

遺伝子組換え毒素及びモノクローナル抗体を用いた *Clostridium perfringens* の迅速診断法に関する研究

日大生産工(院) ○井上 方晴
日大生産工 神野 英毅

1. 緒言

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) は、腸管内、土壌など自然界に広く分布しており、多彩な毒素や酵素群を産生する偏性嫌気性グラム陽性桿菌の一種である。本菌によるヒトへの感染症として食中毒・ガス壊疽などが知られている。さらに、ヒト以外の家畜を含めた動物に対しても致死感染を引き起こす為、その予防や治療が重要な菌として知られている。現在行われている診断法としては、免疫学的診断法や PCR 法が挙げられるが¹⁾、迅速性・簡易性において問題点を残しているのが実状である^{2,3)}。これらの実状を踏まえ、本研究では、特別な機器を必要としない簡易な免疫学的診断法による *C. perfringens* 産生毒素の検出法の確立を目的し、モノクローナル抗体を作成する際に必要となる抗原を簡易に得る為、 α -toxin 産生組換え体大腸菌の作成と抗原となる組換え α -toxin の精製を目指した。

2. 実験方法

2-1. 使用菌体と DNA 抽出

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 *C. perfringens* GAI 94074 株を 3%BHI 液体培地 (difco) で 3~4 日間嫌気培養を行い純培養した後、実験に使用した。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。

2-2. 毒素産生部位遺伝子の増幅

ベクターに組み込む α 毒素の全遺伝子領域を増幅する為、Primer (Table 1) として 5' 末端に CACC の配列を有する MI003 及び、5' 末端に終止コドンに相補的な配列 (TTA) を有する MI004 を用い、annealing 温度を 54°C に設定し目的領域の遺伝子を増幅した。増幅後、クリスタルバイオレットを含むアガロースゲルにて電気泳動を行い、Wizard[®] SV GEL and PCR Clean -up System (Promeg) を用いて、ゲルから増幅 遺伝子を抽出・精製し、挿入遺伝子とした。

2-3. 大腸菌への毒素産生部位遺伝子の導入

精製した DNA に pET 100/ D-TOPO vector (Invitrogen) を添加し静置後、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 Ampicillin 含有のアガロースゲルプレート上に展開し、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 LB 培地にて一晚培養し、培養液から Wizard[®] SV GEL and SV Minipreps DNA purification System (Promeg) を用いて、プラスミドの抽出を行った。

2-4. 組換え毒素タンパクの発現

抽出した pET 100/ D-TOPO プラスミドを BL21-star (Invitrogen) に加え氷上静止後、熱刺激 (42°C 30 秒) を加え形質転換した。これに SOC 培地を加え 1 時間培養後、培養液を LB 培地に加え一晚培養後、吸光度 ($\lambda=600\text{nm}$) が 1.5 となった地点で誘導物質である IPGM を添加して発現を誘導し、1 時間毎に菌体を集菌した。

2-5. 組換え毒素タンパクの精製

培養液を遠心分離し、ペレットを溶解緩衝溶液で溶解させた。その後、リゾチームと Triton X-100 をそれぞれ加え、30 分間遠心分離し、ペレットを 8 M urea で溶解した。この溶液中の毒素タンパク質を His Trap HP (GE health care bioscience) に結合させて、250mM イミダゾールで溶出させることで精製を行った。

3. 結果及び考察

3-1. 組み換え用 Primer の設計

ベクターに組み込む PCR 産物には 5' 末端に CACC が入っている事が必要であり、また、組み込む DNA 断片にはタンパク質翻訳部位以外にも、リボソーム結合部位とシグナルペプチド部位が必要と考え MI003・MI004 を設計した。本プライマーにより増幅される配列は 1265bp と推定された⁴⁾。各プライマーの配列を Table 1 に示す。塩基配列は DDBJ/EMBL /GenBank D321241 を参照した。

3-2. α -toxin 遺伝子の増幅

MI003-004 を Primer として PCR を行った結果を Fig. 1 に示す。1353bp と 1078bp 間(1270bp 付近) にバンドを確認出来たので、5'末端に CACC を有し、リボソーム結合部位とシグナルペプチド部位を含む α 毒素産生遺伝子の増幅に成功したと言える。

3-3. 組換え体のスクリーニング

増幅遺伝子断片をゲルから抽出精製し、ベクターに組込み、これを熱刺激下で TOP10 Competent Cells に導入した。1 時間 SOC 培地にて培養後、アンピシリンを含む LB 培地にて一晚培養し、形成したコロニーから組換え体のみをスクリーニングする為、MI003-004 を用いてコロニー PCR を行った結果を Fig. 2 に示す。

