

主論文

薬
76 函
1-0

ラット肝細胞ミトコンドリアに存在する  
糖タンパク質糖鎖の生化学的および免疫  
化学的研究

伊藤 信行

ラット肝細胞ミトコンドリアに存在する  
糖タンパク質糖鎖の生化学的および免疫  
化学的研究

伊 藤 信 行

# 目 次

序 論	1
第 1 章 ラット肝細胞ミトコンドリアに存在する糖タンパク質糖鎖の生化学的研究	3
第 1 節 肝細胞ミトコンドリアの糖組成の決定および糖ペプチドの単離	4
第 2 節 肝細胞ミトコンドリアの糖タンパク質糖鎖のミトコンドリア内分布	10
第 3 節 肝細胞ミトコンドリアの糖タンパク質糖鎖の代謝	13
第 4 節 ミトコンドリアのエネルギー依存性の $\text{Ca}^{2+}$ の取り込みに対するコンドロイチナーゼABCの影響	15
第 5 節 ミトコンドリアの外膜酵素のトリプシン感受性に対するコンドロイチナーゼABCの影響	18
第 6 節 考察ならびに総括	24
実験の部	30
第 2 章 ラット肝細胞ミトコンドリアに存在する糖タンパク質糖鎖の免疫化学的研究	36
第 1 節 抗マンナン抗体の調製とその性質	37
第 2 節 抗マンナン抗体と糖タンパク質糖鎖との交叉反応	39
第 3 節 抗マンナン抗体とミトコンドリアの糖タンパク質糖鎖との交叉反応	46
第 4 節 考察ならびに総括	51
実験の部	53
結 論	55
謝 辞	56
引用文献	57

## 序 論

動物細胞の膜系は主としてタンパク質と脂質より成るが、少量ながら複合糖質も普遍的に含むことが明らかにされている。<sup>1)</sup> 膜系に存在する複合糖質としては糖タンパク質、糖脂質およびプロテオグリカンが確認されており、特に、糖タンパク質は膜系の複合糖質の主成分であると言われている。<sup>1)</sup> この膜系に存在する複合糖質の糖鎖の一次構造および膜における存在状態は細胞の悪性腫瘍化、分裂周期および細胞の分化の度合に従って変化することが観察されている。<sup>1)</sup>

著者の属する研究室ではラット正常肝細胞の膜系の糖タンパク質についての研究が行われ、原形質膜<sup>2),3)</sup>、滑面および粗面小胞体膜<sup>4),19)</sup> および核膜<sup>5)</sup> に存在する糖タンパク質の糖鎖の化学的および代謝的性質が明らかにされた。それによれば、各膜系に存在する糖タンパク質の糖鎖の化学的および代謝的性質は各膜系に特徴的である。膜系に存在する糖タンパク質の糖鎖の生物学的役割は未だ明らかにされていないが、これらの知見はその生物学的役割を明らかにする上で、極めて有用な知見と考えられる。

従って、著者は肝細胞膜系の一つであるミトコンドリアの存在する糖タンパク質の糖鎖の化学的および代謝的諸性質を明らかにし、既に明らかにされている肝細胞の他膜系に存在する糖タンパク質の糖鎖の諸性質と比較検討した。その結果、ミトコンドリアに存在する糖タンパク質の糖鎖の性質はミトコンドリアに特徴的であることが明らかになった。

次に、このミトコンドリアに存在する糖タンパク質のミトコンドリア内分布を調べるために、ミトコンドリアを外膜、膜間部、内膜および礎質に細分画し、各画分の糖組成を調べた。ミトコンドリアに存在する糖タンパク質の内の約60%が膜間部に存在し、残りは外膜および内膜にほぼ等量ずつ分布し、タンパク質の最も多い礎質には糖タンパク質はほとんど存在しないことが明らかになった。また、ミトコンドリアの糖タンパク質のあるものはミトコンドリアの外表面に露出して存在することが明らかになった。

更に、これらの糖タンパク質の生合成部位を明らかにし、ミトコンドリアの形成機構の一部を明らかにする目的で、これらの糖タンパク質の代謝的性質を調べた。ミトコンドリアに存在する糖タンパク質の大部分はミトコンドリア以外の場所、おそらくはミクロゾームで合成されてからミトコンドリアに組み込まれていることが明らかになった。しかし、ミトコンドリアの内膜に存在する糖タンパク質はミトコンドリア内で合成されている可能性が強く示唆された。

従来、細胞間質にのみ存在すると考えられていたムコ多糖が原形質膜<sup>37),38)</sup> においてその存在が見い出され、細胞膜成分としてのムコ多糖が注目されている。ミトコンドリアにおいてもム

コ多糖の存在を調べたところ、微量ながらB型のコンドロイチン硫酸が検出され、このムコ多糖はミトコンドリアの外表面を覆っていることが明らかになった。

細胞膜系の糖タンパク質の糖鎖の生物学的役割を明らかにするための一つの手段として糖鎖に特異性をもつ抗体を細胞化学的試薬として用いることが考えられるが、一般に、糖タンパク質は主としてペプチド部分に抗原性を有し、糖鎖に特異性をもつ抗体は調製し難いことが示されている。<sup>6)</sup> 一方、酵母の細胞表層多糖であるマンナンに対する抗体は特定のオリゴマンノシド鎖に特異的であることが示されている。<sup>7), 8)</sup> 従って、著者は抗マンナン抗体と糖タンパク質の糖鎖との交叉反応性を調べた。その結果、抗マンナン抗体はマンノースを非還元末端にもつ種々の中性糖鎖と反応することが明らかになった。ミトコンドリアに存在する中性糖鎖も抗マンナン抗体と反応した。抗マンナン抗体はこれらの糖鎖を識別する有用な細胞化学的試薬になり得ることが明らかになった。以下、これらの諸点を中心として研究結果を述べる。

## 第1章 ラット肝細胞ミトコンドリアに存在する糖タンパク質糖鎖の生化学的研究

肝細胞ミトコンドリアは肝細胞膜系の内、代表的な膜系の一つであり、肝細胞の内にあって、呼吸によるエネルギーの産生およびその転換と利用などの肝細胞の重要な生理機能の一端を担っている。

著者は既に明らかにされている他膜系の糖タンパク質の糖鎖の化学的および代謝的性質と比較するため、ミトコンドリアに存在する糖タンパク質の糖鎖の化学的および代謝的性質を調べた。またミトコンドリアに存在する糖タンパク質の役割を明らかにする目的で、これらの糖タンパク質のミトコンドリア内分布を調べた。

また、ミトコンドリアに存在する複合糖質の微量成分であるB型のコンドロイチン硫酸の存在様式および生理的意義についても調べた。

その結果、次の諸点が明らかになった。

- (1) ミトコンドリアに存在する複合糖質の主要成分は他膜系と同様、ペプチド鎖にN-グリコシド型結合した糖鎖をもつ糖タンパク質である。
- (2) ミトコンドリアに存在する糖タンパク質の糖鎖はグルコサミンおよびマンノースより成る中性糖鎖とグルコサミン、マンノース、ガラクトースおよびシアル酸より成る酸性糖鎖に大別された。各糖鎖ともミトコンドリアに特徴的である。
- (3) ミトコンドリアに存在する糖タンパク質の多く(約60%)は外膜と内膜に囲まれた膜間部に存在し、残りは外膜と内膜にほぼ等量ずつ分布し、タンパク質を最も多く含む物質には糖タンパク質はほとんど存在しない。
- (4) ミトコンドリアに存在する糖タンパク質の一部はミトコンドリアの外表面に露出して存在している。
- (5) ミトコンドリアの糖タンパク質の糖鎖の代謝的性質よりミトコンドリアの大部分の糖タンパク質はミトコンドリア以外の場所、おそらくはミクロゾーム、で合成されてからミトコンドリアに組み込まれていると考えられる。しかし、内膜に存在する糖タンパク質の一部はミトコンドリア内で合成されることが示唆された。
- (6) ミトコンドリアのエネルギー依存性の $Ca^{2+}$ の取り込みがルテニウムレッドにより阻害されることにより、この $Ca^{2+}$ の取り込みにムコ多糖が関与しているのではないかと考えられていたが、著者の研究によりミトコンドリアのエネルギー依存性の $Ca^{2+}$ の取り込みにはムコ多糖は関与していないことが明らかになった。

(7) ミトコンドリアの表面にはムコ多糖がミトコンドリアを保護するかのようになり、ミトコンドリア表面に露出して存在していることが明らかになった。しかし、その生理的意義については不明である。

第 1 節 肝細胞ミトコンドリアの糖組成の決定および糖ペプチドの単離

肝細胞ミトコンドリアの単離と性質

ミトコンドリアはラット正常肝細胞より基本的には de Duve らの方法<sup>9)</sup>に従い、0.07 M スクロースと、0.1 mM EDTA を含む 0.21 M マンニトール (PH 7.4 - 7.5) を用いて調製した。

(実験の部参照)

得られたミトコンドリアの純度を確かめるため、ミトコンドリア、ミクロゾームおよびリソゾームの標識酵素であるチトクローム C 酸化酵素、グルコース-6-ホスファターゼおよび酸性ホスファターゼの活性を測定した。その結果を Table 1 に示した。

Table 1. Enzymatic Properties of Mitochondrial Fraction

	Protein(%)	Cytochrome Oxidase	
		S.A.	T.A.(%)
Homogenate	100	0.179 (1.00)	100
Mitochondria	13.1	0.615 (3.50)	37
Glucose-6-Phosphatase		Acid Phosphatase	
S.A.	T.A.(%)	S.A.	T.A.(%)
$8.30 \times 10^{-2}$	(1.00)	100	100
$7.65 \times 10^{-2}$	(0.09)	1.44	19

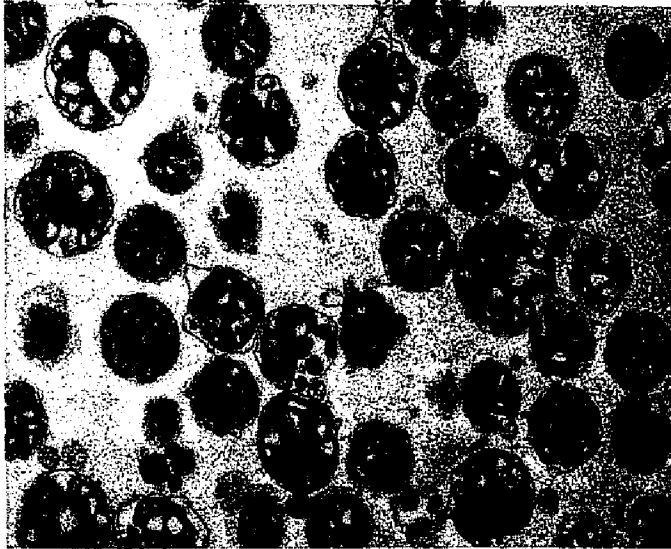
S.A.=specific activity, T.A.=total activity

ミクロゾームおよびリソゾームの標識酵素の活性より、得られたミトコンドリア画分に含まれるミクロゾームおよびリソゾームの混入はタンパク質量を基準にしてそれぞれ約 2% 程度と考えられる。また、ミトコンドリアの標識酵素であるチトクローム C 酸化酵素のミトコンドリア画分の比活性はホモジネートに比べて 3.5 倍に上昇し、また、ホモジネートの総活性の 37% が回収された。

また、電子顕微鏡による形態的観察により、他膜系の混入はほとんどみられなかった。

(Photo. 1 参照)

Photo.1. Electron Micrograph of Mitochondrial Fraction. Magnification, X10,000



従って、これらのことより今回用いたミトコンドリアの調製法により十分純度の高いミトコンドリアが収率よく調製されることが明らかになった。

#### ミトコンドリアの糖組成

調製されたミトコンドリアを1%DOC(Sodium deoxycholate)(pH 7.8に調整)に溶解し、蒸留水に対して透析し、凍結乾燥標品を得た。この凍結乾燥標品の糖組成をTable 2に示した。

Table 2. Carbohydrate composition of mitochondria from rat liver. Values are expressed as  $\mu$ moles per g protein.

Fucose	0.4
Galactose	8.0
Glucose	21.8
Mannose	14.5
Ribose	12.5
Glucosamine	8.5
Galactosamine	2.2
Sialic acid	4.1



糖タンパク質の一般的な構成糖であるガラクトース、マンノース、グルコサミン、ガラクトサミンおよびシアル酸が主要な糖成分として検出された。グルコースが最も高い値を示したが、これはのちに述べるように、糖ペプチド画分にはほとんど検出されず、糖タンパク質の成分とは考えられず、ミトコンドリアを調製する際に用いたスクロース中に混入するデキストランに由来するものと考えられる。ミトコンドリアのタンパク質当りの糖含量は原形質膜<sup>2)</sup>やミクロゾーム膜<sup>4)</sup>の1/2~1/3程度で、核膜<sup>5)</sup>とほぼ同じ糖含量を示した。

#### 糖ペプチドの単離と分画

ミトコンドリア凍結乾燥標品より脂質を除去するため、まず、クロロホルム-メタノール(2:1)で3回抽出を行ない、さらにアセトンで2回処理した。得られた脂質抽出液には全グルコサミンおよびガラクトサミンのそれぞれ1%および3%しか回収されず、ミトコンドリアには従来から指摘されているように糖脂質はほとんど存在しないと考えられる。<sup>58)</sup>

次に、この脱脂ミトコンドリア画分をブロナーゼで37℃、72時間徹底的に消化を行なった。消化後、遠心して不溶性画分と可溶性画分とに分離した。不溶性画分へのグルコサミンおよびガラクトサミンの回収率はそれぞれ5.4%および9.7%で大部分の糖は可溶性画分に回収された。次にこのブロナーゼ消化可溶性画分を濃縮後、セファデックスG-25で分画した(Fig. 1)。

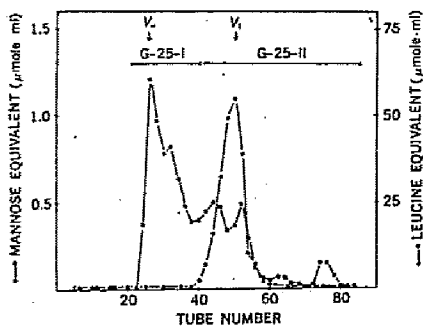


Fig. 1. Fractionation of the pronase digest of mitochondrial proteins on Sephadex G-25. The pronase digest of mitochondrial proteins (2.9 g) was applied to a column of Sephadex G-25 (2.0×90 cm) equilibrated with 0.05 M pyridine-acetic acid buffer, pH 5.0. Elution was carried out with the same buffer. The flow rate was 20 ml per hr, and 5.0 ml fractions were collected. Aliquots were used for the orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and ninhydrin reactions.

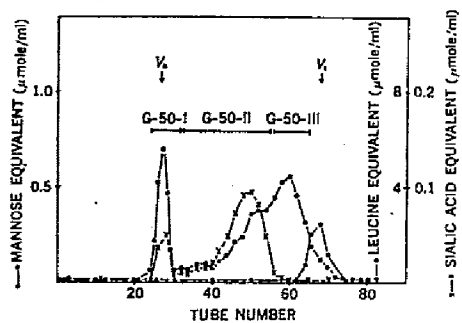


Fig. 2. Fractionation of G-25-I on Sephadex G-50. G-25-I, after concentration, was applied to a column of Sephadex G-50 (2.1×108 cm) equilibrated with 0.05 M pyridine-acetic acid buffer, pH 5.0. Elution was carried out with the same buffer. The flow rate was 15 ml per hr, and 5.0-ml fractions were collected. Aliquots were used for the orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reaction, ninhydrin reaction, and sialic acid determination.

糖ペプチドと思われる画分をセファデックスG-50により、更に、分画した。その結果をFig. 2に示した。

各フラクションについてオルシノール—硫酸法により中性糖、レゾルシノール—塩酸法によりシアル酸の含量を測定した。中性糖のパターンより少なくとも3つのピーク (G-50-I、G-50-II および G-50-III) に分けられる。その内、G-50-I と G-50-II のみにシアル酸が検出された。G-50-I はセファデックス G-50 を素通りすることからかなりの高分子から成る画分と考えられる。この G-50-I にはブローナーゼ可溶性画分のガラクトサミンおよびグルコサミンのそれぞれ 100% および 13% が回収される。この G-50-I にはのちに述べるように、B 型のコンドロイチン硫酸とシアル酸を含むムチン型糖ペプチドが存在することが明らかにされた。G-50-II はシアル酸を含む酸性糖鎖より成り、G-50-III はシアル酸を含まない中性糖鎖より成ると考えられる。これらの2つのタイプ (酸性および中性) の糖鎖はラット肝細胞ミクロソーム膜においても見い出されているが、セファデックス G-50 における溶出位置はミクロソーム膜の場合とはかなり異なっている。ブローナーゼ消化可溶性画分のグルコサミンの 87% を含む主要な糖ペプチド画分である G-50-II と G-50-III を合わせ、DEAE-セファデックス A-25 のクロマトグラフィを行ってより適確に糖ペプチドを分画した。

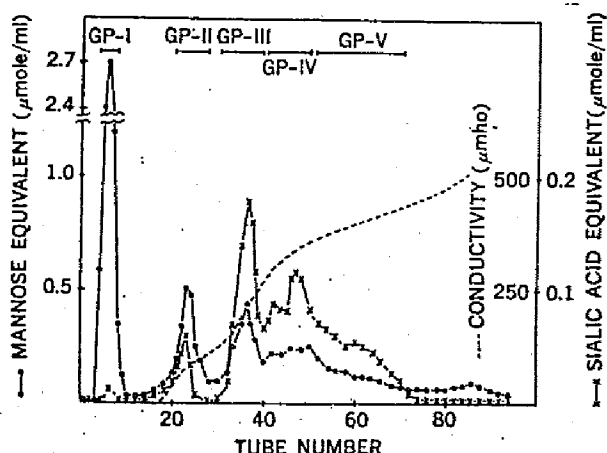


Fig. 3. Fractionation of glycopeptides (G-50-II and -III) from mitochondria on DEAE-Sephadex A-25. A combined fraction of G-50-II and -III amounting to 6.2 mg mannose equivalent was dissolved in 3 ml of 0.02 M pyridine-0.01 M acetic acid buffer, pH 5.2, and applied to a column of DEAE-Sephadex A-25 (0.9×17 cm) equilibrated with the same buffer. Elution was carried out initially with the same buffer, then with a linear gradient from the same buffer to 1.5 M pyridine-0.75 M acetic acid buffer, pH 5.2. The flow rate was 7 ml per hr and 1.55 ml fractions were collected. Aliquots were used for the orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reaction and sialic acid determination.

Fig. 3に示したように、シアル酸を含まない中性糖ペプチドは素通りし、シアル酸を含む酸性ペプチドは緩衝液の濃度を高めることにより溶出されてきた。それぞれのピークをブールし、それぞれをGP-I、GP-II、GP-III、GP-IVおよびGP-Vとした。単純ペプチドを除くためそれぞれの画分をDowex 50X8(H<sup>+</sup>)に通した。単離されたそれぞれの糖ペプチド画分をろ紙電気泳動(ピリジン：酢酸：水=1：10：89、pH 3.6、40V/cm、2時間)で純度を調べたところいずれの画分も不均一性を示した。しかし、それぞれの糖ペプチド画分の泳動度はDEAE-セファデックスA-25の溶出パターンとよく対応した。GP-Iからは陰極側に3.3 cm および2.0 cmの泳動度を示す2つのスポットが得られた。これらの泳動度は中性のアミノ酸とほぼ同程度であった。GP-III、GP-IVおよびGP-Vは陽極側に泳動する長いスポットを示し、それぞれの中心の位置は、4.2 cm、5.2 cm および6.5 cm であった。この条件下ではアスバラギン酸の泳動度は8.7 cmであった。また、GP-IIからは陽極側と陰極側の両方に泳動するスポットが得られた。

#### 単離された糖ペプチドの糖およびアミノ酸組成

それぞれの糖ペプチドの糖とアミノ酸組成をTable 3に示した。

Table 3. Amino acid and carbohydrate compositions of glycopeptides isolated from mitochondria of rat liver. Values are expressed as moles per mole of aspartic acid. Molar distribution values are expressed as molar percentages of total glycopeptides, assuming that each glycopeptide contains one mole of aspartic acid per mole.

