薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
107(8) 531-547 (1987)

動物細胞におけるホスファチジルセリンの生合成及び機能に関する 遺伝生化学的研究

西島正弘

国立予防衛生研究所化学部, 〒141 品川区上大崎 2-10-35

Genetic and Biochemical Studies on Biosynthesis and Physiological Roles of Phosphatidylserine in Mammalian Cells

MASAHIRO NISHIJIMA

Department of Chemistry, National Institute of Health, 2-10-35
Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan

The base-exchange enzymes which catalyze exchange of free serine, choline, and ethanolamine with polar head groups of phospholipids are known to occur in eukaryotic cells. To understand the physiological roles of the base-exchange reactions, a rapid autoradiographic *in situ* enzyme assay has been developed for detecting the base-exchange activities in Chinese hamster ovary (CHO) cell colonies immobilized on filter paper or polyester cloth and obtained several mutants strikingly defective in the choline-exchange activity. CHO cell mutants that required exogenously added phosphatidylserine for cell growth were also isolated by using the replica technique with polyester cloth. Biochemical characterization of these mutants has revealed the following results. 1) There are at least two kinds of serine-exchange enzyme in CHO-K1 cells; one of the enzymes (serine-exchange enzyme I) can catalyze the base-exchange reaction of phospholipids with serine, choline and ethanolamine, and the other enzyme (serine-exchange enzyme II) does not use choline as a substrate. 2) Phosphatidylserine in CHO cells is biosynthesized through the following sequential reactions: phosphatidylcholine→phosphatidylserine→phosphatidylethanolamine→phosphatidylserine. The three reactions are catalyzed by serine-exchange I, phosphatidylserine decarboxylase, and serine-exchange enzyme II, respectively. 3) Serine-exchange enzyme I is essential for the growth of CHO cells. In addition, we have found that exogenous phosphatidylserine can be efficiently incorporated into CHO cells and utilized for membrane biogenesis, endogenous phosphatidylserine biosynthesis thereby being suppressed.

Keywords—membrane phospholipid; phosphatidylserine; Chinese hamster ovary cell; somatic cell genetics

1. はじめに

生体膜が細胞の機能発現において種々の重要な機能を担っていることは今日よく知られているところである。この生体膜はリン脂質二重層を基本骨格とし、主として蛋白質と脂質から構成されている。リン脂質分子は、その親水性部分及び疎水性部分にいろいろな種類の残基を含む極めて多様な両親媒性物質である。このような複雑・多岐な成分からなる膜リン脂質のそれぞれの分子種の生合成機構や膜機能発現における役割を解明することは現在なお困難な研究課題である。これらの問題点を解決するための手段として、リン脂質代謝に異常を有する変異株を用いた遺伝生化学的研究は1つの有力な研究手段である。著者らは、この6—7年、動物細胞膜リン脂質の生合成機構とその生理的意義の解明をめざし、Chinese hamster ovary (CHO) 由来の細胞株 CHO-K1 からリン脂質代謝異常変異株の分離を試みてきた。その結果、ホスファチジルセリン (PS) の生合成が異常となった数種の変異株の分離に成功し、得られた変異株の解析から動物細胞における PS の生合成機構に関していくつかの

本総説は、昭和 61 年度日本薬学会奨励賞の受賞業績を中心に記述したものである。

新しい知見を得ることができた。更に、変異株を用いることにより、ある種の被膜 ribonucleic acid (RNA) ウイルスの感染において PS の生合成が重要な働きをしていることも明らかにすることができた。

2. CHO 細胞リン脂質・塩基交換反応損傷変異株の分離とその性状解析

2-1. 研究の背景 動物細胞には、Fig. 1 に示すように、既存のリン脂質塩基部分とセリン、コリンあるいはエタノールアミン間でその塩基を交換する、いわゆるリン脂質・塩基交換反応が存在し、それぞれの反応により、PS、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) が生成する。これらの反応はおよそ 25 年前にすでに発見され、この間、酵素学的研究は数多く行われてきた。^{1,2)} しかし、これら反応の生理的役割については、セリン交換反応が動物細胞における PS の生合成に関与するらしいと推定されていたのみで、コリ

Fig. 1. Base-Exchange Reactions

Fig. 2. Properties of the Serine-Exchange Reaction in Extracts of CHO-K1 Cells

Cell extracts were prepared from CHO-K1 cells grown at 37°C and assayed. Effects of the following factors on the incorporation of L- $[^{14}\text{C}]$ serine into phospholipids (expressed as nanomoles) are shown. A, various concentrations of CaCl_2 and 1 mM EGTA; B, various pH values of HEPES (50 mM) (●) and glycine (50 mM) (○) buffers; C, incubation time; D, protein concentration.

ンとエタノールアミンの交換反応の役割を含め、明確なことは何も理解されていなかった。そこで、著者らは、CHO-K1 細胞株より、リン脂質・塩基交換反応欠損株の分離を行い、以下に述べるように、その分離に成功した。そして、その変異株の解析から、CHO 細胞におけるリン脂質・塩基交換反応の役割を明らかにすることができた。

2-2. CHO 細胞におけるリン脂質・塩基交換反応の性状³⁾ 変異株のスクリーニングに先立って、CHO 細胞ホモジネートにおける塩基交換反応の性状を調べた。Fig. 2 に示すように、セリン交換反応は活性発現に Ca^{2+} イオンを要求し、反応の至適 pH は約 7.5 で、反応はおよそ 20 分まで直線的に進行した。コリン及びエタノールアミン交換反応も同様の性質を示した。セリン、コリン及びエタノールアミンに対する K_m は、それぞれ 0.027 mM, 0.18 mM, 0.048 mM であり、3 種の塩基を基質とする交換反応はいずれも 10 万 g 遠心の沈澱画分に回収された。以上の性状は、ラット脳などにおける塩基交換活性と極めて類似していた。¹⁾

2-3. 変異株のスクリーニング リン脂質代謝が異常となった大腸菌変異株を分離する方法として、Raetz は、大腸菌コロニーをセルロース沓紙上にレプリカして固定化し、その沓紙上のコロニーを用いて *in situ* にリン脂質代謝酵素活性を測定するコロニーオートラジオグラフ法を考察した。⁴⁾ この方法を用いることにより、それまで適当なスクリーニング方法がなかったために分離することが非常に困難であったリン脂質代謝異常変異株が多数分離されるに至った。^{5,6)} その後、Esko らは、このコロニーオートラジオグラフ法を動物培養細胞に応用し、CHO 細胞が沓紙上にコロニーを形成すること、及び沓紙上に付着した細胞を用いてこのコロニーをレプリカすることができることを見出した。⁷⁾ 更に、ある種のポリエステル布はセルロース沓紙以上にコロニーのレプリカに適することも報告された。⁸⁾ 本研究ではこのレプリカ法を応用して変異株のスクリーニングを行った。

