食中毒を引き起こすウェルシュ菌エンテロトキシンCPEの構造生物学的研究

京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科生体分子工学部門 北所健悟, 西村昂亮
大阪大学微生物病研究所分子細菌学分野 神谷重樹, 堀口安彦

Kengo KITADOKORO, Kousuke NISHIMURA, Shigeki KAMITANI and Yasuhiko HORIGUCHI: Structural Biology of the Food Poisoning *Clostridium Perfringens* Enterotoxin

Clostridium perfringens enterotoxin (CPE) is a cause of food poisoning and is considered a pore-forming toxin which damages target cells by disrupting the selective permeability of the plasma membrane. We determined the crystal structure of the full-length CPE at 2.0 Å. The overall structure of CPE displays an elongated shape, composed of three distinct domains, D1, D2, and D3. In this structure, the pore-forming domain (Val81 ~ Ile106) of CPE has alternating pattern of polar and hydrophobic residues and forms α -helix. This characteristic sequence is frequently observed in β pore-forming toxin families as typified by α -hemolysin. These results indicate that CPE behaves as β pore-forming toxins.

1. はじめに

喫食によって引き起こされるノロウイルスやO-157などの感染による食中毒は、一年を通して常にわれわれと背中合わせにあり、時には重篤な症状を引き起こす厄介な存在である。これら食中毒は、腹痛、下痢、嘔吐や発熱を引き起こすが、その原因は、食品中に含まれた病原物質が人が口から摂取したことによる。最近では、ノロウイルスなどの人から人へ感染するウイルス性の食中毒も見られる。

細菌感染によって引き起こされる食中毒としては、世界最強の毒と言われるボツリヌス菌が産生するボツリヌス神経毒素が有名である。¹⁾ この毒素の致死量は、普通の毒とはケタ違いで、ペットボトル1本分で全人類を死滅させるほどであり、¹⁾炭疽菌と同様にバイオテロへの使用が懸念されている。

1.1 細菌毒素とは

細菌毒素 (bacterial toxin) とは、細菌が生産するタンパク質で、微量で生体に重篤な障害をもたらすものを総称している。¹⁾ 細菌毒素による強い毒性の原因は、細菌毒素がもつ構造上の特徴にある。つまり細菌毒素は「病気を起こすのに必要なすべての機能を一分子内に包含する」マルチドメインを有する超分子複合体の総称である。すなわち、宿主内でターゲットとなる標的細胞に、受容体との特異的な結合を介して取り付き、細胞内に侵入する。その後、生体内のオルガネラなどを用いて細胞内を移動する。その後、標的分子に対して特異的な生物活性を発揮する。この

ように細菌毒素は、分子内に種々の活性領域をもち、これらが分担して上記の諸過程を実現している。このように、細菌毒素は、非常に巧みに構成された超分子複合体であり、生物のような精密な分子マシーナリーであると言える。¹⁾

1.2 ウェルシュ菌による食中毒について

「カレーは2日目がおいしい」などと言われるが、ここで気をつけないといけないのが、ウェルシュ菌による食中毒である。ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、クロストリジウム属に分類されるグラム陽性の嫌気性桿菌である。¹⁾ ヒトを含む動物の大腸内のいわゆる悪玉の常在菌で、海、河川、下水、土壌中など広く自然界に分布している。ウェルシュ菌はヒトに対して、ガス壊疽、出血性腸炎、腸内毒素血症などのさまざまな感染症を引き起こすが、本菌が最も多く引き起こす感染症は、給食などで発生する大量食中毒である。¹⁾ ウェルシュ菌は別名、給食病または給食菌やカフェテリア菌と呼ばれることがあり、この菌による食中毒の1件当たりの患者数は、ほかの細菌性食中毒と比べて圧倒的に多いのが特徴である。¹⁾ 毎年国内でも、30例程度の発生件数がある。ウェルシュ菌は耐熱性の芽胞を形成するため、食品の加熱処理によりほかの菌が死滅しても、生き残ることができる。カレーなど大鍋で調理した食品を一晩放置して、翌日に引き続き食べる場合は、よく加熱しないとほかの菌が死滅しても、耐熱性のウェルシュ菌のみが残る場合がある。未処理で残ったウェルシュ菌は、腸管内で菌の増殖とともに耐熱性の芽胞を形成し、同時にウェルシュ菌エンテロトキシン (*Clostridium perfringens*

enterotoxin : 以下, CPE と略す) という毒素タンパク質を産出する。²⁾ CPE は腸管上皮細胞の細胞膜に傷害を起こして細胞を死に至らしめる。これが食中毒時の下痢や腹痛の原因となると考えられている。

