

特集：膜輸送ナノマシンの構造・作動機構と制御

緑膿菌の異物・抗生物質排出トランスポーターの機能とそれを支える構造

中 江 太 治

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) などのグラム陰性菌は複数の抗生物質に耐性を示す場合が多い。この多剤耐性の担い手はグラム陰性菌に特有である細胞膜の二重構造、すなわち細胞質膜及び外膜が存在することによる場合が多い。グラム陰性菌には三成分からなる異物・抗生物質排出トランスポーターが存在する。その三成分とは内膜貫通タンパク、外膜貫通タンパク及びペリプラズムタンパクである。この輸送体は内膜サブユニットのペリプラズム空間で基質を認識し外膜タンパク、ペリプラズムタンパクの助けを借り、異物を細胞外に能動排出することが明らかとなりつつある。最近これらのサブユニットタンパクはそれぞれに結晶化されその構造が明らかとなった。本稿ではこれらのサブユニットの結晶構造に基づいた異物排出トランスポーターの機能について解説する。

1. はじめに

緑膿菌は免疫力の低下した患者、老人などに感染を起こすことなどから、院内感染の起原因菌として近年大きな問題となっている。この菌が問題となる最大の原因は、複数の構造的にも作用機作の上からも異なる抗生物質に耐性を示すことにある¹⁻⁴⁾。このような多剤耐性の原因は主として外膜の透過性が低いこと、及び一旦細胞内に透過してきた抗生物質を細胞外に輸送するいわゆる薬剤排出ポンプを発現することに起因する^{5,6)}。多剤耐性の原因となる排出ポンプのうち主として問題となるのは、resistance-nodulation-division (RND) 型トランスポーターである⁷⁾。

RND 異物・薬物排出ポンプは、内膜貫通サブユニット (RND サブユニット) (例、緑膿菌の MexB、大腸菌の AcrB など)、外膜貫通サブユニット (outer membrane protein)

(例、緑膿菌の OprM、大腸菌の TolC など)、これらを連結するペリプラズムサブユニット (membrane fusion protein) (例、緑膿菌の MexA、大腸菌の AcrA など) の三つのサブユニットから構成されている (図 1)。緑膿菌における RND 型排出タンパク質は複数の系が知られているが、それらのうち MexAB-OprM 排出系が最も重要な役割

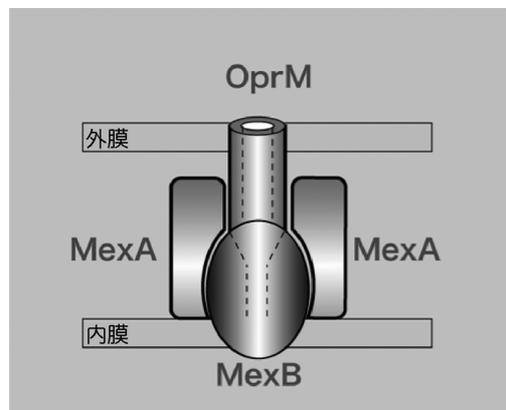


図 1 MexAB-OprM (AcrAB-TolC) の古典的モデル
トランスポーターは内膜貫通 MexB、外膜貫通 OprM 及びペリプラズムに位置する MexA の 3 種のサブユニットによって構成されている。

北里研究所 抗感染症薬研究センター (〒228-8555 相模原市北里 1-15-1 北里大学 S-105)

Structural basis of the xenobiotic-antibiotics transporter function

Taiji Nakae (Antimicrobial Research Center, Kitasato Institute, Bldg S-105, Kitasato University, Kitasato 1-15-1, Sagamihara, Kanagawa, postal code 228-8555, Japan)

を担っている。MexBは基質を認識し、また輸送のためのエネルギーを供給しているものと考えられている。OprMは主として基質の外膜透過のための透過孔を形成しているものと考えられている。MexAはMexBとOprMを連結することが主たる機能であろうと考えられてきた。

このように複雑な構成からなるRND型排出ポンプの構造と機能を明らかにすることは、科学としての興味と共に医学的にも大きく貢献できるものと考えられる。本稿ではRND型異物薬物排出トランスポーターの構造及び各サブユニットの機能、更にはそれらの集合体形成に係わる最近の知見を集めて紹介する。

