

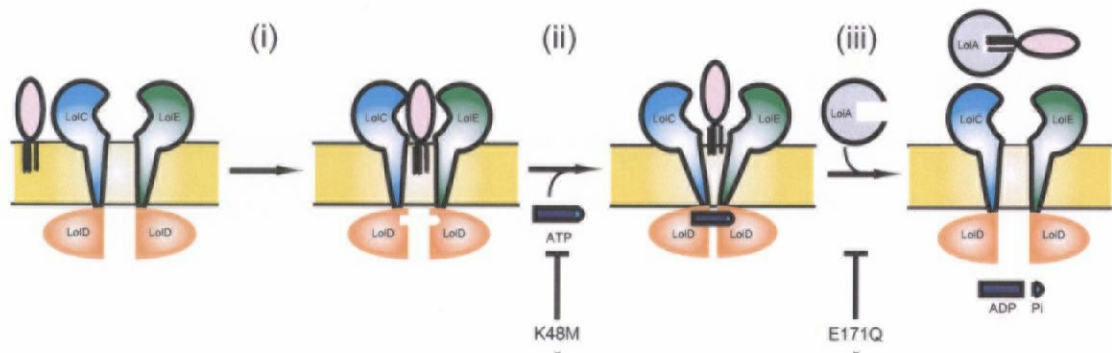
4. 考察

LolCDE の触媒モデル

本実験結果をもとにして、LolCDE によるリポ蛋白質遊離反応の触媒機構を図 25 に示す。反応 (i) ; 単離した基質結合型 LolCDE は内膜上で生成した基質-LolCDE 複合体が可溶化・精製されたものであり、また ATP と結合できない LolCD(K48M)E 変異体は ATP 存在下で基質と結合した。したがって、LolCDE は内膜上で成熟体となった外膜リポ蛋白質を、ATP よりも先に結合すると考えられる。一方で、外膜リポ蛋白質は LolCDE の ATPase 活性を促進することから (Masuda et al., 2002)、LolCDE の触媒サイクルは、基質との結合から始まると考えられる。反応 (ii) ; 基質結合型 LolCDE は、界面活性剤存在下で ATP 依存的に基質を解離し、ATP の結合のみを誘導する (ATP の加水分解が起こらない) 条件下でも同様に基質を解離した。さらに、ATP と結合できても加水分解できない LolCD(E171Q)E 変異体においても、界面活性剤存在下で ATP 依存的に基質を解離した。したがって、LolD による ATP の加水分解ではなく ATP との結合が、LolC および LolE と基質との疎水的相互作用を弱めると考えられる。反応 (iii) ; 基質結合型 LolCDE と大腸菌リン脂質からプロテオリポソームを調製して、LolCDE によるリポ蛋白質遊離反応を解析したところ、リポ蛋白質の遊離には、LolA と ATP 加水分解を要求した。したがって、LolCDE による触媒サイクルを廻すためには、ATP 加水分解に共役した LolA へのリポ蛋白質受け渡しが必要であることが示唆された。本実験により明らかとなった LolCDE の触媒機構は、最近 Higgins と Linton ら (2004) により提唱された“ The ATP switch model ”とよく一致している。本モデルは、一般の排出系 ABC システムで見出された知見をまとめたものであり、ATP の結合と加水分解に伴う NBD 二量体構造の変化 (二量体の形成および解離) が、膜ドメインの構造変化を引き起こすスイッチとなって基質が輸送されていく機構を示したものである。

「1. 序論」でも述べたように、LolCDE は ABC システムに共通した ATP 加水分解機構を利用すると考えられるので、LolD の触媒機構については、“ The ATP switch model ” (Higgins and Linton, 2004) と、LolD と 43.7% の相同性を有する MJ0796 (E171Q) 変異体の結晶構造 (Smith et al., 2002) を参考にして図 25-B に示す。反応 (i) ; 基質存在下では、ATPase サブユニット

A



B

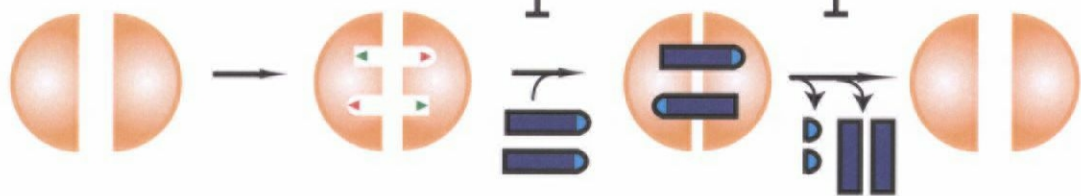


図25 LolCDE によるリポ蛋白質遊離反応モデル

(A) 本実験により明らかとなった LolCDE の触媒機構。LolCDE は内膜上で成熟体となった外膜リポ蛋白質と結合する (i)。LolD による ATP の結合が、基質と膜サブユニット LolC および LolE との相互作用を弱める (ii)。LolCDE の触媒サイクルを廻すためには、LolA へのリポ蛋白質の受け渡しと LolD による ATP 加水分解が要求される (iii)。LolCD_H(K48M)E および LolCD_H(E171Q)E はそれぞれ (ii) および (iii) のステップの進行を阻害する。(B) 一般の ABC システムにおける NBD 触媒機構を参考にした LolD の反応モデル。ATPase サブユニット LolD は、膜サブユニット LolC / E が基質と結合すると、ATP との親和性が高まる (i)。LolD は、ATP との結合に伴い二量体を形成する。片方の Walker モチーフ(緑矢印)ともう片方の ABC signature モチーフ(赤矢印)とが対になって ATP と結合する (ii)。ATP の加水分解により生じた ADP と無機リン酸のうち、無機リン酸が先に遊離し、その後 ADP が遊離してモノマーになる (iii)。

