ポリアミンによる蛋白質・核酸合成調節

五十嵐一衛

千葉大学薬学部, 〒280 千葉市亥鼻 1-8-1

Regulation of Synthesis of Proteins and Nucleic Acids by Polyamines

KAZUEI IGARASHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Inohana Campus, Chiba University,
1-8-1, Inohana, Chiba 280, Japan

Since polyamines are essential components of cell proliferation, mechanism of polyamine stimulation of cell growth has been studied. It has been found that polyamines play several important roles in protein synthesis: (a) they stimulate the synthesis of specific proteins; (b) they decrease misincorporation of amino acid into polypeptides; and (c) they stimulate the assembly of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits from their constituents. Effect of polyamines on nucleic acid synthesis is briefly summarized.

Keywords—polyamine; protein synthesis; nucleic acid synthesis; cell proliferation; *Escherichia coli*; bovine lymphocytes

はじめに

ポリアミンは, “ポリ” という接頭語から高分子物質を頭に描かれる方もおられるが, プトレスシン (PUT) $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]$, スペルミジン (SPD) $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2]$, スペルミン $[\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2]$ からなる低分子生理活性アミンの総称である. 通常, 原核細胞は PUT と SPD を含み, 真核細胞は PSD と SP を含んでいる. ポリアミンは細胞内に mm のオーダーで大量に含まれているため, その歴史は核酸の歴史よりおよそ 200 年位古く, Antony van Leewenhoek (顕微鏡の発明家) が 1674 年にヒトの精液中にリン酸スペルミンを結晶として見出した時に始まる. しかし, ポリアミンはその後長い間人々に忘れられていたが, 1960 年代の後半になるとポリアミンが細胞増殖に強く係わっていることが次第に明らかになってきた. すなわち, 再生肝,¹⁾ 増殖刺激をうけたマウス耳下腺²⁾ とリンパ球,³⁾ 大腸菌⁴⁾ で, ポリアミンが細胞増殖に先立ち, あるいは並行して増加することが明らかとなった. また, ポリアミンの生合成酵素欠損株が大腸菌,^{5,6)} yeast,^{7,8)} チャイニーズハムスター卵巣細胞^{9,10)} で分離され, これらの細胞は培地中にポリアミンを添加しないと細胞増殖が全く起こらなくなるかあるいは遅くなることも判明した.

これらの結果をふまえ, 多くの研究室がポリアミンの細胞増殖促進メカニズムに関して研究している. 私達もここ数年間ポリアミンによる蛋白合成促進メカニズムについて研究している. それは, 1) 大腸菌のポリアミン生合成酵素欠損株は培地中へのポリアミンの添加により増殖が促進を受けるが, その際蛋白合成促進が ribonucleic acid (RNA)・deoxyribonucleic acid (DNA) 合成促進より早く起こること,¹¹⁾ 2) ポリアミンがリン脂質, RNA, DNA の中で RNA と最も強く相互作用する¹²⁾ という 2 つの理由からである. 私達の初期の仕事は拙稿¹³⁾ で紹介したので, 本稿ではポリアミンによる蛋白合成調節のそれ以後の発展と, 核酸合成に対するポリアミンの影響に関する最近の知見を紹介する.

尚, ポリアミン定量とポリアミン代謝拮抗剤ががんの診断と治療に応用できる可能性については総説を参照されたい.¹⁴⁻¹⁷⁾

ポリアミンによる蛋白合成調節

1. 無細胞系でのポリアミンによる蛋白合成促進 私達はポリアミン添加により, 蛋白合成の至適 Mg^{2+} 濃度が低下するだけでなく, Mg^{2+} の至適濃度で得られる蛋白合成能より更に高い合成能が得られることを, 大腸菌のポリフェニルアラニン合成で証明した.¹⁸⁾ 以後大腸菌の系では, MS2 RNA レプリカーゼ,¹⁹⁾ T7 RNA ポリメラーゼ,²⁰⁻²²⁾ RNA ポリメラーゼの $\beta\beta'$ 亜粒子²²⁾ の合成が, 小麦胚の系ではタバコモザイクウイルス RNA 依

存の蛋白合成²³⁾が、エールリッヒ腹水癌の系ではアデノウイルス RNA 依存の蛋白合成及びグロビン合成²⁴⁾が、網状赤血球の系ではグロビン合成^{25,26)}がポリアミンにより促進を受けることが次々と証明された。

しかし、yeast や卵巣細胞のポリアミン生合成酵素欠損株の細胞増殖がポリアミンに完全に依存するのに対し、無細胞蛋白合成系ではポリアミンにより非常に高分子の蛋白合成を除いて、せいぜい 2—4 倍その合成能が上昇するのみであった。私達は最近うさぎ網状赤血球の蛋白合成に必要なリボソーム、開始因子、ペプチド鎖伸長因子及びアミノアシル tRNA 合成酵素を部分精製し蛋白合成系を再構成した。²⁷⁾ Fig. 1 に示すようにグロビン合成がほぼ完全に加えたポリアミンに依存する蛋白合成系が得られた。この系 (purified system) のポリアミン量は従来用いられている系 (nuclease-treated lysate) のポリアミン量に比べると著しく減少していた (Table I). Lysate を Sephadex G-25 にとおすだけでも多くのポリアミンが除かれ、ポリアミンによる蛋白合成能の上昇が認められた (Sephadex G-25-treated lysate). この結果は、ポリアミンによる細胞増殖の促進にはポリアミンによる蛋白合成の促進が重要な役割を果たしているという私達の仮説を更に強く支持するものである。

2. ポリアミンによる蛋白合成ミスリーディングの低下 ポリアミンによる蛋白合成調節におけるもう 1 つの大きな役割はミスリーディングの低下である。この現象は 1979 年に 3 つの研究室からほぼ同時に発表された。²⁸⁻³⁰⁾ 筆者は小麦胚の無細胞系で mRNA として poly(U) を用い、ミスリーディングは Phe (genetic code, UUU と UUC) のかわりに Leu (GUX, UUA, UUG) がポリペプチド中にとりこまれる量で測定した。ポリフェニルアラニン合成は 1.5 mM SPD の添加により促進を受けたが、ミスリーディングは SPD の添加により明らかに低下した。²⁹⁾

このポリアミンによるミスリーディングの低下をさらに詳しく分析し以下のことを明らかにした。³¹⁾

Fig. 1. Effect of Spermidine on Globin Synthesis

○—○, 0.5 mM SPD; ●—●, no SPD.

