

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590403

研究課題名（和文）市中獲得型 MRSA の新奇毒素遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of novel toxin genes in CA-MRSA

研究代表者

平松 啓一（HIRAMATSU KEIICHI）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10173262

研究成果の概要（和文）：

市中獲得型MRSA (CA-MRSA) は、病院獲得型のMRSA (HA-MRSA) より強い病原性を持つ。Panton-Valentine Leukocidin (PVL) という白血球溶解毒素の産生が重要な病原因子とされている。しかし、この毒素のみで、CA-MRSAによる強い病原性を説明しえるかどうかは、已然明確ではない。我々は強毒CA-MRSA株MW2が産生するMW1941/1942leukocidinに着目し、タンパクを大腸菌内で発現し、精製タンパクを用いて、ヒト白血球傷害活性を測定した。その結果、このタンパクの存在下で、PVLの白血球傷害活性が増幅することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

Community-acquired MRSA (CA-MRSA) has a stronger virulence than Healthcare-associated MRSA. Production of Panton-Valentine Leukocidin (PVL) is deemed to be responsible for the strong virulence. However, it was not clear that PVL alone could explain the strong virulence of CA-MRSA. We noticed that CA-MRSA strain MW2 produced another set of leukocidins MW1941/1942. We expressed the toxins in *E. coli*, purified the toxin proteins and measured their lytic activity against human leukocytes. We observed a synergistic lytic activity of PVL and MW1941/1942 against human leukocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：細菌学

キーワード：MRSA leukocidin CA-MRSA HA-MRSA PVL

## 1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が産生する白血球溶解毒素

(Leukocidin) は、小児、若年者や免疫機能が低下した immunocompromised host 等において白血球減少症に伴う敗

血症 (sepsis) や様々な皮膚・軟部組織感染症等の疾患の発症に関与しているという報告があり、古くから病原性因子として考えられてきた (1-2)。1990年代半ばより、米国やオーストラリアなどの国で、院内感染型 MRSA (HA-MRSA: Healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) とは異なる、市中で蔓延している MRSA (CA-MRSA: Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) の感染に伴い、壊死性肺炎などの重篤な合併症が引き起こされることが相次いで報告され (3-7)、多大なインパクトを与えるとともに、多くの研究者が疫学的な解析にとどまらず、CA-MRSA の病原性因子の解明に多大な努力を払ってきた。また、Leukocidin homologue の中にはヒト以外の動物種にも疾患を引き起こすことが報告されている。CA-MRSA の病原性因子の候補として最も注目を集めたものの一つが、強力な白血球溶解活性を有する白血球溶解毒素の一つである PVL (Panton-Valentine Leukocidin) であった。我々は、CA-MRSA の強毒株の一つである USA400 MW2 株を用いて、PVL の白血球溶解毒素としての機能について解析を行ってきた (8)。その結果、PVL はヒトの白血球に対して強い溶解活性を示し、マウス白血球には作用しないことや、PVL を欠失させた株の培養上清においても白血球溶解活性が残存していることを明らかにし、PVL には種特異性があること、また、PVL 以外の他の白血球溶解毒素が白血球溶解に関与し、病原性を発揮している可能性があることを推定し、新規 Leukocidin 蛋白質の機能解析にも着手しはじめた。

HA-MRSA のみならず CA-MRSA 強毒株の染色体には、PVL と同様の homologue を有する蛋白質が複数存在している (g-ヘモリジン (Hlg)、LukED、MW1941、MW1942 etc) (9-11)。しかしながら、Leukocidin 蛋白質の種特異性については、マウス、ウサギ等、実験室レベルで使用できるごく一部の動物を用いて一部の蛋白質について断片的に解析が

行われているのみであり、特に PVL 以外の毒素蛋白質については詳細が明らかになっていない。また、これらの Leukocidin のクラスを超えた相互間作用や生物学的活性の差については未知の部分が多く、複数の白血球溶解毒素がどのようにヒト病態に関与しているのかは解明されていない。CA-MRSA の病原性への関与という点に着目すると、これらの分野の研究は端緒にいたばかりであると考えられる。このような背景から、本研究では、各種白血球溶解毒素 (Leukocidin) の種特異性の差や生物学的活性の本質を明らかにし、各クラス間相互作用という点に着目して黄色ブドウ球菌の病原性因子としての位置づけを解明していくことを目指すものである。

