天然型スフィンゴミエリンの酵素的合成

中野益男, 根岸 孝, 伊藤精亮, 藤野安彦

(帯広畜産大学農産化学科)

昭和 44 年 1 月 27 日 受 理

Enzymatic Formation of the Natural Type of Sphingomyelin

By Masuo NAKANO, Takashi NEGISHI, Seisuke ITO and Yasuhiko FUJINO

Department of Agricultural Chemistry, Obihiro Zootechnical University,

Obihiro, Hokkaido, Japan

It was reported in the literature that in the enzymatic synthesis of sphingomyelin from ceramide and cytidine diphosphate choline, *erythro*-ceramide, the natural type of sphingolipids, was relatively ineffective as acceptor of phosphorylcholine in contrast to *threo*-ceramide, the unnatural one. The present experiments have shown that not only *threo*-ceramide but also *erythro*-ceramide is active as precursor of sphingomyelin in the synthetic reaction *in vitro* and that *erythro*-ceramide is rather reactive than *threo*-ceramide under the appropriate conditions. This implies that the enzyme, CDP-choline : ceramide cholinephosphotransferase (EC.2.7.8.3), catalyzing the synthetic reaction is destitute of the absolute specificity for either the *erythro* or *threo* isomers of the substrate ceramide. This is the first demonstration of the biosynthesis of the natural type of sphingomyelin *in vitro*.

(Received January 27, 1969)

緒 言

スフィンゴミエリンが酵素的にセラミド (N-アシルスフィンゴシン) から合成されることは, Sribney and Kennedy (1958)⁽¹⁾ によって明らかにされている. この反応は次式のようにセラミドが CDP-コリンのリン酸コリン部分を酵素的に受容してスフィンゴミエリンを生成する反応である.

セラミド + CDP-コリン

セラミドにはエリスロ型, スレオ型の立体異性があるが, 彼らはこの反応で, 非天然のスレオ型セラミドだけが基質として有効で天然のエリスロ型は不活性であり, したがって, 生成されたリピドは非天然性スレオ型スフィンゴミエリンであったことを報告している.

一方, Brady, Bradley, Young and Kaller (1965)⁽²⁾ が見出したスフィンゴミエリン生合成のもうひとつの経路, すなわちスフィンゴシルホスホリルコリンが酵素的にアシル化されてスフィンゴミエリンを生ずる反応にお

いて, Fujino and Negishi (1968)⁽³⁾ はエリスロ型スフィンゴシルホスホリルコリンのほうがスレオ型スフィンゴシルホスホリルコリンよりも基質として活性であることを認め, したがって, この経路ではエリスロ型スフィンゴミエリンが *in vitro* で生成しうることを示唆した. 天然に存在するセラミドおよびスフィンゴミエリンはともにエリスロ型である⁽⁴⁻⁷⁾ ことが知られているから, セラミド経路においてエリスロ型のセラミドが全く基質活性を有しないというのは理解し難い. われわれは, この原因が主として酵素反応混濁の乳化の困難性にもとづくものと考え, この点を配慮して実験を行なった結果, 適当な条件のもとでは, スレオ-セラミドよりもむしろエリスロ-セラミドのほうが高い基質活性を有することを認めたので報告する.

実 験 方 法

1. セラミドの調製 天然セラミドは Fränkel and Bielschowsky (1932)⁽⁸⁾ の方法にしたがって調製した. まず新鮮な牛の脾臓からアセトン粉末をつくり, そのエーテル抽出画分を氷室に静置して析出した沈澱を取り出

し, これを酢酸エチルおよびメタノールから再結して粗セラミドを得た. 次にこの粗セラミドをフロリシラカラムにかけ, クロロホルム-メタノール (4:1) で溶出して精製した⁽⁹⁾. 融点 86~87°C. 実測値: N, 2.63; P, 痕跡; モーリッシュ反応, 陰性. パルミトイルスフィンゴシン $C_{34}H_{67}O_3N$ としての計算値: N, 2.60; P, 0; 糖, 0. この天然セラミドを構成しているスフィンゴシン塩基はエリスロ型の不飽和のスフィンゴシンであり, また, 主な構成脂肪酸はパルミチン酸, リグノセリン酸であった⁽¹⁰⁾.

