

膜蛋白質の局在及びトポロジー形成原理の解明

●阪口 雅郎

兵庫県立大学大学院生命理学研究科

〈研究の目的と進め方〉

蛋白質は合成されると同時に固有の高次構造を形成して独自の機能を発揮する。一般の蛋白質のなかでも特に膜蛋白質は、合成と同時に膜内に配置され高次構造を形成する過程で、細胞（生命）に備わったさまざまな構造形成補助因子が決定的に寄与する。これらの因子なしに膜蛋白質の立体構造は形成され得ない。また、このような諸因子は、膜蛋白質が多様な細胞内オルガネラ膜に特異的に局在化する過程にも作用している。ゲノムがコードする蛋白質のアミノ酸配列が明らかにされ、それらの機能や細胞内の空間的配置が重要視される中で、立体構造形成原理と細胞内局在化原理を、諸因子の関与を知った上で解明することはきわめて重要である。本研究は、細胞内で進行する蛋白質の局在化と膜内構造形成の原理を解明することによって、ゲノムがコードするすべての膜蛋白質の立体構造及び細胞内局在の予測を実現することを目的として企画された。小胞体における膜蛋白質のトポロジー形成の全容を明らかにすると同時に、並行して疎水性度の高い膜蛋白質が小胞体への標的化を回避し、ミトコンドリアやペルオキシソームなどの分泌経路以外のオルガネラに標的化するためのシグナルとそれぞれの標的化した先での、構造形成装置の関与した構造形成機構を明らかにすることを目指した。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 小胞体膜でのタンパク質合成に共役した膜への組み込み系について、疎水性によらない新しい膜組み込みモードをさらに解析し、小胞体での組み込み研究を完成させる。成果をゲノム情報科学解析にフィードバックし、そこから提唱される新たな作業仮説を実験的に検証することによって、予測精度を向上させる。
- 2) いくつかの代表的な膜蛋白質に絞って、全ての膜貫通セグメントのトポロジー形成様式を徹底して探求し、本研究で明らかにするトポロジー形成様式の普遍性を検証するとともに、新たな構造形成様式発見の可能性を探る。
- 3) 疎水性セグメントをもつ膜蛋白質が蛋白質合成に共役した小胞体への標的化機構を回避し、それ以外のオルガネラ膜に標的化するためのシグナルとそのシグナル識別機構を明らかにする。また、これらの小胞体以外のオルガネラ膜上での膜トポロジー形成原理について、小胞体の研究基盤を生かして解析を進める。

〈研究期間の成果〉

- 1) 新規シグナル配列の作用機構の解明：小胞体での、膜結合型リボソームおよび小胞体の蛋白質膜組み込み装置（トランスロコン）が関与するポリペプチド鎖の膜組み込みの全様式を実験的に明らかにし、それぞれの実例を解析した。以下に記すごとく、これまで疎水性度のみを考慮してきた膜蛋白質のトポロジー解析に生命独自の構造形成基盤を提唱した（総説15）（図1）。このポリペプチド鎖膜内配置機構によると、疎水性度

のほとんど無いむしろ親水的なセグメントですら膜貫通配置を形成できる。

まず、I型シグナルアンカー配列の、膜蛋白質合成途上の膜組み込みの時期を正確に決定し、疎水性配列がリボソームより出現するとすぐに小胞体膜へ標的化し、その直後の正荷電アミノ酸残基がさらにリボソームより出た時点で、アミノ末端の膜透過が完了することを示した。また、疎水性配列のアミノ末端側に隣接するプロリン残基の一アミノ酸変化でトポロジー形成が不全となることを見出した（21, 27）。疎水性度や電荷に関係しないトポロジー形成要因として注目された。

