

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

田中耕路¹, Koldo Morante¹, Jose M.M. Caaveiro¹, Juan Manuel González-Mañas², 津本浩平^{1,3}

¹ 東京大学大学院工学系研究科, ² University of the Basque Country, ³ 東京大学医科学研究所

The Mechanism of Transformation of FraC, a Pore Forming Toxin

Koji TANAKA¹, Koldo MORANTE¹, Jose M.M. CAAVEIRO¹,
Juan Manuel GONZÁLEZ-MAÑAS², Kouhei TSUMOTO^{1,3}

¹School of Engineering, The University of Tokyo,
²Faculty of Science and Technology, University of the Basque Country,
³Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Abstract

FraC はイソギンチャクが分泌する Pore-Forming Toxin である。Pore-Forming Toxin は可溶性蛋白質として発現した後、生体膜に付着して膜貫通蛋白質に変化するという興味深い挙動を示す。本研究では、FraC の単量体と反応中間体構造の構造比較、及び生体膜の組成が FraC の小孔形成に及ぼす影響の解析を通じて、FraC の詳細な反応機構を提案した。FraC の有する膜貫通ドメインは生体膜の小さなゆるみを感じ取るセンサーであることが示され、FraC の多量体化に伴う「疎水ポケット挿入残基の交換反応」がセンサー作動のスイッチとなることが示唆された。

1. はじめに

蛋白質は生体内のいたるところに存在する、生体機能の担い手である。蛋白質は働いている環境によって、それ自体の性質も大きく異なる。主に細胞質などを活動場所とする蛋白質は可溶性蛋白質と呼ばれる。一方、生体膜（脂質二重膜）に組み込まれた蛋白質は膜蛋白質と称される。この様に蛋白質を分類すると、Pore-Forming Toxin (PFT) に属する蛋白質の性質の面白さが際立ってくる。PFT は可溶性蛋白質として生産され、生体膜上で構造変化を経て膜貫通型多量体（小孔）を形成する蛋白質である。これまで、この自発的な小孔形成の詳細な機構や、生体膜の組成が PFT の小孔形成能に影響を与えるメカニズムは未解明であった。可溶性蛋白質が生体膜上で不可逆的に膜貫通蛋白質に変化するメカニズムの解明は、蛋白質のフォールディングや自己組織化の本質的な理解に貢献することが期待されている。本研究では PFT の一種 FraC を用いて、PFT の自己組織化機構や生体膜の影響の解明を目指した。

2. FraC 可溶性単量体と脂質結合単量体の結晶構造

FraC 可溶性単量体 (Soluble monomer: S) の結晶構造は分解能 1.7 Å で決定された (Fig. 1A, B)。この構造は、イソギンチャク由来 PFT である actinoporin 類に共通する構造を有していた [1, 2]。Actinoporin 類の N 末端に存在する両親媒性 α -ヘリックス (Fig. 1: 橙色部分) は生体膜上でコアドメイン (Fig. 1: 青色部分) から離れ膜挿入される、膜貫通ドメインである [3]。

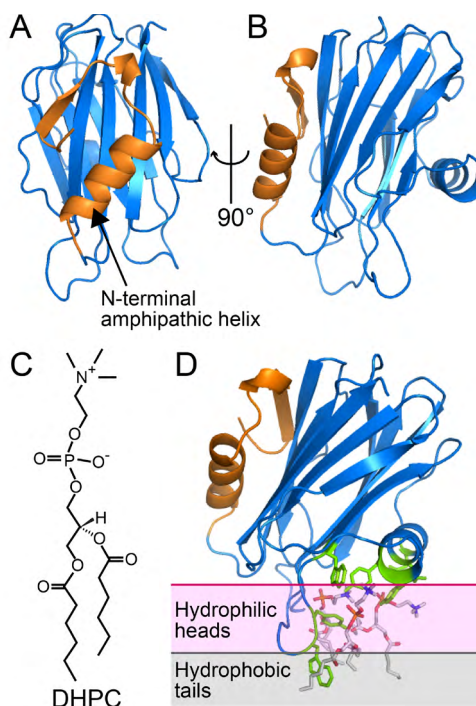


Figure 1
Crystal structures of soluble monomeric form and membrane bound-monomeric form of FraC. The core region and the amphipathic N-terminal helix are depicted in blue and orange, respectively. (A) Front view and (B) side view of the water-soluble monomer of FraC. (C) The chemical structure of DHPC. (D) Structure of membrane-bound monomer of FraC. The residues interacting with DHPC are depicted in green. The region occupied by the lipid head groups and the acyl chains are colored pink and grey, respectively.

