

①

主 題 文

ラット肝における糖タンパク質生合成の調節
——肝細胞増殖との関連性に注目して——

1990

玉井(小田)幸恵

ラット肝における糖タンパク質生合成の調節
—— 肝細胞増殖との関連性に注目して ——

1990

玉井(小田)幸恵

目次

第1章 序論	1
第1節 糖タンパク質糖鎖の構造と機能	1
第2節 N-グリコシド型糖鎖の生合成経路	4
第3節 糖タンパク質糖鎖生合成の調節	8
第4節 本研究の目的と概要	9
第2章 実験材料及び基本となる実験方法	10
第1節 実験材料	10
第2節 ラット肝ミクロソーム、ゴルジ膜の調製	11
第3節 ペーパークロマトグラフィー	12
第4節 リピド中間体の加水分解	12
第5節 タンパク質及びN-グリコシド型糖タンパク質結合ヘキサミン、 ガラクトースとシアル酸の定量	12
第6節 N-グリコシル化経路へのグルコースの転移	13
第7節 肝ミクロソーム内のドリコールリン酸の定量	15
第8節 ドリコールリン酸を基質にする合成酵素活性	16
第9節 酵素反応の基質の調製	17
第10節 オリゴ糖リピドからタンパク質へのオリゴ糖転移	19
第11節 変性 α -ラクトアルブミンへのグルコース転移	20
第12節 ドリコールリン酸結合糖からオリゴ糖リピドへの糖転移	20
第13節 グリコシダーゼ活性	21
第14節 糖転移酵素活性	22
第15節 放射活性の測定	23
第3章 再生肝におけるN-グリコシル化経路活性の調節	24
第1節 緒言	24
第2節 再生肝と対照のN-グリコシル化経路活性の比較	24
第3節 ドリコールリン酸のN-グリコシル化経路活性への影響	26
第4節 再生肝におけるオリゴ糖転移の低下の要因	28
第5節 [^{14}C]グルコース-オリゴ糖リピドの分解活性とオリゴ糖転移 酵素の安定性のオリゴ糖転移活性に対する影響	31
第6節 総括および考察	34
第4章 幼若ラット肝におけるN-グリコシル化経路活性の調節	37
第1節 緒言	37
第2節 N-グリコシル化経路活性の出生後の変化	37
第3節 変性 α -ラクトアルブミンへの糖転移活性	40

第4節	オリゴ糖リビド生合成の調節	42
第5節	総括および考察	44
第5章	幼若ラット肝における糖鎖プロセッシング経路の調節	46
第1節	緒言	46
第2節	糖鎖プロセッシングの初期に関与する酵素の活性変化	46
第3節	糖鎖シアリル化の変化とガラクトース転移酵素とシアル酸転移酵素の活性変化	47
第4節	総括および考察	52
第六章	結論および考察	54
謝辞		56
参考文献		57

略語表

ADP	adenosine 5'-diphosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
CMP	cytidine 5'-monophosphate
GDP	guanosine 5'-diphosphate
UDP	uridine 5'-diphosphate
DEAE	diethylamino ethyl
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
Tris(トリス)	tris(hydroxymethyl)amino methane
Mes	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
Glc	グルコース
Man	マンノース
GlcNAc	N-アセチルグルコサミン
Thr	トレオニン
Ser	セリン
Dol-P	ドリコールリン酸
Dol-PP	ドリコールピロリン酸

第1章 序論

第1節 糖タンパク質糖鎖の構造と機能

糖タンパク質は、タンパク質部分と糖部分とから成る複合高分子である。糖タンパク質はあらゆる生物組織に存在し、酵素やホルモンとして、また生体を構築する必須の成分として、さまざまな生理機能にあずかっている。近年注目を集めているインターフェロン、フィブロネクチンやガン胎児性抗原なども糖タンパク質である。これら糖タンパク質分子が果たしている生物学的機能に、糖鎖が何らかの重要な寄与をしているのではないかと考えられてきた(1-4)。

糖タンパク質の糖鎖には、その非還元性水酸基が、ポリペプチド鎖のセリンまたはトレオニンの水酸基と結合したO-グリコシド型と、アスパラギンの酸アミド基と結合したN-グリコシド型がある。2種類の糖鎖は、結合様式その他、その構成糖と構造に違いがみられる。多くの場合、O-グリコシド型糖鎖にはN-アセチルガラクトサミン、N-グリコシド型糖鎖にはマンノースが存在する。図1に、O-グリコシド型糖鎖の実例を示したが、糖鎖は短く(普通1-3個の糖)単純な構造のものが多く、一方、N-グリコシド型糖鎖は、高マンノース型、複合型、混成型に大別される(図2)。複合型糖鎖の多くは、2-4分岐(図3)であるが、それ以上に分岐した5、6分岐のものも存在している。

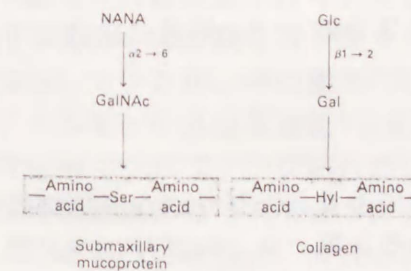


図1 O-グリコシド型糖鎖構造の実例(5)

左は、顎下腺ムコタンパク質、
右はコラーゲンの代表的糖鎖。

NANA:N-アセチルノイラミン酸
Glc:グルコース、Gal:ガラクトース
GalNAc:N-アセチルガラクトサミン
Hyl:ヒドロキシリシン、Ser:セリン

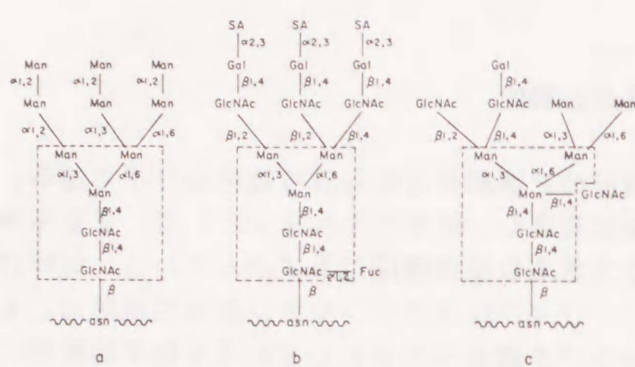


図2 N-グリコシド型糖鎖の一般的構造(6)。

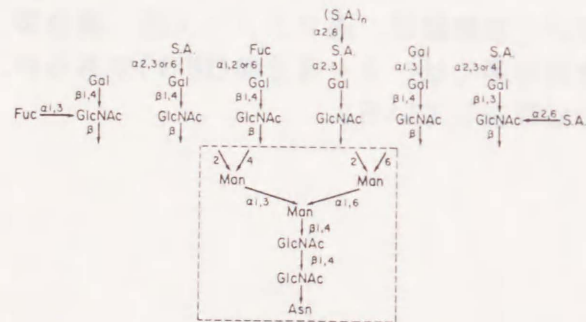
(a)高マンノース型

(b)複合型

(c)混成型

いずれも破線内に示すように共通の $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ コア構造をもつ

asn:アスパラギン、GlcNAc:N-アセチルグルコサミン
Man:マンノース、Gal:ガラクトース、SA:シアル酸



Asn:アスパラギン
GlcNAc:N-アセチルグルコサミン
Man:マンノース
Gal:ガラクトース
Fuc:フコース
S.A.:シアル酸

図3 複合型糖鎖の種類(7)。

破線外に示したような構造の糖鎖がコア構造の2つの α -Man残基に結合して2-4本分岐糖鎖となる。

N-グリコシド型糖鎖は、主に以下の2つの理由により、O-グリコシド型糖鎖に比べより重要な機能に関与していると考えられる。第一に、N-グリコシド型糖鎖の構造(図2、3)は、O-グリコシド型糖鎖(図1)に比べ多様であるという点である。この多様性によりN-グリコシド型糖鎖は、後述する種々の認識作用に対応できると考えられる。単純な構造のO-グリコシド型糖鎖に関しては、血液型

物質としての機能以外には、認識作用に関する重要な報告はない。第二に、N-グリコシド型糖鎖は、合成途上のポリペプチド鎖へ結合するという点である。このN-グリコシド型糖鎖の結合は、タンパク質の正常な立体構造の形成に必要であり(8)、また熱安定性(9)やプロテアーゼ抵抗性(10、11)を高めるなど、タンパク質の物理化学的性質への関与が知られている。タンパク質部分の合成完了後に結合するO-グリコシド型糖鎖は、タンパク質立体構造の形成には関与し得ない。また、O-グリコシド型糖鎖は、顎下腺糖タンパク質の粘度(12)や、抗凍結性糖タンパク質の凝固点(13)に影響を持つと考えられてきたが、糖鎖がどれほどこれらの性質に寄与しているかは明らかではない。このように、O-グリコシド型糖鎖は、概して重要な機能は果たしていないと考えられる。そこで、本研究では、N-グリコシド型糖鎖に注目した。以下、糖鎖とは、特にことわらない限り、N-グリコシド型糖鎖をさす。

N-グリコシド型糖鎖の認識作用への機能として、最もよく調べられているのは、糖タンパク質の細胞内局在性に関する細胞内輸送のマーカー的役割である。例えば、リソゾーム酵素は、その糖鎖に存在するマンノース6-リン酸残基をレセプターに認識され、ゴルジ体などからリソゾームに運ばれる(14)。また、血漿糖タンパク質は、糖鎖末端のシアル酸が除去されてガラクトースが露出すると、肝臓のアシアロ糖タンパク質レセプターに認識されて、細胞内にとりこまれ代謝される(15)。その他の糖鎖の機能として、糖タンパク質の持つ生理活性への関与が報告されている。例えば、インシュリン(16)、上皮成長因子(17)やプロスタグランジン(18)などのレセプターは糖タンパク質であるが、突然変異細胞や、糖鎖合成阻害剤の添加によって、その糖鎖構造が変化または消失すると、リガンドとの結合能が変化し、その結果レセプターとしての機能に変化が見られた。また、黄体形成ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、卵胞刺激ホルモンや絨毛性腺刺激ホルモンなどの糖タンパク質ホルモンは、酵素学的、または化学的にその糖鎖を取り除くと、レセプターとの結合能は不変または、むしろ増加していたが、その機能(例えば、アデニル酸シクラーゼ活性化やステロイドホルモンの分泌促進能)は低下していた(19、20)。免疫グロブリンGの補体活性化やマクロファージ結合能(21)、細胞のラミニン、コラーゲンとの接着(22)にも糖鎖は必要であるようだ。

このように糖鎖は、成長、発生などに重要な、細胞、タンパク質間の相互作用や、糖タンパク質の細胞内外での局在化に関与していると考えられる。また、N-グリコシド型糖鎖の変化と、細胞の分化、増殖やガン化との関連性も多数報告されている(23-25)。糖鎖は、細胞の増殖や分化の過程においてどのような調節を受けて変化するのか、非常に興味深い問題である。

第2節 N-グリコシド型糖鎖の生合成経路

ポリペプチド鎖の鑄型依存の生合成とは対照的に、N-グリコシド型糖鎖は、厳密な基質特異性を示す一連の糖転移酵素の作用によって組み立てられる。糖鎖の生合成経路の概要は、すでにいくつかの総説にまとめられている(6,7)が、第1節で述べた糖鎖の重要性と対応する二段階に分けられる。まず、すべての糖鎖は、オリゴ糖リピドという前駆体から、合成途上のポリペプチド鎖へ、オリゴ糖が転移される過程を経て合成される。この前駆体であるオリゴ糖リピドの合成から、オリゴ糖転移までの過程をN-グリコシル化経路と呼ぶ。オリゴ糖転移に続いて、各糖鎖によって異なる糖鎖修飾過程(これを糖鎖プロセッシング経路と呼ぶ)を経て、多種多様な糖鎖構造が完成するのである。

最初に、N-グリコシル化経路の概略を述べる。まず図4 aに示した構造をもつオリゴ糖(26)が、担体リピド(ドリコールリン酸(Dol-P)(図4 b))上に伸長する。このオリゴ糖リピドの生合成過程を図5に示した。オリゴ糖リピド生合成は、図中左端に下向きの矢印で示した糖鎖伸長と、その基質供給(糖鎖伸長の最初の反応であるDol-PP-N-アセチルグルコサミン合成、図中右下に示したDol-P-マンノース合成とDol-P-グルコース合成)反応に分けられる。図6には、オリゴ糖鎖伸長反応の中でもマンノース転移の順序と構造との関係を示した。

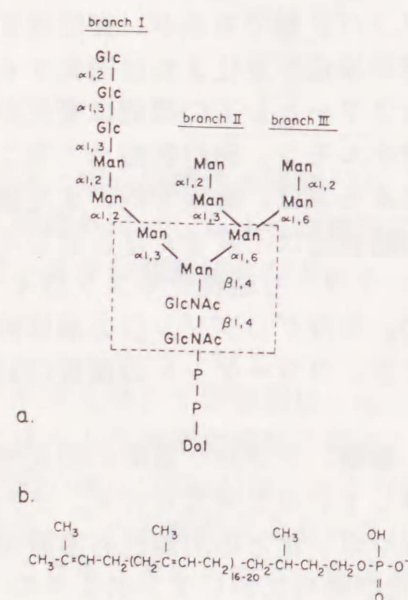


図4 N-グリコシド型糖鎖の前駆体であるオリゴ糖リピド(a)と、オリゴ糖担体であるドリコールリン酸(Dol-P)(α -飽和ポリプレノールのモノリン酸エステル)(b)の構造(6)。

a、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)2分子、マンノース(Man)9分子とグルコース(Glc)3分子が、構造式に示す結合様式で、ドリコールピロリン酸(Dol-PP)上に伸長する。破線内は、図2で示した共通のコア構造部分にあたる。

b、ドリコール部分は強い疎水性を示し、脂質二重膜を貫通するのに十分な長さがある。

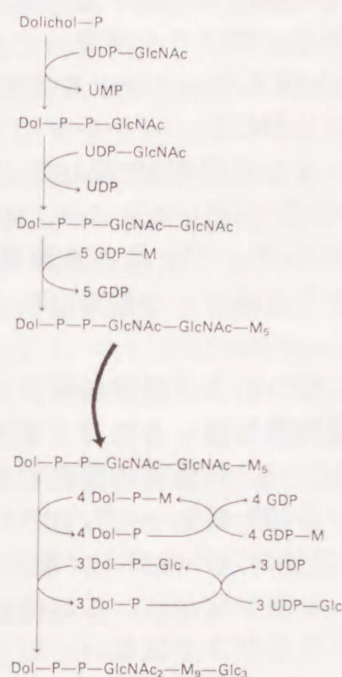
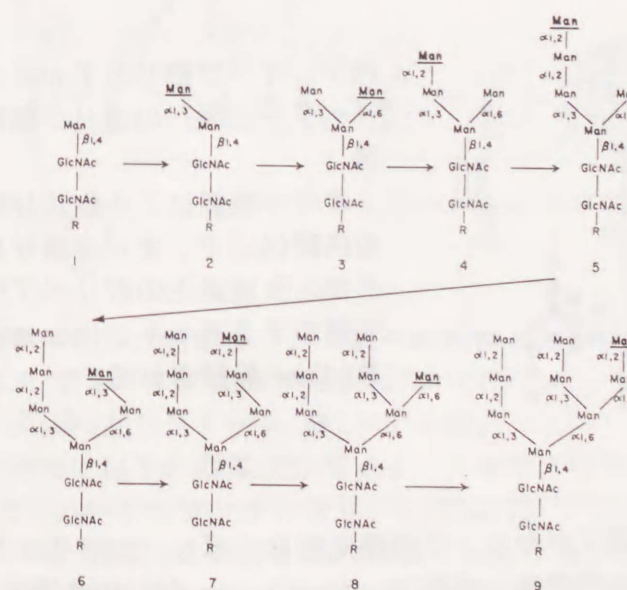


図5 N-グリコシド型糖鎖の前駆体であるオリゴ糖リピドの生合成過程(5)。

小胞体(ER)の細胞質側で、Dol-PとUDP-N-アセチルグルコサミンからDol-PP-N-アセチルグルコサミンが合成され、これにN-アセチルグルコサミン1分子とマンノース5分子が糖ヌクレオチドから直接転移される。

合成されたリピド中間体であるDol-PP-GlcNAc₂M₅は、ER内腔に運ばれ、残りのマンノース4分子とグルコース3分子が糖ヌクレオチドからそれぞれ、Dol-P-マンノース、Dol-P-グルコース合成を経て転移される。Dol-Pは、糖鎖をER上に固定し、また内腔へ運搬する役割を果たしていると推定される。

GlcNAc:N-アセチルグルコサミン
M:マンノース、Glc:グルコース



R:ドリコールピロリン酸、Man:マンノース、GlcNAc:N-アセチルグルコサミン

図6 オリゴ糖リピドへのマンノース残基の付加(6)。

各構造式に下線で示したマンノース残基が、上段の1-5はGDP-マンノースから直接(27)、下段の6-9はGDP-マンノースから合成されたDol-P-マンノースから、順に、特異的なマンノース転移酵素の作用によって転移されると考えられる。

オリゴ糖リビド合成の各糖付加反応を触媒する転移酵素に関する研究は、少ない。その理由は、糖供与体であるリビド中間体や、糖アクセプターである基質の調製が困難であるためと考えられる。Dol-Pと糖ヌクレオチドを基質にする、糖鎖伸長反応の基質供給に関与する3種の合成酵素(Dol-PP-N-アセチルグルコサミン、Dol-P-マンノース、Dol-P-グルコース合成酵素)に関する研究は、割合すすんでいる(28-30)。この他の糖転移酵素では、マンノース転移酵素群(図6参照)に関する研究が比較的なされている(31-37)。これら酵素とオリゴ糖リビドの細胞内局在性から、オリゴ糖リビド合成は、小胞体(ER)で行なわれていると考えられる(38)。

図7に、オリゴ糖リビド合成後のポリペプチド鎖へのオリゴ糖転移を示した。オリゴ糖転移酵素のオリゴ糖リビドに対する基質特異性は、それほど厳密ではないが、オリゴ糖リビドの糖鎖非還元末端にグルコース3残基の存在したものに對して、最も低いKmを示すことが報告されている(39-41)。一方、ポリペプチド鎖に対しては、-Thr(Ser)-X-Asn配列(Xはプロリン以外のアミノ酸(42))のアスパラギン残基のみ基質として認識する(43)。しかしながら、この構造を持つタンパク質のすべての部位に糖鎖の結合が見られるわけではない。以上ここまでの段階が、N-グリコシル化経路である。

