Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* の粗菌体 タンパク質を抗原としたモノクローナル抗体の作製

水野 明文*・野津 祐三**・門田 育生*・西山 幸司*

Akifumi MIZUNO*, Yuzou NOZU**, Ikuo KADOTA* and Koushi NISHIYAMA* :
The Monoclonal Antibodies against Protein Complex Derived from
Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*

Abstract

To obtain specific monoclonal antibodies (MAbs) against *Curtobacterium flaccumfaciens* (Hedges 1922) Collins and Jones 1984, protein complexes of *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 strain, extracted by method (P-1) of De Boer and Wieczorek, and method (P-2) of Yakrus and Schaad were used as immunogen in mouse. Seven hybridoma lines (1P1, 2P1, 3P1, 4P1, 5P1, 6P1, and 7P1) were established with the P-1 antigen and four ones (1P2, 2P2, 3P2, and 4P2) with the P-2. Three MAbs from P-2-hybridoma lines (2P2, 3P2, and 4P2) showed high specificity against whole cells of *C. flaccumfaciens* in an indirect ELISA (ABC-AP-ELISA). The isotype of three MAbs was IgG3. All the MAbs from P-1-hybridoma line and 1 MAb from P-2-ones, which were classified as IgM, reacted with many strains of 4 genera of Gram positive bacteria used in this study on ABC-AP-ELISA. The epitopes included in the P-1 and P-2 were analyzed with purified MAb 1P1 and MAb 3P2. When digested with glucoamylase, antigenicity against these MAbs was retained. Further digestion with proteinase K or trypsin destroyed the antigenicity. On western immunoblot of P-1 and P-2, MAb 1P1 recognized two bands of molecular weight 25 k and 59 k, and MAb 3P2 recognized two bands of molecular weight less than 14.4 k and 59 k. Those epitopes are probably proteins because of their susceptibility to proteinase K and trypsin. The antibodies recognized epitopes present on a same protein or different proteins having a very similar molecular weight at 59 k. They also recognized smaller one clearly different between two antibodies. Purified MAb 3P2 can be used for highly specific detection of *C. flaccumfaciens*, and all the MAb may be used for the analysis of epitopes in whole cells of some Gram positive bacteria related to *C. flaccumfaciens*.

(Received June 15, 1994)

Key words: monoclonal antibody, antigenicity, *Curtobacterium flaccumfaciens*

緒 言

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* (Hedges 1922) Collins and Jones 1984 は、日本を除く大洋州、西アジア、北アメリカ、ヨーロッパに分布し、インゲンマメ、エンドウ、ダイズなどに全身の萎ちょう、葉の軟化腐敗などの病徴を引き起こす¹⁾。そして、日本の植物検疫上侵入を警戒する重要細菌の一つとされている²⁾。本菌の検定のために生菌体を抗原として作製したポリクローナル抗体 (polyclonal antibody ; PAb) は、抗血清作製菌株に対して高い特異性が認められ、多数の血清型に分かれた³⁾。そこで、*C. flaccumfaciens* を種レベルで包括し得る抗血清を作製するための抗原を探索する目的で、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 の生菌体を抗原と

して作製した PAb に対するグラム陽性細菌 4 属 10 種から抽出した粗菌体タンパク質の抗原成分について、寒天ゲル内二重拡散法とウェスタンブロット法で調べた。その結果、*C. flaccumfaciens* のすべての供試菌株に共通する抗原決定基を確認することはできなかったが、*C. flaccumfaciens* の特異性に関する粗菌体タンパク質の存在が予測された⁷⁾。本研究では、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 の粗菌体タンパク質を抗原としてモノクローナル抗体 (monoclonal antibody ; MAb) を作製し、その特異性について検討した。

材料および方法

供試細菌 得られたすべての MAb の特異性の調査のための抗原として、Table 1 に示す 10 種 28 菌株のグラム陽

* 農業環境技術研究所

** 農業生物資源研究所

National Institute of Agro-Environmental Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

National Institute of Agrobiological Resources, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

