

博士（保健学）学位論文

Streptococcus agalactiae 新生児感染症において
L-ficolin/MASP 複合体が感染防御に果たす役割

Role of L-ficolin/MASP Complexes in the Protective Immunity to
Neonatal Infection with *Streptococcus agalactiae*

2007 年

指導教員 奥脇 義行 教授

青柳 祐子

AOYAGI, Youko

女子栄養大学

目次

要旨	1
緒言	4
第 1 章 III 型 <i>Streptococcus agalactiae</i> のオプソニン貪食における L-ficolin/MASP 複合体の役割	6
目的	6
材料と方法	7
結果	15
考察	18
第 2 章 L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の <i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i> 莢膜多糖体への結合および補体の活性化	21
目的	21
材料と方法	22
結果	26
考察	30
総括	34
謝辞	35
引用文献	36
図	47
表	61

要旨

Streptococcus agalactiae (B 群レンサ球菌; GBS) は、新生児の敗血症や髄膜炎の一般的な原因細菌である。母親の GBS 莢膜多糖体 (CPS) 特異 IgG は胎盤を経て胎児に移行し、侵襲性 GBS 感染から GBS に汚染された新生児を保護する。しかし、出産に際し GBS に汚染された大部分の小児は、侵襲性の疾患に進展せず、そしてこれらの感染しなかった小児でも、保護的なレベルの CPS 特異 IgG を欠いている場合が少なくない。実際、CPS 特異 IgG が欠失した血清でも、実験的に多形核白血球 (PMN) によるオプソニン貪食殺菌を促す。この IgG 非依存性のオプソニン貪食殺菌は、 Ca^{++} と Mg^{++} の存在下での補体経路活性化を必要とし、そして EGTA を用いて Ca^{++} をキレート化することによって有意に減少する。本研究では、III 型 GBS の Ca^{++} 依存性、抗体非依存性のオプソニン貪食殺菌における L-ficolin/MASP 複合体の役割を明らかにし、次いで、L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の GBS 上のリガンドを特定することを試みた。

III 型 GBS を精製 L-ficolin/MASP 複合体および C1q/Ab 除去血清と反応させた後、 Mg^{++} /EGTA の存在下で補体副経路を活性化させた際に、PMN による効果的なオプソニン貪食殺菌が生じた。この殺菌は、反応系に L-ficolin のリガンドである *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を加えることによって阻害された。異なる GBS 株における L-ficolin の結合は個々の株の CPS 含有量に比例し、そしてオプソニン貪食殺菌と C4 活性化は CPS を反応に加えることによって阻害され、L-ficolin が CPS に結合することが示唆された。一方、異なる GBS 株におけるオプソニン貪食殺菌は、*N*-アセチルノイラミン酸 (NeuNAc) 含有量に反比例し、CPS の側鎖の非還元末端に位置する NeuNAc が C3b 増幅ループの活性化を

阻害して最適なオプソニン化を抑制すると考えられた。この仮説に矛盾せず、CPS 特異 IgG2 を補体副経路の活性化前に反応系に加えた際に、L-ficolin/MASP 複合体によって開始されるオプソニン貪食殺菌は有意に促進され、一方、副経路活性化後に加えた際に殺菌は増強されなかった。すなわち、抗体が PMN の FcR との相互作用によってではなく、補体活性の促進によって貪食殺菌を増強させることを示した。以上の結果は、L-ficolin/MASP 複合体が C3b 沈着を開始させ、そして NeuNAc による副経路 C3 転換酵素の形成阻害を CPS 特異 IgG2 が中和することで C3b 沈着と PMN による殺菌を促進させることを示している。

L-ficolin と MBL の固相化 GlcNAc への結合における精製 CPS と CPS を構成する単糖の阻害曲線は、L-ficolin と MBL が全ての型の CPS に結合すること、そして L-ficolin と MBL が NeuNAc と GlcNAc にほぼ同等に結合することを示した。CPS の 50%阻害濃度は GlcNAc や NeuNAc に比較して 100 倍以上低値で、L-ficolin や MBL は CPS 中に繰り返し構造として存在する GlcNAc あるいは NeuNAc に効率よく結合することを示した。細胞を用いた結合試験の結果は、精製 CPS による結合阻害試験の結果と異なり、MBL は供試株いずれに対しても結合しなかった。また、L-ficolin の結合は RDP 型で異なっていた。すなわち、L-ficolin は RDP Ib-1, III-2, III-3, V-1, V-2, V-3, VI-1, VIII-1 型の全てに結合したが、他の RDP 型の全てに結合しなかった。NeuNAc 含有量が狭い範囲に分布した RDP VI-1 と VIII-1 型を除いて、NeuNAc 含有量と L-ficolin 結合量に相関が認められた。結合した L-ficolin/MASP 複合体は全ての株において C4 を消費した。MBL/MASP 複合体がどの GBS 株にも結合しなかったため、C4 消費は L-ficolin/MASP 複合体によると考えられた。ノイラミニデース処理細胞への L-ficolin 結合は、除去された NeuNAc 量

に比例して低下し，NeuNAc が L-ficolin のリガンドであることを示唆した。さらに，相同変異体を用いた実験は，少なくとも RDP III-3 型において，L-ficolin が結合する細胞構造物が唯一 CPS であり，さらに CPS 中の NeuNAc であることを示した。以上の精製 CPS と細胞への結合の違いを矛盾なく説明し得る仮説の一つは，細胞表層構造であると考えられる。

本研究の成果は，L-ficolin/MASP 複合体によって開始される補体経路活性化が，多くの RDP 型のオプソニン貪食殺菌を促すことを示している。また，L-ficolin/MASP 複合体や MBL/MASP 複合体は，GBS の増殖に伴って細胞から放出される遊離 CPS に結合し，補体経路を活性化することで獲得免疫における特異抗体産生に一定の役割を果たす可能性を示唆している。出産時に GBS に汚染されたにも関わらず，CPS 特異 IgG を欠いている小児の多くが感染しない理由の一つに抗体非依存性のレクチン経路の活性化が挙げられると考える。

緒言

Streptococcus agalactiae (B 群レンサ球菌; GBS) は、新生児の敗血症や髄膜炎の最も一般的な原因である¹⁾。GBS は莢膜多糖体 (CPS) の免疫学的反応性に従って 9 つの血清型に分類される。III 型 GBS は、この血清型が新生児における早発疾患 (生後 1 週間以内) の有意な割合、大部分の遅発疾患 (生後 1 週間後), そして髄膜炎の大部分¹⁾ を引き起こす故に特に重要である。

母親の CPS 特異 IgG は胎盤を経て胎児に移行し、侵襲性 GBS 感染から GBS に汚染された新生児を保護する。しかし、出産に際し GBS に汚染された大部分の小児は、侵襲性の疾患に進展せず、そしてこれらの感染しなかった小児でも、保護的なレベルの CPS 特異 IgG を欠いている場合が少なくない²⁾。CPS の側鎖末端に位置する *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuNAc) は、補体副経路の活性化を阻害することによって GBS をオプソニン貪食抵抗性にし、オプソニン貪食に特に重要である C3b と iC3b の細胞表面への沈着を減少させる³⁾。CPS 特異 IgG 量は、試験管内で多形核白血球 (PMN) によるオプソニン貪食殺菌の効果^{4, 5)}, およ

略語一覧

CPS (capsular polysaccharide, 莢膜多糖体)

GBS (group B streptococci, B 群レンサ球菌, *Streptococcus agalactiae*)

GlcNAc (*N*-acetylglucosamine, *N*-アセチルグルコサミン)

HSA (human serum albumin, ヒト血清アルブミン)

mAb (monoclonal antibody, モノクローナル抗体)

MASP (MBL-associated serine proteases, MBL 関連セリンプロテアーゼ)

MBL (mannose-binding lectin, マンノース結合レクチン)

NeuNAc (*N*-acetylneuraminic acid, *N*-アセチルノイラミン酸)

PMN (polymorphonuclear leukocytes, 多形核白血球)

RDP (restriction digest pattern, 制限消化パターン)

THB (Todd-Hewitt broth, Todd-Hewitt ブロス)

び補体由来の化学誘引物質 C5a の産生⁶⁾ と相関する。しかしながら、III 型 CPS 特異 IgG 欠失血清は、それでもなお補体経路の活性化に必要とされる Ca^{++} と Mg^{++} の存在下で有意なオプソニン貪食殺菌⁵⁾ と C5a 産生⁶⁾ を促す。この III 型 GBS による抗体非依存性の補体活性化は、EGTA により Ca^{++} をキレート化することで減少させられる故に Ca^{++} 依存性の C3 転換酵素 C4b2a の重要な役割を示唆している。GBS 感染症に対する感受性が、C4 欠失マウスにおいて増加するという観察結果は、この細菌に対する感染防御における C4b2a の役割を支持している⁷⁾。古典経路の最初の補体である C1q は、GBS に直接結合し得るが、C1q 結合は抗体非依存性のオプソニン貪食殺菌に十分ではない⁸⁾。

本研究では、III 型 GBS のオプソニン貪食における L-ficolin/MASP 複合体の役割を明らかにし (第 1 章)、次いで、L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の GBS 上のリガンドを特定することを試みた (第 2 章)。

第 1 章 III 型 *Streptococcus agalactiae* のオプソニン貪食における L-ficolin/MASP 複合体の役割⁹⁾

目的

レクチン経路は活性化物質の糖質構造に対する糖質認識コンポーネントの結合によって開始される。血清中には 3 つの異なる糖質認識コンポーネント、mannose-binding lectin (MBL), L-ficolin, H-ficolin が存在する¹⁰⁻¹³⁾。これら全ては、N-末端のコラーゲン様ドメイン、ネック領域、そして C-末端の糖鎖認識領域をもつ単一ポリペプチド鎖のホモトリマーを構成し、そしてホモトリマーはさらに高次のオリゴマーとして存在する¹⁴⁾。血清中で、このオリゴマーは、 Ca^{++} の存在下において¹⁵⁾ MBL-associated serine proteases (MASPs; MASP-1, MASP-2, MASP-3) と複合体を形成し、レクチン経路活性化複合体¹⁶⁻²¹⁾と成る。これらの内、MASP-2 は、C4 と C2 を分解し C4b2a 複合体を形成させる^{19, 22-24)}。このように、レクチン経路の C3 転換酵素 C4b2a 複合体の形成は、 Ca^{++} 依存性で、且つ抗体と C1 に非依存性である。

MBL/MASP 複合体は、GBS に対し低い親和性しか持たず^{25, 26)}、また、H-ficolin は III 型 GBS の CPS を構成する 4 つの単糖^{29, 30)}のいずれにも結合しない²⁷⁾。L-ficolin/MASP 複合体は、GBS から抽出したリポタイコ酸に結合し、レクチン経路を活性化する²⁸⁾が、L-ficolin が GBS の細胞上でレクチン経路を活性化することは報告されていない。また、L-ficolin は、III 型 GBS の CPS を構成する単糖の 1 つである N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) に結合する²⁷⁾。本研究においては、L-ficolin/MASP 複合体が III 型 CPS と結合するか否か、さらにレクチン経路の活性化を開

始することによって III 型 GBS をオプソニン貪食殺菌に導くか否かを明らかにすることを試みた。

材料と方法

供試菌株を表 1 に、また精製試料を表 2 に示す。

CPS 欠失相同変異体の作製

glucosyl-1-phosphate transferase をコードする GBS *cps E* の欠失は、CPS 発現の完全な欠失につながる³¹⁾。Framson ら³²⁾ と Adderson ら³³⁾の方法に準じて *cps E* を短絡することによって、GBS 874391 株の CPS 欠失相同変異体 874391/*cps*⁻株を構築した。プライマー *cpsE5f* (5' AGCAGAAGCTTATAAGATTATCTGTAG 3'), *cpsE5r* (5' AACTACAACT-GTTTGAATTCTCGCTATA 3'), *cpsE3f* (5' AGGTAGAATTCCTCGGGAC-AGGAG 3') および *cpsE3r* (5' CAATTCTCTTCGAAATAAAGTTGGC 3')を用いることによって *cps E* の 5' と 3' の両端を PCR によって増幅した。増幅産物を *EcoRI* で消化し、ライゲートし、再度、プライマー *cpsE5f* と *cpsE3r* で増幅して 1,322 bp の塩基を短絡した配列 (*cpsE/tr5f-3r*) を得た。*cpsE/tr5f-3r* を温度感受性シャトルベクター pHY304 (Washington 大学の Craig E Rubens 教授から分与) に組み込み、エレクトロポレーションによって 874391 株のコンピテント細胞に形質転換した。形質転換体を Todd-Hewitt broth (THB, BBL) 培地に接種し、30°C で 180 分間培養し、874391 株細胞内で染色体の *cpsE* と pHY304/*cpsE/tr5f-3r* の組換えを生じさせた。培養温度を 37°C に上げ 180 分間培養した後、0.063 µg/ml エリスロマイシン加 THB 寒天培地に塗布して 37°C で一夜培養し、染色体と組換えを生じなかった pHY304/*cpsE/tr5f-3r* を細胞から脱落さ

せた。培養菌の 20 μ l を 2 ml の THB 培地に接種し、30°C で 180 分間培養し、染色体に組み込まれた pHY304/cpsE/tr5f-3r DNA から pHY304 DNA を離脱させた。培養温度を 37°C に上げ 180 分間培養した後、THB 寒天培地に接種して 37°C で一夜培養し、染色体から離脱した pHY304 を細胞から脱落させ、874391/cps⁻変異体を得た。染色体の *cpsE* と *cpsE/tr5f-3r* の組換えは PCR で確認し、変異体の NeuNAc の脱落は Aminoff のチオバルビツール酸法³⁴⁾で確認した。

