

百日咳菌が産生する物質の探索と その応用利用

北里大学大学院 感染制御科学府

感染制御科学専攻

感染制御・免疫学履修コース 免疫機能制御科学

DI-15001 小田中啓太

指導教員 渡邊峰雄 准教授

目次

緒言	3
1. 百日咳菌が分泌する黄色色素の同定とその役割	5
1.1. 材料および方法	7
1.2. 結果	21
1.3. 考察	24
2. 百日咳の新規診断用抗原の探索	47
2.1. 材料および方法	49
2.2. 結果	55
2.3. 考察	56
結論	65
謝辞	67
引用文献	68

緒言

百日咳菌はグラム陰性の短桿菌であり、百日咳の起因菌として知られている。百日咳の主症状である痙攣性の咳症状は、治療を受けなかった場合、2～3ヶ月間という長期にわたり続くこともある。またその伝染力は強く、免疫のない家族内接触者、特にワクチン未接種の乳児では90%以上に伝染する [WHO, 2005.]. 生後6ヶ月以下の乳児が発症すると、肺炎や脳症の合併症などによって死に至ることもある [Greenberg DP, 2005.]. 百日咳菌は免疫細胞障害作用を示す百日咳毒素 (PT) や宿主への付着に關与する纖維状赤血球凝集素 (FHA) など様々な病原因子を産生することが知られているものの、咳発作の発症メカニズムについては未だ不明である。また、PT や FHA は百日咳ワクチンの主要構成成分であり、百日咳の診断用抗原としても使用されている。しかし、感染防御免疫における標的抗原については未だ同定されていないものもあり、未知な部分が存在する。百日咳菌が産生する既知物質に関しては多面的な解析が行われていることを考えると、百日咳菌が産生する未同定物質が、咳を含めた病原性発現や感染防御免疫に關与している可能性が高いと考えられた。そこで本研究では、百日咳菌が産生する未同定物質を探索し、その機能や応用利用の可能性を考察した。

百日咳菌が産生する低分子量物質についてはシデロフォアを除きほとんど研究がされておらず、新たな探索と得られる知見の積み重ねが重要であると考えられる。病原性を示す百日咳菌を培養すると、その培養上清は鮮やかな黄色を呈することが知られている。細菌が分泌する色素は病原性に關与することが知られている [Liu GY, 2009; Venil CK, 2013.]. 例えば緑膿菌が分泌する青緑色色素であるピオシアニンは、バイオフィルム形成促進作用などを有することが知られている [Kanthakumar K, 1993; Costa KC, 2017.]. また、黄色ブドウ球菌は、抗酸化作用を持つスタフィロキサンチンという黄色色素を分泌する [Liu GY, 2005; Pelz A, 2005.]. しかし、百日咳菌に關しては黄色色素を分

泌することは知られていたものの、この色素に関する詳細な研究は行われてこなかった。そこで、百日咳菌が分泌する色素の同定とその機能の解明を目指し、研究を開始した。

百日咳菌の高分子量産生物質の解析においては、直接的生理活性を有するタンパク質毒素などの研究が主として進められてきた。現在の血清学的診断法においては、ワクチン抗原である PT と FHA が診断用抗原として使用されているため、ワクチン接種後の免疫と感染による免疫の区別が付かないという問題がある。このことは、ワクチン接種者における百日咳の診断を困難にする要因となる。そこで、百日咳患者血清が認識する PT、FHA 以外の百日咳菌産生タンパク質を探索し、診断用抗原としての可能性を考察した。

1. 百日咳菌が分泌する黄色色素の同定とその役割

細菌が分泌する色素は、バイオフィルム形成促進作用や酸化ストレス抵抗性などを示すことが知られており [Hasset DJ, 1992; Kanthakumar K, 1993; Costa KC, 2017.], 細菌の病原性に関与することも多い [Liu GY, 2009; Venil CK, 2013.]. 一方、百日咳菌の培養上清は鮮やかな黄色を示すことから、百日咳菌は黄色の色素を菌体外へ分泌すると考えられてきた (Fig 1)。まず、研究で広く使用されている百日咳菌東浜株の培養上清から黄色色素を抽出し、その同定を試みた。その結果、百日咳菌東浜株培養上清中から黄色を示すリボフラビンとルミクロムが検出された。本研究では、培養上清中にドミナントに分泌されていたリボフラビンの役割を解明すべく研究を行った。近年、病原因子のジェノタイプやフェノタイプの変異した百日咳菌による百日咳の流行が報告されていることから [齋藤、2012; Moriuchi T, 2017.], 新鮮分離株においてもリボフラビンが分泌されているか確認した。*Bordetella* 属細菌は様々な病原因子を産生するが、その中には、菌種特異的に産生されるものも知られている。例えば、免疫細胞障害作用を持つ PT は、百日咳菌のみが産生能を有し、他の *Bordetella* 属細菌は産生しない [Gerlach G, 2001; Dorji D, 2017.]. そこで、リボフラビンの分泌が百日咳菌に特異な現象なのかを調べるために、百日咳菌を含めた *Bordetella* 属 4 菌種におけるリボフラビン分泌の有無を調べることにした。

次に、リボフラビンの作用を推察するためにも百日咳菌の各増殖段階におけるリボフラビン分泌状況を調べる必要があると考え、培養上清中のリボフラビン量を経時的に調べた。また、植物共生細菌の一種であるアルファルファ根粒菌において、菌体外に分泌されたリボフラビンが菌の増殖および宿主への定着を促進するという報告がある [Yang G, 2002.] ことから、百日咳菌においても培養上清中に分泌されたリボフラビンが、菌の増殖や宿主への定着に影響をおよぼしている可能性があると考えられた。そこ

で、リボフラビンが百日咳菌の増殖におよぼす影響を調べた。さらに、リボフラビンの阻害剤として報告されているルミフラビン[Kearney EB, 1952; Becvar J, 1982; Plantinga A, 2011.]が百日咳菌の宿主細胞への付着におよぼす影響を調べ、次いで、マウスモデルを使用し、ルミフラビンが *in vivo* における百日咳菌の定着におよぼす影響を調べた。

最後に、リボフラビン添加によって産生量に影響を受けるタンパク質が存在した場合、そのタンパク質はリボフラビンの作用に関与している可能性があると考え、リボフラビンの分子的な作用メカニズム解明の手掛かりを得るべく、リボフラビン添加による菌体タンパク質プロファイルの変化を調べた。

1.1. 材料および方法

1.1.1. 試薬

標品として使用したリボフラビンとルミクロムおよびルミフラビンは、それぞれナカライテスク（京都）と東京化成工業（埼玉）および Santa cruz biotechnology (Dallas, TX, USA)から購入した。

1.1.2. 菌株

百日咳菌の標準株として広く使用されている東浜株 I 相菌 (*B. pertussis* Tohamal) を使用した [Kasuga T, 1953.]. 一方、新鮮分離野外株として 2010 年に関東地方で分離された代表的な百日咳菌臨床分離株を 2 株使用した (Table 1)。SK2 株はパータクチン（付着因子）非産生株であり、SK3 株は百日咳毒素とパータクチンのジェノタイプが東浜株と異なっていた (Table 1)。百日咳菌以外の *Bordetella* 属細菌として、ヒトに感染して百日咳を起こすパラ百日咳菌 12822 株 (*B. parapertussis* 12822) [Kasuga T, 1953; Heininger U, 2002.], および *B. holmesii* ATCC51541 [Weyant RS, 1995.] を使用した。また、動物に感染し、気管支炎などを起こす *Bordetella* 属細菌として気管支敗血症菌 RB50 株 (*B. bronchiseptica* RB50) [Cotter PA, 1994.] を使用した。

1.1.3. 培地

平板培地として Bordet-Gengou 寒天培地 (BG 培地) およびメチル化 β サイクロデキストリン寒天培地 (MCD 寒天培地) を使用した。液体培地として Stainer-Scholte 培地 (S/S 培地) を使用した。調製法は、以下に示した。

1.1.3.1 BG 培地

1% (w/v) グリセロール水 500 mL に Bordet-Gengou Agar Base (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 15 g を懸濁した。その後、121°C

で 15 分間、高圧蒸気滅菌し、51℃まで放冷後、緬羊脱纖維素血液(日本バイオテスト研究所または日本生物材料センター、いずれも東京)75 mL を加え混和した。その後、シャーレに注ぎ、平板培地として製した。

1.1.3.2. S/S 培地

Table 2 の通り成分を混合し、121℃で 15 分間、高圧蒸気滅菌した。使用直前に Supplement (Table 3)を最終濃度 1% (v/v)となるように加えた。

1.1.3.3. MCD 寒天培地

Table 4 の通り成分を混合し、121℃で 15 分間、高圧蒸気滅菌した。51℃まで放冷後、Supplement (Table 4)を最終濃度が 1% (v/v)となるように加えた。さらに、0.22 μ m PVDF フィルター(Merck Millipore)でろ過滅菌した 20% (w/v)メチル化 β サイクロデキストリン(東京化成工業)溶液を最終濃度が 2 mg/mL となるように加え、平板培地として製した。

1.1.4. シード菌液の培養

百日咳菌を BG 培地に塗抹して、36.5℃で 4 日間培養した。 β 溶血を示す真珠様コロニーを釣菌し、BG 培地上に塗布して、36.5℃で 1 日間増菌培養した。培地上に増殖した百日咳菌を滅菌綿棒で集菌し、 1×10^9 cells/mL となるよう S/S 培地に懸濁した後、36.5℃で約 24 時間、振とう培養(185 rpm, 36.5℃)した。培養容器として 50 mL バイオリアクターチューブ(TPP, Trasadingen, Switzerland)を用い、培養容量は 20 mL/tube とした。

1.1.5. 黄色色素の抽出

S/S 培地に 2×10^9 cells/mL となるようシード菌液を植菌

後、36.5℃で1～7日間静置培養した。培養容器はガラス大ルー瓶を使用し、培養容量は、250 mL/flaskとした。得られた培養液を遠心

(13,400×g, 30 min, 4℃) 後、上清を回収し、孔径 0.2 μm のポリエーテルスルホン (PES) 膜 (TPP) で、ろ過滅菌した。得られた非感染性上清を、あらかじめメタノール 3 mL と MilliQ 水 3 mL でコンディショニングした Sep-Pak C18 (充填剤量, 360 mg; カラム容量, 0.7 mL; Waters, Milford, MA, USA) 固相抽出カラムに通した。上清を通したカラムを 3 mL の MilliQ 水で洗浄後、0.002% (v/v) 塩酸メタノールで溶出し、色素粗画分を得た。

1.1.6. High performance liquid chromatography (HPLC)

前項の方法に従って得られた色素粗画分を溶媒濃縮装置 (Soltra mini, テクノシグマ, 岡山) で乾固後、MilliQ 水で乾固物を溶解させ HPLC に供した。HPLC には、Symmetry C18 カラム (2.1×150 mm, 粒子径: 3.5 μm; Waters) を接続した Agilent 1100, 1200 シリーズシステム (Agilent Technologies, Santa Clara, MA, USA) を使用した。移動相として、アセトニトリルと 0.05% (w/v) リン酸含有 MilliQ 水を使用し、流速 0.2 mL/min でクロマトグラフィーを行った。リニアグラジエント溶出 (アセトニトリル 5→100%, 20 min, 室温) によってカラムに吸着した物質を分離した。

1.1.7. 紫外可視吸収スペクトル測定

紫外可視吸収スペクトルは、HPLC システムに接続したフォトダイオードアレイ検出器 (Waters) で測定した。

1.1.8. 質量分析 (LC-ESI-MS)

LC-ESI-MS は、Inertsil ODS-4 カラム (3.0×250 mm; GL Sciences, 東京) を接続した Agilent 1200 シリーズシステム (Agilent) と AB Sciex QSTAR Hybrid LC/MS/MS システム (AB Sciex, Framingham, MA, USA) を使用した。移動相は、1.5% (w/v) 酢酸アンモニウム水溶液

と 1.5% (w/v) 酢酸アンモニウム-メタノール溶液を使用した。リニアグラジエント溶出は、流速を 0.5 mL/min とし、30 分かけて酢酸アンモニウムメタノール溶液の割合が 5~100% (v/v) となるよう設定した。また、カラム温度は 40℃とした。スペクトルデータは、フォトダイオードアレイ検出器で検出した。フラグメンテーションは、質量-電荷比 (m/z) の検出範囲が 100~2,000 Da の範囲で記録した。その他のパラメーターはイオンスプレー電圧, 5500 V; ソースガス流量, 50 L/min; カーテングガス流量, 30 L/min; デクラスタリングポテンシャル, 50 V; フォーカシングポテンシャル, 250 V; 温度, 450℃; コーン電圧, 20、35 および 50 V とした。

1.1.9. 黄色色素の同定

百日咳菌の培養上清から得られた色素粗画分を、Section 1.1.6 の通り HPLC で分離した。OD₂₁₀ で溶出物質をモニターし、黄色物質のピークに含まれる物質を、紫外・可視吸収スペクトル測定および質量分析に供した。

紫外・可視吸収スペクトル測定と質量分析の結果をもとにデータベース (Dictionary of Natural Products; Chapman and Hall, London, UK) 検索を行い、黄色色素の候補物質を抽出した。その後、データベース検索でヒットした化合物の高純度標品を入手し、HPLC における保持時間、紫外・可視極大吸収波長、および分子量を百日咳菌の分泌した黄色色素と比較した。

1.1.10. 黄色色素の定量

黄色色素の分泌量は、濃度既知の標品とクロマトグラムにおけるピーク面積を比較して算出した。また、菌体あたりのリボフラビン分泌量は、培養上清中のリボフラビン量を培養液中の総菌数で割ることで求めた。培養液中の総菌数は、培養液の OD₆₅₀ 値から算出した。

1.1.11. リボフラビン添加培地での培養

リボフラビン添加培地で百日咳菌東浜株を培養した。シード菌液 (OD_{650} : 0.3~0.5) を、菌の最終濃度が 0.01×10^9 cells/mL または 0.1×10^9 cells/mL となるように植菌し、 36.5°C で 7 日間振とう (200 rpm) 培養した。培養液の OD_{650} を経時的に測定した (層長 16 mm, miniphoto 518R, TAITEC, 埼玉)。

1.1.12. ルミフラビン添加培地での培養

リボフラビンの阻害剤であるルミフラビンを $10 \mu\text{g/mL}$ となるように培地中に添加し、百日咳菌を培養した。シード菌液 (OD_{650} : 0.3~0.5) を、菌の濃度が 0.01×10^9 cells/mL となるようにルミフラビン添加培地へ植菌した。植菌後、 36.5°C で 4 日間振とう (200 rpm) 培養して得られた培養液の OD_{650} を測定 (層長 16 mm, miniphoto 518R, TAITEC) した。

1.1.13. 細胞付着性試験

細胞付着性試験は、斎藤らの方法に従って行った [斎藤, 2017.]。24 well 細胞培養用プレート (TPP) にヒト肺上皮細胞由来の A549 細胞、またはヒト気管支上皮細胞由来の BEAS-2B 細胞をそれぞれ 6.0×10^5 cells/well となるように植え、5% CO_2 存在下、 37°C で 24 時間培養しコンフルエントにした。 37°C にプレヒートした Hank's Balanced Salt Solutions (HBSS(-)), (富士フィルム和光純薬工業, 大阪) で各 well を洗浄後、 $100 \mu\text{g/mL}$ ルミフラビン加 HBSS(-)、または HBSS(-) を 1 mL/well となるように加えた。その後、百日咳菌東浜株を multiplicity of infection (MOI)=5 となるように各 well に加えた。5% CO_2 存在下、 36.5°C で 2 時間培養後、Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS (-)) 1 mL/well で細胞表面を 3 回洗浄し、細

胞に付着していない百日咳菌を除いた。その後、滅菌 MilliQ を 1 mL/well となるように加え、5 分後にピペッティングによって細胞を破壊し細胞に付着した菌を回収した。回収した菌液を DPBS(-) で段階希釈し、各段階希釈液を 100 μ L ずつ MCD 寒天培地に塗抹した。塗抹後のプレート を 36.5℃ で 5 日間培養後、MCD 寒天培地上に生育したコロニーの数を計数し、細胞に付着した生菌数を算出した。

1.1.14. 動物実験

実験動物の飼育および動物実験は北里大学動物実験委員会の実験許可のもと、北里大学における動物実験等に関する規定に則って行った(承認番号: 17-052)。

1.1.14.1. 実験動物

5 週齢の雌性 BALB/c マウス (日本 SLC, 静岡) を使用した。

1.1.14.2. 攻撃用菌液の調製

百日咳菌東浜株を BG 培地に塗抹して、36.5℃ で培養した。4 日間培養して得られた I 相菌コロニーを釣菌し、BG 培地上に塗り広げて 36.5℃ で 1 日間、増菌培養した。増殖した百日咳菌を滅菌綿棒で集菌し、100 μ g/mL ルミフラビン加 DPBS (-)、または DPBS (-) に懸濁させ、OD₆₅₀ を 1.0 に調整した。この菌懸濁液をそれぞれ、100 μ g/mL ルミフラビン加 DPBS (-) または DPBS (-) で 30 倍希釈して攻撃用菌液とした。

1.1.14.3. 感染

百日咳菌東浜株を含む攻撃用菌液 50 μ L をそれぞれ麻酔下でマウスに経鼻接種した。麻酔薬は、ソムノペンチル (共立製薬, 東京) を使用した。ソムノペンチル (共立製薬) 1 mL を 24 mL の DPBS (-)

で 25 倍希釈し、腹腔内投与 (0.5 mL/dose ; ペントバルビタールナトリウムとして 1.3 mg/dose) した。

感染 0 日 (2 時間)、2 日、および 5 日後にマウスを頸椎脱臼によって安楽死させ、肺を無菌的に摘出した。摘出した肺を DPBS (-) 10 mL 中でホモジナイズした (DT-20 ホモジナイズチューブ, ULTRA-TURRAX チューブホモジナイザー; IKA, Staufen, Germany)。ホモジナイズした肺懸濁液を 10^{-1} 倍希釈液とし、DPBS (-) で 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 希釈まで 10 倍段階希釈液を調整した。 10^{-1} 、 $\sim 10^{-4}$ 倍希釈した肺懸濁液 100 μ L を MCD 寒天培地に塗抹し、36.5°C で 5 日間培養した。生じたコロニーを計数し、肺内生菌数を算定した。

