Glycogen in Liver: Characteristics and Biosynthesis

肝グリコゲン: その性質と生合成

^{1,*}Gannon, Mary C.; and ^{*}Nuttall, Frank Q.

Metabolic Research Laboratory and the Section of Endocrinology, Metabolism and Nutrition, Minneapolis Veterans Affairs Medical Center and the Departments of Medicine^{*} and Food Science & Nutrition¹, University of Minnesota
Minneapolis, MN 55417 USA, FAX: 1-612-725-2273, E-mail: ganno004@maroon.tc.umn.edu

Key Words: glycogen, glycogenin, liver, proteoglycan

Abstract

It generally is agreed that initiation of a glycogen molecule occurs through the addition of a linear array of glucose molecules to a protein referred to as glycogenin. The addition of glucosyl units is catalyzed by glycogenin itself. The product is then branched and expanded by other enzymes. This process has been studied best in skeletal muscle. In skeletal muscle, all of the glycogenin is incorporated into glycogen molecules (1). The glycogen molecules also are all presumed to be proteoglycans.

In liver, glycogenin is free, *i.e.*, not incorporated into a proteoglycan molecule in the fasted state and it becomes incorporated into a glycogen molecule only later in the feeding phase. Furthermore, preliminary data suggest that most of the glycogen molecules are not proteoglycans but rather are independent of glycogenin. Thus, the character and biosynthesis of glycogen in liver appears to be much more complex than in skeletal muscle. Regulation of the various forms of glycogen also is likely to be complex.

要約

グリコーゲン分子の合成は、glycogenin と呼ばれるタンパク質へグルコース残基が線状に付加されることによって開始されることが一般に受け入れられている。グルコース残基の付加は glycogenin 自身により触媒され、それによって生じた産物は他の酵素によって枝付けされ伸長される。この過程は骨格筋において最もよく研究されている。骨格筋ではすべての glycogenin 分子がグリコーゲンに取り込まれた形で存在する (1)。したがって、グリコーゲン分子はすべてプロテオグリカンであると考えられている。

肝臓においては glycogenin は遊離の状態 で存在する。すなわち絶食状態では glycogenin はプロテオグリコーゲン分子に取り込まれず、その後の給餌によってのみ取り込まれる。さらに、大部分のグリコーゲン分子はプロテオグリカンではなく、glycogenin とは独立に存在することが予備的な実験により示されている。したがって、肝臓におけるグリコーゲンの性質と生合成過程は骨格筋におけるそれらよりもずっと複雑であるらしい。グリコーゲンの多様な形態の制御も複雑であるようだ。

A. Introduction

Glycogen is the storage form of glucose in animals. It is a highly branched structure composed of thousands of glucose molecules attached to each other in an α -1,4 glucosidic linkage with branch points consisting of α -1,6 linkages. The external branches on the surface of the glycogen molecule are estimated to consist of a linear array of 12-14 glucose molecules. The internal branches are ~4-6 glycosyl units in length.

The molecular weight (MW) of glycogen is polydisperse. Particles with an estimated MW up to 1 billion have been reported on gradient density analysis and by electron microscopy (2). However, these very large particles most likely represent aggregates or assemblies of individual glycogen molecules. The largest individual glycogen molecule appears to have a MW of ~8 million and to contain 50,000 glucose molecules arranged in 12 tiers of branches (2, 3). Why there is a limit in glycogen molecular weight is uncertain. It has been attributed to steric hindrance (4).

A. はじめに

グリコーゲンは動物におけるグルコースの貯蔵形態である。その分子は高度に分岐した構造を持っており、数千のグルコース残基が α -1,4- グルコシド結合で連結され、それらが α -1,6- グルコシド結合で枝分かれしている。グリコーゲン分子の表面の外部鎖は 12~14 グルコースからなり、内部鎖は ~4-6 グルコースからなる。

グリコーゲンの分子量は多様である。密度勾配分析や電子顕微鏡観察により、分子量 10 億に及ぶ粒子が報告されている (2)。しかし、これらの非常に大きな粒子はおそらくグリコーゲン分子の会合体、または集合体であろう。単独のグリコーゲン分子で最大のものは分子量 ~800 万程度で、50,000 グルコース残基が 12 層の分岐単位に配列されている (2, 3)。なぜグリコーゲンの分子量に上限があるのかは不明確であるが、立体障害のためであるとされている (4)。

In spite of the very large size of some of these molecules, each begins with a single glucose molecule which is referred to as the reducing end because unless it is derivatized to protein or another substance, it has a free aldehyde group which is chemically reactive. Thus, theoretically a glycogen molecule could consist of anywhere from less than 100 glycosyl units to several thousand.

As currently defined, glycogen consists of those structures which after potassium hydroxide (KOH) digestion of tissue are precipitable by a 66% ethanol (EtOH) solution. This is the method against which other extraction methods are compared (5). This procedure, however, is known to degrade glycogen particles. Primarily it affects the association of the glycogen molecules, probably through formation of isosaccharinic acid groups, although some degradation of individual molecules also occurs (6). In order to isolate intact glycogen other methods must be used. A number of these have been described (2, 3, 7-9). Whether ethanol also will precipitate small nascent or immature small glycogen molecules, particularly if they are attached to protein is uncertain, although ethanol has been reported to precipitate even oligosaccharides (10). To our knowledge, this issue has not been rigorously evaluated. Nevertheless, ethanol precipitation currently is considered the best method for isolating and quantifying the total amount of glycogen present in a tissue.

B. Expansion of Nascent Glycogen or Oligosaccharides to Mature Glycogen

Small glycogen molecules or even malto-oligosaccharides are substrate for glycogen synthase which adds glucosyl units to the non-reducing ends of the branches of glycogen or the non-reducing end of oligosaccharides in an α -1,4 linkage. UDP-glucose is the glucosyl donor. Once the chain is elongated to 12-14 units, branching enzyme removes a linear chain of 4-6 glucose molecules and inserts it in an α -1,6 linkage forming a branch point. This chain also then may be elongated by the action of glycogen synthase.

We have purified the branching enzyme from rat liver and have found the activity to be 150-fold greater than that of the synthase (unpublished), confirming that it is the synthase which is rate limiting in expansion of the nascent glycogen molecule to a mature glycogen molecule.