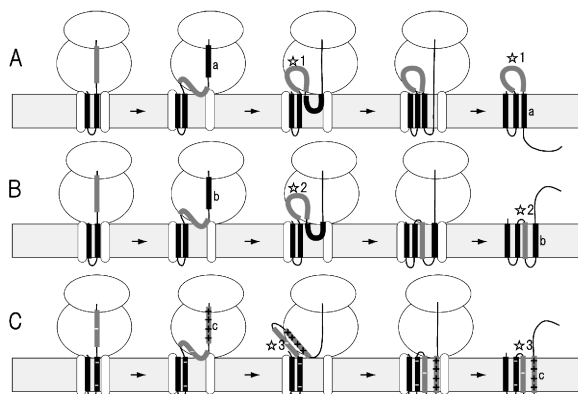


図1 解明された小胞体におけるポリペプチド鎖膜内配置の様式。A、疎水性の高いセグメント (a) が自発的に膜内に配置され、続く配列の膜への進入を開始する。B、I型シグナルアンカー配列 (b) が分子内で機能するとそのアミノ末端側の疎水性度の低い配列が膜内に引き込まれ、膜貫通トポロジーを形成する。C、二つのセグメント (☆3とc) が電荷間相互作用によって組になり膜に組み込まれる。

- 2) 疎水性相互作用による膜内配置：マルチスパン膜蛋白質である赤血球バンド3蛋白質の全ても膜貫通セグメント (TM) のトポロジー形成機能を、膜透過停止、膜組み込み開始、配向決定作用について徹底的に定量化した。その結果、単独ではm圏内に配置されないTM2がTM1との相互作用によって、疎水性度の低いTM2が膜内に配置されうること示した（28）（図2）。
- 3) ミトコンドリア外膜蛋白質で、分子の中央部分に膜貫通領域をもつTom22（8）、N-末端にTMを持つTmo20（26）について、これらが小胞体への標的化を回避し、ミトコンドリア外膜へ特異的に標的化されるために必要な「シグナル情報」を明らかにした。Nアンカー型、中央膜貫通型いずれでも、ミトコンドリア標的化には膜貫通セグメントの高すぎる疎水特性は小胞体標的化をきたすため、適度に低い疎水特性が要求されることが明らかになった。また中央アンカー型では他のミトコンドリア標的化シグナルとは異なって、疎水セグメントの両側に必要シグナルがあることが判明した。また、N-末端側ドメインのシグナルモチーフはαヘリッ

クス構造であることをあることも示唆した。

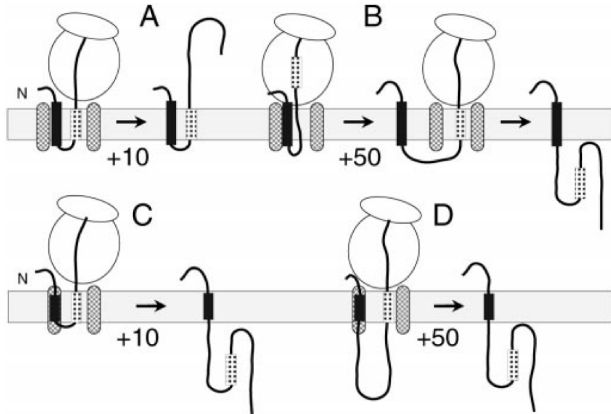


図2、小胞体トランスロコン内での膜貫通セグメント間の相互作用による膜内配置。アミノ末端のシグナル配列(黒塗り四角)が長い場合には直後に存在する疎水性の不十分なセグメント(点四角)が相互作用により膜内に配置される(A)。これがシグナル配列より離れると、相互作用できずに膜を透過してしまう(B)。シグナル配列が短い場合にはいずれの場合にも、距離によらず相互作用による膜内配置は見られない。(C,D)

