総 説

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 71, No. 11, pp. 1147~1152, 1997]

海産無脊椎動物レクチンの構造と機能に関する研究†

(1997 年度農芸化学奨励賞受賞)

島 山 智 充

(長崎大学工学部応用化学科)

Key words : lectin ; toxin ; hemolysin ; carbohydrate ; marine invertebrate ; Holothuroidea

生体内では様々な糖鎖が分子間や細胞間の認識過程において重要な役割を果たしているが、これらを特異的に結合する糖結合タンパク質としてのレクチンにも様々なタイプのものが存在することが明らかになってきた。レクチンはもともと多くの植物種子中に含まれ、細胞表面の糖鎖と結合することによって、それらを選択的に凝集させるタンパク質として見いだされたが、このような糖鎖特異的な認識能によって特定の細胞の染色や糖タンパク質などの精製・検出などに広く用いられてきた。一方、最近では動物体内においても様々なレクチンが存在しており、重要な生理的機能を果たしていることが明らかにされてきたが、これまでに知られている動物レクチンはその構造上の類似性から、C型、ガレクチン(S型)、P型、I型、ペントラクシンなどのファミリーに分類されている⁽¹⁻³⁾。中でも、活性にCa²⁺を必要とするC型レクチンはよく知られているが、120~130個のアミノ酸残基からなるC型糖認識ドメイン(C-type carbohydrate-recognition domain)を共通に持ち、それらが異なる機能を持つ様々なドメインと結合することによって、糖結合モジュールとして機能するものが多い^(4,5)。脊椎動物のC型レクチンはそのドメイン構造から7つのグループに分類されており、免疫反応などの生体防御機構にも深く関与していることが知られている。一方、無脊椎動物においても、多くの種にレクチンが存在することが明らかになっており、

その中のいくつかについてはアミノ酸配列が決定され、オプソニン作用などを通して生体防御に関与していることも示唆されているが⁽⁶⁻⁸⁾、現在のところその構造や機能の詳細が明らかにされたものは少ない。ここでは、筆者らがこれまでに行ってきた海産無脊椎動物のレクチン、中でも強い細胞膜傷害性をもつ棘皮動物グミ(*Cucumaria echinata*)のCa²⁺依存性レクチンCEL-IIIの構造と機能に関する研究を中心に述べる。

1. マナマコ及びグミのCa²⁺依存性レクチン

種々の海産無脊椎動物体内にはレクチンが存在することが知られているが、これまでにそのアミノ酸配列が明らかになったものは少ない⁽⁹⁻¹⁸⁾。このなかには、活性にCa²⁺を必要とし、また決定されたアミノ酸配列からもC型CRDを含むものが多いが、一般にそれらのC型CRD間での配列相同性は低く、同一種から得られるレクチンにおいても、アミノ酸相同性が25%程度のものである⁽¹⁰⁾。筆者らはこれまでに海産無脊椎動物の中でも、棘皮動物に属するマナマコ(*Stichopus japonicus*)及び近年九州北部海域に大量発生しているグミ(*Cucumaria echinata*)から6種類のCa²⁺依存性レクチンを精製し、その構造と機能について検討してきた⁽¹⁴⁻²²⁾。表1に示すように、これらのレクチンはいずれもN-アセチルガラクトサミンやガラクトースに強い親和性を持ち、CEL-IIを除いてヒトやウサギの赤血球を凝集させることがわかった。このうち、SJL-IとCEL-IVについては全アミノ酸配列を、またCEL-Iについては部分アミノ酸配列をこれまでに決定し、すでに配列の明らかになっている脊椎動物及び無脊椎動物のC型CRDと比較したところ、明らかな相同性が認められたことから、これらがC型レクチンファミリーに属することが明らかになった^(16,17)。保存されているアミノ酸残基を比較してみると、特にシステインやトリプトファン残基の保存性が高かったことから、これらのアミ

