

## 17. 拮抗細菌 (*Pseudomonas cepacia*) に対するモノクローナル抗体の作製と利用

農業環境技術研究所 環境生物部 微生物管理科

### 要 約

ダイコン苗立枯病菌ほか各種の植物病原糸状菌・細菌に対して拮抗作用を示す *Pseudomonas cepacia* に対する反応特異性の異なる高力価モノクローナル抗体が作製され、同抗体を利用して異種および同種細菌混在土壤から標的とする *P. cepacia* 菌株を高感度に検出する手法が開発された。

### 背景・目的

蛍光性 *Pseudomonas* 等の拮抗微生物を利用した土壤病害の生物防除法の開発は国内外で進められている。これら拮抗性 *Pseudomonas* の土壤中における動態を明らかにすることは拮抗微生物の能力を発揮させるうえに、また、その安全性を確認するうえからも重要である。そのためには標的とする拮抗細菌（拮抗性 *Pseudomonas*）を特異的かつ高精度に検出する手法の開発が必要である。

### 内容及び特徴

- (1) *P. cepacia* RB 425 株の生菌 (L) 由来 16 株、固定株 (F) 由来 8 株のハイブリドーマから、反応特異性の異なる計 6 株の高力価モノクローナル抗体が得られた。
- (2) これらの抗体に対する反応性から RB 425 株には少なくとも 6 個 (Ia, Ib, IIa, IIb, IIIa, IIIb) の抗原性決定基 (エピトープ) が存在することが明らかとなった。
- (3) 間接ELISA 法により、*P. cepacia* 5 菌株、*Pseudomonas* 属 6 菌種および他属 8 菌種に対する反応特異性を調べた結果、同一種内の菌株間、およびポリクローナル抗体では区別できない同属他種菌をも識別することが可能であった。
- (4) 他種の *Pseudomonas* 属菌が混在する自然土壤に接種された複数の *P. cepacia* 菌株を反応特異性の異なるモノクローナル抗体を用いて、それぞれ高感度に検出できた。

### 活用面と留意点

- (1) 作製された *P. cepacia* 由来のハイブリドーマおよびモノクローナル抗体の中には反応特異性の異なるものが多数選抜され、かつ保存されており、今後当該菌のみならず同属他種または異属他種の細菌の診断・検出への利用が可能である。
- (2) 異なる抗原性決定基を認識するモノクローナル抗体が得られ、抗原解析等の血清学的基礎研究への応用が計られるとともに、本菌の臨床系株との比較研究に利用できる。

### キーワード

拮抗細菌、*Pseudomonas cepacia*、モノクローナル抗体、検出手法

(土屋健一)

表1 モノクローナル抗体の反応特異性<sup>a)</sup>

抗原 <sup>b)</sup>	PCL			PCF		
	6C12 (Ia) <sup>c)</sup>	7G2 (Ib)	8F1 (IIa)	1A5 (IIb)	2G1 (IIIa)	5H1 (IIIb)
生菌 (L)	+++ <sup>d)</sup>	++	+	+++	+	+
固定菌 (F)	-	-	+	+++	++	++
熱処理菌 (HL)	+	+	+++	+++	+++	+++
熱処理固定菌 (HF)	-	-	+	+++	+	+

a) 間接ELISA法(ABC ELISA法)によって検定した。

b) *P. cepacia* RB 425株 (ca 10<sup>7</sup> cfu/ml)

c) モノクローナル抗体によって認識される抗原性決定基(エピトープ)

d) 基質添加30分後の波長410nmにおける吸光度: +++: 1.0~2.0, ++: 0.5~1.0,

+: 0.1~0.5, -: &lt;0.1

表2 モノクローナル抗体の同属異種および他属細菌に対する反応特異性<sup>a)</sup>

供試細菌 <sup>b)</sup> (生菌)	PCL			PCF		Anti-L	Anti-L
	6C12 (Ia) <sup>c)</sup>	7G2 (Ib)	8F1 (IIa)	1A5 (IIb)	2G1 (IIIa)	anti-serum	anti-serum
<i>Pseudomonas cepacia</i>							
RB 425	+++ <sup>d)</sup>	++	+	+++	+	+++	+++
ATCC 25416	++	+++	+	+++	+	+++	+++
343-2	++	+++	+	-	+	+++	+++
A I	++	+++	-	-	-	+++	+
356-4	+	++	-	-	+	+++	+++
<i>P. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i> (3)	-	+	-	-	-	+++	+
<i>P. caryophylli</i> (2)	+/-	++	-	-	-	+++	+
<i>P. glumae</i> (2)	-	+	-	-	-	+++	+
<i>P. avenae</i> (2)	+	+/-	-	-	-	+++	+
<i>P. solanaceanum</i> (2)	-	+/-	-	-	-	++	-
<i>P. syringae</i> pvs. (5)	-	-	-	-	-	+/-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pvs. (6)	-	+/-	-	-	-	+/-	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (1)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Erwinia</i> spp. (12)	-	-	-	-	-	+/-	-
<i>Clavibacter</i> spp. (4)	-	-	-	-	-	-	-
Other genera of soil origin (5)	-	-	-	-	-	-	-

a) c) 表1を参照。

b) ()内の数字は試験菌株数

d) 表1を参照, +/-: 分離株によって反応が異なる。

表3 モノクローナル抗体を用いた間接ELISA法による*P. cepacia*の土壤からの検出

試料 <sup>a)</sup>	RB 425 (H) 血清	7G2	1A5	2G1
Pc 356-2	1.51->2.0 <sup>b)</sup>	0.39-0.51	1.77->2.0	<0.1
Pc 356-5	0.68-1.28	0.18-0.27	0.09-0.16	1.43->2.0
Pc 356-2 +	0.88->2.0	0.28-0.44	>2.0	1.26->2.0
Pc 356-5 対照	0.16-0.19	0.19-0.31	<0.1	<0.1

a) *P. solanacearum* (ca 10<sup>6</sup> cfu/g土)汚染土壤に各 *P. cepacia* 菌株を 2~6×10<sup>3</sup> cfu/g土添加, 28°C 3日間静置し, PBS-Tに懸濁, 上清をコーティング後, 間接ELISA法により検定した。

b) 波長405nmの吸光度。6回復の最低値-最高値を示した。