

図2. エンテロトキシン産生性ウエルシュ菌の嫌気培養結果

TGC 培地で培養したエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌を 1/1000, 1/10,000, 1/100,000 倍希釈した後, CW 寒天培地で嫌気培養した.

プレート右下の数字はコロニー数を示す.

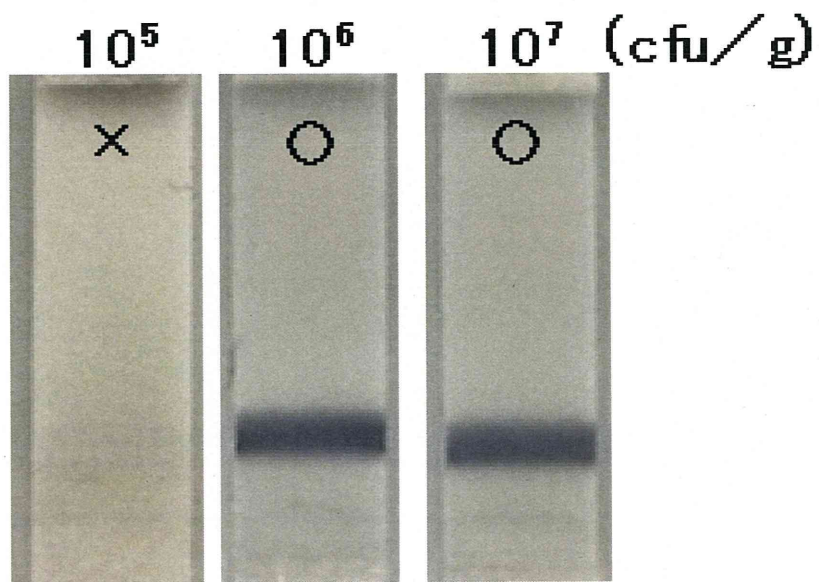


図3. 菌接種試験

カレー試料にエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌
(10^5 , 10^6 , 10^7 cfu/g) を接種した.

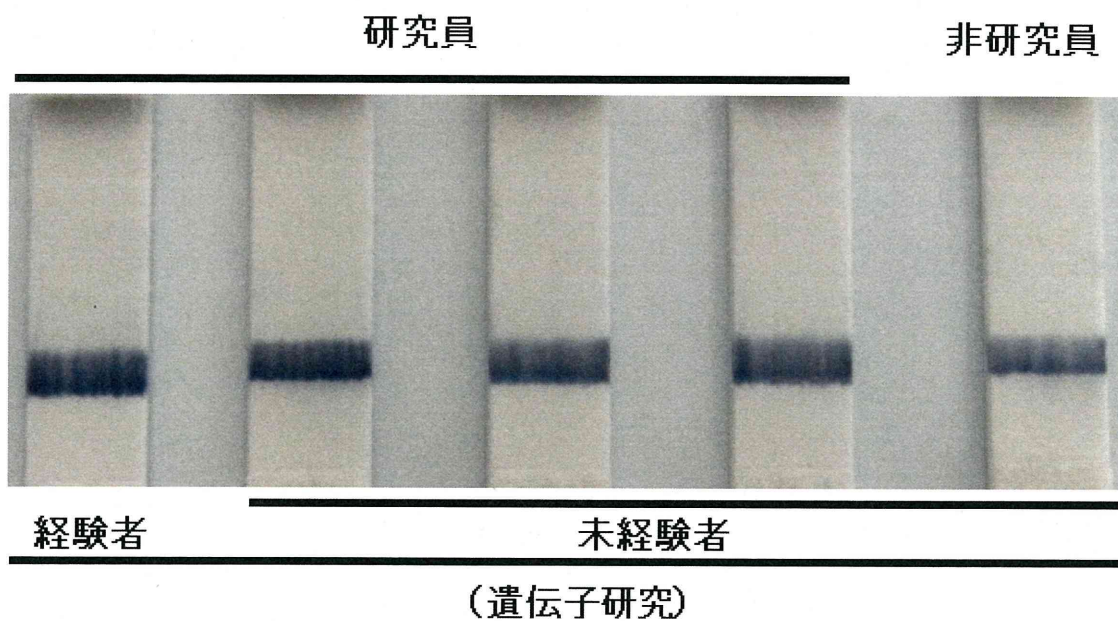


図4. 菌接種試験の測定者間再現性

5名の検査作業者により、カレー試料に接種したエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌 (10^6 cfu/g) を検出した。