	GP-I	GP-II	GP-III	GP-IV	GP-V
Aspartic acid	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Threonine	0.30	0.40	0.65	0.68	0.57
Serine	0.38	0.54	0.61	0.48	0.49
Glutamic acid	0.16	0.50	0.66	1.14	1.46
Proline	0.44	0.34	1.36	0.75	0.97
Glycine	0.23	0.33	0.54	0.47	0.64
Alanine	0.13	0.15	0.53	0.33	0.38
Glucosamine	1.65	1.90	2.28	2.13	0.61
Mannose	3.16	3.81	1.56	1.45	0.50
Galactose	—	0.68	0.66	1.06	0.36
Glucose	0.92	0.58	0.12	0.10	0.11
Fucose	0.18	0.23	0.17	0.12	0.05
Sialic acid	0.03	0.45	1.23	1.59	0.54
Molar distribution (%)	24.4	7.6	15.6	15.6	36.8

いずれの糖ペプチドにおいても主要なアミノ酸はアスパラギン酸であった。このことは糖鎖はアスパルチルグリコシラミン結合を介してアスパラギン酸に結合していることを示している。従ってそれぞれの糖ペプチドの糖およびアミノ酸組成はアスパラギン酸 1 モルに対する各成分のモル比によって表わした。GP-I はシアル酸を含まない中性糖ペプチドで、アスパラギン酸 1 モルに対してグルコサミン 1.65 モルおよびマンノース 3.16 モル含んでいる。GP-I は不均一ではあるが、これらの値より、多くの糖タンパク質に見出される糖鎖と同じように、2 つのグルコサミンをコア構造に持ち、その 1 つがアスパラギン酸に結合していると考えられている。<sup>56)</sup> そして、マンノースはコア構造の外部に存在していると考えられる。<sup>56)</sup> しかし、ミクロゾーム膜より得られる中性糖ペプチドがアスパラギン酸 1 モルに対し、5 モルのマンノースを含むのに対し、GP-I はマンノース含量が低い。このことは GP-I はミクロゾーム膜より得られる中性糖ペプチドのセファデックス G-50 の溶出位置<sup>4)</sup> より少し遅れていることとよく一致する。GP-II はアスパラギン酸 1 モル当り約半モルのシアル酸を含む。このことから GP-II の約半量が中性糖ペプチドと考えられる。中性糖ペプチドが DEAE-セファデックスに吸着するのは酸性アミノ酸 (グルタミン酸) のためと思われる。GP-III ~ IV は酸性糖ペプチドで、その組成は多様である。GP-III ~ IV は 1 モルのアスパラギン酸に対して約 2 モルのグルコサミンをもち、カラムからの溶出順に従い、シアル酸の含量が増大している。GP-V においてはアスパラギン酸当りの糖含量はほかの糖ペプチドに比べてかなり低い。このことから GP-V の糖鎖は他の糖ペプチドの糖鎖に比べてかなり低分子であろうと考えられる。

これらの酸性糖ペプチドの化学組成をラット肝細胞の粗面および滑面ミクロゾーム膜より得られる酸性糖ペプチドの化学組成<sup>4)</sup> と比較すると、ミトコンドリアの糖ペプチドの糖鎖はミクロゾーム膜のそれに比べて小さいことが分った。たとえば、GP-III と同じ濃度で DEAE-セファデックス A-25 より溶出される粗面ミクロゾーム膜の酸性糖ペプチドの糖組成はアスパラギン酸 1 モルに対し、グルコサミン、マンノース、ガラクトース、およびシアル酸はそれぞれ 2.38、2.64、1.18 および 1.24 モルである。特に、ガラクトースおよびマンノース含量の差異は明らかである。同様に、滑面ミクロゾーム膜より得られる GP-III に相当する糖ペプチドの糖鎖もミトコンドリアの GP-III の糖鎖に比べて大きいことが示されている。

ミトコンドリアの糖タンパク質中に含まれる糖鎖のモル分布をそれぞれの糖ペプチド画分に含まれるアスパラギン酸の量を基準にして求め、Table 3 にその値を示した。中性糖ペプチド (GP-I と GP-II の約半量) は全糖ペプチドの約 30% を占めた。この値は滑面 (10%) および粗面 (60%) ミクロゾーム膜<sup>4)</sup> の中間的な値である。

第 2 節 肝細胞ミトコンドリアの糖タンパク質糖鎖のミトコンドリア内分布

ミトコンドリアの細分画とその性質

ラット肝細胞より調製されたミトコンドリアを基本的には Schnaitman らの方法<sup>10)</sup> と、Hoppel らの方法<sup>11)</sup> を組み合わせた方法によりジギトニン処理によって外膜、膜間部、内膜および礎質の各画分に分画した。(実験の部参照)

得られた各画分の純度を調べるために、外膜、内膜および礎質のそれぞれの標識酵素であるキヌレニン-3-モノオキシゲナーゼ、チトクロームC酸化酵素およびリンゴ酸デヒドロゲナーゼの活性を測定した。

各画分におけるタンパク質と標識酵素の活性の分布を Table 4 に示した。

Table 4.

Protein, cytochrome oxidase, malate dehydrogenase and kynurenine-3-mono-oxygenase of mitochondrial subfractions from rat liver

Fraction	Protein	Cytochrome oxidase		Malate dehydrogenase	Kynurenine-3-mono-oxygenase		
	(%)	U*/mg protein	(%)	U/mg protein	(%)	mU/mg protein	
Whole mitochondria	100	0.96	100	1.41	100	2.7	100
OM	6.9	1.25	9.0	0.77	3.0	21.0	54.7
IMS	22.1	0.05	1.0	0.56	12.4	0.5	4.9
IM	32.6	2.45	82.5	0.62	14.5	1.3	17.4
MAT	38.4	0.19	7.5	2.63	70.0	1.6	22.9

\* One unit of activity is the amount of enzyme which will catalyze the change of one  $\mu$ mole of substrate per min.

これらの値は他の研究者らによって示されている値とよく一致した。<sup>10), 11), 29)</sup> 従ってこれらの結果より本研究に使用するには十分純度の高い各画分が得られたものとして以下の実験に用いた。

ミトコンドリアおよびミトコンドリア細画分の糖組成

ミトコンドリアおよびミトコンドリア細画分を1%リンタングステン酸を含む5%トリクロロ酢酸中でタンパク質を沈澱させ、遠心して沈澱を得た。さらに、その沈澱を3回、1%リンタングステン酸を含む5%トリクロロ酢酸溶液で洗浄したのち、エタノールで3回、クロロホルム:メタノール=2:1 (V/V)で3回、アセトンで2回抽出を行なって脂質を除いた。得られた標品を真空デシケーター中でP<sub>2</sub>O<sub>5</sub>とNaOH上で乾燥した。

各画分の糖組成を Table 5 に示した。

Table 5.  
Carbohydrate compositions of mitochondria and submitochondrial fractions

Fraction	Glucosamine	Galactosamine	Sialic acid	Mannose	Galactose
Whole mitochondria	3.66* (100)**	0.68 (100)	1.49 (100)	4.35 (100)	1.71 (100)
OM	9.22 (17.0)	2.28 (23.4)	4.40 (22.7)	9.16 (15.1)	3.80 (17.3)
IMS	10.5 (65.2)	1.32 (50.3)	3.40 (57.0)	12.7 (69.6)	4.13 (63.1)
IM	1.69 (13.0)	0.55 (23.5)	0.80 (17.1)	1.88 (12.8)	0.88 (16.8)
MAT	0.42 (4.8)	0.04 (2.8)	0.08 (3.2)	0.25 (2.5)	0.10 (2.8)

* $\mu$ moles/g protein; ** % distribution	Fucose	Glucose
	0.45 (100)	1.31 (100)
	0.80 (13.5)	10.8 (43.8)
	1.20 (68.8)	3.28 (44.6)
	0.22 (15.3)	0.40 (6.7)
	0.02 (2.4)	0.19 (4.8)

未分画ミトコンドリアのタンパク質重量当りの糖含量の値は Table 2 に示した値よりかなり低くなっている。この差は化学分析に用いる前のミトコンドリアの前処理の差に由来するものと考えられる。すなわち、Table 2 の実験では分析する前にミトコンドリアを D O C で可溶化後、蒸留水に対して徹底的に透析を行なったため、糖タンパク質以外の比較的低分子のタンパク質が除かれたのに反し、Table 5 の実験ではミトコンドリアをリンタングステン酸を含むトリクロロ酢酸で処理したためすべてのタンパク質が沈澱に得られたものと思われる。

いずれの画分にもかなりの量のグルコースが検出されるが、これは先にも述べたように糖タンパク質以外のものに由来するものと考えられる。しかし、Table 5 の実験ではトリクロロ酢酸処理したためスクロース由来のデキストランはかなり除かれ、その結果 Table 2 に比べてグルコース含量はかなり低くなっている。また、後に述べるように、ガラクトサミンの一部はムコ多糖に由来するものと考えられる。上記の 2 つの糖以外のものはすべて糖タンパク質の成分であり、その多くは N-グリコシド型結合をした糖鎖に由来するものと考えられる。

Table 5 が示すように外膜、膜間部および内膜の各画分はほとんど同じ割合でマンノース、グルコサミン、フコース、ガラクトース、シアル酸およびガラクトサミンを含む。従って、このことよりミトコンドリアの各画分は共に類似した糖組成をもつ糖タンパク質を含むと考えられ、糖組成の分布からは各画分がそれぞれ特徴的な糖鎖をもつことを示すデータは得られなかった。

膜間部はいずれの糖についても最高の含量を示し、全ミトコンドリアの約60%の糖を含んでいる。外膜および内膜は同じような糖の分布を示しているが、タンパク質量当りの糖含量は外膜の方が内膜より5倍高い値を示している。タンパク質量の最も多い物質はほとんど糖を含まず、糖タンパク質は存在しないと考えられる。

#### レクチンによるミトコンドリアの凝集

糖タンパク質中のマンノース残基に特異的と言われているコンカナバリンA<sup>50)</sup> およびガラクトース残基に特異的と言われているRicin<sup>us communis</sup> agglutinin<sup>31)</sup> を用いてミトコンドリアの凝集を調べた。その結果をTable 6に示した。

Table 6. Agglutination of Mitochondria by Concanavalin A and Ricin<sup>us communis</sup> agglutinin

medium		agglutination of mitochondria at serial dilutions of agglutinin			
		1	2	4	8
Concanavalin A	0.28M Lactose 10mM HEPES(pH7.5)	+4	+3	+2	+1
	0.28M Sucrose 10mM HEPES(pH7.5)	-	-	-	-
<u>Ricin<sup>us commu-</sup> <u>nis</u> agglutinin</u>	0.28M Lactose 10mM HEPES(pH7.5)	-	-	-	-
	0.28M Sucrose 10mM HEPES(pH7.5)	+4	+3	+2	+1

Starting concentration of agglutinins; Concanavalin A = 1.0 mg/ml  
Ricin<sup>us</sup> c.a. = 2.5 mg/ml  
 Concentration of mitochondria = 3.5 mg protein/ml

コンカナバリンAおよびRicin<sup>us communis</sup> agglutinin は共にミトコンドリアを強く凝集し、それぞれの阻害剤(スクロースおよびラクトース)の存在下ではほとんど凝集しなかった。従って、この凝集はミトコンドリアの表面に存在する糖残基によるものと考えられる。

ミトコンドリアに存在するほとんどすべての糖鎖が糖タンパク質に由来するものであることが示されていることより、マンノース残基およびガラクトース残基を含む糖タンパク質のあるものはミトコンドリアの外表面に露出していると考えられる。一方Table 6には示さなかったが、ジギトン処理をして外膜を取り除いたミトコンドリアは未処理のミトコンドリアに比べて、Ricin<sup>us communis</sup> agglutinin では凝集性が増大したが、コンカナバリンAではほとんど凝集しなかった。

外膜および内膜の糖組成がほとんど変わらないことから、外膜および内膜には同じような糖鎖が存在していると考えられたが、この二つのレクチンによる凝集性の差より、外膜および内膜の外表面に露出している糖鎖の性質あるいは分布はかなり異なっているものと考えられる。

### 第 3 節 肝細胞ミトコンドリアの糖タンパク質糖鎖の代謝

#### ミトコンドリアの糖タンパク質糖鎖の代謝

5匹のラットを一群とし、一匹当り3 $\mu$ Ciのグルコサミン-1- $^{14}$ C、塩酸塩(10.7mCi/mole)をラットの腹腔内に投与した。一定時間後に、軽くエーテル麻酔した状態で頸動脈および頸静脈より放血したのち、肝臓をin situで0.07Mスクロースと0.1mMEDTAを含む0.21Mマンニトール溶液(pH 7.4-7.5)でかん流後、肝臓を摘出した。得られた肝臓より常法に従いミトコンドリアおよびマイクロソームを調製した(実験の部参照)。得られた各画分を10%トリクロロ酢酸で沈澱させ、沈澱物を更に3回、10%トリクロロ酢酸で洗浄した。沈澱物を更にエタノールで1回、クロロホルム:メタノール=2:1で1回、アセトンで1回抽出を行ない、各画分のタンパク質画分を得た。

グルコサミンはin vivoにおいては糖タンパク質の糖鎖のシアル酸およびヘキサミンに取り込まれることが知られている。<sup>57)</sup> 従って、それぞれのタンパク質画分よりシアル酸およびヘキサミン画分を分離し、それぞれの比活性を測定した(実験の部参照)。その結果をFig. 4に示した。

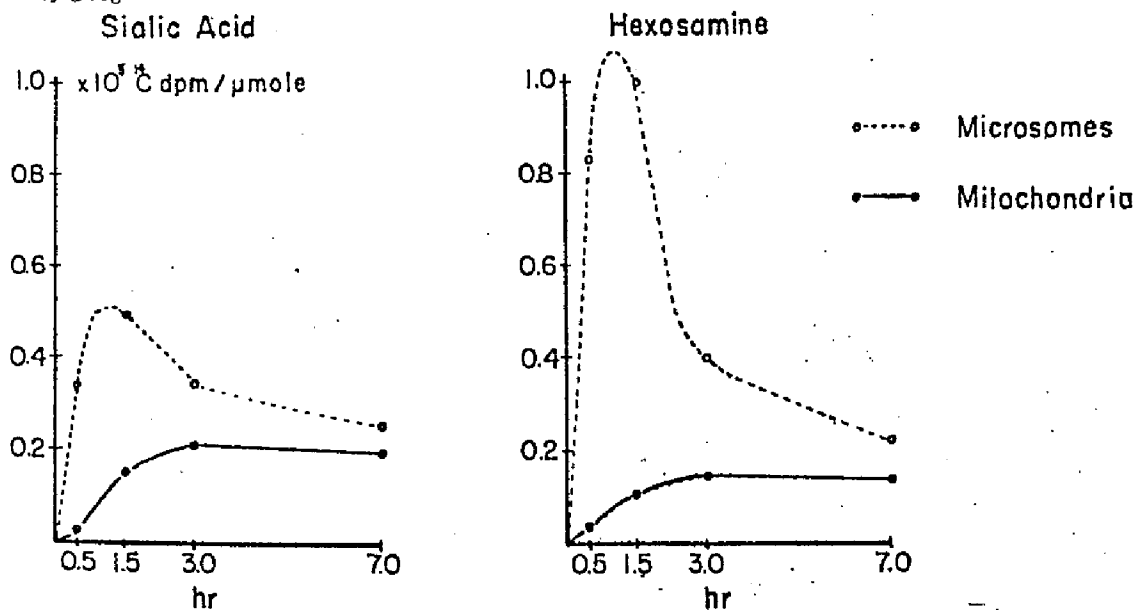


Fig. 4. Incorporation of D-Glucosamine-1- $^{14}$ C into Hexosamine and Sialic Acid of Mitochondrial and Microsomal Glycoproteins

D-Glucosamine-1- $^{14}$ C (3  $\mu$ Ci) was administered intraperitoneally to each rat. After administration of D-Glucosamine-1- $^{14}$ C, each rat was killed at the indicated times, and mitochondria and microsomes were prepared from liver.

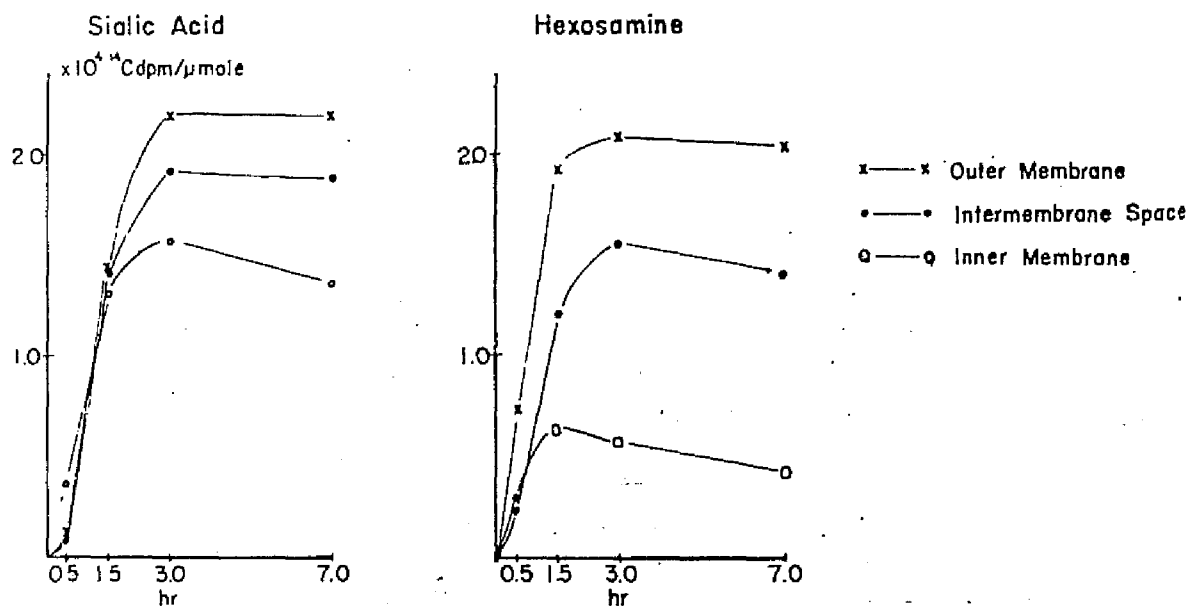


シアル酸およびヘキソサミンは共にミクロゾームではほぼ 1 時間以内にすみやかに標識されるのに対し、ミトコンドリアではかなりゆっくりと標識されていることが分る。前述の実験結果より、ミトコンドリアに存在するシアル酸およびヘキソサミンのほとんどすべては糖タンパク質に由来するものであることが明らかであるから、この取り込みの速度は糖タンパク質の糖鎖へのグルコサミンの取り込み速度を示していると考えられる。

ミトコンドリアの取り込みの速度は原形質膜の取り込みの速度<sup>3)</sup>とほぼ類似していた。このことより、ミトコンドリアに存在する大部分の糖タンパク質はミトコンドリア以外の場所、おそらくはミクロゾームで合成されてからミトコンドリアに組み込まれていると考えられる。

#### ミトコンドリアの細画分の糖タンパク質糖鎖の代謝

ミトコンドリアの外膜、膜間部および内膜のそれぞれに存在する糖タンパク質のシアル酸およびヘキソサミン画分へのグルコサミン- $1-^{14}C$  の取り込みを調べた。実験条件はミトコンドリアの場合と同様である。その結果を Fig. 5 に示した。





エネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込み関与していると推論されている。<sup>41)</sup> 従って、著者はミトコンドリアに存在するこのB型のコンドロイチン硫酸の生理的意義を明らかにする目的で、このムコ多糖のエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みとの関係を検討した。

ミトコンドリアのB型のコンドロイチン硫酸はコンドロイチナーゼABCによって分解することが知られている。<sup>35)</sup> 従って、著者はミトコンドリアをコンドロイチナーゼABC消化して、エネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みの変化を調べた。

エネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みはミトコンドリアの呼吸の可逆的増大と共役している。<sup>41)</sup> 従って、著者は反応溶液中の酸素消費量を測定することによりエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みを調べた。

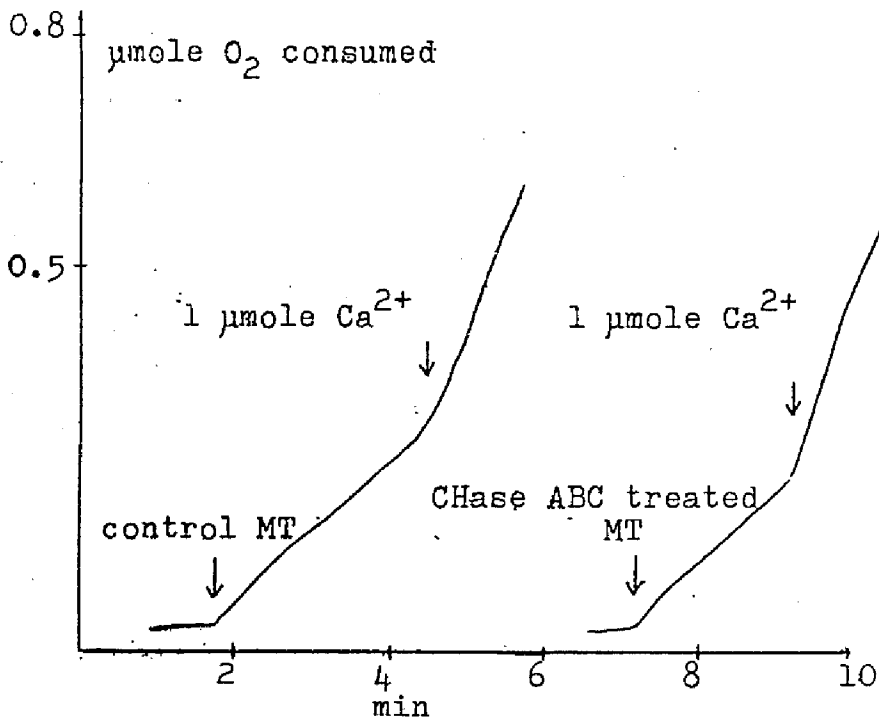


Fig.6. Effect of Chondroitinase ABC on the Mitochondrial Uptake of  $\text{Ca}^{2+}$

Mitochondria (5 mg protein) and CHase ABC (1 unit) were incubated for 15 min at  $30^\circ\text{C}$  in 0.2 ml of a medium composed of 0.21 M mannitol, 0.07 M sucrose and 2 mM HEPFS, pH 8.0. After incubation, the mitochondrial respiration was measured polarographically.

