【解説】

大腸菌膜プロテアーゼによる 膜の品質管理とストレス応答調節

千葉志信, 秋山芳展

最近, 様々な生物種において, 膜内在性プロテアーゼによる膜の品質管理やストレス応答調節機構が注目を浴びている。膜を超えて情報はどのようなメカニズムで伝達されるのであろうか, また脂質二重層という疎水的環境下での加水分解反応はいかになされているのであろうか。大腸菌で最近明らかにされてきた知見を中心に, 膜プロテアーゼの反応機構に即して解説する。

生体膜の機能とその品質管理の重要性

生体膜は細胞と外界を仕切り, 物質の無秩序な出入りを規制することで細胞を個たらしめ, 細胞内の恒常性を維持する。このような物理的障壁としての役割に加え, 内外の物質や情報の選択的なやりとりを行なう関所のような性質を有する必要性から, 生体膜上にはイオンチャンネルやホルモン受容体, 各種物質のトランスポーターなど, 物質の輸送や情報の受容, 伝達に関わる膜蛋白質が多く存在する。それらの働きが生命活動の維持に必須

であるため, 正常に働くことのできる状態を保つこと, すなわち「膜の品質管理」は, 生命活動の維持にきわめて重要なのである。

膜の品質管理機構の全貌は明らかにされていないが, 生体膜上に存在するプロテアーゼが膜ストレスを軽減させたり, ストレス応答を仲介したりするなど, 重要な役割を果たすことが最近明らかになってきた。本稿では大腸菌を中心に, 膜プロテアーゼによる膜の品質管理やストレス応答調節における役割を解説する。

FtsH による膜の品質管理

膜蛋白質の変異や翻訳の異常, 膜への組み込み異常は, 生体膜にダメージを与える。また, 複数のサブユニットからなる膜蛋白質が複合体を形成し損ね, そのサブユニットが単独状態で細胞膜に蓄積した場合にも, 細胞の生育に悪影響を及ぼすことが知られている。それらの細胞毒性の分子メカニズムは必ずしも明らかではないが, たとえば物質の輸送に関与する膜蛋白質がその制御を逸脱した形で働くと, 物質の透過障壁としての膜機能が著しく損なわれることが予想される。また, 異常な膜

Roles of *Escherichia coli* Integral Membrane Proteases in Membrane Quality Control and Stress Responses
Shinobu CHIBA, Yoshinori AKIYAMA, 京都大学ウイルス研究所

蛋白質の蓄積によって膜が物理的なダメージを受けたり、本来の物理化学的性質を損なったりする可能性も考えられる。いずれにせよ、そのような異常膜蛋白質は速やかに除去される必要があるが、大腸菌においてその中心的な役割を担うと考えられているのが、FtsH と呼ばれる膜プロテアーゼである。

FtsH は、AAA (ATPase associated with diverse cellular activities) ATPase ファミリーに属する ATP 依存性亜鉛メタロプロテアーゼである。大腸菌には 5 種類の ATP 依存性プロテアーゼが存在するが、FtsH は他の ATP 依存性プロテアーゼと異なり、唯一膜に局在し、また唯一生育に必須である。N 末端側に 2 本の膜貫通領域をもち、C 末端側は大きく細胞質側に露出している。この細胞質領域に、AAA ATPase ドメインや亜鉛メタロプロテアーゼドメインが存在する(図 1)。

FtsH は、熱ショックレギュレーターの σ^{32} や、 λ ファージ由来の溶菌・溶原化決定因子である λ CII、リポ多糖の合成に関与する LpxC など、細胞質に局在する幾つかの短寿命の可溶性蛋白質を分解する。しかしこの酵素のきわだった特徴は、膜蛋白質を分解する点にある。たとえば、蛋白質膜透過装置のサブユニットの一つである SecY は、他の膜サブユニットと複合体を形成しているときには安定に存在できるが、複合体を形成し損ねたときには速やかに FtsH によって分解を受ける。F₁F₀ ATP 合成酵素のサブユニットである F₀a もまた、膜複合体に組み込まれないと FtsH によって分解される。SecY や F₀a は、単独状態で過剰に発現させると強

