

氏 名(本籍)	にし 西	やま 山	あき 晃	ひと 史
学位の種類	博	士	(農	学)
学位記番号	農	博	第	744号
学位授与年月日	平	成	15年	3月24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応用生命科学専攻 (博士課程)			
学位論文題目	ブドウ球菌白血球崩壊毒素ロイコシジンのリン酸化と毒 素活性			
論文審査委員	(主 査)	教 授	神 尾	好 是
	(副 査)	教 授	中 島	佑
		教 授	五 味	勝 也

論文内容要旨

第1章 緒言

Staphylococcus aureus (以下、*S. aureus*) は自然界に広く分布しているヒトの常在菌である一方、ヒトや動物の細菌感染症の代表的な起因菌としても知られている。*S. aureus* は α -、 β -、 γ -、及び δ -hemolysin、leukocidin、コアグラゼ、エンテロトキシン A-O、毒素性ショック症候群毒素-1 (TSST-1) 等多くの病原因子を産生、分泌し、毒素性食中毒、毒素性ショック症候群、皮膚感染症、多剤耐性菌 MRSA による院内感染、ウシの乳房炎など様々な感染症を引き起こす。これらの感染症の治療法の確立には多剤耐性菌の出現防止の観点から考えても病原因子の詳細研究が不可欠である。従って、当研究室ではこれら病原因子のうち特にヒト及びウサギ白血球崩壊毒素 leukocidin (以下、Luk)、ヒト及びウサギ赤血球崩壊毒素 γ -hemolysin (Hlg) について詳細な研究を行ってきた。

Luk は 32.5 kDa の LukS と 34 kDa の LukF の二成分から成り、この両者が共同してヒト及びウサギの多形核白血球、単球、及びマクロファージを崩壊する。また、ウサギ赤血球に対しても溶血性を示す。一方、Hlg は 31 kDa の Hlg2 と LukF の二成分からなり、ヒト及びウサギ赤血球を崩壊する。Luk と Hlg は LukF を共通成分としており、LukS と Hlg2 が全く異なる血球特異性を決定している。しかしながら、LukS と Hlg2 は一次構造で約 80% の相同性 (同一のアミノ酸が 72%) を有している。従って、当研究室の成谷が LukS と Hlg2 の特異性を決定するドメインを同定するため、両成分の高い相同性を利用し、一連のキメラ成分を構築して解析を行った。その結果、LukS の Ser¹⁶⁴ 以降の C 末端領域に Luk の白血球特異性を決定する領域が存在する事を明らかにした。また、当研究室の菅原らにより両毒素が膜孔形成毒素であることが証明され、標的細胞膜上より両毒素の膜孔複合体が単離された。さらに両毒素の膜孔複合体は二成分が 3:4 又は 4:3 で会合していることが明らかにされた。

本研究において、私は *S. aureus* の産生する Luk の白血球崩壊機構の解明を目的とした。そして、LukS の Ser¹⁶⁴ 以降の C 末端領域に注目して解析を行い、Luk の白血球崩壊活性を担う LukS の最小必須領域 box Z (I²⁴²KRST²⁴⁶) を同定した。また、Luk の白血球崩壊活性の発現に box Z での LukS のリン酸化が必須である事を証明した。さらに、*Staphylococcus intermedius* (以下、

S. intermedius) の産生するヒト及びウサギ白血球崩壊毒素 Luk-I (LukS-I, LukF-I) の活性発現に LukS とは異なる部位 box I (K¹³⁶KIS¹³⁸) での LukS-I のリン酸化が必須であることを明らかにし、class S 成分のリン酸化が leukocidin のヒト白血球崩壊活性の発現に必須であることを明らかにした。

第 2 章 Luk のヒト白血球崩壊活性に対する LukS のリン酸化の関与

2-1 LukS 及び Hlg2 の一次構造の比較

Luk と Hlg の class S 成分である LukS と Hlg2 は全く異なる血球特異性を示すにもかかわらず 80% という高い相同性を有する (Fig. 1)。当研究室の成谷による両成分のキメラタンパク質を用いた研究から LukS の Ser¹⁶⁴ 以降の C 末端領域にヒト白血球崩壊活性の発現に必須な領域が存在することが明らかにされた。従ってこの領域を検索した結果、私は LukS にのみ存在する I²⁴²KRST²⁴⁶ という配列を見出した (Fig. 1, box Z)。興味深いことにこれら 5 残基のうちの K²⁴³RST²⁴⁶ は真核細胞の cAMP-dependent protein kinase (以下、PKA) によるリン酸化認識配列であった。PKA は真核細胞由来の protein serine/threonine kinase で、標的タンパク質の K/R-K/R-X-S/T というモチーフを特異的に認識し、Ser 又は Thr 残基をリン酸化する。Ser 残基に対してより高い基質特異性を示すことが報告されている。よって、LukS に特徴的な I²⁴²KRST²⁴⁶、特に PKA によるリン酸化部位 Thr²⁴⁶ に注目してヒト白血球崩壊活性を担う LukS の必須領域の探索、及び Luk のヒト白血球崩壊活性の発現機構の解析を行った。

