

百日咳菌が産生する物質の探索とその応用利用
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

【背景および目的】

百日咳は、特徴的なけいれん性咳発作 (whooping cough) を特徴とする上気道感染症であり、その主な起因菌は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) である。百日咳菌は免疫細胞障害作用を示す百日咳毒素 (PT) や宿主への付着に関与する繊維状赤血球凝集素 (FHA) など様々な病原因子を産生することが報告されてきた。しかし咳発作の発症機構や感染防御免疫の標的抗原など重要な部分は未だ不明である。既に発見されている百日咳菌産生物質は、多面的な解析が既に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病原性や感染防御免疫の鍵を担っ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その病原性に関与することも多く、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、バイオフィーム形成促進作用などを有することが知られている。一方、百日咳菌が分泌する色素は同定されていなかったことから、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、タンパク毒素などの直接的に生理活性を示す物質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。今まで着目されてこなかったドミナント抗原を探索することで、新しい診断用抗原として応用できる可能性がある。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検出し、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色素の同定とその機能解析

【方法】

(1) 構造解析

百日咳菌の培養上清を固相抽出カラムに通し、吸着した物質を塩酸メタノールで溶出した。溶出物を濃縮し、逆相カラムを使用した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離した。OD₂₁₀ および OD₄₅₀ で溶出物質をモニターした。黄色物質のピークに含まれた物質を、質量分析および紫

外・可視吸収スペクトル測定に供した。

(2) 黄色色素の同定

質量分析と紫外・可視吸収スペクトル測定の結果をもとにデータベース (Dictionary of Natural Products; Chapman and Hall, London, UK) 検索を行った。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、分子量、紫外・可視極大吸収波長を百日咳菌の黄色色素と比較した。

(3) 黄色色素の定量

黄色色素の定量は、クロマトグラムにおけるピーク面積を標準物質と比較して算出した。

(4) リボフラビン添加培地における培養

リボフラビンが百日咳菌の増殖におよぼす影響を調べるために、リボフラビン添加 Stainer-Scholte (S/S) 培地中で百日咳菌を培養した。菌濃度が 0.01×10^9 cells/mL となるように百日咳菌を植菌し、 36.5°C で 1~7 日間静置または振とう培養した。

(5) リボフラビン添加によって誘導される菌体タンパク質の同定

10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ リボフラビン添加 S/S 培地で百日咳菌東浜株を培養し、リボフラビンの添加によって増加した菌体タンパク質を SDS-PAGE で検出した。当該タンパク質のバンドを切り出し、ESI-MS/MS で同定した。

(6) 培養細胞への付着性

ヒト肺上皮細胞、またはヒト気管支上皮細胞をそれぞれ 6.0×10^5 cells/well となるように植え、24 時間培養した。リボフラビンの特異的阻害剤であるルミフラビンを 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加えた Hank's Balanced Salt Solutions HBSS(-) に懸濁した百日咳菌東浜株を multiplicity of infection (MOI)=5 となるように細胞に感染させた。 $5\% \text{CO}_2$ 存在下、 36.5°C で 2 時間培養後、細胞に付着した菌を回収し、細胞に付着した生菌数を算出した。

(7) マウス肺への定着試験

百日咳菌を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ルミフラビン加 DPBS (-) に懸濁し、 OD_{650} を 1.0 に調整した。この菌懸濁液を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ルミフラビン加 DPBS (-) で 30 倍希釈して攻撃用菌液とした。攻撃用菌液 50 μL をマウスに経鼻接種した。感染 0 日、2 日、5 日後に肺を摘出し肺内生菌数を算定した。

【結果および考察】

百日咳菌が分泌する黄色色素の同定とその役割

百日咳菌東浜株の培養上清から色素粗画分を抽出し、黄色色素の同定を試みた。その結果、黄色を示す物質としてリボフラビンを同定した。新鮮臨床分離株 2 株についても同様に分析したところ、両株ともにリボフラビンを分泌していたことから百日咳菌は株を問わずリボフラビンを分

泌することが示唆された。

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。これを解明するため、以下の実験を行った。

百日咳菌を培養し、培養上清中に分泌されたりボフラビンの濃度を経時的に調べたところ、菌体あたりのリボフラビン分泌は、誘導期から対数増殖前期にかけて多かった。この結果から、菌体外へ分泌されたりボフラビンは、百日咳菌の増殖初期段階で重要な役割を担っている可能性があると考えられた。このため、培養上清中に分泌されたりボフラビンが百日咳菌の増殖におよぼす影響を調べた。その結果、リボフラビンを培地に添加すると、百日咳菌の増殖が促進されることが明らかとなった。

リボフラビンを添加して培養した百日咳菌では、分子量 23 kDa のタンパク質の発現が促進していた。このタンパク質は BvgA と同定された。

ヒト肺上皮細胞およびヒト気管支上皮細胞への百日咳菌の付着性はリボフラビン阻害剤であるルミフラビンを加えても変化がなく、ルミフラビンは宿主細胞への付着に影響をおよぼさないと考えられた。一方、ルミフラビン共存下で百日咳菌をマウスに感染させ、肺内生菌数を調べたところ、ルミフラビンによって肺内生菌数は低下した。

【結論】

百日咳菌は主に誘導期および対数増殖前期に菌体外へリボフラビンを分泌し、菌体外のリボフラビンを介して百日咳菌の増殖を促進することが推察された。また、マウスへの百日咳菌感染時にルミフラビンを同時接種した場合、ルミフラビン非接種のときに比べ、肺内生菌数が低く推移することが明らかとなった。

2. 百日咳の新規診断用抗原の探索

【方法】

(1) ウエスタンブロット法

百日咳菌全菌体タンパク質を 2 次元電気泳動 (2D-PAGE) に供した。

2D-PAGE によって分離されたタンパク質を PVDF 膜に転写し、抗百日咳毒素抗体および抗繊維状赤血球凝集素抗体を除去済みの百日咳患者血清が認識するタンパク質スポットを検出した。

(2) プロテオミクス解析

ウエスタンブロット法で検出されたスポットをトリプシン消化後、ESI-ME/MS によって解析した。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。

(3) 組み換えタンパク質の調製

前項で検出されたタンパク質をコードする DNA 配列を PCR で増幅し、組み換えタンパク質として大腸菌に発現させた。

(4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

組み換えタンパク質に対する患者血清および健常人血清の抗体価は ELISA 法で測定した。50 倍希釈した血清を使用して得られた OD₄₅₀ の値を抗体価とした。

【結果および考察】

百日咳患者血清が認識する百日咳菌の菌体タンパク質として、GroEL、ATP シンターゼ β サブユニットとペプチジルプロリルシス-トランスイソメラーゼ (PPIase) を検出した。各タンパク質に対する百日咳患者血清中と健常人血清中の抗体価を比較したところ、すべてのタンパク質に対する特異抗体価は患者血清の方が健常人血清よりも有意に高く、診断用抗原として有望であることが示唆された。しかし、他菌種との交差反応性について考察するために、類似アミノ酸配列をもつタンパク質を検索したところ、検出された 3 抗原はすべて、百日咳起因菌である他 *Bordetella* 属菌種を含む多種多様な細菌が産生するホモログと高い相同性を示した。これらのことから、GroEL、ATP シンターゼ β サブユニットと 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、より有効な百日咳診断用抗原を発見すべく、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。

【結論】

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、その交差反応性が問題となり診断用抗原としては使用に堪えないものと考えられた。