Staphylococcus aureus のロイコシジンおよび γ ヘモリジン —遺伝子の起源および毒素成分活性特異性を決定している最小領域—

神 尾 好 是

東北大学農学部応用生物化学科 応用微生物学研究室
〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町1-1

〔受理：1997年 8 月20日〕

極めて相同性の高い一次構造を持つ2種類の蛋白質が、数個のアミノ酸残基の相違により全く異なった機能を持つという事実が *Staphylococcus aureus* の二成分蛋白毒素ロイコシジンならびに γ ヘモリジンにおいて明らかにされた。両者は、それぞれヒト白血球および赤血球上で孔を形成する蛋白毒素であるが、ロイコシジンの LukS 成分が、プロテインキナーゼ A 認識蛋白質であり、本毒素成分のリン酸化と毒素活性特異性とに強い相関があることが明らかになった。また Pantone-Valentine ロイコシジン遺伝子 (*lukF-PV* および *lukS-PV*) は ϕ PVL と命名された *S. aureus* の溶原ファージゲノム上に存在した。本総説において、次の5項目；(i) 二成分サイトリジンファミリー遺伝子の存在、(ii) *lukF-PV* および *lukS-PV* の溶原ファージゲノム上での存在、(iii) ロイコシジンと γ ヘモリジン成分の標的細胞への作用機構、(iv) ロイコシジンと γ ヘモリジン成分の細胞認識特異性を決定する最小領域、および (v) プロテインキナーゼ A 認識蛋白質としてのロイコシジン LukS 成分、について今日までに明らかにされた研究成果を解説した。

1. は じ め に

Staphylococcus aureus は自然界に幅広く存在し、院内感染の起因菌となる。人や動物の細菌感染症の代表菌種であり、表皮剥脱から敗血症など幅広い病症を引き起こす。メチシリン耐性 *S. aureus* (MRSA) や他の薬剤耐性菌の出現は現在、病原性細菌の感染に対する予防法改善の必要性が問われている。*S. aureus* は、発展途上国における食品の腐敗菌であることから、我が国の食品工業においてもその管理が必要となる。ま

た、乳牛の乳腺炎の原因菌となることも予想される。

S. aureus は5種類の血球崩壊毒素 (α , β , γ , δ ヘモリジンおよびロイコシジン)、コアグラーゼ、エンテロトキシン A-E、毒素性ショック症候群毒素-1を含む多種類の分泌蛋白質を産生する (1, 21, 40)。これらの分泌蛋白質は宿主細胞への感染に重要な役割を果たす。*Staphylococcus* の分泌蛋白質のほとんどは *agr* の制御により対数増殖期の末期に産生される。この制御機構の主体は RNA すなわち RNAIII であり、これらは分泌蛋白質をコードする遺伝子の転写を活性化する (31)。本調節機構に関する解説は最近、橋本により本誌になされたのでこれを参照にしたい (12)。

Yoshiyuki KAMIO
Staphylococcal leukocidin and γ -hemolysin
Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of
Agriculture, Tohoku University, Sendai 981

ロイコジンならびにガンマヘモリジンは、それぞれ二成分蛋白質 (LukF と LukS) および (Hlg1 と Hlg2) から構成され、それぞれの毒素活性発現には各々、二成分が必須である。ロイコジンは多核白血球、単核白血球およびマクロファージを特異的に崩壊する。 γ ヘモリジンは哺乳類の赤血球を崩壊する。1993年、Coony ら、Supersac ら、そして我々は独立して、 γ ヘモリジンとロイコジンが共通成分 (LukF=Hlg1) を持つことを明らかにした (4, 15, 37, 46)。ロイコジンおよび γ ヘモリジンの血球崩壊機構は今日まで詳しく知られていなかったが、我々の研究ならびに Piemont グループの研究から徐々にその一端が見え始めた。本総説において、両毒素遺伝子および毒素蛋白質の構造と活性特異性など次の5項目について今日まで明らかにされた研究成果を解説する。

- (i) 二成分型サイトトキシンファミリー遺伝子の存在。
- (ii) Pantone-Valentine 型ロイコジン遺伝子の溶原ファージゲノム上での存在。
- (iii) ロイコジンとガンマヘモリジン成分の標的細胞への吸着および作用機構。
- (iv) 毒素成分の細胞認識特異性を決定する最小領域の同定領域。
- (v) ロイコジン LukS 成分のプロテインキナーゼ A によるリン酸化。

尚、本稿に掲げる毒素成分遺伝子のクローニングおよび遺伝子産物の物理化学的特性については、文献14および48を参照にさせていただきたい。

2. *Staphylococcus aureus* の二成分 サイトリジンファミリーの存在

4種類の二成分サイトリジンが黄色ブドウ球菌の培養濾液から分離精製された。

最初の毒素は Woodin により黄色ブドウ球菌 V8 株の培養濾液から最初に精製された Pantone-Valentine leukocidin (PVL) である (34)。Woodin は、本毒素が 32 K と 38 K からなる二成分毒素であることを初めて見いだした (50, 51)。後に Noda らにより同一菌株より精製され、さらに結晶化された (28, 29)。1991年、Barbancon らは、これまでの複雑な精製法とは

全く異なった方法により PVL の二成分の精製に成功した (8)。PVL は標的細胞崩壊特異性が極めて強く、ヒトおよびウサギ由来の多核白血球、単核白血球およびマクロファージを特異的に崩壊する (10)。1996年に PVL 遺伝子 (*lukS-PV* ならびに *lukF-PV*) が Prevost らによりクローニングされ、その塩基配列が決定された (35)。

第2は、RIMD310925 株の培養濾液から分離精製された leukocidin (Luk) である (38, 39)。本遺伝子 (*lukS* および *lukF*) は1991年および1992年に我々により RIMD 310925 株の染色体よりクローニングされ、塩基配列が決定された (38, 39)。*lukS* と *lukF* はクラスターとして存在する (図1B) (37)。本遺伝子産物 (LukS および LukF) は LukS-PV ならびに LukF-PV とは、互いに異なる蛋白質である事が遺伝子の塩基配列ならびに遺伝子産物の標的細胞に対する活性特異性の相違により明らかになった。すなわち、Luk はヒトおよびウサギ由来の多核白血球、単核白血球およびマクロファージを崩壊するが、ウサギの赤血球をも崩壊する (ヒト由来の赤血球を崩壊しない)。一方 PVL は、どんな赤血球崩壊活性もみられない (35)。

