



Title	リポホリンの物理化学的性質に関する研究
Author(s)	長尾, 恵理子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第2859号
Issue Date	1991-03-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.11501/3084725">https://doi.org/10.11501/3084725</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/51141">https://hdl.handle.net/2115/51141</a>
Type	doctoral thesis
File Information	000000237875.pdf



主論文

リポホリンの物理化学的  
性質に関する研究

長尾恵理子

①

リポホリンの物理化学的性質に  
関する研究

長尾恵理子

## 目次

I. 総論	p. 3
II. 主論文	
第一部 トノサマバッタのリポホリンの糖鎖に関する研究	p. 11
序論	p. 12
実験方法	p. 14
実験結果	p. 21
考察	p. 39
要旨	p. 41
参考文献	p. 42
第二部 アディポキネティックホルモンの作用により生成されるバッタ の低密度リポホリンの物理化学的性質に関する研究	p. 47
序論	p. 48
実験方法	p. 50
実験結果と考察	p. 54
要旨	p. 65
参考文献	p. 67
参考副論文	p. 69
謝辞	p. 70

・ 前編 Ⅰ

文組上 Ⅱ

第一編

第二編

文組下 Ⅲ

第二編

## 総論

昆虫は地球上の生物の一大仲間であるが、地球上で最も繁栄している動物群である。その繁殖力は非常に高く、一年間に幾何級数的に増殖する。昆虫の繁殖力は大抵動物界を凌いでいる。昆虫の繁殖力の高さは、その生活史をたどる中で、卵の産出の頻度、100万個以上と多量に産出する。この繁殖力の高さは、その生活史の各段階にわたって、第一に、卵の産出、第二に、幼虫の成長、第三としてその移動力と関係がある。

昆虫は成虫の姿を成り切るためにその生活史の中に個體的に組み込まれた段階があり、適応的な適応能力のあらわれである。成虫期にはいると、昆虫の生活は一転し、代謝率が急激に低下して動きは鈍くなるだけでなく、呼吸量も減少する。たとえば、成虫期の昆虫の呼吸量は非常に低下し、成虫期には呼吸がほとんど停止することが実験から明らかになっている(1-4)。

また、昆虫は、寄生動物の中で成虫の開始手段を用意させた。これは、寄生性をもった寄生性を促進させ、さらに寄生性の高い節足動物からの水分の供給を促すために、体表を同化物質(プロテイン)を主成分とする厚いワックス層で被った。このことにより、あらゆる気候帯に適応し、乾燥地帯でも生き残るようになった。

そして、昆虫の最も大きな特徴の一つは、その体の大きさの割に移動力が大きいことである。特に昆虫の長距離飛行はその生活史に於いて非常に重要な役割を果たしている。トビや鷹などの鳥類では数キロメートル以上、また、アフリカのバードは大西洋を横断して1000km以上飛行を続ける。また、アフリカのバードは大西洋を横断して1000km以上飛行を続ける。また、アフリカのバードは大西洋を横断して1000km以上飛行を続ける。

また、昆虫は、成虫期の代謝率は非常に低下し、乾燥地帯でも生き残るようになった。

昆虫は系統樹の一方の頂点にたち、地球上で最も繁栄している動物群である。その昆虫は今からおよそ三億年前に熱帯にあらわれ、地理的、気候的大変動を耐えて生き抜き、今でも熱帯から極地まであらゆる気候帯に適応し、その生存圏を広げている。また昆虫の種類は100万ともそれ以上とも言われ、全動物種の90%以上を占めている。この繁栄の要因として、第一に、冬に対する高度の適応、第二に、乾燥に対する強い抵抗性、第三としてその移動力をあげることができよう。

休眠は昆虫が冬を乗り切るためにその生涯の中に積極的に組み込んだプログラムであり、遺伝的な適応能力のあらわれである。休眠相にはいると、昆虫の生理は一転し、代謝率が極端に低下して寒さに強くなるだけでなく寒さそのものが有利の条件となる。たとえば、休眠中の昆虫の呼吸量は非常に低下し、休眠時に特有なエネルギー代謝を行うことが茅野らや早川らの研究により明らかにされている(1-4)。

また、昆虫は、陸生動物の中で抜群の耐乾燥手段を発達させた。かれらは、キチン質をもった外骨格を発達させ、さらにキチン質の薄い節間部からの水分の蒸散を防ぐために、体表を炭化水素(パラフィン)を主成分とする厚いワックス層で被った。このことにより、あらゆる気候帯に適応し、砂漠地帯でさえも生存を可能にした。

そして、昆虫の最も大きな特徴の一つは、からだの大きさの割に移動力が大きいことである。特に昆虫の長距離飛行はその生息域を拡大する上で非常に重要な役割を果たしてきた。トンボやウンカのある種では飲まず食わずで1000km以上、ときには2000kmも飛行を続けるという。また、アフリカのバッタが大西洋を越えて4000kmぐらいあるカリブ海まで飛んだという報告もある。

バッタはふだん、血液中のトレハロースなど炭水化物を主として筋収縮への

エネルギー源としているが、長距離飛行へ移ると炭水化物から脂肪へと燃料の切り替えが起こる。Mayer と Candy は1967年、トノサマバッタが飛行を開始すると、血液中のジグリセリドのレベルが数倍に上昇することを観察し、つづいてこのジグリセリドの増加は側心体 (corpora cardiaca) から分泌されるペプチドホルモンの一種、adipokinetic hormone (AKH) によって引き起こされることを示した (5, 6)。

これより 3年前の1964年、茅野はセクロピア蚕の脂肪体からジグリセリドが血液中に特異的に放出されることを発見した (7, 8)。このジグリセリドの放出は昆虫の血液に対してだけ特異的に起こり、他のタンパク質たとえば、ほ乳類の血清や卵アルブミンなどに対しては全くみられない。このことより、昆虫の血液中にはジグリセリドをその脂肪体から積極的に取り込む特異な機能をもったタンパク質が存在すると彼は考え、1969年、このタンパク質を精製することに成功した (9)。後に、茅野によりこのタンパク質はリポホリンと命名された (10)。

しかし、Mayer と Candy により発見された AKHの研究と茅野が発見したリポホリンの研究がつながるのには、リポホリンの発見より15年後のことになる。合成された AKHが手にはいるようになったのを契機に、1984年より、ようやく、昆虫の長距離飛行、特にその燃料切り替えのメカニズムの一端が、我々の研究室で解明された (11, 12)。

前述したように、鱗翅類やバッタなどでは長距離飛行により、数千キロにもおよぶ移動をすることが知られている。このように長時間の飛翔や運動を行う昆虫ではエネルギー源として中性脂質を使用している。中性脂質は単位重量あたりの熱量がアミノ酸や炭水化物と比べて最も高く、飛翔のエネルギー源としては最適である。バッタでは長距離飛行の際、側心体から AKHが放出されることにより、エネルギー源が炭水化物からジアシルグリセロールに切りかわる。

このとき、リポホリンがこのジアシルグリセロールの飛翔筋への迅速な供給に重要な働きをし、このとき、リポホリンに重要な物理化学的变化がおこることが最近の研究で明らかにされた。

また、リポホリンはジアシルグリセロール以外の脂質も輸送する。前述したように、乾燥に対する抵抗手段として、体表を炭化水素（パラフィン）を主成分とする厚いワックス層で被っているわけだが、その炭化水素の輸送もリポホリンが行っていることは片瀬らによって明らかにされた(13, 14)。また、そのほかに、リポホリンが含有する脂質としては、リン脂質、コレステロール、カロチノイドなどが上げられ、これらがリポホリン分子としてどのような立体構造をとっているかは、X線の小角散乱および NMRを使い、片桐らが立体モデルを提示している(15-17)。

このように、我々の研究室では、この脂質輸送タンパク質リポホリンの性質と生理的機能について研究を行ってきた。申請者は、この数年間、研究対象としてトノサマバッタを用い、そのリポホリンの物理化学的性質およびその生理機能について研究を行った。提出論文は主論文として、第一部として、トノサマバッタリポホリンの糖鎖に関する研究、及び、第二部として、アディポキネティックホルモンの作用により生成される低密度リポホリンの物理化学的性質に関する研究を行った。

参考副論文として、トノサマバッタリポホリンの糖鎖に関する研究（副論文 1）、トノサマバッタリポホリンの主要糖鎖の構造解析に関する研究（副論文 2）、低密度リポホリンの物理化学的性質に関する研究（副論文 3）、カルモデュリ

ンのCa<sup>2+</sup>結合部位におけるCa<sup>2+</sup>結合親和性に関する研究（副論文 4）、ラット胎仔期における創傷治癒に関する研究（副論文 5）を提出する。

1. HAYASHI, S. (1957) Conversion of glycogen to alcohol and glycerol in the developing egg of the *Bombix silkworm*. *Japan. J. Zool.* **1**, 106-107.
2. HAYASHI, S. (1958) Carbohydrate metabolism in silkworm pupae of the *Bombix mori*. II. Conversion of glycogen into alcohol and glycerol. *J. Insect Physiol.* **4**, 1-11.
3. HAYASHI, S., OHNO, H. and YAMAZAKI, Y. (1961) An enzyme which liberates Ca<sup>2+</sup> at an early stage of pupation. *Biophys. Acta* **44**, 14-17.
4. HAYASHI, S. (1965) Activation mechanism of insect fat body phospholipase by cold. *Insect Biochem.* **15**, 123-127.
5. HAYASHI, S. and GANDY, D. J. (1969) Control of hemolymph lipid concentration during locust flight: An aliphatic alcohol esterase from the corpora cardiaca. *J. Insect Physiol.* **15**, 619-620.
6. HAYASHI, S. and GANDY, D. J. (1969) Changes in energy reserve during flight of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Comp. Biochem. Physiol.* **31**, 409-415.
7. CALBO, H. and GILBERT, L. L. (1964) Diglyceride release from insect fat body. *Science* **143**, 359-361.
8. CALBO, H. and GILBERT, L. L. (1965) Lipid release and transport in insects. *Biochim. Biophys. Acta* **33**, 242.

#### REFERENCE

1. CHINO H. (1957) Conversion of glycogen to solbitol and glycerol in the diapausing egg of the Bombix silkworm. Nature 108, 606-607.
2. CHINO H. (1958) Carbohydrate metabolism in diapausing eggs of the silkworm, Bombix mori. II. Conversion of glycogen into solbitol and glycerol. J. Insect Physiol. 2, 1-12.
3. HAYAKAWA Y. and CHINO H. (1983) Insect fat body phosphorylase kinase is  $Ca^{2+}$ -independent and acts even at  $0^{\circ}C$ . Biochem. Biophys. Acta 746, 14-17.
4. HAYAKAWA Y. (1985) Activation mechanism of insect fat body phosphorylase by cold. Insect Biochem. 15, 123-128.
5. MAYER R. J. and CANDY D. J. (1969) Control of haemolymph lipid concentration during locust flight: An adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. J. Insect Physiol. 15, 611-620.
6. MAYER R. J. and CANDY D. J. (1969) Changes in energy reserve during flight of the desert locust, schistoceros gregaria. Comp. Biochem. Physiol. 31, 409-418.
7. CHINO H. and GILBERT L. I. (1964) Diglyceride release from insect fat body. Science 143, 359-361.
8. CHINO H. and GILBERT L. I. (1965) Lipid release and transport in insects. Biochim. Biophys. Acta 98, 94-

- 110.
9. CHINO H., MURAKAMI S. and HARASHIMA K. (1969) Diglyceride-carrying lipoproteins in insect hemolymph: isolation, purification, and properties. Biochim. Biophys. Acta 176, 1-26.
  10. CHINO H., DOWNER R. G. H., WYATT G. R. and GILBERT L. I. (1981) Lipophorins, a major class of insect hemolymph. Insect Biochem. 11, 491.
  11. CHINO H., DOWNER R. G. H., and TAKAHASHI K. (1986) Effect of adipokinetic hormone on the structure and properties of lipophorin in locusts. J. Lipid Res. 27, 21-29.
  12. CHINO H., KIYOMOTO Y. and TAKAHASHI K. (1989) In vitro study of the action of adipokinetic hormone in locusts. J. Lipid Res. 30, 571-578.
  13. KATASE H. and CHINO H. (1982) Transport of hydrocarbons by the lipophorin of insect hemolymph. Biochim. Biophys. Acta 710, 341-348.
  14. KATASE H. and CHINO H. (1984) Transport of hydrocarbons by haemolymph lipophorin in locusta migratoria. Insect Biochem. 14, 1-6.
  15. KATAGIRI C. (1985) Structure of lipophorin in insect blood: Location of phospholipid. Biochim. Biophys. Acta 834, 139-143.
  16. KATAGIRI C., KIMURA J. and MURASE N. (1985) Structural studies of lipophorin in insect blood by differential

scanning calorimetry and  $^{13}\text{C}$  Nuclear magnetic relaxation measurements. J. Biol. Chem. 260, 13490-13495.

17. KATAGIRI C., SATO M. and TANAKA N. (1987) Small-angle X-ray scattering study of insect lipophorin. J. Biol. Chem. 262, 15857-15861.

主論文 第一部

シマバタリボホリンの  
糖鎖に関する研究



## 序論

昆虫の血液リポタンパク質、リポホリンは現在知られている限り、すべての昆虫の血液に、そして幼虫期から成虫期まですべてのステージに存在していると考えられている。その血液中の濃度は非常に高く、たとえばゴキブリでは全血液タンパク質の約50%、バッタでも30%近くに達する。

このリポタンパク質は特異な生理機能をもち、脂肪体で合成された後、いったん血液中に放出されると、ある特定の脂質を特定の器官で積み込み、それをまた特定の器官で積み下ろす再利用可能な一種のシャトルとして働く。(たとえば、脂肪体からのジアシルグリセロールの輸送、消化官からのコレステロールの輸送、および、エノサイトからの炭化水素の輸送など) (1)。

リポホリンは分子量約60万、直径約150Åのほぼ球形タンパク質で、タンパク質部分(アポタンパク質)は分子量約25万の重鎖と約8.5万の軽鎖それぞれ一本から成り立つ。また、重鎖のみにマンノースとN-アセチルグルコサミンを含む糖鎖がアポタンパク質に対して約3%の割合で存在することが茅野と北沢により報告されていた(2)。申請者はリポホリンが特定の脂質を特定の器官で積み込み、積み下ろす際に、この糖鎖が認識部位として働いているのではないかと考え、この糖鎖に関する研究を行うことにした。

タンパク質に結合する糖鎖の分析には、その糖鎖をタンパク質から切り出すことが必要である。1977年に高橋により発見されたアーモンドグリコペプチダーゼ(N-oligosaccharide glycopeptidase, EC 3.5.1.52)はアスパラギン結合糖鎖のアスパラギンとN-アセチルグルコサミン間の結合を特異的に切断するものとして知られている(3)。オリゴ糖鎖構造に対する特異性は幅広く、アスパラギンに結合する高マンノース型、複合型、ハイブリッド型の糖鎖をいずれも切断できる(4)。糖タンパク質から糖鎖を遊離させるもっとも一般的な方法と

してはヒドラジン分解法がよく用いられているが、この方法に比べると酵素による切断法の方が簡便かつ安全である。

そこで、まずこの酵素により、リポホリンに存在する糖鎖が全種類切り出されるかどうか調べた。その結果、あとで詳しく述べるように、酵素により切り出されたものと、ヒドラジン分解法により切り出されたものが全く同じであった。そこで、糖鎖を遊離させる方法としてアーモンドグリコペプチダーゼを使用し、一連の糖鎖の分析を行った。

## 材料と方法

### 【動物及び採血】

トノサマバッタ (*Locusta migratoria*) に オーチャードグラスとふすまを与えて我々の研究室で飼育し、成虫になって 3-5週間のものを実験に用いた。採血は茅野と北沢の方法に従い(2)、 以下のように行った。トノサマバッタの第三脚を根元から切断し、腹部から採血用緩衝液(0.25M NaCl, 5mM EDTA, 50mM リン酸緩衝液, pH6.0)を注射した(約0.5ml/匹)。傷口から流出する血液を集め、10,000rpm で 5分間遠心分離し、血球を除いたものを血液試料とした。

### 【リポホリンの精製】

精製は、茅野らの方法に従い行った(2)。30匹のトノサマバッタ(オス、メス共)の血液試料(約15ml)を蒸留水に対して1時間透析した。透析後、10,000rpm で 5分間遠心分離し、生じた濁りを取り除き、上清に8倍量の氷冷した蒸留水を一度に加え、よく振り混ぜた。30分間静置後、10,000rpm で10分間遠心分離し、生成した黄色い沈澱を集めた。沈澱を少量の緩衝液(200mM リン酸緩衝液, pH6.0)で溶かし、同量の蒸留水を加えた。この溶液を緩衝液(100mM リン酸緩衝液, pH6.0)で前もって平衡化してあった DEAE-セルロース または DEAE-Toyopearlカラム(1.6 x 15cm)にアプライし、同じ緩衝液でリポホリンを流出させた。この方法で得られたリポホリン溶液は電気泳動的に純粋なりポホリンのみを含み、精製後三日以内に以下の実験に用いた。

### 【リポホリンの脱脂】

リポホリンに結合する糖鎖を分析するには、まず脂質を除去する必要がある。そのため、精製されたリポホリン溶液にまず14倍量のクロロホルム：メタノー

ル(2:1, v/v)を一度に加え、よく振り混ぜ、一晩放置した後、3,000rpmで5分間遠心分離し、沈澱を集め、クロロホルム:メタノール(1:1, v/v)で2回洗浄後、10% TCA(Trichloroacetic acid)で3回洗浄し、混在している無機塩を取り除く。次に沈澱をアセトンで1回、続いてエーテルで3回洗浄し、注意深くドライヤーで乾燥し、白く細かい粉末状のアポタンパク質(重鎖と軽鎖の混合物)を得ることができる。

#### 【メタノリシスによる糖鎖の分析】

リポホリン脱脂粉末 2mgをチューブにとり、デシケーター中で一晩乾燥させた後、0.5N塩酸-メタノール試薬 0.5ml加え、N<sub>2</sub>-ガスを吹き込みふたをしめ、75℃で一晩加熱する。内部標準として ribitolを500nmole加え、炭酸銀で中和後、0.1ml無水酢酸を加え、室温で6時間放置する。3,000rpmで5分間遠心分離し、上清をとった後再び、0.5mlメタノールを加え、3,000rpmで5分間遠心分離し、上清をとり、まえにとったものと合わせてN<sub>2</sub>エバポレーターで乾固し、デシケーター中で一晩乾燥する。残査にピリジン、ヘキサメチルジシラザン、トリメチルクロロシランを加えてTMS化し(5)、このTMS化されたサンプルをガスクロマトグラフィにかけ、アポタンパク質に結合している糖の種類を調べた。