4) 分子のカルボキシル末端に膜結合領域を持つミトコンドリア外膜蛋白質Tom5について、小胞体標的化を回避しミトコンドリア外膜に特異的に標的化されるための「シグナル情報」を明らかにした(9, 16)。N-末端や分子中央に膜貫通セグメントを有するミトコンドリア膜蛋白質と同じく、膜貫通セグメントの高すぎる疎水性度は小胞体標的化をきたすため、適度に低い疎水特性が要求されることが明らかになった。また酵母細胞ではTOM複合体に組み込まれる酵母Tom5の場合には、ミトコンドリア外膜に広く分散して存在するC-アンカー型膜蛋白質とは異なり、C-末端の正荷電セグメントが不要であることを明らかにした。このように、C-アンカー型ミトコンドリア外膜蛋白質には複数の標的化機構が存在することが示唆された。

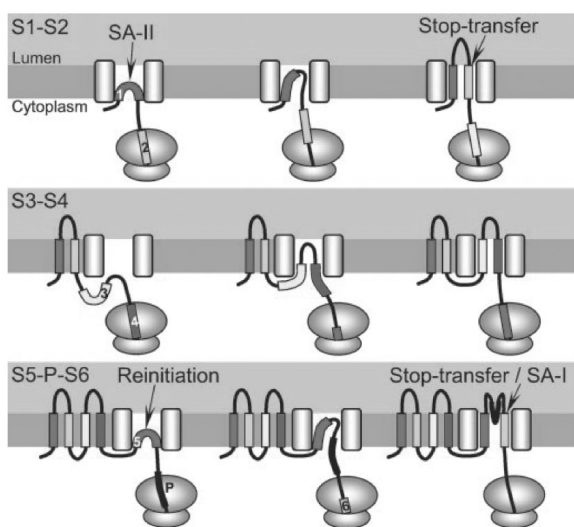


図3、膜電位依存型 K⁺イオンチャネルの膜組み込みモデル。S1とS2およびS5とS6は疎水性による膜組み込み様式で説明される。正電荷が多数存在する親水性膜貫通部分S4は、S3とS4とが相互作用することによって初めて膜内に配置される。

5) イオンチャネルには透過ポア部分に深く進入しているループ構造、いわゆる「フィルター領域」が普遍的に見られる。この膜内ループ構造のトポロジー形成を調べた。その結果、このセグメントは一般の膜貫通セグメントに匹敵する疎水性度を有するにもかかわらず、生合成途上で一度大きく小胞体内腔側に露出し、その後分子のフォールディングにともなって、内腔側より膜内に収納されることが明らかになった。このことを2種のカリウムチャネルで示した(10, 23)。

6) 電位依存性イオンチャネルの電位センサーを構成する「多数の正電荷を有する膜貫通セグメントS4」の膜貫通トポロジー形成機構を解析した。これらの正電荷が、その前(アミノ末端側)の膜貫通セグメント(S2やS3)中に存在する負荷電アミノ酸残基と特異的に相互作用することによって、S4が膜貫通トポロジーを形成することを明らかにした。また、電荷間相互作用にかかわる残基を特定しそれぞれの機能を区別可能となった(11, 13, 18)(図3)。この成果は、これまで膜貫通部分は疎水性配列であるという固定概念からは予想できなかったことであり、可溶性蛋白質と同様、蛋白質分子の多様なフォールディング様式によって膜組み込みが起きることを明確に示した。この正荷電セグメントは電位依存性K⁺イオンチャネルの膜電位センサーとして作用していることから、さらにその作用機構の解明が待たれるところである。

7) マルチスパン膜蛋白質バンド3の徹底した組み込み機構解析：マルチスパン膜蛋白質のトポロジー及びその形成機構に関する研究をさらに進展させた。赤血球膜の陰イオン交換輸送体(バンド3蛋白質)について知られている遺伝病(SAO)では、第一膜貫通セグメントが膜組み込み不全となっていることを見出した。遺伝病の病因が膜トポロジー形成不全によっていることを見出したのは初めての成果である(12)。

また、バンド3の疎水性度の低いセグメント「10thRセグメント」が、小胞体内腔に一度大きく露出してから、合成完了と同時に分子全体の構造形成に依存して膜内部に収納されることを示した(14)。この部分の小胞体膜内腔への露出程度は、蛋白質の合成速度によって変動することが示された。

