

平成22年 5月26日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590453

研究課題名（和文）宿主免疫応答を制御する結核菌由来ミコール酸修飾因子の研究

研究課題名（英文）Modified mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis* regulate the host immune responses

研究代表者

藤原 永年（FUJIWARA NAGATOSHI）

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80326256

研究成果の概要（和文）：結核菌細胞表層の特徴的なミコール酸は炭素鎖長 80-90 からなる天然では希な長鎖脂肪酸である。菌種特異的に炭素鎖長、構成分子種（ α 、メトキシ、ケト、ジカルボキシ、エポキシ等）、不飽和度（シクロプロパン環、二重結合）が異なり、幾何異性体も存在した。結核菌の特徴的形態（コード紐状）、抗酸性の減弱化に加え、ミコール酸分子種や修飾基が構造特異的に宿主免疫応答の制御因子として結核菌の病原性や毒性の発現に寄与していた。

研究成果の概要（英文）：Mycolic acid is a characteristic cell wall component expressed in acid-fast bacteria containing *Mycobacterium tuberculosis*. The heterogeneity of mycolic acid subclasses (α , methoxy, keto, dicarboxy, epoxy, etc), unsaturations (monoene, diene, cyclopropane), and geometrical isomers (*cis*, *trans*) effected to cord forming, acid-fastness, and host immune responses to Mycobacteria. The modifications of mycolic acids play an important role in their virulence and pathogenicity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：感染免疫，脂質分子，宿主免疫応答，結核菌，ミコール酸

1. 研究開始当初の背景

結核は今なお甚大な被害をもたらす世界三大感染症のひとつであり、世界人口の1/3が感染し、毎年200万人前後の尊い命を奪っている。現在までに、タンパク抗原を中心とした宿主免疫応答機構は種々の知見が蓄

積されているが、脂質分子の宿主免疫応答はほとんど未解明である。結核菌の細胞表層は脂質成分に富み、宿主免疫応答へ寄与していることが想定され、これら脂質分子を排して結核の感染防御を論じることは適当でない。結核菌の重要な細胞表層成分であるミコール酸は菌種により構造的不均一であり、菌の形態、

生化学的性状のみならず、宿主免疫応答への関与が示唆されるが、その分子機序は明らかでない。

我々は、抗酸菌及び類縁抗酸菌由来ミコール酸分子を系統的に構造解析し、また、マウス肺肉芽腫炎症誘導能との構造相関からミコール酸含有糖脂質は異物性及び過敏性の結核類似肉芽腫炎症病変を誘導することを証明した。今までの研究成果から、単にミコール酸分子が抗原として宿主に認識されるのではなく、分子種や修飾基が構造特異的に宿主応答と連関して制御因子として働き、結核菌の病原性や毒性の発現に寄与することに着想した。

2. 研究の目的

ミコール酸の宿主免疫応答機構への関与は、ミコール酸の分子種、修飾基が直接的に宿主免疫応答を制御すると仮定した。本研究では、各種ミコール酸合成遺伝子欠損結核菌変異株の作製とミコール酸分子の宿主免疫応答を制御する因子を同定する。さらに、ミコール酸含有糖脂質分子の宿主細胞の応答機序を解明することにより、結核における脂質分子の役割についてその一端を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミコール酸合成遺伝子欠損結核菌変異株の作製

ミコール酸合成に関連した遺伝子群の機能と特徴を基に、ミコール酸合成欠損結核菌変異株の作製をフェージ型遺伝子導入法で試みた。*pcaA*, *cmaA2*, *kasB*, *mma4*及び*hma*遺伝子を候補とした。

(2) ミコール酸合成遺伝子欠損結核菌変異株の表現型

各変異株を野生株と比較して、形態学的・生化学的相違を観察した。細胞壁の構造変化は膜の透過性や宿主感染防御からのエスケープ機構にも重要であり、電子顕微鏡による細胞表層の特徴、抗酸性について重点的に検討した。

(3) ミコール酸およびトレハロースジミコール酸 (cord factor, TDM) の単離精製と構造解析

各変異株の死菌体からミコール酸画分を抽出した。メチルエステル誘導体を薄層クロマトグラフィーでミコール酸分子種を精製純化した。Cord factorは死菌体を超音波破碎後Forchの方法に準じて脂質画分を抽出し、溶媒分画法により精製純化した。構造は、質量分析装置 (MALDI/TOF/MS) で質量数を、ト

リメチルシリル誘導体のGC/MSで炭素鎖長と修飾基を、NMRで幾何異性体を解析した。

(4) Cord factor投与によるマウス肉芽腫炎症病変誘導 (*in vivo*)

各欠損株から精製した構成ミコール酸分子種、修飾基の異なる cord factor を water-in-oil-in-water ミセルとしてマウス尾静脈より投与した。経時的に各臓器 (肺、脾臓、肝臓) に誘導される肉芽腫炎症病変を下記の項目について検討した。