Table 1. Bacterial strains used

Species	Strain	Other designation	Source
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	NCPBP 178		Kidney bean in USA
do	NCPBP 390		Kidney bean in Hungary
do	NCPBP 567		Kidney bean in Germany
do	NCPBP 1751		Kidney bean in Rumania
do	NCPBP 558 ^{a)}		Kidney bean in USA
do	NCPBP 2344 ^{b)}		do
do	ATCC 33802		Soybean in USA
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	MAFF 302170 ^T	ATCC 25283 ^T	Tulip in Netherlands
do	YPPS Y-3		Tulip in Japan
do	YPPS T-4		do
do	MAFF 301198		do
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	MAFF 302181 ^T	ATCC 9682 ^T	Poinsettia in USA
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	MAFF 302607	ATCC 13437	Red-beet in UK
<i>C. albidum</i>	MAFF 302648 ^{T, c)}	IFO 15078 ^T	Paddy in China
<i>C. citreum</i>	MAFF 302649 ^{T, c)}	IFO 12677 ^T	do
<i>C. luteum</i>	MAFF 302650 ^{T, c)}	IFO 12676 ^T	do
<i>C. pusillum</i>	MAFF 302651 ^{T, c)}	IFO 12674 ^T	Oil-brines in Japan
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	MAFF 302187 ^T	NCPBP 2979 ^T	Tomato in Hungary
do	YPPS K1-1		Tomato in Japan
do	YPPS R-1		do
<i>Cl. michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	MAFF 302195 ^T	NCPBP 1109 ^T	Lucerne in USA
<i>Cl. michiganensis</i> subsp. <i>nebrashensis</i>	MAFF 302196 ^T	NCPBP 2581 ^T	Maize in USA
<i>Cl. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	MAFF 302162 ^T	ATCC 33113 ^T	Potato in Canada
<i>Cl. rathayi</i>	MAFF 302197 ^T	NCPBP 2980 ^T	Cocksfoot in New Zealand
<i>Cl. tritici</i>	MAFF 302182 ^T	ATCC 11403 ^T	Wheat in Egypt
<i>Arthrobacter ilicis</i>	MAFF 302180 ^T	ATCC 14264 ^T	American holly in USA
<i>Rhodococcus fascians</i>	NCPBP 156		Chrysanthemum in UK
<i>R. fascians</i>	NCPBP 1488 ^T		Sweet pea in UK
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	MAFF 302163 ^T	ATCC 19358 ^T	unknown (Netherlands)
<i>A. rhizogenes</i>	MAFF 302164 ^T	ATCC 11325 ^T	Apple in USA
<i>A. tumefaciens</i>	MAFF 302165 ^T	ATCC 23308 ^T	unknown (USA)
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	MAFF 302159 ^T	ATCC 15713 ^T	Potato in Denmark
<i>E. chrysanthemi</i>	MAFF 301660		Welsh onion in Japan
<i>E. herbicola</i>	MAFF 302186 ^T	NCPBP 2971 ^T	unknown (Canada)
<i>E. rhapontici</i>	MAFF 302161 ^T	ATCC 29283 ^T	Rhubarb in UK
<i>Pseudomonas andropogonis</i>	MAFF 302151 ^T	ATCC 23061 ^T	Sorghum in USA
<i>P. avenae</i>	MAFF 302183 ^T	NCPBP 1011 ^T	Maize in USA
<i>P. betle</i>	MAFF 302173 ^T	ATCC 19861 ^T	Betel pepper in Sri Lanka
<i>P. caricapapayae</i>	MAFF 302190 ^T	NCPBP 1873 ^T	Papaya in Brazil
<i>P. cichorii</i>	MAFF 302152 ^T	ATCC 10879 ^T	Endive in Germany
<i>P. corrugata</i>	MAFF 302158 ^T	ATCC 29736 ^T	Tomato in Japan
<i>P. gladioli</i>	MAFF 302545		Rice in Japan
<i>P. solanacearum</i>	MAFF 301492		Eggplant in Japan
<i>P. syringae</i> pv. <i>aptata</i>	MAFF 302253 ^T	ICMP 459 ^T	Sugar beet in USA
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i>	MAFF 302257 ^T	ICMP 3113 ^T	Oat in UK
<i>P. syringae</i> pv. <i>erobotryae</i>	MAFF 302259 ^T	ICMP 4455 ^T	Loquat in USA
<i>P. syringae</i> pv. <i>glycinea</i>	MAFF 302260 ^T	ICMP 2189 ^T	Soybean in New Zealand
<i>P. syringae</i> pv. <i>pisi</i>	MAFF 302269 ^T	ICMP 2452 ^T	Pea in New Zealand
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	MAFF 302272 ^T	ICMP 2844 ^T	Tomato in UK
<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	MAFF 302278 ^T	ATCC 7386 ^T	Cucumber in USA
<i>P. syringae</i> pv. <i>morsprunorum</i>	MAFF 302280 ^T	ATCC 19322 ^T	Plum in Europe
<i>P. viridiflava</i>	MAFF 302156 ^T	ATCC 13223 ^T	Kidney bean in Switzerland
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	MAFF 301152		Broccoli in Japan

