ニワトリ胚十二指腸粘膜刷子縁の膜脂肪酸組成と 膜酵素活性誘導に及ぼすハイドロコルチゾン ならびにビタミン D₃ 投与の影響

高瀬 幸子, 合田 敏尚

静岡県立大学食品栄養科学部栄養学科

Effects of Hydrocortisone and Vitamin D₃ on Fatty Acid Composition of Duodenal Brush Border Membrane in Chick Embryos

Sachiko TAKASE and Toshinao GODA

*Department of Nutrition, School of Food and Nutritional Sciences,
The University of Shizuoka, Shizuoka 422*

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 43, 133~138 (1990)

A study was conducted to investigate the effects of hydrocortisone and vitamin D₃ on the fatty acid composition of the duodenal brush border membranes in developing chick embryos, and to observe whether such effects on membrane lipids are related to the developmental induction of membrane-bound enzyme activity. Hydrocortisone was administered to embryos on days 14 and 17 of incubation, and vitamin D₃ was administered on day 14 of incubation. The duodenal brush border membranes were isolated from the pooled duodenal mucosa of 10 or 15 embryos on day 20 of incubation. The administration of hydrocortisone resulted in an increase of duodenal mucosa weight and DNA content of the duodenal mucosa in 20-day-old embryos. The embryonic membrane protein in the duodenal brush border was also increased through this treatment. However, there was no increase of membrane protein as expressed per unit of mucosal DNA. Administration of vitamin D₃ had no effects on these parameters. The fatty acid composition of the duodenal brush border membranes was changed by both hydrocortisone and vitamin D₃ administration. The polyunsaturated fatty acid levels of ω 6 acids such as 18:2 (ω 6) and 20:4 (ω 6) were significantly increased by both treatments. Hydrocortisone administration enhanced the specific activities of sucrase and alkaline phosphatase in the duodenal brush border membrane of 20-day-old chick embryos. However, vitamin D₃ treatment increased alkaline phosphatase activity only. Induction of alkaline phosphatase related to a change in fatty acid composition was thus caused by treatment with either hydrocortisone or vitamin D₃. Sucrase induction was not related to alteration of membrane lipids. These results suggest that hydrocortisone as well as vitamin D₃ might be involved in the developmental induction of membrane-bound enzyme (alkaline phosphatase) activity, affecting membrane fluidity through alteration of the membrane fatty acid composition.

Key Words fatty acid composition, hydrocortisone, vitamin D₃, sucrase, alkaline phosphatase.

(Received October 17, 1989)

小腸粘膜の微絨毛膜には、二糖類水解酵素、ジペプチダーゼやその他の種々の膜酵素が局在し、食物の最終段階の消化ならびに吸収に関与している¹⁾。これらの膜酵素活性は動物の個体発達に伴って誘導され、ラットでは離乳期を、ニワトリではふ化を境に酵素活性は著しく増

加することが観察されている²⁾³⁾。

これら離乳期やふ化期に起こる膜酵素活性の誘導に副腎皮質ホルモンの関与することが報告されており⁴⁾⁵⁾、その誘導機構として、ホルモンによる酵素タンパク質の合成促進によることが証明されている⁶⁾。また、この時期には小腸粘膜細胞の膜脂質組成の変化の起こることも

観察されており⁷⁾, 膜酵素活性の誘導機構の一つに, 膜の流動性の変化が関連している可能性が考えられる。

一方, ニワトリ胚十二指腸の器官培養系を用いて, ビタミン D₃ の代謝活性物質である 1,25-ジヒドロキシビタミン D₃ の投与により, 膜酵素のアルカリホスファターゼ活性の増大することが報告されている⁸⁾⁹⁾。

したがって, 発達過程の小腸膜酵素の誘導には, ヒドロコチゾンやビタミン D₃ による刷子縁膜の膜脂質の変動を介する膜流動性の増大が関連していると推察される。

そこで, 副腎皮質ホルモンのヒドロコチゾンならびにビタミン D₃ を 14 日目ニワトリ胚に投与して (ヒドロコチゾンの場合にはさらに 17 日目に投与), 6 日後の 20 日目ニワトリ胚の十二指腸刷子縁膜脂質の脂肪酸組成に及ぼす影響を観察し, さらに同時に起こる膜酵素活性の変動とその脂肪酸組成の変化を比較してそれらの関連性を検討した。

