

分 担 研 究 報 告 書

ウエルシュ菌新型エンテロトキシン精製の試み

鎌田 洋一

## 厚生労働科学研究費補助金

### 食品の安心・安全確保推進研究事業

#### 「食品中の毒素産生食中毒細菌及び毒素の直接試験法の研究」

#### 分担研究報告書

##### ウエルシュ菌新型エンテロトキシン精製の試み

分担研究者	鎌田 洋一	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部	室長
協力研究者	入倉 大祐	国立医薬品食品衛生研究所	衛生微生物部	研究員
	門間 千枝	東京都健康安全研究センター	微生物部	主任研究員
	仲真 晶子	東京都健康安全研究センター	微生物部	科長
	鈴木 康規	東京都健康安全研究センター	微生物部	研究員
	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター	微生物部	部長
	山本 茂貴	国威率医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部	部長

研究要旨：ウエルシュ菌食中毒は、腸管上皮細胞を標的とするエンテロトキシンが下痢を誘発することで成立している。食品内および病勢初期の患者下痢便中から分離されたウエルシュ菌で、既知のエンテロトキシンが検出されないのに、下痢を誘発する能力がある事例菌株が分離されている。当該菌は新しい種類のエンテロトキシンを産生していると考えられる。生化学的および分子生物学的手法を用いて、新型エンテロトキシンの精製を試みた。事例株である W5052 株を変法 DS 培地で培養し、生化学的手法を用いて新型エンテロトキシンの精製を試みた。段階的に濃度を調整した硫酸アンモニウム沈殿法と、分子量の違いでタンパク質を分離解析するゲルろ過法を組み合わせ、活性を保持したままで、SDS-電気泳動上 10 数種のタンパク質群中に目的毒素タンパク質を回収できることを明らかにした。同 W5052 株のゲノム塩基配列を、次世代シーケンサーを用いて解析した。既知エンテロトキシン産生ウエルシュ菌 SM101 株には存在せず、W5052 株のみが保有する遺伝子は 54 種類で、この中に新型エンテロトキシン遺伝子が存在する可能性がある。部分精製毒素タンパク質の解析から得られる情報と、遺伝子解析から得られる情報を組み合わせ、新型エンテロトキシンの遺伝子およびそのタンパク質を同定できる可能性が認められた。

## A. 研究目的

ウエルシュ菌食中毒は生体内毒素型食中毒に分類されている。生菌が食品とともに体内に取り込まれ、腸管で定着・増殖し、毒素を産生、下痢を引き起こすとされている<sup>1)</sup>。毒素はエンテロトキシンと呼ばれるタンパク質で、319個のアミノ酸からなり、1993年にその遺伝子がクローニング、塩基配列が報告された (GenBank accession no. M98037)<sup>2)</sup>。エンテロトキシンに関する研究は古くから展開されており、ウサギ腸管ループテストで、顕著に液体貯留とループの腫脹を示し、典型的な腸管攻撃毒素である。エンテロトキシンはまた、腎臓、肝臓などに由来する上皮系培養細胞に毒性を示すことが知られている。それら細胞のなかで、アフリカミドリザル腎臓上皮細胞 Vero 細胞で、エンテロトキシンの検出と、毒性メカニズムの解析によく用いられている<sup>3,4)</sup>。エンテロトキシンの受容体は1997年に発見された<sup>5)</sup>。各種細胞におけるエンテロトキシンの感受性を解析する研究から、同毒素に非感受性の細胞があることが見いだされている。マウス由来の繊維芽細胞である L929 細胞がそうである。L929 細胞はエンテロトキシン受容体を持たない<sup>5)</sup>。

原因食中にエンテロトキシン遺伝子を持つウエルシュ菌生菌が分離され、患者の病勢初期の便中にエンテロトキシンが検出された場合、ウエルシュ菌食中毒であると確定診断される。1997年、門間らにより症状や原因食品の特徴からウエル

シュ菌食中毒と推定され、原因食からのウエルシュ菌の分離があるにもかかわらず、同分離菌がエンテロトキシン遺伝子を持たず、便中にエンテロトキシンも検出されない事例に遭遇した。同分離菌株に対して種々の検討がなされ、その性状が報告されている<sup>6)</sup>。分離菌株は毒素産生用培地で培養してもエンテロトキシンを産生しない。しかしながら、培養ろ液について腸管ループ試験を実施すると、液体の貯留とループの腫脹が認められた。ろ液中にエンテロトキシン活性のある物質があると推定されることから、ろ液に対し、60°C5分の加熱、pH11.5の強アルカリ曝露、およびプロナーゼ処理が行われ、いずれの処理によっても腸管ループテスト陰性になっている。これらの事から、門間らはウエルシュ菌が新しいタンパク質性の下痢原性を有する毒素を分泌するのではないかと推察している。同じような事例は2003年<sup>7)</sup>にも報告されている。事例の培養液は、Vero細胞に対して、既知のエンテロトキシンとは異なる変性状態を誘発する。また、既知エンテロトキシンが毒性を示さない L929 細胞にも毒性を示す。

本分担研究は、その存在を推定している新型のエンテロトキシンを精製し、性状を調査し、新しい毒素によるウエルシュ菌食中毒の存在を確定するために実施する。この目的に向かって、二つのアプローチを行う。一つは、Vero および L929 細胞変性効果を指標に、事例菌株の培養液から、生化学的手法を用いて、新型エ

