薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
112 (6) 349-357 (1992)

大腸菌における分泌型蛋白質の細胞質膜透過機構

徳田 元

東京大学応用微生物研究所, 〒113 東京都文京区弥生 1-1-1

Translocation Mechanism of Presecretory Protein across the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*

Hajime TOKUDA

*Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo,
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan*

Translocation of presecretory proteins across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* requires several Sec proteins and two kinds of energies, adenosine triphosphate (ATP) and a proton motive force. *In vitro* assay system established for the analysis of protein translocation revealed that ATP and the proton motive force play different roles in protein translocation. SecA, a peripheral membrane protein, was shown to be essential for *in vitro* protein translocation. SecE and SecY, both of which are integral membrane proteins, were purified from *E. coli* cells overproducing these proteins, and reconstituted into proteoliposomes. The reconstituted proteoliposomes exhibited protein translocation activity in the presence of ATP and SecA, indicating that SecE and SecY as well as SecA are indispensable components of protein translocation machinery. In this paper, the molecular mechanism of protein translocation across the membrane of *E. coli* is discussed based on the recent data obtained by both *in vitro* and reconstitution systems.

Keywords—protein translocation; SecA; SecE; SecY; reconstitution; *in vitro* assay system; proton motive force

1. はじめに

リボゾーム上で合成された蛋白質が生理的に重要な機能を果たすためには、それぞれの蛋白質が細胞内の所定の場所に存在する必要がある。したがって、蛋白質の局在化は、遺伝子発現の最終段階と位置づけることができる。小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア等の細胞内小器官を有する真核細胞では、蛋白質が局在する場所は特に多様である。特定の蛋白質が特定の器官あるいは場所を選別されて輸送されるメカニズムは、すべての生物に普遍的に備わっている。蛋白質の選別輸送機構は、数多くの因子の関与した新しい代謝経路の1つとして、現在最も盛んに研究されている分野の1つである。¹⁾

小胞体を経由する蛋白質選別輸送系は、蛋白質が小胞体膜を透過することによって開始される。またミトコンドリアに局在する蛋白質の多くは、細胞質で合成された後、ミトコンドリアの外膜(あるいは外膜と内膜の両方)を透過する。細胞内小器官を持たない原核細胞でも、細胞質膜の外側に数多くの蛋白質が輸送される。生体膜の重要な機能の1つは、低分子物質に対しても透過障壁となることである。蛋白質のような巨大分子が、どのような機構で膜本来の機能を損なうことなく膜を透過するかは、極めて興味ある研究課題である。

蛋白質膜透過機構の研究は，“シグナル仮説”²⁾を中心として，真核細胞や原核細胞で展開されてきた。その結果，大腸菌における蛋白質の細胞質膜透過系は，その基本的な点において，小胞体膜の機構と共通性があることが明らかになってきている。本総説では，大腸菌における蛋白質の膜透過がどのような機構で行われているかについて，我々の研究室で現在までに得られた知見を中心に紹介し，併せてこの分野の将来を展望したい。

2. シグナルペプチドの構造と機能

グラム陰性の大腸菌は，細胞質膜（内膜）の外側に更に外膜と呼ばれる膜構造を有している。外膜と内膜の間隙であるペリプラズムには，加水分解酵素，アミノ酸や糖に対する結合蛋白質などが存在している。大腸菌では培地中にまで分泌される蛋白質は少数のみである。しかし外膜やペリプラズムに存在する多数の蛋白質は，細胞質膜を越えて輸送されるため，分泌型蛋白質と定義されている。分泌型蛋白質は，一般に N 末端に 20—30 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドを持った前駆体として合成される。シグナルペプチドは蛋白質の膜透過に必須である。小胞体膜を透過する蛋白質のシグナルペプチドと，大腸菌の細胞質膜を透過するシグナルペプチドは互換可能である。各種の分泌型蛋白質のシグナルペプチドに共通の配列は存在しない。しかし以下の性質は重要な共通点である。

- ① N 末端部分には，正電荷を持つアミノ酸残基が 1 個以上存在する。
- ② 中央部には，疎水性アミノ酸残基からなるクラスターがある。
- ③ シグナルペプチダーゼによる切断点には，側鎖の短いアミノ酸残基がある。

