

---

**総 説**

---

# HMG CoA レダクターゼによる コレステロール合成の制御

成 田 宏 史

Regulation of Cholesterol Biosynthesis by HMG CoA Reductase

Narita Hiroshi

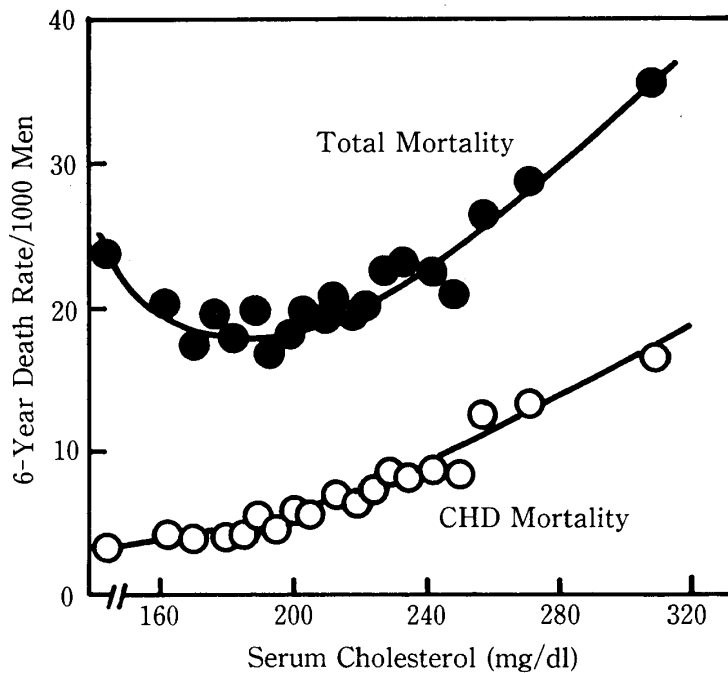
## はじめに

現在ではコレステロールと聞くと、その動脈硬化症との関連から生体にとっては“ワルモノ”であるというイメージを持っている人が多くなってきているようである。Fig. 1 はアメリカにおいて35才から57才の男性約36万人を6年間調査した結果得られた、血清コレステロール値と総死亡率並びに虚血性心疾患 (CHD) による死亡率との関係を見たものである<sup>1)</sup>。後者は明らかに 200 mg/dl あたりから立ち上がりを見せ、前述の見解が正しいことを証明している。しかし、総死亡率は 190 mg/dl あたりを極小とした下に凸のカーブを描き、高コレステロール血症の危険性と共に低コレステロール血症の危険性も示している。これを裏返せば、コレステロールは生体にとって必要な物質でありいわば両刃の刃的性格を持った化合物である事が分かる。また、その極小範囲の狭さは、生体はその量を厳密に制御しなければいけない、換言すれば、生体にはコレステロール含量の厳密な制御機構が存在する事を示している。

本総説ではコレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA レダクターゼ (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase EC 1.1.1.34, 以下 HMGR と略す) の制御機構をわかりやすく解説することを通じて生命の妙あるいはそれを明らかにせんとして進歩してきた生化学の流れ、現状を紹介できればと思っている。

## I. コレステロール代謝

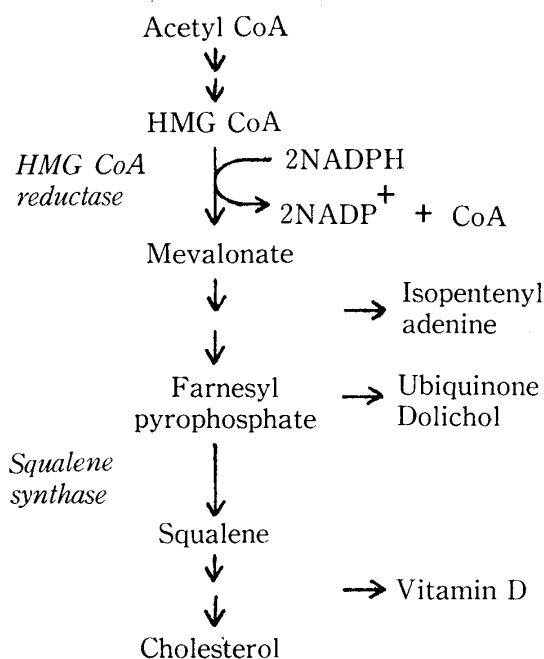
コレステロールは細胞膜の約50%を占める主成分であるのみならず、ステロイドホルモン、胆汁酸の前駆体でもあり、生体の構造及び生理機能上必須の化合物である。通常成人では1日当り最高約1gの食事性コレステロール(胆汁、消化管脱落細胞由来のコレステロールを含む)が小腸で吸収され、カイロミクロンと呼ばれるリポタンパク質(脂質とタンパク質の複合体で水に溶けにくい脂質の可溶化と方向付けをする運搬体)として門脈に分泌され肝臓に至る。肝臓に運ばれた食事性コレステロールのうち、肝細胞で利用されたものや胆汁酸に異化されたもの以外は VLDL (very low density lipoprotein) として循環系に放出され、各組織細胞に分配される。この際 VLDL は血流中で LDL (low density lipoprotein) に転換された後、各組織細胞表面に存在する LDL レセプターを介して細胞内に特異的に取り込まれる。一方 Fig. 2 にまとめたように、コレステロールはアセチル CoA を出発物質として10数段階の酵素反応をへて細胞内で合成される。これまで調べられた全ての動物細胞はこの経路を有しており、成人でその量は一日当り約1gである。従って、細胞は常に外因性コレステロール(カイロミクロンや LDL など)とバランスをとってコレステロール合成量を決定しなければならない。1950年代後半までの研究でコレステロール合成の律速段階が HMGR による HMG-CoA のメバロン酸への変換にあること



**Fig. 1** Age-adjusted 6-year coronary heart disease (CHD) and total mortality per 1000 men according to serum cholesterol<sup>19</sup>.