い細胞毒性を示すため、FtsH によるこのような異常膜蛋白質の分解除去は細胞の生育にとって重要な機能であるといえる^(1,2)。

さらに、膜蛋白質の過剰生産や FtsH の機能欠損が細胞表層ストレスをひき起こすことが見いだされた⁽³⁾。大腸菌は外膜と細胞質膜(内膜)の二重の膜構造をもち、これらに挟まれた空間をペリプラズムという。細胞質膜から外側を細胞表層といい、この空間にミスフォールドした(正しく折りたたまれなかった)蛋白質などが蓄積すると、それらを除去するための酵素群などの発現が上昇する。この細胞応答は、細胞表層ストレス応答と呼ばれている。細胞表層ストレスは、絨毛や膜の形成不全によってもひき起こされる。

細胞表層ストレス応答は、主として Cpx 経路、 σ^E 経路と呼ばれる 2 つのシグナル伝達経路によって媒介される⁽⁴⁾。膜蛋白質の過剰生産や FtsH の機能欠損は、とりわけ Cpx 経路を介した細胞表層ストレス応答をひき起こすことが示された。このことは、FtsH による膜蛋白質分解が膜の品質管理に重要であることを示す一つの例である。

筆者らのグループでは、大腸菌の内膜に局在する FtsH 以外のプロテアーゼで、膜の品質管理に寄与していると思われる膜プロテアーゼとして、最近 HtpX を見いだした⁽⁵⁾。HtpX は、Cpx 経路が活性化されると発現が誘導される。また、FtsH と HtpX の変異を併せもつ株は高温での生育が著しく損なわれることから、HtpX は FtsH と協力して細胞の生育を維持するのに働

図 1 ■大腸菌 FtsH

大腸菌 FtsH は、N 末端側の 2 本の膜貫通領域で細胞質膜にアンカーされている。AAA ATPase ドメインや、亜鉛メタロプロテアーゼ活性中心 (HExxH モチーフを含む) を細胞質側にもつ。短寿命の可溶性基質や、複合体を形成し損ねた膜蛋白質などを分解する。H: ヒスチジン, E: グルタミン酸, x: 任意のアミノ酸

いていることが示唆される。HtpX は FtsH と同様に、N 末端近くにある 2 本の膜貫通領域を介して細胞質膜にアンカーされており、C 末端細胞質領域に亜鉛メタロプロテアーゼドメインをもつ。ただし、FtsH とは異なり、エネルギー非依存的プロテアーゼであると推測される⁽³⁾。この HtpX が FtsH とどのように役割を分担し、またオーバーラップして働いているのかは、興味深い問題である。

大腸菌膜プロテアーゼによるストレス応答調節

大腸菌の膜プロテアーゼには、細胞表層ストレスを軽減するために働く FtsH のようなタイプだけでなく、ストレス応答の媒介に働くようなものも存在する。DegS と YaeL の 2 つの膜プロテアーゼがそれである。

前述の通り、大腸菌の細胞表層ストレスを細胞内に伝達する経路には、Cpx 経路と σ^E 経路が存在する。スト

レスシグナルの伝達は、Cpx 経路ではストレスセンサーである CpxA と、転写調節因子である CpxR 間でのリン酸基転移反応により媒介される。CpxA, CpxR は、いわゆる「二成分制御系 (two-component regulatory system)」に属する蛋白質で、細胞表層ストレスを感知した CpxA は自己リン酸化で活性化し、自身のリン酸基を CpxR に転移する。CpxR はリン酸化されることで活性化し、標的遺伝子に結合することで転写を促進する。

