毒素原性大腸菌耐熱性エンテロトキシン 受容体研究トピックス

平山 壽哉・和田 昭裕

長崎大学熱帯医学研究所 病原体解析部門 病原因子機能解析分野 (病原細菌学)
〒852 長崎県長崎市坂本1丁目12-4

〔受理: 1994年11月2日〕

細菌性下痢毒素による水様性下痢の発症メカニズムについて、とくに腸管上皮における Cl^- の分泌促進に嚢胞性線維症遺伝子由来蛋白質 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: CFTR) Cl^- チャンネルが関与する成績が集積されつつある。すなわち、毒素作用によって生じた環状ヌクレオチドに応答して A キナーゼが CFTR Cl^- チャンネルをリン酸化し、 Cl^- の流出を促すものである。コレラ毒素や毒素原性大腸菌耐熱性エンテロトキシンは、毒作用の初期効果としてそれぞれサイクリック AMP、サイクリック GMP を増加させる。コレラ毒素がガングリオシッド GM1 に結合し、ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性によってアデニル酸シクラーゼを活性化される詳細はよく解明されている。毒素受容体と活性化される酵素が一体となっている膜結合型グアニル酸シクラーゼが毒素原性大腸菌耐熱性エンテロトキシンによって活性化されるしくみも明らかにされようとしている。

I. はじめに

コレラ菌、大腸菌、*Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii* などの細菌は毒素を産生してしばしば重篤な下痢を引き起こす。これらの毒素は熱に対する安定性から2つのグループに大別される。その一つは 60°C, 10分間の加熱処理により失活する易熱性エンテロトキシンであり、他の一つはこの熱処理によっても活性を失わない耐熱性エンテロトキシンである。Finkelstein と LoSpalluto (17) はコレラ菌から易熱性エンテロ

トキシンであるコレラ毒素を精製した。毒素原性大腸菌にもコレラ毒素と類似の構造と機能を持つ易熱性のエンテロトキシン LT が見出され、LT-1 と LT-2 の2種類が知られている。コレラ毒素は A, B サブユニットからなり、B サブユニットが細胞表層のガングリオシッド GM1 に結合し、A サブユニットが細胞膜 GTP 結合蛋白である $\text{Gs}\alpha$ を NAD 依存的に ADP-リボシル化してアデニル酸シクラーゼ系を活性化することが証明された (23, 35)。以後今日にいたるまで、コレラ毒素はコレラの疾病に関わる病因論的な意義についての研究に限らず、百日咳毒素などと共にサイクリック AMP を介する生体反応や GTP 結合蛋白質の調節因子としての機能の解析など、広く細胞機能の解明に不可欠な役割を果たしている。

サイクリック AMP がエピネフリンやグルカゴンの血糖上昇作用を仲介する因子として1957

Toshiya HIRAYAMA and Akihiro WADA
Current Topics of Receptor Proteins for Heat-Stable
Enterotoxin Produced by Enterotoxigenic *Escherichia coli*
Department of Bacteriology, Institute of Tropical
Medicine, Nagasaki University, 1-12-4 Sakamoto,
Nagasaki 852

年 Sutherland と Rall によって発見され (57), その後多くのホルモンや神経刺激物質による外界刺激を細胞内に伝達するセカンドメッセンジャーとして認知されてきた。一方, サイクリック GMP は1963年 Ashman ら (3) によって尿に見出されたが, 長い間セカンドメッセンジャーとしての機能については不明であった。1970年代半ば, グアニル酸シクラーゼやホスホジエステラーゼが多くの組織に見出され, サイクリック AMP 同様にホルモンや神経刺激伝達物質の情報伝達における重要性が強調された。しかし, 1977年以後, カルモジュリンのモジュレーターとしての機能の研究や1979年からのイノシトールリン脂質シグナル系に関する研究の発展は著しく, サイクリック GMP を介する情報伝達系の研究はやや遅れてしまった観は歪めない。近年, サイクリック GMP は視細胞での光受容に関わる情報伝達物質として, またナトリウム利尿ペプチドや一酸化窒素 (NO) による血管拡張作用の情報伝達物質として極めて重要な機能を持っていることがしだいに明らかにされている。

本稿では, 受容体蛋白質および受容体に結合する生体内生理活性物質が明らかになり, 受容体の本来の機能の解明とともに, 生体内でのサイクリック GMP を介した毒作用のしくみが明らかになりつつある毒素原性大腸菌の耐熱性エンテロトキシンの最近の知見を受容体蛋白質に焦点をあてて概説したい。

II. 毒素原性大腸菌の耐熱性エンテロトキシン

毒素原性大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシンには STa と STb の2種類がある。STa は18あるいは19残基のアミノ酸からなるペプチド性毒素で, メタノール可溶性である。これに対して, STb は48残基のアミノ酸から構成されるメタノール不溶性の下痢毒素である。当初, STb には STa で観察される乳飲みマウスを用いた腸管内液体貯留活性が認められず, STb は唯一幼若ブタの結紮腸管でのみ毒性を引き起こすとされた (6)。しかし, 現在では実験動物にみられるこのような STb 感受性の差異は腸管での蛋白質分解酵素の性状の差を反映した結果であると理解されている (63)。STa 遺伝子は薬剤耐性遺伝子や

LT 遺伝子と一緒にあるいは単独にプラスミドにコードされ, トランスポゾン Tn 1681として大腸菌間での広範な伝播を容易にしている (55, 56)。しかし, STb の遺伝子には STa 遺伝子にみられるような逆向き反復配列は認められていない (43)。

III. STa の構造

STa はヒトおよびブタ分離株から単離精製された。ヒト臨床分離株由来の STa (STh) とブタ由来株の STa (STp) はそれぞれ19, 18残基のアミノ酸から構成されている (58)。下西らの STa 合成アナログを用いた一連の研究によって, STh では N 末端アミノ酸から5番目のシステインから17番目のシステインにいたる13残基のアミノ酸から成る部分が毒素活性ドメインであり, これらの配列は3つの分子内ジスルフィド結合によって安定した構造に保たれている。さらにこの配列は, 大腸菌 STa のみならず, *Y. enterocolitica* ST, *Vibrio cholerae* non-O1 ST, *V. mimicus* ST, *Citrobacter freundii* ST など, これまでにアミノ酸配列の決定されている耐熱性エンテロトキシンに共通して保存されている (58)。最近, Ozaki らによって天然 STa と同等の毒性を有する STa アナログがX線結晶解析され, STa の分子構造が決められた (48)。それによれば, STa の毒素活性ドメインは3つの構造区分, すなわち N 末端部の I 型 β -ターン, 中央部の I 型 β -ターン及び C 末端部の II 型 β -ターンからなる。これらの3つの β -ターン構造部分はジスルフィド結合によって互いに結び合わされている。この研究は STa の3つの分子内ジスルフィド結合が, STa の立体構造を形成する上で重要な位置にあり, 還元剤によってジスルフィド結合が切断されると STa の耐熱性及び毒性発現に必要な構造が崩壊するという考えを高次構造解析の上から裏付けている。

竹田らは, *Yersinia enterocolitica* の培養液中にこれまで報告された STa より分子量が大きい53残基のアミノ酸から成る STa を見出した。興味深いことに, この研究のなかで, 毒素活性ドメインの N 末端アミノ酸側システインにトリプトファンを付加したペプチドはトリプトファンを付加

しないものよりも乳飲みマウスに約4倍強い液体貯留活性を示した(竹田多恵ら, 私信)。このような位置に付加されたトリプトファンが腸管上皮細胞膜上に存在する STa の受容体と毒素の結合に直接親和性を増加させるように働くものなのか,あるいは受容体結合以後の情報伝達に影響するのかは現在のところ不明である。