分 担 研 究 報 告 書

ウエルシュ菌食中毒発現機構の考察

三宅 眞実

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

ウエルシュ菌食中毒発現機構の考察

分担研究者 三宅 眞実 大阪府立大学大学院 応用生命科学研究科 教授

協力研究者 星 英之 大阪府立大学大学院 応用生命科学研究科 教授

研究要旨：ウエルシュ菌は大規模型の食中毒を起こす。検査法は確立されているが、食中毒発生メカニズムには不明のことが多い。腸管内での菌増殖、芽胞形成、毒素産生機構はほとんど研究されていない。本厚生労働科学研究で、新領域であるウエルシュ菌の腸管内増殖機構について、研究を進めて来た。本年度は、消化管内に到達したウエルシュ菌に作用して食中毒発症の誘因となる宿主環境因子を同定すべく、ウエルシュ菌の芽胞形成とウエルシュ菌エンテロトキシン(CPE)産生を引き起こす共培養系培地条件を検討した。その結果、まず培地中の糖が菌の挙動に大きな影響を与えることを再確認し、これまで使用してきたDMEM培地のグルコースをstarchに代替したDMEM-S培地を使用したときに、ある程度の芽胞形成とCPEの産生が引き起こされることを確認した。しかしこの時の芽胞形成・CPE産生は、古くからの細菌学的研究によって確立されたDS培地中で見られるものと比べると弱く、相加的・相乗的に作用する何らかの因子がDS培地中に存在することが示唆された。今後はこの相加的・相乗的に作用する因子についてさらに検討を加えると共に、消化管内に存在する因子についても、菌の芽胞形成・CPE産生を亢進させるものがないか探索を行う予定である。少なくとも酪酸は本実験系では有意な影響を持たないことが確認されたが、今後はその他の因子について詳細に検討を加えたい。

A. 研究目的

ウエルシュ菌は各種の疾病を引き起こすが、その中に食中毒がある。その食中毒は、加熱加工食品や総菜が原因食のことが多く、患者数が100人を越すような大規模型であることを特徴とする¹⁾。従って、ウエルシュ菌食中毒の制御には、大きな意義がある。

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。本食中毒発生の機序として、1) 食品内での大量の生菌の存在、2) 食品を通じて取り込まれた生菌の胃通過、3) 生菌の腸管内での増殖、4) 芽胞とエンテロトキシンの産生、5) 毒素の腸管上皮細胞への攻撃、が認識されており、最終的にエンテロトキシンによる下痢誘発に至るものと理解されている¹⁾。つまり本食中毒は、非常に複雑な機序を経て発生することから、多方面からの分析調査解析がウエルシュ菌食中毒の予防に必要であることを示している。

本厚生労働科学研究において、前年度までに、ウエルシュ菌標準株を用いて *in vitro* 感染実験系を構築し、菌は消化管内では宿主細胞の代謝活性や宿主因子を利用して自らが増殖しやすい条件を作りだしていることを明らかにしてきた。さらに食中毒由来株と非食中毒由来株について腸上皮バリア破壊能を比較検討すると、食中毒由来株はバリア破壊能を示さないことを明らかにした。これらの結果は、ウエルシュ菌が宿主に感染して病原性を発揮するには宿主因子・環境に応答することが非常に重要であること、そしてその環境応

