

共鳴ラマン分光法によるヘムタンパク質の構造解析



技術解説

宇野 公之*

Structure Analysis of Heme Proteins by Resonance Raman Spectroscopy

Key Words : Resonance Raman Effect, Heme Protein, Active Site

1. はじめに

1928年にC. V. Ramanらがラマン効果を報告¹⁾して以来、ラマン分光法は様々な分子の構造解析に適用されてきた。ラマン効果とは、分子に光を照射した際に、散乱される光のエネルギーが分子の振動エネルギー分だけずれる現象である。したがって、散乱光のスペクトルを調べれば、分子の振動エネルギーに関する情報が得られる。振動スペクトルは分子構造の微小な変化に敏感であるため、その解析から分子の電子状態やコンフォメーションの変化を検出することができる。同様の情報は赤外吸収(IR)スペクトルからも得られるが、後述するように生体試料の解析にはラマン分光法が圧倒的に有利である。さらに、共鳴ラマン分光法を利用することにより、微量生体試料中に含まれる特定の分子団に関する有用な構造情報が得られる。本稿では特にヘムタンパク質の構造解析に絞り、共鳴ラマン分光法について概説する。

2. 共鳴ラマン分光法

振動数 ν_1 で振動している分子に振動数 ν_0 の光を照射すると、入射光と同じ振動数 ν_0 の光(レイリー散乱)に加えて、 $\nu_0 \pm \nu_1$ という分子固有の振動数 ν_1 を含む光(ラマン散乱)が観測される。この

現象がラマン効果であり、レイリー散乱とラマン散乱の差(=シフト)を測定すれば ν_1 が得られることになる。励起光 ν_0 を分子の電子吸収帯(いわゆる紫外可視吸収帯)に合わせるとラマン散乱光は著しく増大し(共鳴ラマン効果)、通常 $10^4 \sim 10^6$ 程度にスペクトルが増強される。したがって、特定の発色団に共鳴するように励起波長を選べば、得られるスペクトルには実質上その発色団に由来する振動ピークのみが観測される。

ラマン効果はきわめて微弱な現象であり、その量子収率は $10^{-14} \sim 10^{-10}$ 程度であるため、わずかなケイ光性不純物(通常量子収率は 10^{-1} 程度)の混入により測定が著しく妨害される。また、微弱な信号を検出する一方でわずかなピークの変化を観測するため、測定には高感度かつ高分解能の装置が必要となる。そのため、ラマン分光計は高額なものとなってしまう、ラマン分光法の普及にとって大きな障害となっていた。

しかし、ラマン分光法には以上の短所を補ってあまりある長所がある。たとえば、もうひとつの振動分光法であるIRでは分子の振動数 ν_1 に相当する光(赤外光)の吸収を直接観測するのに対し、ラマン分光法では通常可視域の光を用いて $\nu_0 - \nu_1$ を観測し、間接的に ν_1 を測定する。したがって、IRで使用されるKBr等の高価なセルを必要とせず、可視光が通る安価なガラスセルを利用できる。また、選択律の違いにより、ラマンスペクトルではIRに比べて水の変角振動モード(1650 cm^{-1} 付近)が弱いため、水溶媒が測定上の妨害にならない。一方、通常ラマン散乱の励起にはレーザーが用いられるが、そのビーム幅だけの微量試料(数 μL 程度)で測定が可能である。さらに、共鳴ラマン効果を利用すれば、 μM オーダーの希薄試料で測定が可能になるとともに、複雑な分子中に含まれる特定の分子発色団の振動情



*Tadayuki UNO

1958年1月生
東京大学大学院薬学系研究科・博士課程修了(1986年)
現在、大阪大学大学院 薬学研究科 分子反応解析学分野 教授 薬学博士 生物分析化学、生物物理化学
TEL : 06-6879-8205
FAX : 06-6879-8209
E-mail : unot@phs.osaka-u.ac.jp