- 1) P. D. Ward, W. H. Turner. Identification of Staphylococcal Panton-Valentine Leukocidin as a Potent Dermonecrotic Toxin. *Infection and Immunity* 1980, **27** (5): 393-397.
- 2) Lina G, Piémont Y, Godail-Gamot F, et al: Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis.* 1999, **29**: 1128-1132.
- 3) Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002, **359**: 753-9.
- 4) Dubrous P, Cuguillère A, Gendrot A, Koeck JL. Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* responsible for necrotizing pneumonia [in French]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2007, **65**: 277-81.

- 5) Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 2007, **315**: 1130-33.
- 6) Four pediatric deaths from community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Minnesota and North Dakota, 1997-1999. *JAMA* 1999; **282**: 1123-25.
- 7) Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003, **9**: 978-84.
- 8) Isamu Hongo, Tadashi Baba, Kanenari Oishi, Yuh Morimoto, Teruyo Ito, Keiichi Hiramatsu. Phenol soluble modulins enhance the human neutrophil lysis mediated by Panton-Valentine Leukocidin. *J. I. D.* 2009, **200** (5): 715-723.
- 9) Prévost G, Cribier B, Couppez P, et al. Panton-Valentine leukocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. *Infect Immun* 1995, **63**: 4121-9.
- 10) Supersac G, Prévost G, Piémont Y. Sequencing of leukocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that staphylococcal leukocidins and gamma-hemolysin are members of a single, two-component family of toxins. *Infect Immun* 1993, **61**: 580-7.
- 11) Morinaga Naoko, Kaihou Uriko, Noda Masatoshi. Purification, Cloning and Characterization of Variant LukE-LukD with strong leukocidal activity of Staphylococcal Bi-component Leukotoxin Family.

*Microbiol. Immunol.* 2003, **47**(1): 81-90.

## 2. 研究の目的

毒性の強い CA-MRSA による感染症の著明な増加は、全世界的な現象であり、新たな健康への脅威として大きな医療問題となっている。CA-MRSA 感染に伴う重篤な合併症の報告以来、その病原性因子として大きな注目を集めてきたものが、白血球溶解毒素 (Leukocidin) の一つ、PVL (Panton-Valentine Leukocidin) であった。しかしながら、PVL homologue に関する研究、特に病原性因子として着目した研究は多くはなく、各種 Leukocidin の相互作用については未知の部分が多い。このような観点から、本研究は各種 Leukocidin の生物学的多様性や機能を網羅的に解析することを目的とし、そのことにより、CA-MRSA にとどまらず、黄色ブドウ球菌感染症における病態にこれら Leukocidin がどのように関わっているのかを解明する。本研究の最終的な目的は、黄色ブドウ球菌感染症の治療及び予防に資する知見を得ることであり、各種白血球溶解毒素 (Leukocidin) の生物学的活性 (好中球溶解活性を主要な指標とし、接着因子の誘導 etc) を明らかにする。また、各白血球溶解毒素の好中球溶解活性の発現に種差があるのかどうかを明らかにする。さらに、各種白血球溶解毒素 (Leukocidin) のクラス相互間作用を明らかにし、病原性への関与について培養細胞、感染モデルを用いて推定する。特に、今まで気付かれなかった leukocidin-like 遺伝子 MW1091/1092 が強毒 CA-MRSA 株 MW2 に存在することに注目し、その細胞障害活性と、PVL との相互作用を評価する。