2-3-1. CHO 細胞のレプリカ方法——セルロース沓紙あるいはポリエステル布を用いたレプリカ方法の詳細については既に他誌^{9,10)} に記載したのでここではその概略を述べることにする (Fig. 3)。1) 直径 100 mm のシャーレ 1 枚につき、約 200 個のコロニーが生じるように細胞を植え込む。2) 数日後に、円形の沓紙あるいはポリエステル布を載せる。ポリエステル布を使用する場合、3 枚のポリエステル布を重ねて載せると、同時に 3 枚のレプリカが得られる (Fig. 4 D—F)。3) 2) の操作直後に、直径 3—4 mm のガラスビーズに密着させる。4) 1 週間おきに培地を交換して培養を続けると、シャーレ上、沓紙、ポリエステル布上に直径数 mm のコロニーが形成され

Fig. 3. Replica Method by Filter Paper on Polyester Cloth

Fig. 4. Replica Plating by Polyester Cloth

A, Coomassie blue stained master plate. B, Polyester cloth also stained with Coomassie blue. C, Stained replica polyester cloth. D—F, Coomassie blue stained polyester cloths simultaneously prepared (D, bottom; E, middle; F, upper).

る。5) 傾斜法によりガラスビーズと培地を取り除く。6) ピンセットを用い、沱紙又はポリエステル布を取り除き、新しいシャーレに移す。ポリエステル布を使用する場合には、更にその上に新しいポリエステル布を載せ、ポリエステル布からポリエステル布へのレプリカを行う。もとのシャーレ上の細胞は、10% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) を含む培地を加え、 -70°C で保存する。7) 3) と 4) の操作を繰り返す。8) マスタープレート、沱紙あるいはポリエステル布、レプリカプレートあるいはレプリカポリエステル布上に同じコロニーパターンが得られる (Fig. 4)。

CHO 細胞のコロニーをセルロース沱紙あるいはポリエステル布上に形成させることが可能になったため、つぎのような方法で変異株をスクリーニングすることができるようになった。

(1) 簡単な操作で非常に精度の高いレプリカを作ることができるため、栄養要求株、薬剤感受性株、温度感受性株などのスクリーニングが容易に行える (レプリカ法)。

(2) 凍結融解により、沱紙あるいはポリエステル布上のコロニー細胞を破壊し、*in situ* に酵素反応を行い、その酵素活性の低下した変異株をスクリーニングすることができる (*in situ* 酵素活性測定法)。

(3) 沱紙あるいはポリエステル布上のコロニー細胞を用い、細胞を生かした状態で *in situ* に、deoxyribonucleic acid (DNA), RNA, タンパク質及び脂質などの生合成の放射性前駆物質を取込ませ、オートラジオグラムを作製し、その放射性物質の取込みの低下した変異株をスクリーニングすることができる。標識したリガンドを用い、受容体の欠損変異株などをスクリーニングすることも可能である (*in vivo* コロニーオートラジオグラフ法)。

実際、(1) の方法によりイノシトール要求株,⁷⁾ PS 要求株,¹¹⁾ ultraviolet (UV) 感受性株,^{12,13)} (2) の方法により α -マンノシダーゼ欠損株,¹⁴⁾ アルカリ性ホスファターゼ欠損株,¹⁵⁾ PE シンターゼ欠損株,¹⁶⁾ リン脂質・塩基交換酵素欠損株,^{8,17)} アシルヒドロキシアセトンリン酸シンターゼ欠損株,¹⁸⁾ (3) の方法により PC 合成欠損株,¹⁹⁾ フ

コース転移欠損株,^{20,21)} アラキドニル-CoA シンターゼ欠損株,²²⁾ プロテオグリカン合成欠損株,²³⁾ アセチルコリン受容体欠損株,²⁴⁾ プロリン輸送欠損株,²⁵⁾ グルコース輸送欠損株,²⁶⁾ リソゾーム酵素輸送欠損株²⁷⁾などが分離された。ここでは、筆者らが CHO-K1 細胞から分離したリン脂質・塩基交換酵素欠損株と PS 要求株の分離方法を述べる。これら変異株の性質については後述する。

2-3-2. *In Situ* 酵素活性測定法によるリン脂質・塩基交換酵素欠損変異株の分離^{3,17)}—EMS 処理をした CHO-K1 細胞を、直径 100 mm のシャーレ 1 枚につき 200—300 個のコロニーが形成されるように植込む。2-3-1 で述べた方法に従い、33°C で濾紙又はポリエステル布にコロニーを形成させたのち、酵素の合成又は活性が温度感受性となった変異株も分離するため、これらの濾紙又はポリエステル布を 40°C で更に 1 晩培養する。

コロニーを付着した濾紙又はポリエステル布を 2 ml の phosphate buffered saline (PBS) が入ったシャーレに浸し 3 回凍結融解を繰り返す。この操作により細胞膜が破壊され、酵素と基質が接触可能となり酵素反応が進行する。凍結融解処理をした濾紙又はポリエステル布を 2 ml の酵素反応液が入ったシャーレに浸し、40°C の水浴槽中にシャーレを浮かべて 20 分間保温する。反応液は、50 mM HEPES (pH 7.5), 5 mM CaCl₂, 及び 0.21 mM ¹⁴C-セリン, 0.16 mM ¹⁴C-コリン又は ¹⁴C-エタノールアミンを含むものである。反応後、濾紙又はポリエステル布を 2 ml の 10% tricarboxylic acid (TCA) がはいったシャーレに移して反応を停止させる。この TCA 処理により、リン脂質に取込まれた放射性塩基物質は沈澱する（ここで用いた反応条件で、TCA 不溶性の放射性物質の 95% 以上はリン脂質であった）。次に、濾紙又はポリエステル布をブフナー漏斗にのせて、減圧しながら十分量の 5% TCA で洗浄して未反応の放射性基質を除去したのち、オートラジオグラフを作成し、続いてコロニーをクマジーブルーで染色し、放射性基質の取込みの弱いコロニーを検索した。

以上の方法で約 1 万個のコロニーをスクリーニングし、セリン交換反応欠損株として 1 株 (89.1 株),³⁾ コリン交換反応欠損株として 2 株 (38 株と 64 株)¹⁷⁾ を分離することができた (Fig. 5)。

2-3-3. レプリカ法による PS 要求株の分離¹¹⁾—EMS 処理した CHO-K1 細胞を直径 100 mm のシャーレ 1 枚につき約 4000 個まき、30 μ M の PS リポソームを添加した培地中、37°C で培養する。3 日後、2 枚のポリ

Fig. 5. Identification of a CHO Cell Colony Defective in the Choline-Exchange Reaction¹⁷⁾

(A) Coomassie blue-stained polyester disc. (B) Autoradiogram of the polyester disc. The arrows mark the position of the mutant colony.

