

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

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

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、その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<sup>1)</sup>。

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、それぞれ特異性などに関して問題が指摘されている<sup>2)</sup>。

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、質量分析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った。

### 2. 実験方法

#### 2-1. 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* GAI 99093 株を使用した。本菌は *C. difficile* の毒素タンパクとして挙げられる Toxin A, Toxin B 両方の産生性を持つ菌体である。また陰性検体として毒素非産生性の *C. difficile* GAI 99047 株も使用した。

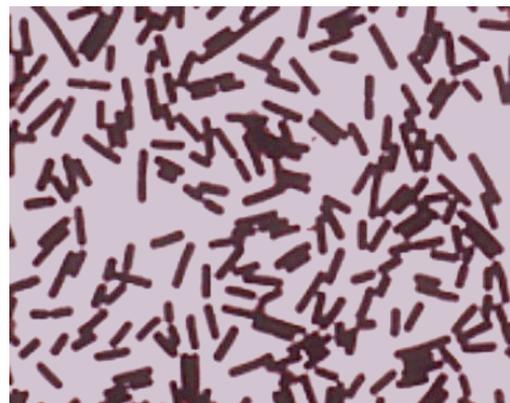


Fig. 1. Gram stain examination of *C. difficile*

#### 2-2. 培養

実験においては確実に *C. difficile* の培養を行う為に、前培養ならびに本培養と呼ばれる2段階の培養を行うことによって菌の活性を保ちながら純粋に細菌の培養を行った。まず、GAI 99093 株ならびに GAI 99047 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を行った。そして前培養として、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、本培養とし

て 500ml メディウム瓶を用いて BHI 液体培地に 2~7 日間本培養を行い培養条件の検討を行った。また偏性嫌気性菌は非常に厳密な嫌気状態を必要としているので、培養はどの段階においても嫌気状態を保てるように密閉性の高い容器を使用し、嫌気条件下 37°C で行った。

### 2-3. 菌体除去

菌体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 (8000×g, 30 min) し、菌体を沈殿させ取り除いた。さらにポアサイズ 0.45 μm のタンパク低吸着性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。

### 2-4. 硫酸アンモニウム分画

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を塩析させタンパク抽出を行った。硫酸アンモニウムの設定濃度は 45%, 55%, 65% の 10% 刻みで塩析を行った。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°C 以下を維持して行った。その後、遠心分離 (9000×g, 30 min) を行い、タンパクとその他の培地成分を分離し、タンパクは 0.05 M Tris-HCl buffer に溶解し試料とした<sup>3)4)</sup>。

### 2-5. ポリアクリルアミド電気泳動

目的タンパクの抽出や分離確認の為に、ポリアクリルアミドゲルを作製し SDS-PAGE を行った。今回の実験においては、5.0%, 10.0%, 12.5% 等のゲルを用い定電圧で泳動操作を行った。その後、CBB 染色または銀染色によりタンパクを染色して確認を行った。

### 2-6. タンパク定量

抽出した総タンパクの定量法として、ビンコニン酸法 (BCA 法) を用いた。BCA 法は、ペプチド結合由来の反応で発色し、色素結合法について感度が高く、またタンパク間のばらつきが少ないので明瞭なデータが得られた。

実験においては 96well-plate を用い、マイクロプレートリーダー SpectraMax M2 (Molecular Devices K.K.) を使用して測定を行った。

### 2-7. タンパク 2 次元分画

HPLC の 1 種である ProteomeLab PF 2D (Beckman Coulter K.K.) を用いてタンパクの分離を行った。この HPLC では、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を用いており、それら 2 種の展開によりタンパクの分離を行った。

それぞれの過程においてはフラクションを採取しており、必要に応じて次の過程の試料とした。

### 2-8. 細胞変形能の確認

毒素タンパクの生理活性の確認の為に、付着細胞である MDCK 細胞を用いて細胞変形能 (CPE : cytopathic effect) の確認を行った。

### 2-9. 質量分析

目的タンパクの質量分析の為に、質量分析装置 LTQ Orbitrap Hybrid FT Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific K.K.) を用いた。この装置はイオン化の方法としてタンパクに最適なエレクトロスプレーイオン化法 (ESI : Electrospray Ionization) を用いている。分析においては MS フラグメンテーションパターンの解析検索をし、タンパクの同定を行った<sup>5)</sup>。