シグナルペプチドは，膜透過の過程でシグナルペプチダーゼによって切断される。この切断は膜透過には必須ではない。しかし成熟体部分を膜から遊離するのに必要な過程である。シグナルペプチドが膜透過の決定因子であり，成熟体部分には膜透過を決定する情報はない。

シグナルペプチド N 末端の正電荷は，後述する SecA 蛋白質との相互作用に重要である。正電荷を持ったアミノ酸残基数が増加するに従い，SecA との相互作用³⁾と膜透過の効率⁴⁾が上昇することが見いだされている。“ループモデル”⁵⁾は，シグナルペプチドが正電荷によって細胞質膜内側表面に固定化され，疎水性部分の膜内への挿入によって膜透過が開始するような機構を提唱したものである (Fig. 1)。

3. 膜透過系に関与する因子

大腸菌の蛋白質膜透過には，Table I に示した遺伝子（産物）が関与していることが遺伝学的解析によって示されている。⁶⁾ これらの因子は，2 種類の変異株取得法によって同定されたものである。

Fig. 1. Loop Model⁵⁾

TABLE I. Genes Involved in Protein Translocation in *E. coli*

sec gene	pri gene	Cellular localization of gene product
A	D	Cytoplasm and cytoplasmic membrane
B		Cytoplasm
D		Cytoplasmic membrane
E	G	Cytoplasmic membrane
F		Cytoplasmic membrane
Y	A	Cytoplasmic membrane
	C	Cytoplasm
	F	

sec 遺伝子群の *A*, *E* 及び *Y* は, *prl* 遺伝子群の *D*, *G* 及び *A* とそれぞれ同一である. 2 種類の方法によって同一の遺伝子が同定されたことは, これら 3 種の遺伝子が特に重要であることを示唆している. 大腸菌に存在する多数の分泌型蛋白質の膜透過は, これら *sec* 遺伝子産物で構築された共通の装置によって膜透過していると考えられる. *secB* 以外の *sec* 遺伝子は, 生育に必須であり, これら遺伝子の条件致死変異株を非許容条件下におくと, 蛋白質の分泌が阻害され, 前駆体が蓄積する.

4. *In Vitro* 実験系とエネルギー要求性

細胞質膜に存在する呼吸鎖や F_0F_1 -adenosine triphosphatase (ATPase) は, 呼吸基質の酸化や adenosine triphosphate (ATP) の加水分解によって, プロトン細胞質膜の外に汲み出す. この結果, 膜内外にプロトンの電気化学ポテンシャル差 ($\Delta\mu H^+$) が形成される. *In vivo* における研究から, 蛋白質の膜透過にはプロトン駆動力 ($\Delta p = \Delta\mu H^+/F$, F はファラデー定数) が必要であることが示唆された. しかし, *in vivo* では蛋白合成と膜透過の ATP 要求性を区別して解析することが困難であるため, ATP の必要性は明らかとはならなかった. その後大腸菌をフレンチプレスで破碎して調製した反転膜小胞を用いて, *in vitro* で蛋白質の小胞内への輸送を解析できるようになった. *In vitro* 実験系では, 小胞内に輸送された蛋白質が小胞外に加えたプロテアーゼで消化分解されないことを利用して検出する. 蛋白質の *in vitro* での合成と膜透過が同時に起きる系が先ず開発されたが, 更に蛋白合成と膜透過反応を切り放した実験系が確立された (Fig. 2). こうして前駆体蛋白質合成後の反応液に含まれている ATP 等を除いた前駆体を用いて, 膜透過反応にどのようなエネルギーが要求されるかが解析可能となったのである.^{7,8)}

F_0F_1 -ATPase 欠損変異株から調製した反転膜小胞では, ATP を加えてもプロトン駆動力は形成されない. しかし, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADH) やコハク酸等の呼吸基質を酸化してプロトン駆動力を形成することができる. このような実験系を用いて, 蛋白質の膜透過には ATP とプロトン駆動力の両方が必要であることが確立した.^{7,8)} ATP の加水分解は膜透過反応に絶対的に必要であるのに対し, プロトン駆動力はなくても速度の遅い膜透過反応は進行する. 我々は ATP とプロトン駆動力の役割を詳細に解析し, 現在までに以下の点を明らかにしている.

