

メバロン酸二リン酸脱炭酸酵素の細胞内分布

道原明宏、赤崎健司、辻 宏

Subcellular distribution of mevalonate pyrophosphate decarboxylase

Akihiro MICHIHARA, Kenji AKASAKI and Hiroshi TSUJI

ABSTRACT

Mevalonate pyrophosphate decarboxylase (MPD) is found in the 100,000 x g supernatant fraction of cells or tissues and has been considered a cytosolic protein. Recently, it has been demonstrated by other groups that peroxisomes contain a number of enzymes involved in cholesterol biosynthesis which previously were considered to be cytosolic or located exclusively in the endoplasmic reticulum. This review discusses the main subcellular location of MPD.

1. コレステロール合成経路と合成酵素の局在場所

物質の動向は供給と消費のバランスで決まる。体内におけるコレステロールの蓄積も同様である。コレステロールは食事により体内に取り込まれる他に、アセチルCoA (エネルギー代謝の中間物質) を経て主に肝臓で合成される。肝臓で合成されるコレステロールの量は、食事によるコレステロール摂取量に左右されるが、1日の体内のコレステロールの約70%である。

Fig. 1はコレステロール合成経路と合成酵素の局在場所を示している。アセチルCoAは少なくとも32段階の酵素過程を経て、コレステロールへ変換されることが知られている (Fig. 1-①)。メバロン酸はリン酸化と脱炭酸化により、ステロイド骨格を組み立てるためのブロックにあたるイソペンテニルピロフォスフェイト (IPP)、すなわちイソプレノイド単位へ変換される。次に、この単位の6個が縮合されることにより中間体であるスクアレンが形成され、それからさらにステロイド骨格の母体であるラノステロールが生じる。コレステロールはさらにいくつかの段階を経て形成される。この経路の律速段階はHMG-CoAをメバロン酸へ変換するHMG-CoA還元酵素であり、多くの抗高脂血症薬はこの酵素をターゲットとしてデザインされている (Fig. 1-②)。合成されたコレステロールは細胞膜への供給、あるいは胆汁酸、ステロイドホルモン等の前駆体として用いられる (Fig. 1-③)。また、この経路の中間代謝物であるファルネシルピロフォスフェイト (FPP) は生体成分に必要なドリコール、コエンザイムQ、ファルネシル化されたタンパク

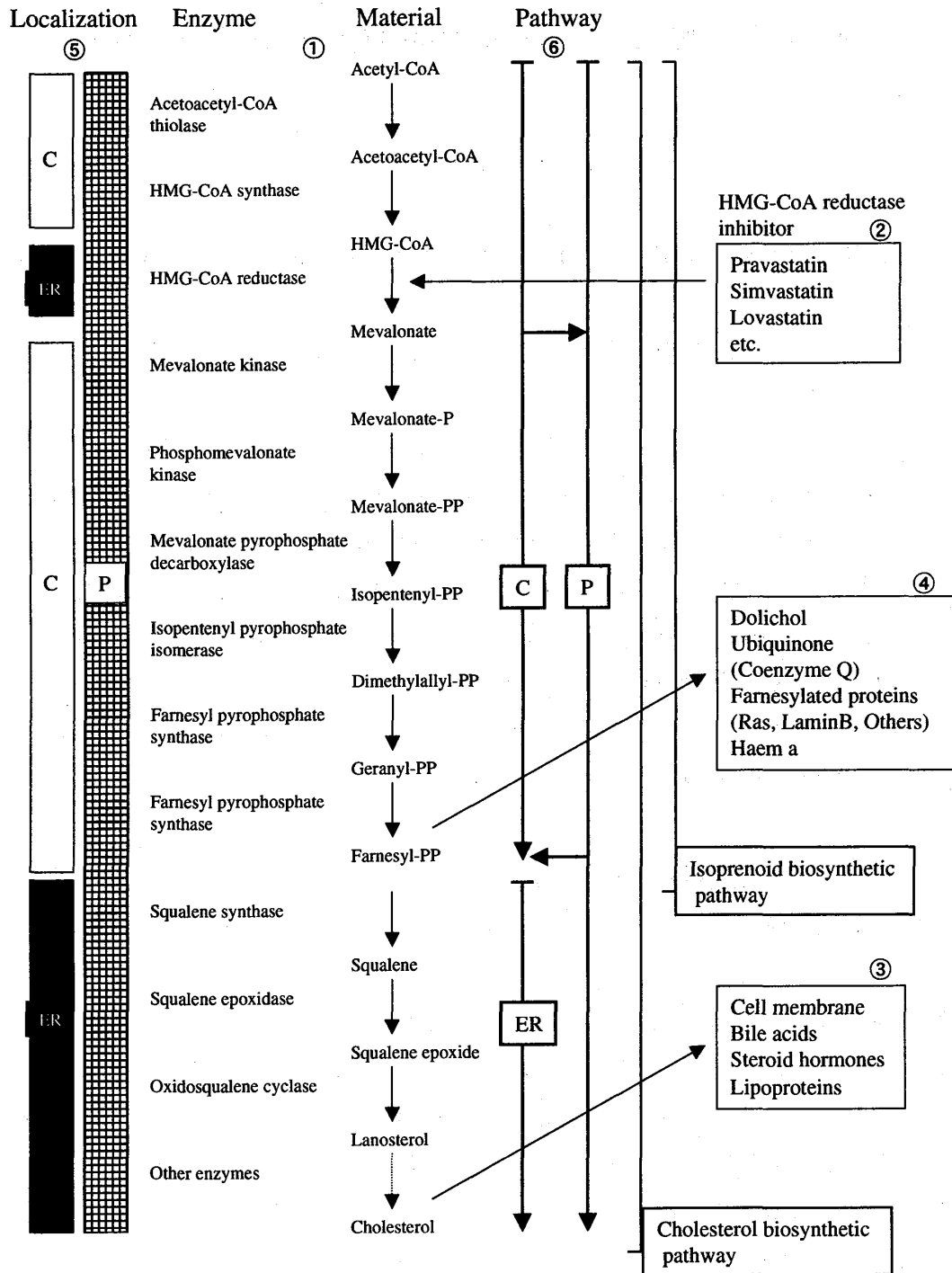


Fig. 1 Cholesterol biosynthetic pathway and subcellular distribution of enzymes involved in cholesterol biosynthesis.

