

黄色ブドウ球菌 γ ヘモリジンが形成するヘテロヘプタマー膜孔複合体の立体構造予測と分子配置解析

Analysis of Three-Dimensional Structure with Subunit Mismatch Arrangements of Staphylococcal γ -hemolysin Heteroheptameric Transmembrane Pore

富田 典子^a, 安西 眸^b, 阿部 和代^a, 太田 信^a

Noriko Tomita, Hitomi Anzai, Kazuyo Abe and Makoto Ohta

^a東北大学流体科学研究所

^b東北大学大学院工学研究科

要旨 黄色ブドウ球菌 γ ヘモリジンは 34 kDa の Hlg1 成分と 32 kDa の Hlg2 成分から成る 2 成分性溶血毒素である。筆者らは、2 成分が血球上で 3:4 または 4:3 の割合で交互に並んで集合し、リング状のヘテロヘプタマー膜孔複合体を形成することを明らかとしてきた。本研究では、未だ明らかとされていない γ ヘモリジン膜孔複合体の立体構造を再構築することを目的とし、高精細電子顕微鏡像を基に、ヘテロ 7 量体非対称性構造に特徴的な分子配置を解析し、正 7 角形からのずれを伴った立体構造の予測をおこなった。電顕像からサブユニットの形状および大きさを計測し、3 次元構造を設計した。膜孔は上部が円柱構造、下部は分子が内側に折れ曲がり底部に小孔が付随した漏斗状構造をしていると予測された。さらに、対角線法および画像解析により、ある隣接サブユニット間が正 7 角形から約 15° 離れる方向にずれて配置されていることが明らかとなった。

キーワード：黄色ブドウ球菌 γ ヘモリジン、ヘテロヘプタマー膜孔複合体、高精細ネガティブ電子顕微鏡像、3 次元構造、分子配置解析

1. 序論

黄色ブドウ球菌はヒトの常在菌として健康人から分離されるが、一方でヒトの重篤な日和見感染症、皮膚疾患、並びに食中毒の起原因菌として知られている^{1,2)}。黄色ブドウ球菌は病原因子と考えられる多種類の菌体外タンパク質を産生する^{3,4)}。その中には、4 種類の赤血球崩壊毒素 (α ヘモリジン, β ヘモリジン, γ ヘモリジンおよび δ ヘモリジン), 白血球崩壊毒素であるロイコシジン, コアグララーゼ, エンテロトキシン A-E, Toxic Shock Syndrome Toxin-1 などが含まれ、ブドウ球菌感染症は、これら多種類の病原因子の存在によって、その病態が多様化すると考えられる。筆者らは、黄色ブドウ球菌感染症の新規治療法の開発への糸口を見出すために、宿主の生体防御機構の破壊を起こして菌の感染成立を促進すると考えられている細胞崩壊毒素、特に、2 成分性の赤血球崩壊毒素 γ ヘモリジン、および白血球崩壊毒素ロイコシジンの細胞崩壊機構に関する研究をおこなってきた。 γ ヘモリジンは 34 kDa の Hlg1 成分と 32 kDa の Hlg2 成分から成り、ロイコシジンは 34 kDa の LukF 成分と 33 kDa の LukS 成分から成る。2 成分は独立した水溶性タンパク質としてそれぞれ菌

体外に分泌される⁵⁾。神尾らの研究により、Hlg1 と LukF が同一遺伝子産物であることが明らかとされている⁶⁾。さらに、 γ ヘモリジンの溶血活性発現には LukF 成分の W¹⁷⁷ と R¹⁹⁸ のホスファチジルコリンへの結合が必要であること^{7,8)}、Hlg2 成分の N 末端領域が重要であること⁹⁾、また、ロイコシジン活性には LukS 成分の C 末端領域に存在する I²⁴²KRST²⁴⁶ 配列中の T²⁴⁶ のリン酸化が必須であることが明らかとされてきた^{10,11)}。

