ガングリオシド GM3 合成の制御機構

上村 聡志†

The Regulation of Ganglioside GM3 Synthesis

Satoshi Uemura†

Division of Glycopathology, Institute of Molecular Biomembrane and Glycobiology, Tohoku
Pharmaceutical University; 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan.

(Received May 16, 2012)

Glycosphingolipids (GSLs) exist in the outer leaflet of the plasma membrane, where they form lipid microdomains that function as platforms for the regulation of trans-membrane signal transduction. In mammals, complex GSLs differing in the number and/or type of sugar species are produced in a cell-type specific manner, and the variety of glycan structures in GSLs are believed to determine specific cell functions. The glycan moieties of GSLs are synthesized at the luminal side of the Golgi apparatus by multiple Golgi-resident glycosyltransferases. Since the expression levels of most endogenous glycosyltransferases are relatively low, their detection is generally difficult. Nevertheless, we have succeeded in detecting endogenous mouse GM3 synthase (GM3S), the primary glycosyltransferase responsible for the biosynthesis of ganglio-series gangliosides. Mouse GM3S (mGM3S) has three isoforms (M1-GM3S, M2-GM3S, and M3-GM3S), each with a distinct length in its NH₂-terminal cytoplasmic tail. These isoforms are produced by leaky scanning from two mRNA variants, mGM3Sa and mGM3Sb. M1-GM3S is stably localized in the endoplasmic reticulum (ER), as a result of retrograde transport signals (arginine [R]-based motifs); consequently, its *in vivo* GM3 synthesis activity is very low compared with that of other isoforms. In contrast, both M2-GM3S and M3-GM3S are localized in the Golgi apparatus, yet each exhibits a distinct intracellular fate. M2-GM3S is rapidly degraded in the lysosomes, whereas M3-GM3S is retained in the Golgi apparatus. A system that produces GM3S isoforms having such distinct characteristics is likely to be of critical importance in the regulation of GM3 biosynthesis under various pathological and physiological conditions.

Key words—GM3; glycosyltransferase; retrograde transport; membrane traffic

1. はじめに

スフィンゴ糖脂質は、疎水性のセラミド部分と親水性の糖鎖部分からなり、哺乳動物では糖鎖部分の構造多様性により数百種類の分子種が存在する [Fig. 1(A)]. スフィンゴ糖脂質は主に細胞膜の外層に存在し、スフィンゴミエリンやコレステロールとともに脂質マイクロドメイン (脂質ラフト) を形成している [Fig. 1(B)]. この脂質マイクロドメインは細胞外からの増殖シグナルなどを細胞内へ効率

的に伝えるための中継地点として機能しており、受容体などの細胞膜タンパク質や細胞内のシグナル伝達分子は脂質マイクロドメインに集積すると考えられている。¹⁾

本総説では、哺乳動物におけるスフィンゴ糖脂質の1つであるガングリオシド GM3 を合成する酵素に焦点を当て、そのアイソフォーム産生と細胞内トラフィックという観点から、GM3 合成の制御機構について述べる。

2. 逆行輸送によるガングリオシド GM3 合成酵素の制御機構

2-1. ガングリオシド GM3 の生理機能 スフィンゴ糖脂質の糖鎖部分にシアル酸を含むものを総称してガングリオシドと呼び、GM3 は、ガングリオシドの中で最初に合成され、すべてのガングリオシドの前駆体となる鍵分子である (Fig. 2). これまでに、GM3 は様々な生命現象に係わることが示

The author declares no conflict of interest.

東北薬科大学分子生体膜研究所機能病態分子学教室
(〒981-8558 仙台市青葉区小松島 4-4-1)

現所属：†青山学院大学理工学部化学・生命科学科分子
遺伝学研究室 (〒252-5258 相模原市中央区淵野辺 5-
10-1)

e-mail: uemura@chem.aoyama.ac.jp

本総説は、平成 23 年度日本薬学会東北支部奨励賞 (基
礎薬学部門) の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Structure of Glycosphingolipid

A, Glycosphingolipids contain both hydrophobic (ceramide) and hydrophilic (glycan moiety) regions. Glc, Gal, and SA indicate glucose, galactose, and sialic acid, respectively. B, Glycosphingolipids exit in the outer leaflet of plasma membrane and form lipid microdomains (rafts) that, with cholesterol and sphingomyelin, function as platforms for effective signal transduction in the plasma membrane.

