

厚生科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

劇症型レンサ球菌感染症の病態解明
及び治療法の確立に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 浜田茂幸

平成13年(2001年)3月

目 次

I. 総括研究報告書	
劇症型レンサ球菌感染症の病態解明及び治療法の確立に関する研究-----	1
浜川 茂幸	
II. 分担研究報告	
1. A 群レンサ球菌の新規フィブロネクチン結合タンパクの分子-----	15
生物学的解析	
浜田 茂幸	
2. GAS の産生する Streptococcal pyrogenic exotoxin-B の遺伝子ク-----	19
ローニングと発現に関する研究	
大國 寿士	
3. M1, M3, M4 および M12 型 A 群レンサ球菌の性状-----	25
—劇症型感染症との関連性について—	
内山 竹彦	
4. 劇症型起炎株の分子疫学と病原因子の分子遺伝学的解析-----	29
渡辺 治雄	
5. A 群レンサ球菌の迅速高度検出法の開発及び症候分類別プロ-----	33
テオーム解析, 特に SpeF 毒素について	
太田 美智男	
6. 劇症 A 群レンサ球菌感染症におけるプロテアーゼの病原性発-----	35
現機構の解析と治療法の開発	
赤池 孝章	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	41
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	43

劇症型レンサ球菌感染症の病態解明及び治療法の確立に関する研究

(主任) 研究者 浜田 茂幸 大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子感染制御学講座 教授

研究要旨 劇症型 A 群レンサ球菌感染症 (TSLs) 患者から最も高頻度に分離される M1 型の GAS のゲノム遺伝子データベースから、新規菌体表層タンパク質 (Fba) を分離し、その病原性に及ぼす影響と機能解析を試みた。その結果、Fba はフィブロネクチンと結合し、咽頭上皮細胞株への付着と侵入に関与することが示された。次に、GAS の産生する菌体外毒素の一つである Streptococcal pyrogenic exotoxin-B (SPE-B/SCP) をコードする *speB* 遺伝子を大腸菌に組換え、チオールプロテアーゼ活性を示す組換え型 SPE-B/SCP (rSPE-B/SCP) を作製した。得られた rSPE-B/SCP をモルモット皮内に投与したところ、血管透過性の亢進が認められた。また、SPE-B/SCP は、ヒト単核球由来 U937 細胞に caspase-3 活性の上昇をもたらしてアポトーシスを誘導した。このようなアポトーシス誘導は、*Serratia marcescens* 56 kDa プロテアーゼ、および *Pseudomonas aeruginosa* エラスターゼなどの細菌性プロテアーゼにおいても同様に認められた。この際、細胞内の c-IAP (inhibitor of apoptosis) 1 タンパク質の消失が認められ、細菌性プロテアーゼが、宿主細胞内の c-IAP1 の分解を介してアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。さらに、GAS のもう 1 つのプロテアーゼである C5a-ペプチダーゼを欠失させた変異株を用いて新たなプロテアーゼを検索したところ、強力なブラジキニン (BK) 分解活性を持つペプチダーゼが見いだされた。次いで、GAS の産生する菌体外分泌タンパク質を二次元電気泳動を用いて解析を行った。その結果、SPE-B/SCP, SPE-F, ストレプトリジン O といった既知の菌体外毒素以外に、新たに酵素活性を持つ病原性に関連すると考えられるタンパク質の同定に成功した。遺伝学的な側面からは、1990 年代に増加した M3 型菌と 1980 年以前に分離された菌で差違の認められる DNA 領域の塩基配列を決定した。その結果、少なくとも 10 個の ORF の存在が認められた。1 つの ORF を除く 9 つの ORF は、1990 年代に分離された M3 型に共通して存在することが判明した。さらに、この領域は、二本鎖 DNA フェージによりもたらされた可能性が示唆された。さらに、TSLs で高頻度に分離される M1 および M3 型菌と、非 TSLs 例で高頻度に分離される M4 および M12 型菌について、それぞれ TSLs 例および非 TSLs 例由来菌で種々の病原因子について検討した。その結果、スーパー抗原量、NAD glycohydrolase 活性、SPE-A および SPE-C 遺伝子の有無などは M 型により大きく異なる事が示された。マウス致死性は実際の TSLs での分離頻度とよく相関した。M3 型菌および M4 型菌においては、TSLs 由来菌は非 TSLs 由来菌に比べ高い SLO 産生とマウス致死性、低い SPE-B 産生性を示した。

分担研究者：		
大国 寿士	日本医科大学老人病研究所 教授	
内山 竹彦	東京女子医科大学微生物学免疫学教室 教授	
渡辺 治雄	国立感染症研究所細菌部 部長	
太田美智男	名古屋大学大学院医学研究科 教授	
赤池 孝章	熊本大学医学部 助教授	

A. 研究目的

A 群レンサ球菌 (GAS) は、近年、劇症型 A 群レンサ球菌感染症 (TSLs) の起原因菌として注目を集めている。TSLs は GAS による重度の敗血症、DIC 様の病態を特徴とし、病態の進行が急激で死亡率も高いため、有効な治療法や予防法の確立が求められている。これまでの研究によって GAS には数多くの病原因子が存在すると示唆されているが、TSLs 発症の機序は不明な点が多い。その理由としては、(1) 未知の病原因子が未だ数多く存在していること (2) 既知の病原因子も環境などの要因によって発現量・機能が変化すること等が挙げられる。本研究では、TSLs 患者分離株および対照分離株 (咽頭炎患者分離株や実験室株) を用いて、GAS ゲノムデータベースの情報や分子疫学的・分子遺伝学的手法による病原遺伝子の検索を行う。さらに、産生タンパク質のプロテオーム解析による未知の病原因子の同定、および菌体成分の病態成立における作用機序を明らかとし、TSLs の発症メカニズムに基づいた適切な治療法・予防法の開発を目的とする。

B. 研究方法

1. GAS ゲノムデータベースからの新規菌体表層タンパク質の同定とその機能解析

GAS 全ゲノムデータベースの塩基配列より GAS の菌体表層タンパク質に認

められる LPXTG モチーフを有する遺伝子を検索した。得られた新規表層タンパク質遺伝子 *fba* の組換えタンパク質 rFba は TSLs 患者由来の臨床分離株 SSI-9 株 (M1 型) の染色体 DNA をもとに PCR 法にて増幅し、pGEX-6P-1 プラスミドベクターを用いて発現・精製した。抗血清は rFba をウサギに免疫して作製した。菌体での発現はこの抗血清を用いて確認した。*fba* 遺伝子の分布は特異的プライマーを用いた PCR 法により検索した。さらに、*fba* 遺伝子を有する GAS 菌株について DNA 塩基配列を決定した。Fba の機能解析は、各種免疫グロブリン (Ig) およびフィブロネクチン (Fn) に対する結合能をビオチン化 Fn, IgA, IgG, および IgM を用いて検索した。Fba を欠失させた変異株の宿主細胞への付着・侵入率は、ヒト咽頭上皮細胞 HEp-2 株を用いて測定した。Fba の致死毒性に対する影響は、Fba 変異株を 6 週齢の CD-1 マウスに皮下接種し、その致死毒性を野生株と比較した。*fba* 遺伝子の発現機構の解析は、*fba* 遺伝子の 5' 末端上流域および 3' 末端下流域の DNA 塩基配列を検索し、*fba* 遺伝子の 5' 末端上流域に存在する *mga* 遺伝子欠失株を作製して *fba* 遺伝子の発現の変化を RT-PCR 法で検索した。

2. リコンビナント SPE-B/SCP (rSPE-B/SCP) の精製と活性の測定

GAS NZ131 の染色体 DNA より、PCR 法にて *speB* 遺伝子およびそのプロモーター領域と推測される周辺遺伝子を増幅した。得られた増幅断片を pBluescript II SK⁺ プラスミドベクターに組み換え、これを pSK-SCP とした。得られた pSK-SCP を *Escherichia coli* JM109 に組み換え、形質転換体 *E. coli* B10 を得た。rSPE-B/SCP の精製は、IPTG の添加による発現誘導後の培養上清を分取し、80% 硫酸アンモニウム沈殿による濃縮後、イオン交換カラムクロマトグラフィー、

