

尿素サイクル酵素遺伝子群の構造と発現およびその異常

Structure and expression of urea cycle enzyme genes and related diseases

代表研究者	熊本大学医学部教授 Prof., Kumamoto Univ. Med. Sch. Masataka MORI	森 正 敬
協同研究者	熊本大学医学部助教授 Assoc. Prof., Kumamoto Univ. Med. Sch. Masaki TAKIGUCHI	滝 口 正 樹
	熊本大学医学部助手 Assist. Prof., Kumamoto Univ. Med. Sch. Atsushi NISHIYORI	西 依 淳
	熊本大学医学部大学院生 Grad. Student, Kumamoto Univ. Med. Sch. Takashi MURAKAMI, Yougo HARAGUCHI and Tadashi MATSUBASA	村上 淳・原口洋吾・松葉佐 正

The urea cycle is the major pathway for detoxication of ammonia formed in amino acid metabolism. The urea cycle involves five enzymes including ornithine transcarbamylase (OTC) and arginase. The complete urea cycle is found only in the liver where all five enzymes increase in the perinatal period in a coordinated manner. Coordinated induction of the cycle enzymes is also caused by dietary protein and hormones such as glucagon and glucocorticoids. There are enzyme deficiencies in all the enzymes of the cycle. If one of these enzymes is missing, conversion of ammonia to urea is impaired and hyperammonemia occurs.

The rat and human OTC genes are 73-75 kb long and are split into 10 exons. The 1.3-kb 5'-flanking region of the gene directed expression of the fused CAT gene in HepG2 cells much more efficiently than in CHO cells. Analysis of deletion mutants revealed one negative and two positive regulatory elements within the 220-bp immediate 5'-flanking region. Transgenic mice carrying a recombinant gene containing the rat OTC promoter (1.3 kb of the 5'-flanking region) were produced. Tissue-specific expression of the transgene was observed, but the expression in the liver was low. Further transient expression analysis in HepG2 cells revealed the existence of an enhancer located 11 kb upstream of the cap site. The OTC enhancer was also hepatoma cell-specific. Gel shift competition analysis showed that one of the factors binding to liver-specific sites of the enhancer is related to C/EBP.

The rat and human arginase genes are about 12 kb and are split into 8 exons. We investigated its promoter using an *in vitro* transcription system. The arginase promoter was transcribed more efficiently in liver nuclear extracts than in brain extracts, reproducing the *in vivo* tissue specificity qualitatively. Deletion mutant analysis of the 5'-flanking region in liver nuclear extracts revealed a positive regulatory region spanning nucleotides -90 to -51 relative to the cap site. Three factors related to CTF/NF1, Sp1 and C/EBP bound to the promoter region. Therefore, C/EBP may be one of the factors responsible to the tissue-specific and coordinated expression of these urea cycle enzyme genes. DNA analysis of argininemia revealed mutations of the arginase gene.

研究目的

哺乳動物では、アミノ酸代謝の結果生じた有毒なアンモニアは、尿素サイクルによる無害な尿素に変換されて尿中に排出される。尿素サイクルは図1に示すように五つの酵素からなる。このうち、カルバミルリン酸合成酵素I (CPS または CPSI)、オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) の二つの酵素はミトコンドリアマトリックスに存在し、後半の3酵素、アルギニノコハク酸合成酵素 (AS)、アルギニノコハク酸リアーゼ (AL)、アルギナーゼはシトソールに存在する。すなわち、中間代謝産物であるオルニチンとシトルリンがミトコンドリアを出入りすることにより、ミトコンドリアとシトソールの協同作業でアンモニアから尿素が合成される。ミトコンドリアに局在する前半の2酵素もその遺伝子は核染色体上にあり、シトソールで前駆体として合成された後にミトコンドリアへの移行するが、その興味深いメカニズムがしだいに明らかになってきている。

これら五つの酵素の、あるものはさまざまな組織で低レベルに発現しているが、すべての酵素がそろって大量に発現するのは肝臓のみである。また、尿素サイクルの各酵素は出生前にその mRNA レベルがそろって上昇するなど、協調的

