ペルオキシソームの形成・機能と遺伝病：ABC トランスポーターを中心に

今中 常雄[†]**Biogenesis, the Function of Peroxisomes, and Their Role in Genetic Disease: With a Focus on the ABC Transporter**Tsuneo Imanaka[†]*Department of Biological Chemistry, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama; 2630 Sugitani, Toyama 930-0194, Japan.*

(Received March 6, 2018)

Peroxisomes are organelles that are present in almost all eukaryotic cells. These organelles were first described in 1954, in the cytoplasm of the proximal tubule cells in the mouse kidney, using electron microscopy by Rhodin and referred to as “microbodies”. Then, de Duve and Baudhuin isolated microbodies from rat liver using density gradient centrifugation, defined the microbodies as membrane-bound organelles containing several H₂O₂-producing oxidases and H₂O₂-degrading catalase, and named them peroxisomes. At present, the biogenesis of peroxisomes in mammals involves three different processes: the formation of pre-peroxisomes from the endoplasmic reticulum, the import of peroxisomal membrane and matrix proteins to the pre-peroxisomes, and the growth and division of the peroxisomes. These organelles are involved in a variety of metabolic processes, including the β -oxidation of very long chain fatty acids, and the synthesis of ether phospholipids and bile acids in mammals. These metabolic pathways require the transport of metabolites in and out of peroxisomes. The transport of such metabolites is facilitated in part by the ATP-binding cassette (ABC) transporter. Impairment of the biogenesis and function of peroxisomes causes severe peroxisomal disorders. Since I began peroxisome research at Professor de Duve’s laboratory in 1985, I have studied the biogenesis and function of peroxisomes and peroxisome diseases for more than 30 years, with a focus on ABC transporters. Here, I review the biogenesis of peroxisomes, the targeting of ABC transporters to the peroxisome, and the function of ABC transporters in physiological and pathological processes, including X-linked adrenoleukodystrophy, a neurodegenerative disease.

Key words—peroxisome; biogenesis; ATP-binding cassette transporter; fatty acid β -oxidation; peroxisome disease; X-linked adrenoleukodystrophy

1. はじめに

ペルオキシソームは真核細胞に広く分布し、ヒトでは極長鎖脂肪酸の β 酸化，エーテル型リン脂質の生合成，コレステロールの胆汁酸への変換など，脂質代謝に重要な役割を担っている。一方，ペルオキシソームの形成異常やペルオキシソームタンパク質の欠損は，いわゆるペルオキシソーム病と呼ばれる重篤な疾患と原因なる。私は，1985 年 Rockefeller 大学 (New York) の Prof. de Duve 研究室でペルオキシソームの形成機構に関する研究に携わ

る機会を得た (Fig. 1)。それ以来，30 年以上にわたり「ペルオキシソーム ATP-binding cassette (ABC) タンパク質を中心にペルオキシソームの形成・機能並びに遺伝病」に関する研究に取り組んできた。ペルオキシソームは 1954 年に初めて発見されたオルガネラである。よって，60 年余りに及ぶペルオキシソームに関する研究の歴史の中で，ちょうど後半部分に携わってきたことになる。研究の進展には感慨深いものがある。これまでの私たちの研究成果を中心にペルオキシソームを眺めてみたい。

2. ペルオキシソームとは

ペルオキシソームは一重膜で囲まれたオルガネラであり，哺乳動物細胞に広く分布している (Fig. 2)。細胞によりペルオキシソームの形や大きさは異なるが，およそその直径は 0.1–1 μm である。ペルオキシソームは，1954 年にスウェーデンの大学院

富山大学大学院医学薬学研究部分子細胞機能学研究室 (〒930-0194 富山市杉谷 2630)

現所属：*広島国際大学薬学部 (〒737-0112 広島県呉市広古新開 5-1-1)

e-mail: imanaka@ps.hirokoku-u.ac.jp

本総説は，平成 28 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

Fig. 1. Prof. de Duve in His Laboratory of Biochemical Cytology at Rockefeller University in 1987
Prof. de Duve stands close to the centrifuge that he developed.

Fig. 2. Electron Micrograph of Rat Liver Peroxisomes
P, Peroxisome. The bar, 1 μ m. Courtesy of Sadaki Yokota (Professor emeritus at Yamanashi University).

生 Rhodin がマウス腎臓の近位尿細管細胞を電子顕微鏡で観察した際に発見された。彼の学位論文でミクロボディー (microbody) と記載されている。¹⁾ その後、1965 年に de Duve と Baudhuin は、ラット肝臓から粗オルガネラ分画を調製し、密度勾配遠心によりミクロボディーを他のオルガネラから分離することに成功した。ミクロボディーには H_2O_2 を産生する数種のアキシダーゼと H_2O_2 を分解するカタラーゼが局在していることより、彼らはミクロボディーをペルオキシソームと呼ぶことを提唱した。²⁾

1976 年、Lazarow と de Duve はマウス肝臓のペ

ルオキシソームにシアン非感受性の脂肪酸 β 酸化系が存在することを発見し、この活性が高脂血症薬クロフィブラートで顕著に誘導されることを示した。³⁾ これは哺乳動物細胞においてペルオキシソームの生理的機能が記載された初めての報告である。

一方、1964 年 Bowen らは、cerebro-hepato-renal syndrome (Zellweger 病) が遺伝的疾患であることを示した。⁴⁾ その後、Goldfischer らは Zellweger 病患者ではペルオキシソームが欠損していることを発見した。⁵⁾ 間もなく、ペルオキシソームはヒトの生命活動に必須であることが認識されるようになった。

今日では、ヒトを含めた哺乳動物において、ペルオキシソームは脂質代謝に必須のオルガネラであり、生体の恒常性維持に重要な役割を担っていることが明らかになっている。中枢神経系の細胞では、ペルオキシソームのサイズは肝臓や腎臓に比べて小さいが、神経系の発達に重要である。⁶⁾ また、ペルオキシソームがヒトの発育や健康に欠くべからざるオルガネラであることは、ペルオキシソームに係わる多くの先天代謝異常症からも窺える。

現在までに、ヒトでは 120 以上のペルオキシソーム関連遺伝子が同定され、20 以上の遺伝病がペルオキシソーム病に分類されている。⁷⁾ さらにペルオキシソームはダイナミックに変化するオルガネラであり、栄養状態や環境の変化により、その数とサイズが顕著に増減する。ヒトでは絶食、糖尿病、高脂肪食などがペルオキシソームの数の増加を誘導することが知られている。⁸⁾

1985 年、私がペルオキシソームの研究に参加した当時は、ラット肝臓での脂肪酸 β 酸化系酵素の精製や遺伝子クローニングが始まった頃であった。また、ペルオキシソームタンパク質が遊離型ポリソームで翻訳されることがわかり、ペルオキシソーム形成に係わる研究が新たな局面を迎えていた。ペルオキシソーム病については、患者線維芽細胞での

今中常雄

1975 年広島大学医学部薬学科卒、77 年同大学院薬学研究科修士課程修了。85 年薬学博士。77 年帝京大学薬学部助手。85 年米国ロックフェラー大学研究員。88 年帝京大学薬学部講師、97 年同助教授。98 年富山医科薬科大学薬学部教授。2005 年富山大学薬学部教授。17 年広島国際大学薬学部客員教授。専門は生化学・分子細胞生物学。

研究が始まった。振り返ってみるとペルオキシソーム研究の黎明期の感がある。

なお、ペルオキシソームと共通の形成機構を持つオルガネラとして、解糖系の諸酵素が局在している原虫グリコソーム (glycosome),⁹⁾ 多細胞生物である糸状菌の細胞が障害された際、細胞間をつなぐ隔壁孔を塞ぎ細胞質の流出を防ぐウォロニンボディ (Woronin body),¹⁰⁾ 植物の発芽に係わるグリオキシソーム (glyoxysome) がある。¹¹⁾ オルガネラの多様性・機能の観点から興味深い。

3. ペルオキシソームの形成機構

3-1. ペルオキシソーム形成の概要 1960-70

年代、ペルオキシソームと小胞体が密に近接しているという電子顕微鏡観察から、ペルオキシソームは小胞体から出芽して形成されると考えられていた。¹²⁾ 1980 年代、ペルオキシソームタンパク質が遊離型ポリソームで生合成されることが明らかになり、ペルオキシソームはミトコンドリアと同じように、既に存在しているペルオキシソームに新たに生合成されたペルオキシソームタンパク質が輸送され、分裂を経て形成されるという考えが主流になった。¹³⁾ 私も当時そう考えていた。その後、ペルオキシソームの形成に係わる因子 (タンパク質を peroxin, 遺伝子を *PEX* と呼ぶ) が同定されてきた。*PEX3* や *PEX19* 遺伝子に異常がある細胞ではペルオキシソームが検出されず、野生型遺伝子を導入するとペルオキシソームが形成されること、新たに生合成された Pex3p (遺伝子 *PEX3* から翻訳されたタンパク質を Pex3p と略称する) は、小胞体へ輸送されるなどの知見が得られてきた。これらの知見を基に現在では、ペルオキシソームはその前駆体が小胞体から出芽し、遊離型ポリソームで生合成されたペルオキシソームタンパク質が前駆体に輸送され、成熟したペルオキシソームが形成されると考えられている (Fig. 3)。¹⁴⁾ しかしながら、小胞体のどこから出芽するかなど解析すべき課題は残っている。

このように時代の最新技術を用いた研究によりペルオキシソーム形成のモデルが提唱され、技術の進展に伴う新たな知見から、モデルが変遷していることは興味深い。半世紀を経てペルオキシソームの出発点の小胞体に戻った感がある。現在までに 36 種類の *PEX* 遺伝子が同定され、個々の *PEX* 遺伝子の異常が重篤なペルオキシソーム形成異常症の原因

Fig. 3. Biogenesis of Peroxisome

A pre-peroxisome containing Pex3p and Pex16p is budded from ER. Newly synthesized peroxisomal membrane and matrix proteins are post-translationally imported to pre-peroxisome. After fusion of pre-peroxisomes, mature peroxisome is formed. The number of peroxisome increases by division. PMP, peroxisomal membrane protein.

