

# シグナル伝達と $\text{Ca}^{++}$ 要求性リン脂質結合蛋白 —特にリポコルチン様蛋白について—

内 海 耕 智

(生物学教室)

## Signal Transduction and $\text{Ca}^{++}$ -dependent Phospholipid-binding Protein. Studies on Lipocortin-like 33 kDa Protein of Guinea Pig Neutrophils

Kozo UTSUMI

(Department of Medical Biology, Kochi Medical School, Kohasu, Oko-cho,  
Nankoku-shi, Kochi 781-51, Japan)

**Abstract.**  $\text{Ca}^{++}$  acts as an intracellular second messenger by virtue of its concentration-dependent binding to regulatory proteins. In the cell, all intracellular  $\text{Ca}^{++}$ -binding proteins were thought to belong to single structural group, characterized by the presence of an EF hand structure. However, recently it has characterized the intracellular  $\text{Ca}^{++}$ -dependent lipid-binding protein as a distinct family by several properties including immunologically cross-reaction. This new family protein is involved in metabolic regulation in the cell by  $\text{Ca}^{++}$  and phospholipid. Protein Kinase C,  $\text{Ca}^{++}$ -dependent protease (CANP/Calpain), and lipocortin (carpactin) are the typical proteins of the family. During the course of study on the mechanism of superoxide generation in guinea pig neutrophils, we found a large amount of  $\text{Ca}^{++}$ -dependent phospholipid-binding 33 KDa protein (p33). The protein has a quite similar properties with that of lipocortin I obtained from human placenta. In this paper, the author described the outline of lipocortin like protein and the biological and biochemical properties of the p33.

The 33 KDa protein has following several properties; 1) association with liposomal membrane containing acidic phospholipids in  $\text{Ca}^{++}$  dependent manner, 2) distribution only in neutrophils, 3) inhibition of the phospholipase A<sub>2</sub>, 4) binding with actin, 5) phosphorylation by protein Kinase C (on serine residue), 6) similar component of amino acid with that of other lipocortin-like proteins, and 7) homologous amino acid sequence with human lipocortin 1. These results indicate that the p33 plays an important roles in signal transduction system of neutrophil.

### 1. はじめに

細胞は常に外部からの情報を受け取り、細胞特有の応答反応を示す。これらの情報の多くは

細胞表面か細胞膜に局在する受容体に受け取られ、膜結合酵素によって増幅され、細胞内部に伝達される<sup>1)</sup>。いま具体的に最近明らかにされた伝達機構の一例について説明すると、刺激情報となるリガンド (Ligand) は膜表面の受容体に結合し、GTP 蛋白との相互作用<sup>2)</sup>でfosファチジルイノシトール (PI) 特異的フォスフォリパーゼ C を活性化し、ジグリセライド (DG) とイノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) を生成する<sup>3)</sup>。そして、生成された IP<sub>3</sub> はミクロソーム内 Ca<sup>++</sup> を細胞質に放出させ、細胞内 Ca<sup>++</sup> ([Ca<sup>++</sup>] i) を増大させる<sup>1)</sup>。増大した [Ca<sup>++</sup>] i は Ca<sup>++</sup>-リン脂質要求性蛋白リン酸化酵素 (C-キナーゼ)<sup>4)</sup> に結合し、酵素蛋白は疎水領域を露出して、DG や fos ファチジルセリン (PS) のある細胞膜に結合し活性化されるものと説明されている<sup>5)</sup>。従って膜結合 C-キナーゼは膜結合蛋白を優先的にリン酸化し<sup>6)</sup>、受容体自身のリン酸化も行って膜を介した代謝調節に大きく関与する<sup>7)</sup>。即ち細胞膜は細胞の外側においては外部情報を受け取るために重要な役割を果たすが、これと対応して細胞の内側においては細胞質との相互作用が情報伝達に大きな役割を果している<sup>8)</sup>。ここで細胞質と細胞膜内面との相互反応は極めて多岐に渡るが、中でも “Ca<sup>++</sup>要求性リン脂質結合蛋白” の果す役割は特に注目されている<sup>9,10)</sup>。これに類する蛋白はここ数年の間に次々と発見され、Geisow と Walker<sup>10)</sup> はこの種の蛋白質を “New proteins involved in cell regulation by Ca<sup>2+</sup> and phospholipid” の中にこれが新しい特性をもつ蛋白群として TIBS に報告し、注目されるようになった。表 I にはこれら蛋白質の幾つかについて若干の性質を示したものである<sup>11,45)</sup>。もちろんこの他にもこの研究の発端ともいいうべき Ca<sup>++</sup>結合蛋白にはカルモジュリン<sup>46)</sup>を始め、トロポニン C や CAB-27, CAB-48, Calcinulin, S100 蛋白, Parvalbumin,<sup>47)</sup> p36/gelsolin<sup>48)</sup> 等があり、また Ca<sup>++</sup>依存性蛋白分解酵素 (Calpain<sup>49)</sup>, CANP<sup>50)</sup> )を始め、C-キナーゼ<sup>4)</sup>もこの蛋白群と極めて類似の性質を持つ。しかしこれらはその蛋白群と異なり何れもホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) の阻害作用を持たない<sup>51,52)</sup>。

この Ca<sup>++</sup>要求性リン脂質結合蛋白に属するものには次のような共通した特性がある。1) 細

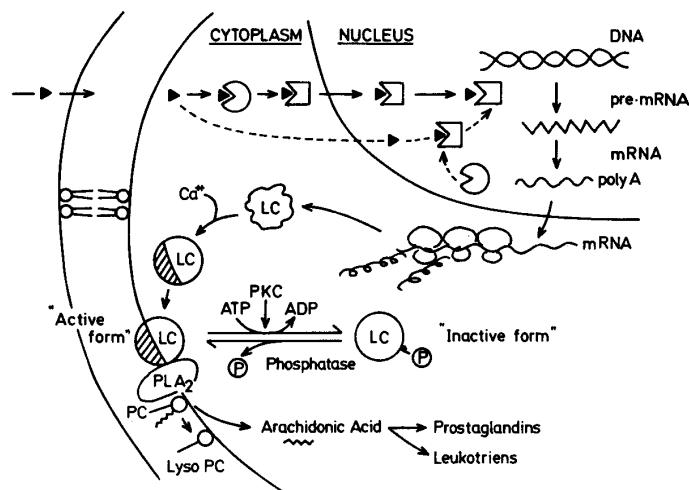


図 1. リポコルチン様蛋白質の誘導と細胞膜フォスフォリパーゼ A<sub>2</sub>活性の調節機構

表1. A. リポコルチン様蛋白質の種類とその性質

蛋白質	分子量	リン脂質要求性	Ca <sup>++</sup> 要求性 KC <sup>++</sup> (μM)	Consensus Sequence	Actinとの結合性	PLA <sub>2</sub> 阻害性	器官	文献
Calpactin Complex	90~73	PS, PI	+	+	+	++	牛肺 人胎盤	11 12
Calelectin	67	+	+	+			牛肝, 脳 副腎髓質	13
p67(Synhibin) Calelectin Calregulin	67	PS	+		+	+	豚肺	14
p67 Protein III	67 68	P1	+(1~1.5μM)	+	+		牛動脈 豚肝	15 16 17, 18, 19
Chromibidins Calelectin Lipocortin II	67 67 36	+		+			牛脳, 人胎盤 クロマフィン	20
Sy nexin II	56	PS	+				肝	21
Sy nexin I (Fusion)	47	PS	+(200μM)	-			クロマフィン 副腎髓質	22, 23, 24
Protein I	36 (36+10)2	PS	+(100μM)	+	+		豚肝	16, 25 17, 18, 20
Lipocortin II	36 (37~33)		+	+	+		人胎盤 ラット腹水 浸出液 ラット胎盤	29 30
Calpactin I	36 (34~39)	PI PS	+(4.5μM)	+	+	+	人胎盤	31, 32, 33 11, 12
Lipocortin 様 38K	38					+	MI 細胞	34

表1. B.

蛋白質	分子量	リン脂質要求性	Ca <sup>++</sup> 要求性 KC <sup>++</sup> (μM)	Consensus Sequence	Actinとの結合性	PLA <sub>2</sub> 阻害性	器官	文献
Lipocortin I	35 (35~37)	PS	+(75μM)	+	+	+	人胎盤	35, 36 37
Calpactin II	35	PS	+(10μM)	+	+	+	人胎盤	11, 12, 31 32
Lipocortin 様 32(Endonexin)	32	PS				+	人单球	38
Endonexin II (Annexin)	33 (32.5)	PS+PA	(25μM)	+			人胎盤 牛豚	39, 40 17, 41, 42
Protein II	32	PI PA PS	+(25μM)	+	+		豚肝 豚小腸上皮	17, 41, 42 16, 25
Calelectin	34	PS	+(10~100μM)				電気エイ	13, 43
Calcimedin	p33 (p67)	PS	+	+		-	ニワトリ包囊	44, 45
37K (I~III)	32	PS				+	胸心筋以外 人胎盤	36
p33	33	PS	+	+	+	+	モルモット 白血球	70, 75, 76 78

胞質に存在し、刺激等による細胞内 Ca<sup>++</sup> ([Ca<sup>++</sup>] <sub>i</sub>) の増大に伴って細胞膜に結合し、生物活性を発揮するものが多く、2) 分子量も 70~80 kDa と 30~36 kDa にわたる種々の蛋白で等電位点も 7.8 から 5.4 と 幅広く、3) それぞれ Ca<sup>++</sup>結合サイトまたは Ca<sup>++</sup>に依存して構造変化をするサイトを持ち、4) 蛋白リン酸化酵素の基質となりやすい構造を持つ。5) また生物活性はそれぞれの蛋白で異なるが PLA<sub>2</sub>を阻害し、6) アクチンとの結合性を持ち、7) 酸性リン脂質膜に結合したり、膜と反応して膜凝集を起こさせ（膜融合を伴う場合もある）るといった性質を持っている。これら性質の中で特に PLA<sub>2</sub>に対する阻害活性、アクチンとの結合性、Ca<sup>++</sup>に依存してリン脂質に結合する性質を持つものについてはそれらを総称してリポコルチニン様蛋白と呼ぶようになった。これには次のような歴史的な背景がある。即ちグルコルチコイドにより誘導され、PLA<sub>2</sub>を阻害してアラキドン酸の遊離を抑制し、プロスタグランдинやロイコトリエン等による免疫メディエーターの生合成を抑制する抗炎症蛋白として別々の研究室で研究され、それぞれマクロコルチニン<sup>53)</sup>、リポモジュリン<sup>54)</sup>、レノコルチニン<sup>55)</sup>として報告された。しかしそれらは何れも免疫学的にも極めて類似している蛋白質であるために、リポコルチニンとして統一されることになった<sup>56)</sup>。

