〔原 著〕

黄色ブドウ球菌変異株 UV 2 の産生する プロテイン A の分析

栗岡 晋*・名竹洋子*・石岡憲昭*・櫻田純次**・益田昭吾**

SUMMARY

Protein A extracellularly produced by UV 2 (a mutant of *Staphylococcal aureus* Cowan I) in some cultivation conditions was analyzed with two dimensional electrophoresis and immunoblotting. Three major proteins (MW 47 K_d , pI 5.2; MW 50 K_d , pI 5.1; MW 51 K_d , pI 5.0) were indicated on the electropherogram of the fluid of conventional cultivation at 37°C, and these proteins were identified with protein A. The same protein A was observed in the cultivation fluid using cellophane bag at 25°C, but the fluid was characterized by the presence of low molecular weight protein A in the range of MW 18 K_d -49 K_d and pI 4.2-5.8 and many non-protein A protein. On the other hand, in the fluid of the cellophane bag cultivation at 37°C, there only observed a lot of low molecular weight protein A ranging between MW 35 K_d -13 K_d and pI 4.5-6.5 and considerable amount of non-protein A proteins that were never found in the conventional cultivation fluid.

Key words: protein A, two-dimensional electrophoresis.

はじめに

黄色ブドウ球菌の細胞壁タンパク質の一つであるプロテイン A は、免疫グロブリン IgG の Fc 部分と特異的に結合する性質をもつことでよく知られている。この性質を利用して、セファロース等の適当な担体に結合させたプロテイン A は、IgG の精製、抗体産生細胞の定量、抗体を結合した細胞の分離等に広く用いられている。本来、プロテイン A は、細胞壁成分と結合しているため、熱処理、酵素消化等¹⁾によって分離されていたが、細胞壁に結合しないで培養液中にプロテイン A を分泌する変異株¹⁾の利用や、遺伝子工学的手法でプロテイン A を生産できるようになった^{2,3)}。

プロテイン A について、Sjöquist および Sjödahls の研

究が広く知られており⁴⁻⁷⁾、また数種の細胞外分泌型のプロテイン A の分子量について、Movitz ら¹⁾がゲル濾過法、および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE: Weber & Osborn 法⁸⁾) によって研究している。UV 2 は、黄色ブドウ球菌 Cowan I 由来の変異株の一つであり、プロテイン A を細胞外に分泌することが知られている。今回、この UV 2 を異なった三つの条件下で培養し、そのとき培養液中に分泌されるタンパク質について二次元電気泳動法で分離分析し、さらにウェスタンブロットング-免疫染色法によりプロテイン A を同定した結果について報告する。

Analysis of staphylococcal protein A extracellularly produced by a mutant UV 2.

* Susumu Kurioka, Yoko Natake, Noriaki Ishioka; 東京慈恵会医科大学医科学研究所生化学研究部

** Junji Sakurada, Shogo Masuda; 東京慈恵会医科大学第二細菌学

Correspondence address: Susumu Kurioka, Division of Biochemistry, Institute of Medical Science, Jikei University School of Medicine; 3-25-8, Nishishinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan.

(受付 1992年1月20日, 受理 1992年4月16日)

実験材料と方法

1. UV2 株培養と培養上清液の調製

培養上清液は次の2通りの方法で調製した。

1) 通常培養上清液

1,000 ml のブレインハートインフュージョン培地に UV2 を接種後, 37°C, 48 時間培養した。培養終了後, 1,000×g, 30 分遠心し, 除菌上清を培養上清液とした。

2) セロファン表面培養上清液⁹⁾

500 ml のブレインハートインフュージョン培地をセロファンチューブ (三光製薬, C-75) に入れて両端を閉じた後, 3,000 ml の三角フラスコにいれフラスコ口をアルミホイルで蓋をして高圧滅菌を行った。この過程中にチューブの外側にチューブ内容のおよそ 1/10 の液量が浸出してくる。この状態で UV2 をセロファン表面に接種後, 37°C, または 25°C, 48 時間培養を行い, 培養終了後, 1,000×g, 30 分遠心した除菌上清を培養上清液とした。

2. 二次元電気泳動法¹⁰⁻¹⁴⁾

〈試薬〉アクリルアミド (A. A.), ビスアクリルアミド (BisA. A.), ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), N, N, N', N' テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) は生化学工業の電気泳動用試薬を用いた。過硫酸アンモニウム (APS), グリシン, グリセリン, 2-メルカプトエタノール, クマシーブリアントブルー R 250 (CBB) は半井化学の特級試薬を用いた。

