

# 細胞内エネルギー代謝における 代謝修復経路とその破綻

後藤 仁志<sup>1</sup>、平居 憲人<sup>2</sup>

1 京都府立医科大学大学院医学研究科 神経発生生物学

2 京都府立医科大学医学部医学科

## 要約

細胞内エネルギー代謝は、正常な細胞の働きを支持するためのエネルギーを産生する過程である。このエネルギーを産生する過程では様々な'余計な'産物が生じることが知られている。細胞はこういった産物を修復・除去するための様々な機構を備えているが、本稿では特に副産物の修復・除去を担う酵素に着目し、論述する。また、その一部を担う酵素遺伝子について発達期のマウス脳における発現解析を行ったので、併せて報告する。

## 1. 緒言

細胞内エネルギー代謝経路は、エネルギーや細胞の活動に必要な物質を産生する経路であり、全ての生物において生命を維持するために必須の過程である。主たる栄養素であるグルコースは数多くの酵素によって代謝されてエネルギーに変換されるが、その過程は本学一年時にも学習する古典的な内容である。グルコースを代謝する経路は、細胞質での一連の酵素反応によるアデノシン三リン酸 (ATP) の合成、ミトコンドリアにおけるトリカルボン酸 (TCA) 回路、そしてミトコンドリア膜を隔てた電氣的勾配を ATP へと変換する過程からなる。1分子のグルコースを細胞質およびミトコンドリアで代謝すると、およそ 30 分子程度の ATP が形成される。しかし、ガソリンなどの燃料を燃焼してエネルギーを取り出すと、熱や CO<sub>2</sub> 以外に窒素酸化物などの副産物が生じるように、生物の細胞内で酵素反応によりエネルギー源を代謝する過程で、様々な'余計な'副産物が生じることが知られている。

ミトコンドリアでの代謝に伴い生じる活性酸素は、細胞内で生じる代謝副産物とし

て特に有名な物質である。活性酸素は、ラジカル分子として他の生体分子と反応して細胞障害を与えるのみならず、細胞機能に影響を与えるシグナル分子としても働く。一方で、細胞内代謝に関わる一連の酵素 (metabolic enzyme) が触媒する反応は特異的であるが、低い確率で本来の基質とは異なる基質と副反応を起こし、その結果副生産物 (noncanonical metabolite) を生じる。このような酵素活性は、promiscuous (乱雑な) 酵素活性と呼ばれることもあり、この活性により産生された代謝副生産物は細胞内で毒性を示すものが多い。生物の細胞には、こういった代謝副生産物を分解・排除する働きをする代謝修復酵素 (metabolite repair enzyme) を持っていることが知られている。こういった代謝修復酵素は生物間においてよく保存されているが、不要な代謝産物を細胞外へと排出しやすい単細胞生物よりも、細胞内外の物質の輸送が高度に制御されている哺乳類などの細胞でより重要な働きをしていると考えられている。それぞれの代謝修復酵素は生理的条件下では正常に働き代謝副産物も処理されているため、修復酵素の存在はその遺伝子欠損など異常がおきてはじめて明らかになることも多い。実際、ヒトでも代謝修復酵素の遺伝子に変異を持つ疾患が近年になっても新たに報告されている。本論文では、細胞内代謝に伴う'余計な'代謝産物を取り除く代謝修復酵素として機能し、特にヒトにおいて重要な機能をはたす遺伝子についてこれまで報告されてきたことについて論述する。さらに、そのうちの一つである Naxd, Naxe 遺伝子の遺伝子発現解析について報告する。

## 2. 代謝副産物によりもたらされる疾患とそのメカニズム

### 1) グルコースのリン酸化における副生産物の生成とその異常

主要なエネルギー源であるグルコースを解糖系で代謝するための最初のステップとして、細胞内に取り込んだグルコースは ATP のエネルギーを使ってリン酸化される。この反応は、ヘキソキナーゼによって触媒される反応であり、リン酸化されたグルコースは解糖系やペントースリン酸回路などの多様な代謝経路へと使用される。