#### 【アーモンドグリコペプチダーゼの精製】

アーモンドグリコペプチダーゼの精製は高橋らの方法(4, 6)を以下のように変更して行った。市販のアーモンド種子100gをコーヒーマイルで粉碎してアセトン粉末を作る。アセトン粉末 75gを450mlの緩衝液(10mMクエン酸-リン酸緩衝液, 0.1M NaCl, pH6.0)に懸濁し、一晩攪はん抽出する。ガーゼ(二重)でこし、濾液を6,500rpmで30分遠心分離する操作を二回くりかえす。上清を -20

℃で凍結させた後、解凍し、再び6,500rpmで30分遠心分離した後、上清をNaOHでpH5.0に合わせ、透析チューブに入れ、ポリエチレングリコールを用いて濃縮する。濃縮したサンプルを60℃で10分間加熱した後10,000rpmで10分間遠心分離して上清をとる。セファデックス G-150のカラム(1.2L)を緩衝液(10mM クエン酸-リン酸緩衝液, 0.1M NaCl, pH6.0)であらかじめ平衡化しておき、同じ緩衝液でサンプルをゲル濾過し、アーモンドグリコペプチダーゼ活性のある画分をとり、同様に濃縮する。次に、アミコン社のグループ特異性アフィニティクロマト用担体 Dyematrix (Red A) を緩衝液(20mM トリス-塩酸緩衝液, pH 7.5)で平衡化し、濃縮した画分をこのカラムにかけ、同じ緩衝液で一晩流して洗い、ついで 0.2M KCl 含有の同じ緩衝液で溶出する。酵素活性のある画分を集めてポリエチレングリコールで濃縮し、再び同様の操作で、Dyematrix (Red A) カラムにかけ、酵素活性のある画分を集め、ポリエチレングリコールにより濃縮し、-20℃ に凍結保存する。このようにして得た酵素標品は、各種のグリコシダーゼ、ペプチダーゼの混在していない精製品である。

#### 【アーモンドグリコペプチダーゼによる糖鎖の切り出し】

リポホリンの脱脂粉末10mgをはかりとり、0.2mg ペプシン/ 0.01N HCl 1ml に懸濁して37℃で16時間消化する。ペプシン活性を消失させるため、100℃で30分間煮沸した後、窒素エバポレーターにより乾固し、0.5ml 緩衝液(クエン酸-リン酸緩衝液, pH5.0)に溶かす。そこに、アーモンドグリコペプチダーゼ(37℃で16時間反応させることにより、オボアルブミンの糖ペプチド 0.5  $\mu$  moleより糖鎖を完全に遊離させることのできる量)を加え、37℃で16時間反応させる。続いて、DDW で平衡化した Dowex 50x8(H<sup>+</sup>) カラム(5ml)、Dowex 1x8(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) カラム(5ml) にそれぞれかけ、DDW で溶出すると、糖鎖を含む中性画分が得られる。

#### 【ヒドラジン分解による全糖鎖の切り出し】

リポホリン脱脂粉末10mgをデシケーター中で一晩乾燥させた後、0.1ml 無水ヒドラジンを加え100℃で10時間ドライブロックを用いて加熱する。続いて硫酸デシケーター中で減圧乾固し、飽和重曹10ml、無水酢酸0.5ml加え、Dowex 50x8(H<sup>+</sup>)カラム(10ml)にアプライし、5倍量のDDWで洗い、乾固する。残査をDDWに溶かしBio-Gel P-4カラム(1.25 x 120cm)にアプライし、各画分の一部をとり、オルシノール-硫酸法(7)により、糖の存在を確認し、糖鎖の画分を集める。

#### 【薄層クロマトグラフィによる糖鎖の分析及び精製】

酵素及びヒドラジン分解により、アポタンパク質から切り出された糖鎖の画分を減圧乾固したのち、20 $\mu$ lのDDWにとかし、シリカゲルプレート60(Merck Art. 5553)にアプライし、n-プロパノール:酢酸:水(3:3:2, v/v/v)で16時間+16時間、二重展開する。プレートを乾燥させ(8)、オルシノール-硫酸試薬を噴霧し、ホットプレートで加熱して発色させ、クロマトグラフィックスキャナー(Shimadzu TLC Scanner CS-900)により、スポットをスキャンする。また、おのおのの糖鎖の分離は、シリカゲルプレートの一部を発色させ、スポットの位置に相当する部分が発色させていないシリカゲルプレートよりかきとり、DDWにより抽出する。こうして分離精製されたおのおのの糖鎖は以下の方法によってさらに分析された。

#### 【ガスクロマトグラフィによる糖組成の分析】

薄層クロマトグラフィにより精製されたそれぞれの糖鎖を4N HCl中で100℃4時間減圧下で加水分解し、窒素エバポレーターで乾固したのち、内部標準と

してリビトールを加え、再び乾固したのち、メタノール：酢酸：ピリジン(5:0.5:0.1, v/v/v)を加えてアセチル化し、再度乾固する。次に、ピリジン 14 $\mu$ l、ヘキサメチルジシラザン7 $\mu$ l、トリメチルクロロシラン4 $\mu$ l加えて室温で15分間放置して TMS化し(5)、ガスクロマトグラフィにアプライした。カラムは 5%(W/W) SE-52 Chromosorb WAW DMCSを充填したガラスカラム(2m x 3mm)を用い、130 $^{\circ}$ Cから 250 $^{\circ}$ Cに 4 $^{\circ}$ C/minで昇温した。

#### 【比色法による糖鎖の分析】

中性糖とアミノ糖の比は比色法により調べられた。中性糖の定量はオルシノール-硫酸反応で、アミノ糖の定量はMBTH反応(9)により行われた。中性糖の標準物質としてマンノースをアミノ糖の標準物質としてはN-アセチルグルコサミンが用いられた。

#### 【 $\alpha$ -マンノシダーゼによる糖鎖の消化】

マンノース量150nmoleに相当する量の糖鎖を50mMナトリウム-酢酸緩衝液(pH5.0)にとかし、0.3 ユニットのナタマメの $\alpha$ -マンノシダーゼを加えて37 $^{\circ}$ Cで0~4時間消化を行った。消化後、100 $^{\circ}$ Cで 5分間煮沸して反応を止め、Dowex 50x8カラム(0.3ml) および、Dowex 1x8 カラム(0.3ml) に順次アプライして水で流出し、窒素エバポレーターで乾固したのち、少量の DDWにとかし、上記と同じ薄層クロマトグラフィにかけた。

#### 【メチル化分析】

メチル化分析はCicanuとKerek の方法(10)に従って行われた。糖鎖(30~40 $\mu$ g)を一晩デシケーター中で乾燥したのち、メチルスルホキサイド100 $\mu$ lを加え、細かい粉末状のNaOH10mgとヨウ化メチル50 $\mu$ lを加え室温で 1時間攪拌す

る。次に DDWとクロロホルムを 1mlずつ加えて洗い、クロロホルム層をとる。続いて、クロロホルム層を 1ml DDWで洗う操作を 3回繰り返す。そしてクロロホルムを窒素エバポレーターでとばし、メチル化された糖鎖を得ることができる。このサンプルをStellnerらの方法(11)に従って加水分解、還元、アセチル化を行い、アルディトールアセテート誘導体を得ることができる。これをガスクロマトグラフィ(3% OV-17, Gas-chromQカラム(2mm x 1m))ーマススペクトロメトリー(JOEL JMS-DX300)にかけ、分析を行った。ガスクロマトグラフィの注入温度は 250°Cで、カラム温度は 150°Cから 250°Cへ 4°C/minで昇温した。マススペクトロメトリーの条件はionizing energyが30eV、separetor 温度が 250°C、accercating voltageが1.35KVだった。

#### 【NMR分析】

糖鎖に99.98%  $^2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) 0.4ml加え30分間放置し凍結乾燥する操作を 3回繰り返して、デシケーター中で一晩乾燥したのち、99.995%  $^2\text{H}_2\text{O}$ (Merck) を 0.4mlと内部標準として3-(trimethylsilyl)-propionic acid- $d_4$  sodiumを加えて5mm tube(Wilmad Glass Co.)に封入した。これを $^1\text{H}$ -NMRスペクトロメトリー(JOEL GX-400) 400MHzを用いて分析した。試料のスペクトルと既知の糖鎖のスペクトル(12, 13, 14)を比較することにより、試料の構造を決定した。

#### 【リポホリンのアポタンパク質重鎖と軽鎖の分離】

2mg/mlリポホリン溶液に6M濃度になるようにグアニジンー塩酸を溶かし、低温室で一晩放置する(15)。この溶液を、前もって緩衝液(50mM リン酸緩衝液、6Mグアニジンー塩酸, pH7.0)で平衡化してあったSepharose CL-4B カラム(2.5 x 90cm)にアプライし、同じ緩衝液で20ml/hで流出させた。

## 【試薬】

使用した試薬はすべて特級試薬を使用した。薄層クロマトグラフィで標準物質として用いたグルコースオリゴマーは Nishigakiらの方法(16)に従いデキストランより調製した。デキストラン0.5gに0.1N HClを5ml加え、100°Cで4時間加熱した後、窒素エバポレーターで乾固し、次に、メタノール1ml加えて溶かした後、乾固するという操作を3回繰り返す。デシケーター中で一晩乾燥したのち、1ml DDWに溶かし、DDWで平衡化した Bio-Gel P-4カラム(1.25 x 120 cm) にアプライし、55°C、5ml/h の条件で流出し、薄層クロマトグラフィによりグルコースユニット数を確認した。ペプシンは Worthington Biochemical Co.より購入した。アーモンドグリコペプチダーゼの基質となる標準物質としての糖ペプチドはオボアルブミン(Sigma)より以下のように調製した。1gのオボアルブミンを49.5ml DDWに溶かし、100°Cで5分間煮沸し、さましてから0.5ml 1N HClを加え、ペプシン10mg加える。37°Cで一晩消化した後、凍結乾燥し、2mlの0.02M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  にとかし、pHをNaOHで7にあわせる。25,000 rpmで30分間遠心分離し、その上清を0.02M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  であらかじめ平衡化した Sephadex G-25カラム(2 x 53cm)にアプライし、同じ溶媒で流出し、糖の含まれる画分を集めペーパークロマトグラフィで2日間展開する。展開溶媒の組成はn-ブタノール：ピリジン：酢酸：水(5:10:3:12, v/v/v/v)であった。糖ペプチドを含む部分をニンヒドリン試薬により一部発色させて確認し、DDWで抽出し、標準物質とした。 $\alpha$ -マンノシダーゼは Sigmaより購入した。無水ヒドラジンは Aldrichより購入した。

## 結果

バターのリポホリンは全体量の約40%が脂質でこれは糖鎖の精製の際妨げとなるので、クロロホルム：メタノール(2:1)で脱脂して得られたアポタンパクの粉末を実験開始の物質とした。まずこのアポタンパク質からメタノリシスにより糖鎖を切り出し、ガスクロマトグラフィを用いて分析した。その結果、リポホリンは主にマンノースとN-アセチルグルコサミンを含む糖鎖を持つことが分かり、これはChinoとKitazawaの報告(2)を確かめるものであった。

次に、脱脂したリポホリンをペプシン消化した後、アーモンドグリコペプチダーゼ処理した結果、アポタンパク質に含まれる全糖量の85%の糖が遊離された。この糖鎖を薄層クロマトグラフィで展開したところ Fig. 1に示すように、6種のスポットが確認され、2種の主要なもの、4種のマイナーなものが存在することがわかった。

続いて、アーモンドグリコペプチダーゼの基質特異性により、切り出されない糖鎖が存在する可能性を調べるため、ヒドラジン分解法により全糖鎖を切り出し、薄層クロマトグラフィで調べた結果、酵素を用いて切り出した糖鎖のパターンと全く同じ結果が得られた。そこで、以後の全ての実験では、取り扱い方法が簡便で危険性のないアーモンドグリコペプチダーゼを用いて糖鎖を切り出した。

薄層クロマトグラフィにおいて得られたそれぞれの糖鎖のスポット部分に相当するシリカゲルをかきとり水で抽出することにより、6種類の糖鎖を分離精製した。分離精製を確認するために再び薄層クロマトグラフィで展開した結果をFig. 2に示す。これより、おのおのの糖鎖が異なる移動度を示し、さらにそれぞれが単一のスポットであることが確認された。それぞれの糖鎖を移動度が大きい順にA, B, C, D, E, Fとすると、Aは8糖、Bは9糖、Cは9-10糖、D

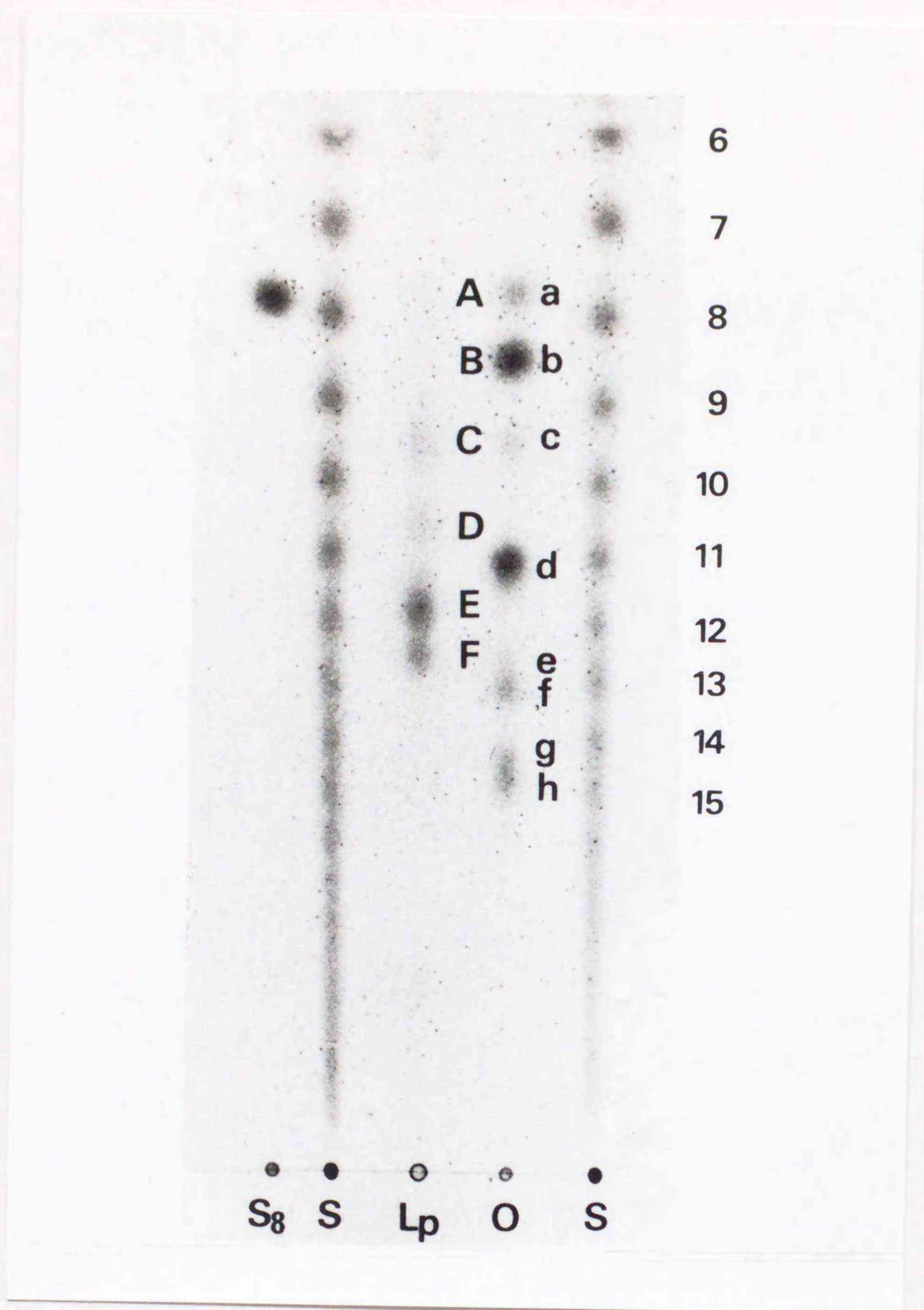


Fig.1 リポホリンのアポタンパク質の糖鎖の薄層クロマトグラフィ  
 オルシノール-硫酸試薬を噴霧し、加熱することにより、発色させた。S<sub>8</sub>, イソマルトオクタオース (8 グルコースユニット) ; S, スタンダードグルコースオリゴマー、6-15はグルコースユニット数を示している ; Lp, リポホリンの糖鎖 (A-F) ; O, オボアルブミンの糖鎖 (a-h)、これらの糖組成はすでに報告されている (18, 19, 20, 21) : a, Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; b, Man<sub>6</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; c, Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>; d, Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>4</sub>; e, Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>5</sub>; f, Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>5</sub>; g, Gal<sub>1</sub>Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>5</sub>; h, Gal<sub>1</sub>Man<sub>5</sub>GlcNAc<sub>5</sub>