一方 σ^E 経路では、転写因子 σ^E と抗 σ 因子である RseA が働く。 σ^E は、細胞がストレスに曝されていないときには、細胞質膜に局在する RseA と結合することで膜上にトラップされ不活性化されている。しかし、細胞がストレスに曝されると RseA が分解を受け、その結果 σ^E が膜からリリースされ転写因子として働き、細胞表層で働くプロテアーゼやシャペロンなどをコードする一群の遺伝子の発現を誘導する。このとき RseA を分解

図 2 ■ DegS と YaeL による大腸菌 σ^E の活性化

σ^E は通常、抗 σ 因子である RseA により細胞質膜 (内膜) にアンカーされている。細胞表層ストレスを感知した DegS が RseA をペリプラズム側で切断すると (①)、次いで YaeL が膜内で RseA を切断する (②)。この二段階切断により、 σ^E は RseA から遊離される。DegS の PDZ ドメインは RseA 切断活性を負に制御しており、異常外膜蛋白質が PDZ ドメインに結合するとこの抑制が解除される。YaeL はペリプラズム側に PDZ ドメインをもち、細胞質側にはプロテアーゼ活性部位モチーフ (HExxH と LDG) が存在する。YaeL の PDZ ドメインおよび RseA ペリプラズム領域のグルタミンリッチな領域 (Q-rich 領域) は、DegS で切断されていない RseA を切断することを抑制している。DegS により Q-rich 領域を含むペリプラズムドメインが除去されると、RseA は YaeL 感受性になる。H: ヒスチジン, E: グルタミン酸, L: ロイシン, D: アスパラギン酸, G: グリシン, x: 任意のアミノ酸

するプロテアーゼとして働くのが、DegS と YaeL の 2 つの膜プロテアーゼである (図 2)。

DegS は、N 末端側の 1 本の膜貫通領域で細胞質膜に結合しており、C 末端側はペリプラズムに露出している。ペリプラズム領域には、プロテアーゼ活性中心および蛋白質間相互作用に働くといわれる PDZ ドメインをもつ。一方 YaeL は、4 回膜貫通型蛋白質であり、ペリプラズム側に PDZ ドメイン、膜貫通領域に近い細胞質側に亜鉛メタロプロテアーゼモチーフをもつ。YaeL の PDZ ドメインとプロテアーゼ活性中心が、膜を挟んで互いに反対側に位置している点は大変興味深い。ストレス応答時には、まず DegS が RseA のペリプラズム側で一段階目の切断を行ない (図 2-①)、次いで YaeL が、RseA の膜貫通領域もしくはその近傍で二段階目の切断を行なう (②)。

大腸菌の *yaeL* 遺伝子は、真核生物の S2P (site-2 protease) のホモログをコードするものとして見いだされていたが、その遺伝子産物 YaeL の大腸菌における機能はわかっていなかった。金原らは、YaeL が細胞の生育に必須であることを示し、次いで、遺伝学的スクリーニングから、 σ^E の過剰発現が *yaeL* 欠失株の生育欠損を相補することを見いだした⁽⁶⁾。さらに、*rseA* 遺伝子の欠失によっても YaeL が必須でなくなることを明らかにした。これらの表現型は、YaeL が σ^E の活性化のプロセスに必要であると考えとうまく説明がつく。これらの発見を手がかりに金原らは、YaeL が RseA を切断することで σ^E の活性化を媒介していることを示した^(6,8)。 σ^E の活性化には DegS による RseA の切断が必要であることはわかっていたが、DegS のプロテアーゼ活性中心がペリプラズム側にあることを考えると、DegS による切断がいかにして細胞質側における

σ^E の活性化につながるのかは不明であった。YaeL による二段階目の切断は、この問題点を明らかにするための重要なカギとなるものである。なお、米国の Gross らのグループもほぼ同時に YaeL による RseA の切断を見いだした⁽⁷⁾。

