

機関番号：11301  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20580069  
 研究課題名(和文) 2成分性膜孔形成毒素  
 -血球崩壊機構の全貌解明と標的特異的毒素分子設計への応用-  
 研究課題名(英文) Two-component membrane pore-forming toxins  
 -The elucidation of the details of cytolysis mechanism, and its application to the cell-specific toxin molecular design-  
 研究代表者  
 金子 淳 (KANEKO JUN)  
 東北大学・大学院農学研究科・准教授  
 研究者番号：30221188

## 研究成果の概要(和文)：200字

黄色ブドウ球菌の $\gamma$ -ヘモリジン・ロイコシジンは2成分性膜孔形成毒素である。本研究ではその細胞特異性と作用機構および毒素遺伝子の水辺伝播に関わるファージに関する研究を行った。1) 毒素の初発成分の標的細胞認識に関わる因子を解析した。2) 膜孔形成に関与する毒素成分内因子を探索した。3) 白血球崩壊および炎症を引き起こす機構を解析した。4) 毒素遺伝子を伝播する新規ファージを発見し、宿主認識機構を解明した。

## 研究成果の概要(英文)：

Staphylococcal  $\gamma$ -hemolysin and leukocidins are two-component hetero oligomeric pore-forming cytolytic toxins. In this study, the mode of action including cell specificity and horizontal gene transfer system of these toxins were investigated.

- 1) Receptors for the initial components on the target cells were explored.
- 2) The intra-molecular factor(s) involved in the opening pore was searched.
- 3) The mechanism causing the white cell lysis and inflammation was studied.
- 4) Novel bacteriophages related to horizontal transfer of Pantone Valentine leukocidin was characterized, and the phage protein which recognize host cell was identified.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：細菌学、応用微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物機能・2成分性膜孔形成毒素

## 1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌はヒトの常在菌である一方、日和見感染や食中毒の起因菌ともなる。菌の抗生物質に対する耐性化は深刻であり、臨床現場では多剤耐性菌、特にメチシリン耐

性を獲得した株(MRSA)が院内感染の起因菌として問題となっている。現在では耐性菌は畜産の現場にまで広がっている。これら耐性菌による感染症の抗生物質に頼らない治療を行うためには、黄色ブドウ球菌が感染に

伴い産生する毒素の作用及び宿主細胞の応答を知ることが重要である。そのような観点から、われわれはほとんど全ての黄色ブドウ球菌が保有して感染の成立に重要な役割を担っているγ-ヘモリジン(Hlg)/ロイコシジン(Luk)ファミリーに注目した。そして研究代表者は研究分担者と共に、日本で唯一の研究グループとして2つのタンパク質が共同して膜孔を形成するユニークな2成分性細胞崩壊毒素である Hlg/Luk 遺伝子のクローン化に世界に先駆けて成功して以来、2成分性毒素タンパク質の構造と作用機構の相関、膜孔中間体並びに膜孔のクラスター化によるヒト赤血球膜上での「超チャネル」の発見、ロイコシジンのリン酸化と白血球崩壊活性との相関、並びに「一分子技術」による膜孔形成機序などの極めて独創性の高い研究に関わり、成果を発信して世界の研究を牽引してきた。これらの成果は2004年の第11回国際ブドウ球菌シンポジウム (ISSSI) で、「一分子技術」による膜孔形成機序の研究結果が膜孔毒素に関して一般性を植え付けた発見であると高く評価された。一方近年、一部の黄色ブドウ球菌が保有し、ヒト白血球に特異的に作用する Hlg/Luk ファミリーに属する毒素である Panton-Valentine 型ロイコシジン(PVL)が、強毒型の市中獲得性 MRSA(CA-MRSA)の主要病原因子として欧米で注目されている。本研究代表者はウシ乳房炎由来株から PVL 型の新規毒素 LukM-LukF-PV (P83) (LukMFPV)を見だし、さらに PVL および LukMFPV 遺伝子がプロファージ上にコードされていることを発見して、これら PVL 型2成分性毒素の水平伝播を証明した。これら PVL の毒素発現能を獲得する機構としての PVL 変換ファージ群は2004年に開かれた11<sup>th</sup> 国際ブドウ球菌シンポジウム(ISSSI)の基調講演および全ての関連演題で取り上げられ、Nature review of Microbiology をはじめ多くの総説や論文に引用されている。また我が国においても皮膚軟部組織感染症における PVL の重要性を見だし、細菌学分野の多くの論文に引用されている。