1.1.15. SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

百日咳菌東浜株を Section 1.1.4. に記載の通り培養し、シード菌液を得た。シード菌液を S/S 培地および 10 μ g/mL リボフラビン含有 S/S 培地に 0.01×10^9 cells/mL となるように植菌後、36.5°C で 4 日間、静置培養した。培養容器は、25 cm² 組織培養用フラスコ (TPP) を使用した。培養液の容量は、5 mL/flask とした。培養液を遠心

(13,400 \times g , 30 min, 4°C) 後、得られた菌体タンパク質の SDS-PAGE プロファイルを調べた。すなわち、百日咳全菌体を OD₆₅₀ が 0.8 (層長 = 10 mm) となるように百日咳菌全菌体を MilliQ 水に懸濁し、その 50 μ L と等容量の 20% トリクロロ酢酸を加えた。混合後、室温で 5 分間静置した。卓上遠心機で遠心 (16,200 \times g , 5 min, 4°C) し、上清を除いた後、2 -メルカプトエタノール加 Laemmli sample buffer (Table 5) 12 μ L を加えて混和した。この試料を 100°C にて 5 分間加熱し、放冷後、SDS-PAGE に供した。10% 分離ゲル (Table 6) を調製した後に、濃縮ゲル (Table 7, 8) を重層し使用した。泳動は 60 V で 2 時間行い、泳動終了後、Bio-Safe Coomassie G250 stain (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) で染色した。分子量マーカーとして Precision Plus Protein Standards

Dual Color(BIO-RAD)を用いた。得られた SDS-PAGE プロファイルをデンストメトリー解析に供し、バンドの濃さをピクセル強度で表した。デンストメトリー解析ソフトは、Quantity one 1次元解析ソフトウェア(BIO-RAD, Hercules, CA)を使用した。

1.1.16. ウェスタンブロット法

BvgA の検出は、ラビット抗 BvgA ペプチド抗体（北里大学、阿部章夫 博士より分与）を使用しウェスタンブロット法で解析した。百日咳菌の全菌体タンパク質は、Section 1.1.15.の方法に従って SDS-PAGE にて展開後、TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD) と転写バッファ（Table 9）を使用して、ニトロセルロース膜に転写した（15 V, 300 mA, 30 min）。このニトロセルロース膜を 5%（v/v）ブロッキングワシ（ナカライテスク）および Tween 20 加 Tris-buffered saline（pH: 7.4, TBS）に浸し、30 分間振とうした。次いで、5%（v/v）ブロッキングワシ（ナカライテスク）および 0.1%（v/v）Tween 20 加 TBS で 1,000 倍希釈したラビット抗 BvgA ペプチド抗体を加え、90 分間振とうした。メンブレンを 0.05%（v/v）Tween 20 加 TBS で 3 回洗浄した後、5%（v/v）ブロッキングワシ（ナカライテスク）および 0.05%（v/v）Tween 20 加 TBS で 1,000 倍希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ラビット IgG 抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA）を添加し 60 分間振とうした。メンブレンを 0.05%（v/v）Tween 20 加 TBS で 3 回洗浄し、1-Step NBT-BCIP（Roche, Basel, Switzerland）を使用し、発色反応を行った。7%（v/v）酢酸、続いて MilliQ 水にメンブレンを浸し反応を停止させた。

1.1.17. プロテオミクス解析

タンパク質の同定は、Genomin 株式会社（Pohang, Korea）に委託した。すなわち、百日咳菌菌体タンパク質の SDS-PAGE におけるバン

ドを切り出し、トリプシン消化後、エレクトロスプレーイオン化タンデム質量分析 (ESI-MS/MS) によって解析した。各種タンパク質の同定は MASCOT サーチによって行った。

1.1.18. 統計解析

統計解析は、GraphPad Prism ver. 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を使用した。 t -検定または Two-way ANOVA にて解析を行った。Two-way ANOVA による解析では、解析後ポストホック検定として Bonferroni 検定を行った。

(a)



(b)



Fig 1. 百日咳菌の培養上清

(a) S/S 培地

(b) 百日咳菌東浜株を 2×10^9 cells/mL となるように S/S 培地に懸濁した後、
静置培養(36.5℃, 7 日間)して得られた培養上清

Table 1. 使用した菌株の特徴

百日咳菌株	分離年	ジェノタイプ			
		百日咳毒素*			パータクチン*
		<i>ptxP</i>	<i>ptxA</i>	<i>ptxB</i>	<i>Prn</i>
東浜	1953	1	2	1	1
SK2	2010	1	2	2	1 (ただしパータクチン非産生)
SK3	2010	3	1	2	2

*: 百日咳毒素およびパータクチンの番号は、それぞれのジェノタイプを示す。

Table 2. Stainer-Scholte 培地

成分	量
Tris-base	1.53 g
Glutamic acid (Monosodium salt)	10.72 g
NaCl	2.50 g
KH ₂ PO ₄	0.50 g
L-proline	0.24 g
KCl	0.20 g
MgCl ₂ ・6H ₂ O	0.10 g
1 M CaCl ₂	135 µL
MilliQ water	Add to 1 L

HClで培地の最終pHを7.6に合わせた。

Table 3. Supplement

成分	量
Glutathione (reduced)	1.00 g
L-cystine	0.40 g
Ascorbic acid	0.20 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.10 g
Niacin	0.04 g
MilliQ water	Add to 100 mL

L-cystineを溶解させるためにHClを加えた。
 Supplementを調製後、0.2 μm PVDFフィルターでろ過滅菌した。

Table 4. メチル化βサイクロデキストリン寒天培地

成分	量
Bacto Agar	17 g
Sodium glutamate mono hydrate	10.7 g
Tris-base	6.1 g
Casamino acid	2.5 g
NaCl	2.5 g
KH ₂ PO ₄	0.50 g
L-proline	0.24 g
KCl	0.20 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.10 g
1 M CaCl ₂	135 μL
MilliQ water	add to 1L

HClで培地の最終pHを7.6に合わせた。

Table 5. Laemmli sample buffer

成分	量
10% sodium dodecyl sulfate	200 μ L
1 M Tris-HCl	200 μ L
50% glycerol	350 μ L
0.03% bromophenol blue	100 μ L
1 M dithiothreitol	100 μ L
0.1% pyronin Y	50 μ L

Table 6. 10% polyacrylamide gel

成分	量
40% acrylamide/Bis solution, 37.5: 1	2.3 mL
3 M Tris-base (pH 8.9)	1.6 mL
10% ammonium peroxodisulfate	40 μ L
N, N, N, N-methylethylenediamine	10 μ L
MilliQ water	4.9 mL

Table 7. Stacking mixture

成分	量
Acrylamide	7.5 g
N,N'-methylene-bis-acrylamide	1.5 g
Tris-base	4.54 g
MilliQ water	Add to 270 mL
HClで溶液のpHを6.8に調整する。	

Table 8. Stacking gel

成分	量
Stacking mixture	2.7 mL
10 % ammonium peroxodisulfate	40 μ L
N, N, N, N-methylethylenediamine	10 μ L

Table 9. Recipe of transfer buffer for Western blotting

成分	量
Glycine	7.2 g
Tris-base	1.5 g
Methanol	100 mL
MilliQ water	Add to 500 mL

1.2. 結果

百日咳菌が分泌する黄色色素の同定を試みた。色素粗画分を HPLC で分離したところ、黄色を示す物質が保持時間 6.5 分および 8.9 分で溶出された (Fig 2)。以下、カラム保持時間 6.5 分を示した物質を黄色物質 1、8.9 分の物質を黄色物質 2 と表記する。これらについて、紫外可視吸収スペクトル測定および質量分析を行ったところ、黄色物質 1 の極大吸収波長は、226、268、370 および 450 nm (Fig 3)を示し、そのプロトン負荷分子 $[M+H]^+$ の質量は、377 であった (Fig 4)。一方、黄色物質 2 の極大吸収波長は、216、260、353 および 388 nm (Fig 5)を示し、そのプロトン負荷分子 $[M+H]^+$ の質量は、243 であった (Fig 6)。

得られた機器分析データをもとにデータベース検索を行った結果、黄色物質 1 はリボフラビン (Fig 7a)、黄色物質 2 はルミクロム (Fig 7b) であると考えられたため、両化合物の標品を入手し HPLC におけるカラム保持時間、極大吸収波長、および分子量を試料と比較した (Table 10, 11; Fig 2~6)。その結果、黄色物質 1 とリボフラビン、黄色物質 2 とルミクロムの HPLC におけるカラム保持時間、極大吸収波長、および分子量は完全一致した (Table 10, 11)。以上の結果から、百日咳菌が分泌する黄色色素はリボフラビンとルミクロムであることが明らかとなった。また、百日咳菌東浜株におけるリボフラビンとルミクロムの分泌量を調べた。Section 1.1.4. および 1.1.5. に記載の通り百日咳菌を培養し得られた培養上清中のリボフラビンおよびルミクロムの量を調べたところ、リボフラビン量は 46 $\mu\text{g}/250\text{ mL}$ であり、ルミクロムは、6 $\mu\text{g}/250\text{mL}$ であった。この結果から、培養上清中の両化合物存在比 (リボフラビン : ルミクロム) は、およそ 7.7 : 1 であり百日咳菌が分泌する黄色色素は主にリボフラビンであることが明らかとなった。

百日咳菌新鮮分離株 (SK2, SK3 株) においても、東浜株と同様にリボフラビンを分泌しているか調べた。SK2、SK3 株の培養上清は共に黄色を呈し、HPLC においてリボフラビンと同一の保持時間にピーク

を検出した。そのピークの物質は、226, 268, 370, および 450 nm の極大吸収波長を示し、分子量は 376 を示し、リボフラビンの値と完全一致したことから、SK2 株および SK3 株は東浜株と同様リボフラビンを分泌することが明かとなった (Fig 8, 9)。さらに、百日咳菌以外の *Bordetella* 属菌種が、リボフラビンを分泌しているか調べた。その結果、百日咳菌に加え、ヒトに感染し百日咳を引き起こすパラ百日咳菌、*B. holmesii*、および犬、猫、豚などに感染し気管支炎などを引き起こす気管支敗血症菌はすべて培養上清中にリボフラビンを分泌していた (Table 12)。各 *Bordetella* 属菌種間のリボフラビン分泌量に有意な差は検出されなかった (Table 12)。

百日咳菌東浜株を 250 mL の S/S 培地に 2×10^9 cells/mL となるように植菌した。36.5°C で 1~6 日間静置培養し、培養上清中のリボフラビン濃度を経時的に定量した。その結果、培養上清中のリボフラビン濃度は、百日咳の増殖の誘導期から対数増殖前期にかけて上昇し、対数増殖後期から定常期に低下した (Fig 10a)。また、菌体あたりのリボフラビン分泌量は、誘導期から対数増殖前期までの方が対数増殖後期以降よりも多かった (Fig 10b)。

リボフラビン添加培地で百日咳菌を培養し、その増殖に寄与するのかについて調べた。10 μ g/mL リボフラビン含有 S/S 培地 4 mL に百日咳菌を 0.01×10^9 cells/mL または 0.1×10^9 cells/mL となるように植菌し、36.5°C で振とう (200 rpm) 培養した。リボフラビンを S/S 培地に添加すると、リボフラビン不含培地で培養したときと比較して、百日咳菌の増殖が促進されることが明らかとなった (Fig 11a)。この現象は、菌濃度が低いとき (0.01×10^9 cells/mL) に観察され、菌濃度が高い (0.1×10^9 cells/mL) ときには観察されなかった (Fig 11b)。また、リボフラビンの阻害剤であるルミフラビンを培地に添加した場合、リボフラビンの添加による百日咳菌の増殖促進作用が見られなくなった (Fig 12)。

ルミフラビンが百日咳菌の宿主細胞への付着におよぼす影響を調べるために、ルミフラビン添加時における A549 細胞、および BEAS-2B 細胞への付着性の変化を調べた。その結果、ルミフラビンを添

加しても両細胞に対する百日咳菌の付着性に変化は見られなかった (Fig 13)。次に、マウスモデルにおいて百日咳菌とルミフラビンを同時に経鼻接種し、ルミフラビンを加えていない対照群と肺内生菌数推移を比較したところ、ルミフラビンを同時接種した方が、肺内生菌数が有意に低く推移した (Fig 14)。ルミフラビンは、実験に使用した濃度では菌の増殖を阻害しないことを確認したことから、マウスモデルの結果はルミフラビンによって、百日咳菌の定着が阻害されたものと推察された。これらのことから、ルミフラビンは百日咳菌の宿主への付着には関与しないが、その宿主への定着に関わることが示唆された (Fig 13, 14)。

百日咳菌の全菌体タンパク質を SDS-PAGE で分離し、得られた SDS-PAGE プロファイルをデンストメトリーで解析した。その結果、リボフラビン添加培地で百日咳菌を培養した場合、リボフラビン不含培地で培養したときに比べて、分子量 23 kDa のバンドが濃くなった (Fig 15)。このことから、リボフラビンの添加で 23 kDa のタンパク質の発現が亢進した、またはこのタンパク質の分解が抑えられたことが示唆された。このバンドをプロテオミクス解析に供したところ、リボフラビン添加で発現の亢進または分解が抑えられたタンパク質は百日咳菌の病原因子産生制御を担う BvgA であることが明らかとなった。リボフラビン添加による BvgA 発現量を詳細に調べるため、リボフラビン添加培地および不含培地で百日咳菌を培養したときの BvgA 発現量についてウェスタンブロット法で解析後、得られた BvgA のバンド濃度をデンストメトリーにて半定量的に数値化した。その結果、リボフラビン添加培地で培養したときの方がリボフラビン不含培地で培養したときに比べ、BvgA のバンドの濃さが濃かった (Fig 16)。

1.3. 考察

百日咳菌の培養上清中に存在する黄色色素は、リボフラビンとルミクロムであることが明らかとなった。両化合物の培養上清中存在比（リボフラビン：ルミクロム）は、7.7：1であった。

リボフラビンは、多くの細菌によって生合成されることが知られており [Bereswill S, 1999; Vitreschak AG, 2002]、菌体内でフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) やフラビンモノヌクレオチド (FMN) に変換される。FAD や FMN は、電子伝達系でのプロトン転移反応など ATP を生成する経路で機能することから、FAD や FMN の原料であるリボフラビンの供給は、細菌（特に好気性細菌）の効率的なエネルギー獲得のために必須である [Abbas CA, 2001; Vitreschak AG, 2002.]. 細菌がリボフラビンを菌体外へ分泌する報告はいくつか存在する [Marsili E, 2008; Rajamani S, 2008; Yurgel SN, 2014.]. その例として、アルファルファ根粒菌、シュワネラ属細菌がリボフラビンを分泌するという報告がある [Marsili E, 2008; Yurgel SN, 2014.]. また、バチラス属細菌において、その変異体によるリボフラビンの工業的な生産方法も試みられている [Mack M, 1998.]. 一方、百日咳菌におけるリボフラビン分泌の報告は無く、その分泌意義に興味を持たれた。ルミクロムはリボフラビンの側鎖部分が存在しない構造を有し (Fig 7)、光照射、および酸性条件下でリボフラビンが分解して生ずることが分かっている [Huang R, 2006; Remucal CK, 2011.]. アルファルファ根粒菌がルミクロムを分泌するという報告がある [Dakora FD, 2015.]. しかし、アルファルファ根粒菌におけるルミクロム分泌に関してはリボフラビンが光分解され、副次的にルミクロムを生ずるのではないかという報告もあり [Phillips DA, 1999.]. その詳細は明らかとなっていない。今後、百日咳菌においても、ルミクロムの分泌機構や生合成経路について詳細に調べ、ルミクロム分泌能に関する知見を得る必要がある。

日本で分離された新鮮分離株 2 株においても、東浜株と同様

にリボフラビンが分泌されているか調べた。PT 遺伝子は、PT オペロンのプロモーターをコードする遺伝子である *ptxP*、毒素活性部位（A サブユニット）をコードする遺伝子（*ptxA*）と細胞結合部位（B サブユニット）をコードする遺伝子（*ptxB*）からなる [Locht C, 1986; Nicosia A, 1986; Tamura M, 1982]。近年、PT 遺伝子（*ptxP*、*ptpA*、*ptpB*）、およびパータクチンの構造遺伝子（*prn*）の変異株が多く検出されている [Bouchez V, 2009; Mooi FR, 2009; van Gent M, 2012; Hegerle N, 2012; Otsuka N, 2012; Petersen RF, 2012; Schmidtke AJ, 2012; Bodilis H, 2013; Pawloski LC, 2014, 齋籐、2012.]。使用した百日咳菌は、近年野外で検出される代表的な株であり、国内における臨床分離株のほとんどは PT やパータクチンのジェノタイプが実験室株と大きく異なる SK3 株型であり、パータクチンを産生しない SK2 株型がそれに続く分離頻度である [Otsuka N, 2012; 齋籐、2012.]。調べた結果、SK2 株および SK3 株はともにリボフラビンを分泌していた (Fig 8, 9)。また、百日咳菌以外の *Bordetella* 属菌種 3 菌種に関してもリボフラビンを分泌していた (Table 12)。これらの結果から、リボフラビン分泌能は *Bordetella* 属細菌の菌種を超えて保存された性質であることが示唆された。今後、病原性の強度とリボフラビン分泌の関連などを明らかにするため、より多くの分離株においてリボフラビンの分泌性を調べていく必要があると考えている。

細菌においてリボフラビンは、GTP とペントースリン酸回路の中間体であるリブロース 5-リン酸から、4 つの酵素 (GTP cyclohydrolase, Riblose-5-phosphate, RibB; Pyrimidine deaminase, Pyrimidine reductase, RibD; Riboflavin synthase β -chain, RibH; Riboflavin synthase α -chain, RibE) の触媒によって合成されることが知られている (Fig 17) [Vitreschak AG, 2002.]。また、これらの酵素をコードする遺伝子は、オペロン (*rib* オペロン) を形成する [Vitreschak AG, 2002.]。本研究で使用した *Bordetella* 属 4 菌種は、すべて *rib* オペロンを保有しており、自身でリボフラビンを合成することが可能と考えられた。また、それぞれの菌種間における RibB、

