



Title	唾液PRPを介したA群レンサ球菌の咽頭付着機構の分子解析
Author(s)	村上, 旬平
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1503
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

学位論文

唾液 PRP を介した A 群レンサ球菌の咽頭付着機構の分子解析

大阪大学大学院歯学研究科

歯学臨床系専攻（障害者歯科学）

村上 旬平

要約

A 群レンサ球菌（以下 GAS と省略）の咽頭上皮細胞付着に及ぼす唾液高プロリンタンパク（PRP）の影響を検討するため、PRP を介した GAS 付着メカニズムを分子レベルで解析した。単層培養した HEp-2 細胞に対して GAS は、全唾液成分、PRP およびムチンの添加により付着菌数および侵入菌数ともに有意に増加した ($P < 0.05$)。本実験系に抗 PRP 抗体を添加すると、PRP による GAS の付着促進作用が阻害された ($P < 0.05$)。一方、GAS B514Sm 株をマウスに経口感染した場合、PRP 非添加の対照群に比して添加群では、GAS の咽頭粘膜への定着率が低かった。これらの結果から、PRP は GAS の咽頭粘膜上皮細胞への付着を促進させることが明らかとなった。

GAS の菌体表層に局在する M タンパクや F タンパクを欠失した変異株においても野生株と同様に、PRP の添加により菌体凝集反応が認められたことから、本菌の菌体表層には M および F タンパク以外に、PRP 結合タンパクが存在すると推測された。GAS SSI-9 株の 8 M 尿素抽出画分には、PRP と結合する約 28 kDa タンパクの存在がウェスタンブロッティングにより認められた。同タンパクはアミノ酸シーケンスの結果からシャペロンタンパクの GrpE であると同定された。抗 GrpE 抗体を用いた免疫染色により、GrpE は細胞分裂時の菌体表層分裂界面付近に限局して発現していることが顕微形態学的に示された。GrpE 断片の組換えタンパクを用いた解析により、GrpE は N 末端側で PRP と結合することが示された。また、GrpE 欠失株では、菌形態や一部の生化学的性質に変化が認められ、野生株に比して HEp-2 細胞への付着および侵入能が低下した。

以上の結果より、GAS の咽頭粘膜付着メカニズムとして、これまで報告されてきた M タンパクや F タンパクなどの分子間接着以外に、新たに菌体表層に発現したシャペロンタンパク GrpE と唾液 PRP との結合を介した付着系の存在が示唆された。

はじめに

A 群レンサ球菌 (Group A *Streptococcus pyogenes* : GAS) は咽頭および皮膚より時に分離され、ヒツジ赤血球加血液寒天培地上で β 溶血 (完全溶血) をおこすグラム陽性球菌である。GAS はヒト粘膜組織に感染して咽頭炎、扁桃炎、肺炎、中耳炎、猩紅熱または産褥熱などを発症し、皮膚への感染では膿痂疹や丹毒などを生じる。さらに感染 2~4 週間後に急性糸球体腎炎やリウマチ熱のような続発症を惹起させることも報告されている。毎年、日本国内のみならず世界的にも散発的に GAS 感染症が流行し、特に劇症型 A 群レンサ球菌感染症については、一般の人々も含めて世界的に広く注目されるようになった。この劇症型 A 群レンサ球菌感染症は、ブドウ球菌の外毒素による toxic shock syndrome に症状が類似することから toxic shock-like syndrome (TSLS) とも呼ばれ、日本国内では、2000 年および 2001 年の両年とも年間 40 例以上が報告されている (国立感染症研究所感染症情報センター)。GAS による TSLS は多臓器不全、壊死性筋膜炎や蜂窩織炎をはじめ、敗血症や播種性血管内凝固症候群を生じて患者を短期間に死に至らしめることがあるため、本菌の感染機序の解明は危急の課題である。

細菌感染の初歩は宿主細胞への付着で始まる (1)。GAS についても様々な細胞への付着に関する研究が行われ、呼吸上皮細胞由来の A549 細胞 (2)、咽頭粘膜由来の HEp-2 細胞 (3)、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞 (3)、臍帯静脈内皮細胞の HUVEC 細胞 (3)、ケラチノサイト (4)、咽頭癌細胞由来の Detroit 562 細胞 (5)、鼻咽頭癌由来の FaDu 細胞 (5) に付着することが報告されている。また、付着に際しては、菌体側の付着因子 (アドヘジン) と細胞側レセプター分子 (リガンド) 間の結合が生じている (6)。これまで、GAS の M タンパク C 末端がケラチノサイトの CD46 分子と結合すること (7)、GAS 莢膜ヒアルロン酸がケラチノサイトの CD44 分子と結合すること (8)、および GAS フィブロネクチン結合

タンパクがフィブロネクチンを介して宿主細胞のインテグリン $\alpha_5\beta_1$ 分子に結合すること (9, 10) などが明らかにされてきた. GAS は宿主細胞への付着後, 細胞内への侵入, ついで組織内へ拡散することによって病原性を発揮すると考えられる. GAS の侵入メカニズムについては全容が明らかにされていないが, 現在, 以下の 2 つの様式が示されている (11). ひとつは, GAS 菌体表層のフィブロネクチン結合タンパクの一種である Streptococcal fibronectin-binding protein I (Sfbl) が, フィブロネクチンを介して宿主細胞上のインテグリン $\alpha_5\beta_1$ 分子に結合した場合であり, GAS との接着部位で宿主細胞膜に大きな陥入が生じ, GAS がファゴソーム内に侵入するというものである (12). いまひとつは, 分子間結合を介さずに細胞に付着した GAS に対して, 宿主細胞の微絨毛が伸長して菌体を取り囲み, アメーバ偽足様の構造物で GAS を取り込む結果, GAS が細胞質内に侵入する様式である. この他にも, Streptococcal surface dehydrogenase (SDH; 5), M タンパク (14, 15), F1 タンパク (15), Streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB; 16, 17) やリポタイコ酸 (LTA; 18) などの菌体成分が侵入に関与する. 以上のように, GAS の細胞付着・侵入には様々な因子が関与することが考えられる.

細菌が宿主細胞に付着する場合, 宿主組織に存在する糖類やペプチドに結合する因子を介在させる場合が多い (1). 先に示したフィブロネクチンもそのひとつであるが, 咽頭粘膜面には粘膜上皮細胞自身の分泌物, 鼻汁や涙液などの他に唾液腺を由来とする唾液成分が存在する. このことから, 唾液成分も GAS の細胞付着に対して影響を及ぼすことが推測される. 唾液には 10 種類以上のタンパクが存在し, その多くが細菌に作用することが知られる. 例えば, 分泌型免疫グロブリン (sIgA), ラクトフェリン, リゾチーム, ヒスタチンやペルオキシダーゼなどは抗細菌作用があり, ムチン, 高プロリン含有糖タンパク (PRG), sIgA やアミラーゼなどには菌体凝集および排泄作用がある. さらに細菌の付着には, sIgA, ムチン, 高プロリン含有タンパク (PRP), フィブロネクチン, アミラーゼ, リゾチームやラクトフェリンが関与するとされており (19, 20, 21), なかでも PRP は, 高度な多形性により細菌の口腔表面への付着を仲介する因子と

して注目されるようになった (22, 23, 24).

PRP は、主に耳下腺で産生、分泌される低分子量の糖タンパクであり、酸性 PRP と塩基性 PRP に分類される。PRP は歯面ペリクルの形成、エナメル質の再石灰化や歯石形成などに関与しており、歯面への口腔常在菌の吸着を促進して、デンタルプラーク形成に関与することが知られている。PRP と結合する細菌としては、*Actinomyces naeslundii* (22), *Actinomyces odontolyticus* (22), *Actinomyces viscosus* (22), *Streptococcus mutans* (23), *Porphyromonas gingivalis* (24), *Streptococcus gordonii* (25), *Streptococcus sanguinis* (25), *Streptococcus oralis* (25), *Fusobacterium nucleatum* (26), *Fusobacterium vincentii* (26) および *Fusobacterium polymorphum* (26) などが報告されているが、PRP と GAS の相互作用に関しては報告がない。唯一、唾液ムチンの糖鎖が GAS と結合するという報告が Ryan らによりなされている (27)。そのため、GAS の咽頭粘膜への付着と侵入において、唾液成分がどのような影響を及ぼすかについて詳細な検討を行うことは、GAS の宿主細胞への付着・侵入メカニズムを解明する上で重要な課題であると考えられる。そこで本研究では、唾液成分が GAS の咽頭上皮細胞への付着に及ぼす影響を培養細胞にを用いて検討し、PRP についてはマウス咽頭への GAS の定着に与える影響を調べ、さらに GAS 表層の PRP と結合するタンパクを同定して分子レベルで解析を行った。

材料と方法

1. 使用した細菌，細胞と培養方法

用いた細菌およびプラスミドを表 1 に示す．GAS の TSLS 由来の株は東邦大学医学部 村井貞子博士および国立感染症研究所より分与された．咽頭炎由来の株は，東京女子医科大学 菊池 賢博士ならびに佐賀県衛生研究所 森屋一雄博士より供与され，そのうち *emm* (M タンパク) 遺伝子型が同定されているものを用いた (28)．咽頭由来の GAS JRS4 株およびその組換え株である JRS145 株，SAM1 株と SAM2 株はヘブライ大学 Emanuel Hanski 博士より，NY-5 株は東京都立衛生研究所 五十嵐秀雄博士より供与された．GAS の培養には Todd Hewitt Broth (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) に 0.2% (w/v) Yeast Extract (Becton Dickinson) を添加した THY 培地を使用した．必要に応じて抗生物質を次の最終濃度で添加した [ストレプトマイシン (和光純薬，大阪) 1,000 μ g/ml，クロラムフェニコール (和光純薬) 5 μ g/ml，エリスロマイシン (和光純薬) 5 μ g/ml またはスペクチノマイシン (和光純薬) 500 μ g/ml]．また，大腸菌の培養には LB Broth (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) を使用し，必要に応じてアンピシリン (和光純薬) 100 μ g/ml あるいはスペクチノマイシン 100 μ g/ml となるよう添加した．寒天平板培地の作製には 1.5% (w/v) 寒天 (和光純薬) を添加した．

咽頭粘膜上皮由来の HEP-2 細胞の培養には，80 ml 細胞培養シャーレ (Nalge Nunc, Naperville, IL, USA) を用いた．Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma Aldrich) に，10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)，最終濃度 50 μ g/ml のゲンタマイシン (Sigma Aldrich)，10 U/ml のペニシリン G (和光純薬) を添加した培地において 5% CO₂ ・ 95% 空気内にて 37°C で培養した．

2. 主要な唾液成分の精製

健康なボランティアにパラフィルム (American National Can, Chicago,

表 1 使用菌株およびプラスミド

菌株	特徴	抗生物質耐性	由来
GAS (<i>Streptococcus pyogenes</i>)			
JRS4	M6 型, 実験室継代株	Str	Hanski 博士
JRS4 GFP	JRS4 株の EGFP*発現株	Str, Erm	中川博士
JRS145	JRS4 株の M タンパク欠失株	Str, Chr	Hanski 博士
SAM1	JRS4 株の F タンパク欠失株	Str, Erm	Hanski 博士
SAM2	JRS4 株の M, F 両タンパク欠失株	Str, Chr, Erm	Hanski 博士
NY-5	M12 型, 実験室継代株	なし	五十嵐博士
NY-5 GFP	NY-5 株の EGFP 発現株	Erm	中川博士
B514Sm	M50 型, マウス咽頭由来株	Str	Scott 博士
TR45	B514Sm 株の GrpE 欠失株	Str, Spc	本研究
SSI-9	M1 型, TSLS*由来臨床分離株	なし	村井博士
SSI-9 GFP	SSI-9 株の EGFP 発現株	Erm	中川博士
SSI-25	M1 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	村井博士
SSI-124	M1 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	村井博士
SSI-127	M1 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	村井博士
SSI-1	M3 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	村井博士
SSI-8	M3 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	村井博士
SSI-29	M3 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	村井博士
SSI-35	M3 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	村井博士
#30	M12 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	国立感染症研究所
#42	M12 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	国立感染症研究所
#43-1	M12 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	国立感染症研究所
#43-2	M18 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	国立感染症研究所
#50	M18 型, TSLS 由来臨床分離株	なし	国立感染症研究所
SE1013	M2 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	森屋博士
TW3358	M3 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	菊池博士
TW3392	M4 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	菊池博士
TW3420	M6 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	菊池博士
SE1022	M9 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	森屋博士
TW3341	M11 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	菊池博士
TW3344	M12 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	菊池博士
TW3353	M13 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	菊池博士
TW3363	M18 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	菊池博士
TW3532	M22 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	菊池博士
TW3359	M28 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	菊池博士
TW3424	M44 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	菊池博士
TW3425	M49 型, 咽頭炎由来臨床分離株	なし	菊池博士
大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)			
XL-10 Gold	形質転換用コンピテント細胞	Tet	StrataGene 社
プラスミド			
pGEM-T	PCR 産物クローニングベクター	Amp	Promega 社
pGEM-T Easy	PCR 産物クローニングベクター	Amp	Promega 社
pGEX-6P-1	GST 融合タンパク発現ベクター	Amp	Amersham Biosciences 社
pSF152	大腸菌用クローニングベクター	Spc	Ferretti 博士
pGrpE	サザンブロットプローブ用, pGEM-T に <i>grpE</i> 遺伝子を挿入	Amp	本研究
pGrpE1~6-T	組換えタンパク発現用, pGEM-T に <i>grpE</i> 遺伝子の一部を挿入	Amp	本研究
pGrpE1~6	組換えタンパク発現用, pGEX-6P-1 に <i>grpE</i> 遺伝子の一部を挿入	Amp	本研究
pGrpE-S	シーケンシング用, pGEM-T Easy に <i>grpE</i> 前後の遺伝子を挿入	Amp	本研究
pGrpE-KO	欠失株作製用, pGEM-T Easy に <i>grpE</i> 遺伝子の一部を挿入	Amp	本研究
pJM100	欠失株作製用, pSF152 に <i>grpE</i> 遺伝子の一部を挿入	Spc	本研究

*EGFP: Enhanced green fluorescent protein, *TSLS: Toxic shock-like syndrome, Str: ストレプトマイシン, Chr: クロラムフェニコール, Erm: エリスロマイシン, Spc: スペクチノマイシン, Tet: テトラサイクリン, Amp: アンピシリン

IL, USA) を咬ませて 100 ml の唾液を採集し, 50°C, 30 分間のプロテアーゼ失活処理を行った. 10,000 g, 4°C, 30 分間の遠心でデブリスを除去し, 上清を Spectra/Por6 MWCO 1,000 (Spectrum, Gardena, CA, USA) を用いて蒸留水に対して透析を行った. ついで, FREEZONE 1L (Labocono, Kansas, MO, USA) にて凍結乾燥し, 6 M グアニジン塩酸/50 mM トリス塩酸 (pH7.4) 緩衝液 [50 mM トリスアミノメタン (トリス; Sigma Aldrich) を塩酸で pH 調整] に溶解した. 可溶画分を Sephacryl S-200 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) による径 3 cm, 高さ 170 cm のゲルろ過クロマトグラフィーに供試し, BioLogic Workstation (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用い, 流速 1 ml/分で 4 ml ずつ分画した. 各画分を 12% アクリルアミドゲルによるドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供試した. この際, 下部泳動ゲルは, 375 mM トリス塩酸 (pH 8.8), 0.1% (w/v) SDS と 12% アクリルアミド溶液 [11.67% (w/v) アクリルアミド, 0.33% (w/v) ビスアクリルアミド] に 0.05% (w/v) 過硫酸アンモニウム (APS) と 0.5% (v/v) N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) を加えて作製し, 上部濃縮ゲルは 125 mM トリス塩酸 (pH 6.8), 0.1% (w/v) SDS, 8% (w/v) アクリルアミドに APS と TEMED を加えて作製した. 試料には, 等量の 2x SDS 泳動緩衝液 [125 mM トリス塩酸 (pH6.8), 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) グリセロール, 0.2% (w/v) ブロムフェノールブルー (BPB)] と 10 mM ジチオトレイトール (DTT) を添加し, 100°C で 5 分間の熱処理を行った. SDS-PAGE 緩衝液 [25 mM トリス, 192 mM グリシン, 0.1% (w/v) SDS] 中で電気泳動し, クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色液 [0.25% (w/v) CBB R-250 (Fluka Chemie GmbH, Steinheim, Switzerland), 50% (v/v) メタノール, 5% (v/v) 酢酸] で 10 分間染色後, 30% メタノールで脱色した.

陽イオン交換カラム (polyCAT A カラム, 4.6 x 200 mm ; PolyLC, Columbia, MD, USA) による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて PRP を精製した. A 緩衝液を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (KPB, pH 6.0), B 緩衝液を 1 M 塩化ナトリウム/A 緩衝液とし, 溶出条件は流速 1 ml/分にて 0~5 分で A 100%, 60 分で A 40%, 65 分で A 0%, 70 分で A 100%とした. A_{220} で検出された

ピークを回収し，SDS-PAGE を行った．

3. 咽頭由来 HEp-2 上皮細胞への GAS の付着，侵入試験

(1) GAS 培養法による付着，侵入試験

24 穴培養プレート (Nalge Nunc) にて HEp-2 細胞をコンフルエントまで培養した．滅菌リン酸緩衝食塩水 [PBS ; 137 mM 塩化ナトリウム，8.1 mM リン酸一水素ナトリウム，2.68 mM 塩化カリウム，1.47 mM リン酸二水素カリウム] で 2 回洗浄後，DMEM 培地を加え，全唾液成分 (0, 2.5, 5, 10 mg/ml)，PRP (0, 0.5, 1, 5 mg/ml)，ムチン (0, 0.5, 1, 2.5 mg/ml)，アミラーゼ (0, 0.5, 1, 5 mg/ml) またはスタセリン (0, 0.5, 1, 5 mg/ml) のいずれかを添加した．30 分後に 10^7 cfu の GAS (SSI-9, NY-5 および JRS4) を接種し，37°C で 3 時間感染させた．2 回洗浄後，5% (w/v) トリプシン (Sigma Aldrich) を 100 μ l 加えて 37°C で 5 分間静置し，PBS 900 μ l を加えて細胞とともに回収した．遠沈した細胞に蒸留水を 1 ml 加え，5 分間振盪して破碎した．同試料を THY 寒天培地上に播種して生育コロニー数から付着・侵入菌数を求め，接種菌数に対する百分率で付着・侵入率を算出した．一方で GAS 感染後にゲンタマイシンとペニシリン G を含む DMEM 培地内で 1 時間培養したものについて，侵入率を算出した．PRP の C 末端ペプチド (PRP-C) を認識するウサギ抗 PRP-C 抗体は，大阪大学歯学部 片岡宏介博士より分与され，DMEM 培地に希釈して使用した．

(2) 共焦点レーザー顕微鏡下での付着・侵入試験

Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) を発現させた SSI-9 GFP 株，NY-5 GFP 株および JRS4 GFP 株は大阪大学歯学部 中川一路博士より供与された (29)．Lab-Tek II Chamber Slide System (Nalge Nunc) 内でコンフルエントの HEp-2 細胞に， 10^7 cfu の GAS を 3 時間感染させ，洗浄後，4% パラホルムアルデヒド溶液 (pH 7.2) 200 μ l を加えて 4°C で一夜静置した．洗浄後，ブロッキング剤 [1% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma Aldrich)，5% (v/v) FBS，10% (v/v) ブロックエース (大日本製薬，大阪)，5% (v/v) ヤギ血清 (Chemicon

International, Temecula, CA, USA)] を 200 μ l 加え, 37°C で 1 時間静置した. ウサギ抗 GAS 抗体 (29) を 100 倍希釈して加え, 37°C で 1 時間静置後に洗浄し, AlexaFluor568 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を 1,000 倍希釈して加えた. 37°C で 1 時間反応後, 洗浄して VECTASHIELD (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を 1 滴加え, 同試料を共焦点レーザー顕微鏡 (AxioPlan2 型; Carl Zeiss, Aalen, Germany) にて観察した.

