

GPI アンカー型タンパク質の生合成・リモデリング機構

藤田盛久

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) によるタンパク質修飾は真核生物に広く保存された翻訳後修飾であり, 受容体や細胞接着因子, 加水分解酵素など多様なタンパク質が GPI 修飾を受け, 生体膜に結合している。GPI は小胞体において生合成され, タンパク質へ修飾される。その後, 構造変化 (リモデリング) を受けながら, 細胞表面へ輸送される。これら一連の過程には, これまでに 25 種類以上の遺伝子産物が関与していることが明らかになっており, 最近, GPI 生合成遺伝子の部分欠損による先天性 GPI 欠損症が報告されている。また GPI アンカー型タンパク質の切断・遊離に関わる酵素もいくつか報告されており, 生体機能調節に重要であることが示されている。本稿では哺乳動物細胞の GPI アンカーを中心にその生合成, リモデリング機構, 欠損症について概説する。

1. はじめに

膜タンパク質の中には, 脂質による修飾を受け, その疎水性部分を錨 (アンカー) として生体膜と結合するタンパク質が存在する。グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) はオリゴ糖鎖とイノシトールリン脂質からなる糖脂質であり, GPI 付加シグナルを有するタンパク質の C 末端に共有結合で付加される。GPI による修飾を受けたタンパク質は GPI アンカー型タンパク質と呼ばれ, 一部の古細菌および, 原虫のような原生生物, 真菌, 植物, 動物に至る真核生物に広く存在している。1960 年代に粗精製されたホスホリパーゼ C (PLC) によって, アルカリホスファターゼが哺乳動物細胞から遊離することが報告された¹⁾。1970 年代には池澤宏郎先生らによって, 細菌由来のホスファチジルイノシトール (PI) 特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLC) により動物細胞から遊離するタンパク質の存在が報告され, それ以降, 様々な生物種にイノシトールリン脂質を含有したタンパク質が存在することが明らかとなった²⁾。

現在までに, 哺乳動物では 100 種類以上のタンパク質が GPI アンカー型として存在していることが明らかとなっている。1988 年には, トリパノソーマ原虫の可変性表面糖タンパク質 (VSG) およびラット Thy-1 の GPI アンカーの完全構造が決定され^{3,4)}, その基本骨格は生物種間で保存されていることが明らかとなった。GPI の基本骨格はイノシトール (Ino) リン (P) 脂質, グルコサミン (GlcN), 三つのマンノース (Man), エタノールアミンリン酸 (EtNP) から成り立っており, その構造は EtNP-6-Man- α 1, 2-Man- α 1, 6-Man- α 1, 4-GlcN- α 1, 6-Ino-P-脂質である (図 1)。一方で糖鎖部分の側鎖構造や脂質部分の分子種には生物種, 細胞あるいはタンパク質によって違いが見られる⁵⁾。本稿では, 哺乳動物細胞を中心に GPI の生合成およびリモデリング機構について紹介する。

2. 哺乳動物細胞の GPI の構造

現在まで知られている哺乳動物の GPI アンカー型タンパク質は上述の基本骨格に加え, 一つ目の Man (Man1) の 2 位に EtNP を有している (図 1)。さらにタンパク質や細胞によって, 側鎖構造に違いが見られる。たとえば, 三つ目の Man (Man3) に α 1, 4-Man (Man4) が結合 (R1), 二つ目の Man (Man2) の 6 位に EtNP が結合 (R2) することが示されている。また Man1 に β 1, 4-N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) \pm ガラクトース \pm シアル酸が結合 (R3), Man2 の 6 位に β -N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) リ

大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患研究分野 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 3-1)

Biosynthesis and remodeling of GPI-anchored proteins
Morihiisa Fujita (Department of Immunoregulation, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

本総説は 2013 年度奨励賞を受賞した。

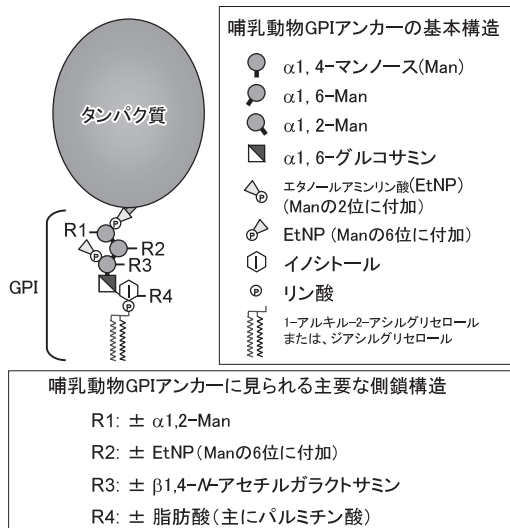


図1 哺乳動物 GPI アンカーの基本構造

ン酸が結合しうることが示されている^{5,6}。これらの構造は、同一タンパク質種内でも不均一である。上述の側鎖構造のうち、Man4およびEtNPの付加は小胞体におけるGPIの生合成過程で行われる。β1,4-GalNAcの付加は、タンパク質付加前のGPI中間体では見られないことから、おそらくGPIがタンパク質に付加された後に行われると考えられる。

哺乳動物 GPI アンカー型タンパク質上の脂質部分は多くが1-アルキル-2-アシルグリセロール型(アルキル型)であり、一部がジアシルグリセロール型(ジアシル型)である。その脂肪酸組成は、グリセロール骨格 *sn*-2 位に飽和脂肪酸を有していることを特徴としている。例外として、ヒト赤血球では Ino 残基にも脂肪酸を有しており(R4)、三つの脂鎖で膜上に存在する⁷。さらにグリセロール骨格 *sn*-2 位の脂鎖も不飽和脂肪酸である。

3. GPIの生合成

(Step 1) GlcNAc-PIの合成:

GPIの生合成は小胞体膜上で行われ、PIから少なくとも11段階のステップを経る(表1)。生合成に用いられるPIは、哺乳動物では1-stearoyl-2-arachidonyl-PI (C18:0/C20:4)のようなグリセロール骨格 *sn*-2 位に不飽和脂肪酸を有するものが主に用いられる。まず、小胞体膜の細胞質側でPIに *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が転移し、GlcNAc-PIが生成する(図2)。この反応はPIGA, PIGC, PIGH, PIGP, PIGQ, PIGY, DPM2から成るGPI-GnT複合体によって行われる⁸。このうち、PIGAが触媒サブユニットであり、carbohydrate-active enzyme (CAZy)の分類では glycosyltransferase family 4 (GT4)に属する。その他のサブユニットについての詳細な役割についてはまだわかっていない。このうち、DPM2はGPI-GnT活性を

上げる活性を有している⁹。また、ヒトPIGYは71アミノ酸からなる膜タンパク質であり、GPI-GnT複合体の形成には影響しないが、PIGAと直接結合し、活性に必須の役割を果たす¹⁰。出芽酵母のEri1pは68アミノ酸からなるタンパク質であり、PIGYと相同性は低いものの、同様な膜トポロジーを示し、GPI-GnT活性に必要である。Eri1pは活性化Rasと結合し、RasはGPI-GnTを阻害することが示されている¹¹。哺乳動物細胞においては、RasによるPIGYとの結合およびGPI-GnT活性阻害は見られないことが示されている。

(Step 2) GlcNAc-PIの脱アセチル化:

続いて、細胞質側でGlcNAc-PIの *N*-アセチル基がPIGLによって除去され、GlcN-PIとなる。PIGLは細胞質側に大きな触媒ドメインを持つ1回膜貫通タンパク質であり、金属要求性の脱アセチル化酵素ファミリーに属する。酵素活性は2価金属イオンで増強し¹²、ファミリー間で保存された(P/A)-H-(P/A)-DDおよびHxxHの二つのコンセンサス配列が金属結合と活性に重要であることが示されている^{13,14}。

(Step 3) フリップ・フロップ:

