

学位論文  
Doctor's Thesis

細菌感染におけるプロテアーゼによるアポトーシス誘導  
と病態発現の分子メカニズムに関する研究  
( Molecular Mechanism of Apoptosis Induction by Bacterial  
Proteases and Its Implication for Bacterial Pathogenesis )

田村 文雄  
Fumio Tamura

指導教官

熊本大学大学院医学研究科博士課程微生物学

前田 浩 前教授

熊本大学大学院医学研究科博士課程内科学第一

安藤 正幸 前教授

紹介教授

熊本大学大学院医学教育部消化器内科学

佐々木 裕 教授

2004年度

学位論文  
Doctor's Thesis

論文名：細菌感染におけるプロテアーゼによるアポトーシス  
誘導と病態発現の分子メカニズムに関する研究  
(Molecular Mechanism of Apoptosis Induction by Bacterial  
Proteases and Its Implication for Bacterial Pathogenesis)

著者名：田村 文雄 (Fumio Tamura)

指導教官名：熊本大学大学院医学研究博士課程微生物学

前田 浩 前教授

熊本大学大学院医学研究科博士課程内科学第一

安藤 正幸 前教授

紹介教授名：熊本大学大学院医学教育部消化器内科学

佐々木 裕 教授

2004年度

## 要 旨

### 【目的】

Streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB)として知られるチオールプロテアーゼによるアポトーシスの誘導が、劇症型 A 群レンサ球菌感染症の病態発現に関与することが示唆されている。また、以前より我々は SpeB などの各種細菌性プロテアーゼによるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 活性化機構について解析してきた。そこで今回、各種細菌性プロテアーゼによる宿主細胞のアポトーシス誘導機序を解析した。あわせて、劇症型 A 群レンサ球菌感染症における SpeB による MMP の活性化を介するアポトーシス誘導とその病態生理学的意義について検討した。

### 【方法】

U937 細胞を、SpeB、*Serratia marcescens* 56 kDa protease、および *Pseudomonas aeruginosa* elastase などの細菌性プロテアーゼにより処理しアポトーシスの誘導をみた。アポトーシス誘導機序解明のため、抗アポトーシス蛋白の Bcl-2、c-IAP1、hsp70 の発現量を Western blot 法にて検討した。また、SpeB、proMMP-9 や proMMP-2 などの組換え蛋白を作製し、SpeB による proMMP の活性化、およびそれに伴う可溶性 Fas ligand (FasL) や tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  の細胞外放出によるアポトーシスの誘導について解析した。さらに、劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスにおける MMP の活性化と血清中の FasL、TNF- $\alpha$  を ELISA 法にて測定し、劇症型感染症におけるアポトーシスの関与について検討を試みた。

### 【結果】

各種細菌性プロテアーゼは濃度依存性にアポトーシスを誘導した。また、serratial protease 処理細胞では、 $\alpha_2$ -マクログロブリンと complex をつくり細胞内に移入後、細胞内の c-IAP1 を分解し、アポトーシスを誘導する可能性が示唆された。SpeB は、proMMP-9 および proMMP-2 を限定分解し、活性体に変換した。活性体 MMP-9 は膜型 FasL や TNF- $\alpha$  を processing し、可溶性 FasL や TNF- $\alpha$  を細胞外に放出してアポトーシスを誘導していた。さらに、劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスにおいても、MMP-9、-2 の増加と血清中の可溶性 FasL、TNF- $\alpha$  が著明に上昇しており、肺病巣では著しいアポトーシスが認められた。しかし、SpeB 欠損 A 群レンサ球菌株による感染では、MMP の活性化、可溶性

FasL、TNF- $\alpha$ の上昇およびアポトーシスの誘導は軽微であった。

【結語】

細菌性プロテアーゼによる宿主細胞の c-IAP1 の分解は、細菌感染によるアポトーシス誘導の新たな機序と考えられた。SpeB は、proMMP を限定分解して活性体とするが、活性体 MMP は FasL や TNF- $\alpha$ の細胞外放出を促進し、アポトーシスを誘導していることが示された。劇症型 A 群レンサ球菌感染症において、SpeB が MMP の活性化および組織内 FasL や TNF- $\alpha$ の上昇を引き起こし、アポトーシスを促進することにより、劇症化の病態に深く関与しているものと思われた。

## Abstracts

Apoptosis has been implicated in the mechanism of bacterial pathogenesis, which involves a variety of host-pathogen interaction and bacterial proteases. Recently it was shown that streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB), a thiol protease derived from group A *Streptococcus* (GAS) could cause an increase in apoptotic cell death. The present study is aimed to clarify the mechanism of apoptosis induced by a variety of bacterial proteases. When human monocyte-like U937 cells were treated with SpeB, *Serratia marcescens* 56kDa protease, or *Pseudomonas aeruginosa* elastase, all these bacterial proteases induced apoptosis in U937 cells. Serratial protease was internalized by the cells in culture as a complex form with  $\alpha_2$ -macroglobulin ( $\alpha_2$ -M) via  $\alpha_2$ -M receptor, which resulted in apoptosis. Furthermore, expressions of Bcl-2, c-IAP1 and hsp70, which were anti-apoptotic proteins, were investigated by Western blot analysis after treatment of U937 cells with serratial protease. Serratial protease degraded c-IAP1 protein more selectively than others intracellular proteins. It has been shown that TNF- $\alpha$  and Fas ligand were processed from the cell surface by MMPs. We previously reported that some bacterial proteases could activate human MMPs, which may play important roles in tissue degeneration, and in the present study, SpeB also was confirmed activation of MMPs. We investigated whether SpeB-activated MMP could process TNF- $\alpha$  and Fas ligand from cell membrane to cause apoptotic cell death. SpeB activated with proMMP-9, and soluble TNF- $\alpha$  and Fas ligand were released from culture cells by this activated MMP-9. SpeB-dependent induction of extensive apoptosis and its related proapoptotic molecules, e.g., soluble TNF- $\alpha$ , Fas ligand, and MMPs, was evident in a murine model of severe GAS infections. These results suggested that bacterial proteases induce apoptotic cell death either via  $\alpha_2$ -M receptor, or via activation of MMPs.

## 発表論文リスト

- 1) Tamura, F., Nakagawa, R., Akuta, T., Okamoto, S., Hamada, S., Maeda, H., Kawabata, S., and Akaike, T. Proapoptotic effect of proteolytic activation of matrix metalloproteinases by *Streptococcus pyogenes* thiol proteinase (*Streptococcus pyogenes* exotoxin B). *Infect. Immun.* 72(8): 4836-47, 2004.
- 2) Alam, MS., Akaike, T., Okamoto, S., Kubota, T., Yoshitake, J., Sawa, T., Miyamoto, Y., Tamura, F., and Maeda, H. Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities. *Infect. Immun.* 70(6): 3130-42. 2002.
- 3) Akaike, T., Okamoto, S., Sawa, T., Yoshitake, J., Tamura, F., Ichimori, K., Miyazaki, K., Sasamoto, K., and Maeda, H. 8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100(2): 685-90. 2003.
- 4) Tanaka, S., Akaike, T., Fang, J., Beppu, T., Ogawa, M., Tamura, F., Miyamoto, Y., and Maeda, H. Antiapoptotic effect of haem oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumour. *Br. J. Cancer.* 88(6): 902-9. 2003.
- 5) Yoshitake, J., Akaike, T., Akuta, T., Tamura, F., Ogura, T., Esumi, H., and Maeda, H. Nitric oxide as an endogenous mutagen for Sendai virus without antiviral activity. *J. Virol.* 78(16): 8709-19. 2004.
- 6) Okamoto, T., Akuta, T., Tamura, F., van der Vliet, A., and Akaike, T. Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation. *Biol. Chem.* 385: 997-1006. 2004.
- 7) 田村文雄、赤池孝章、前田 浩  
インフルエンザウイルスとA群レンサ球菌複合感染モデルマウスにおけるオセルタミビルとセフジニルの併用効果  
*新薬と臨床.* 52(3): 83-88, 2003
- 8) 田村文雄、前田 浩  
HIVプロテアーゼインヒビター  
*臨床検査.* 47(8): 903-5, 2003

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜わりました熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野 前田 浩前教授（名誉教授）ならびに内科学第一講座 安藤正幸前教授、消化器内科学 佐々木裕教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の立案・遂行および論文作成にあたり、御教示、御指導を賜わりました熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野 赤池孝章助教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究において、御支援、御助言を賜わりました熊本大学大学院医学薬学研究部 微生物学分野の芥 照夫助手をはじめ、宮本洋一前助手、澤 智裕前助手および微生物学分野および内科学第一講座、消化器内科学の諸氏に心より感謝いたします。

## 目 次

要 旨 (和文) -----	1
要 旨 (英文) -----	3
発表論文リスト -----	4
謝 辞 -----	5
目 次 -----	6
略語一覧 -----	9
第 1 章 背景と目的 -----	11
1.1 アポトーシスと細菌感染 -----	11
アポトーシスの概要	
細菌感染におけるアポトーシス誘導	
1.2 細菌性プロテアーゼと病原性 -----	12
細菌性プロテアーゼの多面的機能	
細菌性プロテアーゼと MMP	
細菌性プロテアーゼによる細胞傷害	
劇症型 A 群レンサ球菌感染症	
1.3 本研究の目的 -----	16
第 2 章 実験方法 -----	21
2.1 細菌性プロテアーゼによる細胞死の検討 -----	21
2.1.1 細菌性プロテアーゼによる細胞死誘導	
2.1.2 プロテアーゼインヒビター	
2.1.3 NO compound	
2.2 Caspase-3 活性の測定 -----	22
2.3 Flow cytometry (FACS)によるアポトーシスの解析 -----	22
2.4 $\alpha_2$ -マクログロブリン ( $\alpha_2$ -M) -----	23
2.5 ウエスタンブロット法による抗アポトーシス蛋白発現検出 -----	23
2.6 組換え蛋白質の精製 -----	24
2.6.1 組換え SpeB 蛋白の発現・精製	
2.6.2 ProSpeB(C192S)変異蛋白の発現・精製	
2.6.3 組換え proMMP-9 蛋白の発現・精製	



2.6.4	組換え proMMP-2 蛋白の発現・精製	
2.7	MMP の活性化	29
2.7.1	細菌性プロテアーゼによる MMP-9、-2 の限定分解	
2.7.2	ゼラチン分解	
2.7.3	ゼラチンザイモグラフィ (gelatin zymography)	
2.8	可溶型 Fas ligand (sFasL) の検出とアポトーシスの誘導	30
2.9	TNF- $\alpha$ の ELISA 法による検出とアポトーシスの誘導	30
2.10	劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウス	31
2.10.1	モデルマウスの作成	
2.10.2	血液、肺胞洗浄液 (BALF) および組織標本の準備	
2.10.3	HE 染色および TUNEL 染色	
2.10.4	血清および BALF 中の TNF- $\alpha$ および sFasL の検出 (ELISA 法)	
2.10.5	BALF の gelatin zymography	
第 3 章	実験結果	37
3.1	細菌性プロテアーゼによる細胞死の検討	37
3.1.1	各種細菌性プロテアーゼによる細胞死	
3.1.2	プロテアーゼインヒビターの効果	
3.1.3	細胞死と caspase-3 活性	
3.1.4	細胞死に対する NO の影響	
3.1.5	Flow cytometry によるアポトーシスの検出	
3.2	$\alpha_2$ -M を介したアポトーシス誘導	38
3.3	抗アポトーシス蛋白発現への影響	38
3.4	組換え蛋白の発現	39
3.5	SpeB による proMMP-9、-2 の活性化	39
3.6	SpeB によって活性化された MMP-9 による可溶型 Fas ligand と TNF- $\alpha$ の細胞外放出	40
3.7	可溶型 FasL、TNF- $\alpha$ を含む培養液のアポトーシス誘導効果	40
3.8	劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスの生存率	41
3.9	劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウス肺組織と TUNEL 染色	41
3.10	劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスにおける MMP と可溶型	

FasL、TNF- $\alpha$ .....	41
3.11 SpeB 欠損 TR-11 株との複合感染 .....	41
第 4 章 まとめ・考察 .....	59
第 5 章 結 語 .....	62
参考文献 .....	64

## 略語一覽

IpaB: invasive plasmid antigen B

SipB: *Salmonella* invasion protein B

YopJ: *Yersinia* outer protein

FasL: Fas ligand

GAS: group A *streptococci*

MMP: matrix metalloproteinase

MT-MMP: membrane type matrix metalloproteinase

ARDS: acute respiratory distress syndrome

TIMP: tissue inhibitor of metalloproteinases

$\alpha_2$ -M:  $\alpha_2$ -macroglobulin

Spe: streptococcal pyrogenic exotoxin

SpeB: streptococcal pyrogenic exotoxin B

E 64: trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido (4-guanidino)-butane

Ac-DMQD-CHO: acetyl-L-Asp-L-Met-L-Gln-L-Asp-aldehyde

Z-VAD-FMK: benzylcarbonyl-L-Val-L-Ala-L-Asp-fluoromethyl ketone

p-NONOate: propylamine NONOate ( $\text{CH}_3\text{N}[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2^+\text{CH}_3$ )

GSNO: S-nitrosoglutathione

$\alpha_1$ -PI:  $\alpha_1$ -protease inhibitor

PMSF: phenylmethanesulfonyl fluoride

DTT: 1,4-dithiothreitol

APMA: p-amino phenyl mercuric acetate

CBB: Coomassie brilliant blue

PCR: polymerase chain reaction

FCS: fetal calf serum

PBS: phosphate-buffered saline

DMSO: dimethyl sulfoxide

FPLC: fast performance liquid chromatography

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane

BPB: bromophenol blue

DIC: disseminated intravascular coagulation

IPTG: isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactoside

MOI: multiplicity of infection

SDS: sodium dodecyl sulfate

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

MEM: minimal essential medium

PLP: periodate-lysine-paraformaldehyde

## 第一章 研究の背景と目的

### 1.1 細菌感染とアポトーシス

#### アポトーシスの概要

細胞死は、ネクローシス (necrosis) とアポトーシス (apoptosis) に大別される。ネクローシスが、非生理的な受動的細胞死であるのに対して、アポトーシスは、遺伝子によって制御された細胞の能動的な自己消去機構 (programmed cell death: プログラム細胞死) である (Kerr et al., 1972)。このアポトーシスの制御異常が、がんや自己免疫疾患、AIDS などのウイルス感染症、アルツハイマー病などの神経変性疾患といった様々な疾病と密接に関係していることが明らかになってきた (Thompson, 1995)。

アポトーシスは現在、細胞の形態学的変化と生化学的変化によって定義される。形態学的には、ネクローシスは細胞が膨化するのに対して、アポトーシスでは細胞は縮小化し、クロマチンの凝縮や核の断片化をおこし、最終的には細胞自体も断片化して、いわゆる“アポトーシス小体”を形成する。生化学的には、細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度の上昇や、特定蛋白の限定分解やリン酸化、活性化がみられ、またアポトーシスの顕著な特徴としてヌクレオソーム単位でのクロマチン DNA の断片化が起こる。アポトーシスを誘導するシグナルとして、サイトカインやホルモン、ウイルス、抗原、活性酸素や薬物、放射線、栄養飢餓など種々の内外のストレスが要因になる。これらのシグナルの多くは、細胞膜上に存在するデスレセプターと呼ばれるレセプターに伝達される。このようなアポトーシスシグナルレセプターの細胞内には、アダプター蛋白やリン酸化カスケードがある。これらの下流において、核内の p53 などの細胞の生死を司るような転写因子による制御が細胞の運命を決定している。そして、アポトーシスの実行過程では caspases による特定タンパク質の限定分解が行われ、DNA の断片化へと進行しアポトーシスが完結していく (Tanuma, 1996; Schulze-Osthoff, 1998; Nagata, 1997; Cohen, 1997) (図 1-1)。

#### 細菌感染におけるアポトーシス誘導

感染症とアポトーシスの研究は、従来は AIDS に代表されるウイルス感染を対象に行われてきた。細菌感染とアポトーシスに関して、その意義やメカニズ

ムについても十分に明らかにされていなかった。しかし近年、細菌感染がアポトーシスを惹起すること、グラム陰性および陽性菌に問わず種々の細菌がアポトーシスを誘導し、さらに細菌が産生する内毒素、外毒素等を含む細菌代謝産物もアポトーシスを起こすことが明らかになってきた (Zychlinsky *et al.*, 1997)。その中で、*Shigella flexneri*、*Salmonella typhimurium*、*Yersinia enterocolitica*、*Yersinia pertis*、*Pseudomonas aeruginosa* について、アポトーシス誘導メカニズムが明らかになってきている (Grassmé, 2001)。*Shigella flexneri* が産生する IpaB (invasive plasmid antigen B) や *Salmonella typhimurium* が産生する SipB (*Salmonella* invasion protein B) は、type III secretion system により細胞内に取り込まれ、これら蛋白は caspase-1 に結合、活性化し、アポトーシスを誘導する (Chen, 1996; Hersh, 1999; Hilbi, 1998; Jesenberger, 2000)。*Yersinia* 属において、YopP および YopJ (*Yersinia* outer protein) も type III secretion system により細胞内に取り込まれ、転写因子 NF $\kappa$ B や MAP kinase をブロックすることによりアポトーシスを誘導することが示された。また、同蛋白がミトコンドリアの cytochrome c の放出に関与し、caspases の活性化も引き起こすことも明らかになっている (Orth, 1999; Orth, 2000; Denecker, 2001)。さらに、*Pseudomonas aeruginosa* 感染細胞において、CD95/CD95 ligand (Fas/FasL) の発現増加によりアポトーシスが誘導されることが知られている (Grassmé, 2000) (図 1-2)。

## 1.2 細菌性プロテアーゼと病原性

### 細菌性プロテアーゼの多面的機能

種々の細菌が産生するプロテアーゼは、宿主内への病原体の侵入や病原性に深く関与している。その作用機序として、宿主のさまざまな内因性プロテアーゼカスケードを活性化または不活性化することにより、感染病巣において病原性を発揮していることが明らかになってきた。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) やセラチア菌 (*Serratia marcescens*)、A 群レンサ球菌 (group A streptococcus, *Streptococcus pyogenes*) などでは、特に比較的多量のプロテアーゼを産生しており、これらのプロテアーゼが宿主プロテアーゼを活性化あるいは内因性プロテアーゼインヒビターを失活することにより、プロテアーゼカスケードの制御破綻をきたす。細菌性プロテアーゼの機能として、カリクレイン-キニンカスケードの活性化、凝固系カスケード、ウイルス活性化、内因性抗菌蛋白質とペプ

チドの破壊、細胞表面受容体の切断、免疫グロブリンの切断、補体カスケードの活性化や不活性化、サイトカインの活性化や不活性化、組織と血漿プロテアーゼインヒビターの不活性化、細胞外マトリックス蛋白質の崩壊、神経エキソサイトーシス抑制などの報告があり、いずれも感染病態において炎症反応や組織破壊、宿主防御および免疫機構に関わっており、これらの制御破綻は病原体の病態発現の誘因になっている (Trevis, 1995) (図 1-3)。

### 細菌性プロテアーゼと MMP

近年、組織破壊を進行させるマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase: MMP) も各種の細菌性プロテアーゼによって活性化されることが見いだされた (Okamoto, 1997; Maeda, 1998)。MMP ファミリーは、中性 pH 環境下で細胞外マトリックスの構成タンパク質を加水分解する亜鉛含有の蛋白分解酵素群である。1 次構造と基質特異性から、コラゲナーゼ群 (MMP-1, 8, 13)、ゼラチナーゼ群 (MMP-2, 9)、ストロムライシン群 (MMP-3, 10)、その他の群 (MMP-7, 11, 12 など)、膜型 MMP 群 (MT-MMP: MMP-14, 15, 16 など)、の 5 群に分類される。MT-MMP を除いたすべての MMP は、不活性前駆体 (proMMP) として産生・分泌され、細胞外で活性化される。特に、呼吸器系の細菌感染病態において、ゼラチナーゼ群 (MMP-2, 9) の重要性が指摘されており、肺線維症や ARDS (acute respiratory distress syndrome) などの急性肺炎では、これらゼラチナーゼ群の病態への関与が多数報告されている (Corbel, 2000; D'Ortho, 1994; Delclaux, 1997; Corbel, 1998)。

