総 説

生体膜の物質透過とタンパク質の役割

笠 原 道 弘

東京大学理学部（東京都文京区本郷 7-3-1）

Role of Membrane Protein on Solute Transport in Biological Membranes

Michihiro KASAHARA

Faculty of Science, The University of Tokyo
(7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo)

1 はじめに

生体膜は外界と細胞質あるいは細胞質とオルガネラ（細胞内小器官真核細胞でのミトコンドリア、小胞体などをさす。）内部とを隔てる障壁であって、外部と相互作用を行いながらそれぞれの内部環境を保っている。外界の変化や代謝活動に応じて細胞は動的に対応しているが、このため生体膜には外界からの情報を受容し、また必要とする物質のとり込みや排出を行う機能がとっている。さらに各種の膜結合性酵素が存在し代謝活動の一端を担っている。したがって生体膜は障壁としての基本的性格に加え、ベクトリアルな情報の伝達、物質透過、代謝活動を行う場として細胞活動においてユニークな存在といえる。オルガネラ膜は上記特徴に加えさらに内部に特殊な代謝系を局在化して持っていたり、膜構成成分であるタンパク質や脂質、それらの糖鎖の合成や分解、あるいは貯蔵にも関与しており、さらに複雑な膜系といえる。細菌では細胞膜の外側に外膜と呼ばれる保護的存在の膜が発達しているものがある。植物では細胞壁と呼ばれる多糖類を主体とする膜が細胞膜の外側に形成され細胞の強度維持に寄与している。

本項では生体膜特有の機能である膜透過の研究について生化学的研究を中心として述べる。まず初めに物質透過の研究のあゆみをごく簡単に紹介し、ついで物質透過をつかさどるタンパク質の同定と精製についてやや詳しく述べる。同定法のうちもっとも重要な再構成の手法とその適用によって得られた成果についてヒト赤血球の糖輸送系について概観した後、最近進歩の著しい物質透過の調節機構と分子生物学的アプローチについて述べる。

2 物質透過の研究のあゆみ

前世紀のおわりに Overton¹⁾ によって非電解質の細胞

内への透過性が脂質への溶解度に従って増すことから細胞が脂質様のものによって囲まれそれが外界との境界になっていることが示唆された。Osterhout ら²⁾ 及び Lundergårdh³⁾ は生体膜における物質透過が膜内のキャリアー (carrier) によって媒介され则认为したが、この考えは 1950 年代までかえりみられることがなかった。1950 年代に多くの輸送モデルが提示され、現象の分類、整理が行われた。この時代に導入された放射性同位元素が本質的な寄与をなした。Widdas⁴⁾ は動物細胞の糖輸送の実験から酵素反応におけるミカエリス-メンテンの式と同形の式を導き輸送のキネティックスを記述するパラメーターを確立した。さらに特定の基質に対して特異的な輸送が明らかとなり、基質特異性、飽和キネティックス、競合阻害、特異的阻害剤の存在などが明らかとなってきた。これらの研究から輸送の様式の分類が行われ、中性の小分子が非特異的に脂質を通して透過する単純拡散 (simple diffusion)、生体膜内で輸送を媒介するタンパク [輸送体 (transporter)、担体 (carrier) などと呼ばれる。] によって運ばれる促進拡散 (facilitated diffusion)、さらに輸送体にエネルギー供与が伴い濃度こう配に逆らう輸送のできる能動輸送 (active transport)、形式としては能動輸送の形をとるが、輸送と共役し透過する分子の化学変化が起こる分子転送 (group translocation) などの区別がなされ、それぞれの特徴が明らかにされてきた。

一方、1950 年代後半にパスツール研究所の Monod ら⁵⁾ は大腸菌のラクトース輸送の輸送体がラクトース・オペロンの γ 遺伝子の産物であることを見だし、膜透過の遺伝学的解析の端緒を開いた。Fox と Kennedy⁶⁾ は 1965 年にこの遺伝学上の知識を生かしラクトース輸送体を、共有結合する阻害剤 (*N*-エチル・マレイミド) を用い同定した。輸送体の精製とその機能の解明は、輸送体が膜タンパク質であり界面活性剤などで可溶化する

