

コンスアロールに特異的に結合するPoririmpolyvinil (8-重合)
の生化学的研究

岩本 真知子

①

コレステロールに特異的に結合するPerfringolysin O (θ -毒素)
の生化学的研究

岩本 真知子

目次

略語	2
序章	3
第1章 θ -毒素、切断毒素の調製とその構造	
はじめに	5
材料と実験方法	5
結果および考察	7
まとめ	11
第2章 毒素の溶血活性と赤血球への結合能におけるチオール基の役割	
はじめに	12
実験方法	12
結果および考察	13
まとめ	18
第3章 切断毒素のフラグメントの単離とその性質	
はじめに	19
実験方法	19
結果および考察	21
まとめ	26
第4章 毒素会合体形成による溶血とそれに対するT2の阻害効果	
はじめに	28
実験方法	28
結果および考察	30
まとめ	33
第5章 総括的考察および毒素のプロープとしての応用に関する考察	34
謝辞	39
引用文献	40

略語

本論文中で使用した主な略語を以下に示す。

θ -毒素	perfringolysin O
C θ	ズブチリシン・カールスバーク切断 θ -毒素
T θ	トリプシン切断 θ -毒素
DTNB	5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)
NEM	N-エチルマレイミド
DTNB- θ	チオール基をDTNBで修飾した θ -毒素
NEM- θ	チオール基をNEMで修飾した θ -毒素
CN- θ	チオール基をNaCNで修飾した θ -毒素
DTT	ジチオスレイトール
PMSF	フェニルメチルスルホニルフロリド
SDS	ラウリル硫酸ナトリウム
SDS-PAGE	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	10 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 / 150 mM NaCl
BSA	牛血清アルブミン
HD ₅₀	一定の条件で50%の溶血を起こすのに必要な毒素量
HU	溶血単位: 1 HUは2.5 mM DTTをふくむ0.5%羊赤血球 1 mlの37°C 30分間でのHD ₅₀ とした。
[¹²⁵ I] θ	放射性ヨード標識をした θ -毒素
[¹²⁵ I] C θ	放射性ヨード標識をした C θ

序章

Clostridium perfringens は土壤中に存在する嫌気性グラム陽性菌で、種々の酵素や毒素を菌体外に産生し、ヒトのガス壊疽や食中毒の原因になっている(1,2)。この菌の産生する毒素のうちperfringolysin O (θ -毒素)は強い溶血作用を持つチオール活性化毒素の一つとして知られている。チオール活性化毒素にはClostridium 属のほかにBacillus属、Streptococcus 属、Listeria属などの細菌が産生する10数種類の蛋白質毒素が含まれている(3-6)。これらの毒素は、活性発現に還元されたチオール基が必須とされ(7-14)、少量のコレステロールによって不可逆的に失活し(11-16)、分子量や等電点など生化学的な性質の類似性(1-3) および血清学的な交差反応性(4, 13, 17) などから、共通性の高い毒素群として一括して考えられてきた。これらの毒素はその高い溶血活性のほか、アミノ酸やヌクレオシドの細胞膜透過への影響(18)、レクチンによるリンパ球のプラスト化の阻害(19)、白血球の遊走阻止(20, 21) などが報告されているが、実際の感染症でどのような働きをしているかは明らかになっていない。しかし、Listeria monocytogenes の変異株で活性のあるチオール活性化毒素を産生しない菌は病原性を持たないという報告もあり(22)、これらの毒素が感染症の成立に何らかの関係があるものと考えられる。

最近、 θ -毒素(23)、ストレプトリジンO(24)、ニューモリジン(25)、リステリオリジンO(26)の4種類のチオール活性化毒素の遺伝子の塩基配列とアミノ酸一次構造が報告され、高い相同性のあることが明らかになった。特に、それぞれの毒素に一残基のみ含まれるシステイン残基近傍の11~13残基のアミノ酸配列は完全に一致しており、この部分の重要性が推測されているが、実際の溶血反応におけるチオール基の役割は明らかにされていない。

また、チオール活性化毒素の溶血活性が少量のコレステロールによって失われ(11-16)、コレステロールを含まない細菌の膜は破壊されないことから(5)、細胞膜のコレステロールが毒素の結合部位であると考えられている。コレステロール類似体による毒素の不活性化を調べることにより(4, 6, 14)、コレステロールの β 3-水酸基および17位の脂肪族側鎖が毒素との結合に特に重要であることが明らかにされた。このようにコレステロールという特異性の高い結合部位が存在するにもかかわらず、チオール活性化毒素による溶血機構は解明されていなかった。

このチオール活性化毒素による溶血機構を明らかにするために、様々な θ -毒素の

誘導体を調製し（第1章）、それを使って研究を進めた。チオール基を修飾した θ -毒素を使用した研究により、チオール基周辺の構造が毒素と細胞膜コレステロールとの結合に重要な役割を果していることが明らかになった（第2、3章）。また、 θ -毒素のC末端側のフラグメントを使用することにより、この部分がコレステロール結合部位を含んでおり（第3章）、毒素分子の会合体の形成が溶血の機構であることを示すことができた（第4章）。さらに毒素のコレステロールに対する結合が高い特異性と親和性を持つことから、今後生体内でのコレステロールの分布や機能の研究のプロープとしての応用性に関して考察した（第5章）。

第1章 θ -毒素、切断毒素の調製とその構造

はじめに

θ -毒素の細胞膜コレステロールへの結合とその溶血機構を明らかにするため、まず毒素の精製と切断毒素の調製を行って毒素分子の構造について検討した。

材料と実験方法

試薬類

特に付記したものの以外の一般的な試薬は主に和光純薬工業と半井化学薬品の特級品を使用した。

θ -毒素の精製

Clostridium perfringens (type A, PB6K15) の培養液 (20 l) を限外ろ過により濃縮後 50 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 に透析し、DEAE-Sephadex A-50 にかけて α -毒素を吸着させた未吸着画分を千葉県血清研究所の鷹野サナエ氏、泉七江氏より供与いただき、これを θ -毒素精製の出発材料とした。

コレステリルヘミサクシネートをリガンドとして Sepharose 6B に結合させたアフィニティークロマトグラフィー担体を富山医科薬科大学、三井健一郎助教授から提供していただいた。上記の C. perfringens の培養液の DEAE-Sephadex A-50 未吸着画分に硫酸を 1 M になるように加え、緩衝液 A (70 mM リン酸緩衝液 pH 6.0 / 78 mM NaCl / 1 M 硫酸) で平衡化したコレステリルヘミサクシネート-Sepharose 6B カラム (150 ml) にかけて。このカラムを緩衝液 A で十分に洗浄後、緩衝液 A、緩衝液 B (70 mM リン酸緩衝液 pH 6.0 / 78 mM NaCl / 0.2 M 硫酸 / 40 % エチレンジグリコール) の linear gradient とさらに充分量の緩衝液 B により θ -毒素を溶出した。溶出液の溶血活性と SDS-PAGE のパターンから判定して θ -毒素を含む画分を集め、1 mM ジチオスレイトール (DTT) を含む 20 mM トリス塩酸緩衝液 pH 7.5 で透析した後、同一緩衝液で平衡化した DE-52 (150 ml, Whatman) カラムにかけて。この緩衝液中で 0 - 0.15 M NaCl の linear gradient により θ -毒素を溶出し、溶出液の SDS-PAGE より θ -毒素単一バンドの画分を集め、10 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 に透析して以後の実験に使用した (27)。

切断毒素C θ 、T θ の調製

θ -毒素をズブチリシン・カールスバークおよびトリプシンによって限定分解し、切断毒素C θ 、T θ を調製した。50 mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.8 中の θ -毒素に1/25量のズブチリシン・カールスバーク(Sigma) 又は1/20量のトリプシン(Worthington, TPKC処理したもの)を加え、25°Cで3時間保温後、さらに同量のプロテアーゼを加えて25°Cで一晩保温した。ズブチリシン・カールスバーク切断毒素(C θ)は、これに3.3 mMになるようフェニルメチルスルフォニルフロリド(PMSF, Sigma)を添加した後、蒸留水で4倍に希釈してから20 mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.8 で平衡化したDE-52のカラムにかけた。吸着せずに溶出されるプロテアーゼを洗い去った後、同一緩衝液中での0 - 0.3 M NaClのlinear gradientによりC θ を溶出し、透析して使用した。トリプシン切断毒素(T θ)はプロテアーゼ処理後0.5 MになるようNaClを添加し、50 mM トリス塩酸緩衝液 pH 8.8/0.5 M NaClで平衡化したBenzamide-Sepharose 6Bカラム(Pharmacia)にかけてトリプシンを吸着させ、未吸着分画を集めて透析し、T θ として使用した。

蛋白質の定量はLowry等の方法(28)に従って行った。

2-ニトロチオシアノ安息香酸による θ -毒素の化学的切断

システイン残基部分での θ -毒素の切断は、2-ニトロチオシアノ安息香酸を使用したJacobsonらの方法(29)に準じて行った(30)。

ゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は12%又は15%のポリアクリルアミドゲルを用いてLaemmliの方法(31)にしたがって行った。分子量マーカーはBio-Rad社の低分子用マーカーを使用した。二次元電気泳動はO'Farrellらの方法(32)にしたがって行った。一次元目の等電点電気泳動ではLKB社のAmpholineを用い、尿素は必要に応じて添加した。二次元目は通常の12%アクリルアミドゲルを使用したSDS-PAGEにより行った。泳動したゲルはMerrillらの方法(33)に準じた銀染色によって蛋白質のバンドを検出した。

アミノ酸分析とN末端アミノ酸配列の分析

C θ 、T θ はそれぞれTSK gel-TMS 250 カラム (0.4 x 10 cm, 東洋曹達工業) を使った高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.1% トリフルオロ酢酸中で 0 - 60% のアセトニトリルの linear gradient によりフラグメントを単離した。 θ -毒素および高速液体クロマトグラフィーで分離したフラグメントは減圧下で 6 N 塩酸、110°C、20時間の条件で加水分解し、日立自動アミノ酸分析機 (835-50) によりアミノ酸組成の分析を行った。N末端アミノ酸配列の分析にはアブライド・バイオシステムスのプロテイン・シーケンサー (モデル 470 A) を用いた。

結果および考察

切断毒素C θ 、T θ の調製

θ -毒素 (分子量 Mr 53000) をトリプシン又はズブチリシン・カールスバーグと一晚保温することによって二種類の切断毒素 T θ 、C θ が得られた。これらの切断毒素はプロテアーゼを更に加えて保温してもそれ以上の切断は起こらなかった。SDS-PAGEによる分析の結果 (図1-1)、トリプシン切断毒素 (T θ) ズブチリシン・カールスバーグ切断毒素 (C θ) どちらも2つのフラグメントから成ることがわかり、それぞれ分子量の大きいフラグメントから T1 (Mr 28000)、T2 (Mr 25000)、C1 (Mr 38000)、C2 (Mr 15000) と呼ぶことにした。