4. GAS 咽頭定着マウスモデル

June R. Scott 博士 (エモリー大学) より供与された GAS B514Sm 株 (30) をストレプトマイシン含有 THY (THY-Sm) 培地で静止期まで培養した. 洗浄後, PBS に再懸濁して THY-Sm 寒天培地上に播種, 培養し, 生育コロニー数から投与菌数を求めた. BALB/c マウス (メス, 4 週齢; 日本クレア, 東京) に, 1 mg/ml ストレプトマイシンおよび 50 U/ml ペニシリン G を含有した飲料水を 3 日間与え, 次に $10^6 \sim 10^9$ cfu の B514Sm 培養の 100 μ l を PRP (最終濃度 0.5 mg/ml) と混和し, 1~3 日間連続でマイクロピペットを用いて口腔内に投与した. 菌投与翌日より, 滅菌綿棒で咽頭のスワブを行い, THY-Sm 寒天培地上に播種, 培養して, 生育コロニー数を計測することで付着の有無を検討した. 死亡マウスの咽頭, 肺, 脾臓, 肝臓, 腎臓および心臓を磨碎し, THY-Sm 寒天培地上に播種, 培養して GAS の各臓器における分布を調べた.

5. GAS 菌体凝集試験

TSLS 由来 13 株, 非 TSLS 由来 6 株の静止期菌体を洗浄し, $A_{600}=0.3$ となるように PBS で懸濁して生菌試料とした. また静止期菌体を凍結乾燥して PBS に懸濁し, 乾燥菌試料とした. 96 穴丸底プレート (Nalge Nunc) にて GAS 100 μ l に 0~1,000 μ g/ml の PRP を混和し, 37°C で 8 時間反応後の凝集塊の直径をもとに 4 段階 (-, $\pm$, +, ++) に菌株凝集を判定した.

6. GAS 表層における PRP 結合タンパクの同定法

(1) GAS 菌体表層タンパクの 8 M 尿素抽出

GAS SSI-9 株を 10 l の TTY 透析培地 [7.2% (w/v) トリプチケースペプトン (Invitrogen), 0.72% (w/v) トリプトース (Invitrogen), 0.72% (w/v) Yeast Extract 水溶液, 緩衝液 {0.2% (w/v) リン酸一水素カリウム, 0.2% (w/v) 炭酸ナトリウム, 0.2% (w/v) 塩化ナトリウム, 0.5% (w/v) リン酸二水素カリウム}, 1% (w/v) グルコース] で培養した. 菌体を洗浄後, 8 M 尿素 50 ml に懸濁して室温で 2 時間攪拌し, 10,000 g, 30 分間の遠心で回収した上清を PBS で透析して 8 M 尿素抽出画分とした.

(2) PRP のビオチン標識とウェスタンブロッティング

ビオチン標識には ECL Biotinylation Kit (Amersham Biosciences) を用いた. 10 µg/ml の PRP/重炭酸緩衝液 2 ml にビオチン標識試薬 40 µl を添加して室温で 1 時間反応後, 1% (w/v) BSA/PBS 5 ml と PBS 20 ml で洗浄した Sephadex G25 カラム (Amersham Biosciences) に添加し, PBS 5 ml で溶出した.

8 M 尿素抽出画分の SDS-PAGE 後, ゲルをウェスタンブロッティング緩衝液 [50% (v/v) SDS-PAGE 緩衝液, 25% (v/v) メタノール] に浸漬した. メタノール浸漬で活性化させたポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (Immobilon ; Millipore, Bedford, MA, USA) に, Western Blotter (Bio-Rad) を用いて 10 V, 1 時間でタンパク転写を行った. PVDF 膜を 5% (w/v) スキムミルクにて室温で 1 時間ブロッキングし, 0.2% (v/v) Tween20 (Sigma Aldrich) を含有した PBS (PBST) で 3 回洗浄後, PBST で 100 倍希釈したビオチン標識 PRP を室温で 1 時間反応させた. 5 回洗浄後, 1,500 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ストレプトアビジン (Amersham Biosciences) を室温で 1 時間反応させた. 5 回洗浄後, ECL 発色液 (Amersham Biosciences) を 1 分間反応させ, PVDF 膜を Fuji Medical X-ray Film (富士写真フィルム, 東京) に密着させてオートラジオグラフィーを行った.

(3) PRP 結合タンパクの精製

陰イオン交換カラム (DEAE20 カラム ; Bio-Rad) を用いて PRP 結合タンパクを精製した. A 緩衝液を 20mM KPB (pH 8.0), B 緩衝液を 1 M 塩化ナトリウム/A 緩衝液とし, A 緩衝液で透析した GAS SSI-9 の 8 M 尿素抽出画分を流速 1 ml/分にて, 0~20 分は A 100%, 80 分で A 60%, 90~95 分では A 0%, 100 分で A 100%として分画した. 2 ml ずつ回収し, SDS-PAGE 後に銀染色とビオチン標識 PRP を用いたウェスタンブロットを行った. 銀染色には, 2D-銀染色試薬・II 「第一」 (第一化学薬品, 東京) を用いた. すなわち, 固定液 I [50% (v/v) メタノール, 10% (v/v) 酢酸] 中で 10 分間, 固定液 II [30% (v/v) メタノール, 10% (v/v) 酢酸, 5% (v/v) 固定化剤] 中で 15 分間振盪した. 次に前処理液 [50% (v/v) メタノール, 5% (v/v) 前処理剤] 中で 10 分間振盪後, 蒸留水中で 5 分間洗浄した. 銀染色液 [5% (v/v) 染色液 A, 5% (v/v) 染色液 B] 中で 15 分間振盪し, 2 分間洗浄を 3 回行った. 現像液 [5% (v/v) 現像原液] にて染色像が得られたところで停止液を加え, 蒸留水で洗浄した.

PRP 結合タンパクを含む画分について, さらにアパタイトカラム (CHT-10 カラム ; Bio-Rad) を用いて精製を行った. A 緩衝液を 20 mM KPB (pH 8.0), B 緩衝液を 1 M 塩化ナトリウム/A 緩衝液とし, A 緩衝液で透析した試料を DEAE カラムと同条件で分画した.

(4) アミノ酸シーケンス

a) N 末端シーケンス

PRP 結合タンパクを電気泳動後に PVDF 膜に転写し, CBB 染色を行った. 次に目的スポットを切り出し, N 末端シーケンスシステム (HP G1005A ; Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) によるシーケンスと, Hitachi L8500S amino acid analyzer (日立, 東京) による解析を行った.

b) アミノ酸内部シーケンス

電気泳動後のゲルを CBB 染色し, 蒸留水中で 15 分間振盪した. 目的スポットと近隣の同体積の対照ゲルを細かく切り出し, 蒸留水中で 10 分間振盪

した．次に 25 mM 重炭酸アンモニウム/50% アセトニトリル中で 10 分間の振盪を CBB 色が消えるまで繰り返した．アセトニトリル中で 5 分間，0.1 M 重炭酸アンモニウム中で 5 分間，および 0.1 M 重炭酸アンモニウムと等量のアセトニトリル中で 15 分間静置後に，ゲルを 30 分間減圧乾燥した．還元用緩衝液 (10 mM DTT/0.1 M 重炭酸アンモニウム) を加え，56℃で 45 分間保温した．室温まで冷却し，還元用緩衝液と等量の 55 mM ヨードアセトアミド/0.1 M 重炭酸アンモニウムを加えて暗所にて室温で 30 分間反応させた．蒸留水中で 10 分間振盪し，次いで 25 mM 重炭酸アンモニウム/50% アセトニトリル中での 10 分間の振盪を 2 回繰り返した後，アセトニトリル中で静置した．0.1 M 重炭酸アンモニウム中で 5 分間，0.1 M 重炭酸アンモニウムと等量のアセトニトリル中で 15 分間静置後，30 分間減圧乾燥させた．氷上で 0.5 μ M トリプシン溶液/25 mM 重炭酸アンモニウム 30 μ l を加えてゲルを膨潤させ，30 分間静置した後，37℃で 24 時間保温した．上清を減圧遠心機で乾固し，0.1% (v/v) トリフルオロ酢酸 (TFA; 和光純薬) 20 μ l に溶解した．20,000 g で 5 分間遠心分離し，上清を逆相 HPLC に供試してペプチドマップを作成した．HPLC は，逆相カラム (C18 カラム，2 x 150 nm ; Western Analytical Products, Murietta, CA, USA) を使用し，A 緩衝液を 0.1% TFA，B 緩衝液を 0.08% (v/v) TFA/アセトニトリルとして，流速 0.8 ml/分にて 0 分で A 100%，60 分で A 20%の条件で分画した．得られたペプチド画分について，アミノ酸シーケンサー (HP G1005A 型 ; Hewlett Packard) を用いてシーケンスを行った．

c) オープンリーディングフレームの検索

オクラホマ大学で公開されている GAS SF370 株 (M1 型) 全ゲノムデータベース (<http://www.genome.ou.edu/strep.html>) より全ゲノム DNA 配列を入手した．配列を解析ソフト Artemis release 4 for Windows (The Sanger Centre UK) に読み込み，推定アミノ酸配列に変換してオープンリーディングフレーム (ORF) を検索した．相同性検索には Standard protein-protein BLAST を用いた．

7. サザンブロッティング

(1) 染色体 DNA の抽出と精製

THY 培地 40 ml 中で一夜培養した GAS 菌体を TEN [10 mM トリス塩酸 (pH 7.5), 1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (EDTA), 100 mM 塩化ナトリウム] で洗浄し, TEN 5 ml に再懸濁した. ムタノリジン (Sigma Aldrich) 5 mg とリゾチーム (和光純薬) 4 mg を添加して 50°C で 1 時間反応させた. 0.5 mM EDTA (pH 8.0) 200 μ l を加えて 10 分間, 次いで 10% SDS を 1.5 ml 加えて 10 分間静置した. RNase (Sigma Aldrich) 23 μ l を加えて 37°C で 1 時間反応後, プロテイナーゼ K (和光純薬) 500 μ g を加えて 50°C で 1 時間処理した. トリス飽和フェノール (pH 8.0) 20 ml を加えて 30 分以上攪拌し, 8,000 g で 20 分間遠心して水層を回収した. これを 2 回繰り返す, 水層にフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール [PCI ; 50% (v/v) トリス飽和フェノール, 48% (v/v) クロロホルム, 2% (v/v) イソアミルアルコール] を等量加え, 攪拌後に水層を回収した. これを 2 回繰り返す, 水層中の DNA をエタノール濃縮した. すなわち水層に 10 分の 1 量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と 2.5 倍量の 100% エタノールを加えて DNA をエタノール共沈させ, パスツールピペットを用いて回収し, 70% エタノール中で 3 回洗浄した. 自然乾燥後に TE に溶解し, DNA 濃度測定を行った.

(2) DNA プローブの作製

GAS SSI-9 株の *grpE* 遺伝子をプライマー F1 と R1 (表 2) および AmpliTaq Gold (Perkin Elmer Analytical Instruments, Shelton, CT, USA) を用いた Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で増幅した. PCR 反応液は 1 試料あたり, 0.1 μ g/ μ l SSI-9 染色体 DNA 1 μ l, 10x PCR Buffer (Perkin Elmer) 10 μ l, 2 mM dNTP Mixture (Perkin Elmer) 10 μ l, 25 mM MgCl₂ (Perkin Elmer) 10 μ l, 20 μ M プライマー溶液 各 2.5 μ l と AmpliTaq Gold 0.3 μ l に蒸留水を加えて計 100 μ l とした. 94°C で 9 分間反応後, 94°C で 30 秒間, 55°C で 30 秒間, 72°C で 30 秒間を 35 回繰り返す, その後 72°C で 7 分間の伸長反応を行った. PCR 産物には泳動

表2 本研究で用いたプライマー

名前	配列
F1	5'- GGAGGCACTCAGTGTCTAG -3'
F2	5'- CGGGATCCGTGTCAGAAGAAATTAAGGACG -3'
F3	5'- CGGGATCCCAGAATATACAGCGTCGCTC -3'
F4	5'- CGGGATCCAATCTAGAACGTGCCTTGG -3'
F5	5'- CGGGATCCGTAGAAGAAGTAGAAGTCG -3'
F6	5'- GCAGAATATACAGCGTCGCTC -3'
R1	5'- CAACTACCATCGCTGGTC -3'
R2	5'- GGAATTCGTTATAACAACCTACCATCGC -3'
R3	5'- GGAATTCGAGAGCGACGCTGTATATTCTG -3'
R4	5'- GGAATTCGCGTTCGTTTGCAAGTTCTAACTC -3'
recF	5'- GCCGGACCAGATATGTTGGAGGAACAGCC -3'
recR	5'- CACTGCACCCTTACCAAAATCTTTTTC -3'
SF1	5'- GGACAAGTGGCCATTACCC -3'
SR1	5'- GCTCATCAATACTATCTAGCC -3'
SF2	5'- GGCAAACTAGAGAAGTTGGG -3'
SR2	5'- GGAGTCCAAACCCACGG -3'
SF3	5'- GCTGGCAAGGTAAATTC -3'
SR3	5'- GCGTTCGTTTGCAAGTTC -3'
SF4	5'- GGATTATCGTAGGTCTGTAGTTTG -3'
SR4	5'- GCTATCTAGTTTACTGTCATTACGG -3'
SF5	5'- CGTAGAAGAAGTAGAAGTCG -3'
SR5	5'- GGTTTGTCAGTCTTGACG -3'
SF6	5'- GAGGTATTAACATGTCT -3'
SR6	5'- CGTCAATGTACCACCACCA -3'
aadF	5'- CCACTCTCAACTCCTGATCC -3'
aadR	5'- GTTAGCAGTTCGTAGTTATC -3'

緩衝液 [10% (v/v) グリセリン, 0.2 mM EDTA (pH 8.0), 0.05% (w/v) BPB, 0.05% (w/v) キシレンシアノール (和光純薬)] を加え, TBE 緩衝液 [89 mM トリス, 89 mM ホウ酸, 10 mM EDTA (pH 8.0)] 内で 1% (w/v) アガロース (Promega,

Madison, WI, USA) ゲルを用いた 100 V の電気泳動を行った。ゲルは臭化エチジウム染色と蒸留水による脱色を行い、紫外線ランプ上で DNA を観察した。*grpE* 遺伝子を含むゲルを切り出し、Quantum Prep Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (スピニングカラム ; Bio-Rad) 内で -20°C にて 5 分間静置した。20,000 g, 室温で 5 分間遠心して DNA 溶液を溶出し、エタノール濃縮して鋳型 DNA とした。

鋳型 DNA の ^{32}P 標識には TaKaRa Random Primer DNA Labeling Kit ver.2.0 (宝酒造, 大津) を使用した。200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 鋳型 DNA 5 μl , Random Primer (宝酒造) 2 μl , 蒸留水 7 μl を混合して 95°C で 3 分間加熱後、氷中で急冷して 5 分間静置した。さらに、10x Buffer (宝酒造), dNTP Mixture (0.2 mM each dGTP, dATP, dTTP; 宝酒造) 各 1.25 μl と [α - ^{32}P] 標識 dCTP (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, USA) 2.5 μl (0.925 MBq, 25 μCi) を加え、Exo-free Klenow Fragment (宝酒造) 0.5 μl を添加して 37°C で 10 分間反応させた。30 mM EDTA を加え 95°C で 3 分間加熱後、氷中で急冷して全量をハイブリダイゼーションプロブ液とした。

(3) 染色体 DNA の酵素処理とメンブレン転写

1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 染色体 DNA 5 μl に 10x *EcoR* I Buffer (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) 5 μl と制限酵素 *EcoR* I (New England Biolabs) 50 U を加え、蒸留水で 50 μl として 37°C で 5 時間反応させた。0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動後のゲルをアルカリ変性溶液 (1.5 M 水酸化ナトリウム, 0.5 M 塩化ナトリウム) に 10 分間浸漬して蒸留水で洗浄後、中和溶液 [1 M トリス塩酸 (pH 7.4), 1.5 M NaCl] に 10 分間浸漬した。蒸留水と 20x SSPE (pH 7.4 ; 3 M 塩化ナトリウム, 173 mM リン酸二水素ナトリウム, 25 mM EDTA) で洗浄し、20x SSPE を染み込ませた 3 MM ろ紙 (Whatman, Kent, UK) 上に置いた。ゲル上にナイロン膜 (NytranN; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany), その上に 20x SSPE を染み込ませた 3 MM ろ紙 4 枚とペーパータオルを置き、約 5 g/cm² の力を上から均一に加えた。一晩転写後のナイロン膜を 2x SSPE で洗浄して自然乾燥

後、1,200 J の紫外線を照射した。プレハイブリ液 [20x SSPE 5 ml, 100x デンハルト液 {2% (w/v) BSA, 2% (w/v) Ficoll 400 (Amersham Biosciences), 2% (w/v) ポリビニルピロリドン (和光純薬)} 1 ml, 10% (w/v) SDS 1 ml, ホルムアミド 10 ml, 蒸留水 3 ml] に膜を浸漬し、42°C で 1 時間反応させた。次にハイブリ液 [プレハイブリ液 20 ml, サケ精子 DNA (Sigma Aldrich) 20 μ l, ハイブリダイゼーションプローブ液] 内で一夜反応させた。一次洗浄液 [2x SSPE, 0.1% (w/v) SDS] で 30 分間洗浄し、ついで 65°C の二次洗浄液 [0.2x SSPE, 0.1% (w/v) SDS] 内で振盪し洗浄後、Fuji X-ray film を用いてオートラジオグラフィを行った。

8. DNA シークエンスと系統樹作成

SF370 株全ゲノム配列に基づいて *grpE* 遺伝子周囲でプライマー SF1~6 および SR1~6 (表 2) を設計し、SSI-9 染色体 DNA をもとに *Ex Taq* を用いた PCR を行った。PCR 反応液は 1 試料あたり、10x *Ex Taq* Buffer (宝酒造) 5 μ l, 2.5 mM dNTP Mixture (宝酒造) 4 μ l, 20 μ M プライマー溶液 各 1.25 μ l, 100 μ g/ml SSI-9 染色体 DNA 1 μ l および 5 U/ μ l *Ex Taq* (宝酒造) 1 μ l に蒸留水を加えて 50 μ l とした。プライマーセットは SF1 と SR1, SF2 と SR2, SF3 と SR3, SF4 と SR4, SF5 と SR5 および SF6 と SR6 とし、95°C で 5 分間反応後、94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間を 35 回繰り返した。反応終了後に 2% アガロースゲルで電気泳動した PCR 産物をスピンカラムで精製した。1 μ g/ μ l の PCR 産物 1 μ l に、pGEM-T Easy Vector (Promega) 1 μ l, T4 DNA Ligase (Promega) 1 μ l, 10x Ligase Buffer (Promega) 1 μ l, 蒸留水 6 μ l を加え、16°C で 30 分間のライゲーション反応を行った。形質転換用の大腸菌 XL-10 Gold は SOB 培地 [2% (w/v) バクトトリプトン (Becton Dickinson), 0.5% (w/v) Yeast Extract, 10 mM 塩化ナトリウム, 2.5 mM 塩化カリウム, 10 mM 硫酸マグネシウム・7 水和物, 10 mM 塩化マグネシウム・6 水和物] 250 ml で 18°C にて $A_{600}=0.6$ まで培養し、氷冷した形質転換用緩衝液 [TB ; 10 mM ピペラジン-1,4'-ビス (2-エタンスルホン酸) (PIPES; 和光純薬), 15 mM 塩化カルシウム・二水和物, 250 mM 塩化カリウム, 55 mM 塩化マンガン・四水和物] 84 ml に懸