Our laboratory also has shown that specific isozymes of synthase are present in liver and skeletal muscle (11-14). Both isozymes are regulated by a complex dephosphorylation-phosphorylation mechanism which also interacts in a complex fashion with allosteric effectors (15, 16). However, the liver enzyme is more highly phosphorylated, and its physiological regulation is different than that of skeletal muscle (15). Recently we have cloned and sequenced the gene for the human liver enzyme (11), have localized the gene to chromosome 12

このようにグリコーゲン分子のあるものは特に高分子であるが、タンパクや他の物質と結合しているのでない限り、おのおの分子は還元性末端という単一のグルコース分子からはじまっている。その末端は遊離のアルデヒド基を持っており、化学的に反応性が高い。このように、理論的にはグリコーゲン分子は100グルコース残基以下のものから数千グルコース残基に至るものまでどの大きさのものも存在しうる。

現在定義されているところでは、グリコーゲンは、組織を水酸化カリウム (KOH) で消化した後、66% エタノールで沈殿する構造体からなる。この方法は、他の抽出方法に匹敵するものである (5) が、グリコーゲン顆粒を分解することが知られている。いくらかは、個々の分子の分解も起こるが、主に、たぶんイソサッカリン酸基の形成によりグリコーゲン分子の会合に影響を及ぼすのである (6)。完全な状態のグリコーゲンを単離するためには、他の方法を用いなければならず、そのための多くの方法が報告されている (2, 3, 7-9)。エタノールはオリゴ糖でさえも沈殿させることが報告されているが (10)、合成途中の、あるいは未熟な低分子グリコーゲンを沈殿させるかどうかは、特にそれらがタンパク質と結合している場合はっきりしない。私たちの知る限りでは、この問題は厳密には調べられていない。それでも、エタノール沈殿は現在のところ組織中のグリコーゲンを単離し定量するための最善の方法と考えられている。

B. 合成途中のグリコーゲン、あるいはオリゴ糖の成熟グリコーゲンへの伸長

低分子グリコーゲン、あるいはマルトオリゴ糖でも glycogen synthase の基質となる。この酵素は、グリコーゲンの枝の非還元末端やオリゴ糖の非還元末端に α -1,4-結合でグルコシル基を付加する酵素であり、UDP-グルコースがグルコシル基供与体となる。いったん、鎖が12-14グルコシル残基分まで伸びると、branching enzyme が4-6グルコース残基の鎖を取り除き、それを転移させて α -1,6-結合の分岐点を作る。そして、その鎖も glycogen synthase の作用により伸ばされ得る。

私たちはラット肝臓の branching enzyme を精製し、その活性は synthase よりも150倍も多く存在することを見いだした (未発表)。このことは、新生グリコーゲンが成熟グリコーゲンへ伸長する過程を律速しているのが synthase であることを確認するものであった。

私たちの研究室では、肝臓と骨格筋に特異的な synthase アイソザイムが存在することを示してきた (11-14)。両アイソザイムともに、複雑な脱リン酸化-リン酸化機構による制御を受けており、その機構もアロステリックエフェクターと複雑に相互作用する (15, 16)。しかし、肝臓の酵素はより高度にリン酸化されており、その生理学的な制御は骨格筋におけるそれと異なっている (15)。最近私たちはヒト肝臓の本酵素遺伝子のクローン化と塩基配列決定を行うとともに (11)、本遺伝子が12番

(17) and have begun site-directed mutagenesis studies in order to probe the structural basis for its regulation. The regulation of synthase has been a major interest in our laboratory for many years.

Although synthase and the branching enzyme activities can explain the expansion of small or nascent glycogen molecules, they are not likely to explain the *de novo* synthesis of glycogen molecules. Nevertheless, this is a theoretical possibility. The minimal length of a malto-oligosaccharide chain that will serve as a substrate for glycogen synthase was reported to be 1 to 4 glucose units (maltotetraose) (18-20). However, the affinity was much less than when acting on the branches of glycogen and contamination of the synthase preparation with glycogenin cannot be ruled out.

C. Initiation of the New Glycogen Molecule

In 1934 Willstätter and Rohdewald (9) extracted tissues with hot water. A soluble fraction was obtained, referred to as lyo-glycogen. From the insoluble material a second smaller fraction was obtained after proteolytic enzyme treatment or alkaline digestion which they referred to as desmo-glycogen. They believed the latter form of glycogen to be less soluble due to combination with protein. They also reported that it was lyo-glycogen that changed with feeding. Others referred to the desmo-glycogen fraction as "residual" glycogen (5).

Whether there were two forms of glycogen, one trichloroacetic acid (TCA) precipitable and one not, and whether their metabolism was regulated differently, resulted in numerous publications [reviewed in reference (5)] and became a contentious issue that has never been completely resolved. In a review, Stetten and Stetten (5), as well as Roe *et al.* (21) suggested that there were many forms of glycogen present in cells and that the classification into an easily extractable form and a more difficult to extract form was somewhat arbitrary. Until recently there has been little interest in pursuing the possibility of different forms being present or the possibility that they may be metabolically important and regulated differently.

Stetten and Stetten (5) also suggested that the protein associated with glycogen as fractionated was due both to a non-specific binding of proteins and to non-covalent attachment of the enzymes concerned with glycogen metabolism. Later, Fischer and Stetten (22) reported that protein made up ~40-50% of the glycogen as isolated from skeletal muscle. They and subsequently Cohen (23) attributed the protein to non-covalently bound enzymes important in glycogen metabolism. These included glycogen phosphorylase, phosphorylase kinase, glycogen synthase, synthase kinase 2, and cAMP kinase. Small amounts of other enzymes and sarcoplasmic reticulum also were present. That the protein associated with glycogen represented non-covalently bound proteins, primarily glycogen associated enzymes, was the accepted explanation for the small

染色体に存在していることを示した (17)。また、その制御における構造的な基本原理を探るために部位特異的変異操作を用いた研究を開始した。Synthase の制御は私たちの研究室における長年の主要な興味の対象である。

低分子の、あるいは合成途中のグリコーゲンの伸長は、synthase と branching enzyme の活性によって説明することができるが、それらの活性によってグリコーゲン分子の新規合成を説明することはできそうにない。それでも理論上は可能性がある。Glycogen synthase の基質になりうる最小のマルトオリゴ糖は 1 から 4 グルコース残基 (マルトテトラオース) からなると報告されている (18-20)。しかし、その場合の親和性はグリコーゲンの枝に作用する場合と比べるとずっと低い、使われた synthase 標品に glycogenin が混入していた可能性も否定できない。

C. 新しいグリコーゲン分子の合成開始反応

1934 年に Willstätter と Rohdewald (9) は組織を熱水抽出して可溶性の画分を得、これを溶解型グリコーゲンと呼んだ。不溶性の画分からは、タンパク分解酵素処理やアルカリ分解の後に第 2 のより少量の画分を得て、これを結合型グリコーゲンと呼んだ。彼らは、後者のグリコーゲンは、タンパク質と結合しているために溶解しにくいのだと考え、また溶解型グリコーゲンが給餌によって変化したものであると報告している。別の研究者は、結合型グリコーゲン画分を“残留”グリコーゲンと呼んでいる (5)。

トリクロロ酢酸 (TCA) で沈殿するものと沈殿しないものの 2 種類のグリコーゲン形態があるのかどうか、またそれらの代謝が別々に制御されているのかどうかについては、多くの報告があり [文献 (5) に総説がある]、論争的になっているが完全には解決されていない。ある総説において、Stetten と Stetten (5) は、細胞内には多くの形態のグリコーゲンが存在すること、それらの易抽出形態と難抽出形態への分類はやや恣意的になるということを示している。Roe ら (21) も同様の示唆を行っている。最近までこの異なった形態が存在する可能性、あるいはそれらの代謝における重要性や別個に制御されている可能性を追求することにはほとんど興味が払われていなかった。

Stetten と Stetten (5) は、分画されたグリコーゲンに結合しているタンパク質には非特異的に結合しているものと非共有結合で付着しているグリコーゲン代謝に関係する酵素の両方があることも示唆している。後に、Fischer と Stetten (22) は骨格筋から単離されたグリコーゲン標品には ~40-50% のタンパク質が含まれることを報告した。彼らと、後には Cohen (23) は、それらのタンパク質はグリコーゲン代謝において重要な酵素が非共有結合したものであるとしている。これらのタンパク質は、glycogen phosphorylase、phosphorylase kinase、glycogen synthase、synthase kinase 2、および cAMP kinase を含んでおり、少量の他の酵素や筋小胞体も存在した。グリコーゲンに非共有結合したタンパク質、主にグリコーゲン会合酵素の存在は、肝臓や骨格筋や他の臓器から高度に精製されたグリコーゲン標品に少量のタンパク質が存在することの説明として受け入れられてきた。

amounts of protein present in highly purified glycogen preparations from liver, skeletal muscle and other organs.

