

ジフテリア毒素をモデルとした高分子物質の細胞内輸送機構の解析

Study of macromolecule transport into the cytoplasm using diphtheria toxin

代表研究者 久留米大学分子生命科学研究所教授 目加田 英 輔
Prof., Institute of Life Science, Kurume Univ.
Eisuke MEKADA

Diphtheria toxin (DT) inhibits protein synthesis of eukariotic cells by catalyzing the ADP-ribosylation of elongation factor-2, which results in its inactivation. The first step of intoxication by DT is binding of the toxin to a susceptible cell. The toxin molecules bound to the cell surface are internalized by endocytosis and their A fragments, at least, enter the cytoplasm to exert their effect. Thus, the toxin is a good marker for the analysis of endocytic process of proteins and the mechanism of protein transport.

Vero cells, derived from monkey kidney, are one of the cell lines most sensitive to DT. We demonstrated previously that a 14.5 kDa protein (DTR14.5) in Vero cell membrane is the DT receptor, or at least a DT-binding molecule in the DT receptor complex. In this studies. we purified DTR14.5 from Vero cell membrane.

For further analysis of the DT receptor and related proteins, we attempted to isolate monoclonal antibodies to those molecules. A monoclonal antibody which blocks the binding of DT to Vero cells was isolated by immunizing mice with Vero cell membrane. The antibody inhibits the binding of DT to Vero cells. This antibody does not directly react with DTR14.5, but react with a novel membrane protein with 27 kDa. Further studies revealed that the 27 kDa protein and DTR14.5 closely associate in Vero cell membrane and that the inhibition of the binding of DT to the receptor is due to the binding of the antibody to the 27 kDa molecule.

Intravesicular low pH is believed to be required for the entry of the toxin into the cytoplasm. We tested whether the toxicity of DT was inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase. When bafilomycin was added to the culture medium, the acidification of intracellular vesicles in intact Vero cells was inhibited. At the same concentration bafilomycin completely inhibited the toxicity of DT. The binding study of ¹²⁵I-DT revealed that the inhibition was the step after internalization. These results indicate that vacuolar-type H⁺-ATPase is involved in entry of DT into cytoplasm from endocytic vesicle.

研究目的

細胞はアミノ酸やブドウ糖などの低分子物質ばかりでなく、種々の高分子物質を細胞内に取り込み、その生命維持に役立っている。高分子物質は、直接細胞膜を通過できないので、リセプターを介したエンドサイトーシスという機構で細胞内に取り込まれる。また、エンドサイトーシスによる高分子物質の取り込みは、栄養分の摂取に必要であるばかりでなく、増殖シグナルの伝達とその制御、抗原の再提示に代表される免疫反応、トランスサイトーシスによるタンパクの輸送、など個体

の維持にも極めて重要である。しかしこのような重要な役割にもかかわらず、エンドサイトーシス機構そのもの、あるいはそれに続いて起こる選別輸送や膜通過の機構の解析は未だあまり進んでいない。

ジフテリア菌が合成するジフテリア毒素は分子量 58,000 のタンパク質で、真核細胞のタンパク合成系を阻害する作用を持つ。この毒素が毒性を発揮するためには、毒素分子あるいはその A フラグメントが細胞質内に入ることが必須である。毒素の細胞内侵入は、細胞の持つエンドサイトー

シス機構に依存している。それゆえジフテリア毒素は、エンドサイトーシス機構解明の有効な材料となる。申請者は、このような立場から、ジフテリア毒素の細胞内侵入機構を、細胞内侵入に必須な毒素分子の構造解析と、それに関与する細胞側の因子の解明、の両面から研究を進めてきた。本研究は、ジフテリア毒素という細胞外から細胞内に入りそこで毒性を発揮するタンパク質を用いて、エンドサイトーシス機構ならびにタンパク質の膜通過機構の解明を目指すものである。

研究経過ならびに研究成果

本研究でエンドサイトーシス機構を調べるにあたり、[1]ジフテリア毒素がリセプターに結合する過程、[2]毒素分子のエンドソーム膜通過の過程、の二つについて解析した。

