

綜 説

生体膜脂質とミクロソーム電子伝達系

福 島 弘 文

信州大学医学部法医学教室

Membrane Lipids and Microsomal Electron Transport System

Hirofumi FUKUSHIMA

Department of Legal Medicine, Shinshu University School of Medicine

Key words : membrane, microsome, fatty acid, sterol, cytochrome

膜, ミクロソーム, 脂肪酸, ステロール, チトクローム

I はじめに

細胞や組織が生物のもつ合目的な機能を発揮するためには、相互の密接な協調性が必要である。近年、生体機能の調節機能を解明するために、生体现象の適応と応答の2つの視点から多彩な解析がなされてきた。なかでも、細胞膜は細胞内外の隔壁としてだけでなく、多くの生体機能発現のための情報伝達の“反応の場”として重要であり、多くの研究者によって注目されてきた¹⁾。

細胞は種々の外的環境因子、たとえば、温度、薬物、栄養、加齢などに対し、巧みな適応能力を発揮し、生命を維持している。このような適応現象に生体膜脂質の動的構造が重要な働きをしていることが報告されている²⁾。一方、細胞の応答に関しては、①リン脂質のメチル化³⁾ ②PI (ホスファチジルイノシトール) の代謝回転などの膜リン脂質代謝と Ca^{++} の動態との相関性に関して⁴⁾、最近、特に注目を集めており、 Ca^{++} がセカンドメッセンジャーとしてホルモン作用の発現に重要であることが明らかにされてきた。

このように、膜自体が以前の“静的”な概念から“動的”なものへと認識されるに至り、さらに種々の膜脂質も構築成分としてだけでなく、“機能”を有する膜脂質として新たに認識されはじめています。

本稿では脂肪酸を中心とした細胞の環境適応に伴う膜脂質修飾について、また不飽和脂肪酸およびコレステロールの膜における生理的役割と代謝、さらにこれ

らに關与するミクロソーム電子伝達系について述べてみたい。

II 膜脂質変動

膜の物理化学的状態と膜機能発現の相関性に関しては、これまでに多くの報告がなされている。1972年 Singer と Nicolson⁵⁾ によって提唱された流動モザイク膜モデルは生体膜の構造と機能を理解するための基本概念として好都合であり、さらに細胞骨格系を含めたダイナミックな膜構造体に関する研究は、生体膜を理解するうえで重要である。

脂質は生体膜成分の1つであり、その変動に関する研究は膜機能を理解するうえに興味深い課題である。環境の変化に伴った膜脂質の変動は、生物の生存に必要な膜機能を常に至適な流動状態に保持するための適応現象 (homeoviscous adaptation)⁶⁾ であり、また防御反応とも考えられる。ここで諸種の環境変化に伴う膜脂質変動についての代表例を述べる。

環境変動の因子には物理的、化学的および生物的要素が含まれ、特に温度による影響は著明である。その他にも、栄養、薬剤、光、pH、加齢などによる変化も注目すべきものがある。

恒温動物の哺乳類および鳥類を除いた脊椎動物や無脊椎動物では、体温調節が行われないため、外界温度によって影響を受けやすく、著明な膜脂質修飾が生じる。1962年に Marr と Ingraham⁷⁾ によって大腸菌の膜リン脂質アシル鎖が著明に変化することがはじめ

表1 各生育温度における脂肪酸構成

脂肪酸	真 菌 ⁸⁾		原生動物 ⁹⁾		カエル ¹⁰⁾		ラ ッ ト ¹¹⁾	
	<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Tetrahymena</i> (microsomes)		lung		Epididymal adipocyte (mitochondria)	
	15°C	37°C	15°C	39.5°C	4°C	27°C	5°C	28°C
C16:0	19.9	19.3	8.9	13.2	20.2	27.6	18.0	22.3
C16:1	—	—	8.8	8.7	7.0	5.2	2.9	2.7
C18:0	1.8	0.6	0.5	2.2	41.7	37.0	21.6	23.9
C18:1	7.8	42.2	7.1	13.9	15.1	17.9	14.6	14.3
C18:2	52.9	36.2	26.1	16.3	1.5	1.4	24.5	18.1
C18:3	17.5	1.6	31.8	21.4	10.6	8.4	—	—
C20:4	—	—	—	—	4.0	2.5	16.9	16.7