が明らかにされてきた。酢酸からの HMG-CoA の合成速度やメバロン酸からのコレステロール合成速度がコレステロールによってあまり影響を受けないにもかかわらず、HMG-CoA からのメバロン酸の合成速度は強い抑制を受けるからである。つまり、LDL レセプターを介した細胞内へのコレステロールの取り込みによりコレステロールの生合成が抑制される事になる。こ

のように生合成系の最終生成物はその系の初期反応を抑制する事は負のフィードバック制御と呼ばれている。Fig. 2 はさらに重要なことを示している。このコレステロール生合成経路の側鎖反応として、tRNA の構成成分であるイソペンテニルアデニンや呼吸鎖における ATP 合成に必須なユビキノン、ビタミン D、糖タンパク質合成に係わるドリコールなどの合成経路が位置している事である。つまり、HMGR によるメバロン酸合成の制御はコレステロール生合成のみならず他のいくつかの生体にとって極めて重要な化合物の合成量を制御している可能性があるからである。では HMGR はどのように制御されているのであろうか？ その前に HMGR 自体について理解しておく必要がある。



**Fig. 2** Biosynthetic pathway of cholesterol.

## II. HMG-CoA reductase

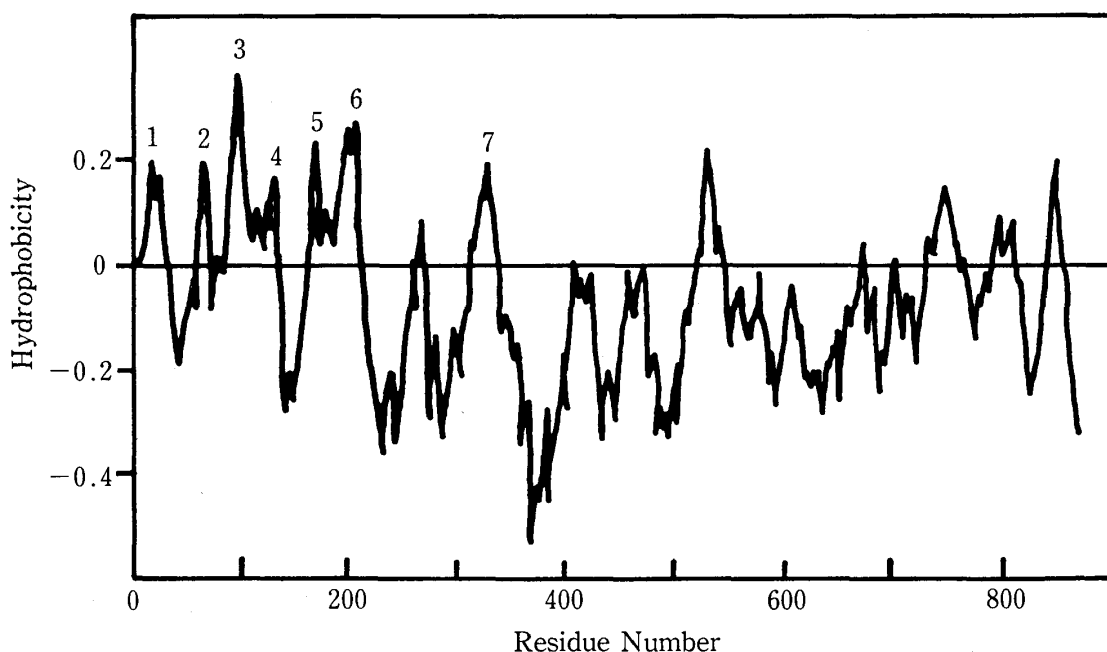
HMGR の重要性が1950年代に指摘されていたにもかかわらず、その実体が判明するまでには長い時間が必要であった。それは HMGR の存在量が少ないことに加えて、HMGR が細胞内の小胞体画分に存在する膜結合酵素であるため、その精製には膜からの可溶化が必要とされ困難を極めた。しかし、1976年遠藤ら<sup>20</sup>によって発見された HMGR の阻害剤 ML 236B (コンパクチン) の利用がその後の HMGR 研究を飛躍的に発展させることになる。

スタンフォード大学の Simoni ら<sup>3,5)</sup> とテキサス大学の Brown と Goldstein ら<sup>6)</sup> は、動物培養細胞を ML 236 B に馴化させることにより高濃度 ML 236 B 耐性株を樹立した。これらの細胞は ML 236 B による阻害に打ち勝つために、正常細胞に比べて100倍以上の HMGR を含むような能力を獲得したものであった。彼等はこれらの細胞を用いて HMGR がモノマー当り97キロダルトン (kD) の分子量を持つ高マンノース型の糖タンパク質であることを明らかにした<sup>7,8)</sup>。さらに、遺伝子工学的手法の導入により HMGR の mRNA に相補的な cDNA が単離され、その塩基配列が決定された<sup>9,10)</sup>。チャイニーズハムスター輸卵管 (CHO) 細胞由来の HMGR の場合<sup>9)</sup>、アミノ酸として887残基、推定分子量約 97 kD をコードする mRNA の全容がこうして明らかとなった。Fig. 3 はこのタンパク質のアミノ酸配列と各残基の近傍の疎水性度との関係を表している<sup>11)</sup>。N 末端側340番までに22~30残基からなる7つの疎水性の高い領域が連続しているのが特徴的である。この部分は一次構造上  $\alpha$ -ヘリックスをとりやすい。 $\alpha$ -ヘリックスが一回転あたり3.6残基5.4 Å であることを考慮すると、約 40 Å の生体膜を貫通するためには約26残基のアミノ酸が必要である。この値から、前述の7つの領域は小胞体膜を貫通している部分に相当していることが予想される。また、HMGR をタンパク質分解酵素の阻害剤なしで可溶化すると分子量約 52 kD の活性酵素が得られるが、これ

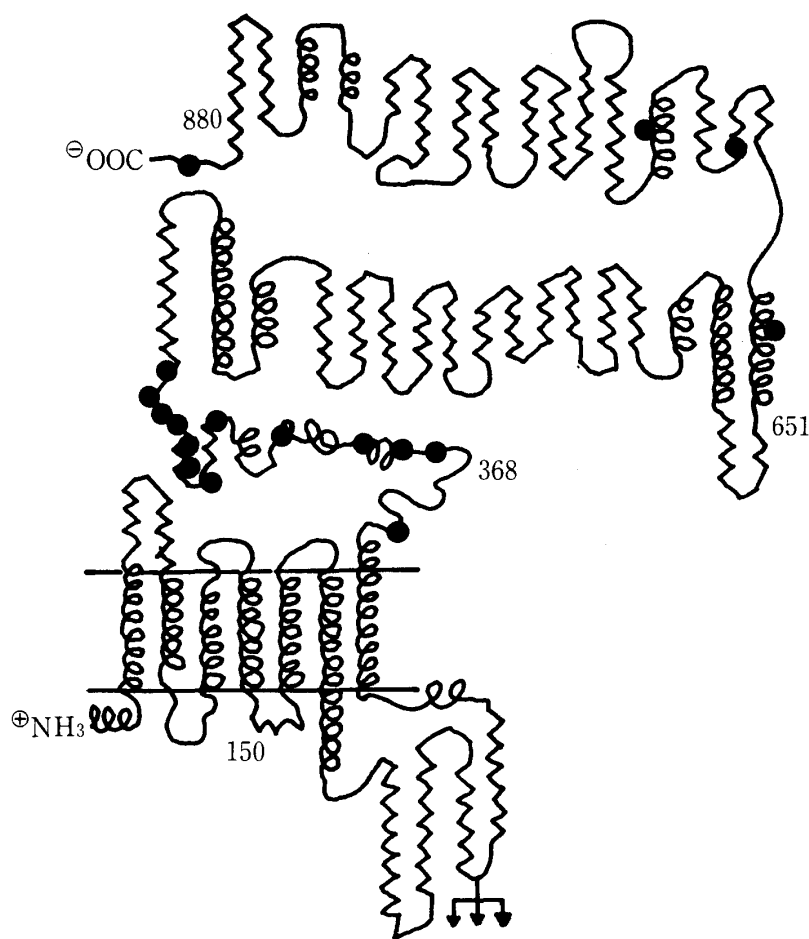
は HMGR の C 末端側の530残基に相当する。このほか、この親水性触媒部分が小胞体の細胞質側を、糖鎖は小胞体の内側を向いていることが明らかにされ、HMGR の構造が Fig. 4 のように推定された。又、HMGR タンパク質の N 末端のアミノ酸配列は遺伝子から予想される配列と同じであることから HMGR は一般の膜タンパク質とは異なり切断されるシグナル配列を持たない事も判明した。Table 1 にこの CHO 細胞由来の HMGR とシリアンハムスター<sup>10)</sup>、ヒト<sup>12)</sup> 由来 HMGR とのアミノ酸配列の相同性をまとめた。この場合、“タンパク質のアミノ酸配列は、種が近い程あるいは、機能的に重要な部分程進化の過程でよく保存されている”事が予想される。予想通り、全体で見るとハムスターどうしは極めて良く似ており、また種