a) Orange-colored strain. b) purple-pigment producing strain. c) The strain was not tested for pathogenicity to plant. T : Type strain or pathotype strain. MAFF : Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. YPPS : Yokohama Plant Protection Station. NCPBP : National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK. IFO : Institute of Fermentation, Osaka. ATCC : American Type Culture Collection. ICMP : International Collection of Micro-organisms from Plants.

性細菌を供試した。そのうち、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* は4か国で採集された7菌株で、橙黄色の集落を形成する系統 (orange-colored strain) と紫色の水溶性色素を産生する系統 (purple-pigment producing strain) を含んでいる。また、*C. flaccumfaciens* の特異的検出に利用できる可能性のある MAb に対しては、さらにグラム陰性細菌25菌株を供試した (Table 1)。供試菌株の増殖培地として、*Pseudomonas solanacearum* および *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* には脇本処方の PSA 斜面培地¹³⁾、その他の細菌には PPGA 斜面培地⁸⁾ を用いた。

粗菌体タンパク質の抽出 *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 の粗菌体タンパク質を2通りの方法で抽出し、それぞれを免疫源とした。1つは De Boer and Wieczorek²⁾ が *Clavibacter michiganensis* subsp. *se-*

pedonicus の粗細胞壁成分を抽出した方法に従った。すなわち、523 培地⁴⁾ のスクロースをグルコースに替え、坂口フラスコで60時間、27°Cで振とう培養し、これを遠心集菌した後、生理食塩水で洗浄した。この湿菌体1gを20mlの0.2M LiClに懸濁して、4°C下で一晩静置した。つぎに45°Cで3.5時間、120 rpmで振とうした後、12,000×*g*、30分間遠心した上清を100,000×*g*、2時間遠心し、その沈殿物を少量の滅菌水に懸濁し、-20°Cで保存した (protein complex 1; P-1)。もう1つの方法は Yakrus and Schaad¹²⁾ が *Erwinia chrysanthemi* の粗外膜タンパク質を抽出した方法を適用した。すなわち、P-1抽出時と同様の方法で培養、集菌、洗浄した湿菌体1gに同重量のガラスビーズ (Yeast cell 破砕用直径710~1180 μm) を加え、20mlの0.2M LiClに懸濁した。これを45°Cで4.5時間、120

Table 2. Reactivity of monoclonal antibodies (culture supernatants) with whole cells of Gram positive bacteria in indirect ELISA (ABC-AP-ELISA)