実験方法

1. 実験動物

白色レグホン種の受精卵 (東豊田養鶏ふ化場, 静岡市) を 37°C, 相対湿度 60% でふ卵した 14 日目ニワトリ胚を 3 群に分け, それぞれの群にヒドロコチゾンコハク酸ナトリウム塩液 (日本アップジョン社) 10 μ l (0.025 μ g), ビタミン D₃ 10 μ l (100 IU) あるいは生理的食塩水 10 μ l を気室側より卵殻内に注射した。さらにヒドロコチゾンと生理的食塩水の 2 回目の投与を, ふ卵 17 日目胚に 1 回目と同様にして行った。その後ふ卵を続けてふ卵 20 日目胚を卵殻より取り出し十二指腸を採取した。以上の実験を 4 回行った。

2. 十二指腸粘膜刷子縁の調製および膜酵素活性の測定

十二指腸粘膜刷子縁膜の調製は Kessler の方法¹⁰⁾ に従い, 実験操作はすべて 4°C のもとで行った。10~15 匹の 20 日目胚十二指腸から剝離した粘膜組織をプールして刷子縁膜を調製した。粘膜組織重量に, 50 mM マンニトールを含む 2 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.1) を 30 倍量加えてホモジネイトを作り, その一部 (1 ml) を DNA 測定のために -20°C に保存した。残りのホモジネイトに塩化カルシウムを 10 mM になるように加えて 0°C に 20 分間放置した後, 3,000 $\times g$, 15 分間冷却遠心を行い上清画分を得た。さらに, 27,000 $\times g$, 30 分間遠心して得られる沈査画分を 50 mM マンニトールを含む 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) に分散させた後, さらに 27,000 $\times g$, 30 分間遠心して沈査画分を得た。このものを粘膜組織 1 g 当り 1.5 ml の同上の緩衝液に分散して刷子縁膜標品とし, -20°C に保存

した。

膜酵素として二糖類水解酵素のスクラーゼとアルカリホスファターゼの二つの酵素活性を測定した。スクラーゼ活性はグルコースオキシダーゼを用いる Dahlqvist の方法¹¹⁾に従い, 0.1 M マレイン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.1) で溶解した 60 mM ショ糖を基質に用い, 反応生成物のグルコースをグルコスタット試薬 (イヤトロセツト GLUE, ヤトロン社) を用いて測定した。

アルカリホスファターゼ活性は Lowry の方法¹²⁾に従って測定した。基質液はグリシン緩衝液 (pH 10.5) に溶解した 5.4 mM *p*-ニトロフェノールリン酸ジナトリウムを用いて, 反応により遊離生成したニトロフェノールを比色定量した。

酵素活性はタンパク質 1 mg 当り 1 時間あるいは 30 分間に遊離した反応生成物を μ mol 単位で表した。

3. 十二指腸粘膜刷子縁の脂肪酸組成の測定

十二指腸粘膜刷子縁の脂質は Folch の方法¹³⁾ により抽出した。抽出にあたり, あらかじめ抗酸化剤としてハイドロキノン組織 1 g 当り 10 mg と, 脂肪酸のガスクロマトグラフィー分析のための内部標準としてアラキジン酸 (Applied Science Lab. Inc.) を組織 1 g 当り 5 mg を加えた。各粗脂質抽出液は 0.2% HCl で洗った後, ロータリーエバポレーターを用いて溶剤を蒸発乾固した後, 10 ml のクロロホルムに粗脂質を溶解した。この粗脂肪抽出液 1 ml を有栓試験管にとり, N₂ 気流下で蒸発乾固させたのち, 2 ml の 2% H₂SO₄ を含むメタノールを加え気相を N₂ ガスで置換した状態で 60°C に一晩反応させた。脂肪酸のメチルエステルは石油エーテル (bp 38~40°C) で抽出した後, ガスクロマトグラフィー (島津 GC-6A) により分析した。ガスクロマトグラフィーの条件として, 10% EGSS-X をコートした gaschrom p カラム, カラム温度 180°C を用いた。各ピークの同定は, Hofstetter らの方法¹⁴⁾に従った。

4. DNA およびタンパク質量の測定

十二指腸粘膜ホモジネイトの DNA は, ウシ胸腺 DNA (Type 1, Sigma 社) を標準にして, Burton の方法¹⁵⁾ に従い測定した。試料酵素液のタンパク質量の測定は, ウシ血清アルブミンを標準として Lowry らの方法¹⁶⁾ に従い測定した。

実験結果

1. ニワトリ胚における十二指腸の発達に及ぼすヒドロコチゾンならびにビタミン D₃ 投与の影響

ヒドロコチゾンやビタミン D₃ を投与した群のふ卵 20 日胚の体重は Table 1 に示すように, 対照群との間に有意差は認められなかった。したがって, 体重についてはヒドロコチゾンやビタミン D₃ 投与による早熟現

Table 1. Effect of administration of hydrocortisone and vitamin D₃ on embryonic body weight on day 20 of incubation.

