

【原著】

組換え *Clostridium difficile* Cytotoxin (toxin B) の発現とその細胞毒性発現に関する研究小森谷友絵¹、強矢佳織²、五味菜々恵²、神野英毅^{1,2}¹ 日本大学生産工学部環境安全工学科² 日本大学生産工学部応用分子化学科

(受付：平成 23 年 3 月 23 日)

(受理：平成 23 年 4 月 4 日)

要 旨

Clostridium difficile (*C. difficile*) は偏性嫌気性有芽胞グラム陽性桿菌で、抗生物質が誘因となる下痢症あるいは腸炎の主要な原因菌である。*C. difficile* の病原因子は、toxin A および toxin B があり、本菌を毒素産生性で分類すると両毒素を産生する toxin A+B+ 株、toxin B のみ産生する toxin A-B+ 株、「Binary toxin 産生株」、そして毒素非産生の toxin A-B- 株とに分けられる。本研究では、有毒株に共通の産生毒素である toxin B に着目した。

まず、*C. difficile* の毒性発現機序を解明するため、大腸菌の系における遺伝子組換え技術を用いて、toxin B の毒性発現に重要とされるグルコシル転移酵素ドメインの W102 および D286-V-D288 を含むフラグメントの発現を行った。その発現ペプチドを 8M Urea 溶液にて可溶化し、Brij 35 を含む再生緩衝液にてリフォールディングをした。その後、フィルタ滅菌し、Vero 細胞に添加して、細胞円形化を調べた。この結果、リコンビナントタンパクを含む溶液でのみ、細胞の円形化が確認された。このことから、W102 および D286-V-D288 を含む部位が毒性を示すことが確認できた。

キーワード： *Clostridium difficile*、Toxin B、Cytotoxicity

緒 言

Clostridium difficile (*C. difficile*) は偏性嫌気性有芽胞グラム陽性桿菌で、抗生物質が誘因となる下痢症や偽膜性大腸炎の原因菌であり、院内感染症の原因菌として多く報告されている。さらに 2003 年以降は強毒株の出現により *C. difficile* による腸炎死亡事例が増加している^{1,2)}。*C. difficile* の病原因子としては enterotoxin としての toxin A および細胞障害性の cytotoxin, toxin B があり、また近年新たな毒素である Binary toxin の産生が報告されている¹⁾。本菌を毒素産生性で分類すると両毒素を産生する toxin A+B+ 株、toxin B のみ産生する toxin A-B+ 株、Binary toxin 産生株、そして毒素非産生の toxin A-B- 株とに分けられる³⁾。その作用機序は本菌が産生する toxin B が細胞表面のレセプターに結合後、ファゴゾームの形で細胞内に取り込まれ、ファゴゾーム内の酸性環境で立体構造が変化し、チャ

ネルが形成され、活性タンパク質が細胞質内に放出される。最近の報告では、細胞内に放出された toxin B は Rho タンパクの N 末端から 37 番目のスレオニンに UDP- グルコースからグルコースが転移することにより GTP 分解酵素を失活させる⁴⁾。その結果、アクチンの重合が阻害され、細胞骨格の破壊、細胞の円形化が起こるとされている。これらの原因により大腸粘膜に炎症が生じ重篤な場合は致死的な偽膜性大腸炎を引き起こすと考えられている。本研究では生産量が非常に微量で細胞毒性を強く示し、その作用機序が十分に解明されていない toxin B に着目した。toxin B はその配列上グルコシル転移酵素ドメイン・転移ドメイン・結合ドメインの 3 領域の働きにより細胞毒性を発現するとされている。これらの活性の生じる部位は、Fig. 1 で示すように C 末端 516 アミノ酸残基の反復配列部位に標的細胞上のレセプターと結合する結

合ドメインがあり、グルコシル転移酵素ドメインと結合ドメインの間に毒素がファゴゾームから細胞質へ転移する機能を担う転移ドメインが存在し、そして、UDP-グルコースの結合に重要とされる W102 および酵素活性に必須のアミノ酸モチーフである D286-V-D288 を含む N 末端 546 アミノ酸残基にグルコシル転移酵素ドメインが存在すると推測されている^{5,6,7)}。

