



展 TENBO 望

黄色ブドウ球菌が産生する 膜孔形成毒素の作用機構



田中 良和

Tanaka Yoshikazu

(北海道大学大学院先端生命科学研究院)

1 膜孔形成毒素

鉄は全ての生物にとって必須な元素であり，病原性微生物もその例外ではない。病原性微生物は宿主の体内で増殖して疾患を引き起こすが，ヒトをはじめとした宿主の体内では，大部分の鉄は赤血球の中のヘモグロビンにヘム鉄として保持されており，遊離した鉄はほとんど存在しない。そのため病原性微生物は，膜孔形成毒素と呼ばれるタンパク質を使って赤血球を破壊し，漏出したヘモグロビンから鉄を獲得す

る。膜孔形成毒素は，可溶性の単量体タンパク質として分泌されるが，赤血球の表面では円状に会合してプレポアと呼ばれる会合体を形成する。その後，大きな構造変化を起こし，細胞膜に膜孔と呼ばれる孔を形成する（図1）。膜孔の形成により，赤血球内部の分子が漏出し，細胞が破壊される¹⁾。興味深いことに，膜孔を形成して細胞を殺傷するという手段は，哺乳類の免疫系においても用いられており，したがって，膜孔形成は様々な生物により普遍的に用いられている細胞攻撃戦略であると言える²⁾。さ

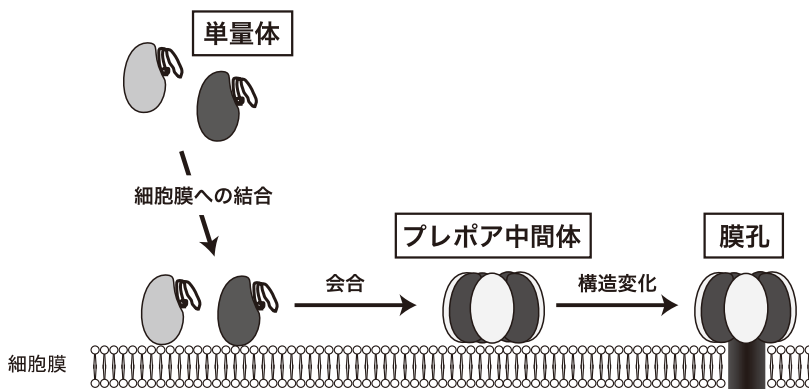


図1 膜孔形成毒素の作用機構の模式図

らに、膜孔を分子が通過するときに生じる電位の変化を利用して、膜孔形成毒素はDNAセンサーをはじめとしたナノデバイスとして応用されている^{3,4)}。このように、膜孔形成毒素は生命科学的に重要なだけでなく、分子工学的観点からも意義深いタンパク質である。

筆者らは黄色ブドウ球菌が産生する膜孔形成毒素に焦点を当てて研究をしてきた。黄色ブドウ球菌は食中毒や院内感染の原因菌として広く知られる病原性微生物であり、複数の膜孔形成毒素(α ヘモリジン, γ ヘモリジン, ロイコシジンなど)を分泌する。これらの膜孔形成毒素は、会合するタンパク質の数により2種類に分類される。1つ目は1種類のタンパク質が複数個会合して膜孔を形成するタイプ(1成分性膜孔形成毒素)で、これには α ヘモリジンが該当する。2つ目は、2種類の異なるタンパク質が複数個ずつ会合して初めて膜孔を形成するタイプ(2成分性膜孔形成毒素)で、 γ ヘモリジン、ロイコシジンなどがこれに含まれる。黄色ブドウ球菌の膜孔形成毒素に関する研究の歴史は古く、その分子機構の解明に向けて非常に多くの研究が行われてきた。最近、筆者らはX線結晶構造解析の手法を用いて、2成分性膜孔形成毒素の動的な分子機構を解明することに成功した^{5,6)}。本稿では、明らかになった機構を、その解明に至る経緯とともに紹介する。