となる。

3-2. ペルオキシソームマトリックスタンパク質の輸送機構

ミトコンドリアと異なりペルオキシソームは DNA を持っていないので、すべてのペルオキシソームタンパク質は核の DNA にコードされている。[³⁵S] メチオニンを用いたタンパク質生合成のパルス-チェイス実験などにより、ペルオキシソームマトリックスタンパク質は翻訳後にペルオキシソームに輸送されることが予想された。

Rockefeller 大学での私の最初のテーマは、ペルオキシソームタンパク質の *in vitro* 輸送系を構築し、輸送メカニズムの詳細を解析することであった。ペルオキシソームの主要タンパク質の 1 つである acyl-CoA oxidase に着目した。Acyl-CoA oxidase の mRNA を [³⁵S] メチオニンを添加した reticulocyte lysate で翻訳し、ラット肝臓より精製したペルオキシソームと incubation し、proteinase 処理によりペルオキシソーム内に取り込まれた acyl-CoA oxidase の量をフルオログラフィーで定量化した。ペルオキシソームを壊れないように取り扱うこと、acyl-CoA oxidase は成熟型タンパク質として生合成されるので、ペルオキシソーム膜に結合した acyl-CoA oxidase とペルオキシソーム内に輸送されたものを区別する条件の設定に苦労した。輸送に ATP の加水分解が必要であること、ペルオキシソーム膜に受容体があること、細胞質因子で輸送が促進されることなどを明らかにした (Fig. 4)。細胞質因子は今でいう Pex5p であったのだろうか。この成果

Fig. 4. Translocation of Acyl-CoA Oxidase into Peroxisome
 $[^{35}\text{S}]$ acyl-CoA oxidase (AOx) is incorporated into peroxisomes in a proteinase K-resistant fashion. The import of AOx into peroxisomes could be dissociated into two steps: Binding occurs at 0°C in the absence of ATP; Translocation occurs only at 26°C and requires the hydrolysis of ATP. Translocation is not inhibited by ionophores.

Fig. 5. Import of Newly Synthesized Peroxisomal Matrix Proteins into Peroxisome

A set of peroxins are involved in the process (See the text). The number in each oval indicates the sequential number of peroxin.

は 1987 年の *J. Cell Biol.* に報告した.¹⁵⁾ ちょうど私の論文の後にカリフォルニア大学の大学院生であった Gould が、ホタルの luciferase (ホタルの発光器官細胞のペルオキシソームに存在する) を CV-1 monkey 細胞に発現させ、COOH 末端 12 アミノ酸にペルオキシソーム移行シグナルがあることを報告した.¹⁶⁾ ペルオキシソーム形成に関する新しい知見が並んで発表されたことに驚いた。1988 年、彼らは COOH 末端の Ser-Lys-Leu (SKL) がペルオキシソーム移行シグナルであることを示した。¹⁷⁾

その後、ペルオキシソーム移行シグナルの受容体は細胞質の Pex5p と Pex7p であること、この受容体とペルオキシソームタンパク質複合体はペルオキシソーム膜の pore を通ってペルオキシソーム内に取り込まれること、受容体は再度細胞質に戻って利用されることなどが明らかにされた (Fig. 5)。

すなわち、ペルオキシソームマトリックスタンパク質は、COOH 末端にトリペプチド (S/A/C)-(K/R/H)-(L/M) からなるペルオキシソーム移行シグナル (PTS1) 若しくは NH₂ 末端に (R/K)-(L/I/K)-X5-(Q/H)-(L/I/V) からなる PTS2 を持っている。新たに生合成された PTS1 を持つタンパク質は細胞質で Pex5p に認識される。哺乳動物ではスプライシングの違いによる 2 種類の Pex5pL と Pex5pS が存在する。一方、NH₂ 末端の PTS2 は Pex7p に認識される。Pex7p はペルオキシソームへの移行に Pex5pL との結合を必要とする。ペルオキシソーム

マトリックスタンパク質を結合した Pex5p と Pex7p は Pex14p と Pex13p からなるペルオキシソーム膜上のドッキングタンパク質と結合し、複合体はペルオキシソーム内に輸送される。その後、マトリックスタンパク質と解離した Pex5p や Pex7p はペルオキシソーム膜から細胞質に輸送され、輸送サイクルを繰り返すかプロテアソームで分解される。^{18,19)} この過程では Pex2p, Pex10p やユビキチンリガーゼ活性を持つ Pex12p が係わる。Pex12p はレセプターをモノユビキチン化若しくはポリユビキチン化する。ユビキチン化された Pex5pL, Pex5pS, Pex7p は Pex14p と Pex13p からなるドッキングタンパク質と結合し、細胞質に逆輸送される。その際、細胞質に存在する ATPases associated with diverse cellular activities (AAA) ファミリーに属する Pex1p とペルオキシソーム膜上の Pex26p と結合している Pex6p の 6 量体がペルオキシソーム膜からのユビキチン化された Pex5p の遊離に係わっている。²⁰⁾ なお、モノユビキチン化された受容体はマトリックスタンパク質輸送に再利用され、ポリユビキチン化された受容体は分解される。

生合成されたペルオキシソームタンパク質が細胞質で受容体と結合することは予想外であった。また、この複合体がそのままペルオキシソーム膜の pore を通過する。その際 pore は一旦開いてまた閉じる。受容体のリサイクリングはユビキチン化で制御される。このようにペルオキシソームタンパク質の膜透過はユニークである。真核生物は、細胞質で

翻訳された微量のペルオキシソームタンパク質を正しくかつ効率よくペルオキシソームに輸送するために、このような複雑な仕組みを獲得したと思われる。

3-3. ペルオキシソーム膜形成の分子機構

1980年代、Zellweger病ではペルオキシソームが検出されないことより、ペルオキシソーム膜タンパク質の生合成に異常があり、ペルオキシソーム自体が欠損しているのではないかと考えられていた。私たちはラット肝臓より精製したペルオキシソーム膜タンパク質に対する抗体を作製し、Zellweger病患者線維芽細胞を用いてペルオキシソーム膜タンパク質の挙動を解析した。すると興味深いことに、ペルオキシソーム膜タンパク質はショ糖密度勾配遠心で比重 1.18 の位置に沈降し、他のオルガネラにミスターゲティングしていないことが示唆された。さらに蛍光抗体法や免疫組織学による細胞の観察により、マトリックスタンパク質を含まないペルオキシソーム膜顆粒が存在していることを明らかにし、ペルオキシソーム膜ゴーストと名付けた。^{21,22)} この結果は、ペルオキシソーム形成において膜タンパク質の輸送はマトリックスタンパク質の輸送とは異なること、Zellweger病ではペルオキシソーム膜は形成されるがマトリックスタンパク質の輸送に障害を持つ例があることを示している。

その後、70 kDa ペルオキシソーム膜タンパク質 (PMP70) を用いる *in vitro* 輸送系を構築し、PMP70 の輸送には、PTS1 や PTS2 とは異なる輸送シグナルが NH₂ 末端側に存在すること、膜上に受容体が存在すること、細胞質因子が存在すること、ATP の加水分解は必要ないことなどを示した。²³⁾ しばらくして、Pex19p と Pex3p がペルオキシソームの膜形成に必要であることが明らかにされた。Pex19p は生合成された各種のペルオキシソーム膜タンパク質と選択的に結合し疎水性のペルオキシソーム膜タンパク質を可溶性に保つ分子シャペロン様の役割を担い、ペルオキシソーム膜上の Pex3p と相互作用し、膜タンパク質をペルオキシソームに挿入していることが示唆された。²⁴⁾ 私たちは京都大学の加藤教授との共同研究でペルオキシソーム膜タンパク質局在化の分子機構を構造生物学の立場から明らかにすることを試みた。精製 Pex19p は可溶性であったが、数十 mg/mL の濃度でも結晶化しなかった。一方、Pex19p は NH₂ 末端 44 アミノ酸に

Fig. 6. Targeting of Peroxisomal Membrane Protein to Peroxisomal Membrane

After being translated in free polysomes, peroxisomal membrane protein is recognized and become bound to Pex19p through the Pex19p binding motif located in the NH₂-terminal region. The interaction is strengthened by sequences located downstream in the TMDs. Pex19p maintains the peroxisomal membrane proteins in a soluble and proper conformation in the cytosol. Then, the peroxisomal membrane protein-Pex19p complex docks at the peroxisomal membrane via association with its docking factor, Pex3p. Finally, the peroxisomal membrane protein is inserted into the peroxisomal membrane and Pex19p shuttles back to the cytosol to initiate another import cycle (See text). (Color figure can be accessed in the online version.)