IV. STa の受容体

1. 受容体遺伝子クローニング

STa は腸管上皮細胞に存在する膜結合型グアニル酸シクラーゼを活性化し,細胞内サイクリック GMP を増加させる。さらに動物実験において 8-ブromo cGMP を投与すると, STa 投与と同様に腸管内液体貯留を引き起こす。従って, STa の作用はホルモンや神経刺激伝達物質など,他の生体内情報伝達物質の様にサイクリック GMP をセカンドメッセンジャーとして発現していると理解されている(58)。しかも STa によるサイクリック GMP の増加は腸管上皮にのみみられ,肺,肝,脾,胃などの他の組織では認められないことから, STa の作用が極めて腸管細胞に限局された臓器特異性の高いものと考えられた。しかし, Knoop と Thomas (38) はラットの好塩基性白血球細胞に, Forte ら (18) はフクロネズミの腎皮質および睪丸に STa によるサイクリック GMP の増加を認め,他の組織においても STa に対する情報伝達系が存在することを示している。

STa 受容体を直接腸管上皮細胞に見出し,これを精製して性状を明らかにする試みがなされた(16, 27, 28)。しかし,こうした研究とはまったく独立に膜結合型グアニル酸シクラーゼの研究が進み,1970年代の半ば, Garbers ら (20) はウニの精子に膜結合型のグアニル酸シクラーゼを見出し,その酵素学的性状が他のさまざまな哺乳類の組織から調製した膜結合型グアニル酸シクラーゼのそれと類似することを示唆した。その後,ウニのグアニル酸シクラーゼの抗体がラットの肺などの組織から界面活性剤で可溶化したグアニル酸シクラーゼを免疫沈降させたことから,膜結合型グアニル酸シクラーゼは種を越えた免疫学的共通性があることが明らかにされた。さらに,精製したウニの精子の膜結合型グアニル酸シクラーゼ

は,分子量 135 kDa の糖蛋白質であり,ウニの卵子でつくられる精子遊走化ペプチド・リザクトと結合すると,脱リン酸化して活性化することが示された(50)。この報告は膜結合型グアニル酸シクラーゼが受精の初期に細胞刺激に応答して情報伝達する受容体の機能を持つことをはじめて証明している。

一方,膜結合型とは別に遊離型グアニル酸シクラーゼがラットの肺から精製された。

この遊離型グアニル酸シクラーゼは二つの異なる蛋白質からなる二量体で構成され,ヘムを含み,NO によって活性化される特徴を持つ(10, 22)。ウニのグアニル酸シクラーゼ遺伝子がクローニングされ,70.5 kDa サブユニットは調節ユニット,77.5 kDa サブユニットがグアニル酸シクラーゼ活性ユニットであること(39, 40),NO や sodium nitroprusside によって活性化を受けるためには70.5と 77.5 kDa 両方のサブユニットが必要であることが遺伝子をコトランスフェクションした実験成績から確かめられた(25)。膜結合型グアニル酸シクラーゼ遺伝子のクローニングは,遊離型グアニル酸シクラーゼ 70.5 kDa サブユニット遺伝子のクローニングと同じ1988年に報告された。Singh (54) らは精製したウニ精子の膜結合型グアニル酸シクラーゼのアミノ酸配列の情報をもとに遺伝子をクローニングし,膜結合型グアニル酸シクラーゼがプロテインキナーゼと相同性を有する膜一回貫通型の蛋白であることを示した。1989年にはこの遺伝子の一部を用いて GC-A 遺伝子を,さらに GC-A 遺伝子の一部を用いて GC-B 遺伝子をクローニングし,グアニル酸シクラーゼを活性化してサイクリック GMP をセカンドメッセンジャーとするナトリウム利尿ペプチド (ANP) の受容体蛋白遺伝子を明らかにしている。このような膜結合型グアニル酸シクラーゼ遺伝子ハンティングはさらにつづき,1990年, Schulz (52) らは遊離型及び膜結合型グアニル酸シクラーゼに保存されている部分を PCR 法により増幅してプローブを調製し,ラット腸管上皮細胞から新奇な膜結合型グアニル酸シクラーゼ (GC-C) 遺伝子をクローニングした。この遺伝子をトランスフェクションして発現させた COS 細胞は対照細胞に比べて有意に STa 結合能を獲得したこと

から、GC-C が STa 受容体 (STaR) であると結論した。ここに僅か 2 年あまりにウニの精子活性化ペプチド、ナトリウム利尿ペプチドおよび STa といったサイクリック GMP をセカンドメッセンジャーとする物質の受容体がいずれも膜結合型グアニル酸シクラーゼであることが実証された。

Schulz (52) らによればラット GC-C は 1053 残基のアミノ酸からなる分子量約 121kDa の細胞膜一回貫通型の蛋白であった。しかし、著者らの追試した成績では細胞内領域の Glu457-Thr458-Asn459 は存在しない (31)。GC-C は、GC-A および GC-B と同様に N 末端側が細胞外に露出して C 末端側が細胞内に位置する蛋白で、リガンドが結合する細胞外領域、膜貫通領域、チロシリン酸化酵素様領域 (PK 領域) グアニル酸シクラーゼ領域 (GC 領域) の 4 つの領域が順に配列している (52) (図 1)。とくに GC-C の C 末端側の構造は GC-A や GC-B より 60 残基ほど長く、これら 60 残基アミノ酸の 20% がグルタミンとセリンから構成されていて、この部分を介して細胞骨格に結合していると考えられている。GC-C の GC-A と GC-B に対する相同性は、細胞外領域で 10% (GC-A と GC-B の相同性は 43%)、リン酸化酵素様領域でそれぞれ 39% と 35% (GC-A と GC-B の相同性は 72%)、グアニル酸シクラーゼ領域で 55% (GC-A と GC-B の相同性は 91%) である。このように GC-C の細胞外領域が GC-A および GC-B に対して相同性が低いのは、GC-C のリガンドが異なることを反映するものであり、1992 年には STa と構造の似た生体内生理活性物質グアニリンが発見・単離され (11)、その遺伝子クローニングも報告されている (65)。興味深い事

実として、グアニリンはバーネット細胞で合成されて分泌された後、刷子縁細胞膜上の GC-C に結合し腸管上皮での Cl^- の透過性を調節する傍分泌の作用機構が明らかにされている (1)。

2. 細胞外領域にある特徴的な構造の機能

最近著者らは、ブタ STa 受容体遺伝子进行操作して、ブタ STaR の機能を調べた (62)。クローニングしたブタ STaR の cDNA は 3773 塩基、成熟蛋白質として 1050 残基から成る約 121 kDa の蛋白質であった。ブタ STaR とヒト (14) およびラット STaR (52) の相同性はそれぞれ 87%、82% であり、ブタ STaR はラットよりヒト STaR に近いアミノ酸配列であった。STaR 上の STa 結合に重要な部位を明らかにする為に、細胞外領域の部位特異的変異体を作製し、ブタ STaR 上の M8 と M15 の部位 (Arg136Met138 と Asp347Asn348) が STa 結合に重要な部位であることがわかった。一方、これまで膜結合型グアニル酸シクラーゼ受容体ファミリーとして呼ぶべき 6 種の蛋白質 (NPR-A, NPR-B, NPR-C, STaR, retGC, sapGC) が報告されている。このうち retGC は網膜から遺伝子が最近クローニングされた蛋白質で、推定される構造には他の膜結合型グアニル酸シクラーゼと異なり N-グリコシレーション部位が存在せず (53)、現在まで retGC と結合するリガンドの報告はない。面白いことに膜結合型グアニル酸シクラーゼ受容体ファミリーに属する 13 種類の蛋白質の細胞外領域のアミノ酸配列を並べてみると、ブタ STaR の 6 残基のアミノ酸 (Cys72, Gly98, Pro99, Cys101, Asp347, Asp351) がすべての受容体蛋白質に保存されていることがわかった (図 2)。さらに比較的保存されているアミノ酸を考慮すると細胞外領域の N 末端近くに GP モチーフ ($\text{CX}_{20-25}\text{GPXCXY}$ or $\text{CX}_{20-25}\text{GPXXXCXY}$) が、細胞膜の近くに DXXGD モチーフが共通して存在する。このモチーフが単に進化の過程で偶然保存されてきたのか、それとも何らかの機能を有するものなのかを調べるためにまず、M15 の部位にある DXXGD モチーフに焦点を絞り、ブタ STaR の DNCGD (アミノ酸 347-351) のアミノ酸残基をそれぞれ A に換えた STaR 変異体を作製した。その結果、免疫沈降により蛋白質の発現は確認されたが、DXX-

