大腸菌耐熱性エンテロトキシンの生合成と成熟化過程

岡 本 敬の介・山 中 浩 泰

徳島文理大学 薬学部 生化学講座
〒770 徳島市山城町西浜傍180

〔受理：1996年4月30日〕

毒素原性大腸菌が産生する耐熱性エンテロトキシン (ST) には STI と STII の 2 種類が存在する。菌体外に放出された STI は 18 個もしくは 19 個のアミノ酸、STII は 48 個のアミノ酸からなるペプチドである。両 ST はともに前駆体として生合成される。菌体内のサイクリック AMP は両 ST 遺伝子の発現に影響をあたえる。細胞質で生合成された前駆体 ST はアミノ末端に存在するシグナルペプチドを利用し、sec 依存的に内膜を通過し、ペリプラスム中に移行する。移行した ST は酵素 dsbA の作用をうけて、分子内ジスルフィド結合が架橋される。ジスルフィド結合が架橋された ST は大腸菌が保有する機能を利用して外膜を通過し、菌体外に分泌される。このジスルフィド結合の形成と内膜、外膜の二層の膜の通過は ST の成熟化にとって大切な問題である。本総説ではこの ST のジスルフィド結合の形成と膜通過過程を紹介するとともに、他の細菌性タンパクの膜通過機構についても述べた。

I. は じ め に

大腸菌は哺乳動物の腸管に棲息する無毒の菌、いわゆる正常細菌叢を形成する菌である。しかしこの大腸菌の一部のグループが下痢症や腸炎を引き起こすことは、かなり以前から知られていたようであり、1890年代後半にはすでに腸管に病原性を示す大腸菌の存在が示唆されている (34)。その後の研究により、この腸管に病変をもたらす大腸菌にはいくつかの種類があることがわかった。現在ではこの腸管病原性的大腸菌は菌の病原因子 (病状を引き起こす因子) の差異から、①腸管病原性大腸菌 (enteropathogenic *E. coli*)、②

腸管侵入性大腸菌 (enteroinvasive *E. coli*)、③毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*)、④出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*)、⑤凝集性大腸菌 (enteroaggregative *E. coli*) の 5 種類に分類されている (45, 61, 80, 112)。

毒素原性大腸菌感染による主たる臨床症状は水様性下痢と腹痛であり、発熱はほとんど見られない。潜伏期間は 12 時間から 2 日と言われている。本菌感染から発症にいたるまでには、①経口的に摂取された菌が小腸粘膜上皮細胞上のレセプターに定着性線毛を介して付着・定着する。この付着・定着がなければ摂取された菌は腸管の蠕動運動などのクリアランス機能でもって、ただちに排除される。②定着した菌はエンテロトキシンを生合成し、生合成されたトキシンは活性型に構成・構築され、菌体外に放出される。③活性型のエンテロトキシンは腸管上皮細胞に作用し、細胞のイオンのバランスを乱し、水分の漏出をもたらす。こ

Keinosuke OKAMOTO and Hiroyasu YAMANAKA
Synthesis and Maturation Pathway of *Escherichia coli*
Heat-Stable Enterotoxin
Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Tokushima Bunri University, Tokushima 770

の結果宿主に下痢が生じる (46)。

この大腸菌のエンテロトキシンの性状が明らかになったのは1960年代後半である。1967年には Smith と Halls によってこのエンテロトキシンが耐熱性であることが示唆され (105), ついで, 1969年には Gyles と Barnum によってコレラトキシンと類似している易熱性のエンテロトキシン (*E. coli* heat-labile enterotoxin, LT) の存在が示された (37)。さらに1978年には耐熱性のエンテロトキシンには二種類が存在する事が示された (16)。今日ではこの二種類の耐熱性のエンテロトキシンは STI (*E. coli* heat-stable enterotoxin I) および STII とよばれている。(STI, STII を STa, STb とよぶこともある。)

STI は透析膜を通過する低分子の物質であり, また免疫原性も低く (52, 113), 高分子量のタンパク毒素と比べると, 取り扱いにくい毒素であった。また活性の測定には乳のみマウスを用いなければならず, 煩雑でかつ費用のかかる方法でしか STI のアッセイができなかった。それゆえ STI の精製には相当手間取り, STI の精製が報告されたのは1982年のことである (3)。

一方 STII が発見された1978年には遺伝子操作の技術が広まりつつあった時期でもある。1983年にはこの STII の遺伝子はクローニングされ, その塩基配列も決定, 報告された (59, 87)。しかしこの STII はブタの腸管ループ試験では陽性を示したが, 他の動物の腸管ループ試験では陰性を示すことが多かった。そのため STII の正確な解析にはブタを用いなければならなかった (121, 122)。ブタを用いてのアッセイで毒素の精製をすすめることは, 通常の実験室ではまず不可能にちかく, STII のタンパク側からの解析は放置されたままであった。その後タンパク分解阻害剤を添加すると, STII はマウスやラットの腸管ループ試験でも確実に陽性を示すことが示され, 1991年になって毒素の精製もなされた (29)。

本総説ではこの二種類の ST が菌体内で生合成されてから活性を有する成熟体として菌体外に分泌されるまでの過程を説明する。

II. 成熟体 ST の構造

活性型 ST, すなわち培養上清中に分泌された

活性を有する ST の構造は ST の分泌, 成熟過程を理解するうえで大切であるので, まず活性型 ST の構造について説明する。

1) STI の構造

STI には STIp と STIh の二種類が知られている。STIp は18個, STIh は19個のアミノ酸からなるペプチドである (3, 111, 114)。それらのアミノ酸配列を図1に記しているが, アミノ酸配列は類似している。特に4位以降 (STIp) の配列では, 15位が STIp ではアラニンであるが, STIh ではスレオニンである点が異なるだけである。STI の立体構造, 活性発現に必要な構造の解析の研究も多くなされてきた。その結果分子内には3本のジスルフィド結合が5位-10位間, 6位-14位間, 9位-17位間で架橋している (103, 128)。これらの3本のジスルフィド結合の架橋と毒素活性との関係が検討された。その結果活性構造が構築されるためには3本のジスルフィド結合が正しく架橋されなければならないことがわかった (78, 128)。さらに「5位-10位間, 6位-14位間」あるいは「6位-14位間, 9位-17位間」の2本のジスルフィド結合を有する STI はわずかながら活性を有しているが, 「5位-10位間, 9位-17位間」の2本のジスルフィド結合を有する STI には活性が見られないことが判明した (128)。このことは3本のジスルフィド結合のうち6位-14位間の結合の形成が活性構造構築により重要である事を示している。また STI が活性を発揮するためには11位のアスパラギンや13位のアラニンの側鎖の構造が大切であることが示されている (81, 129)。6位-14位間のジスルフィド結合は11位や13位のアミノ酸によって構築される構造の保持に寄与しているのであろう。

2) STII の構造

STII は48個のアミノ酸からなるペプチドであり, 分子内には2本のジスルフィド結合が10-48位間, 21-36位間で架橋している (図1) (22, 29)。最近 STII の立体構造が明らかになった (図2) (109)。それによると10位~22位および38位~44位はヘリックス構造がある。10位~22位に存在するヘリックス構造は両親媒性であり, 親水性アミノ酸の極性基は外側 (親水性の溶媒) にむかい, 疎水性の基は内側に向かってい

図1. 成熟 STI, 成熟 STII およびグアニリンのアミノ酸配列。

図2. STII の基本骨格の模式図。

番号はアミノ末端からのアミノ酸残基数を示している (文献109より引用作図)。

る。内側に向いた基はカルボキシ末端側のヘリックスの疎水性基と接触している。22位~35位のループは疎水性アミノ酸のクラスターで形成されている。この STII の立体構造の維持にはジスルフィド結合が重要な役割を果たしており、ジスルフィド結合を解裂すると、STII の構造は乱れてしまう (109)。

III. ST の遺伝子と発現

STI および STII の遺伝子はともにプラスミドにコードされており、トランスポゾンで伝達されている (58, 106)。本章では ST の遺伝子とその発現について説明する。

1) STI 遺伝子

STI 遺伝子をコードしている種々のプラスミドが大腸菌野生株から分離されており、そのプラスミドのサイズは広範囲にわたっている。それらのプラスミドは通常 STI のみならず、線毛遺伝子、薬剤耐性遺伝子などもコードしている (36, 38)。

