Heat Stress-induced Protein Glycosylation in Mammalian Cells

哺乳動物細胞において熱ストレスにより誘導されるグリコシル化について

Henle, Kurt J.; Jethmalani, Sunita M.; and Nagle, William A.

Department of Medicine, Division of Hematology/Oncology, University of Arkansas for Medical Sciences,
Little Rock, AR 72205-5484, USA, FAX:1-501-671-2510, E-mail: KJHenle@Life.UAMS.edu

Key Words: *calreticulin, GP50, heat shock proteins, stress glycosylation, thermotolerance*

Abstract

The cellular stress response is a model for the regulation of gene expression and represents a highly conserved mechanism for cells that respond to a changing environment. The cellular stress response includes a significant glycobio-logical component, which although not well characterized, appears essential and complementary to the role of “classical” heat shock proteins (HSPs). This review concentrates on the glycobio-logical component of the mammalian stress response, where several major heat stress-induced glycoproteins have been identified to date. For example, the expression and glycosylation of GP50 and GP62 is associated with the development of thermotolerance, while P-SG67 and P-SG64 are glycosylated “promptly”, *i.e.*, within minutes after the initiation of heat stress. GP50 in CHO cells is homologous to the serpin family-related retinoic acid-inducible mouse J6 gene product, whereas P-SG67 and P-SG64 are glycosylated variants of the multifunctional ER protein, calreticulin. Potential functions for stress glycoproteins and their possible interaction with HSPs are discussed. The availability of molecular probes for stress glycoproteins should facilitate studies to understand their functions and to utilize them in biotechnological applications.

要 約

ストレスに対する細胞の応答は遺伝子発現制御のモデルであり、変化する環境に細胞が応答するために遺伝的に保存された機構のよい例である。細胞のストレスに対する応答には、糖鎖生物学的な因子がかなり関係している。こうした因子の性質はよく調べられてはいないが、“古典的な”熱ショックタンパク質(HSPs)が機能するために必要であり、HSPsの機能を補うはたらきがある。この総説は、哺乳動物のストレス応答における糖鎖生物学的成分に焦点をあて、現在までに同定されているいくつかの主要な熱ストレス誘導糖タンパク質についてのべる。たとえば、GP50とGP62では遺伝子発現及びグリコシル化が熱許容性の誘導に伴って起こるが、P-SG67とP-SG64の場合には“敏速な”(すなわち、熱ストレス開始の数分内)グリコシル化が起こる。CHO細胞のGP50は、サービンファミリーに属するレチノール酸で誘導されるマウスのJ6遺伝子産物とホモロジーがあるが、P-SG67とP-SG64は多くの機能を合わせ持つERタンパク質であるカルレチクリンのグリコシル化された変型である。この総説では、ストレス糖タンパク質のあり得る機能とそのHSPsとの関係について議論する。ストレス糖タンパク質に対する分子プローブを用いることにより、ストレス糖タンパク質の機能を理解する研究と、それらの糖タンパク質を生物工学に利用することが容易になるはずである。

A. Introduction

Individual cells and multicellular organisms respond to heat stress with rapid and profound alterations in cell metabolism and gene expression. This dramatic response has become the focus of a new field of investigation with profound implications for basic cell physiology and biotechnology applications. Early studies concentrated almost exclusively on heat shock proteins (HSPs), their synthesis, and their mechanism of regulation in the cellular stress response. Studies on HSPs have now expanded to the extent that they are featured in several major annual reviews (Parsell 1993, Morimoto 1993, Todd 1994, Becker 1994, Lund 1994). Their role now extends well beyond heat stress to a spectrum of other physiological and non-physiological stress conditions.

The mechanisms operative in the cellular stress response appear closely related to the normal physiological pro-

A. はじめに

個々の細胞および多細胞生物は、熱ストレスに対し、細胞の代謝と遺伝子発現を迅速かつ徹底して変化することで応答する。この劇的な応答は、新しい研究分野の焦点となり、基礎細胞生理学と応用生物工学に多大な影響を持つことになった。初期の研究はほとんどすべて熱ショックタンパク質(HSPs)と、その生合成及び細胞ストレス応答における制御に集中した。HSPsに関する研究は、毎年いくつかの主要な総説に掲げられるまでに増大している(Parsell 1993, Morimoto 1993, Todd 1994, Becker 1994, Lund 1994)。熱ショックタンパク質は、熱ストレスだけでなく他のさまざまな生理的、非生理的ストレス状態においても機能していることがわかってきた。

細胞のストレス応答のメカニズムは、正常な生理的過程におけるタンパク質の生合成、輸送と組上げに密接に関係してい

cesses involved in protein synthesis, transport and assembly, where most HSPs serve as important physiological catalysts (Schlesinger 1994, Hartl 1994, Stuart 1994). HSPs are also linked to the phenomenon of thermotolerance - the transient acquisition of resistance to otherwise lethal heat exposures (Henle 1978, Parsell 1993b). In spite of the great strides in defining the underlying mechanisms and functions for various HSPs, the HSP paradigm, where HSPs account for all aspects of the cellular stress response, remains incomplete. For example, cells that express high constitutive levels of a particular HSP, such as HSP70, are not always heat resistant; conversely, heat-resistant cells are not necessarily characterized by high cellular levels of HSPs, *e.g.*, HSP70 or HSP27 (Henle 1987). Nevertheless, it appears generally true that high levels of HSPs such as HSP70, HSP27, and HSP104 appear to be capable of increasing cellular heat resistance to some extent (Parsell 1994). However, the persistent observation that cellular levels of HSPs alone do not determine cellular heat resistance, has led to the suggestion that multiple mechanisms may be responsible for expression of thermotolerance (Laszlo 1988, Lee 1988, Piper 1993). In this review, we concentrate on the role of one such mechanism, namely, protein glycosylation induced by cellular heat stress.

B. Polyols

Studies with compounds that protect cells against heat killing have provided insights into potential mechanisms of thermotolerance (Henle 1981, Henle 1987b). A small number of compounds can increase cellular resistance to high temperatures when added to culture medium in a dose-dependent manner (Henle 1987b). These "heat protectors" are generally non-toxic, and do not themselves elicit a cellular stress response, as seen for example with exposure to arsenite, diamide, or heavy metals and which leads to the development of (endogenous) thermotolerance. The presence of heat protectors is absolutely necessary during stress to achieve heat resistance. Both sugars, polyols, and their naturally occurring stereoisomers, as well as certain non-biological synthetic compounds have been included in the category of heat protectors (Henle 1985). These observations have led to the formulation of the polyol hypothesis - the proposition that carbohydrates play an important role as physiological heat protectors in cellular thermotolerance (Henle 1982).

In yeast, elevated level of the disaccharide, trehalose, appears to be the principal mechanism for elevated cellular heat resistance (De Virgilio 1990). The cellular trehalose concentration was closely correlated to thermotolerance expression, whereas, HSP70 was correlated to cellular recovery from heat-stress and not directly to the expression of thermotolerance in yeast (Hottiger 1992, 1994). However, cellular trehalose levels themselves may be regulated by HSP70, and to a lesser extent

るように見える。これらの過程でほとんどのHSPは、主要な生理的触媒としての機能を果たしている (Schlesinger 1994, Hartl 1994, Stuart 1994)。HSPsは熱許容性(致死的な熱処理に対する一過的な抵抗性の獲得)の現象とも結びついている (Henle 1978, Parsell 1993b)。種々のHSPsの機能のメカニズムの解明が大幅に進んできたにもかかわらず、HSPパラダイム(HSPsがあらゆる細胞ストレス応答に関与していること)についての理解は完全ではない。たとえば、特定のHSP(HSP70)を常時高レベルで発現している細胞が、必ずしも常に熱抵抗性があるとは限らない。反対に、熱抵抗性のある細胞は、必ずしも高レベルの細胞内HSPs(HSP70またはHSP27)を持つとは限らない (Henle 1987)。一般的に言えば、高レベルのHSPs(HSP70、HSP27そしてHSP104)は、細胞の熱抵抗性のある程度増大させることができるようにみえる (Parsell 1994)。しかし、HSPsの細胞内レベルは単独で細胞の熱抵抗性を決定するわけではないという多くの観察により、熱許容性の発現にはいくつかのメカニズムが必要なのではないかということが示唆される (Laszlo 1988, Lee 1988, Piper 1993)。この総説では、我々はそのようなメカニズムの一つ、主として細胞に対する熱ストレスにより誘導されるタンパク質グリコシル化の機能に注目する。

B. ポリオール

熱による殺傷から細胞を保護する化合物の研究は、熱許容性のメカニズムの理解のてがかりとなった (Henle 1981, Henle 1987b)。いくつかの化合物を培養細胞の培地に加えると、高温に対する細胞の抵抗性が濃度依存的に増大する (Henle 1987b)。これらの"熱保護剤"は一般的に非毒性で、それ自身は細胞ストレス応答を誘導しない。これに対し、たとえば砒素化合物、ジアミドや重金属処理は熱許容性を誘導する。熱抵抗性の発現には、ストレスのかかっている間熱保護剤が存在することが絶対に必要である。糖、ポリオールと自然界に存在するそれらの立体異性体、生物体内には存在しないある種の合成化合物などは、熱保護剤の範疇に入る (Henle 1985)。これらの観察から、ポリオール仮説(糖質が細胞の生理的熱許容性に重要な役割を果たしている)が生まれた (Henle 1982)。

酵母においては、二糖類トレハロースのレベルが上昇することが、細胞の熱抵抗性の上昇における基本的なメカニズムらしい (De Virgilio 1990)。細胞のトレハロース濃度は熱許容性の発現と密接に対応している。それに対しHSP70は熱ストレスからの回復に対応し、熱許容性発現には直接対応してはいない (Hottiger 1992, 1994)。しかし細胞のトレハロースレベルそれ自身はHSP70により制御されているらしい。トレハロースレベルはHSP104とHSP90によっても、HSP70より弱い制御されてい

by HSP104 and HSP90 (Cheng 1993). In contrast to yeast, mammalian cells do not accumulate intracellular polyols or sugars during thermotolerance (Henle 1987).

