

## *Clostridium perfringens* α 毒素産生遺伝子のクローニングと 大腸菌における組換えタンパク質の発現と分泌

神野英毅（応用分子化学科） 岩村道子（東邦大・理）  
松本宏治郎（東邦大・薬）

### 1. 緒言

*Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) は、ヒトの腸管内や土壌など自然界に広く分布している偏性嫌気性グラム陽性桿菌の一種である。本菌は生存・増殖の過程において種々の毒素や酵素を産生し、その毒素産生能の違いにより A~E 型菌に分類されている<sup>1), 2)</sup>。本菌によるヒトへの感染症として食中毒・ガス壊疽・壊死性腸炎などが知られ、ガス壊疽の主要な病原因子は、A~E 型菌全てにおいて産生される α 毒素と考えられている<sup>3)</sup>。さらに、ヒト以外の家畜を含めた動物に対しても致死性の感染症を引き起こす為、その予防や治療が重要な菌として知られている<sup>4)</sup>。現在行われている診断法として、細胞培養法・免疫学的診断法・PCR 法が挙げられるが、迅速性・簡易性において課題を残しているのが実状である。また、近年の研究の成果により、本菌の毒素調節機序は明らかになりつつあるが、他の病原菌に比べて不明な点が多く残されている<sup>5), 6), 7)</sup>。そこで、免疫学的方法による診断法の迅速・簡易化を目指した。抗体作製の際に必要な毒素タンパクを大量に回収する為、大腸菌発現系にて、酵素活性を有した組換え α 毒素の発現と細胞外分泌を試みた。

### 2. 材料と方法

#### 2-1. 使用菌株とベクター

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された *Clostridium perfringens* GAI 94074 株を実験に使用した。本菌を 3%BHI 液体培地 (Difco) で 3~4 日間嫌気培養を行った後に抽出したゲノム DNA を、組換え遺伝子の増幅の為の鋳型とした。

発現ベクターとしてクローニングサイトの上流に T7 プロモーターを有する pET100/D-TOPO (5.7kb) (Invitrogen, Michigan, USA) を用いた<sup>8)</sup>。そして、宿主 (大腸菌) として TOP 10 Competent *E. coli* 及び BL 21 Star (DE3) (Invitrogen) を用いた。大腸菌はアンピシリンを 100 μg/ml 含む Luria Bertain (LB) 培地で、37°C にて攪拌しながら培養した。

#### 2-2. 組換え体の作製

DNA 抽出は熱処理操作後、Protease K を作用させ、フェノール・クロロホルム法及びアルコール沈殿法を用いて行った。抽出した DNA を鋳型とし、3 種類 (α 毒素産生領域のみ・シグナルペプチド産生領域を含むもの・リボソーム結合領域を含むもの) の挿入遺伝子断片を PCR にて増幅する為、MI003・MI004・MI005・MI006 primer を設計した。Table 1 に各 primer の塩基配列と予想される増幅サイズを、Fig. 1 に各 primer の α 毒素遺伝子上の位置を示した。各 primer 対により増幅される DNA 断片には次の様な特徴を持つ。MI003-004 はリボソーム結合部位・シグナルペプチド産生部位・α 毒素産生部位を含

Table 1 Primers used to amplify fragments of alpha toxin

Primer	Sequence (5'→3')	Size	Location
MI003 Fragment			
MI003	CACCTTAACGGGGGATATAAAAATG	1265bp	150
MI004	TTATTTTATATTATAAGTTGAATTTTCCTGA		1335
MI005 Fragment			
MI005	CACCATGAAAAGAAAAGATTTGTAA	1201bp	168
MI004	TTATTTTATATTATAAGTTGAATTTTCCTGA		1335
MI006 Fragment			
MI006	CACCTGGGATGGAAAAATTGAT	1117bp	252
MI004	TTATTTTATATTATAAGTTGAATTTTCCTGA		1335

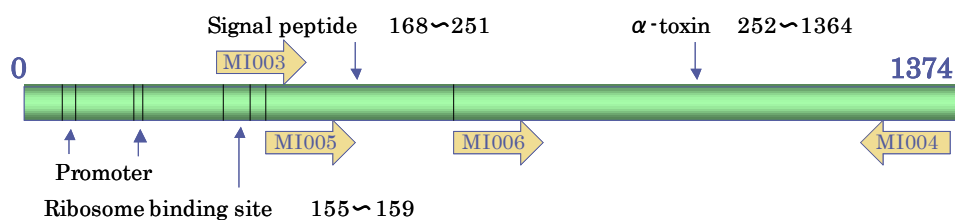


Fig. 1 The location of Primers on *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -toxin gene.