GPIの生合成は細胞質側で開始されるのに対して、タンパク質への転移は小胞体内腔側で行われる。このため、生合成過程にGPI中間体のフリップが行われることが示唆されている。Step 2までが細胞質側で、Step 4以降はおそらく小胞体内腔側で行われることから、GlcN-PIが小胞体膜内腔側にフリップしていると推定される。in vitroでの再構成実験からATP非依存性であることが示されているものの、フリッパーゼの同定には至っていない¹⁵。

(Step 4) Inoアシル化:

生成したGlcN-PIはIno残基C2位のヒドロキシ基に脂肪酸の付加を受け、GlcN-(acyl)PIが生成する。この反応はPIGWによって行われ、基質としてアシルCoAが用いられる¹⁶。出芽酵母Gwt1p(PIGWホモログ)のトポロジー解析から、Inoアシル化は膜内腔側で行われていることが示唆されている¹⁷。その後の反応は小胞体膜内腔側で行われる。出芽酵母Gwt1pは、GPIアンカー型タンパク質の細胞壁局在を阻害する化合物1-(4-butylbenzyl)isoquinoline (BIQ)のターゲット分子として同定された^{18,19}。E1210はBIQを元に最適化された化合物であり、哺乳動物のPIGW活性は阻害せず、様々な真菌に対する抗真菌剤として開発が進められている²⁰。

(Step 5) アルキル型への変換:

哺乳動物において、PIの脂質部分の大部分はジアシル型であるのに対して、GPIアンカー脂質の多くがアルキル型、一部がジアシル型である。GPI脂質中間体の解析からGlcN-PIまではジアシル型が大部分であるのに対して、GlcN-(acyl)PI以降でアルキル型の割合が増加している²¹。

表1 GPI アンカー生合成, リモデリングに関与する遺伝子群

ステップ	酵素名	供与基質	ヒト遺伝子	遺伝子座	遺伝子欠損症	出芽酵母遺伝子
1	GPI-GlcNAc 転移酵素 (GPI-GnT)	UDP-GlcNAc	<i>PIGA</i>	Xp22.1	PNH, 先天性 GPI 欠損症 (MCAHS)	<i>GPI3</i>
			<i>PIGC</i>	1q23-q25		<i>GPI2</i>
			<i>PIGH</i>	14q24.1		<i>GPI15</i>
			<i>PIGP</i>	21q22.2		<i>GPI19</i>
			<i>PIGQ</i>	16p13.3		<i>GPI1</i>
			<i>PIGY</i>	4q22.1		<i>ERI1</i>
			<i>DPM2</i>	9q34.13		DPM2-CDG —
2	GlcNAc-PI 脱アセチラーゼ		<i>PIGL</i>	17p12-p11.2	CHIME syndrome	<i>GPI12</i>
3	フリッパーゼ?		Not identified			
4	Ino アシル基転移酵素	Palmitoyl-CoA	<i>PIGW</i>	17q12		<i>GWT1</i>
5	PI アルキル型変換酵素	?	Not identified			—
6	α 1, 4-Man 転移酵素 I (GPI-MT I)	Dol-P-Man	<i>PIGM</i>	1q23.1	先天性 GPI 欠損症	<i>GPI14</i>
			<i>PIGX</i>	3q29		<i>PBN1</i> <i>ARV1</i>
7	α 1, 6-Man 転移酵素 II (GPI-MT II)	Dol-P-Man	<i>PIGV</i> —	1p36.11	HPMR	<i>GPI18</i> <i>PGA1</i>
8	EtNP 転移酵素 I (GPI-ET I)	PE	<i>PIGN</i>	18q21.33	先天性 GPI 欠損症 (MCAHS)	<i>MCD4</i>
9	α 1, 2-Man 転移酵素 III (GPI-MT III)	Dol-P-Man	<i>PIGB</i>	15q21.3		<i>GPI10</i>
M4	α 1, 2-Man 転移酵素 IV (GPI-MT IV)	Dol-P-Man	<i>PIGZ (SMP3)</i>	3q29		<i>SMP3</i>
10	EtNP 転移酵素 III (GPI-ET III)	PE	<i>PIGO</i>	9p13.3	HPMR	<i>GPI13</i>
			<i>PIGF</i>	2p21-p16		<i>GPI11</i>
11	EtNP 転移酵素 II (GPI-ET II)	PE	<i>PIGG (GPI7)</i> <i>PIGF</i>	4p16.3 2p21-p16		<i>GPI7</i> <i>GPI11</i>
12	GPI トランスアミダーゼ (GPI-TA)		<i>PIGK</i>	1p31.1	先天性 GPI 欠損症	<i>GPI8</i>
			<i>GPAA1</i>	8q24.3		<i>GAA1</i>
			<i>PIGS</i>	17p13.2		<i>GPI17</i>
			<i>PIGT</i>	20q12-q13.12		<i>GPI16</i>
			<i>PIGU</i>	20q11.22		<i>GAB1</i>
13	Ino 脱アシル化酵素		<i>PGAP1</i>	2q33.1		<i>BST1</i>
14	EtNP リン酸ジエステラーゼ		<i>PGAP5 (MPPE1)</i>	18p11.21		<i>CDC1</i> <i>TED1</i>
16	GPI ホスホリパーゼ A2		<i>PGAP3</i>	17q12		<i>PER1</i>
17	リゾ GPI アシル基転移酵素	Stearyl-CoA ?	<i>PGAP2</i>	11p15.5	HPMR	<i>CWH43-N ?</i>
			Not identified			<i>GUP1</i>
CR	セラミドリモデラーゼ	Ceramide ?	<i>CWH43-C ?</i>	4p11		<i>CWH43</i>
	Dol-P-Man (DPM) 合成酵素		<i>DPM1</i>	20q13.13	CDG-Ie	<i>DPM1</i>
			<i>DPM2</i>	9q34.13	DPM2-CDG	—
			<i>DPM3</i>	1q22	CDG-Io	—
	DPM/Dol-P-Glucose 利用		<i>MPDU1</i>	17p13.1-p12	CDG-If	—

各ステップは本文中と図1, 2に対応する.

PNH: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, HPMR: hyperphosphatasia with mental retardation syndrome,

CHIME: coloboma, congenital heart disease, ichthyosiform dermatosis, mental retardation, and ear anomalies syndrome,

MCAHS: multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome,

CDG: Congenital disorder of glycosylation.

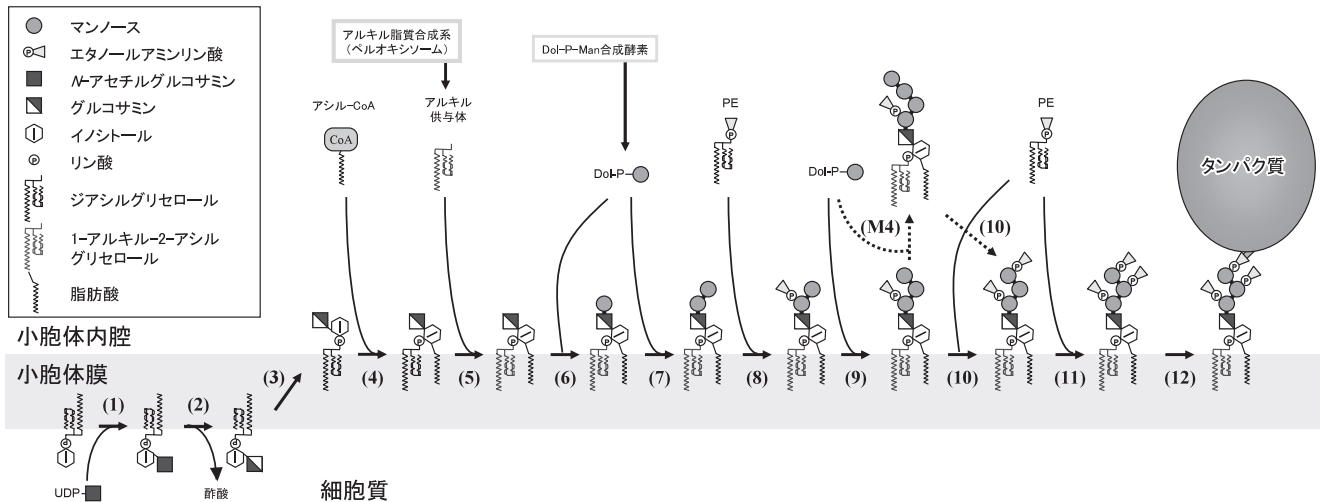


図2 哺乳動物細胞における GPI の生合成機構

このことから、GlcN-(acyl)PI 以降で脂質部分の交換が行われていることが示唆されている。この反応を行う酵素についてはまだ不明であるが、基質となるアルキル型の脂質はペルオキシソーム由来であることが明らかとなっている^{22, 23)}。

