

# 博士論文

Mechanism of the self-assembly of a pore forming toxin  
triggered by specific membranes

(生体膜特異的な膜孔形成毒素の物性と作用機序)

田中 耕路

## 【第1章：序論】

### 研究背景と動機

膜蛋白質は生体活動において重要な役割を担っており、機能発現には生体膜上での動的な局在化や自己組織化が重要である。しかしながら、膜蛋白質の自己組織化における分子機構や駆動力の解明は困難であった。これは、膜蛋白質が生体膜の物理化学的性質や生体膜上の様々な分子の影響を受けるためである。

本研究は、生体膜が蛋白質の自己組織化に与える影響を解明する手掛かりとして、溶血性の膜孔形成毒素 Pore-Forming Toxins (PFT) に着目した。PFT は水溶性蛋白質として発現し、生体膜上で構造変化を経て膜貫通型多量体(膜孔)を形成するという、自己組織化に際して最も顕著に生体膜からの影響を受ける蛋白質群である<sup>1</sup>(図1)。PFT はまた、病原性細菌の毒素から人間の免疫システム、アポトーシス誘導因子に至るまで幅広い生物種により使用される重要な生体因子でもある<sup>2</sup>。

これまで構造研究が進められている PFT は、界面活性剤やアルコールを用いた疎水的環境によって膜孔形成を誘起できるものに限られていた<sup>3</sup>。一方、大部分の PFT は脂質二重膜存在下でのみ膜孔を形成するため、それらの脂質膜要求性 PFT の膜孔の詳細な構造は未解明であった。さらに PFT が生体膜上のみで自発的に複合体を形成する機構、及び生体膜の組成が PFT の膜孔形成能に影響を与える分子機構は解明されていない。脂質膜要求性 PFT の構造解析及び、PFT-生体膜間の相互作用の速度論および熱力学的測定により、PFT の生体膜上における詳細な自己組織化機構や、その際の生体膜の影響は解明されると考えられる。

本研究の目的は脂質膜要求性 PFT の一種である Fragaceatoxin C (FraC) をモデル蛋白質として、膜上反応の熱力学的駆動力、及びアミノ酸残基レベルの分子機構を解明することを通じて、膜蛋白質の自己組織化に特徴的な性質、また蛋白質の自己組織化に影響を与える生体膜の性質を明らかにすることである。

### モデル蛋白質 FraC

PFT の中でも、イソギンチャクが産生する分子量 20 kDa 程度の蛋白質はアクチノポリン (actinoporin) と名付けられている。イソギンチャクはアクチノポリンを用いて餌となる魚の捕食や外敵からの防御を行っていると考えられている。蛋白質 FraC は Equinatoxin II (EqII), Sticholysin I, II (StnI, StnII) と並び、今日最も研究されているアクチノポリンである<sup>4,5</sup>。アクチノポリンの膜孔形成は多段階反応であり、最終的な膜孔形成までに、膜への結合、膜貫通領域の構造変化、多量体化を経ることが知られている<sup>6</sup>。

アクチノポリンはスフィンゴミエリン(SM)を含む膜に対して高い溶血活性を有する<sup>7,8</sup>。また、アクチノポリンは SM とコレステロール(Chol)からなる脂質ラフトに特異的に局在し、時間経過と共にラフトドメインの境界領域に集積されることが報告されている<sup>9</sup>。SM が特異的な結合レセプターとして、アクチノポリンの膜結合に寄与しているというのが、現在まで広く認められてきた説である<sup>10</sup>。しかしながら、アクチノポリンの多段階反応のステップごとの解析はこれまでなされていないため、SM や脂質ドメインの存在が、多段階反応のどのステップにどのような影響を及ぼしているのかは未解明である。