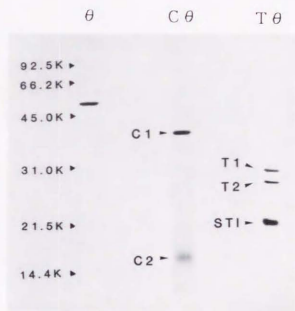


図1-1 θ -毒素と切断毒素C θ 、T θ の SDS-PAGEパターン (27)

12%アクリルアミドゲルを用い、Laemmliの方法で電気泳動を行った。矢印は分子量マーカーの位置と、フラグメントの位置を示す。

STI : ダイストリプシンインヒビター

等電点の測定

θ -毒素及び切断毒素の性質を調べるため二次元電気泳動を行った(図1-2)。一次元目の等電点電気泳動に尿素を加えて行った二次元電気泳動では(図1-2、B、D)、マーカーと比較して得られたそれぞれのフラグメントの等電点(pI)はT1(pI 9.7)、T2(pI 5.2)、C1(pI 5.9)、C2(pI 9.6)で、 θ -毒素では6.9であった。しかし、等電点電気泳動に尿素を加えないで行った二次元電気泳動では(図1-2、A、C)、個々のpIが大きく違うにもかかわらず、どちらの切断毒素でも2つのフラグメントが等電点の同じ位置に泳動され、T θ 、C θ とも変性していない条件では2つのフラグメントの複合体として存在していることが示された。

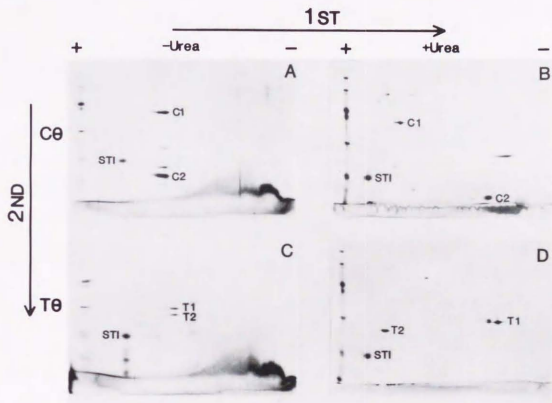


図1-2 C θ 、T θ の二次元電気泳動パターン(27)

O'Farrell 等の方法に従って、一次元目は非平衡等電点電気泳動をA、Cでは尿素を加えずに、B、Dでは9 M 尿素存在下で行った。二次元目は12 %ゲルを使ったSDS-PAGEを行った。内部標準位置マーカーとしてダイズトリプシンインヒビター(STI)を用いた。
A、B : C θ の泳動パターン。 C、D : T θ の泳動パターン。

表1-1 θ -毒素と各フラグメントのアミノ酸組成

アミノ酸	θ -Toxin	C1	C2	C1+C2	T1	T2	T1+T2
Asp	75.4	53.6	21.5	75.1	40.3	36.7	77.0
Thr	35.4	27.2	6.2	33.4	15.7	21.3	37.0
Ser	46.8	32.1	13.8	45.9	27.9	19.2	47.1
Glu	42.8	32.0	11.5	43.5	21.8	22.6	44.4
Pro	19.1	12.1	8.3	20.4	12.1	9.8	21.9
Gly	23.1	13.3	9.0	22.3	11.8	12.3	24.1
Ala	32.3	27.8	5.1	32.9	16.0	17.6	33.6
Cys	1.0	0.6	0	0.6	0	0.9	0.9
Val	38.7	28.4	10.3	38.7	21.9	16.8	38.7
Met	4.5	3.8	1.2	5.0	3.8	0.4	4.2
Ile	31.3	17.9	11.5	29.4	16.8	13.8	30.6
Leu	30.8	21.8	9.2	31.0	19.2	10.1	29.3
Tyr	24.8	20.6	4.0	24.6	10.3	15.9	26.2
Phe	13.7	11.4	3.2	14.6	7.8	6.6	14.4
Lys	43.6	29.6	14.4	44.0	26.5	17.7	44.2
His	6.5	6.3	0.1	6.4	1.6	5.8	7.4
Arg	17.1	10.3	6.9	17.2	9.1	6.0	15.1
Total	486.9	348.8	136.2	485.0	262.6	233.5	496.1

θ -毒素の分子量を53000として計算した毒素1分子あたりのアミノ酸残基の数を示した。
システイン残基は過硫酸酸化の後、測定した。

	1	5	10	15	20	25	30	35									
θ -Toxin	K	K	I	T	D	I	N	Q	S	I	D	S	G	I	X	X	L
T1	K	K	I	T	X	I	N	Q	X	I							
C2																	
T2	N	S	Q	Q	Y	S	D	I	Y	E	N	S	X	F			
C1	X	T	L	P	A	R	T	Q	Y	S	E	X					

図1-3 θ -毒素と各フラグメントのN末端アミノ酸配列

アミノ酸組成とN末端アミノ酸配列の分析

高速液体クロマトグラフィーによって単離したフラグメントのアミノ酸組成の分析の結果を表1-1に示した。C1とC2およびT1とT2のアミノ酸組成の和は θ -毒素のアミノ酸組成と非常に近い値を示し、プロテアーゼによる切断が限定的に起こっていると推定できる。また、 θ -毒素1分子に1残基だけ含まれていると報告されるシステイン残基は(7)、T2とC1に存在することが明らかになった。 θ -毒素とフラグメントのN末端アミノ酸分析の結果(図1-3)、T1と θ -毒素のN末端から8残基の配列が一致したがT2のN末端の配列は異なり、T θ ではT1が θ -毒素のN末端側を、T2がC末端側を占めることがわかった。このT2のN末端アミノ酸配列は、DNAのクローニングを行って θ -毒素のアミノ酸配列を決定したTwetenにより、 θ -毒素の276番目からC末端側のアミノ酸配列と一致することが報告されている(23)。また、C θ のトリプシン分解によってT2が生成することと、C2のN末端11残基のうち7残基が θ -毒素のN末端から7残基目からの11残基の配列と一致することからC1が θ -毒素のC末端側に位置し、C2が6残基短いN末端を含むことが明らかになった。さらに、2-ニトロロチオシアノ安息香酸により θ -毒素のシステイン残基部分で切断を起こし、SDS-PAGEで分析した結果(図1-4)分子量48000と50000のフラグメントが検出された。アミノ酸分析よりC末端側フラグメントT2、C1がシステインを含むことがわかっているので、システインは θ -毒素のC末端からおよそ5000ダルトンの位置にあることが明らかになった。これまでわかっていた θ -毒素とT θ 、C θ の構造の模式図を図1-5に示す。

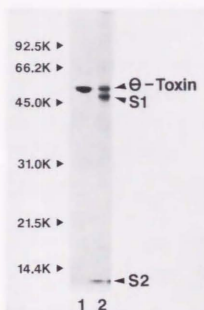


図1-4 2-ニトロロチオシアノ安息香酸による
 θ -毒素のシステイン残基での切断(30)

12%ゲルのSDS-PAGEパターン。1： θ -毒素、
2：2-ニトロロチオシアノ安息香酸切断毒素。
左側に分子量マーカーの位置を、右側に θ -毒素と
フラグメントの位置を示す。

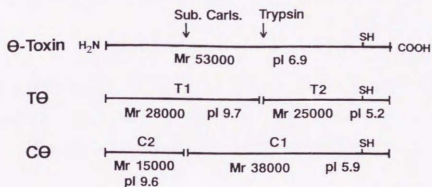


図1-5 θ -毒素と切断毒素C θ 、T θ の構造の模式図

まとめ

- (1) θ -毒素を精製し、プロテアーゼ限定分解により二種類の切断毒素C θ 、T θ を調製した。
- (2) C θ 、T θ はどちらもN末端側の塩基性のフラグメントとC末端側の弱酸性のフラグメントの複合体として存在していた。
- (3) チオール基を持つシステイン残基は毒素分子中に一残基のみC末端側からおよそ5000ダルトンの位置に存在しており、切断毒素ではC末端側のフラグメントC1、T2に含まれていた。

Biochemistry 25, 6048 - 6053, (1986) および

Eur. J. Biochem. 167, 425 - 430, (1987) に発表

第2章 毒素の溶血活性と赤血球への結合能におけるチオール基の役割

はじめに

チオール活性化毒素の活性の発現には還元型のチオール基が必須と考えられている(7-13)。溶血反応におけるチオール基の役割を調べるため、チオール基を修飾した θ -毒素と切断毒素を調製し、その溶血活性と赤血球への結合能を測定した。

実験方法

チオール基を修飾した毒素の調製

θ -毒素、切断毒素およびT2のチオール基の修飾には、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、N-エチルマレイミド(NEM)、シアン化ナトリウム(NaCN)を使用した。50 mM リン酸緩衝液 pH 8.0 に溶解した 10 μ M 以下の毒素またはフラグメントを 500 μ M DTNBまたは 1 mM NEM と各々10分間または30分間室温で反応させた(33)。シアン化の場合はDTNB化した毒素をP6-DG (Bio-Rad) のカラムに通して過剰のDTNBを除いた後 5 mMになるようNaCNを加え、室温で1時間反応させた。シアノ基によって置換されて遊離してくる2-ニトロ-5-チオ安息香酸を 410 nm の吸光度により測定したところ、90 %以上がシアノ基によって置換されていた。

溶血活性の測定

θ -毒素の活性は羊赤血球に対する溶血能によって測定した。羊赤血球は市販の羊保存血液を10 mM リン酸緩衝液 pH 7.0/150 mM NaCl (PBS)で3回洗浄し、ヘマトクリットにより濃度を調整した。 θ -毒素またはその切断毒素やフラグメントは 1 mg/ml牛血清アルブミン(BSA)を含むPBSで希釈して活性測定に用いた。通常の溶血反応は 0.25 mlの希釈した毒素溶液に 0.75 mlの0.67 %羊赤血球を加え、37°Cで30分保温した後遠心し、上清の540 nmの吸光度から溶血率を算出した。2.5 mM DTTを含む0.5 %羊赤血球 1 mlを37°Cで30分間に50 %溶血させるのに必要な毒素量(HD₅₀)を1溶血単位(1 HU)とした。溶血反応の毒素-溶血曲線はシグモイド形を示し、この曲線からHD₅₀値を求めることは誤差が生じやすいので、補体の溶血曲線の直線化に用いるvon Kroghの式(34)を用いて溶血曲線を直線化し、HD₅₀値を求めた。

毒素の赤血球への結合の測定

θ -毒素、切断毒素およびその誘導体と種々の濃度の羊赤血球を0.5 mg/ml のBSAを含むPBS中で20℃で15分間保温した。反応液を速心して上清を分離し、それに含まれている毒素を2.5 mMのDTTを含む溶血反応によって測定し、検量線から残存量を求め100%から差し引いて結合率を求めた(30)。