III 型 CPS の精製

III 型 CPS は、Jennigs らの方法³⁵⁾に準じて III 型 GBS 874391 株の培養上清から抽出し精製した。0.5%にホルマリンを加えた後期指数増殖期の培養液 (THB 培地) から遠心により細胞を除去した後、上清をフィルター滅菌し、限外ろ過膜 PM30 (Millipore) を用いて濃縮した。試料の NaCl 濃度を 150mM に調整した後、エタノールを 50%に加え大部分のタンパクと核酸を沈殿させた。上清にエタノールを 80%に加え CPS を沈殿させ、50mM Tris-HCl (pH 7.4) に溶解した。この試料を同緩衝液で平衡化した Sephacryl S-300 HR (Amersham) カラム (2.6 $\times$ 85 cm) を用いてゲルろ過した。NeuNAc を含む画分を限外ろ過膜 PM30 を用いて濃縮した。この試料の NaCl 濃度を 150mM に調製した後、エタノールを 80%に加え CPS を沈殿させ 50mM Tris-HCl (pH 8.6) に溶解した。次いで同緩衝液で平衡化した Q Sepharose HP (Amersham) カラム (1.6 $\times$ 14 cm) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。NeuNAc を含む画分 (160~200 mM NaCl で溶出) を限外ろ過膜 PM30 を用いて濃縮した。試料の NaCl 濃度を 150mM に調製した後、エタノールを 80%に加え CPS を沈殿させ、水に溶解した。試料中の CPS は抗型特異ウサ

ギ血清 (デンカ生研の権平氏から分与) を用いた Ochterlony のゲル内沈降法³⁶⁾ で, また B 群多糖体抗原は Phadebact Streptococcus Test (Boule Diagnostics) によって分析した。精製 CPS の NeuNAc 濃度はチオバルビツール酸法³⁴⁾ によって確認した。

自然 III 型 CPS 特異 IgG の精製

III 型 CPS 特異 IgG をアフィニティークロマトグラフィーによって静注用ヒト IgG 製剤 グロベニン-I (武田) から精製した。IgG 試料を 10 mM Tris-HCl-150 mM NaCl (pH7.4) で平衡化した CPS-Sepharose 6B カラム [1.6 x 4 cm, 精製 CPS をエポキシ活性化 Sepharose 6B (Amersham) に結合させて作製] に添加した。カラムを同緩衝液で洗浄した後, CPS 特異 IgG を 100 mM glycine-HCl-1.0 M NaCl (pH2.7) を用いて 1/10 量の 1 M Tris-HCl (pH9.0) 入りの試験管に溶出した。CPS 特異 IgG を限外ろ過膜 YM10 (Millipore) を用いて濃縮した。CPS-Sepharose 6B から遊離する可能性のある NeuNAc を除去するために 50 mM Tris-HCl-1.0 M NaCl (pH7.4) に対して分子量限界 25,000 Da の透析膜 (Spectrum) を用いて透析した。調製した III 型 CPS 特異 IgG のサブタイプを ELISA によって確認したところ 99%以上 IgG2 であった。この試料を 10 mM Tris-HCl-150 mM NaCl (pH7.4) で平衡化した抗-IgG1-agarose カラム, 抗-IgG3-agarose カラム, 抗-IgG4-agarose カラム [抗-IgG1 mAb (Zymed), 抗-IgG3 mAb (Zymed), 抗-IgG4 mAb (Zymed)をそれぞれ HiTrap NHS 活性化 HP (1 ml, Amersham) に結合させて作製] に順次添加し, IgG1, IgG3, IgG4 を吸着除去した。抗 III 型 CPS 特異 IgG2 の濃度は 280nm における吸収によって測定した。

L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の精製

L-ficolin/MASP 複合体および MBL/MASP 複合体はヒト血清から Matsushita ら¹⁴⁾ と Cseh ら¹⁵⁾ の方法に準じて精製した。血清 400 ml にポリエチレングリコール 4000 を 8% (w/v) に加え溶解させた後, MBL/MASP 複合体および L-ficolin/MASP 複合体を含む析出物を 4°C で遠心して沈殿させた。沈殿物を 400 ml の 50 mM Tris-HCl-200 mM NaCl-20 mM CaCl_2 (pH7.8) (50 mM TBS-Ca) に溶解し, この試料を同緩衝液で平衡化した GlcNAc-agarose (Sigma) カラム (1.6 x 8 cm) に添加した。50 mM TBS-Ca でカラムを洗浄した後, 最初に 300 mM mannose を含む 50 mM TBS-Ca を用いて MBL/MASP 複合体を分画溶出し, 次いで 300 mM GlcNAc を含む 50 mM TBS-Ca を用いて L-ficolin/MASP 複合体を分画溶出した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE, 12%ゲル) により各画分中成分の分子量を測定し, MBL/MASP 複合体では 32 kdal, また L-ficolin/MASP 複合体では 35 kdal の分子を含む画分を集めた。この試料を限外ろ過器 Amicon Ultra15 (Millipore) を用い 2 ml に濃縮した後, 50 mM TBS-Ca に対して透析した。MBL/MASP 複合体を含む試料は 20 mM Tris-HCl-150 mM NaCl-20 mM CaCl_2 (pH7.8) (20 mM TBS-Ca) で平衡化した mannose-Sepharose カラム [1.6 x 4 cm, mannose をエポキシ活性化 Sepharose 6B (Amersham) に結合させて作製] に添加した。20 mM TBS-Ca でカラムを洗浄した後, 300 mM GlcNAc で MBL/MASP 複合体を分画溶出した。前述と同様に各画分中の成分の分子量を測定し, 32 kdal の分子を含む画分を集め 2 ml に濃縮した。L-ficolin/MASP 複合体を含む試料は 20 mM TBS-Ca で平衡化した asiarofetuin-Sepharose カラム [1.6 x 4 cm, asiarofetuin (Sigma) を CNBr 活性化 Sepharose 4B (Amersham) に結合させて作製] に添加した。20 mM TBS-Ca でカラ

ムを洗浄した後，300 mM GlcNAc を含む 20 mM TBS-Ca を用いて L-ficolin/MASP 複合体を分画溶出した。前述と同様に各画分中の成分の分子量を測定し，35 kdal の分子を含む画分を集め 2 ml に濃縮した。濃縮後の試料を 20 mM TBS-Ca で平衡化した抗-IgG-agarose カラムと抗-IgM-agarose カラム [抗-IgG mAb (Zymed) と抗-IgM mAb (Zymed) をそれぞれ HiTrap NHS 活性化 HP (1 ml, Amersham) に結合させて作製] に順次添加し，IgG と IgM を吸着除去した。MBL/MASP 複合体および L-ficolin/MASP 複合体の濃度は BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce) を用い測定した。

C1q/Ab 除去血清および Ab 吸収血清の調製

ヒト血清を 2.5 mM EDTA を用いてキレート化した。高度に塩基性のタンパクである C1q³⁷⁾ を弱陽イオン交換クロマトグラフィーによって選択的に除去した。血清を 82 mM NaCl と 2 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で平衡化した CM Sepharose FF カラム (5 ml, Amersham) に添加し，同じ緩衝液で溶出した後，限外ろ過膜 YM10 で元の量に濃縮した。C1q 除去血清および EDTA キレート化血清 (各 10 ml) を GBS 表面に存在する全抗原に対する抗体を吸収するために，実験に用いる 4 株のホルマリン固定 GBS 細胞と 4°C で 6 時間以上，3 回繰り返して反応させた。それぞれの吸収操作の後，細胞を遠心によって除去した。ホルマリン固定 GBS 細胞は 0.6 OD₆₀₀ 後期指数増殖期細胞懸濁液 200 ml を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)-150 mM NaCl (PBS) で洗浄し，5%ホルマリンを含む PBS 中で 37°C で 2 時間固定し，次いで 1 mM EDTA を含む PBS で 5 回洗浄して調製した。このようにして得られた C1q/Ab 除去血清あるいは Ab 吸収血清から Mg⁺⁺-EDTA と Ca⁺⁺-EDTA

を除去するために Mg^{++} と Ca^{++} を含まない Hanks's balanced salt solution (HBSS^{-/-}, Invitrogen) に対して透析した。C1q/Ab 除去血清あるいは Ab 吸収血清の量を限外ろ過膜 YM10 で元の量 (10 ml) に濃縮した。

多形核白血球 (PMN) の調製

PMN は、ヘパリンを加えたヒト新鮮血液から Polymorphprep (Nycomed Pharma) を用いた密度勾配法によって分離した。HBSS^{-/-} で 2 回洗浄後 0.4% ヒト血清アルブミン (HSA, Shigma) と 10 mM HEPES (Invitrogen) を含む Medium 199 (Invitrogen) に 4.6×10^6 cells/ml の濃度に再懸濁した。染色性に基づいて 95% 以上の PMN が生存していることを確認した。0.4% HSA と 10 mM HEPES を含む Medium 199 に PMN 試料の赤血球濃度と等しい濃度の赤血球を懸濁させ、後述のオプソニン貪食殺菌分析において標準曲線を求めるために用いた。

細菌細胞のオプソニン化

細菌細胞を THB 培地で一夜培養し、新たな THB 培地に 1/20 量を接種し、そして 37°C で 90 分間増殖させた。細胞を HBSS^{-/-} で 2 回洗浄し、そして HBSS^{-/-} に 0.60 OD₆₀₀ になるように懸濁した。1 ml の 0.60 OD₆₀₀ の懸濁液は、細胞乾燥重量 168 μ g で、そして 0.4×10^8 から 1.8×10^8 の CFU を含む³⁸⁾。0.4% の HSA と 10 mM HEPES を含む HBSS^{-/-} で希釈した細胞 (0.12 OD₆₀₀) を以下の成分あるいは血清と 200 μ l の混合液中で順次反応させた。2 mM $CaCl_2$ の存在下で L-ficolin/MASP 複合体と 30 分間、2 mM $MgCl_2$ と 2 mM $CaCl_2$ の存在下で 10% C1q/Ab 除去血清と 1 分間、そして 4 mM $MgCl_2$ -16 mM EGTA の存在下で 10% C1q/Ab 除去血清あるいは 10% Ab 吸収血清と 4 分間である。いくつかの実験で

は、細胞を 2 mM CaCl_2 の存在下でヒト C1 と CPS 特異 IgG2 と共に 30 分間反応させた。オプソニン化した細胞を HBSS^{-/-} で 3 回洗浄し、そして Mg^{++} と Ca^{++} を含む HBSS (HBSS^{+/+}) 中に 0.06 OD₆₀₀ の濃度に再懸濁した。このようにして得られたオプソニン化細胞懸濁液 (100%) の一部から 100, 56.2, 31.6, 17.8, 10.0% 懸濁液を調製し、オプソニン貪食殺菌分析における標準として用いた。

オプソニン貪食殺菌分析

細菌細胞のオプソニン貪食殺菌は、Takahashi らの方法³⁸⁾ に準じて定量した。350 μl の 4.6×10^6 cells/ml PMN 懸濁液を 50 μl の 100% オプソニン化 GBS 懸濁液に加え、37°C で 60 分間、振盪しながら反応させた後、氷水中で冷却した。赤血球懸濁液 350 μl を 50 μl の標準懸濁液に加え、同様に反応させた。反応後、PMN 細胞外の細菌細胞生存率を測定するために 3.6 ml の THB 培地を反応液に加え、ブレンダーを用いて完全に混和した。PMN と赤血球を遠心 (200 $\times$ g) によって沈殿させ、2 ml の上清をキュベットに移し、37°C で加温し、増殖を OD₆₄₀ でモニターした。100% 標準の OD₆₄₀ 値が 0.2 に達した時、すべての懸濁液を直ちに氷水中で冷却し細菌の増殖を停止させた。5 つの標準懸濁液の OD 値とパーセント濃度の対数との間の回帰式を求めた。この回帰式からオプソニン貪食殺菌後の細菌細胞の生存率を求め、殺菌の程度を殺菌率 (%) として示した。

なお、PMN 細胞外に生存する細菌細胞数は、PMN 細胞内と細胞外の両方に生存する細菌細胞数とおおよそ同じである³⁸⁾。

オプソニン化細胞に結合した補体成分の測定

細菌細胞に結合した L-ficolin/MASP 複合体は, L-ficolin/MASP 複合体と反応させた後の C1q/Ab 除去血清と反応させる前の細胞を用いて測定した。L-ficolin/MASP 複合体以外の補体成分は, C1q/Ab 除去血清および Ab 吸収血清と反応させた後の細胞を用いて測定した。各 80 μ l の 0.0015 OD₆₀₀ 細胞 を ELISA プレート (アサヒテクノグラス) のウエルに入れ, 4°C で一夜放置してウエルに接着させた。ウエルに 200 μ l の 0.1% HSA を含む 10 mM Tris-HCl-150 mM NaCl-5 mM CaCl₂ (pH7.4) (10 mM TBS-Ca) を入れ, 4°C で 2 時間, ブロッキングした。補体成分量は, 1 次抗体として各 80 μ l の 1 μ g/ml 抗 L-ficolin mAb 2F5, 抗 C1q mAb (Quidel), 抗 C4d mAb (Quidel), 抗 Bb mAb (Quidel), 抗 C3d mAb (Quidel), 2 次抗体として 80 μ l の 1 μ g/ml アルカリフォスファターゼ標識抗マウス免疫グロブリンヤギ抗体 (Zymed) を加え ELISA Amplification System (Invitrogen) を用いて測定した。抗体は 10 mM TBS-Ca-0.05% Tween 20 に溶解して用いた。1 次抗体を加えないウエルの測定値を陰性対照とした。なお, 各反応の終了後, ウエルを 10 mM TBS-Ca-0.05% Tween 20 で洗浄した。

L-ficolin/MASP 複合体の C4 分解活性の測定

L-ficolin/MASP 複合体による C4 分解は Petersen らの方法³⁹⁾ に準じて定量した。80 μ l の 16 μ g/ml CPS を ELISA プレートのウエルに入れ, 4°C で一夜放置してウエルをコートした。ウエルに 200 μ l の 0.1% HSA を含む 10 mM TBS-Ca を入れ, 37°C で 1 時間, ブロッキングした。20 mM TBS-Ca-0.05% Triron X-100-0.1% HSA (pH7.4) に溶解した 1 μ g/ml L-ficolin/MASP 複合体 80 μ l をウエルに加え, 4°C で一夜放置して CPS