(Step 6) Man1 の付加：

続いて、GlcN-(acyl)PI に α 1,4-Man が付加される。この反応はドリコールリン酸マンノース (Dol-P-Man) を基質とし、PIGM, PIGX から成る GPI-マンノース転移酵素 (GPI-MT) I 複合体によって行われる。PIGM は触媒サブユニットであり、GT50 に属する。PIGX は PIGM と複合体を形成し、PIGM を安定化している。出芽酵母ではこのステップにおいて、Arv1p が GlcN-(acyl)PI を GPI-MT I に効率的に運ぶ役割をしていることが示されている²⁴⁾。

(Step 7) Man2 の付加：

同じく Dol-P-Man を基質とし、GPI-MT II である PIGV によって Man-GlcN-(acyl)PI に α 1,6-Man が付加される。PIGV は GT76 に分類される糖転移酵素である。最近、PIGV は PIGM, PIGV, PIGB の三つの GPI マンノース転移酵素のうち、Dol-P-Man 制限条件下において律速段階になっていることが示された²⁵⁾。出芽酵母においては、Pgalp がこのステップに必須であり、PIGV のホモログ Gpi18p と結合していることが明らかとなっている²⁶⁾。

(Step 8) Man1 への EtNP 転移：

Man1 の 2 位に EtNP が付加される。この反応は PIGN によって行われる。PIGN は膜内腔側にアルカリホスファターゼ様のドメインを有する複数膜貫通タンパク質である。ホスファチジルエタノールアミン (PE) が、EtNP 付加の基質として用いられる。*Codinea simplex* の代謝物テルペノイドラクトンである YW3548/BE49385A は PIGN による反応を阻害する^{27, 28)}。出芽酵母では、この反応で付加

される側鎖 EtNP は次の Step 9 の反応に大きく影響を与えることから、基質認識に重要と思われる。哺乳動物細胞においては PIGN 欠損細胞で反応は進むものの、タンパク質への修飾効率は低下する。これは後述の GPI トランスアミダーゼによる認識が悪くなっているためと考えられる²⁹⁾。

(Step 9) Man3 の付加：

PIGB によって Man-(EtNP)Man-GlcN-(acyl)PI に α 1,2-Man が付加される³⁰⁾。PIGB は GT22 に属するマンノース転移酵素であり、PIGM, PIGV による反応同様 Dol-P-Man を基質とする。

(Step M4) Man4 の付加：

細胞株や組織により、四つ目の Man が付加されることがある。この反応は同じく GT22 に属するマンノース転移酵素 PIGZ によって行われ、 α 1,2-Man が Man-Man-(EtNP)Man-GlcN-(acyl)PI に付加される³¹⁾。哺乳動物細胞では、この反応は生合成にとって必ずしも必要ではないが、出芽酵母においては Step 10 の EtNP 付加に必須である³²⁾。

(Step 10) Man3 への EtNP：

Man3 の 6 位に付加される EtNP はタンパク質との結合に用いられる。この反応は PIGO と PIGF からなる GPI-EtNP 転移酵素 III 複合体によって行われる³³⁾。PIGO は PIGN と同じく、膜内腔側にアルカリホスファターゼ様ドメインを有しており触媒サブユニットであると考えられる。PIGF は 2 回膜貫通タンパク質であり、PIGO を安定化している。哺乳動物において、この反応は Step 4 での PIGW による Ino アシル化が行われていないと、効率的に行えないようである¹⁶⁾。これは原虫トリパノソーマでも同様である³⁴⁾。この反応によって、EtNP-Man-Man-(EtNP)Man-GlcN-(acyl)PI (GPI 中間体：H7) が合成される。

(Step 11) Man2 への EtNP :

Man2 の 6 位への EtNP の付加は PIGG と PIGF からなる GPI-EtNP 転移酵素 II 複合体によって行われる³⁵⁾。PIGG は PIGN と PIGO と同じファミリーに属するタンパク質であり、触媒サブユニットであると考えられる。PIGF は GPI-EtNP 転移酵素 II および III の共通のサブユニットであり、PIGO と PIGG をともに安定化している。この反応によって GPI 前駆体 H8 が合成される。Man2 への側鎖 EtNP は細胞表面に到達した GPI アンカー型タンパク質の大半では見られないため、側鎖 EtNP を欠いた H7 が主にタンパク質への転移に用いられ、H8 は GPI 前駆体としてはマイナーな基質であると考えられてきた。しかしながら、PIGG の出芽酵母ホモログである GPI7 変異株で GPI 中間体が蓄積し、細胞分離異常や細胞壁異常を示すこと、GPI トランスアミダーゼのサブユニットである GPI8 (哺乳動物 PIGK) と GPI7 が合成増殖阻害を示すことなどから、側鎖 EtNP を有さない H7 は最適な基質ではないと考えられる^{36,37)}。後述するようにタンパク質に付加された後に EtNP が除去されることが明らかとなり³⁸⁾、正常な生合成過程においては、H8 が主にタンパク質の転移に用いられると考えられる。

4. GPI のタンパク質修飾 (Step 12)

GPI アンカー型となるタンパク質は N 末端の小胞体ターゲットシグナルに加えて C 末端に GPI 付加シグナルを有している。GPI 付加シグナルは除去され、新しく露出した C 末端のカルボキシ基に GPI 末端 EtNP のアミノ基がアミド結合で付加される。GPI が結合するアミノ酸残基を ω -site と呼ぶ。GPI 付加シグナルは、コンセンサス配列はないが、多くの GPI アンカー付加シグナルの特徴として、次の四つが挙げられる^{8,39)}。(i) ω -site として側鎖の小さいアミノ酸が用いられる。(ii) $\omega+2$ のアミノ酸も Gly, Ala, Ser のような小さい側鎖のアミノ酸が用いられる。(iii) $\omega+3$ より 6~10 アミノ酸の親水性領域がある。(iv)

その後の C 末端までの 10~20 アミノ酸が疎水領域である。近年、GPI 付加シグナルを予測するプログラムが複数公開されている。

GPI のタンパク質修飾は PIGK, GAA1, PIGS, PIGT, PIGU からなる GPI トランスアミダーゼ複合体によって行われる。このうち、PIGK はシステインプロテアーゼにホモロジーがあり、触媒サブユニットであると考えられる。事実、システインプロテアーゼに保存された Cys および His 残基の変異型 PIGK は活性を有さない⁴⁰⁾。また、PIGU は PIGM に弱いホモロジーを有しており、GPI の認識に関与していると推定される。PIGT は PIGK とタンパク質間でジスルフィド結合を形成しており、トランスアミダーゼ活性に重要であることが示されている⁴¹⁾。その他のサブユニットも反応に必須であるが、それぞれの詳細な役割については良くわかっていない。トリパノソーマの GPI トランスアミダーゼ複合体は PIGK, GAA1, PIGT ホモログ (それぞれ TbGPI8, TbGAA1, TbGPI16) を有するが、PIGS および PIGU に変わって、TTA1, TTA2 の別のサブユニットから構成されている⁴²⁾。このうち、TTA1 は PIGS と弱く相同性を示す。TTA1, TTA2 どちらのサブユニットもトランスアミダーゼ活性には必須である。

5. GPI アンカーのリモデリング

(Step 13) GPI イノシトール脱アシル化 :