**Table 1** Amino acids homology of different domains of Syrian hamster and Human versus Chinese hamster HMGR. Human HMGR has an additional amino acid in the linker domain. <sup>10~12)</sup>

Domain	Residue Number	Syrian Hamster	Human
Membrane	1-339	100%	98
Linker	340-448	85	77
Catalytic	449-887	99	95
Whole	1-887	98	93



**Fig. 3** Hydrophobicity plots of the amino acid sequence of HMGR. The 7 predicted membrane-spanning regions are numbered 1-7<sup>11)</sup>.



**Fig. 4** Topological model for HMGR in the membrane of the endoplasmic reticulum. The arrows indicate the carbohydrate chain. The 17 amino acid substitutions between the hamster lines are shown in closed circles<sup>9,10)</sup>

が違っても触媒部位は良く保存されている。膜部位と触媒部位のつなぎ部分では相同性が低く、シリアンハムスターの場合全体で17個の置換のうち13個がこの部位に集中しており (Fig. 4), この部分があまり重要でないことを推測させる。

一方、驚いたことに、膜部位はハムスターどうしでは全く同じであり、ヒトの場合も含めて触媒部位より高い相同性を示している。このことは膜部位が本酵素の機能上非常に重要な役割を果たしていることを示唆している (後述)。

### III. HMGR の制御機構

酸素反応速度は酵素量に比例する。細胞が酵素量を変動させる方法としては、酵素タンパク質の生合成速度を変化させる、分解速度を変化させる、の2通りがある。

ここではテキサス大学の Brown と Goldstein らのグループによって解明された HMGR の制御機構を中

心に解説する。因みに、彼等はコレステロール代謝に関する研究で1985年度のノーベル医学、生理学賞を受賞している。

#### 1) HMGR 生合成の制御

前述したように HMGR はコレステロールによって負のフィードバック制御を受けている。この現象は試験管内での HMGR 反応では見られない為、間接的な仕方である。

コレステロールを含まない脱脂血清中で培養した UT-1 細胞 (CHO 細胞由来の ML 236B 耐性高 HMGR 細胞) にコレステロール運搬体である LDL を加えると HMGR 活性が低下する。このとき同時に HMGR 自身の合成速度、さらに HMGR の mRNA 量も低下する<sup>13)</sup> (Fig. 5)。つまり、LDL (コレステロール) は HMGR 生合成を転写レベルで抑制している。従って、HMGR をコードしている DNA 部分にコレステロール量の増加により HMGR の転写を抑制する部分 (オペレータ) があることになる。彼等はこのオ

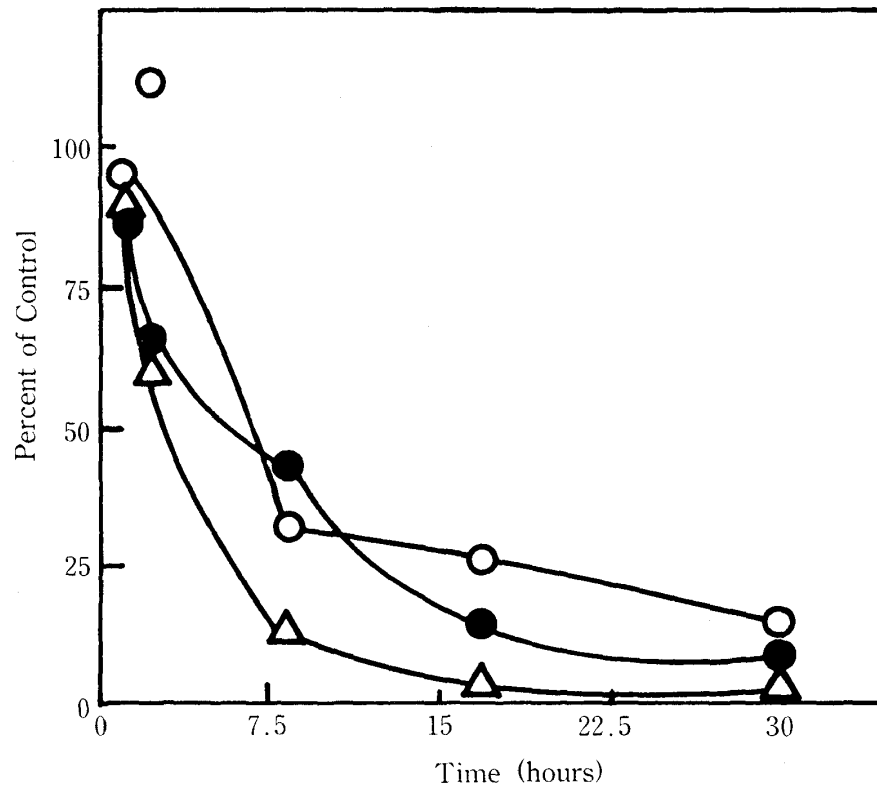
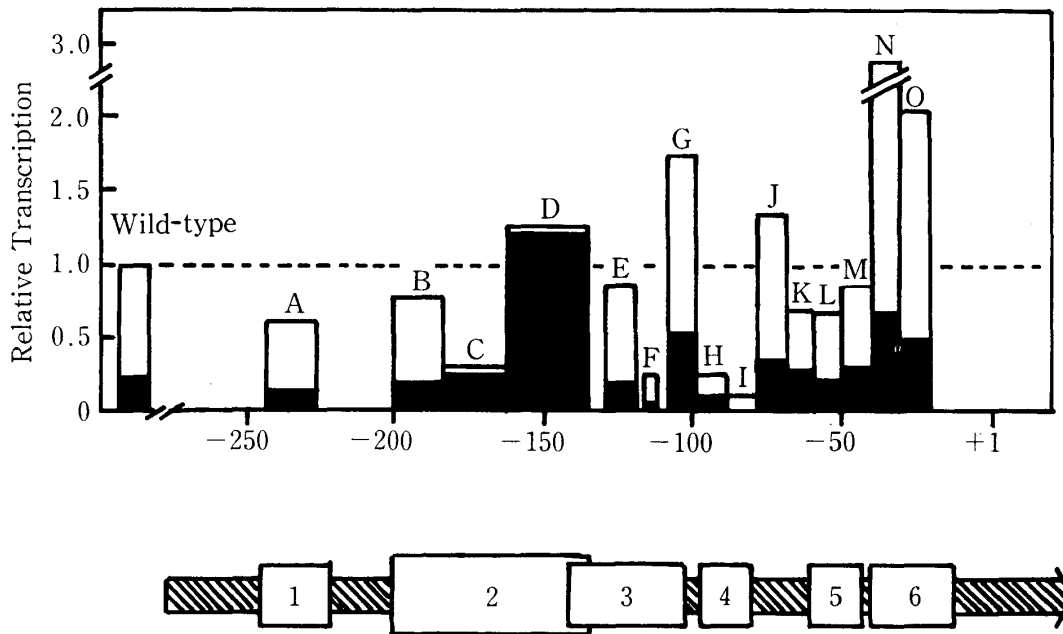