合成セラミドは, 天然のスフィンゴ脂質から得た各種のスフィンゴシン塩基を出発物質として合成した. まずエリスロ-スフィンゴシンは天然のセラミドをメタノール性 1N カセイカリで加水分解して調製した. この条件では異性化はおきない⁽¹¹⁾. 遊離したスフィンゴシン塩基はケイ酸カラムにかけクロロホルム, クロロホルム-メタノール (9:1; 4:1; 2:1), メタノールで順次に溶出して精製した. スレオ-スフィンゴシンは, 天然セラミドを Gaver and Sweeley (1965)⁽¹²⁾ の含水メタノール性 1N 塩酸で加水分解し, 異性化により生じたエリスロ-スフィンゴシンとスレオ-スフィンゴシンの混合物を, クロロホルム-メタノール-2N アンモニア (40:10:1) を展開溶媒⁽¹³⁾ とするケイ酸薄層クロマトグラフィーに供して精製した. エリスロ-ジヒドロスフィンゴシンは, 牛の脊髄のプレノシンから誘導されたトリベンゾイルジヒドロスフィンゴシン⁽¹⁴⁾ をエタノール性 0.5N カセイカリ⁽¹⁵⁾ で加水分解して調製した. これらのスフィンゴシン塩基を原料として, 各種のN-アシル化合物 (合成セラミド) を次のようにして誘導した. すなわち, N-アセチル-エリスロ-スフィンゴシンと N-アセチル-スレオ-スフィンゴシンは, 当該スフィンゴシン異性体の無水酢酸によるアセチル化⁽¹⁶⁾, また N-パルミトイル-エリスロ-スフィンゴシンと N-パルミトイル-スレオ-スフィンゴシンは, 当該スフィンゴシン異性体のパルミチン酸塩化物によるパルミトイル化⁽¹⁶⁾ によって合成した. N-アセチル-スフィンゴシンおよび N-アセチル-ジヒドロスフィンゴシンのエリスロ, スレオ両異性の混合物は, エリスロ-スフィンゴシンおよびエリスロ-ジヒドロスフィンゴシンを Klenk (1926)⁽¹⁷⁾ の方法に従い, それぞれ酢酸性 10% 硫酸で処理して, 部分的に異性化させたのちケイ酸カラムに通して精製した.

2. CDP-コリン ($CH_3-^{14}C$) の調製 まずホスホリ

ルコリン ($CH_3-^{14}C$) を Baer and McArthur (1944)⁽¹⁸⁾ および Baer (1947)⁽¹⁹⁾ の方法に従って, コリンクロライド ($CH_3-^{14}C$) とジフェニールクロロホスフェートとからピリジン中で有機合成し, 次にこのホスホリルコリン ($CH_3-^{14}C$) を Kennedy and Weiss (1956)⁽²⁰⁾ の方法により CTP と酵素的に作用させて CDP-コリンを合成した.

3. 酵素標品の調製 酵素系は Brady, Bradley, Young and Kaller (1965)⁽²⁾ の方法に準じて調製した. すなわち, 幼若ニワトリの肝臓を 4 倍量の 0.25 M ショ糖溶液でホモジネートし, これを 600×g で 12 分間遠心して組織細片を除去した後, 12,000×g で 12 分間遠心して沈澱してくる顆粒画分をミトコンドリア画分, この上澄液を 100,000×g で 30 分間遠沈して得られた顆粒画分をミクロソーム画分とした. この各々の画分のうち, その半量を最初ホモジネート量の 0.2 容量の 0.1 M リン酸緩衝液にサスペンドして酵素溶液とした. また残りの各半量は, 同様にしてつくったサスペンションに 1 ml あたり 5 mg のコール酸ソーダを加え, 0°C で overnight した後 100,000×g で 30 分間遠心し, その上澄液を各画分の酵素溶液として実験に供した.