必要があること、可溶性・精製した後再び輸送活性を測定できる実験系-再構成系が必要なことなどから、1970年代までみるべき成果がなかった。1971年香川とRacker⁷⁾によって報告されたミトコンドリアのPi-ATP交換反応のリボソームを用いる再構成実験は膜透過の研究に新しいページを開くものとなった。

能動輸送のエネルギー供与の形式については1960年前半までに動物細胞膜でのNa⁺K⁺輸送と筋小胞体のCa輸送についてATPaseが直接関与するいわゆる一次能動輸送であることが明らかとなってきた。動物細胞の糖やアミノ酸透過についてはNa⁺との共輸送によるいわゆる二次能動輸送系が小腸やじん臓に存在することがCrane⁸⁾によって示唆されてきた。細菌において本格的にエネルギーの問題に取り組めるようになったのはKaback⁹⁾が輸送能をもつ膜小胞を調製し精力的な仕事を行ったことによる所が大である。細菌膜小胞ではMitchell¹⁰⁾の提唱したプロトン駆動力(proton motive force)が多く輸送系のエネルギー源となっていることが示され、プロトン駆動力が広く生物界のエネルギー変換機構に共通の基盤をもっていることが確かめられた。さらに細菌ではATP依存の輸送系と分子転送の輸送系もあることが明らかとなった。共輸送されるイオンとしてH⁺以外にNa⁺もあることがわかり次第にエネルギー共役の全体像が明らかとなりつつある。

3 膜タンパク質の特徴

タンパク質の合成は生物学の基本にかかわるものとして生化学の中心的な課題であり多くの研究がなされてきたが、最近になって膜タンパク質の合成についてあいついで新しい発見がなされた¹¹⁾。膜タンパク質の合成は大別して2つの様式があることがわかった。ミトコンドリア、クロロプラストなどのオルガネラあるいは原核細胞の細胞膜や外膜のタンパク質はアミノ末端に短いシグナルペプチドと呼ばれる余分のペプチドをつけて合成されることが多く、それらが目的とする膜に入る際、この余分の部分が切り捨てられ局在化することが明らかとなった。さらに第2の様式としてリゾソーム、真核細胞の細胞膜あるいは分泌タンパク質は小胞体で合成がおこなわれ、ゴルジ器官を経てそれぞれの目的の場所に運搬用の小胞によって運ばれることが明らかとなった。

できあがった膜タンパク質は膜に局在するタンパク質としていくつかの特徴をもっている。その第1は疎水性のアミノ酸残基のクラスターをもっていることである。KyteとDoolittle¹²⁾は各アミノ酸残基に親水性、疎水性に応じ-4.5から+4.5までの数値をあてはめ、各残基を中心として7~11程度の残基の移動平均値をその中心の残基に対する数値としてプロットし、アミノ酸配列の各部の疎水性をみつめた。このHydropathy解析か

ら膜タンパク質の膜を貫通する部分は20~25の疎水性のアミノ酸残基がクラスターをつくっていることがわかり一次構造から膜を貫通する部分が推定できることを示した。さらに大部分の膜貫通部分が α -ヘリックス構造をとっていることがわかり¹³⁾50Å程度の膜の厚さにみあう長さをもつことが明らかとなった。例外として他の構造をとるものもあり、大腸菌外膜のporinが β 構造を¹⁴⁾、抗生物質のグラミジジンAが“ β -ヘリックス”をとる¹⁵⁾といわれている。さらに α -ヘリックスにおける各残基の方向性を考慮し、親水性の残基と疎水性の残基がヘリックスの対向する面に分離できるような部分をもつタンパク質やあるいは低分子のタンパク質全体がその構造をもつものも知られてきた。Eisenbergら¹⁶⁾はHydrophobic moment plotによりハチ毒であるMellitinなどがそのような膜表在性に適する性質を持つタンパク質であることをみつけた。膜表面に疎水性部分で結合し脂質構造を破壊すると考えられる。さらに電圧が加わることによりさらに膜の中に進入すると考えられる¹⁷⁾。これまで膜透過に関与するタンパク質は多数の膜貫通部をもつことが知られている¹⁸⁾。バクテリオロドプシンが7つ、アセチルコリン・リセプターの α , β , γ , δ サブユニットのそれぞれが5つ、ラクトース輸送体が12こ、サルモネラのヒスチジン輸送体が5こ膜貫通部をもちいづれもそれぞれの貫通部分の相互作用により透過が行われていることをうかがわせる。