1.3 食中毒病原因子 CPE について

CPE は 319 残基からなる分子量 35,317 Da, 等電点 4.3 の易熱性タンパク質で, pore-forming toxin (孔形成毒素) として機能し, 2つのドメインからなるいわゆる AB 毒素 (Active & Binding の両ドメインを有する毒素) である。³⁾ すなわち, その作用機構は, 細胞表面への結合 (C 末側受容体結合ドメイン) と, ⁴⁾ その後の膜孔形成による細胞の形態変化 (N 末側細胞障害ドメイン) の 2 段階に分けられる。⁸⁾ C 末側 122 残基についてはすでに立体構造が決定されている。⁹⁾ CPE が結合する受容体は, 上皮系細胞の細胞膜上にあるタイトジャンクションを形成するクロードイン (Claudin ; 以下, Cldn と略す) である。^{7), 10)-12)} Cldn は, 細胞間バリアの中樞をなす細胞接着に必要な 22 kDa からなる 4 回膜貫通型タンパク質で, 4つの膜貫通領域と 2つの細胞外領域を有する。2つの細胞外領域は, 54 残基の第 1 ループと 23 残基の第 2 ループからなる。CPE が 24 種類あるうちの Cldn-3/4 の第 2 ループに結合し, 細胞膜内へ侵入する。受容体である Cldn への結合には Tyr306, Tyr310, Tyr312, Leu315 が必須であることがわかっている。¹³⁾⁻¹⁵⁾

CPE がヒトに対して食中毒を発生させる機構は, ①標的細胞への取り付け, ②細胞膜上での多量体化, ③細胞膜への孔形成, という三段階で構成されていると考えられている。¹⁶⁾ 最初の段階として, CPE はまず, 標的となる腸管上皮細胞上に存在する細胞間接着分子である Claudin の細胞外第 2 ループと特異的に結合することにより, 標的細胞に取り付く。¹⁷⁾ 細胞に取り付いた CPE は, 次に細胞膜上で多量体を形成する。多量体形成後, CPE は細胞膜に孔を形成し, 細胞内に Ca^{2+} を流し込むことにより, 標的細胞の細胞死を誘発する (図 1)。³⁾ CPE の受容体である Claudin はさまざまな細胞で発現しており, そのため CPE は Drug delivery system (DDS) への応用が検討されている。また, Claudin は特定のガン細胞上で発現量が増加しており, こ

のことから CPE は抗がん剤への応用も期待されている。^{18), 19)} これらの理由から, CPE に関する基礎研究は数多く行われてきた。そして CPE の作用機構は上記のように, 受容体結合のメカニズムが解明されている。

一方, 多くの膜孔形成性毒素が, 細胞膜に存在するコレステロールなどの脂質を受容体とし, 広範囲の細胞種に作用するのに対して, CPE は, 腸管, 腎臓, 肝臓などに由来する上皮系細胞にのみ作用することが知られている。CPE には, 1) アミノ酸配列上, ほかの膜傷害性毒素との相同性は認められない。2) Cldn のみを受容体として認識する。3) CPE による膜傷害はイオンなどの低分子の透過性を亢進させるカルシウムイオン非依存性の膜傷害と高分子の透過を可能にするカルシウムイオン依存性の膜傷害の 2 段階に分けることができ, 細胞外液中にカルシウムイオンが存在しないと高分子の透過は起こらない。というほかの膜傷害性毒素とは明確に異なる特徴があり, このため CPE は既存の膜傷害性毒素のいずれのグループにも属さず, その膜孔形成のメカニズムが不明である。

また細胞毒性を発揮する際に起こる多量体形成に必要な領域が細胞毒性領域であり, 中でも Asp48 は多量体化に必須の残基である。¹⁶⁾ 膜孔形成領域は疎水性残基と親水性残基が交互に並ぶアミノ酸配列を有しており, これはほかの膜孔形成毒素と一致する一次構造上の特徴である。

このように, 全長 CPE の立体構造は解明されていなかったため, 分子レベルでの詳細な膜孔形成の作用機構はまだ解明されていない。そこで, 全長の CPE の立体構造を決定し, CPE の膜孔形成メカニズムを解明することを目的として, X 線構造解析を行い, 2.0 Å 分解能での構造決定を行うことができた。²⁰⁾ また得られた構造と既存の膜孔形成毒素との比較から, CPE 分子の構造自体が孔形成活性の制御にかかわっていること, CPE が宿主の細胞膜表面で構造変化して作用していることが示唆された。