に L-ficolin/MASP 複合体を結合させた。2 mM CaCl_2 と 1 mM MgCl_2 を含むペロナール緩衝液に溶解した 80 μl の 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 精製ヒト C4 (Sigma) をウエルに加え、37°C で 90 分間反応させた。L-ficolin 結合および C4d 結合は、1 次抗体として各 80 μl の 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗 L-ficolin mAb 2F5 と抗 C4d mAb、2 次抗体として 80 μl の 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アルカリフォスファターゼ標識抗マウス免疫グロブリンヤギ抗体を加え、ELISA Amplification System を用いて測定した。抗体は 10 mM TBS-Ca-0.05% Tween 20 に溶解して用いた。1 次抗体を加えないウエルの測定値を陰性対照とした。なお、各反応の終了後、ウエルを 10 mM TBS-Ca-0.05% Tween 20 で洗浄した。

結果

古典経路非依存性のオプソニン貪食殺菌のための条件決定

オプソニン貪食殺菌における L-ficolin/MASP 複体の役割りを明らかにするために C1q/Ab 除去血清と Ab 吸収血清を用いた。C1q/Ab 除去血清中で加温した後の 874391 株の殺菌率は、細菌細胞を Ca^{++} と Mg^{++} の存在下 (C4b2a 複体の形成を可能にする) で 1 分間 C1q/Ab 除去血清と共に反応させた際に 5%以下であった (図 1A)。細胞を $\text{Mg}^{++}/\text{EGTA}$ の存在下 (副経路の活性化を可能にする) で引き続き反応させた際にも、4 分の間、殺菌率は低値のままであった (図 1A)。

補体 D 因子は、C1q と同様に陽イオン交換樹脂に、ある程度吸着される³⁷⁾。C1q/Ab 除去血清が D 因子や C1q 以外の補体成分を L-ficolin/MASP 複体によって開始されるオプソニン貪食殺菌を支持する程度に含むことを確認するため、ヒト C1 と CPS 特異 IgG2 を加えることによって血清のオプソニン活性が増加し得るか否かを試験した。C1q/Ab 除去血

清の殺菌率 (図 1A) と細菌細胞への Bb 因子と C3d の結合 (図 1B) は、ヒト C1 と CPS 特異 IgG2 を加えることによって有意に増加した。これらの成績は、C1q/Ab 除去血清が、これらの条件下で、オプソニン化における古典経路の関与を除外し、 Mg^{++} /EGTA の存在下で副経路の活性化を可能にすることを示している。

III 型 GBS への L-ficolin-MASP 複合体の結合およびレクチン経路の活性化

上述の条件を用いて、874391 株を L-ficolin/MASP 複合体と反応させ、引き続き C1q/Ab 除去血清と反応させた際に PMN による殺菌が観察された (図 2A)。オプソニン貪食殺菌は、L-ficolin/MASP 複合体の濃度の増加にともなって増加した。L-ficolin のリガンドである GlcNAc を GBS と L-ficolin/MASP 複合体の反応液中加入した際に殺菌は完全に阻害された (図 2A)。さらに 874391 株への L-ficolin と C3d, Bb, C4d の各フラグメントの濃度依存性の結合が観察された (図 2B)。これらの観察結果は、III 型 GBS に結合した L-ficolin/MASP 複合体がレクチン経路を活性化し、次いで副経路の増幅ループが働いた結果、PMN によるオプソニン貪食殺菌を増加させることを示している。

III 型 CPS への L-ficolin/MASP 複合体の結合およびレクチン経路の活性化

異なる量の CPS を保持する GBS 4 株と CPS 欠失相同変異体 874391/cps⁻株への L-ficolin/MASP 複合体の結合は、L-ficolin/MASP 複合体の結合が CPS 含有量と相関することを示した (図 3B)。副経路は GBS のオプソニン貪食にとってきわめて重要と考えられ、したがって殺

菌率は副経路を阻害する NeuNAc 含有量に反比例した (図 3A)。しかしながら、L-ficolin 結合量は NeuNAc 含有量に比例して増加し (図 3B), それ故に、それぞれの株の殺菌率は CPS 含有量 (NeuNAc 含有量を指数として) におおよそ比例した様式で増加した (図 3A)。これらの成績は、L-ficolin/MASP 複合体が CPS に結合し、そして補体を活性化し得ることを示している。これらの結論は、オプソニン貪食殺菌 (図 4A) および L-ficolin 結合と C4 活性化 (図 4B) が、GBS と L-ficolin/MASP 複体の反応液中に過剰の CPS を加えた際に阻害されることで追認された。さらに CPS でコートしたウエル上での L-ficolin 結合と C4 活性化は、CPS を液相に加えることによって阻害された (図 5)。

L-ficolin/MASP 複合体によって開始されるオプソニン貪食殺菌における CPS 特異 IgG2 の効果

これまでの研究によって、III 型 CPS 中の NeuNAc による補体副経路の阻害を CPS 特異 IgG が中和することが明らかにされている³⁻⁶⁾。そこで CPS 特異 IgG2 が、L-ficolin/MASP 複合体によって開始されるオプソニン貪食殺菌を促進し得るかを試験した。874391 株を L-ficolin/MASP 複合体と反応させ、C1q/Ab 除去血清 (Ca^{++} と Mg^{++} を含む)、次いで Ab 吸収血清 (Mg^{++} /EGTA を含む) と反応させた際の殺菌 (図 6, F/CaMg/Mg) は、細菌細胞を予め CPS 特異 IgG2 および L-ficolin/MASP 複合体と反応させた際に有意に促進された (F,IgG/CaMg/Mg)。細胞を L-ficolin/MASP 複合体と C1q/Ab 除去血清と反応させた後、Ab 除去血清と反応させる直前に CPS 特異 IgG2 と反応させた際にも殺菌率の促進が観察された (F/CaMg/IgG/Mg)。一方、補体を活性化した後に、細胞を CPS 特異 IgG2 と反応させた際に殺菌率の促進は観察されず

(F/CaMg/Mg/IgG), IgG2 による殺菌率の促進は, PMN の FcR を介する結合によらないことを示した。細胞を L-ficolin/MASP 複合体と反応させなかった陰性対照は, 10%以下の殺菌率を示した (IgG/CaMg/Mg)。これらの成績は, CPS 特異 IgG2 が NeuNAc と結合し中和し, それによって副経路の C3 転換酵素 C3bBb が, L-ficolin/MASP 複合体によって細胞上に沈着した C3b を増幅することを示唆している。これらの実験条件下で CPS 特異 IgG2 は, 抗体依存性の古典経路活性化によって誘発される殺菌においてより, L-ficolin/ MASP 複合体によって開始されるオプソニン貪食殺菌を促進させることにおいて, 一層効果的であった (図 7)。

考察

III 型 CPS 特異 IgG による副経路の活性化は, C3b と iC3b による III 型 GBS のオプソニン化を促し, PMN による効果的な貪食と殺菌に繋がる。しかしながら, III 型 CPS 特異 IgG 欠失血清は, それでもなお Ca^{++} と Mg^{++} の存在下で有意なオプソニン貪食殺菌を生じさせ⁵⁾, このことは補体の C3 転換酵素 C4b2a の重要な役割を示唆している。L-ficolin は GBS 由来のリポタイコ酸に結合し²⁸⁾, そして L-ficolin のリガンドである GlcNAc²⁷⁾ は, III 型 CPS を構成する 4 つの単糖^{29,30)} の 1 つである。したがって, L-ficolin が関与するレクチン経路は, III 型 GBS のオプソニン化を開始するための潜在的な機構である。

本研究で, L-ficolin は, 固相化精製 CPS および GBS 細胞に結合し, そして GBS への結合は CPS 含有量 (NeuNAc 含有量を指標として) に比例した。L-ficolin/MASP 複合体の活性化は, C3b を生じさせる C3 転換酵素 C4b2a を産生し, C3b は次々に B 因子と結合して副経路の C3

転換酵素 C3bBb となり、最終的に細胞上の C3b 沈着を増幅する。実際、レクチン経路は副経路の C3 転換酵素の形成に役立つ^{40, 41)}。本研究では、古典経路活性化が関与しないオプソニン貪食殺菌における L-ficolin/MASP 複合体の役割を研究するために、C1q/Ab 除去血清を用い、次いで Mg^{++} /EGTA の存在下で副経路を活性化させた。この条件下で、PMN による III 型 GBS 874391 株のオプソニン貪食殺菌は、加えた L-ficolin/MASP 複合体の濃度に比例し、そして有意な殺菌は、ヒト新生児の臍帯血中に認められる濃度⁴²⁾ において観察された。

異なる GBS 株に対する L-ficolin の結合は、それらの株の NeuNAc 含有量に正比例し、一方、オプソニン貪食殺菌は、NeuNAc 含有量に反比例した。この観察結果は、III 型 CPS を保持する株が、CPS 特異 IgG 欠失条件下で副経路を活性化しないというこれまでの観察結果^{5, 6)} と矛盾しない。副経路活性化の阻害は、III 型 CPS の側鎖末端に位置する NeuNAc^{29, 30)} の阻害効果を反映している。NeuNAc が存在する細胞表面は、結合した C3b への H 因子の親和性を増加させ、I 因子による C3b の iC3b への分解と、その結果として生ずる C3b 増幅ループの遮断につながる^{43, 44)}。この機構は、III 型 GBS のノイラミニデース処理³⁾、あるいはトランスポゾン挿入変異誘発^{45, 46)} による CPS からの NeuNAc の除去が、細胞を補体副経路の非活性表面から活性表面にかえた実験によって証明されている。本研究の実験結果は、GBS に結合する L-ficolin/MASP 複合体が、細菌細胞に C3b 沈着をもたらすが、しかし NeuNAc は、C3b 増幅ループの活性化を阻害し、そして最適なオプソニン貪食殺菌を阻害することを示唆する。この仮説に一致して、副経路活性化の前の CPS 特異 IgG2 の添加は、L-ficolin/MASP 複合体によって開始されるオプソニン貪食殺菌を促進した。CPS 特異 IgG2 を補体活性化後に加え

た際に、CPS 特異 IgG2 が L-ficolin/MASP 複合体によって開始されるオプソニン貪食殺菌を増強しないことは、抗体が PMN の FcR との相互作用によってではなく、補体活性の増強によって貪食殺菌を増強させるという報告⁵⁾と矛盾しない。総合すると、本研究の観察結果は、L-ficolin/MASP 複合体が C3b 沈着を開始し、そして CPS 特異 IgG2 は NeuNAc が関与する副経路の C3 転換酵素の阻害を中和することで C3b 沈着を増加させるモデルと一致する。

第 2 章 L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の *Streptococcus agalactiae* 莢膜多糖体への結合および補体の活性化⁴⁷⁾

目的

GBS は莢膜多糖体の免疫学的反応性に従って 9 つの血清型 (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII 型) に分類され, さらに染色体 DNA の制限酵素消化パターンの数値解析 (RDP 型) によって分類される⁴⁸⁻⁵⁰⁾。RDP 型は, デンドログラム上で異なる血清型が同一のクラスターを構成しない, という基準に基づいているため血清型をさらに細かく分類することができる。CPS は 5 つの単糖 (NeuNAc, GlcNAc, グルコース, ガラクトース, ラムノース) のいずれかの組み合わせで構成され^{29, 35, 51-56)}, その発現量は RDP 型毎に異なる傾向がある^{48, 49)}。

L-ficolin/MASP 複合体は III 型 GBS に結合し, レクチン経路を活性化することによって PMN による効果的なオプソニン貪食殺菌に導く(第 1 章) が, 他の型株のオプソニン化における L-ficolin/MASP 複合体の役割は明らかでない。一方, MBL は, GBS に対して低い親和性しか持たないと報告されている^{25, 26)} が, L-ficolin や MBL のリガンドである GlcNAc²⁷⁾ は, Ia, Ib, II, III, V 型 CPS を構成する単糖の一つである^{29, 35, 51-56)}。

本研究では, L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の GBS 細胞とその精製 CPS への結合, および C4 分解活性を測定し, GBS 感染症における L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の役割を明らかにすることを試みた。

材料と方法

供試菌株

CPS 欠失相同変異体, NeuNAc 欠失相同変異体, およびそれらの親株 (COH1 株とその相同変異体はいずれも Washington 大学の Craig E Rubens 教授から分与) を表 3 に示す。臨床由来株は, 既に RDP 型が明らかな 149 株⁵⁰⁾ について CPS の NeuNAc 含有量を測定し, RDP 型毎に NeuNAc 含有量が幅広く分布するように 56 株を選択した (表 4)。また, 供試株は THB 培地中で一夜培養し, 新たな THB 培地に 1/10 量接種した。これを, 37°C で 90 分間, 振盪培養した。この培養細胞は後期指数増殖期に相当する。細胞は 10 mM TBS-0.02% NaN₃ を用いて 2 回洗浄し, 10 mM TBS-0.02% NaN₃ に 0.60 OD₆₀₀ に懸濁した。細胞の NeuNAc 含有量測定のため, 同一の培養細胞を純水で 2 回洗浄し, 0.1 M HCl に 0.60 OD₆₀₀ に懸濁した。懸濁液を 84°C で 20 分間加熱し NeuNAc を加水分解により遊離させ抽出した。抽出試料中の NeuNAc 濃度はチオバルビツール酸法³⁴⁾ で測定した。

細菌細胞のノイラミニデース処理

ノイラミニデース反応緩衝液 (20 mM リン酸緩衝液-150 mM NaCl-0.02% NaN₃ (pH 5.1)) 2000 μ l 中で細胞 (0.60 OD₆₀₀) と 20 U/ml ノイラミニデースを, 37°C で 8 時間, 振盪しながら反応させた。対照として同一の細胞を, ノイラミニデースを含まないことを除いて同様に処理した。ノイラミニデース処理細胞と未処理細胞はそれぞれ 10 mM TBS-0.02% NaN₃ を用いて 2 回洗浄し, 10 mM TBS-0.02% NaN₃ に 0.60 OD₆₀₀ に懸濁した。細胞の NeuNAc 含有量測定のため, ノイラミニデース処理細胞と未処理細胞のそれぞれ 1000 μ l を純水で 2 回洗浄し, 0.1 M

HCl に 0.60 OD₆₀₀ に懸濁した。NeuNAc の抽出と濃度測定は前述と同様に行った。

CPS の精製

CPS は、供試株として RDPIa-2 型 i45 株, RDPIb-1 型 590448 株, RDPII-2 型 Washington 株, RDPIII-3 型 874391 株, RDPV-3 型 i16 株, RDPVI-1 型 853009 株, RDPVIII-1 型 872808 株を用い, 第 1 章に述べた方法で精製した。