C. Stress-induced Protein Glycosylation

Without evidence to support the polyol hypothesis in mammalian cells, subsequent studies sought a correlation between heat stress-induced protein glycosylation and thermotolerance (Henle 1987). Covalent attachment of carbohydrates to proteins should sidestep the increased osmotic pressure that results from the accumulation of intracellular polyols, while potentially providing heat protection similar to that achieved with polyols in the microenvironment of the glycosylated protein. Motivated by such reasoning, several stress glycoproteins were identified and are now being implicated in mechanisms of cellular stress response. Moreover, an increase in the activity of several glycosyltransferases was also observed when cells recovered from heat stress and developed cellular thermotolerance (Henle 1988b, Henle 1990).

C-1. GP50

GP50 is the major stress glycoprotein induced in CHO cells following thermotolerance development by heat stress (Henle 1988, Fig. 1). Expression of GP50, like that of HSP70, was correlated with cellular heat resistance in CHO cells (Henle 1990b, Henle 1991). This protein is closely related to, or identical to gp46 (Clarke 1991), J6 protein (Wang 1990) and HSP47 (Hirayoshi 1991). GP50 has recently been identified as the homolog of the murine retinoic acid-inducible J6 gene product after Northern and Western blotting using J6 cDNA probe and antibodies (Henle 1994). The J6 gene is approx. 7.7 kb in length and contains 5 or 6 exons (Wang 1994). One of the splice sites is modified by heat, but not by other stress condi-

るらしい (Cheng 1993)。哺乳動物細胞は酵母とは異なり、熱許容時に細胞内ポリオールや糖を蓄積しない (Henle 1987)。

C. ストレスにより誘導されるタンパク質のグリコシル化

哺乳動物細胞においてはポリオール仮説を支持する証拠はないが、以下に述べる研究は熱ストレス誘導タンパク質のグリコシル化と熱許容性との関連をしらべたものである (Henle 1987)。糖鎖をタンパク質と共有結合させることによって、細胞内ポリオールが蓄積する場合に起こる浸透圧の増大を回避することができ、糖タンパク質の微細環境においてポリオールによるものと似た熱保護効果が得られると考えられる。そのような考え方から、いくつかのストレス糖タンパク質が同定された。そしてそれらは現在、細胞ストレス応答のメカニズムに関与していることが示唆されはじめている。しかも、いくつかの糖転移酵素活性の上昇が、熱ストレスから回復し細胞の熱許容性が発達した細胞において観察された (Henle 1988b, Henle 1990)。

C-1. GP50

GP50はCHO細胞で誘導される主要なストレス糖タンパク質で、熱ストレスにより熱許容性が発達したあとで誘導される (Henle 1988, 図1参照)。CHO細胞におけるGP50の発現はHSP70のように細胞の熱抵抗性に対応する (Henle 1990b, Henle 1991)。このタンパク質はGP46 (Clarke 1991)、J6タンパク質 (Wang 1990) そしてHSP47 (Hirayoshi 1991) と密接に関連があるか、またはそれらと同じものである。GP50は、J6 cDNAプローブと抗体を用いたノーザン及びウエスタンブロッティングにより、マウスのレチノール酸誘導遺伝子産物のホモログとして同定された (Henle 1994)。J6 遺伝子は 7.7 kb の長さで 5~6 のエキソンを含む (Wang 1994)。スプライシングの起こる部位の一つは、熱によ

Fig. 1. Heat-induced protein glycosylation in three mammalian cell lines. Three representative cell lines, including Chinese hamster ovary (CHO), human mammary carcinoma, MCF7, and Syrian hamster duct deferens DDT1 cells were grown under identical culture conditions and heated in a water bath either at 37°C (C), or at 45°C for 10 min (h). After 5 h at 37°C incubation for thermotolerance development, cells were labeled for 1 h at 37°C with D-[2-³H]mannose (50 µCi/ml), washed, and scraped as previously described (Henle 1988). Cell proteins were analyzed by SDS-PAGE after separation into soluble (Cy) and insoluble (nuclear: Nu) fractions; gel lanes were loaded with equal amounts of radioactivity. In the fluorogram presented here, molecular weight markers are indicated on the left side; the arrow on the right side indicates the position of GP50, the 50 kDa protein, whereas, the arrow on the left side indicates the position of GP62, the 62 kDa protein. GP62 is especially prominent in cytosol of CHO and MCF-7 cells.

tions, and increases the mRNA in the non-coding region (Takechi 1994). The 5'-flanking region features a potential heat shock element and a binding site for the GATA-1 and GATA-2 transcription factors (Wang 1994). Specific functions for J6 protein have not been identified, but J6 is a member of the serpin (serine protease inhibitor) protein family; however, it lacks the active site of a typical protease inhibitor. The serpin family proteins are involved in multiple regulatory functions that include protein folding, extracellular matrix remodeling, and cell differentiation (Potempa 1994). HSP47, the probable chicken homolog of J6, has been implicated in a collagen-specific chaperone function (Takechi 1992, Natsume 1994).

C-2. GP62

GP62 is a less prominent stress glycoprotein that appears in CHO cells after thermotolerance induction by heat stress. However, this protein also occurs in other cell lines (Fig. 1); in some cases, it was the major stress glycoprotein while GP50 was the less prominent stress glycoprotein. One such example is the rodent cell line, M21, derived from the parental cell line, Rat-1. M21 was modified to stably overexpress the human HSP70 (Li 1991); simultaneously, M21 cells exhibited a high level of constitutive heat resistance, but with no loss of their capacity for further thermotolerance development following heat conditioning. The heat resistant phenotype of M21 cells was attributed to the overexpression of HSP70 because no other modifications were noted in the protein synthesis profile (Li 1991). However, recent studies from our laboratory have demonstrated concurrent changes in heat stress-induced protein glycosylation in M21 cells (Henle 1995). Specific glycosylation of GP62 was increased in the heat-resistant M21 cells when compared with Rat-1 cells, which was further enhanced in both Rat-1 and M21 cells with thermotolerance development. Thus, GP62 glycosylation correlated directly with cellular heat resistance (Henle 1995). These changes occurred in parallel with the expression of HSP70, indicating that stress-induced protein glycosylation is a significant component of cellular stress response. Whether stress glycoproteins act through independent or cooperative mechanisms with HSPs remains to be determined (see hypotheses below). GP62 has recently been purified and is being identified by microsequencing (Jethmalani, unpublished).

As in CHO cells, GP62 appeared clearly visible in human mammary carcinoma, MCF7, and the Syrian hamster duct deferens cells, DDT1, but was a less prominent stress glycoprotein (Fig. 1). Glycosylation of GP50 was also increased in both cytosol and nuclear fractions after thermotolerance induction in all three cell lines studied (Fig. 1). In comparison to GP50, the less prominent glycosylation of GP62, the second heat-induced glycoprotein, appeared to be increased mostly in the cytosol of CHO and MCF7 cells with minor increases in the nuclear fraction. Thus, stress-induced glycosylation of GP50 and GP62 is a

り変化を受けるが他のストレス条件によっては受けず、非転写領域のmRNAが増大する(Takechi 1994)。5' 隣接領域は潜在的熱ショック配列を持ち、GATA-1とGATA-2の転写因子結合部位を持つ(Wang 1994)。J6タンパク質に特異的な機能は同定されていないが、J6はサーピンファミリー(セリンプロテアーゼインヒビター)の一員である。しかしプロテアーゼインヒビターに典型的な活性部位は欠如している。サーピンファミリータンパク質は、タンパク質の折り畳み、細胞外マトリックスの再構築、そして細胞分化などの、多くの制御機能に関与している(Potempa 1994)。HSP47はニワトリのJ6ホモログである可能性があり、コラーゲンに特異的なシャペロン機能が示唆されている(Takechi 1992, Natsume 1994)。

C-2. GP62

GP62はGP50よりは量の少ないストレス糖タンパク質で、CHO細胞内において熱ストレスによる熱許容性の誘導後あらわれる。しかしこのタンパク質は他の細胞系統においてもみられ(図1)、GP50が量の少ないストレス糖タンパク質である場合、主要なストレス糖タンパク質であることもある。そのような例の一つは、Rat-1親細胞系列に由来する齧歯類細胞系統M21である。M21をヒトHSP70を安定に過剰発現するように変化させると(Li 1991)、M21細胞は高レベルの熱抵抗性を示した。しかし熱処理後に熱許容性を発達させる能力は失われなかった。M21の熱抵抗性という表現型はHSP70の過剰発現によるものとされている。なぜならタンパク質合成パターンにおいて他のタンパク質の変化は観察されなかったからである(Li 1991)。しかし、近年我々の研究室では、M21細胞において、熱ストレスにより誘導されるタンパク質のグリコシル化がHSP70の過剰発現に伴って変化することが示された(Henle 1995)。熱抵抗性M21変異細胞におけるGP62の特異的グリコシル化は、Rat-1細胞にくらべ増加し、熱許容性の発達にともなって、Rat-1とM21細胞両方においてさらに増大した。このようにGP62のグリコシル化は細胞の熱抵抗性に直接対応した(Henle 1995)。これらの変化はHSP70の発現に平行して起こり、このことは、ストレスにより誘導されるタンパク質のグリコシル化は、細胞のストレス応答の重要な部分であることを示している。ストレス糖タンパク質が独立に働くかHSPと共同したメカニズムで働くかは今後の研究に待たねばならない(下記の仮説参照)。GP62は近年精製され、マイクロシーケンシングによりその同定が進行中である(Jethmalani,未発表)。