即ちリポコルチニンはこの種の蛋白質の代表的な物質でありカルパクチニン<sup>11,12,31,32)</sup>ともよばれる。尚、リポコルチニンの機能については現在図 1 のように考えられている<sup>57)</sup>。リポコルチニンについては文献<sup>58, 59, 60</sup>等多くの総説があり参考されたい。

我々は80年代の初期からこの細胞膜内面と細胞質蛋白との相互作用の重要性に着目し、種々の解析を行っているが、ここではそれらの研究成果の一端として、好中球に分布する Ca<sup>++</sup>要求

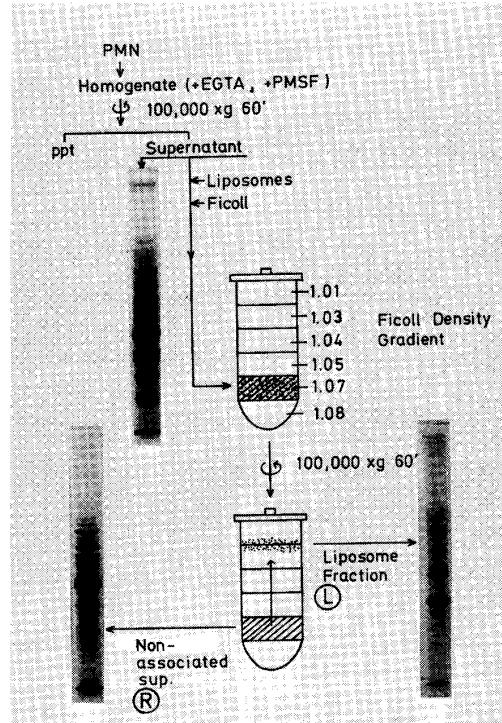


図 2. リポゾームを使用した脂質親和性蛋白質の分離分画法

性リン脂質結合蛋白の一種リポコルチン様33 kDa蛋白（p33）について紹介したい。研究材料としてモルモット好中球を選んだのは外部情報に応答して極めて顕著な反応を示し、膜を介した代謝調節、シグナルトランスダクションの解析に多くの利点を持つためである。

## 2. 種々人工脂質膜（リポゾーム）に結合性を持つ細胞質蛋白

細胞質に存在し常時細胞内面と相互に密接な作用を持つものの中では特に膜脂質に強い親和性を示す細胞質蛋白が注目される<sup>61,62)</sup>。この蛋白の中には細胞骨格系蛋白、例えばアクチン、チューブリン、アクチニン、アクトミオシン等を始め、多くの蛋白がある。いま単純なリン脂質膜（ここではジパルミトイールフォスファチジルコリン、DPPC）とモルモット細胞質蛋白を室温にて混和し、ファイコール密度勾配遠心法で蛋白を結合したDPPCリポゾームを遠心上層に回収し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）にて分画してみると、図2に示すようにDPPCリポゾームには多くの細胞質蛋白の結合が認められる。しかもこれら蛋白の膜への結合によって、リポゾーム膜物性はかなり著しく変化する。例えばリポゾームに蛍光色素の一種カルボキシフルオレッセイン（CF）を封入し、図3に示すような方法で膜透過性変化を種々の温度で測定すると<sup>62)</sup>、図4のように膜構成脂質の相転移温度で若干のリポゾーム容積の増大を伴い、同時にCFの遊出が起こる（ここではDPPCリポゾームの相転移温度42°C前後で起きている）。これは相転移温度で膜脂質の配列構造が吸収熱により不安定となるため、膜区画性が低下することによると考えられている。このような温度においてはリポゾームに親和性の強いアクチンをはじめ種々の細胞質蛋白や極めて微量のPLA<sub>2</sub>はリポゾームに結合し易く、その結果膜透過性を促進させる<sup>63)</sup>。このことはリン脂質リポゾームと蛋白の相互作用により脂質の配列構造や物性が変化し、同時にその脂質相転移温度ではこれら蛋白は脂質膜に結合しやすい状態にあることを示唆している。

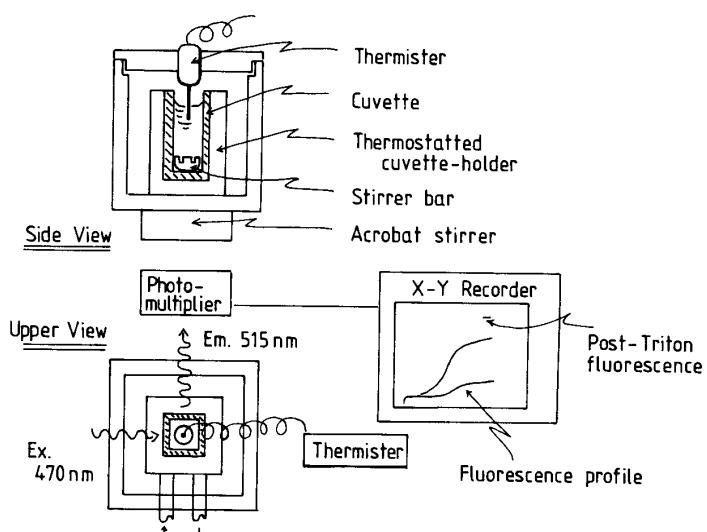


図3. カルボキシフルオレッセイン（CF）を封入したリポゾームによる相転移遊出法とそれによる膜透過性変化の測定

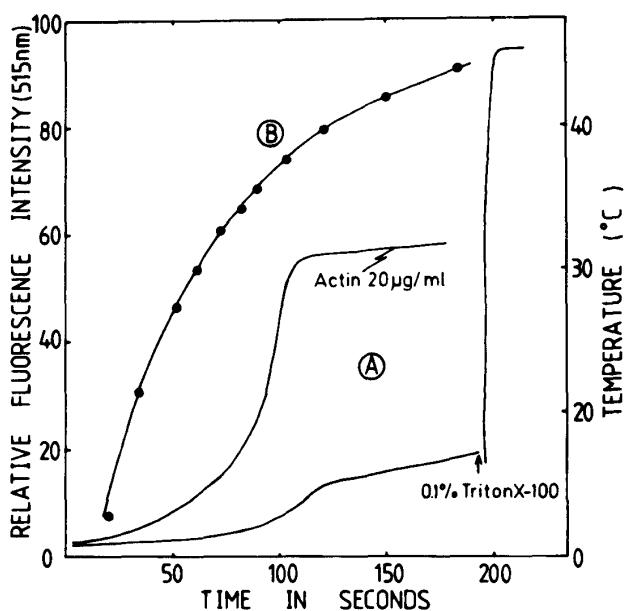


図4. CF封入DPPCリポゾームを使用した相転移遊出法によるアクチナーリポゾーム相互作用の解析<sup>61)</sup>  
反応液は0.1M NaCl-10mM リン酸緩衝液(pH6.8) 温度は0°Cより43°Cに昇温。CFのリポゾームからの遊出は470nmと励起光で515nmの蛍光を測定。A: 相転移温度遊出曲線, B: 温度変化。

一般に形質膜にはコレステロールが多く、DPPCリポゾームへの細胞質蛋白の結合は脂質膜に含有されるコレステロール量の増加につれて阻害され(図5)，従って膜透過性の促進も阻害される<sup>62,64,65)</sup>。しかし、コレステロールを含むDPPCリポゾームで蛋白結合能の低下した脂質膜

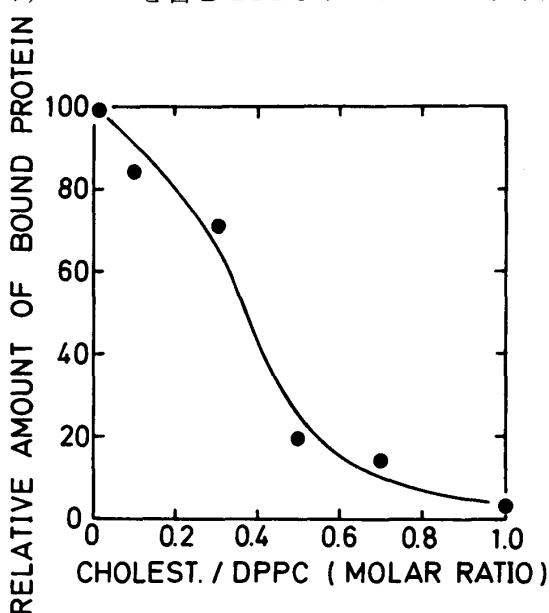
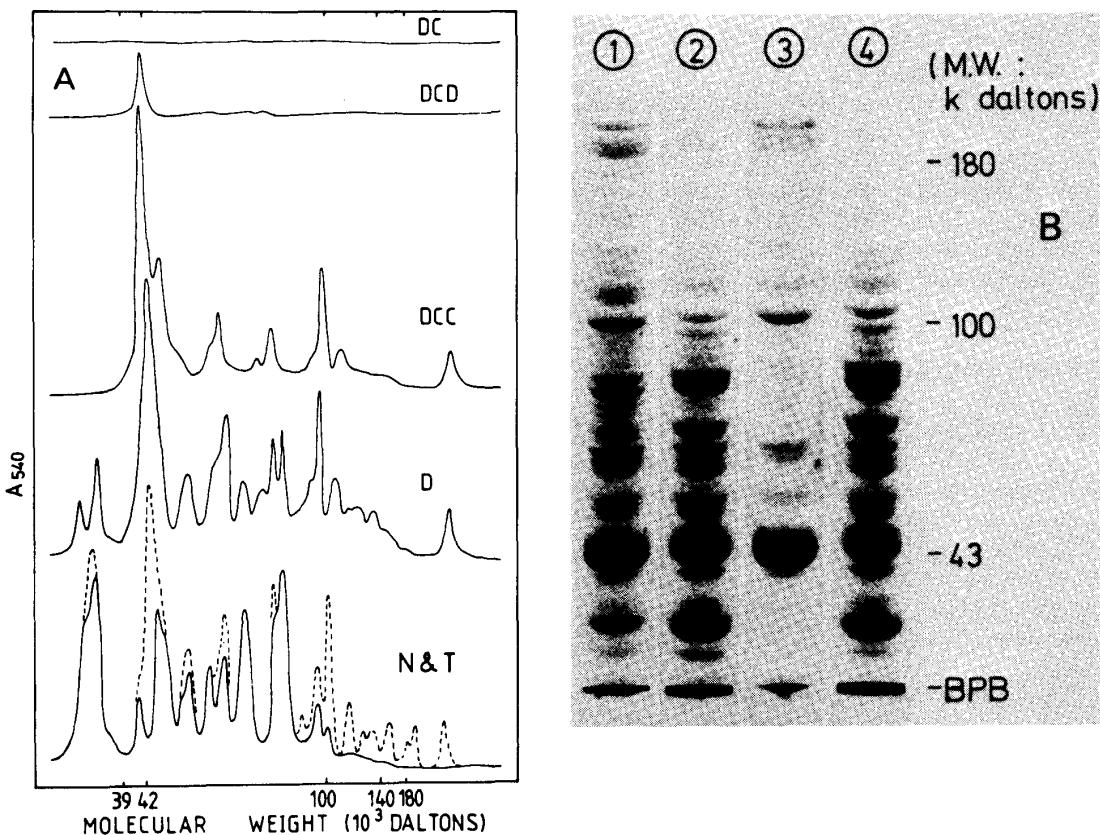


