

ロイコトリエンB₄ω水酸化酵素の研究

楠瀬正道*・菊田安至*

Studies on Leukotriene B₄ ω-Hydroxylase

Masamichi KUSUNOSE and Yasushi KIKUTA

ABSTRACT

We have isolated and sequenced cDNAs encoding two human leukotriene B₄ (LTB₄) ω-hydroxylases. Human neutrophil enzyme (CYP4F3) contained 520 amino acids with a molecular weight of 59,805 Da, while human liver enzyme (CYP4F2) contained 520 amino acids with a molecular weight of 59,853 Da. The two enzymes showed 87.3% sequence homology with each other. The microsomes from yeast cells transfected with the cDNAs for CYP4F3 and CYP4F2 catalyzed the ω-hydroxylation of LTB₄ with K_m values of 0.71 μM and 46 μM, respectively. Highly purified enzyme of CYP4F3 also exhibited ω-hydroxylase activities toward LTB₄, 6-trans-LTB₄, 20-hydroxy LTB₄, lipoxin A₄, lipoxin B₄, and 12-HETE. Southern blot of human genomic DNA probed with the CYP4F3 cDNA indicated the existence of at least 5 related genes of CYP4F. The CYP4F3 gene, which contained 12 exons, was mapped to chromosome 19p13.2.

キーワード：脂肪酸ω水酸化酵素, チトクローム P450, ロイコトリエンB₄ω水酸化酵素, CYP4F, cDNA, クローニング, 遺伝子, 染色体

1. はじめに

ω酸化とはオランダの生化学者Verkadeらによって1933年に提唱された脂肪酸の代謝経路である¹⁾。ω位すなわち脂肪酸カルボキシル基の反対側の末端位のメチル基が酸化される反応である。彼らは炭素数11の脂肪酸からなるトリグリセリドを摂取した健康人の尿中に、多量のundecane dioic acid (炭素数11のジカルボン酸)が排泄される事実を観察し、このような脂肪酸の代謝をω酸化と名づけた。



Verkadeはさらに精力的に研究を行った結果、生体内において脂肪酸はω酸化によってまずジカルボン酸に酸化され、その後、炭素数の少ないジカルボン酸へと分解されるものと主張した。しかし1950年代になり、脂肪酸β酸化に関する一連の酵素がミトコンドリアから精製されるにおよび、脂肪酸の主要な代謝経路はβ酸化であることが決定的になった。現在、細胞内でのω酸化の重要性については殆ど未決着と言ってよい。しかし著者はこのω酸化経路の最初のステップであるω水酸化反応の活性が、生物界に広く分布している事実注目した。例えば、ヘキサンを単一炭素源として培養した細菌から分離された酵素系は、中級脂肪酸の

* 食品工学科

ω 水酸化を触媒し、この反応には脂肪酸 ω 水酸化酵素の他に鉄硫黄蛋白質ルブレドキシンとNADH-ルブレドキシン還元酵素を必要とすることを見出した²⁾。さらに脂肪酸の ω 水酸化酵素は種々の脊椎動物の肝、腎、肺等のミクロソームにも存在し、チトクロームP450の一種であることを明らかにした^{3,4)}。チトクロームP450 (P450) とは、プロトヘムを補欠分子族とするヘム-チオレート蛋白質の総称で、その還元型に一酸化炭素を通じて差スペクトルを測定すると、450nmに吸収極大を示す色素 (Pigment) という意味で、PigmentのPをとってP450と命名されたものである⁵⁾。P450は共通の祖先から出発して、生物の進化と共に多数の分子種に分岐しつつ、動物、植物、微生物に広く分布し、P450遺伝子スーパーファミリーを形成している⁶⁾。これらのP450の大部分は脂溶性物質を基質とする一原子酸素添加酵素であるが、イソメラーゼやNOの還元酵素として働くP450も存在する。この約30年間にわたり、多くの生化学者や薬理学者によって活発に研究が続けられてきたP450は、異物の解毒や活性化に働く肝臓の薬物代謝酵素群と、副腎皮質及び生殖器のステロイドホルモン合成酵素群の二つである⁷⁾。そこで著者らは、 ω 酸化の生物学的意義を解明する第一歩として、 ω 水酸化P450の精製を行い、その本体の解明を試みたところ、あまたのP450 (上述の2群) には属さないユニークな存在であることがわかってきた。著者らはまず、脂肪酸ならびにプロスタグランジン ω 水酸化に関するP450、続いてロイコトリエンの同反応に関するP450について研究を進めた。