Fig. 2. Glycosphingolipid Biosynthesis Pathways Found in Mammal

The differences of number and/or type of sugar chains contribute to diversity of glycosphingolipids.

されているが、最も注目すべきトピックは2型糖尿病との係わりである。肥満モデル動物である *ob/ob* マウスや *Zucker fa/fa* ラットの脂肪組織において、GM3 合成酵素 (GM3S) 遺伝子の増加に伴い、GM3 量が著しく増加している。²⁾ また、3T3-L1 脂肪細胞を用いた、TNF α によるインスリン抵抗性モデル細胞系においても、GM3S の遺伝子発現量と GM3 量の増加が認められる。²⁾ さらに、この条件下で GM3 量を低下させるグルコシルセラミド (GlcCer) 合成酵素阻害剤 (D-PDMP) の添加によって、インスリン抵抗性の指標である IRS-1 のチロシンリン酸化抑制が解除される。²⁾ このような GM3 量増加によるインスリンシグナルの抑制効果は、インスリン受容体の膜直上のリジン残基と GM3 のシアル酸部分の静電的相互作用で説明されている。^{3,4)} インスリン受容体は、インスリンによるシグナルを細胞内部に伝えるためには、カベオラと呼ばれる細胞膜の

くぼみ構造に存在していなければならない。しかしながら、GM3 が増加すると、カベオラとは別のマイクロドメインを形成している GM3 の豊富な領域にインスリン受容体が静電的相互作用で引き寄せられ、その結果、カベオラから解離するというモデルである。さらに、GM3S のノックアウトマウスで、インスリンに対する感受性が亢進していることや、⁵⁾ GlcCer 合成酵素阻害剤 (AMP-DNM 及び Genz-123346) を肥満モデル動物に投与すると、インスリン抵抗性が改善されることも報告されており、^{6,7)} GM3 生合成の制御が2型糖尿病の治療のターゲットとしても期待されている。

2-2. ガングリオシドの生合成機構 ガングリオシド合成は小胞体におけるセラミドの合成から始まる (Fig. 3)。その後、シスゴルジに運ばれたセラミドは、細胞質側でグルコシルセラミド (GlcCer) 合成酵素によってグルコースが転移され、GlcCer となる。GlcCer は、FAPP2 によって非小胞輸送 (non-vesicular transport) でトランスゴルジに運ばれ、⁸⁾ そこで内腔側に反転し、ラクトシルセラミド (LacCer) 合成に使われると考えられているが、

上村聡志

青山学院大学理工学部助教。2000 年北海道大学薬学部卒業、2002 年北海道大学大学院薬学研究科修士課程修了、2004 年北海道大学大学院薬学研究科博士課程修了、その後 CREST 研究員を経て 2006 年東北薬科大学分子生体膜研究所助手～助教、2011 年青山学院大学理工学部助手。2012 年より現職。

Fig. 3. GM3 Synthesis Mechanism in Trans-Golgi

Ceramide is glucosylated to glucosylceramide (GlcCer) on the cytosolic leaflet of cis-Golgi membrane by glucosylceramide synthase. GlcCer is transported to trans-Golgi compartment by FAPP2 and translocated to the luminal leaflet. Then, GlcCer is converted to lactosylceramide (LacCer) in the lumen of this compartment. GM3 is synthesized from LacCer and CMP-sialic acid (CMP-Sia) by GM3 synthase (GM3S), which is a type II membrane protein and possesses several N-glycans. CMP-Sia is imported into the lumen by CMP-Sia transporter (CMP-Sia Tr) in trans-Golgi. GM3S transports from endoplasmic reticulum (ER) to cis-Golgi by COPII vesicle and arrives at trans-Golgi with Golgi maturation.

