

ラット AFP の電気泳動法における不均一性について

江 原 朗*

Electrophoretic Variants of Rat α -Fetoprotein

Akira EHARA

Department of Biochemistry,
Hokkaido University School of Medicine,
Sapporo 060, Japan

It has been well documented that rat AFP is separated into two discrete fractions electrophoretically and by ion exchange chromatography and it is generally accepted that the two forms of AFP, "Slow" and "Fast" variants, have different charges and molecular sizes. In this paper, the molecular basis of electrophoretic variants of rat α -fetoprotein (AFP) was studied. Carbohydrate-free rat AFP was electrophoretically homogeneous. Stepwise conversion of molecular sizes by deglycosylation with glycopeptidase F and the specific activities of the variants of which sugar chains were radiolabelled suggest that "Slow" and "Fast" variants have two and one sugar chains per molecule, respectively.

Running title: Electrophoretic Variants of Rat α -Fetoprotein

Key Words: α -fetoprotein, Glycosylation, Glycopeptidase F

略語: AFP, α -fetoprotein; SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis

緒 言

α -フェトプロテイン (AFP) は、個体発生の時期にみられる主要な血清蛋白のひとつであり、主に胎児の肝臓および卵黄嚢で産生される¹⁾。AFP の産生は生後著明に減少するが、肝細胞癌や卵黄嚢癌では AFP が産生されるため、これらの疾患に罹患すると血中濃度の上昇が認められる。AFP 産生の増加が悪性腫瘍の発生と密接に関連していることは、疾患の診断に有用なだけでなく、発癌のメカニズムを理解するうえでも興味深いことである。しかし、AFP の生理的機能については詳細が知られておらず、脂肪酸結合能がある^{2,3)}ということ、また、齧歯類の AFP ではエストロゲン結合能がある⁴⁾ということが知られているにすぎない。

一方、AFP の物理化学的特性については様々な分析がなされてきた。これらの結果、AFP は比較

的均一な分子であるが、種によっては分子多様性が存在することが明らかになった。ラット AFP は、デンブゲル電気泳動⁵⁾、SDS 非存在下^{6,7)}または存在下⁸⁾でのポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動⁹⁾およびイオン交換クロマトグラフィー⁹⁾で2つの分画に分離され、それぞれ電気泳動における移動度の違いから、“Slow”および“Fast”と名付けられた⁶⁾。2つの分子種の間では電荷⁵⁻¹²⁾および分子量^{8,12-14)}が異なり、“Slow”および“Fast”の等電点は pH 4.76 および 5.05⁹⁾、分子量は 72.5 kDa および 69.5 kDa¹⁴⁾である。“Slow”と“Fast”の化学組成についてはいくつかの報告がなされているが、2つの分子種がなぜ生じるかということは一致した結論が得られていない。

N 端 1 番目から 18 番目までのアミノ酸配列は、“Slow”と“Fast”で一致するが、C 端では差異を認めるという報告がある¹¹⁾。また、“Slow”と“Fast”の糖の組成を調べてみても、差異がみられず、両者の分子量が 3 kDa 異なることを説明できない^{8,10,15)}。このため、“Slow”と“Fast”の違いはペプ

*北海道大学医学部生化学第一講座
(主任：西信三教授)

チド部分の違いであると推論された。しかし、C端のアミノ酸は“Slow”と“Fast”で同一であるという報告⁸⁾もある。さらに、“Slow”のシアル酸含有量は“Fast”の約2倍である⁷⁾とも報じられている。

一方、糖蛋白質の糖鎖の合成を阻害するツニカマイシンの存在下でラットの肝癌細胞を培養すると、この細胞から分泌された AFP は SDS-PAGE で均一なバンドを示す¹³⁾。また、糖鎖の結合がおこらないとされている大腸菌でラット AFP の cDNA を発現させると、均一な産物が得られる¹⁴⁾。さらに、糖鎖の結合がおこらない mRNA の無細胞蛋白合成系で産生された AFP も均一である¹⁵⁾。これらの事実は、糖鎖部分の違いによって“Slow”と“Fast”が生じることを示唆する。

本論文では、グリコペプチターゼ F による糖鎖の除去、糖鎖の放射標識およびツニカマイシンによる糖鎖の合成阻害を行い、ラット AFP の不均一性について検討を行った。その結果、不均一性の成因が AFP 上の存在する 2 カ所の糖鎖結合部位^{14,17,18)}に“Slow”では 2 本、“Fast”では 1 本の糖鎖が結合するためであるという結論を得た。

