〔原 著〕

ストレプトリジンSによる溶血作用

鈴木 潤・菊池佐知子・吉原英児・小林貞男

SUMMARY

The streptolysin S (SLS) complex has an isoelectric point (pI) of 5.4 and a molecular weight of 32,000, and it shows hemolytic activity in the absence of 2-mercaptoethanol (2-ME). The hemolytic activity of SLS was compared to that of streptolysin O (SLO). These hemolysins differed with respect to the binding and release of hemoglobin (Hb). SLS was bound to phospholipids on the membranes of target erythrocytes, followed by the rapid release of K^+ and slow Hb release after a relatively long lag time. In contrast SLO released Hb as rapidly as K^+ . SLS-induced hemolysis was inhibited by the addition of 30 mM Dextran 4. These results indicate that the effective diameter of the pores formed by SLS was about 3.5 nm. SLS showed a lower hemolytic efficiency than SLO, reflecting the fact that these hemolysins destroy erythrocytes by different mechanisms.

Key words: streptolysin S, characteristics, hemolysis, isoelectric focusing, K^+ -sensitive electrode.

緒 言

近年、米国を中心にレンサ球菌による Toxic shock syndrome 様症例の多発傾向が報告されてから、本菌の病原性発現機構が再び注目されている。A群レンサ球菌の特徴の一つは菌体外に産生する溶血毒素ストレプトリジン S (SLS) およびストレプトリジン O (SLO) による強い溶血作用である。両毒素とも赤血球膜に結合した後、溶血を惹起させるが、溶血に至る過程における作用機序は異なっており、それぞれの毒素について多くの研究成果が報告されている¹⁻⁴⁾。

Duncan らは、SLO では分子が膜上にリング状あるいは半円構造状に分子集合し、孔を形成して溶血を起こすことを電顕的に証明し、また、SLS では赤血球からヘモグロビン (Hb) が遊離する前に、あらかじめ赤血球に取り込まれた rubidium-86 (Rb) の放出がみられることよ

り、コロイド浸透圧過程に従い溶血が進行することを証明した^{2,5)}。今回、われわれは両毒素における溶血機序の差異を Rb の代りに K^+ 特異検出電極を用いて、簡便で、しかも赤血球をより自然に近い状態で使用できる方法により解析を行った。また、SLS が孔形成細胞障害毒素であるか否かを溶血保護効果より検討した。さらに、溶血効率 (hemolytic efficiency, HE) が毒素による溶血機序を知る上で一つの指標になりうる可能性についても検討した。

材料および方法

1. SLS

市販の毒素標品 (SIGMA) を用いた。

2. SLO

Streptococcus pyogenes SS265 (A群3型菌) を 41 の富養化 Todd-Hewitt 限外濾過培地 (3% グルコース、

Characteristics of the hemolytic process by streptolysin S.

Jun Suzuki, Sachiko Kikuchi, Eiji Yoshihara, Sadao Kobayashi; 麻布大学環境保健学部生物有機化学

Correspondence address: Jun Suzuki, Department of Bioorganic Chemistry, College of Environmental Health, Azabu University, Sagami-hara 229, Japan.

(受付 1993年10月6日, 受理 1993年11月25日)

略号一覧: Hb, ヘモグロビン; HE, 溶血効率, hemolytic efficiency; SLS, ストレプトリジンS; SLO, ストレプトリジンO; Rb, rubidium-86.

1% 酵母抽出液添加) で 37°C 16~18 時間, pH を 20% NaOH で pH 7.2 に修正しながら培養した. 培養上清は遠沈により除菌し, 限外濾過法により 100 ml まで濃縮し粗毒素とした.

3. pI 測定および分子量測定^{6,7)}

pI 測定はアガロースゲル等電電気泳動, 分子量測定は TLG アパレータス (Pharmacia-LKB) を用いた Sephadex G 200 superfine 薄層ゲル濾過法により行った.

4. 赤血球内から遊離する K⁺ および Hb の測定

K⁺ は valinomycin を封入した PVC 膜電極⁸⁾ (K⁺特異検出電極) を用いて標準電極との電位差から算出した. また, 赤血球からの Hb の流出は 540 nm における吸光度より測定した.