- ① プロトン駆動力は膜透過反応の V_{max} を上昇させると共に, 反応系の ATP に対する親和性を顕著に増加させる.⁹⁾
- ② 外膜蛋白質 OmpA の前駆体の膜透過は, プロトン駆動力非存在下では, C 末端領域の膜透過が律速段階になる. このような条件下では, 膜透過を完了していない透過中間体が検出されるが, プロトン駆動力存在下では中間体は全く検出されない. また中間体の蓄積後にプロトン駆動力を形成させると, 中間体は直ちに膜透過を完了する.¹⁰⁾ OmpA 前駆体の C 末端領域に存在する 2 つのシスチン残基間にジスルフィド結合を形成させると, このような前駆体はプロトン駆動力存在下でのみ膜透過を完了でき

Fig. 2. *In Vitro* Protein Translocation System

る。ATP のみが存在している場合は、ジスルフィド結合部分で膜透過が停止した中間体が検出される。中間体が膜透過を完了するためには、プロトン駆動力のみが必要であり、ATP の加水分解は必要ではない。¹¹⁾

③ プロトン駆動力要求性の程度は、前駆体蛋白質の種類によって異なる。¹²⁾ 特に成熟体蛋白質の N 末端近傍にプロリン残基が存在する前駆体蛋白質は、プロトン駆動力非存在下での膜透過速度が早い。¹³⁾

④ 成熟体部分に電荷を持たない蛋白質の膜透過もプロトン駆動力を要求する。¹⁴⁾ したがって、蛋白質の負に荷電した部分が電気泳動的に膜内を移動するために膜電位が必要になるのではなく、また塩基性残基を膜透過され易い非解離型にするために、 ΔpH の形成が必要になるのでもない。

⑤ プロトン駆動力は電位差 (膜電位) と ΔpH から構成されているが、膜電位と ΔpH はどちらも蛋白質の膜透過を促進する。⁷⁾

これらの知見を総合すると、プロトン駆動力は膜透過系を直接活性化することによって、膜透過しにくい構造を持った前駆体蛋白質でも効率よく膜透過させると考えられる。Driessen と Wickner は、蛋白質膜透過反応の速度が重水中では遅くなることから、膜透過にはプロトンの移動を伴うことを示唆している。¹⁵⁾ 蛋白質の膜透過は、プロトン駆動力の方向とは逆方向になる。最近我々は、蛋白質膜透過系が蛋白質/プロトン-アンチポーター用の活性を持っていることを示唆する結果を得た。¹⁶⁾ アンチポーター活性は、プロトン駆動力の膜透過系に対する作用機構を示していると考えられ興味深い。

5. SecA 蛋白質

SecA は分子量 102000 の ATPase 活性を持つ蛋白質である。¹⁷⁾ 反転膜小胞には、通常一定レベルの SecA が存在し、特に SecA を添加しなくても膜透過活性は検出できる。しかし添加すると反応は顕著に促進される。膜に結合している SecA は、膜を尿素処理すると除去できる。このような膜では、蛋白質の膜透過は SecA の添加を必要とする。¹⁸⁾ したがって SecA は必須の因子である。細胞に存在する大部分の SecA は、細胞質の可溶性画分として存在している。存在状態の異なる SecA が、蛋白質の膜透過とどう関わっているかは不明である。

SecA の ATPase 活性は、反転膜小胞と前駆体蛋白質の添加によって促進される。この促進された活性を、Lill らは translocation ATPase と呼んでいる。¹⁹⁾ 我々は SecY, SecE を大量発現した膜を用いると、通常の膜に比べ translocation ATPase 活性が約 6 倍高くなることを見いだした。¹⁶⁾ また SecY に対する抗体で膜を処理すると、translocation ATPase 活性は阻害される。¹⁹⁾ しかし Lill らによると、加えた前駆体蛋白質 1 分子当り、約 1000 分子の ATP が分解されていることになる。また膜透過の障害となるような化学修飾を加えた proOmpA を用いても、translocation ATPase 活性は促進を受ける。²⁰⁾ この結果は、translocation ATPase 活性が、蛋白質の完全な膜透過に共役したものではなく、膜透過の初期反応のみに共役していることを示唆している。ATP の分解がどのような変化を SecA にもたらして蛋白質の膜透過を開始するのかは、今後の研究課題である。