However, data began to accumulate that the synthesis of an α -1-4 glucan attached to a protein was present in liver (24, 25), heart (26), and retina (27) of mammals, *Escherichia coli* (28, 29) *Neurospora crassa* (30), potato tubers (31) and carrots (32). UDP-glucose at a micromolar concentration functioned as the glycosyl donor. The product formed was generally but not exclusively (33, 34) found in the TCA precipitable fractions of cell extracts (33-35). Data were obtained in potato tubers indicating that the product produced was a linear chain of glucose molecules in α -1,4 linkage attached to a protein (33). The nature of the protein or the protein-glucan bond was not known. It was shown not to be a serine or threonine-O-glycosyl bond.

It also was speculated that the protein was a foundation or primer upon which new glycogen or starch molecules could be formed (25, 33). That is, it became incorporated into the glycogen or starch molecule. Also, in potato tubers enzymes were present which could cleave it from the ethanol precipitable product (starch).

Earlier investigators also had suggested that formation of a glucoproteic intermediate was a general mechanism for the synthesis of α - and β -glucans (36). Thus, the general concept was developed that a UDP-glucose-protein transglucosylase was present in plants and animals which produced a product (either a single glucose or most likely a linear array of glucose molecules attached to a protein) which then was acted upon by other enzymes to produce a mature starch or glycogen molecule.

Subsequently, the protein in potato tubers and carrots (32) and mammals to which glucosyl units were being attached was shown to be a 37-40 kDa protein (37, 38). In carrots it was shown to be self-glycosylating (32). This protein has been purified from rabbit skeletal muscle, the amino acid sequence determined, and a specific tyrosine to which the glucose molecules are attached identified (39). The gene also has been cloned and sequenced (40). It is a manganese dependent self-glycosylating enzymic protein which may add up to 8-12 glucosyl units to itself in a linear array (41). This includes the addition of the first glucose to a specific tyrosine in the protein. Thus, it is a very unique enzyme. Not only is it a self-glycosylating enzyme, it gets incorporated in to the glycogen molecule. It has been given the name, glycogenin (42).

Subsequently, we (unpublished data) and others have obtained data indicating that not only does it glycosylate itself, it also will glycosylate malto-oligosaccharides and artificial alkylglucosides or maltosides (43-45). Indeed, dodecyl- β -D-maltoside is reported to be an excellent substrate for the kidney enzyme (44). The rate of reaction is even faster than for self glycosylation. These observations then raise the possibility that not only does glycogenin self glycosylate and become in-

しかしながら、ほ乳類の肝臓 (24, 25) や心臓 (26) や網膜 (27)、また *Escherichia coli* (28, 29)、*Neurospora crassa* (30)、バレイショ塊茎 (31) そしてニンジンで、タンパク質に結合した α -1,4-グルカンの合成が起こるというデータが蓄積されはじめた。 μ モル濃度レベルの UDP- グルコースがグリコシル供与体として働き、生産物はすべてではないが (33, 34) 一般的に細胞抽出物の TCA 沈殿画分として検出される。バレイショ塊茎において得られたデータでは、生産物はタンパク質に結合した直鎖状の α -1,4-グルカンであることが示された (33)。そのタンパク質の性質、あるいはタンパク質とグルカンの結合の性質については分かっていない。セリンあるいはトレオニン-O-グリコシル結合でないことは示されている。

そのタンパク質が新たなグリコーゲンやデンプン分子が合成されるための基盤、あるいはプライマーであるという推論もなされた (25, 33)。すなわち、それがグリコーゲンやデンプン分子に取り込まれるということである。また、バレイショ塊茎においてはそのタンパクをエタノール沈殿画分(デンプン)から切り放しうる酵素が存在した。

初期の研究者たちは、糖タンパク中間体の形成が α -グルカンと β -グルカン合成における一般的機構であるとも考えた (36)。このように、UDP-グルコース-タンパク質 transglucosylase が植物および動物中に存在して、ある生産物 (単一のグルコース、あるいはもっと可能性が高いところではグルコースの直鎖がタンパク質に結合したもの) を合成し、それが他の酵素の作用を受けて成熟デンプンやグリコーゲン分子ができるという一般概念が発展してきた。

その後、バレイショ塊茎、ニンジン (32)、および動物においてグリコシル残基が付加されるのは 37-40kDa のタンパク質であることが示された (37, 38)。ニンジンにおいてはそのタンパク質は自己グリコシル化を行うことが報告された (32)。このタンパク質はウサギ骨格筋から精製されて、そのアミノ酸配列が決定され、またグルコース分子が付加される残基として特異的なチロシン残基が同定された (39)。遺伝子のクローン化と塩基配列決定も行われた (40)。そのタンパク質はマンガン依存性の自己グリコシル化酵素であり、自分自身に 8-12 残基までのグルコースを直鎖状に付加する (41)。この過程は特異的なチロシン残基への最初のグルコース基の付加を含んでいる。非常にユニークな酵素であり、自己グリコシル化酵素であるというだけでなく、グリコーゲン分子に取り込まれる。この酵素は glycogenin と名付けられた (42)。

その後、私たち (未発表データ)、および他の研究者らはそれが自己をグリコシル化するだけでなく、マルトオリゴ糖、あるいは人工のアルキルグルコシドやマルトシドをもグリコシル化することを示すデータを得た (43-45)。実際、ドデシル- β -D-マルトシドは腎臓の酵素にとって非常によい基質であることが報告されている (44)。その反応速度は自己グリコシル化よりも早い。これらの観察から次のような可能性が考えられた。すなわち、glycogenin が自己をグリコシル化して成長するグリコーゲン分子に基盤あるいはプライマーとして取り込まれるだけで

corporated into the growing glycogen molecule as the backbone or primer, it also may catalyze the glycosylation of endogenous maltosaccharides or other endogenous substrates such as alkyl derivatives of maltose or malto-oligosaccharides, which in turn may function as primers. That is, glycogenin may have a dual function.

D. Malto-Oligosaccharides

The presence of malto-oligosaccharides in tissue has been reported by several investigators. Beloff-Chain *et al.* (46) identified a series of malto-oligosaccharides in diaphragm muscle the largest of which was at least malto-heptaose (7 glycosyl units in length). The production of these was accelerated by addition of insulin to an incubated diaphragm preparation. Fishman and Sie (10) reported the isolation of the same family of oligosaccharides up to malto-decaose (10 glycosyl units in length) and even higher from rat liver. They speculated that they were derived from the endogenous degradation of glycogen. However, in a subsequent publication using ^{14}C labeling experiments (47), they concluded that it was likely that the oligo-saccharides were precursor substrates for glycogen synthesis. Mordoh *et al.* (3) homogenized rat liver in HgCl_2 in order to inhibit enzymic activity and reported the presence of oligosaccharides but the concentration ($1.3 \mu\text{mol/g}$ liver using maltose as a standard) was lower. The concentration also did not change with oral sucrose administration. This was in contrast to the increase with feeding reported by Sie and Fishman (47). The higher concentration reported by Sie and Fishman they attributed to endogenous- α -amylase not being inhibited during preparation of the liver for assay. They did not consider the amount present to be significant.