TABLE I. Relationship between the Degree of Polyamine Stimulation and the Polyamine Content in the Reaction Mixture of Globin Synthesis

System	Polyamines in the reaction mixture (μM)			Globin synthesis		
				Ion (mM)		$[^{14}\text{C}]$ Leu-incorporated (cpm)
	PUT	SPD	SP	Mg ²⁺	SPD	
Nuclease-treated lysate	4.3	202	19.3	1.5	0	12 414
				1.0	0.3	13 748
				1.0	0.5	10 752
Sephadex G-25-treated lysate	0.84	3.64	2.18	2.0	0	3 215
				1.5	0.3	13 139
				1.5	0.5	12 215
Purified system	0.10	0.64	0.14	3.5	0	1 978
				2.0	0.3	14 973
				2.0	0.5	15 811

まずどのレベルでミスリーディングが低下するかを調べたところ、aminoacylation レベルではなく、aminoacyl-tRNA のリボゾームへの結合レベルでポリアミンはミスリーディングを低下させた。Fig. 2 に示すように、Poly(U) 依存の Phe-tRNA のリボゾームへの結合は 1.5 mM SPD により促進をうけるが、Lue-tRNA のリボゾームへの結合は SPD により阻害された。次に genetic code の 5' 側、まん中、3' 側のどの部位のミスリーディングがポリアミンにより強く抑えられるかを、tRNA を精製し検討した (Table II)。大腸菌において報告されているように、小麦胚でも例外 (Leu-1) を除くと、ミスリーディングの起こり易さは 3' > 5' > まん中の順であり、5' 側の U のミスリーディングの起こり易さは C > A > G の順であった。Leu-1 の場合はコドンとアンチコドンの 3 つの塩基がすべて水素結合により塩基対を作ることが出来るため、ミスリーディングが多く起こると解釈された。ポリアミンはこれらの

ミスリーディングをすべて抑えたが、ミスリーディングの起こりにくいものを更に起こりにくくする傾向が認められた。すなわち、tRNA^{Leu-1} によるミスリーディングの頻度は 25.7 mmol/mol Phe であり、SPD によりミスリーディングが 1/2.47 に減少した。一方、tRNA^{Ile} によるミスリーディングの頻度は 1.79 mmol/mol Phe であり、SPD によりミスリーディングが 1/4.1 に減少した。

このミスリーディングの低下が natural mRNA 依存の蛋白合成においても起こるかどうかは興味ある問題であった。幸いにもマスのプロタミンは 7 種類のアミノ酸 (Arg, Pro, Ser, Val, Gly, Ala, Ile) しか含まない。筆者はプロタミン mRNA 依存蛋白合成系において Arg (genetic code, AG₆^A) のかわりにとりこまれる Lys (AA₆^A) の量を測定し、Lys/Arg の比をとることによりミスリーディングを測定した。Fig. 3 に示すように、蛋白合成後蔗糖密度勾配遠心により分離されたリボゾーム上の Lys/Arg の比は SPD により明らかに低下していた。³²⁾

In vivo でもポリアミンによりミスリーディングが低下することが Algranati らによって報告されている。³³⁾ 彼らは MS2 RNA 依存のコート蛋白合成において、ミスリーディング蛋白 (正常のコート蛋白と等電点の異なる蛋白) の合成がポリアミンにより低下することを大腸菌のポリアミン生合成酵素欠損株を用いて明らかにした。

Fig. 2. Effect of Spermidine on Poly(U)-directed Binding of Phe-tRNA and Leu-tRNA to Wheat Germ Ribosomes

○—○, 1.5 mM SPD; ●—●, no SPD.

TABLE II. Misincorporation of Individual Amino Acid in Poly(U)-directed Polypeptide Synthesis

Amino acid	Codon (5'→3')	Expected anticodon (5'→3')	Misincorporated amino acid/phenylalanine (mmol/mol)	Increase of	
				Fidelity by 1 mM spermidine (-fold)	Misincorporation by 3 μM paromomycin
Phe	UUU	GAA ^{a)}			
Leu	CUU	IAG	25.7	2.47	2.16
Ile	AUU	IAU	1.79	4.10	5.19
Val	GUU	IAC	0.62	4.04	4.95
Ser	UCU	IGA	0.48	2.70	1.80
Tyr	UAU	G ^ψ A	±		
Leu	UUA(G)	UAA	17.7	3.12	3.03
Leu	CUA(G)	UAG ^{a)}	4.96	3.88	9.86

a) Represents a modified base, bold type indicates the base which can or may make the base pair with U; ±, no significant misincorporation.

Fig. 3. Sucrose Gradient Analysis of Protamine mRNA Directed Arginine Incorporation and Lysine Misincorporation into Polypeptides

A, 4.5 mM Mg^{2+} ; B, 3 mM Mg^{2+} plus 1 mM SPD.

3. ポリアミンによる大腸菌 30 S リボゾーム亜粒子の生合成促進

ポリアミンが大腸菌の蛋白合成を上昇させるもう 1 つのメカニズムに 30 S リボゾーム亜粒子の生合成促進がある。この現象は 1975 年に大腸菌のポリアミン生合成酵素欠損株 (ポリアミン要求株) を用いて Echandi と Algranati により報告された。^{34,35)} 筆者はポリアミンがどのような機構で 30 S 亜粒子の生合成を促進するかに興味を覚え、Nomura らの開発した 30 S 亜粒子再構成法³⁶⁾を用いて解析した。ポリアミン要求株をブトレスシン添加及び無添加培地で培養し、リボゾーム亜粒子を調製した。既報のようにブトレスシン無添加培地培養の 30 S 亜粒子の活性の方が低かったので、30 S 亜粒子を 16 S rRNA と 21 種類の蛋白質にわけ、いろいろな組みあわせで再構成を行った。その結果としてポリアミン欠乏による 30 S 亜粒子活性の低下の原因は RNA ではなく蛋白質であることが判明した。更に split protein (S1, S2, S3, S5, S9, S10, S14) と 23 S core 粒子 (14 種類の split protein 以外の蛋白質と 16 S rRNA) による再構成を行い、split protein と core protein のどちらに原因があるかを検討したところ、split protein によることが判明した。³⁷⁾ 次に、split protein のどの蛋白質が少なくなっているかを、 $[^{14}C]$ ロイシンでラベルした split protein を電気泳動で分離して測定した。Table III に示すように S1 と S9 蛋白質が他の蛋白質に比べ少なくなっていることが判明した。³⁸⁾ すなわち、ポリアミンが欠乏するとこれらの蛋白質が 23 S core 粒子に assembly しにくくなると考えられる。また、30 S 亜粒子に少量含まれている Mr55K の蛋白質が非常に減少していた。この蛋白質の機能に関しては目下検討中である。

