

# *Clostridium difficile* の毒素産生機序に関する研究

日大生産工 (院) ○強矢 佳織  
日大生産工 神野 英毅

## 1. 緒言

*Clostridium difficile* (*C. difficile*) は偏性嫌気性有芽胞菌で、抗生物質が誘因となる下痢症あるいは腸炎の主要な原因菌である。その症状は軽度の下痢症状から、腸閉塞や大腸炎、さらには死に至るような重篤な病態まで幅広いものである。

本菌は院内感染の原因菌としても挙げられる。これは本菌が他のクロストリジウム属の菌種より強い抗生物質抵抗性を示し、投与患者が多い病院では選択的に生存しやすいからである。さらに、芽胞は病院床で少なくとも5カ月は生存するため環境の汚染が継続しやすいと考えられている。

*C. difficile* の病原因子としてはエンテロトキシン (toxin A) 及び サイトトキシン (toxin B) が報告されている。毒素産生性の分類としては両毒素を産生する toxin A+B+ 株、toxin B のみ産生する toxin A-B+ 株、そして毒素非産生株 toxin A-B- とに分けられる。

*C. difficile* の毒素産生機序は toxin A 毒素産生部位である *tcdA*、toxin B 毒素産生部位である *tcdB*、そしてそれらの調節因子をコードする *tcdC*、*tcdD*、*tcdE* から構成される病原性座位により成り立っている<sup>4)</sup>。

本研究では、簡便で迅速な検査法として注目している抗原抗体反応を用いた臨床診断薬の作製を目的としている。そのために抗原として必要な toxin B 毒素タンパクを DNA 組換え技術にて生産し、比較検討を行う。

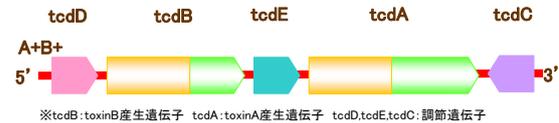


Fig.1. *Clostridium difficile* の病原性座位

## 2. 実験方法

*C. difficile* toxin B 毒素産生遺伝子である *tcdB* 全体(7098bp,分子量 269,696)を PCR 法によって増幅した。このような長鎖の増幅は困難であるため、それに適した DNA polymerase や PCR 条件の検討も行った。DNA polymerase については Expand Long Template PCR System および TaKaRa Ex Taq で検討を行った。PCR 条件は伸長反応時間を通常より長い 6min に設定し、11 サイクル目からの 20 サイクルは 1 サイクル毎に 20sec ずつ延ばしていくようにした。

primer は vector に合うようにそれぞれ設計した。pET100/D-TOPO vector の forward primer(DK *tcdB*-100F: CACCAGTTTAGTTAATAGAAAACAGTTAG)は、はじめに CCAC 配列を置き、直後に開始コドンの後からの配列を続け、reverse primer(DK *tcdB*-100R: AGAACACTTTATGTAGTGTATCATTTTG)には停止コドン以降の配列に相補的なものを用いた。pET101/D-TOPO vector の forward primer(DK *tcdB*-101F: CACCATGAGTTTAGTTAATAGAAAACAGTTAG)も、はじめに CCAC 配列を置き、直後に開始コドンからの配列を続け、reverse primer(DK *tcdB*-101R: TTCACTAATCACTAATTGAGCTGTATC)には停止コドンまでの配列に相補的なものを用いた。

この様にして増幅した *tcdB* 遺伝子をサブクローニングし、大腸菌(TOP10)に導入した。大腸菌を培養し、コロニーPCRを行うことで確認した後、プラスミドを回収し、発現用の宿主細胞(LB21)に導入した。そして、IPTGにより誘導し、0~6時間まで1時間ごとに分注して凍結融解することによりサンプルを得た。このサンプルをSDS-PAGEゲル電気泳動し、目的である毒素タンパクが産生されているかを確認した。