### 3. 結果・考察

実験においては、*C. difficile* の産生するタンパクの抽出・精製を行っていくにあたり、まず始めに培養日数の至適条件の検討を行った。

その結果 Fig. 2 に示すように、産生された総タンパク量に関して、硫酸濃度 65% 分画物は 7 日目、硫酸濃度 55% 分画物は 6 日目、硫酸濃度 45% 分画物は 5 日目がそれぞれ最大となった。

しかし、Fig. 3 に示した PAGE の結果を見るとバンドの濃さより、3 日培養物がどの硫酸分画物においても目的タンパクが濃く検出されていることが分かる。また、硫酸濃度 65% の場合が効率よく塩析を行っていることが確認された。

以上のことより、培養日数増加に伴い培養液中のタンパク濃度は増加傾向にあるが、菌体が毒素タンパクを効率よく産生するのは植え継ぎ後 3~4 日であり、これは菌体の対数増殖期と重なると考えられる。その為、*C. difficile* 産生タンパクの抽出にはその時期の培養物を用いるのが適していると考えられた。

その後の実験において *C. difficile* の産生するタンパクの分離・精製を行っていくにあたっては、至適培養条件において産生されたタンパクの採取を行った。タンパク抽出操作により得た試料をタンパク 2 次元分画システムである PF2D により、分離・分析を行った。そしてその内、クロマトフォーカシングを用いた HPLC によって得られた結果を Fig. 4 に示した。グラフ中に楕円で囲まれた部分付近が目的のタンパクの isoelectric point 付近である。そしてその目的部分付近のフラクションを SDS-PAGE により分析したところ、Fig. 5 に示した様に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

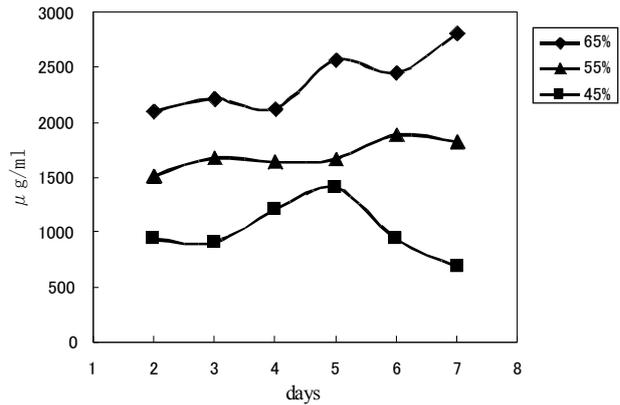


Fig. 2. Incubation time and amount of produced protein by *C. difficile*



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Lane 1: 2days incubation, precipitate from 65% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Lane 2: 3days incubation, precipitate from 65% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Lane 3: 4days incubation, precipitate from 65% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Lane 4: 5days incubation, precipitate from 65% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Lane 5: 6days incubation, precipitate from 65% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Lane 6: 2days incubation, precipitate from 55% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Lane 7: 3days incubation, precipitate from 55% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Lane 8: 4days incubation, precipitate from 55% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Lane 9: 5days incubation, precipitate from 55% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Lane 10: 6days incubation, precipitate from 55% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Fig. 3. SDS-PAGE analysis of *C. difficile* producing proteins

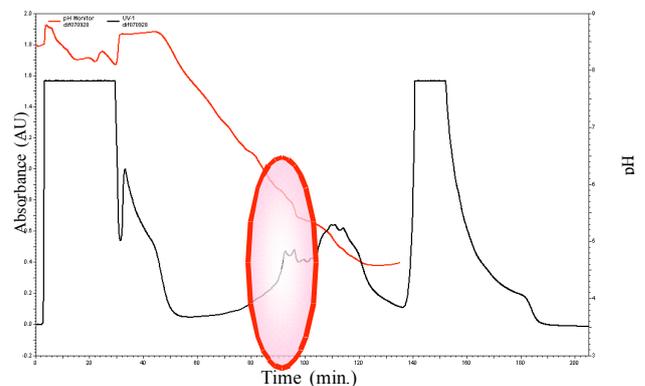


Fig. 4. Results of 1st Dimension -HPLC using chromatofocusing method by PF2D

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ところ、付着細胞である MDCK 細胞の壁面からの剥離などの変形が観察され CPE 陽性が確認された。

