



Title	化膿レンサ球菌のシステインプロテアーゼSpeBによる ヒト補体免疫系回避機構
Author(s)	小川, 真理子
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52333
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

化膿レンサ球菌のシステインプロテアーゼ
SpeB によるヒト補体免疫系回避機構

大阪大学大学院歯学研究科
統合機能口腔科学専攻
(顎口腔機能再建学講座)

小川（本多）真理子

本論文の要旨の一部は、Journal of Biological Chemistry 誌，2013 年 288 巻 22 号 15854～15864 ページ，第 21 回 Lancefield レンサ球菌研究会（2012 年 6 月 8～9 日，吹田），第 65 回日本細菌学会関西支部総会（2012 年 11 月 17 日，神戸），第 5 回「口腔環境制御研究」カテゴリー集会（2013 年 2 月 1 日，長崎），第 86 回日本細菌学会総会（2013 年 3 月 18～20 日，千葉），第 2 回口腔微生物研究会（2014 年 9 月 25 日，福岡）において発表した。

要約

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) はヒトの口腔や鼻腔から飛沫感染し、咽頭炎や膿痂疹などの比較的低侵襲な疾患から、壊死性筋膜炎などの重篤な症状を呈する劇症型化膿レンサ球菌感染症 (Streptococcal toxic shock syndrome; STSS) まで幅広い臨床症状を示す。STSS 患者に対する治療では主にペニシリン系化学療法薬が用いられるが、予後は不良であり死亡率は 20~50%にものぼる。過去に、ヒト補体制御因子のひとつである C1 esterase inhibitor (C1-INH) を補助療法として投与し、症状の軽減した症例が報告されたが、その作用機序については不明な点が多い。本研究では *S. pyogenes* が産生するプロテアーゼによる補体関連因子の分解を検討し、*S. pyogenes* の病原因子によるヒト補体免疫回避機構を解析した。

S. pyogenes の主要な菌体表層プロテアーゼである streptococcal C5a peptidase、または分泌型プロテアーゼである streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) の組換え体とヒト補体血清 (ヒト血清) をそれぞれ反応させ、各プロテアーゼによる C1-INH の分解を抗 C1-INH 抗体で解析した結果、SpeB が高い C1-INH 分解能を有することが示された。次に、10 種の M 血清型の *S. pyogenes* 臨床分離株の培養上清をヒト血清と反応させ、各菌株における SpeB 産生量と C1-INH 分解能を比較した。その結果、SpeB 産生量の多い菌株ほど C1-INH 分解活性が高い傾向を示した。また、エドマン分解法を用いた解析により、SpeB は C1-INH の Ile⁴⁹ と Ser⁵⁰ 間ならびに Val¹²⁷ と Thr¹²⁸ 間を切断することが明らかになった。続いて、ヒト血清もしくは非働化ヒト血清中における野生株および *speB* 変異株の生菌数を比較した結果、ヒト血清と反応させた *speB* 変異株の生菌数は野生株と比較して有意に少なかった。ヒト血清中における野生株の生菌数は非働化ヒト血清中

と比較して有意に多かった。一方、非働化ヒト血清と反応させた *speB* 変異株の菌数増加率はヒト血清中と比較して有意に高かった。続いて、SpeB 組換え体と種々の補体関連因子をそれぞれ反応させ、各種補体関連因子の分解をウェスタンブロット法にて解析した。その結果、SpeB は C2, C3b, C4, C5a, C6, C7, C8, C9, および膜侵襲複合体 (membrane attack complex; MAC) をそれぞれ分解した。また、走査型電子顕微鏡を用いてヒト血清と反応させた野生株および *speB* 変異株の表層構造を観察した結果、*speB* 変異株では野生株と比較して菌体表層構造の破壊が認められた。さらに、フローサイトメトリーを用いて野生株および *speB* 変異株表層への MAC もしくは C9 の会合量を解析したところ、MAC は両株に会合したが、C9 は *speB* 変異株のみに会合した。

以上の結果より、*S. pyogenes* の分泌型システインプロテアーゼ SpeB は、種々のヒト補体関連因子を分解することにより補体活性化経路を阻害し、宿主免疫機構に影響を及ぼす可能性が示唆された。

はじめに

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は血液寒天培地上で β 溶血性を示す通性嫌気性のグラム陽性球菌で、口腔および咽頭常在細菌叢を形成することがある。菌の感染部位によって多彩な臨床症状を呈することが知られており、咽頭炎や扁桃炎などの粘膜疾患や、皮膚創傷部位への感染による膿痂疹や丹毒、猩紅熱を引き起こす。さらに、軟部組織壊死を伴い敗血症性ショックを来す劇症型化膿レンサ球菌感染症 (streptococcal toxic shock syndrome; STSS) は同菌の引き起こす重篤な病態であり、近年発症率の増加ならびにその侵襲性が問題となっている。これまでの報告から、同菌の産生する菌体表層型および菌体外分泌型病原因子が咽頭上皮等の細胞表面への付着、組織内への侵入による感染拡大、さらには血中における宿主免疫系からの回避に寄与することが明らかにされている¹。特に、*S. pyogenes* と宿主免疫系との相互作用については同菌の病原因子である M タンパク²や streptococcal inhibitor of complement-mediated lysis³, streptococcal C5a peptidase A (ScpA)⁴が宿主免疫機構の回避に関与することが報告されている。

化膿レンサ球菌感染症に対する治療ではペニシリン系化学療法薬が主に用いられるが、STSS による致死率は 20~50%にものぼると報告されている⁵⁻⁸。過去にヒト補体制御因子のひとつである C1 esterase inhibitor (C1-INH) を補助療法として STSS 患者に投与し、症状の軽減した症例が報告された⁹。補体系は生体への病原体侵入を認識する宿主自然免疫機構のひとつであり、感染早期の宿主防御に関与する。病原微生物感染時には補体制御因子の制御下において、それぞれの補体関連因子による一連の活性化反応を起こす。さらに、後期補体経路において形成される膜侵襲複合体 (membrane attack

complex; MAC) は、病原微生物の細胞膜に孔を形成し溶菌現象を引き起こす¹⁰。また、血清中には種々の補体関連因子が存在しており、そのうち C1-INH は補体因子 C1r, C1s, mannose-binding protease-associates serine protease-1 (MASP-1) ならびに MASP-2 を不活化することで補体系における調節因子として機能する。さらに、C1-INH は活性化カリクレインの不活化および活性化血液凝固第 12 因子の不活化により血液凝固線溶系を制御し、ブラジキニンやプラスミンの過剰産生を抑制する因子として機能している¹¹。

C1-INH 欠損症患者においては、ブラジキニン産生や血管透過性の亢進に伴う血管性浮腫の症状が認められる¹²。一方、STSS 患者においても毛細血管漏出症候群、播種性血管内凝固症候群¹³、C1-INH 価の低下⁹ が確認されており、C1-INH 欠損症の患者と部分的に類似する症状を呈する。C1-INH 欠損症の病態に関しては、血液凝固線溶系の制御不全に伴うブラジキニンの過剰産生によって血管透過性が亢進する結果、症状が出現すると報告されている¹²。しかし、STSS の病態や症状と C1-INH との関連については詳細に解明されていない。また、C1-INH 製剤は STSS 患者に対する治療法として有効性が認められたにも関わらずその作用機序については不明な点が多く、現段階では標準的な治療法としては確立されていない。

本研究では、*S. pyogenes* の産生する主要な病原因子と C1-INH の相互作用を解析し、streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) が C1-INH の機能阻害に関与することを明らかにした。さらに、C1-INH 以外のヒト補体関連因子にも着目し、*S. pyogenes* の病原因子が補体免疫系の回避に及ぼす作用とその機序について解析した。

材料と方法

1. 実験材料および培養方法

本研究で使用した *S. pyogenes* 菌株を表 1 に示した. 表中の臨床分離株は, 東邦大学 村井貞子博士 (現日本秋田赤十字看護大学) より分与された¹⁴. 本研究に使用した *scpA* 変異株 TR-9 ならびに *speB* 変異株 TR-11 は, SSI-9 株 (野生株) にスーサイドベクター pSF151 を用いて過去に作製された菌株である^{15,16}. *S. pyogenes* の培養には 0.2% (w/v) Yeast Extract (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を添加した Todd-Hewitt (Becton, Dickinson and Company) (THY) 液体培地, または THY 寒天平板培地を使用した. 寒天平板培地の作製には 1.5% (w/v) 寒天 (和光純薬, 大阪) を添加した. *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysE 株 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) は Luria-Bertani (LB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 液体培地, または 2×YT 培地 (Sigma-Aldrich) を用いて培養した. *E. coli* の形質転換体の選択にはアンピシリン (100 µg/ml) を使用した.

表 1. 本研究で使用した *S. pyogenes* 菌株とその M 血清型

M 血清型	菌株	M 血清型	菌株
M1	SSI-9	M12	NY-5*
M1	SSI-25	M12	TW3337
M1	SSI-127	M12	TW3344
M2	SE1013	M18	T18*
M2	SE1181	M18	TW3338
M2	SE1207	M18	TW3363
M3	SSI-1	M22	TW3532
M3	SSI-7	M22	TW3403
M3	SSI-8	M22	TW3543
M4	TW3392	M28	TW3359
M4	TW3398	M28	TW3413
M4	TW3400	M28	TW3528
M6	SE1387	M49	CS101*
M6	SE1303	M49	TW3425
M6	TW3420	M49	TW3424

表中の*は当研究室継代菌株を示す. それ以外の菌株は分与を受けた臨床分離株である.