一方筆者らは、 γ ヘモリジンとロイコシジンによる血球崩壊機構の分子の実体を解析し、これら毒素の 2 成分が、標的細胞膜上で会合して内径約 3 nm、外径約 9 nm のリング状複合体を形成し、実効内径約 2 nm の親水性の膜孔として作動し溶血を引き起こすことを明らかとしてきた^{12,13)}。さらに高精細電子顕微鏡および生化学的手法を組み合わせる γ ヘモリジン膜孔複合体の微細構造を解析し、2 成分が 3:4 または 4:3 の割合で交互に並んで集合したヘテロヘプタマー構造を形成することを明らかとしてきた¹⁴⁾。本形成機構は、厳密な組成比で構成されるタンパク質複合体としては極めて特異な例であり、本構造をより詳細に解明すべく膜孔の結晶化が試みられてきたが、未だ成し遂げられていない。

電子顕微鏡を使用したタンパク質複合体の構造解析には単粒子解析法、Cryo 電顕法などにより解析されるケースが多いが¹⁵⁾、 γ ヘモリジン膜孔は 2 成分が異なる割合で含まれた複合体が混在し、さらにヘテロな構造のためか電顕像で

^a 〒 980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1
TEL & FAX: 022-217-5224
E-mail: tomita@biofluid.ifs.tohoku.ac.jp
2010 年 8 月 31 日受付

はひずみが多く見られ、粒子が明瞭に判別できる画像の数が非常に制限されていた。これまで、サブユニットの配置に関してひずみがあることが示されてきたのは、回転重ね合わせ法によるのみであった¹⁴⁾。これらの限界を克服するために、本研究においては高精細電子顕微鏡像と画像解析技術を組み合わせ、 γ ヘモリジンが形成する異なる2成分からなるヘテロ7量体非対称性構造に特徴的な構造と分子配置を解析することを試みた。

2. 実験方法

(1) γ ヘモリジンの精製

γ ヘモリジン (Hlg1 (LukF), Hlg2) は黄色ブドウ球菌 Smith5R 株培養上清から精製した¹⁶⁾。タンパク質濃度は Bradford 法により測定した。

(2) 溶血活性測定

ヒト赤血球細胞を 0.5–1.0% (v/v) の濃度になるように Tris-buffered saline (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 140 mM NaCl) に懸濁し、 γ ヘモリジンを添加して 37°C でインキュベーションした。4°C にて 800 × g, 5 分間遠心し、上清 100 μ L 中のヘモグロビン量を 541 nm の吸光度で測定した。ヘモリジンを添加しない場合を 0% 活性、ヘモリジンの代わりに TritonX-100 を添加した場合を 100% 活性とし、次式により活性を算出した。

溶血活性 (%)

$$= A541 - A541(0\%) \{A541(\text{TritonX-100}) - A541(0\%)\} \times 100$$

(3) ショ糖密度勾配遠心法による γ ヘモリジン膜孔の単離

3% (v/v) ヒト赤血球懸濁液 400 mL に γ ヘモリジン (Hlg1, 10 μ g/ml; Hlg2, 10 μ g/ml) を添加し、37°C で 30 分間反応させた。反応後の赤血球膜を 4°C で 22,000 × g, 30 分間遠心し回収した。赤血球膜を 2% SDS で室温で可溶化した。この条件下で膜孔の大部分は解離しないことが確認されている^{11,13)}。可溶性画分を 0.1% SDS を含む 10–40% ショ糖密度勾配溶液に重層し、Beckman SW40Ti ローターで 130,000 × g, 4°C, 19 時間遠心した。膜孔を含む画分を 10 mM Tris-HCl buffer に対して透析し、電子顕微鏡観察に供した。

(4) 電子顕微鏡観察

単離した膜孔をカーボン膜でコートした透過型電子顕微鏡用グリッドにのせ、5 mM ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗浄後、1% (w/v) リンタングステン酸ナトリウム (Nacalai Tesque Co., Ltd. Kyoto, Japan) で染色した。日立透過型電子顕微鏡 H-8100 を用いて、加速電圧 100 kV で観察した。

(5) 膜孔中のサブユニット配置の正7角形頂点に対するずれ角度の計測

(a) 目視によるずれ角度の計測 (対角線法)

図 3A に示したように Pro/ENGINEER で正7角形を作成し、各頂点を反時計回りに A–G とナンバリングした。うち A 以外の 6 つの頂点において、2 つおきに頂点を結ぶ線を対角線 B–E, C–F, D–G とそれぞれ定義した。頂点 A については、