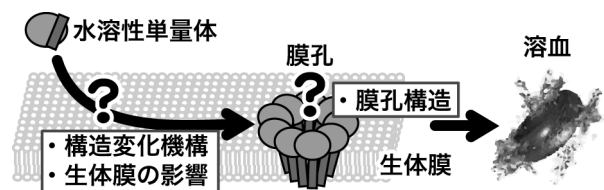


図1: PFT の反応機構

アクチノポリンが形成する膜孔の構造は4量体からなるトロイダルポア(troidal pore)であると長年考えられてきた<sup>11</sup>。トロイダルポアとは、脂質からなる膜孔の壁面が蛋白質によって安定化されているというモデルであり、このモデル中では蛋白質同士は互いに接触していない。近年、アクチノポリンの膜孔構造は9量体の蛋白質のみから形成された膜孔(barrel-stave pore)であることが提案された<sup>5</sup>。しかしながら、アクチノポリンの膜孔の形態およびプロトマー数の決定はなされておらず、近年の議論の焦点であった<sup>11</sup>。

## 【第2章：実験手法】

### リポソームの調製

クロロホルムに溶解した脂質ジオレオイルフォスファチジルコリン(DOPC), SM, Chol を適量試験管に分取し、脱気によってクロロホルムを揮発させた。乾燥させた脂質にバッファ(50 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.4)を加えボルテックスを行い、LMV(Large, Multilamellar Vesicles)を形成させた。脂質溶液を-80 °Cと 40 °Cに交互に 10 回さらすことで、懸濁液中のLMV をLUV (Large, Unilamellar Vesicles)に変化させた。フィルタ(ポアサイズ 100 nm)を用いてLUV の粒子径を均一にした。本稿では、この 100 nm 均一径LUV をリポソームと呼称する。

### FraC 膜孔の精製

水溶性単量体 FraC と DOPC/SM(1:1)リポソームとを室温で 30 分間インキュベートし、脂質膜上に FraC の膜孔を形成させた(図 2)。その溶液に 1% Triton X-100 を添加し、脂質と蛋白質を可溶化した。膜蛋白質に変化した FraC(膜孔)を精製するため、カチオン交換カラム Resource S を用いて脂質の除去および界面活性剤の交換を行った。さらにサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により、FraC 膜孔を単離した。SEC を行う際、分子種分析には界面活性剤 LDAO (3 mM) を、FraC 膜孔の結晶化には DDM (0.3 mM)を用いた。

### FraC の結晶化

膜孔構造：FraC 膜孔の結晶化には脂質メソフェーズ法を用いた<sup>12</sup>。構造解析には 7 mg/ml 蛋白質溶液 (20 mM Tris/HCl (pH7.4), 10 mM NaCl, 0.3 mM DDM)と脂質溶液 (Jeffamine M600, 1,2,3-ヘプタンチオール, モノオレイン,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , HEPES, pH 7.0)を等量混合し、20 °Cで6ヶ月インキュベートした後に生じた結晶が用いられた。

脂質結合単量体構造：解析に用いた結晶の一つは蛋白質溶液と等量の結晶化溶液(0.2 M チオシアン酸ナトリウム, 20% PEG 3350, 30 mM ジヘキサノイルフォスファチジルコリン (DHPC), 3 mM デハイドロエピandroステロン, pH 6.9)を混合し、20 °Cで2週間静置した後に得られた。

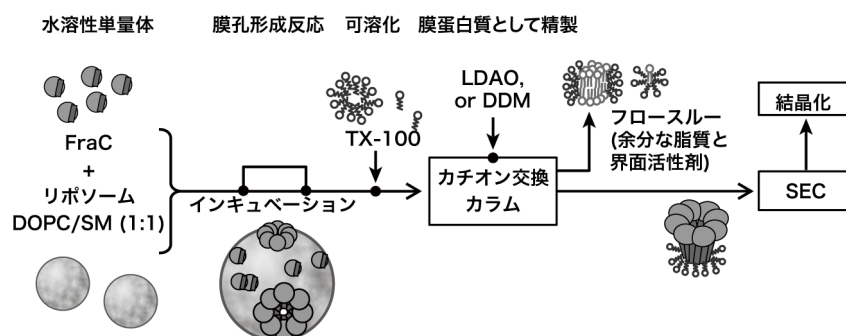


図2：FraC膜孔の精製法

2量体構造：解析に用いた結晶の一つは蛋白質溶液と等量の結晶化溶液(100 mM POC, 3 mM DDM, 200 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM ギ酸アンモニウム, 24% PEG 8000, 100 mM 酢酸ナトリウム, pH 4.2)を混合し, 20 °Cで3週間インキュベートした後に得られた。