Fig. 6は未処理のミトコンドリアおよびコンドロイチナーゼABC処理したミトコンドリアのエネルギー依存性のCa<sup>2+</sup>の取り込みを比較したものである。Fig. 6より明らかなように、Ca<sup>2+</sup>を加えるとミトコンドリアの呼吸の増大が見られ、エネルギー依存性のCa<sup>2+</sup>の取り込みが起っていることが分る。しかし、コンドロイチナーゼABC処理したミトコンドリアでもほぼ同様な呼吸の増大が見られ、この処理はエネルギー依存性のCa<sup>2+</sup>の取り込みには影響を与えないことが明らかになった。

エネルギー依存性のCa<sup>2+</sup>の取り込みは内膜上で行なわれ、さらに、外膜は高分子物質の透過に抵抗性を有する<sup>43)</sup>ことから、コンドロイチナーゼABCが内膜上に存在するエネルギー依存性のCa<sup>2+</sup>の取り込み部位に到達できなかった可能性がある。従って、著者はジギトニン処理をして外膜を除去したミトコンドリアについてもFig. 6と同様にコンドロイチナーゼABCの影響を調

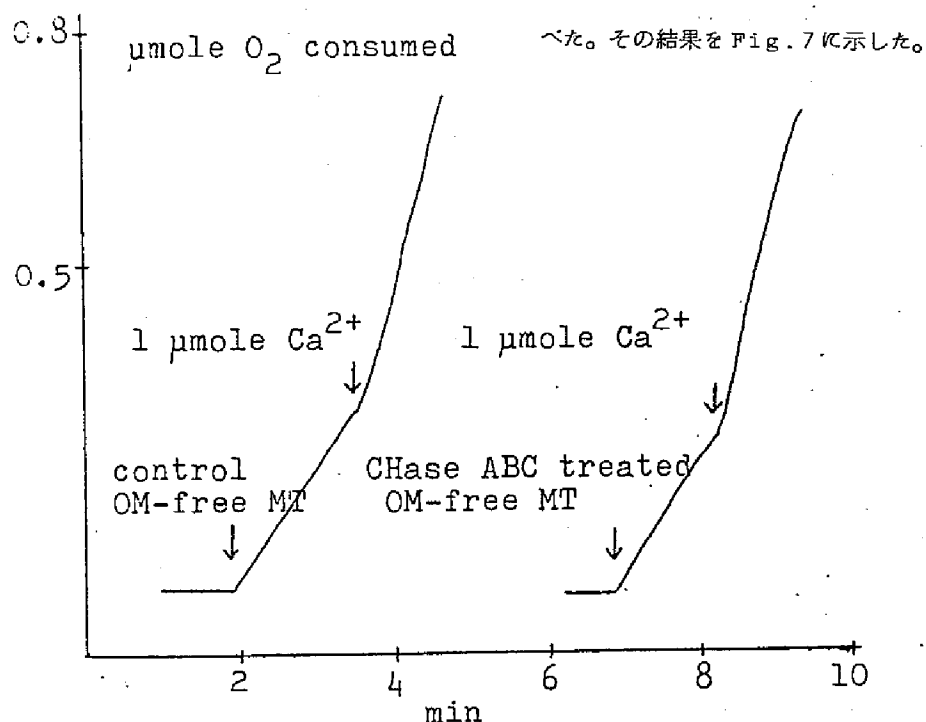


Fig. 7. Effect of Chondroitinase ABC on the Outer Membrane-free Mitochondrial Uptake of Ca<sup>2+</sup>

Outer membrane-free mitochondria (prepared from 7 mg protein intact mitochondria) and CHase ABC (1 unit) were incubated for 15 min at 30°C in 0.2 ml of a medium composed of 0.21 M mannitol, 0.07 M sucrose and 2 mM HEPES, pH 8.0. After incubation, the outer membrane-free mitochondrial respiration was measured polarographically.

外膜を除去したミトコンドリアでも  $\text{Ca}^{2+}$  を加えると呼吸の増大が見られ、ジギトニン処理をしてもミトコンドリアのエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込み能力は保たれていることが分る。しかし、外膜を除去したミトコンドリアをコンドロイチナーゼABC処理してもほとんどエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みには影響を及ぼさなかった。

#### 第 5 節 ミトコンドリアの外膜酵素のトリブリン感受性に対するコンドロイチナーゼABCの影響

ロテノン-非感受性NADH-チトクロームC還元酵素(以外、チトクロームC還元酵素と略す。)とモノアミン酸化酵素はミトコンドリアの外膜に局在していることが明らかにされている。<sup>10)</sup>しかし、この二つの酵素はトリブリンに対して異なった感受性を示すことにより、外膜における存在様式が異なっていると考えられる。<sup>44)</sup>チトクロームC還元酵素はミトコンドリアにトリブリンを作用させることによって容易に失活するが、モノアミン酸化酵素はトリブリンによってはほとんど失活しない。

ミトコンドリアに存在するB型のコンドロイチン硫酸がミトコンドリアの外膜の外表面に存在するならば、ミトコンドリアにコンドロイチナーゼABCを作用させ、表面に存在するムコ多糖を除去すれば、外膜酵素のトリブリン感受性は影響を受けると考えられる。従って、著者はこれらの2つの外膜酵素のトリブリン感受性に対するコンドロイチナーゼABCの影響を調べることによってB型のコンドロイチン硫酸のミトコンドリア内の局在性について検討した。

その結果をFig. 8に示した。

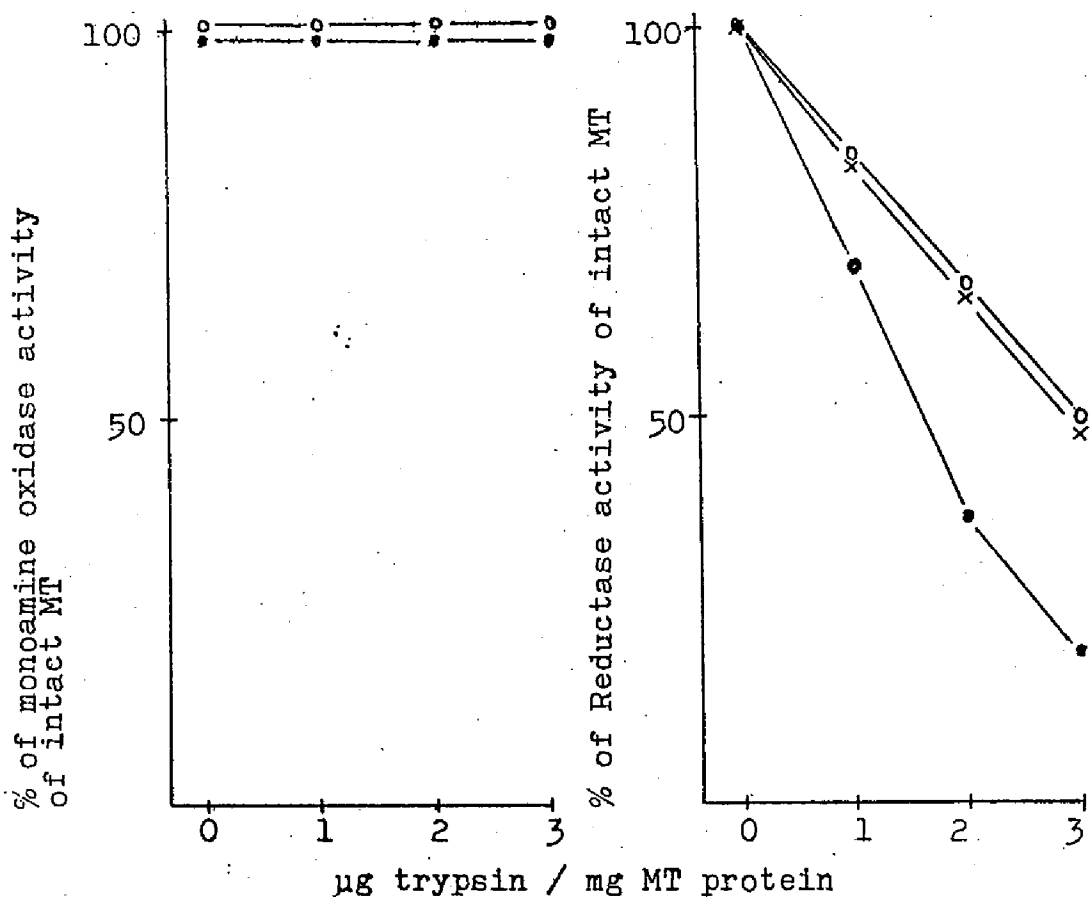


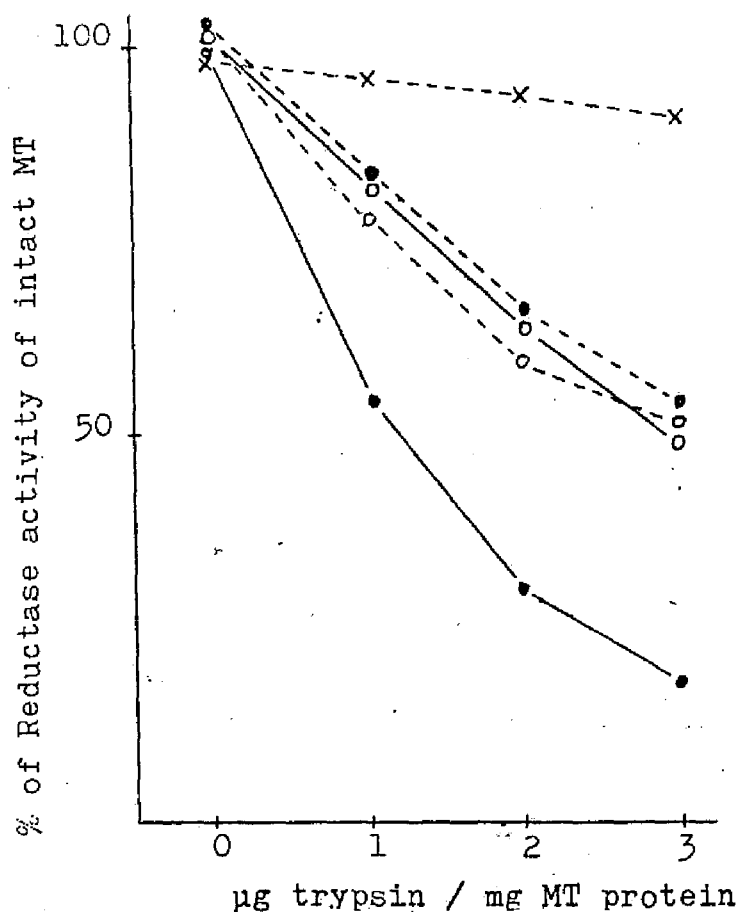
Fig.8. Effect of Chondroitinase ABC or AC on the Tryptic Sensitivity of the Outer Membrane Enzymes

Mitochondria(2 mg protein) and CHase ABC or AC (0.2 unit) were incubated for 20 min. at 25°C in 0.4 ml of a medium composed of 0.21 M mannitol, 0.07 M sucrose and 10 mM HEPES, pH 7.5. After incubation, varying amounts of trypsin in 0.1 ml of the medium were added, and incubation was continued for another 10 min. Incubation was stopped by the addition of 32 µg of trypsin inhibitor in 0.4 ml of the medium. Aliquots of the incubation mixture were used for the enzyme assays.

○—○ without CHase  
 ●—● with CHase ABC  
 x—x with CHase AC

既に報告されているように<sup>44)</sup> 未処理のミトコンドリアをトリプシン処理するとチトクロームC還元酵素は失活したが、モノアミン酸化酵素は全く失活しなかった。ミトコンドリアをあらかじめコンドロイチナーゼABC処理しておいた後、2つの酵素のトリプシン感受性を調べた。モノアミン酸化酵素は未処理のミトコンドリアと同様、トリプシンによって失活しなかった。一方、チトクロームC還元酵素はコンドロイチナーゼABCによってトリプシンに対する感受性が増大した。しかし、B型のコンドロイチン硫酸には作用しないコンドロイチナーゼACではほとんど影響を受けなかった。従って、この効果はB型のコンドロイチン硫酸が分解したためと考えられる。

コンドロイチナーゼABCの影響がコンドロイチナーゼABCの酵素作用の結果によるものかどうかを更に確かめるため、コンドロイチン硫酸を加えてコンドロイチナーゼABCの作用を阻害して、その影響を調べた。各コンドロイチン硫酸のコンドロイチナーゼABCに対する感受性の相違から判断して、<sup>45)</sup> この実験条件ではコンドロイチン硫酸AおよびCは大部分が消化を受けるがコンドロイチン硫酸Bは半分以上は未消化のままであると考えられる。



CHase	ABC	Chondroitin sulfates
o—o	-	-
•—•	+	-
•---•	+	A
x---x	+	B
o---o	+	C

Fig. 9. Effect of Exogenous Chondroitin Sulfates on the Action of Chondroitinase Affeting the Tryptic Sensitivity of Reductase

Mitochondria(2 mg protein), CHase ABC(0.2 unit) and the chondroitin sulfates A, B or C(2.5 mg) were incubated for 20 min at 25°C in 0.4 ml of the medium used in Fig. 8. After incubation, varying amounts of trypsin in 0.1 ml of the medium were added, and incubation was continued for another 10 min. Incubation was stopped by the addition of 32 µg of trypsin inhibitor in 0.4 ml of the medium. Aliquots of the incubation mixture were used for the Reductase assay.

Fig. 9に示したように、コンドロイチン硫酸AおよびCはチトクロームC還元酵素のトリプシン感受性をコントロールとほぼ同程度までおさえたが、コンドロイチン硫酸Bはコントロール以上の安定化作用を示した。これらの結果よりコンドロイチン硫酸がコンドロイチナーゼABCがミトコンドリアの表面に存在するB型のコンドロイチン硫酸に作用するのを阻害し、消化されずに残ったコンドロイチン硫酸はミトコンドリアの表面に吸着され、そのため、チトクロームC還元酵素のトリプシンに対する抵抗性は増大したと考えられる。



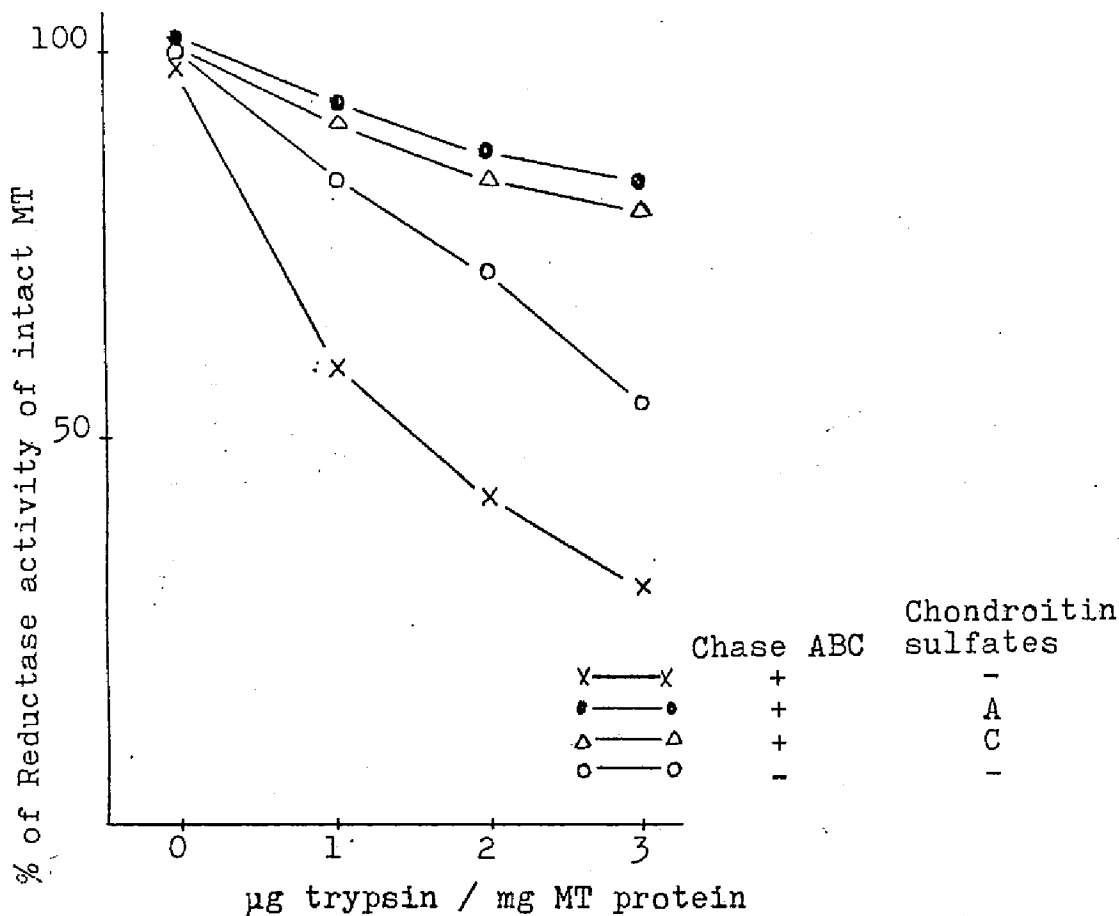


Fig. 10. Effect of Exogenous Chondroitin Sulfates on the Tryptic Sensitivity of Reductase of Mitochondria Digested with Chondroitinase ABC

Mitochondria(2 mg protein), Chase ABC(0.2 unit) were incubated for 20 min at 25°C in 0.3 ml the medium used in Fig. 8. After incubation, the chondroitin sulfates A or C and varying amounts of trypsin in 0.2 ml of the medium were added, and incubation was continued for another 10 min. Incubation was stopped by the addition of 32 µg of trypsin inhibitor in 0.4 ml of the medium. Aliquots of the incubation mixture were used for the Reductase assay.