Giri *et al.* (48) described an enzyme preparation from rat liver and brain which generated from maltose a series of α -1,4 oligo-saccharides, liberating glucose in the process. A similar glucosylating activity was reported in rabbit liver (49) but these activities have never been confirmed. A D- or disproportionating enzyme has been described in potatoes. This enzyme transferred maltosyl or higher malto-oligosaccharyl residues from oligo- and polysaccharides to various receptors. The glucose concentration in the incubation mixture appeared to regulate the average chain lengths of the maltodextrin produced (50).

The importance, if any, of these transglucosylase activities or of α -amylase or α -glucosidase activities in glycogen metabolism remains unknown. However, they could provide a non-protein bound primer for synthesis of a glycogen molecule by glycogen synthase and branching enzyme. It should be noted that glycogen synthase may use oligosaccharides as short as maltotetraose as a substrate but the rate was very slow (19).

Thus, that oligosaccharides or small branched or unbranched maltodextrins either produced by cleavage of these

なく、内在性のマルトオリゴ糖、あるいはマルトースやマルトオリゴ糖のアルキル誘導体のような他の内在性基質のグリコシル化を触媒し、それがプライマーとして機能するという可能性である。すなわち、glycogenin は2つの機能を持つものかもしれない。

D. マルトオリゴ糖

組織中のマルトオリゴ糖の存在は数人の研究者によって報告されている。Beloff-Chain ら (46) は横隔膜筋肉中に存在する一連のマルトオリゴ糖を同定したが、そのうちの最大のものは少なくともマルトヘプタオース (7 グルコース残基長) 以上であった。これらの生産は培養横隔膜にインシュリンを添加することによって促進された。Fishman と Sie (10) はラット肝臓からマルトデカオース (10 グルコース残基長) までの、そしてより長鎖の同種オリゴ糖の単離について報告している。彼らは、それらのオリゴ糖が内在性のグリコーゲンの分解によって生じたと推測している。しかしながら、 ^{14}C ラベル実験を用いたその後の報告では (47)、そのオリゴ糖はグリコーゲン合成の前駆体であるらしいと結論している。Mordoh ら (3) は、酵素活性を阻害するためにラット肝臓を HgCl_2 存在下でホモゲナイズし、濃度はもっと低い (マルトースを標準として $1.3 \mu\text{mol/g}$ liver)、マルトオリゴ糖が存在することを報告した。その濃度はしょ糖の経口投与によっても変化しなかった。このことは、Sie と Fishman (47) により報告された、給餌による増加とは相反していた。Sie と Fishman によってより高い濃度が観察された原因として、彼らは測定のための肝臓調製中に内在性 α -amylase が阻害されていなかったことを指摘しており、その存在量は有意ではないと考えている。

Giri ら (48) は、グルコースを遊離しながらマルトースから一連の α -1,4-オリゴ糖を生成する酵素標品をラットの肝臓と脳から得ている。同様なグルコシル化活性がウサギ肝臓において報告されているが、これらの活性はまだ確認されていない。バレイショには、D-酵素、すなわち不均化酵素が存在することが示されている。この酵素はマルトシル基、あるいはより長いマルトオリゴシル基をオリゴ糖や多糖から種々の受容体に転移する。反応液中におけるグルコース濃度が生産されるマルトデキストリンの平均鎖長を制御しているらしい (50)。

これらの transglucosylase 活性、 α -amylase 活性、あるいは α -glucosidase 活性のグリコーゲン代謝において重要であるかどうかは不明である。しかし、それらの酵素は glycogen synthase と branching enzyme によるグリコーゲン分子合成に対して、タンパク質非結合型プライマーを供給しうる。Glycogen synthase が、速度は非常に遅いが、マルトテトラオースのような短いオリゴ糖も基質として使用しうることは注目すべきである (19)。

このように、glycogenin 初期生産物やタンパク質非結合型グリコーゲン分子の部分分解によって生じる、オリゴ糖、低分

from a glycogenin initiated product or from partial degradation of protein-free glycogen molecules are substrates for a formation of new glycogen molecules is a distinct possibility.

E. α -Glucosidases in Liver

A lysosomal, acid, α -glucosidase is present which hydrolyzes both α -1,4 and α -1,6 glycosyl bonds and thus can completely hydrolyze glycogen to glucose or maltose. In its absence glycogen of normal structure accumulates in lysosomes resulting in death or disability (glycogen storage disease, Type II or Pompe's disease) (51). Thus, autophagy of glycogen has been considered to be important in glycogen degradation. The mechanism by which glycogen molecules are selected for and taken up by lysosomes remains unknown, as does its possible regulation. Also, whether the glycogen taken up by the lysosomes is derivatized by glycogenin is not known, nor are the actual products released from microsomes *in vivo*.

An additional α -glucosidase active at neutral pH has been described which releases glucose from glycogen. It is referred to as α -glucosidase C. It has been purified, and the gene cloned, sequenced, and assigned to chromosome 15 (52, 53). However, its role, if any, in glycogen metabolism is unknown. In this regard, some investigators have attributed the inability to identify large proteoglycogen species in skeletal muscle extracts, after labeling with ^{14}C using ^{14}C -UDP-glucose as substrate, to the presence of an α -glucosidase (54).

Whether there is a cytosolic α -amylase active at a neutral pH in addition to the lysosomal acid α -amylase remains uncertain but has not been identified in liver.

F. Proteoglycogen and Glycogen Metabolism

In animal skeletal muscle, glycogen preparations have invariably contained protein with amounts up to 3% by weight (8, 55). The minimal amount present generally is ~0.3-0.4% (54). Based on the latter, it has been calculated that there is at least one glycogenin molecule present for each glycogen molecule (61, 62). Also, it has been reported that free reducing groups are not present in skeletal muscle glycogen (54). This has led to the concept that in skeletal muscle, all of the glycogen molecules have attached to them a glycogenin molecule. That is, they are all proteoglycans even though the glycan may be extremely large relative to the size of the protein.