Pex3p との結合領域があり、91 番目のアミノ酸以降にペルオキシソーム膜タンパク質との結合領域があった。²⁵⁾ そこで、Pex3p の NH₂ 末端膜貫通領域を除いた細胞質領域 (aa.49–373) と Pex19p の NH₂ 末端領域 (aa.1–44) を複合体として結晶化させることに成功した。Pex3p は、2 番目の α ヘリックスを軸に 6 つ逆平行性の α ヘリックスが束になったユニークな楕円構造をとり、その先端部分で Pex19p の 16 アミノ酸残基からなる α ヘリックス構造と結合していた。その結合は、Pex3p の Trp¹⁰⁴ と Pex19p の Leu^{18,21,22}, Phe²⁹ の間での疎水性結合を介していた (Fig. 6)。²⁶⁾

野生型 Pex3p は Pex19p に高い親和性を示し、その解離定数は約 3 nM であり、Trp¹⁰⁴ を Ala に置換するとその親和性が 1/300 に低下した。²⁷⁾ また、Pex19p を欠損した Zellweger 病患者線維芽細胞に野生型 cDNA を導入すると約 5 日後にペルオキシソームが形成されたことが確認できた。一方、Pex3p との結合に関与しない Leu26Ala の変異型 cDNA の導入では約 5 日後にペルオキシソームが形成され

たが, Leu22Ala や Phe29Ala の変異ではペルオキシソームは形成されなかった. よって, 生体内でもこの相互作用を介してペルオキシソーム膜が形成されていることが推測される. 一方, 試験管内での Pex3p と Pex19p との解離定数は, Pex19p がペルオキシソーム膜タンパク質と複合体を形成していてもいなくても変わらない. よってペルオキシソーム膜上には, Pex19p がペルオキシソーム膜タンパク質をペルオキシソーム膜に降ろした後, Pex3p との解離を促進するタンパク質が存在すると予想される.

3-4. ABCD タンパク質の局在化機構 ABC タンパク質サブファミリー D には ABCD1-4 の 4 種のタンパク質が同定されている. これらは, NH₂ 末端側の 6 つの膜貫通ヘリックスからなる膜貫通ドメイン (transmembrane domain; TMD) とそれに続くヌクレオチド結合ドメイン (nucleotide-binding domain; NBD) から構成されている (Fig. 7). ABCD1-4 は, 当初 adrenoleukodystrophy protein (ALDP), ALDP related protein (ALDRP), PMP70, PMP70 related protein (P70R) と呼ばれた. ABCD1-3 はペルオキシソーム膜に, ABCD4 はリソソーム膜に局在している. これらタンパク質の局在化に関しては, NH₂ 末端側から数えて 1 番目の TMD (TMD1) の NH₂ 末端に位置する疎水性セグメント (H0 モチーフ) が重要な役割を果たしている.²⁸⁾ ABCD1-3 は遊離型ポリソームでの翻訳中に Pex19p に捕捉され, ペルオキシソームへと輸送される. 一方, ABCD4 は H0 モチーフを欠くために Pex19p とは結合できず TMD1 を含む領域がシグナル認識粒子 (signal recognition particle; SRP) に捕捉され, 小胞体に局在化しリソソームへと移行する (Fig. 8). GTOP データベースによれば, 哺乳動物 ABCD タンパク質ホモログを持つ 193 生物種のうち, 疎水性プロットが可能であった 143 種についてみると, 60 種の生物で H0 モチーフを持たない ABCD タンパク質が存在することが確認できた. ABCD タンパク質局在化におけるオルガネラ選択性は種を越えて保存されていると思われる.²⁹⁾

私たちは, ペルオキシソーム膜タンパク質 ABCD3 について詳細な解析を行ってきた. ABCD3 の局在化シグナルについて, ABCD3 の NH₂ 末端側や COOH 末端側を欠失させ green fluorescent protein (GFP) を融合させた construct

Fig. 7. Hypothesized Structure of the Peroxisomal ABC Transporter

The transporter is a half-size ABC transporter with one transmembrane domain (TMD) and one nucleotide-binding domain (NBD). Six transmembrane helices are located in the NH₂-terminal half of the transporter, and Walker A, B and ATP-binding Cassette signature sequence (the ABC signature) is located in the COOH-terminal half of the transporter. In mammals, three ABC proteins belonging to subfamily D, ABCD1, ABCD2 and ABCD3 exist in peroxisomes, predominately as a homodimer. Walker A motif is a motif in proteins that is associated with phosphate binding. The motif has consensus sequence GXXXXGKT/S. It is present in many ATP or GTP utilizing proteins. Walker B motif is situated downstream of the A-motif. The consensus sequence is hhhhDE (h: hydrophobic amino acid). The motif is involved in ATP hydrolysis through binding of Mg²⁺ to the aspartate residue. The ABC signature is a conserved sequence (LSGGQ) identified in the NBD of all ABC transporters.

ABCD1, ABCD2, ABCD3

Fig. 8. Targeting and Localization of ABCD Proteins

For the trafficking of ABCD proteins, an NH₂-terminal H0 motif plays an important role. ABCD1-3 possessing H0 motif are selectively captured by Pex19p and destined for peroxisomes. In contrast, ABCD4 hardly interacts with Pex19p because of its lack of the H0 motif, and as a result, ABCD4 is recognized by signal recognition particle (SRP) and integrated into the ER membrane. Subsequently, ABCD4 is transported to lysosomes.

を CHO 細胞に発現させることによりペルオキシソーム局在化を解析した.^{30,31)} TMD1 と TMD2 を含む ABCD3 (AA.1-144)-GFP 並びに TMD5 と TMD6 を含む GFP-ABCD3 (AA.263-375) はペルオキシソームへ局在した. さらに NH₂ 末端側や COOH 末端側を欠失させた ABCD3 と Pex19 との結合性を解析すると, ABCD3 は NH₂ 末端の Leu²¹-Leu²²-Leu²³ と TMD5-TMD6 の領域で Pex19p と選択的に結合した. さらにターゲティングに必要な領域として, 疎水性アミノ酸配列 Leu²¹-Leu²²-Leu²³ に続く Ile⁷⁰-Leu⁷¹ と TMD5 と TMD6 に隣接した Ile³⁰⁷-Leu³⁰⁸ が同定された. よって ABCD3 は翻訳中に NH₂ 末端の Leu²¹-Leu²²-Leu²³ を含む領域 (H0 モチーフ) で Pex19p と結合し, さらに Pex19p と TMD5-TMD6 の結合で複合体が安定化し, Ile⁷⁰-Leu⁷¹ と Ile³⁰⁷-Leu³⁰⁸ を含む領域でペルオキシソーム膜に存在する受容体と結合する可能性が示唆された (Fig. 9). ABCD1 や ABCD2 についても同様のアミノ酸配列が Pex19p との結合とペルオキシソームへの局在化に係わっていると予想される.³²⁾

一方, ABCD4 は, ABCD1 及び ABCD2 とのホモロジー検索によって見い出され, 当初はペルオキシソームに局在するとされていた. しかしながら私たちは, CHO 細胞に安定過剰発現させた ABCD4 がペルオキシソームではなく小胞体に局在すること, それは ABCD4 がペルオキシソームへの局在化に必須な H0 モチーフを欠くためであることを明らかにしてきた.²⁸⁾

最近, ABCD4 を欠損するビタミン B₁₂ 欠乏症患者が発見され, 患者線維芽細胞ではリソソームにビタミン B₁₂ が蓄積していることより, ABCD4 はリソソーム内から細胞質にビタミン B₁₂ を排出するトランスポーターである可能性が指摘された.³³⁾ また, アダプタータンパク質としての機能を持つと予想されるリソソーム膜タンパク質 LMBD1 を欠損してもリソソームにビタミン B₁₂ が蓄積するビタミン B₁₂ 欠乏症の原因になることが報告されている.³⁴⁾ 私たちは, 機能が異なる 2 つのタンパク質の変異により同様の表現型を示すことから, 「小胞体上で ABCD4 が LMBD1 とアセンブルすることによりリソソームへ局在化し, ビタミン B₁₂ 輸送に関与する」 (Fig. 10) のではないかと考えた.

最初に, ヒト肝がん由来 HuH7 細胞に, COOH

Fig. 9. A Hypothetical Model for the Targeting of ABCD3 to Peroxisome

After being synthesized in the cytosol, ABCD3 is recognized by and bound to Pex19p at the NH₂-terminal hydrophobic motif constituted by Leu²¹-Leu²²-Leu²³ and the region of TMD5-TMD6. The ABCD3/PMP70-Pex19p complex is transported to peroxisomes by the mPTSs located in the NH₂-terminal 124-amino acid region and the region of ABCD3 (AA.263-375) (the hydrophobicity of Ile⁷⁰-Leu⁷¹ and Ile³⁰⁷-Leu³⁰⁸ might be essential). Finally, ABCD3 is inserted into peroxisomal membranes through the unidentified proteinaceous components on the peroxisomal membranes. In this process, at least two TMDs are required for correct insertion.

Fig. 10. ABCD4 Is Translocated from the ER to Lysosomes in Association with LMBD1

The newly synthesized ABCD4 is inserted into the ER membrane and assembles into a homodimer. ABCD4 then associates with the newly synthesized lysosomal membrane protein LMBD1 and the complex of ABCD4 with LMBD1 is transported to the lysosomes. ABCD4 stays on the ER membrane without LMBD1.

