

A群溶血性連鎖球菌が産生する発赤毒遺伝子のPCRによる 型別について

竹田美文

要約： A群溶血性連鎖球菌が産生する3種類の発赤毒SPE-A, SPE-B, SPE-Cそれぞれの遺伝子をPCR法によって型別判定する方法を確立した。この方法によってSPE-A, SPE-B, SPE-Cの遺伝子DNAを1~10pgの微量で検出でき、また培養液を用いた場合は、それぞれの遺伝子を持つ菌が30-300CFUあれば検出できた。この方法を利用して、今後、川崎病患者由来の*Streptococcus*がSPEないしはその類似毒素を産生するかどうかを調べる。

見出し語： A群溶血性連鎖球菌、発赤毒、SPE-A, SPE-B, SPE-C, PCR

A群溶血性連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)の産生する発赤毒(streptococcal pyogenic exotoxin, SPE)は猩紅熱の原因毒素と考えられ、その精製と生物活性について多くの研究が行われてきた。SPEの生物活性は極めて多彩で、発熱性、紅斑惹起性、致死性、細胞障害性のほか、エンドトキシンショックの感受性の増大、細網内皮系の機能低下、免疫応答抑制作用、マイトージェン活性などが報告されていて、さらに最近、SPEをスーパー抗原として位置づける報告も行われている。

川崎病の病態がA群溶血性連鎖球菌感染症の病態と類似点があるところから、川崎病が本菌が産生するSPEないしはSPE類似毒素による可能性を考え、まずSPE遺伝子をPCR法によって型別判定する方法を確立することを試みた。

プライマーの設計

プライマーの設計は、すでに報告されているSPEの構造遺伝子の塩基配列よりに基づいて、SPE-A, SPE-B, SPE-Cの特異性を考慮して行った。増幅されるDNA断片が、大きさの違いから、電気泳動後の泳動位置によりいずれの遺伝子由来するのかが容易に判別できるよう工夫した。

反応条件と判定

反応液は、10mM Tri-HCl pH8.5, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 0.2mM dNTP(dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 0.2-1μMプライマーよりなり、これに加熱処理菌液1μl, 2.5U Taq DNAポリメラーゼ(Perkin-Elmer Cetus)を加えて混合し、さらに50μlのミネラルオイルを重層した。増幅反応には、Thermal Sequencer TRS-300(Iwaki Glass CoLtd.)を用い、熱変性94℃、1分、アニーリング52℃、1.5

分、鎖長反応72℃、1.5分の条件で、通常30サイクルで増幅を行った。増幅したDNA断片は、6%ポリアクリルアミド電気泳動法により検出した。図1に標準菌株（P.Schlievert博士より分与された*S. pyogenes*594株86-858株およびT18P株）および遺伝子陰性対照菌株（*S. agalactiae* 5127株）の結果を示した。SPE-Aの標準株594株、SPE-Bの標準株86-858株、SPE-Cの標準株T18P株それぞれが*speA*, *speB*, *speC*のプライマーから計算される大きさのDNA断片を保持していることが示されている。なお標準菌株594株とT18P株は、SPE-B遺伝子も保有していることがわかる。増幅DNA断片がそれぞ

れ*speA*, *speB*, *speC*由来のものかどうかの確認は、増幅したDNAを特定の制限酵素（増幅したDNAを2つの断片にし、か切断しないことをあらかじめ塩基配列から確認した制限酵素：SPE-A遺伝子由来のDNA断片の場合は*Hin*II, SPE-B遺伝子由来のDNA断片の場合は*Pst*I, SPE-C遺伝子由来のDNA断片の場合は*Eco*RV）で処理した後の断片のパターンを調べることや、それぞれのDNA断片内の特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションで行うことができる。

