つは肝実質細胞内に局在する肝臓マンナン結合タンパク質であり、他は、肝非実質細胞に局在し、マンノースあるいはN-アセチルグルコサミンを非還元末端にもつ糖タンパク質を細胞内に取り込むレセプター・マンナン結合タンパク質である。

実験の部

1. 試薬

マンナンはパン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)をオリエンタル酵母株式会社より購入し、LeeとBallouの方法³⁹⁾に従って調製し、さらに、NakajimaとBallouの方法⁴⁰⁾により精製した。Neoglycoproteinは米国Johns Hopkins大学のY.C.Lee博士より恵与された。Man-BSAは1分子当たり33個のマンノースを、GlcNAc-BSAは1分子当たり43個のN-アセチルグルコサミンを牛血清アルブミンに共有結合させたものである。オロソムコイドは米国赤十字社のM.Wickerhauser博士より恵与された。アシアロオロソムコイドは、オロソムコイドを0.05M 硫酸と80℃で1時間反応させる酸加水分解法により調製した。アガラクトオロソムコイドは、アシアロオロソムコイドを *Aspergillus oryzae* RT 102より単離した β -galactosidaseで酵素消化する方法⁴¹⁾により調製した。アヘキソサミノオロソムコイドは米国国立衛生研究所のG. Ashwell博士より恵与された。種々の糖タンパク質は、carrier free Na¹²⁵I (Amersham社より購入)を用いてGreenwoodらの方法⁴²⁾に従いヨウ素標識した。ラット肝臓マンナン結合タンパク質は水野らの方法⁵⁾により精製し、ラット肝臓マンナン結合タンパク質に対する抗体はウサギを用いて川崎らの方法¹¹⁾により調製した。抗体のFabフラグメントはPutnamらの方法⁴³⁾により調製した。マンナン-Sepharose 4Bは川崎らの方法³⁾に従って調製した。

2. 肝実質細胞と肝非実質細胞の単離

肝実質細胞と肝非実質細胞の単離は、BerryとFriendの方法⁴⁴⁾を一部改良したSteerとClarenburgの方法³⁵⁾に準じて行った。150~200g

のWistar系雄ラットの肝臓をコラーゲナーゼで灌流し、Metrizamideを用いたMunthe-KaasとSeglenの密度勾配遠心法^{4,5)}により両細胞を分離した。単離した細胞は20mM HEPESでpH7.4に調整したEagle's minimum essential mediumに懸濁して実験に用いた。この方法により、一匹のラットの肝臓から $3\sim 5\times 10^8$ 個の実質細胞と $2\sim 5\times 10^7$ 個の非実質細胞が得られた。得られた実質細胞の85~90%と非実質細胞の95%以上はトリパンブルーで染まらないことから生細胞であることが確かめられ、相互の混入は1%以下であった。

3. 活性測定法

(A)細胞による取り込み活性の測定

単離した各々の細胞($1\sim 20\times 10^5$ 個)を20mM HEPESでpH7.4に調整したEagle's minimum essential medium 0.5ml中で、 $1.5\mu\text{g}$ の¹²⁵I-マンナンあるいは種々の糖タンパク質と37℃で60分間インキュベートした。1.5mlの氷冷したmediumを加えて取り込みを停止させ、 $500\times g$ で5分間遠心分離することにより細胞を沈澱として集めた。細胞を2mlのmediumで2回洗浄したのち、細胞に取り込まれた放射活性を測定した。細胞表面に結合したリガンド量を求める場合には、インキュベーションを4℃で行った。

(B)マンナン結合活性の測定

川寄らの方法³⁾に従って行った。0.1%(v/v)トリトンX-100、0.6%(w/v)牛血清アルブミン、1M NaClおよび50mM CaCl₂を含む50mM イミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.8) 0.5ml中に、 $1.5\mu\text{g}$ の¹²⁵I-マンナンあるいは種々の糖タンパク質と、精製した肝臓マンナン結合タンパク質($0.1\sim 2.0\mu\text{g}$)あるいはそれと同程度のマンナン結合活性を有する単離細胞を加え、室温で15分間インキュベートした。反応後0.5mlの飽

和硫酸を加えて反応生成物を沈澱させ、0℃で10分間放置後、沈澱物をグラスフィルター濾紙上に吸引濾過した。この沈澱物を50%飽和硫酸で数回洗浄したのち、沈澱の放射活性を測定した。

放射活性の測定は(A)、(B)ともBeckman社のAuto-Gamma spectrophotometer Gamma-5500により測定した。取り込みあるいは結合活性は、上記のインキュベーションの際に大過剰(50 μ g)の未標識のリガンドを加えた場合をブランクとして測定し、加えない場合との差を特異的な取り込みあるいは結合として求めた。1 ngのリガンドの特異的な取り込みあるいは結合が見られた場合を1 Unitとした。

4. 肝実質細胞および肝非実質細胞中のマンナン結合タンパク質の精製

川寄らの方法⁵⁾に従い、肝臓全体から精製する場合と同様の操作で行った。5匹のラットの肝臓から単離した実質細胞(1.6×10^9 個)に氷冷したアセトン250mlを加えてワーリングブレンダー中で破碎しアセトンパウダーを調製した。このアセトンパウダーを4℃で一晩放置したのち、0.4M KCl、0.5mM EDTAおよび2%トリトン X-100を含む20mM イミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.8)を用いて4℃で30分間攪拌しながら抽出した。懸濁液を10,000 $\times g$ で30分間遠心分離し抽出液を得た。沈澱はさらに2回同様の操作で抽出した。遠心上清を混合し、最終濃度が20mMとなるようにCaCl₂を加えたのち、40mlのマンナン-Sepharose 4B カラムにかけた。カラムを1.25M NaCl、50mM CaCl₂および0.5%トリトン X-100を含む20mM イミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.8)で十分に洗浄したのち、結合したマンナン結合タンパク質を1.25M NaCl、2mM EDTAおよび0.5%トリトンX-100を含む20mM イミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.8)で溶出した。フラクションは10mlずつ集めた。マンナン結合

活性を含むフラクションを集め、最終濃度が20mMとなるようにCaCl₂を加えたのち、樹脂量を減らしたマンナン-Sepharose 4B カラムにかけてさらに2回アフィニティークロマトグラフィーを繰り返し、マンナン結合タンパク質を均一にまで精製した。10匹のラットの肝臓から単離した非実質細胞(2.1×10^8 個)からのマンナン結合タンパク質の精製も同様に行った。

5. 電気泳動

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動はWeberとOsbornの方法⁴⁶⁾に従って行い、タンパク質染色はクーマシーブリリアントブルー G-250を用いた。

6. タンパク質の定量

牛血清アルブミンを標準としてLowryらの方法⁴⁷⁾により行った。試料中のトリトンX-100の影響を除くために若干の改良を加えた⁴⁸⁾。

第 2 章 肝臓マンナン結合タンパク質およびその内在性リガンドの細胞内分布

前章の研究で明らかにされたように、肝臓全体より単離されるマンナン結合タンパク質(肝臓マンナン結合タンパク質)はほとんどすべて肝実質細胞に由来する。ところが、この実質細胞はマンナンを取り込む活性をもたず、また、実質細胞表面にはマンナン結合活性が検出されない。従って、肝臓マンナン結合タンパク質は実質細胞内部に存在すると考えられた。

そこで次に、すでに確立されている方法に従い種々の細胞内オルガネラを単離し、肝臓マンナン結合タンパク質の細胞内分布を調べた。

また、肝臓全体あるいは単離した実質細胞からマンナン-Sepharose 4Bを用いたアフィニティークラムにより、肝臓マンナン結合タンパク質を精製する際に、1 回目のアフィニティークロマトグラフィーにおいて回収率が100%を越えた。これは、肝臓中にマンナン結合活性を阻害する物質が存在し、この物質が精製段階で除かれたためと考えられた。そこで一定の精製肝臓マンナン結合タンパク質にカラムの素通り画分を加えてみたところ、著しい阻害が観察された。次に、この阻害物質の阻害様式を調べたところ拮抗的阻害であることが明らかになり、この阻害物質は肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドであると考えられた。

そこで、肝臓マンナン結合タンパク質と内在性リガンドを分離して両者の肝細胞内分布を調べた。また、肝臓マンナン結合タンパク質の存在様式についても検討した。

第1節 肝臓中のマンナン結合タンパク質に対する内在性阻害物質の阻害様式

肝臓全体あるいは実質細胞からマンナン結合タンパク質を、マンナン-Sepharose 4Bを用いたアフィニティークラムにより精製する際に、1回目のアフィニティークロマトグラフィーにおいて回収率が100%を越えた(第1章 Table 3および文献5)。この結果は、肝臓中には肝臓マンナン結合タンパク質に対する阻害物質が存在することを示唆している。そこで、精製肝臓マンナン結合タンパク質を含む標準活性測定系に、1回目のアフィニティークロマトグラフィーの素通り画分を加えて測定すると、予想通りマンナン結合活性が阻害された。この阻害様式をFig.7に示すように、Lineweaver-Burk plotにより解析すると、拮抗的阻害であった。従って、この阻害物質は肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドであると考えられた。なお、図より求めた K_i 値は 3.5mg タンパク質/ml となり、かなり強い阻害活性を示した。

第2節 肝臓マンナン結合タンパク質の細胞内分布

実験の部に示した方法により、肝臓マンナン結合タンパク質と内在性リガンドを分離したのち、両者の細胞内分布を調べた。その結果をTable 7に示す。なおここで、種々の細胞内オルガネラから内在性リガンドを分離したのちマンナン結合活性を測定した場合をMethod B、細胞内オルガネラをトリトンX-100で可溶化し、そのまま ^{125}I -マンナンとインキュベートしてマンナン結合活性を測定した場合をMethod A

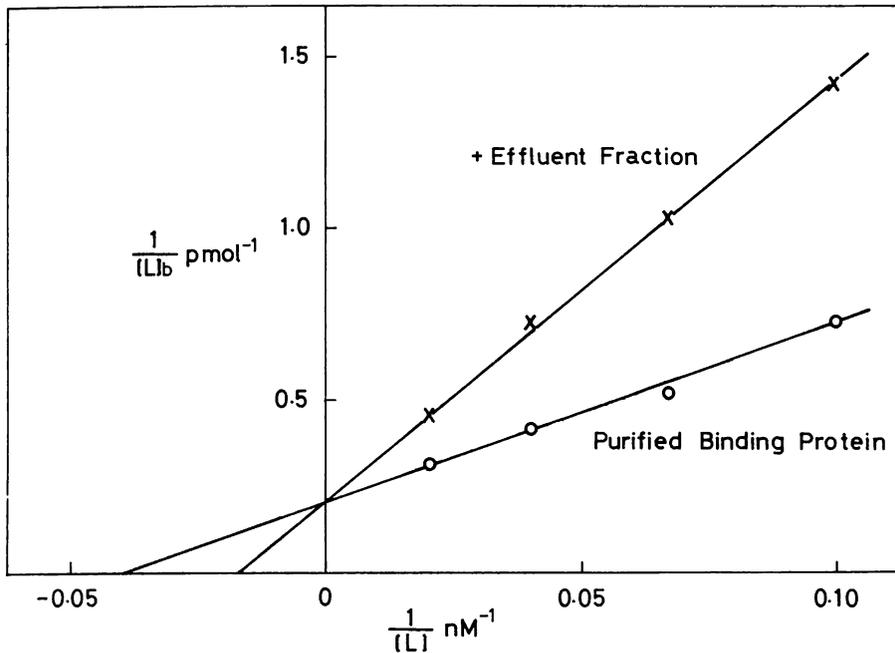


Fig.7. Examination of mode of inhibition by endogenous inhibitors present in the liver homogenate by Lineweaver-Burk plot analysis. The purified mannan-binding protein ($0.4\mu g$) was incubated with various amount ($50-300ng$) of ^{125}I -Man₃₃-bovine serum albumin in the absence (○) or presence (×) of the inhibitor fraction. The inhibitor fraction used in this assay was the pass-through fraction of first affinity chromatography on Sepharose 4B-mannan as described in Table 3. $1/[L]$ is the reciprocal of the concentration of ligand added and $1/[L]b$ is the reciprocal of the concentration of ligand bound.

とした。内在性リガンド(内在性阻害物質)が存在する場合、Method AではMethod Bに比べマンナン結合活性が低く測定されることになる。

TABLE 7
DISTRIBUTION OF BINDING ACTIVITY IN RAT LIVER ORGANELLES

Experiment number	Fraction	Total protein (mg/g liver)	Total activity (U ^a /g liver)		Specific activity ^b (U ^a /mg protein)		Latency ^c (%)	
			Method A	Method B	Method A	Method B		
I	Homogenate	92.6	268	606	2.89	6.54	55.8	
	Nuclei	19.8	72.8	144	3.68	7.27	49.4	
	Heavy mitochondria	12.4	1.8	1.4	0.15	0.11	—	
	Light mitochondria	14.5	8.7	24.9	0.60	1.72	65.1	
	Microsomes	27.7	139	554	5.02	20.0	74.9	
	Soluble fraction	17.3	11.9	10.6	0.69	0.61	—	
II	Whole microsomes	16.4	125	499	7.62	30.4	74.9	
	Rough microsomes	7.55	37.4	259	4.95	34.3	85.6	
	Smooth microsomes	4.80	52.8	82.1	11.0	17.1	35.7	
III	Common Golgi	0.802	8.09	8.42	10.1	10.5	34.6 ^d	
IV	Golgi apparatus	GF1	0.0572	1.50	nd	26.2	—	—
		GF2	0.185	4.77	nd	25.8	—	—
		GF3	2.79	45.7	nd	16.4	—	—
V	Lysosomes	0.297	<0.02	0.12	<0.07	0.4	—	
VI	Plasma membranes	0.0978	<0.01	nd	<0.1	—	—	

Note. Assays were carried out by two methods as described under Materials and Methods. nd, not determined.

^a One unit is defined as 1 ng of ¹²⁵I-labeled mannan bound in the standard assay.

^b Specific activity is calculated as the quotient of total activity divided by total protein.

^c Latency is calculated as 100 (B - A)/B. A and B refer to the total activity determined by Methods A and B, respectively.

^d This value is calculated by taking the activity of the Triton X-100 extract (5.51 U/g liver) as the value of A (see Materials and Methods).

Table 8 はその単離した細胞内オルガネラの純度を、種々のマーカー酵素活性を測定して調べた結果を示している。

ラット肝臓を常法⁴⁹⁾に従い5分画すると、Table 7のExp. Iに示すように、ホモジネートの全マンナン結合活性の約75%がミクロソーム画分に回収された。粗ミトコンドリア、粗リソソームおよび可溶性画分のマンナン結合活性はわずかであった。この活性の分布は、小胞体のマーカー酵素であるグルコース 6-ホスファターゼ活性の分布とよく一致し、原形質膜のマーカー酵素である5'-ヌクレオチダーゼやリ

TABLE 8
 ENZYME MARKER PROFILES IN RAT LIVER ORGANELLES

Experiment number	Fraction	5'-Nucleotidase	Glucose-6-phosphatase	Acid phosphatase	Galactosyl-transferase	Malate dehydrogenase	
I	Homogenate	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
	Nuclei	0.44	0.80	0.64	nd	nd	
	Heavy mitochondria	0.19	0.06	1.21	nd	nd	
	Light mitochondria	0.28	0.27	2.06	nd	nd	
	Microsomes	2.30	2.56	0.98	nd	nd	
	Soluble fraction	0.74	0.03	0.41	nd	nd	
IV	Golgi apparatus	GF1	2.44	0.12	1.60	53.8	nd
		GF2	13.8	0.35	1.90	10.8	nd
		GF3	7.16	0.95	0.79	0.28	nd
V	Lysosomes	1.02	0.25	29.3	nd	0.35	
VI	Plasma membranes	15.5	1.72	0.83	nd	nd	

Note. The values listed above represent the relative specific activity: the ratio of specific activity in any given fraction to that of the homogenate arbitrarily set at unity. nd, not determined.

ソソームのマーカー酵素である酸性ホスファターゼとは異なっていた (Table 8)。

次に、マンナン結合タンパク質がミクロソーム固有のタンパク質であるかどうかを調べるため、塩およびEDTAによる洗浄実験を行った。ミクロソームを0.15M KCl、あるいは、10mM EDTAを含む0.15M KCl溶液中でホモジナイズしたのち、105,000×g、60分間遠心分離を行い、ミクロソームを沈澱として回収した。Table 9 に示すように、この操作により22~26%のタンパク質が上清に回収されたが、83~87%のマンナン結合タンパク質は沈澱に回収された。これらの結果は、マンナン結合タンパク質は非特異的な電気的結合⁵⁰⁾により、あるいは、カルシウムイオンの関与のもとに、リガンドとの特異的な結合を介してミクロソームの表面に結合している可溶性画分のタンパク質ではないことを示している。また、リボソームの構成成分はミクロソームのEDTA 処理によりミクロソームから解離することが知られており⁵¹⁾、

TABLE 9
Effect of Salt Wash on Mannan-Binding Protein of Microsomes

		Activity (units/g liver)	Protein (mg/g liver)	Specific activity (units/mg protein)
Control		110	15.4	7.14
0.15M KCl	Ppt.	89.2 (87%)	10.9 (78%)	8.18
	Sup.	13.5 (13%)	3.1 (22%)	4.35
0.15M KCl +10mM EDTA	Ppt.	84.8 (83%)	10.3 (74%)	8.23
	Sup.	17.1 (17%)	3.6 (26%)	4.75

Note. Freshly prepared microsomes were suspended by homogenization in 0.15M KCl or 0.15M KCl containing 10mM EDTA and then washed by centrifugation at 105,000×g for 60min. Protein and mannan-binding protein in precipitates (Ppt.) or supernatant (Sup.) were determined as described under Materials and Methods.