C: cytosol, P: peroxisome, ER: endoplasmic reticulum.

The catalytic domain of HMG-CoA reductase, which includes the COOH-terminal two-thirds of the protein, extends into the cytoplasm.

質、ヘム a 等に対して部分的に用いられる (Fig. 1-④)。

HMG-CoA還元酵素並びにFPPからコレステロールへの合成に関与する酵素は、細胞分画により得られたマイクロゾーム画分に検出されることから小胞体の酵素であることが一般的に受け入れられている (Fig. 1-⑤)。また、アセチルCoAからFPPまでの合成に関与する酵素は、HMG-CoA還元酵素を除いて、106,000 x gの上清中に検出されることから細胞質に局在する酵素であると考えられてきた。近年、各合成酵素の1次構造解明によるペルオキシソームターゲティングシグナル (PTS) の同定、並びに細胞分画、免疫電顕、ジギトニンの実験 (特異的に分離した細胞質画分を用いる実験) または各合成酵素の推定的PTSを含む融合タンパク質の一過性発現と二重染色蛍光抗体法の結果より、アセチルCoAからFPPまでの合成経路 (イソプレノイド合成経路) に関与する酵素は、ペルオキシソームに多く局在していることが明らかにされてきた。¹⁻¹⁴⁾

現在、コレステロールの合成場所、並びにペルオキシソームにおけるコレステロール合成の意義が議論的となっている。現時点においてコレステロール合成経路は、1) 細胞質-小胞体経路、2) ペルオキシソーム経路、3) 複合型経路の3種類が提案されている (Fig. 1-⑥)。細胞質-小胞体経路は従来の経路であり、細胞質と小胞体に合成酵素が存在し、局在場所に沿ってコレステロール合成が行われる (HMG-CoA還元酵素は小胞体の膜に局在し、触媒領域は細胞質側に存在している)。ペルオキシソーム経路はペルオキシソームに全ての酵素が存在し、ペルオキシソーム内でコレステロール合成が行われる。複合型経路は細胞質、小胞体、ペルオキシソームに酵素が存在し、コレステロール中間代謝物がこれらの細胞内小器官を行き来してコレステロール合成が行われる。このように3種類の仮説が提案されているがコンセンサスは得られていない。

2. ペルオキシソームへの局在化シグナル

ペルオキシソームタンパク質は局在化に必要なシグナルをアミノ酸配列としてあるいは高次構造として保持しており、それを認識する装置がタンパク質をペルオキシソームへ移行させることが考えられている。これまでに明らかにされたPTSは、PTS1とPTS2、そして、2つのPTSと異なるカタラーゼが保持するPTScである (Table 1)。

PTS1はカルボキシル末端に3つのアミノ酸が並ぶシグナル配列 (-[S/A/C][K/H/R][L/M]) である (一般的には-SKL: PTS1)。^{15, 16)}

Table 1 Peroxisomal targeting signals

Targeting signal	Sequence
PTS1	-[S/A/C][K/H/R][L/M]-COOH
PTS2	H ₂ N- - - [R/K][L/V/I](X ₅)[H/Q][L/A]-
PTSc	-[L/E/V/R/K][A][N][L]-COOH

PTSc: PTS of catalase

PTS2はPTS1とは異なり、アミノ末端側に位置している。アミノ末端30アミノ酸までに現れる $-[R/K][L/V/I][X_5][H/Q][L/A]-$ がコンセンサス配列であり、ペルオキシソームへ局在化するための必要十分条件であることが考えられている（近年、Xの数が5以外の例も報告されている）。¹⁷⁻²¹⁾ PTS2配列はペルオキシソーム輸送後に切断される。^{22, 23)}

ヒトカタラーゼのPTScはカルボキシル末端に4つのアミノ酸が並ぶシグナル配列である (-KANL: KをL/E/V/Rに置換可能)。²⁴⁾ ヒトカタラーゼのPTSはPTS1と異なる点が2つ存在する。1つ目はカルボキシル末端から2番目のアミノ酸が塩基性アミノ酸でない点、2つ目はカルボキシル末端から4個目のアミノ酸が必須であるという点である。

3. ペルオキシソームタンパク質の局在化機構

Fig. 2はこれまでの報告をまとめた推定的なペルオキシソームマトリックスタンパク質の輸入メカニズムを示している。PTS1/PTS2タンパク質共に細胞質のリボゾーム上で合成され、その後ペルオキシソームへ輸送される。その時、細胞質からペルオキシソームまでPTSを運ぶタンパク質がPex5pとPex7pである。PTS1/PTScタンパク質はPex5pが、PTS2タンパク質はPex7pがレセプターあるいはキャリアータンパクとして働き、ペルオキシソームまで輸送する。Pex5p、Pex7p共に細胞内における局在性を調べた結果、実験系により異なるが細胞質とペルオキシソーム