て報告され、この分野の研究がスタートした、すなわち、低温細胞では、パルミトオレイン酸 (C16:1) が増加し、パルミチン酸 (C16:0) とミリスチン酸 (C14:0) が減少し、その結果不飽和脂肪酸の多い膜組成を形成した。逆に高温細胞では、飽和脂肪酸が増加し、この変動はきわめて迅速である。細菌のほかに真菌⁸⁾、原性動物⁹⁾、カエル¹⁰⁾、ラット¹¹⁾の温度変化に伴う脂肪酸変動を表1に示した。真菌(カビ)では、C18:1が高温で多く、低温ではC18:2、C18:3などの二重結合数の多い不飽和脂肪酸が増大する。脂肪酸の融点は二重結合の増加に伴って低下し、低温生育細胞の不飽和脂肪酸の増大は膜状態の調節に重要である。カビより高等な原生動物(テトラヒメナ細胞)においても温度変化に伴う脂質の変動が著しく、低温ではC18:2とC18:3が増大する。さらに変温動物のカエルでは、低温でC18:0、C18:3、C20:4が増加する。一方、哺乳動物のなかには冬眠する動物もあり、冬眠中の脂質組成として不飽和脂肪酸やリゾリン脂質が増大するという報告もある。表1に低温、および高温で飼育したラット epididymal adipocyte のミトコンドリアの脂肪酸組成を示しており、著明な変動は認められないが、低温でC18:2が増加することはミトコンドリアの機能との関連性から注目される点である。脂肪酸の変動以外にもリン脂質、ステロール、糖脂質等も生育温度変化に伴う変動が認められるけれども、概してリン脂質アシル鎖の修飾ほど顕著ではない。

栄養に伴う膜脂質修飾には特定な栄養源を必須とする例として、大腸菌の不飽和脂肪酸要求株やレシチン合成欠損株等があり、栄養添加に伴う変化には、原生動物のテトラヒメナ細胞¹²⁾や *Acholeplasma* 形質膜¹³⁾

の膜修飾の例がある。また、高塩濃度に適応して生存する細胞には *Halobacterium cutirubrum*¹⁴⁾があり、興味ある脂質分析結果が報告されている。薬剤投与の例として、エタノールによる脂質修飾がある。ラットを用いた実験では、肝ミトコンドリアのリン脂質および、そのアシル鎖の脂質変動について報告されている。さらに加齢による膜脂質変化も多くの生物で知られており、ラット脳では生後10日間で重量が増加し、軸索や樹状突起が成長し、その後3週間にかけてミエリン形成が進行する。この間にホスファチジルコリンのアシル鎖のうちC16:0とC16:1が減少し、C18:0とC18:1が増加する報告がある。ヒト新生児赤血球は生後1週間の間C18:2が増加し、一方C20:4、C22:6はやや減少する。これらの変化と細胞膜の機能および物性との相関性についての詳細は明らかではないが、生体膜の適応現象としての観点から注目される。

III 膜脂質修飾の調節機構

生体膜は通常の生理条件下で一定の流動性を保ち、したがって膜脂質の修飾は膜流動性のある適正な範囲に維持することにあると解釈されている。膜流動性に関与する因子にはリン脂質、タンパク質、糖、コレステロール、脂肪酸、イオンなどがあげられる。なかでも、脂肪酸、つまりリン脂質のアシル鎖とコレステロールは細胞膜機能に影響を及ぼしやすい。アシル鎖の場合、鎖長、二重結合の数および位置によって生体膜の動的状態が変動し、環境に順応した脂質組成を示すと考えられる。膜結合酵素や膜リセプターの多くは、膜リン脂質の極性基およびそのアシル鎖の物性の影響を受ける。たとえば、金魚の脳シナプトソームにおい

表2 温度シフトによるテトラヒメナ細胞の酵素活性変動

(単位 %)

酵 素	39.5°C- 生育細胞	温度シフト (39.5°C→15°C) 後の時間	
		2時間	6時間
(1) 脂肪酸の不飽和化に関与する酵素			
パルミトイル CoA 不飽和化酵素	100	433	60
ステアロイル CoA 不飽和化酵素	100	283	43
NADH-フェリシアン化カリウム還元酵素	100	153	123
NADH-チトクロム c 還元酵素	100	219	132
NADPH-チトクロム c 還元酵素	100	149	88
チトクロム <i>b</i> _{560ms}	100	114	104
チトクロム <i>b</i> _{560ms} 酸化活性	100	368	112
(2) その他の酵素			
CO結合ヘムタンパク	100	100	155
グルコース-6-ホスファターゼ	100	119	143
プロテアーゼ	100	206	1816
酸性ホスファターゼ	100	118	136

て、水温が低下するに伴って不飽和脂肪酸が増加し、膜物性としての相転移温度も低温にシフトする¹⁵⁾。冬眠をする動物のうち、リスの肝ミトコンドリア¹⁶⁾はリゾリン脂質が増加し、流動性の減少した膜状態を形成し、相転移も消失していることはミトコンドリアの代謝活性が冬眠中では低下していることとよく一致する。原生動物のテトラヒメナ細胞は人工培地中で容易に培養ができ、しかも、高等動物細胞と同様内膜系の分化発達がよく、膜研究には好都合なモデル細胞である¹⁷⁾。また、環境変化に対しても迅速な膜脂質の修飾が行われ、高い適応能力を発揮するため、適応機構の解明には有用な細胞である。たとえば温度変化に対して膜リン脂質アシル鎖が変動し、特に不飽和脂肪酸の増減が著しい。表2に、温度シフト後のテトラヒメナ細胞の各種酵素の変動についてまとめた。膜リン脂質アシル鎖の著しい増加は温度シフト後2時間後に認められ、同時に不飽和化反応に関連した酵素としてチトクロム *b*_{560ms} 酸化活性¹⁸⁾、還元酵素活性¹⁹⁾、パルミトイルおよびステアロイル-CoA 不飽和化活性¹⁹⁾²⁰⁾などは2時間後にピークを示した。一方、グルコース-6-ホスファターゼ²¹⁾、CO結合タンパク²¹⁾、酸性ホスファターゼ²²⁾などは2時間後のピークは認められず、むしろ除々に増加する傾向が認められた。したがって不飽和脂肪酸の増大にはミクロソームの電子伝達系酵素の活性変動が関与することを示唆している。冬眠中と高

