

偏性嫌気性菌 *Clostridium perfringens* の臨床検査に関する研究

日大生産工 神野 英毅、東邦大理 岩村 道子
東邦大・薬 松本 宏治郎

本研究は、*Clostridium perfringens* の迅速診断を目的とし行われた。平成 17 年度は、本菌を迅速に測定するために遺伝子学的手法を用いて検出を行った。平成 18 - 21 年度は、本菌が分泌する α 毒素をターゲットとし、イムノアッセイを用いた検出を行うために、*Clostridium perfringens* 培養液からの α 毒素の精製、大腸菌を用いた遺伝子組換え α 毒素の作製、組換え α 毒素の LC/MS/MS を用いた同定、組換え α 毒素によるモノクロナール抗体の作製等を行った。本報告は、その組換え α 毒素の作製から抗体の作製までの研究を報告する。

1. 緒言

C. perfringens (*Clostridium perfringens*) は、腸管内、土壌など自然界に広く分布し、 α 毒素を始めとして種々の毒素産生能により A~E 型に分類される偏性嫌気性グラム陽性桿菌の一種である。本菌はヒトへの感染症として、食中毒、ガス壊疽、化膿性感染症等が知られており、その主な病原因子は A 型菌である。さらに、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ため、その予防や治療が重要視されている。本菌の検出法には、培養法、遺伝子学的手法である PCR (polymerase chain reaction) 等があるが、これらの手法には操作の簡易化、時間の短縮が求められている^{1,2)}。一方で、迅速な検出が可能な免疫学的手法はエンテロトキシンが対象のため、一部の A 型菌のみが検出対象となる。また、*C. perfringens* の A 型を含め全菌型が産生する毒素である α 毒素は抽出が困難であり、回収量が微量なことが課題となる。

本研究では、遺伝子組換え技術を用いて α 毒素を大量生産することで抗原を作製し、目的の抗 α 毒素抗体を得ることで簡便かつ高感度な免疫学的手法の確立を目的とする。

2. 実験

2-1. 抗原作製

2-1-1. 遺伝子断片の調整

C. perfringens は、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分与された臨床分離株である *C. perfringens* GAI 94074 株を使用した。

C. perfringens の α 毒素に相当する遺伝子を Table 1 に示したプライマー MI06、MI04 を用いて PCR により増幅した。得られた PCR 産物は、クリスタルバイオレットゲルを用いて切り出し精製し、Wizard[®]SV GEL and PCR Clean-up System (Promega) により抽出した。

2-1-2. 組換えプラスミドの作製

精製した DNA 断片と pET100/D-TOPO ベクター (Invitrogen) を混合し、*E. coli* TOP10 Competent Cells (Invitrogen) にヒートショックにて形質転換した。この組換え菌体を ampicillin 含有の LB 寒天培地に塗布し、37°C で一晩培養した。形成したコロニーに対し、T7 プライマー (Table 1) を用いた PCR によるスクリーニングを行い、陽性を示したコロニーを LB 培地にて培養した。培養後、Wizard[®]SV GEL and SV Minipreps DNA purification System (Promega) を用いてプラスミドを抽出し、組換えプラスミドベクターを得た。

2-1-3. 組換えタンパク質の発現

Table 1 Primer pairs for α -toxin and T7 fragment

Fragment	Primer	Primer sequence (5'-3')	Tm (°C)	Size
α -toxin	MI06	CACCTGGGATGGAAAAATTGAT	65.6	1117 bp
	MI04	TTATTTTATATTATAAGTTGAATTTCTGA	58.6	
T7 fragment	T7-F	TAATACGACTCACTATAGGGGAATTG	61.9	1399 pb
	T7-R	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	62.7	

作製した組換えプラスミドを *E. coli* BL21-star (Invitrogen) に形質転換した。この形質転換体に IPTG (isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside) を作用させることで、組換えタンパク質の発現を誘導した。組換えタンパク質の発現確認は、IPTG を添加、非添加による比較培養をし、その培養液の遠心分離 (13200 rpm, 2 min) し、その上清試料と沈殿試料を SDS-PAGE にて比較することにより確認を行った。

2-1-4. 組換えタンパク質の精製および同定

発現した組換えタンパク質にはベクター由来の His-tag が修飾される。このヒスチジンに対して親和性のある Ni イオンを用いた Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) 充填カラムおよび溶出剤に含まれるイミダゾール濃度を検討し、精製系の確立を行った。精製した組換えタンパク質はプロテオーム解析として LC/MS/MS (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific) により同定した。