† Studies on Structure and Function of Marine Invertebrate Lectins

Tomomitsu HATAKEYAMA (Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Nagasaki University)

表 1 マナマコ (*Stichopus japonicus*) 及びグミ (*Cucumaria echinata*) から精製された Ca^{2+} 依存性レクチン

Lectin	Mr	Carbohydrate-Specificity	Hemagglutinating Activity	Hemolytic Activity
<i>S. japonicus</i>				
SJL-I	13,000 ^a	GalNAc>Gal>Lactose	+	—
SJL-II	15,000 ^a	Oligosaccharide(?)	+	—
<i>C. echinata</i>				
CEL-I	32,100 ^b (16,050×2)	GalNAc>>Gal>Lactose	+	—
CEL-II	35,000 ^a	Gal	—	—
CEL-III	47,500 ^b	GalNAc>Lactose>Gal	+	+
CEL-IV	68,000 ^a (17,098 ^c ×4)	GalNAc>Gal>Lactose	+	—

^a Determined by SDS-PAGE.^b Determined by MALDI-TOF-MS.^c The value calculated from the amino acid sequence⁽¹⁷⁾.

ノ酸は C 型 CRD の基本的な立体構造を保つのに重要であると考えられる。しかしながら、分子内で形成されている 2 カ所のジスルフィド結合は他のレクチンではすべて保存されているのに対して、SJL-I, CEL-I, CEL-IV の場合、これらのうちの一对のジスルフィド結合に関与するシステインが保存されておらず、このような分子内架橋が C 型 CRD の形成に必ずしも必要ではない可能性も示唆された⁽¹⁷⁾。C 型レクチンの三次元構造については、これまでにラットのマンノース結合タンパク質^(23,24)、ヒトの E-セレクチン⁽²⁵⁾ について X 線結晶解析から明らかにされたが、両者は相同性が 30% 程度であるにも関わらず、立体的には非常に類似していることから、アミノ酸配列の上からはさらに相同性の低いこれら海産無脊椎動物 C 型レクチンも、基本的には同様の立体構造をとっていることが予想される。

一方、CEL-III と名付けた分子質量 47.5 kDa の

Ca^{2+} 依存性レクチンは興味あることにヒトやウサギの赤血球に対して強い溶血活性を示すとともに、培養細胞に対しても強い細胞毒性を示すことが明らかになった^(15,21)。このレクチンは図 1 に示すように酸性 pH ではほとんど溶血活性を示さないのに対して、アルカリ側では pH の上昇とともに急激に活性が上昇し、pH 10 では pH 7.5 での 20 倍程度の活性の増強が認められた。この事実は、後で述べる細菌由来の溶血性毒素などが酸性領域に至適 pH を示すのとは対照的である。また、温度依存性を調べた結果、10°C 付近という比較的低温の領域で最も活性が高いことが明らかになったが、このことは、CEL-III の溶血作用がホスホリパーゼなどの酵素作用によるものではないことを示唆している⁽¹⁸⁾。

CEL-III の溶血作用は N-アセチルガラクトサミンやガラクトース含有糖によって阻害されることがわかったが、中でも N-アセチルガラクトサミンは最も強い阻害作用を示し、それに続いて、ラクトースやその他のガラクトース含有糖でも顕著な阻害が見られた。これらの結果は、CEL-III が赤血球膜表面糖鎖へ結合することが溶血活性に重要であり、これらの外から加えた単糖またはオリゴ糖が CEL-III の赤血球膜への結合を競合的に阻害することを示している。実際、筆者が最近開発した糖固定化マイクロプレートを用いるアッセイ法⁽²⁶⁾ によって CEL-III の糖結合特異性について検討した結果、CEL-III との最も強い親和性は N-アセチルガラクトサミンで認められ、次いでラクトースやラクトースなど β -1,4 結合をもつガラクトース含有糖で強い親和性が認められた⁽²⁰⁾。この CEL-III に対する親和性は、溶血活性に及ぼすこれらの糖の阻害の順序と