TABLE III. Radioactivity Incorporated into Split Proteins from Starved or Unstarved Bacteria (*E. coli* MA261)

Split protein	Radioactivity incorporated (cpm)		Starved/unstarved
	Starved	Unstarved	
S1	559	687	1.23
Small peak ^{a)}	82	174	2.12
S2	748	701	0.94
S3	2 139	2 010	0.94
S5	1 489	1 249	0.83
S9	855	844	0.99
S10	309	264	0.85
S14	394	358	0.91

a) M_r 55 kDa protein.

Fig. 4. Effect of Spermidine on the Reconstitution of 30S Particles Prepared from 16S rRNA Lacking the Methylgroups on Twoneighboring Adenines and Total Proteins of *E. coli* 30S Subunits

The reconstitution was carried out for 5 (A) or 20 (B) min.
○—○, 3 mM SPD; ▲—▲, 1 mM SPD; ●—●, no SPD.

Fig. 5. Effect of Spermidine on the Reconstitution of *E. coli* 50S Particles from 23S rRNA, 5S rRNA and Total Proteins of *E. coli* 50S Subunits

The reconstitution was carried out for 30 (A) or 90 (B) min.
○—○, 3 mM SPD; ▲—▲, 1 mM SPD; ●—●, no SPD.

この *in vivo* の結果が *in vitro* のリボゾームの再構成でも再現できるかどうか検討した。³⁰⁾ Figs. 4, 5 に示すように、30S 亜粒子の再構成はポリアミンにより促進を受けたが、50S 亜粒子の再構成は促進を受けなかった。更に、どの蛋白質がポリアミンにより 23S core 粒子につきやすくなるかを電気泳動で分析したところ、*in vivo* と同様に S1 と S9 の蛋白質が付きやすくなることが判明した (Fig. 6)。

それでは何故ポリアミン欠乏下, split protein, 特に S1, S9 蛋白質が 23 S core 粒子に assembly しにくくなるのであろうか? ポリアミンが RNA と結合してその 3 次構造を変化させ, 30 S 亜粒子の生合成を促進することが 1 つのメカニズムと考えられる (Fig. 4). もう 1 つは, 16 S rRNA 中の 3' 末端近傍に存在するアデニンのメチル化がポリアミンにより促進を受けることが関係していた.³⁷⁾ このメチル化は蛋白合成開始反応に関与し,⁴⁰⁾ 開始阻害剤であるカスガマイシン耐性菌では, このメチル化が欠損している.⁴¹⁾ このメチル化欠損の 23 S core 粒子を基質として, メチル化酵素によるアデニンのメチル化を測定したところ,⁴²⁾ ポリアミンがこの反応を促進することが判明した.⁴³⁾ また, メチル化した 23 S core 粒子とメチル化欠損 23 S core 粒子への split protein の assembly を比較すると, メチル化した方に S1, S9 蛋白が assembly しやすくなり, *in vivo* の結果とよく一致した.⁴⁴⁾ すなわち, RNA のポリアミンによる構造変化及びそれに付随したポリアミンによるアデニンのメチル化促進が, ポリアミンによる 30 S 亜粒子の生合成促進に関与していることが示された。

4. リボソーム上におけるポリアミンの結合部位 ポリアミンによる蛋白合成調節機構を理解するために, リボソーム上におけるポリアミンの結合部位の決定を試みた. 最初に RNA と [¹⁴C] SP を直接 crosslink する架橋剤を用い, [¹⁴C] SP の RNA 上における結合部位の決定を試みたが, [¹⁴C] SP-RNA の回収率が非常に低く, 解析が不可能であった. したがって, 蛋白質と [¹⁴C] SP を crosslink する架橋剤である dimethylsuberimidate (DMS) と 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene (FFD) を用い, 間接的なリボソーム上におけるポリアミンの結合部位の決定を試みた. すなわち, ポリアミンは RNA と結合するが, その近くに存在する蛋白と crosslink させることにより実際の結合部位を推測するという方法である.⁴⁶⁾

Table IV は [¹⁴C] SP がリボソーム蛋白質に crosslink するのに rRNA が必要であるというデータを示しており, ポリアミンが RNA と結合することを支持するデータである. 30 S 亜粒子の場合は, DMS を架橋剤とすると S4 蛋白質が [¹⁴C] SP と結合し, FFD を架橋剤とすると S3 蛋白質が [¹⁴C] SP と結合した (Fig. 7). この 2 つの蛋白質は EF-Tu 依存の aminoacyl-tRNA のリボソームへの結合,⁴⁶⁾ AUG のリボソームへの結合,⁴⁷⁾ 及びミスリーディングの低下⁴⁸⁾に関与する蛋白質でポリアミンの機能と密接に係わっている. 50 S 亜粒子の場合は, 2 つの架橋剤で共通して [¹⁴C] SP と結合する蛋白質は L2, L3, L6, L24, L28 蛋白質である (Fig. 8). このうち, L2 と L3 蛋白は peptidyl transferase 活性に必須であるが, 他の蛋白質の機能はまだよく分かっていない. ポリ

Fig. 6. Identification of 30S Subunit Split Proteins Involved in the Spermidine-stimulated Assembly of 30S Particles

----, 3 mM SPD; —, no SPD.