そこで、本研究では *C. difficile* の毒性発現機序を解明すべく、大腸菌の系における遺伝子組換えタンパクを用いて、毒性発現に重要とされるグルコシル転移酵素ドメインの W102 および D286-V-D288 を含むフラグメントの発現を行い、その細胞毒性の発現機構を調べることを目的とした。

実験方法

1. 使用菌株

菌株は岐阜大学生命科学総合実験センターより供与された *C. difficile* 臨床分離株 GAI 99093 を使用した。本株は toxin A, toxin B を産生する毒素産生株である。

2. 遺伝子増幅

嫌気培養法により培養した *C. difficile* 菌体からフェノール・クロロホルム法によりゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA を template として UDP-グルコースの結合に重要な W102 および酵素活性に必須のアミノ酸モチーフである D286-V-D288 を含む部位をデザインし、DNA Polymerase (TaKaRa Ex Taq, Takata bio, Otsu, Shiga) を使用した Polymerase Chain Reaction (PCR) 法にて目的部位を増幅した。primer (Table 1) は、forward primer (DK tcdB W102-F) の 5' 末端に CACC 配列を置き、直後に開始コドン (ATG)、続いて導入部位の配列となるようにし、一方 reverse primer (DK tcdB DVD-R) は導入部位に続き、終止コドン (TAG) を置き、その相補的な配列とした。反応条件は、1.25 u/reaction Taq polymerase、10 × PCR buffer 5 μl、25 mM MgCl₂ 4μl、dNTP Mixture (2.5 mM each) 4 μl、DNA template 5 μl、forward primer 0.6 μl、reverse primer 0.6 μl で全量 50 μl に調製し、94°C 300 sec、(94°C-30 sec, 63°C-30 sec, 72°C-60 sec) × 30cycle、72°C-300 sec の温度条件で目的部位を増幅した。この増幅産物はクリスタルバイオレットを含む

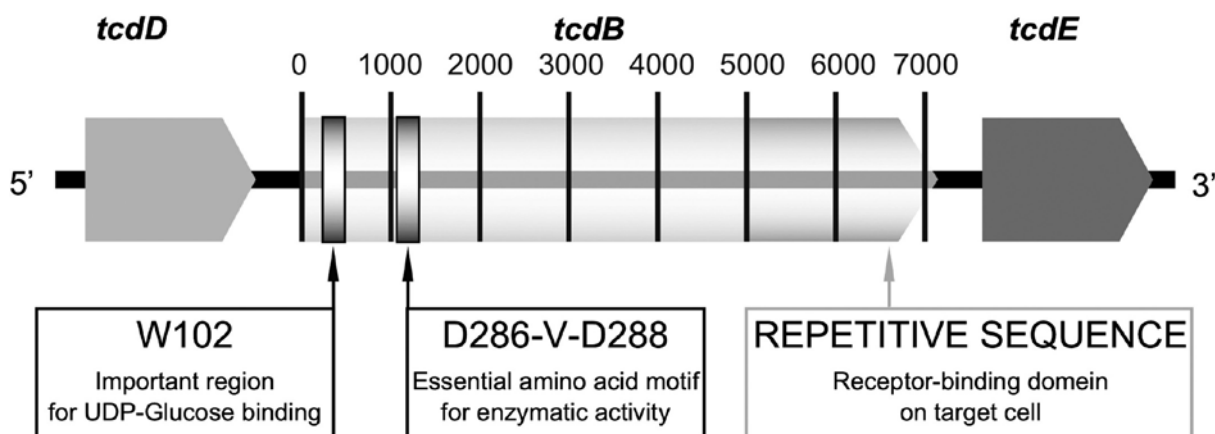


Fig.1 Schematic presentation of the tcdB in *C. difficile* pathogenicity locus (PaLoc)

Table 1 Sequences of Primer pair Used to Amplify Gene in *C. difficile* tcdB

Primer	Sequence (5'-3')
DK tcdB W102-F	CACCATGAATAATAATTAACTCCAG
DK tcdB DVD-R	CTACTCTTATAGACTCAAATAAGTCTGGTTG

アガロースゲルにて電気泳動し、目的のバンドを切り出し、Wizard SV GEL and PCR Clean-up System (Promega, WI, USA) を用いて増幅遺伝子部位を精製した。