のコンフォメーションが変化して、NBD と ATP との親和性が増し (Mannerling et al., 2001; Qu et al., 2003)、基質が ATPase 活性を促進する (Bishop et al., 1989; Davidson et al., 1992; Scarborough, 1995; van der Heide et al., 2001; van Veen et al., 2000)。反応 (ii) ; ATP 存在下では、片側の ATPase モノマーにおける Walker モチーフともう片側の ATPase モノマーにおける Signature モチーフとが対になって 1 分子の ATP を挟み込み、ダイマーあたり 2 分子の ATP と結合したサンドイッチダイマー構造をとる (Smith et al., 2002)。このとき、MSD のコンフォメーションが変化して (Kreimer et al., 2000; Rosenberg et al., 2003; Rosenberg et al., 2001; Sonveaux et al., 1999; Vigano et al., 2000)、ABC 蛋白質と基質との親和性が低下する (Martin et al., 2001; Rosenberg et al., 2001)。反応 (iii) ; 無機リン酸アナログであるバナジン酸 (Vi) は、ATP の加水分解により生じた無機リン酸 (Pi) と置換して、ABC 蛋白質-ADP-Vi の安定な複合体を形成することから、Pi が遊離した後に ADP が遊離する (Janas et al., 2003; Senior et al., 1995; Sharma and Davidson, 2000)。なお、基質が MSD から外れることにより ATP の加水分解が始まるのか、ATP 加水分解が自発的な反応であるのかは不明である。ATP 加水分解エネルギーは、基質を解離したあとのコンフォメーションをもとに戻すのに必要と考えられている (Higgins and Linton, 2004)。

ATP 加水分解エネルギーの利用

本実験では、ATP の結合エネルギーにより、LolCDE と基質との疎水的相互作用を弱めることが示されたものの、ATP 加水分解エネルギーが何に使われているのかは明らかとしていない。竹田ら (2003) の示したモデルによれば、LolD による ATP 加水分解エネルギーは、LolC / E を介して LolA にまで伝わり、LolA の基質結合ポケットを覆う蓋を開けるのに使われている。現在、LolA(R43L)変異体を用いて、このモデルの検証を進めている。通常の LolA は、43 番目のアルギニンと lid-helix 部分との水素結合により蓋を閉じて安定な構造をとるが、LolA(R43L)ではこの水素結合が破壊されているために蓋を閉じることができない。LolA(R43L)は、通常の LolA と同様に LolCDE からリポ蛋白質を受け取るが、リポ蛋白質との安定な複合体を形成してしまうためにペリプラズムに蓄積する (Miyamoto et al., 2001)。通常は、リポ蛋白質と LolA の複合体はエネルギー的に不安定な中間体であるため、LolA に結

合したりポ蛋白質は速やかに LolB に渡される。

竹田らのモデルが正しければ、基質結合型 LolCDE と大腸菌リン脂質からプロテオリポソームを調製して、LolA(R43L)に依存したりポ蛋白質遊離反応を解析した場合、LolA(R43L)は蓋が開いているために ATP 加水分解エネルギーを利用しなくても基質が膜から遊離するはずである。ただ、図 25-(i)、(ii)は LolA 非依存の反応であるから、ATP 結合エネルギーにより LolC/E と基質との親和性が低下した際に、LolA(R43L)はりポ蛋白質を受け取れるようになると考えられる。したがって、ATP 非加水分解アナログ或いは本実験で作成した LolC(E171Q)E 変異体 (ATP を結合するが加水分解ができない) を用いた解析は大変に興味深い。本実験を通して、図 25-(iii)の反応に関する重要な情報が得られると考えている。

in vitro における基質-LolCDE 複合体形成

本実験において調製された「基質結合型 LolCDE」は、基質遊離反応の機能的な中間体であり、既に報告された数多くの ABC 蛋白質の中で、基質との複合体として精製された初めての例となる。しかしながら、本複合体にはさまざまな外膜リポ蛋白質が含まれるため、基質と LolCDE とのストイキオメトリーを正確に定量することが困難である。そこで、一種類の基質のみを結合した LolCDE 複合体の調製を試みた。

精製した LolC_HE と精製した Pal を、0.01%DDM および±ATP 条件下で混ぜて TALON カラムに吸着させ、洗浄後、イミダゾールで溶出すると、±ATP いずれの条件においても Pal の一部は LolC_HE と共に溶出された。Pal が LolC_HE と機能的な複合体を形成しているのならば、+ATP 条件下では基質との複合体を作り得ないはずであるから、ここで観察された Pal と LolCDE との相互作用は、生理的な機能を反映したものではないと考えられる。LolCDE による基質輸送の方向を考慮すると、外膜リポ蛋白質が細胞膜の外側で LolCDE に対して水平方向から接触することにより、LolCDE と機能的な複合体ができるのではないかと考えられる。つまり、本実験において機能的な複合体が形成されなかったのは、外膜リポ蛋白質がランダムな方向から LolCDE と接触したためと思われた。

そこで、大腸菌リン脂質、フリーの LolC_HE および Pal からプロテオリポソームを調製した後、1%DDM、±ATP 条件下で膜を可溶化して TALON カラムを用いて LolC_HE を精製し

た。ところが、理由は不明であるが LolCD_HE のサブユニット構造が崩れてしまい、基質と LolCDE との相互作用についての正確な解析を行うことができなかった。したがって、*in vitro* における基質と LolCDE との複合体形成の試みは、まだ成功していない。

LolCDE と基質との相互作用

①LolCDE により認識されるリポ蛋白質の部分

本実験で LolCDE との結合が見出された 5 種類の外膜リポ蛋白質 (LolB, YcfM, Pal, NlpC および Lpp) を比べると、蛋白質部分についての相同性は N 末端側のシステイン以外にない。一方で、リポ蛋白質の 3 つの脂肪酸部分の組成は均一ではないが、主に 2 分子のパルミチン酸 (16:0) と 1 分子のバクセン酸 (18:1) からなると考えられている。このことから、LolCDE により認識されるのは、リポ蛋白質の N 末端側システインとアシル基部分からなるユニット (Cys-アシル基) であると考えられる。また、Lnt によるアシル基の付加を受けていないアポリポ蛋白質は、プロテオリポソーム膜に再構成した LolCDE から遊離しない (Fukuda et al., 2002) ことから、リポ蛋白質に 3 本のアシル基が付加されていることが、LolCDE による認識に重要であると考えられる。なお、Pal の +2 位付近までは膜内にあることから (Hara et al., unpublished results)、LolCDE により認識される Cys-アシル基ユニットは全て膜内にあることになる。

