

京都大学ウイルス研究所 教授

伊藤 維昭

「タンパク質の膜を越えたダイナミズムを支える細胞機能の解明」

1. 研究実施の概要

タンパク質が細胞の特定の場所に配置され細胞を形づくる際の、膜を越えた分泌輸送、膜組み込み、局在化、構造形成、分解過程などを司る細胞機構の実体解明を目指して研究した。モデル生物として大腸菌を用い、タンパク質膜透過チャネル因子 SecYEG、輸送 ATPase SecA、膜タンパク質の分解制御にかかわる FtsH 複合体、YaeL プロテアーゼ等のダイナミックな働きを解明し、また、分泌タンパク質のジスルフィド結合形成装置 Dsb、リポタンパク質の外膜への局在化装置 Lol、などの構造と機能を明らかにした。研究は、京都大学ウイルス研究所・伊藤維昭研究室（細胞機能グループ）と東京大学分子細胞生物学研究所・徳田元研究室（分子機能グループ）がチームを組んで行った。

膜透過装置の解析では、分泌タンパク質の膜を越えた輸送を司る Sec 膜透過装置の構造と機能を研究した。SecA の膜への挿入と脱離サイクル（SecA サイクル）を直接の駆動力として、膜内在性タンパク質複合体 SecYEG を介してこの過程が起こることを示した。種々の SecY 変異、SecA の解析から、SecYEG-SecA 複合体におけるサブユニット相互作用や SecA 分子内の相互作用による ATPase 活性制御機構を明らかにした。また、SecG は自らの膜配向性を反転させることによって、SecA の膜挿入・脱離サイクルを促進することを明らかにし、膜透過反応における、プロトン駆動力の役割を詳しく調べた。これらの研究によって、膜輸送反応の駆動力である SecA サイクルが SecG、酸性リン脂質、プロトン駆動力によって促進される機構を解明した。また、多くの生化学的、および遺伝学的知識が集積した。同時に、構造生物学的解析に向けて、高度好熱菌の SecA、SecYE の実験系を開発・確立した。

一方、SecA の発現制御の研究を行い、SecM (Secretion Monitor) を同定し、新生 SecM ポリペプチドがリボソームの内部で exit tunnel の成分と相互作用すること、およびこの相互作用が合成途上分子の膜透過状態による制御を受けることを発見した。この研究により細胞の分泌活性の変動に応じた SecA の翻訳制御機構を開明し、同時にリボソーム内部のトンネルによる翻訳制御の新分野を開拓することができた。

膜タンパク質分解系の解析では、膜結合型 ATPase・プロテアーゼである FtsH が異常な膜タンパク質を除去するため、細胞質に一定の長さ以上が露出した末端から分解を開始し、膜から細胞質に逆輸送しつつ加水分解を行うことを示した。FtsH は、膜という疎水環境にあるタンパク質に対する効率的な加水分解のための装置であるが、我々は膜近傍における、制御された切断反応 (Regulated Intramembrane Proteolysis) を司る新たな膜結合プロテアーゼ YaeL を同定した。YaeL は σE 表層ストレス応答経路を、anti- σE (RseA) の 2 段階目の切断を促すことによって活性化することを発見した。また、大腸菌の表層ストレス応答系が細胞質膜の内在性膜タンパク質の異常に応答することを見だし、膜結合型亜鉛メタルプロテアーゼ HtpX が Cpx ストレス応答経路による発現制御を受けることを見いだした。

リポタンパク質の選別装置の解析では、外膜への選別装置 (LolABCDE) を発見し、その構造と機能を開明した。LolCDE は膜からのリポタンパク質の遊離を触媒する前例のない

い特異な ABC トランスポーターであることを示し、リポ蛋白質の選別シグナルは、LolCDE によって認識されることを明らかにした。また、LolCDE の ATPase 活性に対するリポ蛋白質選別シグナルの影響を調べ、内膜局在化シグナルは LolCDE による認識を避けるシグナルであることを明らかにした。N 末端 Cys 残基のアミノ基に結合しているアシル基は、LolCDE による認識に必須であることを明らかにした。リポ蛋白質特異的分子シャペロン LolA の結晶構造を解明し、リポ蛋白質との複合体形成機構の解明が大きく前進した。