2. 脂肪酸及びプロスタグランジン ω 水酸化酵素の精製とcDNAクローニング

まずウサギの腎皮質のミクロソームから3種の異なる脂肪酸 ω 水酸化酵素⁸⁻¹⁰⁾を、またプロゲステロンを投与したウサギの肺のミクロソームから種々のプロスタグランジンを ω 水酸化する酵素を均一に精製した¹¹⁾。つづいてそれらの全一次構造をcDNAクローニングにより決定した¹²⁻¹⁴⁾。その結果、以上の ω 水酸化酵素は互いに高い相同性 (85%以上) を示すP450で、P450遺伝子スーパーファミリー (CYP) 中のCYP4群 (ファミリー) のA亜群 (サブファミリー) と位置づけられた⁶⁾。これらの ω 水酸化酵素群は、前述した異物代謝型P450 (CYP1, 2, 3群) やステロイドホルモン合成型P450 (CYP11, 17, 21群) とは20数%以下の相同性しか示さなかった¹²⁻¹⁴⁾。さらに本酵素は腎や肺の他に、小腸¹⁵⁾、大腸¹⁶⁾、胎盤¹⁷⁾、肝臓^{18,19)}からも精製され、また子宮¹⁷⁾や耳下腺にも顕著に存在することが判明した。このように脂肪酸及びプロスタグランジン ω 水酸化P450が種々の組織に広く分布する事実は、本酵素が生体内でなんらかの重要な役割を演じていることを示唆している。Schwartzmanらはアラキドン酸の ω 水酸化によって作られた ω ヒドロキシアラキドン酸 (20-HETE) が、腎臓のNa,K-ATPase活性の促進や血管の収縮作用を示し、高血圧と深く関わっていると報告している²⁰⁾。

3. ロイコトリエンB₄ ω 水酸化酵素の研究

1) ヒト好中球のロイコトリエンB₄ ω 水酸化酵素のcDNAクローニングと発現

ロイコトリエンB₄ (LTB₄) は白血球の走化性、凝集、脱顆粒、活性酸素産生等を促進するなど多彩な生理活性を示し、炎症やアレルギーのメディエーターとして重要な役割を演じる物質である。このLTB₄は刺激を受けた好中球で、アラキドン酸から5-リポキシゲナーゼ経路によって合成される²¹⁾。しかしこれは強い生理活性を有するために、機能を果たせば直ちに分解除去されなければならない。その役割を担うのがロイコトリエンB₄ ω 水酸化酵素である。LTB₄は好中球の本酵素により20-ヒドロキシLTB₄、更に20-カルボキシLTB₄に代謝され速やかに不活性化を受ける (図1)。この不活性化経路の最初のステップであるLTB₄ ω 水酸化反応には、酸素分子とNADPHを必要とし、一酸化炭素によって阻害をうけることから、チトクロームP450によって触媒されると推定されていた²²⁾。しかし、この酵素はヒトの白血球にのみ特異的に存在し、ブタ、ウシ、ウサギ、ラット等の白血球には見出されないことから本酵素の精製は困難であり、その詳細は不明のままであった。著者らはウサギの肺のプロスタグランジン ω 水酸化酵素 (CYP4A4) に対するモルモット抗体が、ヒト白血球のミクロソームのLTB₄ ω 水酸化活性を阻害することを見出した (図2)²³⁾。この結果はプロスタグランジンとLTB₄の両 ω 水酸化酵素の構造的類似性を示唆している。そこでCYP4A4のcDNAをプローブとして、ヒト好中球のcDNAライブラリーよりLTB₄ ω 水酸化酵素のcDNAクローニングを行った²⁴⁾。その結果、本酵素は520のアミノ酸残基よりなり、分子量は59,805Daで、P450に特異的なアミノ酸配列を有していることが示された (図3)。この得られたcDNAを用いて本酵素を酵母内で発現させた

