

博士論文
令和4年度

二成分毒素の複合体構造および酵素成分の膜孔透過機構の解明

京都産業大学大学院
生命科学研究科 生命科学専攻
博士後期課程3年
学生証番号 087159
氏名 山田等仁

目次

第1章 研究の背景と目的	
1-1 二成分毒素の概要	4
1-2 炭疽菌が産生する二成分毒素の構造	8
1-3 提唱されてきた膜透過機構	10
1-4 目的	13
第2章 ウェルシュ菌イオタ毒素の構造解析	
2-1 概要	15
2-2 背景	16
2-3 サンプルの調製	
2-3-1 酵素成分 Ia の発現及び精製	17
2-3-2 膜結合成分 Ib の発現及び精製	21
2-3-3 効率的な 7 量体 Ib オリゴマーの形成	23
2-3-4 密度勾配遠心による電子顕微鏡サンプルの調製	25
2-4 電子顕微鏡を用いた構造解析	
2-4-1 負染色観察・単粒子構造解析	31
2-4-2 Ib 膜孔の全体構造	39
2-4-3 Ia・Ib 膜孔複合体の全体構造	40
2-4-4 Ia N 末端におけるアンフォールディング	41
2-5 考察	42
第3章 デフィシル菌 CDT 毒素の構造解析	
3-1 概要	46
3-2 背景	47
3-3 サンプルの調製	
3-3-1 酵素成分 CDTa の発現及び精製	48
3-3-2 膜結合成分 CDTb の発現及び精製	51
3-3-3 一残基変異による 14 量体形成の抑制	53
3-3-4 構造解析サンプル調製の流れ	55
3-4 クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析	
3-4-1 単粒子構造解析	56
3-4-2 CDTa・CDTb 膜孔複合体の全体構造	59
3-4-3 狭窄部位 NSS-loop の構造	61
2-4-4 CDTa N 末端におけるアンフォールディング	62
3-4-5 N 末端 α ヘリックスの構造変化	63

3-4-6 CDTa と CDTb 膜孔の相互作用の評価	66
3-5 考察	69
第4章 新たな二成分毒素の膜透過機構の提唱	73
総括	74
参考文献	75
謝辞	81

略語一覽

PFT:	Pore forming toxin
<i>C. perfringens</i> :	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>C. difficile</i> :	<i>Clostridium difficile</i> , <i>Clostridioides difficile</i>
<i>C. spiroforme</i> :	<i>Clostridium spiroforme</i>
<i>C. botulinum</i> :	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>B. thuringiensis</i> :	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>B. anthracis</i> :	<i>Bacillus anthracis</i>
LSR:	Lipolysis stimulated lipoprotein receptor
PA:	Protective antigen
LF:	Lethal factor
EF:	Edema factor
IPTG:	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
PMSF:	Phenylmethanesulphonyl fluoride
FT:	Flow through
EtOH:	Ethanol
LMNG:	Lauryl maltose neopentyl glycol
CTF:	Contrast transfer function
FSC:	Fourier shell correlation
CDT:	<i>Clostridioides difficile</i> transferase
3DVA:	3D variability analysis
SPR:	Surface plasmon resonance

第1章 研究の背景と目的

1-1 二成分毒素の概要

膜孔形成毒素 PFT (Pore forming toxin) は細菌から真核生物に至る様々な生物によって産生されるタンパク質毒素である^{1,2}。PFT は可溶性なモノマーとして産生され、標的細胞膜の脂質、あるいは脂質膜上の糖やタンパク質などの受容体に結合し膜上に集合する(図 1a)。PFT の多くはプロテアーゼによって N 末端あるいは C 末端の配列 (Pro 配列) が切断されることで活性化され、リング状に整列した多量体の形成が誘導される(図 1b)。多量体となった PFT は構造変化に伴って各プロトマーから膜に向かって膜貫通部位が供給され、膜貫通型 α -ヘリックスから成る膜孔、あるいは β シートが筒状に配列した β バレル構造の膜孔を形成する(図 1c)。この膜貫通部位を形成する構造の違いから、PFT は前者の α -PFT と後者の β -PFT に大別される³。細胞が膜孔の形成を受けると本来保たれていたイオンやタンパク質の膜内外でのバランスが失われ、ネクローシス誘導などによって細胞が死に至ることもある。

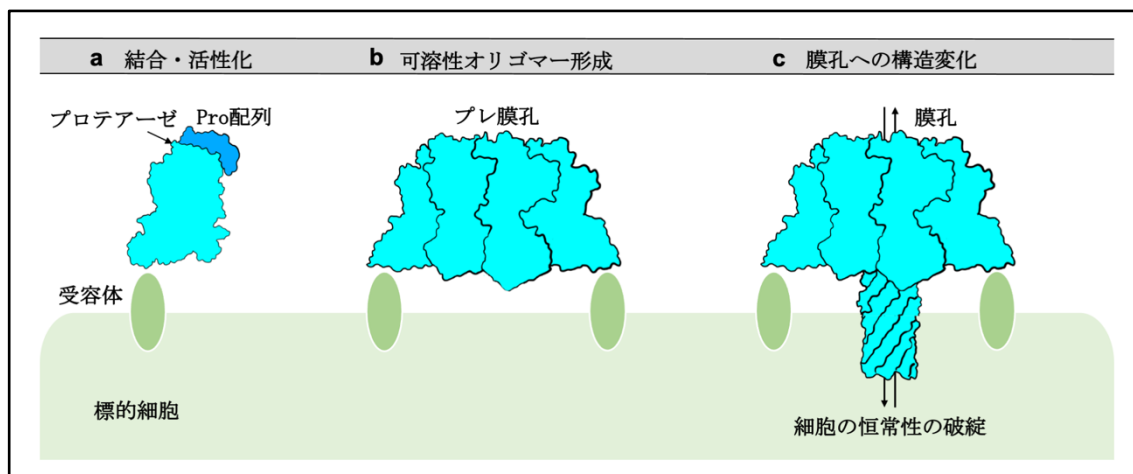


図 1. PFT による細胞攻撃機構

a 可溶性モノマー (非活性型)。プロテアーゼによる加水分解を受けて活性化する。b プレ膜孔 (可溶性オリゴマー)。c 膜孔 (膜貫通型オリゴマー)。

さらに種々の生物は標的細胞膜上に形成した PFT を毒素タンパク質の輸送に用いることがある。*Photorhabdus luminescens*, *Xenorhabdus nematophila*, *Yersinia pseudotuberculosis* などは ABC の三種類のサブユニットから構成される Tc 毒素を産生する。サブユニット B 及び C は二者で Cocoon と呼ばれる複合体を形成し、 α -PFT であるサブユニット A のオリゴマーと三者複合体を形成する^{4,5}。Cocoon の内部には構造をとっていない酵素成分が格納されており、サブユニット A との複合体の形成後、膜孔を介して細胞内に酵素成分が放出されると考えられている。

一方で β -PFT を介して酵素成分を細胞内に輸送する毒素として二成分毒素が知られている^{6,7}。二成分毒素は酵素成分と、酵素成分を細胞内に輸送する β -PFT である膜結合成分から構成されるタンパク質毒素である。膜結合成分は非活性型の可溶性のモノマーであるプロトキシシンとして産生され、プロテアーゼによって N 末端の Pro 配列と呼ばれる領域が分解されることで活性化する (図 2a,b)^{8,9}。活性化された膜結合成分は標的細胞膜上の受容体に結合すると、可溶性のオリゴマー (プレ膜孔) を形成し、酵素成分がこれに結合することで複合体を形成する (図 2c,d)¹⁰。この複合体はエンドソームに取り込まれ、エンドソーム内の pH が低下するとプレ膜孔が膜貫通型 β バレルを有する膜孔に構造変化する (図 2e)¹¹。酵素成分は pH 勾配を利用してこの中を透過して標的細胞に侵入し、重篤な影響を与えると考えられている (図 2f,g)^{12,13}。

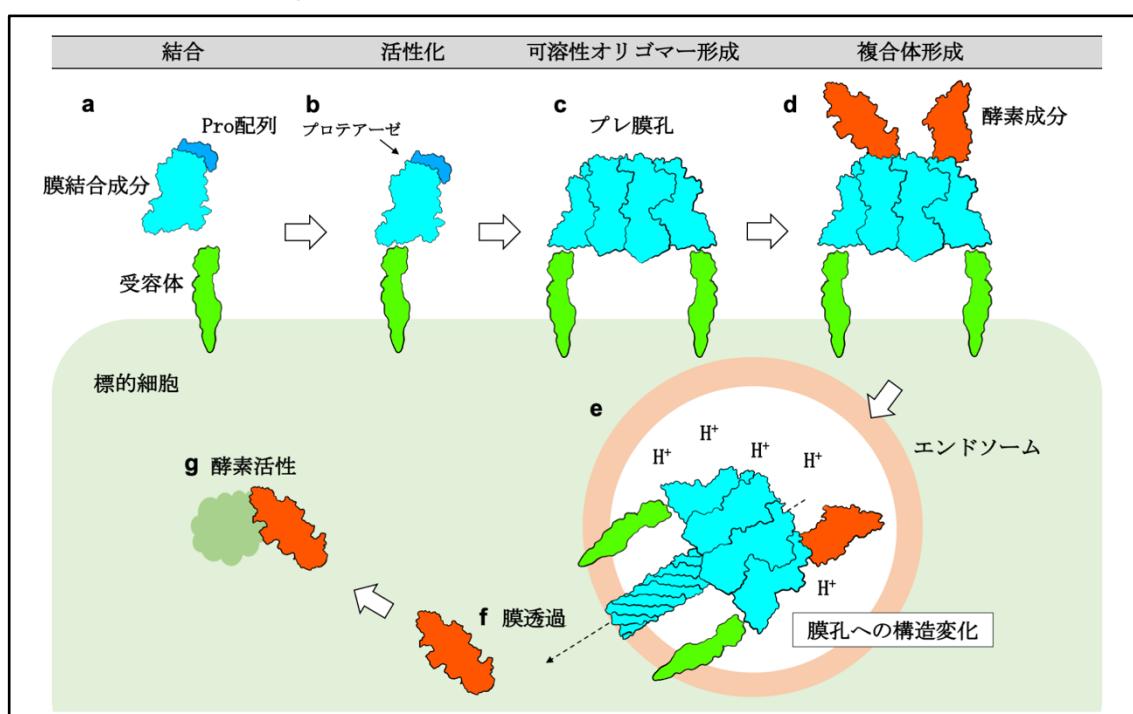


図 2. 二成分毒素の細胞攻撃機構

膜結合成分をシアン、酵素成分を赤で色付けした。a 可溶性モノマー (非活性型)。b プロテアーゼの加水分解による活性化。c プレ膜孔。d 酵素成分とプレ膜孔の複合体。e pH の低下したエンドソームにおける膜孔への構造変化。f 酵素成分の膜透過。g 酵素成分による細胞毒性の發揮。

二成分毒素は種々の細菌から産生されており、いずれにおいても膜結合成分は受容体結合ドメインを除いて非常に高い相同性を持つことが知られている。一方で酵素成分の構造および機能の違いから、炭疽菌 *Bacillus anthracis* の産生する炭疽菌毒素¹⁴ とその他のグループの二種類に大別される (表 1)。特に *Clostridium perfringens* のイオタ毒素¹⁵, *C. difficile* (あるいは *Clostridioides difficile*) の CDT 毒素¹⁶, *C. spiroforme* の CST 毒素¹⁷ は共通の受容体である LSR (Lipolysis stimulated lipoprotein receptor) を認識することが知られており、膜結合成分全体で高い相同性を持つことが知られている¹⁸⁻²⁰。

	イオタ毒素	CDT	CST	C2毒素	Vip	炭疽菌毒素
産生細菌	<i>C. perfringens</i>	<i>C. difficile</i>	<i>C. spiroforme</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>
酵素成分	Ia	CDTa	CSTa	C2I	Vip2	Lehtal factor (LF) Edema factor (EF)
膜結合成分	Ib	CDTb	CSTb	C2II	Vip1	Protective antigen (PA)
受容体	LSR (Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor)			糖鎖	TEM8, CMG2	

表 1. 二成分毒素の産生細菌別一覧

二成分毒素の酵素成分は2つのドメインで構成されており、N末端側がプレ膜孔への結合ドメイン、C末端側が活性中心を有するドメインであることが知られている (図3)²¹⁻²⁷。ボツリヌス菌 C2 毒素の酵素成分 C2I の結合ドメイン及び、Rho を ADP リボシル化するボツリヌス菌 C3 毒素の融合タンパク質を膜結合成分 C2II とともに細胞に添加すると、細胞形態が変化することが報告された^{27,28}。同様に、炭疽菌毒素 LF の結合ドメインと、ペプチド鎖伸長因子を ADP リボシル化してタンパク質合成を阻害するジフテリア毒素 DTA の融合タンパク質を細胞に添加するとペプチド合成が阻害されることが報告されている^{29,30}。

膜結合成分は4つのドメイン (D1-4) で構成されている。D1 はオリゴマー形成を立体的に阻害する約 20 kDa の β バレル構造を持ったサブドメインを有しており、これは Chymotrypsin のようなプロテアーゼによって切断される。Pro 配列が切断によって取り除かれた後の D1 は特に D1' と呼ばれている。D1' の N 末端側にはカルシウムイオン結合モチーフ (DXDXD) が存在し、2つのカルシウムイオンの結合によって構造安定化することが明らかにされている³¹⁻³³。また D1' は酵素成分との結合に関与することが知られている³⁴。D2 は膜結合成分がリング状のオリゴマーを形成した際に中央側に位置するドメインであり、酵素成分の透過経路の特徴的な構造を形成する^{35,36}。D2 の中でも膜孔において構造変化し、膜貫通型 β バレルを形成する領域を D2s と呼び、その他の領域を D2c と呼ぶ。D3 はオリゴマー中では外側に存在する構造であり、モノマー及びプレ膜孔状態において D2s を D4 との間で収納する。D4 は構造的なまとまりから、さらに2つのサブドメイン D4I と D4II に分けることが可能である。特に D4II は受容体結合ドメインとして働くことが知られている^{34,37}。標的とする宿主の違いから二成分毒素の膜結合成分間で最も相同性が低いドメインである。



図3. 二成分毒素のドメイン構造

クロストリジウム二成分毒素の酵素成分と膜結合成分のドメイン構造。膜結合成分についてはプロテアーゼによる活性化を受けた後の構造を示す。

1-2 炭疽菌が産生する二成分毒素の構造

炭疽菌は動物だけでなくヒトにも強毒性を持つ病原菌として知られており、芽胞を形成することで休眠状態を取るため、過酷な環境下でも生存が可能な細菌である。体内への侵入経路の違いから、皮膚炭疽、消化器炭疽、吸入炭疽の3種に病型が分類される。炭疽菌の主な病原因子として二成分毒素(炭疽菌毒素)が知られている¹⁴。

炭疽菌毒素は1つの膜結合成分 PA (Protective antigen) に対して、酵素成分は二種類確認されており、それぞれ Zn^{2+} 依存的な MAP キナーゼキナーゼのプロテアーゼである致死因子 LF (Lethal factor) と、過剰に cAMP 合成を行い細胞内の水の恒常性を破綻させる浮腫因子 EF (Edema factor) から構成される(図 4a,b)。酵素成分 LF 及び EF は異なる活性を持つ酵素成分であるため、活性中心の存在する C 末端ドメインに相同性はない一方で、N 末端ドメインは高度に保存されている(図 4c)^{38,39}。結晶構造解析によって PA はモノマーとプレ膜孔に加えて、1つの LF N 末端ドメイン (LF_N) が2つの PA プロトマーの間に結合した複合体構造が報告された。

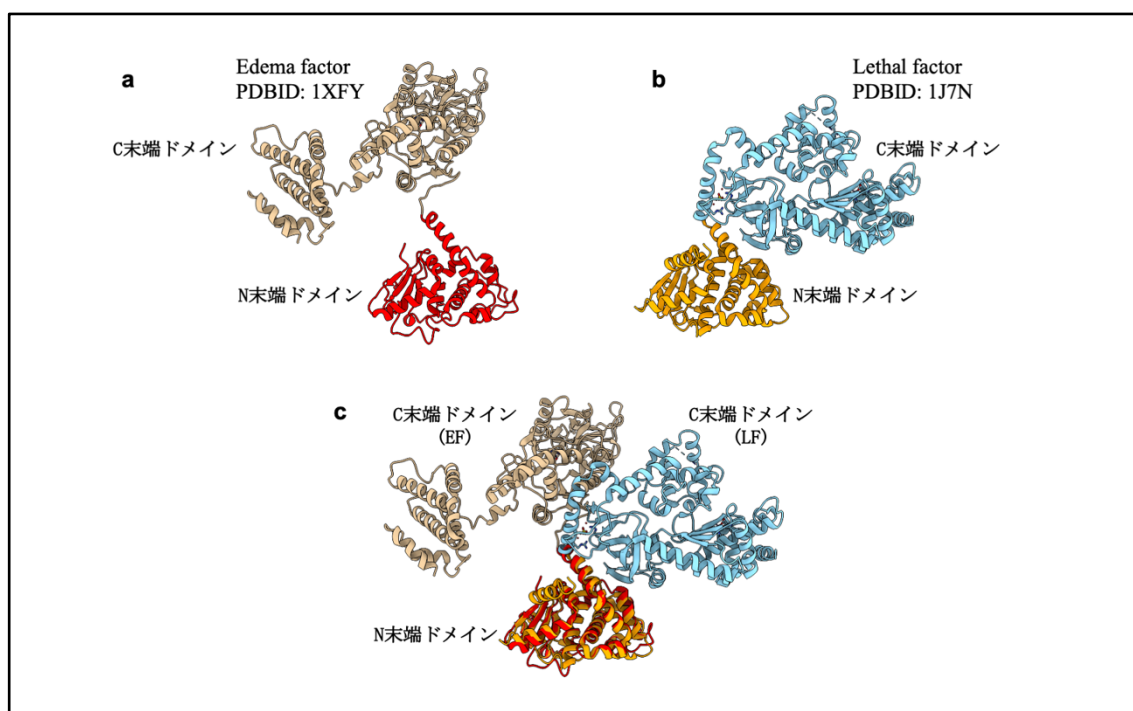


図 4. 炭疽菌毒素の酵素成分の構造

a,b Edema Factor と Lethal Factor の原子モデル (PDBID: 1XFY, 1J7N)。N 末端ドメインと C 末端ドメインでそれぞれ色分けを行った。c Edema Factor と Lethal Factor のモデルの構造アライメント。

結晶構造においてLFのN末端 α ヘリックスは分子内部に折り畳まれた構造を取るが、PAとの複合体中においてはこれが構造変化し両プロトマーのD1'の疎水的な溝(α -clamp)に結合することが明らかにされた(図5)^{40,41}。2021年に報告されたEF及びLFと膜孔との複合体の構造から、2量体PAにおいても7量体膜孔においても同様の結合様式を保つことが明らかにされた^{42,43}。また3つの全長LFが7量体PAプレ膜孔に結合した構造が報告されており、炭疽菌毒素の酵素成分はPA膜孔においても最大で3:7の効率で結合することが示唆された。

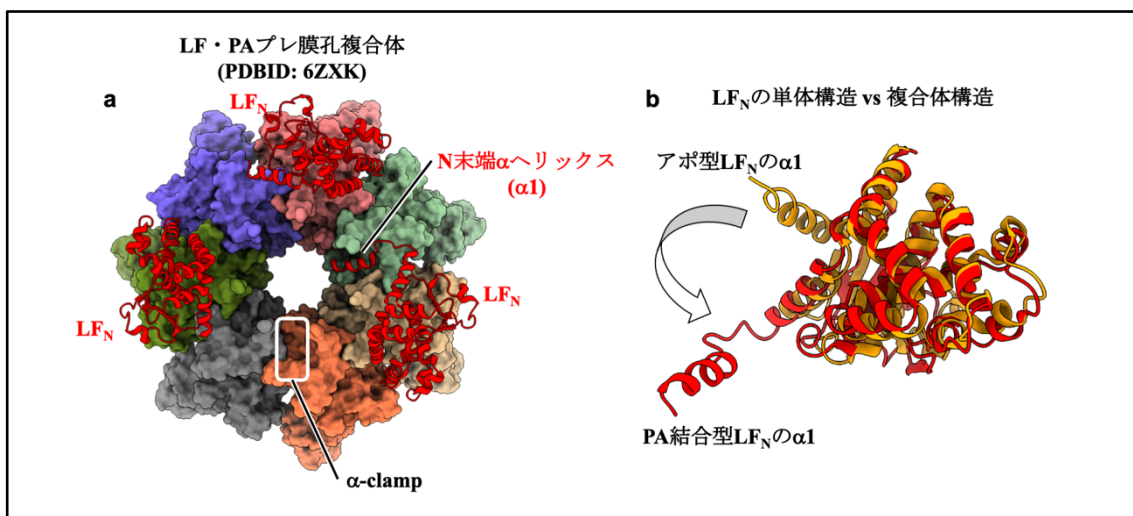


図5. 炭疽菌毒素複合体の構造

a 炭疽菌毒素 LF・PA プレ膜孔複合体のモデル。プロトマー間に存在する構造 (α -clamp) に、LF の α 1 が結合した様子。**b** アポ型と PA 結合型の LF N 末端構造の比較。

1-3 提唱されてきた膜透過機構

PA 膜孔の構造が明らかになる以前から F427 の残基がプレ膜孔から膜孔への構造変化及び、酵素成分の膜透過に重要な残基であることが示唆されていた⁴⁴。実際に明らかにされた PA 膜孔の構造から、F427 は酵素成分が透過すると考えられる膜孔において7つのプロトマーからそれぞれ膜孔中央に飛び出しおり、直径がわずか6Åしかない狭窄部位(ϕ -clamp)を形成することが明らかにされた(図6)³⁶。一般的に α -ヘリックスの直径は12Åであり、酵素成分と膜孔の両者が構造を保ったままでは透過を達成することができない。

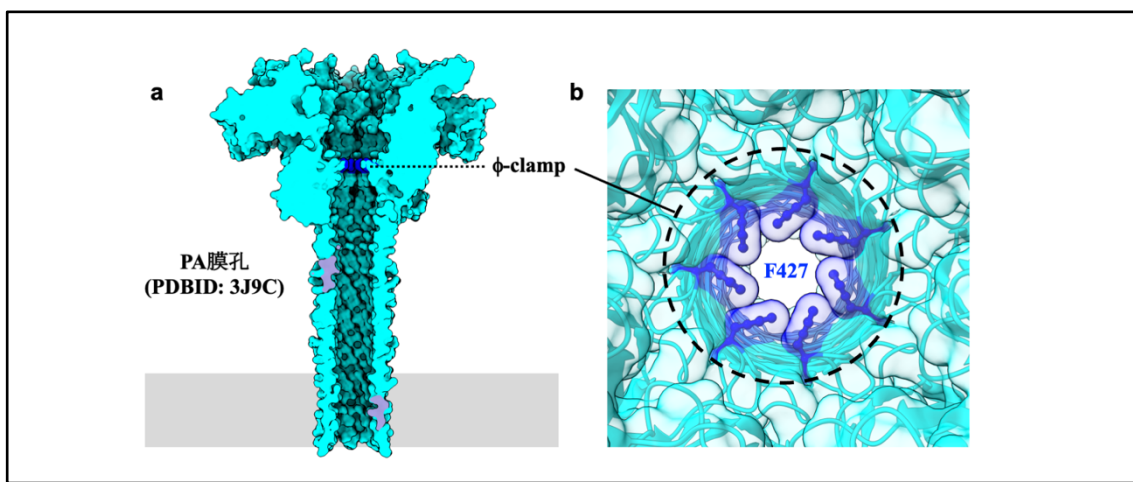


図 6. 膜孔で最も狭い構造

a 炭疽菌毒素 PA 膜孔の原子モデルの断面図。狭窄部位である ϕ -clamp に色付けを行なった。b ϕ -clamp の原子モデルの top view。

そこで二成分毒素の透過メカニズムについては Extended chain Brownian ratchet model と α -helix compression model の2つの仮説が提唱されてきた⁴⁵。これらの膜透過モデルは酵素成分全体に対してどちらかが当てはめられる訳ではなく、酵素成分の部分ごとによって使い分けられている可能性も示唆されている。

Extended-chain Brownian ratchet model

このモデルでは酵素成分が二次構造を持たない **Extended chain** として ϕ -clamp を通過するとされている (図 7)。二成分毒素の複合体は膜透過を行う前にエンドームに取り込まれ, 低 pH の環境に晒される。酵素成分は酸変性によってアンフォールドされ, 負に帯電したアミノ酸側鎖がプロトン化され中性状態になる。この状態になった酵素成分は膜孔の負に帯電した狭窄部位 (**Charge clamp**) を通過することが可能であり, 中性的な pH である細胞質側で透過前に付加されたプロトンが脱離することで高次構造を取り戻す。透過後は静電的反発によって, ブラウン運動によるエンドソーム側への逆行が阻止され透過方向が制限されるという¹³。

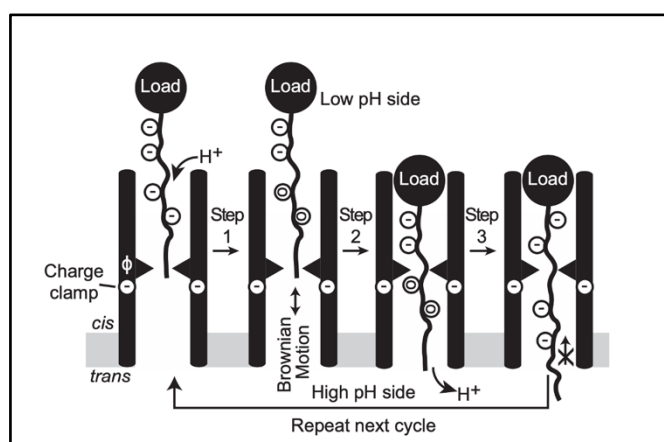


図 7. Extended-chain Brownian ratchet model

Das, D. & Krantz, B. A. (2016) より引用。プロトンと結合して Asp/Glu の電荷が中性となった伸長鎖が ϕ -clamp を通過し, 透過方向にある負に帯電した Charge clamp をブラウン運動によって通過する。サイトゾル側の中性 pH においてプロトンが脱離し, Charge clamp の逆行を阻止する Ratchet な機構によって透過が一方向に進むとするモデル。