第3は、 γ ヘモリジン (Hlg) である。本毒素は、1938年に Smith と Price により初めて報告された赤血球崩壊毒素である (41)。本毒素成分は、32 K および 36 K の二成分赤血球崩壊毒素として分離された (11, 47)。 γ ヘモリジンは哺乳類の赤血球ならびに培養細胞を崩壊する。本毒素遺伝子 (*hlg*) は、*S. aureus* 5R Smith 株の染色体からクローニングされ、*hlgA*, *hlgB* および *hlgC* から構成されていることが明らかにされた (図1C) (4)。*hlgB* および *hlgC* はそれぞれ RIMD 310925 株の *lukF* および *lukS* (37) と 97%の相同性がある (4)。*HlgA* (32 KDa) および *HlgC* (32 KDa) は *HlgB* (36 K) と協同でウサギ赤血球を崩壊する (4)。

第4は、ロイコジン R (LukR)である(42)。本毒素遺伝子 (*lukF-R* および *lukS-R*) は、牛の乳房炎患部から分離された *S. aureus* P83 の染色体からクローニングされた (図1D) (46)。本毒素はリコンビナントロイコジンとして大腸菌から精製された (46)。LukF-R および LukS-R は

図1. *S. aureus* における二成分サイトリジンファミリー遺伝子。N.D. は未決定を示す。

それぞれ HlgC および HlgB と97%の相同性がある。LukR は、ヒト多核白血球、単核白血球およびマクロファージのみならずヒト赤血球をも崩壊することで、Luk あるいは、Hlg とは区別される毒素である (46)。最近、*S. aureus* P83 の染色体から、Hlg2 遺伝子 *hlg2(P83)* がクローニングされ、塩基配列が決定された (44)。本遺伝子産物である Hlg2(P83) は、5R Smith 株の HlgA あるいは Hlg2 に相当するが、LukF との協同でのヒト赤血球崩壊活性は HlgA あるいは Hlg2 の約40%で、明らかに低下している。これは、Hlg2 の217番目のアルギニン残基が Hlg2 (P83) では、リジンに変換していることに起因する (44)。

1995年に LukS とアミノ酸配列が70%相同であるが、LukS 活性がなく、LukF と同等の生理活性を持つ成分 (LukM) が P83 株から、我々により考案されたロイコシジンおよびヘモリジンの分離法 (22) により分離精製され、さらに本遺伝子がクローニングされた (2)。1997年には *lukM* 遺伝子が *lukF-PV* とリンクして存在し *lukS-PV* のバリエーションであることが判明した (図1 E) (17)。

1995年、*S. aureus* V8 (ATCC 49775) が先に述べた LukS-PV および LukF-PV の他に Hlg2、

LukS および LukF を分泌していることが Piemont グループにより明らかにされた (35)。これらの遺伝子の染色体における分布に関する研究から、*S. aureus* V8 (ATCC 49775) には、*hlg2*、*lukS* および *lukF* から構成される “First locus” と、*lukS-PV* および *lukF-PV* から構成される “Second locus” の2つの遺伝子座が存在することが明らかにされた (図1 A) (35)。

3. *lukF-PV* および *lukS-PV* 遺伝子の溶原性バクテリオファージゲノム上での存在

1997年我々の研究から、*S. aureus* P83 には V8 株同様、*hlg2*、*lukS* および *lukF* から構成される “First locus” と *LukM*、*LukF-PV* (*p83*) から構成される “Second locus” が存在することが明らかにされた (17)。我々は *lukM* および *lukF-PV* 近傍の遺伝子塩基配列を検討中、次の2つの事実を見いだした。1つは、*lukM* 構造遺伝子の350 bp 上流に新規の蛋白質をコードする遺伝子 (ORF) が存在していることである。本 ORF は753 bp からなり、251アミノ酸残基からなるポリペプチドをコードしていた。本 ORF は予想アミノ酸配列から prophage 由来の staphylococcal peptidoglycan hydrolase (49) と高いホモロジーを示す事が明らかになった (17)。もう1つは、

図2. ϕ PVL ゲノムにおける PVL 遺伝子および制限酵素地図。E, H, P, S および X は、それぞれ *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *SphI*, *XbaI* 制限酵素切断箇所を示す。

“Second locus” 近傍に *S. aureus* の溶原ファージ ϕ 11 の attachment site のコア配列 (20) と極めて相溶性の高い 6-bp (TGGGAA あるいは ATGGGA) が存在していることである (17)。先に *Piemont* グループにより、*S. aureus* における “First locus” および “Second locus” の分布が検討されたが、“First locus” はほとんどすべての菌株に存在するのに対して、“Second locus” は数%の菌株にしか存在しない事実が報告されている (36)。また、“Second locus” は保持菌から簡単に脱落しやすい性質を持つ。これらの事実から我々は、*lukS-PV* および *lukF-PV* 遺伝子から構成されている “Second locus” は、溶原バクテリオファージゲノム上に存在するのではないかと推定して、*S. aureus* のマイトマイシン C および UV 処理によるファージ粒子の誘発とファージ粒子ゲノムにおける *lukS-PV* および *lukF-PV* の検索を行ってきた。その結果、ごく最近我々により、推定通り “Second locus” が、*S. aureus* V8 (ATCC 49775) のマイトマイシン C 処理による溶菌上清から回収したファージ粒子内の DNA に存在していることが発見された (図2) (16)。*S. aureus* のサイトトキシン遺伝子のファージゲノム上での存在に関する報告は、これが初めてである。 ϕ PVL と名付けられたこのファージ粒子は *cos* 部分を持つ約 40 kbp の二本鎖 DNA を有し、両 *cos* 部分からほぼ均等に位置する約 4 kb の領域に [*lukS-PV-lukF-PV*] クラスター、*attP* および

int (integrase 遺伝子) がこの順序で配列していた (図2)。*attP* 領域には、*S. aureus* のファージの recombinase の結合領域と相溶性の高い5個の 9-bp からなるダイレトリピートが存在した。*int* 遺伝子産物の予想アミノ酸配列は、*S. aureus* の溶原ファージ L54a のそれと70%の相溶性を有していた (16)。現在まで、300株の臨床分離株および20株の type strain において “Second locus” のファージゲノムにおける存在を検討した結果、V8 (ATCC 49775) 以外には見つからなかった。また、P83 株においても “Second locus” 遺伝子はファージゲノムとしては回収されなかった。*lukF-PV* (P83) 下流の塩基配列を決定した結果、*int* が欠損していた (未発表データ)。