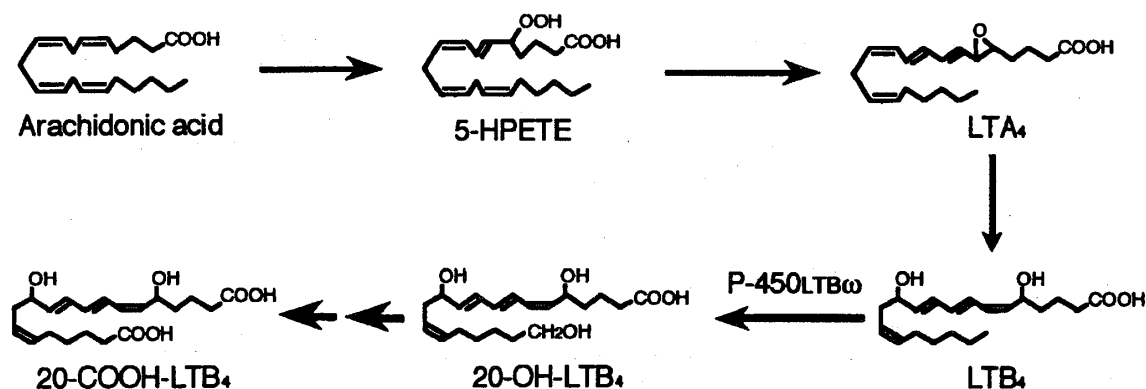


図1 ロイコトリエンB₄の生合成と代謝

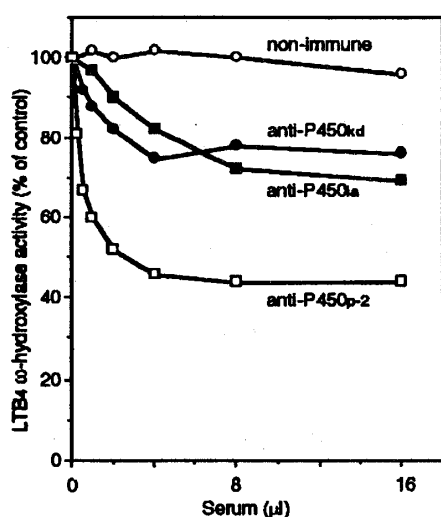


図2 抗P450_{p-2}および抗P450_{ka}、抗P450_{kd}血清によるヒト好中球ミクロソーム画分のロイコトリエンB₄ ω水酸化活性に対する影響

表1 ヒト好中球のロイコトリエンB₄ ω水酸化酵素 (CYP4F3) とその他のP450分子種との一次構造の相同性

P-450 gene (CYP)	Trivial name	Species	Sequence similarity (%)
1A1	c	Human	14.0
2B1	b	Rat	15.6
2E1	j	Human	15.0
2J1	ib	Rabbit	14.6
3A4	nf	Human	20.7
4A1	LA _ω	Rat	42.0
4A4	p-2	Rabbit	42.8
4A5	kd	Rabbit	42.8
4A6	ka-1	Rabbit	42.6
4A7	ka-2	Rabbit	43.7
4A11	HK _ω	Human	40.3
4B1	HP	Human	39.6
4C1		Cockroach	30.9
11A1	scc	Human	16.9
11B1	11β	Bovine	14.8
21A1	C21	Human	20.8
101A1	cam	<i>P. putida</i>	11.8

ところ、LTB₄ ω水酸化活性を持つP450の存在が認められた。本P450の一次構造を他のP450と比較すると、CYP4遺伝子ファミリーとは40%前後の相同性を示したが、その他のファミリーとは14~21%に過ぎなかった(表1)。この結果よりLTB₄ ω水酸化酵素は、CYP4ファミリーに属するが、プロスタグランジンや脂肪酸 ω水酸化酵素等のCYP4Aサブファミリーとは異なる新しいP450であることが明らかとなった。著者らが報告した1993年に、Hardwickら²⁵⁾はラットから分離した肝細胞に発ガン剤のアセチルアミノフルオレンを長期間添加して作成した腫瘍細胞中に、未知のP450が誘導されていることを認め、それがCYP4群のP450と約40%の相同性を示すことから、CYP4の新しい亜群 (CYP4Fサブファミリー) のP450としてCYP4F1と命名された。著者らのLTB₄ ω水酸化酵素はこのP450と78%という高い相同性を示すことから、同じ亜群のCYP4F3と命名されることとなった⁶⁾。しかしCYP4F1はその一次構造が決定されただけで、P450蛋白質としての性質、特に機能については全く明らかにされていない。

2) ヒト肝のロイコトリエンB₄ ω水酸化酵素のcDNAクローニングと発現

肝癌切除手術の際の病理標本の一部より調製したミクロソーム画分が顕著なLTB₄ ω水酸化活性を示すことが認められた。そこでヒト好中球のLTB₄ ω水酸化酵素 (CYP4F3) のcDNAをプローブとして用い、ヒト肝のcDNAライブラリーよりヒト肝のLTB₄ ω水酸化酵素のクローニングを行った²⁶⁾ (図3)。得られたcDNAクローンは520のアミノ酸残基よりなり、分子量59,853Daの蛋白質をコードしていた。その一次構造

はヒト好中球のLTB₄水酸化酵素 (CYP4F3) 及びラット肝腫瘍に発現しているP450 (CYP4F1) とそれぞれ87.3%及び78.5%という高い相同性を示し、本酵素もCYP4F遺伝子サブファミリーに属していることが示され、CYP4F2と命名された。得られたcDNAを用いて本酵素を酵母内で発現させたところ、LTB₄水酸化活性を持ったP450が発現したが、そのLTB₄に対するKm値は44.8 μMで、好中球の酵素 (CYP4F3) のKm値0.71 μMの63倍高い値を示した。また肝と好中球の両酵素のcDNAの全長をそれぞれプローブとして、ノーザンブロット解析を行ったところ、いずれも肝、腎及び白血球の全てにバンドが認められた。ところが、両cDNAの間で最も相同性の低い (50%以下) 配列である肝の酵素のcDNAの279-384番目、ならびに好中球の酵素のcDNAの236-377番目を、各特異的プローブとして用いてノーザンブロット解析を行ったところ、肝の酵素は肝に、好中球の酵素は白血球にのみ、それぞれ特異的に発現していることが明らかとなった。