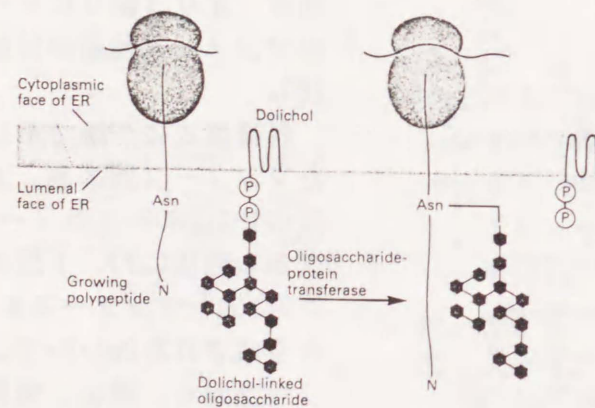


図7 オリゴ糖リビドからポリペプチド鎖へのオリゴ糖転移

オリゴ糖鎖は、小胞体(ER)の内腔(44)で、オリゴ糖リビドから合成途上のポリペプチド鎖のアスパラギン(Asn)残基(45)へ転移される。

N-グリコシル化経路に続く糖鎖プロセッシング経路を図8に示し、以下その概略を述べる。ポリペプチド鎖に転移直後の糖鎖 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ (46)の非還元末端に、ERで(47)順に、 α -グルコシダーゼ I、IIが作用(図8、段階2,3)し、グルコース残基が除去される。その後、ERからシスゴルジ体へと運ばれ、マン

ノース残基の一部が、各 α -マンノシダーゼの作用(図8、段階4)で除去される。ここまでの段階で、何らかの理由で経路からはずれたものが、高マンノース型となる(47)。糖鎖がさらに修飾されるには、続いて、メディアルゴルジ体へ運ばれ、N-アセチルグルコサミン転移酵素 I の作用(図8、段階5)を受けることが必須である(44)。転移したN-アセチルグルコサミン残基を認識してゴルジ α -マンノシダーゼ II が作用(図8、段階6)し、さらに2残基のマンノースが除去される(45)(このマンノシダーゼの作用を受けずに、その他の糖が転移してできたものが混成型となるが、この型の糖タンパク質は自然界には、広範には存在しない)。生じた $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$ は、N-アセチルグルコサミン転移酵素、フコース転移酵素の作用(図8、段階7,8)を受け、さらにメディアルゴルジ体からトランスゴルジ体へ運ばれ、そこに存在するガラクトース転移酵素、シアル酸転移酵素の作用(図8、段階9)を受け、複合型糖鎖となる(51)。これらの酵素のうちN-アセチルグルコサミン転移酵素群によって糖鎖の分岐が調節される(52)、2-4分岐、さらには、5、6分岐糖鎖(図3参照)が合成される。

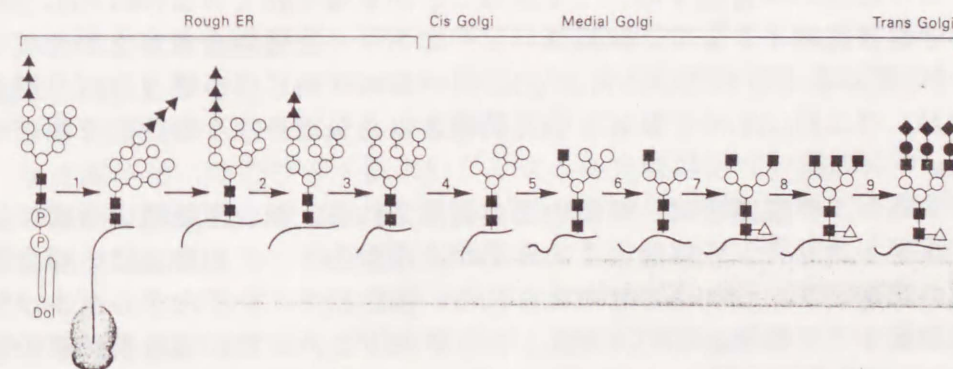


図8 オリゴ糖のタンパク質への転移と糖鎖プロセッシング経路(70)。

■、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc); ○、マンノース; ▲、グルコース; △、フコース; ●、ガラクトース; ◆、シアル酸。

各段階で以下の酵素が作用する。1、オリゴ糖転移酵素; 2、 α -グルコシダーゼ I; 3、 α -グルコシダーゼ II; 4、ER α 1,2-マンノシダーゼ、ゴルジ α -マンノシダーゼ I A, B; 5、GlcNAc転移酵素 I; 6、ゴルジ α -マンノシダーゼ II; 7、GlcNAc転移酵素 II、フコース転移酵素; 8、GlcNAc転移酵素 IV; 9、ガラクトース転移酵素、シアル酸転移酵素

第3節 糖タンパク質糖鎖生合成の調節

第2節で述べたように、すべての型のN-グリコシド型糖鎖は、N-グリコシル化経路を経て合成されるので、この経路の活性は、全糖鎖の生合成活性に影響を及ぼす。このN-グリコシル化経路の活性は、主としてそれに関わる酵素群の活性によって調節されていると考えられている。特に、最後の反応を触媒するオリゴ糖転移酵素は、N-グリコシル化経路の律速因子の一つと考えられる。エストロゲンによるニワトリ輸卵管の分化誘導で、オリゴ糖転移酵素の活性の上昇が、糖タンパク質合成活性の増加の一因であることが報告されている(53)。また、ブタ甲状腺細胞で、チロトロピン処理によるオリゴ糖転移酵素の活性増加が、糖タンパク質合成の増加の要因である可能性が示唆されている(54)。オリゴ糖転移酵素の他には、オリゴ糖鎖伸長の基質供給に関与する3種の合成酵素(Dol-PP-N-アセチルグルコサミン、Dol-P-マンノース、Dol-P-グルコース合成酵素)の活性変化が、出生後のラット脳(55)やウサギ筋(56)、ウニ胚(57)で報告されている。これら3酵素のなかでも、Dol-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素は、活性が最も低く、またN-グリコシル化経路の最初の反応を触媒するので、この経路の律速因子の一つであることが示唆されている(55,56)。酵素以外の活性調節因子として、糖担体リビドであり、生体内含量がきわめて低い、Dol-Pの量が増えられる。これまでにDol-P量の変動に伴う糖タンパク質合成の変化が、ウニ胚(58)やテレピン油で誘導された炎症ラット肝(59)で報告されている。

糖鎖プロセッシング経路では、糖鎖の型が調節される。複合型糖鎖の合成には、N-アセチルグルコサミン転移酵素Iの作用が必須なので、この酵素は、複合型糖鎖合成の律速因子になり得ると考えられる。再生肝で、N-アセチルグルコサミン転移酵素Iの活性増加(60)に対応した、肝糖タンパク質の複合型糖鎖の割合の増加(61-63)が認められた。また、複合型の糖鎖分岐はN-アセチルグルコサミン転移酵素群(52)、その複雑な構造は各糖転移酵素の活性バランスによって調節されていると考えられる。幼若ラットの小腸では、基質を競合するシアル酸転移酵素とフコース転移酵素の、それぞれ活性低下と活性増加が、3週令前後で開始され、同時期に膜糖タンパク質のシアル酸含量の低下とフコース含量の増加がみられることが報告されている(64)。また、シアル酸転移酵素の活性に対応して膜糖タンパク質のシアル酸含量が、メラノーマ細胞(65)、ラット小腸(66)の分化時において増加すること、一方、出生後のウサギ筋では、低下すること(67)が報告されている。

以上、これまでに糖タンパク質生合成の調節に関してなされた報告の主なも

のをあげた。これらの研究は、N-グリコシル化経路についてなされたものがほとんどであり、糖鎖プロセッシング経路の調節に関する報告は、糖鎖シアリル化に関するものを除くと、ほとんどされていない。また、N-グリコシル化経路についても、経路に関与する酵素群やDol-P量すべての変化が報告されている場合が多く、律速因子の特定は難しい。もちろんここにあげた以外に、糖アクセプターとなるタンパク質や酵素の基質の、量や細胞内局在性なども、糖タンパク質生合成の調節に関わると考えられる。このように糖タンパク質生合成の調節に関しては、まだ不明な点が多い。

第4節 本研究の目的と概要

第1節で述べたように、N-グリコシド型糖鎖の構造変化は、細胞の増殖、分化などに関連をもつことが報告されているので、この構造変化の要因となる糖鎖生合成の調節機構を明らかにすることには、大きな意義があると考えられる。そこで、本研究では、肝細胞増殖時に注目し、成熟ラットの再生肝と幼若ラット肝を用いて、N-グリコシド型糖鎖生合成の調節機構について、明らかにすることを目的とした。

第3章では、再生肝のN-グリコシル化経路活性の調節について調べた。その結果、再生肝では、オリゴ糖転移酵素が強力な調節因子として働いて、N-グリコシル化経路の活性を低下させていることが示唆された。

第4章では、幼若ラット肝のN-グリコシル化経路活性の調節について調べた。その結果、出生後2週令までは、N-グリコシル化経路に関与する酵素群ほぼ全体の活性増加により、経路活性が増加しており、特定の酵素による調節はされていないことが示された。2週令以降の経路活性の低下においては、オリゴ糖リビド生合成過程に関与する酵素群が、調節因子であることが示唆された。

一方、肝糖タンパク質の糖鎖について調べると、新生仔や5週令ラットに比べて、2週令ラットではシアル酸を欠いた複合型の割合の増加が認められた。そこで、第5章では、幼若ラット肝の糖鎖プロセッシング経路の調節について調べた。糖鎖プロセッシングに関与する酵素群のほとんどの活性は、出生後増加し、2週令で最大に達した後減少し、複合型糖鎖の変化と対応していることが示された。また、シアル酸転移酵素は、他のプロセッシング酵素より遅れて、2週令以降に活性が増加していた。このシアル酸転移酵素の活性増加時期の遅延が、2週令におけるシアル酸を欠いた複合型糖鎖の増加の要因であることが示唆された。

第2章 実験材料及び基本となる実験方法

第1節 実験材料

i) 実験動物

ラットは、一定温度(23.5°C)で、12時間(6:30-18:30)点灯し、12時間消灯した部屋で、固形飼料を与えて飼育した。第3章には、ウィスター系雄ラット(体重約120g、5週令に相当)を日本クレアから購入した。第4、5章には、妊娠中期のウィスター系ラットを日本ラットから購入し、出産させて、性別に関係なく、出生後15時間以内のラットを新生仔、7日後を1週令、14日前後を2週令とした。3-5週令ラットは、ウィスター系雄ラットを同社から購入した。

ii) 肝部分切除法

ラットをエーテル麻酔下で、HigginsとAndersonの方法(68)により、肝部分切除手術を行なった。対照には、シャム手術を行なった。

iii) ラット肝および血漿の調製

第3章の実験には、肝部分切除手術後24時間飼育したラットを用いた。ラットは、頭部を打ち頸椎をはずして殺し、肝を直ちに摘出し、氷冷0.9%塩化ナトリウムで洗った。第4、5章の実験の新生仔、1、2週令のラットは、断頭して殺した。肝を直ちに摘出し、氷冷0.9%塩化ナトリウムで洗い、一腹のもの(10-15匹)を合わせた。3-5週令のラットは、脱血死させた。肝を直ちに摘出し、氷冷0.9%塩化ナトリウムで洗い、3匹分を合わせた。また、新生仔、1-5週令のラットの血液1-2mlを、15mgのクエン酸ナトリウムの入ったスピッツ管に直接集め、混和した。これを1,000xgで10分間遠心後の上清を血漿とした。

iv) 主な実験材料

ブタDol-P、ウシ α -ラクトアルブミン、ウシ血清アルブミン、オプアルブミン(grade V)、オボムコイド(trypsin inhibitor, Type III-0)、ヒトトランスフェリン、スワインソニン、UDP-N-アセチルグルコサミン、GDP-マンノース、UDP-グルコース、UDP-ガラクトース、CMP-N-アセチルノイラミン酸、p-ニトロフェニル α -マンノピラノシド、p-ニトロフェニル α -グルコピラノシドは、Sigma Chemical Co.(U.S.A.)のものを用いた。UDP-[U-¹⁴C]グルコース(233mCi/mmol)、GDP-[U-¹⁴C]マンノース(203mCi/mmol)、UDP-[U-¹⁴C]-N-アセチルグルコサミン(229mCi/mmol)、UDP-[U-¹⁴C]ガラクトース(297mCi/mmol)、CMP-N-ア

セチル[U-¹⁴C]ノイラミン酸(351mCi/mmol)は、The Radiochemical Centre、Amersham(U.K.)のものを用いた。各標識糖ヌクレオチドは、場合によっては、放射活性非標識の同物質で、各実験に示した比活性に希釈して用いた。ダウエックス 50W-X8(200-400)、ダウエックス 1X8(200-400)とダウエックス 50W-X2(200-400)はDow Chemical(U.S.A.)、セファデックスG-25(medium)とコンカナバリンA-セファロースはPharmacia(Sweden)、DEAE-セルロースは Serva(West Germany)、メチル α -グルコピラノシドは生化学工業、アクチナーゼEは科研製薬のものを用いた。その他の試薬は、すべて市販の特級を用いた。

第2節 ラット肝ミクロソーム、ゴルジ膜の調製

i) 試薬

- TMK緩衝液-50mM トリス-塩酸 緩衝液 pH 7.4、5mM 塩化マグネシウム、25mM 塩化カリウム
- 懸濁溶液-5mM トリス-マレイン酸 緩衝液 pH 6.7、0.25M ショ糖、5mM 塩化マグネシウム

ii) 肝ミクロソームの調製

操作は、すべて4°Cで行なった。ラット肝に4倍容の0.25M ショ糖を含むTMK緩衝液を加え、はさみで細切りにした後、テフロン製ポッター型ホモジナイザーで3ストローク、ホモジナイズした。ホモジネートを15,000xgで10分間(佐久間6B)遠心して得られた上清を、さらに105,000xgで60分間(日立RP60)遠心した。沈殿として回収されたミクロソームを、懸濁溶液中に懸濁し、タンパク質濃度を約30mg/mlとした。使用するまで、-20°Cに保存した。

iii) ゴルジ膜の調製

ゴルジ膜は、4°CでFleischerとKervinaの方法(69)を基礎に、肝ミクロソームより分画した。ii)で述べた105,000xgの沈殿に、0.25M ショ糖を含むTMK緩衝液を、タンパク質濃度が約30mg/mlになるように加えてホモジナイズし、2.0M ショ糖を加えてショ糖の終濃度を1.25Mとした。この溶液3.5mlを1.05M、1.0M、0.25M ショ糖を含むTMK緩衝液各々2.8mlを遠心管(日立40T)の底から重層した上に静かに加えた。150,000xgで90分間(日立40T)遠心した後、0.25Mと1.0M ショ糖の間のゴルジ膜を集め、1.6倍容のTMK緩衝液を加え懸濁し、180,000xgで45分間(日立RP65)遠心した。得られた沈殿を懸濁溶液中に懸濁し、タンパク質濃度を約3mg/mlとした。使用するまで、-20°Cに保存した。

第3節 ペーパークロマトグラフィー

東洋No.50ろ紙を用いて、以下の溶媒中で下降法によるペーパークロマトグラフィーを行なった。

溶媒1：1-ブタノール-エタノール-水(13:8:4、v/v)

溶媒2：酢酸エチル-ピリジン-酢酸-水(5:5:1:3、v/v)

溶媒3：1-ブタノール-ピリジン-水(6:4:3、v/v)。

第4節 リピド中間体の加水分解

脂溶性試料を窒素気流下で乾燥させ、0.4mlの10mM 塩酸を含む50%(v/v)1-ブタノールに溶解し、100℃で20分間加水分解を行なった(70)。2.6mlのクロロホルム-メタノール-水(8:3:2、v/v)を加えて二相分配によって得られる水相を集めて1M 水酸化ナトリウムで中和した。

第5節 タンパク質及びN-グリコシド型糖タンパク質結合ヘキソサミン、ガラクトースとシアル酸の定量

i)タンパク質の定量

タンパク質量はLowryらの方法(71)でウシ血清アルブミン(BSA)を標準として測定した。

ii)N-グリコシド型糖タンパク質の調製

肝ミクロソームまたは血漿(15-20mgタンパク質)に、等容の氷冷2%(w/v)リンタンゲステン酸を含む20%(w/v)トリクロロ酢酸を加え、タンパク質を沈殿させた。1,000xgで10分間遠心後、得られた沈殿をそれぞれ等容の氷冷1%(w/v)リンタンゲステン酸を含む10%(w/v)トリクロロ酢酸、エタノール、エタノール-エーテル(1:1、v/v)、エーテルで洗浄し、最終的に得られた沈殿を窒素気流下で乾燥した。0.1M 水酸化ナトリウムを4ml加え溶解し、37℃で48時間保温し、O-グリコシド型糖鎖をアルカリ分解した(72)。4.0M 塩酸で中和した後、氷冷トリクロロ酢酸を最終濃度10%(w/v)になるように加え、氷中30分放置した。この時、ヘキソサミン定量の場合のみ、100℃で5分間煮沸してオリゴ糖リピドを分解する操作を行なった。4℃で1,000xgで10分間遠心し得られた沈殿を、氷冷10%(w/v)トリクロロ酢酸、エタノール、エタノール-エーテル(1:1、v/v)、エーテルで洗浄し、窒素気流下で乾燥させた。これに、0.2M 水酸化ナトリウムを5mgタン

パク質/mlになるよう加え、加温溶解し、N-グリコシド型糖タンパク質として分析に用いた。

iii)N-グリコシド型糖タンパク質結合ヘキソサミンの定量

N-グリコシド型糖タンパク質(1.8ml)をキャップ付試験管に移し、2.56mlの6M 塩酸を加え水で5mlとした(終濃度3M 塩酸)。この試験管の気相を窒素置換した後、100℃で5時間加水分解を行なった。冷却後1,000xgで10分間遠心し、得られた上清を蒸発乾固させ、1mlの水に溶かした。これをダウエックス 50W-X8(H⁺形)カラム(1cmx7cm)にのせて、20mlの水で洗った後、30mlの2M 塩酸でヘキソサミンを溶出した(73)。溶出液中のヘキソサミン量をLevy, G.A.とMacAllan, A.の方法(74)で測定した。

iv)N-グリコシド型糖タンパク質結合シアル酸、ガラクトースの定量

N-グリコシド型糖タンパク質(1.8ml)をキャップ付試験管に移し、塩酸で中和した後、0.25mlの2N 硫酸を加え、水で5mlとした(終濃度0.1N 硫酸)。これを、80℃で1時間緩和な加水分解を行なった(73)。1,000xgで10分間遠心後の上清をシアル酸の定量に、沈殿をガラクトースの定量に用いた。

上清に0.5M アンモニア水を加えてpHを8とし、ダウエックス 1X8(HCOO⁻形)カラム(0.6cmx13cm)にのせ、50mlの0.01M ギ酸、25mlの1M ギ酸で順次溶出した(73)。1M ギ酸溶出液を40-50℃でエバポレートし、少量の水に溶解した。この溶液中のシアル酸をチオバルビツール酸法(75)で定量した。

沈殿を少量の0.2M 水酸化ナトリウムで溶解し、塩酸で中和した後、1.25mlの2N 硫酸を加え水で5mlとした(終濃度0.5N 硫酸)。これを100℃で6時間加水分解した。1,000xgで10分間遠心後、得られた上清を水酸化ナトリウムで中和し、溶液中のガラクトースをガラクトースデヒドロゲナーゼ法(76)で定量した。