GP62は、CHO細胞と同様にヒト乳癌MCF7とシリアンハムスター輸送管細胞 DDT1においても、明瞭に発現しているのが認められるが、ストレス糖タンパク質に占める割合はそう高くない(図1)。これら三つの細胞系すべてにおいて、GP50のグリコシル化も、熱抵抗性の誘導に伴って細胞質と核画分の双方で起こることが認められている(図1)。こうしたGP-50の挙動に比べると、第二の熱誘導糖タンパク質であり、量的にもあまり多くないGP62のグリコシル化は、主としてCHOとMCF7細胞の細胞質で増加しているように見え、核画分での増加はこれに比べずっと少ないようである。このようにストレスにより誘導されるGP50とGP62のグリコシル化は、HSP70の発現と同様、他の面

highly conserved feature, like the appearance of HSP70, in otherwise unrelated mammalian cell lines. The conserved nature of GP50 and GP62 glycosylation is in contrast to the variability that occurs during “prompt” stress glycosylation (see below).

C-3. P-SG67 and Calreticulin

Acute heat stress conditions induce a novel type of protein glycosylation that is distinct from stress glycosylation in thermotolerant cells, discussed above. Heat stress at 43°C, or higher, results in a profound inhibition of general protein glycosylation in mammalian cells. However, residual glycosylation becomes highly selective and results in the glycosylation of the so-called “prompt” stress glycoproteins (Henle 1993). The “prompt” glycosylation phenomenon was observed during acute heat stress episodes as short as 10 min at 45°C. Glycosylation increased in a dose-dependent manner up to 60 min at 45°C. Interestingly, prompt glycosylation was observed even in the presence of cycloheximide which suggests that glycosylation occurred on mature proteins (Henle 1993). Prompt glycosylation does not appear to correlate with cellular heat resistance, in contrast to glycosylation of GP50 and GP62.

P-SG67 is the major “prompt” stress glycoprotein in CHO cells and has been recently identified as calreticulin using microsequencing techniques (Jethmalani 1994b). P-SG64, the secondary “prompt” stress glycoprotein in these cells, was also found to be identical to calreticulin (Jethmalani 1994b). Thus, calreticulin is a stress glycoprotein that appears to be variably glycosylated during “prompt” heat stress. The two glycosylated forms of calreticulin had similar calcium binding properties (Jethmalani 1994a, 1994b) as the unglycosylated protein (Michalak 1992). Prompt glycosylation of P-SG67/P-SG64/calreticulin was not affected when the heat-induced intracellular rise in calcium was blocked by chelation with the calcium chelator BAPTA (Jethmalani 1994a). The reason for a variable glycosylation status of calreticulin, and its function in the heat damaged cells is unknown, but is probably not related to calcium homeostasis.

Calreticulin is usually resident in the endoplasmic reticulum (ER), and is closely related to calnexin (Bergeron 1994). Calnexin also shares significant partial homology with P-SG67 (Jethmalani 1994b). Calnexin is known to perform chaperone functions like HSPs, but within the hydrophobic membrane milieu, where hydrophilic HSPs have limited access (Ou 1993). The observation that HSP70 contains a calmodulin binding domain (Stevenson 1990) which is highly conserved in a variety of organisms, suggests that these chaperones do not function as single agents, but could interact with calcium or calcium-binding proteins like calreticulin and calnexin. The latter concept is reinforced by a recent study where affinity columns were constructed with various unrelated denatured proteins (histones, gelatin, α -fetoprotein, IgG, *etc.*); these columns bound seven ER proteins that were specifically eluted with ATP. The

では相互に関係のない哺乳細胞系統間で非常によく保存された現象といえる。GP50とGP62のグリコシル化がよく保存された現象であるという性質は、以下に述べる、“敏速な”ストレス応答グリコシル化が変化に富んでいるのとは対象的である。

C-3. P-SG67とカルレチクリン

急性の熱ストレス状態は新しいタイプのタンパク質のグリコシル化を誘導するが、それは上に述べた熱許容性を獲得した細胞におけるストレスグリコシル化とは決定的に異なっている。43°C及びそれ以上の熱ストレスは、哺乳動物細胞において通常のタンパク質グリコシル化を強く阻害する。しかし残存グリコシル化活性は高度に選択的になり、“敏速な”ストレス糖タンパク質とよばれるタンパク質群のグリコシル化が行われる (Henle 1993)。この“敏速な”グリコシル化現象は、10分、45°Cというような短い急性の熱ストレス過程で観察される。このグリコシル化は45°Cで60分までの間、時間依存的に増加する。面白いことに、この敏速なグリコシル化はシクロヘキシミド存在下でも観察される。このことはこのグリコシル化が成熟タンパク質に対して起こることを示唆している (Henle 1993)。敏速なグリコシル化はGP50とGP62のグリコシル化の場合とは異なり、細胞の熱抵抗性とは対応していないようにみえる。

P-SG67はCHO細胞における最大の“敏速な”ストレス糖タンパク質であり、近年マイクロシーケンス法によりカルレチクリンであることが同定された (Jethmalani 1994b)。P-SG64はこの細胞の第二の“敏速な”ストレス糖タンパク質であるが、これもやはりカルレチクリンと同一分子であることが明らかになった (Jethmalani 1994b)。このようにカルレチクリンはストレス糖タンパク質であり、“敏速な”熱ストレス過程で変化に富むグリコシル化を受けているように見える。カルレチクリンのこの二つのグリコシル化型は (Jethmalani 1994a, 1994b) グリコシル化されていないものと似たカルシウム結合能を持つ (Michalak 1992)。P-SG67/P-SG64/カルレチクリンの敏速なグリコシル化は、熱により誘導される細胞内カルシウムの上昇を、カルシウムキレーターBAPTAによるキレーションによりブロックしても影響を受けない (Jethmalani 1994a)。カルレチクリンにいろいろなグリコシル化状態がある理由、そして熱による損傷を受けた細胞におけるカルレチクリンの機能は不明であるが、カルシウムホメオスタシスとは関係ないと考えられる。

カルレチクリンは普通ERに存在し、カルネキシンと密接な関係がある (Bergeron 1994)。カルネキシンはP-SG67ともかなりの量の部分的ホモロジーを持つ (Jethmalani 1994b)。カルネキシンはHSPと同様シャペロン機能を持つことが知られているが、親水性のHSPが近づきにくい疎水的な膜環境において機能している (Ou 1993)。多くの生物でHSP70がカルモジュリン結合ドメインを持つという観察は (Stevenson 1990)、これらのシャペロンは単一の作用物として機能するのではなく、カルレチクリンやカルネキシンと同様、カルシウムやカルシウム結合タンパク質と相互作用する可能性を示唆している。この後者の概念は、いろいろな変性タンパク質 (ヒストン、ゼラチン、 α -フェトタンパク質、IgGなど) を固定化したアフィニティーカラムを用いた研究により補強された。7つのERタンパク質がこれらのカラムに

bound ER proteins included Grp78 (the ER chaperone, BiP), Grp94, calreticulin, an unidentified 46 kDa protein, and 3 members of the thioredoxin family (protein-disulfide isomerase, ERp72 and P50). Release of bound proteins was Ca^{2+} -dependent suggesting that these proteins belonged to a class of Ca^{2+} -dependent chaperones (Nigam 1994). Although present models of the stress response do not integrate the heat-related HSP and glycosylation phenomena in a comprehensive molecular concept, observations such as those above, suggest that the stress response requires the coordinated interplay of heat-induced Ca^{2+} fluxes, HSP mobilization, HSP redistribution, calreticulin modification, and protein glycosylation. The net effect of these various stress response elements could result in the expression of stress resistance and enhanced recovery from cell injury.