〈装置〉アトー(株)のラピダス・グラディゲル作製装置 (SJ-1060 GF), ラピダス・八連ミニスラブゲル作製装置 (AE-6480), ラピダス・二連ミニスラブゲル電気泳動装置 (AE-6450), ラピダス・レクタングル電気泳動装置 (AE-6050) を使用した。

〈泳動〉

一次元目は変性剤のない条件で等電点電気泳動を行い, ゲルは, 0.23% TEMED 液; 0.5 ml, 16% AA-0.8% BisAA; 1.0 ml, 蒸留水; 2.05 ml, アンホライン (pI 3.5~10); 0.2 ml, (pI 4~6) 0.05 ml, 1% APS; 0.2 ml の各液を混合して, レクタングルを作製し, 400 V, 2 時間泳動した。二次元目は 4~17% グラディエントゲルを用い, 定電流 15 mA で泳動した。泳動後, ゲルは CBB 染色し, 7% 酢酸液中で保存した。

3. ウェスタンブロットと免疫化学染色法^{15,16)}

〈試薬〉ウシ血清アルブミン (BSA)・フラクシオン V (Armour), ツイーン 20 (関東化学), 二次抗体: ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウサギ IgG (Bio-yeda), 3-3' ジ

アミノベンチジン (DAB) (半井化学), 0.2 μm ニトロセルロース (NC) 膜 (アドバンテック) をそれぞれ使用した。一次抗体: プロテイン A を分泌する黄色ブドウ球菌 Cowan I 由来の変異株 UV2 の通常培養上清液から得た精製プロテイン A を抗原として, 既報の方法¹⁷⁾ により作製したウサギ抗血清を用いた。なお, 同じく Cowan I 由来であるがプロテイン A を産生分泌しない HL 変異株の培養上清液中には, この抗血清により免疫染色されるタンパク質が認められない。

〈ブロッキング〉スラブゲルのタンパク質を, セミドライプロッターと 25 mM トリス-92 mM グリシン-20% メタノール-0.1% SDS (pH 8.7) を用い, 100 mA, 70 分で NC 膜に転写した。転写した NC 膜を以下の手順に従い室温で処理した。

〈ブロッキング〉3% BSA (ウシ血清アルブミン)-PBS (0.81% 塩化ナトリウム-10 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) 緩衝液) の中に, 30 分間膜を浸した。

〈一次抗体処理〉3% BSA-TPBS (PBS に 0.05% ツイーン 20 を加えた溶液) で 5,000 倍希釈したプロテイン A ウサギ抗血清と 30 分間反応させた。

〈洗浄〉TPBS で 10 分, 3 回さらに PBS で 5 分間洗浄後, 再び 3% BSA-PBS で NC 膜を処理した。

〈二次抗体処理〉3% BSA-TPBS で 1,500 倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ウサギ IgG と 30 分間反応させた。

〈洗浄〉一次抗体反応後の洗浄と同様に行った。

〈検出〉DAB 溶液 (0.01% DAB-0.01% 過酸化水素-50 mM トリス-塩酸 (pH 7.6) 緩衝液で発色させた。

結 果

それぞれの培養上清中のタンパク質を二次元電気泳動法を用い, CBB によるタンパク質染色およびプロテイン A の免疫化学染色によって分析した結果を以下に述べる。

〈通常培養上清液の分析〉通常培養液の CBB 染色パターンを Fig. 1 に示した。CBB 染色によるタンパク質スポットは少なくとも 15 個以上存在したが, そのうち主要なスポット群は Fig. 1 に示したように, 1 (MW 50 K_a, pI 5.0), 2 (MW 49 K_a, pI 5.1), 3 (MW 47 K_a, pI 5.2) と, これらより幾分弱く染色される 4, 5, 6, 7 のスポットから構成されていた。一方, プロテイン A の免疫染色の結果, 強く染色される 7 個のスポット (Fig. 2, 1~7) 群が検出された。これらは 7 を除いて CBB によって染色される主なる 6 個のタンパク質スポ

Fig. 1. Two-dimensional electrophoretic pattern of proteins from the culture medium of UV 2. The bacteria were cultivated in brain-heart infusion at 37°C. The isoelectric focusing gel was loaded with 1 μ g of proteins. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250, and the numbers (1-7) showed main protein spots stained.

