

リソゾーム膜に存在する糖蛋白質に関する 生化学的研究

赤崎健司, 辻 宏

Biochemical Studies on the Glycoprotein of Lysosomal Membranes.

Kenzi AKAZAKI and Hiroshi TSUJI

ABSTRACT A glycoprotein was purified from rat liver lysosomal membranes. The purified glycoprotein contained about 39% carbohydrates, and showed highly acidic isoelectric point (pH=2.7) due to many sialic acid residues. The glycoprotein designated as MSGP (major sialoglycoprotein in lysosomal membranes) retained tetrameric structures with 420kDa in its native state, which consist of 107kDa(α) and 96kDa(β) subunit polypeptide. Data of Carbohydrate analyses on MSGP showed that MSGP has about 15 N-linked oligosaccharide chains of complex type and 7 O-linked oligosaccharide chains per each subunit.

Topography of MSGP in the tritososomal membranes was examined by ^{125}I -labeled antibodies directed against MSGP and neuraminidase treatment. Antibody binding sites and susceptibility of MSGP to neuraminidase were enclosed within vesicles and became accessible only after disruption of tritosomes with osmotic shock, suggesting that MSGP is on the inside surface of lysosomes.

A kinetic study of MSGP on the biosynthesis and turnover rate was carried out in rat *in vivo* using [^3H]-leucine as a metabolic precursor. The incorporated radioactivity in MSGP was measured after purification of MSGP with immunoaffinity chromatography. Radioactivity in MSGP peaked at 3 hours after [^3H]-leucine injection, and later declined slowly with the approximate half life of 33h, which indicated that MSGP reaches the lysosomes within 3h after its synthesis on the rough endoplasmic reticulum.

諸言

真核細胞の内部には生体膜に囲まれたオルガネラが多数存在し、独自の機能を有している。各々のオルガネラの機能発現にはオルガネラに固有の蛋白質の機能や性質が深くかかわり合っているが、このようなオルガネラがどのようにして形成されるかという問題は、現在、細胞生物学の中心課題の1つになっている。

1955年に *de Duve* らによって発見されたリソゾームも細胞内オルガネラの1つである(1)。リソゾームの機能は細胞内外の物質を消化することであり、この機能の発現には、リソゾームに局在する多数の加水分解酵素が関与している(2)。リソゾーム形成の概念(3)は *Palade* らの膵外分泌細胞を用いたチモーゲン顆粒形成の研究(4)が基礎となって生まれてきた。それによれば、粗面小胞体で合成されたリソゾーム酵素はまずゴルジ複合体に輸送される。次に、リソゾーム酵素は小胞に包みこまれて(1次リソゾーム)ゴルジ複合体から分離し、細胞内外の物質を包み込んだ貧食胞と特異的に融合し、2次リソゾームを形成する。そこでリソゾーム酵素による消化が進行していくと考えられている (Fig.1)(5)。

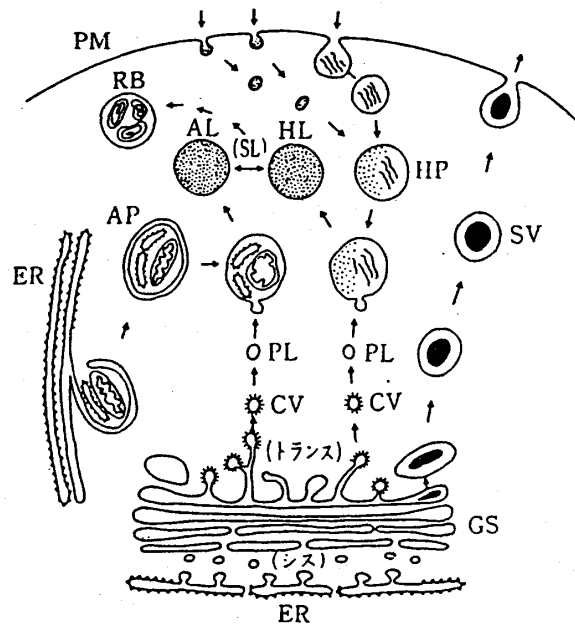


Fig.1. Diagram illustrating the formation of lysosomes.

The detailed explanation was described in the text and abbreviations used were as the following: ER; rough endoplasmic reticulum, GS; Golgi stacks, CV; coated vesicles, PV; primary lysosomes, HP; heterophagosomes, AP; autophagosomes, HL; heterolysosomes, AL; autolysosomes, SL; secondary lysosomes, PM; plasma membranes, RB; residual bodies.