4. ロイコシジンとガンマヘモリジン 成分の標的細胞への吸着と表層膜 における孔の形成

1) ロイコシジン LukS の C 末端領域アミノ酸 残基の活性発現における重要性

我々により、RIMD310925 株の培養濾液から、LukS の C 末端17アミノ酸残基が欠失した成分 (LS2) が偶然発見された (23)。本物質は、おそらく LukS の精製過程中、培養液中に含まれた黄色ブドウ球菌の産生するプロテアーゼによる部分分解で生成されたものであると考えられる。本 LS2 は LukS としての活性および GM1 との結合活性は全く示さなかった。また生理的塩溶液中で

は LukS は 1 量体で存在するが、LS2 は 2 量体で存在していた。興味あることには LS2 は LukS よりも塩基性アミノ酸残基が少ないにもかかわらず、陽イオンカラムクロマトグラフィーにおいて LukS より遅れて溶出されてくる。これは後述されるように LS2 の二次構造に起因するものである。従って、LukS の C 末端 17 アミノ残基が欠損すると LukS の二次構造が変化することが明らかになった (23)。次に 17 アミノ酸残基の内、どのアミノ酸残基が活性および GM1 との結合に関与しているかが検討された。その結果、LukS の C 末端から第 12 番目に存在する W が GM1 との結合に重要なアミノ酸残基であることが本 W 残基を G 残基に変異させた株の実験から明らかにされた (24)。

2) LukS・GM1 複合体の性質

3-1 に示された結果から LS2 が LukS としての活性を持たない原因は、本成分が白血球膜上の GM1 と結合できないことに起因している可能性が考えられたので、LukS および LS2 の GM1 との結合能が検討された。LukS が GM1 と結合して [LukS・GM1] 複合体を形成することは Noda らにより明らかにされているが、本複合体の性質については明らかにされていない (30)。従って、[LukS・GM1] 複合体の性質が検討された。LukS と [6-³H-galactose] GM1 との複合体をゲルろ過カラムクロマトグラフィーで分離した。その結果、LukS は分子量 31,000 の位置に溶出された (23)。ところが、本成分が GM1 と結合して [LukS・GM1] 複合体が形成されると、相対分子質量が大きくなるにも拘らず LukS 本来の溶出位置より遅れて溶出された。LukS には 4 個のトリプトファン残基が存在する。LukS の構造変化はトリプトファン蛍光測定でさらに詳しく検討された。その結果、LukS が GM1 と 1:1 で結合すると、LukS の最大 Emission 波長が 318 nm から 310 nm に移行すること、しかも Emission 強度が 33% 減少することが明らかになった (23)。この結果から、LukS 本来のトリプトファン残基は [LukS-GM1] 複合体が形成されることにより、より分子内に folding された状態になった事が示唆された。また、LukS 分子表面がより疎水性に変化したことも予想される。一方、LS2 および LukF におい

ては、全くこの様な変化は見られなかった。この無細胞系での実験結果から白血球膜表層における LukF および LukS の存在状態について次のことが予想される。すなわち、白血球膜に存在する GM1 と親水性の LukS が結合することにより、LukS の表面が疎水性に変化して、白血球膜との親和性が増大し、次に起きる反応に好都合な状態に変化するものと考えられる。本結果は後述する LukS の活性特異性決定最小領域の決定および白血球崩壊時の本領域の細胞膜における存在状態を考察する上で重要になる。

3) Hlg2 におけるヘモリジン活性の GM1 添加による抑制

LukS の C 末端 17 アミノ酸領域が GM1 との結合に重要な役割を演じていることは前述した。図 3 に示された LukS および Hlg2 のアミノ酸配列から、それぞれの C 末端 19 アミノ酸配列には非常に高い相同性があるので、Hlg2 の赤血球膜におけるレセプターも GM1 の可能性がある。従って、Hlg2 は種々の糖脂質と混合され、保温後、LukF との協同で、ヒト赤血球崩壊活性が調べられた。その結果、Hlg2 は等モルの GM1 と前処理されるとヘモリジン活性は完全に抑制された。しかし、他の種々のガングリオンドやヒト赤血球膜の主要構成糖脂質である GM3、グロボンドおよびパラグロボンドでは全く活性は抑制されなかった (33)。一方、コレラ毒素サブユニット B あるいは LukS で赤血球を飽和させた後、Hlg2 および LukF 成分の作用を検討した結果、赤血球崩壊が 50% 阻害された。しかし、ロイコシジンにみられる完全阻害は起きなかった (33)。また、3-1 に示した実験と同様に、[Hlg2・GM1] 複合体の試験管内で形成実験結果から、Hlg2 は LukS 同様 GM1 と結合して、[Hlg2・GM1] 複合体を形成する。しかし、LukS でみられる最大 Emission 波長の移行は全くみられない (33)。この結果から、Hlg2 は GM1 とは結合するが、LukS との結合様式とは異なることが示唆された (33)。

4) ロイコシジンおよびガンマヘモリジン成分の標的細胞への結合順序

Woodin は、LukS および LukF のヒト白血への結合順序の存在を見だし、32 kDa の成分 (S 成分) の最初の白血球への結合が次の 36 kDa

(F 成分) の結合に必須であることを発見した (51)。Noda らもウサギの白血球において同様の結果を得た (30)。さらに Noda らは、両成分の白血球への結合が、ウサギ白血球の phospholipase A₂ の活性化を促すことを報告した (30)。Colin らも Woodin の結果を支持した (3)。これに対して、Hlg の赤血球への作用機序に関する報告は1995年の我々の報告までなかった。最初に γ ヘモリジン成分のヒト赤血球における結合順序と赤血球崩壊の関連性が検討された。その結果、Hlg1 (=LukF) が先に赤血球膜に結合した時のみ、Hlg2 成分の赤血球膜への結合が観察され、赤血球崩壊活性が表れた (32)。崩壊した赤血球膜中には、両成分がほぼ 1:1 で存在する約 100 KDa 以上の高分子物質が形成された。本高分子物質は抗 LukF 抗体および抗 Hlg2 抗体の両者に反応した。本高分子は 60°C までの SDS 処理では LukF と Hlg2 に解離しなかった。一方、あらかじめヒト赤血球をトリプシンで処理した後、LukF と Hlg2 を作用させても、赤