ンテロトキシンの分離を試みる。二つは、次世代シーケンシング技術による当該ウエルシュ菌のゲノム解析から新型エンテロトキシン遺伝子の同定を試みる。

次世代シーケンシング技術について概説しておく。本研究では Roche Genome Sequencer FLX を用いる。当該ウエルシュ菌からゲノム DNA を抽出、音波処理によって 500 bp 程度の大きさに断片化する。アダプターを付加してゲノム DNA ライブラリーを作製する。以下、エマルジョン PCR という手法を実施する。ライブラリーの総数と同じ数のナノビーズを混合し、DNA が 1 分子結合したビーズの状態を作出する。このビーズをエマルジョンオイル中に分散させ、希釈し、微少なウエルの開いた PicoTiterPlate にセットする。すなわち、1 well に 1 ビーズが入っている状態を作出する。プレートに反応および検知器にセットし、アダプターを起点とし、DNA ポリメラーゼによる伸長反応を行う。この時、dNTP の塩基それぞれが付加する際、伸長反応によって生じたピロリン酸を Sulfurylase によって ATP に変換、Luciferase を共存させておき、ATP による発光を誘発させる。プレートを CCD カメラによってモニターしておき、極めて多数の well に対し、同時かつ塩基の種類毎に、発光を記録する。dNTP は 1 種類ずつ添加するため、多数の種類の子断片について、塩基配列が読み取れることとなる。Roche の機器を用いる場合、平均的に 400 bp が判読できるとされている (図 1、2)。

本分担研究では、以下の検討を行う。

1: 事例由来ウエルシュ菌 W5052 株を、芽胞形成培地で培養し、新型エンテロトキシンの精製を試みる。まず、毒素活性の定量的測定方法を確立する。新型エンテロトキシンがタンパク質であると想定し、タンパク質の精製手法に頻用される硫酸アンモニウム沈殿法を適応する。沈殿画分の毒素活性、タンパク質濃度測定、タンパク質の電気泳動分析を行う。さらに、タンパク質を分子量で分別できるゲルろ過法を適応し、得られる各フラクションのタンパク質濃度、毒素活性、および電気泳動像から、目的のエンテロトキシンを濃縮、分離を試みる。

2: 上述した次世代シーケンシング技術を用いて、事例株である W5052 株のゲノムの塩基配列を de novo (新規) 解析する。ウエルシュ菌についてはすでに 3 菌株のゲノム配列が Public database に登録されている。それらは、1 種が既知のエンテロトキシン産生株、2 種が非産生株のウエルシュ菌で、それらの中には無く、W5052 株に特異的な遺伝を探索し、その中から新型エンテロトキシン遺伝子を追求する。

## B. 実験方法

### 1 ウエルシュ菌新型エンテロトキシンの精製

#### 1-1 菌株

東京都健康安全研究センターで、当該事例から分離された W5052 株を用いた。

同菌株はグリセロールストックするとともに、クックトミート培地に接種、37°Cの恒温器中で保存した。

#### 1-2 培養

W5052 株をクックトミート培地に接種し、37°Cで2日間培養した。75°C15分加熱した。その後、Brain Heart Infusion 培地に接種し、37°Cで一晩培養した。

変法 DS 培地を調製した<sup>8)</sup>。同培地の液量の、1%の上記 BHI 一晩培養液を接種した。37°Cで1-4日間培養した。

#### 1-3 硫酸アンモニウム沈殿

培養した DS 培地を 10,000 rpm、10 分間遠心分離し上清を回収した。硫酸アンモニウムを 70% w/v になるように加え、10 分間スララーを用いて攪拌し、その後 4°Cで一日静置した。混合物を 10,000 rpm、10 分間遠心分離し、沈殿を得、元の液量の Phosphate buffered saline (以下 PBS) で沈殿を溶解した。PBS に対し溶解物を 4°C、2 日間透析した。回収した沈殿の溶解物のタンパク質濃度および細胞毒性力価を測定した。タンパク質濃度の測定には、BCA 法を用いた<sup>9)</sup>。細胞毒性の力価測定については後述する。

#### 1-4 段階的濃度を設定しての硫酸アンモニウム沈殿による分画

変法 DS 培地での培養液を PBS で 10 倍に希釈した。40% w/v となるよう硫酸アンモニウムを加え、沈殿を形成させた。遠心分離によって沈殿を回収、元の液量の PBS で溶解した。

遠心分離上清に、最終濃度が 50% w/v になるよう硫酸アンモニウムを加え、沈

殿を形成させ、遠心分離で回収した。添加した硫酸アンモニウムは 10%w/v に相当する。以後、60%および 70% w/v と同様な操作を繰り返した。PBS 溶解物は、4°C で透析し、タンパク質濃度と細胞毒性力価を測定した。

#### 1-5 ゲルろ過

上記の段階的硫酸アンモニウム沈殿分画で、細胞毒性の確認された画分に対し、ゲルろ過を行った。カラムは SUPERDEX 200 10/300 GL (GE HealthCare) を用いた。送液した緩衝液は PBS で、流速は 0.5 ml/分、溶出液を 1 フラクション当り 0.5 ml の割合で回収した。溶出液に含まれるタンパク質濃度は、280 nm の吸光値として測定した。得られたフラクション中のタンパク質を SDS 電気泳動解析した。

#### 1-6 細胞毒性力価の測定

既知のエンテロトキシンは、和光純薬より購入した。毒性を観察する細胞には、Vero 細胞と L929 細胞を用いた。Vero 細胞は、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部に保管中のものを、L929 細胞はニューマンサイエンス財団より購入した。細胞培養は、10%非働化ウシ胎児血清 (以下 FBS) および Non-essential amino acid (NEAA) を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて、37°C CO2 インキュベーター内で行った。両細胞を、トリプシンを用いて培養シャーレ面から剥がし、 $1 \times 10^5$  cells/ml の細胞懸濁液を調製した。これを 0.2 ml/well の割合で 96 well プレートに播種し、一晩 1% FBS-NEAA-DMEM を用いて培養した。