しかしながら炭疽菌毒素の酵素成分 LF, EF を用いた研究では, 酵素成分は低 pH によって立体構造に緩みが生じるものの, 2次構造が失われることはないと報告されている⁴⁶。そのため Extended-chain Brownian ratchet model には, いかにして酵素成分が完全にアンフォールドされるかが不明という問題点を抱えていた。

α -helix compression model

Extended-chain model とは対照的に、酵素成分が α ヘリックスを維持した状態で透過することが提唱されている (図 8)。このモデルにおいても Extended-chain model と同じく、 ϕ -clamp 通過後にはプロトンの結合/脱離による一方向性の透過が生じると考えられている。

PA 膜孔を用いた電気生理の研究が行われてきており PA の膜孔形成によって流れる電流値には2つのパターンがあることが報告された^{47,48}。 ϕ -clamp の変異体 F427A においてこの2つのパターンの電流値が増加したことから、小さい方の電流値は報告された PA 膜孔構造と同じく狭い ϕ -clamp の状態に対応し、もう一方の大きい電流値は ϕ -clamp が拡張された状態であることが予想された。さらに鏡像異性体アミノ酸の α ヘリックス (α L, α D) や、同じアミノ酸配列でL体D体を混ぜたポリペプチド鎖 (α LD) をこの PA 膜孔に添加したところ、 α L, α D では短時間の電流ブロックが行われるのに対し、 α LD では長時間の電流ブロックが確認された。また α L, α D は α LD に比べて膜孔への親和性が高く、特に狭い ϕ -clamp の状態の膜孔に対しては拡張された状態よりも顕著に親和性が高いことが報告された。筆者らはシングルチャネルの阻害時間を膜透過時間と考えており、 α ヘリックスの構造をとったポリペプチドでは透過が有利であるとした。

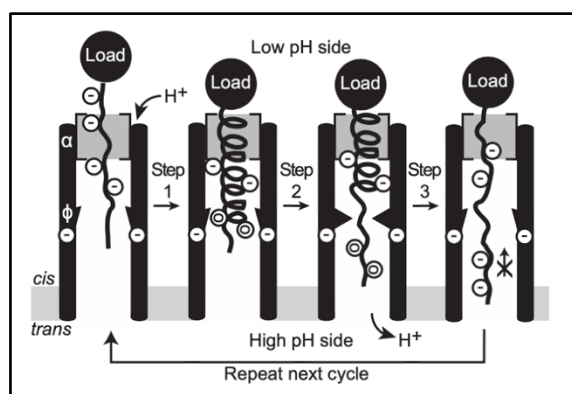


図 8. α -helix compression model

Das, D. & Krantz, B. A. (2016) より引用。 α ヘリックスを保った酵素成分が広がった ϕ -clamp を通過し、ヘリックスと膜孔が結合すると高親和性の閉じた ϕ -clamp に構造変化する。これによって ϕ -clamp を通過途中のヘリックスがアンフォールドされ、Compression された状態から伸長鎖となると同時に Charge clamp などの構造を超えて透過が進む。

α -helix compression model では膜孔の ϕ -clamp は開閉した二つの状態があり、 α ヘリックスを保った酵素成分が広がった ϕ -clamp を透過可能であると考えられているが、 α ヘリックスが透過可能なほど広がった膜孔の構造はこれまでに報告されていない。またこのモデルを支持する文献では、シングルチャネルの阻害時間を透過時間であると捉えて解釈されているが、それが実際に透過による阻害であるかは分からない。

1-4 目的

膜を介したタンパク質の輸送はあらゆる生物が利用する必須の機構であり、細胞の恒常性維持や病原因子からの防御あるいは攻撃に至るまで様々な面で活用されている。タンパク質の膜透過は、それぞれが異なる機構によって行われている。生体膜は細胞やオルガネラの内外を区切るため、タンパク質がこれを透過するにあたって膜孔あるいはチャネルの利用、局所的な膜の破壊、膜小胞による輸送などが行われている⁴⁹。膜孔・チャネルを利用した経路のみに焦点当てても、タンパク質の膜透過はさらに分類をすることができる。

リボソームで産生されたタンパク質の新生鎖をオルガネラに輸送する経路として、小胞体内に局在する Sec 複合体^{50,51}、ミトコンドリア外膜に局在する TOM 複合体のようなトランスロケータが知られている⁵²⁻⁵⁴。Sec 複合体はリボソームから産生されている最中の新生鎖を小胞体内に輸送する co-translational な輸送と、翻訳後にシャペロンと結合した前駆体タンパク質を輸送する post-translational な輸送を行う。TOM 複合体はサイトゾルで翻訳された前駆体タンパク質の輸送を行い、さらにミトコンドリアの膜間部に輸送された前駆体はさらに SAM を介して外膜に挿入、あるいは TIM 複合体を介して内膜に挿入またはマトリックスに輸送されるなど異なる輸送が行われる。Sec 複合体の co-translational な輸送とは異なって基質の一部がフォールディングされている場合があるが、ミトコンドリア内膜のシャペロン HSP70 の ATP 加水分解による TIM 複合体への結合/解離によって、一方向性の膜透過を助けることが報告されている⁵⁵。

細菌が産生したタンパク質の分泌装置は 9 種類ほど知られている。その中でも T2SS は細菌の内膜からペリプラズムを介して外膜にまで挿入された、巨大な複合体のトランスロケータであり、フォールディングしたタンパク質を輸送することが知られている。二成分毒素と同様に、酵素と膜結合性の A と B の成分から構成されるコレラ毒素の複合体 AB₅ や、アロリジン 2 量体といったフォールディングされた複合体をも輸送することが知られている^{56,57}。この他にも真核生物が有するトランスロコンでフォールディングした基質を輸送するものが複数知られている。

細菌が産生する二成分毒素も同様にタンパク質の膜透過装置とその基質で構成されるが、上述のトランスロコンとは異なり、細菌から分泌された外的なタンパク質が受容体を介して標的細胞で膜孔を形成し、細胞内に基質を送り込む。さらにその基質はフォールディングされた状態で膜孔に結合するが、狭窄部位 ϕ -clamp の通過のために少なくともその構造の一部はアンフォールドされる必要があると考えられる。二成分毒素の膜透過には上述の TIM 複合体の機構と同じく、シャペロンの関与が示されている⁵⁸。一方で二成分毒素の膜孔は直径約 15 Å、長さ 90 Å 以上に及ぶ膜貫通型 β バレル構造を持ち、基質はこの中を通過すると考えられているため、 β バレルから基質が通り抜けるまでシャペロンの介入を受けることができないと思われる。しかしながらどのように ϕ -clamp を通過し、さらに長い β バレルを透過するのかが明らかにされていない。

細胞外から与えられた膜孔が基質を標的細胞に送り込むということ、一度フォールディングされた基質が膜透過して細胞内に輸送されるといった、二成分毒素の特徴は任意のタンパク質を含む分子を細胞内に送達するシステムとして応用が可能であると期待される。さらに二成分毒素に似た膜孔形成タンパク質として知られるヘモリシンを応用して、近年では DNA のシーケンシングが行われており⁵⁹、タンパク質のアミノ酸シーケンシングへの応用も試みられている。基質がアンフォールドされて膜孔を通過するという機構は、このようなナノデバイスとしての応用も期待されるであろう。

二成分毒素はクロストリジウム属細菌が産生するタイプと炭疽菌が産生するタイプに大別される。両者間で膜結合成分は高度に保存されている一方で、基質である酵素成分については全く異なる。これまで膜結合成分の構造情報は炭疽菌毒素に限られてきたため、膜透過機構も炭疽菌毒素を中心として研究されてきたが、酵素成分の異なる両タイプの毒素の知見が得られることで、膜透過に必要な共通項が可視化されると期待できる。そこで本研究ではクロストリジウム属二成分毒素である、ウェルシュ菌イオタ毒素 (Ia, Ib) とデフィシル菌二成分毒素 (CDTa, CDTb) の複合体の構造解析を行い、膜を介した未知のタンパク質透過機構について明らかにすることを目標とした。

第2章 ウェルシュ菌イオタ毒素の構造解析

2-1 概要

ウェルシュ菌 *Clostridium perfringens* が産生する二成分毒素であるイオタ毒素の酵素成分 Ia 及び、膜結合成分 Ib はそれぞれ形質転換体大腸菌を使用して発現・精製した。Ib は可溶性モノマーとして得られるが、実際に毒素として機能する際には N 末端 Pro 配列の分解を受けた上でオリゴマーを形成する必要がある。これまで *in vitro* の実験系において、Ib はプロテアーゼによる活性化後、極微量しかオリゴマーを形成しなかった。本研究の過程で活性化された Ib に~10% (v/v) のエタノールを加えることでオリゴマー形成が誘導されることを見出した。この方法で得られたオリゴマーは界面活性剤が非存在下において沈殿する傾向にあることから、可溶性プレ膜孔ではなく膜貫通型の膜孔の状態にあると考えられた。そこで LMNG (Lauryl maltose neopentyl glycol) を微量加えた条件で可溶化処理を行い、LMNG 存在下で密度勾配遠心による精製を行った。

構造解析に向けたサンプル調製は大きく分けて2回行っており、1度目のサンプルではあらかじめ Ia と Ib 膜孔を混ぜた状態で密度勾配遠心にかけて複合体を精製した。この方法で得られたサンプルでは、電子顕微鏡画像上で LMNG ミセルが多く見られ複合体の割合が少ないことがわかった。そこで2度目の調製では LMNG 濃度を下げた状態で Ib 膜孔を調製し、そこに Ia を加えて遊離 Ia を取り除くなどそれ以上の精製は行わずにクライオ電子顕微鏡によるデータの測定を行なった。

単粒子構造解析によって Ib 膜孔及び、Ia・Ib 膜孔複合体の構造をそれぞれ高分解能で決定することに成功した⁶⁰。Ib 膜孔はクロストリジウム属二成分毒素として初となる膜孔構造であり、既に報告されていた炭疽菌毒素 PA 膜孔と合わせて二成分毒素の膜透過研究を進めることが可能になった。Ia・Ib 膜孔複合体は炭疽菌毒素と異なって酵素成分と膜結合成分が 1:7 の比で結合しており、さらに結合様式が全く異なることが明らかになった。また複合体の形成に伴って、Ia の N 末端の α -ヘリックスは Ib 膜孔内部の狭窄部位にてアンフォールドすることがわかった。

2-2 背景

イオタ毒素¹⁵はE型ウェルシュ菌が産生する酵素成分Iaと膜結合成分Ibで構成されるタンパク質毒素である。それぞれシグナルペプチドが外れるとIaは413残基(47,605 Da)、Ibは837残基(94,012 Da)のタンパク質である。IbはプロテアーゼによってN末端のPro配列が切断されることで活性化を受け、664残基(74,147 Da)のタンパク質となり、約520 kDaの巨大な7量体オリゴマーを形成する。

IaはNAD⁺をニコチンアミドとADPリボースに加水分解し、アクチンを特異的にADPリボシル化する⁶¹。ADPリボシル化を受けたアクチンは再重合が阻害され、細胞中のFアクチンが減少する。その結果、細胞骨格が破綻し細胞の円形化が起きることが知られている。Iaの活性中心はC末端ドメインに存在することが知られており、NADHが活性中心に結合した構造、さらに、Iaが標的であるアクチンに結合した複合体構造が結晶構造解析によって報告されている^{22,23}。N末端側のドメインはIbとの結合ドメインであることが知られているが、その結合機序は明確にされてこなかった。IbのN末端にはカルシウムイオン結合モチーフ(DXD₂DXD)があることがそのアミノ酸配列から知られており、モチーフ中のアスパラギン酸を一つずつアラニンに置換した変異体とIaとの相互作用解析から、Iaはカルシウムイオン(あるいは結合モチーフ)依存的にIbと結合することが報告された³³。Ibにおいてこのカルシウムイオン結合モチーフはPro配列が切断されたD1'のN末端側に位置していることから、D1'にてIaのN末端ドメインと結合することが予想された。しかしながらその複合体の全体構造については明らかにされてこなかった。

これまで私はIbのX線結晶構造解析に向けて結晶作製を試みてきたが、結晶サンプルを得ることはできなかった。クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析は結晶化を要さず、膜タンパク質を含む巨大なタンパク質サンプルの構造解析に強みを持つことから、私はIb膜孔及び、Ia・Ib膜孔複合体の単粒子構造解析を試みた。

2-3 サンプルの調製

2-3-1 酵素成分 Ia の発現及び精製

Ia は先行研究により N 末端が Ib への結合ドメイン、C 末端が ADP リボシル化活性ドメインであることが明らかにされていた。N 末端側に余分な配列があると Ib への結合の障害となる可能性を考え、C 末端に 6His タグが付与された Ia を設計した (図 9a)。これとは別に N 末端に 6His タグを付与した Ia を設計し、精製後 Thrombin 処理で N 末 His タグを切断した Ia の調製を行なった (図 9b)。

培養及び発現誘導

Ia の遺伝子 (Uniplot ID: Q46220, 42-454 残基, 原子モデル作成時にシグナルペプチド後を 1 番として残基番号を振り直した) をそれぞれ pET-15b と pET-21b に挿入され、過剰発現は *E. coli* BL21 star (DE3) 株を用いて行われた。この形質転換体を ampicillin (50 ng/μl) を含む Super Broth 培地 (表 2) を用いて 37°C で培養し、OD₆₀₀=1.5 になったところで IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) を終濃度で 0.5 mM になるように加え、さらに 37°C, 16 時間培養後、それぞれの Ia を発現した培養液を遠心にかけて菌体から培地を取り除き、菌体を回収した。



図 9. 発現した Ia のコンストラクトマップ

a C 末端 His タグ Ia にはプロテアーゼによる切断サイトは挿入していない。b N 末端 His タグ Ia では精製過程で、Thrombin 処理によって His タグを除くために認識配列を挿入した。

Super Broth 培地

Tryptone	32 g
Yeast extract	20 g
NaCl	5 g
5N NaOH	1 ml
Volume	1 L

表 2. Super Broth 培地組成

精製手順

Ia を発現した大腸菌をそれぞれ buffer A に再懸濁し、予期せぬ分解を回避するためにプロテアーゼ阻害剤カクテルである cOmplete ULTRA Tablets (Roche) を 1 錠添加した (表 3)。この菌体懸濁液を氷水上でソニケーションし、超遠心 (180,000×g, 40min) にかけて可溶性画分と不溶性画分に分離した。上清を Ni-NTA 担体に結合させ、担体に結合したタンパク質を担体の 10 倍量の buffer A で洗浄し、さらに担体体積の 3 倍量の buffer B で溶出した。その後、C 末端 His タグ Ia は Amicon 30K を用いて NaCl を含まない buffer C へ置換し、buffer C,D を用いて Hi-Trap Q (GE Healthcare) による陰イオン交換精製を行なった。その後、buffer E に置換し C 末 His タグの Ia を濃縮した (図 10a)。

N 末に His タグがついている Ia は Ni-NTA の後、buffer C へ置換し Thrombin (0.001 unit/ μg Ia) 処理によって N 末端の His タグを切断した。PMSF (Phenylmethylsulphonyl fluoride) (終濃度 1mM) の添加によって Thrombin の活性を失わせ、もう一度 Ni-NTA にサンプルをアプライした。このフロースルー液を集め buffer E への置換を行い、His タグなしの Ia を濃縮した (図 10b)。

それぞれのサンプルの精製度は SDS-PAGE で確認した (図 10)。確認後、液体窒素による急速凍結を行い-80℃で冷凍保存した。

C 末 His タグ Ia の精製

菌体 (BL21)

- ↓ 再懸濁 buffer A
- ↓ cOmplete 1 錠添加
- ↓ ソニケーション
- ↓ 超遠心 4°C, 180,000 × g, 40min
- ↓ 上清を Ni-NTA 担体 3ml に添加
- ↓ 低温室, 1 時間
- ↓ buffer A で wash CV × 15 回
- ↓ buffer B で elution 1ml × 15 回
- ↓ Amicon 30K buffer 交換 (B→C)

- ↓ 陰イオン交換 buffer (C→D)
 - ↓ Amicon 30K buffer E に交換&濃縮
- 凍結保存

His タグなし Ia

菌体 (BL21)

- ↓ 再懸濁 Buffer A
 - ↓ cOmplete 1 錠添加
 - ↓ ソニケーション
 - ↓ 超遠心 4°C, 180,000 × g, 40min
 - ↓ 上清を Ni-NTA 担体 3ml に添加
 - ↓ 低温室, 1 時間
 - ↓ buffer A で wash CV × 15 回
 - ↓ buffer B で elution 1ml × 15 回
 - ↓ Amicon 30K buffer 交換 (B→C)
- ↓ Thrombin 添加 (0.001 unit/ μg Ia)
 - ↓ 室温, 37°C
 - ↓ PMSF (終濃度 1mM) 添加
 - ↓ サンプルを Ni-NTA 担体 3ml に添加
 - ↓ FT を Amicon 30K buffer E に交換&濃縮
- 凍結保存

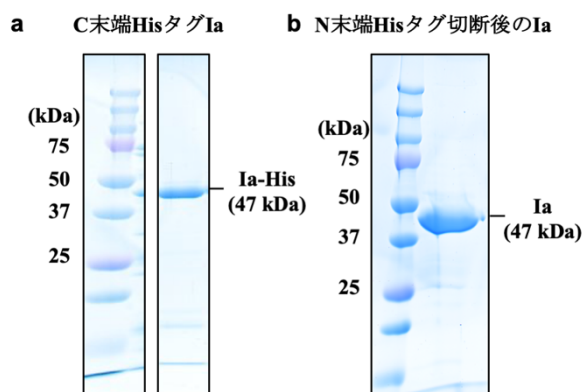


図 10. 精製した Ia の電気泳動

a,b クライオ電子顕微鏡による構造解析に用いた Ia の精製産物の SDS-PAGE。

buffer A: 20 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole

buffer B: 20 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazole

buffer C: 20 mM Tris pH 8.0, 2 mM CaCl₂

buffer D: 20 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 2 mM CaCl₂

buffer E: 10 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl

表 3. Ia 精製に用いた buffer の組成

2-3-2 膜結合成分 Ib の発現及び精製

Ib は可溶性のモノマーとして産生される。オリゴマー形成を任意のタイミングで行うために、Pro 配列が N 末端についた Ib を発現させた。また Ib は Pro 配列が結合している状態では 100kDa 程度の巨大なタンパク質であるため、精製に利用するタグとして水への可溶性が高い GST タグを選択した。

培養及び発現誘導

pGEX4T-1 ベクターに挿入された遺伝子 (Uniplot ID: Q46221, 40-875 残基) を用いて *E. Coli* Origami (2 種類の還元酵素が変異されたホストで、細胞内をより酸化的な状態に保つことでジスルフィド形成に有利とされる) を形質転換し、過剰発現を行わせた (図 11)。この菌体を ampicillin (50 ng/μl), tetracycline (12.5 ng/μl), kanamycin (15 ng/μl) を含む Super Broth 培地を用いて 37°C で培養し、OD₆₀₀=0.6 となったところで IPTG を 1 mM となるように添加し 23°C で 16 時間のさらなる培養後、遠心によって培地を取り除き、菌体を回収した。

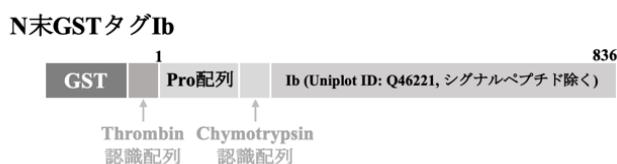


図 11. 発現した Ib のコンストラクトマップ

精製手順

培地を取り除かれた GST-Pro-Ib を発現した菌体を buffer F (表 4) に再懸濁し、予期せぬ分解を回避するためにプロテアーゼ阻害剤カクテルである cComplete ULTRA Tablets (Roche) を 1 錠添加した。この菌体懸濁液を氷水上でソニケーションし、超遠心 (180,000 × g, 40min) にかけて可溶性画分と不溶性画分に分離した。上清を Glutathione Sepharose 4B resin (GE Healthcare) に結合させ、担体に結合したタンパク質を担体の 15 倍量の buffer F で洗浄した。その後、担体の 3 倍量の buffer G で溶出したタンパク質溶液に対して Amicon 50K を用いて buffer H への buffer 交換、および濃縮を行なった。サンプルの精製度は SDS-PAGE で確認した (図 12)。濃縮したサンプルは液体窒素によって急速凍結した後に -80°C で冷凍保存した。

大腸菌菌体

↓再懸濁 buffer F

↓cOmplete 1 錠添加

↓ソニケーション

↓超遠心 4°C, 180,000×g, 40min

↓上清を GS 担体 3ml に添加

↓低温室, 1 時間

↓buffer F で wash CV×15 回

↓buffer G で elution 1ml×15 回

↓Amicon 50K buffer 交換 (G→H)

↓濃縮

凍結保存

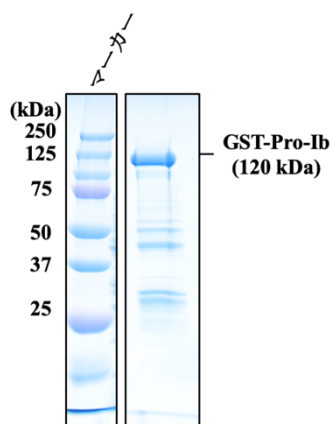


図 12. 精製した Ib の電気泳動

GST タグを用いて精製した Ib (GST-Pro-Ib) の SDS-PAGE。

buffer F: 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5mM dithiothreitol

buffer G: 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM reduced glutathione

buffer H: 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂

表 4. Ib 精製に用いた buffer の組成

2-3-3 効率的な7量体 Ib オリゴマーの形成

エタノール添加によるオリゴマー形成誘導

Ib のオリゴマー形成は N 末端の Pro 配列が切断されることで活性化する。そこで精製した GST-Pro-Ib にタンパク量の 1/1000 の Chymotrypsin を加え 1 時間 室温で反応させた。ここに PMSF (Phenylmethylsulphonyl fluoride) (終濃度 1 mM) を添加し酵素反応を非可逆的に阻害した。さらに 37°C で 1 時間インキュベーションした。二成分毒素オリゴマーは非加熱条件下においては、SDS 存在下でもモノマーに解離しない SDS 耐性を有することが知られているため、オリゴマーの形成を非加熱の SDS-PAGE で評価した。しかしながら上記の操作では Ib のオリゴマー形成効率は極めて低いことがわかった。そこで条件探索をしていたところ、エタノールの添加が Ib のオリゴマー形成を効率的に誘導することを見出した (図 13a)。これによって得られた Ib オリゴマーは界面活性剤のない条件下では不溶性であり、SDS を加えた条件下では溶解することがわかった (図 13b)。

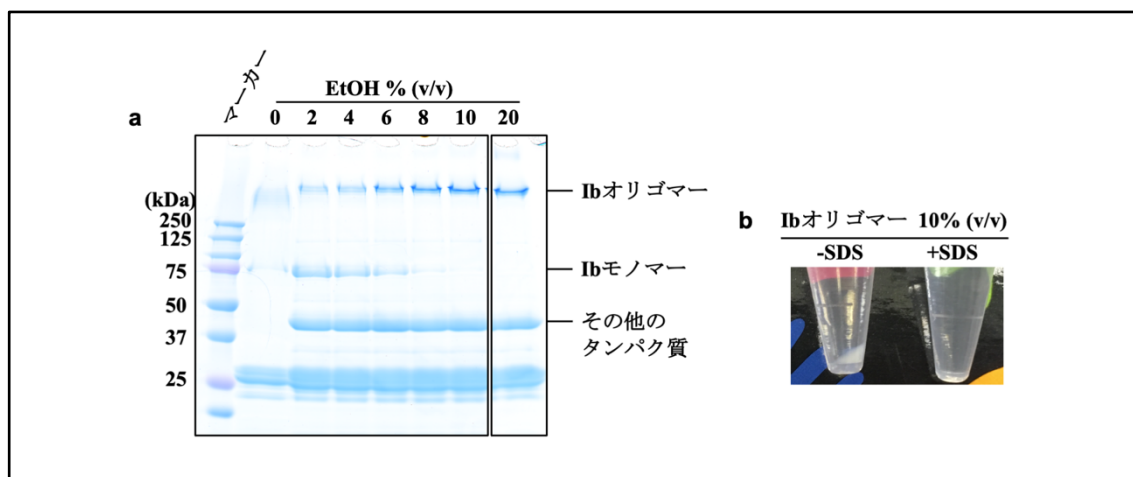


図 13. エタノール (EtOH) によるオリゴマー形成誘導

a エタノールによる Ib のオリゴマー形成効率の変化を比較した SDS-PAGE。各レーンで同一のサンプルを等量使用しているため、Ib 以外のバンドをコントロールとして考えられる。Ib の活性化処理時に用いる Chymotrypsin の阻害剤として使用している PMSF がエタノールを溶媒としているため、0%条件では PMSF が未添加であり分解が進行している。**b** 10% (v/v) 条件における Ib オリゴマーの可溶性の確認。エタノールと共に SDS を加えたものと buffer を加えたもので比較を行なった。

過剰量のエタノール添加は Ib の凝集を引き起こしてしまうため、ほぼ全ての Ib がオリゴマーを形成し、かつ凝集物由来と思われるバンドの見られない、10% (v/v) のエタノール存在下におけるオリゴマー化が最適であると考えられた。