タンパク質のジスルフィド結合形成装置の研究では、DsbA によって導入されたジスルフィド結合が DsbC によって、矯正されること、DsbA は膜タンパク質 DsbB によって再酸化されるが、DsbA-DsbB 系が働くためには、細胞の呼吸鎖機能が必要であることを発見した。DsbB の CXXC モチーフは呼吸鎖成分（キノン）を介して酸素によって強く酸化されていることを示し、キノンによる酸化に重要な DsbB 領域を同定した。さらに、DsbA-DsbB 間の相互作用の生化学解析を行い、レドックスポテンシャルの逆転現象を見いだした。

細胞機能グループ

膜透過装置の研究では、分泌タンパク質の膜を越えた輸送反応は、SecA の膜への挿入と脱離サイクル (SecA サイクル) を直接の駆動力として、膜内在性タンパク質複合体 SecYEG を介して起こる。この細胞にとって基本的な反応を司る装置の実体解明が進み、構造生物学に結びつける段階に達した。また、研究はリボソームによる翻訳制御の分野にも及び、翻訳と膜タンパク質の組込み機構などへの発展も期待される状況となった。SecYEG チャネルの構造と機能、SecYEG と SecA の相互作用と膜透過駆動機構、SecA の活性制御、SecA の発現制御とリボソームの役割、高度好熱菌の SecA、SecYE 複合体の解析などをおこなった。膜タンパク質分解系の解析では、膜結合型 ATPase・プロテアーゼである FtsH を、SecY を分解するプロテアーゼとして同定し、それが制御因子 HflKC と複合体を形成することなどを明らかにしてきた。膜タンパク質品質管理及びシグナル伝達制御に関わる新たな膜プロテアーゼを見出し、その細胞機能についての解析も進めた。FtsH が膜タンパク質を引きずり出す実際のメカニズムやその過程でのエネルギー利用、HflKC 等の制御タンパク質の作用機構、YaeL による RseA の 2 段階切断の機構とその制御など、新たな問題点を発掘し、in vitro アッセイ系や構造解析による分子メカニズムの解明へと進展させる準備が整った。FtsH の構造と機能、FtsH による膜タンパク質の逆輸送と分解、膜におけるストレス応答とクオリティーコントロール、YaeL プロテアーゼと RIP による制御系に関して、研究を行った。ジスルフィド結合形成装置の解析では大腸菌のペリプラズムにおけるタンパク質のジスルフィド結合形成を司る、DsbA、DsbB、DsbC などの機能解析を in vivo、in vitro で行った。

分子機能グループ

輸送装置を構成する因子 SecA は、ATP と分泌タンパク質を結合すると膜内に深く挿入

し、ATP 加水分解で膜から脱離する。この時、膜内在性タンパク質 SecG の配向性は反転し、その後、元の配向性を回復する。SecG の構造変化の役割を追求し、以下の知見を得た。secG 欠失変異によって、生育と分泌タンパク質の膜輸送が低温感受性になる。この低温感受性は、リン脂質生合成に関与する遺伝子 *gnsA* (グリセロール-3-リン酸脱水素酵素) や *pgsA* (ホスファチジルグリセロリン酸合成酵素) を過剰発現すると抑制されることを見いだした。*pgsA* の過剰発現によって酸性リン脂質量が増加し、 Δ secG 変異だけでなく、低温感受性 *secA* 変異 (*secAcsR11*) も特異的に抑制することを明らかにした。さらに、 Δ secG-*secAcsR11* 二重変異は致命的になることから、両因子の構造変化は協調して起きることが示唆された。そこで、*pgsA* 過剰発現による酸性リン脂質量の上昇と、SecG の有無が SecA の膜挿入に与える影響を調べ、SecG は SecA の膜挿入を促進すること、SecG が無い時は酸性リン脂質量の増加によって SecA の膜挿入が促進されること、これには SecA の ATPase 活性促進が伴うことを明らかにした。これらの知見により、SecA の膜挿入・脱離サイクルを促進することが SecG の構造変化の重要な役割であることが明らかとなった。SecG の構造変化をシステイン特異的の化学修飾によって検出する実験系を確立した。さらに、SecG は膜内配向性を反転した時、SecA と膜中で強く相互作用することを見いだした。膜透過反応は、プロトン駆動力によって強く促進されるが、この機構はこれまで不明であった。SecA サイクルに対するプロトン駆動力の影響を調べ、プロトン駆動力は SecA の膜からの脱離過程を促進することを明らかにした。これらの研究によって、膜輸送反応の駆動力である SecA サイクルが SecG、酸性リン脂質、プロトン駆動力によって促進される機構を解明した。