材料と方法

1) 試薬

³⁵S-メチオニン、³⁵S-システイン (1211Ci/mmol) は ICN 社、³H-マンノース (30Ci/mmol) は Amersham 社、ツニカマイシンおよびグリコペプチターゼ F はペーリンガーマインハイム社、アンホライン pH 4~6.5 は LKB 社、RPMI1640 培地およびウシ胎児血清は GIBCO 社、ダルベッコ変法イーグル培地は日本製薬のものをそれぞれ使用した。他の試薬の市販の特級品を使用した。

2) AFP の精製および“Slow”と“Fast”の分離

高 AFP 産生性の腹水肝癌 AH 66 株⁹⁾を呑竜ラット(日本ラット)に移植し、得られた腹水を AFP 精製の材料とした。精製は、ラット AFP に対するモノクローナル抗体、S2 を結合させた免疫吸着カラム^{6,14,19)}により行った。ラット腹水をカラムに通して AFP を吸着させ、洗浄後吸着した AFP を 0.1 M グリシン塩酸緩衝液 pH 2.1 で溶出した。培養液からの AFP の精製も同様に行った。

イオン交換クロマトグラフィーにより精製 AFP を“Slow”と“Fast”分離したが、ファルマシア社の Mono Q HR5/5 カラムで Wong ら⁹⁾の方法に準じて行った。20 mM モノエタノールアミン pH 9.5, 0.125 M 塩化ナトリウムの緩衝液で平衡化した Mono

Q カラムに AFP を吸着させ、0.125 M~0.375 M の塩化ナトリウム濃度勾配によって、“Slow”と“Fast”を分離溶出した。

3) グリコペプチターゼ F による消化²⁰⁾

25 μ g の AFP を 100 μ l の緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液 pH7.2, 50 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.2% SDS, 1% 2-メルカプトエタノール) に溶解し、1 分間 100°C で熱変性した。冷却後、1 unit のグリコペプチターゼ F を加え、37°C で 0~90 分間消化した。

4) AFP の標識

ウシ胎児血清を 10% に添加した RPMI1640 培地に、³⁵S-メチオニンおよび³⁵S-システインを終濃度 10 μ Ci/ml, AH 66 細胞を終濃度 1 \times 10⁶/ml となるように加え、37°C で 21 時間培養した。ツニカマイシン (終濃度 3 μ g/ml) の存在下で培養する場合には、標識化合物を加えずに 3 時間前培養を行い、その後上記と同様の培養を行った。

AFP の糖鎖を標識する場合には、³H-マンノースを終濃度 11 μ Ci/ml で加えたダルベッコ変法イーグル培地を用い、48 時間培養を行った。

5) 電気泳動法

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は、濃度 8% のゲルを用い、SDS の存在下²¹⁾または非存在下²²⁾で行った。蛋白染色にはクマシーブリリアントブルーを用いた。³⁵S-標識蛋白の検出はフルオートグラフィで行った。

ショ糖密度勾配等電点電気泳動²³⁾には LKB 社の 8101 カラム (110 ml 用) を使用した。アンホライン pH 4~6.5 を平均終濃度 1% で加え、700 V で 72 時間泳動した。

³H および³⁵S の放射活性はシンチレーションカウンターで測定した。ポリアクリルアミドゲル中の蛋白の放射活性の測定は、予めゲル断片を 50°C の過酸化水素水で分解して行った。AFP 定量は Mancini ら²⁴⁾の方法にしたがった。また、SDS-PAGE 後の“Slow”と“Fast”の蛋白量は、クマシーブリリアントブルーで染色後、600 nm の波長でデンシトメトリーを行って求めた。