STI 遺伝子を最初にクローニングし、その塩基配列を報告したのは So と MacCarthy である (106)。彼女達は Tn1681 中の STI 遺伝子の塩基配列を決定した。この STI 遺伝子の両端には ISI (挿入配列 I) が組み込まれていた。これは STI 遺伝子がトランスポゾンで伝達されていることを証明している。薬剤耐性遺伝子以外でトランスポゾンでの伝達が立証されたのは STI がはじめてである。Tn1681 の STI はブタ由来の大腸菌が保有していたとの理由で、STIp 遺伝子と言われている。しかしその後の調査より、この菌株はウシ由来であることがわかったが、改称せず現在でも STIp と言われている。その後ヒト由来の大腸菌の STI 遺伝子 (STIh) もクローニングされ塩基配列が決定された (71)。

STIp と STIh の塩基配列の相同性は低いが、塩基配列からは STIp, STIh とともに72個のアミノ酸からなるペプチドとして生合成されと考えられた。72個の構成アミノ酸のうち、29個の構成アミノ酸は STIp と STIh とでは異なっている (図3) (1)。しかし STI が想像されているように、72個のアミノ酸からなる前駆体として生合成されているか否かは確認されてはいなかった。STI の成熟化の過程を明らかにするためには、まず STI が72個のアミノ酸からなる前駆体として生合成されることを証明する必要がある。そこ

で筆者たちは STIp の翻訳開始アミノ酸を明確にするために、72個のペプチド中にあるメチオニン残基のコードンを他のアミノ酸のコードンに変換し、この変異 STI を産生する菌の STI 活性を測定した。すなわち STIp の 5 位、53位のメチオニン残基 (図3) をグルタミン酸残基、セリン残基に変換した。しかしこの変換は菌の STI 活性にはほとんど影響しなかった (79)。このことは STIp は 5 位、53位のメチオニン残基からは翻訳されてなく、想定されているように 1 位のメチオニンから翻訳されていることを示している。すなわち STIp は72個のアミノ酸からなるペプチドとして生合成されていることが明らかとなった。

2) STII 遺伝子

STII 遺伝子の遺伝子塩基配列は Lee らのグループ (59) と Picken らのグループ (87) で同時に発表された。その結果 STII は71個のアミノ酸からなるペプチドとして生合成されていることがわかった。

3) ST 遺伝子の発現制御

STI および STII 遺伝子の発現がともに異化代謝産物抑制と関係していることを示唆する報告がある (17, 36, 67)。報告ではサイクリック AMP (cAMP) やサイクリック AMP の受容タンパク (cAMP receptor protein, CRP) を合成

	1		10		20
STIp:	NH ₂ -Met-Lys-Lys-Leu-Met-Leu-Ala-Ile-Phe-Ile-Ser-Val-Leu-Ser-Phe-Pro-Ser-Phe-Ser-Gln-				
STIh:	— — — Ser- Ile — Phe — — Leu — — — — — Ser-Pro — Pro —				
	21		30		40
STIp:	Ser-Thr-Glu-Ser-Leu-Asp-Ser-Ser-Lys-Glu-Lys-Ile-Thr-Leu-Glu-Thr-Lys-Lys-Cys-Asp-				
STIh:	Asp-Ala-Lys-Pro-Val-Glu — — — — — — — — — Ser — — — Asn				
	41		50		60
STIp:	Val-Val-Lys-Asn-Asn-Ser-Glu-Lys-Lys-Ser-Glu-Asn-Met-Asn-Asn-Thr-Phe-Tyr-Cys-Cys-				
STIh:	Ile-Ala — Lys-Ser-Asn-Lys-Ser-Gly-Pro — Ser — — Ser-Ser-Asn — — —				
	61		70		
STIp:	Glu-Leu-Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys-Ala-Gly-Cys-Tyr-COOH				
STIh:	— — — — — — — — — Thr — — —				

図3. STI の前駆体のアミノ酸配列。
STIh で STIp と相同なアミノ酸は「—」で示している。

する遺伝子を欠損した変異株を用いての解析, さらにグルコースやサイクリック AMP の存在下で培養した時の ST 活性の解析などを行い, STI, STII 遺伝子の発現は異化代謝産物抑制と関連していることを見出している。

異化代謝産物抑制では, グルコースなどの添加によりサイクリック AMP 濃度が上昇し, そのサイクリック AMP が CRP と複合体を形成し, その cAMP-CRP の複合体が特定の遺伝子に結合し, その遺伝子の発現に影響をあたえる (2, 76)。報告から判断すると, cAMP-CRP 複合体は STI 遺伝子, STII 遺伝子の発現を正に制御していると考えられる。しかし分子レベルでの検討が行われていないので, 現時点で STI 遺伝子, STII 遺伝子の発現が cAMP-CRP 複合体で制御されているとは結論できない。現在までに cAMP-CRP 複合体で制御される遺伝子には, cAMP-CRP で正に制御される遺伝子 (*lac* 遺伝子, *mal* 遺伝子など) と負に制御される遺伝子 (*crp* 遺伝子, *cya* 遺伝子など) があり, これらの遺伝子の特定の部位に cAMP-CRP 複合体が結合することが知られている。その結合部位には TGTGA モチーフとそれと逆対称の TCACA モチーフ (……TGTGA……TCACA……の配列) が保存されている (2)。cAMP-CRP の複合体はこの保存されているモチーフに結合し, 転写レベルで遺伝子の発現を制御している。STI 遺伝子, STII 遺伝子にはともにプロモーターであると推定される付近にこの結合モチーフが存在している。それゆえ両 ST 遺伝子の発現が cAMP-CRP で制御されている可能性は大いに有り得る。今後 cAMP-CRP 複合体が実際にこの部位に結合するか否か, また ST 遺伝子の制御が転写レベルで生じているか否かなどを明らかにしていく必要がある。

この ST 遺伝子のサイクリック AMP による発現制御は ST の機能を考察するうえで興味深い。述べた様に, STI 遺伝子はプラスミドにコードされおり, トランスポゾンで伝達されている。STI 遺伝子はもともと大腸菌に存在している遺伝子ではない可能性が高い。恐らくは感染した大腸菌と宿主の遺伝子が触れ合っているうちに, 宿主に存在していた STI 遺伝子 (または STI の元

祖となった遺伝子) がトランスポゾンで大腸菌のプラスミドに乗り移った可能性が高い。最近 STI と構造が類似したペプチドとして, グアニリンが発見されている (図 1) (19)。このグアニリンに関連する遺伝子などが STI の起源となる遺伝子であるかもしれない。

STI は膜結合型のグアニレートサイクラーゼをレセプターとし, このレセプターに STI が結合するとレセプターすなわちグアニレートサイクラーゼが活性化され, 細胞内のサイクリック GMP 濃度が上昇する (42)。またグアニリンも腸管に内在性のグアニレートサイクラーゼの活性化因子と考えられている。すなわち STI およびその起源となるペプチドは何らかの形でサイクリックヌクレオチドの変動と関係したペプチドである可能性がある。サイクリックヌクレオチドの変動をもたらす STI の発現が, サイクリック AMP の系で制御されていることは大いに有り得る。

STII の作用メカニズムはまだ不明であるが, 提唱されているように, STII が cAMP-CRP で制御をうけていることが証明されれば, STII の機能の解析もすすむであろう。

IV. ST の内膜通過とジスルフィド結合の形成

II 章で述べたように ST は菌体外に分泌されるペプチドである。大腸菌をはじめとするグラム陰性菌は内膜, 外膜の二層の膜を有しており, 細胞質で合成された毒素が菌体の外にまで分泌されるには, この内膜, 外膜の二層の膜を通過しなくてはならない。膜は 2 つの領域を区分けするための境界であり, 一般の物質は通過できない。しかし ST などのある種のタンパクはこの二層の膜を通過し, 菌体外に放出される。本章ではまずグラム陰性菌, 特に大腸菌での内膜通過の概略を述べ, ついで ST の内膜通過に関する研究を紹介する。内膜を通過した ST はジスルフィド結合が架橋され活性型 ST に移行する。本章後半では ST のジスルフィド結合形成過程を紹介する。

1) 内膜通過機構

1) シグナルペプチドと sec タンパク

大腸菌の外膜あるいはペリプラスム中のタンパクは全て内膜を通過したタンパクであり, これら

のタンパクの解析から大腸菌における内膜通過の機構の研究がすすんだ。その結果、内膜を通過するタンパクはアミノ末端に20個位のアミノ酸からなるペプチドをもった前駆体として生合成され、このペプチドの助けをかりて内膜を通過していることがわかった。この内膜通過の際に機能するアミノ末端の20個位のアミノ酸から構成されるペプチドはシグナルペプチドとよばれている。なお大腸菌のシグナルペプチドと、動物細胞の粗面小胞体膜を通過するタンパクのシグナルペプチドとは、基本的に共通しており、交換してもそれぞれ機能する (116)。