マンナン結合タンパク質はリボソームの構成成分でもないと考えられる。従って以上の結果から、マンナン結合タンパク質はミクロソーム固有のタンパク質であり、主として小胞体に局在すると結論された。

次に、ミクロソームをCsCl法⁵²⁾を用いて粗面ミクロソームと滑面ミクロソームにわけ、マンナン結合活性の分布を調べた。Table 7 の Exp. II に示すように、マンナン結合タンパク質は粗面ミクロソームに約76%が回収され、タンパク質あたりの比活性も、粗面ミクロソームが滑面ミクロソームの約2倍高い値を示した。粗面ミクロソームはほとんどすべて粗面小胞体から成ることが知られており、従ってマンナン結合タンパク質は粗面小胞体に高濃度に含まれると結論された。一方、滑面ミクロソームにもホモジネートの2~3倍高い活性がみられた。滑面ミクロソームはいくつかのオルガネラから成ることが知られているため、次に滑面ミクロソームに含まれる細胞内オルガネラを別

々に単離し、これらのマンナン結合タンパク質含量を調べた。

Table 7のExp. III, IVに示すように、ゴルジ装置のマンナン結合タンパク質の比活性はホモジネートの場合に比べ3~10倍高かった。なお、粗ゴルジ装置(Common Golgi)のマンナン結合タンパク質をMethod Bで測定すると、トリトン X-100抽出時の回収率が68%と例外的に低く正確な定量が困難であった。そこで、粗ゴルジ装置をさらにGF1、GF2、GF3画分に分けてマンナン結合活性を測定する場合には、内在性リガンドと分離する前の値(Method Aによる値)を用いた。従って後述するように、これらの画分に含まれる内在性リガンドの存在を考慮すればゴルジ装置のマンナン結合タンパク質の比活性はさらに高くなると考えられる。GF1は高度に精製されたゴルジトランス域を含む画分である。GF3はゴルジ装置の成分、滑面小胞体および原形質膜の混合物であり、GF2はGF1とGF3の混合物である。マンナン結合タンパク質の比活性はGF1、GF2ともホモジネートの場合の約9倍高く、GF3でもホモジネートの場合の5倍以上高かった。なおここで、トランスゴルジ域のマーカー酵素であるガラクトシルトランスフェラーゼの比活性は、GF1で最も高く、GF2では低く、GF3では非常に低かった(Table 8)。一方、小胞体のマーカー酵素であるグルコース 6-ホスファターゼの比活性はGF1、GF2、GF3の順に高くなっていた(Table 8)。従って、マンナン結合タンパク質はゴルジ装置において、トランス面からシス面にわたりかなり広く分布しており、おそらく滑面小胞体にも存在していると考えられた。

Table 7のExp. VIに示すように、原形質膜のマンナン結合タンパク質含量はかなり低く、ミクロソームの混入により説明できる程度の量であった。この結果は、実質細胞はマンナンを取り込まず、また、そ

の細胞表面にマンナン結合活性が検出されないことと一致している。Table 7 のExp. Vに示すように、精製リソソーム画分のマンナン結合活性は非常に低かった。リソソームを単離するときに種々のプロテアーゼ阻害剤を加えても結果は同じであった。

以上の結果から、マンナン結合タンパク質は粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内膜系に広く分布しているが、粗面小胞体に多量かつ高濃度に存在していること、また、リソソームおよび原形質膜にはほとんど含まれないことが明らかになった。

第3節 ミクロソームにおける肝臓マンナン結合タンパク質の存在様式

マンナン結合タンパク質がミクロソームの膜面の細胞質側に存在するか、それとも内腔側に存在するか(膜面でのオリエンテーション)を調べるため、ミクロソームをプロテアーゼの一種であるスブチリジンで処理した。なお、このようなプロテアーゼはミクロソーム膜を通過できず、従って膜の外側(細胞質側)に存在するタンパク質にのみ選択的に作用することが知られている。対照として、すでにミクロソームでのオリエンテーションが明らかにされている次の2つの酵素を用いた。ヌクレオシドジホスファターゼはミクロソーム内腔に存在しており⁵³⁾、一方、NADPH-シトクロムC レダクターゼはミクロソームの膜貫通タンパク質であり、その活性部位が膜面の細胞質側に位置している⁵⁴⁾。

Fig.8Aは新しく調製したミクロソームを種々の濃度のスブチリジンと0℃で15時間インキュベートしたのち、残存しているマンナン結合

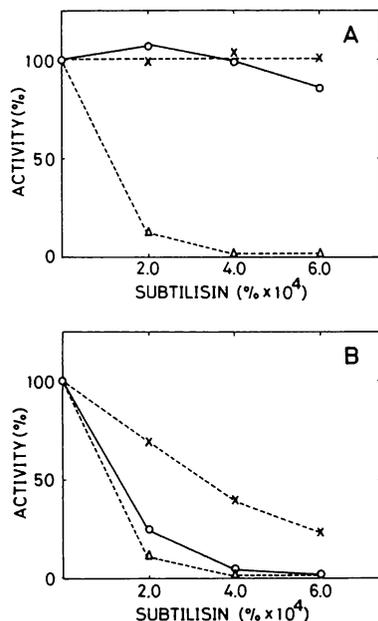


FIG. 8. Effect of subtilisin on the inactivation of the mannan-binding protein in rat liver microsomes. Freshly prepared microsomes were suspended by gentle homogenization in Buffer A to a protein concentration of 3 to 5 mg/ml. To the suspension, subtilisin was added to various final concentrations as shown on the abscissa. After standing for 15 h at 0°C in the absence (A) or presence (B) of 0.08% Triton X-100, the suspension was separated into supernatant and precipitate by centrifugation at 105,000*g* for 90 min. The precipitate was solubilized with 0.8% Triton X-100 in Buffer A, and the extract was recovered by centrifugation (precipitate extract). (A) Aliquots of the precipitate extract were assayed for NADPH-cytochrome *c* reductase (Δ) and nucleoside diphosphatase (\times), and also for the mannan-binding protein (\circ) after purification therefrom by affinity chromatography as described under Materials and Methods. (B) An aliquot of the precipitate extract was used for the assay of NADPH-cytochrome *c* reductase, and aliquots of the supernatant for the assay of nucleoside diphosphatase and the mannan-binding protein after purification as in (A). Symbols are the same as in (A). The activities are expressed as percentages of the control activity (with no subtilisin added).

タンパク質と2つの酵素の活性を測定した結果を示している。マンナン結合タンパク質の活性はヌクレオシドジフォスファターゼの場合と

同様に全く失われなかったが、NADPH-シトクロムC レダクターゼは完全に失活した。しかし、スブチリジン処理の際に、低濃度(0.08%)のトリトン X-100を共存させてマイクロソーム膜を部分的に破壊しておく、Fig. 8Bに示すように3種の活性はいずれも失活した。また、マイクロソームを4℃で90分間¹²⁵I-マンナンとインキュベートしてもマイクロソーム膜表面にマンナンはほとんど結合しなかった。従って、マンナン結合タンパク質はマイクロソームの内腔側に存在することが明らかになった。

次に、マンナン結合タンパク質のマイクロソーム膜との結合の度合いを調べるため、界面活性剤トリトン X-100によるマイクロソームの段階的可溶化実験⁵⁵⁾を行った。Fig. 9はマイクロソーム膜を種々の濃度のト

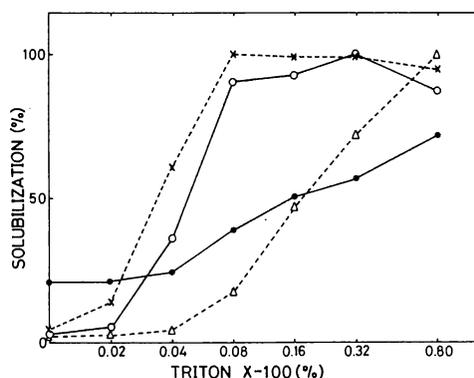


FIG. 9. Effect of Triton X-100 on the solubilization of the mannan-binding protein in rat liver microsomes. The microsomal suspension prepared as described in Fig. 1 was incubated with various concentrations of Triton X-100 as shown on the abscissa. After standing for 30 min at 0°C, the suspension was centrifuged at 105,000g for 90 min. Aliquots of the resulting supernatant were used for the assay of protein (●), nucleoside diphosphatase (×), and NADPH-cytochrome c reductase (Δ), and for the estimation of the mannan-binding protein (○) by Method B after purification by affinity chromatography as described under Materials and Methods. The activities are expressed as percentages of the maximum activity detected in the experiments.

リトン X-100で0℃、30分間処理したのち、 $105,000\times g$ 、90分間の遠心分離を行い、上清に遊離したマンナン結合タンパク質と2種の酵素の活性およびタンパク質量を測定した結果を示している。ヌクレオシドジフォスファターゼは容易に可溶化され、0.08%のトリトン X-100処理でほとんどすべてが可溶化された。これに対し、NADPH-シトクロムCレダクターゼやミクロソームの大部分のタンパク質の可溶化には0.8%以上のトリトンX-100が必要であった。マンナン結合タンパク質は比較的容易に可溶化され、その可溶化はヌクレオシドジフォスファターゼよりわずかに遅い程度であった。

以上の結果から、マンナン結合タンパク質はミクロソームの内腔側に、膜にゆるく結合する形で存在すると考えられた。

第4節 肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドの細胞内分布

次に、肝臓マンナン結合タンパク質の内在性拮抗的阻害物質(内在性リガンド)の細胞内分布を調べた。Fig.10に示すように、ホモジネートあるいは単離した細胞内オルガネラの内在性リガンド画分による精製肝臓マンナン結合タンパク質のマンナン結合活性の阻害は、直線的な濃度依存性を示した。Table 10は、この関係を用いて内在性リガンドの定量を行い、内在性リガンドの細胞内分布を調べた結果を示している。内在性リガンドはマンナン結合タンパク質の場合とほぼ一致した分布を示した。ホモジネートを5分画すると、ミクロソームに60%以上の活性が回収された(Exp. I)。ミクロソーム内では約78%の活性が粗面ミクロソームに回収され(Exp. II)、またゴルジ装置にも、総

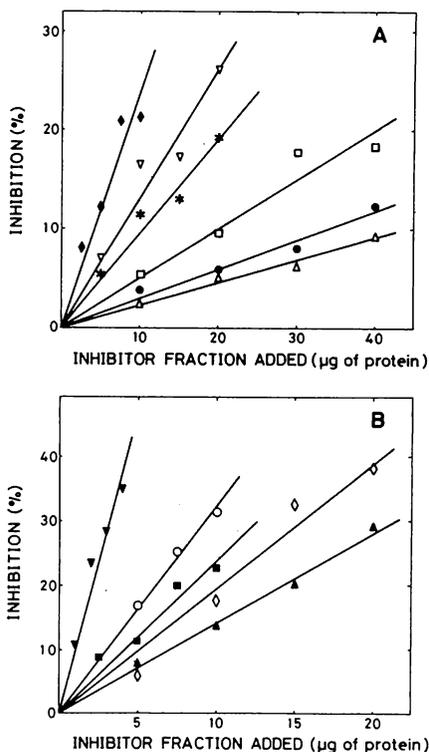


FIG.10. Estimation of inhibitory activity of rat liver organelles. To the standard assay mixture containing 0.35 μg of the purified binding protein and 300 ng ¹²⁵I-mannan, an increasing amount of the inhibitor fraction of each organelle was added, and the binding assay was carried out as described under Materials and Methods. Inhibitory activity was expressed as the percentage inhibition of the control binding measured in the absence of inhibitors. The symbols in (A) are *, homogenate; ▽, nuclei; △, heavy mitochondria; □, light mitochondria; ◆, microsomes (Exp. I); and ●, soluble fraction, and those in (B) are ■, whole microsomes (Exp. II); ○, rough microsomes; ▲, smooth microsomes; ◇, common Golgi; and ▼, lysosomes.

量としてはわずかであるが、ホモジネートの場合の2倍以上の比活性を示す内在性リガンドが存在した(Exp. III)。リソソームには Table 7 で示したように、マンナン結合タンパク質は検出されなかったが、内在性リガンドが高度に濃縮されていた。リソソームの内在性リガンドの総量はホモジネートの3%程度であったが、その比活性はホモジネ

TABLE 10
DISTRIBUTION OF INHIBITORY ACTIVITY IN RAT LIVER ORGANELLES

Experiment number	Fraction	Total activity		Specific activity ^c (U ^a /μg protein)	Relative specific activity (-fold)
		U ^a × 10 ⁻⁴ /g liver	% ^b		
I	Homogenate	8.85	(100)	0.956	1.00
	Nuclei	2.49	23.4	1.26	1.32
	Heavy mitochondria	0.28	2.6	0.228	0.24
	Light mitochondria	0.73	6.8	0.501	0.52
	Microsomes	6.65	62.4	2.40	2.51
	Soluble fraction	0.51	4.8	0.295	0.31
II	Whole microsomes	4.17	(100)	2.54	2.66
	Rough microsomes	2.54	77.9	3.36	3.51
	Smooth microsomes	0.72	22.1	1.49	1.56
III	Common Golgi	0.16	1.8	2.04	2.13
V	Lysosomes	0.28	3.2	9.36	9.79

Note. Inhibitory activity was estimated as described under Materials and Methods.

^a One unit is defined as the amount of inhibitory activity giving 1% inhibition in the standard inhibition assay.

^b The summation of activity recovered in the subfractions was taken as 100%, which corresponded to 120% (Exp. I) and 78.2% (Exp. II) of the activity of the homogenate and whole microsomes, respectively. In Exp. III and V, percentage distribution is calculated by taking the activity of the homogenate (88,500 U/g liver) as 100%.

^c Specific activity is calculated as the quotient of total inhibitory activity divided by total protein listed in Table 7.

ートの場合の約10倍と、調べたオルガネラの中では最も高い値を示した(Exp. V)。

粗面ミクロソームおよびリソソームの内在性リガンドによるマンナン結合活性の阻害様式をScatchard plotにより解析すると、Fig. 11に示すようにホモジネートの場合と同様拮抗的であった。K_i値はそれぞれ25.9 μg タンパク質/ml、8.67 μg タンパク質/mlであった。従って、これらの内在性リガンドはマンノースまたはN-アセチルグルコサミン残基を非還元末端にもつ糖タンパク質であると考えられる。

以上の結果から、内在性リガンドは粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内膜系と、リソソーム顆粒に存在していることが明らかとなった。

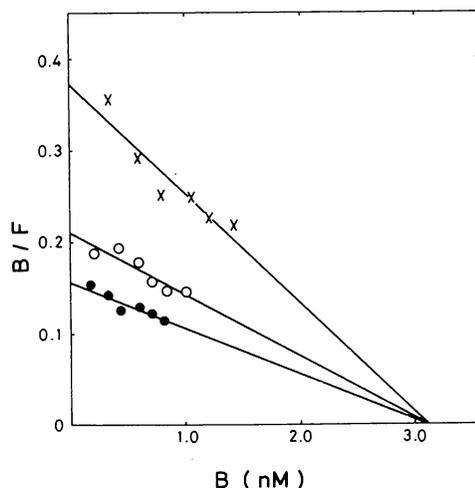


FIG.11. Estimation of K_i values for the inhibitor fractions of rough microsomes and lysosomes by Scatchard plot analyses. The purified binding protein (0.4 μg) was incubated with various amounts (50-300 ng) of ^{125}I -mannosyl-bovine serum albumin in the absence (x) or presence of the inhibitor fraction of rough microsomes (10.0 μg , o) or lysosomes (6.0 μg , ●). B is the concentration of bound ligand, and B/F is the concentration of bound ligand divided by the concentration of free ligand.

