

氏 名(本籍)	よこ 横	た 田	けん 健	じ 治
学位の種類	博	士	(農	学)
学位記番号	農	博	第	622号
学位授与年月日	平	成	12年	3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科農芸化学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	黄色ブドウ球菌の γ -ヘモリジンの構造及び作用機構に関する研究			
論文審査委員	(主	査)	教	授
			神	尾
			好	是
			勝	亦
			勝	一
			五	味
			勝	也

論文内容要旨

序論

膜孔形成型血球崩壊毒素の毒素活性の発現には、毒素タンパク質の標的細胞表面のレセプター分子の認識及び結合、そして膜孔形成過程における集合・複合体化並びに膜への挿入が重要な要因となる。黄色ブドウ球菌は自然界に広く存在して、日和見感染により敗血症などを引き起こす病原性細菌である。黄色ブドウ球菌の産生する種々の毒素タンパク質の中で、赤血球及び白血球を崩壊する血球崩壊毒素には、現在までに赤血球崩壊毒素として α -、 β -、 δ -、 γ -の4種類のヘモリジンと白血球崩壊毒素ロイコシジンが見いだされている。著者の在籍する応用微生物学研究室では、前述の血球崩壊毒素の中で、毒素活性発現に二種類のタンパク質を要求する二成分性血球崩壊毒素 γ -ヘモリジン及びロイコシジンについて研究が進められている。そして現在までに、神尾らにより γ -ヘモリジンとロイコシジンはLukF (34kDa) を共通成分として、Hlg2 (32kDa) との共同で赤血球崩壊活性を示し、LukS (32.5kDa) との共同で白血球崩壊活性を示すこと、小沢らにより γ -ヘモリジンでは、赤血球へLukF、Hlg2の順序で結合すること、そして菅原らによりLukFとHlg2は分子比1対1で、赤血球膜上に約200kDaのリング状の膜孔を形成することが明らかにされた。一方、フランスのPiemontらにより黄色ブドウ球菌の産生するもう一つの二成分性毒素Panton-Valentine型ロイコシジン (PVロイコシジン) の遺伝子がクローン化され、前述のロイコシジンLukF、LukS成分と各々、70%以上の相同性を有するLukF-PV (34.4kDa)、LukS-PV (32.4kDa) の存在が明らかにされた。更に、 γ -ヘモリジンとロイコシジン、PVロイコシジンを構成するクラスF (LukFとLukF-PV) とクラスS (Hlg2とLukS、LukS-PV) の組み合わせによる白血球崩壊活性が検討され、ロイコシジンとPVロイコシジンでは各々のクラスF、クラスS成分の組み合わせでも、ほぼ同様の白血球崩壊活性を示すことが明らかにされた。当研究室では成谷らにより前述の5種類のクラスFとクラスSの成分の組み合わせによるウサギ赤血球崩壊活性が比較検討された。その結果LukFとLukF-PVは72%の非常に高いアミノ酸配列の相同性を有するにもかかわらず、Hlg2との共同によるウサギ赤血球崩壊活性では、LukF-Hlg2のヘモリジン活性を100%とすると、LukF-PV-Hlg2は0.08%という極端に低い赤血球崩壊活性を示す事実が明らかになった。

当研究室において、成谷らによりHlg2はLukSと72%の同一なアミノ酸配列を有するにもかかわらず、LukF共存下での厳密な標的細胞崩壊活性の特異性を有することが明らかにされた。そしてHlg2とLukSのキメラタンパク質の解析から、Hlg2のK²³RLAI²⁷の配列はLukSの対応するNKWGV配列と置換することでLukFとの共同によるヘモリジン活性が3.3%に減少する重要なアミノ酸配列であることが明らかにされた。一方、黄色ブドウ球菌P83株の産生するHlg2はArg²¹⁷がLysとなっており、1アミノ酸残基の相違がLukFとの共同によるヘモリジン活性を43%に減少することが見いだされている。

本博士論文では、まず、LukFとLukF-PVのHlg2との共同によるヘモリジン活性の差異は、LukF-PVの赤血球への結合能がLukFと比較して非常に低いことに起因することを明らかにした。また、LukFのphosphatidylcholineへの結合は γ -ヘモリジン活性の発現に必須であるが、LukFの赤血球への結合には重要でないこと、LukFのTyr⁷²とTyr²⁰³は各々、LukFの赤血球への結合に重要であることを明らかにした。一方、Hlg2においてK²³RLAI²⁷セグメントとArg²¹⁷残基がヘモリジン活性に必須であることを明らかにした。

第1章 LukFの三次元構造と赤血球崩壊活性発現機構の解明

1 LukFとLukF-PVの構造の比較とHlg2との共同によるヘモリジン活性の発現過程における差異

1-1 LukFとLukF-PVの三次元構造の比較

米国コロンビア大学のGouauxらのグループとの共同でX線結晶構造解析によるLukF成分の三次元構造を明らかにした (Fig. 1.)。一方、フランスのPrevostらによりLukF-PVのX線結晶構造が一ヶ月後に明らかにされた (Fig. 2.)。両者の三次元構造は、ほぼ同一であることから、Hlg2との共同によるヘモリジン活性の差異はLukFとLukF-PVの一次構造の相違に起因するものであった。