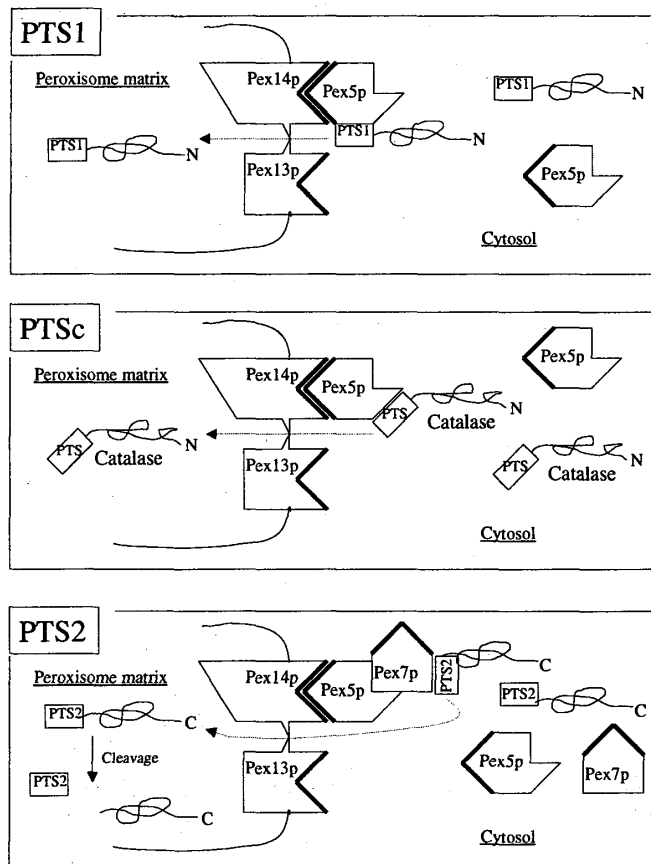


Fig. 2 Putative peroxisomal matrix protein import machinery.

ムに存在する。よって、PTSレセプター (Pex5pとPex7p) は細胞質とペルオキシソーム間を循環している可能性が考えられる。²⁵⁾ PTS2タンパク質はPex7pに結合した後、Pex5pとの複合体によって輸送され、Pex13p、Pex14p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る。Pex13p、Pex14pがともにPTSレセプターに結合すること、Pex13pまたはPex14pが欠失するとPTSタンパク質がペルオキシソーム内に入らないことから、Pex13pとPex14pはペルオキシソームマトリックスタンパク質がペルオキシソームに入るための共通の輸入場所であると考えられている。²⁶⁻²⁹⁾ しかし、PTSタンパク質と結合したPTSレセプターが、ペルオキシソーム表面上で次のPexタンパク質 (Pex13p、Pex14pなど) にPTSタンパク質を渡すのか、あるいはPTSレセプターごとペルオキシソーム内に入り、その後、PTSタンパク質を離すのかについては明らかになっていない。酵母ではPTSレセプターがペルオキシソーム内にまで入ることが報告されている。^{25, 30)}

4. ペルオキシソームとコレステロール合成酵素

コレステロール合成酵素のアミノ酸配列の分析結果から、PTSを含んでいる酵素はメバロン酸キナーゼ (MVAK: PTS2)、ホスホメバロン酸キナーゼ (PMVAK: PTS1) の2種類であることが明らかになった (Table 2)。³⁾ また、各合成酵素の推定的PTSを含む融合タンパク質の一過性発現と二重染色蛍光抗体法の結果から、新しいPTS1/PTS2類似配列を含んでいる酵素として、アセトアセチル CoA チオラーゼ (PTS1)、HMG-CoA 合成酵素 (PTS2)、MPD (PTS2)、IPP イソメラーゼ (PTS1) FPP 合成酵素 (PTS2) が明らかにされている。³⁾

Table 2 Peroxisomal targeting signals of cholesterol biosynthetic enzymes

Enzyme	Targeting signal	Sequence (species)
Acetoacetyl-CoA thiolase	*PTS1	QKL (human) QKL (rat)
HMG-CoA synthase	*PTS2	SV(X ₅)QL (human) SV(X ₅)QL (rat)
HMG-CoA reductase	Unknown	
Mevalonate kinase	PTS2	KV(X ₅)QL (human) KV(X ₅)QL (rat)
Phosphomevalonate kinase	PTS1	SRL (human) AKL (rat)
Mevalonate-PP decarboxylase	*PTS2	SV(X ₅)QL (human) SV(X ₅)QL (rat)
Isopentenyl-PP isomerase	*PTS1	YRM (human) HRM (rat)
Farnesyl-PP synthase	*PTS2	NS(X ₄)QE (human) KL(X ₄)QE (rat)

*New variation of the PTS1/PTS2 sequence as a peroxisomal targeting signal.

Isopentenyl-PP isomerase (IPPI) contains both a putative C-terminal PTS1 (-YRM in human and -HRM in hamster) and a N-terminal PTS2 (-HL[X₅]QL-, human and hamster). Localization studies indicate that IPPI is targeted to peroxisomes through the use of its C-terminal peptide.

FPPからスクアレンを合成するスクアレン合成酵素は、細胞分画、免疫電顕の結果から、小胞体に多く局在していることが明らかになった。^{31,32)} さらに、細胞分画により分離したマイクロゾーム画分とペルオキシソーム画分を用いて、スクアレンからコレステロールへの合成能を調べた結果、マイクロゾーム画分ではコレステロールへの合成が認められたが、ペルオキシソーム画分では認められなかった。³³⁾ 以上の結果より、現在スクアレンからコレステロールへの合成は小胞体で行われることが考えられている。

前述の結果から、イソプレノイド合成経路に関与する酵素の多くはペルオキシソームに局在していることが認知されはじめていた。近年、我々の実験結果 (MPDの細胞内分布) から、この局在場所に疑問符が打たれ始めてきた。

5. MPDの細胞内分布

MPDはATPとMgの存在下、メバロン酸二リン酸をIPPへ変換する時に脱炭酸反応を行う酵素であり、HMG-CoA還元酵素と並んでコレステロール合成調節に関与していることが報告されている。³⁴⁻³⁷⁾

