

ANTIGENICITY OF M PROTEIN OF *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ISOLATED FROM PATIENTS WITH TONSILLITIS

Tetsuya Kasashima and Junichiro Shimada

Department of Otorhinolaryngology, Kamo Hospital

Shunkichi Baba

Department of Otorhinolaryngology, Nagoya City University Medical School

Streptococcus pyogenes can cause pharyngitis, tonsillitis, and more serious illnesses such as rheumatic fever and glomerulonephritis. M protein is a major virulence factor located on the surface of *S.pyogenes*. Amino acid sequence analyses of the M5, M6, and M24 proteins show that the amino acid sequences in the C-terminal halves of these M proteins are strongly conserved, whereas those in the N-terminal halves of these M proteins are highly variable. In addition, the central regions of M5 and M6 are conserved but distinct from the corresponding region of M24. Synthetic peptides corresponding to seque-

nces in the C-terminal halves, the central regions, and N-terminal halves were made and were designated A-24, A-23, and A-22 respectively. Guinea pigs were immunized subcutaneously with synthetic peptides conjugated to keyhole limpet hemocyanin. Antisera were reacted with *S.pyogenes* isolated from patients with tonsillitis by bacterial dot blot immunoassay. Anti A-24 serum was reacted with all strains tested. Anti A-23 serum was reacted with five strains of ten and anti A-22 serum was reacted with two strains of ten. These results indicate that only A-24 is present among all strains tested.

扁桃炎患者より分離された *Streptococcus pyogenes* のM蛋白の抗原性に関する検討

笠島 哲也 島田 純一郎

厚生連加茂病院耳鼻咽喉科

馬場 駿 吉

名古屋市立大学医学部耳鼻咽喉科教室

はじめに

Streptococcus pyogenes は咽頭炎、扁桃炎をはじめとする種々の化膿性炎症や、リウ

マチ熱、急性糸球体腎炎などの自己免疫疾患を引き起こす。この菌体の表面に存在するM蛋白は型特異性を有し、食菌作用に抵抗性を

示すビルレンス因子である。そのため *S.pyogenes* に対する感染防御ワクチンを開発するには、M蛋白の抗原性について検討する必要がある。

Hollingshead ら¹⁾はM蛋白6型の遺伝子をクローニングし、完全なアミノ酸の一次配列を決定した。Miller ら²⁾はM蛋白5型の遺伝子配列を、Mouw ら³⁾はM蛋白24型の遺伝子配列を決定した。それらに基づいてM蛋白6型、5型、24型のアミノ酸配列を比較した。そしてM蛋白6型のアミノ酸配列のうち、他の型のM蛋白と相同性がある部分（定常部）、変化に富んでいる部分（可変部）、その中間部分から10個のアミノ酸を選び同配列の合成ペプチドを作製した。これらをモルモットに免疫して作製した合成ペプチド抗体と扁桃炎患者より分離された *S.pyogenes* との反応性をみたので報告する。

材料と方法

1 合成ペプチドの作製

Peptide synthesizer 430Aを用いて、M蛋白6型のアミノ酸配列のうち、M蛋白5型、24型と相同性があり、その上抗原性、親水性が高い部分から10個のアミノ酸を選び、同配列の合成ペプチドを作製し、A-24と命名した。次に、M蛋白5型と相同性はあるが、M蛋白24型とは相同性がなく、その上抗原性、親水性が高い部分から10個のアミノ酸を選び、同配列の合成ペプチドを作製し、A-23と命名した。最後に、M蛋白5型、24型とは相同性がなく、変化に富んでおり、その上抗原性、親水性が高い部分から10個のアミノ酸を選び、同配列の合成ペプチドを作製し、A-22と命名した (Table 1)。

2 合成ペプチド・キャリア蛋白の結合

GAD法⁴⁾を用いて、合成ペプチドをキャリア蛋白である KLH, BSA に結合させた。

3 抗合成ペプチド抗体の作製

合成ペプチド-KLH とフロイド完全ア

Synthetic peptide	Amino acid sequence
A-22	Thr - Asp - Gln - Asn - Lys - Asn - Leu - Thr - Thr - Glu
A-23	Glu - Ser - Lys - Glu - Thr - Ile - Gly - Thr - Leu - Lys
A-24	Leu - Arg - Arg - Asp - Leu - Asp - Ala - Ser - Arg - Glu

Table 1. Synthetic peptides of M6 Protein ジュバンドを混和してエマルジョンを作製し、モルモットの皮下に注射した。1週間間隔で3回免疫を行った。抗体上昇の確認は dot-blot 免疫測定法にて行った。抗原としては合成ペプチド-BSA を用いた。免疫前血清に比べ、免疫後血清において強い反応を示し、抗体の上昇を認めた。

4 使用菌株

標準菌株として、M蛋白3型を有する株 (M3)、M蛋白を有しない株 (M-)、M蛋白5型を有する株 (M5)、M蛋白6型を有する (M6) を用いた。また臨床分離株として、扁桃炎患者より分離された株 (SP1 ~ SP15) を用いた。