これまで膜タンパク質の3次構造の研究はX線解析に必要な結晶を作ることが難しく著しく困難であったが、膜平面上での二次元の結晶を用い、電子顕微鏡写真の画像解析や電子線回折、さらに極低温により電子線による資料の破壊を防ぐことなどの工夫によりバクテリオロドプシンを始めとし十指にあまる膜タンパクが取り扱われてきた¹⁸⁾。さらに界面活性剤により可溶化し、3次元結晶も得られてきており徐々に解像度も上がりつつある。バクテリオロドプシンでは3.7Åの解像度まで得られているが各残基の配列まではわかってない¹⁹⁾。今後NMRなどによる動的解析とあいまって透過のメカニズムにアプローチが可能な状態となりつつある。

4 生体膜の輸送体の同定と精製^{20)~22)}

さて、前項で物質透過に関与するタンパク質のいくつかの特徴について述べたが、それではどのようにしてそれらタンパク質が透過にかかわっていると同定することができたであろうか。これまで大別して4つの方法がそれぞれ単独であるいは組み合わせで用いられてきた。1) 遺伝学的方法。欠損株や増幅株を用いてタンパク質を同定する。しかしこの方法単独では輸送体を同定することはむずかしく以下の方法と通常組み合わせで用いられる。最近では細菌のみならず真核細胞にも適用され始め

た。2) 共有結合による標識。基質アナログや阻害剤で標識し、その標識を目標として同定する。3) 非共有結合による解析。2) の方法では活性を阻害するので、透過の部分反応である結合反応や阻害剤の結合を目安に同定する。4) 再構成法。上記 1)~3) の方法ではいずれも、ある膜機能がそのタンパク質により発現されているかどうかを直接に確定することは困難である。これに対し再構成法は精製した膜タンパク質による膜透過を直接的に測定できる唯一の方法であり最良で最終的同定法となりうる。しかし膜タンパク質の可溶化、精製の困難さ、再構成系を構築する困難さのためこの方法の適用が遅れていたが、近年の主として経験的な工夫による技術的困難さの克服によって著しい発展がみられている。

以下再構成法の概略を述べヒト赤血球糖輸送体を例にとり研究の進展をながめてみる。まず膜タンパク質の可溶化には各種界面活性剤が用いられる。コール酸、デオキシ・コール酸 (DOC) などのイオン性界面活性剤、Triton X-100、オクチル・グルコシド、ヘプチルチオグルコシド²³⁾などの非イオン性界面活性剤が用いられる。膜を可溶化するが膜タンパク質の変性はもたらさないもの、除去しやすいもの、イオン交換カラムクロマトグラフィーが可能なこと、溶解度が低温でも充分なことタンパク濃度の測定が簡単に行えるため紫外部の吸収をもたないことなどの性質を勘案し選択されるが、すべての条件をみとすことは難しい。このうちオクチルグルコシドは高価であるが比較的多くの系で満足すべき結果を得ている。精製には可溶性タンパク質と同様な手法が界面活性剤存在下で用いられる。しかし可溶化後の操作はいずれも可溶性タンパク質の場合に比べて難しく、可溶化以前にできるだけ可溶性タンパク質や表在性膜タンパク質を EDTA 処理、塩処理、アルカリ処理などで除くことが重要となる。ゲル濾過、DEAE-セルロースなどのイオン交換カラムクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどがよく用いられる。精製標品から界面活性剤を除くにはミセル・サイズが小さいものやミセル量の少ない状態で使用するもの、例えばコール酸やオクチル・グルコシドの場合は透析を行い、その他の場合は疎水性ビーズに吸着させる。再構成実験は実際は精製されたタンパク質について行われることよりも、粗分画を用いて行われることが普通である。それは、一般的な再構成法が確立してなくそれぞれの系に応じて工夫が必要なこと、精製の途中で活性を失うことがあることなどの理由による。再構成法は表-1 に代表的なものを示すように種々あるが、もっとも一般的なものは凍結融解/超音波法とオクチルグルコシドを用いる希釈法である。凍結融解/超音波法は赤血球の糖輸送体の同定及び精製のため開発された方法で²⁷⁾、界面活性剤を除いた膜タンパク質をあらかじめ一層になるまで超音波処理した