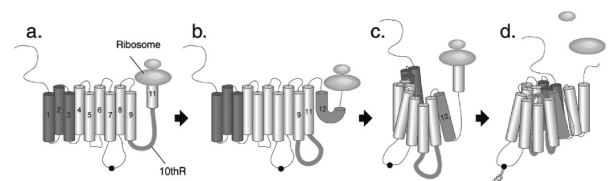


図4、バンド3の疎水性度の低いセグメント 10thR セグメントは小胞体内腔に一度大きく露出してから、合成完了と同時に分子全体の構造形成に依存して膜内部に収納される。

8) β バレル型膜蛋白質のトポロジー解析：ミトコンドリア外膜の β バレル膜蛋白質TOM40について、膜トポロジーを解析し、カルボキシル末端側の主要部分が膜内ドメインであり、 β バレル構造を形成していることが判明した。さらに、TOM40分子内にはミトコンドリア標的化シグナルに結合する部分があり、シグナルは実験的に区別される二段階で結合することを示した(7)。さらに、大腸菌内での封入体としての大量発現、可溶化、再生、精製、リフォールディングを可能とし、機

能解析と構造解析への道を開いた。

9) I型シグナルアンカー配列による大きなアミノ末端ドメインの膜透過の分子機構：I型シグナルアンカー配列によるポリペプチド鎖の膜透過輸送機構を詳細に解析した。I型シグナルアンカー配列のアミノ末端側にDHFRドメインを融合し、リガンド（メトトレキセート）を結合させ立体構造を安定化させることによってこのドメインの膜透過が抑制でき、さらにこのリガンドを除去することによって膜透過を再開できる実験系を確立した。これを用いて、大きなN-末端ドメインの膜透過には、小胞体内腔のBiPが不要なこと、ATPも不要なこと、ポリペプチド鎖の引込みの駆動力は主にシグナル配列が膜貫通 α ヘリックスを形成する際の自由エネルギー変化により供給されることを示した。また、この過程には、リボソームとトランスロコン間の密接な連携が必須であることが判明し、生命に備わった構造形成装置の重要性がクローズアップされた(3)(図5)。さらに、このモデル実験系を培養細胞系で再現することに成功した。メトトレキセートによるDHFRドメインの透過抑制が生細胞内でも見られること、透過抑制されたDHFR-膜蛋白質が膜に正確に標的化できていることを示した(2)(図6)。細胞内でも、I型シグナルアンカー配列によるN-末端の膜透過は、疎水性セグメントによって開始すること、N-末端ドメインは透過前に立体構造形成の余地があることが明らかになった。

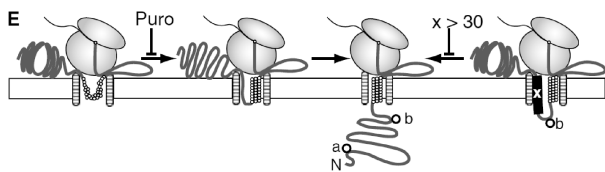


図5、大きなアミノ末端ドメインの膜透過にはATPなどの高エネルギーリン酸化合物や小胞体内腔側のhsp70(BiP)、は不要である。リボソームが必須であり、大きなドメインの引き込みには、シグナル配列の膜貫通 α ヘリックス形成が駆動力として作用する。

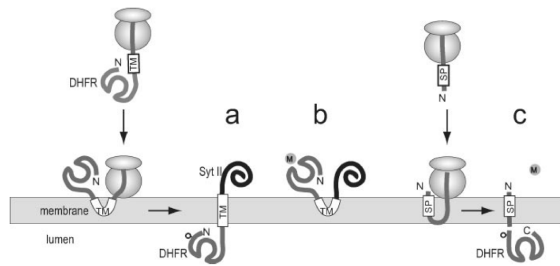


図6、細胞内での膜蛋白質のトポロジー制御。I型シグナルアンカー配列のアミノ末端側にジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)ドメインをアミノ末端に融合した場合、これに結合するリガンド(メトトレキセート、M)を添加することによって膜透過が抑制され、結果的に膜貫通トポロジー(a)から、膜内ループトポロジー(b)に変換された。培養細胞内でもこの変換が起きることが明らかになった。

