

先天性ペルオキシソーム欠損症における病因遺伝子と細胞機能障害

田村 茂彦

細胞内小器官ペルオキシソームは細胞内タンパク質選別輸送、オルガネラの形成と障害機構など、いわゆるプロテインキネシスの課題解明に適したモデルオルガネラとして、近年、その研究が著しく進展している。数種の酵母や哺乳動物培養細胞由来のペルオキシソーム欠損性変異株を用いたペルオキシソーム形成に必須な多くのペルオキシシン遺伝子 (*PEX*) のクローニングと解析が進み、このオルガネラの形成機構の概要が明らかになってきている。そして、多くの相補性群に分類される Zellweger 症候群など、致死性遺伝疾患ペルオキシソーム欠損症 (形成異常症) の病因 *PEX* 遺伝子の全容が解明され、個々のペルオキシシンの生化学的な機能解析へと研究の主流が移り、大きな展開を見せようとしている。これら一連の研究の進歩についてまとめた。

はじめに

ペルオキシソーム (peroxisome) は、真核生物に広く存在する直径 0.1~1 μ m の球状または楕円形の単重単位膜細胞内小器官 (オルガネラ) である。このオルガネラは核やミトコンドリアなどと比べると馴染みの薄い印象があるが、その機能は極長鎖脂肪酸の β 酸化、プラズマローゲンとよばれるエーテルリン脂質の合成や胆汁酸の生合成などがあり、多岐にわたる重要な代謝機能を有している¹⁾。このオルガネラの生理的機能に関する知見はヒト先天性代謝異常疾患、ペルオキシソーム病の研究によるところが大きい。また、ペルオキシソームの特徴として、一連の抗高脂血剤やプラスチック可塑剤などいわゆるペルオキシソーム増殖剤 (peroxisome proliferator, PP) を投与したげっ歯類において、 β 酸化系酵素など一群のペルオキシソーム酵素の誘導とペルオキシソームの著しい増殖がみられる。このペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PP-activated receptor: PPAR) として、PPAR α ²⁾ ついで β , γ などのサブ

タイプがクローニングされている³⁾。それらの生理的リガンドとして、アラキドン酸 J2 (PPAR γ のリガンド) とロイコトリエン B4 (PPAR α のリガンド) が同定されたことから、肥満・糖尿病・炎症など医学的分野との関連性も高い。

オルガネラの形成・複製という複雑な過程も、オルガネラタンパク質自身が持つ情報 (シグナル) とその認識 (細胞内装置) に基づく細胞内選別輸送という観点からとらえることができる。細胞内におけるこれらタンパク質輸送の過程やその障害に起因するヒトの病態などの諸問題、オルガネラ間の相互作用の調節機構などについて議論しようとする研究課題が「プロテインキネシス」である。我々はこの課題解明を目指した一つのモデル系として、重篤な遺伝性疾患であるペルオキシソーム形成異常症に着目しており、その病因解明、さらには個々のペルオキシソーム形成因子 (ペルオキシシン) が織りなす協調的なオルガネラ形成やその制御メカニズムを分子レベルで明らかにすべく研究を進めている。本稿では研究の進展が著しいペルオキシソーム欠損症の病因解明とその障害について、我々の研究を含め最近の知見を解説する。

1. ペルオキシソームへのタンパク質輸送

ペルオキシソームへのタンパク質選別輸送に関しては、サイトゾルの遊離型ポリソームで合成された構成タンパク質が翻訳された後、既存のペルオキシソームに移送されること、その結果ペルオキシソームが成長、分裂して増殖し

九州大学大学院理学研究院生物科学部門 (〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1)

A pathogenic gene in an inherited peroxisome disorder and its cellular dysfunction

Shigehiko Tamura (Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University Graduate School, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan)

本総説は 2003 年度奨励賞を受賞した。

ていくというモデルが一般的に受け入れられている¹⁾。ペルオキシソーム構成マトリックスタンパク質の輸送シグナルとして、現在までに二つのタイプ (peroxisome targeting signal 1 (PTS1), PTS2) が同定されており、大半の酵素は PTS1 型である。ペルオキシソームへのタンパク質の輸送・取り込み時に、PTS2 はプロテアーゼによるプロセッシングを受けるが、PTS1 は切断されない。一方、ペルオキシソーム膜タンパク質の局在化シグナル (mPTS) に関しては、最近多くのタンパク質について解析がなされ mPTS が同定されてきたが、その長さやアミノ酸配列は多岐にわたっている⁴⁻¹¹⁾。ペルオキシソーム膜タンパク質の輸送システムの問題を含めたペルオキシソーム膜生成機構の解明は、それに関わる因子の作用機序や他のオルガネラとの関わりなどと合わせ、今後の全体像の解明が待たれる。

2. ペルオキシソーム病と細胞表現型

[1] ペルオキシソームの欠損と複数の代謝障害を伴う疾患

Zellweger 症候群 (ZS) とよばれる脳・肝・腎症候群 (表 1) は 1964 年に Bowen らによつてはじめて報告された。この症候群は新生児期より筋緊張低下、顔貌異常、肝腫大、精神運動発達遅延など多発奇形を有し、乳児期早期 (数週間～1 年以内) にほとんど死亡する重篤な常染色体劣性遺伝疾患である¹²⁾ (表 2)。ZS の臨床生化学的な異常として、エーテル結合型リン脂質であるプラスマローゲンの著減、極長鎖脂肪酸やピペコール酸の増加、胆汁酸中間代謝産物の蓄積などがみとめられている (表 3)。1973 年には Goldfisher らが ZS 患者の肝臓と腎臓で、形態学的にペルオキシソームが欠損していることを報告した¹³⁾ (図 1)。患者細胞ではペルオキシソーム酵素の生合成は正常に行われているが、その選別輸送に障害があるため形態学的にペルオキシソームを観察することができなくなっている。一

表 1 ペルオキシソーム病の分類

- | | |
|----|--------------------------------|
| 1. | ペルオキシソームの欠損および複数の代謝障害を伴う疾患 |
| | ・Zellweger 症候群 (ZS) |
| | ・新生児型副腎白質ジストロフィー (NALD) |
| | ・乳児型 Refsum 病 (IRD) |
| 2. | 複数の代謝障害を伴うもののペルオキシソームがみとめられる疾患 |
| | ・斑状軟骨形成不全症 II 型 (RCDP) |
| | ・Zellweger 様症候群 |
| 3. | ペルオキシソーム酵素単独欠損症 |
| | ・無カタラーゼ症 |
| | ・伴性型副腎白質ジストロフィー (伴性型 ALD) |
| | ・原発性高シュウ酸尿症 I 型 (PH-1) |
| | ・アシル-CoA オキシダーゼ欠損症 |
| | ・二頭 (三頭) 酵素欠損症 |
| | ・3-ケトアシル-CoA チオラーゼ欠損症 |

方、ペルオキシソーム形成異常症の相補性群では、後述する三つの相補性群を除けば、内部が空洞の“ペルオキシソームゴースト”と呼ばれる膜構造物を本症患者由来の線維芽細胞で検出できる (表 4)。すなわちこれらの線維芽細胞ではペルオキシソーム膜タンパク質の輸送およびその膜構造の形成は正常に行われていると考えられる¹⁴⁾。ペルオキシソーム形成異常症のいわゆるプロトタイプである ZS と類似した疾患として、新生児型副腎白質ジストロフィー (neonatal adrenoleukodystrophy : NALD) と乳児型 Refsum 病 (infantile Refsum disease : IRD) がある (表 1)。広範な脳白質の脱髄と副腎皮質細胞の膨大をみる遺伝性疾患 ALD の新生児型 (NALD)、ならびにフィタン酸の増量を含めた種々の生化学的異常がみとめられる IRD は、ペルオキシソームの欠損や減少に起因する (表 2, 3)。両者とも、ZS に比して症状は軽度で患者の寿命も長い。