Fig. 6. Identification of a PS Auxotroph (Mutant PSA-3)¹¹⁾

Colonies derived from mutagen-treated cells were replicated on discs of polyester cloth in growth medium with (A) or without (B) 30 μ M phosphatidylserine. The arrows mark the position of the mutant colony.

エステル布, 1枚のセルロース濾紙, ガラスビーズをこの順番に上層する. 更に7日間培養後, 上層のポリエステル布はクマシーブルーで染色する. 下層のポリエステル布は, PBS中で軽くゆすいだ後, PSを含まない培地が入ったシャーレに移し, その上に新しいポリエステル布, 濾紙, ガラスビーズを上層する. 37°Cで4日間培養後, 今度はポリエステル布をアシッドレッド26で染色する. このようにしてPS存在下と非存在下で作製したポリエステル布上のコロニーを比較し, PS存在下にはコロニーを形成するが, PS非存在下にはコロニーを形成しないクローンを検索した. 約10000個のコロニーをスクリーニングした結果, 22個の候補株が検出され, これらのPS要求性を再度ポリエステル布レプリカ法で調べ, 最終的に3つのPS要求株(PSA1—3)を得ることができた(Fig. 6).

2-4. CHO細胞におけるリン脂質・塩基交換酵素の役割 CHO-K1細胞から分離した数種のリン脂質・塩基交換酵素欠損変異株の解析からCHO細胞には少なくとも2種類のセリン交換酵素の存在することが明らかにされた. そして, その1つはセリン, コリン及びエタノールアミン交換反応をいずれも触媒することができ, 他の1つはセリンとエタノールアミン交換反応を触媒すると考えられた. 更に, これらのセリン交換酵素は, CHO細胞のPS合成に必須であることも明らかにされた.

2-4-1. CHO細胞には2種類のセリン交換酵素が存在する——筆者らは, リン脂質・塩基交換酵素欠損株を, セリン交換酵素欠損株として1株(89.1株),⁸⁾ コリン交換酵素欠損株として2株(38株と64株),¹⁷⁾ PS要求株として3株(PSA-1株, PSA-2株, PSA-3株)¹¹⁾をそれぞれ分離することに成功した.

Table IにCHO-K1, 89.1株, 64株, PSA-3株におけるリン脂質・塩基交換酵素活性を示す. このTableから明らかなように, 3つの異なった方法でスクリーニングして得られた変異株では, ともにコリン交換活性が著しく減少し, 同時にセリンとエタノールアミン交換活性も部分的に減少していた. これらの結果から, CHO-K1細胞には, 少なくとも2種類のセリン交換酵素が存在し, その1つ(以下セリン交換酵素Iと呼ぶ)はセリン交換反応と同時にコリンとエタノールアミンの交換反応を触媒し, もう1つの酵素(以下セリン交換酵素IIと呼ぶ)はセリンとエタノールアミン交換反応を触媒するという可能性が示唆された(Fig. 7). そして, 89.1株, 64

TABLE I. Enzymatic Activities of Base-Exchange Reactions in Extracts Prepared from Mutant 89.1, Mutant 64, PSA-3, and CHO-K1

Strain	Specific activity [nmol/h·mg protein]		
	Substrate		
	Serine	Choline	Ethanolamine
CHO-K1 ⁽³⁾	1.4	0.52	4.4
89.1 ⁽³⁾	0.75	0.05	4.0
CHO-K1 ⁽¹⁷⁾	1.7	0.72	2.3
64 ⁽¹⁷⁾	0.62	0.05	0.79
CHO-K1 ⁽¹¹⁾	3.0	1.0	4.9
PSA-3 ⁽¹¹⁾	1.0	<0.1	2.2

Fig. 7. Two Kinds of Base-Exchange Enzymes in CHO-K1 Cells

Fig. 8. Inhibition of the Choline-Exchange Activity by Serine (A) and Ethanolamine (B)⁽¹¹⁾

The choline-exchange activity in cell extracts prepared from CHO-K1 cells was assayed in the presence of various amounts of serine (A) and ethanolamine (B). Each assay mixture contained 0.2 mM [methyl-¹⁴C]choline (20 μ Ci/ μ mol) as substrate.

株, PSA-3 株はともにセリン交換酵素 I に損傷を有するものと考えられた。

CHO-K1 細胞に 2 種類のセリン交換酵素が存在するという考えはつぎの阻害実験からも支持された。すなわち, CHO-K1 細胞のコリン交換活性はセリンあるいはエタノールアミンにより顕著に阻害され, ある濃度以上ではほぼ完全に阻害された (Fig. 8)。また, CHO-K1 細胞のセリン交換活性はコリンにより阻害を受けるが, この場合には過剰のコリンを添加しても阻害の程度はおおよそ 50% であった (Fig. 9 A)。一方, PSA-3 株のセリン交換活性はコリンによってほとんど阻害を受けず, したがって過剰のコリン存在下では親株と PSA-3 株の比活性はほぼ等しくなった (Fig. 9 A)。また, このセリン交換活性は親株の CHO-K1 細胞及び変異株の PSA-3 株においてともに過剰のエタノールアミン添加によりほぼ完全に阻害された (Fig. 9 B)。これらの結果は, Fig. 7 に示した可能性を支持するものである。

最近, Suzuki と Kanfer⁽²⁸⁾ は, ラット脳からセリンとエタノールアミンの交換反応をともに触媒する酵素をほぼ純粋に精製した。この酵素は, Fig. 7 のセリン酵素 II に相当するものと推定される。従来, セリン, コリン, エタノールアミン交換反応を触媒する酵素はそれぞれ別の酵素タンパク質であろうと考えられてきたが, これらの活性を触媒する酵素とその基質特異性は Fig. 7 のように整理できそうである。この可能性を更に確実にするために, 今後, セリン交換酵素 I の精製とセリン交換酵素 II の欠損変異株の分離を行う必要がある。

2-4-2. PS 生合成におけるセリン交換酵素の役割——89.1 株は, 10% 新生仔ウシ血清を含む培地中で, 33°C, 37°C, 40°C いずれの温度でも親株と同様の速度で増殖した。⁽⁸⁾ しかし, 64 株は上記の培地中 33°C では親株と

同様の速度で増殖するが (Fig. 10 A), 40°C では親株に比べ明らかに増殖速度が低下していた (Fig. 10 B). 更に, 64 株はリポタンパク質画分を除去した新生仔ウシ血清を含む培地中では増殖に関し温度感受性を示し, 40°C では数回分裂した後, 増殖が停止することが分かった (Fig. 10 C).