Antigen	MAbs from P-1-hybridoma lines							MAbs from P-2-hybridoma lines			
	1P1	2P1	3P1	4P1	5P1	6P1	7P1	1P2	2P2	3P2	4P2
Cff NCPPB 178	++	++	++	++	++	+	+	+	++	++	++
Cff NCPPB 390	+	+	++	++	++	+	+	++	++	++	++
Cff NCPPB 567	+	++	++	++	++	+	+	+	-	+	-
Cff NCPPB 1751	+	+	++	+++	++	+	+	++	+++	+++	+++
Cff NCPPB 558	++	++	+	+	++	+	+	+	+++	+++	+++
Cff NCPPB 2344	++	++	++	++	+++	+	+	++	+++	++	++
Cff ATCC 33802	++	+	+	++	++	+	+	++	+++	++	++
Cfo MAFF 302170 ^T	++	++	+	++	++	+	+	++	++	++	++
Cfo MAFF 301198	++	++	++	+	++	+	+	+++	++	++	++
Cfo YPPS Y-3	++	++	++	++	++	+	++	+	-	-	-
Cfo YPPS T-4	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
Cfp MAFF 302181 ^T	++	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+
Cfb MAFF 302607	++	+	++	++	+++	+	+	+	+++	+++	++
Ca MAFF 302648 ^T	++	+	+	++	+	+	+	+	+++	+++	+++
Cc MAFF 302649 ^T	++	++	+	++	+++	+	+	++	-	-	-
Cl MAFF 302650 ^T	++	++	+	++	+++	+	++	++	-	-	-
Cp MAFF 302651 ^T	++	++	++	+++	+++	++	++	+++	+	+++	+++
Clm MAFF 302187 ^T	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Clm YPPS K1-1	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Clm YPPS R-1	++	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Cli MAFF 302195 ^T	+	+	+	+	++	-	-	+	-	-	-
Cln MAFF 302186 ^T	+	+	-	+	++	-	-	+	-	-	-
Cls MAFF 302162 ^T	+	-	+	+	++	-	-	+	++	++	+
Clr MAFF 302179 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Clt MAFF 302182 ^T	+	+	++	+	++	+	+	-	-	-	-
Ai MAFF 302180 ^T	+	+	+	++	++	+	+	+	-	-	-
Rf NCPPB 156	+	+	++	++	+++	+	+	+++	++	+	+
Rf NCPPB 1488 ^T	+	+	++	++	++	+	+	+++	-	-	-
isotype	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM	IgG3	IgG3	IgG3

Symbols: +++ ; $A_{410} \geq \text{blank} \times 9$, ++ ; $A_{410} = \text{blank} \times 6$ to 9, + ; $A_{410} = \text{blank} \times 3$ to 6, - ; $A_{410} < \text{blank} \times 3$, blank ; $A_{410} = 0.08$ to 0.14, Cff ; *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, Cfo ; *C. flaccumfaciens* pv. *oortii*, Cfp ; *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae*, Cfb ; *C. flaccumfaciens* pv. *betae*, Ca ; *C. albidum*, Cc ; *C. citreum*, Cl ; *C. luteum*, Cp ; *C. pusillum*, Clm ; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Cli ; *Cl. michiganensis* subsp. *insidiosus*, Cln ; *Cl. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, Cls ; *Cl. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Clr ; *Cl. rathayi*, Clt ; *Cl. tritici*, Ai ; *Arthrobacter ilicis*, Rf ; *Rhodococcus fascians*.

Note : The concentration of bacterium for antigen is prepared to 1×10^8 cfu/ml.

Table 3. Reactivity of the purified MAb 3P2 with whole cells of *Curtobacterium flaccumfaciens* and other genera in indirect ELISA (ABC-AP-ELISA)

+ ^{a)}	7 strains of <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> , <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i> MAFF 302170 [†] , MAFF 301198, YPPS T-4 <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i> , <i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i> , <i>C. pusillum</i>
—	<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i> YPPS Y-3, <i>C. albidum</i> , <i>C. citreum</i> , <i>C. luteum</i> , 8 strains of the genus <i>Clavibacter</i> , <i>Arthrobacter ilicis</i> , 2 strains of <i>Rhodococcus fascians</i> , 25 strains of Gram negative bacteria

Note: The concentration of purified MAb 3P2 is prepared to 5 µg/ml. The concentration of bacterium for antigen is prepared to 1×10⁸ cfu/ml.

a) Refer to Table 2.

rpmで振とうした後、5000×g、20分間遠心し、さらにその上清を30,000×g、40分間遠心した。その上清を100,000×gで2時間遠心し、その沈殿物を少量の滅菌水に懸濁し、-20°Cに保存した (protein complex 2; P-2)。

抗原の調製および免疫 P-1とP-2をそれぞれ抗原とし、生後5週目の雄のBALB/cマウスに10日間隔で、合計4回免疫した。免疫源の濃度は10倍に希釈したときにO.D.₂₈₀値がおおよそ0.5になるように調製した。初回免疫は免疫源 (P-1またはP-2) と Freund's complete adjuvant の等量を混合したエマルジョンを、2回目と3回目は免疫源と Freund's incomplete adjuvant の等量を混合したエマルジョンを、それぞれ0.2 ml ずつ腹腔内に注射した。最終免疫は免疫源のみを0.5 ml 腹腔内に注射した。細胞融合はその3日後に行った。