リソゾーム内容物に含まれる β -グルクロニダーゼとカテプシンDの生合成およびプロセッシングに関する研究(6~9)では、上述の概念を支持する知見が得られてきた。

一方リソゾーム膜の形成に関しては、小胞体→ゴルジ→リソゾームと膜が流れていく間に何らかの機構が働いて、リソゾーム膜に固有な蛋白質が選別され、固有な膜蛋白質組成が形成されると考えられる(10)。この仮説を実証するためにはリソゾーム膜に固有な蛋白質を精製し、その生化学的な性質、生合成、細胞内輸送経路、および局在化機構を明らかにしなければならない。

ラット肝のリソゾーム膜には従来から、特徴的な糖蛋白質がかなり存在していることが知られている(11,12)。これらの糖蛋白質の生化学的研究はリソゾーム形成に関する問題を解明する意味で、きわめて重要である。この総説では、ラット肝リソゾーム膜の主要な成分であるシアロ糖蛋白質 (Major Sialoglycoprotein in Lysosomal Membranes ; MSGP) に関する一連の研究を紹介し、他に報告されているリソゾーム膜糖蛋白質の研究についても述べることにする。

1. ラット肝リソゾーム膜の調製

ラット肝より高純度のリソゾーム膜を分離する方法の1つに、まずリソゾームを純度よく分離した後、膜画分を分離する方法がとられている(13~17)。リソゾームを純度よく分離するのによく用いられるのは、Triton WR-1339をラットに投与し、リソゾームに取り込ませリソゾームの比重を軽くし、ミトコンドリアおよびペルオキシゾームからリソゾーム (Tritosome) を分離する方法である(13~15)。また Wattiaux らの方法(18)に従えば、純度の高い正常リソゾームを得ることができる。しかし、これらの方法では大量のリソゾーム膜を調製することは困難であり、膜糖蛋白質の精製には適切ではない。これらの難点を解決するために、正常なラット肝より純度の高いリソゾーム膜を大量に分離することができる簡便調製法を開発した(19)。この方法は無傷なリソゾームを分離した後に、この試料から膜を調製する方法をとらずに、リソゾームが濃縮された画分を低張処理し、リソゾームを破壊した後、他のオルガネラと分離する方法をとっている。

この方法で得られた膜について、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ない、蛋白質および糖の染色をした (Fig.2)。

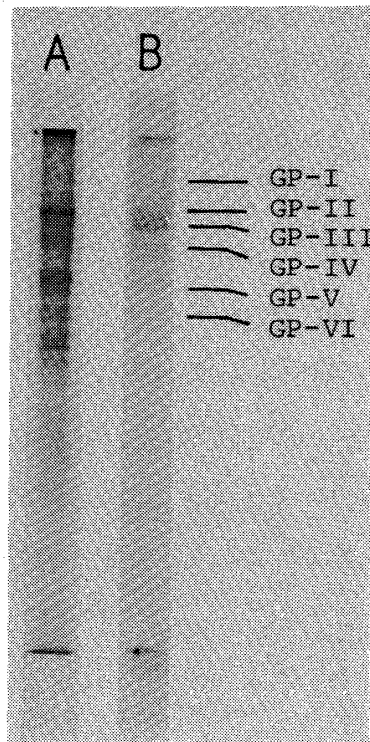


Fig. 2. SDS-Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of rat liver lysosomal membranes.

Lysosomal membranes were prepared from rat livers by the method of Ohsumi et al (19) and then subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Gel-A was stained for proteins with Coomassie blue and gel-B was stained for carbohydrates by periodate-Schiff procedure.

リソゾーム膜には分子量が 60,000 から 120,000 の間に数本の糖蛋白質のバンドが検出される。これらのうち、最も強く染色される GP-II および GP-III がリソゾーム膜の主要なコンポーネントである MSGP のサブユニットである。

2. MSGP の精製と性質(20)

MSGP は簡便法でラット肝から大量に調製したリソゾーム膜を界面活性剤 (Triton X-100) で可溶化した後、2種のレクチン (Concanavalin A と Wheat Germ Agglutinin) を用いたアフィニティークロマトグラフィーで濃縮し、ハイドロキシアパタイトと DEAE-Sepharose

カラムクロマトグラフィーで分離し、調製用 PAGE で均一な状態にまで精製した。Fig.3 には精製した MSGP の SDS-PAGE(21)および Davis の方法による PAGE(22)における泳動パターンを示した。この精製標品の主な生化学的な性質を Table 1 に示した。

