豚胸腺より精製した sn−1, 2−ジアシルグリセロールキナーゼ活性の再構成

新潟大学医学部第二生化学教室（主任：小野輝夫教授）
岩 田 豊 人

Construction of Enzyme Activity of Diacylglycerol Kinase purified from Pig Thymus

Toyoto IWATA

Department of Biochemistry, Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Teruo ONO)

ATP: sn−1, 2−diacylglycerol phosphotransferase〔EC 2.7.1.−., DG−kinase〕was purified from pig thymus cytosol. The activity of the enzyme was reconstituted by the addition of either deoxycholate or phosphatidylcholine (PC). In addition, bovine serum albumin also activated DG−kinase activity.

As was seen in the activation kinetics by PC alone, polymyxin B at 4μM in the presence of PC activated DG−kinase by increasing the number of activated enzyme. On the other hand, polymyxin B at 10μM inhibited DG−kinase by altering the interaction between 1,2−diacylglycerol and detergent. Similar inhibition was also observed by the addition of oleoyl CoA. Since oleoyl−CoA is a substrate of triacylglycerol synthesis, inhibitory effect of oleoyl−CoA on DG−kinase may play a regulatory role *in vivo*. Ca^{2+} at 10^{-7} M inhibited DG−kinase activity, suggesting a possible role of Ca^{2+} in modulation of DG−kinase activity *in vivo*.

The inhibitory effect of p−mercuribenzoate on DG−kinase activity was partially relieved by the addition of dithiothreitol, indicating that the inhibition might be reversible. As compared with 1,3−diaclyglycerol, preincubation of DG−kinase with 1,2−diacylglycerol effectively protected p−mercuribenzoate inhibition.

These observations suggest that DG−kinase may have a functional SH−group and can be regulated through hydrophobic interaction, oleoyl−CoA and Ca^{2+} in the process of biomembrane response systems.

Key words: diacylglycerol kinase, polymyxin B, Ca^{2+}, oleoyl−CoA, SH−reagent
ジアシルグリセロールキナーゼ，ポリミキシン B，カルシウム，オレオイル CoA，SH−試薬

Reprint requests to: Toyoto IWATA,
Department of Biochemistry,
Niigata University School of Medicine,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通 1 番町
新潟大学医学部第二生化学教室
岩 田 豊 人

トリアシルグリセロールやリン脂質生合成経路の重要な分岐部にあるホスファチジン酸とジアシルグリセロールは[1,2]，それ自身が生理活性をもつことが知られている．ホスファチジン酸はイオノフォアとしての性質をもつ[3]他，ホスファチジルイノシトール1，4，5-トリリン酸の加水分解をひきおこして DNA 合成を促進し[4]，一方ジアシルグリセロールはリン脂質・カルシウム依存性の蛋白リン酸化酵素（プロテインキナーゼC）の活性化を介して[5]，ホスホリパーゼ A_2，Cを活性化する[6]他，細胞の形態変化を引きおこす[7]．

このホスファチジン酸とジアシルグリセロール間の転換にはホスファチジン酸ホスファターゼ及びジアシルグリセロールキナーゼ（EC 2．7．1.-，以下 DG キナーゼと略称）が関与している．この二種の酵素は細胞上清とミクロソーム両方に存在するが[8,9]，ホスファチジン酸とジアシルグリセロール間の転換の代謝上での役割や調節の機構については明らかにされていない．

それを知るためには，DG キナーゼ阻害剤を用いて血小板凝集での役割を解明したり[10,11]，分子種の分析によって代謝の流れを追う[12]などの試みのほか，精製した酵素の性質を検討することが必要である．DG キナーゼについてはこれまでに，大腸菌[13,14]，ネズミ脳[15]，ネズミ肝[9,16]，豚脳[17,18,19]において分子量，基質特異性，至適 pH その他の性質が知られているが，ここでは豚胸腺の細胞上清から得た精製酵素を用いて，種々の物質が活性に与える影響を検討した．

実　験　方　法

1．試　薬

1，2- ジオレイン（sn-1，2- ジオレオイルグリセロール）はジオレオイルホスファチジルコリンに Welsch 菌由来のホスホリパーゼCを作用させるか，Sigma 社より購入して得たジオレインを精製して用いた．精製にはシリカゲル60（Merck）薄層上にて石油エーテル／ジエチルエーテル／酢酸（70：30：1）で展開したのち，1，2- ジオレインを抽出して用いた．[γ-^{32}p] ATP は ICN，p- メルクリ安息香酸，ネオマイシンは和光純薬，N-エチルマレイミド，牛血清アルブミン（BSA），PMA（4β-phorbol 12β-myristate 13β-acetate），ポリミキシンB，バシトラシンは Sigma 社より購入した．デオキシコール酸，コール酸，有機溶媒，各種塩類は和光純薬の特級試薬を用いた．サイクロヘキシミドは和光純薬の一級をそのまま用いた．