64 株の性状解析からセリン交換酵素 I は PS の生合成に関与することが明らかにされた. まず, この変異株のリン脂質組成の分析から (Table II), 33°C では親株と 64 株とでリン脂質組成に差がないが, 40°C で培養した場

Fig. 9. Inhibition of the Serine-Exchange Activity by Choline (A) and Ethanolamine (B)¹¹⁾

The serine-exchange activity in cell extracts prepared from CHO-K1 (●) and mutant PSA-3 (○) was assayed in the presence of various amounts of choline (A) and ethanolamine (B). Each assay mixture contained 0.05 mM L-[U-¹⁴C]serine (20 μ Ci/ μ mol) as substrate. Although the values of specific activities in the absence of inhibitors varied somewhat from experiment to experiment (compare A and B), the ratios of those of CHO-K1 and mutant PSA-3 remained almost constant.

Fig. 10. Growth of Mutant 64 (○, □) and CHO-K1 (●, ■) Cells¹⁷⁾

A: Growth at 33°C in medium supplemented with 10% (v/v) newborn calf serum. B: Growth at 40°C in the same medium as in A in the absence (○, ●) or presence (□, ■) of 50 μ M PS liposomes. C: Growth in medium supplemented with 2% (v/v) lipoprotein-deficient newborn calf serum. Cells were incubated at 33°C (○, ●), and after 40 h, one set of cultures was shifted to 40°C (□, ■).

TABLE II. Phospholipid Compositions of Mutant 64, Temperature-Resistant Revertant and CHO-K1 Cells¹⁷⁾

Strain	Growth temp. (°C)	% of total phospholipid					
		PS	PC	PE	PI	SM	Other
CHO-K1	33	6.4	47.9	21.9	7.1	9.8	6.8
	40	5.8	55.7	17.0	7.7	9.2	4.7
64	33	6.0	50.6	20.0	7.6	9.0	6.7
	40	2.7	62.7	11.4	9.4	8.1	5.6
R-32	40	5.8	53.3	18.4	8.6	8.7	5.4
R-33	40	6.0	51.7	18.9	9.2	9.2	5.1

Fig. 11. Incorporation of ^{32}P i into PS and PC by Mutant 64, Temperature-Resistant Revertant and CHO-K1 Cells *in Vivo*¹⁷⁾

A, PS; B, PC. Strains: (●), CHO-K1; (○), mutant 64; (■), R-32; (□), R-33. a: 33°C; b, c: 40°C.

TABLE III. Enzymatic Activities of Base-Exchange Reactions in Extracts Prepared from Mutant 38, Mutant 64, Temperature-Resistant Revertants from Mutant 64 and CHO-K1¹⁷⁾

Strain	Growth temp. (°C)	Specific activity		
		Substrate		
		Choline	Serine	Ethanol-amine
(nmol/h/mg protein)				
CHO-K1	33	0.79	1.70	2.60
	40	0.72	1.74	2.34
64	33	0.10	0.72	1.08
	40	0.05	0.62	0.79
R-32	33	0.70	1.78	2.36
	40	0.67	1.97	2.54
R-33	33	0.60	1.57	1.92
	40	0.64	2.36	3.25

合には 64 株における PS 含量が親株の約 1/2 に減少していることが分かった。また、40°C では 64 株の PE 含量も親株の 70% くらいに減少していた。 ^{32}P i を用いて各リン脂質の合成速度を測定すると、33°C では PS, PE, PC, PI への ^{32}P の取込み速度は両株で差がなかったが、40°C では ^{32}P i の PS への取込み速度が 64 株で著しく低下していた (Fig. 11)。40°C では、 ^{32}P i の PE への取込み速度も PS の場合ほどではないが低下していた。これは PE が PS の脱炭酸反応により生成するという知見と一致する。PC の合成速度は 33°C でも 40°C でも両株間でほとんど差がなかった (Fig. 11)。

前述したように、10% 新生仔ウシ血清を含む培地中で 40°C における 64 株の増殖速度は親株に比べ遅い。しかし、この培地に PS リポソームを添加すると 64 株の増殖速度は親株のレベルにまで回復した (Fig. 10C)。この結果から PS 生合成の低下が 64 株の増殖能低下の直接の原因であることが示唆された。

64 株におけるコリン、セリン、エタノールアミン交換活性の低下及び PS の生合成異常が 1 つの変異によるものかどうかを調べる目的で、64 株より、リポタンパク質画分を含まない培地中、40°C で増殖可能な自然復帰変異株を分離した。その結果、Table II, III と Fig. 11 に示すように、64 株の温度耐性復帰変異株である R-32 株と R-33 株におけるリン脂質組成、コリン、セリン、エタノールアミン交換活性及び 40°C における PS 生合成速度はすべて親株のレベルにまで回復していることが判明し、64 株における種々の異常な性状は単点変異 (single mutation) により引き起こされたことが分かった。

以上述べたように、セリン交換酵素 I が PS の生合成に関与し、かつ細胞増殖にとって必須の酵素であることがコリン交換反応欠損変異株 (64 株) を分離することにより明らかにされた。この点を更に確認するために、PS の生合成に損傷を有する変異株を PS の要求株として分離した (2-3-3)。

PS 要求株の 1 つである PSA-3 株は 30 μM の PS を培地中では正常に増殖するが、PS 非存在下に培養すると数回細胞分裂を繰り返した後、増殖を停止した (Fig. 12)。PSA-3 株のリン脂質組成は、細胞を PS 存在下に培養すると親株と同じであったが、PS 非存在下で 2 日間培養すると PS と PE の割合がそれぞれ親株の 1/3 と 1/2 に減少していた (Table IV)。

次に、 ^{32}P i, ^{14}C -セリンあるいは ^{14}C -エタノールアミンを用いて PSA-3 株における PS と PE の生合成について検討したところ、 ^{32}P i 及び ^{14}C -セリンの PS と PE への取り込み速度が親株に比べ大きく減少していた (Fig. 13, 14)。一方、PSA-3 株における ^{14}C -エタノールアミンからの ^{14}C -PE の生成は親株に比べやや上昇していた。

Fig. 12. Effect of PS on Cell Growth of CHO-K1 (A) and Mutant PSA-3 (B)¹¹⁾

Cells were seeded at approximately 5×10^4 cells/60-mm diameter dish in growth medium supplemented with various amounts of phosphatidylserine (0–30 μ M) followed by incubation at 37°C. At the times indicated, cells were dispersed with trypsin and counted with a Coulter model ZB1 counter. ●, 0 μ M; ■, 5 μ M; ▲, 10 μ M; ○, 30 μ M.