②リポ蛋白質を認識する LolCDE の部分

LolCDE が、リポ蛋白質の Cys-アシル基部分 (膜内に存在) を認識しているとするれば、リポ蛋白質を認識する LolCDE 側の部分は、膜貫通領域において脂質二重層のアシル鎖と向き合った α -ヘリックス部分であると考えられる。これまでに報告された ABC 蛋白質において、数多くの変異体解析やフォトアフィニティーラベル実験が行われたにもかかわらず、基質結合サイトについて明らかにされた例はまだない (Higgins and Linton, 2004)。今後は、LolC および LolE の機能に欠陥がある変異体を構築し、本実験で見出した基質との複合体として LolCDE を精製する方法と合わせて、LolCDE における基質結合サイトを明らかにしていきたいと考えている。

LolCDE と LolA との相互作用

無機リン酸アナログであるバナジン酸 (Vi) は、ATP の加水分解により生じた無機リン酸 (Pi) と置換して、ABC 蛋白質-ADP-Vi の安定な中間体を形成することにより ATP 加水分解を阻害する。最近、大腸菌のマルトース輸送体において、バナジン酸が ATP 加水分解のみならず物質輸送の遷移状態 (ABC 蛋白質 (MalFGK₂) と基質結合蛋白質 (MalE) との安定な複合体) をもトラップできることが報告された (Chen et al., 2001)。しかし、LolCDE に関しては、バナジン酸による LolA との安定な複合体形成は観られない (unpublished results)。また、MalFGK₂ を始めとする細菌型取り込み系の ABC 輸送体は、ABC 蛋白質をコードする遺伝子上流、下流或いは中流に基質結合蛋白質をコードする遺伝子が存在するが、LolCDE については、LolA 遺伝子と LolCDE 遺伝子の位置は 20 万塩基以上離れている。さらに LolCDE はリポ蛋白質の遊離に LolA を要求するものの、基質および LolA の非存在下でも ATP を加水分解できる点で MalFGK₂ 等と異なっている。以上の理由から、LolCDE と LolA による基質輸送のシステムは、基質結合蛋白質依存型の ABC 輸送体とは異なっている可能性がある。これまでに、LolCDE が LolA と安定な複合体を形成する条件は見い出せていない。本実験においても、精製した変異 LolCDE 蛋白質はいずれも LolA を含んでおらず、再構成実験でも変異 LolCDE と LolA との結合は観られなかった。

LolD モチーフの役割

LolD_H(D101N)および LolD_H(D101R)プラスミドを野生型大腸菌で過剰発現させた場合の菌の生育は、他の LolD モチーフ変異体の場合に比べて著しく損なわれていた。また、LolD モチーフ変異プラスミドを Lpp 欠損大腸菌株で過剰発現させた場合、D101N および D101R を除く他の変異体ではほぼ正常な生育が観察された。さらに、D101N および D101R を含む変異 LolCD_HE 蛋白質は、ATP 非存在下において LolCD_HE 複合体形成能を失っていた。一方で、ATP 存在下で精製した場合、LolCD_HE 複合体形成は正常であったが、ATPase 活性を顕著に失っていた。以上のことから、LolD モチーフを構成するアミノ酸の中で、101 番目のアスパ

ラギン酸は LolD の機能、特に ATP 非存在下における LolCDE 複合体の安定性を維持するのに重要であることが示された。一方、D101N および D101R を比較すると、わずかな違いではあるが、本変異プラスミドを過剰発現させた野生型大腸菌の生育および Lpp 欠損株の生育、LolCDE 複合体形成能、LolCDE 複合体の ATPase 活性のいずれにおいても、D101R の方が変異体としての性質が強いことから、アスパラギン酸の負電荷が重要であるのかもしれない。なお、データは示していないが、LolCD_HE を精製する際に、DDM の代わりに SM を使用すると ATP 非存在下における LolCDE 複合体形成能が著しく不安定になった。このことから、ATP 依存的に LolCDE 複合体としての安定性が高まると考えられる。D101N および D101R 変異体では、この性質が増幅していると解釈される。

一方、H96P 変異体は、単独 LolD_H の ATPase 活性は野生型と同程度であったにもかかわらず、LolCDE 複合体の ATPase 活性およびリポ蛋白質遊離活性は著しく損なわれていた。LolCD_H(H96P)E の複合体形成能は±ATP いずれの条件下でも正常であったことから、H96P 変異体の結果は、LolD モチーフが膜サブユニットと ATPase サブユニットとの「機能的な相互作用」に重要な領域であることを示唆している。「機能的な相互作用」については、以下2つの仮説を考えている。

①LolD と LolC / E との情報伝達を媒介；ATP の加水分解に共役した物質輸送を行う ABC 蛋白質では、ATPase サブユニットと膜サブユニット間の情報のやりとりが要求される（これまでの知見にもとづけば、情報は構造変化を介して伝達される）。この情報のやりとりを仲介するのが、本モチーフであるとする説である。この仮説に基づくと、LolD モチーフの重要な残基に変異が導入されると、「ATP の結合・加水分解」および「基質の結合・解離」の各ステップにおいて、一方のサブユニットの構造変化が、もう一方のサブユニットの構造変化を効率よく誘導できないために、ATPase 活性の効率が低くなると考えられる。

