

第23回麻布環境科学研究会 講演 A6

A群レンサ球菌の産生するストレプトリジンOの 2次元電気泳動法による解析

田中 秀幸, 坂口 和子, 鈴木 潤

麻布大・環境保健学・病態生化学

【目的】

近年A, CおよびG群レンサ球菌の感染を基礎とする軟部組織炎を伴う敗血症性ショック症状を呈する症例が世界各地で報告されている。この中でA群レンサ球菌による敗血症性ショックは我が国では劇症型A群レンサ球菌感染症と呼称され、また人喰いバクテリアとして本症候群は注目されている。劇症型A群レンサ球菌感染症の出現については不明な点が多く、その発症要因の解明が急務である。そこで病原因子の一つである細胞障害性毒素ストレプトリジンO (SLO) およびストレプトリジンS (SLS) の性状解析を目的にA群レンサ球菌が菌体外に産生する物質をマイクロ2次元電気泳動法 (M2D-PAGE) で分離させ、さらに赤血球寒天平板重層法によるザイモグラム分析を行った。今回は、これまでに報告したSLO2量体の存在に加えてSLS結合SLO2量体の存在を確認した。さらに、2量体SLO間の結合様式および、立体構造より発症要因の検討を行った。

【方法】

A群レンサ球菌の同一株 (Streptococcus pyogenes SS 265 A群3型菌) をTodd-Hewitt broth (Difco社製) で培養し、上清をLabo-Module法 (6000-molecular-weight cut off size: Asahi chemical社製) により40倍に濃縮し蒸留水で透析した培養上清を粗毒素とした。そして粗毒素に対して40% (w/v) になるようにショ糖を添加したものを電気泳動試料とした。これらを-40℃で凍結保存し、用時解凍して用いた。また結合解離実験で前処理を行ったものはショ糖添加後の試料に対して1:1で処理剤を混合し、37℃で30

分間インキュベートした後、試料として用いた。

試薬ならびにM2D-PAGEについては真鍋等¹⁾の方法を基に試料に適した両性担体や泳動時間を設定した。また、M2D-PAGE後の溶血毒素の検出法として2.5%ウサギ赤血球寒天平板を用いたザイモグラム分析²⁾を行った。

【結果】

SLOおよびSLS混在粗毒素調整試料を用いてM2D-PAGE後にザイモグラム分析を行うとSLO2量体が検出された。その性状は2メルカプトエタノール (2-ME) に依存性であったが γ -Gによって毒素中和されなかった。また別の試料を用いるとSLO2量体で2-MEに非依存性であり、 γ -Gによって毒素中和されないSLO2量体が検出された。この2-MEに非依存的なSLO2量体はSLOの性状とは異なり、SLSと同じ性状を示しているため、SLSがSLO2量体に結合しているものと考えられる。SLOは単量体での多様性²⁾のみならず、SLO2量体での多様性も示された。

同じ試料を用いてSLO2量体の結合様式を知るために各種化学結合を解離させる実験を行った。粗毒素試料に対して尿素、2-ME、硫酸、および各種pHクエン酸緩衝液をそれぞれ加えた。この操作により、水素結合、ジスルフィド結合、疎水結合、およびイオン結合を解離させ2量体を単量体に変化させる実験を試みたが、結合を解離させる決定的な実験結果は得ることができなかった。

【考察】

今回SLO2量体にSLSが結合した毒素が新たに検

出された。SLSが含まれている粗毒素でも SLO2 量体-SLS 複合体が検出されない試料もあることから、SLO2 量体であっても SLS の結合は一様でないことが示された。

また、SLO2 量体の結合を解離させる実験を試みたが化学結合を解離する結果が得られなかった。これは、検出方法が溶血活性を利用した方法であり、SDS のような強力な解離剤を用いることができず、温和な解離剤しか用いることができなかつたこと、および結合自体が強固なものであるという二つの理由が考えられる。

さらに結合様式を考えるために SLO がコレステロール結合細胞障害性毒素 (CBC) ファミリーであることから、CBC ファミリーで分子構造が決定しているパーフリンゴリジン O (PFO) を公開分子グラフィックスソフト RasMol³⁾ とプロテインデータバンクに登録されている分子構造ファイル⁴⁾等を参考に SLO2 量体の立体構造を推察した。そして、図 1-A で

示すような 2 量体構造を推察した。この構造は、毒素分子同士が向き合うことにより γ -G の結合サイトが隠され、毒素中和が行われにくくなる構造と考えられる。また、重合して孔を形成する段階では図 1-B の構造が考えられる。しかし、図 1-B では γ -G の結合サイトは隠されず毒素中和を受けることから、溶液中では図 1-A の構造をとり膜結合時に毒素分子は疎水性の微小環境に対応して分子形態が図 1-A から図 1-B の様に変化し、分子重合を促進し孔を形成する事が示唆される。

いずれの SLO2 量体において毒素中和されないという知見は、A 群レンサ球菌感染症の発症要因解明において有用であると考えられる。

【参考文献】

- 1) Manabe T. et al. Electrophoresis, 1985, 6: 462-7
- 2) Suzuki J. Infect Immun, 1988, 56: 2474-8
- 3) Roger S. et al. Trends in Biochemical Sciences, 1955, 20: 374
- 4) Rossjohn J. et al. Cell, 1997, 89: 685-92

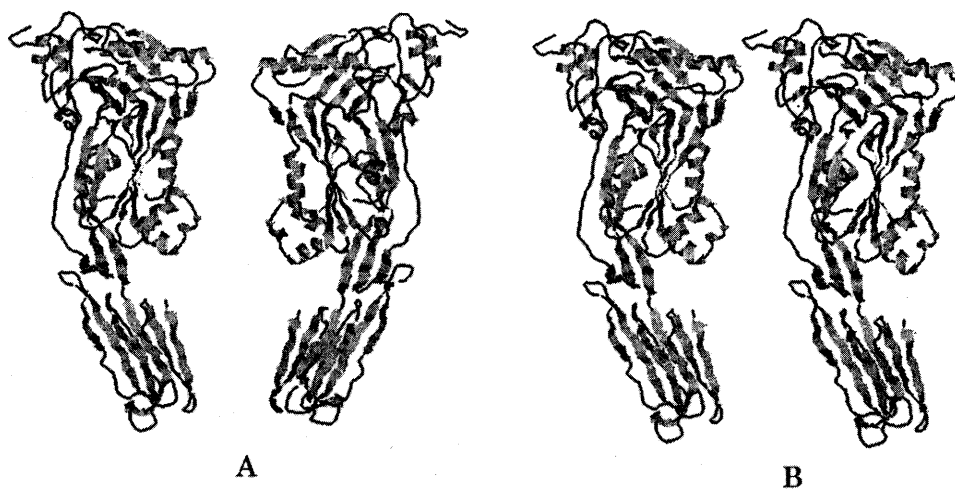


図1 PFOを用いたSLO2量体構造の推定