な調節を受けている。また、これら尿素サイクルを形成する五つの酵素にすべて酵素欠損症が知られている。欠損症患者はアンモニアの解毒不全から高アンモニア血症をきたし、その症状は重篤である。尿素サイクル酵素、あるいはこれをコードする遺伝子の分子生物学的な解析の進歩は、尿素サイクル酵素欠損症の病態解明、診断、あるいは治療にも大きく役立つものと期待される。

研究経過

五つの尿素サイクル酵素のうち、1番目にCPSと2番目のOTCはミトコンドリアに局在する。我々は、両酵素がまずミトコンドリアの外で分子量の大きい前駆体として合成された後、ミトコンドリアに移行して成熟酵素に転換されることを明らかにした。この成果は、ミトコンドリアタンパク質が前駆体の形で合成されることを動物の系ではじめて明らかにしたもので、ミトコンドリア形成およびタンパク質の膜透過の研究に分子的基盤を与えた。

ついでラットおよびヒトのOCT cDNAをクローン化し、OTC前駆体の構造を明らかにした。その結果、OTCのN末端に32アミノ酸残基より成る延長ペプチド(プレシークエンス)が付いており、これがミトコンドリア移行のためのシグ

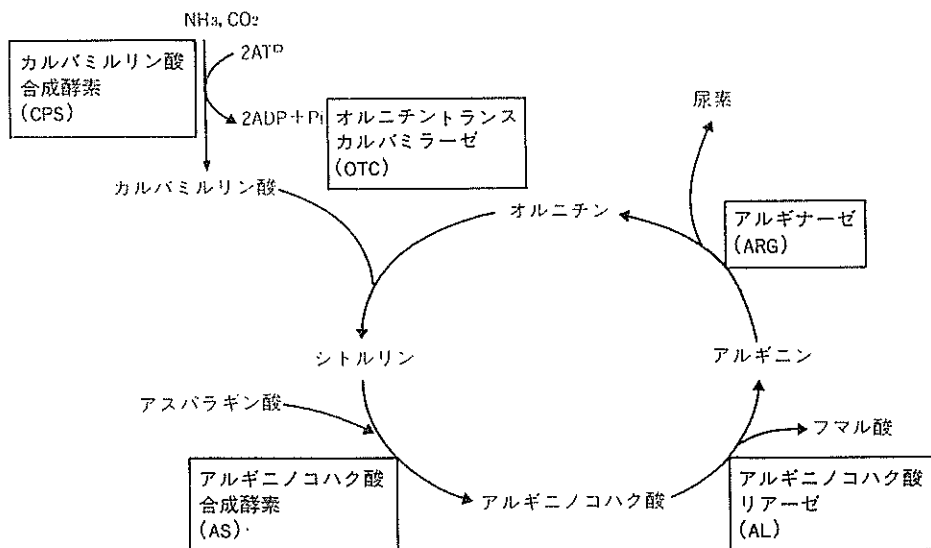


図1. 尿素サイクル

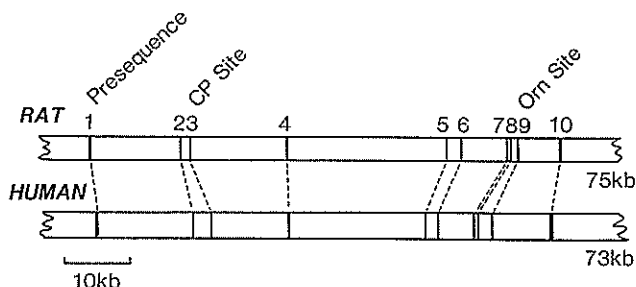


図2. オルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子の構造。黒い部分はエクソン、白い部分はイントロンを示す。Presequence, 本酵素がミトコンドリアへ移行するシグナルとして働く延長ペプチド部分; CP Site カルバミルリン酸結合部位; Orn Site, オルニチン結合部位