RibD、および RibH のアミノ酸配列の相同性を BLAST サーチによって調べたところ、88%~99%と高い値を示した。一方 RibE に関しては、*B. holmesii* のみ他の *Bordetella* 属菌種とのアミノ酸配列の相同性が 35%~37%と低いものの、RibE ホモログをコードする遺伝子を保有することが分かった。リボフラビンは水溶性ビタミンであり、脂質二重膜を通過しないことから、その分泌にはトランスポーター(分泌装置)が必要であると考えられる。シュワネラ属細菌において Multidrug and Toxin Extrusion family protein(MATE family protein)によってリボフラビンが分泌されることが知られている[Garcia-Angulo VA, 2017.]。MATE family protein は、薬剤排泄に関与するタンパク質であり、多くの細菌が保有するもののその構造には多様性が存在する[Moriyama Y, 2008; Garcia-Angulo VA, 2017]。今回調べたすべての *Bordetella* 属菌種は MATE family protein のホモログをコードする遺伝子を保有していることから *Bordetella* 属細菌も、このタンパク質を介してリボフラビンを分泌している可能性がある。

百日咳菌の増殖過程におけるリボフラビンの分泌量を経時的に調べた結果、培養上清中のリボフラビン濃度は対数増殖期まで上昇し、定常期以降で低下することが明らかとなった(Fig 10a)。菌体あたりのリボフラビン分泌量は誘導期から対数増殖前期の方が定常期以降よりも多いことが示唆された(Fig 10b)。これらのことから、菌体外に分泌されたリボフラビンは、百日咳菌の増殖初期段階において重要な役割を担っていると推察された。また、本研究では百日咳菌の増殖を OD₆₅₀ で評価したが、今後分泌されたリボフラビンと百日咳菌増殖の関連性を詳細に明らかにするためには、生菌数を経時的に測定した実験も行う必要がある。

リボフラビンは、菌体内で FMN や FAD に変換され ATP 合成の補酵素としてはたらくことが知られている[Abbas CA, 2001; Vitreschak AG, 2002.]。今回の実験において、培地へのリボフラビンの添加により百日咳菌の増殖促進作用が観察された(Fig 11)。百日咳菌が培地中のリボフラビンを吸収することで、菌体内における FAD や FMN の安定的かつ速やかな供

給がなされエネルギー獲得が効率的に行われた結果、増殖促進が誘導されたことが示唆された。百日咳菌によるリボフラビンの吸収機構は不明であるが、リボフラビンは水溶性を示すことからその吸収機構はトランスポーターを介したものであると推察される。これまで、リボフラビンのインポーターとして、9つのタンパク質がアルファルファ根粒菌などにおいて報告されている(RibU, RibM, RibN, RibV, RibZ, RfnT, RfuABCD, RibXYZ, Imp)[Garcia-Angulo VA, 2017.]. BLAST サーチの結果、百日咳菌の機能未知タンパク質である BP2600 が RfnT と 47%の相同性を示すことが明らかとなった。今後、分泌されたリボフラビンの分布や動態を明らかにするために、放射性同位体で標識されたリボフラビンを培地に添加し百日咳菌を培養する必要がある。さらに、リボフラビン産生欠損株や分泌能を欠失させた株を作製し、リボフラビンによる百日咳菌の増殖促進作用について詳細に調べていく必要がある。

近年、リボフラビンがヒトの免疫系を抑制するという報告があり[Levit R, 2018.], 百日咳菌がリボフラビンの分泌によって宿主免疫を制御している可能性もあり得ると考えられた。

今後、菌体外にリボフラビンを分泌しない変異株を作製し、培地上での増殖やマウス体内での生菌数の推移を調べることで、より詳細に菌体外リボフラビンの役割を調べ、さらにリボフラビンが宿主免疫におよぼす影響を明らかにするために、宿主細胞または、マウスへの感染後のサイトカイン産生量変化なども調べていく必要があると考えている。

BvgAS 系は BvgA と BvgS の 2 成分から成り、この制御系が活性化(Bvg⁺)されると、菌体膜に存在する膜貫通センサーキナーゼである BvgS がリン酸化され、それに共役して最終的に転写調節因子である BvgA がリン酸化される。BvgA はリン酸化されることでプロモーター領域への結合が増強される。これによって、様々な病原遺伝子の転写が活性化され、また、病原性抑制遺伝子(*vsg*)を抑制する BvgR が発現することで、付着因子、毒素や3型分泌装置など

の病原因子の発現が制御されている[Chen Q, 2017.]. 一方、この制御系がオフの状態(Bvg⁻)では、BvgA と BvgS を介したシグナル伝達が行われず、病原因子を産生しなくなる。Bvg⁻と Bvg⁺状態の切り替わりは可逆的であり、百日咳菌を低温培養(25℃)したり、培地中にニコチン酸や MgSO₄を添加したりすることで Bvg⁻状態が誘導されることが知られている[Deora R, 2001; Chen Q, 2017.].

リボフラビンが百日咳菌のタンパク質発現におよぼす影響を調べたところ、リボフラビンの添加によって、分子量 23 kDa の菌体タンパク質の発現が亢進された、もしくはこのタンパク質の分解が抑えられたものと考えられた (Fig 15, 16)。プロテオミクス解析の結果、23 kDa の菌体タンパク質は BvgA であることが明らかとなった。しかし、BvgA 産生量を半定量的に調べる実験は単回のみの結果であることから、今後複数回の実験によって再現性を得る必要がある。また、リボフラビンと BvgA の関連性について明らかにするために今後、リボフラビン産生欠損株を作製して、リボフラビン産生の有無と BvgA 産生量の関連性についても調べる必要がある。さらに、リボフラビンが BvgAS 制御系の活性化に関与するののかについて明らかにするためには、BvgA のリン酸化の状態を調べる必要がある。

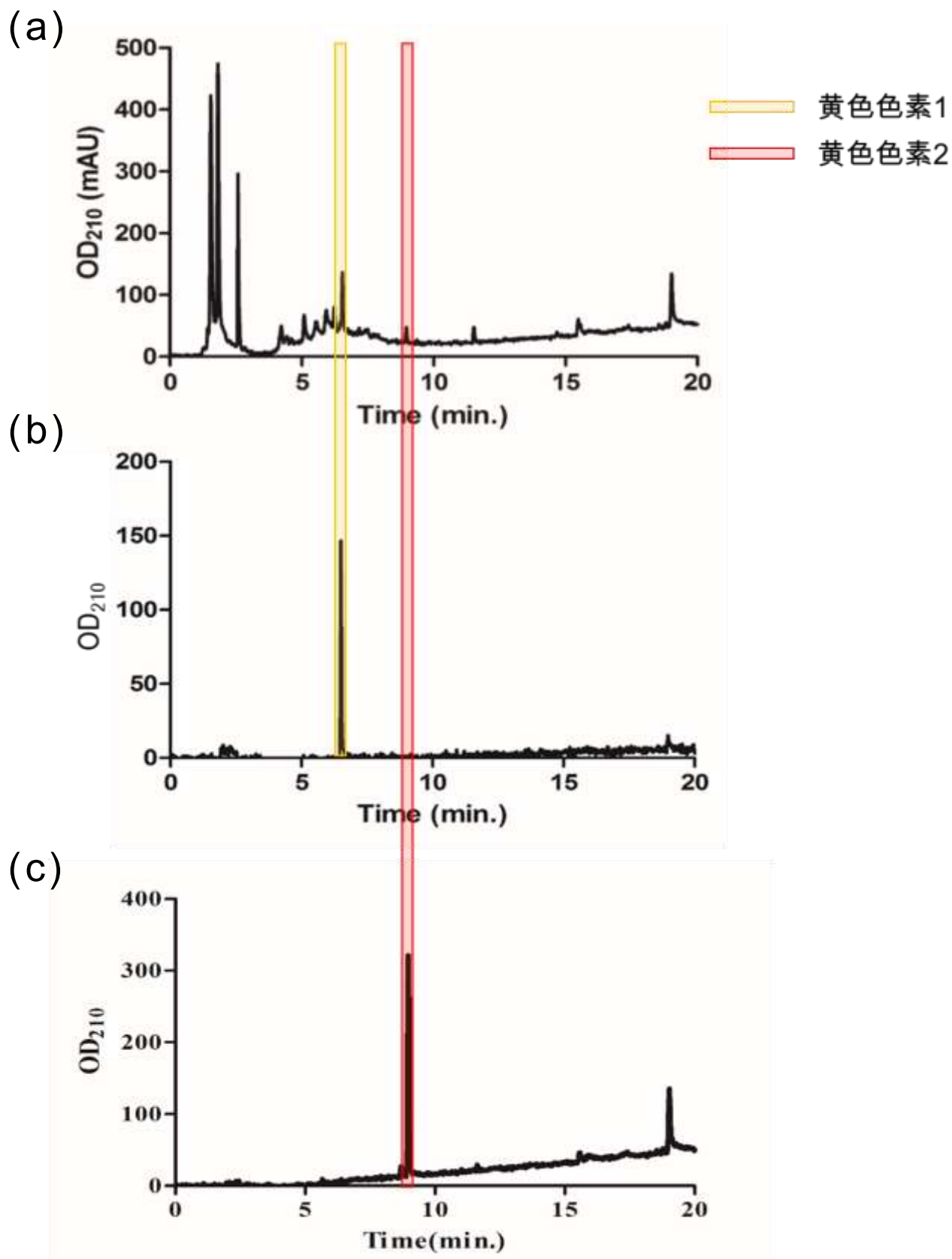
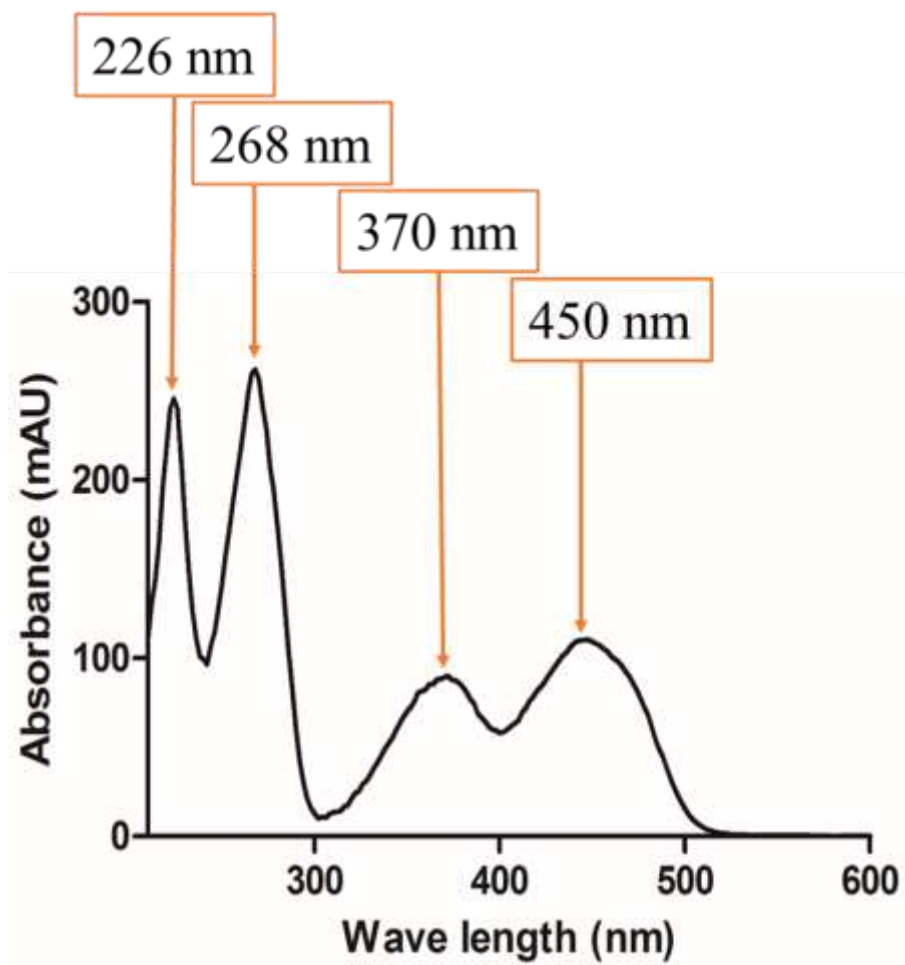


Fig 2. 黄色色素粗画分のクロマトグラム

HPLC は、Section 1.1.に記載の通り行った。(a)色素粗画分のクロマトグラム OD₂₁₀、(b)リボフラビン標品のクロマトグラム、(c)ルミクロム標品のクロマトグラム

(a)



(b)

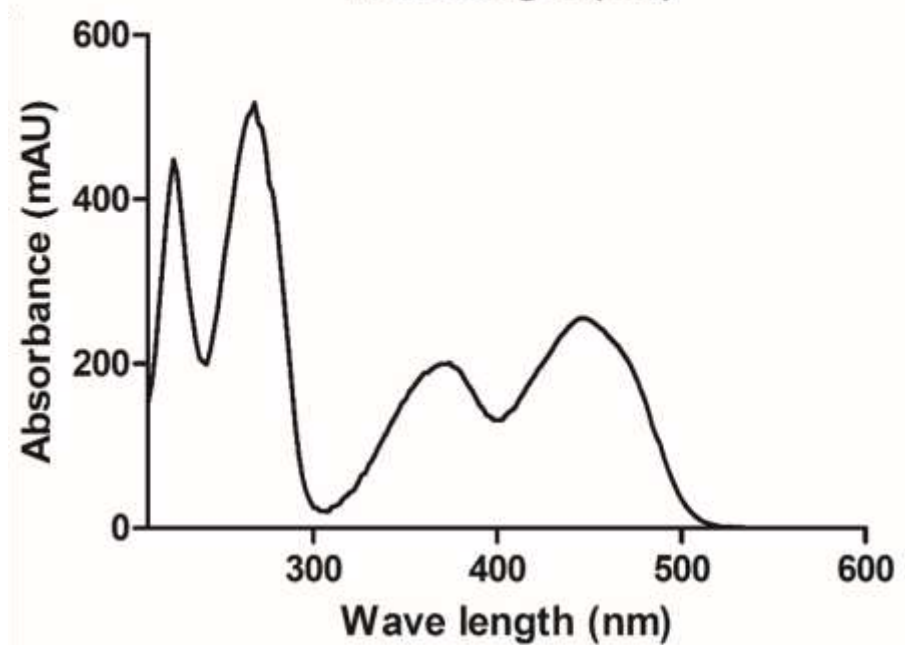
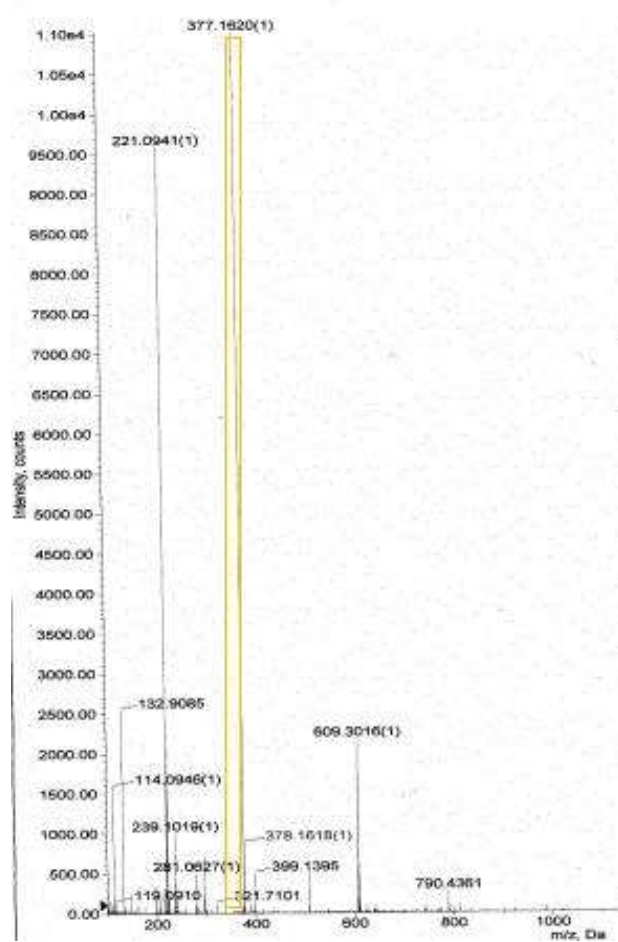


Fig 3. 黄色色素 1(a)およびリボフラビン標品(b)の紫外可視吸収スペクトル

(a)



(b)

