ISSN 2186-5647

6-19

Clostridium difficile の産生する新規な毒素である Binary toxin の発現に関する研究

日大生産工　(院)　○五味　菜々恵
日大生産工　小森谷　友絵　吉宗　一晃　神野　英毅

1. 緒言

Clostridium difficile は偏性嫌気性菌であり院内感染制御の観点から最も対応の難しい病原体の一つである。本菌はヒトの腸内に存在する常在菌であり、抗生物質の投与などにより腸内フローラが攪乱することで増殖し毒素を産生する。

主な毒素は Toxin A/B で、これらの毒素により軽度な下痢症から抗生物質関連下痢症(AAD)、偽膜性大腸炎を引き起こし重篤な場合死に至る。

さらに最近の Out break では 027 型の強毒素産生株による、Binary toxin という二つのサブユニットで形成される毒素が新たに報告された。本毒素は細胞を形成する Actin に直接働き毒性を発現することから毒性が高く、多くの死亡者が報告されている [1]。

また、Binary toxin の検出法は PCR 法のみであり迅速で簡便な診断に欠けるため、迅速な診断が可能なイムノクロマト法の確立は必須である。

よって本研究ではイムノクロマト法を確立するために必要な抗体を作製するため、抗原の確立を遺伝子組換えによる生産を用いて行うことを目的とする。

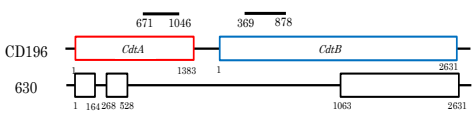

Fig. 1 *Clostridium difficile* strain CD196 and strain 630

2. 実験方法

2-1. Binary toxin 特異的遺伝子部位の決定

Toxin A/B(630 株)と Binary toxin(CD196 株)の遺伝子は、CdtA の上流領域(100 bp)で 95%、CdtB の下流領域(103 bp)で 96%の相同性を有している [2]。また CdtA の下流領域の 671-1046 bp、CdtB の下流領域の 369-878 bp にそれぞれ Binary toxin の特異的な配列がある。(Fig. 1) よって本研究では結合作用コードしている CdtB の特異的な部位 369-878 bp に着目しタンパクの発現を行った。

2-2.Binary toxin 特異的遺伝子断片の取得

C. difficile 027 株(Binary toxin 産生株)を GAM 培地にて 37℃で嫌気培養し、生粋な菌を得るため 3～4 回植え継ぎ、コロニーをピックアップした。さらに BHI 培地にて培養し 3～4 回植え継いだ。得られた培養液から Magtration system 6GC(PSS)を用いて DNA 抽出を行った。

抽出した DNA を用い PCR を行った。Primer には CdtB の 369-878 bp を目的として設計した。

Forward:5'-GGCCCTCGAGTTAATGCAAG TAAATA-3'

Reverse:5'-CAACCTGCAGTAACGGATCT CTTG-3'

Polymerase には KOD Plus NEO(TOYOBO)を用いて PCR を行った。またアニーリング温度の検討も行った。得られた目的遺伝子は、アガロースゲルで電気泳動後、増幅した目的 DNA(510 bp)のみを切出し精製した。

Study on Expression of CDTb Fragment of Binary Toxin from *C.difficile*

Nanae GOMI, Tomoe KOMORIYA, Kazuaki YOSHIMUNE and Hideki KOHNO

2-3.プラスミドベクターの構築

本実験の使用 Vector である pCold ProS2 DNA(TaKaRa)は可溶性タンパクを得るのに最適な ProS2-tag が構築されており、低温で発現を可能できることから、他のタンパク質の発現が抑えられ、純度の高い目的タンパク質を得るのに最適な Vector である。

この pCold ProS2 DNA(TaKaRa)と目的 DNA を Primer に用いた制限酵素 Xho Ⅰ、Pst Ⅰを用いて 37℃で制限酵素処理し断片を得た後、16℃で 3 時間 Ligation しプラスミドベクターを得た。得られた組換えプラスミドベクターでクローニング型大腸菌 TOP10 を形質転換した。得られたコロニーをコロニーPCR にて確認し組換えプラスミドの抽出を行った。その後目的 DNA をシークエンスにより解析した。

2-4. 組換え大腸菌による Binary toxin fragment の発現と精製

IPTG を用いて 15℃で 30 時間撹拌培養し 3 時間ごとに培養液を採取した。このタンパクの確認を SDS-PAGE で行った。

確認した目的タンパクに Urea を加え可溶化した後、Urea の透析を行った。得られた可溶化タンパクを His-tag を用いアフィニティークロマトグラフで精製した。

3.結果・考察

ゲノム DNA を用いた目的遺伝子の PCR 結果を示す。(Fig. 2) 最適アニーリング温度を検討した結果、Lene 3 において、よりクリアで単一な一本のバンドが得られたので 60.3℃をアニーリング温度に設定した。

次に IPTG によって得られたタンパク質の確認を SDS-PAGE で行った。(Fig. 3) 得られたタンパクに Tris-HCl(pH=8.0)を加え凍結融解にて大腸菌 BL21 の膜内からタンパク質を遊離した。得られた上清サンプルと沈殿サンプルを確認した結果、IPTG ありには理論値(45 kDa)付近にバンドを得ることができた。また目的タンパク質は沈殿サンプルから得られ、封入体であった。さらに IPTG 終濃度 0.1 mM・0.5 mM・1.0 mM の検討した結果、濃度変化の影響はなかった。

封入体タンパク質に Urea を加えて可溶化を試みた結果、可溶性タンパク質を得ることに成功した。また得られた可溶性タンパク質を His-tag 精製したところ目的付近に単一のタンパクを得ることに成功した。

得られたタンパク質を用い抗体の作製を行うことにより、早期発見のためのイムノクロマト法を確立できると示唆される。

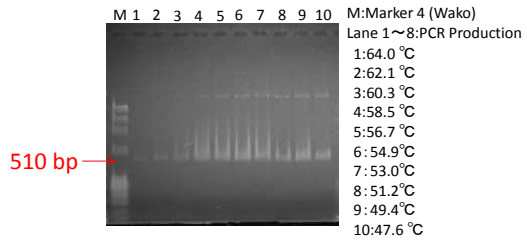

Fig. 2 Amplifed PCR products of CdtB fragment gene target in various annealing condition after electrophoresis in agarose gel

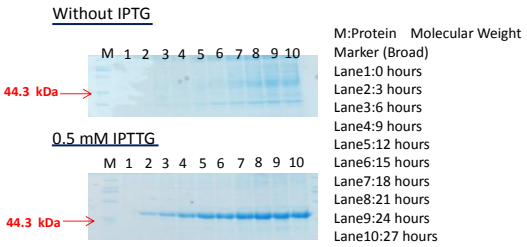

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of Recombinan protein

4.参考文献

1)K. Aktorie *et al.,* Toxicon 1-10 (2012)

2)M. Rupnik *et al.*, *Anaerobe*, 9, 289-294(2003)