

偏性嫌気性菌 *Clostridium difficile* における産生毒素タンパクに関する研究

日大生産工（院）○白井 篤義 斎藤 仁
日大生産工 小森谷 友絵 神野 英毅

【緒言】

近年、新興感染症および再興感染症が注目され *Clostridium difficile* (*C.difficile*) も原因菌の一つとして挙げられている。

C.difficile は、腸内に常在する偏性嫌気性有芽胞菌であり、グラム陽性桿菌の一種である。本菌は化学療法剤や第三世代抗生物質などに感受性がなく、日和見感染症として毒素である enterotoxin (toxin A) と cytotoxin (toxin B) を産生する。そしてその毒素が腸管粘膜に障害を起こして抗生物質関連下痢症や偽膜性大腸炎を引き起こし重篤な症状をきたすことが知られている。

現在 *C.difficile* を検出する臨床検査法としては、細胞培養法・ラテックス凝集法・酵素免疫測定法が行われているが、それぞれ特異性の点などで問題が指摘されている。

そこで、本研究室では従来の検査と比較し迅速かつ簡便な検出法として PCR, Real-Time PCR に注目し、*C.difficile* 臨床分離株間の差異の基礎的検討ならびに高感度化を目指して検討を行い迅速診断法としての確立を目指してきた。

本研究では、ジェノミクスの見地からの PCR, Real-Time PCR 法を用いた実験を元に、プロテオミクスの見地から *C.difficile* の産生する毒素タンパク自体に注目し、そのタンパクの分離精製、抗体の作製、ならびにタンパク活性の検討を通して、*C.difficile* 臨床分離株の検討を行い迅速診断法としての確立を目指し、その為の基礎的研究を行う。

【実験方法】

＜臨床分離株＞

菌体として、岐阜大学生命科学総合研究支援センター嫌気性菌研究分野より供与された臨床分離株 *C.difficile* GAI99093 株を使用した。本菌は *C.difficile* の毒素タンパク Toxin A, Toxin B 両方の産生性を持つ菌体である。

＜培養＞

GAI99093 株を保存培地より起こし、変法 GAM 寒天プレート上にて純粋培養した。純粋培養されたコロニーを採取し、20ml ねじ口試験管を用いて BHI 液体培地にて 2 日間嫌気培養した。その後、500ml メディウム瓶を用いて BHI 液体培地にて 3~4 日間本培養を行った。培養はどの段階においても、嫌気条件下 37℃で行った。

＜菌体除去＞

菌により産生したタンパクを抽出する為、培養した菌体懸濁液を遠心分離 (9000×g, 30min) し、菌体を沈殿させ取り除いた。さらにポアサイズ 0.45 μm のメンブレンフィルターを用いて濾過を行い、菌体を完全に除去して試料とした。

＜硫酸分画＞

目的のタンパクを得るために硫酸アンモニウムを用いてタンパク質を塩析させタンパク抽出を行った。硫酸の設定濃度は 65% で塩析を行った。また、実験操作はタンパクへの影響を考慮し、冷蔵庫中にて 4℃以下を維持して行った。

その後、遠心分離を行い、タンパクと培地成分を分離し、タンパクは 0.05M Tris-HCl buffer に溶解し試料とした。

<PAGE>

目的タンパクの抽出確認の為に、ゲルを作製し SDS-PAGE を行った。今回の実験においては、10%のゲルを用い定電圧で泳動操作を行った後、銀染色によりタンパクを染色して確認を行った。

<クロマトグラフィー>

毒素タンパクの分離精製の為、AKTA (GE Healthcare Bio-Sciences K.K.) において自らカラムパックした Sepacryl S-300 ゲルを用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。

<タンパク 2 次元分画>

PF2D (Beckman Coulter K.K.) を用いて、1 次元目としてクロマトフォーカシング法、2 次元目として逆相クロマトグラフィーによる 2 種の展開によりタンパク質の分離を行った。

<質量分析>

毒素タンパクの質量分析の為、質量分析装置 LTQ Orbitrap Hybrid FT Mass Spectrometer (Thermo Electron K.K.) によりフラグメンテーションの解析を行った。

【結果・考察】

まず実験においては、*C.difficile* の産生する毒素タンパクの分離・精製を行っていくにあたって、至適培養条件において産生された毒素タンパクの採取を行った。

次に、上記操作により得た試料をタンパク 2 次元分画システムにより、分離・分析を行った。クロマトフォーカシングを用いた HPLC によって得られたフラクションを SDS-PAGE により分析したところ、Toxin A の isoelectric point 付近にて得られたフラクションより目的タンパクと考えられるバンドが検出された。

また、目的タンパクが含まれていると考えられたフラクションに関しては CPE により生理活性の確認を行った。

そして、そのフラクションを MS にて分析を行ったところ、*C.difficile* の産生する特異的タンパク質を同定することができた。

今後は、透析、濃縮などによってさらにタ

ンパク質サンプルの最適化を行い、より高純度で分離を行いたい。そして、目的の Toxin タンパクを MS によって同定していきたいと考えている。

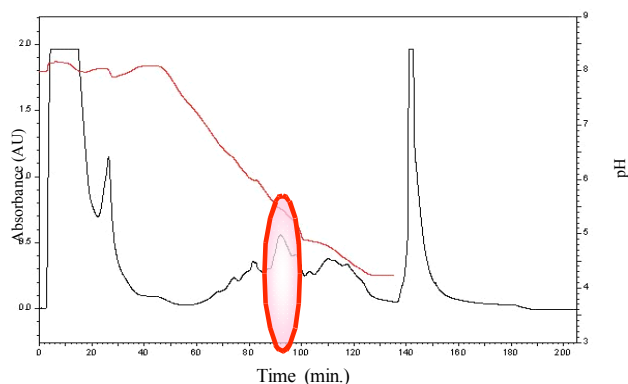


Fig.1. 1st Dimension-HPLC using PF2D

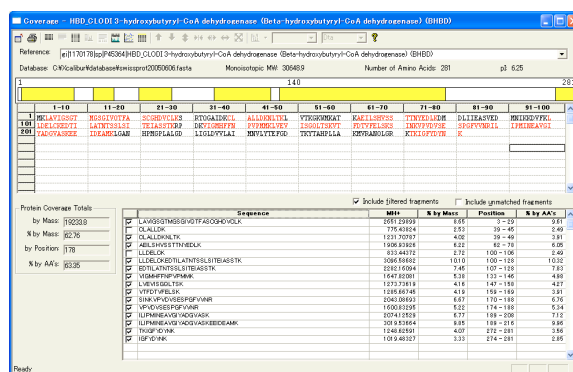


Fig.2. Result of Mass Spectrometry

【参考文献】

- Si-Wu Fu *et al.* , Simplified purification method for *Clostridium difficile* toxin A , *World Journal of Gastroenterol* , 2004;10(18):2756-2758
- Ralf Gerhard *et al.* , Comparison of wild type with recombinant *Clostridium difficile* toxin A , *Microbial Pathogenesis* 38(2005) , 77-83
- JAMES MEADOR III and RODNEY K. TWETEN , Purification and Characterization of Toxin B from *Clostridium difficile* , *Infection and Immunity* , July 1988 , p.1708-1714
- 基礎生化学実験法 第3巻 タンパク質, 東京化学同人
- 原田健一, 田口良, 橋本豊, 生命科学のための最新マスマススペクトロメトリー, 講談社サイエンティフィク