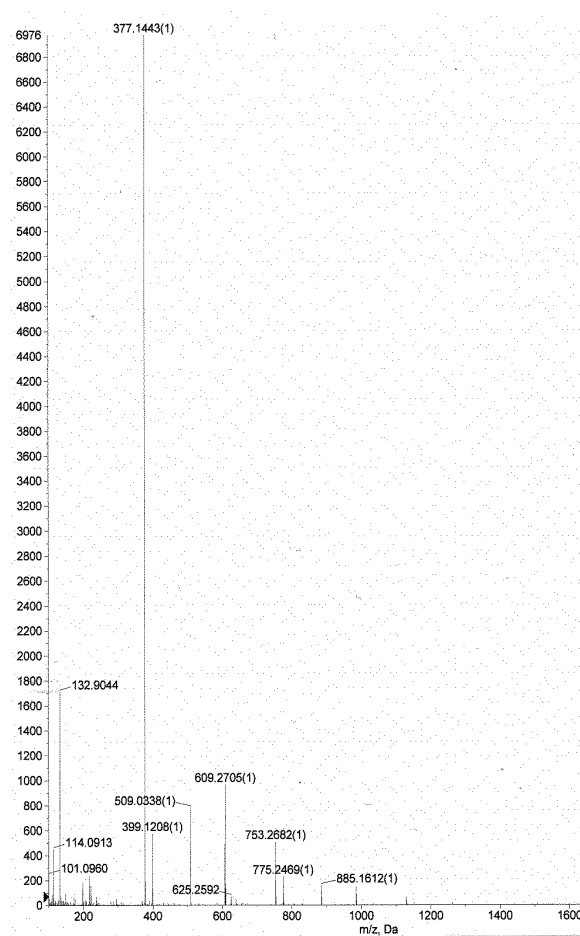
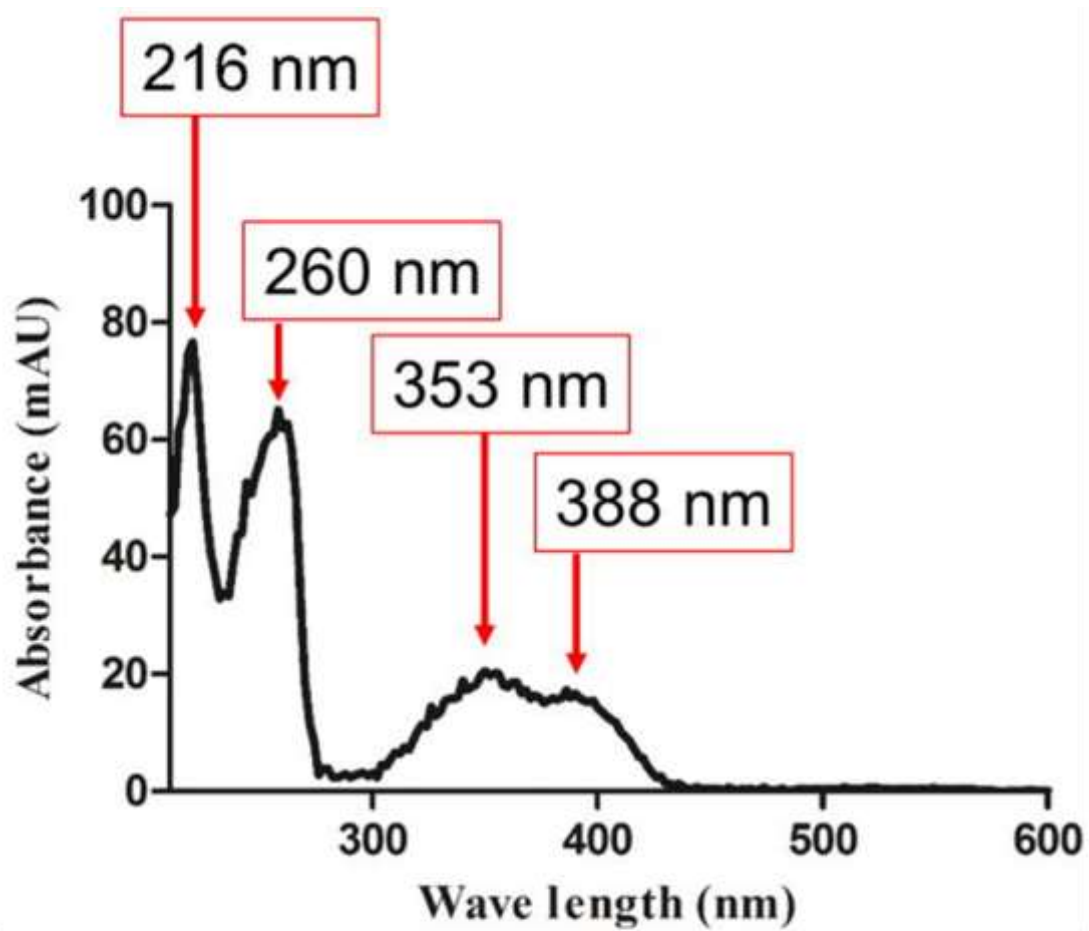


Fig 4. 黄色色素 1(a)およびリボフラビン標品(b)の LC-ESI-MS スペクトル

(a)



(b)

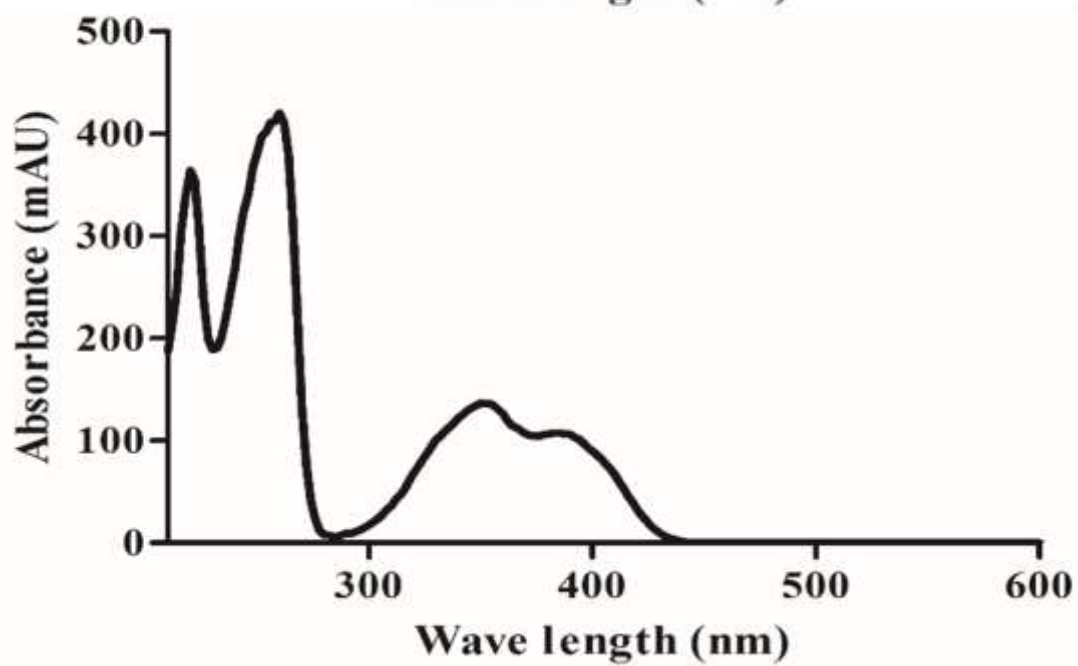
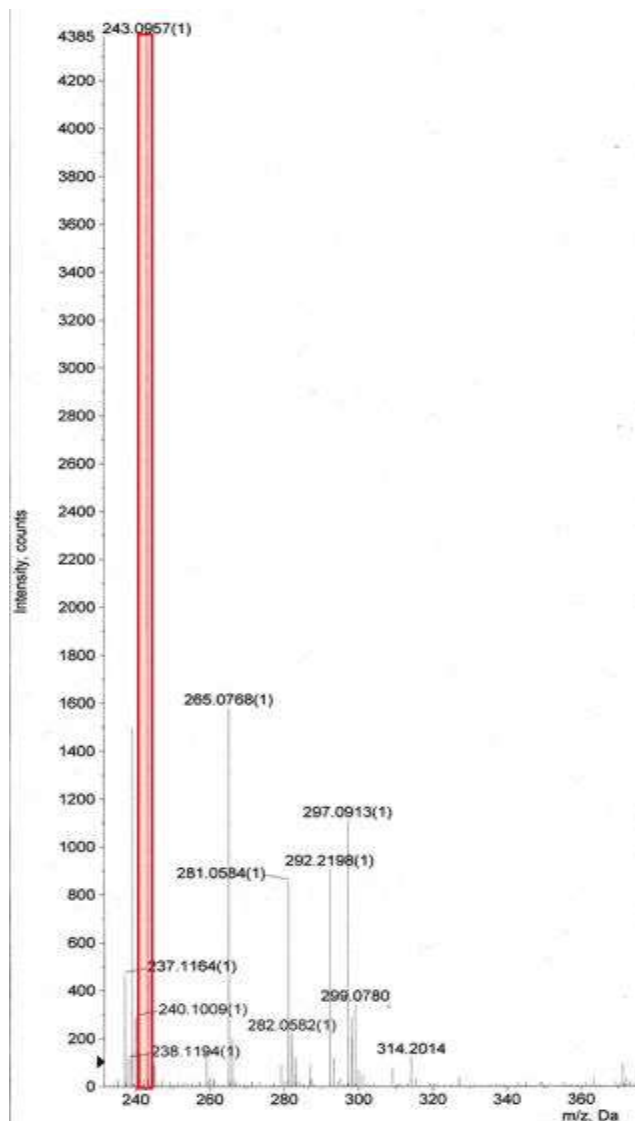


Fig 5. 黄色色素 2(a)およびルミクロム標品(b)の紫外可視吸収スペクトル

(a)



(b)

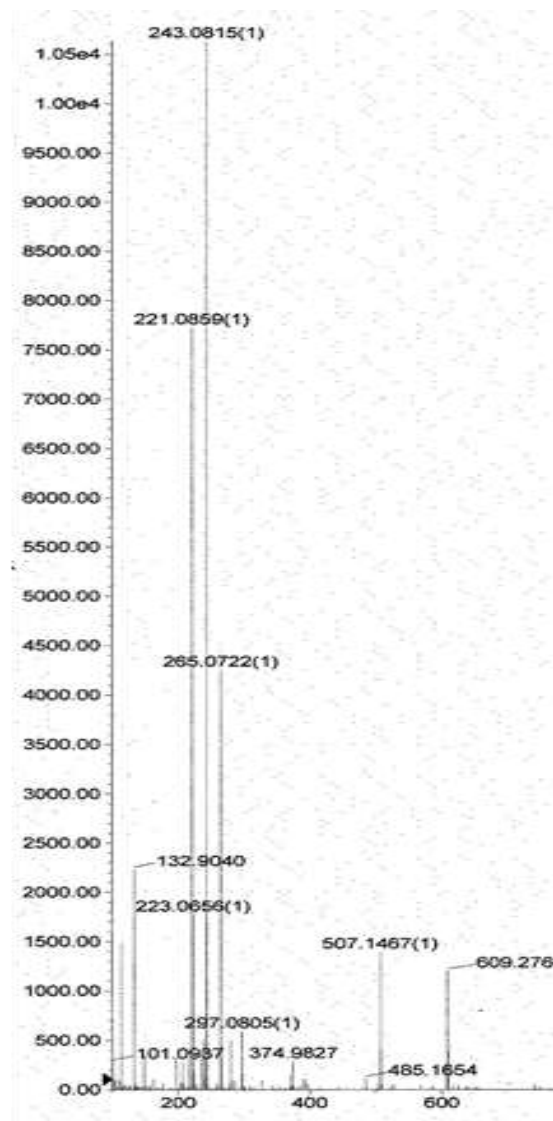
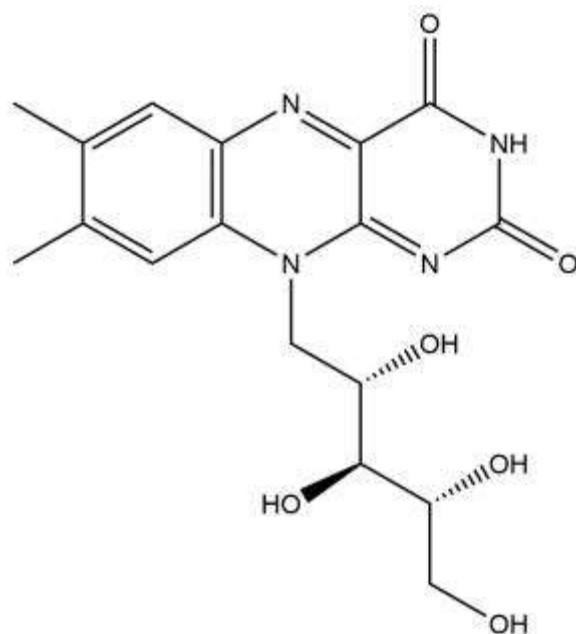


Fig 6. 黄色色素 2(a)およびブルミクロム標品(b)の LC-ESI-MS スペクトル

(a)



(b)

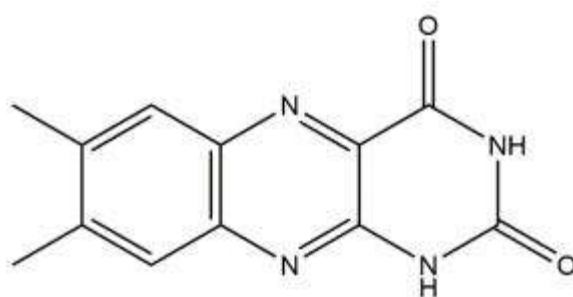


Fig 7. リボフラビン(a)とルミクロム(b)の構造

Table 10. 黄色色素1とリボフラビン標品の機器分析データ

	HPLC 保持時間 (min)	極大吸収波長 (nm)	分子量
黄色色素1	6.5	226, 268, 379, および	450 376
リボフラビン	6.5	226, 268, 370, および	450 376

Table 11. 黄色色素2とルミクロム標品の機器分析データ

	HPLC 保持時間 (min)	極大吸収波長 (nm)	分子量
黄色色素2	8.9	216, 260, 353, および	388 242
ルミクロム	8.9	216, 260, 353, および	388 242

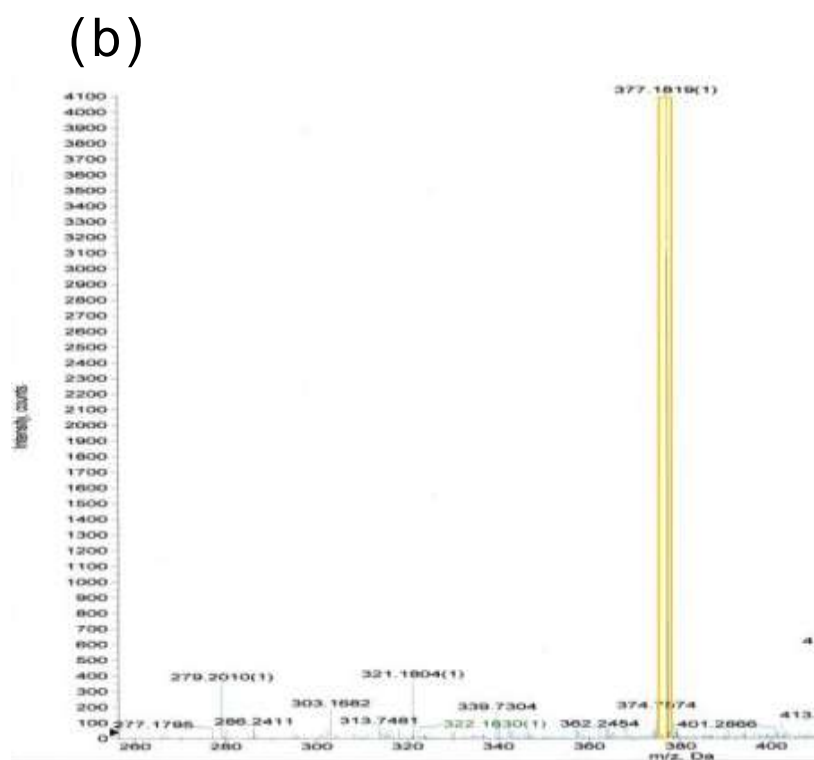
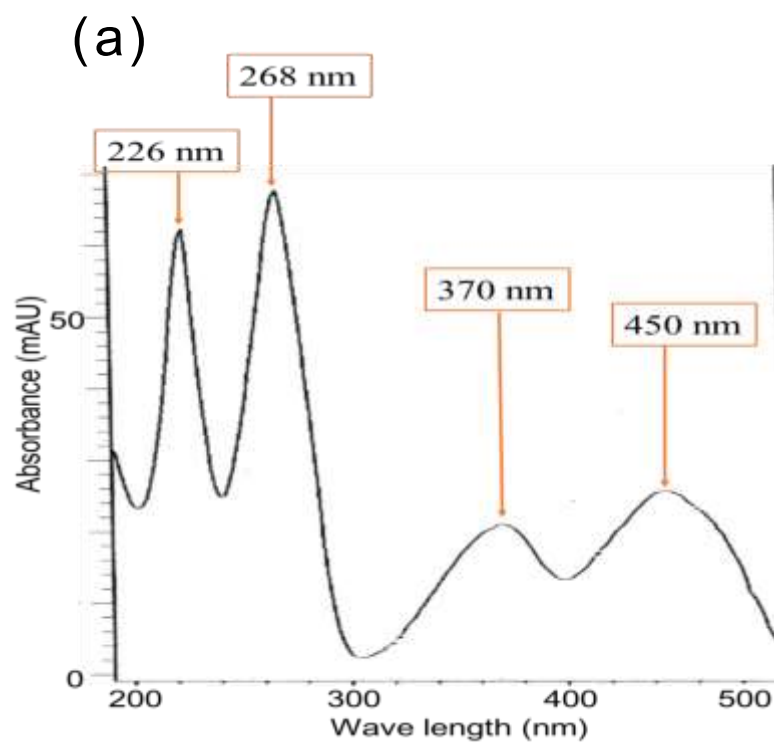
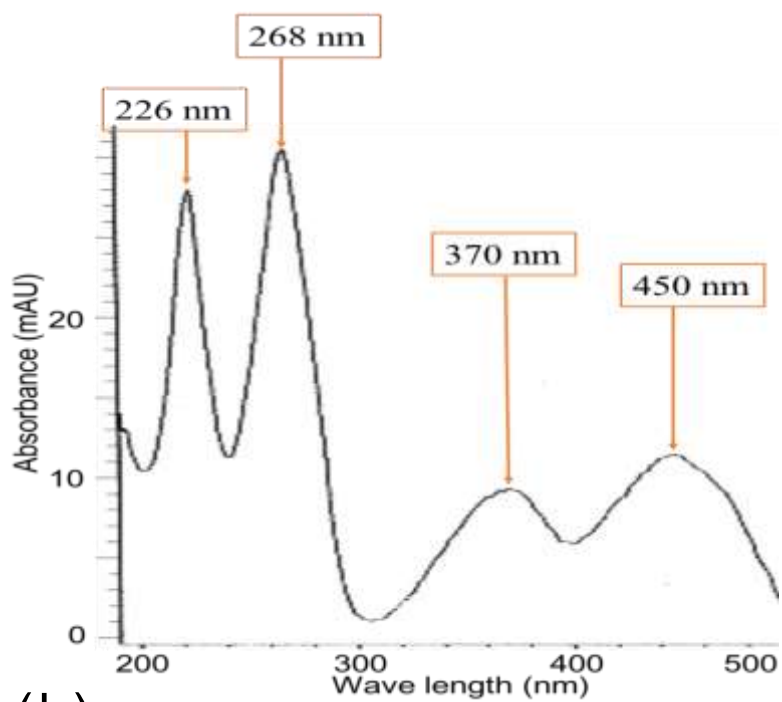