答性は菌株によりばらつきがあることを示唆するものである。食中毒症状を引き起こす菌株は共通の環境応答性を獲得して、腸管内にある特異的な環境因子を認識・応答する能力を保持して病原性を発揮していることが強く疑われる。そこで本年度は、食中毒由来株が消化管内でどんな環境因子に応答して表現性を変化させ、最終的に宿主を下痢に導くのかを明らかにすることを目的に研究を進めた。

B. 実験方法

1) Caco-2 細胞の培養と上皮間電気抵抗値の測定

ヒト結腸由来細胞株 Caco-2 細胞は、ウシ胎児血清 (FCS) 含有ダルベッコ MEM (DMEM) を用いて培養した。トランスウエル内側にあたるウエルに Caco-2 細胞を播種し、5日間培養した。タイトジャンクションが形成されると、細胞の基底膜側と管腔側とが遮断され、物質の移動が制限される。基底膜側と管腔側間に通電し、電気抵抗 (TER) が発生していることを確かめた。培地中の血清、その他の条件を変え、TER を測定した。

2) ウエルシュ菌と菌数測定

トランスウエル内に、ガス壊疽由来および食中毒由来株を接種し、以下に記載する各種の条件で培養し、培養上清をサンプリング、菌数を測定した。寒天平板培地に上清を塗布し、嫌気パック中で培養、生じたコロニーを計数した。芽胞数を計数する場合、生菌を取り除くため、検液を100℃で

10分処理した後、培地に添加した。

3) 芽胞形成に関わる検討

実験モデルで使用しているトランスウェル中での芽胞形成に、培地成分が同影響するか検討した。

グルコース、可溶性澱粉 (starch)、ラフィノース等の、菌数、芽胞数、およびエンテロトキシン産生性を調べた。

4) ウェルシュ菌エンテロトキシンの測定

デンカ生研のラテックス凝集試験法を用いて、培養液中の cpe 濃度を測定した。また、ウサギ抗 cpe 抗体を用いてのウエスタンブロット法を用いて、cpe の存在を確認した。

C. 結果

1 芽胞形成培地の検討

食中毒株が宿主に下痢を引き起こすためには、宿主体内に摂取された菌が消化管内で芽胞を形成すると共にウェルシュ菌エンテロトキシン (以下、CPE) を産生することが必要である。昨年度使用した *in vitro* 実験条件下ではウェルシュ菌は芽胞を形成せず、芽胞形成に伴い産生されることが知られる CPE 産生も見られなかった (図 1)。これは培地 (Dulbecco's Modified Eagle Medium、以下 DMEM) 中に存在するグルコースが芽胞形成や CPE 産生を抑制しているためである。ウェルシュ菌は Duncan-Strong 培地 (以下、DS 培地) と呼ばれる芽胞形成培地中で高率に芽胞形成するが、この培地には糖として soluble starch (以下、starch) や

raffinose が添加されている (表 1)。そこで DMEM のグルコースを starch (最終濃度 0.4%) に置き換えた培地 (以下、DMEM-S) を用いたときに芽胞形成が引き起こされるか検討した。その結果、図 2 に示すように DMEM-S を使用することによって熱処理耐性の芽胞が培養上清中に検出された。同時に培養上清中の CPE 産生も調べたところ、Western blot で確認できるほどの量ではなかったが、逆受身ラテックス凝集反応により 10 ng/ml 程度の CPE 産生が確認できた (図 2)。以上の結果、培地の糖が芽胞形成に決定的な影響を持つこと、DMEM-S 培地を用いれば宿主細胞との共培養系でウェルシュ菌の芽胞形成を観察することが可能となることが明らかになった。

