

原 著

A 群レンサ球菌の産生する発熱毒素 B の遺伝子クローニングと
組み換え蛋白 (recombinant SPE B/SCP) の発現に関する研究

渡邊ユキノ

日本医科大学老人病研究所免疫部門

Cloning of Group A Streptococcal Pyrogenic Exotoxin-B Gene and its Recombinant Protein
Expression in Culture Supernatant

Yukino Watanabe

Department of Immunology and Infectious Diseases, Institute of Gerontology, Nippon Medical School

Abstract

Streptococcal pyrogenic exotoxin B, a conserved cysteine protease (SPE B/SCP) released by group A *Streptococcus* (GAS) strains, is considered to be an important virulence factor of this bacterium. This paper reports the cloning of gene encoding SPE B/SCP. For production of recombinant SPE B/SCP (rSPE B/SCP), the primers specific for the SPE B/SCP gene (*spe b*) were designed based on its nucleotide sequence. Polymerase chain reaction (PCR) was performed with the genomic DNA of GAS strain NZ131 as a template. The amplified PCR products were purified and cloned into the pBluescript II SK⁺ plasmid vector. The vector was transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) JM109. The rSPE B/SCP and its recombinant proenzyme (rzym) were secreted in the culture supernate of the transformant. The rSPE B/SCP was purified from the supernatant by sequential chromatography on DEAE-Sepharose, matrix gel Red A and Sephadex G-50 columns. The purified rzym and rSPE B/SCP, respectively, gave a single band with a molecular weight approximately 40 kDa and 27 kDa on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and reacted with anti-SPE B/SCP antibodies in Western Blot analysis. This is the first report in which rSPE B/SCP was obtained from the culture supernate of the transformant. (J Nippon Med Sch 2001; 68: 222 - 232)

Key words : group A *streptococcus*, streptococcal pyrogenic exotoxin B, cysteine protease, molecular cloning, secreted recombinant protein

緒 言

A 群レンサ球菌【Group A *Streptococcus* (化膿レンサ球菌 , *Streptococcus pyogenes* , *S. pyogenes*) , GAS】によ

る感染はヒトに咽頭炎、扁桃炎などの上気道炎や膿瘍疹などの急性、限局性の化膿性炎を、あるいは猩紅熱などの毒素性疾病を引き起こし、また、かかる急性感染症後に、ときに急性糸球体腎炎やリウマチ熱などの続発症の起こることが知られ、さらに最近では劇症型 A 群レンサ球菌感染症として、敗血症性ショック症候群 (Streptococcal toxic shock syndrome , STSS) を惹起することが報告されている¹。このように GAS の感染は極めて多彩な病変を呈することが知られているが、その病態の成立機構は十分に明らかにされていない。

Correspondence to Yukino Watanabe, Department of Immunology and Infectious Diseases, Institute of Gerontology, Nippon Medical School, 1-396 Kosugi-cho, Nakahara-ku, Kawasaki, Kanagawa 211-8533, Japan
E-mail: wtnbykn-nms@umin.ac.jp
Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jnms/>)

よく知られているように, GAS は多くの菌体代謝物質を産生するが, このうち発熱毒素【Streptococcal pyrogenic exotoxin, SPE (発赤毒素, Erythrotoxic toxin と呼ばれる)】として知られる SPE A と SPE C にはスーパー抗原としての活性のあることが明らかにされ^{2,3}, また最近, SME-Z⁴, SPE-F⁵, SPE-H, SPE-G, SPE-J, SMEZ-2⁶ と呼称される多くのスーパー抗原が同定された。一方, 同様に SPE ではあるが, スーパー抗原活性を保有せず⁷, cysteine protease (Streptococcal cysteine protease, SCP) としての酵素活性をもつ SPE B (SPE B/SCP) は, fibronectin や vitronectin のような細胞外マトリックス蛋白を分解し⁸, IL-1 β 前駆体を活性型の IL-1 β に変換することが明らかにされている⁹。また, 血漿中の kininogen に働いて kinin を遊離することも報告された¹⁰。さらに, マウスの皮下ないしは腹腔に SPE B 産生株を投与することにより膿瘍が発現する一方で, この親株の保有する SPE B/SCP をコードする遺伝子 *spe b* を knock out した欠損株においては, その発現および致死作用が著しく低下すること¹¹ から, SPE B/SCP が virulence factor として, GAS の感染症ないしは STSS の成立の上で重要であることが示唆されている。

SPE B/SCP は多くの GAS で産生され, これをコードする *spe b* は染色体 DNA からクローニングされた¹²。*spe b* は 27 残基のシグナルペプチドを含む 398 アミノ酸残基からなる蛋白をコードし, 翻訳後にスプライシングされ, 371 アミノ酸残基からなる分子量 40,314 Da の zymogen として分泌されるとともに, 容易に autocatalytic に分解され, N 末端 118 アミノ酸残基が切断されて, 253 アミノ酸残基(分子量 27,580 Da) からなる mature な蛋白となって, SPE B/SCP としての活性を発揮する¹³。

この SPE B/SCP の GAS 感染症における意義をより明らかにする試みの中で, 大腸菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) に *spe b* を組み換え, 組み換え SPE B/SCP (recombinant SPE B/SCP, rSPE B/SCP) を作製する試みがなされてきた¹⁴⁻¹⁶。一般に *E. coli* 中で発現した組み換え蛋白は, 菌体 periplasm 内にしばしば不溶性の封入体として存在し, 組み換え蛋白を得るには菌体を超音波処理するか, あるいは Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) などで可溶化することにより抽出・精製することが多い。しかし, これらの方法では収量の点で満足すべきものではなく, 菌体由来の物質も多く含まれることから, 精製も容易ではない。rSPE B/SCP に関して, これまでの報告では rSPE B/SCP は菌体内で発現しており, したがって, 菌体を破碎することにより抽

出・精製が試みられてきた。このような方法で得られた rSPE B/SCP は収量の問題とともに, その理由は必ずしも明らかではないが, cysteine protease としての活性がしばしば認められないか, 認められるにしてもその活性は低く, 還元剤の添加によっても酵素活性の回復は十分でないことなどから, rSPE B/SCP を得るための発現系の構築に関しては, 検討すべき問題が残されていた。

今回, 私どもは rSPE B/SCP を得るために, プロモーター領域を含めた *spe b* をベクターに組み換え, *E. coli* に形質転換し誘導を試みた結果, 菌体培養上清中に cysteine protease 活性を有する rSPE B/SCP が産生されることを見出したので報告する。

研究材料および方法

(1) 使用菌株

SPE B 遺伝子 (*spe b*) 保有菌株として GAS, NZ 131 株を用いた。本菌株は培養することにより, その培養上清中に SPE B/SCP を産生することが確認されている。