Fig. 5 Coordinate decrease in mRNA ( $\Delta$ ), synthetic rate ( $\circ$ ) and enzymatic activity ( $\bullet$ ) of HMGR after addition of LDL<sup>13)</sup>.

ペレーターの塩基配列を極めて巧妙な手段で同定した<sup>14)</sup>。Fig. 6 に示すように、彼等は HMGR 遺伝子の転写開始コドンより 5' 上流277塩基対の A~O のそれぞれ異なった部位に変異をもつ15個の変異プロモーターを作製し、これらをバクテリアのクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子のコード領域の上流につないだプラスミドを構築した。これらのプラスミドが CHO 細胞に導入され、このキメラ遺伝子の転写効率に対する培地へのコレステロールの添加の影響が調べられた。プロモーターが正常な場合、培地へのコレステロールの添加により約70%の転写抑制がみられる (Fig. 6, 左端)。C, F および H+I 部分の変異により転写活性が著しく低下する事から、これらの配列がプロモーター活性に重要であることが推察される。一方、D における変異はプロモーター活性に影響を与えないが、コレステロールによる転写抑制を完全に解除してしまう。次に D 部分の5' 側20塩基対をヘルペスウィルスのチミジンキナーゼのプロモーター部分に挿入し、先ほど同様 CAT 遺伝子につないで CHO 細胞に導入してやると、CAT の発現が培地へのコレステロールの添加によって抑制されるようになる。この様に、D 領域のこの20塩基対はオペレーターとしての必要十分条件を備えている。Fig. 6 の下部

に示したように、HMGR 遺伝子のこのプロモーター部分には6つのタンパク質結合サイトがあるが、Dの部分はその2番目とオーバーラップしている。そしてこのD領域における変異によりタンパク質結合活性も消失することが明らかにされた。さらにこのD領域中には、HMGR 同様コレステロールによってその転写が抑制される事が明らかとされている LDL レセプター遺伝子のオペレーター領域と8残基中7残基まで一致する部分がある<sup>15)</sup>。彼等はこの8残基配列  $\text{GTG}_C^C \text{GGTG}$  がコレステロール依存性転写抑制をつかさどるタンパク質の結合サイトであると推定している。現在この配列に結合可能なタンパク質が検索されているが、特異的なものはまだ発見されていない<sup>16)</sup>。

HMGR の生合成速度は翻訳段階においても制御されている。Peffley と Sinensky は HMG-CoA 合成酵素を欠損しているためにメバロン酸要求性である CHO 細胞を用いて、HMGR に対する培地への25-ヒドロキシコレステロールとメバロン酸の添加効果を調べた<sup>17)</sup>。25-ヒドロキシコレステロールのみの添加では、HMGR の活性、合成速度、mRNA 量はともに25%までしか低下しなかったが、25-ヒドロキシコレステロールをメバロン酸とともに添加すると、HMGR-mRNA 量の低下は同じであるにもかかわらず HMGR



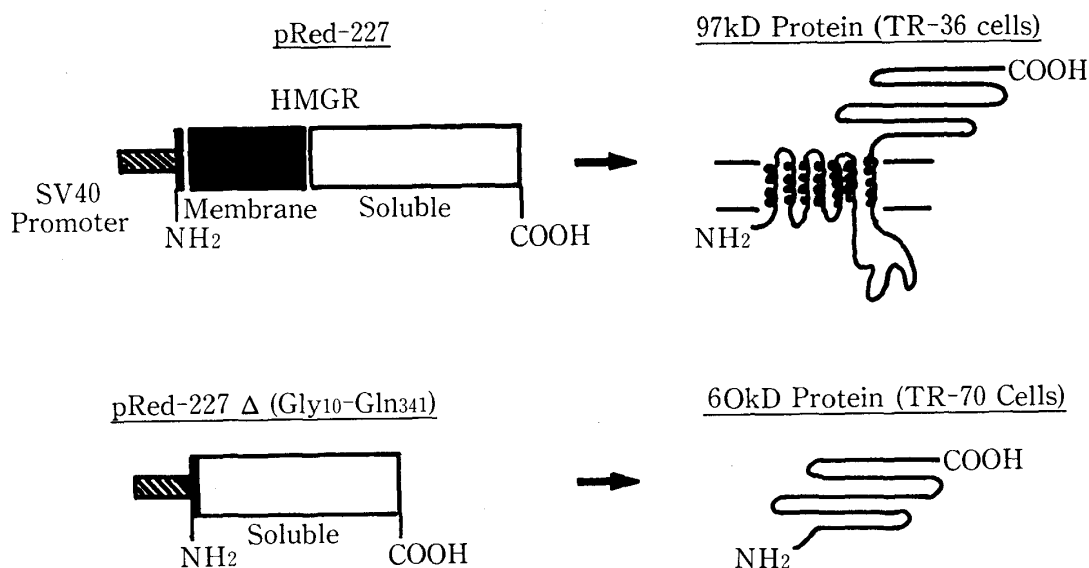
**Fig. 6** Relative transcription of plasmids driven by wild-type and mutant HMGR promoters in CHO cells in the absence (open bar) or presence (closed bar) of sterol. The horizontal axis indicates the location of each mutation in the reductase promoter sequence (+1 corresponds to nucleotide A of initiation ATG). All values are plotted relative to the transcriptional activity shown by wild-type HMGR promoter (very left). Six protein binding regions are shown at the bottom<sup>14)</sup>.