	C	X20-25	GPX1-3CXY (GP-motif)
rNPR-A (58-118)	GVC-SDT-AA-PLAA-MDLKWEHSPAV-FLGP-G-CVYSAAPVGRFHTAHWRVPLLTAGAPALGIGVK-D	GVC-SDT-AA-PLAA-MDLKWEHSPAV-FLGP-G-CVYSAAPVGRFHTAHWRVPLLTAGAPALGIGVK-D	GVC-SDT-AA-PLAA-MDLKWEHSPAV-FLGP-G-CVYSAAPVGRFHTAHWRVPLLTAGAPALGIGVK-D
mNPR-A (58-118)	GVC-SDT-AA-PLAA-MDLKWEHSPAV-FLGP-G-CVYSAAPVGRFHTAHWRVPLLTAGAPALGIGVK-D	GVC-SDT-AA-PLAA-MDLKWEHSPAV-FLGP-G-CVYSAAPVGRFHTAHWRVPLLTAGAPALGIGVK-D	GVC-SDT-AA-PLAA-MDLKWEHSPAV-FLGP-G-CVYSAAPVGRFHTAHWRVPLLTAGAPALGIGVK-D
hNPR-A (58-118)	GVC-SDT-AA-PLAA-MDLKWEHSPAV-FLGP-G-CVYSAAPVGRFHTAHWRVPLLTAGAPALGIGVK-D	GVC-SDT-AA-PLAA-MDLKWEHSPAV-FLGP-G-CVYSAAPVGRFHTAHWRVPLLTAGAPALGIGVK-D	GVC-SDT-AA-PLAA-MDLKWEHSPAV-FLGP-G-CVYSAAPVGRFHTAHWRVPLLTAGAPALGIGVK-D
rNPR-B (51-112)	GAC-SEY-LA-PLRA-MDLKLYHDPDL-LLGP-G-CVYPAASVARFASHWHLLPLLTAGAVASGFSAKNE	GAC-SEY-LA-PLRA-MDLKLYHDPDL-LLGP-G-CVYPAASVARFASHWHLLPLLTAGAVASGFSAKNE	GAC-SEY-LA-PLRA-MDLKLYHDPDL-LLGP-G-CVYPAASVARFASHWHLLPLLTAGAVASGFSAKNE
hNPR-B (51-112)	GAC-SEY-LA-PLRA-MDLKLYHDPDL-LLGP-G-CVYPAASVARFASHWHLLPLLTAGAVASGFSAKNE	GAC-SEY-LA-PLRA-MDLKLYHDPDL-LLGP-G-CVYPAASVARFASHWHLLPLLTAGAVASGFSAKNE	GAC-SEY-LA-PLRA-MDLKLYHDPDL-LLGP-G-CVYPAASVARFASHWHLLPLLTAGAVASGFSAKNE
bNPR-C (61-123)	SDC-GNR-ALFSLVDRMAAARGAKPDL-ILGP-V-CEYAAAPVARLASHWDLPLMSACALAAQFOHK-D	SDC-GNR-ALFSLVDRMAAARGAKPDL-ILGP-V-CEYAAAPVARLASHWDLPLMSACALAAQFOHK-D	SDC-GNR-ALFSLVDRMAAARGAKPDL-ILGP-V-CEYAAAPVARLASHWDLPLMSACALAAQFOHK-D
hNPR-C (61-123)	SDC-GNR-ALFSLVDRMAAARGAKPDL-ILGP-V-CEYAAAPVARLASHWDLPLMSACALAAQFOHK-D	SDC-GNR-ALFSLVDRMAAARGAKPDL-ILGP-V-CEYAAAPVARLASHWDLPLMSACALAAQFOHK-D	SDC-GNR-ALFSLVDRMAAARGAKPDL-ILGP-V-CEYAAAPVARLASHWDLPLMSACALAAQFOHK-D
rStAR (70-132)	GDGRSSTCEGLDLLREITRDRKMGCVL-M-GP-S-CTYSTFQMY-LDTLNYPMISAGSFGLSCDYK-E	GDGRSSTCEGLDLLREITRDRKMGCVL-M-GP-S-CTYSTFQMY-LDTLNYPMISAGSFGLSCDYK-E	GDGRSSTCEGLDLLREITRDRKMGCVL-M-GP-S-CTYSTFQMY-LDTLNYPMISAGSFGLSCDYK-E
pStAR (70-132)	SDGRSSTCEGLDLLRTISSEKRMGCVL-L-GP-S-CTYSTFQMY-LDTLNYPMISAGSFGLSCDYK-E	SDGRSSTCEGLDLLRTISSEKRMGCVL-L-GP-S-CTYSTFQMY-LDTLNYPMISAGSFGLSCDYK-E	SDGRSSTCEGLDLLRTISSEKRMGCVL-L-GP-S-CTYSTFQMY-LDTLNYPMISAGSFGLSCDYK-E
hStAR (70-132)	GDGRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVL-I-GP-S-CTYSTFQMY-LDTLSYPMISAGSFGLSCDYK-E	GDGRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVL-I-GP-S-CTYSTFQMY-LDTLSYPMISAGSFGLSCDYK-E	GDGRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVL-I-GP-S-CTYSTFQMY-LDTLSYPMISAGSFGLSCDYK-E
hretGC (52-111)	EPC-RT--PG-SLGA-MSSALARVSG--LVGPVNPCLPNSRAARRSRDRAGLGL-PLDAG-GGHHG	EPC-RT--PG-SLGA-MSSALARVSG--LVGPVNPCLPNSRAARRSRDRAGLGL-PLDAG-GGHHG	EPC-RT--PG-SLGA-MSSALARVSG--LVGPVNPCLPNSRAARRSRDRAGLGL-PLDAG-GGHHG
sapGC1 (91-148)	THC-DIN-LG--MAA-IS-DWWKRGFLGVIGPGCGCTV---E-GRLASALNFMIDYACDENPVSNK-E	THC-DIN-LG--MAA-IS-DWWKRGFLGVIGPGCGCTV---E-GRLASALNFMIDYACDENPVSNK-E	THC-DIN-LG--MAA-IS-DWWKRGFLGVIGPGCGCTV---E-GRLASALNFMIDYACDENPVSNK-E
sapGC2 (91-148)	THC-DIN-IG--MHA-MS-DWWKRGFVGVI-GPGCGCTV---E-GRLASALNFMIDYVCDENPVSDK-S	THC-DIN-IG--MHA-MS-DWWKRGFVGVI-GPGCGCTV---E-GRLASALNFMIDYVCDENPVSDK-S	THC-DIN-IG--MHA-MS-DWWKRGFVGVI-GPGCGCTV---E-GRLASALNFMIDYVCDENPVSDK-S