L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の精製

L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体は第 1 章に述べた方法で精製した。

CPS および単糖による L-ficolin および MBL の固相化 GlcNAc への結合の 50%阻害量 (I_{50}) の測定

CPS および単糖による L-ficolin および MBL 結合の I_{50} は Haurum らの方法⁵⁹⁾ に準じて測定した。PBS に溶解した 80 μ l の 2.16 μ g/ml GlcNAc-BSA (1 μ M GlcNAc を含む) を ELISA プレートのウエルに入れ, 4°C で一夜, 放置して結合させた。ウエルに 0.1% HSA を含む 10 mM TBS-0.02% NaN₃ を入れ, 室温で 1 時間, ブロッキングした。予め結合緩衝液 (10 mM Tris-HCl-10 mM HEPES-150 mM NaCl-4 mM CaCl₂-0.4% HSA-0.05% Triton X-100-0.02% NaN₃) に溶解した数段階の濃度の CPS または単糖 40 μ l をウエルに入れ, 次いで結合緩衝液に溶解した各 40 μ l の 0.5 μ g/ml L-ficolin/MASP 複合体または 0.5 μ g/ml MBL/MASP 複合体を入れ, 4°C で一夜, 放置して固相化 GlcNAc へ結合させた。標準

には結合緩衝液で段階希釈した各 0.0156~0.25 µg/ml の L-ficolin/MASP 複合体または MBL/MASP 複合体を用いた。L-ficolin と MBL の固相化 GlcNAc への結合量は、1 次抗体として各 80 µl の 1 µg/ml 抗 L-ficolin mAb (GN5) または 1 µg/ml 抗 MBL mAb (3E7) を加え、2 次抗体として 80 µl の 1 µg/ml アルカリフォスファターゼ標識抗マウス免疫グロブリンヤギ抗体を加え、ELISA Amplification System を用いて測定した。抗体は 10 mM TBS-Ca-0.05% Tween 20 に溶解して用いた。1 次抗体を加えないウエルの測定値を陰性対照とした。なお、各反応の終了後、ウエルを 10 mM TBS-Ca-0.05% Tween 20 で洗浄した。 I_{50} は各 CPS または単糖の阻害曲線から求めた。

L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複体の GBS 細胞への結合の測定

結合緩衝液 300 µl 中で細胞 (0.60 OD₆₀₀) と 8%血清を、37°C で 30 分間、振盪しながら反応させた後、遠心により細胞を沈殿させて上清を得た。いくつかの実験では、細胞から 0.0375~2.4 OD₆₀₀ の段階希釈系列を調製して用いた。標準には細胞を加えないことを除いて同様に反応させた 8%血清を用いた。PBS に溶解した 1 µg/ml 抗 L-ficolin mAb (GN5, HyCult) または 1 µg/ml 抗 MBL mAb (Hyb131-1, Abcam) 80 µl を ELISA プレートのウエルに入れ、4°C で一夜、放置して結合させた。ウエルに 0.1% HSA を含む 10 mM TBS-0.02% NaN₃ を入れ、室温で 1 時間、ブロッキングした。上述の細胞と反応後の上清 80 µl をウエルに入れ、4°C で一夜、放置して結合させた。上述の標準を結合緩衝液を用いて段階希釈し同様に反応させた。L-ficolin と MBL の結合量は、各 80 µl の 1 µg/ml アルカリフォスファターゼ標識抗 L-ficolin mAb (2F5) または 1 µg/ml ア

ルカリフォスファターゼ標識抗 MBL mAb (Hyb131-1, Abcam)を加え ELISA Amplification System を用いて測定した。抗体のアルカリフォスファターゼ標識には EZ-Link Maleimide Activated Alkaline Phosphatase Kit (Pierce) を用い、調製した抗体は 10 mM TBS-Ca-0.05% Tween 20 に溶解して用いた。血清を加えないウエルの測定値を陰性対照とした。なお、各反応の終了後、ウエルを 10 mM TBS-Ca-0.05% Tween 20 で洗浄した。L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の結合は、

$$\text{結合率 (\%)} = (\text{加えた量} - \text{残存量}) / \text{加えた量} \times 100$$

として求めた。

GBS 細胞に結合した L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体による C4 分解の測定

C4 分解の測定は Krarup らの方法⁶⁰⁾ に準じて行った。高塩濃度結合緩衝液 (10 mM Tris-HCl-10 mM HEPES-500 mM NaCl-4 mM CaCl₂-0.4% HSA-0.05% Triton X-100-0.02% NaN₃) 1000 μ l 中で細胞 (0.60 OD₆₀₀) と 8%血清を、4°C で一夜、ローリングしながら反応させた。反応後の細胞を 10 mM TBS-Ca-0.02% NaN₃ を用いて 2 回洗浄し、10 mM TBS-Ca-0.02% NaN₃ に 0.60 OD₆₀₀ に懸濁した。いくつかの実験では、血清と反応させた細胞から 0.0375~2.4 OD₆₀₀ の段階希釈系列を調製して用いた。C4 反応緩衝液 (ペロナル緩衝液-150 mM NaCl-4 mM CaCl₂-0.4% HSA-0.05% Triton X-100-0.02% NaN₃) 300 μ l 中で細胞 (0.60 OD₆₀₀) と 1 μ g/ml 精製ヒト C4 を、37°C で 30 分間、振盪しながら反応させた後、遠心により細胞を沈殿させて上清を得た。標準には、血清と反応させない細胞と 1 μ g/ml C4 を同様に反応させ、その上清を用いた。

PBSに溶解した1 µg/ml マンナン (Sigma) 80 µl をELISA プレーットのウェルに入れ、4°C で一夜、放置して結合させた。ウェルに0.1% HSAを含む10 mM TBS-0.02% NaN₃を入れ、室温で1時間、ブロッキングした。ウェルに高塩濃度結合緩衝液に溶解した8%血清80 µlを加え、4°C で一夜、放置して血清中のMBL/MASP複合体を固相化させた。

上述の細胞とC4を反応させた後の上清80 µlをウェルに入れ残存C4と固相化MBL/MASP複合体を37°Cで60分間反応させた。上述の標準を100%とし、結合緩衝液を用いて75, 50, 25, 12.5%に希釈し、同様に反応させた。固相化MBL/MASP複合体によって分解されプレートに結合したC4b量を、1次抗体として80 µlの0.125 µg/ml 抗-C4 mAb (Hyb 162-02, Abcam), 2次抗体として80 µlの1 µg/ml アルカリフォスファターゼ標識抗マウス免疫グロブリンヤギ抗体を加え、ELISA Amplification Systemを用いて測定した。抗体は10 mM TBS-Ca-0.05% Tween 20に溶解して用いた。1次抗体を加えないウェルの測定値を陰性対照とした。なお、各反応の終了後、ウェルを10 mM TBS-Ca-0.05% Tween 20で洗浄した。細胞に結合したL-ficolin/ MASP複合体とMBL/MASP複合体によるC4分解は、

$$\text{C4 消費率 (\%)} = (\text{加えた量} - \text{残存量}) / \text{加えた量} \times 100$$
として求めた。

結果

RDP型とNeuNAc含有量

既にRDP型が明らかなGBS 149株についてCPSのNeuNAc含有量を測定した。既に明らかにされている^{48, 49)}ようにNeuNAc含有量は

RDP 型毎に異なる傾向を示した (図 8)。RDP 型毎に NeuNAc 含有量が幅広く分布するように RDP Ia-1, Ia-2, Ia-3/4 型からそれぞれ 3 株, RDPII-1, II-2, II-3, III-1, III-4, V-1 型からそれぞれ 2 株, これら以外の RDP 型からそれぞれ 5 株の計 56 株を選択し以下の実験に用いた。

精製 CPS と CPS を構成する単糖への L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の結合

固相化 GlcNAc への L-ficolin と MBL の結合における精製 CPS の阻害曲線は, L-ficolin と MBL の両方が, 全ての型の CPS に結合することを示した (図 9A, 9B)。L-ficolin の結合に対する VIII 型 CPS の I_{50} は, VIII 型 CPS 中に L-ficolin のリガンドである GlcNAc が含まれていないにもかかわらず, 他の型の CPS のそれよりおよそ 4~7 倍低かった (表 5)。固相化 GlcNAc への L-ficolin の結合における CPS を構成している単糖の阻害曲線は, NeuNAc が GlcNAc とほぼ同等の阻害活性を示し, そして他の単糖は, 試験した濃度において阻害活性を示さなかった (図 10A)。一方, MBL の結合における単糖の阻害曲線は, GlcNAc, NeuNAc, ラムノース, グルコース, ガラクトースの順で強い阻害活性を示した (図 10B, 表 6)。L-ficolin と MBL の両者に対する NeuNAc の阻害曲線は, GlcNAc の阻害曲線より急激に下降し, そして NeuNAc は GlcNAc より少ない量で固相化 GlcNAc への L-ficolin と MBL の結合を完全に阻害した。

L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の GBS 細胞への結合, および細胞に結合した L-ficolin/MASP 複合体による C4 分解

L-ficolin/MASP 複合体と MBL/MASP 複合体の GBS 細胞への結合は, 細胞と血清を反応させ, 上清中の結合しなかった L-ficolin または MBL

量から結合率として求めた。また、C4 分解は、C1q の沈着を阻害し、且つ C4 の分解が生じない 500 mM NaCl の存在下³⁹⁾ で細胞と血清を反応させ、次いで細胞を洗浄後に精製 C4 と反応させ、上清中の分解されなかった C4 量から消費率として求めた。実験の結果、L-ficolin または MBL の結合率が 30%以下の株については、L-ficolin 結合率が細胞濃度依存性であるか否かを試験し、細胞濃度依存性でなかった場合には非特異的な吸着と判断した。L-ficolin の結合率は RDP 型で異なっていた。すなわち、L-ficolin は RDP Ib-1 型 (5 株), V-1, V-2, V-3 型 (計 12 株), VI-1 型 (5 株), VIII-1 型 (5 株) の全てに結合したが、RDP Ia-1, Ia-2, Ia-3 型 (計 9 株), II-1, II-2, II-3 型 (計 6 株) の全てに結合しなかった。血清 III 型において、L-ficolin は RDP III-2 型 (5 株), III-3 型 (5 株) の全てに結合したが、RDP III-1 型 (2 株), III-4 型 (2 株) の全てに結合しなかった。さらに RDP Ib-1, III-2, III-3, V-1, V-2, V-3 型の L-ficolin 結合率は、CPS 中の NeuNAc 含有量の増加と共に増加し、NeuNAc 含有量がおおよそ 6 μ M で一定に達するように思われ、NeuNAc 含有量依存性の L-ficolin 結合を示した (図 11A)。RDP VI-1, VIII-1 型では NeuNAc 含有量依存性の L-ficolin 結合は観察されず、いずれの株でも高値であった (図 11A)。これらの RDP 型の NeuNAc 含有量が狭い範囲に分布することが原因であるかもしれない。一方、MBL は試験した GBS のどれにも結合しなかった。結合した L-ficolin/MASP 複合体は全ての株において C4 を消費し得た (図 11B)。MBL/MASP 複合体がどの GBS 株にも結合しなかった故に、C4 の消費は L-ficolin/MASP 複合体が原因であると考えられた。しかし、C4 消費率と CPS 中の NeuNAc 含有量の間に相関はなく、そしてまた、C4 消費率と L-ficolin 結合量の間にも相関がなかった。RDP VIII-1 型への L-ficolin の結合率は高いにもかかわらず、C4 消費率は、他

の RDP 型と比較して低値であった。血清と反応させた後に希釈系列を調製し C4 と反応させた場合には、細胞濃度と C4 消費量間に相関が認められた (図 12)。この結果は、異なる菌株間の L-ficolin/MASP 複合体結合量と C4 消費量に相関が無いことが、実験法上の要因によらないことを示している。

L-ficolin のリガンドとしての細胞上 NeuNAc の役割

前述の通り、固相化 GlcNAc への L-ficolin の結合における CPS とそれを構成する単糖の阻害曲線は、NeuNAc が GlcNAc とほぼ同等の結合活性を持つことを示した。NeuNAc は、全血清型の CPS 中の側鎖に非還元末端として存在する^{29, 35, 51-56})。そこで L-ficolin のリガンドとしての細胞上 NeuNAc の役割を明らかにするために NeuNAc を除去した細胞を作製した。NeuNAc はノイラミニデース処理によって細胞から選択的に除去した。ノイラミニデース処理細胞の CPS 中に残存する NeuNAc 含有量は、ノイラミニデースを加えないことを除いて同様に処理した未処理細胞の NeuNAc 含有量に対し、RDP Ib-1 型 (590448 株) で 16.2%, III-3 型 (874391 株) で 37.4%, V-3 型 (i16 株) で 13.8%, VI-1 型 (853009 株) で 29.6%, VIII-1 型 (872808 株) で 70%であった。恐らく残存している NeuNAc に L-ficolin が結合し得る故に、L-ficolin は、ノイラミニデース処理細胞にも未処理細胞にも結合した。しかし、効率よく NeuNAc を除去できなかった RDP VIII-1 型を除く全ての型で、ノイラミニデース処理細胞の L-ficolin 結合曲線と未処理細胞の結合曲線は異なり、そして結合曲線は、X 軸のスケールに NeuNAc 含有量を用いることによって描かれる際に、おおよそ等しかった (図 13)。例えば、RDP Ib-1 型株において 0.60 OD₆₀₀ のノイラミニデース処理細胞の NeuNAc 含有量は、

0.096 OD₆₀₀ の未処理細胞の NeuNAc 含有量と同じである。L-ficolin 結合率は、0.60 OD₆₀₀ のノイラミニデース処理細胞と 0.096 OD₆₀₀ の未処理細胞の間でほぼ同じであった。すなわち、除去された NeuNAc 量に比例して L-ficolin 結合が低下した。このことは CPS 中の NeuNAc が GBS 表面の L-ficolin の主なりガンドであることを示唆している。これらの結論は、RDP III-3 型株の相同変異体を用いた実験によって強化された。L-ficolin は、野生株 874391 株と COH1 株 に細胞濃度依存性に結合し得るが、しかし CPS 欠失相同変異体 874391/ cps⁻株と COH1-13 株にも、また、NeuNAc 欠失相同変異体 COH1-11 株にも全く結合しなかった (図 14)。このことは、少なくとも RDP III-3 型において、L-ficolin が結合する細胞上構造物が唯一 CPS であり、さらに CPS 中の NeuNAc であることを示している。