ナルとして働くことが分かった。さらにラットとヒトのアルギナーゼ cDNA をクローン化し、その構造を明らかにした。

一方、多くの尿素サイクル酵素異常症症例について酵素レベル、タンパク質レベルの研究を行い、酵素の構造異常、合成低下、分解亢進などの症例を見いだした。さらに酵素サイクル酵素の *in vitro* 合成に成功し、各酵素に対する mRNA の活性を測定する方法を確立した。

これらの研究経過を土台として研究を行い、以下のような成果を得た。

研究成果

以下に我々が研究した3種の酵素遺伝子について、酵素ごとに述べる。

(1) オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC)

OTC は36 kDa のサブユニットの3量体であり、ミトコンドリアマトリックスに局在する。mRNA が1.8 kb であるのに対し、遺伝子はラットと、ヒトでいずれも73-75 kb と非常に大きい(図2)。10個のエクソンよりなりX染色体上に存在する。この遺伝子の転写調節機構は尿素サイクル酵素遺伝子の中でも比較的解析が進んでいる。我々はラット本遺伝子の5' 上流領域1.3 kb と cDNA との融合遺伝子を作成し、その発現をトランスジェニックマウスを用いて解析した。導入した遺伝子はマウス内在性の遺伝子と同様肝臓と小腸のみに発現がみられ、1.3 kb の5' 領域にこれらの組織に特異的な転写を規定する領域が存在することが明らかになった。しかし、導入遺伝

子は小腸では内在遺伝子と同レベルに発現するのに対し、肝臓での発現は非常に低かった。したがって、肝臓における高レベルの発現には5' 領域1.3 kb だけでは不十分であり、この領域以外の部位に肝臓特異的に働くエンハンサーが存在する可能性が示唆された。

我々は続いてプロモーター領域の解析およびエンハンサー領域の検索を培養細胞への遺伝子導入を用いて行った。トランスジェニックマウスの場合と同様ラット遺伝子の5' 領域1.3 kb と大腸菌クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子の融合遺伝子を作成し、ヒト肝癌由来培養細胞 HepG2 および対照非肝細胞へ導入し CAT 活性を測定したところ HepG2 においてのみ活性が検出され、OTC 5' 領域は培養細胞レベルでも肝臓特異性を示すことが明らかになった。またこの5' 領域を上流より段階的に欠失させた組み換え体を構築し HepG2 細胞に導入して CAT 活性の増減を調べた結果、転写開始部位の上流190 bp 付近に転写を抑制する領域が、また上流100 bp 付近と30 bp 付近の2か所に転写を促進する領域が存在することが明らかになった(図3)。

さらに、エンハンサーの検出を目的として、OTC 遺伝子上流13.8 kb から下流1.6 kb までの領域をいくつかの制限酵素断片に分け、これらの断片を CAT 遺伝子の下流に挿入した組み換え体を構築し同じく HepG2 細胞を用いて CAT アッセイを行った。その結果、5' 上流11 kb と転写開始部位から非常に離れた部位に位置する230

bp あまりの領域が顕著なエンハンサー活性が示すことが明らかになった。このエンハンサーは単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターや SV40 初期プロモーターに対しても活性を示すので、プロモーター特異性は低いものと思われる。一方、対照細胞内ではエンハンサー活性を示さないで、肝臓特異性の高いエンハンサー

であるものと思われる。

これらプロモーターおよびエンハンサー領域に結合する蛋白因子を検索するために、ラットの肝臓と脳より核タンパク抽出液を調製し DNase I フットプリント解析を行った。その結果、プロモーター領域の転写抑制領域、2 か所の転写促進領域、および転写開始部付近にフットプリントが検出され、2 か所の促進領域には肝臓に特徴的なパターンが見られた。一方、エンハンサー領域には 4 か所に顕著なフットプリントが検出され（上流より I~IV）、II および III にはやはり肝臓に特徴的なパターンが見られた。ゲルシフトアッセイの競合阻害実験により、領域 II および III に結合する因子は CPS プロモーターの場合と同様に C/EBP に類似した因子であることが明らかになった（図 4）。

(2) アルギニノコハク酸リアーゼ (AL)