ヘキソキナーゼは、この重要な最初のステップの反応を触媒するのみならず、副反応としてグルコースの類似物質である 1,5- アンヒドログルシトール (1,5-AG) をリン酸化し 1,5- アンヒドログルシトール 6 リン酸 (1,5-AG-6P) を生じる反応を触媒する。生じた 1,5-AG-6P は、ヘキソキナーゼの酵素活性をフィードバック的に阻害することが報告されている。1,5-AG は食餌中に含まれる物質であり、生理的条件下におい

ても細胞内に取り込まれるが、エネルギー源としては代謝されないと考えられている。そのため、一定の割合の 1,5-AG が細胞内でヘキソキナーゼの作用により 1,5-AG-6P となると考えられる。ヒトを含む哺乳類では、ヘキソキナーゼにより生じた副産物を除去するために glucose-6-phosphatase 3 (G6PC3) という酵素が作用する。G6PC3 には 3 つのアイソフォームがあり、いずれも小胞体に局在し、グルコースの糖リン酸化物を脱リン酸化して糖新生に関わるタンパク質として同定された。このうち、G6PC3 は他のアイソフォームと比較して 1,5-AG-6P に対する基質特異性が高く [1]、1,5-AG-6P が生理的な基質であることを示唆している。近年、ヒトで G6PC3 の欠損による遺伝性疾患が報告され、好中球の減少をもたらすことが報告された [2]。また、G6PC3 遺伝子を欠損したヒト好中球で、細胞の活性化に伴って 1,5-AG-6P を細胞内に蓄積し、代謝経路が変化することも報告された [3]。G6PC3 遺伝子変異を有するヒト好中球では、アポトーシス、細胞遊走能や殺菌能が低下しており、代謝異常が細胞の機能異常と直接的に結びついていることを示している。好中球のミトコンドリアはエネルギー産生には寄与せず、好中球は専ら解糖によるエネルギー産生に依存していることが知られている。そのため、好中球は 1,5-AG-6P の修復機構の異常に感受性が高いと考えられる。しかし、解糖系によるエネルギー産生は全ての細胞で行われており、他の細胞でも 1,5-AG-6P が蓄積すると同様の影響が認められるのか、今後の研究により明らかとなっていくことが期待される。

## 2) $\alpha$ -ケトグルタル酸を基質とした代謝副産物

$\alpha$ -ケトグルタル酸はミトコンドリアにおける TCA 回路の中間代謝産物としてはたらくのみならず、神経伝達物質であるグルタミン酸などのアミノ酸生成に関与したり、生体内での窒素を除去する機能など多彩な役割を持っている。 $\alpha$ -ケトグルタル酸は、ミトコンドリアの TCA 回路で作られる経路のほかに、細胞によっては取り込まれたグルタミンやグルタミン酸などのアミノ酸から細胞質でも合成される。この重要な代謝産物に作用して副反応を起こす酵素がいくつか知られている。乳酸脱水素酵素 (LDH) は、本来乳酸とピルビン酸の相互変換を行う酵素であるが、低頻度で  $\alpha$ -ケトグルタル酸に作用して 2-hydroxyglutarate (光学異性体の L 体) を産生する。また、本来リンゴ酸に作用してオキサロ酢酸を合成するマレイン酸脱水素酵素 (MDH) も  $\alpha$ -ケトグルタル酸から同じ 2-hydroxyglutarate を産生する。これらの promiscuous な反