Fig. 10 はコンドロイチナーゼABCで処理したミトコンドリアにコンドロイチン硫酸を加えて、チトクロームC還元酵素のトリブシン感受性の変化を調べたものである。この実験条件では加えられたいずれの型のコンドロイチン硫酸もトリブシン消化の間は大部分は未消化であると考えられる。Fig. 10に示すように、いずれの型のコンドロイチン硫酸もほとんど同程度のチトクロームC還元酵素の安定化作用を示し、その程度はFig. 9のコンドロイチン硫酸Bによる場合とほぼ同じであった。従って、このことはミトコンドリアへのコンドロイチン硫酸の吸着性には型特異性がないことを示している。

また、図には示さなかったが、いずれの型のコンドロイチン硫酸のコンドロイチナーゼABCの消化物はチトクロームC還元酵素のトリブシン感受性には影響を及ぼさず、また、コンドロイチン硫酸自身はトリブシンの酵素作用に影響を及ぼさなかった。

従って、これらの結果よりチトクロームC還元酵素のトリブシン感受性に対するコンドロイチナーゼABCの影響はミトコンドリアの表面よりB型のコンドロイチン硫酸が酵素的に除去されたためと考えられ、ミトコンドリアに存在するB型のコンドロイチン硫酸はミトコンドリア表面に露出して存在していると考えられる。

## 第 6 節 考察ならびに総括

ラット肝細胞膜系の内、原形質膜、滑面および粗面ミクロゾーム膜および核膜にはそれぞれ特徴的な糖鎖をもつ糖タンパク質が存在することが示されている。すなわち、核膜はグルコサミンおよびマンノースから成る中性糖鎖のみを含み<sup>5)</sup>、原形質膜はグルコサミン、マンノース、ガラクトースおよびミアル酸から成る酸性糖鎖のみを含み<sup>2)</sup>、滑面および粗面ミクロゾーム膜は酸性および中性糖鎖の両方を含むことが明らかにされている<sup>4)</sup>。しかし、これらの膜系より得られる中性および酸性糖鎖はセフェデックス G-50 および DEAE-セフェデックス A-25 により分画し、その性質を調べた結果、糖鎖は分子量および糖組成に関して互いに類似していることが明らかにされている。このように、核膜より得られた中性糖鎖はミクロゾーム膜より得られた中性糖鎖と、また、原形質膜より得られた酸性糖鎖はミクロゾーム膜より得られた酸性糖鎖と、それぞれ、互いに類似している。

肝細胞ミトコンドリアにおいては、既に de Bernardis<sup>12)</sup> および Bosmann<sup>13)</sup> によってヘキサミンおよびシアル酸の存在が証明され、糖タンパク質の存在が示唆されていた。また、単離されたミトコンドリアにコンカナバリン A が結合することより、マンノースあるいはグルコースを含む糖タンパク質がミトコンドリアに存在していることが示唆されていた<sup>14)</sup>。また、ある種の糖タンパク質がミトコンドリアから単離され、それが  $\text{Ca}^{2+}$  と強い親和性を示すことより、ミトコンドリアの  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みに関与しているのではないかと推論されていた<sup>15)</sup>。しかし、これまでの研究においてはミトコンドリアの糖タンパク質の詳しい化学的検討は行なわれていなかった。従って、ミトコンドリアの糖タンパク質の生物学的役割を明らかにするため、著者は先ず、ミトコンドリアの糖タンパク質の糖鎖の化学的性質を調べた。

まず、肝細胞より調製された精製ミトコンドリアの糖組成を調べたところ、グルコサミン、ガラクトサミン、フコース、マンノース、ガラクトース、グルコースおよびシアル酸が検出された。この結果は既に他の研究者によって報告されている知見と<sup>12), 16)</sup>一致する。しかし、Martin<sup>16)</sup> によって報告されているアラビノースは検出されなかった。その代り、著者の分析では RNA に由来すると思われるリボースが検出された。従って、Martin らはガスクロマトグラフィによって糖を分析する際に、リボースをアラビノースと誤認したものと思われる。

ミトコンドリアの糖成分は脂質抽出によってほとんど抽出されず、大部分の糖成分はブローナーゼ消化によって得られる糖ペプチド画分に回収された。従って、既に指摘されているように<sup>58)</sup> ミトコンドリアにはほとんど糖脂質は存在せず、糖成分の大部分は糖タンパク質に由来していると考えられる。しかし、前述のごとく大部分のグルコースは糖タンパク質以外のものに由来していると考えられる。

ミトコンドリアをブローナーゼ消化することにより中性糖ペプチドおよび酸性糖ペプチドが得ら

れた。中性糖ペプチドはグルコサミンおよびマンノースを含み、また、酸性糖ペプチドはそれに加えて、ガラクトースおよびシアル酸を含んでいた。

ミトコンドリアより得られる中性糖ペプチドおよび酸性糖ペプチドはミクロゾーム膜をはじめとする他膜系の糖ペプチドに比べて、セフデックス G-50 の溶出位置から判断していずれも分子量が小さいと考えられる。<sup>2), 4), 5)</sup> また、得られた糖ペプチドの化学分析の結果、ミトコンドリアの糖ペプチドは他膜系の糖ペプチドの 1 分子当りの糖残基数は少なく、このことから、ミトコンドリアに存在する糖ペプチドの糖鎖は他膜系のそれに比べて分子量が小さいことが裏付けられている。従って、このことはミトコンドリアにはミトコンドリアに特徴的な糖タンパク質が存在していることを示唆している。

このようにミトコンドリアに特徴的な糖タンパク質がどのような生物学的役割を担っているかは極めて興味ある問題であるが、それを明らかにする一つ的手段として、糖タンパク質のミトコンドリア内の局在性を調べた。

ミトコンドリアを外膜、膜間部、内膜および礎質の各画分に分画し、それぞれの糖組成を調べた。ミトコンドリアに存在する複合糖質のほとんどは糖タンパク質の糖鎖に由来することが著者によって既に明らかにされているので、ここで得られた糖組成の分布はグルコースを除けば糖タンパク質の分布をそのまま反映していると考えられる。

ミトコンドリアの糖タンパク質の約 60% は可溶性画分である膜間部に存在する。残りの約 40% の糖タンパク質はそれぞれ、ほぼ等量ずつ外膜および内膜に存在する。糖タンパク質の存在量に関しては外膜も内膜もほとんど変りないが、外膜のタンパク質の量は内膜のタンパク質の 1/5 程度であるため、タンパク質当りの糖タンパク質の量は外膜は内膜に比べて 5 倍ほど高く、膜間部のタンパク質当りの糖タンパク質含量とはほぼ同程度であった。タンパク質を最も多く含む礎質にはほとんど糖成分は検出されず、従って、礎質は事実上糖タンパク質を含まないと考えられる。外膜、膜間部および内膜の各画分はほとんど同じ割合でマンノース、グルコサミン、フコース、ガラクトースおよびシアル酸を含むことより、それぞれの各画分に存在する糖タンパク質の糖鎖は類似した糖組成をもつと考えられる。

膜間部画分から得られる糖タンパク質が intact なミトコンドリアにおいても膜間部に存在するかどうかは明らかではない。外膜あるいは内膜の外表面に緩やかに結合している糖タンパク質がジギトニン処理により膜表面よりはがれて膜間部画分に回収された可能性も否定できない。しかし、ミトコンドリアに存在する糖タンパク質の約 60% はミトコンドリアの膜の内在性 (intrinsic) 成分ではないことは明らかである。また、ミトコンドリアの糖タンパク質はミトコンドリアのうち細胞質に近い方より多く分布し、内部へいくに従って含量が低くなっている。

de Bernardら<sup>12)</sup>はミトコンドリアを低張処理と超音波処理することによって外膜および内膜を調製し、そのヘキソサミンおよびシアル酸の含量を定量している。シアル酸のタンパク質当りの含量を比較すると外膜は内膜の約4倍の値を示し、著者の研究結果はほぼ一致している。ヘキソサミンの含量は外膜は内膜の約2倍程度しかなく、この結果は著者の研究結果とは一致しない。この原因は不明であるが一つの可能性として、de BernardらはヘキソサミンをElson-Morgan法で比色定量しているためにタンパク質量の多い内膜に存在するElson-Morgan反応の妨害物質によって、見かけのヘキソサミン値が高くなったのではないかと推定される。また、彼らはこれらの結果より<sup>17)</sup>ミトコンドリアに存在するヘキソサミンおよびシアル酸の約80%ほどは外膜および内膜以外の画分に存在すると推定し、それが膜間部に由来することを示している。この結果は量的な差はあるにしても、ミトコンドリアに存在するヘキソサミンおよびシアル酸の多くが膜間部に存在する点で著者の研究結果と基本的に一致する。

Glewら<sup>14)</sup>はコンカナバリンAが糖タンパク質のマノース残基に結合することを利用して、コンカナバリンAの結合量よりミトコンドリア内の糖タンパク質の分布を推定している。コンカナバリンAのミトコンドリアの全結合量の約40%がintactなミトコンドリアに見い出された。このことはミトコンドリアのコンカナバリンAの全結合部位の約40%が外膜の外表面に存在していることを示している。また、ミトコンドリアをジギトニン処理して、外膜、膜間部および内膜の各画分を調製し、コンカナバリンAの結合量を調べている。全体の約70%の結合量が膜間部に存在し、その残りはほぼ等量ずつ外膜および内膜画分に存在することが示されている。この結果は著者の各画分の糖含量の結果とよく一致する。コンカナバリンAの結合部位の約40%がミトコンドリアの外表面に存在するという実験事実から推定すると、膜間部画分に回収される糖タンパク質のあるものは外膜の外表面に緩やかに結合していてジギトニン処理の際に外膜より遊離したことが考えられる。

著者はマノース残基に特異的と言われているコンカナバリンA<sup>50)</sup>およびガラクトース残基に特異的と言われているRicinus communis agglutinin<sup>31)</sup>を使って、ミトコンドリア膜表面の糖鎖の分布を凝集法で調べた。intactなミトコンドリアではコンカナバリンAおよびRicinus communis agglutinin<sup>31)</sup>を使って、ミトコンドリア膜表面の糖鎖の分布を凝集法で調べた。intactなミトコンドリアではコンカナバリンAおよびRicinus communis agglutininは共に強い凝集性を示し、マノース残基およびガラクトース残基をもつ糖タンパク質はミトコンドリアの外表面に露出して存在していると考えられる。この結果はGlewら<sup>14)</sup>およびNicolsonら<sup>18)</sup>によって報告されている結果と一致する。同様に、外膜を除去して内膜の外表面を露出させたミトコンドリアについても、コンカナバリンAおよびRicinus communis agglutininでその凝集性を調べた。Ricinus communis agglu-

lininの凝集性は intact なミトコンドリアより増大したが、コンカナバリンAによる凝集性は示さなかった。

内膜にもマンノースが存在し、また、コンカナバリンAの結合部位が存在する<sup>14)</sup>ことが明らかにされているが、コンカナバリンAが内膜を凝集させないことは内膜上の糖タンパク質の存在状態あるいは分布が外膜とかなり異なっていることを示唆している。

ラット肝細胞の原形質膜、<sup>3)</sup> ミクロゾーム膜<sup>19)</sup> および核膜<sup>5)</sup> に存在する糖タンパク質の代謝的性質は著者の属する研究室によって明らかにされ、原形質膜に存在する糖タンパク質は原形質膜以外の場所、おそらくはミクロゾーム、で合成されてから原形質膜に組み込まれ、一方、ミクロゾーム膜および核膜の糖タンパク質はそれぞれの膜内で合成されていると推定されている。

著者はラット肝細胞ミトコンドリアの糖タンパク質の代謝的性質を調べたところ、ミトコンドリアの糖タンパク質へのグルコサミンの取り込みはミクロゾーム膜に比べて遅く、原形質膜の場合とほぼ一致した。従って、大部分のミトコンドリアの糖タンパク質は原形質膜と同様、ミトコンドリア以外の場所、おそらくはミクロゾーム、で合成されてからミトコンドリアに組み込まれていると考えられる。ミトコンドリアに存在する糖タンパク質の代謝的性質を更に詳しく調べるために、ミトコンドリアから外膜、膜間部および内膜の各画分を調製し、それぞれの糖タンパク質の代謝的性質を調べた。ミトコンドリアの糖タンパク質の大部分を占める膜間部および外膜の糖タンパク質の代謝的性質はミトコンドリア全体の糖タンパク質の場合とほぼ同様で、それらのグルコサミンの取り込み速度から外膜および膜間部の糖タンパク質はミトコンドリア以外の場所で合成されてからミトコンドリアに組み込まれていると考えられる。シアル酸およびヘキシサミン画分の代謝的性質がほとんど変わらないことより、中性糖鎖および酸性糖鎖はほとんど同じ代謝的性質をもつと考えられる。

内膜に存在する糖タンパク質の代謝的性質は膜間部および外膜に存在する糖タンパク質とはかなり異なり、グルコサミンの取り込み速度はかなり速く、特に、ヘキシサミン画分の取り込み速度はミクロゾームに匹敵する。従って、内膜に存在する糖タンパク質の少なくとも一部はミトコンドリア内で合成されていると考えられる。このことはミトコンドリアの内膜のある種のタンパク質がミトコンドリア内で合成されるという事実と一致する。

Bosmannら<sup>20)</sup>は単離されたミトコンドリアを *in vitro* で GDP-<sup>14</sup>C-Man あるいは UDP-<sup>14</sup>C-Gal などとインキュベートしたところ、タンパク質画分に <sup>14</sup>C-Man あるいは <sup>14</sup>C-Gal の取り込みが見られたことを報告している。更に、ミトコンドリアを外膜と内膜に分離し、それぞれを GDP-<sup>14</sup>C-Man および UDP-<sup>14</sup>C-Gal とインキュベートしたところ、外膜にはほとんど取り込み活性は見いだされなかったが、内膜には取り込み活性が見いだされた。このことからミトコンドリアの内膜には糖タンパク質の糖鎖の合成能があると結論している。彼らの *in vitro* の実験

結果は著者の *in vivo* の実験結果とよく一致する。しかし、著者が予備的に行った  $\text{UDP-}^{14}\text{C-GlcNAc}$  を用いた *in vitro* の実験ではミトコンドリアの  $^{14}\text{C-GlcNAc}$  の取り込み活性は弱く、その大部分は糖タンパク質以外の未同定物質に取り込まれていた。また、内膜も外膜もほぼ同程度の取り込み活性を示し、Bosmann らの結果とは一致しなかった。

従来一般に、ムコ多糖は細胞間隙物質と言われ、細胞には存在しないと考えられてきた。しかし、最近、ラット肝細胞<sup>36)</sup>および腹水肝ガン細胞<sup>37)</sup>や Chinese hamster CHO細胞<sup>38)</sup> の原形質膜にムコ多糖の存在が確認され、ムコ多糖は動物細胞の原形質膜の一般的構成成分と見なされつつある。また、肝細胞ミクロゾーム膜<sup>39)</sup>や培養細胞の核膜<sup>40)</sup>などの細胞内膜系にもムコ多糖の存在が報告され、細胞成分としてのムコ多糖の存在様式および生理的意義が非常に注目されている。

ラット肝細胞においては原形質膜およびミクロゾーム膜に主としてヘパラン硫酸が存在することが著者の属する研究室によって明らかにされている<sup>39)</sup>。前述のごとく、ミトコンドリアには B 型のコンドロイチン硫酸が存在することが明らかにされている。この B 型のコンドロイチン硫酸は他膜系にはほとんど検出されず、ミトコンドリアに特異的であると考えられ、その存在様式および生理的意義は極めて興味ある問題である。

ミトコンドリアの重要な生理的機能の一つであるエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みはミトコンドリアの複合糖質が関与している可能性を示す報告がなされている。<sup>15), 41)</sup> ミトコンドリアのエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みがカルテニウムレッドにより阻害されることより、糖タンパク質あるいはムコ多糖がミトコンドリアのエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みに関与しているのではないかと推論されている。<sup>41)</sup>

従って、著者はミトコンドリアに存在する B 型のコンドロイチン硫酸の生物学的存在意義を明らかにする目的でこのムコ多糖がミトコンドリアのエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みに関与しているかどうかを検討した。

Fig. 6 および Fig. 7 より明らかなように、ミトコンドリアおよび外膜を除去したミトコンドリアのエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みにはコンドロイチナーゼ ABC は全く影響を及ぼさなかった。エネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みの部位は内膜の外表面上に存在することが明らかにされている。<sup>42)</sup> ミトコンドリアに存在するムコ多糖がエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みに関与しているならば、この B 型のコンドロイチン硫酸はコンドロイチナーゼ ABC の消化を受けることより、外膜を除去したミトコンドリアはコンドロイチナーゼ ABC によってエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みに影響を受けるはずである。従って、Fig. 6 および Fig. 7 の結果よりこのムコ多糖はエネルギー依存性の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みには関与していないと考えられる。

チトクローム C 還元酵素およびモノアミン酸化酵素はミトコンドリアの外膜に局在していることが明らかにされている。<sup>10)</sup> チトクローム C 還元酵素はミトコンドリアにトリプシンを作用させる

ことよって失活するが、モノアミン酸化酵素は失活しない。<sup>44)</sup>ミトコンドリアに存在するB型のコンドロイチン硫酸がミトコンドリアの表面に存在するならば、コンドロイチナーゼABCの作用によつてミトコンドリアの表面に存在するムコ多糖が除去されることによつて、両酵素のトリプシン感受性が影響を受ける可能性が考えられる。従つて、著者はミトコンドリアのムコ多糖の局在性を明らかにする目的で、外膜酵素のトリプシン感受性に対するコンドロイチナーゼABCの影響を調べた。

Fig. 8より明らかなように、コンドロイチナーゼABCはモノアミン酸化酵素のトリプシン感受性には全く影響を及ぼさなかつたが、チトクロームC還元酵素のトリプシン感受性を著しく高めた。また、ミトコンドリアに存在するB型のコンドロイチン硫酸に全く作用しないコンドロイチナーゼACはチトクロームC還元酵素のトリプシン感受性に対して全く影響を与えなかつた。

コンドロイチナーゼABCによるチトクロームC還元酵素のトリプシン感受性の増大がミトコンドリアの表面に存在するB型のコンドロイチン硫酸の除去によるものかどうかを確かめるため、外からコンドロイチン硫酸を加えてコンドロイチナーゼABCがミトコンドリアに作用するのを妨げて、トリプシン感受性に対する影響を調べた。コンドロイチン硫酸A、BおよびCは共にコンドロイチナーゼABCの効果を減少させた。コンドロイチン硫酸AおよびCはチトクロームC還元酵素のトリプシン感受性を未処理のミトコンドリアとほぼ同程度まで低下させたが、コンドロイチン硫酸Bは更にチトクロームC還元酵素を安定化させた。コンドロイチン硫酸Bはコンドロイチン硫酸AおよびCに比べてコンドロイチナーゼABCの作用を受けにくいことが知られている。<sup>45)</sup>従つて、用いた実験条件ではコンドロイチン硫酸AおよびCはほとんど消化されるが、コンドロイチン硫酸Bは半分以上が未消化のままと考えられ、そのためFig. 9のような結果を示したと考えられる。従つて、Fig. 10のように大部分のコンドロイチン硫酸が未消化のままに残っているような条件では、いずれのコンドロイチン硫酸もFig. 9のコンドロイチン硫酸Bと同程度の安定化効果を示した。

以上の実験結果とコンドロイチン硫酸のコンドロイチナーゼABCによる消化物は全くチトクロームC還元酵素のトリプシン感受性に影響を及ぼさず、また、コンドロイチン硫酸はトリプシンの酵素作用に影響を与えないなどの事実より、コンドロイチナーゼABCによるチトクロームC還元酵素のトリプシン感受性の増大はB型のコンドロイチン硫酸がミトコンドリアの表面より除去されたためと考えられる。

ミトコンドリアに存在するB型のコンドロイチン硫酸がすべてミトコンドリアの表面に存在すると仮定すると、ミトコンドリア1個当りにそれぞれ約10,000残基のガラクトサミンおよびウロン酸が存在することになり<sup>35)</sup>この量はミトコンドリアの表面を覆うのに十分な量と思われる。このミトコンドリアの表面に存在するムコ多糖の生理的意義は極めて興味ある問題ではあるが、それに関してはまだ明らかではない。



