微生物生体膜におけるタンパク質の移行と分泌

依田 幸司・門倉 広・山崎 真狩

東京大学農学部農芸化学科 〒113 東京都文京区弥生 1-1-1

Translocation and Secretion of Proteins across Microbial Membrane

Koji YODA, Hiroshi KADOKURA and Makari YAMASAKI

Department of Agricultural Chemistry, University of Tokyo, Yayoi 1-1-1, Bunkyo-ku, Tokyo 113

Microorganisms secrete proteins into medium or translocate them in specific locations in the cell. The mechanisms of translocation and secretion of proteins in microorganisms and in mammalian organella are found to be similar in many respects. Most proteins to be localized outside of cytoplasm have an amino-terminal extension called signal sequence. Genetic studies in *Escherichia coli* were effectively done in place of biochemical studies in mammalian cells. Analyses of mutations in signal sequence proved this peptide is essential for translocation or secretion. Machinery essential for protein translocation or secretion has been found in mammalian cells such as Signal Recognition Particle or its receptor on endoplasmic reticulum. Though such machinery is yet to be found in microorganisms, existence of their counterparts is supported by analysis of temperature-sensitive mutations such as *secA* or *secY* defective in protein translocation and secretion. *In vitro* translocation and secretion systems using inverted bacterial membrane vesicles showed many proteins can translocate or secrete not only co-translationally but also post-translationally, *i. e.* after the protein synthesis has been completed. *In vitro* systems were also effectively studied to show that ATP is a major energy source of protein translocation or secretion.

Key words : Secretion, Translocation, Signal sequence

はじめに

- I 微生物の分泌タンパク
- II タンパク質の局在化と分泌
- III 局在性の解析法
- IV 膜通過に関するモデル
- V 翻訳と分泌の関係
- VI 今分泌で何が問題か

微生物のタンパク分泌装置

- I 分泌タンパクと膜とのつながり
- II シグナル配列の変異
- III シグナル配列の変異をサプレスする変異
- IV 分泌欠損変異
- V 分泌変異をサプレスする変異
- VI 無細胞系による解析

膜通過のエネルギー

- I 細胞レベルの解析
- II オルガネラでの知見
- III M13 コートタンパクの内膜への移行
- IV 無細胞系による解析

タンパクの局在性

- I 大腸菌外膜の再構成と局在化機構
- II 移送停止配列
- III タンパクの修飾による局在性決定

終りに

はじめに

- I 微生物の分泌タンパク

多くの微生物は様々の物質を細胞外に放出している。

その中には、プロテアーゼ、アミラーゼ、ヌクレアーゼなど加水分解酵素が主であるが、タンパク質も分泌されている。納豆は納豆菌 *Bacillus natto* の分泌するプロテアーゼ、アミラーゼ等の酵素作用などにより大豆を加工して栄養価を高めた微生物加工食品であるし、胃腸薬などに使われるタカジアスターゼは麹菌 *Aspergillus oryzae* の分泌する菌体外酵素の粗精製物である。界面活性剤に対して安定な細菌菌体外プロテアーゼは汚れ落しの補助剤として洗剤に添加されている。また遺伝子操作技術を用いた有用タンパク生産の際に、生産性の増大と精製工程の効率化のために、その産物を分泌させる技術の開発も期待されている。

微生物の培養液中に生産される分泌タンパクが、どのような機構で作られるのかということは非常に興味深い問題であるが、すべての微生物について同じように詳細な生化学的解析が進められているわけではない。基礎的な解析が進められているのは、既にある程度生化学的・遺伝学的な知識が蓄積している微生物に限られている。原核微生物の細菌ではグラム陰性の大腸菌 *Escherichia coli*, グラム陽性の枯草菌 *Bacillus subtilis*, 真核微生物の子囊菌ではパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* が大部分の研究で対象とされている。これらが代表的な研究対象であり、他の微生物の機構はそれとの類似性をふまえて比較検討されている。

Fig. 1 細胞の構造と分泌
リボソームと分泌方向を示す。
細胞の大きさ、各成分の大きさはもちろん正確でない。

これら3種の微生物のうち、真核微生物である酵母におけるタンパク質の分泌機構は遺伝的・生化学的解析の結果、動物の分泌組織である膵臓の細胞におけるのとはほとんど同じであることが明らかになってきている。即ち、

膵臓細胞に比べればほとんど発達していないようにみえるが、とにかく酵母にも小胞体は存在し、まずここに分泌タンパクや膜タンパクは翻訳と共役して入り込み、ゴルジ小胞における修飾を経て分泌顆粒に移行して、最後は exocytosis により細胞質膜或はその外側に至るのである。酵母の最外表層には主にグルカンとマンナンタンパクからなる頑強な細胞壁があるので、分泌タンパクのほとんどはここに蓄積し、これを通り過ぎて培地中にまで出ていくタンパクは稀で特殊な機構をもつものといえる。

一方、細胞内にオルガネラを発達させていない原核微生物においては、タンパクが通過する膜は唯一細胞全体を包んでいる細胞質膜であり、分泌のために特に分化した膜ではない。様々な栄養素を吸収したり ATP を生産したりしている膜とつながっているひとつの膜である。そのため、本稿でもこれから述べるように、基本的にはすべての生物でタンパクの膜通過機構は同じであると考えられるが、細菌には細菌の特殊な機構が存在していることも明らかになってきた。

本稿では微生物のうち主に大腸菌について明らかにされてきた点について述べ、関連する部分で他の微生物に関する知見に触れることとしたい。必要に応じて高等生物のオルガネラについても言及することとなる。

II タンパク質の局在化と分泌

そもそも、オルガネラ内でわざわざ行われるタンパク合成を除いて、すべてのタンパクは細胞質内で合成されている。生物がもつタンパク合成活性のある装置は唯一リボソームであり、アミノ酸のついた tRNA やペプチド伸長因子やエネルギー源となる GTP などタンパク質合成に必要なすべての成分とともに細胞質の可溶性成分として存在している。したがって細胞質以外の領域に存在するタンパクはすべて翻訳中あるいは翻訳後に何らかの機構でそれらの領域に移行してゆくわけである。分泌というのはこのようなタンパクの局在化機構の一つであるととらえるのが、この問題を普遍的に解析する上で重要とならえかたである。

細菌のうちグラム陽性のものでは、細胞質膜に埋め込まれているタンパクとその膜を通過して培地中に放出されるタンパク、この2種が細胞質以外の領域に行くタンパクである。一方、グラム陰性細菌では、細胞質膜は内膜ともよばれ、その外側にもう一つリン脂質とタンパクとリボ多糖とからなる膜構造である外膜をもっている。従って、細胞質膜を通過したタンパクは、外膜にさえぎ

られて内膜と外膜に挟まれたペリプラズムと呼ばれる空間にとどまるか、外膜に局在化するか、特殊な例で培地中に放出されて行くことになる。この場合、細胞質以外というのは、内膜・ペリプラズム・外膜・培地中の4つの領域ということができる。