末端に HA タグを付加した融合タンパク質 ABCD4-HA を安定過剰発現させると小胞体に局在したが, LMBD1-GFP を共発現させると, 驚いたことに ABCD4-HA の分布が細網状からドット状へと劇的に変化し, その分布は LMBD1-GFP 及びリソソーム膜タンパク質 LAMP1 の分布と一致した. 実際, ABCD4 のダイマーが LMBD1 と複合体を形成していた. また, LMBD1 のリソソーム移行シグナルと予想される Tyr²³³-Glu²³⁴-Arg²³⁵-Leu²³⁶ を

それぞれ Ala に置換すると LMBD1 は ABCD4 を伴って細胞膜に移行した。さらに、CRISPR/Cas9 法で LMBD1 をコードする *LMBRD1* 遺伝子を破壊した HEK293 細胞を作製した。ABCD4 の分布についてみると、野生型細胞では小胞体及びリソソームと重なる 2 つのピークが存在し、*LMBRD1* 破壊細胞では、リソソームと重なるピークが野生型の 40% 以下にまで減少し、逆に小胞体と重なるピークが増加していた。すなわち、内在性の ABCD4 は小胞体及びリソソームの両方に局在し、その小胞体からリソソームへの移行が、LMBD1 に制御されていることが明らかとなった。³⁵⁾ これは、ABC トランスポーターの細胞内局在が、アダプタータンパク質によって決定されるという初めての報告である。

ABCD タンパク質のオルガネラ局在化をみると、TMD1 までの NH₂ 末端のアミノ酸配列がタンパク質の小胞体への局在化を抑制している。一方、ABCD3 の実験で、NH₂ 末端のアミノ酸配列 (AA.1-80) は H0 モチーフを含むがミトコンドリアに輸送され、TMD1 と TMD2 が加わるとペルオキシソームへ移行する。³⁶⁾ ABCD3 は、まずは小胞体への移行をミトコンドリアへの移行に必要な HSP70 などとの結合で回避し、その後 TMD1 と TMD2 とで Pex19p との強い結合にシフトし、ペルオキシソームへ移行しているのではないだろうか。オルガネラの表面積を比較すると、小胞体が最も広く、ミトコンドリアと比べてもペルオキシソームは非常に狭い。よって、生体はペルオキシソームに膜タンパク質を効率よく局在化させるために小胞体とミトコンドリアへの局在化を防ぐ手段を獲得したと思われる。

4. ペルオキシソームの機能

4-1. ペルオキシソーム機能の概要 ヒトペルオキシソームには 50 種類以上の酵素が局在し、ペルオキシソーム特有の代謝に係わっている。⁷⁾ 私たちは、ラット肝臓ペルオキシソームのプロテオーム解析により、ペルオキシソームタンパク質の品質管理に係わる lon protease を発見した。³⁷⁾ またペルオキシソームには PTS1 を持つ insulin degrading enzyme が局在し、インスリンの分解ではなく酸化タンパク質の分解に係わることを報告した。³⁸⁾ また酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、ペルオキシソームへの ATP 輸送に係わる ATP/AMP 交換輸

送体を発見した。³⁹⁾

脂肪酸の β 酸化はペルオキシソームにおける重要な代謝経路である。ペルオキシソームでは、極長鎖脂肪酸、分枝脂肪酸、胆汁酸生合成中間体ジヒドロキシコレスタン酸やトリヒドロキシコレスタン酸、長鎖ジカルボン酸、2 ヒドロキシ脂肪酸、プロスタノイドなどが β 酸化される。また、エーテル型リン脂質の生合成、フィタン酸の α 酸化が行われている。脂質代謝以外では、プリン、ポリアミン、グリオキシル酸、アミノ酸の代謝にも関わっている。最近、ペルオキシソームの新たな機能が報告された。ペルオキシソームはミトコンドリアとともに自然免疫反応におけるシグナル伝達のプラットフォームとして働いている。⁴⁰⁾ また、ペルオキシソームはコレステロールのリソソームから小胞体への輸送において、リソソームとの接触が必要らしい。⁴¹⁾ ペルオキシソームはミトコンドリア、リソソーム、小胞体などとも相互作用し、多様な生命現象に係わっている。

4-2. ABCD タンパク質の機能 ペルオキシソームへの物質の取り込みと代謝産物の排出にはトランスポーターを必要とする。関与するトランスポーターのうち、1 つが ABC タンパク質である。脂肪酸は主として CoA 体として細胞質に存在しているので、各種の acyl-CoA はペルオキシソームで酸化される前に ABC タンパク質によってペルオキシソーム内に輸送される。一方、 β 酸化され鎖長が短くなった acyl-CoA は carnitine, taurine/glycine 誘導体に変換されて cation/carnitine transporter (OCNT3) などを通してペルオキシソームから排出される。⁴²⁾

ヒト ABC タンパク質に関しては、NBD を欠く ABCC13 を含めると 49 種が同定され、A-F のサブファミリーに分類されている。⁴³⁾ サブファミリー D には、ABCD1-4 の 4 種の ABCD タンパク質が存在する。これらは主としてホモダイマーとして機能している。最近 ABCD1 と ABCD2 がヘテロテトラマーを形成しているとの報告もある。⁴⁴⁾ ABCD1-3 は Fig. 11 に示すように極長鎖脂肪酸 CoA、長鎖脂肪酸 CoA、分枝脂肪酸 CoA や胆汁酸生合成中間体の CoA を輸送している。ABCD1 と ABCD2 では極長鎖脂肪酸に対する基質特異性がオーバーラップしている。⁴⁵⁻⁴⁷⁾ 一方、ABCD4 はリソソームから細

Fig. 11. Potential Substrates of ABCD Transporters

ABCD1-3 predominately exist as a homodimer. ABCD1 and ABCD2 have overlapping substrate specificities toward saturated and monounsaturated VLCFA-CoAs. However, ABCD1 has a higher specificity to C24:0-CoA and C26:0-CoA than ABCD2. In contrast, ABCD2 has higher specificity for C22:6-CoA and C24:6-CoA. ABCD3 is thought to be involved in the transport of LCFA-CoA, branched chain acyl-CoA, and bile acid intermediates, THCA-CoA and DHCA-CoA. ABCD4 is deduced to be involved in the transport of vitamin B₁₂ from lysosome to cytosol.

胞質へのビタミン B₁₂ の輸送に関与していることが示唆される.³³⁾ ABCD1-4 はいずれも膜上で NBD を細胞質に向けたトポロジーをとることから, ABCD1-3 と ABCD4 とでは基質輸送が逆方向になることは興味深い. ABCD4 は哺乳動物で初めて同定された importer となる. Importer とは, 基質を細胞外から細胞内へ輸送するトランスポーターであり, リソソームや小胞体などのオルガネラ内部は細胞外に相当する.

ABC タンパク質は NBD での ATP の結合・加水分解のサイクルにより構造変化を介して物質を輸送している. 私たちは ATP 結合・加水分解に伴うラット肝臓ペルオキシソーム ABCD3 の構造変化をトリプシン感受性の違いを利用して解析を行い, NBD の helical domain が ATP の結合・加水分解によって構造変化していることを示した.⁴⁸⁾ また, ABCD1 については基質結合により NH₂ 末端側の 44 kDa フラグメントの Factor Xa に対する感受性

が変化することが報告されている.⁴⁹⁾ よって, NH₂ 末端側の TMD が基質の認識に関与し, COOH 末端側の NBD に ATP が結合し構造変化することを示唆している. 最近, 私は ABCD1-4 をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* に大量発現させることに成功し, 精製後プロテオリポソームに組み込み, ABCD1-4 が ATPase 活性を持つことを示した.⁵⁰⁾

4-2-1. ABCD1 ABCD1 の欠損は, 組織における極長鎖脂肪酸の蓄積を特徴とする副腎白質ジストロフィー (X-linked adrenoleukodystrophy; X-ALD) の原因となる. よって, ABCD1 はペルオキシソームでの β 酸化のために極長鎖脂肪酸をペルオキシソームへ輸送するトランスポーターと考えられた. 実際, X-ALD 患者線維芽細胞に *ABCD1* 遺伝子を導入すると, 極長鎖脂肪酸の β 酸化が正常化し, 細胞内の極長鎖脂肪酸量が健常者の細胞と同じレベルに低下する. ヒト ABCD タンパク質ホモログである Pxa1/Pxa2 を欠損させた *S. cerevisiae* に, ヒト ABCD1 を発現させて解析した結果から, ABCD1 が C18:0-, C22:0-, C24:0-, C26:0-, C18:1-, C24:6-CoA のような飽和, モノ不飽和, 多価不飽和脂肪酸-CoA の輸送に係わる可能性が示唆された.⁴⁵⁾

しかしながら, ABCD1 の極長鎖脂肪酸 CoA の輸送機構はよくわかっていない. 最近, シロイヌナズナにおけるヒト ABCD1 ホモログ COMATOSE (CTS) が acyl-CoA thioesterase 活性を有することより, 極長鎖脂肪酸 CoA は一旦 CoA が外れ, 極長鎖脂肪酸として輸送され, acyl-CoA synthetase によって再 CoA 化されるというモデルが提示された.⁵¹⁾ また, ペルオキシソームの β 酸化系酵素である thiolase を欠損させ, carnitine palmitoyltransferase 2-SKL をペルオキシソームに発現させた *S. cerevisiae* を作製し, [¹⁸O] H₂O を含む培養液中でオレイン酸の β 酸化が解析された. その結果, [¹⁸O] で標識された β 酸化中間体 3-OH-C18:1-carnitine を定量することにより, acyl-CoA は一旦 CoA が外れ再 CoA 化を受けた後に代謝されることが示唆された.⁵²⁾ 一方, ヒト線維芽細胞から分離したペルオキシソームで極長鎖脂肪酸 CoA の β 酸化活性が CoA 添加で増加しないことより, 極長鎖脂肪酸 CoA はそのまま輸送される可能性を示す報告もある.⁵³⁾