[2] 複数の代謝障害を伴うもののペルオキシソームがみとめられる疾患

斑状軟骨形成不全症 II 型 (rhizomelic chondrodysplasia

表 2 ペルオキシソーム病の臨床所見

	Zellweger 症候群	乳児型 Refsum 病	新生児型 ALD	斑状軟骨形成不全症 II 型	Zellweger 様症候群 (チオラーゼ欠損症)	伴性型 ALD
顔貌異常	++	+	+	+	+	-
網膜色素変成	+	+	+	-	+	-
先天性筋緊張低下	++	+	+	-	+	-
けいれん	++	+	++	-	+	-
精神運動発達遅滞	++	+	++	++	++	-
肝腫大	++	+	+	-	+	-
腎嚢胞	+	-	-	-	+	-
関節点状石灰化	+	-	-	++	-	-
ペルオキシソームの欠損 または減少 (肝臓)	++	+	+	-	-	-
平均寿命 (年)	0.6		3.0	1	0.9	9

異常の有 (++) > (+), 無 (-) ALD : adrenoleukodystrophy

正常人

Zellweger症候群患者

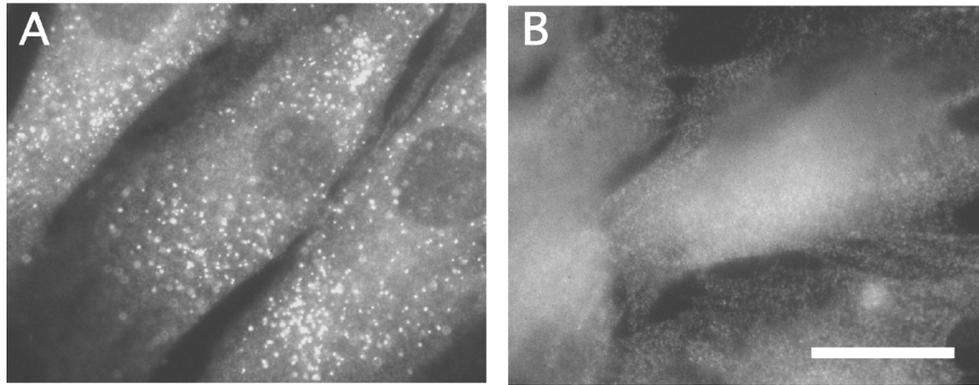


図1 正常人および Zellweger 症候群患者由来線維芽細胞のカタラーゼ輸送
A, 正常人線維芽細胞; B, Zellweger 症候群患者由来の線維芽細胞. スケール (白線) は 30 μ m. 抗カタラーゼ抗体での免疫蛍光抗体染色で, 正常人では無数のペルオキシソームが顆粒状に観察されるが, 患者細胞ではカタラーゼは細胞質に存在しペルオキシソームは認められない.

表3 ペルオキシソーム病の生化学的特性

	Zellweger 症候群	乳児型 Refsum 病	新生児型 ALD	斑状軟骨 形成不全症 II 型	Zellweger 様 症候群 (チオ ラーゼ欠損症)	伴性型 ALD	無カタラーゼ症
体液中の代謝産物							
脂肪酸 (C ₂₆ /C ₂₂ 比)	↑	↑	↑	~	↑	↑	~
ピペコール酸	↑	↑	↑	~	↑	~	~
胆汁酸中間代謝産物	↑	↑	↑	~	↑	~	~
フィタン酸	↑	↑	↑	↑	~	~	~
プラスマローゲン合成							
DHAP-アシルトランスフェラーゼ	↓	↓	↓	↓	~	~	~
アルキル-DHAP シンテターゼ	↓	↓	↓	↓	~	~	~
de novo 合成	↓	↓	↓	↓	~	~	~
ペルオキシソーム							
肝臓における数	↓	↓	↓	~	~	~	~
顆粒体内在性カタラーゼ	↓	↓	↓	~	~	~	↓
脂肪酸 β -酸化系酵素							
アシル-CoA オキシダーゼ	↓	↓	↓	~	~	~	~
三頭酵素	↓	↓	↓	~	~	~	~
3-ケトアシル-CoA チオラーゼ	↓	↓	↓	~	↓	~	~

ALD: adrenoleukodystrophy, DHAP: dihydroxyacetone-phosphate.

↑: 増加, ↓: 低下または欠損, ~: 正常値

punctata: RCDP) や ZS 様症候群とよばれる疾患がこのグループに属する¹²⁾(表1). 病態としては顔貌異常, 精神運動発達遅滞などがみとめられ(表2), 臨床生化学的な特徴として, RCDP ではフィタン酸の増加やプラスマローゲンの著減などの異常を呈するものの, 他は正常である(表3). ペルオキシソームタンパク質の輸送に関しては, ペルオキシソーム局在化シグナル2 (PTS2) 特異的な障害を呈する¹²⁾. 以上のペルオキシソーム形成異常症には現在までに13種の相補性群が報告されている^{15~17)}(表4).

[3] ペルオキシソーム酵素単独欠損症

ペルオキシソームは正常に存在するものの, ペルオキシソーム酵素の単独障害によると考えられる遺伝性疾患で,

無カタラーゼ血症, 伴性型副腎白質ジストロフィー(伴性型 ALD, X-linked ALD), 原発性高シウ酸尿症 I 型(primary hyperoxaluria type 1) やペルオキシソーム β 酸化系酵素の単独欠損症などがある¹⁸⁾(表1~3).

3. ペルオキシソーム形成因子 (ペルオキシシン, peroxin) の単離

[1] ペルオキシソーム形成異常動物変異細胞の分離

ZS に代表されるヒト先天性ペルオキシソーム欠損症疾患群の病因遺伝子の解明とその単離は, 患者より入手可能な線維芽細胞などを用いた実験系では困難である. つまり, 細胞の育成が遅く, なおかつ遺伝子導入の効率が低いことに起因して迅速・効率の良いスクリーニングは不可能

表4 ペルオキシソーム形成異常症相補性群と相補(病因)遺伝子

ヒト相補性群		臨床型	CHO 変異細胞	相補遺伝子	膜アセンブリー	ペルオキシソームの特徴
日本	欧米					
E	1	ZS, NALD, IRD*	Z24/ZP107	<i>PEX 1</i>	+	AAA ファミリー
F	10	ZS, IRD*	Z65	<i>PEX 2</i>	+	PMP, RING フィンガー
G	12	ZS	ZPG208	<i>PEX 3</i>	-	PMP, ペルオキシソーム膜形成因子
	2	ZS, NALD	ZP105*	<i>PEX 5</i>	+	PTS1 受容体, TPR ファミリー
C	4(6)	ZS, NALD*	ZP92/ZP164	<i>PEX 6</i>	+	AAA ファミリー
R	11	RCDP	ZPG207	<i>PEX 7</i>	+	PTS2 受容体, WD40 モチーフ
B	7(5)	ZS, NALD		<i>PEX 10</i>	+	PMP, RING フィンガー
	3	ZS, NALD, IRD	ZP109	<i>PEX 12</i>	+	PMP, RING フィンガー
H	13	ZS, NALD*	ZP128	<i>PEX 13</i>	+	PMP, PTS1 受容体ドッキング因子, SH3 ドメイン
K		ZS	ZP110	<i>PEX 14</i>	+	PMP, PTS1 および PTS2 受容体ドッキング因子
D	9	ZS		<i>PEX 16</i>	-	PMP, ペルオキシソーム膜形成因子
J	14	ZS	ZP119	<i>PEX 19</i>	-	ペルオキシソーム膜形成因子, フェルネシル化
A	8	ZS, NALD*, IRD*	ZP124/ZP167	<i>PEX 26</i>	+	PMP, Pex1p-Pex6p リクルート因子
			ZP114		+	
			ZP126		+	