②LolD の位置関係を調整；一般的な ABC 蛋白質の ATPase と同様に、LolD は ATP との結合によりサンドイッチダイマー構造をとると考えられる。したがって、もしもこうしたダイマー構造で観られる Walkerモチーフと Signatureモチーフとのかみ合わせがうまくいかなければ、ATPase 活性の効率は下がるであろう。反対に、LolD モノマーどうしの位置関係が正確に調整できれば、LolD のダイマーユニットが安定に維持され、ATPase 活性効率が保たれる。本仮説では、LolDモチーフの重要な残基に変異が入ると、本モチーフを介した LolD と

LolC/Eとの結合がうまくいかず、結果としてLolDモノマーどうしのかみ合わせが悪くなり、ATPase 活性の効率が低くなると解釈される。

本研究では、外膜リポ蛋白質を特異的に結合した LolCDE 複合体を機能的な中間体として単離することに成功した。これは、数ある ABC 蛋白質の中で、基質との複合体として初めて単離された初めての例である。なお、バナジン酸によりトラップされたマルトース輸送中間体には基質が結合していないので、本研究により見出された基質結合型 LolCDE とは異なる中間体である。また、単離した基質結合型 LolCDE を基軸とした解析により、LolCDE の主要な触媒機構を明らかとした。本触媒モデルで示された3つのステップは、一般の排出系 ABC システムで観られる特徴を反映しており、それらの特徴を統一する上で本モデルは重要と考えている。一方で、LolD モチーフ変異体の解析から、LolD の 101 番目のアスパラギン酸は ATP 非存在下における LolCDE 複合体の安定性に重要であることが示された。また、LolD の 96 番目のヒスチジンは、LolD と LolC/E との機能的な相互作用に重要であることが示唆された。本研究により、膜サブユニットにおける基質の結合・解離の各反応と、ATPase サブユニットにおける ATP の結合・加水分解の各反応とが、いかなる順序で、またどのように連携しあっているのかに関する重要な知見が得られたと考えている。

参考文献

- Abramson, J., Smirnova, I., Kasho, V., Verner, G., Kaback, H.R. and Iwata, S. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science*, **301**, 610-615.
- Albers, S.V. and Driessen, A.M. (2002) Signal peptides of secreted proteins of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: a genomic survey. *Arch Microbiol*, **177**, 209-216.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2002) *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL*. Newton Press, 29 West 35th Street, New York, USA.
- Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N.F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K.L., Lewis, R.A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M. and Lupski, J.R. (1997) A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (*ABCR*) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet*, **15**, 236-246.
- Ames, G.F. (1990) Energy coupling in periplasmic permeases: the histidine permease as a model system. *Res Microbiol*, **141**, 341-348.
- Bardy, S.L., Eichler, J. and Jarrell, K.F. (2003) Archaeal signal peptides—a comparative survey at the genome level. *Protein Sci*, **12**, 1833-1843.
- Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.C., Raina, S. and Llobes, R. (1998) *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *J Bacteriol*, **180**, 4872-4878.
- Bishop, L., Agbayani, R., Jr., Ambudkar, S.V., Maloney, P.C. and Ames, G.F. (1989) Reconstitution of a bacterial periplasmic permease in proteoliposomes and demonstration of ATP hydrolysis concomitant with transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 6953-6957.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, **277**, 1453-1474.
- Bohm, A., Diez, J., Diederichs, K., Welte, W. and Boos, W. (2002) Structural model of MalK, the ABC subunit of the maltose transporter of *Escherichia coli*: implications for mal gene regulation, inducer exclusion, and subunit assembly. *J Biol Chem*, **277**, 3708-3717.
- Bolhuis, H., van Veen, H.W., Molenaar, D., Poolman, B., Driessen, A.J. and Konings, W.N. (1996) Multidrug resistance in *Lactococcus lactis*: evidence for ATP-dependent drug extrusion from the inner leaflet of the cytoplasmic membrane. *Embo J*, **15**, 4239-4245.
- Bos, M.P., Tefsen, B., Geurtsen, J. and Tommassen, J. (2004) Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9417-9422.
- Bos, M.P. and Tommassen, J. (2004) Biogenesis of the Gram-negative bacterial outer membrane. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 610-616.
- Bouvet, E., Derouiche, R., Rigal, A., Llobes, R., Lazdunski, C. and Benedetti, H. (1995) Peptidoglycan-associated lipoprotein-TolB interaction. A possible key to explaining the formation of contact sites between the inner and outer membranes of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **270**, 11071-11077.
- Braun, V. (1975) Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **415**, 335-377.
- Brox, S.J., Ellison, M., Locke, T., Bortoff, D., Frost, L. and Weiner, J.H. (2004) Genome-wide analysis of lipoprotein expression in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol*, **186**, 3254-3258.
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghegan, N.S. and Venter, J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science*, **273**, 1058-1073.
- Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol*, **104**, 541-555.
- Cascales, E., Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.C. and Llobes, R. (2002) Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J Bacteriol*, **184**, 754-759.
- Chang, G. (2003) Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol*, **330**, 419-430.