新鮮な培地に交換後、さらに1時間培養した。

毒素の希釈段階を、別のプレートで作製した。各wellに70  $\mu$ lの培地を加え、2倍段階希釈列を11段作製した。陰性コントロールには培地のみを用いた。

1時間経過後の細胞入りのwellに、上記毒素希釈液を50  $\mu$ l添加した。その後24時間培養を続けた。生細胞数測定キット(Cell Counting Kit-8、同仁)を10  $\mu$ l/well添加し、さらに1時間培養後、培養液の450 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio-Rad)で測定した。毒素に細胞毒性があった場合、吸光値が低下し、最大吸光値の50%の値を示す毒素の希釈段階の逆数を毒素力価とした。力価はU/mlの単位で表示した。

## 2 ウェルシュ菌ゲノム解析による新型エンテロトキシン遺伝子の探査

### 2-1 ウェルシュ菌株とDNA抽出

新型エンテロトキシンを産生すると予想している事例株W5052を用いた。当該株を、BHI培地を用いて37°Cで1晩培養した。遠心分離によって菌体を回収後、核酸抽出キット(Dneasy Blood & Tissue Kits(QIAGEN))によってDNAを抽出した。調製したDNAは、260/280 nm = 1.74、260/230 nm = 0.89を示した。抽出DNAのアガロースゲル電気泳動像にはスミアーは無く、良好なDNA検体と判ぜられた。

### 2-2 次世代シーケンシング

北海道システム・サイエンス株式会社

にW5052株のDNAを供与し、Roche Genome Sequencer FLXによるゲノムシーケンシングを行った。

### 2-2 データ解析

数百bpを1リードとして、明らかになる塩基配列の重複部分を求め、出来る限り長く決定した塩基配列をcontigと呼ぶ。contigは塩基の正しさが一定以上保証された配列で、contig内にはタンパク質に翻訳される部分であるOpen Reading Frame(ORF)が複数含まれる場合もある。また、イントロンだけで構成されている場合もある。北海道システム・サイエンス(株)から、W5052株のcontigの提供を受けた。

Public databaseに登録されているウェルシュ菌SM101株のcontigを入手し、W5052株に特異的なcontigを抽出した。さらに、contig内のORFについて抽出し、新型エンテロトキシンを産生すると推定しているW5052株中に特異的な遺伝子(タンパク質に転写される塩基配列)の抽出を試みた。

## C. 結果と考察

### 1 新型ウェルシュ菌エンテロトキシンの部分精製

#### 1-1 毒素活性の定量法

L929およびVero細胞を用いて、新型エンテロトキシンの毒素活性を定量的に表記できる実験系の構築を試みた。Cell Counting Kit-8は生きた細胞のみが持つ、WST-8(水溶性テトラゾリウム)を還

元する脱水素酵素により、橙色のホルマザンに定量的に変換される。図3にその原理と、毒素非添加ウェルの吸光値を100%として、段階的に希釈した毒素液を添加した時の各ウェルの吸光値を相対値とした模式図を示す。毒素が濃い状態では吸光値が減少し、希釈に応じて生細胞数が増え、吸光値が上昇する。このときの50%吸光値を示す毒素液の希釈倍率の逆数を毒素力価とした。図3で言えば、毒素力価は10 U/mlとなる。この時の毒素のタンパク質濃度が求まっておれば、タンパク質濃度で除し、U/mg proteinと毒素活性をタンパク質量で表記できる。

#### 1-2 変法 DS 培地における新型エンテロトキシン産生性：培養日数の検討

目的的新型エンテロトキシンを産生していると推定している W5052 株を変法 DS 培地で経日的に培養した。硫酸アンモニウム沈殿法を用いて培養液からタンパク質画分を回収、その細胞毒性を L929 細胞で求めた。表1にその結果を示す。回収できるタンパク質量と、比活性の程度から、今後の新型エンテロトキシンの精製には2日培養物を用いることとした。

#### 1-3 段階的硫酸アンモニウム塩析法による部分精製

新型エンテロトキシンをタンパク質として回収できているので、タンパク質分離の基本的手法である段階的硫酸アンモニウム沈殿法を適応し、新型エンテロトキシンの部分精製を試みた。表2に、

0-40%、40-50%、50-60%、および 60-70% 分画の毒性を比較した結果を示す。0-40% および 60-70%の分画は L929 細胞に毒性を示さなかった。一方、40-50%および 50-60%の分画は、L929 および Vero 細胞の両種に毒性を示した。以上の毒性試験の結果は、新型エンテロトキシンは、40-60%の硫酸アンモニウム分画中に存在する事を示している。

上記の分画に含まれるタンパク質群がどのようなものを含んでいるか、SDS-電気泳動で解析した。新型エンテロトキシンが含まれると推定される分画、すなわち 40-50%と 50-60%硫酸アンモニウム分画中には、多数のタンパク質バンドが含まれていることが示された(図4)。この結果は、新型エンテロトキシンが含まれる分画には、毒素以外の不純物が多く含まれることを示している。

#### 1-4 ゲルろ過による部分精製

40-50%と 50-60%硫酸アンモニウム分画中に新型エンテロトキシンが含まれることが示されたので、さらに精製を試みた。両分画を合わせて濃縮後、Superdex 200 10/300 GL カラムによるゲルろ過を行った。図5 Aに示すように、同画分は多くのタンパク質ピークを示し、分子量の異なる多くのタンパク質の混合物だった。ゲルろ過して得た各フラクションの Vero および L929 細胞への毒性を検定した。両細胞に毒性を示すことが新型エンテロトキシンの特徴であるので、毒性ピークが重なるフラクション 28 から 31 の中に、

