

## X線結晶学者のためのクライオ電子顕微鏡解析の手引き(8)

# クライオ電子顕微鏡による 二成分毒素の構造解析： トキシン膜透過システムの構造基盤

京都産業大学大学院生命科学研究科  
吉田徹, 山田等仁, 津下英明

Toru YOSHIDA, Tomohito YAMADA and Hideaki TSUGE:  
Cryo-EM Structural Analysis of Binary Toxin: Structural Basis of  
Toxin Translocation System

The iota toxin produced by *Clostridium perfringens* type E is a binary toxin comprising two independent polypeptides: Ia, an ADP-ribosyltransferase, and Ib, which is involved in cell binding and translocation of Ia across the cell membrane. Binary toxin family includes *C. perfringens* iota toxin, *C. difficile* CDT, *C. spiroforme* CST, *C. botulinum* C2, and *B. anthracis* anthrax toxin. Here we introduce the binary toxin complex structures using single-particle Cryo-EM structural analysis and the structural basis of toxin translocation system.

### 1. はじめに

近年クライオ電子顕微鏡を用いた重要なタンパク質の構造が数多く報告されている。2021年、クライオ電子顕微鏡による全体の解析数は10,000個に迫り、この年のリリースは約2,900個である。これはタンパク質結晶構造解析での1990年代の最後の状況と似ている。1999年では、総リリース数は9,176個、この年のリリースは1,960個であった。90年代の中頃、タンパク質の結晶構造解析は結晶を凍結するクライオ条件でのデータ測定技術が広まり、輝度の高いシンクロトロンでのデータ測定が可能となり、さまざまなプログラムの進歩と相まって大きな発展を遂げた。現在のクライオ電子顕微鏡の状況は、これに似た活気を感じる。より多くの日本の研究者が、クライオ電子顕微鏡での構造解析分野に入ってくることで、構造生物学がさらに発展することを願っている。特にクライオ電子顕微鏡は、膜タンパク質や大きなタンパク質複合体の情報を得るには、非常に有効である。クライオ電子顕微鏡解析の魅力をわれわれの二成分毒素の研究を通じて紹介したい。

### 2. トキシン膜透過システム

腸内には1,000種類、100兆もの細菌が生息していることが知られている。この中には善玉、悪玉、そのどちらでもない中間の菌もあり、それらが互いに密接な関係をも

ち、複雑なバランスを取っている。クロストリジウム属は悪玉菌の代表であり、偏性嫌気性で芽胞を形成するグラム陽性の桿菌である。土壌内部や腸内などの酸素濃度が低い環境に生息し、通常濃度の酸素存在下では増殖できない。クロストリジウム属にはクロストリジウム・パーフリゲンズ(ウェルシュ菌)、クロストリジウム・デフィシル(デフィシル菌)、クロストリジウム・ボツリナム(ボツリヌス菌)、クロストリジウム・スピロフォルム(スピロフォルム菌)などの菌が知られる。ウェルシュ菌ではさまざまな毒素を分泌することが知られており、その毒素分泌の違いから、いくつかの型にわけられている。ウェルシュ菌E型の産出するイオタ毒素は二成分毒素であり、A成分とB成分からなる。A成分であるIaはアクチンを特異的にADPリボシル化する酵素(毒素)であり、B成分であるIbはIaをエンドサイトーシス経路で細胞内に送り込むタンパク質膜透過の装置と考えられている。これに似た二成分毒素はデフィシル菌CDT(CDTa, CDTb)、ボツリヌス菌C2(C2I, C2II)、スピロフォルム菌CST(CSTa, CSTb)が知られており、それぞれ、アクチンを特異的にADPリボシル化する酵素(毒素)とそれを細胞内に送り込むタンパク質膜透過装置からなっている。一方、バチルス炭疽菌の主毒素は、同じく二成分毒素であるが、クロストリジウム属の二成分毒素とは異なった特徴をもつ。A成分はLF(致死因子:メタルプロテアーゼ)、EF(浮腫因子:カルモジュリン依存アデニ

レートサイクラーゼ)の2つの外毒素であり, これらをエンドサイトーシス経路で細胞内に送り込むタンパク質膜透過の装置PA(防御抗原)からなる。アミノ酸シーケンスの類似性から, タンパク質膜透過装置はIb, C2II, CDTb, CSTbとPAで相同性は高いが, A成分の構造と機能の類似性はない。現在まで, 二成分毒素の構造と機能の研究は, 炭疽菌のLF-PAで大きく進んできたが, クロストリジウム属のタンパク質膜透過装置について, またA成分との複合体については報告がなく, これらのタンパク質膜透過の機構の詳細については不明であった。二成分毒素である, クロストリジウム属のタンパク質膜透過装置とPAタンパク質膜透過装置をまとめて, トキシン膜透過システムと名付ける。