活性とその合成速度は2%まで低下した。すなわち、HMGR mRNA の翻訳がメバロン酸（あるいはそのコレステロール以外の代謝物）によって抑制されている事が判明した。非ステロール性メバロン酸代謝物による HMGR の制御に関しては後述する。

2) HMGR 分解の制御

HMGR 量は転写、翻訳レベルのみならず分解レベルでも制御を受けている。たとえば、小胞体酵素である HMGR の半減期はラット肝臓で2-4時間であるが、この値は他の小胞体のタンパク質の2日に比べて著しく短い<sup>18)</sup>。また UT-1 における HMGR の分解速度は LDL の培地への添加により数倍速くなる<sup>19)</sup>。一方、UT-1 の HMGR はクリスタロイドと呼ばれる特異構造をした小胞体に存在しているが、LDL を培地に加えるとクリスタロイドへのコレステロールの蓄積にともなってこの構造が崩れ HMGR も減少する<sup>20)</sup>。これらの結果から Brown と Goldstein らは“HMGR の膜部分がコレステロールと相互作用することによって HMGR の分解が制御されている”という作業仮説をたてた。前述したように、HMGR の膜部分のアミノ酸配列の著しく高い保存性はこの膜部分が極めて重要であることを示唆している (Table 1)。しかし、HMGR 量は生合成レベルで強い制御を受けている為、正常細

胞を用いて分解機構のみを解明することは不可能であった。そこで、彼等はまず CHO 細胞を変異剤処理し、HMGR 欠損細胞 UT-2 を樹立した<sup>21)</sup>。従って UT-2 はメバロン酸要求細胞である。つぎに simian virus 40 (SV 40) のプロモーターの下流に HMGR cDNA をつないだプラスミドを作製し、これを UT-2 に導入することにより、メバロン酸非要求性となった細胞 TR-36 を樹立した。さらに彼等は HMGR の膜部分を完全に欠損した cDNA を作製しこれを同様に UT-2 に導入して TR-70 という細胞を得た<sup>22)</sup>。TR-36, 70 の HMGR 遺伝子は SV 40 プロモーターにより支配されているためコレステロールによる転写抑制を受けないし、また TR-70 の HMGR は膜部部分を欠いているため分子量は 60 kD で小胞体ではなく細胞質に局在するはずである (Fig. 7)。これらの人工 HMGR 発現系はこのように設計され、事実分析の結果は予定通りであった。Fig. 8 は pulse-chase 実験により TR-36 と TR-70 における HMGR の分解速度を比較した結果である。TR-36 の完全 HMGRの方が TR-70 の膜欠損 HMGR より速く分解する上、その速度は培地へのステロールの添加によりさらに数倍加速される。膜欠損 HMGR の分解速度はステロールの影響を受けない。つまり、彼等の作業仮説の正当性

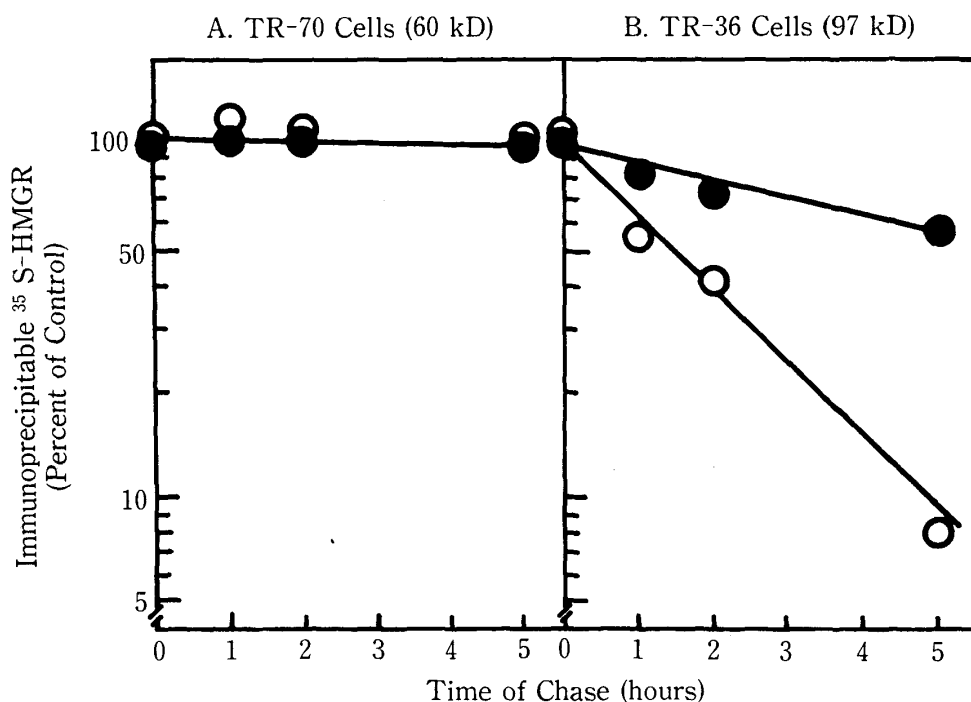


**Fig. 7** Structures of the two HMGR plasmids and the proteins that they encode<sup>22)</sup>. Plasmid pRed-227 encodes the entire 97 kD form of HMGR. Plasmid pRed-227 Δ(Gly<sub>10</sub>-Gln<sub>341</sub>) encodes a 60 kD form of HMGR in which the membrane-spanning domain has been deleted from the 97 kD HMGR.