結果

1) “Slow”と“Fast”の分離およびグリコペプチターゼ F による糖鎖の切断

ラット AFP の不均一性と糖鎖との関係を調べるため、“Slow”と“Fast”を分離し、ペプチド鎖と糖鎖との結合をグリコペプチターゼ F で切断して、

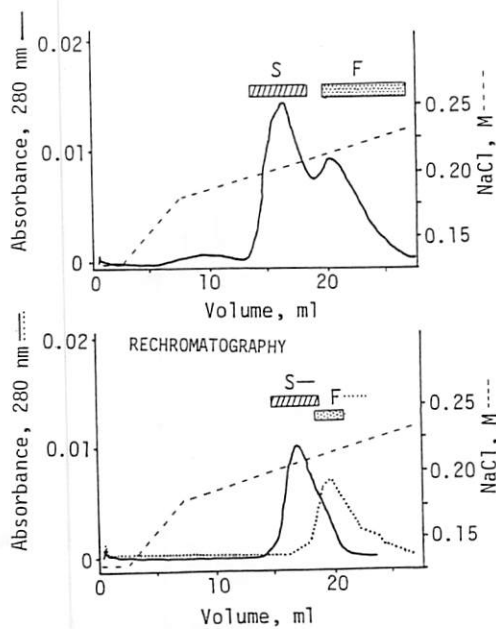


Fig. 1 Separation of "Slow" and "Fast" variants.

A: High-performance anion-exchange chromatography on a pre-packed HR 5/5 Mono Q column. S and F, "Slow" and "Fast" variants; buffer, 20 mM monoethanolamine pH 9.5+NaCl; flow rate, 1 ml/min.

(Upper): Purified AFP was separated into "Slow" and "Fast".

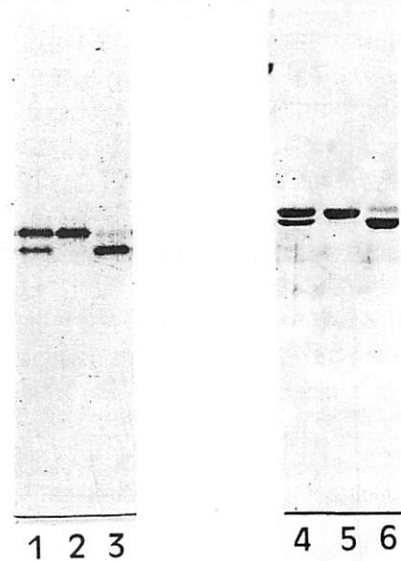
(Lower): The two fractions were rechromatographed, respectively.

経時的な分子量の変化を観察した。

イオン交換カラムによる"Slow"と"Fast"の分離を Fig. 1A に示す。20 mM モノエタノールアミン pH 9.5, 塩化ナトリウム 0.125 M~0.375 M の濃度勾配により溶出を行ったところ, 0.19 M をピークに"Slow"が, 0.21 M をピークに"Fast"が溶出された (Fig. 1A 上)。両者を同一条件でさらにリクロマトグラフィーで分離した (Fig. 1A 下)。リクロマトグラフィー後の PAGE を Fig. 1B に示す。"Slow" (lane 2, 5) は均一であったが, "Fast" (lane 3, 6) では若干の"Slow"の混入がみられた。

調製した"Slow"および"Fast"のグリコペプチダーゼ F による消化産物の分析結果を Fig. 2 に示す。消化の結果, 分子量 72.5 kDa の"Slow" (lane 3) は 69.5 kDa の中間体 (lane 6) を経て, 最終的に 66 kDa (lane 9) となった。一方, 分子量 69.5 kDa の"Fast" (lane 4) は消化されて同様に 66 kDa (lane

SDS (-) 2ME (-) SDS (+) 2ME (+)



B: Electro phoresis of rat AFP (lane 1, 4), "Slow" (lane 2, 5) and "Fast" (lane 3, 6) variants. Each sample was electrophoresed in a 8% polyacrylamide gel in the absence and presence of SDS and stained with Coomassie Brilliant Blue.

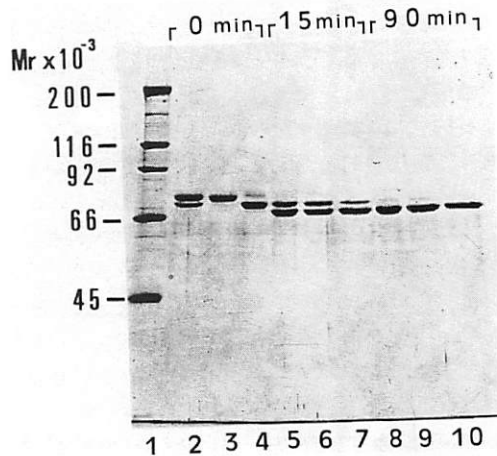


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of deglycosylated AFP. Electrophoresis was done in a 8% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue.