3. 大腸菌への導入

精製した目的部位の増幅産物を plasmid vector (pET101/D-TOPO, Invitrogen, CA, USA) にサブクローニングし、これを氷上で溶解した大腸菌 (TOP10 competent cells, Invitrogen) と混合して室温で 5min インキュベートした後、ヒートショック (42°C, 30s) にて導入した。ここに S.O.C 培地 (Super Optimal broth with Catabolite repression; 2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM sodium chloride, 2.5 mM potassium chloride, 10 mM magnesium chloride, 10 mM magnesium sulfate, 20 mM glucose) 250 μ l を加え、攪拌培養した (37°C, 1h, 200 rpm)。培養後、ampicillin を 100 μ g/ml で含む LB 寒天培地 (1% Trypton, 0.5% Yeast Extract, 1.0% sodium chloride, 1.5% agar) に展開し、37°C にて 16 時間培養した。その後、増殖コロニーを選択し、コロニー PCR を行い目的遺伝子の導入確認を行った。コロニー PCR には plasmid vector の T7 promoter 由来の primer を用いた (Table 2)。また、これらの primer による増幅部位のシーケンスを確認するため CEQ8800 (Beckman Coulter, CA, USA) による塩基配列解析を行い目的部位の導入をその配列データより確認した。

4. IPTG による発現誘導

目的とする遺伝子の導入が確認されたコロニーを LB 培地にて 18 時間培養し、そこから Wizard SV GEL and SV Minipreps DNA purification System (Promega) を用いて plasmid を抽出した。氷上で溶解した大腸菌 (*E. coli*

BL21 Star (DE3), Invitrogen) と plasmid DNA をマイクロチューブ内で静かに混合し、氷上で 30 分間インキュベートした。その後、ヒートショック (42°C, 30s) を与え BL21 に plasmid DNA を導入した。ここに S.O.C 培地 250 μ l を加え、攪拌培養した (37°C, 1h, 200 rpm)。培養後、全量を 50 ml 遠心チューブ内の ampicillin を 100 μ g/ml で含む LB 培地に加え、攪拌培養した (37°C, 16h, 200 rpm)。16 時間の攪拌培養後、ampicillin を含む新たな LB 培地 10 ml に培養液を 500 μ l 加え、攪拌培養した (37°C, 2h, 200 rpm)。これを 5 ml ずつに分注し、片方に終濃度 1.0 mM の IPTG (thiogalactopyranoside) を添加した。IPTG を添加したものを誘導試料、添加しないものを非誘導試料とし、1 時間毎に 5 時間まで 500 μ l ずつ採取し、遠心分離 (16,000 \times g, 30sec) を行い、ペレットをサンプルとした。

5. タンパク発現の確認

IPTG によるタンパク発現誘導実験で得られたペレットを Lysis buffer (50 mM potassium phosphate (pH 7.8), 400 mM sodium chloride, 10 % glycerol, 0.5% Triton X-100, 10 mM imidazole) にて懸濁し、繰り返し凍結融解を行い菌体より発現タンパクを抽出した。遠心分離 (16,000 \times g, 1 min) にて、上清とペレットに分け、それぞれを SDS-PAGE にて発現タンパクを確認した。

6. 発現タンパクの可溶化・再生

組換え発現タンパクは、封入体として発現し、目的タンパクが正しい立体構造を形成し、生理活性を持つようにするため、可溶化・再生を行った。まず、8M Urea 溶液 (10 mM Tris (pH 8.0), 8 M urea, 0.1 M 2-mercaptoethanol, 0.1 M sodium phosphate) にて Lysis ペレットを溶解し可溶化した。次に、これを遠心分離し、上清を Brij 35 を含む再生緩衝液 (50 mM Tris (pH 7.5), 0.15 M sodium chloride, 10 mM calcium chloride, 0.5% Brij 35) に滴下した。そして、この溶液を遠心分離し、上清を Tris-HCl および Brij 35 を含む緩衝液 2 種類 (50 mM Tris (pH 7.5), 0.15 M sodium chloride, 5 mM calcium chloride, 0.5%

Table 2 Sequences of Primer Pair Used to Amplify Gene in T7 Promoter in the pET TOPO Vector

Primer	Sequence (5'-3')
T7 Forward	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 Reverse	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