### Protease Kによる蛋白質分解

FraC (24 μM)とリポソーム(3.65 mM)を30分間インキュベートした後, 6 μM Protease Kを添加し24時間静置した。PMSF (5 mM)により分解反応を停止し, SDS-PAGEで未分解のFraCを検出した。FraCがリポソームに結合している場合は, FraCはProteaseによる分解から保護される。

### リポソーム内包蛍光物質放出量の測定

リポソームを作製する際に, バッファに蛍光色素 ANTS および消光剤 DPX を添加した。リポソーム外の ANTS/DPX は SEC により除去した。100 μM のリポソーム溶液に対し, 0.6 μM の蛋白質を添加し, リポソームに内包された物質の放出量を蛍光強度の上昇によって観測した。リポソームの完全な破壊のために 0.1% TritonX-100 を添加した。励起波長, 測定波長はそれぞれ 355 nm, 515 nm を用いた。蛍光強度の変化は FraC の膜孔形成能の高さを表す。

### 等温滴定型熱量測定

リポソーム溶液(-10-20 mM)に対して蛋白質溶液(-20-50 μM)を添加した際に得られる熱量を, ITC200 Micro Calorimeter を用いて 25 °Cで測定した。熱力学的パラメータは, 脂質/蛋白質のモル比を n として解析された。

## 【第3章：FraC 膜孔の構造学的解析】

本研究では FraC の水溶性単量体構造, 脂質に結合した単量体構造, 反応中間体構造, 膜孔構造を高解像度で決定した。本分野最大の課題であった膜孔構造の決定は, 膜結合反応後のサンプルを回収し, 膜蛋白質として再抽出することで達成された。決定された FraC の膜孔構造は 8 量体であった(図 3)。結晶中において, 膜孔 1 分子につき 24 分子の脂質分子が観察された。脂質の結合位置は 3 種類に分類することができ, 結合位置の一つは隣接した蛋白質の間に存在していた。脂質の影響を考慮しなければ, 膜孔のプロトマー間相互作用界面は 777 Å<sup>2</sup>であり, これは安定な複合体を形成するには小さい。しかしながら, 脂質を含めて考えるとプロトマー間の相互作用界面(1002 Å<sup>2</sup>)は複合体形成に十分な面積であった。このときのプロトマー間相互作用界面の 37%は脂質の寄与により創出されていた。さらに, 詳細な構造解析と変異体解析の結果より, 膜孔の安定化に寄与する脂質は SM のみであることが示された。SM のみが有する 3-OH は FraC のアミノ酸残基 Arg31 と特異的な相互作用を形成しており, 変異体 FraC(R31A)の膜孔形成能は著しく低下した(図 4)。これらの結果より, 標的膜由来の特定の脂質が蛋白質同士の結合を仲介することで膜孔構造の安定化に寄与することが明らかになった。