第6節 N-グリコシル化経路へのグルコースの転移

i)試薬

- 反応液-50mM トリス-マレイン酸 緩衝液 pH6.7、5mM 塩化マンガン、
1.0 μ M UDP-[U-¹⁴C] グルコース(233mCi/mmol)
- CM-クロロホルム-メタノール(2:1、v/v)
- CMW-クロロホルム-メタノール-水(10:10:3、v/v)

ii)反応条件

肝ミクロソーム(約3.0mgタンパク質)を含む反応液200 μ lを37°Cでインキュベートした。DoI-P添加実験の場合は、30 μ g(CM溶液)をTriton X-100(終濃度0.1%)とともに加え、窒素気流下で溶媒を除去した試験管を用いた。一定時間後、CMを4ml加えて反応を停止させた。Waechterらの方法(77)で、以下のように順次”CM画分”、”CMW画分”、”残渣”を得た。

iii) ”CM画分”の調製と標識化合物の同定

試験管内容物を室温で十分にガラス棒で攪拌し、1,000xgで10分間遠心後の上清のCM抽出液と、残った沈殿を同様に4mlのCMで2回抽出した液をあわせて(約12ml)。この抽出液から3mlの0.9%塩化ナトリウムで1回、続いて4.5mlの0.9%塩化ナトリウム-メタノール(2:1, v/v)で2回、2相分配法によって水溶性物質を除去し、得られた有機層を”CM画分”とした。この画分の放射活性は、以下の理由からDoI-P-[¹⁴C]グルコースであると考えられた。

- ”CM画分”をDEAE-セルロースカラムで分析したところ、放射活性生成物は、カラムに保持され、クロロホルム-メタノール-20mM酢酸アンモニウム(10:10:3, v/v)で溶出された。
- ”CM画分”を加水分解したところ、すべての放射活性がグルコースとして回収された。
- 外因性DoI-Pを反応系に添加すると、”CM画分”の放射活性は増加した。

iv) ”CMW画分”の調製と標識化合物の同定

CM不溶性画分を、4mlの0.9%塩化ナトリウム中で超音波処理によって懸濁させ、1,000xgで10分間遠心した。得られた沈殿を8mlの0.9%塩化ナトリウムで1回、10mlの水で3回洗浄し、水溶性物質を除去した。残渣にCMWを4ml加えて懸濁し、室温で30分放置後1,000xgで10分間遠心し上清を回収した。この抽出操作を全部で3回繰り返し、CMW抽出物を集めこれを”CMW画分”とした。この画分の放射活性は、以下の理由から[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リピドであると考えられた。

- ”CMW画分”をDEAE-セルロースカラムにて分析したところ、放射活性生成物は、カラムに保持され、クロロホルム-メタノール-20mM酢酸アンモニウム(10:10:3, v/v)では溶出されなかったが、クロロホルム-メタノール-200mM酢酸アンモニウム(10:10:3, v/v)で溶出された。
- ”CMW画分”を加水分解したところ、すべての放射活性が可溶性となり、セファデックスG-25カラムクロマトグラフィーや、ペーパークロマトグラフィー(溶媒1と2)でオリゴ糖であることが示された。

v) ”残渣”の調製

CMW不溶性画分をアクチナーゼEで徹底消化し、セファデックスG-25カラムで分析した。糖ペプチドは、ボイドボリューム付近に溶出したが、低分子領域にも、放射活性が溶出し、夾雑物の存在が示された。CMW不溶性画分をアクチナーゼ消化前に、4回、4mlの氷冷10%(w/v)トリクロロ酢酸で洗うと、夾雑物の放射活性は、糖ペプチドに比べ無視できる程度になった。そこで、このトリクロロ酢酸で洗った後の最終”残渣”の放射活性を、糖タンパク質へのグルコース転移とした。

第7節 肝ミクロソーム内のドリコールリン酸の定量

i) ドリコールリン酸化合物の抽出

肝ミクロソーム(約15mgタンパク質)を、各々20倍容のCM、CMWで第6節に述べた方法で順に抽出し、”CM画分”、”CMW画分”を得た。”CM画分”をKatesの方法(78)でケン化した。窒素気流下で溶媒を除去した後、残渣を1mlの0.1M水酸化ナトリウムを含むクロロホルム-メタノール(1:4, v/v)に溶解し、室温に15分間放置した。1.9mlのクロロホルム-メタノール-水(8:2:9, v/v)を加え、攪拌後放置した。二相に分離後、水層を除き、有機層を0.5mlのメタノール-水(10:9, v/v)で洗い、窒素気流下で溶媒を除去した。残渣を少量のCMWに溶解し、CMWで平衡化したDEAE-セルロース(CH₃COO⁻形)カラム(0.7x7.8cm)にのせた。15mlのCMWでカラムを洗った後15mlのクロロホルム-メタノール-200mM酢酸アンモニウム(10:10:3, v/v)で、DoI-Pとその誘導体を溶出させた。この画分の溶媒を窒素気流下で除去した後、クロロホルム-メタノール-水(3:2:1, v/v)の二相分配によって酢酸アンモニウム塩を除去した。この抽出物を”CM抽出ケン化物”とする。”CM抽出ケン化物”と”CMW画分”の各々半分について、第4節に述べた方法で、15分間の加水分解を行なった。

ii) ドリコールリン酸定量法

- 反応液-50mM トリス-マレイン酸 緩衝液 pH 7.1、10mM 塩化マグネシウム、3mM AMP、3mM フッ化ナトリウム、0.2% Triton X-100、2.3 μ M GDP-[U-¹⁴C]マンノース(108mCi/mmol)

b. 方法

DoI-P量は、Dallnerらの方法(79)の変法で、ブタDoI-Pをスタンダードに酵素学的に定量した。”CM抽出ケン化物”、”CMW画分”、”両画分の加水分解後の脂溶性画分”の4画分の各適量、あるいは既知量のDoI-P(CM溶液)を試験管に加え、

窒素気流下で溶媒を除去した。これらの試験管に正常ラットの肝ミクロソーム(約0.2mgタンパク質)を含む反応液100 μ lを加えて、37°Cで1分間インキュベートした。反応は4mlの氷冷5%(w/v)トリクロロ酢酸を加えて停止させた。4°C、1,000xgで20分間遠心後の沈殿をさらに、3mlの氷冷5%(w/v)トリクロロ酢酸で2回洗った。沈殿の放射活性は、この条件下ではほとんど全部が、DoI-P-[¹⁴C]マンノースなので、沈殿の放射活性を測定した。

第8節 ドリコールリン酸を基質にする合成酵素活性

i) 試薬

a. DoI-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素用反応液(80)。

50mM トリス-マレイン酸 緩衝液 pH 7.7、10mM 塩化マグネシウム、
0.3mM ATP、5mM 2,3-ジメルカプト-1-プロパノール、5mM AMP、
22 μ M UDP-[U-¹⁴C]-N-アセチルグルコサミン(68mCi/mmol)

b. DoI-P-マンノース合成酵素用反応液

10mM トリス-マレイン酸 緩衝液 pH 7.1、10mM 塩化マグネシウム、
3mM AMP、3mM フッ化ナトリウム、
7 μ M GDP-[U-¹⁴C]マンノース(150mCi/mmol)

c. DoI-P-グルコース合成酵素用反応液

50mM トリス-マレイン酸 緩衝液 pH 6.7、5mM 塩化マンガン、
48 μ M UDP-[U-¹⁴C]グルコース(31mCi/mmol)

ii) 方法

DoI-P(1 μ gを含むCM溶液)をTriton X-100(終濃度0.1%)とともに試験管に入れ、窒素気流下で溶媒を除去した。これらの試験管に、肝ミクロソーム(約0.1mgタンパク質)を含む各反応液50 μ lを加え、37°Cで1分間インキュベートした。反応は、1mlのCMを加えて停止させ、第6節の1/4倍容で調製した"CM画分"の放射活性を測定した。いずれの合成酵素活性の測定の場合も、オリゴ糖リビド、糖タンパク質の放射活性は、ほとんど無視できた。DoI-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素の活性測定に際しては、"CM画分"を加水分解した後、ペーパークロマトグラフィー(溶媒3、21時間)で分析した。N,N'-ジアセチルキトビオース(GlcNAc β 4GlcNAc)の放射活性は、N-アセチルグルコサミンに比べ、ほとんど無視できる程度であった。

第9節 酵素反応の基質の調製

i) [¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビドの調製

5週令ラットの肝ミクロソーム(約24mgタンパク質)を含む、第6節の反応液1.6mlを37°Cで5分間インキュベートした。32mlのCMを加えて反応を停止させ、CM不溶性画分から、第6節の8倍容で"CM画分"を抽出した。これを1本分とし、8本分をあわせてエバポレーターで濃縮し、少量のCMWに溶解した。-20°Cで保存し、1回の実験に用いた。

ii) オリゴ糖リビドの調製

2週令ラットの肝ミクロソーム(約15mgタンパク質)から第7節に従って"CM画分"を抽出した。これを1本分とし、20本分をあわせてエバポレーターで濃縮し、少量のCMWに溶解した。-20°Cで保存し、1回の実験に用いた。

iii) [¹⁴C]グルコース-オリゴ糖の調製

i)に従って調製したオリゴ糖リビドを加水分解した。遊離したオリゴ糖をエバポレーターで濃縮後、少量の水に溶解し、使用するまで-20°Cで保存した。

iv) [¹⁴C]マンノース-オリゴ糖の調製

a. 反応液-0.1M トリス-マレイン酸 緩衝液 pH 7.7、5mM 塩化マグネシウム、
3mM ATP、2mM EDTA、0.5% Triton X-100、
1.37 μ M GDP-[U-¹⁴C]マンノース(146mCi/mmol)

b. 方法

2週令ラットの肝ミクロソーム(約30mgタンパク質)を含む反応液2mlを、48 μ gのDoI-P(CM溶液)を入れ窒素気流下で溶媒を除去した試験管に加え、37°Cで40分間インキュベートした。40mlのCMを加えて反応を停止した後、CM不溶性画分から、第6節の10倍容で"CM画分"を抽出した。これを加水分解して、[¹⁴C]マンノース-オリゴ糖を遊離させ、溶媒1で2日間、溶媒2で5日間ペーパークロマトグラフィーを行なった。アクチグラフで放射活性を検出すると、[¹⁴C]マンノース-オリゴ糖は、二つのピークに分かれていた。そのRf値の小さい高分子の[¹⁴C]マンノース-オリゴ糖部分を切り取り、5%酢酸で溶出した。これをエバポレーターで濃縮後、少量の水に溶解し、使用するまで-20°Cで保存した。

v) DoI-P-[¹⁴C]マンノース、DoI-P-[¹⁴C]グルコースの調製(81)

DoI-P(30 μ gを含むCM溶液)をTriton X-100(終濃度0.1%)とともに、試験管に加え窒素気流下で溶媒を除去した。これらの試験管に5週令ラットの肝ミクロソーム(約24mgタンパク質)を含む、DoI-P-マンノースの調製にはiv)の、DoI-P-

グルコースには第6節の反応液各1.6mlを加え、37°Cで5分間インキュベートした。32mlのCMを加えて反応を停止させ、第6節の8倍容で"CM画分"を得た。これを1本分とし、それぞれ8本分を合わせ、窒素気流下で溶媒を除去した。残渣を10mlの0.1M水酸化ナトリウムを含むクロロホルム-メタノール(1:4、v/v)に溶解し、37°Cで10分間インキュベートした。これを塩酸で中和後、混和した。二相に分離後、水溶性物質を除去し、窒素気流下で溶媒を除去した。残渣を少量のCMWに溶解し、CMWで平衡化したDEAE-セルロース(CH₃COO⁻形)カラム(1cmx18cm)にのせた。70mlのクロロホルム-メタノール-10mM酢酸アンモニウム(10:10:3、v/v)で、溶出を行ない7mlづつ分取した。放射活性のある画分を集め、クロロホルムと10mM塩化マグネシウムをクロロホルム-メタノール-4mM塩化マグネシウム(3:2:1、v/v)になるよう加えて混和した。二相に分れた上層を捨て、下層を1/2容量のクロロホルム-メタノール-3.6mM塩化マグネシウム(3:48:47、v/v)、クロロホルム-メタノール-水(3:48:47、v/v)で順に洗い、溶媒を窒素気流下で除去した。こうして得たDoI-P-[¹⁴C]マンノース、DoI-P-[¹⁴C]グルコースを少量のCMに溶解し、使用するまで-20°Cで保存した。

vi)変性 α -ラクトアルブミンの調製

ウシ α -ラクトアルブミンをBrewらの方法(82)でS-カルボキシメチル化した。

vii)オブアルブミンの画分Vの糖ペプチドの調製

a.反応液-0.1M トリス-塩酸 緩衝液pH 8.0、10mM 塩化カルシウム

b.方法

オブアルブミン(2g)と40mgのアクチナーゼEを含む反応液15mlにトルエンを数滴添加した後、37°Cでインキュベートした。24、48時間後に10mgのアクチナーゼEとトルエン数滴を添加した。72時間後煮沸して反応を停止した。1,000xgで10分間遠心後の上清をセファデックスG-25カラム(0.8cmx68cm)にかけて、Huangらの方法(83)で糖ペプチド画分を得た。糖ペプチドを、ダウエックス 50 W-X2(CH₃COO⁻)カラム(1.25cmx114cm)にかけ、フェノール-硫酸法(84)で糖の溶出を測定し、IからVに分画した(85)。画分Vの糖ペプチド(GP-V)は、Man α 6(Man α 3)Man α 6(Man α 3)Man β 4GlcNAc β 4GlcNAc-Asnと考えられ(85)、その収量は、11 μ molであった。

viii)アシアロトランスフェリンの調製

ヒトトランスフェリンからSpiroの方法(73)でシアル酸を除去し、調製した。

第10節 オリゴ糖リビドからタンパク質へのオリゴ糖転移

i)反応液-50mM トリス-マレイン酸 緩衝液 pH 6.7、5mM 塩化マンガン、1% Triton X-100、

ii)[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビドから内因性タンパク質へのオリゴ糖転移

[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビド(5,000dpm)を加え、窒素気流下で溶媒を除去した試験管に、肝ミクロソーム(約3.0mgタンパク質)を含む反応液200 μ lを加え、37°Cでインキュベートした。反応は、4mlの氷冷10%(w/v)トリクロロ酢酸を加えて停止させた。残存する[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビドを10分間の煮沸によって加水分解した後冷却し、1,000xgで10分間遠心した。さらに、沈殿を4mlの10%トリクロロ酢酸で3回洗浄し、[¹⁴C]グルコース、[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖を除去した(61)。この最終沈殿の放射活性を測定した。

iii)[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビドから外因性タンパク質へのオリゴ糖転移

[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビド(5,000dpm)を加え、窒素気流下で溶媒を除去した試験管に、肝ミクロソーム(約3.0mgタンパク質)と変性 α -ラクトアルブミン(0-3mg)を含む反応液200 μ lを加え、37°Cでインキュベートした。反応は、1mlの氷冷5mM EDTA(ナトリウム塩、pH7.0)を加えて停止させた。試料を氷冷後、4°C、15,000xgで20分間遠心し、内因性タンパク質の大部分を沈殿させた(86)。上清を、試験管にとり1mgのBSAをタンパク質キャリアーとして加えた。沈殿は4mlの水に懸濁した。1/4容量の50%(w/v)トリクロロ酢酸を上清と沈殿の懸濁液の各々に加えた。試料を10分間煮沸し、冷却後1,000xgで10分間遠心した。沈殿をさらに4mlの10%トリクロロ酢酸で3回洗浄し、最終沈殿の放射活性を測定した。

iv)肝ミクロソームにおける[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビドの分解

変性 α -ラクトアルブミンを加えない場合は、ii)と同様にインキュベートし、反応を停止させた。4°C、1,000xgで10分間遠心し、分解物が含まれる上清を集めた。沈殿を2mlの氷冷10%トリクロロ酢酸で2回洗浄し、得られた上清を集め、先の上清と合わせた。この酸可溶性画分を、等容のエーテルで3回洗いトリクロロ酢酸を除いた後、1M水酸化ナトリウムで中和した。この水溶液中の放射活性を[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビドの分解量とした。

トリクロロ酢酸不溶性画分を4mlの10%トリクロロ酢酸に懸濁し、5分間煮沸してオリゴ糖リビドを加水分解した。冷却後、1,000xgで10分間遠心し、遊離

したオリゴ糖を含む上清と、沈殿を2mlの10%トリクロロ酢酸で2回洗浄し、得られた上清と合わせた。これを上述の酸可溶性画分と同様に、エーテル処理、中和した。この水溶液中の放射活性を残っていた $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビド量とした。

変性 α -ラクトアルブミンを加えた場合は、iii)と同様にインキュベートし、反応を停止させた。4°C、15,000xgで20分間遠心後の上清に1/4容量の氷冷50%トリクロロ酢酸を加え、変性 α -ラクトアルブミンを加えない場合と同様に、 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドの分解量と残っていた量を測定した。

第11節 変性 α -ラクトアルブミンへのグルコース転移

Dol-P(30 μ gのCM溶液)をTriton X-100(終濃度0.1%)とともに試験管に加え、窒素気流下で溶媒を除去した。これらの試験管に、肝ミクロソーム(約30mgタンパク質)と、1.8mgの変性 α -ラクトアルブミンを含む第6節の反応液200 μ lを加え、37°Cで5分間インキュベートした。第10節iii)と同様に、EDTAを加えて反応を停止させ、15,000xgで20分間遠心後の上清の放射活性を測定した。

第12節 ドリコールリン酸結合糖からオリゴ糖リビドへの糖転移

i)Dol-P- $[^{14}\text{C}]$ マンノースからの転移

a. 反応液-25mM トリス-マレイン酸 緩衝液 pH 7.1、10mM 塩化マグネシウム、10mM 塩化マンガン

b. 方法

肝ミクロソーム(約20mgタンパク質)から得たオリゴ糖リビドと、10,000dpmのDol-P- $[^{14}\text{C}]$ マンノースをTriton X-100(終濃度0.1%)とともに試験管に加え、窒素気流下で溶媒を除去した。これらの試験管に、肝ミクロソーム(約1mgタンパク質)を含む反応液50 μ lを入れ、37°Cで10分間インキュベートした。1mlのCMを加えて反応を停止し、CM不溶性画分から、第6節の1/4倍容で"CMW画分"を抽出し、放射活性を測定した。"残渣"の放射活性は、ほとんど無視できる程度であった。

ii)Dol-P- $[^{14}\text{C}]$ グルコースからの転移

a. 反応液-50mM トリス-マレイン酸 緩衝液 pH 6.7、10mM 塩化マグネシウム

b. 方法

肝ミクロソーム(約20mgタンパク質)から得たオリゴ糖リビドと、10,000dpm

のDol-P- $[^{14}\text{C}]$ グルコースをTriton X-100(終濃度0.1%)とともに試験管に加え、窒素気流下で溶媒を除去した。これらの試験管に、肝ミクロソーム(約1mgタンパク質)を含む反応液50 μ lを入れ、37°Cで5分間インキュベートした。1mlのCMを加えて反応を停止し、CM不溶性画分から、第6節の1/4容量で"CMW画分"を抽出し、放射活性を測定した。"残渣"の放射活性は、ほとんど無視できる程度であった。