III 局在性の解析法

なにごとともそうであるが実際の研究においては、対象に選んだタンパクが分泌したか否か、特定の領域に局在化できたか否かを決定する方法の善し悪しが結果を左右させることがある。本題に入る前にこの点について少々言及しておきたい。

(A) 菌体外タンパク：培地中まで分泌する場合は単に遠心分離やメンブレン・フィルターを過によって除菌した培養液を検討すればよいのであるが、特に長時間培養した場合などには細胞の溶菌により内容物が非特異的に出てきていることがあるので、 β -ガラクトシダーゼのような細胞質のマーカータンパクの有無についてのチェックが必要である。

(B) ペリプラズムタンパク：グラム陰性菌のペリプラズム空間に存在する成分は、Heppel ら¹⁾が開発した浸透圧ショック法により特異的に抽出することができる。この方法は、蔗糖の高張液にさらして原形質分離をおこした細胞を集め、低温に保ったごく低浸透圧のバッファないし水に急速に懸濁するのである。この過程で細胞のコロニー形成能をほとんど失わずにペリプラズム成分が外液に放出される。但し高張液中に入れる EDTA の濃度を増したりショック外液の塩濃度を水に近付けることにより、コロニー形成能は低下し、ペリプラズム画分の放出効率上がる。また対数増殖期の細胞の方が静止期の細胞より放出効率が高い。この場合も溶菌のチェックが必要である。

(C) 膜タンパク：グラム陰性菌の内膜と外膜を分ける方法としては、三浦と水島が最初に発見した両者の比重の違い²⁾を利用して、密度勾配平衡遠心により軽い内膜と重い外膜を分けるのが最も正確である。これについては様々な具体的手法が報告されている³⁻⁶⁾。また簡便法としては界面活性剤に対する外膜の抵抗性を利用した方法がある。即ち、Triton X-100⁷⁾とかザルコシル⁸⁾とかの界面活性剤は内膜タンパクを可溶化させるが、外膜タンパクは溶けずに残る。SDS のような強力な変性作用を持つ界面活性剤でも 50℃以下で処理すれば一部の外膜タンパクはペプチドグリカンに付いたまま溶けずに残る⁹⁾。しかし界面活性剤を用いた方法はあくまで補

助的なものと考えたほうがよい。

(D) プロテアーゼ感受性：膜を通過したか否かを一般的に調べる方法として重要なのは、プロテアーゼが生体膜を通過しないことを利用して、プロテアーゼに対するタンパクの感受性をチェックするものである。細胞全体を膜の袋にしたと考えられるプロトプラストやそれにまだ壁成分が付着しているスフェロプラストについては、袋の内側にあるものは膜に守られて外から加えたプロテアーゼで消化されないが、膜から出てしまった部分は分解される。無細胞タンパク合成系に加えた膜小胞を用いた実験などでは、膜小胞の中に入り込まなかったものはプロテアーゼで消化され、膜小胞の中に移行できたものは消化されない¹⁰⁾。タンパクそのものがプロテアーゼ耐性でないということは、界面活性剤で膜を溶かしてしまうとすべて同じように分解されるということで示すことができる。

(E) シグナル配列の切断：多くの分泌タンパクはN末端に疎水性アミノ酸に富むシグナル配列をもつ前駆体として合成され、分泌に際してシグナル配列は切除される。このような場合は、特に無細胞系の実験において、シグナル配列の切断除去が膜の通過と同時に起きるという前提のもとに、シグナル配列を切断されたものと切断されていないものの比率を電気泳動ゲルから読み取って、膜を通過したものの比率とすることができる¹¹⁾。しかし、大腸菌のタンパクについてはこのシグナル配列の切断と分泌の関係は動物の分泌系でみられるように同時的なものではないようなのでそのまま応用できない¹²⁾。

いずれにしても、できるならば一つの方法に頼らず、2つ以上の方法により検討することが望ましい。例えば、大腸菌の β -ラクタマーゼの分泌について、そのC末端を欠失したような変異を作って検討したところ、浸透圧ショック法で外液に回収されず、C末端が分泌に必須であるという結論が提出されたことがある¹³⁾。しかし、後に外から加えたプロテアーゼに感受性であることから、C末端を欠いた β -ラクタマーゼも内膜の外側に出ていることが確認され、膜通過はC末端が無くても正常に起こるが、できあがったポリペプチドが構造的に安定でなく変性不溶化し浸透圧ショック法で回収されなかったということが分かった¹⁴⁾。

IV 膜通過に関するモデル

動物、植物、微生物を問わず、タンパクが生体膜を通過する機構が一般に共通であるという認識は、既にいま

Fig. 2 Co-translational な分泌のシグナル仮説
模式図

さら本稿で改めて述べるまでもない。これまでに優れた総説が数多く掲載されている^{12, 15-28)}。以下はこの分野に関わられておられない方の便宜のために簡単に述べるので、詳細は他の総説を参照していただきたい。

タンパクの膜通過に関して最も卓越したモデルは、1975年に Blobel と Dobberstein が提出したシグナル仮説¹⁰⁾である。この仮説はマウス白血病細胞のイムノグロブリン mRNA と小麦胚芽のタンパク合成系とイヌの膵臓のミクロゾーム膜小胞というヘテロな構成の、無細胞タンパク分泌系を用いた実験を根拠に大胆な構想を交えた仮説であったが、いまやそのほとんどの部分について実験的に支持され、より詳細な生化学的機構が明らかにされている。

(A) 初期のシグナル仮説：分泌タンパクをコードしている mRNA は、普通の細胞質のタンパクと同じように細胞質のリボソームにより翻訳を開始する。最初に N 末端に合成されるペプチド部分はシグナル配列と呼ばれる疎水性アミノ酸に富んだもので、これがリボソーム大亜粒子からでてくると小胞体膜上にあるシグナル配列のレセプターに認識されて結合する。するとそれがシグナルとなって、小胞体膜にタンパクを通過させる膜タンパクのトンネルが形成され、またリボソームは膜上のリボソーム結合タンパクにより小胞体膜に固定される。以後この膜結合型リボソームにより合成されるタンパクは小胞体膜を通過して内腔に入り込み、シグナル配列は翻訳中にシグナルペプチダーゼにより切断される。終始コドンに至って翻訳が終了し、リボソームが大小の亜粒子に解離してしまうとともにそれらは膜から離れる。以上が最初のシグナル仮説の概要である。

(B) 現在のシグナル仮説：その後の研究によりさらに詳細な機構が明らかにされた。リボソームから出てきたシグナル配列は、まず細胞質にある 11 S シグナル認識粒子 SRP (Signal Recognition Particle) により認