### 3. 二成分毒素の調製と構造解析

#### 3.1 膜孔の調製とはじめ

B成分である膜透過装置の研究紹介に入る前に, われわれが長らく研究してきたA成分の紹介をする。Iaの結晶構造はADPリボシル化の機能解析と合わせて, 2003年に報告した<sup>1)</sup>。その際にJMB表紙に掲載されたのは想像上のIbオリゴマーが膜に埋もれた絵に, 構造が明らかになったIaが結合する様子だった。その後, IaとADPリボシル化される基質アクチンとの複合体の結晶化に成功, この構造を報告した<sup>2)</sup>。現在でもアクチン全体とのIa様の酵素の複合体はほかに報告されていない。しかしながら, ADPリボシル化毒素(C2I, CDTa, CPILeA)単体の構造, 機能は世界中で研究され, 多くの報告がある<sup>3)-5)</sup>。一方で, Ibについては, 構造研究はなされていなかった。Ibは20 kDaのプロペプチドがプロテアーゼで切断を受けて活性化され, 7量体のオリゴマーである約500 kDaのプロ膜孔を形成する。これと同時にLSR(リボタンパク質受容体)に結合し, さらにIaが結合, この複合体がエンドサイトーシスで細胞に取り込まれ, ここで酸性pHがトリガーになり, 膜孔を形成し, この膜孔をIaが透過するという毒性発現の機構が考えられている(図1)。

われわれは, 結晶構造解析を中心の手法として研究を進めてきたが, 2011年ごろから, クライオ電子顕微鏡の目覚ましい発展を目の当たりにして, Ibでもその構造をクライオ電子顕微鏡で見れないかと考えてきた。実際にクライオ電子顕微鏡での研究を開始したのは2016年である。おそらく, どの研究室も同じであろうが, クライオ電子顕微鏡への参入は, ハードルが高い。しかしながら, 良いデータを取得できれば, 後の精密化からは, 結晶解析の研究室であれば馴染みが深い。また結晶学会誌でこんなことを書くのも妙であるが, クライオ電子顕微鏡解析の最大のメリットは, 結晶がいらぬことである。しかし, それでも依然としてIb膜孔をいかに安定に精製するかは大きな問題であった。当初は負染色電子顕微鏡

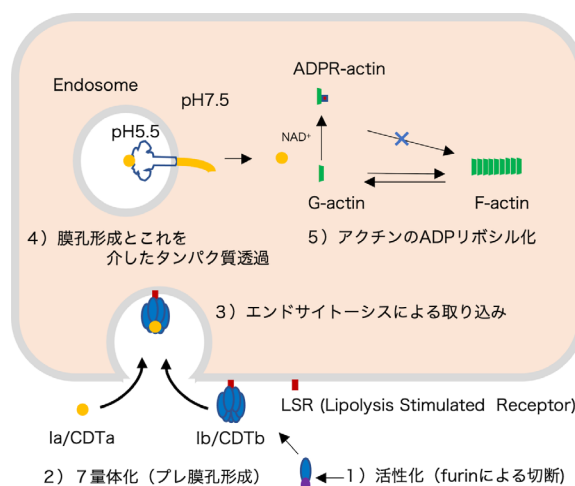


図1 ウェルシュ菌およびデフィシル菌の二成分毒素の毒性発現機構(Ia/IbおよびCDTa/CDTb). (Intoxication mechanism of binary toxin from *C. perfringens* and *C. difficile*.)

の観察を, サンプルの良し悪しのスクリーニングに使用した。ただし, 負染色の過程が複合体構造に影響することもあることから, 最終的にクライオ電子顕微鏡で直接サンプルを見るのがベストであると考えた。このため, サンプル調製, グリッド調製, データ測定, 得られた電子顕微鏡の像を確認するという過程を繰り返すことで, 研究を進めてきた。2018年の夏, 得られていたマップは9 Å, この構造を比叡山で行われた, 京都産業大学, タンパク質動態研究所が主宰した国際会議で発表した。その際に, 見えていたIb膜孔に結合したIaは, なんともおぼろげな構造である。しかし, この後, サンプル調製の改善とあいまって, 分解能は劇的に向上し, Ib膜孔とIaが結合したIb膜孔の構造をそれぞれ3 Åを切る分解能で明らかにした<sup>6)</sup>。

#### 3.2 分解能の向上のための膜孔調製

##### 3.2.1 安定なIbオリゴマー条件を見つける

プロペプチドをキモトリプシンで切断したIbを細胞にふりかけ, 37度で静置すると, 細胞膜上でIbは膜孔を形成することが知られている。しかしながら, 大腸菌で発現したIbをキモトリプシン消化して37度で静置しただけでは, 効率の良いオリゴマー化はできなかった。また, 得られたオリゴマーを精製するために当初はゲルろ過クロマトグラフィーを用いていたが, 高価なカラムを詰まらす事態が発生したことから, 密度勾配遠心を用いた方法での精製へと切り替えた。効率の良いオリゴマー化のための, 大きなプレクスルーは次の点であった。キモトリプシン消化でプロペプチドを切断したあと, 100%エタノールに溶解したプロテアーゼ阻害剤PMSFをサンプルの1/100量加えることでさらなる切断活性を抑えようとしたが, ある日, 間違えて10倍量を(つまり, サンプル