(2) rSPE B/SCP 発現ベクターの構築

1) DNA の抽出

GAS, NZ131 株を 5% CO₂ 存在下で, 5 ml の Brain Heart Infusion Broth (日水製薬, 東京) で一晩静置培養した後, 8,500 × g で 10 分間遠心 (GS-15 R, Beckman Instrument Inc., Fuller-ton, CA) した。得られた菌体は 50 mM EDTA (pH 7.8) 溶液で洗浄後, 5 ml の 10 mM Tris-Maleate-4 mM MgCl₂-NaCl 緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し, N-acetyl muramidase SG (生化学工業, 東京) を終濃度が 20 U/ml となるように加え, 37 °C で 1 時間反応させた。反応終了後, sodium dodecyl sulfate (SDS, 和光純薬, 大阪) を終濃度が 1% になるように加えてプロトプラスト, あるいはスフェロプラストを破碎し, 染色体 DNA を遊離させた。この反応液に 10 mM Tris-1 mM EDTA (TE, pH 7.8) で平衡化した phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1 v/v/v %, TE-PCI) 溶液による除蛋白を行って水層を分取した。エタノール沈殿後 TE に再溶解し, これを粗 DNA 溶液とした。

2) Polymerase chain reaction (PCR) による *spe b* の特異的増幅反応: NZ131 株の保有する *spe b* は, Hauser らにより報告¹⁹された *spe b* の全塩基配列を参考にし, Musser らの方法²⁰ を改変してクローニングを行った。まず, SPEBF 0008: (-5' -3':GTGTCAACT-AACCGTGTATTG) ならびに SPEBR 1485: (-5'

-3':TGATCTGTGTCTGATGGATAGCTT)の2種類のプライマーを用いてPCRを行い、*spe b*を含む領域を特異的に増幅した。PCRはGeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems, Foster, CA)を用い、DNA変性を94℃, 30秒で、プライマーアニーリングを54℃, 30秒で、プライマー伸長反応を75℃, 90秒で行い、このサイクルを25回繰り返した。なお、DNA polymeraseとして*pyrobest* DNA polymerase (TaKaRa Biomedicals, 東京)を用いた。増幅後、得られたPCR産物を1% Agarose gelにて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV照射下でサイズの単一の増幅産物を確認した。

3) PCR増幅産物の発現ベクターへの組み換えと形質転換: PCR増幅産物は、低融点 agarose gel (Sea-plaque GTG agarose gel, FMC BioProducts, Rockland, ME)にて電気泳動後、切り出したゲルプラグをβ-agarase (FMC Bio Products)にて処理し、TE-PCI溶液により除蛋白を行い、精製PCR増幅産物とした。この増幅断片の5'末端をT4 polynucleotide kinase (TaKaRa Biomedicals)を用いてリン酸化し、pBluescript II SK⁺ plasmid vectorのSma Iサイトに導入した(Fig. 1)。なお、ライゲーションはT4 DNA Ligase (Promega Co. Madison, WI)を用いて、15℃で一晩反応させて行った。PCR増幅産物を導入したplasmid vectorに*E. coli* JM 109を加え、氷上で30分放置後、42℃で90秒の熱ショックを与えて形質転換した。形質転換後、直ちにSOC培地(2% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ · 7 H₂O, 20 mM glucose)を1 ml加え、200 rpmで振盪しながら37℃で1時間保温した。この菌液をアンピシリン (Sigma Chemical Co. St Louis, MO) 100 μg/ml, X-Gal (5-bromo-4-chloro-

3-indolyl-β-D-galactopyranoside, 和光純薬)100 μg/mlと0.5 mM IPTG (isopropyl-β-D (-)-thiogalactopyranoside, 和光純薬)を含む1.5% LB寒天培地(1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl, 0.1% glucose, pH 7.0)に塗布し、37℃で一晩培養し、形質転換体を得た。

(3) SPE-B/SCP 遺伝子変異の作製と発現

1) SPE-B/SCP 遺伝子変異の作製

cysteine proteaseとしての活性中心である192残基目のcysteineをserinに置換した点変異SPE B/SCP (mutant SPE B/SCP, mSPE B/SCP)を得るために、これをコードする遺伝子(*mspe b*)をMusserの方法²⁰を改変して、以下のように作製した。

前記した形質転換株からプラスミドをQiagen Plasmid Midi kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)を用いて精製し、これをテンプレートとしてPCRを行った。活性中心より上流方向へは、T3プライマーならびにMUTR 0743:(-5' -3': TAGCAACATTCCGTAGCTGC)を用い、活性中心より下流方向へはT7プライマーならびにMUTF 0726:(-5' -3': CTACAGGAAGTGTGCTACTGC)を用いた。PCRは94℃, 30秒のDNA変性、57℃, 15秒のプライマーアニーリング、72℃, 45秒のプライマー伸長反応を1サイクルとして25サイクル行った。なお、DNA polymeraseとして*Ex Taq* (TaKaRa Biomedicals)を用いた。

得られたPCR増幅産物を1% Agarose gel電気泳動を行って増幅産物を確認後、前記したと同様にβ-agaraseにてagaroseを消化し、PCR産物を抽出・精製した。これを各々10 ng混和し、採取後互いの共通領域をプライマーとしてプライマー伸長反応を行った。反応サイクルは*pyrobest* DNA polymerase (TaKaRa Biomedicals)を用いて、94℃, 30秒でのDNA変性後、

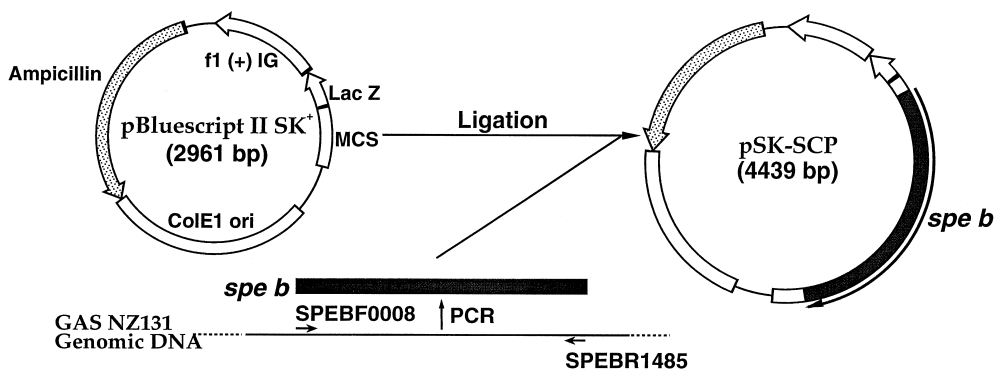


Fig. 1 Construction of SPE B/SCP expression vector. The expression vector is based on the *spe b* of GAS NZ131. The *spe b* was amplified by PCR from GAS NZ131 chromosomal DNA and cloned into the multiple-cloning site of pBluescript II SK⁺ to yield pSK-SCP.

49 , 90 秒でアニーリングを行い, 90 秒で 75 °C まで 1 / 4 秒の割合で温度を上げ, その後, 75 °C で 90 秒保持し, このサイクルを 15 回繰り返した. 反応終了後, この反応液を 1.0 μ l 採取し, これをテンプレートとして T3~T7 間での PCR を行い, 点変異を導入した *mspe b* を得た. 得られた *mspe b* は前記した方法にしたがい, アガロースゲル電気泳動後, ゲルを β -agarase で処理し, 除蛋白後, エタノール沈殿により精製し, 使用時まで -20 °C で保存した.