結果および考察

θ -毒素と切断毒素の溶血活性

切断毒素C θ 、T θ の37℃での溶血活性を θ -毒素と比較した結果を図2-1に示す。図2-1Aのシグモイドの曲線を von Kroghの式によって変換すると図2-1Bのような直線が得られ、50%溶血を起こすに必要な毒素量(HD₅₀)は横軸(H/1-H: Hは溶血率)の値が1の時の縦軸の値で示される。0.5%の羊赤血球1mlに対するHD₅₀の値は θ -毒素、C θ 、T θ でそれぞれ0.34 ng、0.86 ng、1.27 ngとなり、 θ -毒素を100%とした時の相対的な溶血活性はC θ が40%、T θ が27%であった。 θ -毒素とT θ は低温でも溶血活性を保持しているが、C θ は20℃以下では溶血を起こさなかった(27,40 図4-1)。

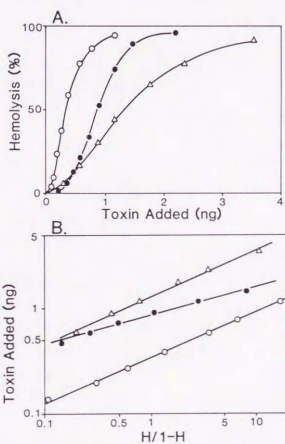


図2-1 θ -毒素、C θ 、T θ の溶血活性(27)

A: 0.5%羊赤血球1mlに各濃度の毒素を加え、37℃で30分間保温した時の溶血曲線。

B: Aを von Krogh の式によって変換したもの。

Hは溶血率を示す。

○: θ -毒素、 ●: C θ 、 △: T θ 。

チオール基修飾毒素の溶血活性

θ -毒素のチオール基をDTNBで修飾した毒素(DTNB- θ)とNEMで修飾した毒素(NEM- θ)の溶血活性を θ -毒素と比較した。図2-2は0.5%の羊赤血球1mlを使用した時の溶血曲線を示し、これから von Kroghの式によって求めた HD_{50} の値が表2-1である。DTNBによるチオール基の修飾は可逆的であるため、還元剤DTTを含まない反応系ではDTNB- θ の溶血活性は非常に低下しているが(およそ1/35)、DTTを反応系に加えると修飾されていない θ -毒素にほぼ等しい HD_{50} 値を示すまでにDTNB- θ の活性が回復している。それに対して非可逆的な修飾剤であるNEMで修飾したNEM- θ の場合はDTTの存在にかかわらず溶血活性はおよそ1/70に低下していた。

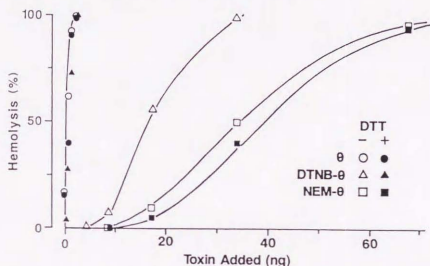


図2-2 θ -毒素とチオール基修飾毒素の溶血曲線(30)

0.5%羊赤血球1mlに各濃度の毒素を加え、37℃で30分間反応させ溶血率を測定した。

白印は反応系にDTTを含まない場合、黒印は含む場合を示す。

○、●： θ -毒素、△、▲：DTNB- θ 、□、■：NEM- θ 。

一方、20%の羊赤血球100 μ lを使用して溶血活性を測定した場合の HD_{50} は表2-2に示すようにDTNB- θ では θ -毒素のおよそ2.5倍、NEM- θ では4.2倍と0.5%赤血球の場合に比べて溶血活性の低下の割合が少ないことがわかった。もし、修飾毒素が全く溶血活性を持たないとすれば、赤血球の濃度を変えても θ -毒素と修飾毒素との HD_{50} の比は変化しないはずである。しかし赤血球の濃度を高くすると θ -毒素との差が少なくなってくることは、修飾毒素自身が溶血活性を持つことを示している。さらに非可逆的な修飾を受けたNEM- θ でも溶血活性を示すことから、赤血球膜上で蛋白質と修飾毒素が反応し、毒素のチオール基が還元されて溶血を起こすという可能性は少ないと考えられる。

表 2-1 θ -毒素とチオール基修飾毒素の0.5%羊赤血球に対する HD_{50} 値

毒素	HD_{50}	
	- DTT	+ DTT
θ	0.44 ng (1.0)	0.51 ng (1.0)
DTNB- θ	15.19 (34.5)	0.76 (1.5)
NEM- θ	30.04 (68.3)	35.44 (69.5)

37℃、30分間の反応で、0.5%の羊赤血球1mlに対する HD_{50} の値を図2-2の溶血曲線からvon Kroghの式によって求めた。

()内は θ -毒素を1とした時の割合を示す。

表 2-2 20%羊赤血球に対する θ -毒素とチオール基修飾毒素の HD_{50} 値

毒素	HD_{50}	
	- DTT	+ DTT
θ	3.59 ng (1.0)	4.33 ng (1.0)
DTNB- θ	9.07 (2.5)	4.33 (1.0)
NEM- θ	15.19 (4.2)	14.56 (3.4)

37℃、30分間の反応で、20%の羊赤血球100 μ lに対する HD_{50} の値をvon Kroghの式によって求めた。()内は θ -毒素を1とした時の割合を示す。

θ -毒素とDTNB- θ の結合親和性の比較

チオール活性化毒素の溶血活性は、毒素の赤血球膜への結合と、その後の溶血に至るまでの過程という2段階の反応と考えられている。チオール基修飾による毒素の溶血活性の低下の原因がどちらの段階にあるのかを調べるため、 θ -毒素とDTNB- θ の赤血球への結合親和性を比較した。種々の濃度の赤血球と一定量の毒素を20℃で15分間保温し上清に残った毒素を添加量から差し引いて求めた結合毒素の割合を図2-3に示す。

0.5%の赤血球で θ -毒素は90%以上が結合しているのに対し、DTNB- θ はほとんど結合していなかった。しかし赤血球濃度の上昇につれてDTNB- θ の結合割合も増加し、50%の毒素が結合するのに必要な赤血球の濃度は θ -毒素で0.16%、DTNB- θ では5.2%となっ

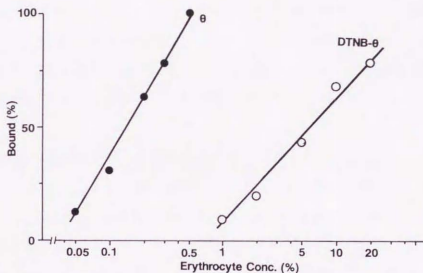


図2-3 θ -毒素、DTNB- θ の赤血球への結合

種々の濃度の羊赤血球と一定量の毒素を20℃で15分間 DTT を含まない系で反応させ、上清に残る毒素量を溶血反応によって定量し、結合量を求めた。

●: θ -毒素、○: DTNB- θ 。

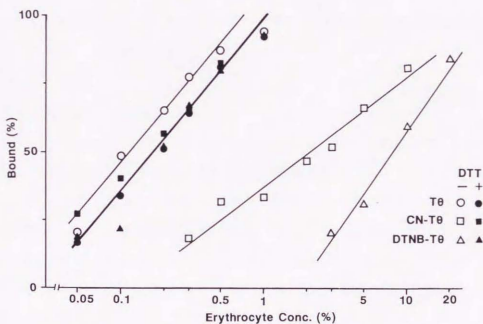


図2-4 T θ の赤血球への結合に対するチオール基修飾の影響
種々の濃度の羊赤血球と一定量の毒素を20℃で15分間反応させ、上清に残る毒素量を溶血反応によって定量し、結合量を求めた。

白印は結合反応系にDTT を含まない場合、黒印は含む場合を示す。

○、●: T θ 、□、■: CN-T θ 、△、▲: DTNB-T θ 。

た。この結果から、チオール基の修飾によって赤血球に対する毒素の結合親和性が非常に低下していることが明らかになり、チオール基の修飾は少なくとも毒素の細胞膜への結合段階を阻害することが示された。これはシステイン残基を含むC末端近傍部分が赤血球膜との結合に関与していることを示唆している。

修飾基の大きさと結合親和性の関係

DTNBによるチオール基の修飾で毒素の赤血球に対する結合親和性が大きく低下することがわかったので、修飾する基の大きさと親和性の低下の関係を切断毒素T θ とそのチオール基の修飾毒素 DTNB-T θ 、CN-T θ を用いて調べた。図2-4に示すように赤血球への結合親和性はT θ 、CN-T θ 、DTNB-T θ と修飾する基が大きくなるにつれて低下している。この結合親和性の低下は溶血活性と同様にDTTの添加により回復した。また、0.5%赤血球に対する溶血活性を調べるとHD₅₀はT θ 、CN-T θ 、DTNB-T θ がそれぞれ1.95、14.0、92.7 ngとなり、DTNB-T θ に比べCN-T θ のほうがより強い溶血活性を持つことがわかった。同様の結果が θ -毒素を修飾した場合にも得られ、チオール基の修飾によって毒素の結合部位が覆われてしまうために、赤血球へ結合しにくくなり、溶血活性が低下すると考えられ、毒素のC末端付近のシステイン残基周辺が赤血球結合部位の少なくとも一部分ではないかと考えられる。

修飾毒素のプロテアーゼ感受性

チオール基の修飾によって赤血球に結合しにくくなった毒素の構造に何らかの変化が起きているか否かを調べるため、 θ -毒素と修飾毒素のプロテアーゼ消化に対する感受性を比較した。 θ -毒素、CN- θ 、DTNB- θ をズブチリシン・カールスバーグで消化した試料をSDS-PAGEによって分析すると(図2-5)、 θ -毒素は切断されてC θ を生成するがそれ以上の消化は起きなかった。しかし、DTNB- θ はC1、C2に相当するフラグメントが出現するものの、そこでは消化が停止せずより小さく断片化されてフラグメントとして残るものはなかった。CN- θ はDTNB- θ ほど消化の進行が早くはないが、同一条件での θ -毒素と比較すると明らかにC1、C2のフラグメントが少なく、時間をかければ消化が進行するものと考えられる。この結果からはチオール基の修飾によって毒素の構造にも何らかの変化が起きていることが示唆され、赤血球への結合親和性の低下が単に修飾基による結合部位の遮蔽の影響だけではない可能性もある。ただ、DTNB- θ を

DTT で還元してからプロテアーゼで処理したものは θ -毒素と同様C θ 以降の消化は起こらないので(30)、この構造変化は可逆的なものと考えられる。

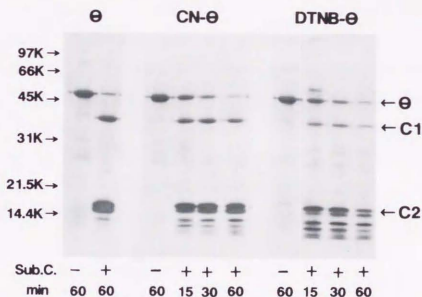


図2-5 θ -毒素のプロテアーゼ消化に対するチオール基修飾の影響
 毒素 3 μ g に 0.3 μ g のズブチリン・カールスバークを加え、室温で反応させた。
 一定時間後に 3.3 mM になるよう PMSF を添加して反応を停止させ、SDS-PAGE でフラグ
 メントの生成量を調べた。 Sub.C : ズブチリン・カールスバーク。

