

鏈球菌致熱外毒素 B 切割人類 S - adenosylhomocysteine 水解酶來誘導 Hypermethioninemia

許茹斐¹, 莊偉哲², 謝淑珠¹, 林以行^{3,6}, 劉清泉⁴, 王志傑², 傅子芳¹, 蔡瑞和¹, 蔡瑋倫¹, 黃玉君¹, 謝逸璇⁵, 吳俊忠¹, 林銘德⁷, 黃溫雅^{1,6*}

¹醫學檢驗生物技術學系; ²生化所; ³微生物學和免疫學; ⁴小兒科; ⁵基醫所; ⁶基因調控與信息傳導研究中心, 國立成功大學醫學院; ⁷慈濟大學醫學科學所

whuang@mail.ncku.edu.tw

Journal of Infectious Diseases, 2008, 198, 367-374

A型鏈球菌是一種常見的病原性細菌，會造成咽炎，膿胞病，肌炎，乃至致死率極高的鏈球菌中毒性休克綜合症。A 型鏈球菌的感染途徑主要為經由鼻，咽或皮膚來進入人體。A 型鏈球菌含有許多致病性毒素來促進其感染和傳播。鏈球菌致熱外毒素 B 是 A 型鏈球菌中最重要的外毒素，其存在與疾病的嚴重程度有密切相關。菌致熱外毒素 B 是一個半胱氨酸蛋白酶，經過催化降解後會自我成熟成一個具有活性的蛋白酶。它會切割並降解細胞外基質的 fibronectin 與 vitronectin，來增加細菌附著在宿主細胞的能力。菌致熱外毒素 B 除了可切割宿主的蛋白質外，它也可切割鏈球菌自己的蛋白。它可切割鏈球菌表面的免疫球蛋白結合蛋白，從而抑制宿主補體活化。它也可抑制宿主巨噬細胞的吞噬能力，使自己可存活下來。總之，藉由這些機轉，菌致熱外毒素 B 可使得宿主的免疫力降低且逃脫宿主的免疫監控。



同型半胱氨酸(homocysteine)生化週期對人體的免疫反應具有非常重要的影響，調控這個生化週期可有效地調節免疫反應。在這生化週期中的 S - adenosylhomocysteine 水解酶 (AdoHcyase) 就是目前免疫抑制治療上一個重要的標的。AdoHcyase 的受質 S - adenosylhomocysteine 的濃度與 B 淋巴細胞的活化有密切關係，因此藉由調控AdoHcyase 來減少其上游分子 S - adenosylhomocysteine 的累積可達到免疫抑制的效果。

在這項研究中，我們首先以酵母雙雜交篩選試驗來篩選會與 A 型鏈球菌致熱外毒素 B 結合的人類宿主蛋白，並探討其功能與 A 型鏈球菌的致病機轉的相關性。為了避免菌致熱外毒素 B 將其結合蛋白切割降解，且為了避免菌致熱外毒素 B 對宿主細胞潛在的毒性作用，我們使用不具酵素活性的菌致熱外毒素 B C192S 的突變蛋白來做實驗。我們發現，在酵母菌中 AdoHcyase 會與菌致熱外毒素 B 結合在一起。我們也進一步將重組的菌致熱外毒素 B 固定在瓊脂糖凝膠柱 4B 中，並通入 293T 人類細胞的蛋白萃取物，發現人體宿主細胞中的 AdoHcyase 可與瓊脂糖凝膠柱中的菌致熱外毒素 B 結合，表示在宿主體內菌致熱外毒素 B 可與 AdoHcyase 直接相互作用。

於是我們便推測 AdoHcyase 極有可能是菌致熱外毒素蛋白酶的受質。利用反轉錄酶聚合酶鏈鎖反應(RT-PCR)及西方點墨法(western blot)等分析，我們也發現 A 型鏈球菌野生型菌株 NZ131 的感染會造成宿主細胞中的 AdoHcyase mRNA 與蛋白質的量皆下降，然而菌致熱外毒素 B 突變株 SW510 就不會產生這樣的情形。此外，A 型鏈球菌野生型菌株 NZ131 也會進一步造成 AdoHcyase 活性下降，然菌致熱外毒素 B 突變株 SW510 則無此影響。這些實驗結果說明了菌致熱外毒素蛋白酶可將 AdoHcyase 切割降解，進而削弱其酵素活性。此外，我們以 A 型鏈球菌來感染小鼠做進一步的觀察。實驗結果顯示，經野生型 NZ131 株感染的小鼠血漿中，同型半胱氨酸的濃度明顯較感染菌致熱外毒素 B 突變株 SW510 的小鼠為低(P值低於 0.05) (圖1)，顯示菌致熱外毒素 B 造成 AdoHcyase 的活性下降，進而造成其受質 S - adenosylhomocysteine 與蛋氨酸(methionine)在細胞中累積。藉由串聯質譜分析，我們也發現這些小鼠血液中的蛋氨酸濃度的確較高。綜合以上實驗結果，說明了菌致熱外毒素 B 確實可抑制宿主細胞內 AdoHcyase 酵素的活性。