	Control	HC	VD ₃
Body weight (g)	20.9±1.2* ¹	21.0±1.4	18.7±1.5
(n)	(82)	(93)	(58)

*¹ The values are mean±SEM. n: number of embryos. Control: Saline was administered to embryos on day 14 of incubation. HC: hydrocortisone was administered to embryos on days 14 and 17 of incubation. VD₃: vitamin D₃ was administered to embryos on day 14 of incubation. There was no significant difference among the groups.

Fig. 1. Effects of hydrocortisone and vitamin D₃ on duodenal mucosa weight (A) and DNA content in duodenal mucosa (B) from 20-day-old chick embryos.

Each bar represents the mean±SEM of four separate experiments. Control: saline was administered to embryos on the day 14 of incubation. HC: hydrocortisone was administered to embryos on days 14 and 17 of incubation. VD₃: vitamin D₃ was administered to embryos on day 14 of incubation. * Significant difference from the value for the control at $p < 0.05$ (*t*-test).

象は観察されなかった。十二指腸粘膜重量については、ビタミン D₃ 投与群では、対照群との間に有意差は認められなかったが、ヒドロコチゾン投与群の約 1.3 倍量に増加した (Fig. 1)。十二指腸粘膜組織の DNA 量については、ビタミン D₃ 投与群は対照群と比べほぼ同じであった。しかし、ヒドロコチゾン投与群では対照群の約 1.8 倍量に増加した (Fig. 1)。

したがって、ヒドロコチゾンを投与の 20 日目ニワトリ胚では十二指腸粘膜の細胞数が増加して粘膜重量が増加しており、ヒドロコチゾンは粘膜組織の発達を早

Fig. 2. Effects of hydrocortisone and vitamin D₃ on protein content in duodenal brush border membranes isolated from 20-day-old chick embryos.

Each bar represents the mean±SEM of four separate experiments. Control: Saline was administered to embryos on day 14 of incubation. HC: hydrocortisone was administered to embryos on days 14 and 17 of incubation. VD₃: vitamin D₃ was administered to embryos on day 14 of incubation. * Significant difference from the value for the control at $p < 0.05$ (*t*-test).

めたものと考えられる。しかし、ビタミン D₃ はそのような作用は示さなかった。

2. 十二指腸粘膜刷子縁のタンパク質量

ヒドロコチゾンおよびビタミン D₃ 投与の十二指腸粘膜刷子縁タンパク質に及ぼす影響を観察した (Fig. 2)。ヒドロコチゾン投与により胚当りの刷子縁膜タンパク質量は明らかに増加しており、対照群の約 1.6 倍であった。一方、ビタミン D₃ 投与はそのような効果は示さなかった。また、DNA mg 当り十二指腸粘膜刷子縁タンパク質量で観察してみると、Fig. 2 に示すとおり各群間に有意差はみられず、ヒドロコチゾン投与により十二指腸全体の刷子縁タンパク質量は増加しても細胞当りのそのタンパク質量は変わらなかった。

したがって、ヒドロコチゾン投与による刷子縁膜タンパク質量の増加は膜を構成するタンパク質量の増加ではなく、十二指腸粘膜細胞数の増加によるもので、小腸絨毛の発達が起こっているものと思われる。

3. ニワトリ胚十二指腸粘膜刷子縁の脂肪酸組成に及ぼすヒドロコチゾンならびにビタミン D₃ 投与の影響

刷子縁膜脂質の脂肪酸組成の変動を介して膜の流動性の増大が発達過程の十二指腸における膜酵素活性の誘導に関連する可能性が考えられる。そこで、刷子縁膜総脂

Table 2. Effects of hydrocortisone and vitamin D₃ on fatty acid composition of total lipids in duodenal brush border membrane from 20-day-old chick embryos.