Fig 8. 百日咳菌 SK2 株が分泌したリボフラビンの検出
(a)紫外可視吸収スペクトル(b)LC-ESI-MS スペクトル

(a)



(b)

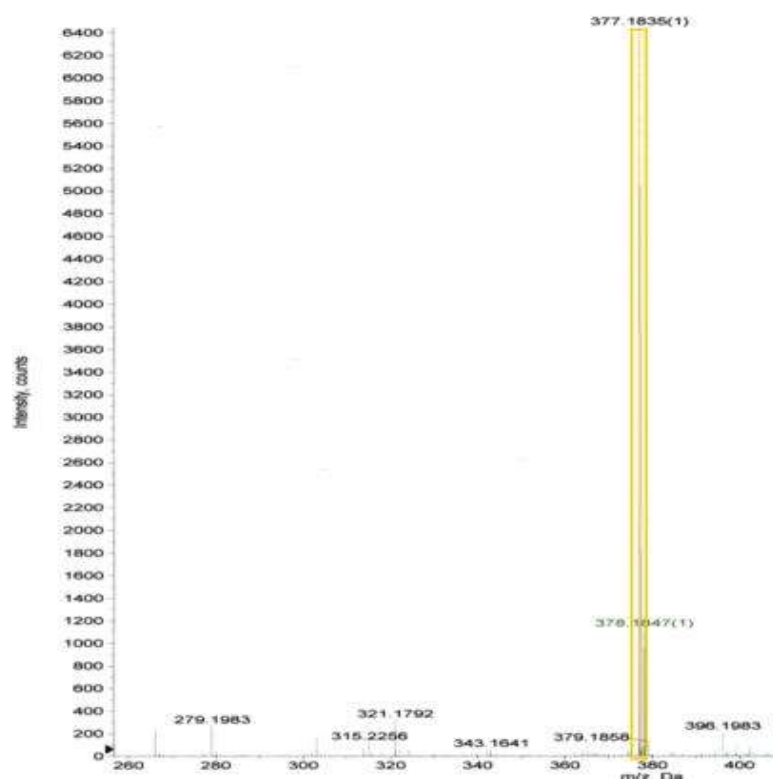


Fig 9. 百日咳菌 SK3 株が分泌したリボフラビンの検出

(a)紫外可視吸収スペクトル(b)LC-ESI-MS スペクトル

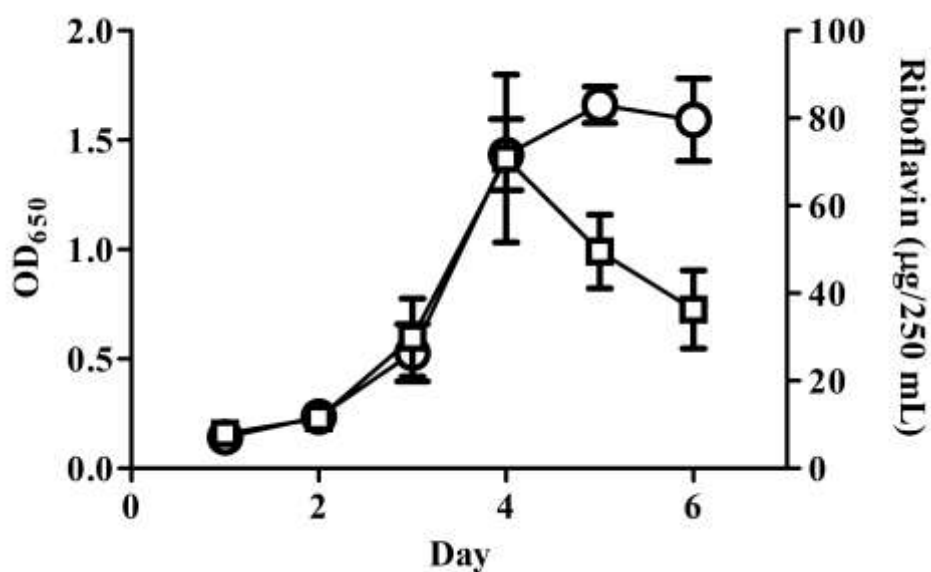
Table 12. *Bordetella* 属細菌培養上清中のリボフラビン量

菌株	リボフラビン (10^{-18} g/cell)
百日咳菌東浜	5.7 ± 3.2
パラ百日咳菌 12822	10.8 ± 3.6
<i>B. holmesii</i> ATCC51541	2.0 ± 0.8
気管支敗血症菌 RB50	2.8 ± 0.6

データは、3回の実験の平均値±標準偏差を示す。

(1菌体あたりのリボフラビン分泌量 (10^{-18} g/cell)=培養上清中のリボフラビン量/OD₆₅₀値から求めた培養液中の百日咳菌数)

(a)



(b)

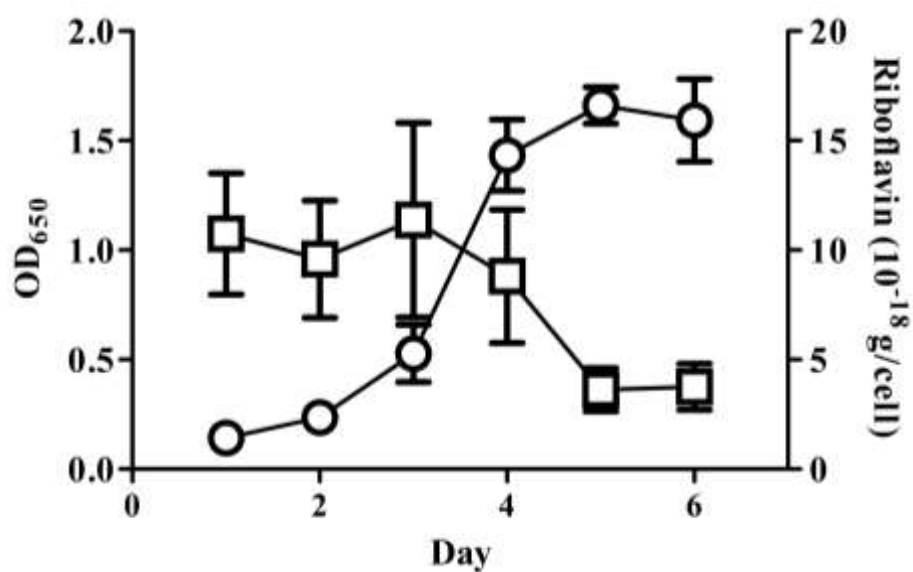
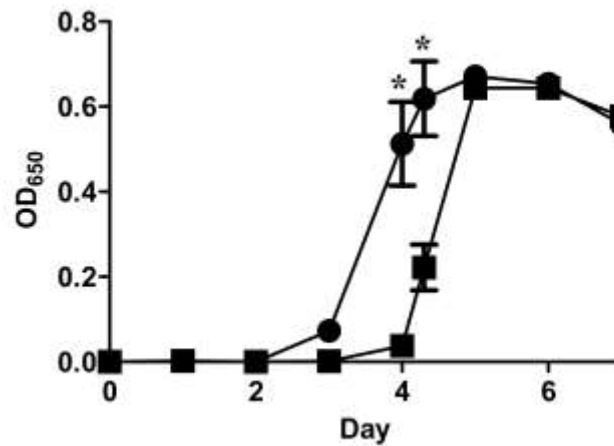


Fig 10. 百日咳菌培養上清中に分泌されるリボフラビン量の経時変化 (a)250 mL の培養上清中のリボフラビンの濃度 (b)1 菌体あたりのリボフラビン分泌量。丸印が百日咳菌の増殖を OD₆₅₀ で示しており、四角印がリボフラビン量を示す(1 菌体あたりのリボフラビン分泌量=培養上清中のリボフラビン量/OD₆₅₀ 値から求めた培養液中の百日咳菌数)。データはそれぞれ平均値±標準偏差値を示す。

(a)



(b)

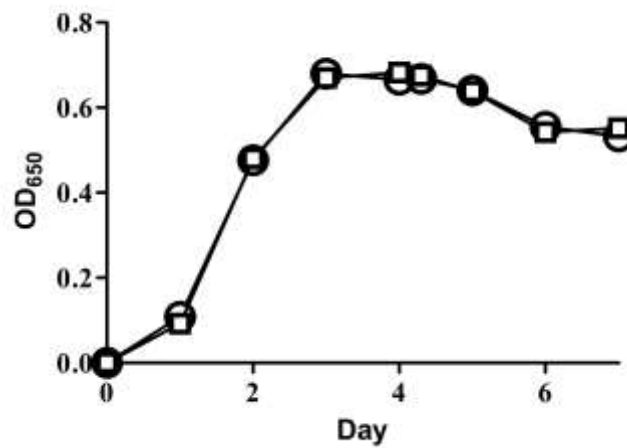


Fig 11. リボフラビンが百日咳菌の増殖におよぼす影響

10 $\mu\text{g/mL}$ リボフラビン添加 S/S 培地または S/S 培地で百日咳菌東浜株を培養したときの増殖を調べた。百日咳菌東浜株を 4 mL の培地に植菌し 36.5°C で振とう (200 rpm) 培養した。培養容器は、ガラス試験管を使用した。(a) 百日咳菌を 0.01×10^9 cells/mL で植菌したときの増殖曲線を OD₆₅₀ で示す (黒丸印, リボフラビン添加 S/S 培地; 黒四角印, リボフラビン不含 S/S 培地)。(b) 百日咳菌を 0.1×10^9 cells/mL で植菌したときの増殖曲線を OD₆₅₀ で示す (白丸印, リボフラビン加 S/S 培地; 白四角印, リボフラビン不含 S/S 培地)。データは、平均値 \pm 標準偏差 (n=3) を表す。アスタリスクは、リボフラビン添加培地とリボフラビン不含培地における百日咳菌の増殖に有意差があることを示す ($p < 0.05$)。統計解析は、Two-way ANOVA にて解析後、ポストホック検定として Bonferroni 検定を行った。

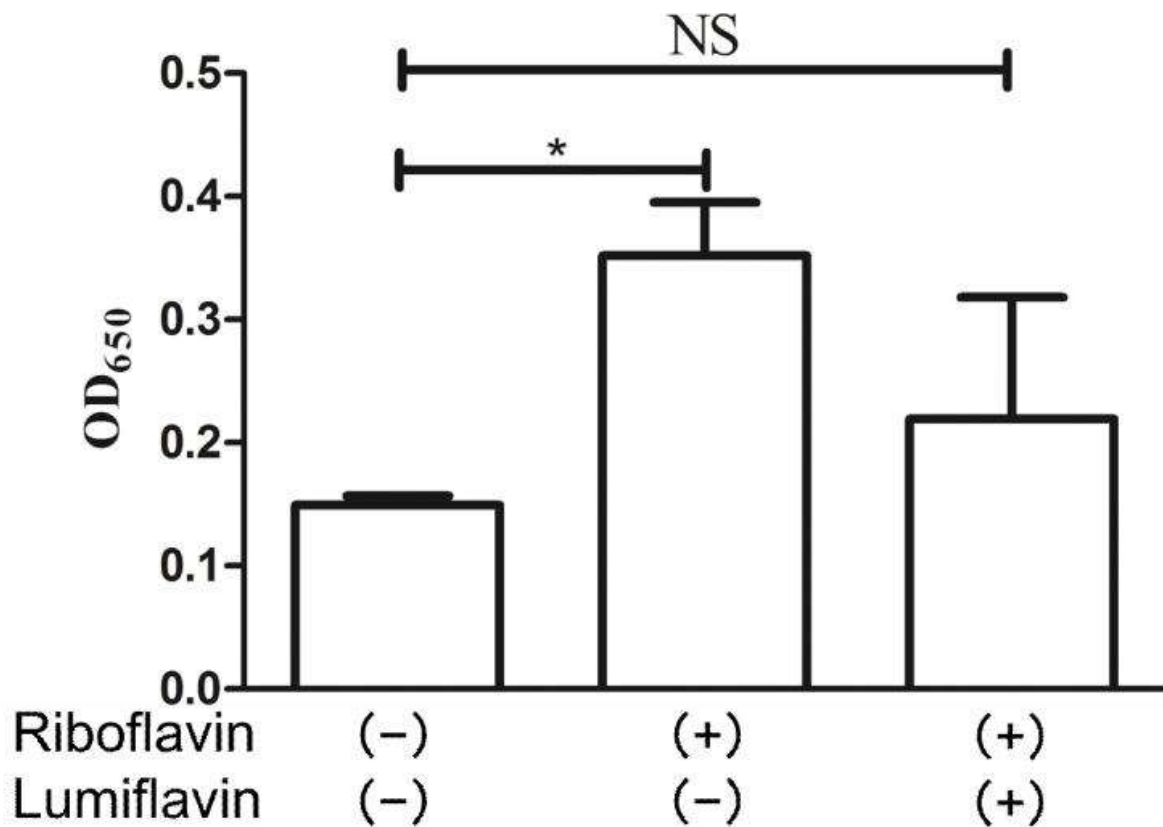


Fig 12. ルミフラビンが百日咳菌の増殖促進作用におよぼす影響
 百日咳菌東浜株を 10 µg/mL リボフラビンと 10 µg/mL ルミフラビン添加
 S/S 培地 4 mL に 0.01×10^9 cells/mL となるように植菌し、36.5°C で 4
 日間振とう (200 rpm) 培養した。培養容器は、ガラス試験管を使用した。
 百日咳菌の増殖は培養 4 日後の培養液の OD₆₅₀ で評価した (*, $p < 0.05$;
 NS, Not significant)。統計解析は、 t -検定にて行った。

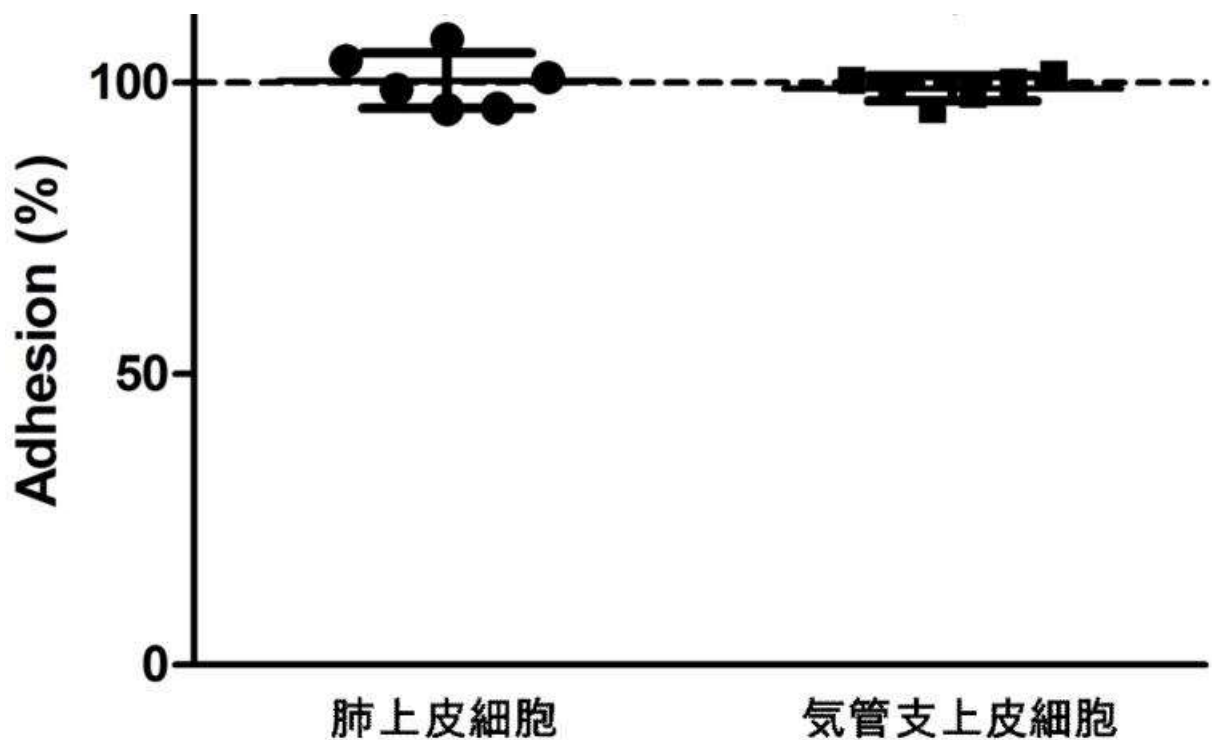


Fig 13. ルミフラビンが百日咳菌の培養細胞への付着性におよぼす影響
 百日咳菌東浜株を肺上皮細胞 (A549 細胞)、および気管支上皮細胞 (BEAS-2B 細胞) に感染させ (MOI=5)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ルミフラビン含有 HBSS (-) 中で 5%CO₂ 存在下 36.5°C で 2 時間培養後、各種細胞に付着した百日咳菌生菌数を算定した。結果はルミフラビン非添加群の付着菌数を 100% としたときの割合で示した。