Prompt glycosylation of calreticulin exhibits an unusual degree of variability within the same cell line in spite of identical growth conditions and heating protocols. This is shown in Fig. 2 where CHO cells were identically heated in separate experiments and demonstrated similar glycosylation patterns for the corresponding unheated control cells. The glycosylation pattern in panel A is the most common one; nevertheless, glycosylation patterns shown in panels B and C, though less common also appeared under apparently identical experimental conditions. This variability is in sharp contrast to the invariant glycosylation patterns for GP50 and GP62 which remain con-

吸着し、ATPにより特異的に溶出された。結合したERタンパク質はGrp78(ERシャペロン、BiP)、Grp94、カルレチクリン、未知の46kDaタンパク質とチオレドキシファミリーに属する三つのタンパク質(タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ、ERp72,P50)である。結合したタンパク質の溶離は Ca^{2+} 依存性であり、このことはこれらのタンパク質は Ca^{2+} 依存性シャペロンに属することを示唆している(Nigam 1994)。現在のストレス応答モデルは、熱関連HSPとグリコシル化現象を全体的な分子的概念として包括してはいない。しかし上記のような観察により、ストレス応答には、熱により誘導される Ca^{2+} の流れ、HSPの移動、HSPの再分布、カルレチクリンの修飾、そしてタンパク質のグリコシル化の協調的な相互作用が必要であることがわかる。これらのいろいろなストレス応答因子の作用が集まって、ストレス抵抗性の発現と、細胞傷害からの速い回復が行われる。

カルレチクリンの敏速なグリコシル化は、同一系統の細胞を、同一条件で生育し、同一条件で熱処理した場合でも、幅広い変化を示す。図2はこのような状況を示したものである。おのおの独立した実験において、CHO細胞を同一条件で加熱し、未処理のコントロール細胞と比べると、それぞれに対応したグリコシル化のパターンが得られた。パネルAのグリコシル化のパターンは最もよくみられるものである。パネルBとCのグリコシル化パターンはあまりみられないが同一実験条件下で見られたものである。(敏速なグリコシル化の場合に見られる)この幅広い変化は、相互に関係のない哺乳類細胞系統においても同一のグリコシル化のパターンを示すことが認められたGP50やGP62

Fig. 2. Variability in prompt glycosylation during heat shock in CHO cells. This figure illustrates the variability in prompt glycosylation that can occur under identical growth and heat shock conditions within the same cell line. Each panel shows glycosylation patterns in parallel lanes for unstressed control cells and heat-stressed cells, labeled for 30 min at 45°C. Molecular weight markers are shown on the left side of each panel. Panel A shows prompt glycosylation of P-SG62. In panel B, the extreme left lane shows prompt glycosylation of P-SG64, whereas, the extreme right lane shows the variable prompt glycosylation of P-SG67 and P-SG64. In panel C, the second lane shows prompt glycosylation of P-SG67, whereas, the third lane shows the variability in prompt glycosylation after treatment with Brefeldin A (Henle 1993). Panel D shows prompt glycosylation of both P-SG64 and P-SG67, similar to cells that are heated more severely (Henle 1993). In all panels, labeling of control cells is comparable to each other. C = Control cells and P = "Prompt" heat-stressed cells. P-SG67 was the most commonly glycosylated prompt stress glycoprotein.

stant even in unrelated mammalian cell lines (Fig. 1). Nevertheless, the variable glycosylation patterns for prompt glycosylation appear to always involve calreticulin and may reflect its post-translation processing during its translocation within the ER membrane (Doms 1993).

C-4. Glycosylation and Other Stress Conditions

Stress conditions other than hyperthermia can also induce a cellular stress response. These conditions include exposures to arsenite, heavy metals, thiol-reactive agents, agents that perturb glucose metabolism (*e.g.*, 2-deoxy-D-glucose, tunicamycin, and glucose starvation), calcium ionophores, and hypoxia (Lee 1992, Parsell 1994, Schlesinger 1994). The non-heat induced stress response caused by arsenite and hypoxia leads to upregulation of J6/GP50 (Henle 1994). Specific stress-inducing agents exhibit characteristic induction efficiencies for various HSPs, GRPs, and for GP50/J6 as well. The concurrent induction of stress proteins and stress glycoproteins, though complex, supports the concept of an integrated stress response pattern.

The relationship between cellular stress and protein glycosylation is further supported by observation of GRP94 (glucose-regulated protein, M_r of 94,000) induction under conditions that disrupt glucose metabolism (Lee 1992). GRP94 induction is very sensitive to agents such as tunicamycin, the calcium ionophore A23187, and amino acid analogs, although it is not significantly induced by heat stress (see Fig. 1). GRP94, like GP50, is a glycoprotein. Its normal glycosylation site is Asn-196, while three other potential glycosylation sites normally remain open. When GRP94 was overexpressed in transient expression studies with COS cells, a fraction of the expressed murine GRP94 was more highly glycosylated than endogenous, constitutive GRP94 (Qu 1994). Analysis of glycosylation via site-directed mutagenesis showed that this type of hyperglycosylation of GRP94 was directly related to the level of GRP94 expression and occurred at acceptor sites downstream from Asn-196 towards the carboxy-terminal region of the protein. Thus, the extent of GRP94 glycosylation is regulated by the level of its protein expression which further supports the concept that stress glycosylation is an integral part of cellular stress response.

Stress-induced glycosylation can also occur on molecules other than proteins and which may be intermediates in the protein glycosylation pathway. For example, arsenite, heavy metals, and thiol-reactive agents greatly increased D-[2- 3 H]mannose radiolabeling of lipid-linked oligosaccharides. These oligosaccharides were designated M14 (M_r of 14,000) and had short half lives of 15 min, typical of other oligosaccharide lipid-linked intermediates (Niewiarowska 1987). It is possible that heat stress can cause a similar increase in radiolabeling of M14 oligosaccharides, and that M14 may participate in the glycosylation of GP50 and P-SG67 (Henle 1993).

に比べて(図1参照)極めて対照的である。その一方で、敏速なグリコシル化の幅広いグリコシル化パターンは、常にカルレチクリンが関与しているようにみえるが、これはこのタンパク質が翻訳後にER膜内を移動する過程においてプロセッシング(グリコシル化)を受けていることを反映しているらしい(Doms 1993)。

C-4. グリコシル化と他のストレス条件

高熱以外のストレス条件も細胞ストレス応答を誘導できる。砒素化合物、重金属、チオール反応物質、グルコース代謝を変化させる試薬(2-デオキシ-D-グルコース、ツニカマイシン、グルコース飢餓)、カルシウムイオノフォア、酸素欠乏症などがそれである(Lee 1992, Parsell 1994, Schlesinger 1994)。砒素と酸素欠乏症により起こる非熱誘導性ストレス応答はJ6/GP50の上昇を起こす(Henle 1994)。それぞれのストレス誘導試薬は、種々のHSPs、GRPsとGP50/J6などに対して特徴的な誘導効率を示す。ストレスタンパク質とストレス糖タンパク質が同時に誘導される現象は複雑であるが、ストレス応答反応が相互に関係しているという概念を支持する。

細胞ストレスとタンパク質のグリコシル化の関係は、グルコース代謝を破壊する条件下でGRP94(グルコースにより制御されるタンパク質、分子量94,000)が誘導されるという観察によりさらに支持された(Lee 1992)。GRP94の誘導は、ツニカマイシン、カルシウムイオノフォアA23187そしてアミノ酸アナログのような試薬に非常に敏感であるが、しかし熱ストレスによっては特に誘導は見られない(図1参照)。GRP94はGP50のように糖タンパク質で、その正常なグリコシル化部位はAsn-196であるが、他の三つの潜在的グリコシル化部位は普通グリコシル化されていない。GRP94がCOS細胞で一過性の過剰発現をすると、発現したマウスGRP94は、内在性の常時存在するGRP94より高度にグリコシル化されている(Qu 1994)。部位特異的突然変異誘発によるグリコシル化の分析により、このタイプのGRP94の過剰グリコシル化はGRP94の発現レベルに直接関連しており、Asn-196からC末方向の下流にあるアクセプター部位で起こる。このようにGRP94のグリコシル化は、そのタンパク質の発現レベルにより制御されるが、このことはストレスによるグリコシル化が細胞ストレス応答の欠かせない要素であるという概念を支持するものである。

ストレスにより誘導されるグリコシル化は、タンパク質のグリコシル化経路の中間体と考えられるタンパク質以外の分子に対しても起こる。たとえば砒素化合物、重金属、チオール反応性物質は、D-[2- 3 H]マンノースの脂質結合オリゴ糖への取り込みを大幅に増大させる。これらのオリゴ糖はM14(分子量14,000)と名付けられ、オリゴ糖脂質結合中間体に典型的な15分という短い半減期を持つ(Niewiarowska 1987)。熱ストレスはこれと同様にM14オリゴ糖のラベルの増大をもたす可能性があり、またこのM14オリゴ糖はGP50とP-SG67のグリコシル化に関与している可能性が考えられる(Henle 1993)。

D. Distribution of Stress Glycoproteins

Some HSPs are known to undergo a dramatic cellular redistribution following heat stress; for example, HSP70 typically translocates from cytoplasm to the nucleolus, where it is thought to facilitate nucleolar recovery (Laszlo 1992). Similarly, cellular distribution of stress glycoproteins was also altered following heat stress. The ER and the Golgi apparatus are the common sites where glycosylation and post-glycosylation events occur; nevertheless, GP50, GP62, and P-SG67 were not confined to these organelles, but were redistributed to other subcellular compartments following heat stress (Jethmalani, unpublished data). With an increase in recovery time after heat stress, stress glycoprotein redistribution changed in a manner that was characteristic for each stress glycoprotein. For example, glycosylated P-SG67 rapidly disappeared from the ER fraction after heat stress and was high in the cytosolic fraction at 6 h post-heating. In contrast, glycosylated GP50 was virtually unchanged with time after heat shock and appeared in the cytosolic fraction only at 18 h after heating. Glycosylated GP62 disappeared almost completely from all subcellular fractions by 18 h and appears to have a much shorter half life than GP50 (Jethmalani, unpublished data). These data suggest that each stress glycoprotein has specific roles within subcellular compartments to facilitate cellular recovery from heat stress.