1-2 LukFとLukF-PVの赤血球崩壊過程における相違

γ -ヘモリジンの赤血球崩壊過程において、LukFはHlg2よりも先に赤血球へ結合する重要な成分である。そこでLukFとLukF-PVのヒト赤血球に対する結合能を比較した。LukF-Hlg2が90%の溶血を引き起こす毒素濃度で、LukFの結合量を100%とするとLukF-PVは3%であった (Fig. 3.)。この結合能の差異がLukFとLukF-PVのヘモリジン活性の相違に影響を及ぼしていた。

1-3 LukFとLukF-PVのキメラタンパク質の解析

第1章1-1から、LukFとLukF-PVのHlg2との共同によるヘモリジン活性の差異は各々の一次構造の相違に起因するものであった。LukFとLukF-PVは72%の同一なアミノ酸配列を有する非常に相同性の高いタンパク質である (Fig. 4.)。そこで、LukFとLukF-PVのキメラタンパク質を作製して、解析を行った (Fig. 5.)。その結果、LukFの40から90アミノ酸残基までの領域をLukF-PVの領域に置換したMLPF23では、Hlg2との共同によるヘモリジン活性が24%にまで減少し、LukFの40から218アミノ酸残基ま

での領域をLukF-PVの領域と置換したMLPF21では全くヘモリジン活性が検出されなかった。両キメラタンパク質のヒト赤血球結合量はLukFと比較して、MLPF23は30%、MLPF21は5%に減少した。以上の事より、LukFの赤血球への結合に重要なアミノ酸残基はLukFの40から218の領域に存在していることを明らかにした。

2 LukF及びLukF-PVのphosphatidylcholineへの結合と赤血球崩壊活性及び赤血球への結合の相関

2-1 LukF-PVのphosphatidylcholine結合能とphosphatidylcholine-LukF複合体のヘモリジン活性及び赤血球結合能

東大医科研の野田らにより、LukFはphosphatidylcholineへ分子比1対1で結合すること、そしてphosphatidylcholineはLukFとLukSの共同によるロイコシジン活性を阻害することが報告されている。そこで、LukF-PVのphosphatidylcholineへの結合能を測定した (Fig. 6.)。LukF-PVはLukFと同様に、モル比50倍量のdipropionyl phosphatidylcholineと37℃、1時間、インキュベートすることで、モル比1対1で結合した。この結果を踏まえ、LukFのphosphatidylcholineへの結合と赤血球結合能との相関関係を明らかにした。ゲルろ過クロマトグラフィーにより得られた分子比1対1のLukF-phosphatidylcholine複合体は、LukFと同様のHlg2との共同によるヘモリジン活性、赤血球結合能及び約200kDaのHlg2との膜孔複合体形成能を示した (Fig. 7.)。以上の結果より、LukFはphosphatidylcholineを予め結合させても十分なヘモリジン活性を示すことを明らかにした。

2-2 膜孔形成過程におけるLukFのphosphatidylcholineへの結合の意義

LukF-phosphatidylcholine複合体の三次元構造解析から、LukFのTrp¹⁷⁷とArg¹⁹⁸は、phosphatidylcholineへの結合に重要であることを明らかにした (Fig. 8.)。そこで、これら2アミノ酸残基の各々、または両方をThrとした変異タンパク質を作製して、解析を行った (Fig. 9.)。Trp¹⁷⁷をThrに置換したLFW177T及びArg¹⁹⁸をThrに置換したLFR198Tは、phosphatidylcholine結合能を欠失して、Hlg2との共同によるヘモリジン活性がいずれも4%以下にまで減少した。また、上述の2アミノ酸残基をThrに置換した変異タンパク質LFW177TR198Tは、phosphatidylcholine結合能を欠失して、Hlg2とのヘモリジン活性は全く検出されなかった。以上のことから、LukFのphosphatidylcholineへの結合はヘモリジン活性の発現に重要であることを明らかにした。しかしながら、上述のいずれの変異タンパク質も、LukFと比較して70%以上の高いヒト赤血球結合能を有し

ていた。この事から、LukFのphosphatidylcholineへの結合は、LukF-Hlg2複合体の膜孔形成に重要であることを明らかにした。

3 LukFの赤血球への結合に重要なアミノ酸残基の特定

第1章2の結果より、LukFの赤血球膜への結合にはphosphatidylcholine結合サイト以外の重要なアミノ酸残基の存在が強く示唆された。LukFの三次元構造の解析により、推定された赤血球膜結合領域には、4つの芳香族アミノ酸残基が、各々の側鎖をLukF分子の表面に露呈して存在していた (Fig. 10.)。そこで、これら4アミノ酸残基のうち、LukF-PVと異なるTyr⁷²、Tyr²⁰³、Phe²⁶⁰の3アミノ酸残基をLukF-PVの相当するThr、Asn、Leuに各々、置換した変異タンパク質を作製して、解析を行った (Fig. 11.)。LukFのPhe²⁶⁰をLeuに置換したLFF260LはHlg2との共同により、100%のヘモリジン活性を示した。一方、LukFのTyr⁷²をThrと置換したLFY72TはHlg2とのヘモリジン活性が20%にまで減少した。そして、Tyr²⁰³をAsnと置換したLFY203NはHlg2とのヘモリジン活性を全く示さなかった。Tyr⁷²とTyr²⁰³の変異タンパク質の赤血球膜への結合量は、LukFと比較して、各々、33%と4%に減少した。以上の事から、LukFのTyr⁷²とTyr²⁰³を赤血球への結合に重要なアミノ酸残基であると同定した。