2. 内膜貫通サブユニット MexB・AcrB の機能とそれを支える構造

MexB・AcrBサブユニットは内膜を貫通するタンパク質であろうことは初期の研究から考えられていたが、それが実験的に証明されたのはMexBのトポロジーの研究からであった⁸⁾。MexBの種々の位置にレポーターを組み込んでそのレポーターの膜における位置の研究から、MexBは内膜を12回貫通するタンパク質であることが明らかとされた。このことはMexBの大腸菌におけるホモログであるAcrBにおいても確認された⁹⁾。この実験結果は後にAcrBタンパク質の結晶構造解析の結果によって確かなものとされた^{10,11)}。つまり、AcrBは内膜を12回貫通するドメインとペリプラズムに大きく突出したドメインを有していた(図2)。ペリプラズムドメインはさらに2個のドメインから構成されていて、ペリプラズムの中央に位置するポータードメインと、外膜側の先端に位置するTolCドッキングドメインと呼ばれる部分である。このようなAcrBは三量体を形成しており、三量体で形成される中央部位のチャネル様構造を介して基質を外膜方向に向けて輸送し、TolCドッキングドメインを介して基質を外膜サブユニットに搬送するものと解釈された。三量体のサブユニット間には基質の取り込み口とおぼしき開口部分、vestibuleが3個所存在している。

AcrB・MexBの機能として考えられていたことは、(i) このサブユニットで基質の認識を行うであろうこと、及び(ii) このサブユニットでポンプに能動輸送のためのエネルギーを供給しているであろうということである。それでは、MexBタンパク質のどの部分で基質を認識するのかという興味ある疑問に答えなければならない。すでに知られているように、多くの異物・抗生物質輸送体はその基質を膜貫通領域で認識するのが一般的である¹²⁻¹⁴⁾。主として大腸菌のAcrBと緑膿菌のMexBなどを中心として行われた研究で二つの興味ある結果が得られた。まずは輸送体の基質特異性が変化した変異株を解析したところ、そのような変異の多くはAcrB・MexBのペリプラズムドメインに存

在することが報告された^{15,16)}。このような結果から、RNDトランスポーターはペリプラズムドメインで基質を認識しているのではないかと考えられるに至った。この仮説を証明することになった重要な実験は、 β -ラクタムを選択するMexB輸送体とアミノグリコシドを選択的に輸送するMexY輸送体の間でキメラタンパク質を構築した実験であった。その結果、これらRND輸送体はペリプラズムに突出したドメインにその基質特異性がゆだねられていることが明らかとなった¹⁷⁾。

ごく最近になってAcrBの基質結合型の結晶が得られた¹⁸⁾。その構造によると、基質結合型AcrBは非結合型に比べ、いくつかの特徴的な新しい情報を提供した(図2, 図3)。(i) 3個のプロトマーのうち一つのみで基質が結合していた。基質結合部位は芳香族アミノ酸に富んでおり、複数の結合部位らしきものが見られた。(ii) 3個のプロトマーは各々に異なったコンフォメーションをとっていた。基質の結合したプロトマー(binding型)は、結合位置が開いた状態であり、そこに基質の結合が見られた。排出型プロトマー(extrusion型)では基質結合位置は閉の状態状態で基質は入り込めない構造であった。基質取り込み型プロトマー(access型)ではbindingプロトマーに近いコンフォメーションで基質の導入口は大きく開いていたが、基質の結合は見られなかった。これらの観察の示すところは、AcrBはaccess型で基質の導入をし、基質と結合してbinding型となり、そしてその基質を放出してextrusion型になるものと解釈された。即ち三量体の各プロトマーはこの三つのコンフォメーションを機能的に回転しながら基質を排出するものと考えられた。また別の結晶体では基質の結合は見られなかったが三つの非対称的コンフォメーションが確認された¹⁹⁾。