ZS: Zellweger 症候群, NALD: 新生児型副腎白質ジストロフィー, IRD: 乳児型 Refsum 病, RCDP: 斑状軟骨形成不全症 II 型
 *: ts (温度感受性), PMP: ペルオキシソーム膜タンパク質

である。そこで筆者の所属する研究グループ(九州大学・藤木研究室)は CHO (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞より, P9OH/UV 法¹⁹⁾および GFP を用いた迅速化法²⁰⁾によりペルオキシソーム欠損性変異細胞の分離を行ってきた。これまでに, 相補性群を異にする 13 種の変異細胞を分離した²¹⁾。これらの変異細胞はその変異が野生株に対して劣性であるなど ZS 患者由来細胞と同じ表現型を示し, なおかつペルオキシソームタンパク質の生合成は正常であるものの, ペルオキシソームの形成過程に障害が認められた。これら CHO 変異細胞のうち, Z24/ZP107, Z65, ZPG208, ZP105/ZP139, ZP92/ZP164, ZPG207, ZP109, ZP128, ZP110, ZP119 および ZP124/ZP167 は, ペルオキシソーム形成異常症患者由来線維芽細胞との細胞融合による相補性試験から, それぞれ相補性群 E 群 (欧米では 1 群), F 群 (欧米 10 群), G 群 (欧米 12 群), 欧米 2 群, C 群 (欧米 4 群), R 群 (欧米 11 群), B 群 (欧米 7 群), 欧米 3 群, H 群 (欧米 13 群), K 群 (欧米 15 群), D 群 (欧米 9 群), J 群 (欧米 14 群) および A 群 (欧米 8 群) に属することが判明した^{16, 17, 21)}(表 4)。この結果から, 哺乳動物におけるペルオキシソーム形成には少なくとも 15 の遺伝子(産物)が関与すると考えられる。

[2] 哺乳動物ペルオキシソーム cDNA のクローニングと解析

(i) ペルオキシソーム形成異常 CHO 変異細胞を用いたアプローチ

我々は前述の CHO 変異細胞に対し, ペルオキシソームの形成回復を指標にした遺伝学的相補活性スクリーニング法によるペルオキシソーム cDNA (*PEX*) のクローニングを進めている。1991 年に藤木らがラット肝臓 cDNA 発現ライ

ブラリーより変異細胞 Z65 に対する相補遺伝子 *PAF-1* (*PEX 2*) cDNA をはじめて単離し, この cDNA は 305 アミノ酸からなる新規な 35kDa のタンパク質をコードしていることを明らかにした²²⁾。当初は *PAF-1* (peroxisome assembly factor-1) と名付けられていたが, 1996 年に酵母から哺乳動物に至るまですべての種由来のペルオキシソーム形成因子の名称を統一するため, *PAF-1* 遺伝子は *PEX 2*, その遺伝子産物(ペルオキシソーム)は *Pex2p* とされた²³⁾。*Pex2p* はカルボキシル末端側に C₃H₄ タイプ²⁴⁾の RING フィンガードドメインと 2 カ所の膜貫通ドメインを持ったペルオキシソーム膜タンパク質である。*Pex2p* はマトリックスタンパク質輸送にかかわる膜輸送装置の構成タンパク質であり, ラットだけでなくヒト, チャイニーズハムスターそしてマウスで cDNA が単離されている²⁵⁻²⁸⁾。ついで変異細胞 ZP92 に対し, ラット *PAF-2* (*PEX 6*) が同様にクローニングされた²⁹⁾。ラット *Pex6p* は 978 アミノ酸からなる 104kDa のタンパク質であり, AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) タンパク質ファミリーに属する³⁰⁾。またヒト *Pex6p* の cDNA も単離されており, これは 980 アミノ酸をコードしてラットとは 87% の相同性を有していた³¹⁾。*Pex6p* はその一次構造から膜貫通ドメインを持たないと思われるが, ペルオキシソーム膜に局在することが報告されている^{29, 32-34)}。

筆者らはヒト肝臓 cDNA ライブラリーを用いた機能相補スクリーニングにより, ZP107 に対する相補遺伝子としてヒト *PEX 1* の単離に成功した³⁵⁾(図 2)。ヒト *Pex1p* は 1283 アミノ酸からなる 143kDa のタンパク質であり, *Pex6p* と同様に AAA タンパク質ファミリーに属する。*Pex1p* は前述の *Pex6p* と共にヘテロ複合体を形成し, この

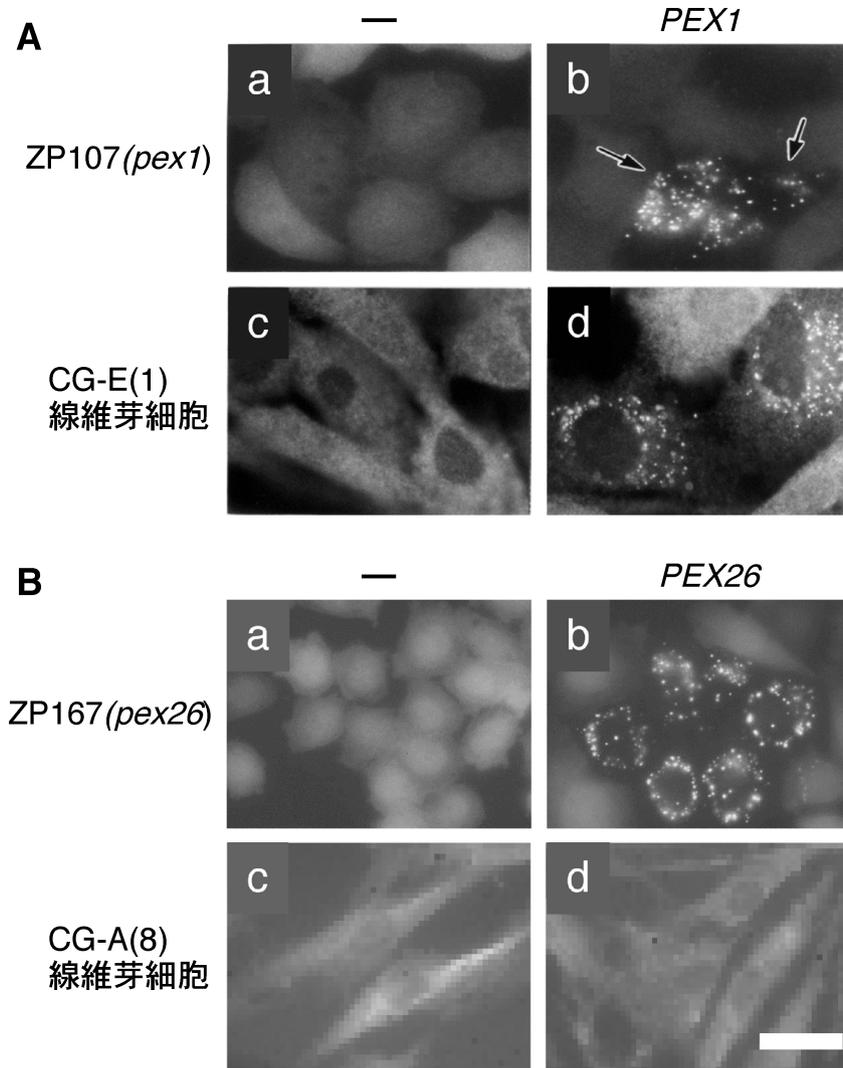


図2 CHO pex 変異細胞と相補 (病因) 遺伝子のクローニング

(A), *pex1* ZP107 細胞 (a) と *PEX1* の導入・発現による EGFP-PTS1 輸送能の回復 (b). 相補性群 E 群 (欧米 1) の ZS 患者由来線維芽細胞におけるカタラーゼ輸送 (c) と *PEX1* 発現によるペルオキシソームの形成回復 (d). (B), *pex26* ZP167 細胞 (a) と *PEX26* による EGFP-PTS1 輸送能の回復 (b). CG-A (8) の NALD 患者由来線維芽細胞でのカタラーゼ輸送 (c) と *PEX26* 発現によりペルオキシソームへの輸送回復が認められる.