応は、細胞を低酸素下で培養すると促進されることから、低酸素適応において何らかの生理的意義を持っている可能性も考えられる [4]。

L 体の 2-hydroxyglutarate は、L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase (L2HGDH) と呼ばれる遺伝子の産物によって分解・修復される [5]。ヒトやマウスでは、この修復遺伝子に欠損があると 2-hydroxyglutarate が mM のオーダーで組織に蓄積する。その結果、尿や脳脊髄液に酸性物質である 2-hydroxyglutarate が蓄積し、酸性尿症や、てんかん・小脳失調・あるいは脳腫瘍など神経疾患の原因となることが知られている [6, 7]。

一方で、ガン細胞ではしばしば TCA サイクルに関わる酵素であるイソクエン酸脱水素酵素の遺伝子に変異が生じ、変異した酵素の作用で  $\alpha$ -ケトグルタル酸から 2-hydroxyglutarate (光学異性体である D 体) が生じる。生じた 2-hydroxyglutarate は、ヒストンや DNA の脱メチル化に関与する酵素を阻害することによりガン細胞のエピゲノムに影響し、その遺伝情報を変化させてしまうことが報告されている。D 体の 2-hydroxyglutarate は D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase (D2HGDH) によって修復される。

D 体、L 体に関わらず 2-hydroxyglutarate は上述した様々な条件によって、 $\alpha$ -ケトグルタル酸を前駆体として細胞内で生成され、蓄積しうる。蓄積した 2-hydroxyglutarate は、細胞内代謝のみならず、遺伝情報にも影響することから修復酵素の発現や活性制御が適切になされることが生体にとって重要であると考えられる。

### 3) グリコーゲン代謝経路の副産物と疾患について

グリコーゲンは、グルコースからなる生体内エネルギー貯蔵物質である。グリコーゲンの代謝異常は、様々な種類の糖源病（細胞内にグリコーゲンが蓄積することによる疾患）を生じることが知られている。グリコーゲン代謝異常による疾患の一つとして Lafora 病という遺伝性疾患が知られている。この疾患では通常グリコーゲン顆粒を蓄積しない神経細胞において Lafora body とよばれるグリコーゲン様の顆粒の蓄積が認められ、この蓄積によって神経細胞が損傷をうけることにより若年性ミオクロニーてんかんを生じる神経変性疾患である。Lafora body は通常のグリコーゲンと比較して分岐が少なく、デンプンの構成要素であるアミロペクチンと類似した構造を持つことが報告されている。Lafora 病を発症する家系の遺伝子解析などから、Epm2a,

Epm2b 遺伝子（タンパク質名はそれぞれ Laforin と Malin）が原因遺伝子として特定されており、Lafora 病はこのどちらかの遺伝子の変異に起因するケースがほとんどである。Laforin と Malin はそれぞれ脱リン酸化酵素、ユビキチン付加酵素としての性質を持ち、それぞれを欠損したマウスモデルでは Lafora body が観察される。近年、グリコーゲンに付加されたグルコース分子の一部が 6 位の炭素鎖でリン酸化されており、Laforin を欠損したマウスの組織中には、リン酸化されたグリコーゲンが蓄積されることが報告された [8]。このことから、Lafora body の形成にグリコーゲンのリン酸化が関与している可能性と、Laforin がその脱リン酸化を担う修復酵素であることが示唆された。リン酸化されたグリコーゲンを生成する反応は、グリコーゲンの合成酵素である glycogen synthase の副反応によって生成されていることが提唱されている。しかし、その後の研究において、Laforin の遺伝子を欠損したマウスに脱リン酸化酵素活性に重要なアミノ酸を変異させた Laforin を再導入したところ、Lafora body の形成はおこらないが、組織中のグリコーゲンのリン酸化度合いは高いままであることが報告された [9]。このことから、グリコーゲンのリン酸化は Lafora body の形成に直接的に関与していないことが示唆される。しかし、副反応により生じたリン酸化グリコーゲンは、グリコーゲン鎖の分岐に関与しているグルコース炭素鎖の 6 位でリン酸化されており、生体内でのグリコーゲン代謝に影響をあたえることが考えられる。副反応により生じたリン酸化グリコーゲンが細胞内代謝にどのような影響を与えるか、今後の解析がまたれる。