2．豚胸腺からの DG キナーゼの調製

屠場で得た新鮮豚胸腺より結合織除去後加納の方法[17]に準じて DG キナーゼの精製を行った．(1) 緩衝液A（0.25 M ショ糖，25mM トリス塩酸 pH 7.4，0.5mM ジチオスレイトール（DTT），50μM ATP，1mM EDTA，0.02%（w/v）窒化ナトリウム）を用いミキサー中で豚胸腺の30%ホモジネートを調製後，10,000× g・30分間，100,000× g・1時間の遠心により得られた上清（S100）の脂質層をガーゼで除いた．(2) 緩衝液Aで平衡化した 500ml の DEAE セルロースカラムに S100 ほぼ 750ml をかけ，緩衝液A（50mM NaCl 含有）でよく洗ったのち，緩衝液A（100mM NaCl 含有）で DG キナーゼを溶出させ，活性画分ほぼ 240ml を集めた．(3) DEAE セルロース分画は，飽和硫安溶液を用い，40－60%飽和硫安の分画を沈澱物として集めた後，緩衝液A（50mM NaCl 含有）のほぼ6ml に溶かした．(4) 緩衝液A（50mM NaCl 含有）で平衡化した Sephadex G-150 カラム（3cm×95cm）に硫安分画を適用し分子篩をおこないほぼ 60ml の活性画分を得た．この段階で比活性は 166 nmole ホスファチジン酸生成／分(mU)/mg であった．(5) Sephadex 分画 240ml を緩衝液A（50mM NaCl 含有）で平衡化した ATP アガロースカラム（1.5cm×7.5cm）にかけ，緩衝液A（50mM NaCl 含有）で洗浄後，緩衝液A中 50mM から 500mM の NaCl の濃度勾配で溶出を行い，約 48ml の活性画分を得た．(6) 10mM リン酸緩衝液（0.25M ショ糖，0.5mM DTT，50μM ATP，0.02%窒化ナトリウム）で平衡化した3ml のハイドロキシアパタイトカラムに ATP アガロース画分をつけ，上記の添加物を含んだ 10mM リン酸緩衝液，50mM リン酸緩衝液で順次洗浄したのち，50mM リン酸緩衝液中0より 1.5M の NaCl の濃度勾配で溶出を行い，0.5M NaCl 付近に溶出される活性画分約8ml を集めた．(7) ハイドロキシアパタイト画分は40%（w/v）ポリエチレングリコール6000（50μM ATP，1mM EDTA，0.5mM DTT）で 0.3－0.5ml に濃縮後，緩衝液A（500mM NaCl）に対し透析した後，緩衝液A（500mM NaCl）で全量を2ml とし，少量ずつを－80℃に凍結保存した．最終酵素標品の比活性は 5,500mU/mg で，SDS- ポリアクリルアミド電気泳動上，分子量約8万の蛋白が90%以上の純度を示した．

3．DG キナーゼ活性の測定

125μl の反応液に，トリス塩酸緩衝液（pH 7.4）100 mM，NaF 20mM，[γ-^{32}p] ATP 0.80mM（ほぼ 5000 cpm/nmole），$MgCl_2$ 12.5mM を加えた．1，2- ジオ

レインは反応直前に Branson Sonifier によって水中に分散させ，終濃度が一定になるように反応液に加えた．卵黄由来のホスファチジルコリンを加える時には 1,2−ジオレインとは別に超音波処理を行なって反応液に加えた．精製酵素約 0.1 μg を加えたのち，30℃で 3 分間保温した．塩酸 50 μl を加えて反応停止後，水 1.5ml を加え 1ml ブタノールで脂溶性画分を抽出し，ブタノール飽和水 1ml で洗浄した後，一部の放射活性をトルエン／トリトン X-100 シンチレーター中で測定した．

4. p− メルクリ安息香酸による修飾

酵素活性に対する p− メルクリ安息香酸の影響と添加物の保護効果をみるために，精製酵素 4 μg，緩衝液 A（50mM NaCl 含有）40 μl，添加物を加え 50 μl とした溶液を室温で 5 分間放置後，20 μl ずつを取り出し，直前に調製した 2.5mM p− メルクリ安息香酸（pH 7.4）5 μl あるいは対照として水 5 μl を加え，その 10 μl（2 サンプル）中の酵素活性を測定した．

5. その他

ホスファチジルコリンは Bartlett の方法で[20]，ジアシルグリセロールは Hanahan らの方法で[21] 定量した．

実 験 結 果

1. 胆汁酸およびホスファチジルコリン依存活性の性質

酵素反応液に胆汁酸を加えると，DG キナーゼ活性は胆汁酸の濃度に依存したつり鐘状を示し，以前からの報告を裏付けた[16,22]．各胆汁酸の臨界ミセル濃度の大きさに相応して 1mM デオキシコール酸および 5mM コール酸の時活性は最大となった（図 1）．デオキシコール酸が 0.5mM，1mM，2mM のときのみかけ上の Km は，それぞれ 6 μM，50 μM，45 μM となり，デオキシコール酸が 0.5mM から 1mM までは Km は減少して Vmax はふえるというタイプの活性化がおこり，1mM から 2mM までは Km がほとんど変化せずに Vmax が減少する非拮抗阻害剤に似たはたらきを示した．（図 **2-a, b**）．