RseA の分解に関しては注目すべき点が 2 点ある。まず、基質の切断が二段階で起こる点、そして YaeL による二段階目の切断は基質の膜貫通領域内で起こっているらしいという点である。これとよく似た反応様式は他の生物でも保存されており、とりわけ基質膜貫通領域での切断は、RIP (regulated intramembrane proteolysis) と命名されている。また、RIP を行なうプロテアーゼは I-CLiP (intramembrane-cleaving protease) とも呼ばれている⁽⁸⁻¹⁰⁾。この場合、YaeL による RseA の切断は RIP であり、したがって YaeL は I-CLiP の仲間であると言える。

膜貫通領域で基質を切断する膜プロテアーゼ

これまで知られている I-CLiP は、一次構造のおおよその類似性から、大きく S2P (site-2 protease)、SPP (signal peptide peptidase)、Rhomboid、プレセニリンの 4 つのファミリーに分けられている (表 1)。いずれのファミリーのメンバーも膜内在性プロテアーゼである。

1. S2P ファミリー

S2P ファミリーは亜鉛メタロプロテアーゼである。大腸菌 YaeL がこのファミリーに属する。哺乳動物の S2P は、ステロール合成系に関与する SREBP や UPR (unfolded protein response) を媒介する ATF6 など

表 1 ■ I-CLiP の分類

ファミリー名 (プロテアーゼの種類)	酵素名	基質	基質の機能	対象となる生物
S2P (亜鉛メタロプロテアーゼ)	S2P	SREBP	ステロール合成制御	哺乳動物
		ATF6	小胞体ストレス応答	哺乳動物
	SpoIVFB YaeL	pro- σ^E RseA	胞子形成 細胞表層ストレス応答	枯草菌 大腸菌
SPP (アスパラギン酸プロテアーゼ)	SPP	シグナルペプチド HCV コア蛋白質	HLA-E エピトープの生成 コア蛋白質成熟	哺乳動物 哺乳動物
Rhomboid (セリンプロテアーゼ)	Rhomboid	Spitz, Keren, Gurken	成長因子活性化	ショウジョウバエ
プレセニリン (アスパラギン酸プロテアーゼ)	プレセニリン	APP	β -アミロイドの蓄積	哺乳動物
		Notch	細胞の分化	哺乳動物
		E-cadherin	細胞接着	哺乳動物
		Erb-B4	シグナル伝達	哺乳動物

S2P : site-2 protease, SPP : signal peptide peptidase

基質とする。両者はどちらも S1P (site-1 protease) により、ゴルジ体内腔側で一段階目の切断を受け、次いで膜内で S2P による切断を受ける。これにより、活性ドメインが膜からリリースされ、標的遺伝子の転写を促進する。

哺乳動物における S2P と大腸菌における YaeL の働きは、膜に結合した転写調節因子を膜からリリースさせるという点で共通しており、またどちらも二段階切断の二段階目で働く。しかし、S2P が膜結合型の転写調節因子自身の膜貫通領域を切断するのに対し、YaeL は、抗転写調節因子を切断し不活性化するという相違もある。また、一段階目の切断を担う S1P と DegS はアミノ酸配列の類似性をもたない。

枯草菌の孢子形成に働く σ 因子である σ^K は、膜結合型の前駆体として合成されるが、S2P ホモログである SpoIVFB によって膜貫通領域が切断されると、転写活性化能をもつ部分が膜から母細胞の細胞質にリリースされる。この場合、S2P や YaeL の場合と異なり、切断は SpoIVFB による一段階の反応と考えられている。

2. SPP ファミリー

SPP ファミリーに属する仲間は一アスパラギン酸プロテアーゼに属し、蛋白質が膜透過する際に前駆体から切り出されるシグナル配列をさらに切断するのに働く。

3. Rhomboid ファミリー

Rhomboid ファミリーはセリンプロテアーゼに属する。膜結合型 EGF (epidermal growth factor) リガンドである Spitz の膜貫通領域を切断することで、成長因子として働く細胞外ドメインを膜から細胞外へリリースさせる。原核細胞にも Rhomboid ホモログは存在し、細胞密度の感知 (クォーラムセンシング) に関わることを示唆されているが、その働きはまだよくわかっていない。