細胞融合と MAb 産生細胞のスクリーニング 免疫したマウスの脾細胞とミエローマ細胞 (API) との融合・増殖は野津⁹⁾の方法に従った。MAb 産生細胞のスクリーニングは、MAb 産生細胞の培養上清と ELISA プレートに吸着させた各種グラム陽性細菌との間で ABC-AP (Vectastain 社製) を用いた Indirect-ELISA (ABC-AP-ELISA)¹¹⁾ により行った。抗原は、0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で約 1×10⁸ cfu/ml に調製した細菌懸濁液の 50 µl を ELISA プレートに吸着させた。また、MAb のイソタイプは Monoclonal Antibody Typing Kit (The Binding Site 社製) を用いて検定した。

これらの MAb 産生細胞は増殖後 3×10⁶ cells を 1 ml の細胞凍結保存液 (セルバンカー, ダイアトロン社製) に懸濁し、-80°Cで凍結保存した。

MAb の特異性 上記のスクリーニングの結果から *C. flaccumfaciens* の検出に利用できる可能性のある MAb 産生細胞について、3×10⁶ cells を予めプリスタン (Aldrich 社製) 0.5 ml を腹腔内に注射しておいた BALB/c マウスの腹腔に注射した。10~14 日後、腹水から MAb を硫酸塩析法あるいはアフィニティカラム (Bio-Rad 社製) で精製した。抗体濃度を 5 µg/ml に調製し、その条件下で ABC-AP-ELISA による *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 の生菌体の検出限界を調べた。そして、Table 1 に示す計 53 菌株の生菌体との反応を ABC-AP-ELISA で調査した。

Fig. 1 Western immunoblot analysis of epitope(s) in P-1 and P-2 derived from *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 against MAb 1P1 and MAb 3P2.

a: antibody; MAb 1P1, b: antibody; MAb 3P2, lane 1; P-1, lane 2; P-2.

抗原物質の解析 上記の方法で精製した P-1 由来および P-2 由来のそれぞれ 1 種の MAb を抗原検出用抗体として供試し、抗原物質を 2 通りの方法で解析した。はじめに P-1 および P-2 を O.D.₂₈₀ の値がおおよそ 1.0 になるように調製し、その 25 µl と 0.12% Glucoamylase を含む 40 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) の 25 µl とを混合し、37°C に 4 時間保った。その後、それらの試料各 5 µl をそれぞれ 50 µl の 2% Proteinase K を含む 200 ml トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、2% Tripsin を含む 200 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) および 0.06% Glucoamylase を含む 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.5) に加え、37°C に 4 時間保った。

Proteinase K あるいは Tripsin で処理した試料はそれぞれ 100°C で 15 分間加熱して酵素反応を停止した。そして、100 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加えてそれぞれの試料の 10 倍希釈液と 100 倍希釈液を作成した。各々の処理を施した試料について、その 1 µl をニトロセルロースメンブレンにドットし、MAb と反応させ、ABC-AP キットを用いた DIBA 法³⁾ (MAb の濃度は 5 µg/ml) によりその

反応を調査した。つぎに、P-1 および P-2 の濃度を 10 倍に希釈したとき O.D.₂₈₀ の値がおおよそ 1.0 になるように調製し、その 10 μ l を SDS-PAGE (12.5% ポリアクリルアミドゲル)⁵⁾ により分離した。そして、Towbin ら¹⁰⁾ のウェスタンブロット法によってメンブレン (クリアブロット P 膜, アトー社製) に転写した後、濃度を 40 μ g/ml に調製した MAb を用いて、その抗原物質を検出し、そのおよその分子量を調べた。

結 果

MAb 産生細胞のスクリーニング

C. flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 に対する MAb 産生細胞は、免疫源が P-1 のものから 7 株 (1P1, 2P1, 3P1, 4P1, 5P1, 6P1 および 7P1), P-2 のものから 4 株 (1P2, 2P2, 3P2 および 4P2) 得られた。これらの MAb のイソタイプは 2P2, 3P2 および 4P2 が IgG3 で、その他のものは IgM であった。また、ELISA によるこれらの MAb の各種グラム陽性細菌に対する反応は Table 2 に示すとおりである。2P2, 3P2, 4P2 は *C. flaccumfaciens* のほとんどの供試菌株と反応した。他種の供試細菌との間では、*C. albidum*, *C. pusillum*, *Cl. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *R. fascians* NCPPB 156 と反応した。その他の 8 種の MAb は *Curtobacterium* 属のすべての供試細菌と反応し、さらに *Clavibacter*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus* に属する多くの供試菌株とも反応した (Table 2)。