MPDの多くは細胞質に存在することが一般的に受け入れられてきた。しかし近年の研究の結果、MPDを含むコレステロール合成酵素の多くはペルオキシソームに局在していることが報告されている。¹⁻¹⁴⁾ そこで、どちらの画分にMPDが多く局在しているのかを明確にするために、1) ペルオキシソーム増殖薬で処理したラット肝におけるイムノブロット解析、2) ラット肝並びにラット肝実質細胞を用いたスクロース密度勾配遠心法による細胞分画、3) ラット肝実質細胞を用いたジギトニンの実験ならびに4) 二重染色蛍光抗体法によりMPDの細胞内分布を調査した。^{38,39)} ペルオキシソーム増殖薬であるクロフィブレートで処理したラット肝のカタラーゼの量は、未処理に比べ著しい増加を示した (Fig. 3)。しかし、MPDの量はクロフィブレート処理、未処理ともに類似した値を示した。細胞分画によりラット肝とラット肝実質細胞を細胞質画分とペルオキシソーム画分に分離し、イムノブロット解析を行った結果、MPDは細胞質画分に多く検出され、ペルオキシソーム画分には全く検出されなかった (データ未掲載)。培養細胞にジギトニンを加えると膜の透過性が増大し、細胞内小器官は無傷な状態で細胞質タンパク質のみメディウム中に漏れ出してくることが報告されている。この方法に従いジギトニン存在下、非存在下におけるメディウム (細胞質画分) と細胞 (膜/オルガネラ画分) を用いてイムノブロット解析を行った結果、MPDの90%が細胞質画分中に検出された (Fig. 4)。さらに、細胞質のマーカー酵素であるヘキサキナーゼとMPDによる二重染色蛍光抗体法を行った結果、MPDの染色パターンはヘキサキナーゼによる典型的な細胞質タンパク質の染色パターンと類似していた (Fig. 5)。以上の結果よりMPDは細胞質に多く局在していることが明らかになった。

Krisansらは、MPDの全てがペルオキシソームに局在することをCV-1細胞 (サル腎臓細胞) を用いて、ジギトニンの実験結果から報告している。³⁾ そこで、種や細胞の違いにより局在場所が異なる可能性を明らかにするために、ノーマルラット腎臓細胞 (NRK)、マウスメラノーマ

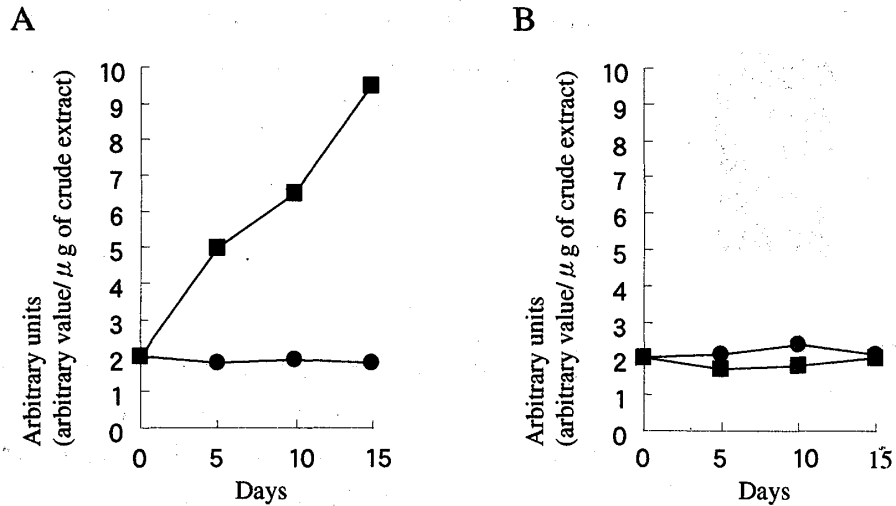


Fig. 3 Immunoblot analysis of catalase or MPD in crude extract of the livers of rats administered peroxisome proliferative drug.

Rats were fed powdered normal chow or chow containing 0.5% clofibrate for the periods indicated, then immunoblot analysis was performed with anti-catalase antibody or anti-MPD antiserum using crude extracts of the livers of rats. After the signals of catalase or MPD in the extracts were measured by a chromatoscanner, arbitrary units (the value obtained with the chromatoscanner/the value obtained using 1µg of protein from the crude extract of the liver) were estimated. A: Arbitrary units of catalase in the livers of rats administered a drug (normal chow [●] or chow containing 0.5% clofibrate [■]). B: Arbitrary units of MPD in the livers of rats (symbols same as A). Values are the means of three independent experiments and the variation was within 5%.

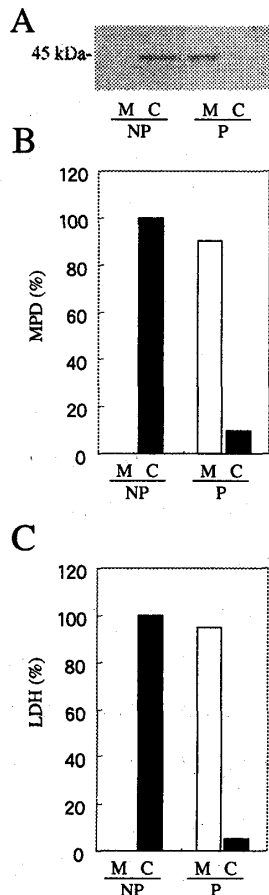


Fig. 4 Immunoblot analysis of MPD in nonpermeabilized and permeabilized rat hepatocytes.