図5. ラット肝上清分画蛋白質の種々濃度コレステロールを含むDPPCリポゾームとの結合<sup>65)</sup>  
蛋白分解酵素の阻害剤PMSF存在下に10mM NaCl-リン酸緩衝液(pH6.8)中にラット肝のホモゲネートを作り、上清分画と種々の濃度のコレステロールを含むDPPCリポゾームを37°C, 10分間反応(5mg蛋白/15μmolリン脂質)，その反応液をフィコール密度勾配遠心分離にて、蛋白質を結合したリポゾームを分離し、膜結合リポゾームをSDS-PAGEにて分析。図はリポゾームへの細胞質蛋白の結合に対するコレステロールの効果を示す。

図6. モルモット好中球上清蛋白と種々のリポゾームとの結合<sup>62)</sup>

実験条件は図5に同じ、ただしリポゾームはDMPC(D)にコレステロール(C)やセチルアミン(C)、ジセチルリン酸(D)を含む。

A: デンシトメトリーパターン, B: SDS-PAGEの写真。

D: DMPC。

DCC: NMPC/コレステロール/セチルアミン(1/1/0.1分子比)。

DCD: DMPC/コレステロール/ジセチルリン酸(1/1/0.1分子比)。

DC: DMPC/コレステロール(1/1分子比)。

①(D) ③(DCC) はリポゾーム結合蛋白。

②(D), ④(DCC) はリポゾームに非結合性蛋白。

でも、その膜にさらに陽荷電を含むセチルアミン(CA)を添加すると、その量に依存して再び結合性を回復する。この時結合性を回復する蛋白は細胞骨格系の蛋白にかなり特異的で、他の多くの蛋白は結合性を回復しない(図6 A, B)。これに対し、陰荷電を含むジセチルリン酸(DCP)にはこのような結合促進作用は認められず陽荷電が重要な因子となっている。またコレステロールを含むリポゾーム膜でも浸透圧を高め、膜の曲線を大きくすると再び種々の蛋白質は膜に結合し(図7)，かつ膜透過性を促進する<sup>64,66)</sup>。このことはコレステロールを含む膜においては、膜構成脂質の物性、特に荷電によってかなり細胞質蛋白と膜の相互作用が支配され、この結合が単なる疎水結合でないことを示唆するものである。

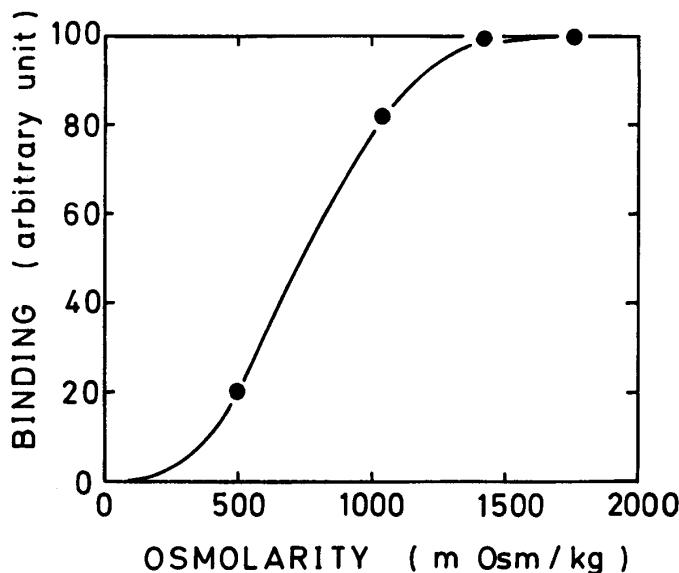


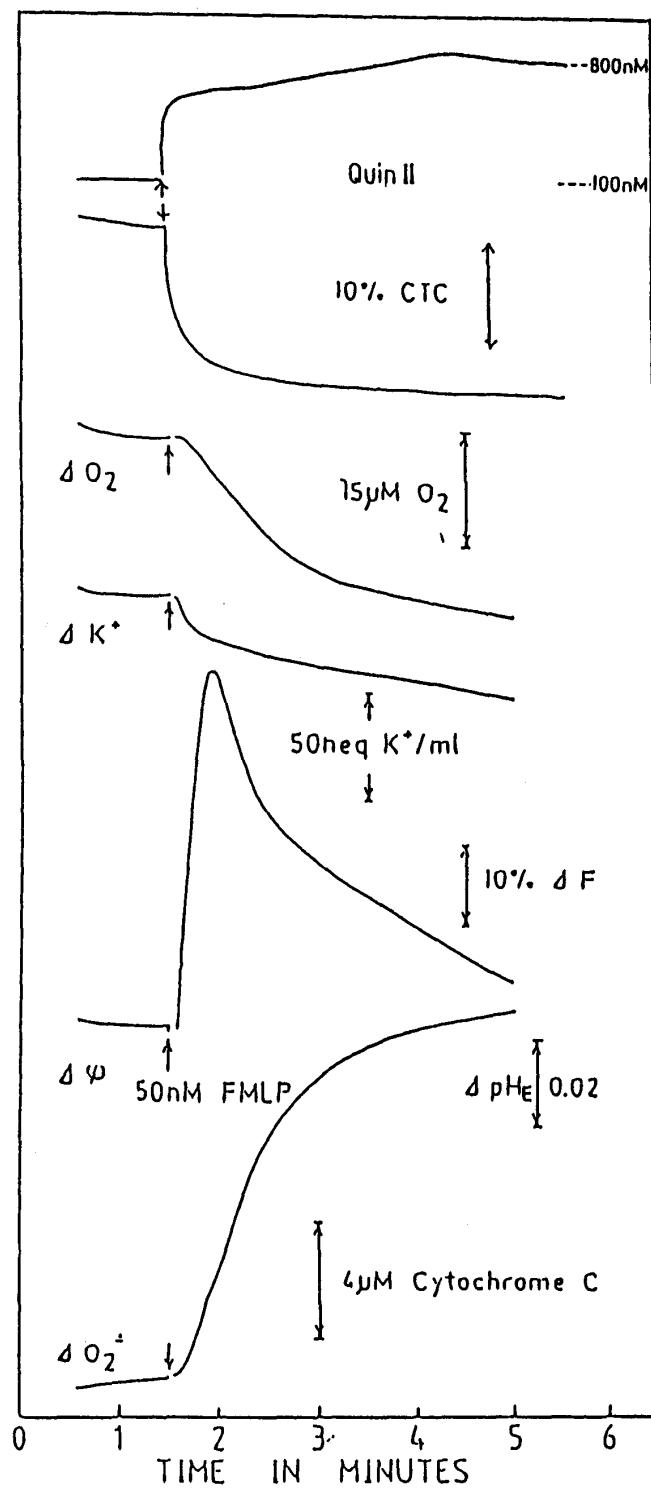
図7. ラット肝上清画中蛋白質とDPPC-コレステロールリポゾームとの結合性に対する浸透圧の効果<sup>66)</sup>  
実験条件は図5と同じ。ただしリポゾームはDPPC/コレステロール(1/1分子比)。反応液はNaCl濃度を変えて浸透圧を調節。

### 3. モルモット好中球の刺激に依存した [Ca<sup>++</sup>]iを始めとする種々の応答反応

古くて新しい話題の一つに [Ca<sup>++</sup>]iがある。最近ではQuin2, Fura2,エクオリン等の蛍光変化によって [Ca<sup>++</sup>]iを定量的に測定することが可能となり、刺激に応答した [Ca<sup>++</sup>]iの速い変化でも測定されるようになった。図8はQuin2をロードしたモルモット好中球の走化因子ホルミールメチオニールロイシールフェニールアラニン(FMLP)添加に伴う種々の代謝変化を<sup>67,68,69)</sup>示す。この図に示すように、刺激に応答した酸素消費やO<sub>2</sub>形成の促進、膜電位変化や、イオン透過性促進等と平行して、[Ca<sup>++</sup>]iは10<sup>-8</sup>Mレベルより10<sup>-6</sup>Mレベルと急激に増加する(図8)。