MMP は、生体内において MMP 遺伝子発現調節、proMMP の活性化、および TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) による活性阻害、と 3 つのステップで厳密に制御されている。特に、MMP の活性化には、従来 1) 蛋白分解酵素による活性化と、2) 化学修飾による活性化の 2 つの経路が報告されていた。トリプシン、キモトリプシン、プラスミンといった内因性セリンプロテアーゼによる蛋白分解酵素による MMP の活性化機構には、Nagase らの多段階活性化説 (step activation theory) で説明されていた。しかし、サーモライシン系に属する緑膿菌エラスターゼ、コレラ菌プロテアーゼ、そしてサーモライシンの 3 種の細菌性プロテアーゼは一度の反応・切断で proMMP を活性化することが明らかになった (Okamoto, 1997)。また、活性酸素種など化学修飾による MMP の活性化に関しては、Wart らのシステインスイッチ説 (cysteine switch theory) が

示されていたが、さらに ONOO<sup>-</sup>（パーオキシナイトライト：過酸化亜硝酸）などの活性酸化窒素種による proMMP の活性化とグルタチオンによる制御について新たに報告されている。それは、細菌感染による炎症に伴い NO（一酸化窒素）の過剰産生が惹起され、その後細胞外環境が酸化的に傾くと proMMP が活性化されるが、炎症の終焉により細胞外環境が還元的に傾くと、proMMP は前駆体を回復するといった制御システムである。すなわち、システインスイッチが炎症局所の酸化還元（redox state）状態に対するセンサーのような役割を果たしていることが明らかになった（Okamoto, 1997; Maeda, 1998; Okamoto, 2001）。

MMP は、細胞外マトリックス成分を分解、代謝に重要な役割を果たしているが、その基質は細胞膜タンパク質など多種類の細胞外マトリックス以外の分子に対しても分解活性を有しており、細胞の機能調節などの役割があることが示されている。MMP の多くは、アポトーシスを誘導する TNF- $\alpha$  や Fas ligand (FasL) を細胞膜から切断・遊離することが知られている（Mohler, 1994; Gearing, 1994; McGeehan, 1994; Kayagaki, 1995; Black, 1997; Moss, 1997）。

#### 細菌性プロテアーゼによる細胞傷害

以上のように、細菌性プロテアーゼの機能は多岐に渡るものの、細菌性プロテアーゼによる細胞傷害やアポトーシス誘導に関する報告は少なく、そのメカニズムについても殆ど解明されていない。

*Serratia marcescens* は、数種類のプロテアーゼを産生する。その中で、serratial 56 kDa protease は、 $\alpha_2$ -マクログロブリン ( $\alpha_2$ -M) と複合体を形成後、細胞傷害を起こすことが報告されている（Maeda, 1987; Maeda, 1989）。 $\alpha_2$ -M は、血漿プロテアーゼインヒビターの一つで、180 kDa の同一単量体が2つの SS 結合を介して逆向き の二量体となり、その二量体同士が非共有結合で集まった 720 kDa の高分子複合体である。各種のプロテアーゼは、 $\alpha_2$ -M 分子内部に取り込まれ失活するが、取り込まれたプロテアーゼの活性中心は無傷であり酵素活性は保持されたままである（図 1-4）（Sottrup-Jensen, 1989）。したがって、serratial protease は  $\alpha_2$ -M と複合体形成後、一旦は失活するが、細胞膜上に存在する  $\alpha_2$ -M レセプターを通じて、serratial protease は endocytosis で細胞内に移入され、プロテアーゼが再活性化されて細胞傷害を来すと考えられている。しかし、細胞内に移入された serratial protease が、どのようなメカニズムで細胞に傷害を与えるのか、また同細胞傷害はアポトーシスなのか、ネクローシスなのか不明である。



また、最近 *Streptococcus pyogenes* (A 群レンサ球菌) が産生する streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) が、ヒト単核球系細胞や上皮細胞に caspase cascade の活性化を介して、アポトーシスを誘導することが報告されているが、詳細な機序は解っていない (Kuo, 1999; Tsai, 1999)。

### 劇症型 A 群レンサ球菌感染症

A 群レンサ球菌は、ヒトの化膿性疾患をおこすグラム陽性球菌の一種である。扁桃炎などの急性炎症を引き起こす一般細菌であるが、一方で敗血症やショック、多臓器不全を来す劇症型の報告が世界的に報告されており、社会問題としても注目を浴びている。A 群レンサ球菌が産生する毒素性病原因子には、exotoxin、streptolysin、streptokinase など 20 種類以上の生理活性物質を培養上清中に産生している。特に、exotoxin いわゆる erythrogenic toxin (発赤毒素) は、streptococcal pyrogenic exotoxin (Spe) ともいわれ、この中の streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) はチオールプロテアーゼであり、これまでの研究により種々の生理活性をもつことがわかってきた。SpeB はフィブロネクチンやヴィトロネクチンを分解することにより組織破壊を促進したり (Kapur, 1993)、ヒトの interleukin 1b (IL-1b) の前駆体をプロセッシングし、活性型を生成して炎症反応の増強させたりする (Kapur, 1993)。また、ウロキナーゼレセプターを細胞表面から活性型として放出したり、キニノーゲンを活性化してキニンを遊離させる (Wolf, 1994; Herward, 1996)。さらに、既に述べたように、SpeB もまた MMP を活性化することが報告されている (Burns, 1996)。マウス A 群レンサ球菌感染モデルにおいて、あらかじめ SpeB でマウスを免疫しておくことと本感染症による致死率が改善することにより、SpeB が劇症型 A 群レンサ球菌感染症の主要な病原因子であることが示されている (Kapur, 1994)。劇症型 A 群レンサ球菌感染症は、レンサ球菌による急激な血管侵襲による重度の敗血症、出血性病変、DIC 様の病態を来す予後不良の疾患である。特に、壊死性筋膜炎や軟部組織壊死など広範なネクロシスを引き起こすが、病変部ではアポトーシス像が見られ、選択的に T 細胞がアポトーシスに陥っているという報告もあり、劇症型の病態に対してアポトーシスが、何らかの役割を演じている可能性が示唆されている (Watanabe-Onishi, 1995)。そして、SpeB は宿主細胞にアポトーシスを誘導することが知られており、この SpeB によるアポトーシス誘導のメカニズムを明らかにすることは、劇症型 A 群レンサ球菌感染症の病態を理解する上で大

変重要である。

### 1.3 本研究の目的

種々の細菌（病原微生物）が産生する細菌性プロテアーゼが、宿主の様々な内因性プロテアーゼカスケードを活性化あるいは不活性化することにより、生理的な生体防御機構の破綻を来たして、細菌は病原性を発揮している。しかし、細菌性プロテアーゼによる宿主細胞のアポトーシス誘導に関して、その誘導メカニズムや病原性に対するアポトーシスの意義には不明な点が多く、詳細な検討がなされていないのが現状である。本研究では、各種細菌性プロテアーゼによるアポトーシスの誘導を検討し、そのメカニズムを明らかにするとともに、細菌感染症におけるアポトーシス誘導の意義について考察する。まず、 $\alpha_2$ -マクログロブリン ( $\alpha_2$ -M) を介した細胞傷害について検討し、細菌性プロテアーゼによる細胞内の抗アポトーシス蛋白発現に対する影響について解析した。また、細菌性プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を活性化することが知られているが、一方 MMP は TNF- $\alpha$  や Fas ligand (FasL) のようなアポトーシス誘導分子を放出促進することが報告されている。そこで、特に A 群レンサ球菌が産生する streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) によるアポトーシスの誘導を、ゼラチナーゼ群 (MMP-2, -9) の活性化に焦点を当て、TNF- $\alpha$  や FasL の放出促進とアポトーシス誘導について解析した。さらに、劇症型 A 群レンサ球菌感染モデルマウスを用いて、本菌の劇症感染における SpeB によるアポトーシス誘導の病態生理学的意義について検討した。

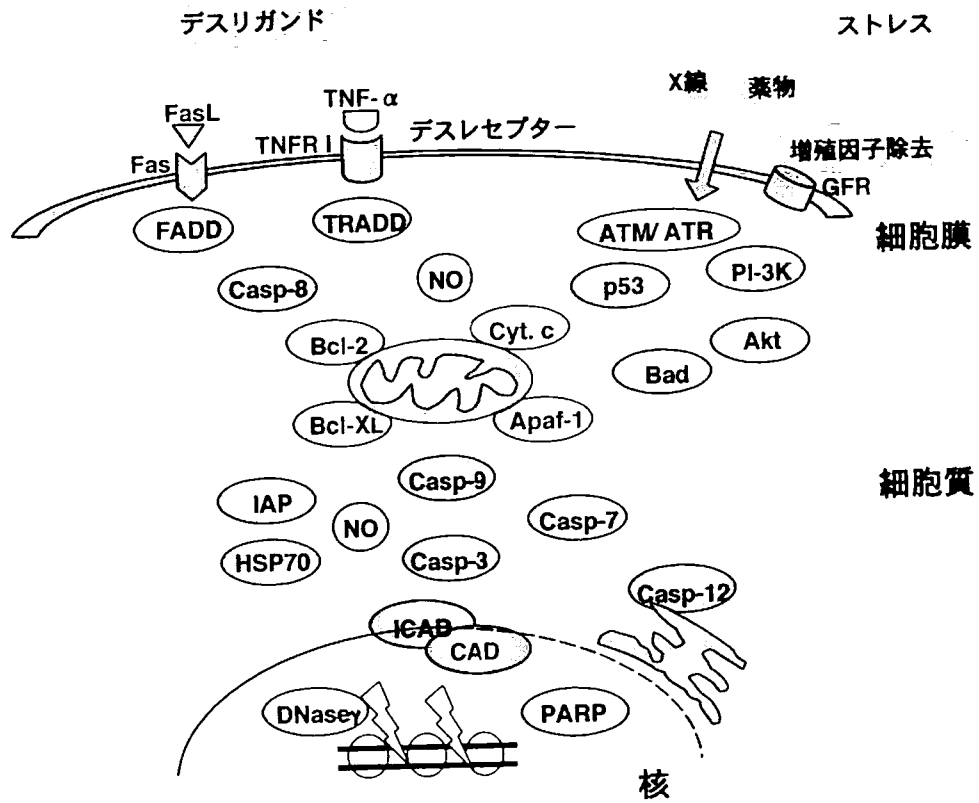


図1-1 アポトーシス関連分子の概略図

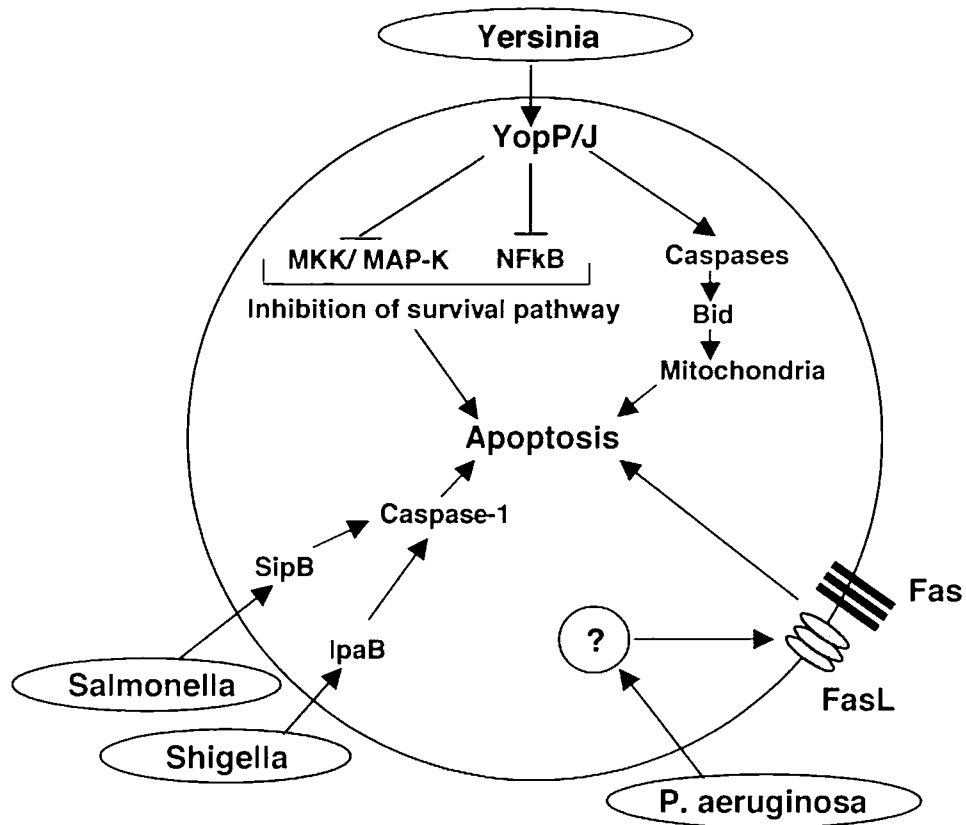


図1-2 細菌感染による既知のアポトーシス誘導メカニズム  
 (Grassméら、2001改変) いずれの細菌の蛋白も、type III secretion systemにより細胞内に移入される。

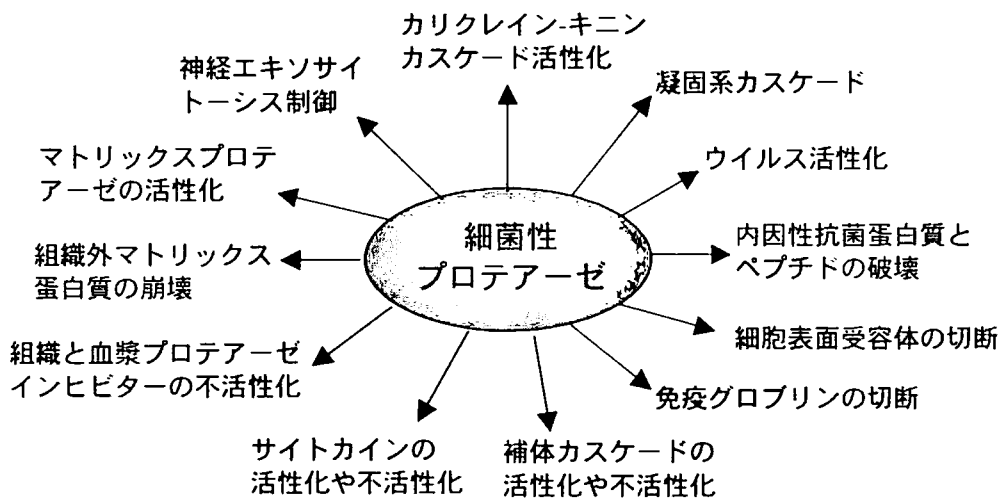


図1-3 細菌性プロテアーゼの多面的な病原発現メカニズム

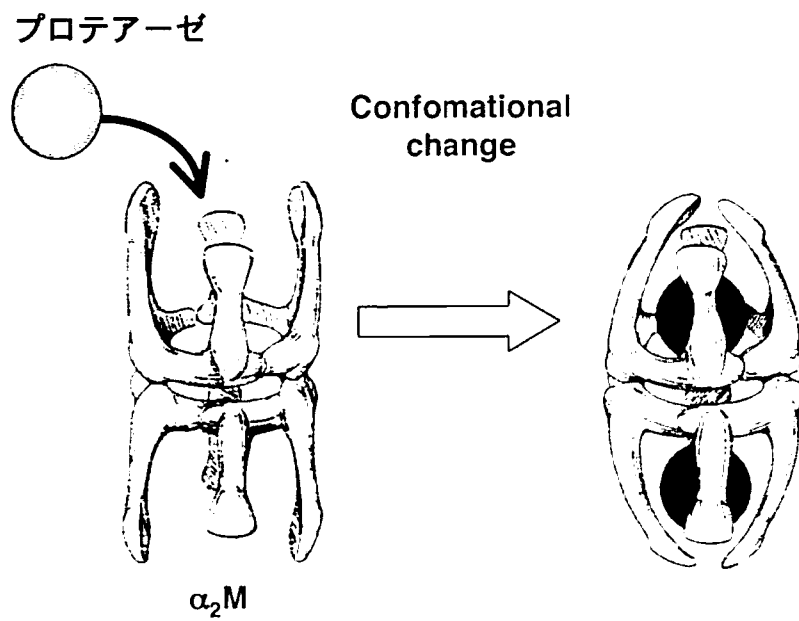


図1-4  $\alpha_2M$ とプロテアーゼとの相互作用 (Charleen T, 1994より抜粋)

## 第2章 実験方法

### 2.1 細菌性プロテアーゼによる細胞死の検討

#### 2.1.1 細菌性プロテアーゼによる細胞死誘導

ヒト単球系の培養細胞 U937 細胞に、*Serratia marcescens* 56kDa protease、*Pseudomonas aeruginosa* elastase および SpeB の各種細菌性プロテアーゼをそれぞれ添加した。24 時間後に細胞を回収し、ethidium bromide-acridine orange 染色を用い、蛍光顕微鏡で観察した。同染色によりオレンジ色に染色されている細胞が死細胞であり、緑色に染色されている細胞を生細胞と判定し、各視野における生細胞および死細胞の細胞数を求め、死細胞の割合（全細胞数 500）を各細菌性プロテアーゼの濃度毎に算出した。

[試薬] acridine orange 液 100 µg/ml、ethidium bromide 液 100 µl/ml PBS (-)

- [手順]
1. acridine orange 液および ethidium bromide 液を等量混合。
  2. 細胞を 1500rpm, 5min 遠心後、PBS (-)に  $5 \times 10^6$ /ml 細胞となるように浮遊。
  3. 25ml の細胞浮遊液に 1ml の acridine orange/ethidium bromide 混合液を加える。
  4. 染色した細胞液をスライドグラスに載せ、カバーグラスで覆い蛍光顕微鏡で観察した。

#### 2.1.2 プロテアーゼインヒビター

細菌性プロテアーゼの細胞死において、各種プロテアーゼインヒビターの効果を検討した。細菌性プロテアーゼとしてシステインプロテアーゼである SpeB を用い、システインプロテアーゼインヒビターである E-64 (N-[N-(1-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatine)、caspase-3 インヒビターとして Ac-DMQD-CHO (MBL Co. Ltd.)、あるいは broad caspases inhibitor の Z-VAD-FMK (MBL Co. Ltd.) を、SpeB と同時に U937 細胞培養系に添加した。

### 2.1.3 NO compound

細菌性プロテアーゼによるアポトーシスにおける NO の効果を検討するため、NO 放出剤として p-NONOate を、またニトロソチオールとして GS-NO とヒト  $\alpha_1$ -protease inhibitor ( $\alpha_1$ -PI) の S-ニトロソ体である S-NO- $\alpha_1$ PI を用いて、SpeB 誘導性アポトーシスにおける NO の効果を、ethidium bromide-acridine orange 染色にて細胞死数計測、および caspase-3 活性測定にて行なった。SpeB と上記 NO compound 同時処理した場合、または NO compound 前処理し PBS (-) 洗浄後に SpeB 処理した場合の細胞死を検討した。また、下記方法にて caspase-3 活性の測定をした。

## 2.2 Caspase-3 活性の測定

SpeB にて 24 時間処理した細胞およびそのコントロールの細胞を 2 回 PBS (-) にて洗浄後、50 mM KCl, 5 mM Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-*N, N, N', N'*-tetraacetic acid (EGTA), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ M cytochalasin B, 1  $\mu$ M PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml pepstatin A, 50  $\mu$ g/ml antipain 含有 50 mM PIPES-NaOH (pH 7.0) 抽出緩衝液を加え、凍結融解を 4 回繰り返して、cell lysate を調製した。4°C、13,000  $\times$ g で 30 分間遠心分離し、上清を -80°C で保存した (Enari, 1996)。サンプルの蛋白濃度を Lowry 法にて測定し、10% sucrose, 0.1 mM HEPES-KOH buffer (pH 7.5) にて 36  $\mu$ g に調製し、1  $\mu$ M MOCAc-Asp-Glu-Val-Asp-Ala-Pro-Lys (Dnp)-NH<sub>2</sub> fluorescent substrate (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japan) を加えて、30°C、30 分間反応させた後の蛍光強度 (excitation 328 nm, emission 392 nm) を測定し、caspase-3 活性とした。また、同じサンプルに、1  $\mu$ M Ac-DMQD-CHO caspase-3 inhibitor (Peptide Institute)、あるいは 6  $\mu$ M S-NO- $\alpha_1$ PI を加え、同様に蛍光強度を測定、比較した。