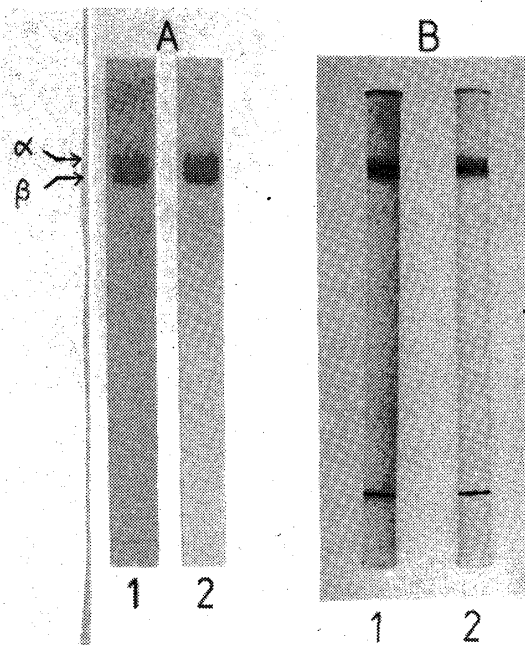


Fig.3. SDS-polyacrylamide and polyacrylamide gel electrophoretic patterns of MSGP purified from rat liver lysosomal membranes by the method of Ohsumi et al (20).

A: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE).

B: Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE).

1: Gels were stained for proteins with Coomassie blue.

2: Gels were stained for carbohydrate by the periodate-Schiff procedure.

Table 1 Biochemical Properties of MSGP

Molecular weight of ^a native form	420,000
Subunit molecular weight ^b	$\alpha = 106,000$ $\beta = 97,000$
Isoelectric point	pH = 2.7
Carbohydrate contents	38.8%

^a Determined by gel filtration on Sephacryl S-300.

^b Determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

MSGP は2種のサブユニット (α , β subunit) から成る分子量 420,000 の糖蛋白質であり、全重量の約39%の糖質を含有していることが明らかになった。Table 2 には MSGP の糖組成を示した。MSGP はマンノースと N-アセチルグルコサミンの他に、ガラクトースとシアル酸を多量に含むことから多量の N-グリコシド型の複合型糖鎖 (Fig. 4, A) を有していると推察される。また N-アセチルガラクトサミンも検出されることから、O-グリコシド型の糖鎖 (Fig. 4-B) も含まれていると考えられる。MSGP の異常に低い等電点は分子内に多量に存在するシアル酸 ($pK_a=2.4$) によるものである。