10) 正電荷の作用

膜蛋白質のトポロジー形成要因として最もよく知られていた正電荷アミノ酸残基について、作用を発揮する生合成におけるタイミングと認識される場所を解析した。I型シグナルアンカー配列の後ろ(カルボキシル末端側)に存在する正電荷アミノ酸残基は、膜透過抑制

作用を発揮することによってI型トポロジー形成に寄与する。詳細な解析の結果、この正電荷は25残基は離してもその作用を発揮できること、これを後ろにずらせた場合には、アミノ末端の膜透過のタイミングも遅くずれることを見出した(1)(図7)。トランスロコンは予想外に広いスパンのアミノ酸配列を識別してトポロジーを決定していることを示している。

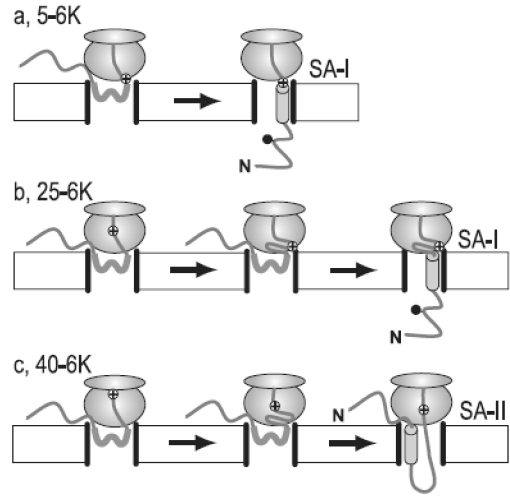


図7、荷電アミノ酸残基はリボソームから出て、トランスロコンによって解読される。疎水性配列直後の正電荷はすぐにトポロジー形成に寄与できる(a)。疎水性配列から離れた正電荷は、疎水性配列がトランスロコンに入ってからトポロジーが確定するまで時間的に遅れるが、25残基離れてもまだ作用できる(b)。さらに後ろに離れるとものはや寄与できない(c)。

11) ミトコンドリアへの膜蛋白質の標的化

疎水性度の高い膜蛋白質はこれまでの常識的な考え方によると、リボソームから出てくるとすぐにシグナル認識粒子(SRP)によって認識され、合成完了以前に小胞体に標的化されてしまう。この考え方がすべて正しいと仮定すると、小胞体に由来するオルガネラ膜(小胞体、ゴルジ体、細胞膜、リソソーム膜など)以外に膜蛋白質は存在しないことになる。ミトコンドリアに存在するABC輸送体B10アイソフォームの標的化の研究より、膜蛋白質に特化した長いミトコンドリア標的化シグナル配列(N135)を見出した(5)。N135は膜蛋白質の小胞体標的化を抑制する作用を有し、かつミトコンドリア標的化能を有していた。また、この配列によって標的化された蛋白質は、合成後にミトコンドリアに進入することを証明し、標的化経路のスイッチングが起きていることを示した(図8)。