2-2 Luk のヒト白血球崩壊活性を担う LukS の最小必須領域の同定

LukS の K²⁴³RST²⁴⁶ の推定リン酸化部位 Thr²⁴⁶ を Ser、Tyr、又は Ala に変換した変異体 MLS-TS、MLS-TY、及び MLS-TA を作製し、解析した。その結果、MLS-TS は LukS の 10 倍のヒト白血球崩壊活性を示した (Fig. 2, lanes 1 and 2)。一方で、MLS-TA 及び MLS-TY は LukF と共同してヒト白血球を膨潤させたが崩壊しなかった (Fig. 2, lanes 3 and 4)。さらに、Hlg2 に LukS の box Z を挿入することで Hlg2 に白血球崩壊活性を導入できた (Fig. 2, lanes 5 and 6)。よって以上の結果から LukS の box Z (I²⁴²KRST²⁴⁶) を Luk

のヒト白血球崩壊活性を担う最小必須領域であると同定した。さらに Luk のヒト白血球崩壊活性の発現に PKA による LukS のリン酸化が関与していることが示唆された。

2-3 Luk のヒト白血球崩壊活性への LukS のリン酸化の関与

Luk のヒト白血球崩壊活性への LukS のリン酸化の関与を検討した。まず、LukS が PKA の基質となるかどうか検討するため、LukS、Hlg2 及び各変異体 を無細胞系、PKA (catalytic subunit from bovine heart PKA) 及び $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下で反応させた。その結果、全ての成分の活性体はほとんどリン酸化されなかった (Fig. 3)。しかし、 100°C 、5 min 熱処理した LukS は活性体の 100 倍も強くリン酸化された (Fig. 3, lanes 1 and 2)。また、熱処理した MLS-TS (T246S) は熱処理した LukS よりも 4 倍も強くリン酸化された (Fig. 3, lanes 2 and 4)。さらに、Hlg2 に box Z を挿入した MHS-Z は熱処理することで、わずかではあるが ^{32}P の放射活性の取り込みが増加した (Fig. 3, lanes 9 and 10)。しかしながら、崩壊活性を示さなかった成分は熱処理してもほとんどリン酸化されなかった。以上の結果から、LukS が PKA の基質になることを明らかにし、さらに Luk のヒト白血球崩壊活性の発現に PKA による LukS のリン酸化が関与していることが強く示唆された。

そこで、LukS のヒト多形核白血球存在下でのリン酸化を検討した。 $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$ 存在下で LukS 単独、又は LukS、LukF で処理したヒト多形核白血球の lysate から抗 LukS 抗体を用いた免疫沈降反応で沈降物を回収した。沈降物を SDS-PAGE 及び western immunoblotting に供し、 ^{32}P の放射活性をイメージスキャナーで解析した。その結果、LukS を単独、及び LukF と共同して作用させた試料において、抗 LukS 抗体で検出した LukS のバンド (Fig. 4, lanes S) と一致する ^{32}P の放射活性を持つバンドが検出された (Fig. 4, lanes 1 and 2)。MLS-TA (T246A) を作用させた試料では同様のバンドは検出されなかった (Fig. 4, lane 3)。さらに、このリン酸化が PKA によるものかどうか検討するため、細胞膜透過性の PKA 特異的阻害剤 *N*-[2-(*p*-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (以下、H-89) による LukS のリン酸化及び Luk の白血球崩壊活性の阻害実験を行った。 $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$ 存在下でヒト多形核白血球を H-89 で前処理した後、Luk を作用させた。その

結果, LukS のリン酸化は H-89 の濃度依存的に阻害され、その IC₅₀ 値は 0.05 μM であった (Fig. 5, panels A and B)。LukS のリン酸化に対する IC₅₀ 値 (0.05 μM) 以上の濃度の H-89 存在下では Luk はヒト白血球を膨潤させたが、崩壊しなかった (Fig. 6, panels C-E)。以上の結果から、Luk のヒト白血球崩壊活性の発現には膜孔の形成だけでなく LukS の Thr²⁴⁶ でのリン酸化が必須である事を明らかにした。また LukS のリン酸化に PKA が関与していることが強く示唆された。

第 3 章 *S. intermedius* leukocidin (Luk-I) のヒト白血球崩壊活性に対する LukS-I のリン酸化の関与

3-1 LukS-I のリン酸化部位 K¹³⁶KIS¹³⁸ (box I) の発見

家畜病原性細菌である *S. intermedius* は宿主に感染する際に *S. aureus* 同様、外毒素を含む様々な病原因子を産生する。Luk-I (LukS-I, LukF-I) もその一つである。Luk-I の両成分 (LukS-I, LukF-I) はそれぞれ LukS、LukF と 67%、及び 73% の同一のアミノ酸を保持している。興味深いことに、Luk-I は二成分が共同して Luk と同様のヒト白血球崩壊活性を発現するにもかかわらず、LukS-I は Hlg2 と同様に box Z を持たない (Fig. 7)。そこで他の領域に box Z と同様の PKA によるリン酸化部位が存在するかどうか調べるため、LukS-I の配列を検索したところ box Z から 108 残基 N 末端側の推定の膜貫通領域 pre-stem domain で K¹³⁶KIS¹³⁸ (box I) を見出した。