3) 両ロイコトリエンB₄水酸化酵素の精製と性質

リーダー配列及びトレーラー配列を改変したcDNAを使用して、ヒトの両ロイコトリエンB₄水酸化酵素の酵母内発現を行ったところ、共にマイクロソーム画分の蛋白質1mg当たり0.05~0.10nmolの酵素が発現し、改変していないcDNAを用いた発現量よりも3倍以上高くなった。これらの酵母マイクロソーム画分を1%コール酸で可溶化後、AHセファローズ4B, DEAE-5PW-HPLC, 及びヒドロキシルアパタイトHPLCの各カラムにかけてクロマトを行った。得られた精製両酵素はいずれもSDS-PAGE上均一なバンドを示し、その見かけ上の分子量は好中球の酵素が55KDa, 肝臓の酵素が57KDaであった。これらの酵素標品のN-末端アミノ酸配列を調べたところ、N-末端のメチオニンは欠落していたが、他はすべてcDNAより推定される配列と同一であった。好中球の精製酵素 (CYP4F3) の酸化型の絶対スペクトルは、低スピン型のP450のプロフィールを示し、Soret帯、α吸収帯及びβ吸収帯の吸収極大はそれぞれ419nm, 573nm及び534nmであった (図4A)。また本酵素の還元型一酸化炭素結合差スペクトルは典型的なP450のプロフィールを示し、その吸収極大は449.5nmであった (図4B)。一方、肝臓の酵素 (CYP4F2) も酸化型の吸収スペクトルは低スピン型を示し、還元型一酸化炭素結合差スペクトルの吸収極大は450nmであったが、420nm付近にもピークが見られ、これは酵素蛋白が一部変性を受けていることを示している。両酵素のLTB₄水酸化活性に対するNADPH-チトクロームP450還元酵素 (fp₂) とチトクローム b₅の要求性を調べたところ、精製CYP4F3の活性にはfp₂が必須で、チトクローム b₅は若干の促進作用を示した。一方、CYP4F2は精製により失活するため、1-*o*-*n*-オクチル-β-D-グルコピラノシドによりマイクロソーム画分より可溶化された標品について測定すると、fp₂は活性に必須であり、さらにチトクローム b₅はfp₂の存在下に活性を2~3倍増加させ、CYP4F3よりもチトクローム b₅の要求性が顕著であった。次に両酵素の基質特異性についてさらに検討した。精製されたCYP4F3のLTB₄に対するKmは0.64 μMで、Vmaxは34.0nmol/min/nmol P450であ

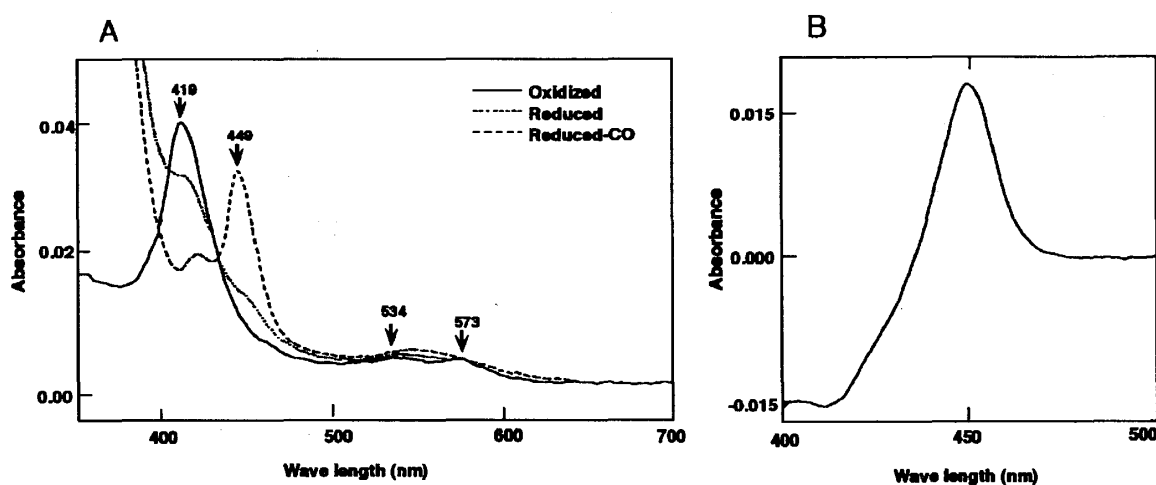


図4 酵母マイクロソーム画分から精製したヒト好中球のロイコトリエンB₄水酸化酵素 (CYP4F3) の絶対吸収スペクトル (A) と還元型一酸化炭素差スペクトル (B)