### 3.結果及び考察

Fig. 2より、DNA polymeraseにはより高感度の TaKaRa Ex Taq を用いることにした。また、アニーリング温度は検出可能な範囲でより高温に設定するため、pET100/D-TOPO用の primerでは59°C、pET101/D-TOPO用では60°Cで行うことにした。

*tcdB* をサブクローニングした pET100/D-TOPO vector, pET101/D-TOPO vectorの2種類を大腸菌に導入したが、pET100/D-TOPOでは陽性のコロニーが確認できなかった。pET101/D-TOPOでは陽性のコロニーが1つ確認できたため、このコロニーからプラスミド回収し、サンプルを得た。IPTG誘導実験から得られたペレットをLysis Bufferに溶解した後、遠心分離によって得られた上清をSDS-PAGEゲル電気泳動結果をFig. 3に示す。0時間から6時間までに徐々にバンドが濃くなっていることが確認できた。1時間後にも薄くではあるがバンドが確認できるため、目的タンパクの生成はすぐに始まっていることが分かった。

今回、目的タンパクの発現は確認できたが、免疫するのに十分な量を得ることはできなかった。今後、より多くタンパクを発現させるために組込む部位や、vector、発現用宿主細胞の検討を行っていく。

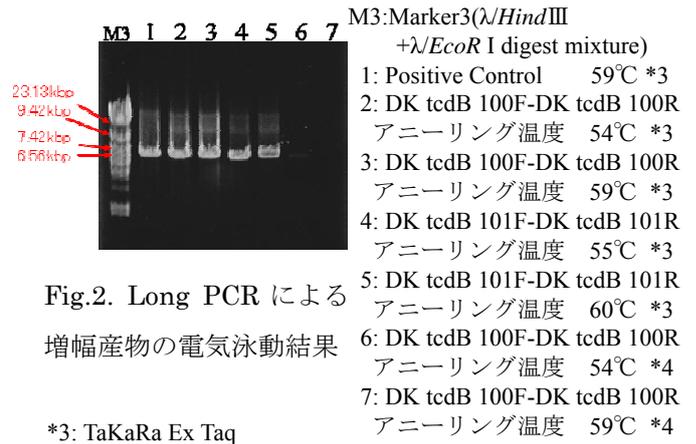


Fig.2. Long PCRによる増幅産物の電気泳動結果

\*3: TaKaRa Ex Taq

\*4: Expand Long Template PCR System

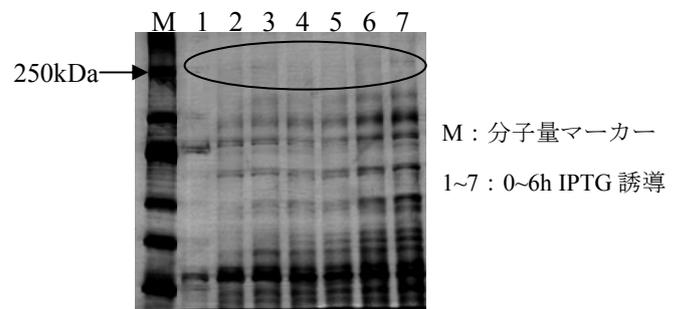


Fig.3. SDS-PAGEゲル電気泳動結果

### 4.参考文献

- 1) Duncan R. MacCannell, Thomas J. Louie, Dan B. Gregson, Michel Laverdiere, Annie-Claude Labbe, Felicia Laing, and Scott Henwick, Molecular Analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027 Isolates from Eastern and Western Canada, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 44(6),2147-2152, 2006 June
- 2) 貫名正文, 神戸市感染症情報, Vol.6, No.7, 57, 2003
- 3) 大分感染症研究会, 海外感染症話題 第6巻 第3号, 2005
- 4) Maja Rupnik, Naoki Kato, Miklavz Grabnar, and Haru Kato, New Types of Toxin A-Negative, Toxin B-Positive Strains among *Clostridium difficile* Isolates from Asia, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, p. 1118-1125, 2003 Mar