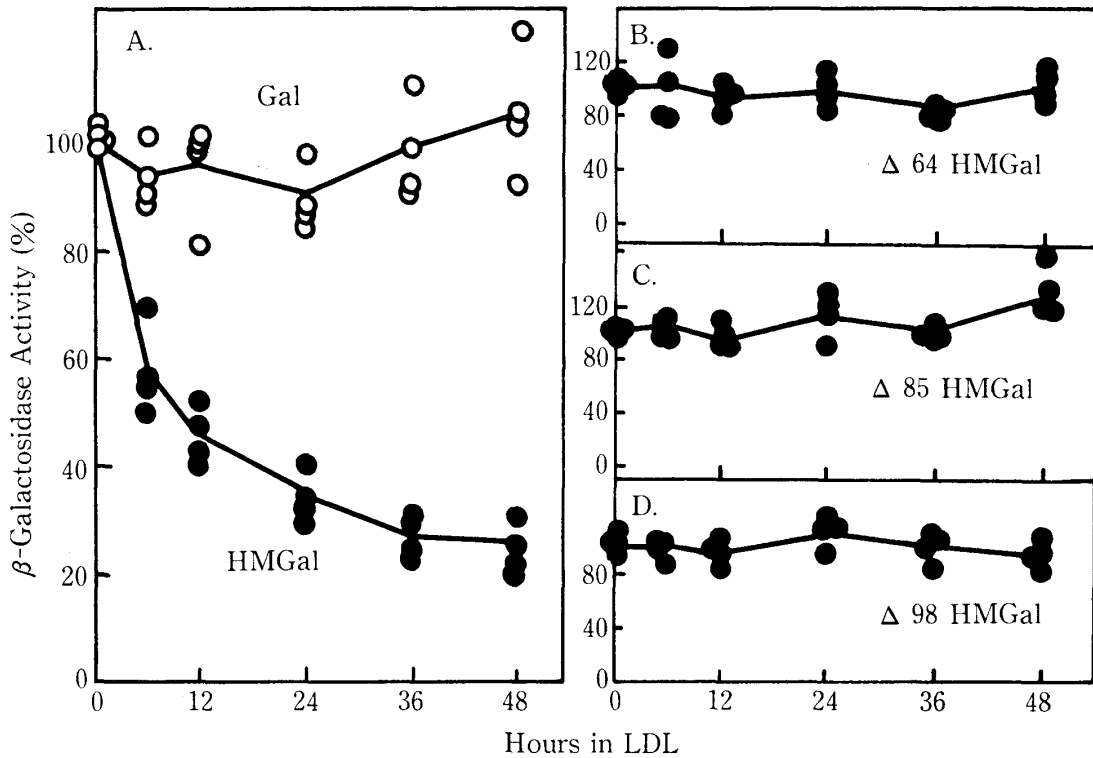
が証明された訳である。

HMGR の膜部分の重要性は別の方法を用いても明らかにされた。Simoni らは HMGR の膜部分をコードする塩基配列に大腸菌の β-ガラクトシダーゼの配列をつなぎ、これを SV 40 のプロモーターのもとに CHO 細胞に導入した<sup>23)</sup>。発現されたタンパク質は HMGR の膜部分 (36 kD) と β-ガラクトシダーゼ

(116 kD) のハイブリッド (152 kD) であり、名前も両者にちなんで HMGal と命名された。対照として CHO 細胞に導入された β-ガラクトシダーゼ (Gal) は可溶性画分の酵素であったが、HMGal は小胞体に局在していた。つまり、HMGR は切断されるシグナル配列を持たないことから、この膜部分が小胞体への酵素の局在化の情報を担っていることになる。さらに重



**Fig. 8** Effect of sterol on the turnover of <sup>35</sup>S-labeled HMGR in TR-70 cells (A) and TR-36 cells (B)<sup>22)</sup>. ●: no sterol, ○: +sterol

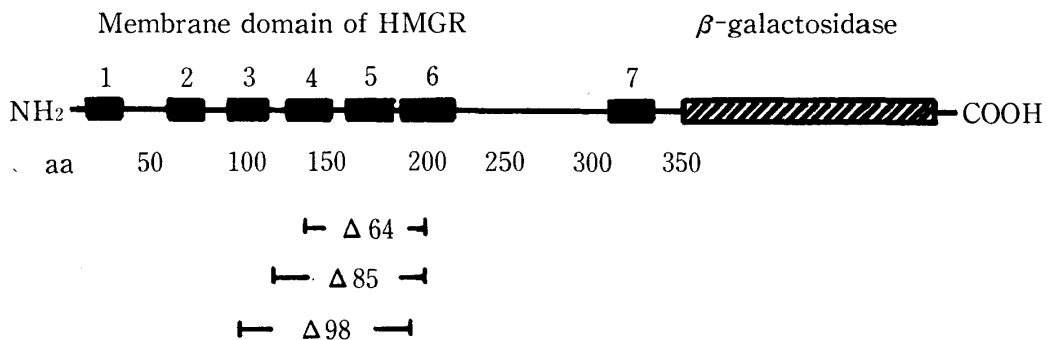


**Fig. 9** Suppression of  $\beta$ -galactosidase activity in cell lines expressing HMGal (●) or Gal (○) after addition of LDL<sup>23)</sup>.

要なことは、Gal 活性は培地への LDL の添加によって変化しないが、HMGal 活性は LDL の添加によって急速に低下した (Fig. 9A)。HMGal の転写は LDL の影響を受けない SV 40 のプロモーターによって支配されているため、この活性変化は HMGal の分解速度の上昇によるものと考えられる。このように、HMGR の膜部分がコレステロールによって制御される分解に必須であることは明白である。また、Fig. 10 のようにこの膜部分を一部欠損した HMGal を作製してみると、酵素の小胞体への局在は起こるが LDL による分解促進は起こらなくなった (Fig. 9 B, C, D)。即ち、HMGR の 6 番目までの膜部分のうち N 末端側

半分が酵素の局在性に関する情報を、C 末端側半分がコレステロールによる分解制御に関する情報を担っていることが明らかとなった。現在これらの領域をさらに詳細に同定する試みが続けられている。

Brown と Goldstein らは非ステロール性メバロン酸代謝物も HMGR の分解を促進することを明らかにしている<sup>24)</sup>。この場合も HMGR の膜部分が必須である事から、この分解制御は当初考えられていたような、HMGR の膜部分が小胞体膜のコレステロール含量を感知するといった単純な機構ではない事が判明した。さて、先に述べたように非ステロール性メバロン酸代謝物は翻訳レベルでの制御にも関与していた。Brown



**Fig. 10** Generation of deletions (64, 85, and 98 amino acids) in the membrane domain of HMGR. The numbered residues indicate the seven membrane domains<sup>23)</sup>.



と Goldstein らは HMGR がステロールおよび、非ステロール性メバロン酸代謝物の両方によって制御されていることを早くから指摘し、これを multivalent feedback regulation と呼んでいる<sup>25)</sup>。現在のところこの非ステロール性メバロン酸代謝物の実体は不明である。

Fig. 2 に示したように、HMGR 反応以降にはコレステロール合成の他イソペンテニルアデニン、ユビキノン、ドリコールといった重要な化合物の合成系が分岐している。これらの化合物はコレステロールが LDL によって細胞外から十分に供給される場合においてもやはり合成される必要がある。この場合、まずコレステロールによる HMGR 転写の抑制と HMGR 分解の促進により細胞内のメバロン酸あるいはそれ以降の代謝物濃度が低下する。しかし、これらの代謝物の1つあるいはそれ以上がすでにメバロン酸合成を HMGR の翻訳と分解レベルで抑制しているため、この濃度低下は抑制の解除をもたらし、系はメバロン酸合成に傾く事になる。この時もう一つ重要な事は、スクアレン合成酵素 (Fig. 2) も LDL により抑制される事である。従って、LDL 存在下で合成されたメバロン酸はコレステロール合成に流れる事なく有効に分岐鎖のほうに供給される事になる。まさに生命の妙と言わざるを得ない。

