

生命・生物工学に基づく健康と疾患の研究グループ

Clostridium perfringens 産生毒素の精製と産生機序に関する研究

神野英毅 (応用分子化学科)

1. 緒言及び目的

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) は、腸管内、土壌など自然界に広く分布しており、 α 毒素など種々の毒素を産生する偏性嫌気性グラム陽性桿菌の一種である。本菌による感染症として食中毒・ガス壊疽・壊死性腸炎などが知られており、その予防や治療が重要となる。現在行われている診断法は、免疫学的診断法や PCR 法が挙げられる¹⁾。PCR 法は感度が良好であるが、単離・抽出に時間がかかる。免疫学的方法は、迅速性及び簡便性に優れている。しかし、本菌が産生する毒素タンパクは、毒素産生機序が解明されていないため病因との関連性が不明である。本研究では、免疫学的方法による毒素の検出を目的とし、*C. perfringens* の毒素を精製すると共に、産生機序の解明を目指した。

2. 実験方法

2-1. 供試菌体

研究に用いた菌体は、偏性嫌気性細菌 *Clostridium perfringens* (GAI 94074 岐阜大学生命科学総合実験センター嫌気性菌実験分野より供与) を用いた。本菌を 3%BHI 液体培地 (difco) で 3~4 日間嫌気条件下で純培養を行い研究に使用した。

2-2. 毒素産生の発現遺伝子と調節機構

本菌のゲノム解析の結果、生存・増殖に必要な栄養源獲得機構のひとつとして毒素が産生され、感染症を引き起こされる事が示唆されている。また、病原性発現調節については二成分制御系システム VirR/VirS、転写調節 RNA、細胞外シグナルなどの調節機構の関与が示唆

されている²⁾。しかし、この調節機構が何により活性化されるかは未だ解明されていない。そこで、様々な条件下で菌体を培養し、増殖と毒素産生の関係性を調べることにより、どの様な要因によって、細胞内の情報伝達が引き起こされ、結果として毒素産生を促すかを検討した。

2-3. 菌体の増殖と培地 pH の変化

BHI 培地にて培養した菌体を各時間ごとサンプリングを行い、菌体濃度の指標となる吸光度測定と培地の pH を測定をした。次に、遠心分離・ろ過・硫酸塩析・透析などの粗精製を行った後にレシチナーゼ活性を測定した。

2-4. 菌体の熱耐性

菌体の培養液 (BHI 培地) を 50°C から 80°C までの温度で 20・40・60 分加熱し、寒天培地に植え継ぎ芽胞数を測定した。さらに、加熱した培養液中の菌体濃度を測定した。

2-5. 異なる培地での菌体の増殖

菌体の培養液 (BHI 培地) 3ml を複合培地である SD 培地、芽胞形成培地である変法 DS 培地、一般的に用いられる BHI 培地 (各 280ml) に植え継ぎ、菌体増殖とレシチナーゼ活性を測定した。

2-6. 培地 pH 別の菌体増殖と毒素産生

pH3~9 までの緩衝溶液を調整し、調整した緩衝溶液を用いて 3%BHI 緩衝培地を作製した。この緩衝培地に菌体を植え継ぎ、菌体増殖とレシチナーゼ活性を測定した。

2-7. α 毒素の精製

Sepharose-4B を活性化させ、銅を結合させたカラムを銅キレートカラムとして用いた¹⁾。0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.02M Tris-HCl 緩衝液で平衡化したカラムに 2ml の sample をア

プライシ、①0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.02M Tris-HCl 緩衝液、次に②0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸緩衝液、最後に③0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.02M 酢酸緩衝液を流し、銅キレートゲルと反応したタンパクを溶出させた。fraction はすべて回収し、egg yolk 法により目的の毒素タンパク特有のレシチナーゼ活性があるかどうか、また BCA 法によりタンパク量を調べた。レシチナーゼ活性が確認できた fraction を遠心限外ろ過 (30,000 MWCO membrane、VIVASCIENCE 社) により濃縮 (4,000g 3min) した後、Electro Elution 法によるタンパク抽出を行い、毒素タンパクの精製を行った。