外膜特異的リポタンパク質を内膜から遊離させる LolCDE 複合体を発見し、遺伝子の塩基配列を明らかにし、大量発現・精製ならびに再構成実験系を確立した。LolCDE は ABC トランスポーターファミリーに属するが、前例のない膜からの遊離を触媒する特異な ABC トランスポーターであることを示した。これによって、リポタンパク質の選別と膜局在化機構に関与する 5 種類の因子 (LolABCDE) がすべて解明された。また、すべての因子が大腸菌に必須であることを、遺伝子破壊株を構築して明らかにした。+2 位が Asp のリポタンパク質は内膜に、Asp 以外のアミノ酸を +2 位にもつりポタンパク質は外膜に局在化する。+2 位の Asp が内膜シグナルとして機能するためには、+3 位のアミノ酸が重要であること、天然の内膜特異的リポタンパク質はすべて、+2 位の Asp を内膜シグナルにするためのアミノ酸を +3 位にもっていることを明らかにした。リポタンパク質の膜局在化シグナルは、LolCDE 複合体によって選別されていること、内膜シグナルは LolCDE の認識を回避するシグナルであるため、リポタンパク質は遊離せず内膜にとどまることを明らかにした。このような性質のシグナルは、他のタンパク質局在化系では知られていない。大腸菌に存在する 90 種以上のリポタンパク質は、すべて Lol システムによって選別され膜に局在化すると考えられることを明らかにした。外膜特異的的主要リポタンパク質 (Lpp) が誤って内膜に局在すると致死的作用を示すことを見いだした。ペリプラズムの分子シャ

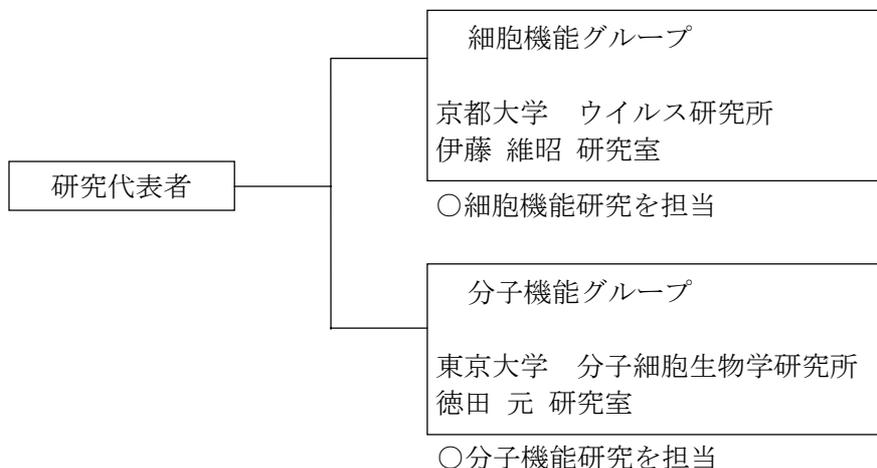
ペロン LolA 変異体を分離し、リポタンパク質、LolCDE、LolB との相互作用を解析し、Lol システムの分子機構の詳細を明らかにした。さらに、LolA と LolB の結晶構造を解明し、アミノ酸配列に相同性がないにもかかわらず、両因子の結晶構造は極めてよく似ていることを明らかにした。これらの研究成果によって、Lol システムによるリポタンパク質の選別と膜局在化機構の全体像解明に大きく前進した。