However, highly purified preparations of liver glycogen obtained under conditions which minimize degradation have yielded preparations in which the protein content varied between 0.04 to less than 0.01% or was unmeasurable (2, 3, 54). In liver, if one assumes a molecular weight of 8,000 kDa for the fundamental, mature, glycogen particle, then the molar ratio of glycogenin to glycogen would be 1:12 at a protein content of 0.04% by weight for ethanol precipitable glycogen. That is, only 1 glycogenin protein for each 12 glycogen molecules. The

子の分岐、あるいは非分岐マルトデキストリンが新たなグリコーゲン分子合成の基質になるという別の可能性がある。

E. 肝臓における α -glucosidases

α -1,4 と α -1,6-グルコシド結合の両方を加水分解し、グリコーゲンを完全にグルコースやマルトースに加水分解しうるリソソーム酸性 α -glucosidase が存在する。それが存在しないと、正常な構造のグリコーゲンがリソソームに蓄積し、死に至るか、障害を生じる (2 型糖原病、あるいはポンペ病) (51)。このように、グリコーゲンの自家融解はグリコーゲン分解において重要であると考えられている。グリコーゲン分子がリソソームによって選択され、取り込まれる機構はわかっておらず、その可能な制御も不明である。また、リソソームに取り込まれるグリコーゲンが glycogenin の誘導体であるかどうか不明であり、*in vivo* において顆粒体から放出される実際の生産物もわかっていない。

グリコーゲンからグルコースを遊離する、中性 pH 域で活性のある別の α -glucosidase が報告されており、 α -glucosidase C と呼ばれている。この酵素は精製されており、その遺伝子のクローン化と塩基配列決定が行われ、また 15 番染色体に存在することがわかっている (52, 53)。しかし、グリコーゲン代謝における機能は、もしあるとしても分かっていない。この点に関しては、 ^{14}C -UDP-グルコースを基質として用いたラベル実験で骨格筋抽出液から高分子プロテオグリコーゲンが同定されない原因として、ある研究者たちは α -glucosidase の存在をあげている (54)。

リソソームに存在する酸性 α -amylase の他に中性 pH 域で活性のある細胞質 α -amylase が存在するかどうかは不明であり、肝臓では同定されていない。

F. プロテオグリコーゲンとグリコーゲンの代謝

動物の骨格筋においては、グリコーゲン標品は重量にして 3% までのタンパク質を必ず含んでいる (8, 55)。最少量は一般に ~0.3-0.4% である (54)。後者の値に基づく、それぞれのグリコーゲン分子には少なくとも 1 個の glycogenin 分子が存在する計算になる。さらに、骨格筋グリコーゲンには遊離の還元末端は存在しないと報告されている (54)。このことより、骨格筋においてはすべてのグリコーゲン分子が glycogenin と結合していると考えられる。すなわち、タンパクの大きさに比べて糖部分が極端に大きい、それらグリコーゲンはすべてプロテオグリカンである。

しかし、分解を最小限にするような条件で、高度に精製された肝臓グリコーゲン標品においては、タンパク質含量は 0.04% から 0.01% 以下、あるいは検出限界以下であった (2, 3, 54)。肝臓において、基本的な成熟グリコーゲン粒子の分子量を 8,000 kDa と仮定すると、glycogenin とグリコーゲンのモル比は 1:12 になる。これは、0.04% タンパク質を含むエタノール沈殿性グリコーゲンの場合である。つまり、12 個のグリコーゲン分子に対して glycogenin タンパク質はわずかに 1 個である。一般

ratio is likely to be greater if even smaller amounts of protein are present as has generally been reported. This is less than the proposed presence of one glycogenin for each alpha particle (63).

Many years ago the presence of reducing groups in rabbit liver glycogen samples with molecular weights of 0.1 to 34 million (6) was reported. The glycogen samples were subjected to anaerobic strong alkali treatment. The latter results in production of isosaccharinic acid at the reducing end of the molecule. Skeletal muscle or other tissues were not studied. In these studies care was not taken to rapidly remove and process the liver samples and all samples were subjected to acid or alkali extraction. Thus, they likely had been modified.

Overall, the best evidence obtained many years ago is that the majority of glycogen molecules in liver in contrast to skeletal muscle (and probably other tissues), do not have a glycogenin protein attached. Whether the majority have a free reducing end present has been less certain.

We have obtained preliminary data which indicate that indeed free reducing ends are present (Table I), and that glycogen molecules with free reducing ends may represent the majority of molecules present.

If a large number of free reducing groups are present and

に報告されているようにタンパク質の量がさらに低いとすれば、この比はもっと大きくなるだろう。この比は、それぞれのアルファ粒子当たり1分子の glycogenin が存在するという提案から与えられる比よりも小さいのである。

ずっと以前に、分子量10万から3,400万のウサギ肝臓グリコーゲンに還元性末端が存在することが報告された(6)。そのグリコーゲンサンプルは酸素非存在下で強アルカリ処理された。その処理は、分子の還元性末端でのイソサッカリン酸の生成をもたらすのである。骨格筋、あるいは他の臓器では研究されていない。これらの研究では肝臓サンプルをすばやく取り出して処理するのに注意が払われておらず、すべてのサンプルは酸あるいはアルカリで抽出されている。したがって、サンプルは修飾されていた可能性がある。

全体として、肝臓のグリコーゲン分子の大部分は、骨格筋の（そしておそらくは他の臓器の）グリコーゲンと違って glycogenin タンパクを持たないと言うことを示す良い証拠が多年にわたって得られている。大部分が遊離の還元末端を持っているかどうかは不明確であった。

私たちは実際に遊離の還元末端が存在し（表 I）、その還元末端を持つグリコーゲン分子が大部分を占めることを示す予備的なデータを得ている。

もし、多数の遊離還元末端が存在し、かつ glycogenin がす

Table I. Stoichiometry of Incorporation of Tritium into Glycogen. Glycogen pellets (200,00 × g) were prepared from fed rat livers using the least manipulation possible, and compared with a commercial rabbit liver glycogen preparation. They were incubated for 2 hours with an excess of $^3\text{H NaBH}_4$. Replicate experiments were performed on different days. The number of moles of aldehyde reduced in a population of glycogen molecules was calculated based on a molecular weight of glycogen of 8000 kDaltons, and the appropriate cpm/pmole of $^3\text{H NaBH}_4$.

	cpm	pmoles ^3H incorporated	% molecules reduced
Commercial Rabbit Liver Glycogen	2136	15.38	246%
	2820	9.92	158%
	2260	7.96	128%
Rat Liver Glycogen Pellet Prep #1	3550	12.5	94%
	2558	28.2	134%
	2408	17.4	130%
Rat Liver Glycogen Pellet Prep #2	3194	23.0	128%
	6632	47.8	266%
	5340	38.4	213%

These preliminary data indicate that free reducing groups are present in glycogen. Since greater than 100% incorporation of tritium was observed in several samples, it indicates that the average molecular weight of the glycogen particles present must be less than 8000 kDa. This is to be expected since the molecular weight of glycogen is known to be polydisperse. Protein was undetectable in the pellet preparations.

if glycogenin is assumed to initiate the formation of all new glycogen molecules, then a mechanism for cleaving glycogenin from the glycogen molecules must be present. This could be an enzymic process and could be important in regulating the rate of formation of new individual glycogen molecules. That is, it could regulate the number of glycogen molecules present in different physiological states. Alternatively, malto-oligosaccharides may be produced and function as primers for new glycogen synthesis. These are possibilities that we currently are pursuing.

G. Is Proteoglycogen a Unique Species?

Using bovine retinal membrane preparations Lacoste *et al.* (56) have provided evidence that a small proteoglycogen containing glycogenin is found primarily in the microsomal fraction on ultracentrifugation and is attached to a membranous structure. This proteoglycan is TCA precipitable. Incubation with a micromolar concentration of UDP-glucose resulted in labeling of the proteoglycogen. Incubation with a higher concentration of UDP-¹⁴C glucose resulted in release from the membrane structure and the product now became soluble in TCA and precipitable by ethanol. This suggested expansion of the glycan to a large polysaccharide structure. A pulse-chase experiment indicated the conversion of the proteoglycan, in which the glycogen moiety was small, to one in which it was considerably larger. The expansion of the glycogen structure was attributed to the activity of glycogen synthase and branching enzyme, although the actual structure of the product was not determined. Addition of a detergent (SDS) also resulted in dissociation from the membranes. In this regard it has been reported that the glycogen in liver of fasted rats is difficult to solubilize and that the glycogen in a 12,000 × g pellet was only completely extracted when chloroform was added (57). Thus, these data suggest that a fraction of nascent glycogen may be membrane bound.