SecA は ATP や前駆体蛋白質だけでなく、細胞質膜、酸性リン脂質とも親和性を持っている。これらと SecA が相互作用すると、SecA の構造が変化し、プロテアーゼに対する感受性が変化することが明らかとなっている。²¹⁾ SecA は、N 末端領域に ATP、前駆体蛋白質と親和性のある部位を持っている。²²⁾

尿素処理によって SecA が膜から除去されたり、反応液に添加した SecA が膜透過を促進することは、SecA は膜表在性の因子として蛋白質膜透過反応に関与していることを示している。一方、プロトン駆動力によって膜透過反応の ATP に対する親和性が変化することは、SecA は膜表在性で

ありながら、膜を介したエネルギーであるプロトン駆動力に影響されることを示唆している。プロトン駆動力の影響は SecY, SecE などの膜内在性因子を経由して、膜表在性の SecA 蛋白質に伝達されることが考えられる。大腸菌の SecA は、海洋細菌 *Vibrio alginolyticus* より調製した反転膜小胞内への蛋白質膜透過も促進する。²³⁾ ATP 要求性は大腸菌の反転膜小胞を用いた場合と同じであるが、*V. alginolyticus* の反転膜小胞を用いると、プロトン駆動力ではなく、ナトリウム駆動力が重要となる。この結果は、プロトン駆動力やナトリウム駆動力が作用するのは、膜内在性の膜透過系因子であることを示唆している。

6. 膜内在性 Sec 因子の精製

SecA¹⁷⁾ や SecB²⁴⁾ は、これらを大量発現した大腸菌から精製され、構造と機能の詳細が研究されている。我々の研究室では、SecY, SecE, SecD, SecF のすべてを大腸菌で大量に発現させることに成功している。²⁵⁾ SecE の発現は単独でも可能であるが、SecY は SecE の大量発現を誘導したときのみ大量発現される。²⁶⁾ このことは、SecY と SecE が膜中で相互作用し、SecY が SecE によって安定化されることを示唆している。膜内在性因子の構造と機能を明らかにするため、我々はまず SecE, 続いて SecY の精製を試みた。

大量発現した SecE は、細胞質膜に局在しており、膜蛋白質全量の約 6% を占める。SecE を 2.5% オクチルグルコシドで可溶化し、pH 7.5 で陰イオン交換カラムで分画すると、SecE は素通り画分に得られた。これに対し、他の多くの蛋白質は樹脂に強く吸着した。SecE を含む素通り画分をゲルろ過カラムで精製すると、純度 80% 以上の精製標品が得られた。²⁷⁾ SecY は SecE に比べ、可溶化が困難な蛋白質であり、条件を詳細に検討する必要がある。2.5% オクチルグルコシドでも、膜蛋白質濃度が高いと一部しか可溶化されなかった。またたとえ可溶化しても、すぐに沈澱してしまいう傾向があった。さらに条件を検討した結果、可溶化時にリン脂質を高濃度存在させれば SecY の可溶化効率が著しく改善されることが判明した。可溶化時の緩衝液の pH が中性以下では、SecY はオクチルグルコシドに不溶であった。可溶化後に生ずる沈澱や、酸性 pH でオクチルグルコシド不溶性の蛋白質には、他の蛋白質はほとんど含まれず、ほぼ SecY のみが存在した。このことは、大腸菌の膜蛋白質の内、SecY はオクチルグルコシドによる可溶化が最も困難な蛋白質であることを示している。ほぼ SecY のみからなる不溶性画分の可溶化を試みたが成功しなかった。

オクチルグルコシドで可溶化した SecY を、150 mM NaCl 存在下に pH 6.95 の陽イオン交換カラムで分離したところ、SecY と少数の蛋白質は樹脂に弱く吸着し素通り画分の少し後に溶出された。一方、大部分の蛋白質はこの条件では樹脂に吸着せず、カラムを素通りした。SecY に富んだ溶出画分をゲルろ過カラムで更に生成し、ほぼ均一な精製標品を得た。²⁸⁾ 我々の研究室では、SecE や SecY だけでなく、SecD, SecF の精製にも成功している。²⁹⁾