TABLE IV. Phospholipid Compositions of Mutant PSA-3 and CHO-K1¹¹⁾

Phospholipid ^{a)}	Percentage of total phospholipids			
	With PS		Without PS	
	CHO-K1	PSA-3	CHO-K1	PSA-3
PS	8.6	8.0	6.9	2.4
PE	20.5	17.7	17.6	9.3
PC	48.6	51.0	51.7	65.4
PI	6.0	6.9	7.7	8.5
SM	12.3	11.6	12.1	9.8
Other ^{b)}	4.0	4.8	4.0	4.6

Cells were seeded at 5×10^5 /100-mm diameter dish in growth medium with 30 μ M phosphatidylserine at 37°C. After 2 d, the medium was replaced with fresh growth medium supplemented with or without 30 μ M phosphatidylserine. After an additional 48 h, the cells were washed with phosphate-buffered saline and harvested with a rubber policeman. The cellular phospholipids were extracted and analyzed by two-dimensional TLC. To quantitate the individual phospholipids, the phosphate in each spot on a chromatogram was determined chemically.

a) PS, PE, PC, PI, phosphatidylinositol; SM, sphingomyelin. b) Other lipids included lysophosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, and cardiolipin.

(Fig. 15). したがって、PSA-3 株は PE の生合成経路の 1 つである CDP-エタノールアミン経路には損傷がないものと考えられた。

PSA-3 株のリン脂質・塩基交換活性は、すでに述べた通り、64 株と同様、コリン交換活性が著しく低下し、同時にセリンとエタノールアミンの交換活性も親株の約 40% に減少していた。

このような PSA-3 株の生化学的解析から、この変異株は PS の生合成に損傷を有することが明らかにされ、更にその欠損部位がセリン交換酵素 I であることが分かった。このようにしてセリン交換酵素 I が PS の生合成

Fig. 13. Pulse Labeling of CHO-K1 (●) and Mutant PSA-3 (○) with ^{32}Pi ¹¹⁾

Cells were seeded in each of a series of 100-mm diameter dishes and grown to a density of $2-3 \times 10^6$ /dish in growth medium supplemented with 30 μ M phosphatidylserine at 37°C. Then, the medium was replaced with growth medium without exogenous phosphatidylserine. After 24 h, at time 0, the cells were metabolically labeled at 37°C by replacing the medium with fresh growth medium containing 2 μ Ci/ml ^{32}Pi . At the times indicated, one dish of each strain was removed, and cellular phospholipids were extracted and analyzed by two-dimensional TLC. The number of cells at zero time was determined and used to standardize the results. A, PS; B, PE; C, PC; D, PI.

Fig. 14. Incorporation of L-[U-¹⁴C]Serine into PS (A) and PE (B)⁽¹¹⁾

Cells were seeded in each of a series of 60-mm diameter dishes and grown to a density of $5-10 \times 10^5$ /dish in growth medium supplemented with $30 \mu\text{M}$ phosphatidylserine at 37°C . Then, the medium was replaced with growth medium without exogenous PS. After 24 h, at time zero, the cells were metabolically labeled at 37°C by replacing the medium with fresh growth medium containing $0.2 \mu\text{Ci/ml}$ L-[U-¹⁴C]serine ($2 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). At the times indicated, one dish of each strain was removed, and cellular phospholipids were extracted and analyzed by one-dimensional TLC. The number of cells at zero time was determined and used to standardize the results. ○, mutant PSA-3; ●, CHO-K1.

に参与することが再度確認された訳である。

2-4-3. PS の生合成前駆体リン脂質⁽²⁰⁾——PSA-

3 株を利用することにより, PS 生合成の前駆体リン脂質が何であるかもほぼ明らかにすることができた. ³²Pi で標識した PC あるいは PE を細胞内に取込ませ, それらが [³²P]PS に変換されるかどうかを親株と PSA-3 株の間で比較すると, Fig. 16, 17 に示すように, 親株では [³²P]PC と [³²P]PE の両者から [³²P]PS が生成した. 一方, PSA-3 株では, [³²P]PE は [³²P]PS に変換されるが [³²P]PC からは [³²P]PS の生成が見られなかった (Fig. 16, 17). これらの結果から, CHO 細胞の PS 生合成経路には, PC から合成される経路と PE から合成される経路の 2 経路が存在し, PSA-3 株は前者の経路に損傷を有することが明らかとなった. そして, PSA-3 株は, 先に述べたように, セリン交換酵素 I に損傷をもつが, セリン交換酵素 II は正常であることから, PC から

PS の生合成はセリン交換酵素 I により触媒され, PE からの PS の生合成はセリン交換酵素 II により触媒されるものと推定された.

PSA-3 株が, セリン交換酵素 II は正常であるにもかかわらず, ほとんど PS を生合成できないのは, PSA-3 株ではセリン交換酵素 II の基質となる PE 量が低下し, そのために *in vivo* ではセリン交換酵素 II による PS の生合成も低下するためと考えられた. このことは, PSA-3 株の PE 含量が親株の約 1/2 に減少していること, 更に培地に PE を添加すると PSA-3 株は正常に増殖し, その時 PS の生合成も正常になる事実から支持された. また, PSA-3 株は, 遊離のエタノールアミンを PE に取込む反応と PS の脱炭酸反応は正常であることから, PSA-3 株における PE 含量の低下は, セリン交換酵素 I により生成する PS 量が低下し, その結果 PS の脱炭酸反応による PE の生成も低下するためと考えられた.

以上述べたように, セリン交換酵素 I と II は, *in vivo* ではそれぞれ PC と PE を基質とすることが分かった. 更に, CHO 細胞では, まずセリン交換酵素 I の触媒作用で PC から PS が生成し, この PS は直ちに脱炭酸されて PE に変換され, つぎにこの PE がセリン交換酵素 II の基質となって PS が生成するものと推定された

Fig. 15. Incorporation of [2-¹⁴C]Ethanolamine into PE⁽¹¹⁾

The experimental conditions were the same as those in the legend to Fig. 4, except that the cells were labeled by changing the medium to fresh growth medium containing $0.2 \mu\text{Ci/ml}$ [2-¹⁴C]ethanolamine ($2 \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). The number of cells at zero time was determined and used to standardize the results. ○, mutant PSA-3; ●, CHO-K1.