ゲル濾過クロマトグラフィーにより分画した。分画の際、それぞれの画分についてカゼイン分解活性を指標にチオールプロテアーゼ活性を確認した。得られた精製画分について抗 SPE-B/SCP IgG 抗体を用いて rSPE-B/SCP を検出した。得られた rSPE-B/SCP およびその前駆体である組換え型 zymogen (rZym) のアミノ酸配列は、N 末端アミノ酸分析により配列を決定した。機能評価は、チオールプロテアーゼ特異的阻害剤である E-64 および Box-LVG-CHN₂ を用いてアゾカゼイン分解活性の阻害、およびスキムミルク寒天での透明帯形成阻害によって評価した。血管透過性に対する影響は、モルモットの皮下に rSPE-B/SCP を投与し、さらに 1% Evans Blue を静注することによって Evans Blue の血管からの漏出を観察した。

3. SPE-B/SCP によるアポトーシス誘導機構の解析

GAS の NZ amine 培養液上清より天然型 SPE-B/SCP を分離・精製した。次に、ヒト単球様 U937 細胞の SPE-B/SCP や *Serratia marcescens* 56 kDa プロテアーゼ、および *Pseudomonas aeruginosa* エラスターゼによるアポトーシス (細胞死) 誘導を、エチジウムブロミド/アクリジンオレンジで染色法、および、アネキシン V-FITC とヨウ化プロピディウムを用いた染色によりフローサイトメーターにて検討した。また、アポトーシス誘導に伴った caspase-3 活性の上昇は合成基質である MOCac-Asp-Glu-Val-Asp-Ala-Pro-Lys (Dnp) -NH₂ の分解を指標に測定した。この際、Ac-DMQD-CHO (caspase-3) や Z-VAD-FMK、および E-64 などの特異的阻害剤を使って阻害実験を行った。あわせて、細胞内抗アポトーシスタンパク質である Bcl-2 や c-IAP (inhibitor of apoptosis) 1 の発現におよぼす細菌性プロテアーゼの影響について解析した。

4. GAS の保有する新規のブラジキニン (BK) 分解酵素の同定

新規の BK 分解酵素の同定は、C5a-ヘプチダーゼ欠損株の菌体の超音波破砕物から疎水性カラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、分離精製を行った。BK 分解酵素活性は、合成 BK ペプチドを各種 GAS 菌体抽出分画と反応させ、その分解を薄相クロマトグラフィーにより検出した。さらに、他群のレンサ球菌の金属依存性ヘプチダーゼファミリーに属すると思われる遺伝子構造を持つ、ヘプチダーゼ遺伝子を用いて作成された組み換え蛋白の BK 分解特性について、LC-MS により解析し、これを上記のヘプチダーゼと比較検討した。

5. GAS 発現タンパク質の二次元電気泳動によるプロテオーム解析

GAS 臨床分離株を培養し、菌体外分泌タンパク質を抽出し、その発現状況を二次元電気泳動法により解析した。二次元電気泳動法にて検出されたスポットは、N 末端のアミノ酸分析を行い、データベースからそのタンパク質を同定した。また同定されたタンパク質で、今まで報告されていない場合はそのアミノ酸配列から DNA 配列を推定し、PCR 法にてクローニングした。クローニングした遺伝子はタンパク質発現ベクターに組み込みリコンビナントタンパク質を合成し、その生物学的機能解析を行った。

6. M3 型 TSLs 由来株の新規病原遺伝子の解析

1990 年代以降の臨床分離株の DNA 塩基配列を基に、プライマーを設計した。このプライマーを用いて PCR 法により約 8.0 kb の DNA 領域を増幅し、塩基配列を決定した。相同性検索は BLASTP 検索を用いて行った。また、TSLs 由来の M3 型に特異的と考えられるファージ DNA の調整を行った。5 ml の P 培地 (6%

proteose peptone, 0.05 M NaCl, 2.5 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM CaCl₂, 0.05 M グルコース, 5% (v/v) 馬血清) 中で培養後, マイトマイシン C の添加により, フェージを誘導した. 溶菌した培養上清より 20% PEG8000 溶液でフェージ粒子を沈殿させ, フェノール抽出によりフェージ DNA を抽出した.

7. M1, M3, M4 および M12 型 A 群レンサ球菌の性状の検討

TSLs 症例からの分離頻度の少ない M4 型菌と M12 型菌, 高頻度に分離される M1 型菌と M3 型菌について, TSLs 由来菌株と非 TSLs 由来菌株を収集した. 各 M 型について TSLs 由来菌および非 TSLs 由来菌をそれぞれ 4 株ずつ計 8 株の構成とし, 必要に応じて例数を増やした. マウスの致死毒性は, 種々の量の菌を腹腔内投与後 7 日間生死観察を行い, 各菌量での死亡率より LD₅₀ 値を算出した. 溶血毒素産生量は, 菌の培養上清によるヒツジ赤血球の溶血誘導率から算出した. SPE-A, SPE-C および新規挿入 DNA 配列 (AB006751) は PCR 法で検討した. 各菌体外毒素 SPE-A, B および C 産生量は, 抗 SPE-A, B または C 抗体を用いた定量的ウエスタンブロッティングにより測定した. 総スーパー抗原性外毒素量は, GAS 培養上清によりヒト末梢血リンパ球を刺激することで産生されるインターロイキン 2 (IL-2) 量を指標として測定した. NAD glycohydrolase 活性は, GAS 培養上清と一定時間反応させた β-NAD の残存量を酵素的還元による非直接的分光学的方法で測定した.

(倫理面での配慮)

実験動物を用いた研究の実施に関しては, 国の勧告などに基づいた各所施設の審査・承認を受け, その指針に則り動物愛護の精神を損なうことの無きように行った. 患者からの材料の取得は, 当該施設の規定に従い, 患者あるいは家族の

承認 (インフォームドコンセント) を得て行った. 患者の個人情報については菌株とその由来間で連結不可能な匿名化を行った上で菌株および結果の発表を行い患者が特定されないように配慮した. 実験内容によっては各所属施設の組換え DNA 実験指針やラジオアイソトープの取扱いの承認を得て, 各実験を行った.

C. 研究結果

1. GAS ゲノムデータベースからの新規菌体表層タンパク質の同定とその機能解析

GAS ゲノムデータベースから LPXTG モチーフを有する ORF を 15 種類見出した. 相同検索の結果, Mga レギュロンの 3' 末端下流域に位置し, *Staphylococcus aureus* の Fn 結合タンパク質 (FBP) の機能ドメインと約 70% の類似性を示す ORF (Fba) が存在した. PCR の結果, *fba* 遺伝子は GAS のみに認められ, なかでも M1, 2, 4, 9, 13, 22, 28, 44, 49, 60, 67, 75, 77, 79, 80, 82, 87 および 89 型に存在した. この Fba について組換えタンパク質を作製し, 各種基質との結合能を調べた結果, Fn と結合することが示された. さらに, Fba の各ドメインについて組換えタンパク質を作製し, Fn 結合領域を検索したところ, Fn は Fba タンパク質のプロリンに富んだ繰り返し領域と結合することが示された. 抗 Fba 血清を用いた GAS の 8 M 尿素抽出菌体表層タンパク質画分のウエスタンブロットの結果から, Fba が GAS 菌体表層に発現していることが確認された. Fba 欠失変異株を用いた HEp-2 細胞への付着・侵入能を検索した結果, 付着・侵入率は共に親株に比して有意に低下した. この Fba 欠失変異株を 6 週齢の CD-1 マウスに皮下接種したところ, 死亡率が親株より有意に低下した. *mga* 遺伝子欠失変異株を用いた RT-PCR の結果より, *fba* 遺伝子が Mga によって正の転写制御を受けることが示唆された.

