分子の配列を電顕で見る

—ストレプトリジン O により形成される赤血球膜の孔—

関 矢 加智子

北里大学薬学部微生物学教室
〒108 東京都港区白金5-9-1

〔受理：1995年1月18日〕

I. は じ め に

細菌の産生する細胞溶解毒素には、酸化により活性を失い、チオール化合物により活性化されるファミリーが存在する。これらは、分子量約5～6万のタンパク毒素で、赤血球などの生体膜のコレステロールを標的に結合し、傷害作用（溶血）を起こすことが知られている。A, C, G 群の溶血レンサ球菌の産生するストレプトリジン O (SLO) や (1), *Clostridium perfringens* の産生するパーフリンゴリジン (7) は、その代表的なものである。

これら毒素による細胞傷害についての電子顕微鏡（電顕）レベルでの超微形態学的な研究も古くからなされており、赤血球膜あるいは、リポソーム上でリング構造を形成することが、ネガティブ染色像やフリーズ・フラクチャー像から観察され (3, 4, 8), 私達も同様な結果 (図1説明後述) を得ているが、しかし、その像の解釈をめぐる、研究者間に意見の相違があり、現在では、明らかに誤りであると考えられるものもある。そこで、まずその像解釈をめぐるどのような解釈がなさ

れてきたかを歴史的に振り返ってみたい。

II. リングの像解釈の歴史

1975年に Duncan と Schlegel (4) は、SLO を赤血球膜に作用させた際に、内径 24 nm, 外径 38 nm を示すリング構造の電顕像から、図2のような1リング1分子説モデルを考察した。つまり、SLO は分子量6万で、その α ヘリックスのコンフォメーションから、78 nm の長さを導きだし、1分子の SLO の周りにコレステロールが結合し、75 nm の長さの弧を形成したと考えた。しかしながら、コレステロールの分子量は、390程度で、大量のコレステロールが、SLO に結合しても、1 nm の巾にもならないはずである。また、リング形成した赤血球膜からのコレステロールの回収率は、重量計算で SLO の 1～1.5% との報告 (3) と矛盾し、その解釈には明らかに誤りがあると思われた。さらに、彼らは、半円 (C), S 字 (S), 正円 (O) 状のリングができる理由を図3のように考察した。長さ 75 nm の1分子で1リングが形成されるとすると、O 状のリングの場合は、半径が 24 nm となるが、C や S 状の開環状のリングの場合は、その曲率半径が、異なってくるはずであり、電顕写真上は、どのような形態のリングも同じに観察されていることと矛盾し、誤った解釈と考えられる。

1979年 Mitsui ら (7) は、*C. perfringens* の産

Kachiko SEKIYA

Electron-Microscopic Observation of Pore Formation in the Erythrocyte Membrane by Streptolysin O

Department of Microbiology, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, Minato-ku, Tokyo 108

図1. a: SLO を作用したウサギ赤血球膜の電顕像
 孔を伴った SLO リング (矢頭) と孔を伴わない SLO リング (矢印) の像
 b: 赤血球膜上の SLO リングの図解 (図1b, 文献10より引用)

生するパーフリンゴリジンでも SLO と同様の直径 24 nm, 巾 5 nm のリング構造を電顕上で観察し, 図4のように考察した。すなわち, 毒素単独の場合は, 左図のように卵型の20~28(図では22)の粒子が同心円状に連なった形でリングが形成され, コレステロール存在下で, 2層あるいは3層に重なり, より明瞭なリングが観察さ

れると考えた。卵型の粒子と分子との関係は論じていないが, リングが多分子で構成されると理解され, 評価できるモデルと思われる。

1985年に Niedermeyer(8) は, 図5に示すように18~20のサブユニットないし分子が弓状に連なった形の SLO リングのモデルを提唱し, 馬蹄型の形をしたサブユニットの厚さは, 1 nm で

図2. Duncan と Schlegel による C リング形成の図解 (文献4より引用)

図3. Duncan と Schlegel による C, S, O リング形成の図解 (文献4より引用)

あると報告した。

図6は、1985年の Bhakdi ら (3) の膜内に形成された SLO リングのモデルである。脂質二重層の断端面に図示されたような自由端が存在する

とすると、分子同士が図のように重なり合って存在することはできず、ヘアピン型のリン脂質が並

んでいるとすると、その厚みは、リン脂質二重層の約3倍近くなるはずであり、この図はその点が不明確であるように思える。しかし、このモデルの特徴は、SLO リングがリン脂質二重層より突出した形であることを意図して描かれている点にある。ネガティブ染色でリングとして観察され

