農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

Functional analysis of Staphylococcal bi-component toxins produced by Staphylococcus aureus from bovine mastitic milk

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2019-03-22
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 秦, 英司
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002204

研究紹介

牛乳房炎由来黄色ブドウ球菌が産生するロイコシジンの機能解析

秦　英司[1)]

Functional analysis of Staphylococcal bi-component toxins produced by *Staphylococcus aureus* from bovine mastitic milk

Eiji HATA[1)]

はじめに

牛乳房炎はわが国乳用牛の約30％の疾病に関与し，酪農家にとって最も経済的損失が大きい疾病である。黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*：SA）は牛乳房炎の重要な原因菌の一つであり，抗生物質投与による乳房内からの排除が極めて困難な，いわゆる「難治性牛乳房炎」の原因菌である。

牛乳房炎の原因となるSAの多くはmultilocus sequence typing（MLST）によりclonal complex（CC）97，CC133，CC479およびCC705に型別される菌株群である。これらは世界中の反すう獣に蔓延しているにもかかわらず，反すう獣以外の動物からの分離報告が極めて少ない特殊な菌株群である。わが国ではCC97およびCC705の2つのSA菌株群が牛乳房炎原因菌として広く蔓延している[1)]。CC97およびCC705は血清型Ⅵ型のコアグラーゼ，ならびに二成分膜孔形成毒素（staphylococcal bi-component toxin：SBCT）であるγヘモリシン（HLG），ロイコシジン（LukE/LukD，LukM/LukF'-PV）を共通の病原因子として産生するが，これらのうちLukM/LukF'-PVはCC97，CC133，CC479およびCC705に特有の病原因子である[1) 2) 3)]。SAが産生する病原因子や菌体成分は病勢に深く関与すると考えられ，SBCTの一部はヒトやマウスの赤血球や白血球に作用して細胞傷害や炎症を誘発することが報告されている[4) 5) 6)]。

研究担当者はSAによる牛乳房感染（IMI）ならびに牛乳房炎発病機構の一端を解明するため，平成22～23年度の動物衛生研究所重点強化研究（交付金）において，LukM/ LukF'-PVをはじめとするSBCTの牛由来各種細胞に対する機能解明を目的に研究を実施した。本報告では重点強化研究で得られた成果について，その概要を紹介する。

試験方法

わが国の牛乳房炎乳由来SA計12株（CC97：5株，CC705：5株，CC15：1株，CC30：1株），ヒト由来SA計1株（CC121），反すう獣由来SAのうち全ゲノム配列が報告されている計3株（ED133（CC133），LGA251（CC425），RF122（CC705）），およびヒト由来市中感染型メチシリン耐性SAであるMW2（CC15）についてSBCTの推定アミノ酸配列を比較解析した。

牛乳房炎乳由来SA（CC30，CC97，CC705）の遺伝子からSBCTの各因子（LukM，LukF'-PV，LukE，LukD，LukS-PV，LukF-PV，HlgA，HlgCおよびHlgB）をGST fusion組換え蛋白質発現系を用い作製した。

牛由来細胞のうち白血球については牛頸静脈血から調整した。まず牛静脈血をFicoll-conray液を用いた密度勾配遠心により多形核白血球（PMN）と単核球系細胞に分けた。次に単核球系細胞から免疫磁気ビーズによりCD14陽性細胞を分離し，組換え牛コロニー刺激因子を添加・培養後，接着能を有する細胞をマクロファージ（Mφ）として用いた。一方，単核球系細胞のうち接着能のない細胞をリンパ球として用いた。また，牛乳房組織を細切し，各種蛋白分解酵素で処理後，接着能を示す細胞を乳腺上皮細胞（MEC）として用いた。

牛由来細胞に対するSBCTの細胞傷害性をMTT試験によって解析した。SBCTの膜孔形成能については，膜

1）農研機構 動物衛生研究所 寒地酪農衛生研究領域

孔形成の結果起こる細胞内へのCa^{2+}流入をフローサイトメトリにより測定して評価した。なお，SBCTの細胞傷害能の有意差検定はTwo way-ANOVAを用いて実施した。

組換えSBCTの催炎症性は牛由来細胞に細胞傷害可能濃度以下のSBCTを添加し，7時間反応後，各種サイトカインmRNAの発現をリアルタイムPCRにより測定して評価した。

結果の概要

SBCTであるHLG，LukE/LukDおよびLukM/LukF'-PVの遺伝子は牛乳房炎乳由来株のうちCC97，CC133およびCC705に共通に認められた。しかしながら，HLGの構成因子の一つ（*hlgB*）はCC705菌株群で偽遺伝子化していた。同様に*lukE*はCC97菌株群の一部とCC133菌株で偽遺伝子化していた。SBCTであるパントンバレンタインロイコシジン（PVL）遺伝子（*lukS-PV*/*lukF-PV*）は牛乳房炎乳由来株ではCC15菌株1株にしか認められず，CC97，CC705およびCC133では認められなかった。またCC97菌株およびCC705菌株が保有するすべてのSBCT構成因子は，両菌株群間でアミノ酸配列の相違が認められた。