研究代表者らはこれまで膜孔の形成に(1)両毒素が LukF を共通成分として、Hlg2あるいは LukS と共に標的細胞膜上に順序よく結合し、両成分を含むヘテロ7量体の中間体を経て膜孔を形成、さらに70~100個の膜孔が集合して『超チャネル』を形成し溶血を促進す

ること、(2)分子イメージング技術を用いて①LukFの初発の膜への結合⇨②Hlg2の LukFへの結合⇨③[LukF-Hlg2]複合体形成⇨④[LukF-Hlg2]複合体3分子集合による6量体/7量体前駆体形成⇨⑤STEM伸張による「膜孔」形成⇨⑥膜孔の集合⇨⑦超チャネル形成の7つの行程からなることを明らかにしてきた。しかし、上記の7行程のうち①②における各成分の結合及びその順序を規定する機構、③の2成分が膜上で出会い集合する機構、⑤以降のクラスター形成に関わる機構の詳細は不明である。これらにはいずれも「標的細胞側の因子」が関与していると考えられる。さらに④で前駆体からプレSTEMがリリースされ標的細胞へ挿入してβパレル膜孔を形成する過程でLukFとHlg2の2成分が協調してプレSTEMを伸張する機構が存在すると予想されるが、その詳細は不明である。一方ロイコシジン、特にPVLは白血球に対する特異性が高く、感染組織の細胞には直接作用しない。従ってロイコシジンにより引き起こされる組織の炎症は菌の感染及び毒素産生により白血球系細胞が崩壊し、それが引き金となる宿主の2次的な応答だと考えられる。すでにロイコシジンは膜孔を形成して白血球の膨潤を引き起こすが、さらにネクロシス様の完全崩壊に至るためには初発成分である LukS にのみ存在するプロテインキナーゼ認識部位 [KRST<sup>246</sup>]のTが白血球膜上でリン酸化されることが必須であることを明らかにした。さらにロイコシジンの膜孔が白血球膜の脂質ラフト上で形成することを明らかにした。しかしLukSのリン酸化を伴う白血球崩壊に関与するLukSレセプターを含めた細胞側の応答因子は不明である。

## 2. 研究の目的

背景に記載した様々な問題点を明らかにして、黄色ブドウ球菌二成分性毒素の細胞特異的な崩壊機構の全貌を明らかにすることが本課題の目的である、その結果得られた成果は、標的細胞特異的な毒素を分子設計するための基盤となる。

具体的には、膜孔の形成機構では標的となる白血球細胞上における初発成分のレセプター、第2の成分の結合およびヘテロ2量体の形成に至る膜孔形成初期の段階に関与する因子など「細胞側因子」を同定し、それらと関わる「毒素側の必須なドメイン及びアミノ

酸」との関係解析して(1) 2成分性毒素の膜孔形成の初期段階における毒素による細胞認識のメカニズムを解明する。さらに(2) 膜孔βバレル形成に必須な因子を明らかにして、膜孔形成機構の全貌を明らかにする。また、(1)とともに(3)白血球における膜孔形成からネクロシス様崩壊を起こすメカニズムを解明することにより、感染の場における二成分性毒素の役割、およびPVLが関与する感染における炎症発現の機構の解明に繋げる。

以上の成果を通じ、特にCA-MRSA感染症の抗生物質に頼らない治療、さらにはPVLの水平伝播に関わるファージの解析と合わせ、新たな病原菌の出現の予測および抑制技術などの応用につなげる。また、細胞特異性を決定する機構を応用した標的特異的毒素の分子設計の基盤を作ることを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 2成分性毒素の膜孔形成の初期段階における毒素による細胞認識のメカニズムの解明