受容体結合ドメイン欠失によるオリゴマー形成誘導

1% (v/v) エタノールの条件において形成された Ib オリゴマーを熱変性した上で SDS-PAGE を行うと, Ib モノマーと思われるバンドが 2 つ現れた (図 14a,b)。分子量マーカーとの比較からこのうち予定外に分解を受けたと思われるバンドは, 受容体結合ドメイン D4 のサブドメインである D4II を失ったサイズにおおよそ相当すると考えられた。このバンドはオリゴマー精製前の非加熱条件では一切見られないことから, 積極的に Ib のオリゴマーに取り込まれている可能性があると考えた (図 14a)。そこで D4II を欠失するコンストラクトの Ib をデザインし, 上述と同様の方法で発現・精製を行なった。その結果, Chymotrypsin 処理による活性化を行なった後にエタノールを加えずとも, ほぼ全ての Ib がオリゴマーになることがわかった (図 14c)。

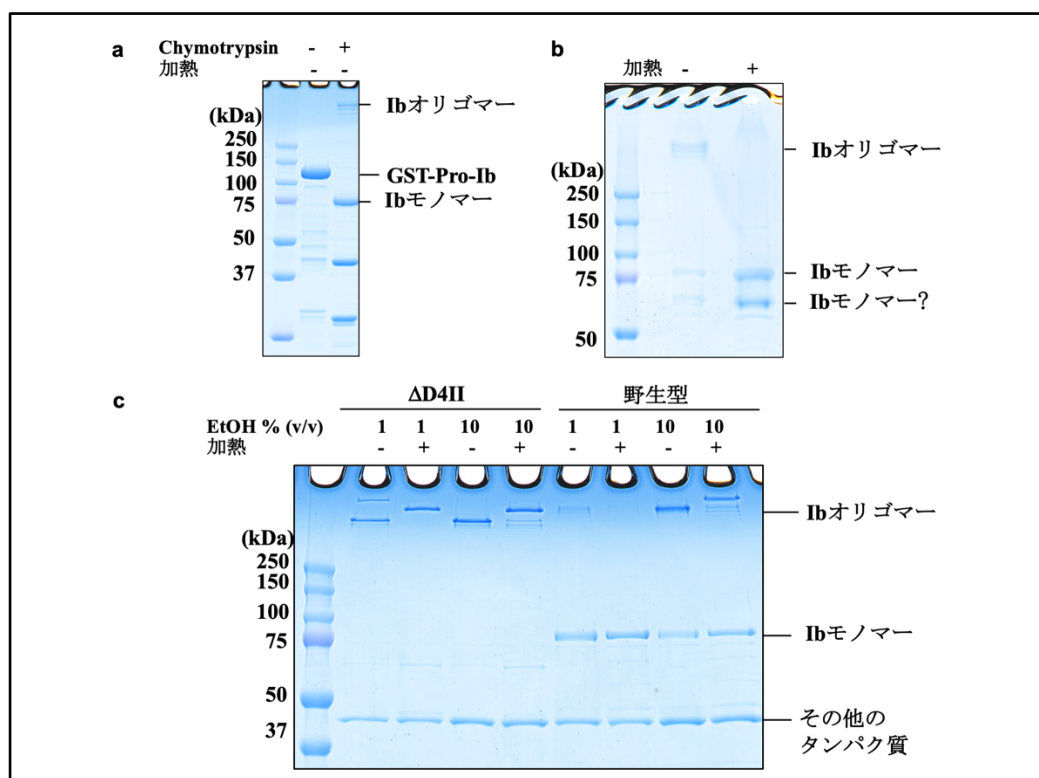


図 14. オリゴマーを形成する Ib モノマーの確認

a 非活性化型 Ib モノマーと Ib オリゴマーの非加熱電気泳動。 **b** 1% (v/v) エタノールで調製した Ib オリゴマーの非加熱・加熱 SDS-PAGE。加熱 SDS-PAGE では非加熱条件で見られなかった, 過剰な切断を受けたと考えられる Ib モノマーのバンドが見られる。 **c** D4II 欠失変異体と野生型 Ib のオリゴマー形成効率, 及び熱安定性の比較。Ib の活性化処理時に用いる Chymotrypsin の阻害剤として使用している PMSF がエタノールを溶媒としているため, 1% (v/v) 条件と 10% (v/v) で比較を行なった。

2-3-4 密度勾配遠心による電子顕微鏡サンプルの調製

Ib は元々Pro 配列のついた状態で発現しているため、Chymotrypsin 処理後のエタノールによるオリゴマー誘導をした時点では、オリゴマー、モノマー、Pro 配列やタグなど、様々なタンパク質が混在する。そのため、均一なサンプル調製のためにはさらなる精製をする必要がある。Ib は7量体の巨大なオリゴマーを作ることから、オリゴマーの精製にはゲル濾過や密度勾配遠心などのサイズ依存的に分子の分離が可能な手法が効果的であると考えられた。しかしながら、当研究の初期においてエタノールによってオリゴマー形成が誘導された Ib は、可溶性なプレ膜孔と膜貫通型の膜孔のどちらの状態にあるのか不明な状態であったため、ゲル濾過カラムの目詰まりを避けるために密度勾配遠心を選択した。

Ib はエタノール存在下で放置すると沈澱が生じるが、さらに界面活性剤を加えた条件下においては沈澱が生じない。このことから Ib オリゴマーは膜貫通型の膜孔の状態にあることが示唆された。そこで私は界面活性剤 LMNG (Lauryl maltose neopentyl glycol) を加えた条件下でエタノールによるオリゴマー形成誘導、およびその後の buffer においても LMNG を使用することにした。LMNG 存在下における密度勾配遠心では GraDeR という手法が報告されている⁶²。この手法では密度勾配遠心ベッドの密度勾配 (遠心チューブの底側が高濃度, 頂部が低濃度) に対して, LMNG を逆の濃度勾配 (遠心チューブの底側が低濃度, 頂部が高濃度) で調製する。この条件で作製した遠心チューブを用いてあらかじめ可溶化されたサンプルを遠心にかけることで, 緩やかにサンプルは低濃度の LMNG 環境に晒されることになる。一方私は遠心チューブ内の LMNG が均一な条件で密度勾配遠心を行なった⁶³。

密度勾配遠心後はチューブの底に穴を空け, 5 滴ずつ (およそ 250 μ l) サンプルを分取した。これの A280 nm を測定し, SDS-PAGE から Ib オリゴマーを十分に精製できることを確認した (図 15)。

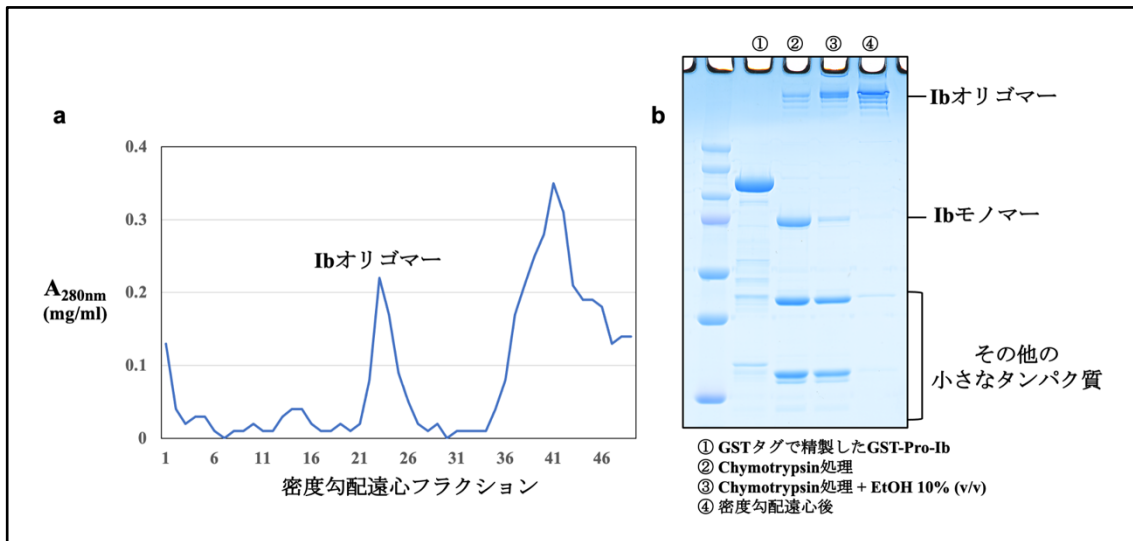


図 15. 密度勾配遠心による精製

a エタノールによるオリゴマー形成誘導後に LMNG 存在下で行なった密度勾配遠心分画の $A_{280\text{nm}}$ をプロットしたグラフ。遠心後、各フラクションの 280 nm における吸光度を測定しプロットした。**b** 密度勾配遠心による精製前後の Ib サンプルの SDS-PAGE。

構造解析を行う上でサンプルは均一な状態であることが好ましい。しかしながら、Chymotrypsin 処理した Ib モノマーの中にはエタノール非存在下でオリゴマーになるものと、ならないものの 2 種類が混在しており、形成されるオリゴマーは少量である。当初はエタノール非存在化でオリゴマー化したサンプルを解析する予定であったが、オリゴマーを形成しなかった残りの均一なモノマーをサンプルとして解析に用いることにした。

まず、1% (v/v) エタノールで Ib をオリゴマー化させ、過剰量の C 末 His タグの Ia を添加した。この Ia・Ib オリゴマー混合液を Ni-NTA にかけて、1%エタノール条件ではオリゴマーを形成せず、Ia と結合できなかつた Ib モノマーが含まれるフロースルー画分を回収した。次にこのフロースルー画分にエタノール (終濃度 10% (v/v)) 及び、LMNG (終濃度 0.03% (w/v)) を添加して Ib のオリゴマー形成を誘導した。このサンプルをグリセロール密度勾配 (10% - 30% グリセロール, 50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.03% (w/v) LMNG) にアプライし、超遠心 (230,139×g, 16 時間) を行なった。遠心後チューブの底に穴を空け、250 µl ずつ分画を行なった。電子顕微鏡の構造解析においてグリセロールや界面活性剤はノイズの原因となるため、PD10 を用いて buffer 交換 (10 mM HEPES pH 7.5, 1 mM CaCl₂, 0.01% (w/v) LMNG) を行なった。さらに Amicon を用いて濃縮を行い、サンプルの状態を SDS-PAGE によって確認した。

Ni-NTA のフロースルー画分を利用しているにも関わらず、SDS-PAGE で少量の C 末 His タグの Ia が Ib オリゴマーと共に精製されている様子が確認された。これを 1 回目のサンプルとして電子顕微鏡で撮影した。

1 回目のサンプルの電子顕微鏡観察の結果を受け、2 回目のサンプルは界面活性剤 LMNG の減量と, Ia・Ib 複合体の割合を向上することに注目した。まずは LMNG の減量を目的に Ib オリゴマー精製の各段階において LMNG を加えない条件を試し, サンプルの状態を SDS-PAGE で確認した (図 16)。しかしながらどの段階においても LMNG がなければ Ib オリゴマーが凝集してしまうことから LMNG は低濃度で常に使用することにした。

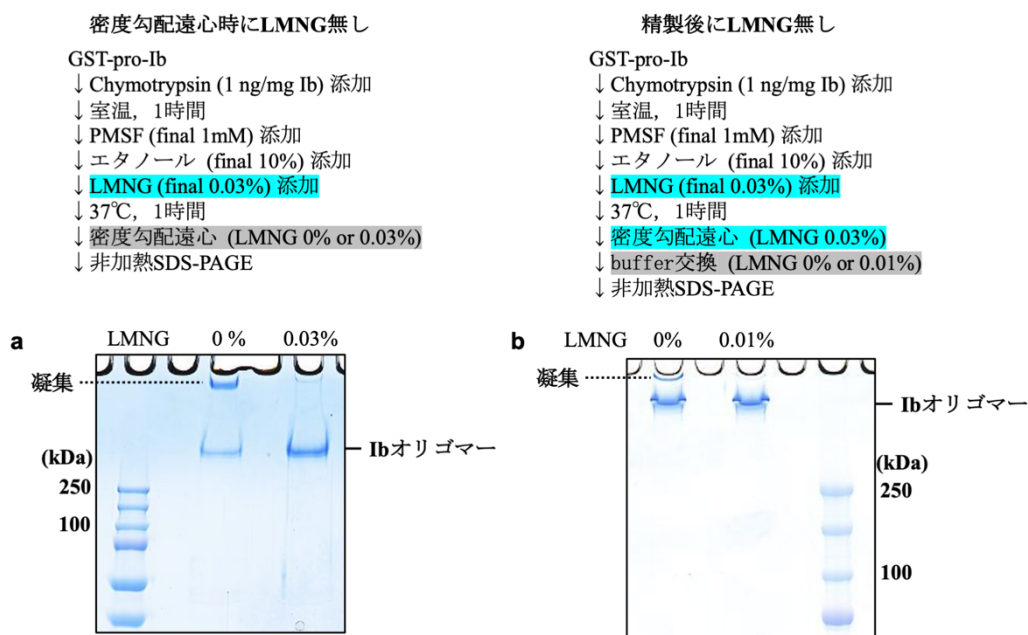


図 16. Ib 膜孔可溶化に向けた LMNG 添加量の検討

Ib 膜孔の可溶性維持のために LMNG が必要かどうかを, a 密度勾配遠心時 b 最終の buffer 交換のタイミングでそれぞれ検討した。LMNG の必要性は SDS-PAGE の結果の観察から凝集体と思われるバンドの視認によって判別した。

2 回目のサンプル調製においては 1 回目に比べて密度勾配遠心以降の LMNG の濃度を減らした。また 1 回目のサンプル調製では Ia,Ib の混合液を密度勾配遠心にかけていたが (図 17a), これを変更し Ib オリゴマーの精製後に Ia を添加する方法にした (図 17b)。

具体的には、まず Chymotrypsin 処理した Ib にエタノール (終濃度 10% (v/v)), LMNG (0.03% (w/v)) を添加しオリゴマー化させた。これをグリセロール密度勾配にのせ (10%–30% グリセロール, 50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1mM CaCl₂, 0.003% (w/v) LMNG), 超遠心 (230,139×g, 16 時間) を行なった。遠心後チューブの底に穴を空け, 250 μl ずつフラクション分けを行なった。PD10 を用いて buffer 交換 (10 mM HEPES pH 7.5, 1 mM CaCl₂, 0.003% (w/v) LMNG) を行なった。さらに Amicon を用いて濃縮し, サンプルの状態を SDS-PAGE によって確認した (図 17)。この精製した Ib オリゴマーに His タグなしの Ia をモル比で 3 倍加え, 2 回目のサンプルとして電子顕微鏡で撮影した。

1 回目サンプル調製

GST-Pro-Ib

- ↓ chymotrypsin (1 ng/μg Ib) 添加
- ↓ 室温, 1 時間
- ↓ PMSF (終濃度 1mM) 添加
- ↓ 37°C, 1 時間
- ↓ C 末 His タグ Ia 添加
- ↓ Ni-NTA FT 回収
- ↓ エタノール (終濃度 10%) 添加
- ↓ LMNG (終濃度 0.03%) 添加
- ↓ 37°C, 1 時間
- ↓ 密度勾配遠心 (0.03% LMNG)
- ↓ フラクシオン回収
- ↓ buffer 交換 (0.01% LMNG)
- ↓ 濃縮
- ↓ SDS-PAGE
- ↓ 電子顕微鏡で撮影

2 回目サンプル調製

GST-Pro-Ib

- ↓ chymotrypsin (1 ng/μg Ib) 添加
- ↓ 室温, 1 時間
- ↓ PMSF (終濃度 1mM) 添加
- ↓ エタノール (終濃度 10%) 添加
- ↓ LMNG (終濃度 0.03%) 添加
- ↓ 37°C, 1 時間
- ↓ 密度勾配遠心 (0.003% LMNG)
- ↓ フラクシオン回収
- ↓ buffer 交換 (0.003% LMNG)
- ↓ 濃縮
- ↓ SDS-PAGE
- ↓ His タグなし Ia 添加
- ↓ 電子顕微鏡で撮影

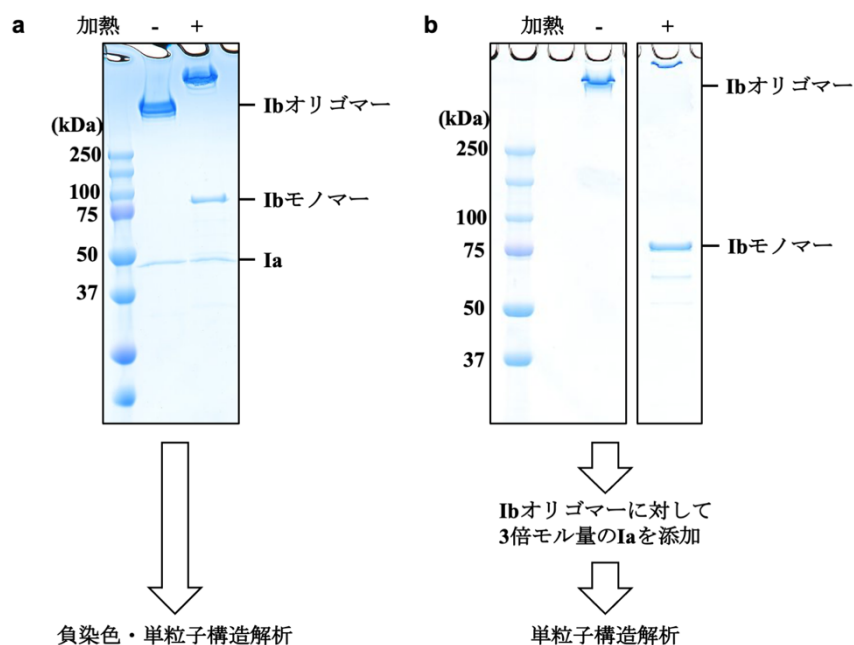


図 17. イオタ毒素の構造解析サンプルの調製

a 1 回目 **b** 2 回目 の電子顕微鏡サンプルの SDS-PAGE。 **b** 2 回目のサンプルでは Ib オリゴマーのみの調製後に Ia を添加したものを撮影に使用した。

2-4 電子顕微鏡を用いた構造解析

2-4-1 負染色観察・単粒子構造解析

負染色 (ネガティブステイン) によるサンプルの確認

サンプルの状態の確認のために、タンパク質に重元素によるコントラストをつけて電子顕微鏡で撮影 (負染色) を行なった。負染色はクライオ電子顕微鏡で行う必要がなく、小さなタンパク質でなければサンプルの概形もよくわかる。図 18 に示すのは 1 回目のサンプル 3 μl を、グリッド上で 3 μl の染色液と添加・乾燥を 3 度繰り返し、撮影した負染色像である。

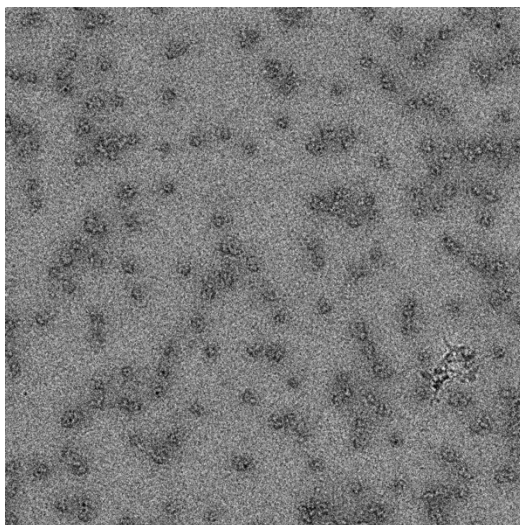


図 18. 1 回目に調製したサンプルの負染色像

酢酸ウランによって染色した精製サンプルを観察したもの。

負染色像の観察から, Ib オリゴマーがよく単分散していることが確認された。目立った凝集物もないことから電子顕微鏡サンプルとしては良好であると思われたため, クライオ電子顕微鏡に向けた凍結グリッドの作製を行うことにした。

クライオ電子顕微鏡での撮影にはサンプルが凍結したグリッドを使用することになるが、凍結グリッドと負染色で観察するグリッドではタンパク質のグリッド上での分布の仕方などが大きく異なる。そのため、クライオ電子顕微鏡を用いて本データの撮影に向けて、さらに数種類の条件からスクリーニングして最適な凍結グリッドを作成する必要がある。グリッドは Quantifoil R1.2/1.3 (Cu) を、凍結グリッドの作成には Vitrobot (FEI) を、スクリーニング用のクライオ電子顕微鏡による撮影は大阪大学蛋白質研究所)に設置されている Talos Arctica (FEI) を用いて行なった。

Vitrobotによる凍結ではグロー放電によって親水化されたグリッドにサンプルを乗せ、濾紙で余分な水分をグリッドから抜き取り、液体エタンで急速凍結する作業を行う。様々な要因によって出来上がるグリッドの質に差が生じるためスクリーニングが必要となる。グリッド上の氷が厚過ぎれば電子が十分に透過せず、氷が薄過ぎればタンパク質が気液界面に晒され構造が壊れてしまう。スクリーニングの結果 2.6 μ l のサンプルを 4.5 秒グリッド上で静置し、濾紙による吸水を行う方法が最適であることがわかった。

1 回目のサンプルには LMNG によるノイズが強く現れたため高いサンプル濃度での本データの撮影を行うことができなかった。そこで LMNG を含まない buffer (10 mM HEPES pH 7.5, 1 mM CaCl₂) で 5 倍希釈し撮影を行なうことにした (図 19)。

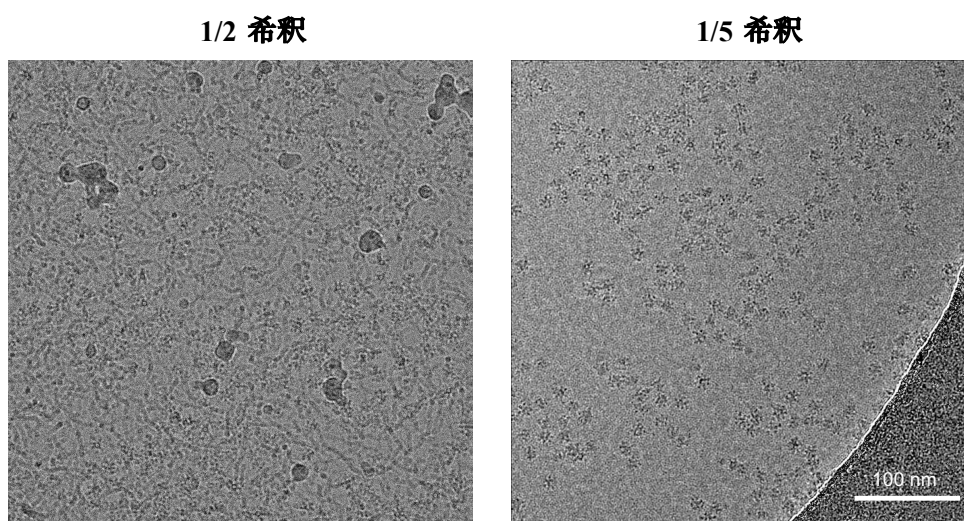


図 19. 凍結グリッドのスクリーニング

同じサンプルを LMNG が含まれない buffer で希釈して電子顕微鏡を用いて撮影した画像。1/2 倍希釈では強く現れていた LMNG 由来のノイズが 1/5 希釈では全く現れていない。

本データの撮影は 300kV のクライオ電子顕微鏡である、大阪大学蛋白質研究所に設置された Titan Krios (FEI) を用いて行なった。球面収差補正機 Cs コレクターを利用し、検出器は Falcon 3 を用いた。ピクセルサイズは 1.13 Å でフレーム撮影を行なった。さらに周波数成分を補完するために -0.8 μm から -2.5 μm のデフォーカスをつけた。この条件でそれぞれ 1 回目のサンプルで 2,120 個の視野の動画, 2 回目のサンプルでは 2,151 個の視野の動画を撮影した。一連の解析は全て単粒子構造解析ソフト RELION⁶⁴ を用いて行った。

1 回目のサンプルの単粒子構造解析

2,120 個の動画に粒子の MotionCor2 によるドリフト補正⁶⁵と Gctf による CTF 補正⁶⁶を行なった。ここから 299,491 個の粒子を抽出し, 2D classification と 3D classification を通して良質で均一な粒子画像セットを抽出した。Ib 膜孔は 1 つの軸に対して 7 回対称を持つことから C7 の平均計算を用いて精密化し, 構造を 2.9 Å の分解能で決定した (図 20a-d)。

さらに, このサンプルには Ia-Ib 膜孔複合体が含まれると考えられたので, 別途解析を行なった (図 20e-g)。複合体全体の中で Ia は小さく, そのシグナルがアライメントの比重に不十分な可能性があった。そこで Ia らしき密度が見えない Ib 膜孔のみのクラスを除外し再度 3D classification にかける作業を繰り返し行なった。その結果 1,735 粒子で Ia 様の密度が強く現れるマップが得られた。これをリファレンスに再度全粒子に対して 3D classification を行なった。Ib のβバレルの周りには非対称な密度が確認されたため, これをシグナル減算し再度三次元マップの計算をした結果, Ia-Ib 膜孔複合体のマップを 5.2 Å で得ることができた。