ホスファチジルコリンを酵素反応液に加えると，ホスファチジルコリンの濃度に依存して 1mM 以上で最大活性を示すが，ホスファチジルコリン 0.2mM と 1mM の間で Km と Vmax が共に増加した（図 **2-d**）．反拮抗阻害剤をとり去る場合に似たこの変化は，反応に参画する酵素の量がふえることで活性化がおこることを示唆した．1，2− ジオレインによる基質阻害は，1，2− ジオレイン 1mM 程度でホスファチジルコリン依存活性の方に強くあらわれた（図 **2-c**）．

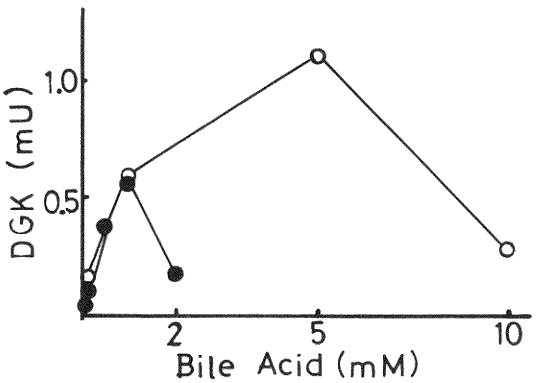

図 1 DG キナーゼ活性への胆汁酸濃度の影響
（●）デオキシコール酸
（○）コール酸
1, 2 - ジオレインは 0.3mM とした

デオキシコール酸依存活性は KCl 濃度によってほとんど変化を受けないのに対して，ホスファチジルコリン依存活性は KCl 濃度に依存して阻害をうけた（図 **3**）．

2. 脂肪酸およびアシル CoA の影響

デオキシコール酸やホスファチジン酸を添加しない酵素反応液にオレオイル CoA，パルミトイル CoA を加えると，16−80 μM の範囲できわめて弱い活性がみられた（図 **4**）．遊離のオレイン酸けん濁液，オレイン酸ナトリウムでは活性はみとめられなかった．一方デオキシコール酸およびホスファチジルコリン存在下では，オレオイル CoA の添加濃度に応じて，活性の阻害がみとめられた．

3. 蛋白，二価金属イオン，ポリアミン，抗生物質の影響

デオキシコール酸やホスファチジルコリンを添加しない酵素反応液に BSA を加えると 40 μg/ml の濃度で，デオキシコール酸添加に匹敵する活性がみられた(図 **5**)．クロロホルム／メタノール（2：1）で脱脂後もほとんど変化せず，100℃10分の熱処理で活性は低下の傾向を示した．ゼラチンでは 1mg/ml で活性がみとめられ，炭酸脱水素酵素を100℃10分間熱処理したものでは活性は検出されなかった．

カルシウムイオン濃度の影響はデオキシコール酸依存活性よりホスファチジルコリン依存活性に強くあらわれ，10^{-7}M 程度で阻害がみとめられた．亜鉛イオンは 10^{-6}M より阻害がおこった（図 **6**）．