### 4. 酸性リン脂質を含むリポゾームへの細胞質蛋白の結合とそのCa<sup>++</sup>依存性

上記のように好中球は刺激に応答して [Ca<sup>++</sup>]iが増加することから、この [Ca<sup>++</sup>]iの増加に依存して起こる細胞膜—細胞質蛋白の相互作用変化の重要性を考え、これを解析するため次のような実験を行った。即ち、膜脂質組成としてDPPCに約30%のコレステロールを添加し、さらに10%の酸性リン脂質(Ca<sup>++</sup>結合性を持つ)を加えてリポゾームを作製し、Ca<sup>++</sup>に依存してこのリポゾームに結合する細胞質蛋白を検索した。その結果図9に示すようにモルモット好中球の細胞質には微量のCa<sup>++</sup>(10<sup>-6</sup>M)に依存して、PSやカルジオリビン(CL)等の酸性リン脂質を含むリポゾームに結合する33 kDa蛋白(p33)のあることを明らかにした。もちろんこの蛋白の脂質への結合性はCa<sup>++</sup>濃度の依存性が強く、CLでは10<sup>-8</sup>M Ca<sup>++</sup>で、PSでは10<sup>-6</sup>

図8. モルモット好中球のFMLPによる種々の応答反応<sup>69)</sup>

KRP (pH7.4), 37°C 中, 50nM FMLP 添加による種々の応答反応を測定。細胞質 Ca<sup>++</sup> (Quin II 蛍光変化), 膜結合 Ca<sup>++</sup> (CTC の蛍光変化), 酸素消費 (酸素電極による), K<sup>+</sup>の遊出 (K<sup>+</sup>電極による), 膜脱分極 (シアニン色素の蛍光変化による), スーパーオキサイドアニオンの生成 (シトクロム c の還元による) を示す。

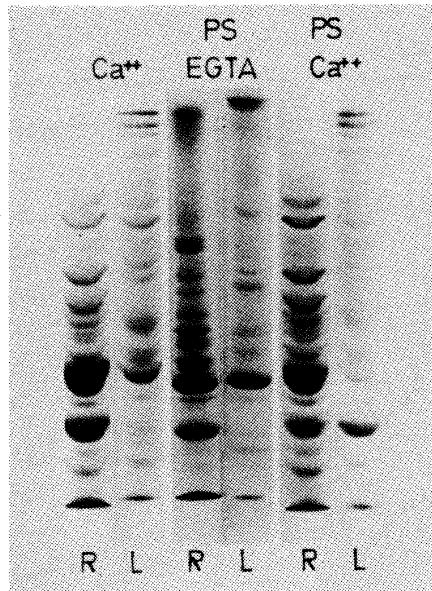


図9. モルモット好中球上清蛋白とPSを含むリポゾームとの結合性とそのCa<sup>++</sup>依存性  
実験条件は図5と同じ。

リポゾームはDPPC/コレステロール/フォスファチジルセリン(1/0.5/1分子比)

PSを含むリポゾームにCa<sup>++</sup>に依存して33kDa蛋白が結合する。1mM EGTA存在下には同じ組成のリポゾームに結合しない。

R:非結合蛋白, L:リポゾーム結合蛋白。Ca<sup>++</sup>, 0.3mM。

MのCa<sup>++</sup>で結合し、細胞内で変動するレベルの[Ca<sup>++</sup>]iで容易に可逆的に膜に結合する性質を持っている<sup>70)</sup>。このことはp33が刺激応答反応において形質膜と可逆的な相互作用を行い、細胞の代謝調節に重要な役割を果していることを示唆する。最近刺激応答に伴う[Ca<sup>++</sup>]iの増加に依存して細胞質から細胞膜に移行する蛋白質についての研究は多く見受けられるが、C-キナーゼやCa<sup>++</sup>依存性の蛋白分解酵素などはそれらの中の代表的なものといえる<sup>52,71,72,73,74)</sup>。

## 5. モルモットp33の精製

2% Nutrose(コダック、カゼイン)を含む生理的食塩水をモルモット腹腔内に注入後、16時間目に腹腔内にKrebs-Ringer-リン酸緩衝液(pH7.4)(KPP)を充分量入れ、腹腔細胞を採取し、2~3回KRPにて洗滌する。このようにして集めた好中球に赤血球の混入のある場合はアンモニウムクロライド液処理を行い混入赤血球を除去したものを材料とした。

これら白血球は1mM Phenylmethylsulfonyl-fluorid(PMSF)、1%ロイペプチドと1mM EGTAを含むHepes緩衝液(20mM Hepes/100mM NaCl, pH7.4)中で、テフロンホモジナイザーにて4°C、10分間ホモゲナイズを行い、100,000×g 60分の上清分画に大部分のp33を回収することができる。この上清とDPPC/Cholesterol/CardiolipinあるいはDPPC/Cholesterol/PS(1:0.5:0.5)のリポゾームと1mM CaCl<sub>2</sub>存在下に4°C、10分間反応し、p33をリポゾームに結合させ、100,000×g 30分の沈渣に5mM EGTAを添加し、さらに100,000×g 20分間遠心

してリポゾーム結合蛋白を遊離させる。そして硫安飽和で沈殿部分を回収する。この沈殿物を最小量の25mM Trisethanolamineiminodiacetic acid (pH8.3)に溶解し、同じ液に対し、一夜透析する。不溶物は100,000xg30分で取り除き、200x5mmのPharmacia Mono Pカラムにチャージし、10% Polybuffer-iminodiacetic acid (pH5.0)にて溶出する。得られたp33を多く含む分画をさらに300x5mmのTSK G3000SWにチャージし、50mM リン酸衝液 (pH7.4)にて溶出、ゲル濾過を行う。このようにして得られたp33はSDS PAGEの銀染色で一本のバンドを示す単一の蛋白として確認された(図10)<sup>75,76)</sup>。

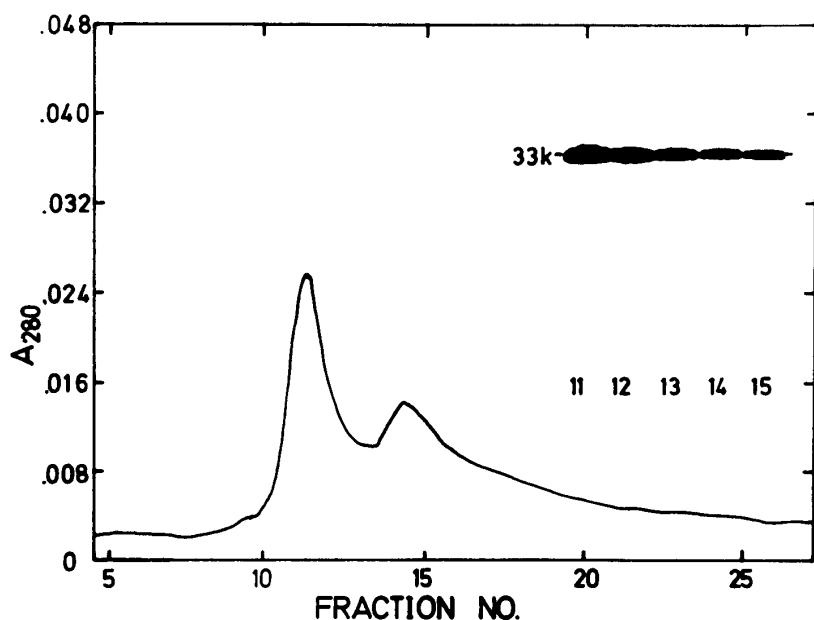


図10. モルモット好中球より精製した33kDa蛋白<sup>76)</sup>

モルモット好中球を1 mM EGTA, 1 mM PMSF存在下に20mM Hepes, 100mM NaCl液にてホモゲナイズし、上清を得る。この蛋白はDPPC/コレステロール/カルジオリビン(1/0.5/0.5)のリポゾームと反応後、リポゾーム結合蛋白をさらに、硫安にて沈殿、Mono Pカラムにてかなり精製されたp33を得る。この図はその蛋白をTSK G3000SWにて分画した280nmの吸収による精製p33の分画パターンとそのSDS-PAGEの銀染色像を示す。

## 6. 抗p33抗体を使用した組織及び細胞内分布

モルモット好中球のp33を抗原とし、常法に従ってポリクロナール抗体及びモノクロナール抗体を作成した<sup>77)</sup>。モルモット各組織ホモゲネート上清分画をSDS-PAGEにかけ、ポリクロナール抗体をイムノプロットし、p33の組織分布を検索した結果、図11を示すようにこの蛋白質は特に肺及び脾ホモゲネート上清に多く分布していた。なお肝ホモゲネートには弱いながら未同定の陽性蛋白が2, 3認められた。また各組織を凍結切片としたものや、骨髄スタンプ標本についてp33のモノクロナール抗体による免疫細胞化学的な方法で観察した結果、これら組織の陽性細胞はすべて好中球であった(図12A, B)<sup>75,78)</sup>。これらのこととはp33は好中球に特有な蛋白であることを示唆する。事実モルモット以外の人やラットの好中球のホモゲネート上清のSDS-PAGEについてマウス抗モルモットp33ポリクロナール抗体によるイムノプロットを行

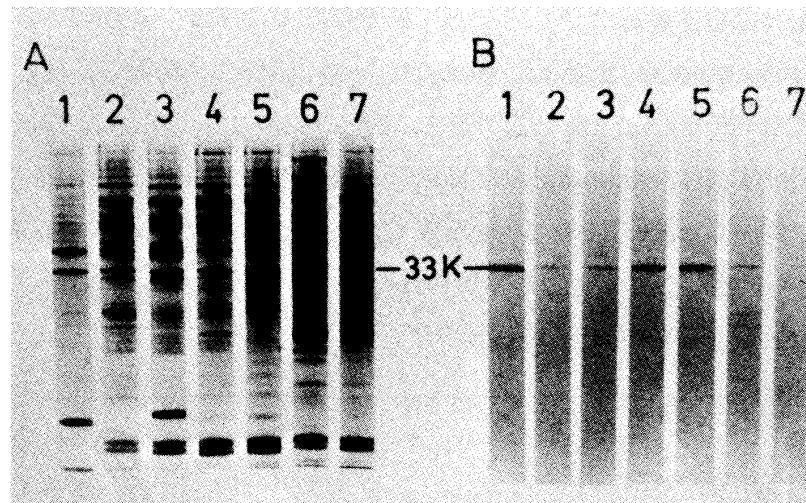


図11. モルモットの各組織蛋白の SDS-PAGE のポリクロナール抗 p33抗体によるイムノプロット像<sup>74)</sup>  
マウスポリクロナール抗 p33抗体を作製し、モルモットの各組織上清蛋白の SDS-PAGE をイムノプロットした像を示す。抗 p33抗体は、肺、脾に強く認められる。

