

動物細胞における細胞膜蛋白質の選別と局在化機構 ——肝細胞を中心に——

Sorting and topogenesis of cell membrane proteins in eukaryotic cells, especially in hepatocytes (3)

代表研究者	関西医科大学教授 Prof., Dept. of Physiology, Kansai Medical Univ. Yutaka TASHIRO	田代裕
協同研究者	関西医科大学助教授 Assoc. Prof., Dept. of Physiology, Kansai Medical Univ. Koichiro OMORI	大森浩一郎
	関西医科大学講師 Assist. Prof. of Physiology, Kansai Medical Univ. Hiroshi NAKADA	中田博*
	関西医科大学講師 Assist. Prof. of Physiology, Kansai Medical Univ. Akitsugu YAMAMOTO	山本章嗣
	関西医科大学助手 Assist., Dept. of Physiology, Kansai Medical Univ. Ryuichi MASAKI	榎木龍一
	関西医科大学助手 Assist., Dept. of Physiology, Kansai Medical Univ. Tamotsu YOSHIMORI	吉森保

Intracellular transport, processing, sorting and distribution in rat hepatocyte of the four membrane proteins—phenobarbital inducible cytochrome P-450 (P-450-(PB)), asialoglycoprotein receptor (ASGPR), (Na⁺, K⁺) ATPase and leucine amino peptidase (LAP)—were investigated; the former as a marker membrane protein of endoplasmic reticulum (ER) and the latter three as those of plasma membrane, and following results were obtained.

1) We asked whether P-450 (PB) is transported to the Golgi apparatus or not by combining biochemical and quantitative ferritin immunoelectron microscopic techniques. We found that P-450 (PB) was not detectable on the membrane of Golgi cisternae either when P-450 was maximally induced by phenobarbital (PB) treatment or when P-450 content in the microsomes rapidly decreased after cessation of the treatment. We suggest that when the transfer vesicles are formed by budding on the transitional elements of ER, P-450 is completely excluded from such regions and is not transported to the Golgi apparatus, and only the membrane proteins destined for the Golgi apparatus, plasma membranes and lysosomes are selectively collected and transported.

Then we asked where P-450 (PB) is degraded in rat liver. Autolysosomes, almost completely free from contamination by the other organelles such as ER, were prepared from leupeptin-treated rat livers. Quantitative immunoblot analysis showed that P-450 (PB) was found in large amounts

* 現, 京都産業大学国土開発研究所助教授

in the autolysosomes regardless of PB treatment, whereas hardly any P-450 (PB) was detected in the cytosol fraction throughout the experiment. Ferritin immunoelectron microscopy revealed directly that when the limiting membranes of the premature autolysosomes were partially broken, the smooth vesicles segregated within the autolysosomes were heavily stained with ferritin anti-P-450 (PB) conjugates. Thus, we could present convincing evidence that P-450 (PB) is transported to the autolysosomes to be degraded.

2) Rat asialoglycoprotein receptor (ASGPR) is composed of 43, 54, and 64 kilodalton (kd) components. Incorporation of ^3H -leucine into these forms showed that no precursor product relationship exists between the 54 kd and 64 kd forms. The half-life of the 43 kd for (25 h) was shorter than those of the 54 kd and 64 kd forms (66 and 70 h, respectively). Gel filtration analysis of the glycopeptides before and after endo H treatment revealed that they were all resistant to endo H, indicating that the three molecular forms contained only complex oligosaccharide chains. The receptor was prepared from rat livers previously treated with tunicamycin *in vivo* and subjected to SDS-PAGE. It was also immunoprecipitated from rat hepatocytes in primary culture previously labeled with ^{35}S -methionine and analysed by SDS-PAGE and fluorography. Our results indicate that the 43 kd form is synthesized as a 33 kd polypeptide, cotranslationally glycosylated to form the 41 kd component then processed to the final 43 kd form.