濁して 10 分間氷上で静置後，TB 20 ml とジメチルスルホキシド (DMSO; 和光純薬) 1.5 ml に懸濁して液体窒素内で使用時まで保存した．氷中で融解した XL-10 Gold 100 μ l とライゲーション反応液 5 μ l を 17-10 チューブ (旭テクノグラス，東京) に入れて氷中で 15 分間静置した．チューブを 42°C で 30 秒間湯浴し，直ちに氷中に戻した．SOC 培地 (20 mM グルコース/SOB) 900 μ l を加え，37°C で 1 時間振盪培養した．100 mM イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG ; Sigma Aldrich) 50 μ l および 20 mg/ml 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド (X-gal ; 和光純薬)/N,N-ジメチルホルムアミド (DMF ; 和光純薬) 50 μ l を塗り広げておいたアンピシリン含有 LB (LB-Amp) 寒天培地上に大腸菌を播種し，37°C で一夜培養した．白色コロニーについて，コロニーダイレクト PCR を行い，アガロースゲル電気泳動で目的バンドが観察された大腸菌を培養し，ABI Prism Miniprep Kit (Perkin Elmer) を用いて DNA を精製した．すなわち，1 ml 菌液中の菌体を再希釈液 150 μ l で懸濁し，溶解液 150 μ l を加えて 3 分間静置した．沈降液 150 μ l を加えて遠心し，上清に結合液 600 μ l を加えてミニプレップカラムチューブに添加した．1,000 g で 3 分間遠心後，洗浄液 500 μ l および最終洗浄液 900 μ l を加えてそれぞれ遠心した．カラムを 14,000 g で 1 分間遠心してレジンを乾燥させ，TE 90 μ l を加えて 3 分間静置後，14,000 g で 1 分間遠心してプラスミドを溶出した．200 μ g/ml プラスミド溶液 4 μ l に Ready Reaction mix BigDye (Perkin Elmer) 8 μ l，0.8 μ M -21M13 プライマー (Perkin Elmer) または M13 プライマー RV (宝酒造) 4 μ l，蒸留水 4 μ l を加え，96°C で 3 分間反応後，96°C で 10 秒間，50°C で 5 秒間，60°C で 4 秒間を 25 回繰り返した．PCR 産物をエタノール濃縮し，Template Suppression Reagent (TSR; Perkin Elmer) 25 μ l に溶解して 95°C で 2 分間熱処理した．DNA シークエンサー ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) を用いてシーケンスし，Sequencing Analysis 3.0 (Perkin Elmer) で塩基配列を決定した．

各生物種の GrpE アミノ酸配列は，National Center for Biotechnology Information (NCBI) の配列解析ソフト CLUSTALW を用いてマルチプルアライメントを行い，TreeView (Taxonomy and Systematics at Glasgow, University of

Glasgow, Glasgow, UK) で系統樹を作製した.

9. 大腸菌による組換えタンパクの作製

N 末端側に制限酵素 *Bam*H I (New England Biolabs), C 末端側に *Eco*R I の認識配列を付与したプライマーを用いて *grpE* 遺伝子中の全長 rGrpE1 (表 2 中のプライマー F2, R2 : 598 bp), C 末端側フラグメントの rGrpE2 (プライマー F3, R2 : 377 bp), rGrpE3 (プライマー F4, R2 : 283 bp) および rGrpE4 (プライマー F5, R2 : 181 bp), N 末端側フラグメントの rGrpE5 (プライマー F2, R3 : 193 bp) と rGrpE6 (プライマー F2, R4 : 103 bp) の遺伝子 *Ex Taq* にて増幅した. 95°C で 5 分間反応後, 94°C で 30 秒間, 55°C で 30 秒間, 72°C で 30 秒間を 35 回繰り返す, PCR 産物を pGEM-T Vector (Promega) にライゲーションして大腸菌 XL-10 Gold に形質転換した. 100 ml LB 培地で培養した大腸菌からのプラスミド DNA の抽出と精製には, Qiafilter Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いた. まず, 再懸濁液 [50 mM トリス塩酸 (pH 8.0), 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A] 4 ml に大腸菌を懸濁し, 溶解液 [200 mM 水酸化ナトリウム, 1% (w/v) SDS] 4 ml を加えて 5 分間, 中和液 [3.0 M 酢酸カリウム (pH 5.5)] 4 ml を加えて 10 分間静置した. QIAGEN-tip 100 (Qiagen) を平衡化液 [750 mM 塩化ナトリウム, 50 mM 3-モルホリノプロパンスルホン酸 (MOPS; pH 7.0), 15% イソプロパノール] 4 ml で平衡化し, 大腸菌可溶画分を添加した. 洗浄液 [1 M 塩化ナトリウム, 50 mM MOPS (pH 7.0), 15% イソプロパノール] 10 ml で 2 回洗浄し, 溶出液 [1.6 M 塩化ナトリウム, 50 mM トリス塩酸 (pH 8.5), 15% イソプロパノール] 5 ml にて溶出した. 得られたプラスミド溶液にイソプロパノール 3.5 ml を加えて 15,000 g, 4°C で 30 分間遠心し, 70% エタノール 2 ml を加えて 15,000 g で 10 分間遠心した. 得られたプラスミドと GST 融合タンパク発現ベクター pGEX-6P-1 (Amersham Biosciences) を *Bam*H I および *Eco*R I で切断し, TaKaRa ligation kit ver.2 solution I (宝酒造) を加えて, 16°C, 30 分間のライゲーション反応を行い, XL-10 Gold に形質転換した. 1 mM IPTG 誘導により目的タンパクを発現している大腸菌を選択し, 同菌をアンピシリン含有 2YT

(2YT-Amp) 培地 (Sigma Aldrich) 1 l 中で 30℃にて培養した。 $A_{600}=0.2$ の時点で 1 mM の IPTG を添加し、3 時間培養後に菌体を回収した。菌体は氷冷した超音波破碎緩衝液 [50 mM トリス塩酸 (pH 8.0), 50 mM 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA および 1 mM DTT] 20 ml に懸濁し、次に超音波破碎機 (トミー精工, 東京) により出力 5, 10 秒間の間欠的な超音波破碎を 10 回繰り返した。可溶画分をグルタチオン - Sepharose4B ゲル (Amersham Biosciences) に添加し、4℃で一晩攪拌した。ゲルを PBS と切断用緩衝液 [50 mM トリス塩酸 (pH 7.0), 150 mM 塩化ナトリウム, 1 mM EDTA, 1 mM DTT] で洗浄し、切断緩衝液 5 ml と PreScission Protease (Amersham Biosciences) 50 μ l を添加して 4℃で 48 時間反応させた。溶出液を PBS で透析し、目的の組換えタンパクを得た。

GST タンパクの免疫反応は、一次抗体に 1,000 倍希釈ヤギ抗 GST 抗体 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA), 二次抗体に 1,000 倍希釈アルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (Chemicon International) を用いたウェスタンブロッティングにより行った。BCIP/NBT 含有 Alkaline Phosphatase Substrate (Moss, Pasadena, MD, USA) を 5 ml 加え、適度な発色が得られたところで 0.5 M EDTA (pH 8.0) を加えて反応を停止させた。

抗 rGrpE 抗体の作成にはウサギ (New Zealand white rabbit, メス, 2 kg ; ケアリー, 大阪) を使用した。ウサギ耳介静脈上の皮膚にキシレン (和光純薬) を塗布後、切開により採血した。血液を 4℃で一晩静置し、3,000 g, 4℃, 10 分間の遠心により血清を回収した。同日、rGrpE1 300 μ g を電気泳動後のゲルから切り出して PBS 1 ml に懸濁した。これを等量の Freund's Complete Adjuvant (FCA; Becton Dickinson) と混和して油中水滴とし、ウサギ背側皮下に注入した。2, 4 および 6 週後に rGrpE1 200 μ g と等量の Freund's Incomplete Adjuvant (FIA ; Becton Dickinson) との混和物をウサギ背側に皮下注射し、同日に採血した。抗体価の確認はウェスタンブロットにて行い、一次抗体にはウサギ免疫血清, 二次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いた。

10. 菌体表層 GrpE の観察

(1) 共焦点レーザー顕微鏡下での観察

1 ml の SSI-9 株菌液を 3,000 g, 室温で 5 分間遠心し, 菌体を PBS で 2 回洗浄後, 50 µg/ml ヒト IgG1 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) を含むブロッキング剤で 37°C, 1 時間のブロッキング反応を行った. 次に, 100 倍希釈した抗 rGrpE 抗体と 37°C で 1 時間反応させ, 3 回洗浄後に 1,000 倍希釈した AlexaFluor568 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と 37°C で 1 時間遮光して反応させた. さらに, Sybr Green II RNA Gel stain (Molecular Probes) を 20,000 倍希釈となるよう添加し, 37°C で 15 分間遮光して静置した. 菌体を回収し, VECTASHIELD を加えて共焦点レーザー顕微鏡下で観察した.

(2) 免疫電子顕微鏡像の観察

SSI-9 菌液 1 ml を 3,000 g, 8 分間で遠心して集菌した. PBS で 2 回洗浄後, 30 分間ブロッキングし, 50 倍希釈した抗 rGrpE 抗体を 60 分間反応させた. 3 回洗浄後に 40 倍希釈した 15 nM 金コロイド標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Biosciences) を 30 分間反応させた. 3 回洗浄後, 2.5% (v/v) グルタルアルデヒド (和光純薬)/0.1 M リン酸ナトリウム液 (pH 7.3) を 10 分間作用させて固定した. 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.3) で 1 回, 蒸留水で 3 回洗浄し, 支持膜上に滴下して透過型電子顕微鏡 (H-800 型; 日立) にて観察した.

11. Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)

20 mM DL-トレオニン (和光純薬) 含有 TH 培地 200 ml で培養した SSI-9 を PBS 10 ml に懸濁し, 2 mg/ml のリゾチームを加えて 37°C で 60 分間反応させた. 0.1 mg/ml のムタノリジンを加えて 37°C で 1 時間反応後に 0.1% ジエチルピロカルボネート (DEPC) 処理した PBS 5 ml で洗浄した. 菌体を TRIZOL (Invitrogen) 5 ml に懸濁し, クロロホルム 1 ml を加えて 10,000 g, 4°C で 15 分間の遠心後, 2.5 ml の水層を回収した. PCI (Invitrogen) 2.5 ml を加えて遠心にて

水層を回収した．等量のイソプロパノールを加え，遠心後のペレットを 80% エタノール 5 ml で洗浄し，遠心後に自然乾燥した．DEPC 処理水 800 μ l と RQ1 RNase-Free DNase (Promega) 800 μ l を加え，37°C で 3 時間反応させた．PCI を 1.6 ml 加え，水層を回収した．これを 3 回繰り返して得られた水層と等量のイソプロパノールを加えて遠心し，80% エタノールで洗浄した．ペレットを自然乾燥後，蒸留水に懸濁して総 RNA を得た．

RT-PCR を行うため，100 μ g/ μ l 総 RNA 10 μ l に 500 μ g/ml Random 9mers (Promega) 1 μ l を加え，70°C で 5 分間反応させた．10x PCR Buffer 10 μ l，25 mM $MgCl_2$ 20 μ l，2 mM dNTP Mixture 50 μ l，400 U/ml RNase inhibitor (Promega) 2.5 μ l，200 U/ml Superscript II (Promega) 1.25 μ l を加え，42°C で 60 分，99°C で 5 分，5°C で 5 分間の逆転写反応を行った，次に RNaseH (Promega) 1 μ l を加えて 37°C で 20 分間反応させて cDNA を得た．cDNA 20 μ l に 10x PCR Buffer 8 μ l，25 mM $MgCl_2$ 4 μ l，20 μ M プライマー F1 および R1 (表 2) 各 2.5 μ l，AmpliTaq Gold 0.5 μ l，DEPC 処理水 62.5 μ l を加え，94°C で 9 分間反応の後，94°C で 30 秒間，60°C で 60 秒間，72°C で 60 秒間を 30 回繰り返す PCR を行った．対照として，*recA* 遺伝子のプライマー *recF* および *recR* (表 2) を用いた PCR を行った．1% アガロースゲル電気泳動後，撮影した画像をイメージスキャナー (EPSON，東京) にて取り込み，画像処理ソフト Scion Image (Scion Corporation, Fredrick, MD, USA) を用いて DNA 濃度を数値化した．

12. 欠失株の作成と観察

(1) 欠失株の作成

大腸菌クローニングベクター pSF152 (31) を *EcoR* I で切断して得たプラスミド 1 μ g に 10x Alkaline Phosphatase Buffer (宝酒造) 5 μ l，*E. coli* C57 Bacterial Alkaline Phosphatase (BAP ; 宝酒造) 2 μ l と蒸留水を加えて 50 μ l とし，65°C で 30 分間の BAP 処理を行った．一方で，プライマー F6 および R4 (表 2) で増幅した PCR 産物を pGEM-T Easy Vector に組込み，*EcoR* I で切り出した．これらの遺伝子をライゲーションして GrpE 欠失株作成用ベクター pJM100 を作成し

た.

GAS B514Sm を 20 mM グリシン含有 THY 培地 100 ml 内で $A_{600}=0.2$ となるまで培養した. 菌体を培養上清 5 ml に再懸濁し, 43°C で 9 分間処理後に, 氷冷した 15% グリセロールで 2 回洗浄した. 菌体を 15% グリセロール 0.6 ml に懸濁して氷上に静置し, 200 μ l の菌液に対して 10 μ g の pJM100 を添加した. 菌液を 0.2 cm 幅のキュベット (Bio-Rad) に移し, Gene Pulser (Bio-Rad) を用いて 1.75 kV, 25 μ F, 400 Ω の条件で DNA を導入した. 菌液を氷上で 45 分間静置し, 37°C の THY 培地 10 ml に懸濁して 37°C で 1 時間培養した. スペクチノマイシン含有 THY 寒天培地上に播種, 培養して生育したコロニーに対し, スペクチノマイシン遺伝子 (*aad9*) 内のプライマー (表 2, *aadF* あるいは *aadR*) と *grpE* 遺伝子内のプライマー (表 2, F1) を用いてコロニーダイレクト PCR を行った. 遺伝子の導入された GAS 全菌体に対する抗 rGrpE 抗体によるウェスタンブロットを行い, GrpE 発現の認められない株を TR45 とした.

(2) 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

THY 培地 10 ml で培養した GAS を 0.1 M カコジル酸緩衝液 [0.1 M カコジル酸ナトリウム, 0.2 M 塩酸にて pH 7.4 に調整] にて 3 回洗浄した. 次に, Half-Karnovsky 液 [4% (w/v) パラホルムアルデヒド, 5% (w/v) グルタルアルデヒド] に 3 時間浸漬して固定した. 0.1 M カコジル酸緩衝液にて 3 回洗浄し, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 最後に 100% エタノールの順にそれぞれ 10 分間浸漬し, 再度 100% エタノールに 20 分間浸漬した. 次に, 100% エタノールと *t*-ブチルアルコールを等量混和した液に 10 分間浸漬し, 続いて *t*-ブチルアルコールに 10 分間浸漬を 2 回, 20 分間浸漬を 1 回行った. 菌体を 4°C で凍結し, JFD-310 (JEOL, 東京) にて凍結乾燥した. 同試料をプラズママルチコーター (PMC-3000 型; 盟和商事, 大阪) にて金蒸着し, 走査型電子顕微鏡 (JSM-5310LV 型; JEOL) で観察した.

13. 菌の生化学的検査

レンサ球菌同定キットのストレプトグラム（和光純薬）にて、酸産生能（基質としてアミグダリン，ラクトース，トレハロース，マンニトール，アルブチン，ラフィノース，ソルビトール，アラビノース，イヌリンまたはメリビオース），酵素酸性能（N-アセチルグルコサミダーゼ，フコピラノシダーゼ， α -ガラクトシダーゼ， β -ガラクトシダーゼ，アルカリフォスファターゼ， β -グルクロニダーゼおよびピロリドンアリルアミダーゼ），アルギニン，エスクリンと馬尿酸の加水分解能およびアセトイン産生能を調べた．

14. 統計処理

すべての統計処理には，StatViewJ 5.0 (SAS Institute, Cary, CA, USA) を用いた．

結果

1. 培養 HEP-2 細胞に対する GAS 付着と侵入における PRP の影響

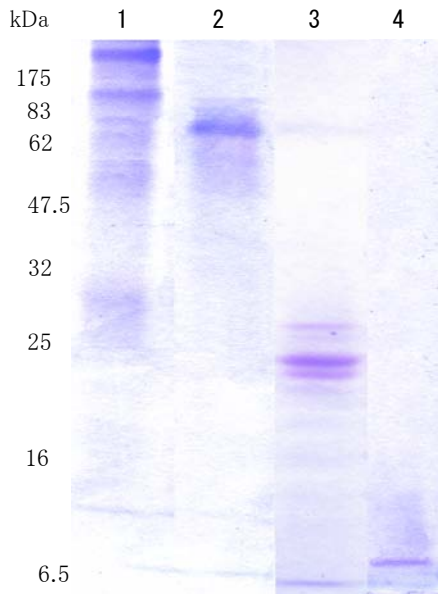


図1 唾液成分の精製後の SDS-PAGE 像
全唾液成分を 6 M グアニジン塩酸に溶解し、Sephacryl S-200 によるゲルろ過クロマトグラフィーで分画した。
レーン 1: ムチン画分, レーン 2: アミラーゼ画分, レーン 3: PRP 画分, レーン 4: スタセリン画分。

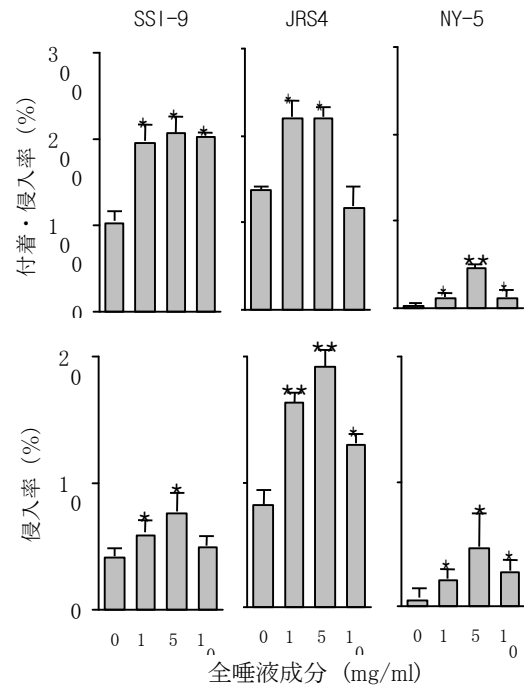


図2 全唾液成分を添加した場合の付着, 侵入試験.
HEP-2 細胞培養培地内に全唾液成分を添加し, さらに GAS 10^7 cfu を 3 時間感染させた. 細胞に付着および侵入した菌数を求め, 接種菌数の百分率から付着・侵入率 (%) を算定した. また, 付着菌を抗生物質処理し, 侵入率 (%) を算定した. 非添加群と比較した場合の有意水準 **Dunnett's $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