第13節 グリコシダーゼ活性

i) $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖を基質に用いた場合の α -グリコシダーゼ活性

a. 反応液-50mM リン酸ナトリウム 緩衝液 pH 7.0、0.2% Triton X-100

b. 方法

肝ミクロソーム(約1mgタンパク質)と、2,000dpmの $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖を含む反応液0.1mlを37°Cで1時間インキュベートした。反応は、0.1mlのピリジンを加えて停止させた。ペーパークロマトグラフィー(溶媒3、21時間)を行ない、遊離した $[^{14}\text{C}]$ -グルコースを $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖から分離し、放射活性を測定した。

ii)PNP- α -グルコースを基質に用いた場合の α -グリコシダーゼ活性

a. 反応液-50mM リン酸ナトリウム 緩衝液 pH 7.0、

4mM p-ニトロフェニル α -グルコピラノシド

b. 方法

肝ミクロソーム(約0.3mgタンパク質)を含む反応液0.1mlを37°Cで1時間インキュベートした。反応は、1mlの0.2M 炭酸ナトリウムを加えて停止させた後、400nmの吸光度を測定した。ブランクとして、反応液と肝ミクロソームを分けてインキュベートし、炭酸ナトリウムと混和したものをを用いた。

iii) $[^{14}\text{C}]$ マンノース-オリゴ糖を基質に用いた場合の α -マンノシダーゼ活性

a. 反応液-50mM リン酸ナトリウム 緩衝液 pH 6.1、0.2% Triton X-100

b. 方法

肝ミクロソーム(約0.5mgタンパク質)と、3,000dpmの $[^{14}\text{C}]$ マンノース-オリゴ糖を含む反応液0.1mlを37°Cで1時間インキュベートした。反応は、0.1mlのピリジンを加えて、停止させた。ペーパークロマトグラフィー(溶媒3、21時間)を行ない、遊離した $[^{14}\text{C}]$ マンノースを $[^{14}\text{C}]$ マンノース-オリゴ糖から分離し、放射活性を測定した。

iv) PNP- α -マンノースを基質に用いた場合の α -マンノシダーゼ活性(87)

a. 試薬

- 1) 反応液 - 0.1M 酢酸ナトリウム 緩衝液 pH 5.5、
4mM p-ニトロフェニル α -マンノピラノシド
- 2) アルカリ緩衝液 - 0.144M グリシン、0.067M 塩化ナトリウム、
0.083M 炭酸ナトリウム pH 10.7

b. 方法

肝ミクロソーム(約0.1mgタンパク質)を含む反応液0.5mlを37℃で30分間インキュベートした。1.0mlのアルカリ緩衝液を加えて反応を停止させた後、400nmの吸光度を測定した。ブランクとして、反応液と肝ミクロソームを分けてインキュベートし、アルカリ緩衝液と混和したものをを用いた。

第14節 糖転移酵素活性

i) N-アセチルグルコサミン転移酵素 I 活性(88)

a. 試薬

- 1) 反応液 - 0.1M Mes-水酸化ナトリウム 緩衝液 pH 6.5、0.2% Triton X-100、
10mM 塩化マグネシウム、2mM ATP、0.2mM GP-V、
20 μ M スワインソニン(α -マンノシダーゼ II の活性抑制剤(89))
2mM UDP-[U-¹⁴C]N-アセチルグルコサミン(125mCi/mmol)、
- 2) PBS - 137mM 塩化ナトリウム、2.68mM 塩化カリウム、
8.09mM リン酸二ナトリウム、1.47mM リン酸一カリウム pH 7.2

b. 方法

肝ミクロソーム(約0.1mgタンパク質)を含む反応液50 μ lを37℃で30分間インキュベート後、5分間煮沸して反応を停止した。1mlのPBSを加えて、混和後10,000xgで2分間遠心した。その上清を、コンカナバリンA-セファロースカラム(0.48cmx2.8cm)にのせ、7mlのPBSで洗った。続いて、2.5mlの0.1M メチル α -グルコピラノシドを含む10mM トリス-塩酸 pH 8.0で溶出するものを集めて、放射活性を測定した。GP-Vを加えない場合には、ほとんど活性はみられなかった。

ii) ガラクトース転移酵素活性(54)

a. 試薬

- 1) 反応液 - 0.1M Mes-水酸化ナトリウム 緩衝液 pH 6.3、20mM 塩化マンガン、
0.5% Triton X-100、1mM UDP-[U-¹⁴C]ガラクトース(1.0mCi/mmol)

2) PTA - 1% リンタンゲステン酸、0.5M 塩酸

b. 方法

ゴルジ膜(10 μ gタンパク質)と、2mgのオボムコイドを含む反応液50 μ lを37℃で30分間インキュベートした。1mlの氷冷PTAを加えて反応を停止させ、BSA(2mg)をタンパク質キャリアーとして加えた。30分間氷冷後、4℃、1,000xgで、10分間遠心した。得られた沈殿を、1mlの氷冷PTAで2回洗浄した後、放射活性を測定した。オボムコイド非添加の場合も同様に測定し、ブランクとした。

iii) シアル酸転移酵素活性の測定(90)

- a. 反応液 - 0.1M Mes 緩衝液 pH 6.3、0.5% Triton X-100、
0.2mg BSA(65℃で15分間前処理したもの)、
4mM CMP-N-アセチル[U-¹⁴C]ノイラミン酸(1.5mCi/mmol)

b. 方法

ゴルジ膜(10 μ gタンパク質)と2mgのアシアロトランスフェリンを含む反応液50 μ lを37℃で30分間インキュベートした。1mlの氷冷PTAを加えて反応を停止させ、30分間氷冷後、4℃、1,000xgで10分間遠心した。得られた沈殿を1mlの氷冷PTAで2回洗浄した後、放射活性を測定した。アシアロトランスフェリン非添加の場合も同様に測定し、ブランクとした。

第15節 放射活性の測定

i) 試薬

- a. DPO - 0.6%(w/v)2,5-ジフェニルオキサゾール(トルエン溶液)
- b. シンチレーター - DPO-Triton X-100(2:1、v/v)

ii) 方法

CM、CMW画分は、バイアルに入れ、窒素気流下で溶媒を除去した後、4mlのシンチレーターと0.5mlの水を加えた。トリクロロ酢酸、及びPTA沈殿は、1M 水酸化ナトリウムで中和し、0.5mlの0.2M 水酸化ナトリウムを加えて溶解した後、バイアルに移し、4mlのシンチレーターと25 μ lの4M 塩酸を加えた。ペーパークロマトグラフィーの試料については、展開後ろ紙を1cm巾に切り、10mlのDPOを加えたバイアルに入れた。放射活性は、ベックマンまたはアロカの液体シンチレーションカウンターで測定した。

第3章 再生肝におけるN-グリコシル化経路活性の調節

第1節 緒言

外科的手術により、肝を2/3切除すると、残りの肝細胞が増殖を開始し、その結果肝はもとの大きさまで肥大することが知られている。ラット肝部分切除後24時間でDNAの生合成は、最も盛んになるが、このとき肝の糖タンパク質合成能は、対照に比べ低下していることが肝スライスを用いた実験で示され(91)、その低下はオリゴ糖リビドからタンパク質へのオリゴ糖転移の段階に起因することが、マイクロソームとGDP-マンノースを用いた実験結果から示唆された(81)。しかし、オリゴ糖転移の低下が、オリゴ糖転移酵素の活性低下によるのか、アクセプターとなる内因性タンパク質量の低下によるのか、詳しい要因は不明であった。また、オリゴ糖リビドからタンパク質へのオリゴ糖転移には、オリゴ糖鎖非還元末端のグリコース3残基が重要であることが、ラット肝マイクロソーム(92)を始めとする多くの組織、細胞で報告されている(39-41, 93, 94)。そこで本研究では、UDP-グルコースからDol-P-グルコース、オリゴ糖リビドと糖タンパク質へのグルコース転移活性と、オリゴ糖リビドからタンパク質へのオリゴ糖転移活性の変化について再生肝で調べた。特にオリゴ糖転移については、詳細な検討を加え、再生肝におけるN-グリコシル化経路活性の調節機構の解明を試みた。

第2節 再生肝と対照のN-グリコシル化経路活性の比較

UDP-グルコースからDol-P-グルコース、オリゴ糖リビド、糖タンパク質へのグルコース転移活性の経時変化を、シャム手術ラット肝(以下対照)マイクロソームを用いて測定した。結果を図9に示したが、UDP-グルコースから、すみやかにDol-P-グルコースが合成され、続いて、グルコース-オリゴ糖リビド、糖タンパク質へと順次グルコースが転移されることが確認された。糖タンパク質へのグルコース転移は、反応時間5分で最大になり、それ以降は低下していた。この低下は、おもに肝マイクロソームに含まれる α -グルコシダーゼの作用(95)によると考えられた。そこで、再生肝と対照の比較は、糖タンパク質へのグルコース転移が最大になった反応時間5分で行なうことにした。

表1に結果を示したが、Dol-P-グルコース、グルコース-オリゴ糖リビド(以下両者をあわせてリビド中間体)、糖タンパク質へのグルコース転移が、再生肝では対照の各々67、38、51%とすべて有意に低下していた。すべてが低下し

ているので、リビド担体であるDol-P量全体が再生肝で低下している可能性が第一に考えられた。

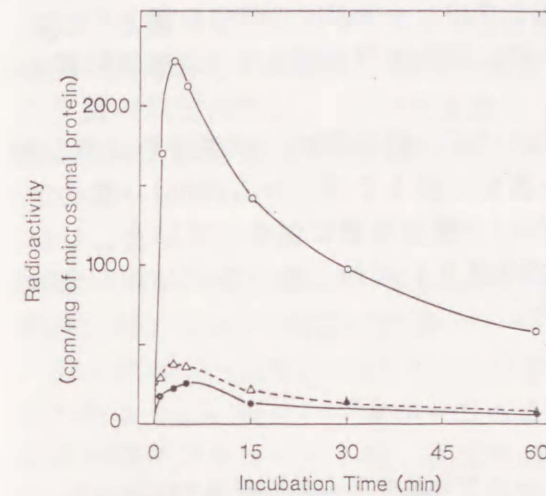


図9 UDP-[¹⁴C]グルコースから、リビド中間体、糖タンパク質へのグルコース転移の経時変化

シャム手術ラット肝マイクロソームを、方法に述べたように、UDP-[¹⁴C]グルコースと37°Cでインキュベートし、1、3、5、15、30、60分後のDol-P-グルコース(O)、グルコース-オリゴ糖リビド(Δ)、糖タンパク質(●)の放射活性を測定した。縦軸は、マイクロソームタンパク質あたりの測定値を示す。

表1 UDP-[¹⁴C]グルコースから、リビド中間体、糖タンパク質へのグルコース転移

肝マイクロソームを方法に述べたように、UDP-[¹⁴C]グルコースと5分間インキュベート後、各生成物の放射活性を測定した。各値は、4匹のラットからそれぞれ調製した肝マイクロソームについての測定値(マイクロソームタンパク質あたりの値)の平均値±S.E.を示す。

生成物	放射活性	
	対照	再生肝
	cpm/mgマイクロソームタンパク質	
Dol-P-グルコース	2646±126	1769±106 ^a
グルコース-オリゴ糖リビド	656±62	249±13 ^a
糖タンパク質	247±12	127±11 ^a

^a対照との差は、P<0.01であった。

第3節 ドリコールリン酸のN-グリコシル化経路活性への影響

再生肝でのN-グリコシル化経路活性の低下に、Dol-Pがなんらかの役割を果たしている可能性を検討するために、肝ミクロソーム内のDol-P含量とリビド中間体、糖タンパク質へのグルコース転移に対する外因性Dol-P添加の影響を調べた。

肝ミクロソーム内のDol-Pは、遊離型Dol-Pと、結合型Dol-P(糖またはリン酸を結合したDol-P)として存在している。表2に肝ミクロソーム内Dol-P量の定量の結果を示した。再生肝では、遊離型Dol-P量が有意に減少していた。しかし、遊離型Dol-Pの量は、全Dol-P量の10%程度とわずかであった。しかも全Dol-P量は、対照と再生肝ではほぼ同じであった。

表2 肝ミクロソーム内Dol-P量

方法に述べたように、肝ミクロソームから"CM画分"、"CMW画分"を抽出し、ケン化、あるいは加水分解を行なった。遊離型Dol-P量は、"CM抽出ケン化物"を用いて測定した。CM可溶性の結合型Dol-P量は、"CM抽出ケン化物"を加水分解した後測定したDol-P量から、遊離型Dol-P量を差し引いて求めた。CMW可溶性の結合型Dol-P量は、"CMW画分"を加水分解後遊離したDol-P量を、加水分解前をブランクに測定した。全Dol-P量は遊離型Dol-P量と結合型Dol-P量の和である。各値は、6-8匹のラットからそれぞれ調製した肝ミクロソームについての測定値(ミクロソームタンパク質あたりの値)の平均値±S.E.を示す。

画分	Dol-P	
	対照	再生肝
	ng/mgミクロソームタンパク質	
遊離型Dol-P	2.3±0.5	0.8±0.3 ^a
結合型Dol-P	CM可溶	4.3±1.0
	CMW可溶	10.8±3.1
全Dol-P	17.4±4.3	16.0±3.0

^a対照との差は、P<0.05であった。

次に0.1% Triton X-100の存在下で、30 μgのDol-Pを添加したときのUDP-グルコースからリビド中間体、糖タンパク質へのグルコース転移を測定した(表3)。Triton X-100の添加により、生成物の放射活性はすべて、非添加時の値(表1)に比べ低下したが、Dol-Pを添加するとリビド中間体の放射活性は、再生肝、対照ともに増加し、両者の差はみられなくなった。それに対し、糖タンパク質の放射活性は、Dol-Pを添加しても顕著な変化はみられず、依然として再生肝の方が対照より低い値を示した。

表3 UDP-[¹⁴C]グルコースからリビド中間体、糖タンパク質へのグルコース転移に対するDol-P添加の影響

肝ミクロソームをTriton X-100の存在下でUDP-[¹⁴C]グルコースと、方法に述べたように、Dol-P-グルコースへの転移の測定には1分間、その他の場合には5分間インキュベート後、生成物の放射活性を測定した。各値は、4-10匹のラットからそれぞれ調製した肝ミクロソームについての測定値(ミクロソームタンパク質あたりの値)の平均値±S.E.を示す。

生成物	Dol-P 添加量 μg	放射活性	
		対照	再生肝
		cpm/mgミクロソームタンパク質	
Dol-P-グルコース	0	1127±87	848±77 ^a
	30	3583±444	3500±344
グルコース-オリゴ糖リビド	0	249±41	140±26 ^a
	30	363±74	350±74
糖タンパク質	0	153±6	106±9 ^a
	30	150±7	116±7 ^a

^a対照との差は、P<0.05であった。

これらの実験結果から、再生肝におけるUDP-グルコースからリビド中間体へのグルコース転移の低下は、おもに内因性遊離型Dol-P量の低下に基づくこと

が示された。一方、糖タンパク質へのグルコース転移の低下は、遊離型Dol-P量の低下ではなく、オリゴ糖リビドからタンパク質へのオリゴ糖転移の低下が主要因であることが示唆された。この結果は、GDP-マンノースを用いた実験結果から示唆された、再生肝ではオリゴ糖転移が低下しているという推測(81)と矛盾しない。

第4節 再生肝におけるオリゴ糖転移の低下の要因

再生肝では、オリゴ糖リビドからタンパク質へのオリゴ糖転移の活性が低下し、N-グリコシル化経路の活性低下を引き起こしていることが、確認された。オリゴ糖転移の低下には、主として次の3つの要因が考えられる。1)オリゴ糖リビドのオリゴ糖部分の構造変化。2)オリゴ糖転移酵素の活性低下。3)オリゴ糖アクセプターとなる内因性タンパク質量の低下。これらのうち、どれが主要因となっているのか調べた。

最初に、1)の可能性について検討するために、再生肝由来のオリゴ糖リビドのオリゴ糖部分を対照と比較した。肝ミクロソームをUDP-[¹⁴C]グルコースとインキュベートした後、[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビドを抽出し、これを加水分解して得られたオリゴ糖について、ペーパークロマトグラフィーによる分析を行なった。図10に示したように、再生肝、対照どちらの場合もほぼ単一の放射活性のピークを与え、その他の放射活性はほとんど無視できる程少なかった。このピークは、[³H]マンノースと肝スライスをインキュベートして得られたオリゴ糖リビド由来のオリゴ糖(61)と同じ移動度を示し、非還元末端にグルコース3残基を有するものと考えられた(94)。この結果から、再生肝由来の[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビドのオリゴ糖部分は、対照と同じであり、オリゴ糖転移に影響を及ぼすような構造変化は起きていないことが示された。

次に、2)、3)の可能性について調べるために、まず[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビドから内因性タンパク質へのオリゴ糖転移の活性を再生肝と対照で比較した。この反応にはTriton X-100が必要で、その至適濃度は再生肝、対照ともに、1.0%(v/v)であった。図11に内因性タンパク質へのオリゴ糖転移の経時変化を示した。再生肝、対照とも反応時間5分以降、オリゴ糖転移反応は平衡に達した。しかし、どの時点においても、再生肝のオリゴ糖転移活性は、対照より低い値を示した。この結果から、オリゴ糖転移酵素の活性、あるいは、オリゴ糖アクセプターになる内因性タンパク質量の量が、再生肝において低下していることが示された。

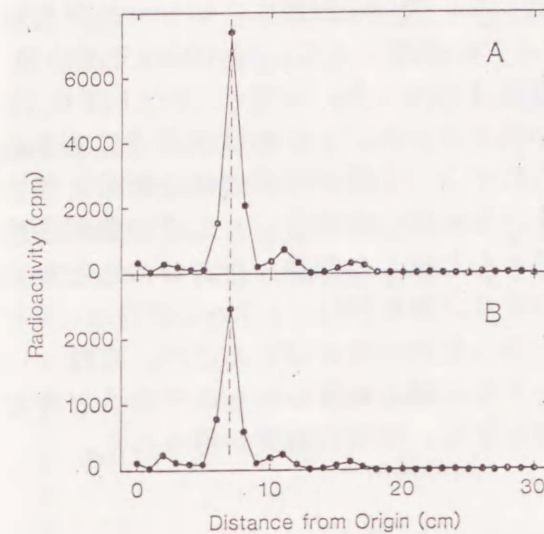


図10 [¹⁴C]グルコース-オリゴ糖のペーパークロマトグラフィー

肝ミクロソーム(約24mgタンパク質)を、第6節に述べた反応液1.6mlで5分間インキュベートした。方法に述べたように抽出したオリゴ糖リビド画分を加水分解し、[¹⁴C]-グルコース-オリゴ糖を得た。対照(A)、再生肝(B)由来の[¹⁴C]-グルコース-オリゴ糖について、それぞれ溶媒1で2日間、次いで溶媒2で20日間、下降法によって展開した。