## 2.3 Flow cytometry (FACS)によるアポトーシスの解析

アポトーシス細胞の検出は、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit を用いて、flow cytometry (Becton Dickinson) により行なった。サンプルの準備および測定



は、以下の手順に従って行なった。

1. 細菌性プロテアーゼで処理した細胞を 4℃、PBS (-) で 2 回洗浄後、1×binding buffer にて  $1 \times 10^6$ /ml になうように調製する。
2. 5 ml ポリスチレンラウンドチューブに上記細胞溶液を 100  $\mu$ l 移し、5  $\mu$ l の Annexin V-FITC 溶液と 2  $\mu$ l propidium iodide (PI) 溶液を加える。
3. 遮光、室温にて 15 分間反応。
4. 400  $\mu$ l の 1×binding buffer を加え、flow cytometry で測定。

#### 2.4 $\alpha_2$ -マクログロブリン ( $\alpha_2$ -M)

$\alpha_2$ -マクログロブリンは、化学及び血清療法研究所（化血研、熊本）の濱本高義博士から提供して頂いた。

#### 2.5 ウェスタンブロット法による抗アポトーシス蛋白質の検出

serratial protease- $\alpha_2$ M complex 処理細胞をエッペンドルフチューブに回収後、4℃、2000 rpm で 5 分間遠心し、上清は除いた。1 ml の PBS (-) にて 2 回洗浄後、lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 125 mM NaCl, 0.1 % NP-40) にて細胞融解した。4℃、8000rpm で 20 分間遠心後、cell lysate として上清を回収し、Lowry 法にてタンパク量を測定した。2×treatment buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM 1, 4-dithiothreitol (DTT), 4 % SDS, 0.2 % bromophenol blue, 20 % glycerol) 混和後、10% SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動 (SDS-PAGE) を行ない、セミドライ法にて Immobilon™ polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Co. Ltd., Bedford, MA) に転写した。5% スキムミルク、2% bovine serum albumin 含有 TTBS (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.9 % NaCl, 0.1 % Tween 20) にて、室温 60 分間ブロッキングした後、1 次抗体として抗アポトーシス蛋白である Bcl-2、HSP70、c-IAP1 の抗体（購入元会社名??）と 4℃、over night 反応させた。TTBS にて 30 分間、4 回洗浄後、1000 倍希釈濃度の 2 次抗体 (anti-rabbit IgG-HRP, anti-mouse IgG-HRP, Santa Cruz) で室温、60 分間反応させた。再度 TTBS にて 15 分間、3 回洗浄後、ECL system (Amersham International plc, Buck, UK) を用いて、

目的のタンパク質を検出し、比較検討した。

## 2.6 組換え蛋白質の精製

### 2.6.1 組換え SpeB 蛋白質の発現・精製 (図 2-1)

SpeB の cDNA が挿入されたプラスミド pSK-SCP (メディカジャパン総合研 大國壽士博士、渡邊ユキノ博士より供与) をテンプレートとして、シグナル配 列を除去した proSpeB の cDNA 断片を PCR 法に構築した。具体的には、*Ex-Taq* DNA polymerase (Takara Biomedicals, Kyoto, Japan)を用いて、

センスプライマー：5'-GTTCCATGGATCAAAACTTTGCTCGTAACG-3'

(    は、*Nco*I サイト) およびアンチセンスプライマー：5'-  
TTGAATTCTTATCAATGATGATGATGATGATGAGGTTTGATGCCTACAACAGC-

3' (    は *Bam*HI サイト、=は、ヒスチジンタグ) を用い、95℃、5min の熱 変性に続いて、94℃、1 min、55℃、1 min、72℃、1 min 30 sec を1サイクル として30サイクルをおこない増幅させた。得られた PCR 断片を PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Germany)を用いて精製し、pCR II TOPO TAcloning vector (Invitrogen Corp., CA USA)に連結させ、大腸菌 DH5  $\alpha$  に形質転換して pCR II TOPO-proSpeB を得た。配列解析をおこなった後、制限酵素 *Nco*I と *Bam*HI で 切断し、C 末端側にヒスチジンのタグがついた proSpeB の遺伝子断片を調製し、 同様の制限酵素で切断した大腸菌発現ベクター-pET-3d (Stratagene, La Jolla, CA) に連結させ、pET-SPE-BHIS を構築した。発現誘導は、大腸菌として、*Rosetta*(DE3) pLysS (Novagen, Madison, WI)を宿主として、200  $\mu$ g/ml アンピシリン、25  $\mu$ g/ml クロラムフェニコール、2 %グルコースを含む 50ml の LB 培地にて 37℃で一 晩振とう培養し、種菌とした。このうち 40ml をアンピシリン 200  $\mu$ g/ml、2 % グルコースを含む 2 L の 2 $\times$ YT 培地に添加し、37℃で約3時間培養し、O.D. 600nm の値が 0.5 になった時点で、1 mM IPTG を加えて 30℃、6 時間培養することで 発現誘導させた。その後、遠心集菌 (3000 rpm, 10 min, 4℃) し、PBS(-) (pH7.4) で同様に遠心洗浄し、得られた菌体を -80℃に凍結保存した。

菌体は、0.3 M NaCl、20 mM Imidazole を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液

に懸濁し、超音波破碎装置 (Insonator 201M, Kubota 社) にて 200 W、20 min 0°C の条件で超音波破碎した。その後、遠心 (9000 rpm、15 min、4°C) し上清を回収した後、0.45  $\mu$ m のフィルターで濾過した。精製は、FPLC システム (Amersham Biosciences 社) を用いておこなった。菌体ライセートをニッケルアフィニティカラム 5 ml (Amersham Biosciences 社) に流速 1 ml/min のスピードで添加し、0.3 M NaCl、20 mM Imidazole を含む 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液で流速 5 ml/min のスピードで洗浄した。溶出は、溶出緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.3 M NaCl、0.5 M Imidazole) を用いて、流速 2 ml/min のスピードで吸着画分を回収した。続いて本画分を、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液に 4°C で一晩透析し、陰イオン交換樹脂である DEAE カラム (1 ml) (Amersham Biosciences 社) に添加後、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 緩衝液で洗浄し、50 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 2 M NaCl 緩衝液を用いたグラジエント溶出にて組換え SpeB 蛋白を精製した。さらに、蛋白溶液中に混入するリポポリサッカライド (LPS) を除去するために、Detoxi-Gel endotoxin-removing gel (PIERCE Biotechnology inc, Rockford, Ill.) を用いて LPS を吸着させることで除去し、非吸着画分の SpeB 蛋白溶液を回収した。LPS 含量を LAL アッセイにて測定したところ、2.8 ng LPS / mg SpeB 蛋白であった。本発現系による収率は、50 mg / L 培養という、高収率であり、純度も SDS-PAGE (Fig.) の解析の結果、95% 以上であった。なお、proSpeB として発現させたにもかかわらず、回収された蛋白質は、菌体内で自己消化によってプロセシングされた成熟体の 28 kDa の蛋白質であった。

得られた組換え SpeB の酵素活性は、サンプルを 1 mM DTT 存在下で 37°C、15 分、インキュベーションし活性化後、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 mM diethylenetriamine pentaacetic acid、0.05 mM 4-methylcoumaryl-7-amide (MCA) 基質 (Pro-Phe-Arg-MCA) 溶液 540  $\mu$ l に加え、37°C、30 分インキュベーションし、0.01 mg/ml E-64 (チオールプロテアーゼ阻害剤、Sigma 社) を加えて反応を停止させ、蛍光分光高度計 (Hitachi 650-40) にて excitation 380 nm, emission 441 nm を測定した。

#### 2.6.2 ProSpeB(C192S)変異蛋白の発現・精製 (図 2-2)

Cys-192-Ser(C192S)変異により活性を失った SpeB は、Quik Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene, CA, USA)を用いて構築した。具体的には、pCRII-TOPO-SpeB をテンプレートとして変異用プライマー、Sense primer : 5'-CATGCAGCTACAGGATCTGTTGCTACTGCAACTG-3、Antisense primer : 5'-CAGTTGCAGTAGCAACAGATCCTGTAGCTGCCTG -3' (下線部が変異導入箇所) を用い、*Pfu* Turbo DNA polymerase (Stratagene, CA, USA)を用いて、95℃ 30sec の変性に続いて、95℃、30sec、55℃、1min、68℃、10min 30sec を 12 サイクルおこなった。反応終了後、制限酵素 *DpnI* を添加し、37℃で 1 時間反応することで、メチル化 template DNA を切断し、切断を免れた非メチル化増幅プラスミドを大腸菌を形質転換することを得たコロニーより回収した。任意の 3 クローンの DNA 配列解析をおこない、C192S 変異が確認された pCRII-TOPO-SpeBCS を取得した。これを *Bam*H I 切断後、Blunting kit (TaKaRa, Kyoto, Japan) を用いて平滑化処理し、続いて *Eco*RI にて切断することにより、ProSpeB (C192S)断片を回収した。同様の制限酵素にて処理した pTrcHisB (Invitrogen Corp, CA, USA) に連結させ、N 末端に His-Tag が付加された pTrcHisProSpeBCS を構築した。これを *Eco*RI 切断後、平滑化処理し、続いて *Nco*I にて切断することにより、HisProSpeB (C192S)断片を回収した。一方、pET3d (Stratagene, CA USA) を、*Bam*H I 切断後、平滑化処理し、続いて *Nco*I にて切断し、これに HisProSpeB (C192S)断片を連結させ、pET-ProSpeBCS を構築した。組換え C192S SpeB 蛋白の発現と精製は、組換え SpeB と同様におこなった。変異蛋白の収率も 60 mg / L 培養であった。

精製された SpeB の活性を、可視的に確認するため、rSpeB の等電点が pI = 9.6 であることを利用し、1 mg/ml のゼラチンを含む 7.5%の酸性アクリルアミドゲル (酢酸-KOH バッファー (pH4.3)) にてβ-Ala-酢酸バッファー (pH 4.5) を泳動バッファーとして、4℃、5 時間電気泳動後、ゲルを 50mMTris-HCl (pH8.0)、1mM DTT 存在下で 37℃、20 時間インキュベーションし、CBB 染色した。

### 2.6.3 組換え proMMP-9 蛋白の発現・精製 (図 2-3)

#### 組換え proMMP-9 蛋白を発現するバキュロウイルスベクターの構築

ヒト MMP-9 (hMMP-9)の全長の cDNA 断片が挿入された pBS-92-174 (B. L. Marmer and G. I. Goldberg (Washington University, St. Louis, MO) より供与)を template とし、KOD DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan)を用いた PCR 法によ

り、センスプライマー：

5'-GTACCATATGAGCCTCTGGCAGCCCCTGGTCCTGG-3'

およびアンチセンスプライマー：

5'-GGTTACTAGTCCTCAGGGCACTGCAGGATGTCATA-3'を用いて増幅させ、得られた PCR 断片を pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen 社)に連結し、pCRBlunt-hMMP-9 を構築した。これを *EcoRI* で切断し、遺伝子の両側に *EcoRI* サイトをもつ全長の hMMP-9 遺伝子断片を回収し、バキュロウイルストランスファーベクター pBacPAK9 (Clontech 社) の *EcoRI* サイトに連結させ、pBacPAK9-hMMP-9 を構築した。組換えバキュロウイルスベクターの構築は、BacPAK™ baculovirus expression system (Clontech 社)のマニュアルに従っておこなった。具体的には、昆虫細胞 Sf21 (*Spondoptera frugiperda*) (Invitrogen 社) を 10% FCS, 0.1% Pluronic F-69, 10 μg / ml gentamicin を含む Graces's Insect Medium (Invitrogen 社) で培養し、Bactofectin (Clontech 社)を用いて、BacPAK6 viral DNA と pBacPAK9-hMMP-9 を細胞にコトランスフェクションし、27℃で 72 時間培養し、組換えバキュロウイルスを上清に回収した。得られたウイルス溶液を Sf21 細胞に感染させ、1%アガロースを含む培地下で 5 日間、培養することでプラークを形成させた。このプラークをアガロースごと回収し、4℃で一晩 500 μl の培地下で浸漬させることで、ウイルスを溶液中に回収した。得られたウイルスを、 $1.5 \times 10^6$  cells / well 6 well plate(Falcon 社)に調整した Sf21 細胞に再感染させ、MMP-9 を発現するウイルスベクターのスクリーニングは、培地に分泌された蛋白質の SDS-PAGE と MMP のザイモグラムアッセイにておこなった。

#### 組換え proMMP-9 の発現・精製

HighFive™細胞 (Invitrogen 社) を 0.1% Pluronic F-69, 10 μg / ml gentamicin を含む EX-Cell 400 無血清培地 ( JRH 社) に、 $1 \times 10^6$  cells / ml で 100ml に調整し、ウイルスベクターを MOI=5 で感染させ、スピナーフラスコ (Bellco Glass, Vineland, NJ) を用いて、28℃、96 時間、120rpm、回転培養をおこなうことによって組換え proMMP-9 を培地上清に分泌発現させた。この培地上清を遠心 (6000rpm, 4℃, 10 min) にて沈殿を除去し、透析チューブ (分子量 14000 カッ

ト、和光)を用いて、20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 % Brij35, 50 mM NaCl に対して4℃で、一晚透析した。遠心 (13K rpm, 4℃, 30 min) し、上清を Gelatin-sepharose 4B (Amersham Bioscience) 樹脂 5 ml を加え、4℃で一晩、バッチ法にて吸着させた。その後、遠心 (6000 rpm, 10 min, 4℃) し樹脂を回収し、透析バッファー100 ml で遠心洗浄 (6000 rpm, 10 min, 4℃) 後、樹脂をオープンカラムに詰めた。これを、透析バッファーで洗浄後、カラムに 20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5% Brij35, 1 M NaCl, 5% dimethyl sulfoxide を添加・溶出し、組換え proMMP-9 を精製した。

#### 2.6.4 組換え proMMP-2 蛋白の発現・精製 (図 2-3)

##### 組換え proMMP-2 蛋白を発現するバキュロウイルスベクターの構築

ヒト MMP-2 の全長 cDNA は、GenBank NM004530 を参考に、ヒト fibrosarcoma HT1080 細胞株から RT-PCR 法によりクローニングした。具体的には、細胞 1 × 10<sup>6</sup>個に TRIzol 試薬 (Invitrogen 社) を用いて total RNA を抽出した後、アンチセンスプライマー: 5'-GGTTATCAGCAGCCTAGCCAGTCGGATTTGG-3' と M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) により逆転写した後、*Ex-Taq* polymerase (TaKaRa Bio. Inc.) を使って、センスプライマー

5'-GGCATATGGAGGCGCTAATGGCCCGG-3'、

およびアンチセンスプライマー

5'-GGTTATCAGCAGCCTAGCCAGTCGGATTTGG-3'を用いて PCR 法によって増幅させた。得られた PCR 産物を pCR-TOPO TA cloning vector (Invitrogen) に連結させ、pCR II -TOPO-hMMP-2 を構築し、DNA 配列解析の結果、GeneBank と配列が同じであることを確認した。これを制限酵素 *EcoR* I で切断することで得た hMMP-2 cDNA フラグメントを、pBacPAK9 の *EcoRI* サイトに連結し、トランスファーベクター pBacPAK9-hMMP-2 を構築した。このベクターを用いて hMMP-9 と同様に、BacPAK6 viral DNA と Sf21 細胞にコトランスフェクションすることで組換えバキュロウイルスを調製し、ザイモグラム法を用いて培地上清のゼラチナーゼ活性を指標に組換え proMMP-2 蛋白を発現するバキュロウイルスベクターをスクリーニングした。

## 組換え proMMP-2 の発現・精製

Mimim<sup>TM</sup>Sf9 細胞 (Invitrogen) 細胞 (Invitrogen 社) を 0.1% Pluronic F-69、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamici、10% FCS を含む Graces's Insect Medium (Invitrogen 社) に、 $1 \times 10^6$  cells/ml で 100ml に調整し、ウイルスベクターを MOI=5 で感染させ、スピナーフラスコ (Bellco Glass, Vineland, NJ) を用いて、28°C、72 時間、120rpm、回転培養をおこなうことによって組換え proMMP-2 を培地上清に分泌発現させた。

proMMP-2 の精製は、proMMP-9 と同様に Gelatin-sepharose 4B (Amersham Bioscience) 樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーにておこなった。

## 2.7 MMP 活性化の解析

### 2.7.1 細菌性プロテアーゼによる MMP-9、-2 の限定分解

組換え proMMP 2  $\mu\text{g}$  に対して、組換え SpeB を各種濃度で 37°C、30 分間反応させ、限定分解による活性化について検討した。また、経時的に proMMP の活性化についても検討した。

### 2.7.2 ゼラチン分解

SpeB によって限定分解された MMP-2、-9 (ゼラチナーゼ群) がゼラチナーゼ活性があるかどうかを調べるため、ゼラチンまたは熱変性コラーゲン (denatured collagen) の分解を SDS-PAGE で検討した。

### 2.7.3 ゼラチンザイモグラフィ法 (gelatin zymography)

1 mg/ml ゼラチンを含む 10 %アクリルアミドゲルを調製し、サンプル 20  $\mu\text{l}$  に対し 2×treatment buffer (0.01 % BPB, 40 % glycerol, 0.25 M Tris-HCl buffer, pH 6.8) を 7  $\mu\text{l}$  加えて、37°C で 1 時間インキュベーションし、SDS 化する。その後、水中にて電気泳動し、ゲルをザイモグラム用バッファー (40 mM Tris-HCl buffer, pH7.6, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$ , 0.1 % Brij35) に 2.5 % TritonX-100 を含む溶液で 15 分、3 回洗浄後、ザイモグラム用バッファーに置換し、37°C、20 時間インキュベーションした。その後、CBB 染色 (Quick CBB, Wako) にて lytic band を確認した。

## 2.8 可溶性 Fas ligand (sFasL) の検出とアポトーシスの誘導

大腸がん由来株 SW480 細胞は、細胞膜表面の Fas ligand の発現レベルが高いことが知られているので、本解析に利用した。SW480 細胞を  $1 \times 10^7$ /10 cm dish に 24 時間前培養後、PBS (-) で 2 回洗浄後に血清を含まない minimal essential medium (MEM) 4 ml に置換した。0.5  $\mu$ g の proMMP-9 または同モルの SpeB にて活性化した SpeB-activated MMP-9 を添加し、1 時間培養後に medium を回収した。Centricon YM-10 filter を用い、 $5,000 \times g$  で遠心して 50 倍まで濃縮し、本サンプルを 12 % SDS-PAGE に泳動後、Western blot 法にて medium 中に放出された可溶性 Fas ligand を検出した (anti-FasL monoclonal antibody, BD Biosciences Pharmingen, 1: 250)。検出には、ECL detection system (Amasham) を使用した。

上記 SpeB-activated MMP-9 を添加して 1 時間培養後の SW480 細胞の medium を 15 倍まで同様に濃縮し、U937 細胞  $1 \times 10^6$ /100  $\mu$ l/well (Falcon 96-well dish) に等量加えた。12 時間培養後、U937 細胞のアポトーシスの誘導を、Annexin V および PI を用いて、flow cytometry にて検討した。さらに、中和抗体 anti-FasL monoclonal IgG 抗体 (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan) を用いて、誘導された U937 細胞のアポトーシスが抑制されるかを、合わせて検討した。

## 2.9 TNF- $\alpha$ の ELISA 法による検出とアポトーシスの誘導

マウスマクロファージ RAW264 細胞株を 24 well plate (Falcon) に  $10^6$ /well 撒き、24 時間後に PBS(-) にて 2 回洗浄ののち、血清を含まない MEM 1 ml に置換した。SpeB-activated MMP-9 (2  $\mu$ g/ml) を含む MEM から、SpeB 単独ならび proMMP-9 単独、あるいは MMP inhibitor (SI-27) を添加後 1 時間インキュベートし、各 medium を回収し、TNF- $\alpha$  ELISA kit (BioSource International, Inc., Camarillo, Calif.) にて、それぞれの medium 中に放出された TNF- $\alpha$  を測定した。

SpeB-activated MMP-9 (2  $\mu$ g/ml) を含む上記 RAW264 細胞の 1 時間培養 condition medium は、U937 細胞  $1 \times 10^6$ /100  $\mu$ l/well (Falcon 96-well dish) に等量加えられた。