採取した 100 ml の唾液から, 約 500 mg のヒト全唾液成分 (WHS) を得た. 同 WHS をゲルろ過し, ムチン, アミラーゼ, PRP とスタセリンの 4 種類の成分 (図 1) を調整した. これらを用いて, HEP-2 細胞への GAS SSI-9 株 (M1 型), JRS4 株 (M6 型) と NY-5 株 (M12 型) の付着と侵入におよぼす影響を調べた. 最初に, WHS を添加した場合の SSI-9 および JRS4 両株の付着・侵入率および侵入率は, WHS 非添加群と比較して有意に上昇した ($P < 0.05$, 図 2). SSI-9 に比し

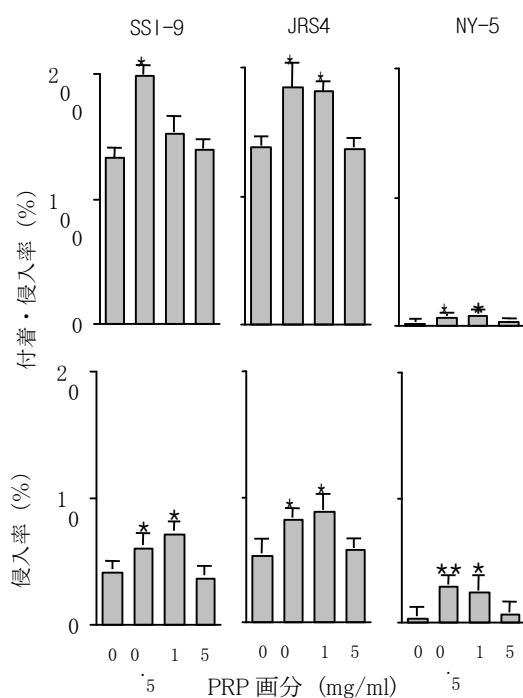


図3 PRP画分添加した場合の付着，侵入試験. HEp-2細胞培養培地内にPRPを添加し，さらに GAS 10⁷cfu を3時間感染させた．細胞に付着および侵入した菌数を求め，接種菌数の百分率から付着・侵入率 (%) を算定した．また，付着菌を抗生物質処理し，侵入率 (%) を算定した．非添加と比較した場合の有意水準 **Dunnett's $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

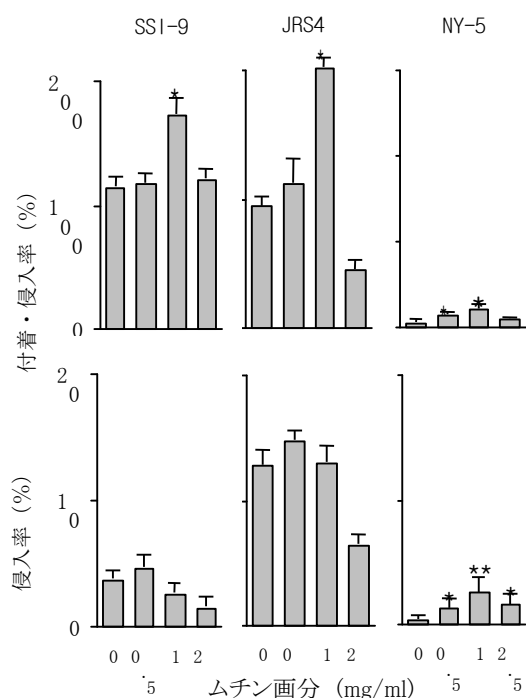


図4 ムチン画分を添加した場合の付着，侵入試験. HEp-2細胞培養培地内にムチンを添加し，さらに GAS 10⁷cfu を3時間感染させた．細胞に付着・侵入した菌数を求め，接種菌数の百分率から付着・侵入率 (%) を算定した．また，付着菌を抗生物質処理し，侵入率 (%) を算定した．非添加と比較した場合の有意水準 *Dunnett's $P < 0.05$.

て JRS4 では付着・侵入率，侵入率ともに高く，特に後者については顕著な上昇が認められた．一方 NY-5 は菌体表面タンパクが著しく少ないことが示されており，付着および侵入率ともに他の2株に比して極めて弱かったが，WHS 添加により付着・侵入率と侵入率は10倍以上に上昇した．

つぎに PRP 添加時の影響を検討した (図3) ところ，3株ともに付着・侵入率の有意な上昇が認められた ($P < 0.05$)．また侵入率は，PRP が 0.5 mg/ml あるいは 1.0 mg/ml のときに，全株で非添加群に比べて有意に促進した．しかしながら，PRP を過剰 (5 mg/ml) に添加したときには，付着・侵入率および侵入率の上昇作用は解消した．

SSI-9 および JRS4 では，ムチンの添加 (1 mg/ml) により付着・侵入率が有意に上昇した ($P < 0.05$) (図4)．しかしながら，侵入率には有意な変化はなく，

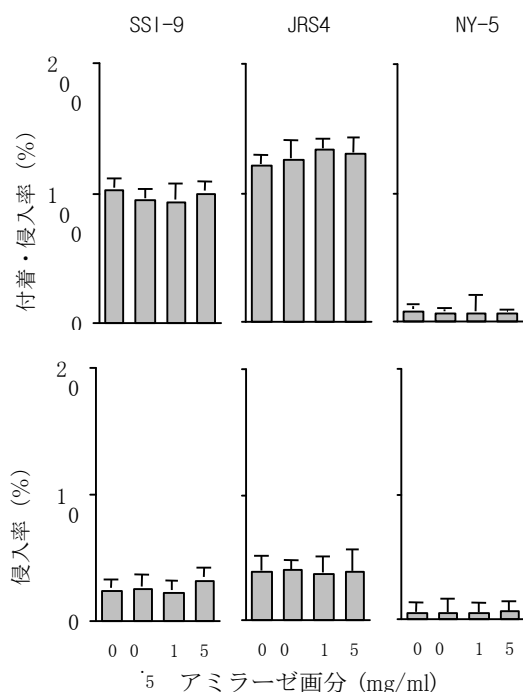


図5 アミラーゼ画分を添加した場合の付着，侵入試験。非添加群と比較した場合に，有意差は認められない。

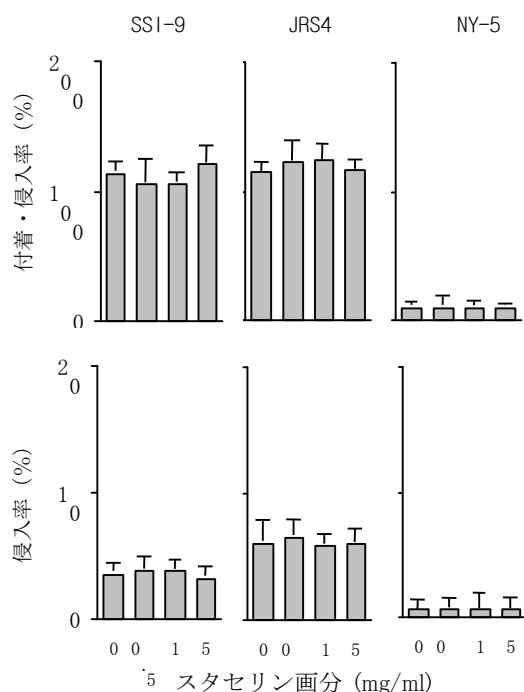


図6 スタセリン画分を添加した場合の付着，侵入試験。非添加群と比較した場合に，有意差は認められない。

むしろ 5 mg/ml と過剰なムチンを添加したときには，JRS4 では非添加群よりも侵入率が減少した。一方，NY-5 ではムチン添加により，を付着・侵入率および侵入率の有意な上昇が観察された。

アミラーゼ (図 5) とスタセリン (図 6) の添加時には，いずれの菌も非添加群に比べて有意な変化はなく，GAS の付着および侵入には影響しないことが示された。

上述の PRP を，HPLC により，酸性 PRP と塩基性 PRP を分画した (図 7A)。これらの PRP を用いて，SSI-9 の HEp-2 細胞への付着試験を行ったところ (図 7B)，両 PRP の添加 (0.5 mg/ml) により付着率が上昇した ($P < 0.05$)。このことから，酸性および塩基性を問わず PRP は，細胞付着の促進作用があることが示された。また，PRP と同時に抗 PRP-C 抗体を加えて同様の付着試験を試みたところ，同抗体は酸性 PRP による付着促進作用をほぼ抑制することができ，塩基性 PRP の付着促進作用についてもわずかに抑制することが明らかとなった。

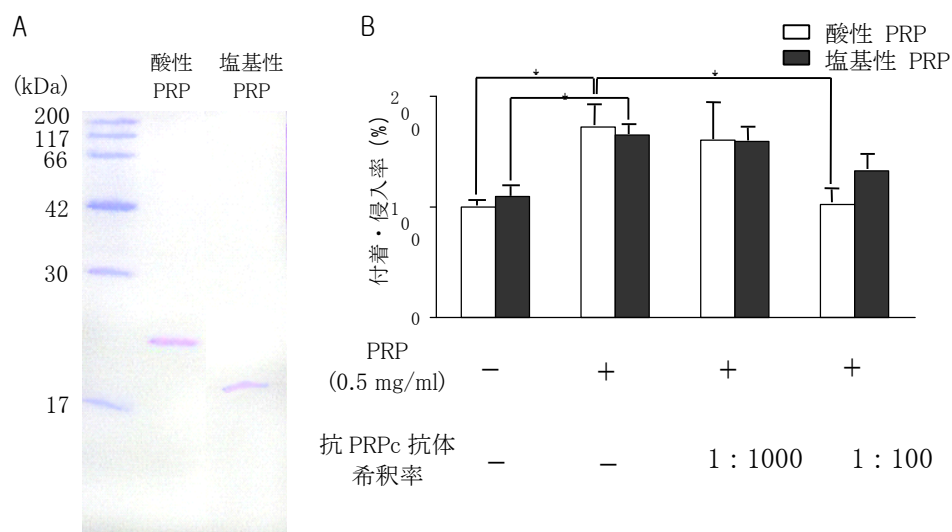


図 7 抗 PRPc 抗体添加による GAS 付着の阻害効果

A 酸性 PRP と塩基性 PRP の精製. ゲルろ過クロマトグラフィーで得られた PRP 画分から HPLC を用いて分離, 精製した.

B 抗 PRP 抗体の GAS 付着阻害作用. コンフルエント HEp-2 細胞に対し SSI-9 株と酸性あるいは塩基性 PRP を 0.5 mg/ml となるよう添加し, 同時に抗 PRP-C 抗体を 1,000 倍 または 100 倍希釈となるよう添加して付着・侵入率の変化を観察した. *Scheffe's $P < 0.05$.

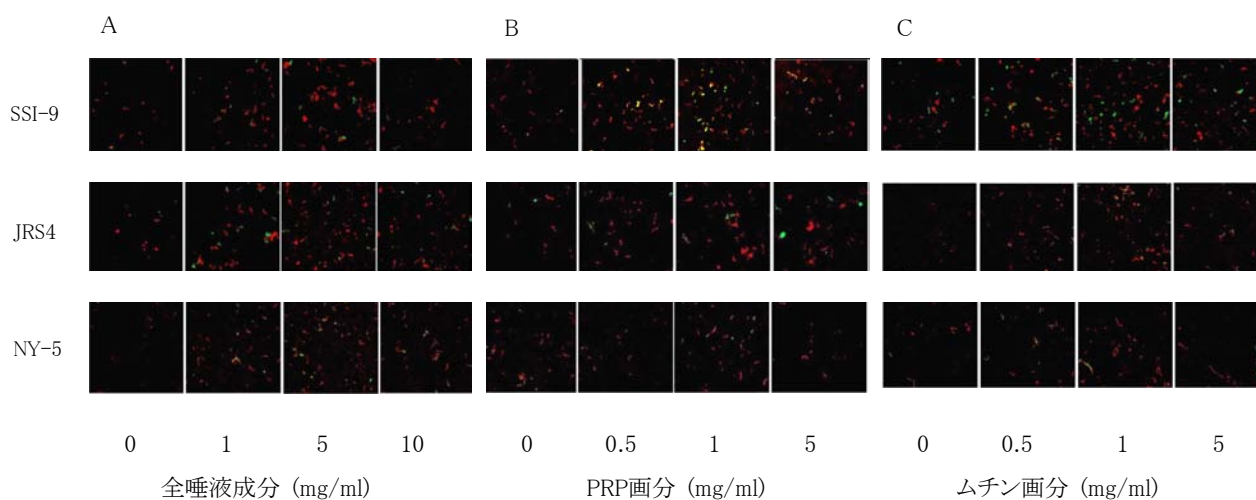


図 8 HEp-2 細胞へ付着・侵入する GFP 発現 GAS の共焦点レーザー顕微鏡写真像

HEp-2 細胞に唾液成分と GFP 発現 GAS を添加し, 3 時間感染させた. 細胞外の菌体を抗 GAS 抗体と AlexaFluor568 で赤色に染色し, 共焦点レーザー顕微鏡下で観察した. 赤: 付着細菌, 緑: 侵入細菌. A: 全唾液成分添加時. B: PRP 画分添加時. C: ムチン画分添加時.

つぎに, 唾液成分の添加による GAS の HEp-2 細胞への付着と侵入の変化

を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。HEp-2 細胞へ付着あるいは侵入した EGFP 標識 GAS は緑色を示すが、細胞外に付着した GAS をウサギ抗 GAS 抗体と AlexaFluor568 標識抗ウサギ IgG 抗体で染色することにより、細胞外付着菌を赤色、侵入菌を緑色に染め分けた。その結果、WHS (図 8A), PRP (図 8B) およびムチン (図 8C) の添加により、付着菌数と侵入菌数が増加した。WHS を 5 mg/ml, PRP を 1 mg/ml あるいはムチンを 1 mg/ml となるように添加したときに、非添加群と比べて付着菌数と侵入菌数が最も増加した。このような顕微鏡観察においても、唾液成分による GAS の付着と侵入の促進が明らかとなった。しかしながら培養法と比較したとき、付着菌数に対する侵入菌数の増加率には明らかな変化をみとめず、培養法による付着・侵入試験では、一部の菌が抗生物質処理から逃れている可能性が示唆された。

2. マウス咽頭への GAS の定着における PRP の影響

マウス咽頭への GAS 定着において唾液 PRP がどのような影響を与えるかを検討するため、これまでにマウス咽頭への定着が報告されている GAS B514Sm 株を供試して、GAS 咽頭付着のマウスモデルを構築した。B514Sm を PRP と混和してマウス口腔内に投与し、綿棒による咽頭スワブを寒天培地上で培養した。このとき添加する PRP の濃度は、培養法において付着・侵入率が最も亢進したときと同じ 0.5 mg/ml とした。投与する GAS の菌数および投与回数を変化させ、GAS の咽頭定着におよぼす PRP の影響を検討した (表 3)。いずれの菌数および投与回数においても、PRP の添加により咽頭付着率は亢進した。また 10^8 cfu の B514Sm を 1 回投与したときと 10^9 cfu を 2 回あるいは 3 回投与したときに、PRP 添加群のマウスが死亡した。 10^9 cfu の菌を 2 日あるいは 3 日連続で投与したとき、PRP 添加群のすべてのマウスで 6 日間以上の GAS 定着がみられた。このことから、PRP を添加したときには非添加群よりも GAS が長期に定着することが示された。 10^9 cfu の B514Sm に PRP を添加して 2 日連続で投与したときには、投与後 5 日目あるいは 6 日目で PRP 非添加群と比較して、咽頭定着率が有意に

表 3 B514Sm のマウス咽頭への定着

感染回数	GAS (cfu)	PRP (μg/ml)	n	感染後日数					
				1	2	3	4	5	6
1	10 ⁶	0	5	0	0	0	0	0	0
		500	5	2	2	2	2	2	2
1	10 ⁷	0	5	2	1	0	0	0	0
		500	5	4	3	3	3	3	3
1	10 ⁸	0	5	1	1	1	1	1	1
		500	5	3(1)	3(1)	3(1)	3(1)	3(1)	3(1)
1	10 ⁹	0	5	3	3	3	2	2	1
		500	5	3	3	3	3	3	3
2	10 ⁶	0	5	2	1	0	0	0	0
		500	5	2	2	2	2	2	2
2	10 ⁷	0	5	1	1	1	0	0	0
		500	5	3	3	3	3	3	3
2	10 ⁸	0	5	1	1	1	1	1	1
		500	5	3	3	3	3	3	3
2	10 ⁹	0	5	3	2	2	2	1	1
		500	5	5	4(1)	4(1)	4(1)	4(1)	4(1)
3	10 ⁶	0	5	1	1	1	1	1	0
		500	5	3	3	2	2	2	2
3	10 ⁷	0	5	2	2	2	2	1	1
		500	5	3	3	3	3	3	3
3	10 ⁸	0	5	2	2	2	2	2	1
		500	5	4	4	4	4	4	4
3	10 ⁹	0	5	5	5	4	3	3	2
		500	5	4(1)	4(1)	3(2)	3(2)	3(2)	3(2)

数字は GAS 定着マウスの匹数, ()内は死亡マウス数を示す.

3 日連続感染させた翌日より咽頭スワブを行い, 咽頭への GAS 定着を判定した.

*カイ二乗 $P < 0.05$.

高値を保った ($P < 0.05$). 他の条件下では有意差が認められなかったことから, PRP 添加 GAS 咽頭定着マウスモデルとしては, 10⁹ cfu の B514Sm を 2 日連続して投与する条件が最適であった. 死亡マウスの心臓, 腎臓, 肺, 咽頭周囲組織, 脾臓と肝臓を磨碎して血液寒天培地上で培養したところ, 咽頭, 肺, 肝臓と脾臓より GAS が回収された. このことから, 咽頭に付着した GAS が組織から血中に侵入し, 敗血症による多臓器不全を生じてマウスを死亡させたことが示唆さ

れた。

10^9 cfu の GAS を 2 日連続投与するモデルにおいて、長期間の定着率の推移を観察した (図 9)。6 日目では PRP を添加したマウスのすべてに GAS が定着したが、PRP 非添加群では 10 匹中 3 匹にしか定着しなかった。また、PRP 添加群では、3 日目に 2 匹が、4 日目に 1 匹が死亡した。さらに 15 日目の PRP 添加群では 7 匹中 6 匹、30 日目に 7 匹中 3 匹そして 60 日目に 7 匹中 1 匹に GAS が定着していたが、90 日目には完全に排除された。一方、PRP 非添加群では、15 日目に 10 匹中 1 匹に GAS が定着していたものの、30 日以降では定着はなかった。以上より、PRP と GAS の混合投与は長期間の定着を促進した。

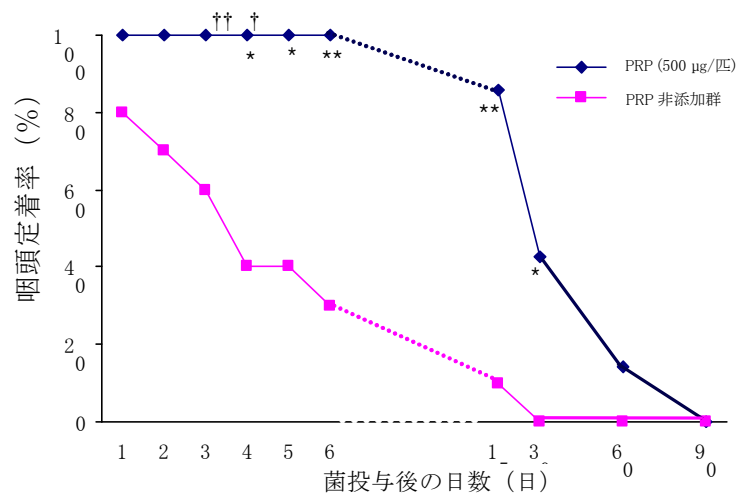


図 9 マウス咽頭定着率の推移. 10^9 cfu の B514Sm 株に PRP を添加したもの (◆: $n=10$) と添加しないもの (■: $n=10$) について、2 日連続で口腔内に投与した。翌日より咽頭スワブを培養し、生育コロニーから定着の有無を決定した。**カイ二乗 $P<0.01$, * $P<0.01$. †: 死亡。

3. GAS 凝集試験による PRP と菌体の相互作用

表 4 PRP 添加時の菌体凝集試験

菌株	M 型	凍結乾燥菌体					新鮮生菌体				
		PRP (μg/ml)					PRP (μg/ml)				
		0	8	40	200	1,000	0	8	40	200	1,000
Non-TSLS株											
JRS4	6	-	-	-	±	-	-	-	-	±	±
JRS145(M-)	6	-	-	±	+	±	±	±	±	+	±
SAM1(F-)	6	-	±	±	+	±	-	±	±	+	±
SAM2(M-F-)	6	-	-	±	±	-	-	±	±	+	±
NY-5	12	-	-	-	±	-	-	-	-	±	±
B514Sm	50	±	±	+	+	+	±	+	+	+	+
TSLS 株											
SSI-9	1	±	+	+	+	+	+	++	++	++	++
SSI-25	1	+	+	++	++	+	-	+	++	++	++
SSI-124	1	+	+	++	++	++	-	++	++	++	++
SSI-127	1	±	±	+	++	++	-	+	++	++	++
SSI-1	3	-	-	-	-	±	+	+	++	++	±
SSI-8	3	-	-	±	+	+	-	-	-	±	-
SSI-29	3	±	+	+	++	++	-	±	±	±	-
SSI-35	3	-	-	±	+	+	-	-	-	±	-
#30	12	-	+	+	++	++	±	++	++	++	±
#42	12	-	±	±	±	-	±	++	++	++	±
#43-1	12	±	+	+	±	-	-	±	±	±	±
#43-2	18	±	++	++	+	±	-	±	±	±	±
#50	18	-	±	+	+	++	-	+	+	++	+

$A_{600}=0.3$ の PBS 懸濁菌体（乾燥菌試料および生菌試料）を PRP と混和し、37℃で 8 時間後に凝集を観察して 4 段階に分類した。-:凝集なし, ±:凝集塊の直径 (ϕ) < 0.5 mm, +: 0.5 ≤ ϕ < 1 mm, ++: ϕ ≥ 1 mm.