2 MPD との出会いと2成分性毒素の膜孔の構造解析

筆者らが黄色ブドウ球菌の膜孔形成毒素の研究を開始した2004年当時、既に1成分性の α ヘモリジンの膜孔⁷⁾と2成分性毒素の幾つかの単量体の結晶構造⁸⁻¹⁰⁾が決定されていた。これらの構造を基に膜孔形成機構が議論されていたが、異なる毒素の単量体と膜孔の構造に基づく機構であるために不明瞭な点が多く、筆者らは、いずれかの毒素について、膜孔と単量体の両方の結晶構造を得なければ、詳細な機構が議

論できないと考えた。これを達成するために筆者らが解析すべき分子は、(1)1成分性毒素の単量体、(2)2成分性毒素の膜孔のどちらかであった。(1)は1種類の可溶性タンパク質、(2)は2種類のタンパク質から構成される膜タンパク質であることから、(1)の方が容易であると考え、筆者らは1成分性毒素の単量体の結晶構造解析に着手した。

筆者らは、1成分性毒素の単量体を精製し、あらゆる条件にて結晶化を試した。その結果、高濃度の2,4-ジメチルペンタンジオール(MPD)を含む条件下で良好な結晶が得られた。大型放射光施設にてX線回折データを収集し、その結晶を用いて構造解析を行った結果、大変驚いたことに、この結晶は7量体の膜孔のものであった(図2)¹¹⁾。単量体を結晶化させたにもかかわらず、膜孔の構造が得られた理由について調査した結果、結晶化溶液中に入っていたMPDには膜孔形成毒素を自発的に会合させる性質があり、MPD存在下で膜孔形成毒素はあたかも細胞膜に結合したかのように振る舞って、膜孔へと構造変化することが分かってきた。解析しようとした1成分性毒素の単量体の構造解析は成功できなかったが、筆者らは、MPDを用いれば、より解析が困難な2成分性毒素の膜孔の構造が決められるのではないかと推察し、次に、この課題に着手した。

当時、2成分性毒素の膜孔の構造については、



図2 MPD中で自発的に会合した1成分性膜孔形成毒素の結晶構造
 β バレル領域を黒で表示してある

非常に大きな疑問が存在していた。それは、2種類のポリペプチドが会合してできる2成分性毒素の膜孔が、1成分性毒素の膜孔と同様に7量体の膜孔を形成するのか、それとも、偶数個のプロトマーから構成される膜孔を形成するのかということである。それぞれの機構を主張するグループがあらゆる手段を駆使し、その真理に迫ろうとしたが、決定的な証拠は得られず、高分解能の結晶構造解析が切望されていた。筆者らは、1成分性毒素の場合と同様、2成分性毒素の単量体を精製し、それにMPDを添加して結晶化した。その結果、予想通りに2成分性毒素の膜孔構造が得られた。明らかになった膜孔の構造は、2つの成分が交互に円状に会合した8量体であった(図3)⁶⁾。これにより、長きにわたり繰り広げられてきた、膜孔中でのプロ