2. 研究構想

遺伝情報の翻訳産物としてのタンパク質の細胞内での動きと配置、正しい立体構造の獲得などの諸過程が効率よく的確に起こるために細胞に備えられたメカニズムの解明を目的とした。特に、ゲノムから細胞への道筋の重要な問題の一つとしてタンパク質の動きと細胞膜の関係をとりあげた。我々は、大腸菌細胞質膜におけるタンパク質膜透過チャンネルを構成する SecY、SecE、SecG のうち SecY (伊藤)、SecG (徳田) を発見したが、現在この3者複合体に相当するもの (小胞体膜では Sec61 複合体) が全生物を通じて保存されていることが知られている。これらのタンパク質因子はタンパク質の膜を越えた輸送を行うものであるが、同時にこれらのあるものはそれ自身が膜を横切るダイナミックな動きを伴ってその機能を発揮する。SecA ATPase は ATP 結合に伴い膜を横断するほど深く挿入し、ATP の加水分解を伴ってもとに戻る。また、SecG はその膜貫通領域の配向性を逆転させる。このような驚くべきタンパク質のダイナミズムの実体を解明を目指した。細胞表層タンパク質のダイナミズムは膜透過に引き続く構造形成、選別の過程を経て完結する。また、このような膜内在性装置の機能は膜におけるタンパク質分解装置などによるクオリティコントロール機構によって維持される。本研究は、タンパク質の膜を越えたダイナミックな動きがいかんして成し遂げられるかを中心として、研究代表者らの開発・発見になるユニークな研究系を用いて、細胞機構と分子機構の両面から解明を目指したものである。この目的のため、京都大学ウイルス研究所・伊藤維昭研究室 (細胞機能グループ) と東京大学分子細胞生物学研究所・徳田元研究室 (分子機能グループ) がチームを組んで、分担しつつ協力して行った。

3. 研究実施体制

(1) 体制



4. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 13 年 3 月 13 日～ 平成 13 年 3 月 16 日	国際シンポジウム 「AAA 蛋白質：多彩な 細胞機能と共通分子 基盤」	ホテル京都 ガーデンパ レス	115 (国内 54、 海外 64)	様々な生物、実験系で AAA ATPase を研究している研 究者が世界から集まり集 中の研究発表と討論を 行った。文部省国際シンポ ジウム開催経費による援 助も受けた

チーム内ミーティング

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 11 年 3 月 11 日～ 平成 11 年 3 月 12 日	第 1 回京大・東大合同 研究発表会	静岡県 伊豆長岡	27	CREST の研究プロジェクト に関して、京大・東大両 研究グループ間で議論し、 研究の発展を図った。
平成 12 年 3 月 23 日～ 平成 12 年 3 月 24 日	第 2 回京大・東大合 同研究発表会	愛知県 蒲郡市	30	伊藤グループ及び徳田 グループの研究進展状 況について討議した。

5. 主な研究成果

(1) 論文発表 (国内 4 件、海外 61 件)

細胞機能グループ (国内 1 件、海外 36 件)