複合体形成能が両者の機能にとって重要であることが示唆されている³⁶⁻³⁸). さらに, ZP109, ZP128 そして ZP110 に対しても相補活性スクリーニングを行い, それぞれ *PEX12*, *PEX13* そして *PEX14* を単離した³⁹⁻⁴²). 一方, ペルオキシソーム膜の形成異常を表現型とする CHO 変異細胞 ZPG208 および ZP119 に対しても同様の手法によりそれぞれ相補遺伝子 *PEX3* および *PEX19* を単離した^{43,44}). そして最後に, 我々は ZP124/ZP167 の相補遺伝子を長年の間探求し続けてきたが, ヒト腎臓 cDNA 発現ライブラリーを用いた相補活性スクリーニング法により, ようやくペルオキシソーム形成能を回復させるヒト cDNA の単離に成功した³³). 我々は長らく肝臓由来の cDNA を用いて機

能相補スクリーニングを行ってきたのだが, この相補性群ではどうしてもポジティブクローンを見いだすことができなかった. そこで腎臓由来の cDNA ライブラリーに切り替えたのであるが, これが功を奏してようやくペルオキシソーム形成能を回復した細胞を観察することができた (図 2). この cDNA クローンは 305 アミノ酸からなる 34kDa のタンパク質をコードし, N 末端側を細胞質に, C 末端側をペルオキシソームマトリックスに配向した II 型ペルオキシソーム膜タンパク質であった. このタンパク質はこれまでに報告されているすべてのペルオキシソームとも顕著な相同性が認められないことから新規ペルオキシソーム (*PEX26*) と名づけた (表 4). Pex26p は Pex6p を介して

Pex1p と複合体を形成し、Pex6p-Pex1p 複合体をペルオキシソームへとリクルートするペルオキシシンであることを明らかにした³³⁾。

(ii) EST 法によるアプローチ

哺乳動物由来の培養細胞だけではなく、ペルオキシソームの生合成過程に異常を示す数多くの酵母変異株が、*Saccharomyces cerevisiae*⁴⁵⁾、*Pichia pastoris*^{46,47)}、*Hansenula polymorpha*⁴⁸⁾ や *Yarrowia lipolytica*⁴⁹⁾ などから分離されている。それらの酵母変異株に対する相補遺伝子に哺乳動物由来細胞の実験系から得られたものも合わせると、現在までに 32 の *PEX* 遺伝子がクローニングされている⁵⁰⁻⁵²⁾。このような酵母 *PEX* 遺伝子に対し、ヒト DNA データベースを用いたヒトホモログのクローニング (expressed sequence tag search: EST 法) が展開されてきた。ペルオキシソーム局在化シグナル 1 (PTS1) の酵母受容体遺伝子 *PEX 5* からヒト *PEX 5* が最初にクローニングされた⁵³⁾。こうして、酵母 PTS2 受容体遺伝子 *PEX 7* や前述の *PEX 6* のヒトホモログも同様に明らかにされた^{31,54)}。また、我々が報告した *PEX 1*、*PEX 12*、*PEX 13*、*PEX 14* についても酵母のヒトホモログ cDNA が報告されている⁵¹⁾。さらに我々は、この手法によりヒト *PEX 10*、*PEX 16* のクローニングに成功した^{55,56)}。ついで、ペルオキシソーム膜形成に必須なヒト *PEX 3* も同様に単離された¹⁴⁾。

4. ペルオキシソーム病の病因遺伝子とその障害

[1] ペルオキシソーム形成異常症の病因遺伝子

ペルオキシソーム形成因子としてクローニングされた *PAF-1* (*PEX 2*) を F 群 (欧米 10 群) の Zellweger 症候群 (ZS) 患者由来線維芽細胞で発現させたところ、ペルオキシソームの形成が回復した²⁶⁾。この患者は Pex2p の配列中 Arg119 (CGA) が終止コドン (TGA) に変異したホモ接合型変異 *PEX 2* 遺伝子を持つこと、そして Pex2p (1-118) はペルオキシシン活性を失っていることが判明した。よって、この患者はペルオキシソーム形成不全の結果、ZS を発症したものと結論された²⁶⁾。これが世界ではじめての ZS 病因遺伝子の解明であると同時に、この疾患が常染色体劣性遺伝病であることを遺伝子レベルで解明した報告であった。この報告をさきがけとして、その後、次々と病因遺伝子が明らかにされていった。

ペルオキシソーム欠損症における相補性群のなかでも最も患者数の多い E 群 (欧米 1 群) の患者由来線維芽細胞に *PEX 1* を発現させたところ、ペルオキシソーム形成が回復した^{35,57,58)} (図 2)。この ZS 患者は Pex1p の配列中、L664P および del634-690 という変異をヘテロで持ち、その結果 Pex6p との結合能を著しく低下させることがペルオキシソーム形成不全を引き起こす要因であることを示し

た^{35,59)}。

現在までに ZS をはじめとしたペルオキシソーム欠損症における相補性群のうち、G 群 (欧米 12 群)、2 群、C 群 (欧米 4 群)、3 群、H 群 (欧米 13 群) および J 群 (欧米 14 群) に対し、CHO 変異細胞を用いて同定、単離した *PEX 3*、*PEX 5*、*PEX 6*、*PEX 12*、*PEX 13* および *PEX 19* が病因遺伝子であることを明らかにしている^{21,60)} (表 4)。また、酵母遺伝子を用いた EST 法によるアプローチからクローニングしたヒト *PEX 10* および *PEX 16* も、それぞれ相補性群 B 群 (欧米 7 群)、D 群 (欧米 9 群) ペルオキシソーム欠損症の病因遺伝子であることを明らかにした^{55,56)}。欧米では主としてこの EST 法による解明が並行して行われてきた¹⁴⁾。

そして筆者らは、最後まで不明のままであった相補性群 A 群 (欧米 8 群) の病因遺伝子が *PEX 26* であることを長年の苦闘の末に明らかにした^{33,61)}。つまり A 群の NALD 患者由来の線維芽細胞に *PEX 26* を発現させるとペルオキシソーム形成が回復すること (図 2)、そしてこの患者では Pex26p の 98 番目の Arg が Trp に置換するという変異がホモ接合型で見いだされ、この変異 Pex26p はペルオキシソーム形成能を失っていることが明らかになった (図 3)。さらに数名の A 群患者由来の線維芽細胞を用いて変異部位解析を行った結果、Pex26p の N 末端細胞質領域上流に変異を多くみとめ、その領域の機能的な重要性が示唆された^{61,62)} (図 3)。

この新規遺伝子の単離により、長年探索が続いたペルオキシソーム欠損症相補性群の相補遺伝子で最後の相補遺伝子がクローニングされたことになる。世界ではじめて F 群 (欧米 10 群) の ZS 病因遺伝子として 305 アミノ酸をコードする *PEX 2* が単離されたのを端緒とし、その約 12 年後にこれまで報告されている相補性群の中では最後の病因遺伝子である *PEX 26* が解明された。最初と最後の病因遺伝子がいずれも 305 アミノ酸からなるタンパク質をコードしていたのは偶然ではないかもしれない。以上の成果により、ヒト先天性疾患ペルオキシソーム形成異常症の全相補性群に対する全病因遺伝子の解明に至った (表 4)。