Fig. 16. Labeling of Mutant PSA-3 and CHO-K1 Cells with [³²P]PC⁽²⁹⁾

Approximately 2×10^5 cells were seeded in a series of 100-mm diameter dishes containing medium supplemented with 10% newborn calf serum and $10 \mu\text{M}$ PS, followed by incubation for 2 d at 37°C . At the time indicated as 0, the cells were labeled by changing the medium to 10 ml of fresh medium containing 10% newborn calf serum, $10 \mu\text{M}$ PS, and 1×10^6 cpm/ml of [³²P]PC. At the times indicated, one dish of each strain was removed, and the cells were washed with phosphate-buffered saline and harvested by scraping with a rubber policeman. The cellular phospholipids were extracted by the method of Bligh and Dyer and separated by two-dimensional TLC. The radioactivities of the individual phospholipids were quantitated by liquid scintillation spectrometry using a toluene scintillator system. Unlabeled cultures were used to determine the number of cells/dish. The results are expressed as cpm/ 10^6 cells. A, PS; B, PE; C, PC. ●, CHO-K1; ○, mutant PSA-3.

(Fig. 18).

3. CHO 細胞における PS 生合成の調節機構⁽³⁰⁾

先に述べた PS 要求株を分離・解析する過程で、培地中に PS を添加すると、その PS は CHO 細胞に効率よく取り込まれ、かつ、*de novo* の PS 生合成を著しく阻害するという興味深い事実を明らかにすることができた。本節ではこの点について述べることにする。

CHO 細胞を $75 \mu\text{M}$ の PS 添加あるいは無添加で培養し、³²Pi の各リン脂質への取込みを調べると、PS 添加培地で培養した CHO 細胞では ³²Pi の PS への取込みが著しく減少することが分かった (Fig. 19). この ³²Pi の PS への取込み阻害は培地に添加した PS 濃度に依存していた (Fig. 20). ³²Pi の PE への取込みも PS 添加により減少するが、これは PS の脱炭酸反応により生成する PE が減少したためと考えられる。しかし、PC, SM, PI などへの ³²Pi の取込みは PS 添加により大きな影響は受けなかった。なお、少なくとも $100 \mu\text{M}$ の PS を培地に添加しても CHO 細胞の増殖はほぼ正常であった。

Fig. 17. Labeling of Mutant PSA-3 and CHO-K1 Cells with [³²P]PE⁽²⁹⁾

The experimental conditions were the same as described in the legend to Fig. 1, except that the cells were labeled by changing the medium to 10 ml of fresh medium containing 10% newborn calf serum, $10 \mu\text{M}$ PS, and 3.6×10^5 cpm/ml of [³²P]PE. The results are expressed as cpm/ 10^6 cells. A, PS; B, PE. ●, CHO-K1; ○, mutant PSA-3.

Fig. 18. Possible Pathway for PS and PE Biosyntheses in CHO Cells⁽²⁹⁾

The abbreviations used are: DG, diacylglycerol; S, serine; C, choline; E, ethanolamine; CDP-E, CDP-ethanolamine.

Fig. 19. Autoradiography of ^{32}P -labeled phospholipids from CHO-K1 cells grown in the presence and absence of phosphatidylserine liposomes³⁰⁾

Approximately 5×10^5 cells were added to two 100-mm diameter tissue culture dishes containing 10 ml of growth medium supplemented with 10% (v/v) newborn calf serum and ^{32}P ($1 \mu\text{Ci/ml}$). One of the cultures received 0.15 ml of 5 mM phosphatidylserine liposomes (final $75 \mu\text{M}$) while the other did not, and both were incubated at 37°C . After 3 d, the cells were harvested with a rubber policeman and lipids were extracted by the method of Bligh and Dyer. The phospholipids were separated by two-dimensional TLC. Shown in the figure are autoradiograms of phospholipids obtained from cells grown (A) in the absence and (B) in the presence of PS. CL, cardiolipin; PA, phosphatidic acid.

Fig. 20. Effect of Exogenous PS Concentration on Phospholipid Biosynthesis in CHO-K1 Cells³⁰⁾

Approximately 2×10^5 cells were added to 100-mm diameter dishes containing 10 ml of growth medium supplemented with 10% (v/v) newborn calf serum followed by culturing at 37°C . After 1 d, the cultures received ^{32}P ($1 \mu\text{Ci/ml}$) and PS liposomes at various concentrations as shown in the figure. After incubation for an additional 3 d at 37°C , the cells were harvested and lipids were extracted. Individual phospholipids were quantitated. ●, PS; ■, PE; ○, PC; △, SM; □, PI.

TABLE V. Phospholipid Compositions Determined by Continuous Labeling with ^{32}P of CHO-K1 Cells Grown in the Presence of Various Phospholipids³⁰⁾

Phospholipid supplement (μM)	Percentage of total phospholipids					
	PS	PC	SM	PE	PI	Other
None	5.9	56.8	8.7	16.6	7.2	4.7
PS (60)	1.2	62.1	12.1	12.3	7.7	4.6
PC (50)	6.2	55.3	8.7	17.1	7.7	5.1
SM (40)	6.3	55.2	8.6	17.2	7.6	5.0
PE (50)	5.8	52.8	10.7	19.2	6.9	4.6
PI (40)	6.6	56.1	8.6	16.8	7.0	4.8

Approximately 5×10^5 cells were added to 100-mm diameter tissue culture dishes containing 15 ml of growth medium supplemented with 10% (v/v) newborn bovine serum, ^{32}P ($1 \mu\text{Ci/ml}$), and various phospholipids at the concentrations indicated in the table. After 3 d at 37°C , the cells were harvested and lipids were extracted. Individual phospholipids were quantitated by two-dimensional TLC. Other lipids included lysophosphatidylcholine, phosphatidylglycerol, phosphatidic acid, and cardiolipin.

Table V は、いろいろな種類のリン脂質を添加した培地中で、 ^{32}P 存在下、CHO 細胞を 3 日間培養し、そのリン脂質組成を放射活性から定量した結果である。PS 存在下では、PS 量は 5.9% から 1.2% に減少する。しかし、PC, SM, PE, PI などを培地に添加してもリン脂質組成には顕著な変化は見られなかった。したがって、培地に加えたリン脂質によ

TABLE VI. Phospholipid Compositions and Contents Determined Chemically of CHO-K1 Cells Grown in the Presence of Various Phospholipids³⁰⁾

Phospholipid supplement (μM)	Percentage of total phospholipids						Total
	PS	PC	SM	PE	PI	Other	
None	8.3 (17.0)	53.0 (109)	10.2 (20.9)	16.9 (34.6)	6.3 (12.9)	5.4 (11.1)	(205)
PS (60)	9.3 (20.5)	47.5 (105)	9.8 (21.6)	22.0 (48.4)	6.9 (15.8)	4.5 (9.9)	(220)
PC (50)	7.0 (13.2)	52.4 (99)	9.5 (18.0)	17.4 (32.9)	8.1 (15.3)	5.7 (10.8)	(189)
SM (40)	8.9 (18.7)	52.0 (109)	9.6 (20.2)	17.9 (37.6)	6.8 (14.3)	4.9 (10.3)	(210)
PE (50)	5.5 (14.5)	38.8 (102)	10.7 (28.1)	35.9 (94.1)	5.0 (13.2)	4.0 (10.5)	(263)
PI (50)	7.5 (17.6)	50.8 (119)	10.4 (24.3)	17.5 (41.0)	7.7 (18.0)	6.0 (14.0)	(234)

Cells were cultured and harvested as described in Table V. The cellular phospholipids were extracted and analyzed by two-dimensional TLC. To quantitate the individual phospholipids, the phosphate in each spot was determined chemically. The values in parentheses are expressed in nmol of phospholipid/mg of protein. Two independent experiments gave similar results, and one set of results is presented here.