図4. Mitsuiらの示したパーフリンゴリジンによるリング形成の図解 (文献7より引用)

図5. Niedermeyer による SLO リングの図解 (文献8より引用)

ることは、単なる孔の存在でなくリングの部分が、その両サイドより突出していることを意味しているとの解釈に基づいて描かれたものと思われる。彼らが、正しい解釈をしていながら、その膜から突出した構造を電顕像で証明できなかったのは、SLO リングが、1978年に Trantum-Jensen ら(12)によって報告され、既に良く知られている補体のシリンダー構造 (図7) ほど膜面から突出していないため、電顕ではっきり捕らえられ難かったことによるものと思われる。以上のように、電顕観察結果の像解釈はさまざまであり、いずれも正確さの点で問題があると思われた。また、生化学的手法によっても、一つのリングが、何分子の毒素により形成されているかについて、その計測体積や溶血力価から、それぞれ20~100分子あるいは、70~125分子といった報告(2)があるが、確証は得られておらず、その生体膜傷害機構の詳細は、不明なままであった。

そこで、筆者らは、電顕像に基づく画像処理等の結果から、本毒素により形成されるリング構造がどのような分子配列で構成されるかについて検討した(10)。本稿では、細菌学における電顕の利用例の一つとして、その内容の一部を解説した

図6. Bhakdi による膜内に形成された SLO リングの図解 (文献3より引用)

い。

III. ネガティブ染色像

SLO には、*Streptococcus pyogenes* の培養上清を硫酸塩析した粗毒素を使用した。SLO を作用させた生体膜の傷害像を、電顕で再現性良く捕らえるために、安定した生体膜の材料として、最も一般的なウサギ赤血球膜を用いた。数 nm オーダーでの解析のため、その分解能を満たし得る電顕試料作製法として、古典的ではあるが、ネガティブ染色法を選択した。試料作製に際し、血球膜の重層や、膜に付着する裏打ちタンパクなどによる像障害を避けるために次の工夫を加えた。SLO を作用後、赤血球の微量を蒸留水上に滴下し、水面上に浮上した膜を支持膜に付着させて観察した。また、予め蒸留水で溶血したゴースト膜を同様の操作で水面上に浮上させて得たゴースト浮上膜に SLO を作用させて観察した。試料支持膜も試料作製時や観察中の電子線損傷により破損しないよう、丈夫で薄い膜の作製に工夫がなされた。

SLO を作用した赤血球膜は、2.5% グルタルアルデヒドで固定後、2% リンタングステン酸でネガティブ染色し、透過型電顕で観察した。溶血赤血球膜を真上から見た場合に、従来から報告されている半円(C)、あるいは正円(O)状のリングが観察された(図1a)。50個のリングの平均値からリングの巾は、従来報告(3, 4)された

図7. Trantum-Jensen らによる補体によって脂質二重層中に形成された孔の図解 (文献12より引用)

図 8. a: SLO 作用により溶血したウサギ赤血球膜の電顕像

赤血球膜の洩に形成されたリングを横から見た時に観察されるリング上の冠状構造 (矢印)

b: リング上の冠状構造の図解

上部から冠状構造に相当する明帯の頭部 (H), 暗帯の頸部 (N), 膜内の基底部 (B) の三層構造 (図 8 b, 文献10より引用)

7 nm より狭く 4.9 ± 0.1 nm, 内径は, 約 24 nm と計測された (図 1 b)。リング構造を折れ返した膜の洩の部分で横向き状態で見た場合に, リング上に赤血球膜から突出した冠状構造を, 初めて観察することができた (図 8 a)。この冠状構造は, 上部から冠部の明帯, 暗帯, 赤血球膜内の三層に染められ, それぞれ 3.2 nm, 1.6 nm, 5.0

nm と計測された (図 8 b)。

ゴースト膜を用いた際に, Niedermeyer (8) も観察したように, 赤血球膜を伴わない試料支持膜上にも正円状のリング構造が形成された (図省略)。これは, 赤血球膜内から溶出した成分が, 試料支持膜に付着し, その上に SLO 分子がリングを形成したものと考えられる。この場合, 生体