図 1 CEL-III によるウサギ赤血球溶血の pH 依存性

ほぼ一致しており、このことから糖との結合が溶血活性と密接な関係を持つことが示された。

CEL-III のアミノ酸配列については、これまでにその一部が明らかになり、約 30 残基からなる配列の数回にわたる反復が存在することが明らかになったが、C 型レクチン類を含めて、それほど高い相同性を示すタンパク質は見いだされなかった。このことから CEL-III は Ca^{2+} 依存性のレクチンではあるが、C 型レクチンファミリーとは異なるタンパク質であることが示唆された。 Ca^{2+} 依存性のレクチンとしては、このほかにペントラクシンファミリーが知られているが、現在のところ、あまり配列の類似性は認められず、これまでに知られていない新規なタイプの Ca^{2+} 依存性レクチンである可能性も考えられる。

2. CEL-III の溶血機構

このように CEL-III の Ca^{2+} 依存性レクチンとしての性質が、その溶血作用と深く結びついていることが明らかとなったが、ではどのようにして CEL-III の赤血球表面糖鎖への結合から赤血球の溶解へと至るのかを解明する必要がある。そこでまず、CEL-III がホスホリパーゼやプロテアーゼなどの酵素活性により細胞膜を破壊している可能性について検討するために、CEL-III によって処理した後の赤血球膜成分を分析したが、主な脂質成分にはほとんど変化がなく、また、CEL-III 自体にもプロテアーゼ活性は検出されなかった。さらに、上述のように溶血活性の至適温度が 10°C 付近と低温であることなどからも、酵素的な溶血作用ではないことが示唆された。そこで次に、ある種の細菌毒素に見ら

れるような、細胞膜への pore (小孔) 形成による溶血の可能性について検討した⁽¹⁸⁾。CEL-III 処理後の赤血球膜を抗 CEL-III 抗血清を用いたイムノプロットイングによって調べた結果、赤血球膜中に約 270 kDa のオリゴマーとして CEL-III が結合しており、またその結合量は溶血活性が上昇するアルカリ性領域で増加していることが明らかになった(図 2)。さらに、CEL-III を赤血球に作用させる際に、分子質量 4,000 Da 以上の多糖類を共存させておくと、見かけ上、溶血は阻止されるが、赤血球内部の ATP が流出してくること、また、非還元末端にガラクトースや N-アセチルガラクトサミンを含む糖脂質と卵黄ホスファチジルコリンからなるリポソームの内部から CEL-III が蛍光色素を遊離させることなどから、CEL-III は脂質膜表面糖鎖と結合後、膜内でオリゴマーとして pore を形成していることが明らかになった。すなわち、CEL-III は赤血球膜表面の特異的糖鎖と結合した後に膜内でオリゴマー化し、低分子イオンが自由に通過できる pore が形成されるが、内部のヘモグロビンなどの高分子物質はこの pore を通過できないために、膜内外の高分子物質に基づく浸透圧差によって赤血球が破裂するものと考えられる。

このように、CEL-III が赤血球表面の糖鎖と結合した後に、膜内でオリゴマーを形成することが明らかになったが、通常は水溶性の高い CEL-III が膜内でオリゴマー化するためには何らかのコンフォメーション変化が必要である。1つの可能性として、赤血球表面糖鎖との結合がそのような構造変化の引き金となることが考えられたことから、CEL-III が特異的な糖と結合した際の構造変化について検討した⁽¹⁹⁾。その結果、通常の中性付近では、ラクトースと結合しても CEL-III の構造変化はほとんど認められなかったが、高 pH、高塩濃度条件下(例えば pH 10, 1 M NaCl 存在下)でラクトースと結合すると、CEL-III は表面疎水性が著しく上昇するとともに、水溶液中でも、赤血球膜中で形成したのと同じサイズのオリゴマーを形成することが明らかになった。さらに円二色性スペクトルの変化から、この際に CEL-III の二次構造のうち β シート構造が増加しているものと推定された。このような特異的な糖との結合による水溶液中でのオリゴマー形成は、ガラクトース含有糖の中でも、ラクトース、ラクツロース、N-アセチルラクタミンなどの β -1,4 結合を含む二糖類でのみ認められたが、N-アセチルガラクトサミンのよ