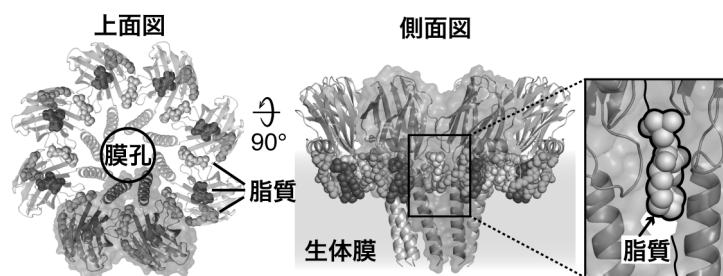


図 3 : 脂質により安定化された FraC の膜孔構造

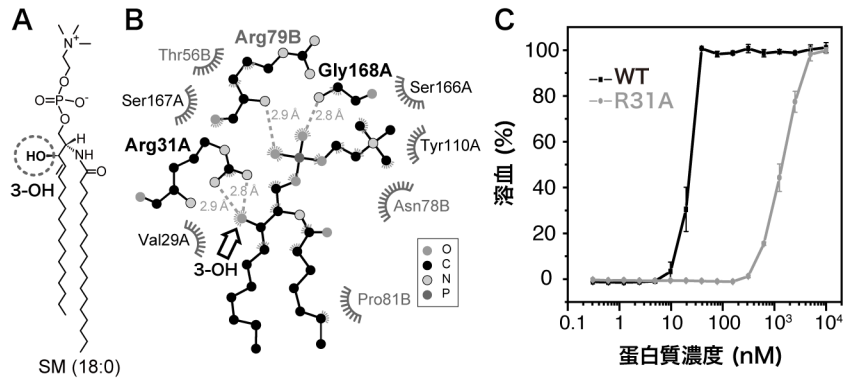


図4: SM と Arg31 の特異的相互作用による構造脂質の認識 (A)SM の構造 (B)SM と周辺残基の相互作用 (C)R31A の溶血活性

### 【第4章: FraC の膜孔形成機構】

FraC がジヘキサノイルフォスファチジルコリン(DHPC)と結合することから, SM は膜結合ステップに際しては FraC の特異的レセプターではないことが示された(図 5A). また, FraC は DOPC のみ, SM のみからなる脂質膜の存在下でもプロテアーゼによる分解から保護されており, FraC は膜結合に際しては強い脂質特異性を有さないことが確かめられた(図 5B).

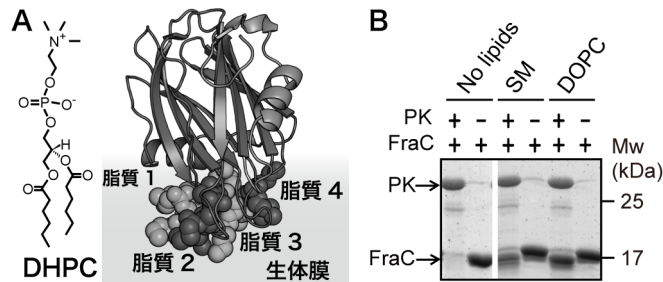


図5: SM 非特異的な FraC の膜結合 (A)DHPC に結合した FraC の構造 (B) リポソームによる FraC の分解阻害

FraC 二量体構造は, 膜貫通領域を除いては膜孔と同じ相互作用界面を有しており, 蛋白質間相互作用に寄与しているアミノ酸残基も同じであった. そこで, 2 量体は FraC の多量体化機構を解明する重要な手掛かりになると考え, 詳細な解析を行った. 水溶性単量体と 2 量体の構造を比較すると, 2 量体中の B 鎖は単量体の構造と同一であった. 一方, 2 量体 A 鎖は B 鎖から

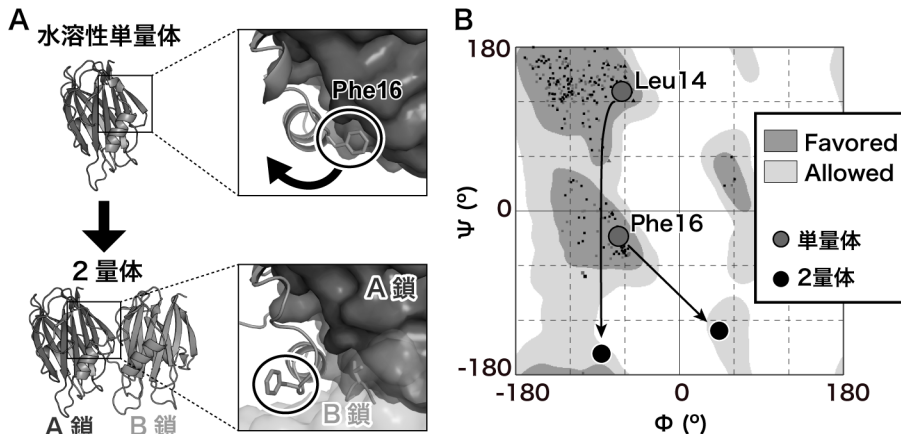


図6: FraC の多量体化により誘起される構造変化 (A)FraC の単量体と 2 量体との構造比較 (B) 単量体と 2 量体のラマチャンドラン・プロット

の相互作用のために、膜貫通領域の Phe16 の位置が単量体と大きく異なっていた。単量体中では Phe16 は疎水性間隙中に位置していたが、2 量体中では A 鎖の間隙に B 鎖 V60 が挿入されているために A 鎖 Phe16 は溶媒中に露出していた(図 6 A)。2 量体 A 鎖のラマチャンドラン・プロットをとると、Leu14 と Phe16 の二面角が大きく変化していた(図 6 B)。その両者ともが好ましい結合角(favored)から許容される結合角(allowed)に変化、つまり不安定化していた。