5. 浸透圧保護実験⁹⁾

保護物質として, dextran 8 (平均分子径, >3.5 nm, Serva), dextran 4 (同, 3.5 nm, Serva), inulin (同, 2.8 nm, 和光), raffinose (同, 1.1 nm, 和光), sucrose (同, 0.9 nm, 和光) をそれぞれ 30 mM を含む 59 mM Mops-Tris/100 mM choline chloride pH 7.2 で 1% 家兎赤血球懸濁液を調製し, 40 HD₅₀ の毒素量を添加して, 25°C 60 分間経時的に溶血を観察した.

6. HE の測定

両毒素の HE 測定は既報⁹⁾に従った.

結 果

1. pI および分子量測定

SLS の物理化学的性状を知るために, 還元状態および非還元状態での pI 分析, TLG による分子量測定を溶血を指標として行った. SLS の pI は 5.4 の単一溶血成分からなっており, 非還元状態でも溶血活性を示した (Fig. 1). 分子量は Fig. 2 レーン 3 に示すように 32,000 であり, pI 測定の成績と同様に非還元状態でも活性を示した. また, レーン 1, 2 に示す SLO の 2 サンプルはいずれも分子量 76,000 を示し, 還元状態でのみ活性が検出された. レーン 4, 5 に示す SLS および SLO が混在する毒素標品 2 サンプルの分子量は還元状態では分子量 32,000 の溶血スポットのみが検出された.

2. 赤血球からの K⁺ および Hb の遊離

毒素処理による K⁺ 遊離のタイムコースは SLS および SLO で 10 分でプラトーに達した (Fig. 3, Fig. 4). Hb の遊離は SLO 処理では K⁺ 遊離と同時に 10 分でプラトーに達したが, SLS では 10 分の lag period 後

Fig. 1. Determination of the pI value of streptolysin S and the oxygen susceptibility of its hemolytic activity.

Streptolysin S was applied to agarose gel containing 2% Ampholine and focused for 2 h. Hemolytic activity was detected by overlaying agarose plates containing erythrocytes with or without 2ME. The clear bands on the overlaid plate indicates hemolysis.

Fig. 2. Determination of the molecular weight of streptolysin by thin-layer gel filtration in the presence or absence of 2-ME.

Hemolytic activity was detected as shown in Fig. 1. Lanes 1, 2 (SLO), lane 3 (SLS), lanes 4, 5 (SLO and SLS). Thin-layer plate: 20×20 cm. Gel: Sephadex G-200 superfine. Layer thickness: 0.6 mm. Time: 7.25 h. Angle: 20°. The migration distance for Blue dextran was 88 mm.

Fig. 3. Effect of osmotic protectants on SLS-induced hemolysis.

Rabbit erythrocyte suspensions (1%, v/v) containing 30 mM sucrose (□), 30 mM raffinose (▲), 30 mM inulin (△), 30 mM dextran 4 (●), 10 mM dextran 8 (■), or no protectant (○) were incubated with the hemolysin (40 HD₅₀) at 25°C. Then the release of K⁺(A) and Hb(B) from the erythrocytes was determined.

Fig. 4. Effect of osmotic protectants on SLO-induced hemolysis, experimental conditions were as described in Fig. 3.

と SLO が混在する毒素標品ではこの中間の HE を示し、SLS の含有量が HE に影響することが示された。

考 察

1) SLS は毒素の本体物質 (数十個のアミノ酸からなるポリペプチド) とアルブミン, α リポタンパク, オリゴヌクレオチド (AF), および Tween らの carrier との複合体であることが, Ginsburg ら^{10,11)}によって報告されている。ゆえに, 測定結果は SLS の複合体の pI および分子量を示す。今回使用した SLS 複合体の pI は 5.4 と SLO に比し低値であり, 従来より報告されているように非還元状態でも溶血活性を示した。一方, SLO は還元状態でのみ活性を示すので SLS と識別される。SLS 複合体の分子量は 32,000 を示したが, この数値は carrier protein の示す分子量と考えられる。また, pI 測定時と同様に非還元状態でも活性が認められた。SLO の分子量はレーン 1, 2 およびレーン 4, 5 では差がみられるが, 繰返し実験および sample 数増加時には, これまで報告⁹⁾した値とほぼ同様の成績を示した。