## 実 験 の 部

### 肝細胞ミトコンドリアの調製

ラット(正常雄、Wistar系、体重110-130g)を一夜絶食後、エーテル麻酔下で頸動脈および頸静脈を切断して放血したのち、0.07Mスクロースおよび0.1mM EDTAを含む0.21M マンニトール溶液(pH 7.4-7.5)(以下、SEM溶液と略す)を用いて門脈を経て充分に肝臓をかみ流し摘出した。細切した肝臓を4倍容量のSEM溶液の中で、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで1200rpmで2回ホモジナイズした。ホモジネートを600×g、15分間遠心して上清を除いた。得られた沈殿は同量のSEM溶液に懸濁し、更に、600×g、15分間遠心して上清を除いた。沈殿はさらにもう一度同様の条件で洗浄した。得られた3つの上清を合わせ、4500×g、12分間遠心した。得られた沈殿は更にSEM溶液で同様の条件で3回洗浄した。得られた沈殿を精製ミトコンドリアとして以下の実験に用いた。

### ミトコンドリアの電子顕微鏡写真

ミトコンドリアを0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.4)中、2%グルタルアルデヒドで前固定した後、1%四酸化オスmiumで固定した。エタノール濃度を順次上げた溶液で脱水し、エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片とした後、酢酸ウランおよび酸化鉛で電子染色し、Hitachi 11C型電子顕微鏡により観察した。

### ミトコンドリア画分の酵素活性の測定

<チトクロームC酸化酵素> チトクロームC(type III, Sigma Chem. Co.製)を基質にして基本的にはSchnaitman, Greenawaltらの方法<sup>10)</sup>に従い測定した。75mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.5)(3.6 ml)、28 mg/mlチトクロームC(50 μl)、1%トリトン×100(10 μl)および酵素液(100 μl)を加え、暫く25°Cでインキュベートしてから、0.14 mg/mlアスコルビン酸ナトリウム(20 μl)を加えて反応を25°Cで開始させた。消費された酵素量は酸素電極法により測定した。

<グルコース-6-ホスファターゼ> グルコース-6-リン酸(Boehringer-Mannheim Co.製)を基質にして基本的にはNordlie, Arionの方法<sup>21)</sup>に従い測定した。0.1Mカコシル酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)(0.6 ml)、0.15Mグルコース-6-リン酸(0.2 ml)および酵素液(0.7 ml)を加えて30°C反応させた。10%TCA(1.5 ml)を加えて反応を停止させ遊離してきた無機オルトリン酸を中村の方法<sup>22)</sup>で定量した。

<酸性ホスファターゼ> β-グリセリン酸を基質にして基本的にはde Duveらの方法<sup>9)</sup>に従い測定した。0.125M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.0)(0.6 ml)、0.138Mβ-グリセリン酸(0.2 ml)、15%トリトン×100(0.1 ml)および酵素液(0.6 ml)を加えて30°Cで反応させた。10%TCA(1.5 ml)を加えて反応を停止させ遊離してきた無機オルトリン酸を中村の

方法<sup>22)</sup>に従い定量した。

#### タンパク質の定量

Lowryらの方法<sup>23)</sup>に従い、牛血清アルブミン（結晶、Armour Pharm. CO.製）を標準品として測定した。

#### ミトコンドリアの糖組成分析

<中性糖> 試料を1N塩酸、100°C、8時間加水分解した。内部標準として一定量のキシロースを加え、Dowex 1×8（100-200 mesh、 $\text{HCO}_3^-$ 形）で中和した。樹脂はろ過した後、10倍容量の水で洗った。ろ液および洗液を合わせてDowex 50×4（200-400 mesh、 $\text{H}^+$ 形）のカラム（0.9×6 cm）に通し、カラムを更に10倍容量の水で洗った。溶出液および洗液を合わせてロータリエバポレーターで35~45°Cで少量に濃縮した後、ガラス管に移して真空デシケーターの中で $\text{P}_2\text{O}_5$ とKOH上で完全に乾固させた。このガラス管に0.5N塩化水素-メタノールを1.5 ml加えて封管し、100°C、24時間メチル化を行なった。この溶液に炭酸銀を加えて中和し、遠心して上清を除いた。炭酸銀を更に2回メタノールで洗い、遠心して上清を除いた。上清を合わせてロータリエバポレーターでメタノールを完全に除去した。得られたメチルグリコシドに0.1 mlのトリメチルシリル化剤（無水ピリジン：ヘキサメチルジシラン：トリメチルシリルクロリド=10：2：1）を加えて、30分間、室温で時々かくはんして反応させた後、一定量をカラムに注入した。カラムとしては1.5%SE30を塗布したchromosorb Wを充填したステンレス製カラムを使用した。クロマトグラフィは115°Cで2分間置き、その後毎分2°C割合で215°Cまで昇温しつつ行なった。ガラクマトグラフは水素炎イオン化検出器と昇温装置付きのHitachi Gaschromatograph Type K-23を使用した。

<ヘキソサミン> 試料を2N塩酸、100°C、16時間、真空封管中で加水分解した。加水分解物はDowex 1×8（100-200 mesh、 $\text{HCO}_3^-$ 形）で中和した。樹脂はろ過した後、10倍容量の水で洗った。ろ液および洗液を合わせてDowex 50×8（200-400 mesh、 $\text{H}^+$ 形）のカラム（1×20 cm）に添加した。カラムを水洗の後、ヘキソサミンはBoas<sup>24)</sup>の方法により2N塩酸で溶出した。溶出液は再びDowex 1×8（100-200 mesh、 $\text{HCO}_3^-$ 形）で中和した。樹脂はろ過した後、10倍容量の水で洗った。ろ液および洗液を合わせてロータリエバポレーターで乾固し、アミノ酸分析計（Hitachi KLA-3B）によってグルコサミンとガラクトサミンを分別定量した。

<シアル酸> 試料を2.5%トリクロロ酢酸中、80°C、60分間加水分解した。遠心して上清を除き、沈殿を2.5%トリクロロ酢酸で2回洗った。上清および洗液を合わせて中性になるまでエーテルでトリクロロ酢酸を抽出した後、Jourdainらの方法<sup>25)</sup>でシアル酸を定量した。標準品としてN-アセチルノイラミン酸（生化学工業株式会社製）を用いた。

### 脱脂ミトコンドリア画分のプロナーゼ消化

76匹のラット肝細胞より調製された脱脂ミトコンドリア(2.9gタンパク質)を280 mlの0.01 M酢酸カルシウムを含む0.1 Mホウ酸緩衝液(pH8.0)に懸濁し、60 mgプロナーゼ(Streptomyces griseus proteinase, Grade P, 科研化学株式会社製)を加えて少量のトルエン存在下で、37°C、72時間消化した。反応後、消化物を遠心して上清と沈殿に分け、上清を糖ペプチド画分として以下の実験に用いた。

### セファデックスG-25およびG-50とDEAE-セファデックスA-25の各画分の糖およびアミノ酸の定量

<中性糖> Hewittの方法<sup>26)</sup>に従い、オルシノール・硫酸法で定量した。但し、微量化の為にスケールを1/5に縮小し、分光光度計による測定の際にはマイクロセルを用いた。

<シアル酸> Jourdianらの方法<sup>25)</sup>に従い、レゾルシノール・塩酸法で定量した。但し、微量化の為にスケールを1/5に縮小し、分光光度計による測定の際にはマイクロセルを用いた。

<アミノ酸> Yemm, Cockingの方法<sup>27)</sup>に従い、ニンヒドリン反応法で定量した。

### 糖ペプチドの糖およびアミノ酸組成の決定

<アミノ酸およびヘキソサミン> 試料を6N塩酸、100°C、16時間加水分解後、アミノ酸分析計で定量した。

<中性糖> 前述と同じ方法でガスクロマトグラフィーにより定量した。

<シアル酸> Jourdianらの方法<sup>25)</sup>に従い、レゾルシノール・塩酸法で定量した。

### 高圧ろ紙電気泳動

ビリジン：酢酸：水(1:10:89)、pH3.6でToyoろ紙、Na51を用いて、50 volt/cmの定電圧で15時間泳動させた。泳動後、スポットは塩素化法<sup>28)</sup>で検出した。

### ミトコンドリアの細分画

ラット肝細胞より調製されたミトコンドリアを基本的には Schnaitmanらの方法<sup>10)</sup>および Hoppelらの方法<sup>11)</sup>を組み合わせた方法によりジギトニン処理により外膜、膜間部、内膜および健質の各画分を調製した。

約100 mgタンパク質/mlになるようにミトコンドリアをSEM溶液に懸濁し、ミトコンドリアのタンパク質の0.123倍重量(w/w)のジギトニン(Merk Co.製、エタノールで2回再結晶してから使用した。)をSEM溶液に溶かして加えた。このジギトニンの濃度はミトコンドリアの最終タンパク質濃度が60 mg/mlになるように調製した。ジギトニン溶液を加えて0°C、5分間かくはんしながら放置した。3倍容量のSEM溶液で希釈して15,000×g、15分間遠心して上清と沈殿とに分けた。沈殿を更に同量のSEM溶液に懸濁して15,000×g、15分間遠心して上清と沈殿とに分けた。ここで得られた2つの15,000×g上清画分を合わせて105,000×g

90分間遠心して上清と沈殿とに分けた。この105,000×gの上清画分を膜間部画分、沈殿を外膜画分とした。15,000×g沈殿は最初のミトコンドリアのタンパク質量の0.246倍重量(W/W)のジギトニンを0.9%水溶液中に懸濁してPotter-Elvehjem型ホモジナイザーで激しく5回ホモジナイズした。同量の水で希釈して105,000×g、90分間遠心した。沈殿を内膜画分、上清を礎質画分とした。

#### ミトコンドリア細画分の酵素活性の測定

<チトクロームC酸化酵素> 前述の方法により測定した。

<キヌレン-3-モノオキシゲナーゼ> L-キヌレンを基質にして基本的にはOkamotoの方法<sup>29)</sup>に従い測定した。0.5M トリス酢酸緩衝液(pH 8.1)(0.6ml)、0.3M KCl(0.1ml)、0.0042M NADPH(0.1ml)、0.03M L-キヌレン(0.01ml)、0.013M KCN(0.1ml)、1%トリトン×100(0.5ml)、水(1.3ml)および酵素液(0.2ml)を加えて30℃で反応させた。反応の進行は自己分光光度計で測定した。

<マレイン酸デヒドロゲナーゼ> オキサロ酢酸を基質にして基本的にはOchoaの方法<sup>30)</sup>に従い測定した。0.25M グリシルグリシンカリウム緩衝液(pH 7.4)(0.3ml)、0.038M オキサロ酢酸(KOHでpHを7.4にした。)(0.1ml)、0.075M NADH(0.1ml)、0.03M アモルビタル酸ナトリウム(0.1ml)、水(2.4ml)および酵素液(20μl)を加えて30℃で反応させた。試料は低張処理をしてから加えた。反応の進行は自己分光光度計で測定した。

#### レクチンによるミトコンドリアの凝集

<コンカナバリンA> ミトコンドリアを10mM N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンスルホン酸(HEPES)ナトリウム緩衝液(pH 7.5)を含む0.28M ラクトース溶液(以下、HL溶液と略す。)で3回洗浄して70mgタンパク質/mlになるようにHL溶液に懸濁した。このミトコンドリア懸濁液(0.3ml)にHL溶液に溶かしたコンカナバリンA(Sigma Chem. Co.製)(0.3ml)を加えて37℃、20分間インキュベートしてから、顕微鏡下でミトコンドリアの凝集を観察した。

<Ricinus communis agglutinin> HL溶液の代りに10mM HEPESナトリウム緩衝液を含む0.28M スクロース溶液を使用した以外はコンカナバリンAの場合と同様。Ricinus communis agglutininはRicinus communis beansよりNicolsonらの方法<sup>31)</sup>により調製した。

#### マイクロゾームの調製

ミトコンドリアを沈殿させた4,500×g、12分間の遠心上清を10,000×g、10分間遠心して得られた上清を更に、105,000×g、90分間遠心した。得られた沈殿をマイクロゾーム画分と

した。

#### 放射活性の測定

試料 (0.5 - 1.0 ml) を Madson の方法<sup>32)</sup> によるシンチレーション混合液 (トルエン:トリトン×100 = 2:1 の溶液に 0.4% (W/V) の 2,5-ジフェニルオキサゾール (DPO) を加える) (10 ml) に溶かして Beckman 社製液体シンチレーションカウンター Model LS-100 で測定した。計数効率は外部標準法で測定して cpm を dpm に補正した。

#### シアル酸の比放射活性の測定

試料を 2.5% トリクロロ酢酸中で 80°C、60 分間加水分解した。冷却後、最終濃度が 10% (W/V) になるようにトリクロロ酢酸を加えて遠心した。上清を除き、沈殿を 10% トリクロロ酢酸で 2 回洗浄した。上清および洗液を合わせてエーテルで 4 回、トリクロロ酢酸を抽出した。残存する微量のトリクロロ酢酸をピリジンで中和して Dowex 1×8 (100-200 mesh, Cl<sup>-</sup> 形) のカラム (1×8.5 cm) に添加した。25 ml の水で洗浄した後、10 ml の 0.2 N 塩酸でシアル酸を溶出した。溶出液を NaHCO<sub>3</sub> で中和して濃縮した。一部を放射活性の測定に用い、一部は Warren の方法<sup>33)</sup> に従い、チオバルビツール酸法でシアル酸を定量した。

#### ヘキソサミンの比放射活性の測定

前述の 2.5% トリクロロ酢酸加水分解残渣を 2 N 塩酸、100°C、16 時間真空封管中で加水分解した。加水分解液は Dowex 1×8 (100-200 mesh, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 形) で中和した。樹脂はろ過した後、10 倍容量の水で洗浄した。ろ液および洗液を合わせて Dowex 50×8 (200-400 mesh, H<sup>+</sup> 形) のカラム (1×20 cm) に添加した。カラムを 30 ml の水で洗浄した後、ヘキソサミンは Boas の方法<sup>24)</sup> に従い 2 N 塩酸で溶出した。溶出液は再び Dowex 1×8 (100-200 mesh, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 形) で中和した。樹脂はろ過した後、10 倍容量の水で洗浄した。ろ液および洗液を合わせて濃縮した。一部を放射活性の測定に用い、一部は Elson-Morgan 反応法<sup>34)</sup> によりヘキソサミンを定量した。

#### ミトコンドリアおよび外膜を除去したミトコンドリアのコンドロイチナーゼ ABC 消化 (第4節)

ミトコンドリア (5 mg タンパク質) あるいは外膜を除去したミトコンドリア (7 mg タンパク質相当のミトコンドリアから調製されたもの。) と 1 unit のコンドロイチナーゼ ABC (生化学工業株式会社製) を 0.2 ml の 0.07 M スクロースおよび 2 mM N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸 (HEPES) ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) を含む 0.21 M マンニトール溶液中で、30°C、15 分間インキュベートした。

#### ミトコンドリアの酸素消費量の測定

基本的に Moore の方法<sup>41)</sup> に従い、0.2 ml の試料を 3.8 ml の 20 mM コリン塩化物、4 mM トリスエタノールアミン、2 mM リン酸、10 mM グルタミン酸、10 mM リンゴ酸および 1 mM

KClを含む0.22 M スクロース溶液 (NaOHでpH7.4に調整) 中で、30°Cで酸素電極法により測定した。

#### ミトコンドリアの外膜酵素の酵素活性の測定

<モノアミン酸化酵素> ベンジルアミンを基質にして基本的には Schnaitman らの方法<sup>10)</sup>に従い測定した。0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) (2.95 ml)、0.15 M ベンジルアミン (0.05 ml) および2%トリトン×100で可溶化した酵素液 (0.2 ml) を加えて30°Cで反応させた。反応の進行は自記分光光度計により測定した。

<ロテノン-非感受性 NADH-チトクロームC還元酵素> チトクロームCを基質にして基本的には Sottocasa らの方法<sup>46)</sup>に従い測定した。3 mM NADH (0.1 ml)、3 mM チトクロームC (0.1 ml)、5 μM Rotenone および0.3 mM KCNを含む0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) (2.8 ml) および酵素液 (0.05 ml) を加えて30°Cで反応させた。反応の進行は自己分光光度計により測定した。

#### ミトコンドリアのコンドロイチナーゼABCおよびAC消化 (第5節)

ミトコンドリア (2mgタンパク質) と0.2 unitのコンドロイチナーゼABCあるいはAC (生化学工業株式会社製) を0.4 mlの0.07 M スクロースおよび10mM HEPESナトリウム緩衝液 (pH7.4) を含む0.21 M マンニトール溶液中で、30°C、15分間インキュベートした。コンドロイチン硫酸を加えてコンドロイチナーゼABCを阻害するときは25mgのコンドロイチン硫酸A、BあるいはC (super special grade、生化学工業株式会社製) を加えた。

#### ミトコンドリアのトリブシン消化

ミトコンドリア (2mgタンパク質) を0.4 mlの0.07 M スクロースおよび10mM HEPESナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を含む0.21 M マンニトール溶液に懸濁させ、0.1 mlの上記の溶液に溶かしたトリブシン (Type III, Sigma Chem. Co. 製) を加えて、25°C、10分間インキュベートしてから、32 μgのトリブシン インヒビター (soy bean, Sigma Chem. Co. 製) を含む上記の溶液0.4 mlを加えて反応を停止させた。

## 第2章 ラット肝細胞ミトコンドリアに存在する糖タンパク質 糖鎖の免疫化学的研究

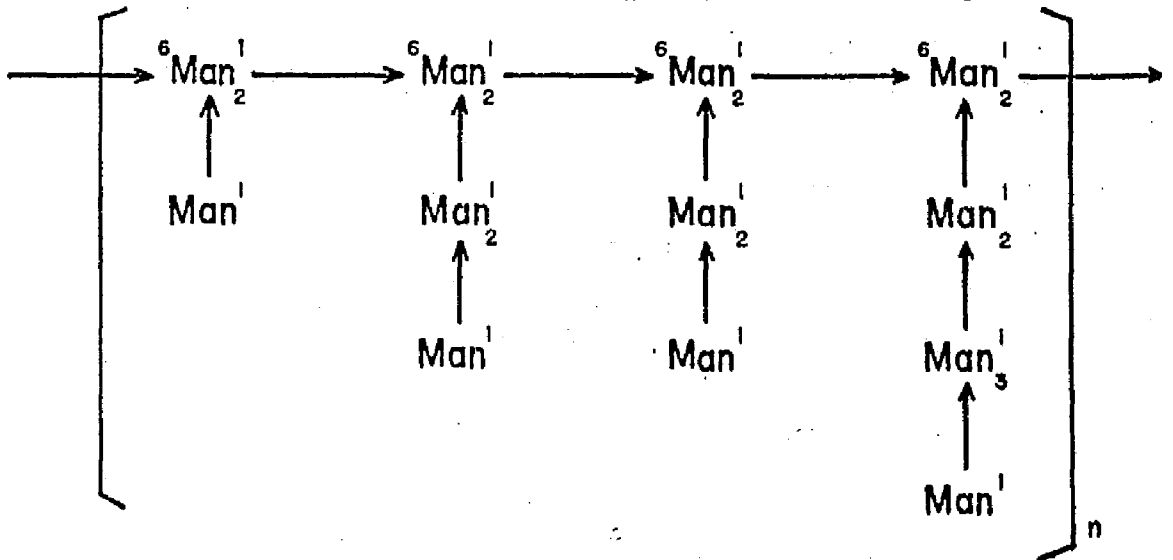
細胞表面および各種膜系の糖タンパク質の糖鎖の検索には従来から各種レクチンが用いられてきたが、(14), 18) レクチンは糖鎖に対する特異性が厳密でなく、多くの場合、細胞毒性をもち、また、一価の結合価をもつ標品が調製し難いなどの欠点をもっている。これに対し、糖タンパク質の糖鎖に特異性をもつ抗体を用いることができれば、これらの欠点は補われると考えられ、糖タンパク質の糖鎖の検索試薬として糖鎖に特異性をもつ抗体の調製が望まれている。