表-1 主な再構成法

方 法	界 面 活 性 剤	文献
A. リポソームを用いるもの		
1. 界面活性剤除去法		
透 析 法	オクチル・グルコシド、コール酸、デオキシコール酸など	7
希 釈 法	オクチル・グルコシドなど	24
ゲル濾過法	各 種	25
2. 超音波法	—	26
3. 凍結融解/超音波法	—	27
B. 黒膜を用いるもの		
1. 脂質混入法	—	28
2. 小胞添加法	—	29

リポソームを混ぜたのち凍結融解を行い相変化に伴うリポソームの融合時に膜タンパク質を組み込む方法で安定で高い活性をもった再構成リポソームが得られる。希釈法はラクトース輸送体の再構成³⁰⁾に用いられた以後種々の系でその有用性が再認識された方法で、界面活性剤としてオクチルグルコシドが使用されることが多い。膜タンパク質と脂質及び界面活性剤を混ぜ、界面活性剤の有効濃度以下に希釈し、できてくるリポソームに膜タンパク質を組み込むもので、希釈された再構成リポソームは遠心操作により集める。

膜透過のどのような性質が輸送体に基因するのであろうか。又、再構成系はどのような特徴をもつのだろうか。凍結融解/超音波法で再構成されたヒト赤血球糖輸送体を取りあげてみる。ヒト赤血球の糖輸送系は促進拡散の様式をとる輸送系の代表的な例として知られ多くの研究がなされてきた³¹⁾。赤血球膜を調製した後、表在性膜タンパク質をアルカリ処理で除き、Triton X-100 で可溶化し、適切な条件を選ぶことにより、DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで精製された²⁷⁾。分子量が SDS 電気泳動で 55K の糖タンパク質できわめて

図-1 再構成リポソームへのグルコースの取り込み。ヒト赤血球から精製した糖輸送体をリポソームに再構成し、D-グルコースの輸送をみた。赤血球における同様の早い時間経過を示した。L-グルコースの取り込みを対照としてもちいた。L-グルコースは遅い時間経過で単純拡散によりリポソームに取り込まれる。

凝集しやすく多くの疎水性膜タンパク質の特徴をもっていた。Bio-Beads SM-2 と呼ばれる疎水性ビーズで Triton X-100 を除いたのち、凍結融解/超音波法で、大豆の粗脂質を用い再構成した (図-1)。この活性は基質特異性も、阻害剤の効果も、基質に対するアフィニティーももとの赤血球のものと変わらず、生理的機能を保持した輸送系がリポソーム上に再構成されたことがわかった。この再構成リポソーム上での輸送体の組み込まれ方を、フリーズ・フラクチャー電顕像とタンパク量を変えた時の輸送活性の変化により詳しく調べてみると³²⁾、輸送体とリポソームの相互作用はまったくランダムで輸送体はポアソン分布に従ってリポソームに組み込まれていることがわかった (図-2)。このことから、輸送体量が少ないときは、1 つの輸送体しかもたないリポソームが実現できることがわかる。さらに輸送体の機能単位間に相互作用がないこともいえ、分子機序の研究に格好の実験系が提供できることがわかった。他の再構成法による実験系ではまだ輸送体の分布は調べられていない。

多くの再構成系の仕事から一般的な性質もはっきりしてきた。第 1 に膜透過には単一のタンパク質が通常関係しており多くのタンパク質は必要ないこと。例外としては、細菌における ATP 依存の輸送系や PEP をエネルギー源とする分子転送系があり、2 個以上のタンパク質が関与していることがわかった。ただし、サブユニットをもつものは多く知られており、 F_1F_0 ATPase と呼ばれるミトコンドリアや細菌膜に存在する H^+ -ATPase、アセチルコリン・リセプター、Ca-ATPase、Na-K-ATPase などでは 2 個以上のサブユニットからなる。しかしそれぞれの系により各サブユニットの機能について