MexB・AcrBのもう一つの重要な機能は、この排出ポンプアセンブリーに能動輸送のエネルギーを供給することである。それには内膜を介したプロトンの濃度勾配が係わっていることが初期の研究から明らかとされてきた。この事実を具体的に示したのは、緑膿菌MexBの膜貫通領域(TMS)に存在する荷電アミノ酸残基への点特異的変異導入の実験であった。その結果、TMS-4にあるAsp407、Asp408残基とTMS-10にあるLys939(AcrBでは940)残基が排出機能に必須であることが明らかとなった²⁰⁾。AcrBの結晶構造から見ると、事実これらの残基は膜中で最近位にあることが明らかとなった¹⁰⁾(図3)。基質と結合したAcrBのこの部分の構造を見ると、access及びbindingプロトマーではLys940とAsp407がイオン結合をしている状態が見られる。ところがextrusionプロトマーではこのイオン結合は解離してTMS-10のLys940は方向を変えてしまっており、あたかもエネルギーを放出した後のような構造が見られた¹⁸⁾。これらの結果及び上記の基質結合の構造

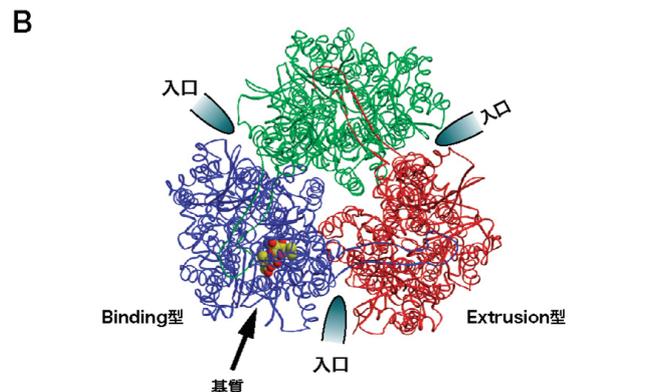
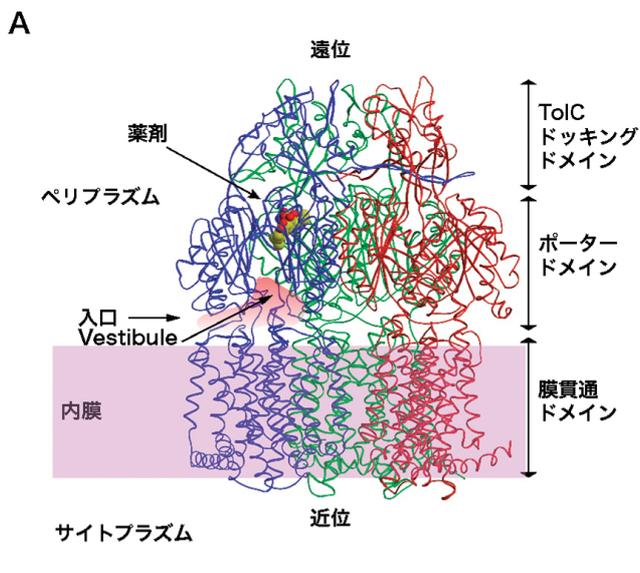


図3 AcrB (MexB) 三量体の各サブユニットの状態を模式化した図。詳細は本文を参照。

図2 AcrB (MexB) 内膜サブユニットの構造
 A, AcrB 三量体の側面図。三量体の各サブユニットはリボンの色によって識別されている。B, 三量体を TolC 結合ドメイン側から見た図。中央部分に基質の通路と思える部分が見える。X線解析像は大阪大学村上聡氏の提供

をあわせると、基質結合部位とエネルギー変換部位が連携してコンフォメーション変化をしていることが明らかである (図3)。

RND型輸送体は胆汁酸、界面活性剤及び有機溶媒など疎水性物質も輸送する。これらの物質は膜の疎水性領域で取り込まれるのであろうとする解釈がなされていたが、上にも書いたドメイン交換の実験の結果、疎水性物質もペリプラズムドメインで取り込まれることが証明され、RND輸送体は外膜での能動輸送体であることが真に確立された²¹⁾。