### 膜ドメイン依存的な FraC の自己組織化

蛍光物質を充填したリポソームに対する FraC の膜孔形成能を測定したところ、FraC は DOPC のみ、SM のみからなる膜上では膜孔を形成せず、両脂質が共存し膜ドメインが形成される条件下でのみ膜孔を形成した(図 7 A)。コレステロールの添加により流動性を高めた SM 膜に対しても FraC は活性を有しており、脂質ドメインの有無や膜の流動性の違いは FraC による膜孔形成に速度論的影響を与えていた(図 7 B)。FraC とリポソームとの相互作用の熱力学的解析を行ったところ、FraC はいずれの脂質にも結合するが、膜ドメイン存在時のみ構造変化と多量体化に由来する大きな発熱( $\Delta H$ )を示した(図 8)。興味深いことに、膜結合と膜孔形成の間の自由エネルギー変化( $\Delta G$ )は非常に小さいことが明らかになった。以上の結果から、脂質ドメインの境界の存在が、FraC の膜挿入過程の活性化エネルギーを下げることで、FraC の膜孔形成が促進されることが解明された。

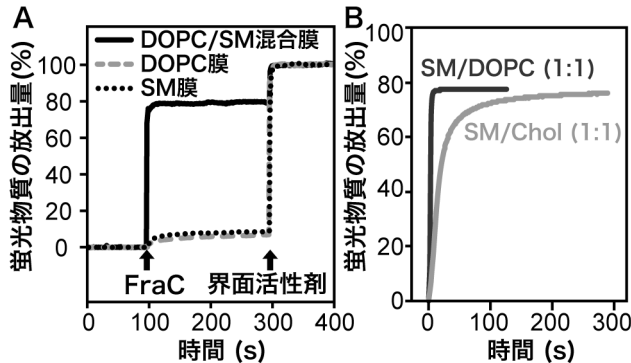


図 7 : FraC の膜孔形成に対する膜組成の影響 (A) 膜ドメインの影響 (B) 組成の影響の速度論

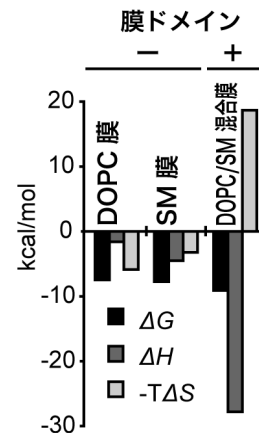


図 8 : ITC による FraC と生体膜との相互作用解析

## 【第5章：結論】

以上の結果を統合すると、FraC は生体膜結合の際には脂質特異性を示さないが、SM を含む脂質ドメインの存在下で膜孔を形成する。その過程で脂質ドメインの存在が速度論に FraC の膜孔形成を促進し、また SM が FraC のアセンブリにおけるコファクターとして働くことが、特定の組成を持った生体膜特異的に FraC が膜孔を形成する理由であった(図 9)。脂質ドメインの境界には膜のたゆみ(defect)や段差が存在する。このドメイン境界の defect が FraC の膜挿入過程の活性化エネルギーを触媒的に下げることで、膜孔形成が促進されることが強く示唆された。また、流動性の高い脂質膜はゆるみを生じ、脂質ドメイン同様に蛋白質の膜挿入および自己組織化を促進することが示された。

さらに、蛋白質の自発的構造変化機構として、多量体化によって膜貫通領域の主鎖のゆがみが誘起されることが、膜貫通領域のコア領域からの離脱と構造変化につながることを示唆された。以上のように本研究では、熱力学的解析と蛋白質構造情報から、水溶性蛋白質が膜貫通蛋白質に変化する際の駆動力と詳細なメカニズムを蛋白質-脂質間、蛋白質間相互作用の両側面から解明した。