FAPP2 による GlcCer 輸送に関しては議論の余地がまだ残されている。⁹⁾ トランスゴルジの内腔側で合成された LacCer は、GM3 合成酵素 (GM3S) によってシアル酸が転移され、GM3 が合成される。LacCer 合成酵素 (LacCerS) は GM3S と複合体を形成しており、合成された LacCer は GM3S へ速やかに受け渡されるため、GM3 合成は効率的に行われる。¹⁰⁾

GM3S は II 型の膜タンパク質であり、内腔側にシアル酸転移を触媒する領域が存在する (Fig. 3)。この内腔側領域には、シアル酸転移酵素で高度に保全されたシアルリモチーフ L, S, VS が存在する。また、GM3S は糖タンパク質であり、マウスでは 3 ヲ所 (¹⁸⁰N, ²²⁴N, ³³⁴N) にアスパラギン結合型糖鎖が付加し、これらの糖鎖が酵素活性に必須である。¹¹⁾ GM3S の細胞質側領域には、小胞体からゴルジ体へ輸送されるときに機能する [R/K] (X) [R/K] 配列が存在する。この配列と COPII コートタンパク質である Sar1 が相互作用することによって、GM3S は COPII 小胞に積み込まれることが示唆されている。¹²⁾ しかしながら、この検討には内腔側を EGFP に入れ替えたキメラタンパク質のみが使用されているため、全長の GM3S において、[R/K] (X) [R/K] 配列が小胞体搬出に必要であるかについては明らかにされていない。

2-3. GM3 合成酵素アイソフォームの産生メカニズム マウス GM3S には転写開始地点の異なる 2 種類の mRNA バリエント (mGM3Sa と mGM3Sb) が存在し、類似した組織分布パターンを示す。¹³⁾ この結果は、mGM3Sa と mGM3Sb の転写開始地点が近接しているため、転写制御領域が共通していることを示唆している。mGM3Sa と mGM3Sb における大きな違いは、mGM3Sa の最初のエキソンに開始コドンとなるメチオニンが存在することである。¹³⁾ mGM3Sa と mGM3Sb をそれぞれ細胞に発現させ、正確な分子量を把握するために、GM3S に付加したアスパラギン結合型糖鎖を PNGaseF で切断し、抗 GM3S 抗体を用いたイムノブロットティングを行うと、mGM3Sa からは 3 本、mGM3Sb からは 2 本のバンドが検出される [Fig. 4(B)]。さらに、開始コドン (ATG) と予想される最初のメチオニンのさらに下流のメチオニンをアラニンに置換すると、一番大きな分子量以外のバンドは消失する [Fig. 4(C)]。これらの結果は、両バリエントとも、mRNA の最初の ATG だけでなく、さらに下流の ATG も開始コドンとして認識され、タンパク質の翻訳が起こっていることを示している。この現象はリークスキヤニングと呼ばれ、¹⁴⁾ 開始コドンがリボソームによって認識され難い場合に起こるが、その法則性と詳細なメカニズムは分かっていない。た

Fig. 4. Translation of GM3S Isoforms from RNA Variants by Leaky Scanning

A, The structure of cDNA constructs used in these experiments. Horizontal lines indicate a 5'-UTR of GM3Sa and GM3Sb. M1, M2, and M3 denote initiation codons, and TGA denotes a termination codon. TM and CS indicate a transmembrane region and common sequence, respectively. B and C, CHO cells were transiently transfected with a pcDNA3.1 Zeo (+) vector (vector) or a plasmid encoding GM3Sa, GM3Sb, GM3Sa M28/56A mutant, or GM3Sb M29A mutant, as indicated. Integral membrane fractions were prepared, treated with (+) or without (-) PNGase F, and then analyzed by immunoblotting with anti-GM3S antibodies. D, Microsome fractions prepared from brain tissue of GM3S^{+/+} and GM3S^{-/-} mice were subjected to immunoprecipitation with anti-GM3S Ab. Immunoprecipitates were treated with PNGase F and then analyzed by immunoblotting with anti-GM3S Ab and Rabbit IgG TrueBlot.

だし、ATGの直前の配列を『GCCACC』（コザック配列）にすると、リーキースキャニングの大部分を抑えることができる。¹³⁾ このように、リーキースキャニングによって、mGM3Saからは3種類（M1-GM3S, M2-GM3S, M3-GM3S）、mGM3Sbからは2種類（M2-GM3S, M3-GM3S）、N末端側の細胞質領域の長さが異なるアイソフォームが産生される（M1-GM3S: 69 アミノ酸, M2-GM3S: 42 アミノ酸, M3-GM3S: 14 アミノ酸）。マウスの脳に含まれる内因性 GM3S を検出した場合も3本のバンドが検出されることから [Fig. 4(D)], 生体内においてもリーキースキャニングにより複数の GM3S アイソフォームが産生され、細胞内で共存していると考えられる。