## 3. 研究の方法

遺伝子をクローニングし、大腸菌でタンパクを発現、精製し、ヒトおよび動物の白血球に反応させ、傷害性を評価した。

## 4. 研究成果

市中獲得メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (CA-MRSA) MW2, USA300 が産生する新奇 leukocidin/hemolysin toxin

family protein の白血球傷害性の発現解析を目的に研究を実施した。強力な白血球溶解活性を有する毒素である Panton-Valentine leukocidin (PVL) 蛋白質を産生する CA-MRSA の代表株の一つである USA400 MW2 株を用いて白血球溶解毒素である *pvl* 遺伝子及び leukocidin 活性を有する既知の蛋白質である  $\gamma$ -hemolysin (*hlg*) 及び新奇毒素蛋白質をコードしていると推定される MW1941 及び MW1942 遺伝子の knock-out 株、並びにこれらの毒素遺伝子の double- 及び triple- knock-out 株を作製し、作製株の培養上清を用いて白血球溶解活性を評価した。その結果、*pvl* 遺伝子の欠失株では軽度から中等度の白血球溶解活性の低下が認められたのに対し、新奇毒素蛋白質である MW1941 及び MW1942 及び既知の  $\gamma$ -hemolysin (*hlg*) を knock-out した株では親株の MW2 株と有意な差がみられず、single knock-out 株では白血球溶解活性の残存が認められた。一方、PVL を含めた double- ( $\Delta pvl$ -  $\Delta hlg$  及び  $\Delta pvl$ -  $\Delta MW1941/MW1942$ ) 及び triple-knock-out 株 ( $\Delta pvl$ - $\Delta MW1941/MW1942$ - $\Delta hlg$ ) では、親株に比較して白血球溶解活性の有意な減少が観察され、triple-knock-out 株では、ほぼコントロールに近いレベルにまで溶解活性が低下した。これらのことから、これらの毒素蛋白質が複数共同して白血球溶解を惹起し、当該株の病原性の発揮に関与している可能性が示唆された。

より詳細な検討を行うため、クローニングにより未知の新奇毒素蛋白質である MW1941 及び MW1942 蛋白質を精製した。その結果、精製した rMW1941 及び rMW1942 蛋白質は単独ではヒト白血球溶解活性を示さず、両蛋白質の共存下でのみヒト白血球を溶解した。これらの結果から、新奇毒素蛋白質は、PVL や  $\gamma$ -hemolysin (*hlg*) 同様、2成分が組み合わさって白血球溶解活性を発揮する、2成分毒素 (SHT) であることが確認された。また、単独では、その活性の程度は PVL に比較してかなり弱く、近年報告された MSSA 株である Newman 株 が保有する orthologs 遺伝子のそれと活性に

差は認められないと判断された。これら一連の実験結果から、MW2 株が保有する leukocidin の中では、やはり、PVL がヒト白血球溶解に最も重要な役割を果たしていることが示唆された。なお、PVL と同様に、rMW1941/rMW1942 は、マウス腹腔浸出細胞 (PECs) には作用せず、さらに、ヒト由来の気道及び肺胞上皮細胞にも細胞死を惹起しなかった。RT-PCR の結果から、*pvl* を保有しない Newman 株で当該新規遺伝子の ortholog の発現が高いことが見いだされ、菌株間で優位に作用している leukocidin に相違があることが示唆された。この場合は、MW2, N315 など他の株と比較し、Newman では MW1941/1942 産生量が多く、そのことが比較的強い白血球傷害性の原因であると考えられた。

しかし、MW2 においては、PVL の産生が主ではあるが、MW1941/1942 の産生は、PVL と相乗的に働き、PVL の白血球毒性を増幅することが示唆された。従って、CA-MRSA 株 MW2 におけるヒト白血球傷害性に関しては、PVL が主原因であり、PVL 遺伝子を持たない黄色ブドウ球菌では、MW1941/1942 の大量産生によって白血球傷害がおきるものと考えられた。

## 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1件)

Isamu HONGO, Miki MATSUO, Shinya MIYAZAKI, Chikara KAITO, Teruyo ITO, Kazuhisa SEKIMIZU, and Keiichi HIRAMATSU. The pore-forming activities of Leukocidin/hemolysin toxin family proteins, MW1941 and MW1942 of community-acquired MRSA strain, MW2. Submitted to *Microbes and Infection*.

[学会発表] (計1件)

Isamu HONGO, Miki MATSUO, Teruyo ITO, Keiichi HIRAMATSU. Identification of novel Leukocidin/hemolysin toxin family proteins, MW1941 and MW1942 in *Staphylococcus aureus* XIII International Congress of

Bacteriology and Applied Microbiology  
(IUMS2011) 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平松 啓一 (HIRAMATSU KEIICHI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号 : 10173262