

Streptococcus anginosus が産生する マイトジェニックファクターの部分精製

佐々木 実, 根本 優子, 富樫 正幸*, 金子 克

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座

〔主任：金子 克教授〕

岩手医科大学歯学部保存学第二講座*

〔主任：上野 和之教授〕

(受付：1994年10月13日)

(受理：1994年11月29日)

Abstract : A soluble mitogenic factor was partially purified from the culture supernatant of *Streptococcus anginosus* by DEAE-Sephadex column chromatography, followed by Sephadex G-100 column chromatography. In Sephadex G-100, three protein fractions were separated. Fraction 1 (F1) from Sephadex G-100 contained mitogenic activity for human peripheral blood mononuclear cells. The specific activity of F1 was increased to 4.4 times that of the of culture supernatant. The mitogenic activity of F1 rose at from 0.1 μ g/ml to 1 μ g/ml, but the activity fell at a dose of 10 μ g/ml. These results suggest that the novel mitogenic factor from *S.anginosus* culture supernatant may cause inflammation.

Key words : *Streptococcus anginosus*, mitogenic factor, partial purification .

結 言

Streptococcus anginosus は *S. constellatus* および *S. intermedius* とともに “*S. milleri*” グループに属する細菌で歯肉膿瘍の主要な原因菌といわれ¹⁾, さらに呼吸器感染症²⁾, 種々の化膿性疾患³⁾や成人歯周炎からも分離されると報告⁴⁾されている。また, 他の口腔レンサ球菌にくらべ, 歯肉縁下プラークから高率に分離されるとい報告⁵⁾もあるが, その病原因子については明らかになっていない。

同じレンサ球菌属の *S. pyogenes* が産生する発赤毒素は, スーパー抗原とも呼ばれ, 多彩な生物活性を有することが報告⁶⁾されている。すなわち抗原が抗原提示細胞内でフラグメント化

されずに MHC クラス II 分子の外側に直接結合し, 特定の V β を有する T 細胞をクローン性をこえて活性化させる。その際過剰に産生されるサイトカインが種々の炎症性疾患の原因となることが考えられている。また, Lima ら⁷⁾は *S. intermedius* が産生する B 細胞マイトジェンは サプレッサー T 細胞を誘導し, 感染局所で *S. intermedius* の生存をゆるし感染を増強すると報告している。

このようにレンサ球菌が産生するマイトジェニックファクターが炎症性疾患との関連で話題になっている。今回, 著者らは, *S. anginosus* が菌体外にマイトジェニックファクターを産生することを見いだしたので, その部分精製法について報告する。

Partial purification of soluble mitogenic factor from *Streptococcus anginosus* culture supernatant.
Minoru SASAKI, Yuko OHARA-NEMOTO, Masayuki TOGASHI* and Masaru KANEKO.
(Department of Microbiology, and Periodontology* School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

材料と方法

使用菌株: *Streptococcus anginosus* (NCTC 8787) を用い, Todd Hewitt Broth (BBL) で 37°C, 24 時間, ガスパック法で嫌気培養した。

マイトジェニックファクターの部分精製法:

1) DEAE-Sephacel カラムクロマトグラフィ; *S. anginosus* の培養上清 (180 ml) を 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過し, 氷冷精製水で 5 倍希釈した後に pH を 8.0 に修正した。以後の精製過程はすべて 4°C 下で行った。5 倍希釈した培養上清に DEAE-Sephacel (Pharmacia) を 40 ml 加えて, 30 分間, 時々攪拌しながら樹脂に吸着させた。未吸着物を 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で洗った後, 樹脂をカラム管に充填した。NaCl を 0 M, および 0.6 M 含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) を用いて, 吸着物を NaCl のリニアグラジェントで溶出した。

2) Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィ; DEAE-Sephacel でのタンパク質溶出画分 (fr. 25 - fr. 33) 30 ml をプールして, アミコンフィルター YM-10 (Amicon) で 2 ml に濃縮した。Sephadex G-100 (Pharmacia) カラム (2 cm \times 100 cm) に上記サンプルを添加し, 流速 25 ml/hr で 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) により溶出した。

