

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15150

研究課題名(和文)らい菌が潜伏する宿主細胞に蓄積される特定のTAGを制御する細胞内メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the intracellular mechanism that controls TAG accumulated in host cells containing *Mycobacterium leprae*

研究代表者

谷川 和也 (TANIGAWA, KAZUNARI)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：10443110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、本研究では、らい菌感染によって誘発される宿主細胞の脂質代謝の変化について、細胞内脂質組成変化とそのメカニズムについて検討を行なった。らい菌感染後のヒト培養マクロファージTHP-1細胞においてTAG産生が特異的に誘導されることをHPTLCにより、示した。また、 $[^{14}C]$ stearic acidを使用することで、新規合成されたTAGがらい菌に取り込まれることを明らかにした。さらに、TAG蓄積に一致して、de novo TAG合成の重要な酵素である宿主GPAT3の発現が有意に増加した。作製したGPAT3 KOでは、宿主細胞におけるらい菌の数、および生存率が劇的に低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ハンセン病は未だ世界で年間20万人以上の新規患者が発症する重要な感染症である。WHOが推進する多剤併用療法(MDT)によって菌の排除は望めるが、薬剤耐性菌も出現しており、経過中や治療によって死滅した菌体成分に対する急性のアレルギー性反応である「らい反応」が出現するなど、治療が困難な疾患である。そのため、抗菌薬に変わるマイルドな治療戦略が求められている。その点に関して、我々は、宿主細胞内の環境をターゲットにした戦略を提案するものである。すなわち、宿主への脂質の蓄積をコントロールすることで宿主由来の免疫応答を生かして排除することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to determine the intracellular lipid composition and underlying mechanisms for changes in host cell lipid metabolism induced by *M. leprae* infection. Using HPTLC, we demonstrated specific induction of TAG production in human macrophage THP-1 cells following *M. leprae* infection. We then used $[^{14}C]$ stearic acid tracing to show incorporation of this newly synthesized host cell TAG into *M. leprae*. In parallel with TAG accumulation, expression of host GPAT3, a key enzyme in de novo TAG synthesis, was significantly increased in *M. leprae*-infected cells. CRISPR/Cas9 genome editing of GPAT3 in THP-1 cells (GPAT3 KO) dramatically reduced accumulation of TAG following *M. leprae* infection, intracellular mycobacterial load, and bacteria viability. These results together suggest that *M. leprae* induces host GPAT3 expression to facilitate TAG accumulation within macrophages to maintain a suitable environment that is crucial for intracellular survival of these bacilli.

研究分野：細菌学

キーワード：ハンセン病 らい菌 抗酸菌 脂質 triacylglycerol lipid droplet

1. 研究開始当初の背景

ハンセン病は未だ世界で年間 20 万人以上の新規患者が発症する重要な感染症である。WHO が推進する多剤併用療法 (MDT) によって菌の排除は望めるが、薬剤耐性菌も出現しており、経過中や治療によって死滅した菌体成分に対する急性のアレルギー性反応である「らい反応」が出現するなど、治療が困難な疾患である。

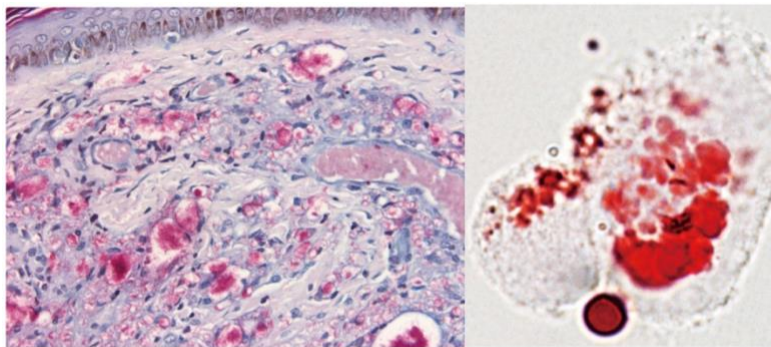


図1らい菌は宿主に蓄積した脂質に覆われて生存する
ハンセン病皮膚において、らい菌は脂質を取り込んで泡沫化した組織球に局在し(A)、
ヒト培養マクロファージにらい菌を感染させると油滴を形成し、菌はその中に観察される(B)。