新型エンテロトキシンが含まれると考えられる。

各フラクションをSDS-電気泳動で解析した。フラクションの28から31に注目すると、同フラクション中には、本数は少ないものの、複数のタンパク質バンドが確認された(図6)。以上の結果は、新型エンテロトキシンはまだ完全には精製されていないことを示している。硫酸アンモニウム分画に比べると、毒素が含まれるフラクション中のタンパク質バンド数は減少しており、毒素タンパク質の精製度は向上しているものの、完全ではない。今後さらに生化学的手法を用いての、毒素の精製が必要である。

## 2 ウエルシュ菌 W5052 株のゲノム解析

### 2-1 リード長の解析

次世代シーケンサー Roche Genome Sequencer FLX を用いて、W5052 株ゲノムのシーケンスを解析した。読み取れた配列、すなわちリードの長さが、一定以上であれば、シーケンス解析が正しく実行されていると判断できる。用いたシーケンサーの性能では、平均読み取り塩基長が 300 bp 以上であれば、適正なパイロシーケンスが行われているとされる。W5052 株の場合、平均リード長が 350 bp、最長が 600 bp 近くシーケンスされており、パイロシーケンス反応の適正さが担保されていた。読み取れた塩基数は 79,504,451 bp だった。

### 2-2 contig の総括

読み取れたリード数は 227,152 本で、これをアッセンブルさせ、contig を得た。解析したリードのうち、アッセンブル出来たのは 223,586 リードだったが、その中で 3574 リードは部分的だった。部分的だったリードの内容は、リードが 1 塩基のみ、重複配列などだった。

最終的に比較解析に用いることが出来たのは 220,012 リードとなった。リードの総塩基数は 3,330,997 bp だった。

有効なリードをアッセンブルし、contig を形成させた結果、W5052 株のゲノム解析からは、132 の contig が得られた。塩基数は 3,336,496 bp だった。132 contig のうち、その塩基長が 500 bp を越える、遺伝子解析に有用な contig は 112 だった。

### 2-3 W5052 株と SM101 株の比較

SM101 は既知エンテロトキシン産生株で、エンテロトキシン遺伝子を持つことが確認されている。W5052 株の contig と、すでにゲノム情報が公開されている SM101 株のそれとを比較した。Contig の比較とその結果に対する考え方とまとめを図 8 に示す。W5052 株が持ち、SM101 株が保有しない contig は 21 種存在した。それらの contig の塩基配列について、タンパク質に翻訳可能かどうか、すなわち機能を持つ遺伝子かどうか検索したところ 54 の配列が同定された。Open reading frame であるこれらの配列について、今後遺伝子探査を行い、新型エンテロキシン遺伝子のクローニングを試みる。



#### D. 結論

ウエルシュ菌が従来認識されていないエンテロトキシンを産生している可能性がある。事例株である W5052 株を培養し、生化学的手法を用いて新型エンテロトキシンの精製を試みた。活性を保持したままで、硫酸アンモニウム沈殿法とゲルろ過法を組み合わせ、SDS-電気泳動上 10 数種のタンパク質群中に目的毒素タンパク質が存在することを明らかにした。

同 W5052 株のゲノムを解析した。既知エンテロトキシン産生ウエルシュ菌 SM101 株にはなく、W5052 株のみが保有する遺伝子は 54 種類で、この中に新型エンテロトキシン遺伝子が存在する可能性がある。部分精製毒素タンパク質の解析から得られる情報と、遺伝子情報を組み合わせ、新型エンテロトキシンの遺伝子およびそのタンパク質を同定できる可能性が認められた。

#### E. 健康危害情報

なし。

#### F. 文献

- 1) 山中英明、藤井建夫、塩見一雄、微生物性食中毒、「食品衛生学第二版」恒星社厚生閣、東京 (2007)
- 2) Czczulin, J.R., Hanna, P.C. and McClane, B.A. Cloning, necleotide

sequencing, and expression of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene in *Escherichia coli*. Infect. Immun. 61:3429-39 (1993)

- 3) McClane, B.A. and McDonel, J.L. Characterization of membrane permeability alterations induced in Vero cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. Biochim. Biophys. Acta 600:974-85 (1980)
- 4) McClane, B.A. and McDonel J.L. The effects of *Clostridium perfringens* enterotoxin on morphology, viability, and macromolecular synthesis in Vero cells. J Cell. Physiol 99:191-200 (1979)
- 5) Katahira, J., Inoue, N., Horiguchi, Y., Matsuda, M., Sugimoto, N. Molecular cloning and functional characterization of the receptor for *Clostridium perfringens* enterotoxin. J. Cell. Biol. 136:1239-1247 (1997)
- 6) 門間千枝、柳川義勢、畠山薫、尾畑浩魅、横山敬子、新垣正夫、甲斐明美、諸角聖、五十嵐英夫、伊藤武。新型エンテロトキシンを産生すると推定されたウエルシュ菌とその下痢原性毒素について。日本細菌学雑誌54:120 (1999)
- 7) 門間千枝、柴田幹良、下島優香子、小西典子、小畑浩魅、甲斐明美、山田澄夫、諸角 聖。既知エンテロトキシン非産生ウエルシュ菌によると推定され

た食中毒事例（第2例）、日本細菌学雑誌 59:283 (2004)

- 8) 大谷仁己、氏家淳雄。変法 DS 培地におけるウエルシュ菌の芽胞形成とエンテロトキシン産生性、食品衛生学雑誌 28:282-285 (1987)