2. 組換え体作製

ScpAについてはミネソタ大学 Patrick P. Cleary博士から分与を受けた pGEX:scpを制限酵素 *Bam*HI ならびに*Eco*RI を用いて処理し, *scpA*遺伝子断片を切り出した. 発現ベクター pGEX-6P-1 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) に*scpA*遺伝子を挿入し, *scpA* 含有プラスミド pYT1277を構築した. *Spe*Bについては *S. pyogenes* SSI-9株の染色体DNAを鋳型として*speB*に特異的なプライマーを用い, PCR法で増幅した. これらのプライマーとして, 5'-CATGCCATGGATAAAAAGAAATTAGGTATCAG-3' (センス鎖, 制限酵素 *Nco*I 認識部位を含む) ならびに 5'-CCCCCGGGAGGTTTGATGCCTACAACAGCACTTTGG-3' (アンチセンス鎖, 制限酵素 *Sma*I 認識部位を含む) を用いた. 得られたPCR産物は制限酵素 *Nco*I ならびに *Sma*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) で処理し, 同制限酵素で処理した pIVEX2.3-MCS vectorシステム (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) に組み込み, *speB* 含有プラスミド pYT1175を構築した. 構築したこれらのプラスミドをそれぞれ *E. coli* BL21 (DE3)pLysE株に形質転換し, N末端にグルタチオン S-トランスフェラーゼタグを付与させた組換え (r) ScpA および, C末端にヒスチジンタグを付与させたr*Spe*Bを作製した. それぞれの組換え体は0.1 mM イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド添加アンピシリン含有 2×YT培地 100 mlにて20°C, 24時間振盪培養した. 回収した菌体は超音波で破碎した後, 遠心分離を行った. 得られた上清画分のrScpAについてはグルタチオンセファロース4Bアフィニティークロマトグラフィー (GE Healthcare Life Sciences) とジエチルアミノエチルカラムクロマトグラフィー (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用い, r*Spe*Bについてはニッケルニトリロ三酢酸アガロースアフィニティークロマトグラフィー (Qiagen, Hilden, Germany) とジエチルアミノエチルカラムクロマトグラフィー (Bio-Rad) を用いて精製した. 精

製後の組換えタンパクは、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS; 137 mM 塩化ナトリウム, 8.10 mM リン酸水素二ナトリウム, 2.68 mM 塩化カリウム, 1.47 mM リン酸二水素カリウム）を用いて透析した。さらに、リムルス ES-II シングルテスト（和光純薬）を用いて精製タンパク中の*E. coli* 由来リポポリサッカライド（LPS）量を測定した。1 mg の精製タンパク中に含まれるLPS量は検出限界の5 ng以下であり、精製タンパク中のLPS量は反応系に毒性影響を与えない低値であることを確認した。

3. *S. pyogenes* 培養上清サンプルの回収と濃縮

表1に示した*S. pyogenes* 30株, *scpA*変異株および*speB*変異株を10 mlのTHY液体培地中で37°C, 18時間培養した後、遠心分離（3,000 g, 5分間, 4°C）により上清画分を回収した。回収した上清画分に飽和硫酸アンモニウム 20 mlを加え、適宜ボルテックスミキサーにて攪拌しながら氷上に1時間静置した。遠心分離（4,000 g, 10分間, 4°C）後、回収した沈殿を1 ml の滅菌超純水で溶解し、PBSにて透析を行った。

4. SpeBによる各種補体関連因子分解能の解析

ScpAならびにSpeBのC1-INH分解能はウェスタンブロット法を用いて、以下の手順で調べた。*S. pyogenes* 野生株, *scpA*変異株および*speB*変異株の濃縮培養上清 40 µl もしくは1 µM の各プロテアーゼ組換え体（rScpAもしくはrSpeB）10 µl をヒト補体血清（以下ヒト血清, Sigma-Aldrich）10 µlと混和し、37°Cで3時間反応させた。続いて、サンプルと等量のLaemmli バッファー（10% (v/v) 0.5 M Tris-HCl, 20% (v/v) グリセロール, 4% (w/v) SDS, 12% (v/v) β-メルカプトエタノール, ブロモチモールブルー適量）を添加し、100°Cで5分間熱処理した。各試料は7.5% もしくは12% (v/v) ドデシル硫酸ナ

トリウム-ポリアクリルアミドゲル上に電気泳動 (SDS-PAGE) にて展開した。セミドライ式ウェスタンブロッティング装置 (Bio-Rad) を用いて同ゲルをポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Merck Millipore) に転写し, 10% (v/v) ヤギ血清 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 添加メンブレンブロッキング液 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に浸漬し, 4°Cにて一晚振盪した。続いて, それぞれのPVDF膜を0.1% (w/v) Tween 20 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBST) で3回洗浄した後, 一次抗体としてウサギ抗ヒト C1-INH抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 添加PBSTと室温で1時間反応させた。PVDF膜をPBST 15 mlで3回洗浄した後, 二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgG抗体 (Cell Signaling Technology, Denver, MA, USA) を添加し, 室温で1時間反応させた。PVDF膜をPBSTで3回洗浄した後, 5-ブロモ4-クロロ3-インドリルフォスファターゼ/ニトロブルーテトラゾリウム (BCIP/NBT) アルカリフォスファターゼ発色液 (Moss, Pasadena, MD, USA) を添加し, 室温で15~30分間反応させた後, EDTA水溶液にて反応を停止させた。

SpeBによる各種補体関連因子に対する分解能は, 以下の方法で評価した。1 μ M rSpeB と25 nM 各種精製補体関連因子 (C2, C3b, C4, C5, C5b, C6, C7, C8, もしくはC9; Calbiochem, La Jolla, CA, USA) をそれぞれ等量混合し, 37°Cで3時間反応させた。SDS-PAGEには5~20 % グラディエントゲル (アトー, 東京) を用いた。精製 C2, C3b ならびにC4とrSpeBの反応サンプルについては, 一次抗体としてそれぞれヤギ抗ヒトC2, C3bもしくはC4抗血清 (Calbiochem) を, 二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ標識マウス抗ヤギIgG抗体 (Cell Signaling Technology) を, 発色液として3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンペルオキシダーゼ発色基質 (Moss) を用いた。精製C5, C5b, C6, C7, C8, ならびにC9とrSpeBの反応サンプルについては, 一次抗体としてそれぞれウサ

ギ抗ヒトC5a (Calbiochem), C5b (American Research Products, Inc., St. Waltham, MA, USA), C6, C7, C8 β ならびにC9抗血清 (Atlas Antibodies AB, Stockholm, Sweden) を, 二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (Cell Signaling Technology) を, 発色基質としてBCIP/NBT アルカリフォスファターゼ発色液を用いた.

MACの分解能は以下の通り評価した. Teraoの方法に従い, 25 nM 精製 C5b6, C7, C8, C9を等量ずつ混和しMACを作製した¹⁷. 形成したMACを 200 nM rSpeBと等量混和し, 37°Cで1時間反応させた. サンプルを5~20% グラディエントゲル上に展開し, 一次抗体としてウサギ抗ヒトMAC抗体 (Calbiochem) を, 二次抗体として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.

5. 10種のM血清型 *S. pyogenes* におけるSpeB産生量とC1-INH分解能の比較

10種のM血清型由来の*S. pyogenes*濃縮培養上清 40 μ lを, ヒト血清10 μ lと37°Cで3時間反応させた. その後, 抗C1-INH抗体を用いたウェスタンブロット法により, 濃縮培養上清と反応させた血清中のC1-INHを検出した. また, ウサギ抗SpeB抗体 (Toxin Technology, Inc., Sarasota, FL, USA) を用いたウェスタンブロット法により, 濃縮培養上清中のSpeBを検出した. さらに, デンシトメーター (Image J version 8.8.7, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) によりPVDF膜上に検出されたタンパクバンドの光学濃度を半定量した¹⁸.

6. SpeBによるC1-INH分解産物量の経時的変化の観察

0.1 μ M rSpeBと終濃度1 μ M のジチオトレイトールを室温で30分間反応させrSpeBを活性化させた. 続いて, rSpeBと等量の1 μ M 精製C1-INH (Sigma-Aldrich) を37°Cにて

10, 20, 30, 40, 50分, 1, 2, 3もしくは4時間反応させた. 抗C1-INH抗体を用いたウェスタンブロット法により, 得られたC1-INH分解産物を検出した. デンシトメーターを用いてPVDF膜上に検出されたバンドの光学濃度を半定量し, C1-INH分解産物の産生量を経時的に比較した¹⁸. その結果を基に, SpeBが最も効率的にC1-INH分解能を示す反応時間を決定した.

7. SpeBにより分解されたC1-INH断片のN末端アミノ酸配列の決定

上記で決定した反応時間を基に, 1 μ M 活性化 rSpeBと1 μ M C1-INHを37°Cで1時間反応させた. SDS-PAGEにてC1-INHの分解産物をゲル上に展開し, クマシーブリアントブルー R-250 (CBB) 溶液で染色した. これを40% (v/v) メタノール添加7.5% (v/v) 酢酸で脱色し, 続いて超純水にて24時間脱色した. さらに, ABI protein sequencer model 491HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いたエドマン分解法により, CBB染色により検出された2種の分解産物のN末端アミノ酸配列を決定した.

8. 各種ヒト血清中における*S. pyogenes* 生菌数算定

S. pyogenes 野生株および*speB*変異株を波長600 nmにおける吸光度 (OD₆₀₀) が0.4 (対数増殖期中期) となるまでTHY液体培地中で培養し, 遠心分離 (3,000 g, 5分間, 4°C) により菌体を回収した. 菌体をPBSにて2回洗浄した後, それぞれの菌株の培養上清を用いて0.2~1 $\times$ 10⁴コロニー形成単位 (colony forming unit; CFU) /mlに調製した. 調製した菌液90 μ lとヒト血清, C1-INH除去ヒト血清, C1-INH再添加ヒト血清もしくは非働化ヒト血清10 μ lを37°Cにて3時間反応させ, THY寒天培地上に播種した. 37°Cで一晩培養後, 生菌数を算定した. なお, 非働化ヒト血清は, ヒト血清を56°Cにて30分間熱処理

することにより得た。ヒト血清からのC1-INH除去には、プロテインG抗体アフィニティクロマトグラフィー (Protein G sepharose 4Fas Flow; GE healthcare) を用いた。プロテインGセファロースビーズ1 mlを遠心分離 (4,000 g, 5分間, 4°C) し、上清を除去した。続いてPBS 500 µlを加えビーズを2回洗浄し、上清を完全に除去した。200 µg/ml 抗ヒトC1-INH抗体を500 µl加え、緩やかに回転させながら4°Cにて1時間反応させた。抗ヒトC1-INH抗体結合プロテインGセファロースビーズをカラムに充填し、PBSで2回洗浄した。続いて、カラムにヒト血清 1 mlを加えて室温で1時間振盪し、上清画分をC1-INH除去ヒト血清として回収した。抗C1-INH抗体を用いたウェスタンブロット法により、血清中にC1-INHの残存がないことを確認した。さらに、C1-INH再添加ヒト血清は、C1-INH除去ヒト血清 64 µlに対して1.2 µg/ml 精製ヒトC1-INH (Calbiochem) 16 µlを加えて調製した。

9. 走査型電子顕微鏡による形態学的解析

S. pyogenes 野生株および*speB*変異株をそれぞれ対数増殖期中期 ($OD_{600}=0.4$) まで培養し、PBSにて 1.5×10^7 CFU/mlの濃度に調製した。90 µl の調製菌液をそれぞれヒト血清10 µlと混和し、37°Cにて15, 30, 45もしくは60分間反応させた。マトリゲル (Becton, Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) にて表面処理したガラス上にサンプル菌液50 µlを滴下し、2.5% (w/v) グルタルアルデヒド溶液 (TAAB Laboratories Equipment Ltd., Berks, UK) に浸漬し室温で1時間反応させ、サンプルを固定した。超純水にて3回洗浄後、100% (v/v) *t*-ブチルアルコール (和光純薬) で脱水処理を3回行い、凍結乾燥した (JFD-320, JEOL Ltd., 東京)。続いて、白金粒子を用いて蒸着処理 (JFC-1600, JEOL Ltd.) し、走査型電子顕微鏡 (JSM-6390LVZ, JEOL Ltd.) を用いて菌体の表層構造を観察した。