らい菌は、ゲノム中に偽遺伝子や非翻訳領域が占める割合が非常に高く、特に脂質代謝に寄与する遺伝子が少ないことから細胞壁の複雑な脂質合成を含め宿主に対する依存性が強いと考えられている。一方、宿主として利用されるマクロファージは、大量の脂質が蓄積されることから (図 1)、らい菌の細胞壁脂質合成に利用されていると考えられるが、その証明はされていない。申請者等は、独自に確立した *in vitro* の培養モデルの系で脂質蓄積メカニズムや、その脂質成分が感染や生存に与える影響について研究を行ってきた。すなわち、脂質ホメオスタシスの調節を担う adipose differentiation-related protein (ADRP), perilipin または hormone-sensitive lipase (HSL) の発現調節を介して脂質蓄積を維持するメカニズムが存在することを明らかにした (Tanigawa *et al*, *FEMS Microbiol Lett* 2008, Tanigawa *et al*, *Microb Pathog* 2012)。また、HPTLC 及び LC-MS/MS 解析によって、蓄積される脂質が TAG であることを示し、それには宿主側の TAG 合成の律速酵素である glycerol-3-phosphate acyltransferase 3 (GPAT3) の発現が誘導されることを示している。これらのことから、らい菌は宿主遺伝子を利用することで脂質を蓄積するという自身にとって都合の良い環境を構築していると考えられた。しかしながら、GPAT3 を介した脂質の蓄積が、らい菌の寄生の成立や増殖に与える影響については分かっていない。

2. 研究の目的

らい菌の細胞壁成分には哺乳動物には見られない様々な脂質分子種が含まれており、近年炭素数が 80 にもなる極長鎖脂肪酸が含まれることも報告されている (J Biol Chem 281(7):3866-3875, 2006)。これらの特殊な成分は種々の生物活性を有することから宿主感染細胞に影響を与える可能性が高い。これまでに申請者等はらい菌感染細胞のファゴゾーム内に速やかに脂質が蓄積され、その機序として宿主遺伝子である ADRP, perilipin や HSL が利用されていることを明らかにしてきたが (Tanigawa *et al*, *FEMS Microbiol Lett* 2008, Tanigawa *et al*, *Microb Pathog* 2012)、蓄積する脂質の成分や合成機序については全く不明である。したがって、本研究によってらい菌由来の成分が惹起する新たな感染メカニズムを解明できると考えている。本研究の最終目標は、らい菌が利用する細胞内の栄養源とその合成機構を明らかにし、らい菌感染や潜伏への影響を評価することである。それを応用することによって、ハンセン病の分子標的薬に利用したいと考えている。そのために、これまでの検討実験で得られたらい菌感染に伴って蓄積する特異的な TAG に関して、GPAT3 の関与を明確にする。

3. 研究の方法

1. 宿主に蓄積される脂質 (TAG) がらい菌に利用されるかについての検討

感染後に蓄積される TAG を実際にらい菌が取り込むか否かを評価する。すなわち、らい菌感染後に ^{14}C -ステアリン酸を添加して培養する。その後、継時的にらい菌を単離し、菌由来の脂質を Bligh-Dyer によって抽出し、TLC で定性的な評価を行う。コントロールとして加熱して失活した死菌を用いる。

2. CRISPR-Cas9 を用いたヒト培養マクロファージにおける GPAT3 KO 細胞の構築

予備検討によって、らい菌をヒト培養マクロファージである THP-1 細胞に感染させると、GPAT3 の発現が促され、ある特定の TAG 分子種が顕著に増加する予備データを得ている。そこで、そのような分子種が GPAT3 を介した増加であることを証明するために、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集技術を利用し GPAT3 の欠損株を作製する。確認方法はウエスタンブロッティング、および ^{14}C -ステアリン酸、 ^{14}C -アラキドン酸の取り込みで活性を評価する。

3. GPAT3 KO 細胞を用いたらい菌感染と脂質蓄積への影響

作製した GPAT3 欠損株を用い、らい菌の感染効率の評価を行う。すなわち、FITC 標識したら

い菌を MOI (multiplicity of infection) をふり欠損株および WT 細胞に添加する。細胞内に取り込まれファゴソーム内に安定して局在するらい菌を蛍光顕微鏡で観察することで Titer (力価) を比較する。同様に FACS でも定量的に評価する。