血球崩壊は全く起きなかった。また、LukF および Hlg2 の赤血球への吸着も観察されなかった (18)。従って、赤血球における LukF の吸着には赤血球表層蛋白質が関与していることが示唆される。これらの事実から、LukF の作用順序は白血球と赤血球とでは逆になっていることが判明した (18, 32)。

5) ロイコシジンおよび γ ヘモリジンの標的細胞表層における孔 (Pore) の形成

1993年 Barbancon らは、PVL がヒト白血球に作用するとその表層にカルシウムイオンが通過できる孔が形成され、これが血球崩壊の引き金になることを報告している (7)。しかしながら、ロイコシジンによる孔形成の分子レベルでの研究は、現在まで全くなされていない。

1996年我々は、 γ ヘモリジンがヒト赤血球に結合し赤血球膜上に 100 kDa 以上の [LukF・Hlg2] 複合体を形成することを明らかにした (18, 32)。さらに、1997年我々は、本複合体が内径および外形がそれぞれ約 2.5 nm および 7 nm の親

図3. LukS と Hlg2 のアミノ酸配列の比較。LukS と Hlg2 間で一致するアミノ酸残基は星印で表された。Box D における Hlg2 の KRLAI 配列は、Hlg2 のヒト赤血球崩壊活性に必須の最小領域である。Box Z における LukS の IKRST 配列は、LukS のヒトおよびウサギ白血球崩壊活性に必須の最小領域である。また、この領域がプロテインキナーゼ A によるリン酸化部位である。Box Y については、図4で説明する。

表1に Luk, PVL および Hlg を構成する各成分の組み合わせによる標的細胞崩壊特異性を示した。これから明らかなように, LukF を共通成分としたときヒト白血球および赤血球崩壊を決定する成分はそれぞれ LukS および Hlg2 である。さらに, Luk と PVL における標的細胞崩壊活性特異性を比較すると, ウサギ赤血球崩壊活性を決定している成分は LukS である。ところが, 構成アミノ酸配列を比較すると, LukS を100としたとき, Hlg2 および LukS-PV はそれぞれ90%およ

	LukS-PV	LukS	Hlg2
LukF-PV	100	100	—
	—	—	—
	—	—	0.1
LukF	100	100	—
	—	—	100
	0.4	15	100

び80%の相同性を有し、3者は、互いに非常に類似性の高い一次構造を有している(図3および4)。しかも細胞膜貫通ドメインのアミノ酸配列は、3者間で実に95%の相同性がある(図3参照)。それでは、それぞれの成分でどの領域が血球崩壊特異性を決定しているのでしょうか？

1) Hlg2 および LukS のヒト赤血球および白血球崩壊活性決定領域の同定

Hlg2 および LukS のヒト赤血球および白血球崩壊活性に必須の領域が LukS と Hlg2 とのキメラ蛋白質を作製して同定された。LukS と Hlg2 のキメラ蛋白質中のペプチド断片間でのつなぎ目のアミノ酸残基が変換されることのないように、キメラ蛋白質の遺伝子が overlapping 法 (13) により構築され、大腸菌で発現させた。これらキメラ蛋白質は大腸菌菌株から精製されヒト血球崩壊活性および GM1 との相互作用が解析された。その結果、ガンマヘモリジン活性には、Hlg2 の N 末端から Arg⁵⁷ までの57アミノ酸残基から構成される領域が、ロイコシジン活性には LukS の Ser¹⁶⁴ から C 末端までの128アミノ酸残基からなる領域が重要であることが明らかにされた (図5) (24)。LukS における本 C 末端領域には先に言及した GM1 結合に必須アミノ酸残基である W が含まれている。特筆すべきことは、図5に見られるようにキメラ蛋白質 MHLS5 および MHLS7 が、LukF と協同してロイコシジンおよびヘモリジン両活性を示すが、添加された GM1 は両キメラ蛋白質に結合するにも拘わらずヘモリジン活性は GM1 により全く抑制されないことである (24)。MHLS5 および MHLS7 は GM1 と結合しても全体的な立体構造、特にヘモリジン活性に必須の N 末端領域が活性発現に影響を及ぼさないような立体構造 (後述するが、Hlg2 の N

末端領域は LukF との結合に重要である) をとっていると考えられる。MHLS5 のヒト赤血球崩壊の初速度は Hlg2 より約2倍である (未発表データ)。この原因は解明されていないが、一個の血球あたりの複合体の数が2倍になっている可能性がある。

それでは、Hlg2 の N 末端58アミノ酸残基および LukS の C 末端128残基領域でそれぞれの活性特異性を担う最小領域はどこであろうか？

2) Hlg2 のヒト赤血球崩壊活性決定領域の同定

最初に Hlg2 の59アミノ酸残基からなる N 末端領域のヒト赤血球崩壊活性に必須の最小活性領域の同定実験がなされた。図3から明らかなように D 領域が LukS と Hlg2 とでは異なっている。図6は N 末端34アミノ酸残基間での Robson のコンピューター解析 (9) による両者のペプチドの二次構造予想比較図である。もし LukS の D 領域のアミノ酸残基を Hlg2 のアミノ酸残基と変換する LukS の N 末端領域の Robson の二次構造は完全に Hlg2 型になる (図6, レーン5)。この予想に基づいて両者間の本領域ならびに周辺のアミノ酸残基の変換を行い、両者それぞれの変異蛋白質を大腸菌でさせ、これを菌体から精製し、LukF 存在下で、血球崩壊活性が調べられた。その結果、LukS の D 領域の5つのアミノ酸 NKWGV を Hlg2 の KRLAI に変換された LukS 変異株 (MLS-D) は Hlg2 と同等のヒト赤血球崩壊活性を持ち、逆に、Hlg2 の KRLAI を

図5. LukS と Hlg2 とのキメラ蛋白質のロイコシジンおよびγヘモリジン活性。毒素活性は LukF 存在下で測定された。++++, +++, ++ および + は、LukS および H₂II の活性を100とした時の相対活性であり、それぞれ200%, 100%, 70%および10%である。ND は測定されなかった意味である。