報を選択的に得ることができる。以上の利点は、貴重な生体高分子を測定する際にきわめて有利であり、特にヘムタンパク質を研究する上で共鳴ラマン分光法は必要不可欠のものとなっている。

3. ヘムタンパク質

ヘムタンパク質とは、活性中心に鉄ポルフィリン錯体（ヘム）を含むタンパク質の総称である。図1に代表的なヘムであるヘムbの構造を示す。ポルフ

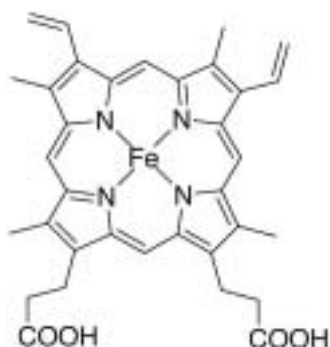


図1 ヘムbの構造

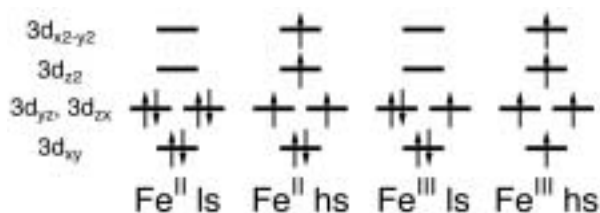


図2 3d軌道の分裂と電子配置

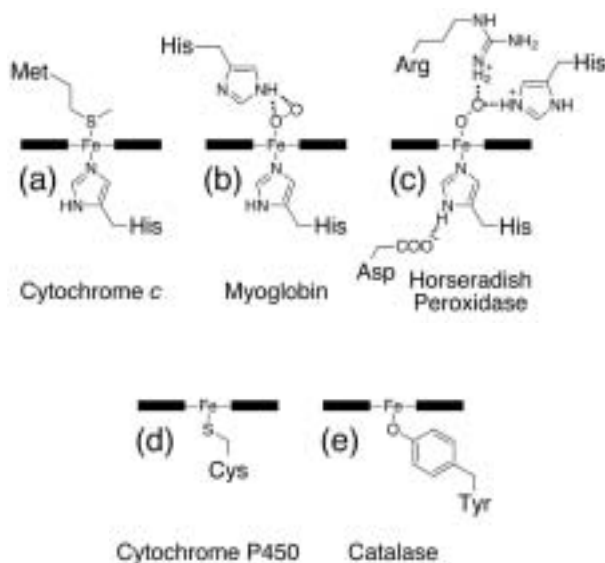


図3 ヘム周辺構造

ィリン環は芳香族性を示して平面構造をとり、中心には鉄がキレートされている。鉄は通常2価（還元型）あるいは3価（酸化型）が安定であり、それぞれ3d軌道に6個あるいは5個の電子を持つ。3d軌道は5つの軌道からなるが、ピロール窒素及びヘム面上下の軸配位子により縮退が解け、図2に示したようなエネルギーレベルに分裂する。これらの軌道に6個あるいは5個の電子をつめる場合、通常それぞれ2通りの方法が可能である。電子が各軌道へばらばらに入ってスピン量子数Sが大きくなる場合を高スピン状態（hs）、できるだけ対を作ってSが小さくなるように入る場合を低スピン状態（ls）とよぶ。これらの電子のつまり方は軸配位子の種類と数によって決まる。すなわち、強い配位子場を持つ共有結合性の配位子が軸配位子となる場合には低スピン状態となり、弱い配位子場を持つイオン結合性の軸配位子の場合には高スピン状態となる。また、軸配位子が1つの場合（5配位状態）には、通常高スピン状態となる。