る *de novo* の生合成阻害は、調べた限りでは PS に特異的な現象であろうと考えられた。

Table V と同一条件で CHO 細胞を培養し、そのリン脂質含量及びリン脂質組成を Pi の比色定量法で測定した結果が Table VI である。PS を添加すると上述したように *de novo* の PS 生合成は阻害されるにもかかわらず、細胞内の PS 組成及び PS 含量は PS 無添加の場合と差がなかった。このことは、培地中に加えた PS が正常な PS 量を保つだけ細胞内に取込まれることを示唆している。PS が CHO 細胞に効率よく取込まれることは、³H-PS を用いて直接的に確認することもできた (Fig. 21)。一方、PC, SM, PI を添加した場合も各リン脂質の組成及び含量は変化しないが、PE を添加した場合は PE 含量が通常の約 2 倍に増加し、同時に全リン脂質含量も増加していた (Table VI)。PE 添加の場合、PE が細胞内に蓄積するにもかかわらず *de novo* の PE 生合成は阻害されず、この点は PS 添加の場合と非常に異なっている。

PS 存在下で ³²Pi の PS への取込みが著しく抑制される原因として、*de novo* の PS 生合成の阻害と生合成された PS の速かな分解の 2 つの可能性が考えられたので、¹⁴C-セリンを用いてこれらの可能性を検討した。Fig. 22 は、細胞を ¹⁴C-セリンで標識し、その PS, PE, SM への取込み速度を調べた結果であるが、PS 存在下 (80 μM) では、PS 非存在下に

Fig. 21. Uptake of [³H]Serine-labeled PS by CHO-K1 Cells³⁰⁾

Approximately 4×10^5 cells were added to 60-mm diameter tissue culture dishes containing 5 ml of regular growth medium. After 2 d at 37°C, the medium was removed, and then half of the dishes received 2 ml of regular medium containing 50 μM [³H]serine-labeled distearoylphosphatidylserine/non-radioactive PS (from bovine brain) (1:1000, mol/mol; 4.9×10^4 cpm/nmol); the remaining dishes received 2 ml of regular medium. At the indicated times, cells incubated without the radioactive PS were harvested with trypsin and counted in a Coulter Counter, whereas the cells incubated with the radioactive PS were washed with 5 ml of cold phosphate-buffered saline three times and then harvested with a rubber policeman and extracted. The amounts of PS incorporated into cells (nmol/10⁶ cells) were calculated on the assumption that [³H]serine-labeled distearoylphosphatidylserine and nonradioactive PS (from bovine brain) are taken up at the same rate.

比べ、 ^{14}C -セリンの PS への取込み速度が約 1/5 に減少していた。PS 存在下では ^{14}C -セリンの PE への取込み速度も著しく減少するが、これは PE が PS の脱炭酸反応により生成するためである。一方、 ^{14}C -セリンの SM への取込み速度は、PS 存在下と非存在下で差がなく、したがって、 ^{14}C -セリンの細胞内輸送速度も両条件下で差がないと考えられる。

次に、PS の代謝回転速度を PS 存在下と非存在下で比較・検討した。Fig. 23 は、PS 非存在下で 90 分間 ^{14}C -

Fig. 22. Pulse Labeling of CHO-K1 Cells with L-[U- ^{14}C]Serine in the Presence and Absence of PS⁽⁸⁰⁾

CHO-K1 cells were grown for 4 d at 37°C in growth medium supplemented with 10% (v/v) newborn calf serum and 80 μM phosphatidylserine (closed circles) or the serum only (open circles). The respective cultured cells were harvested with trypsin and added at 1×10^6 cells to 60-mm diameter tissue culture dishes containing 5 ml of the same growth media as described above, respectively. After 1 d, the cultures received 2 μCi of L-[U- ^{14}C]serine followed by incubation at 37°C. At the indicated times the cells were harvested with a rubber policeman and extracted by the method of Bligh and Dyer. The phospholipids were quantitated by one-dimensional TLC. A, PS; B, PE; C, SM.

セリンで CHO 細胞を標識し、 ^{14}C -セリンを洗浄・除去した後、PS 存在下と非存在下で細胞の培養を続け、PS, PE, SM に残存する放射活性を測定した結果である。PS は半減期約 7 時間で速かに代謝回転するがその速度は PS 存在下と非存在下で差はなかった。一方、PS の脱炭酸反応により生成する PE は時間とともに増加するが、その増加速度も PS の添加により影響されなかった。また、SM の放射活性はチェイスの間ほぼ一定であった。

Fig. 22 と Fig. 23 の結果から、PS 存在下で ^{32}P i の PS への取込みが減少するのは、新しく生合成された PS の代謝回転が促進されるためではなく、PS の生合成自身が阻害されることが強く示唆された。

培地に加えた PS がどのようなメカニズムで *de novo* の PS 生合成を阻害するのかを明らかにする

Fig. 23. Turnover of PS Pulse Labeled with L-[U- ^{14}C]Serine in CHO-K1 Cells in the Presence and Absence of Exogenous PS⁽⁸⁰⁾

Approximately 2×10^5 cells were added to 60-mm diameter tissue culture dishes containing 5 ml of growth medium supplemented with 10% (v/v) newborn calf serum. After incubation for 2 d, the cells were washed with 5 ml of phosphate-buffered saline and then labeled for 90 min in 1 ml of Ham's F-12 lacking serine, supplemented with 10% (v/v) dialyzed newborn calf serum and L-[U- ^{14}C]serine (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$). After removing the radioactive medium (zero time), the cells were washed with phosphate-buffered saline and cultured in the regular medium (open symbols) or in the medium supplemented with 80 μM PS (closed symbols). At the indicated times, the cells were harvested with a rubber policeman, and phospholipids were extracted and analyzed by one-dimensional TLC. Δ , Δ , PS; $\circ$, $\circ$, PE; $\square$, $\square$, SM.