最近、私はヒト ABCD1 を *P. pastoris* に発現させ、ABCD1 が acyl-CoA thioesterase 活性を持つことを示した。⁵⁰⁾ 今後、acyl-CoA 輸送に ABCD1 の ATPase 活性と acyl-CoA thioesterase 活性がどのような役割を果たしているかなど輸送メカニズムの解明が望まれる。また、ABCD1 を欠損するとリソソームからのコレステロールの排出が低下することが報告された。⁴¹⁾ そのメカニズムは不明であるが、ペルオキシソームとリソソームのクロストークがどのようにコレステロール代謝に影響するかも興味深い。

4-2-2. ABCD2 ABCD2 は ABCD1 と機能的なオーバーラップがある。実際、X-ALD の患者線維芽細胞に ABCD2 cDNA を導入すると、極長鎖脂肪酸の β 酸化を正常化する。一方、ABCD2 と ABCD1 のノックアウトマウスでは、脂肪酸蓄積異常のパターンが異なる。ABCD1 ノックアウトマウスでは C24:0 や C26:0 の顕著な蓄積増加がみられるが、ABCD2 ノックアウトマウスでは 1 価並びに多価不飽和極長鎖脂肪酸が蓄積する。⁵⁴⁾ また、ヒト ABCD1 並びに ABCD2 を Pxa1 / Pxa2 欠損 *S. cerevisiae* に発現させた解析からも、ABCD2 が C22:6-CoA や C24:6-CoA の輸送に特異性が高いことが窺える。⁴⁵⁾ また、ABCD1 と ABCD2 の発現は、組織や細胞によって異なっている。どちらを発現するかで組織によって利点があるのかもしれない。ABCD2 の発現は、PPAR α , RXR, TR β , SREBP などによって制御されている。⁴³⁾ ABCD2 の発現はヒトでは低く、ABCD2 遺伝子の変異による疾患はまだ知られていない。

4-2-3. ABCD3 ABCD3 は肝臓や腎臓においてペルオキシソーム膜の主要タンパク質の 1 つである。私たちは、ABCD3 を CHO 細胞に安定過剰発現させるとパルミチン酸の β 酸化活性が亢進することより、ABCD3 は長鎖脂肪酸の輸送に係わっている可能性を示した。⁵⁵⁾ ABCD3 を Pxa1/Pxa2 欠損 *S. cerevisiae* に発現させた実験から、ABCD3 は飽和、不飽和長鎖脂肪酸、分岐長鎖脂肪酸、長鎖ジカルボン酸、などの少し水溶性の高い脂肪酸の輸送に係わっていると予想される (Fig. 11)。⁴⁶⁾ 実際、ABCD3 ノックアウトマウスでは、胆汁酸代謝の異常がみられ、肝臓、胆汁や小腸でのタウリンやグリ

シン抱合したケノデオキシコール酸やコール酸の量が低下し、胆汁酸前駆体のトリヒドロキシコレスタン酸とジヒドロキシコレスタン酸が顕著に増加する。食餌中に含まれるフィトール（葉緑素由来のジテルペンアルコール）は腸内細菌によりフィタン酸やプリスタン酸に変換され、ペルオキシソームで分解される。よって、フィトール食を ABCD3 ノックアウトマウスに摂取させると、フィタン酸やプリスタン酸の代謝異常で、これら分枝脂肪酸の血中量が増加する。最近、ABCD3 遺伝子に変異を持つ患者が発見され、ノックアウトマウス同様の代謝異常を示し、肝臓・脾臓脾腫と重篤な肝障害を示すことが報告されている。⁴⁷⁾

4-2-4. ABCD4 ABCD4 の遺伝子異常でリソソームにビタミン B₁₂ が蓄積するビタミン B₁₂ 欠乏症患者が発見されたことより、ABCD4 はビタミン B₁₂ のリソソームから細胞質への輸送に係わっていると思われる。ビタミン B₁₂ は血中でトランスコバラミン (TC) と複合体を形成し、細胞表面にある受容体と結合したのち、エンドサイトーシスによりリソソーム内へと取り込まれる。その後、リソソーム内から細胞質、さらに一部ミトコンドリア内へと輸送され、methionine synthase や methylmalonyl-CoA mutase の補酵素として利用される。

哺乳動物細胞では、細胞外へのビタミン B₁₂ の排出を細胞膜上の ABC タンパク質 ABCC1 が担うことが示唆されている。⁵⁶⁾ また、大腸菌では細胞外からのビタミン B₁₂ の取り込みを細胞膜の ABC タンパク質 BtuCD が担っている。⁵⁷⁾ よって、リソソームにおいて、ビタミン B₁₂ 輸送の本体は ABCD4 であり LMBD1 は多種類のプロテアーゼを含む酸性オルガネラであるリソソーム膜上で ABCD4 の安定性に寄与しているかもしれない。

5. ペルオキシソーム病

ペルオキシソームの欠損では、極長鎖脂肪酸やフィタン酸などの物質が蓄積する。一方では、DHA、胆汁酸、プラズマローゲンなど生体に必須の物質が減少する。ペルオキシソーム酵素やペルオキシソームの形成に係わる遺伝子変異でいわゆるペルオキシソーム病が起こる。ペルオキシソーム病は、ペルオキシソーム形成に係わる疾患ペルオキシソーム形成異常症 (peroxisome biogenesis disease; PBD) と単一酵素異常症の 2 つに分類される。⁵⁸⁾

5-1. ペルオキシソーム形成異常症 ペルオキシソームの形成は、ペルオキシソーム前駆体の小胞体からの出芽、マトリックスタンパク質の輸送、成熟と分裂による増殖の過程から成り立っている。ペルオキシソーム形成異常症は、常染色体の2つの対立 *PEX* 遺伝子の異常による劣性遺伝病である。これまでに13種類の *PEX* 遺伝子の変異が報告されていた。最近、ペルオキシソームの分裂に係わる遺伝子 *DLP/DRP1* と *PEX11β* の変異によるペルオキシソーム形成異常症が報告された。^{59,60)}

ペルオキシソーム形成異常症は、臨床的には重篤で致死的な疾患から比較的軽度で進行性の神経系疾患まで幅広い。ペルオキシソーム形成異常症の共通した病態は、肝臓障害、神経系の発達の遅れ、網膜症、聴覚障害などである。疾患の重篤度は、ペルオキシソーム形成における peroxin の役割と変異 peroxin に残っている機能の程度に依存する。最も重篤なケースは、Zellweger 病、新生児型副腎白質ジストロフィー (X-ALD とは異なる疾患)、乳児型レフサム病である。これらの病名は原因遺伝子が発見される以前につけられたので、同じ遺伝子変異でも重症度の程度と疾患の表現系の特徴により異なる病名がついている。*PEX1*, *PEX2*, *PEX3*, *PEX5*, *PEX6*, *PEX7*, *PEX10*, *PEX11*, *PEX12*, *PEX13*, *PEX14*, *PEX16*, *TEX19*, *PEX26*, *DLP/DRP1* 遺伝子の異常が報告されている。

PEX7 遺伝子の変異では *PTS2* を持つペルオキシソームマトリックスタンパク質のペルオキシソームへの輸送が障害される致死性の骨系統疾患で点状石灰化を伴う近位優位の四肢短縮症 (rhizomelic chondrodysplasia punctata; RCDP) type 1 に分類されている。Type 2, 3 及び 4 は単一酵素異常疾患 (後述) で、最近 *Pex5pL*, *DLP/DRP1*, *Pex11pβ* の遺伝子異常が Type 5 に分類されている。

5-2. 単一酵素欠損症 単一酵素欠損症には、ペルオキシソームマトリックス酵素と膜タンパク質の欠損がある。欠損症の病態は、それぞれのタンパク質のペルオキシソーム代謝における役割に依存する。単一酵素欠損症も生化学的異常を示し、多くの場合重篤である。脂肪酸 β 酸化系酵素の欠損としては、acyl-CoA oxidase 欠損症、D-bifunctional protein (multifunctional protein 2; MFP2) 欠損症、2-methylacyl-CoA racemase 欠損症、sterol carrier

protein X (SCPx) 欠損症が知られている。 α 酸化酵素 phytanoyl-CoA hydroxylase の欠損はレフサム病 (乳児型レフサム病とは異なる) の原因となる。エーテル型リン脂質合成に係わる acyl-CoA: dihydroxyacetonephosphate acyltransferase (DHAPTA), alkyl-DHAP synthase, fatty acyl-CoA reductase の欠損は RCDP type 2, 3, 4 の原因となる。Alanine: glyoxylate amino transferase の欠損は原発性高シュウ酸尿症 type 1, catalase の欠損はアカタラセミアの原因となる。一方、トランスポーターである ABCD1 の欠損は X-ALD の原因となる。2016 年、肝脾腫と重篤な肝臓障害を持つ ABCD3 欠損症患者が初めて見つかった。⁴⁷⁾