4. 反応混液の調製 反応混液の組成を Table I に示した. これは基本的には Sribney and Kennedy (1958)⁽¹⁾ が用いた混液の組成に準じている. すなわち, これは 100 μ M のリン酸緩衝液 (pH 7.8), 4 μ M の塩化マンガン, 20 μ M のシステイン, 5 mg の乳化剤, および 0.25 ml の酵素液から成る. これらを混合して全量を 1 ml とし, 37°C で 2 時間インキュベートした.

反応混液を乳化する際, 基質, CDP-コリン, 酵素溶液, および共同因子を加える順序が酵素活性に大きな影響のあることが報告されている^(21,22) ので, われわれは次のような手順に従って乳化した. 基質と乳化剤をいったんクロロホルムに溶かし, 窒素気流下で蒸発乾固した

Table I. Composition of Reaction Mixture

Phosphate buffer (pH 7.8)	100 μ moles
MnCl ₂	4 μ moles
Cysteine	20 μ moles
Detergents	5 mg
Ceramide (<i>erythro</i> - or <i>threo</i> -)	4 μ moles
CDP-Choline ($CH_3-^{14}C$) (2600 cpm/ μ mole)	1.6 μ moles
Enzyme solution (ca. 10 mg protein)	0.25 ml
Incubation : 2 hr, 37°C	1.0 ml

後, リン酸緩衝液を加え, 80°C で 5 秒間加熱, 冷却した後 CDP-コリン, システインを加えて全体を 30 分間超音波処理をする。これに酵素溶液を加え, 最後に Mn^{2+} を加えた。これは, Mn^{2+} を先に加えると不溶性の白色沈澱を生じ, 均一な混合を妨げることがあるからである。

5. 放射性スフィンゴミエリンの測定 インキュベーションが終了した後, 混液に 3ml のメタノールを加えて反応を止める。これを 55°C に 5 分間保ってリピドを抽出, 同様の操作をさらに 3 回くり返し, 全抽出液にメタノール性カセイカリを 0.4 N 溶液になるように加える。この混液を 37°C で 2 時間インキュベートしてエステル型脂質を分解した後, アルカリ安定性のリピドを 5 ml のクロロホルムで抽出する。この画分の放射能は, ラベルされたスフィンゴミエリンに由来するとみなされるものである。この画分を 20 ml の 2 M 塩化カリで 3 回, 水で 1 回水洗した後, クロロホルム層の放射能をガスフローカウンターで測定した。

結 果

1. 乳化剤の影響

セラミドを基質とするこの反応混液は乳化しにくいので, まず乳化しやすい条件を検討した。天然セラミドを基質とする反応混液 (Table I) に乳化剤として Tween 20, Triton X-100, コール酸ソーダ, 血清アルブミンを種々に組合せて加え, 酵素活性を調べた結果が Table II である。この表に見るように, 乳化剤を Tween 20 3 mg, Triton X-100 2 mg の割合で添加したとき, 天然セラミドに対する酵素活性はもっとも高かった。よって以下の実験では, Tween 20-Triton X-100 (3:2) の混合物を乳化剤として使用することにした。

2. 反応の基質特異性

Table I の組成と条件に従い, 酵素反応を行なって, アルカリ安定性のリピドに組込まれたホスホリルコリンの放射能をガスフローカウンターで測定した結果が Table III である。

この表に示されるように, 天然セラミドと合成セラミドを問わず, セラミドはいずれも基質活性を有すること

Table II. Effect of Detergents on Incorporation of Phosphorylcholine ($CH_3-^{14}C$) into Alkali-stable Lipids (Composition of reaction mixture: see Table I.)