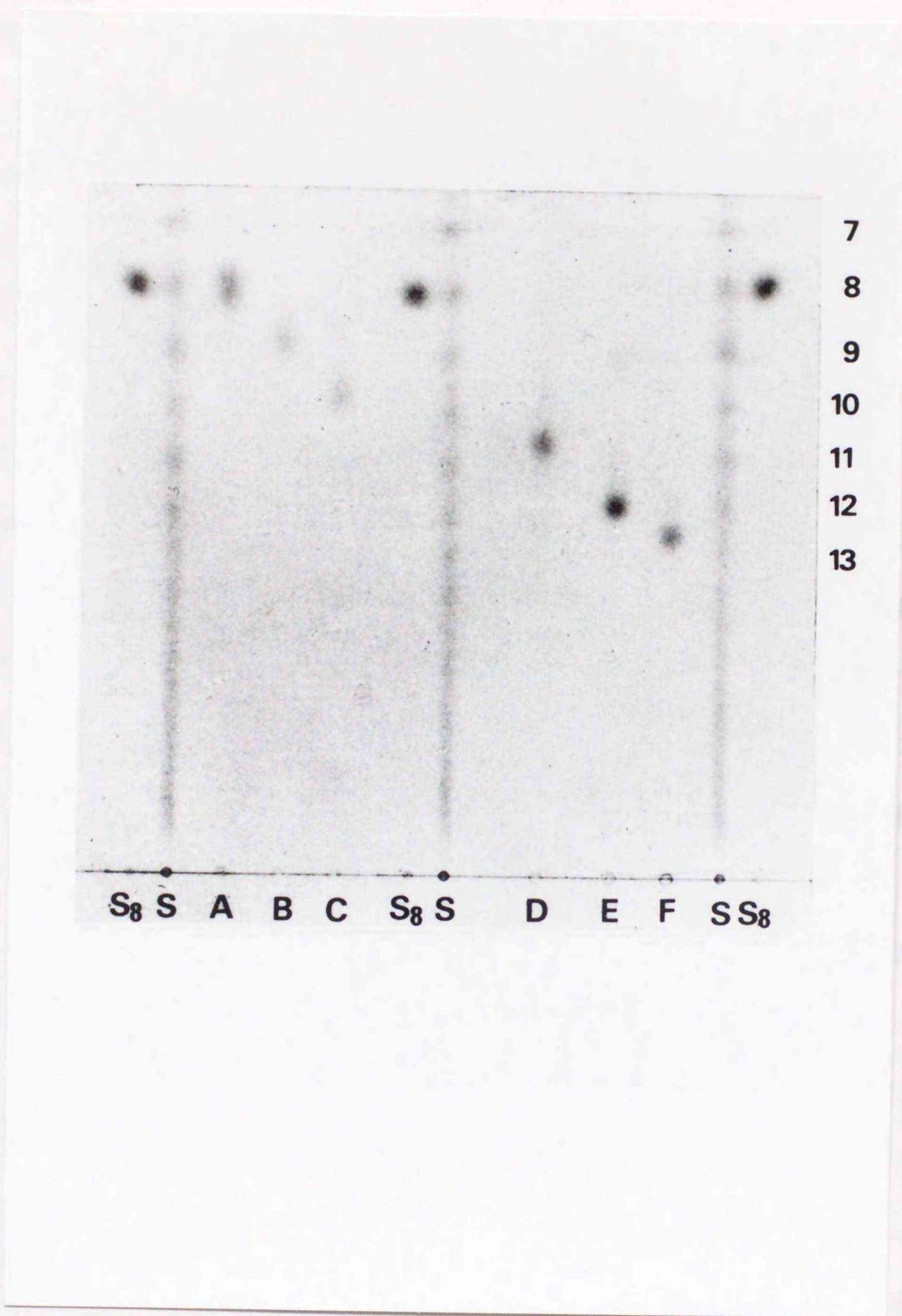


Fig. 2 リポホリンのアポタンパク質より遊離されたそれぞれの糖鎖の薄層クロマトグラフィ

それぞれの糖鎖は薄層クロマトグラフィにより分離され (Fig. 1 に示してある)、オルシノール-硫酸試薬を噴霧し、加熱することにより、発色させた。S<sub>8</sub>, イソマルトオクタオース (8 グルコースユニット) ; S, スタンダードグルコースオリゴマー ; A-F, リポホリンの糖鎖

は 10-11糖、Eは12糖、Fは 12-13糖のグルコースユニットをもつグルコースオリゴマーの移動度に相当した。次に、それぞれの糖鎖の構成糖をガスクロマトグラフィにより調べた。その結果、6種すべての糖鎖にマンノースとN-アセチルグルコサミンが存在することがわかり、また6種すべての糖鎖にごく少量のグルコースが存在することがわかった。しかし、このグルコースはリポホリンを精製する際に使用した DEAE-セルロースカラムから由来する人為的産物である可能性が強いので、それを調べるため DEAE-セルロースカラムのかわりに DEAE-Toyopearl (Toyo-Soda Co., Japan) を使用してリポホリンを精製し、同様の手順にしたがってガスクロマトグラフィを用いて分析した結果、糖鎖 A, B, C, D, Eからはグルコースのピークが消えたのに対して、糖鎖 Fにはマンノース：グルコースが 6~8 : 1 の割合でグルコースのピークがあらわれた (Fig. 3)。このことより糖鎖 Fはいままで発見されている高マンノース型の糖鎖とは違うユニークな構造を持つことが予想された。

続いて、6種の糖鎖に含まれる中性糖とアミノ糖との量比を比色法により調べた結果を Table 1 に示す。ガスクロマトグラフィ、薄層クロマトグラフィ、比色法によって調べられた糖鎖の構成糖、移動度、中性糖とアミノ糖との量比、さらにこれらと薄層クロマトグラフィにおける糖鎖の移動度と糖組成との相関関係に関する報告 (17) を考え合わせた結果、6種すべての糖鎖は高マンノース型でさらに、Table 1 (右端) に示すような糖組成を持つことが導かれた。

これに続いて、主要糖鎖である糖鎖 E ( $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) と F ( $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) に関してさらに構造解析を行うことにした。まず、これら二種の糖鎖の構造の詳細な情報を得るため、それぞれの糖鎖についてメチル化分析を行った。この結果を Table 2 に示す。糖鎖 E は非還元末端マンノース：2-0-置換マンノース：3,6-0-置換マンノースの比が 3:4:2 であり、糖鎖 F は非還元末端マンノースまたはグルコース：2-0-置換マンノースまたはグルコース：3-0-置換マンノース

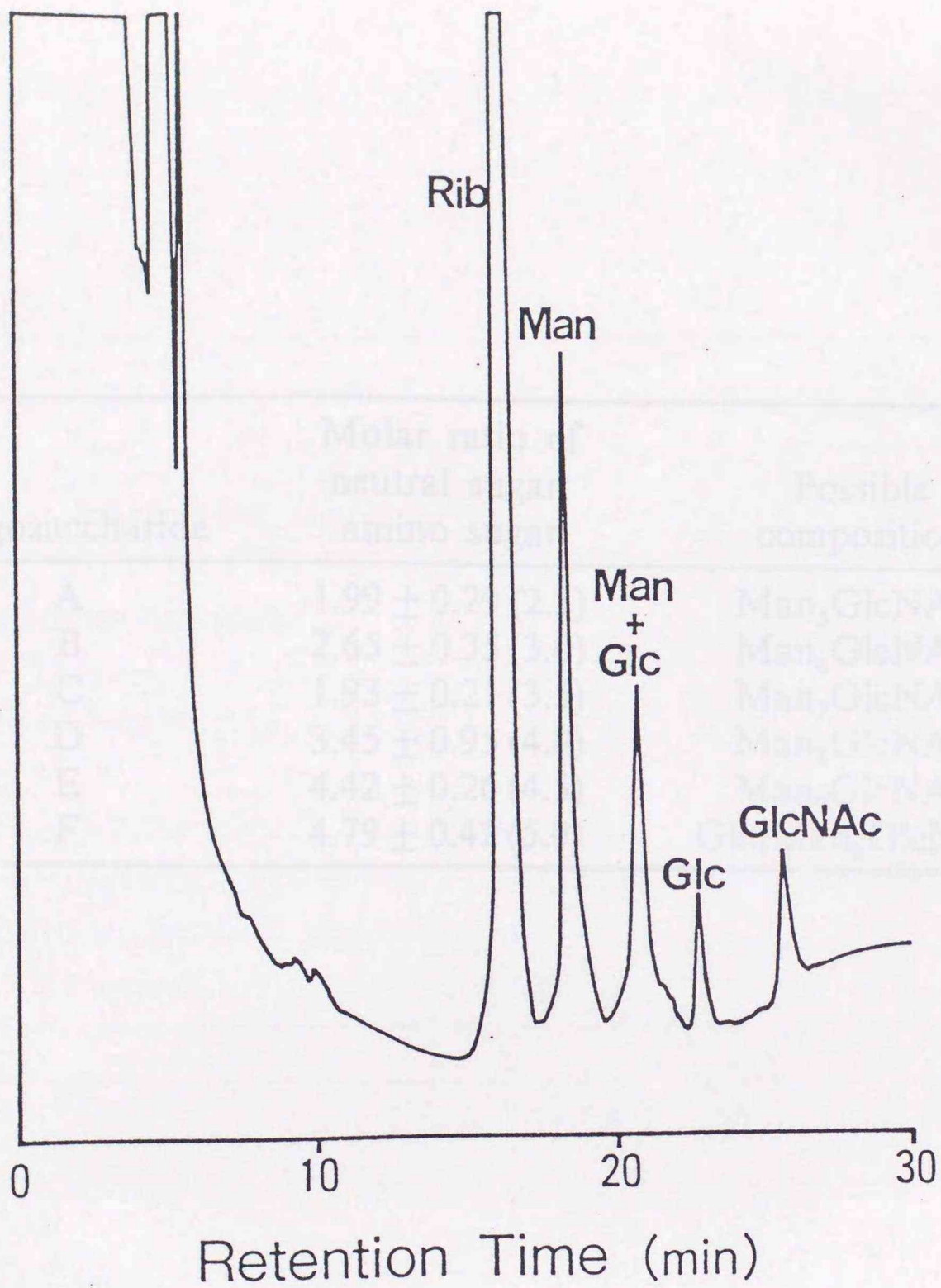


Fig. 3 リポホリンの糖鎖 F のガスクロマトグラフィ

Man, マンノース; Glc, グルコース; GlcNAc, N-アセチルグルコサミン  
; Rib, リビトール (スタンダード)

Table 1) リポホリンの糖鎖のアミノ糖に対する中性糖の比とそれらの糖組成

Oligosaccharide	Molar ratio of neutral sugar: amino sugar	Possible composition
A	$1.99 \pm 0.29$ (2.5)	Man <sub>5</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
B	$2.65 \pm 0.35$ (3.0)	Man <sub>6</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
C	$1.93 \pm 0.21$ (3.5)	Man <sub>7</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
D	$3.45 \pm 0.95$ (4.0)	Man <sub>8</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
E	$4.42 \pm 0.26$ (4.5)	Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub>
F	$4.79 \pm 0.42$ (5.0)	Glc <sub>1</sub> Man <sub>9</sub> GlcNAc <sub>2</sub>

カッコ内の数字は糖組成より計算されたアミノ糖に対する中性糖の比の理論値。糖鎖 Cにおける実験値と理論値との矛盾は、試料の量が非常に少なかったため実験誤差が生じたためと思われる。

Table 2) 糖鎖 E と F のメチル化分析

Methylated Sugars	Molar Ratio <sup>a</sup>	
	E	F
Glucitol and/or mannitol		
2,3,4,6-Tetra-O-methyl(1,5-di-O-acetyl)	3.0	3.0
3,4,6-Tri-O-methyl(1,2,5-tri-O-acetyl)	4.0	3.5
Mannitol		
2,4,6-Tri-O-methyl(1,3,5-tri-O-acetyl)	trace <sup>b</sup>	1.2
2,4-Di-O-methyl(1,3,5,6-tetra-O-acetyl)	2.2	1.7
2-N-Methylacetamido-2-deoxyglucitol <sup>c</sup>		
3,6-Di-O-methyl(1,4,5-tri-O-acetyl)	1.1	1.4

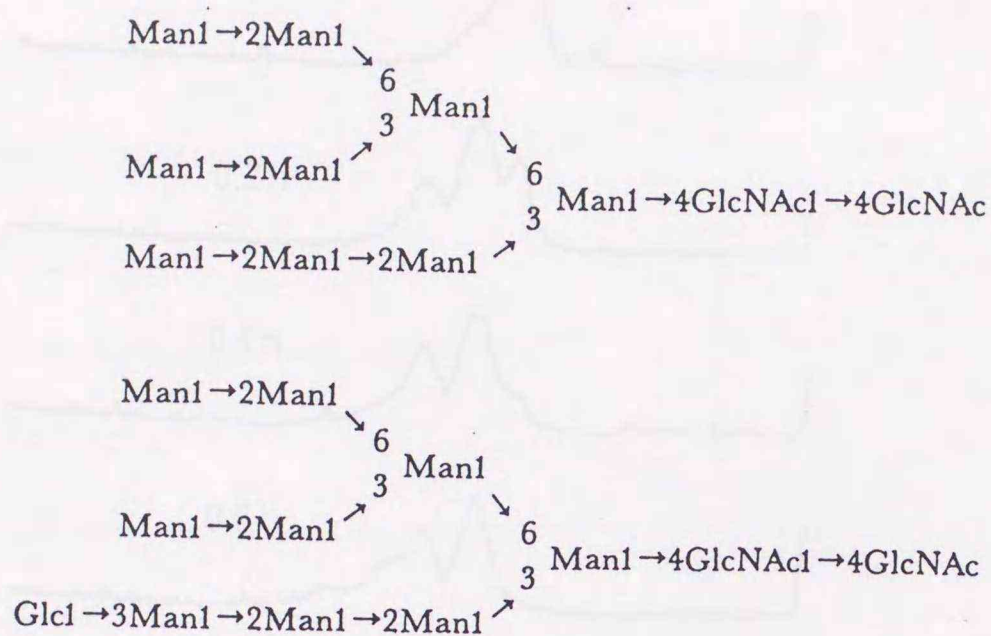
<sup>a</sup> 2,3,4,6-tetra-O-methylmannitol and/or glucitol の値を 3.0 とした。

<sup>b</sup> 0.3 以下

<sup>c</sup> これらの回収率は中性糖のものとは一般的に低い。

求められた糖組成 (Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> と Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) より計算される理論値は 2.0 となる。

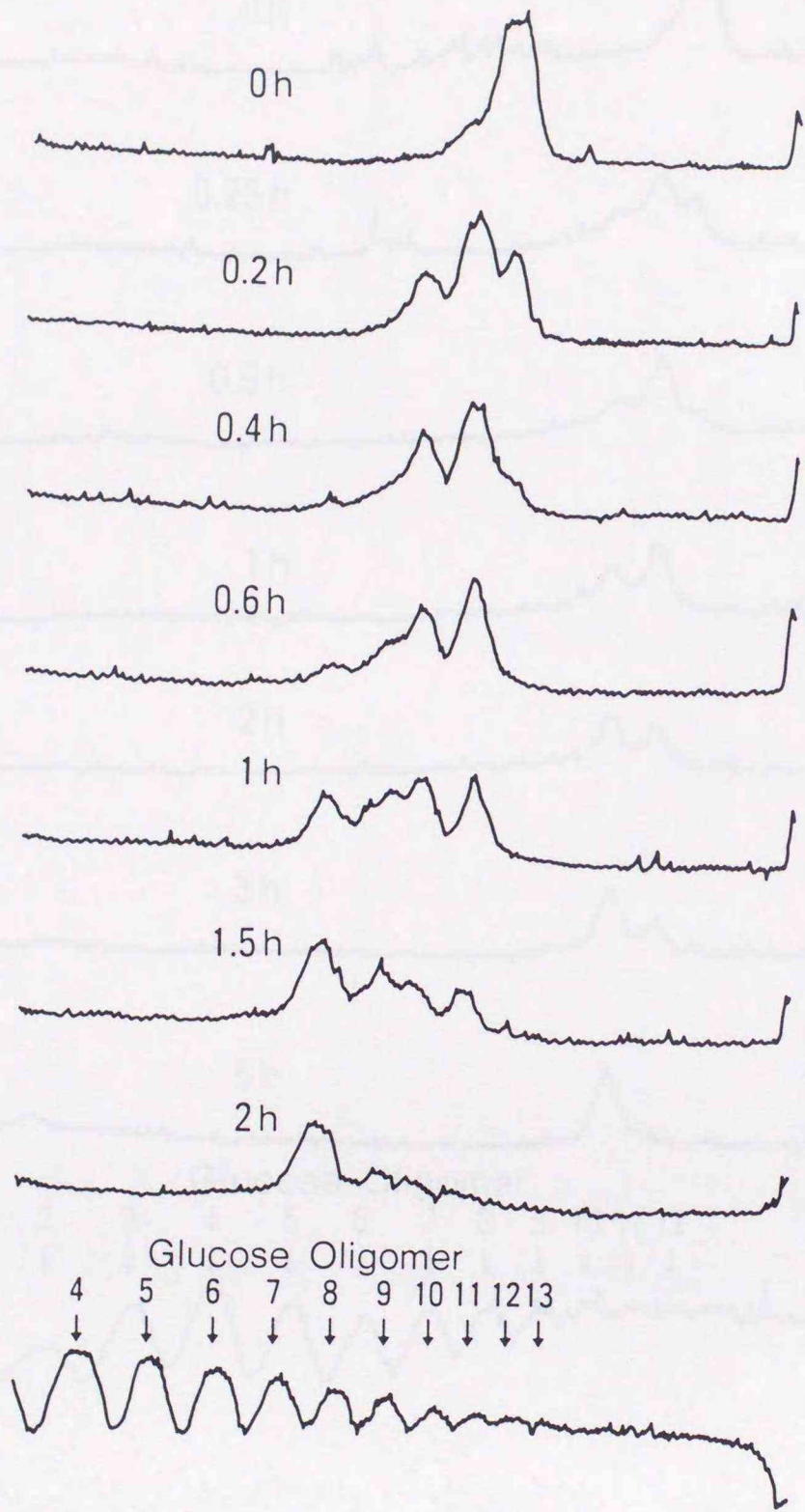
ース：3,6-O-置換マンノースとの比がだいたい 3:4:2:1であるという結果が得られた。以上のデータとこれまで知られているアスパラギン結合糖鎖の生合成経路(22)とを考え合わせると、以下のような推定構造が示された。



この構造をさらに確かめるため、続いてナタマメの $\alpha$ -マンノシダーゼによる消化を行った。ナタマメの $\alpha$ -マンノシダーゼはBermanとAllerhandの報告(23)によると $\alpha 1 \rightarrow 2(\alpha) \gg \alpha 1 \rightarrow 3(\beta) > \alpha 1 \rightarrow 6(\alpha) > \alpha 1 \rightarrow 3(\alpha) = \alpha 1 \rightarrow 6(\alpha)$ の順に切断するので、適当な条件を選べば $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合だけ選択的に切断できる。そこですでに構造の分かっているオボアルブミンのハイマンノース型の糖鎖を使ってその条件を決め、糖鎖 E, Fを消化し、その産物を薄層クロマトグラフィで展開し、発色後、TLCスキャナーにより得られた結果を Fig. 4に示す。これより、糖鎖 Eは $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合が4個切れた状態で反応が止まり、糖鎖 Fでは $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合が2個切れた状態で止まっていることが分かった。つまり、糖鎖 Fは $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合しているマンノースが2個存在する鎖の非還元末端にグルコースが結合しているため、 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合が2個切れた状態で止まってしまったものと考えられる。

さらに、これらの糖鎖の結合様式を調べるため、 $^1\text{H-NMR}$ により構造解析を行

[E]



[F]