図 2 種々の pH においてウサギ赤血球膜に不可逆的に結合した CEL-III のイムノプロットイング

図 3 CEL-III の赤血球膜上での糖鎖との結合とそれに続く pore 形成

うな単糖については CEL-III に最も強く結合するにも関わらず、オリゴマー化を引き起こさなかった。このことから、CEL-III のオリゴマー化には単に糖との親和性のみが関係しているのではなく、その構造及びサイズもまた重要であり、二糖類以上でなければ CEL-III のコンフォメーション変化を引き起こすことができないのではないかと考えられる。これらの結果は、CEL-III の糖鎖を介した赤血球表面への結合が、単に CEL-III を膜表面へ濃縮するだけでなく、タンパク質の立体構造の変化を引き起こすことによって分子表面に疎水性領域を露出させ、会合体形成と脂質二重層への侵入を誘導する役割を果たしていることを示唆している (図 3)。

CEL-III オリゴマーのサイズは、SDS-PAGE 上では約 270 kDa と推定されたが、溶液中でラクトースとの結合によって生じたオリゴマーに関しては、沈降速度法を用いた超遠心分析で 37 S というかなり大きな値が得られた。また、シンクロトロン放射光を用いた X 線小角散乱実験からも、1,019 kDa という値が得られており、水溶液中で CEL-III オリゴマーはおそらく 6 量体または 7 量体がさらに 3~4 分子緩く会合した大きな構造体を形成しているのではないかと推定される⁽²²⁾。

3. レクチンの生理的機能

CEL-III はアルカリ性領域で強い溶血作用を持つレクチンとして見いだされたが、本来の生理的機能としては、外敵からの防御物質としての役割が考えられる。CEL-III の培養細胞に対する毒性を調べた結果、HeLa 細胞、MDCK 細胞、Vero 細胞などに対して強い毒性が見られ⁽²¹⁾、さらにマウス腹腔内注射でも致死量は数十 mg 程度であること、また強い魚毒性を示すことなどから、生体内においても、外来微生物や捕食者に対する防御物質として働いているものと思われる。無脊椎動物レクチンは免疫グロブリンの代わりに外来異物の糖鎖と結合することによって、それらを排除するために働いている可能性が示されており、また、脊椎動物の C 型レクチンの中でも血清マンノース結合タンパク質は外来微生物表面の糖鎖と結合することが引き金となって、補体系を活性化する作用をもつことが知られている^(27,28)。このような動物レクチンの間接的な異物排除機構における役割とは異なって、植物レクチンの中には細胞表面上の糖鎖との特異的な結合を介して直接的な細胞毒性を発現するものがある。例えば、*Griffonia simplicifolia* レクチン GS1 B₄ や小麦胚芽レクチン WGA は種々の細胞に傷害活性を示すが、これは標的細胞に対するアポトーシスの誘導によることが示されている⁽²⁹⁾。また、非常に毒性の強いレクチンとして知られるヒマ種子のリシン及びトウアズキ種子のアブリンはレクチン活性を示す糖結合性サブユニット (B-鎖) とリボソームを不活性化する酵素サブユニット (A-鎖) からなるが、この場合、B-鎖は標的細胞表面糖鎖に結合することによって、A-鎖の細胞質内への導入を補助する役割を果たしている。いずれの場合もレクチンの糖結合活性が標的細胞の認識及び毒性発現に重要な役割を果たしており、抗体によらない異物排除機構または細胞毒性発現機構にとってレクチンの特異的な糖鎖の認識が重要であることを示している。