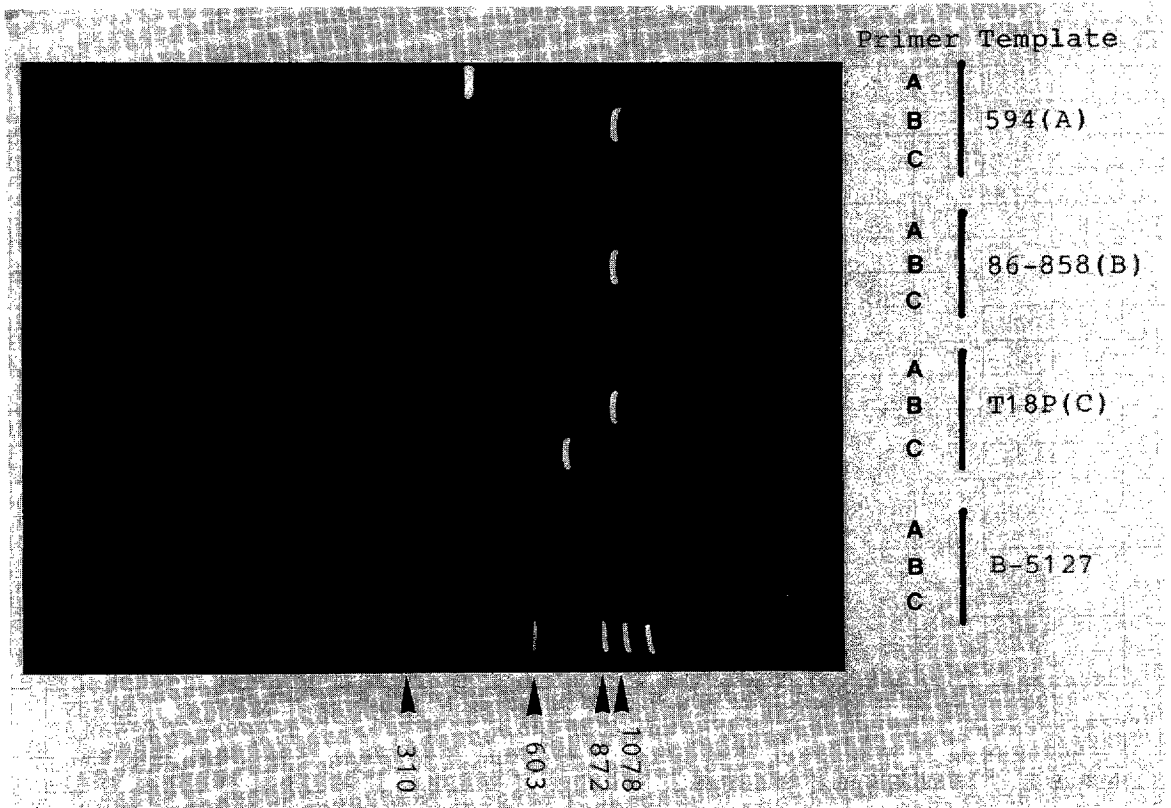


図1：A群溶連菌標準菌株でのPCR反応：電気泳動後の増幅DNA断片。

標準菌株*S. pyogenes*594株、86-858株、T18P株およびSPE遺伝子陰性の*S. agalactiae*B-5127株の培養菌液を用いて、それぞれSPE-A,B,C遺伝子用プライマーでDNA断片の増幅を行った。分子量マーカーは、制限酵素*Hae* III処理X-174ファージDNA。

サンプルの調製法

被検菌をBrain heart infusion培地(Difco)にて37℃一夜振盪培養後、滅菌蒸留水にて10倍に希釈し、95℃、5分間加熱処理して溶菌したものをサンプルとする。被検菌より調製した全DNAをサンプルとする場合には、上述の培養菌を1mM EDTAを含むTris-HCl緩衝液(10mM)で洗浄後、SDS存在下で65℃、30分間加温した。遠心後の菌体をマイクロウェーブオーブンで900W、1分間の処理を3回行い、常法に従って

フェノール・クロロフォルム抽出、エタノール沈澱後、さらにRNase処理して全DNAを得た。

検出感度

本法によるSPE遺伝子の検出感度を図2に示した。すなわち、全DNAを用いた場合、SPE-A、SPE-B、SPE-C遺伝子のすべてが1-10pgの微量で検出できた。培養液を用いた場合の検出感度は、30-300CFUであった。

