

吉田(達) 聖月論文内容の要旨

主 論 文

Measurement of protease activity of exfoliative toxin A using synthetic peptidyl substrates and correlation between *in vivo* and *in vitro* activities

合成ペプチド基質を用いた表皮剥脱毒素 ETA のプロテアーゼ活性測定と
in vivo および *in vitro* 活性の相互関係

吉田(達) 聖月, 根本優子, 馬場友巳, 小早川健, 藤田修一,
池田通, 鮎瀬卓郎, 大井久美子, 根本孝幸

ACTA MEDICA NAGASAKIENSIA (in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻
(主任指導教員: 鮎瀬 卓郎教授)

緒 言

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 感染によって発症するブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) は, 表皮内棘融解・水疱形成により全身の皮膚が脱落する疾患で, 表皮剥脱毒素 (exfoliative toxin A, ETA) がその病原因子として発見された. その作用機序は永らく不明であったが, 最近, セリンプロテアーゼ様の 3 次構造をとることが示され, さらに, 皮膚組織の細胞間接着装置であるデスモソームの構成タンパク質であるデスモグレイン 1 の Glu₃₈₁-Gly₃₈₂ 間を特異的に加水分解することが示された. しかし, それ以外の基質に対する加水分解活性はこれまで認められておらず, 本毒素の構造とプロテアーゼ活性, 生物活性発現の関係は明らかではない. 本研究では, 野生型 ETA, その変異体, および *S. aureus* が産生する主要なグルタミン酸特異的プロテアーゼ (GluV8) 組換え体を発現し, これらのプロテアーゼ活性および生物活性間での関係について検討した.

対象と方法

ETA 野生型, プレプロ配列欠失 (Glu39-ETA), α 1 ヘリックス領域欠失 (Val158-ETA), 活性中心である Ser₂₃₃ を Ala に変異させたそれぞれの S233A 変異分子, および proGluV8 は C 末 His タグ付加組換え分子として大腸菌発現系を用いて発現, 精製し, エドマン分解により各精製組換え分子の N 末端を決定した. proGluV8 はサーモライシン処理により GluV8 活性型とした. プロテアーゼ活性は蛍光標識合成ペプチドを基質として測定し, 生物活性は精製標品を 1 日齢マウスの背部皮下に投与し, 24 時間後の肉眼所見と組織観察から検討した.

結 果

N 末端解析の結果、野生型 ETA (Met1-Glu280) 組換え分子はシグナル配列を欠失し、N 末が Phe24 であった。Phe24-ETA, Glu39-ETA は、LLE-, AE-, LE-MCA を分解し、一方、LLQ-, LD-, AAA-MCA は分解しないことから、ETA は Glu に対する基質特異性を有すること、また、two-way repeated-measures ANOVA による解析から Glu39-ETA が Phe24-ETA に比して有意にプロテアーゼ活性が高いことが示された。Glu39-ETA の基質特異性は GluV8 のそれと同じであったが、比活性は 1/36,000 であった。また、Phe24-ETA, Glu39-ETA の活性はセリンプロテアーゼ阻害剤である Pefabloc により消失した。一方、 $\alpha 1$ ヘリックスを欠失した Val58-ETA 及び S233A 変異分子ではプロテアーゼ活性は消失した。マウスを用いた生物活性測定においてもプロテアーゼ活性を示した Phe24-ETA および Glu39-ETA 投与マウスでは全身の表皮剥離が起こり、有棘層からの顆粒層の分離を認め、さらにこの活性は Phe24-ETA に比べて Glu39-ETA で有意に高かった。一方、プロテアーゼ活性がない Val58-ETA および S233A 変異分子では表皮の変化を認めなかった。GluV8 投与では発赤を認め、ETA と同量の投与では致死であったが、顆粒層の分離は認めなかった。

考 察

本研究で初めて合成ペプチド基質を用いて in vitro における ETA のプロテアーゼ活性を認めた。また、 $\alpha 1$ ヘリックス領域はプロテアーゼ活性発現に必要であることが明らかになった。*S. aureus* 感染により惹起される表皮剥脱では、Glu 特異的なプロテアーゼ活性を有する ETA が機能すること、さらにデスモソームの解離のみを対象とする限定的なタンパク質分解が起こる必要があることが示唆された。