TABLE IV. Necessity of the Conformation of Ribosomal Subunits for Crosslinking of Spermine to Ribosomal Proteins through Dimethyl Suberimidate

Condition of incubation	Protein or ribosomal subunits	[¹⁴ C]Spermine crosslinked ^{a)}
Without urea	<i>E. coli</i> 30-S ribosomal subunits (4A ₂₈₀ units)	3.97
	<i>E. coli</i> 30-S ribosomal proteins (30 μg)	0.02
	Bovine serum albumin (30 μg)	0.12
With 2 M urea	<i>E. coli</i> 30-S ribosomal proteins (30 μg)	0.01
	Bovine serum albumin (30 μg)	0.10

a) Values are expressed as mol spermidine crosslinked per mol 30-S ribosomal subunits, mol 30-S ribosomal proteins, or mol bovine serum albumin.

Fig. 7. Identification of 30S Ribosomal Subunit Proteins Crosslinked with [^{14}C]Spermine

A, Proteins crosslinked to [^{14}C]spermine through dimethyl suberimidate; B, proteins crosslinked to [^{14}C]spermine through 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene; C, 30S ribosomal proteins stained with Coomassie brilliant blue G-250; D, spots numbered according to Madjar *et al.*⁽⁸⁷⁾

Fig. 8. Identification of 50S Ribosomal Subunit proteins Crosslinked with [^{14}C]Spermine

A, Proteins crosslinked to [^{14}C]spermine through dimethyl suberimidate; B, proteins crosslinked to [^{14}C]spermine through 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene; C, 50S ribosomal proteins stained with Coomassie brilliant blue G-250; D, spots numbered according to Madjar *et al.*⁽⁸⁷⁾

Fig. 9. Fluorograph of [^3H]Lysine-labeled PI Protein Precipitated by Anti-PI Protein with the Aid of *S. aureus* Cowan I Cells

1, polyamine-deficient MA261; 2, polyamine-sufficient MA261; 3, polyamine-deficient KK101; 4, polyamine-sufficient KK101; 5, polyamine-deficient HT283; 6, polyamine-sufficient HT283.

アミンを [^{14}C] SPD に変えると 30 S 亜粒子の場合は, S3 と S4 蛋白質に加えて S9 と S14 蛋白質が [^{14}C] SPD と結合するようになる. この蛋白質はアデニンのメチル化に関連している蛋白質である.

以上のようにポリアミンはポリアミンの機能と密接に関連している蛋白質の近くに結合する. しかし, 確固たる答を得るには, なんらかの方法でポリアミンの RNA 上における直接の結合部位を決定することが必要であると思われる.

5. 大腸菌内においてポリアミンにより合成促進を受ける蛋白質の同定 無細胞系でのポリアミンによる蛋白合成促進をふまえ, *in vivo* においてポリアミンにより合成が促進を受ける蛋白質の同定を試みた. この目的のために大腸菌では 3 種のポリアミン要求株を用いた. この 3 種の菌株は培地中への PUT の添加により成長速度が 2—3 倍に上昇する (Table V). そのうちの 1 つである MA 261 株⁴⁹⁾を用いて, 分子量 62 kDa の蛋白質 (ポリアミンにより合成が誘導されるため, polyamine induced (PI) protein と命名) がポリアミンにより強く合成促進を受けること,⁵⁰⁾ 及び RNA polymerase の $\beta\beta'$ subunits の合成がポリアミンにより促進を受けること⁵¹⁾を蛋白質を [^{14}C] Lys でラベルした後フルオログラフィーで分析することにより明らかにした.

しかし, フルオログラフィーで識別出来る蛋白質は非常に少なく, 目的とする蛋白質がポリアミンにより合成促進を受けるかどうかを判定するには, その蛋白質を精製し抗体を調製し, 免疫沈降法によりその蛋白質の合成量を測定しなければならない. このためには多くの労力を必要とするので, 筆者らは最初に蛋白合成に関与する蛋白質に焦点をしばり, ポリアミンによりそれら蛋白質の合成が促進を受けるかどうか検討した.⁵²⁾ Fig. 9 は前述の PI protein が 3 種の大腸菌ポリアミン要求株でポリアミンにより合成促進を受けることを免疫沈降法で示した図である. この PI protein を含め, 蛋白合成に関与する蛋白質のポリアミンによる合成促進率を示したのが Table VI である. S1 リボソーム蛋白質の合成は PI protein 同様ポリアミンにより強く促進を受けた. また, 他のリボソーム蛋白質と RNA ポリメラーゼの合成はポリアミンにより少し促進を受けた. 3 種のポリアミン要求

TABLE V. Growth Rates and Polyamine Contents of Polyamine-requiring Mutants

Strain	PUT in medium ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Doubling time (min)	Polyamine (nmol/mg protein)	
			PUT	SPD
MA261	0	260	0	1.6
	100	128	97	11
KK101	0	416	0	2.4
	100	129	85	10
HT283	0	330	0	0
	100	121	95	0

TABLE VI. Effect of Putrescine on the Amounts of Proteins Synthesized in *E. coli*

Protein	Relative intensity (+PUT/-PUT)		
	MA261	KK101	HT283
PI protein	3.79	4.03	2.15
Ribosomal protein			
S1	3.03	5.05	2.48
L20	1.25	2.20	1.15
X1	1.48	2.11	1.21
RNA polymerase			
$\beta\beta'$	1.37	1.16	1.35
σ	1.21	1.15	1.12
α	1.24	1.24	1.23
Initiation factor			
IF2 α	0.90	1.05	1.05
β	1.07	1.01	1.04
IF3	1.01	1.03	0.95

株の中で **KK101** がポリアミンによって最も強く成長促進を受けるが、**KK101** では **S1** リボゾーム蛋白質の他に **L20**, **X1** リボゾーム蛋白質の合成がポリアミンによって強く促進を受けた。尚、**X1** は当研究室において見出された新しいリボゾーム蛋白質である。⁵³⁾ ポリアミンは蛋白合成の開始反応を促進するが、⁵⁴⁾ 開始因子 2 及び 3 (**IF2** and **IF3**) の合成はポリアミンにより全く影響をうけなかった。

これらの結果から、リボゾーム蛋白質の合成、とりわけ **S1** 蛋白質の合成促進と **PI protein** の合成促進が、大腸菌におけるポリアミンの細胞増殖促進に密接に関連していると推察される。**PI protein** の機能に関しては、以前に蛋白合成開始因子とともに **MS2 RNA** 依存の **RNA** レプリカーゼ合成を促進することを報告している⁵⁰⁾ がその効果はあまり大きくないため、**PI protein** が他の機能を有しているかどうか検討中である。**S1** リボゾーム蛋白質に関しては、ポリアミンはその合成と **S1** 欠損 **30S** 亜粒子への **S1** 蛋白の **assembly** の両方を促進することになる (**Fig. 6**, **Table VI**)。