3. 外膜貫通サブユニット OprM・TolC の機能とそれを支える構造

RND型排出ポンプの特徴は、基質を外膜越しに能動輸

送することにある。そのためには外膜貫通サブユニットが機能していなければならない。緑膿菌の場合は例えば MexAB-OprM ポンプのように外膜サブユニットが内膜及びペリプラズムサブユニットと共に一つのオペロンでコードされている³⁾。従って OprM が基質の透過チャネルを形成するものと考えられた。大腸菌の場合には多機能外膜タンパク質 TolC が OprM と同じ機能をする事がわかっている⁵⁾。OprM と TolC の大きな違いは、(i) OprM は脂肪酸で修飾を受けているが²²⁾、TolC にはそのような構造はない。また脂肪酸を外してもポンプ機能に影響ないことから脂肪酸は輸送機能に必須ではないものと考えられる²²⁾。(ii) OprM など緑膿菌の外膜サブユニットは専用の内膜及びペリプラズムサブユニット (例、MexB, MexA) と機能する 경우가多いが、TolC は多くの異なった輸送体と共役的に機能する^{5, 23)}。

OprM・TolC は結晶化され、その構造が明らかとなっている^{24, 25)}。OprM 及び TolC の一般的な構造は互いに類似している。主たる類似点は次のような点である。(i) 全体の構造としてはホモ三量体である。三量体は大きく分けてβ構造に富む部位とαヘリックスに富む部位から成っている (図4a, b)。(ii) 三量体は合計12本のβシートにより樽状 (barrel) を形成している。βバレルは約40Åの長さで、中央には開孔部が見られる。この部分は外膜を貫通しているものと考えられるが、孔の部分は6~8Åと狭く、抗生物質などが自由に透過できる大きさではない。(iii) αヘリックス部位も三量体を形成しており、12本のαヘリックスが細長い樽状を形成している。αバレルの部分は約100Å程の長さでペリプラズムの約半分くらいまで伸びている。このαバレルの長さと同約70Åの長さを有する AcrB・MexB のペリプラズムドメインがペリプラズム空間