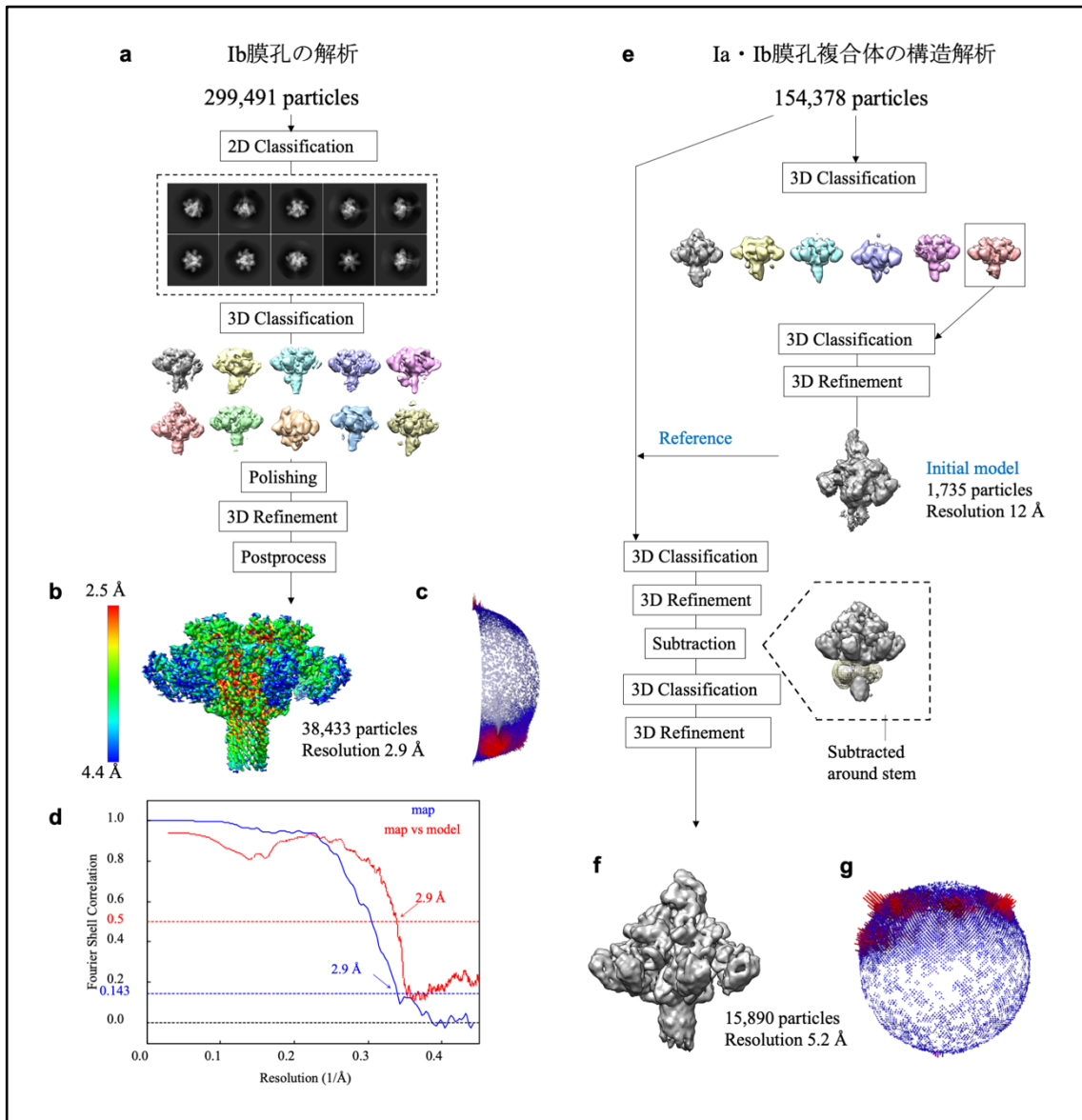


図 20.1 回目のサンプルの単粒子構造解析

1 回目のデータを用いた単粒子構造解析は、Ib 膜孔と Ia・Ib 膜孔複合体の解析を目的に、独立して二度行なった。**a** Ib 膜孔の解析のフローチャート。**b** 局所分解能による色付けをした Ib 膜孔の密度マップ。**c** Ib 膜孔の再構成に使用した粒子の投影角度のヒストグラム。**d** Ib 膜孔クラスの Half map 同士の FSC と、Ib 膜孔のマップ (Half map ではない) と原子モデルの FSC。**e** Ia・Ib 膜孔複合体の解析のフローチャート。**f** Ia・Ib 膜孔複合体の密度マップ。**g** Ia・Ib 膜孔複合体の再構成に使用した粒子の投影角度のヒストグラム

2 回目のサンプルの単粒子構造解析

2,151 個の動画に MotionCor2 によるドリフト補正⁶⁵と Gctf による CTF 補正⁶⁶を行い, ここから 871,264 個の粒子を抽出し, 2D classification と 3D classification を行なった。3D クラスの中には 1 回目の解析から得られたマップと同じ長さのβバレルが形成されたクラス (Short) と長いβバレルが形成されたクラス (Long) があったので, それぞれを精密化し Ia-Ib 膜孔複合体 Short は 2.8 Å で, Ia-Ib 膜孔複合体 Long は 2.9 Å の分解能のマップを得た (図 21)。

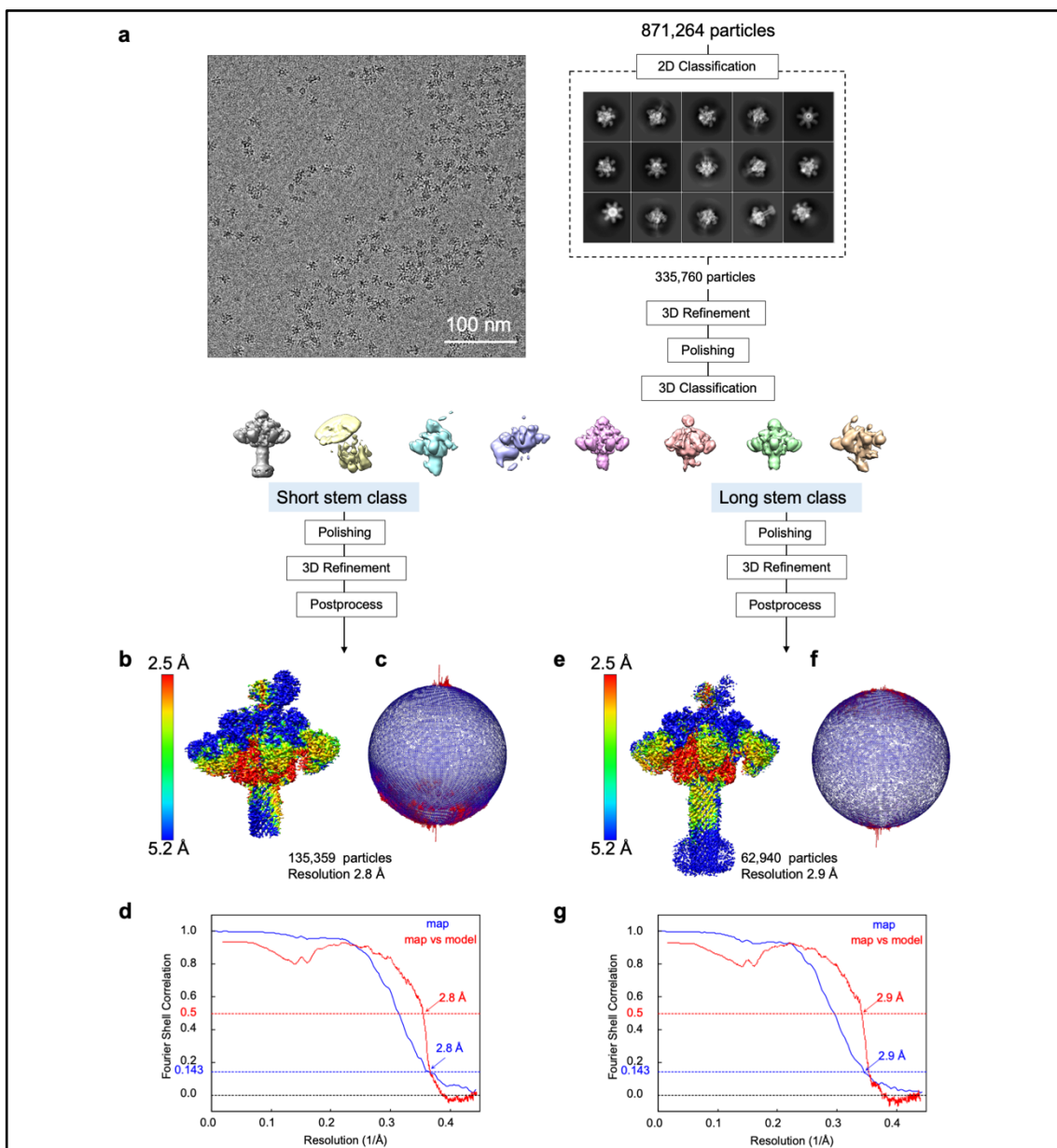


図 21.2 回目のサンプルの単粒子構造解析

a 単粒子解析のフローチャート。**b** 局所分解能による色付けをした Ia・Ib 膜孔複合体 (Short) の密度マップ。**c** Ia・Ib 膜孔複合体 (Short) の再構成に使用した粒子の投影角度のヒストグラム。**d** Ia・Ib 膜孔複合体 (Short) の Half map 同士の FSC と、マップ (Half map ではない) と原子モデルの FSC。**e** 局所分解能による色付けをした Ia・Ib 膜孔複合体 (Long) の密度マップ。**f** Ia・Ib 膜孔複合体 (Long) の再構成に使用した粒子の投影角度のヒストグラム。**g** Ia・Ib 膜孔複合体 (Long) クラスの Half map 同士の FSC と、マップと原子モデルの FSC。

	Ib 膜孔	Ia · Ib 膜孔 (Short)	Ia · Ib 膜孔 (Long)
EMDB ID	EMDB-0721	EMDB-0713	EMDB-0720
PDB ID	6KLX	6KLO	6KLW
Data collection and processing			
Magnification	59,000		
Voltage (kV)	300		
Electron exposure (e ⁻ /Å ²)	50		
Defocus range (μm)	-0.8 to -2.5		
Pixel size (Å)	0.88		
Symmetry imposed	C7	C1	C1
Initial particle images (no.)	299,491	871,264	871,264
Final particle images (no.)	38,433	135,359	62,940
Map resolution (Å)	2.9	2.8	2.9
FSC threshold	0.143	0.143	0.143
Map sharpening <i>B</i> factor (Å ²)	-46	-10	-29
Refinement			
Model resolution (Å)	2.9	2.8	2.9
FSC threshold	0.5	0.5	0.5
Model composition			
Non-hydrogen atoms	20,025	23,275	25,179
Protein residues	2,576	2,972	3,238
Ligands	14	14	14
<i>B</i> factors (Å²)			
Protein	49.67	57.47	51.02
Ligand	40.87	37.59	27.50
R.m.s deviations			
Bond lengths (Å)	0.008	0.005	0.005
Bond angles (Å)	0.686	0.591	0.653
Validation			
MolProbity score	1.83	1.72	1.80
Clashscore	7.01	5.93	6.84
Poor rotamers (%)	0.00	0.00	0.00
Ramachandran plot			
Favored (%)	93.21	94.05	93.51
Allowed (%)	6.79	5.95	6.49
Disallowed (%)	0.00	0.00	0.00

表 5. イオタ毒素構造の validation table

2回の異なるサンプルの測定から得られたデータの解析によって、合計3つのクラスのマッピングを得ることができた (図 22)。1回目の測定データからは 38,433 粒子からの 2.9 Å分解能で Ib 膜孔の密度マップを、2回目の測定データからはそれぞれ 135,359 粒子からの 2.8 Å分解能、及び 25,179 粒子から 2.9 Åの分解能で2つの Ia・Ib 膜孔複合体の構造を明らかにすることができた。クライオ電子顕微鏡によって得られた密度マップの分解能の定義は、二つに分けられたそれぞれの粒子セットを用いて再構成された Half map 同士の相関が 0.143 まで落ちた時の空間周波数の逆数をとった値 (FSC=0.143) を採用している。

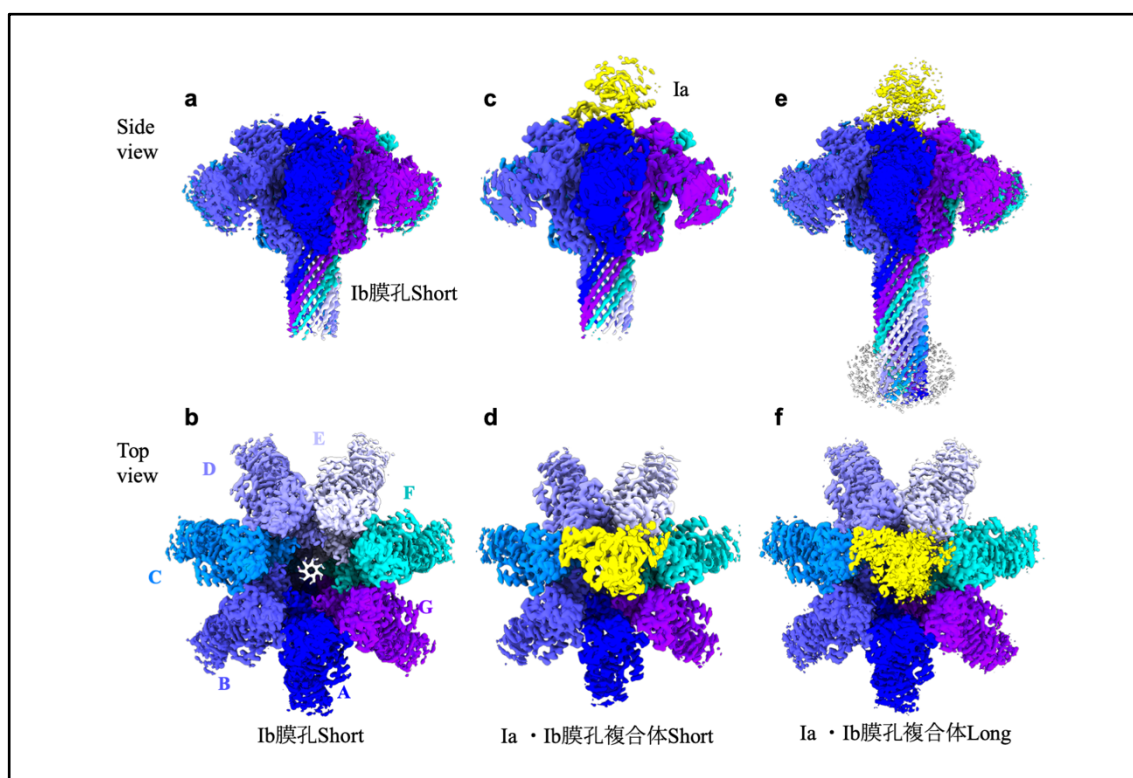


図 22. 単粒子構造解析によって得られたイオタ毒素の密度マップ

各マップの Ib 膜孔はプロトマー毎に色付けを行なった。Ia は黄色で色付けをした。a,b Ib 膜孔の密度マップ。c,d Ia・Ib 膜孔複合体 (Short) の密度マップ。e,f Ia・Ib 膜孔複合体 (Short) の密度マップ。

すでに構造が明らかにされている PA 膜孔 (PDB: 3J9C) と結晶構造の Ia (PDB: 1GIQ) をもとに UCSF Chimera⁶⁷ によるモデルフィッティング、構造解析ソフト COOT⁶⁸ と PHENIX⁶⁹ を用いて Ib 膜孔と Ia-Ib 膜孔複合体のマップに対応するモデルの構造精密化を行なった。

2-4-2 Ib 膜孔の全体構造

エタノールによる誘導によって得られた Ib オリゴマーは7量体であり、可溶性のプレ膜孔ではなく、膜貫通型の膜孔であることが明らかになった。いずれも Ib 膜孔は酵素成分の透過経路と思われる膜孔の内側に複数の狭窄部位を持つことがわかった (図 23a)。1つ目の狭窄部位は Ca^{2+} が二つ結合することで構造安定化する Ca-edge (直径 45 Å) である (図 23b)。この構造は D1' に存在しており、プロテアーゼによって Pro 配列が切断された配列の直後のカルシウムイオン結合モチーフによって形成されていた。2つ目の狭窄部位は NSQ の3残基が膜孔の内側に飛び出した NSQ-loop (直径 23 Å) である (図 23c)。そして3つ目の狭窄部位は7つのプロトマーからそれぞれ中央に向かってフェニルアラニン (F454) が供給されて形成される ϕ -clamp (直径 6 Å) である (図 23d)。 ϕ -clamp 周辺の残基は他の二成分毒素においても保存されており、2015年に報告された PA 膜孔における構造と一致したことから (図 6b)、炭疽菌毒素に限らずクロストリジウム二成分毒素においても保存された構造であることが明らかになった。

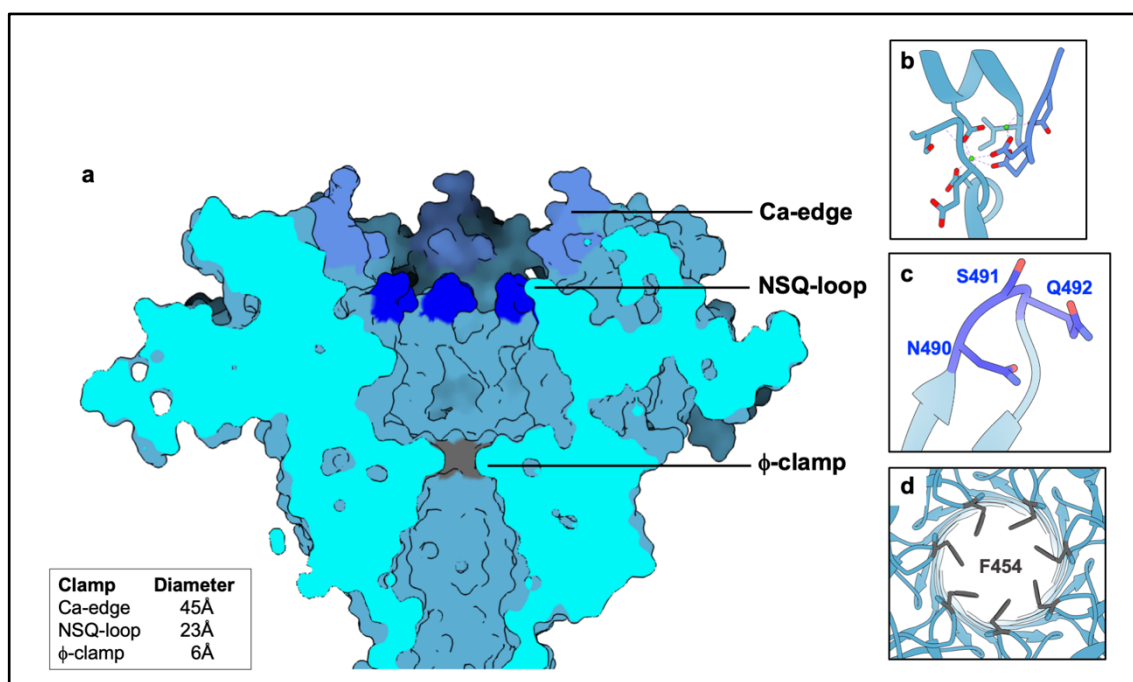


図 23. Ib 膜孔の狭窄部位の構造

a Ib 膜孔の表面モデルの断面図。狭窄部位である Ca-edge (群青色), NSQ-loop (青色), ϕ -clamp (グレー) にそれぞれ色分けを行なった。b Ca-edge の構造。c NSQ-loop の構造。d ϕ -clamp の構造。

2-4-3 Ia・Ib 膜孔複合体の全体構造

2回目のデータ測定結果から得られた Ia・Ib 膜孔体からは Ib 膜孔の β バレルが短い (Short) もの、また β バレルが長い (Long) に結合した、2つの Ia・Ib 膜孔複合体の構造を明らかにすることができた (図 24b,c)。酵素成分が膜孔に結合した高分解能構造は、2019 年当時では炭疽菌毒素においても報告がなかったため、初の酵素成分・膜孔複合体構造となった。Ia は N 末端ドメインを介して Ib 膜孔の Ca-edge に結合しており (図 24d-j), ADP リボシル化の活性を有する C 末端ドメインは膜孔との結合には関与していなかった。Ia の最も N 末端に存在する二次構造である α ヘリックス (以下 $\alpha 1$ とする) は Ib 膜孔の NSQ-loop に位置していた。

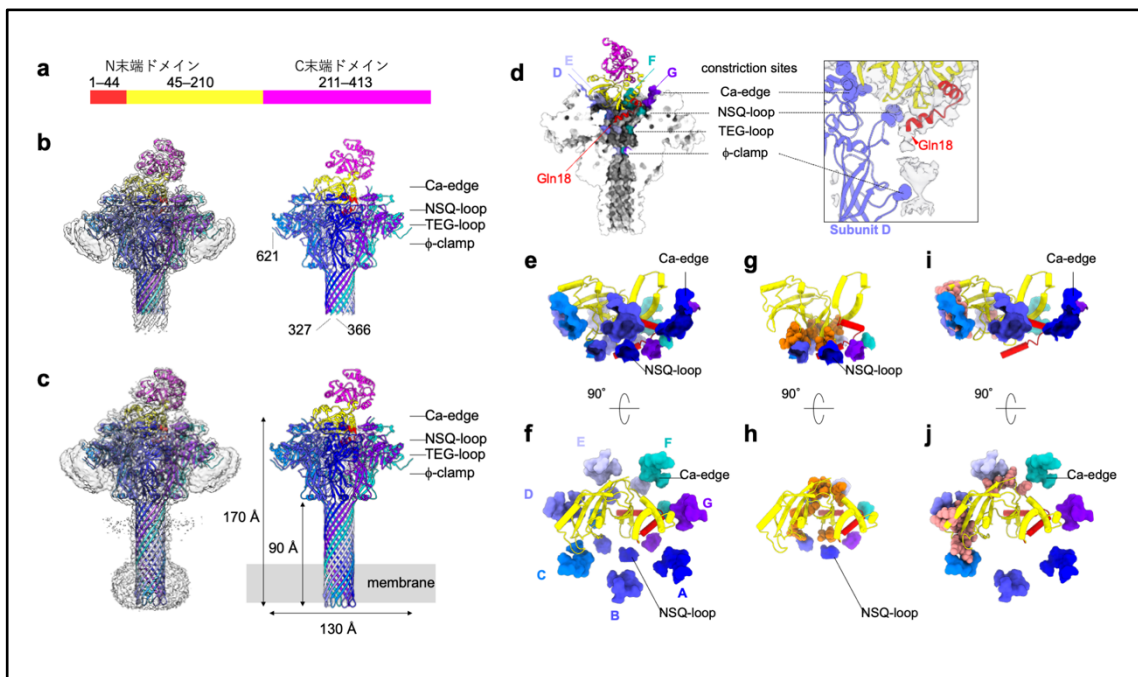


図 24. Ia・Ib 膜孔複合体の構造

Ib 膜孔の原子モデルはプロトマー毎に、Ia はドメイン毎に色付けを行なった。a Ia のドメイン構造。b,c Ia・Ib 膜孔複合体の密度マップと原子モデル。d Ia・Ib 膜孔複合体の表面モデルの断面図。Ib 膜孔の原子モデル周囲 3 Å を減算した密度マップ。e,f Ia の N 末端ドメインと Ca-edge, NSQ-loop の相互作用。g,h Ia の N 末端ドメインと NSQ-loop の相互作用。i,j Ia の N 末端ドメインと Ca-edge の相互作用。

2-4-4 Ia N 末端におけるアンフォールディング

Ib 膜孔の NSQ-loop は Ia 非結合の状態では 7 回対称性を保っている状態にある (図 25a)。一方で Ia が結合した複合体においては, 7 つのうち 2 つのプロトマー (サブユニット E と F) において NSQ-loop が膜孔の外側に向かって押し出されたような構造に変化している様子が見られた (図 25b)。その中でも膜孔の外側に押し出されたサブユニット F の NSQ-loop は $\alpha 1$ と水素結合を形成していた。

本件研究で得られた Ia・Ib 膜孔複合体をリファレンスとして, 既に構造が報告されていた単体の結晶構造 Ia を Ib 膜孔に並べたところ, $\alpha 1$ は Ib 膜孔の ϕ -clamp に向かって傾斜していることがわかった。さらに複合体の密度マップの観察から, アポ状態の $\alpha 1$ に比べて, 複合体中における $\alpha 1$ は短くなっていることがわかった (図 25c,d)。複合体においてもアポ状態と同じ長い $\alpha 1$ を維持していた場合, $\alpha 1$ の N 末端側がまたサブユニット C の NSQ-loop に衝突してしまう。また, 短くなった $\alpha 1$ に続く密度が ϕ -clamp に向かって続いていく様子も確認できた (図 26)。

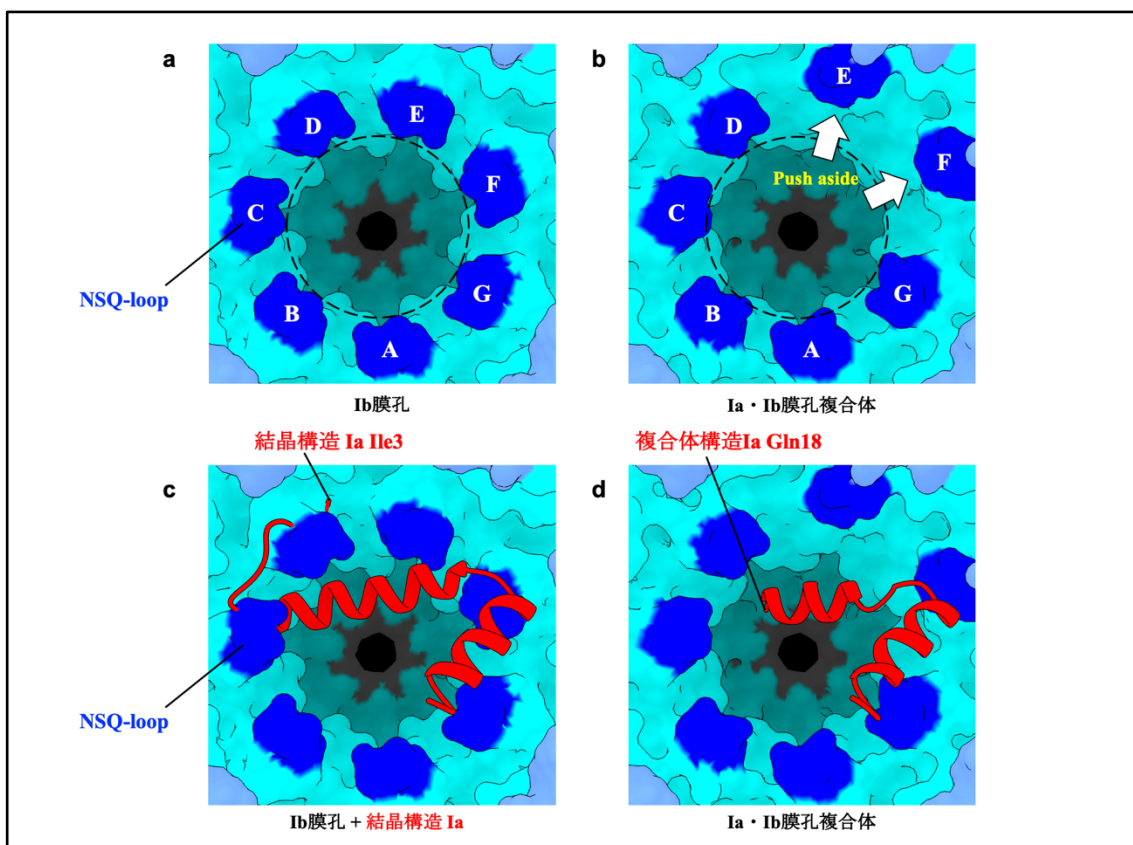


図 25. NSQ-loop における Ia の N 末端のアンフォールディング

NSQ-loop を青色, ϕ -clamp をグレーにそれぞれ色付けした。a Ib 膜孔の表面モデル。b Ia 結合型の Ib 膜孔。c Ib 膜孔の表面モデルと単体結晶構造の Ia のリボンモデル。Ia は複合体 Ia をリファレンスに構造アライメントして位置を揃えた。d Ia・Ib 膜孔複合体中の Ib 膜孔 (表面モデル) と Ia (リボンモデル)。