10. フローサイトメトリー

対数増殖期中期 ($OD_{600}=0.4$) の *S. pyogenes* 野生株ならびに *speB* 変異株の培養液各 1 ml を、それぞれヒト血清 10 μ l と 37°C で 1 時間反応させた。その後、5% ウシ血清アルブミン (BSA : Sigma-Aldrich) ならびに 10% ヤギ血清添加ブロッキング液と室温で 1 時間反応させ、PBS で 2 回洗浄した。続いてウサギ抗 MAC 抗体、ウサギ抗ヒト C9 抗体、ウサギ抗ヒト C1-INH 抗体と室温で 1 時間反応させた。なお、ポジティブコントロールとしてウサギ抗 M1 抗体¹⁹を、ネガティブコントロールとして非免疫ウサギ血清を使用した。PBS による洗浄後、サンプルを Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies) と室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄した後フローサイトメーター CyFlow SL system (Partec GmbH, Münster, Germany) を用いて、10,000 個の菌体表層に会合した MAC, C9, C1-INH を検出し、ソフトウェア Flowjo software version 8.8.7 (Flowjo, LLC., Ashland, OR, USA) を用いて解析した。

11. 統計学的解析

全ての実験は少なくとも 3 回以上行い、StatMate III ソフトウェア (ATMS Co., Ltd., 東京) を用いて統計処理を行った。2 群間の比較には、Mann-Whitney *U* 検定を用い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

上記における遺伝子組換え実験については、大阪大学の遺伝子組換え実験安全規程に従い、各委員会の承認を受けて実施した (遺伝子組換え承認番号 3398-1)。

結果

1. C1-INH に作用する *S. pyogenes* プロテアーゼの同定

S. pyogenes は数種の病原因子プロテアーゼを産生するが、そのうちのいくつかについては補体因子に対する分解能を有することが既に明らかにされている。細胞壁架橋型セリンプロテアーゼである ScpA は補体因子 C5a を分解することが²⁰、細胞外分泌型システインプロテアーゼである streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) は補体因子 C3b^{21,22} ならびに補体制御因子プロペルジンを分解することが知られている²³。そこで、ScpA ならびに SpeB を C1-INH を分解するプロテアーゼの候補として、血清中の C1-INH に対する分解能を検討した。定常期の野生株, *scpA* 変異株および *speB* 変異株の上清画分, rScpA ならびに rSpeB をそれぞれヒト血清と反応させ、ウェスタンブロット法にて各画分における C1-INH 分解を解析した (図 1A)。その結果、血清と反応させた野生株, *scpA* 変異株の上清画分ならびに rSpeB においては C1-INH の全長を示す 105 kDa 付近のバンドの消失が認められた。一方で、*speB* 変異株培養上清画分と反応させた血清サンプル, rScpA と反応後の血清サンプルでは全長サイズである 105 kDa 付近に C1-INH バンドが検出された。なお、*scpA* 変異株および野生株の菌体画分とそれぞれ反応させた血清サンプルでは、C1-INH の分解に差が認められなかった (データは示さず)。次に、段階希釈した rSpeB を血清と反応させたところ、rSpeB は濃度依存的に C1-INH を分解することを確認した (図 1B)。これらの結果から、培養上清中に産生される分泌型プロテアーゼである SpeB は C1-INH 分解能を有することが示された。

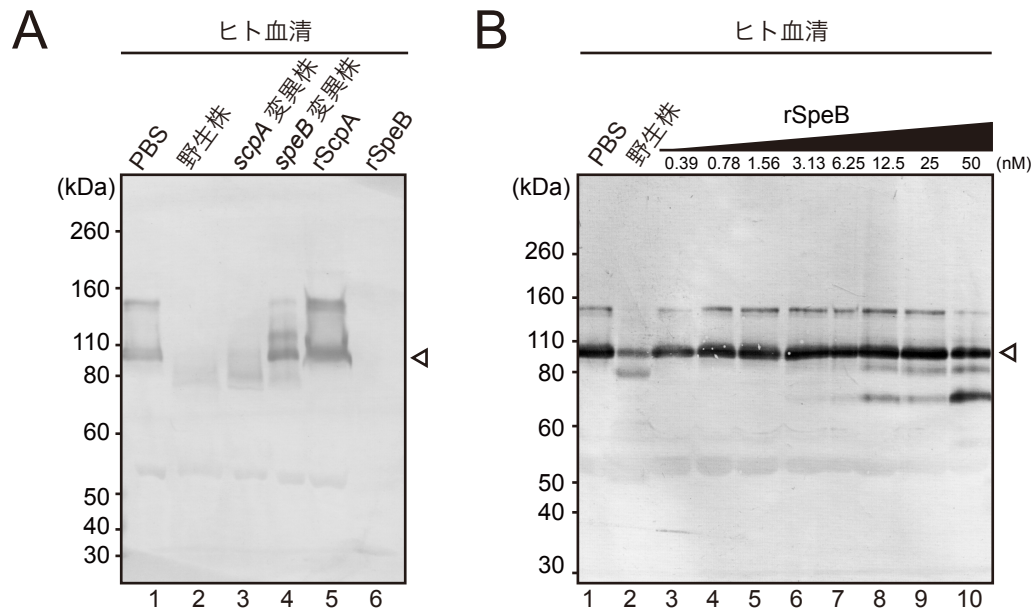


図 1. *S. pyogenes* の SpeB による C1-INH 分解能

(A) *S. pyogenes* 野生株, *scpA* 変異株, *speB* 変異株の培養上清ならびに rScpA, rSpeB をそれぞれ血清と 37°C にて 3 時間反応させ、ウェスタンブロット法により C1-INH を検出した。レーン 1, PBS (ネガティブコントロール)。レーン 2, 野生株培養上清。レーン 3, *scpA* 変異株培養上清。レーン 4, *speB* 変異株培養上清。レーン 5, 組換え (r) ScpA。レーン 6, rSpeB。(B) *S. pyogenes* 野生株の培養上清ならびに所定濃度の rSpeB をそれぞれヒト血清と 37°C にて 1 時間反応させ、ウェスタンブロット法により C1-INH を検出した。レーン 1, PBS。レーン 2, 野生株培養上清。レーン 3~10, PBS にて 2 倍ずつ段階希釈した rSpeB。図中の白三角 (◁) は C1-INH バンドを示す。

2. 種々の M 血清型 *S. pyogenes* における SpeB 産生量と C1-INH 分解能との関連性の検討

S. pyogenes は菌体表層に架橋する M タンパクの抗原性の違いから、130 種以上の血清型に分類されている。このうち臨床分離頻度が高い 10 種の M 血清型の菌株から培養上清画分を採取し、ウェスタンブロット法によりそれぞれの C1-INH 分解能を解析した(図 2A)。また、同じくウェスタンブロット法により、同株における SpeB 産生量をそれぞれ検出した(図 2B)。続いて、PVDF 膜上に検出されたバンド濃度をデンスitomーターで数値化し、各培養上清の C1-INH 分解能および各株の SpeB 産生量を比較した(図 2C)。その結果、培養上清画分における SpeB 産生量が多い株ほど C1-INH 分解能が高い傾向

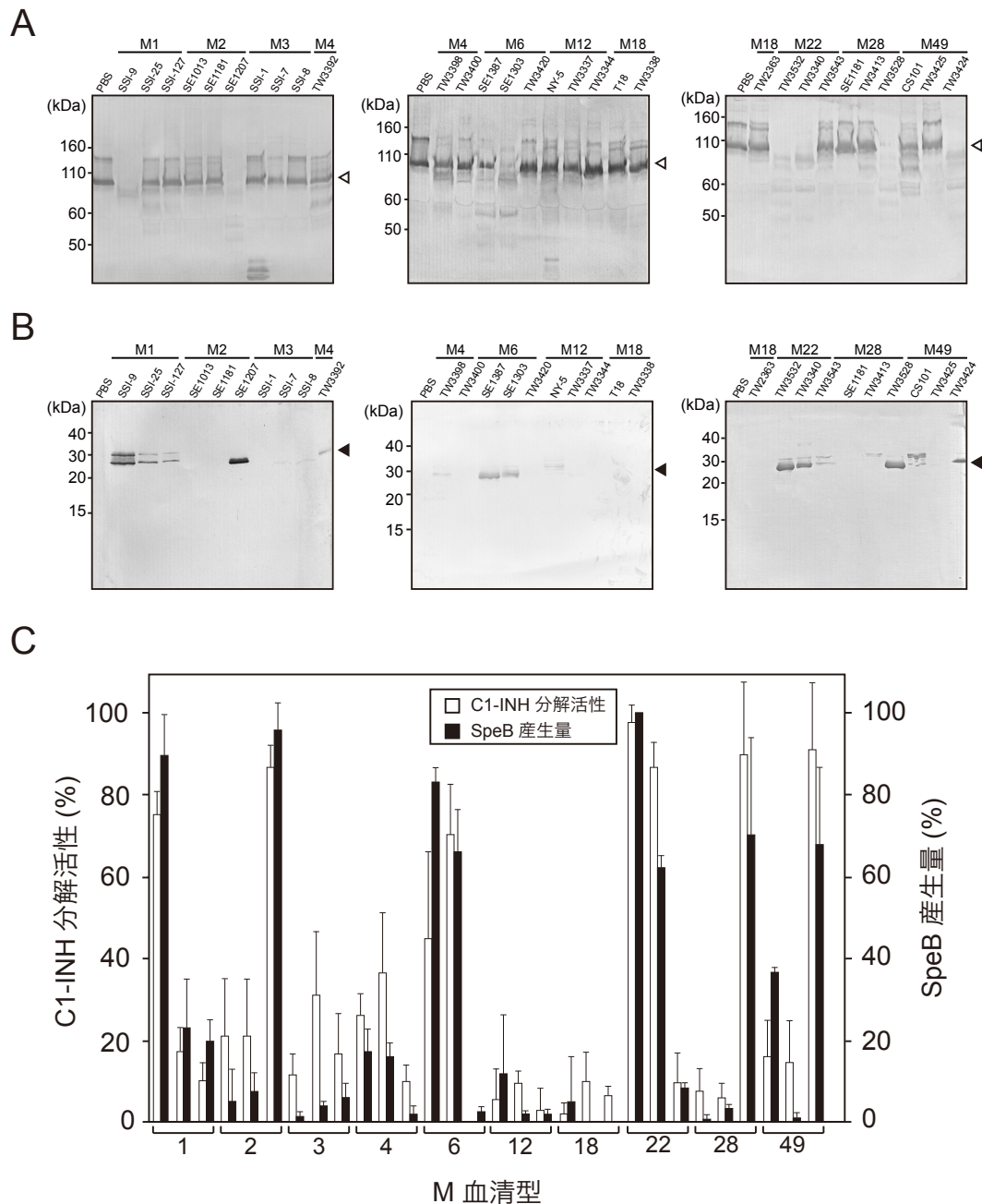


図 2. 種々の M 血清型の *S. pyogenes* 菌株における C1-INH 分解活性と SpeB 産生量との比較

10 種の M 血清型から 3 種ずつ計 30 株の臨床分離株の培養上清を回収した。(A) ヒト血清と 37°C にて 3 時間反応させ、ウェスタンブロット法を用いて C1-INH を検出した。(B) ウェスタンブロット法を用いて培養上清中の SpeB を検出した。(C) A, B にて得られた C1-INH および SpeB のタンパクバンド輝度をデンスitrometrick解析で数値化することにより、C1-INH 分解活性と SpeB 産生量を比較した。C1-INH 分解活性はオリジナルの C1-INH のバンド輝度を 0%, バックグラウンドを 100% として計算した (縦軸左)。SpeB 産生量については最大輝度を示した TW 3532 株 (M22) のバンドを 100%, バックグラウンドを 0% として計算した (縦軸右)。A, B については 3 回の実験を行った中の代表的なデータを示す。なお、白三角 (◁) は C1-INH バンドを、黒三角 (◄) は SpeB バンドを示す。C において、図中の縦棒は 3 回の実験における平均値を、誤差バーは標準偏差をそれぞれ示す。

