

Chimeric mutants of staphylococcal hemolysin, which act as both one-component and two-component hemolysin, created by grafting the stem domain

The FEBS Journal (2022)

Nouran Ghanem, Natsuki Kanagami, Takashi Matsui, Kein Takeda, Jun Kaneko, Yasuyuki Shiraishi, Christian A. Choe, Tomomi Uchikubo-Kamo, Mikako Shirouzu, Tsubasa Hashimoto, Tomohisa Ogawa, Tomoaki Matsuura, Hang Po-Ssu, Takeshi Yokoyama, and Yoshikazu Tanaka

Summary

黄色ブドウ球菌は、数種類の溶血性膜孔形成毒素（PFTs）を発現しており、それらはすべて共通してキャップ、リム、ステムの3つのドメインから構成されている。PFTsは可溶性のモノマーとして発現し、多量体になることで赤血球の細胞膜を貫通するβ-バレル孔を形成する。その際、ステムドメインは、膜孔を形成するために大きく構造が変化する。ブドウ球菌のPFTsは、1成分型のα-ヘモリジン（α-HL）と2成分型のγ-ヘモリジン（γ-HL）の2つに分類される。α-HLはホモ7量体を形成し、γ-HLはF成分（LukF）とS成分（Hlg2）からなるヘテロ8量体を形成する。PFTsはナノポアを用いたセンサーの材料としても利用されており、その機能特性に関する知見は、新たな人工PFTsの開発に役立つ。しかし、PFTsは、膜貫通型β-バレルを形成するのに大きな構造変化を必要とするため、β-バレル孔を有するPFTsの人工設計は依然として困難である。

本研究では、大きな構造変化を伴い形成されるβ-バレルの設計法則を調べるために、α-HLのキャップ/リムドメインとLukFまたはHlg2のステムドメインからなるキメラ変異体を作製した（AFキメラ変異体またはAGキメラ変異体）。作成したキメラ変異体の生化学的解析と電子顕微鏡観察の結果から、そのうちの1つは7量体の1成分型PFTを、1つは7量体の1成分型PFTと7量体/8量体の2成分型PFTの両方を形成することが明らかとなった。また、すべてのキメラ変異体は、SDS耐性のオリゴマーを形成していた。1成分型と2成分型の特徴を併せ持つPFTsのキメラ変異体から構成されるβ-バレル孔を設計し、ステムドメインがPFTsの膜孔形成に大きな影響を与えることを明らかにしたのは本研究が初めてである。本研究により得られた知見は、黄色ブドウ球菌が持つPFT β-バレルのさらなる応用に向けたエンジニアリングに有益な情報を提供する。

キメラ変異体の作成およびその活性の評価

膜貫通型β-バレルとキャップドメインの間のループ領域（Triangle region）の長さが異なるAFキメラ変異体とAGキメラ変異体をそれぞれ3種類作成し、それらの溶血活性を測定した。その結果、AF2とAF3のみがウサギ赤血球への溶血活性を示した。一方で、溶血活性に関わらず全てのキメラ変異体は多量体を形成した（α-HLおよびγ-HLはMPD存在下で多量体下する）。また、AF2とAF3間で異なるアミノ酸を変異させたAF2(F110K)とAF2(K151V)の溶血活性を測定した結果、AF2よりも顕著に高い活性を示した。これらの結果から、LukFとHlg2のステムはTriangle regionの設計に関係なく多量体を形成するが、溶血活性にはその設計が重要であることが明らかとなった。

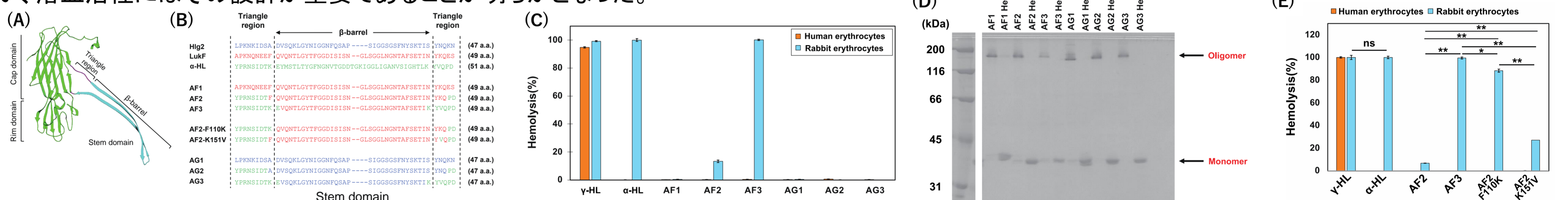


Figure 1. (A) α-HLの立体構造. (B) ステムドメインのアミノ酸配列のアライメント. (C) WT-HLおよびキメラ変異体の赤血球溶血活性. (D) MPDにより多量体化させたキメラ変異体のSDS-PAGEの結果. (E) WT-HL、キメラ変異体、およびAF2変異体の赤血球溶血活性.