考察

精製 CPS による結合阻害試験は、L-ficolin と MBL が全ての CPS に結合することを示した。CPS は 5 つの単糖 (NeuNAc, GlcNAc, グルコース, ガラクトース, ラムノース) のいずれかの組み合わせで構成されている^{29, 35, 51-56)}。CPS を構成する単糖を用いた結合阻害試験は、L-ficolin が GlcNAc と NeuNAc に、また MBL が GlcNAc, NeuNAc, ラムノース, グルコース, ガラクトースの順で強く結合することを示した。MBL の糖鎖認識ドメインは、古典的 C 型レクチンドメインであり、Ca⁺⁺の存在下でピラノース環 3, 4 位の水酸基と結合することが結晶化解析により明らかにされている^{61, 62)}。一方、L-ficolin はピラノース環にアセチル基を持つ GlcNAc や GalNAc の他に *N*-アセチルシステイン, *N*-アセチルグリ

シン, *N*-アセチルコリンにも結合が認められ, *N*-アセチル基への結合が示唆されている²⁷⁾。グルコースが CPS の側鎖の非還元末端に位置する V 型を例外として, GlcNAc, グルコース, ガラクトース, ラムノースは, いずれも CPS 中でピラノース環の 3 位または 4 位で他の単糖と結合している^{29, 35, 51-56)}。一方, GlcNAc の *N*-アセチル基はピラノース環の 2 位にあり, 糖鎖中で他の単糖と結合していない。したがって CPS 中の GlcNAc, グルコース, ガラクトース, ラムノースは, MBL によって認識されないが, GlcNAc は L-ficolin によって認識され得ると考えられる。NeuNAc はいずれの血清型でも CPS 中の側鎖の非還元末端に位置している。MBL の糖鎖認識ドメインが結合する NeuNAc の構造は明らかではない。しかし, 遊離 CPS への MBL の結合は, GlcNAc が存在しない VI 型や VIII 型を含め, いずれの血清型でもほぼ同等であり, このことは全ての型の CPS に共通して側鎖の非還元末端に位置する NeuNAc が MBL のリガンドであることを示唆している。GlcNAc を含まない VI 型 CPS に対する L-ficolin の結合は CPS 中に GlcNAc を含む他の型の CPS に対する結合と同等であり, 一方, 同じく GlcNAc を含まない VIII 型 CPS に対する L-ficolin の結合は他の型の CPS に対する結合と量的にもまた阻害曲線の傾きでも異なっていた。したがって, 遊離 CPS において L-ficolin が GlcNAc と NeuNAc の両方に結合しているか, あるいはいずれか一方に優位に結合しているかは不明である。なお, 遊離 GlcNAc や遊離 NeuNAc に比較し CPS の I_{50} は 100 倍以上低値で, L-ficolin や MBL が CPS 中に繰り返し構造として存在する GlcNAc あるいは NeuNAc に効率よく結合することを示した。

細胞を用いた結合試験の結果は, 精製 CPS による結合阻害試験の結果と異なり, MBL は供試株いずれに対しても結合しなかった。また,

L-ficolin は、RDP Ib-1, V-1, V-2, V-3, VI-1, VIII-1 型の全てに結合したが、RDP Ia-1, Ia-2, Ia-3, II-1, II-2, II-3 型の全てに結合しなかった。III 型株において、L-ficolin は RDP III-2, III-3 型の全てに結合したが、RDP III-1, III-4 型の全てに結合しなかった。精製 CPS を用いた結合阻害試験の結果は CPS 量の違いによって L-ficolin の結合量に差が生ずることを示すが、NeuNAc 含有量が狭い範囲に分布した RDP VI-1 型と VIII-1 型を除いて、NeuNAc 含有量と L-ficolin 結合量に相関が認められた。ノイラミニデース処理細胞に対する L-ficolin 結合は、効率よく NeuNAc を除去できなかった RDP VIII-1 型を除く全ての型で、除去された NeuNAc 量に比例して低下し、NeuNAc が GBS 表面の L-ficolin の主なりガンドであることを示唆した。さらに、相同変異体を用いた実験は、少なくとも RDP III-3 型において、L-ficolin が結合する細胞上構造物が唯一 CPS であり、さらに CPS 中の NeuNAc であることを示した。精製 CPS による結合阻害試験と細胞への結合率の成績の違いを矛盾なく説明し得る仮説の一つは、細胞表層構造である。L-ficolin に対しては血清型や RDP 型の違いを反映する細胞表層構造の差が存在し、MBL に対しては全ての血清型や RDP 型に共通する結合を阻害する細胞表層構造が存在すると考えることができる。L-ficolin や MBL の結合を阻害する細胞表層構造は明らかでないが、CPS 自身かもしれず、また他の構造物かもしれない。

L-ficolin と MASP は血清中で複合体を形成しており、L-ficolin の結合量の増加は MASP 量の増加を意味し、結果として C4 消費量も増加すると推測できる。しかし、細胞を用いた C4 消費試験で、L-ficolin 結合率と C4 消費率に相関関係は認められなかった。また、RDP VIII-1 型では、L-ficolin の結合が高値であるにも関わらず C4 消費率は他の RDP 型に比較して低値であった。C4 分解活性を有する MASP-2 は未活性型の状態

で L-ficolin と結合しているが、L-ficolin がリガンドと結合すると酵素活性を示す 2 本鎖の活性型となり、C4 を C4a と C4b に分解してリガンドの近傍に存在する水酸基かアミノ基に C4b を結合させる^{20, 22-24)}。精製 CPS を用いた固相化 GlcNAc への L-ficolin 結合の阻害試験で、精製 VIII 型 CPS の I_{50} は、他の型の CPS の I_{50} より 4~7 倍低値で、また阻害曲線の傾きも明らかに異なっていた。VIII 型 CPS への結合によって生ずる L-ficolin 構造の変化が他の型の CPS に対する結合によって生ずる構造変化と異なるとすれば、その違いは MASP-2 の活性化の違いに現れる可能性がある。

GBS 新生児感染症において L-ficolin/MASP 複合体や MBL/MASP 複合体が感染防御に果たす役割には 2 つあると考えられる。第 1 章で L-ficolin によって開始される補体経路の活性化が RDPIII-3 型株を有効なオプソニン貪食殺菌に導くことを明らかにした。L-ficolin/MASP 複合体が結合した RDP 型の細胞は、有効にオプソニン貪食殺菌されると考えられる。一方、L-ficolin や MBL が、精製 CPS に結合するが、細胞上には結合しなかった RDP 型ではオプソニン貪食殺菌の促進を期待することはできない。しかし補体の活性化は B 細胞による抗原認識を促し、獲得免疫における特異抗体産生に繋がる。GBS は増殖の過程で細胞外に CPS を放出する。L-ficolin/MASP 複合体や MBL/MASP 複合体は、遊離 CPS に結合し補体経路を活性化することで獲得免疫における特異抗体産生に一定の役割を果たしている可能性を否定できない。

総括

母親の CPS 特異 IgG は胎盤を経て胎児に移行し、侵襲性 GBS 感染から GBS に汚染された新生児を保護する。しかし、出産に際し GBS に重度に汚染された大部分の小児は、侵襲性の疾患に進展せず、そしてこれらの感染しなかった小児でも、保護的なレベルの CPS 特異 IgG を欠いている場合が少なくない²⁾。GBS に汚染されたにも関わらず、CPS 特異 IgG を欠いている小児の多くが感染しない理由は明らかでない。GBS 表層のタンパク抗原に対する母親の抗体⁶³⁾、あるいは GBS の遺伝系統間の病原性の本質的な相違^{33, 48-50, 64)}が原因であるかもしれない。実際、RDP III-3 型 (ST-17 complex) が他の遺伝系統株に比較して有意に早発型感染の原因となる⁶⁵⁾。

本研究は、L-ficolin/MASP 複合体によって開始されるレクチン経路活性化が、多くの RDP 型のオプソニン化を促すことを示した。また L-ficolin/ MASP 複合体や MBL/MASP 複合体は、GBS の増殖に伴って細胞から放出される遊離 CPS に結合し補体経路を活性化することで獲得免疫における特異抗体産生に一定の役割を果たす可能性を示唆している。GBS に汚染されたにも関わらず、CPS 特異 IgG を欠いている小児の多くが感染しない理由の一つに抗体非依存性のレクチン経路の活性化が挙げられると考える。

L-ficolin⁶⁶⁾ や MBL⁶⁷⁾ をコードする遺伝子の多形が高率に存在し、L-ficolin や MBL の血中濃度や結合活性に影響することが明らかにされている。GBS 新生児感染と遺伝子多形との関連を疫学的に解析することで GBS 感染予防に繋がると期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始、温かいご指導とご鞭撻を頂きました女子栄養大学教授奥脇義行博士に衷心よりお礼申し上げます。

本研究は、MASP や L-ficolin を発見者であり補体研究の世界的権威である東海大学教授松下操博士ならびに福島県立医科大学教授藤田禎三博士のご指導とご協力をなくしては成し得ませんでした。米国 Washington 大学教授 Creig E. Rubens 博士には相同変異体の作製にあたり細部にわたってご指導とご協力を頂きました。また、本研究は米国 Utah 大学教授 John F. Bohnsack 博士、St. Jude Children's Research Hospital Elisabeth E. Adderson 博士ならびに女子栄養大学教授高橋信二博士の GBS 新生児感染症に関する長年の研究を礎として成し得たものです。諸先生方に深謝申し上げます。

引用文献

1. Baker, C. J. 2000. Group B streptococcal infections, p. 222-237. *In* D. L. Stevens and E. L. Kaplan (ed.), Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis. Oxford University Press, New York.
2. Lin FY, Weisman LE, Azimi PH, Philips JB 3rd, Clark P, Regan J, Rhoads GG, Frasch CE, Gray BM, Troendle J, Brenner RA, Moyer P, Clemens JD. 2004. Level of maternal IgG anti-group B streptococcus type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. *J Infect Dis.* 190:928-34.
3. Edwards, M. S., Kasper, D. L., Jennings, H. J., Baker, C. J., Nicholson-Weller, A. 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *J. Immunol.* 128:1278-1283.
4. Edwards, M. S., Baker, C. J., Kasper, D. L. 1979. Opsonic specificity of human antibody to the type III polysaccharide of group B streptococcus. *J. Infect. Dis.* 140: 1004-1008.
5. Edwards, M. S., Nicholson-Weller, A., Baker, C. J., Kasper, D. L. 1980. The role of specific antibody in alternative complement pathway-mediated opsonophagocytosis of type III, group B streptococcus. *J. Exp. Med.* 151:1275-1287.
6. Takahashi, S., Aoyagi, Y., Adderson, E. E., Okuwaki, Y., Bohnsack J. F. 1999. Capsular sialic acid limits C5a production on type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 67:1866-1870.

7. Wessels, M. R., Butko, P., Ma, M., Warren, H. B., Lage, A. L., Carroll, M. C. 1995. Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:11490-11494.
8. Butko, P., Nicholson-Weller, A., Wessels, M. R. 1999. Role of complement component C1q in the IgG-independent opsonophagocytosis of group B streptococcus. *J. Immunol.* 163:2761-2768.
9. Aoyagi, Y., Adderson, E. E., Min, J. G., Matsushita, M., Fujita, T., Takahashi, S., Okuwaki, Y., and Bohnsack, J. F. 2005. Role of L-Ficolin/MASP Complexes in the Opsonophagocytosis of type III Group B Streptococci. *J. Immunol.* 174:418-425.
10. Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T., Yamashina, I. 1987. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454.
11. Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., Mizuochi, T. 1996. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J. Biol. Chem.* 271:2448-2454.
12. Sugimoto, R., Yae, Y., Akaiwa, M., Kitajima, S., Shibata, Y., Sato, H., Hirata, J., Okochi, K., Izuhara, K., Hamasaki, N.. 1998. Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. *J. Biol. Chem.* 273:20721-20727.