2) *mspe b* の発現ベクターへの組み換えと形質転換

得られた *mspe b* は *Bam* HI ならびに *Xho* I (TaKaRa Biomedicals) で二重消化し, これを pBluescript II SK⁺ プラスミドベクターの同消化サイトへ組み換えた. ライゲーションの方法ならびに実験条件は 2 項の 3) に準じて行った.

(4) rSPE B/SCP ならびに mSPE B/SCP の発現と精製

1) rSPE B/SCP ならびに mSPE B/SCP の発現誘導
rSPE B/SCP ならびに mSPE B/SCP は以下のように発現誘導を行った. すなわち, 完全長の *spe b* ないしは *mspe b* を含むプラスミドを保有する形質転換株をアンピシリン (100 μ g/ml) で培養し, その対数増殖期前期の菌体を得. 使用時まで 20% グリセロールを含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.8) 中で, -80 °C に保存した. 使用に際しては氷上でこれを融解し, 予め 37 °C に保温したアンピシリン (100 μ g/ml) を含む 1 l の LB 培地にこの菌体を接種し, OD 600 nm が 0.02 になるまで 37 °C , 200 rpm で振盪培養した. OD が 0.02 に達したら, 直ちに IPTG を最終濃度が 2 mM となるように加え, さらに一晩培養し, 発現誘導を試みた.

2) rSPE B/SCP ならびに mSPE B/SCP の精製

発現誘導後の培養液は 4 °C 下, 10,000 \times g で 15 分遠心 (Model RS-20 P , トミー精工 , 東京) し, 培養上清と沈渣に分けた. 上清には直ちに phenyl-methylsulphonyl fluoride (PMSF , Sigma Chemical Co.) を最終濃度が 1 mM になるように加え, 次いで 0.45 μ m のミリポアフィルター (Millipore Co. , Bedford , MA) を用いて濾過した. 得られた濾液に対し, 80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを加え, 4 °C で一晩攪拌し, その後遠心して沈渣を得た. 得られた沈渣を出発量の 1/20 vol. の 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で溶解し, 同緩衝液に対して 4 °C 下で透析した. 透析後, 内液 1 vol. に対し 4 vol. の冷蒸留水を加え, pH を 8.0 に調整後, 先の緩衝液で平衡化した DEAE-Sepharose CL 6B (Pharmacia Biotech , Uppsala , Sweden) を 1/20 vol. 添加し, 氷冷中で 30 分間攪拌しながら放置した. 次いで

ブフナー漏斗を用いて濾過して非吸着物質を採取し, さらに 0.45 μ m のフィルターで濾過後, Amicon PM10 (Amicon Co. , Lexington , MA) を用いて濃縮した. 培養液 4 l から最終的に約 200 ml の濃縮液を得た. この濃縮液を 20% のエタノールを含む 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) に対して透析後, 同緩衝液で平衡化した matrix gel Red A (Amicon Co.) カラム (1.5 \times 20 cm) に添加した²¹. 添加後, 吸光度 (OD 280 nm) がベースラインに達するまで同緩衝液でカラムを洗浄し, 次いで, 2 M NaCl を含む同緩衝液で, 流速 700 μ l/min で溶出を行った. 得られた各溶出画分の protease 活性 (後述) を測定し, 活性画分は Amicon PM10 で濃縮した後, その濃縮液を 0.1 M ammonium bicarbonate 緩衝液で平衡化した Sephadex G 50 (Pharmacia Biotech) カラム (1.5 \times 150 cm) に充填し, 同緩衝液で溶出した. 得られた各画分の protease 活性を測定し, また抗 SEP B/SCP 抗体との反応性は Western Blot 法 (後述) により検討した.

(5) Protease 活性の測定

すでに報告された Kuo C-F ら²² の方法を一部改変して測定した. 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で溶解した azocasein (2.7 mg/ml) (Sigma Chemical Co.) を 37 °C で予め温めておき, この溶液 75 μ l に 1 mM dithiothreitol (Sigma Chemical Co.) で活性化された検体 10 μ l を加え, 37 °C で 20 分間振盪しながら保温した. 反応終了後, 15% の冷 trichloroacetic acid (TCA) を 25 μ l 加え, 氷冷下で 15 分放置後遠心し, 上清 85 μ l に 0.5 M NaOH を 85 μ l 加え, 波長 450 nm で吸光度を測定した. 吸光度の測定には Microplate reader (Model 450 , BioRad Lab. , Richmond , CA.) を用いた. 一部の実験においては Hynes と Tagg の方法²³ を改変し, skim milk を用いた plate assay により protease 活性を測定した. また, E 64 [(L-3-carboxy-trans-2,3-epoxypropionyl-leucyl-amido-(4-guanidino)butane)] (Sigma Chemical Co.) ないしは Box-LVG-CHN₂ (N-t-butoxycarbonyl-leucyl-valyl-glycyl diazomethyl ketone , Enzyme System Products, Livermore , CA) を用いた protease 活性の阻害実験では, 活性化された検体に種々の濃度の阻害剤を添加後, 同様に酵素活性を測定した. なお, 検体の蛋白量は Lowry らの方法²⁴ により測定した.

(6) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Laemmli の方法²⁵ に準拠し, 5% spacer gel , 10% separating gel を用い, 不連続 Tris 緩衝液中, 40 mA の定電流で得られた検体を 2 時間泳動した. 分子量

マーカーとして、Prestained protein marker (Broad range, New England Biolabs Inc., Beverly, MA)を用いた。検体は sample buffer [2 w/v% SDS, 2 v/v% 2-mercaptoethanol, 30 v/v% glycerol, 0.01 w/v% bromophenolblue]と等量混合し、100 μl, 2分間加熱後、spacer gel上に添加した。泳動終了後、ゲルを0.2% Commassie Brilliant Blue-R (Sigma Chemical Co.)で染色し、次いで、10% methanol-7% acetic acidで脱色し、出現するバンドを観察した。

(7) Western Blot 法

Towbinらの方法²⁶により SDS-PAGE で分離したペプチド画分を1Aで1時間 nitrocellulose 膜 (SSBA 85; Scheicher & Schuell Co., Dassel, Germany)に転写した。転写後、nitrocellulose 膜は Block Ace™ (大日本製薬, 大阪)と一晩反応させ、次いで、Blocking buffer [0.5% Tween 20 (和光純薬), 0.5 M NaCl, 10 mM Tris (pH 8.2) 0.2% sodium azide (和光純薬)]にて洗浄後、ウサギ抗 SPE B/SCP IgG 抗体²⁷と室温、1時間反応させた後、アルカリホスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギ IgG 抗体 (Cappel Lab., Cochranville, PA)と反応させ、すでに報告した方法²⁸にしたがい発色した。

(8) N-末端アミノ酸配列の検討

SDS-PAGEを行った後に、ペプチド画分を polyvinylidene difluoride 膜 (PVDF, Millipore Co. Bedford, MA)に転写した。プロット用緩衝液には 25 mM Tris-40 mM ε-amino capronic acid-20% methanolを用いた。転写後、25 mM NaCl-20 mM boric acid 緩衝液 (pH 8.0)にて洗浄し、蒸留水で更に洗浄した PVDF 膜は染色液 [0.6 g amidoblack (Sigma Chemical Co.) 250 ml methanol-100 ml acetic acid に蒸留水を加えて、総量 600 ml とする]で5分間染色した。その後、90% methanolで脱色し、蒸留水で洗浄後、乾燥した。染色されたバンドを切り出し、Automated gas phase amino acid sequencer (島津製作所, 京都)を用いて、アミノ酸配列を検討した。