AF3およびAG2の負染色電子顕微鏡単粒子解析

溶血活性を持つAF3および溶血活性を持たないAG2を負染色電子顕微鏡観察に供し、得られた画像を用いて単粒子解析を行った。その結果、AF3はWT-HLと同様の7量体からなる孔を形成するのに対し、AG2は不完全な孔を形成することが明らかとなった。

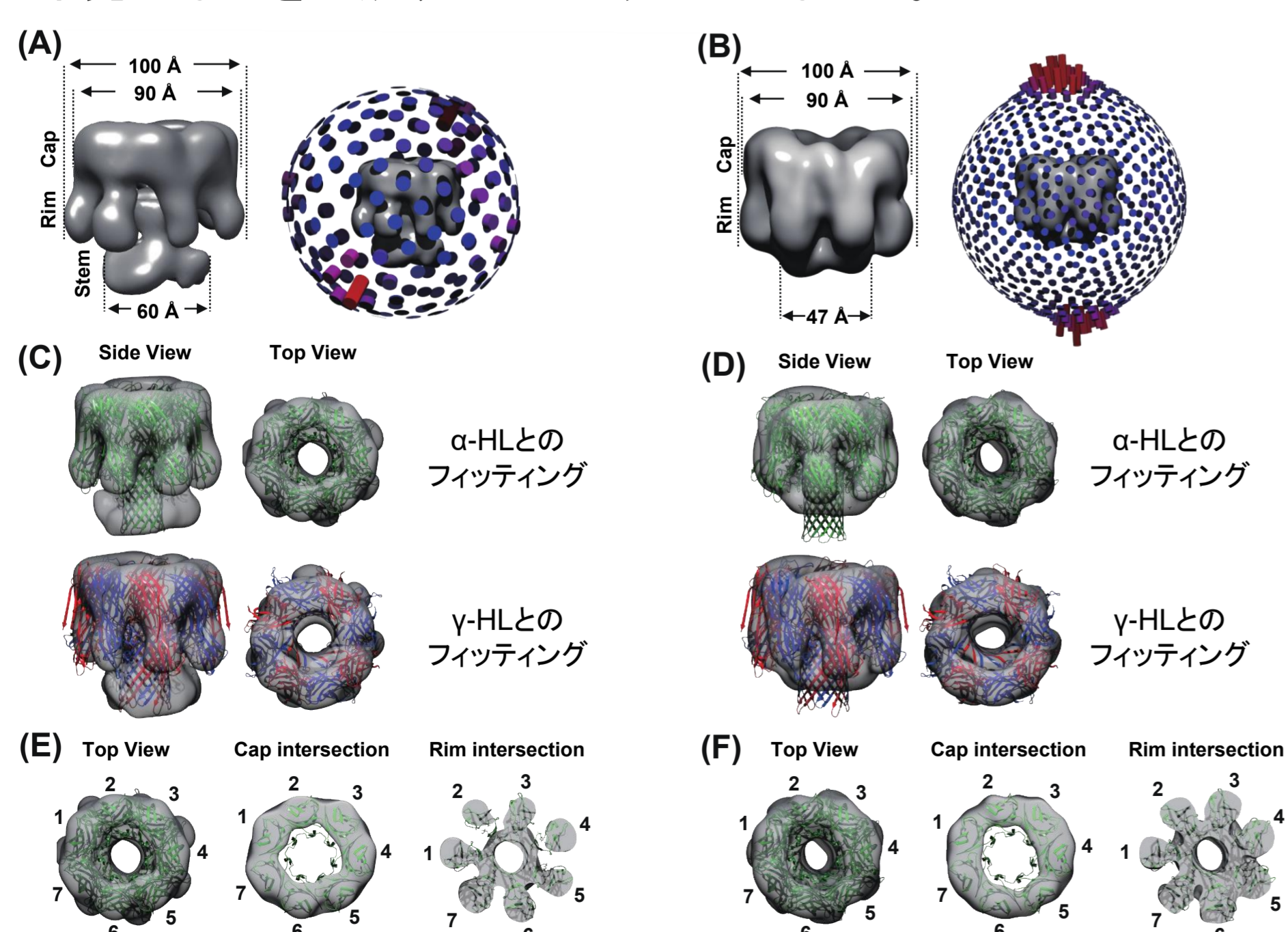


Figure 2. (A) AF3多量体の三次元マップ. (B) AG2多量体の三次元マップ. (C) WT-HL多量体とAF3多量体マップのフィッティング. (D) WT-HL多量体とAG2多量体マップのフィッティング. (E) AF3多量体マップの断面図. (F) AG2多量体マップの断面図.