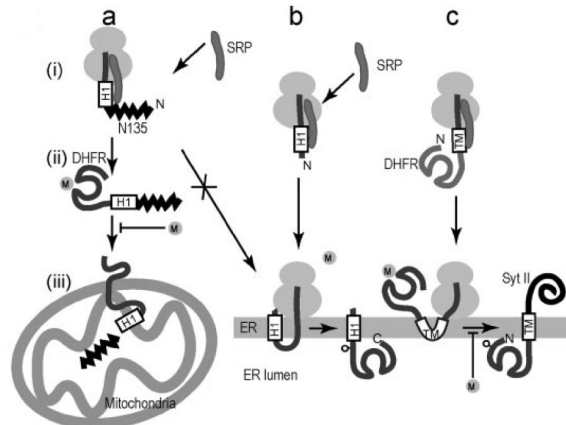


図8、N135による疎水性膜蛋白質の標的化機構のスイッチング

12)NHEファミリー蛋白質の構造形成機構と膜トポロジー:NHE (Na⁺/H⁺交換輸送体) ファミリーについて、各膜貫通セグメントの小胞体膜上でのトポロジー形成様式を徹底して解析した。ヒトNHE1のアミノ末端TM (TM1) は、切断を受けるシグナル配列、すなわちシグナルペプチドであること、これが無いとTM2は正常に組み込まれないこと、TM9とTM10の間にある疎水性配列 (H10) は、膜を透過し小胞体内腔側のループであること、H10直後には隠れたシグナルペプチダーゼによる切断部位が存在すること、TM11はH10領域よりも疎水性度が低いにもかかわらず膜貫通状態にあることなどを明らかにした (6)。蛋白質膜組み込み装置と生合成過程を考慮することの重要性がここでも明らかになった。

また、植物のNHEファミリー蛋白質、NHX1について、植物分野ではこれまで動物のものとはまったく異なる膜トポロジーであるとされてきた。しかし、トポロジー形成の詳細な検討の結果、これはアミノ末端のシグナルペプチドが見られない点を除いて、動物のNHE1と同等の膜トポロジー形成特性を有することが判明した。これをもって、普遍的なNHEファミリーのトポロジーモデルを提唱した。(4) (図9)。植物 (NHX1) と動物 (NHE1) との最も大きな違いは、後者に存在するシグナル配列が前者には無いことである。しかし、植物のものはシグナルペプチド無しでもTM2相当の部分が正確にアミノ末端側を膜透過させる、いわゆるSA-Iの作用を持っていることが実験的に示された。トポロジー予測における、トポロジー形成能の正確な見積もりの重要性が明らかになった。

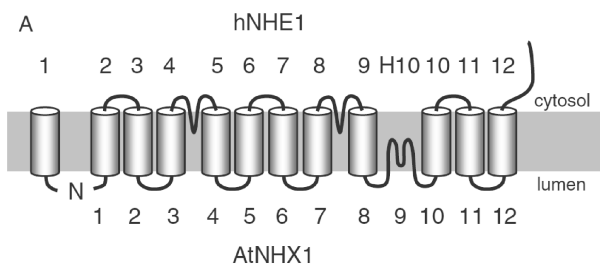


図9、NHE1の膜蛋白質のH10部分は膜透過と同時に膜内に配置される内腔側ループである。TM9とH10の間には隠れたシグナルペプチダーゼの切断サイトが存在する。

〈国内外での成果の位置づけ〉

小胞体におけるトポロジー形成を包括的に探求し、あらたなトポロジー形成様式とその概念を提唱していることで世界をリードしている。また、膜蛋白質の小胞体標的化回避という視点は、われわれ独自のものである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

これまでの実験による知見や、ゲノム情報科学解析からの知見をもとに考えられたさまざまな仮説の検証および予測法の精密化を一部やり残した。これは、少人数グループのため手が回らなかったことも要因のひとつと考えている。

〈今後の課題〉

小胞体膜標的化回避シグナルとしての「やや低い疎水性セグメント」識別機構の解明、高疎水性膜蛋白質の小胞体回避シグナルの確定、小胞体 (分泌系オルガネラ) 以外のオルガネラ膜での構造形成様式の解明と小胞体のもとの厳密な対比によって、すべての膜蛋白質の局在