2. リコンビナント SPE-B/SCP (rSPE-B/SCP) の精製とその活性

pSK-SCP を形質転換して得た *E. coli* B10 株の培養上清中にチオールプロテアーゼ活性が検出されたことより、rSPE-B/SCP が菌体外に分泌されていることが示唆された。このチオールプロテアーゼ活性は、約 27 kDa のタンパク質の溶出画分と相関して推移しており、得られた 27 kDa のタンパク質は、N 末端アミノ酸配列解析により天然型 SPE-B (nSPE-B/SCP) と一致していることが明らかとなった。rSPE-B/SCP のチオールプロテアーゼ活性は、nSPE-B のそれと比較して同等か、あるいはそれ以上であり、また E64 および Box-LVG-CHN₂ の添加により、標品と同様に良好に阻害された。精製後の収量は 6-9 mg/l であった。rSPE-B/SCP によるモルモット皮膚内における血管透過性亢進作用については、nSPE-B/SCP においては 2.4 µg、rSPE-B/SCP においては 1.6 µg を投与した。いずれも広範囲において血管透過性亢進が認められた。病理学的所見においては血管からの赤血球成分の漏出の他、炎症性細胞の浸潤、浮腫および表皮の剥離が観察された。これらの作用は、1 mM の DTT 添加により増強された。

3. SPE-B/SCP によるアポトーシス誘導機構の解析

SPE-B/SCP は、ヒト単核球由来 U937 細胞に caspase-3 活性の上昇をもたらすアポトーシスを誘導した。この際、各種 caspase 阻害剤や E-64 により、細胞死はコントロールレベルまで減少した。このようなアポトーシス誘導は、*Serratia marcescens* 56 kDa プロテアーゼ、および *Pseudomonas aeruginosa* エラスターゼなどのその他の細菌性プロテアーゼにおいても同様に認められ、この際、細胞内の Bcl-2 のレベルには変動がなかったが、c-IAP1 はプロテアーゼ処理

後 3-4 時間後より著明に減少していた。

4. 新規 BK 分解酵素の同定

C5a-ペプチダーゼ欠損株では C5a-ペプチダーゼ活性は欠失していたものの、BK 分解活性は保持されていることから、A 群レンサ球菌が、C5a-ペプチダーゼ以外に BK などの生理活性ペプチドを分解するプロテアーゼ (ペプチダーゼ) を産生することを示している。その BK 分解酵素活性は、金属キレート剤である、o-phenanthroline により完全に抑制され、Co あるいは Mn を添加することにより回復した。このことは本酵素が金属依存型ペプチダーゼであることを示している。また、GAS の組換えペプチダーゼも全く同様の金属依存性を示し、さらに、LC-MC による BK 分解産物を解析したところ、BK は、本ペプチダーゼによりフェニルアラニン末端側で特異的に切断されていた。

5. GAS 発現タンパク質の 2 次元電気泳動によるプロテオーム解析

二次元電気泳動法を用いて TSL5 由来の臨床分離株から培養上清中に分泌される菌体外タンパク質の解析を行い、SPE-B、SPE-F、ストレプトリジン O をはじめ既知の分泌タンパク質のほか、多くの未報告のタンパク質が検出された。SPE-F に関しては N 末端アミノ酸の配列の異なる二種類のスポットが同定された。検出されたタンパク質の発現パターンは A 群レンサ球菌の M 型に多くは依存しているが、同じ M 型、引き起こした病像の違う株間でも差が見られた。未報告のタンパク質のうち、アミノ酸配列から遺伝子バンクのデータとの比較により、いくつかの酵素活性を持つ新たな病原性に関連すると考えられるタンパク質の同定に成功した。現在すでにその中の 4 種の遺伝子に関して DNA クローニングが終了し塩基配列の決定、リコンビナントタンパク質の作製を行い、未報告の

DNA 分解酵素であることを確認した。一例として臨床経過が非常に特異な症例からの M89 型の臨床分離菌を収集した。細菌学的には二次元電気泳動のタンパク質の定性ではその他の M1, M3 型の株とは異なるものであった。

6. 1990 年代の M3 型株に特異的に見られる DNA 断片の塩基配列の決定

NIH1 (M3) 株をテンプレートとして用い、PCR 法により増幅した約 8.0 kb の DNA 領域の塩基配列を決定した。その塩基配列の ORF 検索の結果、この領域には、10 個の ORF が同一方向に並んで存在していた。そしてその塩基配列から推定されるアミノ酸のホモロジーを検索したところ、5 つの ORF において、*Streptococcus thermophilus* に溶原化しているバクテリオファージの遺伝子がコードするタンパク質と 27~69% 相同性が認められた。それぞれの ORF が 1990 年代の M3 型株に特異的か否かについて各 ORF に特異的なプライマーを用いて PCR により増幅されるかどうかを調べた。その結果、例外はあるものの、1990 年代の咽頭炎由来株、TSLS 由来株で各 ORF は増幅されたが、調べた限りの全ての 1980 年以前の株においては PCR 産物を確認することはできなかった。5 つの ORF はバクテリオファージ遺伝子と相同性があったことから、ファージ DNA をテンプレートとして PCR を行ったところ、塩基配列を決定した領域がすべて増幅されたことから、この領域は二本鎖 DNA ファージによりもたらされたものと考えられた。

7. M1, M3, M4 および M12 型 A 群レンサ球菌の性状の検討

LD₅₀ 値は、M4 型分離菌株では TSLS 由来と咽頭炎由来を問わず全体として高値（低致死性）であったが、後者は前者より低値であった。M12 型菌と M1 型菌では由来の別なく M4 型菌より低値で

あった。M3 型菌では、高値を示す菌株から著しく低値を示す菌株まで様々であった。著しい低値を示す菌株は TSLS 由来の方が多かった。SLO 産生については M4 では TSLS 由来菌株は皆高産生型であったが、非 TSLS 由来菌株では 1 株のみが高産生型だった。M1 型株では非常に産生の少ない 1 株を除いて皆低度の産生を示し、TSLS 由来株でより高かった。M3 型株では 2 株を除いて皆中程度の産生を示し、TSLS 由来株でより高かった。M12 型株は 1 株を除いて SLO 産生は非常に低く、また TSLS との相関は見いだせなかった。SLS 産生については M4 型株では 8 株中すべての TSLS 由来株を含む 5 株が低度の産生を示した。M12 型株では 8 株中 1 株のみで産生を認めた。M1 型株では TSLS 由来の 3 株で産生を認めた。M3 型株では 1 株を除いてすべての菌株で高い産生が認められた。M4 型株および M12 型株のすべての菌は SPE-C 遺伝子のみを保有していた。M1 では TSLS 由来菌中 3 株が SPE-A のみを保有しており、他の 5 株は SPE-A および SPE-C 両方を保有していた。M3 は SPE-A のみを保有していた。M4 型株では、TSLS 由来菌株で SPE-C 産生量が少なかった。M12 型菌株では 1 株以外で SPE-C 産生が認められたが、TSLS との相関は認められなかった。M1 型菌株では、SPE-A 遺伝子保有菌はすべて SPE-A を産生していた。一方、SPE-A については TSLS 由来菌株では非 TSLS 由来菌株に比べ、SPE-A 産生が高かった。M3 型株は皆 SPE-A を産生していたが、TSLS との相関は認められなかった。M4 型株 および M12 型株では、M1 型株および M3 型株に比べ有意に高いスーパー抗原性外毒素産生が認められた。他の M 型に比べ高産生型であった。M1 型株では TSLS 由来の 3 株は相対的に低産生を示したが、これらの株はすべて SPE-C 遺伝子非保有株であった。SPE-B 産生量は菌株により大きく異なっていた。

M4 型株においては TSLs 由来株では SPE-B 産生が認められなかった。M12 型株では TSLs 由来株中 2 株で僅かに産生を認めた。M1 型株では非 TSLs 由来株 4 株中 3 株で相対的に高い SPE-B 産生が認められた。M3 型株では 8 株中 5 株で産生を認め、非 TSLs 由来の 2 株が高産生を示した。AB006751 遺伝子は、M4 型株および M3 型株とも 8 株中 7 株で本遺伝子が検出され、TSLs との相関は認められなかった。M12 型株および M1 型株ではこの遺伝子は検出されなかった。NAD glycohydrolase 活性は、M4 型株では 1 菌株を除いて高活性型、M12 型株では 1 株を除いて低活性型、M1 型株は中活性型、M3 型株は高活性型だった。