E. Potential Functions of Stress-induced Protein Glycosylation

The simultaneous appearance of both stress-induced protein glycosylation and enhanced HSP accumulation after heat stress is supported by numerous studies. Several viable hypotheses, discussed below, provide a conceptual framework for the role of protein glycosylation in the cellular stress response and its interaction with HSPs. Alternatively, it has been argued that stress-induced protein glycosylation may be non-specific, reflecting random cellular injury analogous to that observed during non-enzymatic glycosylation of serum and cell proteins in the diabetic state marked by elevated glucose concentrations. The latter view, however, does not explain the selectivity of the glycosylation events and the virtually universal appearance of stress glycosylation in mammalian and perhaps other cells as well. These patterns are consistent with biological purpose and function. This concept of biological function for stress glycosylation is further supported by the parallel concepts underlying the polyol hypothesis for thermotolerance in yeast and its growing experimental support (De Virgilio 1990, Hottiger 1994). The following four principal hypotheses provide concepts, partial experimental support, and future directions for investigating specific mechanisms by which stress-induced protein glycosylation mediates the stress-resistant phenotype.

D. ストレス糖タンパク質の分布

いくつかのHSPは熱ストレスを受けると劇的な細胞内分布の変化を示す。たとえばHSP70は（熱ストレス下で）多くの場合、細胞質から核小体へ移動するが、そこでは核小体の回復を助けるといわれている(Laszlo 1992)。同様にストレス糖タンパク質の細胞内分布も、熱ストレスを受けると変化する。ERとゴルジ体はグリコシル化とグリコシル化後のいろいろな修飾が起こる場だが、GP50、GP62とP-SG67はこれらの細胞内小器官にとどまらず、熱ストレスを受けると他の細胞内コンパートメントに再分布する(Jethmalani, 未発表)。熱ストレスからの回復時間の経過とともに、ストレス糖タンパク質の再分布は、各ストレス糖タンパク質に特徴的な形でおこる。たとえばグリコシル化されたP-SG67は熱ストレスをうけると急速にER画分から失われ、熱処理6時間後に細胞質画分で上昇する。それに対しグリコシル化されたGP50は、熱ショックを受けた後も少しも変化せず、熱処理18時間後でやっと細胞質画分に現れる。グリコシル化したGP62は18時間後にはほとんど完全に全細胞画分より失われ、GP50より短い半減期を持つようにみえる(Jethmalani, 未発表)。これらのデータは、おのおののストレス糖タンパク質は各細胞内コンパートメントにおいて熱ストレスからの細胞の回復を容易にするための特異的な役割を持つことを示唆する。

E. ストレス誘導性のタンパク質グリコシル化のあり得る機能

ストレス誘導性のタンパク質グリコシル化と熱ストレスによるHSP蓄積の増加が同時に起こることは、多くの研究により支持されている。下記のいくつかの仮説は細胞ストレス応答とHSPとの相互作用におけるタンパク質のグリコシル化の役割の概念的枠組みを与える。別の考え方として、ストレス誘導性のタンパク質グリコシル化は非特異的であって、糖尿病におけるグルコース濃度の上昇による血漿と細胞タンパク質の非酵素的グリコシル化にみられるようなランダムな細胞の傷害を反映したものだともいわれる。しかし後者の観点はグリコシル化が選択的に起こることや、ストレスによるグリコシル化が哺乳類細胞でもその他の細胞でもほとんど普遍的に起こることの説明にはなっていない。ストレスによって誘導されるグリコシル化のパターンは生物学的目的と機能に一致している。このストレス誘導性グリコシル化が生物学的に機能を果たしているという概念は、これと軌を一にする概念である、酵母における熱許容性のポリオール仮説の基盤となる考え方およびそれに対する実験的裏付けの増大によりさらに支持されている(De Virgilio 1990, Hottiger 1994)。下記の四つの基本的な仮説は、グリコシル化がストレス抵抗性表現型をつくりだす特異的なメカニズムを研究するための概念とそれに対する部分的な実験的根拠、および将来の方向を与えるものである。

Antiaggregation hypothesis. Stress-induced glycosylation prevents non-specific and irreversible aggregation of the type that is associated with inter-protein disulfide bond formation.

Support for this hypothesis derives from studies with virally infected cells, where inhibition of protein glycosylation resulted in the aggregation of viral glycoproteins - this aggregation occurred within less than 1 min after protein release from polysomes and was accompanied by the formation of aberrant interchain disulfide bonds that stabilized the non-specific aggregation complex (Marquardt 1992). Protein aggregation was partially reversible, probably through the action of enzymes, such as protein disulfide isomerase (PDI) which is weakly inducible by cellular stress (Dorner 1990). PDI is an ER resident protein, involved in native disulfide bond formation during and shortly after translocation of secretory proteins into the ER (Freedman 1989). PDI also increases the rate of formation of disulfide bonds, and thus can catalyze the rearrangement of non-native bonds in reduced and denatured proteins *in vitro* (Freedman 1989). Also of interest is a recent report of protein disaggregation mediated by HSP104, which confers heat resistance to yeast cells (Parsell 1994). Of all the available protein disaggregation mechanisms, the glycosylation of native viral proteins to prevent aggregation is probably the most energy-efficient process for cells at risk for injury (Marquardt 1992).

Modulation of interactions with chaperones. Stress-induced glycosylation modifies the interaction of proteins with molecular chaperones.

This hypothesis is supported by the observation that glycosylation of invertase prevented its association with the molecular chaperone, GroEL (Kern 1992). Such a mechanism might be useful under certain stress conditions when association of denatured proteins with chaperones is disadvantageous to cells. For example, impaired energy metabolism and reduced cellular ATP levels can activate a stress response in kidney cells (VanWhy 1994). However, the association of partially denatured proteins with molecular chaperones may be non-productive under conditions of low cellular ATP, because the binding and dissociation cycle of the chaperone complex is ATP-dependent (Hartl 1994). The formation of protein-chaperone complexes in those cells would prevent natural refolding (not mediated by chaperones) of partially denatured proteins, and could be catastrophic if such unproductive associations between proteins and chaperones continued to persist for the duration of cellular stress. We hypothesize that under similar stress conditions, glycosylation represents an alternate mechanism (probably ATP-independent) that could facilitate cellular recovery from the energy-deprived state by preventing protein-chaperone interactions.

Chaperone functions related to specific subcellular compartments. Glycoprotein chaperones may be required in subcellular compartments where classical HSPs have limited ac-

抗凝集仮説 ストレスにより誘導されるグリコシル化は、タンパク質間S-S結合形成を伴うようなタイプの非特異的な不可逆的凝集を阻止する。

この仮説に対する支持は、ウイルスに感染した細胞の研究において、糖タンパク質のグリコシル化の阻害がウイルス糖タンパク質の凝集を起こすという知見から得られた。この凝集はタンパク質がポリソームをはなれた一分以内に起こり、異常な鎖間S-S結合形成を伴う。このS-S結合形成は非特異的な凝集複合体を安定化する(Marquardt 1992)。このタンパク質の凝集は部分的に可逆的であったが、これはおそらく、細胞ストレスにより弱く誘導されることが知られているタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)のような酵素(Dorner 1990)の働きによるものと考えられる。PDIはERに存在するタンパク質で、分泌タンパク質がERに運搬されたすぐ後や、その間のS-S結合形成に関与している(Freedman 1989)。PDIはまたSS結合の形成速度を上昇させるが、還元され変性したタンパク質中でこの作用によって非正常型のSS結合を*in vitro*で再構成することができる(Freedman 1989)。さらに面白いのは、HSP104はこのタンパク質凝集の解離を助け、酵母細胞に熱抵抗性を与えるという最近の報告である(Parsell 1994)。すべてのタンパク質凝集を阻止する、あるいは解離するメカニズムの中で、グリコシル化することによりウイルスタンパク質の凝集が阻止する機構は、傷害を受ける可能性のある細胞にとって多分もっともエネルギー効率のよいものなのであろう(Marquardt 1992)。

シャペロンとの相互作用を変化させる機能 ストレスにより誘導されるグリコシル化はタンパク質と分子シャペロンの相互作用を変化させる。

この仮説は、インベルターゼのグリコシル化がインベルターゼが分子シャペロンGroELと結合するのを阻止するという観察によって支持されている(Kern 1992)。そのような機構は、変性タンパク質とシャペロンとの結合が細胞にとって不利である場合のようなある種のストレス条件下では有用であろう。例えば、エネルギー代謝系の損傷と細胞内ATPレベルの低下は、腎細胞においてストレス応答を活性化することができる(VanWhy 1994)。しかし部分的に変性したタンパク質と分子シャペロンとの結合は、細胞内ATPレベルが低下している条件下では非生産的である。なぜならシャペロン複合体の結合と解離のサイクルはATP依存적であるからである(Hartl 1994)。これらの細胞におけるタンパク質-シャペロン複合体形成は、部分的に変性したタンパク質がシャペロンによらずに自然に再び折り畳まれるのを阻止するかもしれない。そしてもしそのようなタンパク質とシャペロンの非生産的結合が、細胞がストレスにさらされている過程で続くとしたらこれは致命的である。我々はこのようなタイプのストレス条件下では、グリコシル化がタンパク質-シャペロン相互作用を妨げることにより、細胞がエネルギー不足の状態から回復するための別の機構を提供しているという仮説を考えている。

特定の細胞内コンパートメントと関係があるシャペロン機能 糖タンパク質シャペロンは古典的なHSPが近づくのに限度があるような細胞内コンパートメントで必要とされるかもしれない

cess.