2-2. 抗体作製

2-2-1. 免疫

Balb/c マウスに精製した組換え α 毒素抗原を 30 μ g - 50 μ g の範囲で等量のアジュバントと混合し、腹部の皮下に投与した。これを 2 週に 1 回の割合で免疫を行った。

2-2-2. 細胞融合

免疫したマウスの心臓から全血を採取後、エタノールに浸した。腹部から脾臓を摘出し、この脾臓細胞とミエロマ細胞 (形質細胞腫細胞株 P3U1) を PEG (polyethylene glycol, 分子量 1500) により 5 : 1 で融合した。融合後は 96 穴プレートにて培養し、

ELISA 法を用いてスクリーニングおよび限界希釈法によりクローニングすることにより目的のハイブリドーマを樹立した。

2-2-3. 抗体精製

樹立したハイブリドーマをプリスタン処理をした Balb/c マウス腹腔内に投与し、腹水として高濃度の抗体を回収した。抽出した腹水に飽和硫酸アンモニウム溶液を 1 : 1 で加え、塩析を行った。得られた沈殿物を PBS (pH 7.0) により溶解し、透析した。透析した溶液を Protein G カラム (GE Healthcare) によりアフィニティー精製した。また、得られた抗体は Iso Strip (Roche Diagnostics) によりクラスおよびサブクラスを確認した。

2-3. 抗体価測定

2-3-1. ELISA

作製した抗体の反応性を検証するため、ELISA の間接法を行った。96 穴プレートを用いて 10 μ g/ml

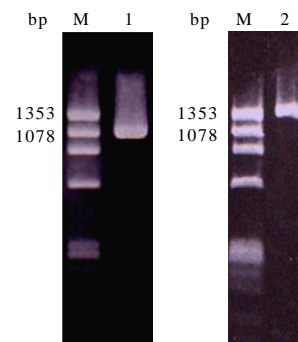


Fig. 1 Amplified α -toxin DNA and T7 fragment ; M is "Marker4 (ϕ \times 174/HaeIII digest)", lane 1 is amplified DNA using M106-M104 primer pair, and lane 2 is amplified DNA using T7 F-R primer pair.

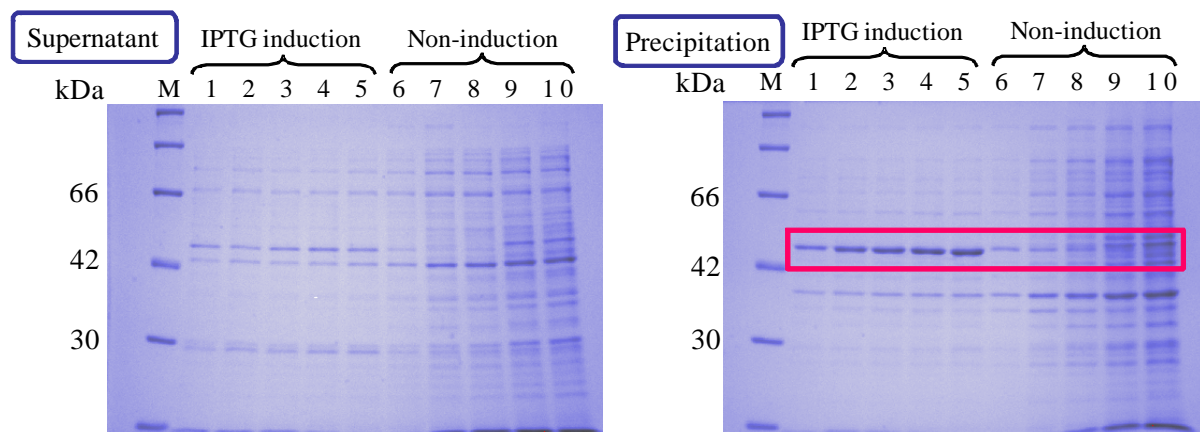


Fig. 2 Expressed protein induced by IPTG, left figure indicates supernatant samples and right figure indicates pellet samples ; lane 1-5 are IPTG induction incubated from 1h to 5h, and lane 6-10 are non-induction. M is "Molecular Weight Marker, High Range (Wako)".