表3 各飼育条件下のハムスター肝ミクロソーム電子伝達系酵素活性

	高温適応	冬眠
ステアロイル CoA 不飽和化酵素 (nmol/mg/min)	0.187	1.16
NADH-フェリシアン化カリウム 還元酵素 (μmol/mg/min)	7.52	6.83
チトクロム <i>b</i> ₅ (pmol/mg)	503	495
チトクロム P-450 (nmol/mg)	1.308	0.938

(Goldman²³⁾より引用)

温飼育したハムスターの肝ミクロソームの電子伝達系酵素活性²³⁾について表3に示した。前述のテトラヒメナと異なり、冬眠中のハムスターでは脂肪酸不飽和化活性は増大するが、チトクロム P-450の減少以外に電子伝達系酵素の変化は認められない。一方、ハムスターの脳組織では、肝のような酵素活性の変化は認められず、興味のもたれるところである。

哺乳動物のような多くの因子を含んだ系での解析は非常に複雑であるが、単純化した系、つまり微生物の温度変化に伴う膜脂質適応機構に関してまとめてみると、次の3つに大別される。① 脂肪酸不飽和化反応 (desaturase) 系 ② 脂肪酸合成活性を介して飽和/不飽和の比を変化させる系 ③ 特殊な脂質が関与する

系などである。テトラヒメナ細胞は①の脂肪酸不飽和化反応系を有し、生育温度変化に伴う膜リン脂質アシル鎖の変動メカニズムには次の機構が作動していると推測される。(i) 不飽和化酵素のタンパク合成レベルでの変化 (ii) 温度による膜状態の変化に誘起された不飽和化酵素活性の変化 (iii) アシルトランスフェラーゼ系およびホスホリパーゼ系の関与などである。シクロヘキシミドなどの実験²⁰⁾から (i) の系が重要であろうと考えられるが、(ii) (iii) の関与もまったく否定はできない。いずれにせよ、ミクロソームの電子伝達系酵素が主要な役割を果たしている。その他にも、ホルモン、サイクリックヌクレオチド等が関与する可能性もあり、今後の研究課題である。

IV 電子伝達系と脂質代謝

A 不飽和脂肪酸

大腸菌では、 β -ketoacyl-ACP synthase IIが中心となり不飽和脂肪酸が直接合成され膜流動性の調節に関与している²⁴⁾。一方、Bacillus 細胞²⁵⁾や原生動物のテトラヒメナ細胞²⁶⁾以上の生物では、電子伝達系によって図1の反応が進み、不飽和脂肪酸が生成される。

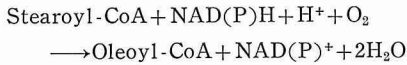


図1 Stearoyl-CoA の不飽和化反応

また、ラット肝ミクロソームでは NAD(P)H と分子状酸素を必要とし²⁷⁾、NADH→NADH-Cyt b_5 reductase → Cyt b_5 → CSF (desaturase) の経路で電子の供与が成立し飽和脂肪酸が不飽和脂肪酸に変換する。一方、NADPH→NADPH-Cyt P-450 reductase → Cyt b_5 → CSF の流れによっても電子が供与され不飽和化反応が可能である。ところで、テトラヒメナ・ミクロソームでは、NADH と分子状酸素によって不飽和脂肪酸が生成されるけれども²⁶⁾、電子伝達系経路の存在の有無については不明であった。そこで、テトラヒメナ・ミクロソームからチトクローム b_5 に類似した b 型ヘムタンパクの精製を試み、その性質を検討した。ミクロソーム画分を 3% Triton X-100 と 1.5% コール酸ナトリウムで可溶化し、DEAE-セルロースカラムおよびセファデックスG-100 カラムを用いて精製した(図2)。ラット肝ミクロソームのチトクローム b_5 (16,700 の分子量)²⁸⁾ と比較してやや大きい分子量 22,000 を示した。得られたヘムタンパクは 414nm に吸



A B

図2 チトクロームの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像
A: ラット肝ミクロソームのチトクローム b_5
B: テトラヒメナ・ミクロソームのチトクローム b_{560ms}