1. Akiyama, Y., and Ito, K. FtsH. pp.1502-1504., Handbook of Proteolytic Enzymes (ed. Barrett, A. D., Rawlings, and N. D., Woessner, J. F., Jr.). Academic Press. (1998)
2. Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. Different pathways for protein degradation by the FtsH/HflKC membrane-embedded protease complex: an implication from the interference by a mutant form of a new substrate protein, YccA. J. Mol. Biol. 279, 175-188. (1998)
3. Akiyama, Y., Ehrmann, M., Kihara, A. and Ito, K. Polypeptide-binding of *E. coli* FtsH. Mol. Microbiol. 28, 803-812. (1998)
4. Matsuo, E. and Ito, K. Genetic analysis of an essential cytoplasmic domain of *Escherichia coli* SecY based on resistance to Syd, a SecY-interacting protein. Mol. Gen. Genet. 258, 240-249. (1998)
5. Matsuo, E., Mori, H., Shimoike, T. and Ito, K. Syd, a SecY-interacting protein, excludes SecA from the SecYE complex with an altered SecY24 subunit. J. Biol. Chem. 273, 18835-18840. (1998)
6. Ukai, H., Matsuzawa, H., Ito, K., Yamada, M. and Nishimura, A. *ftsE(Ts)* affects translocation of K⁺-pump proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180, 3663-3670. (1998)
7. Akiyama, Y., Kihara, A., Mori, H., Ogura, T. and Ito, K. Roles of the periplasmic domain of *Escherichia coli* FtsH (HflB) in protein interactions and activity modulation. J. Biol. Chem., 273, 22326-22333. (1998)
8. Kihara, A. and Ito, K. Translocation, folding and stability of the HflKC complex with signal-anchor topogenic sequences. J. Biol. Chem., 273, 29770-29775. (1998)
9. Matsumoto, G., Mori, H. and Ito, K. Roles of SecG in ATP- and SecA-dependent protein translocation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13567-13572. (1998)
10. Ito, K., Matsuo, E. and Akiyama, Y. A class of integral membrane proteins will be overlooked by the "proteome" study that is based on two-dimensional gel electrophoresis. Mol. Microbiol. 31, 1600-1601. (1999)
11. Akiyama, Y. Self-processing of FtsH and its implication for the cleavage specificity of this protease. Biochemistry 38, 11693-11699. (1999)
12. Kobayashi, T. and Ito, K. Respiratory chain strongly oxidizes the CXXC motif of DsbB in the *Escherichia coli* disulfide-bond formation pathway. EMBO J. 18, 1192-1198. (1999)
13. Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. EMBO J. 18, 2970-2981. (1999)
14. Matsuo, E., Sampei, G., Mizobuchi, K. and Ito, K. The plasmid F OmpP protease, a homologue of OmpT, as a potential obstacle to *E. coli*-based protein production. FEBS Lett. 461, 6-8. (1999)
15. Matsumoto, G., Homma, T., Mori, H. and Ito, K. A mutation in *secY* that causes enhanced SecA insertion and impaired late functions in protein translocation. J. Bacteriol., 182, 3377-3382. (2000)
16. Nakatogawa, H., Mori, H., Matsumoto, G. and Ito, K. Characterization of a mutant form of

- SecA that alleviates a SecY defect at low temperature and shows a synthetic defect with the SecY alteration at high temperature. *J. Biochem.*, 127, 1071 - 1079. (2000)
17. Chiba, S., Akiyama, Y., Mori, H., Matsuo, E. and Ito, K. Length recognition at the N-terminal tail for the initiation of FtsH-mediated proteolysis. *EMBO Reports* 1, 47-52. (2000)
 18. Akiyama, Y. and Ito, K. Roles of multimerization and membrane association in the proteolytic functions of FtsH (HflB). *EMBO J.* 19, 3888-3895. (2000)
 19. Tatsuta, T., Joo, D. M., Calendar, R., Akiyama, Y. and Ogura, T. Evidence for an active role of the DnaK chaperone system in the degradation of σ^{32} . *FEBS Lett.* 478, 271-275. (2000)
 20. Nakatogawa, H., Mori, H. and Ito, K. Two independent mechanisms down-regulate the intrinsic SecA ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 275, 33209-33212. (2000)
 21. Matsumoto, G., Nakatogawa, H., Mori, H. and Ito, K. Genetic dissection of SecA: suppressor mutations against the *secY205* translocase defect. *Genes Cells*, 5, 991-1000. (2000)
 22. 伊藤維昭 (2000) 細胞質膜を舞台としたタンパク質の通過儀礼。タンパク質の一生-タンパク質の誕生、成熟から死まで シリーズ「バイオサイエンスの新世紀」(中野明彦、遠藤斗志也 編、日本生化学会編集) pp.75-91。
 23. Kobayashi, T., Takahashi, Y., and Ito, K. Identification of a segment of DsbB essential for its respiration-coupled oxidation. *Mol. Microbiol.* 39, 158-165. (2001)
 24. Nakatogawa, H. and Ito, K. Secretion monitor, SecM, undergoes self translation arrest in the cytosol. *Mol. Cell* 7, 185-192. (2001)
 25. Mori, H. and Ito, K. An essential amino acid residue in protein translocation channel revealed by targeted random mutagenesis of SecY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 5128-5133. (2001)
 26. Mori, H. and Ito, K. The Sec protein-translocation pathway. *Trends Microbiol.* 9, 494-500. (2001)
 27. Kihara, A., Akiyama, Y. and Ito, K. Revisiting the lysogenization control of bacteriophage λ : Identification and characterization of a new host component, HflD. *J. Biol. Chem.* 276, 13695-13700. (2001)
 28. Akiyama, Y. and Ito, K. Roles of the homo-oligomerization and membrane association in the ATPase and the proteolytic activities of FtsH *in vitro*. *Biochemistry* 40, 7687-7693. (2001)
 29. Kanehara, K., Akiyama, Y. and Ito, K. Characterization of the *yaeL* gene product and its S2P-protease motifs in *Escherichia coli*. *Gene*, 281, 71-79. (2001)
 30. Nakatogawa, H. and Ito, K. The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate. *Cell* 108, 629-636. (2002)
 31. Chiba, K., Mori, H. and Ito, K. Roles of the C-terminal end of SecY in protein translocation and viability of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 2243-2250. (2002)
 32. Inaba, K. and Ito, K. Paradoxical redox properties of DsbB and DsbA in the protein disulfide-introducing reaction cascade. *EMBO J.* 21, 2646-2654. (2002)
 33. Akiyama, Y. Proton-motive force stimulates the proteolytic activity of FtsH, a membrane-bound ATP-dependent protease in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 8066-8071. (2002)
 34. Saikawa, N., Ito, K. and Akiyama, Y. Identification of glutamic acid 479 as the glutamicin coordinator of zinc in FtsH (HflB). *Biochemistry* 41, 1861-1868. (2002)
 35. Chiba, S., Akiyama, Y. and Ito, K. Processive membrane protein degradation by FtsH can be initiated from either end. *J. Bacteriol.* 184, 4775-4782. (2002)