が認められた。しかし、M3 型株の培養上清では比較的高い C1-INH 分解能を示したにも関わらず SpeB 産生は少量であった。なお、C1-INH 分解能は M 血清型に依存せず、個々の株において異なる C1-INH 分解能を示した。これらの結果から、*S. pyogenes* 培養上清による C1-INH 分解活性は SpeB 産生量に依存するが、一部の菌株においては SpeB 以外の因子が C1-INH 分解能に関与する可能性が示唆された。

3. SpeBによるC1-INH切断部位の決定

rSpeB と精製ヒト C1-INH を反応させ、ウェスタンブロット法により C1-INH 分解産物を検出した。3 種の分子量の分解産物が得られ、それぞれフラグメント 1 (F1, 80 kDa)、フラグメント 2 (F2, 60 kDa)、フラグメント 3 (F3, 50 kDa) とした。各バンド濃度をデンシトメーターで半定量し、分解前の C1-INH 量と各分解産物の産生量を比較した結果、C1-INH は SpeB の処理時間依存的に分解された (図 3A)。また、F1, F2, F3 はそれぞれ反応 50 分、1 時間、2 時間後において最大の濃度を示した。なお、F1 は反応 50 分後をピークにその後消失した。一方で、F2 および F3 は反応 1 時間後以降に検出された。以上の結果から、C1-INH には少なくとも 2 箇所以上の SpeB による切断部位が存在することが示唆された。デンシトメーターによる解析にて C1-INH と SpeB の反応後 1 時間で F1 の十分な産生と F2 および F3 の産生を確認したため、以後の実験に用いる反応時間として決定した (データは示さず)。

上記の結果を基に、rSpeB を精製ヒト C1-INH と 1 時間反応させ、ウェスタンブロット法により分解断片が C1-INH 由来であることを確認した (図 3B)。エドマン分解法を用いて、CBB 染色で明瞭に検出された F1 (80 kDa) ならびに F3 (50 kDa) の N 末端配

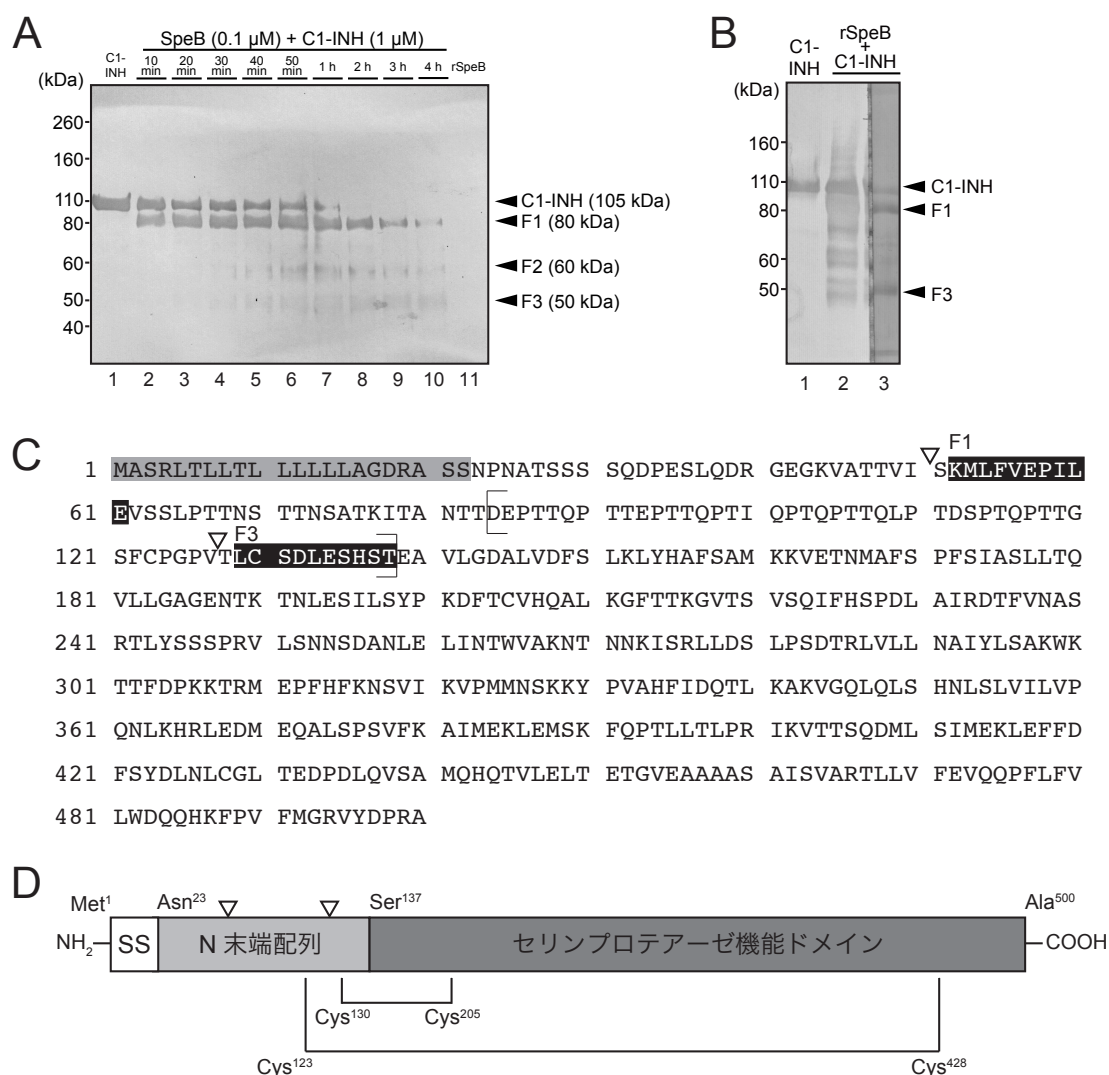


図 3. SpeB による C1-INH 切断部位の決定

(A) C1-INH と rSpeB を 37°C にて反応させ、ウェスタンブロット法にてそれぞれの反応液中の C1-INH を検出し、SpeB による C1-INH 分解産物の産生量を経時的に観察した。レーン 1, C1-INH, レー ン 2~10, C1-INH と rSpeB の反応物 (それぞれ反応時間は 10, 20, 30, 40, 50 分, 1, 2, 3, 4 時間), レー ン 11, rSpeB。4 つの黒矢頭は C1-INH ならびに SpeB により産生された C1-INH 分解断片の分子量を 示し、約 80 kDa, 60 kDa, 50 kDa の断片をそれぞれ F1, F2, F3 とした。(B) C1-INH と rSpeB を 37°C にて 1 時間反応させた。左部の PVDF 膜 (レーン 1, 2) では C1-INH をウェスタンブロット法 により検出した。右部の PVDF 膜は、CBB 溶液で染色し (レーン 3), 明瞭に得られた C1-INH 切断断 片 F1 ならびに F3 の N 末端アミノ酸配列をエドマン分解法により決定した。(C) C1-INH のアミノ酸 配列を示す。灰色の網掛部分はシグナル配列を、黒色の網掛部分はエドマン分解法により決定された C1-INH 分解産物 F1 ならびに F3 の N 末端アミノ酸配列を示す。本研究結果より得られた rSpeB によ る C1-INH 切断部位を白三角 (∇) で示す。括弧は C1-INH 欠損症患者において欠損するアミノ酸配列 を示す。(D) C1-INH の構造の模式図。図中の SS はシグナル配列を、白三角 (∇) は rSpeB による C1-INH 切断部位を示す。図下部の黒線は、C1-INH の N 末端配列とセリンプロテアーゼ機能ドメイン 間に存在する 2 つのジスルフィド結合 (Cys¹²³ と Cys⁴²⁸ 間, Cys¹³⁰ と Cys²⁰⁵ 間) を表す。

列を決定した (図 3C).

F1 ならびに F3 の N 末端配列はそれぞれ KMLFVEPILE ならびに LCSDLSEHST であり, C1-INH アミノ酸配列の一部である Lys⁵²-Glu⁶¹ ならびに Leu¹²⁹-Thr¹³⁸ と一致した. この結果より, SpeB による C1-INH 切断部位は Ile⁵⁰-Ser⁵¹ 間, ならびに Val¹²⁷-Thr¹²⁸ 間であることが明らかになった. また, F3 の N 末端アミノ酸配列は, C1-INH 欠損症患者におけるアミノ酸配列欠損部位である Asp⁸⁴-Thr¹³⁸ の一部と一致した²⁴. さらに F3 における SpeB による C1-INH 切断部位である Val¹²⁷-Thr¹²⁸ 間もまた, この C1-INH 欠損症患者におけるアミノ酸欠損配列の一部に含まれており, C1-INH の立体構造を維持するジスルフィド結合のひとつの近傍に存在していた (図 3D).

4. SpeB と血清中の C1-INH の相互作用が *S. pyogenes* の生存に及ぼす影響

C1-INH は補体古典経路ならびにレクチン経路を制御しているため, 宿主血清中の C1-INH の減少もしくは欠如が, *S. pyogenes* の生存に影響を及ぼす可能性が推測された. そこで, C1-INH 除去ヒト血清中における *S. pyogenes* 野生株および *speB* 変異株の生存率を算定し, ヒト血清ならびに C1-INH が *S. pyogenes* の生菌数に及ぼす影響を検討した (図 4). ヒト血清と反応させた *S. pyogenes* の生菌数は野生株と *speB* 変異株の両方において, 反応前と比較して有意に増加した ($p<0.01$). 特に, 野生株は *speB* 変異株と比較して有意に高い菌数増加率を示した ($p<0.01$). さらに, C1-INH 除去ヒト血清中における *speB* 変異株はヒト血清中ならびに C1-INH 再添加ヒト血清中と比較して有意に高い菌数増加率を示した ($p<0.01$). 一方, C1-INH 再添加血清中における *speB* 変異株の菌数増加率はヒト血清中と比較して有意差を認めなかった. C1-INH 除去ヒト血清中における野生株の菌数増加率は, C1-INH 再添加ヒト血清中と比較して有意差が認められな