るが、その他にも、6-トランスLTB₄、20-ヒドロキシLTB₄、リポキシンA₄、リポキシンB₄、12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸(12-HETE)の ω 水酸化も触媒することが明らかになった。これらの基質のKm値はそれぞれ96.0, 12.7, 253, 91.6, 73.4 μ Mで、Vmaxはそれぞれ29.9, 86.3, 15.0, 138, 73.0 nmol/min/nmol P450であった。一方、可溶化されたCYP4F2は、LTB₄ (Km 46 μ M, Vmax 3.8 nmol/min/nmol P450)の他に、6-トランスLTB₄及びリポキシンA₄も活発に ω 水酸化し、Km値はそれぞれ180及び146mMで、Vmaxはそれぞれ48.3及び8.3 nmol/min/nmol P450であった²⁷⁾。いずれのロイコトリエンB₄ ω 水酸化酵素も、CYP4A亜群の酵素⁸⁻¹⁹⁾と異なり、ラウリン酸、パルミチン酸、アラキドン酸、種々のプロスタグランジンに対する活性は全く認められなかった。

4) 好中球のロイコトリエンB₄ ω 水酸化酵素 (CYP4F3) の遺伝子構造

次にCYP4F3酵素の遺伝子構造について解析を試みた。まずヒトのゲノムDNAのサザンブロッティングを行ったところ、CYP4F3のcDNAの全長をプローブとして用いた場合、制限酵素の切断により最大7本のバンドが認められ、複数の類似の遺伝子の存在が確認された。一方、CYP4F3に特異的なプローブを用いた場合は1~2本のバンドが、CYP4F2に特異的なプローブでは3~5本のバンドが見られ、それぞれに関連した遺伝子が複数個存在していた。

CYP4F3のゲノムDNAのクローニングにより得られた3つのクローン (K-1, 8, 1) について、制限酵素サイトマッピングを行い、さらにエクソンを中心に塩基配列を決定した (図5)²⁸⁾。その結果、本酵素の

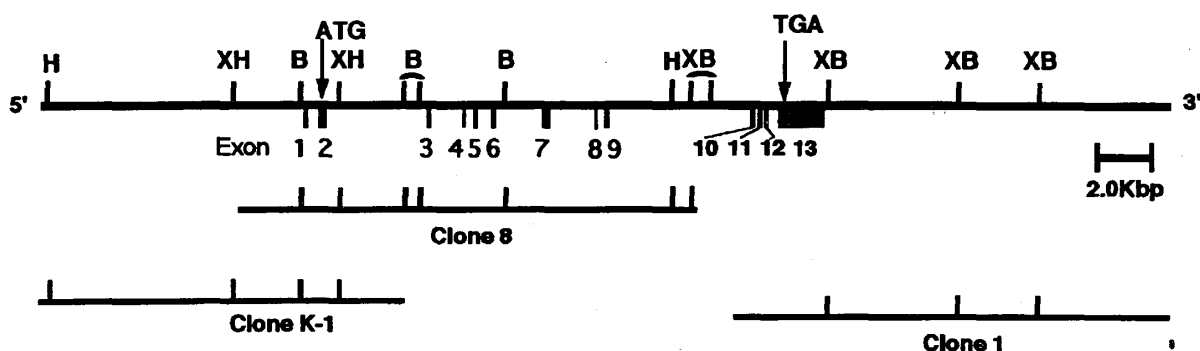


図5 ヒト好中球のロイコトリエンB₄ ω 水酸化酵素 (CYP4F3) 遺伝子の構造

遺伝子の全長は得られなかったが、オープンリーディングフレームは12個のエクソンに分断されていて、エクソンIは49bのリーダー配列をコードしており、開始コドンはエクソンII上に、終止コドンはエクソンXIII上に見られた。このうち、CYP4F3に特異的な配列はエクソンIII上に見られ、CYP4遺伝子ファミリーで共通する配列はエクソンVIIIとエクソンIXにまたがっており、さらにP450の特徴であるヘムと配位するシステインはエクソンXIIIにコードされていた。また、cDNAと比較して、塩基の置換は5箇所見られたが、これらは全てトレーラー配列上にあり、アミノ酸の置換は認められなかった。一方、本遺伝子の転写開始点にはTATAボックスやGCボックス等の典型的なプロモーター配列は認められなかったが、129b上流にCACC結合蛋白質の認識サイトが見られた他、上流1kbの範囲に複数の転写調節因子の結合サイトが確認された。