GPI がタンパク質に転移された後、細胞表面に輸送される過程で GPI アンカー部分の構造変化 (リモデリング) を受ける。小胞体において少なくとも二つの反応が行われる (図 3)。一つ目は生合成中に PIGW によって付加された Ino のアシル基が PGAP1 によって除去される反応である⁴³⁾。PGAP1 は小胞体に局在する複数回膜貫通タンパク質であり、内腔側にリパーゼモチーフ (GxSxG) を有している。この反応はヒト赤血球、マウス赤血球、顆粒球を除く、多くの細胞で行われる。PGAP1 および出芽酵母ホモログである Bst1p による GPI イノシトール脱アシル化は

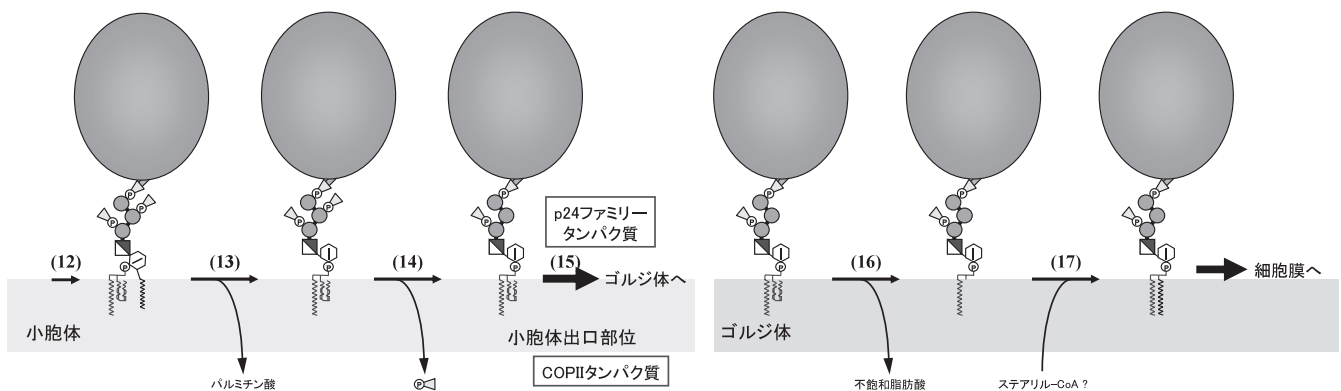


図 3 哺乳動物細胞における GPI アンカーのリモデリング機構
凡例は図 2 参照。

GPI アンカー型タンパク質の小胞体からの効率的な輸送に必要である。また出芽酵母の Bst1p は、ミスフォールドした GPI アンカー型タンパク質 Gas1p (Gas1*p) の効率的な分解にも関与している⁴⁴⁾。これは脱アシル化が GPI アンカー型タンパク質の分解の際に必要、あるいは Gas1*p が ERAD-L (内腔) 基質として認識されるため⁴⁵⁾、Gas1*p の小胞体-ゴルジ体間輸送に必要なためと考えられる。これに加え、Gas1*p は Pmt1p/Pmt2p によって過剰な O-マンノシル化を受け小胞体に留まるが、O-マンノシル化が欠損する場合、液胞へと輸送され、分解される⁴⁶⁾。

Pgap1 欠損マウスが作製されており、その多くは生後まもなく死亡し、その多くに顔面、顎の形成異常が見られ、耳頭症 (otocephaly) あるいは全前脳症 (holoprosencephaly) を呈することが示されている^{47,48)}。興味深いことに、耳頭症を呈するマウスである *Oto* マウスの原因遺伝子が *Pgap1* 自体であることが明らかとなっている⁴⁹⁾。*Pgap1* 欠損により耳頭症を発症する詳細な原因については不明であるが、発生段階での Wnt シグナルあるいは Nodal シグナルの異常が関与しているようである^{48,49)}。生き残った *Pgap1* 欠損マウスではノックアウト精子が輸卵管を上昇できず、雄性不妊になることが明らかとなっている⁴⁷⁾。

(Step 14) 側鎖エタノールアミンリン酸の除去:

GPI の生合成過程において、GPI 前駆体には三つの EtNP が付加されるが、このうち小胞体において、二つ目の EtNP が除去される。この反応は PGAP5 によって行われる³⁸⁾。PGAP5 は 1~2 回膜貫通タンパク質であり、小胞体の内腔側に金属要求性リン酸エステラーゼモチーフを有している。酵素活性には Mn^{2+} イオンを必要とする。ヒト PGAP5 は小胞体 (小胞体出口部位)、小胞体-ゴルジ体中間区画、ゴルジ体に局在が見られ、細胞質側の小胞体回帰シグナル (KxKxx) により小胞体-ゴルジ体間をリサイクルしていると考えられる。PGAP5 による側鎖 EtNP の除去も PGAP1 によるイノシトール脱アシル化と同様に、GPI アンカー型タンパク質の小胞体からの効率的な輸送に必要である。この二つの反応が行えない変異細胞では小胞体出口部位への濃縮が効率よく行えず、輸送が遅延することが明らかとなっている⁵⁰⁾。出芽酵母においても、GPI の二つ目の側鎖 EtNP は前駆体では検出されるのに対して、GPI アンカー型タンパク質では検出されないことから⁵¹⁾、PGAP5 ホモログによって EtNP の除去が行われている可能性がある。出芽酵母の PGAP5 ホモログは Ted1p と Cdc1p の二つ存在し、ともに小胞体に局在する。このうち Ted1p は Gas1p の効率的な輸送に重要であることが示されている⁵²⁾。また *CDC1* も後述の GPI 脂肪酸リモデリングに関与する *PER1* および *GUP1* と遺伝的相互作用が見られる⁵³⁾。

(Step 15) GPI アンカー型タンパク質の小胞体からの輸送:

上述のように PGAP1, PGAP5 による GPI アンカーのリモデリングは GPI アンカー型タンパク質の小胞体からの効率的な輸送に必要である。これは小胞体-ゴルジ体間の輸送を行うコートタンパク質複合体 II (COPII) 小胞への積み込みが悪くなっているためと考えられる。GPI アンカー型タンパク質は PI の脂質部分を介して、膜の内腔側に存在し、膜貫通領域を持たないため、細胞質側に存在する COPII と直接結合することができない。効率的な輸送を行うためには、GPI アンカー型タンパク質と COPII を結ぶ積荷受容体 (カーゴレセプター) が必要である。p24 ファミリータンパク質は膜内腔側に Golgi dynamics (GOLD) ドメイン、コイルド・コイルドメイン、細胞質側には COPII および COPI と結合するモチーフを有する I 型の膜タンパク質である⁵⁴⁾。p24 タンパク質は一次配列から α , β , γ , δ の四つのサブファミリーに分類され、ファミリー間でヘテロオリゴマーを形成し、小胞体-ゴルジ体間をリサイクリングしている。GOLD ドメイン、コイルド・コイルドメインはオリゴマー形成に関与していると考えられるが、詳細な役割についてはわかっていない。これらの特徴から p24 タンパク質はカーゴレセプターであることが示唆されており、ゴルジ体でのコートタンパク質複合体 I (COPI) の形成や小胞体からの積荷の選別に関与していると考えられる⁵⁴⁾。出芽酵母において p24 ファミリータンパク質である *Emp24p*, *Erv25p*, *Erp1p*, *Erp2p* が GPI アンカー型タンパク質の小胞体-ゴルジ体間の輸送に関与していることが示されている^{55~57)}。哺乳動物細胞においても、p24 β 1 および p24 δ 1 のノックダウンで GPI アンカー型タンパク質の輸送が遅延することが明らかとなっている^{58,59)}。GPI アンカー型タンパク質の小胞体でのリモデリングが行えない PGAP1 および PGAP5 変異株では GPI アンカー型レポータータンパク質と p24 タンパク質との結合が減少することから、正しく構造変化した GPI アンカー型タンパク質を認識していると考えられる⁵⁰⁾。また GPI アンカー型タンパク質と p24 との結合には pH 依存性があり、弱塩基性および中性では結合が見られるものの、弱酸性条件下では解離が見られる。これらのことから GPI アンカー型タンパク質は p24 ファミリータンパク質の積荷の一つであると考えられる。