は必ずのものと機能的に重要でないと思われているものがある。第 2 に脂質はそれほど重要な役割を果たしていると思われないこと。流動性をもつ脂質の存在は単なるバリアー以上に重要であるが、特異的脂質要求性はまれである。第 3 に生体膜中では他の構成要素のため輸送体の固有の性質を実験的に確かめることが難しかったが再構成系で初めて確認できる場合があること。たとえば Na-K-ATPase や Ca-ATPase がイオンを一方方向性に輸送する起電性ポンプであることやラクトース輸送体が H^+ と共役するため起電性を示すことなど再構成系で初めて確かめられた。いずれにせよ今後の分子機序の研究にとって活性発現できる唯一の系なので期待する所が大きい。現在の再構成系の欠点で今後の改良が望まれることは 1) 再構成リポソームの大きさが均一でないこと、又、大きさが生体膜にくらべ小さいこと、2) 再構成されるタンパク質の方向性が予測できず又、同一標品中に程度の差はあれ方向性の異なったものが混在していること、3) 膜タンパク質と他のタンパク質の相互作用をみる実験系がなく細胞骨格などの研究に利用できないこと、などで一層の努力が必要とされている。

4 最近の発展

膜透過の研究は様々な手法と実験系により多方面にわたっているがこれまでになかった新しい方向について 2 つとりあげてみよう。

4.1 膜透過の調節機構

生体膜は外界の環境や内部の環境の変化に対し適切に対応した調節する機構が備わっている。外界の変化を直接的に感知するリセプターについてはそのような機構について多くの研究がなされてきた^{33), 34)}。近年の精力的な研究により生体膜に特有な調節機構があることがわかった。これまで調べられた多くのリセプターは、その結合基質を受容し、基質を結合したまた endosome あるいは receptosome と呼ばれる小胞に組み込まれて細胞内に入る。基質はリゾソームで分解され、リセプターは再び細胞膜にリサイクリングすることがわかった。結合基質によって起こされる細胞の応答はこのリサイクリングの過程のいずれかの場所で引き起こされると考えられる。このような現象はリセプターにだけ限られるのであろうか。膜透過系においても同様なメカニズムで膜透過が調節されていることがわかった。

インシュリンは種々の作用を及ぼすが、そのうちで重要なのは血中糖濃度の調節で、インシュリン濃度のわずかな上昇がいくつかの細胞の糖透過能を増し血中濃度を下げる³⁵⁾。ラット脂肪細胞は特にインシュリンに対してよく反応し糖輸送活性が 10 倍程度上昇する。この細胞ではインシュリン・リセプターがリサイクリングすることが知られている。1982 年になって大部分の糖輸送体

フリーズ・フラクチャー電顕像よりリポソームの直径と膜内粒子の数を求めた。それぞれの直径の領域で膜内粒子の分布をプロットした。
●, 実験値。○, 理論値。

図-2 糖輸送体のリポソーム上でのランダムな分布。

表-2 糖輸送体のインシュリンによるリサイクリング

処 理	糖 輸 送 体		
	細胞膜 (%)	低密度ミクロソーム (%)	計 (%)
—	21±2	79±2	100
インシュリン添加	71±4	29±4	104±10
インシュリン除去	35±2	65±2	92±5
インシュリン再添加	78±6	27±6	—

ラット脂肪細胞の糖輸送体の分布をショ糖密度こう配遠心法により分けた分画について糖輸送体に対する抗体を用いイムノブロット法で定量した。無処理の全体の糖輸送体を 100% としている。

ることができる。さらにウシと電気ウナギのサブユニットを混在させ発現することもできた。部位特異的変異とがミクロソーム分画に存在し、インシュリン投与によって細胞膜まで運ばれ活性を発現する機構があることが明らかとなった^{36), 37)}。さらにインシュリンを除去すると又元の場所に帰ってくることが示され³⁸⁾(表-2)、インシュリンによる糖輸送の変化の少なくとも主要な部分を説明できる。この機構の研究には細胞での輸送活性の変化、阻害剤のサイトカラミンBの結合活性の細胞内分画での測定、糖輸送体に対する抗体による細胞内分画での輸送体量の測定、細胞内分画を用いる再構成輸送活性の測定と種々の方法が用いられた。定量的には用いる方法により移動量は異なったが、インシュリンにより糖輸送体が細胞内から細胞膜に移動することはすべての方法で一致した。このリサイクリング系は他のリセプターのリサイクリング系とほぼ同一の性質を示し多様な膜タンパク質で同様の機構があることが示唆される。他の膜透過系ではヒスタミン感受性 H⁺ 輸送系³⁹⁾、バゾプレッシンによって活性化される水輸送系⁴⁰⁾でも同様のメカニズムが想定されている。さらにこれらリサイクリング系は膜タンパク質の合成系とも密接に関係した性質をもっており⁴¹⁾、膜タンパク質の合成、活性調節で同じくこのリサイクリング系が関与している可能性が強い。今後透過の分子機構と共に調節機構の研究がさかんになることと思われる。