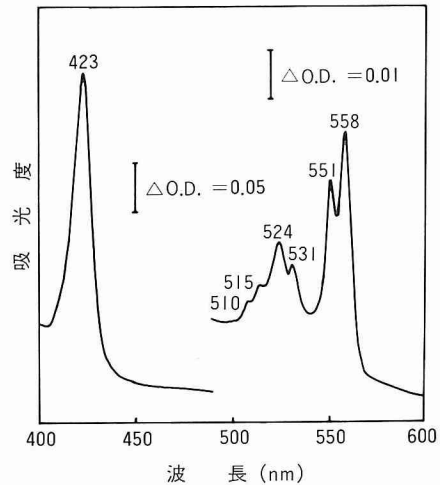


図3 テトラヒメナ・ミクロソームの精製チトクローム b_{560ms} の低温スペクトル

収極大を示し、ジチオナイト添加後の還元型では 560, 528, 425nm に吸収極大を示した。また 560nm の α 帯は 556nm に肩を持つ非対称形のピークである。一方、ラット肝のチトクローム b_5 は 556nm にピークを持ち、560nm に肩を有するスペクトルを示し、得られた b 型ヘムタンパクとは異なっている。さらにこの点は

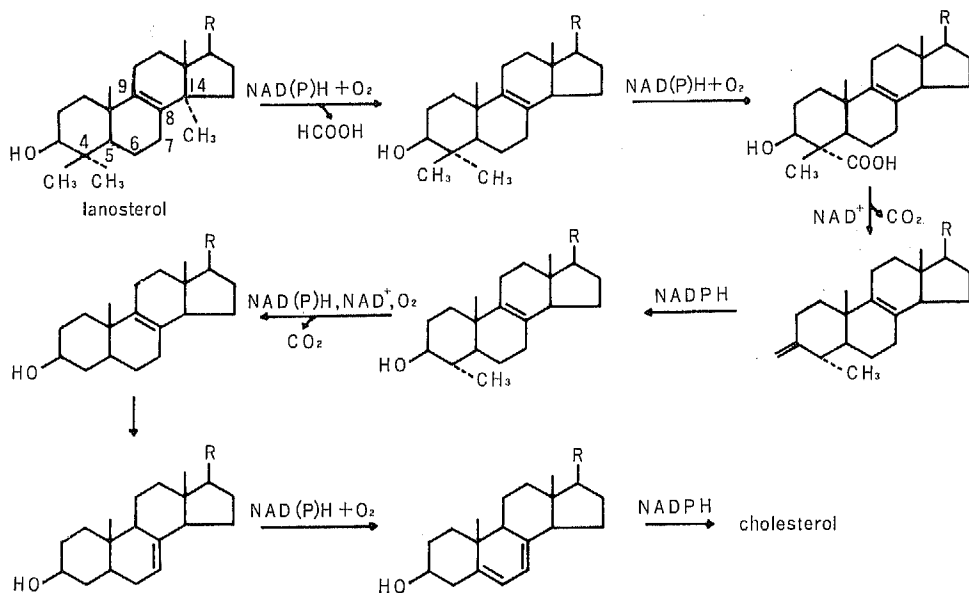


図4 lanosterol から cholesterol への変換経路

-190°における絶対スペクトルによって明確にされた(図3)。α帯が551と558nmの2つに分離され、肝や酵母のチトクローム b_5 にみられる二相性のピークとは若干異なっている。このヘムタンパクは酸性アセトンあるいはアルカリ性ピリジンでヘムが抽出されるためc型でなくb型ヘムタンパクであることが確認された。さらに原子吸光スペクトルによってチトクローム1分子に鉄1分子が含まれていることが明らかとなった。ラット肝のチトクローム b_5 の酸化還元電位(E'_0)は+20mVであるが、テトラヒメナでは-42mVであった。ラット肝ミクロソームから精製したNADH-チトクローム b_5 還元酵素の存在下でNADHによってこのチトクロームが還元されることから、得られたb型ヘムタンパクは、ミクロソーム不飽和化反応系の構成成分の1つであることが推測される。したがって以上の結果から、この新しいヘムタンパクをチトクローム b_{560ms} と命名した²⁹⁾³⁰⁾。

その他の電子伝達系成分として、NADPH-チトクロームc還元酵素もテトラヒメナ・ミクロソームから精製された³¹⁾³²⁾。約1,000倍にまで精製され SDS-PAGE ではほぼ70,000の分子量と推定される。この酵素はFADとFMNを含有し、PCMBや塩化第二水銀によって阻害された。したがってラット肝ミクロソームにおけるNADPH-チトクロームc還元酵素と類似した

性質を示している。肝ミクロソームのNADPH-チトクロームc(チトクロームP-450)還元酵素はNADPHによるチトクロームP-450の還元を触媒する酵素であり、分子量は約80,000のフラビンタンパク質である³³⁾。一方、NADHから電子を供与されるNADH-フェリシアン化カリウム還元酵素は肝ミクロソームから精製され、FADを含むフラビンタンパク質であるが、テトラヒメナのミクロソームからはまだ得られていない。いずれにしても、脂肪酸の不飽和化反応に関与した重要な電子伝達系成分の1つである。

B ステロール

原核生物はステロール合成系を持たないが、コレステロール(高等動物)、エルゴステロール(酵母)、トリテルペノイド(原生動物)、スチグマステロール(高等植物)等は膜構成成分として重要であり、また膜の物理的状態に大きな影響をおよぼしている。コレステロールはアセチル-CoAを出発物質とし、その間20数種の酵素反応を経て合成される。特にメバロン酸を生成するHMG-CoA reductaseの反応が合成系全体の律速段階となっており、リン酸化-脱リン酸化による制御³⁴⁾や、フィードバック的な制御によって微妙に調節されている。一方、ラノステロールからコレステロールへの合成系にはミクロソームの電子伝達系に依存した反応がいくつか知られている。図4に示すように、