4. プレセニリンファミリー

プレセニリンの仲間はアスパラギン酸プロテアーゼに属する。 β -アミロイド蛋白質の前駆体 (APP) の切断や、細胞の分化の過程で働く転写因子 Notch の切断に働く。APP は、まず β -セクレターゼ、次いで γ -セクレターゼによって二段階の切断を受けるが、この γ -セクレターゼのプロテアーゼ活性を担うのがプレセニリンであることが強く示唆されている^(8~10)。プレセニリンの大腸菌ホモログは今のところ見つかっていない。

5. I-CLiP の作用

I-CLiP の働きを俯瞰すると一つの傾向が見えてくる。膜貫通領域をもった前駆体として合成された転写調節因子や成長因子は、膜に局在することにより、その働きが抑えられている。何らかのシグナルが引き金となって I-CLiP がその膜貫通領域 (もしくはその近傍) を切断すると、活性の本体が膜からリリースされ、本来働くべき場所に移行する。転写調節因子であれば活性本体が細胞質側にリリースされ核内に移行し、成長因子の類であれば細胞外にリリースされる。このような I-CLiP による酵素の活性化は、*de novo* 合成を必要とせず、すでに用意された前駆体から活性型の酵素を生成できるためシグナルに応じた酵素の活性化を迅速に行なうことができる。ストレス応答に関与するシグナル伝達系の幾つかがこのメカニズムを採用しているのは、このようなメリットによるものかもしれない。

I-CLiP の作用様式としてもう一つ特徴的なのは、多くの基質で二段階切断が行なわれる点である。いずれの場合も、RIP は二段階切断の二段階目であり、一段階目の切断が起これないと二段階目の切断は起これない。この二段階切断の厳密な制御に関して、最近大腸菌 YaeL について得られた興味深い知見を次に述べる。

二段階切断の制御機構

DegS と YaeL は、どちらも PDZ ドメインをもっている。最近の報告から、この PDZ ドメインが DegS、YaeL のいずれの場合も、RseA の切断を負に制御していることがわかってきた。細胞表層ストレスに曝されていない細胞中でも、PDZ ドメインを欠いた DegS や YaeL は、ストレスの有無にかかわらず σ^E を活性化させ得ることがわかった。PDZ ドメインは一般的に、蛋白質の C 末端を認識することで蛋白質どうしの相互作用を媒介することが示唆されているが、Sauer らのグループは、DegS の PDZ ドメインが外膜蛋白質の C 末端領域で広く保存されているモチーフを認識することを見いだした。また、このモチーフをもつ合成ペプチドが、DegS の RseA 切断活性を昇進することを *in vitro* で示した⁽¹¹⁾。PDZ ドメインを欠いた DegS は、ストレスシグナルの有無にかかわらず RseA を切断する。

外膜蛋白質のミスフォールディングに伴い C 末端モチーフが蛋白質の外部に露出すると、その領域が DegS の PDZ ドメインに認識される。これによって DegS は、外膜蛋白質の「質」を感知することができるのではないかと Sauer らは提唱している。すなわち、PDZ ド

メインは DegS の活性を抑制しており、細胞表層にミスフォールドした外膜蛋白質が蓄積すると PDZ ドメインがそちらに結合することで抑制が解除され RseA の一段階目の切断が起こる。YaeL は、DegS で切断されていない RseA 分子を切断することはできないが、DegS により一段階目の切断を受けた RseA であれば、切断することができる。したがって、DegS の活性化は σ^E 活性化のための主要な調節ポイントである。しかし、この制御が働くためには一段階目の切断がないときには YaeL 活性が抑えられていることが重要である(図2)。