#### 4) グリオキシル酸から LDH の副反応によってシュウ酸が生成される

ヒトを含む哺乳類において、代謝過程で生じるグリオキシル酸はアルデヒド基を持ち、反応性の高い物質である。グリオキシル酸はグリシンや、コラーゲンに含まれるアミノ酸として有名なヒドロキシプロリン、およびグリコール酸から代謝されて生成する。ヒドロキシプロリンは肉類に、グリコール酸は植物に多く含まれることから、グリオキシル酸を生じうるこれらの物質は食事を介して体内に入ると考えられる。生成されたグリオキシル酸は乳酸脱水素酵素（LDH）の副反応によってシュウ酸へと変換される。グリオキシル酸からシュウ酸が生じるのを防ぐため、細胞にはグリオキシル酸を修復・除去するためのいくつかの修復酵素が存在する。Alanine glyoxylate aminotransferase（AGXT）は肝臓で作られる酵素で、ペルオキシソームにおいてグ

リオキシル酸をグリシンへと変換し、修復する役割を持つ。また、Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase (GRHPR) は、ミトコンドリアにおいて、グリオキシル酸をグリコール酸に変換する修復酵素である。これらの修復酵素によって、細胞内のグリオキシル酸濃度を減少させることにより、LDH の副反応により過度のシュウ酸が生成・蓄積することを予防している。原発性高シュウ酸尿症 1 型は稀な遺伝性疾患であり、その 80% 程度は AGXT 遺伝子に、10% 程度が GRHPR 遺伝子に変異を持つ疾患である。前者の変異では、ミスセンス変異により本来ペルオキシソームに局在するべき酵素遺伝子がミトコンドリアに局在する例がよく知られており、ペルオキシソームがグリオキシル酸代謝に重要な働きをしていることがうかがえる。AGXT、GRHPR のいずれかの遺伝子に変異があり、正常な修復酵素が作られないと、蓄積したシュウ酸からシュウ酸カルシウムが生成し、沈着性結石が生じて腎臓障害を起こす。また、過度なシュウ酸結晶によって末梢神経症状を呈することもある。肝臓や腎臓の移植が行われることもあるが、シュウ酸が蓄積するメカニズムを標的とした治療法も開発されつつある。

### 3. NADH や NADPH の代謝副産物とその修復機構

#### 1) NAD から生じる代謝副産物とその異常

Nicotineamide dinucleotide (NAD) およびそのリン酸化化合物である NADP は細胞内代謝において重要な補酵素であり、細胞質とミトコンドリアでの代謝の両方において電子供与体として働くことが知られている。NAD の細胞内代謝における重要性は、その前駆体の欠乏症としてペラグラが引き起こされることから明白である。本論文では、特に NAD に対する代謝副産物とその修復機構に着目して研究を行った。

NAD および NADP (還元型の状態を NAD(P)H と総称する) は、解糖系酵素の一つである GAPDH の副反応によって水酸化され、NAD(P)HX を生じる。また、NAD(P)H に試験管内で熱を付与することによっても NAD(P)HX が生じることが報告されている。細胞レベルでも熱ストレスを与えると NAD(P)HX の産生が促進されるが、これらのどちらの経路によって生体内の NAD(P)HX が生じているかは今の所不明である。生じた NAD(P)HX には S 型と R 型の光学異性体が含まれるが、これらはいずれも自己環状化を経てミトコンドリアの代謝酵素を阻害する物質となる (図 1)。