シグナルペプチドを有する前駆体として生合成された大腸菌タンパクが内膜を通過する際には、菌が保有する sec とよばれる一群のタンパクと相互作用して内膜を通過する。この内膜通過機構を図4に、関与する sec タンパクの性状を表1に示した。

生合成された前駆体タンパクは膜透過に適した構造を維持してなくてはならない。生合成されたタンパクが細胞質中で複雑な立体構造をとると、膜通過には不適である。タンパクが複雑な立体構造をとらないように、生合成されたタンパクに働きかけるタンパクが secB である。SecB はシャ

図4. Sec タンパクによる内膜通過機構の模式図。

表 1. 大腸菌 Sec タンパク

タンパク	分子量 (Da)	タンパクの局在	特 性	参考文献
SecA	102,000	細胞質／細胞膜内	可逆的膜結合型 ATPase	62, 83, 84, 101
SecB	16,600	細胞質	細胞質内分子シャペロン	18, 53, 54, 92
SecD	67,000	細胞膜内	膜内在性タンパク (膜透過後期過程で機能)	30, 31, 70, 88
SecE	14,000	細胞膜内	膜内在性タンパク (SecG, SecY とともに複合体を形成)	49, 98
SecF	39,000	細胞膜内	膜内在性タンパク (膜透過後期過程で機能)	31, 70
SecG	15,000	細胞膜内	膜内在性タンパク (SecE, SecY とともに複合体を形成)	15, 74
SecY	48,000	細胞膜内	膜内在性タンパク (SecE, SecG とともに複合体を形成)	4, 15, 49, 50

ペロンとして機能する。ついでこの前駆体タンパクは膜表在性の secA と結合し、構造変化をうけた secA は分泌タンパクともども膜内に潜入する。SecA は ATPase 活性をもっており、ATP の分解によって得るエネルギーとプロトン駆動力を利用して前駆体はより膜内に挿入する。この作用が効率よく作動するためにはその他の sec タンパクの働きが必要である。このようにして内膜を通過したタンパクはシグナルペプチダーゼによって切断を受け、下流の C 末端側のペプチドはペリプラスム中に放出される (50, 70, 89, 97)。

2) STI および STII の内膜通過

(1) STI

III 章で述べたように、STI は72個のアミノ酸からなるペプチドとして生合成される。培地中に放出された STI は18個 (STIp) ないし19個 (STIh) のアミノ酸から構成されたペプチドである。従って STIp では (72-18) 個、すなわち 54個、STIh では (72-19) 個、すなわち53個のアミノ酸からなるペプチドが成熟毒素のアミノ末端側に結合した形で生合成されている。通常の細菌性タンパクのシグナルペプチドは20個位のアミノ酸からなっているので (82)、STI がアミノ末端に有するペプチド (53~54個のアミノ酸から構成) は通常のシグナルペプチドより相当長い。それゆえこの長いペプチドはシグナルペプチド領域とそれ以外の領域から構成されていると考えられる。

この STI のアミノ末端のペプチドの内、どの部分がシグナルペプチド領域なのかを決定するため、N 末端のペプチドの一部を欠損した変異ペプチドやブドウ球菌スクレアーゼ遺伝子

を STIp 遺伝子中に挿入して発現させた融合タンパクを解析した。その結果、STIp の N 末端の1位~19位の領域は内膜通過時に切り離されており、この領域がシグナルペプチドとして機能していることが示唆された (79, 124)。事実 STIp の N 末端の5位以降を欠損させると、STI の分泌は生じなくなった (77)。これらの結果は STIp では1位~19位がシグナルペプチドとして機能していることを示している。従って STI の前駆体は、シグナルペプチド領域である1位~19位のプレ領域、引き続いての20位~54位のプロ領域、55位~72位の成熟領域の三領域にわけられる (図5)。STIh の前駆体も「プレーブロー成熟」の三領域から構成されることが報告された (93)。

(2) STII

III 章で述べたように STII は71個のアミノ酸からなるペプチドとして生合成される。成熟 STII が48個のアミノ酸から構成されているので、アミノ末端側の23個のアミノ酸から構成されるペプチドがシグナルペプチドであろう。³⁵S-システインを用いてのパルスラベル実験も、

図 5. STI, STII の前駆体の構成領域。
番号はアミノ末端よりのアミノ酸残基数を示す。

ペリプラスム中に放出された STII は48個のアミノ酸から構成されていることを示していた(75)。すなわち STII は「プレー成熟」の領域からなる前駆体ペプチドの構造で生合成されている(図5)。

一般に原核細胞のシグナルペプチドのアミノ末端の数個のアミノ酸は塩基性アミノ酸で構成されており、その下流に疎水性アミノ酸のクラスターが存在するという特徴を有している。STI および STII のプレ領域のペプチドのアミノ酸配列もこのシグナルペプチドの特徴を有している(図3)。またシグナルペプチドが sec タンパクを利用してそのタンパクを内膜通過させるときは、その駆動力はプロトンの移動に伴う電気生理学的ポテンシャルから得ていることが示されている。STI, STII でも内膜通過の駆動力をプロトンの移動に伴う電気生理学的ポテンシャルから得ていることも示されており(55, 93), STI, STII が N 末端のシグナルペプチドを利用して内膜を通過していることは疑いのないところである。

2) ジスルフィド結合の形成

1) ジスルフィド結合の形成と酵素

リボソームで生合成されたタンパクのジスルフィド結合はどのような様式で架橋されているのだろうか？ ジスルフィド結合の形成はシステインの -SH 基同士が反応して -S-S-結合を形成する反応であるから、適切な酸化還元状態であれば、自発的に(他の因子の介添えなしで)反応は進行する。しかし、Anfinsen はリボスクレアーゼを用いて試験管内(*in vitro*)の系での再構築実験を行い、酸化還元状態を与えるだけではそのタンパクの再構築は生体内(*in vivo*)のそれに比べ、その効率、正確さの点でかなり劣ることを見出した(6)。最近の知見からも、*in vitro*の系での再構築は速度論的にも極めて遅く、しかも必ずしも正確に進行しないことが示された(26)。また、Peters と Davidson は、分子内に17ものジスルフィド結合を有するラットアルブミンのジスルフィド結合の形成は、*in vitro*の系では数時間以上もかかるのに対し、*in vivo*の系では30秒以内に完了することを見出した(86)。これらのことから、*in vivo*の系でのジスルフィド結合形成には第3

の因子が介在し、極めて効率よくかつ正確に行われていると推察された。

グラム陰性細菌ではペリプラスム内(真核細胞では小胞体間腔内)は細胞質内に比べ酸化還元レベルがより非還元な状態である(9, 28, 47, 123)。それゆえ細菌の分泌性タンパクのジスルフィド結合は非還元環境下にあるペリプラスム内で架橋されていると考えられる。しかし STI のジスルフィド結合が STI 分泌のどの過程で、どのようにして形成されるのか、また前述の第3の因子がジスルフィド結合形成に関与しているのか否かは不明であった。

最近 Bardwell らと Kamitani らは、ほぼ同時期に大腸菌ペリプラスム内に局在する dsbA とよばれる酸化還元酵素の存在を報告し、この酵素が種々のペリプラスムタンパクや外膜タンパクの分子内ジスルフィド結合の架橋に関与することを明らかにした(10, 51)。その後、コレラ菌をはじめいくつかの菌種においても dsbA と類似した酵素が次々に見つけられ、dsbA を含めたこれら一連の酵素が種々のタンパク毒素や鞭毛構成タンパクの分子内ジスルフィド結合形成に関与することが明らかとなった(20, 85, 117, 119, 131)。さらに dsbC もジスルフィド結合の形成に関与する酸化還元酵素であると報告された(69, 100)。しかしこの dsbC はジスルフィド結合の掛け替えを行う異性化酵素であるとの見解もある(27, 99, 100)。

2) STI のジスルフィド結合の形成

活性を有する STI が効率よく産生されるためには、分子内のジスルフィド結合が正しく、しかも素早く架橋されなければならない。ジスルフィド結合が架橋されていない STI 分子は不安定で、菌体内、外のプロテアーゼで分解される。

そこで我々は STIp のジスルフィド結合形成に dsbA が関与しているか否かを調べた。DsbA 遺伝子を欠損した菌株では STI の産生は極めて低いこと、また *in vitro* でジスルフィド結合が未架橋の STI と dsbA とを反応させると、STI にジスルフィド結合が架橋されることがわかった(126)。これらの結果は *in vivo* において STI のジスルフィド結合が dsbA の触媒作用で架橋されていることを示している。また dsbA はペリプラ