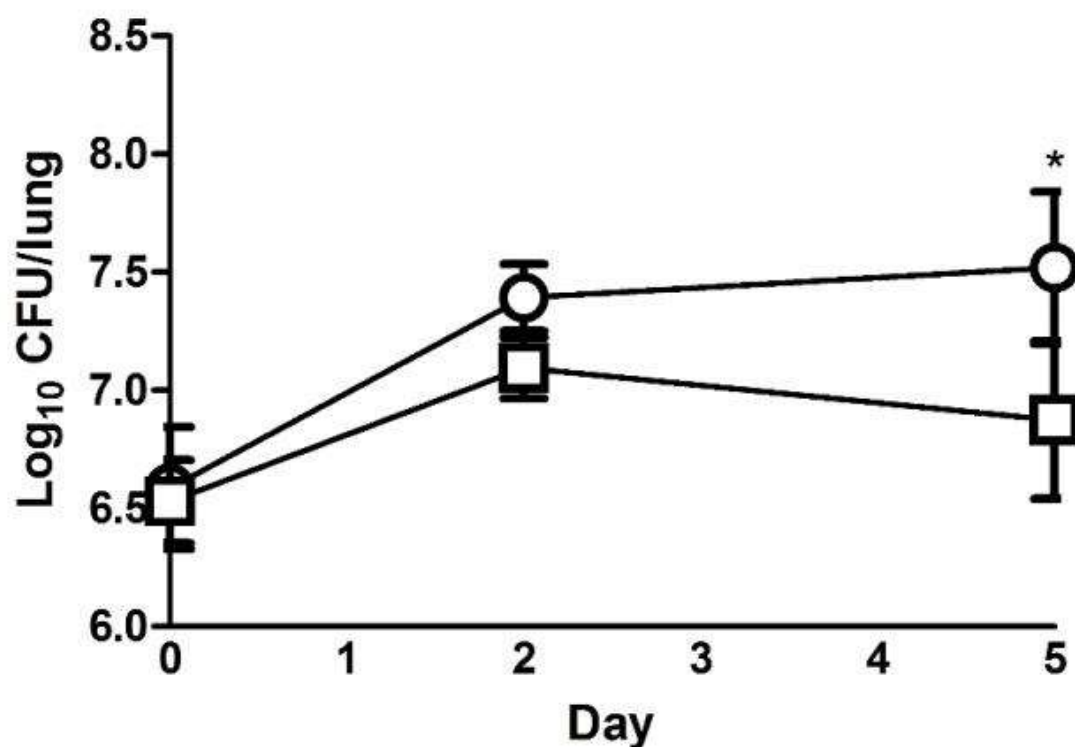


Fig 14. ルミフラビンがマウスモデルにおける百日咳菌肺内生菌数におよぼす影響

百日咳菌東浜株とルミフラビンの同時経鼻接種群(四角印)とルミフラビン非接種群(丸印)のマウス肺内生菌数の推移を示す。感染0日(2時間)、2日、および5日後の肺内生菌数を算定した。データは、各マウスの肺内生菌数の平均値±標準偏差(ルミフラビン接種群, n=2; ルミフラビン非接種群, n=3) アスタリスクは、ルミフラビン接種群とルミフラビン非接種群における肺内生菌数に有意差があることを示す($p<0.05$)。統計解析は、Two-way ANOVAにて解析後、ポストホック検定として Bonferroni 検定を行った。

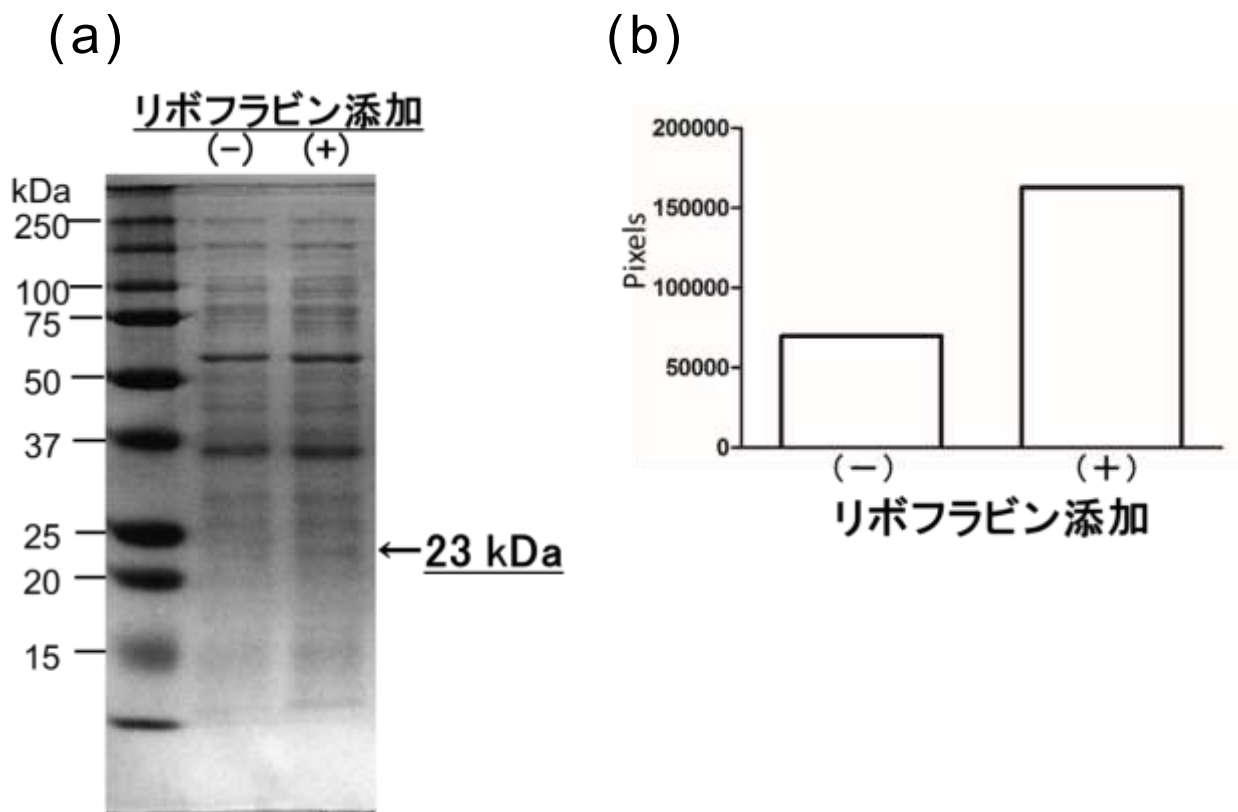
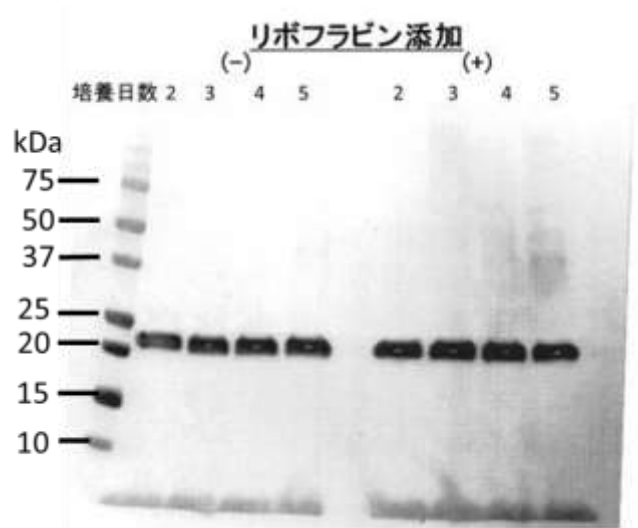


Fig 15. 百日咳菌菌体タンパク質プロファイル

百日咳菌東浜株を 10 $\mu\text{g/mL}$ リボフラビン添加 S/S 培地または、S/S 培地 5 mL に 0.01×10^9 cells/mL となるように植菌後、36.5℃で 4 日間静置培養した。培養液を遠心 (13,400 $\times g$, 30 min, 4℃) し得られたそれぞれの全菌体タンパク質のプロファイルを SDS-PAGE によって調べた (a)。各群における分子量 23 kDa のバンドの濃さをデンストメトリー解析によって数値化した (b)。

(a)



(b)

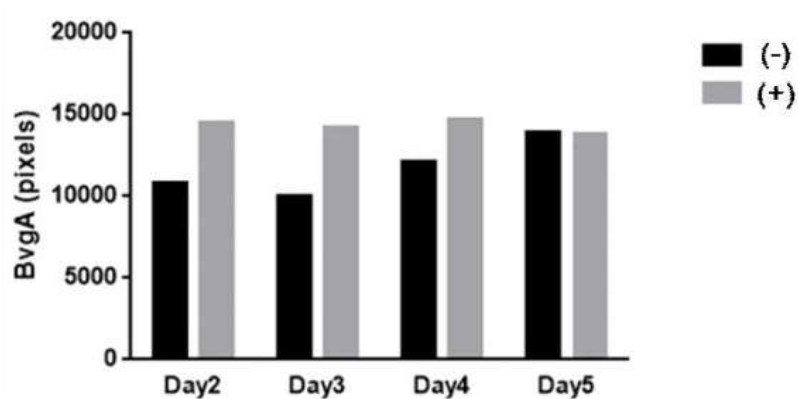


Fig 16. BvgA 産生量の半定量的解析

百日咳菌東浜株を 10 $\mu\text{g/mL}$ リボフラビン添加 S/S 培地または S/S 培地 5 mL に 0.01×10^9 cells/mL となるように植菌後、36.5°C で 2~5 日間静置培養した。百日咳菌の全菌体タンパク質は、Section 1.1.15.の方法に従って SDS-PAGE にて展開後、ニトロセルロース膜に転写し、抗 BvgA 抗体を使用したウエスタンブロット法で BvgA を検出した(a)。デンストメトリー解析によって各バンドの濃さを数値化した(b)。

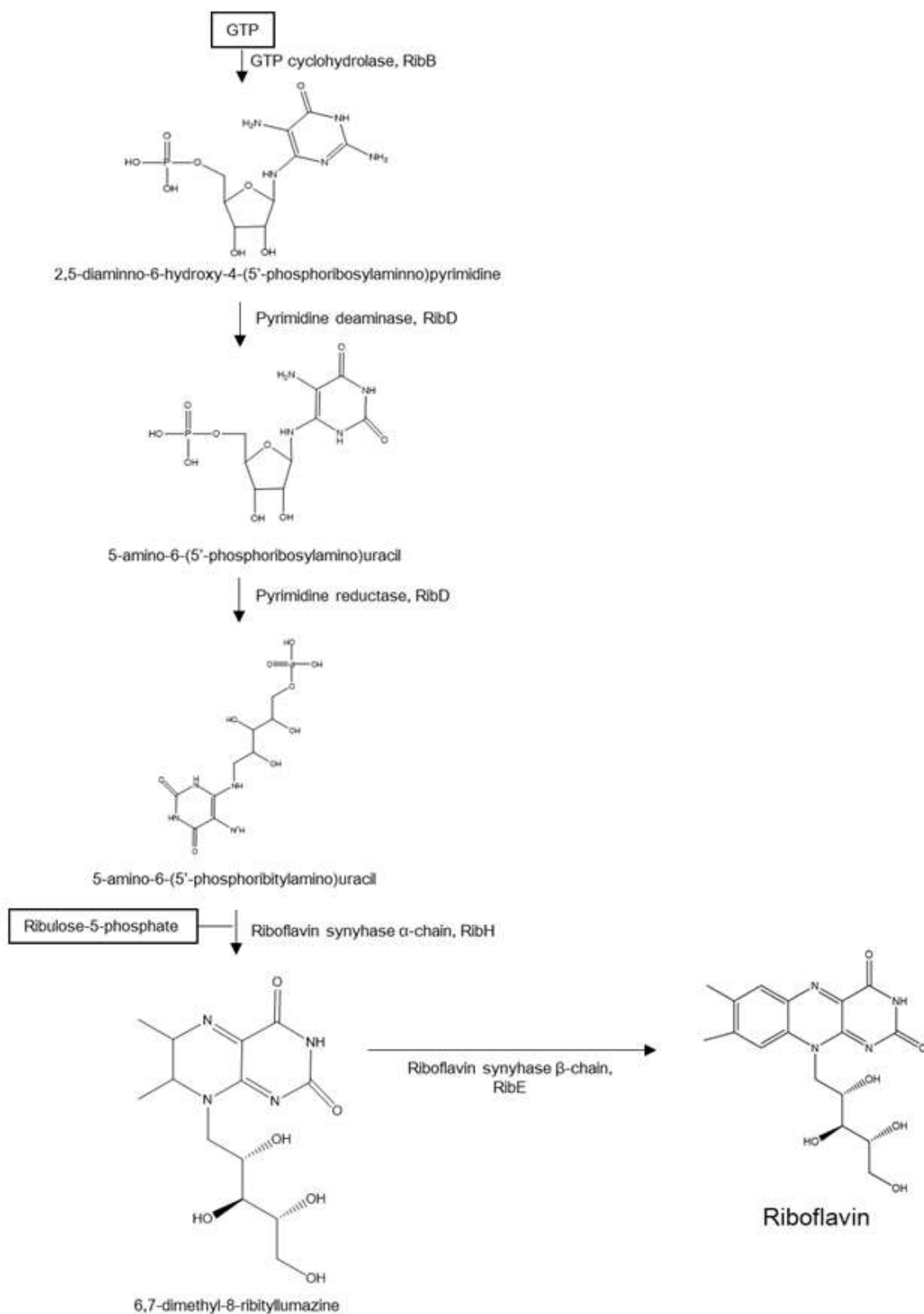


Fig 17. リボフラビンの合成経路

2. 百日咳の新規診断用抗原の探索

百日咳の診断方法の 1 つに咽頭拭い液または喀痰の培養による百日咳菌分離によるものが挙げられる。百日咳菌の培養は難しく、すべての医療機関や研究機関で分離培養を行うことは困難である [Crowcroft NS, 2002.] ため、培養法による百日咳診断は一部でしか行われていない。日本における百日咳の診断方法として多く用いられているのが、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法であり、本法は蛍光プローブを組み込んだ PCR によって百日咳菌の遺伝子を検出するものである [Kamachi K, 2006.]. LAMP 法は、迅速でかつ簡便に感度良く診断が行えるという利点を有する。特に、移行抗体が問題となり血清学的診断法では検出困難な生後 3 か月未満やワクチン接種後 1 年以内の乳児など、感染によって重症化しやすい患者の診断に対して有用である。一方、LAMP 法は、感染後の時間の経過や抗生物質投与による生菌数の減少に伴う百日咳菌 DNA の減少によって感度が低くなるという問題点を抱えている [Tozzi AE, 2005; van der Zee A, 2015.]. 百日咳菌の DNA が少ない状況でも診断可能な方法として血清学的診断法がある。現在日本においては、ELISA 法を用いた血清中の抗 PT 抗体、および抗 FHA 抗体の検出によって血清学的診断を行っている。しかし、これら 2 抗原は共に現行百日咳ワクチンの主要構成成分であるため、ワクチン接種者においては百日咳の血清診断に混乱を来すことがある。また日本における百日咳ワクチン接種率は 99% 以上であることから、この問題は深刻である。このため、百日咳の診断をより特異的かつ確実に行うためには、ワクチン成分以外の新規百日咳診断用抗原を探索、特定することが必要であると考えられる。先行研究において渡邊らは、診断用抗原として検討されてこなかったアデニル酸シクラーゼ、血清抵抗性因子である BrkA やペプチドグリカン結合タンパク質などの病原因子に対する患者血清中の抗体価を測定し、調べた病原因子の全てが感度、特異性において抗 PT 抗体価に劣ることを報告した [Watanabe M, 2006.]. すでに報告

された病原因子では新たな診断用抗原とはなり得なかったことから、その他の未同定因子に視野を広げる必要があると考えられた。

百日咳患者血清中の PT および FHA に対する抗体によって、他の抗原を認識する抗体の検出感度が低くなることが考えられたため、現行百日咳ワクチンの主要構成成分である PT と FHA に対する抗体を免疫沈降法で除去し、これら 2 抗原以外のドミナント抗原を検出することで新規診断用抗原候補タンパク質の探索を試みた。

2.1. 材料および方法

2.1.1. 菌株

ドミナントタンパク質探索のテンプレートとして百日咳菌東浜株を使用した。クローニングおよびリコンビナントタンパク質作製におけるコンピテントセルとして大腸菌 DH5 α 株と大腸菌 Rosetta2(DE3) 株を使用した。

2.1.2. 培地

2.1.2.1. BG 培地

Section 1.1.3.1 に記載の通り調製した。

2.1.2.2. S/S 培地

Section 1.1.3.2 に記載の通り調製した。

2.1.2.3. ルリア-ベルターニ (LB) 培地

LB broth(BD) 12.5 g に、超純水を加え、500 mL にメスアップした。この溶液を高圧蒸気滅菌 (15 min, 121°C) した。

2.1.2.4. ルリア-ベルターニ寒天 (LBA) 培地

LB broth(BD) 12.5 g に超純水を加え、500 mL にメスアップし、得られた溶液に、Bact Agar(BD) 7.5 g を加え、高圧蒸気滅菌 (15 min, 121°C) し 51°C に放冷後、平板培地として製した。

2.1.3. 血清

Informed consent and assent がなされた百日咳患者血清および健常人血清は、シンシナティ子供病院およびシンシナティ大学の Institutional Review Board による研究承認を受け、Weiss 博士 (シンシナティ大学) から提供された [Watanabe M, 2006.]。1998 から 2002 年に米国で収集された培養陽性の百日咳患者 20 名 (12.2 \pm 2.6 歳、範

囲 7-17 歳、咳開始から採血までの日数 49.5 ± 19.9 日、範囲 32~107 日)から得られた血清および健常成人血清はすべて連結不可能匿名化されていた。また、血清の譲受および使用用途は、北里研究所生物製剤研究所における研究倫理審査も受け、許可を受けた上で使用した(許可課題名：百日咳起因菌の感染によって誘導される特異抗体の検索)。

2.1.4. 百日咳患者血清から抗 PT 抗体および抗 FHA 抗体の除去

PT と FHA の精製は、渡邊らの方法に従って行った[Watanabe M, 2000.]。精製したタンパク質は、Dynabeads M-450 Tosylactivated (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)に結合させた。それぞれの血清を 1% (w/v)脱脂粉乳、および 0.05% (v/v) Tween 20 加 DPBS(-)で 500 倍希釈した。希釈した各血清 1 μ L あたり Dynabeads (PT-conjugated Dynabeads, および FHA-conjugated Dynabeads) 20 μ L を混合し、4℃で 1 晩インキュベート後、遠心し得られた上清をウエスタンブロッティングに使用した。

2.1.5. 2 次元電気泳動 (2D-PAGE) およびウエスタンブロット法

百日咳菌東浜株を BG 培地に塗抹して 36.5℃で 4 日間培養した。 β 溶血を示す真珠様コロニーを白金耳で釣菌し、BG 培地上に塗布して 36.5℃で 1 日間増菌培養した。培地上に増殖した百日咳菌を滅菌綿棒で集菌し、S/S 培地に 2×10^9 cells/mL となるように植菌し、36.5℃で 4 日間静置培養した。培養後得られた培養液を遠心 (13,400 $\times g$, 30 min, 4℃)して百日咳菌全菌体を回収し、SDS 可溶化後、2D-PAGE に供した。2D-PAGE は、ReadyPrep 2-D starter kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) をマニュアルに従い使用することで行った。すなわち、百日咳菌全菌体 (湿菌量 50 μ L 分) に 1 mL の 2D-rehydration-sample buffer 1 を加え溶解させ超音波を 2.5 分間照射 (200 W, 4℃) し、遠心 (13,400 $\times g$, 20 min, 4℃) して得られた上清 20 μ L をポリアクリルアミドゲルにアプライし、PROTEAN i12 IEF system and Mini-PROTEAN TGX gel system (等電点電気泳