12 時間培養後、U937 細胞のアポトーシスの誘導を、Annexin V および PI を用いて、flow cytometry にて検討した。また、中和抗体 anti-TNF- $\alpha$  monoclonal IgG 抗体 (R&D System, Inc., Minneapolis, Minn.) を用いて、抑制実験を行なった。

## 2.10 劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウス

全ての動物実験は、熊本大学動物実験指針に基づいて行なわれた。病原微生物を用いた実験は、日本細菌学会および日本ウイルス学会バイオセーフティー指針ならびに国立感染症研究所病原体等安全管理規約に従って施行した。また、動物感染実験は、すべて熊本大学動物資源開発センター感染区域実験室内で行なわれた。

### 2.10.1 モデルマウスの作製

劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスは、Okamoto らが報告したインフルエンザウイルスおよび劇症型 A 群レンサ球菌の複合感染系を使用した (Okamoto, 2003)。ddY マウス (雄、3 週齢、体重 12~15g、セアック吉富) は、に、インフルエンザウイルス A/Aichi/2/68 (H3N2) 株を普通ブイヨン (栄研) にて  $7 \times 10^4$  PFU/ml の濃度とし、回転台付きネブライザー噴霧器内でマウスに 30 分間噴霧接種した。A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*; SSI-1 株) は、Todd Hewitt broth (Difco) にて 37°C、12 時間培養後、PBS (-) にて  $5 \times 10^6$  CFU/ml に調製し、エーテル麻酔下でマウスあたり  $1 \times 10^5$  CFU を経鼻接種した。インフルエンザウイルスと A 群レンサ球菌の複合感染系の作製に際しては、インフルエンザウイルス感染後 36 時間後に、A 群レンサ球菌を接種した。

同様に、SpeB 欠損 A 群レンサ球菌 TR-11 株 (大阪大学 川端重忠博士らより供与) におけるインフルエンザウイルスとの複合感染モデルを作成し、劇症型 A 群レンサ球菌感染症における SpeB の関与について検討した。

### 2.10.2 血液、肺胞洗浄液 (BALF) および組織標本の準備

マウスの採血は、エーテル麻酔下で上腸管膜静脈に 26G 針付き 1 ml シリンジ (ヘパリン付) で静脈血を採取し、遠心血清分離した。

Bronchoalveolar lavage (BAL、気管支肺胞洗浄) を行なうため、マウスをエ

ーテルにて麻酔後、気管切開を行ないエラスター針（20G）の外筒を挿入し、洗浄液の漏出防止のため絹糸を用いて気管とチューブを結紮した。1.0 ml の滅菌 PBS (-)をシリンジでゆっくり注入し、シリンジに陰圧をかけて緩徐に洗浄液を回収した。回収した洗浄液は直ちに  $9.000 \times g$  にて遠心分離し、細胞成分と上清を分離した。

肺組織標本作製にあたり、摘出肺は直ちに 2% Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 溶液に浸し、注射筒内にて陰圧を加え伸展させた後、 $4^{\circ}\text{C}$  にて 4 時間固定した。固定終了時に PBS (-) にて 3 回洗浄し、引き続き PBS (pH 7.4) +10% ショ糖液に浸し 4 時間、さらに PBS (pH 7.4) +15% ショ糖液に 4 時間浸し、OCT compound にて包埋、液体窒素にて凍結させ、使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  にて保存した。クリオスタット (CM1800; Leica 社) を用いて 6 mm の薄切切片を作成し、poly-L-lysine コートスライドガラス (松浪) に貼り付け一晩風乾させた後、HE 染色または TUNEL 染色を行なった。

### 2.10.3 HE 染色および TUNEL 染色

劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスの肺の病理組織学的変化は、ヘマトキシリン&エオジン染色 (HE 染色) により評価した。

TUNEL 染色の全行程は、以下に示す通り TACS™ 2 TdT-Blue Label *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA) のマニュアルに従っておこなった。

1. 4%ホルムアルデヒド/ PBS (-)にて 10 分間固定。
2. PBS (-) (pH 7.4) にて、10 分間 1 回洗浄。
3. Proteinase K Solution を PBS (-) (pH 7.4) にて 20 mg/ml に調製し、室温 15 分間反応。
4. 2%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /MeOH 溶液にて 5 分間 (内因性ペルオキシダーゼ阻害)。
5. PBS (-) (pH 7.4) にて 1 回洗浄。
6. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) labeling buffer に浸し、室温で 5 分間
7. ラベリング反応液 (TdT Enzyme,  $\text{Co}^{2+}$  Cation Stock, TdT dNPT Mix を含む)

を標本に載せ、37℃の湿潤箱の中で60分間反応。

8. 反応停止液に浸し、室温で5分間反応。
9. PBS (-) (pH 7.4)にて洗浄5分間2回。
10. Streptoavidin-horseradish peroxidase (HRP) solution を標本に載せ、室温で10分間反応。
11. PBS (-) (pH 7.4)にて、2分間2回洗浄。
12. TACS Blue Label™ solution を標本に載せ、室温で約2分間反応。
13. 純水にて2分間2回洗浄。
14. Nuclear Fast Red にてカウンター染色約1分間。
15. 純水にて軽く洗浄し、90, 95, 100%のアルコール系列でそれぞれ2分間脱水。
16. p-キシレンに浸し、Permount (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA)にて封入。

#### 2.10.4 血清および BALF 中の TNF- $\alpha$ および sFasL の検出 (ELISA 法)

血清および BALF は、上記方法にて回収し、測定まで-80℃に保存した。TNF- $\alpha$  の測定は、BioSource 社製の TNF- $\alpha$  ELISA kit を使い、sFasL の測定は R&D System 社製の mouse FasL ELISA kit を使い計測した。

#### 2.10.5 BALF の gelatin zymography

それぞれの感染マウスより回収した BALF の gelatin zymography は、前述「方法 2.8」に従っておこなった。

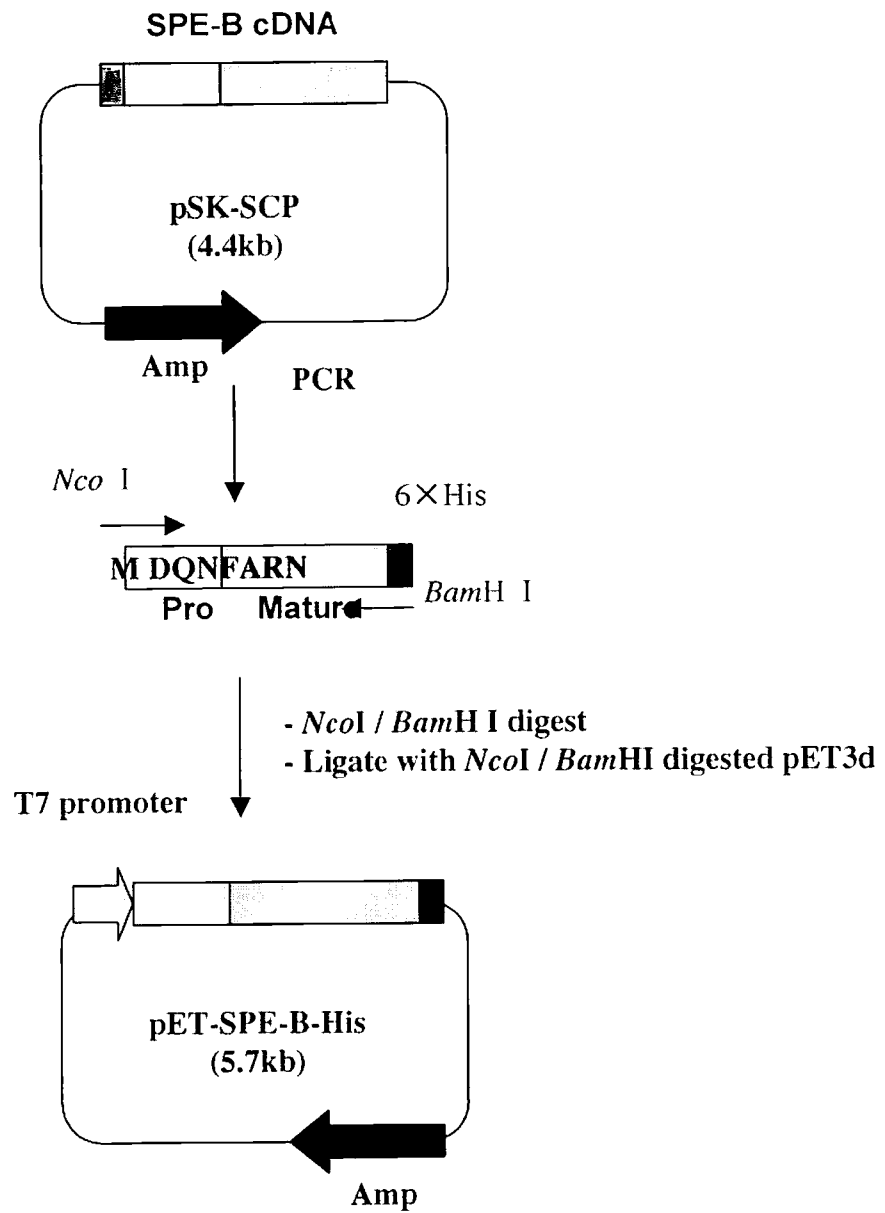


図2-1 組換えSpeBの発現・精製

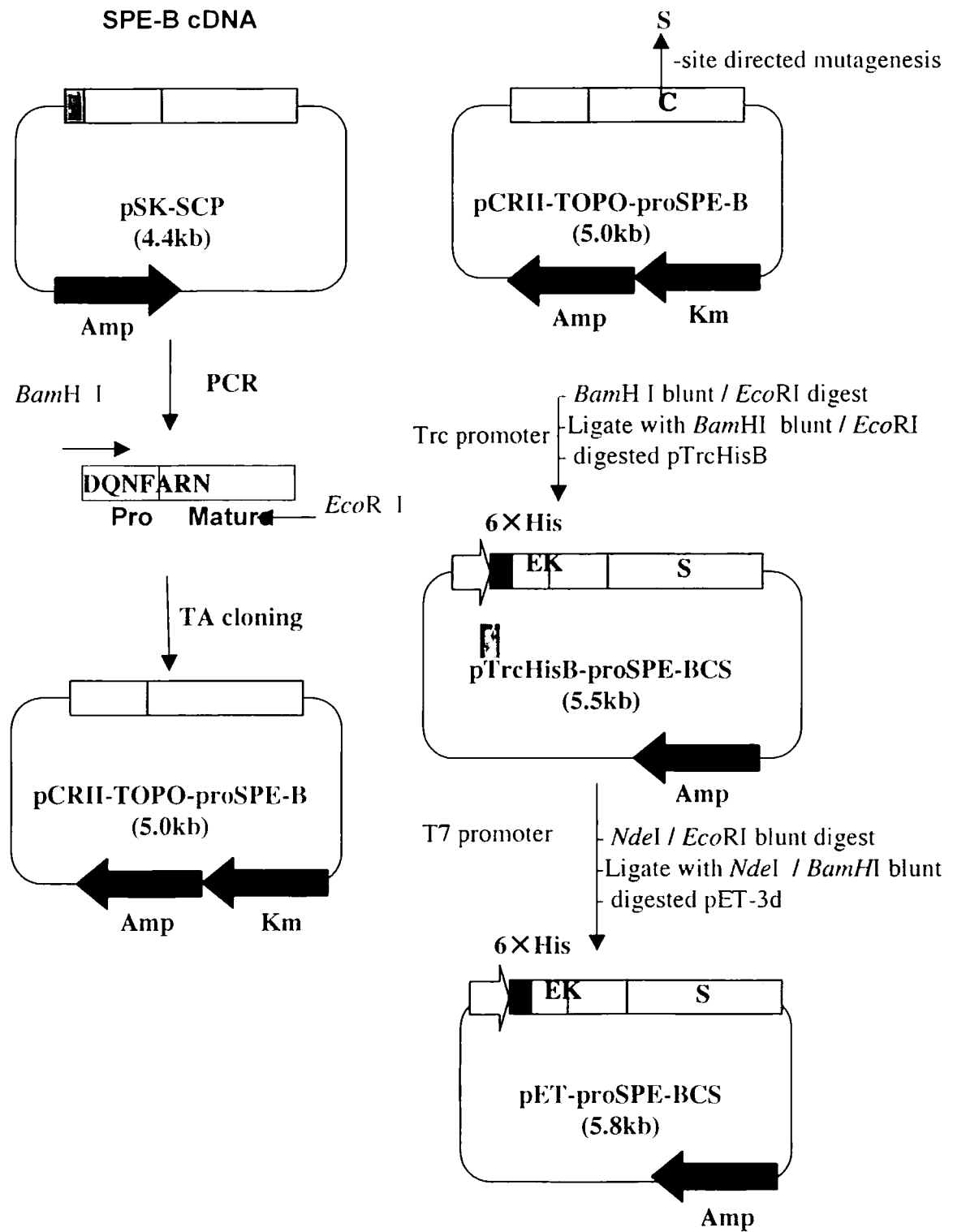


図2-2 ProSpeB(C192S)変異蛋白の発現・精製

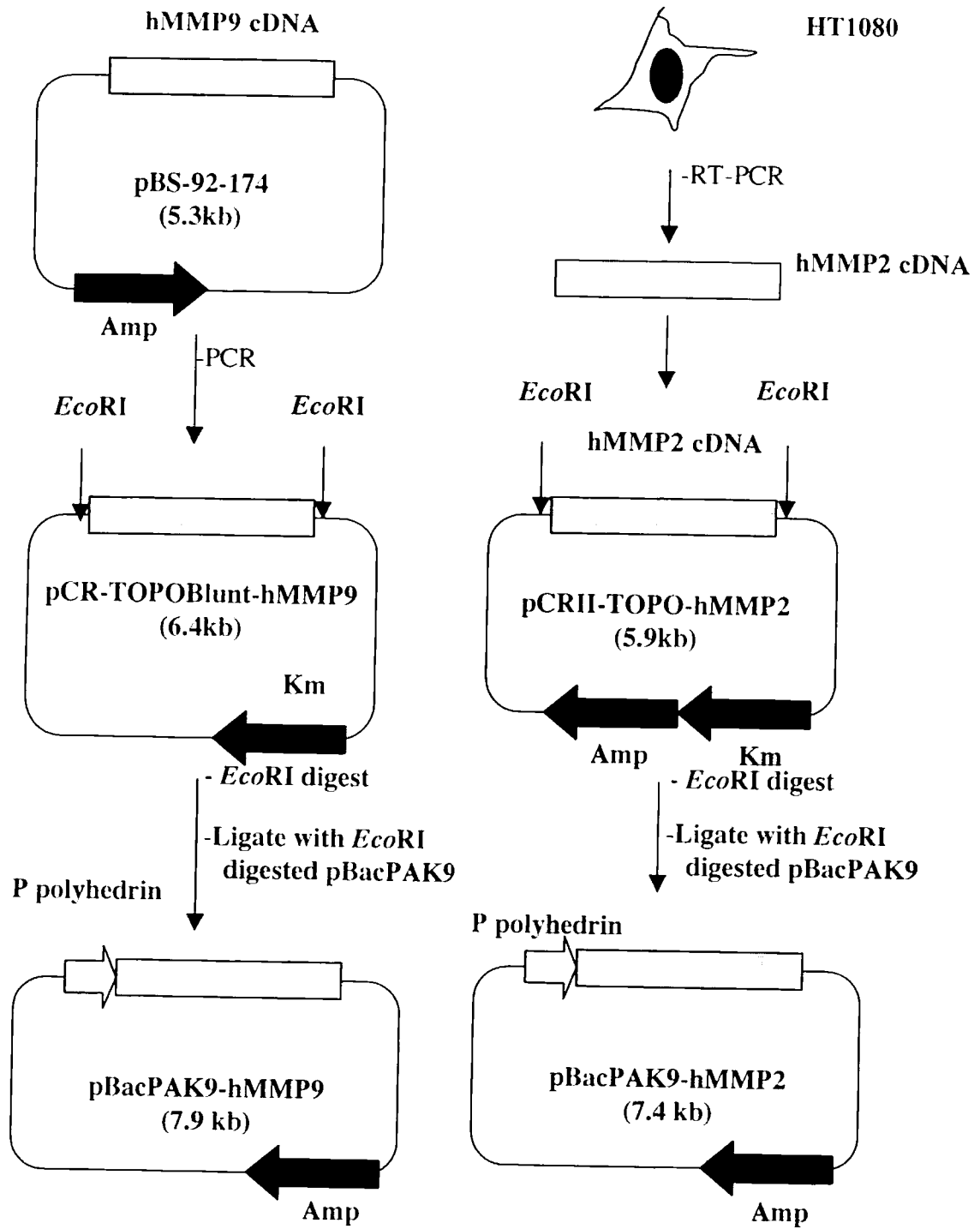


図2-3 組換えproMMP-9, -2の発現・精製

## 第3章 実験結果

### 3.1 細菌性プロテアーゼによる細胞死の検討

#### 3.1.1 各種細菌性プロテアーゼによる細胞死

ヒト単球系細胞株 U937 細胞を、*Serratia marcescens* 56kDa protease、*Pseudomonas aeruginosa* elastase または SpeB の各種細菌性プロテアーゼで 24 時間処理後、エチジウムブロマイド/アクリジンオレンジ染色で細胞の生死判定を行なった。結果、いずれの細菌性プロテアーゼにおいても、濃度依存的に U937 細胞の細胞死を認めた (図 3-1)。

#### 3.1.2 プロテアーゼインヒビターの効果

細菌性プロテアーゼによる細胞死に対する各種プロテアーゼインヒビターの効果を検討するため、cysteine protease inhibitor である E-64、または caspase-3 inhibitor の Ac-DMQD-CHO、あるいは broad caspases inhibitor の Z-VAD-FMK を用いた。U937 細胞を SpeB 処理と同時に、16 mM E-64 または 1 mM Ac-DMQD-CHO、あるいは 1 mM Z-VAD-FMK で処理すると、SpeB 誘導の細胞死はいずれのプロテアーゼインヒビターにおいても抑制された (図 3-2)。このことは、この細胞死が SpeB のプロテアーゼ活性に依存していることを示唆している。また、caspase inhibitor によって SpeB による細胞死が抑制されたことにより、同細胞死が caspase を介した細胞死、いわゆる apoptotic cell death であることを示している。

#### 3.1.3 細胞死と caspase-3 活性

SpeB 処理した U937 細胞における caspase-3 活性を測定すると、SpeB 処理しない細胞に比べ caspase-3 活性が明らかに上昇していた。SpeB 処理細胞を caspase-3 inhibitor および S-NO- $\alpha_1$ PI とともに処理すると、caspase-3 活性はコントロールレベルまで低下した (図 3-3)。以下に述べるように、NO は caspase 阻害活性を有していることが知られていたが、実際 NO 供与体である S-NO- $\alpha_1$ PI は、SpeB による caspase-3 活性の上昇を抑制した。

#### 3.1.4 細胞死に対する NO の影響

細菌感染局所において、マクロファージなどの誘導型一酸化窒素合成酵素

(iNOS) から産生される一酸化窒素 (NO) は、細胞内外のメディエーターとして種々の生理機能を示す。細胞死、特にアポトーシスに関して、NO は細胞傷害性を発揮する場合と、caspase 阻害を介して抗アポトーシス作用を呈する場合の二面性を有していることが報告されている。また、ヒト $\alpha_1$ -protease inhibitor ( $\alpha_1$ -PI)の S-ニトロソ体である S-NO- $\alpha_1$ PI が、強力な NO 供与体として抗菌活性や臓器保護作用などを発揮することを明らかになっている (Miyamoto et al., 2000)。NO 放出剤として p-NONOate を、またニトロソチオールとして GS-NO と S-NO- $\alpha_1$ PI を用いて SpeB 誘導性アポトーシスにおける NO の効果を検討した。SpeB と上記 NO compound 同時処理した場合、いずれも NO compound 濃度依存的に細胞死の減少を認めた (図 3-4 A)。さらに、NO compound 前処理し洗浄後に SpeB 処理すると、S-NO- $\alpha_1$ PI のみ細胞死の減少を認めた (図 3-4 B)。S-NO- $\alpha_1$ PI からの細胞内 NO 移行効率が良いことは、既に報告されており (Miyamoto et al., 2000)、他の NO compound 処理では細胞を洗浄すれば効果は認められないが、S-NO- $\alpha_1$ PI からの NO はすでに細胞内に移行しており、細胞洗浄後も SpeB 誘導性アポトーシスが抑制されるものと思われた。