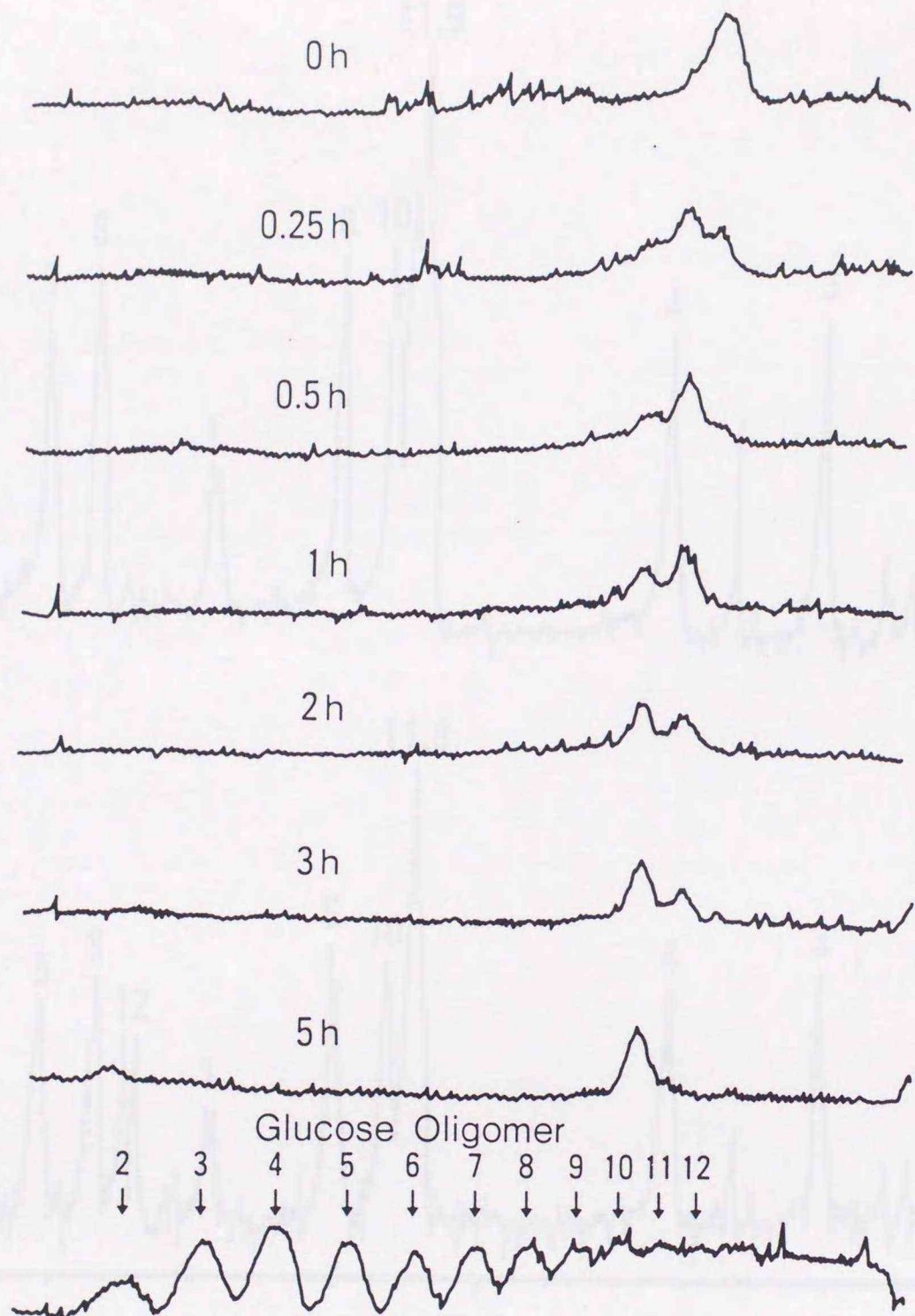


Fig. 4 リポホリンの糖鎖 E と F の  $\alpha$ -マンノシダーゼ消化した産物の薄層クロマトグラフィのスキヤニング

ピークにふってある数字はスタンダードグルコースオリゴマーのグルコースユニット数を示している： E, 糖鎖 E; F, 糖鎖 F

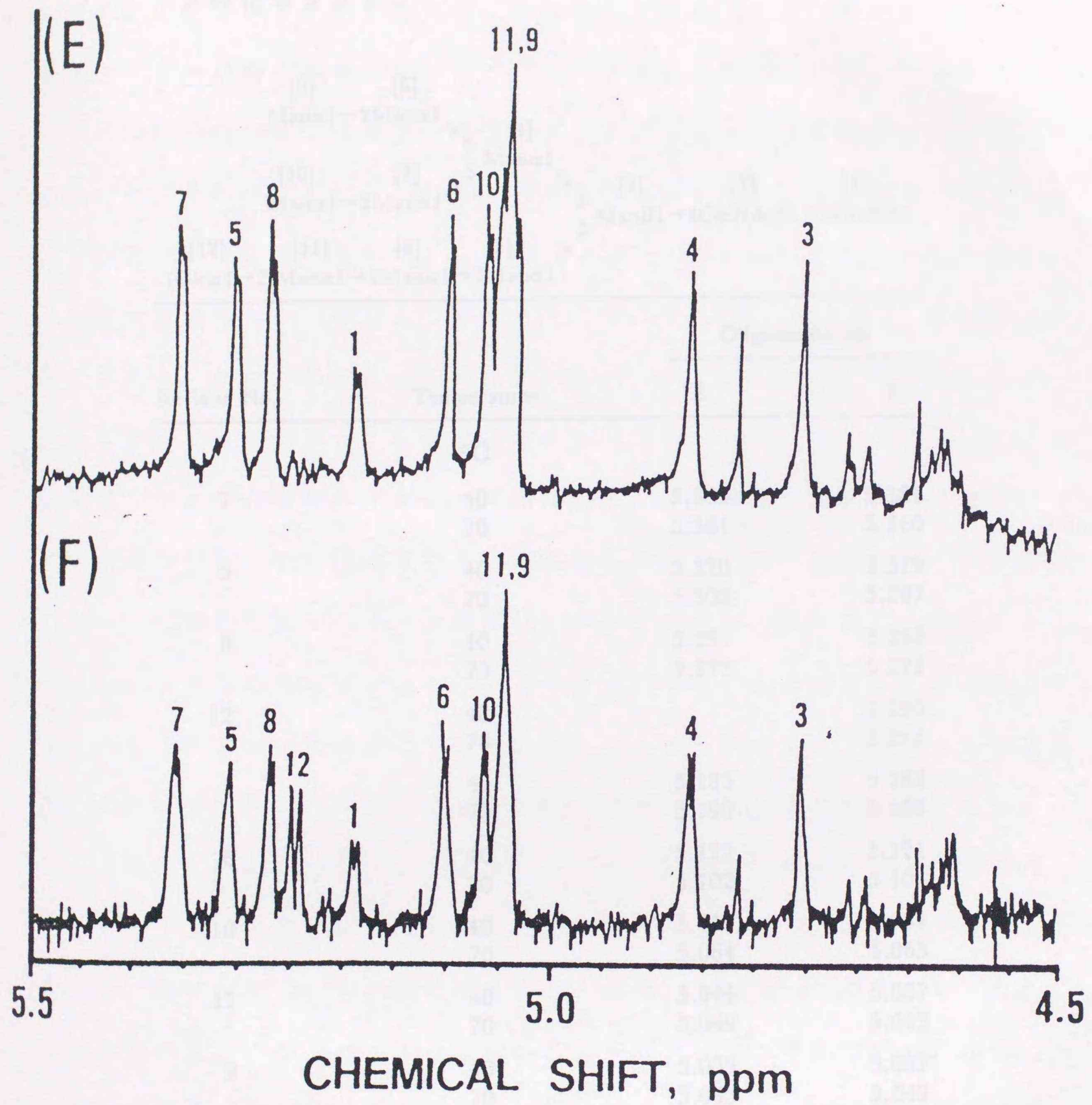
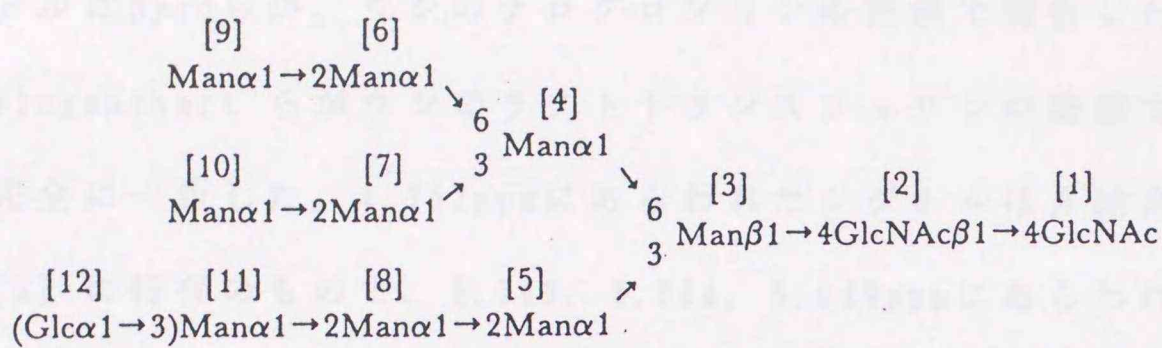


Fig. 5 リポホリンの糖鎖 Eと Fの70°C、400MHzでの<sup>1</sup>H-NMRスペクトル  
 ピークにふってある数字は Table 3で示した残基ナンバーに相当する

Table 3) 400MHz、<sup>1</sup>H-NMRにおける(Glc<sub>1</sub>)Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>のアノメリックプロト

ンの化学シフト

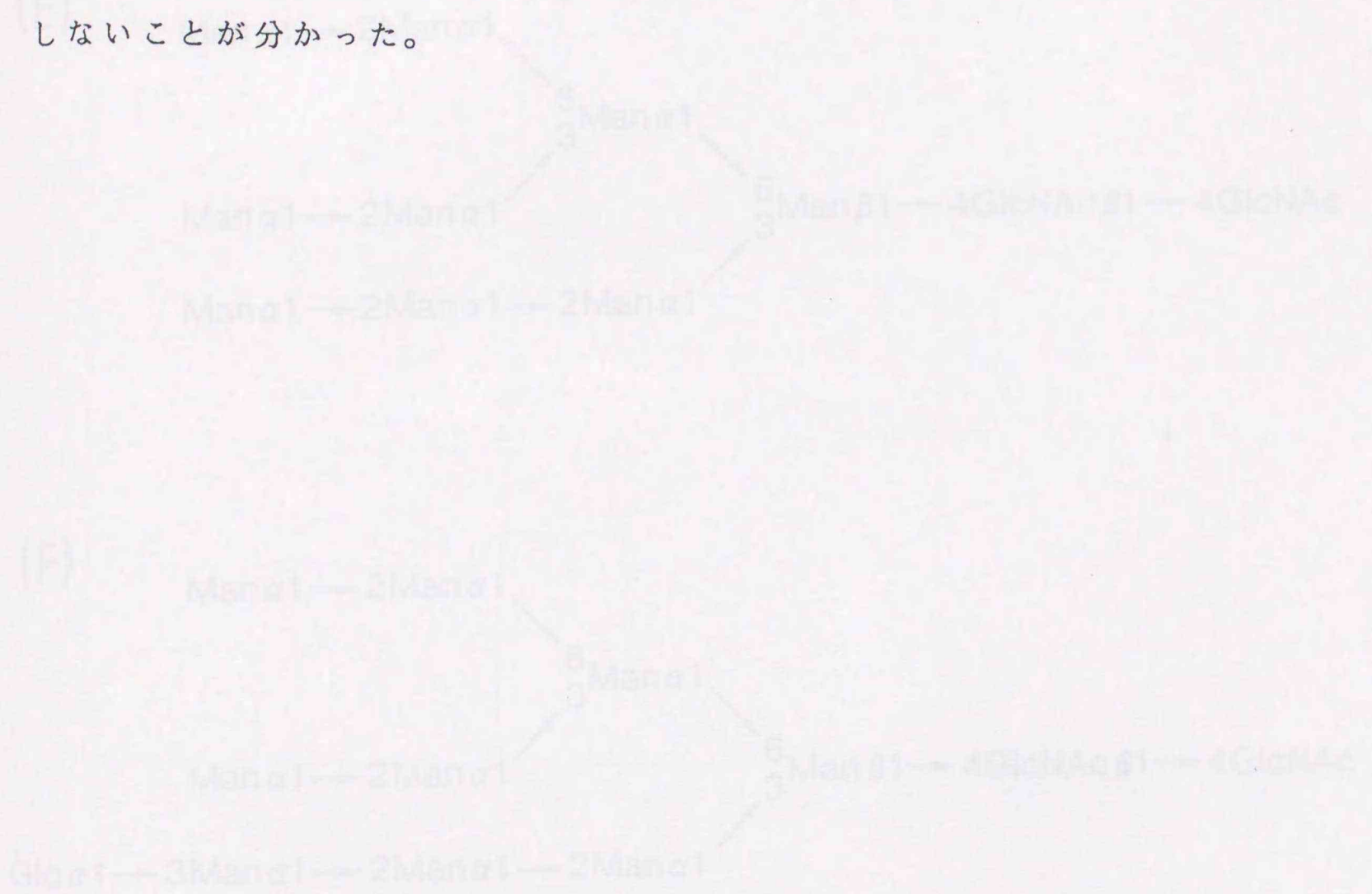


Residue No.	Temperature	Oligosaccharide	
		E	F
	°C		
7	40	5.383	5.381
	70	5.361	5.360
5	40	5.320	5.319
	70	5.308	5.307
8	40	5.291	5.286
	70	5.272	5.271
12	40		5.250
	70		5.245
1	40	5.186	5.182
	70	5.190	5.188
6	40	5.122	5.121
	70	5.102	5.101
10	40	5.057	5.057
	70	5.064	5.063
11	40	5.044	5.037
	70	5.049	5.043
9	40	5.039	5.037
	70	5.043	5.043
4	40	4.865	4.861
	70	4.866	4.864
3	40	4.755	4.758
	70	4.752	4.751

った。Fig. 5 にその結果を示す。また、C1-Hプロトンに由来する化学シフトは Table 3 に示すように帰属される。その結果、糖鎖 EのそれぞれのマンノースのスペクトルはByrdらが、ウシのチログロブリンの糖鎖で報告したもの(12)、そして、Viegenthart らがウシのラクトトランスフェリンの糖鎖で報告したもの(14)と完全に一致した。4.752ppmにあらわれたシグナルは $\beta$ 結合したマンノース残基[3]に特有のもので、5.043, 5.064, 5.049ppmにあらわれたシグナルは非還元末端に $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2結合しているマンノース残基[9], [10], [11]にそれぞれ帰属される。また、4.866, 5.308, 5.102, 5.361, 5.272ppmにあらわれたシグナルはそれぞれ、C-3 とC-6 置換した $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3結合したマンノース残基[4]、C-2 置換した $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3結合のマンノース残基[5]、C-2 置換した $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6結合のマンノース残基[6]、C-2 置換した $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3結合したマンノース残基[7]、C-2 置換した $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2結合したマンノース残基[8]のC-1プロトンにそれぞれ帰属される。5.190ppmにあらわれたシグナルはN-アセチルグルコサミン残基[1]の $\alpha$ アノマーのC-1プロトンに帰属されるが、 $\beta$ アノマーとN-アセチルグルコサミン残基[2]のC-1プロトンのシグナルはH<sup>2</sup>Oシグナルに覆い隠されて得られなかった。さらに、Fig. 5 とTable 3 より、シグナル[11]と[12]を除けば、糖鎖 Eと Fのスペクトルは完全に一致する。糖鎖 Fのシグナル[11]は糖鎖 Eのそれと比べると、わずかに upfield側にシフトし、また、5.245ppmに新たにシグナルが出現している。このシグナルは $\alpha$ 結合したグルコースに特有な3.6Hz という結合定数を持ち、Tsaiらにより示された(13)グルコースを含む糖鎖で見られた $\alpha$ 結合グルコースのC-1プロトンのシグナルと同様の化学シフトを示した。このことより、糖鎖 Fは糖鎖 Eのマンノース残基[11]にグルコース残基[12]が $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3結合した構造を持つことが確認された。以上の結果より、糖鎖 Eと Fの構造は Fig. 6のように決定された。

次に、リポホリンの重鎖と軽鎖にどのような糖鎖が結合しているのかを調べる

ため、グアニジン - 塩酸によりリポホリンを変性させ、重鎖と軽鎖の分離を Sepharose CL-4B カラムで行った (Fig. 7)。分離した重鎖、軽鎖からそれぞれ、糖鎖を精製し、薄層クロマトグラフィで展開した結果を Fig. 8A に示し、またこれを TLC スキャナーにかけた結果を Fig. 8B に示す。この結果、重鎖には 6 種全ての糖鎖が存在するが、軽鎖には糖数の多い糖鎖 D, E, F の 3 種のみしか存在しないことが分かった。



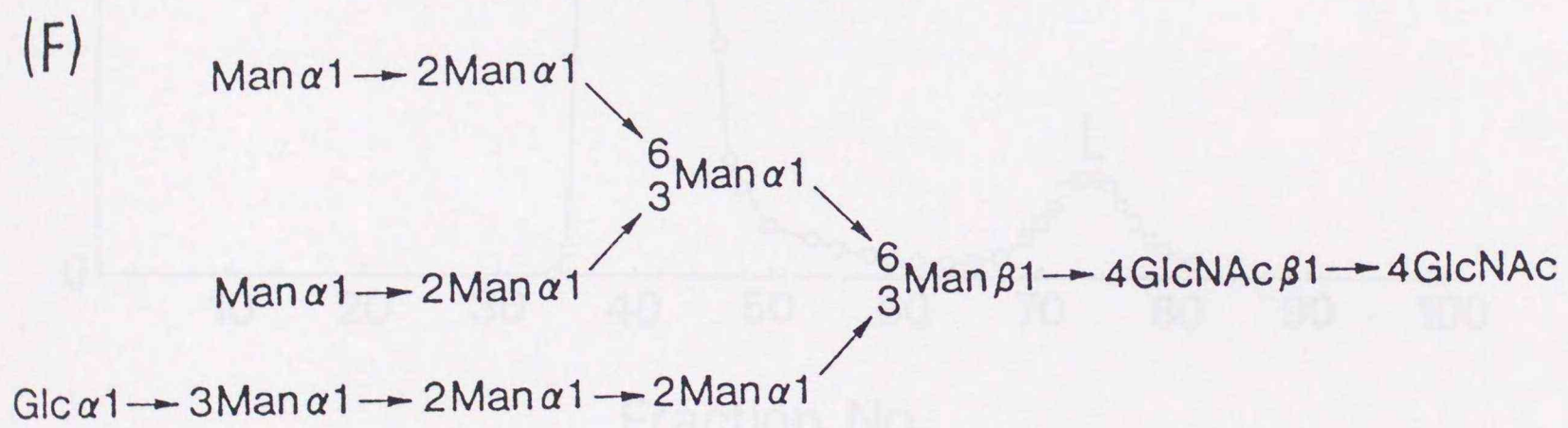
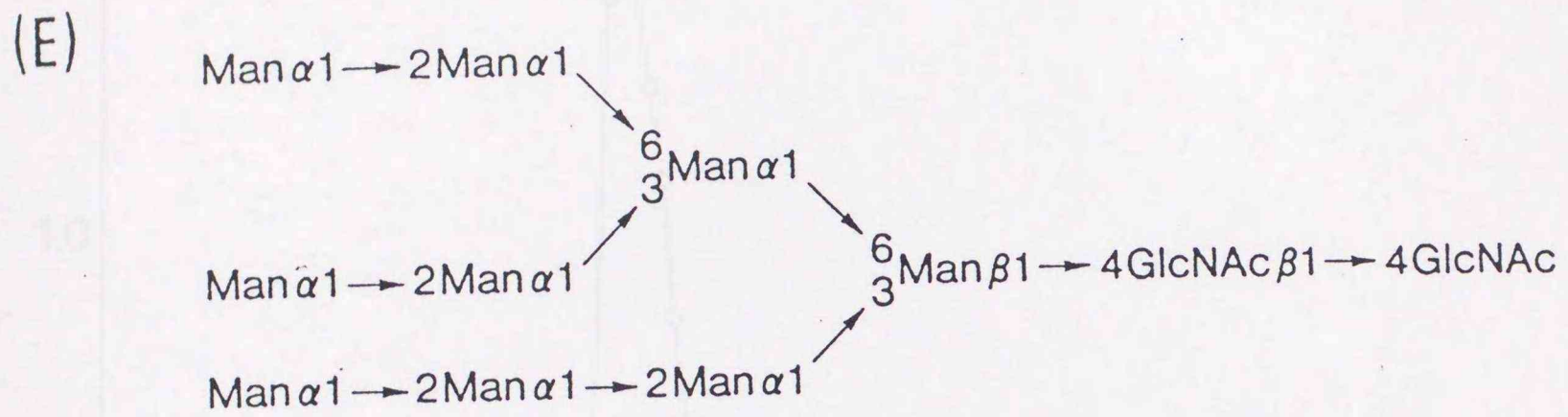