	●	●●●	●
			DXXGD-motif
rNPR-A (321-384)	FHDGILLIYVQAVTETLAQGGTVDGENITORMWNRSFQG-VTGYLKIENGRDRTDFSLWD-M---DPE	FHDGILLIYVQAVTETLAQGGTVDGENITORMWNRSFQG-VTGYLKIENGRDRTDFSLWD-M---DPE	FHDGILLIYVQAVTETLAQGGTVDGENITORMWNRSFQG-VTGYLKIENGRDRTDFSLWD-M---DPE
mNPR-A (321-384)	FHDGILLIYVQAVTETLAQGGTVDGENITORMWNRSFQG-VTGYLKIENGRDRTDFSLWD-M---DPE	FHDGILLIYVQAVTETLAQGGTVDGENITORMWNRSFQG-VTGYLKIENGRDRTDFSLWD-M---DPE	FHDGILLIYVQAVTETLAQGGTVDGENITORMWNRSFQG-VTGYLKIENGRDRTDFSLWD-M---DPE
hNPR-A (321-384)	FHDGILLIYVQAVTETLAQGGTVDGENITORMWNRSFQG-VTGYLKIENGRDRTDFSLWD-M---DPE	FHDGILLIYVQAVTETLAQGGTVDGENITORMWNRSFQG-VTGYLKIENGRDRTDFSLWD-M---DPE	FHDGILLIYVQAVTETLAQGGTVDGENITORMWNRSFQG-VTGYLKIENGRDRTDFSLWD-M---DPE
rNPR-B (315-379)	FYDGLLLIYAQVILNETIQEGGTREDGLRIVEKMQGRHYHG-VTGLVVMKNNDRDRTDFVLLWA-M-G-DLE	FYDGLLLIYAQVILNETIQEGGTREDGLRIVEKMQGRHYHG-VTGLVVMKNNDRDRTDFVLLWA-M-G-DLE	FYDGLLLIYAQVILNETIQEGGTREDGLRIVEKMQGRHYHG-VTGLVVMKNNDRDRTDFVLLWA-M-G-DLE
hNPR-B (315-379)	FYDGLLLIYAQVILNETIQEGGTREDGLRIVEKMQGRHYHG-VTGLVVMKNNDRDRTDFVLLWA-M-G-DLE	FYDGLLLIYAQVILNETIQEGGTREDGLRIVEKMQGRHYHG-VTGLVVMKNNDRDRTDFVLLWA-M-G-DLE	FYDGLLLIYAQVILNETIQEGGTREDGLRIVEKMQGRHYHG-VTGLVVMKNNDRDRTDFVLLWA-M-G-DLE
bNPR-C (316-381)	FHDAILLYVLALREVLRAQYSKKDGSKIIQQTWNRITFEG-IAGQVSIANGDRYGDVSVIA-MT--DTE	FHDAILLYVLALREVLRAQYSKKDGSKIIQQTWNRITFEG-IAGQVSIANGDRYGDVSVIA-MT--DTE	FHDAILLYVLALREVLRAQYSKKDGSKIIQQTWNRITFEG-IAGQVSIANGDRYGDVSVIA-MT--DTE
hNPR-C (316-381)	FHDAILLYVLALREVLRAQYSKKDGSKIIQQTWNRITFEG-IAGQVSIANGDRYGDVSVIA-MT--DTE	FHDAILLYVLALREVLRAQYSKKDGSKIIQQTWNRITFEG-IAGQVSIANGDRYGDVSVIA-MT--DTE	FHDAILLYVLALREVLRAQYSKKDGSKIIQQTWNRITFEG-IAGQVSIANGDRYGDVSVIA-MT--DTE
rStAR (302-364)	YLEGILLIFGHMLQTFLENG-ESVTTPKFAFRNLITFEG-LEGPVTLDDSGDIDNIM-CLL-YV--SLD	YLEGILLIFGHMLQTFLENG-ESVTTPKFAFRNLITFEG-LEGPVTLDDSGDIDNIM-CLL-YV--SLD	YLEGILLIFGHMLQTFLENG-ESVTTPKFAFRNLITFEG-LEGPVTLDDSGDIDNIM-CLL-YV--SLD
pStAR (302-364)	YMNGLILLIFGHMLKIFLENG-EDVTTSKFAFRNLITFEG-HMGPVTLDCGDIDNTM-FLL-YT--SVD	YMNGLILLIFGHMLKIFLENG-EDVTTSKFAFRNLITFEG-HMGPVTLDCGDIDNTM-FLL-YT--SVD	YMNGLILLIFGHMLKIFLENG-EDVTTSKFAFRNLITFEG-HMGPVTLDCGDIDNTM-FLL-YT--SVD
hStAR (302-364)	YLNGLILLIFGHMLKIFLENG-ENITTPKFAFRNLITFEG-YDGPVTLDDGVDSTM-VLL-YT--SVD	YLNGLILLIFGHMLKIFLENG-ENITTPKFAFRNLITFEG-YDGPVTLDDGVDSTM-VLL-YT--SVD	YLNGLILLIFGHMLKIFLENG-ENITTPKFAFRNLITFEG-YDGPVTLDDGVDSTM-VLL-YT--SVD
hretGC (299-360)	IYDAVFLLLARGVAEARAAGGRWVSGAAVAR-HITDAQ--VPGFCG-DLGGDEEPPVLLD-T-D-AAG	IYDAVFLLLARGVAEARAAGGRWVSGAAVAR-HITDAQ--VPGFCG-DLGGDEEPPVLLD-T-D-AAG	IYDAVFLLLARGVAEARAAGGRWVSGAAVAR-HITDAQ--VPGFCG-DLGGDEEPPVLLD-T-D-AAG
sapGC1 (377-443)	IFDATTPELLKADATLQAGGDMYDGSQVVSNNLFNTSYRSKAKADYQFDENGDGVKSPVLLHRI-PIPVG	IFDATTPELLKADATLQAGGDMYDGSQVVSNNLFNTSYRSKAKADYQFDENGDGVKSPVLLHRI-PIPVG	IFDATTPELLKADATLQAGGDMYDGSQVVSNNLFNTSYRSKAKADYQFDENGDGVKSPVLLHRI-PIPVG
sapGC2 (376-442)	MFDAATMQLLEALDRTHAAGGDIYDGEVSVSTLLNSTYRSKTDTFYQFDENGDGVKSPVLLHRI-PIPKG	MFDAATMQLLEALDRTHAAGGDIYDGEVSVSTLLNSTYRSKTDTFYQFDENGDGVKSPVLLHRI-PIPKG	MFDAATMQLLEALDRTHAAGGDIYDGEVSVSTLLNSTYRSKTDTFYQFDENGDGVKSPVLLHRI-PIPKG
	●	●●●	●