2 グルコース非存在下での食中毒株によるバリア破壊

培地中の糖をグルコースから starch に置き換えると、宿主消化管内で引き起こさせる芽胞形成が *in vitro* でも再現できることから、食中毒株のバリア破壊能を DMEM-S 培地を用いて再評価した。その結果、通常の DMEM ではまったくバリア破壊能を示さなかった食中毒株も、starch を糖原とした場合には緩やかなバリア破壊能を示すことが明らかになった (図 3)。これは、消化管内に近い環境に置かれると菌が病原性を発現し、一般に下痢原性を評価する指標に用いられるバリア破壊能を菌が獲得することを示している。すなわち食中毒株は特に環境中の糖に病原性が大きく影響を受け、ある種の糖を利用できる

環境下で病原性を発揮し、バリア破壊のような宿主への侵襲性を示すようになるということが明らかになった。

3 未知の芽胞形成・CPE 産生促進因子

上記の実験はすべて DMEM を基礎培とした結果である。一方、DS 培地を同じ共培養系の培地として用いると、より高度にウェルシュ菌の芽胞形成と CPE 産生が確認できた (図 4)。これは DMEM-S 培地には存在しない芽胞形成・CPE 産生促進因子が DS 培地には存在し、これに応答して菌は高度に芽胞形成・CPE 産生をしたと考えられる。そこでこの芽胞形成促進因子を同定するために、まず、消化管内に存在し宿主細胞と腸内細菌の相互作用に大きな役割を果たしている酪酸に注目し、酪酸が共培養系でのウェルシュ菌芽胞形成や CPE 産生に影響を与えるのか検討した。酪酸の濃度は宿主細胞である Caco-2 細胞の生存性に影響を与えない最大濃度まで調べたが、今回得られた結果では、酪酸はウェルシュ菌の芽胞形成にも CPE 産生にも有意な影響は示さなかった (図 5)。

D. 考察

本年度は、消化管内に到達したウェルシュ菌に作用して食中毒発症の誘因となる宿主環境因子を同定すべく、ウェルシュ菌の芽胞形成と CPE 産生を引き起こす共培養系培地条件を検討した。その結果、まず培地中の糖が菌の挙動に大きな影響を与えることを再確認し、これまで使用してきた DMEM 培地のグルコースを starch に代替

した DMEM-S 培地を使用したときに、ある程度の芽胞形成と CPE の産生が引き起こされることを確認した。しかしこの時の芽胞形成・CPE 産生は、古くからの細菌学的研究によって確立された DS 培地中で見られるものと比べると弱く、相加的・相乗的に作用する何らかの因子が DS 培地中に存在することが示唆された。今後はこの相加的・相乗的に作用する因子についてさらに検討を加えると共に、消化管内に存在する因子についても、菌の芽胞形成・CPE 産生を亢進させるものがないか探索を行う予定である。少なくとも酪酸は本実験系では有意な影響を持たないことが確認されたが、今後はその他の因子について詳細に検討を加えたい。

E. 健康危害情報

特になし。

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)

G. 研究発表

なし。

H. 学会発表

- 1) Hidenobu Hoshi and Masami Miyake. An

in vitro model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. International Conference on Global Issues Influencing Human and Animal Health for ASEAN; One Health Concept. June, 2011. Kohn Kaen, Thailand.

2) Hidenobu Hoshi, Kaori Kondo, Masataka Oda, Masahiro Nagahama, Shigeki Yamamoto, Yoichi Kamata, and Masami Miyake. An *in vitro* model system for studying *Clostridium perfringens* type A infection. IUMS2011. Sept., 2011. Sapporo, Japan.

3) 星 英之、近藤香織、山本茂貴、鎌田洋一、三宅眞実. ウエルシュ菌食中毒の発症メカニズムを解析するための *in vitro* 実験系について. 第 32 回日本食品微生物学会. 2011 年 11 月. 東京.