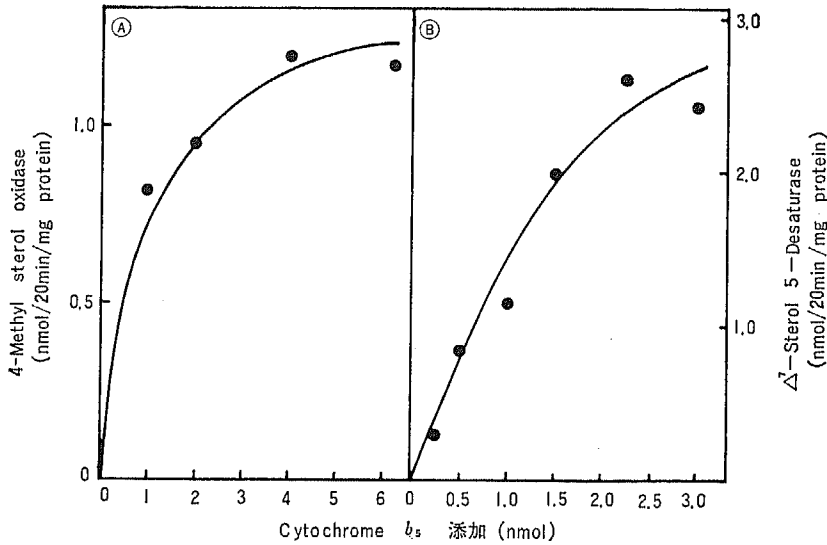


図5 Cytochrome b_5 添加による methyl sterol oxidase および Δ^7 -sterol 5-desaturase

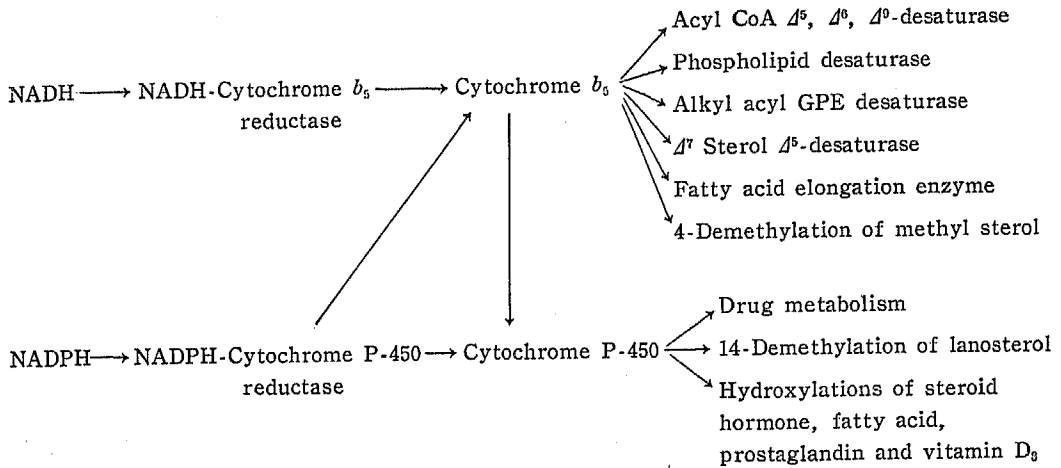
14位と4位のメチル基が順次脱離し、しかもこれらの反応が NAD(P)H と分子状酸素を要求することが報告されている。14位脱メチル反応が CO で阻害されるのに対して、4位脱メチル反応は CN で阻害されこの意味は14位の反応はチトクローム P-450の系で、一方、4位の反応はチトクローム b_5 -CSF 系によるものと推測される。酵母では動物と異なり最終生成物はエルゴステロールであり、しかも最後の数段階のみ異なっており、チモステロールに至るまでの経路は同一である。したがってステロール代謝の実験には非常に好都合であり、Aoyama と Yoshida³⁵⁾ は再構成実験により、チトクローム P-450が14位の脱メチル反応に関与していることを証明した。4位の脱メチル反応については、チトクローム b_5 依存性の反応であることを図5 Aに示す³⁶⁾。ラット肝ミクロソームを Renex 690 で可溶化後 DEAE-セルロースカラムで分画し、チトクローム b_5 を含まない部分精製標品にチトクローム b_5 を添加することによって4位脱メチル活性(4-MSO: Methyl sterol oxidase)が回復された。またトリプシン処理したミクロソームでは、チトクローム b_5 が5%以下に減少し、この処理ミクロソームにチトクローム b_5 を取り込ませると完全に4-MSOの活性が回復した。さらに、チトクローム b_5 の抗体によっても活性阻害が観察され、4位脱メチル反応はチトクローム b_5 依存性であることが証明された。14位や4位の脱メチル反応