図 6. LukS, LukS 変異株, および Hlg2 の N 末端領域の Robson のコンピューター解析による二次構造予測。
 lll, ^^^ および — は、それぞれ α ヘリックス, β ターンおよびランダムコイル構造を示す。MLS-A, MLS-D1, MLS-AD1, MLS-D, および MLS-D2 はそれぞれ LukS の A 領域, D1 領域, A と D1 両領域, D (D1+D2) 領域, および D2 領域を Hlg2 のアミノ酸残基に変換した変異蛋白質である。MHS-D は, D 領域における Hlg2 の KRLAI 残基を LukS の残基 (NKWGV) に変換した変異 Hlg2 である。

LukS の NKWGV に変換された Hlg2 変異株 (MHL1) は Hlg2 活性をほぼ完全に失った。一方, 近傍のアミノ酸残基を変換した変異株は赤血球崩壊活性は示さなかった (図 7)。以上の結果から, KRLAI が Hlg2 のヒト赤血球崩壊活性を示す最小領域であることが示された (25)。さらに本領域は, Hlg2 のヒト赤血球膜上での LukF との複合体形成に必須の領域であること, さらに赤血球膜上での結合順序は LukF が最初で, MLS-D がこれに続くことが明らかになった。し

かも赤血球崩壊活性は, GM1 で阻害されない (25)。

3) LukS のウサギ赤血球崩壊活性を決定している最小領域の同定

LukS および LukS-PV は LukF もしくは LukF-PV 存在下でヒトおよびウサギの白血球を崩壊するが, LukS はさらに LukF と共同で, ウサギ赤血球崩壊活性を持つ (27)。図 4 で明らかのように, LukS と LukS-PV のアミノ酸配列が, 90% 以上の相同にも拘わらず, 両者の血球崩壊

活性特異性をこれほどまで厳密に制御しているのはどの領域だろうか？ 先の LukS と Hlg2 のキメラ蛋白質の作製技法を LukS と LukS-PV 間の

キメラ蛋白質作製法に適用して、両者のペプチド断片間でのつなぎ目のアミノ酸残基が変換されることのないように遺伝子を構築し、大腸菌で発現

図 7. LukS 変異蛋白質のロイコシジンおよび γ ヘモリジン活性。毒素活性は LukF 存在下で測定された。ロイコシジンおよび γ ヘモリジン活性は、それぞれ LukS および Hlg2 の活性を100とした時の相対値である。蛋白質の特性は、図 6 で説明した。MHLS5 (レーン 5) は LukS と Hlg2 のハイブリッド蛋白質である (図 5 参照)。

図 8. LukS と LukS-PV とのキメラ蛋白質および LukS-PV 変異蛋白質の γ ヘモリジン活性。毒素活性は LukF 存在下で測定された。活性は LukS の活性を100とした。レーン 2 から 5 までの蛋白質は LukS-PV と LukS のハイブリッド蛋白質である。MPVS5, MPVS6 および MPVS7 はそれぞれ LukS-PV の X 領域, Y 領域 (図 4) の DI のみ, Y 領域全部のアミノ酸残基を LukS のアミノ酸残基に変換した変異 LukS-PV 蛋白質である。MLS1 は, LukS の DI 欠損変異蛋白質である。

させ、これら発現キメラ蛋白質を精製して、LukF 存在下で毒素活性を解析した。その結果、LukS のウサギ赤血球崩壊活性発現には、LukS の N 末端から Arg⁵⁹ までの59アミノ酸残基から構成される領域が重要であることが明らかになった (図8, レーン5) (27)。図4から明らかのように、本領域におけるアミノ酸配列の相違はわずかに N 末端13アミノ酸残基から構成されている領域である。従って、本領域に焦点が絞られ LukS のウサギ赤血球崩壊活性決定領域が同定された。図8のレーン6から8に示された変異 LukS が作製され、LukF 存在下でウサギ赤血球崩壊活性が解析された。驚くことに、LukS に存在し、LukS-PV には欠損している2アミノ酸残基 (DI) (図4, Box Y) が LukS のウサギ赤血球崩壊活性に必須であることが判明した (27)。すなわち、LukS-PV の A-E 間に DI を挿入すると LukS-PV は、完全に LukS 型になり、ウサギ赤血球崩壊活性を持つようになった (図8, レーン7)。一方、LukS から DI を欠損させた変異株では、ウサギ赤血球崩壊活性は激減した (図8, レーン10)。LukS-PV の DI 領域近傍のアミノ酸配列の LukS 型への変換は、効果的ではなかった (図8, レーン6)。尚、DI 領域は Hlg2 に欠損している (図3) (27)。

4) LukS の白血球崩壊活性を決定している領域の同定

LukS における C 末端128残基領域中の活性特異性を担う最小アミノ酸残基の同定がなされた (図9) (26)。図3および4で明らかのように、LukS および LukS-PV に IKRST (もしくは、ARRTT) の5アミノ酸残基からなる領域 (領域Z) の存在が発見された。領域Zは LukS および LukS-PV に存在し、Hlg2 および LukM には存在しない。これは、4者のアミノ酸配列の化学分析による結果から証明された。驚くことに本領域の KRST もしくは RRTT のアミノ酸配列はプロテインキナーゼ A によりリン酸化される蛋白質のリン酸化部位 [(R/K) n · X · S/T] (6) と相同である。リン酸化される部位は S/T 残基で、T より S のほうがリン酸化されやすいことが知られている (6)。従って、IKRST の T をそれぞれ S, Y および A に変換した LukS を得るために lukS の変異遺伝子を持つ3種類のプラスミド、pMLS-TS, pMLS-TY および pMLS-TA が構築された。MLS-TS, MLS-TY および MLS-TA 蛋白質は大腸菌で発現および精製された後、LukF 存在下で白血球崩壊活性が調べられた。その結果、S に変換された変異株は、野生株 (LukS) の10倍のロイコシジン活性を示した (図9, レーン

図9. LukS 変異蛋白質のロイコシジン活性。活性は LukF 存在下で測定された。活性は LukS の活性を100とした。レーン1および2の蛋白質は LukS と Hlg2 とのハイブリッド蛋白質である (図5参照)。レーン3から8までの蛋白質の特性は本文中に示した。