図2. 膜結合型グアニル酸シクラーゼファミリーの細胞外領域の相同性

● 13種類の膜結合型グアニル酸シクラーゼ受容体に共通して存在するアミノ酸
r: ラット, m: マウス, h: ヒト, b: ウシ, p: ブタ

GD モチーフのアミノ酸 (D, G, D) を A に換えた STaR 変異体には STa 結合活性および STa によるグアニル酸シクラーゼの活性亢進が認められなかった。従って, STaR の細胞外領域に存在する DXXGD モチーフは, リガンドの結合およびグアニル酸シクラーゼ領域の活性化に重要な部位であった。この部位がファミリー間でよく保存されている事実は, 他の膜結合型グアニル酸シクラーゼ受容体においても同様に重要な部位, 例えば, リガンドと直接結合はしないが結合部位の構築に重要な, あるいはグアニル酸シクラーゼ活性化のシグナルを膜を貫いて伝達するのに機能する部位であることを想像させる。

3. STa との相互作用

STa の受容体結合部位としては, アミノ酸を置換して合成した STa アナログの毒素活性試験および受容体結合実験の成績から, STa の中央部に位置する -Asn-Pro-Ala- が推定されている (66)。一方, STa と STa 受容体との結合がチオール試薬により阻害されること, この結合阻害がジ

チオスレイトール処理により可逆的に回復するといった実験成績から, STa によるグアニル酸シクラーゼの活性化は, STa のジスルフィド結合と STa 受容体のチオール基とのチオール・ジスルフィド結合交換反応により結合してグアニル酸シクラーゼの活性化が起これと考えられた (23, 51)。しかし, Cys 残基の -S- を -CH₂- に置換したカルバ型 STa アナログを合成して, それらの乳飲みマウス法による毒素活性試験をおこなった結果は, カルバ型 STa アナログが母体の化合物と同等の毒性を示した (26)。従って, STa と STa 受容体との結合は, 非共有的な相互作用であり, とくに STa の分子内ジスルフィド結合が直接受容体と結びつく可能性は否定されている。

V. STa 受容体のグアニル酸シクラーゼ活性化

1. カルシウムの関与

STa が結合した GC-C はどのようにしてグアニル酸シクラーゼが活性化するのであろうか。この

ステップにカルシウムが関与することを示唆する報告がある。Thomas と Knoop (59) はカルシウムチャンネルブロッカーである diltiazem, nifedipine, cromolyn sodium が STa の乳飲みマウスに引き起こす液体貯留を抑制することを示し、さらにラット好塩基芽球を用いて、カルシウム拮抗剤である Lodoxamide tromethamine や Lanthanum が STa によるサイクリック GMP の増加の抑制と $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の細胞内への流入を阻害することを報告した。Banik と Ganguly (4, 5) は STa を腸管上皮細胞に作用させるとイノシトールリン酸とジアシルグリセロールが増加することを示して細胞内カルシウムの動員が起こることを報告し、グアニル酸シクラーゼの活性化にプロテインキナーゼ C の関与を示唆している。Knoop (37) は、STa による細胞内サイクリック GMP の上昇と並行して膜画分にみられるプロテインキナーゼ活性が10倍に上昇していること、さらに、STa を作用させたラット腸管上皮細胞では STa 受容体を介したカルシウムの細胞内流入もしくは細胞内カルシウムストアからのカルシウムの遊離が、グアニル酸シクラーゼ活性化に先行して起こることを、カルシウムインディケイター、Indo-1 を用いたフルオロサイトメトリーで解析して示している。Crane ら (9) は T84 細胞を phorbol 12,13-dibutyrate で処理すると、 ^{125}I -STa の結合部位の増加と STa によるグアニル酸シクラーゼの活性化亢進が増強されたこと、さらにこのような作用がこの細胞の膜画分を精製プロテインキナーゼ C で処理したときにもみられたことから、STa の作用、特にグアニル酸シクラーゼ活性化にカルシウムおよびプロテインキナーゼ C の関与が重要であることを示唆している。事実、GC-C のリン酸化酵素様領域にはプロテインキナーゼ C によってリン酸化を受けると考えられているコンセンサス配列 Arg-Gly-Ser-Leu-Arg (2) がある。最近、phorbol 12-myristate 13-acetate で細胞を処理すると GC-C がリン酸化されることが証明された (60) が、STa の処理によって GC-C の特異的なリン酸化が起こるという証明は無い。

2. ATP の関与

GC-C のリン酸化酵素様領域には GC-A および

GC-B にある ATP 結合領域 (G (L) XGXXG 配列) が欠けている。GC-A と GC-B のリン酸化酵素様領域にはグアニル酸シクラーゼ活性を抑制する働きがあり、この領域を遺伝子操作して除去した GC-A では構成的に活性化された状態になる (8)。このリン酸化酵素様領域に ATP が結合すると、この抑制効果が失われ抑制が解除される。同様に ANP が GC-A に結合すると、このリン酸化酵素様領域の抑制効果を失わせてグアニル酸シクラーゼ領域が活性化される。しかし、STa が GC-C に結合した場合も、これと同じ機序でグアニル酸シクラーゼの抑制が解除されて活性化が起こる可能性は否定的である。すなわち GC-C のリン酸化酵素様領域は一部分似ているものの GC-A や GC-B との相同性はそれぞれ39%, 36%である。さらに GC-A のリン酸化酵素様領域を GC-C のそれと置換した GC-A では ANP によるグアニル酸シクラーゼの活性化は起きない (41)。網膜視細胞での光受容に際して重要な機能を持つとされる retGC のリン酸化酵素様領域は ATP 結合領域を欠いている。retGC を発現させた細胞では、対照として用いた retGC 遺伝子をトランスフェクションしなかった細胞や GC-A を発現させた細胞に比べてリガンドの刺激なしにすでに約7倍も活性化した状態で発現している。GC-C のリン酸化酵素様領域も同様に ATP 結合領域を欠いているが、発現させた GC-C がすでに活性化されているといった知見は得られていない。このように膜結合型グアニル酸シクラーゼのリン酸化酵素様領域には明らかに構造と機能の違う2種類がある。情報変換分子として重要なサイクリック GMP を産生する膜結合型グアニル酸シクラーゼが構造と機能に明確な区別があるのは興味深い。さらに、GC-C には ATP 結合部位がないことからグアニル酸シクラーゼ活性化には ATP の関与が否定的である (41)。しかし、ATP が活性化に関与することを示す報告がある。Waldman ら (21) は、ラット小腸刷子縁細胞膜の膜結合型グアニル酸シクラーゼに対するヌクレオチドの効果を調べたところ、UTP や CTP に比べて ATP はグアニル酸シクラーゼを著明に活性化した。しかも STa および ATP 単独による活性化よりも、STa と ATP を両方添加した場合に相乗的に活性

化したことを示し, STa のグアニル酸シクラーゼの活性化に ATP が関与することを示唆している。最近, Vaandrager ら (60) は, STa によるグアニル酸シクラーゼの活性化は ATP がなくなると著明に減少し, ATP をその反応系に加えると活性化の状態を保つことを示し, GC-C は ATP に結合して安定性を増し, STa の活性化を受けるに都合のよい構造を維持し続けることができると推論している。さらに, 彼ら (61) は細胞表層に発現させたラット GC-C と腸管刷子縁細胞膜に強さの異なる電子線を照射して STa 受容体を段階的に崩壊させた後に, ^{125}I -STa を結合させて受容体蛋白の大きさを測定している。その結果, 細胞外領域で切断され, グアニル酸シクラーゼ活性を持たない GC-C の 2 量体が 1 分子のネイティブな GC-C と非共有結合で結び合って 3 量体を形成し, その内の 1 分子に STa が結合すると GC-C が他の 1 分子と強く結合して 2 量体を形成するようになり, その結果起こる構造変化が細胞内のグアニル酸シクラーゼ領域の 2 量体化をもたらしてグアニル酸シクラーゼが活性化する考えを提唱した (図 3)。以前から, 腸管刷子縁細胞膜にはグアニル酸シクラーゼ活性を持たない

STa と結合する蛋白質が存在する (31, 42)。これらの蛋白と GC-C との関係, ATP が GC-C にどのように作用しているのかなど GC-C の活性化のしくみは今後詳細に明らかにしなくてはならない重要な課題である。

VI. グアニル酸シクラーゼ活性化以後の生体反応の解析

STa による腸管内液体貯留を種々の薬剤を用い抑制する研究がなされている。インドメタシンの様なシクロキゲネース阻害剤を STa の投与と同時に, もしくは前投与することにより乳飲みマウスに引き起こす液体貯留が阻止され, STa による液体貯留がプロスタグランジンやロイコトリエンを介して起こることが示唆されている。同様な現象は, プロスタグランジン合成阻害剤である Zomepirac sodium や Quinacrine によっても起こる (16)。しかし, これらの成績への反論もある。Dreyfus ら (15) は STa で処理したラットの腸管上皮細胞のプロスタグランジン E_2 , $\text{F}_{2\alpha}$, トロンボキサン B_2 の量をラジオイムノアッセイを用いて調べたがこれらの物質の増加を証明することが出来なかった。一方, サイクリック GMP が増

