

氏 名 (本籍) 伊 藤 哲 郎

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 2540 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 2 月 24 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 59 年 3 月 27 日
東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目 Mechanism of Stimulation of T Cells by
Streptococcus pyogenes : Isolation of a Major
Mitogenic Factor, Cytoplasmic Membrane-
Associated Protein.

(溶連菌による T 細胞刺激機構 : 主要増殖刺激
因子である細胞膜結合蛋白の分離)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 菅 村 和 夫 教 授 伊 藤 恒 敏

教 授 今 野 多 助

論文内容要旨

当教室では、溶連菌加熱死菌がヒト末梢血リンパ球（PBL）を活性化し、T細胞の多クローン性増殖を誘導すること、この増殖刺激活性は溶連菌外毒素等と異なり、細菌培養上清中には認められず菌体に存在することを既に報告した。我々はこの増殖刺激活性を溶連菌より分離精製し、これが細胞膜中に存在する熱安定な低分子蛋白質であるとの結果を得、細胞膜結合蛋白；CAP (cytoplasmic membrane associated protein) と名付けた。本研究ではCAPの分離法とその物理化学的、生物学的性質について報告する。

【材料及び方法】

溶連菌の分画法：本研究で使用した溶連菌は溶連菌 T12 (ATCC12353), Su (ATCC21060), Sv (ATCC21059) 及び C203 (ATCC12384) である。菌は Todd-Hewitt broth で培養後、遠心洗浄し超音波により破碎した。これを遠心分離し細胞壁を主とする沈殿を得た。これを DNase, トリプシンで処理し、細胞壁分画とした。更に、10%トリクロル酢酸処理によりペプチドグリカン分画を得た。破碎細胞の上清を超遠心して得た沈殿を DAase, RNase, M-1 酵素で処理し、細胞膜分画を得た。細胞膜分画をコール酸で一晩懸濁後、超遠心して得た上清を Sephacryl S-200 カラムでゲル濾過し、分子量10,000から15,000の活性分画を得、これをCAPとした。陰イオン交換クロマトグラフィ Mono-Q により更に精製した標品を作成し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動・SAS-PAGE で分子量を決める際などに使用した。破碎細胞上清を超遠心して得られた上清を細胞質成分とした。

細胞培養及び増殖アッセイ法：健康人の末梢血をヘパリン採血し、ファイコールイソペーク濃度勾配遠心法にてPBLを分離し、菌体各分画を加えて5日間培養後、 $[^3\text{H}]$ サイミジンを加え18時間培養後ハーヴェストし、液体シンチレーションで $[^3\text{H}]$ の取り込みを測定した。培地は10%ヒト血清添加 RPMI1640 を用いた。又、増殖刺激活性の half-maximal unit (増殖刺激活性が最大反応の1/2となる濃度) をCAP 1 単位/ml と定義した。

【結果と考察】

各分画の増殖刺激活性：溶連菌 T-12 株の菌体全体、細胞壁、ペプチドグリカン、細胞質分画、リボタイコ酸、細胞膜について細胞増殖刺激活性を調べたところ、細胞膜で菌体全体同様のヒトPBL に対する強い増殖刺激活性を認めた。他の分画では菌体に匹敵する増殖刺激活性は認められなかった。溶連菌 Su, Sv についても同様の結果を得た。

CAPの精製：細胞膜からのCAPの抽出はコール酸により行い、この時の菌体からの増殖刺激活性の回収率は20%、Specific activityは12,500(単位/mg)であった。溶連菌由来のコール酸抽出物をSephacryl S-200カラムでゲル濾過したところ、分子量13,000前後に増殖刺激活性のシングルピークを認め菌体からの増殖刺激活性の回収率は19%、Specific activityは166,700(単位/mg)であった。更にSephacryl S-200によるゲル濾過抽出物に対し陰イオン交換カラムMono-Qによるイオン交換クロマトグラフィを行った。回収率、精製率共にpH7.2で最も効率的に分離され、この時の回収率は7%、Specific activityは555,600(単位/mg)であった。このMono-Qカラムで得た試料に対し、SDS-PAGEを行ったところ、試料は1本のバンドを与え、分子量は15,000程度であった。未染色のゲルをエタノールに一晩滲潤しSDSを除去後スライスし、PBSに一晩滲潤し滲出した増殖刺激活性を測定したところ、このバンドに一致して強い増殖刺激活性を認めた。又、等電点カラムMono-Pによる検討からCAPの等電点は9.3以上であった。