膜を伴わない分、試料の厚みが薄くなるため、より高分解能の像が得られたものと思われる。そこで、この像を不足焦点で観察したところ、分子像が強調され、その配列と思われるものを浮き彫りにすることが出来た（図9）。この像から、まが玉が一部を重ね合せたような形で22~24個の構造が連結した内側リング（図9、矢印）と、その一つ一つに結合し、歯車状に見られる構造（図9、矢頭）からなる外側リングからなる二重リングにより、一つの SLO リングが、構成されることが明らかになった。

IV. 電顕像の三次元画像解析

上記の透過型電顕像は、走査型電顕像と異なり平面画像のため、得られたネガティブ染色電顕像を立体視することを新たに試みた。

図9の試料を正焦点で撮影した（図10a）。そ

の90~100万倍の写真を、マッキントッシュ II Ci を用いたイメージ分析装置により画像処理し、三次元化した。その結果、デンストグラム（図10b）ならびにフィルタリング像（図10c）により、リングが二重であることが確認され、さらに、三次元化した像（図10d）とその拡大像（図10e）から、SLO 分子が内外二重に並んだリングを立体視することができた。図10と同様に、生体膜上のリング構造についても検討した。ゴースト膜上のリングの正焦点像において、ほぼ同様の結果が得られ（図省略）、二重リング構造が確認された。

次に、リングの内径 24 nm（図1 b）、三層のそれぞれの高さが、上から 3.2, 1.6, 5.0 nm（図8 b）で、一リングが内外22個の構造で構成されるとして、その一つの構造単位を立体的に図式化した（図省略）。膜から突出した冠状構造に相当する頭部の直方体が、1.6 nm の長さの細い紐状構

図9. 試料支持膜上の SLO リングの不足焦点像
リングを構成する内側（矢印）と外側（矢頭）それぞれに見られる22~24個の構造単位（まが玉）

図10. 試料支持膜上の SLO リングの正焦点像と三次元画像解析

a: 正焦点像 b: デンシトグラムによる二重リング(二重矢印)の証明 c: フィルタリングによる二重リングの証明 d: 三次元画像解析による二重リングと分子配列 e: dの拡大像(文献10より引用)

造で膜内に埋っている部分の基底部の直方体につながる。これら頭部と基底部を一緒にした1構造単位の占める体積を計算すると、内側構造単位は 77 nm^3 、外側構造単位は 88 nm^3 と計算された。

そこで、この1構造単位の体積が SLO 何分子に相当するかを検討した。SLO の分子量は、およそ 64,000 前後と考えられる(6, 11)。そこで、分子量 55,000 のマイクロチューブルスとの比較で考えてみると、 α , β サブユニットの二量体の体積が 157 nm^3 と報告(5)されていることから、SLO の冠状の頭部と基底部を合わせた約 $80 \sim 90 \text{ nm}^3$ の体積は、正に SLO 1分子に相当すると計算された。この結果は、Bhakdiら(3)や、Niedermeyer(8)の報告にも近い値であった。

従って、内外22個の構造単位は、それぞれ1分子の SLO に相当することが明らかにされた。

近年、SLO には、 $-\text{SH}$ 基が一つしか存在しないことから、チオール化合物による活性化について疑問視する報告(6, 9)もあり、隣の分子同士が $-\text{SH}$ 基で結合しているとの古くからの考えは否定的である。そこで、内外のリングを構成する1分子ずつの結合に $-\text{SH}$ 基が関与しているのではないかと考え、内側の分子 SLO-I と外側の分子 SLO-O の結合模型図(図11)を予想した。リングが赤血球膜の脂質二重層内に潜り込むために、その外側リングの基底部外壁には、疎水性域が存在し、これと対照に、内側リングの基底部内壁には親水性域が存在すると考えられる。

図11. 内外リングを構成する一対の SLO 分子のモデル像
頭部は、細いポリペプチドの頸部で基部と結合（文献10より引用）

図12. SLO リングのモデル像
内外リングを構成する SLO 分子の並びの図式（文献10より引用）

以上のことを総合して、このような内外を構成する1分子ずつの SLO が、22~24ペアでリングを形成するモデルを推定した(図12)。この私達の提唱したモデルによると、一つの正円リングは SLO 44~48分子で形成される結果となり、先に述べた生化学的な手法による報告(2)とも合致し、妥当なモデルと考えられる。