1. モルモット好中球、2. 脳 3. 心 4. 肺 5. 脾 6. 肝 7. 胃。

A : クーマシ-青染色蛋白像、B : イムノプロット像。

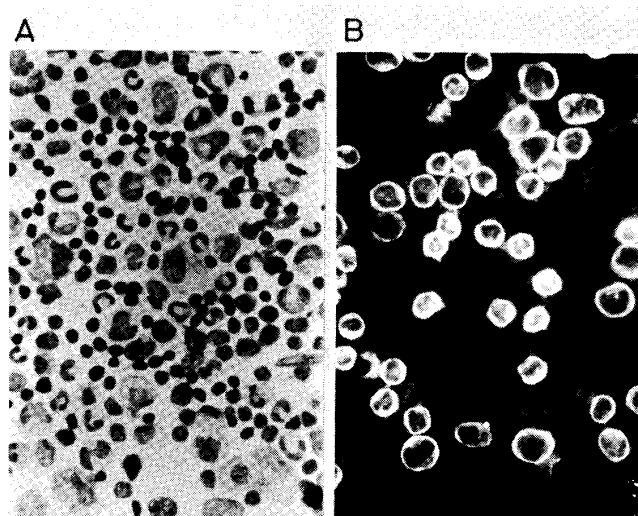


図12. モルモットの骨髄スタンプ標本におけるモノクロナール抗 p33抗体による免疫染色<sup>75)</sup>  
A : ギムザ染色、B : 免疫染色。

った結果、何れも p33の存在が確認された<sup>75)</sup>。

## 7. 刺激に応答した好中球 p33の細胞内移動

先にも述べたごとく p33は、 $10^{-6}$ M Ca<sup>++</sup>の存在下にも PS を含む生体膜に結合する性質がある。この性質はコレステロールを含む膜でも同様で、細胞内では [Ca<sup>++</sup>] i の増加に伴って C-キナーゼ<sup>52,57,71,74)</sup>のように形質膜に移行する可能性がある。図 7 にも示したごとく、モルモット好中球は FMLP 添加に伴って [Ca<sup>++</sup>] i を $10^{-8}$ M オーダーから $10^{-6}$ M オーダーに増大する。このとき p33のモノクロナール抗体を用いて p33の分布を検索してみると図13に示すごとく、

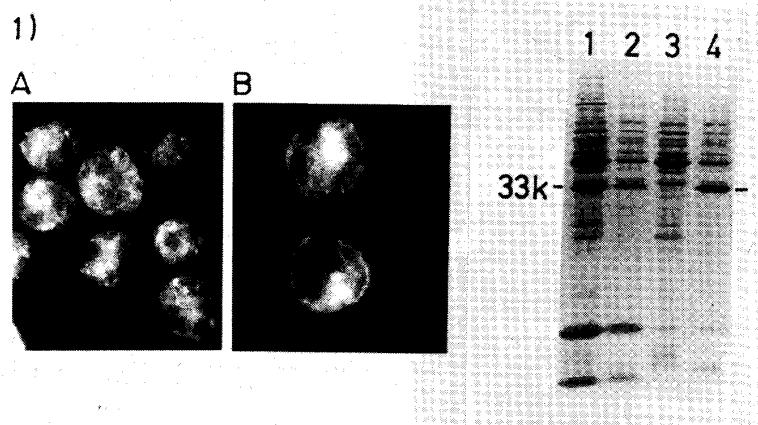


図13. モルモット好中球の FMLP 刺激に伴う p33蛋白質の細胞質から形質膜への移行<sup>75)</sup>

1) マウスモノクロナル抗 p33抗体による細胞内 p33の分布。

A : 非刺激 B : FMLP にて刺激した好中球を示す。

2) Ca<sup>++</sup>の添加に伴う p33の細胞質から膜への移行。

1 mM EGTA 液中の p33の細胞質(1)と膜(2)への分布。

0.3mM Ca<sup>++</sup>液中の p33の細胞質(3)と膜(4)への分布。

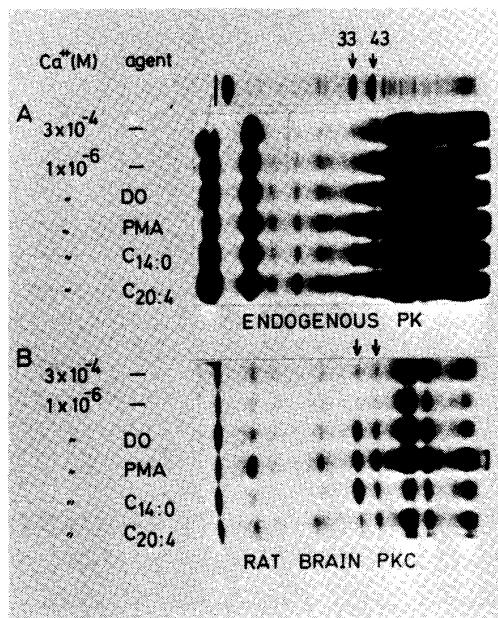
FMLP 刺激によって細胞質に分布していた p33の一部は形質膜に移行し、刺激に応答した細胞内分布の変化が確認された<sup>75,78)</sup>。

## 8. p33の C-キナーゼによるリン酸化

リポコルチン様蛋白は始めにも述べたように、その蛋白質のリン酸化によって PLA<sub>2</sub>活性に対する阻害作用が失われると言われている<sup>34)</sup>。従って、この蛋白のリン酸化は代謝調節には重要な機能を持つことになる。これまでの研究ではラウスサルコマービールスの発癌遺伝子産物で、チロシンキナーゼ活性を持つ p60<sup>src</sup>によってリポコルチンはリン酸化されることが明らかにされている<sup>79)</sup>。さらに入りリポコルチン 1 は EGF レセプターチロシンキナーゼのよい基質であることも明らかにされてきた<sup>15,31,32,57,80,81)</sup>。しかしこれらの蛋白質はチロシンキナーゼ以外に C-キナーゼの基質となることも報告されている<sup>11)</sup>。図14はラット脳より部分精製した C-キナーゼによるモルモット好中球のホモゲネイト上清蛋白のリン酸化を示す<sup>82)</sup>。この図でも明らかなように、C-キナーゼはその活性化物質により若干づつその基質となる蛋白を異にするが、何れの活性化物質で刺激しても p33は共通して強くリン酸化され、C-キナーゼのよい基質であることがうかがえる。しかも Cooper らの方法<sup>83)</sup>によるリン酸化蛋白のアミノ酸分析の結果やアルカリに対する安定性や加水分解物の HTLC 分析から、図15に示すごとくこの蛋白質のセリン残基がリン酸化されていることも明らかにされた<sup>84,85)</sup>。

## 9. p33のアクチンとの結合性

ここでこの種の蛋白質のアクチン結合性について述べてみよう。歴史的にはこのアクチン結

図14. p33のPKCによるリン酸化<sup>82)</sup>

モルモット好中球上清蛋白のラット脳PKCによるリン酸化を示す。

A : 0.3mM~1 μM の Ca<sup>++</sup>と 0.1mM リン脂質(DPPC/PS, 4 / 1 分子比)存在下にモルモット上清蛋白への [γ-<sup>32</sup>P] ATP からの<sup>32</sup>P の取り込みのオートラジオグラム。

B : モルモット上清分画の種々のプロテインキナーゼ活性を 55°C, 3 分で失活させ, ラット脳より部分精製した PKC を添加してリン酸化されたもののオートラジオグラム。

細胞質蛋白は SDS-PAGE 後のクーマシー青染色像とオートラジオグラムを示す。

酵素活性化物質として PMA : 0.15μM, DO : 5 μM, 脂肪酸 : 0.1mM を使用。

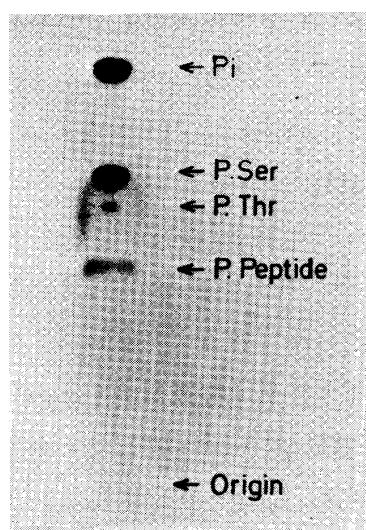


図15. p33のPKCによるリン酸化アミノ酸の分析

リン酸化された p33 をゲルスライスし, 蛋白回収器にて集め, 1 N HCl, 110°C, 10 分間加水分解する。それを Dowex 1 に吸着後, よく洗浄し PS, PI, PE を添加後, HCl にて溶出し, 凍結乾燥, pH 1.19 にて HPTLC において展開したもの。主としてセリンがリン酸化されていることを示す。

合性からリポコルチニンはカルパクチン(Calpactin)とも呼ばれている<sup>11,12,31,32,33)</sup>。この蛋白質は mM オーダーの Ca<sup>++</sup>に依存してスペクトリンやアクチンに結合するが酸性リン脂質の存在下

には  $\text{Ca}^{++}$  要求性は  $\mu\text{M}$  オーダーに低下し、細胞内で起こる生理的濃度変化に共役して細胞骨格構造に影響すると考えられている。蛋白としてはカルパクチン1複合体として存在し、 $\text{Ca}^{++}$ を結合する p33のコアドメインと3 kDa の尾部よりなるカルパクチン1単量体重鎖にそのアミノ末端に 11 kDa の軽鎖(S100蛋白に似る)を結合し、それが複合して四量体の複合体を形成して存在すると考えられている [Heavy chain-tail-light chain-light chain-tail-heavy chain]。しかもこの p33尾部はよく知られている発癌遺伝子  $\text{p66}^{\text{src}}$  でリン酸化され、その尾部はキモトリプシンで分離されやすい構造をもつ。またカルパクチンIIは重鎖に尾部をもつ35 kDa の単量体構造を取るが、軽鎖を結合せず、EGF レセプターチロシンキナーゼでリン酸化される。そして最近になってこの蛋白の遺伝子解析から、カルパクチンIIがリポコルチンIに、またカルパクチンIがリポコルチンIIに相同の蛋白であることが明らかにされていた<sup>11,47)</sup>。