また、各オルガネラのマンナン結合活性を、内在性リガンドを分離する前(Method A)と分離した後(Method B)で測定した結果を比較することにより、粗面ミクロソームのマンナン結合タンパク質の約86%、滑面ミクロソームのマンナン結合タンパク質の約36%、ゴルジ装置のマンナン結合タンパク質の約35%は、内在性リガンドと結合した状態で存在することが示唆された(Table 7 Latency欄)。

第5節 考察

マンナン結合タンパク質およびその内在性リガンドの細胞内分布をまとめてFig.12 に示す。上段が比活性、下段が総活性を示している。

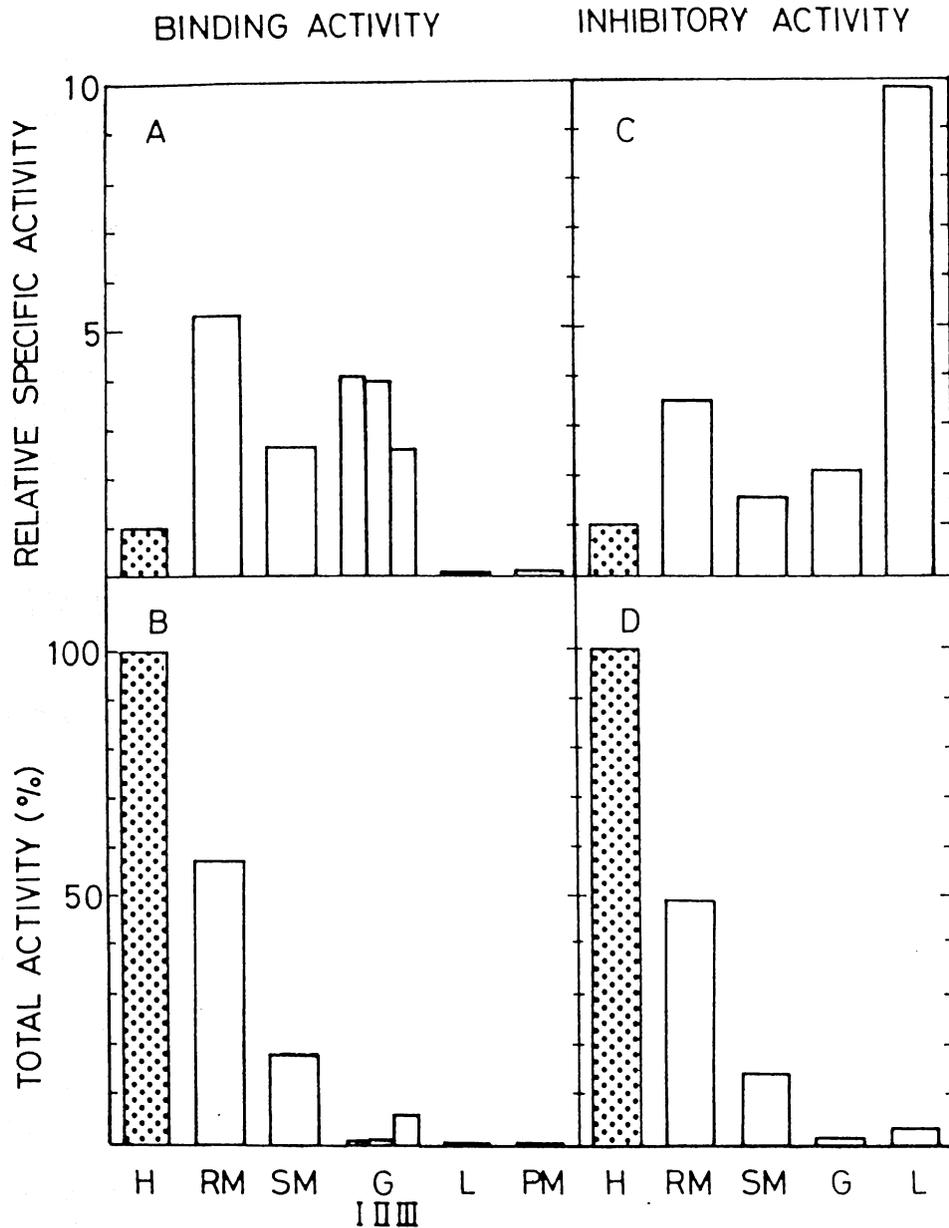


Figure 12. Subcellular distribution of MBP and its endogenous inhibitors. (A) and (C) show the specific activity of mannan binding and its inhibition of subcellular fractions of rat liver, respectively. The value of the homogenate is taken as 1.0. (B) and (D) show the distribution of MBP and its endogenous inhibitors among subcellular fractions, respectively. The amount of the homogenate is taken as 100%. The symbols are as follows: H, homogenate; RM, rough microsomes; SM, smooth microsomes; G, Golgi apparatus; G I, GF1; G II, GF2; G III, GF3; L, lysosomes; PM, plasma membranes.

リソソーム画分を除けば、両者は比活性、総活性とも非常によく一致した分布を示した。すなわち、粗面ミクロソームに最も多く50%以上が回収されたが、滑面ミクロソーム、ゴルジ装置にも存在しており、これらの膜系において、大部分のマンナン結合タンパク質は内在性リガンドと結合していることが示唆された。リソソームには、マンナン結合タンパク質は検出されなかったが、内在性リガンドが高度に濃縮されていた。しかしながらその量は少なく、リソソーム顆粒のタンパク質がホモジネートのタンパク質の2%を占める⁵⁶⁾としても、リソソームの内在性リガンドの総量はホモジネート中の内在性リガンドの20%以下であった。

肝臓マンナン結合タンパク質の細胞内分布を、これまでに肝細胞内分布が明らかにされている他の2種のレクチン、ガラクトースに特異的なレクチンならびにマンノース 6-リン酸に特異的なレクチンと比較してみた。

ガラクトースに特異的なレクチンは、非還元末端にガラクトース残基をもつ糖タンパク質を肝実質細胞内に取り込むレセプターとして機能している²⁶⁾。このレクチンの細胞内分布⁵⁷⁾とマンナン結合タンパク質の細胞内分布には、以下の相異が見られた。常法に従い肝ホモジネートを5分画に分けると、両レクチンはいずれもミクロソームに濃縮されたが、ミクロソームを粗面ミクロソームと滑面ミクロソームに分けると、ガラクトースに特異的なレクチンは約80%が滑面ミクロソームに回収され、ゴルジ装置の比活性が最も高かった。一方、マンナン結合タンパク質では約75%が粗面ミクロソームに回収され、比活性も粗面ミクロソームが最も高かった。また、ガラクトースに特異的なレクチンは、リソソーム、原形質膜に高濃度に存在したが、これらの

オルガネラにマンナン結合タンパク質はほとんど存在しなかった。これらの相異は、ガラクトースに特異的なレクチンがゴルジ装置、原形質膜、リソソームの間を往来しながら非還元末端にガラクトース残基をもつ糖タンパク質を血流中から細胞内に取り込んでいるのに対し、マンナン結合タンパク質は粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内オルガネラにおいて何らかの機能を果たしていることを示唆するものである。

マンノース 6-リン酸に特異的なレクチンは、線維芽細胞においてはリソソーム酵素のリソソーム顆粒内への選択的な組み込み機構に関与することが示されており^{58,59)}、肝臓中にも存在することが報告されている^{29,30)}。このレクチンの肝細胞内分布およびその存在様式はマンナン結合タンパク質の場合と類似している⁶⁰⁾。両者ともに80%以上がミクロソーム画分に回収され、また、両者はミクロソームの内腔に存在し、内在性リガンドと結合した状態にある。しかしながら、サブユニットの分子量、結合特異性、カルシウムイオンの要求性などの点で両者には明らかな相異が見られる^{29,60)}。さらに、マンナン結合タンパク質は粗面ミクロソームに最も高濃度に存在しており、リソソームや原形質膜には存在しない。一方、マンノース 6-リン酸に特異的なレクチンは、リソソームに最も高濃度に存在し、次いでゴルジ装置、小胞体、原形質膜の順であった。さらに、マンノース 6-リン酸を認識するレクチンは被覆小胞に非常に高濃度に(ミクロソーム画分の約60倍)存在することが報告されている⁶¹⁾が、著者が単離した被覆小胞中のマンナン結合タンパク質の濃度はミクロソーム画分の2倍程度であった。これらの結果は、マンノース 6-リン酸を認識するレクチンとマンナン結合タンパク質は異なる役割を果たしていることを

示している。

以上の本章に示した結果から、肝臓マンナン結合タンパク質は、肝実質細胞内の粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内膜系の内腔に、その内在性リガンドと共存する形で存在していることが明らかになった。

実験の部

1. 試薬

マンナンおよび種々の糖タンパク質の入手方法は第1章に示した。UDP-[6-³H]-ガラクトースはAmersham社より購入した。

2. 細胞内オルガネラの調製法

150~200g のWistar系雄ラットを一晩絶食させて断首したのち、肝臓を0.25Mショ糖中でPotter-Elvehjem型ホモジナイザーを用いてホモジナイズし、それぞれの方法により細胞内オルガネラを単離した。肝臓の5分画（核、粗ミトコンドリア、粗リソソーム、ミクロソームおよび可溶性画分）はDe Duveらの方法⁴⁹⁾により行った。粗面ミクロソームと滑面ミクロソームの単離はDallnerらの方法⁵²⁾により、ゴルジ装置はエタノール投与したラットからEhrenreichらの方法⁶²⁾により、リソソームはトリトンWR-1339処理したラットから辻らの方法⁶³⁾により、原形質膜はRayらの方法⁶⁴⁾により単離した。未分画のホモジネートは肝臓を0.5mM CaCl₂を含む1mM 重炭酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)中で、Dounce型ホモジナイザーを用いてホモジナイズして調製した。

単離したオルガネラの純度は、下記のマーカー酵素の活性を測定して調べた。5'-ヌクレオチダーゼ(原形質膜)、グルコース 6-ホスファ

ターゼ(小胞体)、酸性フォスファターゼ(リソソーム)、ガラクトシルトランスフェラーゼ(ゴルジ装置)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ(ミトコンドリア)。

3. 酵素活性測定法

酸性フォスファターゼはAppelmansとDe Duveの方法⁶⁵⁾により、グルコース 6-フォスファターゼはNordlieとArionの方法⁶⁶⁾により、ヌクレオシドジフォスファターゼは山崎と早石の方法⁶⁷⁾により、5'-ヌクレオチダーゼはEmmelotとBosの方法⁶⁸⁾により測定した。遊離した無機リン酸はChenらの方法⁶⁹⁾を用いて定量した。ガラクトシルトランスフェラーゼはHudginとAshwellの方法⁷⁰⁾により、NADPH-シクロムC レダクターゼは大村と竹末の方法⁷¹⁾により、リンゴ酸デヒドロゲナーゼはOchoaの方法⁷²⁾により測定した。

4. 肝臓マンナン結合タンパク質とその内在性リガンドの分離

肝臓のホモジネートあるいは単離したオルガネラを50mM KClと5mM MgCl₂を含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)で最終タンパク質濃度が4 mg/mlとなるように希釈した。最終濃度で0.8%となるようにトリトンX-100を加え0°C、30分間抽出したのち、105,000×gで90分間遠心分離した。この操作により抽出前の画分に含まれるマンナン結合タンパク質と内在性リガンドの90%以上が上清に回収された。上清に等量の0.1M CaCl₂を含む2.5M NaCl溶液を加え、3 mlのマンナン-Sepharose 4B のアフィニティーカラムにかけた。可溶性画分については、50mM KCl、0.1mM EDTAおよび0.1%トリトンX-100を含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に対し透析したのち、CaCl₂を最終濃度で50mMとなるよう加えてアフィニティーカラムにかけた。カラムを1.25M NaCl、50mM CaCl₂および0.5%トリトン X-100を含む20mM イミダゾール-塩酸緩衝

液(pH7.8)で充分洗浄したのち、1.25M NaCl、2mM EDTAおよび0.5%トリトン X-100を含む20mM イミダゾール-塩酸緩衝液(pH7.8)で溶出した。この操作で、内在性リガンドはすべてアフィニティーカラムを素通りした。一方、マンナン結合タンパク質はすべてアフィニティーカラムに結合し、EDTA溶液で溶出した。そこで素通り画分を内在性リガンド画分とし、EDTA溶出画分をマンナン結合タンパク質画分とした。

5. マンナン結合活性の測定

第1章に示した方法により測定した。ただし、 ^{125}I -マンナンは300 ng用いた。

6. 内在性リガンドの定量法

種々の濃度の内在性リガンド画分を、精製した肝臓マンナン結合タンパク質約0.35 μg と300 ngの ^{125}I -マンナンを含む標準活性測定条件に加えてインキュベートし、マンナン結合活性に及ぼす効果を測定した。内在性リガンド画分を加えない場合のマンナン結合活性の1%を阻害するときの内在性リガンド画分の量を1 Unitとした。

7. タンパク質の定量

第1章に示した方法を用いた。

第3章 肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドの単離とその性質

前章の研究において、肝実質細胞の粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内膜系の内腔には、肝臓マンナン結合タンパク質がその内在性リガンドと結合した形で存在すること、またリソソームには、肝臓マンナン結合タンパク質は検出されなかったが、肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドが高度に濃縮されていることが示された。これらの内在性リガンドを同定することは、肝臓マンナン結合タンパク質の生物学的意義を解明するうえで、極めて重要な手掛かりを与えると考えられたので、次に肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドの単離を試みた。その結果、マンナン結合タンパク質をSephrose 4Bに結合させたアフィニティークロマトグラフィーを用いることにより、粗面ミクロソーム抽出液から内在性リガンドの30~40%を単離することができた。また、肝実質細胞については*in vitro*で初代培養を行う方法がすでに確立されている⁷³⁾ので、この実験系を活用して初代培養肝細胞を種々のアイソトープで標識し、内在性リガンドの糖鎖構造ならびに代謝的性質を調べた。さらに、粗面ミクロソームあるいは初代培養肝細胞の内在性リガンドのいくつかをWestern blottingの手法⁷⁴⁾により同定した。

第1節 内在性リガンドの単離

内在性リガンドの単離方法をFig.13に示す。粗面ミクロソーム、初

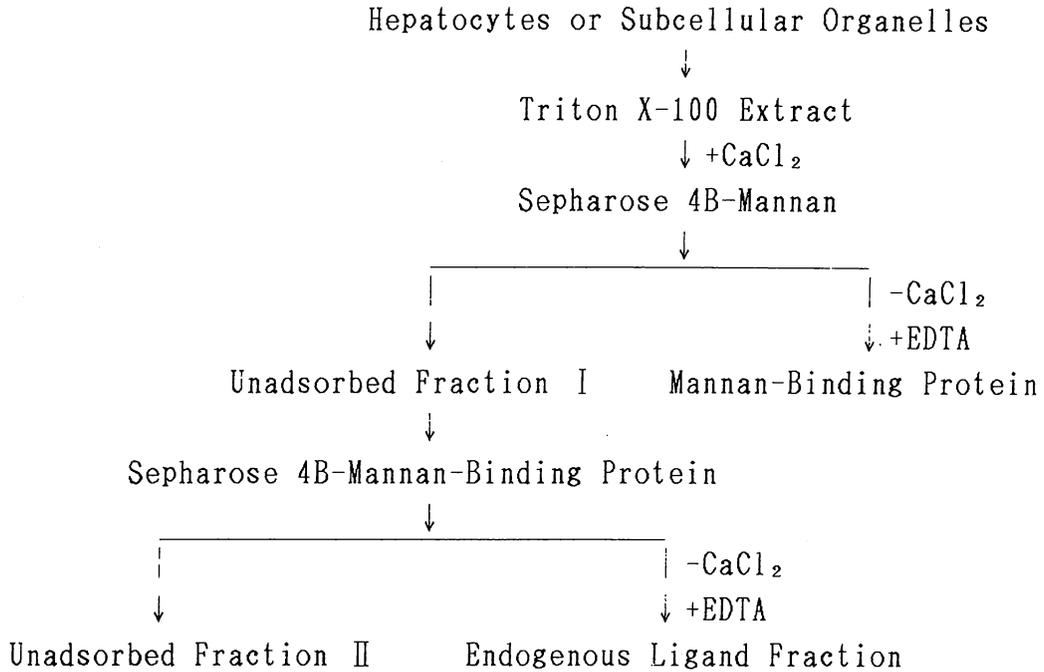


Fig.13. Procedure of isolation of endogenous ligands.