3. 結果及び考察

3-1. 菌体の増殖と培地 pH の変化

菌体の BHI 培養液 (1.6×10^5 CFU/ml) 1ml を BHI 培地 60ml に植え継ぎ、時間経過ごとの菌体濃度と培地の pH を測定した結果を Fig.1 に、各培養時間の菌対数とレシチナーゼ活性を Fig.2・3 に示した。Fig.1 より菌体濃度が増加するごとに培地の pH が減少する事が分かる。これより培地 pH は菌体増殖が分かる指標となることが分かる。また、Fig.2 の結果より、明らかに α 毒素は対数増殖期の最初の段階より産生されたと分かる。これは、クオラムセンシング機構^{3,4)}のことを考えると、大変独特な機構ととらえることが出来る。普通、毒素の様な特殊な代謝物質は、クオラムセンシング機構を利用して、静止期以降に産生される。つまり、普通は菌体数が十分になった静止期以降に発動するクオラムセンシング機構は本菌にそのまま当てはまるのではなく、何か独自の情報伝達調節機構が存在すると考えられる。

3-2. 菌体の耐熱性とレシチナーゼ活性

熱ストレスを与えた菌体の芽胞数と、熱ストレス後の培養液 3 ml を BHI 培地 300ml に植え継ぎ、2 日間培養後の菌体濃度・培地の pH・

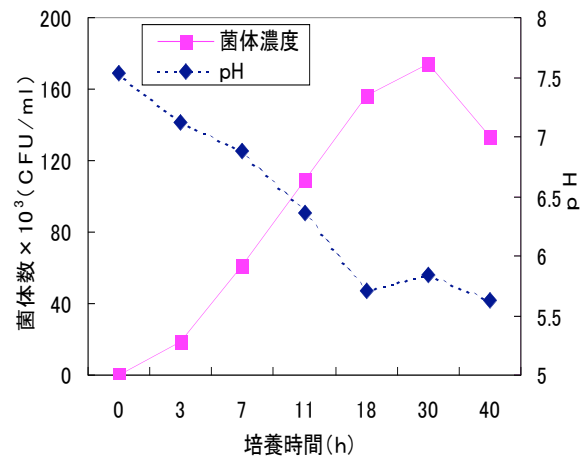


Fig.1 培養時間経過による菌対数と培地 pH

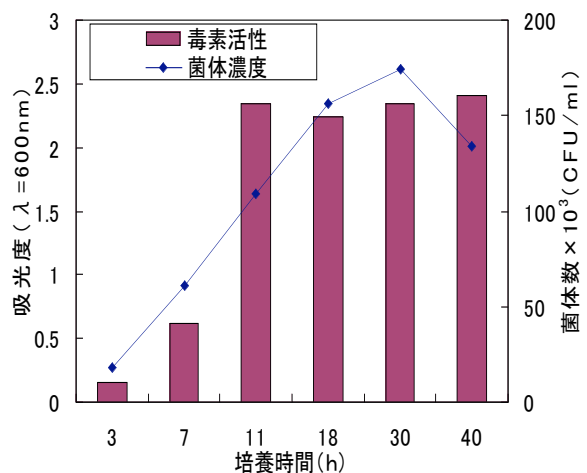


Fig.2 培養時間経過による菌対数と毒素活性

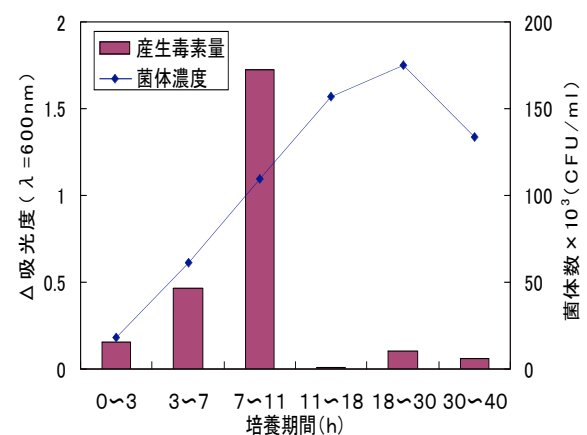


Fig.3 各培養期間の菌対数と毒素産生量

レシチナーゼ活性の測定結果を Table 1 に示す。この結果より、60℃以上の温度で 20 分間加熱には耐えられないことがわかる。さらに、50℃では生存可能であるが、熱刺激を与える時間を変化させても、毒素産生量に違いを確認できなかった。この結果より、実験に用いた菌体、GAI 94074 株は *C. perfringens* の中でも比較的熱に対する抵抗性が低い株であること(熱抵抗性がないということは芽胞を作り難いということ)。さらに、熱刺激はα毒素産生に影響しないということが考えられる。