興味深いことに、PDZ ドメインを欠失した変異 YaeL は、DegS の切断を受けていない RseA さえも切断することができる。YaeL の PDZ ドメインがペリプラズム側に存在していることから、YaeL の PDZ ドメインは RseA のペリプラズム領域の切断を、直接あるいは間接的に認識しているものと考えられる⁽¹²⁾。

一方、RseA のペリプラズム領域内に存在するグルタミンリッチな領域 (Q-rich 領域) を欠失させることで、RseA は DegS に依存せず YaeL により切断を受けるようになる。このことは、RseA 側から見るとペリプラズム領域に特徴的なアミノ酸組成の領域をもつことで YaeL による分解を抑制していると捉えることができる。この Q-rich 領域は、YaeL の PDZ ドメインと何らかの相互作用をして協同的に働いているのかもしれない。いずれにせよ、YaeL の PDZ ドメインや RseA の Q-rich 領域は、DegS によるストレス感知なくしては YaeL が RseA を切断できないといった仕組みを提供しており、これにより、ストレス応答がストレスシグナルによってのみ正しく活性化されることを保証している。また、このような巧妙に制御された二段階切断により、膜外から膜内へ膜を超えてシグナルを伝達することが可能となる。

プロテアーゼの反応様式の違い

これまで見てきたように、大腸菌の膜プロテアーゼには膜ストレスを軽減するための掃除屋としての FtsH があり、一方では、ストレス応答を伝達するための膜プロテアーゼである DegS や YaeL がある。どちらも細胞がストレスに対抗するために働いているが、両者の酵素的な反応様式の違いに注目すると、興味深い対照をなしていることに気がつく。

FtsH は ATP 依存性プロテアーゼであり、ある程度以上の長さで細胞質側に露出した基質の末端領域から分解を開始すると、プロセッシブに分子全体にわたって分解を行なう^(13,14)。膜蛋白質を分解するときには、基質分子を膜から活性中心のある細胞質側へと引きずり出す (dislocation) ことで分子全体を分解する⁽¹⁵⁾。この dislocation のプロセスは、ATP の水解サイクルに伴う FtsH 分子の構造変化により駆動されているものと想像されている。プロセッシブ分解により、おおよそ 10~20 アミノ酸残基からなるポリペプチド断片が分解産物として生じる。異常膜蛋白質による毒性を回避するためには、これらを膜から引きずり出しつつ分子全体を分解するのが効果的なのであろう。

FtsH に限らず、ATP 依存性プロテアーゼは一般的に、6~7 量体からなるリング状のオリゴマー構造を形成し、プロテアーゼ活性中心はそのチャンバーの内部に存在する。チャンバーの入り口は、高次構造を保っている蛋白質を通過させるのに十分な広さはないため、基質がチャンバー内に送り込まれる (translocation される) ためには、ATPase サブユニット (もしくは ATPase ドメイン) の働きで基質がアンフォールディングされる必要がある。FtsH による膜蛋白質基質の dislocation は、この translocation と類似した反応様式で駆動されてい

図 3 ■ FtsH の反応様式

るものと予想されている(図3)^(16,17)。

FtsH が ATPase の活性を利用して膜蛋白質を分子全体にわたって分解するのは対照的に、YaeL など I-CLiP に分類されるプロテアーゼは、基質分解に ATP を使わず、基質分子のある特定の部位 1 個所のみを切断する。基質の機能ドメインを膜からリリースするためには、基質分子全体を分解する必要はない。したがって、ATP のエネルギーを必要とはしないのであろう。

蛋白質分解の実体はペプチド結合の加水分解反応であるため、反応の進行には水分子が必要である。しかし、膜貫通領域は脂質二重層という疎水的な環境下に置かれていることが予想される。したがって、プロテアーゼがどのようにして水分子を活性中心に供給しているのかといった問題は、膜蛋白質の分解様式を理解する上で避けては通れない重要な点である。FtsH は、基質を細胞質側に dislocation することでこの問題を解決していると思われるが、YaeL やその他の I-CLiP ファミリーがこの問題をどう解決しているのかについてはまだ明確な答えは得られていない。

