

学位論文題名

Cloning and sequencing of BES-1 gene encoding the immunogenic antigen of *Streptococcus sanguis* KTH-1 isolated from the patients with Behçet's disease

(ベーチェット病患者から分離された *Streptococcus sanguis* KTH-1 の免疫抗原遺伝子 BES-1 の解析)

学位論文内容の要旨

ベーチェット病の原因はいまだに不明であり、そのため決定的な治療法もない。本病は内因としての病因遺伝子が存在し、ある特定の外因が作用したときに発症する多因子性疾患であると考えられており、外因としては微生物感染が古くから研究されている。ベーチェット病患者では口腔内アフタがほぼ全例に認められる上、他の主症状にさきがけて出現することが多く、扁桃炎や歯周疾患などの既往が高率にみられることから、口腔内細菌が本病の病因に何らかの役割を果たしていることが推測される。そこで我々はベーチェット病患者の口腔内細菌叢を調べ、*Streptococcus(S.) sanguis* が健常人に比べ有意に増加していることを発見した。さらにその血清型を調べたところ、標準株とは異なる新しいタイプの血清型であり、後にKTH-1~4と呼ばれるようになった。また、このKTHに対して患者は高い抗体価を示し、細胞性免疫能も亢進していた。そこで本病における連鎖球菌の免疫学的な役割を検討するために、連鎖球菌抗原の同定を行った。

連鎖球菌として、ベーチェット病患者の口腔内から分離された*S. sanguis* KTH-1を用い、菌の発現する抗原蛋白のうち患者血清と強く反応する蛋白の遺伝子クローニングを行った。まず、菌を1晩培養後、アルカリSDS、プロテイナーゼK、ライソザイムを用いて菌体DNAを抽出した。DNAをEcoRIで消化し、 $\lambda$ gt11ファージを用いてDNAライブラリーを作製した。この $\lambda$ gt11を大腸菌に感染させ、プレート上でIPTG(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)で飽和したニトロセルロースフィルターを被せ、フィルター上に $\beta$ -ガラクトシダーゼ融合蛋白質を発現させた。非特異的蛋白質結合部位をブロックした後、患者血清を一次抗体、アルカリフォスファターゼ結合抗ヒトIgG抗体を二次抗体とするイムノスクリーニングを行った。1回目のスクリーニングでいくつかの陽性プラークが得られた。そのうち特に反応の強いプラークを取り出し、再度スクリーニングを行い、

ブランクが単一になるまで同じ操作を繰り返した。その結果、この抗原を発現している菌体由来DNAは約1.5kbpの大きさであった。また、ウエスタンブロットィングよりこのDNAの発現する蛋白は分子量33~35kDaであった。

得られた1.5kbpのDNAの塩基配列を決めるために、DNAをpUC118プラスミドにサブクローニングし、オートラジオグラフィおよび自動DNAシーケンサーにより塩基配列を解析した。塩基配列から予想されるアミノ酸配列をみたところ、ATG(メチオニン)で始まる2つのopen reading frame(ORF)と考えられる部分が存在していた。大きさは590bpと950bpであり、それぞれ蛋白の分子量に換算すると約21kDaと34kDaであった。ウエスタンブロットィングより患者血清と反応した抗原蛋白は分子量33~35kDaであり、後者のORFに相当する大きさであった。さらに、その16b上流にはリボゾームRNAの結合部位であるShine-Dalgarno配列と思われる部分を有していることから、後者のORFが抗原蛋白を発現している可能性が高いと考えられた。ただ、このORFはストップコドンをもたないままEcoRI siteに移行していたため、その下流部分のクローニングをgenome walking法により行った。その結果、3.3kbpのDNAをクローニングしたところで、ストップコドンが認められた。目的のORFの大きさは2547bp、849のアミノ酸からなり分子量は94758.64Daであった。

次に、クローニングした遺伝子が実際に蛋白を発現しているかを調べた。ORFの前後にプライマーを設定し、polymerase chain reactionにてORFを含んだ領域のDNAを増幅し、プラスミドベクターにライゲーションし、大腸菌を用いて蛋白発現の有無を調べた。ウエスタンブロットィングを行ったところ、95kDaの大きさの患者血清と強く反応する蛋白が認められた。この蛋白は健常人の血清とは反応がみられなかった。以上のことから、クローニングした連鎖球菌由来の遺伝子は、蛋白を発現しており、この蛋白に対してベーチェット病患者は感作されていることが明らかとなった。

同定した蛋白のホモロジーサーチを行ったところ、ヒト網膜のganglion cellで発現されているBrn-3b gene productとホモロジーがみられた。これはホメオボックス遺伝子のなかのPOU domainに含まれており、生体の分化や機能維持に関係している。これまでのところ、ヒトでは特定の疾患との関連は報告されていないが、ベーチェット病あるいはぶどう膜炎との関連について検索していく必要があると考えている。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 松田 英彦

副査 教授 皆川 知紀

副査 教授 小野江 和則

学位論文題名

## Cloning and sequencing of BES-1 gene encoding the immunogenic antigen of *Streptococcus sanguis* KTH-1 isolated from the patients with Behçet's disease