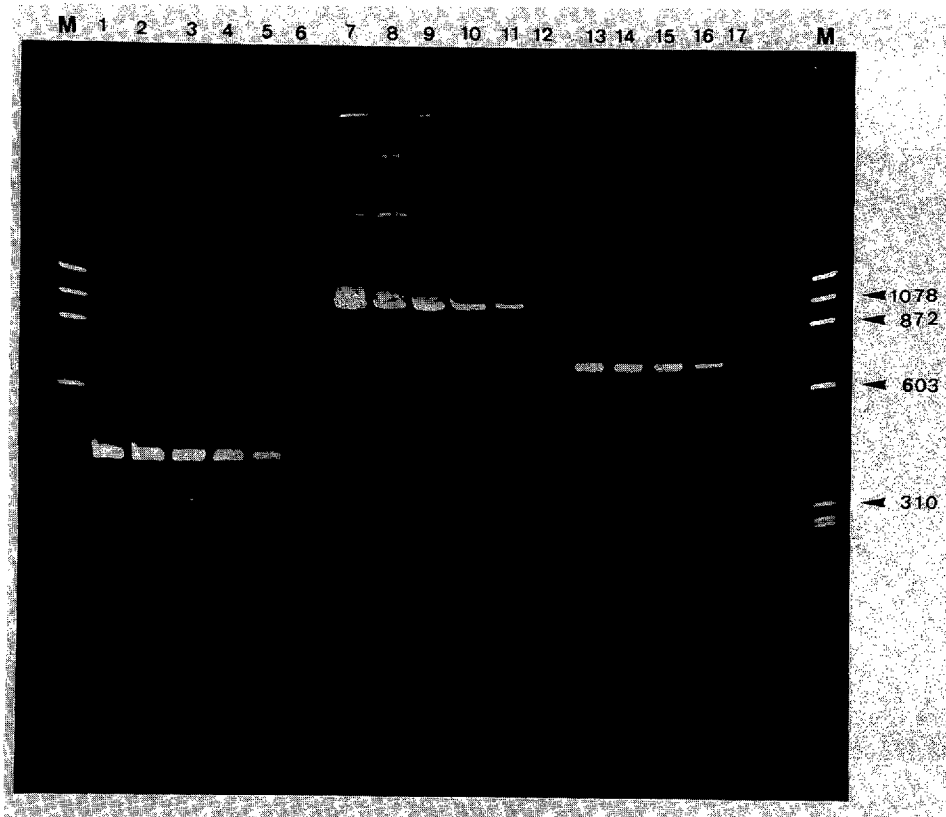


図2：PCR法によるSPE遺伝子由来DNAの検出感度。

3種のSPE遺伝子を保有することをあらかじめ確認した*S. pyogenes* #25株(臨床由来)の全DNAを調製し、100ng(lane 1, 7, 13), 10ng(lane 2, 8, 14), 1ng(lane 3, 9, 15), 100pg(lane 4, 10, 16), 10pg(lane 5, 11, 17), 1pg(lane 6, 12, 18)をPCR反応に供した。Lane 1-6, 7-12, 13-17に、SPE遺伝子それぞれの増幅DNA断片が観察でき、SPE-A, B遺伝子用プライマーの検出感度は1pg、SPE-C遺伝子用プライマーの検出感度は10pgであることがわかった。分子量マーカー(M)は、制限酵素Hae III処理X-174ファージDNA。



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:A群溶血性連鎖球菌が産生する3種類の発赤毒 SPE-A, SPE-B, SPE-Cそれぞれの遺伝子をPCR法によって型別判定する方法を確立した。この方法によって SPE-A, SPE-B, SPE-Cの遺伝子DNAを1~10pgの微量で検出でき、また培養液を用いた場合は、それぞれの遺伝子を持つ菌が30-300CFUあれば検出できた。この方法を利用して、今後、川崎病患者由来のStreptococcusがSPEないしはその類似毒素を産生するかどうかを調べる。