スペルミンやサイクリック AMP はデオキシコール

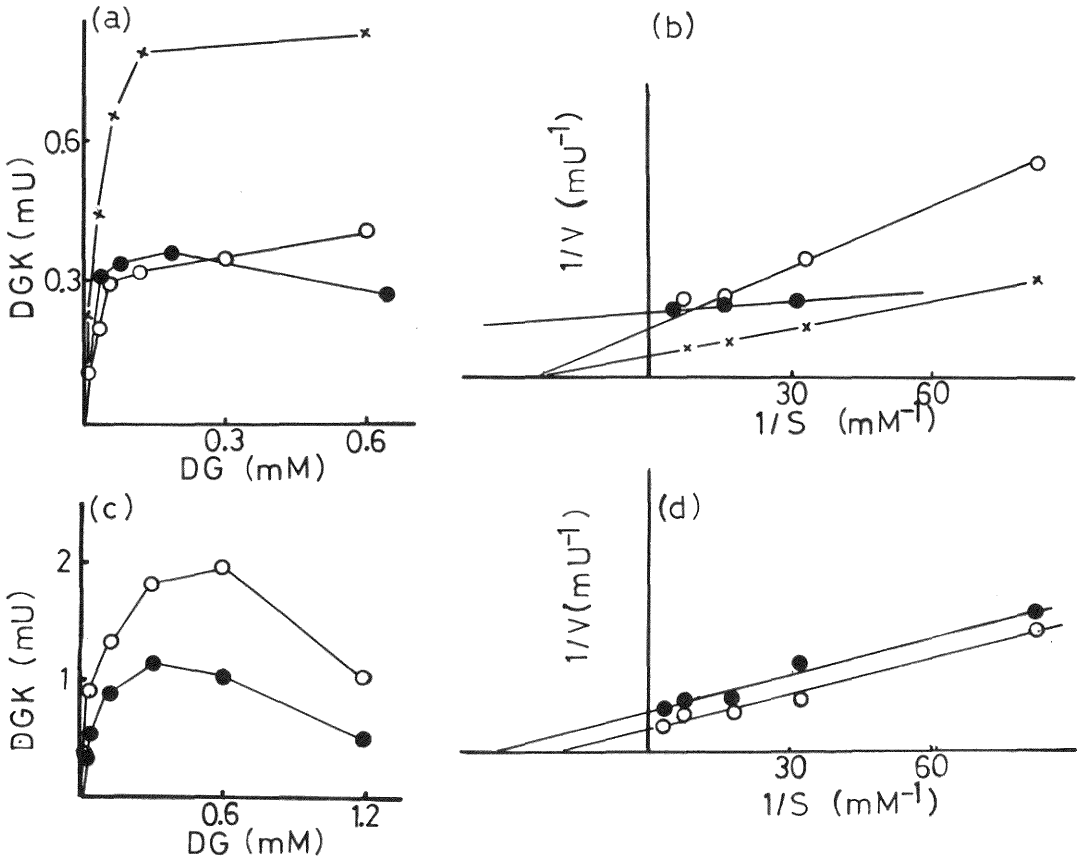

図 2　DG キナーゼ活性の 1, 2-ジオレイン濃度依存性

a) デオキシコール酸, 0.5 mM (●), 1 mM (×), 2 mM (○) における S/V プロット
b) a の Lineweaver-Burk プロット
c) ホスファチジルコリン 0.2 mM (●), 1 mM (○) における S/V プロット
d) c の Lineweaver-Burk プロット

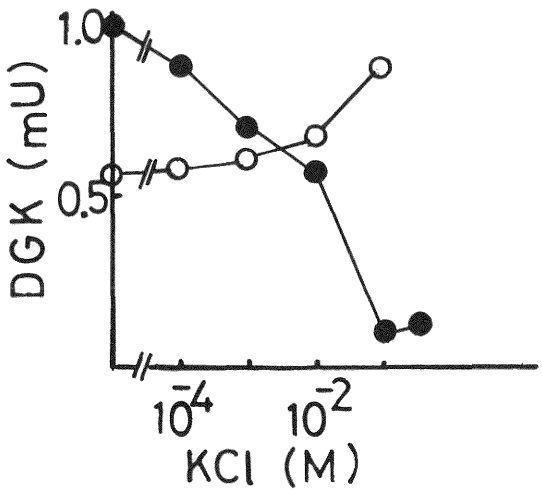

図 3　DG キナーゼ活性への KCl の影響

(●) ホスファチジルコリン 1 mM 存在下
(○) デオキシコール酸 1 mM 存在下
1, 2 - ジオレインは 0.3mM とした

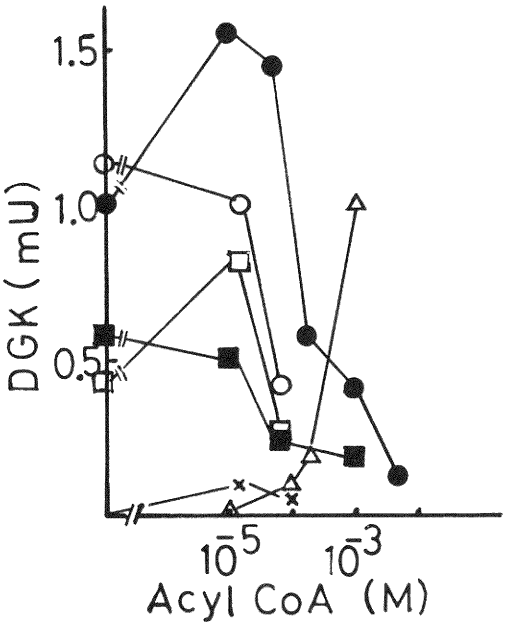

図 4　DG キナーゼ活性へのアシル CoA の影響
ホスファチジルコリン 1mM 存在下にオレイン酸ナトリウム（●），オレオイル CoA（○）を加えた，デオキシコール酸 1mM 存在下にオレイン酸ナトリウム（■），オレオイル CoA（□）を加えた，単独でオレオイル CoA（×），ホスファチジルコリン（△）を加えた，同一図上にキナーゼ活性の変化をプロットした．1, 2−ジレインは 0.3mM とした

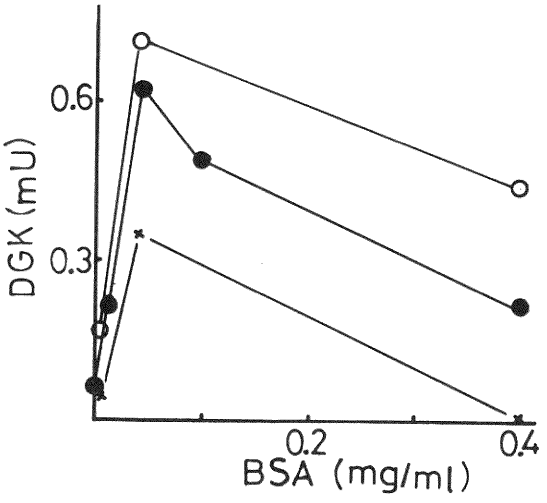

図 5　DG キナーゼ活性への BSA の影響
未処理 BSA（●），脱脂後（○），熱処理後（×），デオキシコール酸 1mM のみの添加での活性 0.55mU.