まとめ

- (1) 切断毒素も溶血活性を保持しており、 θ -毒素を 100% とした時 C θ は 40%、T θ は 27% であった。しかし C θ は 20°C 以下では溶血活性を示さなかった。
- (2) チオール基を修飾することにより溶血活性は非常に低下した。しかし赤血球濃度を高くすると θ -毒素と修飾毒素の溶血活性の差が少なくなることから、修飾毒素にもある程度の溶血活性があると考えられる。
- (3) 修飾毒素では赤血球に対する結合の親和性が低下していた。この結合親和性の低下と修飾基の大きさの間には相関関係があり、修飾基が結合部位を覆い隠すために修飾毒素が結合しにくくなるものと考えられた。
- (4) 修飾毒素はプロテアーゼに対して感受性が高くなっていた。このことからチオール基の修飾は毒素の立体構造にも何らかの影響を与えていると考えられる。

Eur. J. Biochem. 167, 423 - 430, (1987) に発表

第3章 切断毒素のフラグメントの単離とその性質

はじめに

毒素の赤血球結合部位をより詳細に調べるため、切断毒素のチオール基を含むフラグメントを活性を保ったままで単離することを試みた。二種類の切断毒素のうち、T θ をフラグメント調製のために使用した。これはT θ のC末端フラグメントT2がC θ のC末端フラグメントC1に比べて小さいので、T θ を用いた方がシステイン残基周辺の結合部位と思われる部分の機能を調べやすいと考えたためである。尿素を添加した二次元電気泳動ではT θ が解離していることが確認されているので(27)、T θ の解離には尿素を用い、フラグメントの等電点の差を利用してイオン交換クロマトグラフィーによる単離を試みた。

実験方法

T θ のフラグメントの単離

T θ (約 1 mg) 中に痕跡程度に混在するトリプシンを失活させるため、T θ 溶液にPMSFを3.3 mMになるよう添加し室温で10分間反応後、尿素を6 Mになるよう加え30℃で30分間保温してフラグメントを解離させた。これに尿素緩衝液(6 M 尿素/20 mMトリス塩酸緩衝液 pH 7.5/1 mM EDTA)で洗浄したBio-Gel HT(Bio-Rad) 200 μ lを加え、室温で5分間混合した後遠心し、その上清を尿素緩衝液で平衡化したDE-52カラム(3 ml)にかけた。カラムからの溶出は尿素緩衝液、20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0、20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0/150 mM NaCl、20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0/300 mM NaClの順でステップワイスに行った。未吸着画分に溶出されたT1フラグメントは4℃でPBSに対して透析し、300 mM NaClで溶出されたT2フラグメントは蒸留水を加えて等張にしてからそれぞれ1 mg/mlになるようBSAを添加し、以後の活性測定に用いた(35)。

溶血阻害活性の測定

T1、T2フラグメントはそれぞれ1 mg/mlのBSAを含むPBS(PBS/BSA)で希釈して使用した。希釈した50 μ lのフラグメントに25 μ lのPBS/BSA、15 μ lの2%羊赤血球を加え、10 μ lの θ -毒素を加えて反応を開始した。 θ -毒素は10℃で反応を行う場

合には10 HU、37℃では0.2 HUを加え、反応時間は10℃ではおよそ30分、37℃ではおよそ10分間であった。フラグメントを添加しない θ -毒素のみの試料が完全溶血を起こす少し前に遠心で反応を停止させ、70 μ lの上清を蒸留水で希釈して410nmの吸光度を測定し、溶血率を求めた。

毒素に結合する赤血球の膜脂質成分の検出

羊及びヒト赤血球からの脂質の抽出はBligh and Dyerの方法(36)に従って行った。抽出した脂質の一定量をプラスチックシリカゲル薄層プレート(Polygram Sil G; Machery-Nagel, Duren)にスポットし、安藤らの方法(37)に従って最初にクロロホルム/メタノール/酢酸/錳酸/水(35:15:6:2:1, v/v)、次にヘキサン/ジソプロピルエーテル/酢酸(65:35:2)の溶媒で展開した。脂質検出用のプレートは3%酢酸銅/8%リン酸溶液に浸してから140℃に加熱して脂質のスポットを発色させた。ほかのプレートは減圧下で乾燥後、ブロッキング用緩衝液(50 mMトリス塩酸緩衝液 pH 7.4/0.2 M NaCl/3% BSA/0.3%ゼラチン)に浸して非特異的な吸着を抑えてから θ -毒素またはT2で処理した。このプレートをイムノプロット法の場合(38)に準じて抗 θ -毒素ウサギ血清とペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG(Cappel)で処理し、4-クロロ-1-ナフトールと過酸化水素によって毒素と反応したスポットを発色させた。

使用した抗 θ -毒素ウサギ血清は、ホルマリンで不活性化した θ -毒素(39)を完全フロイントアジュバントと混合しウサギに免疫して作製した。

125 I標識毒素の調製

θ -毒素とC θ はラクトペルオキシダーゼとグルコースオキシダーゼを固定化させたエンザイモビーズ(Bio-Rad)を使用して放射性ヨード標識を行った(40)。エンザイモビーズ懸濁液50 μ lにチオール基をDTNBで保護したDTNB- θ またはDTNB-C θ (5-6 μ g)、0.4-0.6 mCiの 125 I、0.4%グルコースを含む80 mMリン酸緩衝液 pH 7.0の反応液125 μ lを加え、室温で15分間反応させた。これに2 μ lの1 M DIT、5 μ lの10% KI、20 μ lのBSAを添加して反応を停止させ、Bio-Gel P6-DGカラムにかけて素通り成分に溶出される 125 I標識毒素を回収した。

125 I標識毒素の赤血球への結合

0.25 mg/mlのBSA を含むPBS に懸濁した羊赤血球に一定量の 125 I標識毒素を加えて反応を開始した。この反応液100 μ l を遠心して上清と沈渣に分離し、それぞれの放射活性を測定して赤血球に結合した毒素の割合を求めた。

結果および考察

T θ のフラグメントの単離と溶血活性

T θ は複合体として存在している時はトリプシンに対して強い抵抗性を持ちそれ以上の消化を受けないが、尿素によって解離させると非常に容易に消化されてしまうことがわかった。そこでPMSFによって痕跡程度に残存しているトリプシンを失活させてから尿素を添加してフラグメントに解離させた。混在する θ -毒素をBio-Gel HTに吸着させて除いた後、DE-52 カラムにかけてT 2 を吸着させた。T 1 を含む未吸着画分はPBS で透析して尿素を除いた。カラムに吸着したT 2 はリン酸緩衝液で尿素を洗い去ってから

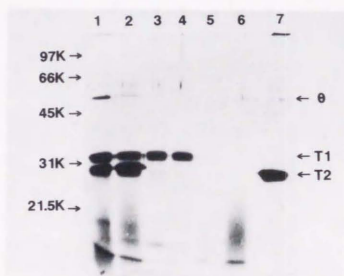


図3-1 DE-52 カラムクロマトグラフィーによるT θ フラグメントの単離 (35)

DE-52 カラムからの各段階の溶出液をSDS-PAGEによって分析した。

1 : T θ 、 2 : Bio-Gel HT処理上清、 3 : DE-52 カラム未吸着画分、

4 : 尿素緩衝液による溶出液、 5 : 20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 による溶出液、

6 : 20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0/150 mM NaCl による溶出液、

7 : 20 mM リン酸緩衝液 pH 7.0/300 mM NaCl による溶出液

左側に分子量マーカーの位置を、右側に θ -毒素とフラグメントの位置を示す。

150 mM NaCl でBio-Gel HTによっても除けなかった θ -毒素とより小さい断片を除き、その後300 mM NaCl で溶出した。図3-1は各段階の溶出液のSDS-PAGEパターンである。

この単離したT1、T2の溶血活性を測定したが、T1は5.18 μ g/ml、T2は7.77 μ g/mlを加えても全く溶血を起こさなかった。さらに3.88 μ g/mlのT1と4.14 μ g/mlのT2を同時に加えても溶血は起こらなかった。0.5% 羊赤血球1 mlに対するT θ のHD₅₀は3-5 ngなので、フラグメントに解離させてしまうと溶血活性は少なくとも1/1000以下に下がることになる。この結果から溶血を起こすためにはT1、T2が複合体を形成していることが必要であり、単離した二つのフラグメントを混合しただけでは複合体は形成されないと考えられる。このようにフラグメントに溶血活性が検出できなかったので、次に溶血活性以外の活性の有無について検討した。

フラグメントの溶血阻害活性

T1、T2どちらのフラグメントにも溶血活性が検出できなかったため、次に溶血阻害活性を測定したところ、T2に強い活性があることがわかった。図3-2に示すように θ -毒素によって起こされる溶血を100 μ l 中13.8 ng のT2で完全に阻害することができる。また、T2と同様にC θ を尿素処理によって解離させ DE-52カラムで単離したC1にも溶血阻害活性が認められ、C末端側のフラグメントにこの活性が共通に存在することがわかった。しかしT1は431 ngを加えても溶血阻害は起こらず、さらにT1とT2を1:1.24の比で混合した場合、その阻害は混合物中のT2の量によるものと一致していた。従ってT1はそれ自身が溶血阻害を起こさず、また、T2の溶血阻害作用に対しても何の影響も与えていないと考えられる。

T2のチオール基をDTNBで修飾すると溶血阻害活性は失われたが、DTTの添加によって完全に回復した(図3-3)。これらの結果はT2フラグメントが細胞膜への結合能を持っていることを強く示唆する。そこでT2と細胞膜との結合を調べた。

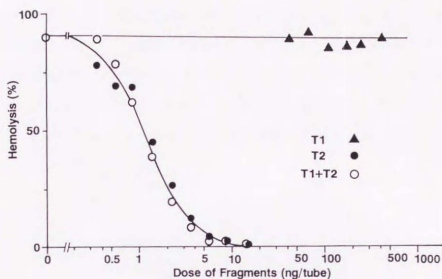


図3-2 θ -毒素による溶血に対するT1、T2フラグメントの影響(35)

T1、T2フラグメントと2.5 mM DTTを含む0.3%羊赤血球 100 μ l に15 HUの θ -毒素を加えて10 $^{\circ}$ Cで30分間反応させ、反応液の上清を希釈して410 nmの吸光度から溶血率を求めた。
 ▲: T1、●: T2、○: T1+T2。

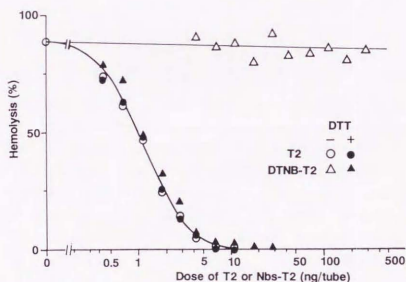


図3-3 T2の溶血阻害活性に対するチオール基修飾の影響(35)

0.3%羊赤血球にT2、DTNB-T2を加え、2.5 mMのDTTの共存する条件(黒印)またはしない条件(白印)で20 $^{\circ}$ C、15分間反応させた。これに1 HUの θ -毒素を添加し、37 $^{\circ}$ Cで5分間反応後、遠心上清の吸光度から溶血率を求めた。
 ○、●: T2、△、▲: DTNB-T2。