む遺伝子 (MI003 Fragment) を増幅する。MI005-004 はシグナルペプチド産生部位・ $\alpha$ 毒素産生部位を含む遺伝子 (MI005 Fragment) を増幅する。MI006-004 は $\alpha$ 毒素産生部位のみの遺伝子 (MI006 Fragment) を増幅する。Primer を設計する際の塩基配列は DDBJ / EMBL / GenBank D321241 を参照した<sup>9), 10)</sup>。

PCR による挿入遺伝子の増幅は KOD-Plus-を DNA ポリメラーゼとして用いて以下の条件で行った。まず、94°C 5 分で DNA 二本鎖の解離を行い、次に 94°C 30 秒, 54°C 30 秒, 68°C 90 秒の増幅を 30 サイクル行った後に、68°C 5 分の伸長反応を行った。増幅した DNA 断片を、クリスタルバイオレットを 0.8  $\mu$ g/ml 含む 1.5% アガロースゲルにアプライし、泳動用緩衝液として Tris -Borate-EDTA buffer を用いて 20 分間電気泳動を行った。泳動後、クリスタルバイオレットによって視覚化された DNA 断片をゲルから抽出した。抽出は Wizard<sup>(R)</sup>SV GEL and PCR Clean-up System (Promega, Louisiana, USA) を用いて行った。

精製した DNA に pET 100/ D-TOPO vector (Invitrogen) を添加し氷上で 15 分間静置後、TOP10 Competent Cells (Invitrogen) を加え、熱刺激 (42°C 30 秒) でこれに形質転換した。形質転換後、TOP10 Competent Cells をアンピシリン含有の LB 寒天培地上に塗布し、一晚培養した。形成した各コロニーに対して、コロニー PCR を行い、形質転換に成功したものをアンピシリン含有 LB 培地にて 20 時間培養し、培養液から Wizard<sup>(R)</sup>SV GEL and SV Minipreps DNA purification System (Promega) を用いて、プラスミドの抽出を行った。抽出した pET 100/ D-TOPO プラスミドを BL 21 Star (Invitrogen) に加え氷上で 30 分静置後、熱刺激 (42°C 30 秒) を加え形質転換した。これに S.O.C. 培地を加え 1 時間培養後、培養液をアンピシリン含有 LB 培地 10ml に継代し、20 時間培養した。

### 2.3. 大腸菌での毒素の発現

pET 100/ D-TOPO に挿入された遺伝子の転写・翻訳は、通常 T7 プロモーター下流の lac operator によって負に制御されているが、Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加する事で、挿入遺伝子由来のタンパク質の発現は誘導される<sup>8)</sup>。

アンピシリン含有の LB 培地での組換え大腸菌の吸光度 ( $\lambda=600$ nm) が 0.7 となったところで、誘導物質である IPTG を終濃度 1.0mM になる様に添加し、1 時間毎に培養液を回収した。回収した培養液は、遠心分離 (14,000 $\times$ g, 1 分) で培地成分と大腸菌ペレットに分離した。大腸菌のペレットを、Lysis buffer にて溶菌し、遠心分離 (14,000 $\times$ g, 5 分) で Lysis 可溶化成分と不溶化成分に分離した。分離した各成分の試料は 12.5% のポリアクリルアミドゲルにて 150V 40mA で 1 時間 30 分電気泳動し、Coomassie Brilliant Blue (CBB) にて染色した後に、バックグラウンドを脱色し、試料中のタンパク質を可視化した。

### 2.4. 作製した組換えプラスミドの解析

挿入した各 DNA 断片がプラスミドの意図した箇所に正しく組換えられたか確かめる為、PCR とシーケンサーによる塩基配列の解読の 2 通りで解析を行った。PCR による解析では、新たにプラスミド上の挿入遺伝子を挟み込む位置に T7-f (5'-TAATACGACTCACTATAGGGGA ATTG-3')・ T7-r (5'-TAGTTATTGCTCAGCGG GTGG-3') primer を設計した。正しく組換えが行われたならば、この primer によって挿入遺伝子よりも 282bp 大きい DNA 断片が増幅される。この PCR 反応は 98°C 10 秒, 57°C 30 秒, 72°C 90 秒の増幅を 30 サイクルで行った。さらに、CEQ8800<sup>TM</sup> (BECKAMN COULTER) によるインサート部位の配列を解読し、プラスミド上の挿入遺伝子がどのような形で組込まれたか確認した。シーケンシング用の PCR 反応は、プラス