Support for this hypothesis comes from several studies of protein glycosylation and molecular folding within the ER, which is the principal organelle for initiating protein glycosylation. Considering the almost limitless sequence and structural variability possible for proteins that fold in the ER, it has been suggested that more than one type of molecular chaperone (e.g., BiP) is required to bind various folding intermediates (Doms 1993). One possibility is an interactive role for BiP and protein glycosylation where BiP stabilizes the folding-competent and assembly-competent state of a polypeptide, and *N*-linked oligosaccharides are structural components that are necessary in the folding process after the polypeptide is released from BiP (Te Heesen 1994). Furthermore, in a non-aqueous membrane milieu (e.g., ER membrane), where classical HSPs have limited access, protein folding may require specialized glycoprotein chaperones, such as calnexin. It is now known that calnexin is part of a unique folding and quality control machinery in the ER that acts as a glycoprotein-specific chaperone (Hammond 1994a). Calnexin appears to recognize and bind partially glucose-trimmed carbohydrate side chains and requires Ca^{2+} as an essential co-factor for proper folding of certain secretory proteins (Lodish 1990). Furthermore, calnexin has been shown to cause the retention of free heavy chains of $\beta 2$ -microglobulin within the ER, thereby, protecting them against rapid proteolytic degradation. Similarly, calnexin participates in quality control, transport, and efficient intracellular folding of MHC class I-peptide complexes (Jackson 1994). Calreticulin/P-SG67, like calnexin, has been implicated in chaperone functions and showed both Ca^{2+} - and ATP-dependence (Nigam 1994), as discussed above. The ER chaperone functions, therefore, are sensitive to perturbations in calcium homeostasis, a notion that is further supported by the vigorous stress response which follows treatments with ionophores and leads to the retention of unfolded proteins within the ER (Lodish 1990). Calcium homeostasis is also challenged by heat stress, and causes a rise in intracellular Ca^{2+} . Stress-induced glycosylation of P-SG67/calreticulin, however, is independent of the rise in intracellular calcium because chelation of intracellular calcium with BAPTA did not prevent prompt glycosylation (Jethmalani 1984a).

Further evidence for glycoprotein-facilitated protein folding comes from a recent study (Hammond 1994b) where folding of the viral G protein in the ER was observed to commence with initial binding of BiP to nascent proteins, which was then followed by calnexin binding to the more completely folded molecules. It is interesting to note that both efficient folding of the G protein and retention of incompletely folded proteins did not occur without appropriate calnexin interactions (Hammond 1994b). Thus, glycoproteins have important physiological roles in normal cells and probably a related function

い。

この仮説に対する支持は、いくつかのタンパク質のグリコシル化とそのER内における分子の折り畳みの研究から得られている。ERはタンパク質のグリコシル化開始における重要なオルガネラである。ERにおいて折り畳まれるタンパク質は、ほとんど無限といえる配列と構造の変化を取り得ることから、いろいろな折り畳み中間体に、一つ以上のタイプの分子シャペロン (BiP)が必要なが示唆されている (Doms 1993)。一つの可能性は、BiPとタンパク質のグリコシル化の相互作用の機能である。この場合、BiPは折り畳み準備と構造形成準備が完了した状態のポリペプチドを安定化し、*N*-結合オリゴ糖はBiPからポリペプチドが遊離したあとの折り畳み過程に必要な構成成分であるというものである (Te Heesen 1994)。さらに非水的な膜環境 (たとえばER膜) においては古典的なHSPは限られた場所にしか近づけないのでタンパク質の折り畳みには特別な糖タンパク質シャペロン (カルネキシンのような)が必要かもしれない。これまでにカルネキシンがERにおけるタンパク質の折り畳みと品質管理の機構の一部として機能し、糖タンパク質特異的シャペロンとして働くことが知られている (Hammond 1994a)。カルネキシンは分泌タンパク質の正常な折り畳みに際して、(*N*-結合型糖鎖の生合成過程で)部分的にグルコースが刈り込まれた糖鎖を認識して結合すると考えられ、また、 Ca^{2+} を必要とすることが知られている (Lodish 1990)。さらにカルネキシンは β -2ミクログロブリンの遊離の重鎖がER中に滞留するのを助け、それによって酵素消化による速やかな分解を防いでいることが示された。またカルネキシンはMHCクラスI-ペプチド複合体の品質管理、運搬、効果的な細胞内折り畳みなどに参与している (Jackson 1994)。カルレチクリン/P-SG67はカルネキシンと同様シャペロン機能が示唆されていて、上記のように Ca^{2+} とATP双方に依存的であることが示された (Nigam 1994)。ERシャペロンの機能はそれゆえカルシウムのホメオスタシスの微小変化に敏感である。このことはイオノフォア処理により激しいストレス応答が起こることと、折り畳まれていないタンパク質がER内へ蓄積することにより支持される概念である (Lodish 1990)。カルシウムホメオスタシスは熱ストレスによっても影響を受け、細胞内カルシウムの上昇が起こる。しかしBAPTAによる細胞内カルシウムのキレーションは敏速なグリコシル化を妨げないので、ストレスにより誘導されるP-SG67/カルレチクリンのグリコシル化は、細胞内のカルシウムの上昇とは独立の現象である (Jethmalani 1984a)。

糖タンパク質によりタンパク折り畳みが助けられるという考えは、ERにおけるウイルスGタンパク質の折り畳みは合成直後のタンパク質にBiPが結合することにより開始され、その後より折り畳み過程が進んだ段階の分子にカルネキシンが結合するという、近年の研究によっても裏付けられている (Hammond 1994b)。Gタンパク質の効果的な折り畳みと不完全に折り畳まれたタンパク質の (ERへの)蓄積が、いずれもカネキシンとの相互作用無くしては起こらないことは興味深い (Hammond 1994b)。このように糖タンパク質は正常な細胞において重要な生理的役割を持ち、ストレスからの細胞の回復においてもそれに関連し

during cellular recovery from stress. The observation of stress glycoproteins distributed throughout several subcellular compartments after heat stress (see above) is consistent with this concept.

Stabilization, facilitated renaturation, and protection against proteolysis. Stress-induced glycosylation facilitates protein renaturation and favors protein stabilization by blocking irreversible transition states.

This hypothesis derives support from several studies which demonstrate that protein glycosylation prevents not only protein aggregation, but is also important for maintenance of an active functional conformation. In yeast, glycosylation of invertase prevented its aggregation, and thereby facilitated its correct refolding (Schuelke 1988). In another study, hen egg white lysozyme, when expressed in a yeast system, gave rise to a hyperglycosylated form that was extremely heat stable with no evidence of coagulation under conditions that caused the wild-type lysozyme to irreversibly coagulate (Nakamura 1993).

The stabilization hypothesis is supported not only by hyperglycosylation studies leading to heat resistance, but also by hypoglycosylation studies that increase molecular heat sensitivity. The latter studies are based on specific deletions of glycosylation sites via oligonucleotide-directed mutagenesis. One such study used yeast acid phosphatase (AP) which has 12 potential *N*-glycosylation sequons (Asn-X-Ser/Thr), all of which are glycosylated in the wild type molecule (Riederer 1991). Systematic mutagenesis of glycosylation sequons yielded hypoglycosylation mutants that had severe defects in protein folding (Riederer 1991). The misfolded proteins were irreversibly retained in the ER and the fraction of retained AP protein correlated with the degree of hypoglycosylation. Further analysis of the hypoglycosylation mutants at lower temperatures indicated that reduced temperatures could compensate for the effect of reduced glycosylation. Reducing the temperature from 30°C to 15°C in the AP aglycone mutant, therefore, resulted in sufficient AP folding to measure enzymatic activity from unglycosylated AP (Riederer 1991). This demonstrated that enzymatic activity per se was not affected by either the amino acid exchange or the lack of glycan chains, but that glycosylation stabilized intermediate states of folded protein. Because protein folding is a critical step in the overall secretion process, glycosylation increased the efficiency of protein folding in a temperature-dependent manner and stabilized the folded protein against thermal denaturation. It was also noted that oligosaccharides at the C-terminus were more effective in mediating protein folding and stabilization, indicating that the formation of final tertiary structures was achieved only when the fully glycosylated protein is in the ER (Riederer 1991).