と構造形成の原理を解明することが残された課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 0602070916
Kida, Y., Morimoto, F., Mihara, K., and Sakaguchi, M. (2006) Function of positive charges following signal-anchor sequences during translocation of the N-terminal domain
J. Biol. Chem., 281, 1152-1158.
- 0602070911
Ikeda, M., Kida, Y., Ikushiro, S., Sakaguchi, M. (2005) Manipulation of membrane protein topology on the endoplasmic reticulum by a specific ligand in living cells
J. Biochem., 138, 631-637.
- 0602070856
Kida, Y., Mihara, K., and Sakaguchi, M. (2005) Translocation of a long amino-terminal domain through ER membrane mediated by following signal-anchor sequence
EMBO J., 24, 3202-3213.
- 0602070841
Sato, Y. and Sakaguchi, M. (2005) Topogenic properties of transmembrane segments of *Arabidopsis thaliana* NHX1 reveal a common topology model of the Na⁺/H⁺ exchanger family
J. Biochem., 138, 425-431.
- 0602070833
Miyazaki, E., Kida, Y., Mihara, K. and Sakaguchi, M. (2005) Switching the sorting mode of membrane proteins from co-translational ER targeting to post-translational mitochondrial import
Mol. Biol. Cell, 16, 1788-1799.
- 0602070827
Sato, Y., Ariyoshi, N., Mihara, K. and Sakaguchi, M. (2004) Topogenesis of NHE1: direct insertion of the membrane loop and sequestration of cryptic glycosylation and processing sites just after TM9.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 324, 281-287.
- 0602070820
Suzuki, H., Kadowaki, T., Maeda, M., Sasaki, H., Nabekura, J., Sakaguchi, M., and Mihara, K. (2004) Membrane-embedded C-terminal segment of rat mitochondrial TOM40 constitutes protein-conducting pore with enriched β -structure
J. Biol. Chem. 279, 50619-50629.
- 0602070807
Nakamura, Y., Suzuki, H., Sakaguchi, M., and Mihara, K. (2004) Targeting and assembly of rat mitochondrial translocase of outer membrane 22 (TOM22) into the TOM complex
J. Biol. Chem. 279, 21223 - 21232.
- 0404061559
Horie, C., Suzuki, H., Sakaguchi, M., and Mihara, K. (2003) Targeting and assembly of mitochondrial tail-anchored protein Tom5 to the TOM complex depend on a signal distinct from that of tail-anchored proteins dispersed in the membrane
J. Biol. Chem. 278, 41462-41471.
- 0403261634
Umigai, N., Sato, Y., Mizutani, A., Utsumi, T., Sakaguchi, M., and Uozumi, N. (2003)