COPII の構成因子である出芽酵母 *Sec13p* は生存に必須であるが、p24 ファミリー遺伝子 *EMP24*, *ERV25* あるいは GPI イノシトール脱アシル化遺伝子 *BST1* を欠損することで、*sec13* 破壊株でも生存できるようになること (bypass-of-sec-thirteen: BST) が知られている⁶⁰⁾。最近、他の GPI リモデリング遺伝子 (*PER1*, *TED1*, *GUP1*) や p24 ファミリータンパク質のメンバー (*ERP1*, *ERP2*) も *BST*

遺伝子として機能し、*sec13* 破壊株の致死性を抑圧することが報告された⁶¹。通常 Sec13p は Sec31p とともに COPII を強固にすることで輸送小胞の湾曲形成を行っているが、Sec13p 欠損下では GPI アンカー型タンパク質のような逆湾曲能の強い積荷を含んだ輸送小胞が形成できない。しかし、GPI アンカーのリモデリング反応や積荷受容体である p24 タンパク質に欠損が起こることで、GPI アンカー型タンパク質が小胞体出口部位へ濃縮されず、積荷タンパク質による膜の逆湾曲能が弱まり Sec13p の非存在下でも COPII 小胞が形成されるためと考えられる^{61,62}。これらの結果からも GPI アンカー型タンパク質の小胞体出口部位でのソーティングに関して、GPI アンカー構造変化と p24 タンパク質の役割が伺える。

COPII 構成因子のうち Sec24 は輸送積荷タンパク質の輸送シグナルを認識する。哺乳動物には四つの Sec24 のパラログ (Sec24A, B, C, D)、出芽酵母では三つの Sec24 のパラログ (Sec24p, Sfb2p, Lst1p) が存在し、このうち哺乳動物 Sec24C/D、酵母 Lst1p がそれぞれ p24 ファミリータンパク質の輸送シグナルを認識することが示されている^{58,61-63}。哺乳動物 Sec24C/D のノックダウン、酵母 *lst1* 破壊株では GPI アンカー型タンパク質の輸送も遅延することから^{58,64}、p24 ファミリータンパク質を介して GPI アンカー型タンパク質が COPII 小胞により輸送されていると考えられる。

(Step 16, 17) GPI 脂肪酸リモデリング:

哺乳動物の GPI は、小胞体での生合成時には脂質部分グリセロール骨格の *sn*-2 位にアラキドン酸 (C20:4) やドコサヘンタエン酸 (C22:5) のような不飽和脂肪酸を有しているが、細胞表面に到達した GPI アンカー型タンパク質では多くの場合、*sn*-2 位が飽和脂肪酸であるステアリン酸 (C18:0) に置き換わる⁶⁵。出芽酵母においても同様に、*sn*-2 位の不飽和脂肪酸が、C26:0 の極長鎖飽和脂肪酸に置き換わる反応が知られている⁶⁶。この反応は GPI 脂肪酸リモデリングと呼ばれ、GPI アンカー型タンパク質が脂質ラフトと呼ばれるスフィンゴ脂質やコレステロールから成る膜構造と会合するのに必須の反応である。これは GPI アンカーの脂質部分が不飽和脂肪酸から、飽和脂肪酸に置き換わることで、修飾タンパク質と脂質ラフトとの親和性を高めていると考えられる。

GPI 脂肪酸リモデリングには、PGAP3 (出芽酵母 Per1p) と PGAP2 が関与している (図 3)^{65,67,68}。PGAP3 は複数回膜貫通タンパク質であり、アルカリセラミダーゼとともに膜貫通型加水分解酵素スーパーファミリーに属する⁶⁹。PGAP3 の出芽酵母ホモログ Per1p において、スーパーファミリー内で保存されたヒスチジンが機能に重要であることが示されている⁶⁸。哺乳動物 PGAP3 は主にゴルジ体に、出芽酵母 Per1p は主に小胞体に局在するが、これは

GPI アンカー型タンパク質がそれぞれの生物種で界面活性剤不溶画分 (DRM) に単離されるようになる場所と一致する。

PGAP2 は主にゴルジ体に局在する約 250 アミノ酸から成る膜貫通タンパク質であり、PGAP3 によってリゾ体になった GPI アンカー型タンパク質に飽和脂肪酸を付加する反応に関与している。PGAP2 変異細胞では、GPI アンカー型タンパク質がリゾ体のまま輸送され、細胞膜で PLD 様の反応によって細胞外へ分泌される⁶⁷。PGAP2 が酵素自体であるかどうかは不明であり、転移酵素活性を有するタンパク質が別に存在する可能性もある。出芽酵母においては membrane-bound *O*-acyltransferase (MBOAT) ファミリーに属する Gup1p が飽和脂肪酸の付加に関与していることが報告されている⁷⁰。

(Step CR) 出芽酵母におけるセラミドリモデリング

出芽酵母の場合、多くの GPI アンカー型タンパク質の脂質部分はさらにセラミド型に変化する⁷¹。この反応には Cwh43p が関与している^{72,73}。Cwh43p は約 950 アミノ酸から成る複数回膜貫通タンパク質であり、N 末端領域は上述の PGAP2 と相同性を示し、さらに C 末端領域にイノシトールリン酸セラミド・ホスホリパーゼ C やスフィンゴミエリナーゼで見られるモチーフを有している。C 末端領域がおそらくジアシルグリセロール型からセラミド型への変換を担っていると考えられる。セラミド合成系を全て欠損させた酵母においてもセラミド型 GPI アンカーが検出されることから、このリモデリングの供与体基質は不明である⁷⁴。これまでに GPI アンカーの構造解析より、アスペルギルス、アメリカトリパノソーマ、粘菌、ナシなどいくつかの生物種でセラミド型の GPI アンカーが同定されている⁵。哺乳動物においては、これまでセラミド型の GPI アンカーは報告されていないが、酵母 Cwh43p の C 末端領域と相同性を有する遺伝子が存在し、この哺乳動物 CWH43-C を酵母で発現させると、Cwh43p を欠損した出芽酵母の一部表現型を相補する⁷³。哺乳動物において、CWH43-C は精巣上体の体部と尾部に強く発現している⁷⁵。CWH43-C に対する抗体によって、精子の運動性が阻害されることが示されており、GPI アンカーの構造が関係するかどうかも含め機能解析が待たれる。

6. GPI アンカーの切断

上述のように GPI アンカー型タンパク質は発見当初から、細胞膜から切断され、遊離することが知られている。これらの遊離には、プロテアーゼによるタンパク質部分の切断以外に GPI アンカー部分の切断によるものが存在する。はじめに述べた細菌由来の PI-PLC に加えて、これまでにいくつか内在性の GPI 切断酵素の存在が知られている。哺乳動物血清中には GPI 特異的ホスホリパーゼ D

(GPI-PLD) が存在している。GPI-PLDの生理的意義についてはあまり詳しく明らかにされていないが、癌胎児性抗原 (CEA) や CD87, Prostatein, Cripto1 といった GPI アンカー型タンパク質の遊離に関わっていることが報告されている⁷⁶⁻⁷⁹⁾。

アンジオテンシン変換酵素 (ACE) はアンジオテンシン I やブラジキニンを分解するジペプチダーゼ活性に加えて、GPI 切断活性を有することが報告されている⁸⁰⁾。Ace 欠損マウスは雄性不妊を示すことが知られており、ACE の GPI 切断活性が、精子受精能獲得に重要な役割を果たすことが示唆されている。最近、ACE のターゲット分子として、TEX101 と呼ばれる精巣特異的に発現する GPI アンカー型タンパク質が報告された⁸¹⁾。精巣内で TEX101 は ADAM3 と結合するが、精子形成時に ACE によって切断され、ADAM3 の適切な成熟化に寄与している。Ace 欠損マウスでは、TEX101 が切断されないまま、精巣上体でも存在し、ADAM3 の局在に影響を与えるようである。これに対して、*Tex101* 欠損マウスでも同様に雄性不妊となるが、これは TEX101 がいないことにより、精子形成時に ADAM3 が分解されてしまうことが原因であると考えられる。