さらに HPLC により得られたフラクションに関して 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である、3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase 等を同定することができた。

#### 4. 結論

本研究ではプロテオミクスの見地から *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った。その結果、まず *C. difficile* 産生のタンパクを効率よく採取する為には本培養日数 3~4 日で硫酸濃度 65% が最適であった。また、HPLC によるタンパク分離では、CPE による確認や質量分析によりそれぞれ *C. difficile* 由来の特異的なタンパクを検出することが出来た。

近年は遺伝子組換えキットの発達により、組換えタンパクに関する研究が多い中、本研究では実際の臨床分離細菌自体からのタンパクの分離・検出といったところに着目した。そして、この研究を通して、コンタミネーションの多いタンパク試料中からも簡便かつ高感度に *C. difficile* 由来の特異タンパクを分離同定することが可能と言え、将来的に臨床分野においての利用の可能性が示唆された。

#### 5. 参考文献

- 1) D.M.Lyerly, H.C.Krivan, and T.D.Wilkins: *Clostridium difficile*: Its Disease and Toxins., Clinical microbiology reviews, 1-1(1988), 1-18
- 2) Izumida S, Kato H, Hashimoto S, Nakamura M.: Comparison of rapid tests of toxin A and

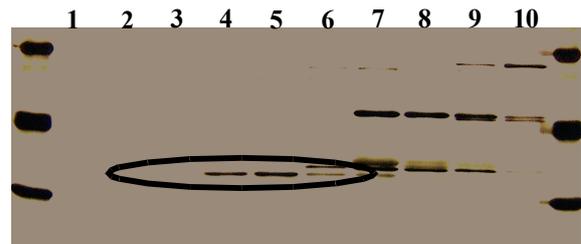


Fig. 5. Analysis of HPLC fractions from *C. difficile* protein by SDS-PAGE

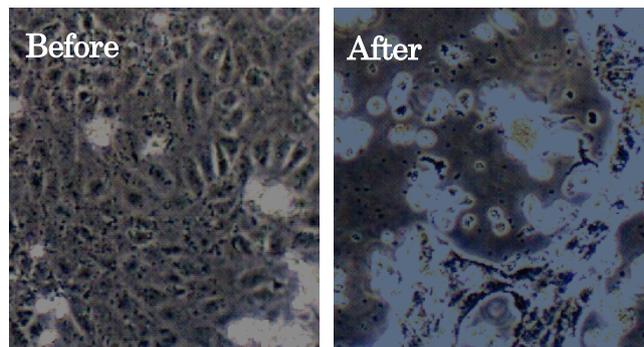


Fig. 6. Photomicrographs of toxicity assay with *C. difficile* cytotoxin on MDCK cells

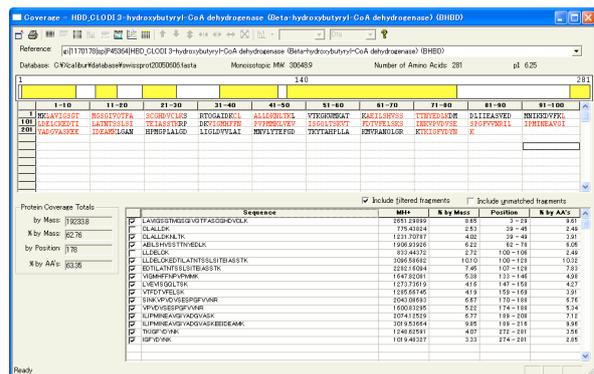


Fig. 7. Result of Mass Spectrometry

glutamate dehydrogenase and culture for detection of *Clostridium difficile*, Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi, 102-8(2005):1004-1009

- 3) Si-Wu Fu *et al.*: Simplified purification method for *Clostridium difficile* toxin A, World Journal of Gastroenterol, 10-18 (2004), 2756-2758
- 4) 大島泰郎：基礎生化学実験法 3 タンパク質 I 検出・構造解析法，東京化学同人 (2001)，107-112
- 5) 原田健一，田口良，橋本豊：生命科学のための最新マスペクトロメトリー，講談社サイエンティフィック (2005)