2-4. GM3 合成酵素アイソフォームの細胞内局在, 安定性, GM3 合成能力 各アイソフォームの細胞内局在を共焦点顕微鏡で調べると、M1-GM3S は細胞全体に網目状にその局在が観察され、M2-GM3S と M3-GM3S は核の周辺にドット状に局在する [Fig. 5(B)]. この M1-GM3S の染色パターンは、小胞体マーカーである KDEL 抗体の染色像と一致し、M2-GM3S と M3-GM3S の染色パターン

Fig. 5. Differences in Subcellular Localization and Protein Stabilities among M1-GM3S, M2-GM3S, and M3-GM3S

A, The N-terminal sequence of mouse M1-GM3S. TM indicates a transmembrane region. M1, M2, and M3 denote initiation codons. B, CHO cells stably expressing M1-GM3S, M2-GM3S, M3-GM3S, or M1-GM3S R11/12S mutant were fixed, permeabilized with 0.5% SDS in PBS, and stained with anti-GM3S antibodies and Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG. Cells were visualized by confocal laserscanning microscopy. Bar, 5 μ m. C, CHO cells stably expressing M1-GM3S, M2-GM3S, M3-GM3S or M1-GM3S R11/12S mutant were pulse-labeled with [³⁵S] Met/[³⁵S] Cys for 30 min and incubated with excessively cold Met/Cys for 1, 2, 3 h. Total cell lysates were prepared, subjected to immunoprecipitation with anti-GM3S antibodies, treated with PNGase F, and separated by SDS-PAGE. Gels were fixed and radiolabeled proteins were detected autoradiography.

は、ゴルジ体マーカーである GM130 の染色像と一致する。M1-GM3S の小胞体局在化は、M1-GM3S の細胞質領域のみに存在する 11, 12, 17 番目のアルギニンが逆行輸送シグナル (R-based motif) として機能することによって起こる [Fig. 5 (A)]. R-based motif は主に II 型膜タンパク質の逆行輸送シグナルとして知られているが、哺乳動物の糖転移酵素においては、GM3S が初めての発見である。この R-based motif は、COPI コートタンパク質である β -COP と δ -COP が作り出す酸性のポケットに入り込むと想定されている。¹⁵⁾ そのため、R-based motif の変異体、GM3S R11/12S は小胞体に逆行輸送されず、ゴルジ体に局在するようになる [Fig. 5 (B)].

各アイソフォームの安定性を比較すると、M1-GM3S と M3-GM3S が安定して細胞内に留まるのに対して、M2-GM3S は速やかにライソソームで分解される [Fig. 5 (C)]. M1-GM3S の安定化は小胞体へ逆行輸送されるためであり、その変異体である M1-GM3S R11/12S は M2-GM3S と同程度の分解速度を示す。一方で、M3-GM3S がどのようなメカニズムで、安定してゴルジ体に繫留しているのかは明らかになっていないが、ゴルジ体間の逆行輸送がその安定化に関与しているのではないだろうか。

各アイソフォームの *in vivo* における GM3 合成活性を比較すると、リーキースキャニングを完全に抑制する M1-GM3S M28/56A 変異体でのみ、GM3 合成活性の低下が観察される。¹³⁾ この結果は M1-GM3S の導入によって産生される微量の M3-GM3S で、GM3 合成が飽和していることを示している。また、M1-GM3S M28/56A 変異体の導入により、完全に GM3 合成が停止しないことは、小胞体での GM3 合成は考え難いため、M1-GM3S の一部は逆行輸送を逃れ、トランスゴルジまで運ばれることを示唆している。

このように、R-based motif の機能をブロックするメカニズムは ATP 感受性のカリウムチャネル (Kir6.2/SUR2) で報告されている。¹⁶⁾ Kir6.2/SUR2 は 4 つの Kir6.2 と 4 つの SUR2 からなるヘテロ 8 量体で構成されており、Kir6.2 と SUR2 のそれぞれに R-based motif が存在する。Kir6.2 と SUR2 が単独で存在する場合、各 R-based motif が機能し、両サブユニットともに逆行輸送により小胞体に留ま

るが、Kir6.2 と SUR2 が複合体を形成したとき、Kir6.2 の R-based motif は SUR2 に、SUR2 の R-based motif は 14-3-3 によってマスクされる。その結果、複合体を形成した機能的な Kir6.2/SUR2 のみ細胞膜へ運ばれるというものである。M1-GM3S がどのようなメカニズムで逆行輸送を逃れているかについては、現在のところまだ分からないが、14-3-3 による輸送制御が GM3 合成活性を調節している可能性は十分に考えられる。