本研究は、膜蛋白質の自己組織化が生体膜から与えられる影響を解明するモデルとして PFT に着目し、構造学的反応機構とその熱力学的駆動力の両者を詳細に解明した点に独創性がある。本研究の持つ意義は PFT が標的膜の脂質を自己組織化の際に部品の一部として取り込むこと、および脂質ドメインの形成という膜のダイナミクスに由来する因子が膜蛋白質の自己組織化のエネルギー障壁を下げることを初めて発見したことである。

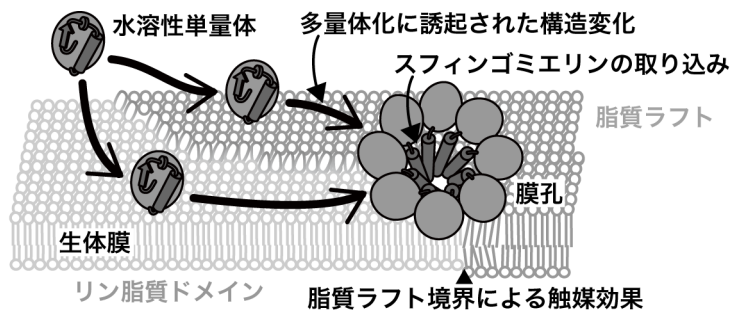


図 9 : FraC 膜孔形成の分子機構

## 【参考文献】

- 1) Iacovache, I., Bischofberger, M. & van der Goot, F. G. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 241–6 (2010).
- 2) Anderluh, G. & Lakey, J. H. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 482–90 (2008).
- 3) Iacovache, I. *et al. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 1611–1623 (2008).
- 4) Bellomio, A. *et al. Toxicon* **54**, 869–80 (2009).
- 5) Mechaly, A. E. *et al. Structure* **19**, 181–91 (2011).
- 6) Kristan, K. C., Viero, G., Dalla Serra, M., Macek, P. & Anderluh, G. *Toxicon* **54**, 1125–34 (2009).
- 7) Bakrač, B. *et al. J. Biol. Chem.* **283**, 18665–18677 (2008).
- 8) Caaveiro, J. M. *et al. Biophys. J.* **80**, 1343–53 (2001).
- 9) Barlic, A. *et al. J. Biol. Chem.* **279**, 34209–16 (2004).
- 10) Anderluh, G. *et al. J. Biol. Chem.* **278**, 45216–23 (2003).
- 11) García-Ortega, L. *et al. Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1808**, 2275–2288 (2011).
- 12) Wöhri, A. B. *et al. Structure* **16**, 1003–9 (2008).

## 【研究業績】

### (1) 学術雑誌等に発表した論文

- 1) K. Tanaka, J. M. M. Caaveiro, K. Morante, J. M. González-Mañas & K. Tsumoto, Structural basis for self-assembly of a cytolytic pore lined by protein and lipid. *Nat. Commun.* **6**, 6337 (2015).
- 2) K. Morante, J. M. M. Caaveiro, K. Tanaka, J. M. González-Mañas & K. Tsumoto, A Pore-Forming Toxin Requires a Specific Residue for Its Activity in Membranes with Particular Physicochemical Properties. *J. Biol. Chem.* **290**, 10850–10861 (2015).
- 3) K. Tanaka, J. M. M. Caaveiro & K. Tsumoto, Bidirectional Transformation of a Protein between its Native Water-Soluble and transmembrane Conformations. *Biochemistry.* **54**, 6863–6866 (2015).

### (2) 学術雑誌等又は商業誌における解説、総説

- 1) 田中耕路, Koldo Morante, Jose Caaveiro, Juan Manuel González-Mañas, 津本浩平  
「最近の研究から: FraC (Pore Forming Toxin)が可溶性蛋白質から膜貫通蛋白質に変化する際の反応機構」 PHOTON FACTORY NEWS, Vol.31, No.2 (2013)