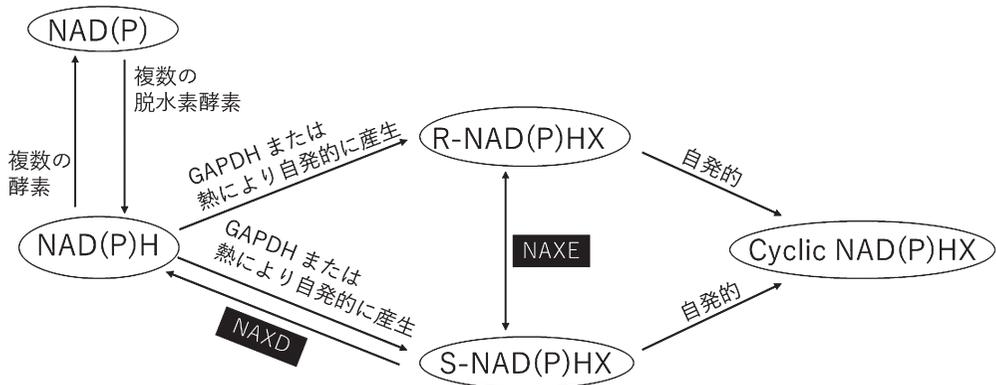


図1 2種類のよく保存された酵素 (Naxd, Naxe) によって毒性のあるピリジンヌクレオチド代謝副産物はピリジンヌクレオチド (NADH・NADPH) に修復される

NAD(P)HX を酵素反応により NAD(P)H に戻す代謝修復酵素の存在は、ヒトで遺伝性に幼児期の脳症を起こす疾患から報告された。この疾患を有する家系のゲノムを exome sequencing により解析したところ、Naxd や Naxe という遺伝子に変異があることが報告された [10, 11]。この疾患は、acute-onset ataxia, cerebellar edema, spinal myelopathy, skin lesions といった症状を示し、新生児で昏睡状態となり全体的な脳の萎縮を経て死に至った。興味深いことに、多くの症例において発症前に細菌感染や感染症に基づく発熱が認められたことが報告され、このことが NAD(P)HX の蓄積のトリガーとなっている可能性が考えられる。Naxe 遺伝子に変異のある患者から採取した繊維芽細胞では Naxe 遺伝子にフレームシフト変異やミスセンス変異がおこっているため、NAXE タンパク質は検出されなかった。また、これらの繊維芽細胞では有害な代謝物の cyclic-NADHX の蓄積が観測され、NAD(P)HX を修復するシステムが破綻していることが示唆された。

## 2) in situ hybridization 法を用いたマウス脳における Naxd および Naxe 遺伝子の発現解析

NAXD・NAXE のヒトにおける重要性から、Naxd, Naxe 遺伝子に着目し、どういった細胞に発現するかを組織学的に解析することとした。そこで、生後発達期である 14 日齢のマウスの脳において Naxd と Naxe の発現部位を調べるために in situ hybridization 法を用いた組織染色を実施した。

まず、成熟したマウス脳から抽出した mRNA から逆転写した cDNA を鋳型とし、

PCR 法によって Naxd と Naxe 遺伝子の部分配列を増幅した (Naxd: NM\_026995 の 264-1165, Naxe: NM\_144897 の 17-904)。増幅した PCR 産物を、EcoRI および BamHI で処理した pBluescript SKII に挿入し、組換えプラスミドを調製した。得られたプラスミド DNA を鋳型とし、試験管内で転写反応を行うことにより、一部の塩基が Digoxigenin (DIG) 標識された RNA プローブを作成した (DIG RNA labeling mix, Sigma 社を使用)。このとき、Naxd・Naxe とともに目的の mRNA を認識して結合するアンチセンス鎖のプローブと、目的の mRNA に結合しないセンス鎖のプローブの両方を合成した。一方で、マウスをパラホルムアルデヒド (PFA) 溶液で還流固定し、脳組織のサンプリングを行った。次に、クリオスタットを用いて厚み 20  $\mu$  m のマウスの脳の凍結切片を作成した。これらの準備段階を経て、in situ hybridization による Naxd と Naxe の発現解析を行った。