3. 展望

GM3S アイソフォームの細胞内動態をまとめたのが Fig. 6 である。ゴルジ体で糖鎖を合成するほとんどの糖転移酵素は、定常状態においてゴルジ体に局在する。しかしながら、GM3S のアイソフォームの 1 つである M1-GM3S は、GM3 合成が行われない小胞体に局在する。M1-GM3S は各組織において主に発現している mRNA バリエーションから翻訳されるメインアイソフォームであるため、生体内に存在する GM3S として大半を占めると考えられ、その生理学的意義を明らかにすることは重要である。M1-GM3S のように、ゴルジ体で働くべき糖転移酵素が小胞体に局在する例としては、O-フコース転移酵素 (OFUT1) が挙げられる。OFUT1 は、その C 末端側の KDEL 様配列によって小胞体へ逆行輸

Fig. 6. Intracellular Dynamics of GM3S Isoforms

M1-GM3S, containing R-based motifs in its cytoplasmic tail, is targeted for ER by retrograde transport. However, a small amount of M1-GM3S is sorted to the trans-Golgi by escaping retrograde transport, and is involved in GM3 synthesis. The significance of the ER targeting of M1-GM3S remains unclear, but M1-GM3S might have chaperone activity in addition to GM3-synthesis activity. M2-GM3S are localized in the trans-Golgi and rapidly sorted to lysosomes for degradation. M3-GM3S is also localized in the trans-Golgi, but the half-life is more stable relative to that of M2-GM3S or the M1-GM3S R11/12S mutant, so the protein is more stably localized. Perhaps, based on the Golgi maturation model, retrograde transport within the Golgi apparatus is involved in the stabilization of M3-GM3S. Because only M3-GM3S carries highly matured N-glycans, retrograde transport in the Golgi apparatus may be necessary for the maturation of N-glycans.

送され、そこで Notch 受容体のシャペロンとして機能することが報告されている。¹⁷⁾ GM3S が OFUT1 のようにシャペロン活性を持つかは不明であるが、GM3 合成活性以外の機能を持っている可能性は否定することはできない。また、逆行輸送により、トランスゴルジへ到達する GM3S 量を少量に保ちつつ、小胞体に GM3S を貯蔵していると考えられることもできる。つまり、細胞外の環境変化や細胞外ストレス、様々な刺激に対応して、GSLs の需要が高まったとき、素早く、そして安定した GM3 供給を行えるような態勢を整えているのかもしれない。

その一方で、M3-GM3S は定常状態でゴルジ体で局在しながら、安定して細胞内に維持される。ゴルジ体の成熟モデルを考えると、^{18,19)} この安定化にはゴルジ体間の逆行輸送が必要である。M2-GM3S や M1-GM3S R11/12S 変異体が速やかにライソソームで分解されることから、M3-GM3S だけが、積極的にゴルジ体間で逆行輸送されている。また、興味深いことに、M3-GM3S に付加しているアスパラギン結合型糖鎖の成熟度の方が、M2-GM3S や M1-GM3S R11/12S 変異体の糖鎖の成熟度よりも高いことから、¹³⁾ ゴルジ体間の逆行輸送が糖鎖成熟を促進することを示唆している。出芽酵母の糖転移酵素の N 末端側の細胞質領域には [F/L] [L/I/W] XX [R/K] 配列が存在し、その配列に Vps74 が結合することによって、COPI 小胞への積み込みが促進され、糖転移酵素がゴルジ体に滞留することが示されている。^{20,21)} しかしながら、GM3S を始めとする哺乳動物の糖転移酵素に [F/L] [L/I/W] XX [R/K] 配列は保存されておらず、酵母と同様のメカニズムが機能しているとは考え難い。糖転移酵素において、N 末の長さが異なるだけで、ゴルジ体以降の輸送メカニズムが大きく異なるという報告はこれまでになく、M3-GM3S と M2-GM3S の輸送経路の違いがどのようにして起こるかを明らかにすることは、哺乳動物の糖転移酵素のゴルジ体滞留メカニズムに迫るきっかけになるかもしれない。

このように、糖転移酵素の中の 1 つの酵素に焦点を当てた研究においても、まだまだ課題が山積みである。しかしながら、GM3S の研究から、糖転移酵素の輸送及び糖鎖合成の制御メカニズムの核心に迫ることができると考え、現在も研究を進めている。