- Chang, G and Roth, C.B. (2001) Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science*, **293**, 1793-1800.
- Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M. and Roninson, I.B. (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, **47**, 381-389.
- Chen, J., Lu, G, Lin, J., Davidson, A.L. and Quioco, F.A. (2003) A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle. *Mol Cell*, **12**, 651-661.
- Chen, J., Sharma, S., Quioco, F.A. and Davidson, A.L. (2001) Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 1525-1530.
- Chifflet, S., Torriglia, A., Chiesa, R. and Tolosa, S. (1988) A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPases. *Anal Biochem*, **168**, 1-4.
- Davidson, A.L. and Chen, J. (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem*, **73**, 241-268.
- Davidson, A.L., Shuman, H.A. and Nikaido, H. (1992) Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 2360-2364.
- de Keyzer, J., van der Does, C. and Driessen, A.J. (2003) The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 2034-2052.
- Dean, D.A., Davidson, A.L. and Nikaido, H. (1990) The role of ATP as the energy source for maltose transport in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, **141**, 348-352.
- Diederichs, K., Diez, J., Greller, G, Muller, C., Breed, J., Schnell, C., Vornrhein, C., Boos, W. and Welte, W. (2000) Crystal structure of MalK, the ATPase subunit of the trehalose/maltose ABC transporter of the archaeon *Thermococcus litoralis*. *Embo J*, **19**, 5951-5961.
- Doerrler, W.T., Gibbons, H.S. and Raetz, C.R. (2004) MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **279**, 45102-45109.
- Drummel-Smith, J. and Whitfield, C. (2000) Translocation of group 1 capsular polysaccharide to the surface of *Escherichia coli* requires a multimeric complex in the outer membrane. *Embo J*, **19**, 57-66.
- Eppens, E.F., Nouwen, N. and Tommassen, J. (1997) Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. *Embo J*, **16**, 4295-4301.
- Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Venter, J.C. and et al. (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature*, **390**, 580-586.
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G, Kelley, J.M. and et al. (1995) The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science*, **270**, 397-403.
- Fukuda, A., Matsuyama, S., Hara, T., Nakayama, J., Nagasawa, H. and Tokuda, H. (2002) Aminoacylation of the N-terminal cysteine is essential for Lol-dependent release of lipoproteins from membranes but does not depend on lipoprotein sorting signals. *J Biol Chem*, **277**, 43512-43518.
- Gaudet, R. and Wiley, D.C. (2001) Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *Embo J*, **20**, 4964-4972.
- Gilson, E., Higgins, C.F., Hofnung, M., Ferro-Luzzi Ames, G and Nikaido, H. (1982) Extensive homology between membrane-associated components of histidine and maltose transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **257**, 9915-9918.
- Gros, P., Croop, J. and Housman, D. (1986) Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell*, **47**, 371-380.
- Ha, S., Walker, D., Shi, Y. and Walker, S. (2000) The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci*, **9**, 1045-1052.
- Hara, T., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (2003) Mechanism underlying the inner membrane retention of *Escherichia coli* lipoproteins caused by Lol

- avoidance signals. *J Biol Chem*, **278**, 40408-40414.
- Harms, N., Koningstein, G., Dontje, W., Muller, M., Oudega, B., Luirink, J. and de Cock, H. (2001) The early interaction of the outer membrane protein phoE with the periplasmic chaperone Skp occurs at the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem*, **276**, 18804-18811.
- Hayashi, S. and Wu, H.C. (1990) Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr*, **22**, 451-471.
- Higgins, C.F. and Linton, K.J. (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 918-926.
- Hirota, Y., Suzuki, H., Nishimura, Y. and Yasuda, S. (1977) On the process of cellular division in *Escherichia coli*: a mutant of *E. coli* lacking a murein-lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 1417-1420.
- Holland, I.B. and Blight, M.A. (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol*, **293**, 381-399.
- Holtje, J.V. (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 181-203.
- Hopfner, K.P., Karcher, A., Shin, D.S., Craig, L., Arthur, L.M., Carney, J.P. and Tainer, J.A. (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell*, **101**, 789-800.
- Horio, M., Gottesman, M.M. and Pastan, I. (1988) ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 3580-3584.
- Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F. and Kim, S.H. (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature*, **396**, 703-707.
- Hunke, S., Mourez, M., Jehanno, M., Dassa, E. and Schneider, E. (2000) ATP modulates subunit-subunit interactions in an ATP-binding cassette transporter (MalFGK2) determined by site-directed chemical cross-linking. *J Biol Chem*, **275**, 15526-15534.
- Hussain, M., Ichihara, S. and Mizushima, S. (1980) Accumulation of glyceride-containing precursor of the outer membrane lipoprotein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* treated with globomycin. *J Biol Chem*, **255**, 3707-3712.
- Hussain, M., Ozawa, Y., Ichihara, S. and Mizushima, S. (1982) Signal peptide digestion in *Escherichia coli*. Effect of protease inhibitors on hydrolysis of the cleaved signal peptide of the major outer-membrane lipoprotein. *Eur J Biochem*, **129**, 233-239.
- Janas, E., Hofacker, M., Chen, M., Gompf, S., van der Does, C. and Tampe, R. (2003) The ATP hydrolysis cycle of the nucleotide-binding domain of the mitochondrial ATP-binding cassette transporter Mdl1p. *J Biol Chem*, **278**, 26862-26869.
- Juncker, A.S., Willenbrock, H., Von Heijne, G., Brunak, S., Nielsen, H. and Krogh, A. (2003) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci*, **12**, 1652-1662.
- Kadokura, H., Katzen, F. and Beckwith, J. (2003) Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem*, **72**, 111-135.
- Karpowich, N., Martsinkevich, O., Millen, L., Yuan, Y.R., Dai, P.L., MacVey, K., Thomas, P.J. and Hunt, J.F. (2001) Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. *Structure (Camb)*, **9**, 571-586.
- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Yamazaki, S., Haikawa, Y., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Nakazawa, H., Takamiya, M., Masuda, S., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Kikuchi, H. and et al. (1999) Complete genome sequence of an aerobic hyper-thermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. *DNA Res*, **6**, 83-101, 145-152.
- Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., Nagai, Y., Sakai, M., Ogura, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Ohfuku, Y., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K. and Kikuchi, H. (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3 (supplement). *DNA Res*, **5**, 147-155.
- Kerppola, R.E. and Ames, G.F. (1992) Topology of the hydrophobic membrane-bound components of the histidine periplasmic permease. Comparison with other members of the family. *J Biol Chem*, **267**, 2329-2336.
- Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J.F., White, O., Nelson,