Not all glycosylation sites are necessarily identical in function. In hemagglutinin-neuraminidase, one specific oli-

た機能を持つ可能性がある。ストレス糖タンパク質が熱ストレスを受けたあとにいくつかの細胞内コンパートメントに分布して広がることは、この概念(上記)と一致する。

タンパク質を安定化し、再生を容易にし、酵素分解に対し保護する機能 ストレスにより誘導されるグリコシル化はタンパク質の再生を容易にし、不可逆的な遷移状態をブロックすることでタンパク質を安定化する

この仮説は、タンパク質のグリコシル化がタンパク質凝集を阻止するだけでなく、活性型コンフォメーションの保持に重要であることを示したいいくつかの研究から支持を得ている。酵母においてはインペルターゼのグリコシル化はインペルターゼの凝集を阻止し、それによってその正しい折り畳みを容易にする (Schuelke 1988)。別の研究では、ニワトリ卵白リゾチームを酵母の系で発現させると、過剰グリコシル化型を生じ、それは非常に熱に安定で、野生型リゾチームの不可逆的凝集を起こす条件下でも凝集を示さない (Nakamura 1993)。

安定化仮説は、熱抵抗性を与える過剰グリコシル化の研究に支持されているだけでなく、分子の熱感受性を増大させる低グリコシル化の研究によっても支持されている。後者の研究はオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によるグリコシル化部位の特異的除去にもとづいている。このような研究の一つは12の潜在的N-グリコシル化部位(Asn-X-Ser/Thr)を持つ酵母の酸性ホスファターゼ(AP)を用いて行われた(Riederer 1991)。野生型分子においては、この部位すべてがグリコシル化されている。次々にグリコシル化部位を変異させることにより低グリコシル化変異分子が得られたが、それらの分子はタンパク質折り畳み機能に非常に欠損を持つことが明らかになった(Riederer 1991)。折り畳み方の間違ったタンパク質は不可逆的にER中に蓄積し、APタンパク質の蓄積はグリコシル化の度合いに対応していた。低温における低グリコシル化変異株の分析により、低温が低グリコシル化の効果を補うことが示された。APアグリコン変異株の培養温度を30°Cから15°Cへ下げることにより、グリコシル化していないAPからの酵素活性を測定できるくらい十分な量のAPが折り畳まれた(Riederer 1991)。このことは酵素活性それ自身はアミノ酸残基の置換や、糖鎖の欠損による影響は受けず、グリコシル化がタンパク質の折り畳み中間体を安定化することを示している。タンパク質の折り畳みは全分泌過程の決定的な段階であり、グリコシル化はタンパク質折り畳みの効率を温度依存的に増大させるとともに、できあがったタンパク分子の熱安定性を増大させる。C末端側のオリゴ糖鎖はタンパク質の折り畳みと安定化に他の部位のもの以上に寄与が大きいことから、最終的な三次元構造の形成は完全にグリコシル化されたタンパク質がERに存在するときのみ起こることが示された(Riederer 1991)。

すべてのグリコシル化部位が必ずしも機能的に同一というわけではない。血球凝集ノイラミニダーゼにおいては、ある一

gosaccharide chain plays a major role in promoting correct folding, whereas another glycan chain, while not essential for initial folding, prevents aggregation of enzyme oligomers. Misfolded molecules in this system rapidly form disulfide-linked aggregates and are retained in the ER as stable complexes with BiP; in contrast, wild-type proteins form specific and transient complexes with BiP during normal folding (Ng 1990). In another study, it was shown that glycans at conserved positions synergistically promoted and stabilized protein conformation suitable for transport, and subsequently enhanced oligomeric assembly and folding rates for hemagglutinin (Roberts 1993).

Protein glycosylation may, or may not, be required for enzyme activity. In the case of lipase activity and enzyme secretion, glycosylation was essential for both folding of fully active enzyme and for secretion; in the presence of tunicamycin, cells produced an aglycone form of lipase that was both heat labile and showed less enzymatic activity (Abouakil 1993). Tunicamycin can also cause dramatically increased degradation of specific proteins (prohormone convertases, phosphotyrosine phosphatases) indicating proteolytic targeting and elimination of non-glycosylated isoforms (Benjannet 1993, Pulido 1992). In other systems, however, non-glycosylated homologs of catalytic glycoproteins suffered no functional decrement. This was the case for a truncated recombinant human lipase expressed in *E. coli*, where in spite of eliminating the glycosylation sequon, the heat stability and catalytic function was similar to that of the glycosylated enzyme (Downs 1994). These observations illustrate that specific glycosylation effects are dependent on the type of glycoprotein, the methods used for inhibition of glycosylation, and on the experimental endpoints used for comparing protein homologs.

Cellular proteolytic systems recognize specific protein conformational states, most commonly exposed hydrophobic regions, and eliminate these proteins. Proteolysis is costly to heat-stressed cells and requires re-synthesis to replace proteins at an energy cost that is generally higher than ATP-dependent protein renaturation. Protein denaturation, however, may be prevented by blocking critical transition states; conversely, renaturation can be achieved by prolonging other transition states that favor refolding with a return to the native protein conformation. The power of transition states is illustrated in the use of catalytic antibodies or "abzymes" that drive chemical reactions by stabilizing specific transition states (Suzuki 1994). Glycosylation may be a molecular means of favoring specific transition states. This area of glycobiology will probably become the focus of many future investigations.

F. Conclusions

We propose that mechanisms underlying the cellular stress response involve integrated and coordinated functions,

つのオリゴ糖鎖が正しい折り畳みを推進するのに主要な役割を果たしている。また初期の折り畳みには必要ではない他の糖鎖が酵素オリゴマーの凝集を防いでいる。間違っただけの折り畳まれた分子はSS結合を介した凝集物をすばやく形成し、BiPと安定な複合体をつくってER中に蓄積する。それに対し野生型タンパク質は、正常な折り畳み過程において、BiPと特異的で一過的な複合体を形成する(Ng 1990)。また、別の研究から、保存された位置にあるグリカン鎖それぞれが相乗的に働くことによって、輸送に適したコンフォメーションが安定化され、それによってこの血球凝集素のオリゴマー形成と折り畳みの速度を増大させることが示されている(Roberts 1993)。

タンパク質のグリコシル化はその活性に必要なかもしれないしそうでないかもしれない。リパーゼの活性とその分泌においては、グリコシル化は完全に活性のある酵素への折り畳みと酵素の分泌の双方に不可欠であった。ツニカマイシン存在下では細胞はアグリコン型のリパーゼを作ったが、この酵素は熱に不安定で酵素活性も低かった(Abouakil 1993)。ツニカマイシンはまた、特定のタンパク質(プロホルモン変換酵素、ホスフォチロシンホスファターゼ)の分解を劇的に増大させる。このことは非グリコシル化型イソフォームが酵素分解の標的となり、除去されていくことを示している(Benjannet 1993, Pulido 1992)。しかしながら他の系では、非グリコシル化型の糖タンパク質酵素のホモログは何ら機能の欠損を示さなかった。大腸菌において発現された切断された(truncated)組み換えヒトリパーゼの場合がこれで、グリコシル化部位を除去しても熱安定性と酵素機能はグリコシル化された酵素のそれとほとんど同じであった(Downs 1994)。これらの観察は、個々の事例で認められたグリコシル化の影響に関する知見が、糖タンパク質の型、グリコシル化の阻害方法、タンパク質ホモログの比較に用いられた実験の限界などに依存するものであることを示している。

細胞のタンパク質分解系は、タンパク質の特定のコンフォメーション状態(普通は疎水の領域が露出した部分)を認識し、これらのタンパク質を除去する。タンパク質分解は、熱ストレスを受けている細胞にとっては高くつく過程である。除去されたタンパク質を補うためにはタンパク質を再合成することが必要であり、この過程はATPに依存する高次構造再生系より一般的に高いエネルギーコストがかかる。これに対して、タンパク質の変性は、変性への決定的な遷移状態をブロックすることにより阻止できる可能性がある。逆にいえば、未変性タンパク質コンフォメーションへ戻るための折り畳みに有利な遷移状態を長引かせることによりコンフォメーションの再生をおこなうことができる。このような遷移状態の重要性は、酵素抗体(abzyme)の作用において明らかにされている(Suzuki 1994)。酵素抗体は特定の遷移状態を安定化することにより化学反応を推進する。グリコシル化は、ある特定の遷移状態をとらせるための分子的手段であるのかもしれない。糖鎖生物学のこの分野は、将来の多くの研究の焦点となる可能性が大きい。

F. 結論

我々は、細胞のストレス応答の基になるメカニズムはよく

including the activity of both “classical” HSPs and stress-induced protein glycosylation. In heat-stressed cells, protein glycosylation occurs both immediately (“prompt” glycosylation) and later when cells recover in concurrence with the development of thermotolerance. Specific functions for stress-induced protein glycosylation *in vivo* have not yet been confirmed, although it is clearly evident that homologs of particular stress glycoproteins do exist in cells of different origin and species. The recent identification of several stress glycoproteins and new information about the functional significance of glycosylation under non-stress conditions, leads us to hypothesize that stress glycosylation serves as a primary mechanism for preventing aggregation of proteins when their hydrophobic regions are uncovered. Since heat-induced protein aggregation is often irreversible and is accompanied by illegitimate disulfide bond formation, we hypothesize that protein glycosylation can also confer structural stability and facilitated renaturation to stress-denatured cellular proteins.

These two major elements of the stress response (HSPs and stress glycosylation) may be complementary (inhibiting aggregation, stabilization, and renaturation) and synergistic in conferring stress resistance to pre-stressed cells. Although each element of this mechanism has its own principal and independent function, built-in redundancy probably allows overlap between primary and secondary physiological functions of these two stress response elements. Our hypothesis further predicts that overexpression of either of the two stress response elements (HSPs or glycosylation) can provide partial expression of stress resistance.

Acknowledgments

This work was supported in parts by PHS Grant CA-33405, awarded by the National Cancer Institute, DHHS.