識され、この SRP はリボソームに結合してタンパク合成をいったん停止させる。それが小胞体膜上にある SRP レセプターにより認識されると、リボソームは膜に結合し、SRP はリボソームから離れ、タンパク合成は再開されて以後は小胞体内に移行される²⁹⁾。SRP は 7 S の RNA と 6 種のタンパクからなる核酸タンパク複合体で Blobel らはリボソームの第 3 の亜粒子と呼んでいる³⁰⁾。既に遺伝子もクローニングされた小胞体膜の SRP レセプター³¹⁾は、ドッキングタンパクとも呼ばれ、分子量 72,000 の膜タンパクだが、N 末端側で膜につなぎとめられていてエラスターゼで部分分解すると C 末端側 60,000 の部分が根元を切られたように膜から外れてくる。このものは膜と混ぜれば活性が再構成される。シグナルペプチダーゼも 6 種のタンパクからなる複合体として精製されている³²⁾。

(C) ループモデル：Blobel のシグナル配列の特徴づけは、疎水性アミノ酸に富んだ配列というだけであったが、井上らは細菌のシグナル配列の解析から、最も N 末端側にある塩基性アミノ酸がリン脂質二重層の陰荷電と静電的親和性により結合し、それに続く疎水性アミノ酸の連続した部分は脂質二重層の脂肪酸側鎖部分との疎水的親和性によりループ状に潜り込んで行くとした¹⁶⁾。また、シグナル配列の内部にあるグリシンやプロリンは潜り込む過程でペプチド鎖の折れ曲がりに関与し、切断点のアミノ酸が側鎖の短いものであることは、シグナルペプチダーゼの基質特異性と関係があると推察した。これがループ・モデルと呼ばれるものであるが、あえてタンパクの膜通過のために特別の装置を推定せず、シグナル配列そのものだけで分泌の開始が可能であるとする点に特徴がある。

(D) 直接移送モデル：von Heijne³³⁾も、膜を通過するポリペプチドの個々のアミノ酸については、水層から油層に入り込む際のエネルギー変化は一方で油層から水層へ出ていく際のエネルギー変化とほぼ収支が合っているから、一度始まってしまうと全体として特別の装置・機構がなくてもタンパクは膜を通過してゆきうろという考え方を示した。

V 翻訳と分泌の関係

翻訳後の膜への組み込みに関する Wickner の Membrane Trigger 仮説については後にも具体的に触れるが、Blobel をはじめとするおおくのモデルがタンパク質の合成と局在化は強く共役していて互いに切り離すことができないとしていたのに対して、両者が本質的には

別々の切り離すことができる独立した過程であり、ただ時間的にはほぼ同時に起きるのだという点に力点を置いたモデルである。

それによると、膜タンパクの前駆体は細胞質内にも作られるがシグナル配列の存在により成熟体とは異なる高次構造をとっている。シグナル配列と膜との出会いによりタンパクの高次構造に変化が起こって、それにより膜への組み込みが起こり、次いでシグナル配列が切断されると新たな局在場所で安定な高次構造になるというものである^{17, 19)}。

Blobel らが最初に材料に選んだ免疫グロブリン L 鎖の分泌を始め、多くの材料については、分泌タンパクの合成系のみを組んでタンパクを合成してしまってから、後で小胞体膜系を加えてもそのタンパクは膜の中に入っていないことから、タンパク合成と分泌は共役しており、つまり分泌は co-translational に起こる。大腸菌などの分泌タンパクや膜タンパクでも普通のパルスラベル実験では全長の前駆体タンパクが検出されることはほとんどないので、co-translational にしか局在化はおこなならないと考えられていた。しかし、Wickner らの材料とした M13 ファージコートタンパクでは細胞質に前駆体タンパクが検出され、タンパク合成が完了してからも局在化が起こる、つまり post-translational にも局在化が起こると考えられた。

このようにタンパクの局在化は co-translational か post-translational かという点は長い間激しい争点となってきたが、研究対象とするタンパクの種類が増えるに従って、明らかに post-translational な局在化があることが証明された。

もっとも決定的だったのは、ミトコンドリアなどのオ

ルガネラのタンパクで主染色体にコードされているもので、精製した前駆体をオルガネラと混ぜることで局在化が起こる。大腸菌の外膜タンパクやペリプラズムタンパク³⁴⁾、酵母の α ファクター³⁵⁾などでも膜結合型でないリボソームで合成された前駆体タンパクが post-translational に局在化することが無細胞タンパク合成系で証明された。

VI 今分泌で何が問題か

タンパクの分泌一般については、先にも述べたように優れた総説が多数発表されている。したがって、分泌一般に関してはそれらの総説を参照していただくとして、本稿では筆者等が興味を持っている側面から微生物のタンパクの膜通過機構について考察してみたい。それは、「微生物の膜にはタンパクを移行させるための特別な装置は有るのか？」また「タンパクが膜を通過して行く際のエネルギー的な問題はどのように考えられているのか？」さらに「あるタンパクが最終的に細胞内の一つの場所にのみ存在するようになるというタンパクの局在性はどのようにして決まるのか？」という問題である。

微生物のタンパク分泌装置

I 分泌タンパクと膜とのつながり

動物のタンパク分泌に関与している膜結合リボソームは、ピュロマイシンでペプチド伸長反応を途中で終わらせても、膜にくっついていて高塩濃度のバッファで処理しないとはずれない。即ちリボソームはそれ自体が膜上のリボソーム結合タンパクと強く結合している。一方、細菌の膜結合リボソームはピュロマイシン処理により膜からはずれてしまう。このことから、細菌の場合、リボソームと膜を結び付けているのは伸長中のペプチド鎖の

Table 1 代表的な大腸菌のシグナル配列

-25 -20 -15 -10 -5 -1 1
 Met-Lys-Lys-Ser-Leu-Val-Leu-Lys-Ala-Ser-Val-Ala-Val-Ala-Thr-Leu-Val-Pro-Met-Leu-Ser-Phe-Ala + Ala M13コートタンパク (内膜)
 Met-Lys-Gln-Ser-Thr-Ile-Ala-Leu-Ala-Leu-Leu-Pro-Leu-Leu-Phe-Thr-Pro-Val-Thr-Lys-Ala + Arg PhoAタンパク (ペリプラズム)
 Met-Lys-Ile-Lys-Thr-Gly-Ala-Arg-Ile-Leu-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Thr-Thr-Met-Met-Phe-Ser-Ala-Ser-Ala-Leu-Ala + Lys MalEタンパク (ペリプラズム)
 Met-Lys-Ala-Thr-Lys-Leu-Val-Leu-Gly-Ala-Val-Ile-Leu-Gly-Ser-Thr-Leu-Leu-Ala-Gly + Cys リボタンパク (外膜)
 Met-Met-Ile-Thr-Leu-Arg-Lys-Leu-Pro-Leu-Ala-Val-Ala-Val-Ala-Ala-Gly-Val-Met-Ser-Ala-Gln-Ala-Met-Ala + Val LamBタンパク (外膜)
 Met-Lys-Lys-Thr-Ala-Ile-Ala-Ile-Ala-Val-Ala-Leu-Ala-Gly-Phe-Ala-Thr-Val-Ala-Gln-Ala + Ala OmpAタンパク (外膜)