さらにCYP4F3の染色体上での位置をFISH法により調べたところ、短い染色体の短腕側でシグナルが確認された (図6A)。これはR分染法により19番染色体上の19p13であると推定されたが (図6B)、20番染色体との区別が明瞭でなく、またより詳細な位置を確かめるために、19番または20番染色体上で変異を持ち、その位置が確認されているヒトの染色体を用いてさらにFISH法を行った。その結果、20番染色体の長腕に欠失を持つ染色体を用いたとき、シグナルは欠失のある染色体上には見られず、本遺伝子が19番染色体上にあると確認された (表2)。また、19番染色体の短腕に組み替えを持つ症例のうち、19p13.1での組み替えを持つ染色体ではシグナルが転移して11番染色体上で確認され、本遺伝子が19p13.1よりも遠位側に存在することが示された。さらに19p13.3で転移している4つの症例の染色体ではシグナルは全て残りの19番染色体上で見られたことから、本遺伝子は19p13.2に位置していることが明らかとなった (表2, 図7)²⁹⁾。

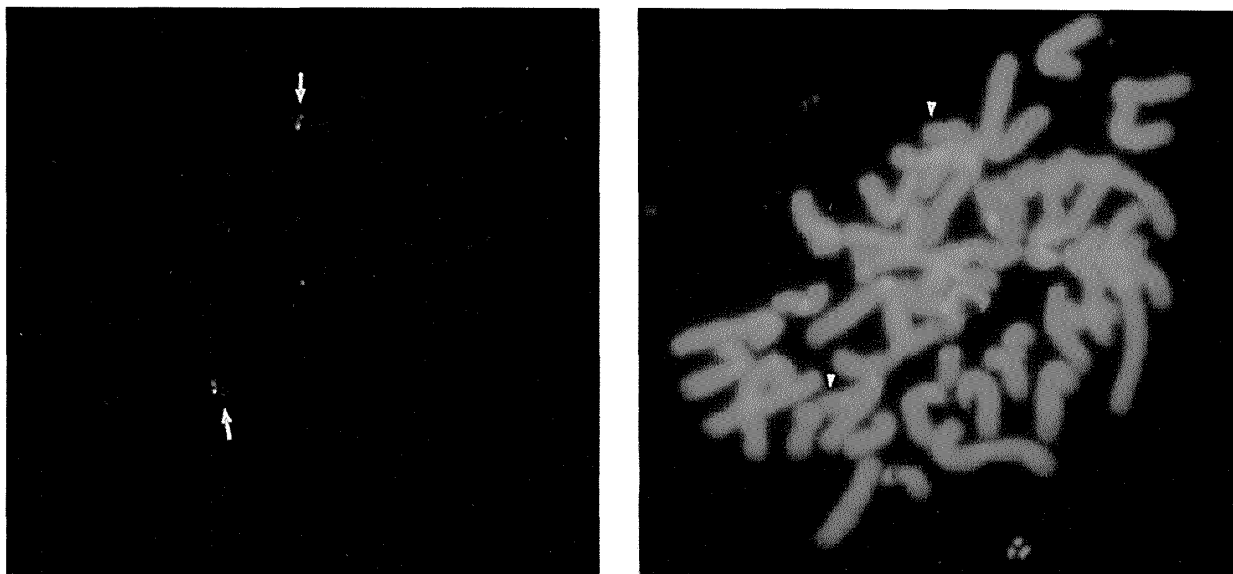


図6 CYP4F3遺伝子の蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (A) と propidium iodide 染色 (B)

表2 変異を持つヒトの染色体上でのCYP4F3遺伝子の位置

Patient number	Karyotic anomaly	Break point of chromosome 19 or 20	Signal location
1	der(1)(p12)(q22), t(8;18)(p11;p11), der(20)(q11)	20q11	19p
2	add(6)(p24),+8, t(11;19)(q23;p13)	19p13.1	11q
3	t(1;19)(q23;p13)	19p13.3	19p
4	t(9;22)(q34;q11), der(19)t(1;19)(q25;p13)	19p13.3	19p
5	+der(1)t(1;19)(q23;p13) der(19)t(1;19)(q23;p13)	19p13.3	19p
6	t(11;19)(q23;p13)	19p13.3	19p