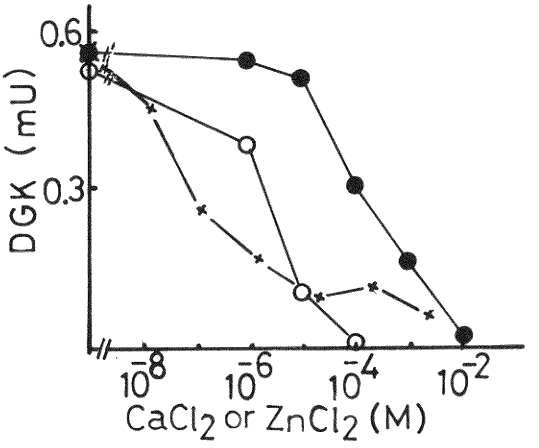

図 6　二価金属イオンの DG キナーゼ活性への影響
デオキシコール酸 1mM 存在下に $CaCl_2$（●），$ZnCl_2$（○）を加えた．ホスファチジルコン 1mM 存在下に $CaCl_2$（×）を加えた．

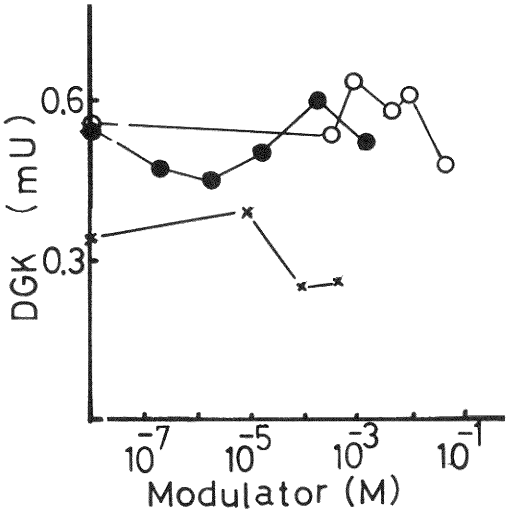

図 7　細胞調節因子の DG キナーゼ活性への影響
スペルミン（●），サイクリック AMP（○），PMA（×）をデオキシコール酸 1mM 存在下に加え．PMA はジメチルスルホキシドに溶かして加え，反応液中のジメチルスルホキシドは 1％を用いた．

酸存在下での DG キナーゼ活性にほとんど影響を示さず，PMA は 0.4mM で20％程度しか阻害を示さなかった（図 7）．

リン脂質膜との相互作用が明らかにされているポリミキシンBは，デオキシコール酸依存の DG キナーゼ活性に対し，数 μM で活性の著しい上昇がみられ，これより高い濃度では完全に活性を阻害した（図 8a）．同

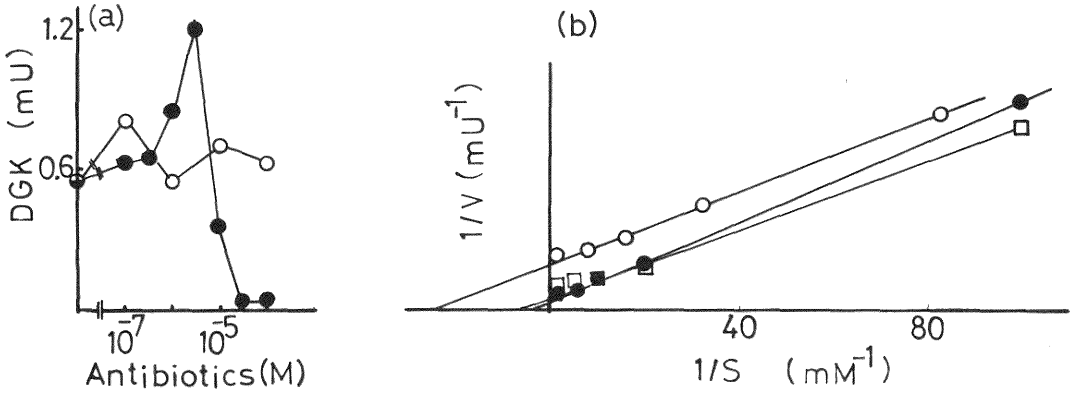

図 8　ポリミキシンBの DG キナーゼ活性への影響

a）ポリミキシンB（●），バシトラシン（○）をデオキシコール酸 1mM 存在下に加えた
b）ポリミキシンB 0μM（○），4μM（●），10μM（□）添加時の 1, 2-ジオレイン依存性