I. 知的所有権の取得情報

なし。

1) 特許取得

なし。

2) 実用新案取得

なし。

3) その他

なし。

表1 DS培地の組成

Ingredient	Conc.(g/L)
Proteptse peptone	15
Yeast Extract	4
Na · thioglycolate	1.0
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	10.0
Soluble starch	4.0

図1 芽胞形成に対する培地中の糖の重要性

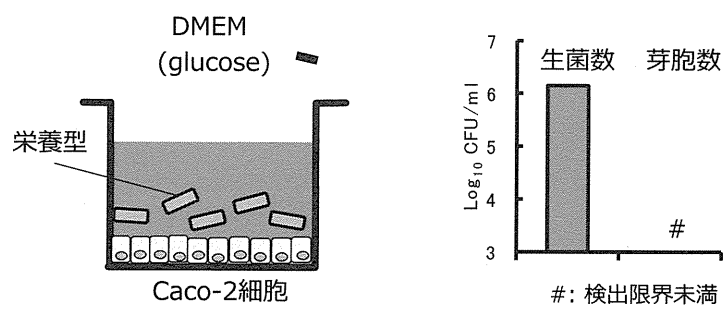
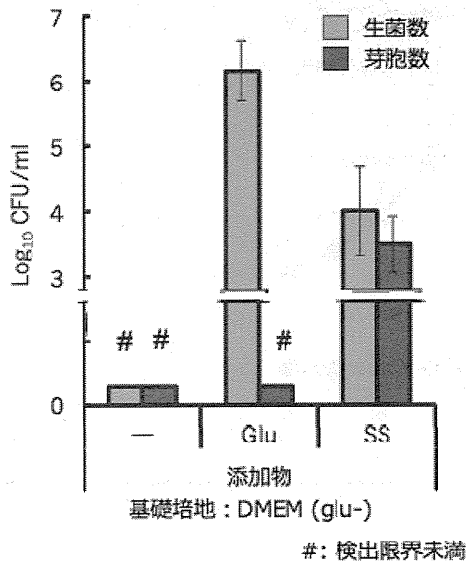
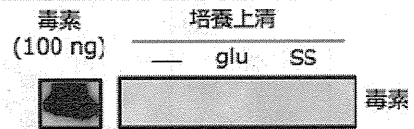