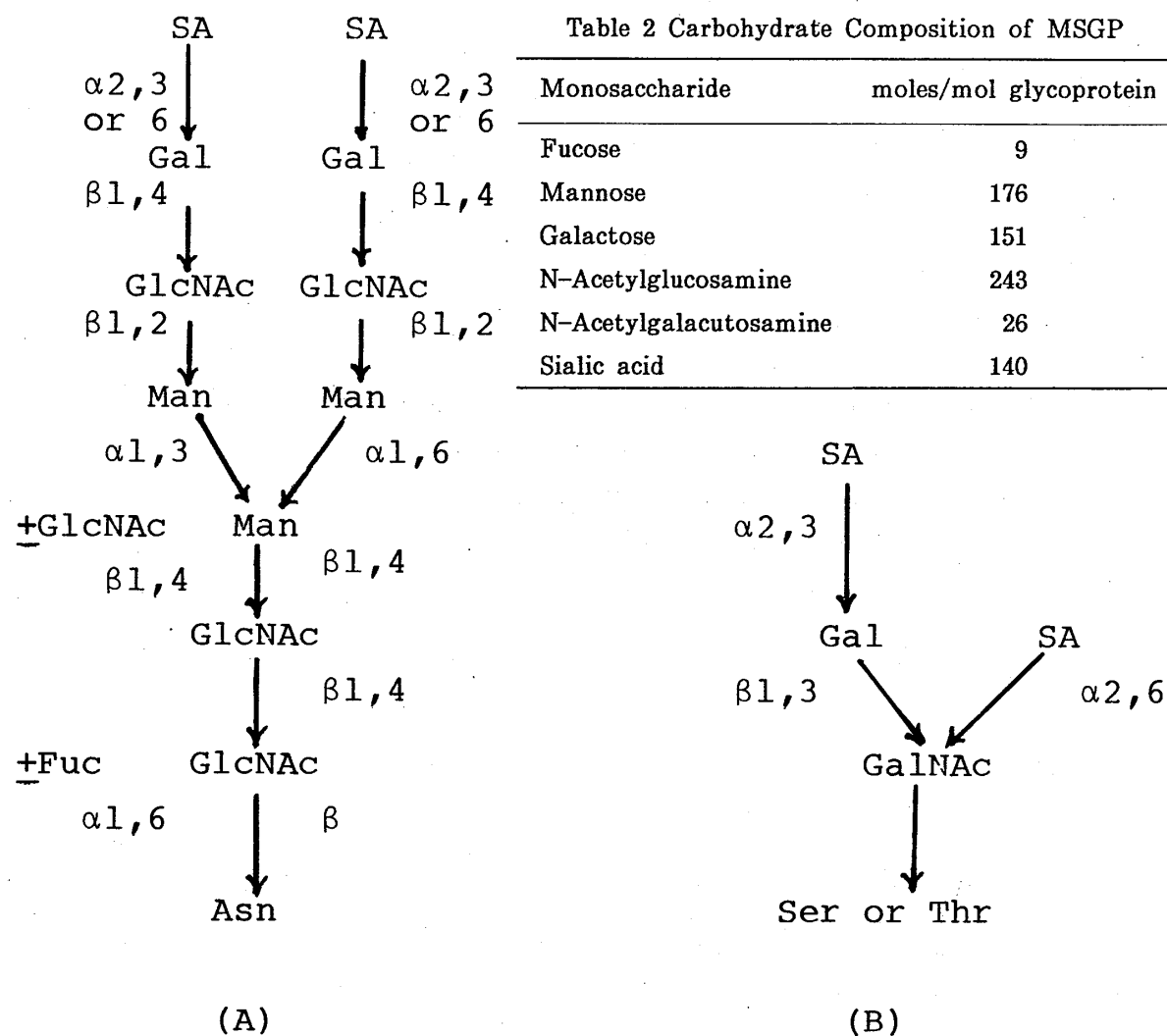


Fig. 4. Structure of a typical complex N-linked oligosaccharide (A) and O-linked oligosaccharide (B).

Abbreviations used were as the following: SA; sialic acid, Gal; galactose, GlcNAc; N-acetylglucosamine, Man; mannose, Fuc; fucose, GalNAc; N-acetylgalactosamine, Asn; asparagine, Ser; serine, Thr; threonine.

3. MSGP に対して特異的な抗体の調製

MSGP の機能, 生合成, 局在化機構を解明する実験を行なうためには MSGP に対して特異的な抗体が必要である。そこで精製した MSGP を家兎に注射し, 抗血清を調製した。得られた抗血清についてオクタロニー免疫二重拡散法(22)を行ない, MSGP に対して特異的な抗体の有無を確かめた (Fig.5)。この結果, 単一の沈降線が得られたので, この抗血清には MSGP に対して特異的な抗体が得られていることが明らかになった。抗体は MSGP を固定した樹脂を用いて精製した。

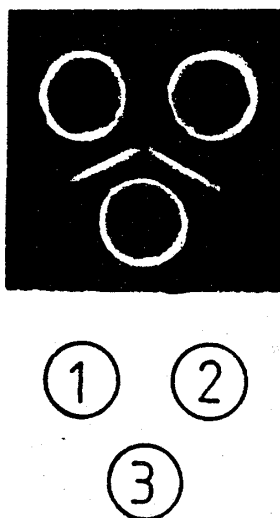


Fig.5. Double immunodiffusion analysis of anti-MSGP antiserum with the purified MSGP and lysosomal membrane lysates.

To each well was added as the following; 1, 10 μg of the purified MSGP; 2, 60 μg of lysosomal membrane lysates; 3, 40 μl of antiserum.

Table 3 Purification of MSGP from rat liver lysosomal membranes with immunoaffinity chromatography. (43g wet weight liver)

	Protein (mg)	Protein ($\mu\text{g}/\text{g}$ of liver)	Yield (%)
1. Lysosomal membranes	4.95	115	100
2. Triton X-100 extracts	3.61	84.1	73
3. WGA affinity chromatography	0.88	20.5	18
4. Immunoaffinity chromatography	0.42	9.7	8.6

4. 固定化抗体を用いた MSGP の精製

2に述べた方法で、MSGP 精製するには多くのカラムクロマトグラフィーを行なわなければならない、しかも収率が低い。そこで、得られた抗体を樹脂に固定し、これを用いたイミューノアフィニティクロマトグラフィーで精製する方法を開発した。Table 3 には各精製段階での収量を示した。Fig.6 にはこれによって得られた精製標品のゲル電気泳動パターンを示した。この泳動パターンから MSGP はほぼ均一な状態にまで精製されたと考えられる。収量はグラム肝当り $9.7 \mu\text{g}$ であり、これは先に述べた方法で精製した場合と比べると約3倍の収量となった。このように、固定化抗体を用いると、MSGP を容易に効率よく精製することができるようになった。