← 塩基性領域 → ← 疎水性領域 → ↑ 切断点

みであると考えられている¹⁵⁾。

II シグナル配列の変異

分泌タンパクが分泌するためにはそのN末端にあるシグナル配列が必須と考えられているが、既に上で述べたように、シグナル配列の特徴は疎水性アミノ酸に富むということ以外余りはっきりしたものがない。最近共通の活性を持つ酵素の活性中心とかコファクター結合部位とか、核内への移行配列とかにコンセンサスなアミノ酸一次配列が指摘されるようになってきたが、シグナル配列についてはそのような共通一次配列は見いだされない。アミノ酸の一次配列よりもむしろその二次構造の方が重要であるとする指摘もある。いずれにしろ、その配列と機能の関係を明らかにするには、シグナル配列の変異株を用いた研究が大いに貢献すると思われる。

(A) 分泌能を失うシグナル配列変異：最初にとられた変異株は、シグナル配列をつけても分泌しないタンパクとして知られる β -ガラクトシダーゼに LamB タンパクや MalE タンパクのシグナル配列をつけた遺伝子を作製し、これらを強く誘導発現させたときに細胞が致死的になる現象を利用して、生き残りの株の中から取得された^{36, 37)}。シグナル配列が機能するとともに分泌できない β -ガラクトシダーゼがわりやり分泌過程に入り込み、分泌装置に異常を起こして致死的になると考えられるので、分泌能を失ったシグナル配列変異株なら生き残るわけである。同じような選択法で PhoA タンパク (アルカリ性ホスファターゼ) のシグナルの変異もとられている。これらは何れも疎水性のアミノ酸の並びの中に塩基性ないし酸性のアミノ酸が入り込んだような変異である。これにより、シグナル配列の中の疎水性アミノ酸の並びが分泌にとって必須であることが証明された。

これらの変異のうちには、塩基性ないし酸性のアミノ酸への変化ではなく、プロリンの導入あるいは小さな欠失変異によってその部分に考えられた α ヘリックスの形成が阻害されるものも得られており、このことからシグナル配列中央部の α ヘリックス構造が分泌に必須であるという考えも提出された。

(B) 部位指定変異処理による変異：別の一群のシグナル配列の変異は、先に述べた井上のループ・モデルの証明のために、彼らのグループが精力的なオリゴヌクレオチドを用いた部位指定変異処理により作成した、リポタンパク遺伝子の変異である。N 末端にある塩基性アミノ酸残基が膜のリン脂質と静電的な結合をすることが

シグナル配列の膜との最初の接触到重要な役割を果たすとするこのモデルを支持するように、N 末端部分のアミノ酸の荷電を中性に変異させたところ、リポタンパクの膜へのアセンブルは遅くなり、更に酸性に変異させると先ず細胞質に可溶性の前駆体が生成し、その後膜に post-translational にアセンブルするようになった³⁸⁾。しかし膜へのアセンブルが完全には阻害されなかったということはN末端の塩基性アミノ酸残基の果たす機能が補助的なものと考えるべきかも知れない。それはこの塩基性アミノ酸という特徴は細菌のシグナル配列について共通にみられることで動物のシグナル配列までは必ずしも共通でないということからも考えられる。

III シグナル配列の変異を抑制 (サブレス) する変異

上述のようなシグナル配列の変異により分泌ができなくなった変異株から、再び分泌ができるようになった株を選択するには、例えば LamB タンパクの場合はこれが外膜に移行しないと細胞はグルコースが4つ以上つなごうたマルトデキストリンを摂取できなくなるので、マルトデキストリンを唯一の炭素源として生育できる株を選び出せばよい。その中には、完全な復帰変異ではない様々な興味ある変異株が取得された。一群はシグナル配列の中で別の変異がおきて最初の変異を抑制 (サブレス) したものである。例えば荷電を持ったアミノ酸が荷電のない疎水性アミノ酸に変わったものが得られている。このことはやはりシグナル配列内の疎水的なアミノ酸の並びがその機能にとって必須であったことを確認させてくれる。

Silhavy 等は、シグナル配列の変異そのものは復帰していないのに染色体上の別の位置に新しい変異が起こることにより、欠陥のあるシグナル配列でも機能できるようになった別の一群の変異株を分離している。特にシグナル配列内に欠失をおこしたものでも分泌させることの出来る変異が得られている。これらは、シグナル配列と相互作用して分泌に関与している細胞成分が変異することによるサブプレッションと考えられた。これらの変異には *prl* (*protein localization*) という名前があたえられ、A から F までは染色体上の異なる位置にマップされた。*prlA* は次に述べる *secY* 遺伝子と同じもので、リボソームタンパクのオペロン中にコードされる膜タンパクである^{18, 24, 26)}。

IV 分泌欠損変異

β -ガラクトシダーゼは四量体で活性をもつタンパクであるが、それに MalE のシグナル配列をもたせたタ

ンパクは、シグナル配列の機能により膜と親和性を持つため、活性が低くなる。もしシグナル配列が機能できなくなるような変異株になれば、このタンパクも細胞質内に作られるようになって活性が高くなると考えられる。このような検索法で取得されたのが、*secA* 変異株である。大腸菌染色体地図の 2.5 分にマップされるこの遺伝子の温度感受性変異株では、温度を上げると MalE, PhoA, LamB, OmpF などいくつかの分泌タンパクの前駆体が同時に蓄積する³⁹⁾。しかし全ての分泌タンパクで分泌が阻害されているわけではないらしい。この *secA* 遺伝子は形質導入ファージからクローンされ、分子量 92,000 のタンパクがコードされていることが明らかとなっている⁴⁰⁾。更に、*secA-lacZ* 融合タンパクに対する抗体を用いた実験から、このタンパクは細胞質膜の細胞質側に存在していると考えられている⁴¹⁾。同様にして、致死変異ではないが MalE, OmpF 前駆体が蓄積する *secB* 変異も取られ、80.5 分にマップされている⁴²⁾。

伊藤らは、リボソームタンパク *spc* オペロンの近傍の温度感受性変異を領域指定変異処理法により多数分離し、その中から高温で分泌タンパク MalE や膜タンパク OmpA, OmpF, リポタンパク (Lpp) の前駆体が蓄積する ts 24 を選び出して解析し、変異を起こした遺伝子を *secY* と命名した⁴³⁾。DNA レベルの遺伝解析より、*secY* は *spc* オペロンの下流に位置するこれまで機能不明だった 443 アミノ酸からなるタンパクをコードするものであった⁴⁴⁾。産物をアイソトープ標識してその性質を検討したところ、あらゆる点で膜に埋め込まれた膜タンパクであると推定された⁴⁵⁾。