また、同様に serratial protease 処理により、U937 細胞は細胞死を来たすが、GS-NO を同時添加すると細胞死は抑制された (図 3-5)。

### 3.1.5 Flow cytometry によるアポトーシスの検出

100  $\mu$ g/ml の serratial protease 処理した U937 細胞を Annexin V-FITC および propidium iodide (PI) で染色後、flow cytometry にて細胞の蛍光強度を測定することにより、アポトーシスを検出した。Serratial protease 処理細胞において、Annexin V (+)細胞が増加しており、さらに early apoptosis 細胞を示す Annexin V (+), PI (-)の細胞が、経時的に増加した (図 3-6)。

## 3.2 $\alpha_2$ -M を介したアポトーシス誘導

ヒト乳がん細胞である MCF-7 は、 $\alpha_2$ -M receptor の発現が高く $\alpha_2$ -M 結合能が良い。serratial protease を $\alpha_2$ -M と反応後に、MCF-7 の培養液中に添加すると、時間とともに細胞死、すなわちアポトーシスを誘導した (図 3-7)。

## 3.3 抗アポトーシス蛋白発現への影響

$\alpha_2$ M-serratial protease complex により MCF-7 は、アポトーシスを誘導する。



「背景と目的」にも述べたが、 $\alpha_2$ M-serratial protease complex は、細胞表面の $\alpha_2$ M receptor に結合後、serratial protease は $\alpha_2$ M から離れ、細胞内に internalization され、再活性化することが示されている。 $\alpha_2$ M-serratial protease complex による細胞傷害（アポトーシス）の機序を解析するため、細胞内の抗アポトーシス蛋白の発現を検討した。抗アポトーシス蛋白として、hsp70、Bcl-2 および c-IAP1 の発現を経時的にみると、Bcl-2 および hsp70 の発現に変化は見られなかったが、c-IAP1 の発現は、数時間で減少をはじめた（図 3-8 A）。また、濃度依存的に発現低下を認めた（図 3-8 B）。また、MCF-7 細胞の培養液に $\alpha_2$ M-serratial protease complex を添加後 3 時間目に同培養液を除去し、PBS(-)で細胞を 2 回洗浄後、12 時間通常の培養液にて培養を続けたが、c-IAP1 の発現低下を認めた（図 3-8 C）。このことは、serratial protease がすでに細胞内に移入されており、c-IAP1 の分解に関与していることを示す結果と考えられた。

#### 3.4 組換え蛋白の発現

「方法 2.6」に従い、SpeB、mutant SpeB (mSpeB)、proMMP-9 および proMMP-2 組換え蛋白を精製後、SDS-PAGE にて電気泳動した。それぞれ 27 kDa、42 kDa、82 kDa および 72 kDa に band を検出した（図 3-9）。

#### 3.5 SpeB による proMMP-9, -2 の活性化

上記組換え蛋白を用い、SpeB による proMMP-9 および pro-MMP-2 の活性化を検討した。各種 SpeB 濃度で、proMMP-9 は限定分解され、51 kDa に活性体と思われる band が検出された。また、等モル濃度にて経時的に proMMP-9 のサイズの変化を観察したところ、時間依存的に 52 kDa 活性体の band が出現していた（図 3-10）。同様に、proMMP-2 についても SpeB により限定分解され、約 40 kDa に band が認められた（図 3-11）。さらに、SpeB によって限定分解された活性体と思われる MMP-9, -2 の活性を gelatin zymogram にて解析したところ、それぞれ限定分解された 51 kDa および 45 kDa に lytic band を認めた（図 3-12）。さらに、限定分解産物のゼラチンの分解能を、実際ゼラチンの分解にて解析した。すなわち、proMMP-9 とゼラチンを反応させても、ゼラチンの分解は認められないが、SpeB と proMMP-9 の反応液ではゼラチンは分解された。また、チオールプロテアーゼインヒビターである E-64 を proMMP-9 の反応前に SpeB と混和すると、proMMP-9 の限定分解もゼラチンの分解も起こらなかった。

以上より、SpeBにより proMMP-9が活性化され、活性体MMP-9によりゼラチンの分解がもたらされたことが示された(図3-13)。

### 3.6 SpeBによって活性化されたMMP-9による可溶性Fas ligandとTNF- $\alpha$ の細胞外放出

まず、FasLを細胞表面に高発現している大腸がん細胞株SW480を用いて、培養液中に放出させた可溶性FasLをWestern blot法にて検出を試みた。図3-14Aに示したように、通常培養液中には可溶性FasLが認められない。また、proMMP-9単独、あるいはmutant SpeB(mSpaB: 不活性体SpeB)とproMMP-9との反応液をSW480細胞の培養液中に添加しても、可溶性FasLは認められなかった。しかし、SpeB処理したproMMP-9、すなわち活性体MMP-9を添加した培養液中には、可溶性FasLを検出できた。興味あることに、SpeB単独でも可溶性FasLが培養液中に存在しており、E-64を添加することによってそれは抑制できた。SpeBの影響を除くため、Ni<sup>2+</sup> His-trap column (Amasham)にて、proMMP-9と反応後にSpeBのみを除去し、活性化させたMMP-9反応液を培地中に添加した。同培養液中には、やはり可溶性FasLの検出が可能であった(図3-14B)。以上より、活性体MMP-9およびSpeBは、膜型FasLをprocessingして可溶性として細胞外に放出していることが明らかになった。

また、膜型TNF- $\alpha$ についても同様に可溶性にprocessingされるかを、培養液中のTNF- $\alpha$ 濃度をELISA法にて検討した。マウスマクロファージ系RAW264細胞株に図3.15の如く、単独でSpeB、mSpeBおよびproMMP-9をそれぞれ添加し1時間培養しても、TNF- $\alpha$ は軽度上昇するのみであった。しかし、SpeB処理したproMMP-9、すなわち活性体MMP-9を添加すると、培地中のTNF- $\alpha$ は約3倍上昇した。これに、MMP inhibitorであるSI-27を加えると、TNF- $\alpha$ はコントロール以下まで低下した。

### 3.7 可溶性FasL、TNF- $\alpha$ を含む培養液のアポトーシス誘導効果

FasLおよびTNF- $\alpha$ は、いずれもproapoptoticに働き、細胞にアポトーシスを誘導する。「結果3.6」で放出された可溶性FasL、TNF- $\alpha$ を含む培養液をU937細胞の培地に加え、12時間培養し、Annexin Vを用いてflow cytometryにてアポトーシスを検出した。いずれにおいても、U937細胞はアポトーシスを誘導し、またFasL中和抗体およびTNF- $\alpha$ 中和抗体により、同アポトーシスは抑制

された (図 3-16)。

### 3.8 劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスの生存率

インフルエンザウイルス単独感染および A 群レンサ球菌単独感染において、全マウスとも生存していたが、両病原体の複合感染マウスは約 1 週間程度でマウスは、劇症型 A 群レンサ球菌感染症のように敗血症にて死亡した (図 3-17 A)。

### 3.9 劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウス肺組織と TUNEL 染色

劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスの一次感染巣である肺の HE 染色では、2 日目 (2 dpi)、4 日目 (4 dpi)と日を追うごとに肺炎像が著しくなった。同時に、TUNEL 陽性細胞 (dark blue の細胞) の増加も著しくなった (図 3-17 B)。なお、両病原体の単独感染マウスの肺組織では、肺炎像は認められず、また TUNEL 陽性細胞もほとんど認めなかった。

### 3.10 劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスにおける MMP と可溶型 FasL、TNF- $\alpha$ 産生誘導

劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスの BALF を gelatin zymography にて解析すると、活性化 MMP-9、-2 の増加が認められたが、インフルエンザウイルス単独感染および A 群レンサ球菌単独感染においては、活性化 MMP-9、-2 はほとんど認めなかった (図3-18 A)。また、同モデルマウスおよび単独感染マウスにおける血中の可溶型 FasL および TNF- $\alpha$ の濃度を ELISA 法にて検討した。劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスの血中には、可溶型 FasL および TNF- $\alpha$ が著しく上昇していたが、単独感染マウスおよび未感染マウスの血中可溶型 FasL および TNF- $\alpha$ は、ほとんど検出できなかった (図3-18 B, C)。

### 3.11 SpeB 欠損 TR-11 株との複合感染

SpeB 欠損 A 群レンサ球菌株を用い、劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスと同様にインフルエンザウイルスとの複合感染系を作製して、劇症型 A 群レンサ球菌感染症における SpeB の関与について検討した。親株である SSI-9 および遺伝子改変 SpeB 欠損 TR-11 株の単独感染では、全マウスとも生存し続

けた。インフルエンザウイルスとの複合感染において、親株である SSI-9 との複合感染では、ほとんどのマウスは死滅したが、SpeB 欠損 TR-11 株との複合感染ではマウスの生存率は約 50%までしか認めなかった。SpeB 欠損株では、明らかに病原性が弱くなっていた (図 3-19 A)。肺の組織および TUNEL 染色でも、SSI-9 との複合感染では肺の著しい炎症および TUNEL 陽性細胞が増加していたが、SpeB 欠損 TR-11 株との複合感染では、肺の炎症像も弱く、TUNEL 陽性細胞もかなり減少していた (図 3-19 B)。

また、BALF の gelatin zymography においても、SpeB 欠損 TR-11 株との複合感染では SSI-9 に比べ、MMP-9、-2 の増加の程度は少なかった。また、血中可溶性 FasL、TNF- $\alpha$  も親株 SSI-9 に比し、SpeB 欠損株の方が増加が弱かった (図 3-20)。

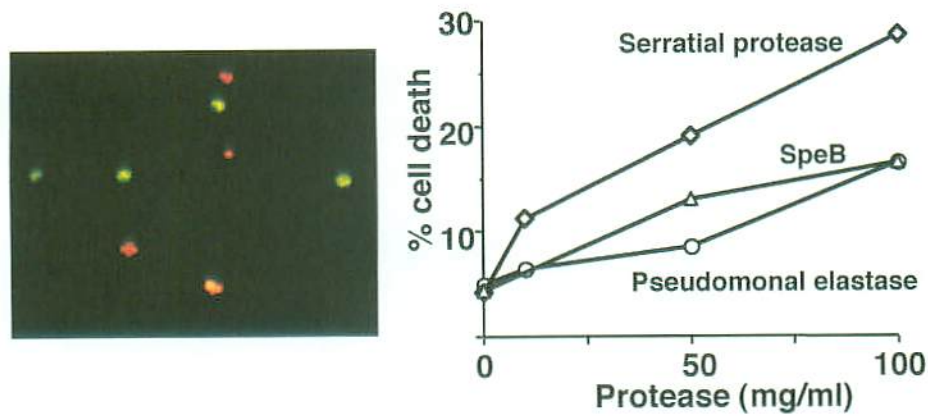


図3-1 各種細菌性プロテアーゼによるU937細胞の細胞死  
細胞生死判定のため、エチジウムブロマイド/アクリジンオレンジ染色を用いた。生細胞は緑色の蛍光を発し、死細胞はオレンジ色の蛍光を発する。

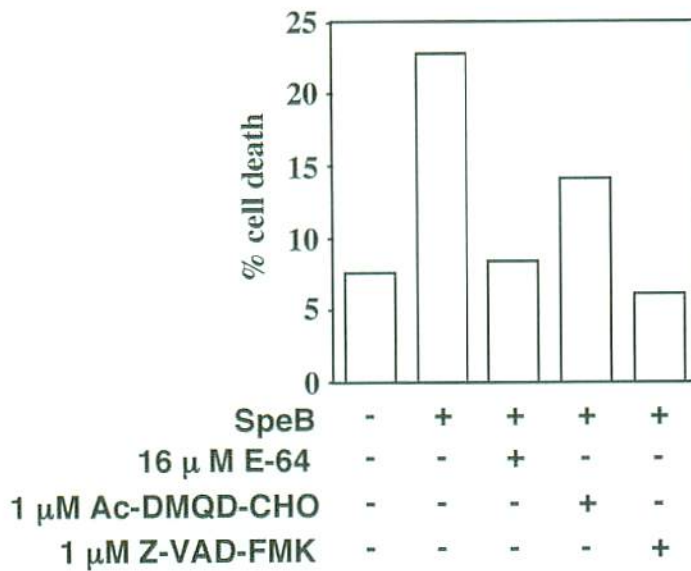
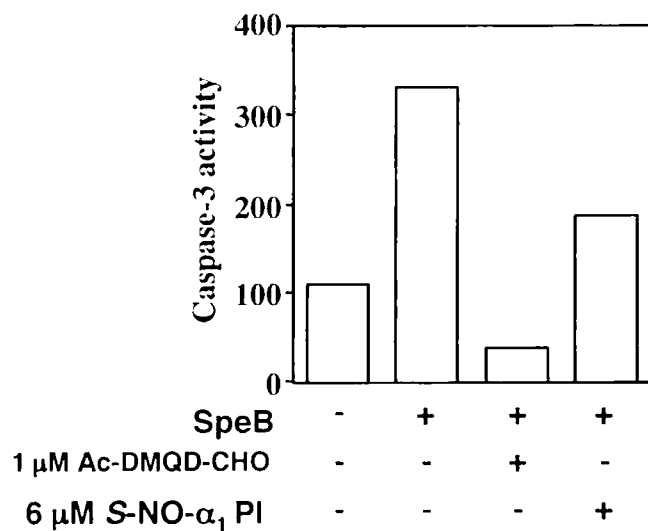


図3-2 SpeBによる細胞死に対する各種プロテアーゼインヒビターの効果  
Cysteine protease inhibitor (E-64)、caspase-3 inhibitor (Ac-DMQD-CHO)、caspases inhibitor (Z-VAD-FMK)によって、SpeB誘導の細胞死は抑制された。



**図3-3 SpeB処理後のU937細胞のcaspase-3活性**  
 SpeB処理したU937細胞において、caspase-3活性の上昇を認めた。  
 また、caspase-3 inhibitor およびS-NO-α<sub>1</sub>PIによりcaspase-3活性はコントロールレベルまで低下した。

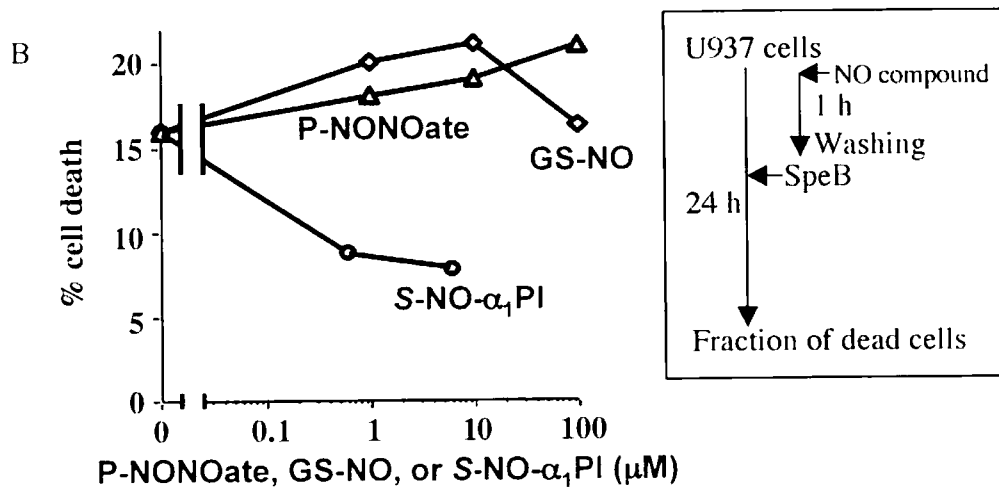
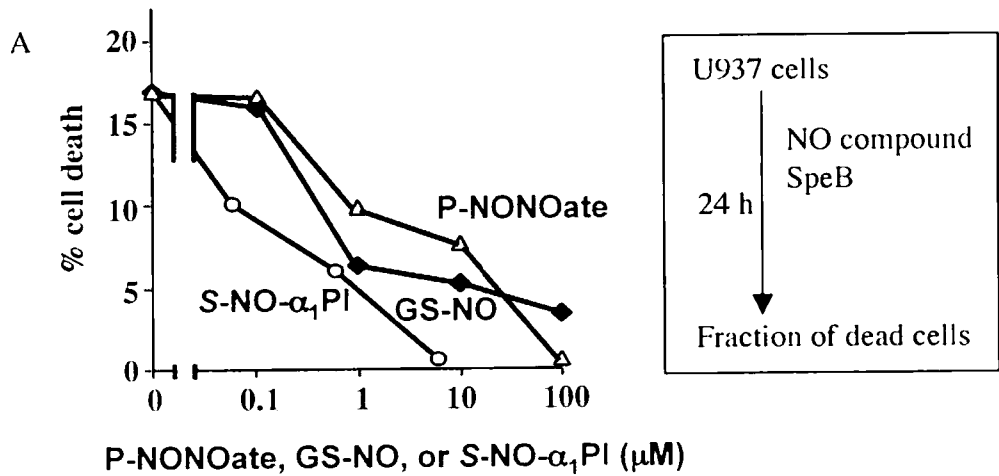
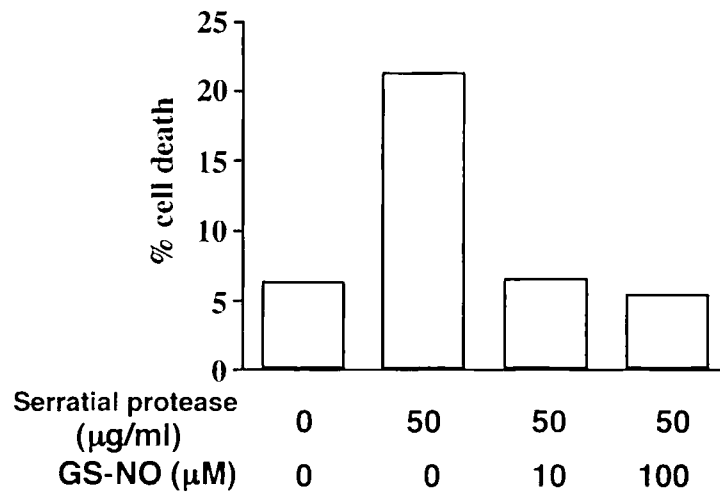


図3-4 SpeB誘導U937細胞死に対するNO, GS-NO, and S-NO- $\alpha_1$ PIの影響

- A. SpeB、NO compound同時処理した場合、NO compound濃度依存的に細胞死の減少を認めた。
- B. NO compound前処理し、洗浄後にSpeB処理すると、S-NO- $\alpha_1$ PIのみ細胞死の減少を認めた。



**図3-5 serratal protease誘導U937細胞死におけるGS-NOの効果**  
 Serratal proteaseにおいても、GS-NO添加にて細胞死の抑制が認められた。



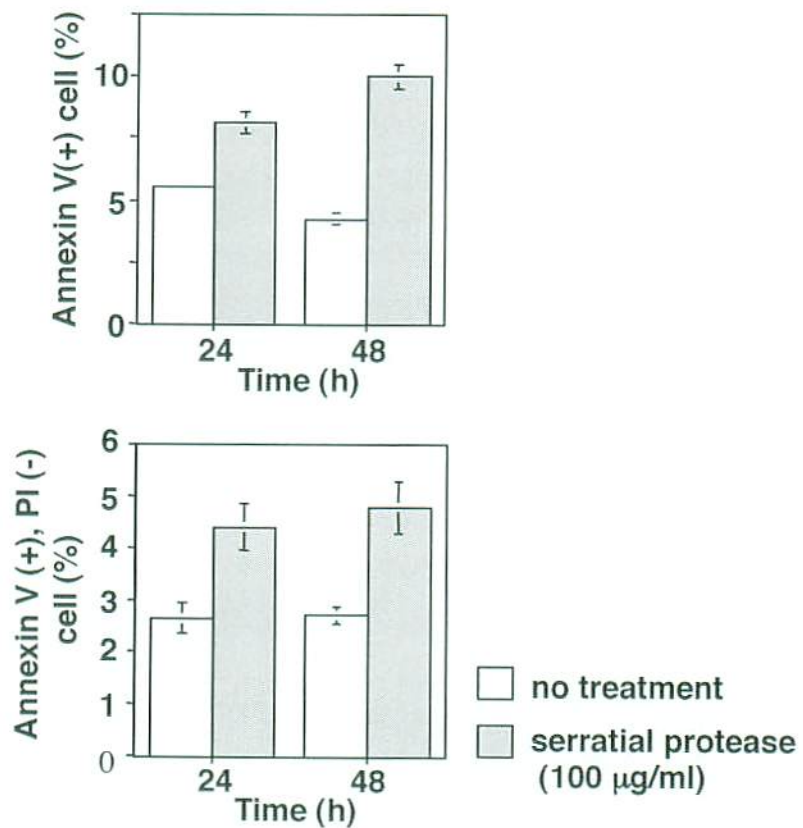
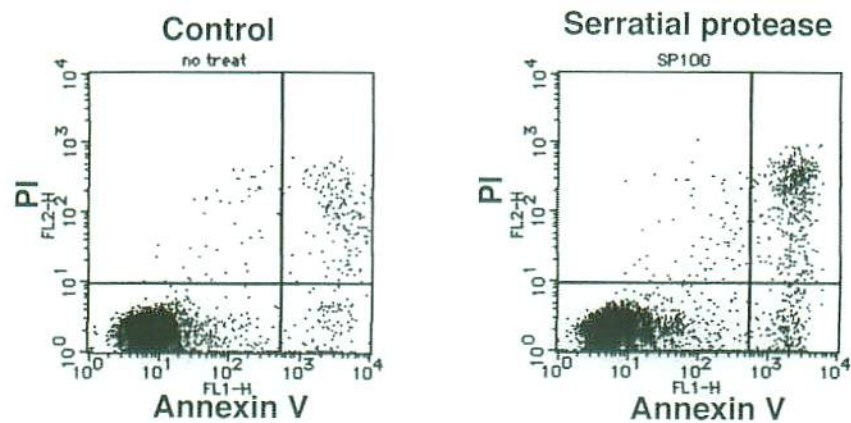