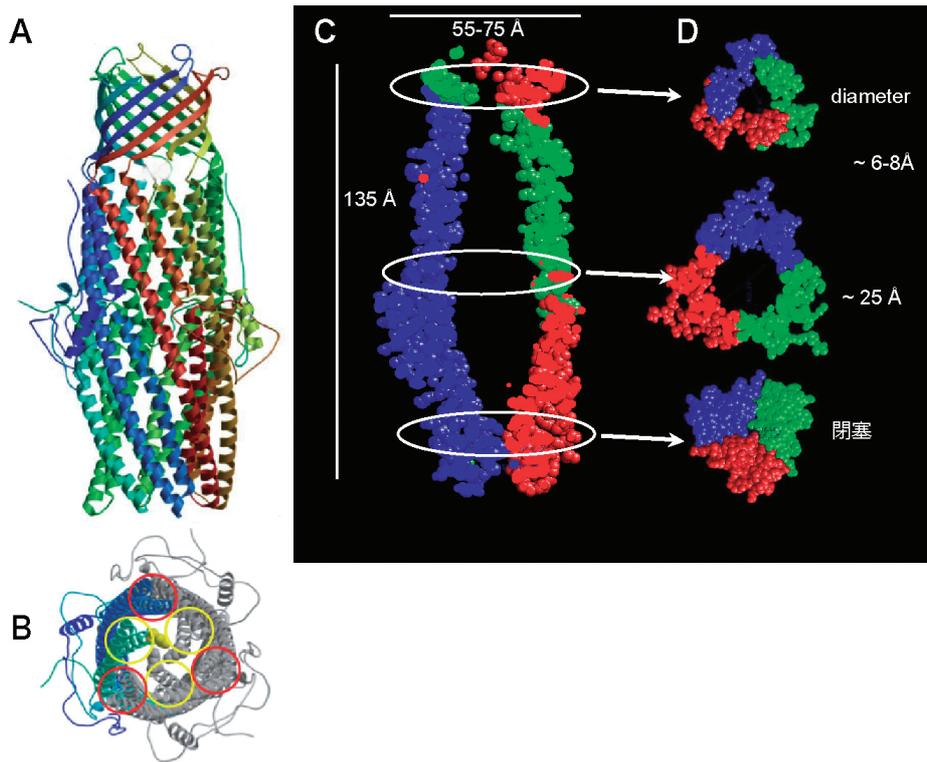


図4 OprM 外膜サブユニットの構造

A, OprM 三量体のリボン構造, 側面図, 各々のサブユニットは異なった色で示してある. B, 三量体を外膜側から見た図, 赤色の円は外膜側の突起, 黄色の円は閉塞状態を示す内膜側の突端を内部からのぞいた図. C, 三量体の縦割り断面図, サブユニットは色分けしてある. 内部の空洞状態及び両端の状態に注意. D, 三量体を外膜貫通部位, ペリプラズムドメイン中央部位, 及びペリプラズム先端で水平に輪切りした図.

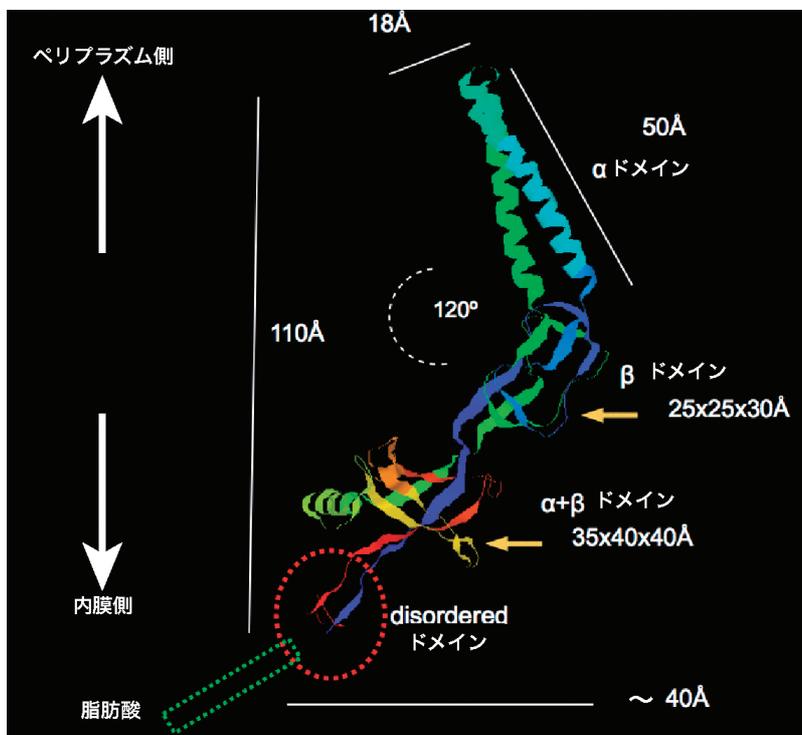


図5 MexA ペリプラズムサブユニットの構造

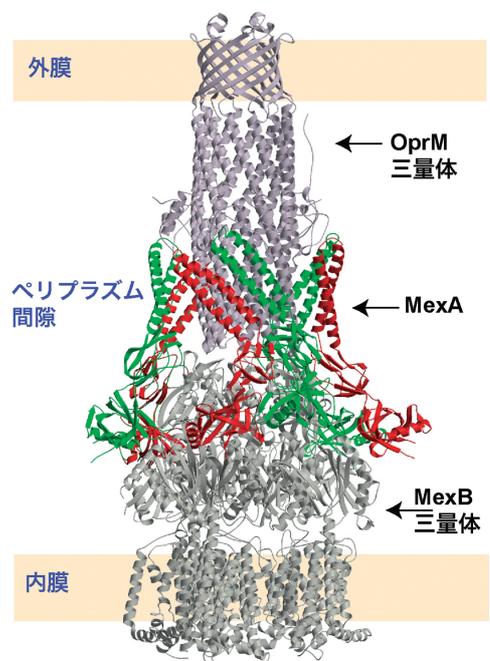


図6 MexAB-OprM・(AcrAB-ToIC)のアセンブリー想像図

X線結晶解析から得られた MexA, AcrB, 及び OprM の構造を元にトランスポーター全体図を構築した図. MexB および OprM は各々に三量体であることが明らかであるがペリプラズムサブユニット MexA の数は未定.