①標的細胞表層の初発成分のレセプターの探索: 初発成分にGSTタグをつけた成分を用い、プルダウン法によりこれらと相互作用する標的白血球細胞膜上の因子(複合体)を回収する。分析は二次元電気泳動で行う。

②赤血球における毒素膜孔形成に反応する因子の解析: ヒト赤血球に2成分性γヘモリジンおよび1成分性αヘモリジンを作用させ、溶血後の赤血球膜を回収し電気泳動で分析する。

(2) 膜孔βバレル形成に必須な構造の解析

①ヘテロな成分同士のプレSTEMがβバレルを形成するタイミングを決定する分子間情報伝達に必須な毒素成分タンパク質上の最小構造を探る。LukFからHlg2ヘSTEM伸張のシグナルが伝達されるために必須なアミノ酸残基を特定するため、これらを含めた候補アミノ酸残基を置換した変異体を作成し、ヘテロ7量体中間体形成並びにSTEM伸張への影響を解析する。

②1成分性のαヘモリジンの水溶性モノマーの結晶構造を明らかにし、αヘモリジン7量体膜孔およびγヘモリジンLukF立体構造と比較することによりSTEM伸張に関わる

構造上の因子を探索する。

(3) 白血球系細胞の崩壊機構と組織の壊死の関係

①ヒト白血球崩壊に関与するLukSに固有のリン酸化部位[KRST<sup>246</sup>]およびPVLのLukS-PVの[RRTT<sup>246</sup>]のTのアラニン置換ミュータント、F型成分、S型成分のキメラ毒素を作成し、intactな毒素とともにレセプターとの相互作用並びにネクロシス応答に関与するサイトカインや成長因子などの放出を定量的に解析する。  
②マウス樹状細胞を用いた自然免疫評価系がロイコシジン各成分単独に対して応答することを見いだした。この系を用いて、これまで作成した様々な変異毒素異性分の活性を評価し、自然免疫応答との関係を検証する。

### 4. 研究成果

(1) 2成分性毒素の膜孔形成の初期段階における毒素による細胞認識機構の解明

①標的細胞上の初発成分のレセプターの同定するツールとして、γヘモリジンの初発性分であるLukFおよびロイコシジンの初発性分であるLukSにGSTタグをつけた各毒素成分を作成し標的細胞膜からGHT融合毒素成分と相互作用する因子を探索した。その結果、現在のところ残念ながらいずれの成分も特異的に結合するタンパク質性レセプターは得られていない。そこで、視点を変え、まだ解析が進んでいなかったLukS成分における標的膜との相互作用に関わるアミノ酸残基を探索した。LukS成分が標的膜に接するrimドメインのアミノ酸について、LukF成分の立体構造及び必須アミノ酸との比較から関与が考えられるものを予測し、アラニンに置換した変異体を得た。これまでに得た変異体ではヒト白血球に対する結合が低下するものは得られなかった。一方、ウシ型ロイコシジンのS型成分LukMがヒト白血球に結合できないことを見いだした(渋谷ら農芸化学会大会発表)。そこでLukSとウシ型ロイコシジンのS型成分LukM、並びにLukSとヒト特異的なLukS-PVの様々なキメラ毒素成分を作成した。そのうち、LukSを主体としたキメラに関しては十分量の毒素タンパクを得ることが出来た。さらに小動物に感染し、ヒトにはほとんど感染例がない*S. intermedius* およびその関連種の新規2成分性毒素遺伝子の塩基配列を決定し、その推定アミノ酸配列を既知のも

のと比較した。その結果特にS型成分において、アミノ酸は配列が明確に異なる領域が3カ所存在することを明らかにした。これらの異なるアミノ酸が標的細胞特有のレセプター認識に関与していると考えられる。現在これらの領域のアミノ酸についてさらにアラニンスキャンを進行中である。