2. CPE の結晶化と X 線構造解析

CPE は, スクリーニング段階で比較的容易に微結晶を得ることができた。得られた結晶は非常にきれいなダイヤモンド形結晶であった。喜び勇んで放射光施設に向かったが, どれも 6 Å 分解能程度の微弱な反射で, 回折データ収集は困難であり, 苦闘の日々が数年続いた。クライオ条件や脱水法の導入などの改良を行っても, なかなかいい結果は得られなかった。ただし, この時点でクライオプロテクトのカクテル使用は行っていなかった。このときの結晶化条件は酒石酸 Na, K を用いた塩による結晶化であったが, 後に PEG3350 で得られた結晶化条件が分解能の向上を導くものであった。このコンストラクトは N 末端側に His タグをつけたものであったが, 構造解析した後で解析すると N 末端の 35 残基は電子密度がまったく見られていなく, これが分解能低下を引き起こす要因であったと

図 1 CPE の作用機序の模式図. (Schematic representation of the CPE action. CPE binds certain Claudins.)

思われる。結局、C 末端側に His タグを導入したときに、PEG3350 で得られた三角形の結晶は、2.0 Å 分解能を超える回折データを収集することができた。²⁰⁾

3. CPE の結晶構造

3.1 CPE 全長の構造決定

回折データ測定は、大型放射光施設 SPring-8 の蛋白研ビームラインである BL44XU で主に行った。三角形の結晶を用いて、最終的には 1.98 Å 分解能のデータを収集した。このデータを用いて構造解析を行った。解析は、C 末側の C-CPE をモデル分子として分子置換法を試みたが、電子密度がノイジーで主鎖のみをトレースしたものの、構造は不明瞭であった。フリーのシステイン残基があるので、数種類の水銀誘導体データについても測定を行っていたが、SAD 法でも SIRAS 法でも構造決定には至らなかった。

そこでトレースした電子密度図をよく観察すると、構造は結晶学的に 3 量体で対称の中心に金属イオンらしき強いピークが観測された。タンパク質中にカルシウムなどの金属イオンの結合サイトがある場合、このサイトに同じ大きさのイオン半径をもつ重原子へと置換して位相を決定する方法がある。そこでこのサイトに重原子を導入するべく、サマリウムなどのランタノイド系の金属イオンとの置換による位相決定を試みた。

バッチ法などで結晶を大きくすることで、実験室系でも 3.1 Å 分解能のデータが測定可能となった。数種類の誘導体データ測定の結果、プログラム *Phaser* を用いて、C-CPE による分子置換法とサマリウム誘導体を用いた SAD 法との Phase combination によって構造決定することができた。その結果、N 末端 36 ~ 319 残基までの全構造を構築することができ、*Refmac5* を用いた精密化で、*R_{free}* = 25.2 %, *R* = 19.3 % の信頼性の高い、立体化学的にも正しい構造を構築することができた。²⁰⁾

3.2 CPE 全長の立体構造

CPE は、モノマー構造をとり、3 量体の対称構造をとっていた (図 2)。モノマー構造は、引き延ばされたような細長い構造をしており、17 本の β -strand と 5 本の α -helix を含む 3 つのドメインで構成されていた (図 2)。模式的に示すと、CPE 分子はイモムシ様の全体像を呈しており、それぞれ頭部 (D1)、体躯 (D2)、尻尾 (D3) に相当する 3 つの機能ドメインから構成されていることがわかった (図 2)。D1 には、腸管上皮細胞膜にある Claudin 受容体に結合するドメインがあり、この受容体に結合するアミノ酸残基が外側を向いていることがわかった。さらに、D2、D3 ドメインには細胞膜に孔をあけると思われる β シート構造が存在し、これにより細胞膜に孔があげられる β ポア形成メカニズムがあること、つまり毒素分子の凝集によって D2 ドメインの構造が大きく変化して細胞膜に孔をあける膜孔が形成されることを見出した。また、CPE で見出され

た β ポア形成メカニズムはほかの β ポアを形成する毒素と立体構造のトポロジーが一致していた。これらのことから、CPE が β -Pore Forming Toxin (β -PFT) のファミリーに属することが示唆された。²⁰⁾

3.3 CPE は結晶中で 3 量体を形成

CPE は結晶中で 3 量体を形成し、その大きさは横幅 90 Å、高さ 52 Å となっていた (図 3)。3 量体の中心には、3 個の Glu94 と 3 個の Glu110 の計 6 個のグルタミン酸によるクラスターが存在した。このグルタミン酸クラスター

図 2 CPE のモノマー構造. (Overall structure of full-length CPE.)