これらの前駆体を蓄積する変異は、その遺伝子の産物が分泌タンパクの正常な膜通過と膜タンパクの正常な膜へのアセンブルに必須であるということから、大腸菌の持つ分泌装置の構成成分の変異であると推定されている。ではこのような分泌装置の構成成分の変異は一体いくつとすることができるだろうか。互いに相互作用するタンパクの構造遺伝子の変異は、次に述べるサプレッサーの検索により、芋づる式に捕まえることが出来ると期待される。

V 分泌欠損変異をサプレスする変異

サプレッサー変異による関連遺伝子の取得法は、前の節でもシグナル配列の変異のサプレッサーとして出てきたが、最初は P 22 ファージ頭部タンパクのアセンブリーの解析で考案された方法である⁴⁶⁾。A という成分が A' に変異したことによる欠損は、A' が A に戻らな

くても、A と相互作用する成分 B の B' への変異により回復することがある。即ち、AB 複合体と A' B' 複合体の機能がほぼ同等であればよい。A と A', B との違いを見分ける形質として、A' が高温感受性、B' が低温感受性となったものを選び出せば、即ち A' の高温での復帰変異株中より低温感受性の B' 変異を分離すれば、B 遺伝子のマッピングや産物の解析ができる。

分泌の装置がファージの頭部のように互いに相互作用を持つ複数のタンパクよりなるのなら、同様の考え方で高温感受性株を一つ手にいれると、そのサプレッサーとして他のタンパクの変異を取得しうるはずである。このような期待のもとに、*secA* および *secY* のサプレッサー変異株が多数分離された。

secA 変異のサプレッサー *ssa* は D から H まで、*secY* のサプレッサー *ssy* は A から H まで、遺伝子地図上の場所が異なるものが得られている^{22*)}。これらが *secA*, *secY* とともに分泌装置を実際に構成しているか否か、分泌にどの様に関与しているかはまだあまり明らかでない。これまでの解析の結果は予想と少し異なってきた。即ち *ssyA* のようにタンパク合成の速度を遅くするような変異により分泌能欠損が復帰するという事実が明らかになってきたのである。

大腸菌でタンパク合成速度の低下がどの様にして分泌の欠損を回復させるかよく分かっていない。分泌を回復させるように変異したものを選び出した結果たまたまタンパク合成速度の方が低下してしまったのかも知れない。タンパク合成の速度が低下する変異を *secA* と組み合わせ、分泌欠損形質が回復したという例がある^{22*)}。タンパク合成速度の低下は、タンパク合成開始の頻度が変わらないなら mRNA あたりのリボソーム数を増加させ、言い替えば合成中のペプチド鎖数を増加させる。前に述べたように細菌の場合、膜とリボソームの結合が合成中のポリペプチド鎖に大きく依存しているなら、この数の増大は膜とリボソームの結合を強くし分泌装置の欠損を補いうるのかも知れない。

VI 無細胞系による解析

真核細胞の分泌機構がごく初期から無細胞タンパク合成系を駆使して研究されてきたのに対して、細菌の分泌機構はこれまでに述べてきたように遺伝学的手法を用いた研究に大きく依存してきた。しかし、大腸菌においても、DNA に依存した無細胞タンパク合成系には Zubay の系というよく知られているものがある。大腸菌でも分泌タンパクがシグナル配列を持つ疎水性の前駆体として

合成され、膜画分に存在するシグナルペプチダーゼにより切除されることは、1977 年アルカリ性ホスファターゼ (*phoA*) 遺伝子を含む形質導入ファージ DNA を用いたこのタンパク合成系により示されている⁴⁷⁾。また、大腸菌の膜小胞を作る方法は、低分子物質の膜透過系の研究で早くから開発され、フレンチプレスで破碎すると、内側と外側が逆になった小胞 (*inverted vesicles*) が得られ、等張液中でペプチドグリカンのリゾチームにより消化後、低張圧にして破裂させると、元の細胞と同じ方向性の小胞 (*right-side-out vesicles*) が得られ、超音波による破碎では両方向混在した小胞 (*mixed vesicles*) が得られることはよく知られている。このうち *inverted vesicles* は、いはば動物の小胞体由来のミクロソーム小胞と同じ方向性を持っているから、外側にタンパク合成系を組むことが出来れば、細胞においてはペリプラズムに分泌する分泌タンパクが膜小胞内に入り込むはずである。

Smith⁴⁸⁾ は 1980 年この様な系を組んで、アルカリ性ホスファターゼとジフテリア毒素がプロテアーゼ耐性な形で小胞内に入り込むことを示した。次いで、この小胞がタンパク合成終了後に加えては無効であることから、分泌とタンパク合成は共役しているとし、更に小胞をあらかじめプロテアーゼで処理しておくことと分泌活性を失うことから、膜の表面に分泌に関与するタンパク性の成分があることを主張した。この系の追試がどこまで行われたかは明かでないが、近年再び同様の系が生まれ、OmpF タンパクや PhoA タンパクはタンパク合成終了後にも分泌すること、即ち少なくともこれらの細菌のタンパクでは、合成と分泌は必ずしも共役していなくてもよいこと (*post-translational translocation*) が複数の研究室から報告されている^{34, 49-52)}。また後述するように、無細胞系の研究はタンパク分泌のエネルギー的問題を解決するために必須の研究法である。

以上のように、各種変異株と無細胞系の知見から、大腸菌においても、動物細胞と同じものではないが、分泌に関与するタンパク性の装置が、膜や細胞質に存在して機能していることは間違いないと考えられる。

膜通過のエネルギー

I 細胞レベルの解析

タンパクの膜通過のためのエネルギーが、なににより供給されるかという問題は、一方ではタンパクの膜通過

が *co-translational* か *post-translational* かという問題と密接に関連している。*post-translational* な場合には膜の高エネルギー状態即ち *proton motive force* (PMF) とか膜に存在して ATP などの高分子物質の加水分解により生じるエネルギーを必要とするタンパク性の分泌装置の関与が考えられる。*co-translational* の場合にはそれにポリペプチド鎖の伸長のエネルギーも考えにいれておかなければならない。

細胞そのものでこのエネルギーの問題を検討したのは、各種の呼吸阻害剤やイオノフォアを用いた実験である。

たとえば Daniels ら⁵³⁾ はペリプラズムタンパクのロイシン結合タンパクや β -ラクタマーゼはプロトン・イオノフォアである CCCP (*carboxylcyanide m-chlorophenylhydrazone*) やカリウム・イオノフォアであるバリノマイシンで処理することにより分泌なくなり、前駆体が蓄積する。これらの処理は膜電位を消失させることから、ペリプラズムタンパクの分泌には膜電位が必要と推定された。Enequist ら⁵⁴⁾ もジニトロフェノールや CCCP 処理で、外膜の OmpF タンパク、OmpA タンパク、LamB タンパク、ペリプラズムのマルトース結合タンパク、アラビノース結合タンパクの前駆体のプロセシングが阻害されることから *proton motive force* (PMF) がタンパクの膜通過に必要なことを報告している。さらにこれらの薬剤が PMF 以外に膜に障害を与えている可能性を除くため、プロトン ATPase の欠損の *uncA* 変異株を嫌氣的に培養することにより、PMF を低下させ、このときプロセシングが著しく阻害されることを示した。しかし PMF の低下は細胞外栄養素の膜透過を低下させ、ATP レベルの低下なども引き起こしてしまうので、厳密な結論を避けている。Bakker らは⁵⁵⁾ この変異株とバリノマイシン処理と培地の pH 変化の組合せにより、 β -ラクタマーゼのプロセシングの 1/2 阻害は PMF が 150 mV に低下したときにおこり、ATP レベルには関係がないと報告している。