D. 考察

Fba タンパク質は、GAS の菌体表層タンパク質に特徴的な C 末端側の LPXTG モチーフと NIH のシグナル配列予測プログラムから推定された 37 アミノ酸残基のシグナル配列を有することから、*in silico* において、菌体表層に発現することが示唆された。また、Fba タンパク質は GAS の他の FBP と同様に繰り返し領域を有し、その領域を介して Fn と結合し、宿主細胞への付着と侵入に関与することが示された。さらに、皮下感染の動物モデルにおいて、Fba タンパク質がマウスの致死性に関与することが示唆された。

fba 遺伝子は GAS のみに存在し、GAS の中でも TSLs 患者から最も高頻度に分離される M1 型の菌株に保存されていることが示された。これまでに GAS のワクチン候補として実験が進められた FBP に、F タンパク質 (Protein F1/Sfb I) が挙げられるが、同タンパク質は M1 型には存在せず、TSLs を視野に入れた免疫原としては不十分と考えられる。以上のことより、Fba タンパク質は GAS の菌体表層に存在する adhesin, invasin 様タ

ンパク質であり、将来の免疫原としての可能性が期待される。そこで、現在はワクチンとしての評価を行うために、Fba タンパク質を用いたマウス免疫実験を行っている。

rSPE-B は *E. coli* 内では不溶性の封入体として発現することが多く、rSPE-B/SCP の精製標品を得ることは必ずしも容易ではない。また、得られた rSPE-B にチオールプロテアーゼとしての酵素活性が十分ではなく、rSPE-B/SCP を単独で用いての研究はほとんど見あたらない。今回構築した rSPE-B/SCP 発現形質転換体では、rSPE-B/SCP は菌体外に分泌されることが明らかとなった。発現誘導の際に IPTG による誘導が必要であることから、プロモーターの一部としてはベクター由来のそれを利用してることが考えられるが、非コード領域の誤翻訳がないこと、あるいはフレームシフト変異を起こしていないことなどから、*speB* 遺伝子の 5' 側に存在したプロモーター領域が、rSPE-B/SCP の転写・翻訳のプロモーターとして作用し、nSPE-B とほぼ同様な発現形式を経て rSPE-B/SCP を菌体外へ分泌させたものと考えられた。

SPE-B/SCP によりヒトマスト細胞、同好塩基球ならびに末梢白血球からヒスタミンが遊離されることをすでに報告しているが、今回の研究により rSPE-B/SCP により血管透過性は亢進した。病理所見的にも赤血球の血管外への漏出、各種炎症性細胞の浸潤が認められると共に浮腫が認められ、また、表皮の剥離が認められた。これらの所見は、DTT の添加によりさらに増強することが明らかとなった。すなわち、チオールプロテアーゼとしての活性を増強することによりその作用も相関して増強することから、このような生物活性の本体は、rSPE-B/SCP がチオールプロテアーゼとして作用した結果であると推測される。この *in vivo* での現象がヒスタミン遊離を介して起こる

か否かは現在のところ必ずしも明らかではなく、さらに検討する必要があるものと考えられる。

これまで、SPE-B/SCP が、アポトーシス誘導活性を有していることが報告されているが、そのメカニズムは今だ不明であるが、最終的にはアポトーシス発現のカスケードの最下流にある caspase の活性化がもたらされる。caspase は、その活性中心に SH 基 (cysteine) を有するチオールプロテアーゼであるが、最近、この SH 基が一酸化窒素 (NO) により修飾 (ニトロソ化) されることにより、caspase 活性が阻害され、その結果、NO が抗アポトーシス活性を発揮することが示されている。実際、これまで我々は、NO の供与剤であるニトロソ化 α 1-プロテアーゼインヒビター (ニトロソ α 1-PI) が、SPE-B/SCP によるアポトーシスの誘導を強く阻害することを報告してきた。さらに、今回の我々の知見より、SPE-B/SCP による c-IAP1 発現の抑制を介して相対的な caspase 活性の上昇がもたらされることにより、アポトーシスが誘導される可能性が示唆された。細菌性プロテアーゼによる宿主細胞内の c-IAP1 の分解は、細菌感染によるアポトーシス誘導の新たな機序と考えられる。これらの知見は、ニトロソ α 1-PI や E-64 などを抗プロテアーゼや抗アポトーシス剤の TSLs 治療への応用の可能性を示唆している。

さらに今回、GAS が、C5a-ペプチダーゼとは異なる新規なプロテアーゼ (ペプチダーゼ) を産生し、これが BK をすみやかに分解不活化することが明らかとなった。本酵素の生化学的特性の詳細は不明であり、今後、組み換え BK ペプチダーゼを用いて、その生化学的・病態生理学的特性を解析していく予定である。

1990 年代に分離された M3 株に特異的な約 8.0 kb の DNA 領域には、少なくとも 10 個の ORF が確認された。そのうち 9 個の ORF は、今回検討した 1990 年

代に分離された M3 株すべてにおいて確認された。これらの ORF は、1980 年以前の M3 株では確認されなかった。このことは、1990 年代の株は、少なくとも 9 個の遺伝子を新たに獲得したことを示唆している。また、今回塩基配列を決定した領域は、2 本鎖 DNA フェージによりもたらされた可能性が示唆された。この結果は、TSLs を引き起こす菌株が 1980 年以降から 1990 年代にかけてフェージが溶原化して病原性を獲得した可能性も考えられる。今後、フェージによりもたらされたと考えられる全領域の塩基配列を決定し、TSLs の発症にかかわる因子を持つかどうかを確認する必要がある。

1990 年代の菌株間では、TSLs 患者由来であろうとも、咽頭炎患者由来であろうともゲノム全体での DNA レベルで明らかな差を確認することができなかった。1990 年代に M3 型の菌株による感染が急激に増加したが、これは単一のクローンに由来していることを強く示唆している。そのクローンの菌には劇症を起こす能力があるが、TSLs を引き起こすかそれとも軽症の感染症でとどまるかは、宿主側の因子が強く絡んでいることが考えられる。このことは、TSLs 患者が発生した家族を調べると、TSLs 患者から分離される菌株と遺伝的に区別つかない菌株が家族の咽頭からも分離されたが、その家族は無症状であるケースが多く見られることから推測される。

TSLs 由来菌株および非 TSLs 由来菌株での各病原因子の産生は、(1) M 型と強く相関するもの、(2) M 型と弱い相関を示すもの、(3) TSLs と相関するもの、(4) 菌により大きく異なるもの、の三種に大別できた。総スーパー抗原性外毒素量、NAD glycohydrolase 活性、spe-a 遺伝子、spe-c 遺伝子および AB006175 配列の存在は M 型と強く相関していた。しかしながら多くの場合例外となる菌が存在することも明らかとなった。LD₅₀ 値は M4, M12 および M1 型

株では M 型からある程度推定が可能だったが、M3 型株は多様であった。SLO, SLS 産生は M4 および M3 型株では高い傾向があり M12 型株では低い傾向があった。M4 および M3 型株では LD₅₀ 値は TSLs 由来菌株で高かった。また SLO 産生は M4, M1 および M3 型株の TSLs 由来菌株で、SLS 産生は M4 および M3 型株の TSLs 由来菌で高かった。SPE-B は M4, M1 および M3 型株では TSLs 由来菌株で低かった。

LD₅₀ 値を群ごとの平均値で比較してみると、M4 (非 TSLs 由来) > M3 (非 TSLs 由来) > M4 (TSLs 由来) > M12 > M3 (TSLs 由来) > M1 の順であった。これは日本における TSLs 症例からの M 型分離頻度と一致している。従って、今回の LD₅₀ 比較が少なくとも部分的には実際の TSLs 症例を反映する可能性が高いことが示唆された。

溶血毒素については M4, M3 および M1 (SLO のみ) 型株では TSLs 産生株は高産生を示したが、M12 型株にはそのような傾向は認められなかった。従って、TSLs における溶血毒素の重要性は M 型によって大きく異なる可能性がある。