対角線 B–E および D–G の交点を通る線とし、対角線 A と定義した。目視で最も大きい分子間角度を形成している 2 つのサブユニット分子の中心を反時計回りにそれぞれ頂点 D, E とし、さらに頂点 A に相当するサブユニット分子の中心を対角線 A が通るようにした。この状態で、正7角形の頂点 B, C, G, F とそれぞれに相当するサブユニットの中心とのずれについて、正7角形の対角線、対角線の交点、及びサブユニット中心と交点を結ぶ線で形成される角度をずれ角度と定義し、測定した。本手法は top view のサンプル 60 個からランダムに抜き出した 10 個のサンプルに適用した。

(b) 2次元画像解析ソフトによるずれ角度の計測

図 4 に示した通り、Scion image (<http://www.scioncorp.com/>) で各サブユニットの画像を 2 値化することで形状を決定し、サブユニットの中心 Cn (n = 1 ~ 7) を決定した隣接するサブユニットの中心間距離を次式により算出した。

$$Ln = \sqrt{\{X(Cn+1) - X(Cn)\}^2 + \{Y(Cn+1) - Y(Cn)\}^2} \quad (1)$$

n が 7 になった場合には n + 1 = 1 とし計算した。最も大きい中心間距離を L1 とし、反時計回りに L2 から L7 までナンバリングした。各サブユニット間のずれ長さ (Mismatch Length, ML) を次式により求め、

$$MLn = Ln / \{\text{Ave}(L1 \sim 7)\} \quad (2)$$

$$\text{Ave}(L1 \sim 7) = \Sigma(L1 \sim 7) / 7 \quad (3)$$

(2), (3) をもとに各サブユニット中心間角度を次式により求め、

$$A(Cn - Cn+1) = 51.4 \times MLn \quad (4)$$

(4) からずれ角度 (Mismatch Angle, MA) を次式により算出した。

$$MA_n = A(Cn - Cn + 1) - 51.4 \quad (5)$$

本手法は Top view のサンプル 60 個に適用した。

(6) 膜孔の 3次元画像構築

透過型電子顕微鏡で撮影された高精細画像から、60 個の top view, 60 個の bottom view, 10 個の side view, 10 個の tilted view を選択し、膜孔および膜孔を構成するサブユニット分子の形状を推測するためトレースし、大きさを digital caliper で計測した。この情報を基に、3次元画像構築ソフト PTC Pro/ENGINEER, wildfire4.0 を使用して 3次元構造を構築した。

3. 結果と考察

(1) 高精細電子顕微鏡画像を基にした膜孔構造の構築

膜孔の構造をデザインに選択したそれぞれの代表的な TEM 像を図 1 に示した。各 TEM 像の隣には膜孔を形成するサブユニットをトレースした像を示した。Top view と定義した像は膜孔を膜外領域のほぼ真上から観察した像と推定され、その内径は平均約 4 nm で、赤血球膜上で観察された膜

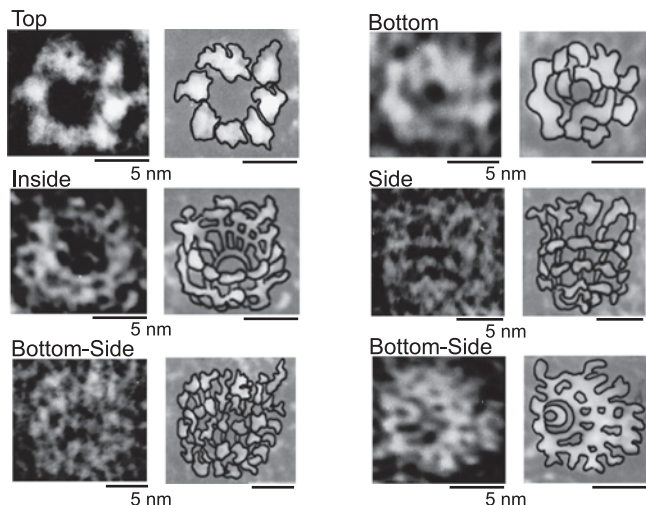


図1 γ ヘモリジン膜孔の高精細ネガティブ電子顕微鏡像
 ショ糖密度勾配遠心法で赤血球膜から単離した膜孔を1%リンタングステン酸でネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。様々な角度で観察された電顕像の右側にサブユニットの形状を目視でトレースした図を示した。Top: 膜外領域真上から観察した像, Bottom: 細胞内(膜貫通孔部)から観察した像, Side: 真横から観察した像, Inside: 膜孔が傾いて, Top view 側から内部が見える像, Bottom-side: Bottom 側から傾いて, 膜貫通孔部周辺の構造が観察される像。一部に参考文献14) から引用した図を使用した。