②一方、 $\gamma$ -ヘモリジンの膜孔形成に伴う赤血球側の応答として、赤血球膜のタンパク質組成が変化することを見いだした。同様な現象は黄色ブドウ球菌の1成分性膜孔形成毒素 $\alpha$ ヘモリジンでも弱いながら観察されたことから、赤血球の膜孔形成毒素に対する応答であると考えられる。(毛利ら、農芸化学学会発表)。現在二種類のタンパク質に絞り、解析を進めている。

(2)膜孔 $\beta$ バレル形成に必須な因子の探索：

①LukFの立体構造から想定される各種のミュータントを作成し、Hlg2と共に膜孔を形成する能力の解析中を試みた。しかしこれまで最も有力であったホスファチジルコリン結合に関与するミュータントを含め、完全にステムが伸びなくなるLukF変異体は未だ得られていない。

②そこで2成分性の $\gamma$ ヘモリジンに比べ、より解析しやすい1成分性 $\alpha$ ヘモリジンについて、未だ未解明の水溶性モノマーの立体構造を解析することでステム伸張に関する貞応を得ようと試みた。その結果、思いがけないことに結晶化沈殿剤2-methyl-2,4-pentanediolの存在下で、 $\alpha$ ヘモリジンがリン脂質の膜が無くとも自律的に7量体を形成し、ステムを伸張して膜孔を形成出来ることを見いだした(Tanakaら、2011)。この成果はブドウ球菌膜孔形成毒素が標的細胞膜無しで機能性膜孔と同様の構造を自律的に形成できることを世界で初めて明らかにしたものである。

現在、本法を応用し、未だ膜孔の構造解析に成功していない2成分性毒素の膜孔の結晶化に挑戦すべく、共同研究者とともに作業を進めている。2成分性毒素膜孔の立体構造が明らかになれば、標的細胞と接する領域やstem伸張後の構造をモノマーと比較することができ、そこから得られた情報は(1)および(2)の研究に対するブレークスルーとなると期待される。

(3)白血球における膜孔形成からネクロシス様崩壊を起こすメカニズム：マウスは感染症モデルとして多用されるが、ロイコシジンはマウス白血球を崩壊しない。そこでロイコシジンの白血球崩壊以外の免疫系かく乱作用について探索した結果、LukFが自然免疫を担う樹状細胞の活性化作用を有することを見いだした(Indenら、2009)。これは、ネクロシス様の応答は、膜孔形成に加え、白血球がそれぞれの成分を認識することによる応答が関与している可能性を示している。並行してPVLのLukS-PVの[RRTT<sup>246</sup>]Tのリン酸化部位をアラニンに置換した変異体およびロイコシジンのLukSとPVLのLukS-PVのキメラタンパク質を作成した。Intactなロイコシジン、 $\gamma$ ヘモリジンおよびPVLの各成分に加え、これら変異毒素を用いて、ロイコシジンのLukSとPVLのLukS-PVのキメラタンパク質白血球崩壊、およびマウスDCおよびマクロファージの炎症応答モデルでの活性を検討した。その結果、いずれの毒素成分でも明確な自然免疫応答は見られなかったが、PVLでは一成分のみでも白血球に膜障害を惹起できることを見いだした。(若林ら、日本農芸化学学会2011年大会発表)

現在、本研究を通じて得られた様々な毒素成分変異体を駆使し、ヒト培養細胞に対する作用を解析する計画を進めている。これによりPVLと炎症惹起との関係をさらに追究することで、CA-MRSA感染症対策に重要な情報を得ることが出来ると期待される。