A: Rat hepatocytes were incubated in KHM buffer (20 mM phosphate buffer [pH 7.2]/110 mM KOAc/2 mM MgOAc) in the presence (P) or absence (NP) of digitonin (40µg/ml) for 5 min at 4°C, and the cells (C; 10µl) and medium (M; 10µl) were analyzed by immunoblotting. B: Signals of A were quantified using a Gel-Pro analyzer. C: Activities of LDH in M and C were measured using permeabilized or nonpermeabilized rat hepatocytes. The amount of MPD or activity of LDH retained in the nonpermeabilized cells was taken as 100%. Data are the means of six identical experiments and each varies within 10%.

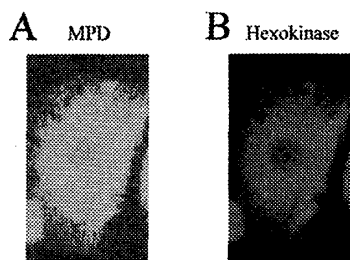


Fig. 5 Localization of MPD and hexokinase in rat hepatocytes.

The primary antibodies used were rabbit anti-rat MPD antibody (A) and mouse anti-hexokinase (B).

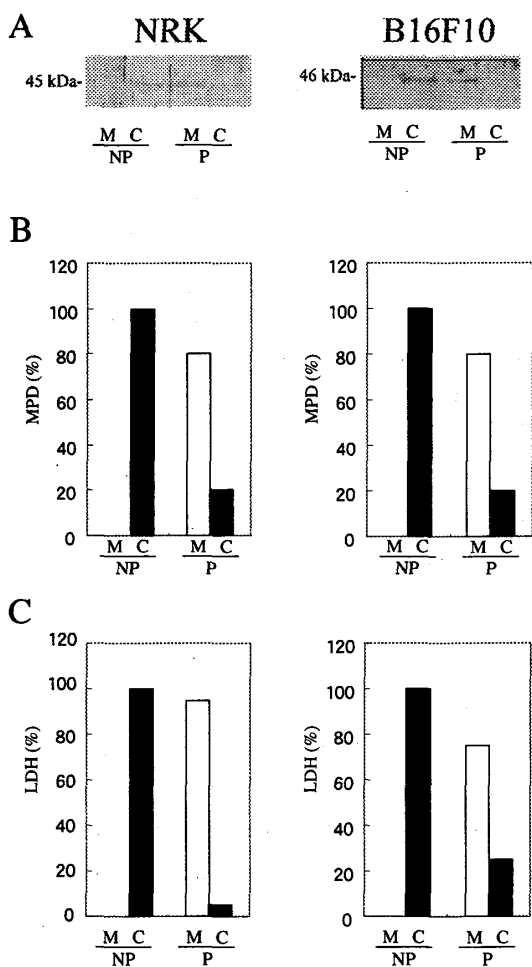


Fig. 6 Immunoblot analysis of MPD in nonpermeabilized and permeabilized normal rat kidney cells or mouse melanoma cells.

A: Normal rat kidney cells (NRK) or mouse melanoma cells (B16F10) were incubated in KHM buffer (20 mM phosphate buffer [pH 7.2]/110 mM KOAc/2 mM MgOAc) in the presence (P) or absence (NP) of digitonin (40 μ g/ml) at 4 $^{\circ}$ C for 5 min or 10 min, respectively, and the cells (C; 10 μ l) and medium (M; 10 μ l) were analyzed by immunoblotting. B: Signals of A were quantified using a Gel-Pro analyzer. C: Activities of LDH in M and C were measured using permeabilized or nonpermeabilized NRK or B16F10, respectively. The amount of MPD or activity of LDH retained in the nonpermeabilized cells was taken as 100%. Data are the means of six identical experiments and each varies within 10%.

(B16F10) を用いて細胞分画、ジギトニンの実験を行った。^{39, 40)} 細胞分画によりNRK、B16F10を細胞質画分とペルオキシソーム画分に分離し、イムノブロット解析を行った結果、MPDは各細胞の細胞質画分に多く検出され、ペルオキシソーム画分には全く検出されなかった(データ未掲載)。ジギトニンの実験において、MPDはNRK、B16F10ともに細胞質画分に多く検出された(Fig. 6)。以上の結果より、種や細胞の違いに関係なくMPDの多くは細胞質に局在し、ペルオキシソームに局在するMPDは少量であることが明らかになった。また、各細胞における膜/オルガネラ画分中のMPDの割合からコンタミンしている乳酸脱水素酵素(細胞質のマーカ酵素)の割合を引いた値と細胞分画の結果から、ペルオキシソームに局在するMPDの量はB16F10(0%)、ラット肝実質細胞(0-5%)、NRK(0-15%)であり、種や細胞の違いにより幾分異なる

ことが示された。Hogenboomらは細胞分画、免疫蛍光抗体法、免疫電顕、ジギトニンの実験により、ヒトMPD、MVAK、PMVAKの細胞内分布を調査した結果、3種の酵素は細胞質に多く局在し、ペルオキシソームには全く存在しないことを報告している。^{41, 42)} これまでの報告と我々の結果から、PTSを含むコレステロール合成酵素の主要な局在場所は、必ずしもペルオキシソームではないことが強く示唆された。

6. コレステロール合成におけるペルオキシソームの役割

次に、MPDが細胞内で増加した時の細胞内分布をラット肝を用いて調査した。以前我々は0.1%プラバスタチン（水溶性HMG-CoA還元酵素阻害剤）と5%コレステラミン（コレステロール腸管吸収阻害剤）を含む餌（CP diet）を12日間摂取させた時に普通食に比べMPD活性が12倍に増加することを報告した。⁴³⁾ この方法に従い、CP dietを12日間摂取させたラット肝を用いてスクロス密度勾配遠心法による細胞分画を行い、ペルオキシソーム画分をイムノプロット解析した結果、未処理のラット肝ペルオキシソーム画分中で検出されなかったMPDが十分検出された（Fig. 7）。各マーカー酵素に対するRelative enrichment（RE）を算出した結果、このペルオキシソーム画分には細胞質のマーカー酵素である乳酸脱水素酵素（LDH）も少量含まれていることが明らかになった（Table 3）。よって、ペルオキシソーム画分で検出されたMPDが細胞質画分のコンタミンであるか否かについて検討するために、MPDのREを算出した。その結果、ペルオキシソーム画分中のMPD-REはLDH-REよりも高い値を示した。これらの結果は、CP dietで処理したラット肝のペルオキシソーム画分中に、MPDが存在していることを示唆している。⁴⁴⁾