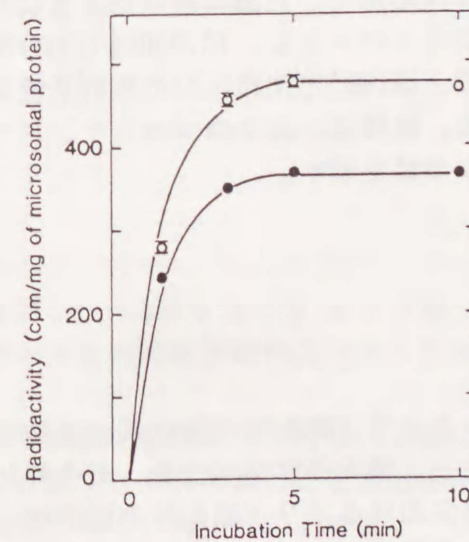


図11 [¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビドから、内因性タンパク質へのオリゴ糖転移

肝ミクロソームを[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リビドと、方法に述べたようにインキュベートした。横軸に示した時間の後、タンパク質に取り込まれた放射活性を測定した。対照(○)、再生肝(●)ともに、3-6匹のラットからそれぞれ調製した肝ミクロソームについての測定値(ミクロソームタンパク質あたりの値)の平均値±S.E.で示した。

そこで、外因性オリゴ糖アクセプターを、 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドからのオリゴ糖転移活性の反応系に添加した。図12に対照マイクロソームを用いた結果を示した。変性 α -ラクトアルブミンの添加により、 $15,000\times g$ で20分間遠心後の上清タンパク質へのオリゴ糖転移は増加した。変性 α -ラクトアルブミンを加えない時でも上清に放射活性が検出されたが、これは反応液に含まれるTriton X-100により、肝マイクロソームのタンパク質が可溶化した結果と考えられた。1.8mgの変性 α -ラクトアルブミンを添加した場合に、上清の放射活性は最高値を示し、沈殿には放射活性はほとんど見られなかった。このことから、肝マイクロソームの内因性タンパク質へのオリゴ糖転移は、1.8mgの変性 α -ラクトアルブミンを添加すると抑制され、上清の放射活性のほとんどが、変性 α -ラクトアルブミンに、 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖の転移したものであると考えられた。再生肝マイクロソームを用いた場合にも、同様の結果が得られた。

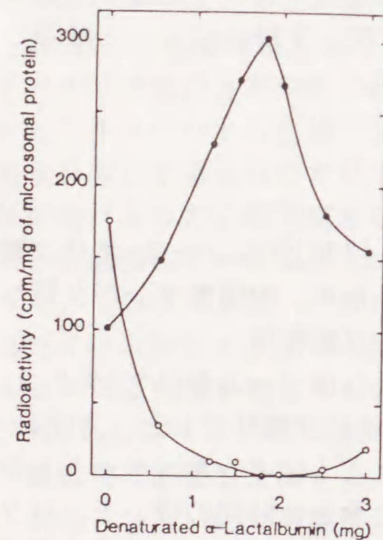


図12 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドからタンパク質へのオリゴ糖転移に対する変性 α -ラクトアルブミンの影響

対照マイクロソームを横軸に示した量の変性 α -ラクトアルブミンを加えたオリゴ糖転移の反応系で、方法に述べたように5分間インキュベートし、 $15,000\times g$ で20分間遠心後の上清(●)と沈殿(○)の放射活性を測定した。縦軸は、マイクロソームタンパク質あたりの値を示す。

つまり、1.8mg変性 α -ラクトアルブミンをオリゴ糖転移の反応系に添加すれば、一定量のオリゴ糖アクセプターへのオリゴ糖転移酵素活性を、再生肝と対照で比較することができる。もし、再生肝におけるオリゴ糖転移の低下が、その一部でも、オリゴ糖アクセプターとなる内因性タンパク質の低下によるものであったなら、十分量の変性 α -ラクトアルブミンを加えることによって、オリゴ糖転移の低下の程度は、小さくなるはずである。図13に示した変性 α -

ラクトアルブミン添加時の結果と、非添加時の結果(図11)を比較すると、再生肝と対照のオリゴ糖転移の差は、むしろ広がっていた。反応時間5分の時点の再生肝のオリゴ糖転移は、 α -ラクトアルブミン添加時には対照の59%、非添加時には対照の77%であった。これらの結果から、再生肝におけるオリゴ糖転移の低下は、オリゴ糖アクセプターとなる内因性タンパク質の量的差異ではなく、オリゴ糖転移酵素の活性低下によることが強く示唆された。しかし、オリゴ糖転移の活性は、5分で平衡に達していた(図11と13)ので、オリゴ糖転移については、さらに詳しい検討が必要と考えられた。

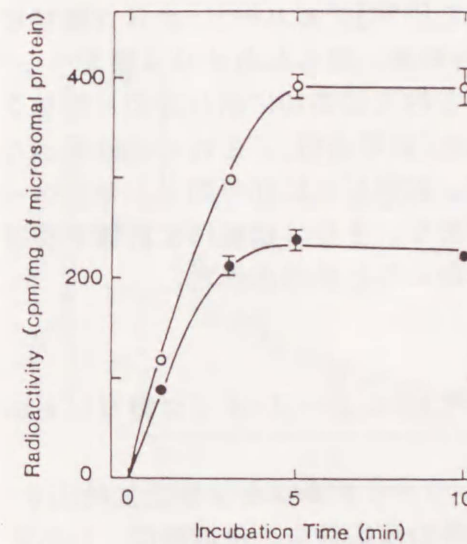


図13 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドから変性 α -ラクトアルブミンへのオリゴ糖転移

肝マイクロソームを1.8mgの変性 α -ラクトアルブミンを加えたオリゴ糖転移の反応系で、方法に述べたように、横軸に示した時間インキュベートし、 $15,000\times g$ で20分間遠心後の上清の放射活性を測定した。対照(○)、再生肝(●)ともに、3-7匹のラットからそれぞれ調製した肝マイクロソームについての測定値(マイクロソームタンパク質あたりの値)の平均値 \pm S.E.で示した。

第5節 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドの分解活性とオリゴ糖転移酵素の安定性のオリゴ糖転移活性に対する影響

オリゴ糖転移酵素の活性が、平衡に達していることから、 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドの分解による基質の不足、あるいは、酵素の失活が起きていると推測される。再生肝におけるオリゴ糖転移の低下に、オリゴ糖リビドの分解活性の上昇、あるいは、オリゴ糖転移酵素の失活が、影響を及ぼしている可能性について検討した。まず、オリゴ糖転移活性測定条件下での $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドの分解活性を再生肝と対照で測定した。変性 α -ラクトアル

ブミンを加えない場合の結果を図14に示したが、 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビド量は反応時間とともに徐々に減少した。3分以内では、再生肝、対照ともにオリゴ糖リビドの減少量は、タンパク質へのオリゴ糖転移量とほぼ一致していた。実際、オリゴ糖リビドは、3分以内にはほとんど分解されず、5分後でもわずかに7-8%が分解されたにすぎなかった。変性 α -ラクトアルブミンを加えた場合にも、10分の後わずかに10%のオリゴ糖リビドが分解されただけであった(結果省略)。これらの結果、オリゴ糖リビドの分解は、ほとんど起きておらず、再生肝と対照の差はみられないことが示された。しかし、 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドが変化し、オリゴ糖転移の有効性に影響を与えている可能性がある。そこで、変性 α -ラクトアルブミン添加のオリゴ糖転移反応を10分間行なった後、15,000xgの沈殿に残っていた $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドをCMWで抽出した。オリゴ糖リビドを加水分解後、得られたオリゴ糖をペーパークロマトグラフィーで分析した結果、基本的には図10に示したのと同じクロマトグラムが、再生肝、対照ともに得られた(結果省略)。これらの結果から、 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドは、再生肝、対照ともに10分間インキュベート後も有効なオリゴ糖供与体として存在しており、オリゴ糖転移に影響を及ぼすような、オリゴ糖部分の変化は起こっていないことが示された。

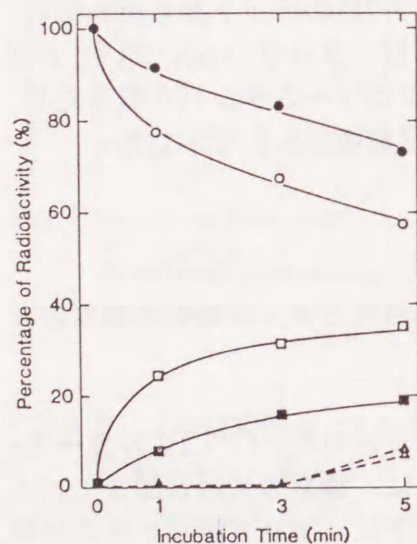


図14 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドの分解

変性 α -ラクトアルブミン非添加時のオリゴ糖転移の反応系で、反応時間、1、3、5分後に、 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビドの分解量(対照、 Δ ；再生肝、 \blacktriangle)、反応後残っていた $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビド量(対照、 \circ ；再生肝、 \bullet)、内因性タンパク質へのオリゴ糖転移(対照、 \square ；再生肝、 \blacksquare)を方法に述べたように測定した。縦軸は、全放射活性を100%とした場合の各測定値(マイクロソームタンパク質あたりの値)の%である。

反応時間5分の時点で、50%以上のオリゴ糖リビドが残存している(図14)のにもかかわらず、オリゴ糖転移は5分以降は、新たには起こっていない(図11と13)。これらの結果から、オリゴ糖転移酵素の失活が起きているものと予想された。そこで次に、オリゴ糖転移酵素の活性測定条件下での安定性を調べた。図15に示したように、再生肝、対照どちらのオリゴ糖転移酵素も、反応時間とともに同様に失活していた。1分のプレインキュベーションで50%以上の活性が失われ、5分後には、約80%が失活していた。このオリゴ糖転移酵素の失活が主な原因となって、オリゴ糖転移活性は、5分で平衡に達したもの(図11と13)と考えられる。

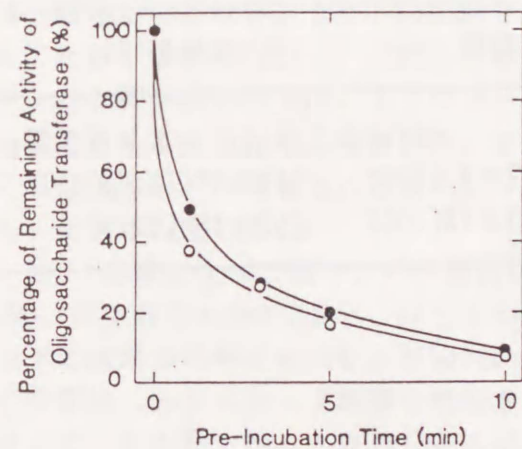


図15 37°Cでのオリゴ糖転移酵素の失活

肝マイクロソーム(約18mgタンパク質)を、方法に述べたオリゴ糖転移の反応液1.2mlと、37°Cでプレインキュベートした。横軸に示した時間に、その0.2mlずつを、 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖リビド(5,000cpm)を入れて窒素気流下で溶媒を除去した試験管に移し、5分間インキュベートした後、方法に述べたようにオリゴ糖転移活性を測定した。

縦軸は、0分の転移活性(241.9、338.8cpm/mgマイクロソームタンパク質、それぞれ、再生肝、対照)を100%とし、プレインキュベート後に残っていた活性を%で、対照(\circ)、再生肝(\bullet)として示した。

オリゴ糖転移酵素の失活は、再生肝、対照とも同程度であったので、オリゴ糖転移の平衡に達した後の飽和量の再生肝と対照の差(図11と13)は、オリゴ糖転移酵素の初速度を反映していると考えられた。このことは、再生肝の変性 α -ラクトアルブミンへのオリゴ糖転移が、初速度は対照の75%で、飽和量は対照の72%であることから確認された(表4)。これらの結果から、再生肝マイクロソームでのタンパク質へのオリゴ糖転移の低下は、オリゴ糖転移酵素の活性低下によるものであることが強く示唆された。

表4 変性 α -ラクトアルブミンへのオリゴ糖転移の初速度と平衡に達した後の飽和量

肝ミクロソームを1.8mgの変性 α -ラクトアルブミンを加えたオリゴ糖転移の反応系で、方法に述べたように、初速度の測定には2分間、飽和量の測定には10分間、インキュベートし、15,000xgで20分間遠心後の上清の放射活性を測定した。各値は、5匹のラットから、それぞれ調製した肝ミクロソームについての測定値(ミクロソームタンパク質あたりの値)の平均値 \pm S.E.を示す。()内は、対照の値を100%とした値を示した。

インキュベーション 時間	放射活性の取り込み	
	対照	再生肝
分	cpm/mgミクロソームタンパク質	
2	157 \pm 4 (100)	118 \pm 4 ^a (75.4)
10	403 \pm 12(100)	292 \pm 16 ^a (72.3)

^a対照との差は、 $P < 0.01$ であった。

第6節 総括および考察

肝再生の初期には、糖タンパク質の合成能は、低下していた(90)。本研究においても、再生肝でN-グリコシル化経路の活性が低下していることが示された(表1)。その低下の主要因としては、次の4つが考えられる：1)リピド中間体合成の低下、2)オリゴ糖リピドの糖部分の変化、3)オリゴ糖アクセプターになる内因性タンパク質量の低下、4)オリゴ糖転移酵素活性の低下。本研究の結果、1)-3)の可能性は、以下のように否定された。

1)全DoI-P量は、再生肝と対照で大きな差はなかった(表2)。外因性DoI-Pの添加は、UDP-グルコースからリピド中間体へのグルコース転移の再生肝での低下を回復させたが、糖タンパク質への転移の低下には影響を与えなかった(表3)。2)UDP-[¹⁴C]グルコースと肝ミクロソームをインキュベートして合成されたオリゴ糖リピドのオリゴ糖(図10)と、オリゴ糖転移測定後残っていたオリゴ糖リピドのオリゴ糖は、ペーパークロマトグラフィーで分析した結果、それぞれ再

生肝と対照の違いはみられなかった。肝ミクロソームのオリゴ糖リピド分解の活性は、再生肝、対照とも低く、差はみられなかった(図14)。

3)[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リピドからタンパク質へのオリゴ糖転移は、変性 α -ラクトアルブミン添加(図13)、非添加(図11)、どちらの場合も再生肝で低下していた。その上、その低下の程度は、外因性アクセプターである変性 α -ラクトアルブミンの添加により、さらに広がっていた。

以上の結果から、4)オリゴ糖転移酵素活性の低下が、再生肝糖タンパク質合成の低下の主要因であることが示唆された。しかし、オリゴ糖転移の活性は、十分量のオリゴ糖リピドが存在しているにもかかわらず、反応時間5分で平衡に達した(図11と13)。同様な結果が、ニワトリ輸卵管(40)、ブタ甲状腺(96)ミクロソームから可溶化されたオリゴ糖転移酵素で報告されているが、その理由は、明らかではない。ラット再生肝では、オリゴ糖転移酵素の失活が要因であることが示された(図15)。これらの結果、並びに表4の結果から再生肝での糖タンパク質合成の低下は、ミクロソームのオリゴ糖転移酵素活性の低下によるものであることが強く示唆された。オリゴ糖転移酵素が、糖タンパク質合成の調節因子の一つであることは、ニワトリ輸卵管(53)、ブタ甲状腺細胞(54)でも、報告されている。

DoI-Pの量変化が、糖タンパク質合成を調節している、という報告がある(58、59)。再生肝でもDoI-P量は、リピド中間体合成の調節を行なっている可能性が以下の結果から考えられた。外因性DoI-Pの添加は、UDP-グルコースからリピド中間体へのグルコース転移を増加させ、再生肝と対照の差をなくした(表3)。さらに、再生肝では、ミクロソームに含まれる遊離型DoI-Pの量が、対照に比べて低下していた(表2)。しかし、遊離型DoI-Pの量は、全DoI-P量のわずか10%程度であり、また再生肝と対照の全DoI-P量は、ほぼ同じであった(表2)。DoI-Pは、オリゴ糖転移のもう一つの産物であるドリコールピロリン酸(DoI-PP)より再合成され(97)、N-グリコシル化経路で再利用されていると考えられる(98)。再生肝では、タンパク質へのオリゴ糖転移活性の低下によりDoI-PP合成が低下し、その結果DoI-Pの再合成が抑制され、遊離型DoI-P量が減少していると推測された。再生肝のミクロソーム内遊離型DoI-P量の低下は、リピド中間体合成の低下となり、さらにN-グリコシル化経路活性を低下させていると考えられる。この仮説は、タンパク質合成の阻害の結果、タンパク質へのオリゴ糖転移が抑制され、それに伴い遊離型DoI-Pへの再利用が低下し、リピド中間体合成が抑えられるという報告(99-101)とよく対応していた。

以上の結果より、再生肝では、オリゴ糖転移酵素が、強力なN-グリコシル化経路活性の調節因子として働いていることが強く示唆された。オリゴ糖転移酵

素の活性低下が、何によって引き起こされるのか、今のところ不明である。再生肝で、膜の脂質組成の変化や、膜流動性の変化が認められており、これらの変化が、膜酵素の活性に大きな影響を及ぼすことが報告されている(102,103)。また、脂質そのものが、酵素の活性を調節している可能性も考えられる。ホスファチジルコリンが、甲状腺から可溶化されたオリゴ糖転移酵素を活性化することが報告されている(104,105)。あるいは、オリゴ糖転移酵素タンパク質の量そのものの減少や、オリゴ糖転移酵素のサブユニットと考えられるグリコシル化部位結合タンパク質(106)と活性ユニットとの結合などの変化が起きているのかもしれない。

再生肝で糖タンパク質合成能の低下していることは、肝部分切除後ガラクトース転移酵素(107)、シアル酸転移酵素(108,109)の活性が増加する、という報告と一見矛盾している。しかし、これらの酵素は、糖鎖プロセッシング経路のなかでも末端の糖転移に関与している。再生肝糖タンパク質は、対照に比べ、複合型糖鎖をもつものの割合が増加している(61-63)。従って、再生肝では、N-グリコシル化経路の活性は低下しているが、糖鎖プロセッシング経路の活性は、活発化していると推察される。