第2章 Hlg2の赤血球崩壊活性発現に必須なアミノ酸残基の同定

Hlg2のK²³RLAI²⁷とArg²¹⁷を各々、NKWGVとLysに置換した変異タンパク質MHS-DRKを構築して、解析を行った。MHS-DRKは、LukF共存下でHlg2が37℃、30分で1x10⁸/350 μLのヒト赤血球を完全溶血する8.6pmol/mlの濃度で全く赤血球崩壊活性を示さなかった (Fig. 12.)。また、ヒト赤血球寒天平板を用いて、毒素濃度600pmol/ml、37℃、6時間インキュベートしても全く赤血球崩壊活性を示さなかった (Fig. 13.)。一方、LukF共存下でLukSは前述のヒト赤血球寒天平板を用いたアッセイで全く赤血球崩壊活性を示さないのに対して、LukSのLys²²⁰をArgに置換したMLSKRは1アミノ酸残基の置換で赤血球崩壊活性を発現した。そしてLukF共存下でのヒト赤血球への結合量はHlg2を100%とすると、Hlg2(P83)は50%、MHS-Dは13%、MLSKRは10%、そしてMHS-DRKとLukSは全く検出されなかった (Fig. 14.)。以上の事から、Hlg2のK²³RLAI²⁷とArg²¹⁷はLukFを結合させた赤血球への結合、並びにγ-ヘモリジンの活性発現に重要であることを明らかにした。

以上の私の研究成果を総括し、 γ -ヘモリジンの膜孔形成過程を提唱した (Fig. 15.)。LukFはTyr⁷²とTyr²⁰³を中心として赤血球膜上の未知のレセプター分子に結合する。赤血球膜に結合したLukFにHlg2がK²³RLAI²⁷とArg²¹⁷で結合して、分子比1:1のLukF-Hlg2複合体を形成する。そして、LukFの赤血球膜のphosphatidylcholineへの結合に伴い、膜貫通性のリング状の構造体となり、赤血球を崩壊する。

総括

1) LukFとLukF-PVのHlg2との共同によるヘモリジン活性の差異は、LukF-PVの赤血球結合能が低下していることに起因していた。

2) LukF-PVはLukFと同様にphosphatidylcholineと分子比1対1で結合した。また、phosphatidylcholineをあらかじめ結合させたLukFは、赤血球膜に結合し、Hlg2と赤血球膜上に膜孔を形成した。LukFのphosphatidylcholineへの結合は赤血球崩壊に必須のものであった。さらに、LukFのphosphatidylcholine結合能を欠失した変異タンパク質は赤血球結合能を有しているが、膜孔は形成しなかった。

3) LukFのTyr⁷²とTyr²⁰³は赤血球への結合に重要であり、これら2アミノ酸残基はphosphatidylcholineとは異なる赤血球膜への結合に重要であった。

4) Hlg2のK²³RLAI²⁷とArg²¹⁷の両者はLukFを作用させた赤血球への結合に重要であり、LukFとの共同による赤血球崩壊活性の発現に必須のアミノ酸残基であった。

原著論文

1) Yokota, K., N., Sugawara, H., Nariya, J., Kaneko, T., Tomita, and Y., Kamio (1998), Further study on the two pivotal parts of Hlg2 for the full hemolytic activity of Staphylococcal γ -hemolysin, *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**, 1745-1750.

2) Yokota, K., and Y., Kamio, Phosphatidylcholine required for the active pore formation of the γ -hemolysin on the human erythrocytes, manuscript in preparation.

參考論文

- 1) Olson, R., H. Nariya, K. Yokota, Y. Kamio, and E. Gouaux (1999), Crystal structure of Staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel, *Nature Structural Biology* **6**, 134-140.



Fig. 1. Three-dimensional structure of LukF. Blue, β -Sandwich domain; red, Rim domain; green, Pre-stem region.

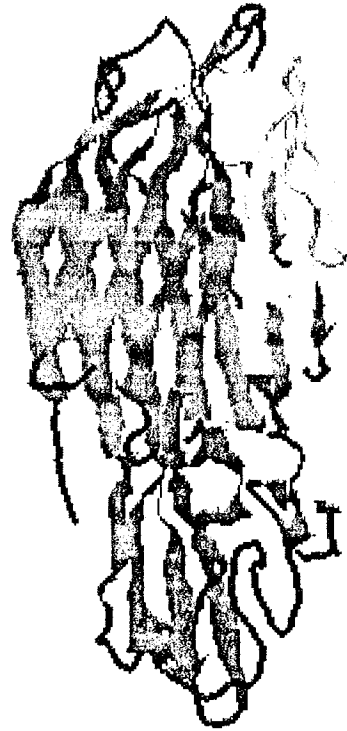


Fig. 2. Three-dimensional structure of LukF-PV. Colors were same as fig.1.