図3-6 Flow cytometryによるアポトーシス細胞の検出

Annexin V-FITCおよびpropidium iodide染色により、serratial protease処理細胞においてannexin V (+)細胞の増加を認めた。また、early apoptosisを示すannexin V (+)、PI (-)細胞も、serratial protease処理細胞は増加していた。

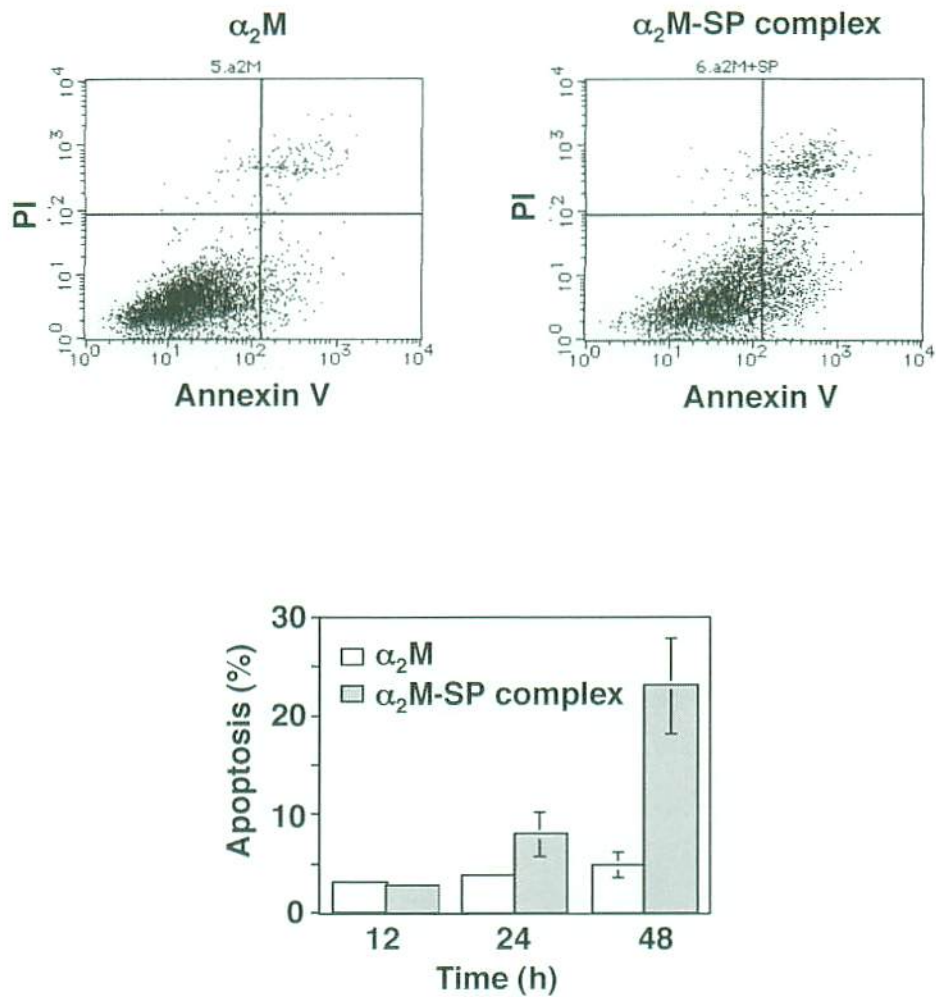
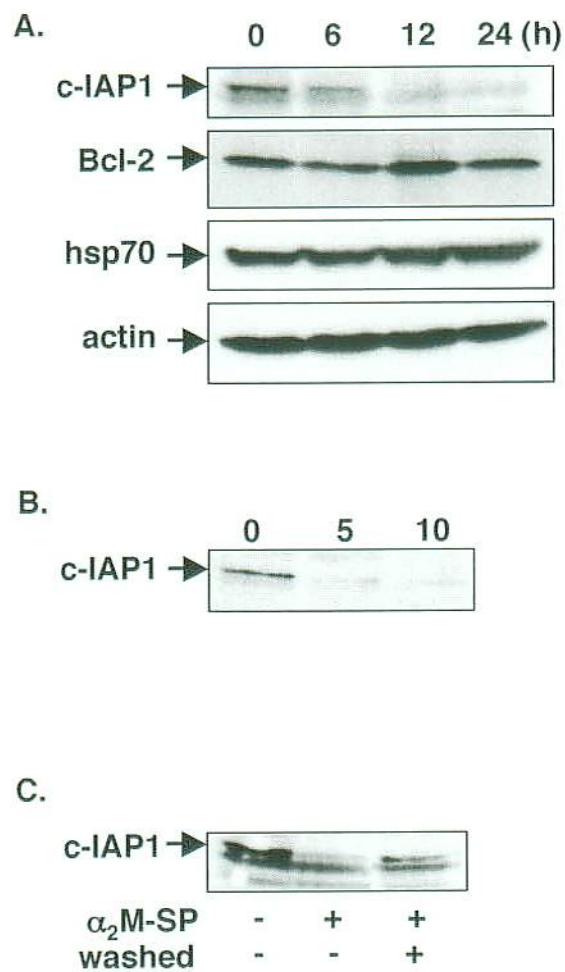


図3-7  $\alpha_2M$ -serratial protease (SP) complex によるMCF-7の細胞死  
 $\alpha_2M$ -SP (10  $\mu\text{g/ml}$ , molar ratio 2: 1)complexにより、MCF-7細胞は経時的にアポトーシス誘導を認めた。



### 図3-8 抗アポトーシス蛋白への影響

- A.  $\alpha_2$ M-serratial protease complex処理MCF-7細胞の抗アポトーシス蛋白の経時的変化
- B. SPの濃度依存的c-IAP1の変化
- C.  $\alpha_2$ M-SP complex処理3時間後に、細胞を洗浄して細胞内c-IAP1の発現を検討した。

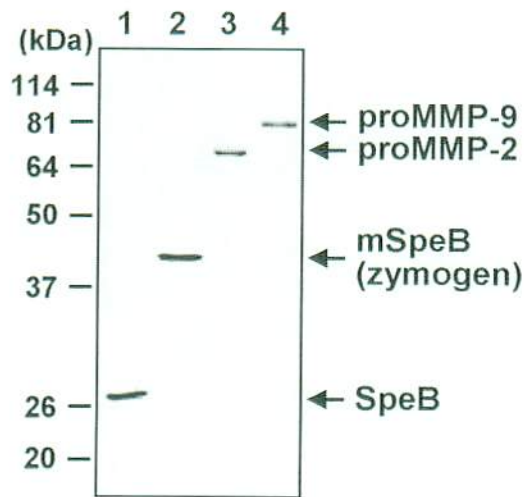


図3-9 組換え蛋白の発現 (SDS-PAGE)  
 lane 1: SpeB、lane 2: 不活性mutant SpeB、  
 lane 3: proMMP-2、lane 4: proMMP-9.

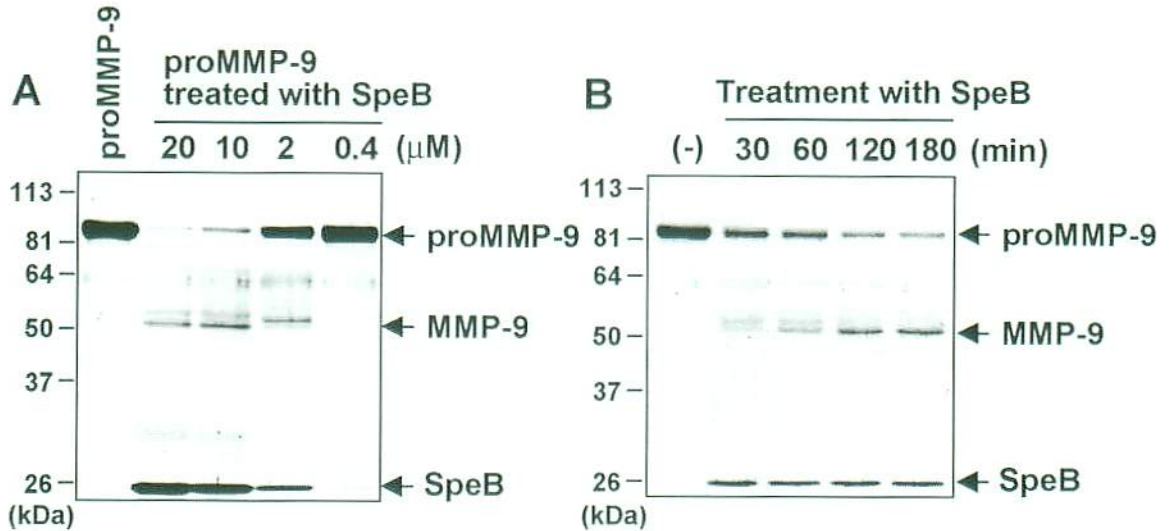


図3-10 SpeBによるproMMP-9の限定分解 (SDS-PAGE)  
 A. 各種SpeBの濃度で、proMMP-9と反応 (37°C, 30min) させた。  
 B. proMM-9とSpeBの反応の経時的変動。

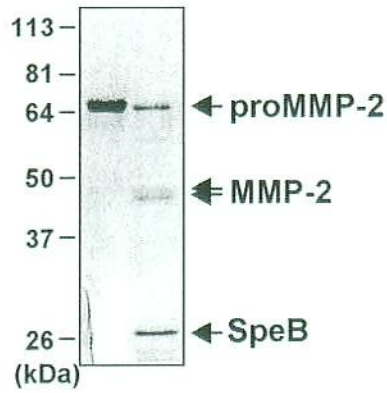


図3-11 SpeBによるproMMP-2の限定分解  
約40 kDaに2本限定分解された活性体MMP-2を認める。

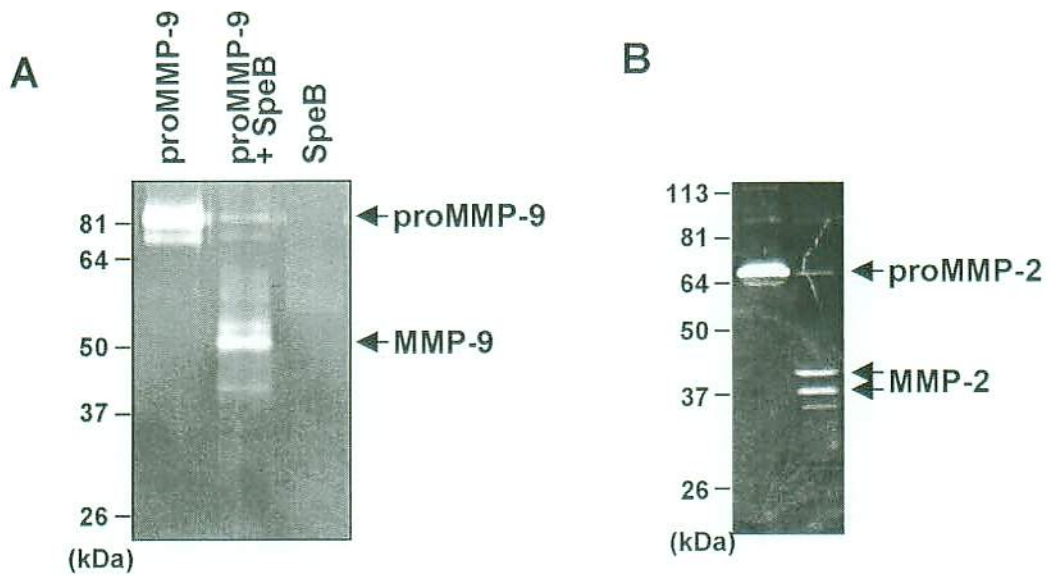


図3-12 gelatin zymogram  
A. SDS-PAGEと同様に、51 kDaにlytic bandを認めた。  
B. 同様に活性体の2本のlytic bandを認めた。

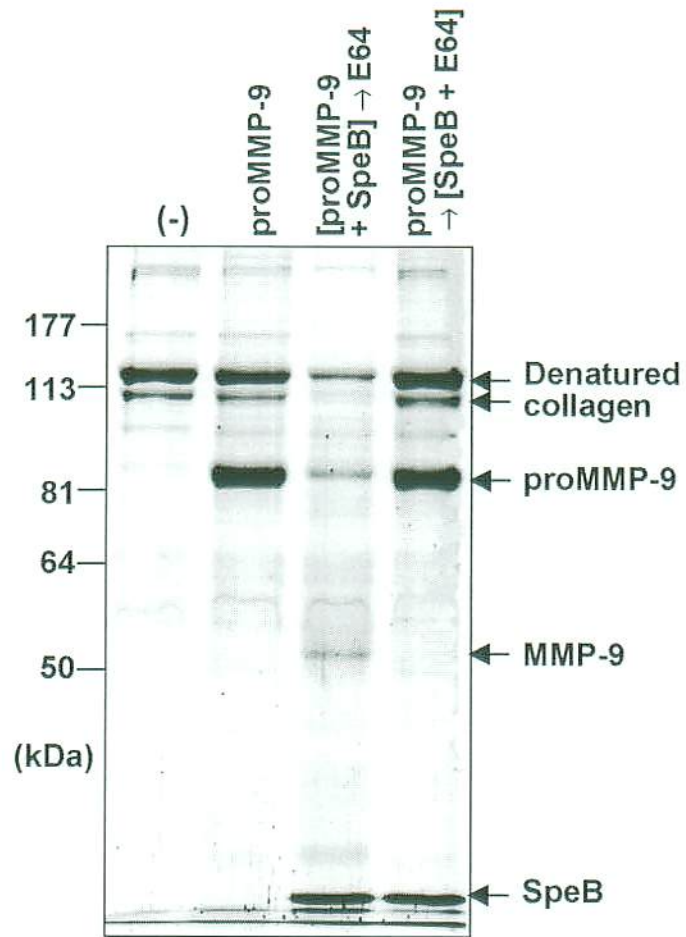


図3-13 SpeBで活性化されたMMP-9によるgelatinの分解  
 SpeBで活性化したproMMP-9を反応させたgelatinは分解されたが、E-64でSpeBを抑制し、proMMP-9と反応させたものでは、gelatinは、分解されなかった。

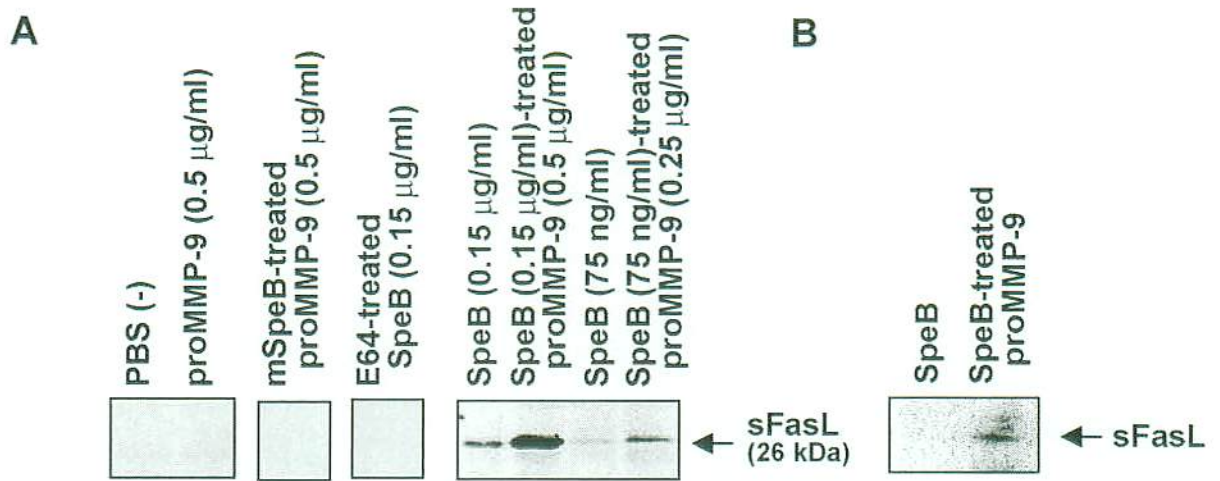


図3-14 SW480培養液中の可溶性FasL (Western blot法)

SpeBで活性化したproMMP-9を添加した培養液のみ可溶性FasLを検出した。

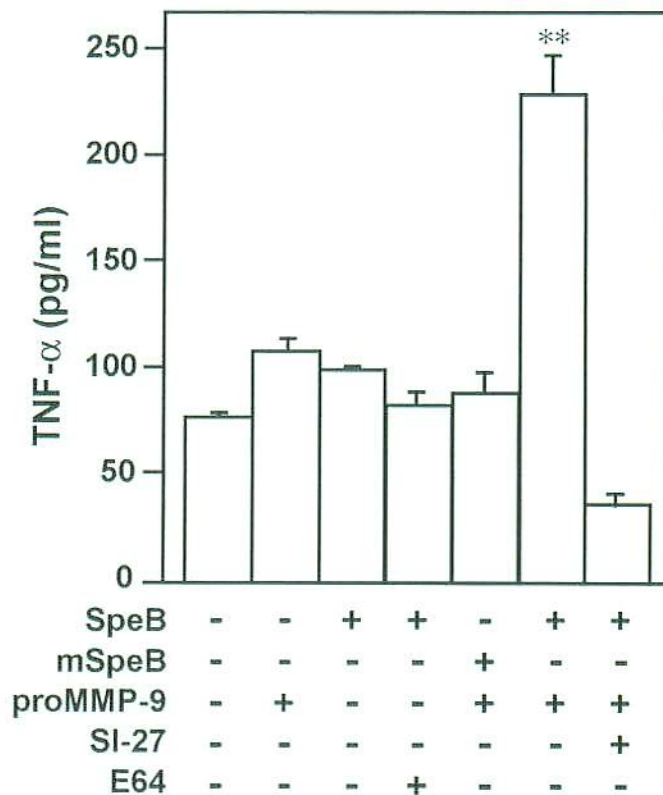


図3-15 RAW264培養液中のTNF-α (ELISA法)

SepeBで活性化したproMMP-9は、著しいTNF-αの上昇を示したが、MMP inhibitorであるSI-27を加えることにより、TNF-αはコントロール以下まで抑えられた。