5) (26)。一方、Y および A に変換された変異株は、全くロイコシジン活性を示さなかった (図 9, レーン 6 および 7)。さらに、Hlg2 の本領域欠損部位にこの 5 アミノ酸残基 IKRST を挿入した Hlg2 変異株 (MHS-Z) は、ロイコシジン活性を持つようになった (図 9, レーン 9)。本実験結果より、LukS および LukS-PV の 5 残基 IKRST/ARRTT はロイコシジン活性に必須であることが判明した (26)。本領域の T のリン酸化反応がロイコシジン活性に重要であることが推察された。

6. ロイコシジン LukS のプロテインキナーゼ A によるリン酸化

無細胞系 (19) における LukS とその変異蛋白質および Hlg2 のプロテインキナーゼ A および [γ - 32 P]ATP 存在下でのリン酸化実験が行われた (26)。予想通り LukS および MLS-TS はリン酸化され、Hlg2, MLS-TY および MLS-TA はされなかった。興味あることに、リン酸化される成分を 100°C で加熱処理し変性した場合、そのリン酸化が 100 倍以上になった。この場合、MLS-TS への放射能リン酸の取り込み量が LukS の 4 倍であった。LukS はヒトおよびウサギ白血球上で GM1 と結合すると考えられているが、前述したように、LukS は試験管内でも GM1 と結合しその立体構造が変化することが明らかにされた。従って、未変性の LukS を GM1 と結合させた後、リン酸化反応を行ったが、変性 LukS ほどのリン酸化は起きなかった (26)。以上のことから、LukS 活性発現と上記 4 残基中の T のリン酸化には密接な相関があると推察され、白血球上での LukS の存在状態が分子レベルで明らかにされれば、詳細なリン酸化のカスケード反応が解明される。ただし、5 残基の LukS 分子内での存在位置は、分子表面には存在しないこと、さらに試験管内での GM1 による構造変化では、表面に突出しないことが予想される。最近、コロンビア大学の Gouaux らにより、*S. aureus* の α ヘモリジンのモノマーおよびヘプタマー構造の X 線回折による結晶構造が解明されたことは前述したが、ロイコシジンおよびガンマヘモリジン成分のアミノ酸配列が α ヘモリジンのそれに非常によく類似

していることから、彼らの立体構造を LukS に対応させると、リン酸化部位は α ヘモリジンの領域 14 と 15 にまたがる β ターン構造の折り曲り部位 (43) に存在することが予想される。しかもこの部位は、標的細胞に突き刺さった場合、細胞膜の内側に貫通した部分に位置している。

前述したように、Hlg2 は GM1 と結合する。また、LukF と共同してヒト赤血球に孔を形成する。それでは、Hlg2 あるいはロイコシジン活性を持たない LukS 変異体はヒト白血球への結合活性を持っているか？ 検討の結果、LukF 存在下で Hlg2 はもちろん、リン酸化能力のない LukS 変異株すべてが、ヒト白血球上で LukF と複合体を形成することが明らかになった (26)。本複合体はヒト白血球に孔を形成している事が予想される。興味あることに、ヒト白血球において [Hlg2・LukF] 複合体が存在すとヒト白血球は大きく膨潤するが、崩壊までは至らない。これらの事実より、ロイコシジンによる白血球崩壊機構は、Hlg にみられる「孔の形成＝血球崩壊」より、複雑な反応により進行することが予想される。我々の見いだしたプロテインキナーゼ A 認識蛋白質 LukS が白血球においてプロテインキナーゼ A によりリン酸化された後、いかなる成分と相互作用を取るかが今後の問題である。Noda らは以前にロイコシジンにより攻撃されたウサギ白血球における phospholipase A₂ の活性化について報告している (30)。LukS のリン酸化と phospholipase A₂ の活性化とに相関が存在する可能性がある。

以上のことから、次のことが結論される。

- (i) Hlg2 に存在する KRLAI はヒトおよびウサギ赤血球崩壊活性に重要な領域である。特にヒト赤血球崩壊活性には、必須である。
- (ii) ウサギ赤血球崩壊活性には、KRLAI 領域は必ずしも必須ではない。KRLAI 領域が存在しない場合は、DI が必須領域になる。
- (iii) LukS および LukS-PV にそれぞれ存在する KRST および RRTT 領域は白血球崩壊活性に必須の領域である。本領域の T 残基がプロテインキナーゼ A によりリン酸化される。
- (iv) LukS における W は LukS のヒト白血球への結合ならびに GM1 結合に必須のアミノ酸

残基である。しかもこの結合反応は Luk による白血球崩壊活性に必須である。

(v) ヒト白血球崩壊活性には必ずしも Hlg の GM1 との結合は必要ではない。

7. お わ り に

S. aureus の二成分蛋白毒素遺伝子と毒素成分の構造と活性特異性について解説した。今日まで、ロイコシジンと γ ヘモリジンの構成成分は、それぞれ独立した成分から構成されていると考えられてきたが、両者は LukF 成分を共通の成分として持ち、LukS と Hlg2 は血球認識のための特異的蛋白質であることが明らかになった。しかも、LukS の C 末端近傍に存在する 5 アミノ酸残基 (IKRST) ならびに Hlg2 の N 末端近傍の 5 アミノ酸残基 (KRLAI) から構成されている領域がそれぞれロイコシジンおよびガンマヘモリジン活性特異性を決定している領域であることが明らかになった。しかも LukS ならびに LukS-PV はプロテインキナーゼ A 認識蛋白質であり、KRST セグメントの T がリン酸化されることが明らかになった。また、LukS のウサギ白血球崩壊活性は、N 末端近傍に存在するたった 2 残基 (DI) で決定されている事実が判明した。これらアミノ酸残基が、どのような機構によりこれら活性特異性を担っているかを更にしばって検討することが重要である。そのためには、LukF と LukS, LukF と Hlg2 がそれぞれの血球膜上でどのような相互作用を取っているのかを究明することが今後の課題である。これらの事が解決されれば、これは、蛋白質の構造と機能との相関を解明する一つのモデルとして有益な情報をもたらすばかりでなく、最終的には感染における病体の発現機構の解明につながる。また、本研究によって、2 種類の蛋白質が別々に細胞膜へ結合して膜表面で複合体を形成する仕組みの一端を明らかにすることが可能である。本研究で取り上げた毒素は、コレラ毒素などいわゆる A-B 毒素とは異なり、二成分が標的細胞の膜表面で複合体を形成して毒素作用を発現する新しい作用機構を有すると考えられる。