ため、PS の生合成に関与するリン脂質・セリン交換活性を、PS 存在下あるいは非存在下で約 10 世代培養した CHO 細胞のホモジネートを用いて比較したが、両者の間でセリン交換酵素の比活性に差は見られなかった (Table VII). 更に、セリン交換活性に対する PS の影響を調べたが酵素反応液中に PS を添加してもセリン交換活性は阻害されなかった (Table VII). PS 添加による *de novo* の PS 生合成の阻害機構は今後の課題である. なお、最近、我々は親株より PS 生合成能が上昇した変異株を分離し、この変異株では培地に PS を添加してもその *de novo* の PS 生合成が阻害されないことを明らかにした. この結果は、CHO 細胞における PS 生合成が PS によりフィードバック阻害調節を受けていることを示すものである. この変異株の解析を通して PS の生合成調節が一層明らかにされるものと期待している.

4. おわりに

以上、セルロース濾紙あるいはポリエステル布を用いた動物培養細胞のレプリカ法とその技術を用いて分離されたリン脂質・塩基交換反応損傷変異株の性状解析を中心に述べた. 本研究において動物細胞における PS の生合成機構について新しい知見を得ることができた. 得られた変異株は、PS の生合成機構のみではなく、PS の機能を解明するのでも有用であり、現在、この方向へ研究を進展させつつある. 実際、ある種の被膜 RNA ウイルスの感染に宿主の PS が重要な働きをしていることを PSA-3 株を用いて明らかにすることができた.

動物培養細胞を用いた遺伝生化学的研究は膜リン脂質研究の分野でも 1 つの有力な研究手段であることは言うまでもない. しかし、現在までに分離されたリン脂質代謝変異株は、リン脂質代謝に関与する遺伝子数に比べればまだほんのわずかである. 今後もスクリーニング方法を改良するなどして更にいろいろな種類の変異株分離にチャレンジしてゆきたい.

謝辞 本研究は国立予防衛生研究所化学部の久下 理博士及び赤松 穰博士との共同研究の成果である. 又、本研究の過程で、共立薬科大学の学生の川崎倫子、亀井雅美、本庄 馨、渡辺加代美、田中孝枝、柿島佳代子各氏の協力を得た. 記して感謝の意を表します. 有益な助言をいただきました国立予防衛生研究所化学部の方に深く感謝致します.

引用文献

- 1) 斎藤政樹, 蛋白質・核酸・酵素, **21**, 100 (1976).
- 2) J. N. Kanfer, *Can. J. Biochem.*, **58**, 1370 (1980).
- 3) M. Nishijima, O. Kuge, M. Maeda, A. Nakano, Y. Akamatsu, *J. Biol. Chem.*, **259**, 7101 (1984).
- 4) C. R. H. Raetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2274 (1975).
- 5) C. R. H. Raetz, *Microbiol. Rev.*, **42**, 614 (1978).
- 6) 西島正弘, 蛋白質・核酸・酵素, **28**, 45 (1983).
- 7) J. D. Esko, C. R. H. Raetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 1190 (1978).
- 8) C. R. H. Raetz, M. M. Wermuth, T. M. McIntyre, J. D. Esko, D. C. Wing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 3223 (1982).
- 9) 久下 理, 西島正弘, “蛋白質・核酸・酵素, 別冊 体細胞遺伝学実験法,” 1984, p. 205.
- 10) 西島正弘, 久下 理, “蛋白質・核酸・酵素, 別冊 体細胞遺伝学実験法,” 1984, p. 276.
- 11) O. Kuge, M. Nishijima, Y. Akamatsu, *J. Biol. Chem.*, **261**, 5790 (1986).
- 12) D. B. Busch, J. E. Cleaver, D. A. Glaser, *Somat. Cell Genet.*, **6**, 407 (1980).
- 13) M. Stefanini, A. Reuser, D. Bootsma, *Somat. Cell Genet.*, **8**, 635 (1982).

TABLE VII. Activities of Base-Exchange Reaction between Phospholipids and Serine⁸⁰⁾

Addition of PS to	Specific activity (nmol/h/mg protein)
A. Growth medium	
0	1.7
80 μ M	2.1
B. Reaction mixture	
0	1.7
0.25 mM	2.0
1.25 mM	2.0

A, extracts were obtained from cells grown in the presence and absence of 80 μ M PS for about 10 generations and assayed. B, extracts were obtained from cells grown in the absence of PS. Assays were performed in the presence of the indicated amounts of phosphatidylserine.

- 14) A. Robbins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 1911 (1979).
- 15) J. R. Gum, Jr., C. R. H. Raetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 3918 (1983).
- 16) M. A. Polokoff, D. C. Wing, C. R. H. Raetz, *J. Biol. Chem.*, **256**, 7687 (1981).
- 17) O. Kuge, M. Nishijima, Y. Akamatsu, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **82**, 1926 (1985).
- 18) R. A. Zoeller, C. R. H. Raetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 5170 (1986).
- 19) J. D. Esko, C. R. H. Raetz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 5192 (1980).
- 20) C. B. Hirschberg, R. M. Baker, M. Perez, L. A. Spencer, D. Watson, *Mol. Cell. Biol.*, **1**, 902 (1981).
- 21) C. B. Hirschberg, M. Perez, M. Snider, W. L. Hanneman, J. D. Esko, C. R. H. Raetz, *J. Cell. Physiol.*, **111**, 255 (1982).
- 22) E. L. Neufeld, T. E. Bross, P. W. Majerus, *J. Biol. Chem.*, **259**, 2461 (1983).
- 23) J. D. Esko, T. E. Stewart, W. H. Taylor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 3197 (1985).
- 24) R. Black, Z. W. Hall, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 124 (1985).
- 25) A. H. Dantzig, C. W. Slayman, E. A. Adelberg, *Samat. Cell Genet.*, **8**, 509 (1982).
- 26) 長谷川一英, 安楽泰宏, 笠原道弘, 赤松 穰, 西島正弘, 生化学, **58**, 804 (1986).
- 27) A. Robbins, S. S. Peng, J. L. Marshall, *J. Cell. Biol.*, **96**, 1064 (1983).
- 28) T. Suzuki, J. N. Kanfer, *J. Biol. Chem.*, **260**, 1394 (1985).
- 29) O. Kuge, M. Nishijima, Y. Akamatsu, *J. Biol. Chem.*, **261**, 5795 (1986).
- 30) M. Nishijima, O. Kuge, Y. Akamatsu, *J. Biol. Chem.*, **261**, 5784 (1986).