AL は 52 kDa のサブユニットの 4 量体でありサイトソールに存在する。ラット遺伝子は全長 14 kb であり 16 個のエクソンよりなる。AL に関しては近年、タンパク質の分子進化学の上で、また進化に伴う遺伝子発現の変化という観点から、非常に興味深い発見がなされた。ヒト AL とニワトリの眼の水晶体タンパク質の一つである $\delta 1$ クリスタリンとがアミノ酸レベルで 60% を超

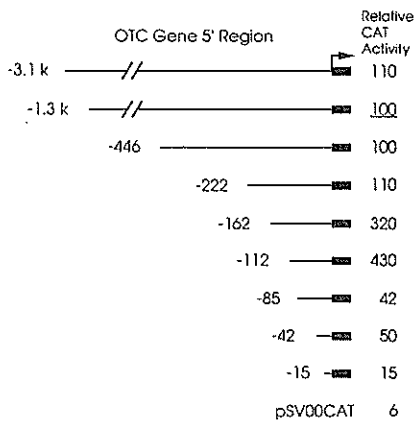


図 3. ラット・オルニチン・トランスカルバミラーゼ遺伝子プロモーターの解析。太い線は第 1 エクソン、細い線は 5' 上流、矢印は転写開始部位を示す、左側にプロモーター活性をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) の相対活性で示す。pSV00CAT, OTC 遺伝子を含まない対照プラスミド。

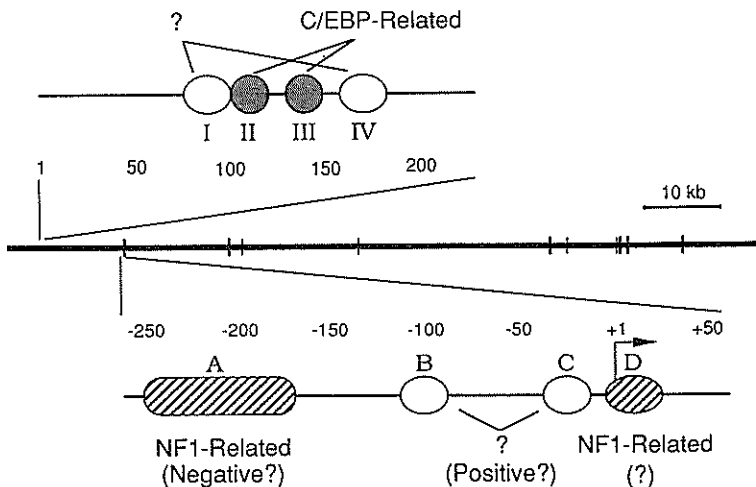


図 4. ラット・オルニチン・トランスカルバミラーゼのプロモーターとエンハンサーおよび結合因子、エンハンサーが転写開始部位から 11 kb 上流に存在する。

える相同性を有することが明らかとなったのである。すなわち、 $\delta 1$ クリスタリン遺伝子は AL 遺伝子を祖先遺伝子とし、何らかの変異により鳥類などの水晶体で大量に発現するようになり、その産物がクリスタリンとして機能するようになったと考えられる。

ニワトリの $\delta 1$ クリスタリン遺伝子のすぐ下流に $\delta 2$ クリスタリン遺伝子と呼ばれる遺伝子が存在する。この二つの遺伝子は非常によく似た構造をしているのでこのように呼ばれているが、 $\delta 2$ 遺伝子は水晶体に大量に発現しているわけではなくクリスタリン遺伝子であるとは言いがたい。最近までその真の機能は不明であったが、ラット AL 遺伝子はニワトリ $\delta 1$ および $\delta 2$ クリスタリン遺伝子に酷似していること (図 5), ヒト AL cDNA をプローブとするとニワトリゲノムには両 δ クリスタリン遺伝子以外にハイブリダイズするものがないこと、 $\delta 2$ クリスタリン遺伝子は実は AL 遺伝子であるものと考えられる。鳥類などの尿酸排泄型動物では尿素サイクル酵素の肝臓における大量発現は認められず、AL すなわち $\delta 2$