### 3) その他の制御機構

HMGR にはこれまで述べてきた量的な制御以外に、酵素の状態の変化による制御機構の関与が提唱されている。

HMGR が可逆的なリン酸化によって不活性型 (低活性型) に移行するという結果は *in vitro* においては

古くから知られていた<sup>26)</sup>。しかし、先にのべた量的変動が著しい事、またコレステロール投与前後の肝ミクロソームにおけるリン酸化 HMGR の割合が変化していない事<sup>27)</sup> から *in vivo* における重要性には疑問が持たれていた。これに対して Beg らは、ラットの胃へのメバロン酸の強制投与後20分で、肝 HMGR への <sup>32</sup>P の取り組みが1.5倍に増加すると共に、HMGR 活性が約40%低下する事、この活性の低下は試料をホスファターゼ処理した場合には認められない事、さらには、投与後60分で約80%の活性低下がみられるが、この低下はホスファターゼ処理した場合でも認められる事を明らかにした<sup>28)</sup>。したがって、HMGR のリン酸化-脱リン酸化による制御は量的制御に先行して起こっている可能性がある。Fig. 11 に現在彼等が提唱しているカスケードモデルをまとめた<sup>29)</sup>。メバロン酸 (あるいはコレステロール) 投与は HMGR キナーゼキナーゼを活性化すると同時に脱リン酸化系を抑制する。活性化されたキナーゼキナーゼは HMGR キナーゼをリン酸化して高活性型とする。これによりさらに HMGR がリン酸化され低活性型となる。同時に、脱リン酸化系の抑制は HMGR キナーゼを高活性型に、HMGR を低活性型に維持するように働き、メバロン酸ひいてはコレステロール生合成が抑制される事になる。現在のところメバロン酸あるいはコレステロールがどのような機構で HMGR キナーゼキナーゼやホスファターゼ系に作用しているかは不明である。

HMGR の分子量はモノマー当り 98 kD であるが、その機能的サイズは HMGR が膜酵素であり容易に凝集してしまう事から解析が困難であった。Ness らは放射線不活性化という特殊技法を用いてラット肝小胞

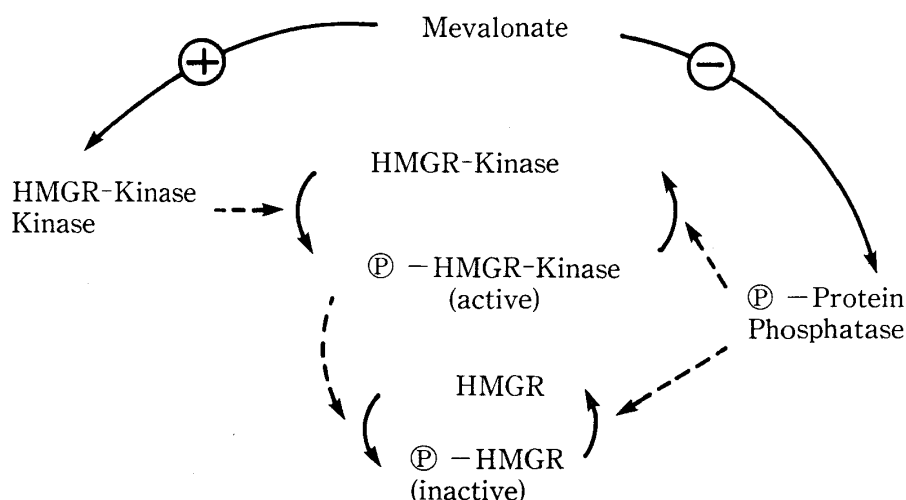


Fig. 11 Schematic representation of the mechanisms involved in the regulation of HMGR activity by phosphorylation-dephosphorylation<sup>29)</sup>. P: phosphorylated form.

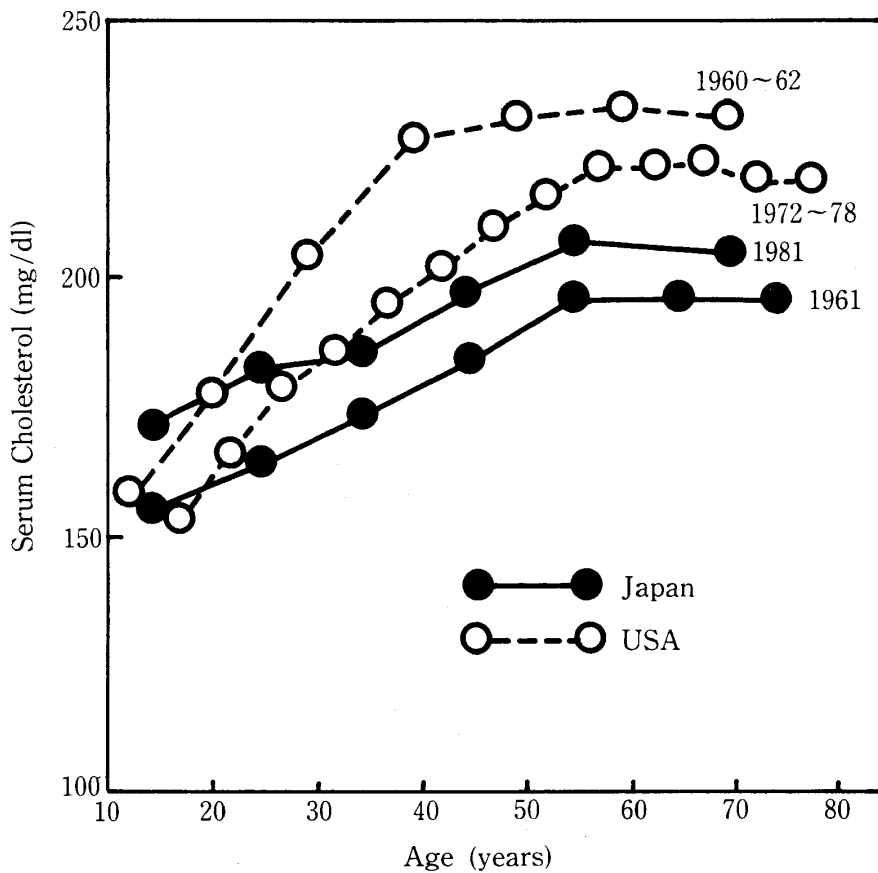


Fig. 12 Changes in the plasma cholesterol level in Japan and U.S.A.<sup>33)</sup>.