Interestingly, in the retinal membrane preparations (56), addition of rabbit liver glycogen in excess during the incubation with 10 mM UDP-glucose did not result in a competitive inhibition of the expansion of the proteoglycogen species. This suggests the presence of a mechanism for addition of glucosyl units to a proteoglycogen which is independent from that of "free" glycogen. Whether glycogen synthase and branching enzyme are responsible for expansion of both forms remains to be determined. We also have provided data suggesting that the two processes are regulated independently *in vivo* (58).

In liver extracts from 24 hour fasted rats, essentially all glycogenin was present in a free form, *i.e.* it was not incorporated into a glycogen molecule (58). Glucose could be transferred from UDP-glucose to the glycogenin. Following oral glucose administration to fasted rats, the glycogen concentration increased for one hour before glycogenin was incorporated

すべての新しいグリコーゲン分子の合成を開始するのであるとすると、グリコーゲンから glycogenin を切断する機構が存在するはずである。この機構は酵素によるプロセスであることが考えられ、また新しい別のグリコーゲン分子の合成速度を制御するのに重要であるかもしれない。つまり、異なる生理的状態においてグリコーゲン分子の数を制御するかもしれない。これとは別に、マルトオリゴ糖が生産されて新たなグリコーゲン合成のプライマーとして働くことも考えられる。これらが、現在私たちの追求している可能性である。

G. プロテオグリコーゲンが唯一の分子種か？

牛網膜標品を用いて Lacoste ら (56) は、glycogenin を含む低分子プロテオグリコーゲンが超遠心による顆粒体画分に主に見いだされ、それが膜構造に結合していることを示す証拠を得ている。このプロテオグリコーゲンはTCAで沈殿する。μモル濃度のUDP-グルコースとともにインキュベートすると、そのプロテオグリコーゲンはラベルされた。より高濃度の¹⁴C-UDP-グルコースとインキュベートすると、膜構造から遊離し、その生産物はTCAに溶解しエタノールで沈殿するようになった。このことはグリカンが高分子多糖構造体に伸長したことを示唆する。パルス-チェース実験によって、このプロテオグリカンの小さかったグリコーゲン部分が顕著に大きくなったことが示された。そのグリコーゲン構造の伸長は glycogen synthase 活性と branching enzyme 活性によるとされたが、実際の生産物構造は決定されていない。界面活性剤 (SDS) の添加によっても、膜からの解離が起こった。一方、絶食させたラットの肝臓グリコーゲンは溶解させることが難しく、12,000 × g で沈殿させたグリコーゲンはクロロホルムを添加したときのみ完全に抽出されることが報告されている。したがって、これらのデータは新生グリコーゲン画分が膜に結合しているかもしれないことを示唆している。

興味深いことに、網膜標品 (56) において、10mM UDP-グルコースとのインキュベーション中に過剰量のウサギ肝臓グリコーゲンを添加しても、プロテオグリコーゲンの伸長の拮抗阻害は起こらない。このことはプロテオグリコーゲンへのグルコシル残基の付加機構が存在し、それは“遊離”グリコーゲンへの付加機構とは別であることを示唆している。Glycogen synthase と branching enzyme が両形態の伸長を担っているのかどうかは分かっていない。私たちはこれらの2つの過程が *in vivo* で独立に制御されていることを示唆するデータも報告している (58)。

24時間絶食させたラットの肝臓抽出液中においては、実質上すべての glycogenin が遊離状態で存在する。すなわち、グリコーゲン分子に取り込まれていない (58)。グルコースはUDP-グルコースから glycogenin に転移されうる。絶食ラットへのグルコース経口投与の後、グリコーゲン濃度は1時間で上昇した

into a large proteoglycan product. Thus, there appears to be a "free" glycogen synthetic pathway, and a proteoglycogen synthetic pathway which are regulated independently in liver as well as in retinal membrane preparation.

In the TCA precipitable fractions of the retinal membranes, the glycogen to which glycogenin was attached had an average M_r of 470 kDa as determined on a sizing column. The TCA soluble fraction had an M_r of ~ 700 kDa, *i.e.*, both were considerably smaller than a mature glycogen molecule (35). Lomako and associates (59) subsequently reported that in skeletal muscle preparations the TCA precipitable form of glycogen also had an M_r of approximately 400 kDa, *i.e.*, considerably smaller than the M_r of the TCA soluble glycogen (~ 8000–10,000 kDa). They have referred to the former as "proglycogen". They also have commented that species smaller than 400 kDa are uncommonly reported. This suggested to the authors that a glycogenin initiated nascent glycogen molecule is rapidly expanded to this 400 kDa species. Using primary cultures of astrocytes from 1–2 day old rats they also provided evidence for an independent regulation of the TCA insoluble and soluble fractions and for the TCA precipitable species being a precursor of the TCA soluble species (60). Thus, in retina, skeletal muscle, astrocytes and liver (58) there is evidence for different forms of glycogen being present and for independent regulation of each. In skeletal muscle, glycosylation of the 400 kDa species and those with a M_r between 42 and 400 kDa occurred with a micromolar concentration of ^{14}C -UDP-glucose (59) a concentration considerably below the K_m for UDP-glucose of glycogen synthase. Whelan and associates (60, 62) suggest a specific proglycogen synthase in addition to classical glycogen synthase is present and this accounts for the activity observed or that glycogen synthase having different phosphorylation states has affinities that are different for "proglycogen" and glycogen. To our knowledge, conversion of proteoglycogen species to a mature (8,000 kDa) species has not been reported *in vitro*.

In liver little is known about the distribution of glycogen between TCA precipitable and soluble fractions, the size of the proteoglycogen in these fractions or how they may vary with feeding or fasting or with glucose administration, etc.

H. Summary

In summary, evidence is developing that indicates the presence of two or more forms of proteoglycogen. In liver a protein-free species appears to be present as well. The interrelationships among these species, their regulation, and their role in fuel metabolism remains to be determined.