G. 知的所有権の取得状況

- 1) 特許取得

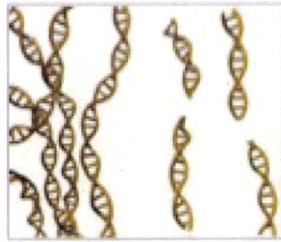
なし。

- 2) 実用新案取得

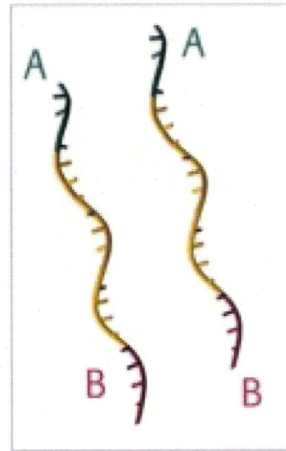
なし。

- 3) その他

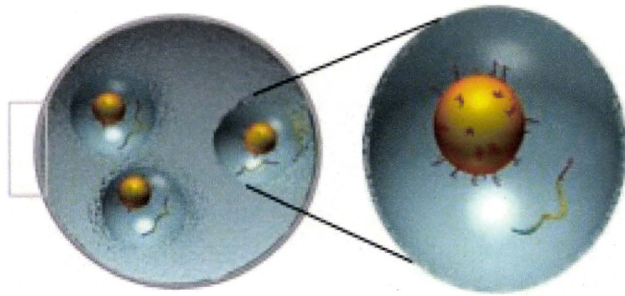
なし。



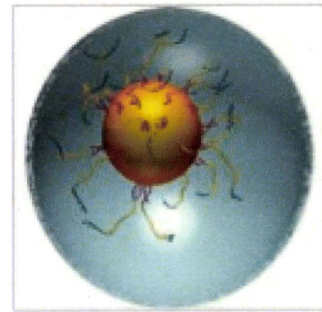
ゲノム DNA の断片化



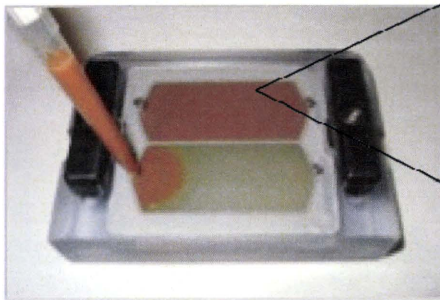
DNA へのアダプター付加  
DNA ライブラリー構築



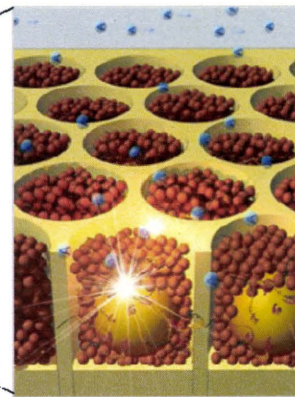
ビーズへの DNA の結合と  
油滴へのビーズの分散



エマルジョン PCR による増幅

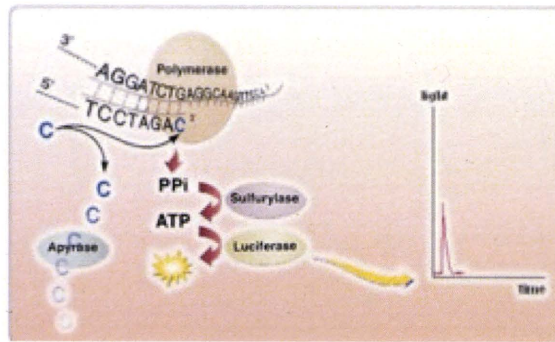


PicoTiterPlate へのアプライ



1 ウェル 1 ビーズに分散

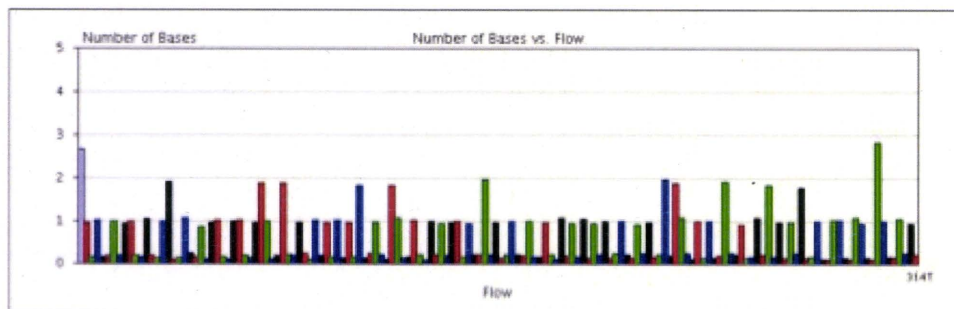
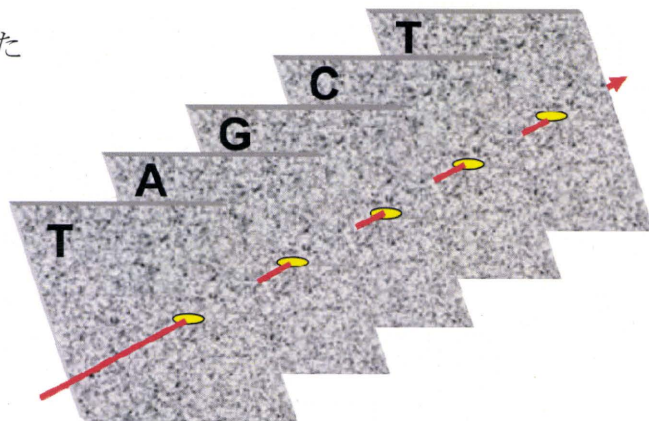
図1 次世代シーケンシング法のスキーム 1



パイロシーケンス法原理図

- ステップ1 : DNA ポリメラーゼによる伸長反応
- ステップ2 : 反応により生じたピロリン酸の ATP への変換
- ステップ3 : ATP によるルシフェラーゼの発光反応誘発
- ステップ4 : 各ウェルの発光を CCD カメラで記録