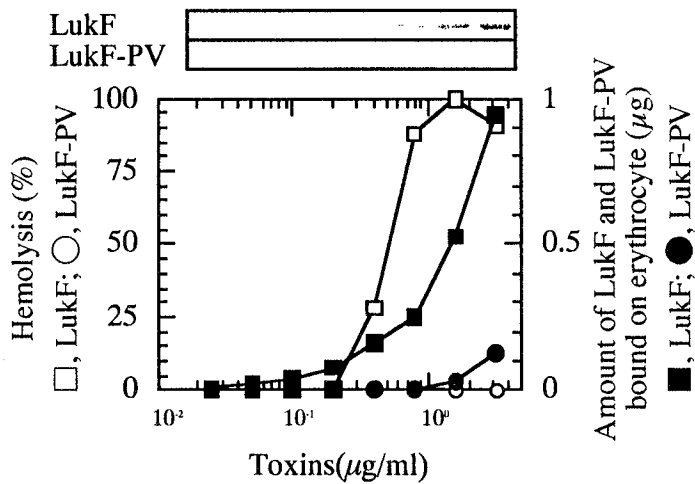


Fig. 3. Hemolytic activity and binding ability of LukF and LukF-PV with Hlg2 on human erythrocytes.

10^8 cells of human erythrocytes were incubated with each concentrations of toxins for 1hr at 37°C . After incubation, membrane fraction of toxin bound erythrocytes were boiled with 1% of SDS and analyzed to SDS-PAGE and Western-immunoblotting.

LukF AEGKITPVSVKKVDDKVTLYKTTATADSDKFKISQILTFNFIKDKSYDKD
LukF-PV A-QHITPVSEKKVDDKIITLYKTTATSDSKLTKISQILTFNFIKDKSYDKD

LukF TLVLKATGNINSGFVKPNPNDYDFSKLYWGAKYNVSTISSQSNDSVNVVDY
LukF-PV TLILKAAGNTYSGYTKPNPKDTISSQFYWGSKYNISINSDSNDSVNVVDY

LukF APKNQNEEFQVQNTLGYTFGGDISTSINGLSSGLNGNTAFSETINYKQESY
LukF-PV APKNQNEEFQVQNTVGYSYGGDINISINGLSSGGNGSKSFSETINYKQESY

LukF RTTILSRNTNYKNGWGWVEAHKIMNNGWGPYGRDSFHPPTYGNEELFLAGRQS
LukF-PV RTSLDKRTNFKKIGWVEAHKIMNNGWGPYGRDSYHISTYGNEVFLGSRQS

LukF SAYAGQNFIAQHOMPLLRSNFNPEFLSVLSHRODGAKKSKITVTYQREM
LukF-PV NLNAGQNFLEYHKMPVLSRGNFNPEFIGVLSRKQNAAKKSKITVTYQREM

LukF DLYQIRWNGFYWAGANYKNFKTRTFKSTYEDWENHKVKLLDT--KETEN
LukF-PV DRYTNFWNLHWIGNNYKDENRATHTSIYEDWENHTVKLLDTQSKEKNP

LukF NK
LukF-PV MS

Fig. 4. Comparison of deduced amino acid sequences of LukF and LukF-PV.

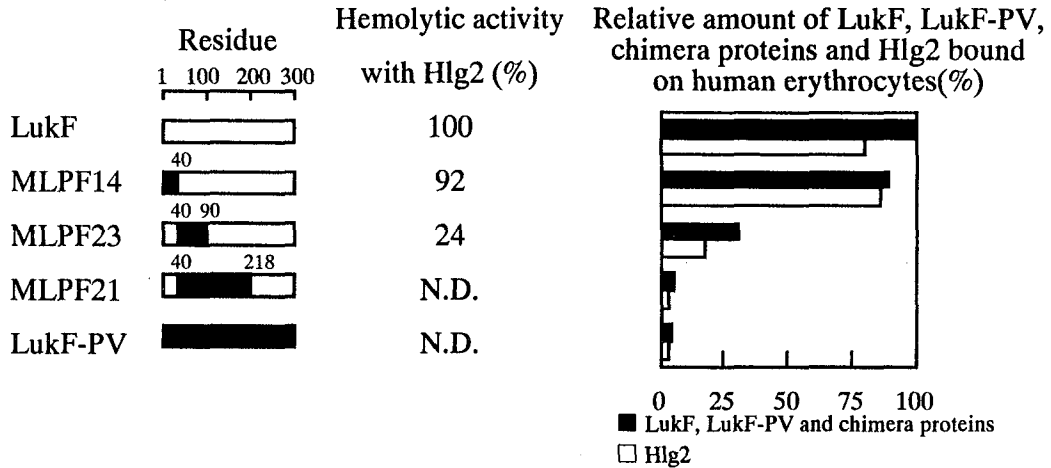


Fig. 5. Hemolytic activity and binding ability of LukF, LukF-PV and chimera proteins with Hlg2 on human erythrocytes.

Hemolytic activity and binding ability were performed as fig. 3. N.D., not detectable.