代培養肝細胞、あるいは精製リソソームの抽出物を第2章に示した方法に従いマンナン-Sepharose 4B カラムにかけ、内在性リガンドを含む素通り画分 I (UI) とマンナン結合タンパク質画分に分けた。UI 画分にはマンナン結合タンパク質以外のほとんどすべてのタンパク質が回収されたため、全タンパク質画分として以下の実験に用いた。次に UI 画分を、マンナン結合タンパク質を Sepharose 4B に結合させたアフィニティーカラム(15ml)にかけた。このカラムを 1.25M NaCl、50mM CaCl₂ および 0.5% トリトン X-100 を含む 20mM イミダゾール-塩酸緩衝液 (pH7.8) で十分に洗浄したのち、1.25M NaCl、2mM EDTA および 0.5% トリトン X-100 を含む 20mM イミダゾール-塩酸緩衝液 (pH7.8) で溶出した。この方法に従い、粗面ミクロソームの抽出物をマンナン結合タン

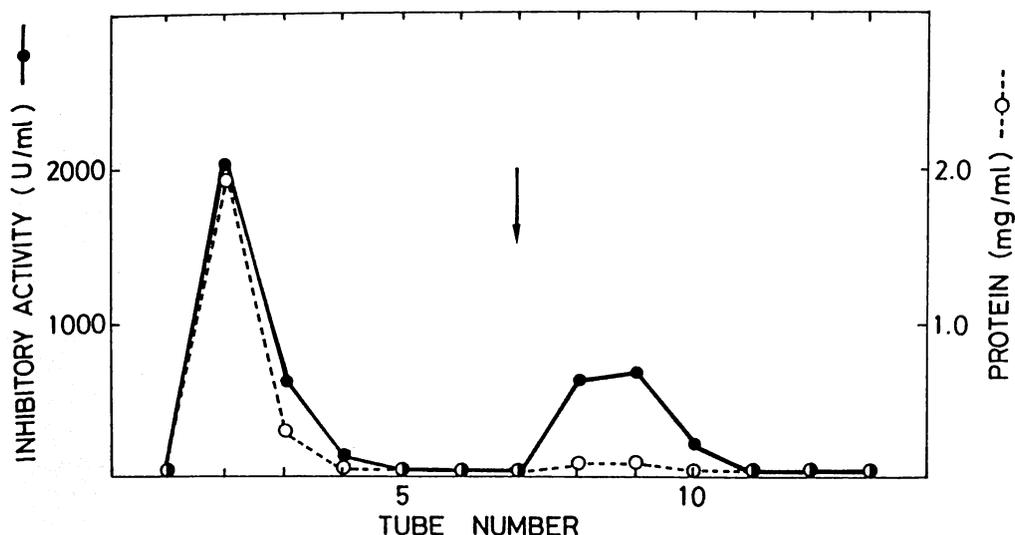


Fig.14. Isolation of endogenous ligands by affinity Chromatography. Triton X-100 extract of rough microsomes (59.3mg protein), from which the mannan-binding protein had been removed with a Sepharose 4B-mannan column (3ml), was applied to a Sepharose 4B-mannan-binding protein column (15ml). The column was washed with the loading buffer, and then eluted with the eluting buffer containing EDTA (indicated by the arrow). Fractions of 5.0ml were collected and aliquots therefrom were used for the determination of protein (○) and inhibitory activity (●) as described under Materials and Methods.

パク質-Sepharose 4Bカラムにかけた結果をFig.14 に示す。粗面ミクロソームの抽出物中のタンパク質はほとんどすべてが素通りしたが、わずかに約1%がカラムに結合しEDTAで溶出した。この溶出液中にはマンナン結合タンパク質に対する阻害活性の35~40%が回収された。粗面ミクロソームの抽出物中の60~65%の阻害活性は、マンナン結合タンパク質に対する親和性が低いためカラムに結合しなかったと考えられる。同様に、初代培養肝細胞からは約0.5%のタンパク質と約35

%の阻害活性が、リソソームからは約2%のタンパク質と12~18%の阻害活性がカラムに結合し、EDTAで溶出した。これらの操作により、マンナン結合タンパク質に高い結合親和性をもつ内在性リガンドを単離することができたので、このEDTA溶出画分を内在性リガンド画分として以下の実験に用いた。

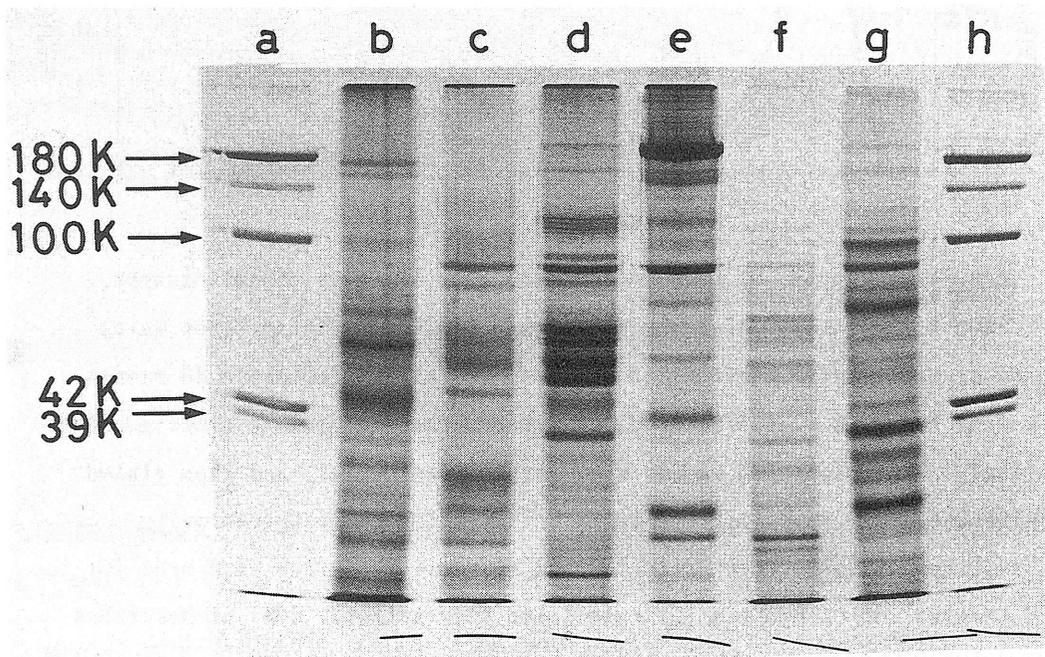


Fig.15. Polyacrylamide gel electrophoresis of endogenous ligands in the presence of sodium dodecyl sulfate. Purified lysosomes (lane b, $50\mu g$), rough microsomes (lane d, $50\mu g$) and primary cultured hepatocytes (lane f, $15\mu g$), and the respective endogenous ligands isolated therefrom (lane c, e and g, $50\mu g$ each) were fractionated in a 10% polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate as described under Materials and Methods. Following electrophoresis, the proteins were stained with Coomassie brilliant blue. The figures to the left refer to the molecular weight of the standard proteins (lane a and h).

まず、粗面ミクロソーム、初代培養肝細胞および精製リソソームの全タンパク質と、そこから単離した内在性リガンドをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ分析した。その結果をFig.15に示す。粗面ミクロソームの内在性リガンドは、lane eに示すように主要な8本のバンドを示した。これらのバンドは、粗面ミクロソーム全体の主要タンパク質のバンド(lane d)とは一致しなかった。この結果は、内在性リガンド画分にはミクロソームのタンパク質の中から、一定の性質を共有する成分が精製されてきたことを示している。同様に、初代培養肝細胞ならびにリソソームの内在性リガンド画分も数本の主要バンドを示した(それぞれlane g, c)が、これらのバンドは全体のタンパク質の主要バンド(それぞれlane f, b)とは一致しなかった。また、粗面ミクロソーム、リソソームおよび初代培養肝細胞の内在性リガンド画分には多くの共通のバンドがみられたが、その相対的な強度は各画分によりかなりの変動がみられた。

次に、 ^3H -グルコサミンで1時間あるいは24時間標識した初代培養肝細胞より内在性リガンドを単離し、これらをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけたのちフルオログラフィーにより分析したところ、Fig.16に示すように、タンパク質染色されるバンドはすべて ^3H -グルコサミンで標識されており、内在性リガンドはすべて糖タンパク質であることが明らかになった。

次に、初代培養肝細胞を ^3H -ロイシン、 ^3H -グルコサミン、 ^3H -マンノースおよび ^3H -ガラクトースで1時間あるいは24時間標識したのち、内在性リガンドを単離し、全タンパク質に取り込まれた放射活性に対する内在性リガンドの放射活性の割合を調べた。その結果をTable 11に示す。 ^3H -マンノースによる1時間の標識では、全取り込み活性の

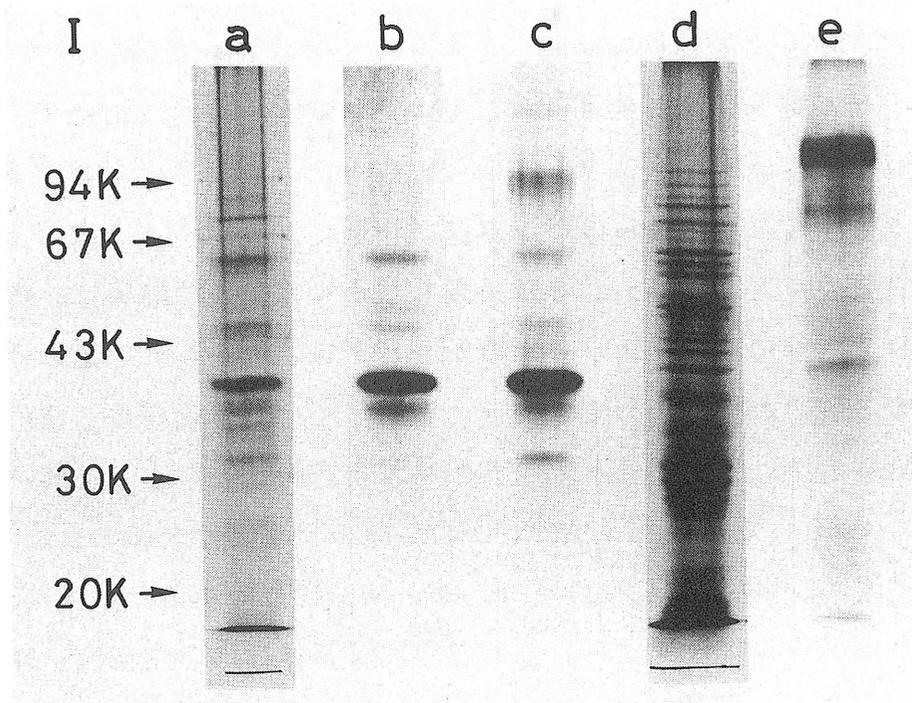


Fig.16. Fluorography of endogenous ligands labeled with ^3H -glucosamine. Primary cultured hepatocytes were labeled with ^3H -glucosamine ($25\mu\text{Ci}/\text{dish}$) for 1 or 24h. Total cellular proteins ($200\mu\text{g}$, lane d, e) and endogenous ligands isolated therefrom ($20\mu\text{g}$, lane a, b, c) were subjected to electrophoresis in 10% polyacrylamide gels in the presence of sodium dodecyl sulfate. Following electrophoresis, the proteins were stained with Coomassie brilliant blue (lane a, d). ^3H -Glucosamine-labeled materials were detected by fluorography as described under Materials and Methods. Lane b; endogenous ligands labeled for 1h, lane c; endogenous ligands labeled for 24h, lane e; total cellular proteins labeled for 24h. The figures to the left refer to the molecular weight of the standard proteins.

TABLE 11
In vitro Labeling of Endogenous Ligands

³ H-Compound	Labeling time (hr)	Acid-precipitable radioactivity (dpm)		B/A × 100 (%)
		total cellular proteins(A)	endogenous ligands(B)	
Leucine	1	846	55.5	6.6
	24	4,985	77.1	1.5
Glucosamine	1	11,000	1,520	13.8
	24	139,000	7,180	5.2
Mannose	1	2,580	763	29.6
	24	7,610	1,410	18.5
Galactose	1	13,400	351	2.6

Note. Primary cultured hepatocytes were labeled with ³H-leucine (20 μCi/dish), ³H-glucosamine(50 μCi/dish), ³H-mannose(50 μCi/dish) or ³H-galactose(50 μCi/dish) for 1h or 24h. Protein-bound radioactivity in the total cellular proteins and endogenous ligands isolated therefrom were determined as described under Materials and Methods.

約1/3が内在性リガンド画分に取り込まれたように、内在性リガンドは比較的短時間で標識されやすいタンパク質であることがわかった。そこで、第2節では内在性リガンドの糖鎖構造を、第3節では内在性リガンドの代謝的性質を調べた。

第2節 内在性リガンドの糖鎖構造

タンパク質中のアスパラギン残基に結合したN-グリコシド型糖鎖は、マンノースとN-アセチルグルコサミンのみから成る高マンノース型糖鎖とシアル酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミンおよ

びマンノースから成る複合型糖鎖の2種類に大別される。前節に示した結果より、内在性リガンドは、マンノースおよびグルコサミンにより標識されやすいことから高マンノース型糖タンパク質であることが示唆されていた。そこで、初代培養肝細胞を ^3H -グルコサミンで標識して糖鎖中のN-アセチルグルコサミンを ^3H 標識し、放射活性をめやすに内在性リガンドの糖鎖構造を調べた。

^3H -グルコサミンで1時間あるいは24時間標識した初代培養肝細胞の全タンパク質あるいはそこから単離した内在性リガンドをプロナーゼPで消化して糖ペプチドを調製した。次に、これらの糖ペプチドをエンド β -N-アセチルグルコサミニダーゼH(エンドH)で消化した。この酵素により高マンノース型糖鎖のペプチドとの結合部位にあたるN-アセチルキトビオース構造の2つのN-アセチルグルコサミンの間の結合が切断されるが、複合型糖ペプチドはこの酵素消化によっては全く構造が変化しないことが知られている。遊離した高マンノース型糖鎖の還元末端を NaBH_4 で還元し、また糖ペプチドのN末端を無水酢酸でアセチル化したのち、この消化物をAG1 \times 2のイオン交換クロマトグラフィーにかけた。その結果をFig.17に示す。このクロマトグラフィーにより消化物は、カラムを素通りする中性画分(N画分)、カラムに結合し10mM HClで溶出する画分(A I画分)、および1M NaClで溶出する画分(A II)の3つに分かれた。小堤ら³³⁾および中尾ら³⁴⁾の研究により、N画分にはエンドHにより消化された高マンノース型糖鎖、A I画分にはエンドH消化により生成したN-アセチルグルコサミニルペプチドとシアル酸を含まない複合型糖ペプチド、A II画分にはシアル酸を含む複合型糖ペプチドが回収されることが明らかにされている。従って、高マンノース型糖ペプチドをエンドH消化すると、

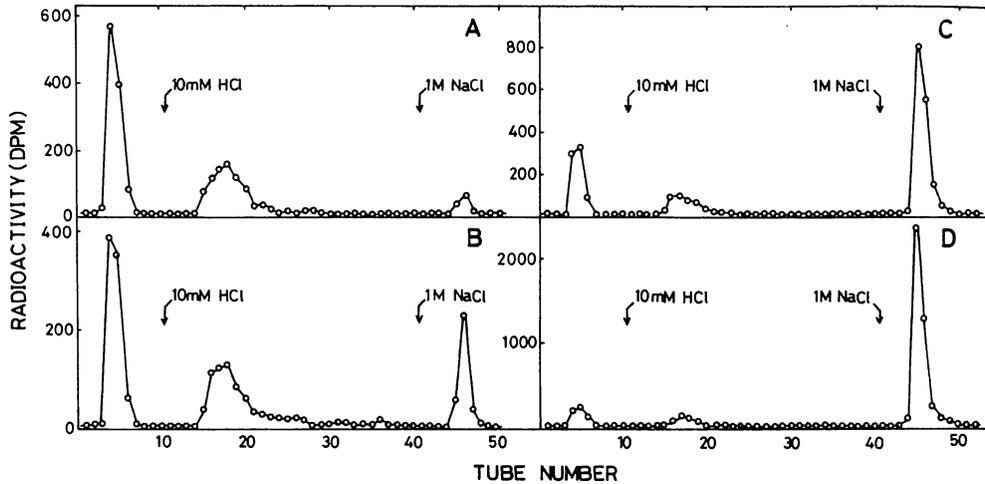


Fig.17. Fractionation of Endo-H digests by AG1x2 chromatography. The endogenous ligands (panel A, B) and total cellular proteins (panel C, D) of the hepatocytes which had been labeled with ^3H -glucosamine ($20\ \mu\text{Ci}/\text{dish}$) for 1h (panel A, C) or 24h (panel B, D) were digested with pronase P and the glycopeptides obtained were digested with Endo-H. The digests were reduced with NaBH_4 and N-acetylated with acetic anhydride, and then applied to a column of AG1x2 ($0.7\times 11\text{cm}$, Cl^- -form, 100-200 mesh). After washing the column with H_2O , materials bound to the column were eluted first with 10mM HCl and then 1M NaCl. Fractions of 1.0ml were collected and an aliquot therefrom was used for the determination of radioactivity.