4. らい菌の細胞内生存における GPAT3 の役割の検討

GPAT3 を介した脂質蓄積がらい菌の生存に重要か否かを評価する。我々は、らい菌生菌に高発現する pseudogene を見出していることから (Suzuki K *et al*, FEMS Microbiol lett, 2006)、野生株および欠損細胞株に感染させたらい菌の経時的な pseudogene の発現変化を RT-PCR で解析を行い生存率として評価する。

4. 研究成果

(1). 中性脂質の分離に適した high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) 条件を使用して、らい菌に感染した THP-1 細胞の脂質成分を評価した。加熱したらい菌 (死菌)、latex beads、ペプチドグリカンに対照として使用した。コレステロールエステル (ChoE)、トリアシルグリセロール (TAG)、脂肪酸 (FA)、コレステロール (Cho)、ジアシルグリセロール (DAG)、モノアシルグリセロール (MAG)、およびリン脂質 (PL) の位置は、RF 値との相対値によって決定された。その結果、TLC プレート上に視覚化された TAG の絶対量が、らい菌生菌感染後にのみ顕著に増加した (Fig. 1A)。一方、加熱死菌によっても一時的に増加されたが、24 時間以内に元のレベルに戻った (Fig. 1A)。また、latex beads やペプチドグリカンで処理された細胞は、TAG 量に変化は見られなかった (Fig. 1A)。感染前にらい菌由来の脂質では TAG が検出されなかったため (Fig. 1B)、観察された脂質は宿主細胞由来であることが示唆された。各脂質の強度を測定し、すべての脂質タイプ間の TAG の相対的な割合を計算した結果、脂質全体に占める TAG の割合も、らい菌感染によって有意に増加しました (Fig. 1C)。PL、FA、Cho、ChoE などの他の脂質成分は、らい菌に感染した後でも変化は見られなかった (data not shown)。これらの結果は、宿主マクロファージにおいて TAG がらい菌感染によって特異的に誘導される重要な脂質であることを示唆している。

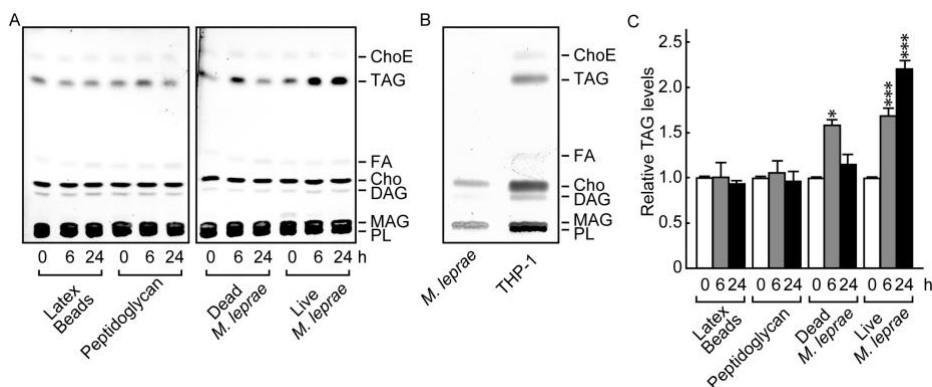


Fig. 1 *M.leprae* promoted TAG accumulation in THP-1 cells

(2). Glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) は、TAG 生合成の律速酵素であり、GPAT1-4 の 4 つのアイソフォームが存在する。らい菌に感染した宿主細胞におけるこれらの GPAT アイソフォームの潜在的な関与を調べるために、qRT-PCR を使用して、らい菌感染後の THP-1 細胞における GPAT1-4 の mRNA 発現レベルを調べた。4 つのアイソフォームのうち、らい菌感染後、MOI10 および 20 で GPAT3 mRNA のみが増加した (Fig. 2A)。GPAT3 mRNA の増加は、らい菌感染後 6 時間で明らかであり、感染後 48 時間まで増加した (Fig. 2B)。Western blotting によって、GPAT3 タンパク質発現も増加することが示された (Fig. 2C)。GPAT3 発現の増加がらい菌感染に特異的であるか、あるいは食作用やマクロファージ活性化に伴う非特異的作用によるものかを明らかにするために、死菌、latex beads、ペプチドグリカンの効果を調べた。Latex beads、ペプチドグリカンとともに GPAT3 発現に変化は見られなかったが、死菌において感染後 6 時間で GPAT3 mRNA レベルが一時的に増加し、24 時間で元のレベルに戻った (Fig. 2D)。らい菌生菌による GPAT3 の持続的な誘導と死菌による GPAT3 の一時的な発現誘導は、Fig. 1 に示す細胞内 TAG 蓄積の変化と一致しており、GPAT3 が TAG 量の増加を仲介する重要な分子であることを示唆している。