リンパ球幼若化反応: 健康ヒト末梢血からセパレート L (ムトウ化学) を用いて単核細胞 (Peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を分離し, 10% ウシ胎児血清, 100 U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む RPMI 1640 (ニッスイ) に 10^6 /ml となるように浮遊した。96 穴マイクロプレート (住友ベークライト) に PBMC を 190 μ l 加え, さらにサンプルとして培養上清あるいは Sephadex G-100 溶出画分を 0.01, 0.1, 1, 10 μ g/ml となるように 10 μ l 加えて, 5% CO₂ 存在下, 37°C で 66 時間培養した。培養後 [³H]Thymidine ([³H]TdR) を 0.2 μ Ci 加え, さらに 6 時間培養してセルハーベスターで細胞を集め, 液体シンチレー

ションカウンターで放射活性を測定した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動:

Laemmli の方法⁸⁾に従い 12.5% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動し, クマシーブリリアントブルー R 250 で染色してタンパク質のバンドを検出した。

タンパク質量: Bradford 法で行い, 595 nm における吸光度を測定した。

結 果

S. anginosus マイトジェニックファクターの部分精製:

S. anginosus 培養上清の DEAE-Sephacel 吸着画分からの溶出は (Fig. 1), 0.03 M NaCl からタンパク質およびマイトジェン活性の溶出が始まり, 0.06 M で [³H]TdR とりこみのピーク画分が認められ, その値は 4,850 dpm であった。0.18 M NaCl でタンパク質および [³H]TdR とりこみ活性のほとんどすべてが一致して溶出した。

つぎに DEAE-Sephacel の活性溶出画分を Sephadex G-100 カラムで分画すると (Fig. 2), タンパク質のピークは fr. 15 ~ fr. 21 (F 1), fr. 23 ~ fr. 31 (F 2) および fr. 33 ~ fr. 45 (F 3) の 3 画分に分かれた。[³H]TdR とりこみ活性は F 1 と一致して認められピーク値は 6,600 dpm であった。

Sephadex G-100 溶出画分のヒト PBMC 幼若化活性:

F 1, F 2 および F 3 のヒト PBMC 幼若化についてみると (Fig. 3), F 1 では 0.1 μ g/ml から幼若化活性の上昇が認められ, 1 μ g/ml で最も値が高く, 5,450 dpm であった。さらに用量を上げ 10 μ g/ml にすると幼若化活性は低下した。F 2 および F 3 ではいずれの用量でも幼若化活性の上昇は認められなかった。

各精製過程における回収率と特異的幼若化活性:

各精製過程の総タンパク質量, 特異的幼若化活性および回収率などを Table 1 に示した。培養上清の総タンパク質量は 2.16 mg で最終的に

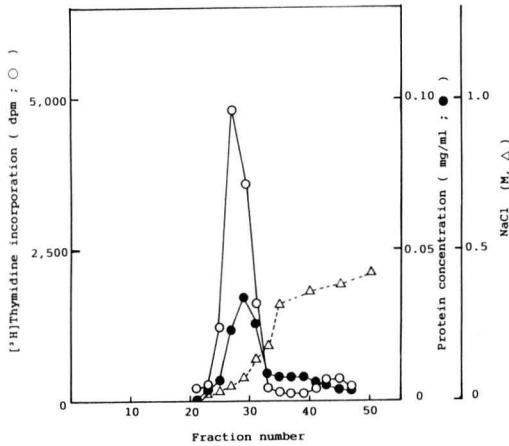


Fig. 1 Elution profile of DEAE-Sephacel column chromatography. The culture supernatant of *S. anginosus* was diluted 5-fold with cold distilled water. The pH was adjusted to 8.0, and then 1/20 volume of DEAE-Sephacel equilibrated in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) was added. Bound proteins were eluted with 80ml each of 0 to 0.6M NaCl in Tris-HCl buffer (pH 8.0). An aliquot (10 μ l) of each fraction was examined for mitogenic activity with human PBMC. The mitogenically active fractions (tubes 25-33) were pooled and concentrated by 10-fold.