13. Matsushita, M., Kuraya, M., Hamasaki, N., Tsujimura, M., Shiraki, H., Fujita, T. 2002. Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). *J. Immunol.* 168:3502-3506.
14. Matsushita, M., Fujita, T. 2002. The role of ficolins in innate immunity. *Immunobiology* 205:490-497.
15. Cseh, S., Vera, L., Matsushita, M., Fujita, T., Arlaud, G. J., Thielens, N. M. 2002. Characterization of the interaction between L-ficolin/p35 and mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J. Immunol.* 169:5735-5743.
16. Matsushita, M., Fujita, T. 1992. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J. Exp. Med.* 176:1497-1502.
17. Ji, Y. H., Fujita, T., Hatsuse, H., Takahashi, A., Matsushita, M., Kawakami, M. 1993. Activation of the C4 and C2 components of complement by a proteinase in serum bactericidal factor, Ra reactive factor. *J. Immunol.* 150:571-578.
18. Sato, T., Endo, Y., Matsushita, M., Fujita, T. 1994. Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein. *Int. Immunol.* 6:665-669.
19. Thiel, S., Vorup-Jensen, T., Stover, C. M., Schwaebler, W., Laursen, S. B., Poulsen, K., Willis, A. C., Eggleton, P., Hansen, S., Holmskov, U., Reid, K. B., Jensenius, J. C. 1997. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that

- activates complement. *Nature*. 386:506-510.
20. Matsushita, M., Endo, Y., Fujita, T. 2000. Complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J. Immunol.* 164:2281-2284.
 21. Dahl, M. R., Thiel, S., Matsushita, M., Fujita, T., Willis, A. C., Christensen, T., Vorup-Jensen, T., Jensenius, J. C. 2001. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* 15:127-135.
 22. Vorup-Jensen, T., Petersen, S. V., Hansen, A. G., Poulsen, K., Schwaebble, W., Sim, R. B., Reid, K. B., Davis, S. J., Thiel, S., Jensenius, J. C. 2000. Distinct pathway of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *J. Immunol.* 165:2093-2100.
 23. Rossi, V., Cseh, S., Bally, I., Thielens, N. M., Jensenius, J. C., Arlaud, G. J. 2001. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J. Biol. Chem.* 276:40880-40887.
 24. Shwaebble, W. J., Dahl, M. R., Thiel, S., Stover, C. M., Jensenius, J. C. 2002. The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MASP-3: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. *Immunobiology* 205:455-466.
 25. van Emmerik, L. C., Kuijper E. J., Fijen, C. A., Dankert, J., Thiel,

- S. 1994. Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis. *Clin. Exp. Immunol.* 97:411-416.
26. Neth, O., Jack, D. L., Dodds, A. W., Holzel, H., Klein, N. J., Turner, M. W. 2000. Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect. Immun.* 68:688-693.
27. Krarup, A., Thiel, S., Hansen, A., Fujita, T., Jensenius, J. C. 2004. L-ficolin Is a Pattern Recognition Molecule Specific for Acetyl Groups. *J. Biol. Chem.* 279: 47513-47519.
28. Lynch, N. J., Roscher, S., Hartung, T., Morath, S., Matsushita, M., Maennel, D. N., Kuraya, M., Fujita, T., Schwaebler, W. J. 2004. L-Ficolin Specifically Binds to Lipoteichoic Acid, a Cell Wall Constituent of Gram-Positive Bacteria, and Activates the Lectin Pathway of Complement. *J. Immunol.* 172:1198-1202.
29. Jennings, H. J., Rosell, K.-G., Kasper, D. L. 1980. Structural determination and serology of the native polysaccharide antigen of type-III group B streptococcus. *Canad. J. Biochem.* 58:112-120.
30. Wessels, M. R., Pozsgay, V., Kasper, D. L., Jennings, H. J. 1987. Structure and immunochemistry of an oligosaccharide repeating unit of the capsular polysaccharide of type III group B Streptococcus. A revised structure for the type III group B streptococcal polysaccharide antigen. *J. Biol. Chem.* 262:8262-8267.
31. Cieslewicz, M. J., Kasper, D. L., Wang, Y., Wessels, M. R. 2001. Functional analysis in type Ia group B Streptococcus of a cluster of

- genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of streptococci. J. Biol. Chem. 276:139-146.
32. Framson, P. E., Nittayajarn, A., Merry, J., Youngman, P., Rubens, C. E. 1997. New genetic techniques for group B streptococci: high-efficiency transformation, maintenance of temperature-sensitive pWV01 plasmids, and mutagenesis with Tn917. Appl. Environ. Microbiol. 63:3539-3547.
 33. Adderson, E. E., Takahashi, S., Wang, Y., Armstrong, J., Miller, D. V., Bohnsack, J. F. 2003. Subtractive hybridization identifies a novel predicted protein mediating epithelial cell invasion by virulent serotype III group B *Streptococcus agalactiae*. Infect. Immun. 71:6857-6863.
 34. Aminoff, D. 1961. Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. Biochem. J. 81: 384-391.
 35. Jennings, H. J., Katzenellenbogen, E., Lugowski, C., Kasper, D. L. 1983. Structure of negative polysaccharide antigens of type Ia and type Ib group B streptococcus. Biochem. 22:1258-1264.
 36. Ouchterlony, O. 1962. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. Prog. Allergy. 6:30-154.
 37. Tenner, A. J., Lesavre, P. H., Cooper, N. R. 1981. Purification and radiolabeling of human C1q. J. Immunol. 127:648-653.
 38. Takahashi, S., Nagano, Y., Nagano, N., Hayashi, O., Taguchi, F., Okuwaki, Y. 1995. Role of C5a-ase in group B streptococcal resistance to opsonophagocytic killing. Infect. Immun.

63:4764-4769.

39. Petersen, S. V., Thiel, S., Jensen, L., Steffensen, R., Jensenius, J. C. 2001. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *J. Immunol. Methods.* 257:107-116.
40. Suankratay, C., X.-H. Zhang, Y. Zhang, T. F. Lint, H. Gewurz. 1998. Requirement for the alternative pathway as well as C4 and C2 in complement-dependent hemolysis via the lectin pathway. *J. Immunol.* 160:3006-3013.
41. Neth, O., Jack, D. L., Johnson, M., Klein, N. J., Turner, M. W. 2002. Enhancement of complement activation and opsonophagocytosis by complexes of mannose-binding lectin with mannose-binding lectin-associated serine protease after binding to *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 169:4430-4436.
42. Le, Y., Lee, S. H., Kon, O. L., Lu, J. 1998. Human L-ficolin: plasma levels, sugar specificity, and assignment of its lectin activity to the fibrinogen-like (FBG) domain. *FEBS Lett.* 425:367-70.
43. Fearon, D. T. 1978. Regulation by membrane sialic acid of β 1H-dependent decay-dissociation of amplification C3 convertase of the alternative complement pathway. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:1971-1975.
44. Pangburn, M. K., Müller-Eberhard, H. J. 1978. Complement C3 convertase: cell surface restriction of β 1H control and generation of restriction on neuraminidase-treated cells. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:2416-2420.

45. Marques, M. B., Kasper, D. L., Pangburn, M. K., Wessels, M. R. 1992. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 60:3986-3993.
46. Wessels, M. R., Haft, R. F., Heggen, L. M., Rubens, C. E. 1992. Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 60:392-400.
47. Aoyagi, Y., Adderson, E. E., Rubens, C. E., Bohnsack, J. F., Min, J. G., Matsushita, M., Fujita, T., Okuwaki, Y., and Takahashi, S. L-ficolin/MASP complexes specifically bind to group B Streptococci through *N*-acetylneuraminic acid of capsular polysaccharide, and activate the complement pathway (submitted for publication).
48. Nagano, Y., Nagano, N., Takahashi, S., Murono, K., Fujita, K., Taguchi, F., Okuwaki, Y. 1991. Restriction endonuclease digest patterns of chromosomal DNA from group B β -haemolytic streptococci. *J. Med. Microbiol.* 35 297-303.
49. Takahashi, S., Adderson, E. E., Nagano, Y., Nagano, N., Briesacher, M. R., Bohnsack, J. F. 1998. Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III group B streptococci. *J. Infect. Dis.* 177:1116-1119.
50. Takahashi, S., Detrick, S., Whiting, A., Blascheke-Bonkowksy, A., Aoyagi, Y., Adderson, E., Bohnsack, J. 2002. Correlation of phylogenetic lineages of group B streptococci, identified by analysis of restriction digest patterns of genomic DNA, with *infB* alleles and mobile genetic elements. *J. Infect. Dis.*

186:1034-1038.

51. Jennings, H. J., Rosell, K-G., Katzenellenbogen, E., Kasper, D. L. 1983. Structural determination of the capsular polysaccharide antigen of type II group B streptococcus. J. Biol. Chem. 258:1793-1798.
52. Wessels, M. R., Benedi, W. J., Jennings, H. J., Michon, F., DiFabio, J. L., Kasper, D. L. 1989. Isolation and characterization of type IV group B Streptococcus capsular polysaccharide. Infect. Immun. 57:1089-1094.
53. Wessels, M. R., DiFabio, J. L., Benedi, V. J., Kasper, D. L., Michon, F., Brisson, J. R., Jelinkova, J., Jennings, H. J. 1991. Structural determination and immunochemical characterization of the type V group B Streptococcus capsular polysaccharide. J. Biol. Chem. 266:6714-6719.
54. Kogan, G., Brisson, J. R., Kasper, D. L., von Hunolstein, C., Orefici, G., Jennings, H. J. 1995. Structural elucidation of the novel type VII group B Streptococcus capsular polysaccharide by high resolution NMR spectroscopy. Carbohydr. Res. 277:1-9.
55. von Hunolstein, C., D'ascenzi, S., Wagner, B., Jelinkova, J., Alfarone, G., Recchia, S., Wagner, M., Orefici, G. 1993. Immunochemistry of capsular type polysaccharide and virulence properties of type VI Streptococcus agalactiae (group B streptococci). Infect. Immun. 61:1272-1280.
56. Kogan, G., Uhrin, D., Brisson, J-R., Paoletti, L. C., Blodgett, A. E., Kasper, D. L., Jennings, H. J. 1996. Structural and

- immunochemical characterization of the type VIII group B Streptococcus capsular polysaccharide. J. Biol. Chem. 271:8786-8790.
57. Kuypers, J. M., Heggen, L. M., Rubence, C. E. 1989. Molecular analysis of a region of the group B streptococcus chromosome involved in type III capsule expression. Infect. Immun. 57:3058-3065.
 58. Rubens, C. E., Heggen, L. M., Haft, R. F., Wessels, M. R. 1993. Identification of cpsD, a gene essential for type III capsule expression in group B streptococci. Mol. Microbiol. 8:843-855.
 59. Haurum, J. S., Thiel, S., Haagsman, H. P., Laursen, S. B., Larsen, B., Jensenius, J. C. 1993. Studies on the carbohydrate-binding characteristics of human pulmonary surfactant-associated protein A and comparison with two other collectins: mannan-binding protein and conglutinin. Biochem. J. 293:873-878.
 60. Krarup, A., Sorensen, U. B., Matsushita, M., Jensenius, J. C., Thiel, S. 2005. Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. Infect. Immun. 73:1052-1060.
 61. Drickamer, K. 1992. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. Nature. 360:183-186.
 62. Weis, W. I., Drickamer, K., Hendrickson, W. A. 1992. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. Nature. 360:127-134.

63. Stalhammar-Carlemalm, M., Stenberg, L., Lindahl, G. 1993. Protein Rib: a novel group B streptococcal cell surface protein that confers protective immunity and is expressed by most strains causing invasive infections. *J. Exp. Med.* 177:1593-1603.
64. Musser, J. M., Mattingly, S. J., Quentin, R., Goudeau, A., Selander, R. K. 1989. Identification of a high-virulence clone of type III *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) causing invasive neonatal disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:4731-4735.
65. Lin, F-Y., Whiting, A., Adderson, E., Takahashi, S., Dunn, D., Weiss, R., Azimi, P., Philips, J 3rd., Weisman, L., Regan, J., Clark, P., Rhoads, G., Frasch, C., Troendle, J., Moyer, P., Bohnsack, J. 2006. Phylogenetic Lineages of Invasive and Colonizing Strains of Serotype III Group B Streptococci from Neonates: A Multi Center Prospective Study. *J. Clin. Microbiol.* 44:1257-1261.
66. Hummelshoj, T., Munthe-Fog, L., Madsen, H. O, Fujita, T., Matsushita, M., Garred, P. 2005. Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. *Hum. Mol. Genet.* 14:1651-1658.
67. Lipscombe, R. J., Beatty, D. W., Ganczakowski, M., Goddard, E. A., Jenkins, T., Lau, Y. L., Spurdle, A. B., Sumiya, M., Summerfield, J. A., Turner, M. W. 1996. Mutations in the human mannose-binding protein gene: frequencies in several population groups. *Eur. J. Hum. Genet.* 4:13-19.

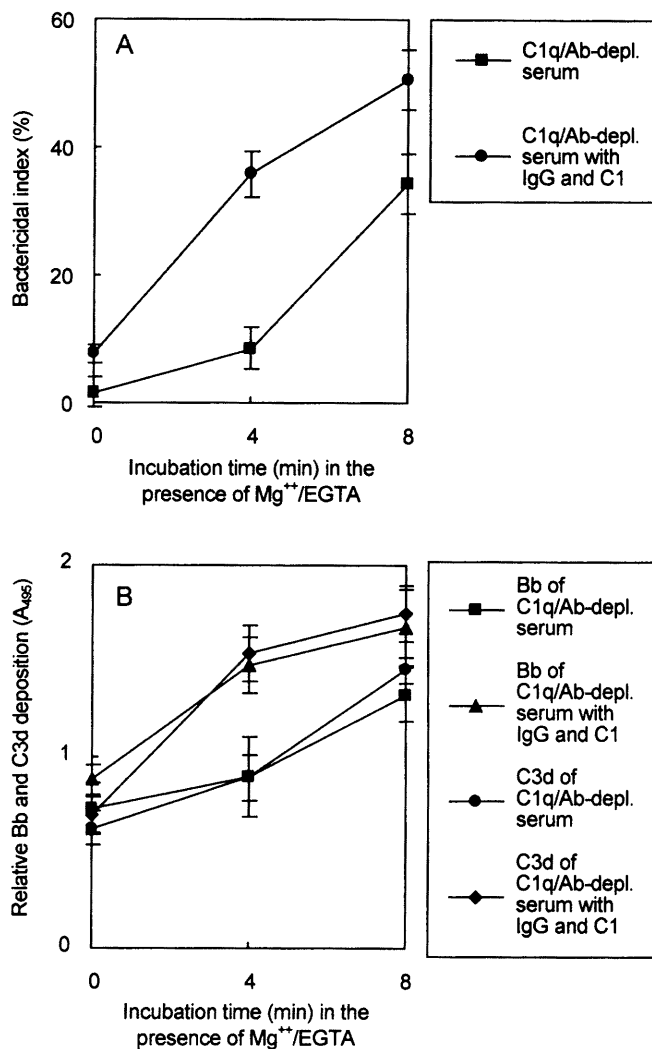


図 1. C1q/Ab 除去血清と反応後の 874391 株のオプソニン貪食殺菌 (A) および Bb と C3d 沈着 (B)。細菌細胞を 32 μ g/mlCPS 特異 IgG2 と 18 μ g/mlC1 と共に、あるいは両者が存在しない条件下で 30 分間反応させた。次いで Ca^{++} と Mg^{++} の存在下で C1q/Ab 除去血清と 1 分間反応させた後、 Mg^{++} /EGTA の存在下で図に示す時間反応させた。成績は 3 回の実験の平均 $\pm$ SD である。