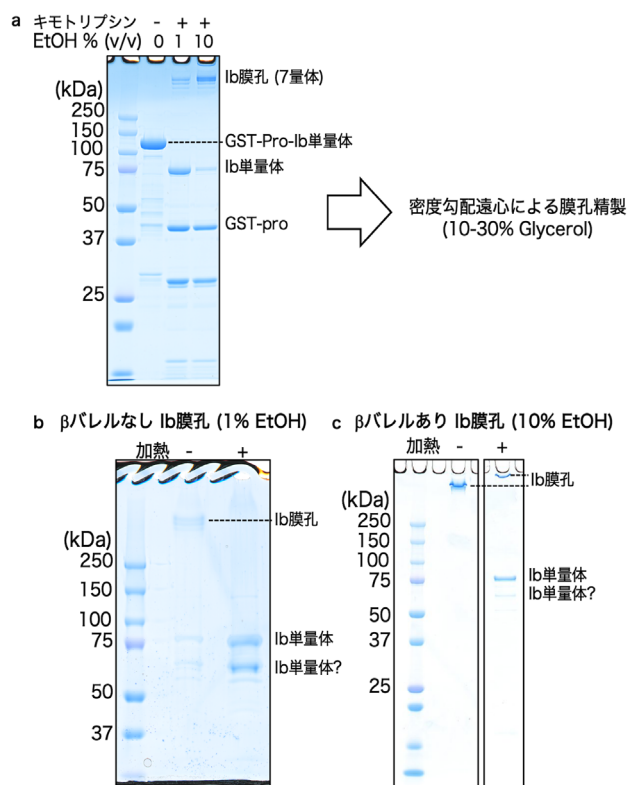


図2 上：密度勾配遠心によるIb膜孔精製，下：βバレルのあるなしでのIb膜孔の物性の違い。(Upper: Ib-pore purification by ultracentrifugation, Lower: Physical property difference of Ib-pore with or without forming β-barrel.)

の1/10量)を加えてしまった。驚いたことに、この10倍量のエタノールは、かつてないほど効率よいオリゴマー化をもたらした(図2a)。(これを見つけた山田(当時3回生)は2021年の日本蛋白質科学会年会の若手奨励賞優秀賞を受賞した)。また、この時点で得られたオリゴマー化したサンプルは、プレ膜孔あるいは膜孔かははっきりしていなかった。まず、最初にプレ膜孔ができる。この後、膜があると、あるいは受容体結合ドメインで膜表面に受容体(LSR)が存在すると、プレ膜孔からβバレルを形成したステムがジャックナイフのように飛び出して膜孔形成をすることを考えられている。しかし、当初は得られたサンプルの状態が不明であった。現在は、βバレル形成前の膜孔(プレ膜孔と異なる。1% EtOH)とβバレル形成後の膜孔(10% EtOH)では、物性が異なることがわかってきた。SDS-pageで見分けることが可能であり、βバレルありの膜孔であれば熱処理をしたサンプルで、オリゴマーとして安定に存在するが、一方、βバレルを組んでいない膜孔はモノマーに解離する(図2b, c)。さらに、面白いのはオリゴマーのバンドは熱処理することで熱処理していないものより上にシフトする(図2c)。

### 3.2.2 界面活性剤の検討

Cryo-EMでの構造決定で近年よく使用されている

サンプル Ib膜孔 1.9mg/ml  
(10 mM HEPES pH 7.5, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.01% (w/v) LMNG)

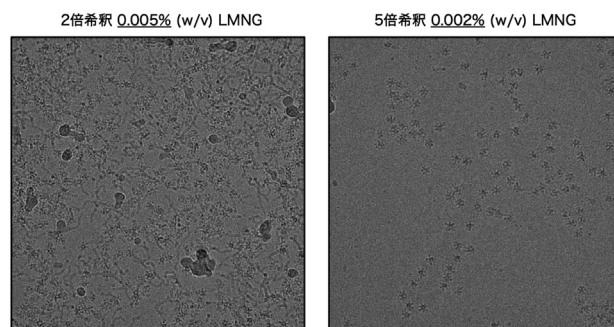


図3 Ib膜孔(LMNG含む)の希釈による単粒子画像。(Images of single particle analysis of Ib-pore with LMNG (2x dilution and 5x dilution).)

界面活性剤を次に記す。GDN (glyco-diosgenin), DDM (*n*-Dodecyl-β-D-maltoside), DDM + CHS (cholesteryl hemisuccinate), LMNG (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol)などの非イオン性界面活性剤である。われわれは最初にLMNGを用いて可溶化したが、この濃度の調整は幾度かのトライアルを必要とした。最終的な判断は、クライオ電子顕微鏡の画像を見て判断した。オリゴマー形成時にはIb膜孔の可溶化を目的に0.03% (w/v) LMNGを使用している。不要に高濃度のLMNGを使用すると電子顕微鏡画像にミセルと思われる像が現れた(図3)。このため、最終的には密度勾配遠心による精製以降にLMNG濃度を0.003% (w/v)に落として、サンプル調製を行った。

当初、分解能が悪かったクライオEM密度マップは、上述した、安定なIbオリゴマー条件を見つけることと界面活性剤の検討を含んで、さらにグリッド条件の検討を行うことで、大きく改善した。最終的に、大阪大・蛋白研のTitan, Kriosで高分解能データを取得してIb膜孔の構造解析に成功した。

さらに、この構造研究の最も重要な課題は、IaとIb膜孔の結合を見ることであった。当初はIaとIb膜孔を混ぜて複合体として精製を試みたが、得られたサンプルでは複合体はわずかのみで、ほとんどがIa非結合のIb膜孔であった。数度のトライアルを経て、最終的に上述したIb膜孔の精製を行い、ここに十分量のIaを加えたサンプル(これ以上の精製はしていない)で、Ia-Ib膜孔の高分解能データを取得して解析を行った。

