

偏性嫌気性菌 *Clostridium difficile* Toxin B フラグメントの発現と臨床検査に関する研究

日大生産工（院）○五味 菜々恵

日大生産工 小森谷 友絵 吉宗 一晃 神野 英毅

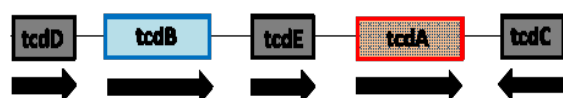
1. 諸言

病院感染制御の観点から最も対応が難しい病原体の一つである *Clostridium difficile* は 2001 年頃から死亡率の増大が見られ最も注目を集めている菌である。本菌はヒト腸内の常在菌であるが抗生物質の投与などにより他の腸内菌が死滅し腸内フローラが攪乱することにより急激に増殖し毒素を生産する。これにより軽度の下痢症から腸閉塞や偽膜性大腸炎を引き起こす。

主な産生毒素は Toxin A(エンテロトキシン)・Toxin B(サイトトキシン)であり産生の有無で第一に Toxin A/B 産生、第二に Toxin B のみ産生、第三に Toxin A/B 非産生の 3 タイプに分類される。現在の治療は確立していない¹⁾ため産生毒素の早期発見が重要な鍵である。

この毒素生産遺伝子は Toxin A 毒素生産部位である *tcdA*、Toxin B 毒素生産部位である *tcdB*、それらの調節因子をコードする *tcdC*、*tcdD*、*tcdE* から構成されている(Fig. 1)。また近年において新たな毒素 Binary Toxin が発見・伝播が報告されており Toxin A/B より毒性が高いことから注目を集めている。

現在、診断法には高感度で迅速なイムノクロマト法が用いられているが Toxin B のみの検出は不可能である。本研究では Toxin B を検出するためのイムノクロマト法を確立するため、必要な抗体を得るべく、抗原の作製を目的とする。

Fig. 1 *C. difficile* PaLoc

2. 実験方法

Toxin B は主に細胞表面の特異的リセプターと結合するために必要な Receptor binding domain、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれるために必要な Transmembrane domain および細胞毒素となる Catalytic domain の三つの部位が作用し細胞を変性(崩壊)させる。

目的とする Toxin B 全体を PCR 法にて増幅すると長鎖のため増幅が難しいことから、アクチン骨格形成の伝達機能をもつ GAT 結合型 Rho²⁾をグルコシル化しその性質を失活させる Catalytic domain (Mn²⁺ UDP-glucose)についてタンパクの発現を行った。

C. difficile GAI99047 株 (Toxin B/A 産生株) を GAM 寒天培地にて 37℃で嫌気培養し 3~4 回植え継ぎ後、コロニーをピックアップし BHI 培地にて培養を行い純粋な菌を得た。得られた培養液から Magstration system 6GC (PSS)を用い DNA 抽出を行った。

抽出した DNA を用い、Polymerase に KOD Plus NEO (TOYOBO)を使用し PCR を行った。Primer は、Mn²⁺UDP-glucose 部位である 1~1101 bp を目的とし、Sac I・BamH I による制限酵素切断部位を含むように設計した。

(Forward : 5'-CCGGGAGCTCATGAGTTTAG TT-3', Reverse:5'-ATAGGGATCCCTCCATAT CGCC-3')

増幅した目的 DNA(1101 bp)のみを切出し精製した後、DNA と pCold ProS2 DNA Vector

(Fig. 2)を制限酵素処理し、さらに DNA Ligation Kit Ver.2.1 (Takara bio) を用いて 16℃で 60 分間 Ligation した。この組換えプラスミドでクローニング型大腸菌 TOP10 を形質転換し、コロニーPCR にて目的組換えプラスミドの有無を確認し抽出を行った。また、目的 DNA をシーケンスにより解析した。

さらに抽出したプラスミドでタンパク誘導型大腸菌 BL21 を形質転換し、IPTG を用いて 15 ℃で 30 時間攪拌培養し 6 時間ごとに培養液を採取した。タンパクの発現を SDS-PAGE で確認した。

3. 結果および考察

ゲノム DNA からの目的遺伝子の PCR 結果を示す (Fig. 3)。

最適アニーリング温度を検討した結果、Lane.5 においてバンドが最もクリアであった。よって、アニーリング温度 55.7℃の PCR 産物を組換えに用いた。

組換えタンパクの確認を SDS-PAGE で行った結果を Fig.4 に示す。得られたタンパク質を Lysis Buffer を加え凍結融解にて大腸菌 BL21 の膜内からタンパク質を遊離した。これにより理論値(66.4 kDa)に IPTG ありにバンドが確認できた。IPTG なしではバンドを確認することができなかったため IPTG はタンパク質を誘導する物質であることが明らかとなった。また IPTG の終濃度 0.1~1.0 mM、30 時間の培養において多くのタンパクを発現することがわかった。

抗体を作製するには免疫のため最低 1 mg の抗原が必要であり同じ条件で大量培養する必要がある。

今後、より純粋なタンパクを得るため Vector に含まれる ProS2-tag 切断を Factor Xa 酵素を用いて行う。この実験が成功することにより抗体の作製ができ、これを用いることで早期発見のためにもイムノクロマトを確立できると思われる。

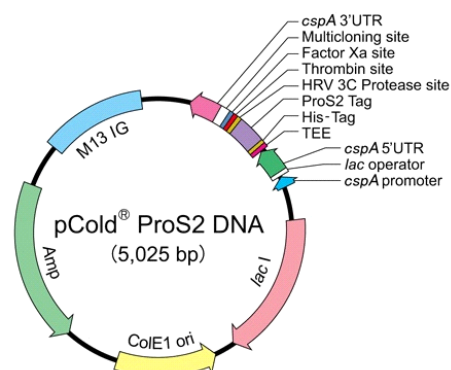


Fig. 2 pCold ProS2 DNA Vector

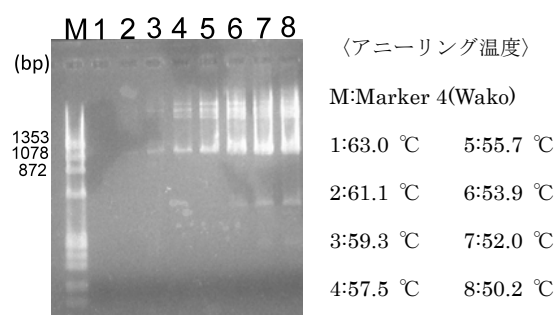


Fig. 3 KOD Plus NEO を用いた最適アニーリング温度検討結果

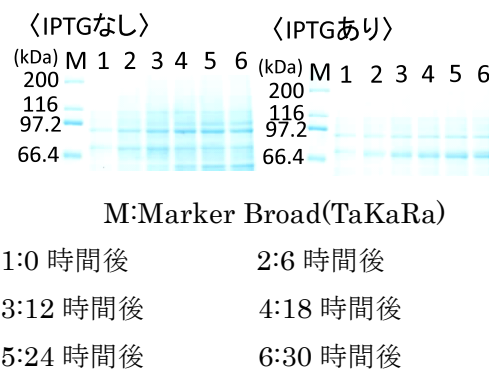


Fig. 4 タンパク発現結果

4. 参考文献

- 1) Fred A.Zar et al. *Clinical Infectious Diseases* **45** 302-305(2007)
- 2) I.Just et al. *Nature* **375** 500-503(1995)