動pH範囲, pH 3-10; ポリアクリルアミドゲル, 5-20% グラジエントゲル)によって百日咳全菌体タンパク質を分離した。超音波処理は、密閉型超音波破碎装置(UCD-300, 東湘電機, 神奈川)を使用して行った。2D-PAGEによって分離されたタンパク質を、PVDF膜に転写した。転写後のメンブレンは、1% (w/v)脱脂粉乳および0.05%(v/v)Tween20 加DPBS(-)で500倍希釈した抗PT抗体および抗FHA抗体不含ヒト血清溶液に浸し、室温で2時間インキュベートした。0.05% (v/v) Tween 20加DPBS(-)でメンブレンを洗浄後、0.05% (v/v) Tween 20加DPBS(-)で5,000倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識抗ヒトIgG抗体(horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG goat anti-body, Jackson Immunoresearch Laboratories)を添加し2時間インキュベートした。The Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate(Merck)でタンパク質の検出を行った。

2.1.6. プラスミドの構築とリコンビナントタンパク質の精製

GroEL、ATP シンターゼ β サブユニット、およびペプチジルプロリルシス-トランスイソメラーゼ(PPIase)遺伝子は、Table 13に記載のプライマーを使用してPCRによって増幅した。増幅した各種遺伝子は、pCRBlunt II-Topo(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いてクローニングした。塩基配列を確認後、遺伝子を発現用ベクタープラスミド(pET22b, Merck)に挿入し、タンパク質発現用コンピテントセル(大腸菌Rosetta2(DE3), Mreck)に導入した。

各種リコンビナントタンパク質は、Overnight express autoinduction system(Merck)を使用して大腸菌で発現させた。培養液を遠心($13,400\times g$, 15 min, 4°C)して得た菌体を、1日以上凍結し、自然解凍した後、BPER-II(Bacterial Protein Extraction Reagent-II)(Thermo Fisher Scientific)で可溶化した。遠心して得られた沈渣(インクルージョンボディ)を20倍希釈BPER-IIで3回洗浄した。インクルージョンボディーとして得られた各種組換えタンパク質を

Inclusion Body Solubilization Buffer で可溶化し、HiTrap-Ni カラム (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)を用いて精製した。得られた精製タンパク質は 0.5 M NaCl および 2 M 尿素加 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer に対して透析し、-20℃で保存した。

2.1.7. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

ヒト血清中の抗体価の測定には、ELISA を用いた。各種リコンビナントタンパク質を 50 mM carbonate buffer (pH, 9.6) で終濃度が 1 µg/mL となるように希釈した。96 well microtiter plate の各 well に抗原溶液を 100 µL ずつ加えて室温で 16 時間静置し抗原を well に固相化した。0.05% (v/v) Tween 20 加 DPBS(-) (washing buffer) で well を 3 回洗浄し、10% (w/v) 脱脂粉乳加 washing buffer (sample dilution buffer) で 50 倍希釈したヒト血清溶液 100 µL を各 well に加えて室温で 2 時間インキュベートした。Washing buffer で 3 回洗浄した後、sample dilution buffer で 5,000 倍に希釈した HRP 標識抗ヒト IgG 抗体 (horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG goat antibody; Jackson ImmunoResearch Laboratory) を 100 µL 加え室温で 2 時間静置した。Washing buffer で well を 3 回洗浄し、TMB substrate solution (Thermo Fisher Scientific) を 100 µL 加え遮光し、室温で 30 分間発色させた。2 M H₂SO₄ を 100 µL 加えて発色を停止し吸光マイクロプレートリーダーで 450 nm における吸光度を測定した。

2.1.8. プロテオミクス解析

タンパク質の同定は、日本テクノサービス (筑波) に委託した。すなわち、2D-PAGE 後、ゲルから百日咳患者血清が認識した百日咳菌菌体タンパク質のスポットを切り出し、トリプシン消化後、ESI-MS/MS によって解析した。各種タンパク質の同定は MASCOT と NCBI BLAST のデータベースを使用して行った。

2.1.9. 統計解析

異なる群間の結果から得られる統計的有意差の比較は、Graph Pad Prism ver. 6(GraphPad Software)を用いて、 t -検定にて行った。

Table 13. 使用したPCRプライマー

ターゲット遺伝子	配列
GroEL (BP3495)	Forward 5' -GGGCATATGATGGCTGCCAAGCAAGTTCTGT TTGCC-3' Reverse 5' -GGGATCCCCGCTACAGCTTCTGAGCGAGCT CC-3'
ATP synthase β subunit (BP3288)	Forward 5' -GGGCATATGGACATGAGCAACGGAA-3' Reverse 5' -GGGATCCCGGATCCTTATTGGAGT-3'
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (BP3561)	Forward 5' -GGCATATGATGAAACGCATCGCCATGCT-3' Reverse 5' -GGGATCCGCTTGGCGCTTACTGGATCT-3'

2.2. 結果

抗 PT 抗体と抗 FHA 抗体を除去した百日咳患者血清が認識する百日咳菌タンパク質の検出を試みた。百日咳菌全菌体を可溶化し、2D-PAGE で分離後、ウエスタンブロット法による解析を行った (Fig 18)。得られた 7 つのスポットをプロテオミクス解析に供したところ、百日咳患者血清が認識した百日咳菌タンパク質は、GroEL (BP3495)、ATP シンターゼ β サブユニット (BP3288) とペプチジルプロリルシス-トランスイソメラーゼ (PPIase; BP3561) であった (Table 14)。これらの組換えタンパク質を使用して、百日咳患者血清 (n=20) 中のタンパク質に対する特異抗体価と健常人の血清 (n=6) 中抗体価を比較し、診断用抗原としての有用性を考察した。その結果、百日咳患者血清中の抗 GroEL-IgG 抗体価は (平均値 \pm 標準偏差, 2.73 ± 0.73) 健常人の抗体価 (平均値 \pm 標準偏差, 0.73 ± 0.53) に比べて有意に高かった ($p < 0.00001$) (Fig 19a)。百日咳患者血清中の抗 ATP シンターゼ β サブユニット抗体価 (平均値 \pm 標準偏差, 1.68 ± 0.67) も健常人の抗体価 (平均値 \pm 標準偏差, 0.49 ± 0.35) に比べて有意に高かった ($p = 0.0004$) (Fig 19b)。さらに、百日咳患者血清中の抗 PPIase 抗体価 (平均値 \pm 標準偏差, 0.97 ± 0.73) も健常人の抗体価 (平均値 \pm 標準偏差, 0.14 ± 0.08) に比べて有意に高かった ($p = 0.0116$) (Fig 19c)。

2.3. 考察

百日咳患者の血清を使用し免疫原性を有する抗原候補タンパク質の探索をプロテオミクス解析によって行ったところ、GroEL、ATP シンターゼ β サブユニット、および PPIase の 3 種類の菌体膜タンパク質が検出された (Table 14)。

GroEL は、chaperonin 60 (Cpn60) とも呼ばれるヒートショックタンパク質であり、様々な細菌で保存されている [Narberhaus F, 2002; Chilukoti N, 2015.]。百日咳菌が産生する GroEL と他菌種が産生するホモログとのアミノ酸配列相同性を BLAST サーチによって調べた。その結果様々な菌種が産生するホモログとの間で高い相同性を示した。その一部を Table 15 に示す。GroEL はサイトゾルに存在し、タンパク質のフォールディングに関与するタンパク質である [Horwich AL, 2006.]。また、GroEL は百日咳菌の outer membrane vesicles (OMV) にも含まれるという報告があり [Raeven RH, 2015.]、Gebara らは、現行百日咳ワクチンに GroEL を添加することでワクチンの効果が増強したと報告している [Cainelli Gebara VC, 2007.]。このように GroEL は、感染防御にも関与し免疫誘導の観点からも非常に興味深いタンパク質である。一方 GroEL は、タンパク質の折り畳みに関与する他に、病原性因子としての側面も有し、宿主細胞への接着に関わるという報告や [Lewthwaite J, 1998.]、宿主免疫細胞からのサイトカイン分泌を誘導するという報告もある [Lewthwaite J, 1998; van Eden W, 2005; Cainelli Gebara VC, 2007.]。百日咳菌の宿主免疫応答におよぼす GroEL の影響を調べることは、その病原性を明らかにする手掛かりとなる可能性や百日咳の新規治療戦略を考えるうえでも非常に重要であると考えられる。

ATP シンターゼは、8 つのサブユニット (α , β , γ , δ , ϵ , a, b, および c サブユニット) で構成され、ADP とリン酸から ATP を合成する酵素である。本酵素は菌体外膜およびペリプラズムに局在し [Nakanishi-Matsui M, 2016.]、黄色ブドウ球菌において本酵素が OMV

に含まれるという報告もある [Lee EY, 2009.]. 近年 ATP シンターゼは抗生物質の新たなターゲットとして注目を集めている。しかし、ATP シンターゼは、種差間におけるアミノ酸配列の違いによる構造の多様性が創薬ターゲットとして問題になりうると考えられ、ワイドレンジな菌種に対する適応を考えた場合、菌種間で保存されている ATP シンターゼの領域の特定などが必要と考えられる [Ahmad Z, 2013.]. しかし、この多様性は、診断用抗原としてはむしろメリットである。多くの細菌が ATP シンターゼを保有しているが、そのアミノ酸配列には多様性が存在する [Nuyttens H, 2010.]. 例えば、ヒト呼吸器への感染によって気管支炎や肺炎を引き起こす *Mycoplasma pneumoniae* の ATP シンターゼ β -サブユニットは百日咳患者血清と交差抗原性を示さないことが報告されている [Nuyttens H, 2010.]. しかし、ATP シンターゼ β -サブユニットのアミノ酸配列と他の細菌が産生するホモログとのアミノ酸配列相同性を BLAST サーチによって比較したところ、百日咳菌以外の *Bordetella* 属細菌の他、*Mycobacterium abscessus subsp. abscessus* や *Achromobacter* 属細菌など多くの細菌が産生する ATP シンターゼ β -サブユニットと、高い相同性を示した (Table 16)。例えば、*M. abscessus subsp. abscessus* は非結核性抗酸菌であり、水系環境などにおいて検出される環境細菌である [Lee MR, 2015.]. しかしながら、本菌はヒトの呼吸器に感染し結核様の肺病変を引き起こすことが報告されており、近年日本における患者数の増加や抗生物質耐性株の出現が問題となっている [Lee MR, 2015; Namkoong H, 2016; Novosad SA, 2016.]. また、*M. abscessus subsp. abscessus* 感染症の臨床症状は長期間の咳を伴い、百日咳患者の臨床症状に似ている。また、*Achromobacter* 属細菌も免疫抑制状態においてヒト呼吸器などに感染することが報告されており、本菌の感染によって喀痰や咳を呈するとの報告がある [Swenson CE, 2015.].

最後に、百日咳患者血清が認識したタンパク質である PPIase が百日咳診断用抗原として有用であるか考察した。まず BLAST サーチに

よって、百日咳菌が産生する PPIase のアミノ酸配列と相同性の高いタンパク質が存在するか調べた。その結果、百日咳菌産生 PPIase のアミノ酸配列は、他の *Bordetella* 属細菌、*M. abscessus subsp. abscessus* や *Achromobacter* 属細菌など多くの細菌が産生する PPIase のアミノ酸配列と相同性が高かった (Table 17)。一方、Kale らは、*Campylobacter jejuni* が産生する PEB4 というタンパク質の構造が PPIase の構造と類似するという報告をしている [Kale A, 2011.]。しかし、百日咳菌の産生する PPIase と PEB4 のアミノ酸配列の相同性は 13.5% と低く、*C. jejuni* 由来の PEB4 が百日咳患者血清と交差抗原性を示すことは考えにくく、診断において問題なることは無いと推察された。

近年、パラ百日咳菌や *Bordetella holmesii* による百日咳の報告があり、感染動態を精査する意味においても百日咳菌を含めたこれら起因菌を鑑別する必要がある。しかし、GroEL、ATP シンターゼ β サブユニットおよび PPIase に関して、百日咳菌産生のものとパラ百日咳菌および *B. holmesii* におけるホモログとの間のアミノ酸配列相同性は高い値を示した (Table 15~17)。これらのことから、GroEL、ATP シンターゼ β サブユニットおよび PPIase を百日咳の診断用抗原として使用した場合、百日咳起因菌を鑑別することはできないものと考えられた。

以上のことから、百日咳菌が産生する GroEL、ATP シンターゼ β サブユニットおよび PPIase は、その特異性の観点から診断用抗原として使用することは難しいと考えられた。今後、百日咳菌、パラ百日咳菌、*B. holmesii* 患者血清が認識する菌体タンパク質 (特に病原因子) を比較し、より特異性の高いドミナント抗原を探索していく必要がある。また、実験室株のみならず近年野外で検出される新鮮分離株を使用して抗原探索を行うことも、その有用性を高めるうえで非常に重要であると考えられる。また、本実験では米国人血清を使用した。探索した診断用抗原を日本で適用することを考えると、今後新規診断用抗原の探索を行う際には、日本人血清を使用することが望ましいと考えられる。また、

今後の課題として、抗体価を比較する上で、患者血清と健常人血清の年齢をマッチングさせることも挙げられる。

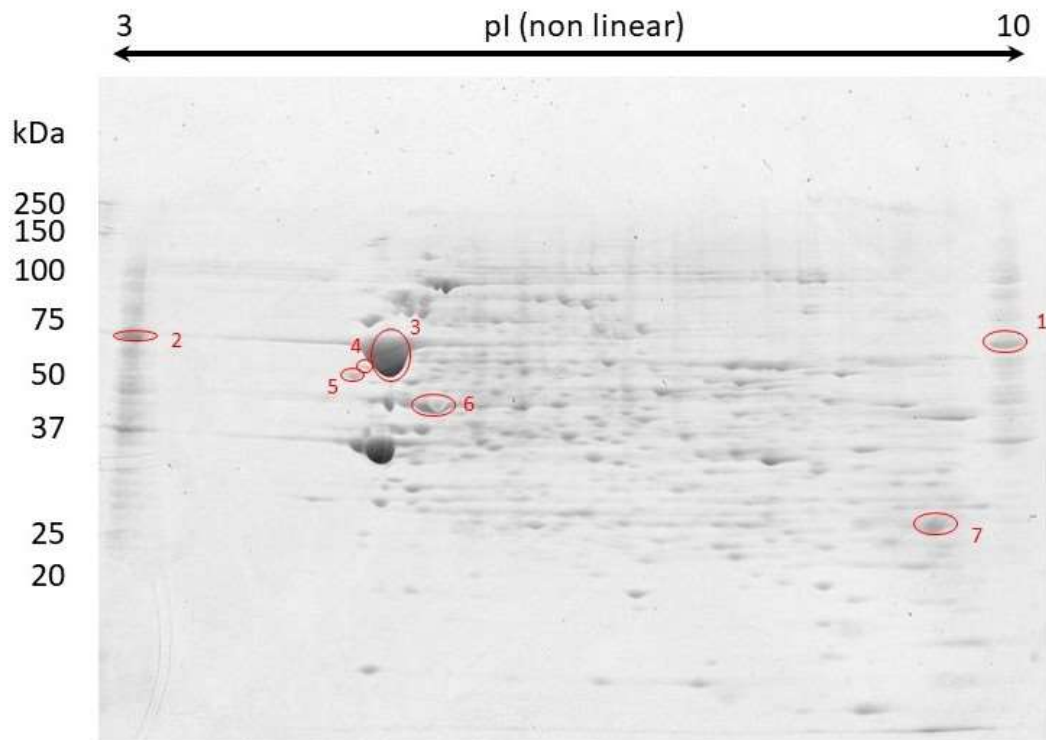


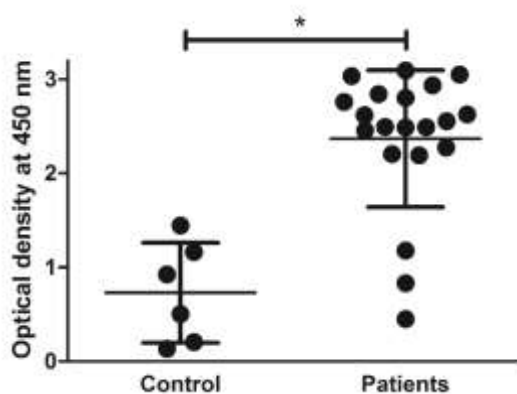
Fig 18. 百日咳患者血清が認識する百日咳菌菌体タンパク質プロファイル

百日咳菌東浜株の菌体タンパク質を 2D-PAGE で分離後、百日咳患者血清が認識するタンパク質をウエスタンブロット法によって検出した。患者血清が共通して認識した 1～7 のスポットについてプロテオミクス解析を行った。

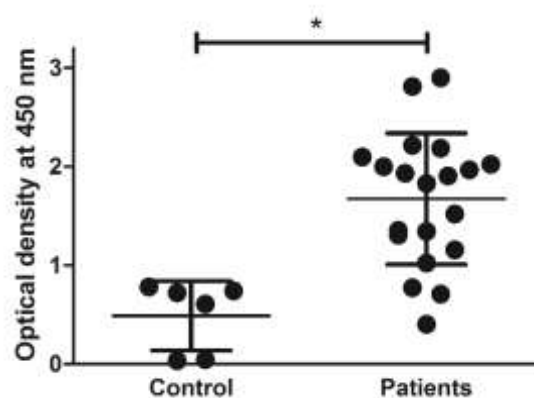
Table 14. 百日咳患者血清が認識したタンパク質のプロテオミクス解析

Spot	Protein (encoding gene)
1	GroEL (BP3495)
2	GroEL (BP3495)
3	GroEL (BP3495)
4	Not identified
5	ATP synthase β subunit (BP3288)
6	Not identified
7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPlase)(BP3561)