ミド 325ng に Master Mix (BECKAMN COULTER, Florida, USA) 8  $\mu$ l と primer 3.2pmol を加え全量を 20  $\mu$ l とし、94 $^{\circ}$ C 30 秒・57 $^{\circ}$ C 30 秒・60 $^{\circ}$ C 90 秒の増幅を 30 サイクルで行った。

### 2.5. Egg Yolk 法による酵素活性測定

$\alpha$  毒素はカルシウムの存在下で、ホスファチジルコリン (レシチン) をジアシルグリセロールとホスホリルコリンに分解するホスホリパーゼ C (PLC) のレシチナーゼ酵素活性を有している<sup>10)</sup>。これを利用した酵素活性測定法が Egg Yolk 法である。Egg Yolk 法は、0.02M Tris-HCl buffer に卵黄 1 個とカオリン 20 g を加え、遠心分離 (8,000 $\times$ g、20 分) による上清を Egg Yolk 溶液とし、この Egg Yolk 溶液に毒素溶液を加え、濁度の上昇の吸光度 ( $\lambda=600$ nm) の変化から毒素活性を測定する方法である<sup>11)</sup>。

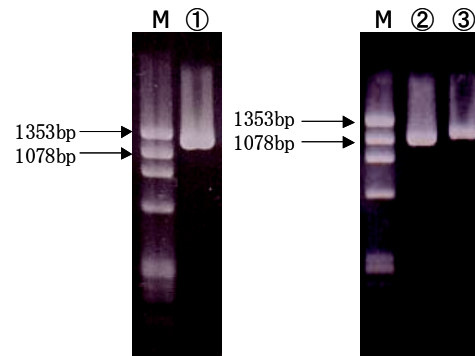
## 3. 結果と考察

### 3-1. 組換え大腸菌の作製

Fig. 1 に示した様に、*C. perfringens*  $\alpha$  毒素産生遺伝子は、一般的な他の病原遺伝子が病原島 (Pathogenicity island) を形成するのに対し、ハウスキーピング遺伝子と同様な存在形式を示す<sup>12)</sup>。そこで、タンパク質翻訳部位のみではなく、その上流に存在するリボソーム結合部位とシグナルペプチド産生部位を含む領域を持つ組換え大腸菌を作製した。

まず、フェノール・クロロホルム法を用いて抽出した GAI 94074 株のゲノム DNA を鋳型とし、MI003-004、MI005-004、MI006-004 primer を用いて、2. 2. に記した反応条件で PCR を行い、各遺伝子断片を増幅した。PCR 反応溶液は、抽出 DNA 2  $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu$ l、dNTP 4  $\mu$ l、各 primer 0.5  $\mu$ l、8mM MgSO<sub>4</sub> 3  $\mu$ l、KOD-Plus- 1  $\mu$ l を滅菌蒸留水で 50  $\mu$ l に定容し調製した。PCR 反応後、PCR 反応溶液と Loading buffer を 1 対 1 に希釈した試料溶液を 1.5% アガロースゲルにて 100V 30 分電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線照射により増幅 DNA を可視化した結果を Fig. 2 に示す。

Fig. 2 より、各 primer 対による増幅産物が予想されたサイズに増幅された事が確認した。次に、10 倍希釈した各精製遺伝子断片 1  $\mu$ l を、1  $\mu$ l の pET 100/D-TOPO プラスミドベクターに加え、氷上で 10 分間静置した。これに、TOP10 Competent Cells を 17  $\mu$ g 加え、15 分間氷上で静



M : Marker4 ( $\phi \times 174$ /HaeIII digest)  
① : Amplified DNA by MI003-004 Primer  
② : Amplified DNA by MI006-004 Primer  
③ : Amplified DNA by MI005-004 Primer  
Fig. 2 Result of amplified DNA by each primer pair.