[2] 臨床型と温度感受性細胞表現型

E 群 (欧米 1 群) において、IRD 患者由来の線維芽細胞は 30°C で培養するとペルオキシソーム形成が回復するが、このような温度感受性は ZS 患者由来の線維芽細胞では観察されないことを見いだした⁶³⁾。この温度感受性は変異 Gly843Asp に起因すること、そしてこの変異が存在することで Pex1p のタンパク質安定性の顕著な低下が認められるが 30°C では回復すること⁵⁹⁾、しかも多くの IRD 患者や一部の NALD 患者にこの変異がホモまたはヘテロで認められることが明らかになった⁶³⁾。IRD や NALD は ZS に比べ

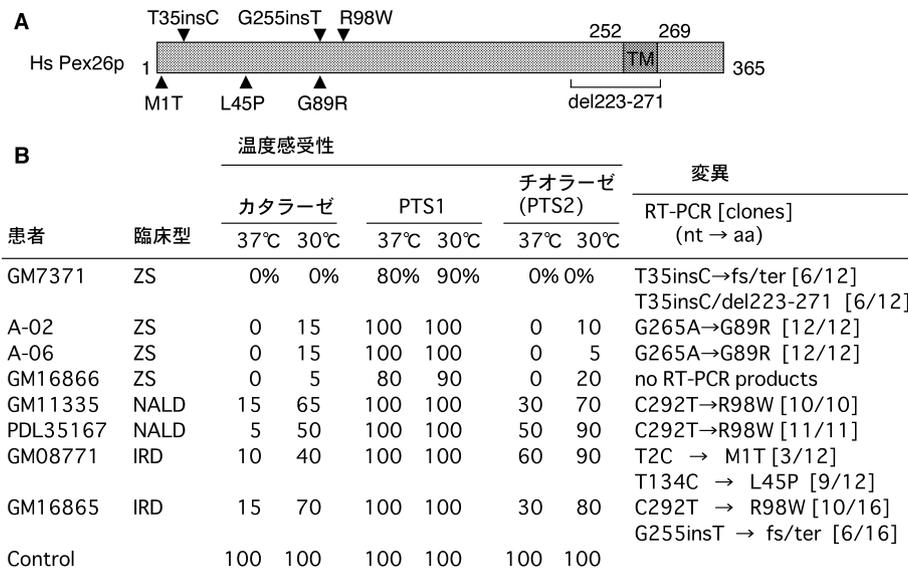


図3 相補性群 A 群 (欧米 8 群) における遺伝子変異と臨床型の相関

(A), 相補性群 A 群の患者由来線維芽細胞の変異部位解析で同定された変異とその位置を模式的に示した。多くの変異が N 末端領域で認められ、この領域の機能的な重要性を示唆している。(B), それぞれの温度で培養した後、抗カタラーゼ、抗 PTS1、抗チオラーゼ抗体で免疫蛍光抗体染色を行った。輸送能が回復し、ペルオキシソームが認められる細胞の割合を相対値 (%) で示した。NALD や IRD の患者由来細胞ではカタラーゼおよびチオラーゼ輸送に温度感受性が認められる。

寿命も比較的長く、臨床的ならびに生化学的にも症状は軽度であり、温度感受性を示す *PEX1* の変異と IRD の臨床病型との密接な関連を強く示唆している。同様の温度感受性の表現型は、*PEX26* 変異を有する NALD や IRD 患者細胞など⁶¹⁾、他の相補性群でも見いだされており、臨床的重症度や生命予後との相関があり、出生前診断、重症度診断や予後判定への道を開く可能性がある (表 4)。

5. マトリックスタンパク質輸送にかかわるペルオキシシン

[1] PTS 受容体ペルオキシシンとドッキング因子

哺乳動物 Pex5p には 2 種のアイソフォーム、S 型と L 型 (S 型内の部位 215-216 の間に 37 アミノ酸の挿入配列) が存在し、これらはホモまたはヘテロ複合体を形成しながら PTS1 タンパク質をサイトゾルからペルオキシソームへと輸送する⁶⁴⁾。一方、PTS2 タンパク質は PTS2 受容体 Pex7p により認識され、両者の複合体は Pex5pL によって輸送される。両複合体のペルオキシソーム膜上ドッキング因子は Pex14p であり、Pex5p の Pex14p や Pex13p への結合には N 末端側 (1-243) に存在する WXXXXF/Y モチーフが必須であること、Pex7p とは Pex5pL 特異的挿入配列の N 末端側約半分と上流側 27 アミノ酸領域で結合すること、また PTS1 タンパク質は膜透過装置構成因子の Pex14p を通過したのち Pex13p の前で解離することが示唆された⁶⁵⁾。Pex5p はサイトゾルとペルオキシソームマトリックス間のシャトル受容体として機能していることが報告されており⁶⁶⁾、

Pex7p も同様の機構で機能していると思われる⁶⁷⁾。よって、ペルオキシソームマトリックスタンパク質は Pex14p、Pex13p そして RING ペルオキシシン (Pex12p, Pex10p, Pex2p) を主体とした膜透過装置を経てペルオキシソーム内へ局在化され、Pex5p と Pex7p はリサイクルする機構が考えられている (図 5)。この過程の詳細な分子レベルでの解明は今後の重要な課題である。

[2] AAA ペルオキシシンである Pex1p と Pex6p

ペルオキシソームへのマトリックスタンパク質輸送はエネルギーを必要とし、GTP や膜電位ではなく ATP に依存している^{68,69)}。前述のように Pex1p と Pex6p は AAA タンパク質ファミリーに属し、マトリックスタンパク質の輸送を担うペルオキシシンである。両者はこれまでに同定されたペルオキシシンの中で構造的に唯一の ATPase であり、マトリックスタンパク質輸送の ATP 要求性と直接かかわりがあると推測できる。Pex1p と Pex6p は、N 末端領域、2 箇所 AAA カセット (D1, D2) そして C 末端領域の四つのドメイン構造に分けることができる³⁴⁾ (図 4)。両者は特に D2 ドメインでよく保存されているが、一方 Pex6p では D1 の Walker motif B (B1) が存在しないなど、その他のドメインでは相同性は高くない³⁶⁾。Pex1p の N 末端領域について結晶構造解析がなされ、同じく AAA タンパク質である NSF や p97/VCP の N 末端領域とよく似た構造を持つこと、そして他のタンパク質や脂質の結合部位である可能