Fatty acids	% of fatty acids		
	Control	HC	VD ₃
12:0	0.2±0.01* ¹	0.4±0.04	0.3±0.01
14:0	0.6±0.1	1.0±0.5	0.9±0.3
14:1	0.6±0.1	0.2±0.04	0.2±0.1
16:0	15.1±3.1	17.0±2.5	11.9±0.1
16:1 ω 7	6.7±0.1	5.1±0.7	8.3±0.3
16:2	6.1±1.4	3.5±2.6	3.6±1.1
18:0	7.2±0.5	6.2±0.3	2.6±0.1*
18:1 ω 9	39.6±0.1	35.4±8.2	35.7±3.0
18:2 ω 6	7.8±1.7	14.3±2.6*	12.1±1.2*
20:4 ω 6	11.4±0.8	14.5±1.1*	20.1±2.0*
20:4 ω 3	1.9±0.2	2.4±1.1	3.4±1.3
Others	2.8±0.4	0.2±0.01	0.9±0.02*

*¹ The values are the mean±SEM of four separate experiments. Control: saline was administered to embryos on day 14 of incubation. HC: hydrocortisone was administered to embryos on days 14 and 17 of incubation. VD₃: vitamin D₃ was administered to embryos on day 14 of incubation. * Significant difference from the value for the control at $p<0.05$ (t -test).

質の脂肪酸組成に及ぼすヒドロコルチゾンならびにビタミン D₃ 投与の影響を観察した (Table 2)。

ヒドロコルチゾンならびにビタミン D₃ 投与のいずれの群でも、十二指腸刷子縁膜総脂質の脂肪酸組成は対照群のそれに比べ変動した。両群で長鎖多価不飽和脂肪酸が著しく増加した。とくにリノール酸 (18:2(ω 6)) やアラキドン酸 (20:4(ω 6)) の ω 6 系の脂肪酸の増加が著明であった。ビタミン D₃ 投与の場合には 18:0 の飽和脂肪酸の減少がみられた。

4. 十二指腸粘膜酵素活性に及ぼすヒドロコルチゾンならびにビタミン D₃ 投与の影響

刷子縁膜のスクラーゼ活性は、ヒドロコルチゾン投与により対照群の 1.5 倍に上昇した。しかし、ビタミン D₃ 投与ではそのような効果はみられず、スクラーゼ活性は対照群と比べ有意差を示さなかった (Fig.3)。

一方、アルカリホスファターゼ活性は、ヒドロコルチゾンならびにビタミン D₃ 投与のいずれの場合にも有意に上昇し、対照群の約 1.3 倍の活性を示した。

アルカリホスファターゼ活性の誘導は、ヒドロコルチゾンあるいはビタミン D₃ 投与のいずれの場合の刷子縁膜脂肪酸組成の変動にも対応した。しかし、スクラーゼ

Fig.3. Effects of hydrocortisone and vitamin D₃ on sucrase activity in duodenal brush border membranes isolated from 20-day-old chick embryos.

Each bar represents the mean±SEM of four separate experiments. Control: Saline was administered to embryos on day 14 of incubation. HC: hydrocortisone was administered to embryos on days 14 and 17 of incubation. VD₃: vitamin D₃ was administered to embryos on day 14 of incubation. * Significant difference from the value for the control at $p<0.05$ (t -test).

活性の場合は応答が異なっていた。

考 察

ニワトリのふ化期はほ乳類の離乳期に相当し、ふ化前の 20 日胚では小腸粘膜酵素活性誘導の開始時期に入るが、スクラーゼやアルカリホスファターゼの活性はまだ低い時期にある。その 20 日胚を用いて、ヒドロコルチゾンおよびビタミン D₃ 投与による十二指腸刷子縁の膜脂質の脂肪酸組成の変動を観察し、同時に、膜酵素のスクラーゼとアルカリホスファターゼ活性へのそれら投与の影響を観察した。

ヒドロコルチゾンならびにビタミン D₃ のニワトリ胚への投与は十二指腸粘膜の膜脂質の脂肪酸組成を変えた。その変動はおもに ω 6 系の脂肪酸 18:2 と 20:4 であった (Table 2)。これらの変動は、著者らがすでに観察したなんの処置も施さないニワトリヒナの発達過程にみられる脂肪酸組成の変動に似ている。生後 2 日後のヒナの十二指腸粘膜組織から抽出した総脂質の脂肪酸組成は、20 日胚のそれに比較して著明な変動がみられ、おもに長鎖多価不飽和脂肪酸が増加した⁷⁾。また、十二指腸刷子縁の膜脂質脂肪酸組成についても、ニワトリヒナの発達過程で同様の変動が観察された¹⁷⁾。すなわち、ヒドロコルチゾンやビタミン D₃ が投与された 20 日胚のそれらの脂肪酸組成は、本来のふ化後 2 日後のヒナの組成を示していた。したがって、ヒドロコルチゾンやビ