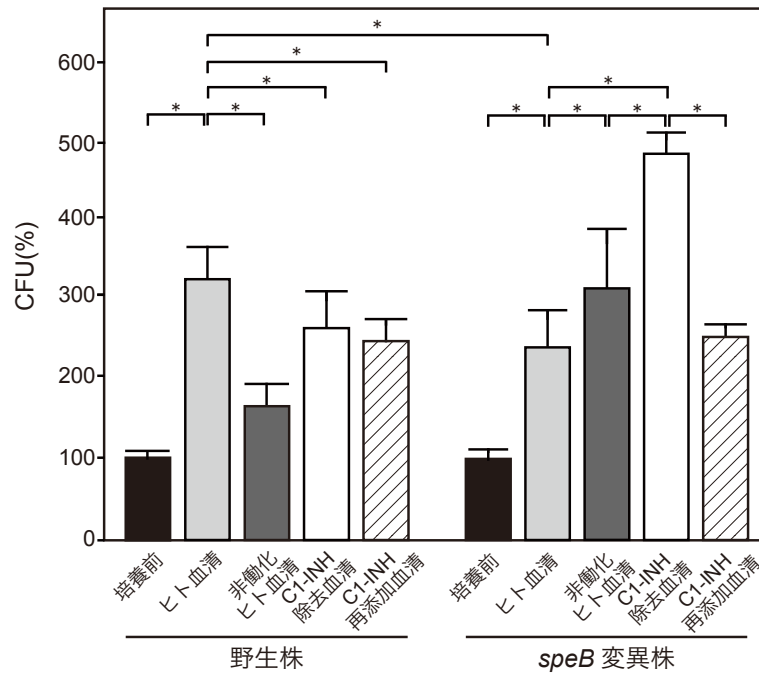


図 4. 野生株ならびに *speB* 変異株における血清中での生育率

S. pyogenes の野生株および *speB* 変異株を対数増殖期中期まで培養し、PBS にて菌数を $0.2 \sim 1 \times 10^4$ CFU/ml に調製した。続いてヒト血清、非働化血清、C1-INH 除去血清、もしくは C1-INH 再添加血清とそれぞれ 37°C にて 3 時間反応させた。得られた菌体は THY 寒天平板培地上に播種し、翌日 CFU を算定した。それぞれの菌株の血清との反応前における CFU を 100% とし、各々の血清中における CFU を増殖率として算出した。黒色、淡灰色、濃灰色、白色、斜線の縦棒がそれぞれ血清反応前、血清との反応後、非働化血清との反応後、C1-INH 除去血清との反応後、C1-INH 再添加血清との反応後の菌数増加率を表す。なお、3 回の実験を行い、最も代表的なデータを示す。誤差バーは標準偏差を表す ($n=6$)。* $p<0.01$

かった。一方、ヒト血清中における野生株の菌数増加率は C1-INH 除去血清中および C1-INH 再添加ヒト血清中と比較して有意に高かった。以上の結果から *SpeB* はヒト血清中の C1-INH を分解することにより *S. pyogenes* の生存に寄与することが示唆された。

続いて、野生株と *speB* 変異株に対するヒト血清中の補体成分の影響を検討するため、ヒト血清もしくは非働化ヒト血清中における両株の菌数増加率を算出し、比較した (図 4)。ヒト血清中の野生株は、非働化ヒト血清中と比較して有意に高い菌数増加率を示した ($p<0.01$)。一方、非働化ヒト血清中における *speB* 変異株の菌数増加率はヒト血清中と比較して有意に高かった。以上の結果から *SpeB* は、ヒト血清中の補体因子による菌の増殖抑制作用を阻害している可能性が示唆された。

5. 他の補体関連因子に対する SpeB の影響についての検討

SpeB が補体中の C1-INH 以外の補体関連因子に及ぼす影響を検討するため、各種精製補体因子をそれぞれ rSpeB と反応させ、SpeB による分解能を解析した (図 5)。その結果、SpeB は C2, C3b, C4, C5a, C6, C7, C8 β , C9 を直接的に分解することが明らかになった。なお、SpeB による C5b の分解は認められなかった (図 5A-I)。

さらに、合成 MAC を構築し SpeB による分解を検討した。MAC は C5b, C6, C7,

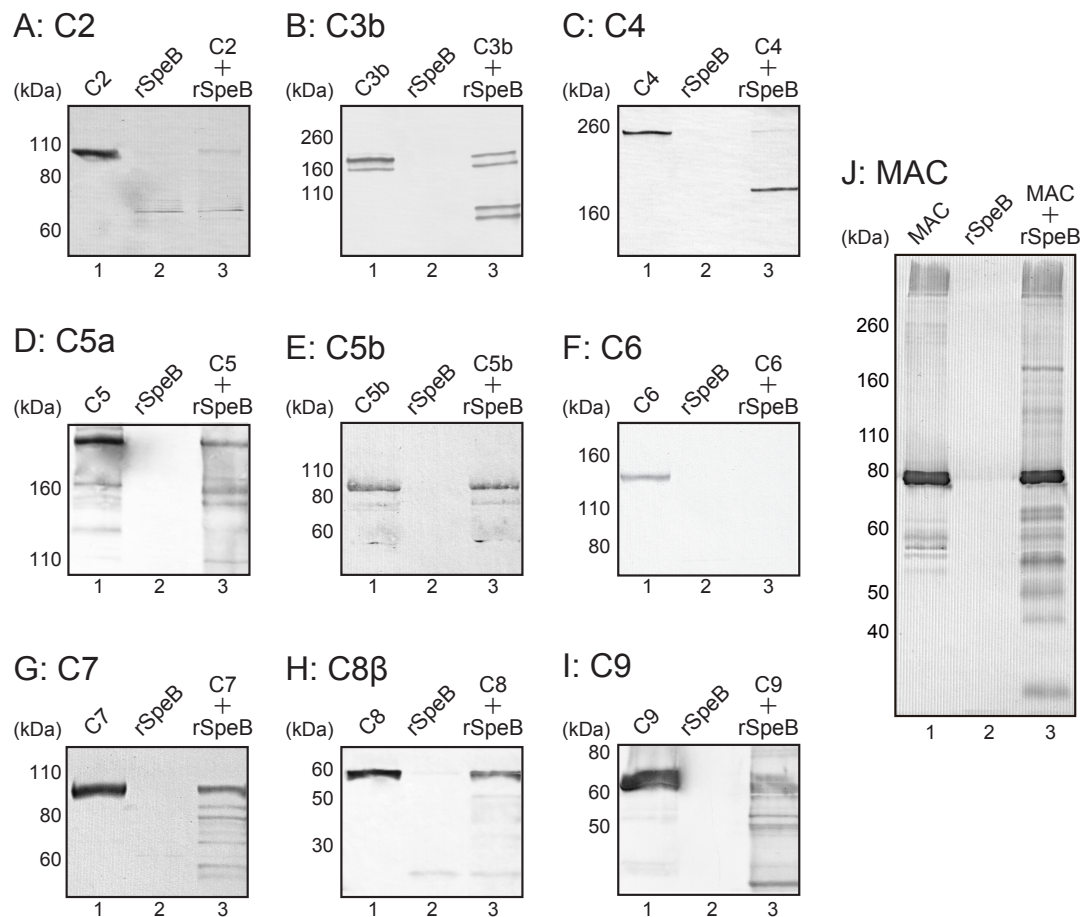


図 5. SpeB による種々の補体関連因子に対する分解活性の検索

rSpeB を精製 C2, C3b, C4, C5, C5b, C6, C7, C8, C9, ならびに形成した MAC と 37°C, 3 時間反応させた。ウェスタンブロット法によりそれぞれの補体因子の分解を確認した。それぞれ (A) C2, (B) C3b, (C) C4, (D) C5a, (E) C5b, (F) C6, (G) C7, (H) C8 β , (I) C9, (J) MAC に対する抗体を用いて検出した。レーン 1, それぞれの精製補体因子。レーン 2, rSpeB。レーン 3, それぞれの精製補体因子と rSpeB を反応させたサンプル。

C8 各 1 分子と、12~18 分子の C9 が会合して構成されるため¹⁰、見かけの分子量は理論上 1,412~1,938 kDa として検出される。従って、本結果では分子量マーカーの 260 kDa の上方のラダーバンドを推定 MAC とした。なお、本実験で使用した抗 MAC 抗体は、その作製にあたり S タンパク（ビトロネクチン）結合 MAC が抗原として使用された。そのため、PVDF 膜上の未処理 MAC のレーン（図 5J, レーン 1）ならびに MAC と rSpeB の反応物のレーン（図 5J, レーン 3）で認められた 80 kDa 付近のバンドは S タンパクを示すと推定された。未処理 MAC および rSpeB で処理した MAC のレーンにおいて MAC を示すラダーバンドを検出したが、rSpeB で処理した MAC のレーンでは 80 kDa に満たないサイズのバンドが複数検出された（図 5J）。この結果より、SpeB は MAC を直接的に分解することが示唆された。

6. 走査型電子顕微鏡によるヒト血清中での *S. pyogenes* 菌体表層構造の観察

ヒト血清中の補体因子が *S. pyogenes* の菌体表層構造に及ぼす影響を検索するために、ヒト血清と *S. pyogenes* 野生株および *speB* 変異株を 15, 30, 45 分もしくは 60 分間反応させ、走査型電子顕微鏡により各菌体を観察した（図 6）。野生株については、ヒト血清との反応 60 分後においても菌体表層構造に変化を認めなかった。一方、ヒト血清と 15 分間反応させた *speB* 変異株の表層には構造変化が認められなかったが、30 分経過後には菌体内容物が漏出している像が観察され、45 分経過後では菌体表層に孔の形成が認められた。さらに、血清反応 60 分後の *speB* 変異株の菌体表層では、菌体構造が顕著に破壊された像が観察された。以上の結果より、*S. pyogenes* は SpeB の補体分解作用により、血清中の補体による溶菌作用を回避している可能性が示唆された。