このような理由から p33の筋肉アクチンとの結合性について検討した。即ち、家兎筋肉アクチンを Pardee らの方法で調整し、p33と binding buffer (10 mM イミダゾール-HCl pH2.4, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 nM NaN<sub>3</sub>, 0.5 mM DTT, 0.1 mM ATP)に 1mM CaCl<sub>2</sub> や 1mM EGTA あるいは 100mM KCL の添加～無添加条件下に 1 時間反応し、95,000 rpm 10 分の上清と沈殿について検討した。その結果図16に示すごとくアクチンは  $\text{Ca}^{++}$  依存的に結合するが<sup>76)</sup>、100mM の KCl でその結合性が失われる<sup>76)</sup>。これらのこととは p33蛋白がカルパクチンと類似の性質をもつことを示すものである。

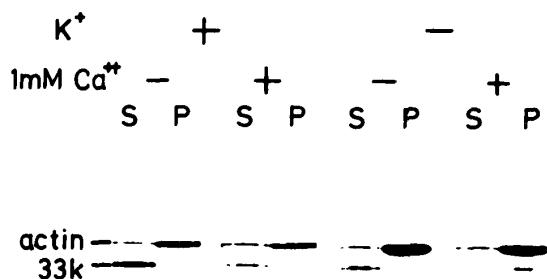


図16. p33のアクチンとの結合性<sup>76)</sup>

100mM KCl または 100mM NaCl に 1 mM  $\text{Ca}^{++}$  または 1 mM EGTA を含む反応液で p33を筋肉 F-アクチンと室温にて反応。遠心上清 (S) と沈殿部分 (P) の SDS-PAGE を示す。

## 10. フォスフォリパーゼ A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) の活性に対する p33の阻害作用

始めに述べたようにリポコルチンは  $\text{Ca}^{++}$  依存的に生体膜を基質とした PLA<sub>2</sub>活性に対し阻害作用を示す蛋白である。p33も PLA<sub>2</sub>を阻害する可能性が示唆されることから [<sup>3</sup>H] オレイン酸を取り込ませた E.coli の細胞膜を基質とし、豚臍 PLA<sub>2</sub>による [<sup>3</sup>H] オレイン酸の遊離反応から PLA<sub>2</sub>の活性を測定し、p33の作用を検討した。その結果図17に示すように p33にも PLA<sub>2</sub>活性を濃度依存的に阻害した<sup>76)</sup>。最近の研究では細胞質蛋白による PLA<sub>2</sub>の阻害は蛋白が基質

となるリン脂質の配列に組み込まれ、PLA<sub>2</sub>の酵素蛋白と脂質との相互作用を阻止するためと考えられる<sup>12)</sup>。従ってこのp33もPSを含む膜にCa<sup>++</sup>に依存的に結合し、PLA<sub>2</sub>と膜脂質の相互作用に影響を与え、それがPLA<sub>2</sub>活性を阻害するものと考えられる。

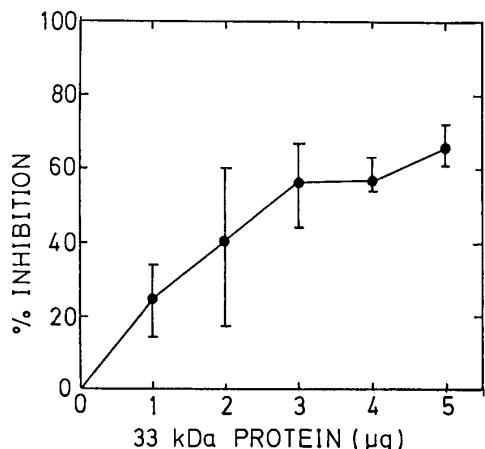


図17. p33のフォスフォリパーゼA<sub>2</sub>の活性に対する阻害作用<sup>76)</sup>

500ngの豚フォスフォリパーゼA<sub>2</sub>活性に対するp33の阻害作用を示す。反応液には[<sup>3</sup>H]-オレイン酸でラベルした。E. coliの膜を基質として含み、4°C、10分間反応し、遊離する[<sup>3</sup>H]-オレイン酸の量を求め測定した。

### 11. 人前骨髄球性白血病細胞 HL-60 の形質転移に伴うp33の増減

人の前骨髄球性白血病細胞 HL-60 はレチノイン酸やDMSOで好中球様の細胞に<sup>86)</sup>、発癌プロモーター(TPA)によって単球系マクロファージ<sup>87)</sup>に形質転換し、刺激物質に応答してO<sub>2</sub><sup>+</sup>生成をするようになる。形質転換していない培養 HL-60 細胞には人好中球より精製したp33のマウスポリクロナール抗体による免疫細胞化学的な反応が認められず、ほとんどp33の存在は認められない。しかし DMSO や TPA で形質転換し好中球やマクロファージ様細胞に形態変化をした細胞には図18に示すようなp33の出現が認められた<sup>88)</sup>。即ち HL-60 細胞は形質転換に伴い p33 が誘導合成されることが明らかである。

### 12. p33のアミノ酸組成と部分アミノ酸配列

リポコルチンやその他のCa<sup>++</sup>結合蛋白は、その性質の解析上アミノ酸組成やアミノ酸配列の研究が盛んである。特にCa<sup>++</sup>結合構造として有名なEFハンド構造との類似性に注目されている<sup>87)</sup>。しかしカルパクチンの10 kDaサブユニットにはS100蛋白と同様にEFバンド構造があるても36Kサブユニットには認められず、この群に入る多くの蛋白質にもまたEFバンド構造は認められていない。

ヒトリポコルチンのアミノ酸配列の全構造についてはWallnerら<sup>37)</sup>によりcDNAの構造が明らかにされ、それが残基数は346のポリペプチドをコードし、リン酸化を受けると考えられるチロシン残基、スレオニン残基にはそれぞれGlu-Glu-Glu-Thr(17-21), Arg-Arg-Lys-Gly-Thr

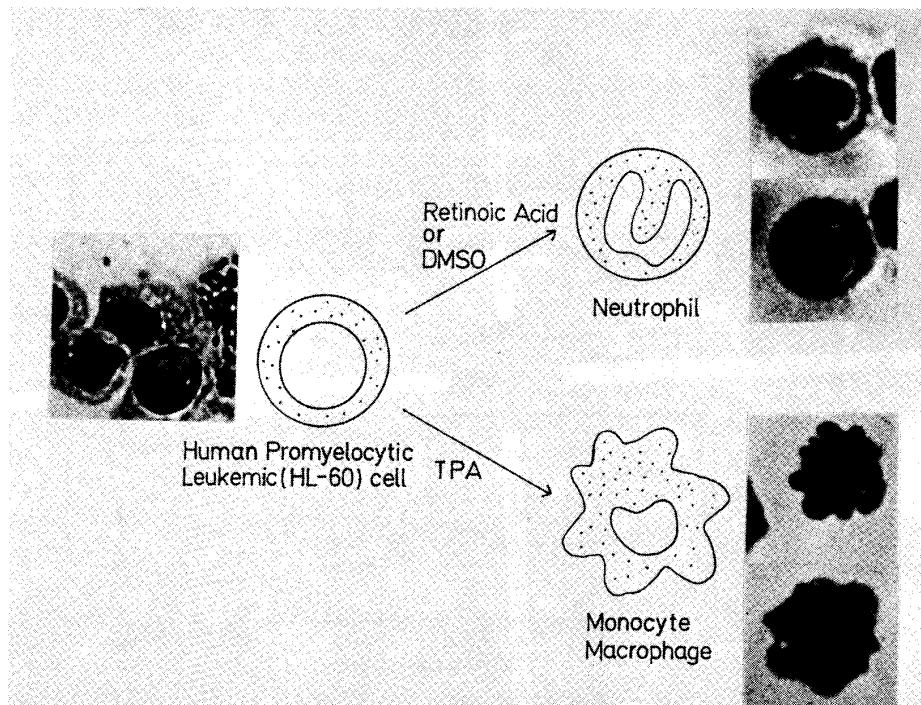
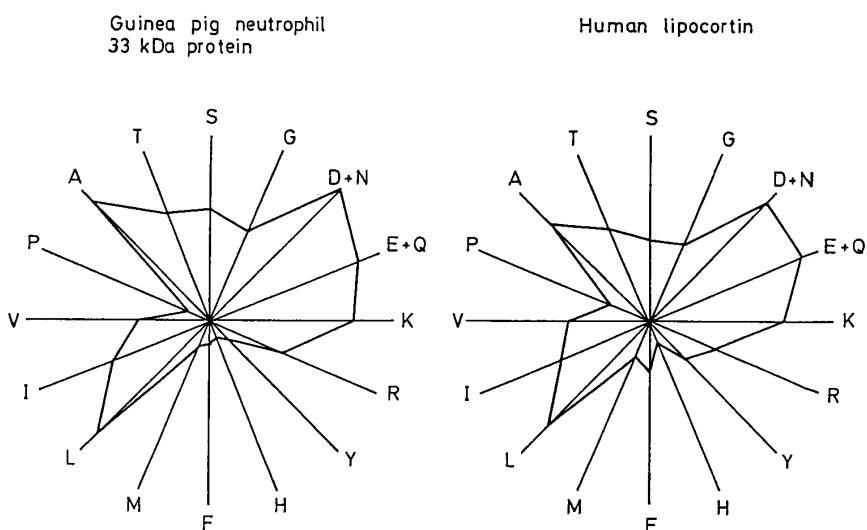


図18. 人前骨髓球性白血病細胞 HL-60の形質転換に伴う p33の出現

HL-60細胞を DMSO や PMA で形質転換させ、人好中球より分離した p33に対するマウスポリクロナール抗体で免疫染色を行ったもので、形質転換に伴い p33の出現が認められる。

(212-216)の配列があり、繰り返し構造のあることが明らかにされている。またカルパクチン1(重鎖)には70個のアミノ酸からなる繰り返し構造があり、その各々には17個のアミノ酸からなる  $\alpha$  ヘリックス、ループ、 $\beta$  シートという consensus repeat があり、これが  $\text{Ca}^{++}$ 結合に関係しているものと考えられている<sup>90,91</sup>。この他にも種々の活性を持つ蛋白との相同性についても次々と明らかにされつつある。今ここで p33とヒトリポコルチン1のアミノ酸組成を比較すると図19のようで極めて類似性が大きい<sup>76</sup>。またこの蛋白のトリプシンフラグメントやシャノ