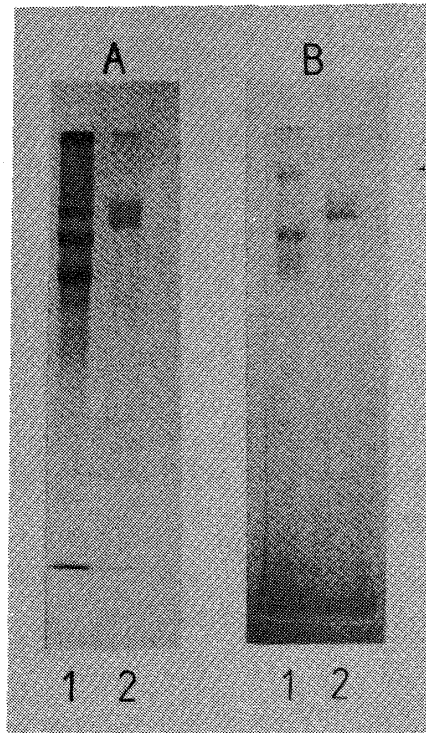


Fig.6. SDS-PAGE of fractions obtained during immunoaffinity chromatography.

Lysosomal membranes solubilized with detergents were subjected to wheat germ agglutinin affinity chromatography to enrich glycoproteins. The enriched glycoproteins were applied to immunoaffinity chromatography (IAC). Fractions recovered from IAC were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels. Lanes 1 and 2 showed SDS-gel electrophoretic patterns of IAC-unbound and IAC-bound fraction respectively. Gels in panel A and B were stained for proteins and carbohydrates respectively.

5. MSGP の細胞内分布とリソゾーム膜における側性(24)

MSGP の抗体を用いる酵素免疫測定法で、MSGP の細胞内分布を調べた。MSGP はリソゾーム (Tritosome) の全蛋白質の約 5% を占めており、さらに、MSGP はミクロゾームおよびゴルジ画分にそれぞれ 0.2%, 0.7% の割合で含有されていた。しかし、ミトコンドリア、形質膜およびサイトゾールには殆ど検出されなかった。リソゾームをさらに膜画分と可溶性画分に分け、MSGP の定量をすると、それぞれの蛋白質の全量の約 10%, と約 2.8% の割合で含有されていた。この結果、MSGP はリソゾームにかなり特異的に濃縮されていることが明確になった。また MSGP はリソゾーム膜を構成する主要な蛋白質であると同時に、リソゾーム内容物中にも可溶性の状態が存在していることも明らかになった。

MSGP の機能を考える上で、MSGP のリソゾーム膜における側性 (特に糖鎖を保持している部分がリソゾームの内側にあるのか、外側にあるのか) を明らかにすることは重要である。MSGP の糖鎖の側性は、MSGP をノイラミニダーゼ処理するとゲル電気泳動の移動度が大きく変化する性質を用いて調べた。無傷のリソゾームと低張処理によって破壊したリソゾームをノイラミニダーゼで処理し、4 に述べたイミュノアフィニティクロマトグラフィーで MSGP を分離し、ゲル電気泳動で移動度を調べた。この結果、無傷のリソゾームの場合、分離した MSGP の移動度には変化がみられなかったが、破壊したリソゾームから得られた MSGP には変化がみられた。さらに、 ^{125}I でラベルした抗 MSGP 抗体で、MSGP のエピトープの側性を調べると、リソゾームの内側に存在することが明らかになった。従って MSGP の糖鎖を含む主要な蛋白部分はリソゾームの内側を向いていることが明らかになった。

6. 可溶性の MSGP の精製と性質

MSGP は可溶性の状態ではリソゾーム内容物中にかなり存在している。内容物中の MSGP (*c*-MSGP) をイミュノアフィニティクロマトグラフィーで精製し、その性質を調べた。*c*-MSGP も膜の MSGP (*m*-MSGP) と同様に 2 種のサブユニットから構成されており、糖質の組成、糖含有量は *m*-MSGP と類似していた。しかし、両者のオリゴマー構造には大きな違いがみられた。すなわち、*m*-MSGP は $\alpha_2\beta_2$ の形をとるのに対して、*c*-MSGP は $\alpha\beta_2$ 構造をしている。しかし両者が無傷のリソゾームでどのような関係にあり、どのように機能しているのかという点については全くわかっていない。

7. MSGP の *in vivo* における生合成と代謝回転(25)

ラット肝リソゾームに含まれる蛋白質のうち、精製された標品について、*in vivo* での放射性アミノ酸の取込みの経時変化や代謝回転が調べられているのは β -グルクロニダーゼ、カテプシンD, B, Hなどのリソゾーム内容物中に含まれる加水分解酵素である(9,26,27)。リソゾーム形成機構を解明するためには、リソゾーム内容物に含まれる蛋白質だけでなく、リソゾーム膜に固有な蛋白質についても、放射性アミノ酸の取込みの経時変化や代謝回転を調べ、比較する必要がある。この意味で MSGP は重要なリソゾーム膜の指標である。