Phosphorylation of asialoglycoprotein receptor was investigated by using rat hepatocytes. Analysis of the purified receptor by SDS-PAGE and autoradiography revealed that the 64 and 54 kd polypeptides of the receptor were phosphorylated but the 43 kd one was not and that phosphorylation took place at the cell surface. These results are compatible with the fact that the 64 and 54 kd species exist predominantly at the cell surface. The sites of phosphorylation were identified as Ser and Thr with no detectable radioactivity in phosphotyrosine.

3) $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ was purified from rat renal outer medulla by concanavalin A- and wheat germ agglutinin-lectin Sepharose-affinity chromatography. The antibody, which was raised in rabbits, markedly inhibited ATPase activity. The endoplasmic reticulum (ER)-rich, and Golgi-rich subfraction were prepared from the rat kidney microsomal fraction by sucrose density gradient centrifugation. On the immunoblot, the molecular weight of the α subunit in both fractions was 95 kd; whereas, that of the β subunit was 50 kd in the ER-rich fraction and 54 kd in the Golgi-rich fraction. When treated with endo H, the 50 kd component was converted to 38 kd, but the 54 kd component was endo H resistant. These results suggest that the β subunit (38 kd) is glycosylated cotranslationally in the ER (50 kd) then is converted to the mature type subunit (54 kd) in the Golgi apparatus.

We have investigated the ultrastructural localization of the α subunit of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ in rat hepatocytes, exocrine pancreatic acinar cells and parotid gland acinar cells and found the subunit is exclusively localized on the basolateral surface of the plasma membranes.

研究目的

動物細胞の種々の細胞小器官に存在する膜タンパク質はすべてリボゾームで合成され、以後複雑な多段階的選別 (sorting) を受け、各々固有の場所に局在化していく。第1の選別は新生タンパク質のN末端に存在するシグナルペプチドによって規定され、シグナルペプチドが存在するとリボゾームは膜結合性となる。次に新生タンパク質に輸送停止シグナルが存在するとそれは小胞体に組み込まれて膜タンパク質となり、存在しないと小胞体腔に輸送されて分泌タンパク質、リソゾーム

タンパク質かまたは空胞系細胞小器官の内腔タンパク質となる。小胞体ではチトクローム P-450 のような小胞体標識膜酵素はここに止るが、他の膜タンパク質は選別されて Golgi 装置に輸送される (第3選別)。Golgi 層板間でも膜タンパク質は選別され、大部分の膜タンパク質はトランス側に輸送される (第4選別)。Golgi 装置のトランス側で膜タンパク質は再び選別され、リソゾーム膜タンパク質はリソゾーム膜へ、細胞膜タンパク質は分泌顆粒膜に入る (第5選別)。分泌顆粒は通常細胞膜の腺腔面に輸送されるが、一部は底側面に

輸送される(第6選別)。さらに細胞膜上で再循環する膜タンパク(例えば受容体膜タンパク質)と、細胞膜に定住する膜タンパク質が選別される(第7選別)。

このうち第1選別過程の分子機構は Blobel らによって解明され、第4選別過程でリソゾームタンパク質の選別はマンノース-6-リン酸によって行われているらしい。(Sly ら)。しかしそれ以外の選別過程がどのような機構によって行われているのかは全く不明である。本研究は細胞膜タンパク質のこのような選別と局在化の機構の解明を窮極の目的とするものである。

その第一歩としてフェノバルビタール(PB)誘導チトクローム P-450 (P-450 (PB)), アシアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR), $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase およびロイシンアミノペプチダーゼ(LAP)を選び、これらの膜タンパク質の主として肝細胞における細胞内輸送とプロセッシング、選別と細胞内局在について研究した。

本研究の発展として種々の細胞小器官、さらに動物細胞の構造形成や極性形成機構を分子レベルで解明することをめざしている。すなわち、細胞膜タンパク質の局在化機構の解明は動物細胞の組織構築、腺分泌や吸収といった細胞機能の発現、さらにはウイルスの細胞感染経路の決定などの問題とも深い関係を持ち、細胞生物学における重要研究課題の一つなのである。なお、発表論文の番号は文中に挿入した。