に遊離が起こり, プラトーになるまで 40 分を要した。

3. 浸透圧保護実験

毒素によって引き起こされる溶血の保護効果を 5 種の保護物質を用いて検討した。SLO では K⁺, Hb のいずれのタイムコースにも保護効果は示されなかった (Fig. 4)。一方, SLS では K⁺ 遊離のタイムコースにはいずれの物質でも影響がみられなかったのに比し, Hb の遊離では dextran 8 で 60 分まで, dextran 4 では 40 分まで溶血が保護された (Fig. 3)。他の物質では同程度の弱い保護効果しか認められなかった。なお, dextran 8 の 30 mM では検液の濁度が増加したため濃度を 10 mM まで減じて用いた。

4. HE の測定

両毒素の溶血曲線の傾き, すなわち HE は SLS で 3.49, SLO では 9.00 であった (Fig. 5)。なお, SLS

Fig. 5. Hemolytic titration and hemolytic efficiency (HE) curves for SLS and SLO.

(A) percent hemolysis; (B) hemolysis in probit. Samples were diluted at 1:100 to obtain a proper hemolytic titer. In panel B, the percent hemolysis data from panel A were transformed by the probit method and plotted against the log value of the hemolysin concentration. The slope of this curve was calculated to determine the HE. SLS (●) showed a low HE (3.49) and SLO (○) showed a higher HE (9.00).

2) SLS および SLO による溶血機序については、これまで多くの研究者により報告されているが、両毒素による赤血球からの K^+ と Hb 遊離のタイムコースの結果は、これらの報告に示される両毒素の差異を反映した。SLO は直接赤血球上のコレステロールに結合後、数十分子からなる直径約 24 nm の孔を膜上に形成するため、分子径が 4.8 nm の Hb や、それより小さい K^+ は同時に遊離を開始し、同時に終了したものと考えられる。一方、SLS では膜成分であるリン脂質と結合することにより、膜のイオン透過性を変化させ、その後浸透圧の作用により膜内への水の流入が起こり、赤血球が膨化破裂し溶血に至るというコロイド浸透圧過程を経る。そのため、先に K^+ が遊離を開始し、 K^+ 遊離が終了した時点から水の膜内流入が始まるので、Hb は 10 分の lag period 後に遊離を開始したものと考えられる。これまでも、両毒素の作用機序の解析には Rb^+ を人工的に取り込ませ、その遊離量を測定することによってこの過程の解析が行われ報告されてきたが、 K^+ 特異検出電極による測定は、もともと赤血球に含有される多量の K^+ を直接測定するため、より自然に近い状態での赤血球の使用が可能となり、より正確な情報が得られたものと考えられる。

3) 次に両毒素によって引き起こされる溶血に対する保護効果を 5 種の物質を用いて検討したが、保護効果は SLS による Hb 遊離過程のみで示された。このことは、

SLS によって惹起される膜のイオン透過性にはこれらの物質は関与せず、水の膜内流入の段階で膜上の孔に栓をする形で作用し、流入を阻止したためと推測される。一方、SLO の溶血過程には水の流入は伴われず、形成される孔も内径 24 nm¹²⁾ と大きいため、保護物質は栓の役目をなさず、溶血に対してなら効果を示さなかったと考えられる。以上の結果より、SLS によるコロイド浸透圧変化過程を伴う溶血時にも SLO とは大きさの異なる孔形成の可能性が示唆された。孔径は Hb の遊離で保護効果を示した dextran 4, dextran 8 の平均分子径から約 3.5 nm と推測される。これまでの電子顕微鏡による解析では SLS 処理赤血球上に孔様構造は認められないと報告^{2,13)}されている。これらの結果は、SLS によって形成される孔径が小さいために確認できなかったものと推察される。したがって、SLS は SLO と同様に孔形成細胞障害毒素に分類することができる。SLS では孔径が SLO と大きく異なるために、コロイド浸透圧過程を経て溶血に至るものと考えられる。

