

百日咳菌壊死毒の細胞侵入過程の解析と受容体同定への試み

○堀口安彦、福井 理、三宅眞実司
阪大・微研・細菌毒素

百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) に代表されるボルデテラ属の細菌は共通して壊死毒素 (dermonecrotic toxin, DNT) を産生する。当研究室ではこれまでに、DNTがRhoの63位のグルタミンを脱アミド化またはポリアミン化するトランスグルタミナーゼであることやDNTによる修飾の結果、Rhoが優性活性型化することを示してきた。しかし、DNTの特異受容体や細胞内への侵入過程は不明である。本シンポジウムでは、この点についてのわれわれの最近の解析結果と現在の進捗状況を報告する。DNTはアミノ酸1464個から構成される一本鎖のタンパク質であり、N末端の54アミノ酸で標的細胞上のレセプターと結合し、C末端の288アミノ酸でトランスグルタミナーゼ活性を示す。DNTはアミノ酸44-45番目でCa²⁺依存性セリンプロテアーゼfurinにより切断される。この過程はDNTの活性に必須であった。Furinにより切断を受けた後も、DNTのN末端側とC末端側は非共有結合によって結ばれており、いわゆるnicked formになっていることがわかった。Furinによる切断部位よりN末端側がレセプター結合領域に相当する。そこで、このN末端断片を除去したDNT (delta B) を精製し、細胞への作用を検討したところ、DNTに非感受性である細胞にもdelta Bが作用することがわかった。このdelta B はリポソームに非特異的に会合することから、疎水性の細胞膜に会合して非感受性細胞内へ侵入することにより作用していると予想された。さらに、DNTのN末端欠損変異体を用いた実験から、delta B でみられた非感受性細胞への侵入には、furin切断部位から約120アミノ酸が必要であることが示唆された。この領域には、細胞膜との相互作用に関わると予想される領域が2つ存在している。一つは疎水性に富んだ膜貫通領域で、もう一つは塩基性に富み、膜貫通に関与するといわれるヒト免疫不全ウイルスタンパクに存在するTAT様配列である。それぞれの領域中の5アミノ酸を欠損させた変異体 (Δ106-1110、Δ155-159) を作製し、細胞への作用を検討したところ、Δ155-159は活性を示したのに対し、Δ106-1110はfurinで切断されず、活性を示せなくなっていることがわかった。このことより、TAT様配列はDNTの活性に必須ではないが、疎水性の領域はfurinで切断されるような構造を保持するのに必要な領域であると考えられた。疎水性の領域が細胞内への侵入に直接関与しているかどうかについてはこれからの研究課題である。現在、DNTの特異受容体遺伝子をクローニングするためのスクリーニング系を確立しつつあるので、その進捗状況についても報告したい。