### 3.3 膜孔と膜孔複合体の構造解析

単粒子構造解析は一般的なワークフローであるモーション補正<sup>7)</sup> CTF補正<sup>8)</sup> RELION-3<sup>9)</sup>を用いた粒子像の抽出、2Dクラス分け、3Dクラス分け、マップの精密化などを繰り返し行った。Ia-Ib膜孔複合体サンプルでは、2,120イメージを取得した。Ib膜孔は7回の対称があることからC7シメトリーでの解析を行った。一方Ia-Ib膜孔複合体の解析は、2,151イメージを取得し、3Dクラス分

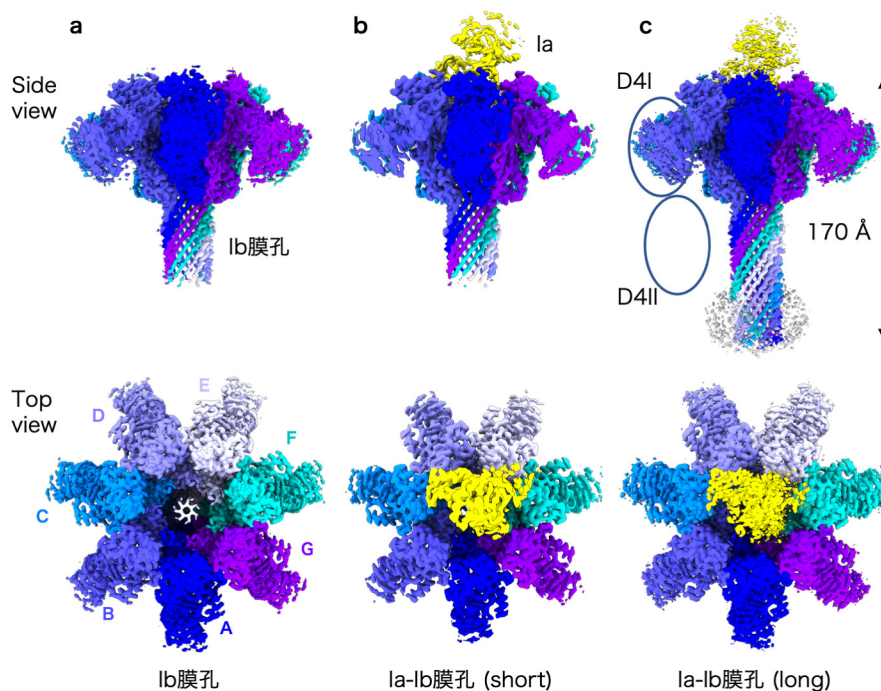


図4 Ib膜孔, Ia結合Ib膜孔 (short), Ia結合Ib膜孔 (long) のクライオEM マップ。(Cryo-EM map of Ib-pore, Ia-bound Ib-pore (short) and Ia-bound Ib-pore (long).)

けから, Ib膜孔のステムの様子が明らかに異なる2つのクラス: ステムが途中まで形成したもの (Short) とステム全長が形成したもの (Long) の解析をそれぞれ行った. こちらはIaが1分子結合することで対称性はなく, Ia非結合なIb膜孔と異なり, C1での解析である. 最終分解能は, 無作為に分けた半分のデータセットから計算された2つのマップの相関係数を空間周波数に対してプロットしたFourier Shell Correlation (FSC) = 0.143から決定した.<sup>10)</sup> それぞれ, Ib膜孔: 2.9 Å, Ia-Ib膜孔 Short: 2.8 Å, Ia-Ib膜孔 Long: 2.9 Åの分解能であった. Longのステムの先, 膜結合部分にはLMNGが疎水性の膜貫通部分を覆った様子が見えている (図4).

Ib膜孔の構造モデルの構築は, (1) PA膜孔の構造を元にしたIb膜孔の構造予測, (2) 予測したIb膜孔構造のrigid body fit, (3) COOT<sup>11)</sup> による手動修正とPhenixのreal-space refinementによる実空間上での構造精密化, の3段階で行った. まず, Ib膜孔の構造予測であるが, PAとIbのアミノ酸配列はドメインD4以外は類似性が高く, また, 今回明らかにしたIb膜孔の構造において受容体結合ドメインD4はほとんど見えていなかった. そこで, IbのドメインD4以外のドメインD1-D3の構造をSWISS-MODELにより予測した. なお, 最も分解能の高い領域であるD2cでは, 各アミノ酸残基の主鎖だけでなく, 側鎖に対応するマップもはっきりと観察することができた (図5). とはいえ, 各原子を区別できるほどの分解能ではないため, 今回のマップからde novoでモデル構築することは難しいと思われた. 次に, Chimera<sup>12)</sup> を用い