膜脂質成分に対するT2の結合特異性

まずT2の赤血球膜の脂質成分に対する結合の特異性を θ -毒素と比較した。シリカゲル薄層プレート上に展開した羊とヒトの赤血球膜脂質成分のうち、T2はコレステロールにのみ結合し、その特異性は θ -毒素と変わりがなかった(図3-4)。また、種々のコレステロール類似体を薄層プレートに一定量添加し、それに対する結合を θ -毒素と比較したが、T2は θ -毒素と同じ反応特異性を示した。

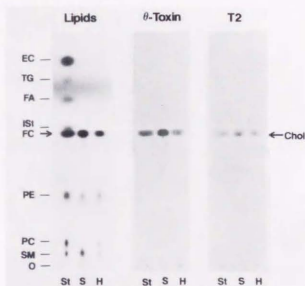


図3-4 赤血球膜脂質成分に対する θ -毒素とT2の結合(35)

脂質標準品と羊及びヒトの赤血球から抽出した脂質を薄層プレートで展開した。左の1枚は各脂質の位置を検出するため3%酢酸銅/8%リン酸に浸し、140℃で加熱した。中央のプレートは2 μ g/mlの θ -毒素で、右のプレートは4 μ g/mlのT2に浸した後、イミューブロットングの方法により4-クロロ-1-ナフトールと過酸化水素で発色させた。

0: 原点、 SW: スフィンゴミエリン、 PC: フォスファチジルコリン、
 PE: フォスファチジルエタノールアミン、 FC: コレステロール、
 ISi: オレイルアルコール(内部標準)、 FA: オレイン酸、
 TG: トリオレイン、 EC: コレステロールオレエート。
 St: 脂質標準品、 S: 羊赤血球脂質、 H: ヒト赤血球脂質。

赤血球へのT2の結合親和性

T2の赤血球への結合は、 θ -毒素と同じようにコレステロールにのみ特異的に結合することが示されたので、その結合親和性を θ -毒素、T θ と比較した(図3-5)。

添加した量の50%のT2が結合するのに必要な赤血球の濃度は0.17%で、 θ -毒素の0.14%、T θ の0.17%とほとんど差がなく、C末端部分のみでも結合の親和性は毒素全体と同程度に保たれており、赤血球への結合部位がT2に存在することが明らかになった。ところがチオール基をDTNBで修飾すると、DTNB- θ やDTNB-T θ は1/50程度に低下はするものの結合親和性をまだ保っているのに対し、DTNB-T2は結合親和性を完全に失っていた。もしDTNB修飾による結合阻害がシステイン残基近傍の赤血球結合部位での遮蔽のみであるならば、DTNB-T2もDTNB-T θ と同程度の結合親和性を保っていることが期待される。しかし、DTNB-T2が赤血球に全く結合できないという結果は、DTNB処理によってT2の赤血球結合部位の構造が大きく変化してしまったことを示している。一方、DTNB-T θ がDTNB- θ と同程度の親和性を保っていることから、DTNB-T θ ではT2部分の構造はDTNB-T2ほど大きく変化していないと考えられる。これはDTNB-T θ においてT2部分がN末端部分T1と複合体を作っているために、チオール基が修飾されても構造変化が制限されているのではないかと推測される。

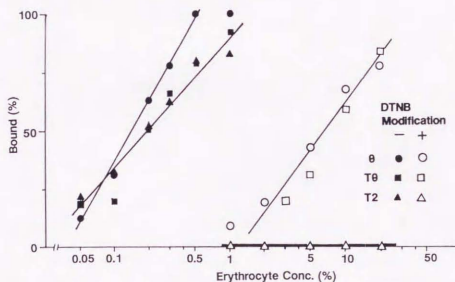


図3-5 種々の濃度の赤血球に対する θ -毒素、T θ 、T2とそのDTNB誘導体の結合(35)

種々の濃度の羊赤血球と一定量の毒素またはフラグメントを20℃で15分間反応させた後遠心し、上清に残った量を毒素は溶血反応で、フラグメントは溶血阻害反応で定量した。

●: θ -毒素、○: DTNB- θ 、■: T θ 、□: DTNB-T θ 、▲: T2、
△: DTNB-T2。

$[^{125}\text{I}]\theta$ の赤血球への結合と溶血に対するT2の効果

T2が赤血球に対して θ -毒素と同等の結合の親和性と特異性を持つことから、 θ -毒素の結合をT2が競合的に阻害するために溶血阻害を起こすという可能性が考えられる。これを確かめるために $[^{125}\text{I}]\theta$ の赤血球への結合と溶血に対するT2の効果を測定した。ところが図3-6のように溶血が完全に阻害されているT2量(50 ng/tube)では $[^{125}\text{I}]\theta$ の赤血球への結合は全く阻害されず、その30倍量のT2が存在してもまだ50%以上の $[^{125}\text{I}]\theta$ が結合していた。すなわち、 θ -毒素の結合を競合的に阻害するのに必要な濃度の1/30以下の濃度で、T2は完全な溶血阻害を起こしている。このことから、低濃度のT2による溶血阻害は θ -毒素の赤血球への結合を阻害するために起こるのではないことが明らかになった。

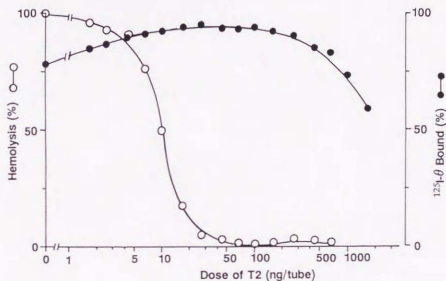


図3-6 $[^{125}\text{I}]\theta$ の赤血球への結合と溶血に対するT2の影響(35)

0.7 ngの $[^{125}\text{I}]\theta$ をT2を含む0.3%羊赤血球 100 μ lの反応液に加え、37°Cで10分間保温した。この反応液を遠心し、上清と沈渣の放射活性を測定して赤血球に結合した毒素の割合を求め、さらに上清の吸光度から溶血率を求めた。

●: $[^{125}\text{I}]\theta$ の結合率(%), ○: 溶血率(%).

まとめ

- (1) 尿素によって解離させたT θ をDE-52カラムのイオン交換クロマトグラフィーにかけ、T1、T2のフラグメントを単離することができた。

- (2) T1、T2フラグメントはそれぞれ単独でも、また混合しても溶血活性は示さなかった。
- (3) T1には何の活性も検出されなかったが、T2には強い溶血阻害活性が存在していた。この活性はチオール基の修飾によって失われた。
- (4) T2の赤血球への結合の特異性と親和性は θ -毒素と同等であった。しかしDTNB-T2は赤血球への結合性を完全に失ってしまう点で、DTNB- θ 、DTNB-T θ と異なり、膜との結合に結合部位の立体構造が重要であることが示唆された。
- (5) [^{125}I] θ の赤血球への結合と溶血に対するT2の影響を調べたところ、溶血が完全に阻害されるT2濃度では[^{125}I] θ の結合は全く阻害を受けず、低濃度のT2による溶血阻害は θ -毒素の結合阻害以外の機構によることが明らかになった。

Eur. J. Biochem. 194, 25 - 31, (1990) に発表

第4章 毒素会合体形成による溶血とそれに対するT2の阻害効果

はじめに

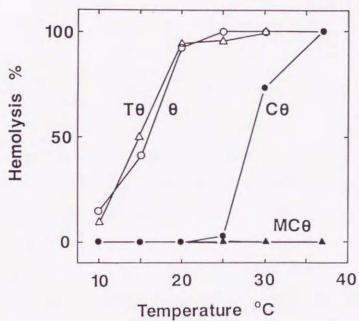
チオール活性化毒素による溶血は、毒素と赤血球膜の結合段階とそれ以後の溶血過程に分けて考えられている。T2による溶血阻害が結合の阻害ではないことが明らかになったので、それ以後のどの段階をT2が阻害するのかを検討した。毒素と膜の結合以後の溶血の過程はまだ詳しく解明されていないが、電子顕微鏡での観察によってチオール活性化毒素によって溶血を起こした膜に環状または弓状の構造が存在することが示され(41-43)、これは毒素会合体で形成された小孔であろうと考えられている(44,45)。調製した切断毒素のうち温度依存性の溶血を起こすC θ と(27)、さらに化学修飾をして37°C以下では溶血を起こさなくなったメチル化C θ (MC θ)を使用することによって(46)、この環状構造の形成と溶血とが非常によい相関関係を示すことが明らかになっている(図4-1)。しかし電子顕微鏡による環状構造の観察には通常の溶血反応に必要な毒素量の数万倍の毒素を使用するために、溶血反応の際本当にこの構造が形成されているのか否かは明らかになっていなかった。そこで¹²⁵I標識毒素を使用して通常の溶血反応の時にもこの会合体が形成されているかどうかを検討し、それに対するT2の影響を調べた。

実験方法

蔗糖密度勾配遠心による会合体の分離

0.3% 羊赤血球500 μ l に [¹²⁵I] θ (4.5 HU, 3.5 ng)を加え、37°Cで10分間保温した。この反応液を100,000 \times g で5分間遠心して膜を集め、5 mMリン酸緩衝液 pH 8.0 で2回洗浄した後150 μ l の10%デオキシコレートを加え室温で1時間可溶化した。1 μ g のT2の添加により溶血が阻害された試料では、37°C、10分間の保温の後2000 \times g 3分間の遠心で赤血球を集め、5 mMリン酸緩衝液pH 8.0で溶血を起こさせてから同様の操作で可溶化した。この可溶化した膜100 μ l を0.25%デオキシコレートを含む3.6 mlの10-50%(W/V)の直線的蔗糖密度勾配に重層し、150,000 \times g で16時間遠心した(47)。これをチューブの底から15フラクションに分取し、それぞれの放射活性を測定した。 [¹²⁵I]C θ を使用した場合は1.25 HU、4.2 ngを赤血球に加え、溶血を起こさせる時は37°Cで15分間、溶血させない時は10°Cで60分間保温してから、同様に膜を集め可溶化して

A



B

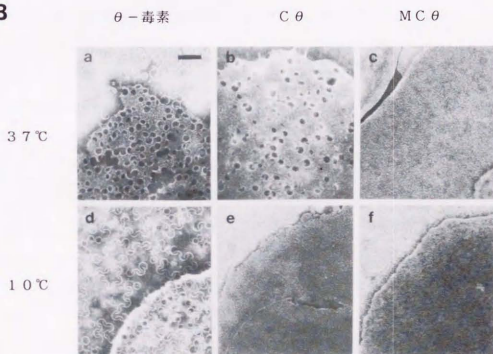


図4-1 θ -毒素とその誘導体の溶血活性の温度変化と毒素処理赤血球膜の電子顕微鏡による観察 (46)

A: 0.5% 羊赤血球を11.2 ng/mlの毒素と種々の温度で30分間保温し、溶血率を求めた。

○: θ -毒素、△: T θ 、●: C θ 、▲: MC θ 。

B: 羊赤血球膜を160 μ g/mlの θ -毒素、C θ 、MC θ と37°Cまたは10°Cで10分間処理した後、1% リンタンクステン酸でネガティブ染色し電子顕微鏡で観察した。