- K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Richardson, D.L., Kerlavage, A.R., Graham, D.E., Kyrpides, N.C., Fleischmann, R.D., Quackenbush, J., Lee, N.H., Sutton, G.G., Gill, S., Kirkness, E.F., Dougherty, B.A., McKenney, K., Adams, M.D., Loftus, B., Venter, J.C. and et al. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature*, **390**, 364-370.
- Kokoeva, M.V., Storch, K.F., Klein, C. and Oesterhelt, D. (2002) A novel mode of sensory transduction in archaea: binding protein-mediated chemotaxis towards osmoprotectants and amino acids. *Embo J*, **21**, 2312-2322.
- Kol, M.A., van Dalen, A., de Kroon, A.I. and de Kruijff, B. (2003) Translocation of phospholipids is facilitated by a subset of membrane-spanning proteins of the bacterial cytoplasmic membrane. *J Biol Chem*, **278**, 24586-24593.
- Kreimer, D.I., Chai, K.P. and Ferro-Luzzi Ames, G. (2000) Nonequivalence of the nucleotide-binding subunits of an ABC transporter, the histidine permease, and conformational changes in the membrane complex. *Biochemistry*, **39**, 14183-14195.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A. and et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, **390**, 249-256.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. and Hiramatsu, K. (2001) Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **357**, 1225-1240.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lapinski, P.E., Neubig, R.R. and Raghavan, M. (2001) Walker A lysine mutations of TAP1 and TAP2 interfere with peptide translocation but not peptide binding. *J Biol Chem*, **276**, 7526-7533.
- Lerner-Marmarosh, N., Gimi, K., Urbatsch, I.L., Gros, P. and Senior, A.E. (1999) Large scale purification of detergent-soluble P-glycoprotein from *Pichia pastoris* cells and characterization of nucleotide binding properties of wild-type, Walker A, and Walker B mutant proteins. *J Biol Chem*, **274**, 34711-34718.
- Locher, K.P., Lee, A.T. and Rees, D.C. (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, **296**, 1091-1098.
- Lommatzsch, J., Templin, M.F., Kraft, A.R., Vollmer, W. and Holtje, J.V. (1997) Outer membrane localization of murein hydrolases: MltA, a third lipoprotein lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **179**, 5465-5470.
- Mannerling, D.E., Sharma, S. and Davidson, A.L. (2001) Demonstration of conformational changes associated with activation of the maltose transport complex. *J Biol Chem*, **276**, 12362-12368.
- Martin, C., Higgins, C.F. and Callaghan, R. (2001) The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein. *Biochemistry*, **40**, 15733-15742.
- Masuda, K., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (2002) Elucidation of the function of lipoprotein-sorting signals that determine membrane localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7390-7395.
- Matsuyama, S., Akimaru, J. and Mizushima, S. (1990) SecE-dependent overproduction of SecY in *Escherichia coli*. Evidence for interaction between two components of the secretory machinery. *FEBS Lett*, **269**, 96-100.
- Matsuyama, S., Fujita, Y., Sagara, K. and Mizushima, S. (1992) Overproduction, purification and characterization of SecD and SecF, integral membrane components of the protein translocation machinery of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **1122**, 77-84.
- Matsuyama, S., Tajima, T. and Tokuda, H. (1995) A novel periplasmic carrier protein involved in the sorting and transport of *Escherichia coli* lipoproteins destined for the outer membrane. *Embo J*, **14**, 3365-3372.
- Matsuyama, S., Yokota, N. and Tokuda, H. (1997) A novel outer membrane lipoprotein, LolB (HemM), involved in the LolA (p20)-dependent localization of lipoproteins to the outer membrane of *Escherichia coli*. *Embo J*, **16**, 6947-6955.

- Mattar, S., Scharf, B., Kent, S.B., Rodewald, K., Oesterhelt, D. and Engelhard, M. (1994) The primary structure of halocyanin, an archaeal blue copper protein, predicts a lipid anchor for membrane fixation. *J Biol Chem*, **269**, 14939-14945.
- Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., Cleary, B.J., Swartzell, S.M. and Mahairas, G.G. (2004) The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *J Bacteriol*, **186**, 7123-7133.
- Miyamoto, A., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (2001) Mutant of LolA, a lipoprotein-specific molecular chaperone of *Escherichia coli*, defective in the transfer of lipoproteins to LolB. *Biochem Biophys Res Commun*, **287**, 1125-1128.
- Miyamoto, A., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (2002) Dominant negative mutant of a lipoprotein-specific molecular chaperone, LolA, tightly associates with LolCDE. *FEBS Lett*, **528**, 193-196.
- Mizuno, T. (1979) A novel peptidoglycan-associated lipoprotein found in the cell envelope of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *J Biochem (Tokyo)*, **86**, 991-1000.
- Moody, J.E., Millen, L., Binns, D., Hunt, J.F. and Thomas, P.J. (2002) Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem*, **277**, 21111-21114.
- Mourez, M., Hofnung, M. and Dassa, E. (1997) Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *Embo J*, **16**, 3066-3077.
- Muller, M., Bakos, E., Welker, E., Varadi, A., Germann, U.A., Gottesman, M.M., Morse, B.S., Roninson, I.B. and Sarkadi, B. (1996) Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the human multidrug resistance protein. *J Biol Chem*, **271**, 1877-1883.
- Narita, S., Kanamaru, K., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (2003) A mutation in the membrane subunit of an ABC transporter LolCDE complex causing outer membrane localization of lipoproteins against their inner membrane-specific signals. *Mol Microbiol*, **49**, 167-177.
- Narita, S., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (2004) Lipoprotein trafficking in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*.
- Narita, S., Tanaka, K., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (2002) Disruption of lolCDE, encoding an ATP-binding cassette transporter, is lethal for *Escherichia coli* and prevents release of lipoproteins from the inner membrane. *J Bacteriol*, **184**, 1417-1422.
- Nikaido, K., Liu, P.Q. and Ames, G.F. (1997) Purification and characterization of HisP, the ATP-binding subunit of a traffic ATPase (ABC transporter), the histidine permease of *Salmonella typhimurium*. Solubility, dimerization, and ATPase activity. *J Biol Chem*, **272**, 27745-27752.
- Nishiyama, K., Mizushima, S. and Tokuda, H. (1993) A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Embo J*, **12**, 3409-3415.
- Nishiyama, K., Mizushima, S. and Tokuda, H. (1995) Preferential interaction of Sec-G with Sec-E stabilizes an unstable Sec-E derivative in the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, **217**, 217-223.
- Pugsley, A.P. (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev*, **57**, 50-108.
- Qu, Q., Russell, P.L. and Sharom, F.J. (2003) Stoichiometry and affinity of nucleotide binding to P-glycoprotein during the catalytic cycle. *Biochemistry*, **42**, 1170-1177.
- Rich, D.P., Anderson, M.P., Gregory, R.J., Cheng, S.H., Paul, S., Jefferson, D.M., McCann, J.D., Klinger, K.W., Smith, A.E. and Welsh, M.J. (1990) Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature*, **347**, 358-363.
- Rosenberg, M.F., Kamis, A.B., Callaghan, R., Higgins, C.F. and Ford, R.C. (2003) Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J Biol Chem*, **278**, 8294-8299.
- Rosenberg, M.F., Velarde, G., Ford, R.C., Martin, C., Berridge, G., Kerr, I.D., Callaghan, R., Schmidlin, A., Wooding, C., Linton, K.J. and Higgins, C.F. (2001) Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *Embo J*, **20**, 5615-5625.
- Rouviere, P.E. and Gross, C.A. (1996) SurA, a periplasmic protein with peptidyl-prolyl isomerase activity, participates in the assembly of outer membrane porins. *Genes Dev*, **10**, 3170-3182.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold

- Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York, USA.
- Sankaran, K. and Wu, H.C. (1994) Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *J Biol Chem*, **269**, 19701-19706.
- Saurin, W., Hofnung, M. and Dassa, E. (1999) Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol*, **48**, 22-41.
- Scarborough, G.A. (1995) Drug-stimulated ATPase activity of the human P-glycoprotein. *J Bioenerg Biomembr*, **27**, 37-41.
- Schmitt, L., Benabdelhak, H., Blight, M.A., Holland, I.B. and Stubbs, M.T. (2003) Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol*, **330**, 333-342.
- Senior, A.E., al-Shawi, M.K. and Urbatsch, I.L. (1995) The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett*, **377**, 285-289.
- Seydel, A., Gounon, P. and Pugsley, A.P. (1999) Testing the '+2 rule' for lipoprotein sorting in the *Escherichia coli* cell envelope with a new genetic selection. *Mol Microbiol*, **34**, 810-821.
- Shapiro, A.B. and Ling, V. (1997) Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *Eur J Biochem*, **250**, 122-129.
- Sharff, A.J., Rodseth, L.E., Spurlino, J.C. and Quioco, F.A. (1992) Crystallographic evidence of a large ligand-induced hinge-twist motion between the two domains of the maltodextrin binding protein involved in active transport and chemotaxis. *Biochemistry*, **31**, 10657-10663.
- Sharma, S. and Davidson, A.L. (2000) Vanadate-induced trapping of nucleotides by purified maltose transport complex requires ATP hydrolysis. *J Bacteriol*, **182**, 6570-6576.
- She, Q., Singh, R.K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M.J., Chan-Weiher, C.C., Clausen, I.G., Curtis, B.A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P.M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A.C., Kozera, C.J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H.P., Redder, P., Schenk, M.E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R.A., Ragan, M.A., Sensen, C.W. and Van der Oost, J. (2001) The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7835-7840. Epub 2001 Jun 7826.
- Shitan, N. and Yazaki, K. (2004) [The diversity of plant ABC protein superfamily]. *Seikagaku*, **76**, 1221-1224.
- Shyamala, V., Baichwal, V., Beall, E. and Ames, G.F. (1991) Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem*, **266**, 18714-18719.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J. and Hunt, J.F. (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell*, **10**, 139-149.
- Sonveaux, N., Vigano, C., Shapiro, A.B., Ling, V. and Ruyschaert, J.M. (1999) Ligand-mediated tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A tryptophan fluorescence quenching analysis. *J Biol Chem*, **274**, 17649-17654.
- Spurlino, J.C., Lu, G.Y. and Quioco, F.A. (1991) The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. *J Biol Chem*, **266**, 5202-5219.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S. and Olson, M.V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, **406**, 959-964.
- Suzuki, H., Nishimura, Y., Yasuda, S., Nishimura, A., Yamada, M. and Hirota, Y. (1978) Murein-lipoprotein of *Escherichia coli*: a protein involved in the stabilization of bacterial cell envelope. *Mol Gen Genet*, **167**, 1-9.
- Tajima, T., Yokota, N., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (1998) 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.
- Takeda, K., Miyatake, H., Yokota, N., Matsuyama, S., Tokuda, H. and Miki, K. (2003) Crystal structures of bacterial lipoprotein localization factors, LolA and LolB. *Embo J*, **22**, 3199-3209.
- Tanaka, K., Matsuyama, S.I. and Tokuda, H. (2001) 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.
- Tani, K., Tokuda, H. and Mizushima, S. (1990) Translocation of ProOmpA possessing an intramolecular disulfide bridge into membrane vesicles of *Escherichia coli*. Effect of membrane energization. *J Biol Chem*, **265**, 17341-17347.
- Terada, M., Kuroda, T., Matsuyama, S.I. and Tokuda, H. (2001) Lipoprotein sorting signals evaluated as the LolA-dependent release of lipoproteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **276**, 47690-47694.
- Thomas, P.M., Cote, G.J., Wohllk, N., Haddad, B., Mathew, P.M., Rabl, W., Aguilar-Bryan, L., Gagel, R.F. and Bryan, J. (1995) Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science*, **268**, 426-429.
- Tikhonova, E.B. and Zgurskaya, H.I. (2004) AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex. *J Biol Chem*, **279**, 32116-32124.
- Tjalsma, H., Kontinen, V.P., Pragai, Z., Wu, H., Meima, R., Venema, G., Bron, S., Sarvas, M. and van Dijk, J.M. (1999) The role of lipoprotein processing by signal peptidase II in the Gram-positive eubacterium *Bacillus subtilis*. Signal peptidase II is required for the efficient secretion of alpha-amylase, a non-lipoprotein. *J Biol Chem*, **274**, 1698-1707.
- Tokuda, H. (2004) [Protein trafficking and envelope biogenesis in bacteria]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **49**, 942-949.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Venter, J.C. and et al. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **388**, 539-547.
- Ueda, K. (2004) [ABC proteins involved in lipid homeostasis]. *Seikagaku*, **76**, 525-531.
- van den Brink-van der Laan, E., Boots, J.W., Spelbrink, R.E., Kool, G.M., Breukink, E., Killian, J.A. and de Kruijff, B. (2003) Membrane interaction of the glycosyltransferase MurG: a special role for cardiolipin. *J Bacteriol*, **185**, 3773-3779.
- van der Heide, T. and Poolman, B. (2002) ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep*, **3**, 938-943.
- van der Heide, T., Stuart, M.C. and Poolman, B. (2001) On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *Embo J*, **20**, 7022-7032.
- van Veen, H.W., Margolles, A., Muller, M., Higgins, C.F. and Konings, W.N. (2000) The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism. *Embo J*, **19**, 2503-2514.
- Verdon, G., Albers, S.V., Dijkstra, B.W., Driessen, A.J. and Thunnissen, A.M. (2003) Crystal structures of the ATPase subunit of the glucose ABC transporter from *Sulfolobus solfataricus*: nucleotide-free and nucleotide-bound conformations. *J Mol Biol*, **330**, 343-358.
- Vigano, C., Margolles, A., van Veen, H.W., Konings, W.N. and Ruysschaert, J.M. (2000) Secondary and tertiary structure changes of reconstituted LmrA induced by nucleotide binding or hydrolysis. A fourier transform attenuated total reflection infrared spectroscopy and tryptophan fluorescence quenching analysis. *J Biol Chem*, **275**, 10962-10967.
- Viitanen, P., Newman, M.J., Foster, D.L., Wilson, T.H. and Kaback, H.R. (1986) Purification, reconstitution, and characterization of the lac permease of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, **125**, 429-452.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M. and Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science*, **299**, 262-265.
- Wada, R., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (2004) Targeted mutagenesis of five conserved tryptophan residues of LolB involved in membrane localization of *Escherichia coli* lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**, 1069-1074.
- Yakushi, T., Masuda, K., Narita, S., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (2000) A new ABC transporter mediating the detachment of lipid-modified proteins from membranes. *Nat Cell Biol*, **2**, 212-218.
- Yakushi, T., Tajima, T., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (1997) Lethality of the covalent linkage between mislocalized major outer membrane lipoprotein and the peptidoglycan of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **179**, 2857-2862.