結 果

1. NZ131 株由来 *spe b* の全塩基配列の解析

NZ131 株より抽出した染色体 DNA をテンプレートに、SPEBF0008 および SPEBR1485 をプライマーとして PCR を行い、単一の特異的増幅断片を得た。この増幅断片を pBluescript II SK⁺ プラスミドベクターに組み換え、*E. coli* JM109 に形質転換し、*spe b* 保有 *E. coli* を得た (Fig. 1)。この *E. coli* が保有するプラスミド (pSK-SCP) の塩基配列の解析を行った。その結果、

pSK-SCP 中に 1,194 bp よりなる ORF を含む、全長 1,479 bp の挿入配列が見出された (Fig. 2)。

この塩基配列の結果を Hauser らの報告¹⁹した 86-858 株の保有する *spe b* の塩基配列と比較した (GenBank accession no. M86905) とすると、ORF 内に 6 塩基の置換、ストップコドン以降の非コード領域に 2 塩基の挿入および 1 塩基の欠失が認められたが、スタートコドン以前の領域には変異は見出されなかった。なお、今回クローニングされた NZ131 株由来の *spe b* は、GenBank に accession no. A051298 として登録された。

2. NZ131 株由来 *spe b* と既知の *spe b* (86-858 株) との ORF の比較

NZ131 株由来の ORF より予測されるアミノ酸一次構造と、既知の 86-858 株の保有するそれとを比較した結果を Fig. 3 に示した。いずれの ORF も 398 残基のアミノ酸をコードしており、similarity 100%, identity 99.2% であった。また、SPE B/SCP の活性中心と考えられている 192 番目のアミノ酸残基である cysteine も保存されていた。

3. rSPE B/SCP, mSPE B/SCP の精製と N 末端アミノ酸配列

spe b あるいは *mspe b* を保有する *E. coli* を培養し、培養上清に硫酸アンモニウムを添加し、得られた沈降物を出発材料にして精製を試みた。この沈降物を Tris 緩衝液で溶解後、DEAE-Sepharose を用いて、非吸着物質を採取後濃縮し、matrix gel Red A を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより protease 活性画分を得、この画分をさらに Sephadex-G50 でゲル濾過した。このゲル濾過による溶出パターンと各溶出画分の protease 活性を Fig. 4 に示した。SDS-PAGE の泳動パターンから F-1 の分子量は約 40 kDa、F-2 は約 27 kDa を示し、F-1 には protease 活性はほとんど認められなかったが、F-2 には強い活性が認められた。さらに SDS-PAGE 後、抗 SPE B/SCP 抗体を用いて Western blot を行ったところ、Fig. 5 に示したように分子量約 40 kDa に相当するバンドと約 27 kDa に相当するバンドが検出された。なお、SPE B/SCP 産生株、NZ131 を培養後、その培養上清から同様な方法で精製された天然型 SPE B/SCP (nSPE B/SCP) も同様に反応した。

次いで、F-1 と F-2 を SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、amidoblack 液で染色した後、その染色バンドを切り出し、オートシーケンサーにより N-末端アミノ酸

```

-35                               -10
GTGTCAACTAACCGTGTATTGTTCTATTACCATTCATGGTATCAGCGACATCGTATGATA 60
ACCATACGATTTCAGCTAAGTAAGGAGGTGTGTCCAATGTACCGTTAAAAGCAAAATGCAGT 120
AGATTAACCTATTATTTGAAAGAGGTATAAAAAAATGAATAAAAAGAAATTAGGTATCAGA 180
                                     S.D.
                                     M N K K K L G I R
TTATTAAGTCTTTTAGCATTAGGTGGATTGTTCTTGTCTAACCCAGTATTTGCCGATCAA 240
L L S L L A L G G F V L A N P V F A D Q
A A C T T T G C T C G T A A C G A A A A G A G C A C A G A T A G C G C T A T C A C A T T T A T C C A A A A A T C A 300
N F A R N E K E A Q D S A I T F I Q K S
GCAGCTATCAAAGCAGGTGCACGAAGCGCAGAAGATATTAAAGCTTGACAAAGTTAACTTA 360
A A I K A G A R S A E D I K L D K V N L
GGTGGAGAACCTTTCTGGCTCTAATATGTATGTTTACAATATTTCTACTGGAGGATTTGTT 420
G G E L S G S N M Y V Y N I S T G G F V
ATCGTTTCAGGAGATAAAGCTTCTCCAGAAATCTTAGGATACTCTACCAGCGGATCAATT 480
I V S G D K R S P E I L G Y S T S G S F
GACGTTAACCGTAAAGAAAACATTTGCTTCCTTCATGGAAAGTTATGTCGAACAATCAAA 540
D V N G K E N I A S F M E S Y V E Q I K
GAAAACAAAATTAGACTACTTATGCTGGTACCCTGAGATTAACAACCAGTTGTT 600
E N K K L D T T Y A G T A E I K Q P V V
AAATCTCTCCTGTATCAAAGGCATTCATTACAATCAAGGTAACCCCTACAACCTATTG 660
K S L L D S K G I H Y N Q G N P Y N L L
ACACCTGTTATTGAAAAGTAAAACCAGGTGAACAATCTTTTGTAGGTCAACATGCAGCT 720
T P V I E K V K P G E Q S F V G Q H A A
ACAGGATGTGTTGCTACTGCAACTGCTCAAAATATGAAATATCATAATTACCCTAACAAA 780
T G C V A T A T A Q I M K Y H N Y P N K
GGTTGAAAGACTACACTTACACACTAAGCTCAATAACCCATATTTCAACCATCTAAG 840
G L K D Y T Y T L S S N N P Y F N H P K
A A C T T G T T G C A G C T A T C T C T A C T A G A C A A T A C A A C T G G A A C A C A T C C T A C T A C T T A T 900
N L F A A I S T R Q Y N W N N I L P T Y
AGCGGAGAGAAATCTAACGTTCAAAAAATGGCGATTTTCAGAATTTGATGGCTGATGTTGGT 960
S G R E S N V Q K M A I S E L M A D V G
A T T C A G T A G A C A T G G A T T A T G G T C C A T C T A G T G G T T C T G C A G G T A G C T C T C G T G T C A A 1020
I S V D M D Y G P S S G S A G S S R V Q
AGAGCCTTGAAGAAAACCTTTGGCTACAACCAATCTGTTCCCAAATCAACCGTAGTGAC 1080
R A L K E N F G Y N Q S V H Q I N R S D
TTTAGCAACAAAGATTGGGAATCACAAATGACAAAGAAATATCTCAAACCAACAGTA 1140
F S K Q D W E S Q I D K E L S Q N Q P V
TACTACCAAGGTTCGCGTAAAGTAGCGGACATGCCCTTTGTTATCGATGGTGTGACGGA 1200
Y Y Q G V G K V G G H A F V I D G A D G
CGTAACCTTCTACCATGTTAACTGGGGTGGGGTGGAGTCTCTGACCGCTTCTTCCGCTCT 1260
R N F Y H V N W G W G G V S D G F F R L
GACGCACTAAACCTTCAGCTCTTGGTACTGGTGGCGCGCAGCGGCTTCAACGGTTAC 1320
D A L N P S A L G T G G G A G G F N G Y
CAAAGTGTGTTGAGGATCAAACTTAGTATGGAATGCATTTGTTAGAACAGAACC 1380
Q S A V V G I K P *
TGAGGCACGCCGATAGCTGAAACCTTTTGTGCCGAAACACACAAAACAAACCCCTAT 1440
GCGCGTGACGAGTTAAGCTATCCATCAGACACAGATCA 1479
    
```