Bar = 100 nm

分析した。

結果および考察

[¹²⁵I]θの会合体形成とそれに対するT2の影響

4.5 HUの [¹²⁵I]θを加えて37℃に保温すると赤血球は1分以内に完全に溶血を起こしたが、1 μgのT2が共存した時には10分間の保温後も全く溶血は認められなかった。 [¹²⁵I]θによって溶血した赤血球と、T2の共存により溶血が阻害された赤血球の膜分画を洗浄してから可溶化し、蔗糖密度勾配遠心で分析した結果を図4-2に示す。T2が共存し溶血が阻害された赤血球膜に結合した [¹²⁵I]θは、θ-毒素のみを遠心して分画した場合と同じ低密度のフラクション(fr.No 13)に回収され、マーカのBSA(4.4 S, Mr 66000)の位置との比較からθ-毒素モノマー(Mr 53000)で存在すると考えられた。それに対して溶血を起こした膜に結合したθ-毒素は明らかにモノマーとは区別される高密度のフラクションに分布し、マーカーストとしてβ-ガラクトシダーゼ(16 S)、カクラーゼ(11 S)、BSA(4.4 S)の位置から推定するとおよそ26 Sの会合体と考えられる。膜に結合したT2は、T2単独で遠心した場合と同様にθ-毒素モノマーよりさらに軽いフラクション(fr.No 14)に回収され、会合体は検出できなかった(図4-2 B)。また、膜蛋白質は大部分が密度勾配の上部に分布し、θ-毒素会合体と同じ密度に分布する蛋白質は検出できなかった(図4-2 C)。この結果から、通常の毒素濃度で起こる溶血反応でもθ-毒素の会合体が形成されていることが明らかになった。さらにT2の共存によってこの会合体が形成されないと溶血が起こらないことから、会合体の形成が溶血に必須であると考えられる。この関係をより明らかにするため、温度依存性の溶血を起こすCθを使って同様の実験を行った。

[¹²⁵I]Cθの会合体形成の温度依存性

すでに述べたようにCθは溶血能に関して温度依存性を示し、20℃以下の温度では溶血能を失っている。そこで、37℃で溶血した膜に結合した [¹²⁵I]Cθと、10℃で溶血をおこなった膜に結合した [¹²⁵I]Cθを可溶化し、蔗糖密度勾配遠心で分析した(図4-3)。どちらの膜分画にも同程度の放射活性が回収されたが、10℃で溶血を起こさなかった時の [¹²⁵I]Cθはすべてモノマーとして膜に結合していたのに対し、37℃で溶血

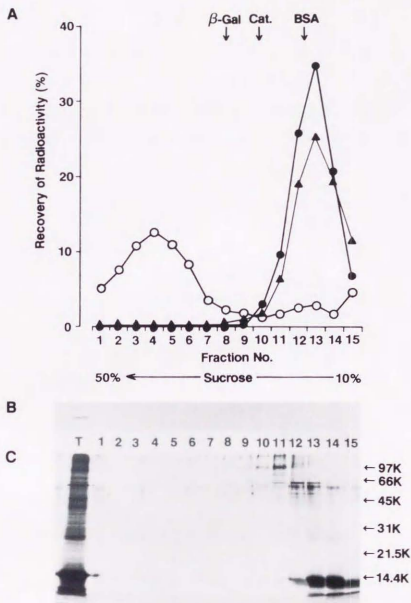


図4-2 $[^{125}\text{I}]\theta$ 会合体の蔗糖密度勾配遠心による分離 (35)

A: 7.0 ng/μl の $[^{125}\text{I}]\theta$ と反応させた羊赤血球膜を10%デオキシコレートで可溶化し、蔗糖密度勾配遠心で分析した。回収された総放射活性を100%として各フラクションの放射活性の割合を求めた。

○: $[^{125}\text{I}]\theta$ で処理した赤血球膜を可溶化したもの。

●: T 2 と $[^{125}\text{I}]\theta$ で処理した赤血球膜を可溶化したもの。

▲: $[^{125}\text{I}]\theta$ 。 β-Gal: β-ガラクトシダーゼ (16 S)、

Cat.: カタラーゼ (11 S)、 BSA: 牛血清アルブミン (4.4 S)。

B: T 2 と $[^{125}\text{I}]\theta$ で処理した赤血球膜を可溶化し蔗糖密度勾配遠心で分取したフラクションの免疫ブロットによるT 2の検出。

T: 可溶化した膜フラクション。

C: BのSDS-PAGEゲルの銀染色による蛋白質のパターン。

を起こした場合には明らかに高密度のフラクションに $[^{125}\text{I}]$ C θ のピークが出現していた。また、溶血を起こさないメチル化C θ は37°Cでもモノマーとして膜に結合していた。この結果は図4-1での溶血した膜における環状構造の存在とよく一致し、この構造が通常の溶血反応でも形成される毒素の会合体であることを強く示唆している。

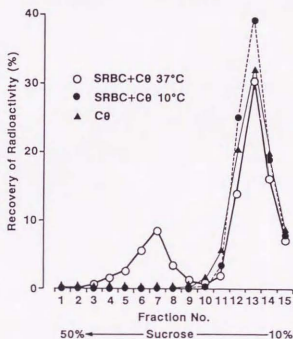


図4-3 赤血球膜結合 $[^{125}\text{I}]$ C θ の蔗糖密度勾配中の分布

8.4 ng/ml の $[^{125}\text{I}]$ C θ と37°Cまたは10°Cで反応させた羊赤血球膜を10%デオキシコレートで可溶化し、蔗糖密度勾配遠心で分析した。回収された総放射活性を100%として各フラクションの放射活性の割合を求めた。

- : 37°Cで $[^{125}\text{I}]$ C θ 処理をした赤血球膜を可溶化したもの、
- : 10°Cで $[^{125}\text{I}]$ C θ 処理をした赤血球膜を可溶化したもの、
- ▲: $[^{125}\text{I}]$ C θ 。

まとめ

- (1) 溶血を起こした赤血球膜上では θ -毒素、C θ ともに会合体を形成していた。これに対し、溶血が阻害された条件では毒素はモノマーのまま存在し、会合体形成が溶血に必須の過程であることが示唆された。
- (2) T2による溶血阻害は、 θ -毒素の赤血球への結合の阻害ではなく、会合体形成を阻害するために起こることが示された。また、T2自体は会合体を形成しなかった。

Biochim. Biophys. Acta 1023, 441 - 448, (1990) および
Eur. J. Biochem. 194, 25 - 31, (1990) に発表

第5章 総合的考察および毒素のプロープとしての応用に関する考察

θ -毒素、切断毒素およびその修飾体を用いた実験により、 θ -毒素分子のC末端から5000ダルトン付近に存在するシステイン残基近傍にコレステロール結合部位が存在すること、 θ -毒素の会合体の形成が溶血に必須の過程であることが明らかになった。

これまでにDNAの塩基配列が明らかにされた4種類のチオール活性化毒素では、毒素分子全体としても42~65%の相同性があることが明らかになっているが、図5-1に示すように分子中の唯一のシステイン残基がC末端からほぼ等しい位置に存在し、しかもこのシステイン残基を含む11~13残基のアミノ酸配列がどの毒素にも共通している(23-26)、この部分が毒素の活性発現に重要な役割を果たしていると考えられる。ところが、遺伝子操作の手法によりストレプトリジンOとニューモリジンの唯一のシステイン(-SH)をアラニン(-H)に置換した変異毒素でも、溶血活性が本来の毒素と変わらずに保たれているという結果が報告された(48,49)。チオール活性化毒素は、産生菌の培養液を空気中で保存しておくことと失活し、システインなどの還元剤を添加することによって活性が回復すること、精製毒素についてもチオール基を修飾すると溶血活性が非常に低下することからチオール基が活性発現に必須と考えられてきた。しかし、これらの変異毒素の結果からチオール活性化毒素の溶血活性の発現にチオール基それ自体は必要ではないことが証明された。チオール基の酸化によって失活すると考えられていた理由のうち、毒素2分子の-S-S-結合体の可能性は不活性型と活性型の毒素の分子量が電気泳動上でほぼ等しいことから否定され、分子内-S-S-結合はチオール基が1つしか存在しないため不可能であるので、酸化による失活は培地中に共存する低分子チオール化合物との反応によって毒素のチオール基が修飾されたために溶血活性が低下したことが原因ではないかと説明されている

					Cys 残基 総残基数 (C末端から)	
θ -Toxin	I K	A R E C T G L A W E W W R	D V I	471	42	番目
Streptolysin O	I M	A R E C T G L A W E W W R	K V I	538	41	
Pneumolysin	V K I	R E C T G L A W E W W R	T V Y	471	44	
Listeriolysin O	V Y A K	E C T G L A W E W W R	T V I	504	46	

図5-1 DNA塩基配列から決定されたシステイン残基近傍のアミノ酸配列

(48)。Alouf は、ストレプトリジンOの粗毒素あるいは部分精製毒素では保存中や精製途中で酸化による可逆的な失活が起こるが、精製毒素では起こりにくいと述べている(6)。このように、チオール基それ自体は溶血活性の発現に必須ではないが、その修飾は毒素の溶血活性の低下をひきおこす。

チオール活性化毒素による溶血は、毒素の細胞膜コレステロールへの結合の過程と膜上での毒素会合体の形成を含む膜破壊の過程の2段階に分けて考えられる。本研究は精製 θ -毒素を用い、チオール基を修飾した毒素では第一段階の膜コレステロールとの結合が阻害されていることを示し、さらにこの結合阻害はチオール基修飾によって毒素のコレステロールへの結合親和性が低下するために起こることを明らかにした(第2章)。チオール基修飾によって結合親和性の低下が引き起こされる理由として、①チオール基自身がコレステロールとの結合に関与している、②チオール基の近傍にある毒素のコレステロール結合部位が修飾基によってふさがれる、③チオール基の修飾により毒素のコレステロール結合部位の立体構造が変化する、の3つが考えられる。しかし、システイン残基をアラニンに置換した変異毒素でも溶血活性が変わらないという上記の結果から、①の可能性は否定された。修飾基の大きさが毒素の赤血球への結合親和性及び溶血活性と逆相関の関係にあるという本研究の結果(図2-4)は、②のチオール基の近傍にコレステロール結合部位があるという可能性を強く示唆する。コレステロールは疎水性の分子であるため、その結合部位も疎水性の領域を含むことが予想される。図5-1の共通アミノ酸配列はトリプトファン3残基及びロイシン、アラニンを含み、疎水性が高い部分と考えられる。システイン残基近傍の共通構造の重要性はストレプトリジンOあるいはニューモリジンのシステイン(-SH)をセリン(-OH)に置換した変異毒素では溶血活性が1/4 または1/6 に低下するという結果からも強調されている(48, 49)。チオール基と水酸基というごくわずかな変化が活性に大きな影響を与える原因として、チオール基の電気陰性度がメチレン基とほぼ同じ値であるのに対して、水酸基は大きな値を示すことから、チオール基の周囲の疎水的な立体構造が重要と推測される。システインやアラニンの場合にはコレステロール結合部位の疎水的な構造が保たれているのに対し、セリンに置換した場合は電気陰性度の大きな水酸基が導入されたことにより結合部位の疎水性が弱められコレステロールへの結合親和性ひいては溶血活性が低下したと考えられる。以上のことは、システイン残基周辺の共通アミノ酸配列部分が膜コレステロールとの結合部位の少なくとも一部分であることを強く示唆している。 θ -毒素分子の中でこのシステイン近傍の共通ア

