

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590452
 研究課題名（和文）劇症型 A 群連鎖球菌によって菌体外に分泌される Nga タンパク質の機能解析
 研究課題名（英文）Characterization of the NAD-glycohydrolase in streptococcal strains

研究代表者

立野 一郎（TATSUNO ICHIRO）
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：50311642

研究成果の概要：A 群連鎖球菌は近年（1900 年以降）劇症型感染症の起因菌となる例が報告されるようになった。これは、本菌が新たな外来病原因子を獲得したためである可能性が指摘されている。本菌によって菌体外に分泌される NAD-glycohydrolase (NADase or Nga) はその候補の一つである。そこで本研究では、当初の計画通り実験を行い、①マウスモデルを用いて *nga* 遺伝子欠損株が劇症型感染症に関する病原性が低下する、②酵素活性に重要なアミノ酸残基（330 番目）の同定、③本酵素活性を阻害するタンパク質を使用することによる本菌病原性の抑制、などの研究成果を得た。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：NADase, Nga, IFS, A 群連鎖球菌、A 群レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

A 群連鎖球菌は、古くから咽頭炎、猩紅熱、丹毒、産褥熱、リウマチ熱、急性糸球体腎炎などの原因菌として知られていた。近年猩紅熱以下の古典的症例が減少する一方、再興感染症として劇症型感染症（人喰いバクテリア）の起因菌となる例が増加している（現代医学 51 巻 2 号 2003, 243-251）。劇症型感染症は

全身の様々な臓器の重篤な病態を引き起こす病気であり、治療（抗生物質投与など）を施しても 50% 程度が死に至る恐ろしい病気である。中でも筋肉が急に腫れ数時間から数日のうちにどんどん壊死していく壊死性筋膜炎は典型的な症状である（Clin Microbiol Rev, 2000, 13:470-511）。この壊死性筋膜炎の侵食速度は他に類を見ないほど早く 1 時間に

2.5cm の速度で壊疽を起こさせるという報告もあるが、そのメカニズムはほとんど不明である。これに関与する細菌側因子の候補の一つとして、NAD-glycohydrolase (Nga) を挙げることができる。NgaはA群連鎖球菌によって菌体外に分泌されるタンパク質(約450アミノ酸)で、in vitro の実験において培養細胞に対し障害活性を示す。また、Ngaは細菌自身にとっても毒性を発揮するので、菌自身はIFSタンパク質を発現することによりNga の毒性を中和する。但し、IFSは分泌されず、Nga のみが分泌される。この毒素活性故 Nga は菌が引き起こす劇症型感染症に関与していると思われるが、直接的な証拠はない。

2. 研究の目的

(1) 発症機構の解明：本菌は近年、劇症型感染症の起原因菌となる例が報告されるようになった。これは、本菌が新たな外来病原因子を獲得したためである可能性が指摘されている。Nga はその候補の一つである。その理由の一つは、過去の菌株が NADase 活性を示さないことにある。しかし、実際には過去に咽頭炎等(劇症型感染症以外)から分離された株も、近年劇症型感染症患者由来の臨床分離株も *nga* 遺伝子(フレームシフト等の明らかな欠陥は見られない)を保有している。①過去と近年の *nga* 遺伝子を比較することによりなぜ近年の株のみが NADase 活性を持つのかを明らかにする。②さらに、Nga の酵素活性に関与する領域解析する。③劇症型感染症マウスモデルを用いて Nga タンパク質が劇症型感染症の発症に関与している可能性について解析する。

(2) 治療：IFS が治療薬として使用できるか検討する。現在使われている抗生物質(ペニシリン)は、細菌の増殖を阻害することで間接的にその毒素の産生を抑えることができる。IFS は直接その毒素活性を阻害できるので抗生物質と同時に使用することで救命率を改善できるかもしれない。

3. 研究の方法

(1) 発症機構の解明：①、②過去と近年の代表的な4株と7株の *nga* 遺伝子の塩基配列を決定した。さらに、GST-Nga 融合タンパク質を構築し、推定アミノ酸配列と活性との関連性を解析した。③劇症型感染症患者由来の臨床分離株8株の培養上清の NADase 活性を測