以外に Δ^7 ステロールの不飽和化反応も同様にチトクローム b_5 依存性である。チトクローム b_5 抗体を用いた実験や、部分精製した画分にチトクローム b_5 を添加することによる活性の回復(図5 B) 実験³⁷⁾からも明らかである。Grinstead と Gaylor³⁸⁾ は Δ^7 sterol の不飽和化には NADH-チトクローム b_5 還元酵素が必要であると報告しているが、今のところ4位脱メチル反応と同一の電子伝達系酵素によるものかどうか明確ではない。一方、酵母を用いても同様な実験結果が報告されている³⁹⁾⁴⁰⁾。また、酵母より高等な原生動物のテトラヒメナ細胞にはステロール様物質のテトラヒメノールが含まれているが電子伝達系とこのトリテルペノイドの代謝との相関性については不明である。いづれにしても、比較生化学的観点から大変興味深い。

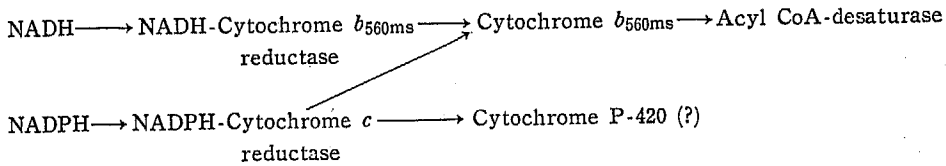
C 電子伝達系末端酵素の多様性

図6には肝およびテトラヒメナ・ミクロソームの電子伝達系を示した。テトラヒメナ・ミクロソームから精製されたチトクローム b_5 の生理機能については、脂肪酸の不飽和化反応に関与する以外はまったく不明である。現在かなり詳細に明らかにされているチトクローム b_5 を介した反応系についてまとめてみた。たとえば脂肪酸の不飽和化反応⁴¹⁾のほかにはプラズマローゲン生合成の最後の段階のアルキル基の α , β 不飽和化反応⁴²⁾、コレステロール生合成におけるB環の

生体膜脂質とミクロソーム電子伝達系



(A) 肝ミクロソーム



(B) テトラヒメナ・ミクロソーム

図6 肝およびテトラヒメナのミクロソーム電子伝達系

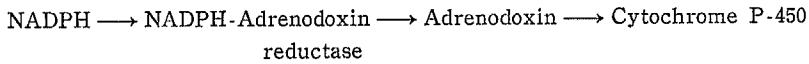


図7 チトクローム P-450 を含む副腎皮質ミトコンドリアの電子伝達系

Δ^5 不飽和化³⁸⁾⁴³⁾, ステロール中間体の4位メチルの酸化離脱反応³⁶⁾, マロン酸 CoA 依存の脂肪酸の鎖長延伸反応⁴⁴⁾などが挙げられる。これらの反応は末端酵素に電子が供与されて反応が成立する。したがってそれぞれの反応に応じた末端酵素が存在していると推測され、その多様性は今後さらに明らかにされるであろう。一方、チトクローム P-450は前述の14位脱メチル反応のほかに薬物代謝に関与する重要な機能を有している。チトクローム P-450は肝ミクロソームの還元型に CO を結合させることによって 450nm に特異な吸収スペクトルを示すヘムタンパクであることを Omura と Sato⁴⁵⁾が明らかにし、"P-450" と命名した。その後、チトクローム P-450は肝のみならず、腎、副腎、小腸粘膜、肺、皮膚、胎盤、卵巣などの各組織にも存在し、さらに植物や微生物にまで広く分布することが明らか

となってきた。我々もイソサフロール誘導チトクローム P-450を得ている⁴⁶⁾。ところで、テトラヒメナ・ミクロソームには CO と結合し、420nm に吸収極大を示すヘムタンパクが存在するけれども 450nm のピークは観察されておらず、このヘムタンパクがどのような生理機能を有しているのか現在のところ不明である。副腎皮質のミトコンドリアにもチトクローム P-450が存在し、肝ミクロソームとは異なった電子伝達系を示し(図7)、副腎皮質ステロイドホルモンの生合成に重要である。チトクローム P-450がアラキドン酸やプロスタグランジンの ω , ($\omega-1$) 酸化に関与していることはすでに知られているが、さらに NADPH と分子状態酸素の存在下にアラキドン酸の種々の炭素が水酸化され、エポキシドを生成しさらにジオールを生じることも報告されており、今後この分野でのチトクローム

P-450 の役割が明らかにされることは興味深い。

ており非常に興味深い。また、末端酵素の多様性に関しては今後の研究の発展が期待される。

V おわりに

生体膜脂質修飾のうち、特に脂肪酸を中心に述べ、さらにミクロソーム電子伝達系酵素について概説した。ミトコンドリアの電子伝達系は ATP を産生し、つまりエネルギー供給の場であるのに対し、ミクロソームの電子伝達系は多くの代謝系および生理機能に関与し