スーパー抗原活性を持つ菌体外毒素では TSLs への *spe-a* の関与が示唆されている。今回用いた M1 および M3 型株は皆、*spe-a* 遺伝子を保有していたこと、およびこれらの M 型菌が TSLs から高頻度に分離されることを考えると、SPE-A の有無は TSLs よりもむしろ M 型と強く相関すると考えられる。一方、M1 および M3 型株は低スーパー抗原性外毒素産生型であった。このことは TSLs におけるスーパー抗原性外毒素の関与を否定するものではないが、黄色ブドウ球菌による TSS とは異なり、レンサ球菌のスーパー抗原性外毒素が一義的に TSLs の病態に関与するとは考えにくい。

SPE-B は、M4, M1 および M3 型株では TSLs 由来菌は皆低産生型であった。

TSLs 由来 M1 型株では非 TSLs 由来菌より SPE-B 産生が少ない傾向があることが報告されており、今回の結果は M4 および M3 型株でも同様の傾向があることを示している。

NAD glycohydrolase は M1 型株で、AB006751 は M3 型株で、近年の分離株にのみ見いだされることが報告され、TSLs への関与の可能性が考えられたが、我々の用いた菌株では同じ M 型内で大きな違いは認められなかった。従ってこれらの因子を保有する各 M 型 GAS はすでに広範囲に拡散しているものと思われる。

E. 結論

1. GAS 全ゲノムデータベースから得られた新規菌体表層タンパク質である Fba は、フィブロネクチンに結合し、宿主細胞への付着・定着および病原性に関与することが示された。

2. GAS の産生するチオールプロテアーゼである SPE-B の高発現系を構築した。得られた rSPE-B/SCP には nSPE-B/SCP と比較して同等か、あるいはそれ以上のチオールプロテアーゼ活性を有していた。

3. SPE-B/SCP によるアポトーシス誘導には細胞内のアポトーシス抑制タンパク質である c-IAP1 の分解によって引き起こされることを明らかとした。

4. GAS のブラジキニン分解に関わる新規ペプチダーゼを同定した。

5. 二次元電気泳動法を用いて A 群レンサ球菌の菌体外タンパク質の解析を行い、病原性に関わるいくつかの酵素を同定した。

6. 1990 年代に流行している M3 株は、1980 年以前の流行株と比べて、少なく

とも新たに 9 個の遺伝子を獲得していることが判明した。

7. GAS の病態に関わる病原因子を総合的に検討したが、それらの因子の多くは M 型との相関が認められ、産生状況等は M 型により大きく異なり、それぞれの病原因子の関与の度合いが異なる可能性が強く示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Kawabata, E. Kunitomo, Y. Terao, I. Nakagawa, K. Kikuchi, K. Totsuka and S. Hamada.: Systemic and mucosal immunization with fibronectin-binding protein FBP54 induce protective immune responses against *Streptococcus pyogenes* challenge in mice. **Infect. Immun.** 69: 924-930. 2001.
- 2) S. Kawabata, J. Murakami, Y. Terao, I. Nakagawa and S. Hamada.: Distribution of *Streptococcus pyogenes* superantigens is associated with clinical status. *In* "Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium" (eds. Martin R.D, Tagg, J.) , 2000; pp.175-178, Securacopy Book, New Zealand.
- 3) Y. Terao, S. Kawabata, E. Kunitomo, I. Nakagawa and S. Hamada.: Immunization of mice with streptococcal fibronectin binding protein. *In* "Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium" (eds. Martin R.D, Tagg, J.) , 2000; pp.451-453, Securacopy Book, New Zealand.
- 4) I. Nakagawa, R. K. Kimura, M. Nakata, H. Kuwata, S. Kawabata and S. Hamada.: Effects of receptor-globulins on invasive group A streptococcal infection. *In* "Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium" (eds. Martin R.D, Tagg, J.) , 2000; pp.595-599, Securacopy Book, New Zealand.
- 5) 大國寿士：ヒト喰いバクテリア — 劇症型 A 群レンサ球菌感染症 — 「最近話題の感染症：その基礎と臨床」 **日本医大誌** 67: 371-374. 2000.
- 6) H. Ohkuni, S. Sakurada, Y. Todome, Y. Watanabe and H. Saito.: Analysis of the role of streptococcal cell wall components on inflammatory responses: NF- κ B activation and production of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human peripheral monocytes-derived macrophages. *In* "Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium" (eds. Martin R.D, Tagg, J.) , 2000; pp.565-567, Securacopy Book, New Zealand.
- 7) Y. Watanabe, Y. Todome, S. Sakurada, H. Ohkuni, K. F. Jones, V. A. Fischetti and J. B. Zabriskie: Cloning and expression of *Streptococcus mitis*-derived human platelet aggregation factor (Sm-hPAF) gene in *Streptococcus gordonii* after chromosomal integration. *In* "Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium" (eds. Martin R.D, Tagg, J.) , 2000; pp.341-343, Securacopy Book, New Zealand.
- 8) S. Sakurada, H. Ohkuni, Y. Todome, Y. Watanabe, Y. Saito, V. A. Fischetti and J. B. Zabriskie: Release of histamine from human cultured mast cells and basophils by streptococcal pyrogenic exotoxin-B (SPE-B) /streptococcal cysteine proteinase (SCP) . *In* "Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium" (eds. Martin R.D, Tagg, J.) , 2000; pp.569-571, Securacopy Book, New Zealand.
- 9) Y. Todome, H. Ohkuni, S. Sakurada, Y.

- Watanabe, J. H. Butterfield, V. A. Fischetti and J. B. Zabriskie.: Release of histamine from human mast cell line, HMC-1 stimulated with streptococcal pyrogenic exotoxin-B (SPE-B) / streptococcal cysteine proteinase (SCP). In "Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium" (eds. Martin R.D, Tagg, J.), 2000; pp.721-723, Securacopy Book, New Zealand.
- 10) N. Takahashi, H. Kato, K. Imanishi, K. Miwa, S. Yamanami, H. Nishida and T. Uchiyama.: Immunopathophysiological aspects of an emerging neonatal infectious disease induced by a bacterial superantigen. **J. Clin. Invest.** 106: 1409-1415, 2000.
 - 11) 内山竹彦 スーパー抗原性外毒素による感染症の発症機序の解析 モダンメディア 46: 344-353, 2000.
 - 12) Y. Inagaki, F. Myouga, H. Kawabata, S. Yamai and H. Watanabe.: Genetic differences in *Streptococcus pyogenes* serotype M3 between recent isolates associated with toxic shock-like syndrome and past clinical isolates. **J. Infect. Dis.** 181: 975-983, 2000.
 - 13) M. Yokota, T. Hasegawa, M. Ohta and T. Satake.: Fatal rapidly progressing Streptococcal toxic shock-like syndrome; case report. **Jpn. J. Infect. Dis.** 53: 81-82, 2000.
 - 14) Y. Miyamoto, T. Akaike, M. Samiul Alam, K. Inoue, T. Hamamoto, N. Ikebe, J. Yoshitake, T. Okamoto and H. Maeda: Novel functions of human α_1 -protease inhibitor after S-nitrosylation: inhibition of cysteine protease and antibacterial activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 267: 918-923, 2000.
 - 15) 赤池孝章, 岡本竜哉, 前田 浩: 細菌性プロテアーゼによる生体内プロテアーゼの活性化と生体制御の破綻. 「生物間の攻撃と防御の蛋白質」(内山竹彦, 中嶋暉躬, 名取俊二, 正木春彦 編), 蛋白質 核酸 酵素, 46: 524-531, 2000.
2. 学会発表
 - 1) 寺尾豊, 川端重忠, 国友栄治, 中川一路, 浜田茂幸: *Streptococcus pyogenes* の新規菌体表層タンパクの分離同定および分子生物学的解析. 第73回日本細菌学会総会. 2000年5月29-31日, 札幌.
 - 2) 国友栄治, 川端重忠, 寺尾豊, 中川一路, 浜田茂幸: *Streptococcus pyogenes* FBP54 タンパクを用いたマウスに対する免疫応答および感染防御効果. 第73回日本細菌学会総会. 2000年5月29-31日, 札幌.
 - 3) 大國寿士: ヒト喰いバクテリア. 「近年話題の細菌感染症 —その基礎と臨床」第10回日本医大医学界シンポジウム. 2000年6月, 東京.
 - 4) 大國寿士: 劇症型レンサ球菌感染症の病態解明と治療法の確立. 「食品, 創傷を介した新興・再興感染症の現況と対策」. 厚生科学研究 研究成果発表公開シンポジウム. 2000年12月, 東京.
 - 5) 櫻田紳策, 大國寿士, 渡邊ユキノ, 留日優子: Streptococcal cysteine protease (SCP) のヒトマスト細胞ならびに好塩基球からの脱顆粒. ヒスタミン遊離. 第74回日本感染症学会総会. 2000年4月, 博多.
 - 6) 留日優子, 櫻田紳策, 渡邊ユキノ, 大國寿士: Streptococcal pyrogenic exotoxin-B (SPE-B) のヒトマスト細胞株 (HMC-1) 並びにスナネズミ (*Mongolian gerbils*, MON/jms/gbs) 腹腔マスト細胞に対する作用. 第74回日本感染症学会総会. 2000年4月, 博多.
 - 7) 留日優子, 渡邊ユキノ, 櫻田紳策, 大國寿士: Group A *Streptococcus* (GAS) 産生 cysteine protease のヒト好塩基球並びにマスト細胞に対する影響. 第73回日本細菌学会総会.