Fig. 6 リポホリンの糖鎖 E と F の構造

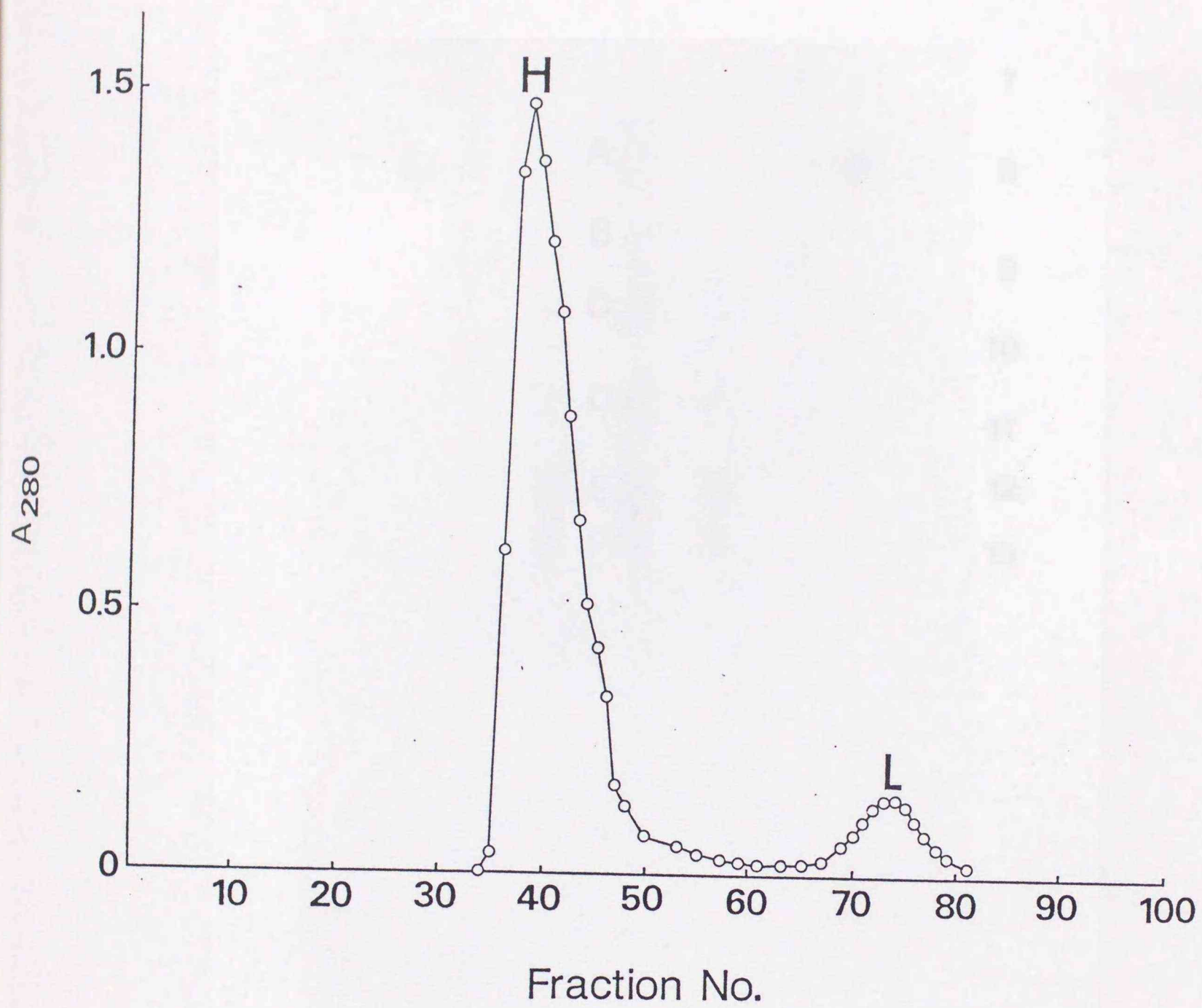
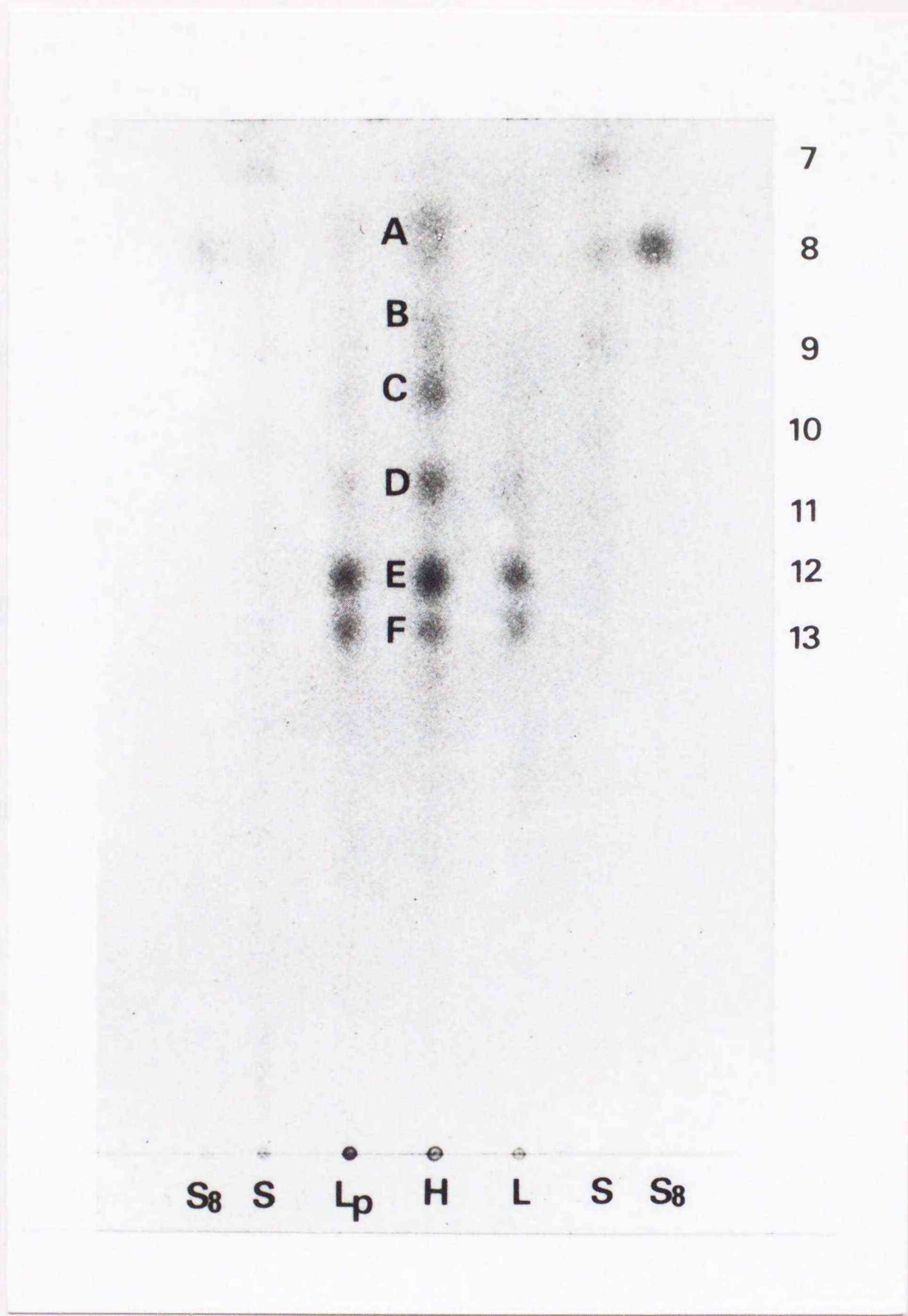


Fig. 7 リポホリンの重鎖と軽鎖の6Mグアニジン-塩酸存在下におけるSepharose CL-4B によるカラムクロマトグラフィ

H, 重鎖; L, 軽鎖;



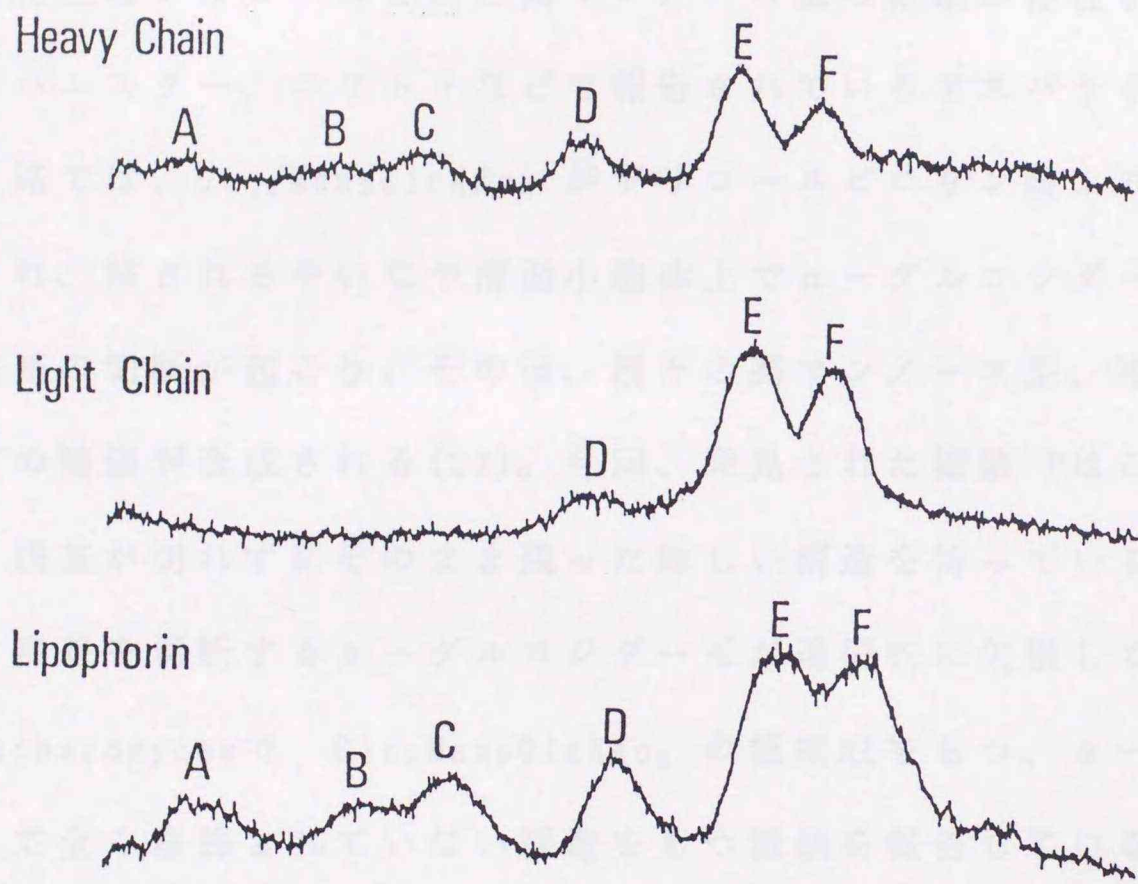


Fig. 8 (A) リポホリンの重鎖と軽鎖の糖鎖の薄層クロマトグラフィ

S, スタンダードグルコースオリゴマー; Lp, リポホリンの糖鎖; H, リポホリンの重鎖の糖鎖; L, リポホリンの軽鎖の糖鎖;

(B) リポホリン、重鎖、軽鎖それぞれの糖鎖の薄層クロマトグラフィのスキヤニング

## 考察

リポホリンには 6種の糖鎖が存在し、すべてがアーモンドグリコペプチダーゼで切り出されることより、糖鎖はリポホリンのアポタンパク質のアスパラギンに結合していることが分かった。また、リポホリンの糖鎖におけるもっとも重要な特色はグルコースを含む高マンノース型の糖鎖が存在することである。酵母、ハムスター、ニワトリなどで報告されているアスパラギン結合糖鎖の生合成経路では、 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  がドリコールピロリン酸より、タンパク部分へ移され、移されるやいなや滑面小胞体上で $\alpha$ -グルコシダーゼによりグルコース残基の切断が起こり、その後、種々の高マンノース型、複合型、ハイブリッド型の糖鎖が合成される(22)。今回、発見された糖鎖 Fはこの 3番目のグルコース残基が切れずにそのまま残った珍しい構造を持っている。Tsaiらはグルコース残基を切断する $\alpha$ -グルコシダーゼが遺伝的に欠損している突然変異種の *Sacharomyces* で  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  の糖組成をもつ、 $\alpha$ -グルコシダーゼによって全く修飾されていない構造をもつ糖鎖を報告している(13)。また、Taniguchi らは *Tetrahymena* において  $\text{Glc}_{1-3}\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  の糖組成をもつ糖鎖を報告している(24)。突然変異種以外でグルコースの存在する高マンノース型の糖鎖が報告されているのは我々が糖鎖 Fの構造決定を行った時点ではこの報告のみであった。ここで構造決定された糖鎖 Fはアスパラギン結合糖鎖の生合成過程における中間体の構造をもつ非常に珍しい糖鎖であると思われる。おそらく、トノサマバッタにおいては脂肪体細胞内で糖鎖が生合成される際の $\alpha$ -グルコシダーゼ活性がほ乳類のそれと比べると、非常に低いのであろう。また、Osirらはタバコスズメガのヴィテロジェニンの糖鎖の構造を報告している(25)。しかし、彼らがデーターとして示した NMR像にはっきりとグルコースのシグナルが現れているにもかかわらず、彼らは糖鎖 Eの構造を報告しているのみで

ある。我々は、彼らのデータより、タバコスズメガのヴィテロジェニンにも糖鎖 F のようなグルコースを含む糖鎖が存在すると予測している。いずれにせよ、昆虫の糖タンパク質の糖鎖構造の詳細が明らかになったのは、本研究が最初である。おそらく、昆虫の糖タンパクでは、グルコースが存在する糖鎖はむしろ一般的なもののなのかもしれない。最近、ヒトデの卵ゼリーコートに存在する主要な糖タンパク質の糖鎖の構造が報告された(26)。その構造はここで報告した糖鎖 F と全く同じ構造、糖鎖 F のグルコース残基にグルコースが  $\alpha 1 \rightarrow 3$  結合している構造、そして、さらにそれにグルコースが  $\alpha 1 \rightarrow 2$  結合している構造をとっていた。以上のことを考え合わせると、グルコースが存在する糖鎖は進化を論じるときに一つの指標となりうるかもしれない。

茅野と北沢はリポホリンを SDS-電気泳動後、PAS-染色を行い、重鎖のみが染色されたことより、重鎖のみにしか糖鎖は存在しないと報告した(2)。しかし、今回、我々が行った実験では、あきらかに重鎖と軽鎖両方に糖鎖が存在することを示している。そして、それはタバコスズメガのリポホリンで Shapiro らが報告したこととも一致している(15)。また、我々はさらに進んで重鎖が 6 種の糖鎖をもつものに対し、軽鎖は 3 種のみしかもたないことを示した。

本研究の究極の目的は、これらの糖鎖がリポホリンの機能にいかに関与しているのかを明らかにすることであった。しかし、現在のところタンパク質部分の変性なしに、糖鎖のみを部分的、または全面的に切断する手段は開発されていないので、この問題の解明は進展していない。また、リポホリンから得られた糖鎖そのものがリポホリンによる脂肪体からのジグリセリドの積み込みを阻害するかどうかを *in vitro* の系でテストしたが、結果は完全にネガティブであった。いずれにせよ、糖鎖がリポホリンの生理的機能に関与しているかどうかという問題は今後の研究課題である。

## 要旨

リポホリンは特定の組織で特定の脂質を積み込み、積み下ろす、再利用可能なシャトルとして働く、一種のキャリアタンパク質である。また、リポホリンはタンパク質部分に対して約3%の割合でマンノースとN-アセチルグルコサミンを含む糖タンパク質であることが報告されている。申請者らは、この糖鎖が脂質の積み込み、積み下ろしの認識に何らかの役割を果たしているのではないかと考え、この糖鎖に関する解析を行うことにした。

バツタのリポホリンの糖鎖は、アーモンドグリコペプチダーゼ(EC 3. 5. 1. 52)により遊離され、6種類の糖鎖が確認された。この6種類のうち、2種は major (E, F)で四種は minor (A, B, C, D)であった。6種類のすべてが高マンノース型の糖鎖で、薄層クロマトグラフィ、ガスクロマトグラフィ、比色法の結果から、それぞれの糖鎖の糖組成は A:  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ , B:  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ , C:  $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_2$ , D:  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ , E:  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , F:  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  であることが分かった。次に、major な糖鎖 E と F の構造解析を行った。糖鎖 E と F を薄層クロマトグラフィから抽出することにより、単離し、おのおのの糖鎖について、メチル化分析、 $\alpha$ マンノシダーゼ消化、 $^1\text{H-NMR}$ 分析を行い、構造を決定した。糖鎖 E の構造は  $\text{Man}\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}\alpha 1\rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}\alpha 1\rightarrow 3)\text{Man}\alpha 1\rightarrow 6(\text{Man}\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}\alpha 1\rightarrow 3)\text{Man}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}$  であることが分かった。また、糖鎖 F の構造は糖鎖 E の  $(\text{Man}\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}\alpha 1\rightarrow 2\text{Man}\alpha 1\rightarrow 3)$  という構造の非還元末端にグルコースが  $\alpha 1\rightarrow 3$  結合していることを除いては糖鎖 E と全く同じ構造であった。さらに、リポホリンのサブユニットである Heavy chain (mol wt. 250,000) には 6 種すべての糖鎖が存在するのに対し、Light chain (mol wt. 85,000) には 3 種の糖鎖のみしか存在しないことが明らかにされた。