4) HE は溶血機序を知る一つの index であることをこれまで報告⁶⁾してきたが、SLS で 3.49, SLO では 9.00 を示した。SLO の示す HE が平均で 6.83 ± 1.35 ($n=50$)であることを考慮すると、SLS は著しく低値である。なお、SLO では pI を異にする二つの hemolytic form が存在し、pI と HE は比例することをこれまで報告してきたが、ここでは neutral type を用いたため

HE は 9.00 と高値を示した。両毒素における溶血機序の違いは既に報告されているが、HE 値の差異はこのメカニズム解析における一つの指標になることが明らかになった。

本報告の一部は第 38 回電気泳動学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Alouf JE. Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxin). *Pharmacol Ther* 1980; 11: 661-717.
- 2) Duncan JL, Mason L. Characteristics of streptolysin S hemolysis. *Infect Immun* 1976; 14: 77-82.
- 3) Bhakdi S, Roth M, Sziegoleit A, Tranum-Jensen J. Isolation and identification of two hemolytic forms of streptolysin O. *Infect Immun* 1984; 46: 394-400.
- 4) Bhakdi S, Tranum-Jensen J, Sziegoleit A. Mechanism of membrane damage by streptolysin O. *Infect Immun* 1985; 47: 52-60.
- 5) Duncan JL. Characteristics of streptolysin O hemolysis: kinetics of hemoglobin and rubidium-86 release. *Infect Immun* 1974; 9: 1022-7.
- 6) Suzuki J, Kobayashi S, Kagaya K, Fukazawa Y. Heterogeneity of hemolytic efficiency and isoelectric point streptolysin O. *Infect Immun* 1988; 56: 2474-8.
- 7) Suzuki J, Yoshihara E, Kobayashi S. Isoelectric points of streptolysin O from groups A, C and G streptococci. In: Kimura Y, Kotani S, Shio-kawa Y, editors. *Recent advances in streptococci and streptococcal diseases*. Bracknell, England: Reedbooks Ltd, 1985: 150-1.
- 8) Katsu T, Kobayashi H, Fujita Y. Mode of action of gramicidin S on *Escherichia coli* membrane. *Biochim Biophys Acta* 1986; 860: 608-14.
- 9) Bhakdi S, Mackman N, Nicaud J, Holland I. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pore. *Infect Immun* 1986; 52: 63-9.
- 10) Ginsburg I, Harris TN. Oxygen-stable hemolysins of group A streptococci. II. Chromatographic and electrophoretic studies. *J Exp Med* 1963; 118: 919-34.
- 11) Lai CY, Wang M-T, De Faria JB, Akao T. Streptolysin S: Improved purification and characterization. *Arch Biochem Biophys* 1978; 191: 804-12.
- 12) Sekiya K, Satou R, Danbara H, Futaesaku Y. A ring-shaped structure with a crown formed by streptolysin O on the erythrocyte membrane. *J Bacteriol* 1993; 175: 5953-61.
- 13) Duncan J, Schlegel R. Effect of streptolysin O on erythrocyte membranes, liposomes, and lipid dispersions. *J Cell Biol* 1975; 67: 160-73.

要 旨

SLS 複合体の pI は 5.4, 分子量は 32,000 であり、非還元状態でも溶血活性を示した。SLS および SLO の溶血作用機序はすでに報告されているが、 K^+ および Hb の遊離態度より機序の差異を確認した。また、溶血保護物質を用いた実験からは dextran 4 以上の分子径で Hb の遊離が阻止された。このことより SLS の惹起する溶血では、膜のイオン透過性変化過程を経て、膜内への水の流入が開始する段階では膜に孔が形成されている可能性が示唆された。また、孔径は種々分子径の異なる物質による溶血保護効果の成績より、約 3.5 nm と測定された。これまで SLS による溶血では膜上に孔様構造は認められないと報告されてきたが、溶血保護効果の成績からは孔の形成が強く示唆された。さらに、SLS の示す HE は 3.49, SLO は 9.00 と大きな差異が認められることより、HE は溶血機序解析の指標となりうることが明らかになった。