6. ウシリンパ球細胞におけるチミジンキナーゼ合成のポリアミンによる促進 動物細胞ではどのような蛋白質の合成がポリアミンによって促進を受けるのであろうか? この質問に答えるためにはポリアミン欠乏細胞を作る必要がある。ポリアミン生合成酵素欠損株がチャイニーズハムスター卵巣細胞で分離されている^{9,10)}が、これを用いてポリアミンの生理作用を研究している報告はまだない。動物細胞の場合はポリアミンの生合成酵素阻害剤を用いてポリアミン欠乏細胞を作り、ポリアミンの生理作用を研究している。**Fig. 10** に動物細胞のポリアミン生合成経路を示したが、**SP** 合成までに 4 種類の酵素、すなわち、オルニチン脱炭酸酵素 (**ODC**)、**S**-アデノシル脱炭酸酵素 (**SAMDC**)、スペルミジン合成酵素及びスペルミン合成酵素が関与する。この 4 種類の酵素に対する阻害剤はかなり多く報告されているが、現在汎用されている阻害剤は **ODC** の阻害剤である α -difluoromethylornithine (**DFMO**)⁵⁵⁾ (**Fig. 11**) と **SAMDC** の阻害剤である methylglyoxal bis (guanylylhydrazone) (**MGBG**)⁵⁶⁾ (**Fig. 11**) である。しかし、**MGBG** の場合は 2, 3 の副作用が報告されている^{57,58)}ので、筆者らは比較的副作用の少ない ethylglyoxal bis (guanylylhydrazone) (**EGBG**)^{59,60)} (**Fig. 11**) を **SAMDC** の阻害剤として使い、**DFMO** と併用している。**MGBG** のラット **SAMDC** に対する **Ki** 値は $0.47 \mu\text{M}$ であるのに対し、**EGBG** のそれは $0.06 \mu\text{M}$ で、**EGBG** の方が約 8 倍強い阻害

Fig. 10. Biosynthetic Pathway of Polyamines in Eukaryotic Cells

(1) ornithine decarboxylase; (2) *S*-adenosylmethionine decarboxylase; (3) spermidine synthetase; (4) spermine synthetase.

inhibitor of **ODC**

α -difluoromethylornithine (**DFMO**)

inhibitor of **SAMDC**

methylglyoxal
bis(guanylylhydrazone) (**MGBG**)

ethylglyoxal
bis(guanylylhydrazone) (**EGBG**)

Fig. 11. Inhibitors of Polyamine Biosynthesis

TABLE VII. Contents of Polyamines, MGBG and EGBG in ConA-activated Lymphocytes

Inhibitor added	Cellular levels (nmol/mg DNA)				
	Putrescine	Spermidine	Spermine	NGBG	EGBG
None	30.0	62.8	58.0		
DFMO	4.8	9.2	41.4		
MGBG	62.9	18.3	24.6	63.6	
EGBG	74.1	19.9	23.8		13.3
DFMO+MGBG	8.2	12.0	22.1	87.5	
DFMO+EGBG	9.2	14.1	23.6		14.2

The concentrations of DFMO, MGBG and EGBG used were 5 mM, 8 μ M and 100 μ M, respectively.

TABLE VIII. Effect of Inhibitors on DNA and Protein Synthesis

Inhibitor added	[³ H]Thymidine incorporation cpm/ μ g DNA	[³ H]Leucine incorporation cpm/ μ g DNA
None	23 870 (1.00)	1 501 (1.00)
DFMO	18 191 (0.76)	1 198 (0.80)
MGBG	13 065 (0.55)	1 047 (0.70)
EGBG	18 154 (0.76)	1 186 (0.79)
DFMO+MGBG	3 453 (0.14)	501 (0.33)
DFMO+EGBG	7 882 (0.33)	661 (0.44)

The concentrations of DFMO, MGBG and EGBG used were 5 mM, 8 μ M and 100 μ M, respectively.

剤である。⁶¹⁾

Table VII と VIII はウシリンパ球の細胞培養系で DFMO と EGBG の効果を MGBG の効果と比

較したものである。⁶⁰⁾ DFMO の培地への添加は PUT と SPD を, EGBG 又は MGBG の添加は SPD と SP を, DFMO と EGBG 又は MGBG の併用は 3 種類のポリアミンを低下させた (Table VII). 使用した濃度は DFMO が膜透過系をもたないため 5 mM と高く, EGBG の場合は MGBG に比べ取り込み速度が遅いため,⁶¹⁾ SAMDC に対して阻害能力が高いにもかかわらず 100 μ M と MGBG の 8 μ M に比べ高かった. しかし, 細胞内濃度は MGBG の方が 5—6 倍高かった (Table VII). 同時に細胞増殖の指標として DNA 合成と蛋白合成を調べたところ, DFMO, EGBG, DFMO+EGBG 投与群ではポリアミン量低下にほぼ並行して DNA 合成と蛋白合成が同程度阻害された. 一方, MGBG, DFMO+MGBG 投与群は DNA 合成の方が常に蛋白合成より強く阻害され, かつ蛋白合成も EGBG 投与群に比べ強く阻害された. EGBG 投与群と MGBG 投与群はポリアミン量の低下はほぼ等しいから, MGBG の場合は明らかにポリアミン量の低下以外の副作用があることを示している. しかし, 50 μ M の SPD を培地中に添加すると DNA 合成及び蛋白合成が完全に回復すること, 及び MGBG の構造が SPD に似ていることから, MGBG は本来ポリアミンが結合する場所に結合し副作用を示すのではないかと考えている.