スム内に局在しているので、STI のジスルフィド結合はペリプラスム内で架橋されていることも明らかになった。

3) STII のジスルフィド結合の形成

前述したように、成熟型 STII はタンパク分解酵素で容易に分解される。ジスルフィド結合が架橋されていない未成熟の STII はそれ以上に早く分解される。またジスルフィド結合が架橋していない STII は外膜を通過できない (75)。それゆえに生合成された STII が菌体内のプロテアーゼによる分解をまぬがれ、菌体外に分泌されるためには、生合成された STII のジスルフィド結合が早急に架橋されなければならない。

最近我々は STII のジスルフィド結合もペリプラスムで dsbA の作用で架橋されることを明らかにした。さらにシステイン残基を置換した変異 STII の解析より、21位-36位間のジスルフィド結合の形成が外膜の通過に大切であること、ジスルフィド結合が架橋されていない STII のプロテアーゼによる切断は14位と15位間の切断から開始されることも明らかにした (75)。

3) STI のプロ領域の機能

すでに述べたように、STI はシグナル配列と成熟領域の間にプロ領域を有する配列で生合成される。この様なプロ領域を有する形で生合成されるタンパクとしてはプロテアーゼや溶血毒などで知られている。そしてある種のタンパクのプロ領域は分子内シャペロンとして機能することも知られている (72, 104)。すなわちプロ領域を有する未成熟なタンパクが成熟タンパクに変換される際に、そのタンパクのプロ領域は自身の未成熟なタンパクに一定の構造を与え、効率のよい成熟化を促進する。それでは STI のプロ領域は STI の成熟化に何らかの機能を発揮しているのであろうか？

STI のプロ領域の機能を調べるため、まずプロ領域をコードする遺伝子を削除した。その変異 STI を産生する菌では STI 活性が親株の約 1/4 に減少していた (79)。またプロ領域を削除するとペリプラスム中での滞留時間が減少することも報告された (130)。これらの知見はプロ領域が STI の成熟化過程で何らかの役割を果たしていることを示唆している。

筆者たちはこのプロ領域の機能について検討をすすめ、プロ領域は ①成熟領域の内膜通過を促進する、②中間体 STI が dsbA の作用を受けやすい構造を提供する、との機能を有することを明らかにした。以下にこの機能を明らかにした実験を紹介する。

1) 成熟領域の内膜通過への影響

STI のアミノ酸配列から推測すると、STI の成熟領域は疎水性に富む領域であり、逆にプロ領域は親水性に富む領域である。膜タンパクなどで知られているように、疎水性アミノ酸で構成される領域は生体膜 (疎水性を有している) へのアンカリングナルとなることが多い (14, 56, 57, 95)。すなわちタンパクの疎水性の強い領域は膜と疎水性-疎水性の反応をおこし、膜中に停滞しやすい。膜を通過しなければならない分泌タンパクにとってはこのような疎水性の強い領域の存在は膜通過に極めて不利である。

STIp の成熟領域の疎水性が膜通過に影響を与えるか否かを融合タンパクを用いて調べた。STIp の成熟領域とブドウ球菌由来のヌクレアーゼからなる融合タンパク遺伝子を作成し、この遺伝子産物 (融合タンパク) がペリプラスム中へ移行する効率を調べた。STIp の成熟領域が組込まれた融合タンパクのペリプラスムへの移行は極めて低下していた (124)。このことは、STI の成熟領域は融合タンパクの内膜通過を阻害していることを示している。恐らく STIp の成熟領域は疎水性のため、膜中を通過しにくく、その結果融合タンパクのペリプラスム中への移行が阻害されたと考えられる。

この様に STI の成熟領域が膜通過に阻害的に作用するにもかかわらず、大腸菌を培養すると STI の成熟領域は内膜、外膜を効率よく通過して培地中に移行している。恐らく STI の成熟領域の膜通過を容易にせしめている何らかの機構が働いていると思われる。

ある種のタンパクにおいては、そのタンパクの膜透過を完了するのにシグナルペプチドだけでは不十分で、その下流にある荷電性アミノ酸を含めた親水性領域が必要であることが報告されている (5, 65, 94, 110)。生合成された STI の成熟領域が効率よく内膜を通過しているのは、シグ

ナルペプチドの下流のプロ領域が親水性にとみ、その親水性がさらに下流の成熟領域の内膜通過を容易にしている可能性が考えられる。

ではこのプロ領域の“成熟領域の内膜通過の促進”の作用は、プロ領域のどの構成アミノ酸が担っているのだろうか？ STIp と STIh のプロ領域のアミノ酸配列を比較すると、27位から39位のアミノ酸配列は高度に保存されているが、40位から53位のアミノ酸配列には相同性は認められない（図3）。このことから前者はプロ領域の保存領域、後者は非保存領域とよばれている。この保存領域をコードする遺伝子を削除すると、STI 産生菌の培養上清の STI 活性は顕著に低下するが、非保存領域の削除では活性の低下は認められなかった（124）。このことから27位～39位の保存領域がプロ領域の機能を担っていると考えられた。

この27位～39位間には29位～31位（Lys-Glu-Lys）と37位～38位（Lys-Lys）の2個所に荷電性アミノ酸のクラスターがある。このクラスターはプロ領域に親水性の性質を賦与している。この荷電性アミノ酸の遺伝子を他のアミノ酸の遺伝子に置換した STIp 遺伝子を作製し、この遺伝子を保有する菌から産生される STI 量を調べた。その結果29～31位の荷電性アミノ酸を疎水性アミノ酸に置換した変異 STI では STI の産生量は減少していた（125）。

さらにパルスラベル法で解析した。29～31位のアミノ酸を図6に示すようなアミノ酸に置換した変異 STI を産生する菌を作製し、培養しペリプラスム中に現れた変異 STI を解析した。図6の5列～7列で示すように、30位のグルタミン酸を疎水性アミノ酸に変換すると、ペリプラスム中に現れる STI の量は減少する。逆に図6の2列で示す様にこの付近の陰性電荷を増すとペリプラスム中に現れる STI の量は増加した。これらの結果から30位の陰性電荷がプロ領域の“成熟領域の内膜通過の促進”の機能の発現に重要であると考えられた。

2) ジスルフィド結合の形成への影響

プロ領域の保存領域の39位にはシステイン残基が存在する。このシステイン残基はフリーで存在している。ある種のタンパクではフリーのシス

テイン残基はジスルフィド結合交換反応などを介して、そのタンパクのジスルフィド結合形成反応に大きな影響を与える（107, 120）。STI においても、プロ領域中の39位のフリーのシステイン残基が成熟領域のジスルフィド結合の形成に影響を与えているのか否かを調べるために、39位のシステイン残基を他のアミノ酸（ロイシン、アラニン、セリンなど）のコドンに置換し、この変異 STI 遺伝子を有する菌の STI 活性を測定した。培養上清中の STI 活性は顕著に低下していた。しかしこれらの変異菌の菌体内には多量の不活性の STI が残存しており、これらの不活性 STI は加熱すると活性 STI に移行した。しかし野生型毒素を産生する菌（39位がシステイン残基）の菌体内には STI は残存していなく、ほとんど全ての STI は活性型となり、培養上清中に放出されていた（126）。

これらの結果は39位のシステイン残基を変異すると、STI は dsbA の作用をうけられなくなり、不活性な形のままでペリプラスム内にとどまっていることを示している。よって STI のジスル

図6. ペリプラスム中へ放出された変異 STIp。
変異 STIp をコードするプラスミドを有する大腸菌を³⁵S-システインでパルスラベルし、ペリプラスム中に放出された STIp を解析した。

イド結合が dsbA によって架橋されるためには、プロ領域の39位のシステイン残基によって構築される構造が必要であることがわかった。Martin らは dsbA の構造を解析し、dsbA には活性部位とは別に基質を受容するための疎水性のポケット構造が存在すると報告している (66)。39位のシステイン残基は、この疎水性ポケットと反応する STI の構造の構築に寄与しているのかもしれない。

V. 外膜通過機構

ペリプラスム内でジスルフィド結合が架橋し、プロセッシングをうけて成熟型となった ST はいかにして外膜を通過しているのであろうか？

外膜タンパク、ペリプラスムタンパクなどで見られる様に内膜を通過するタンパクは多いが、菌体外に放出されるタンパクは限られている。限られた数のタンパクではあるが、多くの研究者によってこれらのタンパクの外膜通過機構の研究がなされてきた。その結果外膜を通過するタンパクは、各タンパク固有の外膜通過機構を有していることがわかった。本章ではこれらのタンパクの外膜通過機構を述べた後、ST の外膜通過に関する知見を紹介する。