置し、熱刺激を与えた後に S. O. C. 培地 100  $\mu$ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養した。この培養液全量をアンピシリン含有の LB 寒天培地に塗布し、37 $^{\circ}$ C で一晚培養した。一晚培養後に形成したコロニー数は MI003 Fragment 由来では 9 個、MI005 Fragment 由来では 11 個、MI005 Fragment 由来では 9 個、MI006 Fragment 由来では 3 個であった。形成したコロニーの内、コロニー-PCR で陽性であったものをアンピシリン含有 LB 培地にて、37 $^{\circ}$ C で一晚培養後にプラスミドの抽出を行った。コロニー-PCR は、各挿入遺伝子の増幅に用いた primer 対を使用した。最後に、抽出した各組換えプラスミドを 10 倍希釈し 2  $\mu$ l を、BL21-Star 25  $\mu$ g に加え、30 分間氷上で静置した後に熱刺激を与え、S.O.C.培地 100  $\mu$ l を加え 37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養した。この培養液全量をアンピシリン含有 LB 培地 10ml に継代し、3 種類の挿入遺伝子 (MI003 Fragment, MI005 Fragment, MI006 Fragment) を有する組換え大腸菌を得た。

### 3-2. 組換えタンパク質の発現

各組換え大腸菌のアンピシリン含有 LB 培地 10ml での菌体濃度が吸光度 ( $\lambda=600$ nm) で 0.7 となった時点で IPTG を終濃度 1.0mM になる様に添加し、挿入遺伝子の転写を誘導した。誘導後、1 時間毎に集菌し、2-4. に記した手順で培地成分試料、Lysis 上清試料、Lysis 沈殿試料の 3 種類の異なる発現画分試料を得た。得られた試料をアクリルアミドゲルで電気泳動し、その後、染色・脱色し、産生タンパク質を可視化した。この結果、MI003 Fragment と MI005 Fragment

が挿入された組換え体では、Lysis 上清（ペリプラズム画分）に、MI006 Fragment が挿入された組換え体では Lysis 沈殿（不溶性画分）に発現タンパク質が、非誘導試料と比較することで確認出来た。この結果を Fig. 3(A),(B),(C)に示す。

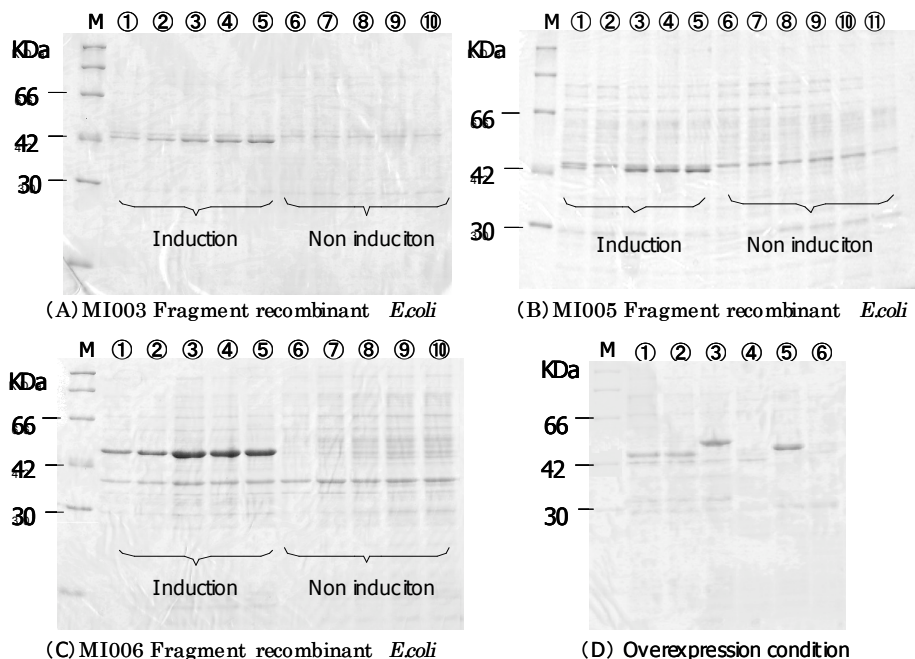
各組換え大腸菌からの発現タンパク質の予想される分子量は以下の通りである。MI003 Fragment 及び MI005 Fragment が挿入された大腸菌では約 51kDa（挿入遺伝子由来 46.5kDa + ベクター遺伝子由来 4.5kDa）、MI006 Fragment が挿入された大腸菌では約 47kDa（挿入遺伝子由来 42.5kDa + ベクター遺伝子由来 4.5kDa）である。また、挿入遺伝子が異なるのに関わらず、MI003 Fragment 挿入大腸菌と MI005 Fragment 挿入大腸菌で発現タンパク質の予想分子量が同等であるのは、MI003 Fragment にはタンパク質に翻訳されないリボソーム結合部位及びその周辺の塩基配列を余分に含んでいるためであり、結果として翻訳されるアミノ酸の数に差は生じない為である。