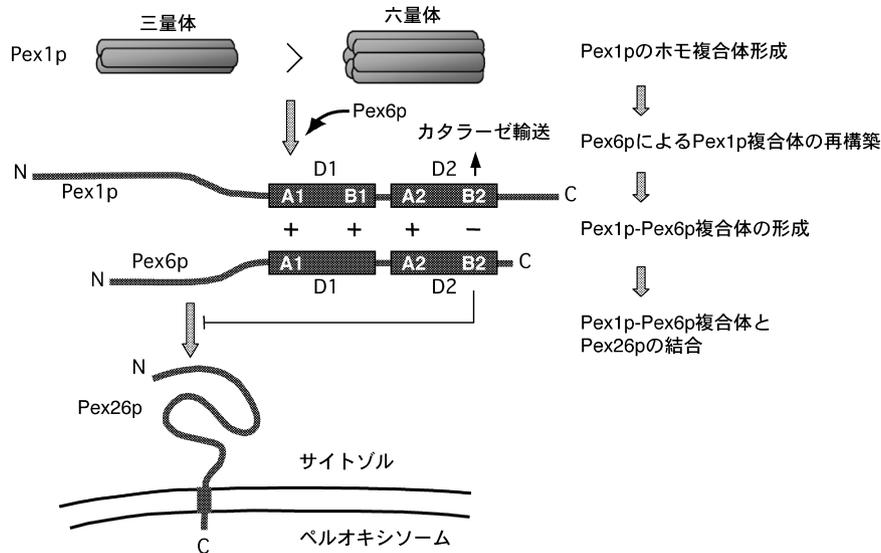


図4 Pex26pがAAAペルオキシンをペルオキシソーム膜へリクルートする機構
細胞質のPex1pは大部分がホモ三量体を、そして部分的にホモ六量体を形成している。Pex1pホモオリゴマーはPex6pとの相互作用により大きく複合体構造を変化させ、Pex6pとのヘテロオリゴマーを形成する、この時、Pex1pのWalker motif A1, B1, A2そしてPex6pのA1, A2がこれらの複合体形成およびペルオキシソーム膜への局在に必要なが(+), B2 motifは関与しない(-)。Pex1pのB2はカタラーゼ輸送に関わり、Pex6pのB2はPex26pからの解離に必要なである。

性が示唆されている^{70,71)}。Pex1pがNSFやp97/VCPと同じく調節性のアダプタータンパク質によって機能制御を受けていると考えることは、ペルオキシソーム機能の制御メカニズムを考えるうえで非常に興味深い。Pex1pとPex6pはATP依存的に結合することが示されてきたが、このヘテロ複合体の大きさや分子構成はいまだはっきりとした結論は出ていない。Pex1p-Pex6p複合体はPex6pを介してPex26pと結合することでペルオキシソーム膜上にリクルートされるが、この報告と時期を同じくして酵母Pex15pも同様にPex6pの膜受容体であることが報告されている⁷²⁾。最近、筆者らはサイトゾルのPex1pがホモ六量体または三量体を形成すること、そしてこのホモ複合体はPex6pによってPex26pを含んだヘテロ複合体に再構成されてペルオキシソーム膜上に局在するというモデルを提案した³⁴⁾(図4)。この時、Pex1pのWalker motif A1, B1, A2そしてPex6pのA1, A2に変異を導入すると両者の結合が弱くなり、なおかつペルオキシソーム膜への局在が観察できなくなる。また、Pex1pのWalker motif B2に変異を導入するとPTS1タンパク質の輸送は正常に行われるが、カタラーゼ輸送が極端に低下することを見いだした。さらに、Pex6pのWalker motif B2への変異導入ではPex26pとの結合が増強されることから、Pex6pのD2によるATP加水分解と共役してPex1p-Pex6p複合体がPex26pから解離し、サイトゾルへエクスポートされる機構があると考えた(図4)。このようにPex1pおよびPex6pがダイナミックに

複合体構造を変化させながらサイトゾルとペルオキシソーム膜の間をシャトリングすることは、両者の機能を解明するうえで非常に興味深い。

[3] Pex5pのリサイクリングに関与するAAAペルオキシシン

これまでにAAAペルオキシシンの機能として、次のような役割、つまり酵母*Yarrowia lipolytica*でのペルオキシソーム膜の融合⁷³⁾、輸送受容体であるPex5pと積み荷タンパク質の解離⁷⁴⁾、Pex5pを再利用するためのペルオキシソーム膜からサイトゾルへの移送⁷⁵⁾、などが考えられてきた。AAAペルオキシシンはいくつかの機能を担った複合体である可能性が高いが、最近、酵母*Saccharomyces cerevisiae*とCHO細胞を用いた実験系から、Pex5pがペルオキシソーム膜からサイトゾルへエクスポートされる際にAAAペルオキシシンが関与していることが示され、これらの機能解析に大きな進展を見せている^{76,77)}(図5)。特に、PTS1タンパク質とPex5pの結合、そしてPex5pのペルオキシソーム膜へのターゲティングではATP加水分解を必要としないが、Pex5pのエクスポートにはATPを必要とすることが明らかになった⁷⁷⁾。この時、酵母の実験系ではPex5pのユビキチン化が膜からのエクスポートまたは分解に重要な働きをしていることが示されている^{76,78,79)}。このように哺乳動物では単離されていないPex4p(E2, ユビキチン結合酵素)の存在や輸送装置を構成する他のペルオ

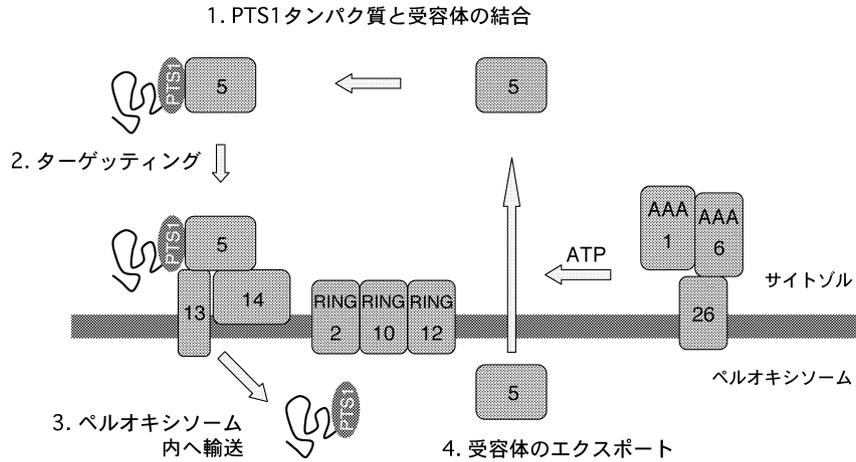


図5 哺乳動物におけるPTS1タンパク質輸送のモデル図

PTS1タンパク質はPTS1受容体であるPex5pSおよびPex5pLにより運ばれ、主としてPex14p, Pex13p, RINGペルオキシシン (Pex2p, Pex10p, Pex12p) から構成される膜透過装置を経てペルオキシソーム内へ局在化される。PTS1タンパク質はPex14pを通過した後、Pex13pに至る前の段階でPex5pから遊離される。AAAペルオキシシンはPex26pによってペルオキシソーム膜へリクルートされ、Pex5pのリサイクルに関わる。ただし、Pex5pがリサイクルされる際の分子メカニズムを含め、輸送機構の詳細については今後の解明が待たれる。

キシシン、特にRINGペルオキシシンであるPex12p, Pex10p, Pex2pとのかかわりもあわせ、興味は尽きない。また、筆者らが単離したPex26pはマトリックスタンパク質の輸送装置を構成するペルオキシシンとAAAペルオキシシンを仲介し、これらの機能を調節する司令塔の役割を担う可能性があると考えている。AAAペルオキシシンとPex26pがどのような分子メカニズムでペルオキシソーム生合成に寄与しているのか、今後の詳細な解析が待ち望まれる。

6. 最 後 に

ペルオキシソームの形成過程には数多くのPEX遺伝子(産物)が関与することが近年の研究の大きな進展により明らかになったが、さらにその数は増えていくと思われる。また、現在までに同定された13相補性群のペルオキシソーム形成異常症の病因遺伝子も国際的な競争の中で飛躍的に解明され、全相補性群の病因遺伝子が明らかにされた。最近、K群(欧米15群)の患者報告がなされたように、今後も新たな相補性群が報告される可能性もある。また我々は、新規相補性群に属する変異CHO細胞の分離を目指して継続的にスクリーニングを行っており、機能相補クローニングによる新規ペルオキシシンの単離というアプローチに今後も期待している。一方、多くの相補性群患者の遺伝子変異解析により遺伝子型と表現型の相関性確立や臨床的な応用も含めてより詳細な解析をする必要がある。また、ペルオキシソーム形成因子欠損・障害モデルマウスを用いたペルオキシソーム欠損症の発症機構、特に胎生期における脳・神経形成や器官形成異常のメカニズムの解