1) タンパクの外膜通過機構

通常外膜を通過するタンパクの遺伝子はポリシストロン性であり、そのタンパク以外にも複数のタンパクが同時に生合成される。これらのポリシストロン性のタンパクは外膜を通過するための装

置を形成するためのタンパクであり、これらのタンパクが協同してある1つのタンパクを菌体外に放出している。この外膜通過の研究のモデルとなったのが大腸菌溶血毒の分泌に関する研究である。

遺伝子の解析から、この毒素遺伝子は図7に示すようなオペロンを形成しており、遺伝子の発現時には溶血毒素 (hlyA) の他に hlyC, hlyB および hlyD が同時に産生される (13, 24, 43, 44, 64)。HlyC は毒素の活性化に必要な因子で、毒素の分泌とは直接には関係していない (48)。HlyB は ATP-結合カセットをその構造中に含んでおり (ATP-トランスポーターと総称されている), secA と同様にタンパクの内膜通過の原動力を引き出す ATPase として機能すると考えられている (11, 12, 23, 32)。また hlyD はアクセサリ因子とよばれており、内膜側では hlyB と、外膜側では大腸菌の外膜タンパクである tolC と相互作用して、内膜と外膜との橋渡しの機能を果たすタンパクと考えられている (73, 102, 115, 118)。大腸菌膜におけるこれらのタンパクはおおよそ図8のように構成されていると推定されており、内膜を通過した毒素分子は構築された穴を通して直接培地中へと分泌される機構が提唱されている (44)。

Erwinia chrysanthemi プロテアーゼ (60), *Pasteurella haemolytica* ロイコトキシン (41, 108), *Bordetella pertussis* サイトリジン (33) や *Pseudomonas aeruginosa* アルカリ性プロテアーゼ

図7. 大腸菌溶血毒素遺伝子オペロンの概略と遺伝子産物の機能。

図8. 大腸菌溶血毒素の分泌経路のモデル図。

(35) などのタンパクも大腸菌溶血毒と類似した機構で菌体外へ分泌されることが示された。現在この様な分泌経路はグラム陰性菌のタイプ1分泌系とよばれている (96) (表2)。

一方 *Klebsiella* が産生するプルラーゼは sec 系に依存して内膜を通過し、ついで自前のタンパク群を機能させて菌体外へ移行することが明らかにされている。同様な分泌系で菌体外に分泌されるタンパクとしては、*Erwinia* のペクテートリアーゼ、*Pseudomonas* のトキシシン A などが知られている (7, 8, 21, 39, 40, 63, 91)。このタイプの分泌を示すタンパクでは、分泌装置を構成するタンパクの種類が非常に多いのが特徴である (プルラーゼでは14のタンパクが内膜から外膜に至る分泌装置を形成している)。この分泌系は、グラム陰性菌のタイプ2分泌系とよばれている (96) (表2)。

さらに最近、エルシニアの yop とよばれるタンパクの分泌ではタイプ1と同様 sec 系には非依存的ではあるが、同時に産生される一群の機能タンパクがタイプ2に類似していることが明らかにされた。このタイプに属する分泌系をタイプ3分泌系とよんでいる (68, 96) (表2)。

2) ST の外膜通過機構

前節で述べたタンパクに対して、STI, STII はともにモノシストロニックであり、外膜を通過するための、ST 固有のタンパクは必要としない。すなわち ST は大腸菌が保有する機構で外膜を通過している。しかしこれがどのような機構なのかはまだわかっていない。

しかし外膜を通過する ST の構造についての検討はなされた。STI については、成熟 STI のアミノ末端にアミノ酸が付加しても STI は外膜を通過できるが、成熟 STI のカルボキシ末端が延長されると (例えば、Ser-Lys-Ala のペプチドをカルボキシ末端に結合させる)、STI は外膜を通過しにくくなる (127)。また dsbA 遺伝子が欠損した菌を用いての実験では、ジスルフィド結合が架橋していない STI でも外膜を通過することがわかった (126)。これらの結果は外膜通過を誘導する構造が成熟領域のカルボキシ末端側に存在していることを示唆しており、そのカルボキシ末端側の構造はジスルフィド結合の形成の有無にかかわらず構築されているらしい。

一方 STII は21位-36位間のジスルフィド結合が架橋されないと、菌体外への移行は極めて低下

表2. グラム陰性細菌の菌体外分泌系と分泌されるタンパク

分類	分泌タンパク	菌	Sec 依存性	オペロン内にコード されている遺伝子群	参考文献
タイプ1	ヘモリジン	<i>Escherichia coli</i>	なし	<i>hlyC, hlyA, hlyB, hlyD</i>	13, 24, 43, 44, 64, 96
	プロテアーゼ	<i>Erwinia chrysanthemi</i>		<i>prtD, prtE, prtF, prtB, prtC</i>	60
	ロイコトキシン	<i>Pasteurella haemolytica</i>		<i>lktA, lktB, lktD</i>	41, 108
	サイトリジン	<i>Bordetella pertussis</i>		<i>cyaA, cyaB, cyaD, cyaE</i>	33
	アルカリ性プロテアーゼ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>aprD, aprE, aprF, aprA</i>	35
タイプ2	プルラナーゼ	<i>Klebsiella oxytoca</i>	あり	<i>pulS, pulB, pulA, pulC, pulD, pulE, pulF, pulG, pulH, pulI, pulJ, pulK, pulL, pulM, pulN, pulO</i>	21, 89, 90, 91
	ペクテートリアーゼ	<i>Erwinia chrysanthemi</i>		<i>outS, outB, outC, outD, outE, outF, outG, outH, outI, outJ, outK, outL, outM, outO</i>	39, 40, 63
	トキシン A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>xcpQ, xcpP, xcpR, xcpS, xcpT, xcpU, xcpV, xcpW, xcpX, xcpY, xcpZ, xcpA</i>	7, 8
タイプ3	YOP プロテイン	<i>Yersinia enterocolitica</i>	なし	<i>yscA, yscB, yscC, yscD, yscE, yscF, yscG, yscH, yscI, yscJ, yscK, yscL, yscM</i>	68, 96

する (75)。また STII の24位~28位間には疎水性アミノ酸の領域 (Gly-Phe-Leu-Gly-Val) があり、この領域の構造は膜通過に関与していることも明らかにされつつある (筆者ら, 未発表)。

また最近 Foreman らは STII の分泌が阻害された菌株の解析から、tolC が STII の外膜通過に関与していると報告した (25)。述べたように tolC は大腸菌ヘモリジンの膜通過に携わっている外膜タンパクである。この大腸菌ヘモリジンは表2で示したようにタイプ1の分泌系で外界に分泌されるタンパクであり、sec タンパクはヘモリジンの分泌には関与しない。しかし STII は sec タンパク依存的に内膜を通過する。ヘモリジンとは全く異なる機序で内膜を通過した STII が、直接 tolC を利用して外膜を通過しているか否かはわからない。TolC 遺伝子の変異の二次的効果として STII の外膜通過阻害が生じた可能性もあり、tolC の STII 分泌への関与は更に詳細に

検討する必要がある。

VI. お わ り に

図9に ST の成熟化の概略を示した。STI は「プレーロー成熟」型の前駆体の形で生合成される。菌体内のサイクリック AMP は STI 遺伝子の発現を正に制御しているらしい。生合成された STI の前駆体は sec 依存的に内膜を通過する。この際、STI のプロ領域は STI の成熟領域の内膜通過を容易にしている。内膜通過時にプロ領域は切り離され、「プレーロー成熟」領域からなる中間体がペリプラスム内に出現する。ペリプラスム内で、中間体 STI は dsbA の作用をうけ、分子内ジスルフィド結合が架橋される。STI のプロ領域、特に39位付近の構造は、中間体 STI が dsbA の作用をうけやすくなるような構造を構築するのに寄与する。ジスルフィド結合が架橋した STI はプロテアーゼでの切断をうけ、プロ領域が切り

離される。成熟型となった STI は大腸菌が本来有している機能（この機能の詳細は不明である）を利用し、菌体外に分泌される。

STII は「プレー成熟」型の前駆体として生合成される。STI と同じく、菌体内のサイクリック AMP は STII 遺伝子の発現を正に制御してい

るらしい。内膜は sec 依存的に通過し、成熟領域からなるペプチドがペリプラスム中に出現する。ここで dsbA の作用を受け、ジスルフィド結合が架橋される。この際まず21位-36位間のジスルフィド結合が架橋され比較的安定な形となり、ついで10位-48位間のジスルフィド結合が架橋さ

