

ミクロゾーム膜脂質の構築に関する研究
第2報 肝ミクロゾームリン脂質合成の非対称性とリン脂質の膜内移動

佐藤 忠 弘

札幌医科大学学生化学第1講座 (主任 秋野豊明 教授)

Lipid Topogenesis in Microsomal Membranes
II. Asymmetry of Biosynthetic Sites of Phospholipids
and Their Translocation in Liver Microsomes

Tadahiro SATO

Department of Biochemistry (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief : Prof. T. Akino)

Biosynthetic sites of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine and their translocation in microsomal membranes were studied using phospholipase C (*C. perfringens*) as a probe to distinguish the inner and outer leaflets of microsomes. The results are summarized as follows.

1. The latency of mannose 6-phosphatase activity was not affected by proteolytic degradation with trypsin, whereas the activity of cholinephosphotransferase and ethanolaminephosphotransferase was eliminated. It seems, therefore, that the enzymes that synthesize phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine *de novo* are localized on the outer leaflet of microsomes.

2. Incorporation of CDP-(methyl- ^{14}C)choline and CDP-(2- ^{14}C)ethanolamine into phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in microsomes was found to be concentrated in the compartment hydrolyzed by phospholipase C treatment, the specific activity in the hydrolyzed compartment being approximately two times of the specific activity of that of the unhydrolyzed compartment. These results indicate that the phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine of the outer leaflet of the microsomal membranes are preferentially labeled by the choline- and ethanolamine-phosphotransferase pathways.

3. S-adenosyl (methyl- ^3H)methionine incorporated into phosphatidyl N-monomethylethanolamine, phosphatidyl N, N-dimethylethanolamine and phosphatidylcholine of liver microsomes. In this labeling profile, phosphatidylcholine, a product in the final step of methylation, was preferentially labeled in the compartment hydrolyzed by phospholipase C treatment. In contrast, the labeling of phosphatidyl N-monomethylethanolamine, a product in the first step of methylation, was found to be significant in the unhydrolyzed compartment. Phosphatidyl N, N-dimethylethanolamine was labeled almost equally in both compartments.

4. Liver microsomes labeled *in vivo* with (methyl- ^3H)choline, 1-(1- ^{14}C)palmitoyl glycerophosphocholine or (methyl- ^3H)methionine were treated by phospholipase C. The specific activity of phosphatidylcholine in the hydrolyzed and unhydrolyzed compartments was determined. The ratio of the specific activity between the hydrolyzed and unhydrolyzed compartments was 1.4 in all the microsomes labeled with the above three precursors. However, in phosphatidylethanolamine labeled with (1- ^3H)ethanolamine or 1-acyl glycerophospho(1- ^3H)ethanolamine, the specific activity was almost the same in both compartments. These results indicate that the equilibration of the labels between the hydrolyzed and unhydrolyzed compartments is faster in phosphatidylethanolamine than in phosphatidylcholine.

5. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in microsomes were pulse-labeled with CDP-(methyl- ^{14}C)choline and CDP-(2- ^{14}C)ethanolamine. After reincubation of the microsomes, the distribution of the labels between the hydrolyzed and unhydrolyzed compartments were measured. The labelings of both phospholipids in the unhydrolyzed compartment increased with a corresponding decrease in those in the hydrolyzed compartment. It should be noted that the equilibration of the labels between the hydrolyzed and unhydrolyzed compartments of microsomes was much faster in phosphatidylethanolamine than in phosphatidylcholine.

(Received November 13, 1982 and accepted December 13, 1982)

Key words: Phospholipid, Membrane bilayer, Microsome, Phospholipid translocation

1 緒 言

前報¹⁾において肝ミクロゾームを構成するリン脂質のうち、少なくとも phosphatidylcholine (以下 PC) の位置解析の方法にホスホリパーゼ C (*C. perfringens*) を用いることが示された。肝ミクロゾーム外側(細胞質側)、内側(内腔側)のリン脂質は、膜内に介在する蛋白(酵素)の機能を調節する役割をもつと考えられる²⁾。また、リン脂質はミクロゾームに静的にとどまっているのではなく、それ自体合成・分解し活発に代謝回転することにより、膜蛋白との相互作用を営むと考えられる。ミクロゾームはリン脂質合成工場³⁾であり、ミクロゾーム外側で主として合成されるリン脂質^{4,5)}は膜内に入り込み(内側に移行し)⁶⁾、あるいはリン脂質交換蛋白⁷⁾、membrane flow⁸⁾などの機序により他の細胞内膜成分へ転送、また、胆汁^{9,10)}や血漿リポ蛋白¹¹⁾のリン脂質として細胞外へ移動するなど、動的に代謝されている。

本研究は、肝ミクロゾーム膜脂質構築の様式を検討する第2報として、PC, phosphatidylethanolamine (以下 PE) 合成の局在性と、ミクロゾーム内における PC, PE の移動について検討することを目的とした。PC, PE 合成に関する各種放射性前駆物質を用いて、肝ミクロゾームにおける PC, PE 合成の局在性を検討、PC, PE 合成の局在性を明らかにし、またミクロゾーム外側で新生された PC, PE の内側への膜内移動に違いがあることを示し得たので、報告する。

2 実験材料と実験方法

2.1 実験材料

ホスホリパーゼ C (*C. perfringens*) は Sigma 社から購入、Type I (20 U/mg 蛋白) または Type X (250 U/mg 蛋白) 製品を用いた。トリプシン (210 U/mg), トリプシンインヒビター (1 mg でトリプシン 2.1

mg を不活化) は Worthington 社から購入した。CDP-choline, CDP-ethanolamine, S-adenosyl methionine, phosphatidyl N, N-dimethylethanolamine (以下 PDME) は Sigma 社から、phosphatidyl N-monomethylethanolamine (以下 PMME) は Calbiochem-Behring 社から購入した。

^3H , ^{14}C 標識化合物は全て Amersham 製品を用いた。1-Acyl glycerol-3-phospho[1- ^3H]ethanolamine (lysophosphatidyl[^3H]ethanolamine) は [1- ^3H]ethanolamine (比活性 5.6 Ci/mmol) 1 mCi をラット腹腔内投与後 3 時間の肝から PE を分離¹²⁾し、この標識 PE をホスホリパーゼ A₂ (*N. naja* Venom) で処理¹³⁾して得た。

2.2 肝ミクロゾームの分離

肝ミクロゾームは前報¹⁾で記述した方法で分離した。

2.3 PC, PE 合成酵素活性の測定

非処理ミクロゾーム、トリプシン、ホスホリパーゼ C (*C. perfringens*)、またはホスホリパーゼ C 処理後トリプシンで処理した肝ミクロゾームの、PC, PE 合成酵素活性を測定した。トリプシン処理は Vance *et al.*¹⁴⁾に従い、反応液 1 ml 中、ミクロゾーム (5 mg 蛋白)、トリプシン (1 mg), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を 37°C, 30 分間インキュベートして行い、トリプシンインヒビター 1 mg を加えて反応を停止した。ホスホリパーゼ C 処理は、反応液 1 ml 中、ミクロゾーム (5 mg 蛋白)、ホスホリパーゼ C (*C. perfringens*, Sigma Type I または Type X) 10 U, 1 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 0°C, 30 分インキュベートして行い、EDTA (最終濃度 5 mM) を加えて反応を停止した。ホスホリパーゼ C 処理後トリプシン処理は、上記と同じ方法でホスホリパーゼ C 処理した後、トリプシンで処理して得られた。次いで、これらのミクロゾームを Vance *et al.*¹⁴⁾に従って、0.4% タウロコール酸 Na で 0°C, 30 分処理した後、PC, PE

合成酵素活性を測定した。

1,2-Biacyl-sn-glycerol: CDP-choline cholinephosphotransferase [EC.2.7.8.2], 1,2-diacyl-sn-glycerol: CDP-ethanolamine ethanolaminephosphotransferase [EC.2.7.8.1] 活性の測定は, Kanoh and Ohno の方法¹⁵⁾に準じて行った。0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.5), 20 mM MgCl₂, 5 mM 還元グルタチオン, 2 mM タウロコール酸 Na, 1 mM 1,2-diacylglycerol, 1 mM CDP-[methyl-¹⁴C]choline (比活性 0.1 μ Ci/ μ mol) または 1 mM CDP-[2-¹⁴C]ethanolamine (比活性 0.1 μ Ci/ μ mol) とマイクロゾーム (200 μ g 蛋白/ml) を 30°C, 5 分間インキュベートし, Bligh and Dyer 法¹⁶⁾で脂質を抽出した。この脂質分画を 50% メタノールで 2 回洗浄し, 放射能を測定した。1,2-Diacylglycerol は肝 PC から調製¹²⁾した。

Acyl-CoA: 1-acyl glycerol-3-phosphocholine acyltransferase [EC.2.3.1.23], acyl-CoA: 1-acyl glycerol-3-phosphoethanolamine acyltransferase [EC.2.3.1.-] 活性は Okuyama *et al.*¹⁷⁾の方法に従って測定した。Linoleoyl-CoA は Reitz and Lands¹⁸⁾の方法に従って調製した。80 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 20 μ M linoleoyl-CoA, 0.1 mM 1-[1-¹⁴C] palmitoyl glycerol-3-phosphocholine (比活性 1 μ Ci/ μ mol) または 1-acyl glycerol-3-phospho[1-³H]ethanolamine (比活性 200×10^4 dpm/ μ mol), ミクロゾーム (200 μ g 蛋白/ml) の反応液を 30°C で 5 分間インキュベートした後, Bligh and Dyer 法¹⁶⁾で脂質を抽出した。この脂質分画から一次元薄層クロマトグラフィー (展開溶媒, クロロホルム: メタノール: 水, 70:30:5, v/v)¹⁹⁾で PC または PE を分離し, 放射能を測定した。

2.4 肝マイクロゾーム PC, PE の標識

2.4.1 *In vitro* による標識

0.5 mM CDP-[methyl-¹⁴C]choline (比活性 1 μ Ci/ μ mol) または CDP-[2-¹⁴C]ethanolamine (比活性 1 μ Ci/ μ mol), ミクロゾーム (5 mg 蛋白/ml), 0.25 M sucrose/10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 20 mM MgCl₂ を 37°C でインキュベート, 4 mM CaCl₂ を加え, 氷冷して反応を停止した。この標識マイクロゾームをホスホリパーゼ C (*C. perfringens*) 10 U/ml で 0°C, 30 分処理し, Bligh and Dyer 法¹⁶⁾で脂質を抽出した。

S-adenosyl [methyl-³H]methionine によるマイクロゾームの標識は, Hirata *et al.*²⁰⁾の報告に従い, S-adenosyl methionine 濃度と反応液 pH を変えて

行った。第 1 に 4 μ M S-adenosyl [methyl-³H]methionine (比活性 65 μ Ci/ μ mol), 50 mM sodium acetate buffer (pH 6.5)/0.87% NaCl, 10 mM MgCl₂, 第 2 に 1 mM S-adenosyl [methyl-³H]methionine (比活性 2 μ Ci/ μ mol), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)/0.87% NaCl, 10 mM MgCl₂ を含む反応液とマイクロゾーム (5 mg 蛋白/ml) を 37°C でインキュベート後, 氷冷し, 25 mM NaOH または 0.5 M HCl でそれぞれ pH を 7.4 に調製した後, 1 mM CaCl₂, ホスホリパーゼ C (*C. perfringens*) 30 U/ml で 0°C, 10 分間処理し, Bligh and Dyer 法¹⁶⁾で脂質を抽出した。

2.4.2 *In vivo* による標識

[methyl-³H]Choline (比活性 77 mCi/mmol) 100 μ Ci, [methyl-³H]methionine (比活性 70 Ci/mmol) 100 μ Ci, [1-³H]ethanolamine 100 μ Ci をそれぞれ 0.5 ml の生理食塩水に溶解, また 1-[1-¹⁴C]palmitoyl lysophosphatidylcholine (比活性 40 mCi/mmol) 10 μ Ci, lysophosphatidyl[1-³H]ethanolamine (比活性 450×10^4 dpm/ μ mol) 5 μ mol は 4% 脂肪酸フリー牛血清アルブミン (Sigma 社)/生理食塩水 0.5 ml に溶解し, ラット門脈内に投与した。投与後 30 分の肝臓を摘出しマイクロゾームを分離, この *in vivo* 標識マイクロゾーム (5 mg 蛋白/ml) をホスホリパーゼ C (*C. perfringens*) 10 U/ml, 1 mM CaCl₂ と 0°C, 30 分間インキュベート後, Bligh and Dyer 法¹⁶⁾で脂質を抽出した。

2.5 肝マイクロゾーム標識 PC, PE の追跡実験

2.4.1 の項で述べた実験条件により, CDP-[methyl-¹⁴C]choline または CDP-[2-¹⁴C]ethanolamine と肝マイクロゾームを 37°C, 5 分間インキュベートした。これに 10 mM の未標識 CDP-choline または CDP-ethanolamine, および 4 mM CaCl₂ を加えて PC, PE 合成を停止した後, さらに 37°C でインキュベーションを 30 分間続行した。この間, 反応液から一部を取り出し, 氷冷してホスホリパーゼ C (*C. perfringens*) 30 U/5 mg 蛋白/ml の条件で, 0°C, 10 分間処理し, クロロホルム: メタノール (1/2, v/v) を加えて反応を停止した。

2.6 脂質の分析

各種標識マイクロゾームはホスホリパーゼ C 処理後, Bligh and Dyer 法¹⁶⁾で脂質を抽出した。この脂質抽出液の一部を用いて, リン脂質量と放射能を測定, 全リン脂質の分解率を求めた。残りの脂質抽出液から, 一次元薄層クロマトグラフィー (展開溶媒, クロロホルム: メタノール: 水, 70:30:5, v/v) で PC, PE を分離¹⁹⁾, dichlorofluorescein で検出後, Arvidson 法²¹⁾

により薄層ゲルから抽出して、リン量と放射能を測定した。また、分離されたPC, PEをArvidson²¹⁾の方法に従って、硝酸銀薄層クロマトグラフィーにより分子種に分画した。Pentaeneとhexaene種は相互に分離しなかったため、Polyene種とした。S-adenosyl [methyl-³H]methionineを用いた場合は、Bligh and Dyer法¹⁶⁾で脂質を抽出、この一部からリン脂質量と放射能を測定後、残りの脂質分画にPMME, PDMEをキャリアーとして加えて一次元薄層クロマトグラフィー(展開溶媒、プロピオン酸:n-プロピルアルコール:クロロホルム:水、2:3:1:1, v/v)²²⁾を行い、dichlorofluoresceinで検出した。PC ($R_f=0.42$), PDME ($R_f=0.58$), PMME ($R_f=0.69$), PE ($R_f=0.78$)は相互によく分離したが、PMMEとPDMEはphosphatidylinositol(以下PI), phosphatidylserine(以下PS)と重なるスポットを示した。しかし、脂質分画をDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーで分離すると、ほぼ全ての放射能が中性リン脂質分画に回収され、酸性リン脂質分画の放射能は痕跡程度であったため、S-adenosyl [methyl-³H]methionine由来の放射能はPI, PSには取り込まれていないことが認められた。従って、PI, PSは無視し、PMME, PDMEスポット部分を直接バイアルに入れて放射能を測定した。PCはArvidson法²¹⁾で抽出してリン量と放射能を測定した。Okano *et al.*²³⁾の報告ではArvidson法²¹⁾によるPCの回収率は94.2%なので、この値を用いて補正し、PMME, PDMEの値と比較した。

2.7 その他の分析

Mannose 6-phosphataseはArion *et al.*²⁴⁾の方法、脂質リン量はBartlett法²⁵⁾、蛋白量はLowry法²⁶⁾で測

定した。放射能はsilica gelを含む場合はACS II (Amersham), silica gelを含まない場合はトルエンシンチレーター²⁷⁾を用い、液体シンチレーションカウンターにより測定した。硝酸銀薄層クロマトグラフィーで分画されたPC, PE分子種のスポットは、直接バイアルに入れ、適量のNaCl結晶、50%メタノール0.5 ml, 酢酸1滴を加え混和した後、ACS II 10 mlを加えて再度混和、これを一晩放置後放射能を測定した。

3 実験結果

3.1 PC, PE合成酵素の肝ミクロゾームにおける局在

トリプシン、ホスホリパーゼC処理肝ミクロゾームにおけるPC, PE合成酵素活性測定の結果をTable 1に示した。mannose 6-phosphatase活性の潜在性(78.1%)が確認されているトリプシン処理ミクロゾームにおいて、cholinephosphotransferase活性の88.2%, ethanolaminephosphotransferase活性の66%が失われた。この結果は両酵素がミクロゾーム外側に存在することを示唆する。1-Acyl glycerol-3-phosphocholine(以下1-acyl GPC) acyltransferase, 1-acyl glycerol-3-phosphoethanolamine(以下1-acyl GPE) acyltransferase活性はトリプシン処理ミクロゾームで残存し、全リン脂質の約50%が分解する量のホスホリパーゼCでミクロゾームを処理した場合も同じであった。ホスホリパーゼC処理後トリプシンで処理するとmannose 6-phosphatase活性の潜在性は失われるが、この際でも1-acyl GPC acyltransferase活性の88%, 1-acyl GPE acyltransferase活性の59%が残存していた。これらの事実は、両アシル化酵素はトリプシン処理によって活性中心は安定で、ま

Table 1 Effects of trypsin and phospholipase C (*C. perfringens*) on the activity of phospholipid biosynthetic enzymes associated with microsomes from rat liver

Treatment of microsomes	% Activity				
	1,2-Diacylglycerol: CDP-choline cholinephosphotransferase	1,2-Diacylglycerol: CDP-ethanolamine ethanolaminephosphotransferase	Acyl CoA:1-acyl glycerol-3-phosphocholine acyltransferase	Acyl CoA:1-acyl glycerol-3-phosphoethanolamine acyltransferase	Mannose 6-phosphatase
None	100	100	100	100	100
Trypsin	11.8±0.7	34.0±4.6	88.5±3.3	101.0±5.7	78.1
Phospholipase C	74.6±3.3	73.0±5.9	101.8±2.6	79.3±13.7	75.0
Phospholipase C + trypsin	2.8±1.9	29.3±16.2	87.9±1.6	58.7±2.7	11.3

Microsomes(5 mg protein) were incubated with 1.0 mg trypsin, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 37°C for 30 min. Soybean trypsin inhibitor(1.0 mg) was added to terminate the reaction. Microsomes(5 mg protein) were also incubated with 10 U phospholipase C (*C. perfringens*), pH 7.4 at 0°C for 30 min. Aliquots were removed from the incubation mixture and incubated with 0.4% sodium taurocholate in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 0°C for 30 min. Enzyme activities were then determined. Values are means ± S.D. (n=3). Values of mannose 6-phosphatase are means of two determinations.

た膜リン脂質の分解によっても活性は維持される状態でミクロゾーム内に存在していることを示しており、トリプシン、ホスホリパーゼC処理によって両アシル化酵素のミクロゾームにおける局在を明らかにすることはできないと思われた。

3.2 *In vitro*における標識前駆物質の肝ミクロゾーム PC, PE への取り込み

肝ミクロゾームを CDP-[methyl- ^{14}C]choline, CDP-[2- ^{14}C]ethanolamine とインキュベートした後、ホスホリパーゼCで処理、分解 PC, PE および未分解 PC, PE の比活性を求めた (Fig. 1). 分解 PC, PE はミクロゾームの外側、未分解 PC, PE は内側に位置するものとして、以下ミクロゾーム外側、内側と記すことにする。CDP-[methyl- ^{14}C]choline の PC への取り込みは外側が内側の約 2 倍であり、インキュベーション 120 分でもこの比は変わらなかった。CDP-[2- ^{14}C]ethan-

olamine の PE への取り込みも外側で著明であった。しかし、インキュベーション 30 分までは外側 PE の比活性は内側 PE の約 2 倍であるが、120 分の内側 PE の比活性は外側 PE に近づいており、PC の場合とは異なっていた。インキュベーション短時間 (2, 5 分) で内側 PC, PE 標識の lag を認めることは出来なかったが、この結果は、CDP-choline, CDP-ethanolamine を經由する PC, PE の *de novo* 合成がミクロゾーム外側で主として行われていることを示し、上記の酵素活性測定結果と一致していた。また、ミクロゾーム外側で *de novo* に新生された PC の内側への移動は遅いが、PE の移動は PC よりも活発であることが示唆されている。

次いで、PE のメチル化により PC を合成する際のメチル基供与体、S-adenosyl [methyl- ^3H]methionine を肝ミクロゾームとインキュベート、ミクロゾーム外側、内側 PMME, PDME, PC の取り込みを検討した。

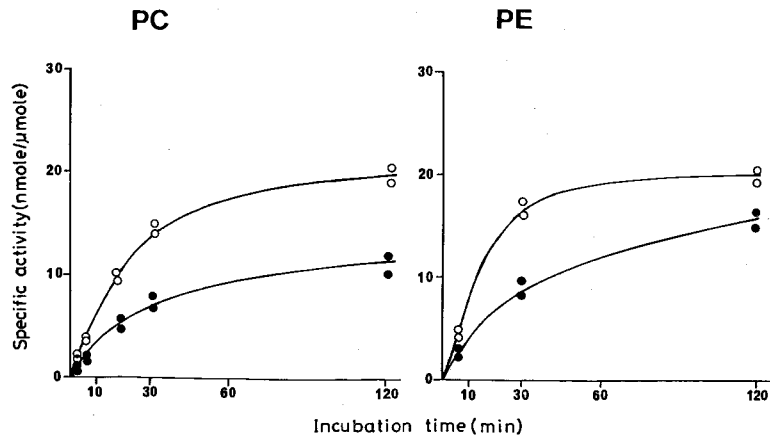


Fig. 1 Incorporation of CDP-(methyl- ^{14}C)choline and CDP-(2- ^{14}C)ethanolamine into phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) in hydrolyzed and unhydrolyzed compartments of rat liver microsomes by phospholipase C (*C. perfringens*). Microsomes (5 mg protein) were incubated for different times at 37°C with CDP-(methyl- ^{14}C)choline (0.5 mM, 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$) and CDP-(2- ^{14}C)ethanolamine (0.5 mM, 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mole}$) in 0.25 M sucrose/10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 20 mM MgCl_2 . The reaction was stopped at the appropriate times by addition of CaCl_2 (4 mM). Microsomes were then treated with phospholipase C (*C. perfringens*) at 0°C for 30 min. Lipids were extracted, and the unhydrolyzed phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine were separated by thin-layer chromatography. The radioactivity and amount of phosphorus of these lipids were determined. The specific activity of hydrolyzed and unhydrolyzed phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine was then calculated.

○—○, hydrolyzed compartment; ●—●, unhydrolyzed compartment.

このインキュベーションは, Hirata *et al.*²⁰⁾ の報告に従い, S-adenosyl methionine 濃度と反応液 pH を変えて行った. S-adenosyl methionine の取り込みにおける PMME/PDME/PC の比は S-adenosyl methionine 1 mM, pH 8.5 の場合, S-adenosyl methionine 4 μ M, pH 6.5 の場合で, 共に約 1/2/3 であった (インキュベーション 120 分) が, pH 8.5 の場合の取り込みは pH 6.5 の場合の約 10 倍であった (Fig. 2). また酸性条件下では, インキュベーション初期に PMME, PDME 合成が活発であることが示されている. pH 8.5 の条件では (Fig. 3), PC は外側へ内側の約 2 倍取り込まれた. これに対し, PMME は内側の取り込みが外側よりも著明であった. また PDME への取り込みは外側が内側より高いが, その差は僅かであった. pH

6.5 の条件でも (Fig. 4), PC への取り込みは外側が内側の約 2 倍であり, PMME では内側の取り込みが外側よりも高かった. PDME ではインキュベーション 30 分までは内側が高いが, 120 分では外側の取り込みが高く, 逆転がみられた.

3.3 *In vivo* における標識前駆物質の肝ミクロゾーム PC, PE への取り込み

[methyl-³H]Choline, 1-[1-¹⁴C]palmitoyl GPC, [methyl-³H]methionine をラット門脈内に投与後 30 分の肝から分離したミクロゾームをホスホリパーゼ C で処理し, 外側および内側 PC への取り込みについて検討した (Table 2). [methyl-³H]Choline から PC の diene 種, 1-[1-¹⁴C]palmitoyl GPC では tetraene 種, [methyl-³H]methionine からは polyene 種が主として

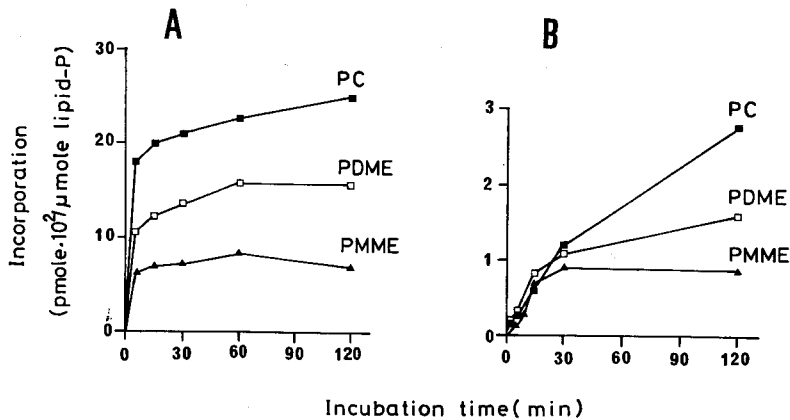


Fig. 2 Incorporation of S-adenosyl (methyl-³H)methionine into phosphatidyl N-monomethylethanolamine (PMME), phosphatidyl N, N-dimethylethanolamine (PDME) and phosphatidylcholine (PC) of rat liver microsomes in high pH (A) and low pH (B). In A, microsomes (5 mg protein) were incubated with S-adenosyl methionine (1 mM, 2 μ Ci/ μ mole) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5)/0.87% NaCl, 10 mM MgCl₂. In B, microsomes (5 mg protein) were incubated with S-adenosyl methionine (4 μ M, 65 μ Ci/ μ mole) in 50 mM Na acetate buffer (pH 6.5)/0.87% NaCl, 10 mM MgCl₂. Lipids were extracted and separated into phosphatidyl N-monomethylethanolamine, phosphatidyl N, N-dimethylethanolamine and phosphatidylcholine with carrier of phosphatidyl N-monomethylethanolamine and phosphatidyl N, N-dimethylethanolamine by thin-layer chromatography. Values of pmole·10³ C³H₃ groups incorporated into μ mole total phospholipid are plotted against time of incubation. A typical experiment is shown in this figure. The experiments were repeated two times with essentially the same results.

▲—▲, phosphatidyl N-monomethylethanolamine; □—□, phosphatidyl N, N-dimethylethanolamine; ■—■, phosphatidylcholine.

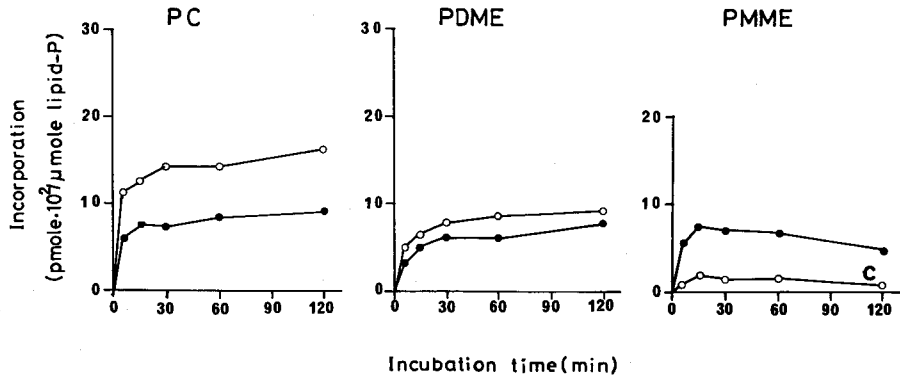


Fig. 3 Incorporation of S-adenosyl (methyl-³H)methionine into phosphatidyl N-monomethylethanolamine (PMME), phosphatidyl N,N-dimethylethanolamine (PDME) and phosphatidylcholine (PC) in hydrolyzed and unhydrolyzed compartments of rat liver microsomes by phospholipase C (*C. perfringens*). This experiment was carried out under the high pH condition described in Fig. 2. After extraction of lipids, phosphatidyl N-monomethylethanolamine, phosphatidyl N,N-dimethylethanolamine and phosphatidylcholine were separated by thin-layer chromatography. The radioactivity of these lipids was determined.

○—○, hydrolyzed compartment; ●—●, unhydrolyzed compartment.

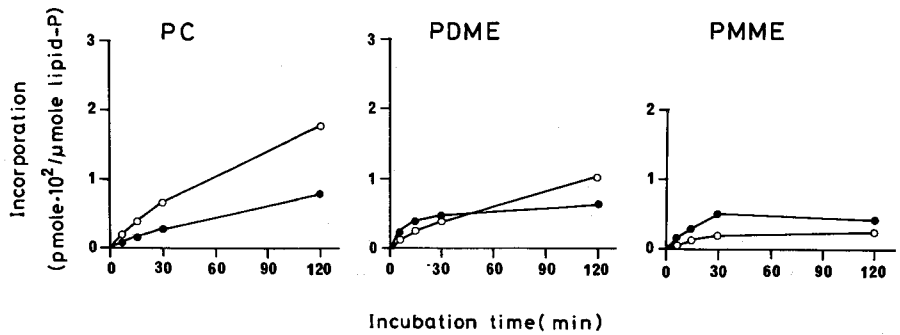


Fig. 4 Incorporation of S-adenosyl (methyl-³H)methionine into phosphatidyl N-monomethylethanolamine (PMME), phosphatidyl N,N-dimethylethanolamine (PDME) and phosphatidylcholine (PC) in hydrolyzed and unhydrolyzed compartments of rat liver microsomes by phospholipase C (*C. perfringens*). This experiment was carried out under the low pH condition described in Fig. 2. After extraction of lipids, phosphatidyl N-monomethylethanolamine, phosphatidyl N,N-dimethylethanolamine and phosphatidylcholine were separated by thin-layer chromatography. The radioactivity of these lipids was determined.

○—○, hydrolyzed compartment; ●—●, unhydrolyzed compartment.

形成された。いずれの場合も全体のPC（以下、全PC）の分解率よりも標識PCの分解率が高く、分解（外側）PCと未分解（内側）PCの比活性の比は、全ての標識前駆物質ではほぼ同じ値（1.4）であった。この結果は、酵素活性の測定においてその局在が不明であった1-acyl GPCのアシル化経路によるPCの合成も、主として外側で行われていることを示唆している。*In vitro*でCDP-[methyl-¹⁴C]cholineと5分間インキュベーション後調製したミクロゾームの分解PCと未分解PCの比活性比は2.1なので、*in vivo*に標識前駆物質投与後30分の肝ミクロゾームでは、外側から内側への新生PCの移動が起きていたと考えられる。またこの結果は、ミクロゾーム外側で新生されたPCが外側から内側へ移動する際、PCの合成経路による差異、およびPC分子種における差異はないことを示していると思われる。

[1-³H]Ethanolamine, lysophosphatidyl[1-³H]ethanolamineを上記と同じくラット門脈内に投与後30分の肝ミクロゾームにおけるPEへの取り込みについて

検討した（Table 3）。これらの標識前駆物質から主として生成されるPEの分子種は、ethanolamineではpolyene種、1-acyl GPEではtetraene種であった。PEの場合はPCとは異なり、全体のPE（以下、全PE）の分解率と標識PEの分解率はほぼ同じで、分解（外側）PEと未分解（内側）PEの比活性は非常に似た値であった。その比活性の比は[1-³H]ethanolamineでは1.10, lysophosphatidyl[1-³H]ethanolamineでは1.04であった。*In vitro*に肝ミクロゾームをCDP-[2-¹⁴C]ethanolamineと5分間インキュベーションした際の分解PEと未分解PEの比活性の比は1.8であった。つまりPEの場合、外側と内側の標識が平衡に達する速度は、PCよりも速いと考えられた。またこの場合も、PEの合成経路および分子種における差異はないと考えられた。

3.4 新生PC, PEのミクロゾーム膜内移動

肝ミクロゾームをCDP-[methyl-¹⁴C]cholineあるいはCDP-[2-¹⁴C]ethanolamineと37℃、5分間イン

Table 2 Asymmetrical labeling of phosphatidylcholine in rat liver microsomes by various precursors. Probe by phospholipase C (*C. perfringens*)

	<i>In vitro</i> (5 min)		<i>In vivo</i> (30 min)	
	CDP-(¹⁴ C)choline	(³ H)Choline	(³ H)Methionine	1-(¹⁴ C)Palmitoyl glycerophosphocholine
Label distribution among molecular species of phosphatidylcholine (%)				
Monoenoic	—	20.2	6.0	7.2
Dienoic	—	57.8	23.1	20.1
Trienoic	—	3.5	3.0	2.5
Tetraenoic	—	10.2	24.5	48.9
Polyenoic	—	8.3	43.4	21.3
Hydrolysis (%)				
Total phospholipid	40.5	54.3	42.7	50.2
Total phosphatidylcholine	51.5	68.2	51.9	65.7
Labeled phosphatidylcholine	75.2	75.3	60.3	70.5
Specific activity (dpm/nmole)				
Total phosphatidylcholine	21.3	458	387	4.15
Unhydrolyzed phosphatidylcholine (U)	15.3	359	320	3.28
Hydrolyzed phosphatidylcholine (H)	32.0	506	450	4.57
		2.09	1.41	1.41
				1.39

(methyl-³H)Choline(100 μCi), 1-(1-¹⁴C)palmitoyl glycerophosphocholine(10 μCi) or (methyl-³H)methionine(100 μCi) was injected into the portal vein of rats 30 min prior to sacrifice and preparation of liver microsomes. Aliquots of the *in vivo* labeled microsomes were taken for analysis of molecular species of phosphatidylcholine. The *in vitro* labeling of microsomes by CDP-(methyl-¹⁴C)choline was done as described in Fig. 1. The *in vivo* or *in vitro* labeled microsomes were treated with phospholipase C (*C. perfringens*) at 0°C for 30 min. The lipids were extracted and unhydrolyzed phosphatidylcholine was separated by thin-layer chromatography. Percent hydrolysis of total phospholipid, total phosphatidylcholine and labeled phosphatidylcholine was determined. The specific activity(dpm/nmole)of total and unhydrolyzed phosphatidylcholines was determined and that of hydrolyzed phosphatidylcholine was calculated from hydrolysis of total phosphatidylcholine. Results are averages of two determinations.

Table 3 Asymmetrical labeling of phosphatidylethanolamine in rat liver microsomes by various precursors. Probe by phospholipase C (*C. perfringens*)

	<i>In vitro</i> (5 min)		<i>In vivo</i> (30 min)	
	CDP-(¹⁴ C)ethanolamine		(³ H)Ethanolamine	1-Acylglycerophospho-(³ H)ethanolamine
Label distribution among molecular species of phosphatidylethanolamine (%)				
Monoenoic	—		7.3	6.2
Dienoic	—		18.2	21.4
Trienoic	—		0.9	0.8
Tetraenoic	—		19.4	45.0
Polyenoic	—		55.2	26.6
Hydrolysis (%)				
Total phospholipid	42.4		40.5	48.1
Total phosphatidylethanolamine	33.3		46.2	52.0
Labeled phosphatidylethanolamine	48.4		48.9	53.2
Specific activity (dpm/nmole)				
		H/U		H/U
Total phosphatidylethanolamine	17.2		946	57.7
Unhydrolyzed phosphatidylethanolamine(U)	14.2	} 1.83	921	} 1.10
Hydrolyzed phosphatidylethanolamine (H)	26.1		1012	

(1-³H)Ethanolamine(100 μ Ci) or 1-acyl glycerophospho(1-³H)ethanolamine(10 μ Ci) was injected into the portal vein of rats 30 min prior to sacrifice and preparation of liver microsomes. Aliquots of the *in vivo* labeled microsomes were taken for analysis of molecular species of phosphatidylethanolamine. The *in vitro* labeling of microsomes by CDP-(2-¹⁴C)ethanolamine was done as described in Fig. 1. The *in vivo* or *in vitro* labeled microsomes were treated with phospholipase C (*C. perfringens*) at 0°C for 30 min. The lipids were extracted and unhydrolyzed phosphatidylethanolamine was separated by thin-layer chromatography. Percent hydrolysis of total phospholipid, total phosphatidylethanolamine and labeled phosphatidylethanolamine was determined. The specific activity(dpm/n mole)of total and unhydrolyzed phosphatidylethanolamines was determined and that of hydrolyzed phosphatidylethanolamine was calculated from hydrolysis of total phosphatidylethanolamine. Results are averages of two determinations.

キュベート, 過剰 (10 mM) の未標識 CDP-choline あるいは CDP-ethanolamine, CaCl₂ (最終濃度 4 mM) を加えて, PC, PE 合成を停止, さらに 37°C でインキュベーションを続行し, ミクロゾームの外側と内側の PC, PE の比活性をインキュベーション時間と共に追跡した. 結果は Fig. 5 に示される. 反応停止時, つまり追跡開始時におけるミクロゾームで新生された PC の比活性は, 外側が内側の約 2 倍であった. 外側 PC の比活性は追跡時間と共に減少するのに対し, 内側 PC の比活性は徐々に上昇することが認められた. PE の場合も同様の結果が認められたが, 特に初期変化が著明であった. すなわち, 追跡開始 5 分までに外側 PE の比活性は著しく減少し, 内側 PE の比活性はこれに見合った上昇を示した. PE のその後の変化は緩やかであった. この結果は, ミクロゾーム外側で *de novo* に合成された PC, PE は内側に移動することを示している. また PC と PE ではその膜内移動に明らかな違いのあるこ

とが示唆された.

4 考 察

本研究は肝ミクロゾームにおける PC, PE 合成の局在を検討する手段としてホスホリパーゼ C (*C. perfringens*) を用い, 各種標識ミクロゾームをそれぞれで処理し, 分解 PC, PE はミクロゾーム外側, 未分解 PC, PE は内側に主として存在すると仮定して行われた. この仮定が成立することは前報¹⁾で報告したが, 本報においても更に確認されている. ホスホリパーゼ C によりミクロゾーム全リン脂質の約 50% が分解する時, 全 PC の分解率は約 60% であるが, *in vitro* に CDP-[methyl-¹⁴C]choline で標識された PC の分解率は約 75-80% であった. また, 全 PE の分解率は約 35-40% であるが, *in vitro* に CDP-[2-¹⁴C]ethanolamine で標識された PE の分解率は約 50-60% で, 明らかに標識 PC, PE の分解率が全 PC, PE の分解率よりも高いことが示され

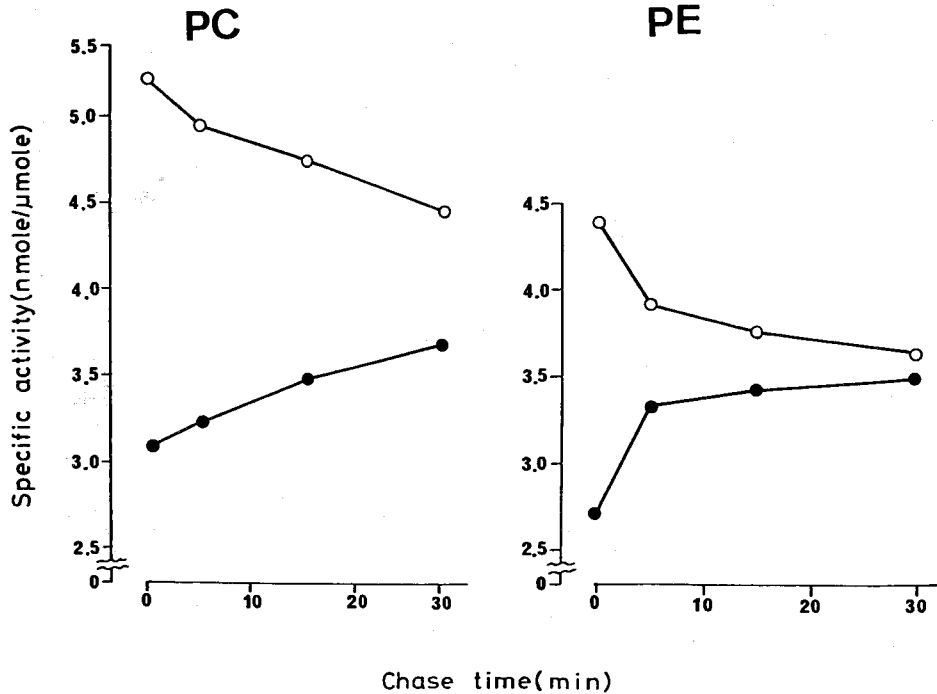


Fig. 5 Chase of labeled phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) in hydrolyzed compartment (outer leaflet) and unhydrolyzed compartment (inner leaflet) after incubation of pulse-labeled microsomes in the absence of continued phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis. Microsomes were labeled by incubating with CDP-(methyl- ^{14}C)choline or CDP-(2- ^{14}C)ethanolamine at 37°C for 5 min. The reaction was stopped by addition of unlabeled CDP-choline or CDP-ethanolamine, and of CaCl_2 (4 mM). Thereafter, the incubation was continued at 37°C for 30 min. Aliquots of the microsomes were taken at the appropriate times and incubated at 0°C for 10 min with phospholipase C (*C. perfringens*). Lipids were extracted and unhydrolyzed phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine were separated by thin-layer chromatography. The radioactivity and amount of phosphorus of these lipids were determined. The specific activity of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in hydrolyzed and unhydrolyzed compartments was then calculated. Values are taken from a typical experiment, because the values of specific activity varied between experiments, though the results were essentially the same in three experiments.
○—○, hydrolyzed compartment; ●—●, unhydrolyzed compartment.

た。つまり、*de novo* 合成された PC, PE はホスホリパーゼ C により分解される画分に主として存在することになる。次に考察するように、cholinephosphotransferase, ethanolaminephosphotransferase はミクロゾーム外側に存在することが示されており、これらの事実からホスホリパーゼ C で分解される PC, PE は主としてミクロゾーム外側に存在するとして支障はないと考えられる。

ミクロゾームにおけるグリセロ脂質合成酵素は、ト

リブシン¹⁴⁾, キモトリブシン⁴⁾, プロナーゼ⁴⁾などの蛋白分解酵素を用いて検討されて来た。これらの蛋白分解酵素はミクロゾーム膜を貫通しないこと^{28,29)}, また透過性バリアーを破壊しないこと^{29,30)}が知られているので、蛋白分解酵素処理により、ミクロゾームの酵素活性が不活化されるか否かが酵素のミクロゾームにおける局在を知る一つの尺度となっている³¹⁾。すなわち不活化されるならば、その酵素はミクロゾームの外側に局在し、膜構造が破壊された後にその酵素が不活化されるなら

ば、内側に局在すると判定する。Cholinephosphotransferase, ethanolaminophosphotransferase 活性は、マイクロゾームのキモトリプシン、トリプシン処理ではほぼ完全に不活化されるので、両酵素はマイクロゾーム外側に局在すると報告^{41,42}されてきたが、本研究でも同様の結果が得られている。Glycerophosphate acyltransferase, 1-acyl glycerophosphate acyltransferase 活性はプロナーゼ処理⁴³および Mercury-dextran 処理³²で不活化され、ホスファチジン酸を形成する両アシル化酵素はマイクロゾーム外側に局在することが報告³³されているが、1-acyl GPC acyltransferase, 1-acyl GPE acyltransferase 両アシル化酵素のマイクロゾーム内局在に関する報告はない。本研究において、トリプシン、ホスホリパーゼ C 処理でこの両アシル化酵素は安定であり、ホスホリパーゼ C 処理後トリプシンで処理した場合、mannose 6-phosphatase 活性の失活がみられるにも拘らず両酵素活性は残存していた。つまり、この手法では両アシル化酵素のマイクロゾーム内局在を決定することはできないと思われた。Hasegawa-Sasaki and Ohno³⁴は肝マイクロゾームの 1-acyl GPC acyltransferase 活性は界面活性剤存在下にトリプシン、パバインで処理しても安定だが、ホスホリパーゼ A₂, ホスホリパーゼ C (B. cereus) 処理では不安定であることを示し、この酵素はマイクロゾーム内で hydrophobic 部分をリン脂質で被覆された状態で存在することが活性維持に重要であるとした。著者は、*in vivo* 投与した 1-[1-¹⁴C]palmitoyl GPC で標識したマイクロゾームをホスホリパーゼ C 処理した時、標識 PC の約 70% が分解され、これは [methyl-³H]choline 投与、つまり *de novo* 合成された PC の場合と同じであることから、1-acyl GPC acyltransferase はマイクロゾーム外側に存在するものと考えている。

PE N-methyltransferase 活性は、PC を生成物として測定した時、トリプシン処理で失活することが報告された¹⁴。しかし、PMME, PDME を生成物として測定した時の局在については検討されていない。Higgins²²は肝マイクロゾームにおいて S-adenosyl [methyl-¹⁴C]methionine 1 mM, pH 8.5 でメチル基は PC へもっとも取り込まれ、PMME, PDME への取り込みは僅かであり、S-adenosyl [methyl-¹⁴C]methionine 4 μM, pH 6.5 でメチル基は PMME, PDME へ主として取り込まれると報告した。本研究でも同じ条件で行ったが、pH 8.5 の場合、全リン脂質への取り込みは pH 6.5 の場合の約 10 倍であった。また、低い pH の場合インキュベーション初期における PMME, PDME への取

り込みが著明であったが、最終的 (120 分インキュベーション) には両条件で PMME, PDME, PC への取り込みの割合は約 1:2:3 でほぼ同じであった。Higgins²²はまた、PMME 生成はマイクロゾーム内側、PC 生成はマイクロゾーム外側で行われることを示した。本研究のマイクロゾーム外側、内側の PMME, PDME, PC への取り込みに関する結果は Higgins²²の結果を確認した。つまり、PE の最初のメチル化は内側で行われ、メチル化の最終段階である PC の生成は外側で起っているといえる。この場合 S-adenosyl methionine はマイクロゾーム膜を貫通して内側に到達しなければならないと思われる。この機構は不明だが、S-adenosyl methionine の輸送蛋白が外側に存在するのかも知れない。PMME から PDME の生成は、内側で PDME が生成されてから外側へ移動する、PMME が外側へ移動後、外側で PDME が生成される、PMME のメチル化と外側への移動が共に起こるといふ機構が考えられる。本研究ではどれが PDME 生成の主たる経路であるかを判定することはできなかった。

PC, PE の *de novo* 合成がマイクロゾーム外側で行われるのは疑いない。PC 合成に関与する酵素のうちでマイクロゾーム内側に局在することが知られているのは塩基交換酵素³³だけである。1-Acyl GPC acyltransferase の局在は不明であるが、PC 合成に関与する酵素の大半はマイクロゾーム外側に局在すると思われる。しかし、PC, PE はマイクロゾームの両側に存在し、肝臓から血中に分泌される血清蛋白は小胞体内腔側で形成される^{35,36}。従ってマイクロゾーム外側で合成された PC, PE は内側へ移動しなければならない。マイクロゾームリン脂質二重層の PC, PE が外側から内側へ、あるいは内側から外側へ移動する機構の詳細は不明である。マイクロゾーム内側の PE がメチル化の過程において外側の PC へ変換されることは Higgins²²により検討されたが、一般に内・外側リン脂質の移動は flip-flop³⁷によって起っていると考えられている。

脂質二重層中のリン脂質の縦方向移動は、スピンドラベル³⁸および NMR³⁹を用い、リポソームで研究されてきた。リポソームの一侧にスピンドラベルしたリン脂質が両側で平衡に達する half time は 10-30 日と測定された³⁸。しかし、native の蛋白を含む生体膜ではリポソームの場合とは異なり flip-flop は速い速度で進行すると考えられている⁴⁰。Zilversmit and Hughes⁴¹はリン脂質交換蛋白を用いて [¹⁴C]choline 標識マイクロゾームからミトコンドリアへ PC が移動する際、82-85% の標識 PC が交換することを見出した。リン脂質交換蛋白はミ

クロゾームベジクルの内側へは達しないことが確認されたので、彼らは内側の標識 PC が外側へ移動するため外側、内側に存在するほとんど全ての標識 PC がミトコンドリアへ転送されると考え、このマイクロゾーム PC の flip-flop の half time を 45 分以下と計算した。また、van den Besselaar *et al.*⁴²⁾ はほぼ同様の実験から、より短い half time を報告している。しかし一方、Higgins²²⁾ は *in vivo*, *in vitro* にマイクロゾーム外側で標識される PC は内側と平衡に達しないと示した。本研究では PC に関して、外側で合成された PC が内側と平衡に達するのは比較的遅いと推測された。もし、マイクロゾーム PC の flip-flop が極めて速いとすれば、内・外側 PC の標識は速やかに平衡に達しなければならない。手法としてリン脂質交換蛋白を用いた場合と、ホスホリパーゼ C を用いた場合との結果におけるこの相違については不明である。

本研究は、PC、PE のマイクロゾーム内移動について興味ある知見を提供した。 *In vivo* に投与した PC 合成前駆物質、³H]choline、1-[¹⁴C]palmitoyl GPC、³H]methionine のマイクロゾーム PC への取り込みにおいて、いずれの場合も外・内側の比活性の比は 1.4 であった。同じく *in vivo* に投与した PE 合成前駆物質、³H]ethanolamine、1-acyl [³H]GPE で標識されるマイクロゾーム PE の比活性は内、外側でほぼ同じであった。この事実はマイクロゾーム外側で新たに合成された PC、PE が内側へ移動する際、PE は PC よりも速やかに平衡に達することを示している。PE が PC よりも速い速度で移動することは、CDP-[¹⁴C]choline、CDP-[¹⁴C]ethanolamine による標識 PC、PE の追跡実験でも示された。本研究において PC と PE のマイクロゾーム膜内移動に相違が認められたことは、この過程が少なくとも PC と PE の間で選択性があることを示している。つまり、リン脂質のマイクロゾーム膜内移動は何らかの調節機構により営まれていることが示唆されている。この flip-flop の調節機構は不明だが、Barsukov *et al.*⁴³⁾ はマイクロゾーム内在性蛋白の cytochrome P-450 を含むリポソームにおいて PC の flip-flop 速度が促進される事実を報告した。これはマイクロゾーム内在性蛋白がこの機構に関与していることを示しており、生体膜の flip-flop の調節も膜蛋白によりなされている可能性が考えられる。

5 結 論

肝マイクロゾームにおける PC、PE 合成の局在性とそのマイクロゾーム膜内移動をホスホリパーゼ C (C. perfringens) 処理の手法を用いて検討し、次の結果を

得た。

5・1 ミクロゾームのトリブシン処理で、cholinephosphotransferase, ethanolaminephosphotransferase 活性が失われることから、この両酵素はマイクロゾーム外側に局在することが示された。

5・2 標識 CDP-choline, CDP-ethanolamine のマイクロゾーム外側 PC、PE への取り込みは内側の約 2 倍であり、トリブシン処理の結果と一致した。外・内側 PC の比活性の比は 120 分までのインキュベーションによってもほとんど変化しないが、PE の場合、内、外側の比活性は近似となった。

5・3 S-adenosyl methionine の標識メチル基の取り込み結果から、PE メチル化の最初の生成物 PMME はマイクロゾーム内側で、最終生成物 PC は外側で形成され、PDME は両側で形成されると思われた。

5・4 標識 choline, 1-acyl GPC, methionine により、*in vivo* に標識された PC のマイクロゾーム外・内側の比活性の比は全て 1.4 であるが、ethanolamine, 1-acyl GPE で標識された PE の外・内側比活性の比は約 1.0 であり、標識 PC、PE のマイクロゾームにおける動態に差がみられた。

5・5 標識 CDP-choline, CDP-ethanolamine で標識されたマイクロゾーム PC、PE の追跡実験から、外側 PC、PE の内側への移動が示され、この場合、PC より PE の移動が著明であることが示唆された。

以上の結果より、肝マイクロゾームにおける PC、PE 合成の局在性が明らかにされ、マイクロゾーム外側で合成された PC、PE が内側へ移動する時、PE は PC よりも速やかに移動することが示唆された。

(稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた本学生化学第 1 講座秋野豊明教授、本研究に御助言いただいた大野公吉名誉教授に深く謝意を表します)

(本研究の一部は、文部省科学研究費一般研究(C) 56570105(秋野)、および北海道老年医学研究振興会の補助によった。)

文 献

1. 佐藤忠弘： ミクロゾーム膜脂質の構築に関する研究。第 1 報肝マイクロゾームリン脂質のホスホリパーゼによる位置解析。札幌医誌 52, 87-98 (1983)。
2. 野澤義則： 生体膜の流動性と機能。生化学 47, 52-82 (1975)。
3. Kennedy, D. P.: Biosynthesis of complex lipids. Fed. Proc. 20, 934-940 (1961)。
4. Coleman, R. and Bell, R. M.: Evidence that bio-