しかし、一般に、糖タンパク質の抗原決定基は主としてペプチド部分に存在し、糖鎖はほとんど抗原性はなく、現在までのところ血液型物質を除けば、糖タンパク質の糖鎖に特異性をもつ抗体は調製し難いとされている。(6)

一方、酵母の細胞表面多糖であるマンナンは強い抗原性を有し、その抗体はマンナンの側鎖に存在する  $\alpha 1 \rightarrow 2$  あるいは  $\alpha 1 \rightarrow 3$  マンノピラノシド残基に特異的であることが知られている。(7), 8) (Fig. 11

参照)

### Structure of Yeast Mannan ( S. cerevisiae )



T.S. Stewart, C.E. Ballou: *Biochemistry*, 7, 1855 (1968)

ラット肝細胞ミクロソーム膜、核膜およびミトコンドリアに存在する糖タンパク質の糖鎖の主成分の一つである中性糖鎖はグルコサミンおよびマンノースから成り、マンノースは主として非還元末端に存在することが推定されている。4)、5)、47) この中性糖鎖はラット正常肝細胞では原形質膜には存在しないが、腹水肝ガン細胞では原形質膜にも存在し、37) 正常細胞とガン細胞の表面糖鎖の差異の一端を担っていると考えられる。

従って、この抗マンナン抗体と糖タンパク質の中性糖鎖との交叉反応性を検討し、抗マンナン抗体の中性糖鎖に対する細胞化学的検索試薬としての可能性を検討した。

その結果、マンノースを非還元末端にもつ糖タンパク質の糖鎖と抗マンナン抗体は交叉反応性を示し、その糖鎖認識の特異性は極めて高いことが明らかになった。

一方、コンカナバリンAもマンノースと反応することが知られており、種々のマンノース含有オリゴ糖または多糖の構造とコンカナバリンAとの反応性が調べられている。51)、52) それによればC-2に置換基をもつマンノースはコンカナバリンAと強く反応することが知られている。

これらの事実をもとに、抗マンナン抗体とコンカナバリンAを用いて、特に、本研究の主題であるミトコンドリアの糖タンパクの中性糖鎖の構造の特徴を調べた。

## 第 1 節 抗マンナン抗体の調製とその性質

抗マンナン抗血清は1%加熱酵母死菌生理食塩水懸濁液をウサギの耳静脈に1週間に2回、10週間投与し、最終免疫後、1週間後に血液を採取して調製した。

得られた抗血清の力価は2%酵母生理食塩水懸濁液に対してX256(抗血清の256倍希釈まで凝集性を示した)であり、この活性はすべて1/2飽和硫酸アンモニウム液で沈殿する $\gamma$ -グロブリン画分に回収された。また、セファデックスG-200で抗血清をIgG、IgAおよびIgMとに分画したところ、凝集力価はIgG画分のみで回収され、IgAおよびIgM画分にはほとんど凝集力価は見られなかった。DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによってもIgG画分に凝集活性が回収された。従って、抗マンナン抗体はIgG抗体であると考えられる。

(Table 7 参照)

精製マンナンと抗血清との定量的沈降反応を行なったところ、典型的な沈降カーブを示し、当量域は0.2m $\mu$ lの抗血清に対して100 $\mu$ gマンナンであった。(Fig. 12 参照)



Table 7  
Agglutination Titer of Antimannan Serum  
and its Subfraction

	Titer <sup>1)</sup>
Serum	X 256
Crude $\gamma$ Globulin fraction (1/2 sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitate)	X 256
Ig M fraction	X 1 >
Ig A fraction	X 1 >
Ig G fraction	X 128

1) Titer was determined by using 2% living yeast suspension in saline.

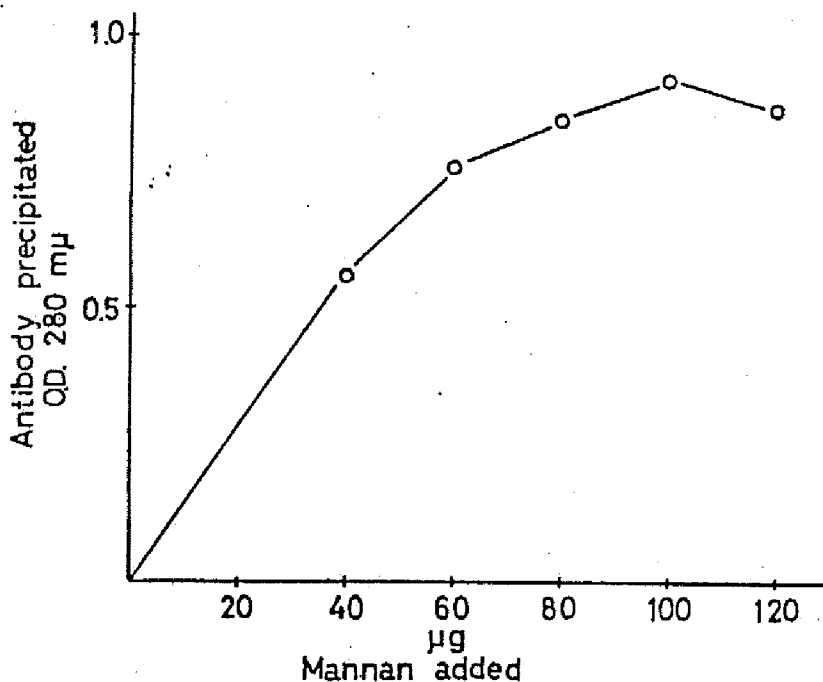


Fig. 12. Quantitative Precipitin Curve of Antimannan Serum against Mannan

The antimannan serum (0.2 ml) and varying amounts of mann in 0.8 ml of PBS (pH 8.0) were mixed. Incubation was performed first for 2 hr at  $37^\circ\text{C}$ , then for 24 hr. at  $4^\circ\text{C}$ . The precipitate formed was collected by centrifugation, washed with PBS (pH 8.0) twice, and then dissolved in 1 ml of 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Absorbance of the solution was measured at 280 m $\mu$ .

第 2 節 抗マンナン抗体と糖タンパク質糖鎖との交叉反応

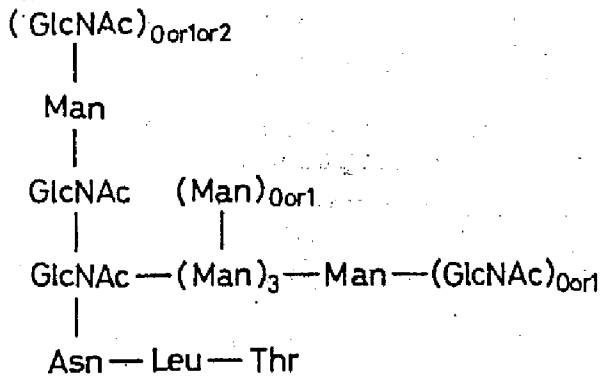
抗マンナン抗体と糖タンパク質の糖鎖との交叉反応性を検討するため、比較的少量に試料が得られ、かつ、糖鎖の構造研究が進んでいるタカアミラーゼA糖ペプチドおよび卵白アルブミン糖ペプチドを用いて調べた。

タカアミラーゼA糖ペプチドおよび卵白アルブミン糖ペプチドの構造式を Table 8 に示した。

Table 8

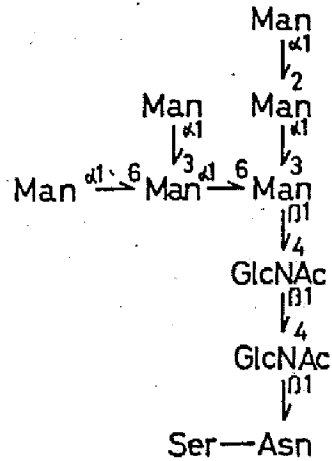
Structure of Glycopeptides

Ovalbumin glycopeptides



C.C.Huang, et al.,  
Carbohydr. Res., 13 127(1970)

Taka amylase A glycopeptides



H.Yamaguchi et al.,  
J. Biochem., 70 587(1971)

タカアミラーゼA糖ペプチドの構造は山口ら<sup>48)</sup>によって提出されたものである。それによれば、糖ペプチド1分子当り、2分子のN-アセチルグルコサミンおよび6分子のマンノースを含み、非還元末端に  $\text{Man} \alpha 1 \rightarrow 2 \text{Man} \alpha 1 \rightarrow 3 \text{Man}$  のトリオース構造をもっている。卵白アルブミン糖ペプチドの糖鎖の構造はHuangら<sup>49)</sup>によって明らかにされている。糖鎖の構造は極めて多様性を示し、多くの場合、非還元末端にN-アセチルグルコサミン残基をもっていることが明らかにされている。

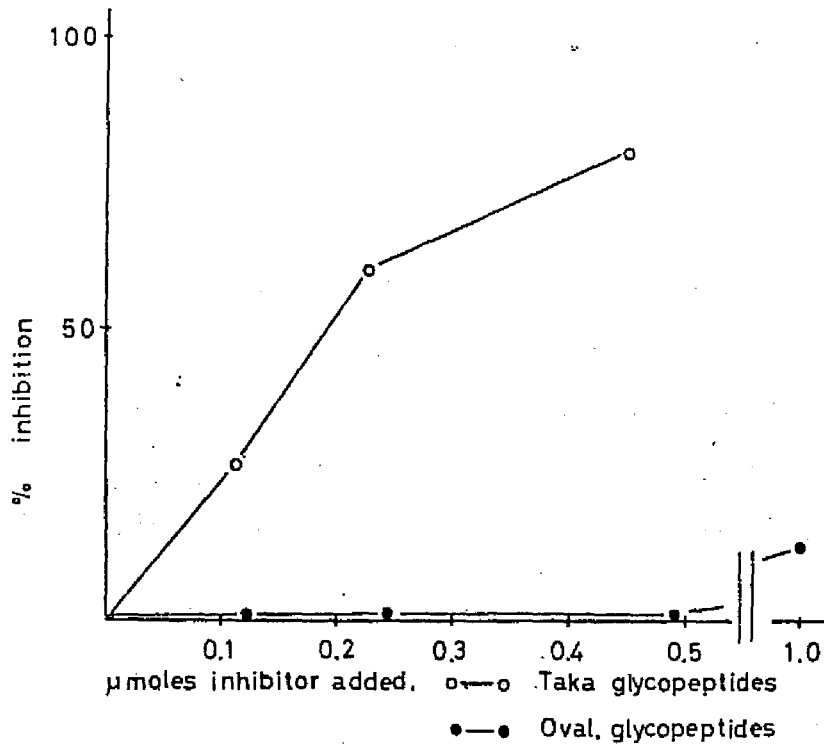


Fig. 13. Inhibition of Antimannan Serum- Mannan Precipitation Reaction by Glycopeptides

The antimannan serum (0.1 ml) and varying amounts of glycopeptide in 0.5 ml of PBS (pH 8.0) were mixed, and after incubation for 2 hr at 37°C, 50 μg mannan in 0.5 ml of PBS (pH 8.0) was added. Incubation was continued first 2 hr at 37°C, then for 24 hr at 4°C. The precipitate formed was collected by centrifugation, washed with PBS (pH 8.0) twice, and then dissolved in 1 ml of 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Absorbance of the solution was measured at 280 mμ.

Fig. 13は抗マンナン抗血清とマンナンの当量域におけるタカアミラーゼA糖ペプチドおよび卵白アルブミン糖ペプチドの沈降阻止活性を調べたものである。図より明らかなように、タカアミラーゼA糖ペプチドは強い沈降阻止活性を示したが、卵白アルブミン糖ペプチドはほとんど沈降阻止活性を示さなかった。

Table 9 はタカアミラーゼA糖ペプチドの沈降阻止活性を鈴木ら<sup>8)</sup>によって報告されているオリゴマンノシド(抗原であるマンナンを加酵分解して調製したもの)の沈降阻止活性と比較したものである。沈降阻止活性は50 μg のマンナンの沈降を50%阻止するのに必要な μmole 数であらわした。タカアミラーゼA糖ペプチドの沈降阻止活性はマンナンの抗原決定基と考えられている Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man のテトラオースや Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man あるいは Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Manなどのトリオースに匹敵するものである。

一方、卵白アルブミン糖ペプチドはほとんど沈降阻止活性を示さず、1 μmoleの糖ペプチドでも13%ほどの沈降阻止を示すのみであった。

山口らはタカアミラーゼA糖ペプチドの糖鎖は均一であり、その構造はTable 8に示したものであると主張している。しかし、著者が調製したタカアミラーゼA糖ペプチドをDowexのカラムクロマトグラフィーによって分画したところ、糖ペプチドは多くの画分に分かれ、タカアミラーゼAの糖鎖は極めて不均一であることが明らかになった。

Table 9. Inhibition by various mannosides of the precipitation of mannan by antimannan

Inhibitor	μmoles to give 50 % inhibition
TA-GP	0.190
OA-GP	(13 %) <sup>a</sup>
Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man	0.083 <sup>b</sup>
Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man	0.250 <sup>b</sup>
Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man	
Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man	1.67 <sup>b</sup>
Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man	4.20 <sup>b</sup>
Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Man	12.0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Percent of inhibition caused by 1.0 μmole of OA-GP,

<sup>b</sup>Date from S.Suzuki, et al., Japan.J.Microbiol., 12, 19-24(1968)

糖ペプチドの分画の結果を Fig. 14 に示した。

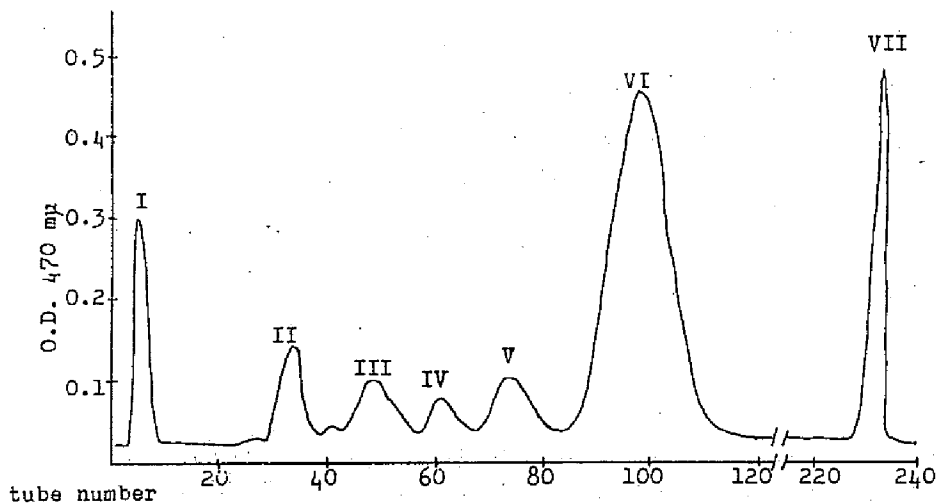


Fig. 14. Fractionation of Taka Amylase A Glycopeptides on Dowex 50X2

Taka amylase A glycopeptides (77.9 mg mannose eq.) were dissolved in 5 ml of 0.001 M pyridine-acetic acid buffer, pH 2.5, and applied to a column of Dowex 50X2 (1.5X 116 cm) equilibrated with the same buffer. Elution was carried out initially with the same buffer, from tube number 71 to tube number 200 with a linear gradient from the same buffer to 0.04M pyridine-acetic acid buffer, pH 3.1 and from tube number 201 with 0.2 M pyridine-acetic acid buffer, pH 3.1. The flow rate was 25 ml per hr and 15.3 ml fractions were collected initially and from tube number 71, 10.5 ml fraction were collected. Aliquots were used for the orcinol- $H_2SO_4$  reaction.

また、得られた各画分の糖およびアミノ酸組織を Table 10 に示した。

Table 10. Amino Acid and Carbohydrate Compositions of Taka Amylase A Glycopeptides Fractionated on Dowex 50X 2

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Asp	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>	<u>1.00</u>
Thr	0.07						0.05
Ser	0.83	0.16	0.96	0.89	0.94	0.89	0.29
Glu	0.07						0.07
Pro	0.11						0.50
Gly	0.16						0.20
Ala	0.03						0.03
Cys							0.16
Val							0.28
Met	0.10						0.09
Ile							0.01
Leu							trace
Tyr							0.32
Phe							
GlcNH <sub>2</sub>	1.55	1.71	1.90	1.73	1.65	1.60	0.63
Man	9.59	5.74	8.29	7.11	6.13	4.97	2.29
Man distribution (%)	6.1	5.6	7.2	5.2	9.5	56.7	9.7

Values are expressed as moles per mole of Asp. Try, Lys, His and Arg were not determined.

画分 III、IV、V および VI はいずれもアスパラギン酸 1 モル当り、1 モルのセリン、2 モルのグルコサミンを含んでいたが、マンノース量は異なり、III、IV、V、VI の順にそれぞれ 8 モル、7 モル、6 モル、5 モルを含んでいた。各画分の沈降阻止活性は互いに異なり、III、IV、V、VI の順に減少していた。

その結果を Fig. 15に示した

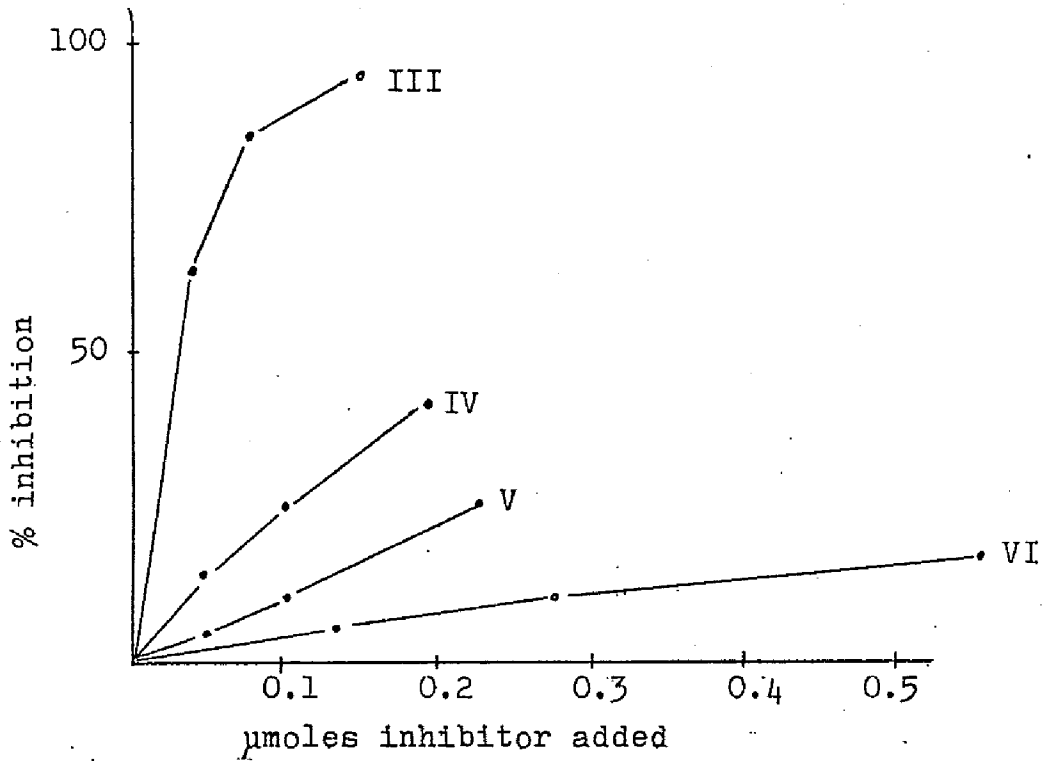


Fig. 15. Inhibition of Antimannan Serum-Mannan Precipitation Reaction by Taka Amylase A Glycopeptides Fractionated on Dowex 50X2

The antimannan serum (0.1 ml) and varying amounts of glycopeptide in 0.5 ml of PBS (pH 8.0) were mixed, and after incubation for 2 hr at 37°C, 50 µg mannan in 0.5 ml of PBS (pH 8.0) was added. Incubation was continued first 2 hr at 37°C, then for 24 hr at 4°C. The precipitate formed was collected by centrifugation, washed with PBS (pH 8.0) twice, and then dissolved in 1 ml of 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Absorbance of the solution was measured at 280 mµ.