AGs存在下でのAF2の溶血活性および膜孔形成能の評価

AGs存在下でAF2の溶血活性を測定したところ、AF2単体よりも高い活性を示した。これは、AGsの存在によりAF2の膜孔形成能が向上したことを示す。そのメカニズムを明らかにするため、AF2にGFPを融合させた変異体（AF2-GFP）を作成し、単体またはAG2存在下で負染色電子顕微鏡単粒子解析を行った。その結果、AF2-GFP/AG2は7量体および8量体両方の孔を形成することが明らかとなった。この結果から、AGsの共存によるAF2の溶血活性の向上は、AF2とAG2が交互に会合する8量体の孔形成に起因することが示唆された。

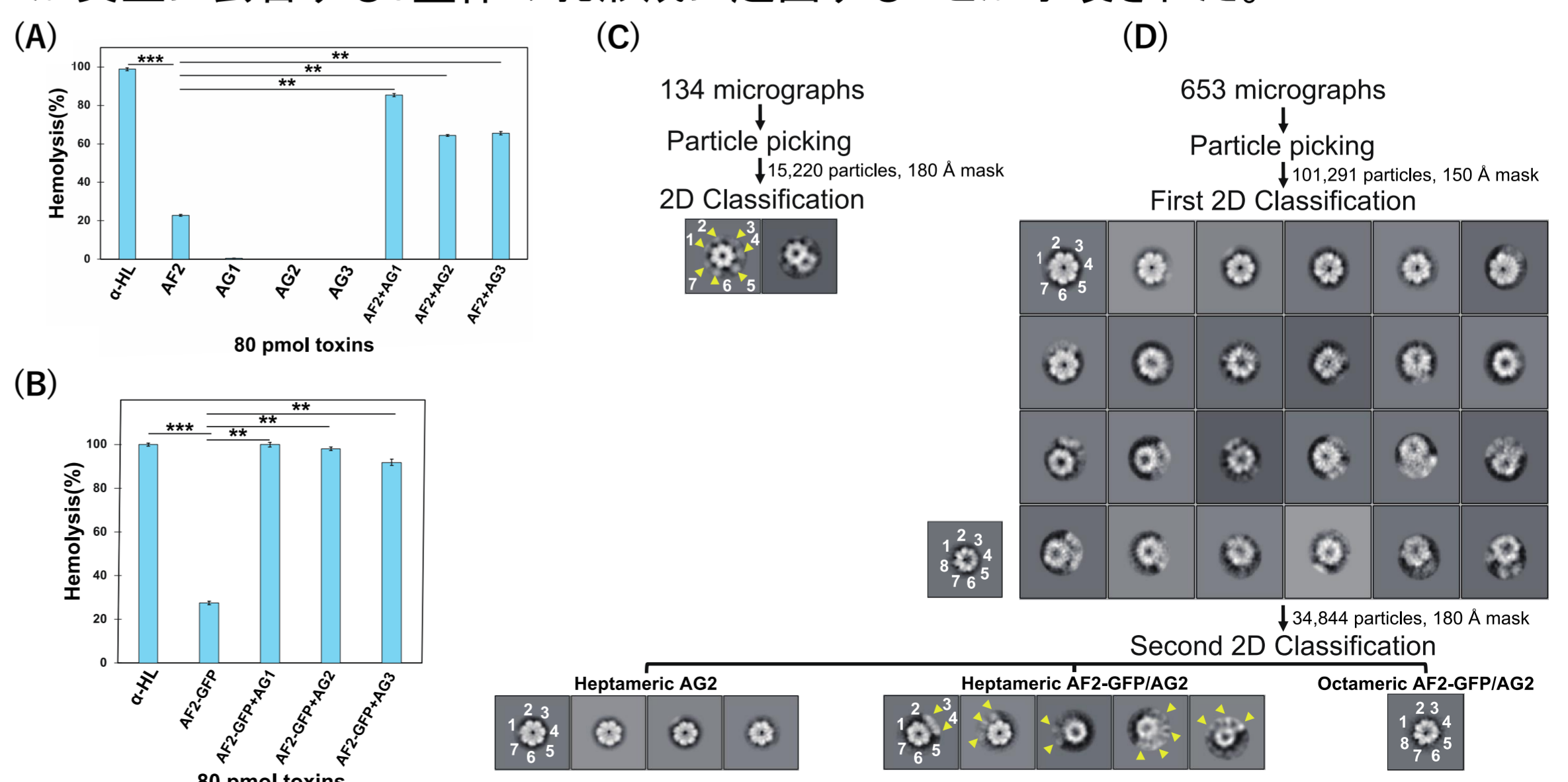


Figure 3. (A) WT-HLおよびAGs、AF2+AGsの溶血活性. (B) α-HLおよびAF2-GFP、AF2-GFP+AGsの溶血活性. (C) AF2-GFP多量体の二次元平均像. (D) AF2-GFP/AG2の二次元平均像.