[³H]-ロイシンをラットに投与し、1, 3, 6, 12, 24および48時間後にラットから肝を取出し、リソゾーム膜を調製し、4に述べた方法で MSGP を精製し、比放射活性を調べた。

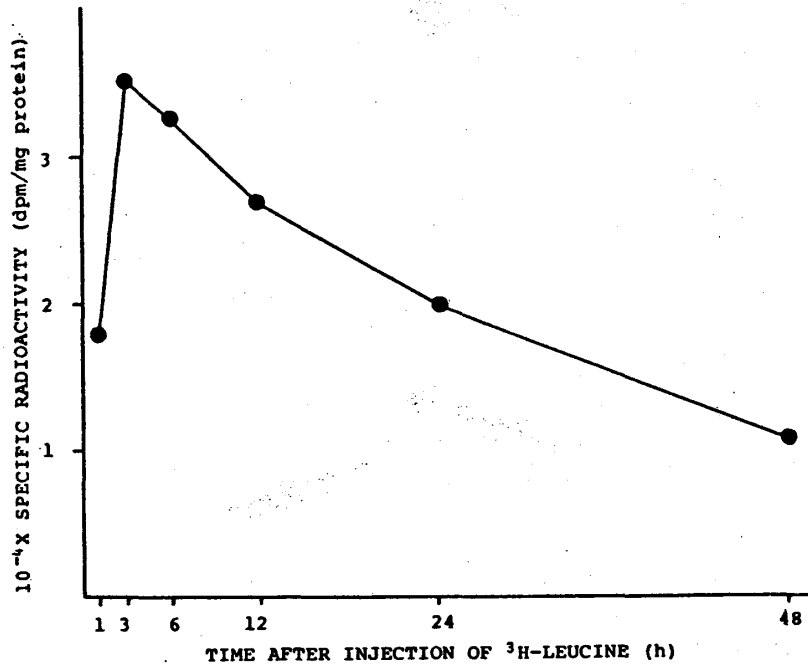


Fig.7. Time-course of incorporation of L-[³H]-leucine in MSGP.

At the time indicated, MSGP was purified from livers of 5 rats receiving [³H]-leucine intraperitoneally. Specific radioactivity is expressed as dpm per mg of protein.

Fig.7 に示したように [³H] ロイシン投与後、放射活性は急速に上昇し、3 時間後にピークに達し、6 時間以降はゆるやかに減少した。MSGP の半寿命を投与後12時間、24時間および48時間の比放射活性値をもとに算定すると、約33時間であった。この結果から、MSGP は生合成後3 時間以内にリソゾームに到達し、以後は半寿命約33時間でゆるやかに代謝回転しているものとみられる。

8. 総括および考察

(1)機能

MSGP の他にも、リソゾーム膜糖蛋白質がいくつかの細胞から分離され、その性質が明らかにされている (Table 4) (28, -30)。いずれの場合もモノクロナール抗体が分離に用いられている。これらのうち、*Reggio* らが精製した lgp 120 は1 分子当たり少なくとも18本のN-グリコシド型の複合型糖鎖を保持しており、しかも、シアル酸による低い等電点を示すことから、MSGP ときわめて類似した糖蛋白質といえる。lgp 120 はリソゾームに局在しており、ゴルジ槽板、皮覆小胞、形質膜にほとんど存在していないことが免疫電顕によって明らかにされている。これに対して、CV-24は主としてリソゾームに検出されるが、形質膜や貪食顆粒にもわずかに認められる。

これらの糖蛋白質の機能はまだ明らかになっていない。しかし、膜の成分が関与しているリソゾームに特有の機能（例えば、リソゾーム内部の酸性化、貪食胞との特異的な融合、物質の選択的な透過など）に重要な役割を果しているものとみられる。

リソゾーム内の pH は細胞質側に比べて、低くなっていることが知られている (31)。このリソゾーム内の酸性化には、リソゾーム膜の ATP 依存性のプロトンポンプが関係していると考えられている (32,33)。しかし、リソゾーム内の酸性保持には MSGP が関与している可能性も否定できない。その理由は MSGP がリソゾーム膜の主要な成分であり、しかもドナソ効果を誘発するのに十分なシアル酸をリソゾームの内側に保持しているからである。いずれにしても MSGP を含めたリソゾーム膜糖蛋白質の機能を解明するためには今後さらに多くの実験が必要である。

Table 4 Lysosomal Membrane Glycoproteins

Glycoprotein	Source	Subunit Mr (kDa)	Characteristic
MSGP	Rat liver	106(α subunit) 97(β subunit)	pI=2.7 Each subunit contains 15 N-linked complex type and 7 O-linked sugar chains.
lgp 120	Rat kidney fibroblast	120	pI<4.3 Contains at least 18 N-linked complex type sugar chains.
LAMP-1 LAMP-2	Mouse embryo 3T3 and NaNIH cell	105~115 100~110	LAMP-1 contains about 20 N-linked complex type sugar chains.
CV 24	Chicken fibroblast	950~105	Contains numerous complex type sugar chains.