MAb 3P2 の各種組菌との反応

精製した 3P2 による *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 の生菌体の検出限界は 1×10^8 cfu/ml であった。そして、この MAb は *C. flaccumfaciens* 12 菌株と *C. pusillum* に反応し、*C. flaccumfaciens* pv. *oortii* YPPS Y-3 およびその他の供試細菌とは反応しなかった (Table 3)。

抗原物質の解析

Glucoamylase で処理した P-1 および P-2 は、原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液とも、1P1 および 3P2 に対して明瞭に反応した。Proteinase K で処理した P-1 および P-2 は、原液、10 倍希釈液、100 倍希釈液のいずれも 1P1 および 3P2 と反応したが、glucoamylase で処理した試料と比較してその反応は弱かった。また、trypsin で処理した試料の場合、原液は 1P1 および 3P2 に対してわずかに反応したが、10 倍希釈液および 100 倍希釈液では全く反応しなかった。

ウェスタンイムノブロット法

1P1 および 3P2 はそれぞれ 2 本のバンドを検出し、そのうち 1 本は両者とも分子量約 59 K であった。他の 1 本については、1P1 は分子量約 25 K であり、3P2 は分子量 14.4 K 以下であった。また、これらのバンドは P-1, P-2 のいずれを抗原とした場合にも検出された (Fig. 1)。

考 察

De Boer and Wieczorek²⁾ は、*Cl. michiganensis* subsp. *sepedonicus* の特異的検出を目的として同菌から抽出した粗細胞壁成分をマウス免疫抗原として同亜種に特異的に反応する MAb を得ている。著者らは *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 から抽出した粗菌体タンパク質をマウスに免疫して 11 種類の MAb を得たが、*C. flaccumfaciens* の供試 13 菌株のすべてと反応し、他の供試細菌とは反応しない MAb を得ることはできなかった。しかし、この中で 2P2, 3P2 および 4P2 は、他の MAb と比べて、種レベルで *C. flaccumfaciens* に対する特異性が高く、特に 3P2 は、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* 7 菌株のすべてと反応し、さらに、*C. flaccumfaciens* pv. *oortii* YPPS Y-3 を除くその他の *C. flaccumfaciens* に属する供試菌株の生菌体とも反応した。この結果は、3P2 が *C. flaccumfaciens* の特異的検出に利用できる可能性を示している。そこで、この MAb を精製し、5 μ g/ml の濃度に調製し、再度グラム陽性細菌 28 菌株に対する反応を調べたところ、抗体産生細胞 3P2 の培養上清を用いた場合に反応した *C. albidum*, *Cl. michiganensis* subsp. *sepedonicus* および *R. fascians* NCPPB 156 は反応しなくなり、さらに特異性が高まった。その他の 8 種類の MAb は、供試グラム陽性細菌のうち *Cl. rathayi* を除く多くの生菌体と反応した。したがって、*C. flaccumfaciens* の生菌体のみに反応する特異的な抗原決定基は、P-1, P-2 の抗原成分には検出できなかった。

1P1 および 3P2 に対する P-1 および P-2 の抗原性は、glucoamylase で処理しても全く失われなかったが、proteinase K で処理すると glucoamylase 処理の場合に比較して著しく減少し、また、trypsin 処理するとほとんど失活した。このことから、これら 2 種の MAb が認識する抗原物質はタンパク質と推察される。

P-1 および P-2 の構成成分を SDS-PAGE により分離し、ウェスタンイムノブロット法で調べた結果、1P1 と 3P2 が認識する抗原物質はそれぞれ 2 本の明瞭なバンドとして検出された。このうち分子量約 59 K のバンドは両 MAb により共通して検出された。この結果から、SDS-PAGE で分離された P-1 および P-2 の分子量約 59 K の位置には、分子量が類似する複数の抗原物質か、または複数の抗原決定基を持つ抗原物質が存在することを示している。