#### REFERENCES

1. CHINO H. (1985) Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin. In Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology (Ed. by KERKUT G.A. and GILBERT L.I.), pp.115-134. Pergamon Press.
2. CHINO H. and KITAZAWA K. (1981) Diacylglycerol-carrying lipoprotein of the locust and some insects. J. Lipid Res. 22, 1042-1052
3. TAKAHASHI N. (1977) Demonstration of an amidase acting on glycopeptides. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76, 1194-1201.
4. TAKAHASHI N. and NISIBE H. (1981) Almond glycopeptidase acting on asparatylglycosylamine linkages. Multiplicity and substrate specificity. Biochim. Biophys. Acta. 657, 457-467.
5. SWEERY C.C., BENTLEY R., MAKITA M. and WELLS W.W. (1963) Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars and related substances. J. Am. Chem. Soc. 85, 2497-2507.
6. TAKAHASHI N. (1985) Almond glycopeptidase (in Japanese). Protein, Nucleic acid, Enzyme, Tokyo 29, 134-137.
7. FRANCOIS C., MARSHALL R.D. and NEUBERGER A. (1962) Carbohydrates in protein: The determination of mannose

- in Hen's-egg albumin by radioisotope dilution. Biochem. J. 83, 335-341.
8. HOLMES E.W. and O'BRIEN J.S. (1979) Separation of glycoprotein-derived oligosaccharides by thin-layer chromatography. Anal. Biochem. 93, 167-170.
  9. SMITH R.L. and GILKERSON E. (1979) Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. Anal. Biochem. 98, 478-480.
  10. CICANU I. and KEREK F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydr. Res. 131, 209-217.
  11. STELLNER K., SAITO H. and HAKOMORI S. (1973) Determination of aminosugar linkages in glycolipids by methylation: aminosugar linkages of ceramide pentasaccharides of rabbit erythrocytes and Fossman antigen. Arch. Biochem. Biophys. 155, 464-472.
  12. BYRD J. C., TARENTINO A. L., MALEY F., ATKINSON P. H. and TRIMBLE R. B. (1982) Glycoprotein synthesis in yeast. J. Biol. Chem. 257, 14657-14666.
  13. TSAI P. K., BALLOU L., ESMON R., SCHEKMAN R. and BALLOU C. E. (1984) Isolation of glucose-containing high-mannose glycoprotein core oligosaccharide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81, 6340-6343.
  14. VIEGENTHART J. F. G., DORLAND L., and HALBERK H. VAN (1983) High resolution, <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance

- spectroscopy as a tool in the structural analysis of carbohydrates related to glycoproteins. in Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, (Tipson, R.S., and Horton, D., eds) Vol.41, pp 209-374, Academic Press, New York.
15. SHAPIRO J.P., KEIN P.S. and LOW J.H. (1984) Structural studies on lipophorin, an insect lipoprotein. J. Biol. Chem. 259, 3680-3685.
  16. NISHIGAKI M., YAMASHITA K., MATSUDA I., ARASHIMA S. and KOBATA A. (1978) Urinary oligosaccharides of fucosidosis: Evidence of the occurrence of X-antigenic determinant in serum-type sugar chains of glycoproteins. J. Biochem. 84, 823-834.
  17. TAKAHASHI N., ISHIHARA H., TEJIMA S., OIKE Y., KIMATA K., SHINOMURA T. and SUZUKI S. (1985) The core molecule from type H proteoglycan: Release of mannose-containing oligosaccharides by digestion with N-oligosaccharide glycopeptidase. Biochem. J. 229, 561-571.
  18. TAI T., YAMASHITA K., OGATA-ARAKAWA M., KOIDE N., MURAMATSU T., IWASHITA S., INOUE I. and KOBATA A. (1975) Structural studies of two ovalbumin glycopeptides in relation to the endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase specificity. J. Biol. Chem. 250, 8569-8575.
  19. TAI T., YAMASHITA K., ITO S. and KOBATA A. (1977)

- Structures of the carbohydrate moiety of ovalbumin glycopeptide III and difference in specificity of endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidases C<sub>II</sub> and H. J. Biol. Chem. 252, 6687-6694.
20. ISHIHARA H., TAKAHASHI N., ITO J., TAKEUCHI E. and TEJIMA S. (1981) Either high mannose-type or hybrid-type oligosaccharide is linked to the same asparagine residue in ovalbumin. Biochim. Biophys. Acta. 669, 216-221.
  21. YAMASHITA K., TACHIBANA Y. and KOBATA A. (1978) The structures of the galactose-containing sugar chains of ovalbumin. J. Biol. Chem. 253, 3862-3869.
  22. HUBBARD S.C. and IVATT R.J. (1981) Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. Ann. Rev. Biochem. 50, 555-583.
  23. BERMAN E. and ALLERHAND A. (1981) Kinetic of  $\alpha$ -mannosidase action on various  $\alpha$ -D-mannopyranosyl linkages in hen ovalbumin glycopeptides as monitored by carbon 13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. J. Biol. Chem. 256, 6657-6662.
  24. TANIGUCHI T., MIZUOCHI T., BANNO Y., NOZAWA Y. and KOBATA A. (1985) Carbohydrates of lysosomal enzymes secreted by Tetrahymena pyriformis. J. Biol. Chem. 260, 13941-13946.
  25. OSIR E. O., ANDERSON D. R., GRIMES W. J. and LAW J. H. (1986) Studies on the carbohydrate moiety of

vitellogenin from the tobacco hornworm, Manduca sexta  
Insect Biochem. 16, 471-478.

26. ENDO T., HOSHI M., ENDO S., ARATA Y. and KOBATA A.  
(1987) Structures of the sugar chains of a major  
glycoprotein present in the egg jelly coat of a  
starfish, Asterias amurensis. Arch. Biochem. Biophys.  
252, 105-112. 主論文 第二節

アディポキネティックホルモンの  
作用により生成される低密度リポタン  
の物理化学的性質に関する研究

## 主論文 第二部

### アディポキネティックホルモンの作用により生成される低密度リポホリンの物理化学的性質に関する研究

## 序論

昆虫血液中で最も主要なタンパク質であるリポホリンは再利用可能なシャトルとしていろいろな脂質（ジグリセリド、炭化水素、コレステロール、カロチノイド）を組織間での輸送に与っているきわめてユニークなタンパク質である(1)。バッタのリポホリンは通常、高密度リポホリン(HDLp)として血液中に存在し、分子量25万の重鎖(apoLp-I)と8.5万の軽鎖(apoLp-II)から構成されており、それぞれに糖鎖が結合している。リポホリンの総重量の約40%が脂質であり、主要な構成成分はジグリセリド、炭化水素、コレステロール、リン脂質である。また、分子量は約60万で、直径は約150Åのほぼ球形タンパク質である。

バッタでは、長距離飛行の際、側心体からアディポキネティックホルモン(AKH)が分泌されることが知られているが(2)、このホルモンをバッタに注射すると、密度が1.12g/mlだったHDLpは、密度が1.065g/mlの低密度リポホリン(LDLp)にかわる。この密度の変化は脂肪体からのリポホリンによるジグリセリドのを積み込みがAKHの作用によって促進されることによって起こる(3)。また、HDLpからLDLpへの変換に伴って、第三のアポタンパク質である分子量約2万のアポリポホリン-III(apoLp-III)が新たにリポホリンに結合することが明らかになっている。さらに、LDLp分子を電顕で観察すると、HDLp分子に比べて明かにサイズが大きく、しかも不均一になることを茅野らは前に報告している(3)。

AKHによって引き起こされるこれらのリポホリンの構造変化は完全に可逆的である。最近 *in vitro* で、精製したHDLpと apoLp-IIIとを、切り出された脂肪体、

AKHの存在下でインキュベートすることにより、HDLp→LDLpへの変換を完全に再現することができるようになった(4)。しかし、apoLp-IIIがリポホリン1分子に対して何分子結合しているのか、そしてなぜLDLp分子はサイズが不均一になるのかなどまだ基本的な問題が残っている。事実、茅野らはリポホリン1



## 材料と方法

### 【動物および採血】

第一部に記されたものと同じ

### 【試薬】

バツタ AKHは Peninsula Laboratories (San Carlos, CA) より購入した。モノステアリンは Sigma社より購入した。使用した試薬はすべて特級試薬を使用した。

### 【リポホリンの精製、分画】

flushing-out法によりとった血液を血球を取り除くため、8,000g、4°Cで5分間遠心した。HDLpは restingのバツタより採血されたサンプルを KBr密度勾配遠心法にかけ、分離した(3, 7)。その後、とくに遊離 apoLp-III のような不純物を取り除くため、再び同じ手法により HDLpを密度勾配遠心法にかけた。LDLpは一匹あたり 20pmoleの AKHを注射したバツタから90分後に採血し、HDLpのときと同様の方法で分離した。密度勾配遠心後、遠心管の上から 0.3mlずつ分画し、それぞれの画分の455nm (リポホリンに含まれるカロチノイドによる吸光)における吸光度を測定した。このリポホリンの各画分のタンパク質量、ジグリセリド量、apoLp-III 量を定量し、さらにそれぞれの画分の電顕像も観察された。

### 【apoLp-III と脱脂したリポホリンの調製】

apoLp-III は基本的に茅野と矢沢によって開発された方法に従って精製された(5)。Ultragel ACA-44 カラムにかける操作を二度行い、17K タンパク質の

ような不純物を取り除いた(5)。二度目にゲル濾過された apoLp-III は蒸留水に対して何度か透析され塩類を完全に除き、その後、凍結乾燥された。リポホリンの脱脂の操作は第一部に記されたものと同じである。精製された apoLp-III と脱脂された HDLp はタンパク質量を定量する際のスタンダードとして用いられた。

#### 【タンパク質量の定量】

タンパク質量の定量は Lowry らの方法(8) にしたがって行われた。LDLp に結合する apoLp-III の量を正確に算出するためには、LDLp の正確な絶対量を求める必要がある。そのためにはスタンダードのタンパク質として一般的に用いられるウシ血清アルブミンのかわりに、精製された apoLp-III と脱脂された HDLp を使用する必要があった。これにより、LDLp に結合している apoLp-III 量が正確に計算される。さらに付け加えると、脱脂された HDLp と精製された apoLp-III のスタンダードカーブは、特に低濃度のところではほとんど差がなかった。このことは LDLp に結合している正確な apoLp-III 量を計算するにあたってひじょうに有利なことであった。

#### 【ジグリセリドの定量】

既知の量のモノステアリンをそれぞれのリポホリン画分に内部標準として加え、その後、イソプロパノール : ヘプタン 4:1(v/v) で脂質を抽出し(9)、Ackman(10) と茅野ら(4) の方法にしたがって、イアトロスキャナー (モデル Th-10) により分析した。イアトロスキャナーはガラス棒に珪酸を焼結させたロッドを薄層クロマトグラフィとして用い、Flame ionization detector(FID) で検出を行う機器であり、微量な試料から精度の高い測定を行うことができる。また、ロッドは chromarod S-III を用い、これにサンプルをアプライしたのち、

ベンゼン：メタノール 60:1.5(v/v) で30分間展開した。

#### 【電気泳動と apoLp-IIIの結合量の測定】

リポホリンの Sodium dodecyl sulfate (SDS) - ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) は Laemmli らの方法 (11) に従って行われた。ゲルはクマジーブルーで染色された。染色されたゲルはクロマトグラフィックスキャナー (Shimadzu TLC scanner CS-900) を使ってスキャンされた。

LDLpへの apoLp-IIIの結合量は以下の手順にしたがって求められた。LDLp (脱脂したHDLpまたは精製した apoLp-IIIをスタンダードとして用いた Lowry法でタンパク質量を測定した) を SDS-PAGEにかけた。また、いろいろな量の apoLp-IIIは同じゲルにスタンダードカーブを得るためにアプライされた。CBBによりゲルを染色したのち、ゲルをスキャンして apoLp-IIIのスタンダードカーブより LDLpに含まれる apoLp-III量を定量した。重鎖 (apoLp-I)、軽鎖 (apoLp-II) および、apoLp-IIIの分子量はそれぞれ250K、85K、20Kであることより、LDLpに結合している apoLp-III分子の数 (x) は以下の式に従って算出することができる。

$$\frac{B}{A - B} = \frac{20x}{250 + 85}$$

AはゲルにアプライされたLDLpのタンパク質量、Bはスタンダードカーブより求められた apoLp-IIIのタンパク質量である。これより、LDLp一分子に対して何分子の apoLp-IIIが結合しているのかが計算された。

#### 【電顕】

密度勾配遠心法により分離、分画されたリポホリンを昆虫リンガー液 (120mM NaCl, 15mM KCl, 4mM CaCl<sub>2</sub>, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM piperazine-N,N'-bis (2

-ethanesulfonic acid) (PIPES), pH 7.0) に数回透析した。サンプルを  $50 \mu\text{g}$  protein/ml に調製し、支持膜上で1%酢酸ウランによりネガティブ染色し、JOEL JEM-1200EX 電子顕微鏡により観察した。カーボンを蒸着した支持膜は使用する直前に親水処理を行った。

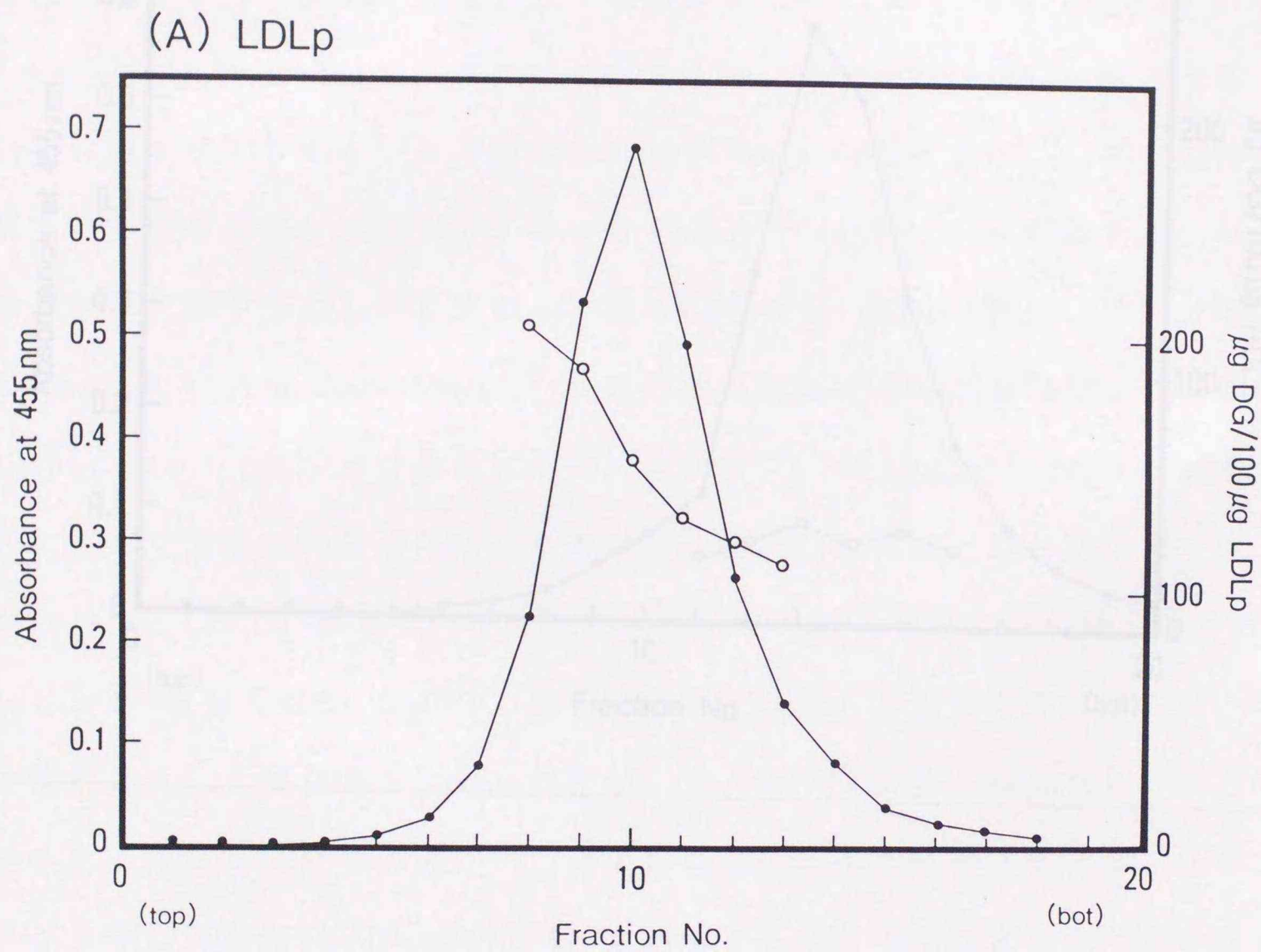
## 結果と考察

本研究以前に、従来行われてきた実験では、LDLpは密度勾配遠心法にかけたのち、その黄色いバンドの濃い部分全体をパスツールピペットですいとり、それをサンプルとして apoLp-IIIの定量、ジグリセリドの定量、そして電顕像を観察していた。しかし、この方法で調製したLDLpのサンプルは若干異なる密度をもつLDLpの混合物であるという可能性は否定できない。そこで、今回の実験では AKHを注射して90分後に採血したサンプルを KBr密度勾配遠心法にかけ、その後、上から0.3 mlずつ非常にせまいレンジで分画して、それぞれの画分について apoLp-III結合量、ジアシルグリセリド量を定量し、さらに電顕像を観察した。

### LDLpとHDLpのジグリセリド含有量

Fig. 1 はLDLp(A) とHDLp(B) の密度勾配遠心のプロフィールと各画分に含まれるジグリセリドの量をあらわしている。LDLpのジグリセリド含有量は画分の密度が低くなるに従い増加する ( $116 \mu\text{g}/100 \mu\text{g protein} \sim 209 \mu\text{g}/100 \mu\text{g protein}$ )。それに対して、HDLpのジグリセリド含有量は画分の密度にかかわらずほぼ一定である ( $33 \mu\text{g}/100 \mu\text{g protein}$ )。