Brij 35)) (50 mM Tris (PH 7.5)、0.15 M sodium chloride、0.5% Brij 35) を用いて透析した⁸⁾。

7. 細胞毒性試験

透析した溶液を Amicon Ultra 30K (Millipore, MA, USA) を用いて限外ろ過し、ろ液を回収。得られたろ液をさらに分子サイズを 10 K とした Amicon Ultra 10K (Millipore) で限外ろ過した。さらに、この濃縮液をポアサイズ 0.2 μm のフィルタを用いてろ滅菌した。細胞毒性試験の比較対照には目的の遺伝子断片を導入していない vector からの発現産物を用いた。これらをそれぞれ段階希釈し、あらかじめ 10% FCS を含む MEM 培養液中で 10⁵ cell/ml を 48 時間培養し、Confluent な状態の 12 ウェルマイクロプレート上に付着しているアフリカミドリザルの腎臓上

皮細胞由来の vero 細胞に添加した。vero 細胞は、*C. difficile* 産生毒素により細胞死を起こし 50% 以上の付着 vero 細胞が円形化することより、組換え toxin B 断片の細胞毒性試験の判定に用いた。

結果および考察

PCR 法にて増幅した増幅産物をアガロースゲル電気泳動した結果を Fig. 2 に示す。アニーリング温度を 59℃ から 63℃ で検討したところ、63℃ でもっとも明瞭な単一のバンドが得られた。この増幅産物を精製し vector へ導入した。コロニー PCR による増幅産物をアガロースゲル電気泳動した結果を Fig. 3 に示す。TOP10 への形質転換におけるコロニー PCR では plasmid vector の T7 promoter 由来の primer を用いたた

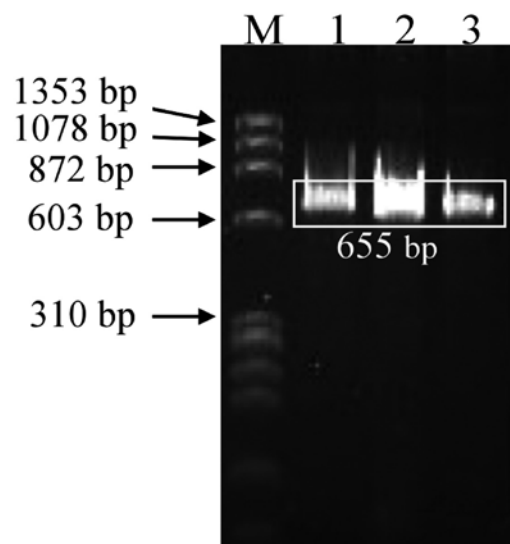


Fig. 2 Agarose electrophoresis of amplified Toxin B Fragment gene (lane 1-3) by PCR and molecular weight marker (lane 1). PCR were carried out by a condition of various annealing temperature (59°C; lane 1, 60°C; lane 2, 63°C; lane 3).

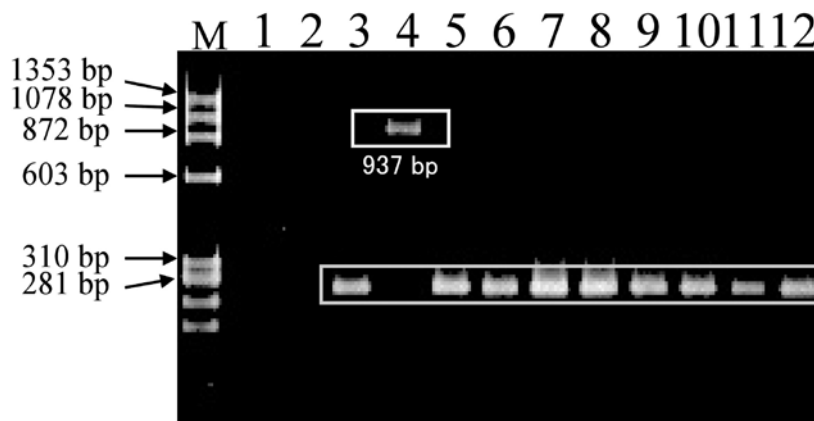


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products by T7 primer pair Lane M is Marker4(X174/ *Hae* III digest) and Lane 1 to 12 were indicated colony number.

