

遺伝子組換え技術を用いた *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 小森谷 友絵・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い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、その予防や治療が重要な菌として注目を集めている。しかし、現在行われている診断法には、特異性・簡易性に向上の余地と必要性がある^{1,2)}。これを踏まえ本研究では、特別な機器を必要としない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とした。そこで、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 産生組換え大腸菌の作製と、抗原になる組換え α -toxin の精製及び同定を行った。

2. 実験方法

2-1. 使用菌体とベクター

岐阜大学より供与された *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に使用した。また、ベクターには pET 100/ D-TOPO, pET 101/ D-TOPO, pBAD / Thio (Invitrogen) を用いた。

2-2. 毒素産生部位遺伝子の増幅

抽出した DNA を鋳型とし、三種類の挿入遺伝子断片を PCR にて増幅する為、MI03・MI04・MI05・MI06 Primer を設計した。Fig.1 に各 Primer の α 毒素遺伝子上の位置を示す。

2-3. 大腸菌への毒素産生部位遺伝子の導入

増幅 DNA 断片にベクターを添加し静置後、TOP10 Competent Cells (Invitrogen) を加え、熱刺激下でこれに形質転換した。形質転換後、TOP10 Competent Cells を Ampicillin 含有の LB

培地に塗布し、20 時間培養した。形成した各コロニーに対し PCR を行い、組換えに成功したものを LB 培地にて 20 時間培養し、培養液から SV Minipreps DNA purification System (Promeg) を用いて、プラスミドの抽出を行い、計 6 種類のプラスミドベクターを得た。

2-4. 組換えタンパク発現と生理活性測定

抽出したプラスミドを BL21- star (Invitrogen) に加え氷上静止後、熱刺激を加え形質転換した。これに SOC 培地を加え 1 時間培養後、LB 培地を加え 20 時間培養し、IPTG もしくはアラビノースを添加し組換えタンパクの発現を誘導した。発現した組換え α 毒素のホスホリパーゼ C 活性をエッグヨーク法³⁾で、細胞毒性を Array Scan (BECKMAN COULTER) を用いた細胞染色法により測定した。

2-5. LC/MS/MS によるタンパクの同定

発現タンパクを SDS-PAGE により分離し、目的タンパクバンドのみをカミソリにより切り出した。これを炭酸水素アンモニウム溶液中で脱染色した。次に、TCEP を含む溶液中で、60°C 10 分、IAA を含む溶液中で暗所室温 60 分それぞれインキュベートし、システイン結合の切断と SH 基の保護を行った。最後に、トリプシン 1 μ g を含む溶液中で、室温にて 16 時間インキュベートを行い、ゲル内タンパク質のトリプシン消化を行った。トリプシン消化試料のペプチドの同定は、LTQ を用いた簡易型ナノフロー LC/MS システムを構築し行った。なお、HPLC には Surveyor MS pump (Thermo Fisher) を、充填剤には BioBasic C18 を、LC/MS/MS には LTQ XL (Thermo Fisher) を用いた。

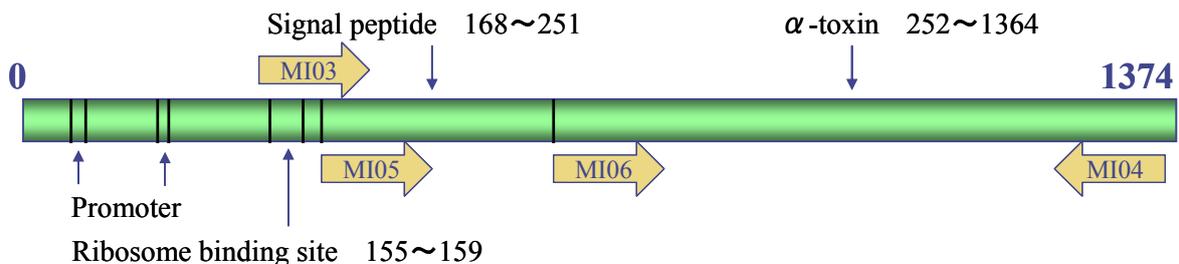


Fig. 1 The location of Primers on *Clostridium perfringens* α -toxin gene

3. 結果及び考察

3-1. 組換え体の作製と生理活性

pET 100/ D-TOPO を用いた 3 種類 (MI03-04, MI05-04, MI06-04)、pET 101/ D-TOPO を用いた 2 種類 (MI03-04, MI05-04)、pBAD / Thio を用いた 1 種類 (MI06-04) の組換え体の作製及び、組換えタンパク質の発現に成功した。これらの内、挿入遺伝子にシグナルペプチド産生遺伝子を含むものでは、発現タンパク質は菌体外に分泌し、酵素活性・細胞毒性共に有していたが、発現量が最も多かった pET100/MI06-04 産生タンパク質を抗原用のタンパク質として使用した。Fig. 2 に pET100/MI06-04 産生タンパク質の SDS-PAGE 結果を示す。