て, 予測構造をマップにrigid body fitさせた. PA膜孔とIb膜孔の全体構造は似ているため, この時点で7割以上の主鎖はマップに適切に収まった. この後は, COOTを用いた手動修正と精密化を, 問題がなくなるまで繰り返した. 精密化の際, 二次構造の束縛は常にかけておいたほうが良い結果が得られた. ただ, どうしても構造モデルがマップに適切に当てはまらない領域も数箇所あった. 特に, X線結晶構造解析のモデル構築において良い目印となる,  $\alpha$ ヘリックスや $\beta$ シートの主鎖の酸素原子に対応するマップの出っ張りが2.9 Åという分解能にもかかわらず, 見られなかった (図5). その結果, COOTでいくら修正しても主鎖の構造が適切にマップに当てはまらないという場面に何回か遭遇した. このような場合は, 二次構造の束縛を解除したり, ほかの束縛を緩めたり, あるいは, simulated annealingを行うことで, モデルがマップに適切に当てはまる精密化条件を地道に探した. 最終的に構造モデルはX線結晶構造解析と同様に, MolProbity<sup>13)</sup> やCOOTのvalidation項目を利用して検証した. Phenixのreal-space refinementではマップとモデルの相関係数CCを精密化の標的関数に使用していない.<sup>14)</sup> 代わりに, 構造制約をかけた中で, 原子がマップのセンターに位置するように精密化を行い, これにより計算速度を稼いでいる. この方法でも最終的なModel vs DataのCC (mask) の値は, かなり良い値となった (Ib膜孔: 0.85, Ia-Ib膜孔 Short: 0.86, Ia-b膜孔 Long: 0.85).

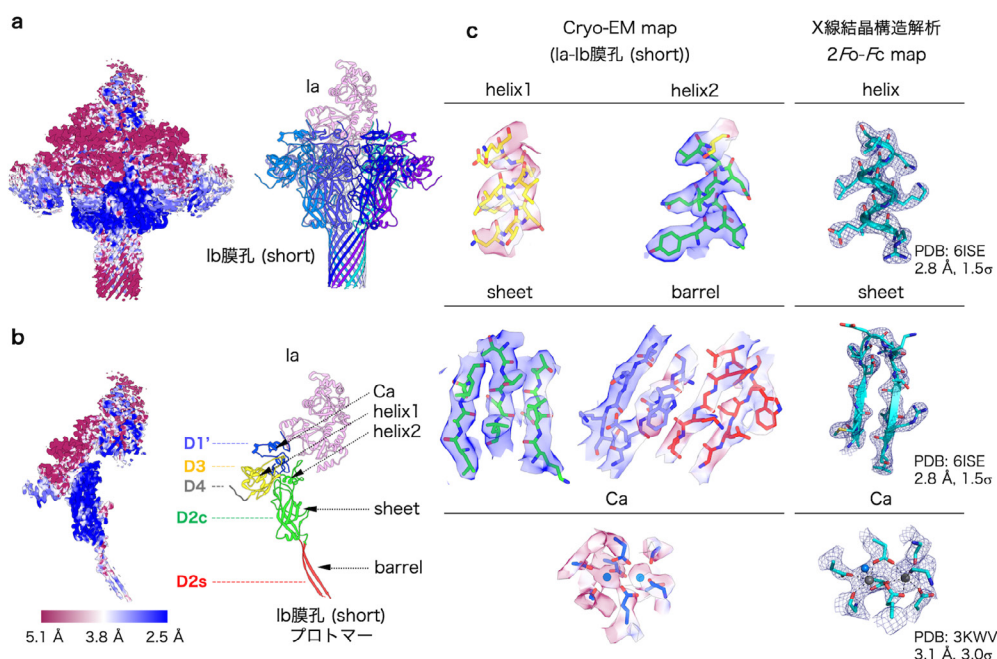


図5 a, b: Ia結合Ib膜孔 (short) 分解能表示したクライオEMマップとその構造 (ドメイン表示), c: Ib単量体のクライオEMマップとX線結晶構造解析の電子密度マップの比較。(a, b: Cryo-EM map of Ia-bound Ib-pore (short) with the resolution and the structure with the domain. c: Comparison with Cryo-EM map and X-ray electron density map.)

## 4. 二成分毒素の構造と膜透過の考察

### 4.1 Ib膜孔の構造

Ib膜孔は7つのプロトマーからなり、ステムが突出した、膜孔を形成していた。このステム全長は100 Åと非常に長いのが特徴である。すでに解析されたPAとともに、この長いステムがタンパク質透過で果たす意味はまだ不明であり、興味深い。断面で見ると、その膜孔の狭窄部位がよくわかる (図6a)。Ib膜孔にはシス側上方からCa-edges, NSQ-loopそして、 $\phi$ クランプという、3つの狭窄部位がある (図6b, c)。Ca-edgesはプロテアーゼでの切断を受けた直後の部位であり、カルシウムが2つ結合した、硬い構造をもつ。このカルシウム結合部位はB成分間で保存されておりPAにも見られる。一方NSQ-loopはその下方に存在し、ループが張り出した構造をもつが、このループのB成分間で保存度は低い。膜孔の最狭窄部位を形成する、 $\phi$ クランプは、まずPAでその構造と機能が予測され、クライオ電子顕微鏡でその構造が明らかにされた。 $\phi$ クランプはプロトマーそれぞれからの突き出た7つのPheからなりB成分間で良く保存されている。このことから、クロストリジウム属のIbでもタンパク質膜透過に最も重要であろうことが予測されてきた。この直径6 Åの狭窄部位である $\phi$ クランプの構造はPAと同じく保持されていた (図6c)。しかし、 $\phi$ クランプだけでなく、次の章で記すように、その他の狭窄部位Ca-edges, NSQ-loopもIaとの結合で重要な働きをするこ