孔とはほぼ一致する内径を有していた¹²⁾。Top view においては7個のサブユニットが明瞭に識別できた。一方, top view で観察された内径よりも小さい内径を持つ像も多数検出された。この平均内径は1.9 nm であり, 我々が以前にポリエチレングリコールを使用して計測した膜孔実効内径に近似していたことから¹²⁾, この小孔は膜貫通型のチャネル構造であると予測した。そこで膜外領域から見た top view に対し, 膜貫通側から見た bottom view と定義した。また孔が確認できず, 縞状構造が認められた像は side view と予測し, サブユニットがいくつかの部分に分かれている様子が観察された。また膜孔が傾いて, 籠状の膜孔内部構造が観察される像 (inside view) や, 膜孔底部および側面構造が観察される像 (bottom-side view) も認められた。

以上のような140個の観察像から膜孔全体, およびサブユニットの大きさを digital caliper で計測して形状を推定し, 2種類のサブユニットが正七角形に倣って配置していると仮定して, 図2に膜孔構造を投影図で示した。Side view から, サブユニットは7個の部分(P1-P7)に分けられると仮定した。膜孔全体の直径は10.2 nm, 高さは12.8 nm であり, 上部が円柱構造を形成し, 下部はサブユニットが内側に折れ曲がり, 底部に内径1.9 nm, 外径4.7 nm の小さい孔が付随する漏斗状構造をしていると認められた。

(2) 膜孔内サブユニット配置ずれ解析

我々はこれまでに, 膜孔画像上でサブユニットを一定の角度で回転させ重ね合わせる手法を用いて, 膜孔のヘプタマー構造が正七角形に準じていることの検証を試みてきたが, 隣

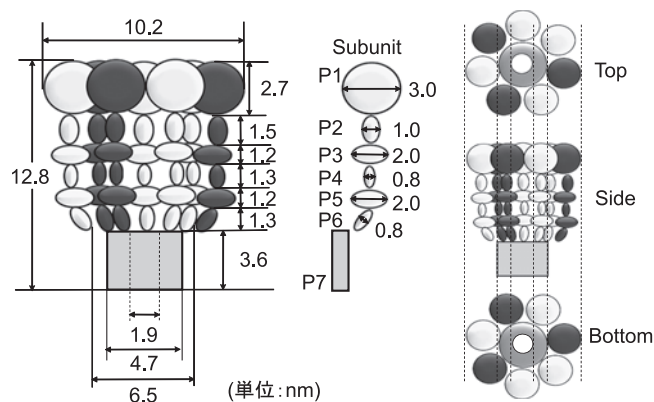


図2 電子顕微鏡像を基にした膜孔構造の投影図
 高精細電顕像から, 140個の画像を選択し, 膜孔およびサブユニットの大きさを digital caliper で計測した。同一サブユニットを色分けして示した(白または灰)。薄灰色は膜貫通型孔形成部と推定された領域。Side view を基に, サブユニットを7つの部位(Part1-7)に分けられた。各大きさは各 view の平均値を示している。