AFP (lane 2, 5, 8), "Slow" (lane 3, 6, 9) and "Fast" (lane 4, 7, 10) variants were electrophoresed before (0 min) and after partial (15 min) and complete (90 min) digestion with glycopeptidase F. Molecular size markers (lane 1) were myosin (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (92 kDa), bovine serum albumin (66 kDa) and ovalbumin (45 kDa).

10) となったが、中間体はみいだされなかった (lane 7).

“Slow”の中間消化産物の分子量が69.5 kDaで“Fast”の分子量と一致していること、また、“Fast”を消化しても中間消化産物が見られないことから、“Slow”には2本、“Fast”には1本の糖鎖が存在すると示唆された。

2) 糖鎖の放射標識

^3H -マンノースで糖鎖を標識した“Slow”と“Fast”の放射活性を比較した。

AH66細胞の培養上清より精製した標識AFP (2 μg)をSDS-PAGEで“Slow”と“Fast”に分離した (Fig. 3, lane 1).

染色後デンストメトリーを行ったところ、“Slow”および“Fast”の分画百分率は65%および35%であ

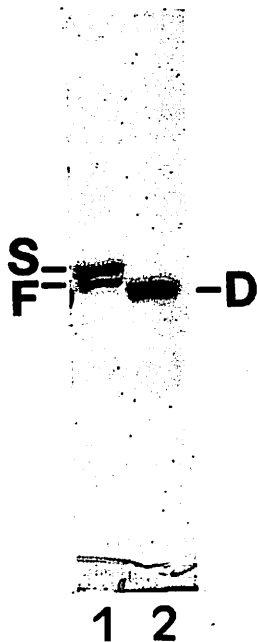


Fig. 3 Electrophoresis of the radiolabelled AFP. AFP radiolabelled with [^3H]mannose was electrophoresed in a 8% polyacrylamide gel in the presence of SDS before (lane 1) and after (lane 2) complete digestion with glycopeptidase F. The amounts of “Slow” and “Fast” variants were determined by the densitometry of the gel stained with Coomassie Brilliant Blue and their radioactivities were counted by the scintigraphy. S and F, “Slow” and “Fast” variants; D, deglycosylated AFP.

Table 1 Radioactivity of labelled AFP

	dpm	μg	dpm/ μg	dpm/ μg	Ratio (corrected)
“Slow”	713	1.3	549	484	2.07
“Fast”	209	0.7	299	234	1
Control	130	2	65	0	-

Control : Deglycosylated AFP

Radioactivities were measured 3 times for 10 minutes.

った。両者のアミノ酸組成には差異がないので^{8,10)}、色素結合能は等しいと思われる。したがって、“Slow”および“Fast”の蛋白量はそれぞれ1.3 μg および0.7 μg となる。また、“Slow”と“Fast”の放射活性を10分間、3回測定したところ、その平均値は713 dpmおよび209 dpmであった。対照として、グリコペプチターゼFで消化した標識AFP (2 μg , Fig. 3, lane 2)の放射活性を同様に測定したが、その値は130 dpmであった。蛋白1 μg あたりの放射活性を算出し、対照との差を求めたところ、“Slow”では484 dpm/ μg 、“Fast”では234 dpm/ μg となり、その比は2.07 : 1となった (Table 1)。ラットAFPには2種類の糖鎖がある¹¹⁾と知られているが、両者の構造は極めて類似しているため、この比は糖鎖の本数の比を表すと考えられる。したがって、グリコペプチターゼFによる消化実験とも考えあわせ、“Slow”には2本、“Fast”に1本の糖鎖があると結論した。

3) ツニカマイシンによる糖鎖の約成阻害

アスパラギン結合型糖鎖の合成を阻害するツニカマイシンの存在下でAH66細胞を培養し、産生されたAFPについてPAGE, SDS-PAGE, 等電点電気泳動を行った。また、グリコペプチターゼFで糖鎖を除去した上記のAFPと分子量を比較した。

PAGE, SDS-PAGEの結果をFig. 4に示す。ツニカマイシン存在下で産生されたAFP (lane 3, 6)は、処理しないAFP (lane 1, 5)のように2本のバンドに分離されず、1本のバンドを示すのみであった。また、グリコペプチターゼFで糖鎖を除去したAFP (lane 2, 4)とツニカマイシン存在下で産生されたAFP (lane 3, 6)とは同じ移動度を示し、分子量はともに66 kDaであった。