4.2 分子生物学的アプローチと生体膜への再構成

生体膜自体へ再構成しようとする試みはいくつかなされた^{41), 42)}。しかしリポソーム系に比し多くのメリットはなかったので見るべき成果はなかった。しかし最近の分子生物学の進歩に伴い新しい動向が生まれた。Kabackら⁴³⁾はラクトース輸送体の 148 番目のシステインをグリシンに部位特異的に変異させ活性との対応をみた。大きな活性の変化はなかったが、輸送体の活性発現を研究する新しい方向を示した。沼ら⁴⁴⁾は電気ウナギのアセチルコリンリセプターの各サブユニットをクローニングし、サル由来の細胞に発現させ、得られた mRNA をアフリ

カツメガエル卵にマイクロ・インジェクションし活性を発現させた。各サブユニットの組み合わせをかせ発現させることができる。さらにウシと電気ウナギのサブユニットを混在させ発現することもできた。部位特異的変異と部位特異的欠損を系統的に行いアセチルコリンの結合とイオンチャネル活性に必要な α -サブユニットの場所を求めた⁴⁵⁾。アセチルコリンによる Na チャネルの反応は膜を貫通する 5 つのセグメントのそれぞれの欠損により消失した。アゴニストの α -bungarotoxin の結合はこれと対応しなかった。このような分子生物学的手法の導入により膜透過における輸送体の構造と機能についての知見が飛躍的に増加すると考えられる。さらに膜タンパク質の生合成時における膜への組み込みと膜内でどのようにしてコンフォメーションが決定されるかという問題にも重要な実験系を与えるものと思われる。

5 おわりに

限られた紙面のため多くのトピックスを割愛せざるを得なかった。例えば、1つ1つのイオンチャネルの開閉を観察できるパッチ・クランプに関する話題⁴⁷⁾、電子伝達に伴い H⁺ をポンプするシトクロム酸化酵素⁴⁸⁾、細菌でエネルギー源を Na⁺ とする膜透過系と電子伝達に伴い Na⁺ を排出する系⁴⁹⁾、タンパク質合成がかかわる膜透過系の調節機構⁵⁰⁾など多くの方面で研究が進んでいる。今後多岐にわたる手法を導入し膜タンパク質を中心においた膜透過の研究が進展することであろう。

(昭和 60 年 10 月 8 日受理)

文 献

- 1) E. Overton, *Vjschr. Naturforsch. Ges. Zürich*, **44**, 88 (1899)
- 2) W.J.V. Osterhout, W.M. Stanley, *J. Gen. Physiol.*, **15**, 667 (1932)
- 3) H. Lundergårdh, *Naturwissenschaften*, **23**, 313 (1935)
- 4) J.F. Widdas, *J. Physiol.*, **125**, 163 (1954)
- 5) G.N. Cohen, J. Monod, *Bact. Rev.*, **21**, 169 (1957)
- 6) C.F. Fox, E.P. Kennedy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **48**, 163 (1965)
- 7) Y. Kagawa, E. Racker, *J. Biol. Chem.*, **246**, 5477 (1971)
- 8) R.K. Crane, *Fed. Proc.*, **24**, 1000 (1965)
- 9) H.R. Kaback, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **54**, 891 (1966)
- 10) P. Mitchell *Biol. Rev.*, **41**, 445 (1966)
- 11) G.E. Palade, *Methods in Enzymol.*, **96**, XXIX (1983)
- 12) J. Kyte, R.F. Doolittle, *J. Mol. Biol.*, **157**, 105 (1982)
- 13) N. Burres, A.K. Dunker, *J. Theor. Biol.*, **21**, 723 (1980)
- 14) J.P. Rosenbusch, *J. Biol. Chem.*, **249**, 8019 (1974)
- 15) D.W. Urry, M.C. Goodall, J.D. Glickson, D.F. Mayers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 1907 (1971)
- 16) D. Eisenberg, E. Schwarz, M. Komaromy, R. Wall, *J. Mol. Biol.*, **179**, 125 (1984)
- 17) C. Kempf, P.D. Klausner, J.N. Weinstein, J.V. Renswoude, M. Pincus, D. Blumenthal, *J. Biol. Chem.*, **257**, 2469 (1982)