図 3. STa による GC-C の活性化モデル (文献61を改変)

R: 結合ドメイン, TM: 細胞膜, KH: リン酸化酵素様領域, GC: グアニル酸シクラーゼ領域

加した後下痢にいたる過程に小腸刷子縁細胞膜に存在するプロテインキナーゼが関与することを示す報告がある。1984年に De Jonge が腸組織にサイクリック GMP 依存性のプロテインキナーゼ (PKG) の存在を証明し (12), STa の作用を PKG が担うことを推察している。著者らも STa による乳飲みマウスの下痢に及ぼす各種プロテインキナーゼ阻害剤の影響を調べた。その結果, PKG 阻害剤 H8, H9 を STa と一緒に投与すると, 乳飲みマウスの腸管内液体貯留は濃度依存的, 且つ完全に抑制された (29)。またこれらの阻害剤は STa を添加すると生じる腸管上皮細胞膜蛋白質のリン酸化を抑制した (30)。コレラ毒素を用いた同様な動物実験では有意な抑制 (50%) がみられたが, 完全には阻害しなかった (29)。こうしたプロテインキナーゼ阻害剤の液体貯留活性抑制効果の違いが, コレラ毒素作用時に活性化されるサイクリック AMP 依存プロテインキナーゼ (PKA) に対する H8 や H9 の親和性が低いために生じた単純な理由によるものか, あるいは, コレラ毒素による下痢には, PKA を介さずプロスタグランジンをメッセンジャーとする経路 (49) が並行して存在するために生じたものなのかは不明である。ごく最近, STa およびコレラ毒素の下痢を惹起する経路に関連した極めて興味深い研究が発表された (7)。この報告は, STa によって引き起こされる腸管上皮細胞膜の Cl^- 分泌促進が, GC-C 活性化の結果増加したサイクリック GMP によって PKA が活性化し, 活性化した PKA が嚢胞性線維症遺伝子由来蛋白質 (CFTR) Cl^- チャンネルをリン酸化して開口させるために生じることを示した。すなわち STa によって引き起こされる T84 細胞の Cl^- 分泌促進が 1) 光学異性体のプロテインキナーゼ阻害剤を用いた実験において PKG の特異的阻害剤である Rp-8-Br-cGMP より PKA の特異的阻害剤である Rp-8-Br-cAMP で細胞を前処理することより抑制された, 2) PKA の触媒中心に結合するペプチド性 PKA 阻害剤 Walsh inhibitor をパッチクランプで取り込ませた細胞では著明に抑制された, 3) CFTR mRNA の アンチセンスオリゴヌクレオチドで CFTR Cl^- チャンネルの発現を抑制した細胞では阻害されたなどの成績から結論している。

腸管上皮細胞の PKG の機能が明確でないにしても, セカンドメッセンジャーとして異なる環状ヌクレオチドを仲介する STa とコレラ毒素が, PKA という同一の機能蛋白を介して CFTR Cl^- チャンネルを開口して Cl^- の分泌を促進させる機序は, 水様性下痢発症のからくりのひとつを示すものとして興味深い。また, 嚢胞性線維症は白色人種間で最も頻度が高く, 脾・肺に重篤な機能障害を引き起こす常染色体劣性の遺伝性疾患である。この疾患は, CFTR Cl^- チャンネルの 3 塩基の欠損で, ATP 結合領域にある 508 番目の Phe の欠損をきたし (44), 気道・唾液腺・脾・汗腺・腸管などの上皮での Cl^- 分泌が低下する。508 番目の Phe の欠損という異常は遺伝学的にはきわめて起こりにくい型の変異でこれまで白色人種に保存されてきた理由として, エンテロトキシンに対して腸液の流出が低下して下痢しにくい利点があったのではないかと憶測されている (24) が, こうした憶測に矛盾しない成績である。

VII. GC-C と異なる STa 受容体の存在

GC-C 遺伝子のクローニングにおいて, Schulz ら (52) は, すでに一次構造が明らかにされていた遊離型および膜結合型グアニル酸シクラーゼのコンセンサスなシーケンスをもとにその部分のオリゴヌクレオチドのプライマーを合成した。このプライマーを用いて, ラット小腸の cDNA を鋳型として PCR を行ない, DNA (SIM3) を増幅した。この SIM3 をプローブとしてラット小腸 cDNA ライブラリーをスクリーニングし, GC-C 遺伝子を得たが, 不思議なことにスクリーニングに用いたプローブの SIM3 と GC-C は異なる塩基配列を持つ DNA で, アミノ酸としての相同性は 62% であった。この結果は, GC-C 以外に GC-C と類似した構造をもつ未知のグアニル酸シクラーゼが存在することを示唆している。

VIII. STb の作用と受容体

前述のように, STb は当初, STa のような乳飲みマウスでの下痢原性を示さず, 幼若ブタの結紮腸管でのみ液体貯留を引き起こした (6)。その後, このような下痢活性の動物種による感受性の違いは, STb がマウスの腸管腔でトリプシン

様の酵素で容易に水解されるためであることが示された (63)。現在では、ソイビン・トリプシンインヒビターを STb 投与時に与え、ラットやマウスを用いて STb の測定が行われている (64)。これにより STa に比べ研究が遅れていた STb の研究が急速に展開し始めている。

STb の構造については最近、岡本らのグループによって明らかにされ、2つのジスルフィド結合を有した48残基のアミノ酸から成る毒素であることが精製毒素を用いて示された (19)。STb のマウス回腸粘膜細胞への作用は環状ヌクレオチド濃度に変化を与えることなく、プロスタグランディン E₂ を増加させた。一方、STb のラット腸管内液体貯留活性はプロスタグランディンの合成阻害剤であるアスピリンやインドメタシンで抑制された。これらの結果は STb の下痢原性に腸管粘膜上皮のプロスタグランディン E₂ が関与することを強く示唆している (34)。さらに、Dilfiazin や Verapamil などの Ca²⁺ チャンネルブロッカーを腹腔内に投与しておくとも STb の下痢を抑制することもわかっている (岡本ら、私信)。今後、これらの薬理的な研究を通して STb の作用の究明がなされるであろう。ごく最近、STb の受容体についてマウス腸管上皮細胞膜に [¹²⁵I] STb と結合親和性を持つ分子量 25 kDa の蛋白質をケミカルクロスリンクさせて検出している (33)。STb の宿主受容体及び応答に関するこれまでの知見は STa のそれとは明確に異なっている。とくに STb の作用は腸管上皮に特異的であり今後受容体の機能解明などを通してその機序が明らかにされるものと思われる。

IX. お わ り に

毒素原性大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシン STa は、腸管上皮細胞の細胞膜を貫いて存在するグアニル酸シクラーゼ GC-C に結合してこれを活性化し、細胞内に生じたサイクリック GMP に応答して活性化した PKA が Cl⁻ チャンネルである CFTR をリン酸化し、その結果このチャンネルの開口によって Cl⁻ の分泌が促される一連の作用機序が明らかにされた。

しかし、この一連の機序を成す個々のステップにおいての詳細は不明な部分も多く、また従来か

らの知見と矛盾せずに説明するためにはなお積み上げなくてはならない実験成績を要求する。例えば、STa が GC-C に結合してグアニル酸シクラーゼを活性化する機序は GC-A や GC-B の活性化のしくみが当てはまらない。サイクリック GMP との結合定数が PKA の約50倍強い値を示している PKG が CFTR Cl⁻ チャンネルのリン酸化には関与しないとすればその機能はなにか。シクロキネーゼ阻害剤が STa の下痢原性を抑制する結果を如何に説明するかなどそれぞれのステップにおいてのシグナル伝達経路とのクロストークについても考慮しなければならない。