DFMO と EGBG を培地中に加えて, ポリアミンによってどの蛋白質合成が影響をうけるかを検討した.^{62,63)} ポリアミン欠乏細胞の培地にポリアミンを添加すると細胞増殖が回復するが, その際蛋白合成の回復が RNA・DNA 合成の回復より早く起こった. この現象は大腸菌ポリアミン要求株でも認められた現象¹¹⁾で, ポリアミンが蛋白合成に重要な役割を果たしていることを示唆する. 次に DNA 合成に関与する 3 つの酵素, DNA ポリメラーゼ α , チミジンキナーゼ (TK), チミジン酸合成酵素の活性がポリアミン欠乏細胞でどのように変化するかを検討した. Fig. 12 に示すように, TK の活性が正常細胞の約 10% に, DNA ポリメラーゼ α の活性が約 50% に低下していた. チミジン酸合成酵素の活性はほとんど変化しなかった.

Fig. 12. Thymidine Kinase, Thymidylate Synthetase and DNA Polymerase α Activities in Con A Activated Lymphocytes

○ and ●, thymidine kinase; △ and ▲, thymidylate synthetase; □ and ■, DNA polymerase α .
—, none; ---, DFMO+EGBG.

この TK 合成がポリアミンによりどのレベルで調節されているかを検討した。まず、northern blot 分析で TK mRNA 量を比較したところ、ポリアミン欠乏細胞でも正常細胞とほぼ同じ量存在した。次いで、TK mRNA の turn over rate を測定したが、両細胞で差が認められなかった。ポリゾーム中の TK mRNA 量を測定すると、正常細胞の TK mRNA はポリアミン欠乏細胞のそれに比べ、やや大きいポリゾーム中に存在し、蛋白合成レベルでポリアミンが TK 合成を調節している可能性が示された。はっきりとした解答を得るにはまだまだ多くの実験を必要とするが、この結果は真核細胞でも、ポリアミンが特定の蛋白質の合成を translational level で制御し、細胞増殖に貢献していることを明らかにした。大腸菌と異なる蛋白質合成がポリアミンにより調節をうけることは非常に興味深い。

ポリアミンによる DNA 合成調節

Tabor 夫妻のグループは大腸菌ポリアミン要求株を用いて、T4 ファージと λ ファージの産生にポリアミンが必要かどうか検討した。⁶⁴⁾ T4 ファージはポリアミンが存在しなくとも作られたが、 λ ファージの産生はポリアミンに依存した。この理由はまだ明らかではない。

ポリアミンと DNA の相互作用に関しては、Liquori ら⁶⁵⁾がスperlミンが B-DNA の minor groove に結合すると報告したが、つい最近 Marton のグループ⁶⁶⁾はスperlミンと DNA のコンピューターによる構造解析からスperlミンは B-DNA の major groove に結合し、DNA を bend する (折りたたむ) というモデルを提出した。このポリアミンの DNA との相互作用により、DNA の B 型から Z 型への変換促進、⁶⁷⁾ DNA の Tm 値 (融解温度) の上昇、⁶⁸⁾ DNA の aggregation (凝縮)⁶⁹⁾ が引き起こされる。これらのポリアミンの作用は細胞増殖と密接に関連していると思われ、この分野の研究の進展が期待される。

DNA の機能に関連する酵素反応におけるポリアミンの効果を以下に述べる。DNA gyrase による supercoiled DNA の catenation (連鎖) がポリアミンにより促進をうける。⁷⁰⁾ 一方、大腸菌の topoisomerase I (DNA relaxing enzyme) による supercoiled DNA の弛緩はポリアミンにより阻害され、⁷¹⁾ 大腸菌ではポリアミンは supercoiled DNA 形成に役立つ。DNA の 3 次構造の変化は DNA 合成のみならず RNA 合成も影響をうけると思われる。一方、真核細胞の topoisomerase I による DNA の弛緩はポリアミンにより促進をうける。⁷¹⁾ 真核細胞の場合は DNA がヌクレオソーム構造をとっており、大腸菌の場合と異なるものと思われる。

ヒストンのアセチル化は遺伝情報発現調節に重要であるといわれている。最初ポリアミンは acetyltransferase の活性を促進すると報告⁷²⁾されたが、実際は histone deacylase の活性がポリアミンにより阻害をうける^{73,74)}ために、ヒストンのアセチル化がポリアミンにより促進をうけるようである。

ポリアミンによる RNA 合成調節

去勢マウスの腎臓の RNA 合成はアンドロゲンによって著しい促進をうけるが、その際 ODC 活性が 1000 倍も上昇し、ポリアミンレベルも上昇する。⁷⁵⁾ この現象を説明するのに 2 つの魅惑的な仮説が提出された。1 つは Kuehn らによるもので、SPD にその活性が完全に依存する protein kinase が存在し、その protein kinase が ODC をリン酸化し、リン酸化された ODC が mRNA 合成を促進するというものである。^{76,77)} もう 1 つは Russell らによるもので、トランスグルタミナーゼの作用により PUT が ODC に共有結合し、その ODC-PUT 複合体が RNA 合成を促進するというものである。^{78,79)} しかし、ODC 合成を DFMO で阻害しても、RNA 合成は進行し、RNA 合成と ODC 合成には相関が認められず、⁸⁰⁾ 上記 2 つの仮説を否定する論文が最近出始めている。^{81,82)}

ポリアミンが cAMP-independent な protein kinase すなわちヘパリンによって阻害をうける N II protein kinase を促進することは良く知られている。Lischwe らは核小体に存在する分子量 11 万の蛋白質が rRNA 合成に重要な働きをすると報告している⁸³⁾が、この蛋白質は N II protein kinase でリン酸化される。したがって、ポリアミンはこの 11 万の蛋白質のリン酸化を促進することにより rRNA 合成を調節しているのかもしれない。また、この蛋白質がスperlミンの存在下に特異的に分解され分子量 5.9 万のリン酸化蛋白質になるという。⁸⁶⁾ 11 万のリン酸化蛋白質が 5.9 万のリン酸化蛋白質に分解されることにより、rRNA 合成の調節がどのように変化するか興味深い。

大腸菌ではポリアミンと RNA 合成の関連を調べたペーパーは少ない。T7 DNA 依存蛋白合成系で T7 RNA ポリメラーゼの合成がポリアミンにより促進される際に、translation レベルだけでなく transcription レベルで