N画分とA I画分にはほぼ同程度の放射活性を与えることになる。

^3H -グルコサミン標識した内在性リガンドをこの条件で分画すると、1時間標識、24時間標識ともN画分とA I画分にはほぼ等量の放射活性が回収された。一方、A II画分には1時間標識では5%、24時間標識

の場合でも17%の放射活性しか回収されなかった。A II 画分には酸性に荷電した糖ペプチドが回収されるが、これをノイラミニダーゼ消化すると約60%の放射活性はA I 画分に移ったことから、ここに回収された主要な糖鎖はシアル酸を含んだ複合型糖鎖であると考えられる。残りの約40%の酸性荷電の原因については現在のところ不明である。以上の結果から、内在性リガンドの糖鎖の80%以上は高マンノース型糖鎖であり、複合型糖鎖は10%以下であると結論された。これに対し全タンパク質の場合1時間標識で53%、24時間標識では69%の放射活性がA II 画分に回収された。この画分の90%以上はノイラミニダーゼにより消化された。従って、全タンパク質の糖鎖の70%以上はシアル酸を含む複合型であると考えられた。

次に、全タンパク質および内在性リガンドのN画分に回収された高マンノース型糖鎖の構造をBio-Gel P-2 を用いたゲル濾過により解析した。その結果を Fig.18, 19 に示す。内在性リガンドのN分画の糖鎖はFig.18 に示すように、1時間標識では83%、24時間標識でも73%の放射活性が $\text{Man}_9\text{GlcNAcol}$ および $\text{Man}_8\text{GlcNAcol}$ の位置に溶出した。 $\text{Man}_9\text{GlcNAcol}$ から $\text{Man}_5\text{GlcNAcol}$ に相当する画分を集めて $\alpha 1\rightarrow 2$ 結合したマンノースに特異的に作用するマンノシダーゼで消化すると、約80%が $\text{Man}_5\text{GlcNAcol}$ の位置に単一ピークとして溶出した。従って、これらの糖鎖はグルコースなどを含まない通常の糖タンパク質にみられる高マンノース型糖鎖であることが明らかになった。これに対し、全タンパク質のN画分の高マンノース型糖鎖はFig.19 に示すように、1時間標識した場合では内在性リガンドの糖鎖とほとんど差がみられなかったが、24時間標識した場合には内在性リガンドの高マンノース型糖鎖に比べ、 $\text{Man}_7\text{GlcNAcol}$ 、 $\text{Man}_6\text{GlcNAcol}$ および $\text{Man}_5\text{GlcNAcol}$ の割合

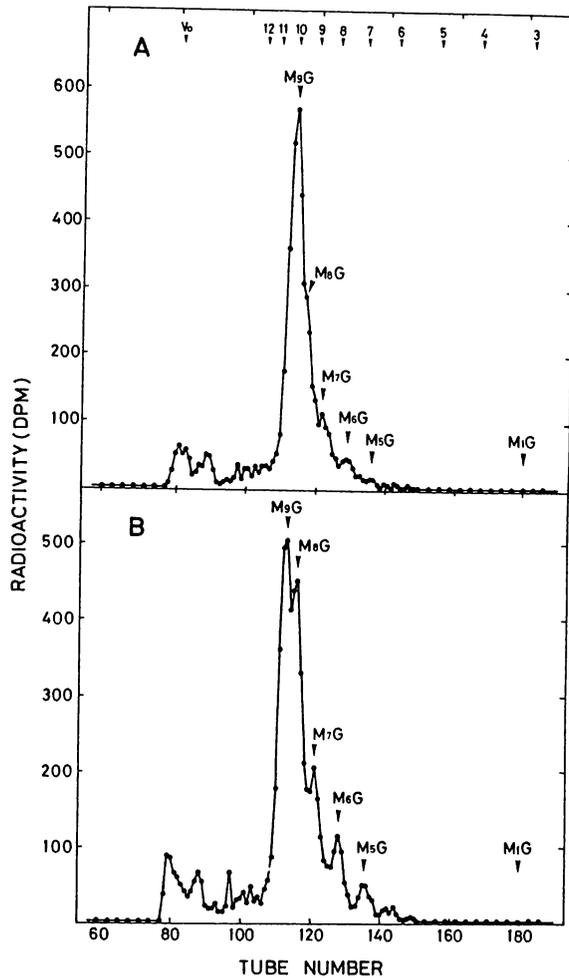


Fig.18. Fractionation of neutral oligosaccharides of endogenous ligands by Bio-Gel P-2 gel filtration. The neutral oligosaccharides of endogenous ligands isolated from the hepatocytes which had been labeled with ^3H -glucosamine ($25\mu\text{Ci/dish}$) for 1h (panel A) and 24h (panel B) were mixed with glucose oligomers, and then applied to a column of Bio-Gel P-2 ($1.8\times 190\text{cm}$, -400 mesh). Fractions of 1.6ml were collected and aliquots therefrom were used for the determination of radioactivity and neutral sugars. The arrow denote the elution positions of the glucose oligomers with numbers indicating the numbers of glucose unit and the calculated elution positions of the standard oligosaccharides (M_9G , $\text{Man}_9\text{GlcNAcol}$; M_8G , $\text{Man}_8\text{GlcNAcol}$; M_7G , $\text{Man}_7\text{GlcNAcol}$; M_6G , $\text{Man}_6\text{GlcNAcol}$; M_5G , $\text{Man}_5\text{GlcNAcol}$; M_1G , ManGlcNAcol ; G, GlcNAcol).

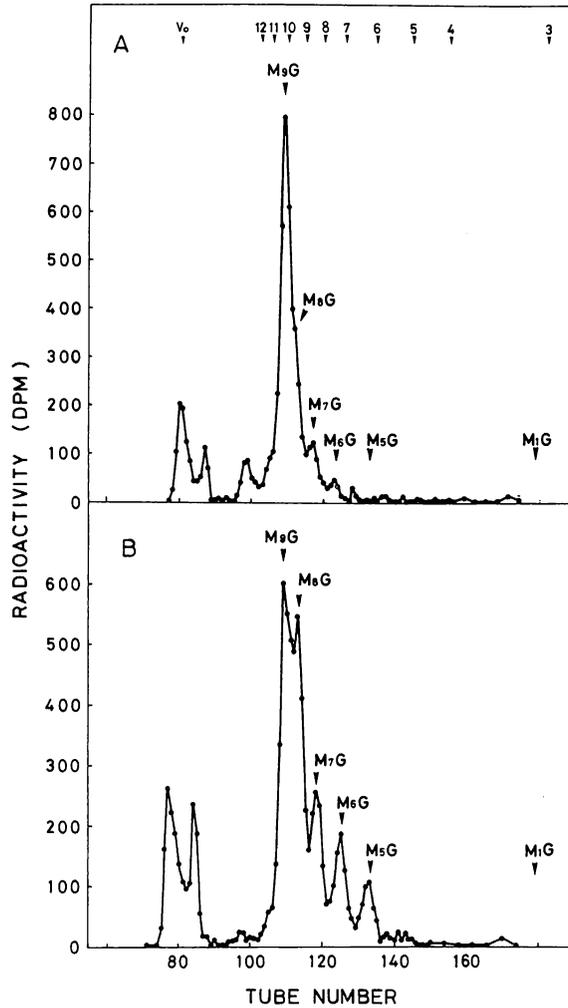


Fig.19. Fractionation of neutral oligosaccharides of total cellular proteins by Bio-Gel P-2 gel filtration. The neutral oligosaccharides of total cellular proteins of the hepatocytes which had been labeled with ^3H -glucosamine ($25\mu\text{Ci/dish}$) for 1h (panel A) and 24h (panel B) were analyzed by Bio-Gel P-2 gel filtration as described in the legend of Fig.18.

がやや高かった。

以上の結果から、内在性リガンドの糖鎖の大部分は、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ および $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ を主成分とする高マンノース型糖鎖であることが明らかになった。

第3節 内在性リガンドの代謝的性質

内在性リガンドの代謝的性質を調べるため、まず Arias ら方法⁷⁵⁾に従い二重標識実験を行った。

TABLE 12
Estimation of the Relative Turnover Rate of Endogenous Ligands

Compound	Acid-precipitable radioactivity (dpm)	
	total cellular proteins	endogenous ligands
^3H -Leucine	4.99×10^6	3.52×10^4
^{14}C -Leucine	3.64×10^6	1.78×10^5
$^{14}\text{C} / ^3\text{H}$	0.73	5.06

Note. Primary cultured hepatocytes were labeled with ^3H -leucine ($100 \mu\text{Ci}/\text{dish}$) for 10h and then chased with unlabeled leucine. 18h later, hepatocytes were labeled with ^{14}C -leucine ($12.5 \mu\text{Ci}/\text{dish}$) for 1h. Protein-bound radioactivity of total cellular proteins and endogenous ligands were determined as described under Materials and Methods.

初代培養肝細胞を ^3H -ロイシンで10時間標識したのち、18時間無標識のロイシンでchaseした。さらにその後 ^{14}C -ロイシンで1時間標識した。この操作により、代謝回転の遅いタンパク質が ^3H で、速いタンパク質が ^{14}C で選択的に標識されたことになる。このように標識した細胞から内在性リガンドおよび全タンパク質を調製し、それぞれについて、 ^{14}C と ^3H の比を調べてみると、Table 12 に示すように、全タンパク質が0.73であったのに対し、内在性リガンドの場合は5.06であった。従って、内在性リガンドは比較的速い代謝回転速度をもつことがわかった。

次に、初代培養肝細胞を ^3H -ロイシンで種々の時間標識したのち、無標識のロイシンでchaseして内在性リガンドの半減期を求めた。その結果をFig. 20に示す。全タンパク質と内在性リガンドに取り込まれた放射活性は、Fig. 20A に示すように、標識時間の延長に伴い増加したが、1時間標識したのちchaseすると、全タンパク質の放射活性は半減期約90分で減少したのに対し、内在性リガンドの半減期は約40分であった。細胞を24時間標識したのちchaseすると、Fig. 20Bに示すように、全タンパク質の放射活性は半減期約5時間でゆっくりと代謝されていた。内在性リガンドは二相性を示し、約2/3の半減期は約45分であったが、残りの約1/3は長い半減期を示した。なお、45分という半減期はFig. 20Aで1時間標識したのちchaseして求めた半減期とほぼ同じであった。

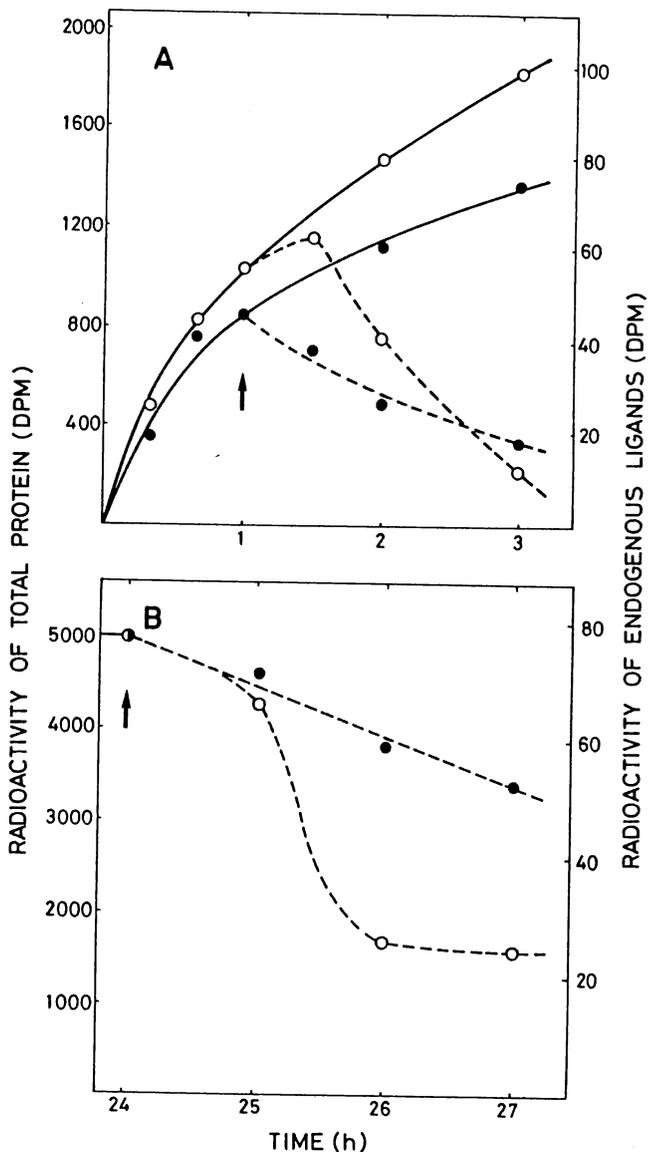


Fig.20. Estimation of turnover rates of endogenous ligands by chase experiments. Primary cultured hepatocytes were labeled with ^3H -leucine ($10\mu\text{Ci}/\text{dish}$) for the indicated time and then chased with unlabeled leucine. Protein-bound radioactivity of total cellular protein (●) and endogenous ligands (○) were determined as described under Materials and Methods. The arrow denote the start of the chase and the dotted lines indicated the decay of the radioactivity after the chase.

第4節 内在性リガンドの同定

粗面ミクロソームおよび初代培養肝細胞の内在性リガンドの同定をWesternブロッティングの手法⁷⁴⁾を用いて行った。

まず、種々の特異的抗体の性質を調べるため、粗面ミクロソームの全タンパク質をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画したのち、ニトロセルロース膜にブロッティングし、各々の抗体と反応させた。その結果をFig. 21Aに示す。抗ラット血清抗体はプロアルブミンの位置にほぼ1本のバンドを与えた(lane b)。その他の特異的抗体はそれぞれ予想される分子量の位置に主要な単一のバンドを示した(lane c, d, f, g, h)。ただし、抗 α_1 -マクログロブリン抗体の場合には190Kと37Kの2本のバンドが検出された(lane e)。この結果は、斎藤と篠原の報告⁷⁶⁾とよく一致していた。

1. 粗面ミクロソームの内在性リガンドの同定

上述した特異性をもつ抗体を用いて粗面ミクロソームの内在性リガンドの同定を行った。その結果をFig. 21Bに示す。粗面ミクロソームの内在性リガンドをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動し、タンパク質染色すると主要な8本のバンドを示した(lane a)。それらの分子量はマーカータンパク質の易動度との比較から190K、150K、74K、63K、52K、40K、30K、25Kと算出された。

次に、この試料を抗ラット血清抗体と反応させると190K、150K、63Kの3本のバンドが検出された(lane b)。従って、これらのバンドは血清タンパク質であると考えられた。190Kのバンドはその分子量と特異抗体との反応性から α_1 -マクログロブリンであると同定された(lane e)。また63Kのバンドも抗 α_1 -マクログロブリン抗体と反応し

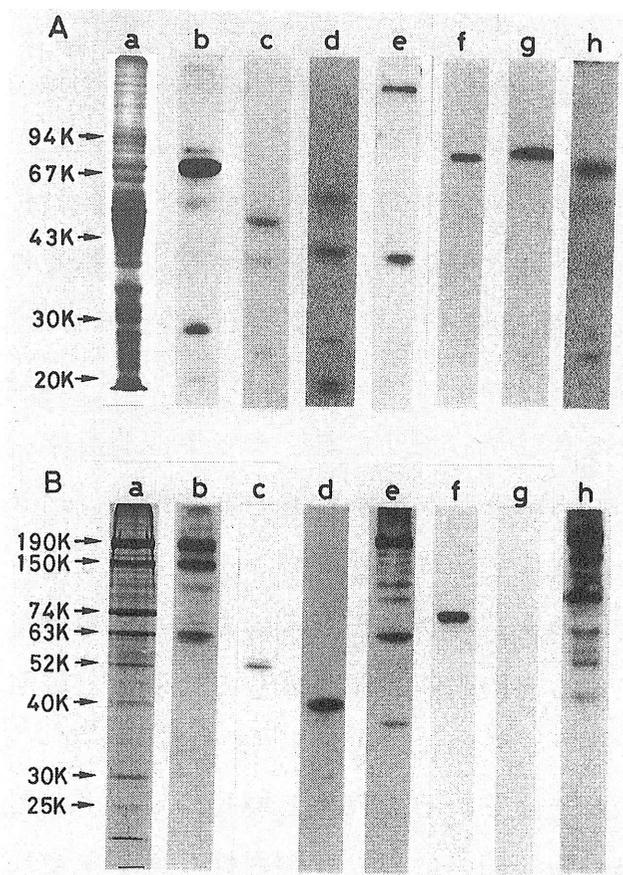


Fig.21. Western blot and immunodetection of endogenous ligands of rough microsomes. Total rough microsomal proteins (160 μ g, panel A) and endogenous ligands isolated therefrom (5 μ g, panel B) were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis in 10% gels in the presence of sodium dodecyl sulfate. Following electrophoresis, protein bands were stained with Coomassie brilliant blue (lane a) or transferred to nitrocellulose membranes. Transferred proteins were treated with various specific antisera and resulting immunocomplexes were reacted with 125 I-protein A and detected by radioautography. Antisera used were anti-rat serum (lane b), anti-rat α_1 -antitrypsin (lane c), anti-rat α_1 -acid glycoprotein (lane d), anti-rat α_1 -macroglobulin (lane e), anti-rat liver lysosomal β -glucuronidase (lane f), anti-rat serum transferrin (lane g), and anti-rat liver 5'-nucleotidase (panel A, lane h). In lane h of panel B, approximately 20 μ g of endogenous ligands, which had been transferred to the membrane after electrophoresis, were treated with the rat liver mannan-binding protein and the resulting mannan-binding protein-endogenous ligand complexes were reacted with anti-liver mannan-binding protein anti-IgG, followed by 125 I-protein A, and detected by radioautography.