以上のように、ヘム鉄は軸配位子によってさまざまな状態をとりうるが、これはヘムタンパク質の機能にとってきわめて重要である。たとえば、シトクロムcはミトコンドリア呼吸鎖を構成するヘムタンパク質であるが、シトクロムbc₁複合体とシトクロムc酸化酵素との間の電子授受を媒介する。このような電子キャリアータンパク質のヘムは多くの場合6配位型となっており、シトクロムcではHisとMetの側鎖がヘム鉄に軸配位している（図3a）。このような2つの強い配位子の結合はヘム鉄の酸化還元電位を変化させ、電子の出入りを容易にするとともに、還元型ヘム鉄に高い親和性を持つ酸素等の配位を阻害している。すなわち、酸素が配位しうる配位座を占有しておくことにより、酸素がヘム鉄を酸化（＝ヘム鉄が酸素を還元）してしまうのを防ぐことができる。

逆に、酸素運搬・貯蔵機能を担うヘモグロビンやミオグロビンでは、酸素が結合しやすいように第6配位座が空位となった5配位型ヘムを含んでいる。さらに、還元型ヘム鉄が酸素により酸化されないよう、結合酸素のそばに位置するHis残基（遠位His）が酸素へ水素結合を形成している（図3b）。

一方、ミオグロビンと同じくHisを軸配位子として持つペルオキシダーゼは、酸素のO-O結合を活

性化し、その酸化当量を用いて種々の基質を酸化する。本酵素は H_2O_2 の O-O 結合をヘテロに解裂させ、自身のヘム鉄が形式上の酸化数 5 価（複合体 I）次いで 4 価（複合体 II）という高酸化状態を経て 3 価へと戻る間に基質を 2 電子当量分酸化する。このヘテロ解裂には、軸配位子 His（近位 His）と近傍の酸性 Asp 残基、及び遠位側の塩基性残基（His、Arg）が関与している（図 3c）。すなわち、負電荷を持つ Asp 残基が近位 His の NH プロトンと強く水素結合することにより His を負に帯電させる。その結果、His からヘム鉄への電子供与が促進されてヘム鉄の酸化還元電位は低下し、高酸化状態が安定化する。一方遠位側では正電荷を帯びた塩基性残基が結合酸素へと水素結合し、酸素の分極を促進することにより O-O 結合をヘテロに解裂させる。このような近位側からの電子 push 効果と遠位側の電子 pull 効果によって酸素が活性化されると考えられている。

近位側からの電子供与は酸素の活性化に必須と考えられ、His 以外の軸配位子でも可能である。たとえば、ヒト肝に含まれる薬物代謝酵素シトクロム P450（CYP）では、ヘム鉄の軸配位子は Cys のチオレート基となっている（図 3d）。本酵素は結合酸素を活性化してヘテロ解裂させ、酸素 1 原子分を基質に導入する。その高酸化状態の構造は未だ不明であるものの、Cys からの電子供与がきわめて重要であると考えられている。さらに、 H_2O_2 を水と分子状酸素に不均一化するカタラーゼでは軸配位子が Tyr のフェノレート基となっている（図 3e）。

以上のように、ヘムタンパク質は共通のヘムを含みながらも多様な機能を発現しており、それらはヘム鉄の近位側軸配位子と、ヘムをはさんで反対側の遠位側アミノ酸環境によって制御されている。したがって、ヘムタンパク質の機能を理解する上で、これらの構造的性質を明らかにすることはきわめて重要となる。そのための手法として共鳴ラマン法は最適であり、以下で実例とともに解析法を紹介する。

4. 面内伸縮振動

前述のように、ヘムの骨格は π 電子共役系を持つため平面構造となり、ヘム鉄を通してヘム面に垂直な 4 回回転軸を持つ正方形（ D_{4h} 対称性）に近似できる。対称中心を持つため、IR 活性な振動モードとラマン活性な振動モードとの間に交互禁制が成り立

つ。特に、面内振動モードにはラマン活性な 35 種（ $9A_{1g} + 9B_{1g} + 8A_{2g} + 9B_{2g}$ ）と IR 活性な 18 種（ E_u ）が存在する²⁾。実際にはビニル基やプロピオン酸基等の側鎖置換基が存在するためにヘムの対称性は低下し、 E_u モードも弱く観測されうる。

一方、ヘム π 電子の最高被占軌道（HOMO）は a_{1u} と a_{2u} からなり、これらは軌道の形が異なるにもかかわらずエネルギーがほぼ等しいという特徴を持つ（偶然の縮退）。また、最低空軌道（LUMO）は二重に縮退した e_g^* である。したがって、 π 電子の遷移（ $\pi \rightarrow \pi^*$ ）として $a_{1u} \rightarrow e_g^*$ と $a_{2u} \rightarrow e_g^*$ の 2 つが可能であるが、両者はエネルギーが近いために相互作用し、よりエネルギーの大きな遷移と小さな遷移が観測される。前者は 400 nm 付近に現れて B 帯（あるいは Soret 帯）と呼ばれるのに対し、後者は 550 nm 付近に現れて Q 帯と呼ばれる。

ヘムタンパク質の共鳴ラマン散乱を励起するためには、これらの電子吸収帯に共鳴する波長を選ぶ。アルゴンイオンレーザー（発振波長 515、488 nm 等）や固体グリーンレーザー（532 nm）を用いれば Q 帯で、クリプトンイオンレーザー（発振波長 407、413 nm 等）や He-Cd レーザー（442 nm）を用いれば B 帯で励起できる。後者では、ラマン活性なモードの中でも特に A_{1g} （全対称伸縮振動）に属するものが強く観測される。また、Q 帯に比べて B 帯の方が数倍大きなモル吸光係数を示すので、共鳴効果も大きい。

振動モードのうち、1300～1700 cm^{-1} の領域には共役結合の面内伸縮振動がいくつか観測される。1970 年代の半ばから 1980 年代初期にかけてヘムタンパク質の共鳴ラマンスペクトルが精力的に研究され、ヘムの構造と相関するピークが見出された（表 1）。たとえば、1360 cm^{-1} 付近に強く出現する V_4

表 1 ヘム鉄の構造マーカーバンド (cm^{-1})

酸化状態 スピン状態 配位数	Fe ^{II} 高 5	Fe ^{II} 低 6	Fe ^{III} 高 6	Fe ^{III} 高 5	Fe ^{III} 低 6	Fe ^{IV} 低 6
V_{37} ($C_{\beta}-C_{\beta}$)	1585	1605	1580	1590	1600	1605
V_2 ($C_{\beta}-C_{\beta}$)	1560	1585	1560	1570	1580	1585
V_{38} ($C_{\alpha}-C_m$)	1520	1560	1520	1535	1555	1565
V_3 ($C_{\alpha}-C_m$)	1470	1495	1480	1495	1505	1510
V_4 ($C_{\alpha}-N$)	1360	1360	1375	1375	1375	1380

モード (A_{1g}) は主としてピロール環の N-C α 伸縮振動に帰属されるが、その波数は鉄が 2 価の時 $1355 \sim 1360 \text{ cm}^{-1}$ に、3 価の時 $1370 \sim 1375 \text{ cm}^{-1}$ に、4 価の複合体 II では $\sim 1380 \text{ cm}^{-1}$ となる。このように、 V_4 モードの波数はヘム鉄の酸化数を反映することから、酸化還元マーカーバンドとよばれている。鉄の価数の変化はそれに配位するピロール窒素の電子状態に大きく影響し、N-C α 結合に違いをもたらすためにこのような波数変化が生ずると考えられる。

一方、 1500 cm^{-1} 付近の V_3 (A_{1g}) や 1570 cm^{-1} 付近の V_2 モード (A_{1g}) はヘム鉄の酸化還元状態やスピン状態、配位子数を反映して変化する。 V_{37} 、 V_{38} モード (E_u) を含め、これらのピークはヘム鉄の状態に応じて平行移動する。 V_2 、 V_{37} は主としてピロール環の C β -C β 伸縮振動に、 V_3 、 V_{38} は主としてピロール環とメチン炭素の C α -C m 伸縮振動に帰属されるが、これらの波数変化は主にヘム骨格の中心コアサイズに起因するものと考えられている。すなわち、ヘム鉄が低スピン状態をとるとき、そのイオン半径は $2.00 \text{ \AA}$ 程度であるが、高スピン状態になると $2.07 \text{ \AA}$ 程度に大きくなるため、ヘムコアは押し広げられる。その結果、骨格を形成する化学結合は引き延ばされて弱くなるため、低波数シフトする。また、高スピン状態となったヘム鉄は、5 配位型では軸配位子に引っ張られて面外へ逃げるため、ヘムコアの拡張は緩和される。その一方で、6 配位高スピン状態ではヘム鉄は第 6 配位子によって面内へ引き戻されるため、コアは相対的に拡張される。このようなわずか $0.1 \text{ \AA}$ 程度の構造変化を鋭敏に検出できるのがラマン分光のひとつの利点である。

図 4 に還元型ミオグロビンの共鳴ラマンスペクトル (407 nm 励起) を示す。 V_4 が 1357 cm^{-1} に観測されていることから、2 価のヘム鉄を含むことがわかる。また、 V_2 、 V_{38} 、 V_3 がそれぞれ 1565 、 1525 、 1473 cm^{-1} に観測されていることから、ヘム鉄は 5 配位高スピン状態にあることがわかる。ESR を用いることにより酸化型ヘム鉄のスピン状態を直接観測することが可能であるが、この手法では通常試料を液体ヘリウム温度程度まで冷却しなければならない。また、還元型ヘム鉄は事実上 ESR 不活性である。したがって、室温付近の生理的条件下における構造を調べるには、共鳴ラマン法の方が有利となる。

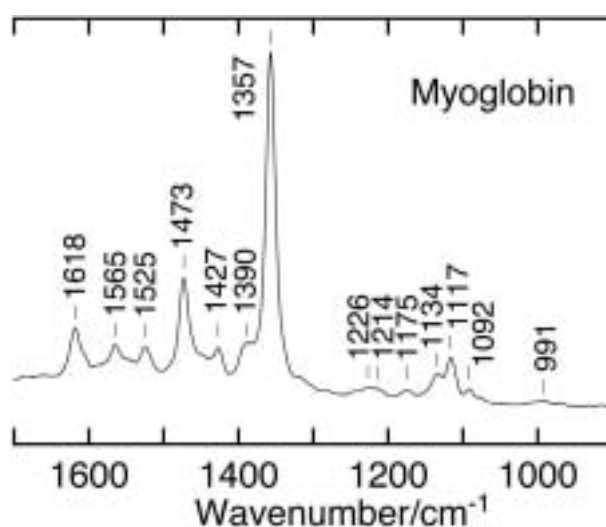


図 4 還元型ミオグロビンの共鳴ラマンスペクトル (407 nm 励起)

5. 第 5 配位子伸縮振動

特に B 帯で励起した場合、前述の面内伸縮振動に加えて軸配位子に由来する振動ピークが観測される場合がある。最初に見出されたのは鉄 2 価 5 配位状態における Fe^{II}-His 伸縮振動である³⁾。たとえば、酸素キャリアタンパク質では 220 cm^{-1} 付近の低波数領域に観測されるのに対して、ペルオキシダーゼでは 240 cm^{-1} 付近に出現する。この結果は、後者において His からヘム鉄への強い電子供与が起こっていることを示し、先述の電子 push 効果によって酸素が活性化されるという根拠になっている。

図 5 にミオグロビンとインドールアミン二原子酸素添加酵素 (IDO) の共鳴ラマンスペクトルを示す。ミオグロビンでは Fe^{II}-His 伸縮振動が 221 cm^{-1} に出現しているのに対し、IDO では 233 cm^{-1} に観測されている。この結果は、IDO ではミオグロビンとペルオキシダーゼの中間的な電子供与が起こっていることを示す。前述のように、ミオグロビンは酸素分子保持のため酸素を活性化しない方が好ましいのに対して、ペルオキシダーゼは O-O 結合をヘテロ解裂させる。一方 IDO は酸素分子をそのまま基質トリプトファンに添加する酵素であり、O-O 結合を解裂させないまま活性化しなければならない。その性質が中間的な電子供与性となって現れていると考えられる。