図 3 CPE の 3 量体構造. (Trimeric Structure of CPE.) A : 3 量体を垂直方向から見た図, B : 3 量体を水平方向から見た図. スティックで示した残基がグルタミン酸.

は先の重原子結合サイトであり, そのグルタミン酸クラスターの中心にカルシウムと考えられる電子密度が存在したことから, この3量体の中心が, 細胞毒性を発揮する際のカルシウムの通り道であると考えられた。

しかし今回得られた3量体構造では, 多量体化に必要なAsp48を介したCPEモノマー間の相互作用が確認できなかった。すでに孔形成状態が観測された β -PFTである α -Hemolysinの結晶構造と比較すると,²¹⁾ 細胞膜に差し込んでいる α -Hemolysinの孔形成領域は長さが52 Åであり, その細胞膜に向けた表面は疎水性領域を形成していた。²¹⁾ これに対してCPEは, 3量体構造自体の高さが52 Åで, その表面は親水性領域を形成していた(図3B)。そこで, CPEの3量体形成に必須であると考えられるGlu94とGlu110の変異体(各々, Asp, Gly, Gln, Tyr, Leu変異体)を作製し, 活性を確認したところ, いずれの変異体も野生型と変化が見られず, したがってこれら2つのグルタミン酸は毒素活性とは関係がないことがわかった。²⁰⁾ よってこの3量体の中心にある溝はカルシウムの通り道ではなく, 今回得られた3量体構造は細胞毒性を発揮する活性型の構造ではなく, 結晶中でのみ形成されている構造であると考えられた。

4. 膜孔形成毒素の構造

4.1 β -Pore-forming toxin (β -PFT) との比較

膜孔形成毒素(Pore-forming toxin: 以下PFTと略す)とは細胞膜に孔を形成し, 細胞死を誘発する毒素タンパク質のことである。PFTの特徴としては, 細菌などから分泌された段階では可溶化状態として存在するが, 標的細胞に取り付くと細胞膜に孔を形成する膜タンパク質となる。可溶化状態から膜孔形成状態への遷移には大きな構造変化を伴い, 細胞膜内部で安定に存在できるように疎水的な領域を形成し, 膜貫通型タンパク質となる。現在までに多くのPFTの結晶構造が解かれており, その一次, 二次, 三次, 四次構造は大きく違っているが, PFTは, その二次構造上の特徴から, α -helix型の α -PFTと β シート型の β -PFTの2つに分類することができる。しかしながら, 大半は β シート型の β -PFTである。

α -PFTとして構造解明されたサルモネラ菌由来のCytolysin A (PDB ID: 2wcd)は, 細胞膜に孔を形成する際に, α -helixの束を細胞膜に差し込む。²²⁾ これによく似た構造は, 赤痢菌毒素分泌装置ニードルの立体構造にも見られる。²³⁾ 一方, β -PFTとは, β -sheetを束ねることにより β -barrel構造を細胞膜内部で形成するPFTのことを指す。²¹⁾ α -hemolysin (PDB ID: 7ahl)などに代表される β -PFTの特徴としては, β -sheetに富む傾向にあること, 細胞膜と相互作用する膜孔形成領域は疎水性残基と親水性残基が交互に並んだ配列を有していることである。²¹⁾ しかしながら, β -PFTに関する細胞膜へのペプチド鎖の挿入機構は

あまり解明されていない。今回, CPEの全長構造の解明によって, 今まで知られている2つのタイプの β -PFTとCPEとの構造比較によって, 膜孔形成のメカニズムを解明することができた。²⁰⁾

4.2 Aerolysin-like toxin family (ALTF) との構造比較

β シートに富んだ構造を有するCPEモノマーは, β -PFTに特徴的な細長い立体構造をとっていた。すなわち頭部にレセプター結合ドメインをもち, そこから膜孔形成領域が伸びた形で存在している。CPEはCDスペクトルでの80%の β シート含量や,²⁴⁾ 膜孔形成領域に疎水性残基と親水性残基が交互に並ぶ配列を有していることから, β -PFTに所属すると考えられていたが, 今回決定した構造からも明らかとなった。²⁰⁾