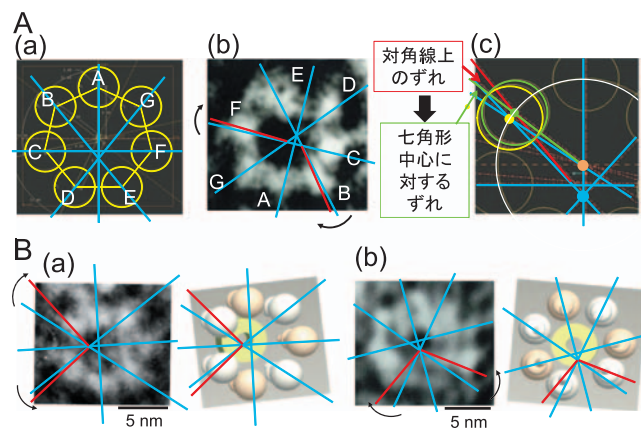


図3 正七角形対角線に対するサブユニットずれ角度計測

A. 目視によるずれ角度計測法

(a) 黄線: 3次元画像構築ソフトで作成した正七角形とその頂点を中心として配置したサブユニット。青線: 頂点を2つおきに結ぶ対角線。頂点Aを通る対角線については, 頂点Aの中心と対角線B-EおよびD-Gの交点を結ぶ線とした。(b) 対角線を重ね合わせた電顕像。赤線: 対角線の交点と目視によるサブユニット中心とを結ぶ線。青で示した対角線, 赤線およびその交点で形成される角度をずれ角度として計測した。(c) 正七角形中心に対するずれ角度の換算。正七角形上に存在するサブユニットの中心が通る円(白線)に沿ってサブユニットが移動すると仮定した場合の, 移動前後のサブユニットをそれぞれ黄, 緑で示した。移動前のサブユニットの中心(黄), 正七角形の中心(橙), 移動後のサブユニットの中心(緑)で形成される角度を計測した。

B. ずれ計測に使用した電顕像とずれ角度を伴う膜孔構築像の典型例

(a), (b) はそれぞれ Top view および Bottom view での計測例とそれぞれのずれ角度を反映して作成した3次元構築

接するサブユニット間角度は40–60°の範囲に分散しており、本手法による証明は困難であることを明らかとしてきた¹⁴⁾。図2でデザインした構造を電顕像と比較した結果、幾つかのサブユニットが正7角形からずれて配置されている可能性が示唆された。そこで、このずれが γ ヘモリジン膜孔に特徴的な構造であるかどうかを、正7角形の頂点を結ぶ対角線を電顕像に重ね合わせて確認したのが本論文である。

図3Aに対角線法によるずれ計測の概念図、図3Bに本手法でのずれ計測に使用した膜孔と、そのずれを伴ってPro/ENGINEERで再構築した典型例を示した。本手法では膜孔のtop viewにおけるずれ配置だけでなく、bottom viewにおけるずれ角度も計測でき、さらにずれを伴った対角線を構築画像のサブユニットの中心を通るように適合させることで、電顕像の実際の傾きを予測できることが示唆された。

また、本手法で計測したずれ角度の定量性を確認するために、画像解析ソフト Scion image を使用して図4に示した手法により、ずれ角度の計測を行った。表1に正7角形対角線を利用して計測したずれ角度平均値、および画像解析処理で分子間中心距離から算出した平均ずれ角度を示した。その結果、対角線法で計測した場合に、頂点DとE間において最も大きいずれ角度が検出され、隣り合う分子が離れる方向に約15°ずれていた。一方、画像解析ソフトにおいても他と比較して隣接分子間角度のずれが大きい部位が1箇所検出され、やはり隣接分子間が離れるように約15°ずれていた。対角線法では10個のサンプル数で平均値を検出しており、目視と手書きで定性的にずれを検出する試験をおこなっている。一方、top viewのサンプル数60個でより定量的にずれを検出できる画像解析の結果においても、同様のずれ角度が計測されたことから、定性的な対角線法において最もずれ角度の大きい部位の特定は可能であることが明らかとなった。また、対角線法と画像解析ソフトを使用した場合のずれ角度を比較した時に、対角線法では最も角度のずれが大きいD-E間以外においても、10°前後の角度のずれが検出される部位があるが、画像解析では、MA1以外の角度のずれは数度に留まっている。これは、対角線法では頂点Aを1つのサブユニットの中心に設定し、かつ頂点DおよびEの位置に重ね合わせるサブユニットを決めて解析を行っている。そのため、D、Eで生じた大きなひずみは、頂点B、C、F、Gの位置において打ち消される必要がある。一方、画像解析では、