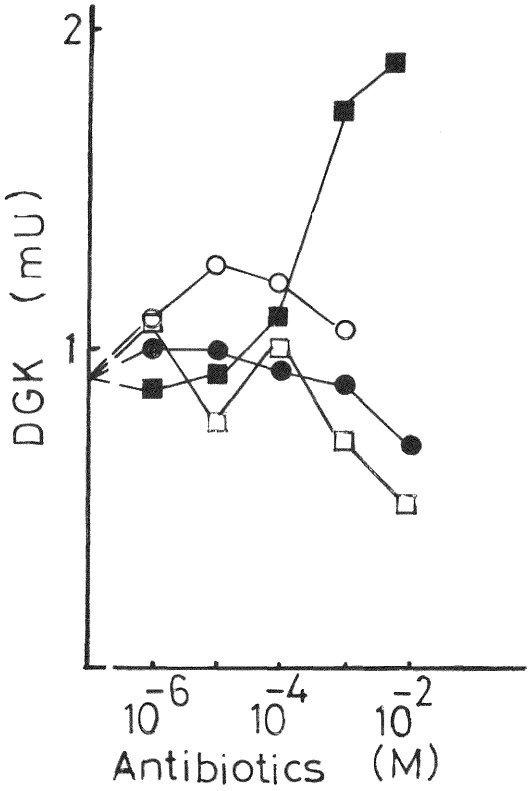

図 9　ネオマイシン，サイクロヘキシミドの DG キナーゼ活性への影響

デオキシコール酸 1mM 中に，ネオマイシン（■），サイクロヘキシミド（●）を加えた場合およびホスファチジルコリン 1mM 中にネオマイシン（□），サイクロヘキシミド（○）を加えた場合

じ現象はホスファチジルコリン依存の活性にもみとめられ，リン脂質との相互作用がみられないバシトラシン[23]では阻害はみとめられなかった．ポリミキシンBによる活性化は，Km と Vmax が同時に上昇する，ホスファチジルコリン添加時に似た（図 **2d**）機構によるものと考えられる（図 **8b**）．ポリミキシンB 10μM ですでに一次反応で近似できなくなっており，基質阻害が強くあらわれるような仕方で阻害がおこると推測される．

ネオマイシンはデオキシコール酸中で強い活性上昇を示し，ホスファチジルコリン中では活性を抑制した（図 **9**）．サイクロヘキシミドはデオキシコール酸中で約30%の阻害がみとめられた．

4.　SH 試薬の影響

p- メルクリ安息香酸は濃度依存性に，デオキシコール酸 1mM による活性が阻害された（図 **10a**）．前反応液中には 0.4mM DTT が存在しており，活性測定中には前反応液がそのまま 8%に希釈されて存在するが p- メルクリ安息香酸の作用前後に DTT を加えて阻害が軽減されるので，p- メルクリ安息香酸の作用は SH 基を介するものであり，かつ可逆的なものであると考えられる（図 **10b, c**）．

前反応液に ATP，$MgCl_2$ を加えた場合 p- メルクリ安息香酸の作用に変化をみとめることはできなかったが，BSA（1mg/ml）存在下に 0.8mM の 1, 2- ジオレインを加えた場合には，0.8mM 1, 3- ジオレイン存在下，あるいはジアシルグリセロールを含まない場合に比べて p- メルクリ安息香酸による阻害が軽減された（図 **10d**）．

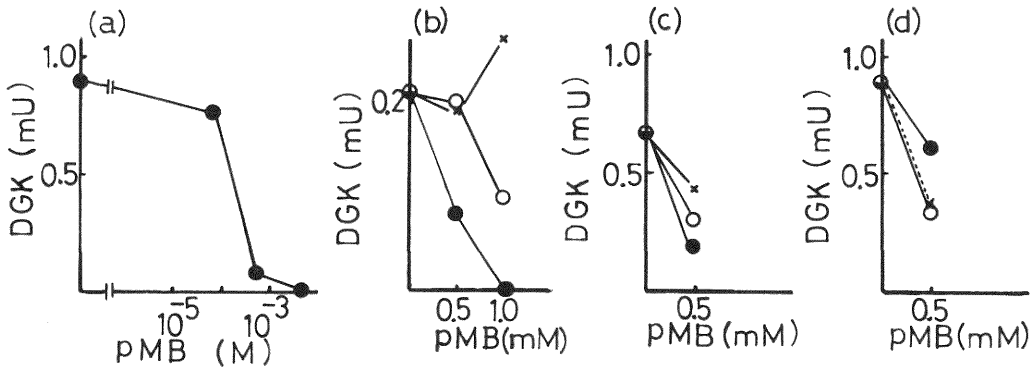

図 10 p-メルクリ安息香酸の影響

a) p-メルクリ安息香酸濃度と活性変化
b) 前反応液中に DTT を 0mM (●), 1mM (○), 10mM (×) 加えたのち p-メルクリ安息香酸を加えた
c) 酵素に p-メルクリ安息香酸を作用させたのち 0mM (●), 1mM (○), 10mM (×) DTT を加えた
d) 前反応液中に BSA (1mg/ml), 1, 2-ジオレイン 0.8mM (●—), 1, 3-ジオレイン 0.8mM (×…) を加えておいて p-メルクリ安息香酸を作用させた. 対照 (○—) にはジオレインを加えていない.