もポリアミンによる合成促進が起こる.^{21,22)} しかし、それ以後の研究の進展はまだ報告されていない。

おわりに

ポリアミンは細胞増殖因子として、今日着実にその地位を築きつつある。しかし、その機序に関しては未だ不明な点が多い。それは偏にポリアミンと核酸あるいはリン脂質との相互作用が弱くかつ比較的非特異的であるためと思われる。その中で、網状赤血球無細胞系グロビン合成がスペルミジンに完全に依存するようになったことは、蛋白合成にポリアミンが重要な役割を果たしていることを明確に示している。リンパ球の場合、ポリアミンが正常値の 30—50% に低下すると、蛋白合成・DNA 合成も 30—50% に低下するが、チミジンキナーゼ合成はほとんど零になる。このことは蛋白合成のポリアミンに対する依存度が各々の蛋白合成で違うことを示している。ポリアミンによる蛋白合成促進が細胞増殖促進に強く係わっていることをより明確にするためには、どの蛋白質合成がポリアミンにより強く促進をうけるかを辛抱強く同定してゆく必要がある。同時にポリアミンによる蛋白合成促進を分子レベルで理解するために、ポリアミンがどのような RNA 構造あるいは蛋白質・RNA 複合体を認識しているかを明らかにしなければならない。

また、ポリアミンによるミスリーディングの低下が *in vivo* 蛋白合成にどの程度貢献しているかということと、ポリアミンが真核細胞のリボゾームの *assembly* にも関与しているかどうかを明らかにすることが重要な課題として残されている。

DNA・RNA 合成のポリアミンによる制御はこれからの取り組むべき課題で、興味ある問題が山積している。

引用文献

- 1) A. Raina, J. Jänne, M. Siimes, *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 197 (1966).
- 2) H. Inoue, H. Tanioka, K. Shiba, A. Asada, Y. Kato, Y. Takeda, *J. Biochem.*, **75**, 679 (1974).
- 3) C. E. Seyfried, D. R. Morris, *Cancer Res.*, **39**, 4861 (1979).
- 4) K. Igarashi, K. Hara, Y. Watanabe, S. Hirose, Y. Takeda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **64**, 897 (1975).
- 5) W. K. Maas, *Mol. Gen. Genet.*, **119**, 1 (1972).
- 6) C. W. Tabor, H. Tabor, E. W. Hafner, *J. Biol. Chem.*, **253**, 3671 (1978).
- 7) P. A. Whitney, D. R. Morris, *J. Bacteriol.*, **134**, 214 (1978).
- 8) M. S. Cohn, C. W. Tabor, H. Tabor, *J. Bacteriol.*, **134**, 208 (1978).
- 9) C. Steglich, I. E. Scheffler, *J. Biol. Chem.*, **257**, 4603 (1982).
- 10) E. Hölttä, P. Pohjanpelto, *Biochim. Biophys. Acta*, **721**, 321 (1982).
- 11) D. V. Young, P. R. Srinivasan, *J. Bacteriol.*, **112**, 30 (1972).
- 12) K. Igarashi, I. Sakamoto, N. Goto, K. Kashiwagi, R. Honma, S. Hirose, *Arch. Biochem. Biophys.*, **219**, 438 (1982).
- 13) 五十嵐一衛, 薬学研究の進歩・研究成果報告集, **1**, 7 (1985).
- 14) J. Jänne, E. Hölttä, A. Kallio, K. Käpyaho, *Special Topics in Endocrinology and Metabolism*, **5**, 227 (1983).
- 15) O. Heby, S. M. Oredsson, M. Kanje, *Adv. Enz. Regul.*, **22**, 243 (1984).
- 16) 五十嵐一衛, 千葉医学, **61**, 383 (1985).
- 17) 樋廻博重, 塚田哲也, 中島邦夫, 蛋白質 核酸 酵素, **30**, 335 (1985).
- 18) K. Igarashi, K. Sugawara, I. Izumi, C. Nagayama, S. Hirose, *Eur. J. Biochem.*, **48**, 495 (1974).
- 19) Y. Watanabe, K. Igarashi, S. Hirose, *Biochim. Biophys. Acta*, **656**, 134 (1981).
- 20) E. Fuchs, *Eur. J. Biochem.*, **63**, 15 (1976).
- 21) B. V. Treadwell, H. F. Kung, H. Weissbach, *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 799 (1976).
- 22) Y. Watanabe, K. Igarashi, K. Mitsui, S. Hirose, *Biochem. Biophys. Acta*, **740**, 362 (1983).
- 23) A. R. Hunter, P. J. Farrell, R. J. Jackson, T. Hunt, *Eur. J. Biochem.*, **75**, 149 (1977).
- 24) J. F. Atkins, J. B. Lewis, C. W. Anderson, R. F. Gesteland, *J. Biol. Chem.*, **250**, 5688 (1975).
- 25) D. Konecki, G. Kramer, P. Pinphanichakarn, B. Hardesty, *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 192 (1975).
- 26) K. Igarashi, M. Kojima, Y. Watanabe, K. Maeda, S. Hirose, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **97**, 480 (1980).