さらに、脂溶性HMG-CoA還元酵素阻害剤であるロバスタチン処理、未処理のラット肝実質細胞を用いたジギトニンの実験により、MPDのペルオキシソーム局在性について調査した。その結果、ロバスタチンで処理した膜/オルガネラ画分中のLDH活性は、未処理とほぼ一致した値を示した（Fig. 8）。しかし、ロバスタチンで処理したMPDの量は、未処理に比べ2.5倍に増加した。以上の結果よりHMG-CoA還元酵素阻害剤により、MPDが増加した時、少量のMPDが細胞質からペルオキシソームへ移行することが示唆された。

我々の結果とこれまでの報告をまとめると、MPD、PMVAK、MVAKはPTSを保持しているにも関わらず、細胞質に多く局在していることが明らかになった。よって、イソプレノイドの主要な合成場所は細胞質であることが考えられる。また、スクアレンからコレステロールへの合成がペルオキシソーム画分で認められないことから、細胞質—小胞体経路がコレステロールの主要な合成経路であることが考えられる（Fig. 9）。さらに、HMG-CoA還元酵素阻害剤により細胞内でのコレステロールの減少が引き起こされ、フィードバック機構によりMPDを含むコレステロール合成酵素が増加した時に、ペルオキシソームは緊急のイソプレノイド合成場所として働く可能性が示唆された。

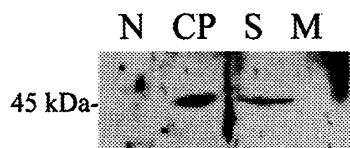


Fig. 7 Analysis of MPD in peroxisomal fraction of the liver of CP diet-treated rat by immunoblot.

CP or N represents intact peroxisomes (200 μ g) in the liver of CP diet (a diet containing 5% cholestyramine and 0.1% pravastatin)-treated or non-treated rat, respectively. Peroxisomal fraction in the liver of CP diet-treated rat was separated into soluble (S) and membrane (M) components. The ratio of S to M was 9 to 1. S represents 180 μ g of peroxisomal soluble and M represents 20 μ g of peroxisomal membrane components.

Table 3 Relative enrichment of LDH and MPD in rat liver peroxisome

Enzyme	Relative enrichment
NADPH-cytochrome P-450 reductase	0.05
Cytochrome-c oxidase	0.08
Acid phosphatase	0.29
Catalase	140.6
LDH	1.7
MPD	3.25

Relative enrichment was defined as the ratio of specific activity of the peroxisome to that of the homogenate. Signals of MPD were measured by a Gel-Pro analyzer, after the homogenate or peroxisome was subjected to immunoblot. Relative enrichment was defined as the ratio of the arbitrary unit (arbitrary value of signal of MPD/protein[μ g]) of the peroxisome to that of the homogenate. The values are the means of three identical experiments and each value varies within 10%. NADPH-cytochrome P-450 reductase (marker enzyme for endoplasmic reticulum); Cytochrome-c oxidase (marker enzyme for mitochondria); Acid phosphatase (marker enzyme for lysosome); Catalase (marker enzyme for peroxisome); Lactate dehydrogenase (LDH: marker enzyme for cytosol).

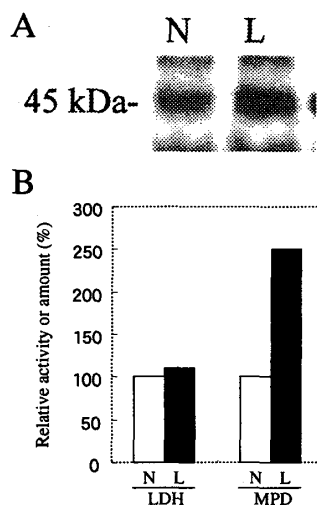


Fig. 8 Analysis of MPD in permeabilized rat hepatocytes by immunoblot.

A: Amount of MPD remaining cells was measured using permeabilized lovastatin-treated (L) or non-treated (N) rat hepatocytes by immunoblot analysis. B: Signals of A were quantified using a Gel-Pro analyzer. Activity of LDH remaining cells was measured using permeabilized lovastatin-treated (■) or non-treated (□) rat hepatocytes. The amount of MPD and activity of LDH retained in the permeabilized cells was taken as 100%. Data are the means of three identical experiments and each varies within 10%.