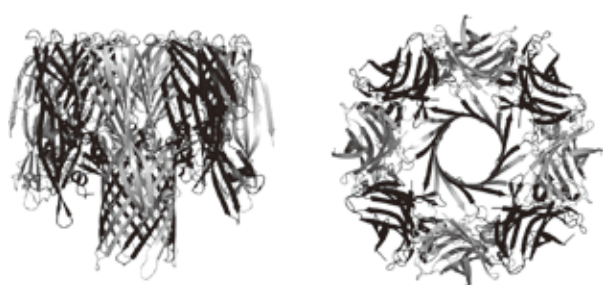


図3 2成分性膜孔形成毒素の膜孔の結晶構造
各成分は灰色及び黒で表示してある。(左)横から見た図、(右)上から見た図

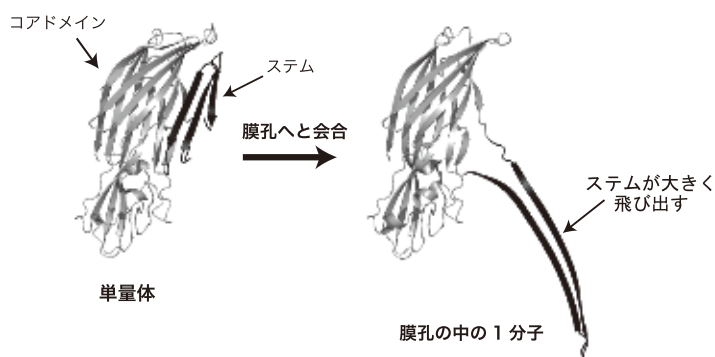


図4 単量体と膜孔の中の1分子の構造比較
ステム部分(黒で表示)が大きく構造変化しているのが分かる

トマーの数に関する論争に決着をつけることができた。また、過去に決定されていた単量体との構造比較により、単量体が膜孔へと会合する際の各部分の動きを明らかにすることができた。もともとはコアドメインの横にコンパクトに折り畳まれていたステム領域が、膜孔に会合するときに大きく飛び出し、ほかのプロトマーとともに β バレルの膜貫通領域を形成することが分かった(図4)。

3 プレポア中間体の構造解析

前記のアプローチにより、2成分性膜孔形成毒素の単量体と膜孔の構造が明らかになった。筆者らが次にチャレンジしたのは、プレポア中間体の構造解析である。プレポア中間体は、単量体から膜孔へと変化する過程で一瞬だけ形成される過渡的で不安定な会合体であり、それをX線結晶構造解析の手法で捉えることは困難と思われた。過去の生化学実験の報告を精査したところ、Trp177, Arg198に変異導入すると、会合体は形成するものの溶血活性がなくなる(すなわち、安定なプレポア中間体を形成する)という報告を発見した¹²⁾。更に興味深いのは、Trp177, Arg198は、前記の膜孔の結晶構造においてMPDが結合していた残基だということである。

筆者らは、このW177A/R198A二重変異体を作製し、MPD中で結晶化させた。幸運なことに、この変異体でも良好な結晶を得ることができ、その構造を決定することができた⁵⁾。明らかになった構造は、膜孔と非常に類似した8量体構造であった。しかし、 β バレルの上側半分だけが形成されており、下部の膜貫通領域は構造を形成していないという点で大きく異なっ

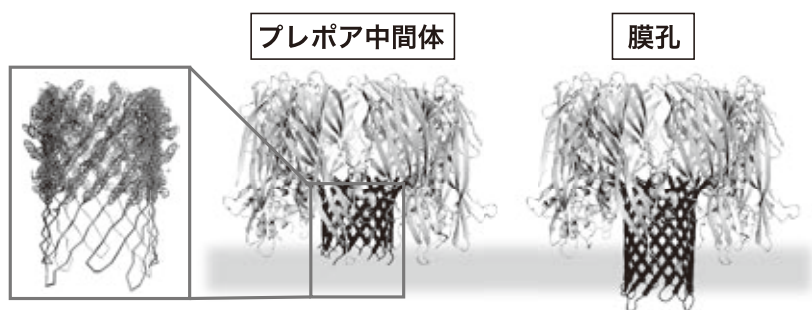


図5 プレポア中間体の結晶構造
比較のために膜孔の構造も示す(右)。 β バレル領域の電子密度も表示した(左)。
プレポア中間体では、 β バレルの上半分だけが形成されているのが分かる