等電点電気泳動法においても、ツニカマイシン存在下で産生されたAFPは、2つのピークに分離されず、“Slow”や“Fast”よりもアルカリ側に1つのピークを示すのみであった (Fig. 5)。等電点は、

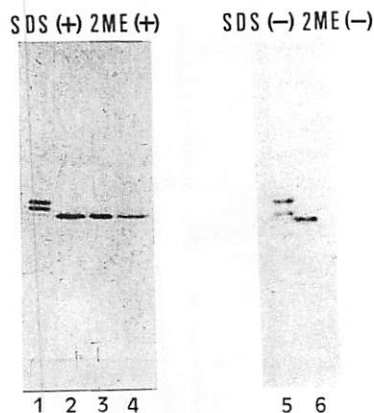


Fig. 4 PAGE analysis of carbohydrate-free AFP. AH66 cells were labelled with L- ^{35}S methionine and ^{35}S cysteine in the absence (lane 1, 2, 5) and presence (lane 3, 4, 6) of tunicamycin. AFP was purified from the culture media and incubated with (lane 2, 4) and without (lane 1, 3, 5, 6) glycopeptidase F (20 unit/ml) for 1 hour at 37°C. Each sample was electrophoresed in a 8% polyacrylamide gel in the presence and absence of SDS and radioactive protein bands were visualized by the fluography.

“Slow”と“Fast”がそれぞれ pH 4.76 および 5.05 であるのに対し、ツニカマイシン存在下で産生された AFP では pH 5.12 であった。以上のことから、ツニカマイシン存在下で産生された AFP は“Slow”や“Fast”とは異なること、また分子多様性を示さないことが明らかになった。

考 察

これまで、“Slow”と“Fast”の違いについては、ペプチド部分が異なる^{8,10,11})という説と、糖鎖部分が異なる^{13,14})という説があり、一致をみていなかった。

ペプチド部分が異なるという説の根拠としては、“Slow”と“Fast”でC端のアミノ酸が異なる¹¹)とい

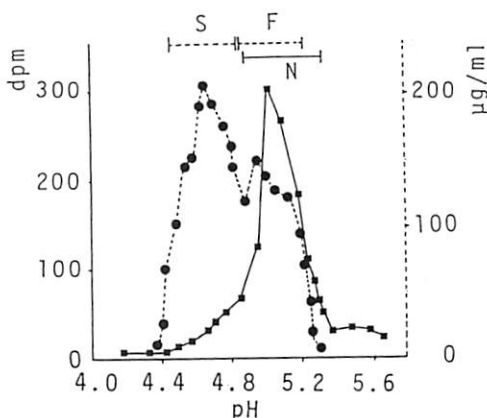


Fig. 5 Isoelectric focusing of carbohydrate-free AFP. Rat AFP (1 ml) and non-glycosylated AFP produced under the tunicamycin treatment (7680 dpm, 40 ng) were applied and run in a pH gradient from 4 to 6.5 for 72 hours at 700V and collected in 1 ml fractions. AFP was determined by the single radial immunodiffusion and scintigraphy. S and F, “Slow” and “Fast” variants; N, non-glycosylated AFP produced under the tunicamycin treatment.

うこと、“Slow”と“Fast”で糖の組成に差異がみられず^{8,10,15}), 両者とも1分子あたり2本の糖鎖を有する¹⁵)ということがあげられた。しかし、C端のアミノ酸については“Slow”と“Fast”で相違を認めないという報告⁹)もある。さらに、AFPの遺伝子はハプロイドあたり1コピー²⁵)であり、cDNAクローンも均一である^{14,17,18})。多様なスプライシングによって異なったAFPのmRNAができる²⁶)という報告もあるが、特別な場合に限られ産生されたタンパクも65 kDaであり“Slow”や“Fast”とは分子量が異なる。

本研究においては、糖鎖を除去した、または付着を阻止したAFPが電気泳動法で分析すると均一であった。また、糖鎖の標識実験から、“Slow”と“Fast”では糖の含有量が2倍異なることを明らかにした。この結果は、糖の含有量が同一である^{8,10,15})というこれまでの報告と相違する。これらの報告では、羊水由来のAFPを使用し、糖の分析も呈色反応およびガスクロマトグラフィーで行っている。しかし、羊水由来のAFPでも、肝癌AFPと同様に“Slow”と“Fast”が存在するので、結果の相違をAFPの採取材料の違いに求めることは難しい。また、分析方法の違いにより異なった結果が得られ