図9. ST の成熟化経路。

れているであろう。成熟型となった STII は tolC に依存して外膜を通過しているらしい。

ST は分子量が 1800 (STI)ないし 5000 (STII)程度の小さいペプチドであるが、このペプチドの分泌-成熟化に関する研究は次のような観点から今後とも有用であると考えている。

① STI, STII とともに大腸菌が本来保有している機能を利用して外膜を通過している。この外膜通過機構が明らかになれば、大腸菌の本来有している膜通過機構が解析される。この解析は真核細胞でのタンパクの膜通過機構の解析にも有用な知見を提供するであろう。

またこの大腸菌の外膜通過の機構が判明すれば、遺伝子工学で合成されたタンパクを菌体外に分泌させ、より多量のタンパクを生合成させることも可能になる。

② STI のプロ領域はペリプラスム内でのジスルフィド結合の形成を促進している。これは一種の成熟化を促進させる因子である。この様な因子の研究が進展すれば、不活性な状態で産生された未成熟のタンパクを、*in vivo* で容易に活性のある成熟化タンパクに変換できる様になる。この様な知見は遺伝子工学を用いての有用タンパクの生合成技術の進歩に役立つであろう。

文 献

- 1) Acheson, D.W.K. (1992): Enterotoxins in acute infective diarrhoea. *J. Infect.* **24**, 225-245.
- 2) 饗場弘二 (1985): 転写調節の分子機構—cAMP 受容タンパク質の働き, 細胞工学 (増刊) **4**, 1122-1134.
- 3) Aimoto, S., Takao, T., Shimonishi, Y., Hara, S., Takeda, T., Takeda, Y., Miwatani, T. (1982): Amino-acid sequence of a heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **129**, 257-263.
- 4) Akiyama, Y., Ito, K. (1987): Topology analysis of the SecY protein, an integral membrane protein involved in protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **6**, 3465-3470.
- 5) Andersson, H., von Heijne, G. (1991): A 30-residue-long "export initiation domain" adjacent to the signal sequence is critical for protein translocation across the inner membrane of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9751-9754.
- 6) Anfinsen, C.B., Haber, E., Sela, M., White Jr., F.H. (1961): The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 1309-1314.
- 7) Bally, M., Ball, G., Badere, A., Lazdunski, A. (1991): Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: the xcpA gene encodes an integral membrane protein homologous to *Klebsiella pneumoniae* secretion function PulO. *J. Bacteriol.* **173**, 479-486.
- 8) Bally, M., Filloux, A., Akrim, M., Ball, G., Lazdunski, A., Tommassen, J. (1992): Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of seven xcp genes and processing of secretory apparatus components by prepilin peptidase. *Mol. Microbiol.* **6**, 1121-1131.
- 9) Bardwell, J.C.A., Beckwith, J. (1993): The bonds that tie: catalyzed disulfide bond formation. *Cell* **74**, 769-771.
- 10) Bardwell, J.C.A., McGovern, K., Beckwith, J. (1991): Identification of a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Cell* **67**, 581-589.
- 11) Binet, R., Wandersman, C. (1995): Protein secretion by hybrid bacterial ABC-transporters: specific functions of the membrane ATPase and the membrane fusion protein. *EMBO J.* **14**, 2298-2306.
- 12) Blight, M.A., Holland, I.B. (1990): Structure and function of haemolysin B, P-glycoprotein and other members of a novel family of membrane translocators. *Mol. Microbiol.* **4**, 873-880.
- 13) Blight, M.A., Kenny, B., Chervaux, C., Pimenta, L., Cecchi, C., Holland, I.B. (1992): The structure and function of the *Escherichia coli* haemolysin A (HlyA) toxin and the membrane localized transport protein, HlyB., p. 207-216., In Quagliariello, E., Palmieri, F. (eds.), *Molecular mechanisms of transport*. Elsevier Science Publishing, Inc., NY.
- 14) Blobel, G. (1980): Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 1496-1500.
- 15) Brundage, L., Fimmel, C.J., Mizushima, S., Wickner, W. (1992): SecY, SecE and band 1 from the membrane-embedded domain of *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Biol. Chem.* **267**, 4166-4170.

- 16) Burgess, M.N., Bywater, R.J., Cowley, C.M., Mullan, N.A., Newsome, P. (1978): Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* **21**, 526-531.
- 17) Busque, P., Letellier, A., Harel, J., Dubreuil, J.D. (1995): Production of *Escherichia coli* STb enterotoxin is subjected to catabolite repression. *Microbiology* **141**, 1621-1627.
- 18) Collier, D.N. (1993): SecB: a molecular chaperone of *Escherichia coli* protein secretion pathway. *Advances in Protein Chem.* **44**, 151-193.
- 19) Currie, M.G., Fok, K.F., Kato, J., Moore, R.J., Hamra, F., Duffin, K.L., Smith, C.E. (1992): Guanylin: An endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 947-951.
- 20) Dailey, F.E., Berg, H.C. (1993): Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1043-1047.
- 21) d'Enfert, C., Reyss, I., Wandersman, C., Pugsley, A.P. (1989): Protein secretion by Gram-negative bacteria. Characterization of two membrane proteins required for pullulanase secretion by *Escherichia coli* K-12. *J. Biol. Chem.* **264**, 17462-17468.
- 22) Dreyfus, L.A., Urban, R.G., Whipp, S.C., Slaughter, C., Tachias, K., Kupersztoch, Y. (1992): Purification of the STB enterotoxin of *Escherichia coli* and the role of selected amino acids on its secretion, stability and toxicity. *Mol. Microbiol.* **6**, 2397-2406.
- 23) Fath, M.J., Kolter, R. (1993): ABC transporters: Bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* **57**, 995-1017.
- 24) Felmler, T., Pellet, S., Welch, R.A. (1985): Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.* **163**, 94-105.
- 25) Foreman, D., Martinez, I., Coombs, G., Torres, A., Kupersztoch, Y.M. (1995): TolC and DsbA are needed for the secretion of STB, a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **18**, 237-245.
- 26) Freedman, R.B. (1991): Protein disulfide isomerase., p. 204-214., In Nall, B.T., Dill, K.A. (eds.) *Conformation and Forces in Protein Folding*. American Association for the Advanced of Science, Washington, DC.
- 27) Freedman, R.B. (1995): The formation of protein disulphide bonds. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 85-91.
- 28) Freedman, R.B., Hirst, T.R., Tuite, M.F. (1994): Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *TIBS* **19**, 331-336.
- 29) Fujii, Y., Hayashi, M., Hitotsubashi, S., Fuke, Y., Yamanaka, H., Okamoto, K. (1991): Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *J. Bacteriol.*, **173**, 5516-5522.
- 30) Gardel, G., Benson, S., Hunt, J., Michaelis, S., Beckwith, J. (1987): SecD, a new gene involved in protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 1286-1290.
- 31) Gardel, G., Johnson, K., Jacq, A., Beckwith, J. (1990): The secD locus of *E. coli* codes for two membrane proteins required for protein export. *EMBO J.* **9**, 3209-3216.
- 32) Gentschev, I., Goebel, W. (1992): Topological and functional studies on HlyB of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **232**, 40-48.
- 33) Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., Danchin, A. (1988): Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* **7**, 3997-4004.
- 34) Gross, R.J. (1990): *Escherichia coli* diarrhoea. p. 469-487, In Parker, M.T., Collier, L.H. (eds), *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. Vol. 3. Edward Arnold.
- 35) Guzzo, J., Pages, J.-M., Duong, F., Lazdunski, A., Murgier, M. (1991): *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J. Bacteriol.* **173**, 5290-5297.
- 36) Gyles, C.L. (1994): *Escherichia coli* enterotoxins. p. 337-364. In Gyles, C.L. (ed), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Cab International.
- 37) Gyles, C.L., Barnum, D.A. (1969): A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropathogenic for pigs. *J. Infect. Dis.* **120**, 419-426.
- 38) Harnett, N.M., Gyles, C.L. (1985): Linkage of genes for heat-stable enterotoxin, drug resistance, K99 antigen, and colicin in bovine and porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ame. J. Veter. Res.* **46**, 428-433.

