

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

日大生産工（院） 白井 篤義  
日大生産工 神野 英毅

## 【緒言】

*Clostridium difficile* (*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。また、*C.difficile* は近年医療問題となっている院内感染症の原因菌の一つとして挙げられている。

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。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 (CD チェック D1 法)・酵素免疫測定法が行われているが、それぞれ特異性の点などで問題が指摘されている。

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* の産生する毒素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、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ている。

## 【実験方法】

### <使用菌体>

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* GAI99093 株を使用した。本菌は *C.difficile* の毒素タンパク Toxin A , Toxin B 両方の産生性を持つ菌体である。

### <培養>

GAI99093 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した。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、300ml メディウム瓶を用いて BHI 液体培地にて 2~7 日間、培養日数を変化させ本培養を行った。培養はどの段階においても、嫌気条件下 37 °C で行った。

### <菌体除去>

菌に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 (9000 × g , 30min) 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。

### <硫酸分画>

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質を塩析させタンパク抽出を行った。硫酸の設定濃度は 45%,55%,65%の 10%刻みで塩析を行った。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、遠心分離を行い、タンパクと培地成分を分離し、タンパクは 0.02M Tris-HCl buffer に溶解し試料とした。

#### < ポリアクリルアミド電気泳動 >

目的タンパクの抽出確認の為に、ゲルを製作し SDS-PAGE を行った。今回の実験においては、5%のゲルを用い定電圧で泳動操作を行った後、CBB 染色によりタンパクを染色して確認を行った。

#### < タンパク定量 >

抽出した総タンパクの定量法として、ピニンコニン酸法 (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、またタンパク質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 (Molecular Device 社) を使用して測定を行った。

#### 【結果・考察】

今回の実験においては、*C.difficile* の産生する毒素タンパクの抽出・精製を行っていくにあたって、培養日数の至適条件の検討を行った。

その結果 Fig.1 に示すように、総タンパク量では、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 日目それぞれピークとなった。

しかし、Fig.2 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。

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、毒素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。

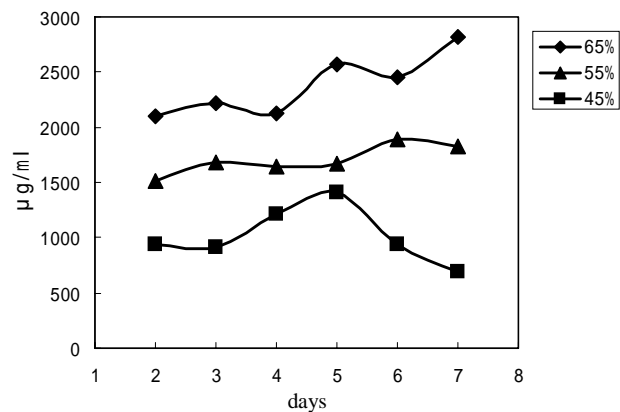
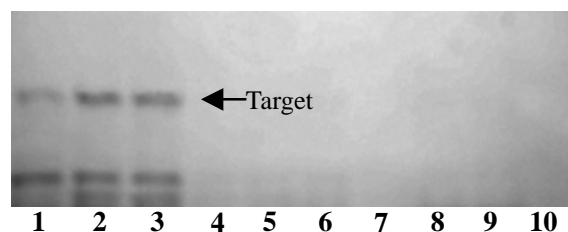


Fig.1 Incubation time and produced protein



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.2 SDS-PAGE analysis of toxin proteins

#### 【参考文献】

- Simplified purification method for *Clostridium difficile* toxin A , Si-Wu Fu *et al.* , *World Journal of Gastroenterol* , 2004;10(18):2756-2758
- Comparison of wild type with recombinant *Clostridium difficile* toxin A , Ralf Gerhard *et al.* , *Microbial Pathogenesis* 38(2005) , 77-83
- Purification and Characterization of Toxin B from *Clostridium difficile* , JAMES MEADOR and RODNEY K. TWETEN , *Infection and Immunity* , July 1988 , p.1708-1714
- 基礎生化学実験法 第3巻 タンパク質 , 東京化学同人