3-2 Luk-I のヒト白血球崩壊活性への LukS-I のリン酸化の関与

LukS-I で見出したリン酸化部位 box I (K¹³⁶KIS¹³⁸) のヒト白血球崩壊活性への関与を検討するため、box I の Ser¹³⁸ を Ala に変換した MLSI-SA を作製した。その結果、Luk-I は Luk の 2 倍のヒト白血球崩壊活性を示したが、MLSI-SA は崩壊活性を示さなかった (Fig. 8)。この結果から、Luk-I のヒト白血球崩壊活性の発現に LukS-I の Ser¹³⁸ での PKA によるリン酸化が関与していることが示唆された。そこで実際に、LukS-I 及び MLSI-SA を無細胞系、PKA (catalytic subunit from bovine heart PKA)、[γ-³²P]ATP 存在下で

反応させたところ、熱処理した LukS-I は PKA によって強くリン酸化されたが、MLSI-SA はリン酸化されなかった (Fig. 9)。以上の結果から LukS-I が PKA の基質になることを証明した。次に、Luk-I のヒト白血球崩壊活性に対する H-89 の影響を検討した。その結果、H-89 の濃度依存的に Luk-I のヒト白血球崩壊活性が阻害された (Fig. 10, panel A)。また、崩壊には至らなかった細胞も MLSI-SA を作用させた時と同様に膨潤した (Fig. 10, panels E-G)。Luk-I に対する H-89 の IC₅₀ 値は 0.5 nM であり Luk の場合よりも 100 倍小さい値だった。以上の結果から、Luk-I のヒト白血球崩壊活性の発現には膜孔の形成だけでなく、LukS-I の Ser¹³⁸ でのリン酸化が必須であること明らかにした。また、LukS-I のリン酸化に PKA が関与していることが強く示唆された。さらに本研究において私は class S 成分のリン酸化がブドウ球菌 leukocidin のヒト白血球崩壊活性の発現に必須な機構であることを明らかにした。

第 4 章 要約

1. LukS の box Z (I²⁴²KRST²⁴⁶) を Luk のヒト白血球崩壊活性を担う最小必須領域であると同定した。
2. Luk のヒト白血球崩壊活性の発現には膜孔の形成だけでなく LukS の Thr²⁴⁶ でのリン酸化が必須であることを明らかにした。また、LukS のリン酸化に PKA が関与していることが強く示唆された。
3. *S. intermedius* の産生する LukS-I が box Z とは異なり、推定の膜貫通領域 pre-stem domain の根元に PKA のリン酸化認識配列 box I (K¹³⁵KIS¹³⁸) を持つことを見出した。さらに、Luk-I のヒト白血球崩壊活性の発現に LukS-I の Ser¹³⁸ でのリン酸化が必須であることを明らかにした。
4. 以上の結果から、class S 成分のヒト白血球でのリン酸化がブドウ球菌の産生する leukocidin のヒト白血球崩壊活性の発現に必須であることを明らかにした。

原著論文

- 1) Nariya, H., Nishiyama, A. and Kamio, Y. (1997) Identification of the minimum segment in which the threonine²⁴⁶ residue is a potential phosphorylated site by protein kinase A for the LukS-specific function of staphylococcal leukocidin. *FEBS Lett.*, 415, 96-100.

- 2) Nishiyama, A., Nariya, H. and Kamio, Y. (1998) Phosphorylation of LukS by protein kinase A is crucial for the LukS-specific function of staphylococcal leukocidin on human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1834-1838.

- 3) Nishiyama, A., Guerra, M. A., Sugawara, S., Yokota, K., Kaneko, J. and Kamio, Y. (2002) Identification of serine138 residue in the 4-residue segment K135K136I137S138 of LukS-I component of *Staphylococcus intermedius* leukocidin crucial for the LukS-I-specific function of staphylococcal leukocidin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 328-335.

LukS 1' ANDTEDIGKGSIDIEIIKRTEDKTSNKGVTQNIQDFVKDTKYNKDALILKMGGFISRT
 * ****.* *****.* ** . .***** *****.* *****

Hlg2 1" ENKIEDIGGGA—EIIKRTQDITSKRLAITQNIQDFVKDKKYNKDALLVVKMGGFISRT
 61' TYYNYKKTNHVKAMRWPFQYNI GLKTNDKYVSLINYL PKNK I ESTNVSQTLGYN I GGNFQ
 ** . ** . * * ***** * * * * * *****.* .*** *****

59" TYSDLKKYPYIKRMIWPFQYNI SLKTKDSNVDL INYL PKNK I DSADVSQKLGYN I GGNFQ
 164

121' SAPSLGGNGSFNYSKSI SYTQQNYVSEVEEQNSKSVLWGVKANS | FATESGQKSAFDSDLF
 ****.* *****.* ** * .***.* ** * * ***** * * * * * **

119" SAPSIGSGSFNYSKTI SYNQKNYVTEVESQNSKGVKNGVKANS | FVTPNGQVSAYDQYLF

181' VGYKPHSKDPRDYFVPDSELPLVQSGFNPSFI ATV SHEKGSSTSEFEI TYGRNMDVTH
 . * ***** .*****.* ***** * .*** * * *****.*

179" AQ-DPTGPAARDYFVPDNQLPPLIQSGFNPSFITTL SHERGKGDKSEFEI TYGRNMDATY

241' A I KRST | HYGNSYLDGHRVHNAFVNRNYTVKYE VNWKTHEI KVKGQN
 * | * * * .** ** * *****.* **

238" A | YVTRHRLAVDRKHDAFKNRNVTVKYE VNWKTHEVKIKSITPK

Box Z

Fig. 1. Comparison of the deduced amino acid sequence of LukS with that of Hlg2.
 Gross dissimilarity between them is indicated by the box Z. Identical and related residues are indicated by stars and dots, respectively. Dashed lines indicated deleted amino acids.