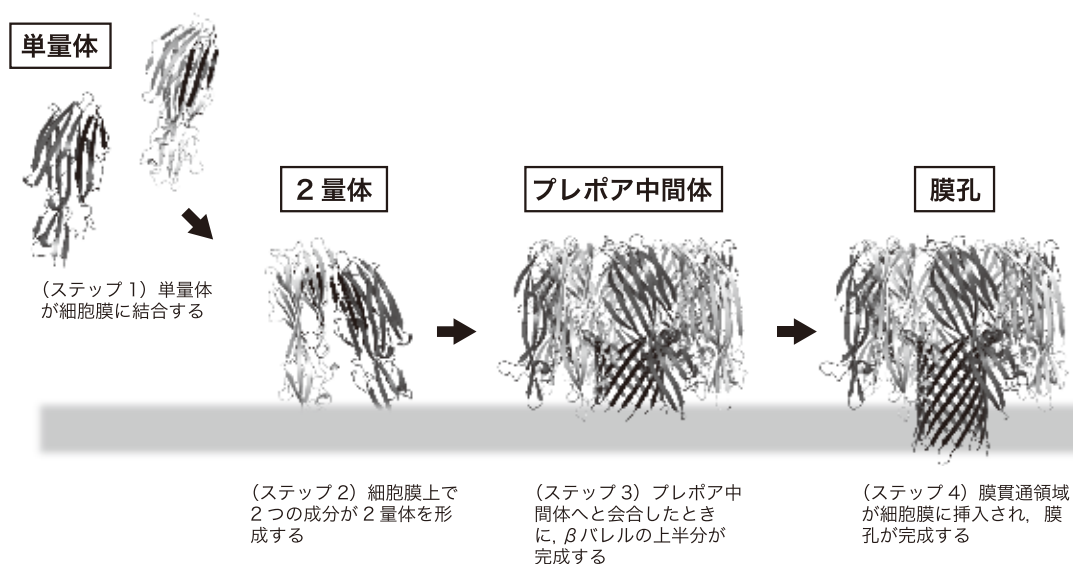


図6 明らかになった膜孔形成機構

ていた(図5)。このような構造的特徴は、 β バレル領域は、上部と下部が別々に段階的に形成されることを意味し、8つのプロトマーが会合してプレポア中間体になったときには上半分が形成されており、そこから膜孔になるとときには、下半分の膜貫通領域だけが構造変化をするということが明らかになった。黄色ブドウ球菌の膜孔形成毒素の β バレルは、非常に強いタンパク質変性作用を持つドデシル硫酸ナトリウムを添加しても解離しない、極めて頑強な構造を有することで知られるが、そのような構造が、

上下ばらばらに形成されるというのは驚きであった。

このようにして、筆者らは、偶然発見した膜孔形成毒素のMPDによる自発的な会合特性を利用して、膜孔とプレポア中間体の結晶構造解析に成功した。これらの一連の構造解析と、長年蓄積されてきた生化学的実験のデータを合わせ、筆者らは、黄色ブドウ球菌の2成分性膜孔形成毒素の動的な分子機構を明らかにすることができた(図6)。

4 今後の展望

膜孔はナノデバイスとして工学的に応用されている分子である。今後、筆者らが明らかにした膜孔形成毒素の動的な分子機構を利用した新たなナノデバイスが開発されることを期待している。また、最初に着手した1成分性膜孔形成毒素の単量体・プレポア中間体の結晶構造解析には、いまだに成功していない。知恵を絞ってこれらの構造を決定し、更に深く膜孔形成の分子機構を理解したい。

参考文献

- 1) Iacovache, I., *et al.*, *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 1611–1623 (2008)
- 2) Peitsch, M.C. and Tschopp, J., *Curr Opin Cell Biol*, **3**, 710–716 (1991)
- 3) Astier, Y., *et al.*, *J Am Chem Soc*, **128**, 1705–1710 (2006)
- 4) Asandei, A., *et al.*, *J Mol Recognit*, **24**, 199–207 (2011)
- 5) Yamashita, D., *et al.*, *Nature Communications*, **5**, 4897 (2014)
- 6) Yamashita, K., *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 17314–17319 (2011)
- 7) Song, L., *et al.*, *Science*, **274**, 1859–1866 (1996)
- 8) Olson, R., *et al.*, *Nat Struct Biol*, **6**, 134–140 (1999)
- 9) Pedelacq, J. D., *et al.*, *Structure*, **7**, 277–287 (1999)
- 10) Guillet, V., *et al.*, *J Biol Chem*, **279**, 41028–41037 (2004)
- 11) Tanaka, Y., *et al.*, *Protein Science*, **20**, 448–456 (2011)
- 12) Monma, N., *et al.*, *J Biochem*, **136**, 427–431 (2004)