め、T7 promoter 周辺の塩基 (282 bp) も含めて増幅されている。よって、目的の W102 および D286-V-D288 を含む断片 (655 bp) が組込まれた場合は 937 bp に、組込まれない場合は T7 promoter 周辺のみ 282 bp にバンドが検出される。Lane1, 2 では増幅が行われなかった。Lane3, 5~7 では T7 promoter 周辺のみバンドが確認できた。そして、Lane 4 では目的のバンドが検出されたことが確認できた。

この colony 4 の塩基配列を解析した結果を Fig. 4 に示す。T7 Forward primer を用いた解析

結果では vector 配列に続いて CACC 配列から始まる目的導入部位の配列が確認できた。また、T7 Reverse primer を用いた解析結果においても vector 配列に続いて目的の導入部位の配列が確認できた。このことから、変異することなく目的部位が正しく導入されたことが確認できた。

次に、colony 4 由来の plasmid DNA を導入した大腸菌 (BL21) によるタンパク発現誘導実験の結果を示す。216 アミノ酸残基からなる目的の毒素タンパクのフラグメントサイズは約 24 kDa である。ペレットの SDS-PAGE の結果、24

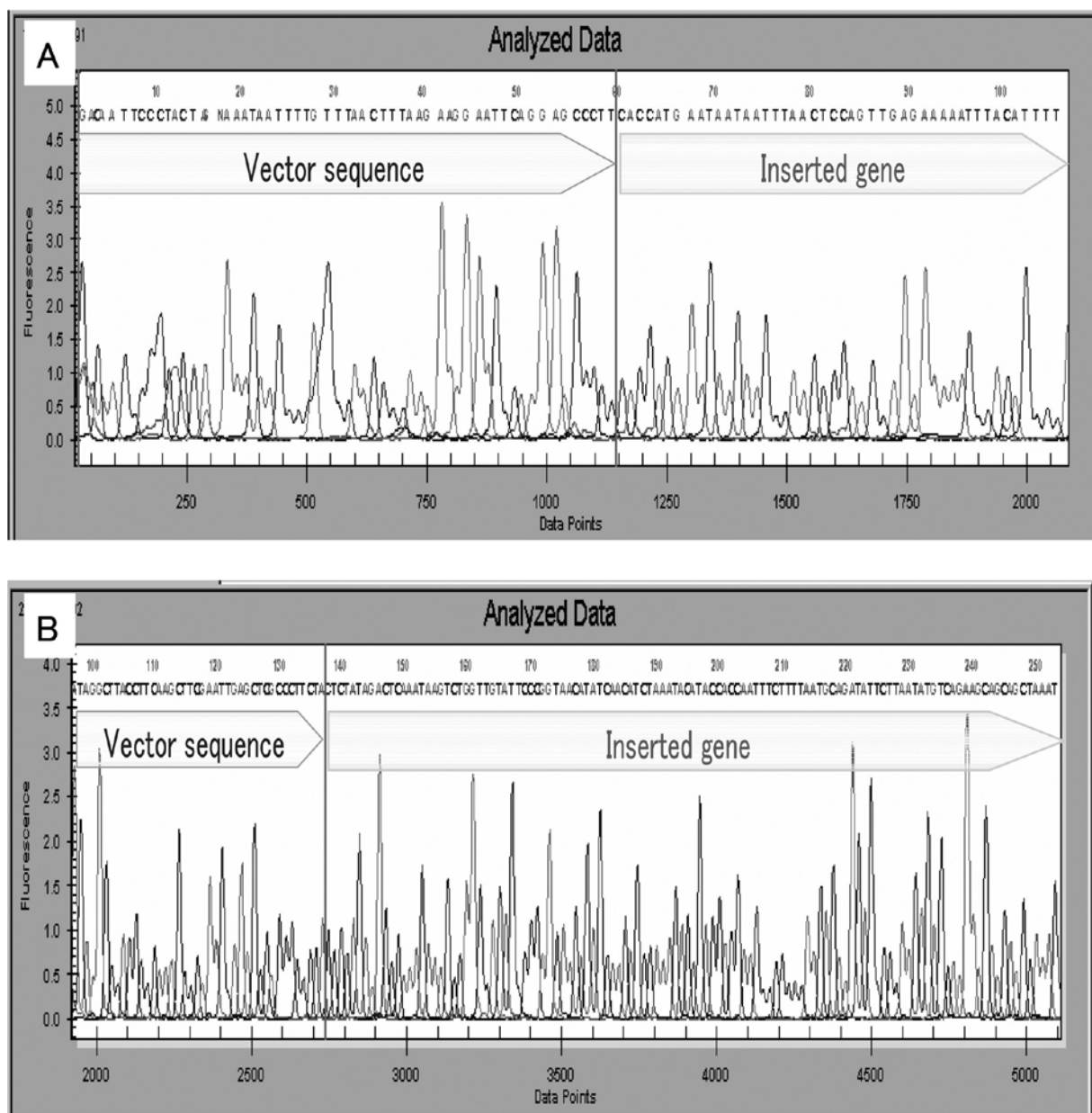


Fig. 4 Analyzed gene sequence of recombinant plasmid using T7-forward primer(A) and T7-reverse primer(B). These sequence data shown that vector was transfected with toxin B fragment gene.

kDa 付近に時間経過とともに濃くなるバンドが確認された (Fig. 5)。このバンドは非誘導では薄く、ほとんど確認できなかった。そのため、誘導によって目的のタンパクが過剰に発現されたものと考えられる。また、Lysis 処理後のペレットに目的のバンドが得られたことから、毒素タンパクのフラグメントが封入体として存在していることがわかる。