たとも考え難い。本研究では、糖鎖の除去実験および糖鎖の標識実験を通じて、“Slow”と“Fast”の糖の含有量に差異があることを示し、分子多様性は糖の含有量の違いによると結論した。

糖の含有量の違いは、おもに結合する糖鎖の本数によると考えられる。Bayardら¹⁵⁾により、ラットAFPの糖鎖構造が決定され、それによると2種類の糖鎖が存在する。それぞれの糖鎖は構造が極めて類似し、相違点はN-アセチルグルコサミンの含有量が1分子異なるだけである。分子量は2.2 kDa および 2.4 kDa で大差はない。したがって、“Slow”と“Fast”に同じ本数の糖鎖が存在するなら、糖鎖構造の違いだけで3 kDa の分子量の違いを説明することはできない。本研究では、グリコペプチダーゼFによる消化実験の結果、“Slow”は2段階に消化され、その中間産物の分子量が“Fast”と一致することが明らかになった。また³H-マンノースによりAFPの糖鎖を標識したところ、“Slow”は“Fast”の約2倍の放射活性を有していた。したがって、ラットAFPに存在する2種類の糖鎖の構造が極めて類似し、マンノース含有量にも違いがないことを考慮し、“Slow”には2本、“Fast”には1本の糖鎖が存在すると結論した。こう考えれば、3 kDa の分子量の違いは糖鎖1本分に相当し、1本の糖鎖の分子量が2.2 kDa および 2.4 kDa であるというBayardら¹⁵⁾の報告ともよく一致する。さらに、“Slow”のシアル酸含有量が“Fast”の約2倍であるという渡辺ら⁷⁾の報告とも矛盾がない。

ヒト²⁷⁾およびマウス²⁸⁾AFPについてもcDNAがクローンされ、アスパラギン結合型の糖鎖が結合できる配列²⁹⁾(Asn-X-Thr/Ser, XはPro, Aspを除くアミノ酸)がヒトAFPではAsn²³², ラットAFPではAsn⁹³, Asn²²⁹, マウスAFPではAsn²²⁷, Asn⁴⁷⁸の部分に存在することが明らかになった。糖鎖が1本しか結合できないヒトAFPでは均一であるのに対し、2本結合できるラットやマウスのAFPでは分子多様性がみられる^{12,14,30)}。ヒトAFPのAsn²³²には必ず糖鎖が結合しているとされている。一次構造の類似性²⁷⁾から、ラットAFPでは2つの糖鎖結合部位のうち、ヒトAFPのAsn²³²に対応するAsn²²⁹には必ず糖鎖が存在し、Asn⁹³には糖鎖が存在する場合としない場合がある可能性が高い。ラットAFPではAsn⁹³の近傍にS-S結合があり、糖鎖の結合がおこりにくいかもしれない。Asn-X-Thr/Ser(XはPro, Aspを除くアミノ酸)の配列が存在しても必ずしも糖鎖が付着するわけでは

なく、オバルブミンではこの構造が2か所(Asn²⁹³, Asn³¹²)存在するにもかかわらず、糖鎖が結合するのは片方(Asn²⁹³)のみである^{31,32)}。また、糖鎖が結合する部位でも、糖鎖が結合する分子としない分子が共存する例がIgG³³⁾, IgM³⁴⁾で知られている。そのほか、ヒトインターフェロン γ においても、2か所の糖鎖結合部位(Asn²⁵, Asn⁹³)のうち、Asn²⁵のみに糖鎖の結合する分子とAsn²⁵, Asn⁹³の両者に糖鎖が結合する分子が共存している²⁵⁾。

糖蛋白質における糖鎖の役割については、生物学的活性の発現に関与したり、蛋白分解酵素による消化から蛋白を防御したり、溶解度や安定性の増強に役立っている³⁵⁾ことが指摘されている。IgGでは抗原との結合には糖鎖の関与はないものの、Fcレセプターを介した補体の活性化には糖鎖の存在が必要である^{36,37)}。また、ヒト絨毛性ゴナドトロピンでは糖鎖がなくてもレセプターとは結合できるが³, ホルモン活性の発現には糖鎖の存在が必要である³⁸⁾。

ラットAFPの作用としては、エストロゲン結合能⁴⁾および脂肪酸結合能^{2,3)}が報告されている。特に、脂肪酸に関してはAFPが脂肪酸と複合体を形成し、AFPレセプターを介して様々な細胞により取り込まれていることが指摘されている³⁾。様々な糖蛋白質において、糖鎖が細胞への情報伝達や代謝に関与していることを考えると、AFPの糖鎖による分子多様性が何らかの機能的意義をもつ可能性も考えられよう。