4. CEL-III と細菌毒素との類似性

CEL-III のような pore 形成タンパク質としてはある種の細菌毒素について詳細な研究がなされている。これらの中には、細胞膜に比較的大きな pore を形成する Streptolysin O などのチオール活性化毒素や、pore のサイズが比較的小さく、赤血球に作用した際、CEL-III の場合のようにコロイド浸透圧ショックによって溶血を引き起こすタイプの毒素がある⁽³⁰⁾。後者の代表的な

ものには *Staphylococcus aureus* の α -毒素, *Aeromonas hydrophila* の aerolysin, *Bacillus anthracis* の anthrax 毒素保護抗原などがあるが, これらについては最近, X 線結晶解析によって, その詳細な立体構造が明らかになった⁽³¹⁻³³⁾. これらはいずれも標的細胞膜に結合した後, 膜表面上で 7 量体を形成し, それに伴って逆平行 β -シートからなる膜貫通領域を膜内に形成するという点において共通している. なかでも, anthrax 毒素保護抗原に関しては, モノマーおよびそれらが会合してできた 7 量体の両者の X 線結晶構造が明らかにされており大変興味深い⁽³³⁾. この場合, モノマーは細胞表面上でのプロテアーゼによる限定加水分解により水溶性 7 量体を形成するが, これが細胞内へエンドサイトーシスによって取り込まれた後, エンドソーム内の pH が低下することによってさらにコンフォメーション変化を生じ, 14 本鎖の β -パレル構造からなる膜貫通領域を形成するものと考えられている.

このような pore 形成毒素とは別に, いわゆる A-B 型毒素のような, 酵素活性によって毒性を発現する細菌毒素の中には細胞表面上の糖鎖をレセプターとするものも多く⁽³⁴⁻³⁷⁾, それらのうち Vero 毒素や百日咳毒素などは, レセプターとなる糖脂質糖鎖との結合がタンパク質の疎水性領域を露出するようなコンフォメーション変化を引き起こすことが明らかにされている^(38,39). 糖鎖との特異的な相互作用は毒素の標的細胞表面への結合に必要であるが, それがさらに毒素の立体構造及び疎水性を変化させることによって膜とのより強い相互作用, さらに酵素サブユニットの細胞質内への侵入を誘導するのであろう.

いずれの場合にも, 毒素タンパク質が細胞膜と相互作用する際には, エンドソーム内での pH の低下やレセプターとの結合などが引き金となってタンパク質のコンフォメーション変化が生じており, このことが通常は親水的なタンパク質が脂質膜中の疎水的環境に移行する原因であると考えられる. 上で述べたように CEL-III に関しても特異的な糖鎖との結合が疎水性の上昇とオリゴマー化を促進することから, これらの細菌毒素と類似したメカニズムで細胞膜と相互作用しているのかもしれない. 水溶性タンパク質の脂質膜への移行のメカニズムについてはまだまだ不明な点が多く, これら細胞膜と相互作用する毒素タンパク質の活性発現機構に関する研究が, タンパク質-脂質間相互作用に関

して, 今後多くの有用な知見を提供することが期待される.

5. おわりに

レクチンは長い間糖鎖構造を識別するための道具として用いられてきたが, その生理的役割については不明な点が多かった. 近年になって, 動物をはじめとする多くの生物体内において細胞間及び分子間の特異的な相互作用に普遍的に糖結合タンパク質が関与していることが明らかになり, 糖鎖研究者のみならず, 様々な研究領域においてますますその重要性が認識されつつある. 一次構造及び立体構造についても今後多くのものが明らかにされるにつれて, 糖認識能とそれに結びついた各々のレクチン固有の生理的機能の関連が明らかになってくるものと思われる. CEL-III のように溶血性を示すレクチンは, 最近カプトガニ血漿中からも見いだされているが⁽⁴⁰⁾, 無脊椎動物の生体防御機構を解明する上で, 細胞膜に対する直接的な傷害活性を示すレクチンの存在は非常に興味深い. 無脊椎動物は高等脊椎動物のような免疫系をもたないために, このようなレクチン類が生体防御に重要な役割を果たしているものと考えられ, 同様なタンパク質が他の海産無脊椎動物にも存在する可能性は高いものと思われる.