Notum はシヨウジョウバエを用いた解析により、Wnt シグナルを負に制御する因子として同定された⁸²⁾。Notum は分泌型の α/β -ヒドロラーゼ・スーパーファミリーに属しており、植物のペクチン・アセチルエステラーゼにホモロジーを有している。解析の結果、Notum は GPI アンカー型ヘパラン硫酸プロテオグリカンである Dally-like protein (Dlp) の GPI 部分を切断する酵素活性を有していることが示された⁸³⁾。哺乳動物細胞においても、Notum がグリピカンなどの GPI アンカー型ヘパラン硫酸プロテオグリカンや他の GPI アンカー型タンパク質を遊離させることが報告されている⁸⁴⁾。

グリセロリン酸ジエステルホスホジエステラーゼ (GDE) は脱アシル化されたリン脂質を分解し、グリセロリン酸とコリンやエタノールアミン、イノシトールといったヘッド・グループのアルコールを生じさせる⁸⁵⁾。このエステラーゼ・ドメインを持ったタンパク質は細菌や酵母、脊椎動物で幅広く存在している。このうち、哺乳動物 GDE2 は Notch シグナルを阻害し、運動ニューロン前駆細胞から脊髄運動ニューロンの分化を誘導することが報告されている⁸⁶⁾。最近、GDE2 が GPI アンカー型メタロプロテアーゼ・インヒビターである RECK を GPI 部分で切断することが示された⁸⁷⁾。運動ニューロン前駆細胞の隣接細胞上の GDE2 は、RECK を切断することで ADAM ファミリーの阻害をはずし、ADAM プロテアーゼが Notch リガンドである Delta-like 1 を切断することで、Notch シグナルを抑制していると考えられる。同じ GDE ファミリーに属

するタンパク質である GDE3, GDE6 についても GPI アンカー型タンパク質であるグリピカンを細胞から遊離させる活性が示されており、GDE ファミリーのうちいくつかは、生体内で特定の GPI アンカー型タンパク質の切断に関与しているのかもしれない⁸⁷⁾。

7. GPI 生合成欠損症

後天性の GPI 生合成欠損症として、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) が知られている⁸⁸⁾。PNH は造血幹細胞上の *PIGA* 遺伝子に欠損が生じ、そのクローン細胞が拡大した結果、血球細胞が補体の攻撃を受け溶血する疾患である。*PIGA* はこれまで知られている GPI 生合成遺伝子で唯一、X 染色体上に存在するため、1 回の体細胞変異で GPI 欠損を生じる。通常、自己細胞表面には、GPI アンカー型の補体制御因子 (CD55, CD59) が存在するため、自己細胞に結合した補体は速やかに不活化される。しかし、GPI 生合成欠損細胞では GPI アンカー型補体制御因子が発現しないため、血球細胞膜上に結合した補体を不活化できず、溶血を引き起こす。Alexion Pharmaceuticals 社によって、補体成分 C5 に対するヒト化モノクローナル抗体エクリズマブ (ソリリス) が開発された⁸⁸⁾。エクリズマブは補体経路の進行を阻害し、GPI 欠損血球細胞の溶血を減少させるのに有効であり、日本においても認可され、PNH の治療に使用されている。

Piga 欠損マウスの解析から全身での GPI 生合成の完全欠損は発生初期において致死性を示すことが明らかとなっているが⁸⁹⁾、最近 GPI の生合成に部分的な欠損を生じた遺伝性の GPI 欠損症が次々と報告されている (表 1)⁹⁰⁻⁹⁸⁾。これらの中には、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析によって明らかにされたものが存在しており、知的障害を伴う高ホスファターゼ血症 (HPMR) や CHIME 症候群などこれまで原因不明だった疾患が GPI 生合成遺伝子の欠損によるものであることが明らかとなってきている。これまでに先天性の GPI 欠損症として、*PIGA*, *PIGL*, *PIGM*, *PIGV*, *PIGN*, *PIGO*, *PIGT*, *PGAP2* の変異が報告されている⁹⁰⁻⁹⁸⁾。本邦においても、今年になって *PIGO* に変異を持つ先天性 GPI 欠損症 (HPMR) が初めて同定された⁹⁹⁾。先天性 GPI 欠損症の症状は多様であり、欠損遺伝子ごとに違いが見られるものの、多くはてんかん発作や知的障害を共通症状として呈し、さらに欠損遺伝子によっては顔貌異常、心疾患、短指骨、難聴、高ホスファターゼ血症等を呈することが示されている。このうち、高ホスファターゼ血症は GPI 生合成後期ステップ (*PIGV*, *PIGO*) の欠損で見られ、初期ステップおよび GPI トランスアミダーゼの欠損では見られない。これは後期 GPI 中間体が GPI トランスアミダーゼに認識され、一部のアルカリホスファターゼのシグナル配列が切断されて、細胞外

へ分泌されるためだと考えられる¹⁰⁰⁾。現在解析中のものも含め(村上, 木下ら, 未発表), 今後同様の症状を示す原因未同定疾患に GPI の生合成異常が見つかるかもしれない。

謝辞

本稿で紹介した研究の多くは著者の現研究室である大阪大学微生物病研究所の木下研究室の成果であります。御指導くださいました木下タロウ先生, 前田裕輔先生, 村上良子先生をはじめ, 免疫不全疾患研究分野の皆様にご感謝申し上げます。大学院時代には産業技術総合研究所糖鎖工学研究センターの故・地神芳文先生, 横尾岳彦先生にご指導いただき, また多くの先輩や同僚に支えていただきました。この場をお借りして感謝申し上げます。