ここで今回の実験で行った ISH の手順を述べる。まず、薄切した切片を貼り付けたスライドガラスを 70% Methanol, 100% Methanol の順で 30 分処理した。リン酸緩衝液 (PBS) に 5 分間浸漬した後に、1  $\mu$  g/ml の ProteinaseK (ProK) で 20 分間処理することによりタンパク質を消化した。PBS で洗った後、4% PFA で 15 分間処理することで ProK 反応を停止させた。TEA-HCl に無水酢酸を加えた液体中で組織切片をインキュベートし、アセチレーションを行った。PBS でスライドガラスを洗浄した後、ハイブリダイゼーション液中で 65°C、2 時間プレハイブリダイゼーションを行った。切片にプローブ溶液をかけて 65°C で 12-16 時間インキュベートした。第 2 日目に、切片を 1xSSC/50% ホルムアルデヒド液中で 65°C、15 分処理し、再度同じ溶液中で 65°C、30 分洗浄した。その後 0.1xSSC で 65°C、30 分洗浄した。切片をマレイン酸緩衝液 (MABT; 100 mM マレイン酸 (pH7.5), 150 mM NaCl, 1% Tween20) で 30 分 2 回洗った。こののちに、ブロッキング溶液 (10% ヒツジ血清, 1% BSA を含む PBS/ 0.1% Triton X-100) で 1 時間処理し、ブロッキングを行った。その後、抗 DIG-AP 抗体 (Roche) を載せて 4°C で一晩インキュベートした。切片を MABT で 30 分 3 回洗った後、アルカリフォスファターゼ反応液 (100 mM Tris-HCl (pH9.5), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 500  $\mu$  M levamisole, 0.1% Tween 20) 中で 5 分 2 回切片を処理した。さらにアルカリフォスファターゼ反応緩衝液に希釈した NBT/ BCIP 溶液中で一晩発色反応を行った。翌日、反応を終了させてネオクリアー