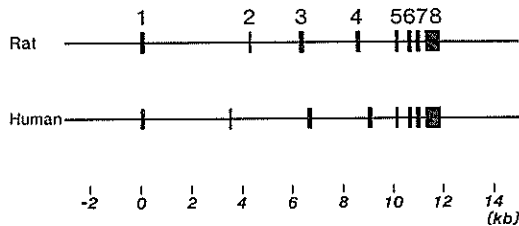


図 5. アルギナーゼ遺伝子の構造。番号のついた太い部分がエクソンを示す。

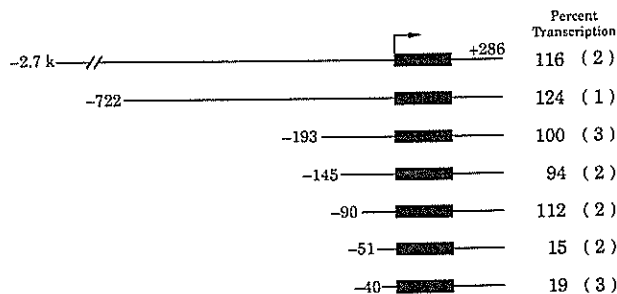


図 6. ラット・アルギナーゼ遺伝子のプロモーターの解析。太い線が第 1 エクソン、細い線が 5' 上流および、第 1 イントロン、矢印は転写開始点を示す。左側に転写活性をパーセントで示す。

クリスタリンも全身の多くの組織に低レベルに発現し、アルギニン合成に関与しているものと思われる。

以上の AL 遺伝子の機能および発現の進化に伴う変遷をまとめると次のようになる。原核生物から魚類にいたるまで AL は他の尿素サイクル酵素と同様に主にアルギニン合成系酵素として機能してきた。魚類はアンモニアを直接水中へと排泄するので尿素サイクルハアンモニア解毒系としては重要な意味は持たない。両生類になり陸上生活を営むようになるとアンモニアを他の化合物に転換して解毒する必要性が生じ、これに対する適応として肝臓における尿素サイクル諸酵素の発現が高まった。この状態は基本的に哺乳類においても同じである。一方、爬虫類および鳥類に分岐するとアンモニアを尿酸に変換して解毒するようになったので、尿素サイクルの重要性が減少し肝臓における高レベルの発現は見られなくなった。また、これらの生物において AL 遺伝子は重複を起こし新しい遺伝子を生じた。この新しい遺伝子は水晶体で大量に発現する機構を獲得して、その産物は $\delta 1$ クリスタリンとして機能するようになった。

このように、AL およびその子孫遺伝子である $\delta 1$ 遺伝子は進化に伴い発現様式を劇的に変化させてきたが、このような変化は主にプロモーター、エンハンサーなどの調節領域の変異により引き起こられてきたと考えられる。したがって、AL 遺伝子の肝臓特異的発現および $\delta 1$ クリスタリン遺伝子の水晶体特異的発現の調節機構の比較は極めて興味深い研究課題である。 $\delta 1$ 遺伝子に

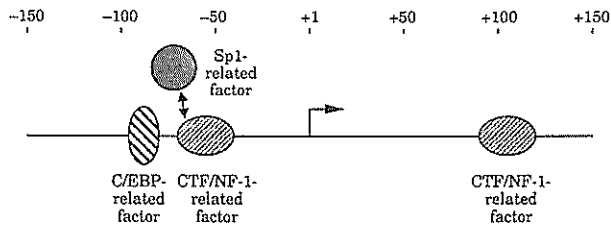


図7. ラット・アルギナーゼ遺伝子のプロモーターおよび結合因子. 矢印は転写開始点, 種々の円は結合因子を示す.