- 2000年5月29-31日, 札幌.
- 8) 渡邊ユキノ, 留目優子, 大国寿士: 厚生科学研究費補助金「新興・再興感染症研究事業」“劇症型 A 群レンサ球菌感染症の病態解明および治療法の確立に関する研究” 研究班 平成 12 年度研究報告, 2001 年 2 月, 大阪.
 - 9) 稲垣善茂, 川端寛樹, 山井志郎, 渡辺治雄. 劇症型 A 群レンサ球菌感染症の M3 型臨床分離株と標準株の間で見いだされた DNA 断片長多形の解析. 第 73 回日本細菌学会総会, 2000 年 5 月 29-31 日, 札幌.
 - 10) 長谷川忠男, 松本昌門, 河野廉, 山篠貴史, 堀井俊伸, 渡辺治雄, 太田美智男: ワークショップ 4 劇症 A 群レンサ球菌感染症の発症要因, 二次元電気泳動法を用いた A 群レンサ球菌菌体外蛋白質の post genome 解析. 第 73 回日本細菌学会総会, 2000 年 5 月 29-31 日, 札幌.
 - 11) 長谷川忠男, 松本昌門, 河野廉, 山篠貴史, 太田美智男: 二次元電気泳動法を用いた A 群レンサ球菌菌体外蛋白質の post genome 解析. 第 9 回 Lancefield レンサ球菌研究会, 2000 年 7 月, 伊香保.
 - 12) 松本昌門, 横山佳子, 渡辺治雄, 鈴木康元, 山篠貴史, 長谷川忠男, 太田美智男: A 群レンサ球菌の産生する発赤毒素 F (SPEF) の遺伝子解析. 第 37 回日本細菌学会中部支部総会, 2000 年 9 月, 岐阜.
 - 13) T. Akaike, S. Fujii, S. Okamoto and H. Maeda.: NO-dependent viral pathogenesis in herpes simplex virus-induced encephalitis in mice. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.) .
 - 14) Y. Miyamoto, M. Samuel Alam, T. Akaike, H. Hamamoto and H. Maeda.: Antiapoptotic activity of S-nitrosylated α_1 -protease inhibitor. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.) .
 - 15) T. Sawa, T. Akaike, J. Fang and H. Maeda.: Formation of 8-nitroguanosine triggers oxygen radical generation via cytochrome P-450 reductase system. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.) .
 - 16) T. Okamoto, T. Akaike, T. Sawa, Y. Miyamoto, M. Suga, M. Ando and H. Maeda.: S-Nitroglutathione produced from peroxynitrite and glutathione activates matrix metalloproteinase (MMP) through unique sulfhydryl modification of MMP. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.) .
 - 17) Mohammad S. Alam, T. Akaike, Y. Miyamoto and H. Maeda.: Role of inducible nitric oxide synthase in host defense against *Salmonella* infection. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.) .
 - 18) M. S. Alam, T. Akaike, Y. Miyamoto and H. Maeda.: Host-defense function of inducible nitric oxide synthase in *Salmonella* infection. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research (SFRR 2000) , October 16-20, 2000 (Kyoto, Japan) .
 - 19) T. Akaike, T. Okamoto, T. Sawa, Y. Miyamoto and H. Maeda.: Peroxynitrite activates matrix metalloproteinases through formation of S-nitroglutathione. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research (SFRR 2000) , October 16-20, 2000 (Kyoto, Japan) .

- 20) T. Akaike, T. Okamoto, T. Sawa and H. Maeda.: Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite. 7th Annual Meeting of the Oxygen Society, November 16-20, 2000 (San Diego, U.S.A.) .
- 21) H. Maeda and T. Akaike.: Microbial infection and consequence of host response in view of NO production and accelerated mutagenic potentials. British Society for Immunology Congress 2000, December 5-8, 2000 (Harrogate, England) .
- 22) Mohammad S. Alam, 赤池孝章, 宮本洋一, 前田 浩 : Streptococcal pyrogenic exotoxin B によって誘導されるアポトーシスのニトロソチオールによる阻害. 第 73 回日本細菌学会総会, 2000 年 5 月 29-31 日, 札幌.
- 23) 宮本洋一, 赤池孝章, 川端重忠, 浜田茂幸, 前田 浩 : *Streptococcus pyogenes* 由来のブラジキニン分解酵素. 第 73 回日本細菌学会総会, 2000 年 5 月 29-31 日, 札幌.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
（分担）研究報告書

A群レンサ球菌の新規フィブロネクチン結合タンパクの分子生物学的解析

（分担）研究者 浜田 茂幸 大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子感染制御学講座 教授

研究要旨 A群レンサ球菌（GAS）の菌体表層には、その病原性に関与するMタンパクやFタンパク等の菌体表層タンパクが複数存在する。これまでの生化学的手法では、これら全てを同定し、その機能を解析するまでには至っていない。本研究では、劇症型A群レンサ球菌感染症（TSLs）患者から最も高頻度に分離されるM1型のGASのゲノム遺伝子データベースから、新規菌体表層タンパク（Fba）を分離し、その病原性に及ぼす影響と機能解析を試みた。その結果、Fbaはフィブロネクチンと結合し、咽頭上皮細胞株への付着と侵入に関与することが示された。このことは、FbaがGAS感染に対する免疫原となり得ることを示唆している。

A. 研究目的

A群レンサ球菌（GAS）は、近年、劇症型A群レンサ球菌感染症（TSLs）の起原菌として注目を集めている。TSLsは病態の進行が急激で死亡率も高いため、有効な治療法や予防法の確立が求められている。しかし、GAS感染に対するワクチンは未だ開発されていないことから、GAS菌体表層タンパクから新規タンパクの分離と同定、および、その病原性の解析を行い、将来の免疫原としての可能性を検索した。

B. 研究方法

1. GASゲノムデータベースからの新規菌体表層タンパクの同定

GASゲノムデータベースの塩基配列を遺伝子解析ソフトを用いて解析し、GASの菌体表層タンパクに認められるLPXTGモチーフを有する遺伝子を検索した。得られた遺伝子をデータベースに照会し、相同性検索を行った。組換えタンパクはTSLs患者由来の臨床分離株SSI-9株（M1型）の染色体DNA、pGEX-6P-1プラスミド、および、大腸菌BL21株を用いて作製した。また、この組換えタンパクをウサギに免疫して抗血清を得

た。

2. 新規菌体表層タンパク*fba*遺伝子の分布

*fba*遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR法により、各種レンサ球菌における同遺伝子の分布を検索した。さらに、*fba*遺伝子を有するGAS菌株についてDNA塩基配列を決定した。また、抗Fba血清を用いた解析をGASの8M尿素抽出菌体表層タンパク画分のウエスタンブロット法により行った。

3. Fbaの機能解析

組換えFbaに対する各種Igおよびフィブロネクチン（Fn）に対する結合能をビオチン標識化Fn、IgA、IgG、およびIgMを用いて検索した。さらに、カナマイシン耐性遺伝子を挿入し、Fbaを欠失させた変異株を作製した。この変異株の宿主細胞への付着・侵入率は、単層培養したヒト咽頭上皮細胞HEp-2株を用いて測定した。また、変異株を6週齢のCD-1マウスに皮下接種し、その致死毒性を野生株と比較した。

