

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19592

研究課題名(和文) 病原性抗酸菌によるManLAMとスフィンゴ糖脂質との結合を介した細胞内寄生機構

研究課題名(英文) The survival strategies of pathogenic mycobacteria in host phagocytes through ManLAM binding to glycosphingolipid

研究代表者

中山 仁志 (Nakayama, Hitoshi)

順天堂大学・医療看護学部・准教授

研究者番号：70514933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、抗酸菌由来リポアラビノマンナン(LAM)とヒト好中球に発現するラクトシルセラミド(LacCer)との認識応答を明らかにすることで、結核菌の細胞内寄生機構を解明することを目的とした。本研究により、LacCerがLAMの1,2-マンノース側鎖を認識すること、結核菌由来LAMが食胞上のLacCerクラスター形成を阻害することが示された。これらは新たな抗酸菌感染症治療薬開発の一助となる。

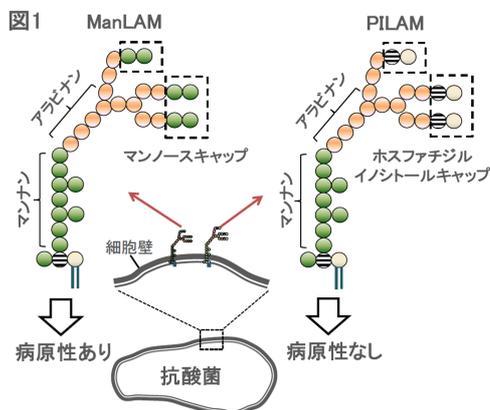
研究成果の概要(英文)：Mycobacterium tuberculosis inhibit the fusion of lysosome with phagosome. Here, we studied how lactosylceramide (LacCer) recognizes mycobacterial lipoarabinomannan (LAM). We showed that LacCer binds to 1,2-mannose side branches of LAM, which are common structures among mycobacterial species. Furthermore, our data suggest ManLAM inhibits the large cluster formation of LacCer on phagosomes, resulting in the abrogation of LacCer/Hck interaction. These results provide new insights into how pathogenic mycobacteria parasite in host phagocytes.

研究分野：生化学、糖鎖生物学、感染免疫学

キーワード：リポアラビノマンナン(LAM) ラクトシルセラミド(LacCer) 結核菌 抗酸菌 ヒト好中球 食胞成熟 ManLAM Hck

## 1. 研究開始当初の背景

病原微生物は菌体固有の分子 (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) を細胞壁に発現しており、宿主細胞へ様々な免疫応答を誘導するばかりか、それら免疫応答を巧妙に操作することも知られている。好中球やマクロファージを含む貪食細胞は、PAMPs を認識するパターン認識受容体 (Pattern-Recognition Receptor, PRR) を用いて病原微生物を細胞内へ取り込む。抗酸菌属の細胞壁には、リポアラビノマンナン (Lipoarabinomannan, LAM) と呼ばれる特徴的な糖脂質が発現しており、抗酸菌の生存に必須の分子である。LAM の構造は、その末端のキャップ構造に着目すると、病原性と非病原性抗酸菌の間で異なることが知られている。結核菌や *Mycobacterium avium* complex (MAC) などの病原性抗酸菌はマンノースキャップ型 LAM (ManLAM) を有する一方で、*M. smegmatis* などの非病原性抗酸菌は、ホスファチジルイノシトールキャップ型 LAM (PILAM) を有する (図1)。また、病原性の違いについても報告があり、例えば、マクロファージへ ManLAM をコートしたビーズを貪食させると、殺菌酵素を豊富に含むリソソームが食胞に融合できない。反対に、PILAM では ManLAM のような抑制作用は認められない (図1)。このように、病原性抗酸菌は ManLAM を利用して、貪食細胞による殺菌を回避すると考えられるが、その詳細な分子機構は不明である。