Fig. 2 Nucleotide and its deduced amino acid sequence of *spe b* and SPE B/SCP. A 1,479 bp of inserted fragment including 1,194 bp of open reading frame was analyzed. Possible promotor (-10 and -35) and Shine-Dalgarno(S.D.) sequences are indicated. (GenBank accession no. A051298)

```

NZ131 1' MNKKKLGIRLLSLLALGGFVLANPVFADQNFARNEKEAQDSAITFIQKSAAIKAGARSAE
*****
86-858 1" MNKKKLGIRLLSLLALGGFVLANPVFADQNFARNEKEAKDSAITFIQKSAAIKAGARSAE
61' DIKLDKVNLLGGELSGSNMYYVNIISTGGFVIVSGDKRSPPELLGYSTSGSFDVNGKENIASF
*****
61" DIKLDKVNLLGGELSGSNMYYVNIISTGGFVIVSGDKRSPPELLGYSTSGSFDANGKENIASF
↓
121' MESYVEQIKENKKLDTTYAGTAEIKQPVVKSLLDSKGIHYNQGNPYNLLTPVIEKVKPGE
*****
121" MESYVEQIKENKKLDTTYAGTAEIKQPVVKSLLDSKGIHYNQGNPYNLLTPVIEKVKPGE
181' QSFVQHAATGQVATATAQIMKYHNPYFNHPKNLFAAISTRQY
*****
181" QSFVQHAATGQVATATAQIMKYHNPYFNHPKNLFAAISTRQY
241' NWNINLPTYSGRESNVQKMAISELMADVGISVDMYGPSSGASGSSRVQRALKENFGYNQ
*****
241" NWNINLPTYSGRESNVQKMAISELMADVGISVDMYGPSSGASGSSRVQRALKENFGYNQ
301' SVHQINRSDFSKQDWESQIDKELSONQPVVYQGVGKVGGHAFVIDGADGRNFYHVNWGWG
*****
301" SVHQINRSDFSKQDWEAQIDKELSONQPVVYQGVGKVGGHAFVIDGADGRNFYHVNWGWG
361' GVSDGFFRLDALNPSALGTGGGAGGFNGYQSAVVGIKP
*****
361" GVSDGFFRLDALNPSALGTGGGAGGFNGYQSAVVGIKP
    
```

Fig. 3 Amino acid sequence similarity between rSPE B/SCP and SPE B. The sequences of *spe b* is that reported by Hauser et al(19) using FASTA search method. Matched amino acid (*) and similar amino acid(.)were indicated. The probable cleavage sites of the signal peptide () and zymogen(↓) are indicated. The N-terminal sequences of rzym (.....) and rSPE B/SCP (—) were indicated. Box is indicated the active site of SPE B/SCP as cysteine protease.

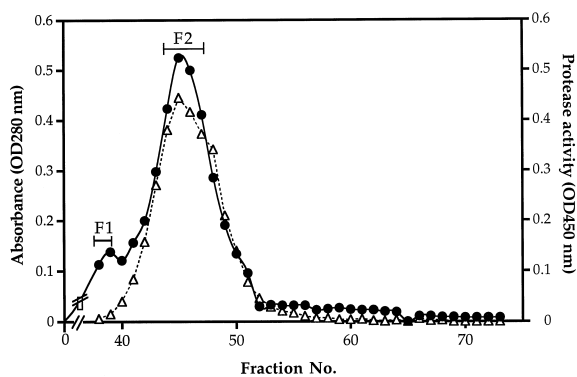


Fig. 4 Elution profile and protease activity of the fraction on Sephadex-G50. The Culture filtrate was brought to 80% saturation with ammonium sulfate. After centrifugation, the pellet was dissolved in a small volume of 20 mM Tris buffer, pH 8.0 and dialyzed against the same solution. Dialysed solution was diluted 4-fold with distilled water and incubated with DEAE-Sepharose at pH 8.0. The DEAE-unbind fraction was collected by filtration and concentrated using PM10 membrane. Concentrated solution was applied to a matrix gel Red A column, eluted with 20 mM Tris buffer-20% ethanol. The fractions containing protease activity were collected, applied to a column of Sephadex-G50 gel, and then eluted with 0.1 M ammonium bicarbonate. Fractions were monitored for absorption at 280 nm () and protease activity ()

配列を検討した。その結果、分子量 40 kDa を示す組み換え蛋白の N-末端 10 残基のアミノ酸配列は H-DQ-NFARNEKE であり、zymogen の塩基配列 (Fig. 3) より推定されるアミノ酸配列のそれに一致し、一方、分子量約 27 kDa を示す組み換え蛋白の N-末端 15 残基のアミノ酸配列は H-QPVVKSLLDSKGIHY で、protease 活性を保有する活性型の SPE B/SCP のそれに一致すると共に、塩基配列 (Fig. 3) から推定されたアミノ酸配列と同一であった。したがって、形質転換体 *E. coli* の培養上清から得られた分子量約 27 kDa の蛋白は protease 活性を持つ (Fig. 4) rSPE B/SCP であり、分子量約 40 kDa の zymogen が autocatalytic に分解されたものと考えられた。なお、収量は、nSPE B/SCP は培養 1 l 当たり 4~5 mg、rSPE B/SCP は 6~9 mg であった。

4. rSPE B/SCP に対する protease 阻害剤の影響

cysteine protease 特異的阻害剤である E 64 ないしは Box-LVG-CHN₂ が、rSPE B/SCP の azocasein に対する酵素活性を阻害するか否かを検討した。Fig. 6

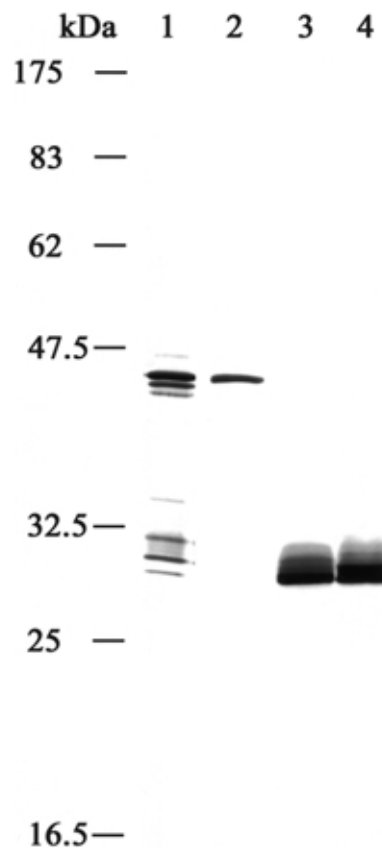


Fig. 5 Western blot analysis of SPE B/SCP. Zymogen and SPE B/SCP were subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with rabbit anti-SPE B/SCP antibody. Lane 1; native zymogen, lane 2; rzym, lane 3; nSPE B/SCP, and lane 4; rSPE B/SCP. Arrows indicate the molecular weight marker.