明、さらには遺伝子治療法確立に向けた基礎的な研究も期待される。これら一連の研究の進展と並行して、PEX遺伝子のクローニングからペルオキシシンの生化学的な機能解析へと研究の主流が移りつつあり、ペルオキシソームをモデルオルガネラとしたプロテインキネシスの研究は、タンパク質の細胞内選別輸送、オルガネラ形成とその制御機構の解明という分子細胞生物学の課題解明へ向けて大きく進展すると確信している。

謝辞

本研究は、筆者が九州大学に赴任後、藤木幸夫博士(九州大学教授・大学院理学研究院)のご指導を頂きながら進めてきたものです。深く感謝申し上げます。また、大学院在学中から現在に至るまで、あらゆる面でご指導下さいました、二井將光博士(大阪大学名誉教授、岩手医科大学教授・薬学部)、前田正知博士(大阪大学教授・大学院薬学研究科)、森山芳則博士(岡山大学教授・大学院医歯薬学総合研究科)、ナターンネルソン博士(テルアビブ大学教授)に深くお礼申し上げます。さらに、患者由来線維芽細胞を用いた解析は、下澤伸行博士(岐阜大学教授)、鈴木康之博士(岐阜大学教授)、ヒューゴモザー博士(ジョンズ・ホプキンス大学教授)との共同研究です。本研究のすべてにわたり不断に激励、助言を頂いた、九州大学大学院理学研究院・藤木研究室の助手である原野友之博士、奥本寛治博士、本庄雅則博士、に深く感謝いたします。最後になりましたが、松元奈緒美博士(現・岩手医科大学助手・薬学部)をはじめとした多くの研究室員の皆様

に深く感謝致します。

文 献

- 1) Lazarow, P.B. & Fujiki, Y. (1985) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**, 489-530.
- 2) Issemann, I. & Green, S. (1990) *Nature*, **347**, 645-650.
- 3) Kersten, S., Desvergne, B., & Wahli, W. (2000) *Nature*, **405**, 421-424.
- 4) Sacksteder, K.A., Jones, J.M., South, S.T., Li, X., Liu, Y., & Gould, S.J. (2000) *J. Cell Biol.*, **148**, 931-944.
- 5) Snyder, W.B., Koller, A., Choy, A.J., & Subramani, S. (2000) *J. Cell Biol.*, **149**, 1171-1177.
- 6) Gloeckner, C.J., Mayerhofer, P.U., Landgraf, P., Muntau, A.C., Holzinger, A., Gerber, J.-K., Kammerer, S., Adamski, J., & Roscher, A.A. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **271**, 144-150.
- 7) Franssen, M., Wylin, T., Brees, C., Mannaerts, G.P., & Van Veldhoven, P.P. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 4413-4424.
- 8) Jones, J.M., Morrell, J.C., & Gould, S.J. (2001) *J. Cell Biol.*, **153**, 1141-1149.
- 9) Brosius, U., Dehmel, T., & Gärtner, J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 774-784.
- 10) Halbach, A., Lorenzen, S., Landgraf, C., Volkmer-Engert, R., Erdmann, R., & Rottensteiner, H. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 21176-21182.
- 11) Girzalsky, W., Hoffmann, L., Schemenewitz, A., Nolte, A., Kunau, W., & Erdmann, R. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 19417-19425.
- 12) Lazarow, P.B. & Moser, H.W. (1995) in *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A.I., Sly, W.S., & Valle, D. eds.), Vol. 7, pp. 2287-2324, McGraw-Hill, New York.
- 13) Goldfischer, S., Moore, C.L., Johnson, A.B., Spiro, A.J., Valsamis, M.P., Wisniewski, H.K., Ritch, R.H., Norton, W.T., Rapin, I., & Gartner, L.M. (1973) *Science*, **182**, 62-64.
- 14) Gould, S.J. & Valle, D. (2000) *Trends Genet.*, **16**, 340-345.
- 15) Fujiki, Y., Okumoto, K., Kinoshita, N., & Ghaedi, K. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 1374-1381.
- 16) Matsumoto, N., Tamura, S., Moser, A., Moser, H.W., Braverman, N., Suzuki, Y., Shimozawa, N., Kondo, N., & Fujiki, Y. (2001) *J. Hum. Genet.*, **46**, 273-277.
- 17) Shimozawa, N., Tsukamoto, T., Nagase, T., Takemoto, Y., Koyama, N., Suzuki, Y., Komori, M., Osumi, T., Jeannette, G., Wanders, R.J.A., & Kondo, N. (2004) *Hum. Mutat.*, **23**, 552-558.
- 18) Eaton, J.M. & Ma, M. (1995) in *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A.I., Sly, W.S., & Valle, D. eds.), Vol. 7, pp. 2325-2350, McGraw-Hill, New York.
- 19) Morand, O.H., Allen, L.-A. H., Zoeller, R.A., & Raetz, C.R.H. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1034**, 132-141.
- 20) Ghaedi, K., Kawai, A., Okumoto, K., Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., & Fujiki, Y. (1999) *Exp. Cell Res.*, **248**, 489-497.
- 21) Fujiki, Y. (2000) *FEBS Lett.*, **476**, 42-46.
- 22) Tsukamoto, T., Miura, S., & Fujiki, Y. (1991) *Nature*, **350**, 77-81.
- 23) Distel, B., Erdmann, R., Gould, S.J., Blobel, G., Crane, D.I., Cregg, J.M., Dodt, G., Fujiki, Y., Goodman, J.M., Just, W.W., Kiel, J.A.K.W., Kunau, W.-H., Lazarow, P.B., Mannaerts, G.P., Moser, H., Osumi, T., Rachubinski, R.A., Roscher, A., Subramani, S., Tabak, H.F., Tsukamoto, T., Valle, D., van der Klei, I., van Veldhoven, P.P., & Veenhuis, M. (1996) *J. Cell Biol.*, **135**, 1-3.
- 24) Saurin, A.J., Borden, K.L.B., Boddy, M.N., & Freemont, P.S. (1996) *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 208-214.
- 25) Thieringer, R. & Raetz, C.R.H. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 12631-12636.
- 26) Shimozawa, N., Tsukamoto, T., Suzuki, Y., Orii, T., Shirayoshi, Y., Mori, T., & Fujiki, Y. (1992) *Science*, **255**, 1132-1134.
- 27) Tsukamoto, T., Shimozawa, N., & Fujiki, Y. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5458-5465.
- 28) Faust, P.L. & Hatten, M.E. (1997) *J. Cell Biol.*, **139**, 1293-1305.
- 29) Tsukamoto, T., Miura, S., Nakai, T., Yokota, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Orii, T., Fujiki, Y., Sakai, F., Bogaki, A., Yasuno, H., & Osumi, T. (1995) *Nat. Genet.*, **11**, 395-401.
- 30) Kunau, W.-H., Beyer, A., Franken, T., Goette, K., Marzioch, M., Saidowsky, J., Skaletz-Rorowski, A., & Wiebel, F.F. (1993) *Biochimie*, **75**, 209-224.
- 31) Fukuda, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Tomatsu, S., Tsukamoto, T., Hashiguchi, N., Osumi, T., Masuno, M., Imaizumi, K., Kuroki, Y., Fujiki, Y., Orii, T., & Kondo, N. (1996) *Am. J. Hum. Genet.*, **59**, 1210-1220.
- 32) Yahraus, T., Braverman, N., Dodt, G., Kalish, J.E., Morrell, J. C., Moser, H.W., Valle, D., & Gould, S.J. (1996) *EMBO J.*, **15**, 2914-2923.
- 33) Matsumoto, N., Tamura, S., & Fujiki, Y. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 454-460.
- 34) Tamura, S., Yasutake, S., Matsumoto, N., & Fujiki, Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 27693-27704.
- 35) Tamura, S., Okumoto, K., Toyama, R., Shimozawa, N., Tsukamoto, T., Suzuki, Y., Osumi, T., Kondo, N., & Fujiki, Y. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4350-4355.
- 36) Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Tsukamoto, T., Osumi, T., & Fujiki, Y. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **245**, 883-886.
- 37) Faber, K.N., Heyman, J.A., & Subramani, S. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 936-943.
- 38) Kiel, J.A.K.W., Hilbrands, R.E., van der Klei, I.J., Rasmussen, S.W., Salomons, F.A., van der Heide, M., Faber, K.N., Cregg, J.M., & Veenhuis, M. (1999) *Yeast*, **15**, 1059-1078.
- 39) Okumoto, K. & Fujiki, Y. (1997) *Nature Genet.*, **17**, 265-266.
- 40) Okumoto, K., Shimozawa, N., Kawai, A., Tamura, S., Tsukamoto, T., Osumi, T., Moser, H., Wanders, R.J.A., Suzuki, Y., Kondo, N., & Fujiki, Y. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 4324-4336.
- 41) Toyama, R., Mukai, S., Itagaki, A., Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., Wanders, R.J.A., & Fujiki, Y. (1999) *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1673-1681.
- 42) Shimizu, N., Itoh, R., Hirano, Y., Otera, H., Ghaedi, K., Tateishi, K., Tamura, S., Okumoto, K., Harano, T., Mukai, S., & Fujiki, Y. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 12593-12604.
- 43) Ghaedi, K., Tamura, S., Okumoto, K., Matsuzono, Y., & Fujiki, Y. (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**, 2085-2102.
- 44) Matsuzono, Y., Kinoshita, N., Tamura, S., Shimozawa, N., Hamasaki, M., Ghaedi, K., Wanders, R.J.A., Suzuki, Y., Kondo, K., & Fujiki, Y. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2116-2121.
- 45) Erdmann, R., Veenhuis, M., Mertens, D., & Kunau, W.-H. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 5419-5423.