Acceptor		Detergents	Alkali-stable lipids labeled	
			Mitochondrial	Microsomal
			mμmoles	
Natural ceramide	Tween 20 (3 mg)		18.5	—
"	Tween 20 (3 mg)+Triton X-100 (2 mg)		94.3	67.9
"	Tween 20 (2 mg)+Triton X-100 (2 mg)+Na-cholate (1 mg)		56.9	—
"	Tween 20 (2 mg)+Triton X-100 (2 mg)+Serum albumin (1 mg)		31.5	—

Table III. Effect of Acceptors on Incorporation of Phosphorylcholine ($CH_3-^{14}C$) into Alkali-stable Lipids (Composition of reaction mixture: see Table I.)

Acceptor	Phosphorylcholine ($CH_3-^{14}C$) incorporated			
	Mitochondrial	Microsomal	Mitochondrial cholate-supernatant	Microsomal cholate-supernatant
mμmoles				
No acceptor, control	2.6	—	—	—
Natural ceramide (<i>erythro</i> -form)	108.5	61.9	48.5	32.1
N-Acetyl- <i>erythro</i> -sphingosine	166.2	91.6	83.8	61.0
N-Acetyl- <i>threo</i> -sphingosine	82.6	56.7	—	—
Mixture of N-acetyl- <i>erythro</i> - and N-acetyl- <i>threo</i> -sphingosine	136.5	—	—	—
N-Palmitoyl- <i>erythro</i> -sphingosine	73.6	50.8	—	—
N-Palmitoyl- <i>threo</i> -sphingosine	56.2	43.1	—	—
N-Acetyl- <i>erythro</i> -dihydrosphingosine	46.9	29.8	—	—
Mixture of N-acetyl- <i>erythro</i> - and N-acetyl- <i>threo</i> -dihydrosphingosine	39.6	—	—	—

がわかる。基質の傾向として、立体配置はエリスロ型のほうがスレオ型よりも、N-アシル基は短鎖のほうが長鎖よりも、構成スフィンゴシン塩基はスフィンゴシンのほうがジヒドロスフィンゴシンよりも活性が高かった。エリスロ-セラミドとスレオ-セラミドの混合物の基質活性がそれぞれのセラミドの基質活性の中間値を示すことは興味深い。またホスホリルコリンの組込みを触媒する酵素の分布する細胞画分については、ミトコンドリア画分のほうがミクロソーム画分に比べて活性が高く、それらの酵素活性はコール酸ソーダで処理することによって各顆粒画分から遊出することが認められた。

3. スフィンゴミエリンの確認

酵素的に生成された放射性リピドがスフィンゴミエリンであることは、次のようにして確認した。

(1) ラジオ薄層クロマトグラフィー：牛の脾臓から調製した天然のセラミドを基質として Table I のように酵素反応を行ない、インキュベーション後混液にキャリアスフィンゴミエリンを加えて、アルカリに安定な放射性リピドを分離し、これをラジオ薄層クロマトグラフィーに供した。Fig. 1 に見るように、放射性リピド画分の放射能は、スフィンゴミエリンのスポットにのみ検出された。放射能の回収率 93%，基質を異にして反復して行なった同様の実験で、回収率は平均 89% であった。

(2) 加水分解産物の検討：天然のセラミド、合成のエリスロ型およびスレオ型のセラミドをそれぞれ基質として、Table I のように酵素反応を行ない、インキュベーション後キャリアスフィンゴミエリンを加えて混液から放射性スフィンゴミエリンの画分を分離した。これを Taketomi and Yamakawa (1966)⁽²³⁾の方法に従っ

Fig. 1. Radio Thin-layer Chromatography of Alkali-stable Lipid Labeled.

Developed by chloroform-methanol-water (65 : 25 : 4). Detected by iodine vapor.