画分ⅢはManα1→3Manα1→2Manα1→2Manのテトラオース、画分ⅣはManα1→3Manα1→2ManあるいはManα1→2Manα1→2Manのトリオース、また、画分ⅤおよびⅥはManα1→3ManあるいはManα1→2Manのジオースの沈降阻止活性に相当する活性を有することが明らかになった。

コンカナバリンAは細胞膜の糖タンパク質の糖鎖の細胞化学的式薬としてよく用いられ、マンノースあるいはグルコース残基に特異的であることが示されている。<sup>50), 51)</sup> 従って、著者は抗マンナン抗体とコンカナバリンAの特異性の比較するためコンカナバリンAについても抗マンナン抗体と

同様の実験を行なった。

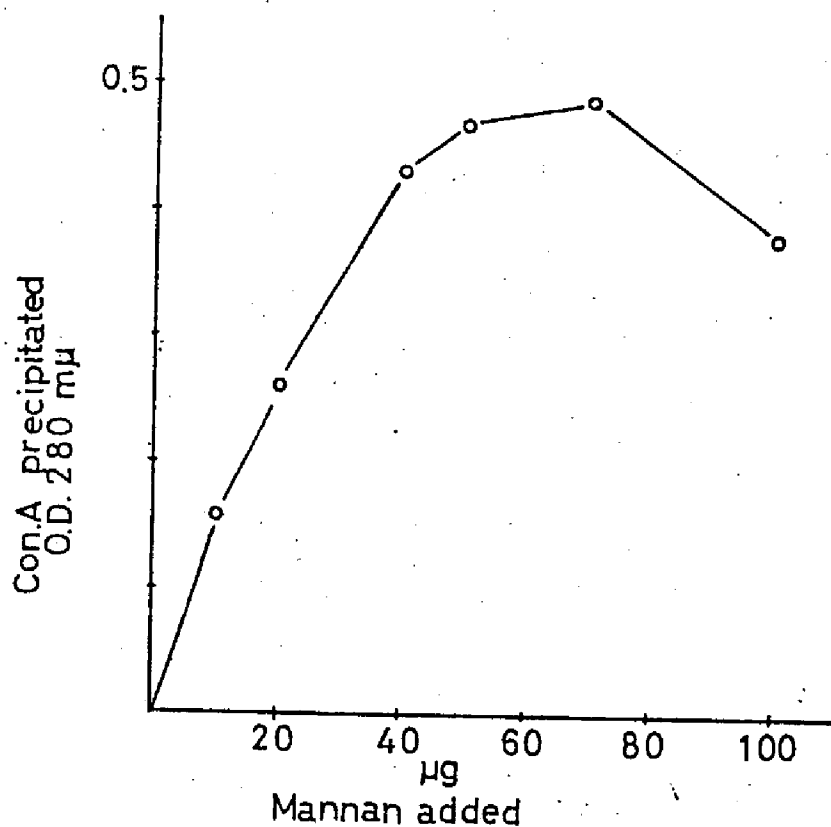


Fig. 16. Quantitative Precipitin Curve of Concanavalin A against Mannan

Concanavalin A (500 μg) in 0.5 ml of TBS (pH 8.0) and varying amounts of mannan in 0.5 ml of TBS (pH 8.0) were mixed. Incubation was performed first for 30 min at 37°C, then for 1 hr at 4°C. The precipitate formed collected by centrifugation, washed with TBS (pH 8.0) once, and then dissolved in 1 ml of 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Absorbance of the solution was measured at 280 mμ.

Fig. 16はコンカナバリンAとマンナンの定量的沈降反応を示したものである。当量域は500 μgのコンカナバリンAに対して約50 μgのマンナンであった。



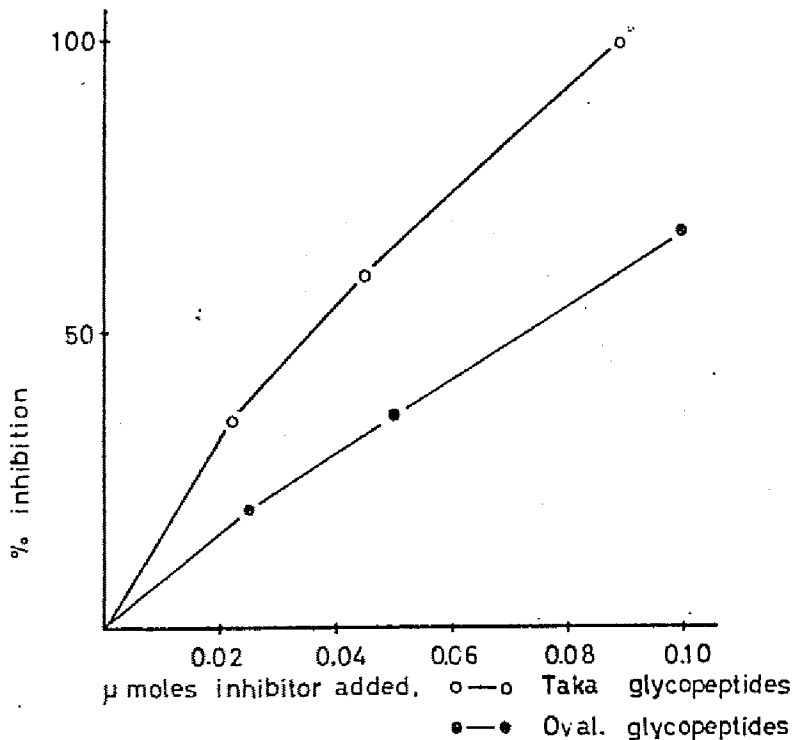


Fig. 17. Inhibition of Concanavalin A-Mannan Precipitation Reaction by Glycopeptides

Concanavalin A (500 μg) in 0.5 ml of TBS (pH 8.0) and varying amounts of glycopeptide in 0.5 ml of TBS (pH 8.0) were mixed, and after incubation for 30 min at 37°C, 50 μg mannan in 0.5 ml of TBS (pH 8.0) was added. Incubation was continued first for 30 min at 37°C, then for 1 hr at 4°C. The precipitate formed was collected by centrifugation, washed with TBS (pH 8.0) once, and then dissolved in 1 ml of 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Absorbance of the solution was measured at 280 mμ.

Fig. 17はこの当量域におけるタカアミラーゼA糖ペプチドおよび卵白アルブミン糖ペプチドの沈降阻止活性を調べたものである。抗マンナン抗体の場合とは異なり、両糖ペプチドとも同程度の沈降阻止活性を示した。この結果は既に明らかにされているコンカナバリンAの特異性<sup>50), 51)</sup>と両糖ペプチドの構造から予想される結果であった。

### 第 3 節 抗マンナン抗体とミトコンドリアの糖タンパク質糖鎖との交叉反応

第2節の研究結果より抗マンナン抗体は非還元末端にα 1→2あるいはα 1→3結合から成るオリゴマンノシド残基をもつ糖タンパク質の糖鎖と交叉反応性を示し、その糖鎖認識の特異性は極めて高いことが明らかになった。

ラット肝細胞膜系に存在する糖タンパク質の糖鎖の主成分はN-グリコシド型結合をした血清型糖鎖であることが明らかにされている。この血清型糖鎖はグルコサミンおよびマンノースより成る中性糖鎖とグルコサミン、マンノース、ガラクトースおよびシアル酸より成る酸性糖鎖に大別される。

中性糖鎖は $\alpha$ -マンノシダーゼによって大部分のマンノースが遊離することより、非還元末端にオリゴマンノシド残基をもっていると推定される。<sup>47)</sup>従って、著者はミクロゾーム膜およびミトコンドリアより調製された中性糖鎖と抗マンナン抗体との交叉反応性を検討した。

Fig. 18および19はラット肝細胞ミトコンドリアおよびミクロゾーム膜より調製された中性および酸性糖ペプチドによる抗マンナン抗体-マンナンの沈降反応の阻止を調べたものである。

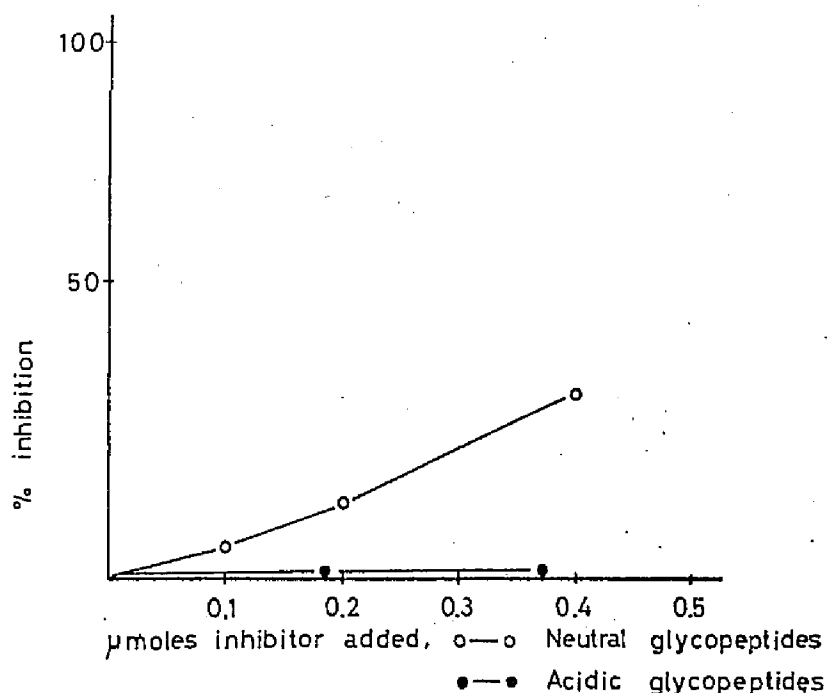


Fig. 18. Inhibition of Antimannan Serum-Mannan Precipitation Reaction by Glycopeptides from Mitochondria of Rat Liver

The antimannan serum (0.1 ml) and varying amounts of glycopeptide in 0.5 ml of PBS (pH 8.0) were mixed, and after incubation for 2 hr at 37°C, 50 μg mannan in 0.5 ml of PBS (pH 8.0) was added. Incubation was continued first 2 hr at 37°C, then for 24 hr at 4°C. The precipitate formed was collected by centrifugation, washed with PBS (pH 8.0) twice, and then dissolved in 1 ml of 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Absorbance of the solution was measured at 280 mμ.

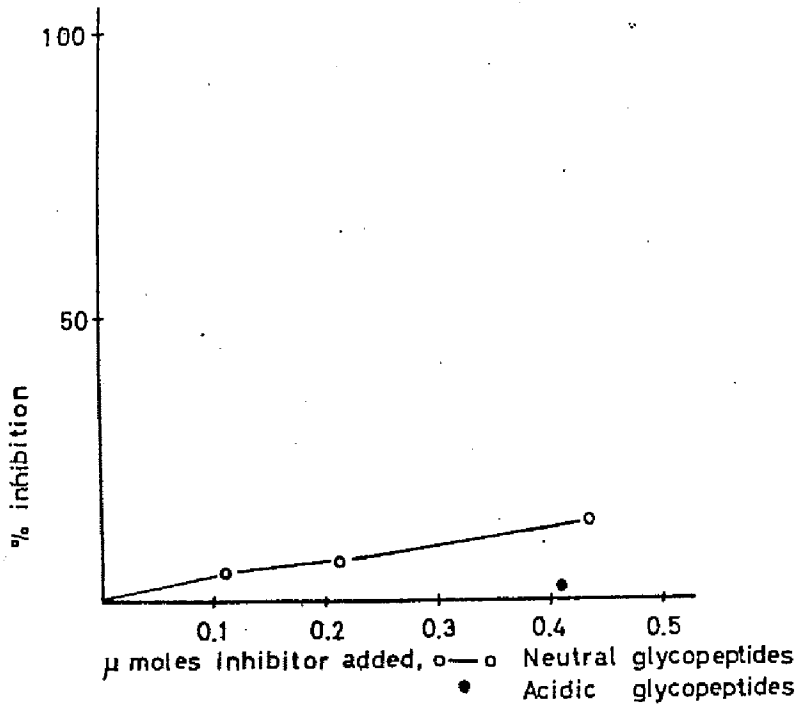


Fig. 19. Inhibition of Antimannan Serum-Mannan Precipitation Reaction by Glycopeptides from Microsomes of Rat Liver

The antimannan serum (0.1 ml) and varying amounts of glycopeptide in 0.5 ml of PBS (pH 8.0) were mixed, and after incubation for 2 hr at 37°C, 50 μg mannan in 0.5 ml of PBS (pH 8.0) was added. Incubation was continued first 2 hr at 37°C, then for 24 hr at 4°C. The precipitate formed was collected by centrifugation, washed with PBS (pH 8.0) twice, and then dissolved in 1 ml of 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Absorbance of the solution was measured at 280 mμ.

酸性糖ペプチドは全く沈降阻止活性を示さなかったが、中性糖ペプチドはミトコンドリアおよびマイクロゾーム膜のいずれの場合も沈降阻止活性を示した。しかし、その沈降阻止活性は低く、タカアミラーゼA糖ペプチドの画分VあるいはVIと同程度であり、α1→2あるいはα1→3マンノジオースに相当するものであると考えられる。ミトコンドリアより調製された中性糖ペプチドはマイクロゾーム膜より調製された中性糖ペプチドよりやや強い阻止活性を示した。

コンカナバリンAについても抗マンナン抗体と同様、ミトコンドリアおよびマイクロゾーム膜より調製された中性および酸性糖ペプチドによる沈降阻止活性を調べた。その結果をFig. 20および21に示した。

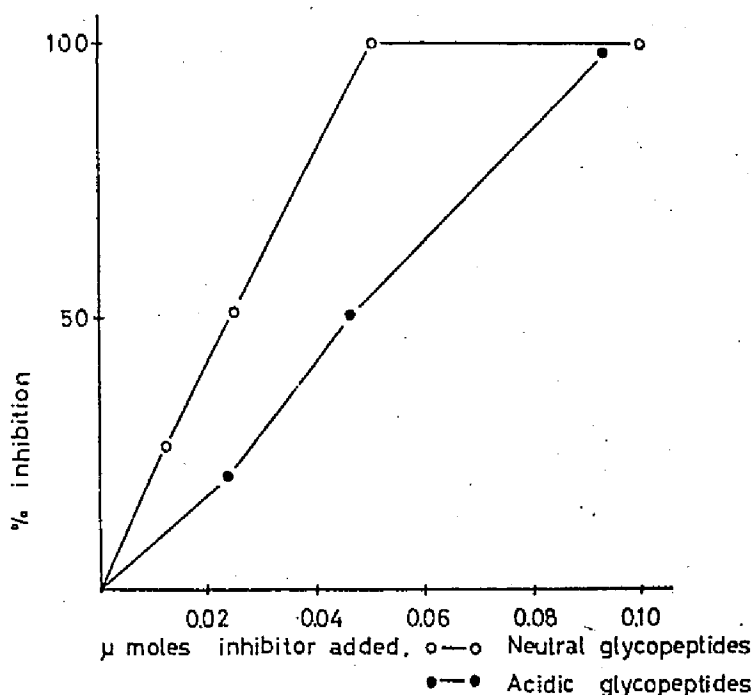


Fig. 20. Inhibition of Concanavalin A-Mannan Precipitation Reaction by Glycopeptides from Mitochondria of Rat Liver

Concanavalin A (500  $\mu\text{g}$ ) in 0.5 ml of TBS (pH 8.0) and varying amounts of glycopeptide in 0.5 ml of TBS (pH 8.0) were mixed, and after incubation for 30 min at 37°C, 50  $\mu\text{g}$  mannan in 0.5 ml of TBS (pH 8.0) was added. Incubation was continued first for 30 min at 37°C, then for 1 hr 4°C. The precipitate formed collected by centrifugation, washed with TBS (pH 8.0) once, and then dissolved in 1 ml of 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Absorbance of the solution was measured at 280 m $\mu$ .

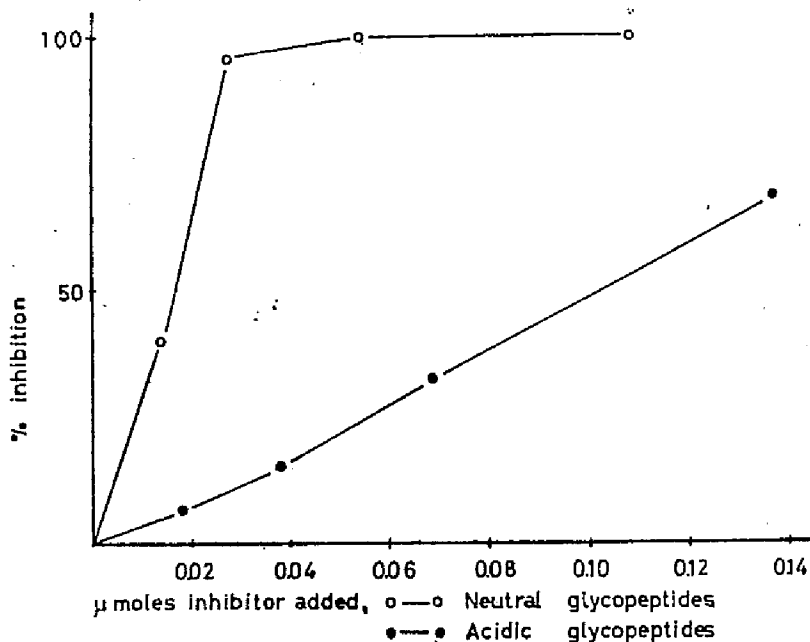


Fig. 21. Inhibition of Concanavalin A- Mannan Precipitation Reaction by Glycopeptides from Microsomes of Rat Liver

Concanavalin A (500  $\mu\text{g}$ ) in 0.5 ml of TBS (pH 8.0) and varying amounts of glycopeptide in 0.5 ml of TBS (pH 8.0) were mixed, and after incubation for 30 min at 37°C, 50  $\mu\text{g}$  mannan in 0.5 ml of TBS (pH 8.0) was added. Incubation was continued first for 30 min at 37°C, then for 1 hr 4°C. The precipitate formed was collected by centrifugation, washed with TBS (pH 8.0) once, and then dissolved in 1 ml of 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Absorbance of the solution was measured at 280 m $\mu$ .