研究経過

まず第1段階として、上記4種膜タンパク質のラット肝細胞における局在を定量的に決定した。この決定には主として我々の教室で開発しつつある定量的免疫電顕法を用いた¹⁾。

次にこれら膜タンパク質の細胞内輸送過程とプロセッシングについて研究した。本報告では4種の膜タンパク質について、それぞれの肝細胞における局在について報告し、次に細胞内輸送過程とプロセッシングについて報告したい。これら膜タンパク質の選別機構については、「今後の課題と発展」の項で考察することとしたい。

研究成果

A. P-450 (PB)

A-1. P-450 (PB) の細胞内局在²⁾

我々はラット肝細胞で P-450 (PB) が膜結合リボソームで合成され、合成と同時に小胞体膜に挿入されることを見いだした(1976, 1979)。さらに P-450(PB) は小胞体膜と核膜外膜のみに存在することをフェリチン免疫電顕法で証明した(1978, 1981)。

問題は Golgi 体であって、Golgi 体に P-450 (PB) のような小胞体酵素が少量ながら存在するという可能性と、全く存在しない可能性の二つが考えられる。我々は定量的フェリチン免疫電顕法を用いてこの問題について詳細に検討し、その結果 P-450 (PB) は Golgi 体に全く存在しないことを証明した。すなわち、P-450 (PB) は Golgi 体のトランス側や中間部はもちろんのこと、シス側や、輸送小胞にも存在しない。

A-2. P-450 (PB) の分解とその輸送³⁾

P-450 (PB) は~20時間ほどの半寿命で代謝していることが知られている。もし P-450 (PB) が Golgi 体に輸送されぬとすると、小胞体→Golgi 体→リソゾームという輸送系を P-450 (PB) の分解に利用することは出来なくなる。我々は自己食食胞の中に P-450 (PB) が多量取り込まれるか否かを吟味した。すなわち、ラットに PB を3日間投与し、4日目にロイペプシンを投与し、3時間後に自己食食胞を単離し、イムノプロット法とフェリチン免疫電顕法で多量の P-450 (PB) の自己食食胞中に証明することが出来た(図1)。

我々は P-450 (PB) 以外に NADPH-cytochrome c 還元酵素、protein disulfide isomerase などの小胞体タンパク質をも自己食食胞中に証明している。これらの結果から、小胞体→自己食食胞という輸送系が存在し、この系が小胞体タンパク質の分解に重要な役割を果たしていることは確実と思われる。

B. アシアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR)

B-1. ASGPR の肝細胞内局在と細胞内輸送

ASGPR は血清中の ASGP と特異的親和性を示す清掃型受容体で肝細胞のみに存在する。我々

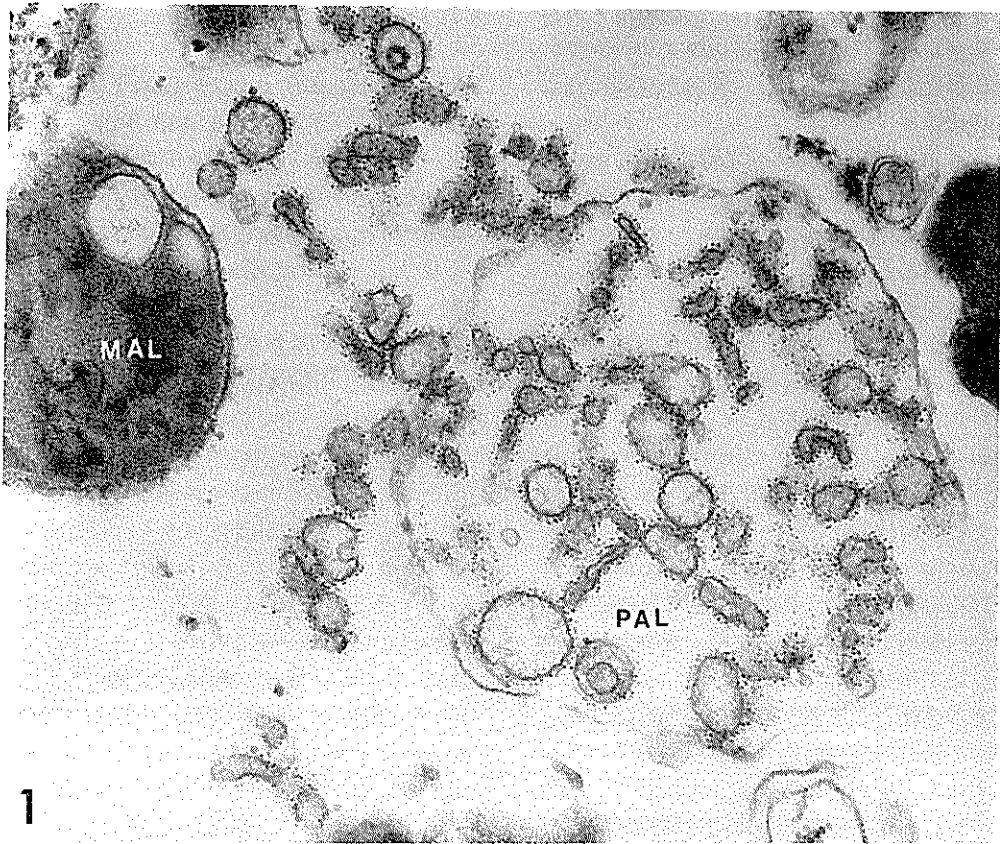


図1. 自己貪食胞のフェリチン免疫電顕法による P-450 (PR) の証明. 自己貪食胞 (PAL) 中に貪食された小胞体上にチトクローム P-450 が存在することをフェリチン免疫電顕法で証明した. MAL は成熟したリソゾームを示す. $\times 48,000$

は ASGPR は粗面小胞体で合成され (1981), 形質膜の底・側面のみにも局在することを定量的免疫電顕法で見いだした (1982)。したがって ASGPR は肝細胞の底・側面に存在する細胞膜標識タンパク質の一つであることは確実で, 形質膜タンパク質の極性に伴う選別機構を解明するために使用することが出来るであろう。

ASGPR の細胞内輸送 (1985) と糖鎖のプロセッシング (1984) についても既に報告したので省略する。

B-2. ASGPR の分子種と磷酸化⁴⁾

ところでラット肝 ASGPR に 43K, 54K, 64K の三つの分子種が存在することが Harford らによって見いだされ, また, Drickamer らは 54K

と 64K 成分の一次構造は相同性が高いが, 43K 成分とはかなり異なることを報告している。しかしこれら三者の相互関係は不明のままに止まっている。そこで ASGPR の細胞内輸送や選別とこれら三つの分子種との間の関係について研究し, 次の結果を得た。

1) [³H] ロイシンの取り込みから測定した生合成速度は 43K > 54K \approx 64K であり, また半寿命から測定した代謝回転速度は 43K (25h) < 54K (66 h) \approx 64K (70 h) であることが判明した。

2) ASGPR のグリコペプチドを調製し, endo H 処理前後にゲル濾過を行うことにより, いずれの成分も複合型糖鎖をもつことが判明した。43K 成分はこのほかに高マンノース型糖鎖を持って

らしく、endo H 処理により 33K と 37K 成分が出現した。

3) 43K 成分のプロセッシングを *in vivo* と初代培養肝細胞系を用いて解析した。その結果 *in vivo* のツニカマイシン処理では 33K と 37K 成分が出現し、また培養肝細胞では 43K 成分は endo H 感受性をもつ 41K 成分を含んでおり、後者は endo H 処理で 33K 成分となることが分かった。すなわち、43K 成分は粗面小胞体で 33K ポリペプチド鎖として合成され、合成と同時に糖鎖が付加され 41K となり、Golgi 装置で複合型糖鎖をもつ 43K 成分となるものと推定した。

4) 以上の研究から 43K, 54K, 64K の 3 成分のうち、少なくとも 43K 成分と 54K+64K 成分の 2 者は相互に独立して合成、分解されることが明らかとなった。