しかし、この様な特定のステップに関する知見を生菌全体を用いて得るのは多くの場合厳密性をかく。それはある変異なり薬剤処理に対して細胞は全体として対応し、二次的・三次的な効果がおこるからである。それを防ぐためには、厳密に条件をコントロールされた無細胞系による検討がなされなければならないと考えられる。

II オルガネラでの知見

ミトコンドリアや葉緑体のような真核生物のオルガネ

ラの構成タンパクは一部はオルガネラ内の DNA にコードされているが、大部分は核染色体の DNA にコードされており、細胞質のリボソームで翻訳された後に各オルガネラの特定の部位に局在化する。細胞質内に作られた可溶性の前駆体は各オルガネラに向かうための sorting signal 配列を持っており、post-translational に局在化することができる。このとき、多くのミトコンドリアタンパクの移行のためにはオルガネラの膜が高エネルギー状態にあることが必要だが、無細胞系のイオノフォア添加実験により示されている。またポリンなどいくつかのオルガネラの膜タンパクでは高エネルギー状態にない膜にも入り込めることが示されている⁵⁶⁾。

III M13 コートタンパクの内膜への移行

M13 は大腸菌雄株の性纖毛先端に吸着感染する一本鎖ファージであるが、このコートタンパクは感染した大腸菌の内膜に先ずアセンブルし、子ファージ DNA が細胞からしみだして行くときに DNA 結合タンパクと置き変わるようにしてファージを包んで菌体外に放出される。アミノ酸 50 個からなる比較的小さなタンパクで、N 末端が酸性、中央部分が疎水性、C 末端が塩基性のアミノ酸に富む構造をしているが、その前駆体は N 末端に更に 23 アミノ酸のシグナル配列をもっている。野生型ファージのバルス・チェイス実験でこのコートタンパクの前駆体は先ず細胞質の可溶性画分に作られた後に膜にアセンブルするという結果が得られ、アセンブリーの遅い変異株の実験からもこのことが確認された⁵⁷⁾。

次いでこの M13 コートタンパク前駆体の成熟型への切断を指標にして、大腸菌のシグナルペプチダーゼが部分精製され、更にマルチコピープラスミドにクローンされた遺伝子を持つ株を用いて、この酵素が大量に精製されるようになった⁵⁸⁾。このシグナルペプチダーゼには M13 コートタンパクばかりでなく、多くの大腸菌の分泌タンパク・膜タンパクの前駆体からシグナル配列を切断する活性が認められた。この酵素の切断するシグナル配列の C 末端アミノ酸はアラニンである。

精製した M13 ファージコートタンパクと人工的膜小胞と精製したシグナルペプチダーゼのみからなる無細胞系が組まれて、この 3 者のみによって post-translational に前駆体の膜への組み込みとプロセッシングが起こることが示されている⁵⁹⁾。このときの膜小胞は高エネルギー状態でなければならないので、この系ではタンパクの膜への組み込みのエネルギーは膜の PMF と考えられた。

この実験はまた Wickner らがシグナル仮説に対抗する形で提唱した membrane trigger 仮説を支持するものとされている。即ち、前述したように膜タンパクの前駆体はシグナル配列の存在により成熟体とは異なる高次構造をとっていて可溶性であるが、シグナル配列と膜との出会いによりタンパクの高次構造に変化が起こって、それにより膜への組み込みが起こり、次いでシグナル配列の切断により新たな安定した高次構造になるというものである。

IV 無細胞系による解析

Rhoads らによる無細胞タンパク分泌系でも⁵¹⁾、生菌を用いたときと同じく、プロトン・イオノフォアの FCCP 50 μ M やカリウム・イオノフォアのバリノマイシン 1 μ M により PMF を低下させると、PhoA タンパクと OmpA タンパクの小胞内への移行が著しく阻害されることが示された。しかし、翌年同じグループから、PhoA タンパクや OmpA タンパクが post-translational にも膜小胞内に移行することが示され³⁴⁾、それを利用してタンパク合成を終了後に前駆体を精製して加える分泌系を組んだところ、異なる結果が得られ⁵²⁾、先の結果は使った実験系の様々な不備によるものとされた。

野生株の膜小胞からなる系に乳酸をくわえると、PMF と ATP がともに生成される。両方をともに阻害するシアンやジニトロフェノール、CCCP、FCCP を加えれば勿論膜通過は阻害される。一方、「ヘキソキナーゼとグルコース」或は「グリセロールキナーゼとグリセロール」というような ATP を消費しきる反応系を加えても、それにより膜通過が阻害された。一方、乳酸のかわりに ATP もしくは ATP 再生産系を加えた系でみると、シアンやジニトロフェノールは膜通過を阻害せず、CCCP と FCCP は部分的阻害しか起こさなかった。さらにプロトン ATPase の F1 部分を欠失した変異株の膜小胞を用いた系を組むと、ここでは乳酸から PMF を作っても ATP を作ることができないが、ATP を加えた系では膜通過がおこり、乳酸を加えた系では膜通過がおこらなかった。以上の結果はすべて膜通過のエネルギーが ATP であることを示している。このことは F_1F_0 -プロトン ATPase の完全欠損変異株を用いても追試された⁶⁰⁾。

以上より、大腸菌では、ATP により駆動される分泌装置が膜にあって、全部ではないかも知れないが多くの

Fig. 3 Tai らの分泌装置のモデル⁶¹⁾. ATP をエネルギー源とする分泌装置がタンパクを分泌させる. 同じタンパクでも, シグナルペプチドが膜に到達するのが速いか遅いかによって co-translational (左)にも post-translational (右)にも分泌し得る.

タンパク質の膜通過に関与していると考えられる (Fig. 3)⁶¹⁾. この ATP が膜通過の過程で何に使われるかは興味深い, 細菌でも post-translational な膜通過が起こるということから, すでに出来上がったタンパクの高次構造を一時的にときほぐすのに必要なのではないかとする考え方が提出されている⁶²⁾.