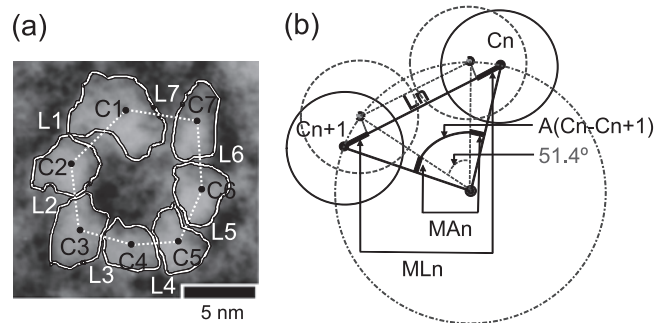


図4 画像解析によるずれ角度計測の測定方法の概念図
(a) 画像解析によるサブユニット中心の決定と中心間距離計測。C: サブユニット中心 (黒点)。L: 中心間距離 (白点線)。サブユニットの形状は白線で示した。
(b) 中心間距離 (L)、ずれ距離 (Mismatch length, ML)、角度 (Angle, A)、ずれ角度 (Mismatch angle, MA) の概念図。一点鎖線は正7角形の外接円、二重丸は正7角形の中心点を示す。破線は正7角形の頂点に存在する場合のサブユニット、実線は移動後のサブユニットを示す。MLおよびMAは太実線で示した。MAは正7角形の頂点間角度を51.4°とし、MLを基に算出した。

個々のサブユニット中心間距離を測定してずれ角度を算出しているため、MA1で生じた大きなひずみを解消するサブユニットは特定されていない。この計測条件設定の違いが、両手法でのずれ角度の違いにつながったと考えられる。

(3) 対角線法で計測したずれ平均角度を基にした膜孔3次元構造

対角線法で計測したずれ平均角度を基に3次元画像構築ソフトで最終的に構築した膜孔立体構造を図5に示した。TopおよびBottom view中の青線は正7角形の頂点を結ぶ対角線で、赤線はサブユニットを平均ずれ角度で移動させた時の、中心を通り正7角形の対角線の交点とを結ぶ線である。膜孔を構成する2種類のサブユニットを白・黄で色分けしている。これまでの研究で、同分子同士では膜孔形成がほとんど見られないこと、また膜孔形成に先立って異成分同士のダイマー形成が起こること¹⁷⁾が分かっている。従って、サブユニットの結合において、異分子間の親和性は、同分子間の親和性より大きいと予測される。2成分が3:4または4:3の割合で交互に並んだヘプタマー構造中では、異分子同士が隣り合う部位が6箇所、同成分同士が隣り合う部位が1箇所存在する。以上のことから、本研究で検出された膜孔中で他の

表1 対角線法および画像解析によるずれ角度の計測結果

プラス (+) 表示は、隣接サブユニット間距離が正7角形の辺の長さより長い場合、マイナス (-) 表示は隣接サブユニット間距離が正7角形の辺の長さより短い場合を表す。最もずれ角度が大きかったD-E間およびMA1から、反時計回りで各分子間のずれ角度を表示した。

対角線法	位置	D-E	E-F	F-G	G-A	A-B	B-C	C-D
	ずれ角度 (°)		+15.3 ± 3.1	-11.1 ± 2.4	+3.9 ± 1.3	-0.5 ± 0.5	-1.9 ± 0.3	+1.5 ± 0.4
画像解析	位置	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5	MA6	MA7
	ずれ角度 (°)		+15.9 ± 2.1	-2.1 ± 0.3	-3.3 ± 0.4	-3.4 ± 0.4	-5.4 ± 0.7	-1.4 ± 0.2

ずれ角度 ± SE

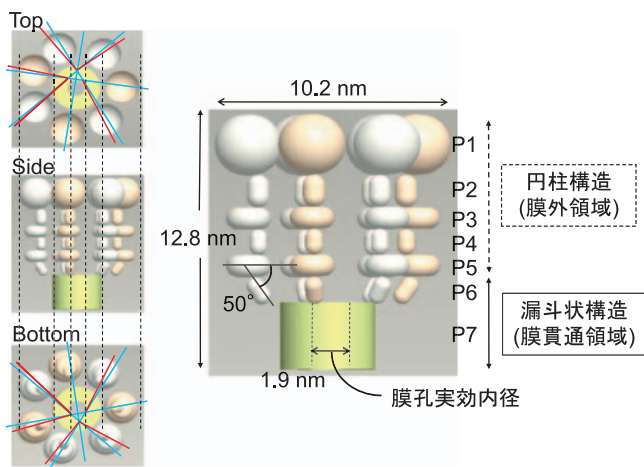


図5 対角線法で計測したずれ平均角度を基にした膜孔の3次元構造

表1に示した対角線法で計測したずれ角度を基に各サブユニットを移動させ、最もずれ角度が大きかった部位に同色のサブユニットを配置した。本構築像から、サブユニットの折れ曲がり角度と、膜外および膜貫通領域を予測した。