5) 次にラット肝 ASGPR のリン酸化について検討し、64K と 54K 成分のみがリン酸化されることが判明した。また 54K+64K 成分は細胞表面に存在するが、43K 成分は殆んど細胞表面に存在しないことも判明した。この事実から 64K, 54K 成分と 43K 成分は異なった機能をもっている可能性が示唆された。なおリン酸化を受けるアミノ酸は Ser, Thr であった。

B-3. アミロイド P 成分の生合成と分泌⁵⁾

ラット肝ミクロゾーム画分をトリトン X-100 で可溶化し、アシアロオロソムコイド・セファローズ親和クロマトグラフィーで精製すると ASGPR の 43K, 54K, 64K 成分のほかに ~30K 成分も検出された。これは当初新しい動物レクチンではないかと考えた (Nakada *et al.* J. Biochem., 94, 1689~1695 (1983))。しかし今回の研究でこれがラット肝アミロイド P 成分であることが判明した。この P 成分の生合成と分泌についても研究し、次の結果を得た。

1) 肝アミロイド P は 28K, 血清アミロイド P は 30.5K で、分子量的には少し差はあるが、免疫化学的には完全に交叉し、生合成では両者の間に前駆体→産物の関係を認めた。

2) 肝アミロイド成分はテレピン油処理で誘導され、mRNA 量は ~46 倍となった。

3) 粗面、滑面両小胞体およびシスゴルジ装置から調整されたアミロイド P 成分はすべて endo H 感受性をもつが、トランスゴルジ装置から調整した P 成分は部分的に endo H 抵抗性を示した。

4) 以上の結果から肝アミロイド P 成分は 26K ポリペプチドとして合成され、合成と同時に糖鎖が付加されて、28K 成分となり、Golgi 装置で 30.5K の複合糖鎖をもつ糖蛋白質にプロセスされ、血中に血清アミロイド P 成分として分泌されることが分かった。

C. (Na⁺, K⁺)ATPase

C-1. (Na⁺, K⁺)ATPase の細胞内局在

分泌腺上皮細胞における Na⁺, K⁺-ATPase の局在については、底・側面のみならず腺腔面にも存在するという説があり、一致をみていない。我々は犬またはラット腎より (Na⁺, K⁺)ATPase を精製し、この holo 酵素に対する抗体を作製し⁶⁾、局在を調べた。そして肝細胞 (1984)、耳下腺⁷⁾ならびに膵外分泌腺細胞腺房細胞⁸⁾については、底・側面のほか、腺腔面にも (Na⁺, K⁺)ATPase が存在するという結果を得た。

しかしその後我々の使用した抗体が腺腔面の何等かの成分と交差反応を示す可能性が出て来た。そこで holo 酵素に対する抗体をラット (Na⁺, K⁺)ATPase の α サブユニットに吸着し、 α サブユニットに対する特異抗体を調製し、この特異抗体を用い、 α サブユニットに対する抗体の局在を調べた。その結果 (Na⁺, K⁺)ATPase の α サブユニットについては、肝細胞、腎細尿管上皮細胞、耳下腺ならびに膵外分泌腺の腺房細胞のいずれにおいても、底・側面にのみ局在することが明らかにされた⁹⁾。

したがって分泌細胞と吸収細胞の区別なく、(Na⁺, K⁺)ATPase は一般的に底・側面だけに局在すると結論出来ると考えている。

C-2. (Na⁺, K⁺)ATPase の生合成とプロセッシング⁶⁾

ラット腎より holo (Na⁺, K⁺)ATPase の精製し、その家兎抗体を調製した。この抗体を用い、ラット腎における (Na⁺, K⁺)ATPase の生合成とプロセッシングについて研究し、次の結果を得

表1. 肝細胞膜上における膜タンパク質の極性分布の定量的免疫電顕法による測定.