Fig. 3(A),(B),(C)より MI003 Fragment と MI005 Fragment が挿入された組換え大腸菌産生の発現タンパク質は約 42.0kDa に確認出来、予想され

る分子量 (51.0kDa) よりも小さかった。対して、MI006 Fragment が挿入された組換え体大腸菌の発現タンパク質は、予想された 47kDa に確認出来た。

分子量が予想される大きさよりも小さくなっているのは、シグナルペプチド産生部位を含む MI003 Fragment 及び MI005 Fragment 挿入の組換え大腸菌であった。さらに、これらの発現タンパク質分子量が、本来の  $\alpha$  毒素の分子量である 42kDa 付近に確認された点から、シグナルペプチドを含む発現タンパク質が、ペリプラズムへ輸送される際、シグナルペプチドが切断され、分子量が低下したと考えられた。

シグナルペプチドの切断を確かめる為、発現量を増やし、発現タンパクがペリプラズムへ輸送されない条件で、産生タンパク質の分子量解析を行った。この結果を Fig. 3(D)に示す。Fig. 3(D)より MI005 Fragment が挿入された大腸菌での発現タンパク質は Lysis 沈殿画分に予想されるサイズ (51.0kDa) で発現された事が確認出来たが、MI003 Fragment が挿入された大腸菌での発現タンパク質は Lysis 上清・沈殿の両方で約 42kDa ( $\alpha$  毒素の分子量) 付近でのみ発現タ



(A) Producing proteins of MI003 Fragment recombinant *E. coli* (B) Producing proteins of MI005 Fragment recombinant *E. coli* (C) Producing proteins of MI006 Fragment recombinant *E. coli* (D) ①Inclusion body sample of MI003 *E. coli* ②Lysis supernat sample of MI003 *E. coli* ③Inclusion body sample of MI005 *E. coli* ④Lysis supernat sample of MI005 *E. coli* ⑤Inclusion body sample of MI005 *E. coli* ⑥Lysis supernat sample of MI006 *E. coli* M is Protein MW Marker III (Cosmo Bio)

Fig. 3 SDS-PAGE gel electrophoresis analysis of recombinant *E. coli* producing proteins

ンパク質が確認された。これは、MI005 Fragment 及び MI006 Fragment と違い、MI003 Fragment には *C.perfringens* 由来のリボソーム結合部位が含まれており、ベクター由来のリボソーム結合部位よりも *C.perfringens* 由来のものが優先され、発現機構が異なる為だと考えられる。

### 3-3. インサート部位の確認

作製した組換えプラスミドを鋳型とし、T7-f・r primer 対を用いて PCR を行った結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4 より、作製した組換えプラスミド (①・②・④) では、挿入遺伝子よりも 282bp 大きい増幅産物が確認出来るため、正しく挿入遺伝子が組み込まれたことが示唆された。また、③は MI006 Fragment が組み込まれたはずのプラスミドで、コロニーPCR で陽性であったものだが、280bp 付近に増幅産物が確認出来るため、正しい位置に挿入遺伝子が組み込まれていない事が判明した。以上の結果から、コロニーPCR では意図していない位置に挿入遺伝子が組み込まれていても、コロニーPCR で陽性になってしまう場合があり、T7-f・r primer 対による確認 PCR は組換え体のスクリーニングに有用だといえる。

次に組換えプラスミドのインサート部位周辺と挿入遺伝子の塩基配列決定を CEQ8800 で行った。ベクターと挿入遺伝子の結合部位の解読結果を Fig. 5 に示す。Fig. 5 よりベクターに挿入遺伝子が正しく組換えられた事が分かる。また、全挿入遺伝子の塩基配列を解読した結果、比較対照とした D321241 株に対し、いくつかの変異が発見された。D321241 株に対する相同性は 99.2%、変異位置は以下 9 点である。13 位 (シグナルペプチド) が GCG → ACG (Ala → Thr)、26 位が TGT → TCT (Cys → Ser)、27 位が TCT → TCC (Ser → Ser)、60 位が AAC → AAT (Asn → Asn)、61 位が GCC → GCA (Ala → Ala)、68 位が CAT → CAC (His → His)、225 位が TTA → CTA (Leu → Leu)、233 位が GCA