その他の物性：CAPは、pH4から10、又凍結融解に対しても安定であったが、トリプシン等の蛋白分解酵素により失活した。

生物学的特性：Mono-Qカラムで精製したCAPのヒトPBLに対する増殖刺激活性を見たところ、CAP 2ng/ml以上で増殖刺激活性を示し、10ng/mlで増殖の最大値に達した。又CAPによるPBLの増殖は、2日ないし3日で反応し始め4日ないし5日でピークに達した。CAPにより誘導されたヒトPBLでは、CD-4優位の増殖が特徴的で、且つ、コントロールに比べ $\gamma\delta$ -T細胞の増加を認めた。又、HLA-DR, CD25, transferrin receptor, LFA-1などのリンパ球の活性化を示すマーカーの増加を認めたが、CD-16, CD-56などのNK細胞マーカーは認められなかった。

更にCAPは種々のスーパー抗原的特徴を備えており、分子量、等電点、血清学的検討より、SPE-A, -B, -C及びM-蛋白等の溶連菌の既知のスーパー抗原とは異なる新しいスーパー抗原であり、その生物学的意義について今後更に検討を加えたい。

審査結果の要旨

本論文は、溶連菌によるヒト末梢血リンパ球の多クローン性増殖が主に溶連菌細胞膜の膜蛋白によることを示し、その膜蛋白の物性、生物活性について報告したものである。

溶連菌はヒト末梢血リンパ球（PBL）の強力なマイトーゲンであることが知られている。更に、溶連菌加熱死菌がT細胞の多クローン性増殖を誘導し、この活性は溶連菌外毒素等と異なり、細菌培養上清中には認められず菌体に存在することが報告されている。本研究は、この増殖刺激活性の本体を明らかにすることを目的としている。そのため溶連菌菌体を分画し、それぞれの分画の増殖刺激活性をヒト末梢白血球の増殖を指標にして測定した。その結果、この増殖刺激活性は、溶連菌加熱死菌の細胞膜に存在し、細胞壁、ペプチドグリカン、リポタイコ酸、細胞質可溶化画分等の他の細胞分画には認められないことが明らかとなった。

更にこの活性を担う分子性状を明らかにするため、細胞膜をコール酸で抽出し、Sephacryl S-200 カラムを用いて分画精製した。増殖刺激活性は分子量10,000～15,000の分画に回収され、蛋白分解酵素で失活するが、pH 4 から10、凍結融解、100°C10分等の処理に対して安定であった。本論文ではこれを細胞膜結合蛋白；CAP（CM-associated protein）と名付け、陰イオン交換カラム Mono Q カラムで更に精製した。増殖刺激活性は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で一本の蛋白質のバンドを与え、その分子量は15,000であった。この分子量15,000の蛋白を SDS を除去後ゲルから回収して増殖刺激活性を測定したところ、強い活性が認められた。等電点カラム Mono-P による検討から CAP の等電点は9.3以上であった。

CAP より誘導される増殖は4ないし5日でピークに達し、10ng/ml の濃度で最大であった。

CAP により増殖が誘導される細胞群は、末梢血中の PBL では、CD-4⁺ の細胞が主で且つ、コントロールに比べ δ -T 細胞群の増加が認められた。これらの活性化リンパ芽球ではリンパ球の活性化の指標である HLA-DR, IL-2 受容体, トランスフェリン受容体, LFA-1 等の表面抗原の発現が増加していた。しかし、CD-16, CD-56 などの NK 細胞マーカーは認められなかった。

以上の結果から、CAP はスーパー抗原様の活性を有している。しかし、既知のスーパー抗原である外毒素、M タンパク等とはその分子量、等電点、細胞膜局在性、血清学反応が異なり、新しいスーパー抗原の可能性はある。

本論文は、T リンパ球の増殖を誘導する新しい溶連菌由来の物質の性状を明らかにしたもので、博士論文に値するとみなす。