Table IV. Radioactivity in Phosphorylcholine Fraction Obtained from Hydrolysate of Labeled Sphingomyelin

Acceptor	Labeled sphingo-myelin	Phosphorylcholine (CH ₃ - ¹⁴ C)	Recovery
		cpm	%
Natural ceramide	2630	2309	87.8
N-Acetyl-erythro-sphingosine	1820	1571	86.3
N-Acetyl-threo-sphingosine	1060	842	79.4

てブタノール性 1N カセイカリで 20 時間、還流下で加水分解し、脂肪酸画分を除いて、リン酸コリン画分とスフィンゴシン塩基画分を分取し、リン酸コリン画分の放射能を測ったところ、Table IV のように、いずれの場合も放射性スフィンゴミエリンの大部分が回収されていることが認められた。

加水分解で遊離したスフィンゴシン塩基の薄層クロマトグラフィーを Fig. 2 に掲げる。図のように、天然のセラミドおよび合成のエリスロ-セラミドからはエリスロ-スフィンゴシンが、また合成のスレオ-セラミドからはスレオ-スフィンゴシンが得られた。このことは、エ

Fig. 2. Thin-layer Chromatography of Sphingosine Bases Obtained from Hydrolysate of Labeled Sphingomyelin.

Sphingosine bases obtained from hydrolysate of labeled sphingomyelin :

1. Originating from natural ceramide
2. Originating from N-acetyl-erythro-sphingosine
3. Originating from N-acetyl-threo-sphingosine
4. erythro-Sphingosine, standard
5. threo-Sphingosine, standard
6. erythro-Dihydrosphingosine, standard

Developed by chloroform-methanol-2N ammonia (40 : 10 : 1). Detected by iodine vapor.

リスロ型セラミドからはエリスロ型（天然型）スフィンゴミエリンが、またスレオ型セラミドからはスレオ型（非天然型）のスフィンゴミエリンが酵素的に生成されていたことを示す。薄層クロマトグラムに淡く出ているジヒドロスフィンゴシンのスポットはキャリアとして加えた豚の脳のスフィンゴミエリンに起因するものと考えられる。

（3）定性ならびに成分分析：天然セラミドを基質として、Table I の 20 倍スケールの酵素反応を行ない、インキュベーション後キャリアを加えることなく、混液から放射性スフィンゴミエリンを分離し、これをケイ酸カラムで精製したのち定性分析ならびに成分分析に供した。このものは、リン反応（モリブデン青試薬）とコリン反応（Dragendorff 試薬）に陽性、アミノ基反応（ニンヒドリン試薬）、糖反応（アンスロン試薬）、プラズマール反応（フクシン試薬）およびエステル反応（ヒドロキシルアミン試薬）に陰性であった。次にこのスフィンゴミエリンのリンとスフィンゴシン塩基の定量分析を行った。リンは King (1932)⁽²⁴⁾の方法により、スフィンゴシン塩基は Lauter and Trams (1962)⁽²⁵⁾の方法に従って定量した。

Table V. Analysis of Sphingomyelin Synthesized

	Found	Calcd. for N-palmitoyl-sphingosylphosphorylcholine $C_{49}H_{81}O_7N_2P$
	%	%
Phosphorus	5.76	6.90
Sphingosine base	60.7	66.5
Phosphorus : Sphingosine base	1 : 1.08	1 : 1

Table V に見るように、測定値はほぼ計算値に近く、またリンとスフィンゴシン塩基の比はほとんど 1 : 1 に等しかった。

（4）赤外線吸収スペクトル：上記の分析に用いたのと同じ放射性スフィンゴミエリンを試料として赤外線分析を行なった。この吸収スペクトルを Fig. 3 に示す。

この赤外線スペクトルは天然から得た純品と同じ吸収を示し、 6.1μ と 6.5μ に酸アミドの吸収、 8.2μ と $9.2\sim 9.6\mu$ のところにリン酸の吸収、 10.5μ にトランス二重結合の明瞭な吸収をもち、かつ 5.8μ と 8.5μ にグリセロ脂質の夾雑にもとづくエステルの吸収を全く有していなかった。