本研究は九州大学農学部農芸化学科生物化学教室及び長崎大学工学部応用化学科生体機能工学研究室において行ったものであり, 長年にわたりご指導いただきました九州大学名誉教授船津軍喜先生ならびに九州大学農学部教授山崎信行先生, また暖かい励ましをいただきました長崎大学工学部教授青柳東彦先生に厚くお礼申し上げます. また多くのご指導ご協力をいただきました諸先生方, 研究室大学院生, 卒業生の方々に厚くお礼申し上げます.

- (1) K. Drickamer : *J. Biol. Chem.*, **263**, 9557-9560 (1988).
- (2) S. H. Barondes, V. Castronovo, D. N. W. Cooper, R. D. Cummings, K. Drickamer, T. Feizi, M. A. Gitt, J. Hirabayashi, C. Hughes, K. Kasai, H. Leffler, F.-T. Liu, R. Lotan, A. M. Mercurio, M. Monsigny, S. Pillai, F. Poirer, A. Raz, P. W. J. Rigby, J. M. Rini and J. L. Wang : *Cell*, **76**, 597-598 (1994).
- (3) H.-J. Gabius : *Eur. J. Biochem.*, **243**, 543-576 (1997).
- (4) K. Drickamer : *Biochem. Soc. Trans.*, **21**, 456-459 (1993).