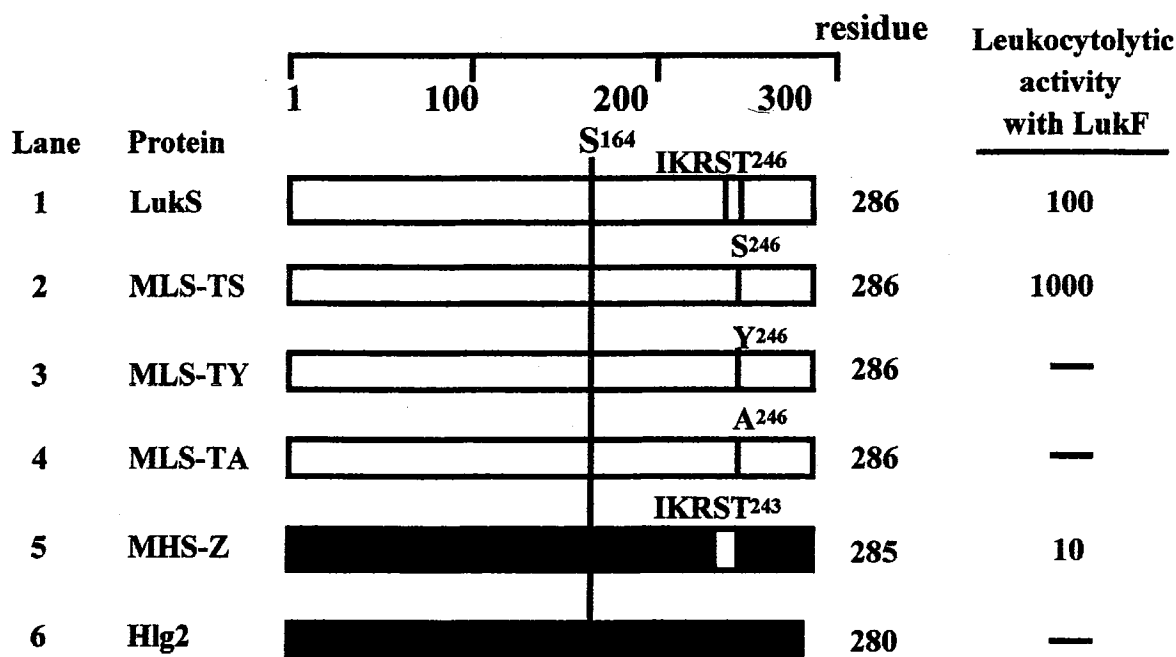


Fig. 2. Schematic representation of LukS, Hlg2 and mutant proteins, and the resulting leukocytolytic activity. White and black boxes indicate the LukS and Hlg2 segments, respectively. The white box in MHS-Z (lane 5) represent the inserted I239K240R241S242T243 segment. Percentage leukocytolysis indicates the activity compared with that of intact LukS (lane 1). A minus indicates no detectable activity.

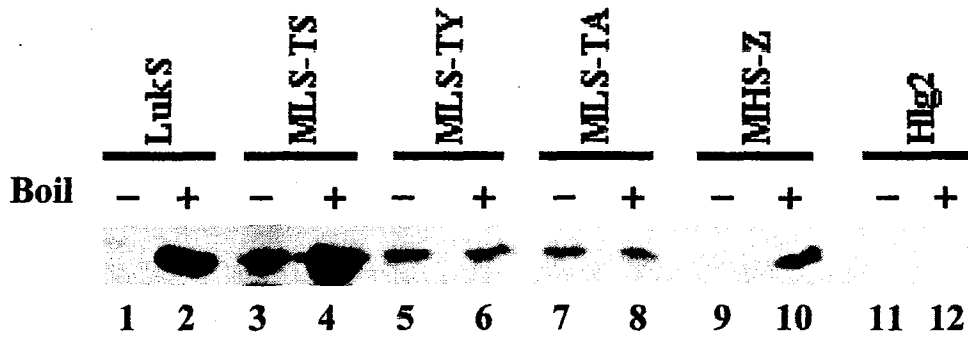


Fig. 3. Phosphorylated products of LukS, Hlg2 and the mutants of LukS and Hlg2 by $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in the presence of PKA in a cell-free system. The reaction was carried out at 37°C for 20 min. The reaction mixture was subjected to SDS-PAGE using 12.5% acrylamide gel. The gel was scanned by an image scanner (Fuji photo film, BAS-2000). The basal reaction mixture (Base) contained 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 1 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 0.2 mM (20 μCi) $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 500 ng/ml PKA catalytic subunit from bovine heart. Lanes 1-12, Base + toxin component which was indicated at the top of the panel. Odd and even numbers represent native and boiled ones, respectively.