を横切って内膜と外膜をつないでいるものと考えられる。 α バレルの内側には大きな空洞があってこの空間を通して抗生物質などの基質が外膜側に押しやられるであろうことは想像に難くない。

このような構造を有する OprM・TolC であるが、これらが機能するためには MexB・AcrB から送られてくる基質を受け取る入口が無ければならない。ところが OprM・TolC のペリプラズム側先端は閉塞状態にあり、抗生物質などが透過できる大きさの孔は見られない (図 4A-D)。この閉じた門はどうしたら開けられるかについては推測の域を出ないが、一つの可能性は TolC のペリプラズム側先端の水素結合及びイオン結合を弱めれば開くとする実験結果がある²⁶⁾。別のモデルとしては α バレルを構成するコイルドコイルに穴とそれに合う出っ張りがある、出っ張り部分が穴を押しコイルドコイルの捻れを元に戻せばよいという説もある²⁷⁾。OprM に関しては α バレルのヘリックス 7 が極度に曲げられているのでこれが直線に近い α ヘリックスになればヘリックス 7 と 8 が外側に移動してペリプラズム先端の門は開くとしている²⁵⁾。しかしいずれのメカニズムであれ、ねじれた (twisted) α ヘリックスの束が捻れを元に戻すように移動したときに門が開の状態になることは間違いなさそうである。

4. MexA の機能とそそれを支える構造

MexA サブユニットは内膜にアンカーしたりポタンパク質であるが、タンパク質脂質部分は全てペリプラズムに突出している²⁸⁾。遺伝子操作によって脂肪酸を取り外してタンパク質部分のみ発現してもポンプ機能には影響がない。MexA は内膜と外膜を連結する膜融合タンパク質 (membrane fusion protein) という名称がつけられている²⁹⁾。

MexA タンパク質も結晶化されその構造が解析された^{30,31)}。MexA の構造については 1999 年に二次元結晶の電子顕微鏡による解析がなされておりコイルドコイル構造及びリポイル構造が予測されていた³²⁾。結晶構造解析の結果、MexA 単量体は鎌状をした細長いタンパク質で大きくは 4 個のドメインから成っている³¹⁾ (図 5)。ヘアピン構造を有する細長い α ドメイン、8 個の β シートからなる球状の β ドメイン、7 個の β シートと 1 個の α ヘリックスからなる $\alpha+\beta$ ドメイン及び詳細な構造は見えないが disordered ドメインが存在する。各々は約 50 Å, 30 Å, 40 Å 及びサイズ不明である。従って全体の長さは約 120 Å 以上である。MexA の N 末端には脂肪酸が結合していて、これが内膜に錨を下ろしたようになっていて考えられるが、N 末端は disordered ドメインに含まれることからこのドメインが内膜に最も近く、従って MexB と会合しているものと解釈された。結果として α ドメインは外膜側にあり OprM と会合するものと解釈された。したがって MexA は MexB

と OprM を連結しポンプアセンブリーを安定化する分子クランプ (molecular clamp) の役割を果たすものと考えられる。

5. MexA-MexB-OprM 排出ポンプが作動するためのサブユニット集合体

すでに述べてきたように内膜貫通サブユニット (MexB・AcrB)、外膜貫通サブユニット (OprM・TolC)、及びペリプラズムサブユニット (MexA・AcrA) の詳細な構造が緑膿菌と大腸菌のシステムで明らかとされているので、それらをつなぎ合わせていけば RND 型排出ポンプの全体像が浮かび上がってくる (図 6)。