スフィンゴ糖脂質であるラクトシルセラミド (LacCer) は、好中球や樹状細胞に豊富に発現しており、コレステロールや様々なシグナル伝達分子と共にマイクロドメイン (リピドラフト) を形成している。これまでに研究代表者らは、MAC や LAM が LacCer と特異的に結合すること、MAC を含む食胞において LacCer とシグナル伝達分子 Hck の会合を阻害することで、リソソーム融合を抑制することを明らかにした。このような背景のもと、研究代表者は、『好中球やマクロファージが抗酸菌を貪食する過程において、ManLAM が LacCer へ直接結合し LacCer を介したシグナル伝達経路に影響を与え、抗酸菌による細胞内寄生を引き起こすのではないか』という仮説を立てた。このような仮説をもとに、研究代表者は、特に、『LacCer がどのような LAM 構造を認識するのか』、『病原性抗酸菌の有する ManLAM がどのように LacCer と Hck の会合に影響を与えるのか』を明らかにするべく、本研究を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、LacCer による ManLAM の認識応答及び、食胞膜上の LacCer と Hck との会合抑制に ManLAM がどのように関与するのか、また、LacCer を介した食胞とリソソームの融合に ManLAM がどのように関与するのかを明らかにすることを目的とした。このような検討を行うことで、ヒト自然免疫担当細胞、特に好中球における病原性抗酸菌の細胞内寄生機構へ、ManLAM とスフィンゴ糖脂質である LacCer との相互作用がどのような影響を与えているのかを詳しく、最終的にはこれらの相互作用を標的とした薬剤の開発に結びつけることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1: 各抗酸菌由来 LAM とスフィンゴ糖脂質との結合実験

本実験では、結核菌、MAC、*M. smegmatis* 由来の LAM、*M. smegmatis* の突然変異株であり LAM の  $\alpha$ 1,2 マンノース側鎖を欠失した MSMEGΔ4247 株由来 LAM を用いた。また、精製品をピオチン化することで結合実験用の試料とした。結合実験は、96 ウェルプレート上に LacCer やガングリオシド GM1 を含む種々のスフィンゴ糖脂質をコートし、それらにピオチン化した LAM をインキュベートさせることで行った。このような実験を行うことで、LacCer が LAM のどのような構造を認識するのかを検討した。

## 2: LAM コートビーズの貪食実験

本実験では、結核菌、MAC、*M. smegmatis*、 $\alpha$ 1,2 マンノース側鎖を欠失した MSMEGΔ4247 株由来 LAM 等をコートしたポリスチレンビーズを作成し、それらに対するヒト末梢血由来好中球の貪食能を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。また、各抗酸菌由来 LAM を好中球へ添加し、LacCer を介した貪食反応に中心的な役割をしている情報伝達分子 Lyn の活性化についても検討した。

## 3: 食胞における分子局在解析

LAM コートビーズ貪食後の好中球を固定後、リソソームマーカーである LAMP3 に対する抗体を用いて免疫染色し、超解像 (STED) 顕微鏡を用いて食胞周囲におけるリソソーム局在を解析した。また、食胞へのリソソームの融合率を算出した。さらに、好中球へ結核死菌と非病原性抗酸菌を貪食させた後、細胞を固定し、抗 LacCer 抗体及び抗 Hck 抗体による免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による解析を行った。一方ビーズを含む食胞を生化学的に分離するために、ヒト好中球へ LAM コートポリスチレンビーズを貪食させた後、細胞を  $N_2$  cavitation 法により破碎し、細胞内から食胞 (ファゴゾーム) を Nycodenz 密度勾配遠心法により分離した。また、分離ファゴゾームを界面活性剤入りの Lysis buffer に溶解し、ダウンスホモゲナイザ

ーにより破碎した。次にこれらの溶液から抗 LacCer 抗体を用いて免疫沈降を行い、磁気ビーズによるプルダウンを行った。さらに、免疫沈降物に対して、Hck などの情報伝達分子に対する特異抗体によるウェスタンブロットティング解析を行った。

## 4 . 研究成果

本研究では、抗酸菌の病原性の有無に係らず、スフィンゴ糖脂質である LacCer が LAM の  $\alpha$ 1,2 マンノース側鎖を特異的に認識することを明らかにした。さらには、様々な抗酸菌由来 LAM をコートしたポリスチレンビーズを貪食させることで、非オプソニン条件下における LacCer を介した抗酸菌の貪食は LAM の  $\alpha$ 1,2 マンノース側鎖を介して起こることが分かった。また、 $\alpha$ 1,2 マンノース側鎖を欠失した LAM は、好中球における Lyn のリン酸化をほとんど誘導しなかったため、抗酸菌の貪食には LacCer と会合した Lyn が重要な働きをしていることが示唆された。一方、抗酸菌を貪食させた後の食胞における分子局在解析を行うと、病原性抗酸菌由来 PILAM をコートしたビーズへのリソソーム融合率が約 80%であるのに対して、病原性抗酸菌由来の ManLAM をコートしたビーズへのリソソーム融合率は 30%程度であることが分かった。また、食胞を生化学的に分離し抗 LacCer 抗体による免疫沈降を行うと、PILAM コートビーズを含む食胞からは Hck が共沈されリン酸化されるのに対して、ManLAM コートビーズを含む食胞からは Hck は回収されないことが分かった。さらには、ヒト好中球へ非病原性抗酸菌と結核死菌を貪食させた後、各菌を含む食胞における LacCer と Hck の局在を共焦点レーザー顕微鏡により解析したところ、非病原性抗酸菌を含む食胞においては LacCer と Hck はよく共局在していたのに対して、結核菌を含む食胞においては、両分子は共局在していなかった。