3-3. 異なる培地での菌体の増殖

菌体の BHI 培養液 (1.2×10^5 CFU/ml) 3 ml を BHI 培地・変法 DS 培地・SD 培地に植え継ぎ、2 日間培養後の測定結果を Table 2 に示す。Table 2 より、BHI 培地と変法 DS 培地では毒素産生が確認出来たが、SD 培地では毒素産生が確認出来なかった。さらに、変法 DS 培地よりも BHI 培地のほうが、毒素産生量が多いことも分かった。芽胞形成培地である変法 DS 培地よりも BHI 培地のほうが、毒素産生量が多いことから、芽胞形成がα毒素産生に影響しないと考えられる。さらに、SD 培地では 3 種類の培地の中で一番菌体数が増えているのに関わらず毒素産生がほとんど起きていないことから、特定の栄養源がないと毒素産生が起きない、もしくは、SD 培地中にα毒素産生を阻害するような物質が含まれていると考えられた。

3-4. 培地 pH 別の菌体増殖と毒素産生

培地 pH 別の菌体増殖と毒素産生量の関係を Table 3、Fig. 4 に示した。Fig. 4 の結果より、*C. perfringens* は pH6~9 の範囲内にて増殖することが分かる。さらに、pH6~9 の範囲内では菌体濃度が異なるのに反し、毒素活性の値が同じ程度であることから、増殖可能な pH 範囲内でも増殖をし易い環境 (pH6・7) に置かれている菌体のほうが、増殖をし難い環境

Table 1 50℃~80℃の熱刺激の影響

	50℃		60℃	70℃	80℃		
加熱時間 (min)	0min	20min	40min	60min	20min	20min	
菌体の生存	○	○	○	○	×	×	×
毒素活性	2.156	2.095	1.927	2.038	×	×	×

Table 2 培地の菌体増殖に与える影響

	BHI	変法DS	SD
菌体濃度 $\times 10^3$ (CFU/ml)	181.7	75.9	264.0
植え継ぎ前の培地pH	7.43	7.73	6.99
植え継ぎ後の培地pH	6.27	6.70	6.10
毒素活性	2.273	1.751	0.246

Table 3 培地 pH 別の菌体増殖・毒素活性

pH	菌体濃度 (UFC/ml)	タンパク濃度 (μ g/ml)	毒素活性
3(3.97)	13.0	—	—
4(4.71)	7.0	1.895	0.231
5(5.36)	5.3	1.794	0.162
6(6.52)	134.6	1.756	2.104
7(7.03)	95.6	1.749	2.192
8(7.88)	86.6	1.768	2.197
9(8.50)	68.3	1.777	1.808