SLO の分子量と電顕像から導きだされた体積計算から、内外の1構造単位が、それぞれ SLO の1分子に相当するとした結論は、この1構造単位を構成する構造物が、SLO 分子のみにより形成されていることが前提であった。その後、固定した生体膜においてもリングが形成されたことから、リング形成には膜内タンパクを利用していないことが証明された(1994年5月日本電子顕微鏡学会第50回学術講演会、口頭発表)。そのため、図11に示した構造は、膜内に存在する基底部も含めて SLO 分子のみにより構成されていることが明らかとなり、ここに示したモデルの正当性が立証された。

V. お わ り に

以上述べてきたような筆者らの研究(10)や他の研究者の報告(1, 3, 4, 8)を総合的に考えてみると、SLO による溶血機構は、次のようにまとめられよう。まず、SLO-I 分子が赤血球膜上のコレステロール分子を介して結合し、SLO-I 分子のみによる不完全リングが形成される。同リングに、チオール化合物で活性化された SLO-O 分子が結合し、膜内へ侵入する。侵入したリングの弧がある長さに達すると、リングの内側における膜の張力が反発力に負けて、孔が形成される。そして、弧は正円状にまでさらに長くなる。このようにして形成された孔が、ヘモグロビンを通過させ得る大きさに達すると溶血が起こると考えられる。内外のリングをどのような SLO 分子が構成するのか、などについては今後の検討課題である。

謝 辞

本稿は、北里大学薬学部檀原宏文教授、同医療衛生学部二重作豊教授、同医学部佐藤亮平講師との共同研究を中心に解説したもので、ここに感謝

の意を表します。

文 献

- 1) Alouf, J.E. (1980): Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S and erythrogenic toxin). *Pharmacol. Ther.* **11**, 661-717.
- 2) Bhakdi, S., Roth, M., Szeigoleit, A., Tranum-Jensen, J. (1984): Isolation and identification of two hemolytic forms of streptolysin-O. *Infect. Immun.* **46**, 394-400.
- 3) Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J., Szeigoleit, A. (1985): Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect. Immun.* **47**, 52-60.
- 4) Duncan, J.L., Schlegel, R. (1975): Effect of streptolysin O on erythrocyte membranes, liposomes, and lipid dispersions. A protein-cholesterol interaction. *J. Cell Biol.* **67**, 160-173.
- 5) Erickson, H.P. (1974): Assembly of microtubules from preformed, ring-shaped protofilaments and 6-S tubulin. *J. Supramol. Struct.* **2**, 393-411.
- 6) Kehoe, M.A., Miller, L., Walker, J.A., Boulnois, G.J. (1987): Nucleotide sequence of the streptolysin O (SLO) gene: structural homologies between SLO and other membrane-damaging, thiol-activated toxins. *Infect. Immun.* **55**, 3228-3232.
- 7) Mitsui, K., Sekiya, T., Okamura, S., Nozawa, Y., Hase, J. (1979): Ring formation of perfringolysin O as revealed by negative stain electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **558**, 307-313.
- 8) Niedermeyer, W. (1985): Interaction of streptolysin-O biomembrane: kinetic and morphological studies on erythrocyte membranes. *Toxicon*. **23**, 425-439.
- 9) Pinkney, M., Beachey, E., Kehoe, M. (1989): The thiol-activated toxin streptolysin O does not require a thiol group for cytolytic activity. *Infect. Immun.* **57**, 2553-2558.
- 10) Sekiya, K., Satoh, R., Danbara, H., Futaesaku, Y. (1993): A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. *J. Bacteriol.* **175**, 5953-5961.
- 11) Suzuki, J., Kobayashi, S., Kagaya, K., Fakazawa, Y. (1988): Heterogeneity of hemolytic efficiency and isoelectric point of streptolysin O. *Infect. Immun.* **56**, 2474-2478.
- 12) Tranum-Jensen J., Bhakdi, S., Bhakdi-Lehnen, O., Bjerrum, J., Speth, V. (1978): Complement lysis: the ultra-structure and orientation of the C5b-9 complex on target sheep erythrocyte membranes. *Scand. J. Immunol.* **7**, 45-56.