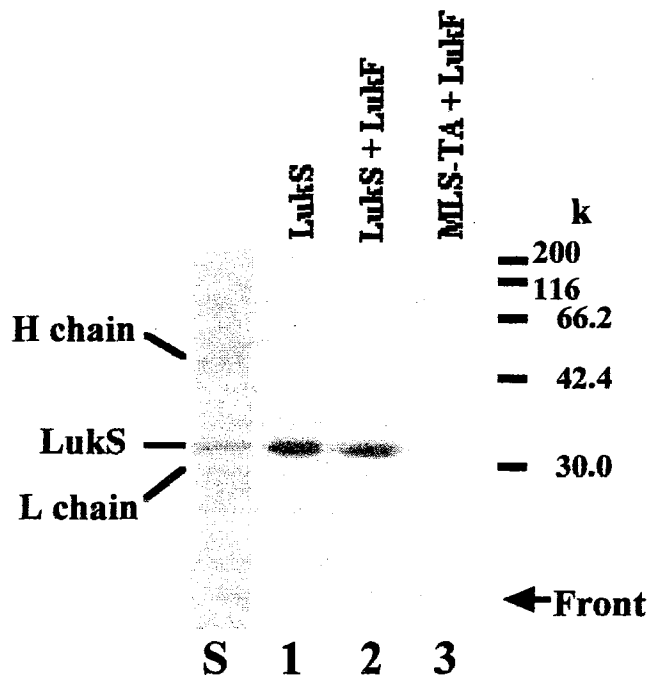


Fig. 4. Immunoblot analysis of the phosphorylated product of LukS and MLS-TA by $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$ on human polymorphonuclear leukocytes using anti-LukS antibody.

Human polymorphonuclear leukocytes (HPMNLs, 1×10^6 cells) were incubated with 300 pmol of LukS alone or 300 pmol each of LukS and LukF in the presence of $^{32}\text{P}\text{-H}_3\text{PO}_4$ (1 mCi, 1.15 μM) for 30 min at 37°C. The toxin components were immunoprecipitated with anti-LukS antibodies from toxin-treated cell lysate. The resultant precipitates were analyzed by western immunoblotting. Lane S represents immunostained proteins in the sample from the cells treated with LukS and LukF. Lanes 1 - 3 represent the radioactive products in immunoprecipitates, respectively.

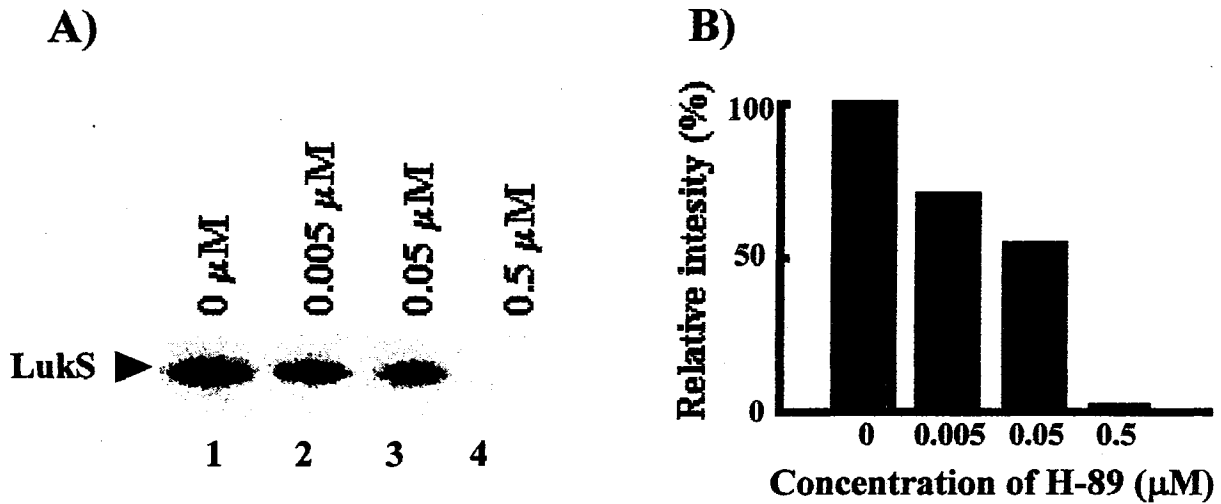


Fig. 5. Immunoblot analysis of the ^{32}P -labeled LukS by using anti-LukS antibody and schematic representation of the relative intensity of the phosphorylation of LukS in the presence of H-89. HPMNLs (1×10^6 cells) were exposed to H-89 (Seikagaku Kogyo, Tokyo) in the presence of $^{32}\text{P}\text{-H}_2\text{PO}_4$ (1 mCi, $1.15 \mu\text{M}$) at 37°C in prior to Luk-treatment. Other procedures were the same as that of Fig. 4. The gel was scanned by the image scanner (panel A) and measured by FLA-2000 (Fuji photo film, Tokyo) (panel B). Results in panel B represent the percent intensity compared with that in unexposed cells to H-89.