また、FraC をリン脂質ジカプロイルフォスファチジルコリン (DHPC) と共結晶化することで、FraC 脂質結合単量体 (Membrane binding monomer: M) の結晶構造が分解能 2.3 Å で決定された (Fig. 1C, D)。FraC (M) は三分子の DHPC と結合しており、それらの DHPC は生体膜様の平面を形成していた。FraC と脂質頭部と水素結合を形成し、さらに芳香族残基をアンカーのように生体膜深部に突き刺すことで、脂質尾部と疎水性相互作用をしていた。今まで actinoporin は脂質一分子のみを認識すると考えられてきた [4]。しかしながら FraC (M) の構造解析から、FraC は単に生体膜中の脂質一分子をリガンドとして 1:1 で結合しているのではなく、特異的結合と非特異的相互作用を併用することで生体膜を「膜」として認識していることが明らかとなった。

3. 脂質ドメインを標的とした小孔形成

FraC の小孔形成過程は、膜結合ステップとそれに続く多量体形成ステップからなることが知られている [5]。本研究では、生体膜の組成の違いが FraC の膜結合と多量体形成に与える影響を、モデル生体膜であるリポソームを用いて解析した。リポソームの作成にはリン脂質であるジオレオイルフォスファチジルコリン (DOPC)、スフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリン (SM) を用いた。DOPC リポソーム、SM リポソーム、DOPC/SM 等量混合リポソームと FraC をそれぞれ反応させ、FraC を界面活性

剤によって再可溶化・再精製した後、サイズ排除クロマトグラフィーを行った (Fig. 2A)。その結果、生体膜と反応していない FraC は 28 mL に溶出した。DOPC リポソーム、あるいは SM リポソームと反応した FraC の溶出位置は共に 22 mL であり、DOPC/SM 混合リポソームと反応した FraC は 11 mL に溶出した。溶出位置 28 mL, 22 mL, 11 mL の FraC の分子種を SEC-MALS により同定したところ、それぞれ FraC (S), FraC (M), FraC 膜貫通型多量体 (Trans-membrane pore; P) であった。この結果より、FraC は DOPC と SM いずれの脂質にも結合するが、両脂質の共存下でのみ膜貫通型多量体を形成することが示された。

DOPC 膜、SM 膜は均一な膜であるが、DOPC/SM 混合膜は脂質ドメインを形成する (Fig. 2B)。このドメインの境界面では、脂質の均一なアラインメントが局所的に損なわれ、膜の水和状態も均一な膜とは異なる [6, 7]。このような脂質分子の小さなゆらみは defects と呼ばれる。より詳細な生化学的解析により、defects が FraC の N 末端ヘリックスの生体膜中への移行を促進していることが明らかになった。つまり、N 末端ヘリックスは defect を感知し攻撃するセンサーであるといえる。しかしながら、FraC (M) でコア領域に密着している N 末端ヘリックスが、どのように展開して生体膜センサーとして働くのか、そのきっかけは依然不明であった。そこで FraC 反応中間体の構造決定を行い、構造変化の最初期に起こる現象の解明を目指した。