4. *fba*遺伝子の発現機構の解析

GASゲノムデータベースから*fba*遺伝子の5'末端上流域および3'末端下流域のDNA塩基配列を抽出し、ORFを検索

した。 *fba* 遺伝子の5'末端上流域に存在する *mga* 遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子で挿入失活させ、 *fba* 遺伝子の発現の変化をRT-PCR法で検索した。

C. 研究結果

GASゲノムデータベースからLPXTGモチーフを有するORFを15種類見出した。相同検索の結果、Mgaレギュロンの3'末端下流域に位置し、 *Staphylococcus aureus* のFn結合タンパク (FBP) の機能ドメインと約70%の類似性を示すORF (Fba) が存在した (図1)。

SF370 (M type 1)

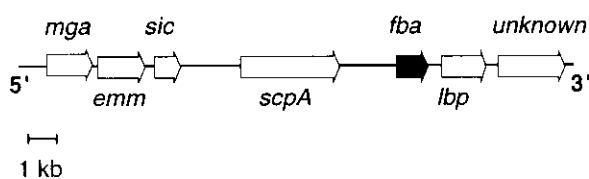


図1. SF370株における *fba* 遺伝子と *mga* レギュロン

PCRの結果、 *fba* 遺伝子はGASのみに認められ、なかでもM1, 2, 4, 9, 13, 22, 28, 44, 49, 60, 67, 75, 77, 79, 80, 82, 87 および 89型に存在した。推定アミノ酸配列から、菌株によって3から4回の繰り返し領域を有することが示された。このFbaについて組換えタンパクを作製し、各種基質との結合能を調べた結果、Fnと結合することが示された。さらに、Fbaの各ドメインについて組換えタンパクを作製し、Fn結合領域を検索したところ、FnはFbaタンパクのプロリンに富んだ繰り返し領域と結合することが示された (図2)。抗Fba血清を用いたGASの8 M尿素抽出菌体表層タンパク画分のウエスタンブロットの結果から、FbaがGAS菌体表層に発現していることが確認された。Fba欠失変異株を用いたHEp-2細胞への付着・侵入能を検索した結果、付着・侵入率は共に親株に比して有意に低下した (図3)。このFba欠失変異株を6週齢のCD-1マウスに皮下接種したところ、死亡率が親株より有意に低下した (図4)。

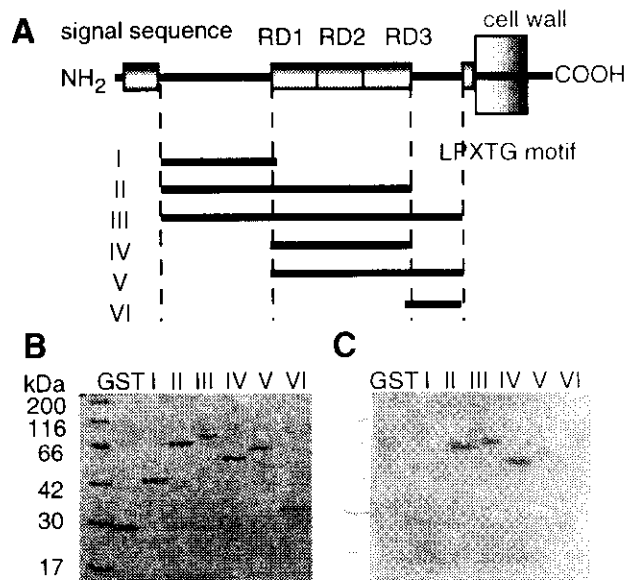


図2. Fbaの各ドメインとFnとの結合能
(A) Fbaの推定二次構造と組換えFba断片。
(B) 組換えFba断片のSDS-PAGE。
(C) 組換えFba断片とビオチン化Fnとの結合。

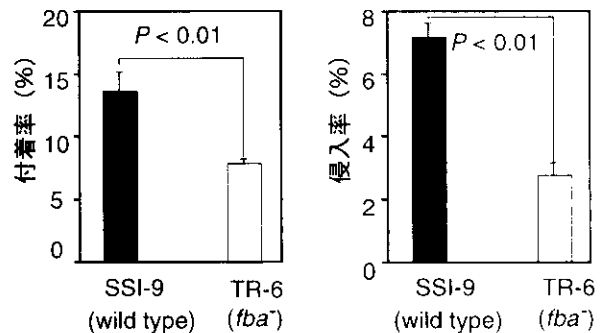


図3. Fba欠失変異株の付着・侵入率

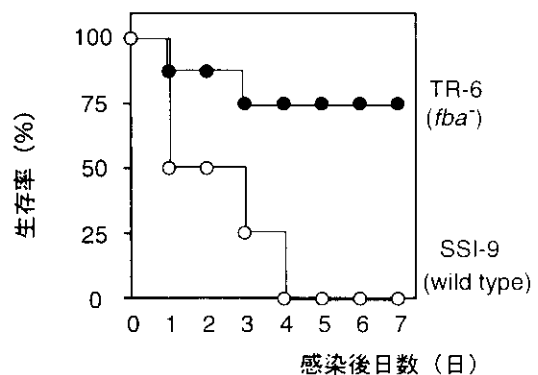


図4. Fba欠失変異株皮下接種後のCD-1マウスの生存率

mga 遺伝子欠失変異株を用いたRT-PCRの結果より、 *fba* 遺伝子がMgaによって正の転写制御を受けることが示唆された。

D. 考察

Fbaタンパクは、GASの菌体表層タンパクに特徴的なC末端側のLPXTGモチーフとNIHのシグナル配列予測プログラムから推定された37アミノ酸残基のシグナル配列を有することから、*in silico*において、菌体表層に発現することが示唆された。抗Fba血清とGASの8M尿素抽出物のウエスタンブロットの結果から、FbaタンパクがGASの菌体表層に発現していることが示された。また、FbaタンパクはGASの他のFBPと同様に繰り返し領域を有し、その領域を介してFnと結合し、宿主細胞への付着と侵入に関与することが示された。さらに、皮下感染の動物モデルにおいて、Fbaタンパクがマウスの致死性に関与することが示唆された。

*fba*遺伝子のGASおよびその他のレンサ球菌での分布を検索したところ、同遺伝子がGASのみに存在し、GASの中でもTSLS患者から最も高頻度に分離されるM1型の菌株に保存されていることが示された。これまでにGASのワクチン候補として実験が進められたFBPに、Fタンパク (Protein F1/Sfb I) が挙げられるが、同タンパクはM1型には存在せず、TSLSを視野に入れた免疫原としては不十分と考えられる。以上のことより、FbaタンパクはGASの菌体表層に存在するadhesin, invasin 様タンパクであり、将来の免疫原としての可能性が期待される。そこで、現在はワクチンとしての評価を行うために、Fbaタンパクを用いたマウス免疫実験を進行している。

E. 結論

GAS全ゲノムデータベースから得られた新規菌体表層タンパク質であるFbaは、フィブロンネクチンに結合し、宿主細胞への付着・定着および病原性に関与することが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) S. Kawabata, E. Kunitomo, Y. Terao, I. Nakagawa, K. Kikuchi, K. Totsuka, and S. Hamada: Systemic and mucosal immunization with fibronectin-binding protein FBP54 induce protective immune responses against *Streptococcus pyogenes* challenge in mice. **Infect Immun.** 69: 924-930. 2001.
- 2) Y. Terao, S. Kawabata, E. Kunitomo, J. Murakami, I. Nakagawa, and S. Hamada: Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the *fba* gene is positively transcribed under the Mga regulator. (投稿中)
- 3) Y. Terao, S. Kawabata, E. Kunitomo, I. Nakagawa, and S. Hamada: Immunization of Mice with Streptococcal Fibronectin Binding Protein. *Streptococci and Streptococcal Diseases: Entering the new Millennium.* New Zealand by Securacopy. 2000.
- 4) S. Kawabata, J. Murakami, Y. Terao, I. Nakagawa, and S. Hamada: Distribution of *Streptococcus pyogenes* superantigens is associated with clinical status. *Streptococci and Streptococcal Diseases: Entering the new Millennium.* New Zealand by Securacopy. 2000.