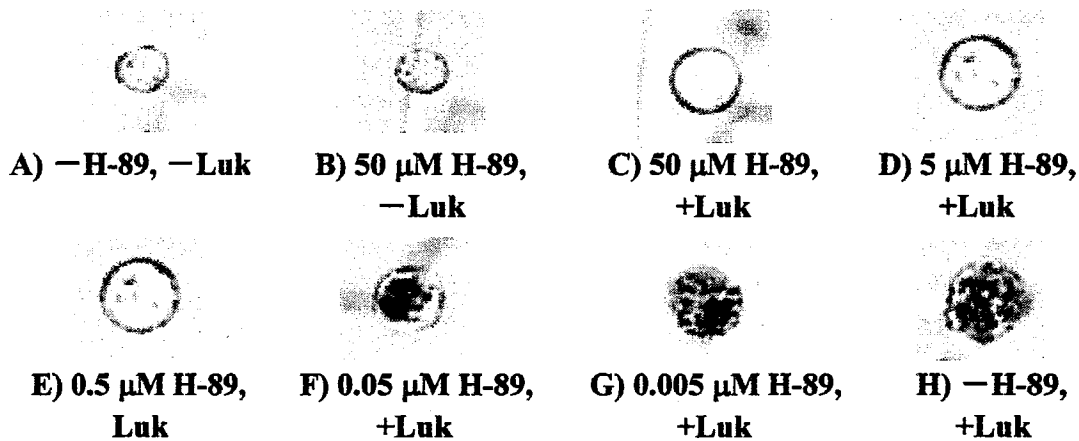


Fig. 6. Light micrographs of HPMNLs which were treated with Luk in the presence or absence of H-89. HPMNLs (2.5×10^4 cells) were exposed to H-89 at 37°C for 10 min at the concentration indicated in this figure, and then treated with LukS (7.5 pmol) and LukF (7.5 pmol).

```

LukS (HlgC) 1:ANDTEDIGKGSDEI|KRTEDKTSNKWGVTONIQDFVVKDKKYNKDALILKMQGF|SSRTTYNYKKTN- 69
LukS-PV 1:DNNIENIGDGA—EVVKRTEDTSSDKWGVTONIQDFVVKDKKYNKDALILKMQGF|NSKRTTYNYKNTD- 67
LukS-I 1:ANTIEEIGEGA—QI|KRTEDVSSRKWGVTONIQDFVVKDKKYNKDALILKMQGF|KSRTSFTDVKGKGY 68
Hlg2 (HlgA) 1:ENKIEDIGQGA—EI|KRTQDITSKRLA|IQNIQDFVVKDKKYNKDALVVKMQGF|SSRTTYSDLKKYP- 67
* * * * *

```

```

LukS (HlgC) 70:-HVKAMRWPFQYNI|GLKTNDKYVSL|INYL|PKNK|ESTNVSQTLGYN|GGNFQSA|PSLGGNGSFNYS KSIS 138
LukS-PV 68:-HIKAMRWPFQYNI|GLKTNDPNVDL|INYL|PKNK|DSVNV|SQTGYN|GGNFNSG|PSTGGNGSFNYS KTIS 136
LukS-I 69:ESTKRILWPFQYNI|ALKTNDPNVFL|INYL|PKNK|IES|DVSQTLGYNVGGNFQSA|PLLGGKGEFNYS KKIS 138
Hlg2 (HlgA) 68:-YIKRM|WPFQYNI|SLKTND|SNVDL|INYL|PKNK|DSADV|SQKLGYN|GGNFQSA|PSLGGSGSFNYS KTIS 136
*****

```

Box I

```

LukS (HlgC) 139:YTQQNYVSEVEQQNSKSVLWGVKANSFATESGQKSAFDSDLFVGYPKPHSKDPRDYFVPDSELPLVQSGF 208
LukS-PV 137:YNOQNYI|SEVEHQNSKSVQWGI|KANSF|ITSLGKMSGHDPNLFVGYKPY|SQNPRDYFVPD|NELPPLVHSGF 206
LukS-I 139:YTQKNYI|SEVAQQNSKN|RW|EVKANSFNTENGQV|SAYDRHLFVR-SP|GPNARDFFV|PND|ELPPLIQSGF 207
Hlg2 (HlgA) 137:YNQKNYVTEVESQNSKGVKGVKANSFVTPNGQV|SAYDQYLFAG-DPTGPAARDYFVPD|NQLPPLIQSGF 205
* * * * *

```

```

LukS (HlgC) 209:NPSFIATVSHEKGS|SDTSEFE|ITYGRN|MDVTHA IKRST HYGNSYLDGHRVHNAFVNRNYTVKYEVNWKTH 279
LukS-PV 207:NPSFIATVSHEKGS|GDTSEFE|ITYGRN|MDVTHA TRRTT HYGNSYLEGSR|IHNAFVNRNYTVKYEVNWKTH 277
LukS-I 208:NPSFIATVSHEK|DKGDTSEFE|IAYGRN|LDITYA T FFPRTGIFAERRHNA|LMNRNLVTKYEVNWKTH 274
Hlg2 (HlgA) 206:NPSFITTL|SHERGK|GDKSEFE|ITYGRN|MDATYA — YVTRHRLAVDRKHDAFKNRNYTVKYEVNWKTH 271
*****

```

Box Z

```

LukS (HlgC) 280:EIKVKGQN— 286
LukS-PV 278:EIKVKGHN— 284
LukS-I 275:EIKVKGH— 280
Hlg2 (HlgA) 272:EVKIKSITPK 280
* * *

```

Fig. 7. Alignment of the sequences of LukS, LukS-PV, LukS-I and Hlg2.
The asterisks indicate residues that are conserved among all of the sequences.
The recognition site of PKA in LukS-I and LukS are indicated by box I and Z,
respectively.