に示したように E 64 ならびに Box-LVG-CHN₂ はいずれも濃度依存的に rSPE B/SCP の活性を阻害し、特に E64 が Box-LVG-CHN₂ に比して低濃度で阻害効果を示した。また、Fig. 7 には casein 分解能を plate assay にて検出した結果を示す。skim milk を含む agar plate に設けられた well に rSPE B/SCP を添加すると、rSPE B/SCP は skim milk 中に含まれる casein を分解することにより、well 周辺部に明確な透明帯が形成される (Fig. 7 A 1, B 1)、阻害剤の添加によりその透明帯の形成が阻害される (Fig. 7 A 2, 3, B 2, 3) ことが観察された。

考 察

GAS による感染は、ヒトに咽頭炎や膿痂疹などの急性、局所性の化膿性炎を引き起こし、また猩紅熱のような毒素性疾患やリウマチ熱ないしは糸球体腎炎のよ

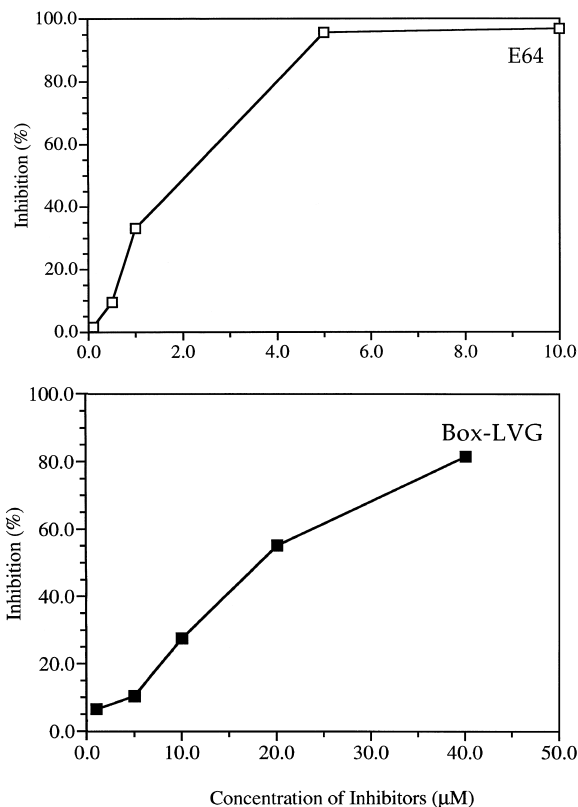


Fig. 6 Effect of E 64 and Box-LVG-CHN₂ on protease activity of nSPE B/SCP and rSPE B/SCP. Ten μl of each SPE B/SCP were incubated with the 1 mM DTT at 37 °C for 25 min. After that, 75 μl of azocasein (2.7 mg/ml) were added to the activated SPE B/SCP solution containing E 64 or Box-LVG-CHN₂. The final concentrations (μM) of each inhibitors were shown. All protease assays were conducted at least in triplicate. E64; 0.1 μM: 2.6 ± 1.0%, 0.5 μM: 9.5 ± 1.6%, 5.0 μM: 95.7 ± 1.3%, 10.0 μM: 96.9 ± 0.4% and Box-LVG-CHN₂; 1 μM: 6.6 ± 2.4%, 5.0 μM: 10.5 ± 2.3%, 10.0 μM: 27.6 ± 2.4%, 20 μM: 55.2 ± 0.8%, 40 μM: 81.6 ± 0.4%.

うな続発症を惹起し、時に毒素性ショック症候群を起こすことが知られ、他のグラム陽性球菌感染症では認め難い、極めて多彩な病態を呈する。この GAS 感染を基盤として出現する病態の成立を明らかにすべく、その発現に関わる菌側の因子に関する研究が今日まで数多くなされてきたが、その因子は未だ十分には明らかにされていない。私どもは猩紅熱の原因毒素の一つと考えられている SPE B/SCP の GAS 感染症における意義を明らかにすることを目的とした基礎的研究の一環として、今回は、遺伝子組み換えによって SEP B/SCP (rSPE B/SCP) を cysteine protease としての酵素活性を保持し、かつ大量に発現させる系の確立を目的とした。

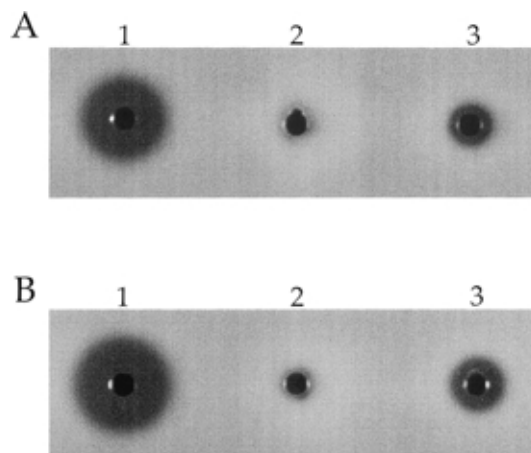


Fig. 7 Effect of protease inhibitors (E64; 5.0 μM and Box-LVG-CHN₂) to each of SPE B/SCPs on a agar plate containing skim milk. Ten μl of rSPE B/SCP and inhibitor (E64; 5.0 μM and Box-LVG-CHN₂; 40 μM) were poured in wells (7 mm) of agar containing 1.5%. The plates were incubated overnight at 37 °C. All SPE B/SCP were activated with 1 mM DTT. A; 1: nSPE B/SCP, 2: nSPE B/SCP and E64 (5.0 μM) 3: nSPE B/SCP and Box-LVG-CHN₂ (40 μM), B; 1: rSPE B/SCP, 2: rSPE B/SCP and E64 (5.0 μM), 3: rSPE B/SCP and Box-LVG-CHN₂ (40 μM)

これまでに報告された rSPE B/SCP の誘導、産生に関する研究¹⁴⁻¹⁸では、rSPE B/SCP は *E. coli* 内では不溶性の封入体として発現しているので、これから効率よく rSPE B/SCP の精製標品を得ることは必ずしも容易ではなく、また、理由は明らかでないが、得られた rSPE B/SCP の cysteine protease としての酵素活性も十分ではなく、rSPE B/SCP 自体を単独で用いた研究はほとんど見あたらないように思われる。

実際には SPE B/SCP は GAS 菌体から分泌型として菌体外に産生している。このことから、本実験では分泌に関わる遺伝子群であるプロモーター領域、Shine-Dalgarno 配列およびシグナル配列領域を、すべてベクターに組み換えるため、すでに報告されている *spe b* およびその周辺領域の塩基配列から各領域を予測、ないしは決定し、全領域を含んだ PCR 産物を得た。これをベクターに組み換えて *E. coli* に形質転換し、発現を試みた。その結果、培養液中に分子量約 40 kDa と約 27 kDa を示す蛋白が分泌されていることが認められた。これら 2 種類の蛋白の N-末端アミノ酸配列を検討すると、約 40 kDa を示す蛋白は *spe b* のシグナルペプチドが開裂した zymogen と一致し、約 27 kDa を示した蛋白は天然型 SPE B/SCP (nSPE B/SCP) の N-末端アミノ酸配列と一致した。したがって、発現し