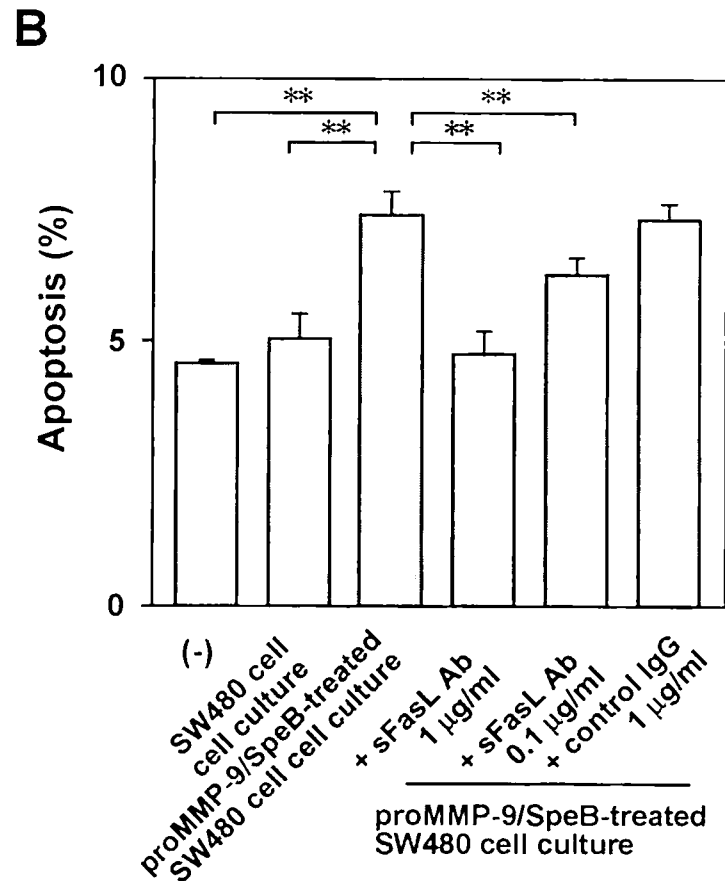
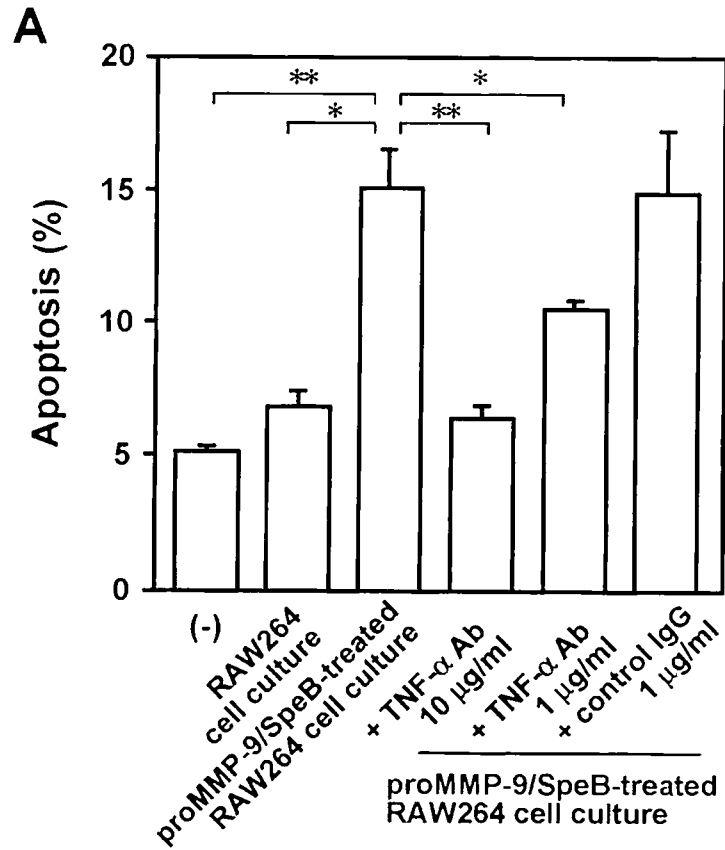


図3-16 培養液中の可溶型FasL, TNF- $\alpha$ によるアポトーシス誘導  
 RAW264細胞、SW480細胞にSpeBで活性化したproMMP-9を添加した培養では、U937細胞にアポトーシス誘導を認めた。TNF- $\alpha$ およびFasLの中和抗体を同時に加えることにより、アポトーシスは抑制された。



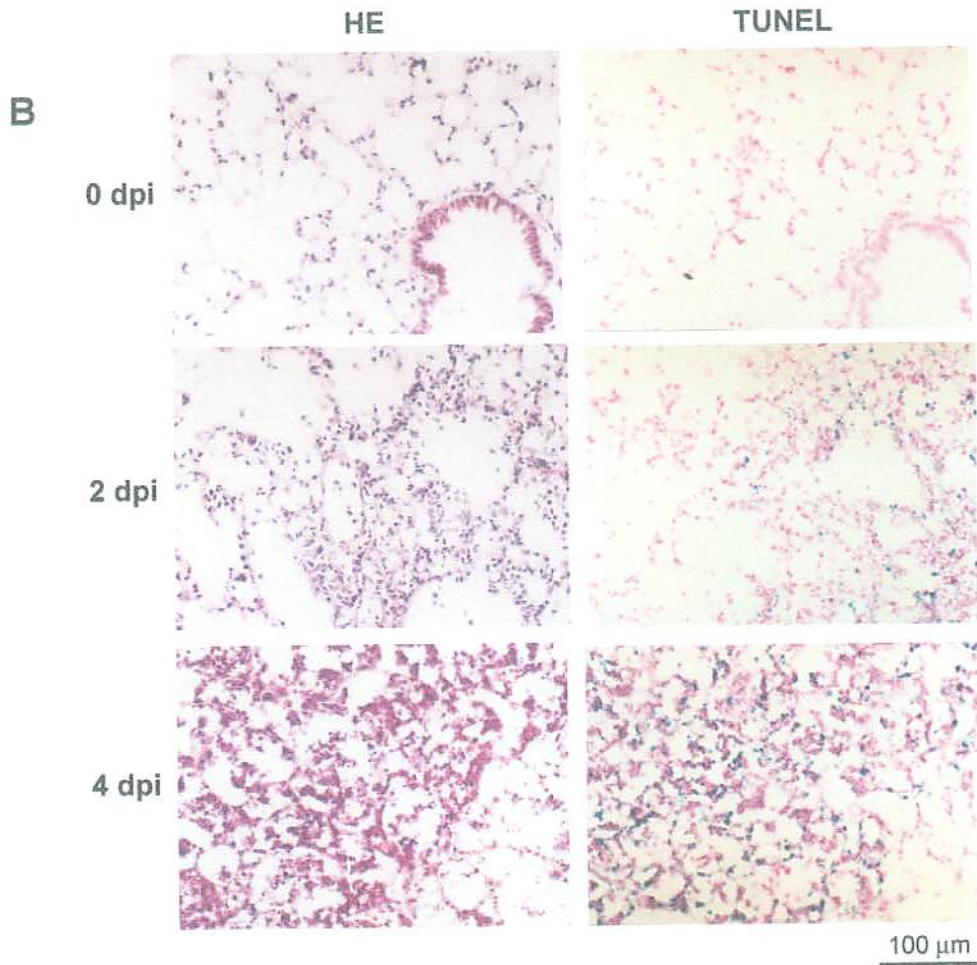
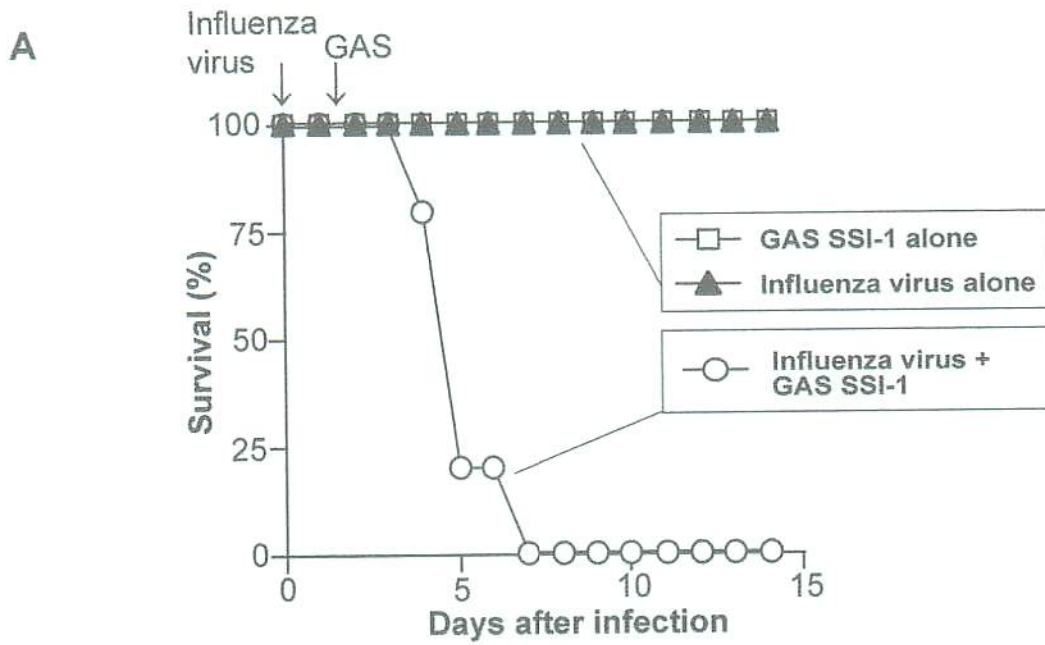


図3-17 劇症型A群レンサ球菌感染モデルマウスの生存率と肺組織  
 A. GASとインフルエンザウイルスの複合感染のみ、マウスは死滅した。  
 B. 同複合感染マウスの肺組織では、著しい炎症像とアポトーシスの誘導を認めた。

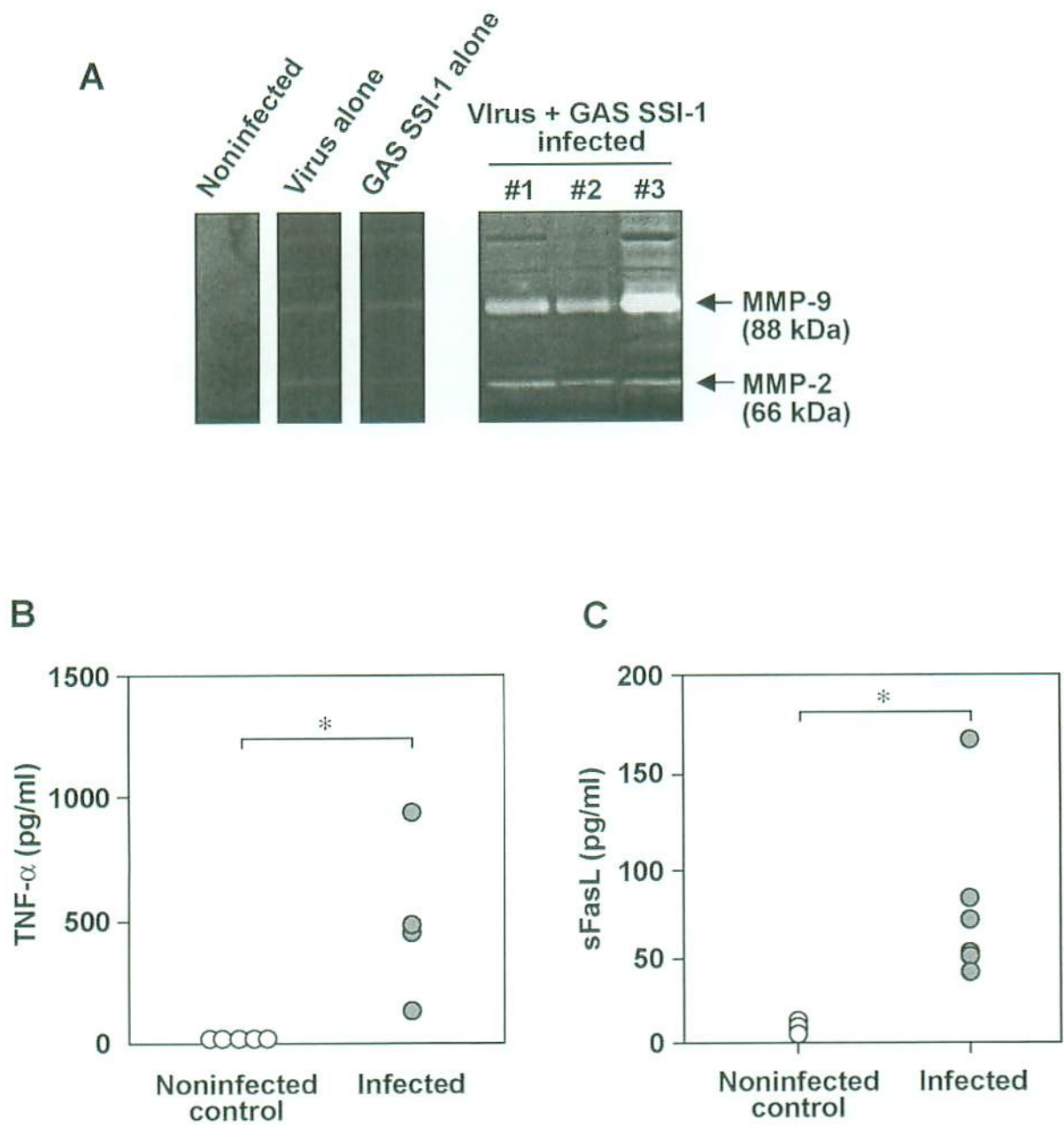


図3-18 BALF中のMMP-9, -2の発現と血清FasL, TNF- $\alpha$   
 A. 複合感染マウスのみ、BALF中のMMP-9, -2の発現増加を認めた。  
 B. 複合感染マウスの血中TNF- $\alpha$ およびsFasLは、著しい上昇を示した。

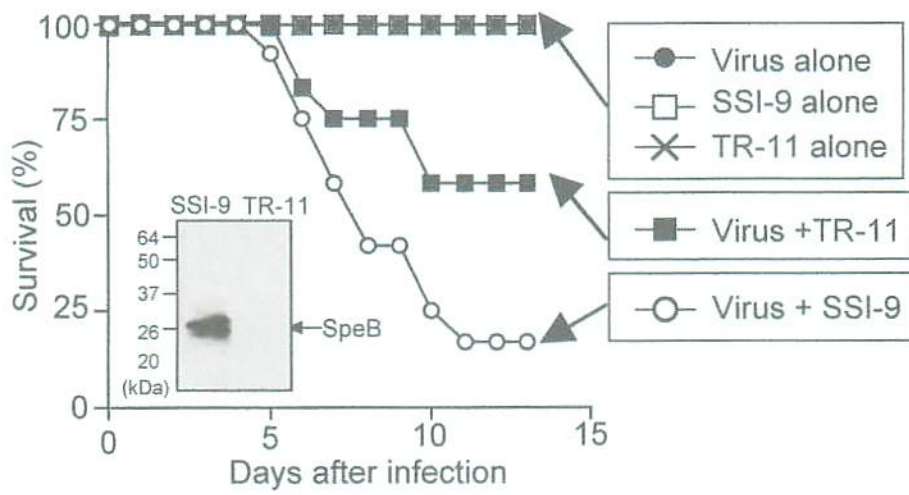
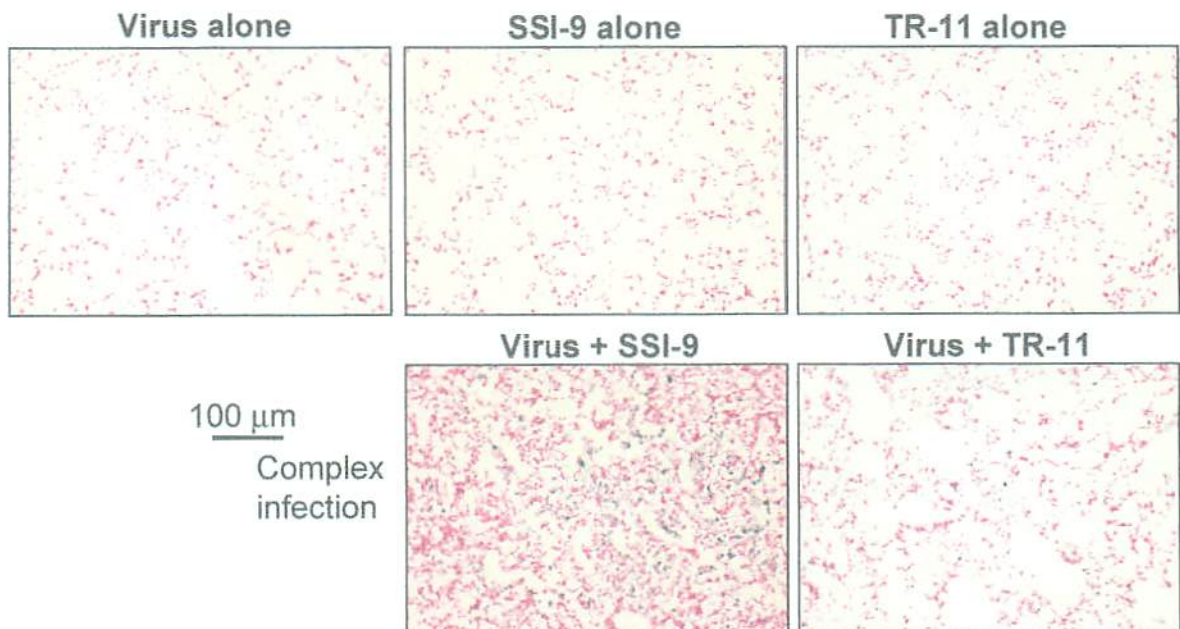
**A****B**

図3-19 SpeB欠損TR-11株の生存率と肺組織のTUNEL染色  
 A. SpeB欠損株TR-11との複合感染では、マウスの生存率が上昇した。  
 B. TR-11株の複合感染では、親株SSI-9より肺組織のアポトーシス誘導も軽微であった。

A



B

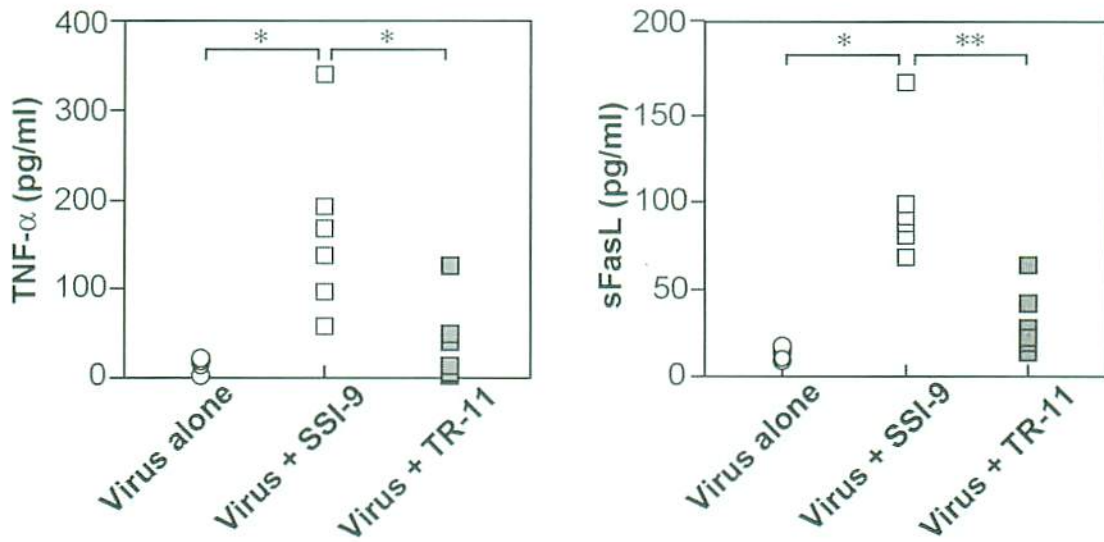


図3-20 SpeB欠損TR-11株感染のBALF中のMMP-9, -2の発現と血清FasL, TNF- $\alpha$

- A. SpeB欠損TR-11株の複合感染マウスのBALF中のMMP-9, -2の発現は、減少していた。
- B. 血中TNF-a、sFasL濃度もTR-11株の複合感染マウスで有為に低値であった。