References

- Abouakil, N., Mas, E., Bruneau, N., Benajiba, A., and Lombardo, D. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 25755–25763
 Becker, J., and Craig, E.A. (1994) *Eur. J. Biochem.* **219**, 11–23
 Benjannet, S., Rondeau, N., Paquet, L., Boudreault, A., Lazure, C., Chretien, M., and Seidah, N.G. (1993) *Biochem. J.* **294**, 735–743
 Bergeron, J.J.M., Brenner, M.B., Thomas, D.Y., and Williams, D.B. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 124–128
 Cheng, L., Kirk, N., and Piper, P.W. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 201–207
 Clarke, E.P., Cates, G.A., Ball, E.H., and Sanwal, B.D. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 17230–17235
 DeVirgilio, C., Simmen, U., Hottiger, T., Boller, T., and Wiemken, A. (1990) *FEBS Lett.* **273**, 107–110
 Doms, R.W., Lamb, R.A., Rose, J.K., and Helenius, A. (1993) *Virology* **193**, 545–562
 Dorner, A.J., Wasley, L.C., Raney, P., Haugejorden, S., Green, M., and Kaufman, R.J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 22029–22034
 Downs, D., Xu, Y.-Y., Tang, J., and Wang, C.-S. (1994) *Biochemistry* **33**, 7979–7985
 Freedman, R. B. (1989) *Cell* **57**, 1069–1072
 Hammond, C., and Helenius, A. (1994b) *Science* **266**, 456–458
 Hammond, C., Braakman, I., and Helenius, A. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 913–917
 Hartl, F.U., Hlodan, R., and Langer, T. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 20–25
 Henle, K.J. (1981) *Radiat. Res.* **88**, 392–402
 Henle, K.J. (1987) In *Thermotolerance*, Vol. I, K.J. Henle, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 13–71
 Henle, K.J. (1987b) In *Thermotolerance*, Vol. I, K.J. Henle, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 127–143
 Henle, K.J., and Dethlefsen, L.A. (1978) *Cancer Res.* **38**, 1843–1851
 Henle, K.J., and Nagle, W.A. (1991) *Exp. Cell Res.* **196**, 184–191
 Henle, K.J., Jethmalani, S.M., Li, L., and Li, G.C. (1995) Submitted.

調和し統合されたものであり、その中には“古典的”なHSPsとストレスにより誘導されるタンパク質のグリコシル化の両者の機能が関与していると提案したい。熱ストレスを受けた細胞におけるタンパク質のグリコシル化には、即座に起こるもの(“敏感な”グリコシル化)と、その後に細胞が熱許容性の獲得を伴って回復するときに起こるものがある。特定のストレス(応答)糖タンパク質のホモログが異なる種や異なる起源の細胞に存在することは明白であるが、このストレスにより誘導されるタンパク質のグリコシル化の *in vivo* における機能はまだ明確になっていない。近年同定されたいくつかのストレス糖タンパク質と、非ストレス条件下でのグリコシル化の機能的重要性に関する新たな情報から、我々は、ストレスに応答したグリコシル化がタンパク質の疎水部分が露出した時に起こる凝集を防ぐ第一のメカニズムとして働くという仮説をたてた。熱により起こるタンパク質の凝集は非可逆的で、不特定のSS結合形成を伴うことが多いため、我々はタンパク質のグリコシル化が構造を安定化し、ストレスにより変性した細胞のタンパク質を再生するのを助けるのだという仮説をたてた。

これらの二つの主なストレス応答要因(HSPとストレス応答グリコシル化)はストレスにさらされた細胞に耐性を与える上で相補的かつ相乗的に作用するのであろう(凝集の阻止、安定化、再生)。このメカニズムの各構成因子はそれぞれ独自の主要な機能を持つが、この二種類の因子がそれぞれ重複する性質を持っているので、恐らくそれらの生理的機能が重なり合うことになっているのだろう。我々の仮説は、さらにこれらの二つのストレス応答因子(HSPまたはグリコシル化)のどちらか一方の過剰発現が、ストレス抵抗性を部分的に発現させることができることを予測させるものである。

農水省農業生物資源研究所
伊藤 ユキ記

- Henle, K.J., Kaushal, G.P., Nagle, W.A., and Nolen, G.T. (1993) *Exp. Cell Res.* **207**, 245–251
- Henle, K.J., Monson, T.P., and Stone, A. (1990) *J. Cell. Physiol.* **142**, 372–378
- Henle, K.J., Monson, T.P., Nagle, W.A., and Moss, A.J. (1985) *Int. J. Hyperthermia* **1**, 371–382
- Henle, K.J., Nagle, W.A., Bedford, J.S., and Harvey, W.F. (1990b) *J. Cell Sci.* **95**, 555–561
- Henle, K.J., Nagle, W.A., Moss, A.J., and Herman, T.S. (1982) *Radiat. Res.* **92**, 445–451, 1982
- Henle, K.J., Nagle, W.A., Norris, J.S., and Moss, A.J. (1988) *Int. J. Radiat. Biol.* **53**, 839–847
- Henle, K.J., Stone, A., and Chatterjee, S.K. (1988b) *Cancer Res.* **48**, 5717–5721
- Henle, K.J., Wang, S.-Y., Nagle, W.A., and Lumpkin, C.K. (1994) *Exp. Cell Res.* **210**, 185–191
- Hirayoshi, K., Kudo, H., Takechi, H., Nakai, A., Iwamatsu, A., Yamada, K.M., and Nagata, K. (1991) *Mol. Cell Biol.* **11**, 4036–4044
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Bell, W., Boller, T., and Wiemken, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **210**, 125–132
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M.N., Boller, T., and Wiemken, A. (1994) *Eur. J. Biochem.* **219**, 187–193
- Jackson, M.R., Cohen-Doyle, M.F., Peterson, P.A., and Williams, D.B. (1994) *Science* **263**, 384–387
- Jethmalani, S.M., and Henle, K.J. (1994a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, 780–787
- Jethmalani, S.M., Henle, K.J., and Kaushal, G.P. (1994b) *J. Biol. Chem.* **269**, 23603–23609
- Kern, G., Schmidt, M., Buchner, J., and Jaenicke, R. (1992) *FEBS Lett.* **305**, 203–205
- Laszlo, A. (1988) *Int. J. Hyperthermia* **4**, 513–526
- Laszlo, A. (1992) *Cell Prolif.* **25**, 59–87
- Lee, A.S. (1992) *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 267–273
- Lee, Y.J., and Dewey, W.C. (1988) *Cell. Physiol.* **135**, 397–406
- Li, G.C., Li, L., Liu, Y.-K., Mak, J.Y., Chen, L., and Lee, W.M.F. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1681–1685
- Lodish, H.F., and Kong, N. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 10893–10899
- Lund, P. (1994) *Bioessays* **16**, 229–231
- Marquardt, T., and Helenius, A. (1992) *J. Cell Biol.* **117**, 505–513
- Michalak, M., Milner, R.E., Burns, K., and Opas, M. (1992) *Biochem. J.* **285**, 681–692
- Morimoto, R.I. (1993) *Science* **259**, 1409–1410
- Nakamura, S., Takasaki, H., Kobayashi, K., and Kato, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 12706–12712
- Natsume, T., Koide, T., Yokota, S.-I., Hirayoshi, K., and Nagata, K. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 31224–31228
- Ng, D.T.W., Hiebert, S.W., and Lamb, R.A. (1990) *Mol. Cell Biol.* **10**, 1989–2001
- Niewiarowska, A., Caltabiano, M.M., Bailey, D.S., Poste, G., and Greig, R.G., (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 14815–14820
- Nigam, S.K., Goldberg, A.L., Ho, S., Rohde, M.F., Bush, K.T., and Sherman, M.Y. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 1744–1749
- Ou, W.-J., Cameron, P.H., Thomas, D.Y., and Bergeron, J.J.M. (1993) *Nature* **364**, 771–776
- Parsell, D.A., and Lindquist, S. (1993) *Ann. Rev. Genet.* **27**, 437–496
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., and Lindquist, S. (1994) *Nature* **372**, 475–478
- Parsell, D.A., Taulien, J., and Lindquist, S. (1993b) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **339**, 279–285
- Piper, P.W. (1993) *FEMS Microbiol. Rev.* **11**, 339–355
- Potempa, J., Korzus, E., and Travis, J., (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15957–15960
- Pulido, R., and Sanchez-Madrid, F. (1992) *Eur. J. Immunol.* **22**, 463–468
- Qu, D., Mazzarella, R.A., and Green, M. (1994) *DNA Cell Biol.* **13**, 117–124
- Riederer, M.A., and Hinnen, A. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 3539–3546
- Roberts, P.C., Garten, W., and Klenk, H.-D. (1993) *J. Virol.* **67**, 3048–3060
- Schlesinger, M.J. (1994) *Pediatr. Res.* **36**, 1–6
- Schuelke, N., and Schmid, F.X. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 8832–8837
- Stevenson, M.A., and Calderwood, S.K. (1990) *Mol. Cell Biol.* **10**, 1234–1238
- Stuart, R.A., Cyr, D.M., Craig, E.A., and Neupert, W. (1994) *Trends. Biochem. Sci.* **19**, 87–92
- Suzuki, H. (1994) *J. Biochem.* **115**, 623–628
- Takechi, H., Hirayoshi, K., Nakai, A., Kudo, H., Saga, S., and Nagata, K. (1992) *Eur. J. Biochem.* **206**, 323–329
- Takechi, H., Hosokawa, N., Hirayoshi, K., and Nagata, K. (1994) *Mol. Cell Biol.* **14**, 567–575
- Te Heesen, S., and Aebi, M., (1994) *Eur. J. Biochem.* **222**, 631–637
- Todd, M.J., Viitanen, P.V., and Lorimer, G.H. (1994) *Science* **265**, 659–666
- Wang, S.-Y., and Gudas, L.J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 15818–15822
- Wang, S.-Y. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 607–613
- VanWhy, S.K., Mann, A.S., Thulin, G., Zhu, X.-H., Kashgarian, M., and Siegel, N.J. (1994) *J. Clin. Invest.* **94**, 1518–1523

Received on March 2, 1995, accepted on March 5, 1995