(a)



(b)



(c)

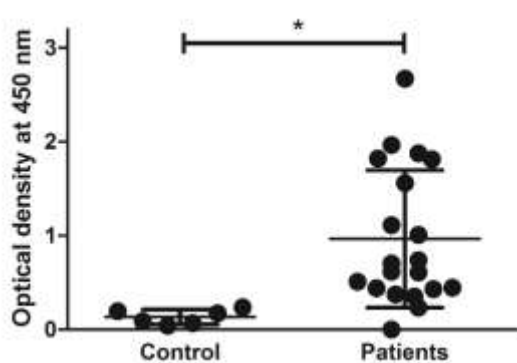


Fig 19. 百日咳患者血清中 IgG 抗体価

各パネルは、抗 GroEL 抗体価 (a)、抗 ATP シンターゼ β -サブユニット抗体価 (b)、抗 PPIase 抗体価 (c) を示す (Control, 健常人血清; Patients, 百日咳患者血清) アスタリスクは、百日咳患者血清中の特異抗体価が健常人血清中の抗体価に比べて有意な差があることを示す ($p < 0.05$)。統計解析は、 t -検定にて行った。

Table 15. 百日咳菌が産生する GroEL とのアミノ酸配列相同性

菌種	アミノ酸配列相同性 (%)
<i>B. parapertussis</i>	99
<i>Mycobacterium abscessus</i> susp. <i>Abscessus</i>	99
他 <i>Bordetella</i> 属菌種	95～99
<i>Achromobacter</i> 属細菌	95～96
<i>B. holmesii</i>	95
<i>Kinetoplastibacterium</i> 属細菌	90～91
<i>Betaproteobacterium</i> 属細菌	90
<i>Candidimonas bauzanensis</i>	90
<i>Advenella</i> 属細菌	89
<i>Pusillimonas</i> 属細菌	89

Table 16. 百日咳菌が産生する ATP synthase β subunit とのアミノ酸配列相同性

菌種	アミノ酸配列相同性 (%)
<i>B. parapertussis</i>	99
<i>Mycobacterium abscessus</i> susp. <i>abscessus</i>	99
他 <i>Bordetella</i> 属菌種	95～99
<i>Achromobacter</i> 属細菌	96～97
<i>B. holmesii</i>	97
<i>Advenella</i> 属細菌	94～95
<i>Capriavidus</i> 属細菌	92
<i>Ralstonia</i> 属細菌	92
<i>Taylorella</i> 属細菌	92
<i>Alcaligenes</i> 属細菌	91

Table 17. 百日咳菌が産生する PPIase とのアミノ酸配列相同性

菌種	アミノ酸配列相同性 (%)
<i>B. parapertussis</i>	100
他 <i>Bordetella</i> 属菌種	81～100
<i>Mycobacterium abscessus susp. abscessus</i>	99
<i>Achromobacter</i> 属細菌	83～90
<i>B. holmesii</i>	84
<i>Candidimonas</i> 属細菌	66～69
<i>Pusillimonas</i> 属細菌	61～66
<i>Alcaligenes</i> 属細菌	62～66
<i>Castellaniella</i> 属細菌	59
<i>Adbenella</i> 属細菌	54～55

結論

1. 百日咳菌が分泌する黄色色素の同定およびその役割

百日咳菌が分泌する黄色色素に関する研究は行われておらず、その同定および役割を明らかにすることで百日咳菌に関する新たな知見を得られると考えられた。百日咳菌が分泌する黄色色素の同定を行った結果、百日咳菌培養上清中から黄色を示すリボフラビンとルミクロムが検出された。本研究では百日咳菌培養上清中にドミナントに分泌されていたリボフラビンの役割について調べた。その結果、リボフラビンは百日咳菌の増殖初期段階で多く分泌され、自身の増殖を促進することが示唆された。さらに、ルミフラビンが、百日咳菌の宿主への付着および定着におよぼす影響を調べたところ、ルミフラビン接種群の方が非接種群に比べ、マウス肺内生菌数が有意に下回ることが示された。今後、リボフラビンの生物学的意義を明らかとするために、リボフラビンによる百日咳菌増殖支持の詳細なメカニズムやリボフラビンが百日咳菌の宿主抵抗性におよぼす影響などを明らかにする必要がある。

2. 百日咳の新規診断用抗原の探索

百日咳の血清学的診断は抗 PT 抗体価と抗 FHA 抗体価の測定によって行われている。血清学的診断法は百日咳菌感染後、時間の経過や抗生物質の服薬によって菌がクリアランスされた場合でも有用である。しかし、百日咳の診断に使用されている診断用抗原は共に現行百日咳ワクチンの主要成分であり、ワクチン接種者において百日咳の診断を困難にすることもある。そのため、より特異性の高い百日咳の血清学的診断法を確立するために現行ワクチン成分以外の診断用抗原となりうるタンパク質を探索する必要があった。そこで本研究では百日咳患者血清が認識する百日咳菌菌体タンパク質をウェスタンブロット法によって検出した。その結果、百日咳菌膜タンパク質である GroEL、ATP シンターゼ β -サブユニット、およびペプチジルプロリルシス-トランスイソメラーゼ

が検出された。これら3種のタンパク質は、パラ百日咳菌、*B. holmesii* や *M. abscessus* など多くの菌種と交差反応性を示す可能性があり、診断用抗原としての使用は困難と考えられた。今後、より特異性の高いドミナント抗原を探索していく必要があると考えている。

謝 辞

本研究は、北里大学大学院北里生命科学研究so医療微生物学研究室（室長：渡邊峰雄）にて行いました。本研究を遂行するにあたり貴重なご指導ご助力を賜りました北里大学大学院北里生命科学研究so熱帯病研究センター 岩月正人 先生、福岡大学薬学部微生物薬品化学研究室 佐藤朝光 先生に深く感謝申し上げるとともに厚く御礼申し上げます。

本論文を執筆するにあたり、貴重なご指導、ご助力を賜りました北里大学生命科学研究so細菌感染制御学研究室 阿部章夫 先生に深く感謝申し上げるとともに厚く御礼申し上げます。

北里大学生命科学研究so感染症学研究室 高橋孝 先生、北里大学薬学部微生物学研究室 岡田信彦 先生、第一薬科大学薬学部免疫薬品学研究室 松原大 先生、北里大学生命科学研究soワクチン学分野の皆様、免疫機能制御科学分野の皆様方に深く感謝するとともに厚く御礼申し上げます。

最後に、長きにわたり支援して下さいました両親、家族、友人、先輩、後輩方に感謝の意を表します。

平成 30 年 7 月

小田中 啓太

引用文献

1. Abbas C.A, Sibirny A.A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001; 75: 321- 60.
2. Ahmad Z, Okafor F, Azim S, et al. ATP synthase: a molecular therapeutic drug target for antimicrobial and antitumor peptides. *Curr Med Chem.* 2013; 20(15): 1956-73.
3. Becvar J, Palmer G. The binding of Flavin derivatives to the riboflavin-binding protein of egg white. A kinetic and thermodynamic study. *J Biol Chem.* 1982; 257(10): 5607-17.
4. Bereswill S, Hinkelmann S, Kist M, et al. Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the ribC gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(10): 3159-66.
5. Bodilis H, Guiso N. Virulence of pertactin-negative *Bordetella pertussis* isolates from infants, France. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(3): 471-4.
6. Bouchez V, Brun D, Cantinelli T, et al. First report and detailed characterization of *B. pertussis* isolates not expressing pertussis toxin or pertactin. *Vacctine.* 2009; 27(43): 6034-41.
7. Cainelli Gebara VC, Risoleo L, Lopes AP, et al. Adjuvant and immunogenic activities of the 73kDa N-terminal alpha-domain of BrkA autotransporter and Cpn60/60kDa chaperonin of *Bordetella pertussis*. *Vaccine.* 2007; 25(4): 621-629.
8. Chen Q, Ng V, Warfel JM, et al. Activation of Bvg-repressed genes in *Bordetella pertussis* by RisA requires cross talk from

noncooperonic histidine Kinase risk. *J Bacteriol.* 2017; 199(22): doi: e00475-17.

9. Chilukoti N, Kumar CM, Mande SC. GroEL2 of *Mycobacterium tuberculosis* reveals the importance of structural pliability in chaperonin function. *J Bacteriol.* 2015; 198(3): 486-497.

10. Costa KC, Glasser NR, Conway SJ, et al. Pyocyanin degradation by a tautomerizing demethylase inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Science.* 2017; 13; 355(6321): 170-3.

11. Cotter PA, Miller JF. BvgAS-mediated signal transduction: analysis of phase-locked regulatory mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a rabbit model. *Infect Immun.* 1994; 62: 3381-90.

12. Crowcroft NS, Britto J. Whooping cough- a continuing problem. *BMJ.* 2002; 324: 1537-38.

13. Dakora FD, Matiru VN, Kanu AS. Rhizosphere ecology of lumichrome and riboflavin, two bacterial signal molecules eliciting developmental changes in plants. *Front Plant Sci.* 2015; 6: 700.

14. Deora R, Bootsma HJ, Miller JF, et al. Diversity in the *Bordetella* virulence regulon: transcriptional control of a Bvg-intermediate phase gene. *Mol Microbiol.* 2001; 40(3): 669-83.

15. Dorji D, Mooi F, Yantorno O, et al. *Bordetella pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. *Med Microbiol Immunol.* 2018; 207(1): 3-26.

16. Garcia-Angulo VA. Overlapping riboflavin supply pathways in bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 2017; 43(2): 196-209.

17. Gerlach G, Von Wintzingerode F, Middendorf B, et al.

- Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect.* 2001; 3(1): 61-72.
18. Greenberg DP, von König CH, Heininger U. Health burden of pertussis in infants and children. *Pediatr Infect Dis J.* 2005; 24:S39-43.
19. Hassett D.J, Charniga L, Bean K, et al. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: Mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. *Infect Immun.* 1992; 60: 328- 36.
20. Hegerle N, Paris AS, Brun D, et al. Evolution of French *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* isolates: increase of *Bordetella* not expressing pertactin. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18(9): E340-6.
21. Heininger U, Cotter PA, Fescemyer HW et al. Comparative phenotypic analysis of the *Bordetella parapertussis* isolate chosen for genomic sequencing. *Infect Immun.* 2002; 70(7): 3777-84.
22. Horwich AL, Farr GW, Fenton WA. GroEL-GroES-mediated protein folding. *Chem Rev.* 2006; 106(5): 1917-30.
23. Huang R, Kin HJ, Min DB. Photosensitizing effect of riboflavin, lumiflavin, and lumichrome on the generation of volatiles in soy milk. *J Agric Food Chem.* 2006; 22; 54(6): 2359-64.
24. Kale A, Phansopa C, Suwannachart C, et al. The virulence factor PEB4 (cj0596) and the periplasmic protein Cjl289 are two structurally related SurA-like chaperones in the human pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem.* 2011; 286(24): 21254-65.
25. Kamachi K, Toyoizumi-Ajisaka H, Toda K, et al. Development

- and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(5): 1899-1902.
26. Kanthakumar K, Taylor G, Tsang KW. Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat in vitro. *Infect Immun.* 1993; 61(7): 2848-53.
27. Kasuga T, Nakase Y, Ukishima K, et al. Studies on *Haemophilus pertussis*. Part 1. Antigen structure of *H. pertussis* and its phases. *Kitasato Arch Exp Med.* 1953; 26: 121-33.
28. Kearney EB. The interaction of yeast flavokinase with riboflavin analogues. *J Biol Chem.* 1952; 194(2): 747-54.
29. Lee EY, Choi DY, Kim DK, et al. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics.* 2009; 9(24): 5425-36.
30. Lee MR, Sheng WH, Hung CC, et al. *Mycobacterium abscessus* complex infections in humans. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21(9): 1638-46.
31. Levit R, Savoy de Giori G, de Moreno de LeBlanc A, et al. Effect of riboflavin-producing bacteria against chemically induced colitis in mice. 2018; 124(1): 232-40.
32. Lewthwaite J, Skinner A, Henderson B. Are molecular chaperones microbial virulence factors? *Trend microbiol.* 1998; 6(11): 426-8.
33. Liu GY, Essex A, Buchanan JT, et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med.* 2005;

18; 202(2):209-15.

34. Liu GY, Nizet V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol.* 2009; 17(9): 406-13.

35. Mack M, Loon A, Hohmann HP. Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavolinase/flavin adenin dinucleotide synthetase encoded by *ribC*. *J Bacteriol.* 1998; 180(4): 950-55.

36. Locht C, Keith JM. Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science.* 1986; 232(4755): 1258- 64.

37. Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, et al. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 3968- 73.

38. Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, et al. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(8): 1206-13.

39. Moriuchi T, Vichit O, Vutthikol Y, et al. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis* in Cambodia determined by direct genotyping of clinical specimens. *Int J Infect Dis.* 2017; 62: 56-58.

40. Moriyama Y, Hiasa M, Matsumoto T, et al. Multidrug and toxic compound extrusion (MATE)-type proteins as anchor transporters for the excretion of metabolic waste products and xenobiotics. *Xenobiotica.* 2008; 37(7-8): 1107-18.

41. Nakanishi-Matsui M, Sekiya M, Futai M. ATP synthase from *Escherichia coli*: Mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols. *Biochim*

Biophys Acta. 2016; 1857(2): 129-140.

42. Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, et al. Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Japan(1).

Emerg Infect Dis. 2016; 22(6): 1116-17.

43. Narberhaus F. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002; 66(1): 64-93.

Nicosia A, Perugini M, Franzini C, et al. R. Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83(13): 4631- 5.

44. Novosad SA, Beekman SE, Polgreen PM, et al. Treatment of *Mycobacterium abscessus* infection. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22(3): 511-4.

45. Nuyttens H, Cyncynatus C, Renaudin H, et al. Identification, expression and serological evaluation of the recombinant ATP synthase beta subunit of *Mycoplasma pneumoniae*. *BMC Microbiol*. 2010; 10(216).

46. Otsuka N, Han HJ, Toyozumi-Ajisaka H, et al. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PLoS One*. 2012; 7(2): e31985.

47. Pawloski LC, Queenan AM, Cassiday PK, et al. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin Vaccine Immunol*. 2014; 21(2): 119-25.

48. Pelz A, Wieland K.P, Putzbach K, et al. Structure and biosynthesis of staphyloxanthin from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2005; 280: 32493- 8.

49. Petersen RF, Dalby T, Dragsted DM, et al. Temporal trends

- in *Bordetella pertussis* populations, Denmark, 1949- 2010. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(5): 767-74.
50. Phillips DA, Joseph CM, Yang GP, et al. Identification of lumichrome as a *sinorhizobium* enhancer of alfalfa root respiration and shoot growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 26; 96(22): 12275-80.
51. Plantinga A, Witte A, Li MH, et al. Bioanalytical screening of riboflavin antagonists for targeted drug delivery- a thermodynamic and kinetic study. *ACS Med Chem Lett.* 2011; 2(5): 363-7.
52. Raeven RH, van der Mass L, Tilstra W, et al. Immunoproteomic Profiling of *Bordetella pertussis* outer membrane vesicle vaccine reveals broad and balanced humoral immunogenicity. *J Proteome Res.* 2015; 14(7): 2929-42.
53. Rajamani S, Bauer WD, Robinson JB, et al. The vitamin riboflavin and its derivative lumichrome activate the LasR bacterial quorum-sensing receptor. *Mol Plant Microbe Interact.* 2008; 21: 1184- 92.
54. Remucal CK, McNeill K. Enhancement of visible-light solar water disinfection with riboflavin and its derivatives. *ACS National Meeting Book of Abstract.* 2011; 241: 111.
55. Schmidtke AJ, Boney KO, Martin SW, et al. Population diversity among *Bordetella pertussis* isolates, United States, 1935- 2009. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18(8): 1248-55.
56. Sheraz MA, Kazi SH, Ahmed S et al. Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. *Beilstein J org Chem.* 2014; 26(10): 1999-2012.
57. Swenson CE, Sadikot RT. *Achoromobacter* respiratory

infection. 2015; 12(2): 252-8.

58. Tamura M, Nogimori K, Murai S, et al. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry*. 1982; 21(22): 5516- 22.

59. Tozzi AE, Celentano LP, Ciofi degli Atti ML, et al. Diagnosis and management of pertussis. *CMAJ*. 2005; 172(4): 509-15.

60. van der Zee A, Schellekens JF, Mooi FR. Laboratory diagnosis of pertussis. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28(4): 1005-26.

61. van Eden W, Van der Zee R, Prakken B. Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(4): 318-30.

62. van Gent M, Bart MJ, van der Heide HG, et al. Small mutations in *Bordetella pertussis* are associated with selective sweeps. *PLoS One*. 2012; 7(9): e46407.

63. Venil CK, Zakaria ZA, Ahmad WA. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem*. 2013; 48(7): 1065-79.

64. Vitreschak AG, Rodionov DA, Mironov AA, et al. Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30: 3141- 51.

65. Watanabe M, Connelly B, Weiss AA. Characterization of serological responses to pertussis. *Clin Vaccine Immunol*. 2006; 13(3): 341-48.

66. Watanabe M, Nagai M, Funaishi K, et al. Efficacy of chemically cross-linked antigens for acellular pertussis vaccine. *Vaccine*. 2000; 19(9-10): 1199-203.

67. Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, et al. *Bordetella*

holmesii sp. nov., a new gram-negative species associated with septicemia. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 1- 7.

68. WHO. Pertussis vaccines WHO position paper. Online:

<http://www.who.int/wer>. 2005; No.4, 80, 29- 40.

69. Yang G, Bhuvaneswari TV, Joseph CM, et al. Roles for riboflavin in the *Sinorhizobium*-alfalfa association. *Mol Plant Microbe Interact.* 2002; 15(5) 456-62.

70. Yurgel SN, Rice J, Domreis E, et al. *Sinorhizobium meliloti* flavin secretion and bacteria-host interaction: Role of the bifunctional RibBA protein. *Mol Plant Microbe Interact.* 2014; 27: 437- 45.

71. 斎藤桃子. 日本における百日咳菌臨床分離株の動向. 2012. 修士論文.

72. 斎藤桃子. 百日咳起因菌に対する新規感染防御抗原の探索. 2017. 博士論文.