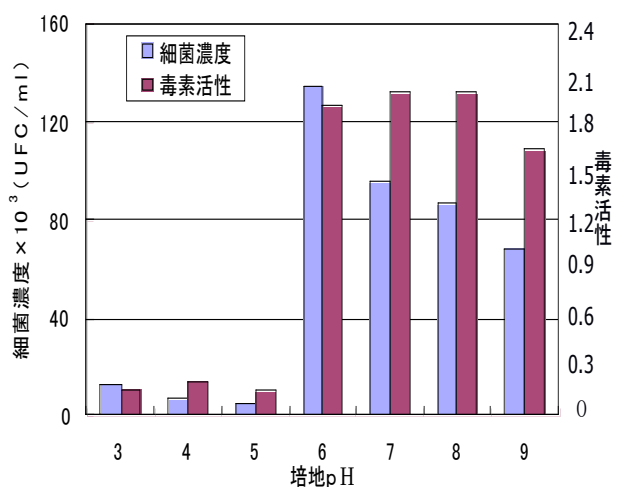


Fig. 4 培地 pH 別の菌体濃度と毒素活性

(pH8.9) に置かれている菌体よりも、1 菌体当りの毒素産生量が多いことがわかる。この結果から得られた考察は、まず、増殖可能な pH 範囲内では、増殖困難な環境に置かれている菌体の方が、産生毒素量が多いということである。次に、視野を変えてみると以下の様に考えられる。毒素産生はクオラムセンシング機構に従って行われ、その調節はオートインデューサー（菌体から産生される何らかの低分子ペプチド）を介している為、毒素産生量と菌体数は関係がなく、そもそも 1 菌体当りの産生毒素量という概念自体成り立たないのではないかという事である。つまり、いかに菌体が多く存在しようとしてオートインデューサーが一定以上になったら、それ以上菌体から毒素が産生されない為に、このような結果が得られたということである。後者の考えの方が的を得ているように思われるが、この考えだけでは pH9 の時の毒素活性の値が他に比べて少し低いことの説明は出来ない。このことから、増殖する際の pH は、毒素産生に何らかの影響を与えているはずだと結論付けられる。

3-5. α 毒素の精製

銅キレート Affinity Chromatography を行った結果、二番目の溶出液である 0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸緩衝液で、目的の毒素タンパクが溶出した。この結果を Fig. 5 に示す。この溶離液の分画の中で、毒素活性のあったフラクションを限外ろ過し、Electro Elution 法によりアクリルアミド電気泳動後、ゲル内より目的の毒素タンパクを抽出した。Fig.6 に、粗精製操作後、銅キレート Affinity Chromatography 後、Electro Elution 法、の 3 段階精製後の SDS-PAGE 結果を示す。Fig.6 より、最終的に 1 つのバンドになったことが分かる。これより、本研究で用いた 3 段階精製により α 毒素を精製したと言える。

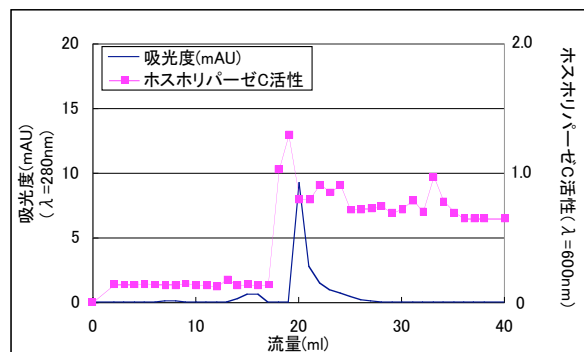


Fig. 5 0.5M 塩化ナトリウムを含む 0.1M リン酸緩衝液で溶出した chromatogram

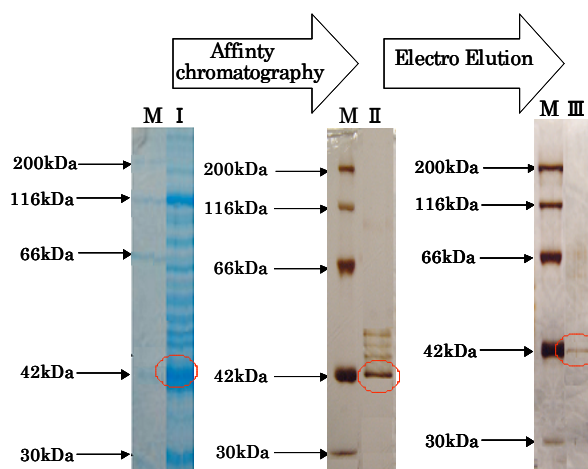


Fig. 6 3 段階精製後の SDS-PAGE の結果 (I : 粗精製後、 II : 銅キレート Affinity Chromatography 後、 III : Electro Elution 後)

4. 参考文献

- 1) Hathway CL : Toxigenic clostridia, Clin. Microbiol. Rev. 6, P1421-1429, 1992
- 2) Ba-Thein : The virR/virS locus regulates the transcription of genes encoding extracellular toxin production in *Clostridium perfringens* ,J. Bacteriol. 178, P2514-2520, 1996
- 3) Fuqua WC : Quorum sensing in bacteria, J. Bacteriol. 176, P269-275, 1994
- 4) Dunny GM : Cell-cell signaling in bacteria, ASM Press, 1999