中性および酸性のいずれの糖ペプチドも沈降阻止活性を示した。ミクロソーム膜より得られた中性糖ペプチドが最も高い沈降阻止活性を示し、ミトコンドリアの中性糖ペプチド、ミトコンドリアの酸性糖ペプチド、ミクロソーム膜の酸性糖ペプチドの順に沈降阻止活性が低くなっていった。

従って、これらの結果より抗マンナン抗体は細胞膜系に存在するN-グリコシド型糖鎖のうち、中性糖鎖に特異的であることが明らかになった。

#### 第 4 節 考察ならびに総括

一般に糖タンパク質それ自身は強い抗原性を有するが、抗原性は主としてペプチド部分に存在し、糖鎖はほとんど抗原性をもたないと考えられる。<sup>6), 52)</sup> その為、糖鎖に特異性を有する抗体を生産させる為に、糖タンパク質を修飾したり、あるいは糖鎖を牛血清アルブミンなどのキャリアーに色々な形で共有結合させたものなどを免疫原として動物に非経口的に投与する試みがなされている。<sup>53)</sup> しかし、このような方法でも糖タンパク質の糖鎖に特異性をもつ抗体は一般に調製し難いとされている。

一方、微生物細胞表層に存在する多糖は一般に強い抗原性を有し、その抗体は特定のオリゴ糖鎖に特異的であることが知られている。酵母の細胞表層多糖であるマンナンは強い抗原性を有し、その抗体 $\alpha 1 \rightarrow 2$ あるいは $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合から成るオリゴマンノシド糖鎖に特異的であることが知られている。<sup>7), 8)</sup>

糖タンパク質の糖鎖の主要なものの一つであるN-グリコシド型結合した中性糖鎖は多くの場合非還元末端にマンノースをもつことが示されている。この中性糖鎖は細胞膜系の糖タンパク質にも存在し、その生物学的役割は極めて興味深い。従って、この中性糖鎖に対する細胞化学的試薬としてこの抗マンナン抗体が利用できるかどうかを検討するため、抗マンナン抗体と中性糖鎖との交叉反応性を検討した。

抗マンナン抗体は酵母の加熱死菌を免疫原としてウサギの耳静脈に投与することにより、高力価の抗血清が容易に調製された。得られた抗マンナン抗体はすべてIg G抗体である。その為、安定性が高く、一価の結合価をもつ標品 (Fab 画分) が調製しやすいなどの利点をもっている。これらのことは抗マンナン抗体を細胞化学的試薬として用いる場合極めて好都合である。

抗マンナン抗体と糖タンパク質の中性糖鎖との交叉反応性を調べるために、比較的容易に試料が得られ、かつ、糖鎖の構造研究がよく進められているタカアミラーゼA糖ペプチドおよび卵白アルブミン糖ペプチドを用いて検討した。

タカアミラーゼA糖ペプチドは抗マンナン抗体に対して強い交叉反応性を示した。その糖鎖構造は山口ら<sup>48)</sup> によって明らかにされ、糖鎖の非還元末端に  $\text{Man } \alpha 1 \rightarrow 2 \text{ Man } \alpha 1 \rightarrow 3 \text{ Man}$  のトリオース構造をもつことが示され、タカアミラーゼA糖ペプチドが抗マンナン抗体に対して強い交叉反応性を示すことと一致する。しかし、著者がタカアミラーゼA糖ペプチドをDowe $\times 50 \times 2$ のイオン交換カラムクロマトグラフィーにより分画したところ、多くの画分に分かれ、タカアミラーゼA糖ペプチドの糖鎖は極めて不均一なものであることが明らかになった。各糖ペプチド画分の糖およびアミノ酸分析の結果からその不均一性は糖鎖のマンノース含量の差によることが明らかになった。化学組成から判断して比較的均一な画分と思われる画分III~VIについて抗マンナン抗体に対する交叉反

応性を調べた。抗マンナン抗体とマンナンとの沈降反応に対する阻止活性の強さから、画分Ⅲはマンナンの抗原決定基と考えられているマンノテトラオース構造、画分Ⅳはマンノトリオース構造、画分ⅤおよびⅥは $\alpha 1 \rightarrow 3$ あるいは $\alpha 1 \rightarrow 2$ マンノジオース構造をもつと考えられる。

一方、卵白アルブミン糖ペプチドは抗マンナン抗体とほとんど交叉反応性を示さなかった。Huangら<sup>49)</sup>によれば、卵白アルブミン糖ペプチドの糖鎖の構造は極めて多様で、多くの場合、非還元末端にN-アセチルグルコサミン残基をもっていることが明らかにされている。従って、この構造研究の知見は抗マンナン抗体が卵白アルブミン糖ペプチドとはほとんど交叉反応性を示さなかった結果と一致する。

従って、これらの結果より、抗マンナン抗体は非還元末端に $\alpha 1 \rightarrow 2$ オリゴマンノシド構造をもつ糖タンパク質の糖鎖とは交叉反応し、その交叉反応性の強さより、末端のオリゴマンノシド構造がある程度推定できることが明らかになった。また、糖タンパク質糖鎖に対する細胞化学的試薬として広く用いられているコンカナバリンAに比べてその糖鎖認識の特異性は極めて高いと考えられる。

ラット肝細胞膜系のうち、ミクロゾーム膜、核膜およびミトコンドリアには中性糖鎖が存在し、 $\alpha$ -マンノシダーゼ消化よりこの中性糖鎖は非還元末端にマンノース残基をもつことが明らかになっている。<sup>47)</sup>従って、著者はミクロゾーム膜およびミトコンドリアから調製された中性糖鎖と抗マンナン抗体との交叉反応性を検討した。このミクロゾーム膜およびミトコンドリアから調製された中性糖鎖は化学組成および分子量の点で異なっていることが既に明らかにされている。両中性糖鎖の抗マンナン抗体-マンナン沈降反応の阻止はマンノジオースに相当する程度であった。ミトコンドリアの中性糖鎖はミクロゾーム膜の中性糖鎖より強い阻止活性を示した。その阻止活性の強さから判断してミトコンドリアの中性糖鎖は $\alpha 1 \rightarrow 3$ マンノジオース、ミクロゾーム膜の中性糖鎖は $\alpha 1 \rightarrow 2$ マンノジオースに相当する構造を非還元末端にもっていると考えられる。

コンカナバリンA-マンナンの沈降反応では抗マンナン抗体の場合とは逆にミクロゾーム膜の中性糖鎖の方がミトコンドリアの中性糖鎖より強い阻止活性を示した。コンカナバリンAはC-2に置換基をもつマンノース残基に強い親和性をもつことが報告されており、<sup>50), 51)</sup>この結果は前述の抗マンナン-マンナン沈降反応の阻止活性より推定された事実とよく一致する。

酸性糖鎖はいずれも抗マンナン-マンナンの沈降反応を阻止せず、抗マンナン抗体とは全く交叉反応しないことが明らかになった。一方、コンカナバリンAはいずれの酸性糖鎖とも反応することが明らかになった。

従って、抗マンナン抗体は糖タンパク質のN-グリコシド型の中性糖鎖に対する特異的な細胞化学的試薬として用いることが可能であり、その沈降阻止活性よりある程度、末端構造を推定することができることが明らかになった。

## 実 験 の 部

### 抗マンナン抗血清の調製

生理食塩水で3回洗浄した酵母 (*S. cerevisiae*; オリエンタル酵母工業株式会社製) を1% (W/V) になるようにして生理食塩水に懸濁した。100°C、60分間加熱して免疫原とした。ウサギ (♂、約3 kg) の耳静脈内に1週間に2回、計19回 (1~5回=0.5ml, 6~7回=1.0ml, 8回=1.5ml, 9~14回=2.0ml, 15~19回=3.0ml) 免疫原を投与した。最終免疫後、1週間後に頸動脈より全採血した。血液を凝固させてから血清を分離し、0.1% (W/V) の濃度になるように  $\text{NaN}_3$  を加えて、冷蔵庫あるいは冷凍庫で保存した。

### 凝集力価の測定

4% (W/V) 酵母 (生理食塩水で3回洗浄) 生理食塩水懸濁液 (0.1ml) と適当に希釈した抗血清 (0.1ml) を混合し、37°C、20分間インキュベートしたのち凝集を判定した。凝集の判定は顕微鏡下 (10×10) で行なった。

### I グロブリン画分の調製

抗血清に同容量の10mMリン酸ナトリウム緩衝生理食塩水 (以下、PBS と略す) (pH 6.8) で希釈してから抗血清の2倍容量の飽和硫酸アンモニウム液 (pH 6.8) をかくはんしながら徐々に加えた。室温で30分間放置後、遠心して沈澱を得た。沈澱は元の抗血清と同容量のPBS (pH 6.8) に溶かして、同容量の飽和硫酸アンモニウム液 (pH 6.8) を加えて沈澱させた。沈澱は更に同一の洗浄操作を行なった後、抗血清の $\frac{1}{2}$ 容量のPBSに溶かし、大過剰のPBS (pH 6.8) に対して透析した。透析後、液量が元の抗血清と同容量になるようにPBS (pH 6.8) を加えた。得られたこの画分を抗マンナンIグロブリン画分とした。0.1% (W/V) の濃度になるように  $\text{NaN}_3$  を加えて、冷蔵庫あるいは冷凍庫で保存した。

### セファデックスG-200 による抗血清の分画

PBS (pH 6.8) で平衡化したセファデックスG-200のカラム (2×100 cm) に抗血清 (5 ml) を加えて分画した。

### Ig G 画分の調製

0.01Mリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) で平衡化したDEAE-セルロースのカラム (1.5×10 cm) に同じ緩衝液に対して透析しておいた抗血清 (2 ml) を加え、同じ緩衝液で溶出した。カラムを素通りする画分をIg G画分とした。

### 抗マンナン抗血清とマンナンの定量的沈降反応

抗血清 (0.2 ml) とPBS (pH 8.0) に溶かしたマンナン (免疫原と同じ酵母から調製したもの。リン、窒素およびグルコースを含まず。東北薬科大学の鈴木茂生博士より恵与されたもの) 溶液 (0.8 ml) を混合し、37°C、2時インキュベートした後、4°C、24時間放置した。遠心して上清を除去した。沈澱は



PBS (pH 8.0) (1.0 ml) で2回洗浄した後、1% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液に溶かして O.D. 280m $\mu$  の吸収を測定した。

#### 卵白アルブミンおよび卵白アルブミン糖ペプチドの調製

新鮮な鶏卵より卵白を分離し、Keckwickらの方法<sup>54)</sup>に従い、結晶化を3回行なって卵白アルブミンを調製した。この卵白アルブミンを3回プロナーゼ消化を繰り返し、セファデックス G-50 で分画して、卵白アルブミン糖ペプチドを調製した。

#### タカアミラーゼAとタカアミラーゼA糖ペプチドの調製

タカジアスターゼ原末(三共株式会社より恵与されたもの)より、Akaboriらの方法<sup>55)</sup>に従い、結晶化を行なってタカアミラーゼAを調製した。

このタカアミラーゼAを3回プロナーゼ消化を繰り返し、セファデックス G-25 および G-50 で分画して、タカアミラーゼA糖ペプチドを調製した。得られた糖ペプチドを未分画タカアミラーゼA糖ペプチドとした。

#### 糖ペプチドによる抗マンナン抗血清とマンナンの沈降反応の阻止

抗血清 (0.1 ml) と PBS (pH 8.0) に溶かした糖ペプチド溶液 (0.5 ml) を混合し、37°C、2時間インキュベートした。更に、50  $\mu\text{g}$  のマンナンを PBS (pH 8.0) に溶かした溶液 (0.5 ml) を加え、37°C、2時間インキュベートした後、4°C、24時間放置した。遠心して上清を除去した。沈殿は PBS (pH 8.0) (1.0 ml) で2回洗浄した後、1% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液に溶かして O.D. 280m $\mu$  の吸収を測定した。

#### コンカナバリンAとマンナンの定量的沈降反応

$1.5 \times 10^{-4} \text{ M CaCl}_2$  および  $5 \times 10^{-4} \text{ M MnCl}_2$  を含む 0mM トリス塩酸緩衝生理食塩水 (pH 8.0) (以下、TBSと略す) に 500  $\mu\text{g}$  のコンカナバリンAを溶かした溶液 (0.5 ml) と TBS (pH 8.0) に溶かしたマンナン溶液 (0.5 ml) を混合し、37°C、30分間インキュベートした後、4°C、1時間放置した。遠心して上清を除去した。沈殿は TBS (pH 8.0) で1回洗浄した後、1% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液に溶かして O.D. 280m $\mu$  の吸収を測定した。

#### 糖ペプチドによるコンカナバリンAとマンナンの沈降反応の阻止

500  $\mu\text{g}$  のコンカナバリンAを TBS (pH 8.0) に溶かした溶液 (0.5 ml) と糖ペプチドを TBS (pH 8.0) に溶かした溶液 (0.5 ml) を混合し、37°C、30分間インキュベートした。更に、50  $\mu\text{g}$  のマンナンを TBS (pH 8.0) に溶かした溶液 (0.5 ml) を加え、37°C、30分間インキュベートした後、4°C、1時間放置した。遠心して上清を除去した。沈殿は TBS (pH 8.0) (1.0 ml) で1回洗浄した後、1% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  水溶液に溶かして O.D. 280 m $\mu$  の吸収を測定した。

著者はラット肝細胞ミトコンドリアに存在する糖タンパク質糖鎖の生化学的および免疫化学的研究を行ない、次の結論を得た。

(1) ミトコンドリアに存在する複合糖質の主要成分は血清型糖鎖(N-グリコジド型糖鎖)をもつ糖タンパク質である。その糖鎖としてはグルコサミンおよびマンノースより成る中性糖鎖とグルコサミン、マンノース、ガラクトースおよびシアル酸より成る酸性糖鎖とが存在し、各糖鎖ともその化学組成、分子量は他膜系のそれと比較して、ミトコンドリアに特徴的である。

(2) ミトコンドリアに存在する糖タンパク質の多く(約60%)は外膜と内膜に囲まれた膜間部に存在し、残りは外膜と内膜にほぼ等量ずつ存在し、タンパク質を最も多く含む礎質には糖タンパク質はほとんど存在しない。外膜に存在する糖タンパク質のあるものはミトコンドリアの外表面に露出して存在している。

(3) ミトコンドリアの糖タンパク質の糖鎖の代謝的性質よりミトコンドリアの大部分の糖タンパク質はミトコンドリア以外の場所、おそらくはミクロゾーム、で合成されてからミトコンドリアに組み込まれていると考えられる。しかし、内膜に存在する糖タンパク質の一部はミトコンドリア内で合成されていることが示唆された。

(4) ミトコンドリアの複合糖質の微量成分として存在するコンドロイチン硫酸B型のムコ多糖はミトコンドリアの表面に露出して存在している。

(5) マンノースを非還元末端にもつ糖タンパク質の糖鎖と抗マンナン抗体は交叉反応性を示し、その糖鎖認識の特異性は極めて高いことが明らかになった。

(6) ミトコンドリアの糖タンパク質の中性糖鎖は抗マンナン抗体と交叉反応性を示した。その反応性はミクロゾーム膜の中性糖鎖の反応性よりも大であった。これらのことからミトコンドリアの中性糖鎖には $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合をもつマンノジオーズ構造が存在すると推定される。

## 謝

## 辞

終りにあたり、本研究に際して終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜った恩師、山科郁男京都大学教授に深く心からの謝意を表します。

また、本研究に際し種々の御助言と御指導を下された川崎敏祐博士に深く感謝致します。そして、本研究に際し種々の御助言と御協力を下さった林恭三博士、船越育雄博士ならび藤本和久修士をはじめとする京都大学薬学部生物化学研究室の方々に感謝致します。

引 用 文 献

- 1) Cook, G.M.W. and Stoddart, R.W. (1973) Surface Carbohydrates of the Eukaryotic Cell pp. 1-293, Academic Press, New York
- 2) Miyajima, N., Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1970) FEBS Lett. 11, 29-32
- 3) Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1971) Biochim. Biophys. Acta 225, 234-238
- 4) Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1973) J. Biochem. 74, 639-647
- 5) Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1972) J. Biochem. 72, 1517-1525
- 6) Bergmann, F.H., Levine, L. and Spiro, R.G. (1962) Biochim. Biophys. Acta 58, 41-51
- 7) Sunayama, H. and Suzuki, S. (1970) Japan. J. Microbiol. 14, 197-207
- 8) Suzuki, S., Sunayama, H. and Saito, T. (1968) Japan. J. Microbiol. 12, 19-24
- 9) de Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955) Biochem. J. 60, 604-617
- 10) Schnaitman, C. and Greenawalt, J.W. (1968) J. Cell Biol. 38, 158-175
- 11) Hoppel, C. and Cooper, C. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 135, 173-183
- 12) de Bernard, B., Pulglicrello, M.C., Sandri, G., Sottocasa, G.L. and Vittur, F. (1971) FEBS Lett. 12, 125-128
- 13) Bosmann, H.B., Myers, M.W., Dehond, D., Ball, R. and Case, K.R. (1972) J. Cell Biol. 55, 147-160
- 14) Glew, R.H., Kayman, S.C. and Kuhlenschmidt, M.S. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3137-3145

- 15) Carafoli, E., Gazzotti, P., Saltini, C., Rossi, C.S., Sottocasa, G.L., Sandri, G., Panfili, E. and de Bernard, B. (1973) Mechanisms in Bioenergetics pp. 293-308, Academic Press, New York
- 16) Martin, S.S. and Bosmann, H.B. (1971) Exptl. Cell Res. 66, 59-64
- 17) Sottocasa, G.L., Sandri, G., Panfili, E. and de Bernard, B. (1971) FEBS Lett. 17, 100-105
- 18) Nicolson, G., Lacorbiere, M. and Delmonte, P. (1972) Exptl. Cell Res., 71, 468-473
- 19) Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1970) J. Biochem. 68, 689-699
- 20) Martin, S.S. and Bosmann, H.B. (1971) Biochim. Biophys. Acta 230, 411-422
- 21) Nordlie, R.C. and Arion, W.J. (1966) Methods in Enzymology, Vol. 9, pp. 619-625, Academic Press, New York
- 22) 中村道徳: (1950) 日本農芸化学会誌 24, 1-4
- 23) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
- 24) Boas, N.F. (1953) J. Biol. Chem. 204, 553-563
- 25) Jouradian, G.W., Dean, L. and Roseman, S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 430-435
- 26) Hewitt, L.F. (1937) Biochem. J. 31, 360-366
- 27) Yemm, E.W. and Cocking, E.C. (1955) Analyst 80, 209-213
- 28) Reindel, F. and Hoppe, W. (1954) Ber. Deut. Chem. Ges. 87, 1103-1107
- 29) Okamoto, H. (1970) Methods in Enzymology, Vol. 17, pp. 460-463, Academic Press, New York

- 30) Ochoa, S. (1955) *Methods in Enzymology*, Vol. 1, pp. 735-739,  
Academic Press, New York
- 31) Nicolson, G.L. and Blaustein, J. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 266,  
543-547
- 32) Madson, N.P. (1969) *Anal. Biochem.* 29, 542-547
- 33) Warren, L. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 1971-1975
- 34) Elson, L.A. and Morgan, W.T.J. (1933) *Biochem. J.* 27, 1824-1828
- 35) 藤本和久, 伊藤信行, 川崎敏祐, 山科郁男 (1974) *生化学* 46, 615
- 36) Akasaki, M., Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1975) *FEBS Lett.* 59  
100-104
- 37) Funakoshi, I., Nakada, H. and Yamashina, I. (1974) *J. Biochem.* 76  
319-333
- 38) Kraemer, P. (1971) *Biochemistry* 10, 1437-1445
- 39) 藤本和久, 赤崎盛昭, 伊藤信行, 川崎敏祐, 山科郁男 (1975) *生化学*, 47, 417
- 40) Bhavandan, V.P. and Davidson, E.A. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci.*  
72, 2032-2036
- 41) Moore, C.L. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 298-305
- 42) Carafoli, E., Gazzotti, P., Rossi, C.S. and Tiozzo, R. (1971)  
*Membrane Bound Enzymes* pp. 63-86, Plenum Press
- 43) Wojtzak, L. and Zaluska, H. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 193,  
64-72
- 44) Kuylenstierna, B., Nicholis, D.G., Hovmöler, S. and Ernster, L.  
(1970) *Eur. J. Biochem.* 12, 419-426

- 45) Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O. and Suzuki, S. (1967)  
J. Biol. Chem. 243, 1523-1535
- 46) Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L. and Bergstrand, A.  
(1967) J. Cell Biol. 32, 415-438
- 47) Kawasaki, T., Sugahara, K., Okumura, T. and Yamashina I. (1974)  
J. Biochem. 75, 437-439
- 48) Yamaguchi, H., Ikenaka, T. and Matsushima, Y. (1971) J. Biochem. 65  
, 793-798
- 49) Huang, C.C., Mayer, H.E. Jr. and Montgomery, R. (1970) Carbohydr. Res.  
13, 127-137
- 50) Goldstein, I.J., Holleman, C.E. and Smith, E.E. (1965) Biochemistry  
4, 876-883
- 51) Pretz, R.D. and Goldstein, I.J. (1970) Biochemistry 9, 2890-2896
- 52) Kaplan, M. and Schlamowitz, M. (1972) Immunochemistry 9, 737-747
- 53) 北村邦夫, 山科郁男 (京都大学薬学部) 未発表
- 54) Keckwick, R.A. and Cannan, R.K. (1936) Biochem. J. 30, 227
- 55) Akabori, S., Hagihara, B. and Ikenaka, T. (1954) J. Biochem. 41  
577-582
- 56) Tai, T., Yamashita, K., Ogata-Arakawa, M., Koide, N., Muramatsu, T.,  
Iwashita, S., Inoue, Y. and Kobata, A. (1975) J. Biol. Chem. 250  
8569-8575
- 57) Lawford, G.R. and Schachter, H. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5408-5418
- 58) Fleisher, S., Rouser, G., Fleisher, B., Casu, A. and Kritchevsky, G.  
(1967) J. Lipid Res. 8, 170-180