→GCG (Ala → Ala)、345 位が ATA → GTA (Ile → Val)

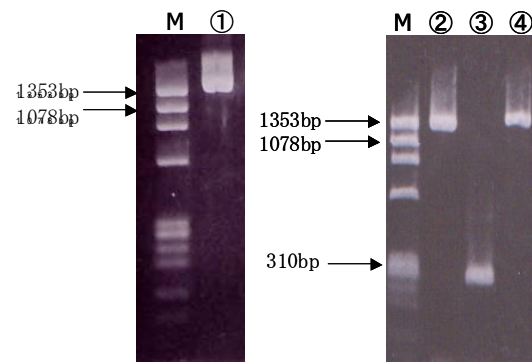
### 3-4. 発現タンパク質の酵素活性測定

大腸菌にて発現させた組換えタンパク質が、生理活性を有しているかどうかを確認する為、2-5. に記した Egg Yolk 法により、ホスホリパーゼ C 活性の測定を行った。

各組換え大腸菌から発現タンパク質が確認出来た試料及び、培地成分試料のホスホリパーゼ C 活性を Egg Yolk 法にて測定した結果を、Fig. 6 に示す。Fig. 6 より MI003・005 Fragment が挿入された大腸菌では Lysis 上清と培地成分に活性を確認出来たが、MI006 Fragment が挿入された大腸菌では、Lysis 上清・培養培地中・Lysis 沈殿のいずれの画分にも活性は確認出来なかった。

## 4. 結論

異なる領域を有する 3 種類の α 毒素産生遺伝子の組換えに成功した。このうち、シグナルペ



M : Marker4 ( $\phi \times 174$ /HaeIII digest)  
 ① : MI003 recombinant plasmid  
 ②,③ : MI006 recombinant plasmid  
 ④ : MI005 recombinant plasmid