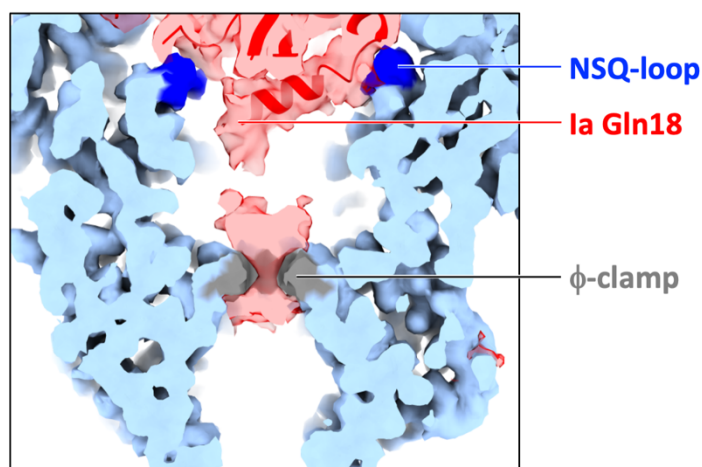


図 26. ϕ -clamp に続く Ia の密度

Ia·Ib 膜孔複合体の密度マップのうち, Ib 膜孔のモデルの中心から 2.5 Å を切り出した密度マップ (水色) と, マップ全体から水色の密度を減算した Ia の密度 (赤半透明) を表示した。Ib 膜孔に相当する密度のうち, NSQ-loop を青色, ϕ -clamp をグレーに色付けした。モデルを組むことができた Ia の N 末端の先の密度が ϕ -clamp に向かって続く様子が見られる。

2-5 考察

Ib は N 末端に位置する Pro 配列を切断することによってオリゴマーの形成が促進されると考えられているが⁹, 試験管内における実験ではこの通りにはならなかった。私は適切なオリゴマー条件の探索からエタノールがオリゴマーの形成を促進することを明らかにした (図 13a)。エタノールを過剰に加えずとも形成された少量のオリゴマーを精製後, 加熱 SDS-PAGE するとモノマーのバンドが 2 つ確認された (図 14a,b)。しかしながらこのうち小さな方のバンドはオリゴマーのみを精製する前は極めて少量であるにも関わらず, オリゴマーの中には期待通りのサイズのモノマーと 1:1 程度の割合で取り込まれていた。このことから, 過剰な分解を受けたモノマーは積極的にオリゴマーを形成することが示唆された。またこの 2 つのバンドの推定される分子量の差はおおよそ C 末端の受容体結合ドメイン D4II に相当する差であると考えられた。そこで D4II を欠失した変異体ではエタノールを加えずとも, オリゴマー形成が有利に進むことがわかった (図 14c)。このことから D4II はモノマー Ib において, オリゴマーを形成する上で立体的障害となる位置に存在している可能性が示唆された。これを欠失した Ib では潤滑にオリゴマー形成が進むように, エタノールを添加した条件ではエタノールによる部分的な変性によって D4II が移動し, オリゴマーの形成を可能にしたのではないかと考察する。このサンプルを用いての構造解析はまだ行なっていないが, エタノールを加えて調製したものよりも自然な条件で調製してることが可能であると期待される。

本研究からクロストリジウム属二成分毒素では報告例のなかった、膜孔の構造をクライオ電子顕微鏡による構造解析から明らかにすることができた (図 22a,b)。Ib 膜孔の全体構造は炭疽菌毒素 PA 膜孔と非常に似た構造を有しており、酵素成分の透過経路上に存在する最狭窄部位である ϕ -clamp に関しても同様の構造を持つことがわかった (図 23)。Ib 膜孔の受容体結合ドメインのサブドメインである D4II は密度マップを観察することができなかったことから、柔軟性をもつ領域であることが示唆された。

Ib 膜孔には β バレルの長さが異なる 2 つの構造が得られた。それぞれ β バレルが短く見えているものを Short, 長いものを Long と名付けた (図 22c-f)。Short のクラスにおいては膜貫通部位を含む領域が密度マップ上で確認が不可能であり、決まった構造をとっていないと考えられる。一方で Long のクラスにおいては膜貫通部位に至るまで密度が完全に確認することができた。Ib 膜孔と同じく β PFT であるヘモリシンにおいても、このような不完全な β バレルを組んだ状態 (膜貫通部位が未形成), と完全長の β バレルが組み立てられた状態の構造が報告されていることから⁷⁰, このような 2 段階の β バレル形成は β -PFT 間で保存された機構である可能性がある。これまで二成分毒素の膜結合成分は、可溶性モノマー→プレ膜孔→膜孔の順で構造変化すると考えられてきたが、本研究の結果よりプレ膜孔と膜孔の間には準安定的な膜孔 (Short) の状態が存在することが示唆された (図 27)。

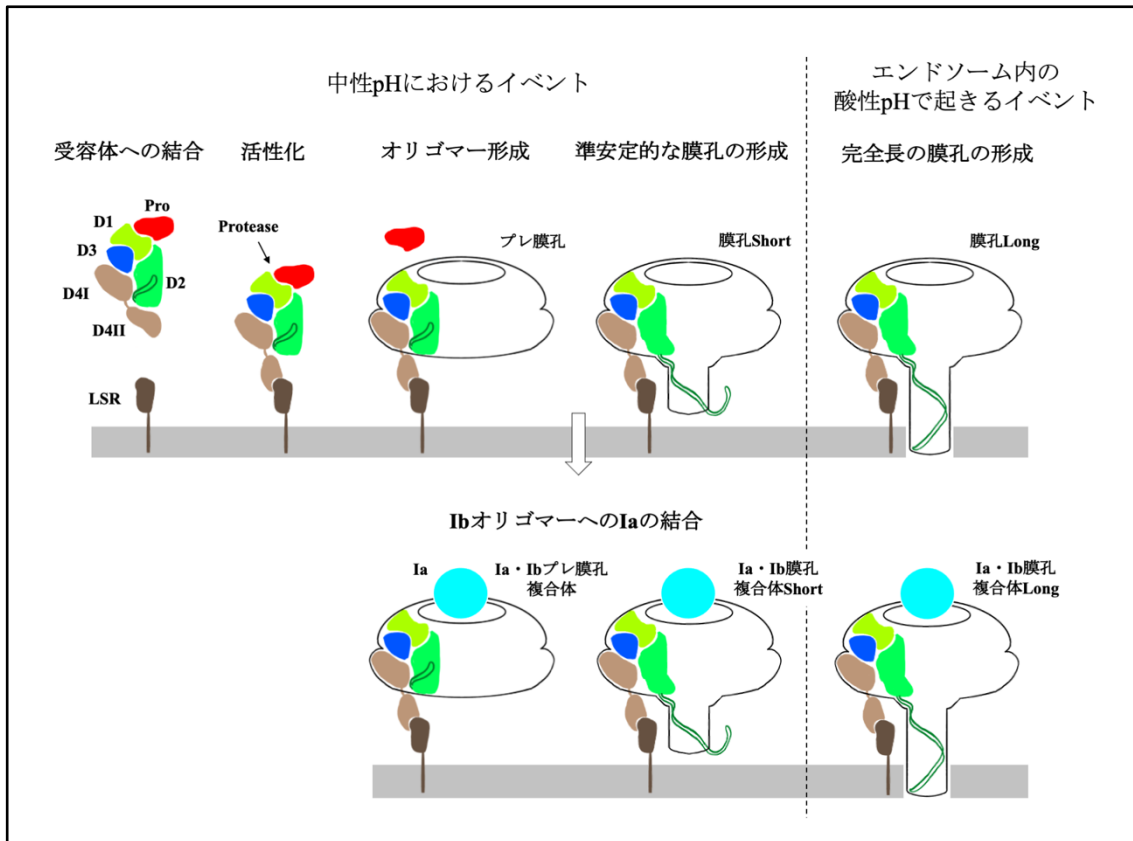


図 27. 新たに提唱する Ib 膜孔の形成機構

Ib 膜孔はドメイン毎に色分けを行なった。受容体に結合した活性型 Ib 膜孔は可溶性プレ膜孔を形成した後, Ib 膜孔 (Short) の準安定的な状態を介して Ib 膜孔 (Long) に構造変化する。

Ia・Ib 膜孔複合体の構造から、1つの Ib 膜孔に対して1つの Ia が膜孔の中央に鎮座する形で結合することがわかった (図 24)。Ia は N 末端が結合ドメイン、C 末端が酵素活性ドメインであることが報告されていたが、実際に明らかにした複合体構造においても N 末端ドメインが Ib 膜孔に結合していた。Ia は特に Ib 膜孔の D1' に存在する構造である Ca-edge に結合することがわかった (図 24i,j)。Ca-edge はカルシウムイオン結合モチーフを有する領域で、密度マップにおいて2つのカルシウムイオンが Ca-edge の構造安定化に寄与している様子を確認できた。これは Ia と Ib の相互作用がカルシウムイオン依存的であるという報告に一致する³³。

また Ia の N 末端の α ヘリックス ($\alpha 1$) は Ca-edge よりも透過経路下流に存在する狭窄部位 NSQ-loop に位置することがわかった (図 25)。NSQ-loop は Ia 非結合の Ib 膜孔では7回対称性を持つと考えられるが、複合体においては Ia の結合によって2つのプロトマー (サブユニット E と F) において膜孔の外側に押し出された構造をとる (図 25a,b)。サブユニット F は $\alpha 1$ と水素結合を形成している一方、サブユニット E は Ia との目立った相互作用が見られず、なぜ構造変化したのか不明である。単体 Ia の結晶構造との比較から、 $\alpha 1$ は NSQ-loop における立体的な障害によってアンフォールドを受け、 ϕ -clamp に向かって傾斜することが明らかになった。以上のことから、複合体形成によって Ia は N 末端の構造が失われ、直径がわずか 6Å の ϕ -clamp をも通過可能になることが示唆された (図 28)。

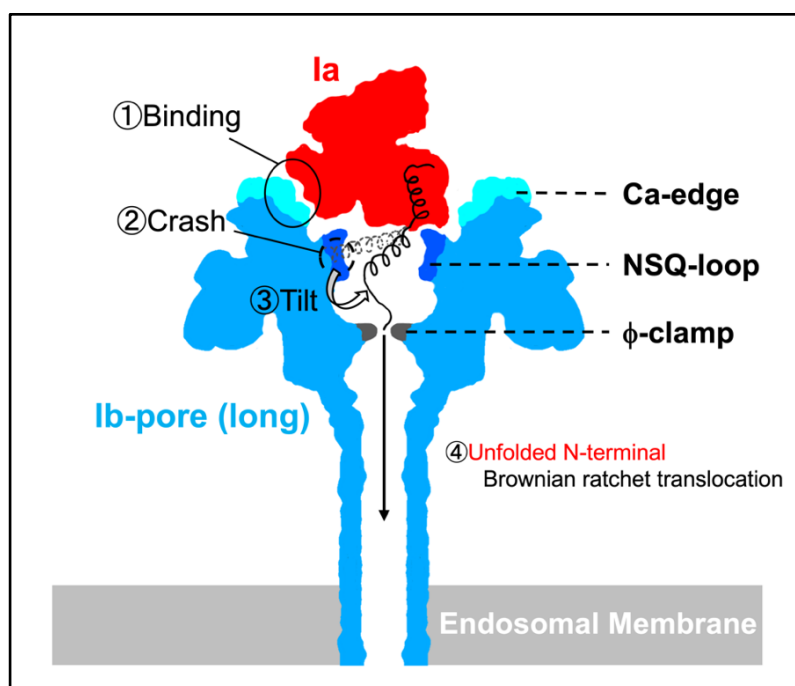


図 28. イオタ毒素の複合体形成とアンフォールド

明らかにしたイオタ毒素の複合体の構造から明らかになった知見 (①-③) と、現段階では予想である④ Unfolded chain translocation を合わせた新規の膜透過機構。立体的な障害によってアンフォールドした Ia の N 末端が ϕ -clamp を通過後に構造を取り戻して逆行を阻止する予想している。

第3章 デフィシル菌 CDT 毒素の構造解析

3-1 概要

デフィシル菌 (*Clostridioides difficile*) が産生する二成分毒素 CDT¹⁶ (*Clostridioides difficile* transferase) の酵素成分 CDTa と膜結合成分 CDTb を、それぞれ形質転換体大腸菌を用いて発現及び、精製を行なった。CDTb 膜孔はプロトキシンのモノマーとして得られたため、これをプロテアーゼによって活性化し、37°Cでのインキュベーションによって膜孔の形成を誘導した。CDTb は7量体の膜孔 (あるいはプレ膜孔) が互いに向き合った、14量体の膜孔ダイマー (以下、14量体と表記する) を形成することが構造とともに報告されていた^{71,72}。しかしながら14量体の状態となった CDTb においては、互いの膜孔の膜貫通部位を隠しあってしまうため、膜孔形成毒素として働くには不利な状態であり、人工的な高濃度条件によって形成された14量体であると考えられた。私は膜孔が14量体化する原因は CDTb の D4II に F774 の残基同士の相互作用であると考え、変異体を作製したところ F774 の変異体では14量体形成の効率が低下することを明らかにした⁷³。

次にイオタ毒素 Ib 膜孔とほぼ同一な調製手法を用いて野生型の CDTb 膜孔を調製し、これにモル比3倍量の CDTa を加えてクライオ電子顕微鏡による撮影と、単粒子構造解析を行った。単粒子構造解析から CDTb 膜孔14量体に CDTa が結合した複合体と、14量体化していない CDTb 膜孔に CDTa が結合した複合体の構造をそれぞれ高分解能で明らかにすることができた^{73,74}。後者では D4II が明瞭に見られたクラス (Long) と、D4II の密度が見えないクラス (Short) について、それぞれマップを得ることができた。CDT 毒素はイオタ毒素と同じ全体構造の複合体を形成することがわかった。密度マップの観察から CDTb 膜孔中の狭窄部位のひとつである NSS-loop は膜孔の内側と外側に向いた、‘in’ と ‘out’ の二状態をとることが明らかになった。また CDTa の結合によって、いくつかのプロトマーでは NSS-loop が ‘out’ に状態に偏ることがわかった。さらにイオタ毒素と同様に、CDTa の N 末端ヘリックスは CDTb 膜孔中でアンフォールドされており、 ϕ -clamp に向かって傾斜していることがわかった。さらに、CDTa・CDTb 膜孔複合体 (Short) を 3D variability analysis⁷⁵ によってクラス分けを行なったところ、CDTa の N 末端のヘリックスが複合体中でアンフォールドしたクラス (Unfolded CDTa) だけではなく、フォールディングされたクラス (Folded CDTa) を得ることができた。Folded CDTa では発現に用いた1番目の残基まで密度マップを確認でき、N 末端の配列がサブユニット D の NSS-loop を押し出して ‘out’ の状態に偏らせることがわかった。一方で Unfolded のクラスでは N 末端はアンフォールドされて ϕ -clamp 側に傾斜しており、NSS-loop は ‘out’ の状態に偏っていた。

これらのことから CDTa は CDTb 膜孔との形成時点では N 末端の構造が維持されており、その後アンフォールディングが起きることが示された。また NSS-loop はその場に居合わせた CDTa の構造に対応するかのようになり、‘in’ と ‘out’ の二状態をとることが新たに明らかになった。

3-2 背景

デフィシル菌はヒトの院内感染症の主要な病原菌であり、アメリカでは年間500,000件の診断が行われ、約12,800件もの死亡事例がある⁷⁶。デフィシル菌はRhoをグリコシル化する毒素TcdA, TcdBを産生し、標的である腸管上皮細胞の細胞骨格形成に障害を与える⁷⁷。さらに強毒性株は第3の毒素として、二成分毒素CDTを産生する。CDTは細胞骨格を形成するアクチンを脱重合し、標的細胞からの微小管の形成・突出を引き起こし細菌の接着面となる足場を生じる⁷⁸。CDTは酵素成分CDTaと膜結合成分CDTbからなる毒素であり、前章のウェルシュ菌イオタ毒素と同様にクロストリジウム二成分毒素に分類される(表1)。イオタ毒素と同様に細胞への侵入機構は詳細にわかっていない。

私のイオタ毒素の構造報告から数ヶ月のうちに異なる2つの研究チームからCDTbの構造がそれぞれ報告された^{71,72}。イオタ毒素Ibは7量体の膜孔を形成することが明らかになったが、これらのCDTbの構造は7量体の膜孔あるいはプレ膜孔同士が受容体結合ドメインを介してお互いに面しあって結合した7量体同士が会合した14量体となった状態であった(図29)。14量体となると互いの膜貫通部位に相当する領域が分子内に隠されてしまい、膜孔形成毒素として働くには不利な状態であるため、これは人工的な高濃度の条件によって生じたアーティファクトである可能性がある。一方でこれに受容体であるLSRを加えた条件下で調製したサンプルは14量体を形成しないことが明らかにされており、CDTaを加えた構造とともに報告されている⁷⁹。しかしながら、この複合体におけるCDTbはβバレルとD4の密度が確認されておらず、膜孔に結合した複合体の構造は明らかにされてこなかった。

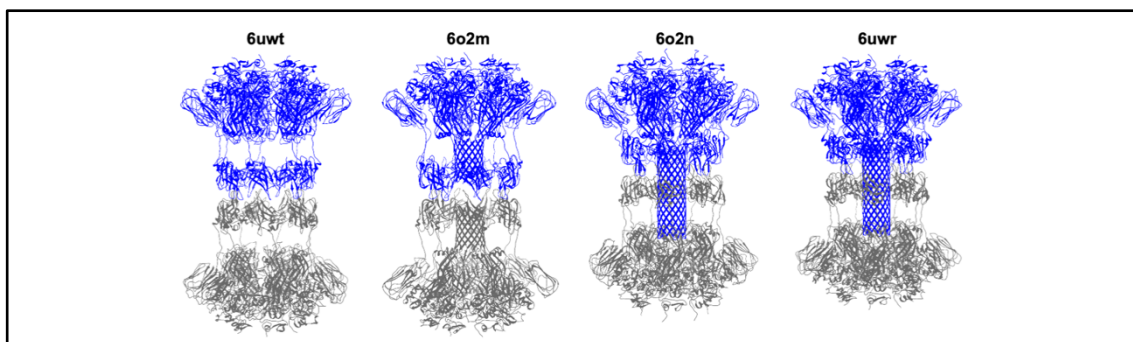


図 29. 報告された CDTb 膜孔の構造

各モデルの上部にPDBIDを記載した。報告された構造では7量体のCDTbオリゴマー同士が結合した14量体構造をとっていた。図中では一方の7量体を青色、もう一方の7量体をグレーで色付けした。

私はイオタ毒素と同様に調製を行えば、CDTb膜孔に結合した複合体構造が明らかにできるかもしれないと考え、イオタ毒素と同じプロトコルでサンプル調製を行い⁶³、クライオ電子顕微鏡による構造解析を行った。

3-3 サンプルの調製

3-3-1 酵素成分 CDTa の発現及び精製

CDTa をクローニングしたプラスミドによって形質転換された大腸菌は, Ia と同様に培養を行なっても菌体量が増えなかったため, グルコースによるカタボライト抑制を行なって培養を行なった。CDTa 発現抑制下で増殖した菌体液をグルコースフリーな培地に移し, IPTG による発現誘導から十分量の CDTa を発現した菌体を得た。

培養及び発現誘導

CDTa の遺伝子 (Uniplot ID: Q9KH42, シグナルペプチドを除く) は pET-23a (C 末端 6His タグ) に挿入され, 過剰発現は *E. coli* C41 株を用いて行わせた (図 30)。この形質転換体を ampicillin (50 ng/μl), 2% (w/v) グルコースを含む LB 培地 (表 6) 150 ml を用いて 16 時間, 37°C で培養し, この培養液を ampicillin (50 ng/μl) を含む 1.35 L の新鮮な LB 培地に添加した。IPTG を終濃度で 0.5 mM になるように加え, さらに 23°C, 5 時間培養後, 遠心にかけて培地を取り除き, 菌体を回収した。

C 末 His タグ CDTa

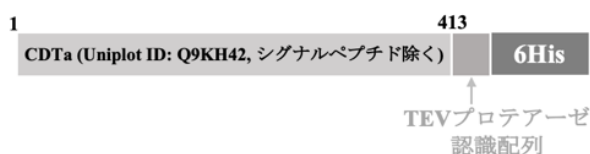


図 30. 発現した CDTa のコンストラクトマップ

Super Broth 培地

Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCL	10 g
Volume	1 L

表 6. LB 培地組成

精製手順

CDTa を発現した大腸菌をそれぞれ buffer A に再懸し, CDTa の予期せぬ分解を回避するためにプロテアーゼ阻害剤カクテルである cOmplete ULTRA Tablets (Roche) を 1 錠添加した (表 7)。この菌体懸濁液を氷水上でソニケーションし, 超遠心 (180,000×g, 40min) にかけて可溶性画分と不溶性画分に分離した。上清を Ni-NTA 担体に結合させ, 担体に結合したタンパク質を担体の 10 倍量の buffer A で洗浄し, さらに担体体積の 3 倍量の buffer B で溶出した。この溶出画分を Amicon 30K で濃縮及び buffer C に buffer 交換を行なったのち, タンパク質全体量に対して 1/10 量の TEV プロテアーゼを加えて 1 時間, 37°C でインキュベーションを行い, His タグを切断した。PMSF (終濃度 1mM) の添加によってプロテアーゼ活性を阻害し, buffer D を用いて Superdex 75 10/300 GL カラムでゲル濾過による精製を行なった。精製産物は Amicon 30K で濃縮をし, SDS-PAGE による精製度の確認後, 液体窒素による凍結を行い-80°C で保存を行なった (図 31)。

大腸菌菌体
 ↓再懸濁 buffer A
 ↓cOmplete 1 錠添加
 ↓ソニケーション
 ↓超遠心 4°C, 180,000×g, 40min
 ↓上清を Ni-NTA 担体 3ml に添加
 ↓低温室, 1 時間
 ↓buffer A で wash CV×15 回
 ↓buffer B で elution 1ml×15 回
 ↓Amicon 30K buffer 交換 (B→C)
 ↓TEV プロテアーゼ処理 37°C, 1 時間
 ↓ゲル濾過 (buffer D) Superdex 75 10/300 GL カラム
 ↓Amicon 50K 濃縮
 ↓濃縮
 ↓SDS-PAGE
 凍結保存

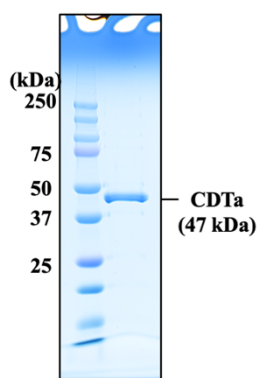


図 31. 精製した CDTa の電気泳動

His タグを用いて精製後、TEV プロテアーゼによってタグを切断した CDTa の SDS-PAGE。

buffer A: 20 mM Tris pH 8.0, 20 mM Imidazole

buffer B: 20 mM Tris pH 8.0, 500 mM Imidazole

buffer C: 50 mM Tris pH 8.0, 300 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂

buffer D: 10 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl

表 7. CDTa 精製に用いた buffer の組成

3-3-2 膜結合成分 CDTb の発現及び精製

CDTb は前章の Ib と同様, N 末端に Pro 配列が付いたプロトキシモノマーとして調製した。また比較的大きなタンパク質であることから, 可溶性を高める目的で精製タグとして GST タグを選択した。

培養及び発現誘導

CDTb の遺伝子 (Uniplot ID: o32739, シグナルペプチドを除く) を pGEX4T-1 (N 末端 GST タグ) に挿入し, 過剰発現は *E. coli* BL21 (DE3) 株を用いて行われた (図 32)。この形質転換体を ampicillin (50 ng/μl) を含む LB 培地を用いて 37°C で OD=0.7 となるまで培養した。IPTG を終濃度で 0.5 mM になるように加え, さらに 23°C, 16 時間培養後, 遠心にかけて培地を取り除き, 菌体を回収した。