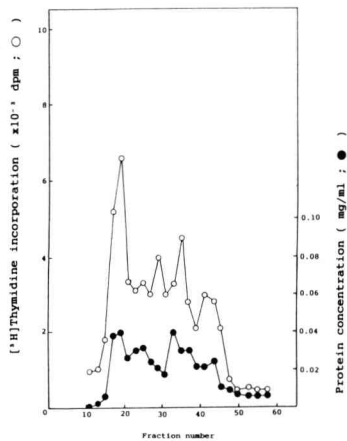


Fig. 2 Elution profile of Sephadex G-100 column chromatography. The pooled and concentrated fraction from DEAE-Sephacel was subjected to Sephadex G-100 column (2.5 X 100cm) equilibrated in 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). Separated protein fractions, tubes 15-21, tubes 23-31 and tubes 33-45, were pooled and concentrated. These fractions were designated F1, F2 and F3, respectively.

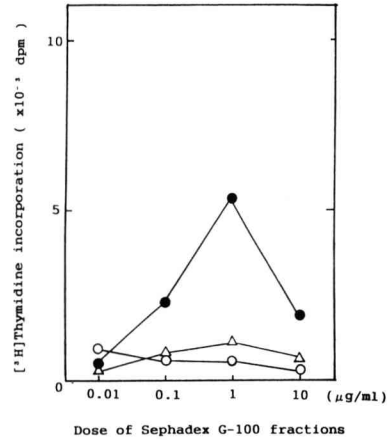


Fig. 3 Mitogenic response of human PBMC stimulated with *S. anginosus* mitogenic factor. Human PBMC were stimulated with various doses of *S. anginosus* mitogenic factor for 66 hrs. After incubation, 0.2 μ Ci of [3 H]thymidine was added to each well. Following a further 6 hrs incubation, cells were collected and incorporation of [3 H]thymidine was counted. Symbols indicate \bullet : F1, \circ : F2, and \triangle : F3.

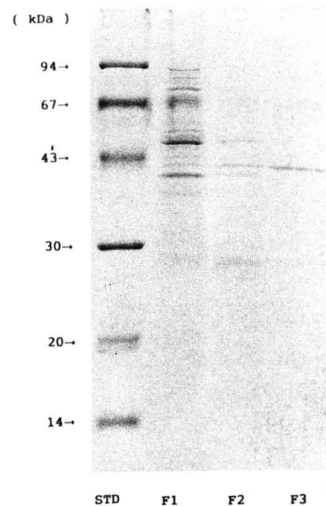


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of F1, F2 and F3. Two micrograms of protein were subjected to 12.5% of acrylamidegel. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250.

Table 1 Summary of partial purification of mitogenic factor from *S. anginosus*

Fraction	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Total protein (mg)	Specific activity (dpm/ μ g)	Total activity (dpm $\times 10^{-3}$)	Recovery (%)
Culture supernatant	180.0	0.012	2.16	5.458	11.789	100.0
DEAE-Sephacel eluate	30.0	0.041	1.10	8.431	9.274	78.7
Sephadex G-100 F1 + YM 10	0.75	0.25	0.19	23.875	4.536	38.5

Human PBMC were stimulated with each fraction samples for 66 hrs. After incubation, 0.2 μ Ci of [3 H] thymidine was added to each well. Following a further 6 hrs incubation, cell were collected and incorporation of [3 H]thymidine was counted. Sephadex G-100 F1 was concentrated by Amicon filter YM-10.