- 18) S.D. Fuller, *Methods in Cell Biol.*, **22**, 251 (1981)
- 19) S.B. Hayward, R.M. Stroud, *J. Mol. Biol.*, **151**, 491 (1981)
- 20) Y. Kagawa, *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 45 (1978)
- 21) E. Racker, *Methods in Enzymol.*, **55**, 699 (1979)
- 22) 笠原道弘, “リボソーム” (野島庄七, 井上圭三, 砂本順三編), 南江堂, 印刷中
- 23) 土屋友房, 島本 整, 齊藤節生, 蛋白質・核酸・酵素, **30**, 1058 (1985)
- 24) E. Racker, T.-F. Chien, A. Kandrach, *FEBS Lett.*, **57**, 14 (1975)
- 25) G. Rudnick, P.J. Nelson, *Biochem.*, **17**, 5300 (1978)
- 26) E. Racker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **55**, 224 (1973)
- 27) M. Kasahara, P.C. Hinkle, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7384 (1977)
- 28) C. Storelli, H. Vögel, G. Semenza, *FEBS Lett.*, **24**, 287 (1972)
- 29) L.A. Drachev, A.A. Jasaitis, A.D. Kanlen, A.A. Kondrashin, E.A. Liberman, I.B. Ostroumov, A.Yu. Semenov, V. Skulachev, *Nature*, **249**, 321 (1974)
- 30) M.J. Newman, T.H. Wilson, *J. Biol. Chem.*, **255**, 10583 (1980)
- 31) 笠原道弘, 新生理学大系, 4, 印刷中, 医学書院
- 32) S. Sase, Y. Anraku, M. Nagano, M. Osumi, M. Kasahara, *J. Biol. Chem.*, **257**, 11100 (1982)
- 33) A. Helenius, I. Mellman, D. Wall, A. Hubbard, *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 245 (1983)
- 34) I. Pastan, M.C. Willingham, *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 250 (1983)
- 35) 葛谷信貞ら, “インスリン” (1980) 講談社
- 36) K. Suzuki, T. Kono, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2542 (1982)
- 37) S.W. Cushman, L.T. Wardzala, *J. Biol. Chem.*, **255**, 4758 (1980)
- 38) O. Ezaki, M. Kasuga, Y. Akanuma, K. Takata, H. Hirano, Y. Fujita-Yamaguchi, M. Kasahara, *J. Biol. Chem.*, in press
- 39) J.G. Forter, J.A. Black, T.M. Forter, T.E. Machen, J.M. Wolosin, *Am. J. Physiol.*, **241**, G 349 (1981)
- 40) J.B. Wade, D.L. Stetson, S.A. Lewis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **372**, 106 (1981)
- 41) K. Altendorf, C.R. Müller, H. Sanderman, Jr., *Eur. J. Biochem.*, **73**, 545 (1977)
- 42) T.C.Y. Lo, *J. Biol. Chem.*, **254**, 591 (1979)
- 43) W.R. Trumble, P.V. Viitanen, H.K. Sarkar, M.S. Poonian, H.R. Kaback, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **119**, 860 (1984)
- 44) M. Mishina *et al.*, *Nature*, **307**, 604 (1984)
- 45) T. Takai *et al.*, *Nature*, **315**, 761 (1985)
- 46) M. Mishina, *et al.*, *Nature*, **313**, 364 (1985)
- 47) R.W. Aldrich, D.P. Corey, C.F. Stevens, *Nature*, **306**, 436 (1983)
- 48) M. Wikström, K. Krab, *Biochim. Biophys. Acta*, **549**, 177 (1979)
- 49) H. Tokuda, T. Unemoto, *J. Biol. Chem.*, **259**, 7785 (1984)
- 50) K. Yamada, L.G. Tillotson, K.J. Isselbacher, *J. Biol. Chem.*, **258**, 9786 (1983)