考 察

以上の実験結果は、セラミドと CDP-コリンからのスフィンゴミエリンの酵素的合成において、エリスロ型、スレオ型の両セラミドがともに前駆体になりうることを示すものである。われわれはスフィンゴシルホスホリルコリンのアシル化によるスフィンゴミエリンの酵素的合成において、エリスロ型、スレオ型の両スフィンゴシルホスホリルコリンがともに基質活性を有していることを認めた⁽³⁾。また Kanfer and Gal (1966)⁽²⁶⁾は *in vivo* の実験で、エリスロ型、スレオ型のスフィンゴシンがともにセラミドおよびスフィンゴミエリンの合成の受容体となりうると報告している。これらの知見は、スフィンゴミエリンを触媒する 2 つの酵素、すなわち CDP-コリン：セラミド コリンホスホトランスフェラーゼとアシル CoA：スフィンゴシルホスホリルコリン アシルトランスフェラーゼがともに、*in vivo* でも *in vitro* でも、

Fig. 3. IR-Spectrum of Sphingomyelin Synthesized.

エリスロ型とスレオ型のスフィンゴシル化合物に対して立体化学的特異性を有していないことを示している。他のスフィンゴ脂質の酵素的反応においても、反応は基質に対してエリスロ、スレオの立体特異性をもたないことがしばしば報告されている。スフィンゴシンと UDP-ガラクトースからのサイコシンの酵素的合成⁽²⁷⁾, スフィンゴシンとアシル-CoA からのセラミドの合成⁽²⁸⁾, スフィンゴシンと遊離の脂肪酸とからのセラミドの合成⁽²⁹⁻³⁰⁾, スフィンゴシンと CDP-コリンからのスフィンゴシルホスホリルコリンの合成⁽³¹⁾, およびセラミドのスフィンゴシンと脂肪酸への酵素的分解⁽³⁰⁻³²⁾はいずれもその例で、どの場合もスフィンゴシン化合物のエリスロ、スレオ両異性体は、基質活性に多少の相違は見られるが、それぞれの反応系の中間物として常に反応性を有するのである。天然に存在するスフィンゴ脂質がすべてエリスロ型であることを考えると、スレオ型のスフィンゴシル化合物が代謝に関与することは一見不合理のように思われるが、スフィンゴ脂質のこのジアステレオマーに関する限り、生体は両型を峻別しないことになる。従来報告されていたスフィンゴミエリンの酵素的合成⁽¹⁾は、スレオ型の代謝にぞくするものであったが、われわれの実験は、適当な条件のもとでは、エリスロ-セラミドからエリスロ型のスフィンゴミエリンが酵素的に生成されうことを明らかにしたわけである。試験管内での天然型のスフィンゴミエリンの酵素的合成は、これがはじめてである。

要 約

セラミドと CDP-コリンからのスフィンゴミエリンの酵素的合成にかんする従来の報告では、非天然型のスレオ-セラミドだけが基質として有効で、天然のエリスロ-セラミドは不活性とされていた。本研究は、スレオ-セラミドのみならずエリスロ-セラミドもスフィンゴミエリンの前駆体としての作用があり、適当な条件のもとでは、エリスロ-セラミドのほうがむしろスレオ-セラミドよりも反応性が強いことを示した。このことは、この合成反応を触媒する酵素 CDP-コリン:セラミド コリンホスホトランスフェラーゼが、基質となるセラミドのエリスロ、スレオの立体異性性に対しては絶対的な特異性をもたないことを意味する。試験管内での、天然型のスフィンゴミエリンの酵素的合成はこれがはじめてである。