体における HMGR の機能的サイズを 100 kD と 200 kD と決定した<sup>30)</sup>。HMGR がモノマーとダイマーをとり得ることは速度論的にも示唆されている。低濃度 (4mM) のグルタチオンの存在下では HMGR は NADPH に対して Hill 定数  $n=2$  のシグモイダルな速度論を与えるが、高濃度 (25 mM) では  $n=1$  である<sup>31)</sup>。Hill 定数の変化は食事条件によってもみられ、肝 HMGR を強く誘導する (食事性コレステロールの取り込みを阻害する) と低グルタチオン濃度でも  $n=1$  に近づき、酵素の分子当たりの活性も強くなる<sup>30,32)</sup>。これらの結果は HMGR の *in vivo* におけるダイマーモノマー変換がコレステロールによって制御されている可能性を示唆している。膜部分を欠いた HMGR は NADPH に対して協働性を示さない ( $n=1$ ) 事から、膜部分が HMGR の可逆的凝集に必須であると考えられる。分解の制御との関連においても興味深い。

おわりに

以上、HMGR の制御機構を解説したが、著者の能力と紙面の都合上触れられなかったり説明不足なところが多々ある事をお詫びしたい。こうしてまとめてみる

と HMGR 研究は現在生化学で問題になっているかなりの領域に関係しており、また、Brown と Goldstein らの研究を見ていると、明らかに生化学が生命を受動的に分析する学問から能動的に解析する学問に変貌を遂げている事を感じざるを得ない。初めに述べたように本稿がその解説になれば幸いである。

最後に Fig. 12 に日本とアメリカにおける年齢別に見た血清コレステロール値の推移を示した。Fig. 1 と合わせて考えていただきたい。日本、特に若年層における血清コレステロール値の上昇が気になるところである。細胞レベルではコレステロール量は極めて巧妙に制御されていた。個体、集団レベルではどうであろうか。教育、栄養指導などいろいろな制御方法があるはずであり、また必要であろう。

文 献

- 1) M. J. Martin, S. B. Hulley, W. S. Browner, L. H. Kuller and D. Wentworth: *Lancet*, 2, 933 (1986)
- 2) A. Endo, M. Kuroda and K. Tanzawa: *FEBS Lett.*, 72, 323 (1976)
- 3) J. Ryan, E. C. Hardeman, A. Endo and R. D.

- Simoni: *J. Biol. Chem.*, **256**, 6762 (1981)
- 4) E. C. Hardeman, H. S. Jenke and R.D. Simoni: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 1516 (1983)
  - 5) D. G. Skalnik, D. A. Brown, P. C. Brown, R. L. Friedman, E. C. Hardeman, R. T. Shimke and R. D. Simoni: *J. Biol. Chem.*, **260**, 1991 (1985)
  - 6) D. J. Chin, K. L. Luskey, J. R. Faust, R. J. MacDonalds, M. S. Brown and J. L. Goldstein: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 7704 (1982)
  - 7) L. Liscum, K. L. Luskey, D. J. Chin, Y. K. Ho, J. L. Goldstein and M. S. Brown: *J. Biol. Chem.*, **258**, 8450 (1983)
  - 8) D. A. Brown and R. D. Simoni: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 1674 (1984)
  - 9) D. J. Chin, G. Gil, D. W. Russell, L. Liscum, K. L. Luskey, S. K. Basu, H. Okayama, P. Berg, J. L. Goldstein and M. S. Brown: *Nature*, **308**, 613 (1984)
  - 10) D. G. Skalnik and R. D. Simoni: *DNA*, **4**, 439 (1985)
  - 11) L. Liscum, J. Finer-Moore, R. M. Stroud, K. L. Luskey, M. S. Brown and J. L. Goldstein: *J. Biol. Chem.*, **260**, 522 (1985)
  - 12) K. L. Luskey and B. Stevens: *J. Biol. Chem.*, **260**, 10271 (1985)
  - 13) K. L. Luskey, J. R. Faust, D. J. Chin, M. S. Brown and J. L. Goldstein: *J. Biol. Chem.*, **258**, 8462 (1983)
  - 14) T. F. Osborne, G. Gil, J. L. Goldstein and M. S. Brown: *J. Biol. Chem.*, **263**, 3380 (1988)
  - 15) P. A. Dawson, S. L. Hofmann, D. R. van der Westhuyzen, T. C. Sudhof, M. S. Brown and J. L. Goldstein: *J. Biol. Chem.*, **263**, 3372 (1988)
  - 16) G. Gil, T. F. Osborne, J. L. Goldstein and M. S. Brown: *J. Biol. Chem.*, **263**, 19009 (1988)
  - 17) D. Peffley and M. Sinensky: *J. Biol. Chem.*, **260**, 9949 (1985)
  - 18) R. T. Shimke: in *Methods in Membrane Biology*, vol. 3, E. D. Korn, ed. (New York: Plenum Press) pp 201 (1975)
  - 19) J. R. Faust, K. L. Luskey, D. J. Chin, J. L. Goldstein and M. S. Brown: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 5205 (1982)
  - 20) L. Orci, M. S. Brown, J. L. Goldstein, L. M. Garcia-Segura and R. G. W. Anderson: *Cell*, **36**, 835 (1984)
  - 21) S. T. Mosley, M. S. Brown, R. G. W. Anderson and J. L. Goldstein: *J. Biol. Chem.*, **258**, 13875 (1983)
  - 22) G. Gil, J. R. Faust, D. J. Chin, J. L. Goldstein and M. S. Brown: *Cell*, **41**, 249 (1985)
  - 23) D. G. Skalnik, H. Narita, C. Kent and R. D. Simoni: *J. Biol. Chem.*, **263**, 6836 (1988)
  - 24) M. Nakanishi, J. L. Goldstein and M. S. Brown: *J. Biol. Chem.*, **263**, 8929 (1988)
  - 25) M. S. Brown and J. L. Goldstein: *J. Lipid Res.*, **21**, 505 (1980)
  - 26) Z. H. Beg, D. W. Allman, and D. W. Gibson: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1362 (1973)
  - 27) M. S. Brown, J. L. Goldstein and J. M. Dietschy: *J. Biol. Chem.*, **254**, 5144 (1979)
  - 28) Z. H. Beg and H. B. Brewer Jr.: *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **41**, 2364 (1982)
  - 29) Z. H. Beg, J. A. Stonik and H. B. Brewer Jr.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **81**, 7293 (1984)
  - 30) G. C. Ness, M. J. McCreery, C. E. Sample, M. Smith and L. C. Pendleton: *J. Biol. Chem.*, **260**, 16395 (1985)
  - 31) J. Roitelman and I. Scechter: *J. Biol. Chem.*, **259**, 870 (1984)
  - 32) J. Roitelman and I. Scechter: *J. Biol. Chem.*, **261**, 5061 (1984)
  - 33) H. Sekimoto: *Rinshoui*, **8**, 1416 (1982)