Fig. 3. Two-dimensional electrophoretic pattern of proteins from the culture medium of UV 2. The bacteria were cultivated on surface of cellophane bag containing brain-heart infusion at 25°C. The isoelectric focusing gel was loaded with 5 μ g of proteins. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The numbers (1-7) and alphabets (a-g) showed main protein spots.

Fig. 2. Two-dimensional electrophoretic pattern of protein A from culture medium of UV 2. The bacteria were cultivated in brain-heart infusion at 37°C. The isoelectric focusing gel was loaded with 1 μ g of proteins. Protein A was identified by immunochemical staining, and the numbers (1-7) showed main protein A spots stained.

Fig. 4. Two-dimensional electrophoretic pattern of protein A from culture medium of UV 2. The bacteria were cultivated on surface of cellophane bag containing brain-heart infusion at 25°C. The isoelectric focusing gel was loaded with 5 μ g of proteins. Protein A was identified with immunochemical staining. The numbers (1-7), alphabets (a-g), and boxed area (Y) showed main and characteristic protein A spots.

ット群と MW, pI が、それぞれ一致していることから、この培養液中に分泌されるタンパク質の主要成分がプロテイン A であることがわかった。さらに CBB 染色パターンの微量成分として MW 35~45 Kd, pI 4.8~5.6 の

範囲に見いだされる 7 を含む 6 個のスポットのうち少なくとも 4 個がプロテイン A 抗体により免疫化学的に染色

された (Fig. 2).

〈25°C セロファン表面培養上清液の分析〉25°C セロファン表面培養上清液中のタンパク質は、 pI 4.2~5.8, MW 66~10 K_d の範囲にプロテイン A のスポット群 (1~7) を含む 160 個以上のタンパク質スポットとして検出された (Fig. 3). Fig. 1 との比較から明らかに、通常培養液中には存在しない MW 50 K_d 以上の高分子量タンパク質や、36 K_d 以下の低分子量タンパク質が多く新たに出現していた。免疫染色の結果、強く染色されるスポットとして 1~7, a~f (Fig. 4) が見いだされた。とくに 1~7 のスポット群は、通常培養液中に存在するプロテイン A と同一であった。a~f のスポット群や pI がほとんど同じで約 1 K_d ほどの MW 差で連なる特徴的な f から g に至るスポット群、さらに点線で囲まれた y 域が、25°C セロファン培養液中に新たに見いだされた。これら以外にも免疫化学的に染色される微量タンパク質としておよそ 15 個程数えられた。

特徴的な f から g に至るスポットと点線で囲った y 域は、Fig. 3 の CBB 染色スポットと対応させることが 2, 3 個を除いて困難であった。

〈37°C セロファン表面培養上清液の分析〉Fig. 5 は、37°C セロファン表面培養液の CBB 染色パターンである。このパターンは通常培養上清液および 25°C セロファン表面培養上清液のパターンとは著しく異なってお

Fig. 5. Two-dimensional electrophoretic pattern of proteins from the culture medium of UV 2.

The bacteria were cultivated on surface of cellophane bag containing brain-heart infusion at 37°C. The isoelectric focusing gel was loaded with 9 μg of proteins. Proteins were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. The boxed areas (Y, Z) and alphabets (f, g) showed characteristic protein spots.

Fig. 6. Two-dimensional electrophoretic pattern of protein A from culture medium of UV 2.

The isoelectric focusing gel was loaded with 9 μg of proteins. Protein A was identified with immunochromatological staining. The bacteria were cultivated on surface of cellophane bag containing brain-heart infusion at 37°C. Alphabet (f, g), and boxed area (X, Y, Z) showed characteristic protein A spots.

り、とくに pI 4.0~6.0, MW 66~14 K_d の範囲に多数のスポットと帯状に染まるタンパク質が多量に産生分泌されていた。免疫染色の結果、Fig. 6 に示したように、37°C セロファン表面培養上清液には、Fig. 2, Fig. 4 に存在するプロテイン A 主要成分 1~7 のスポットがなく、それよりも低分子量域 MW 20~36 K_d , pI 4.6~6.0 の範囲に集中して存在していたが、また CBB で検出されるタンパク質の大部分が、免疫化学染色陰性の非プロテイン A タンパク質であった。免疫染色によって検出される特徴的なスポットは、Fig. 6 上で点線で囲った MW 35~37 K_d , pI 4.7~5.6 の w 域および MW 23~29 K_d , pI 5.2~5.5 の z 域にあるタンパク質群であり、これらは CBB 染色によっても同定できるタンパク質スポットであった。一方、これらは Fig. 2, 4 ではほとんど存在していなかった。y 域と f から g に至るスポット群は、CBB 染色パターン上での同定は、Fig. 3 と同様明確にはできなかったが、25°C セロファン表面培養上清液の免疫染色パターン (Fig. 4) の中に見いだせるものと明らかに同じであった。