PRP と菌体表層タンパクの相互作用を検討するため、GAS 19 株の凍結乾燥菌体と新鮮生菌体について PRP 添加による菌体凝集の変化を観察した（表 4）。その結果、すべての株で PRP の添加により、凝集が促進した。最も凝集が促進される PRP の濃度は菌株に依存しており、過剰な PRP の添加では凝集が認められない株も多数存在した。また、凝集の程度についても菌株に依存することが

示された。菌株を TSLS 由来株と TSLS 非由来株に分けて比較すると、TSLS 由来株のほうが自己凝集能に富み、さらに PRP による凝集促進も顕著であることが示された。また、M 型により凝集程度に差異が認められず、菌体表層の M タンパクが欠失している JRS145、F タンパクが欠失した SAM1 および M タンパクと F タンパク両方のタンパクが欠失した SAM2 のいずれにおいても、PRP による菌体凝集の促進を認めた。このことから、GAS 菌体の表層には M タンパクや F タンパク以外に PRP と結合する分子の存在することが強く示唆され、次に菌体表層に存在する PRP 結合タンパクの検索を行うこととした。

4. GAS 菌体表層の PRP 結合タンパク

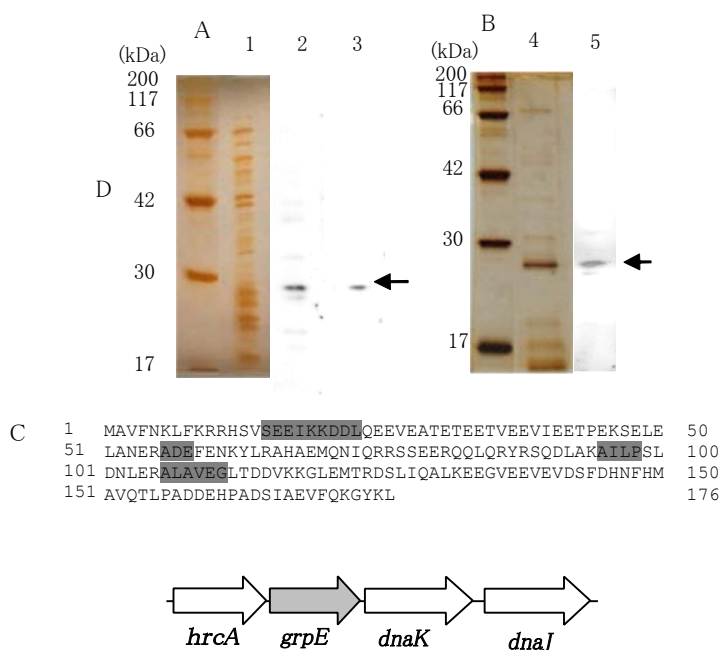


図 10 SSI-9 株 8 M 尿素抽出物中の PRP 結合タンパクの同定
A 8 M 尿素抽出物とビオチン標識 PRP との反応。レーン 1：SSI-9 8 M 尿素抽出物の銀染色像，レーン 2：ビオチン標識酸性 PRP との反応，レーン 3：ビオチン標識塩基性 PRP の反応。
B 陰イオン交換カラムとアパタイトカラムを使用して精製した PRP 結合タンパク。レーン 4：精製 PRP 結合タンパクの銀染色像，レーン 5：精製 PRP 結合タンパクとビオチン標識 PRP との反応。矢印：PRP 結合タンパク。
C PRP 結合タンパク (GrpE) オープンリーディングフレームのアミノ酸配列。アミノ酸配列は SF370 株 ゲノムデータベースから予測した。アミノ酸は一文字表記。網掛け部位は、アミノ酸シークエンスで得られた配列。
D GAS 全ゲノム配列より予測した DnaK オペロン。灰色部分が GrpE 遺伝子 (*grpE*)。

GAS SSI-9 株の 8 M 尿素抽出画分をビオチン標識 PRP と反応させたところ、酸性 PRP と塩基性 PRP の両者が約 28 kDa のタンパクと結合した (図 10A)。この PRP 結合タンパクを陰イオン交換カラムとアパタイトカラムを用いて精製した (図 10B)。精製した PRP 結合タンパクを N 末端アミノ酸シーケンスおよび、トリプシン消化によるアミノ酸内部シーケンスに供試したところ、4 つのアミノ酸配列を得た (図 10C)。得られた配列をオクラホマ大学 SF370 株全ゲノムデータベースと照合し、これらのアミノ酸配列を含有する ORF を検索した。その結果、各アミノ酸配列はシャペロンタンパク GrpE と呼ばれるタンパクの ORF に一致した。このことから、約 28 kDa の PRP 結合タンパクは、GrpE であることが明らかとなった。(図 10C)。データベース配列によると、GrpE をコードする遺伝子 *grpE* は DnaK オペロンと呼ばれる遺伝子群に存在し、GrpE の上流に転写抑制遺伝子である HrcA、下流に熱ショックタンパクである DnaK と DnaJ が存在していた。このことから、GAS の GrpE も DnaK オペロンに存在するシャペロンタンパクであることが判明した (図 10D)。M 型の異なる GAS について *grpE* 遺伝子の存在をサザンブロットィングで検索した結果、調査した 15 株すべてに *grpE* 遺伝子は存在した。このことから、*grpE* 遺伝子は GAS において普遍的に存在することが示された。

GAS SSI-9 の *grpE* 遺伝子の前後の DNA 配列を決定したところ (図 11)、*grpE* 遺伝子は GTG を開始コドン、TAA を終止コドンとする 534 bp の ORF であることが明らかとなった。また、SSI-9 の *grpE* 遺伝子配列と全ゲノムデータベースに登録されている *grpE* 遺伝子配列は完全に一致した。Jayaramann らが *S. mutans* について報告している *grpE* 遺伝子の転写制御予測に関する研究 (32) をもとに SSI-9 のプロモーター配列、リボゾーム結合部位である Shine-Dalgarno (SD) 配列を検索したところ、HrcA のプロモーターと開始コドンの間に、Conserved Inverted Repeat controlling Chaperone Expression (CIRCE) 要素である stem loop が存在した。このことから、GAS の GrpE は *S. mutans* と同様、CIRCE により調節されていることが明らかとなった。一方、HrcA 内には、GrpE の転写に関わるもうひとつのプロモーターおよび SD 配列が存在し、GrpE は

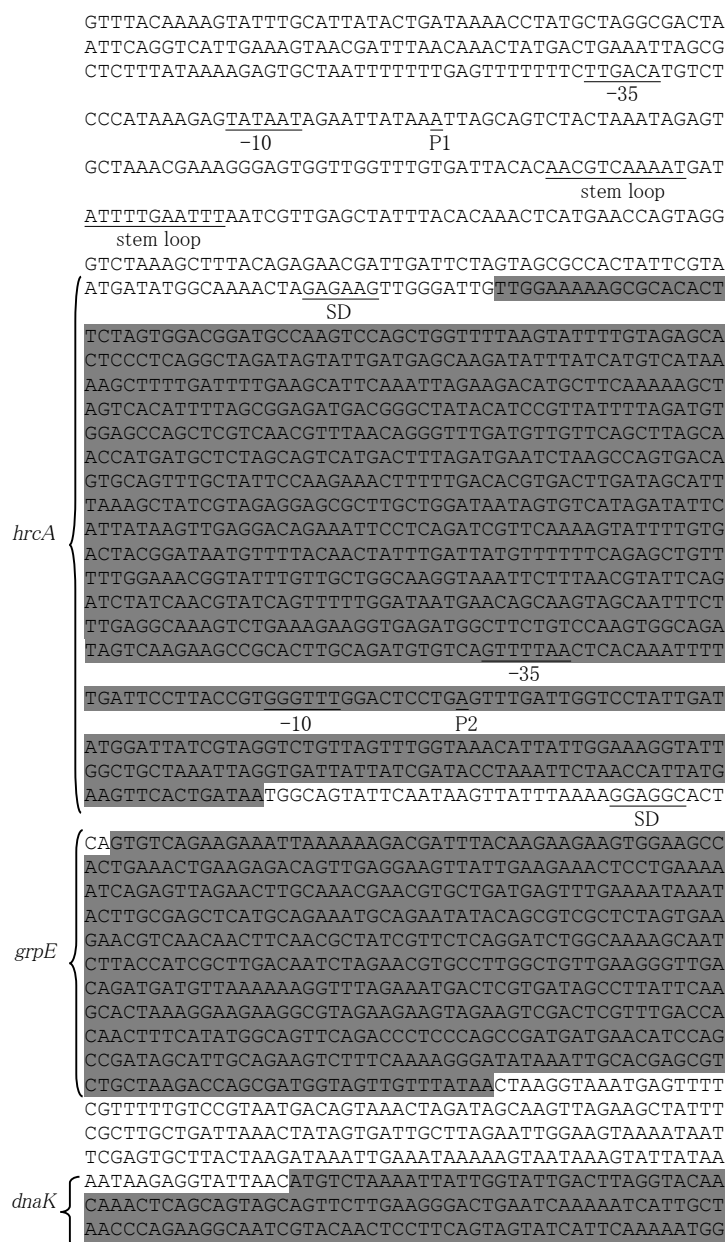


図 11 GAS SSI-9 株 *grpE* 遺伝子および、その上下流の DNA 配列と転写関連遺伝子. 背景黒塗りの部分はオープンリーディングフレームを表す. *S. mutans* の報告 (32) をもとに転写関連遺伝子を予測した. -35: プロモーター -35 配列; -10: プロモーター -10 配列; P1 および P2: 転写開始部位; SD: Shine-Dalgarno 配列; stem loop: CIRCE (conserved inverted repeat controlling chaperone expression) 要素の逆方向反復配列.

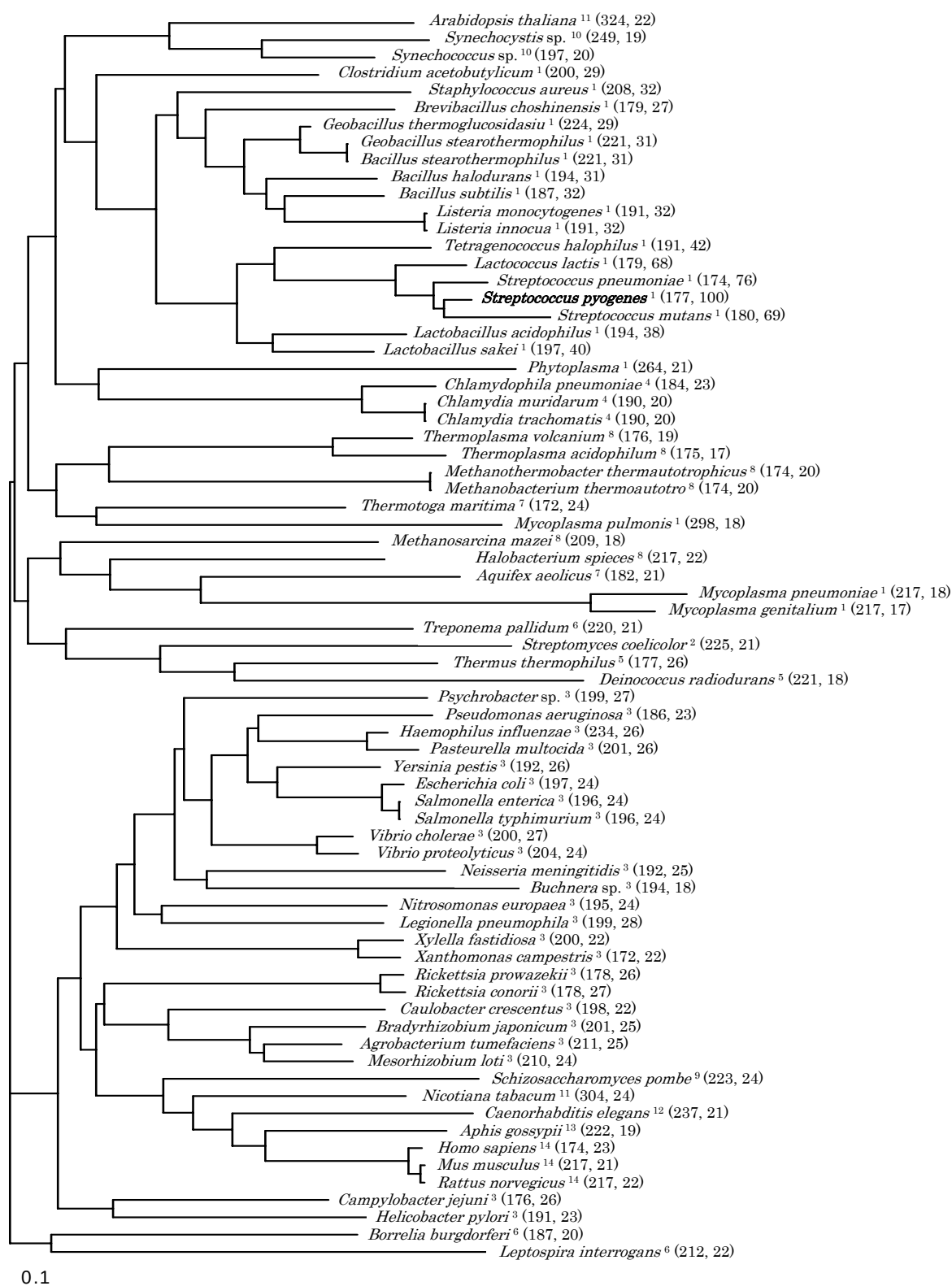


図 12 各種の GrpE アミノ酸配列に基づく系統樹。バーの長さは 0.1 substitutions/site を表す。() 内は、左がアミノ酸残基数で右が *S. pyogenes* SSI-9 株の GrpE を基準にしたアミノ酸一致率を示す。右肩の数字は 1: グラム陽性低 GC 含量細菌, 2: グラム陽性高 GC 含量細菌, 3: プロテオバクテリア綱, 4: クラミジア, 5: デイノコッカス類, 6: スピロヘータ類, 7: その他の細菌, 8: 古細菌, 9: 真菌, 10: 藻類, 11: 植物, 12: 線虫, 13: 昆虫, 14: 哺乳類であり, 分類は生物分類表に基づく。

HrcA 以外にも他のプロモーターにより転写制御されることが示唆された。

GAS を含む計 76 種の生物種について, GrpE アミノ酸配列をもとに, 系統樹を作成した (図 12). その結果, アミノ酸残基数は GAS では 177 であるのに対し, 最も小さいもので 172 (*Thermotoga maritima*, *Xanthomonas campestris*), 最も大きいのは 324 (*Arabidopsis thaliana*) であった. GAS の GrpE アミノ酸配列と最も類似するのは, 同じレンサ球菌である *Streptococcus pneumoniae* の GrpE であり, アミノ酸一致率は 76% であった. ついで *S. mutans* では 69%, *Lactococcus lactis* では 68% であった. このことからレンサ球菌同士, あるいは低グラム陽性 GC 含量細菌に属する *Lactococcus* と GAS の間では, アミノ酸一次構造が高度に一致することが示された. また, アミノ酸一致率が 30% を超えるのは, 低グラム陽性 GC 含量細菌のみであり, 他に分類される細菌や古細菌, 真菌, 藻類, 植物, 線虫, 昆虫または哺乳類などの GrpE では, GAS GrpE とのアミノ酸一致率が 30% 以下であった.

調べた 76 種中では C 末端側に存在する G₁₆₀ と V₁₇₃ が全種に共通するアミノ酸であり (図 13), ほかに L₈₄, S₁₃₀, F₁₃₁, P₁₇₀, A₁₇₁, V₁₇₅ が高度に保存されることが示された. これら 76 種あるいは GAS, 大腸菌およびヒトの GrpE における共通アミノ酸は, 大腸菌における 23 残基の DnaK 結合部位 (33) とはあまり一致しなかったものの, GrpE の C 末端領域には多くの共通領域が認められた.

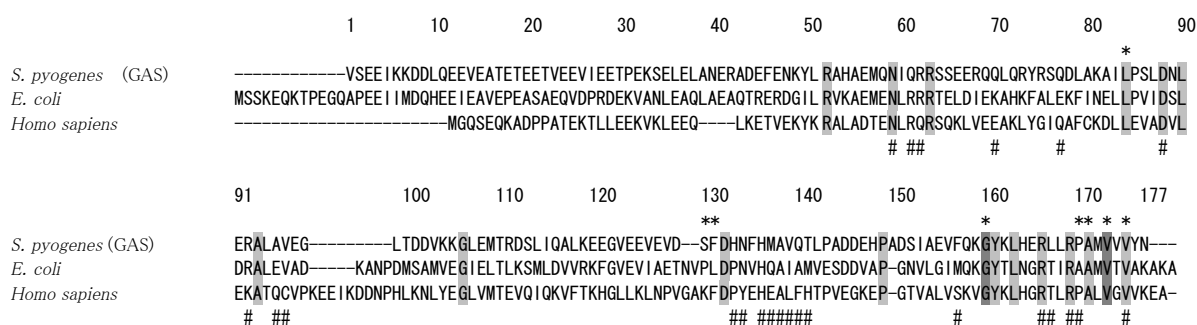


図 13 GrpE タンパクの種によるアミノ酸配列の差異. GAS, 大腸菌およびヒトの GrpE アミノ酸一次構造の比較. 黒塗り: 73 種で完全に一致したアミノ酸残基, 灰色: 3 菌種で一致したアミノ酸残基, *: 73 種で高度に保存されている配列, #: 大腸菌における DnaK 結合部位.