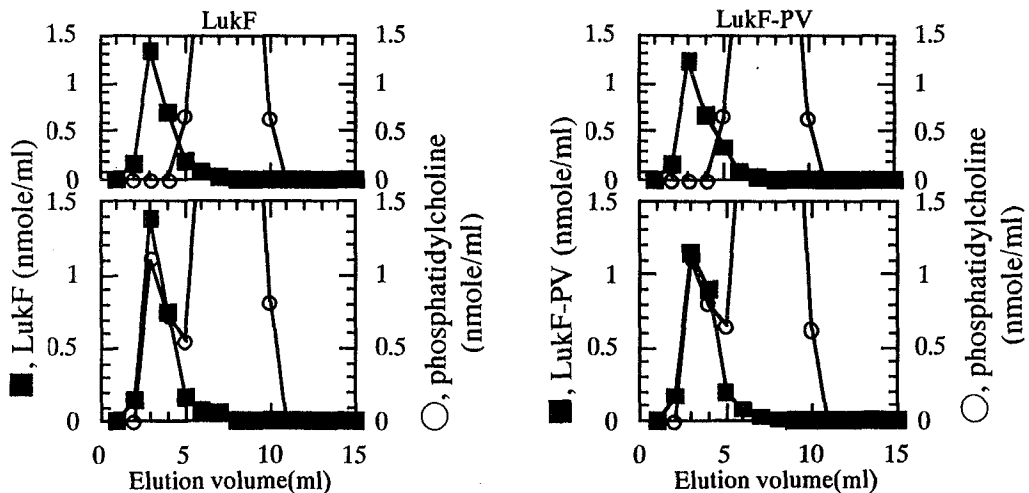


Fig.6. Binding ability of LukF and LukF-PV to phosphatidylcholine.

LukF or LukF-PV was incubated with dipropionoyl phosphatidylcholine at 1:50 mole ratio for 1hr at 37°C. After incubation, mixtures were applied to Sephadex G-25 gel filtration column. Proteins were measured by Western-immunoblotting, and measurement of phosphatidylcholine was performed by phosphorus assay.

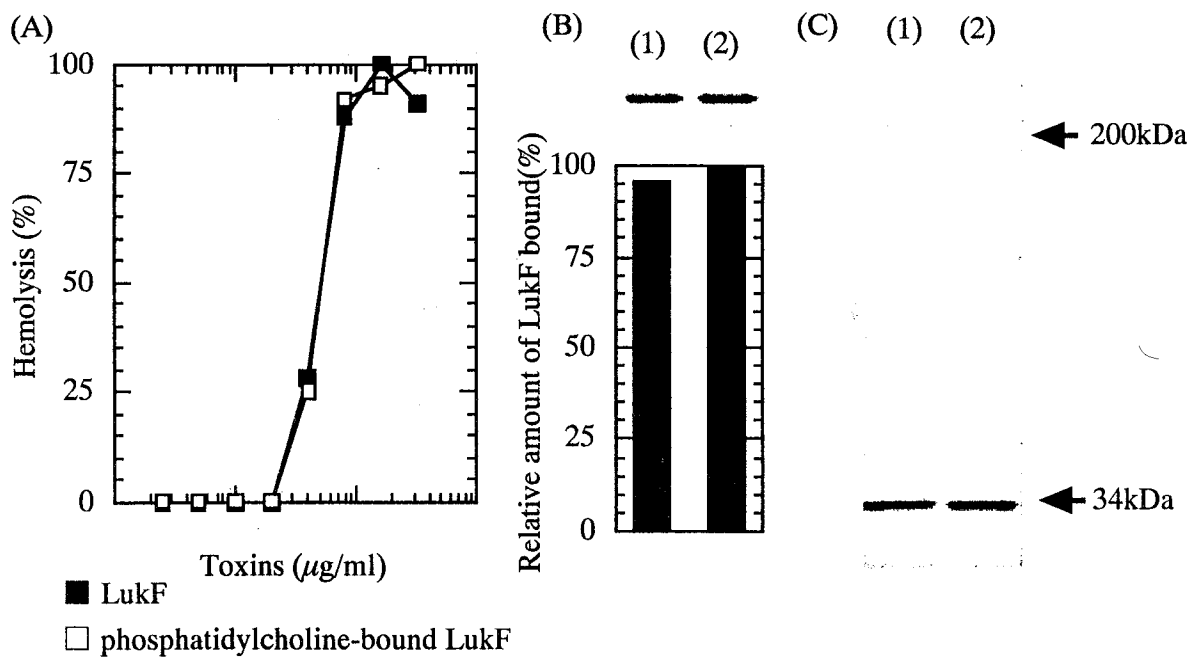


Fig. 7. Comparison of phosphatidylcholine-bound LukF and LukF.

(A), Hemolytic activity with Hlg2; (B), Binding ability to human erythrocytes; (C), Complex formation with Hlg2 on erythrocyte membrane.

In panels (B) and (C), (1) and (2) were indicated phosphatidylcholine-bound LukF and LukF, respectively. Hemolytic activity and binding ability were performed as fig. 3. For detection of LukF-Hlg2 complex, toxin bound human erythrocyte membrane was treated with 1% SDS at 20°C and analyzed by SDS-PAGE (3-14% acrylamide) and Western-immunoblotting by using anti LukF antibody.

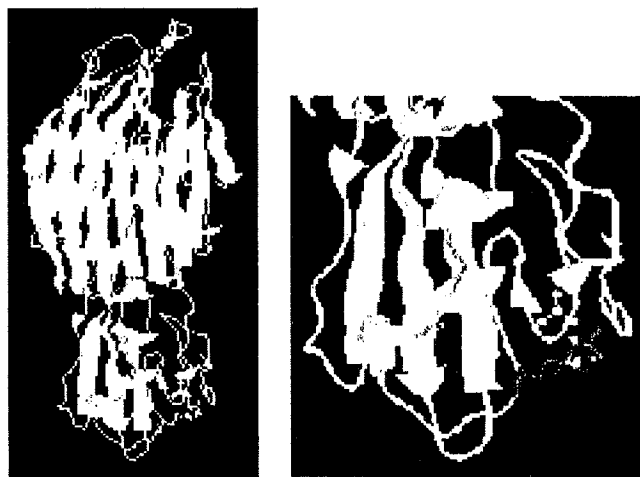


Fig. 8. Three-dimensional structure of phosphatidylcholine-bound LukF. Green and blue were side chains of Trp177 and Arg198, respectively.