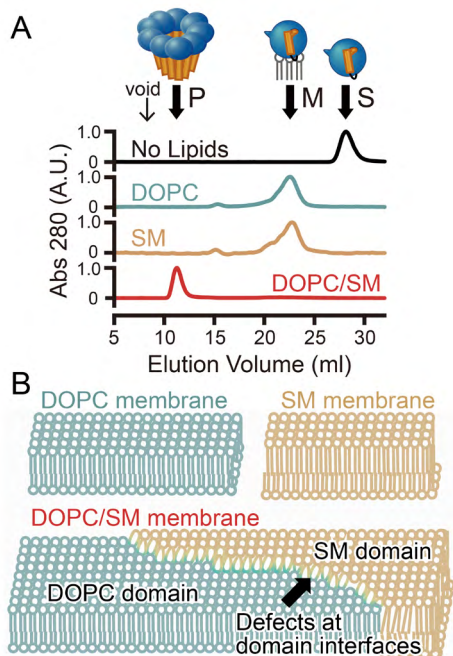


Figure 2
Effect of the lipid composition on the membrane-binding and pore-formation of FraC. (A) SEC analysis for effect of the lipid composition of the liposomes in reaction route of FraC. Buffer contains 3 mM LDAO. (B) Model of lipid membranes. Liposomes composed of only DOPC or only SM have homogeneous membrane surfaces. Lipid domains are observed in liposomes composed of DOPC/SM. Defects are formed at the interface of the lipid domains because of the difference of lipid packing and the mismatch in the thickness of bilayer.

4. FraC 二量体の結晶構造

FraC を界面活性剤 DDM 及び脂質頭部類縁体 POC と共結晶化することで、FraC 二量体構造 (Dimer: D) が分解能 1.6 Å で決定された (Fig. 3A)。FraC (M) の脂質結合様式から FraC (D) と生体膜との位置関係を外挿すると、FraC (D) は生体膜上で単量体同士が横に並んだ形をしていた。FraC (D) と FraC (S) との構造比較を行ったところ、FraC (D) 右側のプロトマーは単量体と同じ構造を有していた。一方 FraC (D) 左側のプロトマーでは、N 末端ヘリックス部位に存在する Phe16 残基周辺の主鎖構造が FraC (S) とは大きく異なっていた (Fig. 3B)。FraC (S) では Trp149, Phe163, Ile171 残基からなる疎水性のポケットに Phe16 残基が挿入されているのに対して、二量体では Phe16 残基は疎水ポケットから外れ、その疎水ポケットには隣接したもう 1 つの FraC の Val60 残基が挿入されるという、「疎水ポケット挿入残基の交換反応」が観察された (Fig. 3C)。また、FraC (D) の Ramachandran plot を解析したところ、この Phe16 残基周辺はエネルギー的に不安定であった。この結果から、FraC (D) は実際の反応プロセスでは遷移状態にあたり、生体環境下では存在しない構造であることが示唆された。今回このような不安定な構造を取得できたのは、結晶化の際の溶液環境や、結晶中での蛋白質の配向によるものであると考えられる。

そこで我々は、二量体が反応中間体であることを、二種類の変異体解析によって確認した。(A) 疎水ポケットを構

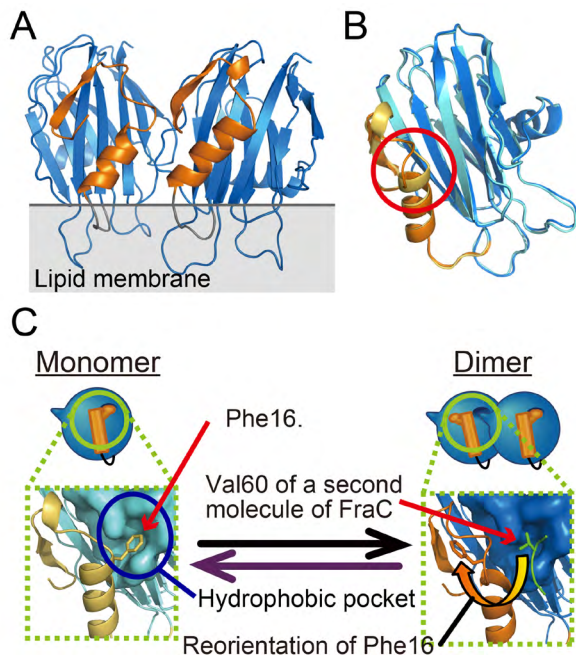


Figure 3
Structural analysis of dimeric form of FraC. (A) Front view of the crystal structure of FraC in the dimer form. (B) Superposition of monomeric FraC (yellow, light blue) and a protomer of FraC in the dimer (orange, blue). The protein chain of the protomer of the dimer corresponds to the left molecule in panel A. (C) Possible mechanism of dimerization in lipid membranes. In the dimeric form an exchange of the residues inserted into the hydrophobic pocket is observed when compared to the monomeric form.