図19. p33のアミノ酸組成<sup>76</sup>

33kDa 蛋白質のアミノ酸組成を人リポコルチン1のそれと比較したもの。

ーゲンプロマイドフラグメントの部分アミノ酸配列をみると、それにはヒトリポコルチンの配列と高いホモロジーが認められる（図20）<sup>76)</sup>。

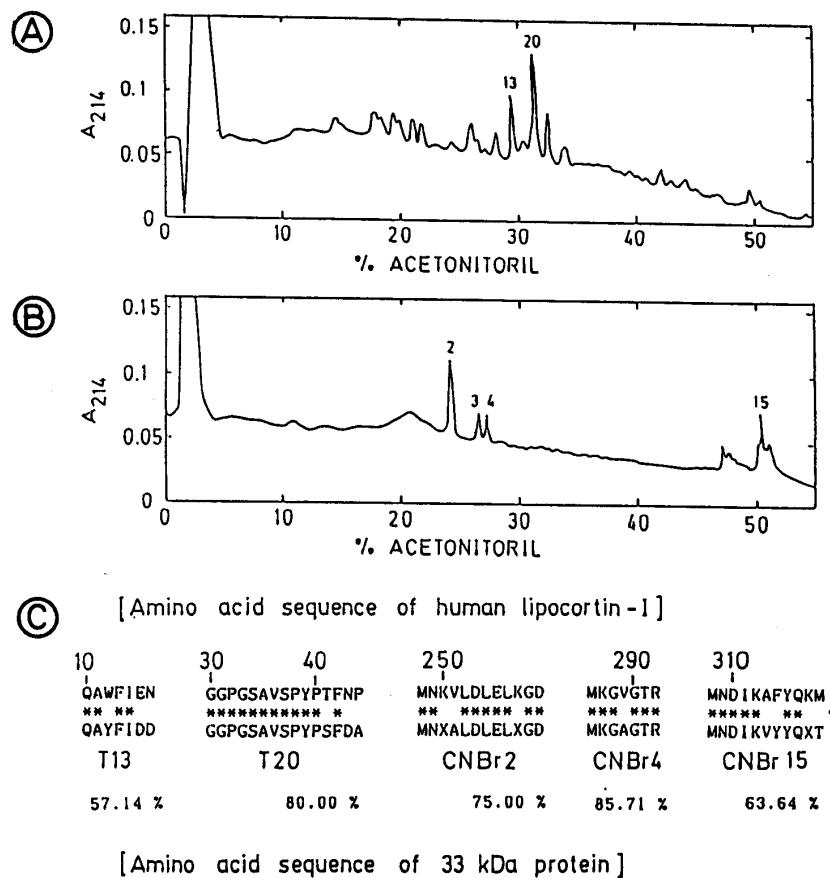


図20. p33のペプチドフラグメントとその部分アミノ酸配列<sup>76)</sup>

精製 p33をトリプシン及びシャノーゲンプロマイド処理し、そのペプチドフラグメントを逆相 C<sub>18</sub>カラムにかけた HPLC 像 (A: トリプシンフラグメント B: シャノーゲンプロマイドフラグメント)。C はその中のいくつかのペプチドについて気相アミノ酸シークエンサーにて分析したもの。T: トリプシンフラグメント, CNBr: シャノーゲンプロマイドフラグメント, ナンバーは人リポコルチンのアミノ酸配列数を示し, %数は p33の各ペプチドにおける人リポコルチンとのホモロジーの%を示す。また\*は両者における相同なアミノ酸配列を示す。

リポコルチン様蛋白の cDNA クローニングは我々の研究を含め現在色々なところで進められているが、我が国でも人胎盤より分離された抗血液凝固作用のある蛋白の cDNA のクローニングとその蛋白のアミノ酸配列が決定され、それがリポコルチン I, II 及びエンドネキシンと極めて高いホモロジーを持つことが明らかにされている<sup>92)</sup>。

従って今後この種の蛋白質の化学構造はより明らかにされ、細胞内での機能の解析も近い将来に期待される。

以上のことからこの蛋白の特性を次のように要略できる。

1. p33は Ca<sup>++</sup>に依存して酸性リン脂質リポゾーム膜に結合する。
2. p33は好中球に特有な蛋白で、好中球の細胞質に分布するが、細胞内 Ca<sup>++</sup>の増加につれて形

質膜に移行する。

3. p33は部分精製したラット脳 C-キナーゼによりリン酸化されるが、このリン酸化は何れの C-キナーゼ活性化物質によっても共通して促進される。なお、リン酸化アミノ酸はセリン残基である。
4. p33は筋肉アクチンと結合するが、KCl 存在下にはその結合性は著しく低下する。
5. p33は膜脂質を基質とするフォスフォリパーゼ A<sub>2</sub>活性を阻害する。
6. 人前骨髄球性白血病細胞 HL-60 では、レチノイン酸や DMSO で好中球様細胞に、また PMA でマクロファージ様細胞に形質転換する時、p33が著しく合成が誘導される。
7. p33のアミノ酸組成やアミノ酸の部分配列はヒトリポコルチン1のそれに高いホモロジーがある。

これらのこととは好中球 p33が好中球特有のリポコルチン様蛋白であり、好中球の代謝応答に重要な働きを持つことを示す。しかし、この蛋白には本稿の始めにも述べたように膜との相互作用による膜の持つ物性への影響を始め、その他にも色々の作用が予期される。従って実際に好中球でどのような他の作用を持つのか、リン酸化で PLA<sub>2</sub>の阻害活性が消失するのか、リン酸化で膜への結合性が消失するのか、また、細胞膜と細胞内顆粒のエキソサイトーシスに関与するのか、なぜ高濃度に細胞質内に分布するのか等今後解析されねばならない多くの問題が残されている。また蛋白構造上から人リポコルチン1やラット腹水浸出細胞と高い類似性が認められているが、他の Ca<sup>++</sup>依存性リン脂質結合蛋白とその遺伝子構造にどのような類似性があるのか多くの点にも興味が持たれ、我々の研究室でも現在この方面的研究を進め cDNA のクローニングに成功し、目下その解析を進めている。

#### 謝辞

本研究は次の方々の御協力によるものであり、ここに付記して感謝の意を表します。

高知医科大学・医学部・生物学教室：佐藤英介、沖増英治、昇 公一、森本保子、宮原正信。

高知医科大学・医学部・病理学教室：原 弘。

高知医科大学附属動物実験施設：枝重圭祐。岡山大学・医学部・解剖学教室： 渡辺定博。

岡山大学・医学部・外科学教室：松野 剛。

尚、本研究にあたり、種々の御助言や便宜をはかつて頂いた高知医科大学附属実験実習器機センターの谷口武利助教授、森沢啓子さん、高知医科大学・免疫学教室の山元 弘助教授、大阪医大・生化学教室 鏡山博行教授 および高知大学・農学部・生化学教室 山本晋平教授に感謝します。

(尚、本稿の校閲中に cDNA の全塩基配列、およびアミノ酸の全配列を決定することに成功し、p33は人およびラットリポコルチン1と90%近いホモロジーを示すことを明らかにすることのできたことを附記したい。)

## 参考文献

- 1) M.Berridge, Scientific American, **253**, 124-134, 1985
- 2) S.Cokcroft, TIBS, 12-February, 75-78, 1984
- 3) Y.Nishizuka, Science, **225**, 1365-1370, 1984
- 4) Y. Nishizuka, Nature, **308**, 693-698, 1984
- 5) M. Wolf, H. Levine III, W. S. May Jr., P. Cuatrecasas and N. Sahyoun Nature, **317**, 546-549, 1985
- 6) S. Terada, K. Nobori, T.Utsumi and K. Utsumi, Cell Struct. Funct., **13**, 395-407,, 1988
- 7) D.R. Sibley, J.L. Benovic, M.G. Caron and R.J. Lefkowitz, Cell, **48**, 913-922, 1987
- 8) 内海耕慥, 沖増英治, 宮原正信 膜, **7**, 2-19, 1982
- 9) M.J.Geisow, FEBS Lett., **203**, 99-103,1986
- 10) M.J.Geisow and J. H. Walker, TIBS II, October, 420-423, 1986
- 11) J.R. Glenney, Jr., B.Tack and M.A.Powell, J.Cell Biol., **104**, 503-500, 1987
- 12) F.F.Davidson, E.A.Dennis, M.Powell and J.R.Glenney, Jr. J.Biol. Chem., **262**, 1698-1705, 1987
- 13) J.K.Mothew, J.M.Krolak and J.R.Dedman, J.Cell Biochen., **32**, 223-234, 1982
- 14) J.Fauvel, P.Vicendo, V.Roques, J.R.Thomas, C.Granier, I. Vilgrain, E.Chambaz, H.Rochat, H. Chap and L.D.Blazy, FEBS Lett., **221**, 397-402,1987
- 15) F.Martin, J-Derancourt, J-Capony, S.Colote and J. Cavadore, Biochem. Biophys. Res. Comm., **145**, 961-968,1987
- 16) P.J.Shadle, V.Gerke and K. Weber, J.Biol. Chem., **260**, 16354-16360, 1985
- 17) T.C.Sudhof, M.Ebbecke, J.H.Walker, U.Fritzsche and C.Boustead, Biochemistry, **23**, 1103-1109, 1984
- 18) M.J. Geisow, J. Childs, B.Dash, A. Harris, G.Panayotou, T. Sudohf and J.H. Walker, EMBO J., **3**, 2969-2974, 1984
- 19) R.J.Owens, C.J. Gallagher and M.J. Crumpton EMBOJ, **3**, 945-952, 1984
- 20) C.E. Cretz, W.J.Zaks, H.C. Hamman, S.Crane, W.H.Martin, K.L.Gould, K.M. Oddie and S.J. Parsons, J.Biol. Chem., **262**, 1860-1868,1987
- 21) W.F.Odenwald and S.J. Morris, Biochem. Biophys. Res. Comm., **112**, 147-154, 1983
- 22) P.Meers, J.D.Ernst., N.Duzgunes., K.Hang, J.Fedor, I.M.Goldstein and D. Papahadjopoulos, J. Biol. Chem., **262**, 7850-7858, 1987
- 23) A.Stutzin, Z.I. Cabantchik, P.E. Lelkes and H.B.Pollard, Biochim. Biophys. Acta, **905**, 205-212, 1987
- 24) C.E. Creutz, C.J. Pazoles and H.B.Pollard, J.Biol. Chem., **253**, 2858-2866, 1978
- 25) P.J.Shadle and K.Weber, Biochim. Biophys. Acta, **897**, 502-506, 1987
- 26) V.Gerke and K. Weber, EMBOJ., **4**, 2917-2920, 1985
- 27) V.Gerke and K.Weber, J.Biol. Chem., **260**, 1688-1695, 1985
- 28) J.Glenney, FEBS Lett., **192**, 79-82, 1985
- 29) H.T.Haigler, D.D.Schlaepfer and W.H.Burgess, J.Biol. Chem., **262**, 6921-6930, 1987
- 30) R.B.Pepepinsky, L.K. Sinclair, J.L.Browning, R.J.Mattaliano, J.E.Smart, E.P.Chow, T.Falbel, A.Ribolini, J.L.Garwin and B.P.Wallner, J.Biol. Chem., **261**, 4239-4246, 1986
- 31) M.A.Powell and J.R.Glenney, Biochem.J., **247**, 321-328, 1987
- 32) J.Glenney, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 4258-4262, 1986
- 33) J.Glenney, J.Biol. Chem., **261**, 7247-7252, 1986