(2)生合成と細胞内局在化機構

リソゾーム酵素は緒言に述べたように、分泌蛋白質や形質膜蛋白質と同様に小胞体に結合したリボゾームで生合成される。その後、小胞体内腔に隔離され、被覆小胞に包まれ、ゴルジ装置を経てリソゾームに運ばれると考えられている。このゴルジ装置がリソゾーム酵素の移行に重要な働きをしているものともられる。

リソゾーム酵素の局在化に関しては、リソゾーム酵素の糖鎖中のマンノース-6-リン酸(M-6-P)とその受容体が移行に重要な役割を果しているという説が有力視されている(34)。この説によるとリソゾーム酵素が生合成された後、高マンノース型の糖鎖が付加され、M-6-Pが形成される。これが指標となり、特異的なリセプターに認識され、酵素の輸送の仲介を果たしているというものである。姫野らの実験結果からMSGPも粗面小胞体で生合成され、ゴルジを経て、リソゾームに到達することが明らかになった(35)。しかし、MSGPはリソゾーム酵素とは異なった機構または異なった経路でリソゾームに局在化している可能性を示す知見が得られている。ラットで行なったMSGPの生合成の実験では、MSGPは生合成後3時間以内にリソゾーム到達することが明らかになった。リソゾーム酵素である β -グロクロニダーゼはその糖鎖中にM-6-Pを保有していることが確認されている酵素であるが(36)、この酵素は*in vivo*で生合成後リソゾームに到達するに18時間を要している(9)。従ってMSGPは*in vivo*でも、少なくとも β -グロクロニダーゼとは異なった経路あるいは異なった機構でリソゾームに到達していると考えられる。*von Figura*らはM-6-Pがゴルジのシス画分で形成されることを明らかにしている(37)。また*Farquhar*らはある種の細胞でM-6-Pのリセプターがゴルジのシス側に局在していることを示している(38,39)。これらの知見はリソゾーム酵素がゴルジのシス側から直接リソゾームに移行している可能性を示している。ところがMSGPが保持している複合型糖鎖の形成に関与するガラクトシルトランスフェラーゼやシアリルトランスフェラーゼはゴルジのトランス側に局在していることが明らかにされている(40,41,42)。従ってMSGPはゴルジのトランス側からリソゾームに移行しているものとみられる。これらはMSGPが β -グロクロニダーゼとは異なった経路をたどってリソゾームに到達している可能性を支持している。

*D'Souza*と*August*はマウスの培養細胞を用いてLAMP-1の生合成と細胞内移行を調べているが(43)、LAMP-1は小胞体で生合成されて、わずか30分でリソゾームに到達する。LAMP-1は培養細胞系における他のリソゾーム酵素と比べて、リソゾームに到達する時間がきわめて短いことから、この糖蛋白質がリソゾームの本体を形成するのに重要な役割を

果たしていると考えている。

CV24 はリソゾーム以外にも形質膜や貪食顆粒に検出される。さらに CV24 はリソゾームと形質膜の間を循環していることが示されている。このことは形質膜とリソゾーム膜との間に流れがあることを示すもので、リソゾーム膜形成を考える上で興味深いものである。

これまで述べてきたように、リソゾーム膜の糖蛋白質も形質膜の糖蛋白質と同様に小胞体の膜結合のリソゾームで生合成され、小胞体内腔に隔離される。そこで高マンノース型の糖鎖が付加され、ゴルジ野に移行し、そこで、糖鎖のプロセッシング（複合型への変換）が起こると考えられる。では、一体どのような機構で、これらの糖蛋白質から選別されてリソゾームに移行するのであろうか。この選別機構 (Segregation Mechanism) は M-6-P とそのリセプターによる機構だけでは説明できない。従って、リソゾーム膜糖蛋白質の選別機構の解明が今後、研究の重要な課題となるであろう。