Fig. 1 はまた、LDLpとHDLpのピークのするどさがほぼ同じであることを示している。このことより、観察されたLDLp画分間におけるこの程度のジグリセリド含有量の違いではピークのするどさはほとんど影響されないことを示している。事実、さらに長時間超遠心を行っても(計18時間)、わずかにLDLpのピークがブロードになり、わずかに低密度側へシフトするが、ピークのするどさにはほとんど差はみられない。



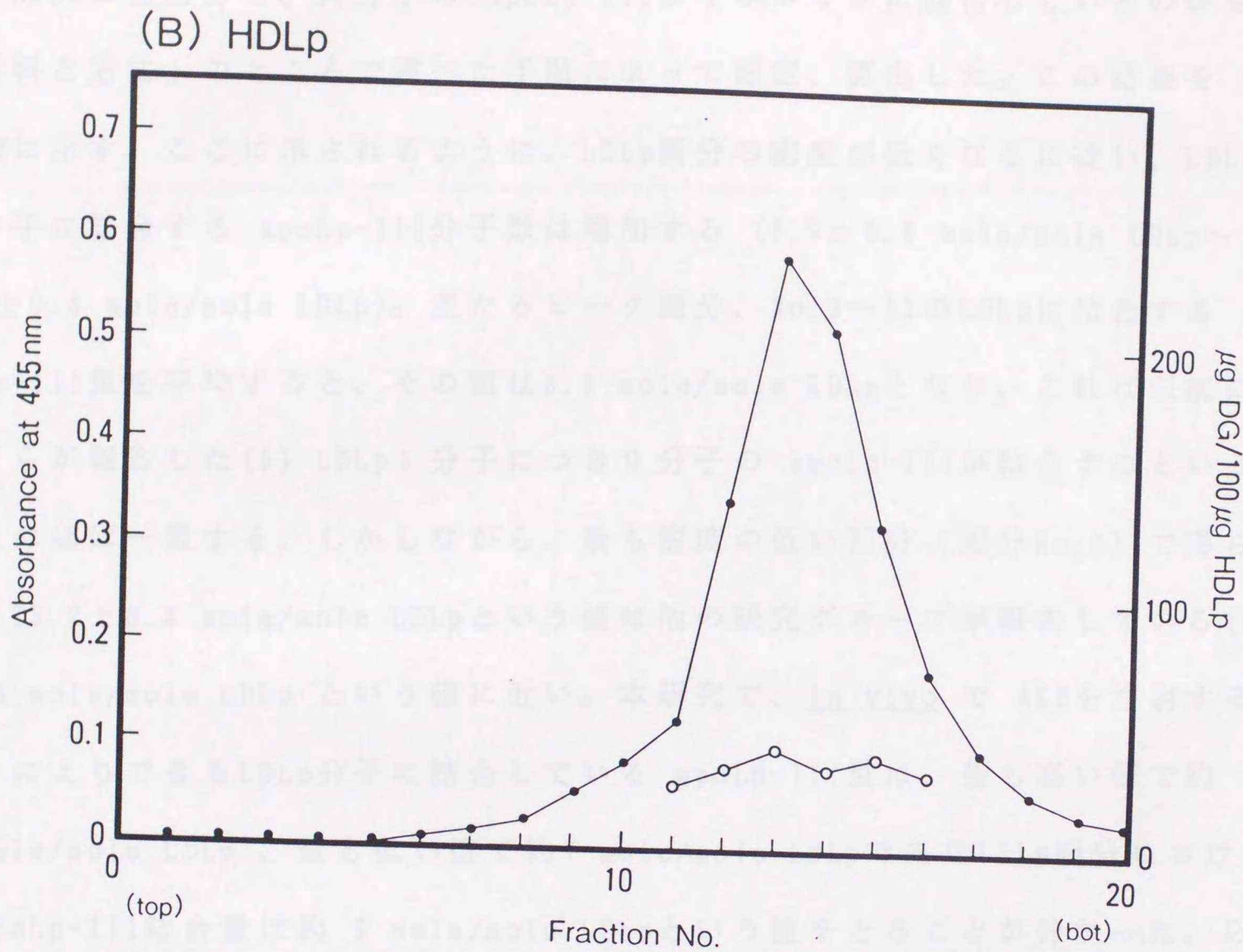


Fig. 1 低密度リポホリン(LDLp)と高密度リポホリン(HDLp)の密度勾配遠心のプロフィールと各画分に含まれるジグリセリド量

AKH(20 pmole)を注射したものとししないものより採血し、KBr密度勾配遠心を二度行った。遠心後、上から0.3mlずつ分画し、リポホリンをカロチノイドの黄色い色によるAbs<sub>455</sub>でモニターした。各画分でタンパク量とジグリセリド量を定量した(3回の実験)。 A: LDLp; B: HDLp; ●, 遠心して分画し、Abs<sub>455</sub>でモニターした一例; ○, ジグリセリド量

### LDLpへの apoLp-IIIの結合量

LDLpの各画分で、何分子の apoLp-IIIがリポホリンに結合しているのかを「材料と方法」のところで述べた手順によって測定、算出した。この結果を Fig. 2に示す。ここに示されるように、LDLp画分の密度が低くなるに従い、LDLp1分子に結合する apoLp-III分子数は増加する ( $6.9 \pm 0.6$  mole/mole LDLp  $\sim$   $13.2 \pm 0.4$  mole/mole LDLp)。主たるピーク画分、No. 9~11のLDLpに結合する apoLp-III量を平均すると、その値は  $8.9$  mole/mole LDLpとなり、これは以前に茅野らが報告した(5) LDLp1分子につき9分子の apoLp-IIIが結合するという結果にほぼ一致する。しかしながら、最も密度の低い画分(画分No. 8)で得られた  $13.2 \pm 0.4$  mole/mole LDLpという値は他の研究グループが報告している(6)  $14$  mole/mole LDLp という値に近い。本研究で、*in vivo* で AKHを注射することによりできるLDLp分子に結合している apoLp-III量は、最も高い値で約  $14$  mole/mole LDLp、最も低い値で約  $7$  mole/mole LDLpで主なLDLp画分における apoLp-III結合量は約  $9$  mole/mole LDLpという値をとることが分かった。以上の結果より、上限があると思われるが、リポホリンに積み込まれているジグリセリドと結合している apoLp-IIIとの間には、ほぼ比例関係があり、リポホリン1分子につき何分子の apoLp-IIIが結合するかという従来論争はあまり意味がないように思われる。

Table 1 は上記のLDLp画分における apoLp-III結合量とジグリセリド量との関係をさらに詳しく示している。LDLp画分の密度低下にともなったジグリセリド含有量の増加と apoLp-III結合量の増加はほぼ比例関係にあることが分かる。1分子の apoLp-III1がLDLpに結合する毎に約130~150分子のジグリセリドが結合している。Wellsらはタバコスズメガにおいて AKHを注射して得られたLDLpでは1分子の apoLp-IIIに対して約70分子のジグリセリドが結合すると報告しているが(12)(彼らのデータより計算した)、バツタで得られた今回

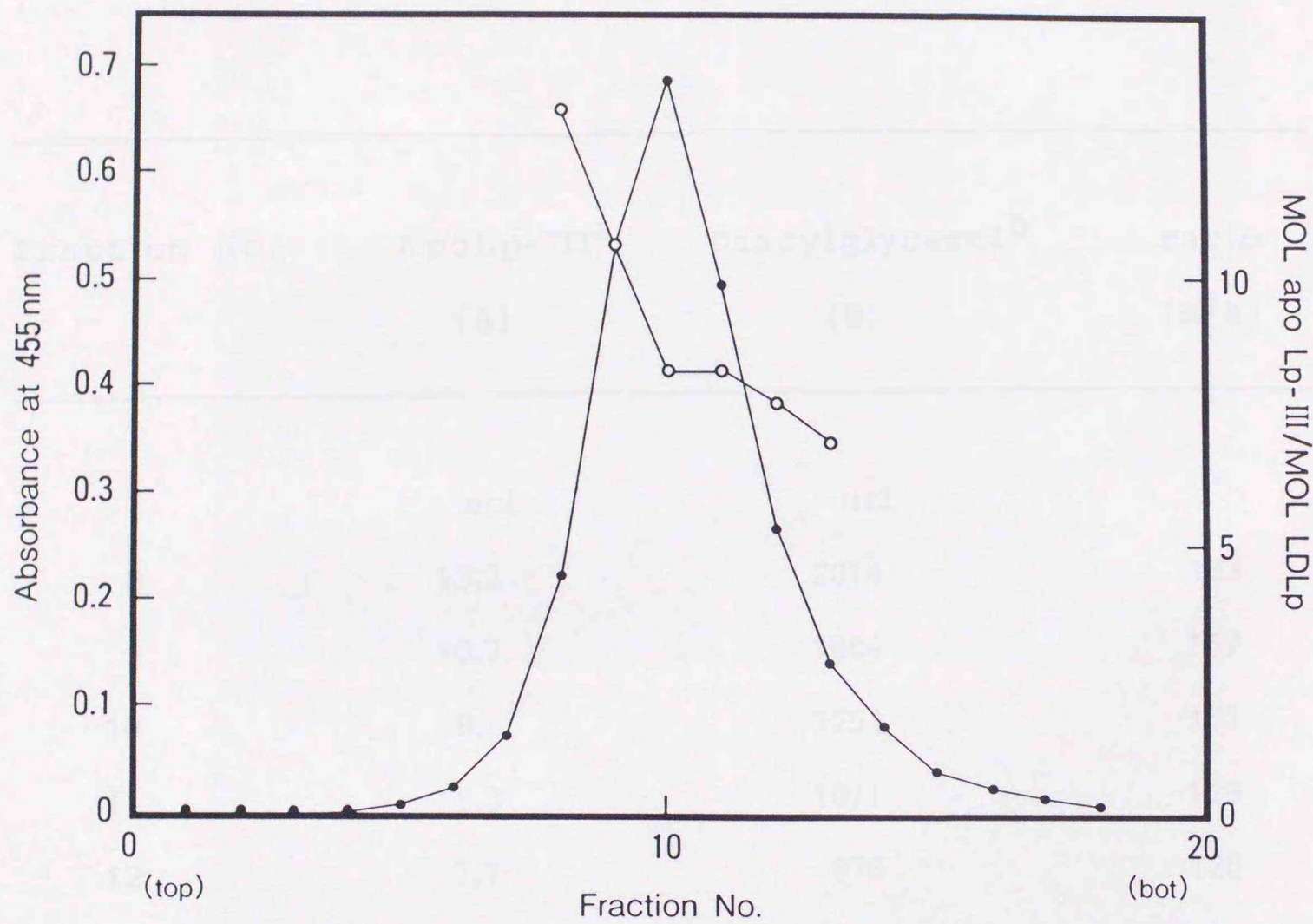


Fig. 2 低密度リポホリン(LDLp)の密度勾配遠心のプロフィールと各画分におけるLDLpに対する apoLp-IIIの結合量

LDLpに対する apoLp-IIIの結合量(モル比)は茅野と矢沢が報告した方法(5)にしたがって計算された。●, 遠心して分画し、Abs<sub>455</sub>でモニターしたLDLpのプロフィール; ○, LDLpに対する apoLp-IIIのモル比(7回の実験)

Table 1) LDLpの各画分における apoLp-IIIとジグリセリド量

Fraction No.	ApoLp-III <sup>a</sup> (A)	Diacylglycerol <sup>b</sup> (B)	ratio (B/A)
	mol	mol	
8	13.2	2014	153
9	10.7	1684	157
10	8.3	1254	151
11	8.3	1071	129
12	7.7	976	128
13	6.9	880	127

<sup>a</sup>1分子のLDLpに結合している apoLp-IIIの量 (モル)

<sup>b</sup>1分子のLDLpに結合しているジグリセリドの量 (モル)

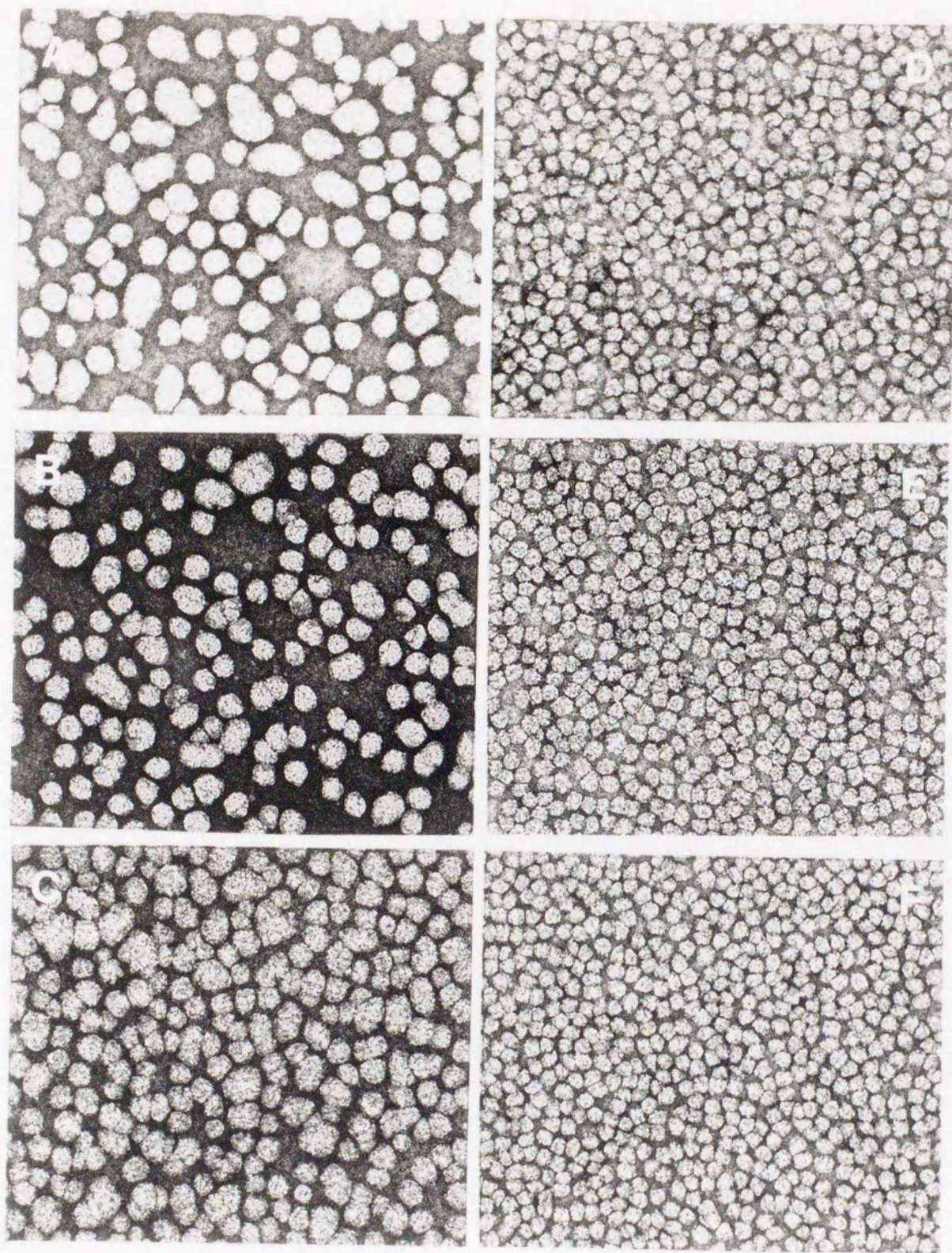


Fig. 3 リポホリンparticleの電子顕微鏡写真

3つの異なる画分におけるLDLpとHDLpは酢酸ウランによりネガティブ染色された(x150,000)。A, LDLp(Fig. 1, Aの画分 No. 8); B, LDLp(Fig. 1, Aの画分 No. 10); C, LDLp(Fig. 1, Aの画分 No. 13); D, HDLp(Fig. 1, Bの画分 No. 11); E, HDLp(Fig. 1, Bの画分 No. 13); F, HDLp(Fig. 1, Bの画分 No. 15)

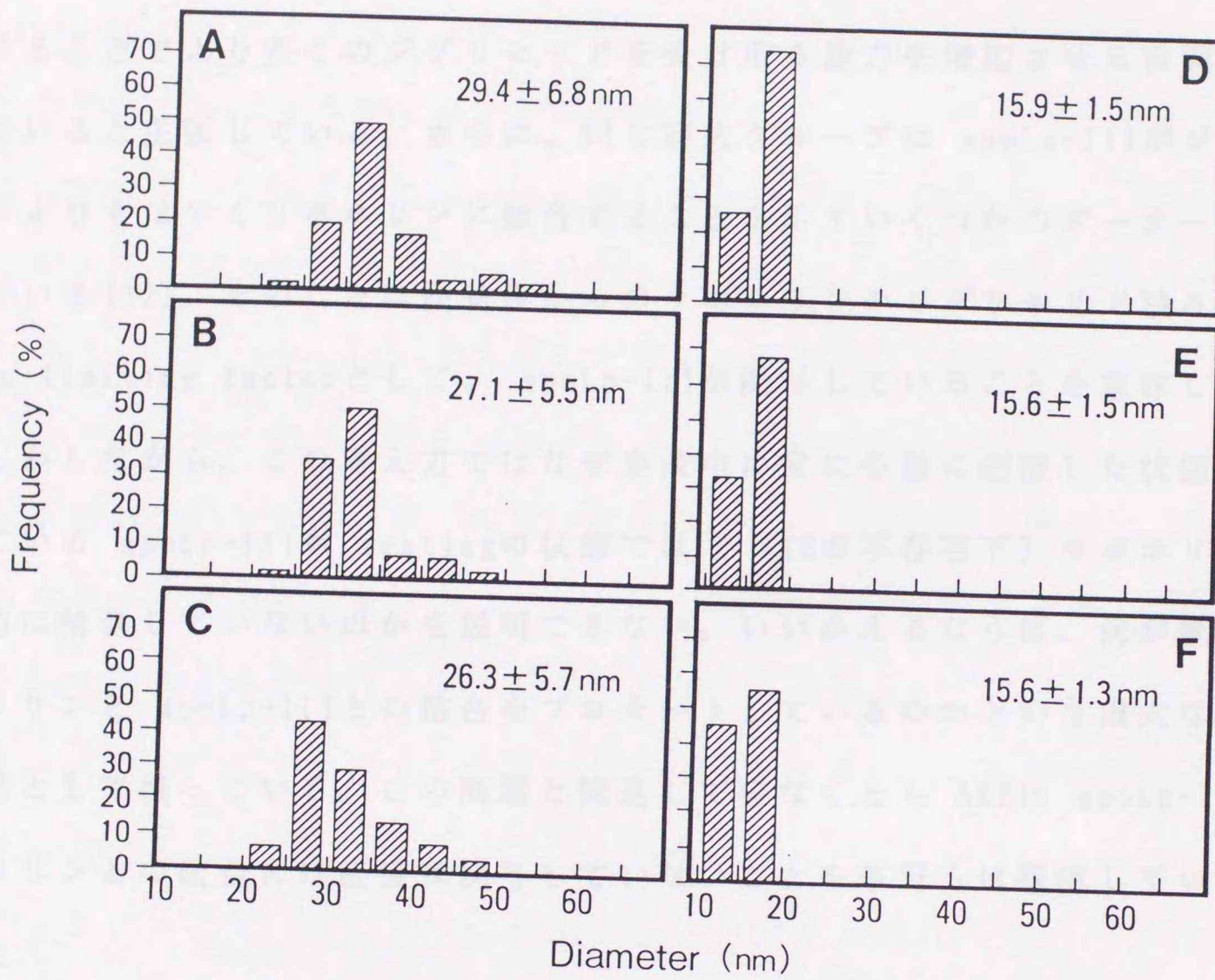


Fig. 4 LDLpとHDLpの直径

値は20万倍の電顕写真のある決められた範囲における 240 particlesのサイズ (平均±スタンダードエラー) をあらわす。A~Fはそれぞれ Fig. 3のA~Fに相当する