一方、受容体と毒作用の研究がわが国において飛躍的に行われている研究として、ジフテリア毒素とボツリヌス毒素があげられる。クローニングされたジフテリア毒素受容体遺伝子からジフテリア毒素受容体は、マクロファージが産生する血管平滑筋の増殖因子、ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) の前駆体である (45)。最近、目加田らのグループによって、ジフテリア毒素が膜貫通型 HB-EGF を介して細胞内に侵入することを証明している (36)。ボツリヌス毒素については小崎俊司博士、西木禎一博士の研究 (46, 47) がある。ボツリヌス毒素の作用は亜鉛依存性の蛋白質分解活性によってシナプス小胞のシナプス前膜への結合と融合に関係する蛋白質を切断してシナプス小胞からのアセチルコリンの分泌を抑制する。この機序は3つのステップ、すなわち1) 受容体への結合、2) 神経終末内への侵入、3) 伝達物質抑制である。彼らは、1) のステップにおいて B 型ボツリヌス毒素受容体がシナプス小胞蛋白質であるシナプトタグミンとガンダリオンドであることを明らかにしている。このように多くの細菌毒素の受容体と機能が解明され、疾病の予防と治療に役立ち、さらには広い細胞機能の解明にもつながる情報が提供される日も遠くないように思われる。

文 献

- 1) Almenoff, J.S., Williams, S.I., Scheving, L.A., Judd, A.K., Schoolnik, G.K. (1993): Ligand-based histochemical localization and capture of cells expressing heat-stable enterotoxin receptors. *Mole.*

- Microb. **8**, 865–873.
- 2) Ashendel, C.L. (1989): Proteinkinase C: a mediator and regulator of receptor-linked signal transduction. pp. 163–175. In Moudgil, F.K. (ed), Receptor phosphorylation, Boca Raton, FL, CRC Press.
 - 3) Ashmann, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M., Price, T.D. (1963): Isolation of adeosine 3',5'-monophosphate from rat urine. Biochem. Biophys. Res. Commun. **11**, 330–334.
 - 4) Banik, N.D., Ganguly, U. (1988): Stimulation of phosphoinositides breakdown by the heat-stable *E. coli* enterotoxin in rat intestinal epithelial cells. FEBS Lett., **236**, 489–492.
 - 5) Banik, N.D., Ganguly, U. (1989): Diacyl glycerol breakdown in plasma membrane of rat intestinal epithelial cells: Effect of *E. coli* heat-stable enterotoxin. FEBS Lett., **236**, 201–204.
 - 6) Burgess, M.N., Mullan, N.A., Newsome, P.M. (1980): Heat-stable enterotoxins from *Escherichia coli*, Infect. Immun. **28**, 1038–1040.
 - 7) Chao, A.C., de Sauvage, F.J., Dong, Y.-J., Wagner, J.A., Goeddel, D.V., Gardner, P. (1994): Activation of intestinal CFTR Cl⁻ channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-deendent protein kinase. EMBO J. **13**, 1065–1072.
 - 8) Chinkers, M., Garbers, D.L. (1989): The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. Science, **245**, 1392–1394.
 - 9) Crane, J.K., Wehner, M.S., Bolen, E.J., Sando, J.J., Linden, J., Guerrant, R.L., Sears, C.L. (1992): Regulation of intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* (STa) and protein kinase C. Infect. Immun., **60**, 5004–5012.
 - 10) Craven, P.A., DeRubertis, F.R. (1978): Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins: Evidence for involvement of paramagnetic nitrosylheme complex in enzyme activation. J. Biol. Chem., **253**, 8433–8443.
 - 11) Currie, M.G., Fok, K.F., Kato, J., Moore, R.J., Hamra, F.K., Duffin, K.L., Smith, C.E. (1992): Guanylin : an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 947–951.
 - 12) de Jonge, H.R. (1976): Cyclic nucleotide-dependent phosphorylation of intestinal epithelium proteins. Nature, **262**, 590–593.
 - 13) de Jonge, H.R. (1985): The mechanism of action of *Escherichia coli* heat-stable toxin. Biochem. Soc. Trans., **12**, 180–184.
 - 14) de Sauvage, F.J., Camerato, T.R., Goeddel, D.V. (1991): Primary structure and functional expression of the human receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. J. Biol. Chem. **266**, 17912–17918.
 - 15) Dreyfus, L.A., Jaso-Friedman, L., Robertson, D.C. (1984): Characterization of the mechanism of action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. **46**, 537–543.
 - 16) Drefus, L.A., Robertson, D.C. (1984): Solubilization and partial characterization of the intestinal receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Infect. Immun., **46**, 537–543.
 - 17) Finkelstein, R.A., LoSpalluto, J.J. (1970): Production of highly purified cholera toxin and cholera toxinogenoid. J. Infect. Dis. **121**(suppl), S63–S72.
 - 18) Forte, L.R., Krause, W.J., Freeman, R.H. (1989): *Escherichia coli* enterotoxin receptors: Localization in opossum kidney, intestine and testis. Am. J. Physiol., **257**, F874–F881.
 - 19) Fujii, Y., Hayashi, M., Hitotubashi, S., Fuke, Y., Yamanaka, H., Okamoto, K. (1991): Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. J. Bacteriol., **173**, 5516–5522.
 - 20) Garbers, D.L., Hardman, J.G., Rudolph, F.B. (1974): Kinetic analysis of sea urchin sperm guanylate cyclase. Biochemistry **13**, 4166–4171.
 - 21) Gazzano, H., Wu, H.I., Waldman, S.A. (1991): Activation of particulate guanylate cyclase by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is regulated by adenine nucleotides. Infect. Immun., **59**, 1552–1557.
 - 22) Gerzer, R., Hoffmann, F., Schultz, G. (1981): Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. Eur. J. Biochem., **116**, 479–486.
 - 23) Gill, D.M., Maren R. (1978): ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: Basis of the activation of adenylate cyclase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 3050–3054.
 - 24) Guggino, S.E. (1994): Gates of Janus: cystic fibrosis and diarrhea. Trend in Microbiol. **2**, 91–94.
 - 25) Harteneck, C., Koesling, D., Soling, A., Schultz, G., Bohme, E. (1990): Expression of soluble guanylate cyclase catalytic activity requires two enzyme subunits. FEBS Lett. **272**, 221–223.