本稿の内容は岐阜大学医学部生化学教室および米国 Missouri 大学医学部生化学教室における研究を中心に概説したものであります。執筆する機会を与えて頂き、御校閲を賜りました当教室の支倉逸人教授に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 野沢義則：生体膜の流動性と機能。生化学, 47 : 52-82, 1975
- 2) Singer, S. J. : The molecular organization of membranes. *Annu Rev Biochem*, 32 : 805-833, 1974
- 3) Hirata, F. and Axelrod, J. : Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science*, 209 : 1082-1090, 1980
- 4) Michell, R. H. : Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta*, 415 : 81-147, 1975
- 5) Singer, S. J. and Nicolson, G. L. : Fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175 : 720-731, 1972
- 6) Sinensky, M. : Homeoviscous adaptation : A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 71 : 522-525, 1974
- 7) Marr, A. G. and Ingraham, J. L. : Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 84 : 1260-1267, 1962
- 8) Miller, R. W. and de la Roche, I. A. : Properties of spin labelled membranes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Biochim Biophys Acta*, 443 : 64-80, 1976
- 9) Fukushima, H., Martin, C. E., Iida, H., Kitajima, Y., Thompson, G. A. and Nozawa, Y. : Changes in membrane lipid composition during temperature adaptation by a thermotolerant strain of *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim Biophys Acta*, 431 : 165-179, 1976
- 10) Goni, F. M., Prado, A. and Millicua, J. C. G. : Influence of short-term thermal acclimation on the lipid composition of toad lungs and alveolar wash. *Comp Biochem Physiol [B]*, 69 : 9-13, 1981
- 11) Cherqui, G., Cadot, M., Senault, C. and Portet, R. : The lipid composition of plasma membrane and mitochondrial fractions from epididymal adipocytes of cold-acclimated rats. *Biochim Biophys Acta*, 551 : 304-314, 1979
- 12) Fukushima, H., Watanabe, T. and Nozawa, Y. : Studies on *Tetrahymena* membranes. *In vivo* manipulation of membrane lipids by 1-o-hexadecyl glycerol-feeding in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim Biophys Acta*, 436 : 249-259, 1976
- 13) McElhaney, R. N. : The effect of alterations in the physical state of the membrane lipids on the ability of *Acholeplasma laidlawii* B to grow at various temperatures. *J Mol Biol*, 84 : 145-157, 1974
- 14) Plachy, W. Z., Lanyi, J. K. and Kates, M. : Lipid interactions in membranes of extremely halophilic bacteria. I. Electron spin resonance and dilatometric studies of bilayer structure. *Biochemistry*, 13 : 4906-4913, 1974
- 15) Cossins, A. R. : Adaptation of biological membranes to temperature. The effect of temperature acclimation of goldfish upon the viscosity of synaptosomal membranes. *Biochim Biophys Acta*, 470 : 395-411, 1977
- 16) Aloia, R. C., Pengelley, E. T., Bolen, L. J. and Rouser, G. : Changes in phospholipid composition in hibernating ground squirrel, *Citellus lateralis*, and their relationships to membrane function at reduced temperatures. *Lipids*, 9 : 993-999, 1974

- 17) Thompson, G.A. and Nozawa, Y. : *Tetrahymena* : A system for studying dynamic membrane alterations with the eukaryotic cell. *Biochim Biophys Acta*, 472 : 55-92, 1977
- 18) Umeki, S. and Nozawa, Y. : Effects of sterol manipulation on microsomal desaturase activities in *Tetrahymena* : with regard to thermal acclimation. *Biochem Biophys Res Commun*, 113 : 96-101, 1983
- 19) Umeki, S., Fukushima, H., Watanabe, T. and Nozawa, Y. : Temperature acclimation mechanisms in *Tetrahymena pyriformis* : Effects of decreased temperature on microsomal electron transport. *Biochem Int*, 4 : 101-107, 1982
- 20) Fukushima, H., Nagao, S. and Nozawa, Y. : Further evidence for changes in the level of palmitoyl-CoA desaturase during thermal adaptation in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim Biophys Acta*, 572 : 178-182, 1979
- 21) Fukushima, H., Watanabe, T., Sasaki, N., Takeda, T. and Nozawa, Y. : Changes in microsomal hemoprotein content and glucose 6-phosphatase activity during low-temperature acclimation of *Tetrahymena pyriformis*. *FEBS Lett*, 161 : 261-264, 1983
- 22) Banno, Y. and Nozawa, Y. : Changes in particulate-bound protease activity during cold acclimation in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochim Biophys Acta*, 719 : 74-80, 1982
- 23) Goldman, S. : Cold resistance of the brain during hibernation: The role of stearyl CoA desaturase in brain and liver as the source for monoenes. *J Neurochem*, 30 : 397-400, 1978
- 24) Mendoza, D.D. and Cronan, J.E. Jr. : Thermal regulation of membrane lipid fluidity in bacteria. *Trends Biochem Sci*, 8 : 49-52, 1983
- 25) Fulco, A. J. : Metabolic alterations of fatty acids. *Annu Rev Biochem*, 43 : 215-241, 1974
- 26) Fukushima, H., Nagao, S., Okano, Y. and Nozawa, Y. : Studies on *Tetrahymena* membranes. Palmitoyl-coenzyme A desaturase, a possible key enzyme for temperature adaptation in *Tetrahymena* microsomes. *Biochim Biophys Acta*, 488 : 442-453, 1977
- 27) Oshino, N., Imai, Y. and Sato, R. : Electron-transfer mechanism associated with fatty acid desaturation catalyzed by liver microsomes. *Biochim Biophys Acta*, 128 : 13-28, 1966
- 28) Spatz, L. and Strittmatter, P. : A form of cytochrome b_5 that contains an additional hydrophobic sequence of 40 amino acid residues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 68 : 1042-1046, 1971
- 29) Fukushima, H., Umeki, S., Watanabe, T. and Nozawa, Y. : Purification and partial characterization of cytochrome b_5 from *Tetrahymena pyriformis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 105 : 502-508, 1982
- 30) Fukushima, H., Takeda, T., Sasaki, N., Watanabe, T. and Nozawa, Y. : Purification and characterization of microsomal cytochrome b_{560ms} from a unicellular eukaryote *Tetrahymena pyriformis*. *J Biol Chem*, 258 : 11991-11996, 1983
- 31) Fukushima, H., Takeda, T., Sasaki, N., Watanabe, T. and Nozawa, Y. : Immunochemical evidence for participation of NADPH-cytochrome c reductase in microsomal fatty acyl-CoA desaturation of *Tetrahymena* cells lacking in cytochrome P-450. *Biochem Biophys Res Commun*, 115 : 456-462, 1983
- 32) Fukushima, H., Takeda, T., Sasaki, N., Watanabe, T. and Nozawa, Y. : Isolation of detergent-solubilized NADPH-cytochrome c reductase from *Tetrahymena* microsomes, with regard to thermoadaptive regulation of fatty acyl-CoA desaturase activity. *Comp Biochem Physiol*, 78B : 855-858, 1984
- 33) Yasukochi, Y. and Masters, B.S.S. : Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c (cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J Biol Chem*, 251 : 5337-5344, 1976
- 34) Beg, Z. H., Stonik, J.A. and Brewer, H.B. Jr. : 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase : Regulation of enzymatic activity by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75 : 3678-3682, 1978