細胞障害性をもつ toxin B は、封入体のままでは正しい立体構造を形成できず、生理活性を示さないため、常法に従って封入体の可溶化・再生を行った。そして、透析・限外ろ過後の溶液を toxin B フラグメントを含む溶液とし、総タンパク濃度 0, 27 ng/ml, 270 ng/ml, 2.7 μg/ml に段階希釈し、confluent な vero 細胞に添加した。24 時間後の顕微鏡写真を Fig. 6 に示す。目的の W102 および D286-V-D288 を含むフラグメント溶液を添加した細胞は底から剥がれ円形化しているこ

とが観察できた。この円形化は総タンパク濃度 27 ng/ml まで認められた。以上のことから、本研究で得た毒素タンパクのフラグメントが vero 細胞に対して強い毒性を示すことが確認でき、本組換えによる *C. difficile* toxin B, Cytotoxin 部位が発現された。

結 論

大腸菌の系における遺伝子組換え技術を用いて、毒素タンパクのフラグメントの発現に成功した。そして、この W102 および D286-V-D288 を含むフラグメントは Vero 細胞に対する毒性を示した。今後は、同様にして他部位のフラグメントを発現させ、それらの機能を比較することにより、より明確な毒性発現機序の解明が行え、*C. difficile* の診断および治療に結びつくことが期待できる。

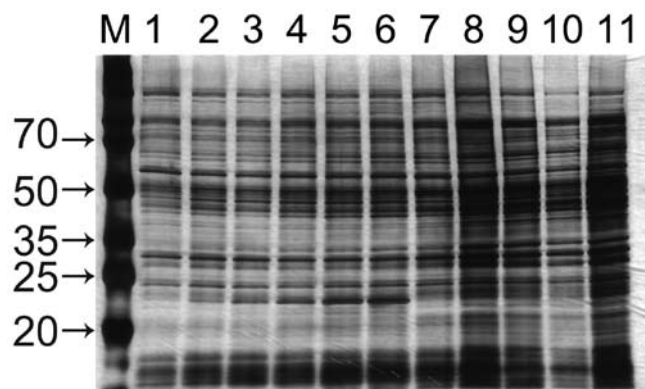


Fig. 5 SDS-PAGE Analysis of Expressed proteins induced by IPTG in *E. coli*. Molecular weight marker (lane 1), Expressed proteins induced by IPTG from 0h to 5h (lane 1 - lane 6), non-induced protein by IPTG from 1h to 5h (lane 7 - lane 11) were separated by SDS-PAGE and visualized with Silver stain kit. Target protein band at 24kDa gradually appeared to induced by IPTG.