結 語

電気泳動法におけるラットAFPの不均一性について検討すべく、2つの分子種“Slow”と“Fast”について、糖鎖の除去実験および糖鎖の標識実験を行った。また、ツニカマイシンによって糖鎖の合成阻害実験を行った。

この結果、“Slow”には2本、“Fast”には1本の糖鎖が存在するため、2つの分子種が生じるとの結果を得た。

謝 辞

稿を終るにあたり、ご指導を賜りました西教授に深謝いたします。また、ご助言をいただいた酒井助教授、梨本助手をはじめ生化学第一講座の皆様にご感謝の念を表します。

文 献

- 1) Ruoslahti, E. and Seppälä, M.: α -fetoprotein in cancer and fetal development. *Adv. Cancer Res.*, **29**: 275-346, 1979.
- 2) Parmelee, D. C., Evenson, M. A. and Deutsch, H. F.: The presence of fatty acids in human α -fetoprotein. *J. Biol. Chem.*, **253**: 2114-2119, 1978.
- 3) Uriel, J., Naval, J. and Laborda, J.: α -fetoprotein-mediated transfer of arachidonic acid into cultured cloned cells derived from a rat rhabdomyosarcoma. *J. Biol. Chem.*, **262**: 3579-3585, 1987.
- 4) Nunez, E. A., Benassayag, C., Savu, L., Vallette, G. and Delorme, J.: Oestrogen binding function of α_1 -fetoprotein. *J. Steroid Biochem.*, **11**: 237-243, 1979.
- 5) Wise, R. W., Ballard, F. J. and Ezekiel, E.: Developmental changes in the plasma protein pattern of the rat. *Comp. Biochem. Physiol.*, **9**: 23-30, 1963.
- 6) Watabe, H.: Purification and chemical characterization of α -fetoprotein from rat and mouse. *Int. J. Cancer*, **13**: 377-388, 1974.
- 7) Watanabe, A., Taketa, K. and Kosaka, K.: Microheterogeneity of rat α -fetoprotein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **259**: 95-108, 1975.
- 8) Kerckaert, J. P., Bayard, B., Debray, H., Sautière, P. and Biserte, G.: Rat α -fetoprotein heterogeneity: Comparative chemical study of the two electrophoretic variants and their *Ricinus* lectin-binding properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **493**: 293-303, 1977.
- 9) Wong, L. T., Xu, Z. J. and Hsia, C. J. C.: Fractionation of rat α -fetoprotein by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **341**: 452-456, 1985.
- 10) Kerckaert, J. P., Bayard, B., Quief, S. and Biserte, G.: Electrophoretic preparation of the two rat α -fetoprotein variants. *FEBS Lett.*, **53**: 234-236, 1975.
- 11) Peters, E. H., Lai, K. C. W., Hay, D. M. and Lorscheider, F. L.: N-terminal amino acid sequences and C-terminal residues of rat α -fetoprotein electrophoretic variants, 'Fast' and 'Slow'. *Scand. J. Immunol.*, **8**, Suppl. 8: 299-304, 1978.
- 12) Kerckaert, J. P., Bayard, B. and Biserte, G.: Microheterogeneity of rat, mouse and human α_1 -fetoprotein as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis and by crossed immunaffino-electrophoresis with different lectins. *Biochim. Biophys. Acta*, **576**: 99-108, 1979.
- 13) Mano, T. and Chou, J. Y.: Biosynthesis of α -fetoprotein in cultured hepatoma cells. *J. Biol. Chem.*, **257**: 5827-5830, 1982.
- 14) Nishi, S., Koyama, Y., Sakamoto, T., Soda, M. and Kairiyama, C. B.: Expression of rat α -fetoprotein cDNA in *Escherichia coli* and in yeast. *J. Biochem.*, **104**: 968-972, 1988.
- 15) Bayard, B., Kerckaert, J. P., Strecker, G., Dorland, L., van Halbeek, H. and Vliegenthart, J. F. G.: Structure determination of the carbohydrate chains of rat α -fetoprotein. *Eur. J. Biochem.*, **137**: 319-323, 1983.
- 16) 曾田光彦: ラット α -フェトプロテイン cDNA のクローニングとその大腸菌での発現. *北海道医誌*, **65**: 510-516, 1990.
- 17) Jagodzinski, L. L., Sargent, T. D., Yang, M., Glackin, C. and Bonner, J.: Sequence homology between RNAs encoding rat α -fetoprotein and rat serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 3521-3525, 1981.
- 18) Turcotte, B., Guertin, M., Chevrette, M. and Bélanger, L.: Rat α_1 -fetoprotein messenger RNA: 5'-end sequence and glucocorticoid-suppressed liver transcription in an improved nuclear run-off assay. *Nucleic Acids Res.*, **13**: 2387-2398, 1985.
- 19) Nishi, S. and Hirai, H.: Purification of human, dog and rabbit α -fetoprotein by immunoabsorbents of sepharose coupled with anti-human α -fetoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, **278**: 293-298, 1972.
- 20) Tarentino, A. L., Gómez, C. M. and Plummer, T. H., Jr.: Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry*, **24**: 4665-4671, 1985.
- 21) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685, 1970.
- 22) Davis, B. J.: Disc electrophoresis-II: Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404-427, 1964.
- 23) Vesterberg, O.: Synthesis and isoelectric fractionation of carrier ampholytes. *Acta Chem. Scand.*, **23**: 2653-2666, 1969.
- 24) Mancini, G., Carbonara, A. O. and Heremans, J. F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, **2**: 235-254, 1965.
- 25) Gal, A., Nahon, J. L., Gomez-Garcia, M., Tratner, I. and Sala-Trepat, J. M.: Organization of the albumin and α -fetoprotein genes in fetal and adult rat tissues, and rat hepatomas. *Differentiation*, **29**: 238-242, 1985.
- 26) Chou, J. Y. and Savitz, A. J.: α -fetoprotein synthesis in transformed fetal rat liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**: 844-851, 1986.
- 27) Morinaga, T., Sakai, M., Wegmann, T. G. and Tamaoki, T.: Primary structures of human α -fetoprotein and its mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 4604-4608, 1983.
- 28) Gorin, M. B., Cooper, D. L., Eiferman, F., van de Rijn, P. and Tilghman, S. M.: The evolution of α -fetoprotein and albumin: I. A comparison of the primary amino acid sequences of mammalian α -fetoprotein and albumin. *J. Biol.*