文 献

- 1) Slein, M.W. & Logan, G.F., Jr. (1963) *J. Bacteriol.*, **85**, 369–381.
- 2) Ikezawa, H. (2002) *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 409–417.
- 3) Ferguson, M.A., Homans, S.W., Dwek, R.A., & Rademacher, T.W. (1988) *Science*, **239**, 753–759.
- 4) Homans, S.W., Ferguson, M.A., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., Anand, R., & Williams, A.F. (1988) *Nature*, **333**, 269–272.
- 5) Ferguson, M.A., Kinoshita, T., & Hart, G.W. (2008) Glycosylphosphatidylinositol Anchors. in *Essentials of Glycobiology* (Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., & Etzler, M.E. eds.), pp. 143–161, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 6) Fukushima, K., Ikehara, Y., Kanai, M., Kochibe, N., Kuroki, M., & Yamashita, K. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 36296–36303.
- 7) Roberts, W.L., Santikarn, S., Reinhold, V.N., & Rosenberry, T.L. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 18776–18784.
- 8) Kinoshita, T., Fujita, M., & Maeda, Y. (2008) *J. Biochem.*, **144**, 287–294.
- 9) Watanabe, R., Murakami, Y., Marmor, M.D., Inoue, N., Maeda, Y., Hino, J., Kangawa, K., Julius, M., & Kinoshita, T. (2000) *EMBO J.*, **19**, 4402–4411.
- 10) Murakami, Y., Siripanyaphinyo, U., Hong, Y., Tashima, Y., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2005) *Mol. Biol. Cell*, **16**, 5236–5246.
- 11) Sobering, A.K., Watanabe, R., Romeo, M.J., Yan, B.C., Specht, C.A., Orlean, P., Riezman, H., & Levin, D.E. (2004) *Cell*, **117**, 637–648.
- 12) Watanabe, R., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N., & Kinoshita, T. (1999) *Biochem. J.*, **339** (Pt 1), 185–192.
- 13) Handa, N., Terada, T., Kamewari, Y., Hamana, H., Tame, J. R., Park, S.Y., Kinoshita, K., Ota, M., Nakamura, H., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., & Yokoyama, S. (2003) *Protein Sci.*, **12**, 1621–1632.
- 14) Urbaniak, M.D., Crossman, A., Chang, T., Smith, T.K., van Aalten, D.M., & Ferguson, M.A. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 22831–22838.
- 15) Vishwakarma, R.A. & Menon, A.K. (2005) *Chem. Commun. (Camb.)*, 453–455.
- 16) Murakami, Y., Siripanyaphinyo, U., Hong, Y., Kang, J.Y., Ishihara, S., Nakakuma, H., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 4285–4295.
- 17) Sagane, K., Umemura, M., Ogawa-Mitsuhashi, K., Tsukahara, K., Yoko-o, T., & Jigami, Y. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 14649–14658.
- 18) Tsukahara, K., Hata, K., Nakamoto, K., Sagane, K., Watanabe, N.A., Kuromitsu, J., Kai, J., Tsuchiya, M., Ohba, F., Jigami, Y., Yoshimatsu, K., & Nagasu, T. (2003) *Mol. Microbiol.*, **48**, 1029–1042.
- 19) Umemura, M., Okamoto, M., Nakayama, K., Sagane, K., Tsukahara, K., Hata, K., & Jigami, Y. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 23639–23647.
- 20) Hata, K., Horii, T., Miyazaki, M., Watanabe, N.A., Okubo, M., Sonoda, J., Nakamoto, K., Tanaka, K., Shirotori, S., Murai, N., Inoue, S., Matsukura, M., Abe, S., Yoshimatsu, K., & Asada, M. (2011) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 4543–4551.
- 21) Houjou, T., Hayakawa, J., Watanabe, R., Tashima, Y., Maeda, Y., Kinoshita, T., & Taguchi, R. (2007) *J. Lipid Res.*, **48**, 1599–1606.
- 22) Kanzawa, N., Maeda, Y., Ogiso, H., Murakami, Y., Taguchi, R., & Kinoshita, T. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17711–17716.
- 23) Kanzawa, N., Shimozawa, N., Wanders, R.J., Ikeda, K., Murakami, Y., Waterham, H.R., Mukai, S., Fujita, M., Maeda, Y., Taguchi, R., Fujiki, Y., & Kinoshita, T. (2012) *J. Lipid Res.*, **53**, 653–663.
- 24) Kajiwara, K., Watanabe, R., Pichler, H., Ihara, K., Murakami, S., Riezman, H., & Funato, K. (2008) *Mol. Biol. Cell*, **19**, 2069–2082.
- 25) Hirata, T., Fujita, M., Kanzawa, N., Murakami, Y., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2013) *J. Biochem.*, **154**, 257–264.
- 26) Sato, K., Noda, Y., & Yoda, K. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 3472–3485.
- 27) Hong, Y., Maeda, Y., Watanabe, R., Ohishi, K., Mishkind, M., Riezman, H., & Kinoshita, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 35099–35106.
- 28) Sutterlin, C., Horvath, A., Gerold, P., Schwarz, R.T., Wang, Y., Dreyfuss, M., & Riezman, H. (1997) *EMBO J.*, **16**, 6374–6383.
- 29) Vainauskas, S. & Menon, A.K. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 38358–38364.
- 30) Takahashi, M., Inoue, N., Ohishi, K., Maeda, Y., Nakamura, N., Endo, Y., Fujita, T., Takeda, J., & Kinoshita, T. (1996) *EMBO J.*, **15**, 4254–4261.
- 31) Taron, B.W., Colussi, P.A., Wiedman, J.M., Orlean, P., & Taron, C.H. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 36083–36092.
- 32) Grimme, S.J., Westfall, B.A., Wiedman, J.M., Taron, C.H., & Orlean, P. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 27731–27739.
- 33) Hong, Y., Maeda, Y., Watanabe, R., Inoue, N., Ohishi, K., & Kinoshita, T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 20911–20919.
- 34) Guthrie, M.L. & Ferguson, M.A. (1995) *EMBO J.*, **14**, 3080–3093.
- 35) Shishioh, N., Hong, Y., Ohishi, K., Ashida, H., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 9728–9734.
- 36) Benachour, A., Sipos, G., Flury, I., Reggiori, F., Canivenc-Gansel, E., Vionnet, C., Conzelmann, A., & Benghezal, M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 15251–15261.
- 37) Fujita, M., Yoko-o, T., Okamoto, M., & Jigami, Y. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 51869–51879.