- 27) T. Ogasawara, K. Igarashi, 投稿中.
- 28) A. K. Abraham, S. Oisnes, A. Pihl, *FEBS Lett.*, **101**, 93 (1979).
- 29) K. Igarashi, K. Kashiwagi, R. Aoki, M. Kojima, S. Hirose, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 440 (1979).
- 30) P. C. Jelenc, C. G. Kurland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 3174 (1979).
- 31) K. Igarashi, S. Hashimoto, A. Miyake, K. Kashiwagi, S. Hirose, *Eur. J. Biochem.*, **128**, 597 (1982).
- 32) K. Ito, K. Igarashi, *Eur. J. Biochem.*, **156**, 505 (1986).
- 33) L. M. McMurry, I. D. Algranati, *Eur. J. Biochem.*, **155**, 383 (1986).
- 34) G. Echandi, I. D. Algranati, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **62**, 313 (1975).
- 35) G. Echandi, I. D. Algranati, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 1185 (1975).
- 36) P. Traub, S. Mizushima, C. V. Lowry, M. Nomura, *Methods Enzymol.*, **20**, 391 (1971).
- 37) K. Igarashi, K. Kashiwagi, K. Kishida, Y. Watanabe, A. Kogo, S. Hirose, *Eur. J. Biochem.*, **93**, 345 (1979).
- 38) K. Igarashi, K. Kashiwagi, K. Kishida, T. Kakegawa, S. Hirose, *Eur. J. Biochem.*, **114**, 127 (1981).
- 39) T. Kakegawa, S. Hirose, K. Kashiwagi, K. Igarashi, *Eur. J. Biochem.*, **158**, 265 (1986).
- 40) B. Poldermans, N. Goosen, P. H. Van Knippenberg, *J. Biol. Chem.*, **254**, 9085 (1979).
- 41) T. L. Helser, J. E. Davis, J. E. Dahlberg, *Nature New Biol.*, **235**, 6 (1972).
- 42) P. Tammana, W. A. Held, *Nature*, **227**, 680 (1974).
- 43) K. Igarashi, K. Kishida, S. Hirose, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 678 (1980).
- 44) K. Igarashi, K. Kishida, K. Kashiwagi, I. Tatokoro, T. Kakegawa, S. Hirose, *Eur. J. Biochem.*, **113**, 587 (1981).
- 45) T. Kakegawa, E. Sato, S. Hirose, K. Igarashi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **251**, 413 (1986).
- 46) L. L. Randall-Hazelbaner, C. G. Kurland, *Mol. Gen. Genet.*, **115**, 234 (1972).
- 47) O. Pong, E. Lanka, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 1505 (1975).
- 48) L. Gorini, *Nature New Biol.*, **234**, 261 (1971).
- 49) S. Cunningham-Rundles, W. K. Maas, *J. Bacteriol.*, **124**, 791 (1975).
- 50) K. Mitsui, K. Igarashi, T. Kakegawa, S. Hirose, *Biochemistry*, **23**, 2679 (1984).
- 51) K. Mitsui, R. Ohnishi, S. Hirose, K. Igarashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 528 (1984).
- 52) K. Kashiwagi, Y. Sakai, K. Igarashi, 投稿中.
- 53) K. Kashiwagi, K. Igarashi, *Biochem. Biophys. Acta*, **911**, 180 (1987).
- 54) K. Igarashi, Y. Watanabe, K. Nakamura, M. Kojima, Y. Fujiki, S. Hirose, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 806 (1978).
- 55) P. S. Mamont, M. C. Duchesne, J. Grove, P. Bey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**, 58 (1978).
- 56) A. Corti, C. Dave, H. G. Williams-Ashman, E. Minich, A. Schenone, *Biochem. J.*, **139**, 351 (1974).
- 57) C. W. Porter, F. Mikles-Robertson, D. Kramer, C. Dave, *Cancer Res.*, **39**, 2414 (1979).
- 58) R. Ohnishi, R. Nagami, S. Hirose, K. Igarashi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **242**, 263 (1985).
- 59) A. G. Pegg, G. Jacobs, *Biochem. J.*, **213**, 495 (1983).
- 60) K. Igarashi, C. W. Porter, D. R. Morris, *Cancer Res.*, **44**, 5326 (1984).
- 61) J. Jänne, D. R. Morris, *Biochem. J.*, **218**, 947 (1984).
- 62) K. Igarashi, D. R. Morris, *Cancer Res.*, **44**, 5332 (1984).
- 63) K. Ito, K. Igarashi, 投稿中.
- 64) E. W. Hafner, C. W. Tabor, H. Tabor, *J. Biol. Chem.*, **254**, 12419 (1979).
- 65) A. M. Liquori, L. Constantino, V. Crescenzi, B. Elia, E. Giglio, R. Puliti, S. M. Desantix, V. Vitigliani, *J. Mol. Biol.*, **24**, 113 (1967).
- 66) B. G. Feuerstein, N. Pattabiraman, L. J. Marton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 5948 (1986).
- 67) M. Behe, G. Felsenfeld, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 1619 (1981).
- 68) H. S. Basu, L. J. Marton, *Biochem. J.*, **244**, 243 (1987).
- 69) K. S. Srivenugopal, D. E. Wemmer, D. R. Morris, *Nucleic Acids Res.*, **15**, 2563 (1987).
- 70) M. A. Kranow, N. R. Cozzarelli, *J. Biol. Chem.*, **257**, 2687 (1982).

- 71) K. S. Srivenugopal, D. R. Morris, *Biochemistry*, **24**, 4766 (1984).
- 72) B. Dod, A. Kervadon, J. Parello, *Eur. J. Biochem.*, **121**, 401 (1982).
- 73) P. R. Libby, J. S. Bertram, *Arch. Biochem. Biophys.*, **201**, 359 (1980).
- 74) Q. A. Vu, D. Zhang, Z. C. Chroneos, D. A. Nelson, *FEBS Lett.*, **220**, 79 (1987).
- 75) S. Henningsson, L. Persson, E. Rosengren, *Acta Physiol. Scand.*, **102**, 385 (1978).
- 76) G. D. Kuehn, H.-U. Affolter, V. J. Atmar, J. Seebach, U. Gubler, R. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **76**, 2541 (1979).
- 77) G. R. Daniels, V. J. Atmar, G. D. Kuehn, *Biochemistry*, **20**, 2525 (1981).
- 78) D. H. Russell, *Med. Biol.*, **59**, 286 (1981).
- 79) D. H. Russell, C.-A. Manen, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 3373 (1982).
- 80) N. Suzuki, T. Miyauchi, M. Urata, H. Yazawa, J. Shimazaki, T. Hosoya, *Endocrinol. Jpn.*, **33**, 233 (1986).
- 81) J. E. Seely, D. A. Stetler, S. T. Jacob, A. E. Pegg, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 219 (1984).
- 82) M. Urata, N. Suzuki, T. Hosoya, *Biochem. J.*, **241**, 169 (1987).
- 83) K. M. Rose, L. E. Bell, D. A. Siefken, S. T. Jacob, *J. Biol. Chem.*, **256**, 7468 (1981).
- 84) S. A. Goueli, A. T. Davis, R. A. Hiipakka, S. Liao, K. Ahmed, *Biochem. J.*, **230**, 293 (1985).
- 85) M. A. Lischwe, R. L. Richards, R. K. Busch, H. Busch, *Exp. Cell. Res.*, **136**, 101 (1981).
- 86) N. Suzuki, H. Matsui, T. Hosoya, *J. Biol. Chem.*, **260**, 8050 (1985).
- 87) J.-J. Madjar, S. Michel, A. J. Cozzzone, J.-P. Reboud, *Anal. Biochem.*, **36**, 401 (1970).