タンパクの局在性

I 大腸菌外膜の再構成と局在化機構

大腸菌の外膜は細胞の最外層にある膜構造で, タンパクとリン脂質とリポ多糖を含んでいる. リポ多糖は外膜の外側の層にはほぼ局在している. タンパクは量的にみると OmpA タンパク, OmpC タンパク, OmpF タンパク, リポタンパク (Lpp) の 4 種のいわゆる外膜主要タンパクが大部分を占め, あとは比較的小量しか存在しない. これらのタンパクは分泌タンパクとほぼ同様の機構で内膜 (細胞質膜) を通過した後に外膜にアSEMBルすると考えられる. これらのタンパクの最終的な落ち着き先をペリプラズムでなく外膜に運搬しているのは何であろうか.

OmpC, OmpF 両タンパクは 3 量体として外膜中に存在し, 分子量 600 以下の低分子物質を通過させるポアを形成しているが, このタンパクの高次構造は SDS 中でも安定である. 山田と水島は SDS 溶液中で精製した OmpC, OmpF タンパクとリポ多糖をペプチドグリカン層上に再構成することに成功している⁶³⁾. このとき, ペプチドグリカンにはそれに共有結合したリポタン

パクが付いていることが必須で, またリポ多糖がなくては規則的な格子配列にはアSEMBリーしなかった. また彼らは単に形態的に見るだけでなく, T4 フェージが吸着感染する生物学的に活性のある膜の再構成にも成功している⁶⁴⁾. 即ち, これらの外膜成分はその相互作用により, 元の細胞で形作られるような外膜の基本構造をセルフ・アSEMBルすることができると考えられる.

OmpA タンパクについては, クローン化した ompA 遺伝子を加工して全 325 アミノ酸の成熟タンパク部分に様々な大きさの欠失をもつ物を作って発現させると, 少なくとも N 末端から 193 アミノ酸を持っていないと外膜に正常に組み込まれないことから, 成熟タンパク部分の中に外膜に落ち着くための情報が含まれていることが示されている⁶⁵⁾.

II 移送停止配列

動物細胞に感染するウイルスのコートタンパクやイムノグロブリン M の C 末端近くには, 疎水性アミノ酸の連続した配列を挟んで, N 末端側に塩基性アミノ酸, C 末端側に酸性アミノ酸をもつような領域があり, これがこれらのタンパクを膜にとどめるのに重要な働きをしていることが示されて, 移送停止配列 (stop transfer sequence) と呼ばれている. 即ち, N 末端のシグナル配列から始まったタンパクの co-translational な移送がこの配列に至って停止し, この部分で膜につなぎ止められると考えられている.

この配列の機能を実証するために, Yost らはプラスミド上で大腸菌の β -ラクタマーゼとグロビン遺伝子の融合したものの間にイムノグロブリンの移送停止配列を挟んだ物を作り, 無細胞系で分泌を検討した⁶⁶⁾. 移送停止配列を挿入する前のものはミクロソーム小胞内に全体が分泌するが, 移送停止配列を挿入後はまさにその部分からあとの C 末端側は膜内に入り込まないことがプロテアーゼ感受性により示された.

III タンパクの修飾による局在性決定

大腸菌の外膜主要タンパクの一つであるリポタンパクは, アミノ酸 58 個からなるが, N 末端のシステインに 3 本の脂肪酸が 1 つはアミノ基へのアミド結合で 2 つは-SH 基についたグリセロールを介して結合している. このリポタンパクも 20 個のアミノ酸からなるシグナル配列をもつ前駆体として生合成されるが, リポタンパクに固有なシグナルペプチダーゼの阻害剤であるグロボマイシンを用いた研究から, 先ず前駆体に脂肪酸のついたグリセロールが転移した後シグナル配列が切断されるこ

とが示された。この脂肪酸による修飾には、シグナル配列切断点を含む Leu-Ala-Gly-Cys ないし類似の配列が必要であると考えられている。ついでながら *Bacillus licheniformis* のペニシリナーゼ前駆体にもこの配列があるため、全てが分泌するのではなく、一部はリポタンパク化して膜結合型となることが示されている⁶⁷⁾。

リポタンパクの外膜への局在化にはこの脂肪酸による修飾が必須であることが、シグナル配列と成熟N末端7アミノ酸を OmpF タンパクのシグナル配列とN末端11アミノ酸とすげ替えたタンパクを作ることにより示された。即ち、このようにして脂肪酸による修飾を受けなくなったリポぬきタンパクは、外膜ではなくペリプラズムに局在したのである。このことからリポタンパクのタンパク本体はペリプラズムに存在し、その脂肪酸部分が外膜にアセンブルしているというモデルが提出されている。

以上のように、タンパクの局在性の情報は成熟タンパク本体のなかにあると考えられる。

終りに

以上、細菌のタンパク質の膜透過研究の現状をまとめた。日々発展を続けている分野であるので短い期間に新しい知見が数多く現れてくると思われる。とくに本稿で問題点として取り上げた点については、変異株と無細胞タンパク透過系の組合せにより多くの本質的に重要な新知見が得られるはずであり、私達もその一端を担うべくアルカリ性ホスファターゼ遺伝子 *phoA* を用いた分泌ベクターを利用し、各種融合タンパクの膜透過を調べることによって、検討を進めているつもりである⁶⁸⁻⁷⁰⁾。読者の皆様にこの分野の面白さが少しでも伝わり、また多少とも問題点が整理されれば望外の喜びである。