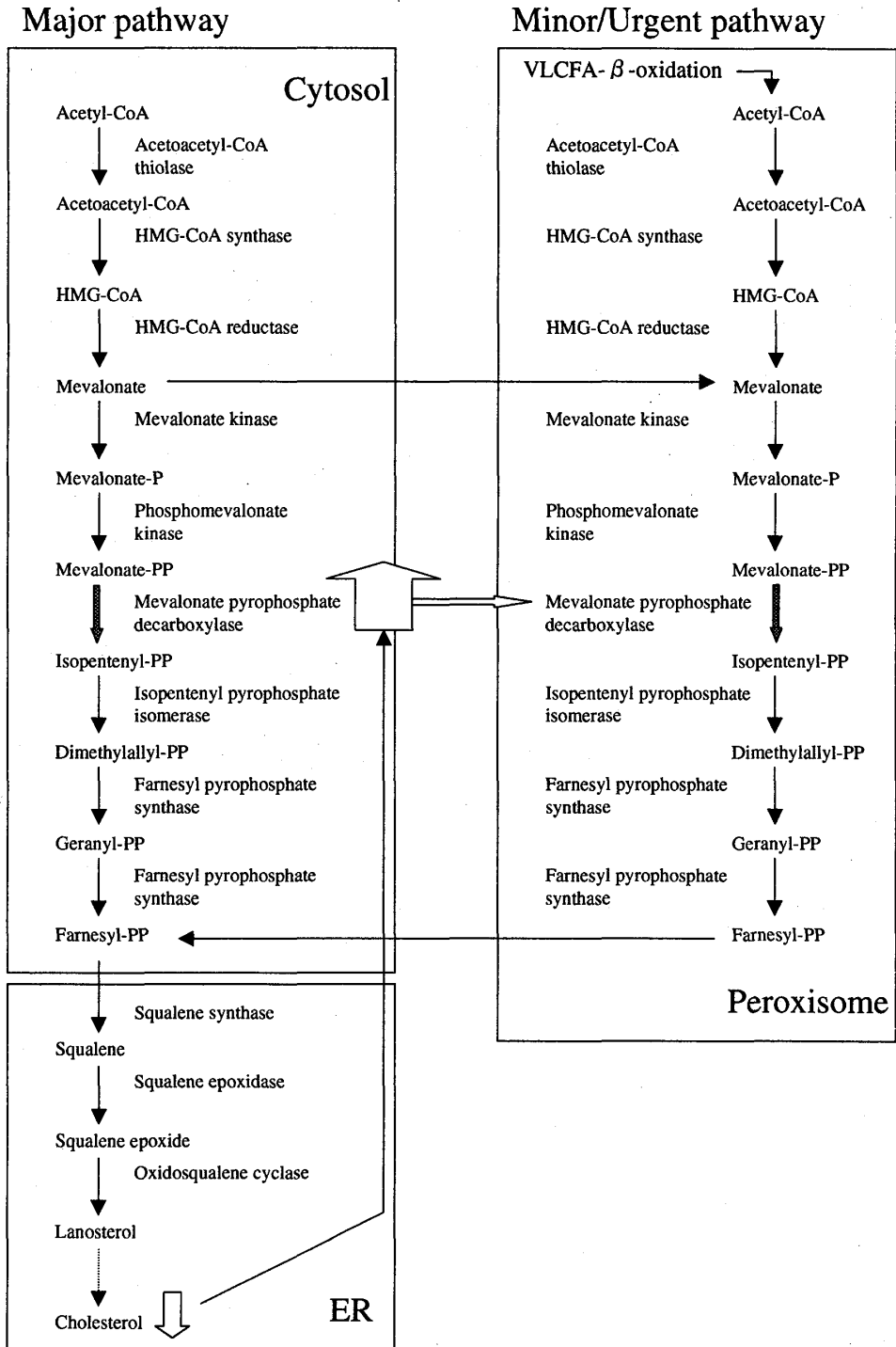


Fig. 9 Major pathway of cholesterol biosynthesis.

7. 今後の展望

我々の実験結果から、PTSを含むコレステロール合成酵素の主要な局在場所は、必ずしもペルオキシソームではないことが強く示唆された。ゆえに、イソプレノイド合成経路に関与する酵素の局在場所を詳細に再検討する必要がある。近年、Yeast Two Hybrid スクリーニングの結果から、ヒートショックプロテインのファミリーの1つであるMortalinがMPDと結合することが報告されている。⁴⁵⁾ Mortalinの局在場所はミトコンドリア、小胞体そして細胞質である。⁴⁶⁻⁴⁸⁾ ゆえに、MPDは細胞質においてMortalinあるいは他のタンパク質との相互作用により、ペルオキシソームへの移行が阻害され細胞質に多く局在しているのかもしれない。また、MPDがペルオキシソームへ移行するときのメカニズムとして、Pex7pとの結合が重要になるが直接的結合データは得られていない。これらの解明と共に、細胞質とペルオキシソームで行われるイソプレノイド合成の役割分担、並びにイソプレノイド合成を行うペルオキシソームの生理機能解明が今後の課題である。

参考文献

1. Thompson, S. L., Krisans, S. K., *J. Biol. Chem.*, **265**, 5731-5735 . (1990).
2. Hovik, R., Brodal, B., Bartlett, K., Osmundsen, H., *J. Lipid Res.*, **32**, 993-999 (1991).
3. Olivier, L. M., Kovacs, W., Masuda, K., Keller, G. A., Krisans, S. K., *J. Lipid Res.*, **41**, 1921-1935 (2000).
4. Krisans, S. K., Rusnak, N., Keller, G. A., Edwards, P. A., *J. Cell Biol.*, **107**, 122 (abstract) (1988).
5. Keller, G. A., Barton, M. C., Shapiro, D. J., Singer, S. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 770-774 (1985).
6. Keller, G. A., Pazirandeh, M., Krisans, S., *J. Cell Biol.*, **103**, 875-886 (1986).
7. Engfelt, W. H., Shackelford, J. E., Aboushadi, N., Jessani, N., Masuda, K., Paton, V. G., Keller, G. A., Krisans, S. K., *J. Biol. Chem.*, **272**, 24579-24587 (1997).
8. Kovacs, W. J., Faust, P. L., Keller, G. A., Krisans, S. K., *Eur. J. Biochem.* **268**, 4850-4859 (2001).
9. Stamellos, K. D., Shackelford, J. E., Tanaka, R. D., Krisans, S. K., *J. Biol. Chem.*, **267**, 5560-5568 (1992).
10. Biardi, L., Sreedhar, A., Zokaei, A., Vartak, N. B., Bozeat, R. L., Shackelford, J. E., Keller, G. A., Krisans, S. K., *J. Biol. Chem.*, **269**, 1197-1205 (1994).
11. Olivier, L. M., Chambliss, K. L., Gibson, K. M., Krisans, S. K., *J. Lipid Res.*, **40**, 672-679,(1999).
12. Paton, V. G., Shackelford, J. E., Krisans, S. K., *J. Biol. Chem.*, **272**, 18945-18950 (1997).
13. Wilkin, D. J., Kutsunai, S. Y, Edwards, P. A., *J. Biol. Chem.*, **265**, 4607-4614 (1990).