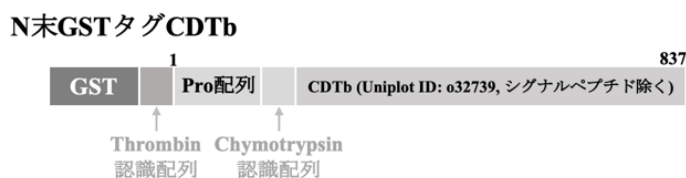


図 32. 発現した CDTb のコンストラクトマップ

精製手順

培地を取り除かれた GST-Pro-CDTb を発現した菌体を buffer E に再懸濁し, 予期せぬ分解を回避するためにプロテアーゼ阻害剤カクテルである cOmplete ULTRA Tablets (Roche) を 1 錠添加した (表 8)。この菌体懸濁液を氷水上でソニケーションによって破碎処理し, 超遠心 (180,000 × g, 40min) にかけて可溶性画分と不溶性画分に分離した。上清を Glutathione Sepharose 4B resin (GE Healthcare) に結合させ, 担体に結合したタンパク質を担体の 15 倍量の buffer E で洗浄した。その後, 担体の 3 倍量の buffer F で溶出したタンパク質溶液に対して Amicon 50K を用いて buffer G への buffer 交換, および濃縮を行なった。サンプルの精製度は SDS-PAGE で確認した。濃縮したサンプルは SDS-PAGE による精製度の確認後, 液体窒素によって急速凍結して -80°C で冷凍保存した (図 33)。

大腸菌菌体

↓再懸濁 buffer E

↓cOmplete 1 錠添加

↓ソニケーション

↓超遠心 4°C, 180,000×g, 40min

↓上清を GS 担体 3ml に添加

↓低温室, 1 時間

↓buffer E で wash 3ml×15 回

↓buffer F で elution 1ml×15 回

↓Amicon 50K buffer 交換 (F→G), 濃縮

↓SDS-PAGE

凍結保存

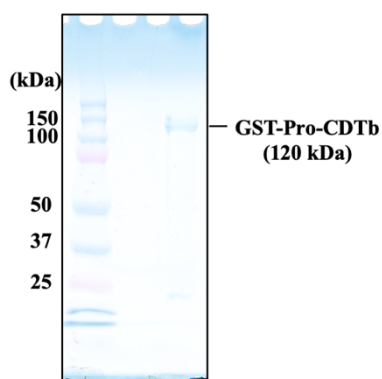


図 33. 精製した CDTb の電気泳動

GST タグを用いて精製した CDTb (GST-Pro-CDTb) の SDS-PAGE。

buffer E: 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5mM dithiothreitol

buffer F: 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM reduced glutathione

buffer G: 20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂

表 8. CDTb 精製に用いた buffer の組成

3-3-3 一残基変異による 14 量体形成の抑制

構造が報告された CDTb 膜孔 14 量体はいずれも、互いの 7 つのプロトマーの受容体結合ドメイン D4II 同士を介して形成される。14 量体中ではお互いの膜貫通領域を分子内に隠しあってしまうため生理的な状態とは考えにくい。14 量体化していない膜孔の構造は明らかにされてこなかった。私は D4II の中でも F774 の残基に注目し、変異体を作成して 14 量体形成効率に変化があるかを調べることにした。イオタ毒素 Ib においては F774 の残基は Leu に置換されているため F774L の変異体、さらに F774G の変異体を作製した。

CDTb 膜孔はイオタ毒素と同様に、プロテアーゼ処理によって Pro 配列を切断した後の 37°C のインキュベーションによって得られる。同研究室の卒業生はオリゴマー化処理を行なった CDTb サンプルで Native PAGE を行い、7 量体と 14 量体のバンドを確認しようと試みたが、明瞭な結果を得ることはできなかった。次に私はグルタルアルデヒドによる架橋を施した上で SDS-PAGE を行ってみたが、14 量体のバンドを確認することはできなかった。そこで電気泳動による判断は諦め、密度勾配遠心後のサンプルの沈降具合で評価することにした。

Chymotrypsin 処理によって活性化された CDTb (WT, F774L, F774G) をそれぞれ、1 時間、37°Cでインキュベーションした。これをグリセロール密度勾配 (10%–30% グリセロール, 50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.003% LMNG) に添加し、超遠心 (230,139×g, 16 時間) を行なった。遠心後の遠心チューブ底に針で穴を開け、250 μl ずつ分画を行い、各フラクションの 280 nm における吸光度を測定しフラクション番号とともにプロットした (図 34a)。

WT においては 15 番と 23 番付近にそれぞれ大小のピーク (14 量体と 7 量体) が確認されたが、F774L では 14 量体のピークが減少し、F774G においては 14 量体のピークは確認されなかった (図 34c–e)。

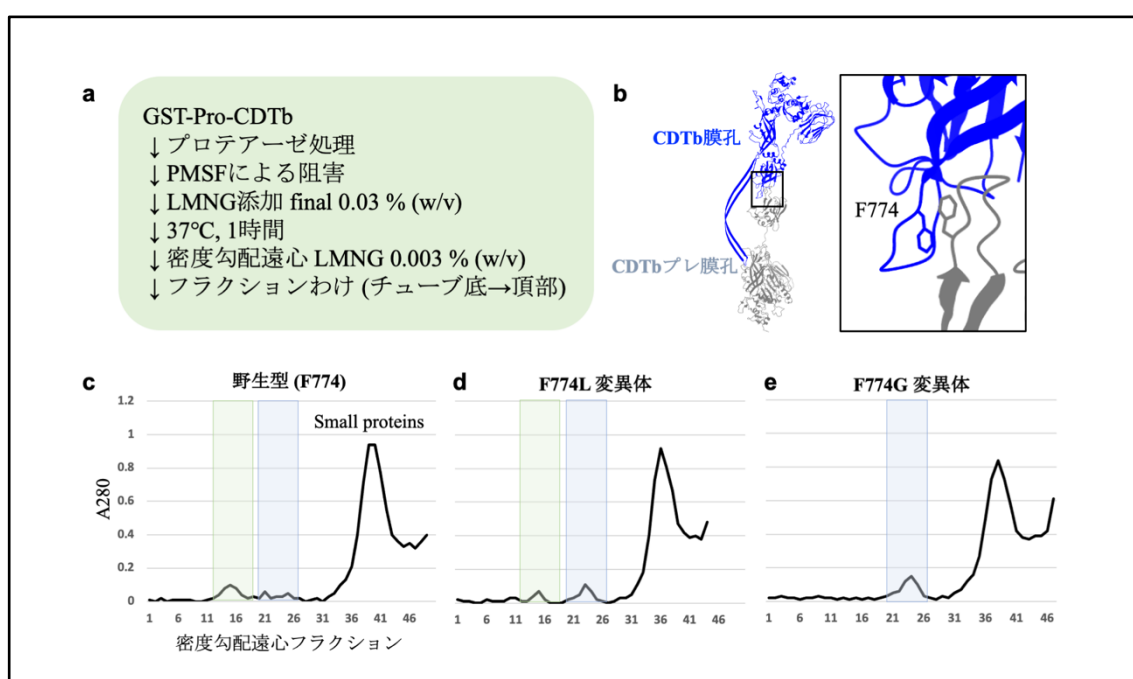


図 34. 密度勾配遠心による CDTb 膜孔 14 量体形成の評価

a CDTb の活性化から膜孔調製までのフローチャート。**b** CDTb の膜孔 14 量体形成に関与すると考えられる F774 の位置。**c** 野生型 CDTb 膜孔サンプルの密度勾配遠心のクロマトグラム。**d** F774L (CDTb) 膜孔サンプルの密度勾配遠心のクロマトグラム。**e** F774G (CDTb) 膜孔サンプルの密度勾配遠心の A280nm をプロットしたもの。

3-3-4 構造解析サンプル調製の流れ

クライオ電子顕微鏡サンプル調製は WT の CDTb 膜孔を使用した。Chymotrypsin 処理によって活性化された CDTb (WT) を 1 時間, 37°C でインキュベーションした。これを密度勾配遠心ベッド (10%–30% グリセロール, 50 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.003% (w/v) LMNG) に添加し, 超遠心 (230,139×g, 16 時間) を行なった。遠心後の遠心チューブ底に針で穴を開け, 250 μl ずつフラクション分けを行った。PD10 によって buffer 交換 (10 mM HEPES pH 7.5, 1 mM CaCl₂, 0.003% (w/v) LMNG) と, Amicon による濃縮を行い, これにモル比 3 倍量の CDTa を加えて構造解析サンプルとした。

3-4 クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析

3-4-1 単粒子構造解析

データの撮影は 300kV のクライオ電子顕微鏡である、大阪大学蛋白質研究所に設置された Titan Krios (FEI) を用いて行なった。球面収差補正機 Cs コレクターを利用し、検出器は K3 カメラを用いた。ピクセルサイズは 0.88 Å で撮影を行なった。さらに周波数成分を補完するために -0.8 μm から -2.5 μm のデフォーカスをつけた。一連の解析は単粒子構造解析ソフト RELION を用いて行った⁶⁴。11,284 個の動画に MotionCor2⁶⁵ によるドリフト補正と Gctf⁶⁶ による CTF 補正を行い、良質な 7,520 個の視野の画像を選択した。735,102 個の粒子をピックアップし、4 倍の binning (1.76 Å/pix) をかけた状態で粒子画像を抽出し、initial model 作製及び 3D classification を行なった。

10 個の 3D クラスに分けられたうちの 2 クラス (計 146,821 粒子) は CDTb 膜孔が 14 量体構造を形成していると見られた。これらの粒子セットから重複粒子像を取り除き、102,116 粒子を生のピクセルサイズ (0.88 Å/pix) で画像から再抽出した。これを三次元再構成および、CTF Refinement にかけることで 3.19 Å 分解能の密度マップを得た (図 35)。

一方で、10 個のクラス中の 1 クラス (276,854 粒子) は 14 量体を形成していないと見られた。この粒子を 3D classification によってさらに 3 つのクラスに分類した。1 つのクラスは見かけ上の質が良くなかったため、その後の計算には使わなかった。残りの 2 つのクラスは比較的質がよく、βバレルに相当する密度及び、D4II の密度に差が確認できた。それぞれを三次元再構成、CTF Refinement、Polishing によって改善し、βバレルがより長く見えたクラス (83,061 粒子) のマップを 2.64 Å、βバレルが比較的短く見えたクラス (173,260 粒子) のマップを 2.56 Å の分解能で得た。後者のクラスの CDTa 相当の密度に対してマスクを作製し、no align のクラス分けを行って良質なクラスを選択し、167,398 粒子を選び再度再構成して 2.56 Å 分解能のマップを得た。

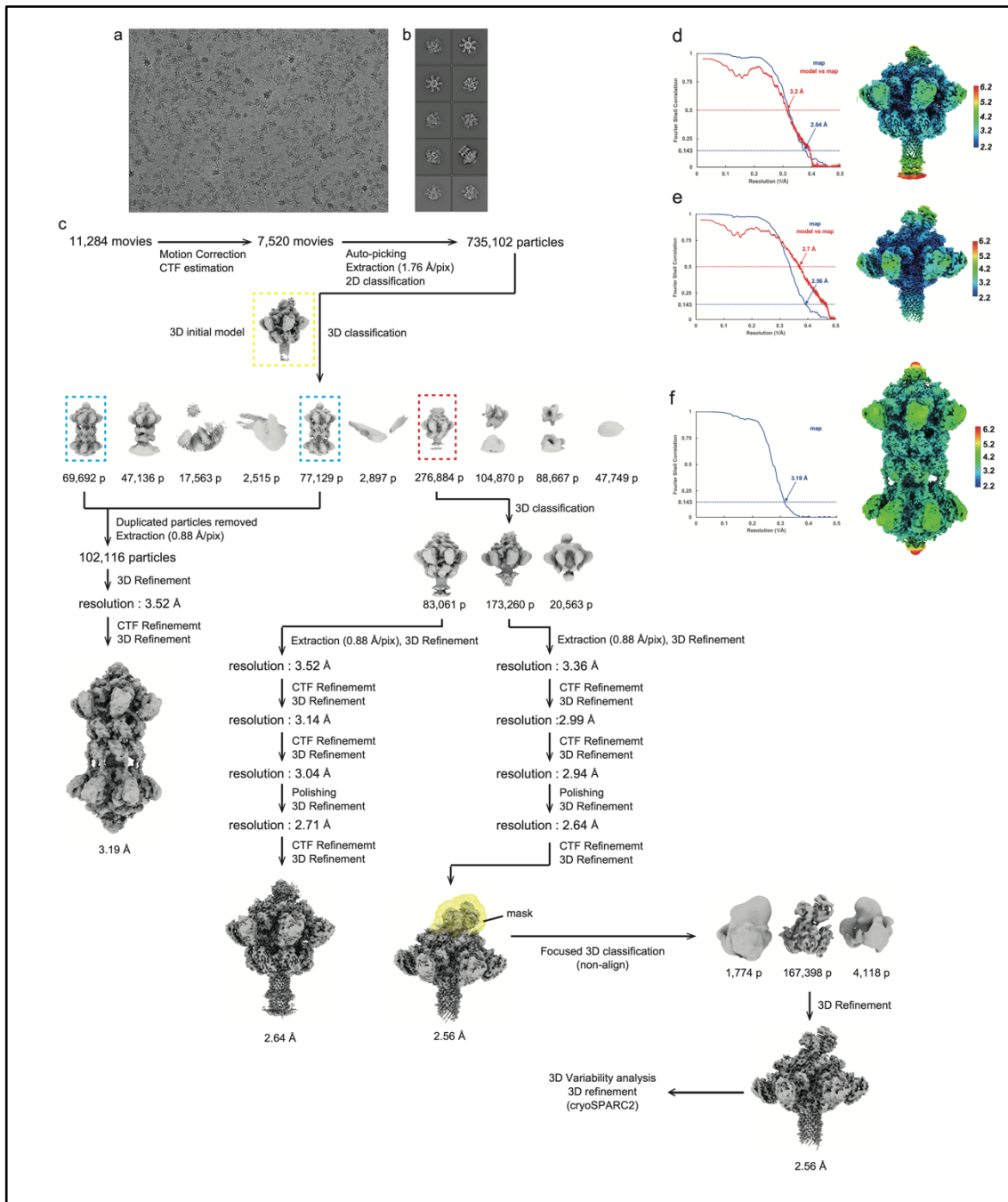


図 35. CDT 毒素の単粒子構造解析

a クライオ電子顕微鏡で撮影したサップルの画像。 **b** 抽出した粒子の二次元平均画像。 **c** 単粒子解析のフローチャート。 **d** 局所分解能による色付けをした CDTa・CDTb 膜孔複合体 (Long) の密度マップ, 及び Half map 同士の FSC と, マップ (Half map ではない) と原子モデルの FSC。 **e** 局所分解能による色付けをした CDTa・CDTb 膜孔複合体 (Long) の密度マップ, 及び Half map 同士の FSC と, マップ (Half map ではない) と原子モデルの FSC。 **f** 局所分解能による色付けをした CDTa・CDTb 膜孔複合体 14 量体の密度マップ。

	14 量体	Long	Short	Folded	Unfolded
EMDB ID	EMD-33188	EMD-32043	EMD-32041	EMD-34136	EMD-34137
PDB ID	-	7VNN	7VNJ	7YVQ	7YVS
Data collection and processing					
Magnification	81,000				
Voltage (kV)	300				
Electron exposure (e ⁻ /Å ²)	50				
Defocus range (μm)	-0.8 to -2.0				
Pixel size (Å)	0.88				
Symmetry imposed	C1				
Initial particle images (no.)	2,608,418				
Final particle images (no.)	102,116	83,061	173,260	24,981	100,912
Map resolution (Å)	3.2	2.6	2.6	3.2	2.8
FSC threshold	0.143	0.143	0.143	0.143	0.143
Map sharpening <i>B</i> factor (Å ²)	-67	-32	-36	-56	-70
Refinement					
Model resolution (Å)	-	3.2	2.8	3.4	3.0
FSC threshold	-	0.5	0.5	0.5	0.5
Model composition					
Non-hydrogen atoms	-	38,823	30,661	30,742	30,593
Protein residues	-	4,863	3,856	3,874	3,856
Ligands	-	21	21	21	21
<i>B</i> factors (Å²)					
Protein	-	61.64	93.72	90.02	78.04
Ligand	-	45.36	77.75	73.97	63.43
R.m.s deviations					
Bond lengths (Å)	-	0.004	0.004	0.005	0.005
Bond angles (Å)	-	0.949	0.956	0.977	0.990
Validation					
MolProbity score	-	1.74	1.65	1.76	1.68
Clashscore	-	6.31	5.58	6.34	6.12
Poor rotamers (%)	-	0.37	0.40	0.75	0.98
Ramachandran plot					
Favored (%)	-	94.27	95.01	93.78	95.09
Allowed (%)	-	5.73	4.99	6.22	4.91
Disallowed (%)	-	0.00	0.00	0.00	0.00

表 9. CDT 毒素構造の validation table

3-4-2 CDTa・CDTb 膜孔複合体の全体構造

単粒子構造解析から合計3つのマップを得ることができた (図36)。一つ目が CDTb 膜孔 14 量体に対して CDTa が一つずつ結合した複合体, 残りは 14 量体化していない CDTb 膜孔に対して CDTa が結合した複合体である。後者の複合体は解析の過程でβバレルに相当する密度に明確な差があったことから, イオタ毒素 Ib 膜孔と同様に長く見えていたクラスを Long, 短く見えていたものを Short と名付けた。また, Long のクラスについては受容体結合ドメイン D4II が明瞭に見えている一方で, Short のクラスで該当する密度が確認されなかった。

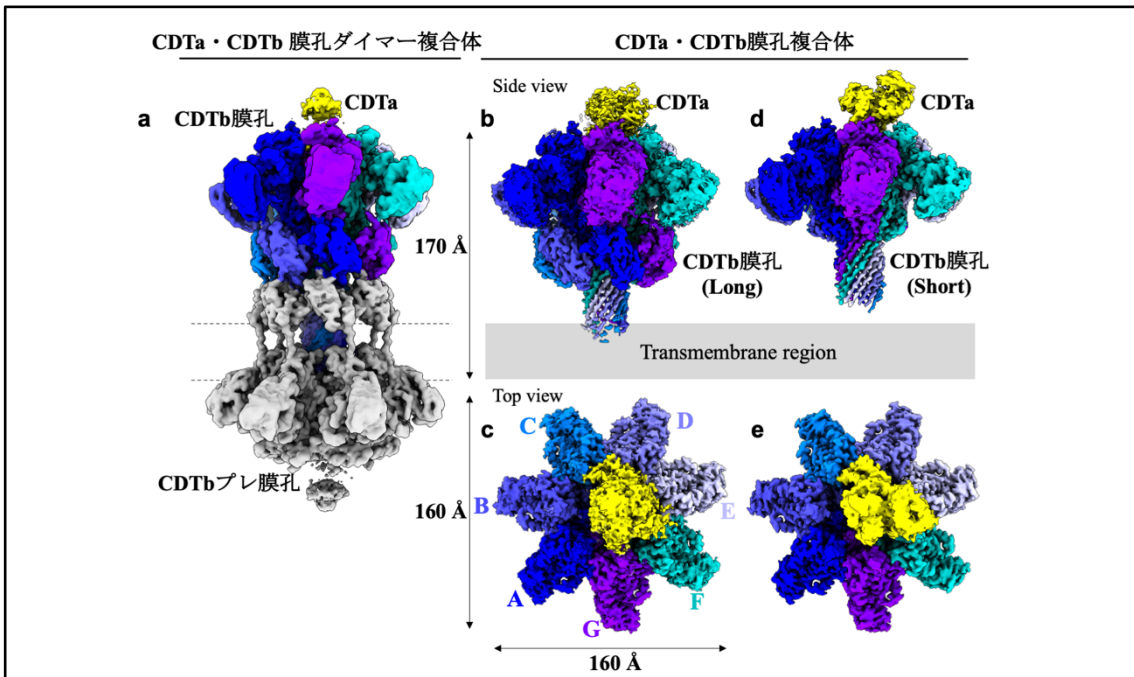


図 36. 単粒子構造解析によって得られた CDT 毒素の密度マップ

各マップの CDTb 膜孔はプロトマー毎に色付けを行なった。CDTa は黄色で色付けをした。a CDTa・CDTb 膜孔複合体 14 量体の密度マップ。一方の膜孔はグレーで色付けした。b,c CDTa・CDTb 膜孔複合体 (Long) の密度マップ。d,e CDTa・CDTb 膜孔複合体 (Short) の密度マップ。

Long と Short のクラスについて、PDBID: 6UWR, 6V1S を初期モデルとして、UCSF Chimera⁶⁷によるモデルフィッティング、構造解析ソフト COOT⁶⁸と PHENIX⁶⁹を用いてマップに対応するモデルの構造精密化を行なった (図 37a,b)。得られた Short のクラスを用いて、HOLE⁸⁰による内径の計算を行った (図 37c)。

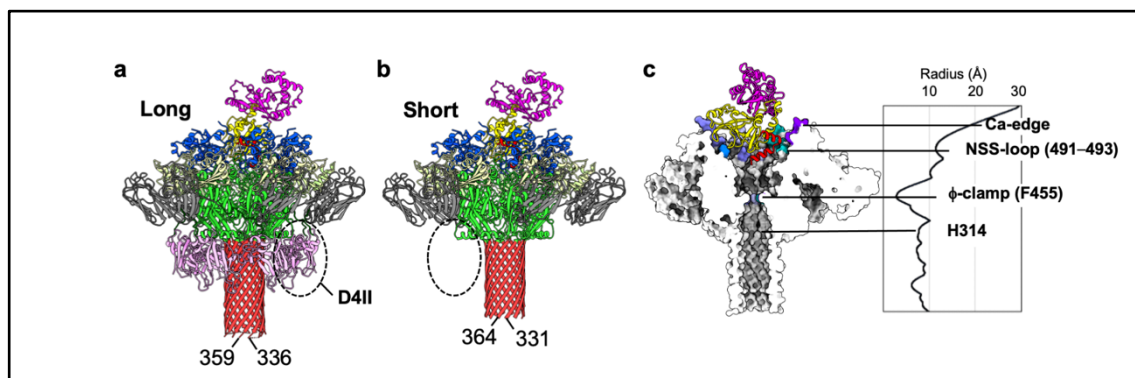


図 37. CDTa · CDTb 膜孔複合体の構造

a,b CDTa · CDTb 膜孔複合体 Long と Short のモデル。c CDTa · CDTb 膜孔複合体 (Short) のモデルの断面図と, HOLE によって算出した複合体中の CDTb 膜孔内部の半径。

3-4-3 狭窄部位 NSS-loop の構造

CDTb 膜孔の狭窄部位の1つである NSS-loop は密度マップとの比較から、膜孔の内側に向けた‘in’と、外側に向けた‘out’の二状態があることが明らかになった (図 38)。サブユニット A,B,D,E,G においては二状態に相当する密度が確認されたが、サブユニット C,F に関しては‘out’の状態に偏っていた。このうち CDTa の N 末端 α ヘリックス (以下, $\alpha 1$) はサブユニット F に結合していた。

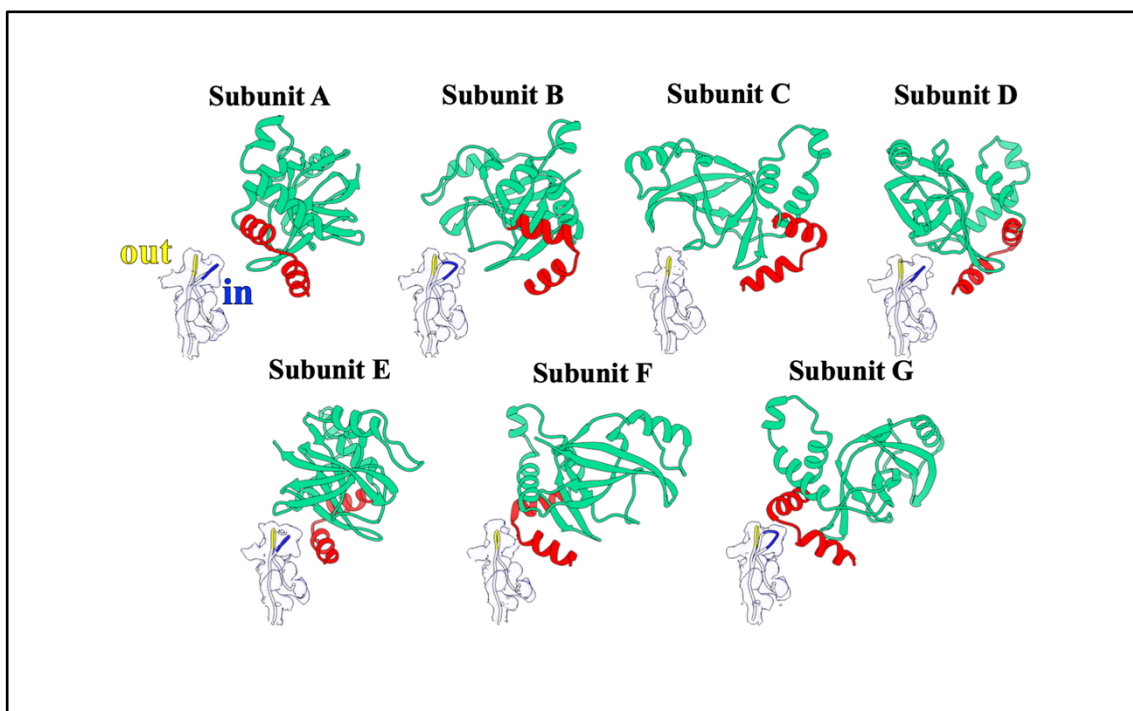


図 38. NSS-loop において見られた 2 つの状態

NSS-loop は‘in’(青色) ‘out’(黄色) としてそれぞれ色分けを行なった。CDTa の C 末端ドメインは表示をしていない。CDTa の N 末端の 2 つの α ヘリックスを赤色に、その他の領域を緑色に色付けした。

3-4-4 CDTa N 末端におけるアンフォールディング

CDTa は単体の結晶構造が既に報告されており、単体の構造において12-31番の残基で $\alpha 1$ は α -ヘリックスの構造を有することが明らかにされていた。一方で CDTb 膜孔との複合体中において $\alpha 1$ は19-30番の残基でのみフォールディングされていた (図 39a)。イオタ毒素についても、単体の結晶構造と複合体における $\alpha 1$ の長さの変化は共通していた (図 39b)。またどちらにおいても、複合体中にて短くなった $\alpha 1$ の先は透過経路に向かって傾斜することがわかった (図 39c,d)。