Sephadex G-100 で得られた部分精製画分の F1 は 0.19 mg となった。タンパク質 1 μ g 当たりの幼若化活性についてみると、培養上清で 5,458 dpm, DEAE-Sephacel 溶出画分では約 1.5 倍上昇し 8,431 dpm, また Sephadex G-100 の F1 では 23,875 dpm で約 4.4 倍上昇した。総活性の回収率は Sephadex G-100 の F1 で 38.5% であった。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動:

Sephadex G-100 溶出画分をプールして得られた F1, F2 および F3 を濃縮してそれぞれ、2 μ g を電気泳動した (Fig.4)。最も活性が高い F1 では存在するタンパク質バンド数も多かった。F2, F3 では数本のバンドが認められた。

考 察

近年, *Streptococcus* 属の産生するマイトジェニックファクターは種々の炎症性疾患の病原因子として注目されている。なかでも T 細胞の活性化⁹⁾によりインターロイキン-2⁶⁾, 腫瘍壊死因子 β ¹⁰⁾ などのサイトカイン産生やエンドトキシン感受性の増大¹¹⁾などが特徴的な生物活性として報告されている。著者らは口腔レンサ球菌のうち *S. anginosus* 培養上清中にヒト PBMC 中のリンパ球を幼若化して, [3 H]TdR とりこみを上昇させるマイトジェニックファクターを見出し, DEAE-Sephacel および Sephadex G-100 を用いて部分精製した。DEAE-Sephacel の精製過程では, 吸着タンパ

ク質を分離できず, 一つのピークが溶出した。つぎに DEAE-Sephacel の溶出画分を Sephadex G-100 を用いて分画したところ, 3 つのタンパク質画分に分かれた。これらのうちヒト PBMC に対してマイトジェン活性を有する画分は F1 であることがわかった。そして比活性は培養上清の DEAE-Sephacel 溶出ピーク画分で約 1.5 倍, Sephadex G-100 の F1 濃縮画分で約 4.4 倍上昇し精製度が高まった。しかし, 最終的に得られた F1 を SDS-PAGE でみるとまだ多くのバンドが存在しており, また比活性が *S. pyogenes* のマイトジェニックファクター¹²⁾や cytoplasmic membrane-associated protein¹³⁾の精製度にくらべて低いことから, さらに高速液体クロマトグラフィーなどによる精製が必要と考える。

最近, Costalonga ら¹⁴⁾は口腔レンサ球菌の一菌種である *S. sanguis* 培養上清からスーパー抗原様物質を分離し, 家兎の実験で心内膜炎をおこしたり, エンドトキシンショックを促進する働きがあることを報告している。また, *S. mitis* が産生するスーパー抗原は, 組織破壊に関与し口腔粘膜疾患を誘発することが示唆されている¹⁵⁾。歯性感染症の後, 敗血症性ショックと DIC を起こした症例から, "*S. milleri*" グループの細菌と *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp. を分離したという報告¹⁶⁾もあり, *S. anginosus* のマイトジェニックファクターも, 敗血症性ショックなどの全身性疾患の

病原因子となる可能性も考えられる。また、口腔領域では *S. anginosus* は歯肉膿瘍からの分離率が高く¹⁾、成人歯周炎患者の歯周ポケットからの分離率も高いという報告²⁾もある。歯周疾患は歯周ポケット内細菌の菌体成分や菌の代謝産物に対する生体の免疫応答により引き起こされる炎症性の疾患ともいわれている。著者らが見いだした *S. anginosus* のマイトジェニックファクターも歯周ポケット内で産生された場合、歯肉組織中のリンパ球あるいは浸潤したリンパ球を活性化し、炎症性サイトカインや炎症性メディエーターを産生することも考えられる。すなわち、*S. anginosus* が産生するマイトジェニックファクターは口腔領域の炎症性疾患や化膿性疾患の原因、あるいは歯周疾患の炎症を増悪する因子となっている可能性も考えられる。