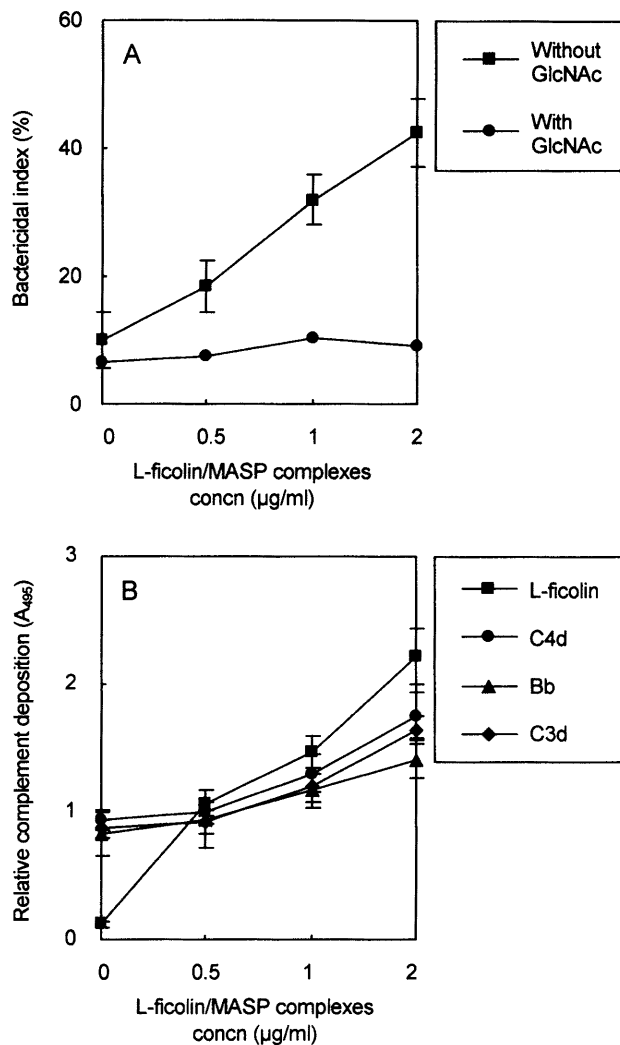


図 2. 874391 株のオプソニン貪食殺菌 (A) および細菌表面への補体沈着 (B) における L-ficolin/MASP 複合体の効果。細菌細胞を Ca^{++} , あるいは Ca^{++} と 100 mM GlcNAc の存在下で, 図に示す濃度の L-ficolin/MASP 複合体と 30 分間反応させた。細胞を洗浄後, Ca^{++} と Mg^{++} の存在下で C1q/Ab 除去血清と 1 分間反応させ, 次いで Mg^{++} /EGTA の存在下で 4 分間反応させた。補体沈着は, GlcNAc の存在しない条件下で反応させた細胞について測定した。成績は GlcNAc の存在下の実験を除いて, 3 回の実験の平均 $\pm$ SD である。

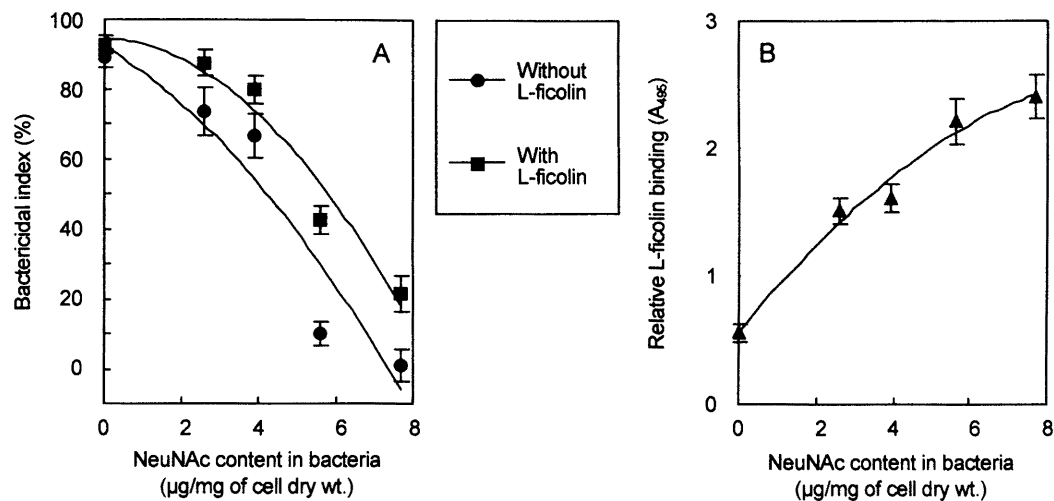


図 3. 細菌細胞の NeuNAc 含有量とオプソニン貪食殺菌との相関 (A) および L-ficolin 結合との相関 (B)。NeuNAc 量の異なる細菌細胞と cps^- 相同変異体を Ca^{++} の存在下で、2 μg/ml L-ficolin/MASP 複合体と、あるいは L-ficolin/MASP 複合体が存在しない条件下で 30 分間反応させた。次いで C1q/Ab 除去血清と Ca^{++} と Mg^{++} の存在下で 1 分間、 Mg^{++} /EGTA の存在下で 4 分間反応させた。成績は 3 回の実験の平均 $\pm$ SD である。

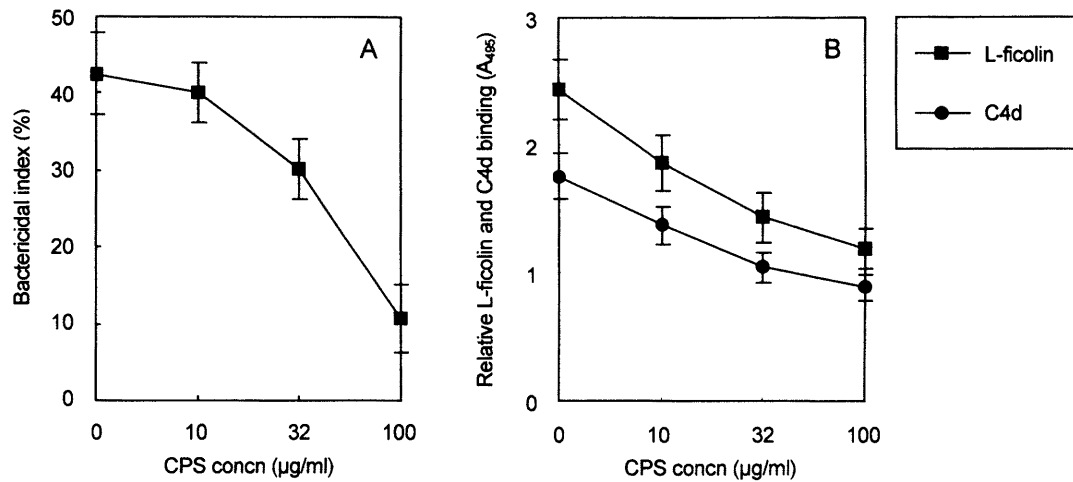


図4. 液相に加えた CPS による 874391 株の L-ficolin によって開始されるオプソニン貪食殺菌の阻害 (A) および L-ficolin 結合と C4d 沈着の阻害 (B)。細菌細胞を Ca^{++} の存在下で、図に示す濃度の CPS と 2 $\mu\text{g/ml}$ L-ficolin/MASP 複合体と共に 30 分間反応させた。細胞を洗浄後、 Ca^{++} と Mg^{++} の存在下で C1q/Ab 除去血清と 1 分間、次いで Mg^{++} /EGTA の存在下で 4 分間反応させた。成績は 3 回の実験の平均 $\pm$ SD である。

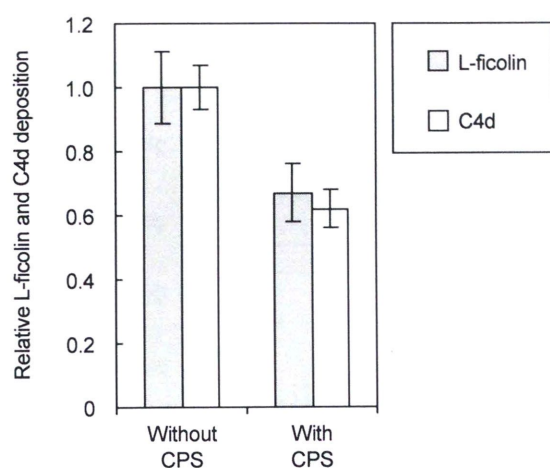


図5. 液相に加えたCPSによる固相化CPSへのL-ficolin結合とC4d沈着の阻害。
80 ng L-ficolin/MASP複合体を1.28 μ g CPSと、あるいはCPSが存在しない条件下で予め反応させた後、CPSをコートしたウエル (1.28 μ g/well) に入れ、4°Cで1夜、放置して結合させた。プレートを洗浄後、80 ng 精製ヒトC4を入れ37°Cで90分間反応させた。成績はCPSの存在しない条件下のL-ficolin結合とC4d沈着の平均値を1.0とした3回の実験の平均 $\pm$ SDである。

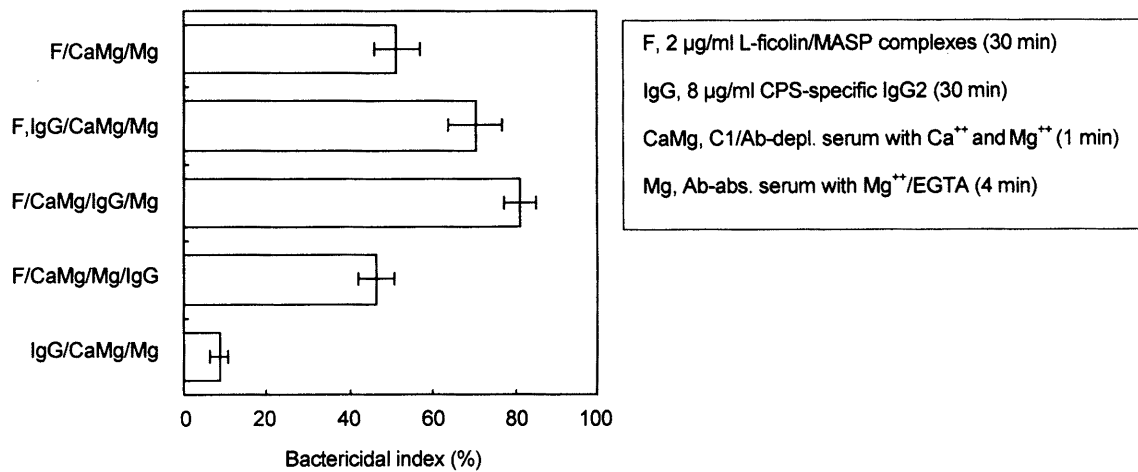


図6. L-ficolin/MASP 複合体によって開始される 874391 株のオプソニン貪食殺菌における CPS 特異 IgG2 の効果。細菌細胞を図に示した順に連続的に反応させた。成績は、3 回の実験の平均 $\pm$ SD である。IgG と反応させなかった細胞 (F/CaMg/Mg) と、L-ficolin/MASP 複合体と共に IgG と反応させた細胞 (F,IgG/CaMg/Mg) ($P < 0.05$), および 副経路活性化前に IgG と反応させた細胞 (F/CaMg/IgG/Mg) ($P < 0.01$) との間に有意な相違があった (Student の t 検定)。

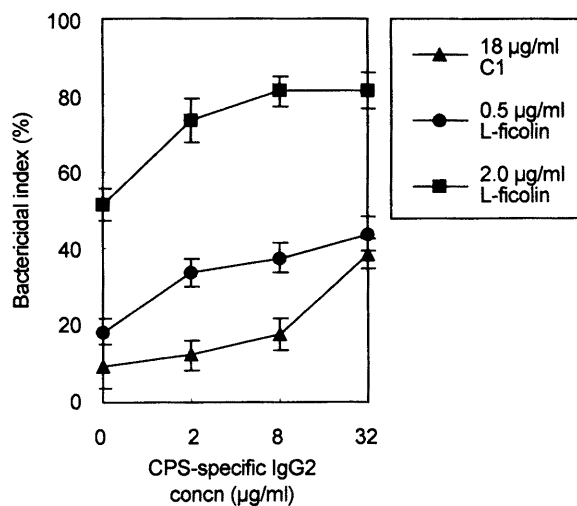


図 7. L-ficolin/MASP 複合体または抗体依存性の古典経路活によって開始される 874391 株のオプソニン貪食殺菌における CPS 特異 IgG2 の効果。細菌細胞を Ca^{++} の存在下で L-ficolin/MASP 複合体と 30 分間、 Ca^{++} と Mg^{++} の存在下で C1q/Ab 除去血清と 1 分間反応させた。次いで図に示す濃度の CPS 特異 IgG2 と 30 分間反応させた後、 Mg^{++} EGTA の存在下で Ab 吸収血清と 4 分間反応させた。抗体依存性の古典経路活性と比較するため、細胞を図に示す濃度の CPS 特異 IgG2 と 18 $\mu\text{g/ml}$ ヒト C1 と共に Ca^{++} の存在下で 30 分間反応させた。次いで Ca^{++} と Mg^{++} の存在下で C1q/Ab 除去血清と 1 分間反応させた後、 Mg^{++} /EGTA の存在下で Ab 吸収血清と 4 分間反応させた。成績は、3 回の実験の平均 $\pm$ SD である。

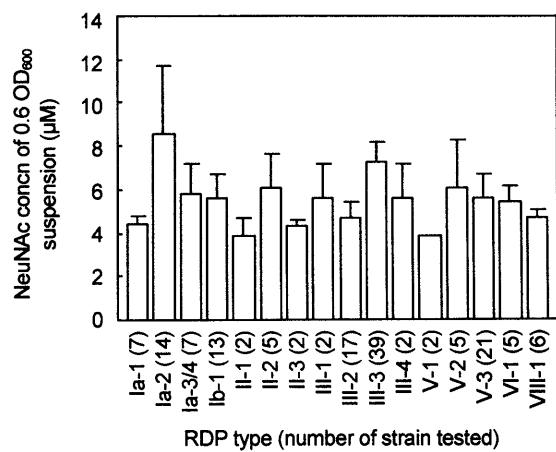


図 8. RDP 型毎の NeuNAc 含有量。NeuNAc は, 0.6 OD₆₀₀ 細菌懸濁液から 0.1 M HCl の存在下, 84°C で 20 分間加熱して抽出し, チオバルビツール酸法³⁴⁾ で測定した。成績は RDP 型毎の NeuNAc 含有量の平均±SD である。