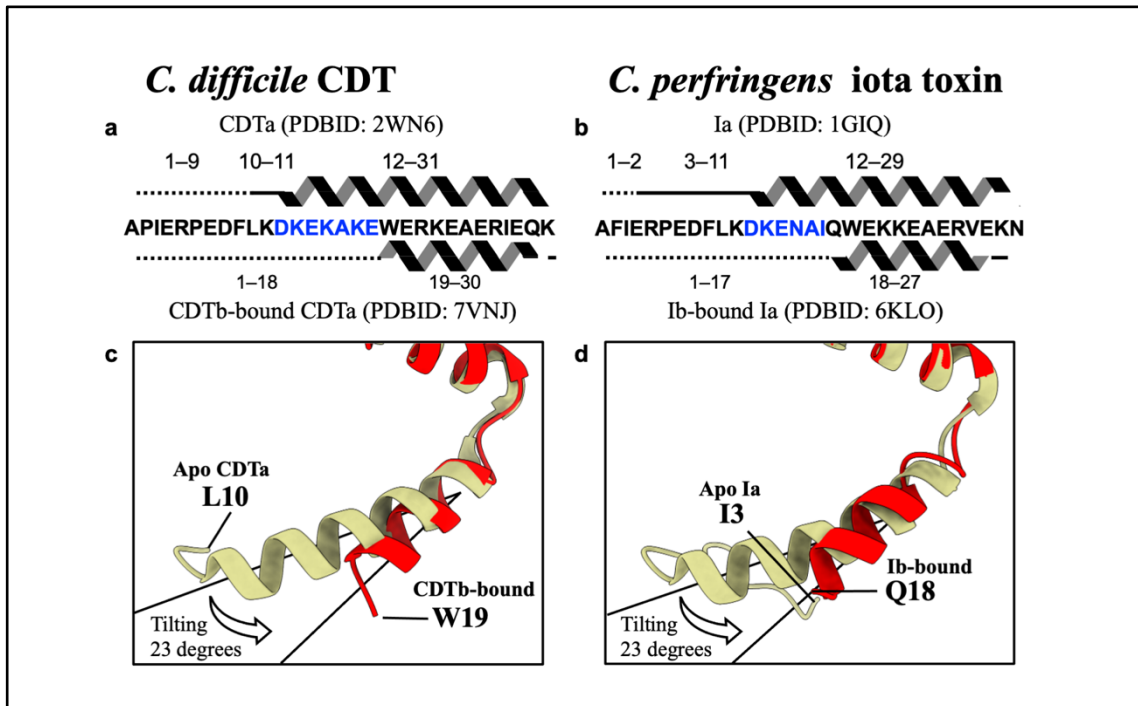


図 39. 二成分毒素間で保存された N 末端のアンフォールディング

a,b CDT 毒素とイオタ毒素の酵素成分 N 末端のアポ型と膜孔結合型における比較。点線は構造が決定されていない残基，棒線は二次構造をとらない残基を示す。膜孔への結合に伴って二次構造が失われる残基を青色で示した。**c,d** 金色はアポ型のモデル，赤色は膜孔結合型の CDTa のモデルをそれぞれ示す (いずれもリボンモデル表示)。

3-4-5 N 末端 α ヘリックスの構造変化

Short のクラスについて CDTa 全体を含むマスクを作製し、これを用いて cryoSPARC⁸¹ の 3D variability analysis⁷⁵ を行った (図 40a)。その結果, CDTa には CDTb 膜孔との複合体状態において, Ca-edge との相互作用箇所を軸に揺れている様子が確認できた。また $\alpha 1$ の密度に注目してみると Short のマップで見られた先端の構造を失った状態だけでなく, 単体構造と同じ長さの $\alpha 1$ を維持した状態の密度も確認することができた。そこで CDTa の動きに合わせて, Frame 1-4, Frame 5-8, Frame 9-20 の3つのクラスに分類し, それぞれで三次元再構成を行った (図 40b-e)。Frame 1-4 のクラス (24,981 粒子) は長い $\alpha 1$ を維持した状態であり, Frame 9-20 のクラス (100,912 粒子) は Short で見られた短くなった $\alpha 1$ の状態となった (図 40f,g)。間である Frame 5-8 のクラスでは, $\alpha 1$ の密度が明瞭に見られなかった。そこで長い $\alpha 1$ (Folded CDTa) と短い $\alpha 1$ (Unfolded CDTa) のマップそれぞれに対してモデルを構築することにした。PDBID: 7VNJ, 2WN6 を初期モデルとして, 構造解析ソフト COOT⁶⁸ と PHENIX⁶⁹ を用いてモデルの構造精密化を行なった。

Folded CDTa のクラスにおいては発現に使用した 1 番目の残基から密度が確認されていたことから, CDTa 全長の構造を網羅することができた。Unfolded CDTa クラスの $\alpha 1$ は基本的に Short のクラスの構造と一致するが, 短くなった N 末端の先の密度が ϕ -clamp まで続く様子を確認することができた。

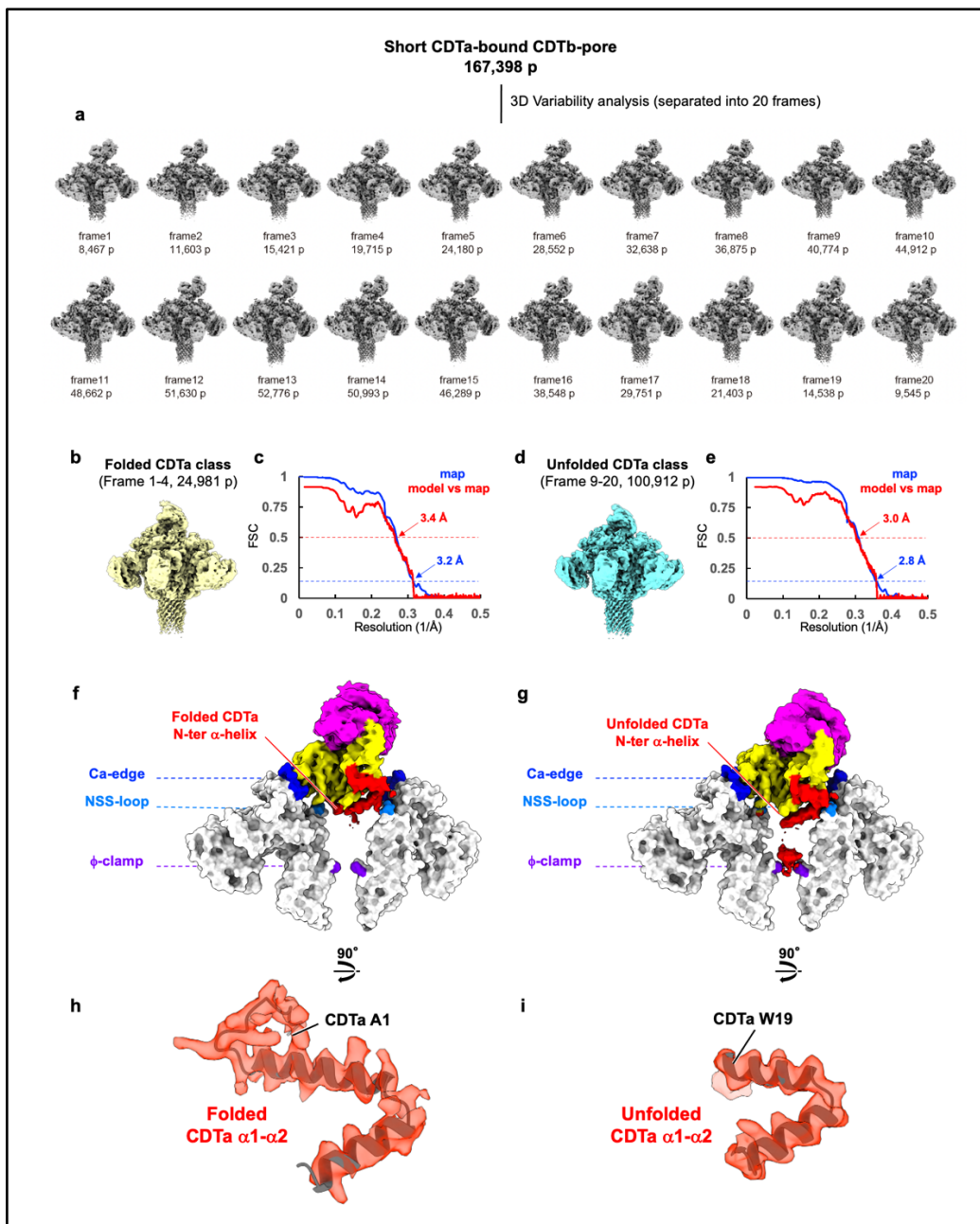


図 40. 3D variability analysis によって明らかになった複合体の構造

a 3D variability analysis から得られたフレームマップ。 **b** Folded CDTa クラスの密度マップ。 **c** Folded CDTa クラスの Half map 同士の FSC と、マップとモデルの FSC。 **d** Unfolded CDTa クラスの密度マップ。 **e** Unfolded CDTa クラスの Half map 同士の FSC と、マップとモデルの FSC。 **f,g** CDTa の密度マップと CDTb 膜孔サブユニット C,F のモデルを合わせて表示した。CDTb の狭窄部位は Ca-edge (青色), NSS-loop (シアン), ϕ -clamp (紫色) それぞれ色付けをした。CDTa は N 末端 α -ヘリックスを赤色, N 末端ドメインを黄色, C 末端ドメインを紫色に色付けをした。 **h,i** Folded CDTa と Unfolded CDTa の N 末端 α -helix (α 1- α 2) のモデルとそれぞれの密度マップ (赤半透明)。

CDTa の $\alpha 1$ は複合体中では NSS-loop に位置しており, Folded CDTa のクラスでは長い $\alpha 1$ がサブユニット C,D の NSS-loop を立体障害的に外側に押しつけて‘out’に偏らせており, 一方で Unfolded CDTa のクラスはサブユニット D の付近から N 末端構造がいなくなるためか, ‘in’の状態に偏ることがわかった (図 41)。

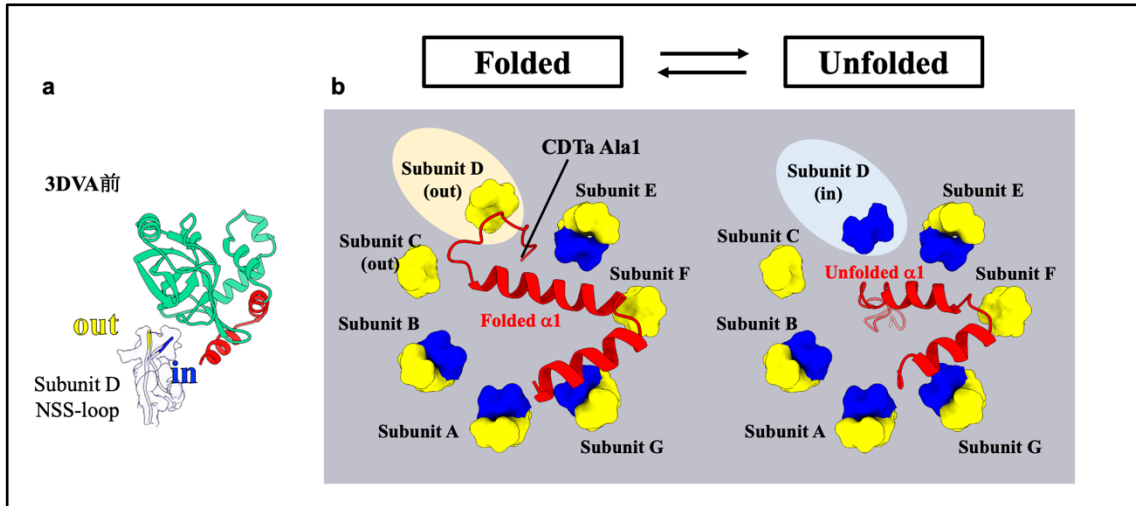


図 41. CDTa の構造に対応した NSS-loop の構造変化

NSS-loop は‘in’(青色)‘out’(黄色)としてそれぞれ色分けを行なった。CDTa の C 末端ドメインは表示をしていない。CDTa の N 末端の 2 つの α ヘリックスを赤色に, その他の領域を緑色に色付けした。a 3D variability analysis によるクラス分けを行う前のリボンモデルと, サブユニット D の NSS-loop 密度マップ。b Folded CDTa クラスと Unfolded CDTa の N 末端の構造と NSS-loop の構造。

3-4-6 CDTa と CDTb 膜孔の相互作用の評価

CDTa と結合する複合体中の構造である NSS-loop が二状態をとることの重要性を踏まえて、NSS-loop 変異体と CDTa の相互作用解析を行った。さらに CDTa が CDTb 膜孔の Ca-edge に結合するという特性から相互作用の Ca^{2+} 依存性についても調べた。プロリンの導入によってこの構造に束縛をかけることを目的に、SPS-loop と PSS-loop を有する変異体を作製した。これを WT と同様に調製し、酸性/中性 pH 条件と、遊離 Ca^{2+} の存在/非存在における CDTa の CDTb 膜孔から解離する様子を SPR (Surface plasmon resonance) によって観察した (SPR の測定及び解析は共同研究者である、株式会社堀場製作所分析・計測開発本部の佐藤優穂博士に行って頂いた)。全ての測定は OpenPlex (HORIBA France) を用いて測定し、バイオチップは CDTb 膜孔 (WT (NSS), SPS, PSS) を SPRi-Biochip (HORIBA France) に固定することで準備した。CDTb のスポッティングには spotter system (HORIBA, Ltd.) を使用した。SPR 測定はそれぞれ pH と Ca^{2+} 条件の異なるそれぞれの Running buffer (表 10) を 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流速で流しながら室温で行った。CDTa の添加後 180 秒間結合をモニターし、さらに Running buffer を 300 秒間流すことで解離の様子を観察した (図 42)。Reflectivity (%) の変化は、CDTb 膜孔をスポットした領域から非スポット領域のシグナルを減算して計算した。Kinetic curve は ScrubberGen software (HORIBA France) を用いて解析し、1:1 の結合モデルを用いて k_a , k_d , 及び K_D ($K_D = k_d/k_a$) を計算した (表 11)。

buffer A: pH 7.4 HEPES 10 mM 0.15 M NaCl 1 mM EGTA, 0.005% (v/v) Surfactant P20
buffer B: pH 7.4 HEPES 10 mM 0.15 M NaCl 1mM EGTA, 0.005% (v/v) SurfactantP20, CaCl_2 5 mM
buffer C: pH 5.5 MES 10 mM 0.15 M NaCl 1 mM EGTA, 0.005% (v/v) Surfactant P20
buffer D: pH 5.5 MES 10 mM 0.15 M NaCl 1 mM EGTA, 0.005% (v/v) Surfactant P20, CaCl_2 5 mM

表 10. SPR 測定に用いた running buffer

図 42, 表 11 で割り振られた (A) – (D) と、使用した Running buffer のアルファベットは対応している。

Buffer	Ligand	$k_a (\times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_d (\times 10^{-4} \text{ s}^{-1})$	$K_D (\text{nM})$
(A) pH 7.4	WT CDTb	1.44	41.3	28.6
	SPS	1.16	30.4	26.2
	PSS	1.03	56.7	55.1
(B) pH 7.4, Ca^{2+}	WT CDTb	1.89	6.19	3.27
	SPS	2.76	5.21	1.89
	PSS	2.2	10.8	4.93
(C) pH 5.5	WT CDTb	4.98	7.63	1.53
	SPS	4.41	7.09	1.61
	PSS	5.84	13.2	2.27
(D) pH 5.5, Ca^{2+}	WT CDTb	1.52	4.36	2.86
	SPS	1.21	3.26	2.69
	PSS	1.64	3.76	2.29

表 11. SPR 解析の結果

pH 7.4 において遊離 Ca^{2+} が高濃度の条件では低濃度の条件に比べて、 K_D 値が低くなった。また WT と SPS 変異体ではおおよそ同一と思われる結果が得られたのに対して、PSS 変異体ではどちらの Ca^{2+} 濃度条件においても K_D 値が僅かに高くなった。一方、酸性 pH においては Ca^{2+} 条件間で顕著な差は見られなかった。PSS 変異体は低濃度の Ca^{2+} 条件において中性 pH と同様に K_D 値が高くなったが、高濃度 Ca^{2+} 条件においてこの差は見られなかった。さらに酸性 pH ではどのコンストラクトの CDTb 膜孔についても中性 pH に比べて K_D 値が低くなることがわかった。

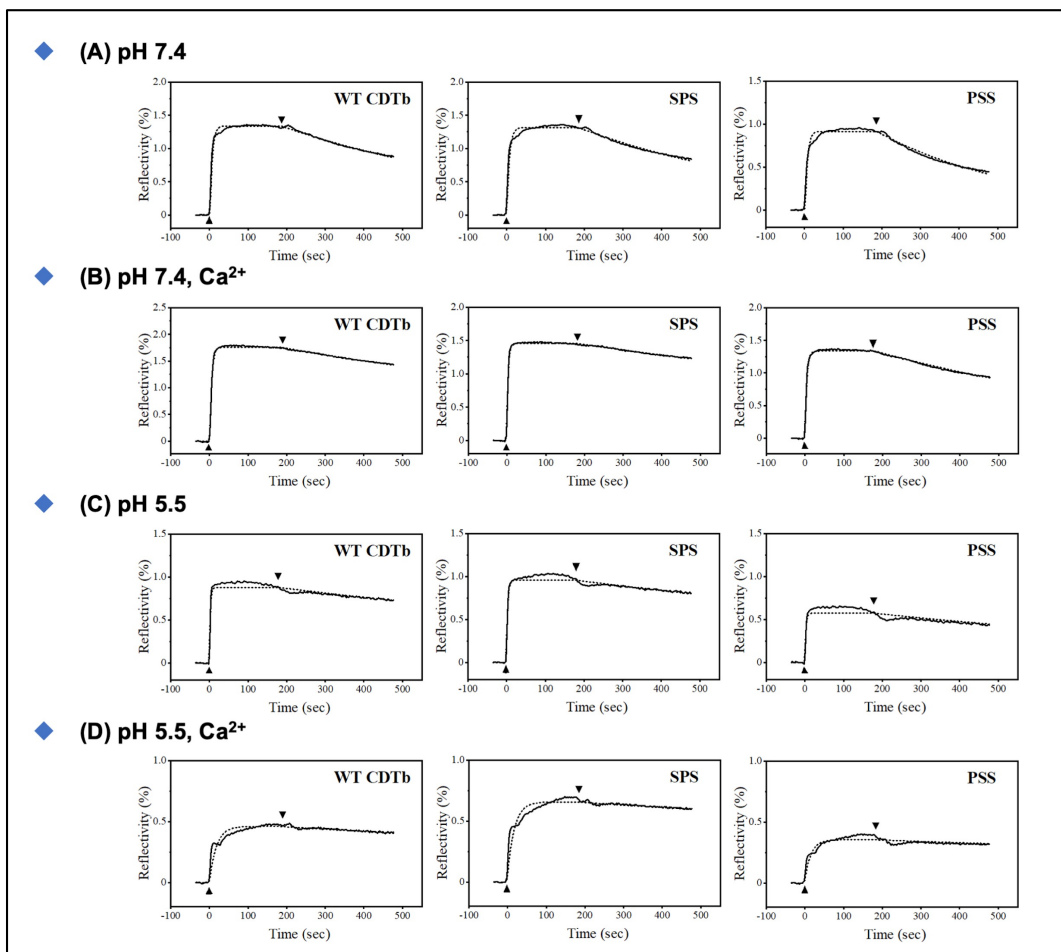


図 42. CDTa と CDTb 膜孔の SPR 解析

CDTb (WT-NSS-loop) と NSS 変異体 (SPS, PSS) を標準的なアミンカップリングで NHS 活性化チップに固定化した。CDTa ($1 \mu\text{M}$) を注入し、180 秒間会合を記録した。解離はランニングバッファーのみを注入し、300 秒間モニターした。三角形はそれぞれ会合と解離の開始を示す。フィッティング曲線は点線で示した。

3-5 考察

CDTb 膜孔はイオタ毒素と同様のプロトコルで調製が可能であったが、大きく2つの相違点がある。一つ目は Ib においてはプロテアーゼによる活性化後、自発的にオリゴマーを形成しないが、過剰量のエタノールの添加によってオリゴマー形成が誘導される。一方で CDTb は活性化後に自発的にオリゴマーを形成する。そのため、より緩やかな条件でサンプルの調製が可能である。二つ目の違いは CDTb 膜孔が積極的に7量体同士で14量体を形成することである。14量体は既に構造が報告されているが^{71,72}、いずれの7量体も膜貫通領域が分子内に閉じ込められた状態となっており、生理的な状態とは考えにくい(図 29)。これに対して Ib で14量体形成は顕著に見られない。14量体の構造から、私はこの原因は CDTb の F774 残基同士の疎水相互作用によるものであると考えた(図 34b)。この残基は Ib では Leu となっているため、F774L 及び F774G の CDTb 変異体を作製した。この変異体を用いてオリゴマー形成及び、密度勾配遠心を行ったところ、14量体に相当するピークが減少する代わりに、14量体化していないオリゴマーに相当するピークが野生型に比べて顕著に増加した(図 34d,e)。この結果から、F774 が14量体形成の主な原因であることが明らかになった。F774 は CDTb において受容体結合ドメインを構成する残基の一つで、受容体認識に関わる残基であることが報告されている⁷¹。また Ib においては Leu に置換されていることから、F774 の残基はその疎水性な側鎖が受容体認識に重要であるが、同時に14量体形成を引き起こす可能性もある残基であると言える。

単粒子構造解析から得られた構造の一つは、異なる研究チームから既に構造の報告があったものと同様の CDTb 膜孔 14量体にそれぞれ CDTa が結合した姿であった(図 36a)。しかしながら、7量体 CDTb 膜孔に対して CDTa は非対称的に結合することから、14量体中のそれぞれの膜孔に結合した CDTa の構造を同時に明瞭にするためことは難しく、対称性をかけずに計算を行ったが、それぞれの密度がアベレージアウトされてしまった。そのため CDTa・CDTb 膜孔 14量体複合体については原子モデルの作成は行わなかった。一方で14量体化していない CDTa・CDTb 膜孔複合体については、CDTa 部分に関してもアベレージアウトすることなくマップを得ることができた(図 36b,c)。CDTa・CDTb 膜孔複合体は解析の過程で受容体結合ドメインが明瞭でβバレルの密度より長く確認された Long のクラスと、受容体結合ドメインが見えず、βバレルの密度短く確認された Short のクラスに分けることができた。CDTa と CDTb 膜孔の結合に関わる構造は両者で変わることはないが、Short のクラスではより明瞭に CDTa に相当する密度が見えたことから、主に Short の構造を用いて相互作用などを調べることにした。

得られた構造から CDT 毒素とイオタ毒素では同じ結合様式の複合体を形成することがわかった (図 24,37)。CDTb 膜孔に Ib 膜孔と同様の狭窄部位が存在しており, Ca-edge, NSS-loop(Ib: NSQ-loop), ϕ -clamp の構造を確認することができた (図 37c)。CDTa は N 末端の結合ドメインを介して主に Ca-edge に結合しており, 最も N 末端の構造は NSS-loop に位置していた。NSS-loop は密度マップの観察から, 膜孔の内側に向けた‘in’と, 外側に向けた‘out’の二状態があることがわかった。NSS-loop が決まった構造を持たず常に柔軟な状態にある場合, 密度マップはアベレージアウトしてしまうが, 明確に 2 つの状態の密度が見えたことから‘in’と‘out’はそれぞれが安定な状態にあると考えられる (図 38)。Long と Short のどちらの複合体においても, サブユニット A,B,D,E,G では‘in’と‘out’の二状態が見られる一方で, サブユニット C,F では‘out’の一状態しか確認できなかった。一方でイオタ複合体についてもこの二状態に相当する密度が確認され, Ib の NSQ-loop はサブユニット A,B,C,D,G が‘in’と‘out’の二状態, サブユニット E,F が‘out’のみの構造に偏っていた (図 43)。どちらの毒素においても, サブユニット F で NSQ-loop が一状態しか見られない原因はそれぞれの酵素成分の $\alpha 1$ との相互作用が原因であると考えられるが, CDTb のサブユニット C と Ib のサブユニット E でなぜ違いが現れたのかは不明である。

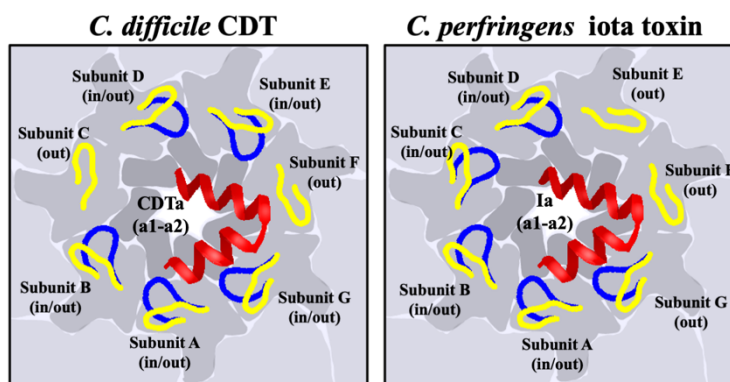


図 43. CDT とイオタ毒素の NSX-loop の比較

NSS-loop (CDTb), NSQ-loop (Ib) は‘in’(青色) ‘out’(黄色) と, CDTa/Ia の N 末端の 2 つの α ヘリックスを赤色で描いたイラスト。Folded クラスと Unfolded クラスに分ける前の全体構造を反映したもの。

次に CDT 毒素とイオタ毒素の酵素成分 N 末端の構造変化についても比較を行った (図 39)。どちらにおいても $\alpha 1$ はほぼ同じ長さがアンフォールドされており、また複合体中において ϕ -clamp に向かって傾斜するといったことまで共通することがわかった。このことから膜孔への結合をきっかけに酵素成分 N 末端がアンフォールドされ、透過方向に向かって傾斜する構造変化は、毒素間で保存された機構であることがわかった。機構は違うものの、炭疽菌毒素複合体も同様に複合体形成に伴って、酵素成分 N 末端が透過方向に向かって構造変化する (図 5b)。これらのことから、二成分毒素の複合体形成によって膜透過に必要な最初の構造変化を引き起こす、ということが共通して言える。