定した。*nga* 遺伝子欠損株を作成した。*nga* 遺伝子をコードする3種類のプラスミド、pLZN2, pLZNRBS, pLZNRBSII2を作成した(それぞれコードされている *nga* 遺伝子開始コドン上流領域の長さが異なる; 0, 16 and 27 bp)。菌液を3週齢のマウスの左わき腹に皮下投与し、1週間観察した(劇症型感染症マウスモデル)。

(2) 治療：IFS タンパク質(166アミノ酸)による Nga 毒素中和機構の解明と治療薬の開発。動物感染モデルを用いて、抗生物質+IFSを投与したマウスと抗生物質のみを投与したマウスと比較する。

4. 研究成果

(1) 発症機構の解明①、②遺伝子の塩基配列から推定される Nga のアミノ酸配列は1989以前の株と1990年以降の塩基配列で97%(438/451 a. a.)の相同性を示した。1990年以降の GST-Nga 融合タンパク質が、NADase 活性を示したのに対し、1989年以前の株由来の GST-Nga は活性を示さなかった。この活性の違いは、330番目のアミノ酸の違いに起因していた。③NADase の活性は、3-5 unit (low activity group) と 50-100 unit (high activity group) の2つのグループに分かれた。それぞれのグループの菌をマウスに投与したところ、その生存曲線は図1のような結果になった。High activity group の一つである GT01 株(致死率 80%=12 death /15 trial)を用いてさらに解析した。GT01 Δ *nga*/pLZ-km2 (control vector)、GT01 Δ *nga*/pLZN2、GT01 Δ *nga*/pLZNRBS、GT01 Δ *nga*/pRBSII2、GT01 (WT)/pLZ12-Km2 の NADase 活性はそれぞれ、0.0, 1.3, 1.8, 4.6, 14.1 unit であった。マウスに対する病原性を致死率と体重の増加率で測定した結果 NADase 活性依存的に菌の病原性が増加した(生存率の結果を Table1、体重変動の結果を図2に示した)。

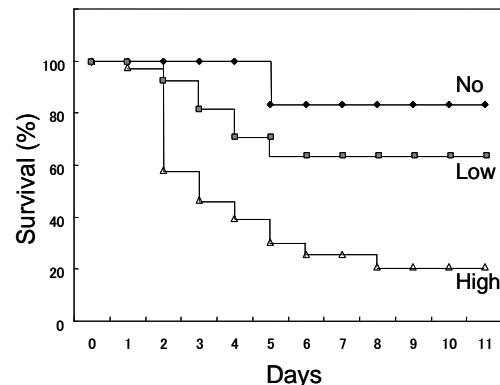


図1 生存曲線。

Low activity group は4種類の臨床分離株(計28匹)、High activity group も4種類

の臨床分離株（計 43 匹）を使用。

Table 1. Virulence (Mortality) to mouse of GT01Δnga with or without cloned *nga* gene.

| Strain | Mortality ^a |
|------------------------|------------------------|
| GT01 (pLZ12-Km2) | 73% (8/11) |
| GT01Δnga (pLZ12-Km2) | 0% (0/17) |
| GT01Δnga (pLZN2) | 0% (0/11) |
| GT01Δnga (pLZN-RBS) | 0% (0/10) |
| GT01Δnga (pLZN-RBSII2) | 29% (4/14) |

Bacteria were cultured in BHI-Y broth supplemented with kanamycin (100 μg/ml).

a, Mice were observed for 8 days.