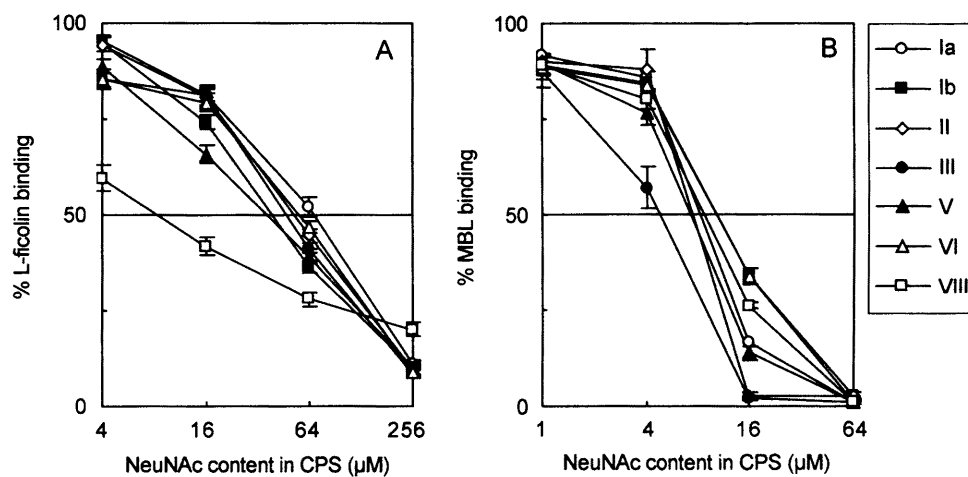


図 9. 固相化 GlcNAc への L-ficolin 結合 (A) および MBL 結合 (B) における型特異 CPS の阻害効果。L-ficolin/MASP 複合体あるいは MBL/MASP 複合体と図に示す濃度の精製 CPS (Ia, Ib, II, III, V, VI, VIII 型) を GlcNAc でコートしたウエル中で反応させた後, GlcNAc に結合した L-ficolin あるいは MBL を測定した。成績は 3 回の実験の平均 $\pm$ SD である。

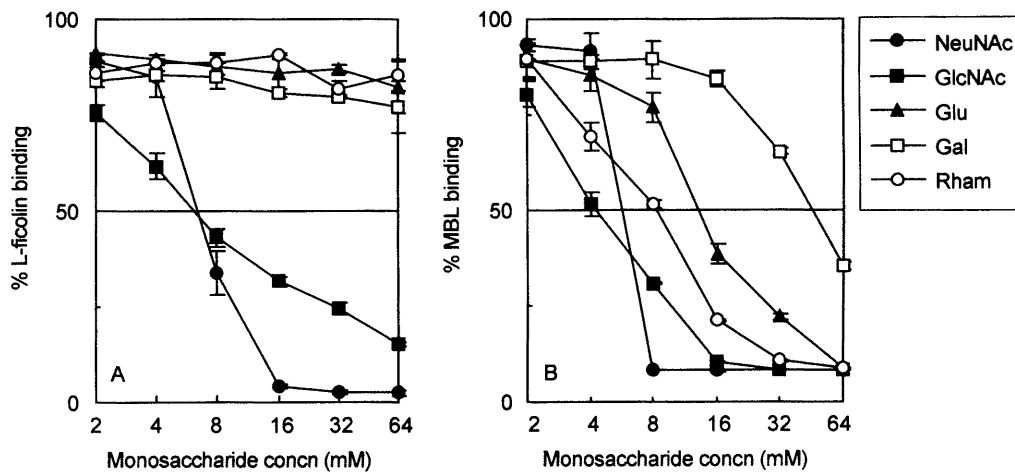


図 10. 固相化 GlcNAc への L-ficolin 結合 (A) および MBL 結合 (B) における型特異 CPS を構成している単糖の阻害効果。L-ficolin/MASP あるいは MBL/MASP 複合体と、図に示す濃度の単糖 (NeuNAc, GlcNAc, グルコース, ガラクトースおよびラムノース) を GlcNAc でコートしたウェル中で反応させた後, GlcNAc に結合した L-ficolin あるいは MBL を測定した。成績は 3 回の実験の平均 $\pm$ SD である。

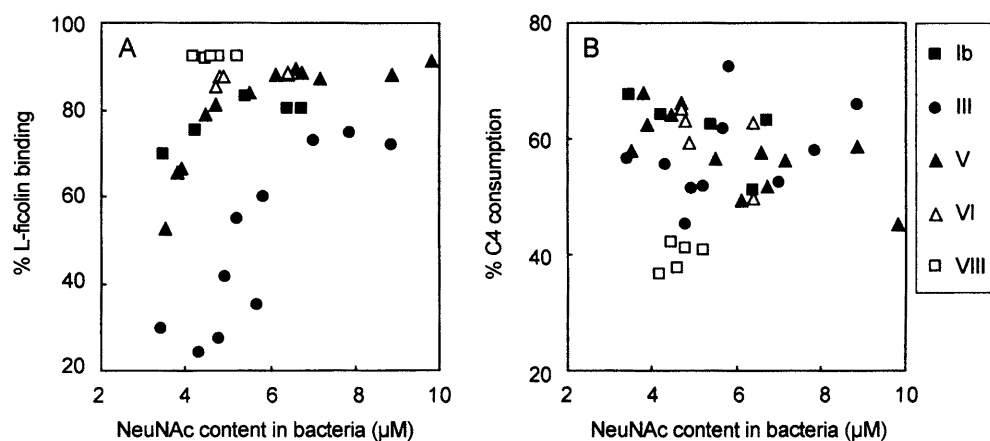


図 11. 細菌細胞への L-ficolin 結合量と NeuNAc 含有量の相関 (A) および細胞に結合した L-ficolin の C4 消費量と NeuNAc 含有量の相関 (B)。L-ficolin 結合量は、種々の量の CPS を保持する細菌細胞と血清を 37°C で 30 分間反応させた後、上清中に残存する量を測定して求めた。C4 消費量は、500 mM NaCl の存在下、4°C で一夜血清と反応させた細胞と精製 C4 を 37°C で 30 分間反応させた後、上清中に残存する量を測定して求めた。成績は 3 回の実験の平均である。

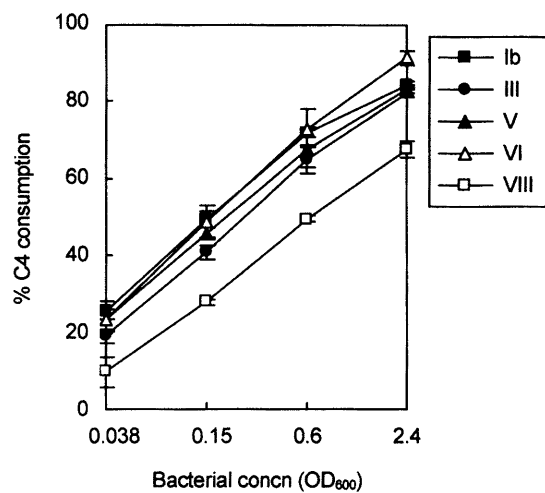


図 12. L-ficolin/MASP 複合体を結合した細菌細胞の C4 消費量。細菌細胞と血清を 500 mM NaCl の存在下、4°C で一夜反応させた。細胞を洗浄後、図に示す濃度に調製して精製 C4 と 37°C で 30 分間反応させた。C4 消費量は、上清中に残存する量を測定して求めた。成績は 3 回の実験の平均である。

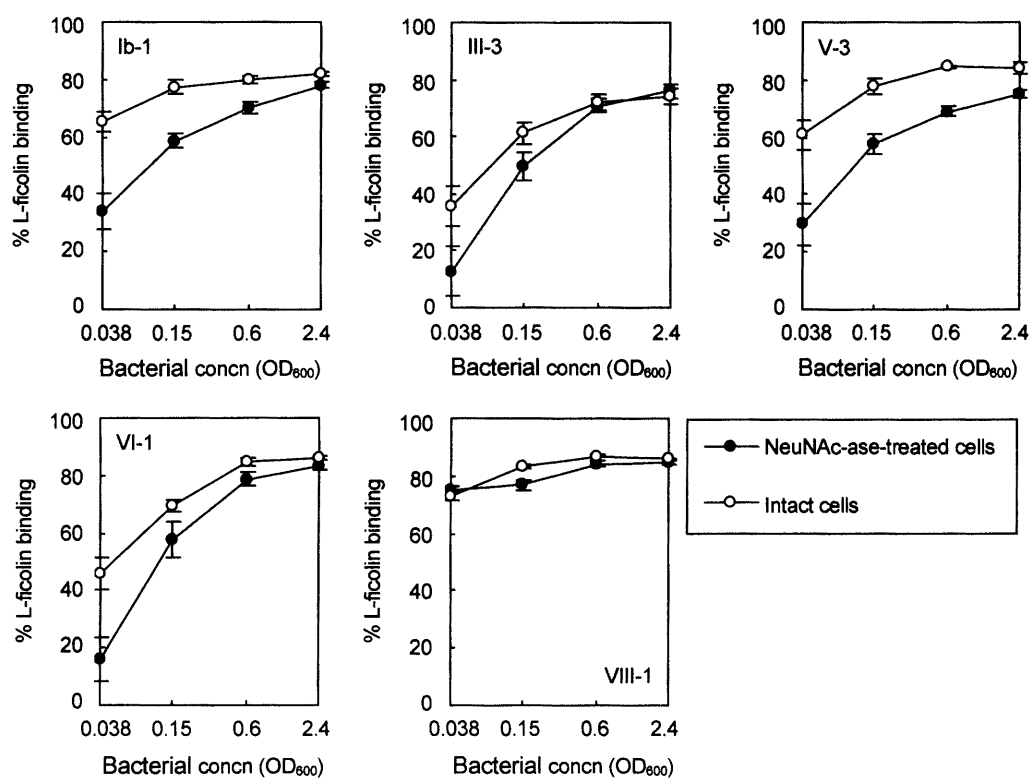


図 13. ノイラミニデース処理細胞および未処理細胞への L-ficolin の結合。細菌細胞をノイラミニデースと、あるいはノイラミニデースを加えずに 37℃で一夜反応させた。細胞を洗浄後、図に示す濃度に調製して血清と 37℃で 30 分間反応させた。L-ficolin 結合量は、上清中に残存する量を測定して求めた。成績は 3 回の実験の平均±SD である。

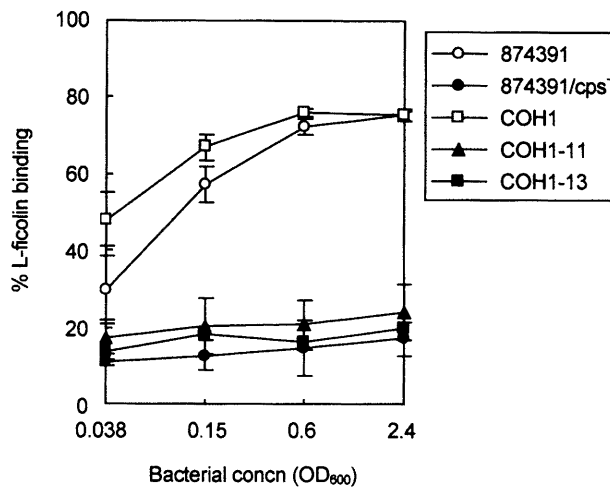


図 14. III 型 GBS 野生株 (874391 株, COH1 株), CPS 欠失変異体 (874391/cps- 株, COH1-13 株), NeuNAc 欠失変異体 (COH1-11 株) への L-ficolin の結合。L-ficolin 結合量は, 細菌細胞を図に示す濃度に調製して血清と 37℃で 30 分間反応させた後, 上清中に残存する量を測定して求めた。成績は 3 回の実験の平均±SD である。

表 1. 供試菌株⁶⁾

菌株	RDP 型	NeuNAc 含有量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 細胞乾燥重量)
874391/cps-	III-3	0
520086	III-3	2.6
872809	III-3	3.9
874391	III-3	5.6
i05	III-3	7.7

表 2. 試料と精製方法

試料	精製方法
<i>cps</i> ⁻ 相同変異株	<i>cps</i> ⁻ 短絡遺伝子を組込んだシャトルベクターpHY304 を野生株に形質転換し、細胞内で相同組換えを生じさせた。
型特異 CPS	培養上清からゲルろ過と陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。
CPS 特異 IgG2	免疫グロブリン製剤から CPS-Sepharose を用いてアフィニティ精製した。
L-ficolin/MASP 複合体	ヒト血清から GlcNAc-agarose と asialofetuin-Sepharose を用いてアフィニティ精製した。
C1q/Ab 除去血清と Ab 吸収血清	C1q は陽イオン交換クロマトグラフィーにより除去した。 特異 IgG は供試菌株を用い吸収除去した。

表 3. 供試相同変異体とその親株

菌株	表現型	文献
874391	wild type, RDP 型 III-3	6
874391/cps-	CPS ⁻	9
COH1	wild type, RDP 型 III-3	57
COH1-11	NeuNAc ⁻	46
COH1-13	CPS ⁻	58

表 4. 供試臨床由来株⁵⁰⁾

菌株	RDP 型	株数
Ia	Ia-1, Ia-2, Ia-3/4	9
Ib	Ib-1	5
II	II-1, II-2, II-3	6
III	III-1, III-2, III-3, III-4	14
V	V-1, V-2, V-3	12
VI	VI-1	5
VIII	VIII-1	5

表 5. 固相化 GlcNAc への L-ficolin と MBL の結合における型特異 CPS の I_{50}

型特異 CPS	L-ficolin		MBL	
	I_{50} (μ M)	I_{50} 比	I_{50} (μ M)	I_{50} 比
Ia	59	0.85	8.2	0.59
Ib	39	1.3	12	0.40
II	53	0.94	7.4	0.65
III	50	1	4.8	1
V	36	1.4	7.2	0.67
VI	53	0.94	11	0.44
VIII	8.4	6.0	8.7	0.55

表 6. 固相化 GlcNAc への L-ficolin と MBL の結合における単糖の I_{50}

糖	L-ficolin		MBL	
	I_{50} (mM)	I_{50} 比	I_{50} (mM)	I_{50} 比
NeuNAc	6.9	0.94	5.7	0.81
GlcNAc	6.5	1	4.6	1
Glucose	NI		13	0.35
Galactose	NI		46	0.10
Rhamnose	NI		8.3	0.55