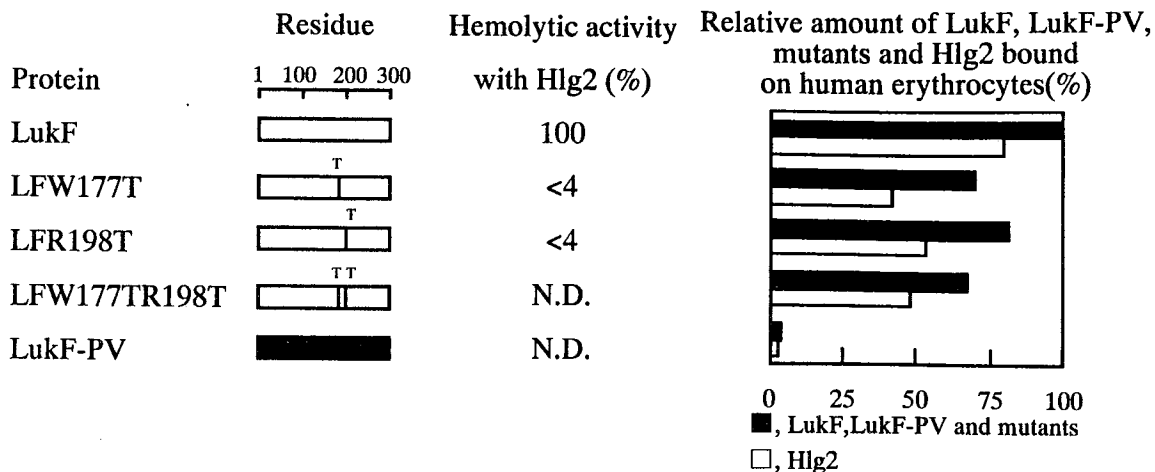


Fig. 9. Hemolytic activity and binding activity of LukF, LukF-PV and mutants in phosphatidylcholine binding site with Hlg2 on human erythrocytes. Hemolytic activity and binding activity were performed as fig.3. N.D., not detectable.

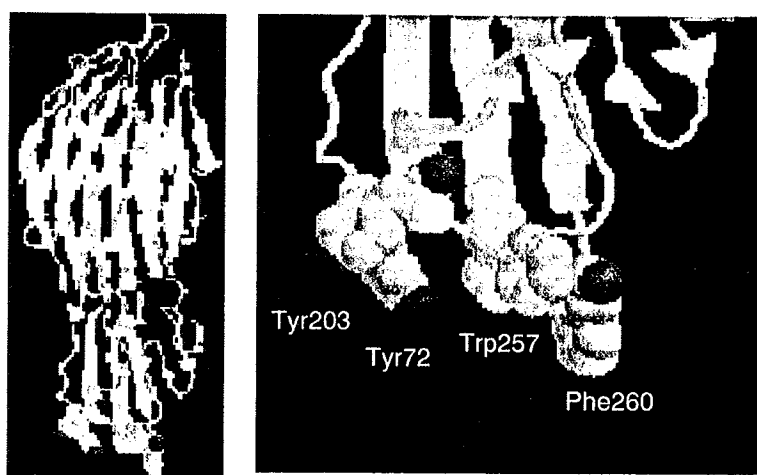


Fig. 10. Three-dimensional structure of LukF. Four-aromatic amino acid residues in deduced erythrocyte membrane binding domain were indicated with spacefill.

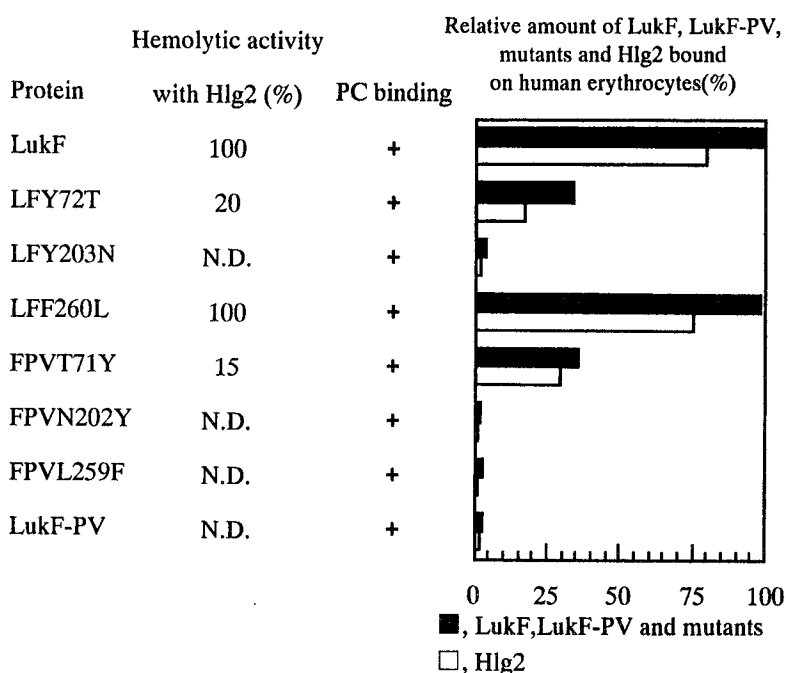


Fig. 11. Hemolytic activity and binding ability to phosphatidylcholine and on human erythrocytes of LukF, LukF-PV and mutants in deduced membrane binding domain with Hlg2. Hemolytic activity and binding activity were performed as fig.3. N.D., not detectable