第4章 幼若ラット肝におけるN-グリコシル化経路活性の調節

第1節 緒言

再生肝でみられたN-グリコシル化経路活性の低下は、主として、オリゴ糖転移酵素活性の低下に起因することを第3章で示した。オリゴ糖転移酵素によるN-グリコシル化経路の活性調節は、増殖期の肝細胞の特徴なのかもしれない。出生後、ラット肝のDNA量は、最初の5日間で2倍になり、その後25日以内に、成熟ラットのレベルへと減少することが、報告されている(110)。幼若ラット肝は、再生肝と同様な増殖期の肝として、糖タンパク質合成の調節を調べるのに適していると考えられた。これまでに、幼若ラット肝の糖タンパク質合成に関しては、新生仔と成熟ラットでの比較のみがなされてきた。単離肝細胞と $[^{14}\text{C}]$ グルコサミンを用いた実験で、細胞全体に取り込まれた放射活性の量に対する、糖タンパク質に取り込まれた量の割合が、新生仔では、成熟ラットの約半分であることが報告されている(111)。また、肝は、血漿糖タンパク質の主要産生器官であるが、血漿糖タンパク質に含まれるヘキサミンのタンパク質あたりの量が、新生仔では成熟ラットの半分以下であることが報告されている(112)。そこで、本章では、新生仔から5週令までの幼若ラットを用いて、肝ミクロソームのN-グリコシル化経路活性の出生後の変化を調べるとともに、その調節機構の解明を試みた。

第2節 N-グリコシル化経路活性の出生後の変化

最初に、N-グリコシル化経路活性を調べるため、肝ミクロソームを用いて、UDP- $[^{14}\text{C}]$ グルコースから、N-グリコシル化経路へのグルコース転移活性を測定した。リピド中間体、糖タンパク質へのグルコース転移活性は、いずれも出生後増加し、2週令で最大に達した(図16)。2週令以降、DoI-P-グルコースへのグルコース転移は、一定レベルを保っていた(図16a)が、オリゴ糖リピド(図16b)、糖タンパク質(図16c)への転移は減少し、4週令で一定となった。ここに示した実験は、Triton X-100の存在下で行なったが、Triton X-100非添加の場合も、ほとんど図16に示したのと同様な出生後の変化を示した(結果省略)。外因性DoI-Pを、UDP-グルコースからN-グリコシル化経路へのグルコース転移の反応系に添加すると、リピド中間体、糖タンパク質への転移は、非添加時に比べると確かに増加したが、出生後の変化パターンには、ほとんど影響を受けなかった(図16)。

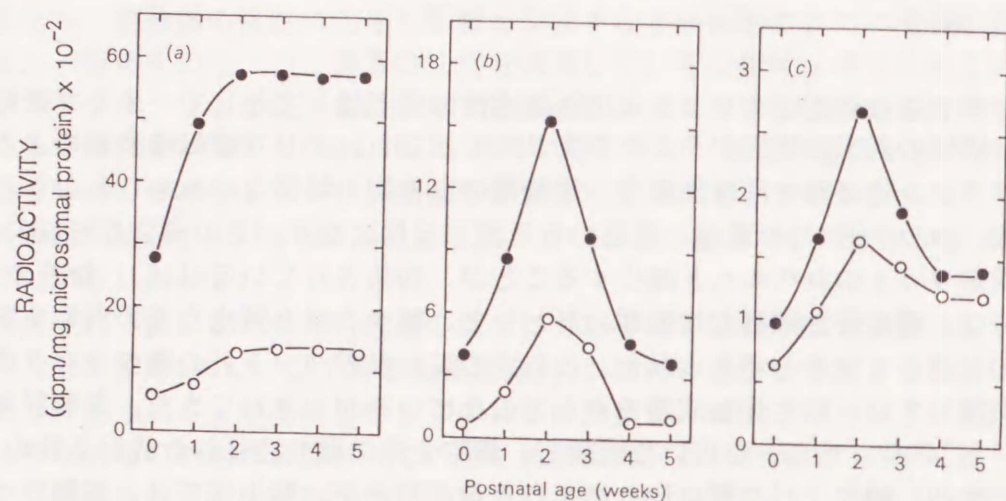


図16 UDP-[¹⁴C]グルコースから、Dol-P-グルコース(a)、オリゴ糖リピド(b)、糖タンパク質(c)への[¹⁴C]グルコース転移

肝ミクロソームを方法に述べたように、Dol-P添加(●)、非添加(○)のUDP-[¹⁴C]グルコースからのグルコース転移の反応系で、5分間インキュベート後、各生成物の放射活性を測定した。縦軸は、ミクロソームタンパク質あたりの値で、各値は、別々に行なった3回の実験の平均値を示す。S.E.は、5%以下であった。

一方、肝ミクロソーム内のDol-Pを定量したところ、2週令で、遊離型Dol-P量は非常に低い値を示し、結合型Dol-P量は増加していた。全Dol-P量は新生仔でやや低い値であったが有意とはいえず、その他の週令では、出生後大きな変化はなかった。これらの結果から、肝ミクロソームのDol-P量は、幼若ラット肝のN-グリコシル化経路活性の調節には、関与しないことが示された。また、[¹⁴C]グルコース-オリゴ糖リピドのオリゴ糖部分のペーパークロマトグラフィーを行なったところ、どの週令においても成熟ラットのオリゴ糖(図10)と同様なクロマトグラムが得られた(結果省略)。従って、オリゴ糖リピドのオリゴ糖は、糖タンパク質合成に影響を及ぼすような出生後の変化はしていないと考えられた。

表5 肝ミクロソーム内Dol-P量の出生後の変化

詳細は、方法および表2の説明文に述べた。全Dol-P量は、遊離型Dol-P量と結合型Dol-P量の和である。各値は、別々に行なった3回の実験の測定値(肝ミクロソームタンパク質あたりの値)の平均値±S.E.を示す。

画分	Dol-P				
	新生仔	1週令	2週令	3週令	5週令
	ng/mgミクロソームタンパク質				
遊離型Dol-P	1.8±0.4 ^a	2.1±0.3	0.03±0.01 ^a	1.9±0.3	2.7±0.3
結合型Dol-P					
CM可溶	6.6±1.2	10.0±1.4	11.7±0.8	8.9±0.9	8.2±1.0
CMW可溶	7.2±3.1	8.0±2.0	8.5±2.6	8.2±2.0	6.4±1.5
全Dol-P	15.6±4.0	20.1±3.4	20.2±2.8	19.0±2.4	17.3±2.2

^ap<0.05

次に、肝ミクロソームと血漿中に存在するN-グリコシド型糖タンパク質に含まれるヘキソサミンを定量した。どちらも、出生後2週令まで増加し、2週令以降ほぼ一定レベルへと減少していた(図17)。これらの結果、および[¹⁴C]グルコース-糖タンパク質合成の結果(図16c)から、ラット肝のN-グリコシル化経路の活性は、出生後増加し2週令で最大に達した後、4週令でほぼ一定レベルになるまで減少していることが強く示唆された。

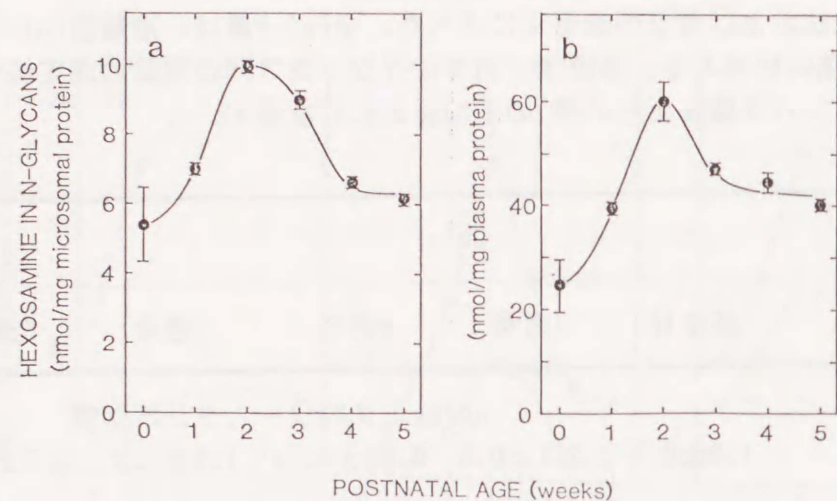


図17 肝ミクロソーム(a)、血漿(b)のN-グリコシド型糖タンパク質に含まれるヘキサミン量

肝ミクロソームと血漿から得た糖タンパク質をアルカリ分解し、O-グリコシド型糖鎖を遊離させた後、タンパク質結合ヘキサミン量を測定した。詳細は、方法に述べた。縦軸は、それぞれ肝ミクロソームと血漿のmgタンパク質当りのヘキサミン量(nmol)である。各値は、別々に行なった3回の実験の平均値±S.E.を示す。

第3節 変性 α -ラクトアルブミンへの糖転移活性

変性 α -ラクトアルブミンを外因性オリゴ糖アクセプターとして添加して、UDP-[14 C]グルコースと[14 C]グルコース-オリゴ糖リピドからそれへの糖転移活性を測定した。図16でみられた、[14 C]グルコース-糖タンパク質の合成の出生後の変化が、内因性糖アクセプター量の変化に依存していたのであれば、十分量のアクセプターの添加により、出生後の変化はみられなくなるか、その程度が小さくなるはずである。図18aに示したように、変性 α -ラクトアルブミンを添加しても、[14 C]グルコース-糖タンパク質の合成は、出生後増加し、2週令で最大に達した後、4週令で一定レベルへと低下していた。一方、[14 C]グ

ルコース-オリゴ糖リピドから変性 α -ラクトアルブミンへの糖転移活性(オリゴ糖転移酵素の活性に相当する)は、出生後2週令まで増加し一定レベルに達した(図18b)。このとき、[14 C]グルコース-オリゴ糖リピドの分解は、どの週令のラットの場合も無視できる程度であった。十分量のオリゴ糖リピドを基質として用いると、もはや2週令以降の糖タンパク質合成の低下は、みられなかった。これらの結果から、2週令以降の[14 C]グルコース-糖タンパク質合成の減少は、[14 C]グルコース-オリゴ糖リピド合成の低下に基づくものであることが示唆された。幼若ラット肝では、オリゴ糖リピドの生合成量が、特に2週令以降のN-グリコシル化経路活性の重要な調節因子であると考えられた。

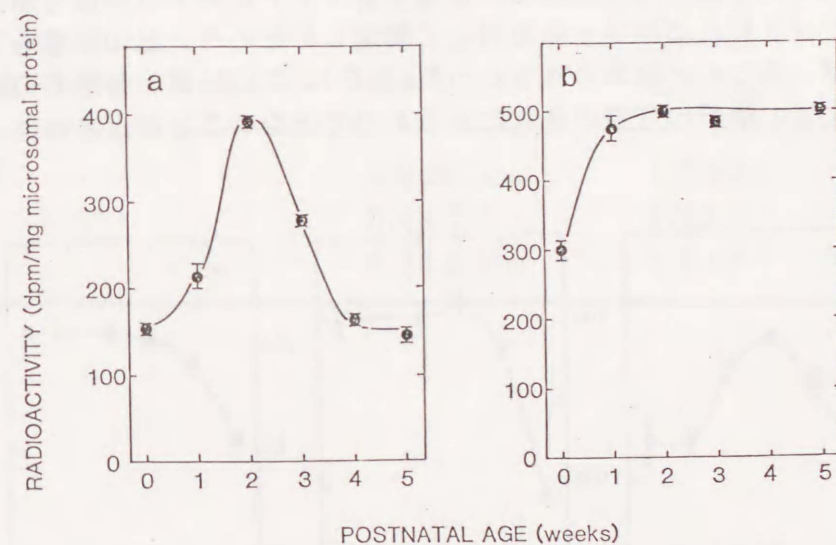


図18 UDP-[14 C]グルコース(a)、あるいは[14 C]グルコース-オリゴ糖リピド(b)から変性 α -ラクトアルブミンへの糖転移

a、肝ミクロソームを、方法に述べたように、変性 α -ラクトアルブミンを添加したグルコース転移の反応系で、5分間インキュベートし、15,000xgで20分間遠心後、上清の放射活性を測定した。

b、肝ミクロソームを、方法に述べたように、オリゴ糖転移活性の測定条件で、10分間インキュベートし、15,000xgで20分間遠心後、上清の放射活性を測定した。

縦軸は、ミクロソームタンパク質あたりの値で、各値は、別々に行なった3回の実験の平均値±S.E.を示す。

第4節 オリゴ糖リビド生合成の調節

幼若ラット肝では、Dol-PによるN-グリコシル化経路の調節はなされていなかった(第2節)、オリゴ糖リビドの生合成は、その過程に関与する転移酵素群の活性により、調節されていると考えられる。まず、基質が簡単に用意できる、Dol-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素、Dol-P-マンノース合成酵素、Dol-P-グルコース合成酵素の活性を測定した。図19に示すように、いずれの酵素活性も出生後2週令まで増加した。2週令以降、Dol-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素の活性は、一定レベルへと減少した(図19a)が、Dol-P-マンノース合成酵素(図19b)、Dol-P-グルコース合成酵素(図19c)の活性は、そのレベルを保っていた。これらの合成酵素の糖ヌクレオチドに対するKm値を新生仔、2、5週令のラット肝ミクロソームを用いて測定したところ、どのKm値も、週令による違いは、ほとんど認められなかった(表6)。この結果、各酵素の週令による活性変化は、酵素の性質の変化によるものではないことが示された。

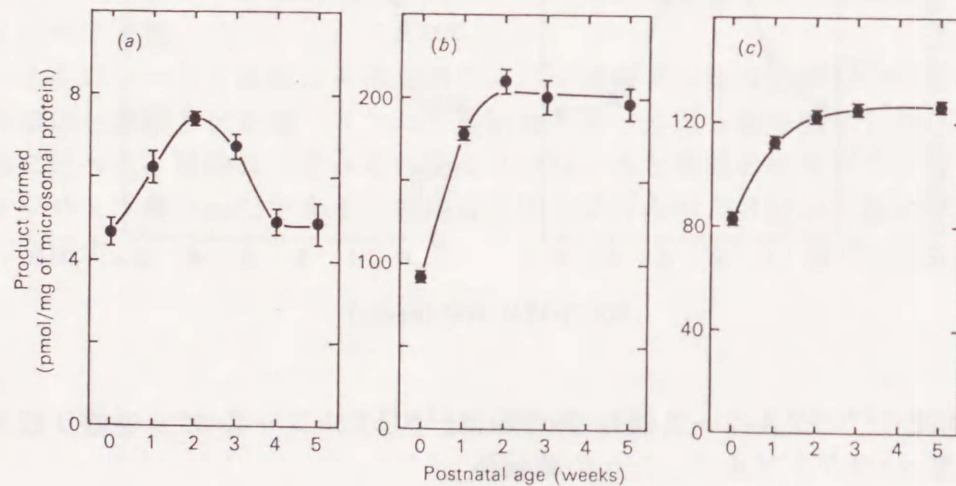


図19 (a)Dol-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素、(b)Dol-P-マンノース合成酵素、(c)Dol-P-グルコース合成酵素の活性

肝ミクロソームを、方法に述べたように、UDP-[¹⁴C]N-アセチルグルコサミン、GDP-[¹⁴C]マンノース、UDP-[¹⁴C]グルコースとそれぞれインキュベート後、”CM画分”の放射活性を測定した。各合成酵素の活性を相互に比較するために、縦軸には、pmol/mgミクロソームタンパク質の値を示した。各値は、別々に行なった3回の実験の平均値±S.E.を示す。

表6 Dol-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素、Dol-P-マンノース合成酵素、Dol-P-グルコース合成酵素の各基質糖ヌクレオチドに対するみかけ上のKm値

新生仔、2、5週令のラット肝ミクロソームを用いて、方法に述べた各合成酵素の活性測定法に従い、Km値を求めた。各Km値は、別々に行なった3回の実験の平均値±S.E.を示す。

ラットの週令 (週)	Km (μM)		
	Dol-PP-GlcNAc 合成酵素 (UDP-GlcNAc に対する)	Dol-P-Man 合成酵素 (GDP-Man に対する)	Dol-P-Glc 合成酵素 (UDP-Glc に対する)
新生仔	5.0±0.2	1.0±0.1	6.5±0.2
2	8.0±0.5	1.5±0.1	8.3±0.3
5	6.3±0.2	1.8±0.1	9.9±0.3

続いて、オリゴ糖リビド生合成に関与するその他の転移酵素の中で、基質の用意のできたDol-P-マンノースからオリゴ糖リビドへのマンノース転移酵素群、Dol-P-グルコースからオリゴ糖リビドへのグルコース転移酵素群の活性を測定した。Dol-P-マンノースから、オリゴ糖リビドへのマンノース転移活性は、出生後増加し、2週令で一定値に達した(図20a)。Dol-P-グルコースから、オリゴ糖リビドへのグルコース転移の活性は、出生後ほぼ一定レベルに保たれていた(図20b)。これらの結果から、Dol-P-マンノース合成酵素、Dol-P-グルコース合成酵素、及びその合成物を基質にする酵素群は、2週令以降のオリゴ糖リビド合成の低下には、関与していないことが示唆された。測定した酵素の中では、Dol-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素のみが、2週令以降の活性が減少し(図19a)、オリゴ糖リビド合成の変化(図16b)と対応していた。

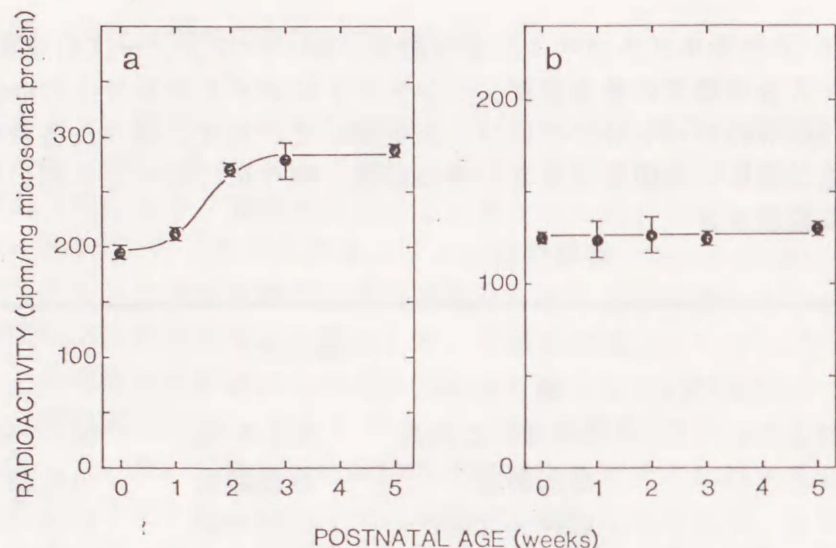


図20 (a)Dol-P-[¹⁴C]マンノースから、オリゴ糖リビドへのマンノース転移、(b)Dol-P-[¹⁴C]グルコースから、オリゴ糖リビドへのグルコース転移の活性肝ミクロソームを、方法に述べたように、Dol-P-[¹⁴C]マンノース、Dol-P-[¹⁴C]グルコースと、それぞれインキュベート後、オリゴ糖リビドの放射活性を測定した。縦軸は、ミクロソームあたりの値で、各値は、別々に行なった3回の実験の平均値±S.E.を示す。