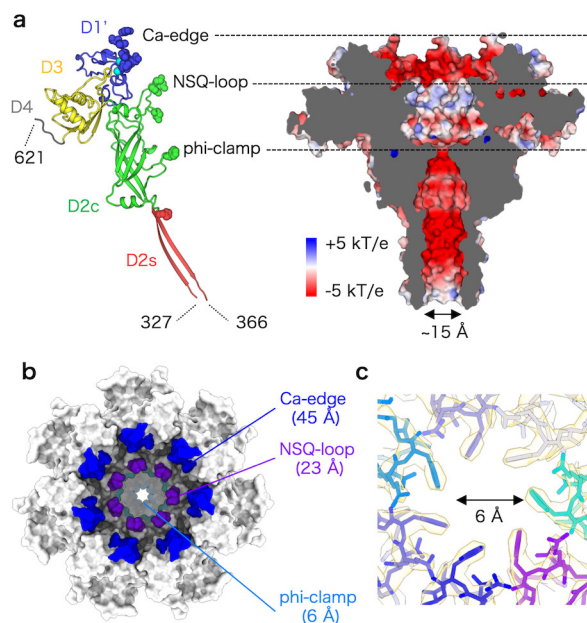


図6 a, b: Ib膜孔狭窄部 (Ca-edge, NSQ-loop,  $\phi$ クランプ), c:  $\phi$ クランプの拡大図。(Narrow clamps of Ib-pore (Ca-edge, NSQ-loop and  $\phi$ -clamp.)

とがわかってきた。

### 4.2 Iaが結合したIb膜孔の構造

クライオ電子顕微鏡の特筆すべき特徴は、1つのグリッドからいくつかのクラスを同時に解析できる点であろう。Iaが結合したIb膜孔の構造は前述したように2つのクラス (ShortとLong) で解析された。どちらのクラス

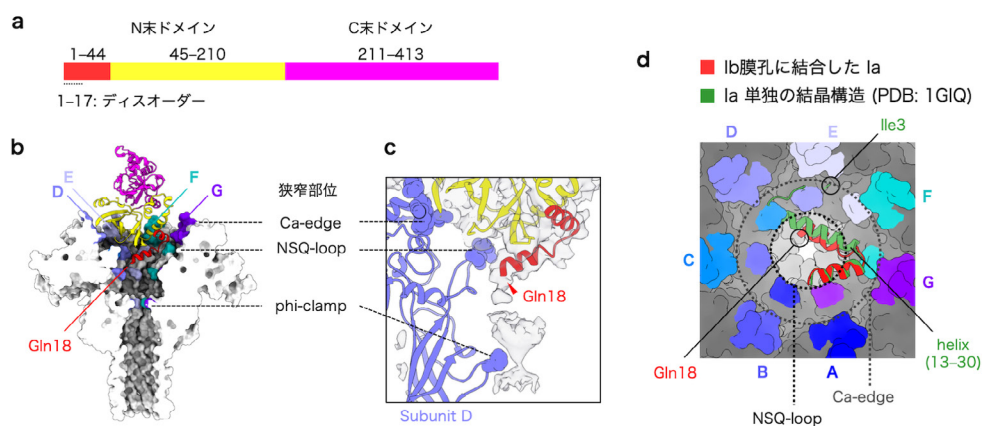


図7 a: Iaのドメイン表示, b: Ia結合Ib膜孔 (short)の断面図, c: Ia N末端のクライオEM マップ, d: Ia N末端のIb膜孔結合構造と単体構造 (X線結晶構造解析: 1GIQ)の比較. (a: Domain representation of Ia b: Cross section of Ia-bound Ib-pore (short) c: Cryo-EM map around Ia N-terminal region d: Structural comparison of cryo-EM Ia-bound Ib-pore (short) complex structure and Ia structure from X-ray crystallography.)

にもIaは同じように結合している. さらにどちらのマップでも, 受容体結合ドメインD4(D4IとD4IIからなる)の密度は, ほかの部分より薄く見えなかった(図4: D4Iはマップは見えるが揺らいでいる, またD4IIはまったく見えない, このために, これらドメインのどちらも構造はおいていない). 特筆すべきは, この解析により, IaのIb膜孔への結合構造が初めて見られ, Ia-Ibの構造が詳細に解析されたことである. IaはN末端とC末端の繰り返しの似た構造ドメインからなる(図7). C末端ドメインにはアクチンADPリボシル化の活性があるが, N末端ドメインにその活性はない. IaのN末端ドメインを介して1分子がIb膜孔に乗っている様子を捉えた. さらに, 複合体の解析をすることで, 上述したCa-edgeとNSQ-loopがIaを受け止めるのに非常に重要な役割をしていることがわかってきた. また, Ca-edgeは硬い構造をとっているが, 一方で, NSQ-loopはそれに比べると柔らかい構造をとっており, Ia結合で2つのプロトマー(E, F)のコンフォメーション変化があることを見出した. これは, Ib膜孔とIa結合したIb膜孔がともに高い分解能の解析だからこそわかったことである. IaのIbへの結合はNSQ-loopのコンフォメーション変化を誘起するだけでなく, Ia自身の構造にも影響を及ぼす. IaにはN末端に2つの $\alpha$ ヘリックスがあり, この最初のヘリックスの一部が解けて, かつ $\alpha$ ヘリックスの角度が変化していた(図7). さらにN末端に続くマップは最狭窄部位 $\phi$ クランプまで続いていた.