そこでCPEのモノマー構造に関して, すでに構造決定された β -PFTとの構造比較を行った。構造比較の対象としたのは, すでにモノマー状態の構造が決定されている β -PFTであるaerolysin like toxin family (以下, ALTFと略す)と比較した。このALTFは, aerolysinを代表とする β -PFTのグループであり, このうちのaerolysin,²⁵⁾ *Clostridium perfringens* ϵ -toxin (以下, ETX),²⁶⁾ および*Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin (以下, LSL)²⁷⁾と比較したものを図4Aに示している。いずれの毒素も図の上部に受容体結合ドメインがあり, 中心に特徴的な長い β ストランドをもつ長く伸びたような長いトポロジーをとっている。興味深いことに, どの毒素も構造の真ん中あたりに, 構造変化を起こして膜孔を形成するフレキシブル領域があると考えられている。Aerolysinは, β -PFTとして初めてモノマー構造が決定された分子で, GPIアンカー型タンパク質を受容体とし, 4つのドメインで構成されている。^{28), 29)} ETX, LSLは, その構造と機能の相関からALTFに所属する β -PFTで, それぞれ膜タンパク質, およびN-アセチルラクタサミン複合糖鎖を含む物質を受容体としており, とともに3つのドメインで構成されている。^{26), 27)} CPEは, ALTである上記の β -PFTと同様に3つのドメイン(aerolysinは4つのドメイン)で構成されていた(図4)。このことからCPEと上記の β -PFTの各ドメインに関する比較を行った。

CPEのD1ドメインは, ALTFのD1(aerolysinのD1, D2)と同様に受容体結合領域を有していたが, このドメインは各々異なる構造をとっていた。この構造の違いは, それぞれの受容体の違いによるものだと考えられた。一方, D2, D3(aerolysinでのD3, D4)はCPE, ALTFともに β -sheetに富む非常に似た構造をしていた。共通の特徴としては, CPEとALTFのD3(aerolysinでのD4)が, 5本または7本の β -strandで構成された β -sandwich構造を形成していたことである。AerolysinでのD4, ETXのD3は, プロテアーゼ処理によりプロセッシングされて活性化し, 膜結合型となって多量体化を引き起こすことが解明されてい

る^{28),30)} CPE の D3 には多量体化に必須である Asp48 が含まれていた。このことから、CPE の D3 は aerolysin での D4, ETX の D3 と同様に多量体化になるドメインとして機能すると考えられる。また、それぞれの D2 (aerolysin での D3) には図 4A に示すように膜孔形成領域が含まれており、この領域は疎水性残基と親水性残基が交互に並ぶ配列をしていた (図 4B)。CPE では Val81 ~ Ile106 が膜孔形成領域であり、この領域を含んだアミノ酸配列をはかの膜孔形成毒素の配列と図 4B で比較した。すでに孔形成状態の構造が解かれた β -PFT である α -hemolysin でも観測されているこの配列は、 β -sheet を形成することで細胞膜側に向ける疎水性領域と膜孔の内側となる親水性領域を作ることが可能となる (図 4C)²¹⁾。このことから CPE は、膜孔形成領域を含む α -helix を β -sheet に構造変化させることにより β -PFT として機能し、aerolysin と同様の機構で膜孔を形成すると考えられた (図 4C)。以上の構造比較から、CPE

は aerolysin, LSL, および ETX と同様に受容体結合ドメイン、膜孔形成ドメイン、多量体化ドメインの 3 つのドメインで構成され、構造の類似性から、これらの ALTF と同様の機構で細胞膜に孔を形成すると考えられた。さらなる共通点として、CPE と ALTF には D2 から D3 (aerolysin での D3 から D4) にかけて伸びる長い逆平行 β -sheet が存在した。これは、過去に電子顕微鏡により多量体化から膜孔形成までの機構が解明された β -PFT である Pneumolysin に見られる特徴であり^{31),32)} 多量体化から細胞膜への孔形成に至るまでに重要な役割を担っていた。

4.3 Perfringolysin O との構造比較

次に別のタイプの β -PFT である Cholesterol を受容体とする Cholesterol-dependent cytolysin (以下 CDC) family との構造比較を行った。Perfringolysin O (以下 PFO) や Pneumolysin (以下 PLV) は、コレステロール結合性の細胞溶解毒素に属する β -PFT である。PFO ならびに PLV は、電子顕微鏡構造と結晶構造から、詳細な構造変化とその膜孔形成のメカニズムが提言されている。

ウェルシュ菌が産生する Perfringolysin O (以下 PFO) は、細胞を破壊し、ガス壊疽を発症させる病原因子の 1 つで、¹⁾ コレステロール結合性の細胞溶解毒素に属し、動物細胞の

図 4 CPE と Aerolysin-like-toxin ファミリーとの構造比較. (Structural similarities between CPE and Aerolysin-like-toxin family.) A : AEL, ETX, LSL, CPE のモノマー構造. 各モノマーの D1, 2, 3, 4 を色違いで示した. 膜孔形成領域は D2 近傍 (AEL では D3) の中央部分に色違いで表示. B : AEL, ETX, LSL, CPE, α -Hemolysin の膜孔形成領域のアミノ酸配列の比較. 数字はアミノ酸残基の番号を示す. C : α -Hemolysin と CPE と aerolysin の膜孔形成状態の模式図.