た蛋白は組み換え型 SPE B/SCP, すなわち rSPE B/SCP であることが明らかとなった。そして精製された rSPE B/SCP は cysteine protease 活性を保有し, その活性は nSPE B/SCP と同様に, protease 特異的阻害剤である E64 および Box-LVG-CHN₂ により濃度依存的に阻害された。また, 結果には示していないが, cysteine 残基を serine に置換した mSPE B/SCP には酵素活性が認められなかったことから, 得られた rSPE B/SCP 標品はこれまでに報告された nSPE B/SCP と同様に, protease としての活性中心は cysteine 残基にあることが示唆された。

今回の実験において発現系を構築する際, ベクターには GAS が本来所有しているシグナルペプチド領域を含んだオープンリーディングフレーム (ORF) とともに, 予想されるプロモーター領域, および Shine-Dalgarno 配列を含めた領域を挿入した。ベクター由来のプロモーターが利用された場合, 予想される翻訳産物は β -galactosidase との融合タンパク質となり, 翻訳産物の N-末端アミノ酸配列は zymogen, あるいは nSPE B/SCP のそれとは異なると思われる。また, リーディングフレームについても, フレームシフトが生じているため, ストップコドンが挿入配列のごく初期に現れることが予想される。今回得られた組み換え体の N-末端アミノ酸配列の解析結果では, Western Blot において認められた約 40 kDa および 27 kDa の翻訳産物は, いずれも β -galactosidase 由来のアミノ酸配列ではなく, zymogen および nSPE B/SCP の N-末端アミノ酸配列に一致したことから, ベクター内で GAS 由来のプロモーターが zymogen への転写翻訳に利用され, GAS 内での発現と基本的には同一の発現系が *E. coli* 内で再現され, 活性を保持した状態で分泌を誘導したものと考えられる。

Bohach ら¹² は, GAS DNA の *spe b* のマッピングを行い, *Bam* HI-*Bgl* II の 4.5 Kbp フラグメント上に *spe b* がコードされていることを報告した。その後, Hauser ら¹⁹ は *spe b* 周辺のさらに詳細な制限酵素地図を作成し, *spe b* が約 2.4 Kbp の *Bam* HI-*Kpn* I フラグメント上にコードされていることを報告した。さらに, プロモーター領域 (-35, -10 領域) と Shine-Dalgarno 配列の両方を予測し, -35 領域と予測された配列より組み換えを行い, 菌体内に SPE B/SCP が発現したことを報告している。しかし, 今回私どもの予測したプロモーター領域は Hauser ら¹⁹ の報告したそれとは異なる領域であり, 組み換えにおいては Hauser らの予測した -35 領域¹⁹ を欠失したものをを用いた結果, SPE B/SCP は菌体外に cysteine protease としての活性を持った分泌

型として産生されたのではないかと考えられた。このことはまた, 実際に -35 領域が Hauser らの予測したそれとは異なるものであることを示唆している。

一般に SPE B/SCP は重篤な GAS 感染症を起こす分離菌株の 75% から検出されるが, *spe b* は全ての GAS が保有している^{8,20}。SPE B/SCP は宿主の細胞外マトリックス蛋白である fibronectin や vitronectin を分解し⁸, IL-1 β 前駆体を活性型 IL-1 β に変換することが知られている⁹。また, ヒト単球細胞株, U 937 株に作用して apoptosis を誘導し²⁹, 血漿中の kininogen に働いて kinin を遊離する¹⁰ とともに, 好塩基球やマスト細胞に作用して, histamine を遊離することなどが報告³⁰ されている。しかしこれらの実験に使用された SPE B/SCP はほとんど培養上清から精製された nSPE B/SCP 標品であり, 培養上清中に存在する他の成分の混在は必ずしも否定できないものと思われる。事実, 精製された nSPE B/SCP にスーパー抗原活性があることが報告された⁷ が, その後, この標品には極く微量の SPE A が混在し, その活性は SPE A に基づくことが明らかにされた⁷。また, *in vivo* での生菌を用いた感染実験では, SPE B/SCP 産生株と *spe b* をトランスポゾンを用いて knock out した SPE B/SCP 非産生株 (mutant 株) を用いて, SPE B/SCP の意義が検討されている^{31,32}。しかし, トランスポゾンを用いた knock out では, *spe b* を含むオペロンにコードされた遺伝子全体に発現ないしは翻訳レベルでの変化が起こる可能性も否定できず, この実験結果が SPE B/SCP の不活化だけを反映しているとは必ずしも言い切れない可能性がある。

このように, これまでの報告では nSPE B/SCP が主に用いられ, rSPE B/SCP それ自体を用いた実験はほとんどなされていない。今回, 私どもは *E. coli* から分泌型として, 酵素活性を保持した状態で, あるいは DTT の添加により活性型の rSPE B/SCP を得ることに成功したので, 今後得られた rSPE B/SCP を用いて, スーパー抗原活性の再検討をはじめとして, 私どもによって明らかにされた nSPE B/SCP によるマスト細胞や好塩基球からのヒスタミン遊離機構の再検討とともに, GAS 感染症における SPE B/SCP の役割を明らかにしていきたい。

結 論

GAS 感染症における SPE B/SCP の意義を検討する研究の一環として, 組み換え体 SPE B/SCP の発現, 誘導に関し検討した。その結果, *E. coli* から cysteine pro-

tease としての酵素活性を持った rSPE B/SCP が分泌型として産生されることを報告した。今後、この rSPE B/SCP の性状を詳細に検討するとともに、nSPE B/SCP と比較しながら GAS 感染症における意義を明らかにしていきたい。なお、分泌型として rSPE B/SCP が産生・誘導された今回の報告は本論文が初めての報告である。

稿を終わるにあたり、ご校閲ならびにご指導を賜りました本学老人病研究所免疫部門・大國壽士教授に心より感謝いたしますとともに、多くのご助言・ご支援をいただきました同・留目優子講師、櫻田紳策博士に深謝いたします。さらに、抗 SPE B 抗体を供与いただきました岩手医科大学歯学部微生物学教室 根本(大原)優子博士ならびに N-末端アミノ酸配列解析においてご協力をいただきました、塩野義製薬(株)創薬研究所 湯通堂隆博士に感謝致します。