引用文献

- 1) H. C. Neu & L. A. Heppel (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 3685.
- 2) T. Miura & S. Mizushima (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **150**, 159.
- 3) M. J. Osborn et al. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 3962.
- 4) S. Mizushima & H. Yamada (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **375**, 44.
- 5) I. Yamato et al. (1975) *J. Biochem.* **77**, 705.
- 6) K. Ito et al. (1977) *Cell* **11**, 551.
- 7) C. A. Schnaitman (1971) *J. Bacteriol.* **108**, 545.
- 8) C. Filip et al. (1973) *J. Bacteriol.* **115**, 717.
- 9) J. P. Rosenbusch (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 8019.
- 10) G. Blobel & B. Dobberstein (1975) *J. Cell Biol.* **67**, 835.
- 11) P. Walter & G. Blobel (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7112.
- 12) L. L. Randall & S. J. S. Hardy (1984) *Microbiol. Rev.* **48**, 290.
- 13) D. Koshland & D. Botstein (1980) *Cell* **20**, 749.
- 14) D. Koshland et al. (1982) *Cell*, **30**, 893.
- 15) B. D. Davis & P.-C. Tai (1980) *Nature* **283**, 433.
- 16) J. M. DiRienzo et al. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 481.
- 17) W. Wickner (1979) *Ann. Rev. Biochem.* **48**, 23.
- 18) S. D. Emr et al (1980) *J. Cell Biol.* **86**, 701.
- 19) W. Wickner (1980) *Science* **210**, 861.
- 20) G. Kreil (1981) *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 317.
- 21) 依田幸司, 田村學造 (1981) 蛋白質核酸酵素 **26**, 386.
- 22) 伊藤維昭 (1981) 生化学 **53**, 427.
- 22a) 伊藤維昭, 芝清隆, 秋山芳展 (1985) 細胞工学 **4**, 1172.
- 23) D. D. Sabatini et al. (1982) *J. Cell Biol.* **92**, 1.
- 24) S. D. Emr & T. J. Silhavy (1982) *J. Cell Biol.* **95**, 689.
- 25) S. Michaelis & J. Beckwith (1982) *Ann. Rev. Microbiol.* **36**, 425.
- 26) T. J. Silhavy et al. (1983) *Microbiol. Rev.* **47**, 313.
- 27) D. Oliver (1985) *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 615.
- 28) S. A. Benson et al. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 101.
- 29) P. Walter & G. Blobel (1981) *J. Cell Biol.* **91**, 551.
- 30) P. Walter & G. Blobel (1982) *Nature* **299**, 691.
- 31) L. Lauffer et al. (1985) *Nature* **318**, 334.
- 32) E. A. Evans et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 581.
- 33) G. Heijne (1979) *Eur. J. Biochem.* **97**, 175.
- 34) L. Chen et al. (1985) *J. Bacteriol.* **161**, 973.
- 35) J. A. Rothblatt & D. I. Meyer (1986) *EMBO Journal* **5**, 1031.
- 36) H. Bedouelle et al. (1980) *Nature* **285**, 78.
- 37) S. D. Emr et al. (1980) *Nature* **285**, 82.
- 38) S. Inouye et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3438.
- 39) D. B. Oliver & J. Beckwith (1981) *Cell* **25**, 765.
- 40) D. B. Oliver & J. Beckwith (1982) *J. Bacteriol.* **150**, 686.
- 41) D. B. Oliver & J. Beckwith (1982) *Cell* **30**, 311.
- 42) C. A. Kumamoto & J. Beckwith (1983) *J. Bacteriol.* **154**, 253.
- 43) K. Ito et al. (1983) *Cell* **32**, 789.
- 44) K. Shiba et al. (1984) *EMBO Journal* **3**, 631.
- 45) Y. Akiyama & K. Ito (1985) *EMBO Journal* **4**, 3351.

- 46) J. Jarvik & D. Botstein (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2738.
- 47) H. Inouye & J. Beckwith (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 1440.
- 48) W. P. Smith (1980) *J. Bacteriol.* **141**, 1142.
- 49) M. Muller & G. Blobel (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7421.
- 50) M. Muller & G. Blobel (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7737.
- 51) D. B. Rhoads et al. (1984) *J. Bacteriol.* **159**, 63.
- 52) L. Chen & P.C. Tai (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4384.
- 53) C. J. Daniels et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5396.
- 54) H. G. Enequist et al. (1981) *Eur. J. Biochem.* **116**, 227.
- 55) E. P. Bakker & L. L. Randall (1984) *EMBO Journal* **3**, 895.
- 56) M. G. Douglas et al. (1986) *Microbiol. Rev.* **50**, 166.
- 57) K. Ito et al. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1199.
- 58) C. Watts et al (1981) *Cell* **25**, 347
- 59) T. Date & W. Wickner (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6106.
- 60) L. Chen & P.C. Tai (1986) *J. Bacteriol.* **167**, 389.
- 61) P. C. Tai, M.P. Caulfield, D. Furlong, L. Chen & B. D. Davis (1985) "Protein Transport and Secretion", Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 48.
- 62) J. E. Rothman & R. D. Kornberg (1986) *Nature* **322**, 209.
- 63) H. Yamada & S. Mizushima (1978) *J. Bacteriol.* **135**, 1024.
- 64) H. Furukawa & S. Mizushima (1982) *J. Bacteriol.* **150**, 916.
- 65) U. Henning et al. (1983) *Eur. J. Biochem.* **136**, 233.
- 66) C. S. Yost et al. (1983) *Cell* **34**, 759.
- 67) J.-S. Lai et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3506.
- 68) 山崎真狩, 田村学造 (1983) 化学と生物 **21**, 649.
- 69) 田村学造, 山崎真狩, 依田幸司 (1985) 「バイオテクノロジー」(丸尾文治編, 学会出版センター), 396.
- 70) K. Yoda et al. (1987) "Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms" (Ed. A. Torriani-Gorini et al.), in press.

繊維学会宮崎基金国際シンポジウム

第3回 膜——その基礎科学と技術——に関するシンポジウム

主 催: 繊維学会 共 催: 日本膜学会, ほか
 日 時: 6月13日(土)~15日(月) 9時~18時
 会 場: 国立教育会館 6F 601号室
 参加申込締切: 5月30日(土) 必着. テキスト郵送希望者は5月9日(土)までに送料700円を参加費に加算してお申し込み下さい. 5月9日以後の申込み者には年次大会受付にてお渡し致します.
 参加費: (括弧内は期限後・テキスト代を含む.) 賛助・維持会員, 共催学会会員 6,000円(8,000円), 会員外

10,000円(12,000円)
 参加申込方法: 参加するシンポジウム名, 氏名, 住所, 会員資格および連絡先を明記し, 参加費を添えてお申し込み下さい. 送金方法は現金書留または銀行振込(三菱銀行目黒支店普通口座 4287837 社団法人繊維学会宛)をご利用下さい.
 申込先: 〒141 東京都品川区上大崎 3-3-9-208 繊維学会「各シンポジウム係」あて (電話 03-441-5627)

第5回 物性物理化学研究会

主 催: 物性物理化学研究会
 共 催: 日本学術会議 化学系・物理系薬学研究連絡委員会
 協 賛: 日本膜学会, ほか
 日 時: 昭和62年7月3日(金) 13:00より
 会 場: 京大会館 101号室(京都市左京区吉田河原町 15-9 TEL 075-751-8311)

プログラム

1. 蛍光検出 HPLC による生体物質の高感度測定 (九大・薬) 大倉洋甫
2. ESR-ENDOR 法による有機薄膜の研究 (電総研) 黒田新一
3. 旋光法による神経の興奮性膜の活動様式の研究 (生理研) 渡辺 昭
4. 一重項酸素および活性酸素種の化学 (京大・工) 松浦輝男

5. 繊維製品の燃焼性と熱分解ガスの毒性について (阪市大・生) 岩崎 錦
 6. 多重膜における酵素反応を伴う拡散の研究 (名市大・薬) 米勢政勝
 7. 錠剤の表面粗さに及ぼす製造条件の影響 (藤沢薬工) 豊島健三
- 懇親会: 18:00より京大会館 102号室にて 会費 6,000円
 参加申込: ハガキに氏名, 所属, 連絡先, 懇親会参加の有無を記して6月30日までに下記宛にお申し込み下さい. なお, 懇親会費は当日受付でお払い下さい.
 連絡先: 〒606 京都市左京区吉田下阿達町 京都大学薬学部薬品物理化学教室内 物性物理化学研究会 (世話人) 宮嶋 孝一郎 TEL (075) 751-2111 内線 4565