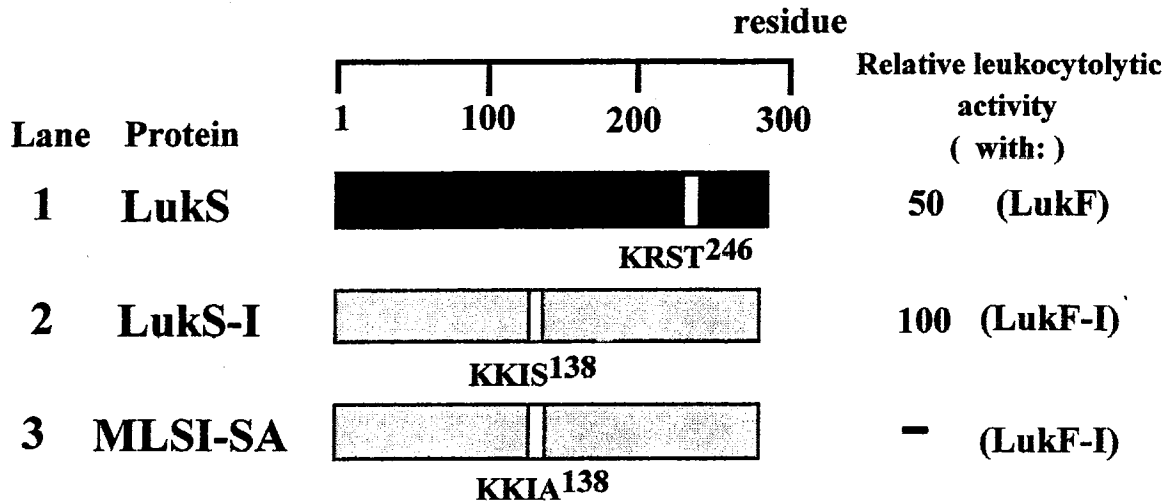


Fig. 8. Schematic representation of LukS, LukS-I and mutant protein, and the resulting leukocidin activity. Black and gray boxes indicate the LukS and LukS-I segments, respectively. The white boxes represent KRST in LukS, KKIS in LukS-I and KKIA in MLSI-SA. Percentage leukocytolysis indicates the activity compared with that of intact LukS-I (lane 2). A minus indicates no detectable activity.

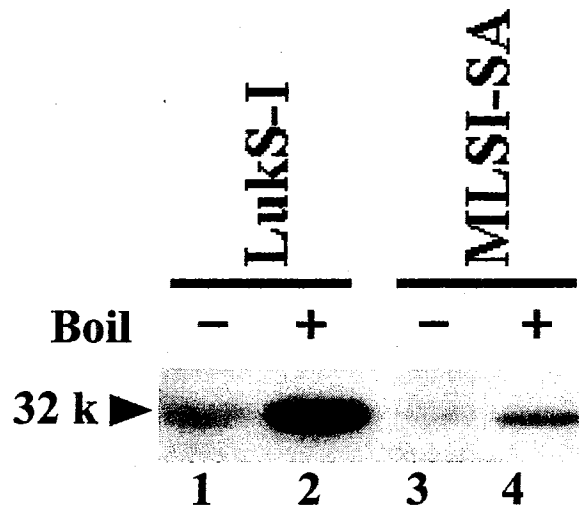


Fig. 9. Phosphorylated products of LukS-I and MLSI-SA by $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ in the presence of PKA in a cell-free system. The reaction was done as described in Fig. 3. Toxin components are indicated above the panel. Odd and even numbers represent native and boiled ones, respectively.