第5節 総括および考察

幼若ラット肝の糖タンパク質合成は、出生後増加し、2週令で最大に達した後低下し、4週令で一定レベルになっていることが、[¹⁴C]グルコース-糖タンパク質合成(図16c)、および肝ミクロソームの糖タンパク質に含まれるヘキサミンの量(図17a)の出生後の変化から、示された。また、以下の結果から、肝ミクロソーム内Dol-P量あるいは、糖アクセプターである内因性タンパク質の変化は、出生後の糖タンパク質合成の変化の主要因ではないと考えられた。Dol-P、変性α-ラクトアルブミンの添加は、UDP-グルコースから糖タンパク質へのグルコース転移の出生後の変化パターンには、影響を与えなかった(図16cと図18a)。むしろ、これらの添加により、2週令から4週令までの低下の程度は、広がっていた。また、肝ミクロソーム内の全Dol-P量は、出生後、ほとん

ど変化していなかった。さらに、オリゴ糖リビドのオリゴ糖部分も、N-グリコシル化経路活性に、影響を及ぼすような変化はしていなかった。これらの結果は、成熟ラット再生肝で得られた結果と似ていた。しかし、成熟ラット再生肝で、N-グリコシル化経路の調節因子の役割を果たしていると考えられたオリゴ糖転移酵素は、幼若ラット肝では、2週令までのN-グリコシル化経路の活性増加には貢献しているが、2週令以降の活性低下には関与していないことが、示された(図18b)。

幼若ラット肝では、特に2週令以降は、オリゴ糖リビド合成活性が、N-グリコシル化経路の調節的役割を果たしていると考えられた。測定した酵素のうち、Dol-P-マンノース合成酵素(図19b)、Dol-P-グルコース合成酵素(図19c)、およびこれらの合成物を基質にする糖転移酵素群(図20)の活性は、2週令以降のオリゴ糖リビド合成の減少には、関与していないことが示された。一方、オリゴ糖リビド合成の最初の反応を触媒する酵素であるDol-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素は、Dol-P-マンノース合成酵素、Dol-P-グルコース合成酵素の活性に比べると低い活性を示し、また、オリゴ糖リビド合成と対応した出生後の変化を示したので、N-グリコシル化経路の律速因子の一つである可能性が、強く示唆された。他の出生後の組織でも、Dol-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素は、オリゴ糖リビド合成の最初の酵素であり、Dol-P-マンノース合成酵素、Dol-P-グルコース合成酵素と比較して低い活性を示すことから、N-グリコシル化経路における調節的役割が示唆されている(55,56)。幼若ラット肝では、2週令以降は、オリゴ糖リビドの生合成に関与する酵素群、なかでもDol-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素の活性低下により、糖タンパク質合成は低下していると推測された。一方、2週令までは、N-グリコシル化経路に関与する酵素群全体の活性増加により、糖タンパク質合成が増加しており、特定の調節因子は、存在していないものと考えられた。

第5章 幼若ラット肝における糖鎖プロセッシング経路の調節

第1節 緒言

成熟ラット再生肝では、N-アセチルグルコサミン転移酵素 I の活性上昇と対応して(60)、複合型糖鎖をもつ肝糖タンパク質の割合が増加していた(61-63)。一方、他の増殖細胞では、逆に増殖時に高マンノース型糖鎖の増加が報告されており(113-115)、複合型糖鎖の増加は、肝細胞の増殖に特異的である可能性が考えられた。そこで、 $[^3\text{H}]$ マンノースで標識した幼若ラット肝のスライス糖ペプチドを、コンカナバリン A (Con A)-セファロースカラムとエンドグリコシダーゼ H を用いて、糖鎖の型によって分類し、その割合の変化を調べた。その結果、複合型糖ペプチドの比率は、出生後 2 週令まで増加し、その後 3 週令ですでに新生仔のレベルにもどることが示された。2 週令で増加した糖ペプチドは、複合型のなかでも Con A 親和性をもつ 2 本分岐糖鎖をもつものであった。そこで、新生仔、2、5 週令ラット肝の複合型糖ペプチドの分子量と、糖鎖シアリル化の程度について、Bio-Gel P-6 と、ノイラミニダーゼ消化と組合せた DEAE-セルロースのカラムグラフィーによって、分析した。新生仔と 5 週令の 2 本分岐糖鎖については、十分に、シアリル化されているという結果が得られた。2 週令の 2 本分岐糖鎖は、新生仔、5 週令のものに比べ、シアリル化の低い、低分子のものが、増加していた。この結果、2 週令ラットの肝糖タンパク質は、他の週令に比べ、シアル酸を欠いた 2 本分岐の複合型糖鎖が増加していることが示された(結果省略)。そこで、本章では、幼若ラット肝糖タンパク質の糖鎖変化の酵素学的背景を調べ、糖鎖プロセッシング経路の調節機構について検討した。

第2節 糖鎖プロセッシングの初期に関与する酵素の活性変化

糖鎖プロセッシングの初期に関与する酵素の活性を、肝ミクロソーム(ゴルジ体を含む)を用いて測定した。 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖を基質に用いた場合の活性は、基質のほとんどがグルコース 3 残基を有するものなので、おもに α -グルコシダーゼ I の活性と考えられた。 $[^{14}\text{C}]$ マンノース-オリゴ糖を基質に用いた場合の活性は、基質が高分子の $[^{14}\text{C}]$ マンノース-オリゴ糖なので、 α -マンノシダーゼ I の活性と考えられた。PNP- α -グルコースと PNP- α -マンノースを基質に用いた場合の活性は、これらの基質には、 α -グルコシダーゼ I (116) と α -マンノシダーゼ I (86) は作用しないので、それぞれ α -グルコシダーゼ II

(117) と、 α -マンノシダーゼ II (86) の活性と考えられた。図 21 に示したように、測定したすべての酵素活性は、出生後増加し、2 週令で最大に達した後、減少していた。 α -グルコシダーゼ I と II の活性は、ほぼ同じパターンで変化していた。 α -マンノシダーゼ I の活性は、1 週令ですでに約 2 倍に上がっていた。 α -マンノシダーゼ II は、I や、他の酵素に比べて、その活性変化は穏やかであった。N-アセチルグルコサミン転移酵素 I の活性は、測定した酵素の中では最も顕著に 2 週令で増加し、3 週令ですでに新生仔のレベルまで低下していた。これらの結果から、肝糖タンパク質の複合型糖鎖の変化に対応して、糖鎖プロセッシングの初期に関与する酵素群の活性は、変化していることが示された。

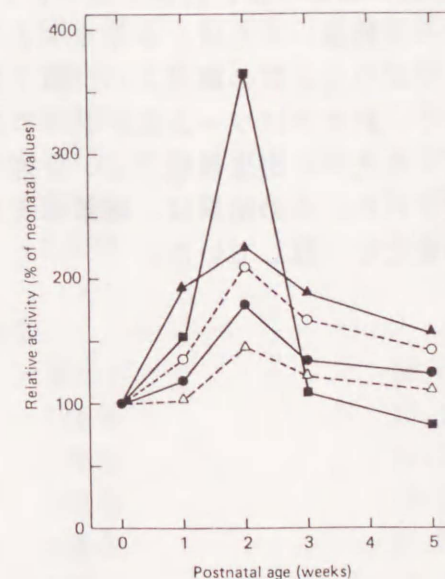


図 21 糖鎖プロセッシング酵素活性の出生後の変化

方法に述べたように、肝ミクロソームを用いて、 $[^{14}\text{C}]$ グルコース-オリゴ糖(●)、PNP- α -グルコース(○)を基質に用いた α -グルコシダーゼ、 $[^{14}\text{C}]$ マンノース-オリゴ糖(▲)、PNP- α -マンノース(Δ)を基質に用いた α -マンノシダーゼ、N-アセチルグルコサミン転移酵素 I (■) の活性を測定した。縦軸は、各酵素活性の変化を相互に比較するため、肝 g 湿重量当りの活性を新生仔を 100% とした比活性である。各値は、別々に行なった 3 回の実験の平均値を示す。S.E. は、10% 以下であった。

第3節 糖鎖シアリル化の変化とガラクトース転移酵素とシアル酸転移酵素の活性変化

2 週令ラットの肝糖タンパク質は、新生仔、5 週令ラットのものに比べて、複合型糖鎖の中でも、特にシアル酸を欠いたものが増加していることが示され

た(第1節)。そこで、糖鎖シアリル化の変化について、さらに詳しく調べるため、肝ミクロソームと血漿中に存在するN-グリコシド型糖タンパク質に含まれる、ガラクトースとシアル酸を定量した。表7に示したように、血漿のN-グリコシド型糖タンパク質に含まれるガラクトースとシアル酸の量は、どちらも出生後から5週令にかけて、徐々に増加し、シアル酸のガラクトースに対する比は、約1に保たれていた。この結果から、出生後の幼若ラットでは、血漿中に存在するN-グリコシド型糖タンパク質のガラクトース残基は、常にほぼ完全にシアリル化されていると考えられた。肝ミクロソーム中に存在するN-グリコシド型糖タンパク質に含まれるガラクトースの量は、出生後増加し、2週令で最大に達した後、減少した。一方、シアル酸量は、出生後から2週令までは、ほぼ一定で、その後増加し、4週令で一定レベルになった。シアル酸のガラクトースに対する比は、出生時と4、5週令でほぼ1になっていたが、その他の週令では1/2以下で、特に2週令では、0.17と最も低い値だった。比が1以下ということは、シアリル化されていないガラクトース残基、または、ポリラクトサミン構造の存在を意味する。しかし、これまでにラット肝の糖タンパク質では、ポリラクトサミン構造は見出されていないので、肝ミクロソームのN-グリコシド型糖タンパク質のガラクトース残基のシアリル化が、出生後低下し、2週令で最低になった後、回復していることが示唆された。この結果は、糖鎖構造を調べた結果から推測された糖鎖シアリル化の変化と一致していた。

表7 肝ミクロソームと血漿のN-グリコシド型糖タンパク質に含まれるシアル酸とガラクトース量

肝ミクロソームと血漿から得た糖タンパク質からO-グリコシド型糖鎖を遊離させた後、タンパク質に結合していたシアル酸とガラクトースを定量した。詳細は、方法に述べた。各値は、別々に行なった3回の実験の平均値(肝ミクロソーム、血漿の各mgタンパク質当りのnmol)±S.E.を示す。

N-グリコシド型 糖鎖の由来	シアル酸量	ガラクトース量	比
	(a)	(b)	(a)/(b)
nmol/mgタンパク質			
肝ミクロソーム			
新生仔	0.85±0.34	0.68±0.22	1.25
1週令	0.80±0.16	1.59±0.15	0.50
2週令	0.78±0.13	4.50±0.30	0.17
3週令	2.05±0.19	4.18±0.80	0.49
4週令	2.36±0.24	2.90±0.18	0.81
5週令	2.27±0.15	2.35±0.50	0.97
血漿			
新生仔	13.8±1.14	11.9±3.38	1.16
1週令	15.1±0.43	14.9±1.42	1.01
2週令	14.2±1.15	16.3±1.14	0.87
3週令	19.3±0.74	17.0±1.77	1.13
4週令	21.3±0.12	20.0±2.10	1.07
5週令	21.9±0.70	25.0±3.55	0.88

続いて、ガラクトース転移酵素、シアル酸転移酵素の活性を測定した。これらの転移酵素は、ゴルジ体に存在することが知られているので、まず肝ゴルジ膜を調製し純度検定を行なった。ゴルジ膜の指標酵素であるガラクトース転移酵素の比活性は、どの週令においてもホモジネートの約60倍になっていた。ガ

ラクトース転移酵素、細胞膜の指標酵素である5'-ヌクレオチダーゼ(118)、ERの指標酵素であるグルコース 6-ホスファターゼ(119)のゴルジ膜への回収率は、どの週令においてもホモジネートのそれぞれ70、1.8、0.6%程度であった。これらの結果、得られた肝ゴルジ膜は、純度が高いものと考えられた。また、肝g湿重量から得られたゴルジ膜のタンパク質量は、出生後図22に示したように変化した。一方、ホモジネートの肝g湿重量あたりのタンパク質量は、出生後ほとんど変化しなかった。これらの結果は、ラット肝実質細胞のゴルジの体積が、3週令から5週令にかけて2倍になっているという電子顕微鏡で観察した報告(120)と矛盾しない。

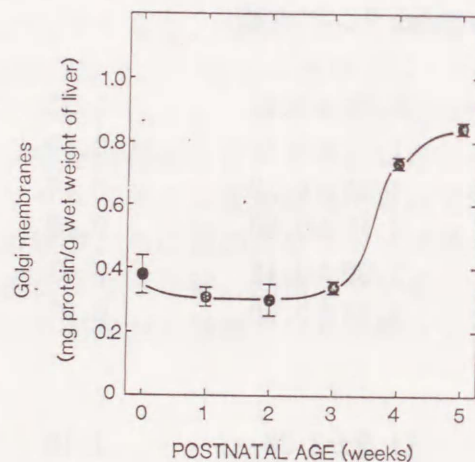


図22 肝ゴルジ膜のタンパク質量
方法に従って、肝ゴルジ膜を調製し、肝1g湿重量から得られたゴルジ膜のタンパク質を示した。各値は、別々に行なった3回の実験の平均値±S.E.を示す。

ゴルジ膜の肝g湿重量あたりのタンパク質量に変化がみられたので、酵素活性は、 μg ゴルジ膜タンパク質あたりの比活性と、g肝湿重量あたりの活性の両方で示した。ガラクトース転移酵素の活性を図23に示したが、 μg ゴルジ膜タンパク質あたりの比活性、肝g湿重量あたりの活性どちらも出生後2週令までは、増加していた。2週令以降、比活性は減少した(図23a)が、肝g湿重量あたりの活性は、ほぼ一定レベルになった(図23b)。

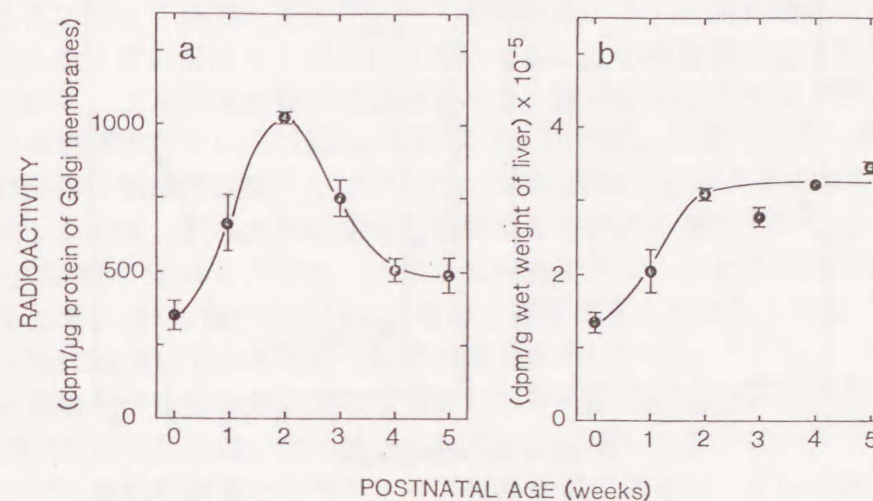


図23 ガラクトース転移酵素の比活性(a)、肝g湿重量当りの活性(b)

肝ゴルジ膜を、方法に述べたように、UDP-[^{14}C]ガラクトースとインキュベートし、オボムコイドに取り込まれた放射活性を測定した。
a、比活性は、 μg ゴルジ膜タンパク質あたりの値を示す。
b、肝g湿重量当りの活性は、比活性(a)とゴルジ膜のタンパク質量(図22)から計算した。各値は、別々に行なった3回の実験の平均値±S.E.を示す。

シアル酸転移酵素の μg ゴルジ膜タンパク質あたりの活性は、出生後2週令まではほぼ一定で、その後4週令まで増加し一定レベルに達した(図24a)。肝g湿重量あたりの活性もやはり、出生後2週令まではほぼ一定で、その後増加していた(図24b)。N-グリコシル化経路と糖鎖プロセッシングの初期に関与する酵素群、およびガラクトース転移酵素の活性が、最大値を示した2週令では、シアル酸転移酵素の活性は、依然として低く、2週令以降に増加をはじめた。このシアル酸転移酵素の活性増加時期の遅延が、2週令ラットの肝糖タンパク質糖鎖のシアリル化の低下の要因になっていると考えられた。

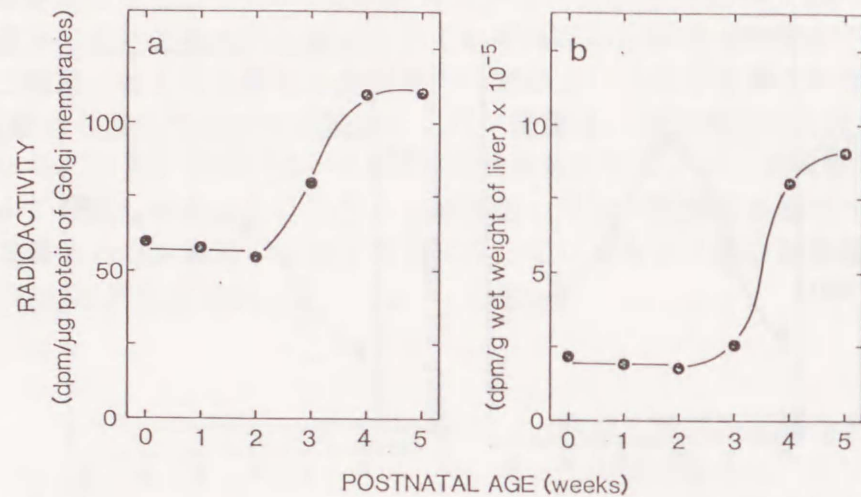


図24 シアル酸転移酵素の比活性(a)、肝g湿重量当りの活性(b)
 肝ゴルジ膜を、方法に述べたように、CMP-[¹⁴C]シアル酸とインキュベートし、アシアロトランスフェリンに取り込まれた放射活性を測定した。
 a、比活性は、 μ gゴルジ膜タンパク質あたりの値を示す。
 b、肝g湿重量当りの活性は、比活性(a)とゴルジ膜のタンパク質量(図22)から計算した。各値は、別々に行なった3回の実験の平均値で、S.E.は10%以下であった。

第4節 総括および考察

糖鎖プロセッシングの初期に関与する酵素群の活性変化は、肝糖タンパク質の複合型糖鎖の比率の変化と対応していた。なかでも、複合型への分岐点にあたるN-アセチルグルコサミン転移酵素Iは、顕著な増加を示し(図21)、また、複合型糖鎖の比率の変化と最もよく似ていた。すなわち、1、2週令で新生仔より高い活性を示し、3週令では、ほぼ新生仔と同じレベルにもどっていた。これらの結果から、成熟ラット再生肝と同様に、幼若ラット肝でも、N-アセチルグルコサミン転移酵素Iは、複合型糖鎖合成の調節因子の一つであることが示唆された。