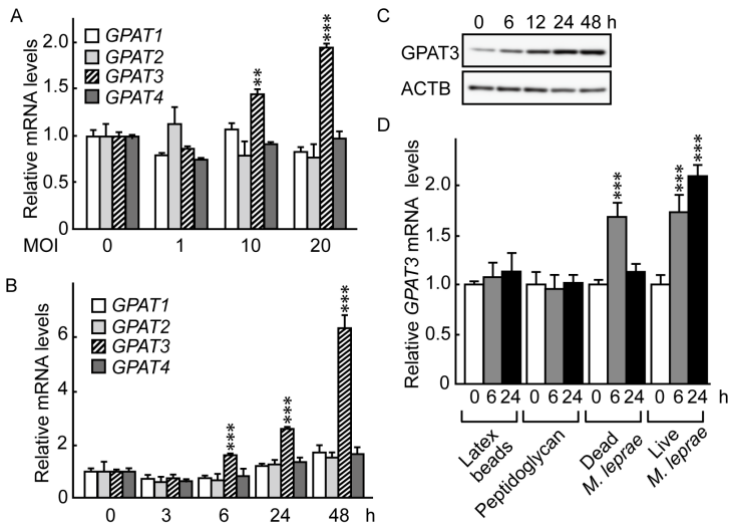


Fig. 2 Glycerol-3-phosphate acyltransferase 3 (GPAT3) expression was induced in THP-1 cells following *M.leprae* infection

(3). らい菌による TAG の蓄積に対する GPAT3 の効果をさらに評価するために、CRISPR / Cas9 システムを使用して GPAT3 KO THP-1 細胞を作製した。3 つの KO クローンのうち、exon 1 に 16 ヌクレオチドの欠失があるクローンをその後の実験に使用した。この欠失は、両方の対立遺伝子にフレームシフトを伴う GPAT3 のホモ接合性欠失をもたらした (Fig. 3A)。KO クローンにおける GPAT3 タンパク質の欠失は、western blotting によって確認された (Fig. 3B)。次に、LipidTOX 染色を使用してらい菌感染による野生株および GPAT3 KO 細胞の脂肪滴形成に対する影響を比較し (Fig. 3C)、蛍光強度を定量化した (Fig. 3D)。らい菌感染後、野生株では多数の脂肪滴が観察されたが、GPAT3 KO 細胞では約 80%減少した。GPAT3 と GPAT4 はどちらも同様の機能を共有するミクロソーム酵素であるが、らい菌感染後も GPAT3 KO 細胞における GPAT4 の発現は変化せず、らい菌感染に応答する主要なアイソフォームが GPAT3 であることを確認している。さらに、らい菌が脂肪滴中の TAG を利用するかどうかを評価するために、 $[^{14}C]$ ステアリン酸で THP-1 細胞の代謝標識を行い、TAG の de novo 合成を追跡しました。らい菌を野生株および GPAT3 KO 細胞を感染してから 24 時間後、 $[^{14}C]$ ステアリン酸を添加し、細胞を 16 時間培養した。その後、菌由来脂質を抽出し、TLC プレートで分離した。らい菌感染細胞から分離された菌数は、らい菌特異的 hsp70 遺伝子の発現で評価した (Fig. 3E)。 $[^{14}C]$ 由来 TAG は、野生株から単離したらい菌のみ検出され、GPAT3 KO 細胞からは検出されなかった (Fig. 3F)。また、らい菌生菌を、PMA 処理した THP-1 細胞から調製した脂質に富んだ細胞溶解物と混合し、非特異的な菌への結合を評価した。しかしながら、 $[^{14}C]$ シグナルは検出されなかった (Fig. 3G)。このことから、TAG はらい菌への非特異的結合が重要でないことを示唆している。これらの結果は、らい菌が宿主マクロファージにおいて GPAT3 依存的に TAG の de novo 合成を誘導し、らい菌によって利用されることを示唆している。