- ① 病理組織学的な臓器病変部の解析 (HE、免疫染色)
- ② 臓器や血清の免疫機能分子群 (ケモカイン、サイトカイン、接着分子等) の発現をELISA法、PCR法で解析した。
- ③ Percoll密度勾配法により分取した臓器病変部白血球画分を各種細胞表面特異抗原マーカーで蛍光ラベルし、フローサイトメトリー (FACS) で浸潤細胞や構成細胞群を解析した。また細胞内サイトカイン蛍光ラベル法を用いて主要サイトカイン産生細胞を検索した。

4. 研究成果

ミコール酸合成遺伝子欠損結核菌変異株の表現型

ミコール酸合成遺伝子欠損結核菌変異株 Δ *pcaA*, Δ *kasB* についてその表現型と宿主応答を解析した。個々の変異株で特徴的な表現型 (ミコール酸合成、形態学的特徴、宿主応答、病原性) を以下に示した。

(1) Δ *pcaA* (ミコール酸シス型シクロプロパン合成遺伝子) 株

- ① Δ *pcaA* 株はシクロプロパン環をもつ α ミコール酸が無くなり、シクロプロパン環合成の中間体である二重結合を有したミコール酸が産生されていた。
- ② メトキシ、ケトミコール酸はトランス型のみでシス型は存在しなかった。
- ③ 結核菌に特徴的な形態であるコード紐状が減弱化していた。

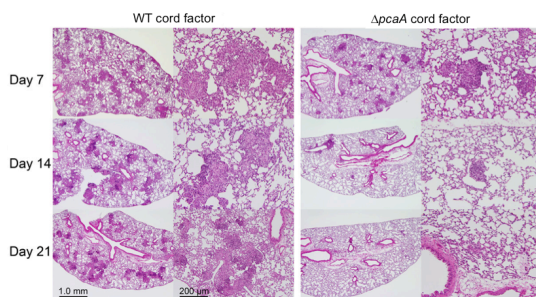


図1. Cord factor投与後のマウス肺病変

④ $\Delta pcaA$ 株由来cord factor投与におけるマウス肺病変は親株由来cord factorに比べ組織学的に肉芽腫炎症病変が軽度であり(図1)、関連サイトカイン産生(TNF- α , IL-12p40等)も抑制されていた。マウス感染実験では $\Delta pcaA$ 株が親株に比べ弱毒化していた。感染初期における肺生菌数、炎症性サイトカインの発現が抑えられたことが要因と考えられた。

(2) $\Delta kasB$ (ミコール酸伸長遺伝子) 株

① 親株に比べミコール酸炭素鎖長が2-6個分短鎖になっていた。 α 、メトキシミコール酸の炭素鎖長は2分子、ケトミコール酸は6分子短鎖であった。

② 幾何異性体に変化が生じ、トランス型のメトキシ、ケトミコール酸が激減していた。結果として $\Delta kasB$ 株はミコール酸の鎖長が短くなり、シス型のみ α 、メトキシ、ケトミコール酸サブクラスから構成されていた(図2)。

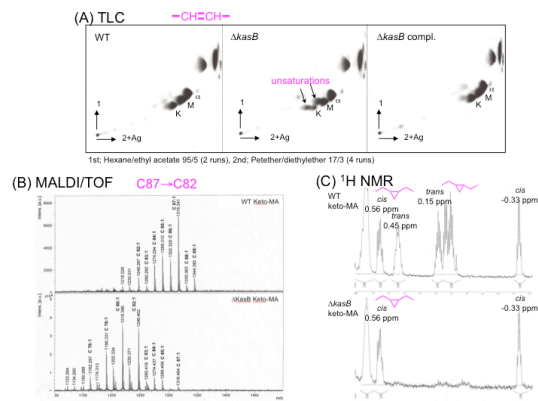


図2. ミコール酸組成の比較

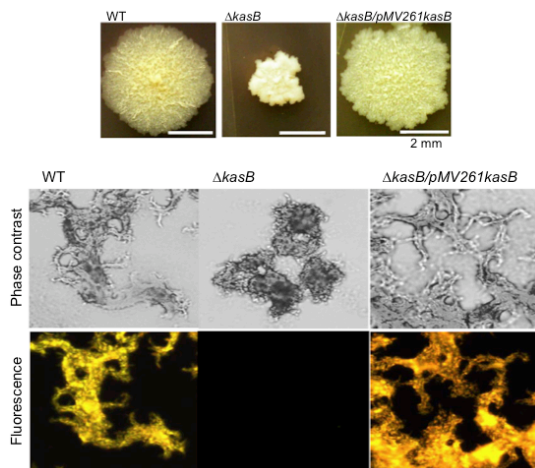


図3. コロニー形態と抗酸性

③ 抗酸性が消失し、コロニーが小さくなっていった(図3)。

④ 抗酸性の消失はミコール酸組成の変化によると考えられ、透過電子顕微鏡観察でミコ

ール酸を多量に含む細胞壁を中心に $\Delta kasB$ 株、親株、相補株で比較観察した。3株間で細胞膜を含むcell envelopの厚さに有意差はなかったが、細胞膜と細胞壁部分の電子密度は $\Delta kasB$ 株が親株、相補株に比べ高値を示し、細胞壁ミコール酸密度が抗酸性を含む表現型に關与していることが示唆された。