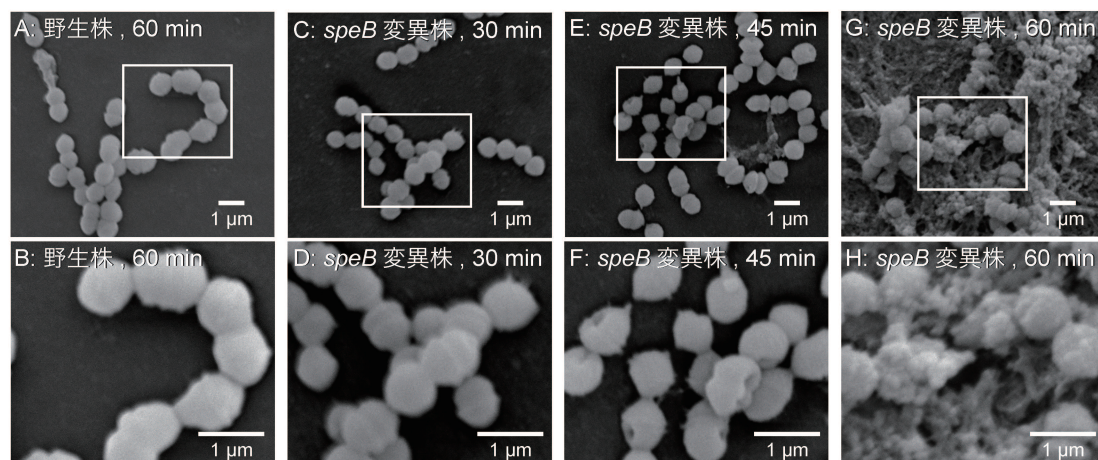


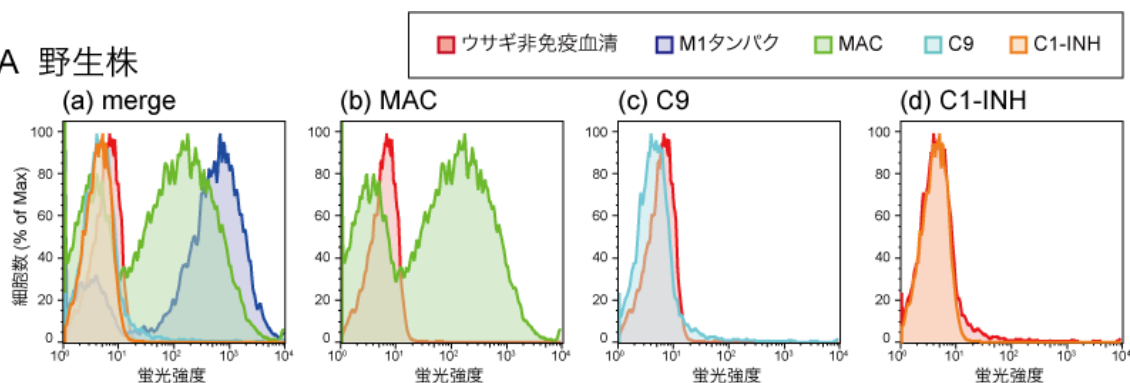
図 6. 走査型電子顕微鏡を用いた血清との反応後の菌体表層構造の観察

対数増殖期中期 ($OD_{600}=0.4$) の *S. pyogenes* 野生株および *speB* 変異株をヒト血清と 37°C にて反応させた。(A, B), ヒト血清との反応 60 分後の野生株。(C-H), 血清処理後の *speB* 変異株。それぞれ反応 30 分後 (C, D), 45 分後 (E, F), 60 分後 (G, H)。A, C, E, G は弱拡大像, B, D, F, H はそれぞれ A, C, E, G 白四角部分の強拡大像を示す。

7. フローサイトメトリーによる補体因子の *S. pyogenes* への会合量の解析

S. pyogenes への補体関連因子の会合に *SpeB* が及ぼす影響を検討した。フローサイトメトリーにより, *S. pyogenes* 野生株ならびに *speB* 変異株表層への MAC, C9 および C1-INH の会合を解析した (図 7)。野生株と *speB* 変異株の両株において MAC のヒストグラムのピークは右方移動を示したため, MAC は両株の菌体表層に会合していることが示唆された。一方, C9 のヒストグラムは *speB* 変異株のみにおいてピークの右方移動がみられ, 野生株ではピークの移動を認めなかった。以上の結果より, *SpeB* は C9 の菌体表層への会合を阻害することが示唆された。なお, C1-INH のヒストグラムについては野生株ならびに *speB* 変異株の両株でピークの移動が認められなかったことから, C1-INH は菌体表層に会合しないことが示された。

A 野生株



B *speB* 変異株

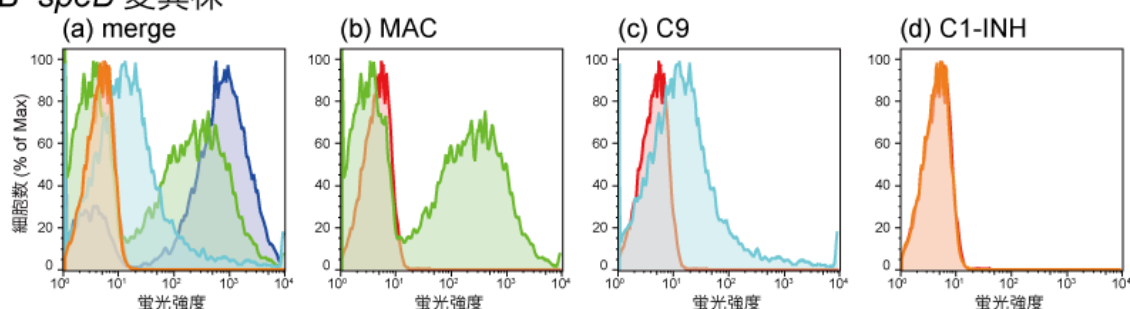


図7. フローサイトメトリーによる各種補体成分の菌体表層への会合の解析

対数増殖期中期の *S. pyogenes* 野生株および *speB* 変異株をそれぞれヒト血清と反応させ、ブロッキング液で処理した後、抗 MAC 抗体、抗 C9 抗体、抗 C1-INH 抗体とそれぞれ反応させた。ウサギ抗 M1 タンパク血清をポジティブコントロール、ウサギ非免疫血清をネガティブコントロールとして用いた。PBS 洗浄後、それぞれのサンプルは Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体にて処理し、フローサイトメトリーにより MAC、C9、C1-INH の菌体表層への会合量を評価した。(A, B)、菌体表層への補体成分の会合のヒストグラム(A, 野生株, B, *speB*変異株)。それぞれ(a) merge, (b) MAC, (c) C9, (d) C1-INH を表す。横軸は蛍光強度を、縦軸は 1 つの波形における最大のピークを 100% としたときの百分率を示す。

考察

S. pyogenes は種々の病原因子を保有しており、ヒト自然免疫ならびに獲得免疫を回避することにより宿主に定着し、感染を成立させる¹。同菌の主なシステインプロテアーゼである SpeB は、宿主因子のみならず種々の細菌因子を分解することが明らかにされている²⁵。本研究結果より、SpeB は補体関連因子 C1-INH, C2, C4, C5a, C6, C7, C8 ならびに C9 を分解することが示された。SpeB は C3b やプロペルジンの分解²¹⁻²³に加え、他の補体関連因子を分解することによりヒト補体免疫系に影響を及ぼすことが推察される。また、C5a を分解することが知られている ScpA については、図 1A に示す結果より C1-INH の分解には関与しないことを明らかにした。

種々の M 血清型の *S. pyogenes* 臨床分離株における C1-INH 分解能ならびに SpeB 産生量を比較したところ、SpeB 産生量の多い菌株は C1-INH 分解能が高い傾向を示した（図 2）。この結果より、SpeB が様々な M 血清型において C1-INH 分解に関与していることが示唆された。一方で、M3 型株である SSI-1, SSI-7, SSI-8 の 3 菌株では SpeB 産生能が低いにも関わらず比較的高い C1-INH 分解能を示した。また、図 1A に示した SSI-9 株についても、*speB* 変異株培養上清とヒト血清を反応させたところ 80 kDa 付近に微弱的な C1-INH 分解バンドを検出した。以上の結果から、*S. pyogenes* 培養上清による C1-INH の分解には SpeB 以外の病原因子も関与する可能性が示唆された。*speB* 遺伝子は全ての *S. pyogenes* に保存されているものの、SpeB タンパク質としては 25～40%の菌株で発現しないことが知られている^{26,27}。しかし、STSS 症例から分離された菌株には SpeB 非産生もしくは低産生株も含まれるため²⁷⁻³⁰、SpeB の機能を他のプロテアーゼが代替する可能性も考えられる。過去の報告より、*S. pyogenes* は SpeB の他にもシステインプロテ

アーゼである Immunoglobulin G-degrading enzyme of *S. pyogenes* (IdeS³¹; ホモログ名 Mac-1³², Sib35³³) を産生することが知られており, IdeS は SpeB と同様に IgG 分解能を有する. これまでに IdeS が IgG 以外の宿主タンパクを分解するという報告はないが, 本研究で用いた SpeB 低産生株の培養上清による C1-INH の分解には, 他のプロテアーゼの関与が推察される.

エドマン分解法を用いたアミノ酸配列解析により, SpeB は C1-INH の 2 つの部位を切断することが明らかになった. C1-INH はシグナル配列 (Met¹~Ser²²), N 末端配列 (Asp²³~His¹³⁶), Serpin 配列 (Ser¹³⁷~Ala⁵⁰⁰) から構成される. また, C1-INH は 2 つのジスルフィド結合によりその立体構造を維持しているが, このジスルフィド結合が欠失すると多量体を形成し機能活性を喪失する²⁴. SpeB による C1-INH 切断部位のひとつは一方のジスルフィド結合に近接していた. さらに, この切断部位は C1-INH 欠損症である遺伝性血管性浮腫 II 型患者におけるアミノ酸配列の欠損部位に含まれていた²⁴. これらの結果より, C1-INH は SpeB に切断されると立体構造が変化し機能が低下することが示唆された. さらに, STSS 患者への C1-INH 製剤の投与は補体カスケードの崩壊を阻止し, 補体系の恒常性維持に役立っている可能性があるとして推察された.

補体系は異物認識による抗原抗体複合体形成から開始する古典経路, 細菌表層のマンノースを認識するマンノース結合レクチンおよびフィコリンの結合から開始するレクチン回路, 細菌に直接 C3b が結合して開始する副経路からなる. 古典経路におけるセリンプロテアーゼである活性化 C1 複合体, レクチン経路におけるセリンプロテアーゼである MASP-1 ならびに MASP-2 が活性化すると C2 や C4 の代謝を惹起し, C3 分解酵素である C4b2a が C3 を C3a と C3b へと分解する³⁴. そして各補体成分量が補体制御因子により制御されることで, 補体経路活性化の均衡は維持される. ヒト血清中における

S. pyogenes の生存に対して C1-INH が及ぼす影響を検討したところ、*speB* 変異株ではヒト血清や C1-INH 再添加ヒト血清と比較して、C1-INH 除去ヒト血清中にて有意に生存菌数が増加した。その理由として、血清中の C1-INH 除去により補体カスケードが無秩序に活性化し各補体因子が過剰に消費された結果、必要な時機に MAC による殺菌反応が起こらず *speB* 変異株の生存に有利な環境が形成された可能性が考えられる。また、非働化ヒト血清では C1q ならびに Bb 因子が不活化されることで古典経路および副経路が阻害されるため、非働化血清と反応させた菌の生存率にはレクチン経路から開始する補体活性化経路の影響が反映される。*speB* 変異株においては非働化ヒト血清中での菌数増加率がヒト血清と比較して上昇し、野生株ではヒト血清中における菌数増加率が非働化ヒト血清と比較して高かった。これらの結果から、*SpeB* は古典経路および副経路を阻害することにより、*S. pyogenes* の補体免疫系回避に寄与することが示唆された。

野生株の *SpeB* は C1-INH を分解するため、ヒト血清ならびに C1-INH 除去血清中における生菌数は同等となることが予想されたが、ヒト血清中における生菌数は C1-INH 除去血清と比較して低下した。そして、非働化血清中における生菌数は C1-INH 除去血清中と比較してさらに低下した。*SpeB* は C1-INH 以外にも種々の補体関連因子を分解したことから、血清と反応させた野生株においては *SpeB* によって産生された血清中の各種補体関連因子の分解産物が菌の増殖に寄与した可能性が考えられる。加えて、ヒト血清中における野生株の菌数増加率が *speB* 変異株よりも高かったことから、野生株と反応させた血清中の補体成分が *SpeB* によって分解されることで、補体活性化経路が阻害された可能性も示唆された。また、*S. pyogenes* の *SpeB* は過去に免疫グロブリン (IgG) を分解することが報告されている³⁵⁻³⁷。従って、今回供試した野生株ならびに *speB* 変異株のヒト血清中における生菌数の差は、*SpeB* による IgG 分解に起因する可能性も考