(4)CA-MRSAにおけるPVLの水平伝播に関与するPVL保有ファージの解析：以上の実験と並行して代表研究者らが見いだした2種類のPVL保有ファージ $\phi$ PVLと $\phi$ SLTの類縁ファージについて、日本で1970-80年代に分離された高病原性CA-MRSAにおける分布を解析し、新規PVL保有ファージを発見した(Maら、2008)。さらにPVL保有ファージ $\phi$ SLTにおける黄色ブドウ球菌認識タンパク質を同定し、菌体表面のリポテイコサンを認識して感染する機構を解明した(Kanekoら、2009)。本成果は宿主認識に関わる機構を黄色ブドウ球菌のファージとして初めて明らかにしたものであり、CA-MRSAにおけるPVL毒素遺伝子の水平伝播による拡散の疫学を考える上で重要な成果である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1) Y. Tanaka, N. Hirano, J. Kaneko, Y. Kamio, M. Yao, I. Tanaka. 1,2-Methyl-2,4-pentanediol induces spontaneous assembly of staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin into heptameric pore structure. *Protein Sci*, **20(2)** (2011) 448-456. (査読有り)

2) J. Kaneko, S. Narita-Yamada, Y. Wakabayashi, Y. Kamio. Identification of ORF636 in phage  $\phi$ SLT carrying Panton-Valentine leukocidin genes, acting as an adhesion protein for a poly(glycerophosphate) chain of lipoteichoic acid on the cell surface of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **191(14)** (2009) 4674-4680. (査読有り)

3) K. Inden, J. Kaneko, A. Miyazato, N. Yamamoto, S. Mouri, Y. Shibuya, K. Nakamura, T. Aoyagi, M. Hatta, H. Kunishima, Y. Hirakata, Y. Itoh, M. Kaku, K. Kawakami. Toll-like receptor 4-dependent activation of myeloid dendritic cells by leukocidin of *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.*, **11(2)** (2009) 245-253. (査読有り)

4) X. X. Ma, T. Ito, Y. Kondo, M. Cho, Y. Yoshizawa, J. Kaneko, A. Katai, M. Higashiide, S. Li, and K. Hiramatsu. Two different PVL phage lineages predominate in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, **46(10)** (2008) 3246-3258. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

1) 若林由佳梨 他 3 名  
*S. aureus* の産生する白血球崩壊毒素群の解析 日本農芸化学会 2011 年度大会  
2011. 3. 27 京都女子大学  
(東日本大震災のため開催中止だが成立)

2) 金子淳  
黄色ブドウ球菌の病原性獲得に関わるファージ: 二成分性毒素遺伝子を伝播するファージ群  
第 3 回ファージ研究会 (大阪大学タンパク研セミナー) 2010 年 9 月 9 日 阪大蛋白研

3) 若林由佳梨 他 3 名  
Panton-Valentine Leukocidin 変換ファージ  $\phi$ SLT における黄色ブドウ球菌細胞表層リポテイコ酸認識尾部タンパク質の同定  
日本農芸化学会 2010 年度大会 2010. 3. 30 東大駒場キャンパス

4) 毛利彰太 他 2 名  
黄色ブドウ球菌が産生する赤血球崩壊毒素  $\gamma$ -ヘモリジンによる赤血球膜構造変化の解析 日本農芸化学会 2010 年度大会  
2010. 3. 30 東大駒場キャンパス

5) 渋谷喜之 他 2 名  
*S. aureus* の生産する 2 成分性血球崩壊毒素ロイコシジンのヒト白血球崩壊における各成分の役割 日本農芸化学会 2010 年度大会  
2010. 3. 30 東大駒場キャンパス

6) 金子淳 他 3 名  
Identification of tail-tip protein in a phage  $\phi$ SLT carrying Panton-Valentine leukocidin genes acting as an adhesion protein to a poly(glycerophosphate) chain of lipoteichoic acid on the cell surface of *Staphylococcus aureus*  
第 83 回日本細菌学会総会 2010. 3. 29 パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

1) 金子淳. 昨日の敵は今日の友 - 生物工学におけるバクテリオファージの応用 - 生物工学会誌, **87(2)** (2009) 解説

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 微生物機能開発科学講座 「応用微生物学分野」ホームページ内 (準備中)  
URL:<http://www.agri.tohoku.ac.jp/microbio/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
金子 淳 (KANEKO JUN)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 30221188

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者  
神尾 好是 (KAMIO YOSHIYUKI)  
東北学院大学・環境防災工学研究所・客員教授  
研究者番号: 00109715