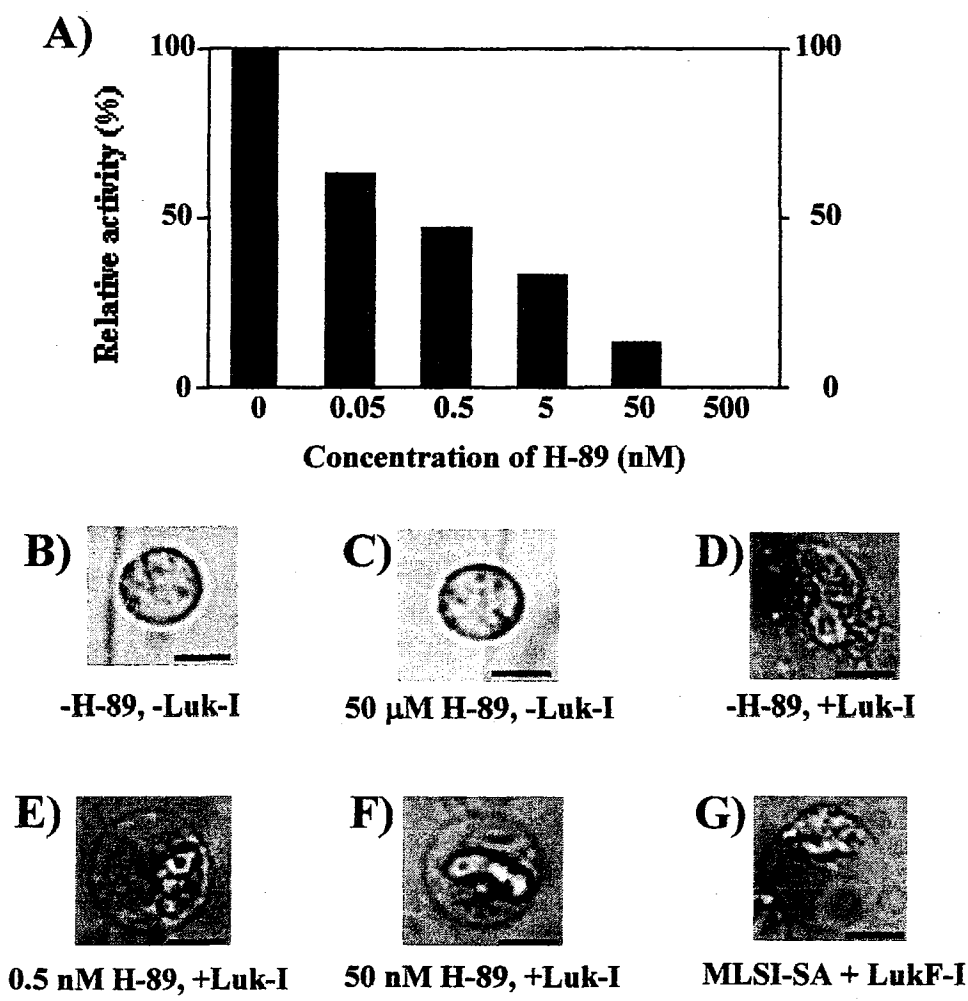


Fig. 10. Light micrographs of human polymorphonuclear leukocytes which were treated with Luk-I in the presence or absence of H-89. HPMNLs (2.5×10^4 cells) were exposed to H-89 at 37°C for 10 min at the concentration indicated in this figure, and then treated with LukS (7.5 pmol) and LukF (7.5 pmol). The bars on panels B to G represent 5 μm.

論文審査結果要旨

Staphylococcus aureus (以下, *S. aureus*) はヒトの常在菌である一方, 様々な病原因子を産生, 分泌することにより重篤な感染症を引き起こす病原性細菌としても知られている。近年, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) などの多剤耐性菌の出現によって, 抗生物質に頼らない治療法の確立が医療現場において重大な課題となっており, 病原因子の作用機構に関する研究が注目されている。本博士論文では病原因子の中でも特に膜孔形成型の二成分性白血球崩壊毒素 leukocidin (Luk; LukS, LukF) に注目し, そのヒト白血球崩壊機構の解明を行った。

Luk は赤血球崩壊毒素 γ -hemolysin (Hlg; Hlg 2, LukF) と LukF を共有している。また, LukS 及び Hlg 2 は全く異なる血球特異性を決定しているにもかかわらず, アミノ酸配列で80%という高い相同性を有している。本研究者はこの両毒素の類似した構造に着目して Luk のヒト白血球崩壊活性に対する必須機構の解明を行った。最初に LukS のみに存在し Hlg 2 では欠失している真核生物の cAMP-dependent protein kinase (以下, PKA) のリン酸化認識配列に相同な LukS の box Z (I242KRST246) に注目した。PKA の特異性に注目して LukS の Thr246 残基に一連の変異を導入して解析した結果, LukS の box Z を Luk のヒト白血球崩壊活性を担う最小必須領域であると同定した。また, LukS が無細胞系で PKA によってリン酸化されることを明らかにした。さらに, LukS が $^{32}\text{P-H}_3\text{PO}_4$ 存在下でヒト白血球に作用させた際にもリン酸化されることを証明した。白血球崩壊活性を発現しなかった LukS の Thr246 残基の Ala 変異体は白血球においてリン酸化されなかった。さらに, LukS のリン酸化及び Luk の白血球崩壊活性が PKA 阻害剤 H-89 によって濃度依存的に阻害されることを示した。以上の結果から, 本研究者は Luk のヒト白血球崩壊活性の発現に膜孔の形成だけでなく, LukS の白血球での Thr246 残基のリン酸化が必須であることを明らかにした。

さらに, 本研究者は *Staphylococcus intermedius* の産生する白血球崩壊毒素 leukocidin (以下, Luk-I) に関しても解析を行った。Hlg 2 と同様に box Z を欠失している LukS-I においてリン酸化部位 box I (K135KIS138) を見出した。LukS-I の Ser138 残基の Ala 変異体の解析から LukS-I の Ser138 残基を Luk-I のヒト白血球崩壊活性に必須なアミノ酸残基として同定した。また, Ala 変異体及び PKA 特異的阻害剤 H-89 を用いた実験から, Luk-I のヒト白血球崩壊活性の発現においても膜孔の形成だけでなく, LukS-I の Ser138 残基のリン酸化が必須であることを明らかにした。

以上のように, 本研究は, ブドウ球菌の産生する全ての二成分性の白血球崩壊毒素 leukocidin において class S 成分のリン酸化が白血球崩壊活性の必須機構として保存されていることを明らかにしたもので, 審査員一同は, 本研究者に博士 (農学) の学位を授与するに値するものと認定した。