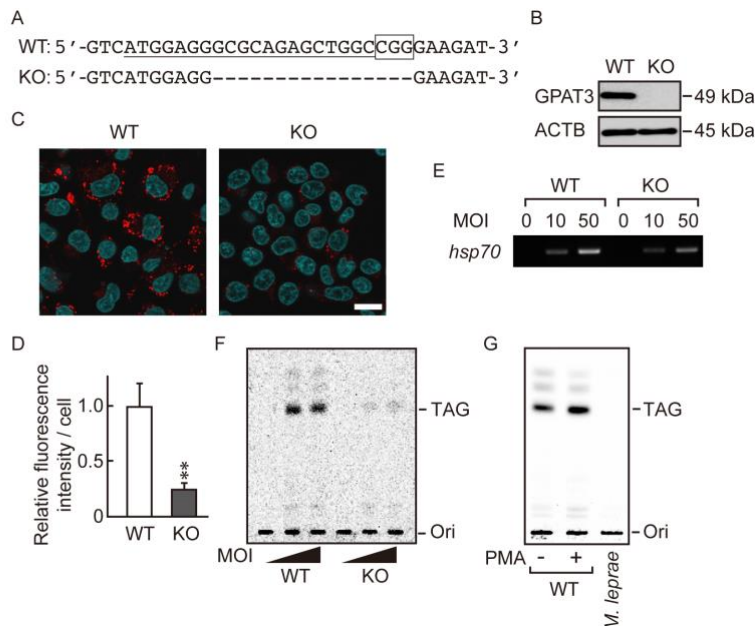


Fig.3 *M. leprae* induces formation of lipid droplets through GPAT3

(4). 共焦点レーザー走査顕微鏡を使用した蛍光イメージングにより、らい菌と脂肪滴の両方の細胞内局在を可視化した (Fig. 4A)。それぞれ 30 個の細胞をカウントし、野生型および GPAT3 KO 細胞の平均および標準偏差を示した (Fig. 4B)。感染後、らい菌は細胞内の脂肪滴に局在したが、GPAT3 KO 細胞ではらい菌および脂肪滴が明らかに減少した。また、FACS により野生株および GPAT3 KO 細胞による FITC 標識らい菌の取り込みを定量的に比較した。THP-1 細胞の 80% 以上が感染後 3 時間で蛍光を発し、6 時間まで野生株と GPAT3 KO 細胞の間で差は見られなかった (Fig. 4C)。FITC 陽性細胞は GPAT3 KO 細胞では 9 時間で減少し始め、24 時間までに 15.5% に減少したが、野生株の蛍光は 24 時間で高いままであった (> 80%) (Fig. 4C)。同様に、平均蛍光強度 (MFI) は、GPAT3 KO 細胞よりも野生株の方が高かった (Fig. 4D)。これは、共焦点顕微鏡の結果 (図 4A および 4B) と一致していた。さらに、らい菌の生存率を評価するために、生菌に高発現する pseudogene の発現量を RT-PCR で定性的に解析することで、らい菌の生存率を推定した。7 つの pseudogene については、感染の 6 時間後に野生株および GPAT3 KO 細胞によって同様のレベルの mRNA が誘導された。しかし、GPAT3 KO 細胞では、その pseudogene の発現は、野生株と比較して急速に減少した (Fig. 4E)。これらの結果は、らい菌の生存率は GPAT3 KO 細胞で低いことを示している。このことから、宿主細胞における GPAT3 は、らい菌が宿主マクロファージ内で効率よく寄生を維持するために必要であり、新たな細胞内環境を構築するために重要であることを示している。