7. 膜透過系の再構成

反転膜小胞を用いた *in vitro* 実験系で、膜透過に必須であることが証明されたのは SecA 蛋白質のみである。SecY などの膜内在性因子が膜透過系を構成するかどうかは、精製因子をリポソームに再構成することによって証明しなければならない。未精製の膜蛋白質可溶化画分を用いた再構成は、我々を含め 3 つのグループによって報告された。我々³⁰⁾と Wickner ら³¹⁾のグループの再構成系では、SecY の重要性が示唆されたが、Blobel ら³²⁾のグループは SecY を含まないプロテオリポソームでも活性があると報告した。

Wickner らのグループは更に精製を進め、SecY, SecE 及びバンド 1 と呼ばれる蛋白質が主要成分である分画を得、これを用いて活性のあるプロテオリポソームの再構成を報告した。³³⁾ Wickner らの再構成は、SecY だけでなく SecE の重要性を示唆するものではあったが、個々の因子を均一にまで精製し再構成したものではなく、またバンド 1 が真に重要であるかどうかは不明であっ

Fig. 3. Reconstitution of Protein Translocation System

た。我々は、ほぼ均一に精製した SecA, SecE 及び SecY を用いて再構成を試みた。

我々の再構成系の概略は以下の通りである (Fig. 3)。オクチルグルコシドに可溶化した膜内在性因子を、大腸菌のリン脂質と反応させる。これを 40 倍量の緩衝液で急激に希釈することにより、因子をリポゾームの脂質二重層内に組み込む。再構成プロテオリポゾームは超遠心によって回収し、緩衝液に懸濁後ドライアイス・エタノール中で凍結し、室温で融解する。プロテオリポゾーム懸濁液を数秒間超音波処理した後、精製 SecA 存在下で蛋白質の膜透過活性を調べる。

SecE や SecY の精製は、得られた溶出画分を再構成し、その活性を調べながら行った。活性のあるプロテオリポゾームの再構成は、常に SecE と SecY 両方を持つ画分を用いた時のみ得られた。他の蛋白質の有無に関わらず、どちらかを欠くと活性は検出できなかった。SecA, SecE 及び SecY

Fig. 4. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Purified SecY, SecE and SecA
 SecY, 0.8 μ g; SecE, 1.0 μ g; SecA 1.4 μ g.

Fig. 5. Effects of SecY, SecE and SecA on the Reconstitution of Protein Translocation System²⁸⁾

Proteoliposomes were reconstituted from 1.9 μ g (0.14 nmol) of SecE and various amounts of SecY (A), or 3 μ g (0.06 nmol) of SecY and various amounts of SecE (B). Protein translocation into the reconstituted proteoliposomes was assayed in the presence (●) or absence (○) of 60 μ g/ml of SecA using [³⁵S]proOmpA D-26 as a substrate at 37°C for 20 min. The amounts of translocated protein are expressed as percentages of the input precursor protein.

の最終精製標品 (Fig. 4) を用いてプロテオリポソームを再構成し, その活性を調べた (Fig. 5).²⁸⁾ Fig. 4 から明らかなように, 最終精製標品には, バンド 1 は含まれていない. Fig. 5 の結果は, SecA, SecE, SecY がいずれも必須の因子であることを示している. また, これら 3 種の因子のみで膜透過系が再構成されることも明らかとなった. 膜透過系に関与しているとされる因子の中でも, SecA, SecE, SecY が特に重要な働きをしていることを示すものであろう.