考 察

黄色ブドウ球菌 Cowan I 由来の変異株 UV 2 の通常培養上清液中には、 MW , pI にわずかな差を示す三つ

の蛋白質Aが主要成分として存在していた。しかし、25℃のセロファン表面培養液中には、これらの蛋白質Aとともに低分子化された蛋白質Aが存在していた。さらに37℃培養では、より低分子化された蛋白質Aだけが検出できた。一方で、セロファン表面培養液中には、通常培養の上清中にはほとんど存在しない非蛋白質Aタンパク質が増加し、とくに37℃培養液中では著しく増加していた。以上のことから、UV2のセロファン表面培養液中の蛋白質Aを含めた産生タンパク質のMWとpIで示される物理化学的性状は、通常培養法によって得られるタンパク質のそれらとは大きな違いを見せ、セロファン表面培養液中の蛋白質Aの性状は培養温度に大きく影響されることが観察された。

セロファン表面培養法は、細菌産生タンパク質および菌体を濃縮調製できる方法であるが、今回の分析結果から、黄色ブドウ球菌 Cowan I 由来の変異株 UV 2 が産生分泌する MW 50 K_d 前後の蛋白質Aを調製することを目的とする場合、セロファン表面培養法は適していないことがわかった。

セロファン表面培養法による非蛋白質Aタンパク質の分泌増加、相対的な蛋白質A分泌量の低下、および蛋白質A分子の低分子化が、黄色ブドウ球菌にとってどのような生理的意義があるのか興味があり、その解析は今後の問題である。

文 献

- 1) Movitz, J. et al.: Microbiol. Immunol., 23: 51, 1979.
- 2) Shuttleworth, H.L. et al.: Gene, 58: 283, 1987.
- 3) Fahnestock, S.R., and Fisher, K.E.: J. Bacteriol., 165: 796, 1986.
- 4) Bjork, I. et al.: Eur. J. Biochem., 29: 579, 1972.
- 5) Hjelm, H. et al.: Eur. J. Biochem., 57: 395, 1975.
- 6) Sjö Dahl, J.: Eur. J. Biochem., 73: 343, 1977.
- 7) Sjö Dahl, J.: Eur. J. Biochem., 78: 471, 1977.
- 8) Weber, K. and Osborn, M.: J. Biol. Chem., 244, 4406, 1969.
- 9) 生貝 初, 他: 臨床検査, 32: 698, 1988.
- 10) Laemmli, U.K.: Nature, 227: 680, 1970.
- 11) O'Farrell, P.H.: J. Biol. Chem., 250: 4007, 1975.
- 12) Manabe, T. et al.: Clin. Chem., 28: 824, 1982.
- 13) Ishioka, N. et al.: Neurochem. Res., 15: 475, 1990.
- 14) Natake, Y. et al.: Jikeikai Med. J., 35: 297, 1988.
- 15) 大室弘美, 飯田和子: 細胞, 15: 28, 1983.
- 16) Burnette, W.N.: Anal. Biochem., 112: 195, 1981.
- 17) Sakurada, J. and Sumi, Y.: Microbiol. Immunol., 36: 35, 1992.

要 旨

異なった方法で培養した黄色ブドウ球菌 Cowan I 由来の変異株 UV 2 の培養上清液中のタンパク質および蛋白質Aを二次元電気泳動法で分離分析した。通常培養法で得られた培養上清液中には、おもなタンパク質スポットとして MW 50 K_d, pI 5.0; MW 49 K_d, pI 5.1; MW 47 K_d, pI 5.2 が検出され、それらは蛋白質Aの主要成分として同定された。一方、25℃セロファン表面培養上清液中には、これら主要成分の蛋白質A分子とともに MW 18~49 K_d, pI 4.2~5.8 の範囲に低分子化した 25 個以上の蛋白質Aが存在した。また、37℃セロファン表面培養上清液中には、主要成分の蛋白質A分子は検出できないばかりか、低分子化がさらに進行し、MW 20~36 K_d, pI 4.5~6.5 の範囲に約 20 個の蛋白質Aが見いだされた。セロファン表面培養上清液中には、通常培養上清液中にはほとんど見られない非蛋白質Aタンパク質が多量に存在していた。