36. Shimohata, N., Chiba, S., Saikawa, N., Ito, K. and Akiyama, Y. The Cpx stress response system of *Escherichia coli* senses plasma membrane proteins and controls HtpX, a membrane protease with cytosolic active site. *Genes Cells*, 7, 653-662. (2002)
37. Kanehara, K., Ito, K. and Akiyama, Y. YaeL (EcfE) activates the σ^E pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti- σ^E , RseA. *Genes Dev.* 16, 2147-2155. (2002)

分子機能グループ (国内 3 件、海外 25 件)

1. Yakushi, T., Yokota, N., Matsuyama, S., and Tokuda, H.: LolA-dependent release of a lipid-modified protein from the inner membrane of *Escherichia coli* requires nucleoside triphosphate. **J. Biol. Chem.** **273**, 32576-32581 (1998)
2. Suzuki, H., Nishiyama, K., and Tokuda, H.: Coupled structure change of SecA and SecG revealed by the synthetic lethality of the *secAcsR11* and Δ *secG::kan* double mutant. **Mol. Microbiol.** **29**, 331-341 (1998)
3. Kunioka, E., Matsuyama, S., and Tokuda, H.: Cloning and expression of the *secA* gene of a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, and analysis of its function in *Escherichia coli*. **Gene** **216**, 303-309 (1998)
4. Nishiyama, K., Furuta, M., and Tokuda, H.: Molecular Cloning and Functional Characterization of SecE of a Marine Bacterium, *Vibrio alginolyticus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **251**, 894-897 (1998)
5. Tajima, T., Yokota, N., Matsuyama, S., and Tokuda, H.: Genetic analyses of the *in vivo* function of LolA, a periplasmic chaperone involved in the outer membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. **FEBS Lett.** **439**, 51-54 (1998)
6. Tokuda, H., and Matsuyama, S.: [Review] Protein traffic from the cytosol to the outer membrane of *Escherichia coli*. in "Protein targeting and translocation" (ed. D. A. Phoenix, Portland Press), 105-119, (1998)
7. 西山賢一、徳田元 蛋白質膜透過装置の構造変化と作動機構。生物物理、**217**, 104-110 (1998)。
8. Yokota, N., Kuroda, T., Matsuyama, S. and Tokuda, H.: Characterization of the LolA-LolB system as the general lipoprotein localization mechanism of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** **274**, 30995-30999 (1999).
9. Suzuki, H., Nishiyama, K. and Tokuda, H.: Increases in acidic phospholipid contents specifically restore protein translocation in a cold-sensitive *secA* or *secG* null mutant. **J. Biol. Chem.** **274**, 31020-31024 (1999).
10. Nishiyama, K., Fukuda, A., Morita, K. and Tokuda, H.: Membrane-deinsertion of SecA underlying proton motive force-dependent stimulation of protein translocation. **EMBO J.** **18**, 1049-1058 (1999).
11. 西山賢一: [総説]大腸菌における分泌タンパク質の膜透過分子機構 —膜透過を駆動する SecA-SecG の構造変化— 生化学 **72**, 1383-1397 (2000) 。
12. Nishiyama, K., Suzuki, H. and Tokuda, H.: Role of the non-essential region encompassing the N-terminal two transmembrane stretches of *Escherichia coli* SecE. **B. B. Biochem.** **64**, 2121-2127 (2000).
13. 薬師寿治、松山伸一、徳田元: [総説] グラム陰性細菌におけるリポ蛋白質の生合成機構 —リポ蛋白質の選別と外膜局在化機構を中心に— 日本細菌学雑誌 **55**, 517-526