部位よりずれ角度が大きい箇所 (D-E 間および MA1) は、膜孔中で1箇所だけ存在する同分子同士が隣接する部位であると推定できる。

また、図2で膜孔下部においてサブユニットが内側に折れ曲がっているが、立体構造から、折れ曲がり角度は約50°であると予測された。折れ曲がり部から下端には膜孔の実効内径とほぼ同様の内径をもつ高さ3.6 nmの小孔が付随している。本小孔部は30–40 Åの赤血球二重膜¹⁸⁾に貫通する程度の幅を持っていることから、本小孔部、あるいは小孔部から折れ曲がり部を含めた領域 P6–P7 で形成される漏斗状構造部が膜貫通領域を形成していると予測された。

黄色ブドウ球菌が産生する膜孔形成毒素には、2成分性のヘモリジン、ロイコシジンの他に1成分性のαヘモリジンが存在する。αヘモリジンもγヘモリジン同様、赤血球膜上で膜孔複合体を形成する。複合体は既に結晶構造解析に成功しており、γヘモリジン同様7量体を形成することが明らかにされている¹⁹⁾。この7量体構造から推定したαヘモリジンのモノマー構造と、γヘモリジンの Hlg1 成分のモノマーの結晶構造⁷⁾、ならびに Hlg2 成分とアミノ酸配列で約70%の相同性を持つ Panton-Valentine 型ロイコシジン LukS-PV 成分²⁰⁾のモノマーの結晶構造の類似性から²¹⁾、γヘモリジンの膜孔構造は、αヘモリジンと同様の構造を有していることが予測された。さらに本研究で明らかにされたγヘモリジン膜孔の高さ及び外径は12.8 nm および10.4 nm であり、αの高さ(10 nm) および外径(10 nm)¹⁹⁾と比べると、縦長であると考えられた。

さらに、結晶構造解析並びに電子顕微鏡解析を使用して複合体構造が明らかとされている膜孔形成タンパク質には、αヘモリジン以外に *Aeromonas hydrophila* が産生する aerolysin、*Vibrio cholerae* が産生する cytolysin (VCC)、*Streptococcus*

pneumonia が産生する pneumolysin が存在するが、αヘモリジン、VCC、aerolysin は7回転対称性^{22–24)}、また pneumolysin は41回転対称性を有することが分かっており^{25,26)}、γヘモリジンのようなサブユニットのずれは報告されていない。従って今回筆者らが提唱したずれを伴う非対称構造は2成分から成るγヘモリジンに特徴的な構造であると考えられる。

また、サブユニット間が正7角形からずれて配置されていることの生物学的な意義について、筆者らはこれまでにγヘモリジンが形成する膜孔が血球膜上でクラスター化することを明らかとしている²⁷⁾。さらに、このクラスターの周囲の膜が破壊されやすい傾向があること、またクラスター形成に伴って溶血活性が促進されることを明らかとしている。これらと本論文の結果より、クラスターは膜孔が様々な向きで3次元的に積み重なっていると考えられ、膜孔の同成分同士が隣り合う場所に別の膜孔の異成分が結合することで、膜孔が重なり合いやすくなっていると考察できる。さらに、γヘモリジンで見られるクラスター化は1成分から成るαヘモリジンには観察されず、さらにクラスター形成に依存して溶血活性が促進されることから、膜孔のずれにより、γヘモリジンに特徴的な細胞崩壊活性を示す可能性がある。

4. 結論

本研究は、黄色ブドウ球菌γヘモリジンが形成する膜孔の構造を、粒子の判別が可能な数少ない高精細像をもとに、画像構築技術を使用して再構築し、ヘプタマー構造のサブユニットの配置を詳細に調べることを目的とした。その結果、γヘモリジン膜孔は円柱状と漏斗状が組み合わされた3次元構造を形成し、異なる2成分から成る7量体構造であるためにサブユニットの top view からの配置に正7角形からのずれが生じていることが予測された。本研究で使用した方法は、異なる成分をヘテロな割合で含み、サンプル数が限られ、またX線結晶構造解析が困難な複合体においても、その特徴的な構造を解明するための有効な手法であることが示唆された。

5. 謝辞

本研究の一部はグローバルCOE「流動ダイナミクス知の融合教育世界拠点プログラム」の支援を受けた。電子顕微鏡画像は日本学術振興会特別研究員 (PD) 採用時に撮影し、電子顕微鏡撮影は東北大学農学部電子顕微鏡室で行ったものである。