8. SecY と SecE の構造と機能

SecY と SecE はどちらも細胞質膜内在性の蛋白質である. 遺伝学的解析から, SecY は 10 カ所,³⁴⁾ SecE は 3 カ所³⁵⁾の膜貫通領域を持っていることが示されている. SecY は可溶化後, 外膜蛋白質 OmpT プロテアーゼによって 2 つのポリペプチドに切断される.³⁶⁾ 我々は, 切断された SecY が再構成活性を有していることを示した.³⁷⁾ 一方, SecE 蛋白質は 3 番目の膜貫通領域のみ存在すれば機能しうることが, 遺伝学的に示唆されている.³⁸⁾ そこで我々は, 3 番目の膜貫通領域を含む C 末端領域のみの変異 SecE 蛋白質を遺伝子工学的に作成し, 変異 SecE 蛋白質を精製した. この変異 SecE 蛋白質と SecY からプロテオリポソームを再構成すると, 野生型 SecE を用いた場合の約 50% の膜透過活性を有していた.³⁹⁾ またこの変異 SecE が SecY と相互作用していることを示す結果を得た. これらの結果は, SecE 蛋白質の機能は C 末端領域に集中していることを示している.

9. 今後の展望

蛋白質膜透過には, SecE, SecY, SecA の他に, SecD, SecF 等の Sec 因子が関与していることが示されている. SecE, SecY, SecA のみからなる再構成プロテオリポソームの膜透過速度は, 反転膜小胞に比べかなり低い. このことは, これら 3 種の因子から膜透過系の基本装置は構築できるが, 完全な装置の構築には, 他の因子を必要とすることを示唆している. これらの因子には, SecD, SecF あるいは, 真核細胞のシグナル認識粒子 (signal recognition particle, SRP) を構成する因子と類似性のある大腸菌の因子,^{40,41)} あるいはシグナルペプチダーゼ等更に数多くの因子が考えられる (Fig. 6). SecE, SecY, SecA を中心とする膜透過装置に, これらの因子がどのような関与をしているかを明らかにすることが今後の重要な課題である.

Fig. 6. Protein Translocation Machinery of *E. coli*

大腸菌における蛋白質の膜透過は、ATP とプロトン駆動力の両方を要求する特徴を持っている。ATP 加水分解やプロトン駆動力が、膜透過装置あるいはそれを構成する因子にどのような影響を与え、蛋白質の膜透過が進行するかは、依然として中心的な研究課題である。

我々の研究室では、シグナルペプチド N 末端の正電荷だけでなく、それに続く疎水性領域にも膜透過を左右する重要な情報があることを明らかにしている。⁴²⁾ また成熟体部分の C 末端近傍にペプチド結合以外の構造を有する蛋白質でも、膜透過することを見いだしている。⁴³⁾ 前駆体蛋白質のどの部分が膜透過装置によって認識されるかも、更に詳細に解析する必要がある。蛋白質膜透過装置の全体像を描き出すためには、膜透過装置の構造と機能、エネルギー要求機構、基質となる前駆体蛋白質の構造的特性について総合的に明らかにすることが必要であろう。

謝辞 本総説は、東京大学応用微生物研究所 水島昭二教授の研究室で得られた知見を中心に述べたものである。水島先生のご支援をはじめ、研究室の皆様のご協力に深く感謝いたします。