[1] ジフテリア毒素リセプターの分離精製とリセプターにアソシエートする膜タンパク質の発見とその遺伝子クローニング

申請者は数年前からジフテリア毒素リセプターの解析を始め、ジフテリア毒素に最も感受性が高いサル腎臓由来の Vero 細胞を用いて、これまでにジフテリア毒素リセプターの同定に成功している。また、Vero 細胞膜を抗原にして、ジフテリア毒素の Vero 細胞への結合を抑えるモノクローナル抗体を得た。本研究では、これをさらに発展させて次のことを明らかにした。(1)ジフテリア毒素リセプターを Vero 細胞膜から完全に精製し、SDS ゲル電気泳動によって分子量 14.5 kD のタンパク質 (DTR14.5) がジフテリア毒素リセプター、あるいは少なくともジフテリア毒素結合分子であること、(2)分離したモノクローナル抗体の抗原は分子量 27 kD の膜タンパク質で、この抗体は 27 kD タンパク質に結合することによって毒素の細胞への結合を抑えること、(3)DTR-14.5 には 27 kD の膜タンパク質がアソシエートしていること、(4)27 kD タンパク質の cDNA クローニングに成功し、塩基配列の決定を行った。またこの cDNA をヒト WI38 細胞にトランジェントな系でトランスフェクションすると毒素の結合量の増加が認められ、この遺伝子がジフテリア毒素の細胞への結合に何らかの役割を果たしてい

ることがわかった。

[2] ジフテリア毒素の膜通過に関与する細胞側の因子の解析

エンドサイトーシスによってエンドソーム内に取り込まれたジフテリア毒素は、エンドソーム膜を通過して細胞質に到達しなければ毒性を発揮し得ない。そして、これまでの申請者及び海外の研究者の研究によって、エンドソームの内部が酸性になっていることが毒素の膜通過に重要であることが明らかになっている。本研究では、申請者は新たに見いだされた空胞系 H^+ -ATPase (V-ATPase) の特異的インヒビターであるバフィロマイシンを用いて、エンドソームの酸性化とジフテリア毒素の毒性発現の関係について調べた。その結果、この薬剤はジフテリア毒素の毒性を完全に阻害し、その阻害はエンドソームから細胞質への膜通過の過程であることが明らかになった。このことから、ジフテリア毒素の膜通過においては、V-ATPase の関与が必須であることがわかった。また本研究によって、バフィロマイシンは生きた細胞に直接用いても極めて効率よく小胞の酸性化を抑えることが明らかになり、この薬剤が小胞酸性化の役割を解析する有効な手段であることを示すこともできた。

今後の課題と発展

課題 [1] の研究で見いだした 27 kD タンパク質は、塩基配列から推定すると、少なくとも 4 回以上膜を貫通した膜タンパク質であり、チャンネルになるような構造をしている。一方、ジフテリア毒素分子には B フラグメントの一部に非常に疎水性の高い部分があり、これが細胞側となんらかの相互作用をすることでフラグメント A の通過が起こると考えられている。通常この疎水性部分は分子内部に隠されているが、課題 [2] で明らかにした V-ATPase の働きによってエンドソームの酸性化が起こり、これによって疎水性部分が分子表面に露出してくるものと思われる。それゆえ、27 kD タンパク質がジフテリア毒素の膜通過にも何らかの役割を果たしている可能性も考えられ、今後はこの可能性について調べたい。また、DTR14.5 の遺伝子クローニングにはまだ成功し

ていないので、これについても是非行いたい。最終的には、27 kD タンパク質 cDNA と 14.5 kD タンパク質 cDNA を共に高発現した細胞を造り、ジフテリア毒素リセプターの各要素の機能解析を行いたい。

近年、インシュリン、EGF、FGF といった増殖因子がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、続いて核に運ばれ、そこで細胞増殖を直接コントロールしていることを示す証拠が提出され、注目されてきている。これまで、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるタンパク質としては、ライソゾームに運ばれ分解を受けるもの、細胞表面にリサイクルされるものがよく知られており、エンドソームあるいはライソゾームの膜を通過して細胞質に至るタンパク質は毒素やウィルスを除いて知られていなかった。増殖因子

の作用機構の一つとして、細胞内で直接働くやり方があるならば、今後この経路の解明はますます重要になってくるものと思われる。ジフテリア毒素を用いた申請者らの研究は、これら増殖因子の作用機構を理解するためにも大いに役立つものと考えている。

発表論文

An antibody that inhibits the binding of diphtheria toxin to cells, revealed the association of a 27-kDa membrane protein with the diphtheria toxin receptor. *J. Biol. Chem.* 266: 20463~20469 (1991).

Purification of diphtheria toxin receptor from Vero cells. *J. Biol. Chem.* 266: 20457~20462 (1991).

The cytotoxic action of diphtheria toxin and its degradation in intact Vero cells are inhibited by bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.*, 265: 21940~21945 (1990).