の値は彼らの値と比べるとかなり大きい。

apoLp-IIIの物理的な役割はまだ完全には明らかにされていないが、Kawooyaらは(13)、タバコスズメガの apoLp-IIIはlipid-water interfaceの増加を安定させることでより多くのジグリセリドを受け取る能力を増加させる役割を果たしていると主張している。さらに、同じ研究グループは apoLp-IIIがジグリセリドよりもはやくリポホリンに結合することを示すいくつかのデータを提示している(12)。そのことは脂肪体からのリポホリンのジグリセリド積み込みのrate-limiting factorとして、apoLp-IIIが関与していることを意味している。しかしながら、この考え方ではなぜ血液中に常に多量に遊離した状態で存在している apoLp-IIIが restingの状態では (AKHの不存在下) リポホリンに自動的に結合していないのかを説明できない。いいかえるならば、何が最初にリポホリンと apoLp-IIIとの結合をプロモートしているのかという重大な疑問が依然として残っている。この問題と関連して少なくとも AKHは apoLp-IIIとリポホリンとの結合には直接は関与していないことを茅野らは確認している(4, 14)。

#### LDLpとHDLpの電顕像

LDLp分画の中で、密度のより低い画分、中間の画分、より高い画分中に含まれるLDLp particleを酢酸ウランによりネガティブ染色したのち、電顕により観察した。それと比較対照するため、HDLp画分も同様に観察した。Fig. 3にその結果を示す。これより、HDLp particleが全ての画分においてparticleのサイズが均一なのに対して(Fig. 3, D, E, F)、LDLp particleのサイズはすべての画分において不均一であった(Fig. 3, A, B, C)。この結果をヒストグラムにしたのが Fig. 4である。また、LDLp particleの平均直径は密度のより低い画分、中間、より高い画分においてそれぞれ $29.4 \pm 6.8$  nm、 $27.1 \pm 5.5$  nm、 $26.3$

± 5.7 nmであった。このことは密度が低くなるにつれてわずかにLDLpの大きなparticleの割合が増加することを示している。一方、HDLpの平均直径はそれぞれの画分で15.9±1.5 nm、15.6±1.5 nm、15.6±1.3 nmであった。このことはHDLp particleのサイズは画分にかかわらず一定であることを示している。今回の実験では、ひじょうに狭いレンジで分画し、従って、それぞれの画分においては密度が均一であると考えられるにもかかわらず、LDLp particleのサイズは不均一であった。このことより、LDLp particleのサイズの不均一さは、密度の異なるLDLp particleが混在した結果であるという可能性は完全に否定された。すなわち、LDLpの密度の均一性と、そのサイズの不均一性との間には明かな矛盾が存在することが、確実となった。LDLpの性質を理解する上で、この矛盾を理論的に説明することは、きわめて重要なことと考えられる。以下は、この矛盾を解決するための一連の試みである。

まず、次に示す式を用いて、申請者はHDLpに対するLDLpの体積比の理論値を導きだした。

$$\frac{V_{LDLp}}{V_{HDLp}} = \frac{(600,000 + x + y) / z}{600,000 / 1.12}$$

VはLDLpまたはHDLpの体積をあらわす。xは増加したジグリセリドの量 (mol wt./mole LDLp) を、yは apoLp-IIIの量 (mol wt./mole LDLp) を、zはLDLpの密度をそれぞれあらわす。600,000はHDLpの分子量で 1.12はHDLpの密度 (g/ml) である。

申請者は実験によって得られたLDLp画分のそれぞれの値を x, y, zに代入し、HDLpに対するLDLpの体積比を計算した。つづいて、HDLpに対するLDLpの直径比 (直径  $V^{1/3}$ ) を計算したところ、密度のより低い画分、中間、より高い画分においてそれぞれ、1.36、1.23、1.17という結果が得られた。HDLp particle

の平均直径を15.7 nm とすると、3つの画分の直径の理論値はそれぞれ15.7 nm  $\times$  1.36 = 21.4 nm、15.7 nm  $\times$  1.23 = 19.4 nm、15.7 nm  $\times$  1.17 = 18.4 nm となった。ただ単にLDLp particle のサイズが積み込まれたジグリセリド量の増加と結合した apoLp-III量のみを反映しているのであれば、理論値と電顕より得られた実験値は多少の誤差はあっても一致するはずである。しかしながら、ほとんどのLDLp particle のサイズはどの画分においても理論値を大きく越えている。実際、いくつかのLDLp particle はサイズが45 nmを越えるものも観察された。もしすでに、茅野らが指摘したように、いろいろなサイズをもつLDLp particle がいろいろな数のLDLp分子がfusionした結果の産物であると仮定するならば、LDLp particle の密度の均一さとサイズの不均一さという矛盾をうまく説明できる。つまり、LDLp分子のfusionによってできたLDLp particle はそのサイズにかかわらず、脂質とタンパク質との割合が一定だからである。つまり、密度は等しく、一定であるはずである。実際、電顕では、このようなfusionの過程と考えられる楕円型の像が観察されている(Fig. 3, A, B, C)。さらに密度の低い画分においては、すなわち、apoLp-IIIとジグリセリドを多くもつLDLp分子では分子間でfuseする傾向がより大きいといえよう。申請者は、このようなバッチのLDLp分子のサイズの不均一さはLDLpの最大の特徴の一つであり、LDLpの物理化学的性質を理解する上で、最も重要なポイントであると考えられる。しかも、LDLpに含まれるジグリセリドが筋肉などで消費されると、再び、fusionしたリポホリン分子は互いに解離し、元のサイズに戻ると考えなければならず、fusion $\leftrightarrow$ dissociationの可逆反応が、どのようにして起こるのか、きわめて興味ある問題を提起している。しかしながら、現在のところ、その生理的意味やfusionメカニズムについては分かっていない。

## 要旨

リポホリンは昆虫血液中で通常、高密度リポホリン(HDLp)として存在するが、アディポキネティックホルモン(AKH)が脂肪体に作用することにより、ジグリセリドを数倍多く積み込んだ低密度リポホリン(LDLp)となることが知られている。このとき、リポホリンには第三の血液タンパク質であるアポ-III(apoLp-III)を結合することが知られている。さらに、HDLp particlesのサイズが均一なのに対して、LDLp particlesのサイズは非常に不均一であることが電顕により観察されている。そこで、この研究は、いくつかの残されている基本的な問題、たとえば、apoLp-IIIはリポホリン1分子につき何分子結合しているのか、また、LDLp particlesはなぜサイズが不均一なのか、を明らかにするために行われた。

リポホリンは密度勾配超遠心後に細かく分画され、そのそれぞれの画分におけるジグリセリド量、apoLp-III量が定量された。その結果、LDLpのジグリセリド量は密度が低い画分になるほど増加していることが分かった(一番密度の高い画分で $116 \mu\text{g}/100 \mu\text{g protein}$  ~ 一番密度の低い画分で $209 \mu\text{g}/100 \mu\text{g protein}$ )。それに対して、HDLpではどの画分においてもジグリセリド量に差はなかった( $33 \mu\text{g}/100 \mu\text{g protein}$ )。また、おのこのLDLp画分におけるapoLp-III量も、密度が低い画分になるほど増加していることが分かった( $6.9 \text{ mol/mol LDLp} \sim 13.2 \text{ mol/mol LDLp}$ )。一方、LDLpとHDLpの、密度の一番低い画分、中間の画分、一番高い画分の電顕像を観察すると、HDLp particlesはどの画分でもサイズが均一なのに対し( $15.9 \pm 1.5 \text{ nm}$ ,  $15.6 \pm 1.5 \text{ nm}$ ,  $15.6 \pm 1.5 \text{ nm}$ )、LDLp particlesではどの画分においてもサイズが不均一であった( $29.4 \pm 6.8 \text{ nm}$ ,  $27.1 \pm 5.5 \text{ nm}$ ,  $26.3 \pm 5.7 \text{ nm}$ )。これらのデータを解析することにより、LDLp particlesのサイズの不均一さは密度の不均一さを反映しているのではな

く、密度の均一なLDLp particles同士の intermolecular fusionの結果である  
という仮説が強く支持された。

REFERENCES

1. FAHNEY, R. 1965. Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipoprotein. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. B. A. Karlam, and L. I. Gilbert, editors. Pergamon Press, Oxford, Vol. 10: 115-134.
2. HAYES, E. J., and D. J. CANEY. 1969. Control of hemolymph lipid concentration during locust flight: an adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. *J. Insect Physiol.* 14: 177-199.
3. CHINO, S., D. E. H. DOWNER, and K. YAMAHARA. 1966. Effect of adipokinetic hormone on the structure and properties of lipoprotein in locusts. *J. Lipid Res.* 7: 21-29.
4. CHINO, S., T. MIYAMOTO, and K. YAMAHARA. 1969. In vitro study of the action of adipokinetic hormone in locusts. *J. Lipid Res.* 10: 571-576.
5. CHINO, S., and M. YAMAZAKI. 1967. Apolipoprotein III in locusts: purification and characterization. *J. Lipid Res.* 8: 377-387.
6. VAN DER HOEFT, D. J., R. D. HEAN, M. G. VAN DOORN, J. H. LAW, and A. W. BERTHIAUME. 1968. Insect lipoprotein hybrid helps to define the role of apolipoprotein III. *J. Biol. Chem.* 243: 2017-2021.
7. SHAPIRO, J. P., P. S. ESTEY, and J. E. LAW. 1961.

#### REFERENCE

1. CHINO, H. 1985. Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. G. A. Kerkut, and L. I. Gilbert, editors. Pergamon Press, Oxford. Vol. 10: 115-134.
2. MAYER, R. J., and D. J. CANDY. 1969. Control of hemolymph lipid concentration during locust flight: an adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. J. Insect physiol. 114: 177-190.
3. CHINO, H., R. G. H. DOWNER, and K. TAKAHASHI. 1986. Effect of adipokinetic hormone on the structure and properties of lipophorin in locusts. J. Lipid Res. 27: 21-29.
4. CHINO, H., Y. KIYOMOTO, and K. TAKAHASHI. 1989. In vitro study of the action of adipokinetic hormone in locusts. J. Lipid Res. 30: 571-578.
5. CHINO, H., and M. YAZAWA. 1986. Apolipophorin III in locusts: purification and characterization. J. Lipid Res. 27: 377-385.
6. VAN DER HORST, D. J., R. O. RYAN, M. C. VAN DOORN, J. H. LAW, and A. M. BEENAKKERS. 1988. An insect lipophorin hybrid helps to define the role of apolipophorin III. J. Biol.Chem. 263: 2027-2033.
7. SHAPIRO, J. P., P. S. KEIM, and J. H. LAW. 1984.

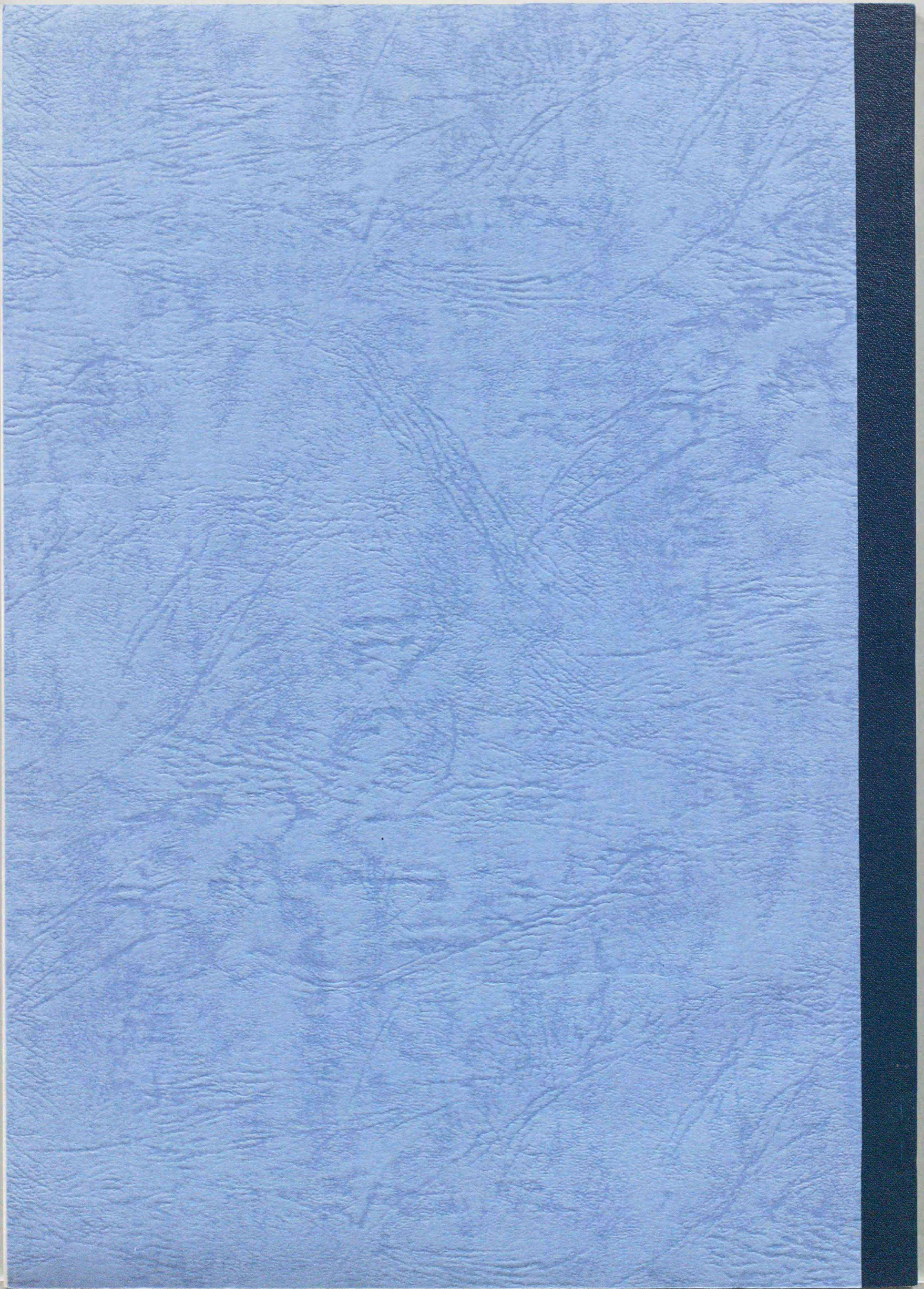
- Structural studies on lipophorin, an insect lipoprotein. J. Biol. Chem. 259: 3680-3685.
8. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
  9. CHINO, H., and L. I. GILBERT. 1965. Lipid release and transport in insects. Biochim. Biophys. Acta. 98: 94-110.
  10. ACKMAN, R. G. 1981. Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods. Methods Enzymol. 72: 205-252.
  11. LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature 227: 680-685.
  12. WELLS, M. A., R. O. RYAN, J. K. KAWOOYA, and J. H. LAW. 1987. The role of apolipophorin III in in vivo lipoprotein interconversions in adult Manduca sexta. J. Biol. Chem. 262: 4172-4176.
  13. KAWOOYA, J. K., S. C. MEREDITH, M. A. WELLS, F. J. KEZDY, and J. H. LAW. 1986. Physical and surface properties of insect Apolipophorin III. J. Biol. Chem. 261: 13588-13591.
  14. LUM, P. Y., and H. CHINO. 1990. The primary role of adipokinetic hormone in the formation of low density lipophorin in locusts. J. Lipid Res. in press.

参考副論文

1. Asparagine-linked oligosaccharides of locust lipophorin.  
ERIKO NAGAO, NORIKO TAKAHASHI and HARUO CHINO  
Insect Biochemistry 17, 531-538. (1987)
2. Structural study of the asparagine-linked oligosaccharides of lipophorin in locusts.  
ERIKO NAGAO and HARUO CHINO  
Journal of Lipid Reseach 28, 450-454. (1987)
3. Further characterization of locust low density lipophorin induced by adipokinetic hormone.  
ERIKO NAGAO and HARUO CHINO  
Journal of Lipid Reseach in press.
4. N-Terminal region (domain 1) of calmodulin is the low affinity site for  $Ca^{2+}$ . A  $^{13}C$ -NMR study of S-Cyano-calmodulin.  
MICHIO YAZAWA, ERIKO KAWAMURA, OSAMU MINOWA, KOICHI YAGI, MITSUHIKO IKURA and KUNIO HIKICHI  
Journal of Biochemistry 95, 443-446. (1984)
5. Ontogenetic transition of wound healing pattern in rat skin occuring at the fatal stage.  
SETSUNOSUKE IHARA, YMIKO MOTOBAYASHI, ERIKO NAGAO and ANDREAS KISTLER  
Development in press.

## 謝辞

本研究を直接ご指導いただき、また三年間の休学の後に再び研究の機会を与えてくださった北海道大学低温科学研究所生化学部門 茅野春雄教授に心より感謝し、お礼申し上げます。アーモンドグリコペプチダーゼの精製をご指導いただき、また適切な助言をくださった名古屋市立大学 高橋禮子教授にお礼申し上げます。本研究を通じ様々な御助言と暖かい励ましをくださった低温科学研究所生化学部門 芦田正明助教授はじめ研究室の皆様にも心から感謝致します。



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
Centimetres 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

### KODAK Color Control Patches

© The Tiffen Company, 2000

**Kodak**  
LICENSED PRODUCT

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

### Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