文 献

- 1) Sheagren, J.N.: *N. Engl. J. Med.*, 310, 1437–1442 (1984)
- 2) Wadstrom, T.: *Zbl. Bakt. Hyg. A.*, 266, 191–211 (1987)
- 3) MacCartney, A.C. and Arbuthnott, J.P.: in Jeljaszewicz, J. and Wadstrom, T. (Eds): *Bacterial Toxins and Cell Membranes*, Academic Press, London, 89–127 (1978)
- 4) Rogolsky, M.: *Microbiol. Rev.*, 43, 320–360 (1979)

- 5) Tomita, T. and Kamio, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 565–572 (1997)
- 6) Kamio, Y., Rhaman, H., Nariya, H., Ozawa, T. and Izaki, K.: *FEBS Lett.*, **321**, 15–18 (1993)
- 7) Olson, R., Nariya, H., Yokota, K., Kamio, Y. and Gouaux, E.: *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 134–140 (1999)
- 8) Momma, N., Nguyen, V.T., Kaneko, J., Higuchi, H. and Kamio, Y.: *J. Biochem.*, **136**, 427–431 (2004)
- 9) Nariya, H. and Kamio, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 1603–1604 (1995)
- 10) Nariya, H., Nishiyama, A. and Kamio, Y.: *FEBS Lett.*, **415**, 96–100 (1997)
- 11) Nishiyama, A., Nariya, H. and Kamio, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1834–1838 (1998)
- 12) Sugawara, N., Tomita, T. and Kamio, Y.: *FEBS Lett.*, **410**, 333–337 (1997)
- 13) Sugawara, N., Tomita, T., Sato, T. and Kamio, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 884–891 (1999)
- 14) Sugawara-Tomita, N., Tomita, T. and Kamio, Y.: *J. Bacteriol.*, **184**, 4747–4756 (2002)
- 15) Mio, K., Kubo, Y., Ogura, T., Yamamoto, T., Arisaka, F. and Sato, C.: *J. Biol. Chem.*, **283**, 1137–1145 (2008)
- 16) Nariya, H., Asami, I., Ozawa, T., Beppu, Y., Izaki, K. and Kamio, Y.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **57**, 2198–2199 (1993)
- 17) Nauyen, V.T., Kamio, Y. and Higuchi, H.: *EMBO J.*, **22**, 4968–4979 (2003)
- 18) Rao, N.M., Plant, A.L., Silin, V., Wight, S. and Hui, S.W.: *Biophys. J.*, **73**, 3066–3077 (1997)
- 19) Song, S., Hobaugh, M.R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley H. and Gouaux, J.E.: *Science*, **274**, 1859–1866 (1996)
- 20) Prevost, G., Cribier, B., Couppie, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-Barbancon, V., Monteil, H. and Piemont, Y.: *Infect. Immun.*, **63**, 4121–4129 (1995)
- 21) Guillet, V., Roblin, P., Werner, S., Coraiola, M., Menestrina, G., Monteil, H., Prevost, G. and Mourey, L.: *J. Biol. Chem.*, **279**, 41028–41037 (2004)
- 22) Gouaux, J.E., Braha, O., Hobaugh, M.R., Song, L., Cheley, S., Shustak, C. and Bayley, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12828–12831 (1994)
- 23) Wilmsen, H.U., Leonard, K.R., Tichelaar, W., Buckley, J.T. and Pattus, F.: *EMBO J.*, **11**, 2457–2463 (1992)
- 24) Olson, L. and Gouaux, J.E.: *J. Mol. Biol.*, **350**, 997–1016 (2005)
- 25) Morgan, P.J., Hyman, S.C., Rowe, W., Buckley, A.J., Mitchell, T.J., Andrew, P.W. and Helen, R.S.: *FEBS Lett.*, **31**, 77–80 (1995)
- 26) Gilbert, R.J., Jimenez, J.L., Chen, S., Tickle, I.J., Rossjohn, J., Parker, M., Andrew, P.W. and Helen, R.S.: *Cell*, **97**, 647–655 (1999)
- 27) 菅原典子, 富田敏夫, 佐藤鶴治, 神尾好是: 日本農芸化学会誌, **73** (増刊号), **6** (1999)