タミ D₃ を投与された胚の小腸では本来の発達よりも早熟の段階にあり、十二指腸粘膜細胞の分化がさかんになって、リノール酸やアラキドン酸の多い脂肪酸組成の微絨毛膜をもつ細胞に成熟したと思われる。

一方、スクラーゼ活性は、ヒドロコチゾン投与により約 1.5 倍に増大した。しかし、ビタミン D₃ 投与では同様の効果は観察されなかった。アルカリホスファターゼ活性はいずれの投与でも有意に増大した。このスクラーゼとアルカリホスファターゼの応答の違いは、おそらくそれら酵素の膜における存在様式の違いによるものであろう。アルカリホスファターゼは、フォスファチジルイノシトールを介して細胞膜に埋まり込んで存在することが知られている¹⁸⁾。スクラーゼはイソマルターゼとの複合体のかたちで腸管腔側に突出して細胞膜表面に存在すると考えられている¹⁹⁾。したがって、アルカリホスファターゼ活性は、スクラーゼよりリン脂質の組成や膜の流動性の影響を受けやすいといえよう。それゆえ、アルカリホスファターゼ活性の上昇は、ヒドロコチゾンならびにビタミン D₃ 投与により膜の脂肪酸組成が変動したために膜の流動性が高まったことと関連しているように思われる。スクラーゼ活性の場合には、ビタミン D₃ 投与では増大しなかったが、ヒドロコチゾン投与により増大し、その応答の程度はアルカリホスファターゼ活性のそれより大きかった。すなわち、膜の流動性以外のファクターが働いていることを示唆しており、ヒドロコチゾンの作用によりもたらされる小腸粘膜細胞の分化・成熟が膜酵素活性の発現を促進している可能性も考えられる。

そのことを支持するものとして、ふ化前のニワトリ胚へのヒドロコチゾン投与は、明らかに粘膜組織の DNA 量と粘膜細胞のタンパク質量の増加をもたらし (Fig. 1, Fig. 2)。しかし、DNA 当りの刷子縁膜タンパク質量は増加しておらず対照群と同じであった。ところが、ビタミン D₃ 投与の場合にはそのような影響は認められなかった。それゆえ、ヒドロコチゾン投与は、小腸絨毛の発達を促し吸収細胞の分化を促進しているものと思われる²⁰⁾。

膜の流動性の変化が膜に結合している酵素の活性化、さらには、膜輸送の活性化に関連していることの報告は多くみられる²¹⁾²²⁾。発達過程での膜酵素の誘導に膜脂質の変動による膜流動性の変化が関連することは十分に考えられることである。

ビタミン D 欠乏ニワトリヒナへのビタミン D₃ 投与により十二指腸刷子縁リン脂質画分の長鎖多価不飽和脂肪酸の増加することが報告されている²³⁾。ビタミン D₃ の代謝活性物質である 1, 25-ジヒドロキシビタミン D₃ がアルカリホスファターゼ誘導に関与していることは、ニ

Fig. 4. Effects of hydrocortisone and vitamin D₃ on alkaline phosphatase activity in duodenal brush border membranes isolated from 20-day-old chick embryos.

Each bar represents the mean $\pm$ SEM of four separate experiments. Control: Saline was administered to embryos on day 14 of incubation. HC: hydrocortisone was administered to embryos on days 14 and 17 of incubation. VD₃: vitamin D₃ was administered to embryos on day 14 of incubation. * Significant difference from the value for the control at $p < 0.05$ (*t*-test).

ワトリ胚十二指腸の器官培養系を用いて証明されている⁸⁾。また、最近、1, 25-ジヒドロキシビタミン D が上皮細胞の分化を促進するという報告もみられる²⁴⁾。これらをあわせ考えると、あるいは、ビタミン D が発達過程での粘膜細胞（上皮細胞）の分化を促進して膜脂質の成熟をもたらしアルカリホスファターゼ活性を誘導していることも推察される。

要 約

十二指腸粘膜膜酵素活性の誘導機構の解明を目的とし、ふ化前のふ卵 14 日目のニワトリ胚にヒドロコチゾンならびにビタミン D₃ を投与して（ヒドロコチゾンは 17 日目に 2 回目の投与）十二指腸粘膜刷子縁の膜脂質の脂肪酸組成に及ぼす影響を観察し、同時に膜酵素としてスクラーゼとアルカリホスファターゼ活性を測定した。これら膜酵素活性の誘導と刷子縁膜脂肪酸組成の変動との関連について比較検討した。