機能的に類似した蛋白質が類似した一次構造を持つことはよく知られているが、一次構造レベル

で極めて類似性の高い蛋白質が、全く異なった機能を持つという事実がロイコシジンならびに γ ヘモリジンにおいて示されたが、今後、蛋白質の構造と機能の相関を理解するには二次および三次構造を考慮する必要がある。本稿ではデータを示さなかったが、LukM の LukS との、あるいは Hlg2 とのアミノ酸配列のホモロジーはそれぞれ 66.7%と 67%で極めて高い相同性を示すが、それにも拘わらず LukM は LukF 活性を持ち、Luk および Hlg2 活性を持たない。LukM の Robson の二次構造予測で、LukM は LukF と極めて類似している。ここに掲げた毒素成分に限定すれば、二成分性毒素成分の宿主細胞認識機構を解明するためには、二成分単独あるいは、複合体の結晶の X 線解析が重要である。最終的には、両血球における両毒素活性発現に関わる因子の単離精製、さらにはその遺伝子のクローニングならびに本遺伝子 DNA の構造解析が可能になれば、両血球における刺激情報物質に対する応答調節機構が明らかになるとともに未知のカスケード反応が発見されるかも知れない。今日まで、ロイコシジンを含む *S. aureus* のサイトトキシン遺伝子の起源が話題にされてきたが、 ϕ PVL における PVL 遺伝子の存在は *S. aureus* におけるサイトトキシン遺伝子 (因子) の伝播と病原性を考える上で大きな話題を提供することができた。

文 献

- 1) Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J. (1991): Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Rev., **55**, 733-751.
- 2) Choerit, W., Kaneko, J., Muramoto, K., Kamio, Y. (1995): Existence of a new protein component with the same function as LukF component of leukocidin or gamma-hemolysin and its gene in *Staphylococcus aureus* P83. FEBS Lett., **357**, 260-264.
- 3) Colin, D.A., Mazurier, I., Sire, S., Fink-Barbacon, V. (1994): Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membrane: sequential binding and subsequent activation. Infect. Immun., **62**, 3184-3188.
- 4) Cooney, J., Kiele, S., Foster, T.J., Otoole, P.W. (1993): The gamma-hemolysin locus of *Staphylo-*

- ccus aureus* comprises three genes, two of which are identical to the genes for the F and S components of leukocidin. *Infect. Immun.*, **61**, 768-771.
- 5) Cyne, M., Birkbeck, T.H., Abuthnott, J.P. (1992): Characterization of Staphylococcal gamma-hemolysin. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 923-930.
 - 6) Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs, E.G. (1987): Protein serin/threonine kinases. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 567-613.
 - 7) Finck-Barbancon, V., Duportail, G., Meunier, O., Colin, D.A. (1993): Pore formation by a two-component leukocidin from *Staphylococcus aureus* within the membrane of human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1182**, 275-282.
 - 8) Finck-Barbancon, V., Prevost, G., Piemont, Y. (1991): Improved purification of leukocidin from *Staphylococcus aureus* and toxin distribution among hospital strains. *Res. Microbiol.*, **142**, 75-85.
 - 9) Garnier, J., Osguthorpe, D.J., Robson, B. (1978): Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.*, **120**, 97-120.
 - 10) Gladstone, G.P., Van Heyningen, W.E. (1957): Staphylococcal leukocidin. *Br. J. Exp Pathol.*, **38**, 123-137.
 - 11) Guyonnet, F., Plomet, M., Bouillanne, C. (1968): Purification de l'hémolysine gamma de *Staphylococcus aureus*. *C.R. Held. Seances Acad. Sci.*, **276**, 1180-1182.
 - 12) 橋本 一 (1996) : ブドウ菌研究の過去から未来へ. *日本細菌学雑誌*, **51**, 841-852.
 - 13) Horton, R., Hunt, H., Ho, S., Pullen, J., Pease, L. (1989): Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, **77**, 61-68.
 - 14) 神尾好是 (1996) : 黄色ブドウ球菌のロイコジンおよびガンマヘモリジンの構造と宿主細胞特異性, p. 33-54 (再燃する細菌感染症) 三瀬勝利, 寺脇良郎, 橋本一編, 菜根出版, 東京.
 - 15) Kamio, Y., Rahman, A., Nariya, H., Ozawa, T., Izaki, K. (1993): The two Staphylococcal bi-component toxins, leukocidin and gamma-hemolysin, share one component in common. *FEBS Lett.*, **321**, 15-18.
 - 16) Kaneko, J., Kimura, T., Kawakami, Y., Tomita, T., Kamio, Y. (1997): Pantone-Valentine leukocidin genes in a phage-like particle isolated from mitomycin C-treated *Staphylococcus aureus* V8 (ATCC 49775). *Biosci. Biotech. Biochem.*, In press.
 - 17) Kaneko, J., Muramoto, K., Kamio, Y. (1997): Gene of LukF-PV-like component of Pantone-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with *lukM*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 541-544.
 - 18) Kaneko, J., Ozawa, T., Tomita, T., Kamio, Y. (1997): Sequential binding of Staphylococcal γ -hemolysin to human erythrocytes and complex formation of the hemolysin on the cell surface. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 846-851.
 - 19) Kennelly, P.J., Krebs, E.G. (1991): Consensus sequence as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.*, **266**, 15555-15558.
 - 20) Lee, C.Y., Iandolo, J.J. (1988): Structural analysis of Staphylococcal bacteriophage ϕ 11 attachment sites. *J. Bacteriol.*, **170**, 2409-2411.
 - 21) MacCartney, A.C., Arbuthnott, J.P. (1978): Mode of action of membrane damaging toxins produced by staphylococci, in Jeljaszewicz J., Wadstroem T. (eds.), *Bacterial Toxins and Cell Membranes*, pp. 89-127, Academic Press, London, pp. 89-127.
 - 22) Nariya, H., Asami, I., Beppu, Y., Izaki, K., Kamio, Y. (1993): Improved method for purification of leukocidin and gamma-hemolysin components from *Staphylococcus aureus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 2198-2199.
 - 23) Nariya, H., Izaki, K., Kamio, K. (1993): The C-terminal region of S component of Staphylococcal leukocidin is essential for the biological activity of the toxin. *FEBS Lett.*, **329**, 219-222.
 - 24) Nariya, H., Kamio, Y. (1995): Identification of the essential regions for lukS- and H γ II-specific function of Staphylococcal leukocidin and gamma-hemolysin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1603-1604.
 - 25) Nariya, H., Kamio, K. (1997): Identification of the minimum segment essential for the H γ II-specific function of Staphylococcal γ -hemolysin. *Biosci. Biotech. Biochem.*, In press.
 - 26) Nariya, H., Nishiyama, A., Kamio, Y. (1997): Identification of the minimum segment in which threonine²⁴⁶ residue is phosphorylated by protein kinase A for the LukS-specific function of staphylococcal leukocidin. *FEBS Lett.* In press.
 - 27) Nariya, H., Shimatani, A., Tomita, T., Kamio, Y. (1997): Identification of the essential amino acid