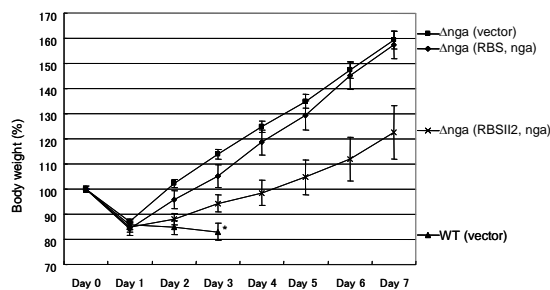


図 2 体重変動

(2) 【結果】菌のみを投与した場合、GT01 株 80% (12/15), CR01 100% (12/12) の致死率を示した。GT01+His-IFS を投与したマウスの致死率 56% (5/9) は GT01+溶出液 (control) を投与したマウスの致死率 89% (8/9) に比べて低かった ($P < 0.05$, 図 3)。GT01 より高病原性を示した CR01 株を用いた場合、His-IFS を投与したマウスの致死率 100% (6/6) は溶出液 (control) を投与したマウスの致死率 100% (5/5) に比べて改善しなかった。そこで、アンピシリン+His-IFS をテストしたところ、コントロールのアンピシリン+溶出液は 100% (10/10) の致死率を示したが、アンピシリン+His-IFS は 0% (0/9) の致死率に改善した。【考察】His-IFS を用いて、劇症型感染症による致死率を 100% から 0% に改善することに成功した。ただし、致死率改善の分子機構は未だ不明である。我々の実験は毒素の活性を抑制することを狙ったものだが、大腸菌から精製した組み換えタンパク質は LPS の混入が予想される。これが、菌の戦略のもう一方 (免疫回避機構) を破綻させた可能性も考えられる。

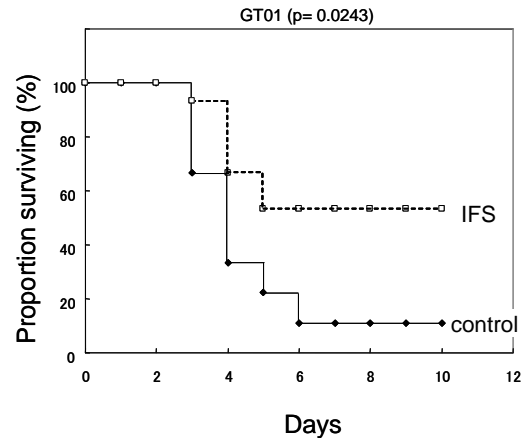


図 3 生存曲線

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Tatsuno I, Sawai J, Okamoto A, Matsumoto M, Minami M, Isaka M, Ohta M, Hasegawa T. Characterization of the NAD-glycohydrolase in streptococcal strains. *Microbiology*. 153: 4253-60. 2007. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 立野一郎、井坂雅徳、南正明、長谷川忠男、劇症型感染症由来 A 群連鎖球菌によって菌体外に分泌される Nga タンパク質と病態の関係、日本細菌学会、2009 年 3 月 13 日、名古屋
- ② 立野一郎、井坂雅徳、南正明、長谷川忠男、マウスモデルを用いた A 群連鎖球菌劇症型感染症の発症抑制、日本細菌学会中部支部総会、2008 年 10 月 17 日、金沢
- ③ 立野一郎、井坂雅徳、南正明、松井秀之、長谷川忠男、A 群連鎖球菌 Nga タンパク質の NAD 活性に関与する領域及び、劇症型感染症との因果関係についての解析、日本細菌学会、2008 年 3 月 25 日、京都
- ④ 井坂雅徳、前山順一、立野一郎、南正明、松井秀之、長谷川忠男、劇症型 A 群連鎖球菌臨床分離株の食菌抵抗性の検討、日本細菌学会、2008 年 3 月 24 日、京都
- ⑤ 長谷川忠男、立野一郎、劇症型 A 群連鎖球菌の菌体外毒素 Nga タンパク質及び、Nga を中和する IFS タンパク質に関する研究、東海乳酸菌研究会、2008 年 2 月 2 日、名

古屋
〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/micro.dir/indexJ.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立野 一郎 (TATSUNO ICHIRO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：50311642

(2) 研究分担者

長谷川 忠男 (HASEGAWA TADAO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：10314014

井坂 雅徳 (ISAKA MASANORI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40336673