引用文献及び注

- 1) 水島昭二編, “タンパク質の細胞内輸送と膜透過,” 東京化学同人, 東京, 1987.
- 2) G. Blobel, B. Dobberstein, *J. Cell. Biol.*, **67**, 835 (1975).
- 3) M. Akita, S. Sasaki, S. Matsuyama, S. Mizushima, *J. Biol. Chem.*, **265**, 8164 (1990).
- 4) S. Sasaki, S. Matsuyama, S. Mizushima, *J. Biol. Chem.*, **265**, 4358 (1990).
- 5) M. Inouye, S. Halegoua, *Crit. Rev. Biochem.*, **7**, 339 (1980).
- 6) K. L. Bieker, G. J. Phillips, T. J. Silhavy, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 291 (1990).
- 7) S. Mizushima, H. Tokuda, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 389 (1990).
- 8) J. Fandl, P. C. Tai, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 369 (1990).
- 9) K. Shiozuka, K. Tani, S. Mizushima, H. Tokuda, *J. Biol. Chem.*, **265**, 18843 (1990).
- 10) K. Tani, K. Shiozuka, H. Tokuda, S. Mizushima, *J. Biol. Chem.*, **264**, 18582 (1989).
- 11) K. Tani, H. Tokuda, S. Mizushima, *J. Biol. Chem.*, **265**, 17341 (1990).
- 12) H. Yamada, H. Tokuda, S. Mizushima, *J. Biol. Chem.*, **264**, 1723 (1989).
- 13) H. M. Lu, H. Yamada, S. Mizushima, *J. Biol. Chem.*, **266**, 9977 (1991).
- 14) M. Kato, H. Tokuda, S. Mizushima, *J. Biol. Chem.*, **267**, 413 (1992).
- 15) A. J. M. Driessen, W. Wickner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 2471 (1991).
- 16) S. Kawasaki, S. Mizushima, H. Tokuda, 投稿中.
- 17) D. B. Oliver, R. J. Cabelli, G. P. Jarosik, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 311 (1990).
- 18) H. Kawasaki, S. Matsuyama, S. Sasaki, M. Akita, S. Mizushima, *FEBS Lett.*, **242**, 431 (1989).
- 19) R. Lill, K. Cunningham, L. A. Brundage, K. Ito, D. Oliver, W. Wickner, *EMBO J.*, **8**, 961 (1989).
- 20) E. Shiebel, A. J. M. Driessen, F.-U. Hartl, W. Wickner, *Cell*, **64**, 927 (1991).
- 21) A. Shinkai, H. M. Lu, H. Tokuda, S. Mizushima, *J. Biol. Chem.*, **266**, 5827 (1991).
- 22) E. Kimura, M. Akita, S. Matsuyama, S. Mizushima, *J. Biol. Chem.*, **266**, 6600 (1991).
- 23) H. Tokuda, Y. J. Kim, S. Mizushima, *FEBS Lett.*, **264**, 10 (1990).
- 24) C. A. Kumamoto, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 337 (1990).
- 25) S. Mizushima, H. Tokuda, S. Matsuyama, “Methods in Cell Biology,” Vol. 34, A. M. Tartakoff ed., Academic Press, New York, 1991, pp. 107—165.
- 26) S. Matsuyama, J. Akimaru, S. Mizushima, *FEBS Lett.*, **269**, 96 (1990).

- 27) H. Tokuda, J. Akimaru, S. Matsuyama, K. Nishiyama, S. Mizushima, *FEBS Lett.*, **279**, 233 (1991).
- 28) J. Akimaru, S. Matsuyama, H. Tokuda, S. Mizushima, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 6545 (1991).
- 29) S. Matsuyama, Y. Fujita, K. Sagara, S. Mizushima, *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
- 30) H. Tokuda, K. Shiozuka, S. Mizushima, *Eur. J. Biochem.*, **192**, 583 (1990).
- 31) A. J. M. Driessen, W. Wickner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 3107 (1990).
- 32) M. Watanabe, C. V. Nicchitta, G. Blobel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 3107 (1990).
- 33) L. Brundage, J. P. Hendrick, E. Schiebel, A. J. M. Driessen, W. Wickner, *Cell*, **62**, 649 (1990).
- 34) K. Ito, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **22**, 353 (1990).
- 35) P. J. Schatz, P. D. Riggs, A. Jacq, M. J. Fath, J. Beckwith, *Genes Dev.*, **3**, 1035 (1989).
- 36) Y. Akiyama, K. Ito, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **167**, 711 (1990).
- 37) K. Nishiyama, Y. Kabuyama, J. Akimaru, S. Matsuyama, H. Tokuda, S. Mizushima, *Biochim. Biophys. Acta*, **1065**, 89 (1991).
- 38) P. J. Schatz, K. L. Bieker, K. M. Ottemann, T. J. Silhavy, J. Beckwith, *EMBO J.*, **10**, 1749 (1991).
- 39) K. Nishiyama, S. Mizushima, H. Tokuda, *J. Biol. Chem.*, **267**, 7170 (1992).
- 40) M. A. Poritz, H. D. Bernstein, K. Strub, D. Zopf, H. Wilhelm, P. Walter, *Science*, **250**, 1111 (1990).
- 41) V. Rikes, K. Romisch, A. Giner, B. Dobberstein, D. Tollervey, *Cell*, **63**, 591 (1990).
- 42) C. Hikita, S. Mizushima, *J. Biol. Chem.*, **267**, 4882 (1992).
- 43) 加藤雅士, 水島昭二, 第 64 回日本生化学会大会講演要旨集, 東京, 1991, p. 710.