結 論

- 1) *Streptococcus anginosus* 培養上清からマイトジェニックファクターを DEAE-Sephacel および Sephadex G-100 を用いて部分精製した。
- 2) このマイトジェニックファクターはヒト末梢血単核細胞に対する幼若化反応をみると、培養上清にくらべ DEAE-Sephacel 溶出画分で 1.5 倍、Sephadex G-100 の F1 で 4.4 倍高まった。

謝 辞

本研究は、平成 5 年度文部省科学研究費補助金助成、奨励 A (No.05771482) および一般 C (No.05807171) により行った。

参 考 文 献

- 1) Fisher, L. E. and Russell, R. R. B. : The isolation and characterization of milleri group streptococci from dental periapical abscesses. *J. Dent. Res.* 72 : 1191-1193, 1993.
- 2) Gossling, O. : Occurrence and pathogenicity of the *Streptococcus milleri* group. *Rev. Infect. Dis.* 10 : 257-285, 1988.
- 3) Murray, H. W., Gross, K. C., Masur, H. and Roberts, R. B. : Serious infections caused by *Streptococcus milleri*. *Am. J. Med.* 64 : 758-764, 1978.
- 4) Flynn, M. J. and Slots, J. : Beta-hemolytic streptococci in advanced periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 8 : 295-297, 1993.
- 5) Frandsen, E. V. G., Pedrazzoli, V. and Kilian, M. : Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. *Oral Microbiol. Immunol.* 6 : 129-133, 1991.
- 6) 内山竹彦, 今西健一 : スーパー抗原特性を示す A 群レンサ球菌発熱性外毒素による T 細胞活性化と異常反応誘導の機序. *Medical Immunol.* 21 : 461-473, 1991.
- 7) Lima, M., Bandeira, A., Portnoi, D., Ribeiro, A. and Chaves, M. A. : Protective effect of a T-cell-dependent immunosuppressive, B-cell-mitogenic protein (F3 · EP-Si, or P90) produced by *Streptococcus intermedius*. *Infect. Immun.* 60 : 3571-3578, 1992.
- 8) Laemmli, U. K. : Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
- 9) Zumla, A. : Superantigen, T cells, and microbes. *Clin. Infect. Dis.* 15 : 313-320, 1992.
- 10) Hackett, S. P. and Stevens, D. L. : Superantigens associated with staphylococcal and streptococcal toxic shock syndrome are potent inducers of tumor necrosis factor- β synthesis. *J. Infect. Dis.* 168 : 232-235, 1993.
- 11) Murai, T., Ogawa, Y., Kawasaki, H. and Kanoh, S. : Physiology of the potentiation of lethal endotoxin shock by streptococcal pyrogenic exotoxin in rabbits. *Infect. Immun.* 55 : 2456-2460, 1987.
- 12) Yutsudo, T., Murai, H., Gonzalez, J., Takao, T., Shimonishi, Y., Takeda, T., Igarashi, H. and Hinuma, Y. : A new type of mitogenic factor produced by *Streptococcus pyogenes*. *FEBS Lett.* 308 : 30-34, 1992.
- 13) Itoh, T., Satoh, H., Isono, N., Rikiishi, H. and Kumagai, K. : Mechanism of stimulation of T cells by *Streptococcus pyogenes* : Isolation of a major mitogenic factor, cytoplasmic membrane-associated protein. *Infect. Immun.* 60 : 3128-3135, 1992.
- 14) Costalonga, M., Powdrill, J. M., Herzberg, M. C. Schlievert, P. M. : Pyrogenic exotoxins and the pathogenesis of *Streptococcus sanguis* endocarditis. *J. Dent. Res.* 73 (SI) : 426, 1994.
- 15) 松下健二, 五十嵐英夫, 内山竹彦, 大國寿士, 長岡成孝, 川越昌宣, 小谷尚三, 高田春比古 : *Streptococcus mitis* スーパー抗原による組織障害の可能性. *日細菌誌*, 49 : 245, 1994.
- 16) Ota, Y. : Successful treatment of severe odontogenic infections which caused septicemia. *Japn. J. Infect. Dis.* 68 : 157-162, 1994.