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products by T7-f・r primer

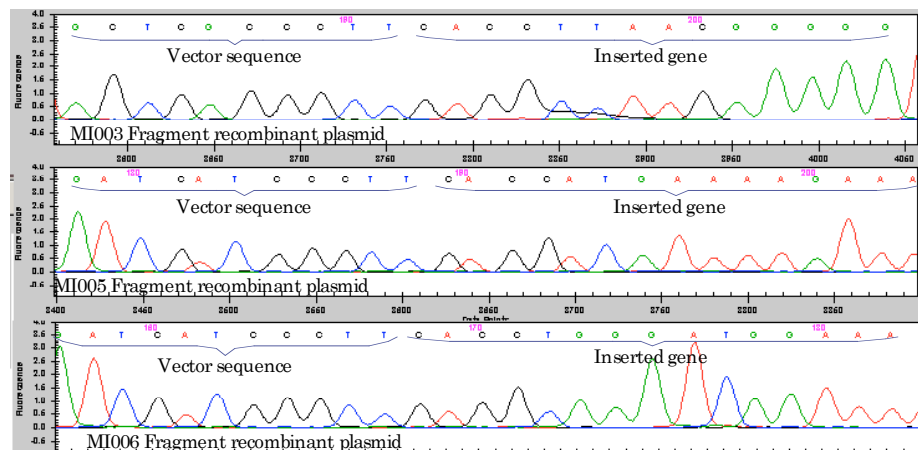


Fig. 5 Sequencing result of recombinant *E.coli* inserted region

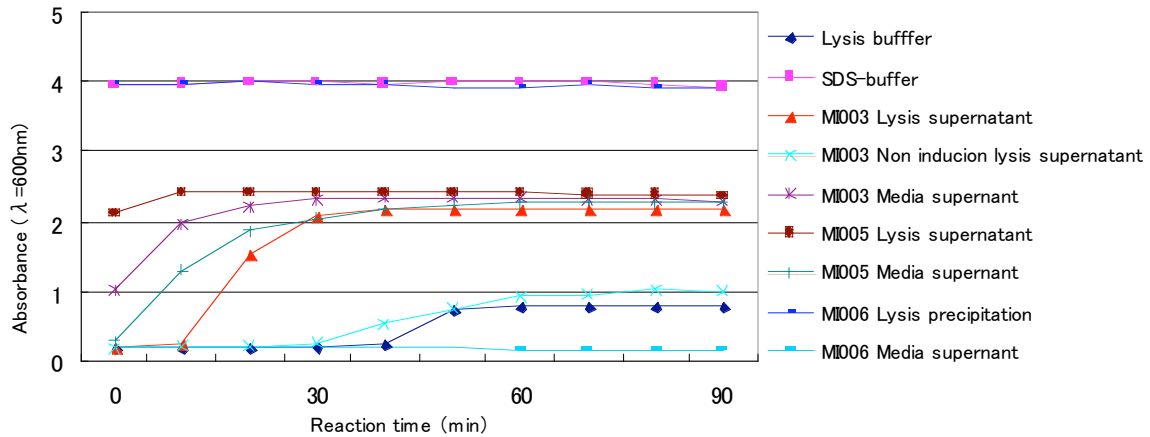


Fig. 6 Assay for Phospholipase C activity of recombinant *E.coli* producing proteins

プチド産生部位を含む組換え体は、シグナルペプチドが切断され、本来の $\alpha$ 毒素の分子量でLysis上清に発現し、培養液中へと分泌する事も確認され、それぞれの発現タンパクを含む試料には、 $\alpha$ 毒素が有するホスホリパーゼC活性を確認出来た。また、菌体由来のリボソーム結合部位を含む組換え体は、含まないものと比較し明らかに発現機構に違いがあったが、この詳細な機構の解明にはさらなる研究が必要だと考えられる。

*C. perfringens*  $\alpha$ 毒素は370個のアミノ酸から構成される分子で、N末端側の250残基(Nドメイン)とC末端側の251~370残基(Cドメイン)から構成されていると考えられており、Nドメインには、ホスホリパーゼC活性の酵素活性に共通のアミノ酸が存在していることから、このNドメインは、毒素の触媒作用に関与しているとされている<sup>10), 13)</sup>。解読した塩基配列変異の中でアミノ酸翻訳への影響があるのは、13位(シグナルペプチド)と26位、そして345位の三部分である。この内26位のアミノ酸は酵素活性に関与するNドメインに存在していたが、ホスホリパーゼC活性は失っていなかった。

本研究により、*C. perfringens* のシグナルペプチドは大腸菌発現系においても、細胞外分泌に有用であることが判明し、今後はリボソーム結合部位の有用性について検討を加えたい。

#### 参考文献

- 1) C L Hatheway. Toxigenic clostridia. 1990. Clin Microbiol Rev. 3 (1) 66-98.
- 2) J Sakurai. Toxins of *Clostridium perfringens*. 1995. Reviews in Medical Microbiology. 6 (3)

175-185.

- 3) MM Awad, AE Bryant, DL Stevens, and JI Rood. 1995. Molecular microbiology. 15 (2) 191-202.
- 4) Songer JG. 1996. Clinical microbiology reviews. 9(2):216-34.
- 5) K Ohtani, H Hayashi, and T Shimizu. 2002. Molecular microbiology. 44 (1) 171-179.
- 6) T Shimizu, H Yaguchi, K Ohtani, S Banu, and H Hayashi 2002. Molecular microbiology. 43 (1) 257-265.
- 7) MB Miller, and BL Bassler. 2001. Annual review of microbiology. 55 165-199.
- 8) FW Studier, AH Rosenberg, JJ Dunn, and JW Dubendorff. 1990. Methods in enzymology. 185 113-130.
- 9) RW Titball, SE Hunter, KL Martin, BC Morris, AD Shuttleworth, T Rubidge, DW Anderson, and DC Kelly. 1989. Infection and immunity. 57 (2) 367-376.
- 10) M Nagahama, T Nakayama, K Michiue, and J Sakurai. 1997. Infection and immunity. 65 (8) 3489-3492
- 11) J Sakurai, Y Fujii, K Torii, and K Koobayashi. 1989. Toxicon. 27(3) 317-323.
- 12) T Shimizu, K Ohtani, H Hirakawa, K Ohshima, A Yamashita, T Shiba, N Ogasawara, M Hattori, S Kuhara, and H Hayashi. 2002. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 99 996-1001.
- 13) EN Claire, TE Julian, H Angela, J Neil, SM David, and WT Richard, KB Ajit 1998. Nature Structural Biology. 5 738 - 746