の組換え α 毒素を固相化し、1次抗体として作製した抗体を10倍、100倍、500倍、1000倍、2000倍希釈して添加した。2次抗体として抗マウスIgGヤギ血清HRP標識モノクローナル抗体を4000倍希釈して使用した。基質液はOPD (*o*-phenylenediamine dihydrochloride)と過酸化水素を溶解したクエン酸-リン酸buffer (pH5.4)を使用し、波長を492 nmとして吸光度を測定した。

2-3-2. Western blot

抗体の特異性を確認するため、western blotを行った。粗精製した組換え α 毒素をゲル電気泳動し、iBlot®Gel Stacks (Invitrogen)を用いてメンブレンに転写した。このメンブレンに1次抗体として1000倍希釈した作製抗体を反応させ、2次抗体として4000倍希釈した抗マウスIgGヤギ血清HRP標識モノクローナル抗体を添加した。基質液はTMB Stabilized Substrate for HRP (Promega)を使用し、20分間遮光後、目視により反応を観察した。

3. 結果および考察

3-1. 抗原作製

3-1-3. 遺伝子断片および組換えプラスミドの調整

Fig. 1に設計した各プライマーによる遺伝子産物の結果を示す。Lane 1にはMI06-MI04プライマーによる α 毒素遺伝子のPCR産物、lane 2には作製した組換えプラスミドをT7プライマーによるPCR産物のゲル電気泳動写真である。MI06-MI04プライマーの遺伝子産物は、Table 1に示したサイズと一致することから α 毒素遺伝子の増幅に成功したと考えられる。この遺伝子を用いて作製した組換えプラスミドはベクターから挟み込むように設計されたT7プライマーにより本来の長さに加え、282 bpのベクター由来の遺伝子が加算される。Lane 2においてその遺伝子断片が確認されたことから組換えプラスミドの作製に成功した。

3-1-2. 組換えタンパク質の発現

作製したプラスミドを用いて実験方法2-1-2に従い、タンパク質を発現させた結果をFig. 2に示す。沈殿試料において、非誘導にはないバンドが誘導側に経時的に濃く見られることから、組換えタンパク質が発現したと考えられる。また、遺伝子断片から

算出したタンパク質分子量の理論値は47 kDaであるため、バンドの位置としても一致していることから目的の組換えタンパク質であることが考えられる。

3-1-3. 組換えタンパク質の精製

Fig. 2より沈殿試料において非誘導側には無いバンドが誘導側で見られたことから、組換えタンパク質の発現が確認できた。ここで、組換えタンパク質が沈殿試料に存在していたため、8 Mの尿素を含む0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0)を用いて可溶化を行った (Fig. 3)。可溶化した上清試料を用いて、溶出液に含まれるイミダゾール濃度の検討により精製系を確立した。作製した組換えタンパク質は、イミダゾール50 mMを送液後、イミダゾール80 mMを送液することで単一のバンドが確認された。イミダゾール50 mMの溶出液を送液することで、夾雑タンパク質が取り除かれ、イミダゾール80 mMにおいて純度の高い組換えタンパク質が回収できたと考えられる (Fig. 4)。

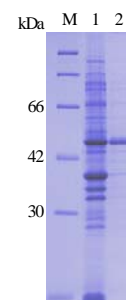


Fig. 3 Urea treatment; lane 1 is precipitation sample after urea treatment, and lane 2 is supernatant sample using. M is “Molecular Weight Marker, High Range (Wako)”.

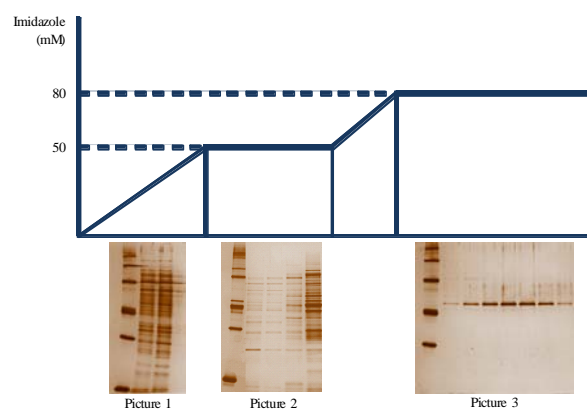


Fig. 4 Purification system; picture 1 indicates fractions for wash, picture 2 indicates fractions of 50 mM imidazole concentration, picture 3 indicates fractions of 80 mM imidazole concentration at which only the protein of interest was eluted.