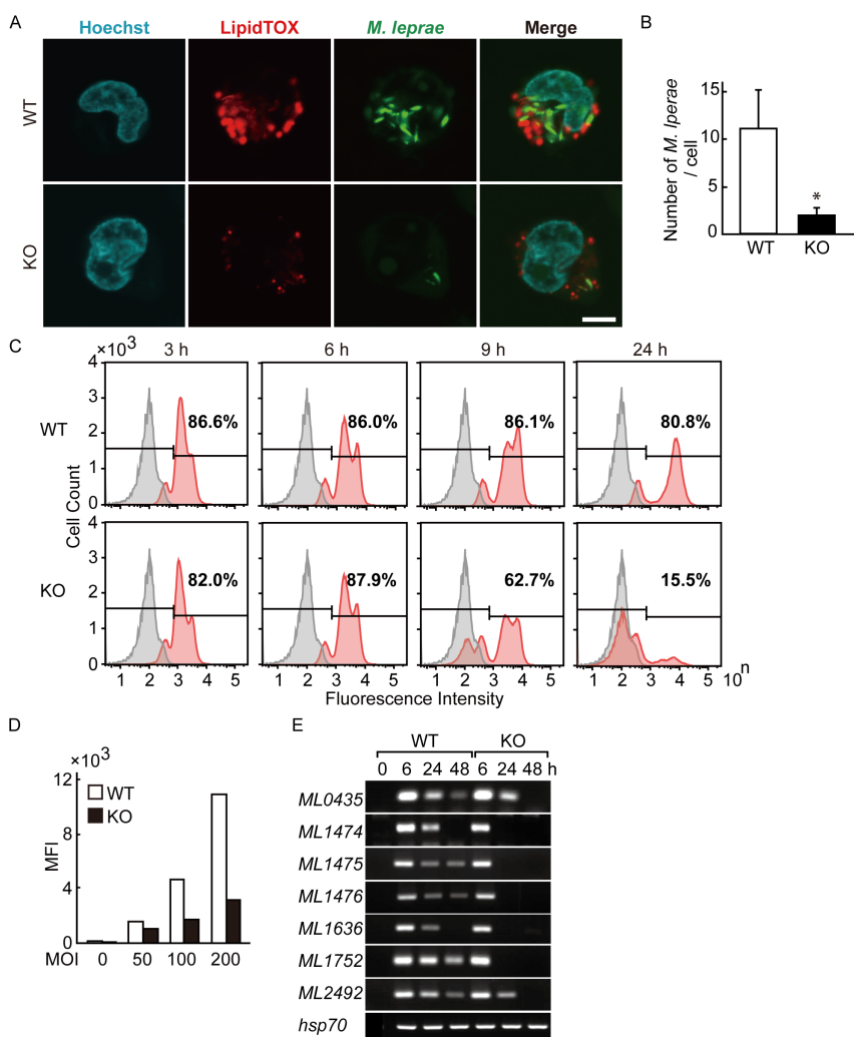


Fig. 4 GPAT3 is essential for the intracellular survival of *M. leprae*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanigawa Kazunari, Hayashi Yasuhiro, Hama Kotaro, Yamashita Atsushi, Yokoyama Kazuaki, Luo Yuqian, Kawashima Akira, Maeda Yumi, Nakamura Yasuhiro, Harada Ayako, Kiriya Mitsuo, Karasawa Ken, Suzuki Koichi	4. 巻 16
2. 論文標題 Mycobacterium leprae promotes triacylglycerol de novo synthesis through induction of GPAT3 expression in human premonocytic THP-1 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0249184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 谷川和也
2. 発表標題 偏性細胞内寄生細菌であるらい菌の生存には宿主細胞内GPAT3発現が必要である
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Kazunari Tanigawa
2. 発表標題 Mycobacterium leprae-induced TAG accumulation is caused by increased expression of GPAT3 in host macrophages
3. 学会等名 20th International Leprosy Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Akira Kawashima
2. 発表標題 Mycobacterium leprae-induced foam cell formation via peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-delta and PPAR-gamma in host
3. 学会等名 20th International Leprosy Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Kazunari Tanigawa
2. 発表標題 M. leprae infection induced GPAT3 expression and accumulated TAG species in host macrophages
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 谷川和也
2. 発表標題 宿主マクロファージにおけるGPAT3のらい菌感染への影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 谷川和也
2. 発表標題 GPAT3はらい菌感染マクロファージにおいてTAG合成を促す
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 谷川和也
2. 発表標題 らい菌感染マクロファージに蓄積する脂質の解析
3. 学会等名 第60回日本脂質生化学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 谷川和也
2. 発表標題 宿主マクロファージにおけるGPAT3のらい菌感染への影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Kazunari Tanigawa
2. 発表標題 M. leprae infection induced GPAT3 expression and accumulated TAG species in host macrophages
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Kauznari Tanigawa
2. 発表標題 Mycobacterium leprae-induced TAG accumulation is caused by increased expression of GPAT3 in host macrophages
3. 学会等名 20th International Leprosy Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Akira Kawashima
2. 発表標題 Mycobacterium leprae-induced foam cell formation via peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- and PPAR-g in host
3. 学会等名 20th International Leprosy Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------