ペルオキシソーム病は重篤で稀な疾患であり、治療法の開発はこれからの課題である。一方、X-ALD については患者数も比較的多く、病態解明や治療法の開発が進められている。

5-3. X-ALD

5-3-1. X-ALD とは X-ALD は、ABCD1 タンパクをコードする *ABCD1* 遺伝子の異常による X 連鎖性の遺伝性疾患である。中枢神経の進行性の脱髄による神経変性と副腎不全を特徴とする (Fig. 12)。ペルオキシソーム病の中で患者数の最も多い疾患で、男児数万人に一人の割合で起こる。3-10 歳で発症して大脳半球に広範な進行性脱髄をきたす小児大脳型のほかに、20 歳以降に痙攣性歩行で発症する adrenomyeloneuropathy, 成人で性格変化、知能低下、精神症状で発症する成人大脳型、副腎不全症状のみのアジソン型など、多彩な臨床型を有している。

X-ALD という疾患は、1923 年に Siemerling と Creutzfeldt が副腎萎縮を伴う進行性脱髄疾患を報告したことにはじまる。⁶¹⁾ 1963 年、X-ALD は X 連鎖劣性遺伝性の疾患であることが推測され、⁶²⁾ 1970 年に Blaw により中枢神経系と副腎皮質が障害される先天代謝異常症として、“adrenoleukodystrophy” という名称が提唱された。⁶³⁾ その後、病変部に脂質を蓄積した封入体 (inclusion body) が発見され、脂質代謝異常症であることが予想された。1976 年、五十嵐らにより患者の脳、副腎に極長鎖脂肪酸が蓄積していることが示された。⁶⁴⁾ 1993 年に Mosser らが、Xq28 上のポジショナルクローニングにより、本症の病因遺伝子として *ALD* 遺伝子 (GenBank

Fig. 12. MRI Images of a Boy with Cerebral X-ALD

Note the extensive white matter lesions involving the parieto-occipital white matter and splenium of the corpus callosum. The left side is FLAIR image and the right side is T1-weighted image. The arrows show linear contrast enhancement.

NM_000033) を同定した。⁶⁵⁾ *ALD* は全長約 21 kb で、10 個のエクソンを含み、745 アミノ酸からなるペルオキシソーム膜 ABC タンパク質 (ALDP) をコードしていた。当初、原因遺伝子は極長鎖脂肪酸を活性型にする acyl-CoA synthase ではないかと推定されていたので、ペルオキシソーム膜トランスポーターが原因遺伝子であったことは驚きであった。

5-3-2. 生化学的特徴と発症機構 中枢神経系だけでなく、ほとんどの組織や血漿、赤血球膜、白血球などにおいて極長鎖脂肪酸の増加が認められる。これらの極長鎖脂肪酸はエステル体としてリン脂質、ガングリオシド、コレステロールエステルを構成している。一方、ドコサヘキサエン酸 (DHA, C22:6) などの多価不飽和脂肪酸の含量は増加していない。血漿中の顕著な飽和極長鎖脂肪酸 (C26:0, C24:0) の増加は、X-ALD の最もよい診断マーカーになっている。最近、1-ヘキサコサノイル-2-リゾ-ホスファチジルコリン (C26:0-lyso-PC) の血中での増加が、X-ALD やペルオキシソーム病の有効な診断マーカーになることが指摘され、新生児マススクリーニングへの応用も期待されている。⁶⁶⁾

X-ALD では、脳グリア細胞や副腎皮質など *ABCD1* が主として発現している細胞が障害のターゲットになっている。X-ALD の発症機序の詳細は不明であるが、まず、*ABCD1* の機能不全により、脳内グリア細胞であるアストロサイトやミクログリアで極長鎖脂肪酸を含むリン脂質などが増加し、ミトコンドリアの機能障害が起こる。引き続き、酸化ストレスや自然免疫系の異常などを介してグリア細胞から炎症性物質などが放出され、神経を取り囲んでいるオリゴデンドロサイトの細胞の死により脱髓

Fig. 13. A Putative Mechanism of Neurodegeneration in X-ALD

In the central nervous system, abnormal accumulation of very long chain fatty acids (VLCFAs), which is caused by the dysfunction of *ABCD1* results in mitochondrial dysfunction. The dysfunction would exacerbate cell function through oxidative stress and might lead to dysregulation of innate immunity. The microglia secretes inflammatory cytokines. Proinflammatory cytokines are known to have negative effects on oligodendrocytes. Bone marrow transplantation may prevent progression of demyelination. Abbreviations: Px, peroxisome; Mt, mitochondrion.

が起こると考えられている (Fig. 13).⁴³⁾

X-ALD の特徴として、*ABCD1* 遺伝子に同じ変異を持つ患者でも、発症時期 (病気の進行) に大きな違いがみられる。これは、*ABCD1* 遺伝子の変異に加えて、他の遺伝子変異や環境などの修飾因子の関与が重要であることを意味している。よって、修飾因子を同定し、その影響を改善することは病気の進行を抑制するために重要である。

5-3-3. X-ALD の治療薬の開発 現在のところ、X-ALD の有効な治療法は確立されていない。以前 X-ALD の治療に有効であると報告されたトリオレインとトリエルシン (エルカ酸トリアシルグリセロール) を 4:1 で配合したロレンツォオイル (Lorenzo's oil) は、血中の極長鎖脂肪酸量を低下させるが神経変性を抑制する効果はない。唯一、発病初期 (発病前) における造血幹細胞移植が、病気の進行を抑制できるが、拒絶反応などの移植のリスクも課題になっている。

治療薬開発に関しては、①変異型 *ABCD1* の多くはペルオキシソームに輸送される前に分解されるので、変異型 *ABCD1* タンパク質分解を抑制する化合物の探索、② *ABCD1* の機能を代行できる *ABCD2* の発現誘導、③ X-ALD 患者の細胞ではペルオキシ

Fig. 14. Possible Targets for X-ALD Therapy

Mutation of ABCD1 leads to the dysfunction of ABCD1, which results in a decrease in VLCFA β -oxidation. The decrease in VLCFA β -oxidation leads to an increase in the VLCFA-CoA level, which is the substrate for fatty acid elongation in the ER. As a result, the VLCFA level is increased and the subsequent abnormal accumulation of VLCFAs results in oxidative damage. 1. Stabilization and correct subcellular localization of missense mutants of ABCD1 with residual activity might be an effective way to recover the dysfunction of ABCD1. 2. Induction of ABCD2 expression. 3. Stimulation of peroxisomal fatty acid β -oxidation. 4. Inhibition of microsomal fatty acid elongation. 5. Attenuation of the dysregulated response to oxidative stress also has potential as an effective approach in X-ALD. Chemical compounds that can pass through blood-brain barrier and act on these targets would be promising drugs for X-ALD therapy since target cells in X-ALD are astrocytes and microglial cells in the central nervous system.

ソームでの極長鎖脂肪酸 β 酸化活性が 30–40% 残っているため、ペルオキシソームの機能亢進、④細胞内での極長鎖脂肪酸合成に係わる酵素の阻害、⑤ミトコンドリアでの酸化ストレスを抑制する化合物の探索などが課題となっている (Fig. 14).⁶⁷⁾ 私たちはこの中で、①と③に関して新たな化合物のスクリーニング系を構築し、有効化合物の探索を行っている。

X-ALD 患者線維芽細胞において、ミスセンス変異 ABCD1 のうち、約 70% の変異でタンパク質が検出されないか若しくは減少している。この原因は、mRNA から翻訳された ABCD1 が正しく折り畳まれず、プロテアソームで分解されてしまうためと考えられている。一方、変異 ABCD1 を持つ X-ALD 患者の線維芽細胞を、体温 (37°C) より低い温度 (26–30°C) で培養すると、一部の変異型 ABCD1 は分解が抑制され、ペルオキシソームに到達し、ペルオキシソームでの極長鎖脂肪酸の分解能をある程度回復する。したがって、このようなミスセンス変異を持つ変異 ABCD1 タンパク質を化合物で安定化し機能を回復させることは、X-ALD に対する治療として有効と考えられる。

私たちは、まず患者で見ついているミスセンス変異 ABCD1 タンパク質に GFP を融合した ABCD1-GFP を発現した CHO 細胞を作製した。この細胞でも変異型 ABCD1-GFP は、37°C の培養条件では分解されて GFP の蛍光は観察されないが、低温培養やプロテアソーム阻害剤で分解を抑えると蛍光が観察できる。このモデル細胞を 96 穴プレート上で培養し、変異型 ABCD1-GFP の蛍光の増加を指標に、既存薬 1948 種についてスクリーニングを行った。その結果、多発性骨髄腫治療薬 bortezomib に変異型 ABCD1 を安定化する作用がみられた。しかし、bortezomib には細胞障害もあり、X-ALD 治療薬としての使用は難しいと思われるので、新たな化合物の発見を目指している。