Current data also indicate that the initiation of glycogen molecules is a much more complex process than originally believed. It now is clear that a self-glycosylating protein containing a glucose molecule attached by its reducing end to a tyrosyl

が、これは glycogenin が高分子プロテオグリカンに取り込まれる前であった。したがって、肝臓や網膜標品中には"遊離"グリコーゲンの合成経路が存在し、プロテオグリコーゲン合成経路は別に制御されているらしい。

網膜膜のTCA沈殿画分における glycogenin 結合型グリコーゲンの平均分子量はカラムで決定したところ 470 kDa であった。TCA 可溶画分の分子量は ~ 700 kDa であり、双方とも成熟グリコーゲン分子よりも明らかに小さかった (35)。Lomako と共同研究者たち (59) が、後に報告しているところでは、骨格筋標品中の TCA 沈殿型グリコーゲンの分子量も約 400 kDa であり、TCA 可溶型グリコーゲン (~ 8000–10,000 kDa) よりも明らかに小さかった。彼らは前者を"プログリコーゲン"と呼んでいる。彼らはまた、400 kDa よりも小さい分子種はほとんど報告されていないと述べている。このことから彼らは、glycogenin が合成開始した新生グリコーゲンは速やかにこの 400 kDa 産物に伸長されることを示唆している。さらに、1–2 日齢のラットの一次培養神経膠星状細胞を用いて、TCA 不溶画分と可溶画分の制御が独立に行われていることと、TCA 沈殿分子が TCA 可溶分子の前駆体であることを示す証拠も報告している (60)。このように、網膜、筋肉、神経細胞、および肝臓 (58) において、グリコーゲンの異なる形態が存在し、それぞれ別個に制御されていることを示す証拠が得られている。骨格筋において、400 kDa 産物のグリコシル化と 42 から 400 kDa の産物のグリコシル化は μ モル濃度の ^{14}C -UDP-グルコースによって行われ、この濃度は glycogen synthase の UDP-グルコースに対する K_m よりもかなり低い。Whelan ら (60, 62) は 2 つの可能性を示している。つまり、特異的な proglycogen synthase が古典的 glycogen synthase とは別に存在し、観察された活性の原因である可能性、あるいは glycogen synthase の異なるリン酸化状態が存在し、それぞれの親和性が"プログリコーゲン"とグリコーゲンに対して異なるという可能性である。私たちの知る限りでは、プロテオグリコーゲンの成熟 (8,000 kDa) 産物への *in vitro* での変換は報告されていない。

肝臓においては TCA 沈殿画分と可溶画分間のグリコーゲンの分布や、これらの画分のプロテオグリコーゲンの大きさ、それらが給餌や絶食やグルコース投与によってどう変化するか、などについてはほとんど分かっていない。

H. まとめ

まとめると、二つあるいはそれ以上の種類のプロテオグリコーゲン形態が存在することを示す証拠が蓄積されつつある。肝臓においてはタンパクを結合しない分子種も存在する。これらの分子種の相互関係、制御、エネルギー代謝における役割については不明である。

現在のデータが示すところでは、グリコーゲン分子の合成開始反応は信じられていたよりもずっと複雑である。自己グリコシル化タンパク質、そのチロシン残基にグルコース分子が還元末端で結合しているのであるが、このタンパクがグリコーゲ

Fig. 1. Potential pathways for glycogen synthesis. (a) Glycogenin attaches several glucosyl units to itself. After reaching a length of 8–12 units, glycogen synthase adds additional glucosyl units and in association with branching enzyme produces a highly branched structure. At some time after a branched structure has been formed, an enzyme catalyzes a hydrolytic cleavage from glycogenin. The products are a branched polysaccharide and glycogenin. The latter now can be used to initiate synthesis of a new polysaccharide. (b) Before branching occurs, while the nascent glycogen molecule is merely a linear chain, an enzyme catalyzes a hydrolytic cleavage from glycogenin. The products are glycogenin and an oligosaccharide. The oligosaccharide then may be a substrate for glycogen synthase and branching enzyme. (c) In this scenario, a glycogen molecule, either independent of, or still attached to the glycogenin protein, is hydrolyzed into smaller branched or linear structures by amylase and/or another endo-amyloglucosidase. These structures then become substrates for glycogen synthase and branching enzyme which expand them into a mature glycogen molecule.

residue in the protein may initiate the synthesis of a glycogen molecule and that the protein may become permanently attached to it. This enzyme which glycosylates itself has been best studied in skeletal muscle. However, even in this organ regulation of the amount of enzyme or of its catalytic activity is poorly understood. Its role in the overall regulation of the amount of glycogen that may be stored in different physiological or pathological states also remains uncertain.

In liver the initiation of glycogen molecules is likely to be even more complex. A similar enzyme is present but whether it is identical to skeletal muscle glycogenin is not known but it is likely to be the case (40, 62-64). In addition, in liver the majority of glycogen molecules apparently do not have attached to them a glycogenin molecule. How these glycogenin-free glycogen molecules are generated is completely unknown. Whether they are derived from the hydrolysis of the bond between glycogenin and glycogen (Fig. 1a) or hydrolysis of a glycogenin (Fig. 1b) synthesized malto-oligosaccharide attached to glycogenin or are generated by fragmentation of glycogen itself by amylase or another enzyme producing either linear or branched products (Fig. 1c) also is completely unknown. It also is possible that the glycogenin-bound and glycogenin-free glycogen molecules are synthesized independently and are regulated independently and have a different cellular location. In any regard, how glycogenin-free glycogen molecules are generated is likely to play an important role in determining the number of glycogen molecules in a liver cell in different physiological and pathophysiological states. It also is likely to regulate the total amount of glycogen that can be stored, *i.e.* the cellular capacity to store glycogen.

ン分子の合成を開始することと、そしてそのまま結合していることは今や明らかである。この自己グリコシル化酵素は骨格筋において最もよく研究されている。しかし、この組織においてさえ酵素量や酵素活性の制御についてはほとんど理解されていない。異なる生理的状態や病的状態のときに貯蔵されるグリコーゲン量の全体的な制御における役割も分かっていない。

肝臓においてはグリコーゲン分子の合成開始はさらに複雑であるらしい。よく似た酵素が存在するが、それが骨格筋 glycogenin と同一であるかどうかは分からない。しかしその可能性は高そうだ (40, 62-64)。さらに、肝臓ではグリコーゲン分子の大部分が明らかに glycogenin を結合していない。これらの glycogenin 非結合型グリコーゲン分子がどのようにして生じるのか全く不明である。それらが glycogenin-グリコーゲン間結合の加水分解 (図 1a) やマルトオリゴ糖を結合する glycogenin の加水分解 (図 1b) によって生じるのか、あるいはグリコーゲン自体がアミラーゼや他の酵素によって直鎖の糖や分岐糖に分解されて (図 1c) それから生じるのかも全く明らかにされていない。Glycogenin 結合型および非結合型のグリコーゲン分子が別個に合成されたり、別個に制御されていたり、別の場所に存在しているという可能性も考えられる。いずれにしても、glycogenin 非結合型グリコーゲン分子がどのように合成されるかは、異なる生理的状態や病的状態における肝臓細胞中のグリコーゲン分子数を決定する上で重要な要素になるであろう。貯蔵されるグリコーゲンの総量、つまり細胞のグリコーゲン貯蔵容量も制御しているかもしれない。

Acknowledgements

Supported by Merit Review Research Funds from the Department of Veterans Affairs, and grant #DK43018 from the National Institutes of Health. The authors would like to thank Claudia Durand for her expert secretarial assistance.