5 抗合成ペプチド抗体と *S.pyogenes* の反応性

bacterial dot-blot 免疫測定法を用いた。60°C、30分間で死菌にした *S.pyogenes* をニトロセルロース膜にプロットさせ、スキムミルクにてブロッキングを行った。一次抗体として400倍希釈した抗合成ペプチド血清を反応させ、0.05% ツィーン20で洗浄した。二次抗体として5000倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗モルモット IgG 抗体を反応させ、再び0.05% ツィーン20で洗浄した。最後にペルオキシダーゼ発色基質を用いて発色させた。

結 果

抗 A-24血清はM3, M-, M5, M6株およびすべての臨床分離株と反応した。抗 A-23血清はM5, M6株および5つの臨床分離株と反応した。抗 A-22血清はM6株および

2つの臨床分離株と反応した (Table 2)。

Strain	Reaction vs antisera		
	A-22	A-23	A-24
M3	—	—	+
M—	—	—	+
M5	—	+	+
M6	+	+	+
SP1	—	—	+
SP2	—	+	+
SP7	—	+	+
SP9	—	—	+
SP10	—	+	+
SP11	+	—	+
SP12	—	—	+
SP13	—	+	+
SP14	+	+	+
SP15	—	—	+

Table 2. Reactivity of *S.pyogenes* with anti-synthetic peptides sera by bacterial dot blot immunoassay

考 察

S.pyogenes に対する感染防御ワクチンを開発するために、まずM蛋白の抗原性について検討した。M蛋白6型、5型、24型に存在するA-24のペプチドは、今回調べた臨床分離株すべてに存在することがわかった。このことより、A-24をワクチンとして利用すれば、M蛋白によって約80種類に分かれる *S.pyogenes* のすべてに有効なワクチンが開発可能かもしれない。しかし問題点としては、A-24は *S.pyogenes* の細胞壁近くに位置する¹⁾⁵⁾ため、実際の感染の場合、抗A-24抗体がN末端側のM蛋白によってA-24への接近が妨げられる可能性がある。Millerら⁶⁾は、定常部に対する抗体は生菌の *S.pyogenes* には結合できないと報告している。また別の問題点としては、M蛋白と人の組織の間には共通の抗原決定基が存在することが知られている。

Hoseinら⁷⁾はトロポミオシンに、Gorony-Bermesら⁸⁾は糸球体に、Krausら⁹⁾はメサンギウム細胞に存在するピメンチンに、共通の抗原決定基が存在すると報告した。そのためむやみにワクチンを接種することは、自己免疫疾患を引き起こす可能性がある。今後、これらの点を踏まえて、*S.pyogenes* に対する感染防御ワクチンの開発を進めたい。

ま と め

M蛋白6型のアミノ酸配列のうち、5型、24型と相同性がある部分 (定常部)、変化に富んでいる部分 (可変部)、その中間部分から10個のアミノ酸を選び同配列の合成ペプチドを作製した。これらに対する抗合成ペプチド抗体を作製し、扁桃炎患者よる分離された *S.pyogenes* との反応性を検討した。

稿を終えるにあたり、臨床分離株の収集に御協力頂いた厚生連加茂病院小児科部長岩瀬勝彦先生、内科部長片田直幸先生、中央検査部中根嘉郎先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) Hollingshead SK, Fischetti VA and Scott JR: Complete nucleotide sequence of type 6 M protein of group A streptococcus. *J. Biol. Chem.*, 261: 1677-1686, 1986.
- 2) Miller L, Gray L, Beachey E, et al.: Antigenic variation among group A streptococcal M proteins. *J. Biol. Chem.*, 263: 5668-5683, 1988.
- 3) Mouw AR, Beachey EH and Burdett V: Molecular evolution of streptococcal M protein: Cloning and nucleotide sequence of the type 24M protein gene and relation to other genes of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, 170: 676-684, 1988.
- 4) Konopka JB, Davis RL, Watanabe S

- M, et al. : Only site-directed antibodies reactive with the highly conserved src-homologous region of the v-abl protein neutralize kinase activity. *J. Virol.*, 51 : 223-232, 1984.
- 5) Fischetti VA, Parry DAD, Trus BL, et al. : Conformational characteristics of the complete sequence of group A streptococcal M6 protein. *Proteins*, 3 : 60-69, 1988.
- 6) Miller L, Burdett V, Poirier TP, et al. : Conservation of protective and nonprotective epitopes in M proteins of group A streptococci. *Infect. Immun.*, 56 : 2198-2204, 1988.
- 7) Hosein B, McCarty M and Fischetti VA : Amino acid sequence and physicochemical similarities between streptococcal M protein and mammalian tropomyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76 : 3765-3768, 1979.
- 8) Goroncy-Bermes P, Dale JB, Beachey EH, et al. : Monoclonal antibody to human renal glomeruli cross-reacts with streptococcal M protein. *Infect. Immun.*, 55 : 2416-2419, 1987.
- 9) Kraus W, Seyer JM and Beachey EH : Vimentin-cross-reactive epitope of type 12 streptococcal M protein. *Infect. Immun.*, 57 : 2457-2461, 1989.