- (2000)。
14. Nagamori, S., Nishiyama, K. and Tokuda, H.: Two SecG molecules present in a single protein translocation machinery are functional even after crosslinking. **J. Biochemistry** **128**, 129-137 (2000).
 15. Yakushi, T., Masuda, K., Narita, S., Matsuyama, S. and Tokuda, H.: A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. **Nature Cell Biol.** **2**, 212-218 (2000).
 16. Terada, M., Kuroda, T., Matsuyama, S. and Tokuda, H.: Lipoprotein sorting signals evaluated as the LolA-dependent release of lipoproteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** **276**, 47690-47694 (2001).
 17. Miyamoto, A., Matsuyama, S. and Tokuda, H.: Mutant of LolA, a lipoprotein-specific molecular chaperone of *Escherichia coli*, defective in transfer of lipoproteins to LolB. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **287**, 1125-1128 (2001).
 18. Sugai, R., Shimizu, H., Nishiyama, K. and Tokuda, H.: Overexpression of *yccL* (*gnsA*) and *ydfY* (*gnsB*) increases unsaturated fatty acids, and suppresses both the temperature-sensitive *fabA6* mutation and cold-sensitive *secG* null mutation of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** **183**, 5523-5528 (2001).
 19. Tanaka, K., Matsuyama, S. and Tokuda, H.: Deletion of *lolB* encoding an outer membrane lipoprotein, is lethal for *Escherichia coli* and causes accumulation of lipoprotein localization intermediates in the periplasm. **J. Bacteriol.** **183**, 6538-6542 (2001).
 20. 徳田元、松山伸一：〔総説〕脂質で修飾された蛋白質を膜から遊離させる ABC トランスポーター 蛋白質・核酸・酵素 **46**, 1221-1227 (2001)。
 21. Masuda, K., Matsuyama, S. and Tokuda, H.: Elucidation of the function of lipoprotein-sorting signals that determine membrane localization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **99**, 7390-7395 (2002).
 22. Narita, S., Tanaka, K., Matsuyama, S. and Tokuda, H.: Disruption of *lolCDE*, encoding an ATP-binding cassette transporter, is lethal for *Escherichia coli* and prevents the release of lipoproteins from the inner membrane. **J. Bacteriol.** **184**, 1417-1422 (2002).
 23. Nagamori, S., Nishiyama, K. and Tokuda, H.: Membrane topology inversion of SecG detected by labeling with a membrane-impermeable sulfhydryl reagent and causing close association of SecG with SecA. **J. Biochemistry** **132**, 629-634 (2002).
 24. Miyamoto, A., Matsuyama, S. and Tokuda, H.: Dominant negative mutant of a lipoprotein-specific molecular chaperone, LolA tightly associates with LolCDE. **FEBS Lett.**, **528**, 193-196 (2002).
 25. Fukuda, A., Matsuyama, S., Hara, T., Nakayama, J., Nagasawa, H. and Tokuda, H.: Amino-acylation of the N-terminal cysteine is essential for Lol-dependent release of lipoproteins from membrane but does not depend on lipoprotein sorting signals. **J. Biol. Chem.**, **277**, 43512-43518 (2002).

(2) 特許出願

①国内 なし

②海外 なし

(3) 新聞報道等
なし

(4) その他特記事項
なし