

川崎病の原因究明：毒素遺伝子検索の試み

竹田 美文

要約： 川崎病の病態は、A群溶血性連鎖球菌感染症の病態と類似している。A群溶血性連鎖球菌の猩紅熱等の病態は本菌によって産生される Exotoxin によって引き起こされると考えられている。川崎病の病態も Exotoxin と類似した毒素で引き起こされるのではと考え、PCR (DNA 増幅) 法で Exotoxin A の DNA プローブを作製し、川崎病患者由来の主としてグラム陽性菌を対象に、本毒素と類似した毒素が存在するかについて、コロニーハイブリダイゼーション試験によって調べていく。

見出し語： A群溶血性連鎖球菌、Exotoxin
DNA プローブ法

我々は、川崎病の病態を毒素で説明できるのではないかと考え、以下の作業仮説を立てた。すなわち、A群溶血性連鎖球菌の猩紅熱等の病態は、本菌によって産生される Exotoxin によって引き起こされると考えられている。A群溶血性連鎖球菌感染症と川崎病の病態とは極めてよく似ていることから、川崎病の病態もA群溶血性連鎖球菌の産生する Exotoxin と類似した毒素で引き起こされるのではと考えた。我々の腸管感染細菌の下痢原因毒素の研究から、例えばコレラ菌の産生するコレラ毒素と類似の毒素が、大腸菌や *Citrobacter freundii* 等の異なった菌種間にも存在することが明らかになっている。その他の例として、腸炎ビ

ブリオの産生する耐熱性溶血毒と類似の毒素が NAG-vibrio *Vibrio mimicus*, *Vibrio hollisae* から、赤痢菌の産生する志賀毒素と類似の毒素が大腸菌から、大腸菌の産生する耐熱性エンテロトキシンと類似の毒素が、*Yersinia enterocolitica*, NAG-vibrio, *Vibrio mimicus*, *Citrobacter freundii* などからもみつまっている。一方、同一菌種から類似した複数の毒素が産生されている例もみつまっている。例えば、大腸菌から赤痢菌が産生する志賀毒素と類似の毒素、Shiga-like toxin または、Vero toxin と呼ばれるものが5種類、腸炎ビブリオの産生する耐熱性溶血毒も7種類存在している。これらの現象は、毒素蛋白をコードしている遺伝

子が、ファージやプラスミドまたはトランスポゾン上に存在し、同一菌種間あるいは異なった菌種間を移動した後、進化の過程で変異が起こり、似て非成る毒素へと変化したものと考えられる。これらの事を川崎病の病態に照らし合わせてみると、A群溶血性連鎖球菌の病原因子であるExotoxinが連鎖球菌あるいはその他のグラム陽性菌の間を移動する間に変異が起こり、このExotoxinと類似の毒素が川崎病の病態と深くかかわっている可能性が考えられる。以上の観点から、A群溶血性連鎖球菌の産生するExotoxin A,B,Cに着眼し、川崎病患者由来の菌株から本毒素と類似した毒素が検出されるかどうかを調べ、川崎病との関連について調べていく。

現在まで、Exotoxin A,B,Cの毒素遺伝子は既にクローニングされており、Exotoxin A,Cについてはその構造遺伝子の全塩基配列が報告されている。我々は、Exotoxinまたは、その類似毒素の存在を調べるためにExotoxin A,Cそれぞれに特異的なプローブを作製することにした。まず、Exotoxin Aのプローブを1986年にInfection and Immunityの52巻p144-150にWeeksとFerrettiらが報告したExotoxin Aの塩基配列を元にPCR (DNA増幅)法にて作製した。すなわち、開始コドンより約90番目付近の20merと終止コドンより約280番目付近の22merにあたるオリゴヌクレオチドをプライマーとし*Streptococcus pyogenes* NY-5株より調整した菌体DNAを鋳型として構造遺伝子の約52%、成熟蛋白の約60%をコードする遺伝子を含む393bpのDNAを合成した。増幅したDNAは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて目的とする分子量であることを確認した。現在この段階までの

実験が完了しているので、今後は、合成したDNA断片が目的としたDNA塩基配列であるかどうかを以下の方法にて確認する。ポリアクリルアミドゲルより増幅したDNA断片を切り出しT4 DNA polymeraseでDNA末端を平滑化し、プラスミドベクター-pUC118に挿入する。*E. coli* MV1184を宿主として作製した組換えDNAを形質転換させ目的とする遺伝子をクローニングし、クローン化した菌株にヘルパーファージを感染させ、一本鎖DNAを調整し、サンガー法にて塩基配列の確認を行う。塩基配列の確認をした後、この約400bpのDNA断片を制限酵素で切り出し、ランダムプライミング法により³²Pでラベルする。このようにして³²Pでラベルしたプローブが用意できたら、川崎病患者のまず咽頭培養、ついでその他の材料より培養した主としてグラム陽性菌について約80%以上の相同性のあるDNAが検出できるHigh stringencyおよび約65%以上の相同性のあるDNAが検出できるLow stringencyの条件下でコロニーハイブリダイゼーションを行いExotoxin Aと類似の毒素遺伝子が存在するかを調べていく予定である。また、同様にExotoxin Cと類似した毒素遺伝子の存在についても調べていく予定である。



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:川崎病の病態は、A群溶血性連鎖球菌感染症の病態と類似している。A群溶血性連鎖球菌の猩紅熱等の病態は本菌によって産生される Exotoxin によって引き起こされると考えられている。川崎病の病態も Exotoxin と類似した毒素で引き起こされるのではと考え、PCR(DNA 増幅)法で ExotoxinA の DNA プローブを作製し、川崎病患者由来の主としてグラム陽性菌を対象に、本毒素と類似した毒素が存在するかについて、コロニーハイブリダイゼーション試験によって調べていく