- 39) He, S.Y., Lindeberg, M., Chatterjee, A.K., Collmer, A. (1991): Cloned *Erwinia chrysanthemi* out genes enable *Escherichia coli* to selectively secrete a diverse family of heterologous proteins into its milieu. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 1079-1083.
- 40) He, S.Y., Schoedel, C., Chatterjee, A.K., Collmer, A. (1991): Extracellular secretion of pectate lyase by the *Erwinia chrysanthemi* out pathway is dependent upon Sec-mediated export across the inner membrane. J. Bacteriol. **173**, 4310-4317.
- 41) Highlander, S.K., Chidambaram, M., Engler, M.J., Weinstock, G.M. (1989): DNA sequence of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin gene cluster. DNA **8**, 15-28.
- 42) 平山壽哉, 和田昭裕 (1995): 毒素原性大腸菌エンテロトキシン受容体トビックス, 日本細菌学雑誌 **50**, 423-434.
- 43) Holland, I.B., Blight, M.A., Kenny, B. (1990): The mechanism of secretion of hemolysin and other polypeptides from Gram-negative bacteria. J. Bioenerg. Biomembr. **22**, 473-491.
- 44) Holland, I.B., Kenny, B., Blight, M. (1990): Haemolysin secretion from *E. coli*. Biochimie **72**, 131-141.
- 45) Honda, T. (1992): Enteropathogenic *Escherichia coli* that cause food poisoning-Current status of diarrheagenic *Escherichia coli*. Asian Med. J. **35**, 359-367.
- 46) 本田武司 (1994): 病気と細菌毒素, p. 70-80, 京都, 化学同人.
- 47) Hwang, C., Sinskey, A.J., Lodish, H.F. (1992): Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. Science **257**, 1496-1502.
- 48) Issartel, J.-P., Koronakis, V., Hughes, C. (1991): Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. Nature (London) **351**, 759-761.
- 49) Ito, K. (1992): SecY and integral membrane components of the *Escherichia coli* protein translocation systems. Mol. Microbiol. **6**, 2423-2428.
- 50) Ito, K., Akiyama, Y. (1991): Membrane components of the protein secretion machinery., p. 189-203., In Tartakoff, A.M. (ed.), Method. Cell Biol. 34: Vectorial transport of proteins into and across membranes, Academic Press, Inc., California.
- 51) Kamitani, S., Akiyama, Y., Ito, K. (1992): Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic protein. EMBO J. **11**, 57-62.
- 52) Kohler, E.M., (1968): Enterotoxic activity of filtrates of *Escherichia coli* in young pigs. Amer. J. Vet. Res. **29**, 2263-2274.
- 53) Kumamoto, C.A. (1991): Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. Mol. Microbiol. **5**, 19-22.
- 54) Kumamoto, C.A., Beckwith, J. (1983): Mutations in a new gene, secB, cause defective protein localization in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **154**, 254-260.
- 55) Kupersztoch, Y.M., Tachias, K., Moonaw, C.R., Dreyfus, L.A., Urban, R., Slaughter, C., Whipp, S. (1990): Secretion of methanol-insoluble heat-stable enterotoxin (STB): energy- and secA-dependent conversion of pre-STB to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. J. Bacteriol. **172**, 2427-2432.
- 56) Kuroiwa, T., Sakaguchi, M., Mihara, K., Omura, T. (1990): Structural requirements for interruption of protein translocation across rough endoplasmic reticulum membrane. J. Biochem. **108**, 829-834.
- 57) Kuroiwa, T., Sakaguchi, M., Mihara, K., Omura, T. (1991): Systemic analysis of stop-transfer sequence for microsomal membrane. J. Biol. Chem. **266**, 9251-9255.
- 58) Lee, C.H., Hu, S.T., Swiatek, P.J., Moseley, S.L., Allen, S.D., So, M. (1985): Isolation of a novel transposon which carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene. J. Bacteriol. **162**, 615-620.
- 59) 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.
- 60) Letoffe, S., Delepelaire, P., Wandersman, C. (1990): Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* α -hemolysin. EMBO J. **9**, 1375-1382.
- 61) Levine, M.M. (1987): *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. **155**, 377-389.

- 62) Lill, R., Cunningham, K., Brundage, L.A., Ito, K., Oliver, D., Wickner, W. (1989): SecA protein hydrolyzes ATP and is an essential component of the protein translocation ATPase of *Escherichia coli*. EMBO J. **8**, 961-966.
- 63) Lindeberg, M., Collmer, A. (1992): Analysis of eight out genes required for pectic enzyme secretion *Erwinia chrysanthemi*: protein sequence comparison with secretion genes from other gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **174**, 7385-7397.
- 64) Mackman, N., Nicaud, J.-M., Gray, L., Holland, I.B. (1986): Secretion of haemolysin by *Escherichia coli*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **125**, 159-181.
- 65) MacIntyre, S., Henning, U. (1990): The role of the mature part of secretory proteins in translocation across the plasma membrane and in regulation of their synthesis in *Escherichia coli*. Biochimie **72**, 157-167.
- 66) Martin, J.L., Bardwell, J.C.A., Kuriyan, J. (1993): Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation in vivo. Nature (London) **365**, 464-468.
- 67) Martinez-Cadena, M.G., Guzman-Verduzco, L.M., Stieglitz, H., Kupersztoch-Portnoy, Y.M. (1981): Catabolite repression of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin activity. Infect. Immun. **145**, 722-728.
- 68) Michiels, T., Vanooteghen, J.-C., Lambert de Rouvroit, C., China, B., Gustin, A., Boudry, P., Cornelis, G.R. (1991): Analysis of virC, an operon involved in the secretion of YOP proteins by *Yersinia enterocolitica*. J. Bacteriol. **173**, 4994-5009.
- 69) Missiakas, D., Georgopoulos, C., Raina, S. (1994): The *Escherichia coli* dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. EMBO J. **13**, 2013-2020.
- 70) Mizushima, S., Tokuda, H., Matsuyama, S. (1991): In vitro biochemical studies on translocation of presecretory proteins across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. p. 107-146., In Tartakoff, A.M. (ed.), Method. Cell Biol. 34: Vectorial transport of proteins into and across membranes, Academic Press, Inc., California.
- 71) Moseley, S.L., Hardy, J.W., Huq, M.I., Echeverria, P., Falkow, S. (1983): Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun. **39**, 1167-1174.
- 72) 永宗喜三郎, 山本耕一郎, 本田武司 (1995): 分子内シャペロンとしてのコレラ菌エルトル溶血毒プロ領域, 第42回毒素シンポジウム予稿集, p. 98-100.
- 73) Niki, H., Imamura, R., Oruga, T., Hiraga, S. (1990): Nucleotide sequence of the tolC gene of *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. **18**, 5547.
- 74) Nishiyama, K., Hanada, M., Tokuda, H. (1994): Disruption of the gene encoding P12 (secG) reveals the direct involvement and important function of SecG in protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. EMBO J. **13**, 3272-3277.
- 75) Okamoto, K., Baba, T., Yamanaka, H., Akashi, N., Fujii, Y. (1995): Disulfide bond formation and secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. J. Bacteriol. **177**, 4579-4586.
- 76) Okamoto, K., Freundlich, M. (1986): Mechanism for the autogenous control of the crp operon: Transcriptional inhibition by a divergent RNA transcript. Proc. Natl Acad. Sci. USA. **83**, 5000-5004.
- 77) 岡本敬の介, 伊藤浩子, 井上 孝, 深山昭雄 (1990): 大腸菌耐熱性下痢原因毒素の分泌機構, 日本細菌学雑誌, **45**, 185.
- 78) Okamoto, K., Okamoto, K., Yukitake, J., Kawamoto, Y., Miyama, A. (1987): Substitution of cysteine residues of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by oligonucleotidedirected mutagenesis. Infect. Immun. **55**, 2121-2125.
- 79) Okamoto, K., Takahara, M. (1990): Synthesis of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STp as a pre-pro form and role of the pro sequence in secretion. J. Bacteriol. **172**, 5260-5265.
- 80) 岡本敬の介, 山中浩泰, 藤井儀夫 (1991): 下痢原性大腸菌と病原因子. 衛生化学 **37**, 427-443.
- 81) Okamoto, K., Okamoto, K., Yukitake, J., Miyama, A. (1988): Reduction of enterotoxin activity of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by substitution for an asparagine residue. Infect. Immun. **56**, 2144-2148.
- 82) Oliver, D. (1985): Protein secretion in *Escherichia coli*. Ann. Rev. Microbiol. **39**, 615-648.
- 83) Oliver, D.B. (1993): SecA protein: autoregulated ATPase catalyzing preprotein insertion and translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. Mol. Microbiol. **7**, 159-165.