た。粗面ミクロソームの全タンパク質を抗 α_1 -マクログロブリン抗体と反応させた場合は63Kのバンドは検出されない(Fig.21A lane e)ことから、おそらく63Kは内在性リガンドの単離の際に生じた α_1 -マクログロブリンのフラグメントであると考えられた。52K、40K、74Kのバンドはその分子量と抗体との反応性から、それぞれ α_1 -アンチトリプシン⁷⁷⁾、 α_1 -酸性糖タンパク質⁷⁸⁾、 β -グルクロニダーゼ⁷⁹⁾と同定された(それぞれlane c, d, f)。150K、30K、25Kのバンドを同定することはできなかった。なお、ラット血清をマンナン結合タンパク質-Sepharose 4B カラムにかけても、血清タンパク質は全くカラムに結合しない。従って、内在性リガンドとして同定された血清タンパク質は、血液中のタンパク質の混入によるものではなく、粗面ミクロソームに存在する細胞内前駆体を表していることは明らかである。一方、抗トランスフェリン抗体と抗5'-ヌクレオチダーゼ抗体の場合、粗面ミクロソームではそれぞれ76Kと68Kのバンドが得られた(それぞれFig.21A lane g, h)のに対し、内在性リガンドでは全くバンドは検出されなかった(Fig.21 B lane g)。従って、これらの糖タンパク質はマンナン結合タンパク質-Sepharose 4B カラムに結合しなかったことになる。

次に、いくつかの酵素について酵素活性を指標として、マンナン結合タンパク質-Sepharose 4B カラムへの結合性を調べた。その結果をTable 13 に示す。粗面ミクロソームのトリトンX-100抽出液中に存在するリソソーム酵素の中では、 β -グルクロニダーゼが最もよい結合性を示し、59%が内在性リガンド画分に得られ、抗体を用いた実験結果とよく一致していた。続いて、酸性フォスファターゼが19%、 α -マンノシダーゼは7%がカラムに結合したが、N-アセチルグルコサ

TABLE 13
Enzyme Profiles of Endogenous Ligands

Enzymes	Bound / Total (%)
β -Glucuronidase	59.3
Acid phosphatase	19.1
α -Mannosidase	7.3
β -Galactosidase	6.7
β -Glucosidase	5.7
β -N-Acetylglucosaminidase	1.6
α -L-Fucosidase	<0.1
Arylsulfatase C	<0.1
Nucleoside diphosphatase	0.6
Arylacylamidase	0.7
Carboxyesterase	0.6
5'-Nucleotidase	0.6
Gal/GalNAc specific lectin	2.5

Note. Triton X-100 extract of rough microsomes (23.3mg protein) was applied to a Sepharose 4B-mannan-binding protein column as described in Text. Various enzyme activities in the pass through fraction (A) and endogenous ligand fraction (B) was determined as described under Materials and Methods. Bound/Total is calculated as the percentages of B/(A+B).

ミニダーゼや α -L-フコシダーゼなどはほとんどカラムには結合しなかった。原形質膜のマーカー酵素である5'-ヌクレオチダーゼ⁸⁰⁾や、ゴルジ装置、原形質膜などに存在するガラクトースに特異的なレクチン⁸¹⁾は糖タンパク質であることが知られており、高マンノース型糖

鎖をもつ前駆体が粗面小胞体に存在すると考えられる。しかし、これらの糖タンパク質はマンナン結合タンパク質-Sepharose 4B カラムには結合しなかった。小胞体の膜タンパク質であり、内腔側に高マンノース型糖鎖をもつことが示されているアリルスルファターゼ⁸²⁾もカラムに結合しなかった。その他、ミクロソーム固有のタンパク質であるヌクレオシドジホスファターゼ、カルボキシエステラーゼもカラムに結合しなかった。

2. 初代培養肝細胞の内在性リガンドの同定

初代培養肝細胞の内在性リガンドについても、粗面ミクロソームの内在性リガンドの場合と同様に、Western ブロッキングの手法により同定した。その結果をFig. 22に示す。初代培養肝細胞を種々の特異的抗体と反応させたところ、 α_1 -マクログロブリン(lane e)、 α_1 -アンチトリプシン(lane c)、 α_1 -酸性糖タンパク質(lane d)などの血清糖タンパク質とリソソーム酵素である β -グルクロニダーゼ(lane f)が同定された。一方、トランスフェリン、5'-ヌクレオチダーゼ、ガラクトースに特異的なレクチンは内在性リガンドとしては同定されなかった(lane g)。ところで、同定された内在性リガンドの相対的な割合は粗面ミクロソームの場合とかなり異なっていた。これは Reinke⁸³⁾も指摘しているように、初代培養を行うときに培養中にデキサメタゾンを加えていることに起因するものと考えられる。

以上の結果から、肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドとして、 α_1 -マクログロブリン、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -酸性糖タンパク質の血清糖タンパク質の細胞内前駆体およびリソソーム酵素の β -グルクロニダーゼが同定された。

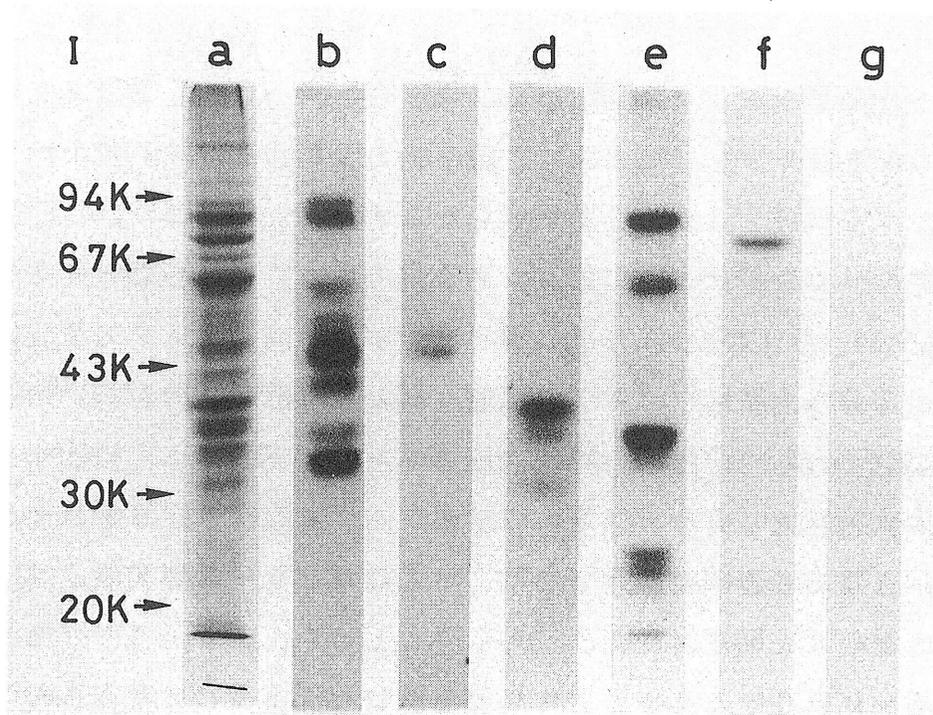


Fig.22. Western blot and immunodetection of endogenous ligands of primary cultured hepatocytes. Endogenous ligands isolated from hepatocytes ($5\mu g$) were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis in a 10% gel in the presence of sodium dodecyl sulfate. Following electrophoresis, protein bands were stained with Coomassie brilliant blue (lane a) or transferred to nitrocellulose membranes. Transferred proteins were treated with various specific antisera and resulting immunocomplexes were reacted with ^{125}I -protein A and detected by radioautography. Antisera used were anti-rat serum (lane b), anti-rat α_1 -antitrypsin (lane c), anti-rat α_1 -acid glycoprotein (lane d), anti-rat α_1 -macroglobulin (lane e), anti-rat liver lysosomal β -glucuronidase (lane f), anti-rat serum transferrin, and anti-rat liver 5'-nucleotidase and anti-rat liver galactose-specific lectin (lane g). The figures to the left refer to the molecular weight of standard proteins.

第5節 考察

マンナン結合タンパク質をSepharose 4Bに結合させたアフィニティークロマトグラフィーにより、肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドを単離し、その性質を明らかにすることができた。

内在性リガンドはすべて糖タンパク質であり、その糖鎖の大部分は $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ および $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ を主成分とする高マンノース型であった。大部分の内在性リガンドの代謝回転は速く、その約2/3の半減期は約45分であった。種々の特異的抗体を用いた実験から、粗面ミクロソームの内在性リガンドの8本の主要なバンドのうち、5本は血清糖タンパク質の細胞内前駆体であり、1本はリソソーム酵素の β -グルクロニダーゼと同定された。

細胞内に存在する高マンノース型糖タンパク質として考えられるのは、1. 血清糖タンパク質の細胞内前駆体、2. リソソーム酵素の前駆体および成熟酵素、3. ゴルジ装置や原形質膜など膜糖タンパク質の前駆体、4. 粗面小胞体固有のタンパク質の4群が考えられる。これらを区別する一つの方法は、その代謝的性質を調べることである。1~3群の生合成前駆体はいずれも代謝回転速度が速く、一方、リソソーム酵素は数日のオーダーの半減期をもつと報告されている⁸⁴⁾。本実験により明らかにされたように、内在性リガンドの約2/3は約45分の速い代謝回転速度をもつ。これらは血清糖タンパク質などの細胞内前駆体の性質とよく一致していた。事実、Western ブロッキングの手法により、分子量と特異的抗体との反応性から同定された内在性リガンドは、 α_1 -マクログロブリン、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -酸性糖タンパク質などの血清糖タンパク質が主成分であった。しかし、

同じ血清糖タンパク質のうちでもトランスフェリンは内在性リガンドとしては検出されなかった。

すべての血清糖タンパク質は生合成の過程で、いずれも同様の高マンノース型糖鎖をもつことが知られているため、上記の結果は、糖鎖構造それ自体以外にマンナン結合タンパク質との親和性を左右する他の要因の存在を示している。その1つに、タンパク質中の糖含量が考えられる。すなわち、マンナン結合タンパク質は卵白アルブミンのように高マンノース型糖鎖を1本だけもつ糖タンパク質よりも、 α -マンノシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、チログロブリンのように高マンノース型糖鎖を複数個もつ糖タンパク質により高い親和性をもつことが知られている⁴⁾。この結果は、糖鎖が複数個存在し、これらがクラスターを形成するとマンナン結合タンパク質に対する親和性が高くなることを示している。血清糖タンパク質の場合、内在性リガンドとして同定されたものの糖含量は、 α_1 -酸性糖タンパク質：41%⁷⁸⁾、 α_1 -アンチトリプシン：10.3%⁷⁷⁾、 α_1 -マクログロブリン：8%⁷⁶⁾であり、内在性リガンド画分に存在しなかったトランスフェリン：5.7%⁸⁵⁾より有意に高く、上記の推察を支持している。

約1/3の内在性リガンドは長い半減期を示し、前述の4群の糖タンパク質あるいは成熟リソソーム酵素のいずれかであると考えられた。マンナン結合タンパク質は、ブタ腎臓より精製した α -マンノシダーゼ³³⁾、ブタ脾臓より精製したカテプシンD³⁴⁾、ラット包皮腺より精製した β -グルクロニダーゼ³⁾のようなりソソーム酵素に高い結合親和性($K_i=10^{-6}\sim 10^{-9}M$)をもつことが示されている。一方、この章で示したように、小胞体内腔に局在する膜貫通タンパク質であり、高マンノース型糖鎖をもつことが示されているアシルスルファターゼCは

マンナン結合タンパク質-Sepharose 4Bカラムに全く結合しなかった。また、5'-ヌクレオチダーゼ、ガラクトースに特異的なレクチンのような原形質膜やゴルジ装置に存在する膜糖タンパク質も、粗面小胞体では高マンノース型糖鎖をもつと考えられるにもかかわらずマンナン結合タンパク質-Sepharose 4Bカラムに結合しなかった。従って、長い半減期をもつ内在性リガンドの主成分は、リソソーム酵素であると考えられた。

ところで、ここに示した膜タンパク質はいずれもかなり高い糖含量をもち、マンナン結合タンパク質に対する親和性の低さを、それらの糖含量により説明することはできなかった。すなわち、マンナン結合タンパク質に結合した β -グルクロニダーゼの糖含量は10%⁸⁶⁾、マンナン結合タンパク質に結合しなかったガラクトースに特異的なレクチンでは10%⁸¹⁾、アリルスルファターゼCでは8.1%⁸²⁾であった。これらの糖タンパク質の結合性の差については現在のところ明確な説明は困難であるが、おそらく糖タンパク質の三次構造がマンナン結合タンパク質による糖鎖の認識に重要であると考えられる。この推論と関連して、MaynardとBaenzigerは、リボヌクレアーゼBを還元アルキル化すると、マンナン結合タンパク質に対する親和性が70倍高まることを報告している¹³⁾。

以上の結果から、肝臓マンナン結合タンパク質は、粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内膜系に含まれており、いくつかの血清糖タンパク質やリソソーム酵素の前駆体を内在性リガンドとして、これらと結合した状態で存在していることが示された。また、リソソームに検出されたマンナン結合タンパク質の内在性リガンドはリソソーム酵素であると考えられた。

なお、内在性リガンドの単離にはウサギ血清マンナン結合タンパク質-Sepharose 4B カラムを用いた。これは、ウサギ血清マンナン結合タンパク質がラット肝臓マンナン結合タンパク質に比べ容易に大量に調製することができるためである^{7,8)}。ウサギ血清マンナン結合タンパク質-Sepharose 4B カラムを用いて単離した内在性リガンドのほとんどは、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したのちもラット肝臓マンナン結合タンパク質に結合したこと(Fig.21B lane h)、また、³H-グルコサミンで1時間標識した初代培養肝細胞からウサギ血清マンナン結合タンパク質-Sepharose 4B カラムを用いて単離した内在性リガンドを、ラット肝臓マンナン結合タンパク質-Sepharose 4B カラムにかけると、すべての放射活性がカラムに結合したことから、ウサギ血清マンナン結合タンパク質を用いてもラット肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドが単離できていると考えられる。

実験の部

1. 試薬

Na¹²⁵I(carrier free)、¹²⁵I-プロテインA(30mCi/mg)、D-[1-³H]ガラクトース(10.4Ci/mmol)、D-[1-³H]マンノース(10.4Ci/mmol)、L-[4,5-³H]ロイシン(131Ci/mmol)とD-[1-³H]グルコサミン-塩酸(3.7Ci/mmol)はAmersham社より購入した。マンナン、マンナン-Sepharose 4B とラット肝臓マンナン結合タンパク質は第1章に示した方法により調製した。ウサギ血清マンナン結合タンパク質は小堤らの方法⁷⁾により調製した。Streptomyces griseus由来のエンドβ-N-アセチルグルコサミニダーゼHは生化学工業より、Arthrobacter ureafaciens由来の

ノイラミニダーゼは半井化学より、プロナーゼPは科研化学より購入した。Aspergillus saitoi由来の $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合に特異的なマンノシダーゼは東京農工大学の一島先生より恵与された。

2. マンナン結合タンパク質-Sepharose 4Bの調製

CuatrecasasとAnfinsenのブロムシアン活性化法⁸⁷⁾を用いて調製した。ラット肝臓マンナン結合タンパク質はエタノール沈澱法⁵⁾によりトリトン X-100を除いたのち用いた。ラット肝臓マンナン結合タンパク質あるいはウサギ血清マンナン結合タンパク質と、ブロムシアンで活性化したSepharose 4Bとを0.1M マンノースと10mM CaCl₂を含む0.1 M 重炭酸緩衝液(pH8.6)中で、4℃で一晩反応させた。Sepharose 4B 1 mlに対し約1 mgのマンナン結合タンパク質が結合した。

3. 抗体の調製

ラット肝臓リソソームの β -グルクロニダーゼとラット肝臓5'-ヌクレオチダーゼに対する抗体は九州大学薬学部の加藤敬太郎先生より恵与された。ラット血清 α_1 -マクログロブリンと α_1 -アンチトリプシンに対する抗体は近畿大学医学部の篠原兵庫先生より恵与された。ラット血清トランスフェリンに対する抗体は関西医科大学の中田博先生、田代裕先生より恵与された。ラット肝臓のガラクトースに特異的なレクチンに対する抗体は川寄らの方法⁸⁸⁾により調製した。ラット血清 α_1 -酸性糖タンパク質に対する抗体は与島らの方法⁸⁹⁾により、アシアロ α_1 -酸性糖タンパク質を抗原として調製した。全ラット血清に対する抗体はMKB社より購入した。

4. 肝臓マンナン結合タンパク質および内在性リガンドの定量

第2章に示した方法により測定した。

5. 細胞内オルガネラの調製

粗面ミクロソームおよびリソソームは第2章に示した方法により調製した。

6. 肝実質細胞の初代培養

肝実質細胞は第1章に示した方法を無菌操作に改良して調製した。William's E 培地に10%牛血清を加え、5 mM HEPESと15mM NaHCO₃を用いてpH7.4に調整し、さらにペニシリンG (100U/ml)、ストレプトマイシン(100 μg/ml)、デキサメタゾン(5×10⁻⁶M)、インシュリン(1×10⁻⁷M)を加えた。単離した細胞をこの培地に懸濁し、5~6×10⁶個ずつ直径100mmのプラスチックペトリ皿にまき、CO₂インキュベーター中で37℃で培養した。4時間後、培地を交換して付着していない細胞を除き、さらに37℃で一晩培養した。