(Sigma 社) で処理した後、封入した。

一連の実験の結果、Naxd と Naxe は P14 マウス小脳において、プルキンエ細胞に特に強く発現していることが分かった (図 2)。

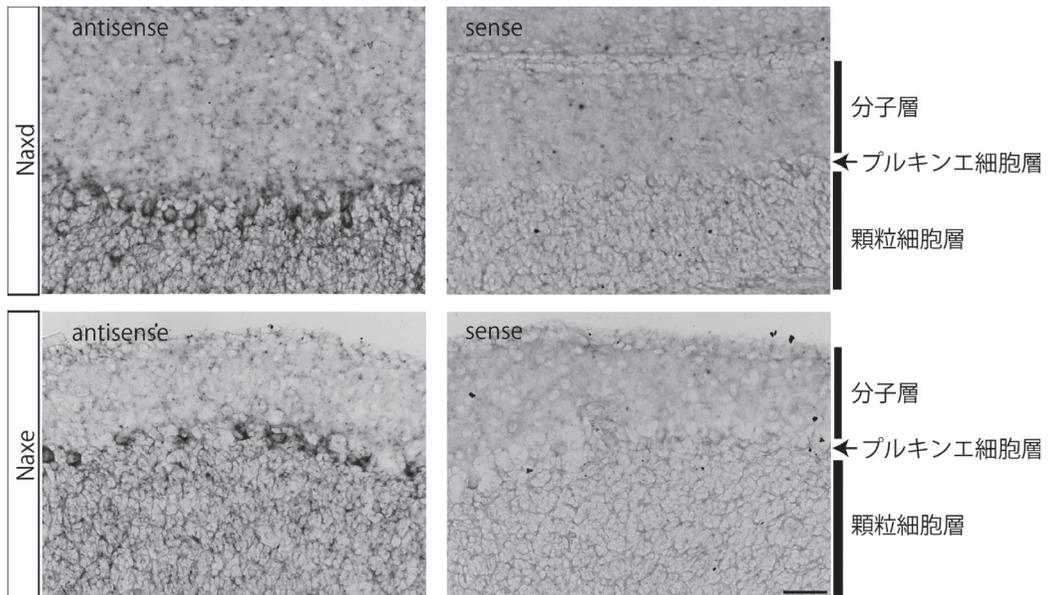


図 2 Naxd と Naxe 遺伝子はプルキンエ細胞層に強く発現する  
生後 14 日目のマウス小脳における ISH 像。アンチセンス鎖 (左側) ではプルキンエ細胞層に強いシグナルが認められるものの、センス鎖ではシグナルはほとんど認められなかった (右側)。スケールバーは 20  $\mu$  m を示している。

プルキンエ細胞は小脳皮質における唯一の出力神経細胞であり、小脳核または前庭神経核の神経細胞に抑制性のシナプスを形成している。このプルキンエ細胞へのシナプス入力とその調節は運動制御および運動学習・運動記憶に重要な働きをしていることが明らかとなっている。したがって、プルキンエ細胞内の NAXD・NAXE が欠如すれば NADHX と NADPHX、およびこれらの cyclic form が蓄積し、これらの副産物がプルキンエ細胞の働きを阻害し、結果的に冒頭で述べたような疾患がおこると考えた。

#### 4. 結論と今後の展望

これまでに述べたように、哺乳類の細胞において様々な代謝副産物が生じ、それを

除去する修復酵素が働いている。こういった代謝副産物には 2-hydroxyglutarate のように、エピジェネティクスなど細胞機能を制御する機構に影響する物質も存在するが、多くは細胞にとって損傷を与える物質を生み出すのみではないかと考えている。近年、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) において、グリオキシル酸の代謝修復酵素である AGXT の発現が減少しており、高シュウ酸尿症のリスクが上昇することが報告された。この例のように、将来的に直接的に代謝修復経路と関連しない病態や生理的現象において、細胞内の修復経路を担う酵素遺伝子に変化している例が報告されることが予測される。

#### 謝辞および利益相反

本論文を執筆するにあたり御協力・御助言いただいた小野勝彦教授、野村真准教授に感謝申し上げます。また、本研究の実験を行うにあたりお世話になりました生物学教室のメンバーにも感謝いたします。本論文の著者には開示すべき利益相反はありません。

#### 参考文献

1. Veiga-da-Cunha, M., Chevalier, N., Stephenne, X., Defour, J. P., Paczia, N., Ferster, A., Achouri, Y., Dewulf, J. P., Linster, C. L., Bommer, G. T. & Van Schaftingen, E. (2019) Failure to eliminate a phosphorylated glucose analog leads to neutropenia in patients with G6PT and G6PC3 deficiency, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **116**, 1241-1250.
2. Boztug, K., Appaswamy, G., Ashikov, A., Schaffer, A. A., Salzer, U., Diestelhorst, J., Germeshausen, M., Brandes, G., Lee-Gossler, J., Noyan, F., Gatzke, A. K., Minkov, M., Greil, J., Kratz, C., Petropoulou, T., Pellier, I., Bellanne-Chantelot, C., Rezaei, N., Monkemoller, K., Irani-Hakimeh, N., Bakker, H., Gerardy-Schahn, R., Zeidler, C., Grimbacher, B., Welte, K. & Klein, C. (2009) A syndrome with congenital neutropenia and mutations in G6PC3, *The New England journal of medicine*. **360**, 32-43.
3. McKinney, C., Ellison, M., Briones, N. J., Baroffio, A., Murphy, J., Tran, A. D.,