なお、本研究の一部は厚生科学研究費補助金「新興・再興感染症研究」劇症型 A 群レンサ球菌感染症の分子発症機構」研究費の補助を受けた。

文 献

1. 清水可方, 大山晃弘, 笠間和典, 宮崎増美, 大江健二, 大河内康美: A 群溶血性連鎖球菌による toxic shock like syndrome の 1 例. 感染症誌 1993; 67: 236-239.
2. Imanishi K, Igarashi H, Uchiyama T: Activation of murine T cells by streptococcal pyrogenic exotoxin type A. Requirement for MHC class II molecules on accessory cells and identification of V β elements in T cell receptor of toxin-reactive T cells. J Immunol 1990; 145: 3170-3176.
3. Goshorn SC, Schlievert PM: Nucleotide sequence of streptococcal pyrogenic exotoxin type C. Infect Immun 1988; 56: 2518-2520.
4. Kamezawa Y, Nakahara T, Nakano S, Abe Y, Nozaki-Renard J, Isono T: Streptococcal mitogenic exotoxin Z, a novel acidic superantigenic toxin produced by a T1 strain of *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun 1997; 65: 3828-3833.
5. Norrby-Teglund A, Newton D, Kotb M, Holm SE, Norgren M: Superantigenic properties of the group A streptococcal exotoxin SpeF (MF). Infect Immun 1994; 62: 5227-5233.
6. Proft T, Moffatt SL, Berkahn CJ, Fraser JD: Identification and characterization of novel superantigens from *Streptococcus pyogenes*. J Exp Med 1999; 189: 89-101.
7. Musser JM: Streptococcal superantigen, mitogen factor, and pyrogenic exotoxin B expressed by *Streptococcus pyogenes*. Structure and function. Superantigens, molecular biology, immunology and relevance to human disease. (Lewng DIM, Huber BT, Schlievert PM eds), 1997; pp 281-310 Maul Deller, Inc., New York, NY.
8. Kapur V, Topouzis S, Majesky MW, Li L-L, Hamrick MR, Hamill RJ, Patti JM, Musser JM: A conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease cleaves human fibronectin and degrades vitronectin. Microbiol Pathol 1993; 15: 327-346.
9. Kapur V, Majesky MW, Li L-L, Black RA, Musser JM: Cleavage of interleukin 1 β (IL-1 β) precursor to produce active IL-1 β by a conserved extracellular cysteine protease from *Streptococcus pyogenes*. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 7676-7680.
10. Herwald H, Collin M, Müller-Esterl W, Björck L: Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: a novel virulence mechanism. J Exp Med 1996; 184: 665-673.
11. Lukomski S, Burns EH Jr, Wyde PR, Podbielski A, Rurangirwa J, Moore-Poveda DK, Musser JM: Genetic inactivation of an extracellular cysteine protease (Spe B) expressed by *Streptococcus pyogenes* decreases resistance to phagocytosis and dissemination to organs. Infect Immun 1998; 66: 771-776.
12. Bohach GA, Hauser AR, Schlievert PM: Cloning of the gene *speB*, for streptococcal pyrogenic exotoxin type B in *Escherichia coli*. Infect Immun 1988; 56: 1665-1667.
13. Hauser AR, Goshorn SC, Kaplan EL: Molecular analysis of the streptococcal pyrogenic exotoxins. Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci (Dunny GM, Cleary PP, McKay LL, eds), 1991; pp 195-200: ASM Press, Washington DC.
14. Toyosaki T, Yoshioka T, Tsuruta Y, Yutsudo T, Iwasaki M, Suzuki R: Definition of the mitogenic factor (MF) as a novel streptococcal superantigen that is different from streptococcal pyrogenic exotoxins A, B and C. Eur J Immunol 1996; 26: 2693-2701.
15. Ashbaugh CD, Warren HB, Carey VJ, Wessels MR: Molecular analysis of the role of the group A streptococcal cysteine protease, Hyaluronic acid capsule, and M protein in a murine model of human invasive soft-tissue infection. J Clin Invest 1998; 102: 550-560.
16. Gubba S, Low DE, Musser JM: Expression and Characterization of group A *Streptococcus* Extracellular cysteine protease recombinant mutant proteins and documentation of seroconversion during human invasive disease episodes. Infect Immun 1998; 66: 765-770.
17. Kagawa TF, Cooney JC, Baker HM, McSweeney S, Liu M, Gubba S, Musser JM, Baker EN: Crystal structure of the zymogen form of the group A *Streptococcus* virulence factor Spe b: An integrin-binding cysteine protease. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 2235-2240.
18. Doran JD, Nomizu M, Takebe S, Ménard R, Griffith D, Ziomek E: Autocatalytic processing of the streptococcal cysteine protease zymogen: Processing mechanism and characterization of the autoproteolytic cleavage sites. Eur J Biochem 1999; 263: 145-151.
19. Hauser AR, Schlievert PM: Nucleotide sequence of the streptococcal pyrogenic exotoxin type B gene and relationship between the toxin and the streptococcal proteinase precursor. J Bacteriol 1990; 172: 4536-4542.
20. Musser JM, Stockbauer K, Kapur V, Rudgers GW: Substitution of cysteine 192 in a highly conserved *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease (Interleukin 1 β convertase) alters proteolytic activity and ablates zymogen processing. Infect Immun 1996; 64: 1913-1917.
21. Tsai, P-J, Kuo C-F, Lin K-Y, Lin Y-S, Lei H-Y, Chen F-

- F, Wang, J-R, Wu J-J: Effect of group A streptococcal cysteine protease on invasion of epithelial cells. *Infect Immun* 1998; 66: 1460-1466.
- 22 . Kuo C-F, Wu, J-J, Lin K-Y, Tsai P-J, Lee S-C, Jin Y-T, Lei H-Y, Lin Y-S: Role of streptococcal pyrogenic exotoxin B in the mouse model of group A streptococcal infection. *Infect Immun* 1998; 66: 3931-3935.
- 23 . Hynes WL, Tagg JR: A simple plate assay for detection of group A streptococcus proteinase. *J Microbiol Methods* 1985; 4: 25-31.
- 24 . Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- 25 . Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- 26 . Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 4350-4354.
- 27 . Ohara-Nemoto Y, Sasaki M, Kaneko M, Nemoto T, Ota M: Cysteine protease activity of streptococcal pyrogenic exotoxin B. *Can J Microbiol* 1994; 40: 930-936.
- 28 . Ohkuni H, Todome Y, Suzuki H, Mizuse M, Kotani N, Horiuchi K, Shikama N, Tsugita A, Johnston KH: Immunochemical studies and complete amino acid sequence of the streptokinase from *Streptococcus pyogenes* (Group A) M type 12 strain A 374. *Infect Immun* 1992; 60: 278-283.
- 29 . Kuo C-F, Wu J-J, Tsai P-J, Kao F-J, Lei H-Y, Lin M-T, Lin Y-S: Streptococcal pyrogenic exotoxin B induces apoptosis and reduces phagocytic activity in U937 cells. *Infect Immun* 1999; 67: 126-130.
- 30 . 大國寿士: A群レンサ球菌感染と川崎病. *モダンメデシア* 2000; 46: 168-177.
- 31 . Li Z, Sledjeski DD, Kreikemeyer B, Podbielski A, Boyle MDP: Identification of *pel*, a *Streptococcus pyogenes* locus that affects both surface and secreted proteins. *J Bacteriol* 1999; 181: 6019-6027.
- 32 . Heath A, DiRita VJ, Barg NL, Engleberg NC: A two-component regulatory system, CsrR-CsrS, represses expression of three *Streptococcus pyogenes* virulence factors, hyaluronic acid capsule, streptolysin S, and pyrogenic exotoxin B. *Infect Immun* 1999; 67: 5298-5305.

(受付 : 2000 年 12 月 4 日)

(受理 : 2000 年 12 月 19 日)