- 38) Fujita, M., Maeda, Y., Ra, M., Yamaguchi, Y., Taguchi, R., & Kinoshita, T. (2009) *Cell*, **139**, 352–365.
- 39) Orlean, P. & Menon, A.K. (2007) *J. Lipid Res.*, **48**, 993–1011.
- 40) Ohishi, K., Inoue, N., Maeda, Y., Takeda, J., Riezman, H., & Kinoshita, T. (2000) *Mol. Biol. Cell*, **11**, 1523–1533.
- 41) Ohishi, K., Nagamune, K., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 13959–13967.
- 42) Nagamune, K., Ohishi, K., Ashida, H., Hong, Y., Hino, J., Kangawa, K., Inoue, N., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 10682–10687.
- 43) Tanaka, S., Maeda, Y., Tashima, Y., & Kinoshita, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 14256–14263.
- 44) Fujita, M., Yoko-o, T., & Jigami, Y. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 834–850.
- 45) Goder, V. & Melero, A. (2011) *J. Cell Sci.*, **124**, 144–153.
- 46) Hirayama, H., Fujita, M., Yoko-o, T., & Jigami, Y. (2008) *J. Biochem.*, **143**, 555–567.
- 47) Ueda, Y., Yamaguchi, R., Ikawa, M., Okabe, M., Morii, E., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 30373–30380.
- 48) McKean, D.M. & Niswander, L. (2012) *Biol. Open*, **1**, 874–883.
- 49) Zoltewicz, J.S., Ashique, A.M., Choe, Y., Lee, G., Taylor, S., Phamluong, K., Solloway, M., & Peterson, A.S. (2009) *PLoS One*, **4**, e6191.
- 50) Fujita, M., Watanabe, R., Jaensch, N., Romanova-Michaelides, M., Satoh, T., Kato, M., Riezman, H., Yamaguchi, Y., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2011) *J. Cell Biol.*, **194**, 61–75.
- 51) Imhof, I., Flury, I., Vionnet, C., Roubaty, C., Egger, D., & Conzelmann, A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 19614–19627.
- 52) Haass, F.A., Jonikas, M., Walter, P., Weissman, J.S., Jan, Y. N., Jan, L.Y., & Schuldiner, M. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18079–18084.
- 53) Losev, E., Papanikou, E., Rossanese, O.W., & Glick, B.S. (2008) *Mol. Cell Biol.*, **28**, 3336–3343.
- 54) Strating, J.R. & Martens, G.J. (2009) *Biol. Cell*, **101**, 495–509.
- 55) Belden, W.J. & Barlowe, C. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 26939–26946.
- 56) Marzioch, M., Henthorn, D.C., Herrmann, J.M., Wilson, R., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J., Solari, R.C., & Rowley, A. (1999) *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1923–1938.
- 57) Schimmoller, F., Singer-Kruger, B., Schroder, S., Kruger, U., Barlowe, C., & Riezman, H. (1995) *EMBO J.*, **14**, 1329–1339.
- 58) Bonnon, C., Wendeler, M.W., Paccaud, J.P., & Hauri, H.P. (2010) *J. Cell Sci.*, **123**, 1705–1715.
- 59) Takida, S., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2008) *Biochem. J.*, **409**, 555–562.
- 60) Elrod-Erickson, M.J. & Kaiser, C.A. (1996) *Mol. Biol. Cell*, **7**, 1043–1058.
- 61) Copic, A., Latham, C.F., Horlbeck, M.A., D’Arcangelo, J.G., & Miller, E.A. (2012) *Science*, **335**, 1359–1362.
- 62) Silvius, J. (2012) *Science*, **335**, 1308–1309.
- 63) Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2003) *Cell*, **114**, 497–509.
- 64) Peng, R., De Antoni, A., & Gallwitz, D. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 11521–11528.
- 65) Maeda, Y., Tashima, Y., Houjou, T., Fujita, M., Yoko-o, T., Jigami, Y., Taguchi, R., & Kinoshita, T. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 1497–1506.
- 66) Sipos, G., Reggiori, F., Vionnet, C., & Conzelmann, A. (1997) *EMBO J.*, **16**, 3494–3505.
- 67) Tashima, Y., Taguchi, R., Murata, C., Ashida, H., Kinoshita, T., & Maeda, Y. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 1410–1420.
- 68) Fujita, M., Umemura, M., Yoko-o, T., & Jigami, Y. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 5253–5264.
- 69) Pei, J., Millay, D.P., Olson, E.N., & Grishin, N.V. (2011) *Biol. Direct*, **6**, 37.
- 70) Bosson, R., Jaquenoud, M., & Conzelmann, A. (2006) *Mol. Biol. Cell*, **17**, 2636–2645.
- 71) Reggiori, F., Canivenc-Gansel, E., & Conzelmann, A. (1997) *EMBO J.*, **16**, 3506–3518.
- 72) Ghugtyal, V., Vionnet, C., Roubaty, C., & Conzelmann, A. (2007) *Mol. Microbiol.*, **65**, 1493–1502.
- 73) Umemura, M., Fujita, M., Yoko-o, T., Fukamizu, A., & Jigami, Y. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 4304–4316.
- 74) Vionnet, C., Roubaty, C., Ejsing, C.S., Knudsen, J., & Conzelmann, A. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 6769–6779.
- 75) Zhan, X., Wang, C., Liu, A., Liu, Q., & Zhang, Y. (2012) *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, **44**, 924–930.
- 76) Verghese, G.M., Gutknecht, M.F., & Caughey, G.H. (2006) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291**, C1258–1270.
- 77) Watanabe, K., Bianco, C., Strizzi, L., Hamada, S., Mancino, M., Bailly, V., Mo, W., Wen, D., Miatkowski, K., Gonzales, M., Sanicola, M., Seno, M., & Salomon, D.S. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 31643–31655.
- 78) Wilhelm, O.G., Wilhelm, S., Escott, G.M., Lutz, V., Magdolen, V., Schmitt, M., Rifkin, D.B., Wilson, E.L., Graeff, H., & Brunner, G. (1999) *J. Cell Physiol.*, **180**, 225–235.
- 79) Yamamoto, Y., Hirakawa, E., Mori, S., Hamada, Y., Kawaguchi, N., & Matsuura, N. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 223–229.
- 80) Kondoh, G., Tojo, H., Nakatani, Y., Komazawa, N., Murata, C., Yamagata, K., Maeda, Y., Kinoshita, T., Okabe, M., Taguchi, R., & Takeda, J. (2005) *Nat. Med.*, **11**, 160–166.
- 81) Fujihara, Y., Tokuhira, K., Muro, Y., Kondoh, G., Araki, Y., Ikawa, M., & Okabe, M. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 8111–8116.
- 82) Giraldez, A.J., Copley, R.R., & Cohen, S.M. (2002) *Dev. Cell*, **2**, 667–676.
- 83) Kreuger, J., Perez, L., Giraldez, A.J., & Cohen, S.M. (2004) *Dev. Cell*, **7**, 503–512.
- 84) Traister, A., Shi, W., & Filmus, J. (2008) *Biochem. J.*, **410**, 503–511.
- 85) Yanaka, N. (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1811–1818.
- 86) Sabharwal, P., Lee, C., Park, S., Rao, M., & Sockanathan, S. (2011) *Neuron*, **71**, 1058–1070.
- 87) Park, S., Lee, C., Sabharwal, P., Zhang, M., Meyers, C.L., & Sockanathan, S. (2013) *Science*, **339**, 324–328.
- 88) Roth, A. & Duhrsen, U. (2011) *Eur. J. Haematol.*, **87**, 473–479.
- 89) Kawagoe, K., Kitamura, D., Okabe, M., Taniuchi, I., Ikawa, M., Watanabe, T., Kinoshita, T., & Takeda, J. (1996) *Blood*, **87**, 3600–3606.
- 90) Almeida, A.M., Murakami, Y., Layton, D.M., Hillmen, P., Sellick, G.S., Maeda, Y., Richards, S., Patterson, S., Kotsianidis, I., Mollica, L., Crawford, D.H., Baker, A., Ferguson, M., Roberts, I., Houlston, R., Kinoshita, T., & Karadimitris, A. (2006) *Nat. Med.*, **12**, 846–851.
- 91) Johnston, J.J., Gropman, A.L., Sapp, J.C., Teer, J.K., Martin,

- J.M., Liu, C.F., Yuan, X., Ye, Z., Cheng, L., Brodsky, R.A., & Biesecker, L.G. (2012) *Am. J. Hum. Genet.*, **90**, 295–300.
- 92) Krawitz, P.M., Murakami, Y., Hecht, J., Kruger, U., Holder, S.E., Mortier, G.R., Delle Chiaie, B., De Baere, E., Thompson, M.D., Roscioli, T., Kielbasa, S., Kinoshita, T., Mundlos, S., Robinson, P.N., & Horn, D. (2012) *Am. J. Hum. Genet.*, **91**, 146–151.
- 93) Krawitz, P.M., Schweiger, M.R., Rodelsperger, C., Marcelis, C., Kolsch, U., Meisel, C., Stephani, F., Kinoshita, T., Murakami, Y., Bauer, S., Isau, M., Fischer, A., Dahl, A., Kerick, M., Hecht, J., Kohler, S., Jager, M., Grunhagen, J., de Condo, B.J., Doelken, S., Brunner, H.G., Meinecke, P., Passarge, E., Thompson, M.D., Cole, D.E., Horn, D., Roscioli, T., Mundlos, S., & Robinson, P.N. (2010) *Nat. Genet.*, **42**, 827–829.
- 94) Maydan, G., Noyman, I., Har-Zahav, A., Neriah, Z.B., Pasmanik-Chor, M., Yeheskel, A., Albin-Kaplanski, A., Maya, I., Magal, N., Birk, E., Simon, A.J., Halevy, A., Rechavi, G., Shohat, M., Straussberg, R., & Basel-Vanagaite, L. (2011) *J. Med. Genet.*, **48**, 383–389.
- 95) Ng, B.G., Hackmann, K., Jones, M.A., Eroshkin, A.M., He, P., Williams, R., Bhide, S., Cantagrel, V., Gleeson, J.G., Paller, A.S., Schnur, R.E., Tinschert, S., Zunich, J., Hegde, M.R., & Freeze, H.H. (2012) *Am. J. Hum. Genet.*, **90**, 685–688.
- 96) Kvarnung, M., Nilsson, D., Lindstrand, A., Korenke, G.C., Chiang, S.C., Blennow, E., Bergmann, M., Stodberg, T., Makitie, O., Anderlid, B.M., Bryceson, Y.T., Nordenskjold, M., & Nordgren, A. (2013) *J. Med. Genet.*, **50**, 521–528.
- 97) Hansen, L., Tawamie, H., Murakami, Y., Mang, Y., ur Rehman, S., Buchert, R., Schaffer, S., Muhammad, S., Bak, M., Nothen, M.M., Bennett, E.P., Maeda, Y., Aigner, M., Reis, A., Kinoshita, T., Tommerup, N., Baig, S.M., & Abou Jamra, R. (2013) *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 575–583.
- 98) Krawitz, P.M., Murakami, Y., Riess, A., Hietala, M., Kruger, U., Zhu, N., Kinoshita, T., Mundlos, S., Hecht, J., Robinson, P.N., & Horn, D. (2013) *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 584–589.
- 99) Kuki, I., Takahashi, Y., Okazaki, S., Kawaki, H., Ehara, E., Inoue, N., Kinoshita, T., & Murakami, Y. (2013) *Neurology*, **81**, 1467–1469.
- 100) Murakami, Y., Kanzawa, N., Saito, K., Krawitz, P.M., Mundlos, S., Robinson, P.N., Karadimitris, A., Maeda, Y., & Kinoshita, T. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 6318–6325.
-