7. 初代培養肝細胞の標識

肝細胞をプラスチックペトリ皿にまいてから約20時間後に、種々のアイソトープで標識した。³H-マンノース(10 μCi/dish)、³H-グルコサミン(25 μCi/dish)および³H-ガラクトース(25 μCi/dish)はEagle's minimum essential mediumを20mM HEPESでpH7.4に調整し、5%牛血清、デキサメタゾン(5×10⁻⁶M)、インシュリン(1×10⁻⁷M)およびカナマイシン(6 μg/ml)を加えた培地に溶かして用いた。³H-ロイシン(25 μCi/dish)は上記の培地から無標識のロイシンを除いた培地に溶かして用いた。標識終了後、細胞を0.1mMの各々の無標識の糖あるいはロイシンを含むPBS(phosphate-buffered saline, pH7.2)で2回洗浄し、0.1%グルコースを加えたPBS中で0.25%トリプシンと室温で3~4分間インキュベートしてペトリ皿からはがした。遊離した細胞を集め、PBSで2回洗浄後実験に用いた。

8. 糖鎖構造の解析法

細胞の全タンパク質および単離した内在性リガンドの糖鎖構造は、小堤ら³³⁾および中尾ら³⁴⁾の方法に準じて解析した。

³H-グルコサミンで1時間あるいは24時間標識した初代培養肝細胞の全タンパク質(7~9 mg)、あるいは、そこから単離した内在性リガンド(40 μg)を、リン酸基(マンノース 6-リン酸)を保護するため0.2M グルコース 6-リン酸と0.1M β-メルカプトエタノール存在下で7日間プロナーゼPで消化した。得られたオリゴ糖をSephadex G-25 カラム(1.5×60cm)で分離したのち、エンドβ-N-アセチルグルコサミニダーゼH(55mU)で48時間消化した。遊離した糖鎖をNaBH₄(10mg)で還元し、アミノ酸のN末端を無水酢酸(100 μl)でアセチル化したのち、AG1×2(0.7×11cm, Cl⁻ form, 100-200mesh)を用いたイオン交換クロマトグラフィーにかけた。素通り画分に回収された中性糖(N画分)は、Bio-Gel P-2(1.8×190cm, <-400mesh)カラムにより55℃でゲル濾過した。グルコースオリゴマーを分子量マーカーとして用いた⁹⁰⁾。中性糖の定量はHewittの方法⁹¹⁾により行った。AG1×2 カラムクロマトグラフィーにおいて10mM HClで溶出した画分(A I)は高崎らの方法⁹²⁾によりヒドラジン分解を行った。AG1×2カラム処理において1M NaClで溶出した画分(A II)はノイラミニダーゼ(0.1U)で3時間消化した。消化物は、同一条件下で再びAG1×2カラムにかけた。

9. 電気泳動

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動はLaemmliの方法⁹³⁾に従い、10%ポリアクリルアミドゲル濃度で行った。タンパク質はクーマシーブリリアントブルー R-250で染色した。³Hで標識したタンパク質はBonnerとLaskeyの方法⁹⁴⁾を用いたフルオログラフィーにより検出した。

WesternブロッティングはBurnetteの方法⁷⁴⁾に準じて行った。タンパク質をSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動したのち、ニトロセルロース膜に転写させ、種々の抗体(0.1mg IgG/ml)と反応させた。生成した免疫複合体を¹²⁵I-プロテインAと反応させ、オートラジオグラフィでバンドを検出した。肝臓マンナン結合タンパク質との反応性を調べる場合には、ニトロセルロース膜に転写したのち 0.9% NaCl、0.05% NaN₃および20mM CaCl₂を含む50mM トリス-塩酸緩衝液(pH7.6)中で、肝臓マンナン結合タンパク質(20μg/ml)と4℃で16時間反応させた。ニトロセルロース膜を上記の緩衝液で4回洗浄後、抗肝臓マンナン結合タンパク質抗体と90分間反応させた。この免疫複合体を20mM CaCl₂存在下で¹²⁵I-プロテインAと反応させ、オートラジオグラフィにかけた。

10. 酵素活性の測定

5'-ヌクレオチダーゼとヌクレオシドジホスファターゼは第2章に示した方法で測定した。リソソーム酵素は、それぞれの基質の4-メチルウンベリフェリル誘導体を用いて0.1M クエン酸緩衝液(pH4.6)中で測定した。アシルスルファターゼCは守安らの方法⁸²⁾により、アシルアシルアミダーゼは赤尾と大村の方法⁹⁵⁾により、カルボキシエステラーゼは Krischの方法⁹⁶⁾により測定した。ガラクトースに特異的なレクチンは PricerとAshwellの方法⁵⁷⁾により測定した。

11. 放射活性の測定

タンパク質に取り込まれた放射活性の測定は、試料中のタンパク質を5%リンタングステン酸を含む1.0M 塩酸により沈澱させ、生じた沈澱をエーテル-エタノール(1:3)で洗浄したのち測定する方法により行った。初代培養肝細胞を³H-ロイシン、³H-グルコサミン、³H-マン

ノースおよび ^3H -ガラクトースで1時間標識した場合、トリトンX-100抽出液中の放射活性のそれぞれ17、23、61および7%がタンパク質に取り込まれていた。これに対し、内在性リガンドの場合は、どのアイソトープで標識してもほとんどすべての放射活性がタンパク質に取り込まれていた。

12. タンパク質の定量

第1章に示した方法により測定した。

総括および結論

著者は、肝臓マンナン結合タンパク質とその内在性リガンドに関する生化学的研究を行い、次のような知見を得た。

1. 肝臓マンナン結合タンパク質は肝実質細胞に局在する。
2. 肝臓マンナン結合タンパク質は肝実質細胞表面には存在せず、粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内膜系の内腔に、膜にゆるく結合する形で存在する。
3. 肝細胞内には、肝臓マンナン結合タンパク質の拮抗的阻害物質(内在性リガンド)が存在し、粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内膜系において、ほとんどの肝臓マンナン結合タンパク質は内在性リガンドと結合した状態で存在する。リソソームには肝臓マンナン結合タンパク質は存在しないが、内在性リガンドが高度に濃縮されている。
4. 内在性リガンドは、 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ および $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ を主成分とする高マンノース型糖タンパク質である。内在性リガンドは、その代謝的性質により2群に大別され、約2/3は半減期約45分の速い代謝回転速度をもち、約1/3は長い半減期をもつ。
5. 粗面ミクロソームの内在性リガンドをWestern blottingの手法により解析したところ、主要な8本のバンドのうち5本は、 α_1 -マクログロブリン、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -酸性糖タンパク質などの血清糖タンパク質の細胞内前駆体、1本はリソソーム酵素である β -グルクロニダーゼと同定された。一方、アシルスルファターゼC、5'-ヌクレオチダーゼ、ガラクトースに特異的なレクチンのような膜タンパク質や、トランス

フェリンの細胞内前駆体は高マンノース型糖鎖をもっているにもかかわらず、マンナン結合タンパク質には結合しなかった。

以上の知見をもとに、肝臓マンナン結合タンパク質の生物学的意義について次のように総括した。

糖タンパク質の糖鎖の細胞内プロセシングの過程はすでによく知られている¹⁾。糖タンパク質はリボソームで合成されると同時に粗面小胞体内腔へ挿入され、脂質に結合した糖鎖生合成中間体から、一様に $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ の構造をもつ糖鎖が付加される。付加された糖鎖のうち、グルコース3分子は粗面小胞体において、グルコシダーゼⅠ,Ⅱの作用により直ちに除去される。小胞体固有の糖タンパク質は、このグルコースがはずれた $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ の糖鎖を主成分とする。血清糖タンパク質、原形質膜やゴルジ装置の膜タンパク質、リソソーム酵素などはゴルジ装置に運ばれたのち、それぞれの目的地へと輸送される。その際ゴルジ装置において、糖鎖が種々の修飾をうけることが知られている。すなわち、Fig.23に示すように、血清糖タンパク質や膜タンパク質の多くは、マンノシダーゼⅠ,ⅡおよびN-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼの作用により $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ の構造を経て、N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、シアル酸が順次付加され、複合型糖鎖へと変換される。一方、リソソーム酵素の多くは高マンノース型 ($\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2 \sim \text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$) の構造を保ったまま、あるいは、そのマンノースの6位にリン酸基が結合した糖鎖構造に変換されたのちリソソーム顆粒へ運ばれる。

著者は、第2章で、肝臓マンナン結合タンパク質とその内在性リガンドが、粗面小胞体からゴルジ装置に至る細胞内膜系の内腔において共存し、両者ともその約50%が粗面ミクロソームに見いだされること

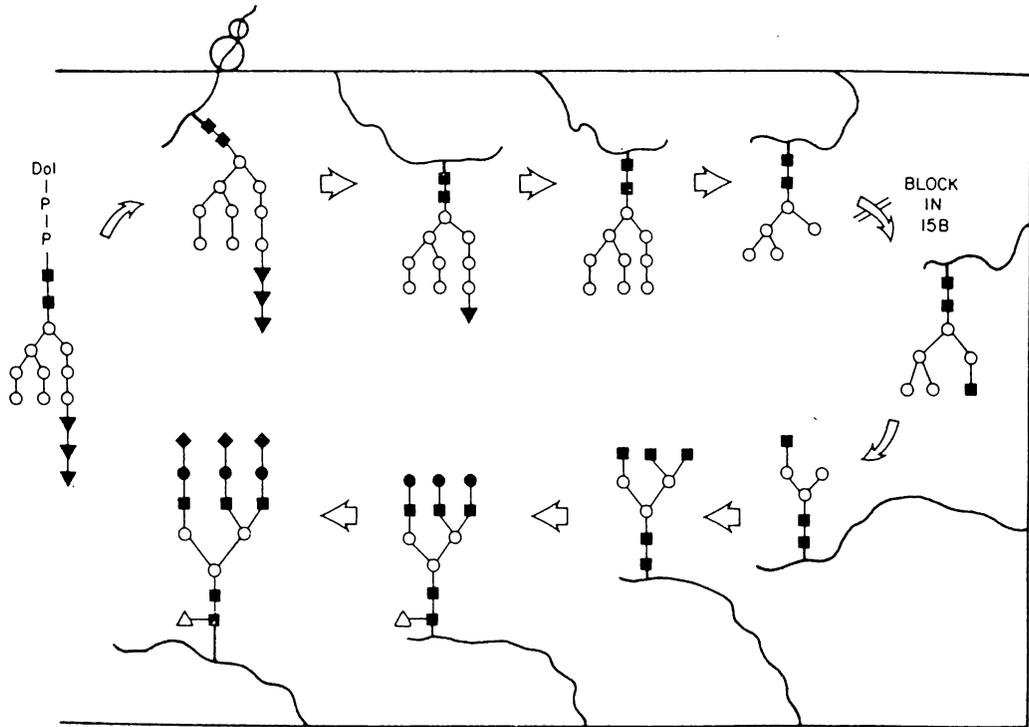


Figure 23. Proposed sequence for the processing of peptide-bound N-linked oligosaccharide chains: ■, N-acetylglucosamine residues; ○, mannose residues; ▼, glucose residues; ●, galactose residues; ◆, sialic acid residues; and △, fucose residues (Kornfeld *et al.*, 1978).

を示した。また、第3章で、肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドは $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ および $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ を主成分とする高マンノース型糖タンパク質であり、その代謝的性質から、大きく2群に大別されることを示した。Western ブロッキング法による同定と、マンナン結合タンパク質-Sepharose 4B カラムへの種々の酵素の結合性から、約2/3の速い代謝回転速度をもつ内在性リガンドは血清糖タンパク質の細胞内前駆体であり、約1/3の長い半減期をもつ内在性リガンドはリソソーム酵素であると考えられた。

以前より、ある種の血清糖タンパク質やリソソーム酵素の細胞内輸送には、その糖鎖部分が極めて重要な役割をはたすことが報告されて

いる^{20-24,97)}。たとえば、ツニカマイシンは糖鎖の脂質中間体の合成を阻害する薬物であるが⁹⁸⁾、細胞をツニカマイシンで処理すると多くのタンパク質の細胞内輸送を阻害し、糖鎖の付いていないタンパク質が粗面小胞体に蓄積される^{22,99-102)}。また、糖鎖の最初のプロセシング酵素である α -グルコシダーゼの阻害剤である1-デオキシノジリマイシン¹⁰³⁾で細胞を処理すると、グルコースの結合した糖鎖をもった糖タンパク質が粗面小胞体に蓄積し、その細胞内輸送が阻害される^{21-23,104)}。すなわち、1-デオキシノジリマイシンは、ラット初代培養肝細胞とヒト肝癌細胞において α_1 -アンチトリプシンの分泌を^{21,22,104)}、またヒト肝癌細胞において α_1 -アンチキモトリプシンと α_2 -マクログロブリン(ラット血中の α_1 -マクログロブリンと同じであると考えられている¹⁰⁵⁾)の分泌を^{22,104)}、さらにヒト線維芽細胞において β -ヘキソサミニダーゼやカテプシンDのようなリソソーム酵素の細胞内輸送²³⁾を阻害する。

また、 α_1 -アンチトリプシンには、いくつかの遺伝的変異種が知られている¹⁰⁶⁾。このうち、Z変異種は点突然変異により342番目のグルタミン酸がリジンに置換されている。Z変異種の血中濃度は正常タンパク質の約15%と低く、大部分は肝臓の粗面ミクロソームに蓄積されている。Z変異種をもつ人は北ヨーロッパ人の約3%にも達し、この患者では、 α_1 -アンチトリプシンの血中濃度の低下と肝臓での蓄積により、肺気腫および肝硬変になりやすいと報告されている。正常な α_1 -アンチトリプシンは3本の複合型糖鎖をもつ¹⁰⁷⁾が、肝臓中に蓄積されているZ変異種の糖鎖は高マンノース型で、さらにグルコースが2分子結合していることが示されている¹⁰⁸⁾。この結果は、培養肝細胞を1-デオキシノジリマイシンで処理した結果^{21,22,104)}とよく一

致しており、粗面小胞体で付加された糖鎖からグルコースが除去されないとゴルジ装置へ細胞内輸送されないことを示している。従って、これらの糖タンパク質の細胞内輸送における糖鎖の意義は立体構造の保持やプロテアーゼに対する安定性の確保ではなく、グルコース残基が除去された高マンノース型糖鎖が細胞内輸送機構に直接関与しているものと考えられる。

しかし、すべての糖タンパク質の細胞内輸送に糖鎖部分が関与しているわけではない。1-デオキシノジリマイシンは、ヒト肝癌細胞において補体成分C3やトランスフェリンの分泌は阻害しない^{22,104)}。ツニカマイシンも同様に、ヒト肝癌細胞やラット初代培養肝細胞において、 α_1 -マクログロブリン、 α_1 -アンチトリプシン、セルロプラスミン、 α_1 -酸性糖タンパク質の分泌を阻害するが、フィブロネクチン、フィブリノーゲン、トランスフェリン、ガラクトースに特異的なレクチンの細胞内輸送を阻害しないといわれている^{22,99-102)}。

なおここで、グルコース残基の除去のみを阻害する1-デオキシノジリマイシンで細胞内輸送が阻害されるものは、糖鎖の付加全体を阻害するツニカマイシンによっても阻害され、1-デオキシノジリマイシンで阻害されないものはツニカマイシンによって阻害されていないことは興味深い。すなわち、リボソームで合成されてからすべて同様に粗面小胞体を経てゴルジ装置へ運ばれ、種々の修飾を受ける糖タンパク質も、その細胞内輸送が糖鎖部分に依存するものとししないものに大別されることを示しているからである。また、細胞内輸送が糖鎖部分に依存する血清糖タンパク質は、依存しないものに比べその細胞内輸送の速度が速いことも報告されている^{20,22,109,110)}。

本研究により、肝臓マンナン結合タンパク質の内在性リガンドとし

て同定された α_1 -マクログロブリン、 α_1 -アンチトリプシン、 α_1 -酸性糖タンパク質は、いずれもその細胞内輸送が糖鎖部分に依存し、その細胞内輸送が速いものに含まれている。一方、肝臓マンナン結合タンパク質に結合しなかったトランスフェリンやガラクトースに特異的なレクチンは、その細胞内輸送が糖鎖部分に依存しないものに含まれる。これらの結果は、マンナン結合タンパク質の認識機構と、糖タンパク質の細胞内輸送に関与する機構が同じ特異性をもつことを示しており、肝臓マンナン結合タンパク質がある種の糖タンパク質、すなわち、細胞内輸送が高マンノース型糖鎖部分に依存する糖タンパク質のキャリアーとしてその細胞内輸送を促進する可能性を強く示唆している。