謝辞 本研究は、学生時代よりご指導して頂いている井ノ口仁一教授（東北薬科大学分子生体膜研究所）の下で、多くの共同研究者とともに実施した成果である。共同研究者各位にこの場を借りて感謝申し上げたい。

REFERENCES

- 1) Simons K., Toomre D., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 31–39 (2000).
- 2) Tagami S., Inokuchi J., Kabayama K., Yoshimura H., Kitamura F., Uemura S., Ogawa C., Ishii A., Saito M., Ohtsuka Y., Sakaue S., Igarashi Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 3085–3092 (2002).
- 3) Kabayama K., Sato T., Kitamura F., Uemura S., Kang B. W., Igarashi Y., Inokuchi J., *Glycobiology*, **15**, 21–29 (2005).
- 4) Kabayama K., Sato T., Saito K., Loberto N., Prinetti A., Sonnino S., Kinjo M., Igarashi Y., Inokuchi J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 13678–13683 (2007).
- 5) Yamashita T., Hashiramoto A., Haluzik M., Mizukami H., Beck S., Norton A., Kono M., Tsuji S., Daniotti J. L., Werth N., Sandhoff R., Sandhoff K., Proia R. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3445–3449 (2003).
- 6) Aerts J. M., Ottenhoff R., Powlson A. S., Grefhorst A., van Eijk M., Dubbelhuis P. F., Aten J., Kuipers F., Serlie M. J., Wennekes T., Sethi J. K., O’Rahilly S., Overkleeft H. S., *Diabetes*, **56**, 1341–1349 (2007).
- 7) Zhao H., Przybylska M., Wu I. H., Zhang J., Siegel C., Komarnitsky S., Yew N. S., Cheng S. H., *Diabetes*, **56**, 1210–1218 (2007).
- 8) D’Angelo G., Polishchuk E., Di Tullio G., Santoro M., Di Campli A., Godi A., West G., Bielawski J., Chuang C. C., van der Spoel A. C., Platt F. M., Hannun Y. A., Polishchuk R., Mattjus P., De Matteis M. A., *Nature*, **449**, 62–67 (2007).
- 9) Halter D., Neumann S., van Dijk S. M., Wolthoorn J., de Maziere A. M., Vieira O. V., Mattjus P., Klumperman J., van Meer G., Sprong H., *J. Cell Biol.*, **179**, 101–115 (2007).
- 10) Giraud C. G., Maccioni H. J., *J. Biol. Chem.*, **278**, 40262–40271 (2003).
- 11) Uemura S., Kurose T., Suzuki T., Yoshida S., Ito M., Saito M., Horiuchi M., Inagaki F.,

- Igarashi Y., Inokuchi J., *Glycobiology*, **16**, 258–270 (2006).
- 12) Giraudo C. G., Maccioni H., *J. Mol. Biol. Cell*, **14**, 3753–3766 (2003).
- 13) Uemura S., Yoshida S., Shishido F., Inokuchi J., *Mol. Biol. Cell*, **20**, 3088–3100 (2009).
- 14) Kozak M., *Gene*, **299**, 1–34 (2002).
- 15) Michelsen K., Schmid V., Metz J., Heusser K., Liebel U., Schwede T., Spang A., Schwappach B., *J. Cell Biol.*, **179**, 209–217 (2007).
- 16) Heusser K., Yuan H., Neagoe I., Tarasov A. I., Ashcroft F. M., Schwappach B., *J. Cell Sci.*, **119**, 4353–4363 (2006).
- 17) Okajima T., Xu A., Lei L., Irvine K. D., *Science*, **307**, 1599–1603 (2005).
- 18) Matsuura-Tokita K., Takeuchi M., Ichihara A., Mikuriya K., Nakano A., *Nature*, **441**, 1007–1010 (2006).
- 19) Losev E., Reinke C. A., Jellen J., Strongin D. E., Bevis B. J., Glick B. S., *Nature*, **441**, 1002–1006 (2006).
- 20) Schmitz K. R., Liu J., Li S., Setty T. G., Wood C. S., Burd C. G., Ferguson K. M., *Dev. Cell*, **14**, 523–534 (2008).
- 21) Tu L., Tai W. C., Chen L., Banfield D. K., *Science*, **321**, 404–407 (2008).