編集部注：カラーの図はオンライン版を参照下さい。

図 5 PFO と CPE の膜孔形成メカニズム. (Comparison of structure between CPE and PFO and a putative model showing how the toxin molecules are folded to insert the antipathic strands into the membrane.) A : CPE と PFO のリボンモデル図. B : PFO の膜孔形成機構に基づく CPE の侵入機構.

膜表面のコレステロールをターゲットとして細胞に結合し、細胞膜上に孔を形成して膜を破壊する。^{33),34)} PFOはCDC familyで最初に構造決定された毒素で,³⁴⁾ その結晶構造は図5Aのようになっている。そこでCPEのモノマーとPFOを構造比較した。

PFOのモノマー構造は4つのドメインから構成されており、D1が多量体化を引き起こすドメイン、D3が細胞膜への孔を形成するドメイン、D4が受容体結合ドメインであることが明らかにされている。^{33),34)} CPEモノマー構造とPFOモノマー構造の共通点は、膜孔形成領域が α -helixを形成している点と、モノマーの中心に長く伸びた逆平行 β -sheetが存在していることである。CPEとPFOのもつ長い逆平行 β -sheetの長さはそれぞれ約60 Å, 約42 Åである。

PFOの結晶構造を基に、cryo電子顕微鏡による観測と分子モデルリングの組み合わせで、PFOの膜孔形成機構が解明されている。^{33),34)} この膜孔形成機構は、まずPFOモノマー分子が細胞膜上の受容体であるコレステロールに結合し、多量体を形成した後、長く伸びた逆平行 β -sheetを折り曲げる。次いで α -helixを形成している膜孔形成領域が、 β -sheetに構造変化して細胞膜に挿入されることにより、巨大な β -バレル孔を形成するという機構である。この作用機構は、PLYやリステリア菌由来の膜孔形成毒素であるListeriolysin O (LLO)、でも同様に考えられている機構である。^{32),35)} また最近、同様に電子顕微鏡構造と結晶構造に基づいて、細胞障害性T細胞(CTL)やNK細胞が産出するPerforinもその膜孔形成メカニズムが明らかとなっている。Perforinは、細胞に孔をあけて細胞を溶解する活性を有し、アポトーシスに関与していることがわかっている。³⁶⁾ また構造解析の結果、PLYと非常によく似た構造をとっており、膜孔形成過程も類似のメカニズムであることが示唆されている。このように進化の過程で細菌毒素と真核生物のタンパク質がよく似たメカニズムをもっている非常に興味深い例である。

さてここでCPEの構造を見ると、CPEにも同様に長く伸びた逆平行 β -sheetがモノマーの中心に存在している。CPEのもつ逆平行 β -sheetは、ドメイン2と3を繋いでいる。そこで、このトポロジーがPFOと共通であることから、PFOでの大きな構造変化による β -sheetの挿入機構を参考に、CPEの膜孔形成メカニズムを次のように仮定した。まずCPEは、細胞膜上のCldn受容体へ結合し、Preporeと呼ばれる多量体を形成する。その後、ドメイン2と3の裂け目を軸に、逆平行 β -sheetを折り曲げることにより、ドメイン2の膜孔形成領域を細胞膜に挿入することで孔を形成することが示唆された(図5B)。CPEの場合はPFOのような巨大 β -バレル孔は形成されず、電気泳動などの結果から、6~7量体の多量体になることがわかっている。¹⁶⁾ しかしながら、 α -helixから β -sheetへの大きな構造変換による膜への侵入機構は類似するものであると考えられる。

以上のように、aerolysin like toxin, PFOとの構造比較から、CPEは β -PFTとしての構造的な特徴を数多く有していることが明らかとなった。これらのことからCPEは、PFOと同様の作用機構で構造変化を起こし、細胞毒性を発揮することが考えられた。またCPEと類似の構造を有するaerolysin like toxinも同様のメカニズムで構造変化を起こし、細胞へ機能する可能性が示唆された。今回得られた不活型のコンフォメーションであったが、CPEが膜状で活性型のコンフォメーションをとると考えられていることから、今後は、リボソーム存在化での結晶化³⁷⁾ や、Cubic phase (LCP) 法による結晶化³⁸⁾ を行い、構造変化した活性型つまり膜孔形成タイプの構造解析に着手する予定である。