成する Trp149 残基と、隣接した FraC の疎水ポケットに挿入される Val60 残基への変異により、疎水ポケット挿入残基の交換反応を阻害した変異体 Val60Glu/Trp149Ala。変異体 Val60Glu/Trp149Ala は小孔形成効率が野生型の約 10 分の 1 に低下し、さらに安定な多量体を形成することが出来なかった。(B) ジスルフィド結合の導入 [5] により N 末端ヘリックスの展開を阻害した変異体 Val8Cys/Lys69Cys。変異体 Val8Cys/Lys69Cys の機能解析の結果、N 末端ヘリックスの展開を阻害すると、多量体化も同時に阻害された。これらの変異体解析から、疎水ポケット挿入残基の交換反応は FraC が小孔を形成する際の重要なステップであることが示された。また、疎水ポケット挿入残基の交換反応に続いて N 末端ヘリックスの展開が起きなければ、多量体構造は保持されないことが明らかになった。

5. まとめ

本研究では FraC の X 線結晶構造解析と生化学的実験により、FraC が可溶性蛋白質から膜貫通型多量体に変化する際の詳細な分子機構を記述した (Fig. 4)。まず FraC (S) はコア領域の脂質結合部位で生体膜に結合する。FraC (M) は両親媒性の N 末端ヘリックスにより生体膜の defects を認識し、ヘリックスを膜中に挿入する。この defects を標的とした両親媒性ヘリックスの生体膜中への移行メカニズムは、生体膜パッキングセンサー・ALPS モチーフ [8, 9] の作用機序と類似している。ただし単量体中の N 末端へ

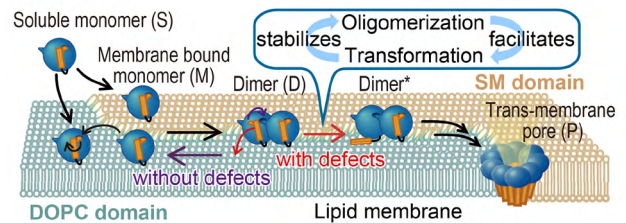


Figure 4
Model of activation of FraC in lipid membranes. FraC (S) binds to lipids possessing a phosphocholine head group (like DOPC or SM). FraC (M) dimerizes, followed by detachment of the N-terminal helix from the core region. The N-terminal helix inserts itself into the membrane in the presence of defects in lipid domains, leading to pore formation (P: pore). The oligomerization and transformation take places cooperatively.

リックスは、Phe16 が疎水ポケットに挿入される留め具となることで、コアドメインに繋ぎ止めているため、何らかのきっかけがなければセンサーとして働かない。そのきっかけとなるのが疎水ポケット挿入残基の交換反応であるとみられる。FraC の多量体化がこの留め具を外し、N 末端ヘリックスのコンフォメーションを不安定化することで、N 末端ヘリックスの展開を促すことが示唆された。また疎水ポケット挿入残基の交換反応では、Val60 が隣接した FraC の疎水ポケットに挿入されることで、多量体の安定化にも貢献していた。さらに、膜にドメインが存在しない場合や、N 末端ヘリックスの展開が変異により阻害された場合は、Phe16 はエネルギー的に安定な元の疎水ポケット内に戻り、二量体化が解消された。Actinoporin の構造変化と多量体化はどちらが先に起こるステップなのかは長らく議論の対象になってきた。本研究により、N 末端ヘリックスの展開と多量体構造の安定化は、疎水ポケットに挿入される残基の交換反応を介して協奏的に進んでいるという新たなモデルが提案された。

6. おわりに

本研究では X 線回折データの収集に、高エネルギー加速器研究機構・Photon Factory のビームライン AR NW12A 及び NE3A を用いた。研究を滞りなく行えたのは、高エネルギー加速器研究機構・Photon Factory のスタッフの方々のご助力のおかげである。ここに感謝の意を表したい。