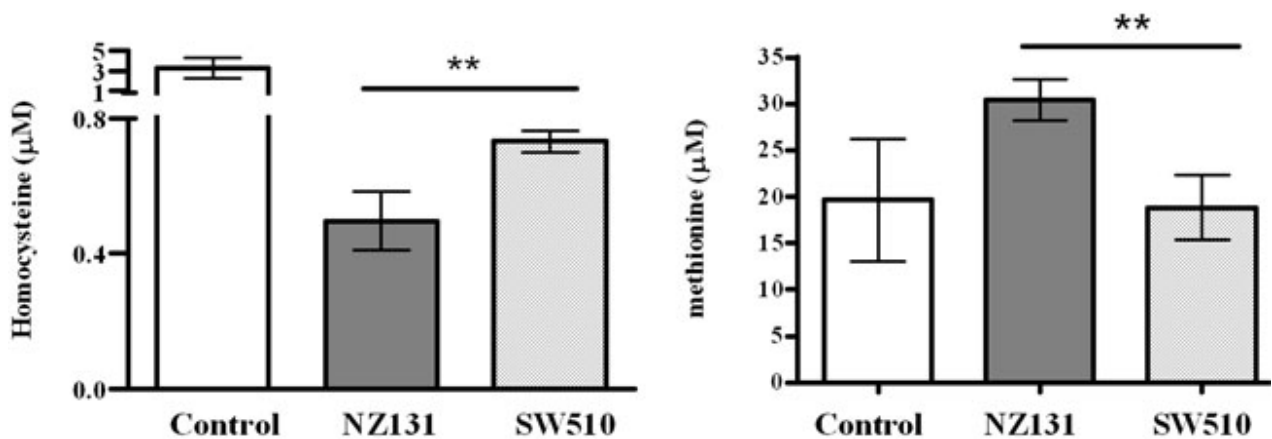


圖1、A型鏈球菌野生型菌株NZ131及菌致熱外毒素 B突變株SW510感染後血漿中同型半胱氨酸和蛋氨酸的濃度。

為了證明菌致熱外毒素 B 可直接將 AdoHcyase 酵素切割降解，我們接著將 AdoHcyase 蛋白在大腸桿菌中重組表現並加以純化。由圖二的結果可發現 AdoHcyase 在加入菌致熱外毒素 B 30 分鐘內就開始被降解，且隨著時間延長降解情形就更明顯。然而未加入菌致熱外毒素 B 的 AdoHcyase 蛋白則完全無降解反應而保持完整全長的狀態。這些實驗結果充分顯示，AdoHcyase 是菌致熱外毒素 B 的受質，被其切割降解。

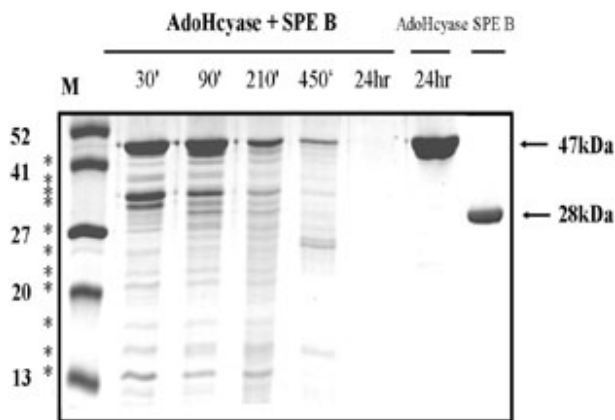


圖2、體外重組蛋白AdoHcyase被菌致熱外毒素 B切割降解的情形。AdoHcyase與菌致熱外毒素 B蛋白的原始大小分別為47與28kDa。左側標示的星狀符號為AdoHcyase被切割下來的產物。

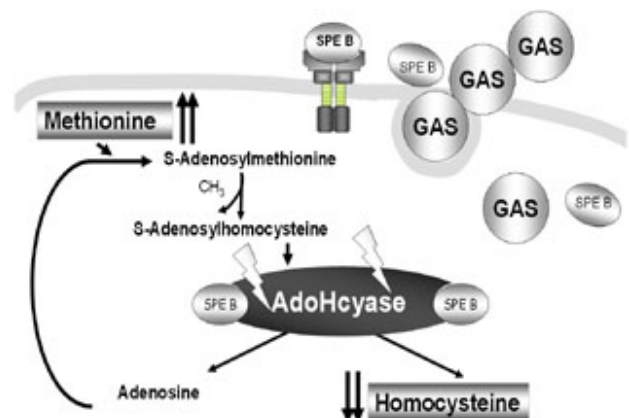


圖3、菌致熱外毒素 B對宿主細胞 AdoHcyase的影響。

綜合本研究以及先前研究的實驗結果，我們在此提出一個模型來闡述 A 型鏈球菌致熱外毒素 B 與宿主細胞 AdoHcyase 的關係（圖3）：菌致熱外毒素 B 可藉由宿主細胞表面的受體進入細胞或由入侵的A型鏈球菌分泌至宿主細胞內。在宿主細胞中，菌致熱外毒素 B 可直接與 AdoHcyase 結合並將其切割降解，破壞其活性。AdoHcyase 活性的喪失進一步造成同型半胱氨酸濃度降低，同時也造成 AdoHcyase 受質 S-adenosylhomocysteine 及其前趨物質蛋氨酸在細胞中的累積。

總結來說，在這項研究中，我們闡述了菌致熱外毒素 B 所造成的病原體宿主相互關係。我們發現，菌致熱外毒素 B 可與人類 AdoHcyase 酵素並將其切割降解，這個現象在體外細胞培養以及在動物體內的研究模式中都清楚地觀察到。AdoHcyase 是核酸合成不可或缺的一個重要酵素，也是免疫抑制治療的藥物標靶分子。因此，菌致熱外毒素 B 有可能藉由削弱 AdoHcyase 的活性來抑制宿主的免疫監視，促進細菌傳播。因此本研究的成果使我們更加了解菌致熱外毒素 B 如何來抑制宿主的免疫系統，也使我們對A型鏈球菌的致病機轉有更深一層的認識。