CCD カメラで撮影した  
プレートの像



各ウェルの ATCG 情報を棒グラフ化、シーケンスとする

図2 次世代シーケンシング法のスキーム 2

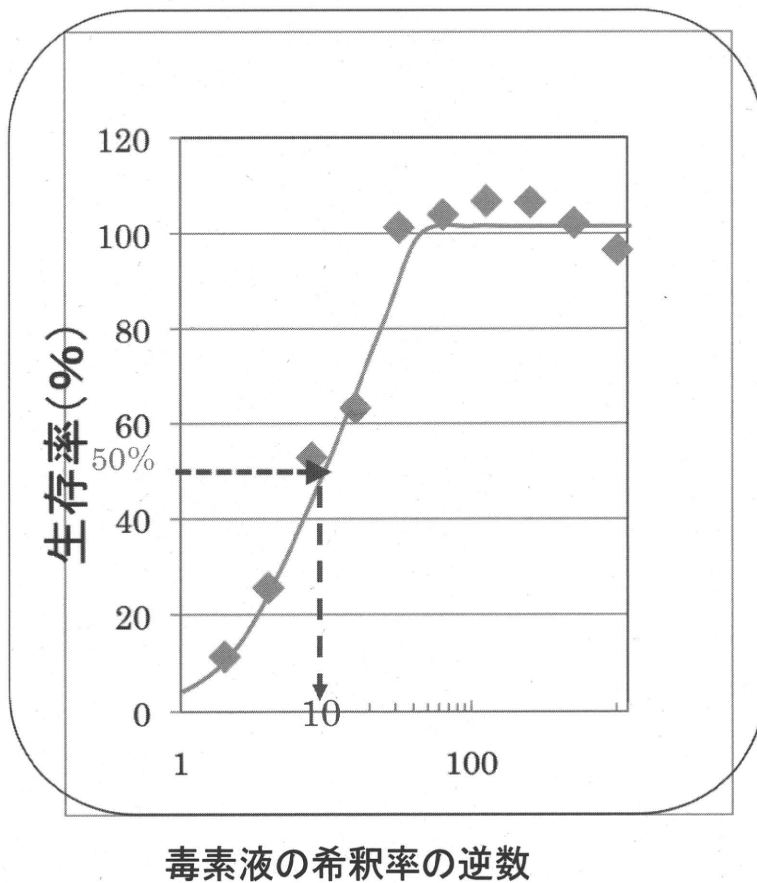
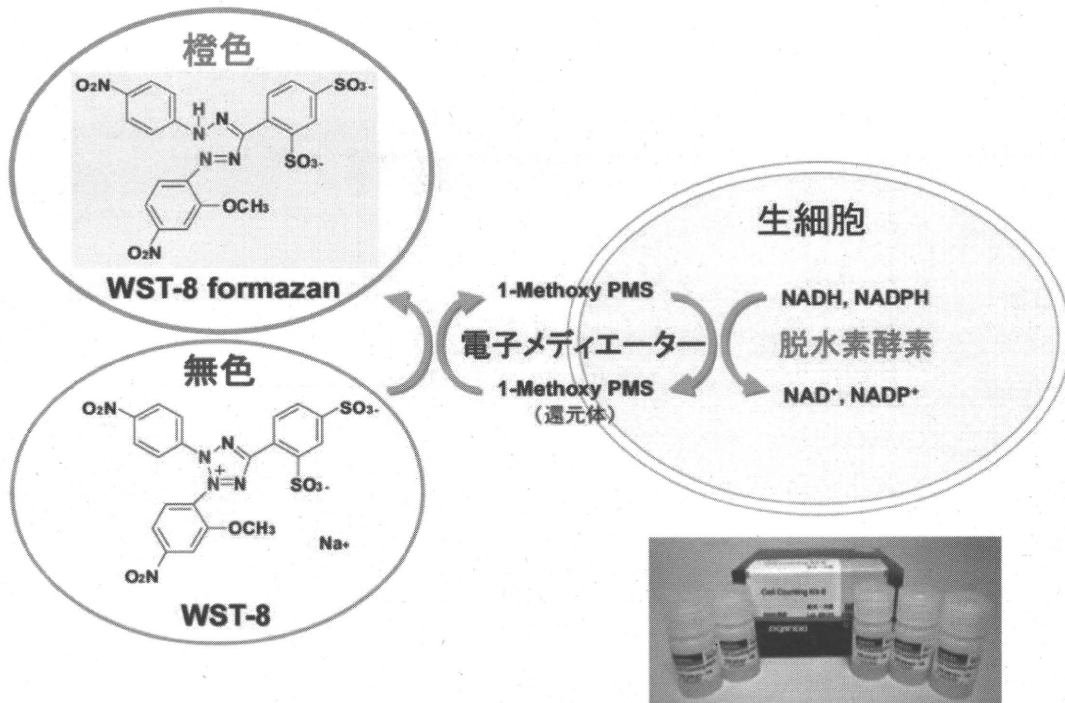


図3 生細胞数測定キットの原理図と、毒素活性の表皮法の模式図

表1 ウエルシュ菌新型エンテロトキシンを産生すると推定される事例ウエルシュ菌の培養液中の細胞毒性：  
培養の経時的検討

培養日数 (日)	タンパク質濃 度 (mg/ml)	L929 細胞毒性	
		毒性 (U/ml)	比活性 (U/mg protein)
1	27	4.3	0.16
2	20	4.3	0.22
3	18	3.3	0.18
4	15	3.0	0.20

検体は、事例ウエルシュ菌を変法 DS 培地で所定の日数培養した後、70%になるよう硫酸アンモニウムを添加、生じた沈殿を遠心分離で回収後、もとの液量で溶解したものと原液とした。図3で示す方法で、L929細胞に対する毒性を測定した。