- 46) Gould, S.J., McCollum, D., Spong, A.P., Heyman, J.A., & Subramani, S. (1992) *Yeast*, **8**, 613–628.
- 47) Liu, H., Tan, X., Veenhuis, M., McCollum, D., & Cregg, J.M. (1992) *J. Bacteriol.*, **174**, 4943–4951.
- 48) Cregg, J.M., Vankiel, I.J., Sulter, G.J., Veenhuis, M., & Harder, W. (1990) *Yeast*, **6**, 87–97.
- 49) Nuttley, W.M., Brade, A.M., Gaillardin, C., Eitzen, G.A., Glover, J.R., Aitchison, J.D., & Rachubinski, R.A. (1993) *Yeast*, **9**, 507–517.
- 50) Lazarow, P.B. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 489–497.
- 51) Purdue, P.E. & Lazarow, P.B. (2001) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**, 701–752.
- 52) Vizeacoumar, F.J., Torres-Guzman, J.C., Bouard, D., Aitchison, J.D., & Rachubinski, R.A. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 665–677.
- 53) Dodt, G., Braverman, N., Wong, C.S., Moser, A., Moser, H.W., Watkins, P., Valle, D., & Gould, S.J. (1995) *Nature Genet.*, **9**, 115–125.
- 54) Braverman, N., Steel, G., Obie, C., Moser, A., Moser, H., Gould, S.J., & Valle, D. (1997) *Nat. Genet.*, **15**, 369–376.
- 55) Okumoto, K., Itoh, R., Shiozawa, N., Suzuki, Y., Tamura, S., Kondo, N., & Fujiki, Y. (1998) *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 1399–1405.
- 56) Honsho, M., Tamura, S., Shiozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., & Fujiki, Y. (1998) *Am. J. Hum. Genet.*, **63**, 1622–1630.
- 57) Portsteffen, H., Beyer, A., Becker, E., Epplen, C., Pawlak, A., Kunau, W.-H., & Dodt, G. (1997) *Nat. Genet.*, **17**, 449–452.
- 58) Reuber, B.E., Germain-Lee, E., Collins, C.S., Morrell, J.C., Ameritunga, R., Moser, H.W., Valle, D., & Gould, S.J. (1997) *Nat. Genet.*, **17**, 445–448.
- 59) Tamura, S., Matsumoto, N., Imamura, A., Shiozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., & Fujiki, Y. (2001) *Biochem. J.*, **357**, 417–426.
- 60) Fujiki, Y. (2003) in *Nature Encyclopedia of the Human Genome* (Cooper, D.N. eds.), Vol. 4, pp. 541–547, Nature Publishing Group, London.
- 61) Matsumoto, N., Tamura, S., Furuki, S., Miyata, N., Moser, A., Shiozawa, N., Moser, H.W., Suzuki, Y., Kondo, N., & Fujiki, Y. (2003) *Am. J. Hum. Genet.*, **73**, 233–246.
- 62) Furuki, S., Tamura, S., Matsumoto, N., Miyata, N., Moser, A., Moser, H.W., & Fujiki, Y. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 1317–1323.
- 63) Imamura, A., Tamura, S., Shiozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Tsukamoto, T., Orii, T., Kondo, N., Osumi, T., & Fujiki, Y. (1998) *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 2089–2094.
- 64) Otera, H., Harano, T., Honsho, M., Ghaedi, K., Mukai, S., Tanaka, A., Kawai, A., Shimizu, N., & Fujiki, Y. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 21703–21714.
- 65) Otera, H., Setoguchi, K., Hamasaki, M., Kumashiro, T., Shimizu, N., & Fujiki, Y. (2002) *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1639–1655.
- 66) Dammai, V. & Subramani, S. (2001) *Cell*, **105**, 187–196.
- 67) Mukai, S., Ghaedi, K., & Fujiki, Y. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 9548–9561.
- 68) Wendland, M. & Subramani, S. (1993) *J. Cell Biol.*, **120**, 675–685.
- 69) Rapp, S., Soto, U., & Just, W.W. (1993) *Exp. Cell Res.*, **205**, 59–65.
- 70) Shiozawa, K., Maita, N., Tomii, K., Seto, A., Goda, N., Akiyama, Y., Shimizu, T., Shirakawa, M., & Hiroaki, H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 50060–50068.
- 71) Shiozawa, K., Goda, N., Shimizu, T., Mizoguchi, K., Kondo, N., Shiozawa, N., Shirakawa, M., & Hiroaki, H. (2006) *FEBS J.*, **273**, 4959–4971.
- 72) Birschmann, I., Stroobants, A.K., van den Berg, M., Schafer, A., Rosenkranz, K., Kunau, W.-H., & Tabak, H.F. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 2226–2236.
- 73) Titorenko, V.I. & Rachubinski, R.A. (2001) *Trends Cell Biol.*, **11**, 22–29.
- 74) Gould, S.J. & Collins, C.S. (2002) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 382–389.
- 75) Erdmann, R. & Schliebs, W. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 738–742.
- 76) Platta, H.W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W., & Erdmann, R. (2005) *Nat. Cell Biol.*, **7**, 817–822.
- 77) Miyata, N. & Fujiki, Y. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 10822–10832.
- 78) Kiel, J.A.K.W., Emmrich, K., Meyer, H.E., & Kunau, W.-H. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 1921–1930.
- 79) Kragt, A., Voorn-Brouwer, T., van den Berg, M., & Distel, B. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 7867–7874.