は第3イントロン内に水晶体特異的なエンハンサーが存在することが知られている。我々の研究室では現在ラット AL 遺伝子のプロモーター領域の解析を行っている。

(3) アルギナーゼ

アルギナーゼは 35 kDa のサブユニットの 3 量体と考えられサイトソールに存在する。ヒト遺伝子は第 6 染色体上に存在する。ヒトおよびラット遺伝子とも全長約 12 kb であり 8 個のエクソンよりなる (図 6)。我々はラット遺伝子のプロモーター領域の解析をラット組織核抽出液を用いた *in vitro* 転写系により行った。

アルギナーゼ遺伝子の 5' 領域 3 kb を含むプラスミドを鋳型として用い肝臓の核タンパク抽出液と保温したところ正しい開始部位よりの転写が認められた。この転写は肝臓の抽出液では脳抽出液を用いた場合よりもより効率的に起こり、少なくとも定性的には *in vivo* の組織特異性が再現された。鋳型 DNA に 5' 上流より段階的に欠失を起こしたところ、-90 ないし -51 bp の間の欠失で鋳型活性が顕著に減少し、この付近に転写促進領域が存在することが明らかとなった。

続いて、肝臓と脳の核抽出液を用いて DNase I フットプリント解析を行ったところ、-95 ないし -82 bp (領域 A)、-70 ないし -39 bp (領域 B) にフットプリントが検出された。また転写開始部位の下流 89 ないし 113 bp (領域 C) にもフットプリントが検出された。領域 A と B のフットプリントには肝臓に特徴的なパターンが見られ、これらの領域に結合する因子がアルギナーゼ遺伝子の肝臓特異的な転写に関与する可能性が示唆された。既知の転写因子の結合部位を含む合

成オリゴヌクレオチドを用いてフットプリントの競合阻害実験を行ったところ、領域 B と C には CTF/NF-1 に類似した因子が結合することが明らかになった (図 7)。なお領域 B には CTF/NF-1 と競合的に Sp1 に類似した因子も結合しうる。この二つの因子がアルギナーゼ遺伝子の転写調節にどのような役割を担っているかは極めて興味深い問題である。

一方、領域 A には C/EBP に類似した因子が結合することが明らかになった。上述したようにこの因子は CPS のプロモーターおよび OTC のエンハンサーにも結合する。したがってこの因子は尿素サイクル酵素遺伝子の発生経過、食餌摂取に伴う同調誘導を制御する因子の候補と考えることができる。

アルギン血症患者のアルギナーゼ遺伝子をクローン化しエクソン部分の塩基配列を決定したところ、第 3 エクソン内に 4 bp の欠失を見いだした。この症例の両親は血族結婚でなく compound heterozygote である可能性が大なので、対立遺伝子の塩基配列を解析したところ、第 2 エクソン内に 1 bp の欠失を見いだした。これらの欠失によりフレームシフトが起こり、短い変異タンパク質が合成されるものと考えられる。両親の遺伝子を PCR 法を用いて解析したところ、4 bp 欠失のある遺伝子は父親由来、1 bp 欠失の遺伝子は母親由来であることが明らかとなった。この家族では保因者診断や出生前診断が可能となった。

今後の課題と発展

このように、尿素サイクル酵素遺伝子についてもプロモーター、エンハンサーなどの転写調節領域の解析とそこに作用するタンパク質因子の同定

が進んできた。酵素異常症の中にはタンパク質コード領域内の点変異に基づく酵素タンパク質の質的異常型の他に、タンパク質の量的異常型が存在し、転写調節機構の異常がそのような異常の原因の一つとなりうる。現在までに塩基配列レベル病因解析のなされた尿素サイクル酵素異常症例においては、転写調節機構の異常が報告された症例はないが、この可能性は常に念頭におくべきである。例えば、GlickらはAL欠損症の一例を報告し、この症例においては肝臓と赤血球ではAL活性が検出されないのに対して脳と腎臓には正常の活性が存在することを見だし、組織特異的な発現の調節機構に異常が存在する可能性を示唆している。