従ってジアシルグリセロール結合部位と密接な関係をもつ SH 基の存在が示唆される.

考　　察

脂質を基質とする酵素の in vitro での解析では, 反応が不均一系でおこることや, 酵素自身が疎水性の強い物質との相互作用でコンフォメーションを変えることなどが問題となる. とくに界面活性剤や脂質に依存して活性が検出される場合には, その酵素の生理的状態をみているかどうか明らかでないことが多い.

膜中ではたらくホスホリパーゼ A_2, C がジアシルグリセロールの添加で活性化することが知られているが[6], この場合ジアシルグリセロールの添加により基質となる膜中のホスファチジルコリンが存在様式を変えることにより酵素の作用をうけやすくなるものと考えられている[24]. 今回 DG キナーゼについても水に分散して与えたジアルシルグリセロールの分子会合の構造に影響を与えることが観察された. すなわち, それ自体が両親媒性であるアシル CoA (図 4) やポリミキシンB (図 8) の高濃度で活性は阻害された. 一方, ホスファチジルコリンやポリミキシンBの添加でみられる活性の上昇は, キネティクスの解析から, 酵素自体に対するこれらの物質の影響であることが示唆された (図 2c, 8b). 塩濃度の影響やネオマイシンの効果がデオキシコール酸依存性の活性とホスファチジルコリン依存性の活性で異なってあらわれる現象は, DG キナーゼの疎水性相互作用のちがいを示すと推定される.

膜中のジアシルグリセロール濃度が増加したとき, 細胞上清の DG が膜に吸着される現象が報告されているが[25,26], これまでにも細胞上清の DG キナーゼは膜上のホスファチジルコリン[18] やホスファチジルセリン[11] との相互作用ではじめて活性をあらわすと考えられてきた. in vitro の系で, 今回 BSA 単独でも DG キナーゼ活性が検出できたことは, 何らかの蛋白因子も本酵素の活性化にあずかる可能性を示唆する. 基質となるジアシルグリセロールのほとんどは膜中から供給されると考えられるが, 細胞質中にけん濁する脂質や, リン脂質移送蛋白[27] から供給されるジアシルグルセロールもリン酸化されうる. この現象は, DG キナーゼがチュビュリンと共存するという報告[28] ともあわせて興味ぶかいが DG キナーゼの活性化をおこしうる蛋白因子の検索は今後の課題である.

in vitro でのアシル CoA による DG キナーゼ活性の阻害は, in vivo でのアシル CoA プールによる DG キナーゼの活性調節を推定させ, トリアシルグリセロール合成系と密接した調節系を構成していると考えられる.

カルシウムイオンによる DG キナーゼ阻害は, ジアシルグリセロール蓄積によってプロテインキナーゼC活性化とは協奏的であり, ホスファチジン酸生成とは拮抗しうる. 実際にはカルシウムイオン流入によってホスファ

チジン酸生成が上昇するので，DG キナーゼ阻害はプロテインキナーゼC活性化を介して，細胞応答の増幅にはたらくと考えられる．

ホスファチジルイノシトールにはたらくホスホリパーゼCはサイクリック AMP 類似物質とホスホジエステラーゼ阻害剤によって阻害され，ひきつづいておきる DG キナーゼによるホスファチジン酸の合成が低下することが報告されている[29]が，少なくとも胸腺ではサイクリック AMP は DG キナーゼに直接はたらかないと考えられる（図 7）．

リン脂質の de novo 合成ではホスファチジン酸はグリセロール-3- リン酸アシルトランスフェラーゼにより生成し，この酵素はポリアミンで阻害をうける[1]．DG キナーゼはポリアミンの一種スペルミンで阻害をうけず（図 7），調節機構を異にすると推定される．

ACTH を投与したネズミ副腎ではステロイド合成に先立ってホスファチジン酸合成が増加する．あらかじめ蛋白合成阻害剤サイクロヘキシミドを投与しておくとそれらの効果がみられなくなり，この時グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼおよびホスファチジン酸ホスファターゼの活性は変化しないことから，DG キナーゼ活性にサイクロヘキシミドの影響がおよんでいる可能性が示されている[30]．胸腺の DG キナーゼでは mM レベルまではサイクロヘキシミドの直接作用はないと考えられる（図 9）．

ネズミ肝の核膜に存在する DG キナーゼは 0.25mM のネオマイシンでは50%の活性阻害が報告されている[31]．胸腺の DG キナーゼはデオキシコール酸中で，同じ濃度で強い活性化が認められており（図 9）．蛋白化学的に異なるためか，膜中の存在様式を反映していると考えられる．