酸化型のヘムにおいても、5 配位状態において Fe^{III}-軸配位子伸縮振動に帰属されるラマン線が検

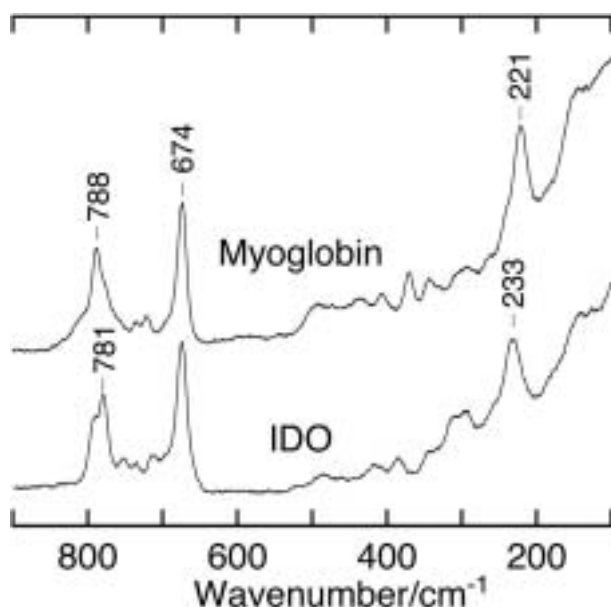


図5 還元型ミオグロビンとIDOの共鳴ラマンスペクトル (407 nm励起)

出されている。たとえば、CYPではヘム鉄の第5配位子がCys由来のチオレート基であり、390 nm付近にB帯の吸収極大を示す。これの短波長側364 nmで励起すると Fe^{III} -Cys伸縮振動が 351 cm^{-1} に観測される⁴⁾が、長波長側の407 nm励起ではヘムの面内振動ピークに埋もれてうまく観測できない。一方、 Fe^{III} -Tyr伸縮振動はQ帯励起で 600 cm^{-1} 付近に観測される⁵⁾が、B帯励起でも検出できる⁶⁾ことがモデル錯体を用いて示されている。このように、共鳴ラマン法では励起波長の選択がきわめて重要であり、共鳴条件をうまく見つけることにより、あらたな構造情報を引き出せる可能性がある。

6. 第6配位子伸縮振動

ヘムタンパク質には基質として酸素を用いるものが多いため、酸素に由来する共鳴ラマンピークの検出は反応機構に関する直接的な証拠を与える。たとえば、 $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ 伸縮振動(780 cm^{-1} 付近)、 $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OOH}$ 伸縮振動(350 cm^{-1} 付近)、 $\text{Fe}^{\text{III}}-\text{OH}$ 伸縮振動(490 cm^{-1} 付近)といった酸素に由来するピークが酵素反応過程で観測されれば、これら中間状態を経由して反応が進行していることを証明できる⁷⁾。ただし、反応中間体は短寿命種である場合が多いため、その観測には工夫が必要となる。

それに対し、反応の初発過程で形成される $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2$ 結合については多くの研究報告がある。 $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2$ 伸縮

振動は通常 570 cm^{-1} 付近に観測され、ヘムタンパク質の種類が異なってもあまり大きな差を生じない。しかしながら、CYPではチオレートアニオンの強い電子供与性により $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2$ 伸縮振動が 540 cm^{-1} 付近へと大きく低波数シフトする⁸⁾。また、興味深いことにCYPでは結合酸素由来のO-O伸縮振動も 1140 cm^{-1} 付近に観測される⁹⁾。この振動モードは通常共鳴ラマン法では観測されず、IRによって測定されている。IRにより観測されたミオグロビンやヘモグロビンのO-O伸縮振動は 1150 cm^{-1} 付近となり、CYPより高波数である。このことは、CYPではO-O結合が相対的に弱くなり、切れやすくなっていることを示している。いずれにしてもこれらの波数は O_2 のO=O伸縮振動(1551 cm^{-1})と H_2O_2 のO-O伸縮振動(877 cm^{-1})との中間になり、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ (1145 cm^{-1})に近い。したがって、ヘムに配位した酸素はスーパーオキシドと近い電子配置をとっていることがわかる。