一方、X-ALD 患者線維芽細胞では極長鎖脂肪酸 β 酸化活性が残っている。最近、遺伝子のエクソン領域のみを濃縮して、DNA の塩基配列を解析するエクソーム解析により、効率的にエクソン上の変異を検出することが可能になった。X-ALD 患者のエクソーム解析から、ペルオキシソームの機能が低くなる遺伝子変異を持っている患者ほど、重篤化する可能性が示唆されている。よって、極長鎖脂肪酸 β 酸化活性の促進を含めてペルオキシソームの機能を改善する化合物は治療薬の候補になると考えられる。私たちは、ヒト線維芽細胞にペルオキシソームのみで β 酸化されることを確認した蛍光化合物ピレンで標識したパルミチン酸を添加し、 β 酸化されて炭素鎖の短くなった脂肪酸を高速液体クロマトグラフィーで検出する方法を開発した。⁶⁸⁾ 現在、96 穴のプレートで X-ALD 患者の線維芽細胞を培養し、脂肪酸 β 酸化活性を促進させる化合物の探索を行っている。

5-3-4. 新たな取り組み 骨髄移植は X-ALD の唯一の治療法であるが、移植による拒絶反応の問題がある。そこで、最近では遺伝子治療が試みられている。2009 年、フランスの Auborg らにより ABCD1cDNA を、lentivirus ベクターを用いて患者造血幹細胞に導入し、移植する遺伝子医療が行われた。⁶⁹⁾ MRI 検査によると、移植 3 年を経過しても脳での脱髄の進行が抑制されている。この結果を受け、アメリカで 17 例の遺伝子治療が行われ 1 例を除いて良好な経過が報告されている。⁷⁰⁾ これらの成功例は画期的である。しかし、発症極初期若しくは

未発症患者の遺伝子治療であり、今後、どの程度の病態の患者まで移植可能であるかとともに長期に渡るフォローアップも必要である。

造血幹細胞移植は脱髄を抑制するが、その作用メカニズムの詳細は不明である。私たちは、X-ALDモデルマウスを用いて、骨髄移植の有効性を検討している。ちなみに、ドナー細胞は脳、脊髄においてミクログリア様細胞に分化し、脳の広域に生着していることが明らかになった。正常ミクログリアが分泌するサイトカイン等の病態への影響などを解析することにより、新たな視点からの創薬が可能になると思われる。

X-ALDでは、発症時期と病態の進行・重症度は患者毎に大きく異なっている。発症早期の骨髄移植が唯一の治療法であり、発症を予知できるバイオマーカーの発見が求められている。X-ALDの診断には、血漿・血清脂質加水分解後の脂肪酸組成分析によるC26:0/C22:0値が用いられているが、病態の程度を反映していない。発症や病態形成には多様な極長鎖脂肪酸を含有した脂質分子種が関与する可能性があるため、発症機序の解明には本来の脂質分子種を解析することが必要である。近年著しく発展したLC/MS/MSを用いて網羅的に極長鎖脂肪酸含有脂質を高感度に定量し構造決定することが可能になった。⁷¹⁾ よって、特定の極長鎖脂肪酸含有脂質の増加と病態の進行・重症度との相関性を解析することで、病態の進展を予測できる新たなバイオマーカーが見つかることが期待される。

またX-ALD患者線維芽細胞からiPS細胞を作製し、オリゴデンドロサイトに分化させることにより病態を解析する試みが報告されている。⁷²⁾ 遺伝子発現解析による発病関連遺伝子の同定、分子病態解析の進展が期待される。

X-ALDは、*ABCD1* 遺伝子の同一変異でも多様な病態を示すことより、病気の進行に係わる*ABCD1* 以外の遺伝子変異の存在が予測される。多数のX-ALD患者の遺伝子のエクソーム解析を行い、X-ALDと関連した遺伝子異常が見い出されれば、新たな視点からの創薬が可能になる。これらの取り組みと治療薬開発があいまって、X-ALDの治療が可能になると期待される。

6. おわりに

1985年以降、一貫して「ペルオキシソームの形

成機構と機能の解析並びに特定疾患であるX-ALDの病態解析と治療薬開発」に取り組んできた。これまでの研究を振り返り、私たちの研究を中心にペルオキシソームの形成機構と機能並びにペルオキシソームに係わる疾患についてまとめた。科学技術の進展とその応用により、ペルオキシソームがどのように形成されるか、またどのような機能を担っているか、その理解は大いに深まった。一方、あることがわかると、「ではなぜそうなのだろうか」と新たな問いかけが出てくるのが科学である。新たにわかった知見をより深く検証し、ペルオキシソームのより深い理解が進むことが望まれる。またペルオキシソームはミトコンドリア、小胞体などと代謝産物の受け渡しを介して相互作用している。これらオルガネラとのコミュニケーションと細胞機能制御の関連性についての研究も重要である。

ペルオキシソーム病に関しては、原因遺伝子の特定とともに病態の理解が進んできた。現在、治療法の開発が進んでいるのはX-ALDのみであるが、近い将来X-ALDの有効な治療法が確立され、すべてのペルオキシソーム病の治療法開発のモデルとなることを期待される。

謝辞 ペルオキシソームに関する研究を進めるにあたり、苦楽をともにした帝京大学薬学部病態生化学研究室（故高野達哉教授）並びに富山大学大学院医学薬学研究部細胞機能学研究室の先生方並びに学生、共同研究を実施した多くの大学・企業の研究者の皆様に感謝いたします。多くの方々とペルオキシソームについての概念を共有できたことは大きな喜びです。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Rhodin J., Thesis, Karolinska Institutet, Aktiebolaget Godvil, Stockholm, 1954.
- 2) De Duve C., Baudhuin P., *Physiol. Rev.*, **46**, 323–357 (1966).
- 3) Lazarow P. B., De Duve C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 2043–2046 (1976).
- 4) Bowen P., Lee C. S., Zellweger H., Lindenberg R., *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, **114**, 402–414 (1964).

- 5) 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., *Science*, **182**, 62–64 (1973).
- 6) Berger J., Dorninger F., Forss-Petter S., Kunze M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 934–955 (2016).
- 7) Waterham H. R., Ferdinandusse S., Wanders R. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 922–933 (2016).
- 8) Vamecq J., Cherkaoui-Malki M., Andreoletti P., Latruffe N., *Biochimie*, **98**, 4–15 (2014).
- 9) Haanstra J. R., González-Marcano E. B., Gualdrón-López M., Michels P. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 1038–1048 (2016).
- 10) Steinberg G., Harmer N. J., Schuster M., Kilaru S., *Fungal Genet. Biol.*, **109**, 53–55 (2017).
- 11) Graham I. A., *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, 115–142 (2008).
- 12) Novikoff P. M., Novikoff A. B., *J. Cell Biol.*, **53**, 532–560 (1972).
- 13) Lazarow P. B., Fujiki Y., *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**, 489–530 (1985).
- 14) Agrawal G., Subramani S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1863**, 892–901 (2016).
- 15) Imanaka T., Small G. M., Lazarow P. B., *J. Cell Biol.*, **105**, 2915–2922 (1987).
- 16) Gould S. G., Keller G. A., Subramani S., *J. Cell Biol.*, **105**, 2923–2931 (1987).
- 17) Gould S. J., Keller G. A., Subramani S., *J. Cell Biol.*, **107**, 897–905 (1988).
- 18) Rucktäschel R., Girzalsky W., Erdmann R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 892–900 (2011).
- 19) Hasan S., Platta H. W., Erdmann R., *Front. Physiol.*, **4**, 261 (2013).
- 20) Fujiki Y., Nashiro C., Miyata N., Tamura S., Okumoto K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 145–149 (2012).
- 21) Santos M. J., Imanaka T., Shio H., Lazarow P. B., *J. Biol. Chem.*, **263**, 10502–10509 (1988).
- 22) Santos M. J., Imanaka T., Shio H., Small G. M., Lazarow P. B., *Science*, **239**, 1536–1538 (1988).
- 23) Imanaka T., Shiina Y., Takano T., Hashimoto T., Osumi T., *J. Biol. Chem.*, **271**, 3706–3713 (1996).
- 24) Fang Y., Morrell J. C., Jones J. M., Gould S. J., *J. Cell Biol.*, **164**, 863–875 (2004).
- 25) Shibata H., Kashiwayama Y., Imanaka T., Kato H., *J. Biol. Chem.*, **279**, 38486–38494 (2004).
- 26) Sato Y., Shibata H., Nakatsu T., Nakano H., Kashiwayama Y., Imanaka T., Kato H., *EMBO J.*, **29**, 4083–4093 (2010).
- 27) Sato Y., Shibata H., Nakano H., Matsuzono Y., Kashiwayama Y., Kobayashi Y., Fujiki Y., Imanaka T., Kato H., *J. Biol. Chem.*, **283**, 6136–6144 (2008).
- 28) Kashiwayama Y., Seki M., Yasui A., Murasaki Y., Morita M., Yamashita Y., Sakaguchi M., Tanaka Y., Imanaka T., *Exp. Cell Res.*, **315**, 190–205 (2009).
- 29) Lee A., Asahina K., Okamoto T., Kawaguchi K., Kostsin D. G., Kashiwayama Y., Takanashi K., Yazaki K., Imanaka T., Morita M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **453**, 612–618 (2014).
- 30) Kashiwayama Y., Asahina K., Shibata H., Morita M., Muntau A. C., Roscher A. A., Wanders R. J., Shimozaawa N., Sakaguchi M., Kato H., Imanaka T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1746**, 116–128 (2005).
- 31) Kashiwayama Y., Asahina K., Morita M., Imanaka T., *J. Biol. Chem.*, **282**, 33831–33844 (2007).
- 32) Halbach A., Lorenzen S., Landgraf C., Volkmer-Engert R., Erdmann R., Rottensteiner H., *J. Biol. Chem.*, **280**, 21176–21182 (2005).
- 33) Coelho D., Kim J. C., Miousse I. R., Fung S., du Moulin M., Buers I., Suormala T., Burda P., Frapolli M., Stucki M., Nürnberg P., Thiele H., Robenek H., Höhne W., Longo N., Pasquali M., Mengel E., Watkins D., Shoubbridge E. A., Majewski J., Rosenblatt D. S., Fowler B., Rutsch F., Baumgartner M. R., *Nat. Genet.*, **44**, 1152–1155 (2012).
- 34) Rutsch F., Gailus S., Miousse I. R., Suormala T., Sagné C., Toliat M. R., Nürnberg G., Witkamp T., Buers I., Sharifi A., Stucki M., Becker C., Baumgartner M., Robenek H., Marquardt T., Höhne W., Gasnier B., Rosenblatt D. S., Fowler B., Nürnberg P., *Nat. Genet.*, **41**, 234–239 (2009).
- 35) Kawaguchi K., Okamoto T., Morita M., Ima-

- naka T., *Sci. Rep.*, **6**, 30183 (2016).
- 36) Iwashita S., Tsuchida M., Tsukuda M., Yamashita Y., Emi Y., Kida Y., Komori M., Kashiwayama Y., Imanaka T., Sakaguchi M., *J. Biochem.*, **147**, 581–590 (2010).
- 37) Kikuchi M., Hatano N., Yokota S., Shimoza-wa N., Imanaka T., Taniguchi H., *J. Biol. Chem.*, **279**, 421–428 (2004).
- 38) Morita M., Kurochkin I. V., Motojima K., Goto S., Takano T., Okamura S., Sato R., Yokota S., Imanaka T., *Cell Struct. Funct.*, **25**, 309–315 (2000).
- 39) Nakagawa T., Imanaka T., Morita M., Ishiguro K., Yurimoto H., Yamashita A., Kato N., Sakai Y., *J. Biol. Chem.*, **275**, 3455–3461 (2000).
- 40) Dixit E., Boulant S., Zhang Y., Lee A. S., Odendall C., Shum B., Hacohen N., Chen Z. J., Whelan S. P., Fransen M., Nibert M. L., Superti-Furga G., Kagan J. C., *Cell*, **141**, 668–681 (2010).
- 41) Chu B. B., Liao Y. C., Qi W., Xie C., Du X., Wang J., Yang H., Miao H. H., Li B. L., Song B. L., *Cell*, **161**, 291–306 (2015).
- 42) Antonenkov V. D., Hiltunen J. K., *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 1374–1386 (2012).
- 43) Morita M., Imanaka T., *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 1387–1396 (2012).
- 44) Geillon F., Gondcaille C., Raas Q., Dias A. M. M., Pecqueur D., Truntzer C., Lucchi G., Ducoroy P., Falson P., Savary S., Trompier D., *J. Biol. Chem.*, **292**, 6965–6977 (2017).
- 45) van Roermund C. W., Visser W. F., Ijlst L., Waterham H. R., Wanders R. J., *Biochim. Biophys. Acta*, **1811**, 148–152 (2011).
- 46) van Roermund C. W., Ijlst L., Wagemans T., Wanders R. J., Waterham H. R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1841**, 563–568 (2014).
- 47) Ferdinandusse S., Jimenez-Sanchez G., Koster J., Denis S., Van Roermund C. W., Silva-Zolezzi I., Moser A. B., Visser W. F., Gul-luoglu M., Durmaz O., Demirkol M., Waterham H. R., Gökçay G., Wanders R. J., Valle D., *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 361–370 (2015).
- 48) Kashiwayama Y., Morita M., Kamijo K., Ima-naka T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**, 1245–1251 (2002).
- 49) Guimarães C. P., Sá-Miranda C., Azevedo J. E., *J. Hum. Genet.*, **50**, 99–105 (2005).
- 50) Okamoto T., Kawaguchi K., Watanabe S., Agustina R., Ikejima T., Ikeda K., Nakano M., Morita M., Imanaka T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **496**, 1122–1127 (2018).
- 51) De Marcos Lousa C., van Roermund C. W., Postis V. L., Dietrich D., Kerr I. D., Wanders R. J., Baldwin S. A., Baker A., Theodoulou F. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 1279–1284 (2013).
- 52) van Roermund C. W., Ijlst L., Majczak W., Waterham H. R., Folkerts H., Wanders R. J., Hellingwerf K. J., *J. Biol. Chem.*, **287**, 20144–20153 (2012).
- 53) Wiesinger C., Kunze M., Regelsberger G., Forss-Petter S., Berger J., *J. Biol. Chem.*, **288**, 19269–19279 (2013).
- 54) Fourcade S., Ruiz M., Camps C., Schlüter A., Houten S. M., Mooyer P. A., Pàmols T., Dacremont G., Wanders R. J., Giròs M., Pujol A., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **296**, E211–E221 (2009).
- 55) Imanaka T., Aihara K., Takano T., Yamashi-ta A., Sato R., Suzuki Y., Yokota S., Osumi T., *J. Biol. Chem.*, **274**, 11968–11976 (1999).
- 56) Beedholm-Ebsen R., van de Wetering K., Har-dlei T., Nexø E., Borst P., Moestrup S. K., *Blood*, **115**, 1632–1639 (2010).
- 57) Borths E. L., Poolman B., Hvorup R. N., Locher K. P., Rees D. C., *Biochemistry*, **44**, 16301–16309 (2005).
- 58) Wanders R. J., Klouwer F. C., Ferdinandusse S., Waterham H. R., Poll-Thé B. T., *Methods Mol. Biol.*, **1595**, 329–342 (2017).
- 59) Waterham H. R., Koster J., van Roermund C. W., Mooyer P. A., Wanders R. J., Leonard J. V., *N. Engl. J. Med.*, **356**, 1736–1741 (2007).
- 60) Ebberink M. S., Koster J., Visser G., Spron-sen F., Stolte-Dijkstra I., Smit G. P., Fock J. M., Kemp S., Wanders R. J., Waterham H. R., *J. Med. Genet.*, **49**, 307–313 (2012).
- 61) Siemerling E., Creutzfeldt H. G., *Eur. Arch. Psych. Clin. Neurosci.*, **68**, 217–244 (1923).
- 62) Fanconi A., Prader A., Isler W., Luethy F., Siebenmann R., *Helv. Paediatr. Acta*, **18**, 480–501 (1963).
- 63) Blaw M., “Neurodystrophies and Neurolipi-doses, Melanodermic type leukodystrophy

- (adrenoleukodystrophy),” ed by Vinken P. J., Bruyn G. W., North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1970, pp. 128–133.
- 64) Igarashi M., Schaumburg H. H., Powers J., Kishimoto Y., Kolodny E., Suzuki K., *J. Neurochem.*, **26**, 851–860 (1976).
- 65) Mosser J., Douar A. M., Sarde C. O., Kioschis P., Feil R., Moser H., Poustka A. M., Mandel J. L., Aubourg P., *Nature*, **361**, 726–730 (1993).
- 66) Hubbard W. C., Moser A. B., Tortorelli S., Liu A., Jones D., Moser H., *Mol. Genet. Metab.*, **89**, 185–187 (2006).
- 67) Morita M., Shimozawa N., Kashiwayama Y., Suzuki Y., Imanaka T., *Curr. Drug Targets*, **12**, 694–706 (2011).
- 68) Morita M., Matsumoto S., Okazaki A., Tomita K., Watanabe S., Kawaguchi K., Minato D., Matsuya Y., Shimozawa N., Imanaka T., *J. Inherit. Metab. Dis.*, **39**, 725–731 (2016).
- 69) Cartier N., Hacein-Bey-Abina S., Bartholomae C. C., Veres G., Schmidt M., Kutschera I., Vidaud M., Abel U., Dal-Cortivo L., Caccavelli L., Mahlaoui N., Kiermer V., Mittelstaedt D., Bellesme C., Lahlou N., Lefrère F., Blanche S., Audit M., Payen E., Leboulch P., l’Homme B., Bougnères P., Von Kalle C., Fischer A., Cavazzana-Calvo M., Aubourg P., *Science*, **326**, 818–823 (2009).
- 70) Eichler F., Duncan C., Musolino P. L., Orchard P. J., De Oliveira S., Thrasher A. J., Armant M., Dansereau C., Lund T. C., Miller W. P., Raymond G. V., Sankar R., Shah A. J., Sevin C., Gaspar H. B., Gissen P., Amartino H., Bratkovic D., Smith N. J. C., Paker A. M., Shamir E., O’Meara T., Davidson D., Aubourg P., Williams D. A., *N. Engl. J. Med.*, **377**, 1630–1638 (2017).
- 71) Hama K., Nagai T., Nishizawa C., Ikeda K., Morita M., Satoh N., Nakanishi H., Imanaka T., Shimozawa N., Taguchi R., Inoue K., Yokoyama K., *Lipids*, **48**, 1253–1267 (2013).
- 72) Jang J., Kang H. C., Kim H. S., Kim J. Y., Huh Y. J., Kim D. S., Yoo J. E., Lee J. A., Lim B., Lee J., Yoon T. M., Park I. H., Hwang D. Y., Daley G. Q., Kim D. W., *Ann. Neurol.*, **70**, 402–409 (2011).