(ベーチェット病患者から分離された *Streptococcus sanguis* KTH-1 の免疫抗原遺伝子 BES-1 の解析)

ベーチェット病は内因としての病因遺伝子が存在し、ある特定の外因が作用したときに発症する多因子性疾患であると考えられており、外因としては微生物感染が古くから研究されている。申請者らはこれまでベーチェット病患者の口腔内細菌叢を調べ、*Streptococcus (S.) sanguis* が健常人に比べ有意に増加していること、その血清型は標準株とは異なる新しいタイプの血清型であること、この菌に対して患者は高い抗体価を示し細胞性免疫能も亢進していることを明らかにしてきた。本論文ではベーチェット病における連鎖球菌の免疫学的な役割を検討するために、連鎖球菌抗原の同定を行った。材料としてベーチェット病患者の口腔内から分離された *S. sanguis* KTH-1 を用い、菌の発現する抗原蛋白のうち患者血清と強く反応する蛋白の遺伝子クローニングを行った。まず菌を培養後、アルカリ SDS、プロテイナーゼ K などを用いて菌体 DNA を抽出した。DNA を *Eco* RI で消化し、 $\lambda$ gt 11 を用いて DNA ライブラリーを作製した。この  $\lambda$ gt 11 を大腸菌に感染させ、プレート上で IPTG で飽和したニトロセルロースフィルターを被せ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ融合蛋白質を発現させた。非特異的蛋白質結合部位をブロックした後、患者血清を一次抗体、アルカリフォスファターゼ結合抗ヒト IgG 抗体を二次抗体とするイムノスクリーニングを行った。もっとも反応の強いプラークを取り出しスクリーニングを繰り返した。その結果、抗原を発現している菌体由来 DNA は約 1.5 kbp であった。また、ウエスタンブロッティングよりこの DNA の発現する蛋白は分子量 33~35 kDa であった。得られた 1.5 kbp の DNA の塩基配列を決めるために、DNA を pUC 118 プラスミドにサブクローニングし、オートラジオグラフィおよび自動 DNA シークエンサーにより塩基配列を解析した。塩

基配列から予想されるアミノ酸配列をみたところ、ATGで始まる2つのopen reading frame (ORF)と考えられる部分が存在していた。大きさは590 bpと950 bpであり、それぞれ蛋白の分子量に換算すると約21 kDaと34 kDaであった。ウエスタンブロッティングより患者血清と反応した抗原蛋白は分子量33~35 kDaであり、後者のORFに相当する大きさであった。さらに、その16 b上流部分にはリボゾームRNAの結合部位であるShine-Dalgarno配列と思われる部分を有していることから、後者のORFが抗原蛋白を発現している可能性が高いと考えられた。ただ、このORFはストップコドンをもたないままEcoRI siteに移行していたため、その下流部分のクローニングをgenome walking法により行った。その結果、3.3 kbpのDNAをクローニングしたところで、ストップコドンが認められた。目的のORFの大きさは2547 bp、849のアミノ酸からなり分子量は94,800 Daであった。次に、クローニングした遺伝子が実際に蛋白を発現しているかを調べた。ORFの前後にプライマーを設定し、PCRにてORFを含んだ領域のDNAを増幅し、pGEM-Tベクターにライゲーションし、大腸菌を用いて蛋白発現の有無を調べた。ウエスタンブロッティングを行ったところ、95 kDaの大きさの患者血清と強く反応する蛋白が認められた。この蛋白は健常人の血清とは反応がみられなかった。以上のことから、クローニングした連鎖球菌由来の遺伝子は蛋白を発現しており、この蛋白に対してベーチェット病患者は感作されていることが明らかとなった。同定した蛋白のホモロジーサーチを行ったところ、ヒト網膜のganglion cellで発現している*Brn-3b* gene productとホモロジーがみられた。

以上の発表について、皆川知紀教授から口腔内にベーチェット病特有の連鎖球菌を持つ患者と持たない患者との間で、同定した連鎖球菌抗原に対する反応に違いがみられるかどうかという点について質問があった。小野江和則教授から同定した連鎖球菌抗原に対するベーチェット病患者の免疫反応においてT細胞、特に $\gamma\delta$ T細胞はどのように関わっているか、ホモロジーのみられた*Brn-3b*の網膜における役割について質問があった。次いで主査の松田英彦教授から抗原を同定することにより治療への応用の可能性について質問があった。いずれの質問に対しても申請者はこれまでの口腔内細菌検索、血清抗体価の測定、抗原を用いた皮内反応のデータ等を引用し、患者の抗原に対する反応の相違、T細胞、B細胞の相互作用、*Brn-3b*とのmimicryについて、および抗原特異的免疫反応の抑制による治療についてspeculationを交えて、豊富な知識に基づいて明解に回答した。

審査員一同は、これらのベーチェット病における免疫抗原を同定することにより発症機序の解明から治療へと発展させることのできる研究成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。