酸素を結合したヘムは不安定な場合が多いのに対し、酸素と同様な2原子分子である一酸化炭素(CO)は還元型ヘム鉄に高い親和性を持つため、安定な複合体を形成する。さらに好ましいことに、COは共鳴ラマン法によって「見える」配位子であり、B帯励起により $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{CO}$ 伸縮振動や $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{C}-\text{O}$ 変角振動、さらには配位CO由来のC-O伸縮振動が観測される。これら振動モードの波数には相関があり、 $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{CO}$ 伸縮振動数が高いほど $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{C}-\text{O}$ 変角振動数は高く、C-O伸縮振動数は低くなる¹⁰⁾。また、 $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{O}_2$ 伸縮振動とは異なり、 $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{CO}$ 伸縮振動はCOの周りの環境によって大きく波数シフトする。すなわち、COのそばに塩基性のアミノ酸が存在すると $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{CO}$ 伸縮振動は高波数側にシフトし、極性が低下すると低波数シフトする。さらに、C-O伸縮振動数との相関関係はヘム鉄第5配位子の種類(CysかHisか、あるいは水等の弱い配位子か)によって変わるため(図6)、それらの波数から逆に第5配位子のアミノ酸を同定することが可能になる¹¹⁾。

図7に、ヒト脳で発現するニューログロビンのCO結合型共鳴ラマンスペクトル¹²⁾を示す。 $\text{Fe}^{\text{II}}-\text{CO}$ 伸縮振動に帰属されるラマン線が 521 cm^{-1} と 494 cm^{-1} に2本出現していることから、COが存在しているヘムポケット内には2種類の状態があることがわかる。また、 521 cm^{-1} の成分はミオグロビン

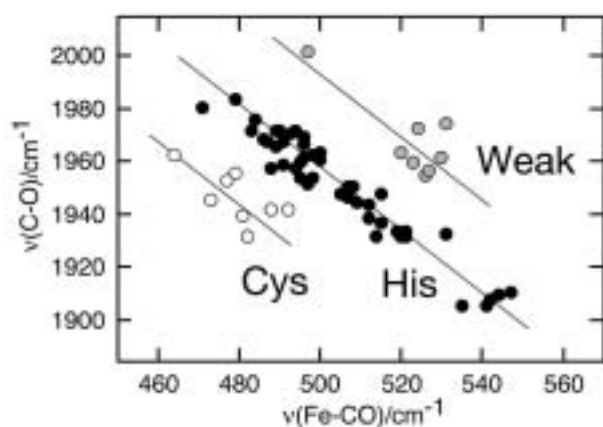


図6 Fe-COとC-Oの波数相関

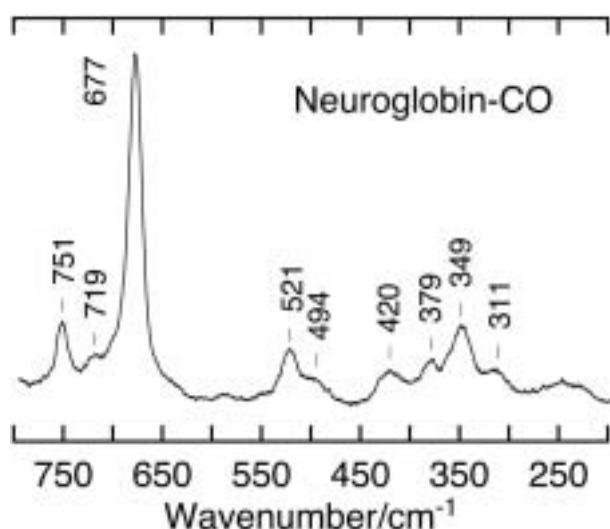


図7 CO結合型ニューログロビンの共鳴ラマンスペクトル (407 nm励起)