DG キナーゼ活性が SH 試薬によって影響をうけることは以前から知られていたが[31][32]，DG キナーゼが細胞中の還元状態やグルタチオン濃度によっても調節をうけることが示唆され，影響をうける SH 基は，ジアシルグリセロール結合部位と密接に関係していると推定される（図 **10d**）．

膜でのジアシルグリセロールの蓄積という現象は DG キナーゼの機能とふかく関わり，かつプロテインキナーゼCと共働して膜系調節機構を構成しうるが，細胞応答もその一部と考えられ，DG キナーゼの作用機作および調節機構は膜系の調節機作を知る上での重要な課題である．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲と賜った小野輝夫教授，札幌医科大学加納英雄教授に深謝いたします．

参 考 文 献

1) **Bell, R.M. and Coleman, R.A.:** Ann. Rev. Biochem., **49**: 459～487, 1980.

2) **Esco, J.D. and Raetz, C.R.H.:** "The Enzymes" **14**: 207～253, Academic Press, New York, 1983.

3) **Ohsako, S. and Deguchi, T.:** J. Biol. Chem., **256**: 10, 5～10948, 1981.

4) **Moolenaar, W.H., Kruijer, W., Tilly, B.C., Verlaan, I., Bierman, A.J. and de Laat, S.W.:** Nature, **323**: 171～173, 1986.

5) **Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T. and Nishizuka, Y.:** Biochem. Biophys. Res. Commun., **91**: 1218～1224, 1979.

6) **Dawson, R.M.C., Irvine, R.F., Bray, J. and Quinn, P.J.:** Biochem. Biophys. Res. Commun., **125**: 836～842, 1984.

7) **Allan, D., Thomas, P. and Michell, R.H.:** Nature, **276**: 289～290, 1978.

8) **Hosaka, K., Yamashita, S. and Numa, S.:** J. Biochem., **77**: 501～509, 1975.

9) **Kanoh, H. and Åkesson, B.:** Eur. J. Biochem., **85**: 225～232, 1978.

10) **de Chaffoy de Courcelles, D., Roevens, P. and Van Belle, H.:** J. Biol. Chem., **260**: 15762～15770, 1985.

11) **Bishop, W.R., Ganong, B.R. and Bell, R.M.:** J. Biol. Chem., **261**: 6993～7000, 1986.

12) **Kennerly, D.A.:** J. Biol. Chem., **262**: 16305～16313, 1987.

13) **Bohnenberger, E. and Sandermann, H.:** Eur. J. Biochem., **94**: 401～407, 1979.

14) **Loomis, C.R., Walsh, J.P. and Bell, R.M.:** J. Biol. Chem., **260**: 4091～4097, 1985.

15) **Lapetina, E.G. and Hawthorne, J.N.:** Biochem. J., **122**: 171～179, 1971.

16) **Kanoh, H. and Ohno, K.:** Arch. Biochem. Biophys., **209**: 266～275, 1981.

17) **Kanoh, H., Kondoh, H. and Ono, T.:** J. Biol. Chem., **258**: 1767～1774, 1983.
18) **Kanoh, H. and Ono, T.:** J. Biol. Chem., **259**: 11197～11202, 1984.
19) **Kanoh, H., Iwata, T., Ono, T. and Suzuki, T.:** J. Biol. Chem., **261**: 5597～5602, 1986.
20) **Bartlett, G.R.:** J. Biol. Chem. **234**: 466～468, 1959.
21) **Hanahan, D.J. and Olley, J.N.:** J. Biol. Chem., **231**: 813～ , 1958.
22) **Hokin, M.R. and Hokin, L.E.:** J. Biol. Chem., **234**: 1381～1386, 1959.
23) **Storn, D.R., Rosenthal, K.S. and Swanson, P.E.:** Ann. Rev. Biochem., **46**: 723～763, 1977.
24) **Das, S. and Rand, R.P.:** Biochemistry, **25**: 2882～2889, 1986.
25) **Besterman, J.M., Pollenz, R.S., Booker, E.L. and Cuatrecasas, P.:** Proc. Natl. Acad. Sci., **83**: 9378～9382, 1986.
26) **Ishitoya, J., Yamakawa, A. and Takenawa, T.:** Biochem. Biophys. Res. Commun. **144**: 1025～1030, 1987.
27) **Nichols, J.W. and Pagano, R.E.:** J. Biol. Chem., **258**: 5368～5371, 1983.
28) **Daleo, G.R., Piras, M.M. and Piras, R.:** Biochem. Biophys. Res. Commun., **61**: 1043～1050, 1974.
29) **Billah, M.M., Lapetina, E.G. and Cuatrecasas, P.:** Biochem. Biophys. Res. Commun., **90**: 92～98, 1979.
30) **Farse, R.V., Sabir, M.A. and Larson, R.E.:** Biochemistry, **20**: 6047～6051, 1981.
31) **Smith, C.D. and Wells, W.W.:** J. Biol. Chem., **258**: 9368～9373, 1983.
32) **Call, F.L. and Rubert, M.:** J. Lipid Res., **14**: 466～474, 1973.

（昭和63年 2月29日受付）