図2 芽胞形成・毒素産生に対する培地中の糖の効果

芽胞数の算出



Western blotting法による毒素検出



逆受身ラテックス凝集反応による毒素検出

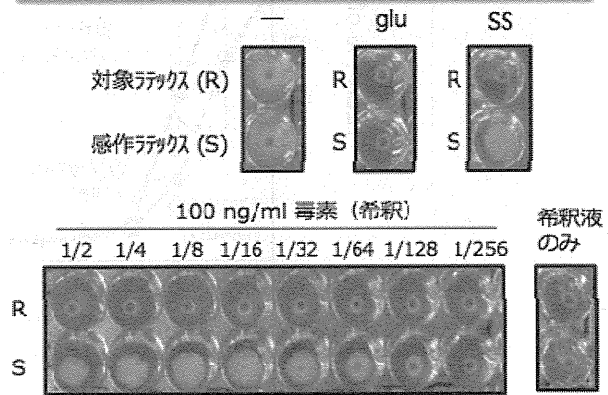


図3 Starch添加によるバリア破壊能発現

異なる培地条件によるバリア破壊能の違い

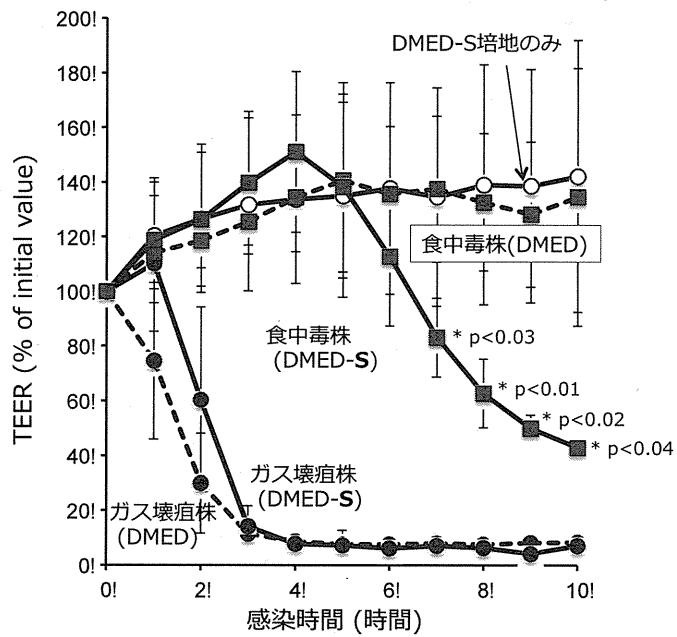
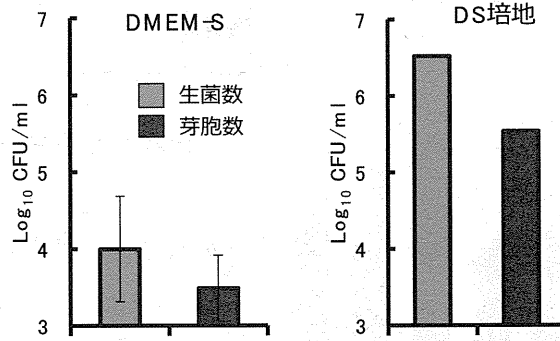


図4 DMEM-Sでは芽胞形成が不十分

芽胞数の算出



Western blotting法による毒素検出

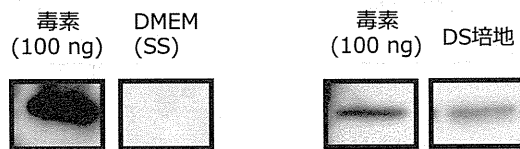
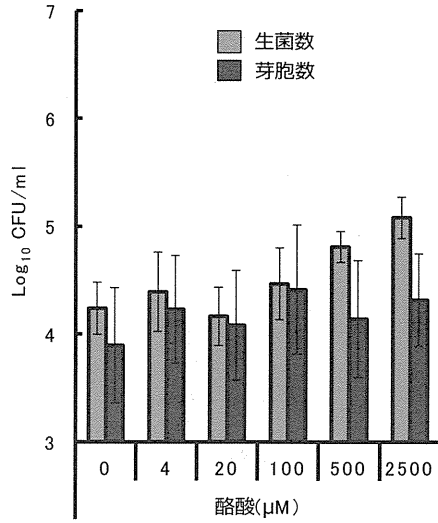
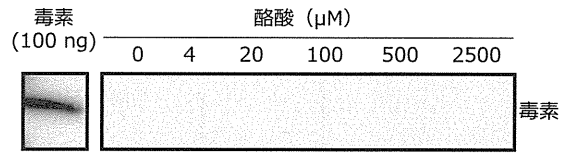


図5 芽胞形成・毒素産生に対する酪酸の効果

生菌数・芽胞数



Western blotting法による毒素検出



毒素によるラテックス試薬の凝集価

実験 No.	酪酸 (μM)						NC	PC
	0	4	20	100	500	2500		
#1	16	32	16	32	32	16	0	128
#2	4	8	4	4	8	8	0	128
#3	4	4	4	4	4	4	0	32

分 担 研 究 報 告 書

ウエルシュ菌新型エンテロトキシンの分離と
精製の検討

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
	堀口 安彦	大阪大学微生物病研究所	分子細菌毒素学領域	教授

研究要旨：ウエルシュ菌食中毒は、同菌が産生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。一方、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。この事例菌はウエルシュ菌が、現在まで認識されていない、新し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。活性を保持した部分精製標品を得、同標品についての質量分析機によるタンパク質消化ペプチドと生物情報学的手法を組み合わせ、また、前年度のゲノム解析結果を利用し、新型エンテロトキシン遺伝子の選抜を試みた。