- 34) K.Takagi, H.Hotta and Y.Suketa, *Biochim. Biophys. Acta*, **930**, 320-325, 1987
- 35) D.D.Schlaepfer and H.T.Haigler, *J.Biol. Chem.*, **262**, 6931-6937, 1987
- 36) H.Hayashi, M.K.Owada, S.Sonobe, T.Kakunaga, H.Kawakatsu and J.Yano, *FEBS Lett.*, **223**, 267-272, 1987
- 37) B.P.Wallner, R.J.Mattaliano, C.Hession, R.L.Browning, K.L.Ramachandran and R.B.Pepinsky, *Nature*, **320**, 77-81, 1986
- 38) B.Rothhut, C.Comera, B.Prieur, M.Errasfa, G.Minassian and F.R.Marie, *FEBS Lett.*, **219**, 169-175, 1987
- 39) D.D.Schlaepfer, T.Mehlman, W.H.Burgess and H.T.Haigler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6078-6082, 1987
- 40) J.Fauvel, J.P.Salles, V.Roques, H.Chap. H.Rochat and L.D.Blazy, *FEBS Lett.*, **216**, 45-50, 1987
- 41) P.J.Shadle, V.Gerke and K.Weber, *J.Biol. Chem.*, **260**, 16354-16360, 1985
- 42) M.J.Geisow, U.Frische, J.M.Hexham, B.Dash and T.Johnson, *Nature*, **320**, 636-638, 1986
- 43) T.C.Sudhof, J.H.Walper and J.Obrocki, *J.Neurochem.*, **44**, 1302-1307, 1985
- 44) P.B.Moore, N.K.Friedmann and J.R.Dedman, *J.Cell Sci.*, **72**, 121-133, 1984
- 45) P.B.Moore and J.R.Dedman, *J.Biol. Chem.*, **257**, 9963-9667, 1982
- 46) M.L.Veigle, T.Vanaman and D.Sedwick, *Biochim. Biophys. Acta*, **738**, 21-48, 1984
- 47) M.Tokuda, N.C.Khanna and D.M.Waisman, *Biochem.J.*, **244**, 401-408, 1987
- 48) R.D.Burgoyne, *Trends Biochem.Sci.*, **12**, 85-86, 1987
- 49) R.D.Burgoyne, *Trends Biochem.Sci.*, **8**, 167-169, 1983
- 50) K.Suzuki, *TIBS* **12**, March, 103-105, 1987
- 51) T.Uchida and C.R.Fiiburn, *J.Biol. Chem.*, **259**, 12311-12314, 1984
- 52) M.Shoji, P.R.Birard, G.J.Massei, W.R.Vogler and J.F.Kuo, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **135**, 1144-1149, 1986
- 53) G.J.Blackwell, R.Carmuccio, M.Di Rosa, *Nature*, **287**, 147-149, 1980
- 54) F.Hirata, E.Schiffmann, K.Venkatasubramanian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2533-2536, 1980
- 55) F.Russo-Marie and D.Duval, *Biochim. Biophys. Acta*, **712**, 177-185, 1982
- 56) M.Di Rosa, R.J.Flower, F.Hirata, L.Parente and F.Russo-Rarie, *Prostaglandins*, **28**, 441- , 1984
- 57) J.S.Brugg, *Cell*, **46**, 149-150, 1986
- 58) 松本 正, *代謝*, **24**, 249-256, 1987
- 59) 川合真一, 赤真秀人, 田中広寿, 市川陽一, *近代医学*, **42**, 777-782, 1987
- 60) 徳田雅明, D.M.Waisman, 畠瀬修, *生化学*, **60**, 26-31, 1988
- 61) K.Utsumi, E.Okimasu, Y.Takehara, S.Watanabe, M.Miyahara and Y.Morimoto, *FEBS Lett.*, **124**, 257-260, 1981
- 62) K.Utsumi, E.Okimasu, Y.M.Morimoto, Y.Nishihara and M.Miyahara, *FEBS Lett.*, **141**, 176-180, 1982
- 63) E.Okimasu, N.Shiraishi, S.Kobayashi, Y.M.Morimoto, M.Miyahara and K.Utsumi, *FEBS Lett.*, **145**, 82-86, 1982
- 64) E.Okimasu, J.Sasaki and K.Utsumi, *FEBS Lett.*, **168**, 43-48, 1984
- 65) E.Okimasu, Y.Fujii, T.Utsumi, Y.Morimoto and K.Utsumi, *Cell Struct.Funct.*, **11**, 273-283, 1986
- 66) E.Okimasu, K.Nobori, S.Kobayashi, E.Suzaki, S.Terada and K.Utsumi, *Cell Struct. Funct.*, **12**, 187-195, 1987

- 67) Y.M.Morimoto, E.Sato, K.Nobori, R.Takahashi and K.Utsumi, Cell Struct.Funct., **11**, 143-155, 1986
- 68) M.Yamamoto, E.Okimasu, S.Terada and K.Utsumi, Cell Struct.Funct., **12**, 357-367, 1987
- 69) T.Matsuno, K.Orita, E.Sato, K.Nobori, B.Inoue and K.Utsumi, Biochem.Pharmacol., **36**, 1613-1616, 1987
- 70) K.Utsumi, E.Sato, E.Okimasu, M.Miyahara and R.Takahashi, FEBS Lett., **201**, 277-281, 1986
- 71) M.Wolf, P.Cuatrecasas and N.Sahyoun, J.Biol. Chem., **260**, 15718-15722, 1985
- 72) E.Deli, Z.Kiss, E.Wilson, J.D.Lambeth and J.F.Kuno, FEBS Lett., **221**, 365-369, 1987
- 73) S.L.Pelech, K.E.Meier and E.G.Krebs, Biochemistry, **25**, 8348-8353, 1986
- 74) P.D.Chanther, J.Cell Biol., **101**, 207-216, 1985
- 75) E.F.Sato, Y.M.Morimoto, T.Matsuno, M.Miyahara and K.Utsumi, FEBS Lett., **214**, 181-186, 1987
- 76) E.F.Sato, M.Miyahara and K.Utsumi, FEBS Lett., **227**, 131-135, 1988
- 77) G.Kohler and C.Milstein, Nature, **256**, 495-497, 1975
- 78) E.F.Sato, E.Okimasu, R.Takahashi, M.Miyahara, T.Matsuno and K.Utsumi, Cell Struct. Funct., **13**, 89-96, 1988
- 79) T.Hunter and J.A.Cooper, Annu Rev Biocem., **54**, 897-930, 1985
- 80) N.Johnsson, J.Vandckerchhove, J.V.Damme and K.Weber, FEBS Lett., **198**, 361-364, 1686
- 81) H.Hayahsi, S.Sonobe, M.K.Owada and T.Kakunaga, Biochim. Biophys. Res. Comm., **146**, 912-919, 1987
- 82) Y.M.Morimoto, K.Nobori, K.Edashige, M.Yamamoto and K.Utsumi, Cell Struct.Funct., **13**, 45-49, 1988
- 83) J.A.Cooper, B.M.Sefton and T.Hunter, Methods in Enzymol, **99**, 387-402, 1983
- 84) E.Okimasu R.Takahashi, E.F.Sato, K.Nobori, M.Miyahara and K.Utsumi, 生化学, **59**, 771, 1987
- 85) N.C.Khanna, M.Tokuda and D.M.Waisman, Biochim. Biophys. Res. Comm., **141**, 547-554, 1986
- 86) S.J.Collins, F.W.Ruscetti, R.E.Gallagher and R.C.Gallo, Proc. Natl.Acad.Sci.USA., **75**, 2458-2462, 1978
- 87) H.P.Koeffler, M.Bar-Eli and M.C.Territo, Cancer Res., **41**, 919-926, 1981
- 88) E.F.Sato Y.M.Morimoto, S.Terada, K.Edashige, M.Miyahara and K.Utsumi, 生化学, **59**, 770, 1987
- 89) R.H.Kretsiugger and C.E.Nackolds, J.Biol. Chem., **248**, 3313-3326, 1973
- 90) C.J.Glenny Jr. and T.Hunter, Cell, **46**, 201-212, 1986
- 91) M.J.Giesow, U.Fritshe, J.M.Hexham, B.Dash and T.Johnson, Nature, **320**, 636-638, 1986
- 92) A.Iwasaki, M.Suda, H.Nakao, T.Nagoya, Y.Saino, K.Arai, T.Mizoguchi, F.Sato, H.Yoshizaki, M.Hirata, T.Miyata, Y.Shidora, M.Murata and M.Maki, J.Biochem., **102**, 1261-1273, 1987

(1988年9月1日受理)