尿素サイクル以外ではすでに転写調節機構の異常によると思われる遺伝子疾患の報告がある。βグロビン遺伝子、血液凝固因子IX遺伝子のプロモーター領域の点変異によると思われるβサラセミア、血友病Bについてはそれぞれ数例の報告がある。CrossleyとBrownleeは第IX因子異常の一症例において、尿素サイクル酵素遺伝子の調節領域にも結合するC/EBPの結合部位の変異を見いだした。正常人では第IX因子遺伝子の転写開始部位の下流1ないし18bpの領域にC/EBPが結合するが、この症例においては13番目の塩基がAからGに変わっておりC/EBPの結合が見られなかった。さらに、正常遺伝子のプロモーターと一緒に細胞に導入されたC/EBPにより活性化されたが、異常遺伝子プロモーターは活性化されなかった。これらの結果から、この症例においてはC/EBP結合部位の異常により転写レベルが低下し第IX因子の欠乏を来したと推定された。同様の異常は他の遺伝子のさまざまな転写因子結合部位についても起こりうるものと考えられる。

また転写調節機構の解明は将状遺伝子治療を企図する際にも重要な基礎知見になるものと考えられる。もし技術的に可能になる日がくれば、高アンモニア血症を来す尿素サイクル酵素異常症の遺伝子治療のためには遺伝子を肝細胞に導入することが理想的であり、さらに導入された遺伝子

が正常遺伝子と同じような調節下に置かれることが望ましい。その実現には各酵素遺伝子のプロモーター領域の解析、さらにはエンハンサー領域の検索を中心とした転写調節機構に対する広範な理解が不可欠と考えられる。

発表論文(1987~1990)

- 1) Haraguchi, Y., Takiguchi, M., Amaya, Y., Kawamoto, S., Matsuda, I. and Mori, M.: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human liver arginase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 412~415 (1987).
- 2) Kawamoto, S., Amaya, Y., Murakami, K., Tokunaga, F., Iwanaga, S., Kobayashi, K., Saheki, T., Kimura, S. and Mori, M.: Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver arginase, *J. Biol. Chem.*, **26**, 6280~6283 (1987).
- 3) Takiguchi, M., Murakami, T., Miura, S and Mori, M.: Structure of the rat ornithine carbamoyltransferase gene, a large, X-chromosome-linked gene with an atypical promoter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 6136~6140 (1987).
- 4) Ohtake, A., Takayanagi, M., Yamamoto, S., Nakajima, H. and Mori, M.: Ornithine transcarbamylase deficiency in *cpf* and *spf-ash* mice: Genes, mRNAs and mRNA precursors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **146**, 1064~1070 (1987).
- 5) Mori, M., Takiguchi, M., Amaya, Y., Haraguchi, Y. and Ohtake, A.: Molecular basis of urea cycle disorders "New Approach to Genetic Diseases," ed. by T. Sasazuki, Academic Press, 1987, pp. 212~222.
- 6) Mori, M., Takiguchi, M., Haraguchi, Y., Matsuda, I., Ohtake, A. and Takayanagi, M.: Molecular aspects of urea cycle enzymes and related disorders (Review), *Enzyme*, **38**, 220~226 (1987).
- 7) Matsuda, I., Hata, A., Jinno, Y., Mori, M. and Shimada, K.: Attempts to investigate the molecular basis of urea cycle disorders (Minireview), *Acta Paediatr. Jpn.*, **29**, 505~509 (1987).
- 8) Amaya, Y., Matsubasa, T., Takiguchi, M., Kobayashi, K., Saheki, T., Kawamoto, S. and Mori, M.: Amino acid sequence of rat argininosuccinate lyase deduced from cDNA, *J. Biochem.*, **103**, 177~181 (1988).
- 9) Hata, A., Tsuzuki, T., Shimada, K., Takiguchi, M., Mori, M. and Matsuda, I.: Structure of the human ornithine transcarbamylase gene, *J. Biochem.*, **103**, 302~308 (1988).