リソソーム酵素に関しては、マンノース 6-リン酸を認識するレクチンが、線維芽細胞においてリソソーム酵素のリソソーム顆粒内への組み込みに関与することが示されている^{58,59)}。しかし一方では、マンノース 6-リン酸残基合成能を欠く I-Cell 病などの患者においても、肝細胞や白血球などではリソソーム酵素のリソソーム顆粒内への蓄積が正常に行われていることも示されており、これらの組織では別の機構が働いていると考えられている¹¹¹⁾。従って、肝臓において肝臓マンナン結合タンパク質がリソソーム酵素のリソソーム顆粒内への組み込みに関与していることも十分に考えられる。リソソーム顆粒内に肝臓マンナン結合タンパク質は検出されなかったが、線維芽細胞においてマンノース 6-リン酸に特異的なレクチンもリソソームには存在しない¹¹²⁾。従って、これらのレクチンは、リソソーム酵素をリソソーム顆粒内に運んだのち、すみやかにゴルジ装置にもどり、その結果、単離したリソソーム顆粒にはレクチンは検出されず、運ばれたり

リソソーム酵素だけが存在していると考えられる。

肝臓マンナン結合タンパク質とリガンドとの結合にはカルシウムイオンが必要である($K_m=0.2M$)。またこの結合はpHに依存し、中性から弱アルカリ性では安定であるが、pH5.0以下では完全に解離する⁵⁾。小胞体には、カルシウムイオンをオルガネラ内に取り込む機構が存在し、その内腔のカルシウムイオン濃度は数mMオーダーであると考えられる^{113,114)}。ゴルジ装置やリソソーム内のカルシウムイオン濃度は不明であるが、リソソーム内のpHが酸性であることはよく知られている。また最近、ゴルジ装置のトランス面には H^+ -ポンプが存在し、その内腔のpHは酸性であることが示されている^{115,116)}。従って、肝臓マンナン結合タンパク質は粗面小胞体でリガンドと結合し、ゴルジ装置のトランス面あるいはリソソームへリガンドを運んだのち、リガンドと解離すると考えられ、糖タンパク質の細胞内輸送のキャリアーとして適切な調節機構を有していることになる。

また、肝臓マンナン結合タンパク質の役割に関しては、ラクトース結合タンパク質の機能として提唱されているように¹¹⁷⁾、ゴルジ装置において、種々のグリコシダーゼやグリコシルトランスフェラーゼの活性を調節し、糖鎖のプロセッシング機構に関与している可能性も考えられる。

以上の知見を総合すると、本研究は肝臓マンナン結合タンパク質が血清糖タンパク質の粗面小胞体からゴルジ装置への細胞内輸送や、リソソーム酵素のリソソーム顆粒内への組み込み機構のキャリアーとして、あるいは、糖鎖のプロセッシング反応の調節タンパク質として重要な意味をもつことを初めて示したものと見える。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に終始御懇意なる御指導と御鞭撻を賜りました恩師京都大学薬学部山科郁男教授に深甚の謝意を表わします。

また、本研究の御指導をして下さいました京都大学薬学部川崎敏祐助教授に深く感謝致します。さらに本研究に際し、種々の有益な御助言を賜りました岐阜薬科大学林恭三教授に謹んで感謝致します。

また、本研究に種々の御助言と御協力をいただいた船越育雄博士、菅原一幸博士をはじめとする京都大学薬学部生物化学教室員の方々に感謝致します。

文 献

- 1) Hubbard, S.C. and Ivatt, R.J. (1981) *Ann. Rev. Biochem.*, 50, 555-583.
- 2) Neufeld, E.F. and Ashwell, G. (1980) *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*, pp.241-266, Plenum Press, New York.
- 3) Kawasaki, T., Etoh, R. and Yamashina, I. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 81, 1018-1024.
- 4) Kawasaki, T., Mori, K., Oka, S., Kawasaki, N., Kozutsumi, Y. and Yamashina, I. (1986) *Vertebrate Lectins*, pp.92-107, Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- 5) Mizuno, Y., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 4247-4252.
- 6) Oka, S., Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, 241, 95-105.
- 7) Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95, 658-664.
- 8) Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1981) *J. Biochem.*, 90, 1799-1807.
- 9) Kawasaki, N., Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1983) *J. Biochem.*, 94, 937-947.
- 10) Kawasaki, N., Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1985) *J. Biochem.*, 98, 1309-1320.
- 11) Kawasaki, T., Mizuno, Y., Masuda, T. and Yamashina, I. (1980)

- J.Biochem., 88, 1891-1894.
- 12) Townsend,R. and Stahl,P.(1981) Biochem.J.,194, 209-214.
 - 13) Maynard,Y. and Baenziger,J.U.(1982) J.Biol.Chem., 257, 3788-3794.
 - 14) Wild,J., Robinson,D. and Winchester,B.(1983) Biochem.J., 210, 167-174.
 - 15) Brownell,M.D., Colley,K.J. and Baenziger,J.U.(1984) J.Biol.Chem., 259, 3925-3932.
 - 16) Taylor,M.E. and Summerfield,J.A.(1984) FEBS Lett., 173, 63-66.
 - 17) Summerfield,J.A. and Taylor,M.E.(1986) Biochim.Biophys. Acta, 883, 197-206.
 - 18) Mori,K., Kawasaki,T. and Yamashina,I.(1983) Arch.Biochem. Biophys., 222, 542-552.
 - 19) Mori,K., Kawasaki,T. and Yamashina,I.(1984) Arch.Biochem. Biophys., 232, 223-233.
 - 20) Lodish,H.F., Kong,N., Snider,M. and Strous,G.J.A.M. (1983) Nature, 304, 80-83.
 - 21) Gross,U., Andus,T., Tran-Thi,T.-A., Schwarz,R.T., Decker, K. and Heinrich,P.C.(1983) J.Biol.Chem., 258, 12203-12209.
 - 22) Lodish,H.F. and Kong,N.(1984) J.Cell Biol., 98, 1720-1729.
 - 23) Lemansky,P., Gieselmann,V., Hasilik,A. and von Figura,K. (1984) J.Biol.Chem., 259, 10129-10135.
 - 24) Gross,U., Steube,K., Tran-Thi,T.-A., McDowell,W., Schwarz, R.T., Decker,K., Gerok,W. and Heinrich,P.C. (1985) Eur.J.

- Biochem., 150, 41-46.
- 25) Blouin, A., Bolender, R.P. and Weibel, E.R. (1977) J. Cell Biol., 72, 441-455.
 - 26) Ashwell, G. and Moréll, A.G. (1974) Adv. Enzymol., 41, 99-128.
 - 27) Stahl, P., Schlesinger, P.H., Rodman, J.S. and Doebber, T. (1976) Nature, 264, 86-88.
 - 28) Baynes, J.W. and Wold, F. (1976) J. Biol. Chem., 251, 6016-6024.
 - 29) Sahagian, G.G., Distler, J. and Jourdian, G.W. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4289-4293.
 - 30) Fischer, H.D., Creek, K.E. and Sly, W.E. (1982) J. Biol. Chem., 257, 9938-9943.
 - 31) Prieels, J.P., Pizzo, S.U., Glasgow, L.R., Paulson, J.C. and Hill, R.L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2215-2219.
 - 32) Lehrman, M.A. and Hill, R.L. (1981) Fed. Proc., 40, 1820.
 - 33) Kozutsumi, Y., Nakao, Y., Teramura, T., Kawasaki, T., Yamashina, I., Mutsaers, J.H.G.M., van Halbeek, H. and Vliegthart, J.F.G. (1986) J. Biochem., 99, 1253-1265.
 - 34) Nakao, Y., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T., Yamashina, I., van Halbeek, H. and Vliegthart, J.F.G. (1984) Arch. Biochem. Biophys., 229, 43-54.
 - 35) Steer, C.J. and Clarenburg, R. (1979) J. Biol. Chem., 254, 4457-4461.
 - 36) Krebs, H.A., Cornell, N.W., Lung, P. and Hemes, R. (1974) Regulation of Hepatic Metabolism, pp.726-750, Academic

Press, New York.

- 37) Stahl, P.D., Rodman, J.S., Miller, M.J. and Schlesinger, P.H.
(1978) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 75, 1399-1403.
- 38) Shepherd, V.L., Lee, Y.C., Schlesinger, P.H. and Stahl, P.D.
(1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1019-1022.
- 39) Lee, Y.C. and Ballou, C.E. (1965) Biochemistry, 4, 257-264.
- 40) Nakajima, T. and Ballou, C.E. (1974) J. Biol. Chem., 249,
7679-7684.
- 41) Akasaki, M., Suzuki, M., Funakoshi, I. and Yamashina, I.
(1976) J. Biochem., 80, 1195-1200.
- 42) Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S. (1963) Biochem.
J. 89, 114-123.
- 43) Putnam, F.W., Tan, M., Lynn, L.T., Easley, C.W. and Migita, S.
(1962) J. Biol. Chem., 237, 717-726.
- 44) Berry, M.N. and Friend, D.S. (1969) J. Cell Biol., 43, 506-
520.
- 45) Munthe-Kaas, A.C. and Seglen, P.O. (1974) FEBS Lett., 43,
252-256.
- 46) Weber, K. and Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.
- 47) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.
(1951) J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- 48) Hudgin, R.L., Pricer, W.E., Jr., Ashwell, G., Stockert, R.J.
and Moréll, A.G. (1974) J. Biol. Chem., 249, 5536-5543.
- 49) De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and
Appelmans, F. (1955) Biochem. J., 60, 604-617.

- 50) Petermann, M.L. and Pavlovec, A. (1961) *J. Biol. Chem.*, 236, 3235-3239.
- 51) Sabatini, D.D., Tashiro, Y. and Palade, G.E. (1966) *J. Mol. Biol.*, 19, 503-524.
- 52) Dallner, G., Siekevits, P. and Palade, G.E. (1966) *J. Cell Biol.*, 30, 73-96.
- 53) Kuriyama, Y. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247, 2979-2988.
- 54) Ito, A. and Sato, R. (1969) *J. Cell Biol.*, 40, 179-189.
- 55) Kreibich, G., Debey, P. and Sabatini, D.D. (1973) *J. Cell Biol.*, 58, 436-462.
- 56) Neville, D.M., Jr. (1976) *Biochemical Analysis of Membranes*, pp. 27-54, Wiley, New York.
- 57) Pricer, W.E., Jr. and Ashwell, G. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 7539-7544.
- 58) Hasilik, A. and Neufeld, E.F. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 4946-4950.
- 59) Goldberg, D.E. and Kornfeld, S. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 3159-3165.
- 60) Fischer, H.D., Gonzalez-Noriega, A., Sly, W.S. and Morré, D.J. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 9608-9615.
- 61) Campbell, C.H., Fine, R.E., Squicciarini, J. and Rome, L.H. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 2628-2633.
- 62) Ehrenreich, J.H., Bergeron, J.J.M., Siekevitz, P. and Palade, G.E. (1973) *J. Cell Biol.*, 59, 45-72.
- 63) Tsuji, H., Hattori, N., Yamamoto, T. and Kato, K. (1977)

- J.Biochem., 82, 619-636.
- 64) Ray, T.K. (1970) Biochim. Biophys. Acta, 196, 1-9.
- 65) Appelmans, F. and De Duve, C. (1955) Biochem. J., 59, 426-433.
- 66) Nordlie, R.C. and Arion, W.J. (1966) Methods in Enzymology, Vol. 9, pp. 619-625, Academic Press, New York.
- 67) Yamazaki, M. and Hayaishi, O. (1968) J. Biol. Chem., 243, 2934-2942.
- 68) Emmelot, P. and Bos, C.J. (1966) Biochim. Biophys. Acta, 120, 369-382.
- 69) Chen, P.S., Toribara, T.Y. and Warner, H. (1956) Anal. Chem., 28, 1756-1758.
- 70) Hudgin, R.L. and Ashwell, G. (1974) J. Biol. Chem., 249, 7369-7372.
- 71) Omura, T. and Takesue, S. (1970) J. Biochem., 67, 249-259.
- 72) Ochoa, S. (1955) Methods in Enzymology, Vol. 1, pp. 735-739, Academic Press, New York.
- 73) Seglen, P.O. (1976) Methods in Cell Biology, 13, 29-83.
- 74) Burnette, W.N. (1981) Anal. Biochem., 112, 195-203.
- 75) Arias, I.M., Doyle, D. and Schimke, R.T. (1969) J. Biol. Chem., 244, 3303-3315
- 76) Saito, A. and Shinohara, H. (1985) J. Biochem., 98, 501-516.
- 77) Takahara, H., Nakayama, H. and Shinohara, H. (1980) J. Biochem., 88, 417-424.
- 78) Schmid, K. (1975) The Plasma Proteins, pp. 183-228, Academic Press, New York.

- 79) Himeno, M., Nishimura, Y., Tsuji, H., and Kato, K. (1976) *Eur. J. Biochem.*, 70, 349-359.
- 80) Evans, W. H. and Gurd, J. W. (1973) *Biochem. J.*, 133, 189-199.
- 81) Kawasaki, T. and Ashwell, G. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251, 5292-5299.
- 82) Moriyasu, M., Ito, A. and Omura, T. (1982) *J. Biochem.*, 92, 1189-1195.
- 83) Reinke, R. and Feigelson, P. (1985) *J. Biol. Chem.*, 260, 4397-4403.
- 84) Tsuji, H. and Kato, K. (1977) *J. Biochem.*, 82, 637-644.
- 85) Putnum, F. W. (1975) *The Plasma Proteins*, pp. 265-316, Academic Press, New York.
- 86) Himeno, M., Nishimura, Y., Takahashi, K. and Kato, K. (1976) *J. Biochem.*, 83, 511-518.
- 87) Cuatrecasas, P., and Anfinsen, C. B. (1971) *Methods in Enzymology*, 22, 345-378.
- 88) Kawasaki, T., Ii, M., Kozutsumi, Y. and Yamashina, I. (1986) *Carb. Res.*, 151, 197-206.
- 89) Yoshima, H., Matsumoto, A., Mizuochi, T., Kawasaki, T. and Kobata, A. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 8476-8484.
- 90) Yamashita, K., Mizuochi, T. and Kobata, A. (1982) *Methods in Enzymology*, Vol. 83, pp. 105-126, Academic Press, New York.
- 91) Hewitt, L. F. (1937) *Biochem. J.*, 31, 360-366.
- 92) Takasaki, S., Mizuno, T. and Kobata, A. (1982) *Methods in Enzymology*, Vol. 83, pp. 263-268, Academic Press, New York.

- 93) Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, 227, 680-685.
- 94) Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974) *Eur. J. Biochem.*, 46, 83-88.
- 95) Akao, T. and Omura, T. (1972) *J. Biochem.*, 72, 1245-1256.
- 96) Krisch, K. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, 122, 265-280.
- 97) Olden, K., Parent, J.B. and White, S.L. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 650, 209-232.
- 98) Elbein, A.D. (1981) *Trends Biochem. Sci.*, 6, 219-223.
- 99) Struck, D.K., Siuta, P.B., Lane, M.D. and Lennarz, W.J. (1978) *J. Biol. Chem.*, 253, 5332-5337.
- 100) Edwards, K., Nagashima, M., Dryburgh, H., Wykes, A. and Schreiber, G. (1979) *FEBS Lett.*, 100, 269-272.
- 101) Breitfeld, P.P., Rup, D. and Schwarz, A.L. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 10414-10421.
- 102) Bawer, H.C., Parent, J.B. and Olden, K. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 128, 368-375.
- 103) Saunier, B., Kilker, R.K., Jr., Tkacz, J.S., Quaroni, A. and Herscovics, A. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257, 14155-14161.
- 104) Yeo, K.-T., Yeo, T.-K., Olden, K. and Parent, J.B. (1984) *J. Cell Biol.*, 99, 99a.
- 105) Gordon, A.H. (1976) *Biochem. J.*, 159, 643-650.
- 106) Carrell, R.W., Jeppsson, J.-O., Laurell, C.-B., Brennan, S.O., Owen, M.C., Vaughan, L. and Boswell, D.R. (1982) *Nature*, 298, 329-333.
- 107) Mega, T., Lujan, E. and Yoshida, A. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255,

- 4053-4061.
- 108) Bathurst, I.C., Travis, J., George, P.M. and Carrell, R.W.
(1984) FEBS Lett., 177, 179-183.
- 109) Parent, J.B., Bauer, H.C. and Olden, K. (1985) Biochim.
Biophys. Acta, 846, 44-50.
- 110) Yeo, K.-T., Parent, J.B., Yeo, T.-K., and Olden, K. (1985)
J. Biol. Chem., 260, 7896-7902.
- 111) Owada, M. and Neufeld, E.F. (1982) Biochem. Biophys. Res.
Commun., 105, 814-820.
- 112) Sahagian, G.G. and Neufeld, E.F. (1983) J. Biol. Chem., 258,
7121-7128.
- 113) Kraus-Friedmann, N., Carafoli, E., Biber, J. and Murer, H.
(1982) Ann. N.Y. Acad. Sci., 402, 440-442.
- 114) Heilmann, C., Spamer, C. and Gerok, W. (1984) J. Biol. Chem.,
259, 11139-11144.
- 115) Zhang, F. and Schneider, D.L. (1983) Biochem. Biophys. Res.
Commun., 114, 620-625.
- 116) Barr, R., Safranski, K., Sun, I.L., Crane, F.L. and Morr e, D.J.
(1984) J. Biol. Chem., 259, 14064-14067.
- 117) Scudder, P., Childs, R.A. and Feizi, T. (1982) Biochem.
Biophys. Res. Commun., 104, 272-279.