以上のことから、*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 に由来する P-1 および P-2 の分子量 14.4 K 以下にバンドを形成したタンパク質に含まれる抗原決定基を認識する 3P2 は *C. flaccumfaciens* の検出に利用できる MAb と考えた。さらに、3P2 の認識する抗原決定基とは異なり、分子量約 25 K にバンドを形成するタンパク質に含まれる抗原決定基を認識する 1P1 は反応特性が広域であ

るため、*C. flaccumfaciens* の特異的検出には利用できないが、他の MAb と同様に *C. flaccumfaciens* に近縁な各種グラム陽性細菌の抗原の解析に利用できる可能性があると考えた。

摘 要

Curtobacterium flaccumfaciens に特異的に反応するモノクローナル抗体 (MAb) の作製を試みた。抗原として *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* NCPPB 390 から De Boer and Wieczorek の方法 (P-1) と Yakrus and Schaad の方法 (P-2) で抽出した粗菌体タンパク質を用い、常法によって 11 種 (P-1 由来 7 種, P-2 由来 4 種) の MAb を得た。これらのうち P-2 由来の 3 種の MAb はイソタイプが IgG3 で他の 8 種の MAb より高い種特異性が認められ、中でも 3P2 は *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* の 1 菌株を除き、*C. flaccumfaciens* 12 菌株の生菌体と反応した。その他の 8 種の MAb はイソタイプが IgM で *Curtobacterium* 属ほか 3 属に属する多数の供試グラム陽性細菌と反応した。P-1 由来の MAb 1P1 および P-2 由来の MAb 3P2 に対する P-1 および P-2 の抗原性は glucoamylase 処理では失活しなかったが、さらに proteinase K あるいは tripsin 処理することで失活または低下した。よって、これら 2 種の MAb が認識する抗原物質はタンパク質であると推定した。また、ウェスタンブロット法による検定から、これら 2 種の MAb が認識している抗原は 2 本のバンドとして検出され、そのうち分子量が約 59K のバンドは両 MAb に共通していた。

以上の結果から、3P2 は *C. flaccumfaciens* の特異的検出に利用できると考えた。さらにこれら 11 種の MAb はいずれも *C. flaccumfaciens* に近縁な各種グラム陽性細菌の抗原解析へ利用できると判断した。

引用文献

1. Commonwealth Mycological Institute (CMI) (1987). *Curtobacterium flaccumfaciens* Distribution Maps of Plant Disease. No. 370, 4th ed.
2. De Boer, S.H. and Wieczorek, A. (1984). Production of monoclonal antibodies to *Corynebacterium sepedonicum*. *Phytopathology* 74 : 1431-1434.
3. 日比忠明 (1984). DIBA 法による植物ウイルスの検出法. *植物防疫* 38 : 380-384.
4. Kado, C.I. and Hesskett, M.G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60 : 969-976.
5. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
6. 水野明文・川合 昭 (1993). 植物検疫重要細菌病の診断技法に関する研究, 第 VI 報 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* の検出. *植防研報* 29 : 27-36.
7. 水野明文・門田育生・西山幸司 (1994). *Curtobacterium flaccumfaciens* の菌体タンパク質の抗原性について. *日植病報* 60 : 365.
8. 西山幸司 (1978). 植物病原細菌簡易同定の試案. *植物防疫* 32 : 283-288.
9. Nozu, Y. (1987). Monoclonal antibodies against plant virus : Procedure and applications. *JARQ* 21 : 96-101.
10. Towbin, H. Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet : Procedure and some applications. *Biochemistry* 79 : 4350-4354.
11. Tsuchiya, K., Takahashi, Y., Shohara, K., Homma, Y. and Suzui, T. (1991). Rapid and simple ELISA procedure for the specific detection of *Pseudomonas cepacia* in soil. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 57 : 196-202.
12. Yakrus, M. and Schaad, N.W. (1979). Serological relationships among strains of *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology* 69 : 517-522.
13. 脇本 哲 (1955). OP₁ phage (*Xanthomonas oryzae* bacteriophage) の増殖に関する研究 I. 種々の条件下の一段増殖実験. *九大農芸誌* 15 : 151-160.