3-2. 組換え α -toxin の精製

pET100/MI06-04 産生タンパク質 Lysis 沈殿画分を、尿素 6M で可溶化し、遠心分離 (13,200 ×g, 10min) により上清と沈殿に分離した。この尿素上清画分を His Trap HP (GE Healthcare) カラムにアプライし、イミダゾール 100mM のリン酸緩衝液を溶出液に用いて精製を行った。この結果を Fig. 3 に示す。SDS-PAGE の結果より精製に成功した事が分かる。また、この精製組換えタンパク質の分子量を ProteomeLab PA800 (BECKMAN COULTER) を用い測定した結果、約 46,700Da と分かった。一連の精製過程において、10ml の培養液より 50 μ g の組換えタンパク質を精製した。

3-3. MS による組換えタンパク質の同定

作製した試料を、逆相カラムである BioBasic C18 (0.180 ×50 mm) に流速 1 μ l/min で注入し、ペプチドの分離を行った。この結果を Fig. 4 に示す。次に、分離したポリペプチドを LTQ XL によって同定した。ESI 法 (Electro-Spray Ionization) により試料をイオン化し、リニアイオントラップによりイオンを検出した。この結果を Fig. 5 に示す。LC/MS/MS の結果、 α 毒素の 26% (96 アミノ酸) に当たる、7つのポリペプチドが検出された。一般的に MS の同定は、2 つの由来ポリペプチドの検出により認められるので、pET100/MI06-0 由来の発現タンパクが間違い無く α 毒素だと同定出来た。

4. 参考文献

- 1) M. T. McCourt, D. A. Finlay, C. Laird, et al., *Veterinary Microbiology* **106**, 259-264 (2005).
- 2) T. Shimizu, K. Ohtani, H. Hirakawa, K. Ohshima, et al., *PNAS*, **99**, 996-1001 (2002).
- 3) T. Karasawa, X. Wang, T. Maegawa et al., *Infection and Immunity*, **71**, 641-646 (2003).

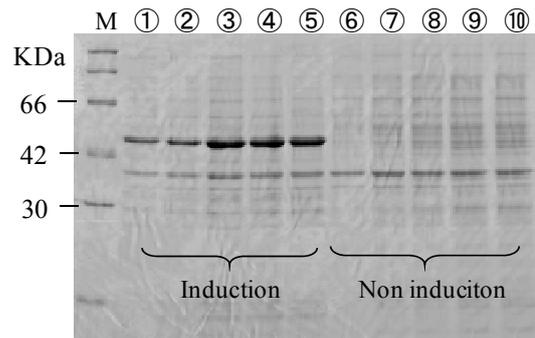


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expressed protein (pET100/MI06-04, Lysis precipitate sample)

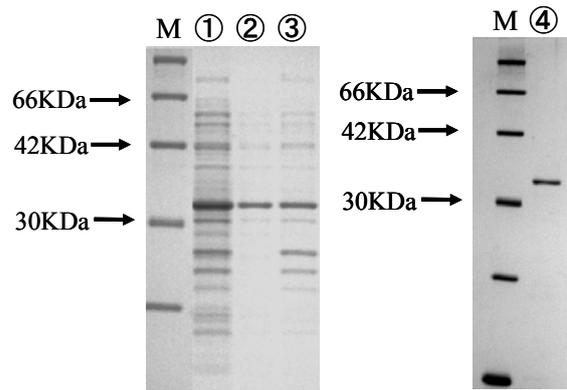


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of each purification stage

M : Protein MW Marker 1-2 (Cosmo Bio), 1 : Lysis precipitate sample, 2 : Urea supernatant sample, 3 : Urea precipitate, 4 : Purified sample

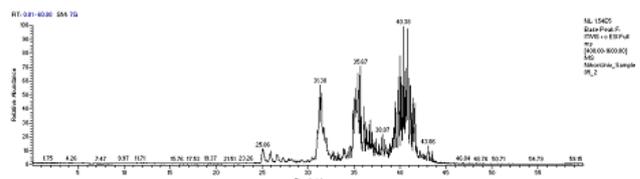


Fig. 4 Chromatogram of digested polypeptide obtained HPLC system

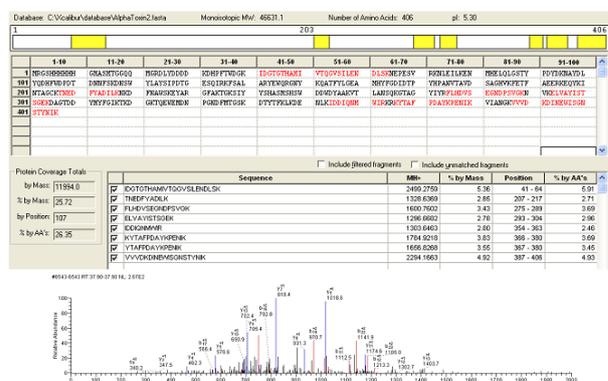


Fig. 5 The results of identified peptide obtained LC/MS/MS