- 26) Hidaka, Y., Ohmori, K., Wada, A., Ozaki, H., Ito, H., Hirayama, T., Takeda, Y., Shimonishi, Y. (1991): Synthesis and biological properties of carba-analogs of heat-stable enterotoxin (ST) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 958-965.
- 27) 平山壽哉 (1990) : 腸管感染症菌が産生する毒素の受容体, 三輪谷俊夫監修, 中野昌康, 吉川昌之介, 竹田美文 (編), 医学細菌学 2 巻, p. 99-129, 東京, 菜根出版.
- 28) 平山壽哉 (1991) 下痢原因細菌毒素の構造と機能 : 大腸菌が産生する毒素を中心として, 日本臨牀 **49**, 1427-1435.
- 29) Hirayama, T., Ito, H., Takeda, Y. (1989): Inhibition by the protein kinase inhibitors, isoquinolinesulfonamides, of fluid accumulation induced by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin, 8-bromo-cGMP, and 8-bromo-cAMP in suckling mice. *Microb. Pathog.*, **7**, 255-261.
- 30) Hirayama, T., Noda, M., Ito, H., Takeda, Y. (1989): Stimulation of phosphorylation of rat brush-border membrane proteins by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin, cholera enterotoxin and cyclic nucleotides, an its inhibition by protein kinase inhibitors, isoquinolinesulfonamides. *Microb. Pathog.*, **8**, 421-431.
- 31) Hirayama, T., Wada, A., Hidaka, Y., Fujisawa, J., Takeda, Y., Shimonishi, Y. (1993): Expression of a truncated guanylate cyclase (GC-C), a receptor for heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*, and its dimer formation in COS-7 cells. *Microb. Pathog.*, **15**, 283-291.
- 32) Hirayama, T., Wada, A., Iwata, N., Takasaki, S., Shimonishi, Y., Takeda, Y. (1992): Glycoprotein receptors for a heat-stable enterotoxin (STh) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**, 4213-4220.
- 33) Hitotubashi, S., Fujii, Y., Okamoto, K. (1994): Binding protein for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II in mouse intestinal membrane. *FEMS Microbiol. Lett.*, in press.
- 34) Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Yamanaka, H., Okamoto, K. (1992): Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Infect. Immun.* **60**, 4468-4474.
- 35) Holmgren, J. (1994): Receptors for cholera toxin and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin revisited. p 163-177, In Svennerholm, L., Asbury, A.K., Reisfeld, R.A., Sandhoff, K., Tettamanti, G., and Toffano, G. (eds), *Progress in Brain Research*. Vol. 101 Elsevier Science BV.
- 36) Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., Mekada, E. (1994): Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *EMBO J.*, **13**: 2312-2330, 1994.
- 37) Knoop, F.C., Martig, R.J., Boehm, W.J. (1990): The effect of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on protein kinase activity. *Toxicon*, **28**, 493-500.
- 38) Knoop, F.C., Thomas, D.D. (1983): Stimulation of calcium uptake and cyclic GMP synthesis in rat basophilic leukemia cells by *Escherichia coli* heat stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, **41**, 971-977.
- 39) Koesling, D., Harteneck, Ch., Humbert, P., Bosserhoff, A., Frank, R., Schultz, G., and Bohme, E. (1990): *FEBS Lett.* **266**, 128-132.
- 40) Koesling, D., Herz, J., Gausepohl, H., Niroomand, F., Hinsch, K-D., Mulsch, A., Bohme, E., Schultz, G., Frank, R. (1988): The primary structure of the 70kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett.* **239**, 29-34.
- 41) Koller, K.J., de Sauvage, Lowe, D.G., Goeddel, D.V. (1992): Conservation of the kinase-like regulatory domain is essential for activation of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclases. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 2581-2590.
- 42) Kuno, T., Kamisaki, Y., Waldman, S.A., Garipey, J., Schoolnik, G., Murad, F. (1986): Characterization of the receptor for heat-stable enterotoxin from *Escherichia coli* in rat intestine. *J. Biol. Chem.* **261**, 1470-1476.
- 43) Lee, C. H., Moseley, S.L., Moon, H.W., Whipp, S.C., Gyles, C.L., So, M. (1983): Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. *Infect. Immun.*, **42**, 264-268.
- 44) McIntosh, I., Cutting, G.R. (1992): Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and the etiology and pathogenesis of cystic fibrosis. *FASEB J.*, **6**, 2775-2782.
- 45) Naglich, J.G., Metherall, J.E., Russell, D.W., Eidels, L. (1992): Expression cloning of a diphtherial toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell*, **69**, 1051-1061.
- 46) Nishiki, T., Kamata, Y., Nemoto, Y., Omori, A.,

- Ito, T., Takahashi, M., Kozaki, S. (1994): Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.* **269**, 10498-10503.
- 47) Nishiki, T., Ogasawara, J., Kamata, Y., Kozaki, S. (1993): Solubilization and characterization of the acceptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin from rat brain synaptic membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1158**, 333-338.
- 48) Ozaki, H., Sato, T., Kubota, H., Hata, Y., Kutsube, Y., Shimonishi, Y. (1991): Molecular structure of the toxic domain of heat-stable enterotoxin produced by a pathogenic strain of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **266**, 5934-5941.
- 49) Peterson, J.W., Ochoa, L.G. (1989): Role of prostaglandins and cAMP in the secretory effects of cholera toxin. *Science*, **245**, 857-859.
- 50) Radany, E.W., Gerzer, R., and Garbers, D.L. (1983): Purification and characterization of articulate guanylate cyclase from sea urchin spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **258**, 8346-8351.
- 51) Rao, M.C. (1985): Toxins which activate guanylate cyclase: pp. 74-93. Heat-stable enterotoxins. Chiba Foundation Symposium 112. Microbial Toxins and Diarrheal Disease.
- 52) Schulz, S., Green, C.K., Yuen, P.S.T., Garbers, D.L. (1990): Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell*, **63**, 941-948.
- 53) Shyjan, A.W., de Sauvage, Gillett, N.A., Goeddel, D.V., Lowe, D.G. (1992): Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase. *Neuron*, **9**, 727-737.
- 54) Singh, S., Lowe, D.G., Thorpe, D.S., Rodriguez, H., Kuang, W.J., Dangott, L.J., Chinkers, M., Goeddel, D.V., Garbers, D.L. (1988): Membrane guanylate cyclase is a cell surface receptor with homology to protein kinases. *Nature*, **334**, 708-712.
- 55) So, M., Heffron, F., McCarthy, B. (1979): The *E. coli* gene encoding heat-stable toxin is a bacterial transposon flanked by inverted repeats of ISI. *Nature*, **277**, 453-456.
- 56) So, M., McCarthy, B. (1980): Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4011-4015.
- 57) Surtherland, E.W., Rall, T. W. (1957): The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg^{++} , and epinephrine or glucagon. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3608.
- 58) 竹田多恵, 下西康嗣 (1986): 腸管感染病原菌の産生する低分子量耐熱性エンテロトキシン, 1巻 p. 301-331. 東京, 菜根出版.
- 59) Thomas, D.D., Knoop, F.C. (1982): The effect of calcium and prostaglandin inhibitors on the intestinal fluid response to heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, **145**, 141-147.
- 60) Vaandrager, A.B., Van der Wiel, E., de Jonge, H.R. (1993): Heat-stable enterotoxin activation of immunopurified guanylyl cyclase C, modulation by adenine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **268**, 19598-19603.
- 61) Vaandrager, A.B., Van der Wiel, E., Hom, M.L., Luthjens, L.H., de Jonge, H.R. (1994): Heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalently linked in the intestine. *J. Biol. Chem.*, **269**, 16409-16415.
- 62) Wada, A., Hirayama, T., Kitao, S., Fujisawa, J., Hidaka, Y., Shimonishi Y. (1994): Pig intestinal membrane bound receptor (guanylyl cyclase) for heat-stable enterotoxin: cDNA cloning, functional expression, and characterization. *Microbiol. Immunol.* **38**, 535-541.
- 63) Whipp, S.C. (1987): Protease degradation of *Escherichia coli* heat-stable, mouse-negative, pig-positive enterotoxin. *Infect. Immun.*, **55**, 2057-2060.
- 64) Whipp, S.C. (1990): Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infect. Immun.*, **58**, 930-934.
- 65) Wiegand, R.C., Kato, J., Currie, G.M. (1992): Rat guanylin cDNA: characterization of the precursor of an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **185**, 812-817.
- 66) Yamasaki, S., Sato, T., Hidaka, Y., Ozaki, H., Ito, H., Hirayama, T., Takeda, Y., Sugimura, T., Tai, A., Shimonishi, Y. (1990): Structure-activity relationship of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: Role of Ala residue at position 14 in toxin receptor-interaction. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 2063-2070.