えられる。

さらに，SpeB は MAC に対する分解能も示した．MAC はグラム陰性菌の細胞膜上に孔を形成し溶菌を促す作用を示すことが明らかにされているが³⁸，近年，グラム陰性菌と比較してペプチドグリカン層の厚いグラム陽性菌の細胞壁にも MAC が形成されることが報告されている^{39,40}．本研究においても走査型電子顕微鏡を用いた観察の結果，ヒト血清中のグラム陽性菌である *S. pyogenes speB* 変異株において MAC による孔形成を示すような菌体表層構造が確認された．*S. pyogenes* に対する MAC の関与についてはさらなる詳細な解析が必要であるが，今回の知見は MAC によるグラム陽性菌の殺菌メカニズムの一端を明らかにしたと考えられる．

フローサイトメトリー解析の結果より，MAC と菌体の会合は野生株ならびに *speB* 変異株の両株においてヒストグラムのピークの右方移動が認められた．一方，C9 のヒストグラムについては *speB* 変異株のみにおいてピークの右方移動が認められた．後期補体経路における MAC 形成は以下のメカニズムで起こる．C5 転換酵素により C5 が C5a ならびに C5b へと分解された後 C6, C7 と順次反応し，C5b7 複合体が形成される．C5b7 複合体が膜へと陥入し，C8, C9 が順次会合することで MAC が形成される^{41,42}．本実験において使用した抗 MAC 抗体は，C5b7 や C5b8 複合体のみならず SpeB によって分解された C5b8 複合体の断片を認識した結果，野生株においてもピークが右方移動した可能性がある．また，MAC 形成における C9 の重合には完全な C5b8 の構造が必要である⁴³．しかし，野生株においては SpeB により後期補体因子が分解を受け C9 の C5b8 複合体への重合が阻害された結果，野生株菌体表層への C9 の会合が抑制されたと推察される．一方，*speB* 変異株においては後期補体因子の分解が起こらず MAC が正常に形成された結果，C9 が菌体表層へ会合したと考えられる．C9 は MAC による溶菌作用の

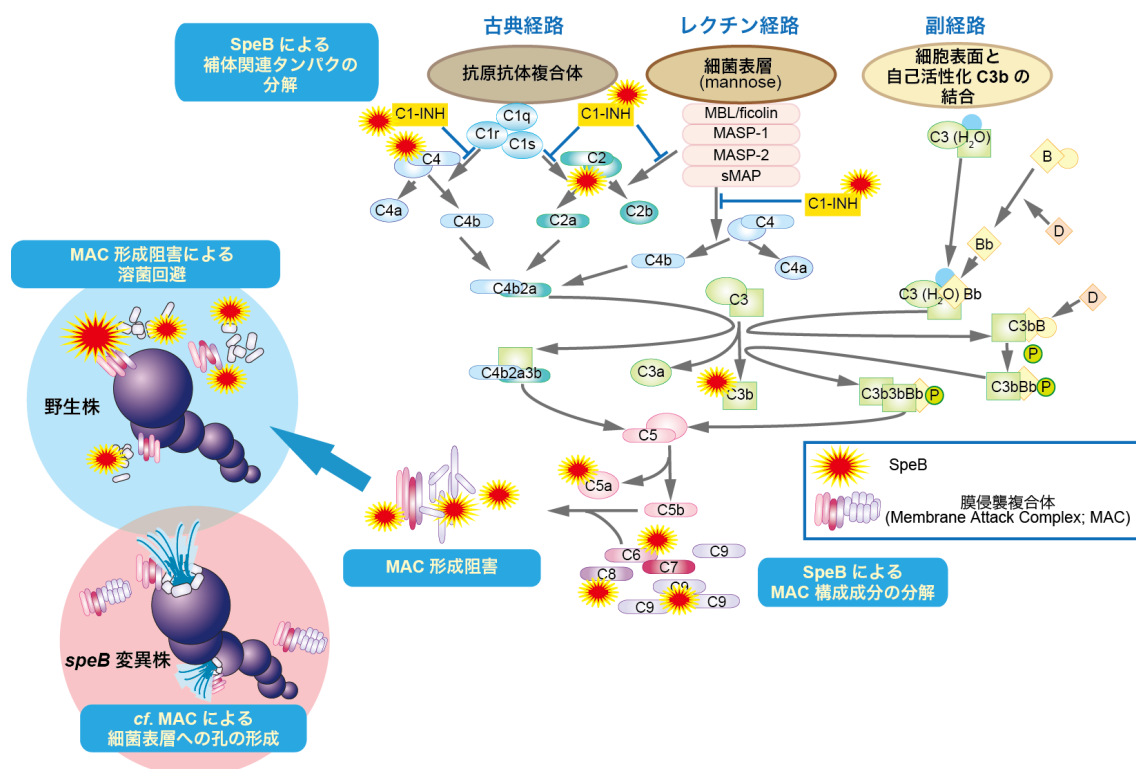


図 8. SpeB による *S. pyogenes* の補体免疫回避機構の模式図

SpeB は C1-INH をはじめとする種々の補体関連因子を分解することで、補体活性化経路における各因子の量的均衡を破壊する。さらに、SpeB は後期補体因子を分解することで MAC 形成を阻害する。以上のメカニズムにより、SpeB は MAC による溶菌作用を回避すると考えられる。

主役を担うことから⁴⁴、この結果は *speB* 変異株における菌体表層の孔様構造の形成ならびにヒト血清中における同株の低い菌数増加率に裏付けられると考えられる。以上の結果より、SpeB は補体系の各因子を分解することにより補体免疫系を阻害し、*S. pyogenes* の宿主免疫機構からの回避を可能にすることが示唆された。本研究より推定される SpeB による *S. pyogenes* の補体免疫回避機構を図 8 に示す。

S. pyogenes は化学療法薬に対する耐性菌の出現頻度が少なく、ペニシリン系化学療法薬による制御が可能であるにも関わらず、STSS による致死率は約 20～50%であり非常に高率である⁵⁻⁸。STSS の重篤な症状は広範な炎症症状による全身毒性や組織障害が主な原因であることから⁴⁵ 一般的に炎症症状を軽減する目的で IgG 製剤が補助療法として投与されているが⁴⁶⁻⁴⁹、STSS の制御においてより効果が期待できる治療法の確立は重

要な課題のひとつである。C1-INH が STSS 治療の補助療法の候補として注目された理由は C1-INH が補体系ならびに血液凝固系を制御する点であった。また、STSS 患者の血漿中では C1-INH 量が減少するため血液凝固系の過亢進が起こり、STSS の病態のひとつである毛細血管漏出症候群を引き起こすと推察されている⁹。しかし、*S. pyogenes* 感染時の血液凝固系に対する C1-INH 製剤の実際の作用機序は解析されていない。STSS 患者への臨床応用についても未だ検証段階である。その一方で、*S. pyogenes* の SpeB については STSS における組織傷害に関与することが報告されている^{45, 50}。STSS では毛細血管漏出症候群の発症に伴い補体因子を含む血漿中タンパクが組織内へと移行する。それに続発する組織傷害は補体系の過剰な活性化が一因であると考えられる⁵¹。この補体系活性化の亢進には、本研究で明らかにした SpeB による各種補体因子の分解による量的均衡の破綻が関与すると推測している。

C1-INH 製剤投与の有効性は、他の病原微生物感染症においても散見される⁵²⁻⁵⁷。特にグラム陰性菌に対する作用機序については、マウスモデルを用いた研究において C1-INH が *Salmonella enterica*, *E. coli* O55:B5, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* および *Serratia marcescens* の LPS に結合し炎症性サイトカイン産生を抑制する結果、菌感染マウスの生存率を向上させることが報告されている⁵⁷。さらに、*E. coli* O157:H7 の産生するメタロプロテアーゼ StcE は C1-INH を分解することで補体免疫を回避することが明らかにされており^{56, 58}、今回報告した SpeB による C1-INH への作用と類似している。本研究で示された SpeB と C1-INH の相互作用は、化膿レンサ球菌感染症に対する C1-INH 製剤の作用機序の科学的根拠となるだろう。STSS 患者への臨床応用についても現時点で不足している臨床治験が今後十分に行われその有効性が提示できれば、本研究で示した作用機序に基づいた新たな治療法の確立につながると考える。

謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、終始ご懇意なるご指導とご鞭撻を賜りました口腔分子感染制御学講座 川端 重忠 教授に深甚なる謝意を心より表します。また、口腔分子感染制御学講座での研究遂行を快諾して頂き、様々な助言を賜りました顎口腔機能再建学講座 前田 芳信 教授に深く感謝申し上げます。

本研究の進行の終始にわたり、直接のご指導とご鞭撻ならびに多くのご教示を賜りました新潟大学 大学院医歯学総合研究科 微生物感染症学分野 寺尾 豊 教授、大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 住友 倫子 助教に心より感謝申し上げます。本研究に対してご懇意なるご指導を賜りました口腔分子感染制御学講座 中田 匡宣 准教授に感謝申し上げます。また、本研究を行うにあたり、ご協力とご支援をいただきました顎口腔機能再建学講座 池邊 一典 講師に感謝申し上げます。本研究を行うに際し、様々なご教示をいただいた口腔分子感染制御学講座 山口 雅也 助教、チューリッヒ大学病院 感染症学講座 Annelies S. Zinkernagel 博士に感謝申し上げます。公私にわたり、幅広いご協力とご支援をいただいた顎口腔機能再建学講座 小川 泰治 博士に心より感謝致します。

最後に、本研究を行うに際し、ご理解とご協力を頂きました口腔分子感染制御学講座ならびに顎口腔機能再建学講座の皆様には厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. Cunningham MW (2000) Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clin Microbiol Rev 13: 470-511.
2. Moses AE, Wessels MR, Zalcman K, Alberti S, Natanson-Yaron S, Menes T, Hanski E (1997) Relative contributions of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence in a mucoid strain of the group A *Streptococcus*. Infect Immun 65: 64-71.
3. Akesson P, Sjöholm AG, Björck L (1996) Protein SIC, a novel extracellular protein of *Streptococcus pyogenes* interfering with complement function. J Biol Chem 271: 1081-1088.
4. Ji Y, McLandsborough L, Kondagunta A, Cleary PP (1996) C5a peptidase alters clearance and trafficking of group A streptococci by infected mice. Infect Immun 64: 503-510.
5. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M (2005) The global burden of group A streptococcal diseases. Lancet Infect Dis 5: 685-694.
6. Davies HD, McGeer A, Schwartz B, Green K, Cann D, Simor AE, Low DE (1996) Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. Ontario Group A Streptococcal Study Group. N Engl J Med 335: 547-554.
7. McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM (2001) Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update. Annu Rev Microbiol 55: 77-104.
8. O'Loughlin RE, Roberson A, Cieslak PR, Lynfield R, Gershman K, Craig A, Albanese BA, Farley MM, Barrett NL, Spina NL, Beall B, Harrison LH, Reingold A, Van Beneden C, Active Bacterial Core Surveillance T (2007) The epidemiology of invasive group A streptococcal infection and potential vaccine implications: United States, 2000-2004. Clin Infect Dis 45: 853-862.
9. Fronhoffs S, Luyken J, Steuer K, Hansis M, Vetter H, Walger P (2000) The effect of C1-esterase inhibitor in definite and suspected streptococcal toxic shock syndrome. Report of seven patients. Intensive Care Med 26: 1566-1570.
10. Muller-Eberhard HJ (1988) Molecular organization and function of the complement system. Annu Rev Biochem 57: 321-347.
11. van der Graaf F, Koedam JA, Bouma BN (1983) Inactivation of kallikrein in human plasma. J Clin Invest 71: 149-158.
12. Castelli R, Zanichelli A, Cugno M (2013) Therapeutic options for patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiencies: from pathophysiology to the clinic. Immunopharmacol