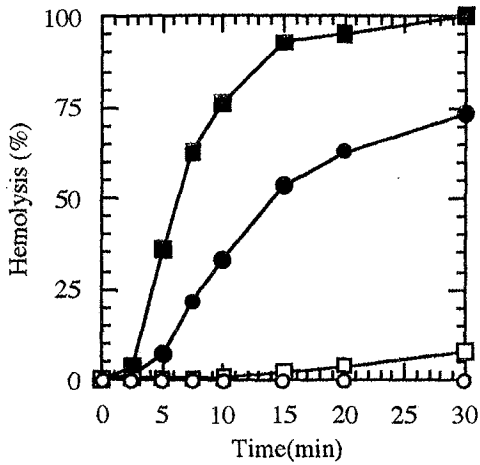


Fig. 12. Course of hemolysis of human erythrocytes by Hlg2 or the mutant proteins in the presence of LukF.

Human erythrocytes (1×10^8 cells in $350 \mu\text{l}$ of PBS) were incubated at 37°C with 3 pmole of either Hlg2 (■), Hlg2(P83) (●), MHS-D (□), or MHS-DRK (○). The concentration of each component in the reaction mixture was 8.6 pmole/ml . At the time indicated, the reaction mixture was taken up and centrifuged at 8000 xg for 1 min. The supernatant was assayed for hemoglobin at 541 nm .

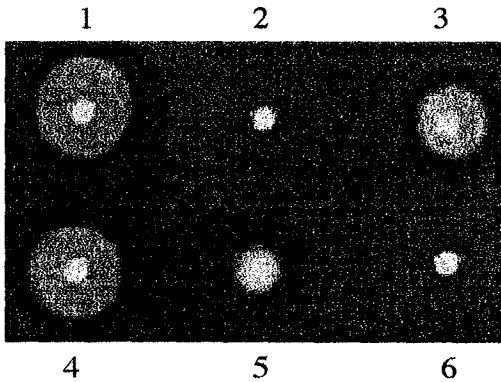
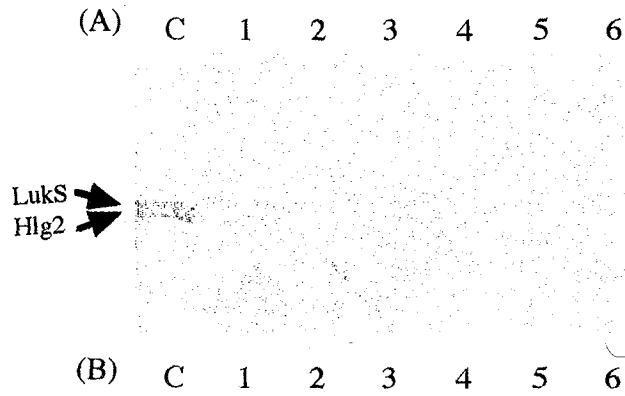


Fig. 13. Hemolytic activity of Hlg2, the mutant proteins, and LukS in the presence of LukF on human blood agarose plate.

Wells 1, 2, 3, 4, 5 and 6 contained Hlg2, MHS-DRK, MHS-D, Hlg2(P83), MLSKR, and LukS, respectively. The concentration of each component was adjusted to 600 pmole/ml in PBS. The amount of each component put in the well was 3 pmole. All wells also contained LukF (3 pmole) of which concentration was also 600 pmole/ml . The plate was incubated at 37°C for 6 hr.



(B) C 1 2 3 4 5 6

(C)

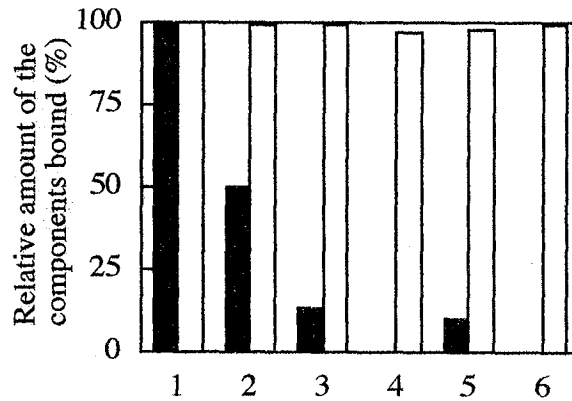


Fig. 14. Immunoblotting analysis of the erythrocyte-bound Hlg2, LukS, and their mutant proteins by using a mixture of anti-Hlg2 and anti-LukS antibodies (A), and anti-LukF antibody (B), and the quantitative representation of the components bound to the erythrocytes (C).

Human erythrocytes (2×10^8 cells in 0.7 ml of PBS) were incubated with 15 pmole of LukF and 15 pmole of either Hlg2 (lane 1), Hlg2(P83) (lane 2), MHS-D (lane 3), MHS-DRK (lane 4), MLSKR (lane 5), or LukS (lane 6) were incubated simultaneously at 37°C . After 10 min of incubation, the membrane fractions were solubilized with 1% of SDS at 100°C and analyzed by SDS-PAGE (8% acrylamide) and western immunoblotting.