表2 段階的硫酸アンモニウム分画によるウエルシュ菌新型エンテロトキシンの部分精製

硫酸アンモニウム分画 (%)	タンパク質濃度 (mg/ml)	Vero 細胞毒性		L929 細胞毒性	
		毒性 (U/ml)	比活性 (U/mg protein)	毒性 (U/ml)	比活性 (U/mg protein)
0 - 40	27	11	0.41	—	—
40 - 50	111	14	0.13	9	0.08
50 - 60	110	14	0.13	11	0.10
60 - 70	77	10	0.13	—	—

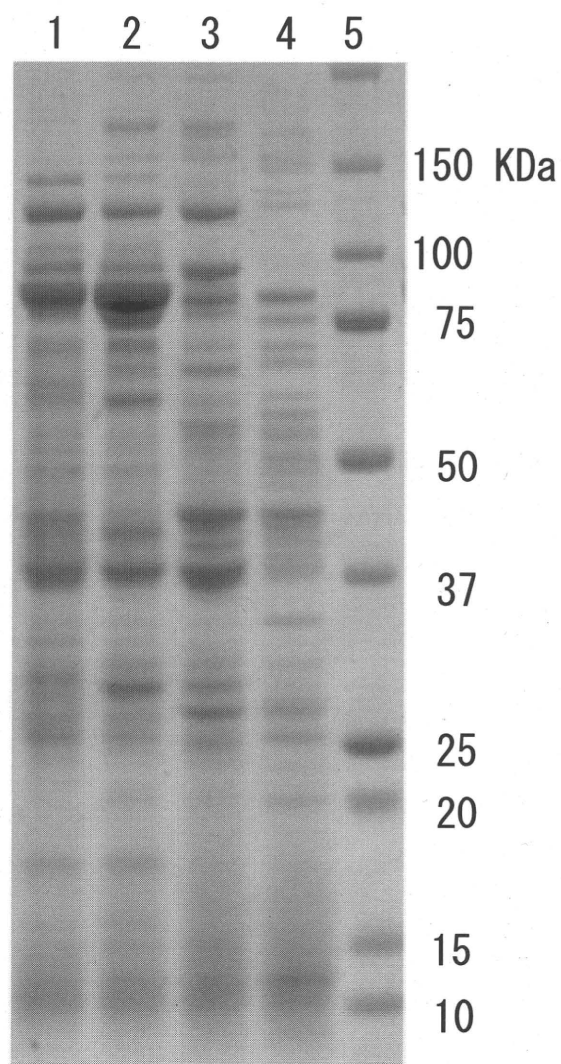


図4 ウェルシュ菌新型エンテロキシンの部分精製：硫酸アンモニウム画分の SDS-電気泳動像

レーン1：0-40%、2：40-50%、3：50-60%、4：60-70%硫酸アンモニウム分画、レーン当り 5  $\mu\text{g}$  を泳動した。5：分子量マーカー