ミノ酸配列以外のどの部分がコレステロールとの結合に関与しているかは明らかではないが、C末端側フラグメントT2が θ -毒素と同等の膜コレステロールへの結合能を持つという結果から(図3-5)、コレステロール結合部位はすべて毒素分子のC末端側に存在すると考えられる。チオール基の修飾は単に活性部位を隠すだけではなく立体構造にも影響を与えていると考えられるので(図2-5)、チオール基修飾毒素では②に加えて③のチオール基修飾によるコレステロール結合部位の立体構造の変化が生じ結合親和性が低下したとも考えられる。

このコレステロール結合部位の立体構造は単離したT2でも保たれているが、T2のチオール基を修飾すると θ -毒素、T θ のチオール基修飾の場合とは異なり、膜への結合能が完全に失われた(図3-5)。これはT θ ではT1とT2が複合体を形成しているためチオール基を修飾してもT2の構造変化が制限されているのに対し、フラグメントに解離してしまうとこの制限が失われ大きな構造変化が起こるためではないかと考えられる。

次に、毒素と赤血球の結合後、溶血に至るまでの過程について、T2フラグメントと温度感受性の溶血を示すC θ を用いて解析を行った。T2フラグメントは θ -毒素と同等のコレステロールに対する結合の特異性と親和性をもつが(図3-4、3-5)溶血能はなく、 θ -毒素と共存させると毒素による溶血を阻害する。しかし、この溶血阻害作用は θ -毒素の赤血球への結合を阻害するためではないことが明らかになった(図3-6)。これまでの電子顕微鏡による観察から、溶血を起こした膜上にみられる環状あるいは弓状の構造が毒素会合体で形成された小孔であろうと考えられていたが(27, 41-46)、この構造の検出には溶血を起こす毒素量の数万倍を必要とするために、実際の溶血反応の際にこの会合体が形成されているかは不明であった。本研究において、 ^{125}I 標識毒素を使って行った蔗糖密度勾配による分析で、通常濃度での溶血反応の際にも毒素の会合体が形成されていることが明らかになった(図4-2、4-3)。Bhakti等はストレプトリジンOを使った同様の実験で高密度フラクションに回収された会合体を電子顕微鏡で観察し、環状構造の存在を報告している(44)。溶血活性を示さないメチル化C θ や低温で反応した場合のC θ 及びT2によって溶血が阻害された場合の θ -毒素では、膜に結合した毒素がモノマーとして存在していることから(図4-2、4-3)、会合体の形成が溶血に必須の過程であると考えられることができる。Hugo等(50)はあらかじめ溶血活性を中和する抗体と反応させたストレプトリジンOは赤血球膜に結合しても会合体を形成しないと報

告し、やはり会合体形成の重要性を示唆している。さらにN末端部分を欠くC1、T2には膜への結合活性は存在するが会合体形成はできないことから、N末端側の塩基性の強いC2部分が会合体形成に何らかの役割を果している可能性も考えられる。

会合体を形成して細胞膜に小孔を作り膜を破壊する蛋白質として、チオール活性化毒素のほかに *Staphyrococcus aureus* の α -毒素や(45, 51) 活性化された補体のC5bC9複合体(45, 47, 52)が研究されている。このうちチオール活性化毒素会合体は、環状以外に弓状構造などさまざまな大きさのものが観察され(42, 43, 45)、BSA など高分子量の蛋白質も通過できる大きな小孔であることが特徴とされている(45, 53)。これに対して α -毒素の小孔は毒素6分子からなる均一な大きさで(45, 51)、蔗糖やイヌリンは通過するがそれ以上の高分子は通さないという比較的小さなもので、溶血は浸透圧による膜破壊の結果とされている。補体複合体も会合したC9の数によって大きさに違いはあるが(47)、外液にデキストランを添加すると溶血を防ぐことができるので溶血は浸透圧による膜破壊と考えられている(52)。これらの会合体は分子の疎水性部分を膜に埋め、親水性部分を寄せ合って膜を貫通する円筒状の構造と考えられている。また、チオール活性化毒素の弓状の構造は、半円形の会合体の内側の親水性部分が膜の脂質成分を反発、排除するために形成されているものと想像されている(45)。この会合体をデオキシコレートで可溶化し、レシチンのみのリポソーム上に再構成することができる(44)。この場合にはチオール活性化毒素でもコレステロールを必要としない。会合体が形成され疎水性部分が露出すればコレステロールとの結合は必要としないのか、会合体にコレステロールが結合しているのかはまだ明らかではない。また、この会合体形成の過程で、膜に結合したモノマーがどのような構造変化を起こして疎水性部分と親水性部分を露出させてくるのかは不明のままであり、今後の検討を必要としている。

コレステロールは細胞膜の主要な構成成分として脂質二重層の物理的な安定化、流動性や透過性の調節など生体膜機能の維持に貢献している(54, 55)。このような物理的な作用のほかに、生体高分子の合成(56)やエンドサイトーシス(57)、ウイルス依存の膜融合(58, 59)など様々な生体機能にコレステロールが関与する可能性が示唆されている。

さらに、血清中のHDLなどリポ蛋白質と血管内皮細胞の膜との間でのコレステロールの分配や、膜から細胞内部へのコレステロールの輸送の機構など、解明されていない問題が多数存在する。このような問題に対し、コレステロールに特異的に結合するプローブで細胞のコレステロールの分布を調べ、機能との関連性を検討するという方法が考えられ

る。コレステロールに特異的に結合する物質として、チオール活性化毒素のほかにジギトニン(60)、ポリエン抗生物質(フィリピン、アンホテリシンB)(61,62)などが知られているが、これらはすべて膜を破壊してしまうためプローブとしては限られた範囲でしか利用できなかった。

切断毒素C θ (40)とそれをメチル化したMC θ (46)膜コレステロールに対する結合は特異性、親和性とも θ -毒素と同等で、しかも溶血を起こさないことからプローブとして利用可能な修飾毒素である。¹²⁵I標識C θ 、MC θ を使用して赤血球膜上の毒素結合部位をScatchardプロットで解析したところ、解離定数が 10^{-9} Mと 10^{-7} Mのオーダーの二種類の結合部位が存在することが明らかになった(40,46)。この高い結合親和性のために、チオール活性化毒素はジギトニンやフィリピンに比べ、数千分の一以下の濃度で溶血を起こすことができると考えられる。赤血球をあらかじめジギトニンで処理しておくどちらの結合部位にも毒素が結合しなくなることから(40)、この二種類の結合部位はコレステロールであり、赤血球膜上のコレステロールには少なくとも二種類の存在状態があることが示された。この二種類の結合部位は赤血球膜に限らずヒトBリンパ腫由来のBall-1細胞(46)、マウス胸腺細胞、マウス脳シナプトソーム膜にも存在し、細胞膜上でコレステロールが不均一な状態で存在していることは特殊な場合ではないと推測できる。大多数のコレステロールが膜の物理的性質を維持するために存在するのに対し、解離定数 10^{-9} Mという毒素に親和性の高いコレステロールはリポプロテインとの交換性など生体機能に關与する特異な分画のコレステロールと考えられるかもしれない。

このような細胞膜上のコレステロールの存在状態の解析のほかに、細胞内のコレステロールの分布を調べるプローブとしても修飾毒素の利用が考えられる。C型Niemann-Pick病患者からとった線維芽細胞ではLDLとして細胞に取込まれたコレステロールが、エステル化されることなくリソゾームとゴルジ装置に蓄積されることがフィリピンを使って観察されている(63,64)。フィリピンはそれ自身が蛍光をもつという利点があるが、水溶性に乏しく、 10^{-6} Mオーダーの濃度が必要で、膜を破壊してしまうという欠点がある。これに対して修飾 θ -毒素では結合親和性が高いため低濃度の毒素処理で済み、水溶性で、膜を破壊せず、¹²⁵I標識毒素を使えば高感度の検出が可能になるなどの利点が考えられる。C θ 、MC θ 以外により小さなプローブとしてT2フラグメントが考えられる。さらに遺伝子操作の手法によりコレステロール結合部位のフラグメントが得られれば、有用なプローブになると予想される。

謝辞

本論文の作製にあたり、その機会を与えてくださり懇切なる御指導を賜りました東京大学医学部第2生化学教室、永井克孝教授（現東京都臨床医学総合研究所所長）並びに岩森正男助教授に心より感謝致します。

また本研究の遂行に際し、初歩的な事柄から終始懇切なる御指導と御助言を賜りました東京都老人総合研究所・生体膜部門、安藤進部長並びに岩下淑子博士に深く感謝致します。*C. perfringens* の培養液を提供して下さった千葉県血清研究所、鷹野サナエ氏および泉七江氏、コレステロールヘミサクシネート-Sepharose 6Bの提供と電子顕微鏡写真撮影をして下さった富山医科薬科大学、三井健一郎助教授、N末端アミノ酸配列の分析をして下さった東京都臨床医学総合研究所、川崎博史博士、そして数々の御助言をいただきました三菱化成生命科学研究所、岩下新太郎博士に感謝致します。さらに、研究中に数々の御助言と御配慮をいただきました東京都老人総合研究所・生体膜部門、酵素生化学部門の皆様、細胞化学部門、千秋達雄室長に感謝致します。