3-1-4. 組換えタンパク質の同定

LC/MS/MS による解析結果を Table 2 に示す。精製した組換えタンパク質を試料として解析した結果、15本の α 毒素に特異的なポリペプチド鎖が検出された。一般的に MS の同定では、比較対象に由来する2本の特異的なポリペプチド鎖が検出されることが基準となる³⁾。従って、本研究にて作製した組換えタンパク質は α 毒素であることが同定された。

3-2. 抗体作製

作製した抗原をもとに抗体を作製した結果、3つのモノクローナル抗体 (B3, D4, E5) を樹立した。それぞれ Iso Strip によりクラス・サブクラスを確認したところ IgG \cdot κ 鎖であることが分かり、免疫学的測定法に応用可能であると示唆された。

3-3. 抗体価測定

3-3-1. ELISA

MoAb (monoclonal antibody) B3, D4, E5 の反応性を Fig. 5 に示した。ELISA の陽性反応の基準を N. C. (negative control) の吸光度値の2倍以上かつ吸光度値0.1以上とした。その結果、MoAb B3 は1000倍希釈、MoAb D4, E5 はそれぞれ500倍希釈まで抗原との反応性を示し、免疫学的手法を確立するのに十分であると考えられる。

3-3-1. Western blot

Fig. 6 に western blotting の結果を示す。ゲル電気泳動では目的の α 毒素以外に複数のタンパク質が確認されるが、作製した抗体は全て α 毒素のみに反応し、メンブレン上でバンドとして確認された。従って、作製した抗体は全て α 毒素に対して特異性を有していると考えられる。

4. 結言

遺伝子組換えにより、His-tag が修飾された組換えタンパク質を作製することができた。この組換えタンパク質は LC/MS/MS により α 毒素であることが同定された。高純度に精製された組換え α 毒素は、組換え菌体培養液 60 ml から 0.2 mg 回収することができた。本研究では、3つのクローン MoAb B3, D4, E5 の樹立に成功した。これらの抗体は ELISA および western blot の結果から反応性と特異性を有しており、免疫学的手法の確立に有用である事が示唆され臨床検査への応用が可能である。

Table 2 Identified α -toxin peptides by LC/MS/MS

Matched peptides sequence	Observed position
IDGTGTHAMIVTQGVSIENLDSK	33-56
NLEILK	65-70
ENMHELQLGSTYPDYDK	71-87
NAVDLYQDHFWDPTDNNFSK	88-108
DNSWYLAYSIPDTWESQIR	109-127
FETFAEER	179-186
TNEDFYADILK	199-209
GTAGYIYRF	259-267
LHDVSEGN D P S V G K	268-281
ELVAYISTSGEK	285-296
DAGTDDYMYFGIK	297-309
TQEWEMDNPGNDFMTGSK	315-332
IDIQNMWIR	346-355
YTAFPDAYKPENIK	359-372
DINEWISGNSTYNIK	384-398

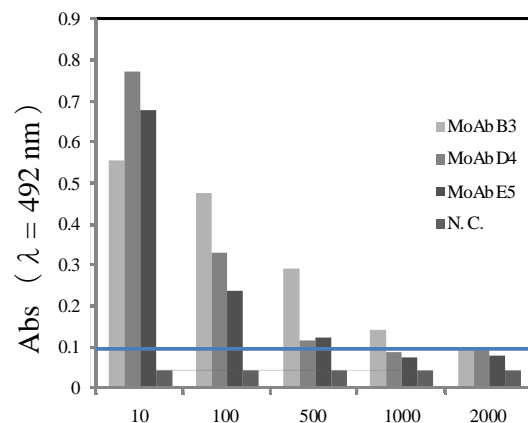


Fig. 5 Reactivity of MoAb B3, D4, E5

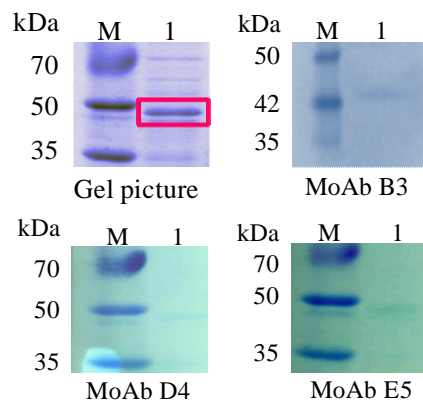


Fig. 6 Western blotting using MoAb B3, D4, E5; M is "WIDE-VIEWTM Prestained Protein Size Marker II (Wako)", and lane 1 is crude purified recombinant α -toxin.

5. 参考文献

- 1) M. T. McCourt, D. A. Finlay, C. Laird, *et al.* : *Veterinary Microbiology*, **106**, (2005), 259-264.
- 2) T. Shimizu, K. Ohtani, H. Hirakawa, K. Ohshima, *et al.* : *PNAS*, **99**, (2002), 996-1001.
- 3) Alexey I Nesvizhskii, *et al.* : *Nature Publishing Group*, **4-10**, (2007), 787-797.