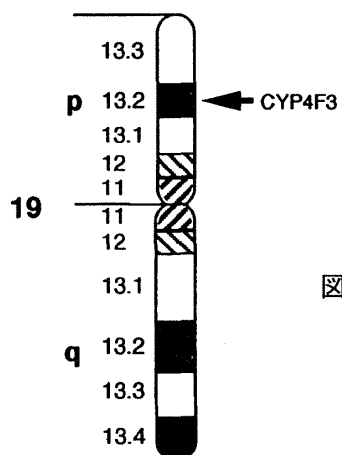


図7 第19番染色体上のCYP4F3遺伝子の位置

5) おわりに

多彩な生理活性と共に、炎症やアレルギーのメディエーターとして働くロイコトリエン B_4 の不活性化には、二つの異なる代謝経路の存在が知られている。その1つは本論文で示した ω 酸化経路であり、他の1つは12位の酸化につづく10, 11位間二重結合の還元が始まる経路である^{30,31}。ヒトの好中球では第一の経路が活発であるが、他の動物の好中球ではロイコトリエン B_4 ω 水酸化酵素は存在せず、第二の経路が発達している。そのためにヒト好中球の同酵素の本体については、多数の研究にも拘わらず解明が遅れていた^{22,32-35}。著者らはウサギのプロスタグランジン ω 水酸化酵素 (CYP4A) のcDNA¹²をプローブに用いて、ヒト好中球のロイコトリエン B_4 ω 水酸化酵素 (CYP4F3) の一次構造を決定し²⁴、ついで酵素を酵母に発現させた後、精製して均一な蛋白質を得た。その結果、本酵素はLTB $_4$ 以外にも種々のリポキシゲナーゼ代謝物を ω 水酸化することが明らかになった。また本酵素の一次構造が、脂肪酸やプロスタグランジン ω 水酸化酵素型P450 (CYP4A亜群) と約40%の相同性しか示さなかったことは予想外であった。一方、本酵素はHardwickら²⁵によって報告されたラットの肝腫瘍に発現するP450 (CYP4F1) と73%という高い相同性を示した。しかしこのP450は蛋白質としては分離されておらず、その機能は全く不明である。さらに著者らはヒトの肝臓に新しいロイコトリエン B_4 ω 水酸化酵素 (CYP4F2) の存在を初めて見出した²⁶。また1994年の米国生化学会の抄録によれば、HardwickらはラットのCYP4F1のcDNAを用いて、ヒト肝臓のcDNAライブラリーをスクリーニングした結果、CYP4F1と73%の相同性を示すP450のcDNAを分離し、これを用いてバキュロウイルス昆虫細胞系にP450を発現させて、ラウリン酸、ステアリン酸、アラキドン酸ならびにロイコトリエン B_4 の ω 水酸化活性を認めている³⁶。このP450の酵素活性値については全く記載がないので、著者らのCYP4F2と比較は困難である。また一方、1994年にカナダで開催されたチトクロームP450の国際学会において、Koopらはヒトの肝臓より、N末端のアミノ酸配列がCYP4F3と72%の相同性を持つP450を精製してCYP4F4と呼んでいる。このP450はロイコトリエン B_4 、ラウリン酸、アラキドン酸及びオレイン酸を ω 水酸化する。以上米国の2研究グループによる報告はいずれも学会報告で、未だに論文として掲載されていないが、著者らの成績とともに、ヒトにおいては数種類のCYP4F亜群P450が存在することを示唆している。現在、われわれはヒトの好中球及び肝臓の両CYP4F酵素の遺伝子の詳細な構造解析を進めている。今後、発現調節領域の構造を明らかにし、同酵素の生理的役割の解明、把握を目指すものである。

参考文献

- 1) P.E. Verkade, M. Elzas, J. van der Lee, H.H. DeWolff, A. Verkade-Sanderbergen, D. van der Sande: *Z. Physiol. Chem.* 215, 225-257 (1933)
- 2) M. Kusunose, E. Kusunose, M.J. Coon: *J. Biol. Chem.* 239, 1374-1380, 2135-2139 (1964)
- 3) K. Ichihara, E. Kusunose, M. Kusunose: *Biochim. Biophys. Acta* 176, 704-712 (1969)
- 4) K. Ichihara, E. Kusunose, M. Kusunose: *Biochim. Biophys. Acta* 239, 198-189 (1971)
- 5) T. Omura, R. Sato: *J. Biol. Chem.* 237, 1375 (1962)
- 6) D.R. Nelson, T. Kamataki, D.J. Waxman, P. Guengerich, R.W. Estabrook, R. Feyereisen, F.J. Gonzalez, M.J. Coon, I.C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda, D.W. Nebert: *DNA Cell Biol.* 12, 1-51 (1993)
- 7) T. Omura, Y. Ishimura, Y. Fujii-Kuriyama: *Cytochrome P-450*, 2nd., Kodansha, Tokyo (1993)
- 8) K. Ogita, E. Kusunose, S. Yamamoto, K. Ichihara, M. Kusunose: *Biochem. Int.* 6, 191-198 (1983)
- 9) E. Kusunose, A. Sawamura, H. Kawashima, I. Kubota, M. Kusunose: *J. Biochem.* 194-196 (1989)
- 10) R. Yoshimura, E. Kusunose, N. Yokotani, S. Yamamoto, I. Kubota, M. Kusunose: *J. Biochem.* 108, 544-548 (1990)
- 11) S. Yamamoto, E. Kusunose, K. Ogita, M. Kaku, K. Ichihara, M. Kusunose: *J. Biochem.* 96, 593-603 (1984)