これまで提唱されているモデルを挙げると、たとえば S2P の基質である SREBP は、S1P による一段階目の切断を受けると膜貫通領域の構造が不安定化し、脂質二重層内部に埋もれていた S2P 切断領域が膜から細胞質側に露出するのではないかと提唱されている。基質の膜貫通領域内にあるヘリックスブレイカー残基が切断に重要であるという実験結果がこのモデルの根拠になっている。このモデルによるならば、二段階目の切断のきっかけと水分子供給の問題を同時に説明し得る。しかし、すべての RIP が二段階切断で起こるわけではないため、このモデルですべてを説明するのは難しい。

たとえば、Rhomboid による Spitz の切断や SpoIV-FB による σ^K の切断は、一段階で起こるものと考えられている。また、YaeL の PDZ ドメインを欠失させると DegS の一段階目の切断に依存せずに RseA の切断が起こるが、この結果も、第一段目の切断が第二段目の切断の前提となる前述のモデルではうまく説明できない。もしかしたら、プロテアーゼの膜貫通領域が親水性チャネルを形成し、水分子を膜内に供給するといった機構が存在するのかもしれない。

*

I-CLiP による基質認識機構や切断部位の同定、切断部位のアミノ酸残基特異性の問題など、未解決な問題は数多く残されている。大腸菌 YaeL の研究が、これらの問題にメスを入れる端緒となることを期待している。

文献

- 1) 小椋 光, 唐田清伸, 千葉志信, 秋山芳展: 蛋白質 核酸 酵素 増刊, **46**, 1679 (2001).
- 2) 才川直哉, 秋山芳展: バイオサイエンスとインダストリー, **61**, 306 (2003).
- 3) N. Shimohata, S. Chiba, N. Saikawa, K. Ito & Y. Akiyama: *Genes Cells*, **7**, 653 (2002).
- 4) T.L. Raivio & T.J. Silhavy: *Annu. Rev. Microbiol.*, **55**, 591 (2001).
- 5) K. Kanehara, Y. Akiyama & K. Ito: *Gene*, **281**, 71 (2001).
- 6) K. Kanehara, K. Ito & Y. Akiyama: *Genes Dev.*, **16**, 2147 (2002).
- 7) B.M. Alba, L.A. Leeds, C. Onufryk, C.Z. Lu & C.A. Gross: *Genes Dev.*, **16**, 2156 (2002).
- 8) M.S. Brown, J. Ye, R.B. Rawson & J.L. Goldstein: *Cell*, **100**, 391 (2000).
- 9) A. Weihofen & B. Martoglio: *Trends Cell Biol.*, **13**, 71 (2003).
- 10) 金原和江, 秋山芳展: 蛋白質 核酸 酵素, **48**, 836 (2003).
- 11) N.P. Walsh, B.M. Alba, B. Bose, C.A. Gross & R.T. Sauer: *Cell*, **113**, 61 (2003).
- 12) K. Kanehara, K. Ito & Y. Akiyama: *EMBO J.*, **22**, 6389 (2003).
- 13) S. Chiba, Y. Akiyama, H. Mori, E. Matsuo & K. Ito: *EMBO Reports*, **1**, 47 (2000).
- 14) S. Chiba, Y. Akiyama & K. Ito: *J. Bacteriol.*, **184**, 4775 (2002).
- 15) A. Kihara, Y. Akiyama & K. Ito: *EMBO J.*, **18**, 2970 (1999).
- 16) T. Ogura & A.J. Wilkinson: *Genes Cells*, **6**, 575 (2001).
- 17) 小椋 光, 唐田清伸: 細胞工学, **19**, 1362 (2000).