タンパク質	A. 膜タンパク質の密度 (膜 1 μm 当たりのフェリチン粒子数)				B. 膜タンパク質の分布 (%)		
	類洞面	側面	毛細胆管面	クラスター形式	類洞面	側面	毛細胆管面
アシアロ糖タンパク質受容体	40.1	11.6	2.0	—	87.7	11.3	1.0
5'-ヌクレオチダーゼ (Na^+ , K^+) ATP アーゼ	5.6	2.1	20.1	+	50.0	8.4	41.6
ロイシンアミノペプチダーゼ	13.6	15.2	—	—	—	—	—
	0.1	0.3	60.4	—	0.8	1.0	98.2

た。

1) (Na^+ , K^+)ATPase の 95K α サブユニットは小胞体で -95K ポリペプチドとして合成され、以後細胞内輸送の過程で分子量は変化しない。

2) β サブユニットは 38K ポリペプチドとして粗面小胞体で合成され、合成と同時に糖鎖が添加されて高マンノース型糖蛋白質 (50K) となり、次いでゴルジ装置で 54K の複合糖蛋白質となることが判明した。

C-3. (Na^+ , K^+)ATPase のアセンブリと細胞内輸送

Na^+ , K^+ , -ATPase の α , β subunit の一次構造についてはすでに多くの動物種について明らかにされている。しかしながら α および β サブユニット間のアセンブリ、細胞内輸送、細胞内分布機構に関しては未解決の問題が多く残されている。我々は本酵素の α , β サブユニットのアセンブリと細胞内輸送について詳細に検討する目的で以下の様な実験を行なった。

クローニングしたラット β サブユニット cDNA を用い、その N 末端半分を pSVneo に挿入し、リン酸カルシウム法を用いてこれを Hela 細胞にトランスフェクトした。G418 でスクリーニングを行ない、薬剤耐性コロニーの中よりラット β サブユニットの N 末端半側の蛋白 (β_N) を発現しているクローンを単離した。この β_N と宿主 Na, K-ATPase とのアセンブリを解析した結果、 β_N は宿主 α および β とアセンブリしないことが明らかとなった。このことより、 α , β のアセンブリには β サブユニットの c 末端半側 (全部あるいは一部) を必要とすることが明らかにされた。現在、この β_N の細胞内局在様式を検討

している (大森ら、未発表)。

D. ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) の細胞内輸送と局在に関する研究¹⁰⁾

B. および C. において ASGPR と (Na^+ , K^+) ATPase が肝細胞膜の底・側面のみに存在することを示した。そこで次に肝細胞膜の腺腔面、すなわち、毛細胆管面のみに存在する膜タンパク質があるか否かを調べた。その結果 LAP (正確には aminopeptidase M または N) が毛細胆管面のみに局在することを見いだした。

LAP は Maroux らの方法により犬腎より精製し、家兎特異抗体を調製した。抗体の特異性は免疫沈降と western blotting 法によって確認した。犬肝細胞は松浦らの方法により単離し、定量的フェリチン免疫電顕法によって LAP の分布を解析し、次の結果を得た。

1) 犬腎培養細胞 (MDCK 細胞) の系を用い、LAP の生合成について調べた。LAP は 90K ポリペプチド鎖として合成され、小胞体で糖鎖の添加を受け 120K 成分となり、Golgi 装置で複合型に転換されて成熟型の 150K 成分となる。

2) 定量的フェリチン免疫電顕法で調べると、LAP はもっぱら毛細胆管面に局在し、類洞・側面には全く存在しないことが判明した。

今後の課題と発展

1) 細胞膜タンパク質の選別と局在化機構研究の第一歩はそれぞれのコンパートメントないしドメインに固有の膜タンパク質、すなわち標識膜タンパク質を見いだすことにある。その結果、小胞体膜については P-450 (PB) が、また形質膜の底・側面については ASGPR と (Na^+ , K^+) ATPase が、また腺腔面については LAP が優れ

た標識タンパク質であることを証明した。この他 5'-nucleotidase については形質膜の底・側面と腺腔面の両面に存在することを証明している (表 1)¹¹⁾。