### 4.3 タンパク質膜透過の機構について

われわれが明らかにした構造はIaがIb膜孔に結合してこれから, 膜透過する直前の構造であると考えている. 想像して欲しいのは, 針に糸を通すのに一番難しいのは最初である. この最初の様子を捉えたと考えている. 狭窄部位 $\phi$ クランプの直径は6 Åしかないために, ここを

通過するにはIaの構造はアンフォールドする, あるいは,  $\phi$ クランプを形成する7つのフェニルアラニンがある程度コンフォメーション変化するしかない. それでもIa全体が通過するには少なからず, Iaのアンフォールドは必要であろう. エンドソームと細胞のpH勾配による膜電位のみで, Iaの透過が進むことは興味深い. 長いステムを通して細胞に行き着いた先には, Hsp70やHsp90といったATPで駆動するシャペロンが待ち受けている. これらが, 巻き戻して重要な働きをすることは報告されている. しかし, そこに行き着くまで, 約100 Åの長いステムの通過は自発的に起こるはずである.

### 4.4 炭素菌LF-PAとの比較から

同じくタンパク質透過する, もう1つの二成分毒素との複合体の構造を比較をすることは興味ぶかい. LF-PAプレ膜孔の構造は2011年に結晶構造で明らかにされていたが, その膜孔との構造は知られていなかった. しかし, 最近LF-PA膜孔の全体構造がクライオ電子顕微鏡で明らかになった.<sup>15)</sup> 明らかにしたのはPAの構造が決定される前に $\phi$ クランプを提唱したKrantzらのグループである.<sup>16)</sup> Ia-Ib膜孔とLF-PA膜孔では, それぞれの膜孔の構造に大きな差はない. しかしながら, IaとLFではその構造は異なり, さらにその膜孔への結合はまったく異なる. Krantzらは以前から, 電気生理の実験を行い, この膜孔に特異的なノイズを見出し, 膜透過機構について考察している.<sup>17)</sup> LFのPAへの結合はIa-Ibと大きく異なっている(図8). PAのプロトマー間で作られた溝( $\alpha$ クランプ)にLFの $\alpha$ ヘリックスが結合し, これが協同的に働き $\phi$ クランプが開き,  $\alpha$ ヘリックスは形成したままで, そのまま通過できるという, ヘリックス コンプレッションモデルを提唱した.<sup>17)</sup> しかし, Ibは $\alpha$ クランプ( $\alpha$ ヘリックスの結合部位)を使用しない, またIbでもPAでも同じコンフォメーションの $\phi$ クランプの構造しか, 観測されて

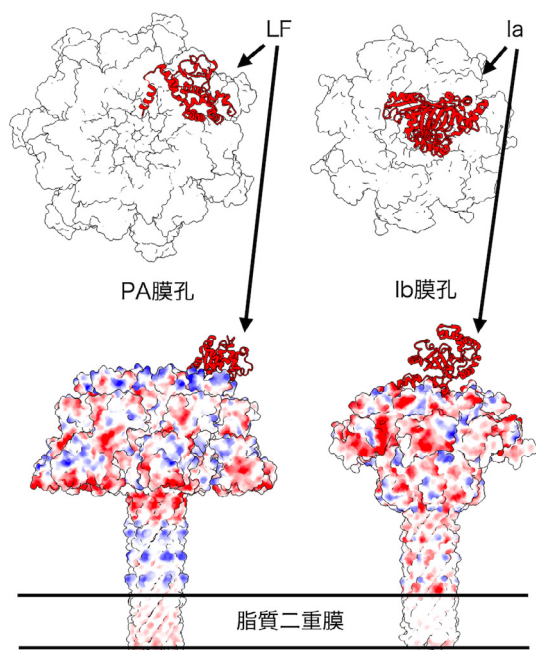


図8 LF結合PA膜孔複合体とIa結合Ib膜孔複合体の構造比較。(Structural comparison with LF-bound PA-pore and Ia-bound Ib-pore (long).)

いない。これらから、少なくともIa-Ibの系では「高次構造がほどけた状態での、ブラウニアラチエットモデルで進む透過機構」が最も適したモデルと考えているが、この透過の様子を直接見た報告はない。IaとLFではその構造は異なり、さらにその膜孔への結合はまったく異なる。どちらのシステムも構造が似た膜透過をする装置をもつが、異なる方法でA成分を結合しそのN末端を解き、さらに解いたN末端から透過を起こす—これは興味深く、このトキシン膜透過システムを考える上で重要であろう。

#### 4.5 デフィシル菌二成分毒素の構造は？

われわれの発表と同時に、デフィシル菌CDTのCDTb膜孔の構造の報告がなされた。面白いのは、見た瞬間に「え??」となる、その14量体の不思議な構造(dihexamers)であった。よく見ると膜孔とプレ膜孔(ステムがない)が受容体結合ドメインD4IIを介して結合した構造である。この奇妙な14量体の構造は、ほぼ同時に2つの米国のグループから独立に報告された。<sup>18),19)</sup>

われわれはこの構造は脂質のない環境で精製されたアーティファクトと考えている。このため、Ia-Ibで用いられたLMNGを用いた精製方法で、CDTa-CDTb膜孔のクライオ顕微鏡での構造を明らかにすべく研究を継続している。この報告はまた別の機会に譲るが、われわれの解析ではCDTa-CDTb膜孔でも、CDTa1つがCDTb7量体膜孔に結合した構造、すなわち本稿に記したIa-Ib膜孔とほぼ同じ構造を見出している。