- residues in LukS for the hemolytic activity of Staphylococcal leukocidin towards rabbit erythrocytes. Biosci. Biotech. Biochem., In press
- 28) Noda, M., Hirayama, T., Kato, I., Matsuda, F. (1980): Crystallization and properties of Staphylococcal leukocidin. Biochem. Biophys. Acta, **633**, 33-44.
 - 29) Noda, M., Kato, I. (1988): Purification and crystallization of Staphylococcal leukocidin. Methods Enzymol., **165**, 22-32.
 - 30) Noda, M., Kato, I., Hirayama, T., Matsuda, F. (1980): Fixation and inactivation of Staphylococcal leukocidin by phosphatidylcolin and ganglioside GM₁ in rabbit polymorpho-nuclear leukocytes. Infect. Immun., **29**, 678-684.
 - 31) Novick, R.P. (1990): The *Staphylococcus* as a molecular genetic system. p. 1-37, In Molecular biology of the Staphylococci. Novik, R.P. (ed), VCH Publishers, N.Y.
 - 32) Ozawa, T., Kaneko, J., Kamio, Y. (1995): Essential binding of LukF of Staphylococcal gamma-hemolysin followed by the binding of H₇II for the hemolysin of human erythrocytes. Biosci. Biotech. Biochem., **59**, 1181-1183.
 - 33) Ozawa, T., Nariya, H., Kaneko, J., Izaki, K., Kamio, Y. (1994): Inactivation of gamma-hemolysin activity by exogenous addition of monosialoganglioside GM₁ in human erythrocyte. Biosci. Biotech. Biochem., **58**, 602-605.
 - 34) Panton, P.W., Valentine, F.C.O. (1932): Staphylococcal leukocidin. Lancet, **222**, 506-508.
 - 35) Prevost, G., Cribier, G., Couppie, P., Petiau, P., Supersac, G., Finck-barbancon, V., Monteil, H., Piemont, Y. (1995): Panton-Valentine leukocidin and gamma-hemolysin from *Staphylococcus aureus* ATCC 49775 are encoded by distinct genetic loci and have different biological activities. Infect. Immun., **63**, 4121-4129.
 - 36) Prevost, G., Couppie, P., Prevost, P., Gayet, S., Petiau, P., Cribier, B., Monteil, H., Piemont, Y. (1995): Epidemiological data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. J. Med. Microbiol., **42**, 237-245.
 - 37) Rahman, A., Izaki, K., Kamio, Y. (1993): Gamma-hemolysin genes in the same family with lukF and lukS genes in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Biosci. Biotech. Biochem., **57**, 1234-1236.
 - 38) Rahman, A., Izaki, K., Kato, I., Kamio, Y. (1991): Nucleotide sequence of leukocidin S-component gene (*lukS*) from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Biochem. Biophys. Res. Commun., **181**, 138-144.
 - 39) Rahman, A., Nariya, H., Izaki, K., Kato, I., Kamio, Y. (1992): Molecular cloning and nucleotide sequence of leukocidin F-component gene (*lukF*) from methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Biochem. Biophys. Res. Commun., **184**, 640-646.
 - 40) Rogolsky, M. (1979): Noncentric toxins of *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Rev., **43**, 320-360.
 - 41) Smith, M.L., Price, S.A. (1938): Staphylococcal gamma-hemolysin. J. Pathol. Bacteriol., **47**, 379-393.
 - 42) Soboll, H., Ito, A., Schaeg, W., Blobel, H. (1973): Leukocidin from *Staphylococci* of different origin. Zentralbl. Bakteriell. Hyg. Abt. Orig., **224**, 184-193.
 - 43) Song, L., Hobaugh, M.R., Cheley, S., Shustak, C., Bayley, H., Gouaux, J.E. (1996): Structure of Staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. Science, **274**, 1859-1866.
 - 44) Sudo, K., Choorit, W., Asami, I., Kaneko, J., Muramoto, K., Kamio, Y. (1995): Substitution of lysine for arginine in the N-terminal 217th amino acid residue of the H₇II of Staphylococcal γ -hemolysin lowers the activity of the toxin. Biosci. Biotech. Biochem., **59**, 1786-1789.
 - 45) Sugawara, N., Tomita, T., Kamio, Y. (1997): Assembly of *Staphylococcus aureus* γ -hemolysin into a pore-forming ring-shaped complex on the surface of human erythrocytes. FEBS Lett., **410**, 333-337.
 - 46) Supersac, G., Prevost, G., Piemont, Y. (1993): Sequencing of leukocidin R from *Staphylococcus aureus* P83 suggests that Staphylococcal leukocidins and gamma hemolysin are member of a single, two component family of toxins. Infect. Immun., **61**, 580-586.
 - 47) Taylor, A.G., Bernheimer, A.W. (1974): Further characterization of Staphylococcal gamma-hemolysin. Infect. Immun., **10**, 54-59.
 - 48) Tomita, T., Kamio, Y. (1997): Molecular biology of the pore-forming cytotoxins from *Staphylococcus aureus*, α - and γ -hemolysins and leukocidin. Biosci. Biotech. Biochem., **61**, 565-572.
 - 49) Wang, X., Wilkinson, B.J., Jayaswal, R.K. (1991): Sequence analysis of a *Staphylococcus aureus* gene encoding a peptidoglycan hydrolase activity. Gene, **102**, 105-109.

- 50) Woodin, A.M. (1959): Fractionation of a leukocidin from *Staphylococcus aureus*. Biochem. J., **73**, 225-237.
- 51) Woodin, A.M. (1960): Purification of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus*. Biochem. J., **75**, 158-165.