5-1. 内膜貫通サブユニット (MexB・AcrB) と外膜貫通サブユニット (OprM・TolC) の会合

AcrB 三量体のペリプラズム側先端は細くすぼんだような形状をしており、また TolC (OprM) のペリプラズム側先端も α バレルが先細りとなっている。従って AcrB・MexB と TolC・OprM の会合はこの部分でなされると思われることができる。事実 X 線解析像上で AcrB-TolC, AcrB-OprM の組合せで分子を回転させるとぴったりと合致する部分がある^{10,25)}。この仮説を支持する生化学的データとして AcrB は TolC とこの部分で化学架橋されるという報告がある³³⁾。従って内膜サブユニットと外膜サブユニットは互いにペリプラズム側先端で会合していることは間違いのないものと解釈できる。しかしながら AcrB・MexB と TolC・OprM の先端は互いに細い構造となっているため相互にサブユニットを選択するような認識機構がこの部分にあるとは考えがたい。

5-2. 内膜サブユニット (MexB・AcrB) とペリプラズムサブユニット (MexA・AcrA) の会合

この組合せの会合を論じるには MexA の結晶構造のうち disordered ドメインの構造を得ることが必須であるが、残念ながら現時点では未だ情報がない。しかしながら遺伝子組換え及び生化学的なデータからこれらの会合を示唆する結果が得られている。(i) AcrA とそのホモログペリプラズムタンパク質の間³⁴⁾でドメイン交換の実験をした結果、AcrA の C 末端部位 (MexA の disordered ドメイン部分) が AcrB との会合の特異性を握っているということが明らかとなった。(ii) MexA の disordered ドメインに相当する AcrA のドメインは AcrB と化学架橋された³⁵⁾。(iii) タンパク質は発現されるけれども MexB と機能的に連携しないような MexA の変異株を調べたところ、変異の多くは disordered ドメインに位置する N 末端及び C 末端に集中していた³³⁾。また MexA と MexB の会合は化学架橋の実験でも確認された³³⁾。このような実験結果を総合すると、

MexBはMexAのdisorderedドメインと会合していることがわかるがMexBの側のMexAとの会合に係わる位置は未だ特定されていない。

5-3. 外膜サブユニットOprMとペリプラズムサブユニットMexAの会合

大腸菌ではTolCサブユニットが万能外膜サブユニットとしていずれのRND型排出ポンプとも機能的に作動するのでTolC-AcrB会合の特異性を論じる必要はないが、緑膿菌では外膜サブユニットとペリプラズムサブユニットの組合せが存在する。この特異性を担っている部位を特定することによってこれらの会合位置を決定した。MexAはOprMとは機能するがOprNとは機能しない。そこでMexAに変異を導入しOprNと機能するような株を選択したところ、その変異は例外なくMexAのコイルドコイルのQ116上に見いだされた³⁶⁾。この実験結果からMexAの α ドメインは外膜タンパク質との会合の特異性を決定しているものと結論した。この結論はMexAとMexEのドメイン交換の実験からも裏付けられた。

6. おわりに

内膜、外膜、ペリプラズムに各々のサブユニットを有する三成分異物排出ポンプは複雑な構造をとって基質を細胞外に輸送している。各サブユニットの生化学的、組み換え遺伝子的及びX線結晶構造解析の結果、排出輸送体が働くための大まかな輪郭が見えてきた。特徴的なこととしては、この種の輸送体は外膜を透過してペリプラズムにきた異物や抗生物質をペリプラズム空間で認識し補足して、内膜のプロトンの能動勾配を利用して細胞外に放出するシステムであるということに尽きる。即ち外膜における新しい能動排出の系が確立されたことになる。これはグラム陰性菌が異物から自己の細胞を守るための実に合理的な輸送系である。即ちグラム陰性菌は、(i) ペリプラズムの異物や抗生物質の濃度を常に低く保つことができる。(ii) ポンプが作動することにより異物の原形質(膜)への透過及びこれによる傷害を低くすることができる。(iii) 万一異物や抗生物質が細胞質内に透過してきた場合は、内膜に存在する別の種類の排出ポンプを使いペリプラズムまで輸送し、ペリプラズムから外へはここに述べたRND型ポンプによって搬送される。このような排出ポンプがどのような内在性異物(例、代謝産物など)を運ぶのかは今後の研究を待たなければならない。