14. Ashby, M. N., Edwards, P. A., *J. Biol. Chem.*, **264**, 635-640 (1989).
15. Gould, S. J., Keller, G. A., Hosken, N., Wilkinson, J., Subramani, S., *J. Cell Biol.*, **108**, 1657-1664 (1989).
16. Swinkels, B. W., Gould, S. J., Subramani, S., *FEBS Lett.*, **110**, 27-34 (1992).
17. Swinkels, B. W., Gould, S. J., Bondnar, A. G., Rachubinski, R. A., Subramani, S., *EMBO J.*, **10**, 3255-3262 (1991).
18. Glover, J. R., Andrews, D. W., Subramani, S., Rachubinski, R. A., *J. Biol. Chem.*, **269**, 7558-7563 (1994).
19. Gietl, C., Faber, K. N., van der Klei, I. J., Veenhuis, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 3151-3155 (1994).
20. Tukamoto, T., Hata, S., Yokota, S., Miura, S., Fujiki, Y., Hijikata, M., Miyazawa, S., Hashimoto, T., Osumi, T., *J. Biol. Chem.*, **269**, 6001-6010 (1994).
21. Subramani, S., *J. Biol. Chem.*, **271**, 32483-32486 (1996).
22. McNew, J. A., Goodman, J. M., *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 54-58 (1996).
23. Waterham, H. R., Cregg, J. M., *BioEssays*, **19**, 57-66 (1996).
24. Purdue, P. E., Lazarow, B., *J. Cell Biol.*, **134**, 849-862 (1996).
25. Rachubinski, R. A., Subramani, S., *Cell*, **83**, 525-528 (1995).
26. Gould, S. J., Kalish, J. E., Morrell, J. C., Bjorkman, J., Urquhart, A., J.Crane, D.I. *J. Cell Biol.*, **135**, 85-95 (1996).
27. Elgersma, Y., Kwast, L., Klein, A., Voorn-Brouwer, T., van den Berg, M., Metzigg, B., America, T., Tabak H. F., Distel, B., *J. Cell. Biol.*, **135**, 97-109 (1996).
28. Erdmann, R., Blobel, G., *J. Cel. Biol.*, **135**, 111-121 (1996).
29. Albertini, M., Rehling, P., Erdmann, R., Girzalsky, W., Kiel, J.A., Veenhuis, M., Kunau, W.H., *Cell*, **89**, 83-92 (1997).
30. Subramani, S., *J. Biol. Chem.*, **271**, 32483-32486 (1996).
31. Stamellos, K. D., Shackelford, J. E., Shechter, I., Jiang, G., Conrad, D., Keller, G. A., Krisans, S. K., *J. Biol. Chem.*, **268**, 12825-12836 (1993).
32. Cohen, L. H., Griffioen, M., van Roermund, C. W., Wanders, R. J., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1126**, 114-118 (1992).
33. Krisans, S. K., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **804**, 142-164 (1996).
34. Ramachandran, C. K., Shah, S. N., *J. Neurochem.*, **28**, 751-757 (1977).
35. Ramachandran, C. K., Shah, S. N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **69**, 42-47 (1976).
36. Jabalquinto, A. M., Cardemil, E., *Arch. Biochem. Biophys.*, **210**, 132-139 (1981).
37. Jabalquinto, A. M., Cardemil, E., *Lipids*, **15**, 196-198 (1980).
38. Michihara, A., Sawamura, M., Yamori, Y., Akasaki, K., Tsuji, H., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 93-

- 95 (2003).
39. Michihara, A., Sawamura, M., Yamori, Y., Akasaki, K., Tsuji, H., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1235-1240 (2001).
 40. Michihara, A., Akasaki, K., Yamori, Y., Tsuji, H., *Bio. Pharm. Bull.*, **26**, 579-584 (2003).
 41. Hogenboom, S., Tuyp, J. J., Espeel, M., Koster, J., Wanders, R. J., Waterham, H. R., *J. Cell Sci.*, **117**, 631-639 (2004).
 42. Hogenboom, S., Tuyp, J. J., Espeel, M., Koster, J., Wanders, R. J., Waterham, H. R., *Mol. Genet. Metab.*, **81**, 216-224 (2004).
 43. Michihara, A., Sawamura, M., Nara, Y., Ikeda, K., Yamori, Y., *J. Biochem. (Tokyo)*, **122**, 647-54 (1997).
 44. Michihara, A., Sawamura, M., Yamori, Y., Akasaki, K., Tsuji, H., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1347-5130 (2001).
 45. Wadhwa, R., Yaguchi, T., Hasan, M. K., Taira, K., Kaul, S. C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **302**, 735-742 (2003).
 46. Ran, Q., Wadhwa, R., Kawai, R., Kaul, S. C., Sifers, R. N., Bick, R. J., Smith, J. R., Pereira-Smith, O. M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 174-179 (2000).
 47. Wadhwa, R., Taira, K., Kaul, S. C., *Cell Stress Chaperones.*, **7**, 309-316 (2002).
 48. Kaul, S. C., Taira, K., Pereira-Smith, O. M., Wadhwa, R., *Exp. Gerontol.*, **37**, 1157-1164 (2002).