## 第4章 まとめ・考察

細菌感染におけるアポトーシスの誘導に関して、*Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* および *Yersinia pertis*, *Pseudomonas aeruginosa* において、type III secretion system により細菌の蛋白が宿主細胞内に移入されることにより、宿主細胞にアポトーシスが誘導されることが報告されている。アポトーシス誘導の意義として、細菌が宿主細胞の免疫担当細胞にアポトーシスを起こし、細菌が生体内に侵入、増殖が可能なように免疫を抑えるため、あるいは逆に寄生性細菌では、寄生された細胞がアポトーシスに陥ることにより細菌を死滅させるためなど、細菌感染におけるアポトーシスの見解は様々である (Zychlinsky *et al.*, 1997)。細菌性プロテアーゼは、宿主の生体防御系に関わる種々のカスケードを活性化、あるいは不活性化して病原体の病態発現の誘因になっていると思われる (Trevis, 1995)。その内、細菌性プロテアーゼによる細胞傷害において、Maeda らは *Serratia marcescens* が産生する serratial 56 kDa protease が  $\alpha_2$ -マクログロブリンと複合体を形成後、細胞傷害を起こすことを報告しているが、そのメカニズムは不明である。A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は、咽頭炎から劇症型感染症まで多様な疾患の原因となっているが、A 群レンサ球菌が産生する 毒素性病原因子の中で SpeB (Streptococcal pyrogenic exotoxin B) は、産生量が多いとともに種々の生理活性を有している。近年、SpeB がアポトーシスを誘導することが、報告されているが、詳細なメカニズムは不明であった (Kuo, 1999; Tsai, 1999)。今回、細菌性プロテアーゼによるアポトーシスの誘導について、その機序と感染病態への関与について明らかにすることを目的として、特に SpeB によるアポトーシスの誘導と劇症型 A 群レンサ球菌感染症における劇症化への関与について研究を行なった。

まず、*Serratia marcescens* 56kDa protease、*Pseudomonas aeruginosa* elastase または SpeB (streptococcal pyrogenic exotoxin B) の各種細菌性プロテアーゼは、濃度依存的あるいは経時的に細胞死を誘導した。この細胞死は、caspase-3 活性の上昇を認めるアポトーシスであり、caspases inhibitor や NO (一酸化窒素) により細胞死が抑制された。特に、serratial protease は、以前 Maeda らの報告にあるように、 $\alpha_2$ -マクログロブリンと complex をつくり、細胞表面の  $\alpha_2$ -マクログロブリンレセプターを介して細胞内に移入後に細胞死を起こしたものと考えられた (Maeda, 1987; Maeda, 1989)。そして、同細胞死がアポトーシスであり、

抗アポトーシス蛋白である c-IAP1 の分解を伴う、新たなアポトーシス誘導機序であることが示唆された。

MMP は、細胞外マトリックス成分の分解、代謝に重要な役割を果たしているが、MMP の多くは、アポトーシスを誘導する TNF- $\alpha$  や Fas ligand (FasL) を細胞膜から切断・遊離することが知られている (Mohler, 1994: Gearing, 1994: McGeehan, 1994: Kayagaki, 1995: Black, 1997: Moss, 1997)。一方、Okamoto らはサーモライシン系の細菌性プロテアーゼが、限定分解により proMMP を活性化することが明らかにしており (Okamoto, 1997)、SpeB についても MMP-2 の活性化について報告はあるものの、正確な活性化機構は明らかにされていない。

(Burns, 1996)。そこで、組換え SpeB、proMMP-9 および proMMP-2 を作製し、SpeB による proMMPs の活性化機構の解明と、SpeB により活性化された MMPs による TNF- $\alpha$ 、FasL の processing について検討した。さらに、劇症型 A 群レンサ球菌感染症は、レンサ球菌により DIC 様の病態を来す予後不良の疾患であり、壊死性筋膜炎など広範なネクロシスを引き起こすが、病変部ではアポトーシス像が見られ、劇症化の病態に対してアポトーシスが、何らかの役割を演じている可能性が示唆されている (Watanabe-Onishi, 1995)。劇症型 A 群レンサ球菌感染症における劇症化の病態とアポトーシスの関連について、MMP の活性化と TNF- $\alpha$ 、FasL の生体内放出に焦点を当て、同疾患モデルマウスを用いて解析した。

まず、MMPs の活性化実験において、SpeB による proMMP-9、-2 の限定分解による活性化を *in vitro* で検討した。SpeB は、proMMP-9、-2 を限定分解し、活性体になることを、gelatin zymography や gelatin の分解実験によって明らかにした。興味あることに、SpeB 自体 gelatinase 様の活性を有していた。SpeB で活性化された MMPs は、膜型 TNF- $\alpha$  と FasL を可溶型として細胞外に遊離しており、これら遊離された可溶型 TNF- $\alpha$  と FasL は、U937 細胞にアポトーシスを誘導した。このアポトーシスの誘導は TNF- $\alpha$  と FasL の中和抗体により完全に抑制された。

同様のことが、生体内でも認められるかを、劇症型 A 群レンサ球菌感染モデルマウスで解析した (Okamoto, 2003)。同モデルマウスの肺病変では、著しい肺炎像を呈しており、TUNEL 陽性細胞が多数認められた。また、BALF 中の MMP-9、-2 の発現量が増加しており、血清 FasL および TNF- $\alpha$  が著しく上昇していた。SpeB 欠損 A 群レンサ球菌株で同様の感染実験を行なったが、MMPs の

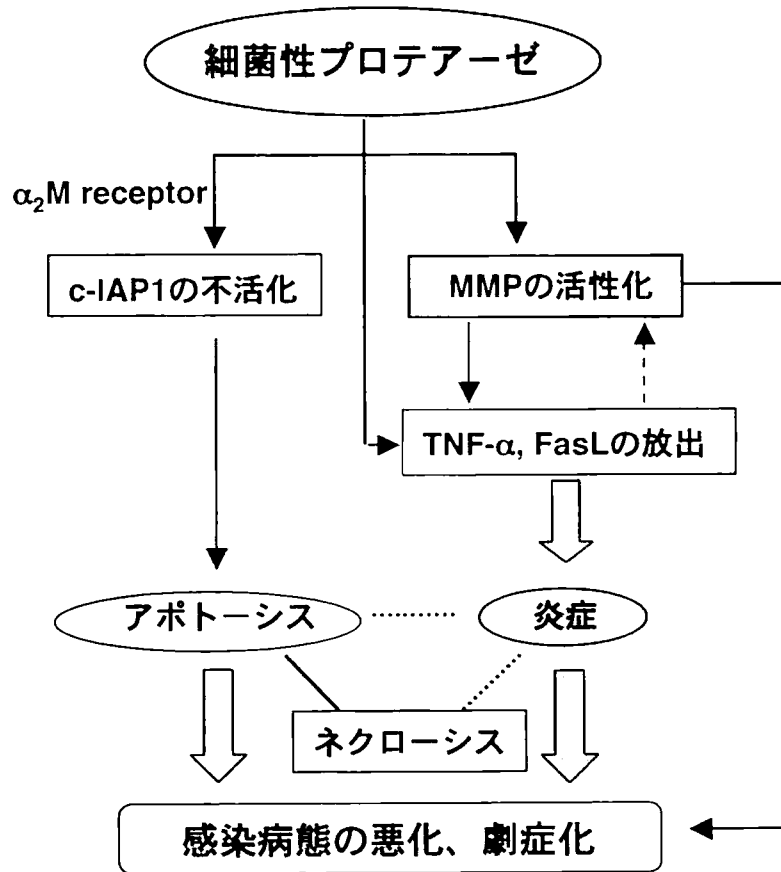
発現量や血清 FasL、TNF- $\alpha$ の増加は軽微であり、肺の炎症や TUNEL 陽性細胞は減少し、最終的にマウスの生存率は改善していた。すなわち、レンサ球菌が産生する菌体外プロテアーゼである SpeB は、MMPs を活性化し組織内あるいは血中の FasL、TNF- $\alpha$ を増加させ、アポトーシスの誘導ならびに病態の悪化を招いていることが示された。SpeB 自体、gelatinase 活性を持っており、レンサ球菌の組織内侵入や組織破壊に寄与しているものと考えられた。しかも、TNF- $\alpha$ は MMP の産生を促進するサイトカインであり、SpeB で一度 MMP が活性化されると、TNF- $\alpha$ の放出、再び MMP の産生増加と、SpeB が悪循環の誘因（引き金）になっていることが示唆される。加えて、近年 Fas や TNF receptor (TNFR) がアポトーシスだけでなく、ネクローシスの pathway になっている可能性が示されており (Matsymura, 2000; Vercammen, 1998)、過度の MMP の活性化や TNF- $\alpha$ 、FasL の放出が、劇症型 A 群レンサ球菌感染症の広範な壊死という特異な病態を引き起こしているのかもしれない。

## 第5章 結 語

細菌性プロテアーゼは、感染病態における炎症反応の増悪や宿主防御、免疫機構の制御破綻を介して、細菌の主要な病原因子として病原体の生体内侵襲に大きく寄与している。今回、細菌性プロテアーゼの細胞傷害、すなわちアポトーシスの誘導について解析を行なった。*Serratia marcescens* 56kDa protease、*Pseudomonas aeruginosa* elastase または SpeB (streptococcal pyrogenic exotoxin B) の各種細菌性プロテアーゼは、宿主細胞のアポトーシスを引き起こし、特に生体内に存在する $\alpha_2$ -マクログロブリン ( $\alpha_2$ -M) と complex をつくり、 $\alpha_2$ -M レセプターを介して、細胞内に移入後アポトーシスを誘導することが示された。その際、細胞内の抗アポトーシス蛋白である c-IAP1 の発現低下が、アポトーシス誘導の一因になっていることが示唆された。また、A 群レンサ球菌が産生する SpeB は、proMMPs を限定分解し、活性体 MMPs に変換することを明らかにした。この活性体 MMPs は、膜型 FasL や TNF- $\alpha$  を可溶型として細胞外に遊離させ、アポトーシスを誘導することが明らかになった。さらに、劇症型 A 群レンサ球菌感染症モデルマウスでも、SpeB に依存した MMPs の活性化、発現増加および血清 FasL、TNF- $\alpha$  の増加が認められ、病巣では著しいアポトーシスが誘導されていた。このことは、SpeB が劇症型 A 群レンサ球菌感染症の病態発現において、アポトーシスの誘導を介して、極めて重要な役割を演じていることを示唆するものである。



# まとめ



## 参考文献

Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March, and D. P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that release tumor-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature (London)* **385**:729-733

Burns, E. H., Jr., A. M. Marciel, and J. M. Musser. 1996. Activation of 66-kilodalton human endothelial cell matrix mettalloprotease by *Streptococcal pyogenes* extracellular cysteine protease. *Infect. Immun.* **64**:4744-4750

Chen, Y., M. R. Smith, K. Thirumalai, and A. Zychlinsky. 1996. A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. *EMBO J.* **15**: 3853-3860

Cohen, G. M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **356**:1-16

Corbel, M., N. Théret, S. Caulet-Maugendre, N. Germain, V. Lagente, B. Clément, and E. Boichot, 1998. Increased activity of matrix metalloproteinase-9 (92 kDa gelatinase) and neutrophil recruitment following chronic exposure to endotoxin in the mouse. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**:A567 (Abstract)

Corbel, M., E. Boichot, and V. Lagente. 2000. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. *Braz. J. Biol. Res.* **33**:749-754

Delclaux, C., M. P. D'Ortho, C. Delcourt, F. Lebargy, C. Brun-Buisson, L. Brochard, F. Lemaire, C. Lafuma and A. Harf, 1997. Gelatinases in epithelial lining fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Physiol.* **272**:L442-L451

Denecker, G., W. Declercq, C. A. Geuijen, A. Boland, R. Benabdillah, M. van Gurp, M. P. Sory, P. Vandenabeele, and G. R. Cornelis. 2001. *Yesinia enterocolitica* YopP-induced apoptosis of macrophages involves the apoptotic signaling cascade upstream of

Bid. J. Biol. Chem. 276:19706-19714

D'Ortho, M. P., P. H. Jarreau, C. Delacourt, I. Macquin-Mavier, M. Levame, S. Pezet, A. Harf, and C. Lafuma, 1994. Matrix metalloproteinase and elastase activities in LPS-induced acute lung injury in guinea pigs. Am. J. Physiol. 266:L209-L216

Enari, M., R. V. Talanian, W. W. Wong, S. Nagata, 1996. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. Nature 380:723-726

Gearing, A. J. H., P. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon, T. M. Leber, M. Mangan, K. Miller, P. Nayee, K. Owen, S. Patel, W. Thomas, G. Wells, L. M. Wood, and K. Woolley. 1994. Processing of tumor necrosis factor- $\alpha$  precursor by metalloproteinases. Nature (London) 370:555-557

Grassmé, H., S. Kirschnek, J. Riethmueller, A. Riehle, G. von Kurthy, F. Lang, M. Weller, and E. Gulbins. 2000. CD95/CD95 ligand interactions on epithelial cells in host defense to *Pseudomonas aeruginosa*. Science 290:527-530

Grassmé, H., V. Jendrossek, and E. Gulbins 2001. Molecular mechanisms of bacteria induced apoptosis. Apoptosis 6:441-445

Hersh, D., D. M. Monach, M. R. Smith, N. Ghori, S. Falkow, and A. Zychlinsky. 1999. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:2396-2401

Herward, H., M. Collin, W. Muller-Esterl, and L. Bjorck. 1996. Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: a novel virulence mechanism. J. Exp. Med. 184:665-673

Hilbi, H., J. E. Moss, D. Hersh, Y. Chen, J. Arondel, S. Banerjee, R. A. Flavell, J. Yuan, P. J. Sansonetti, and A. Zychlinsky. 1998. *Shigella*-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB. J. Biol. Chem. 273:32895-32900

Jesenberger, V., K. J. Procyk, J. Yuan, S. Reipert, and M. Baccarini. 2000. *Salmonella*-induced caspase-2 activation in macrophage. *J. Exp. Med.* **192**:1035-1045

Kapur, V., S. Topouzis, M. W. Majesky, L.-L. Li, M. R. Hamrick, R. J. Hamill, J. M. Patti, and J. M. Musser. 1993. A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. *Microb. Pathog.* **15**:327-346

Kapur, V., M. W. Majesky, L.-L. Li, R. A. Black, and J. M. Musser. 1993. Cleavage of interleukin 1b (IL-1B) precursor to produce active IL-1b by a conserved extracellular cysteine protease from *Streptococcus pyogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:7676-7680

Kapur, V., J. T. Maffei, R. S. Greer, L. -L. Li, G. J. Adams, and J. M. Musser. 1994. Vaccination with streptococcal extracellular cysteine protease (interleukin 1b convertase) protects mice against challenge with heterologous group A streptococci. *Microb. Pathog.* **16**:443-450

Kayagaki, N., A. Kawasaki, T. Ebata, H. Ohmoto, S. Ikeda, S. Inoue, K. Yoshino, K. Okumura, and H. Yagita. 1995. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J. Exp. Med.* **182**:1777-1783

Kerr, J. F., A. H. Wyllie, A. R. Currie. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**:239-257

Kuo C. F., J. J. Wu, P. J. Tsai, F. J. Kao, H. Y. Lei, M. T. Lin, and Y. S. Lin. 1999. Streptococcal pyrogenic exotoxin B induces apoptosis and reduces phagocytic activity in U937 cells. *Infect. Immun.* **67**:126-130

Maeda. H., Okamoto, T., Akaike, T. 1998. *Biol. Chem.*, **379**:193-200

Maeda, H., A. Molla, T. Oda, and T. Katsuki, 1987. Internalization of serratial protease into cells as an enzyme-inhibitor complex with  $\alpha_2$ -macroglobulin and regeneration of protease activity and cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **262**:10946-10950

Maeda, H., A. Molla, K. Sakamoto, A. Murakami, and Y. Matsumura, 1989. Cytotoxicity of bacterial protease in various tumor cells mediated through  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor. *J. Biol. Chem.* **262**:10946-10950

Matsumura, H., Shimizu, Y., Ohsawa, Y., Kuwahara, A., Uchiyama, Y., and Nagata, S., 2000. Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J. Cell Biol.* **151**: 1247-1255

McGeehan, G. M., J. D. Becherer, R. C. Bast Jr., C. M. Boyer, B. Champion, K. M. Connolly, J. G. Conway, P. Furdon, S. Karp, S. Kidao, A. B. McElroy, J. Nichols, K. M. Pryzwansky, F. Schoenen, L. Sekut, A. Truesdale, M. Verghese, J. Warner, and J. P. Ways. 1994. Regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$  processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature (London)* **370**:558-561

Miyamoto, Y., T. Akaike, M. S. Alam, K. Inoue, T. Hamamoto, N. Ikebe, J. Yoshitake, T. Okamoto, and H. Maeda. 2000. Novel functions of human  $\alpha_1$ -protease inhibitor after S-nitrosylation: Inhibition of cysteine protease and antibacterial activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**:918-923

Mohler, K., P. R. Sleath, J. N. Fitzner, D. P. Cerretti, M. Alderson, S. S. Kerwar, D. S. Torrance, C. O.-Evans, T. Greenstreet, K. Weerawarna, S. R. Knonheim, M. Petersen, M. Gerhart, C. J. Kozlosky, C. J. March, and R. A. Black. 1994. Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumor necrosis factor processing. *Nature (London)* **370**:218-220

Moss, M. L., S.-L. Catherine, M. E. Milla, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J.-L. Su, J. Warner, D. Willard,

and J. D. Becherer. 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature (London)* **385**:733-736

Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**:355-365

Orth, K., L. E. Palmer, Z. Q. Bao, S. Stewart, A. E. Rudolph, J. B. Bliska, and J. E. Dixon. 1999. Inhibition of the mitogen-activated protein kinase kinase superfamily by a *Yersinia* effector. *Science* **285**:1920-1923

Orth, K., Z. Xu, M. B. Mudgett Z. Q. Bao, L. E. Palmer, J. B. Bliska, W. F. Mangel, B. Staskawicz, and J. E. Dixon. 2000. Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* **290**:1594-1597

Okamoto, S., S. Kawabata, I. Nakagawa, Y. Okuno, T. Goto, K. Sano, and S. Hamada. 2003. Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of *Streptococcus pyogenes* infection in mice. *J. Virol.* **77**:4104-4112

Okamoto, T., Akaike, T., Suga, M., Tanase, S., Horie, H., Miyajima, S., Ando, M., Ichinose, Y., and Maeda, H. 1997. Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases. *J. Biol. Chem.*, **272**:6059-6066

Okamoto, T., Akaike, T., Nagano, T., Miyajima, S., Suga, M., Ando, M., Ichimori, K., and Maeda, H. 1997. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: A novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**:261-274

Okamoto, T., Akaike, T., Sawa, T., Miyamoto, Y., van der Vliet, A., and Maeda, H., 2001. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-Glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J. Biol. Chem.*, **276**:29596-29602

Schulze-Osthoff, K. D. Ferrari, M. Los, S. Wesselborg and M. E. Peter, 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**:439-459

**Sottrup-Jensen, L.** 1989.  $\alpha$ -Macroglobulins: structure, sharp, and mechanism of proteinase complex formation. *J. Biol. Chem.* **264**:11539-11542

**Tanuma, S.,** 1996. Molecular mechanisms of apoptosis. in *Apoptosis in Normal Development and Cancer* (Sluyser, M. ed). pp39-55. Taylor & Francis, London

**Thompson, C. B.,** 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**:1456-1459

**Trevis, J., Potempa, J., and Maeda, H.** 1995. Are bacterial proteinases pathogenic factors? *Trends Microbiol.* **3**:405-407

**Tsai, P. J., Y. S. Lin, C. F. Kuo, H. Y. Lei, and J. J. Wu.** 1999. Group A streptococcus induces apoptosis in human epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**:4334-4339

**Vercammen, D., Beyaet, R., Denecker, G., Goossens, V., Van Loo, G., Declercq, W., Grooten, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P.,** 1998. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L292 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **187**: 1477- 1485

**Watanabe-Ohnishi, R., D. E. Low, A. M. Schlievert, D. Newton, B. Schwartz, B. Kreiswirth, Ontario Streptococcal Study Project, and M. Kotb.** 1995. Selective depletion of V $\beta$ -bearing T cells in patients with severe invasive group A streptococcal infection and streptococcal toxic shock syndrome. *J. Infect. Dis.* **171**:74-84

**Wolf, B. B., C. A. Gibson, V. Kapur, I. M. Hussaini, J. M. Musser, and S. L. Gonias.** 1994. Proteolytically active streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves monocytic cell urokinase receptor and releases an active fragment of the receptor from the cell surface. *J. Biol. Chem.* **269**:30682-30687

**Zychlinsky, A., Sansonetti, P.** 1997. Apoptosis in Bacterial Pathogenesis. *J. Clin. Invest.* **100**:493-496