事例株 W5052 は、現在までウエルシュ菌が持っていると報告されている毒素のなかで、2種類の毒素と相同性のある毒素遺伝子を持っている可能性が示された。ただし、その相同性は低く、毒素遺伝子のクローニング、組換え体の作製等を通じ、新型エンテロトキシンの存在を確実なものとする必要がある。

A. 研究目的

ウエルシュ菌食中毒は、古くから認識された食中毒で、昭和33年から続く厚生労働省の食中毒統計に、今もその発生が続いている。年間30件程度の発生をみる食中毒で、発生件数は多くないが、患者数が多い、大規模型の発生をする食中毒である¹⁾。ウエルシュ菌食中毒であると判定する方法も確立されている。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。ウエルシュ菌食中毒は下痢を主徴とし、腸管上皮細胞に直接作用し症状を誘発する物質がエンテロトキシンである。エンテロトキシンは、芽胞形成時に合成され、培養液中に放出される。エンテロトキシンは分子量約35,000、アミノ酸319残基、脂質や糖質が結合していないタンパク質で、易熱性、中性領域のpHで安定性を示す。毒素遺伝子はすでにクローニングされ²⁾、遺伝子診断法は確立されている。毒素遺伝子に変異は報告されていない。毒素に血清型はなく、均一な抗原性とされている。抗体を用いての毒素検出キットが市販されている。エンテロトキシンは一部の種類の培養細胞には致死活性を示す。Vero細胞には毒性を示すが、L929細胞には毒性を示さない。前者にはエンテロトキシンの受容体であるクローディンタンパク質が存在するからで、L929細胞は受容体を欠失しており、毒性を受けない^{3,4,5)}。

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が報告された。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⁶⁾。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、培養ろ液をウサギ腸管ループ内に投与すると、液体の貯留とループの腫脹が認められた。この結果はろ液中に下痢を誘発するエンテロトキシン活性のある物質があることが推察された。ろ液に対し、60℃5分の加熱、pH11.5の強アルカリ曝露、およびタンパク質分解酵素処理が行われると、腸管ループテスト陰性になっている。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。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⁷⁾にも報告されている。

本分担研究では、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させる。この目的に向かって、昨年度は二つのアプローチを実行した。一つは、次世代シーク

エンシング技術を用い、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た。事例菌のゲノム情報を解析し、オープンデータベースにあるエンテロトキシン産生性ウエルシュ菌のゲノムと比較、目的の新型エンテロトキシン遺伝子の単離を目指した。解析の結果、事例菌株特異的な遺伝子群は、21種あることが明らかになった。もう一方のアプローチは 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部分精製を試みた。このアプローチの結果、培地成分が取り除かれ、Vero 細胞および L929 細胞の両方に毒性を示す画分が確立できた。しかしながら、毒素を単一には純化できていなかった。予備試験の結果、部分精製画から毒素の精製を進めると、活性が認められなくなった。この試験から、新型エンテロトキシンは複数のタンパク質種からなり、精製を進めることで、各々が分離され、タンパク質としては純化されているものの、分離されたため、毒性を失ってしまう可能性が考えられた。

本年度の分担研究では以下の検討を行った。昨年度確立した方法で、細胞毒性活性を保持したままの、部分精製標品を作製する。それをトリプシン分解し、分解物を質量分析機に適応する。質量解析の結果から、アミノ酸配列を推定する。オープンデータベースを検索し、推定アミノ酸配列に相同性を示す、タンパク質遺伝子を特定する。前年度に明らかにし

た、新型エンテロトキシン特異株に特異的な遺伝子群のなかで、質量解析から推定したタンパク質が存在するか検討した。

B. 実験方法

1 ウエルシュ菌新型エンテロトキシンの部分精製

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°C 15 分加熱した。その後、Brain Heart Infusion 培地に接種し、37°C で一晚培養した。