- 35) Aoyama, Y., and Yoshida, Y. : Interaction of lanosterol to cytochrome P-450 purified from yeast microsomes : Evidence for contribution of cytochrome P-450 to lanosterol metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*, 82 : 33-38, 1978
- 36) Fukushima, H., Grinstead, G.F. and Gaylor, J.L. : Total enzymic synthesis of cholesterol from lanosterol. Cytochrome b_5 -dependence of 4-methyl sterol oxidase. *J Biol Chem*, 256 : 4822-4826, 1981
- 37) Gaylor, J.L. Grinstead, G.F. and Fukushima, H. : Resolution and reconstitution of microsomal Δ^7 -sterol 5-desaturase and 4-methyl sterol oxidase of cholesterol synthesis from lanosterol. Abstracts XII International Congress of Biochemistry, p.348, 1982
- 38) Grinstead, G.F. and Gaylor, J.L. : Total enzymic synthesis of cholesterol from 4, 4, 14 α -trimethyl-5 α -cholesta-8, 24-dien-3 β -ol. Solubilization, resolution, and reconstitution of Δ^7 -sterol 5-desaturase. *J Biol Chem*, 257 : 13937-13944, 1982
- 39) Aoyama, Y., Yoshida, Y., Sato, R., Susani, M. and Ruis, H. : Involvement of cytochrome b_5 and a cyanide-sensitive monooxygenase in the 4-demethylation of 4,4-dimethyl-zymosterol by yeast microsomes. *Biochim Biophys Acta*, 663 : 194-202, 1981
- 40) Osumi, T., Nishino, T. and Katsuki, H. : Studies on the Δ^5 -desaturation in ergosterol biosynthesis in yeast. *J Biochem*, 85 : 819-826, 1979
- 41) Okayasu, T., Nagao, M., Ishibashi, T. and Imai, Y. : Purification and partial characterization of linoleoyl-CoA desaturase from rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 206 : 21-28, 1981
- 42) Paltauf, F., Prough, R.A., Masters, B.S.S. and Johnston, J.M. : Evidence for the participation of cytochrome b_5 in the plasmalogen biosynthesis. *J Biol Chem*, 249 : 2661-2662, 1974
- 43) Reddy, V.V.R., Kupfer, D. and Caspi, E. : Mechanism of C-5 double bond introduction in the biosynthesis of cholesterol by rat liver microsomes : Evidence for the participation of microsomal cytochrome b_5 . *J Biol Chem*, 252 : 2797-2801, 1977
- 44) Keyes, S.R., Alfano, J.A., Jansson, I. and Cinti, D.L. : Rat liver microsomal elongation of fatty acids. Possible involvement of cytochrome b_5 . *J Biol Chem*, 254 : 7778-7784, 1979
- 45) Omura, T. and Sato, R. : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 239 : 2370-2378, 1964
- 46) Fisher, G. J., Fukushima, H. and Gaylor, J.L. : Isolation, Purification, and properties of a unique form of cytochrome P-450 in microsomes of isosafrole-treated rats. *J Biol Chem*, 256 : 4388-4394, 1981

(60. 1. 14 受稿)