- Reisz, J. A., D'Alessandro, A. & Ambruso, D. R. (2020) Metabolic abnormalities in G6PC3-deficient human neutrophils result in severe functional defects, *Blood advances*. **4**, 5888-5901.
4. Intlekofer, A. M., Dematteo, R. G., Venneti, S., Finley, L. W., Lu, C., Judkins, A. R., Rustenburg, A. S., Grinaway, P. B., Chodera, J. D., Cross, J. R. & Thompson, C. B. (2015) Hypoxia Induces Production of L-2-Hydroxyglutarate, *Cell metabolism*. **22**, 304-11.
  5. Rzem, R., Veiga-da-Cunha, M., Noel, G., Goffette, S., Nassogne, M. C., Tabarki, B., Scholler, C., Marquardt, T., Vikkula, M. & Van Schaftingen, E. (2004) A gene encoding a putative FAD-dependent L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase is mutated in L-2-hydroxyglutaric aciduria, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 16849-54.
  6. Duran, M., Kamerling, J. P., Bakker, H. D., van Gennip, A. H. & Wadman, S. K. (1980) L-2-Hydroxyglutaric aciduria: an inborn error of metabolism?, *Journal of inherited metabolic disease*. **3**, 109-12.
  7. Barth, P. G., Hoffmann, G. F., Jaeken, J., Wanders, R. J., Duran, M., Jansen, G. A., Jakobs, C., Lehnert, W., Hanefeld, F., Valk, J. & et al. (1993) L-2-hydroxyglutaric acidemia: clinical and biochemical findings in 12 patients and preliminary report on L-2-hydroxyacid dehydrogenase, *Journal of inherited metabolic disease*. **16**, 753-61.
  8. Tagliabracci, V. S., Turnbull, J., Wang, W., Girard, J. M., Zhao, X., Skurat, A. V., Delgado-Escueta, A. V., Minassian, B. A., Depaoli-Roach, A. A. & Roach, P. J. (2007) Laforin is a glycogen phosphatase, deficiency of which leads to elevated phosphorylation of glycogen in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**, 19262-6.
  9. Nitschke, F., Sullivan, M. A., Wang, P., Zhao, X., Chown, E. E., Perri, A. M., Israelian, L., Juana-Lopez, L., Bovolenta, P., Rodriguez de Cordoba, S., Steup, M. & Minassian, B. A. (2017) Abnormal glycogen chain length pattern, not hyperphosphorylation, is critical in Lafora disease, *EMBO molecular*

*medicine.* **9**, 906-917.

10. Kremer, L. S., Danhauser, K., Herebian, D., Petkovic Ramadza, D., Piekutowska-Abramczuk, D., Seibt, A., Muller-Felber, W., Haack, T. B., Ploski, R., Lohmeier, K., Schneider, D., Klee, D., Rokicki, D., Mayatepek, E., Strom, T. M., Meitinger, T., Klopstock, T., Pronicka, E., Mayr, J. A., Baric, I., Distelmaier, F. & Prokisch, H. (2016) NAXE Mutations Disrupt the Cellular NAD (P) HX Repair System and Cause a Lethal Neurometabolic Disorder of Early Childhood, *American journal of human genetics.* **99**, 894-902.
11. Van Bergen, N. J., Guo, Y., Rankin, J., Paczia, N., Becker-Kettern, J., Kremer, L. S., Pyle, A., Conrotte, J. F., Ellaway, C., Procopis, P., Prelog, K., Homfray, T., Baptista, J., Baple, E., Wakeling, M., Massey, S., Kay, D. P., Shukla, A., Girisha, K. M., Lewis, L. E. S., Santra, S., Power, R., Daubeney, P., Montoya, J., Ruiz-Pesini, E., Kovacs-Nagy, R., Pritsch, M., Ahting, U., Thorburn, D. R., Prokisch, H., Taylor, R. W., Christodoulou, J., Linster, C. L., Ellard, S. & Hakonarson, H. (2019) NAD (P) HX dehydratase (NAXD) deficiency: a novel neurodegenerative disorder exacerbated by febrile illnesses, *Brain : a journal of neurology.* **142**, 50-58.