- Immunotoxicol 35: 181-190.
13. Brosnahan AJ, Schlievert PM (2011) Gram-positive bacterial superantigen outside-in signaling causes toxic shock syndrome. *FEBS J* 278: 4649-4667.
 14. Terao Y, Kawabata S, Kunitomo E, Murakami J, Nakagawa I, Hamada S (2001) 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. *Mol Microbiol* 42: 75-86.
 15. Okamoto S, Kawabata S, Terao Y, Fujitaka H, Okuno Y, Hamada S (2004) The *Streptococcus pyogenes* capsule is required for adhesion of bacteria to virus-infected alveolar epithelial cells and lethal bacterial-viral superinfection. *Infect Immun* 72: 6068-6075.
 16. Terao Y, Yamaguchi M, Hamada S, Kawabata S (2006) Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from neutrophils. *J Biol Chem* 281: 14215-14223.
 17. Terao Y (2012) The virulence factors and pathogenic mechanisms of *Streptococcus pyogenes*. *J Oral Biosci* 54: 96–100.
 18. Yamaguchi M, Terao Y, Mori Y, Hamada S, Kawabata S (2008) PfbA, a novel plasmin- and fibronectin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*, contributes to fibronectin-dependent adhesion and antiphagocytosis. *J Biol Chem* 283: 36272-36279.
 19. Terao Y, Okamoto S, Kataoka K, Hamada S, Kawabata S (2005) Protective immunity against *Streptococcus pyogenes* challenge in mice after immunization with fibronectin-binding protein. *J Infect Dis* 192: 2081-2091.
 20. Chen CC, Cleary PP (1990) Complete nucleotide sequence of the streptococcal C5a peptidase gene of *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* 265: 3161-3167.
 21. Kuo CF, Lin YS, Chuang WJ, Wu JJ, Tsao N (2008) Degradation of complement 3 by streptococcal pyrogenic exotoxin B inhibits complement activation and neutrophil opsonophagocytosis. *Infect Immun* 76: 1163-1169.
 22. Terao Y, Mori Y, Yamaguchi M, Shimizu Y, Ooe K, Hamada S (2008) Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion of innate immunity. *J Biol Chem* 283: 6253-6260.
 23. Tsao N, Tsai WH, Lin YS, Chuang WJ, Wang CH, Kuo CF (2006) Streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves properdin and inhibits complement-mediated opsonophagocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 779-784.

24. Bos IG, Lubbers YT, Roem D, Abrahams JP, Hack CE, Eldering E (2003) The functional integrity of the serpin domain of C1-inhibitor depends on the unique N-terminal domain, as revealed by a pathological mutant. *J Biol Chem* 278: 29463-29470.
25. Nelson DC, Garbe J, Collin M (2011) Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* - a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biol Chem* 392: 1077-1088.
26. Chaussee MS, Liu J, Stevens DL, Ferretti JJ (1996) Genetic and phenotypic diversity among isolates of *Streptococcus pyogenes* from invasive infections. *J Infect Dis* 173: 901-908.
27. Talkington DF, Schwartz B, Black CM, Todd JK, Elliott J, Breiman RF, Facklam RR (1993) Association of phenotypic and genotypic characteristics of invasive *Streptococcus pyogenes* isolates with clinical components of streptococcal toxic shock syndrome. *Infect Immun* 61: 3369-3374.
28. Kansal RG, McGeer A, Low DE, Norrby-Teglund A, Kotb M (2000) Inverse relation between disease severity and expression of the streptococcal cysteine protease, SpeB, among clonal M1T1 isolates recovered from invasive group A streptococcal infection cases. *Infect Immun* 68: 6362-6369.
29. Shiseki M, Miwa K, Nemoto Y, Kato H, Suzuki J, Sekiya K, Murai T, Kikuchi T, Yamashita N, Totsuka K, Ooe K, Shimizu Y, Uchiyama T (1999) Comparison of pathogenic factors expressed by group A Streptococci isolated from patients with streptococcal toxic shock syndrome and scarlet fever. *Microb Pathog* 27: 243-252.
30. Hsueh PR, Wu JJ, Tsai PJ, Liu JW, Chuang YC, Luh KT (1998) Invasive group A streptococcal disease in Taiwan is not associated with the presence of streptococcal pyrogenic exotoxin genes. *Clin Infect Dis* 26: 584-589.
31. von Pawel-Rammingen U, Johansson BP, Bjorck L (2002) IdeS, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G. *EMBO J* 21: 1607-1615.
32. Lei B, DeLeo FR, Hoe NP, Graham MR, Mackie SM, Cole RL, Liu M, Hill HR, Low DE, Federle MJ, Scott JR, Musser JM (2001) Evasion of human innate and acquired immunity by a bacterial homolog of CD11b that inhibits opsonophagocytosis. *Nat Med* 7: 1298-1305.
33. Kawabata S, Tamura Y, Murakami J, Terao Y, Nakagawa I, Hamada S (2002) A novel, anchorless streptococcal surface protein that binds to human immunoglobulins. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 1329-1333.
34. Sim RB, Tsiftoglou SA (2004) Proteases of the complement system. *Biochem Soc Trans*

- 32: 21-27.
35. Collin M, Olsen A (2001) EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. EMBO J 20: 3046-3055.
 36. Collin M, Olsen A (2001) Effect of SpeB and EndoS from *Streptococcus pyogenes* on human immunoglobulins. Infect Immun 69: 7187-7189.
 37. Eriksson A, Norgren M (2003) Cleavage of antigen-bound immunoglobulin G by SpeB contributes to streptococcal persistence in opsonizing blood. Infect Immun 71: 211-217.
 38. Tomlinson S, Taylor PW, Morgan BP, Luzio JP (1989) Killing of gram-negative bacteria by complement. Fractionation of cell membranes after complement C5b-9 deposition on to the surface of *Salmonella minnesota* Re595. Biochem J 263: 505-511.
 39. Blom AM, Bergmann S, Fulde M, Riesbeck K, Agarwal V (2014) *Streptococcus pneumoniae* phosphoglycerate kinase is a novel complement inhibitor affecting the membrane attack complex formation. J Biol Chem 289: 32499-32511.
 40. Berends ET, Dekkers JF, Nijland R, Kuipers A, Soppe JA, van Strijp JA, Rooijackers SH (2013) Distinct localization of the complement C5b-9 complex on Gram-positive bacteria. Cell Microbiol 15: 1955-1968.
 41. Esser AF (1994) The membrane attack complex of complement. Assembly, structure and cytotoxic activity. Toxicology 87: 229-247.
 42. Kinoshita T (1991) Biology of complement: the overture. Immunol Today 12: 291-295.
 43. Podack ER, Tschoop J, Muller-Eberhard HJ (1982) Molecular organization of C9 within the membrane attack complex of complement. Induction of circular C9 polymerization by the C5b-8 assembly. J Exp Med 156: 268-282.
 44. DiScipio RG, Berlin C (1999) The architectural transition of human complement component C9 to poly(C9). Mol Immunol 36: 575-585.
 45. Johansson L, Thulin P, Low DE, Norrby-Teglund A (2010) Getting under the skin: the immunopathogenesis of *Streptococcus pyogenes* deep tissue infections. Clin Infect Dis 51: 58-65.
 46. Linner A, Darenberg J, Sjolín J, Henriques-Normark B, Norrby-Teglund A (2014) Clinical efficacy of polyspecific intravenous immunoglobulin therapy in patients with streptococcal toxic shock syndrome: a comparative observational study. Clin Infect Dis 59: 851-857.
 47. Darenberg J, Ihendyane N, Sjolín J, Aufwerber E, Haidl S, Follin P, Andersson J, Norrby-Teglund A, StreptIg Study G (2003) Intravenous immunoglobulin G therapy in streptococcal toxic shock syndrome: a European randomized, double-blind,

- placebo-controlled trial. Clin Infect Dis 37: 333-340.
48. Baxter F, McChesney J (2000) Severe group A streptococcal infection and streptococcal toxic shock syndrome. Can J Anaesth 47: 1129-1140.
 49. Barry W, Hudgins L, Donta ST, Pesanti EL (1992) Intravenous immunoglobulin therapy for toxic shock syndrome. JAMA 267: 3315-3316.
 50. Olsen RJ, Sitkiewicz I, Ayeras AA, Gonulal VE, Cantu C, Beres SB, Green NM, Lei B, Humbird T, Greaver J, Chang E, Ragasa WP, Montgomery CA, Cartwright J Jr, McGeer A, Low DE, Whitney AR, Cagle PT, Blasdel TL, DeLeo FR, Musser JM (2010) Decreased necrotizing fasciitis capacity caused by a single nucleotide mutation that alters a multiple gene virulence axis. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 888-893.
 51. Nuijens JH, Eerenberg-Belmer AJ, Huijbregts CC, Schreuder WO, Felt-Bersma RJ, Abbink JJ, Thijs LG, Hack CE (1989) Proteolytic inactivation of plasma C1- inhibitor in sepsis. J Clin Invest 84: 443-450.
 52. Liu D, Lu F, Qin G, Fernandes SM, Li J, Davis AE 3rd (2007) C1 inhibitor-mediated protection from sepsis. J Immunol 179: 3966-3972.
 53. Liu D, Zhang D, Scafidi J, Wu X, Cramer CC, Davis AE 3rd (2005) C1 inhibitor prevents Gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced vascular permeability. Blood 105: 2350-2355.
 54. Jansen PM, Eisele B, de Jong IW, Chang A, Delvos U, Taylor FB Jr, Hack CE (1998) Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock. J Immunol 160: 475-484.
 55. Zwijnenburg PJ, van der Poll T, Florquin S, Polfliet MM, van den Berg TK, Dijkstra CD, Roord JJ, Hack CE, van Furth AM (2007) C1 inhibitor treatment improves host defense in pneumococcal meningitis in rats and mice. J Infect Dis 196: 115-123.
 56. Alvin E, Davis AE 3rd, Fengxin Lu, Pedro Mejia (2010) C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. Thromb Haemost 104: 886-893.
 57. Mejia P, Davis AE 3rd (2012) C1 inhibitor suppresses the endotoxic activity of a wide range of lipopolysaccharides and interacts with live gram-negative bacteria. Shock 38: 220-225.
 58. Lathem WW, Grys TE, Witowski SE, Torres AG, Kaper JB, Tarr PI, Welch RA (2002) StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. Mol Microbiol 45: 277-288.