ゴルジの肝あたりのタンパク質量の変化(図22)は、ゴルジ体に存在する酵素の肝全体の活性変化を考えた場合に重要な意味をもつ。テレピン油により誘導された炎症ラット肝で、ガラクトース転移酵素、シアル酸転移酵素などの活性が2倍になっていることが報告されているが、この時酵素の比活性は、ほとんど増加せず、ゴルジ体の量の増加によって、肝あたりの活性は上がっているという結果が示されている(121)。幼若ラット肝では、2週令以降、ガラクトース転移酵素の比活性は低下していたが、ゴルジ膜のg肝あたりのタンパク質量が増加したので、肝あたりの活性に換算するとほぼ一定レベルになることが示された(図23)。しかしながら、シアル酸転移酵素は、2週令以降に比活性が増加したので、g肝あたりの活性も、増加の程度は著しくはなかったが、やはり2週令以降に増加しているという結果が得られた(図24)。

出生後のシアル酸転移酵素の活性変化パターン(図24)は、ガラクトース転移酵素(図23)のそれとは、全く違っているので、同じトランスゴルジ体に存在する、シアル酸転移酵素とガラクトース転移酵素であるが、互いに異なった活性調節を受けているものと推測される。コルヒチンによって、ラット肝ゴルジ膜のシアル酸転移酵素は、ガラクトース転移酵素より、著しく阻害されることが報告されている(122)。ゴルジ体内での微細な局在性や膜脂質環境の違いがあるのかもしれない。

本研究では、シアル酸転移酵素と他の糖タンパク質合成に関与する酵素群の活性とを比較し、糖鎖シアリル化の調節について調べたが、このような報告は、ほとんど見あたらない。オロト酸を含有する食餌を与えられたラットは、脂肪肝が誘発されるが、この時肝ミクロソームのシアル酸転移酵素の活性は1.5倍になるのに対し、フコース転移酵素、ガラクトース転移酵素、N-アセチルグルコサミン転移酵素、の活性は不変であることが報告されている(123)。しかしながら、糖タンパク質糖鎖シアリル化の変化は調べられていない。また、糖タンパク質のシアル酸含量と、シアル酸転移酵素活性の変化を調べた報告はある(65-67)が、他の酵素の活性や、ガラクトース含量の変化は、調べられておらず、シアリル化が低下しているのか、糖鎖の本数(分岐も含めて)が、減少しているのかは、明らかではない。

第六章 結論および考察

ラットにおける肝細胞増殖期の糖タンパク質合成の調節について、以下の知見を得た。

1 成熟ラット再生肝および幼若ラット肝において、ミクロソーム内DoI-P量、オリゴ糖リビドのオリゴ糖構造、糖アクセプターとなる内因性タンパク質量、いずれも糖タンパク質合成の主たる調節因子ではなかった。糖タンパク質合成の低下の主要因は、成熟ラット再生肝では、オリゴ糖転移酵素、2週令以降の幼若ラット肝では、オリゴ糖リビド合成に関与する酵素群、なかでもDoI-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素の活性低下であった。また、2週令までの幼若ラット肝の糖タンパク質合成の増加においては、特定の調節因子は存在しなかった。

2 幼若ラット肝の糖タンパク質糖鎖の複合型の割合が、出生後増加し、2週令で最大に達した後、3週令で新生仔のレベルにまで低下するという変化と、プロセシング酵素活性、なかでもN-アセチルグルコサミン転移酵素Iの活性は、非常によく対応した変化を示した。また、2週令で増加した、肝糖タンパク質複合型糖鎖は、シアリル化が低下していた。このシアリル化の低下は、シアリル転移酵素の活性増加時期が、プロセシング酵素、ガラクトース転移酵素と比較して、遅延していることが主要因であると推察された。

成熟ラット再生肝、幼若ラット肝ともに、ミクロソーム内DoI-P量全体の大きな変化は、認められなかった。しかし、再生肝では、オリゴ糖転移酵素の活性低下は、遊離型DoI-P量の減少となり、オリゴ糖リビド合成の低下を引き起こし、さらに強力な調節をおこなっていることが示された。一方、幼若ラット肝では、2週令で遊離DoI-P量の減少がみられ、この時期のオリゴ糖リビド合成の増加は、限られたDoI-P量により制限されていると推測された。

成熟ラット再生肝と同様な、オリゴ糖転移酵素の糖タンパク質合成の調節因子としての作用が、エストロゲンによるニワトリ輸卵管(53)、チロトロピンによるブタ甲状腺(54)の分化誘導時に報告されている。一方、幼若ラット肝と同様な、DoI-PP-N-アセチルグルコサミン合成酵素を含むオリゴ糖リビド合成に関与する酵素群の、糖タンパク質合成の調節因子としての作用が、出生後のラット脳(55)、ウサギ筋(56)でも報告されている。ただし、オリゴ糖リビド合成による調節は、あくまでもオリゴ糖リビドの小胞体内でのプールサイズが、オ

リゴ糖転移酵素のKm値以下である場合に有効である。この意味では、幼若ラット肝のN-グリコシル化経路においても、オリゴ糖転移酵素は、重要な酵素であるといえる。

幼若ラット肝糖タンパク質合成に関与する酵素群の、多くの活性が2週令を境とする2相性の変化を示したのは、興味深い。この酵素群の活性変化が、2週令でのシアリル酸を欠いた複合型糖鎖の増加の主要因であることが示された。しかし、2週令で増加した複合型は、2本分岐糖鎖であった。糖鎖の分岐は、N-アセチルグルコサミン転移酵素群の活性によって、調節されと考えられている(52)。また、ガラクトース転移酵素、シアリル転移酵素には、各糖の結合の様式や、基質の構造に対応するだけの種類が存在すると考えられている。糖鎖構造の詳細な変化についての調節を論じるには、これら酵素群の活性を別々に測定すること、(しかしながら現段階では容易ではない)が、必要かと思われる。

謝 辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました、聖マリアンナ医科大学医学部 赤松暢教授、また、本論文作成に際し、多大の御助言を賜りました、広島大学医学部総合薬学科 石橋貞彦教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究の進行にあたり、多大な御指導と御助言を賜りました、聖マリアンナ医科大学医学部 加藤恵巳講師に深く感謝致します。

さらに、本研究に際し御討論戴きました、(現)日清製粉中央研究所 岡本保博士に感謝致します。

最後に、本研究に御協力頂きました、聖マリアンナ医科大学医学部 生化学教室の皆様に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1 Atkinson, P.H. & Hakimi, J. (1980) in "The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans" (W.J. Lennarz, ed.) pp.191-239, Plenum; New York
- 2 Neufeld, E.F. & Ashwell, G. (1980) *ibid.* pp.241-266
- 3 Olden, K., Parent, J.B. & White, S.L. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 650, 209-232
- 4 Sharon, N. (1984) *Trend Biochem. Sci.* 9, 198-202
- 5 Darnell, J.E., Lodish, H.F. & Baltimore, D. (1986) in "Molecular Cell Biology" (J.E. Darnell, H.F. Lodish & D. Baltimore, eds.) pp.957-964, Scientific American Books, Inc.
- 6 Snider, M.D. (1984) in "Biology of Carbohydrates" Vol.2 (V. Ginsberg & P.W. Robbins, eds.) pp.163-198, Wiley-Interscience; New York
- 7 Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* 54, 631-664
- 8 Kornfeld, R. & Kornfeld, S., in "The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans" (W.J. Lennarz, ed.) pp.25-27, Plenum; New York
- 9 Woodward, J. & Wiseman, A. (1976) *Biochem. Soc. Trans.* 4, 80-82
- 10 Schwarz, R.T., Rohrschneider, J.M., Schmidt, M.F.G. (1976) *J. Virol.* 19, 782-791
- 11 Olden, K., Pratt, R.M. & Yamada, K.M. (1978) *Cell* 13, 461-473
- 12 Gottschalk, A. & Thomas, M.A.W. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 46, 91-98
- 13 Feeny, R.E. (1974) *Am. Sci.* 62, 712
- 14 Sly, W.S. & Fischer, H.D. (1982) *J. Cell. Biochem.* 18, 67-85
- 15 Ashwell, G. & Hartford, J.A. (1982) *Ann. Rev. Biochem.* 51, 531-554
- 16 Rouiller, D.G., Sharon, N., Mcelduff, A., Podskalny, J.M. & Gorden, P. (1986) *Endocrinology* 118, 1159-1165
- 17 Mangelsdorf, A. & Carpenter, G. (1984) *J. Biol.*

- Chem. 259, 12586-12594
- 18 George, S.T., Ruoho, A.E. & Malbon, C.C. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 16559-16564
- 19 Sairam, M.R. & Bhargavi G.N. (1985) *Science* 229, 65-67
- 20 Keutmann, H.T., Johnson, L. & Ryan, R.J. (1985) *FEBS Lett.* 185, 333-338
- 21 Nose, M. & Wigzell, H. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6632-6636
- 22 Dennis, J.W., Waller, C.A. & Shirrmacher, V. (1984) *J. Cell. Biol.* 99, 1416-1423
- 23 Ivatt, R.J. (1984) in "The Biology of Glycoproteins" (R.J. Ivatt, ed.) pp.95-181, Plenum; New York
- 24 Lennarz, W.J. (1985) *Trends Biochem. Sci.* 10, 248-251
- 25 Olden, K., Bernald, B.A., Humphries, M.J., Yeo, T.-K., Yeo, I.-T., White, S.L., Newton, S.A., Bauer, H.C. & Parent, J.B. (1985) *ibid.* 78-82
- 26 Li, E., Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7762-7770
- 27 Chapman, A., Fujimoto, K. & Kornfeld, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4441-4446
- 28 Kaushal, G.P. & Elbein, A.D. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 16303-16309
- 29 Suzuki, Y., Ecker, C.P. & Blough, H.A. (1984) *Eur. J. Biochem.* 143, 447-453
- 30 Crean, E.V. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 792, 149-157
- 31 Kaushal, G.P. & Elbein, A.D. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 250, 38-47
- 32 Sasak, W., Levrat, C., Warren, C.D. & Jeanloz, R.W. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 332-337
- 33 Jensen, J.W. & Schutzbach, J.S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12899-12904
- 34 Jensen J.W. & Schutzbach, J.S. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9025-9029
- 35 Prakash, C., Katial, A., Kang, M.S. & Vijay, I.K. (1984) *Eur. J. Biochem.* 139, 87-93

- 36 Jensen, J.W. & Schutzbach, J.S. (1985) *Eur. J. Biochem.* 153, 41-48
- 37 Rearick, J.I., Fujimoto, K. & Kornfeld, S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 3762-3769
- 38 Hanover, J.a. & Lennarz, W.J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3600-3604
- 39 Turco, S.J., Stetson, B. & Robbins. P.W. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 4411-4414
- 40 Trimble, R.B., Byrd, J.C. & Maley, F. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11892-11895
- 41 Sharma, C.B., Lehle, L., & Tanner, W. (1981) *Eur. J. Biochem.* 116, 101-108
- 42 Bause, E. (1983) *Biochem. J.* 209, 331-336
- 43 Struck, D.K., Lennarz, W.J. & Brew, K. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5786-5794
- 44 Hanover, J.A. & Lennarz, W.J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3600-3604
- 45 Rothman, J.E. & Lodish, H.F. (1977) *Nature* 269, 775-780
- 46 Kornfeld, S., Li, E. & Tabas, I. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7771-7778
- 47 Tulsiani, D.R.P., Opheim, D.J. & Touster, O. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3227-3233
- 48 Narashimhan, S., Stanley, P. & Schachter, H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 3926-3933
- 49 Li, E. & Kornfeld, S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1600-1605
- 50 Tabas, I. & Kornfeld, S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 7779-7786
- 51 Goldberg, D. & Kornfeld, S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 3159-3165
- 52 Schachter, H., Narashimhan, S., Gleeson, P. & Vella, G. (1983) *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61, 1049-1066
- 53 Snigh, B.N. & Lucas, J.J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12018-12022
- 54 Franc, J.-L., Hovsepian, S., Fayet, G. & Bouchilloux, S. (1984) *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun. 118, 910-915
- 55 Idoyaga-Vargas, V. & Carminatti, H. (1982) *Biochem. J.* 202, 87-95
- 56 Clark, G.F., Miller, R. & Smith, P.B. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 14263-14270
- 57 Welply, J.K., Lau, J.T. & Lennarz, W.J. (1985) *Dev. Biol.* 107, 252-258
- 58 Carson, D.D. & Lennarz, W.J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 5709-5713
- 59 Coolbear, T. & Mookerjee, S. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 4529-4535
- 60 Okamoto, Y., Ito, E. & Akamatsu, N. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 542, 21-27
- 61 Kato, S. & Akamatsu, N. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 798, 68-77
- 62 Kato, S. & Akamatsu, N. (1985) *Biochem. J.* 229, 521-528
- 63 Ishii, I., Takahashi, N., Kato, S., Akamatsu, N. & Kawazoe, Y. (1985) *J. Chromatogr.* 345, 134-139
- 64 Chu, S.W. & Walker, W.A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 883, 496-500
- 65 Lotan, R., Lotan, D. & Amos, B. (1988) *Exp. Cell Res.* 177, 284-294
- 66 Taatjes, D.J. & Roth, J. (1988) *Eur. J. Cell Biol.* 46, 289-298
- 67 Clark, G.F. & Smith, P.B. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 755, 56-64
- 68 Higgins, G.M., & Anderson, R.M. (1931) *Arch. Pathol.* 12, 186-202
- 69 Fleischer, S. & Karvina, M. (1974) *Methods Enzymol.* 31, 6-41
- 70 Parodi, A.J., Behrens, N.H., Leloir, L.F. & Dankert, M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 270, 529-536
- 71 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 72 Carson, D.D., Earles, B.J. & Lennarz, W.J. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 11552-11557
- 73 Spiro, R.G. (1972) *Methods Enzymol.* 8, 3-26
- 74 Levvy, G.A. & McAllan, A. (1959) *Biochem. J.* 73, 127-132
- 75 Warren, L. (1963) *Methods Enzymol.* 6, 463-465
- 76 Wallenfels, K. & Kurz, G. (1966) *Methods Enzymol.* 9, 112-116
- 77 Waechter, C.J., Lucas, J.J. & Lennarz, W.J. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 7570-7579
- 78 Kates, M. (1972) in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology 3, Part II, Techniques of Lipidology" (T.S. Work & E. Word, eds.) pp.267-610, Elsevier/North-Holland, Biomedical Press; Amsterdam
- 79 Dallner, G., Behrens, N.H. Parodi, A.J. & Leloir, L.F. (1972) *FEBS Lett.* 24, 315-317
- 80 Vijay, I.K. & Oka, T. (1986) *Eur. J. Biochem.* 154, 57-62
- 81 Okamoto, Y. & Akamatsu, N. (1981) *Int. J. Biochem.* 13, 791-798
- 82 Brew, K., Castellino, F.J., Vanaman, T.C. & Hill, R.L. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 4570-4582
- 83 Huang, C.-C., Mayer, H.E., Jr. & Montgomery, R. (1970) *Carbohydr. Res.* 13, 127-137
- 84 Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350-356
- 85 Tai, T., Yamashita, K., Ogata-Arakawa, M., Koide, N., Muramatsu, T., Iwashita, S., Inoue, Y. & Kobata, A. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 8569-8575
- 86 Kronquist, K.E. & Lennarz, W.J. (1978) *J. Supramol. Struct.* 8, 51-65
- 87 Tulsiani, D.R.P., Hubbard, S.C., Robbins, P.W. & Touster, O. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 3660-3668
- 88 Dunphy, W.G. & Rothman, J.E. (1983) *J. Cell Biol.* 97, 270-275
- 89 Tulsiani, D.R.P., Harris, P.M. & Touster, O. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7936-7939
- 90 Schachter, H., Narashimhan, S., Gleeson, P. & Vella, G. (1983) *Methods Enzymol.* 98, 98-134

- 91 Okamoto, Y. & Akamatsu, N. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 498, 272-281
- 92 Staneloni, R.J., Ugalde, R.A. & Leloir, L.F. (1980) *Eur. J. Biochem.* 105, 275-278
- 93 Murphy, L.A. & Spiro, R.G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 7487-7494
- 94 Spiro, R.G., Spiro, M.J. & Bhoyroo, V.D. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 9469-9476
- 95 Ugalde, R.A., Staneloni, R.J., & Leloir, L.F. (1978) *FEBS Lett.* 91, 209-212
- 96 Das, R.C. & Heath, E.C. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3811-3815
- 97 Kato, S., Tsuji, M., Nakanishi, Y. & Suzuki, S. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 770-775
- 98 Waechter, C.J. & Lennarz, W.J. (1976) *Ann. Rev. Biochem.* 45, 95-112
- 99 Schmidt, J.W. & Elbein, A.D. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 12291-12294
- 100 Hubbard, S.C. & Robbins, P.W. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 11782-11793
- 101 Grant, S.R. & Lennarz, W.J. (1983) *Eur. J. Biochem.* 134, 575-583
- 102 Bruscalupi, G., Curatola, G., Lenaz, G., Leoni, S., Mangiantini, M.T., Mazzanti, L., Spagnuolo, S. & Trentalance, A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 597, 263-273
- 103 Deliconstantinos, G. & Ramantanis, G. (1983) *Biochem. J.* 212, 445-452
- 104 Franc, J.-L. & Bouchilloux, S. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 800, 166-170
- 105 Chalifour, R.J. & Spiro, R.G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 15673-15680
- 106 Kaplan, H.A., Naider, F. & Lennarz, W.J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 7814-7820
- 107 Bauer, C.H., Hassels, B.F. & Reutter, W.G. (1976) *Biochem. J.* 154, 141-147
- 108 Serafini-Cessi, F. (1977) *Biochem. J.* 166, 381-386
- 109 Ip, C. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 583, 14-19

- 110 Oliver, I.T., Ballard, F.J., Schield, J. & Bentley, P.J. (1962) *Dev. Biol.* 4, 108-116
- 111 Leoni, S., Devirgiliis, C., Spagnudo, S., Mario, M., Trentalance, A. & Mangiantini, M.T. (1986) *IRCS Med. Sci.* 14, 295-296
- 112 Smith, C.L. & Kelleher, P.C. (1969) *Comp. Biochem. Physiol.* 28, 1467-1472
- 113 Muramatsu, T., Koide, N., Ceccarini, C. & Atkinson, P.H. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4673-4679
- 114 Ceccarini, C. & Atkinson, P.H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 500, 197-207
- 115 Rugar, C.A. & Cook, G.M.W. (1982) *Biochem. J.* 201, 377-385
- 116 Elting, J.J. & Lennarz, W.J. (1982) *Methods Enzymol.* 83, 429-432
- 117 Burns, D.M. & Touster, O. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 9991-10000
- 118 Heppel, L.A. & Hilme, R.J. (1955) *Methods Enzymol.* 2, 546-550
- 119 Aronson, N.N., Jr. & Touster, O. (1974) *Methods Enzymol.* 31, 90-102
- 120 Strugess, J.M. & de la Iglesia, F.A. (1972) *J. Cell. Biol.* 55, 524-530
- 121 Lombart, C., Strugess, J. & Schachter, H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 629, 1-12
- 122 Mitraninc, M.M., Boggs, J.M. & Moscarello, M.A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 672, 57-64
- 123 Martin, A., Biol, M.-C., Raisonier, A., Infante, R., Louisot, P. & Richard, M. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 718, 85-91

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