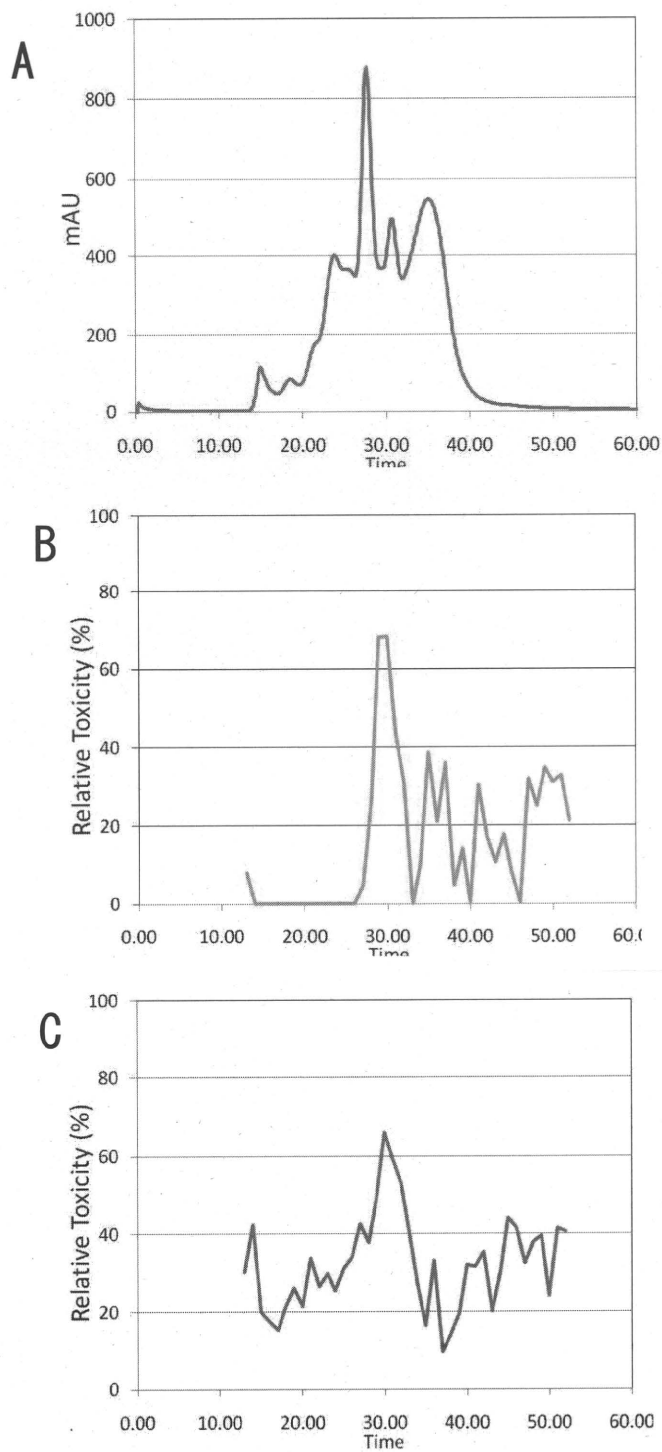


図5 ウェルシュ菌新型エンテロトキシンの Superdex 200 10/300 GL カラムによるゲルろ過

A: タンパク質の溶出パターン (280 nm の吸光値)、B: Vero 細胞に対する細胞毒性、  
C: L929 細胞に対する細胞毒性

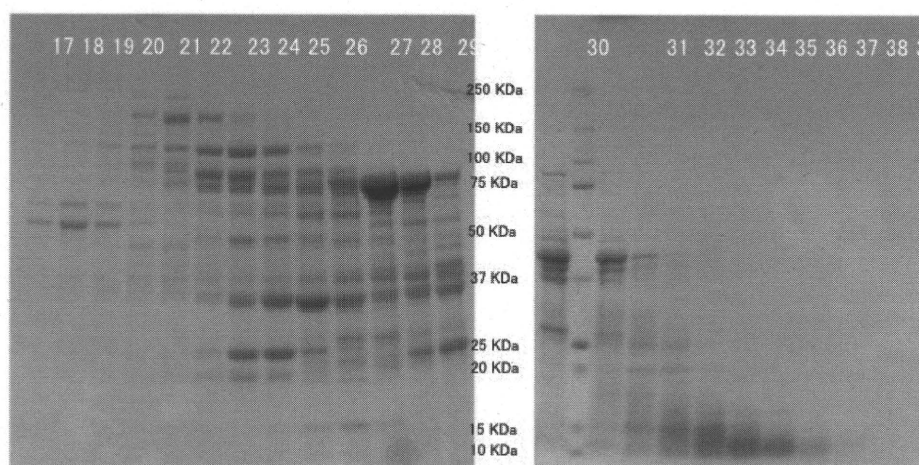


図6 ゲルろ過したウエルシュ菌新型エンテロトキシンのフラクションの SDS-電気泳動像

上部の番号はフラクション番号を示す。

**Run Statistics : Summary of Run Metrics**

Sample ID	PF Reads	PF Bases	Avg. Read Length	Avg. Read Quality
C_perfringens	227,152	79,690,605	350.83	29.70

**PF Reads** : GS RunProcessorのQuality Filterを通過し出力されたリード数。  
**PF Bases** : GS RunProcessorのQuality Filterを通過し出力された塩基数。  
**Avg Read Quality** : 各塩基のQuality値 (Phred-equivalent Quality Score; 後述) の平均。  
**Avg Read Length** : 1リードあたりの平均読み取り長。

**Read Length Distribution**

454Reads.C\_perfringens

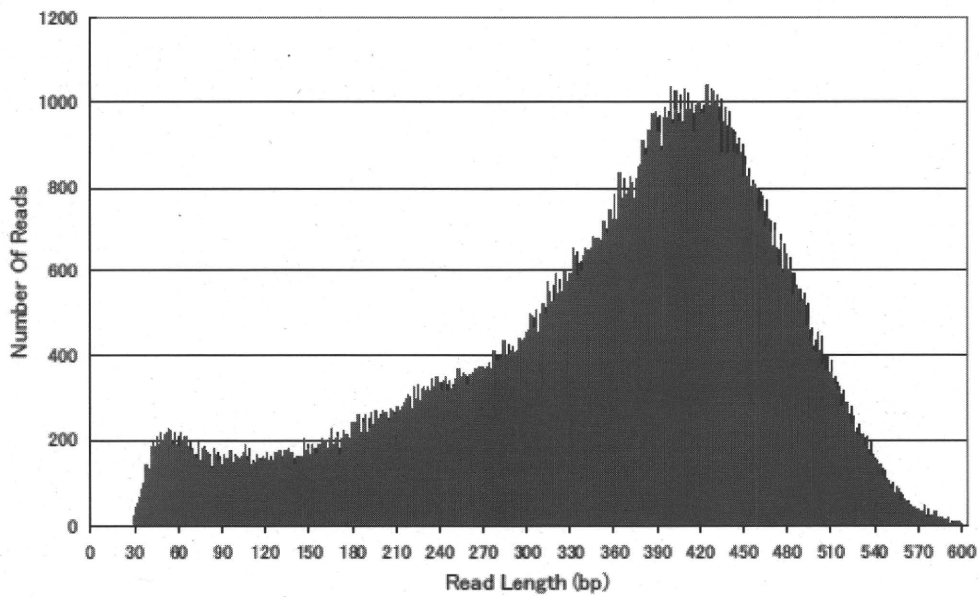


図7 ウエルシュ菌 W5052 株の次世代シーケンス リード長の分析

表3 ウエルシュ菌 W5052 株次世代シーケンス情報 総括

Assembly Results

取得した全リードデータを「GS De Novo Assembler」の「Genome Project」にて de novo アセンブルした結果。

Sample ID	C_perfringens
<b>Run Status</b>	
Number Of Reads	227,150
Number Of Bases	79,504,451
<b>Read Alignment Results</b>	
Number Of Aligned Reads	223,586
Number Of Aligned Bases	79,093,252
<b>Read Status</b>	
Number Of Assembled	220,012
Number Of Partial	3,574
Number Of Singleton	350
Number Of Repeat	134
Number Of Outlier	276
Number Of TooShort	2,804
<b>Large Contig Metrics (over500bp)</b>	
Number Of Contigs	112
Number Of Bases	3,330,997
Average Contig Size	29,741
N50 Contig Size	85,033
Largest Contig Size	246,108
Q40 Plus Bases	99.70%
Q39 Minus Bases	0.30%
<b>All Contig Metrics (over100bp)</b>	
Number Of Contigs	132
Number Of Bases	3,336,496