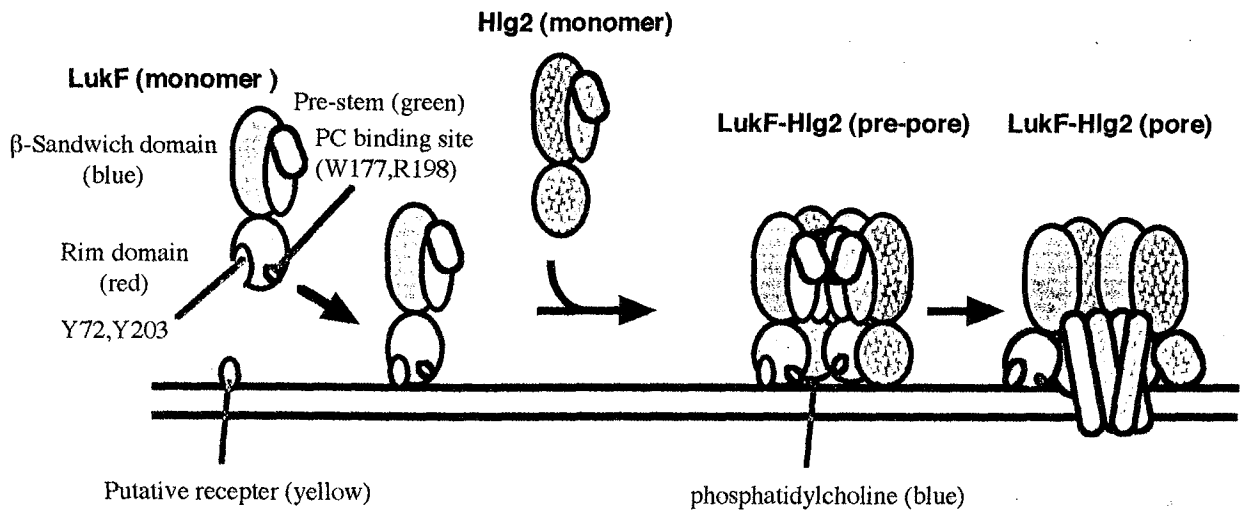


Fig. 15. Proposed assembly process of the γ -hemolysin components.

論文審査結果要旨

黄色ブドウ球菌の γ -ヘモリジン及びロイコシジンは二成分性の血球崩壊毒素である。これまでに、 γ -ヘモリジンはLukF(34kDa)及びHlg2(32kDa)から成り、赤血球膜にLukF, Hlg2の順に結合して、両成分が1対1からなる約200kDaの膜孔を形成して赤血球を崩壊することが明らかにされている。一方、ロイコシジンはLukF及びLukS(32.5kDa)から成り、白血球崩壊活性を示すことが明らかにされている。さらにLukFは両毒素の活性発現に必須な共通の成分であることが明らかにされている。黄色ブドウ球菌のロイコシジンには、前述のLukF, LukSの他に、LukF-PV(34.4kDa)とLukS-PV(32.4kDa)から成るPanton-Valentine型ロイコシジンが存在する。クラスF成分(LukF, LukF-PV)とクラスS成分(Hlg2, LukS, LukS-PV)はそれぞれ、約70%の同一なアミノ酸配列を有する非常に相同性の高いタンパク質である。各毒素成分の組合せによるヘモリジン活性とロイコシジン活性が比較検討され、クラスF成分はLukS, LukS-PVの何れの組合せでも同様の高いロイコシジン活性を示すが、Hlg2共存下でのヘモリジン活性は、LukFと比較してLukF-PVは極めて低い毒素活性を示すことが報告されている。

本研究において、まず本研究者は以下の事項を明らかにした。(1)水溶性モノマーのLukFの三次元構造を米コロンビア大のGouauxらの研究グループとの共同で明らかにした。LukFは七量体膜孔の状態の黄色ブドウ球菌の α -ヘモリジンと極めて類似した三次元構造を有しており、 γ -ヘモリジンの膜孔形成過程の動的な挙動を推測した。(2)Hlg2共存下でのLukFとLukF-PVのヘモリジン活性の差はLukF-PVがLukFと比較して極めて低い赤血球結合能を示すことに起因することを明らかにした。(3)LukFとLukF-PVは何れも、血球膜の主要構成成分であるphosphatidylcholineと分子比1対1で結合し、LukFのW177残基とR198残基が結合に重要なアミノ酸残基であることを明らかにした。また、phosphatidylcholineをあらかじめ結合させてもLukFはHlg2との共同で十分なヘモリジン活性を示した。(4)LukFの赤血球膜への結合に関与するアミノ酸残基としてY⁷²残基とY²⁰³残基を同定した。(5)Hlg2のK²³RLAI²⁷セグメントとR²¹⁷残基は、LukFを作用させた赤血球膜への結合に重要であり、これら6アミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置換した変異タンパク質はLukF共存下で全くヘモリジン活性が検出されなくなることを明らかにした。

以上のように本研究は、黄色ブドウ球菌の生産する γ -ヘモリジンLukF及びHlg2の構造と作用メカニズムを解明したものであり、審査員一同は、本研究者に博士(農学)の学位を授与するのに値するものと認定した。