謝 辞

この研究を行うにあたり、回折データ測定の際にお世話になったSPRING-8のBL44XUのスタッフの皆様、R-AXIS 7を使用させていただいた京都工芸繊維大応用生物部門の原田先生、的場博士に感謝いたします。

文 献

- 1) 桜井 純, 本田武司, 小熊恵二(編): 細菌毒素ハンドブック (サイエンスフォーラム社).
- 2) J. L. McDonel: *Pharmacol Ther.* **10**, 617 (1980).
- 3) B. A. McClane, A. P. Wnek, K. I. Hukower and P. C. Hanna: *J. Biol. Chem.* **263**, 242 (1988).
- 4) A. P. Wnek and B. A. McClane: *Infect. Immun.* **57**, 574 (1989).
- 5) E. U. Wiekowski, A. P. Wnek and B. A. McClane: *J. Biol. Chem.* **269**, 10838 (1994).
- 6) Y. Horiguchi, T. Akai and G. Sakaguchi: *Infect. Immun.* **55**, 2912 (1987).
- 7) P. C. Hanna, T. A. Mietzner, G. K. Schoolnik and B. A. McClane: *J. Biol. Chem.* **266**, 11037 (1991).
- 8) J. F. Kokai-Kun, K. Benton, E. U. Wiekowski and B. A. McClane: *Infect. Immun.* **67**, 5634 (1999).
- 9) C. M. Van Itallie, L. Betts, J. G. 3rd Smedley, B. A. McClane and J. M. Anderson: *J. Biol. Chem.* **283**, 268 (2008).
- 10) N. Sonoda, M. Furuse, H. Sasaki, S. Yonemura, J. Katahira, Y. Horiguchi and S. Tsukita: *J. Cell Biol.* **147**, 195 (1999).
- 11) J. Katahira, N. Inoue, Y. Horiguchi, M. Matsuda and N. Sugimoto: *J. Cell Biol.* **136**, 1239 (1997).
- 12) Y. Horiguchi, T. Akai and G. Sakaguchi: *Infect. Immun.* **55**, 2912 (1987).
- 13) A. Takahashi, E. Komiya, H. Kakutani, T. Yoshida, M. Fujii, Y. Horiguchi, H. Mizuguchi, Y. Tsutsumi, S. Tsunoda, N. Koizumi, K. Isoda, K. Yagi, Y. Watanabe and M. Kondoh: *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1639 (2008).
- 14) M. Harada, M. Kondoh, C. Ebihara, A. Takahashi, E. Komiya, M. Fujii, H. Mizuguchi, S. Tsunoda, Y. Horiguchi, K. Yagi and Y. Watanabe: *Biochem. Pharmacol.* **73**, 206 (2007).
- 15) C. Ebihara, M. Kondoh, M. Harada, M. Fujii, H. Mizuguchi, S. Tsunoda, Y. Horiguchi, K. Yagi and Y. Watanabe: *Biochem. Pharmacol.* **73**, 824 (2007).
- 16) J. G. 3rd Smedley, F. A. Uzal and B. A. McClane: *Infect. Immun.* **75**, 2381 (2007).
- 17) K. Fujita, J. Katahira, Y. Horiguchi, N. Sonoda, M. Furuse and