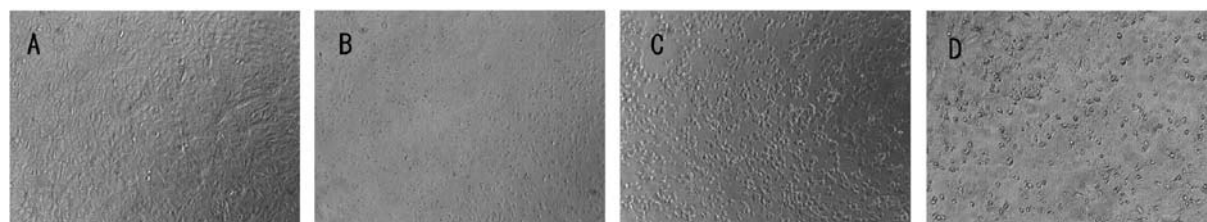


Fig. 6 Cytotoxic Activity of Expressed protein (Toxin B Fragment) including UDP-Glucose binding site and Enzymatic activity site. Refolded proteins (A; 0 ng/ml, B; 27 ng/ml, C; 270 ng/ml, D; 2.7 μg/ml) were added to confluent vero cells. Cytotoxic effect of Toxin B fragments were observed and calculated.

文 献

- 1) Just I, Rupnik M. Large: clostridial cytotoxins. *Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie*. **152**: 23-47 2004
- 2) Redelings MD, Sorvillo F, et.al.: Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004. *Emerg Infect Dis*. **13(9)**: 1417-1419 2007
- 3) Lysterly DM, Barroso LA, et.al.: Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. *Infect Immun*. **60(11)**: 4633-4639 1992
- 4) Rupnik M, Kato N, Grabnar M, et.al.: New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. *J Clin Microbiol*. **41(3)**: 1118-1125 2003
- 5) Hofmann F, Busch C, et.al.: Localization of the glucosyltransferase activity of *Clostridium difficile* toxin B to the N-terminal part of the holotoxin. *J Biol Chem*. **272(17)**: 11074-11078 1997
- 6) Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev*. **18(2)**: 247-263 2005
- 7) Braun V, Hundsberger T, et.al.: Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene*. **181(1-2)**: 29-38 1996
- 8) Itoh M, Masuda K, et.al.: Purification and refolding of recombinant human proMMP-7 (pro-matrilysin) expressed in *Escherichia coli* and its characterization. *J Biochem*. **119(4)**: 667-673 1996

連絡先：神野英毅
日本大学生産工学部環境安全工学科
習志野市泉町 1-2-1 (〒 275-8575)
TEL : 047-474-2566
E-mail: kouno.hideki@nihon-u.ac.jp

Study on Expression and Cytotoxicity of Recombinant *Clostridium difficile* Cytotoxin (Toxin B)

T. KOMORIYA, K. SUNEYA, H. KOHNO

College of Industrial Technology, NIHON University

Summary

Clostridium difficile, an anaerobic, gram-positive bacillus, causes several diseases, including diarrhea, colitis, and septicemia, resulting in death. *C. difficile*-associated diseases have increased significantly due to the emergence of a highly virulent strain of *C. difficile*. Nosocomial infections, particularly, have serious repercussions. Toxin B is essential for *C. difficile* virulence. Here, to elucidate the mechanism underlying *C. difficile* virulence due to toxin B, we constructed a recombinant partial toxin B and analyzed its cytotoxic activity.

The PCR-amplified toxin B fragment from *C. difficile* GAI 99093 was recombined with the pET101/D-TOPO vector. Recombinant protein expression was then induced with isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside. The recombinant protein was refolded to yield a purified active form. In cytotoxic assay, vero cells were grown to confluence in 96-well plates and various concentrations of refolded protein were added to each well. Culture medium devoid of toxins A and B was used for the negative control. After incubation at 37°C/24 h in 5% CO₂, the morphological changes were observed by microscopy.

The protein was then expressed in *Escherichia coli*, and its relative molecular weight was predicted size (24 kDa) of the recombinant protein. Vero cell cytotoxicity assays were conducted with the refolded recombinant protein. The cytotoxic activity observed was toxin B mediated.

(Med Biol **155**: 313-320 2011)

Key words: *Clostridium difficile*, Toxin B, Cytotoxicity

Correspondence address: Hideki KOHNO
College of Industrial Technology, NIHON University
1-2-1 Izumi-cho, Narashino, Chiba, 275-8575, Japan
Tel: 047-474-2566
E-mail: kouno.hideki@nihon-u.ac.jp