- Topogenesis of two transmembrane type K⁺ channels, Kir 2.1 and KcsA. *J. Biol. Chem.* 278, 40373-40384.
11. 0404061605
Sato, Y., Sakaguchi, M., Goshima, S., Nakamura, T., and Uozumi, N. (2003)
Molecular dissection of the contribution of negatively and positively charged residues in S2, S3, and S4 to the final membrane topology of the voltage sensor in the K⁺ channel, KAT1. *J. Biol. Chem.* 278, 13227-13234.
 12. 0303211146
Kanki, T., Young, M.T., Sakaguchi, M., Hamasaki, N. and Tanner, M.J.A. (2003)
The N-terminal region of the transmembrane domain of human erythrocyte band 3: Residues critical for membrane insertion and transport activity. *J. Biol. Chem.* 278, 5564-5573.
 13. 0404061612
Sato, Y., Hosoo, Y., Sakaguchi, M., Uozumi, N. (2003)
Requirement of negative residues, Asp 95 and Asp 105, in S2 on membrane integration of a voltage-dependent K⁺ channel, KAT1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 923-926.
 14. 0303211228
Kanki, T., Sakaguchi, M., Kitamura, A., Sato, T., Mihara, K., and Hamasaki, N. (2002)
The tenth membrane region of band 3 is initially exposed to the luminal side of the endoplasmic reticulum and then integrated into a partially folded band 3 intermediate. *Biochemistry* 41, 13973-13981.
 15. 0303211221
Sakaguchi, M. (2002)
Autonomous and Heteronomous Positioning of Transmembrane Segments in Multispanning Membrane Protein. (Mini Review) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 1-4.
 16. 0303211213
Horie, C., Suzuki, H., Sakaguchi, M., and Mihara, K. (2002)
Characterization of the signal that directs the C-tail anchored proteins to the mammalian mitochondrial outer membrane. *Mol. Biol. Cell* 13, 1615-1625.
 17. 0303211204
Ukaji, K., Ariyoshi, N., Sakaguchi, M., Hamasaki, N., and Mihara, K. (2002)
Membrane topogenesis of the three amino-terminal transmembrane segments of glucose-6-phosphatase on endoplasmic reticulum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292, 153-160.
 18. 0303211158
Sato, Y., Sakaguchi, M., Goshima, S., Nakamura, T., and Uozumi, N. (2002)
Integration of Shaker-type K⁺ channel, KAT1 into the endoplasmic reticulum membrane: Synergistic insertion of voltage sensing segments, S3-S4 and independent insertion of pore-forming segments, S5-P-S6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 60-65.
 19. 0202071643
Miyazaki, E., Sakaguchi, M., Wakabayashi, S., Shigekawa, M. and Mihara, K. (2001)
NHE6 protein possesses a signal peptide destined for endoplasmic reticulum membrane and localizes in secretory organelles of the cell. *J. Biol. Chem.* 276, 49221-49227.
 20. 0202071647
Kanaji, T., Kanaji, S., Osaki, K., Kuroiwa, M., Sakaguchi, M., Mihara, K., Niho, Y., and Okamura, T. (2001)
Identification and characterization of two novel mutations (Q421K and R123P) in congenital factor XII deficiency. *Thromb. Haemost.* 86, 1409-1415.
 21. 0202071650
Kida, Y., Sakaguchi, M., Fukuda, M., Mikoshiba, K., and Mihara, K. (2001)
Amino acid residues before the hydrophobic region which are critical for membrane translocation of the N-terminal domain of synaptotagmin II, *FEBS Lett.*, 507, 341-345.
 22. 0202071653
Yoshimura, S., Nakamura, N., Barr, F. A., Misumi, Y., Ikehara, Y., Ohno, H., Sakaguchi, M. and Mihara, K. (2001)
Direct targeting of cis-Golgi matrix proteins to the Golgi apparatus. *J. Cell Sci.* 114, 4105-4115.
 23. 0111131630
Kato, Y., Sakaguchi, M., Mori, Y., Saito, K., Nakamura, T., Bakker, E. P., Sato, Y., Goshima, S. and Uozumi, N. (2001)
Evidence in support of a four transmembrane-pore-transmembrane topology model for the Arabidopsis thaliana Na⁺/K⁺ translocating AtHKT1 protein, a member of the superfamily of K⁺ transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6488-6493.
 24. 0111131633
Kusano, K., Sakaguchi, M., Kagawa, N., Waterman, M. R., and Omura, T. (2001)
Microsomal P450s use specific proline-rich sequences for efficient folding, but not for maintenance of the folded structure. *J. Biochem.* 129, 259-269.
 25. 0111131633
Kusano, K., Kagawa, N., Sakaguchi, M., Omura, T., and Waterman, M. R. (2001)
Importance of a proline-rich sequence in the amino-terminal region for correct folding of mitochondrial and soluble microbial P450s. *J. Biochem.*, 129, 271-277.
 26. 0111131621
Kanaji, S., Iwahashi, J., Kida, Y., Sakaguchi, M., and Mihara, K. (2000)
Characterization of the signal that directs Tom20 to the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 151, 277-288.
 27. 0111131624
Kida, Y., Sakaguchi, M., Fukuda, M., Mikoshiba, K. and Mihara, K. (2000)
Membrane topogenesis of a type I signal-anchor protein, mouse synaptotagmin 2, on the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 150, 719-729.
 28. 0111131627
Ota, K., Sakaguchi, M., Hamasaki, N. and Mihara, K. (2000)
Membrane integration of the second transmembrane segment of band 3 requires closely apposed preceding signal-anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 275, 29743-29748.