引用文献

- [1] A. Athanasiadis, G. Anderluh, P. Macek, and D. Turk, *Structure* **9**, 341 (2001).
- [2] J. M Mancheño, J. Martín-Benito, M. Martínez-Ripoll, J. G Gavilanes, and J. Hermoso, *Structure* **11**, 1319 (2003).
- [3] P. Malovrh, G. Viero, M. D. Serra, Z. Podlesek, J. H Lakey, P. Macek, G. Menestrina, and G. Anderluh, *J. Biol. Chem.* **278**, 22678 (2003).
- [4] B. Bakrac, I. Gutiérrez-Aguirre, Z. Podlesek, A. F-P Sonnen, R. J C Gilbert, P. Macek, J. H Lakey, and G. Anderluh, *J. Biol. Chem.* **283**, 18665 (2008).
- [5] Q. Hong, I. Gutierrez-Aguirre, A. Barlic, P. Malovrh, K.

Kristan, Z. Podlesek, P. Macek, D. Turk, J. M González-Mañas, J. H Lakey, and G. Anderluh, *J. Biol. Chem.* **277**, 41916 (2002).

[6] K. H Sheikh, and S. P Jarvis, *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 18296 (2011).

[7] F. A Heberle, R. S Petruziolo, J. Pan, P. Drazba, N. Kučerka, R. F Standaert, G. W Feigenson, and J. Katsaras, *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 6853 (2013).

[8] G. Drin, J.-F. Casella, R. Gautier, T. Boehmer, T. U Schwartz, and B. Antony, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 138 (2007).

[9] J. Bigay, and B. Antony, *Dev. Cell* **23**, 886 (2012).

(原稿受付：2013年6月21日)

著者紹介

田中耕路 Koji TANAKA



東京大学大学院工学系研究科 博士課程

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1

TEL: 03-6409-2129

FAX: 03-6409-2129

e-mail: 7838501671@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

略歴：2013年東京大学大学院新領域創成科学研究科修士課程修了。現在、東京大学工学系研究科博士課程に在学中。最近の研究：膜蛋白質マニピュレーション技術の確立。

Koldo MORANTE



東京大学大学院工学系研究科 博士研究員

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1

TEL: 03-6409-2129

FAX: 03-6409-2129

e-mail: koldo@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

略歴：2013年 Univ. of the Basque Country 博士課程修了。2013年より現職。Ph. D.

最近の研究：イソギンチャク由来毒素の作用機序の構造機能解析。

Jose M.M. CAAVEIRO



東京大学大学院工学系研究科 特任助教

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1

TEL: 03-6409-2129

FAX: 03-6409-2129

e-mail: jose@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

略歴：2000年 Univ. of the Basque Country 博士課程修了。MIT, Brandeis 大学, 東京大学博士研究員の後, 東京大学大学院新領域創成科学研究科特任助教を経て, 2013年より現職。Ph. D.

最近の研究：生体分子相互作用の構造生物学。

Juan Manuel GONZÁLEZ-MAÑAS



Univ. of the Basque Country, Dept. of

Biochem. and Mol. Biol. 准教授

Leioa, 48940, Vizcaya, Spain

TEL: +34 94 601 2625

FAX: +34 94 601 3360

e-mail: juanmanuel.gonzalez@ehu.es

略歴：1989年 Univ. of the Basque Country 博士課程修了。EMBL Heidelberg 博士研究員を経て, 1994年より現職。Ph. D.

最近の研究：蛋白質・ペプチドによる膜透過機構の解明。

津本浩平 Kouhei TSUMOTO



東京大学大学院工学系研究科 教授

〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1

TEL: 03-6409-2129

FAX: 03-6409-2129

e-mail: tsumoto@bioeng.t.u-tokyo.ac.jp

略歴：1995年東京大学大学院工学系研究科中退, 同年東北大学大学院工学研究科助手。1997年博士取得(東京大学)。東北大学大学院工学研究科講師, 助教授を経て, 2005年東京大学大学院新領域創成科学研究科准教授, 2010年東京大学医科学研究所教授。2013年より現職。博士(工学)。

最近の研究：生体分子相互作用の解析と工学的制御基盤の確立。