変法 DS 培地を調製した⁸⁾。同培地の液量の、1% の上記 BHI 一晚培養液を接種した。37°C で 1~4 日間培養した。

1-3 段階的硫酸アンモニウム沈殿

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。

1-4 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。

1-5 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、 1×10^5 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、一晚 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 μ 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 μ 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 μ 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 質量解析による分析

2-1 質量解析するサンプルの調製

サンプルの還元アルキル化を行った。活性を保持しした部分精製毒素標品 (10 μ g) を、10 μ l の 100 mM 炭酸水素アンモニウム溶液に懸濁した。45 mM ジチオスレイトールを含んだ 100 mM 炭酸水素アンモニウム 1 μ l を添加し、55°C で 15 分間反応させた。その後、100mM 炭酸水素アンモニウムに溶解させた 100 mM ヨードアセトアミド液 1 μ l を加え、25°C で 15 分反応させた。

上記の処理産物に、1 μ g のトリプシンを添加し、37°C、30 分反応させ、0.1% トリフルオロ酢酸 1 μ l を添加し、トリプシン消化を停止させた。同一処理を行ったサンプルについて、SDS-電気泳動を行い、検体のタンパク質消化が十分に行われたかどうか、確認した。

2-2 質量分析機

アジレント社 6500 シリーズ LCMS GTOF System を用いた。

LC 部分については、機器は Agilent1200 series、カラムは ZorbaX 300SB-C18 (0.075 μ m x 43 mm、5 μ m 径)、初期移動相は 0.1% ギ酸、最終移動相は 0.1% ギ酸を含んだ 90% アセトニトリル-水を用いた。流速は 300 nl/分とした。

MS 部分については、Agilent6530、陽イオン解析で、イオン化には Electro Spray Ionization 法を用いた。乾燥ガスにはチッソを用いた。

質量数からのアミノ酸の同定、アミノ酸配列の決定、同配列の相同性の調査には、解析ソフト Spectrum Mill を用いた。ウエルシュ菌培養液由来物は、生物種を Not mammal、タンパク質データベースは SwissProt を用いて解析した。

C. 結果と考察

1 新型ウエルシュ菌エンテロトキシンの部分精製とトリプシン消化

ウエルシュ菌 W5052 株を変法 DS 培地で 37°C 2 日間培養し、40-60%硫酸アンモニウム沈殿画分を回収しゲルろ過を行った。Vero および L929 細胞への致死毒性がある画分を回収し、部分精製標品とした。

部分精製画分についてトリプシン消化を行った。図 1 に、トリプシン消化前後の、活性保持部分精製新型エンテロトキシンの SDS-電気泳動像を示した。クーマシーブリリアント染色を施したところ、

トリプシン消化後の分画には、タンパク質を思わせるバンドはなく、含まれていたタンパク質はすべてペプチドにまで消化されていることが明らかになった。質量解析機の正確性を検定するために、ウシ血清アルブミンについても同様の作業を行い、部分精製毒素標品と同時に質量分析した。

2 部分精製新型エンテロトキシン画分の質量解析と同毒素の遺伝子候補の検索

トリプシン消化ウシ血清アルブミンについて、その消化産物の質量解析を行い、得られたペプチド情報の相同性を解析したところ、m/z が 781.43 は、ウシ血清アルブミンのアミノ酸配列を示す質量/電荷数となった。この結果は、トリプシン消化と GTOF システムを用いてのタンパク質分析は正しく作動していることが証明しており、部分精製新型エンテロトキシン画分の分析に、本手法が妥当であると判断された。図 2 に LC におけるチャートを、図 3 に MS のシグナルチャートを示す。

解析ソフト Spectrum Mill をデフォルトで作動させ、質量分析結果を解析、データベース検索したところ、細胞毒性の活性を保持している部分精製画分から、66 種類のタンパク質が同定された。そのうち、ウエルシュ菌由来のタンパク質に帰属されたのは以下の 6 種だった (図 4)。

- 伸長因子 Elongation factor Tu
- リボソーマルタンパク質 30S ribosomal protein S6