5. GrpE の菌体表層発現

シャペロンタンパクである GrpE が唾液タンパク PRP と結合することから, GrpE が菌体の表層に発現している可能性が示された. そこで, GrpE に特異的に反応する抗体を作製し, 免疫染色した菌体を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した.

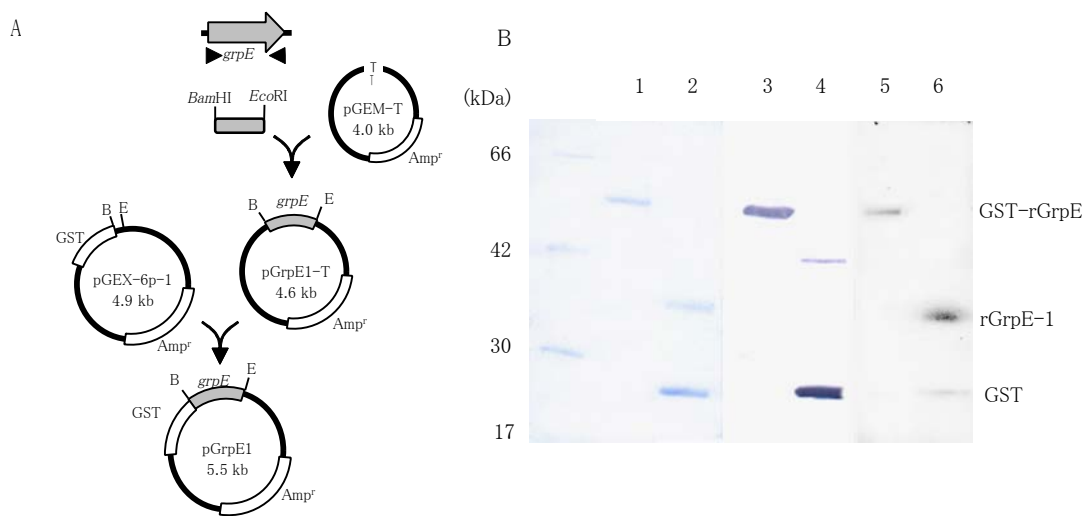


図 14 組換え GrpE タンパク (rGrpE-1) とウサギ抗 rGrpE 抗体の作成

A rGrpE-1 発現用ベクターの構築図.

B rGrpE-1 の確認. レーン 1, 2: SDS-PAGE 像, レーン 3, 4: ウサギ抗 GST 抗体とアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体によるウェスタンブロッティング, レーン 5, 6: ビオチン標識 PRP によるウェスタンブロッティング, レーン 1, 3, 5: GST 融合 rGrpE-1, レーン 2, 4, 6: PreScission Protease による GST 切断後.

抗 GrpE 抗体を作成するにあたり, 組換え GrpE タンパク (rGrpE-1) を作製した. すなわち *grpE* 遺伝子全長を pGEX-6P-1 ベクターに組み込み, IPTG による誘導で大腸菌において GST と融合した rGrpE-1 (GST-rGrpE-1) を発現させた (図 14A, 図 14B レーン 1, 3, 5). GST-rGrpE-1 をプロテアーゼで切断し, 約 35 kDa の rGrpE-1 と約 28 kDa の GST に分離した (図 14B レーン 2). GST-rGrpE-1 および切断後の GST 単体には抗 GST 抗体が反応した (図 14B レーン 3, 4) が,

切断後の rGrpE-1 は抗 GST 抗体と反応せず、GST 成分は除去されていることが示された (図 14B レーン 4). また、切断時に使用した約 40 kDa のプロテアーゼタンパクも抗 GST 抗体と反応した (図 14B レーン 4). GST-rGrpE-1 および切断後の rGrpE-1 と GST はそれぞれ、ビオチン標識した PRP と結合した (図 14B レーン 5, 6). このことから、精製した rGrpE-1 が PRP と結合することが示され、さらに GST にも PRP との結合能があることが示された (図 14 レーン 6).

rGrpE-1 をウサギ皮下に免疫し、ウサギ抗 rGrpE 抗体を得た. 抗 rGrpE 抗

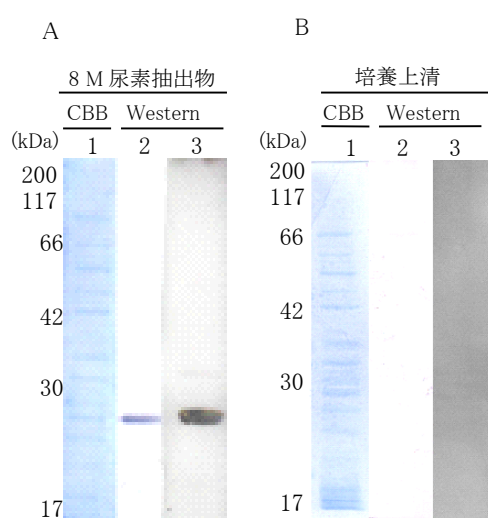


図 15 ウサギ抗 rGrpE 抗体の結合活性

A SSI-9 株 8 M 尿素抽出物と抗 rGrpE 抗体の結合.

B SSI-9 株培養上清との抗 rGrpE 抗体の結合.

レーン 1: SDS-PAGE 像, レーン 2: ウサギ抗 GrpE 抗体 (1:1000) とアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体によるウェスタンブロット. レーン 3: ビオチン標識 PRP によるウェスタンブロット.

体は 1,000 倍希釈で GAS SSI-9 株の 8 M 尿素抽出物 (図 15A レーン 1) に 28 kDa 相当部位で反応し (図 15A レーン 2), このタンパクは、ビオチン標識した PRP と同じ分子量であることが確認された (図 15A レーン 3). 一方で、培養上清には抗 rGrpE 抗体と反応するタンパクは検出されなかった (図 15B).

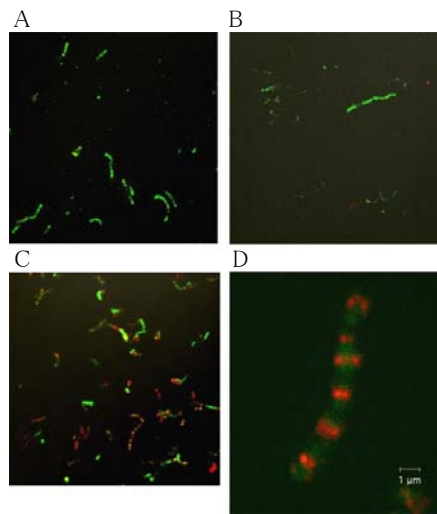


図 16 GrpE の菌体表層発現

赤: GrpE, 緑: SSI-9 菌体. 菌体は Sybr Green II を用いて緑色に染色した.

A AlexaFluor568 標識抗体 (二次抗体) のみで染色.

B 非免疫ウサギ血清と AlexaFluor568 標識抗体で染色.

C ヒト IgG1 (50 μ g/ml) をブロッキング時に添加し, ウサギ抗 rGrpE 抗体と AlexaFluor568 標識抗ウサギ IgG 抗体で染色.

D 拡大図. 菌の分裂部に GrpE の発現を認める.

抗 rGrpE 抗体を一次抗体, AlexaFluor568 を二次抗体として免疫染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ, 二次抗体のみ (図 16A), あるいは抗 rGrpE 抗体を含まないウサギ血清と二次抗体 (図 16B) では, 染色されなかった. 免疫グロブリン結合タンパクの影響を除くため, ヒト IgG1 50 μ g/ml を含有したブロッキング剤を用いて染色した場合 (図 16C), 抗 rGrpE 抗体と二次抗体を反応させると菌体表層の GrpE が染色されたことから, GrpE の菌体表層発現が明らかとなった. また, GrpE の発現部位は, 菌体の分裂部位に局在している様子が観察された (図 16D).

さらに, GrpE の菌体表層への発現部位を明らかにするため抗 rGrpE 抗体と金コロイド標識抗体を用いて処理した菌体を, 免疫電子顕微鏡下で観察した (図 17A, B). その結果, GrpE 発現部位は, 菌体の分裂割面部位に沿って輪状を呈することが示された (図 17B).

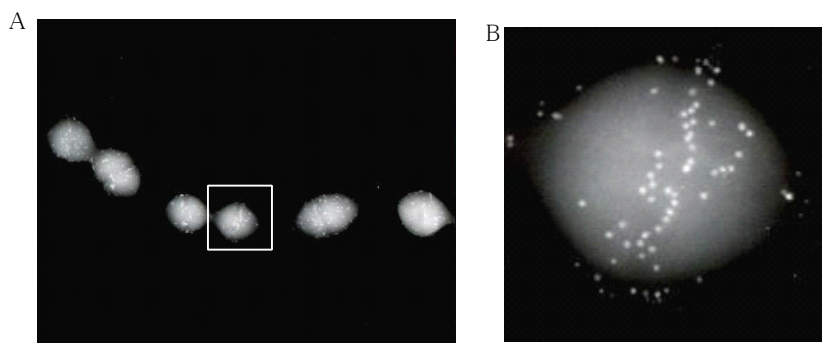


図 17 GrpE の免疫電子顕微鏡像. ウサギ抗 rGrpE 抗体と金コロイド標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた染色. A ; 弱拡大 B ; 四角に含まれた部分の拡大図.

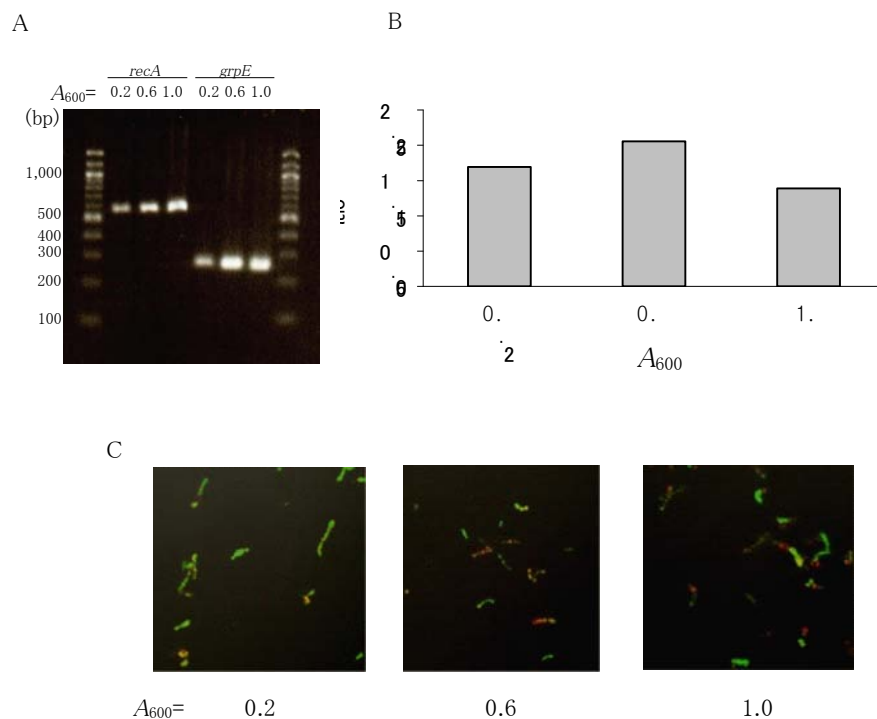


図 18 菌の増殖期による GrpE 発現量の差異

A 増殖初期 ($A_{600}=0.2$), 中期 ($A_{600}=0.6$) および終期 ($A_{600}=1.0$) の GAS *grpE* 遺伝子および *recA* 遺伝子の RT-PCR.

B 濃度を数値化し, *grpE* 濃度/*recA* 濃度を ratio とした.

C 共焦点レーザー顕微鏡像. 緑は GAS, 赤は GrpE を表す.

GAS の増殖期による GrpE 発現の変化を観察するため、増殖初期 ($A_{600}=0.2$)、中期 ($A_{600}=0.6$) および終期 ($A_{600}=1.0$) の GAS について、*grpE* 遺伝子の RT-PCR を行い (図 18A, B), *recA* 遺伝子の発現量に対する *grpE* 遺伝子の発現量の割合を算定した (図 18B). その結果、いずれの増殖期の GAS においても *grpE* 遺伝子の mRNA への転写量には差が認められず、転写レベルでは増殖期による変化はないことが示された. また、免疫染色した場合においても、各増殖期による明らかな差異は認められなかった (図 18C).

6. GrpE と PRP の結合部位

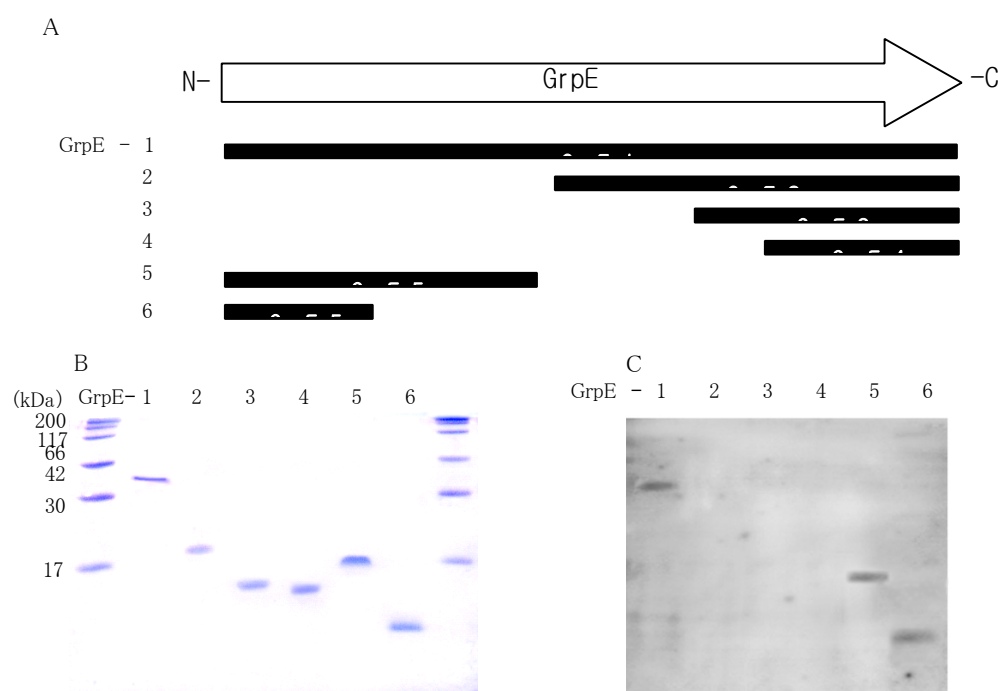


図 19 組換え GrpE フラグメントの PRP 結合能
A 作製したフラグメントタンパク模式図.
B 各フラグメントタンパクの SDS-PAGE 像.
C 各フラグメントタンパクのビオチン標識 PRP との結合.

pGEX-6P-1 ベクターを使用して、全長 rGrpE-1 のほかに、C 末端側 3 種類 (rGrpE-2, rGrpE-3, rGrpE-4) と N 末端側 2 種類 (rGrpE-5, rGrpE-6) の断片組換え GrpE タンパクを作製した (図 19A, B). それぞれの組換え GrpE タンパクとビオチン標識した PRP の結合を調べたところ、rGrpE-1, rGrpE-5 および rGrpE-6 は結合したが、3 種類の C 末端側組換えタンパク断片は PRP との結合を示さなかった (図 19C). このことより、GrpE の N 末端側約 7 kDa のペプチド領域が PRP との結合部位であることが示された。

7. GrpE の欠失株による形態変化と細胞付着・侵入能変化

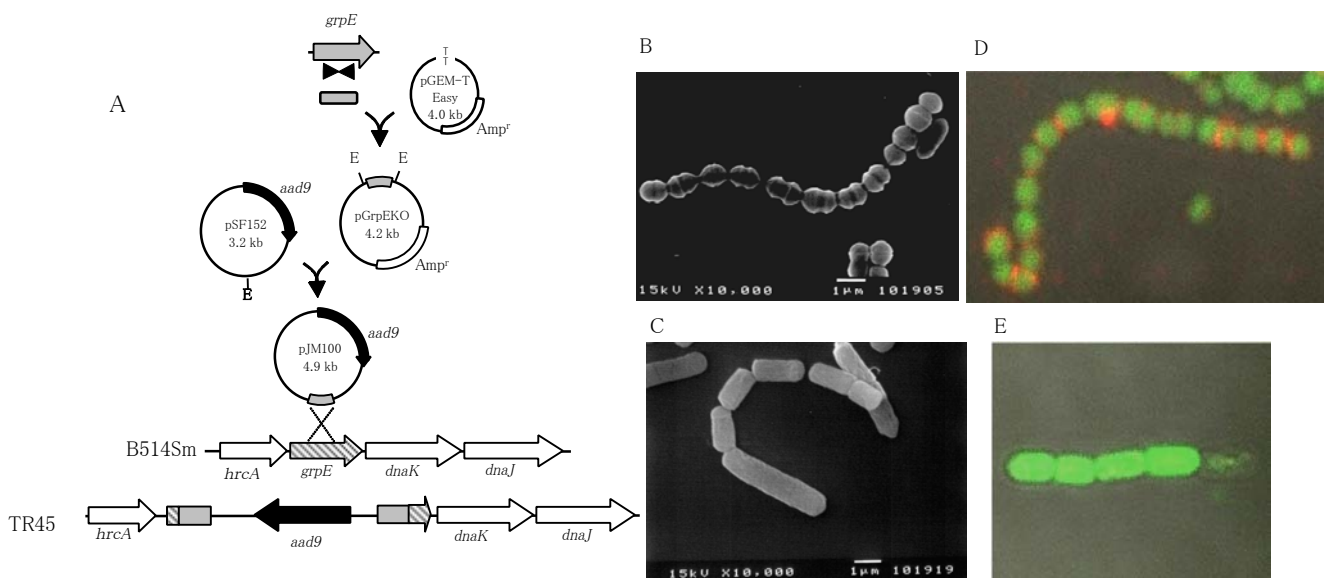


図 20 GrpE 欠失株の作成とその形態変化

A pJM100 を B514Sm 株にエレクトロポレーションで導入し、TR45 株を得た。

B B514Sm 株の走査型電子顕微鏡像。

C TR45 株の走査型電子顕微鏡像。

D B514Sm 株の共焦点レーザー顕微鏡像。抗 GrpE 抗体と AlexaFluor568 標識抗体および SybrGreen II にて染色。

E TR45 株の共焦点レーザー顕微鏡像。抗 GrpE 抗体と AlexaFluor568 標識抗体および SybrGreen II にて染色。

pSF152 に *grpE* 遺伝子の一部を組み込み (図 20A), B514Sm に導入して GrpE 欠失株 TR45 を作成した。SEM 観察の結果、B514Sm 株に比し (図 20B), TR45 株は連鎖を維持しつつ菌体の長径が伸長することが明らかとなった (図

20C). B514Sm 株では SSI-9 株 (図 16) よりも抗 rGrpE 抗体の反応量が少なかったものの, 菌体表層に GrpE タンパクが発現していることが示された (図 20D). 一方, TR45 株では抗 GrpE 抗体が反応せず, GrpE の欠失が確認された (図 20E).