(511 cm⁻¹) より高波数側になっていることから、塩基性の His 残基が CO に非常に近い位置に存在していることがわかる。

これら以外にも、Fe^{II}-NO 伸縮振動 (590 cm⁻¹ 付近) や Fe^{III}-CN 伸縮振動 (450 cm⁻¹ 付近) 等が検出され、ヘムポケット内の環境プローブとして用いることができる。

7. おわりに

共鳴ラマン分光法は、レーザーの発明を契機として 1970 年代から急速に発展してきた。ヘムタンパク質の研究分野に限ると、70 年代におけるマーカーバンドの確立、80 年代における軸配位子振動の検出を経て、90 年代以降はより測定が困難な短寿命分子種の検出や、遺伝子工学の技術に支えられた

機能解析へと向かっている。21 世紀に入り、ヒトゲノム解析から次々に見出されてくる新規ヘムタンパク質が測定対象となってきており、共鳴ラマン分光法は今や円熟期を迎えていると思われる。

最近の各種光学技術の発展は、ラマン分光法によって追い風となっている。たとえば近年、安価・小型・長寿命の半導体レーザーがラマン分光計に組み込まれつつある。発振波長が限られているため、共鳴ラマン分光法への利用は限定的ではあるが、従来用いられてきた高額・大型の水冷式ガスレーザーを駆逐していくと思われる。また、ラマン散乱測定上の大きな障害となるレイリー散乱を効果的にカットするノッチフィルターが開発され、小型・高感度な分光計が現実のものとなっている。さらには、従来の光電子増倍管に代わり、CCD 検出器が普及してきた。広帯域のスペクトルが瞬時に得られ、積算も可能であるため、今や測定上必要不可欠の検出器となっている。これらの技術的発展は、従来検出できなかった短寿命分子種や 1 分子レベルでの計測を可能にしつつあり、ラマン分光法の新たな地平を開いていくものと期待される。

参考文献

- 1) Raman, C. V., and Krishnan, K. S. *Nature* 121, 501 (1928).
- 2) Abe, M., Kitagawa, T., and Kyogoku, Y. *J. Chem. Phys.* 69, 4526 (1978).
- 3) Kitagawa, T., Nagai, K., and Tsubaki, M. *FEBS Lett.* 104, 376 (1979).
- 4) Champion, P. M., Stallard, B., Wagner, G., and Gunsalus, I. C. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 5469 (1982).
- 5) Sharma, K. D., Andersson, L. A., Loehr, T. M., Ternner, J., and Goff, H. M. *J. Biol. Chem.* 264, 12772 (1989).
- 6) Uno, T., Hatano, K., Nishimura, Y., and Arata, Y. *Inorg. Chem.* 29, 2803 (1990).
- 7) Varotsis, C., Zhang, Y., Appelman, E. H., and Babcock, G. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 237 (1993).
- 8) Hu, S., Schneider, A. J., and Kincaid, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* 113, 4815 (1991).
- 9) Bangchaoenpaurpong, O., Rizos, A. K., Cham-

- pion, P. M., Jollie, D., and Sligar, S. *J. Biol. Chem.* 261, 8089 (1986).
- 10) Uno, T., Nishimura, Y., Tsuboi, M., Makino, R., Iizuka, T., and Ishimura, Y. *J. Biol. Chem.* 262, 4549 (1987).
- 11) Uno, T., Nishimura, Y., Makino, R., Iizuka, T., Ishimura, Y., and Tsuboi, M. *J. Biol. Chem.* 262, 2023 (1985).
- 12) Uno, T., Ryu, D., Tsutsumi, H., Tomisugi, Y., Ishikawa, Y., Wilkinson, A. J., Sato, H., and Hayashi, T. *J. Biol. Chem.* 279, 5886 (2004).