- S. Tsukita: *FEBS Lett.* **476**, 258 (2000).
- 18) A. B. Singh, A. Sharma and P. Dhawan: *J. Oncol.* **2010**, 7 (2010).
 - 19) S. L. Kominsky, B. Tyler, J. Sosnowski, K. Brady, M. Doucet, D. Nell, J. G. 3rd Smedley, B. A. McClane, H. Brem and S. Sukumar: *Cancer Research*. **67**, 7977 (2007).
 - 20) K. Kitadokoro, K. Nishimura, S. Kamitani, A. Fukui-Miyazaki, H. Toshima, H. Abe, Y. Kamata, Y. Sugita-Konishi, S. Yamamoto, H. Karatani and Y. Horiguchi: *J. Biol. Chem.* **286**, 19549 (2011).
 - 21) L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley and J. E. Gouaux: *Science* **274**, 1859 (1996).
 - 22) M. Mueller, U. Grauschopf, T. Maier, R. Glockshuber and N. Ban: *Nature* **459**, 726 (2009).
 - 23) J. Ruan, T. Kato, C. L. Santini, T. Miyata, A. Kawamoto, W. J. Zhang, A. Bernadac, L. F. Wu and K. Namba: *P. N. A. S.* **109**, 20643 (2012).
 - 24) P. E. Granum and O. Harbitz: *J. Food Biochem.* **9**, 137 (1985).
 - 25) M. W. Parker, J. T. Buckley, J. P. Postma, A. D. Tucker, K. Leonard, F. Pattus and D. Tsernoglou: *Nature* **367**, 292 (1994).
 - 26) A. R. Cole, M. Gibert, M. Popoff, D. S. Moss, R. W. Titball and A. K. Basak: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 797 (2004).
 - 27) J. M. Mancheno, H. Tateno, I. J. Goldstein, M. Martínez-Ripoll and J. A. Hermoso: *J. Biol. Chem.* **280**, 17251 (2005).
 - 28) O. Knapp, B. G. Stiles and M. R. Popoff: *Open Toxicol. J.* **3**, 53 (2010).
 - 29) M. W. Parker, J. T. Buckley, J. P. Postma, A. D. Tucker, K. Leonard, F. Pattus and D. Tsernoglou: *Nature* **367**, 292 (1994).
 - 30) S. Miyata, O. Matsushita, J. Minami, S. Katayama, S. Shimamoto and A. Okabe: *J. Biol. Chem.* **276**, 13778 (2001).
 - 31) D. M. Czajkowsky, E. M. Hotze, Z. Shao and R. K. Tweten: *EMBO J.* **23**, 3206 (2004).
 - 32) S. J. Tilley, E. V. Orlova, R. J. Gilbert, P. W. Andrew and H. R. Saibil: *Cell* **121**, 247 (2005).
 - 33) A. P. Heuck, E. M. Hotze, R. K. Tweten and A. E. Johnson: *Mol. Cell.* **6**, 1233 (2000).
 - 34) J. Rossjohn, S. C. Feil, W. J. McKinstry, R. K. Tweten and M. W. Parker: *Cell*. **89**, 685 (1997).
 - 35) M. Hamon, H. Bierre and P. Cossart: *Nature Reviews Microbiology* **4**, 423 (2006).
 - 36) R. H. Law, N. Lukyanova, I. Voskoboinik, T. T. Caradoc-Davies, *et al.*: *Nature* **468**, 447 (2010).
 - 37) S. De and R. Olson: *P. N. A. S.* **108**, 7385 (2011).
 - 38) M. Caffrey and V. Cherezov: *Nat. Protoc.* **4**, 706 (2009).

プロフィール

北所健悟 Kengo KITADOKORO
 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科生体分子工学部門
 Graduate School of Science and Technology, Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology
 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町
 Matsugasakiyokaidou-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan
 e-mail: kengo@kit.ac.jp
 最終学歴：大阪大学大学院工学研究科修士課程修了
 専門分野：構造生物学, タンパク質結晶学
 現在の研究テーマ：毒素タンパク質, 生分解性プラスチック関連酵素の構造生物学
 趣味：民俗学研究, 怪異話収集

西村昂亮 Kousuke Nishimura
 京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科生体分子工学部門
 Graduate School of Science and Technology, Department of Biomolecular Engineering, Kyoto Institute of Technology
 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町
 Matsugasakiyokaidou-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan
 最終学歴：京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科修士課程修了

神谷重樹 Shigeki KAMITANI
 大阪大学微生物病研究所分子細菌学分野
 Department of Molecular Bacteriology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University
 〒565-0871 吹田市山田丘3-1
 3-1 Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan
 *現所属 大阪府立大学
 総合リハビリテーション学類栄養療法学専攻
 e-mail: skami@rehab.osakafu-u.ac.jp
 最終学歴：京都大学大学院理学研究科修士課程修了
 専門分野：分子生物学, 分子細菌学
 現在の研究テーマ：細菌毒素の作用機能解明

堀口安彦 Yasuhiko HORIGUCHI
 大阪大学微生物病研究所分子細菌学分野
 Department of Molecular Bacteriology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University
 〒565-0871 吹田市山田丘3-1
 3-1 Yamada-oka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan
 e-mail: horiguti@biken.osaka-u.ac.jp
 最終学歴：大阪府立大学大学院農学研究科博士後期課程
 専門分野：細菌学
 現在の研究テーマ：細菌の病原性の発現機構
 趣味：水草・熱帯魚飼育, 自転車

左から北所, 神谷, 堀口

ポスター賞を受賞した西村君