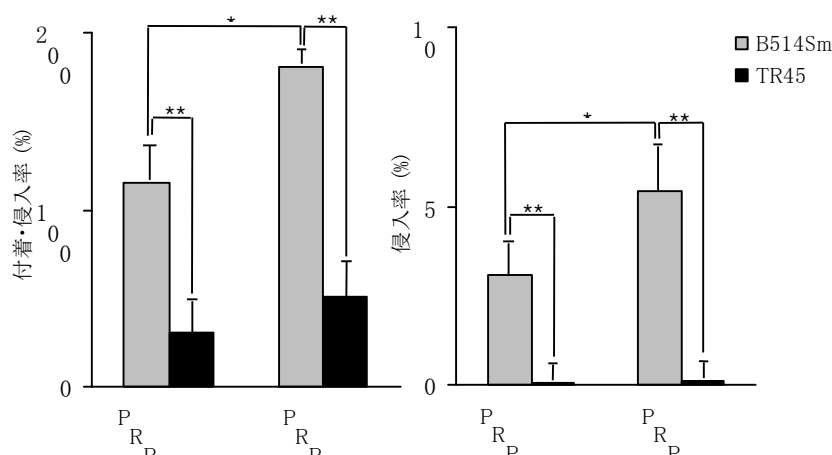


図 21 GrpE 欠失による付着, 侵入の変化. 親株である B514Sm 株 と GrpE 欠失株である TR45 株の HEP-2 細胞に対する付着・侵入試験を行った. PRP 添加群には 0.5 mg/ml の PRP を添加した. *Scheffe's $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

TR45 株の付着・侵入率を B514Sm 株と比較したところ, TR45 では B514Sm に比べて有意に減少した ($P < 0.01$) (図 21). また, 侵入率に関しても B514 に比して有意に減少した ($P < 0.01$). PRP を添加 (0.5 mg/ml) した場合には, B514Sm では付着・侵入率, 侵入率とも有意な促進を示した ($P < 0.05$) もの, TR45 においては付着・侵入率と侵入率について有意差は認められなかった. また, レンサ球菌同定キットを用いて生化学的な反応を調べた結果, TR45 では B514Sm に比べ, ラクトース分解能が上昇し, アルギニンの加水分解能が減少した.

以上のことから, GrpE を欠失させた GAS においては, 菌の形態変化が生じるとともに付着・侵入率が低下し, 一部生化学的性状の変化することが示された.

考察

GAS の咽頭粘膜面への付着における唾液成分の影響については、これまでに報告がない。本研究により筆者は、全唾液成分とその精製画分 PRP およびムチンが GAS の培養咽頭細胞への付着を促進することを初めて示した。GAS の HEP-2 細胞への付着・侵入率の最も顕著な促進を示した全唾液成分の濃度は 5 mg/ml であった。ヒトの全唾液成分濃度は 0.15~7.45 mg/ml とばらつきが認められるものの、その平均は約 2.3 mg/ml と報告されており (34), *in vivo* においても唾液は GAS の初期感染に大きな役割を果たしていると推測される。しかし、口腔内細菌との特異的結合能を有する唾液成分としては、スタセリンやアミラーゼなどが知られているが、両者は HEP-2 細胞への GAS 付着において影響を及ぼさなかった (図 3, 4)。

ヒトにおいて 2 種類あるムチンのうち MG1 の口腔内濃度は 48~70 $\mu\text{g/ml}$ (35), MG2 が 100~250 $\mu\text{g/ml}$ (36, 37) とされており, 合計のムチン濃度は 約 150~320 $\mu\text{g/ml}$ となる。ムチンは 1 mg/ml において最大の付着・侵入率を示し, 口腔内よりも高い濃度において GAS 付着が促進されることが示された。またムチン添加時には, 侵入率の増加はあまり観察されなかった。その理由としては, GAS がムチンと結合する場合, その相手は構成成分の 7 割以上を占める糖分子であることから (27, 36), 糖分子により菌体表層の侵入因子が被覆されるためであることが推測され, このために侵入できなかった GAS が菌体凝集および排泄作用により排除されるのではないかと考えられる。

全唾液中の酸性 PRP 濃度は 288~521 $\mu\text{g/ml}$ (38) であり, PRP は 500 $\mu\text{g/ml}$ で GAS 付着・侵入率をもっとも促進したことから, 口腔内濃度において GAS の上皮細胞付着を顕著に促進することが示された。一方, PRP 添加により, 顕微鏡下では HEP-2 細胞への GAS 付着菌数に対する侵入菌数の割合に変化は認められなかったが, 培養法では付着・侵入菌数に占める侵入菌数の割合が上昇する

ことが観察された。このことは、抗生物質による 1 時間処理後でもなお、被験 GAS が HEp-2 細胞表層において生存し続けている可能性を示している。GAS は血中で凝集により食作用などの宿主防御機構から逃れる (39) ことから、PRP やムチンによる菌体凝集は、抗生物質の効力を減じ、あるいは PRP やムチンの糖鎖やタンパクとの結合被覆により抗生物質の菌体への作用を阻害するなどの可能性が考えられる。また、凝集により宿主細胞への GAS の付着および侵入菌数が増加する (39) との報告や、TSLS 株では非 TSLS 株と比較して菌体の自己凝集および PRP による凝集促進が顕著であった (表 4) ことから、凝集による付着および侵入 GAS 数の増加が TSLS 発症要因となる可能性が示唆された。

PRP と口腔細菌の相互作用解析には、ハイドロキシアパタイト (HA) ビーズに PRP を吸着させて口腔細菌との付着を観察する手法がよく用いられている。*P. gingivalis* については、HA ビーズに吸着させた PRP とスタセリンとは結合するものの、溶液状態の PRP やスタセリンは結合能を発揮しないことが知られている (40)。これは、溶液状態では PRP の細菌とのレセプターが PRP タンパク質分子の内側に存在しており、エナメル質や口腔粘膜などに吸着した際に起こる PRP の立体構造の変化により、同タンパクの C 末端側のレセプターを外側に露出させて菌と結合するためである (41)。これらのことから、大部分の口腔細菌は HA に吸着させた PRP にのみ結合できるのではないかと推測されてきた。しかしながら口腔細菌の *A. viscosus* の 1 型線毛は可溶型 PRP と結合することが報告されていることから (42)、PRP の菌への付着様式も一様ではないといえる。本研究においては、溶液中の PRP により GAS の付着が促進したこと、さらにビオチン標識 PRP と GrpE が結合したことから、可溶型 PRP と GAS 菌体の結合が生じていると考えられる。これにより、GAS と PRP の結合は HA ビーズに吸着させた PRP への口腔細菌の結合とは異なるメカニズムであると考えられた。しかしながら一方で、抗 PRP-C 抗体により付着の亢進が阻害されており、GAS の分裂割面部位の GrpE と結合する場合に PRP の C 末端疎水部位が外側に露出していることによるのかもしれない。

本研究では PRP と結合する GAS 分子として GrpE が同定されたが、唾液成分そのものによる刺激で、GAS 付着や促進に関わる菌体表層分子の発現が促進されることも推測される。例えば、唾液中で *S. gordonii* DL1 株の糖タンパク結合タンパクである SspA と SspB、および *L. lactis* のシャペロンタンパク ClpE に相同性のあるタンパクの発現が増加することが報告されている (43)。SspA および SspB については M1 型 GAS の全ゲノム中には相同性のある ORF はないが、*L. lactis* の ClpE は GAS の ClpE と 77% のアミノ酸相同性を保有している。他にも、*S. sanguinis* の唾液結合タンパク SsaB (44) は、GAS のリポタンパク MtsA に 77% のアミノ酸相同性を保有している。これらのことより、唾液中に浸された GAS においては、さまざまなタンパク発現に変化が生じている可能性がある。特に、ClpE は Clp-ATPase ファミリーに属するシャペロンタンパクであり (45)、このファミリーに属するタンパクはグラム陽性菌で高度に保存されている (46)。また、大腸菌では Clp 系シャペロンと DnaK/DnaJ/GrpE シャペロンが協同することが報告されている (47)。

これまでの結果から、GAS は PRP を介して細胞と結合すると考えられるが、細胞側の PRP 結合因子については明らかではない。細胞表層の PRP と直接結合する因子を同定することが今後の課題であり、同定されれば PRP と結合するタンパクや、既知の GAS と結合する因子を宿主細胞表層で阻害することで、咽頭炎の発症を予防することも可能になるのではないかと考えられる。

GrpE タンパクは、1977 年に *E. coli* K12 株におけるラムダファージの DNA 複製開始に関係するタンパクとして発見された (48)。すなわち、ラムダファージの複製開始因子である P 遺伝子の変異株 (GroP-mutant, 49) と類似した表現形を示す変異株のひとつにおける欠失タンパクが、この GrpE であった。後に GrpE は、DnaK や DnaJ と複合体を形成し、P タンパクの発現を促し (50)、ATPase 活性を促進することが明らかとなった (51)。また、大腸菌 GrpE はファージ由来の遺伝子ではなく、菌体に本来存在するタンパクであり (49)、GAS の全ゲノム配列をもとにした解析によっても GrpE はファージ由来ではないことが示されて

いる (52). 本研究では, GAS の GrpE はラットのそれとは 22%, ヒトとは 23% のアミノ酸配列の相同性を有したものの, これは酵母とラットの GrpE 間の相同性 (30%) (53) をも下回るものであった. 最近, ヒトと大腸菌の GrpE は相同性が 30% 未満であるものの, 3 次元的解析によってヒト GrpE の C 末端側にある DnaK 結合領域および ATPase 結合領域が高度に保存されていることが明らかにされ (54), また同時に, N 末端側の α ヘリックス構造は大腸菌よりもヒトのほうが短くなることが示された. このことから GrpE の C 末端側の立体構造は普遍的に保存されていると考えられ, GAS GrpE も大腸菌 GrpE と C 末端側で類似し, N 末端側で変異していることが示唆された. 実際に GAS, 大腸菌およびヒトの GrpE アミノ酸一次構造を比較したところ (図 13), 大腸菌で報告されている DnaK 結合部位 (55) では一致する部位が少なかったものの, C 末端部分に共通配列領域が多くみられた. このことから, DnaK 結合領域の構造は GAS と他種で類似した構造を示すことが示唆された (図 21). また, G₁₆₀ と V₁₇₃ といった全種に共通するアミノ酸や他の高度に保存されたアミノ酸が核となり, 3 次元構造を保存している可能性も考えられた. 本研究において GAS GrpE の N 末端側に PRP が結合することが明らかとなり, N 末端側が立体構造における変異領域であることを考えると, GrpE の N 末端側をターゲットとした薬剤の開発が, GAS と PRP の付着の特異的な阻害や GAS 特異的な排除を可能にするのではないかと考えられる.

GAS では *S. mutans* と同様に CIRCE の存在が明らかとなり, ストレスに対して Class I 応答していることが示唆されている. グラム陽性菌の熱ショックタンパクは, その発現制御遺伝子により 4 つの Class に分類される (46, 56). Class I 遺伝子は, GroEL や DnaK であり, CIRCE レギュロンに依存し, HrcA により負に制御されている (56, 57). Class II 遺伝子は, 代替のシグマ因子である σ^B により制御され, Class III 遺伝子は, CtsR によってネガティブに制御される (46). 唾液の刺激により発現が増加した ClpE は, この Class III 遺伝子に分類される. そして Class IV はその他の制御系である. 大腸菌には HrcA や CIRCE が存在せず, GrpE と DnaK のリンクがない (58). グラム陽性菌では, GrpE は HrcA タン

パクによって負に制御される Class I 型タンパクであり、HrcA は自律性の σ^A 型プロモーターの近位に CIRCE を保持して熱ショックタンパクの活性化を調節している (59). したがって、GAS の GrpE 発現に関しては、*S. mutans* と同様の制御機構が存在することが推測される. GrpE 発現は成長期による変化は認められなかったが、*S. mutans* では pH 変化や温度により GrpE の発現が変化することも知られており (32), GAS においても、さまざまなショック刺激に対する GrpE の反応を解析する必要がある.

GrpE は GAS の菌体表層に発現することが示されたが、シャペロンタンパクの菌体外への発現についてはこれまで明らかではなかった. GrpE は DnaK と複合体を形成することから、GrpE は DnaK と同様の局在を示すと考えられた. DnaK 自身は細胞分裂 (60) などに関与するタンパクであるが、細菌の溶解産物に認められる可溶性の細胞質性タンパクであることが知られている (61, 62). また、DnaK は金コロイド標識免疫染色により細胞膜への結合の可能性が指摘されており (63), ミニ細胞の細胞膜に多く存在し (64, 65), 浸透圧ショックにより細胞外に放出されることなどから (66, 67), Bayer らが示した細胞膜の内外の結合部位に局在しているのではないかと考えられている (68, 69). 本研究において GrpE は培養上清中では検出できなかったものの、DnaK は培養上清に存在することが報告されたことから (70), DnaK も GrpE と同様に細胞表層に発現している可能性が示唆された. GrpE が DnaK とともに DNA の複製開始タンパクのホールディングなど DNA 複製にかかわるということ、細胞分裂部位は細胞壁の分解酵素などが発現して非常に生合成や生分解が活発な箇所であることなどから、細胞分裂界面は細胞質内タンパクが菌体表層へ露出しやすい部位ではないかと考えられる. 分裂界面に局在するタンパクの報告は GAS では他に報告されていないものの、*E. coli* では FtsZ タンパクが細胞分裂の始まる前には細胞質内に存在し、DNA の分裂が始まった時に分裂界面付近の菌体周囲に輪状に集合することが知られている (71). 大腸菌 (72) や *S. pneumoniae* (73) などには、FtsZ を含む細胞分裂に関係する 10 以上の ORF からなるオペロンが存在する. GAS では同オペロンの報告はないが、GAS 全ゲノム配列からは、同様のオペロンとみら

れる配列が存在する．大腸菌 FtsZ の輪状分布の機能については不明であるが，菌細胞の分裂界面付近に集合しているように見えるのは FtsZ が細胞壁の合成に関与しているためと考えられている．同タンパクの輪状分布には，DnaK と同じ HSP70 ファミリーに属する新規のシャペロンタンパク HscA (73) あるいは DnaK そのものが関係する (74)．HscA は DnaK の機能を代替するが，現在のところグラム陰性菌でのみ知られ，GrpE との結合は DnaK と GrpE との結合ほど強くはない (75)．GAS では HscA のアミノ酸と一致する ORF は発見できなかった．このため，DnaK が HscA の機能を併合していると考えられるものの，類似の機能を持つ ORF の存在は否定できないため，さらなる検索が必要である．そして，GAS においても FtsZ の輸送に関係して，DnaK や GrpE などのシャペロンタンパクが菌体周囲に輪状分布する可能性は十分に考えられる．一方，GrpE は哺乳動物細胞においてはミトコンドリア内にしか存在せず，細胞表層への発現の報告もないことから，GrpE をターゲットとした GAS あるいは細菌に特異的な薬剤のターゲットとしての可能性も残っている．

GrpE 欠失株ではその形態に大きな変化が生じた．レンサ球菌の形態変化は，*S. mutans* の 60 kDa 糖タンパク IDG-60 の欠失株 (76) や，*Streptococcus agalactiae* のムレイン加水分解酵素欠失株 (77) において，隔壁が多数発現し不定形になることが報告されている．他にも，Cibacron blue という染色液を培地に加えると *Staphylococcus* や *Micrococcus* で細胞分裂が阻害され，*Bacillus* や *Lactobacillus* では，フィラメント様に細胞が拡大することが知られている (78)．今回，GrpE 欠失株である TR45 株の SEM 像観察では，隔壁数の増加や菌体形態が不整形になるというような像はなく，連鎖を維持したまま菌体長径のみが伸長してあたかも長桿菌様の形態を示した．また，大腸菌のシャペロンタンパク HscA を欠失させた株では，長径がより伸長することが知られており (73)，本研究における GrpE 欠失株の形態変化により近いと考えられた．一方，例えば *Bacillus subtilis* の HrcA 変異株は，あるタンパクを過剰に発現し，封入体を形成する (79) ことなどからも分かるように，シャペロンタンパクは細胞質内でタンパクの凝集を防いだり，タンパク凝集体を溶解するはたらきをもつことが知ら

れている (80). このことから, GrpE 欠失株においては細胞内にホールディング障害をきたしたタンパクが重積し, 細胞形態の変化を惹起する可能性も考えられた. また, シャペロンタンパクはタンパク輸送も行うことから, GrpE 欠失株においては細胞内でのタンパク輸送に混乱が生じ, 菌体表層タンパクの発現を変化させた可能性がある. また, ラクトース分解能やアルギニン加水分解能の変化から, 菌体表層タンパクの一部に変化が生じていることが推測できる. GrpE 欠失株において付着率と侵入率の低下が観察されたのは, 菌体表層に発現する付着関連タンパクが変化したことや, 菌体の巨大化により宿主細胞への付着能や細胞側の取り込み能力が限界に達したことなどが考えられる.

本研究により, GAS 菌体の分裂割面周囲にはシャペロンタンパク GrpE が輪状に発現することが示され, GrpE を欠失させると菌体にさまざまな変化を生じることが明らかとなった. これらの結果は, GAS 菌体表層の GrpE あるいは PRP と GrpE の結合を特異的に阻害できる薬剤を開発することにより, GAS の凝集や宿主細胞への付着を減じることができる可能性を提示した. 最近のヒトゲノム情報の進歩と, ヒト個人による PRP のバリエーションを考慮すれば, テーラーメイドの菌付着阻害薬の開発にも可能性を残している. ヒト染色体 12p13.2 上には 4 エキソンからなる 4 種類の PRP 遺伝子があり (81, 82, 83), 3 番目エキソンのタンデムリピート数の差異 (84), C 末端領域の切断やスプライシングのバリエーションにより 約 20 種の PRP アイソフォームが生まれる (85). GAS 付着を促進する特異的な PRP アイソフォームあるいは至適 PRP 濃度というものが存在するのであれば, GAS 感染への感受性に個体差が存在するメカニズムに, PRP の多様性あるいは分泌量の個体差 (35) が関与すると推察できる. したがって PRP の立体構造の個体差を検討し, GrpE との結合部位を同定することで, 各個体において最も奏功する阻害薬開発の可能性もある. さらに, GrpE は種により N 末端側が変異することから (図 12, 13), GAS 特異的な免疫原の開発も可能となる.

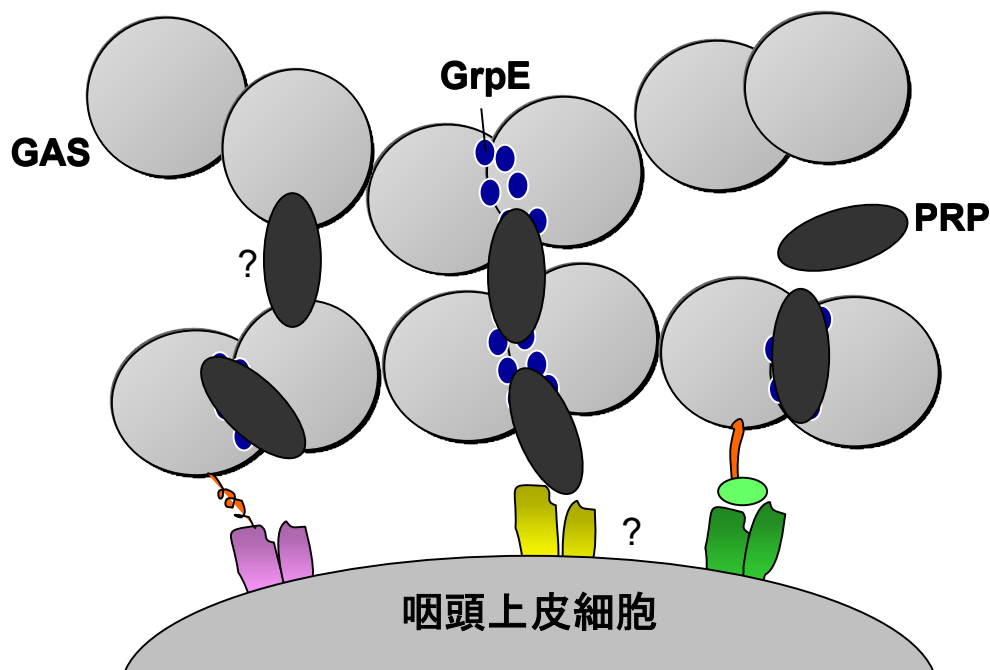


図 22 本研究のまとめ. GrpE への PRP の結合と PRP による凝集.