- 10) Ohtake, A., Takiguchi, M., Shigeto, Y., Amaya, Y., Kawamoto, S. and Mori, M.: Structural organization of the gene for rat liver-type arginase, *J. Biol. Chem.*, **263**, 2245~2249 (1988).
- 11) Hamano, Y., Kodama, H., Yanagisawa, M., Haraguchi, Y., Mori, M. and Yokota, S.: Immunocytochemical localization of ornithine transcarbamylase in rat intestinal mucosa. Light and electron microscopic study, *J. Histochem. Cytochem.*, **36**, 29~35 (1988).
- 12) Matsuo, S., Tatsuno, M., Kobayashi, K., Saheki, T., Miyata, T., Iwanaga, S., Amaya, Y. and Mori, M.: Isolation of cDNA clones of human argininosuccinate lyase and corrected amino acid sequence, *FEBS Lett.*, **234**, 395~399 (1988).
- 13) Haraguchi, Y., Takiguchi, M., Matsuda, I. and Mori, M.: Sequence heterogeneity of human liver arginase cDNAs and restriction fragment length polymorphism of the gene locus, *Jpn. J. Human Genet.*, **33**, 305~313 (1988).
- 14) Murakami, K., Amaya, Y., Takiguchi, M., Ebina, Y. and Mori, M.: Reconstitution of mitochondrial protein transport with purified ornithine transcarbamylase precursor expressed in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **263**, 18437~18442 (1988).
- 15) Takiguchi, M., Haraguchi, Y. and Mori, M.: Human liver-type arginase gene: Structure of the gene and analysis of the promoter region, *Nucl. Acids Res.*, **16**, 8789~8802 (1988).
- 16) Matsubasa, T., Takiguchi, M., Amaya, Y., Matsuda, I. and Mori, M.: Structure of the rat argininosuccinate lyase gene: Close similarity to chicken δ -crystallin genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 592~596 (1989).
- 17) Murakami, T., Takiguchi, M., Inomoto, T., Yamamura, K. and Mori, M.: Tissue- and developmental stage-specific expression of the rat ornithine carbamoyltransferase gene in transgenic mice, *Develop. Genet.*, **10**, 393~401 (1989).
- 18) Takiguchi, M., Matsubasa, T., Amaya, Y. and Mori, M.: Evolutionary aspects of urea cycle enzyme genes (Review), *BioEssays*, **10**, 163~166 (1989).
- 19) Kawamoto, S., Kaneko, T., Mizuki, N., Ohsuga, A., Fukushima, J., Amaya, Y., Mori, M. and Okuda, O.: Molecular cloning and nucleotide sequence of rat brain argininosuccinate lyase cDNA with an extremely long 5'-untranslated sequence: Evidence for identity of the brain and liver enzymes, *Mol. Brain Res.*, **5**, 235~241 (1989).
- 20) Murakami, T., Nishiyori, A., Takiguchi, M. and Mori, M.: Promoter and 11-kilobase upstream enhancer elements responsible for hepatoma cell-specific expression of the rat ornithine transcarbamylase gene, *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1180~1191 (1990).
- 21) Murakami, K., Tokunaga, F., Iwanaga, S. and Mori, M.: Presequence does not prevent folding of a purified mitochondrial precursor protein and is essential for association with a reticulocyte cytosolic factor(s), *J. Biochem.*, **108**, 207~214 (1990).
- 22) Haraguchi, Y., Aparicio R. J. M., Takiguchi, M., Akaboshi, I., Yoshino, M., Mori, M. and Matsuda, I.: Molecular basis of argininemia: Identification of two discrete frame-shift deletions in the liver-type arginase gene, *J. Clin. Invest.*, **86**, 347~350 (1990).
- 23) Murakami, K. and Mori, M.: Purified presequence binding factor (PBF) forms an import-competent complex with a purified mitochondrial precursor protein, *EMBO J.*, **9**, 3201~3208 (1990).
- 24) Ikemoto, M., Tabata, M., Miyake, T., Kono, T., Mori, M., Totani, M. and Murachi, T.: Expression of human liver arginase in *Escherichia coli*: Purification and properties of the product, *Biochem. J.*, **270**, 697~703 (1990).
- 25) T. Mori, M., Matsubasa, T., Amaya, Y. and Takiguchi, M.: Molecular evolution from argininosuccinate lyase to δ -crystallin "Isozymes: Structure, Function and Use in Biology and Medicine," ed. by Z. Ogita and C.L. Markert, Wiley-Liss, 1990 pp. 683~699.