2. 学会発表

- 1) 寺尾豊, 川端重忠, 国友栄治, 中川一路, 浜田茂幸: *Streptococcus pyogenes* の新規菌体表層タンパクの分離同定および分子生物学的解析. 第73回日本細菌学会総会. 2000年5月29-31日, 札幌.
- 2) 国友栄治, 川端重忠, 寺尾豊, 中川一路, 浜田茂幸: *Streptococcus pyogenes* FBP54 タンパクを用いたマウスに対する免疫応答および感染防御効果. 第73回日本細菌学会総会. 2000年5月29-31日, 札幌.

厚生科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業)
(分担) 研究報告書

GAS の産生する Streptococcal pyrogenic exotoxin-B の遺伝子
クローニングと発現に関する研究

(分担) 研究者 大国 寿士 日本医科大学 老人病研究所 免疫部門 教授

研究要旨 劇症型 A 群レンサ球菌感染症 (以下劇症型感染症) の際に起こるショック病態の誘発因子を明らかにするために、本菌の産生する発熱毒素の一つである Streptococcal pyrogenic exotoxin-B (SPE-B/SCP) をコードする遺伝子 (*speB*) を大腸菌に組み換え、cysteine protease としての活性を保持する組み換え型 SPE B/SCP (rSPE B/SCP) を得ることを目的として研究を行った。GAS NZ131 の保有する *speB* をプロモーターを含めてベクターに組み換えて発現ベクターを作製し、大腸菌に形質転換して発現誘導を行ったところ、rSPE B/SCP は cysteine protease としての活性を保持した状態で菌体外へ分泌された。また、得られた rSPE B/SCP をモルモット皮内に投与したところ、血管透過性の亢進が認められた。cysteine protease 活性を有し、分泌型として rSPE B/SCP が取り出された報告はこれまでになく、今後、rSPE B/SCP が SPE B のショック病態成立との関わりを明らかにする研究の上で有用になるであろうと考えられる。

A. 研究目的

A 群レンサ球菌 (以下 GAS) の産生する Streptococcal pyrogenic exotoxin-B (以下、SPE-B) の、敗血症性ショック病態の成立との関連性に関しては未だ明らかではない。しかし、私共は先に、天然型 SPE B (nSPE B/SCP) によりヒト培養マスト細胞からヒスタミンが遊離され、劇症型患者血漿中にヒスタミンが高値を示す症例を確認した。今回は、このヒスタミン遊離に関する反応機構が cysteine protease として作用する SPE B により惹起されることを明らかにするため、今回は cysteine protease としての活性を保持した組み換え型 SPE B (rSPE B/SCP) を得ることを目的としてその発現系を構築した。

B. 研究方法

1) *speB* のクローニング

GAS NZ131 の染色体 DNA より、PCR 法にて *speB* およびそのプロモーター領域と推測される周辺遺伝子を増幅した。得られた増幅断片を pBluescript II SK⁺プラスミドベクターに組み換え、これを

pSK-SCP とした。得られた pSK-SCP を *Escherichia coli* JM109 に組み換え、形質転換体 *E. coli* B10 を得た。

2) rSPE B/SCP の 発現誘導

E. coli B10 をアンピシリン加 LB 液体培地に播種し、OD₆₀₀ = 0.02 となるまで 37 °C、175 rpm で振盪培養した。その後直ちに IPTG を最終濃度が 2 mM となるように添加し、上記の条件にて一晚、発現誘導を行った。

3) rSPE-B/SCP の精製

発現誘導後の培養上清を分取し、80 % 硫酸アンモニウム沈殿による濃縮後、DEAE-Sephadex CL-6B によるデカンテーションを行い、非吸着画分について Matrix gel Red A、Sephadex G50 によるカラムクロマトグラフィーを行い、順次分画した。分画の際、それぞれの画分について Azocasein Assay を行い、casein 分解活性にから cysteine protease 活性を確認した。

4) ウェスタンブロットによる rSPE B/SCP の検出

得られた精製画分について SDS-PAGE を行い、nitrocellulose 膜に転写後、ウサ

ギ抗 SPE B/SCP Ig G ポリクローナル抗体を用いて rSPE B/SCP を検出した。

5) N 末端アミノ酸配列の決定

得られた rSPE B/SCP およびその前駆体である組み換え型 zymogen (ryzm) の N 末端アミノ酸配列は、Automated gas phase amino acid sequencer を用いて決定した。

6) cysteine protease 活性阻害試験

cysteine protease 特異的阻害剤である E64 および Box-LVG-CHN₂ を用い、阻害試験を行った。検出は Azocasein 分解活性の阻害、および skim milk agar 上での透明帯形成阻害によって行った。

7) モルモットに対する血管透過性亢進作用の検出

モルモットの皮下に rSPE B/SCP を投与し、一定時間後、1% Evans Blue 500 μl を静注した。30 分後屠殺し、背面裏面部より Evans Blue の血管からの漏出を観察した。

C. 研究結果

pSK-SCP を形質転換して得た *E. coli* B10 株の培養上清中に cysteine protease 活性が検出されたことより、rSPE B/SCP が菌体外に分泌されていることが示唆された。この cysteine protease 活性は、約 27 kDa の蛋白質の溶出画分と相関して推移しており (Fig.1)、この 27 kDa の蛋白質は、N 末端アミノ酸配列解析により SPE B のそれと一致していることから、rSPE B/SCP であることが明らかとなった。

rSPE B/SCP の cysteine protease 活性は、天然型 SPE B (nSPE B/SCP) のそれと比較して同等か、あるいはそれ以上であり、また E64 および Box-LVG-CHN₂ の添加により、標品と同様に良好に阻害された。

尚、精製後の収量は 6~9 mg/l であった。

rSPE B/SCP によるモルモット皮内における血管透過性亢進作用については、nSPE B/SCP においては 2.4 μg、rSPE B/SCP においては 1.6 μg を投与した。

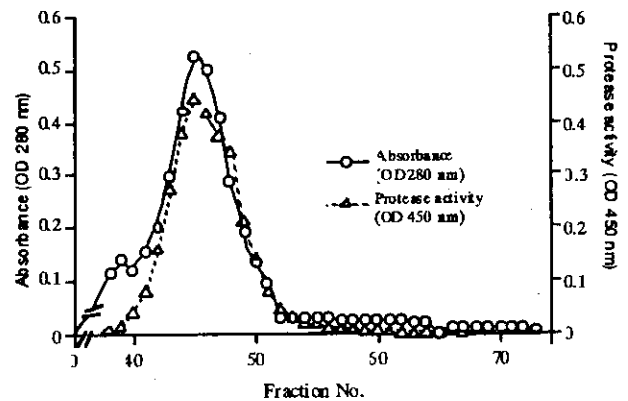


Fig. 1 Elution Profile and Protease Activity of the Fraction on Sephadex-G50

いずれも広範囲において血管透過性亢進が認められた。病理学的所見においては血管からの赤血球成分の漏出の他、炎症性細胞の浸潤、浮腫および表皮の剥離が観察された。これらの作用は、1 mM の DTT 添加により増強された。

D. 考察

これまでに rSPE-B の発現に関する研究について数多く試みられていたが、rSPE B は *E. coli* 内では不溶性の封人体として発現することが多く、rSPE B/SCP の精製標品を得ることは必ずしも容易ではなかった。また、その理由は必ずしも明らかではないが、得られた rSPE B に cysteine protease としての酵素活性が十分ではなく、rSPE B/SCP を単独で用いての研究はほとんど見あたらない。

今回構築した rSPE B/SCP 発現ベクターは、*speB* のプロモーター領域と予測されるスタートコドン以前のある一定の塩基配列を含め、pBluescript II SK⁺プラスミドベクターに組み換えた。これを *E. coli* に形質転換し、得られた形質転換体を用い発現誘導を試みたところ、rSPE B/SCP は菌体外に分泌されることが明らかとなった。発現誘導の際に IPTG による誘導が必要であることから、プロモーターの一部としてはベクター由来のそれを利用していることが考えられるが、非コード領域の誤翻訳がないこと、あるいはフレームシフト変異を