## 5. おわりに：百聞は一見に如かず

われわれが知りたいのは、タンパク質の膜透過機構である。いまだ、高次構造がほどけて、ブラウニアラチエットモデルで透過するであろうと言いつつも、われわれ自身が納得していない。タンパク質の膜透過の理解を進めるには、シスとトランスで異なった膜環境(すなわち擬似膜のナノディスクやLMNGを用いるのでなく)を作り、この脂質二重膜中にIbを埋め込み、Iaを透過する様子を見る必要があると考えている。現在のわれわれのグループの大きな目標である。

この研究の原点は1999年に報告したIaの結晶化およびその後の結晶構造解析からスタートした。<sup>20)</sup>クライオ電子顕微鏡を使用したIa-Ib膜孔の構造解析の研究も、このIaの結晶構造がなければ、解析できなかったばかりでなく、面白みは半減した。なぜなら、結晶構造解析から明らかにした本来のIaの構造と、クライオ電子顕微鏡で明らかにしたIb膜孔に結合したIaの構造を比較することで初めて、Ib膜孔への結合によるIaの構造変化が見えたからである。タンパク質結晶構造解析とクライオ電子顕微鏡とのハイブリッドな研究である。今後もクライオ電子顕微鏡あるいはAlphaFold2などの計算科学の台頭の中で、タンパク質結晶構造解析は、その核として重要な研究手段となることは強調しておきたい。

## 謝辞

クライオ電子顕微鏡の最初の手ほどきを受けた、大阪大学・超高压電子顕微鏡センターの光岡薫教授、さらに本データ測定でお世話になった大阪大学・蛋白質研究所の川本晃大助教、および岩崎憲治教授(現在、筑波大学)との共同研究であり、ここに感謝します。研究の一部は、科学研究費補助金(18K06170, 17K15095)の助成を受けた。また国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)の(課題番号JP19am0101072)支援を受けて行われた。

## 文献

- 1) H. Tsuge, *et al.*: *J. Mol. Biol.* **325**, 471 (2003).
- 2) H. Tsuge, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 7399 (2008).
- 3) C. Schleberger, *et al.*: *J. Mol. Biol.* **364**, 705 (2006).
- 4) A. Sundriyal, *et al.*: *J. Biol. Chem.* **284**, 28713 (2009).
- 5) W. Toniti, *et al.*: *PLoS One* **12**, e0171278 (2017).
- 6) T. Yamada, *et al.*: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **27**, 288 (2020).
- 7) S. Q. Zheng, *et al.*: *Nat. Methods* **14**, 331 (2017).
- 8) K. Zhang, *et al.*: *J. Struct. Biol.* **193**, 1 (2016).
- 9) J. Zivanov, *et al.*: *Elife* **7**, e42166 (2018).
- 10) P. B. Rosenthal and R. Henderson: *J. Mol. Biol.* **333**, 721 (2003).
- 11) P. Emsley and K. Cowtan: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126 (2004).

- 12) E. F. Pettersen, *et al.*: *J. Comput. Chem.* **25** (2004).
- 13) C. J. Williams, *et al.*: *Protein Sci.* **27**, 293 (2018).
- 14) P. V. Afonine, *et al.*: *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **74**, 531 (2018).
- 15) N. J. Hardenbrook, *et al.*: *Nat. Commun.* **11**, 840 (2020).
- 16) B. A. Krantz, *et al.*: *Science* **309**, 777 (2005).
- 17) D. Das and B. A. Krantz: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 9611 (2016).
- 18) D. M. Anderson, *et al.*: *Nat. Microbiol.* **5**, 102 (2020).
- 19) X. Xu, *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 1049 (2020).
- 20) H. Tsuge, *et al.*: *J. Struct. Biol.* **126**, 175 (1999).

#### プロフィール



吉田徹 Toru YOSHIDA  
日本女子大学理学部物質生物科学科 (2020年4月より現職)  
Department of Chemical and Biological Sciences,  
Japan Women's University  
〒112-8681 東京都文京区目白台2-8-1  
2-8-1 Mejirodai, Bunkyo-Ku, Tokyo 112-8681, Japan  
e-mail: yoshidat@fc.jwu.ac.jp  
最終学歴: 東京工業大学大学院 (理学博士)  
専門分野: 生化学, 構造生物学  
現在の研究テーマ: バクテリアセルロース  
趣味: 食べること, バイクに乗ること, ランニング



山田等仁 Tomohito YAMADA  
京都産業大学大学院 生命科学研究科 博士後期  
過程2年  
2<sup>nd</sup> year PhD student, Faculty of Life Sciences, Kyoto  
Sangyo University  
〒603-8555 京都市北区上賀茂本山  
Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555,  
Japan  
e-mail: i2087159@cc.kyoto-su.ac.jp  
最終学歴: 京都産業大学大学院 生命科学研究科  
専門分野: タンパク質構造解析, 細菌毒素  
現在の研究テーマ: 細菌毒素の膜透過機構の解析  
趣味: イラストの作成



津下英明 Hideaki TSUGE  
京都産業大学生命科学部先端生命科学科  
Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University  
〒603-8555 京都市北区上賀茂本山  
Motoyama, Kamigamo, Kita-ku, Kyoto 603-8555,  
Japan  
e-mail: tsuge@cc.kyoto-su.ac.jp  
最終学歴: 北海道大学大学院 (博士 (理学))  
専門分野: 構造生物学, 生物物理学  
現在の研究テーマ: 膜孔形成毒素, タンパク質  
膜透過  
趣味: 音楽, 街探検