- synthesis of phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, and triacylglycerol occurs on the cytoplasmic side of microsomal vesicles. *J. Cell Biol.* **76**, 245-253 (1978).
5. Higgins, J. A. : Asymmetry of the site of choline incorporation into phosphatidylcholine of rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **558**, 48-57 (1979).
 6. Hirata, F. and Axelrod, J. : Enzymatic synthesis and rapid translocation of phosphatidylcholine by two methyltransferases in erythrocyte membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 2348-2352 (1978).
 7. Wirtz, K. W. A. and Zilversmit, D. B. : Exchange of phospholipids between liver mitochondria and microsomes *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **243**, 3596-3602 (1968).
 8. Morre, D. J. : Membrane flow and its contribution to surface formation. In: Popper H., Bianchi, L. and Reutter, W. : Membrane alterations as basis of liver injury. 15-28, MTP Press, England (1977).
 9. Kawamoto, T., Okano, G. and Akino, T. : Biosynthesis and turnover of individual molecular species of phosphatidylcholine in liver and bile. *Biochim. Biophys. Acta* **619**, 20-34 (1980).
 10. Kawamoto, T., Akino, T., Nakamura, M. and Mori, M. : Metabolism of individual molecular species of phosphatidylcholine in the liver subcellular membranes and bile. Origin of bile phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **619**, 35-47 (1980).
 11. Havel, R. J. : Lipoprotein biosynthesis and metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **348**, 16-27 (1980).
 12. 秋野豊明 : リン脂質の調製法. 医化学実験法講座 1 B. 生体構成成分 II. 152-163, 中山書店 (1972).
 13. Okuyama, H., Lands, W. E. M., Gunston, F. D. and Barve, J. A. : Selective transfer of trans-ethylenic acids by acyl Coenzyme A. Phospholipid acyltransferase. *Biochemistry* **11**, 4392-4398 (1972).
 14. Vance, D. E., Choy, P. C., Farren, S. B., Lim, P. H. and Schneider, W. J. : Asymmetry of phospholipid biosynthesis. *Nature* **270**, 268-269 (1977).
 15. Kanoh, H. and Ohno, K. : Solubilization and purification of rat liver microsomal 1,2-diacylglycerol : CDP-choline cholinephosphotransferase and 1,2-diacylglycerol : CDP-ethanolamine ethanolaminephosphotransferase. *Eur. J. Biochem.* **66**, 201-210 (1976).
 16. Bligh, E. G. and Dyer, W. J. : A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 (1959).
 17. Okuyama, H., Yamada, K. and Ikezawa, H. : Acceptor concentration effect in the selectivity of acyl Coenzyme A : 1-acyl glycerophosphorylcholine acyltransferase system in rat liver. *J. Biol. Chem.* **250**, 1710-1713 (1975).
 18. Reitz, R. C. and Lands, W. E. M. : Effects of ethylenic bond position upon acyltransferase activity with isomeric *cis*, *cis*-octadecadienoyl Coenzyme A thiol esters. *J. Biol. Chem.* **243**, 2241-2246 (1968).
 19. Akino, T., Abe, M. and Arai, T. : Studies on the biosynthetic pathways of molecular species of lecithin by rat lung slices. *Biochim. Biophys. Acta* **248**, 274-281 (1971).
 20. Hirata, F., Viveros, O. H., Diliberto, E. M., Jr. and Axelrod, J. : Identification and properties of two methyltransferases in conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **7**, 1718-1721 (1978).
 21. Arvidson, G. A. E. : Structural and metabolic heterogeneity of rat liver glycerophosphatides. *Eur. J. Biochem.* **4**, 478-486 (1968).
 22. Higgins, J. A. : Biogenesis of endoplasmic reticulum phosphatidylcholine. Translocation of intermediates across the membrane bilayer during methylation of phosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta* **640**, 1-15 (1981).
 23. Okano, G., Akino, T. and Mochizuki, Y. : Molecular composition of lecithins in the primary hepatoma induced by 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Tohoku J. Exp. Med.* **122**, 21-33 (1977).
 24. Arion, W. J., Ballas, L. M., Lange, A. J. and Willin, B. K. : Microsomal membrane permeability and the hepatic glucose 6-phosphatase system. Interactions of the system with D-mannose 6-phosphate and D-mannose. *J. Biol. Chem.* **251**, 4901-4907 (1976).
 25. Bartlett, G. R. : Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468 (1959).
 26. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
 27. Snyder, F. : Radioassay of thin-layer chromatograms: A high-resolution zonal scraper for

- quantitative C^{14} and H^3 scanning of thin-layer chromatograms. *Anal. Biochem.* **9**, 183-196 (1964).
28. DePierre, J. W. and Dallner, G. : Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 411-472 (1975).
 29. Nilsson, R., Peterson, E. and Dallner, G. : Permeability of microsomal membranes isolated from rat liver. *J. Cell Biol.* **56**, 762-776 (1973).
 30. Ito, A. and Sato, R. : Proteolytic microdissection of smooth-surfaced vesicles of liver microsomes. *J. Cell Biol.* **40**, 179-189 (1969).
 31. DePierre, J. W. and Ernster, L. : Enzyme topology of intracellular membranes. *Ann. Rev. Biochem.* **46**, 201-262 (1977).
 32. Ballas, L. M. and Bell, R. M. : Topology of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and triacylglycerol biosynthetic enzymes in rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **602**, 578-590 (1980).
 33. Bell, R. M., Ballas, L. M. and Coleman, R. A. : Lipid topogenesis. *J. Lipid Res.* **22**, 391-403 (1980).
 34. Hasegawa-Sasaki, H. and Ohno, K. : Extraction and partial purification of acyl-CoA : 1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine acyltransferase from rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **617**, 205-217 (1980).
 35. Redman, C. M. : Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver. *J. Biol. Chem.* **244**, 4308-4315 (1969).
 36. Redman, C. M. and Cherian, M. G. : The secretory pathways of rat serum glycoproteins and albumin. Localization of newly formed proteins within the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **52**, 231-245 (1972).
 37. van Deenen, L. L. M. : Topology and dynamics of phospholipids in membranes. *FEBS Lett.* **123**, 3-15 (1981).
 38. Kornberg, R. D. and McConnell, H. M. : Inside-out transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry* **10**, 1111-1120 (1971).
 39. De Kruijff, B. and Wirtz, K. W. A. : Induction of a relatively fast transbilayer movement of phosphatidylcholine in vesicles. A ^{13}C NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* **468**, 318-326 (1977).
 40. Rothman, J. E. and Lenard, J. : Membrane asymmetry. *Science* **195**, 743-753 (1977).
 41. Zilversmit, D. B. and Hughes, M. E. : Extensive exchange of rat liver microsomal phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* **469**, 99-110 (1977).
 42. van den Besselaar, A. M. H. P., De Kruijff, B., van den Bosch, H. and van Deenen, L. L. M. : Phosphatidylcholine mobility in liver microsomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **510**, 242-256 (1978).
 43. Barsukov, L. I., Kulikov, V. I., Bachmanova, G. I., Ahchakov, A. I. and Bergelson, L. D. : Cytochrome P-450 facilitates phosphatidylcholine flip-flop in proteoliposomes. *FEBS Lett.* **144**, 337-340 (1982).

別刷請求先 :

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌区科大学生化学第1講座 佐藤忠弘

ERRATA

THE SAPPORO MEDICAL JOURNAL Vol. 52, No. 1, February 1983

Please make corrections from 1) to 4) with errata

Errors → Corrections

1) p. 89 : the 6th line from the left under

ラット門脈内投与し、 → ラット腹腔内投与し、

2) p. 90 : the 3rd line of the figure legend for Fig. 1

L-(4, 5-³H)leucine(100 μ Ci) → L-(4, 5-³H)leucine(25 μ Ci)

3) p. 92 : the 2nd line from the left top

門脈内投与後 → 腹腔内投与後

4) p. 105 : Fig. 3 PMME