- (5) A. J. Day : *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 83-88 (1994).
- (6) H. Komano, D. Mizuno and S. Natori : *J. Biol. Chem.*, **255**, 2919-2924 (1980).
- (7) H. Nakajima, H. Komano, M. Esumi-Kurusu, S. Abe, M. Yamazaki, S. Natori and D. Mizuno : *Gann*, **73**, 627-632 (1982).
- (8) M. Yamazaki, M. Ikenami, H. Komano, S. Tsunawaki, H. Kamiya, S. Natori and D. Mizuno : *Gann*, **74**, 576-583 (1983).
- (9) Y. Giga, A. Ikai and K. Takahashi : *J. Biol. Chem.*, **262**, 6197-6203 (1987).
- (10) K. Muramoto and H. Kamiya : *Biochim. Biophys. Acta*, **1039**, 42-51 (1990).
- (11) T. Suzuki, T. Takagi, T. Furukohri, K. Kawamura and M. Nakauchi : *J. Biol. Chem.*, **265**, 1274-1281 (1990).
- (12) Y. Ozeki, T. Matsui, M. Suzuki and K. Titani : *Biochemistry*, **30**, 2391-2394 (1991).
- (13) T. Saito, S. Kawabata, M. Hirata and S. Iwanaga : *J. Biol. Chem.*, **270**, 14493-14499 (1995).
- (14) T. Hatakeyama, T. Himeshima, A. Komatsu and N. Yamasaki : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1736-1739 (1993).
- (15) T. Hatakeyama, H. Kohzaki, H. Nagatomo and N. Yamasaki : *J. Biochem.*, **116**, 209-214 (1994).
- (16) T. Himeshima, T. Hatakeyama and N. Yamasaki : *J. Biochem.*, **115**, 689-692 (1994).
- (17) T. Hatakeyama, K. Ohuchi, M. Kuroki and N. Yamasaki : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1314-1317 (1995).
- (18) T. Hatakeyama, H. Nagatomo and N. Yamasaki : *J. Biol. Chem.*, **270**, 3560-3564 (1995).
- (19) T. Hatakeyama, M. Furukawa, H. Nagatomo, N. Yamasaki and T. Mori : *J. Biol. Chem.*, **271**, 16915-16920 (1996).
- (20) T. Hatakeyama, Y. Miyamoto, H. Nagatomo, I. Sallay and N. Yamasaki : *J. Biochem.*, **121**, 63-67 (1997).
- (21) T. Oda, M. Tsuru, T. Hatakeyama, H. Nagatomo, T. Muramatsu and N. Yamasaki : *J. Biochem.*, **121**, 560-567 (1997).
- (22) T. Fujisawa, H. Kuwahara, Y. Hiromasa, T. Niidome, H. Aoyagi, and T. Hatakeyama : *FEBS Lett.*, **414**, 79-83 (1997).
- (23) W. I. Weis, R. Kahn, R. Fourme, K. Drickamer and W. A. Hendrickson : *Science*, **254**, 1608-1615 (1991).
- (24) W. I. Weis, K. Drickamer and W. A. Hendrickson : *Nature*, **360**, 127-134 (1992).
- (25) B. J. Graves, R. L. Crowther, C. Chandran, J. M. Rumberger, S. Li, K.-S. Huang, D. H. Presky, P. C. Familletti, B. A. Wolitzky and D. K. Burns : *Nature*, **367**, 532-538 (1994).
- (26) T. Hatakeyama, K. Murakami, Y. Miyamoto and N. Yamasaki : *Anal. Biochem.*, **237**, 188-192 (1996).
- (27) J. Lu, S. Thiel, H. Wiedemann, R. Timpl and K. B. M. Reid : *J. Immunol.*, **144**, 2287-2294 (1990).
- (28) M. Ohta, M. Okada, I. Yamashina and T. Kawasaki : *J. Biol. Chem.*, **265**, 1980-1984 (1990).
- (29) M. Kim, M. V. Rao, D. J. Tweardy, M. Prakash, U. Galili and E. Gorelik : *Glycobiol.*, **3**, 447-453 (1993).
- (30) A. W. Bernheimer and B. Rudy : *Biochim. Biophys. Acta*, **864**, 123-141 (1986).
- (31) M. W. Parker, J. T. Buckley, J. P. M. Postma, A. D. Tucker, K. Leonard, F. Pattus and D. Tsernoglou : *Nature*, **367**, 292-295 (1994).
- (32) L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley and J. E. Gouaux : *Science*, **274**, 1859-1866 (1996).
- (33) C. Petosa, R. J. Collier, K. R. Klimpel, S. H. Leppla and R. C. Liddington : *Nature*, **385**, 833-838 (1997).
- (34) J. Holmgren, I. Lönnroth, L. Svennerholm : *Infect. Immun.*, **8**, 208-214 (1973).
- (35) K. Takamizawa, M. Iwamori, S. Kozaki, G. Sakaguchi, R. Tanaka and Y. Nagai : *FEBS Lett.*, **201**, 229-232 (1986).
- (36) A. Cohen, G. E. Hannigan, B. R. G. Williams and C. A. Lingwood : *J. Biol. Chem.*, **262**, 17088-17091 (1987).
- (37) M. J. Brennan, J. L. David, J. G. Kenimer and C. R. Manclark : *J. Biol. Chem.*, **263**, 4895-4899 (1988).
- (38) B. D. Spangler, L. D. Heerze, C. G. Clark and G. D. Armstrong : *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 153-158 (1993).
- (39) P. M. S. Hilaire, M. K. Boyd and E. J. Toone : *Biochemistry*, **33**, 14452-14463 (1994).
- (40) P. B. Armstrong, S. Swarnakar, S. Srimal, S. Misquith, E. A. Hahn, R. T. Aimes and J. P. Quigley : *J. Biol. Chem.*, **271**, 14717-14721 (1996).