現在のところ、GAS の咽頭上皮細胞への付着メカニズムを解明する上で、PRP が GAS と宿主細胞に介在して直接的に関与するのか、それとも凝集により他の付着因子を介した結合を促進するのかなど、多くの課題が残っている。今後、阻害実験による PRP と GrpE との結合の確認、GrpE タンパクの PRP との結合部位の同定、GrpE 欠失株での GrpE の再発現、GrpE の菌体外へ露出している部位の決定、HEp-2 細胞や KB 細胞などの上皮細胞における PRP レセプターの検索などを行うことで、GAS 感染機序の一端が解明できるのではと考えられる。

謝辞

本研究を行う機会を与えていただき、終始ご懇意なるご指導とご校閲を賜った口腔分子感染制御学講座 浜田茂幸教授 および 療護歯科保健学講座 森崎市治郎教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり、様々なご指導とご教示を頂いた口腔分子感染制御学講座 川端重忠助教授 ならびに 口腔分子免疫制御学講座 天野敦雄教授に深謝いたします。最後に、本研究を行うに際し、幅広いご援助とご協力をいただいた口腔分子感染制御学講座 今里 聡助教授、大阪大学蛋白質研究所 乗岡茂巳助教授、日本大学歯学部 戸田善久教授、口腔細菌学講座ならびに障害者歯科治療部の皆様に感謝いたします。

参考文献

1. Sharon N, Lis H. (1989): Lectins as cell recognition molecules. *Science*, **246**, 227-234.
2. LaPenta D, Rubens C, Chi E, Cleary PP. (1994): Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 12115-12119.
3. Greco R, De Martino L, Donnarumma G, Conte MP, Seganti L, Valenti P. (1995): Invasion of cultured human cells by *Streptococcus pyogenes*. *Res Microbiol*, **146**, 551-560.
4. Schrager HM, Rheinwald JG, Wessels MR. (1996): Hyaluronic acid capsule and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection. *J Clin Invest*, **98**, 1954-1958.
5. Pancholi V, Fischetti VA. (1997): Regulation of the phosphorylation of human pharyngeal cell proteins by group A streptococcal surface dehydrogenase: signal transduction between streptococci and pharyngeal cells. *J Exp Med*, **186**, 1633-1643.
6. Hultgren SJ, Abraham S, Caparon M, Falk P, St Geme JW 3rd, Normark S. (1993): Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell*, **73**, 887-901.
7. Okada N, Liszewski MK, Atkinson JP, Caparon M. (1995): Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 2489-2493.

8. Cywes C, Stamenkovic I, Wessels MR. (2000): CD44 as a receptor for colonization of the pharynx by group A *Streptococcus*. *J Clin Invest*, **106**, 995–1002.
9. Hanski E, Caparon M. (1992): Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 6172–6176.
10. Cue D, Dombek PE, Lam H, Cleary PP. (1998): *Streptococcus pyogenes* serotype M1 encodes multiple pathways for entry into human epithelial cells. *Infect Immun*, **66**, 4593–4601.
11. Molinari G, Rohde M, Guzmán CA, Chhatwal GS. (2000): Two distinct pathways for the invasion of *Streptococcus pyogenes* in non-phagocytic cells. *Cell Microbiol*, **2**, 145–154.
12. Molinari G, Talay SR, Valentin-Weigand P, Rohde M, Chhatwal GS. (1997): The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun*, **65**, 1357–1363.
13. Österlund A, Popa R, Nikkilä T, Scheynius A, Engstrand L. (1997): Intracellular reservoir of *Streptococcus pyogenes* in vivo: a possible explanation for recurrent pharyngotonsillitis. *Laryngoscope*, **107**, 640–647.
14. Fluckiger U, Jones KF, Fischetti VA. (1998): Immunoglobulins to group A streptococcal surface molecules decrease adherence to and invasion of human pharyngeal cells. *Infect Immun*, **66**, 974–979.
15. Jadoun J, Ozeri V, Burstein E, Skutelsky E, Hanski E, Sela S. (1998): Protein F1 is required for efficient entry of *Streptococcus*

- pyogenes* into epithelial cells. *J Infect Dis*, **178**, 147–158.
16. Tsai PJ, Kuo CF, Lin KY, Lin YS, Lei HY, Chen FF, Wang JR, Wu JJ. (1998): Effect of group A streptococcal cysteine protease on invasion of epithelial cells. *Infect Immun*, **66**, 1460–1466.
 17. Burns EH Jr, Lukomski S, Rurangirwa J, Podbielski A, Musser JM. (1998): Genetic inactivation of the extracellular cysteine protease enhances *in vitro* internalization of group A streptococci by human epithelial and endothelial cells. *Microb Pathog*, **24**, 333–339.
 18. Sela S, Marouni MJ, Perry R, Barzilai A. (2000): Effect of lipoteichoic acid on the uptake of *Streptococcus pyogenes* by HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Lett*, **193**, 187–193.
 19. Jalil RA, Ashley FP, Wilson RF. (1992): The relationship between 48-h dental plaque accumulation in young human adults and the concentrations of hypothiocyanite, "free" and "total" lysozyme, lactoferrin and secretory immunoglobulin A in saliva. *Arch oral Biol*, **37**, 23–28.
 20. Jalil RA, Ashley FP, Wilson RF, Wagaiyu EG. (1993): Concentration of thiocyanate, hypothiocyanite, "free" and "total" lysozyme, lactoferrin and secretory IgA in resting and stimulated whole saliva of children aged 12–14 years and the relationship with plaque accumulation and gingivitis. *J Periodont Res*, **28**, 130–136.
 21. Scannapieco FA. (1994): Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med*, **5**, 203–248.
 22. Gibbons RJ, Hay DI. (1988): Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces*

- viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infect Immun*, **56**, 439–445.
23. Gibbons RJ. (1989): Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res*, **68**, 750–760.
 24. Lamkin MS, Oppenheim FG. (1993): Structural features of salivary function. *Crit Rev Oral Biol Med*, **4**, 251–259.
 25. Gibbons RJ, Hay DI, Schlesinger DH. (1991): Delineation of a segment of adsorbed salivary acidic proline-rich proteins which promotes adhesion of *Streptococcus gordonii* to apatitic surfaces. *Infect Immun*, **59**, 2948–2954.
 26. Xie H, Gibbons RJ, Hay DI. (1991): Adhesive properties of strains of *Fusobacterium nucleatum* of the subspecies *nucleatum*, *vincentii* and *polymorphum*. *Oral Microbiol Immunol*, **6**, 257–263.
 27. Ryan PA, Pancholi V, Fischetti VA. (2001): Group A Streptococci bind to mucin and human pharyngeal cells through sialic acid-containing receptors. *Infect Immun*. **69**, 7402–7412.
 28. Murakami J, Kawabata S, Terao Y, Kikuchi K, Totsuka K, Tamaru A, Katsukawa C, Moriya K, Nakagawa I, Morisaki I, Hamada S. (2002): Distribution of *emm* genotypes and superantigen genes of *Streptococcus pyogenes* isolated in Japan from 1994 to 1999. *Epidemiol Infect*, in press.
 29. Nakagawa I, Nakata M, Kawabata S, Hamada S. (2001): Cytochrome *c*-mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. *Cell Microbiol*, **3**, 395–405.
 30. Husmann LK, Dillehay DL, Jennings VM, Scott JR. (1996): *Streptococcus pyogenes* infection in mice. *Microb Pathog*, **20**, 213–

224.

31. Tao L, LeBlanc DJ, Ferretti JJ. (1992): Novel streptococcal-integration shuttle vectors for gene cloning and inactivation. *Gene*, **120**, 105-110.
32. Jayaraman GC, Penders JE, Burne RA. (1997): Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans hrcA*, *grpE* and *dnaK* genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol Microbiol*, **25**, 329-341.
33. Harrison CJ, Hayer-Hartl M, Di Liberto M, Hartl F, Kuriyan J. (1997): Crystal structure of the nucleotide exchange factor GrpE bound to the ATPase domain of the molecular chaperone DnaK. *Science*, **276**, 431-435.
34. Rudney JD, Hickey KL, Ji Z. (1999): Cumulative correlations of lysozyme, lactoferrin, peroxidase, s-IgA, amylase, and total protein concentrations with adherence of oral viridans streptococci to microplates coated with human saliva. *J Dent Res*, **78**, 759-768.
35. Carlén A, Bratt P, Stenudd C, Olsson J, Strömberg N. (1998): Agglutinin and acidic proline-rich protein receptor patterns may modulate bacterial adherence and colonization on tooth surfaces. *J Dent Res*, **77**, 81-90.
36. Saari H, Halinen S, Ganlöv K, Sorsa T, Konttinen YT. (1997): Salivary mucous glycoprotein MG1 in Sjögren's syndrome. *Clin Chim Acta*, **259**, 83-96.
37. Loomis RE, Prakobphol A, Levine MJ, Reddy MS, Jones PC. (1987): Biochemical and biophysical comparison of two mucins from

- submandibular–sublingual saliva. *Arch Biochem Biophys*, **258**, 452–464.
38. Liu B, Rayment SA, Gyurko C, Oppenheim FG, Offner GD, Troxler RF. (2000): The recombinant N-terminal region of human salivary mucin MG2 (MUC7) contains a binding domain for oral *Streptococci* and exhibits candidacidal activity. *Biochem J*, **345**, 557–564.
39. Frick IM, Mörgelin M, Björck L. (2000): Virulent aggregates of *Streptococcus pyogenes* are generated by homophilic protein–protein interactions. *Mol Microbiol*, **37**, 1232–1247.
40. Amano A, Shizukuishi S, Horie H, Kimura S, Morisaki I, Hamada S. (1998): Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to proline-rich glycoproteins in parotid saliva via a domain shared by major salivary components. *Infect Immun*, **66**, 2072–2077.
41. Gibbons RJ, Hay DI. (1988): Adsorbed salivary proline-rich proteins as bacterial receptors on apatitic surfaces. *In: Molecular mechanisms of microbial adhesion*, Switalski LM. ed, Springer-Verag, New York, 1988, 143–169.
42. Leung KP, Nesbitt WE, Fischlschweiger W, Hay DI, Clark WB. (1990): Binding of colloidal gold-labeled salivary proline-rich proteins to *Actinomyces viscosus* type 1 fimbriae. *Infect Immun*, **58**, 1986–1991.
43. Dû LD, Kolenbrander PE. (2000): Identification of saliva-regulated genes of *Streptococcus gordonii* DL1 by differential display using random arbitrarily primed PCR. *Infect Immun*, **68**, 4834–4837.
44. Ganeschkumar N, Hannam PM, Kolenbrander PE, McBride BC. (1991): Nucleotide sequence of a gene coding for a saliva-binding protein (SsaB) from *Streptococcus sanguis* 12 and possible role of the

- protein in coaggregation with Actinomyces. *Infect Immun*, **59**, 1093–1099.
45. Bertin Y, Girardeau JP, Der Vartanian M, Martin C. (1993): The ClpE protein involved in biogenesis of the CS31A capsule-like antigen is a member of a periplasmic chaperone family in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, **108**, 59–68.
 46. Derre I, Rapoport G, Msadek T. (1999): CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, **31**, 117–131.
 47. Zolkiewski M. (1999): ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. A novel multi-chaperone system from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **274**, 28083–28086.
 48. Saito H, Uchida H. (1977): Initiation of the DNA replication of bacteriophage Lambda in *Escherichia coli* K12. *J Mol Biol*, **113**, 1–25.
 49. Georgopoulos CP, Herskowitz I. (1971): *Escherichia coli* mutants blocked in Lambda DNA synthesis. In *The Bactriophage Lambda*, Hershey AD, ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 554–564.
 50. Hoffmann HJ, Lyman SK, Lu C, Petit MA, Echols H. (1992): Activity of the HSP70 chaperone complex–DnaK, DnaJ, and GrpE–in initiating phage λ DNA by sequestering and releasing λ P protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 12108–12111.
 51. Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M. (1991): *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**,

2874–2878.

52. Ferretti JJ, McShan WM, Ajdic D, Savic DJ, Savic G, Lyon K, Primeaux C, Sezate S, Suvorov AN, Kenton S, Lai HS, Lin SP, Qian Y, Jia HG, Najar FZ, Ren Q, Zhu H, Song L, White J, Yuan X, Clifton SW, Roe BA, McLaughlin R. (2001): Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 4658–4663.
53. Naylor DJ, Stines AP, Hoogenraad NJ, Høj PB. (1998): Evidence for the existence of distinct mammalian cytosolic, microsomal, and two mitochondrial GrpE-like proteins, the co-chaperones of specific Hsp70 members. *J Biol Chem*, **273**, 21169–21177.
54. Choglay AA, Chapple JP, Blatch GL, Cheetham ME. (2001): Identification and characterization of a human mitochondrial homologue of the bacterial co-chaperone GrpE. *Gene*, **267**, 125–134.
55. Hecker M, Schumann W, Volker U. (1996): Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, **19**, 417–428.
56. Schulz A, Schumann W. (1996): *hrcA*, the first gene of the *Bacillus subtilis dnaK* operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. *J Bacteriol*, **178**, 1088–1093.
57. Zuber U, Schumann W. (1994): CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **176**, 1359–1363.
58. Lipinska B, King J, Ang D, Georgopoulos C. (1988): Sequence analysis and transcriptional regulation of the *Escherichia coli grpE* gene, encoding a heat shock protein. *Nucleic Acids Res*, **16**,

7545–7562.

59. Lemos JA, Chen YYM, Burne RA. (2001): Genetic and physiologic analysis of the *groE* operon and role of the HrcA repressor in stress gene regulation and acid tolerance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, **183**, 6074–6084.
60. Bukau B, Walker GC. (1989): Cellular defects caused by deletion of the *Escherichia coli dnaK* gene indicate roles for heat shock protein in normal metabolism. *J Bacteriol*, **93**, 1571–1578.
61. Yaagoubi AEL, Kohiyama M, Richarme G. (1994): Localization of DnaK (Chaperone 70) from *Escherichia coli* in an osmotic-shock-sensitive compartment of cytoplasm. *J Bacteriol*, **176**, 7074–7078.
62. Zylicz M, Georgopoulos CP. (1984): Purification and properties of the *Escherichia coli* dnaK replication protein. *J Biol Chem*, **259**, 8820–8825.
63. Bukau B, Reilly P, McCarty J, Walker GC. (1993): Immunogold localization of the DnaK heat shock protein in *Escherichia coli* cells. *J Gen Microbiol*, **139**, 95–99.
64. Kostyal DA, Farrell M, McCabe A, Mei Z, Firshein W. (1989): Replication of an RK2 miniplasmid derivative *in vitro* by a DNA/membrane complex extracted from *Escherichia coli*: involvement of the *dnaA* but not *dnaK* host proteins and association of these and plasmid-encoded proteins with inner membrane. *Plasmid*, **21**, 226–237.
65. Zylicz M, Nieradko J, Taylor K. (1983): *Escherichia coli* *dnaJ*– and *dnaK*–gene products: synthesis in minicells and membrane-affinity. *Biochem Biophys Res Commun*, **110**, 176–180.

66. Nossal NG, Heppel LA. (1966): The release of enzymes by osmotic shock from *Escherichia coli* in exponential phase. *J Biol Chem*, **241**, 3055–3062.
67. Beacham IR. (1979) : Periplasmic enzymes in Gram-negative bacteria. *Int J Biochem*, **10**, 877–883.
68. Bayer MH, Costtello GP, Bayer ME. (1982): Isolation and partial characterization of membrane vesicles carrying markers of the membrane adhesion sites. *J Bacteriol*, **149**, 758–767.
69. Ishidate K, Creeger ES, Zrike J, Deb S, Glauner T, MacAlister TJ, Rothfield LI. (1986): Isolation of differentiated membrane domains from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, including a fraction containing attachment sites between the inner and outer membranes and the murine skeleton of the cell envelope. *J Biol Chem*, **261**, 428–443.
70. Lei B, Mackie S, Lukomski S, Musser JM. (2000): Identification and immunogenecity of group A *Streptococcus* culture supernatant proteins. *Infect Immun*, **68**, 6807–6818.
71. Bi E, Lutkenhaus J. (1990): FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature*, **354**, 161–164.
72. Hesterkamp T, Bukau B. (1998): Role of DnaK and HscA homologs of HSP70 chaperones in protein folding in *E. coli*. *EMBO J*, **17**, 4818–4828.
73. Massidda O, Anderluzzi D, Friedli L, Feger G. (1998): Unconventional organization of the division and cell wall gene cluster of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol*, **144**, 3069–3078.

74. Uehara T, Matsuzawa H, Nishimura A. (2001): HscA is involved in the dynamics of FtsZ-ring formation in *Escherichia coli* K12. *Genes Cells*, **6**, 803–814.
75. Brehmer D, Rüdiger S, Gässler CS, Klostermeier D, Packschies L, Reinstein J, Meyer MP, Bukau B. (2001): Turning of chaperone activity of HSP70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol*, **8**, 427–432.
76. Chia JS, Chang LY, Shun CT, Chang YY, Chen JY. (2001): A 60-kilodalton immunodominant glycoprotein is essential for cell wall integrity and the maintenance of cell shape in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*, **69**, 6987–6998.
77. Reinscheid DJ, Gottshalk B, Schubert A, Eikmanns BJ, Chhatwal GS. (2001): Identification and molecular analysis of PcsB, a protein required for cell wall separation of group B streptococcus. *J Bacteriol*, **183**, 1175–1183.
78. Sugai M, Akiyama T, Komatsuzawa H, Miyake Y, Suginaka H. (1991): Cibacron blue 3G-A inhibits cell separation of gram-positive bacteria. *Arch Microbiol*, **155**, 199–201.
79. Wu SC, Ye R, Wu XC, Ng SC, Wong SL. (1998): Enhanced secretory production of a single-chain antibody fragment from *Bacillus subtilis* by coproduction of molecular chaperones. *J Bacteriol*, **180**, 2830–2835.
80. van Wely KH, Swaving J, Freudl R, Driessen AJM. (2001): Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, **25**, 437–454.

81. Mamula PW, Heerema NA, Palmer CG, Lyons KM, Karn RC. (1985): Localization of the human salivary protein complex (SPC) to chromosome band 12p13.2. *Cytogenet Cell Genet*, **39**, 279–284.
82. Kim HS, Maeda N. (1986): Structures of two *HaeIII*-type genes in the human salivary proline-rich protein multigene family. *J Biol Chem*, **261**, 6712–6718.
83. Lyons KM, Stein JH, Smithies O. (1988): Length polymorphisms in human proline-rich protein genes generated by intragenic unequal crossing over. *Genetics*, **120**, 267–278.
84. Kim HS, Lyons KM, Saitoh E, Azen EA, Smithies O, Maeda N. (1993): The structure and evolution of the human salivary proline-rich protein gene family. *Mamm Genome*, **4**, 3–14.
85. Schlesinger DH, Hay DI, Schluckebier SK, Ahern JM. (1994): Primary structure of a novel human salivary acidic proline-rich protein. *Pept Res*, **7**, 242–247.