CDTa の密度が明瞭に見えた Short のクラスの粒子を用いて行った、cryoSPARC⁸¹ の 3D variability analysis (3DVA)⁷⁵ から CDTa は CDTb 膜孔に結合した後に、N 末端が解けた状態に構造変化することが確認できた。この動きの中で CDTa は Ca-edge との結合を保つが、 $\alpha 1$ とサブユニット F の NSS-loop の相互作用は大きく変化することがわかった (図 40f,g)。さらに、一連の動きの中で CDTa は単体の結晶構造と同じく長い $\alpha 1$ と、アンフォールドされた $\alpha 1$ の二つの状態をとることがわかった。3DVA による解析を行う前の Short のクラスのマップでは N 末端がアンフォールドされた状態であったが、実際はこれらの状態の粒子の混在したマップを観察していた事になる。またこの結果から、イオタ毒素での研究成果と 3DVA 前のマップから酵素成分は膜孔への結合に伴って N 末端が構造変化するものだと思われたが、実際は N 末端の構造を維持したまま複合体を形成し、その後に N 末端の構造が失われることが示唆された。また一連の動きに相当するマップを並べることで、N 末端の構造が失われる過程を捉えたかのような動画を作成することができた。

Folded CDTa のクラスにおいては、発現した CDTa の 1 番目の残基まで密度が見えており、長い $\alpha 1$ の先にさらに続く密度として確認することができた (図 40f,h)。一方で Unfolded CDTa では $\alpha 1$ は短くなっており、さらに構造が失われた部分に相当する密度の ϕ -clamp に続く様子が見られた (図 40g,i)。NSS-loop に注目すると、Folded CDTa の N 末端はサブユニット C と D を立体障害的に押しつけて‘out’の状態に偏らせていることがわかった (図 41b)。一方で、Unfolded CDTa において、サブユニット C 付近から $\alpha 1$ は構造変化によって居なくなっているのに関わらず、‘out’の一状態を維持したままであった (図 41c)。 $\alpha 1$ によって押しつけられた NSS-loop が今度は CDTa の別の構造との接触により、‘in’に戻ることができなくなっているためだと考えられる。また Unfolded CDTa において、サブユニット D の NSS-loop は‘in’の一状態に偏っていた。この近辺の構造を観察すると、CDTa とこの NSS-loop で水素結合が形成されうる向きに側鎖が向いていることがわかった。これらのことから、NSS-loop はその場に居合わせた CDTa の構造に合わせて立体的な障害となる場合には‘out’、相互作用がある場合には‘in’か‘out’のいずれかの状態に偏ることがわかった。また、3DVA によるクラス分け前にはサブユニット D の NSS-loop は‘in’と‘out’の二状態が見られたが、Unfolded CDTa と Folded CDTa ではこの二状態が明確に分かれた (図 41)。このことから、他の二状態の密度が確認される NSS-loop についても‘in’と‘out’の混ざり物の密度であることが示唆された。

SPR の結果から、中性 pH においてより高濃度の Ca^{2+} が存在する条件で K_D 値が低くなることがわかった (表 11)。単粒子解析で明らかにしたイオタ毒素と CDT 毒素のそれぞれの複合体において、酵素成分は膜結合成分の Ca-edge に主に結合していた結果と合致する結果である。すなわち Ca^{2+} が低濃度の条件においては Ca-edge が不安定化し、酵素成分の結合に影響したのであろうと考えられる。一方で酸性 pH において Ca^{2+} 条件間でこのような差は見られず、且つどのコンストラクトにおいても中性 pH に比べて K_D 値が低くなった。これは CDTa と CDTb 膜孔が酸性 pH においては、もはや Ca-edge 依存的な結合をしていないということを示唆している。次に NSS-loop (野生型)、SPS 変異体、PSS 変異体間で比較を行うと NSS と SPS はいずれの条件においても同一と思われる結果が得られたのに対して、PSS のみは K_D 値が比較的高くなる傾向が見られた。SPS は NSS からの二残基変異であるのに PSS は一残基の変異体であるため、この loop の組成は SPS よりも野生型に近い。それに関わらず PSS では SPS への変異に比べて CDTa の結合性が落ちたことから、野生型において二状態をとるこの構造の剛性に影響を与えたのではないかと期待できる。今後、PSS 変異体についても構造解析を行い、さらに構造状態を確認することが望ましい。

第4章 新たな二成分毒素の膜透過機構の提唱

ウェルシュ菌イオタ毒素⁶⁰とデフィシル菌 CDT 毒素の複合体⁷³の構造解析から得られたクロストリジウム二成分毒素の知見をここにまとめて整理する。① 膜結合成分は7量体の膜孔を形成し、一つの酵素成分が膜孔の Ca-edge を介してここに結合する (図 24, 37)。② 酵素成分は構造を維持したまま膜孔に結合する (図 40f,h)。膜孔の NSX-loop は酵素成分の N 末端との相互作用によって対称性を失う (図 25,38,43)。③ 複合体中において酵素成分は N 末端の構造が失われ、 $\alpha 1$ は先端がアンフォールドされ、さらに ϕ -clamp に向かって傾斜する (図 39, 40f,g)。

この先の機構は実際に明らかにされていないが、二成分毒素の膜透過はエンドソーム内外の pH 勾配によって引き起こされると考えられている¹³。透過が始まるとアンフォールドした N 末端から ϕ -clamp を通過し、NSS-loop を含む狭窄部位のような立体的な障害のない β バレル (直径15Å) 中では、アンフォールドされた $\alpha 1$ が再びフォールディングされる可能性がある。これによって、直径わずか 6Å の ϕ -clamp の逆行が不可能になり、Brownian-Ratchet による方向性を持った膜透過が進行すると思われる。二成分毒素の膜透過には宿主のシャペロンが関与することが知られており⁵⁸、長い β バレルを酵素成分が抜けた先では TIM 複合体のラチェット機構として報告されているように⁵⁵、シャペロンによる一方向性の透過が起きるのかも知れない。以上の実験的事実と考察から下記の膜透過機構を提唱する (図 44)。

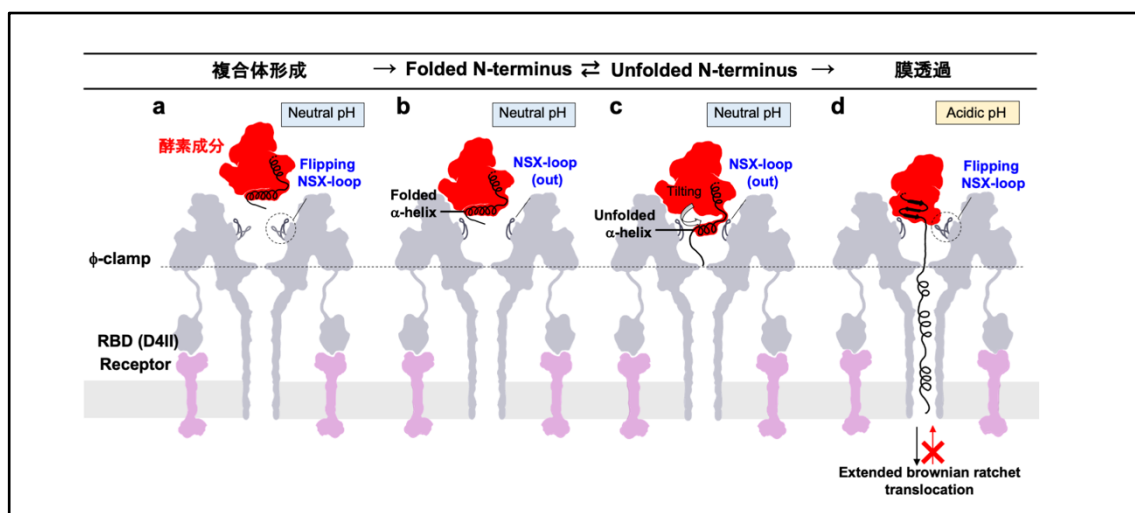


図 44. 新たに提唱する二成分毒素の膜透過機構

a 膜孔は二状態の NSX-loop を有しており、ひとつの酵素成分が結合する。**b** 複合体の形成に伴って、いくつかの NSX-loop は 'out' の状態に偏る。**c** 複合体を形成した後、N 酵素成分の末端の構造が失われ、透過経路に向かって傾斜する。**d** 構造を失った N 末端から狭窄部位である ϕ -clamp を透過する。 ϕ -clamp を透過後に構造を取り戻し、逆行を阻止が阻止される (Extended chain Brownian Ratchet Translocation)。**d** のプロセスについてはまだ詳しく明らかにされていない。

総括

以上の研究により、これまで構造が明らかにされてこなかった *C. perfringens* が産生するイオタ毒素の Ib 膜孔及び Ia・Ib 膜孔複合体、さらに *C. difficile* が産生する CDT 毒素の CDTa・CDTb 膜孔複合体の構造を決定することができた。既に研究が進められてきた炭疽菌毒素とは全く異なる複合体構造を解析することによって、酵素成分は膜孔に結合した後に、N 末端の二次構造がほどけて ϕ -clamp の通過を可能とすることが明らかになった。また複合体形成に際して、Ca-edge や NSX-loop のような狭窄部位が酵素成分との結合に重要な役割を持つことがわかった。本研究で明らかとなったのは酵素成分が膜透過を始めるための準備段階とも言える構造変化であるため、 ϕ -clamp を介した酵素成分の更なる膜透過がどのように行われていくのか、明らかにしていく必要がある。

炭疽菌毒素においては酵素 (LF/EF) と膜結合成分 (PA) との複合体構造が既に複数報告されてきたが、私が本研究を通して明らかにしてきたイオタ毒素及び、CDT 毒素とは酵素成分と膜孔の結合様式が全く異なる (図 5a)。炭疽菌毒素の N 末端の二次構造も α ヘリックスであるが、PA への結合に伴う構造変化についてもイオタ毒素及び、CDT 毒素とは違った動態を示す (図 5b)。これまで二成分毒素の膜透過機構の研究は炭疽菌毒素を中心に行われてきたが、今後は本研究によって明らかにした構造と知見をもとに、両方のタイプの二成分毒素で研究を進めることが可能になり、膜透過機構の解明が促進されると期待される。

近年では様々な膜孔形成タンパク質を用いた DNA やポリペプチドのシーケンシングが盛んに研究されている。二成分毒素のような一度構造をとった分子が解けて狭い穴を通過するという仕組みは、このような測定にも応用可能であると考えられる。また毒素である酵素成分の代わりに、細胞等に薬剤や蛍光マーカーのような任意の分子を送達する装置としての応用も可能になるかもしれない。本研究成果をもとに二成分毒素の膜透過機構の理解は、今後あらゆる研究において応用されていくことが期待される。

参考文献

1. Anderluh, G. & Lakey, J. H. Disparate proteins use similar architectures to damage membranes. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 482–490 (2008).
2. Bischofberger, M., Iacovache, I. & Gisou van der Goot, F. Pathogenic Pore-Forming Proteins: Function and Host Response. *Cell Host Microbe* **12**, 266–275 (2012).
3. Li, Y. *et al.* Structural Basis of the Pore-Forming Toxin/Membrane Interaction. *Toxins* **13**, 128 (2021).
4. Roderer, D., Schubert, E., Sitsel, O. & Raunser, S. Towards the application of Tc toxins as a universal protein translocation system. *Nat. Commun.* **10**, 5263 (2019).
5. Meusch, D. *et al.* Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail. *Nature* **508**, 61–65 (2014).
6. Knapp, O., Benz, R. & Popoff, M. R. Pore-forming activity of clostridial binary toxins. *Biochim. Biophys. Acta* **1858**, 512–525 (2016).
7. Knapp, O., Benz, R., Gibert, M., Marvaud, J. C. & Popoff, M. R. Interaction of *Clostridium perfringens* iota-toxin with lipid bilayer membranes. Demonstration of channel formation by the activated binding component Ib and channel block by the enzyme component Ia. *J. Biol. Chem.* **277**, 6143–6152 (2002).
8. Nagahama, M. *et al.* Binding and internalization of *Clostridium perfringens* iota-toxin in lipid rafts. *Infect. Immun.* **72**, 3267–3275 (2004).
9. Gibert, M., Petit, L., Raffestin, S., Okabe, A. & Popoff, M. R. *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. *Infect. Immun.* **68**, 3848–3853 (2000).
10. Mogridge, J., Cunningham, K., Lacy, D. B., Mourez, M. & Collier, R. J. The lethal and edema factors of anthrax toxin bind only to oligomeric forms of the protective antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 7045–7048 (2002).
11. Barth, H. *et al.* Cellular uptake of *Clostridium botulinum* C2 toxin requires oligomerization and acidification. *J. Biol. Chem.* **275**, 18704–18711 (2000).
12. Gibert, M. *et al.* Differential requirement for the translocation of clostridial binary toxins: Iota toxin requires a membrane potential gradient. *FEBS Lett.* **581**, 1287–1296 (2007).
13. Krantz, B. A., Finkelstein, A. & Collier, R. J. Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. *J. Mol. Biol.* **355**, 968–979 (2006).
14. Collier, R. J. & Young, J. A. T. Anthrax Toxin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 45–70 (2003).
15. Simpson, L. L., Stiles, B. G., Zepeda, H. H. & Wilkins, T. D. Molecular basis for the pathological actions of *Clostridium perfringens* iota toxin. *Infect. Immun.* **55**, 118–122 (1987).
16. Perelle, S., Gibert, M., Bourlioux, P., Corthier, G. & Popoff, M. R. Production of a

- complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect. Immun.* **65**, 1402–1407 (1997).
17. Popoff, M. R. & Boquet, P. *Clostridium* spiroforme toxin is a binary toxin which ADP-ribosylates cellular actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 1361–1368 (1988).
 18. Hemmasi, S. *et al.* Interaction of the *Clostridium difficile* Binary Toxin CDT and Its Host Cell Receptor, Lipolysis-stimulated Lipoprotein Receptor (LSR). *J. Biol. Chem.* **290**, 14031–14044 (2015).
 19. Nagahama, M., Takehara, M. & Kobayashi, K. Interaction of *Clostridium perfringens* Iota Toxin and Lipolysis-Stimulated Lipoprotein Receptor (LSR). *Toxins* **10**, (2018).
 20. Papatheodorou, P. *et al.* Identification of the Cellular Receptor of *Clostridium* spiroforme Toxin. *Infect. Immun.* **80**, 1418–1423 (2012).
 21. Marvaud, J.-C. *et al.* *Clostridium perfringens* iota toxin. Mapping of the Ia domain involved in docking with Ib and cellular internalization. *J. Biol. Chem.* **277**, 43659–43666 (2002).
 22. Tsuge, H. *et al.* Crystal structure and site-directed mutagenesis of enzymatic components from *Clostridium perfringens* iota-toxin. *J. Mol. Biol.* **325**, 471–483 (2003).
 23. Tsuge, H. *et al.* Structural basis of actin recognition and arginine ADP-ribosylation by *Clostridium perfringens* iota-toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7399–7404 (2008).
 24. Sundriyal, A., Roberts, A. K., Shone, C. C. & Acharya, K. R. Structural basis for substrate recognition in the enzymatic component of ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. *J. Biol. Chem.* **284**, 28713–28719 (2009).
 25. Schleberger, C., Hochmann, H., Barth, H., Aktories, K. & Schulz, G. E. Structure and action of the binary C2 toxin from *Clostridium botulinum*. *J. Mol. Biol.* **364**, 705–715 (2006).
 26. Leuber, M., Kronhardt, A., Tonello, F., Dal Molin, F. & Benz, R. Binding of N-terminal fragments of anthrax edema factor (EF(N)) and lethal factor (LF(N)) to the protective antigen pore. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1436–1443 (2008).
 27. Barth, H., Hofmann, F., Olenik, C., Just, I. & Aktories, K. The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infect. Immun.* **66**, 1364–1369 (1998).
 28. Barth, H., Blöcker, D. & Aktories, K. The uptake machinery of clostridial actin ADP-ribosylating toxins - a cell delivery system for fusion proteins and polypeptide drugs. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **366**, 501–512 (2002).
 29. Sun, J., Lang, A. E., Aktories, K. & Collier, R. J. Phenylalanine-427 of anthrax protective antigen functions in both pore formation and protein translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4346–4351 (2008).
 30. Wesche, J., Elliott, J. L., Falnes, P. Ø., Olsnes, S. & Collier, R. J. Characterization of

- Membrane Translocation by Anthrax Protective Antigen. *Biochemistry* **37**, 15737–15746 (1998).
31. Petosa, C., Collier, R. J., Klimpel, K. R., Leppla, S. H. & Liddington, R. C. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* **385**, 833–838 (1997).
 32. Gao-Sheridan, S., Zhang, S. & Collier, R. J. Exchange characteristics of calcium ions bound to anthrax protective antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 61–64 (2003).
 33. Kobayashi, K. *et al.* Role of Ca²⁺-binding motif in cytotoxicity induced by *Clostridium perfringens* iota-toxin. *Microb. Pathog.* **44**, 265–270 (2008).
 34. Marvaud, J. C. *et al.* *Clostridium perfringens* iota-toxin: mapping of receptor binding and Ia docking domains on Ib. *Infect. Immun.* **69**, 2435–2441 (2001).
 35. Lacy, D. B., Wigelsworth, D. J., Melnyk, R. A., Harrison, S. C. & Collier, R. J. Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13147–13151 (2004).
 36. Jiang, J., Pentelute, B. L., Collier, R. J. & Zhou, Z. H. Atomic structure of anthrax protective antigen pore elucidates toxin translocation. *Nature* **521**, 545–549 (2015).
 37. Santelli, E., Bankston, L. A., Leppla, S. H. & Liddington, R. C. Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor. *Nature* **430**, 905–908 (2004).
 38. Pannifer, A. D. *et al.* Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature* **414**, 229–233 (2001).
 39. Shen, Y., Zhukovskaya, N. L., Guo, Q., Florián, J. & Tang, W.-J. Calcium-independent calmodulin binding and two-metal-ion catalytic mechanism of anthrax edema factor. *EMBO J.* **24**, 929–941 (2005).
 40. Feld, G. K. *et al.* Structural basis for the unfolding of anthrax lethal factor by protective antigen oligomers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1383–1390 (2010).
 41. Brown, M. J., Thoren, K. L. & Krantz, B. A. Role of the α Clamp in the Protein Translocation Mechanism of Anthrax Toxin. *J. Mol. Biol.* **427**, 3340–3349 (2015).
 42. Antoni, C. *et al.* Cryo-EM structure of the fully-loaded asymmetric anthrax lethal toxin in its heptameric pre-pore state. *PLOS Pathog.* **16**, e1008530 (2020).
 43. Hardenbrook, N. J. *et al.* Atomic structures of anthrax toxin protective antigen channels bound to partially unfolded lethal and edema factors. *Nat. Commun.* **11**, 840 (2020).
 44. Krantz, B. A. *et al.* A Phenylalanine Clamp Catalyzes Protein Translocation Through the Anthrax Toxin Pore. *Science* **309**, 777–781 (2005).
 45. Das, D. & Krantz, B. A. Secondary Structure Preferences of the Anthrax Toxin Protective Antigen Translocase. *J. Mol. Biol.* **429**, 753–762 (2017).
 46. Krantz, B. A., Trivedi, A. D., Cunningham, K., Christensen, K. A. & Collier, R. J. Acid-induced unfolding of the amino-terminal domains of the lethal and edema factors of anthrax toxin. *J. Mol. Biol.* **344**, 739–756 (2004).

47. Das, D. & Krantz, B. A. Peptide- and proton-driven allosteric clamps catalyze anthrax toxin translocation across membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 9611–9616 (2016).
48. Gonti, S., Westler, W. M., Miyagi, M. & Bann, J. G. Site-Specific Labeling and 19F NMR Provide Direct Evidence for Dynamic Behavior of the Anthrax Toxin Pore ϕ -Clamp Structure. *Biochemistry* **60**, 643–647 (2021).
49. Pei, D. & Dalbey, R. E. Membrane translocation of folded proteins. *J. Biol. Chem.* **298**, 102107 (2022).
50. Zimmermann, R., Eyrich, S., Ahmad, M. & Helms, V. Protein translocation across the ER membrane. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1808**, 912–924 (2011).
51. Rapoport, T. A., Li, L. & Park, E. Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **33**, 369–390 (2017).
52. Endo, T. & Yamano, K. Multiple pathways for mitochondrial protein traffic. **390**, 723–730 (2009).
53. Wasilewski, M., Chojnacka, K. & Chacinska, A. Protein trafficking at the crossroads to mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1864**, 125–137 (2017).
54. Neupert, W. & Herrmann, J. M. Translocation of Proteins into Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 723–749 (2007).
55. Hsp70 chaperones accelerate protein translocation and the unfolding of stable protein aggregates by entropic pulling | PNAS. <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0510496103>.
56. Hirst, T. R. & Holmgren, J. Conformation of protein secreted across bacterial outer membranes: a study of enterotoxin translocation from *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 7418–7422 (1987).
57. Hardie, K. R., Schulze, A., Parker, M. W. & Buckley, J. T. *Vibrio* spp. secrete proaerolysin as a folded dimer without the need for disulphide bond formation. *Mol. Microbiol.* **17**, 1035–1044 (1995).
58. Ernst, K. *et al.* A novel Hsp70 inhibitor prevents cell intoxication with the actin ADP-ribosylating *Clostridium perfringens* iota toxin. *Sci. Rep.* **6**, 20301 (2016).
59. Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y. & Au, K. F. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat. Biotechnol.* **39**, 1348–1365 (2021).
60. Yamada, T. *et al.* Cryo-EM structures reveal translocational unfolding in the clostridial binary iota toxin complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **27**, 288–296 (2020).
61. Vandekerckhove, J., Schering, B., Bärmann, M. & Aktories, K. *Clostridium perfringens* iota toxin ADP-ribosylates skeletal muscle actin in Arg-177. *FEBS Lett.* **225**, 48–52 (1987).
62. Hauer, F. *et al.* GraDeR: Membrane Protein Complex Preparation for Single-Particle Cryo-EM. *Struct. Lond. Engl. 1993* **23**, 1769–1775 (2015).
63. Yamada, T. & Tsuge, H. Preparation of *Clostridium perfringens* binary iota-toxin pore

- complex for structural analysis using cryo-EM. in *Methods in Enzymology* vol. 649 125–148 (Elsevier, 2021).
64. Zivanov, J. *et al.* New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *eLife* **7**, e42166 (2018).
 65. Zheng, S. Q. *et al.* MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* **14**, 331–332 (2017).
 66. Zhang, K. Gctf: Real-time CTF determination and correction. *J. Struct. Biol.* **193**, 1–12 (2016).
 67. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
 68. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132 (2004).
 69. Afonine, P. V. *et al.* Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.* **74**, 531–544 (2018).
 70. Yamashita, D. *et al.* Molecular basis of transmembrane beta-barrel formation of staphylococcal pore-forming toxins. *Nat. Commun.* **5**, 4897 (2014).
 71. Anderson, D. M., Sheedlo, M. J., Jensen, J. L. & Lacy, D. B. Structural insights into the transition of *Clostridioides difficile* binary toxin from prepore to pore. *Nat. Microbiol.* **5**, 102–107 (2020).
 72. Xu, X. *et al.* Structure of the cell-binding component of the *Clostridium difficile* binary toxin reveals a di-heptamer macromolecular assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 1049–1058 (2020).
 73. Kawamoto, A. *et al.* Cryo-EM structures of the translocational binary toxin complex CDTa-bound CDTb-pore from *Clostridioides difficile*. *Nat. Commun.* **13**, 6119 (2022).
 74. Cryo-EM structures of the translocational binary toxin complex CDTa-bound CDTb-pore from *Clostridioides difficile*. <https://www.researchsquare.com> (2021) doi:10.21203/rs.3.rs-1018941/v1.
 75. Punjani, A. & Fleet, D. J. 3D variability analysis: Resolving continuous flexibility and discrete heterogeneity from single particle cryo-EM. *J. Struct. Biol.* **213**, 107702 (2021).
 76. Gerding, D. N., Johnson, S., Rupnik, M. & Aktories, K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* **5**, 15–27 (2014).
 77. Stubbs, S. *et al.* Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**, 307–312 (2000).
 78. Schwan, C. *et al.* *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 2313–2318 (2014).

79. Sheedlo, M. J., Anderson, D. M., Thomas, A. K. & Lacy, D. B. Structural elucidation of the *Clostridioides difficile* transferase toxin reveals a single-site binding mode for the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 6139–6144 (2020).
80. Smart, O. S., Neduvetil, J. G., Wang, X., Wallace, B. A. & Sansom, M. S. P. HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J. Mol. Graph.* **14**, 354–360 (1996).
81. Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J. & Brubaker, M. A. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods* **14**, 290–296 (2017).

謝辞

本研究を行うにあたってご指導下さいました京都産業大学生命科学部の津下英明教授，日本女子大学理学部の吉田徹助教に心より感謝申し上げます。

本研究においてクライオ電子顕微鏡を用いたデータの取得，単粒子構造解析による重要な結果を示して頂いた，大阪大学蛋白質研究所の加藤貴之教授および川本晃大助教，超高压電子顕微鏡センターの光岡薫教授，筑波大学の岩崎憲治教授に深く感謝致します。相互作用解析において重要なデータを示して下さいました，株式会社堀場製作所分析・計測開発本部の佐藤優穂博士に心より感謝申し上げます。またクライオ電子顕微鏡の操作を訓練して頂いた，大阪大学蛋白質研究所の加藤研究室の諸氏，京都大学ウイルス・再生医科学研究所の野田研究室の諸氏に感謝の意を記します。そして苦楽を共にしてきた京都産業大学津下研究室の諸氏に感謝致します。長きに渡り大変お世話になりました。

最後になりますが支えてきて下さった親族の皆様，特に両親に厚く感謝申し上げます。

2022年12月 山田 等仁