文 献

- 1) Li, X.Z., Nikaido, H., & Poole, K. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 1948-1953.
- 2) Morshed, S.R., Lei, Y., Yoneyama, H., & Nakae, T. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, 356-362.
- 3) Poole, K., Heinrichs, D.E., & Neshat, S. (1993) *Mol. Microbiol.*, **10**, 529-544.
- 4) Rella, M. & Haas, D. (1982) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **22**, 242-249.
- 5) Paulsen, I.T., Park, J.H., Choi, P.S., & Saier, M.H., Jr. (1997) *FEMS Microbiol. Lett.*, **156**, 1-8.
- 6) Nakae, T. (1997) *J. Infect. & Chemother.*, **3**, 173-183.
- 7) Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A., & Saier, M.H. (1999) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **1**(1), 107-125.
- 8) Guan, L., Ehrmann, M., Yoneyama, H., & Nakae, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 10517-10522.
- 9) Fujihira, E., Tamura, N., & Yamaguchi, A. (2002) *J. Biochem.*, **131**, 145-151.
- 10) Murakami, S., Nakashima, R., & Yamaguchi, A. (2002) *Nature*, **419**, 587-593.
- 11) Pos, K.M., Schiefner, A., Seeger, M.A., & Diederichs, K. (2004) *FEBS Lett.*, **564**, 333-339.
- 12) Schuldiner, S., Granot, D., Steiner, S., Ninio, S., Rotem, D., Soskin, M., & Yerushalmi, H. (2001) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 155-162.
- 13) Brown, M. H. & Skurray, R.A. (2001) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 163-170.
- 14) Bibi, E., Adler, J., Lewinson, O., & Edgar, R. (2001) *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 171-177.
- 15) Mao, W., Warren, M.S., Black, D.S., Satou, T., Murata, T., Nishino, T., Gotoh, N., & Lomovskaya, O. (2002) *Mol. Microbiol.*, **46**, 889-901.
- 16) Elkins, C. A. & Nikaido, H. (2002) *J. Bacteriol.*, **184**, 6490-6498.
- 17) Eda, S., Maseda, H., & Nakae, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 2085-2088.
- 18) Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., & Yamaguchi, A. (2006) *Nature*, **2006**, 173-179.
- 19) Seeger, M.A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K., & Pos, K.M. (2006) *Science*, **313**, 1295-1298.
- 20) Guan, L. & Nakae, T. (2001) *J. Bacteriol.*, **185**, 1734-1739.
- 21) Li, X., Eda, S., & Nakae, T. (2006) *Microbiol. Immunol.*, **50**, 53-56.
- 22) Nakajima, A., Sugimoto, Y., Yoneyama, H., & Nakae, T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 30064-30068.
- 23) Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (1998) *EMBO J.*, **17**, 6487-6496.
- 24) Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., & Hughes, C. (2000) *Nature*, **405**, 914-919.
- 25) Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., Narita, S.-I., Nakagawa, A., & Nakae, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 52816-52819.
- 26) Andersen, C., Bokma, E., Eswaran, J., Humphreys, D., Hughes, C., & Koronakis, V. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11103-11108.
- 27) Calladine, C.R., Sharff, A., & Luisi, B. (2001) *J. Mol. Biol.*, **305**, 603-618.
- 28) Yoneyama, H., Maseda, H., Kamiguchi, H., & Nakae, T. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 4628-4634.
- 29) Dinh, T., Paulsen, I.T., & Saier, M.H., Jr. (1994) *J. Bacteriol.*, **176**(13), 3825-3831.
- 30) Higgins, M.K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9994-9999.
- 31) Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Tsuki-

- hara, T., Nakagawa, A., Narita, S.-I., & Nakae, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 25939–25942.
- 32) Johnson, J.M. & Church, G.M. (1999) *J. Mol. Biol.*, **287**, 695–715.
- 33) Nehme, D., Li, X.Z., Elliot, R., & Poole, K. (2004) *J. Bacteriol.*, **186**, 2973–2983.
- 34) Elkins, C.A. & Nikaido, H. (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 5349–5356.
- 35) Zgurskaya, H.I. & Nikaido, H. (2000) *J. Bacteriol.*, **182**, 4264–4267.
- 36) Eda, S., Maseda, H., Yoshihara, E., & Nakae, T. (2006) *FEMS Microbiol.*, **254**, 101–107.
-