LukM/LukF'-PVは牛貪食細胞（PMN，単球，Mφ）に対して高い膜孔形成能ならびに細胞傷害能を示したが，牛リンパ球およびMECに対しては膜孔形成能ならびに細胞傷害能を示さなかった。LukM/LukF'-PVの牛PMNに対する細胞傷害能はLukE/LukDおよびPVLよりはるかに高かったが，HLGとは同程度であった。一方，LukM/LukF'-PVの牛Mφに対する細胞傷害能は他のSBCTより有意に高かった。CC97菌株およびCC705菌株のLukM/LukF'-PV間にはLukMおよびLukF'-PVそれぞれにおいて3アミノ酸の相違があったが，両者の細胞傷害性には有意差は認められなかった。一方，CC97菌株から作製したLukE/LukDは牛Mφに対して弱いながらも細胞傷害能を示したが，CC705菌株から作製したLukE/LukDは牛Mφに対して全く細胞傷害能を示さなかった。CC97菌株およびCC705菌株のLukE/LukD間にはLukEで2アミノ酸，LukDで3アミノ酸の相違が認められた。

牛PMN，Mφおよびリンパ球において，SBCTの添加によるサイトカインmRNA（IFN-γ，TNF-α，TGF-β，IL-1β，IL-4，IL-6，IL-8，IL-10およびIL-18）発現量の変化は認められなかった。

考 察

反すう獣由来SAに特有の病原因子であるLukM/LukF'-PVは，牛貪食細胞に対して高い膜孔形成能ならびに細胞傷害能を示した。Barrioら[7]もLukM/LukF'-PVが牛PMNに対し他のSBCTよりも高い膜孔形成能を示すことを報告しているが，著者はさらにLukM/LukF'-PVが示す高い細胞傷害能はあらゆる牛貪食細胞（PMN，単球およびMφ）で認められ，その高い活性はCC97菌株およびCC705菌株で有意差なく認められることを明らかにした。一方，CC97菌株群，CC133菌株およびCC705菌株群において，LukM/LukF'-PV以外のSBCTは偽遺伝子化しているものもあり，一部は牛貪食細胞への細胞傷害能が極端に低下していた。LukM/LukF'-PV以外のSBCTは，牛への感染のために必要不可欠な病原因子ではないのかもしれない。

SBCTはヒトやマウスの白血球の場合，炎症性サイトカインの発現を誘導することが知られているが，牛貪食細胞やリンパ球の場合，各種サイトカインの発現には無関係のようである。牛MECの場合でも同様の結果が報告されていることから，LukM/LukF'-PVをはじめとしたSBCTは牛乳房感染に際し，直接的に乳房炎の原因物質とはなっていないようである。

SAによる乳房炎の特徴として，多くの場合潜在性乳房炎となることと，長期間にわたりIMIが持続することが挙げられる。このような病勢はSAによる乳房炎の早期発見，蔓延防止ならびに予防を困難にする。一方，今回明らかとなった牛貪食細胞に対するLukM/LukF'-PVの作用特性は，SAによる牛乳房炎が示す上述の病勢と一致する部分が多くある。つまり，健康な状態である感染初期の乳房内で，病原微生物排除を担う主たる細胞であるMφに対し，LukM/LukF'-PVは活性化させることなく細胞傷害を引き起こすことが可能であると推測される。SAによる潜在性乳房炎や長期間にわたるIMIに，LukM/LukF'-PVがどのように関わるのか，今後さらに検討する必要がある。

参考文献

1）Hata, E., Katsuda, K., Kobayashi, H., et al.: Genetic variation among *Staphylococcus aureus* strains from bovine milk and their relevance to methicillin-resistant isolates from humans. J. Clin. Microbiol. 48, 2130-2139 (2010).

2）Guinane, C.M., Ben Zakour, N.L., Tormo-Mas, M.A., et al.: Evolutionary genomics of *Staphylococcus aureus*

reveals insights into the origin and molecular basis of ruminant host adaptation. Genome Biol. Evol. 2, 454-466 (2010).

3) Schlotter, K., Ehricht, R., Hotzel, H., et al.: Leukocidin genes lukF-P83 and lukM are associated with *Staphylococcus aureus* clonal complexes 151, 479 and 133 isolated from bovine udder infections in Thuringia, Germany. Vet. Res. 43, 42 (2012).

4) Hensler, T., Köller, M., Prévost, G., et al.: GTP-binding proteins are involved in the modulated activity of human neutrophils treated with the Panton-Valentine leukocidin from *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 62, 5281-5289 (1994).

5) König, B., Prévost, G., Piémont, Y., et al.: Effects of *Staphylococcus aureus* leukocidins on inflammatory mediator release from human granulocytes. J. Infect. Dis. 171, 607-613 (1995).

6) Tomita, T. & Kamio, Y.: Molecular biology of the pore-forming cytolysins from *Staphylococcus aureus*, alpha- and gamma-hemolysins and leukocidin. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61, 565-572 (1997).

7) Barrio, M.B., Rainard, P. & Prévost, G.: LukM/LukF'-PV is the most active *Staphylococcus aureus* leukotoxin on bovine neutrophils. Microbes. Infect. 8, 2068-2074 (2006).