今後は、LacCer と ManLAM との間の結合の様式を構造学的に解析し、さらに、ManLAM が特異的に抑制する LacCer 関連シグナル伝達分子を網羅的に解析することで、ManLAM が標的とする LacCer 関連シグナル伝達経路をさらに詳しくにする予定である。このような構造学的・生化学的分子基盤を明らかにすることによって、新規病原性抗酸菌感染症治療薬開発に結びつくことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Nakayama H, Kurihara H, Morita YS, Kinoshita T, Mauri L, Prinetti A, Sonnino S, Yokoyama N, Ogawa H, Takamori K, and Iwabuchi K. Lipoarabinomannan binding to lactosylceramide in lipid rafts is essential for the phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *Sci Signal*, 2016 Oct 11;9(449):ra101.

DOI: 10.1126/scisignal.aaf1585.

Sueyoshi K, Sumi Y, Inoue Y, Kuroda Y, Ishii K, Nakayama H, Iwabuchi K, Kurishita Y, Shigemitsu H, Hamachi I, Tanaka H. Fluorescence imaging of ATP in neutrophils from patients with sepsis using organelle-localizable fluorescent chemosensors. *Ann Intensive Care*. 2016 Dec;6(1):64.

DOI: 10.1186/s13613-016-0175-z.

Iwabuchi K, Nakayama H, Oizumi A, Suga Y, Ogawa H, Takamori K. Role of Ceramide from Glycosphingolipids and Its Metabolites in Immunological and Inflammatory Responses in Humans. *Mediators Inflamm*. Volume 2015 (2015), Article ID 120748, 10 pages.

DOI: 10.1155/2015/120748.

中山仁志、岩淵和久: スフィンゴ糖脂質の脂質ラフトの構造と機能: ラクトシルセラミドの脂質ラフトを介した自然免疫応答, *生化学* 第 89 巻第 1 号, pp. 1-11, 2017.

DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2017.890062.

[学会発表](計11件)

Iwabuchi K, Nakayama H. Role of Lactosylceramide-enriched lipid rafts in innate immune response of human phagocytes. 12th International Conference on Innate Immunity. Chania, Greece June 2015  
Hitoshi Nakayama, Noriko Yokoyama and Kazuhisa Iwabuchi: Human neutrophils phagocytose mycobacteria through interactions between LacCer and a1,2-monomannose side branches of LAM. The Society For Leukocyte Biology's 49th Annual Meeting and "Neutrophil 2016" Verona, Italy September 2016

Kazuhisa Iwabuchi, Hitoshi Nakayama, Noriko Yokoyama and Kumiko Ishii: Organization and immunological functions of Lactosylceramide-enriched lipid rafts. The Society For Leukocyte Biology's 49th Annual Meeting and "Neutrophil 2016" Verona Italy September 2016

中山仁志、横山紀子、岩淵和久: 病原菌由来細胞壁成分により誘導されるラクトシルセラミドを介した自然免疫応答. 第 34 回日本糖質学会年会、東京、平成 27 年 8 月

中山仁志、横山紀子、岩淵和久: 結核菌による LacCer を介した食胞成熟回避機構について. 第 9 回セラミド研究会、東京、平成 28 年 10 月

〔その他〕

ホームページ：

[http://www.nurs.juntendo.ac.jp/education/teacher/profile\\_nakayama.html](http://www.nurs.juntendo.ac.jp/education/teacher/profile_nakayama.html)

[http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/kankyo\\_igaku/](http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/kankyo_igaku/)

本研究に関するプレスリリース：

<http://www.juntendo.ac.jp/news/20161011-01.html>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

中山 仁志 (Nakayama, Hitoshi)

順天堂大学・医療看護学部・准教授

研究者番号：70514933