- 84) Oliver, D.B., Beckwith, J. (1982): Identification of a new gene (secA) and gene product involved in the secretion of envelope proteins. *J. Bacteriol.* **150**, 686-691.
- 85) Peek, J.A., Taylor, R.K. (1992): Characterization of a periplasmic thiol : disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 12058-12062.
- 86) Peters, T., Davidson, L.K. (1982): The biosynthesis of rat serum albumin ; in vivo studies on the formation of the disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **257**, 8847-8853.
- 87) Picken, R.N., Mazaitis, A.J., Maas, W.K., Rey, M., Heyneker, H. (1983): Nucleotide sequence of the gene for heat-stable enterotoxin II of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **42**, 269-275.
- 88) Pogliano, K.T., Beckwith, J. (1994): Genetic and molecular characterization of the *Escherichia coli* secD operon and its products. *J. Bacteriol.* **176**, 804-814.
- 89) Pugsley, A.P. (1993): The complete general secretion pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 50-108.
- 90) Pugsley, A.P., d'Enfert, C., Reyss, I., Kornacker, M.G. (1990): Genetics of extracellular protein secretion by Gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 67-90.
- 91) Pugsley, A.P., Reyss, I. (1990): Five genes at the 3' end of the *Klebsiella pneumoniae* pulC operon are required for pullulanase secretion. *Mol. Microbiol.* **4**, 365-379.
- 92) Randall, L.L. (1992): Peptide binding by chaperone SecB : implications for recognition by nonnative structure. *Science* **257**, 341-345.
- 93) Rasheed, K., Guzman-Verduzco, L.-M., Kupersztoch, Y.M. (1990): Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* : evidence of extracellular processing. *Mol. Microbiol.* **4**, 265-274.
- 94) Rasmussen, B.A., Silhavy, T.J. (1987): The first 28 amino acids of mature LamB are required for rapid and efficient export from the cytoplasm. *Genes Dev.* **1**, 185-196.
- 95) Sakaguchi, M., Tomiyoshi, R., Kuroiwa, T., Mihara, K., Omura, T. (1992): Functions of signal and signal-anchor sequences are determined by the balance between the hydrophobic segment and the N-terminal charge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- 96) Salmond, G.P.C., Reeves, R.J. (1993): Membrane traffic wardens and protein secretion in Gram-negative bacteria. *TIBS* **18**, 7-12.
- 97) Schatz, P.J., Beckwith, J. (1990): Genetic analysis of protein export in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 215-248.
- 98) Schatz, P.J., Riggs, P.D., Jacq, A., Fath, M.J., Beckwith, J. (1989): The secE gene encodes an integral membrane protein required for protein export in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **3**, 1035-1044.
- 99) Schevchik, V.E., Bortoli-German, I., Robert-Baudouy, J., Robinet, S., Barras, F., Condemine, G. (1995): Differential effect of dsbA and dsbC mutations on extracellular enzyme secretion in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **16**, 745-753.
- 100) Schevchik, V.E., Condemine, G., Robert-Baudouy, J. (1994): Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. *EMBO J.* **13**, 2007-2012.
- 101) Schmidt, M.G., Rollo, E.E., Grodberg, J., Oliver, D.B. (1988): Nucleotide sequence of the secA gene and secA (ts) mutations preventing protein export in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 3404-3414.
- 102) Schulein, R., Gentschev, I., Mollenkopf, H.-I., Goebel, W. (1992): A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 155-163.
- 103) Shimonishi, Y., Hidaka, Y., Koizumi, M., Hane, M., Aimoto, S., Takeda, T., Miwatani, T., Takeda, Y. (1987): Mode of disulfide bond formation of a heat-stable enterotoxin (STh) produced by a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **215**, 165-170.
- 104) Shinde, U., Li, Y., Chatterjee, S., Inouye, M. (1993): Folding pathway mediated by an intramolecular chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6924-6928.
- 105) Smith, H.W., Halls, S. (1967): Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Pathol. Bacteriol.* **93**, 531-543.
- 106) So, M., McCarthy, B.J. (1980): Nucleotide sequence of bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4011-4015.
- 107) Steiner, D.F., Clark, J.L. (1968): The spon-

- taneous reoxidation of reduced beef and rat proinsulins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **60**, 2670-2674.
- 108) Strathdee, C.A., Lo, R.Y.C. (1989): Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinant. J. Bacteriol. **171**, 916-928.
 - 109) Sukumar, M., Rizo, J., Wall, M., Dreyfus, L.A., Kupersztoch, Y.M., Gierasch, L.M. (1995): The structure of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by nuclear magnetic resonance and circular dichroism. Protein Sci. **4**, 1718-1729.
 - 110) Summers, R.G., Knowles, J.R. (1989): Illicit secretion of a cytoplasmic protein into the periplasm of *Escherichia coli* requires a signal peptide plus a portion of the cognate secreted protein: demarcation of the critical region of the mature protein. J. Biol. Chem. **264**, 20074-20081.
 - 111) Takao, T., Hitouji, T., Aimoto, S., Shimonishi, Y., Hara, S., Takeda, T., Takeda, Y., Miwatani, T. (1983): Amino acid sequence of a heat-stable enterotoxin isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli* strain 18D. FEBS Lett. **152**, 1-5.
 - 112) 竹田美文 (1990): 病原大腸菌 (下痢原性大腸菌), 厚生省生活衛生局 (監修), 食品衛生検査指針 (微生物編), p. 108-117, 東京, 日本食品衛生協会.
 - 113) 竹田美文, 三輪谷俊夫 (1982): ビブリオ感染症—腸炎ビブリオ・コレラ菌・毒素原性大腸菌—, P. 205-265, 東京, 医歯薬出版.
 - 114) 竹田美文, 下西康嗣, 山本達夫, 竹田多恵 (1986): 毒素原性大腸菌のエンテロトキシン, 蛋白質核酸酵素 (増刊) **31**, 324-352.
 - 115) Thomas, W.D., Wagner, S.P., Welch, R.A. (1992): A heterologous membrane protein domain fused to the C-terminal ATP-binding domain of HlyB can export *Escherichia coli* hemolysin. J. Bacteriol. **174**, 6771-6779.
 - 116) 徳田 元 (1993): 大腸菌蛋白質分泌の分子機構, 蛋白質核酸酵素, **38**, 947-956.
 - 117) Tomb, J.-F. (1992): A periplasmic protein disulfide bond oxidoreductase is required for transformation of *Haemophilus influenzae* Rd. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**, 10252-10256.
 - 118) Wandersman, C., Delepelaire, P. (1990): TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 4776-4780.
 - 119) Watarai, M., Tobe, T., Yoshikawa, M., Sasakawa, C. (1995): Disulfide oxidoreductase activity of *Shigella flexneri* is required for release of Ipa proteins and invasion of epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**, 4927-4931.
 - 120) Weissman, J.S., Kim, P.S. (1992): The pro region of BPTI facilitates folding. Cell **71**, 841-851.
 - 121) Whipp, S.C. (1987): Protease degradation of *Escherichia coli* heat-stable mouse-negative, pig-positive enterotoxin. Infect. Immun. **55**, 2057-2060.
 - 122) Whipp, S.C. Moon, H.W., Argenzio, R.A. (1981): Comparison of enterotoxic activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. Infect. Immun. **31**, 245-251.
 - 123) Wulfig, C., Pluckthun, A. (1994): Protein folding in the periplasm of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **12**, 685-692.
 - 124) Yamanaka, H., Fuke, Y., Hitotsubashi, S., Fujii, Y., Okamoto, K. (1993): Functional properties of pro region of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Microbiol. Immunol. **37**, 195-205.
 - 125) 山中浩泰, 福家康典, 岡本敬の介 (1992): 大腸菌耐熱性下痢原因毒素 I の膜通過機構, 第39回毒素シンポジウム予稿集, p. 85-89.
 - 126) Yamanaka, H., Kameyama, M., Baba, T., Fujii, Y., Okamoto, K. (1994): Maturation pathway of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I: requirement of DsbA for disulfide bond formation. J. Bacteriol. **176**, 2906-2913.
 - 127) 山中浩泰, 鷹取里英, 井上美紀, 岡本敬の介 (1995): 大腸菌耐熱性エンテロトキシンの外膜通過. 第42回毒素シンポジウム予稿集, p. 106-108.
 - 128) Yamasaki, S., Hidaka, Y., Ito, H., Takeda, Y., Shimonishi, Y. (1988): Structural requirements for the spatial structure and toxicity of heat-stable enterotoxin (STh) of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Bull. Chem. Soc. Jpn. **61**, 1701-1706.
 - 129) 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.
 - 130) Yang, Y., Gao, Z., Guzman-Verduzco, L.-M., Tachias, K., Kupersztoch, Y.M. (1992): Secre-

tion of the STA3 heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: extracellular delivery of Pro-STA is accomplished by either Pro or STA. Mol. Microbiol. **6**, 3521-3529.

131) Yu, J., Webb, H., Hirst, T.R. (1992): A

homologue of the *Escherichia coli* DsbA protein involved in disulphide bond formation is required for enterotoxin biogenesis in *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. **6**, 1949-1958.