2) 次の問題はこれらの膜タンパク質の細胞内輸送過程と輸送過程に伴うプロセッシングを明らかにすることが重要な課題となる。ASGPR とトランスフェリンについてはこの問題を詳細に検討し、N型糖鎖について GlcNAc₂-Man₈ が一般的な糖鎖構造であることを明らかにした (1983, 1984)。この Man₈ が何等かの選別シグナルとして働いている可能性が考えられるが、未だ実験的根拠はない。

3) 小胞体-Golgi 体間の選別シグナルとしては昨年 KDEL が保留シグナル (retention signal) として作用し、KDEL シグナルを C 末端に持たぬタンパク質のみが小胞体→Golgi 体に輸送される可能性が提案された (Munro & Pelham, 1987)。しかしながら esterase のように、明らかに KDEL シグナルを持たぬのに、小胞体に止るタンパク質もある。今のところ KDEL は選別シグナルの 1 つと考えた方がよさそうである。

現在、我々は Protein disulfide isomerase (PDI) を用いて小胞体→Golgi 体間輸送について研究しているが、小胞体→Golgi 体間で働く選別機構を解明するためにはより分子細胞生物学的アプローチの必要性を痛感している。

4) 形質膜の底・側面と腺腔面に輸送されるタンパク質の細胞極性に伴う選別については、現在のところ全く不明で、特にウィルス膜タンパク質を用いて研究が行われているのが現状である。この問題についてさらに多くの膜タンパク質の形質膜上における分布を決定し一次構造と選別との関係について分析を行いたい。同時により直接的な分子細胞生物学的なアプローチも極めて重要であると思われる。

文 献

- 1) 田代 裕, 山本章嗣 定量的免疫電子顕微鏡法序説 電子顕微鏡 21, 207~214 (1987).
- 2) A. Yamamoto, R. Masaki, and Y. Tashiro: Is cytochrome P-450 transported from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in rat hepatocytes? *J. Cell Biol.*, 101, 1733~1740 (1985).
- 3) R. Masaki, A. Yamamoto, and Y. Tashiro: Cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase are degraded in the autolysosomes in rat liver. *J. Cell Biol.*, 104, 1207~1215 (1987).
- 4) H. Nakada, T. Sawamura, T. Okumura, and Y. Tashiro: Three molecular forms of a rat asialoglycoprotein receptor. *J. Biochem.*, 99, 867~876 (1986).
- 5) H. Nakada, S. Matsumoto and Y. Tashiro: Biosynthesis and secretion of amyloid P component in rat liver. *J. Biochem.*, 99, 877~884 (1986).
- 6) M. Akayama, H. Nakada, K. Omori, R. Masaki, S. Taketani and Y. Tashiro: The (Na⁺, K⁺) ATPase of rat kidney: Purification, biosynthesis, and processing. *Cell Struct. Funct.*, 11, 259~271 (1986).
- 7) K. Tanaka, M. Akayama, A. Yamamoto, K. Omori and Y. Tashiro: Quantitative immunoelectron microscopic localization of (Na⁺, K⁺)ATPase on rat exocrine pancreatic cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 35, 675~682 (1987).
- 8) T. Iwano, M. Akayama, A. Yamamoto, K. Omori, T. Kumazawa, and Y. Tashiro: Quantitative immunoelectron microscopic localization of (Na⁺, K⁺)ATPase in rat parotid gland. *J. Histochem. Cytochem.*, 35, 871~879 (1987).
- 9) Y. Tashiro, K. Omori and A. Yamamoto: Absence of the α subunit of (Na⁺, K⁺)ATPase on luminal cell membranes. *J. Histochem. Cytochem.*, 36, 221~222 (1988).
- 10) K. Tanaka, K. Omori and Y. Tashiro: Quantitative immunoferritin localization of leucine aminopeptidase on canine hepatocyte cell surface. *J. Histochem. Cytochem.*, 34, 775~784 (1986).
- 11) Y. Tashiro, A. Yamamoto, R. Masaki, K. Tanaka, M. Okuno and K. Omori: Quantitative immunoelectron microscopic localization of several membrane proteins on hepatocyte cell surface. Proc. XIth Int. Cong. on Electron Microscopy, Kyoto, p. 1837~1840 (1986).