江崎グリコ株式会社・生物化学研究所

高田 洋樹 訳

Reference

1. Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, W.J. (1990) FEBS Lett. **268**, 8-12
2. Calder, P.C. (1991) Int. J. Biochem. **23**, 1335-1352
3. Mordoh, J., Krisman, C.R., and LeLoir, L.F. (1966) Arch. Biochem. Biophys. **113**, 265-272
4. Fletterick, R.J., and Madsen, N.B. (1980) Ann. Rev. Biochem. **49**, 31-61
5. Stetten, D., Jr., and Stetten, M.R. (1960) Physiol. Rev. **40**, 505-537
6. Stetten, M.R., and Katzen, H.M. (1961) J. Am. Chem. Soc. **83**, 2912-2918
7. Lazarow, A. (1942) Anat. Rec. **84**, 31-50
8. Orrell, S.A., and Bueding, E. (1964) J. Biol. Chem. **239**, 4021-4026
9. Willstätter, R., and Rohdewald, M. (1934) Z. Physiol. Chem. **225**, 103-124
10. Fishman, W.H., and Sie, H.-G. (1958) J. Am. Chem. Soc. **80**, 121-123
11. Nuttall, F.Q., Gannon, M.C., Bai, G., and Lee, E.Y.C. (1994) Arch. Biochem. Biophys. **311**, 443-449
12. Tan, A.W.H., and Nuttall, F.Q. (1985) J. Biol. Chem. **260**, 4751-4757
13. Bai, G., Zhang, Z., Werner, R., Nuttall, F.Q., Tan, A.W.H., and Lee, E.Y.C. (1990) J. Biol. Chem. **265**, 7843-7848
14. Kaslow, H. R., Lesikar, D.D., Antwi, D., and Tan, A.W.H. (1985) J. Biol. Chem. **260**, 9953-9956
15. Nuttall, F.Q., Gilboe, D.P., Gannon, M.C., Niewoehner, C.B., and Tan, A.W.H. (1988) Am. J. Med. **85**, 77-85
16. Nuttall, F.Q., and Gannon, M.C. (1993) J. Biol. Chem. **268**, 13286-13290
17. Nuttall, F.Q., Gannon, M.C., Kubic, V.L., and Hoyt, K.J. (1994) Genomics **19**, 404-405

18. Goldemberg, S.H. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* **56**, 357–359
19. Lerner, J. (1976) *Mol. Cell. Biochem.* **12**, 131–136
20. LeLoir, L.F. (1964) in *Control of Glycogen Metabolism* (Whelan, W. J., and Cameron, M. P., eds.) pp. 68–86, J. and A. Churchill Ltd., London
21. Roe, J.H., Bailey, J.M., Gray, R.R., and Robinson, J.N. (1961) *J. Biol. Chem.* **236**, 1244–1246
22. Fischer, C. J., and Stetten, M. R. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* **121**, 102–109
23. Cohen, P. (1978) *Curr.Top. Cell Regul.* **14**, 117–195
24. Berthillier, G., Azzar, G.J.C., and Got, R. (1975) *Eur. J. Biochem.* **51**, 275–282
25. Krisman, C.R. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 1206–1212
26. Bartley, W., and Dean, B. (1968) *Anal. Biochem.* **25**, 99–108
27. Curtino, J.A., Maccioni, H.J., and Caputto, R. (1979) *J. Neurochem.* **33**, 139–147
28. Barengo, R., Flaviá, M., and Krisman, C.R. (1975) *FEBS Lett.* **53**, 274–278
29. Barengo, R., and Krisman, C.R. (1976) *Acta Physiol. Lat. Am.* **26**, 289–296
30. Takahara, H., and Matsuda, K. (1977) *J. Biochem. (Tokyo)* **81**, 1587–1594
31. Lavintman, N., Tandecarz, J., Carceller, M., Mendiara, S., and Cardini, C. E. (1974) *Eur. J. Biochem.* **50**, 145–155
32. Quentmeier, H., Ingold, E., and Seitz, H. V. (1987) *Planta* **171**, 483–488
33. Tandecarz, J.S., Lavintman, N., and Cardini, C.E. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **399**, 345–355
34. Aon, M.A., and Curtino, J.A. (1984) *Eur. J. Biochem.* **140**, 557–566
35. Miozzo, M.C., LaCoste, E.R., and Curtino, J.A. (1989) *Biochem. J.* **260**, 287–289
36. Fredrick, J.F. (1971) *Physiol. Plantarum* **25**, 32–34
37. Moreno, S., and Tandecarz, J.S. (1982) *FEBS Lett.* **139**, 313–316
38. Rodriguez, I.R., and Whelan, W.J. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**, 829–836
39. Smythe, C., Caudwell, F. B., Ferguson, M., and Cohen, P. (1988) *EMBO J.* **7**, 2681–2686
40. Viskupic, E., Cao, Y., Zhang, W., Cheng, C., DePaoli-Roach, A. A., and Roach, P. J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 25759–25763
41. Lomako, J., Lomako, W. M., and Whelan, W.J. (1990) *Biochem. Int.* **21**, 251–260
42. Kennedy, L.D., Kirkman, B. R., Lomako, J., Rodriguez, I. R., and Whelan, W.J. (1985) in *Membranes and Muscle* (Berman, M.C., Gevers, W., and Opie, L.H., eds.) pp. 65–84, Oxford Press, Oxford
43. Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, W.J. (1990) *FEBS Lett.* **264**, 13–16
44. Manzella, S. M., Rodén, L., and Meezan, E. (1995) *Glycobiology* **5**, 263–271
45. Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, W. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15315–15319
46. Beloff-Chain, A., Catanzaro, R., Chain, A.B., Masi, I., Pocchiari, F., and Rossi, C. (1955) *Royal Soc. London Proc.* **143**, 481–503
47. Sie, H.-G., and Fishman, W.H. (1958) *Nature* **182**, 240–242
48. Giri, K.V., Nagabhushanam, A., Nigam, V. N., and Bolavadi, B. (1955) *Science* **121**, 898–899
49. Petrova, A.N. (1959) *Biokhimiya* **24**, 228–233
50. Peat, S., Whelan, W.J., and Rees, W. (1956) *J. Chem. Soc.* **44**, 44–53
51. Hirschhorn, R. (1995) in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., and Valle, D., eds.) pp. 2443–2464, McGraw Hill, New York
52. Martiniuk, F., Hirschhorn, R., and Smith, M. (1980) *Cytogenet. Cell Genet.* **27**, 168
53. Martiniuk, F., and Hirschhorn, R. (1981) *Biochem. Biophys. Acta* **658**, 248
54. Rodriguez, I.R., and Fliesler, S.J. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **206**, 628–637
55. Stetten, M.R., Katzen, H.M., and Stetten, D. (1956) *J. Biol. Chem.* **222**, 587–599
56. Lacoste, E.R., Miozzo, M.C., and Curtino, J.A. (1990) *Biochem. J.* **267**, 775–779
57. Lutkic, A., Reipen, W., and Staib, W. (1980) *Period. Biolog.* **82**, 239–250
58. Ercan, N., Gannon, M.C., and Nuttall, F.Q. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 22328–22333
59. Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, W.J. (1991) *FEBS J.* **279**, 223–228
60. Lomako, J., Lomako, W.M., Whelan, W.J., Dombro, R.S., Neary, J.T., and Norenberg, M.D. (1993) *FASEB J.* **7**, 1386–1393
61. Smythe, C., Watt, P., and Cohen, P. (1990) *Eur. J. Biochem.* **189**, 199–204
62. Alonso, M.D., Lomako, J., Lomako, W.M., and Whelan, W.J. (1995) *FASEB J.* **9**, 1126–1137
63. Smythe, C., Villar-Palasa, C., and Cohen, P. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**, 205–209
64. Barbetti, F., Rocchi, M., Bossolasco, M., Cordera, R., Sbraccia, P., Finelli, P., and Consalez, G.G. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 72–77

Received on February 9, 1996, accepted on April 15, 1996