本研究は、主として文部省科学研究費によって行なわれた。記して謝意を表する。

本研究の要旨は第 39 回日本農芸化学会大会 (昭和 43 年 4 月 1 ~ 4 日, 名古屋) ならびに第 6 回日本生化学会北海道部会例会 (昭和 43 年 7 月 6 日, 札幌) で講演した。またこの研究の一部は *J. Biol. Chem.*, **243**, 4615 (1968) に速報した。

- (1) M. Sribney and E. P. Kennedy: *J. Biol. Chem.*, **233**, 1315 (1958).
- (2) R. O. Brady, R. M. Bradley, O. M. Young and H. Kaller: *J. Biol. Chem.*, **240**, PC 3693 (1965).
- (3) Y. Fujino and T. Negishi: *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 428 (1958).
- (4) Y. Fujino: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **22**, 426 (1958).
- (5) D. Shapiro and H. M. Flowers: *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 1047 (1962).
- (6) V. Groom and M. Sribney: *J. Lipid Res.*, **6**, 220 (1965).
- (7) 伊藤精亮, 藤野安彦, 根岸 孝: 帯広畜産大学学術研究報告, **5**, 89 (1967).
- (8) E. Fränkel and F. Bielschowsky: *Z. Physiol. Chem.*, **202**, 58 (1932).
- (9) A. Makita: *J. Biochem.*, **55**, 269 (1964).
- (10) 伊藤精亮, 根岸 孝, 藤野安彦: 帯広畜産大学学術研究報告, **5**, 251 (1967).
- (11) H. E. Carter and Y. Fujino: *J. Biol. Chem.*, **221**, 879 (1956).
- (12) R. C. Gaver and C. C. Sweeley: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 294 (1965).
- (13) K. Sambasivarao and R. H. McCluer: *J. Lipid Res.*, **4**, 106 (1963).
- (14) 藤野安彦: 農化, **30**, 764 (1956).
- (15) Y. Fujino and I. Zabin: *J. Biol. Chem.*, **237**, 2069 (1962).
- (16) H. E. Carter, F. J. Glick, W. P. Norris, G. E. Phillips and R. Harris: *J. Biol. Chem.*, **170**, 269 (1947).
- (17) E. Klenk: *Z. Physiol. Chem.*, **153**, 74 (1926).
- (18) E. Baer and C. S. McArthur: *J. Biol. Chem.*, **154**, 451 (1944).
- (19) E. Baer: *J. Am. Chem. Soc.*, **69**, 1253 (1947).
- (20) E. P. Kennedy and S. B. Weiss: *J. Biol. Chem.*, **222**, 193 (1956).
- (21) J. C. Carter and E. P. Kennedy: *J. Lipid Res.*, **7**, 678 (1966).
- (22) G. L. Petzold and S. W. Agranoff: *J. Biol. Chem.*, **242**, 1187 (1967).
- (23) T. Taketomi and T. Yamakawa: *Lipids*, **1**, 31 (1966).
- (24) E. J. King: *Biochem. J.*, **26**, 292 (1932).
- (25) C. J. Lauter and E. G. Trams: *J. Lipid Res.*, **3**, 136 (1962).
- (26) J. N. Kanfer and A. E. Gal: *Biochem. Bio-*

- phys. Res. Com.*, **21**, 442 (1966).
- (27) W.W.Cleland and E.P.Kennedy : *J. Biol. Chem.*, **235**, 45 (1960).
- (28) M.Sribney : *Biochim. Biophys. Acta*, **125**, 542 (1966).
- (29) Y. Fujino and S. Ito : *ibid.*, **152**, 627 (1968).
- (30) S. Gatt : *J. Biol. Chem.*, **241**, 3724 (1966).
- (31) Y. Fujino, T. Negishi and S. Ito : *Biochem. J.*, **109**, 310 (1968).
- (32) 伊藤精亮, 藤野安彦, 根岸 孝 : 生化学, **38**, 575 (1966).
-