1) ヒドロコチゾン投与によりふ卵 20 日胚の十二指腸粘膜重量、粘膜 DNA および粘膜刷子縁の膜タンパク質量が増大したが、DNA 当りのタンパク質量は増加せず対照群と同じであった。ビタミン D₃ 投与ではそのような効果はみられなかった。

2) 十二指腸刷子縁膜脂質の脂肪酸組成は、ヒドロ

コーチゾンならびにビタミン D₃ 投与のいずれの場合にも 18:2(ω 6) と 20:4(ω 6) の ω 6 系の長鎖多価不飽和脂肪酸が著明に増加した。

3) ヒドロコーチゾンの投与により、スクラーゼ活性とアルカリホスファターゼ活性が増大した。ビタミン D₃ 投与によりアルカリホスファターゼ活性が増大したが、スクラーゼ活性の誘導は起こらなかった。

以上より、ヒドロコーチゾンやビタミン D₃ 投与は十二指腸粘膜刷り子の膜脂質の脂肪酸組成を変動させることが判明した。さらに、ニワトリヒナの発達過程で小腸粘膜膜酵素活性が誘導されるメカニズムの一つとして、膜脂質の変動を介する膜の流動性の変化が関連していることが示唆された。

文 献

- 1) Semenza, G. : *Annu. Rev. Cell Biol.*, **2**, 255 (1986)
- 2) Moog, F., Denes, A.E. and Porvell, P.M. : *Dev. Biol.*, **35**, 143 (1973)
- 3) Strittmatter, C.F. : *Biochim. Biophys. Acta*, **284**, 183 (1972)
- 4) Herbst, J.J. and Koldovsky, O. : *Biochem. J.*, **126**, 471 (1972)
- 5) 山田和彦, 森内幸子, 細谷憲政 : 栄養と食糧, **31**, 73 (1978)
- 6) Doell, R.G. and Kretchmer, N. : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **54**, 1268 (1965)
- 7) 森内幸子, 吉沢節子, 細谷憲政, 高瀬幸子, 大谷愛 : 栄養と食糧, **30**, 227 (1977)
- 8) Yoshizawa, S., Moriuchi, S. and Hosoya, N. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**, 21 (1976)
- 9) Yoshizawa, S. and Moriuchi, S. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **22**, 263 (1976)
- 10) Kessler, M., Acuto, O., Storelli, C., Murer, H., Müller, M. and Semenza, G. : *Biochim. Biophys. Acta*, **506**, 136 (1978)
- 11) Dahlqvist, A. : *Anal. Biochem.*, **7**, 18 (1964)
- 12) Lowry, O.H. : *Methods in Enzymology* (Colowick, S.P. and Kaplan, W.O., eds.), Vol. **4**, 371 (1957), Academic Press (New York)
- 13) Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H. : *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957)
- 14) Hofstetter, H.H., Sen, H. and Holman, R.T. : *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 537 (1965)
- 15) Burton, K. : *Methods in Enzymology* (Grossman, L. and Moldave, K., eds.), Vol. **12**, part B, 163 (1978), Academic Press (New York)
- 16) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
- 17) 高瀬幸子 : 静岡女子大学研究紀要, **15**, 13 (1982)
- 18) Ikezawa, H., Yamanegi, M., Taguchi, R., Miyashita, T. and Ohyabu, T. : *Biochim. Biophys. Acta*, **450**, 154 (1976)
- 19) Hunziker, W., Spiess, M., Semenza, G. and Lodish, H.F. : *Cell*, **46**, 227 (1986)
- 20) Henning, S. : *Annu. Rev. Physiol.*, **47**, 231 (1985)
- 21) Martonosi, A. : *Biochim. Biophys. Acta*, **415**, 311 (1975)
- 22) Brasitus, T.A., Davidson, N.O. and Schachter, D. : *Biochim. Biophys. Acta*, **812**, 460 (1985)
- 23) Goodman, D.B.P., Haussler, M.R. and Rasmussen, H. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46**, 80 (1972)
- 24) Shinki, T., Kadofuku, T., Sato, T. and Suda, T. : *J. Biol. Chem.*, **261**, 11712 (1986)

(1989年10月17日受理)