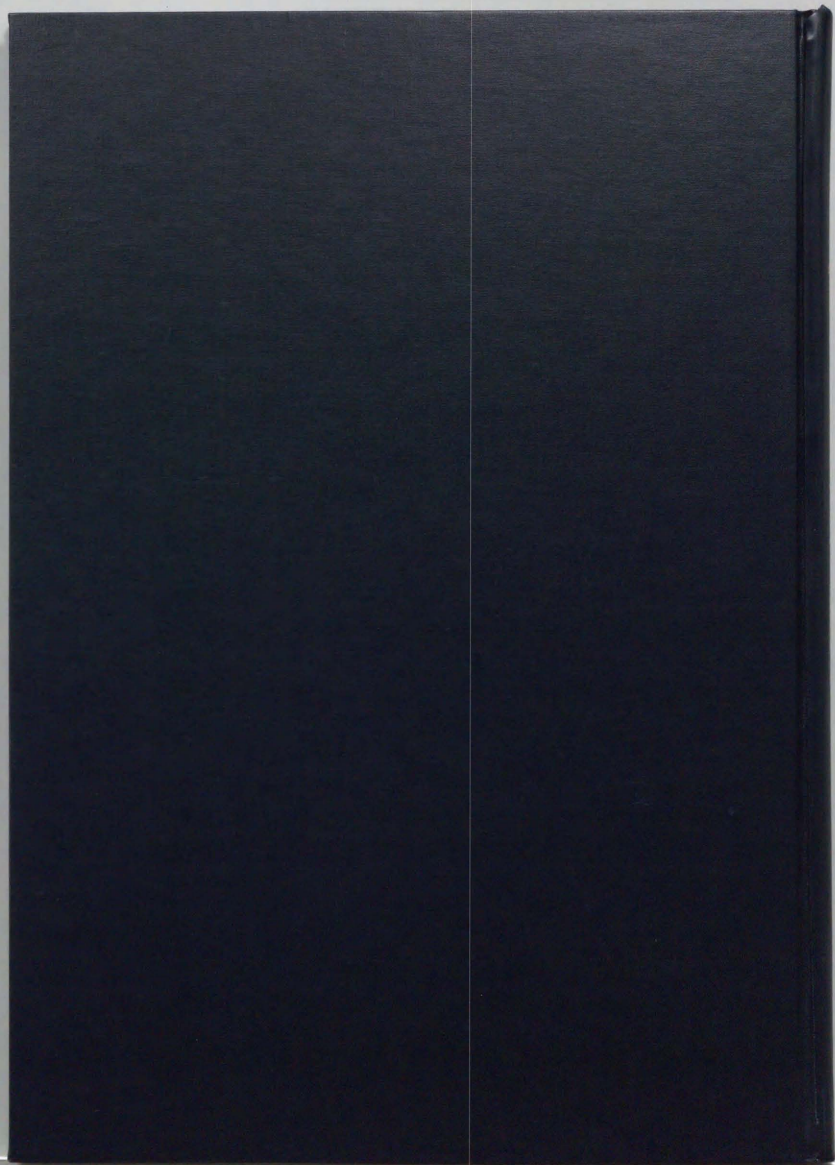
引用文献

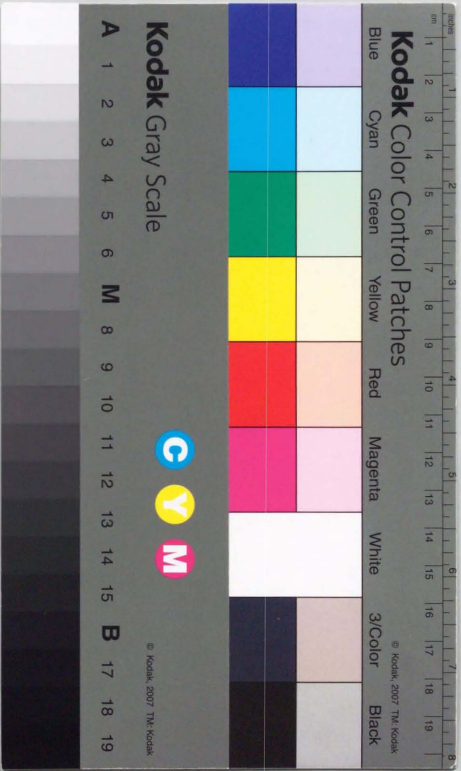
- (1) 村田良介 (1966) 病原微生物学 細菌編 第2版 (福見秀雄、牛場大蔵、三橋進 山本正 編) pp.703-742 医学書院
- (2) 村田良介、逢坂昭 (1972) タンパク毒素 (上) (村田良介、逢坂昭、大橋誠、鈴木友二、田宮信雄、船津勝 編) pp.256-314 講談社
- (3) Bernheimer, A.W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 344, 27-50
- (4) Alouf, J.E. (1976) in *The Specificity and Action of Animal, Bacterial and Plant Toxins* (Cuatrecasas, P., ed.) pp.219-270 Chapman and Hall, London
- (5) Smyth, C.J. and Duncan, J.L. (1978) in *Bacterial Toxins and Cell Membranes* (Jeljaszewicz, J. and Wadstrom, T., eds.) pp.129-183 Academic Press, New York
- (6) Alouf, J.E. (1980) *Pharmacol. Ther.* 11, 661-717
- (7) Yamakawa, Y., Ito, A. and Sato, H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, 494, 301-313
- (8) Mitsui, K., Mitsui, N. and Hase, J. (1973) *Japan. J. Exp. Med.* 43, 377-391
- (9) Van Epps, D.E. and Andersen, B.R. (1971) *Infect. Immun.* 3, 648-652
- (10) Cowell, J.L., Grushoff-Kosyk, P.S. and Bernheimer, A.W. (1976) *Infect. Immun.* 14, 144-154
- (11) Johnson, M.K. (1972) *Infect. Immun.* 6, 755-760
- (12) Mitsui, N., Mitsui, K. and Hase, J. (1980) *Microbiol. Immunol.* 24, 575-584
- (13) Geoffroy, C., Gaillard, J., Alouf, J.E. and Berche, P. (1987) *Infect. Immun.* 55, 1641-1646
- (14) Hase, J., Mitsui, K. and Shonaka, E. (1976) *Japan. J. Exp. Med.* 46, 45-50
- (15) Geoffroy, C. and Alouf, J.E. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 9968-9972
- (16) Bernheimer, A.W. and Grushoff, P. (1967) *J. Gen. Microbiol.* 46, 143-150
- (17) Cowell, J.L. and Bernheimer, A.W. (1977) *Infect. Immun.* 16, 397-399
- (18) Duncan, J.L. and Buckingham, L. (1977) *Infect. Immun.* 18, 688-693
- (19) Andersen, B.R. and Cone, R. (1974) *J. Lab. Clin. Med.* 84, 241-248
- (20) Andersen, B.R. and Van Epps, D. (1972) *J. Infect. Dis.* 125, 353-359

- (21) Van Epps, D. and Andersen, B.R. (1974) *Infect. Immun.* 9, 27-33
- (22) Cossart, P., Vicente, M.F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J.C. and Berche, P. (1989) *Infect. Immun.* 57, 3629-3636
- (23) Tweten, R.K. (1988) *Infect. Immun.* 56, 3235-3240
- (24) Kehoe, M.A., Miller, L., Walker, J.A. and Boulnois, G.J. (1987) *Infect. Immun.* 55, 3228-3232
- (25) Walker, J.A., Allen, R.L., Falmagne, P., Johnson, M.K. and Boulnois, G.J. (1987) *Infect. Immun.* 55, 1184-1189
- (26) Mengaud, J., Vicente, M., Chenevert, J., Pereira, J.M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero, F., Perez-Diaz, J. and Cossart, P. (1988) *Infect. Immun.* 56, 766-772
- (27) Ohno-Iwashita, Y., Iwamoto, M., Mitsui, K., Kawasaki, H. and Ando, S. (1986) *Biochemistry* 25, 6048-6053
- (28) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-285
- (29) Jacobson, G.R., Schaffer, M.H., Stark, G.R. and Vanaman, T.C. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 6583-6591
- (30) Iwamoto, M., Ohno-Iwashita, Y. and Ando, S. (1987) *Eur. J. Biochem.* 167, 425-430
- (31) Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680-685
- (32) O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. and O'Farrell, P.H. (1977) *Cell* 12, 1133-1142
- (33) Merrill, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. and Ebert, M.H. (1981) *Science* 211, 1437-1438
- (34) Mayer, M.M. (1961) in *Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry*, 2nd ed. (Kabat, E.A., ed.) pp.133-240 Thomas, Springfield, IL.
- (35) Iwamoto, M., Ohno-Iwashita, Y. and Ando, S. (1990) *Eur. J. Biochem.* 194, 25-31
- (36) Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917

- (37) Ando, S., Kon, K. and Tanaka, Y. (1980) in *Membrane Fluidity: Biophysical Techniques and Cellular Regulation* (Kates, M. and Kuksis, A., eds.) pp. 43-55, Humana Press, New Jersey
- (38) Hawkes, R., Niday, E. and Gordon, J. (1982) *Anal. Biochem.* 119, 142-147
- (39) Neumüller, C. (1954) *Nature* 174, 405-406
- (40) Ohno-Iwashita, Y., Iwamoto, M., Mitsui, K., Ando, S. and Nagai, Y. (1988) *Eur. J. Biochem.* 176, 95-101
- (41) Mitsui, K., Sekiya, T., Okamura, S., Nozawa, Y. and Hase, J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 558, 307-313
- (42) Duncan, J. L. and Schlegel, R. (1975) *J. Cell Biol.* 67, 160-173
- (43) Cowell, J. L., Kim, K. and Bernheimer, A. W. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 507, 230-241
- (44) Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J. and Sziegoleit, A. (1985) *Infect. Immun.* 47, 52-60
- (45) Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J. (1988) *Prog. Allergy* 40, 1-43
- (46) Ohno-Iwashita, Y., Iwamoto, M., Ando, S., Mitsui, K. and Iwashita, S. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1023, 441-448
- (47) Bhakdi, S., Muhly, M. and Roth, M. (1983) *Methods Enzymol.* 93, 409-420
- (48) Pinkney, M., Beachey, E. and Kehoe, M. (1989) *Infect. Immun.* 57, 2553-2558
- (49) Saunders, F. K., Mitchell, T. J., Walker, J. A. Andrew, P. W. and Boulnois, G. J. (1989) *Infect. Immun.* 57, 2547-2552
- (50) Hugo, F., Reichwein, J., Arvand, M., Krämer, S. and Bhakdi, S. (1986) *Infect. Immun.* 54, 641-645
- (51) Füssle, R., Bhakdi, S., Sziegoleit, A., Tranum-Jensen, J., Kranz, T. and Wellensiek, H. (1981) *J. Cell Biol.* 91, 83-94
- (52) Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 737, 343-372
- (53) Buckingham, L. and Duncan, J. L. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 729, 115-122
- (54) Presi, F. T. (1985) in *Membrane Fluidity in Biology* (Aloia, R. and Boggs, J. M., eds.) vol. 4 pp. 97-146 Academic Press, New York
- (55) Yeagle, P. L. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 822, 267-287

- (56) Dahl, J.S., Dahl, C.E. and Bloch, K. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 87-91
- (57) Davis, B.K. (1980) *Arch. Androl.* 5, 249-254
- (58) White, J. and Helenius, A. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 3273-3277
- (59) Kundrot, C.E., Spangler, E.A., Kendall, D.A., MacDonald, R.C. and MacDonald, R.I. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1608-1612
- (60) Nishikawa, M., Nojima, S., Akiyama, T., Sankawa, U. and Inoue, K. (1984) *J. Biochem.* 96, 1231-1239
- (61) Kruijff, B. and Demel, R.A. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 339, 57-70
- (62) Robinson, J.M. and Karnovsky, M.J. (1980) *J. Histochem. Cytochem.* 28 161-168
- (63) Sokol, J., Blanchette-Mackie, E.J., Kruth, H.S., Dwyer, N.K., Amende, L.M., Butler, J.D., Robinson, E., Patel, S., Brady, R.O., Comly, M.E., Vanier, M.T. and Pentchev, P.G. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 3411-3417
- (64) Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Amende, L.M., Kruth, H.S., Butler, J.D., Sokol, J., Comly, M.E., Vanier, M.T., August, J.T., Brady, R.O. and Pentchev, P.G. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8022-8026





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak