

「生命活動のプログラム」
平成 7 年度採択研究代表者

藤木 幸夫

(九州大学大学院理学系研究科 教授)

「オルガネラ構築と細胞機能発現制御の分子機構」

1. 研究実施の概要

複雑な内部構造をもつ真核細胞の諸々の生命活動は細胞オルガネラの構造と機能に大きく依存している。これら細胞内構造並びに細胞構造は、遺伝情報の翻訳産物であるタンパク質が細胞内で空間的に特定の秩序をもって配置されることにより構築されている。すなわち遺伝子が生体膜を隔てた場をも支配できる基本原理である。従って、そのメカニズムを解明することは遺伝子発現から細胞機能の発現と制御という一連の生命活動を理解するうえで極めて重要な研究課題である。本戦略的基礎研究推進事業ではペルオキシソーム、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、リソソームなど細胞内オルガネラの動的存在状態とその制御機構、並びに種々の病態をもたらす障害機構をペルオキシソーム系を主体として明らかにし、それらの成果を総合的に考察することにより「オルガネラ構築と細胞機能発現制御」の基本原理を導き出すことを目的として研究を行っている。

本研究課題は真核細胞におけるオルガネラの膜系という巨大かつ複雑な構造体を研究対象とし、しかも扱う現象はタンパク質の生合成に伴う細胞内での移動という時間的にも空間的にも極めてダイナミックな現象である。従って、今年度はin vivo, in vitro の両系を駆使してタンパク質の細胞内選別輸送・局在化およびペルオキシソーム系を中心にオルガネラ形成にかかわるより多くの細胞内因子の同定とそれらの機能解明に主力を注いだ。

本課題研究は遺伝情報発現ステップの全貌の理解という生命科学研究における極めて重要な命題解明に分子的基盤を与えるだけでなく、その成果として、将来有用物質の分泌生産、オルガネラを利用したバイオテクノロジーや人工細胞の開発など応用への道も開くことが期待される。

2. 研究実施内容

Aグループ

1. ペルオキシソームの形成機構とその障害の分子機構

本研究代表者の研究対象としている細胞内小器官ペルオキシソームは近年多くの重要な代謝機能が見出される一方、その障害は Zellweger 症候群など遺伝性の

致死的疾患をもたらすなど、生体にとって不可欠な細胞内小器官である。従って、ペルオキシソームは本研究課題の解決に非常に適したモデル小器官系といえる。本年度は昨年度同様、主として多くのペルオキシソーム欠損性動物変異細胞の分離と相補遺伝子の単離を中心に、さらには相補遺伝子産物の細胞生化学的機能の解明を含めて展開した。

2. 核タンパク質の細胞質－核間輸送の分子機構

HIV遺伝子発現調節蛋白質 Tat および Rev をモデル核タンパク質として、その細胞内選別輸送とその制御機構を分子レベルで解明するため、本年度は、Revの核内輸送機構を解析する細胞系の樹立を試みた。またPPARの核輸送機構についても検討をはじめた。

B グループ

1. ミトコンドリアへのタンパク質のターゲッティング膜透過および小胞体膜形成の分子機構

i) ミトコンドリア外膜と内膜とはそれぞれ独立した透過装置を持つ。界面活性剤による内・外膜の解体、人工膜への再構成、化学架橋法などを用いて透過装置を構成する因子の同定と精製を行った。

ii) 小胞体 (ER) 膜タンパク質のトポロジー形成に関わるシグナルの系統的な特性解析を行った。

2. ミトコンドリアおよび小胞体へのターゲッティングシグナルの分子認識機構

i) ミトコンドリアのターゲッティングシグナル受容体とプロセッシングペプチダーゼ上のシグナル認識に係わる構造を遺伝子工学および親和性標識等を用いて同定を試みた。

ii) 小胞体のC末端膜挿入シグナルを持つタンパク質のシグナル基本構造の同定を試みた。

C グループ

1. ゴルジ装置の形成機構

ゴルジ体の形態形成に関与するタンパク質としてGCP60を同定し、ゴルジ膜タンパク質との結合などについてその機能を解析した。また、ゴルジ体形態形成に影響を及ぼす薬剤の作用機構について検討した。

2. リソソーム・エンドソームの形成機構

リソソームとエンドソームの融合に拘わる細胞質因子、エンドソーム膜タンパク質およびリソソーム膜タンパク質をそれぞれ同定、精製、cDNAクローニングを試みた。

(詳細)

Aグループ

1 ペルオキシソームの形成機構とその障害の分子機構

1) 新たなペルオキシソーム欠損性 CHO 細胞株の分離

ヒトの先天性ペルオキシソーム欠損症には現在少なくとも13種類の相補性群が知られているので、多くのペルオキシソーム欠損性変異細胞株の分離を昨年度試みた結果、5つの異なる相補性群に属する変異細胞、それぞれZP124(ヒト相補性群A群)、ZP126、ZP128(ヒト相補性群H群)、ZPG207(ヒト相補性群R群)およびZPG208を得た。このことよりヒト相補性群、ヒト相補性群A群とR群(それぞれアメリカ8群および11群)およびH群に相当する新規なCHO変異細胞株が分離されたことになる。一方、ZP126およびZPG208は既存のCHOおよびヒトのいずれの相補性群にも属さない、哺乳動物細胞におけるそれぞれ第16, 17番目の相補性群変異細胞であることも明らかになった(表1)。つぎにこれら変異細胞を用いて新たなペルオキシソーム形成因子の単離を検討した。

2) ペルオキシソーム形成因子(peroxin)のクローニング、ペルオキシソーム病患者異常遺伝子解析、および機能解明

2-1) 機能相補活性スクリーニング法:

変異細胞 ZP128 に対し相補活性を有する PEX13 遺伝子をヒト cDNA library よりクローニングに成功、H 群の病因遺伝子であることも判明した。ついで ZP110 に対する相補遺伝子のクローニングを試み、PEX14 cDNA の単離に成功した。ペルオキシシン Pex14p はペルオキシソーム膜に局在しペルオキシソーム局在化シグナル PTS1, PTS2 に対するレセプター(それぞれ Pex5p および Pex7p) と結合することから輸入装置の主構成因子と考えられる。さらには ZPG208 を用いてその相補遺伝子 PEX3 の単離にも成功している。また哺乳動物系では PTS1 レセプターである Pex5p にアイソフォーム、Pex5pS および Pex5pL が存在し、両者は PTS1 タンパク質の輸送に関わるだけでなく、Pex5pL は PTS2 タンパク質の輸送を PTS2 レセプター Pex7p と結合することにより担っていることを見出している。

表1 ペルオキシソーム欠損症相補性群とCHO変異細胞および相補遺伝子

ヒ ト			相補性群臨床型	CHO変異細胞	相補遺伝子
日本	アメリカ	オランダ			
A	VIII		ZS, NALD, IRD	<u>ZP124</u>	
B	VII		ZS, NALD		PEX10
C	IV	3	ZS, NALD	ZP92	PEX6
D	IX		ZS		PEX16
E	I	2	ZS, NALD, IRD	Z24, ZP107	PEX1
F	X	5	ZS, IRD	Z65	PEX2 (PAF-1)
	II	4	ZS, NALD	ZP105, ZP139	PEX5
	III		ZS	ZP109	PEX12
	VI		ZS, NALD		
G			ZS		
H			ZS, NALD	<u>ZP128</u>	<u>PEX13</u>
J			ZS	ZP119	PEX19
R	XI	1	RCDP	<u>ZPG207</u>	PEX7
				ZP110	<u>PEX14</u>
				ZP114	
				<u>ZP126</u>	
				<u>ZPG208</u>	(PEX3)

ZS: Zellweger 症候群. NALD: 新生児型 adrenoleukodystrophy. IRD: 乳児型 Refsum 病.
RCDP: rhizomelic chondrodysplasia punctata (斑状軟骨形成不全症 II 型

2. 核タンパク質の細胞質 - 核間輸送の分子機構

HIV遺伝子発現調節タンパク質 Rev をモデル核移行性タンパク質として、細胞内選別輸送とその制御機構を分子レベルで詳細に解明することを目的として、gpt (hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 遺伝子発現をマーカーとしたRev依存性薬剤感受性細胞株の確立と Revの細胞内輸送異常を表現型とする変異細胞の分離を試みている。

B グループ(1)

『ミトコンドリア蛋白質輸送』

ラット肝ミトコンドリア外膜の前駆体蛋白質輸入装置(TOM複合体)を解析し、

さらにミトコンドリア膜間スペースからのアポトーシス因子の輸出過程を解析した。

- 1．哺乳類ミトコンドリアのTom40の解析：ラットミトコンドリア外膜のTom40をクローニングし、TOM複合体の成分として蛋白質輸入チャネルを構成することを明らかにした。
- 2．哺乳類ミトコンドリアのTom22の解析：ミトコンドリア外膜の18 kDa蛋白質に対するcDNAを分離し解析を行った結果、酵母ミトコンドリアのTom22とわずかに19%の相同性しか示さないにも関わらず酵母Tom22の欠損を機能的に相補することを見出し、外膜輸送因子としての性質を解析した。
- 3．哺乳類ミトコンドリアのTOM複合体の分離：ミトコンドリア外膜のTOM複合体がTom40とTom22に加え分子量の小さい3種類の蛋白質(OM10, OM7.5, OM5)より構成され、外膜中で400kDaの複合体として存在することを明らかにした。
- 4．N-末端シグナル・アンカーを持つ外膜蛋白質のターゲティング機構：外膜輸送因子の一つであるTom20のミトコンドリアへのターゲティング・シグナルの解析を行った結果、(1)シグナル・アンカーが中程度の疎水性を持つこと、(2)その直後の5アミノ酸領域内に1個以上の塩基性アミノ酸が存在すること、がシグナルの必要十分条件であることを示した。そして、この塩基性アミノ酸によって、シグナル・アンカーはSRP依存の小胞体輸送を免れることを発見した。
- 5．ミトコンドリア膜間スペースからのシトクロムcの輸出機構：細胞が「死」のシグナルを受けるとミトコンドリアは「アポトーシス因子(シトクロムc、AIF、プロカスペーゼ9など)」を放出しこれによってアポトーシスのカスケードが誘発される。今回はシトクロムcの輸出反応をin vitroで再構成し、その反応に関する細胞質因子を精製し、さらに輸出過程の解析を行った。またAIFのクローニングと抗体作成を行った。

『小胞体膜形成機構』

- 1．小胞体(ER)に於ける膜蛋白質のトポロジー形成に関わるシグナル(I型シグナルアンカーSAI, II型シグナルアンカーSAII, ストップトランスファーシグナルST)の評価を14回の膜貫通領域(TM)を持つ赤血球のバンド3について行った。その結果、いくつかの分子内SAIはその前に存在する疎水性の弱い領域を膜内に引き込み、強制的に膜貫通領域を形成させる活性があること見いだした。さらにSTの機能がその直前に存在するSAIIによって増強され、かつその効果は両者の間の距離によって大きく影響されることを見出した。
- 2．I型の膜配向性をとるシナプトタグミン2を用いてSAIの特性を詳細に解析した。そして、SAの疎水性度、SAの両側の荷電および構造によって膜配向性

が著しい影響を受けることを示した。

B グループ(2)

- 1 . シトクロムb₅ と外膜シトクロムb₅ のターゲティングシグナルの解析から、少なくともこのタンパク質に関しては、小胞体とミトコンドリアへの局在化は二者択一的なものではなく両膜に対して競争的に起こることが分かった。このことが外膜に小胞体のタンパク質と類似したタンパク質が存在する理由と思われる。また、同一タンパク質（ミトコンドリア外膜タンパク質）が臓器により小胞体とミトコンドリア外膜に異なった割合で分布していること、その割合が動物種により異なり、タンパク質は局在化シグナルのみでは決定されないことが示唆された。
- 2 . ミトコンドリアターゲティングシグナルなどオルガネラへのターゲティングシグナルの多くは、「共通性の少ない構造にもかかわらず特定のタンパク質を厳密に見分けて認識している」すなわち、「あいまいな情報を正確に伝達している」。ミトコンドリアでのプロセシング反応も同様な機構で行われていると考えられる。シグナル（前駆体）と受容体（プロセシングペプチダーゼ）の解析が進んでいるこの系を用いて上記のタイプの情報の授受の機構を調べた。ペプチダーゼは認識部位を多数用意している。前駆体はそのうちのいくつかを持っている。さらに両者とも高次構造に柔軟性がある。これらのことにより一見違った情報が同じ情報として認識されているのであろう。また、複数の認識部位を持つことにより特異性を増している。

C グループ(1)

- 1 . ゴルジ体形成に関与する新規タンパク質（GCP60）の同定と機能解析：

酵母のtwo-hybrid法により、ゴルジ膜タンパク質giantinと特異的に結合するタンパク質として分子量60kDaの新しいタンパク質（GCP60）を同定した。GCP60は、N末端側にproline-rich domainおよびacyl-CoA binding motifを、また、中央部にcoiled-coil domainおよび核輸送シグナルを持つ。各種解析の結果、GCP60は次の特徴をもつことがわかった。1）GCP60のゴルジ体への局在化には、C末端側の約60残基（393-452）の配列が必須である。2）N末端側175残基およびC末端側208残基（328-536）を欠失させた変異体は、核に局在するようになる。3）ゴルジ膜をTriton X-100で抽出すると、GCP60はゴルジ膜タンパク質giantin, GM130およびGRASP65との複合体として抽出される。しかし、GCP60は直接GM130やGRASP65と結合しておらず、giantinを介して複合体を形成する。4）GCP60はgiantinのC末端領域（2804-3161）と特異的に結合する。5）GCP60のC末端領域（393-452）を細胞に過剰発現すると、ゴルジ体は解体し細胞質に分散化される。以上の結果から、GCP60はgiantinとの結合を介してゴルジ体特有の形

態形成に関与していることが強く示唆された。

2 . Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) のゴルジ体形態形成への影響 :

これまでの研究で、NDGAはB refeldin A (BFA) と同じようにゴルジ体を解体しゴルジ膜タンパク質を小胞体に再分布させる効果をもつことを明らかにした。BFAとの違いとして、COPI小胞の形成に関与するコートタンパク質に対する影響、すなわちBFAはARFの機能を抑制することによって脱コートさせ、小胞の形成を阻害するのに対して、NDGAはこのような効果を持たない。今回、BFAには見られない新たな知見として、NDGAは次のような作用を持つことがわかった。 1) 細胞をNDGAで処理すると、ゴルジ体に局在するp115が速やかに膜から遊離してサイトソールに分散するようになる。 2) in vitroでゴルジ膜をNDGAとインキュベートすると、ゴルジ膜は速やかに凝集化を惹き起こす。この凝集体はサイトソール/ATP再生系の添加によってゴルジ層板構造を回復するが、p115を除いたサイトソールでは回復しない。さらに、 3) NDGAによるゴルジ膜の凝集化にはNEM (N-ethylmaleimide) 感受性因子が必要であり、特にp97/p47の関与が強く示唆された。

C グループ(2)

- 1 . In vitroでのlysosomeとendosomeのfusion系を確立し、N-ethylmaleimide-sensitive factor(NSF)がこのfusionには働かないことを明らかにした。更に、現在dominant negative NSFを用いてfusionを検討している。
- 2 .Cathepsin BあるいはHはmannose-6-phosphate receptor に非依存的にlysosomeに移行することを明らかにした。この問題をcathepsin Dについても検討している。
- 3 . メラノサイトにおいてメラノソームは「特殊リソソーム」であり、その形成は皮膚や頭髮の色素形成に重要な役割を果たしている。このような「特殊リソソーム」の形成機構をリソソームと比較・検討により行った。蛍光顕微鏡・免疫電顕による形態学的観察および膜蛋白質の細胞質領域を用いた生化学的分離実験の結果、メラノソームとリソソームは異なるオルガネラとして存在していることが明かとなった。現在このメラノソームとリソソームへの蛋白質の選別輸送に関わる分子(VPS41, pallid) の役割について検討を行っている。
- 4 . AAAスーパーファミリー蛋白質であるSKD1はリソソーム・エンドソームを介した小胞輸送において重要な役割を果たしていることが知られている。ATPの加水分解能が欠損した変異型SKD1(E235Q)を発現させた細胞では、エンドソームを介した種々の輸送が停止し管状に変型したエンドソーム (E235Qcompartment)を形成する。この変異体の発現により細胞が死に至ることからSKD1の機能に関しては解析が進んでいない。そこで一過性に多数の細胞に変異型SKD1 (E235Q)を発現させる目的でEcdyson制御で発現が可能なアデノウ

イルスの作成を行った。その結果細胞に90%以上の効率で変異型SKD1を発現させることに成功した。現在このアデノウイルスを用いてリソソーム酵素や膜蛋白質の輸送におけるSKD1の関与について検討を行っている。また極性細胞(肝細胞・MDCK細胞)におけるエンドサイトーシス・トランスサイトーシスへの関与についても検討を行う。

5．マウスSKD1の機能発現を調節する分子を同定する目的で酵母two hybrid法によるスクリーニングを行いSKD1結合蛋白質の検索を行った。その結果新規蛋白質であるSBP1 (SKD1 binding protein 1)を同定した。SBP1は細胞質および一部膜に存在しているが予想されるようにエンドソーム・リソソームには存在していないことが明かとなった。しかしながら変異型SKD1 (E235Q)を発現させた細胞においては変型したエンドソーム(E235Qcompartment)に局在することが明かとなり、間接的ではあるがSKD1の機能発現に関与していることが示唆された。またSBP1はヒト、線虫、シロイヌナズナ、酵母においてそのホモログと思われる分子が存在しており、SBP1欠損酵母の作成を行っている。またアデノウイルスにより変異型SKD1 (E235Q)を発現させE235Qcompartment形成におけるSBP1の関与についても検討中である。

6．ヒトグリア細胞はH-ras (V12) の発現に伴い多数の液胞を形成した後にアポトーシス・ネクローシスとは異なるメカニズム (caspase independent, PI3kinase dependent) により細胞死へと移行する。このような細胞死におけるリソソーム/エンドソームの役割について研究を行った。蛍光顕微鏡および免疫電顕による観察の結果、液胞には初期エンドソーム由来のものと後期エンドソーム・リソソーム由来のもの2種類が存在することが明かとなった。形態的には顕著な変化が認められるのに反し、リソソーム/エンドソームを介する種々の小胞輸送の機能には異常が認められなかった。しかしながら発現されたH-ras(V12)蛋白質自身は形成された液胞膜上に存在していることから、rasを介した膜融合のメカニズムが存在している可能性が示唆された。現在rasの下流に存在する分子について検索を行っている。

7．ラット肝リソソーム膜を抗原としてモノクローナル抗体を作成し、これを用いて分子量55Kを有する新規リソソーム膜タンパク質を同定した。蛍光顕微鏡による検討では本タンパク質はリソソームに存在していた。現在アミノ酸配列を決定中である。

3．主な研究成果の発表(論文発表)

- Toyama, R., Mukai, S., Itagaki, A., Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., Wanders, R.J.A., and Fujiki, Y.: Isolation, characterization, and mutation analysis of PEX13-defective Chinese hamster ovary cell mutants. Hum. Mol. Genet. 8: 1673-1681

- (1999).
- Matsuzono, Y., Kinoshita, N., Tamura, S., Shimozawa, N., Hamasaki, M., Ghaedi, K., Wanders, R. J. A., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y.: Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 2116-2121 (1999).
 - Zhang, Z., Suzuki, Y., Shimozawa, N., Fukuda, S., Imamura, A., Tsukamoto, T., Osumi, T., Fujiki, Y., Oorii, T., Wanders, R.J.A., Barth, P.G., Moser, H.W., Paton, B.C., Besley, G.T., and Kondo, N.: Geneomic structure and identification of 11 novel mutations of PEX6 (peroxisome assembly factor-2) gene in patients with peroxisome biogenesis disorders. *Hum. Mut.* 13: 487-496 (1999).
 - Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Imamura, A., Toyama, R., Mukai, S., Fujiki, Y., Tsukamoto, T., Osumi, T., Oorii, T., Wanders, R.J.A., and Kondo, N.: Nonsense and temperature-sensitive mutations in PEX13 are the cause of complementation group H of peroxisome biogenesis disorders. *Hum. Mol. Genet.* 8: 1077-1083 (1999).
 - Harano, T., Shimizu, N., Otera, H., and Fujiki, Y.: Transmembrane topology of the peroxin Pex2p, an essential component of peroxisome assembly. *J. Biochem.* 125: 1168-1174 (1999).
 - Ghaedi, K., Itagaki, A., Toyama, R., Tamura, S., Matsumura, T., Kawai, A., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y.: Newly identified Chinese hamster ovary cell mutants defective in peroxisome assembly represent complementation group A of human peroxisome biogenesis disorders and one novel group in mammals. *Exp. Cell Res.* 248: 482-488 (1999).
 - Ghaedi, K., Kawai, A., Okumoto, K., Tamura, S., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Kondo, N., and Fujiki, Y.: Isolation and characterization of novel peroxisome biogenesis-defective Chinese hamster ovary cell mutants using green fluorescent protein. *Exp. Cell Res.* 248: 489-497 (1999).
 - Shimizu, N., Itoh, R., Hirono, H., Otera, H., Ghaedi, K., Tateishi, K., Tamura, S., Okumoto, K., Harano, T., Mukai, S., and Fujiki, Y.: The Peroxin Pex14p: cDNA cloning by functional complementation on a Chinese hamster ovary cell mutant, characterization, and functional analysis. *J. Biol. Chem.* 274: 12593-12604 (1999).
 - Saito, M., Iwamori, M., Lin, Bei, Oka, A., Fujiki, Y., Shimozawa, N., Kamoshita, S., Yanagisawa, M., Sakakihara, Y.: Accumulation of glycolipids in mutant Chinese hamster ovary cells (Z65) with defective peroxisomal assembly and comparison of the metabolic rate of glycosphingolipids between Z65 cells and wild-type CHO-K1 cells.

- Biochim. Biophys. Acta 1438: 55-62 (1999).
- Shimozawa, N., Zhang, Z., Suzuki, Y., Imamura, A., Tsukamoto, T., Osumi, T., Fujiki, Y., Orii, T., Barth, P.G., Wanders, R.J.A., and Kondo, N.: Functional heterogeneity of C-terminal peroxisome targeting signal 1 in PEX5-defective patients. Biochem. Biophys. Res. Commun. 262: 504-508 (1999).
 - Shimozawa, N., Imamura, A., Zhang, Z., Suzuki, Y., Orii, T., Tsukamoto, T., Osumi, T., Fujiki, Y., Wanders, R.J.A., Besley, G., and Kondo, N.: Defective PEX gene products correlate with the protein import, biochemical abnormalities, and phenotypic heterogeneity in peroxisome biogenesis disorders. J. Med. Genet. 36: 779-781 (1999).
 - Shimozawa, N., Zhang, Z., Imamura, A., Suzuki, Y., Fujiki, Y., Tsukamoto, T., Osumi, T., Aubourg, P., Wanders, R.J.A., and Kondo, N.: Molecular mechanism of detectable catalase-containing particles, peroxisomes in fibroblasts from patients with peroxisome biogenesis disorders. Biochem. Biophys. Res. Commun. 268: 31-35 (2000).
 - Imamura, A., Shimozawa, N., Suzuki, Y., Zhang, Z., Tsukamoto, T., Fujiki, Y., Orii, T., Osumi, T., and Kondo, N.: Restoration of biochemical function of peroxisome in the temperature-sensitive mild forms of peroxisome biogenesis disorder in humans. Brain & Development 22: 8-12 (2000).
 - 藤木幸夫：ペルオキシソーム形成不全症。増大特集「病気の細胞分子生物学」生体の科学 50: 461-463 (1999).
 - 藤木幸夫：細胞内輸送とは何か。特集「細胞内輸送」生体の科学 50: 514-517 (1999).
 - Y. Abe, T. Shoda, T. Muto, K. Mihara, H. Torii, S. Nishikawa, T. Endo & D. Kohda (2000): Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. Cell 100, 551-560
 - K. Mihara (2000): Targeting and insertion of nuclear-encoded preproteins into the mitochondrial outer membrane. BioEssays, 22, 364-371
 - K. Moriwaki, T. Ogishima and A. Ito (1999): Analysis of Recognition Elements for mitochondrial processing Peptidase using Artificial Amino Acids: Role of the Intervening Portion and Proximal Arginine. J. Biochem., 126, 874-878.
 - Ito, A. (1999): Mitochondrial Processing Peptidase: Multiple-site Recognition of Precursor Proteins (Breakthroughs and views). Biochem. Biophys. Res. Commun., 265, 611-615.
 - 伊藤明夫. タンパク質の細胞内輸送とプロセッシング (2000) 化学工業、51, 51-57
 - Izumi, N., Amizuka, N., Oda, K., Misumi, Y., Ikehara, Y. and Ozawa, H. (1999): Ultrastructural alteration of osteoclasts treated with brefeldin A and Wortmannin. Acta

- Histochem. Cytochem., 32, 393-405.
- Tsujioka, H., Takami, N., Misumi, Y. and Ikehara, Y. (1999): Intracellular cleavage of glycosylphosphatidylinositol by phospholipase D induces activation of protein kinase C- α . *Biochem. J.*, 242, 449-455.
 - Tateishi, K., Misumi, Y. and Ikehara, Y. (1999): Molecular cloning and expression of rat antiseecretory factor and its intracellular localization. *Biochem. Cell Biol.*, 77, 223-228.
 - Takeuchi, H., Kanematsu, T., Misumi, Y. and Hirata, M. (1999): Membrane association of a new inositol-1,4,5-trisphosphate binding protein, p130, is not dependent on the pleckstrin homology domain. *Chem. Physics Lipids*, 98, 35-47.
 - Nishioka, K., Ohtsubo, T., Oda, H., Fujiwara, T., Kang, D. and Nakabeppu, Y. (1999): Expression and differential intracellular localization of two forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol. Biol. Cell*, 10, 1637-1653.
 - Fukushima, K., Hara-Kuge, S., Seko, A. and Ikehara, Y. (1999): Elevation of α 2-6 sialyltransferase and α 1-2 fucosyltransferase in human choriocarcinoma. *Cancer Res.*, 58, 4301-4306.
 - Araki, M., Nanri, H., Fujiwara, T. and Ikeda, M. (1999): Antioxidant function of the mitochondrial protein SP-22 in the cardiovascular system. *J. Biol. Chem.*, 274, 2271-2278.
 - 三角佳生、池原征夫 (1999): 小胞体ーゴルジ体間輸送とゴルジ体形成 (総説). *実験医学*, 17, 2458-2463.
 - 三角佳生、藤原俊幸 (1999): (総説) ゴルジ体の構造とその機能. *臨床化学*, 28, 2-10.
 - Fujita, H., Saeki, M., Yasunaga, K., Ueda, T., Imoto, T., and Himeno, M.: In vitro Binding study of Adaptor Protein Complex (AP-1) to Lysosomal Targeting Motif (LI-Motif). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255, 54-58 (1999).
 - C. Alvarez, H. Fujita, A. L. Hubbard and E. Sztul: ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage. *J. Cell Biol.* 147, 1205-1221, (1999).
 - S. Chi, C. Kitanaka, K. Noguchi, T. Mochizuki, Y. Nogashima, M. Shirouzu, H. Fujita, M. Yoshida, W. Chen, A. Asai, M. Himeno, S. Yokoyama and Y. Kuchino: Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene*, 18, 2281-2290 (1999).
 - Y. Tagawa, A. Yamamoto, T. Yoshimori, R. Masaki, K. Omori, M. Himeno, K. Inoue, and Y. Tashiro: A 60-kDa Plasma Membrane Protein Changes its Localization to Autophagosome and autolysosome Membranes during Induction of Autophagy in Rat

- Hepatoma Cell Line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.*, 24, 59-70 (1999).
- N. Andrejewski, E.L. Punnonen, G. Guhde, Y. Tanaka, R. Lullmann-Rauch, D. Hartmann, K. von Figura and P. Saftig: Normal lysosomal morphology and function in LAMP-1-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 274, 12692-701, (1999).
 - 藤田英明、安永公弥子、姫野勝 「メラノソームとリソソーム」(1999) 生体の科学、50, 105-110.