- Chem., 256: 1954-1959, 1981.
- 29) Kornfeld, R. and Kornfeld, S.: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 631-664, 1985.
- 30) Smith, C. J. P. and Kelleher, P. C.: Alpha-feto-protein molecular heterogeneity: Physiologic correlations with normal growth, carcinogenesis and tumor growth. *Biochim. Biophys. Acta*, 605: 1-32, 1980.
- 31) Sheares, B. T. and Robbins, P. W.: Glycosylation of ovalbumin in a heterologous cell: Analysis of oligosaccharide chains of the cloned glycoprotein in mouse L cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 1993-1997, 1986.
- 32) Sheares, B. T.: Site-specific glycosylation in animal cells: Substitution of glutamine for asparagine 293 in chicken ovalbumin does not allow glycosylation of asparagine 312. *J. Biol. Chem.*, 263: 12778-12782, 1988.
- 33) Savvidou, G., Klein, M., Horne, C., Hofmann, T. and Dorrington, K. J.: A nonoclonal Tmmunoglobul in Gln which some molecules possess glycosylated light chains: I. Site of glycosylation. *Mol. Immunol.*, 18: 793-805, 1981.
- 34) Anderson, D. R., Samaraweera, P. and Grimes, W. J.: Incomplete glycosylation of Asn 563 in mouse immunoglobulin M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116: 771-776, 1983.
- 35) Rinderknecht, E. O' Connor, B. H. and Rodriguez, H.: Natural human interferon- γ : Complete amino acid sequence and determination of sites of glyconylation. *J. Biol. Chem.*, 259: 6790-6797, 1984.
- 36) Tao, M. H. and Morrison, S. L.: Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG: Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J. Immunol.*, 143: 2595-2601, 1989.
- 37) Nose, M. and Wigzell, H.: Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 6632-6636, 1983.
- 38) Matzuk, M. M., Keene, J. L. and Boime, I.: Site specificity of the chorionic gonadotropin N-linked oligosaccharides in signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 264: 2409-2414, 1989.
- (1990年12月7日受付, 1990年12月28日受理)

* * *