- Yakushi, T., Yokota, N., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (1998) LolA-dependent release of a lipid-modified protein from the inner membrane of *Escherichia coli* requires nucleoside triphosphate. *J Biol Chem*, **273**, 32576-32581.
- Yamaguchi, K., Yu, F. and Inouye, M. (1988) A single amino acid determinant of the membrane localization of lipoproteins in *E. coli*. *Cell*, **53**, 423-432.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, **33**, 103-119.
- Yokota, N., Kuroda, T., Matsuyama, S. and Tokuda, H. (1999) Characterization of the LolA-LolB system as the general lipoprotein localization mechanism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **274**, 30995-30999.
- Yuan, Y.R., Blecker, S., Martsinkevich, O., Millen, L., Thomas, P.J. and Hunt, J.F. (2001) The crystal structure of the MJ0796 ATP-binding cassette. Implications for the structural consequences of ATP hydrolysis in the active site of an ABC transporter. *J Biol Chem*, **276**, 32313-32321.
- Zhou, Z., White, K.A., Polissi, A., Georgopoulos, C. and Raetz, C.R. (1998) Function of *Escherichia coli* MsbA, an essential ABC family transporter, in lipid A and phospholipid biosynthesis. *J Biol Chem*, **273**, 12466-12475.

謝辞

本実験を進めるに当たって数々のご指導ならびに数々のご助言を頂き、本論文を御校閲頂いた東京大学分子細胞生物学研究所 細胞形成研究分野 徳田 元教授に厚くお礼申し上げます。

本実験を進めるに当たりご指導ならびに数々のご助言を頂いた立教大学 理学部 生命理学研究科 松山伸一教授に厚くお礼申し上げます。

研究の相談にのって頂き、数々のご指導を頂いた東京大学 分子細胞生物学研究所 細胞形成研究分野 西山賢一助教授に厚くお礼申し上げます。

生化学、微生物学および分子生物学研究の醍醐味を教えて下さった東北大学大学院 農学研究科 応用微生物学研究室 神尾好是教授に厚くお礼申し上げます。

生化学、微生物学および分子生物学研究の基礎を教えて下さった東北大学大学院 農学研究科 応用微生物学研究室 富田敏夫助教授に厚くお礼申し上げます。

研究の相談にのって頂き、数々のご指導並びに有益な情報を与えて下さった東京大学 分子細胞生物学研究所 細胞形成研究分野 成田新一郎助手に厚くお礼申し上げます。

数々のご指導を頂いた同研究分野 多胡義孝助手に厚くお礼申し上げます。

共同研究者として有益なご助言をして下さった同研究分野 金丸京子博士に心よりお礼申し上げます。

研究室の同輩として切磋琢磨しあった渡辺祥司くんに感謝申し上げます。

研究を進めるにあたり示唆に富むディスカッションをしてくれた宮本重彦くんに感謝申し上げます。

先輩後輩の関係を越えて仲良くしてくれた松澤仁美さんに感謝申し上げます。

最後に、博士課程まで私を応援してくれた両親および兄に心から感謝いたします。