Fig. 2 より、④・⑤・⑥のコロニーを形成したものが組換え体と同定出来た。

3-4. 発現用大腸菌への形質転換

④のコロニーを LB 培地にて大量に培養し、プラスミドの抽出を行った。ここで、遺伝子がベクターの意図した場所に組込まれたのか確認する為、挿入遺伝子を挟み込むような T7r-f プライマーを設計し、PCR 法にてその増幅を確認した結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3 より 1400bp 付近に増幅を確認出来た。意図した場所に遺伝子が挿入された場合、増幅遺伝子は 1373bp と推定できるので、正しく組換えが行われた事が確認出来た。次に抽出したプラスミドを BL21- star に熱刺激下で形質転換した。

3-5. 誘導物質による組換え毒素の発現

組換えプラスミドが形質転換された BL21- star を吸光度 1.5 まで増殖後、IPTG を終濃度 10 mM 添加し、5 時間まで発現誘導を行った。採取した菌体をリゾチームで処理し、タンパクの発現を SDS-PAGE で確認した結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4 より、③~⑤で非誘導のレーンには確認出来ないバンドが存在することが分かる。これより、吸光度 ($\lambda=600\text{nm}$) が 1.5 時の誘導物質を加えた場合、3 時間以降から組換えタンパクが発現される事が示唆された。

4. 参考文献

- 1) J. I. Rood, S. T. Cole, *Microbiological Reviews*, **55**, 621 (1991).
- 2) T. Karasawa, X. Wang, *Infection and Immunity*, **71**, 641 (2002).
- 3) T. Shimizu, K. Ohtani, H. Hirakawa, *PNAS*, **99**, 996 (2002).
- 4) T. Karasawa, X. Wang, *Infection and Immunity*, **71**, 2 (2003).

Table 1 Base sequence of Primer MI003-004

Primer	Sequence
MI003	5'-CACCTTAACGGGGGATATAAAAATG-3'
MI004	5'-TTATTTTATATTATAAGTTGAATTCCTGA-3'

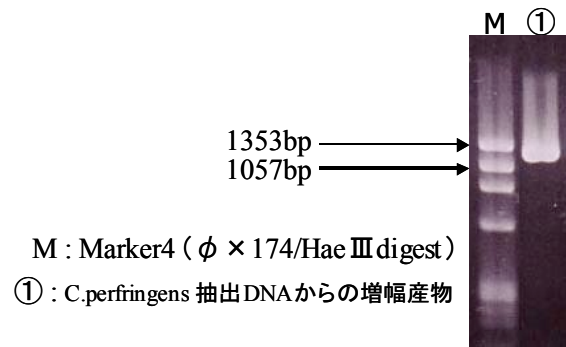


Fig. 1. PCR amplification using MI003-004

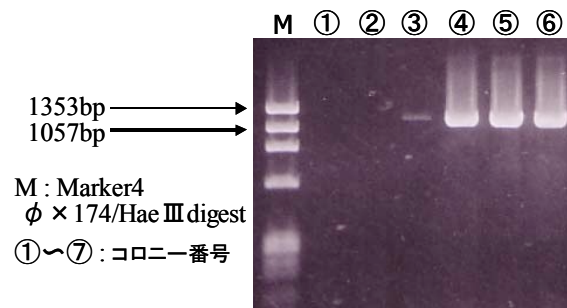


Fig. 2. PCR amplification using MI003-004

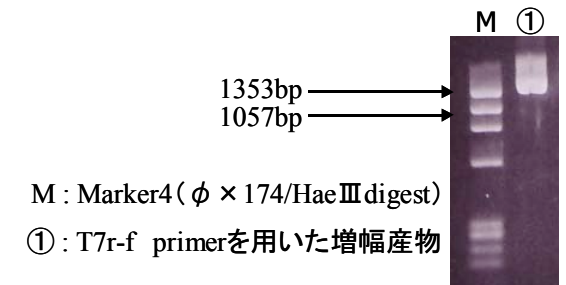
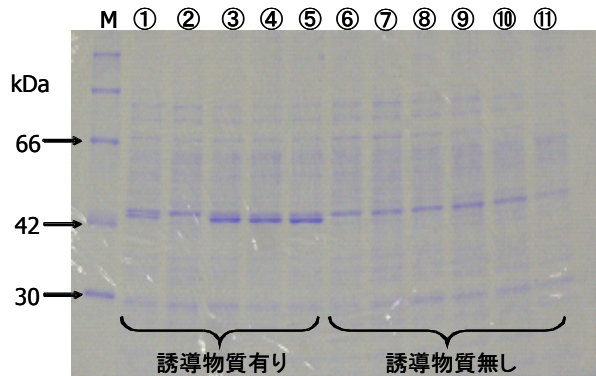


Fig. 3. PCR amplification using T7r-f



M : タンパク質分子量マーカー「第一」・2

①~⑤ : 菌体上清 誘導物質有り(1~5hrs)

⑥~⑪ : 菌体上清 誘導物質無し(0~5hrs)

Fig. 4. SDS-PAGE gel analysis