最後に、これら一連の研究は九州大学薬学部、加藤敬太郎教授の御指導のもとに行なわれたものであって、教授の御懇篤な助言に深く感謝するものである。

文 献

1. de Duve, C., B. C. Pressman, R., Gianette, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. (1955) *Biochem. J.* **60**, 604
2. Baiton, D. F. (1981) *J. Cell Biol.* **91**, 66s
3. de Duve, C. and Wattiaux, R. (1966) *Annu. Rev. Physiol.* **28**, 435
4. Farquhar, M. G. and Palade, G. E. (1981) *J. Cell Biol.* **91**, 77s
5. 加藤敬太郎 (1984) *医学のあゆみ* **131**, 67
6. Erickson, A. H. and Blobel, G. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 11771
7. Rosenfeld, M. G., Kreibich, G., Popov, D., Kato, K. and Sabatini, D. D. (1982) *J. Cell Biol.* **93**, 135
8. Erickson, A. H., Conner, G. E. and Blobel, G. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 11224
9. Tsuji, H. and Kato, K. (1977) *J. Biochem.* **82**, 637
10. Mooré, D. J., Kartenbeck, J. and Franke, W. W. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **559**, 71
11. Yamamoto, K., Ikehara, Y., Kawamoto, S. and Kato, K. (1980) *J. Biochem.* **87**, 237

12. Burnside, J. and Schneider, D. L. (1982) *Biochem. J.* **204**, 525
13. Wattiaux, R., Wibo, M. and Baudhuin, P. (1963) in *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes* (de Reuck, A.V.S. and Csmeron, M. P. eds) 176, J. and A. Churchill, Ltd., London
14. Trouet, A. (1964) *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* **72**, 698
15. Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H., Baudhuin, P., Coffey, J.W., Fowler, S. and Duve, C. (1968) *J. Cell Biol.* **37**, 482
16. Beaufay, H. in *Lysosomes, A Laboratory Handbook* (Dingle, J. T. ed) North-Holland, Amsterdam-London (1972)
17. Arborgh, B., Erisson, J. L. E. and Glaumann, H. (1973) *FEBS Lett.* **32**, 190
18. Wattiaux, R., Wattiaux-De Coninck, S., Ronveaux-Dupal, M. F. and Dubois, F. (1978) *J. Cell Biol.* **78**, 349
19. Ohsumi, Y., Ishikawa, T. and Koto, K. (1983) *J. Biochem.* **93**, 547
20. 大住幸秀, 赤崎健司, 加藤敬太郎 (1981) *生化学*, **53**, 796
21. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680
22. Davis, B. J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404
23. Ouchterlony, O. (1969) in *Hand Book of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis*. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan
24. Kato, K., Ohsumi, Y., Akazaki, K. and Okada, K. (1984) in *3rd International Congress on Cell Biology (Abstracts)* Seno, S. and Okada, Y. eds. Academic press, Inc., Tokyo, Japan, 100
25. 赤崎健司, 大住幸秀, 辻 宏, 加藤敬太郎 (1985) *生化学* **57**, 947
26. 加藤敬太郎 (1984) *細胞工学* **3**, 230
27. 辻 宏, 佐藤博, 天野潤, 赤崎健司, 加藤敬太郎 (1985) *生化学* **57**, 947
28. Lewis, V., Green, S. A., Marsh, M., Vihko, P., Helenius, A. and Mellman, I. (1985) *J. Cell Biol.* **100**, 1839
29. Chen, J. W., Murphy, T. L., Willingham, M. C., Pastan, I. and August, T. (1985) *J. Cell Biol.* **101**, 85
30. Lippincott-Schwartz, J. and Tambrough, D. M. (1986) *J. Cell Biol.* **102**, 1593
31. Ohkuma, S. and Poole, B. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3327

32. Ohkuma, S., Moriyama, Y. and Takano, T. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2758
33. Reggio, H., Baiton, D., Harms, E., Coudrier, E. and Louvard, D. (1984) J. Cell Biol. 99,1511
34. Sly, W. S., Natowics, M., Gonzales-Norieha, A., Grubb, J. H. and Fischer, H. D. (1981) in Lysosomes and Lysosomal Diseases (Callahan, J. W. and J. Alexander, L. eds) 131, Raven Press, New York
35. 姫野勝, 新留徹広, 古野浩二, 加藤敬太郎 (1986) 生化学 58, 698
36. Natowics, M., Baenziger, J. U. and Sly, W. S. (1982) J. Biol. Chem. 257, 4257
37. Pohlmann, R., Waheed, A., Hasilik, A. and von Figura, K. (1982) J. Biol. Chem. 257, 5323
38. Brown, W. J. and Farquhar, M. G. (1984) Cell 36, 295
39. Brown, W. J., E. Constantinescu and Farquhar, M. G. (1984) J. Cell Biol. 99, 320
40. Roth, J. and Berger, E. G. (1982) J. Cell Biol. 93, 223
41. Dunphy, W. G., Fries, E., Urbain, L. J. and Rothman, J. E. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7453
42. Roth, J., Taatjes, D. J., Lucocq, J. M., Weinstein, J. and Paulson, J. C. (1985) Cell 43, 287
43. D'Souza, M. P. and August, J. T. (1986) Arch. Biochem. Biophys 249, 522