- 12) S. Matsubara, S. Yamamoto, K. Sogawa, N. Yokotani, Y. Fujii-Kuriyama, M. Haniu, J.E. Shively, O. Gotoh, E. Kusunose, M. Kusunose: *J. Biol. Chem.* 262, 13366-13371 (1987)
- 13) N. Yokotani, R. Bernhardt, K. Sogawa, E. Kusunose, O. Gotoh, M. Kusunose, Y. Fujii-Kuriyama: *J. Biol. Chem.* 264, 21665-21669 (1989)
- 14) N. Yokotani, E. Kusunose, K. Sogawa, H. Kawashima, M. Kinoshita, M. Kusunose, Y. Fujii-Kuriyama: *Eur. J. Biochem.* 196, 531-536 (1991)
- 15) M. Kaku, K. Ichihara, E. Kusunose, K. Ogita, S. Yamamoto, I. Yano, M. Kusunose: *J. Biochem.* 96, 1883-1891 (1984)
- 16) M. Kaku, E. Kusunose, S. Yamamoto, K. Ichihara, M. Kusunose: *J. Biochem.* 97, 663-670 (1985)
- 17) S. Yamamoto, E. Kusunose, S. Matsubara, K. Ichihara, M. Kusunose: *J. Biochem.* 100, 175-181 (1986)
- 18) Y. Kikuta, E. Kusunose, S. Matsubara, Y. Funae, S. Imaoka, I. Kubota, M. Kusunose: *J. Biochem.* 106, 468-473 (1989)
- 19) Y. Kikuta, E. Kusunose, T. Okumoto, I. Kubota, M. Kusunose: *J. Biochem.* 107, 280-286 (1990)
- 20) M.L. Schwartzman, J.R. Falk, P. Yadagiri, B. Escalante: *J. Biol. Chem.* 264, 11658-11662 (1989)
- 21) S. Hammarstrom, L. Orning, K. Bernstrom: *Mol. Cell. Biochem.* 69, 7-16 (1985)
- 22) H. Sumimoto, K. Takeshige, S. Minakami: *Eur. J. Biochem.* 172, 315-324 (1988)
- 23) H. Sumimoto, Y. Kikuta, E. Kusunose, M. Kusunose, S. Minakami: *Biochem. Int.* 20, 381-387 (1990)
- 24) Y. Kikuta, E. Kusunose, K. Endo, S. Yamamoto, K. Sogawa, Y. Fujii-Kuriyama, M. Kusunose: *J. Biol. Chem.* 268, 9376-9380 (1993)
- 25) L. Chen, J.P. Hardwick: *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 18-23 (1993)
- 26) Y. Kikuta, E. Kusunose, T. Kondo, S. Yamamoto, H. Kinoshita, M. Kusunose: *FEBS Lett.* 348, 70-74 (1994)
- 27) 菊田安至, 楠瀬恵美, 水上洋一, 住本英樹, 竹重公一郎, 榊利之, 藪崎義康, 山本覚, 楠瀬正道: *生化学* 67, 588 (1995)
- 28) 菊田安至, 加藤美加子, 山下嘉章, 楠瀬正道, 楠瀬恵美, 田中公夫, 鎌田七男: *脂質生化学研究* 38 (1996)
- 29) 加藤美加子: 福山大学大学院工学研究科修士論文 (1996)
- 30) V. Kaefer, M. Martin, J. Fauler, K.H. Marx, K. Reisch: *Biochim. Biophys. Acta* 922, 337-344 (1987)
- 31) T. Yokomizo, T. Izumi, T. Takahashi, T. Kasama, Y. Kobayashi, F. Sato, Y. Taketani, T. Shimizu: *J. Biol. Chem.* 268, 18128-18135 (1993)
- 32) G. Hansson, J.A. Lindgren, S.E. Dahlen, P. Hedqvist, B. Samuelsson, *FEBS Lett.* 130, 107-112 (1981)
- 33) G. Shak, I.M. Goldstein: *J. Clin. Invest.* 76, 1218-1228 (1985)
- 34) W.S. Powell: *J. Biol. Chem.* 259, 3082-3089 (1984)
- 35) R.J. Soberman, R.T. Okita, G. Fitzsimmons, J. Rokach, B. Spur, K.F. Austen: *J. Biol. Chem.* 262, 12421-12427 (1987)
- 36) L. Chen, J.P. Hardwick: *FASEB J. Abstract* 257 (1994)