⑤ $\Delta kasB$ 株由来cord factor投与マウスの肉芽腫炎症病変は親株由来cord factorに比べ軽度であった(図4)。マウス感染実験から $\Delta kasB$ 株は感染後の肺生菌数も低くマウスが長期に生存した。

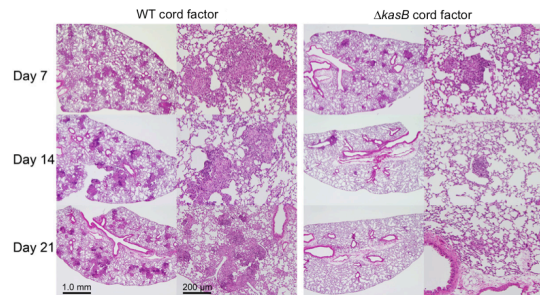


図4. Cord factor投与後のマウス肺病変

⑥ $\Delta kasB$ 株のミコール酸短鎖化は親株が炭素鎖80-86に対して数%程度であり、表現型への影響の度合いは低いと考えた。むしろトランス型ミコール酸の欠失が細胞表層の分子間ミコール酸配列に影響して細胞表層の変化をもたらし、抗酸性や宿主応答の変化に重要であると考えられた。

以上より、結核菌細胞表層の特徴的なミコール酸における構造修飾は結核菌の特徴的形態(コード紐状)、抗酸性に加え、宿主応答の制御因子として結核菌の病原性や毒性の発現に寄与していることが明らかとなった。今後、脂質分子を標的とした新規脂質ワクチン、新規抗菌薬開発に新思考を提供できると確信する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

- ① S.P. Harris, N. Fujiwara, R.H. Mealey, D.C. Alperin, T. Naka, R. Goda, S.A. Hines. Identification of *Rhodococcus equi* lipids recognized by host cytotoxic T-lymphocytes. *Microbiology*. 査読有. 2010; Mar 18. [in press]
- ② M. Okazaki, K. Ohkusu, H. Hata, H. Ohnishi, K. Sugawara, C. Kawamura, N. Fujiwara, S. Matsumoto, Y. Nishiuchi, K. Toyoda, H. Saito, S. Yonetani, Y. Fukugawa, M. Yamamoto, H. Wada, A.

- Sejimo, A. Ebina, H. Goto, T. Ezaki, and T. Watanabe. *Mycobacterium kyorinense* sp. nov., a novel slowly growing *Mycobacterium* sp. related to *Mycobacterium celatum* isolated from human clinical specimens. IJSEM. 査読有. 2009; 59: 1336-1341.
- ③ D. Hayashi, T. Takii, N. Fujiwara, Y. Fujita, I. Yano, S. Yamamoto, M. Kondo, E. Yasuda, E. Inagaki, K. Kanai, A. Fujiwara, A. Kawarazaki, T. Chiba, and K. Onozaki. Comparable Studies of Immunostimulating Activities *In Vitro* among *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) Sub-strains. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 査読有. 2009; 56:116-128.
- ④ Y. Kawamura, J. Tomida, Y. Morita, T. Naka, S. Mizuno, and N. Fujiwara. "*Lysobacter enzymogenes* subsp. *cookii*" Christensen 1 1978 should be recognized as an independent species *Lysobacter cookii* sp. nov. FEMS Microbiol. Lett. 査読有. 2009; 298:118-23.
- ⑤ N. Nakata, N. Fujiwara, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, and S. Maeda. Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure of glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 査読有. 2008; 190:1064- 1071.
- ⑥ N. Fujiwara, N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. J. Bacteriol. 査読有. 2008; 190:3613-3621.
- ⑦ T. Katsube, S. Matsumoto, M. Takatsuka, M. Okuyama, Y. Ozeki, M. Naito, Y. Nishiuchi, N. Fujiwara, M. Yoshimura, T. Tsuboi, M. Torii, N. Oshitani, T. Arakawa, and K. Kobayashi. Control of cell wall assembly by a histone-like protein in mycobacteria. J. Bacteriol. 査読有. 2007; 189:8241-8249.
- 川みどり、水野浄子、小林貴美子、谷口初美. *Mycobacterium smegmatis* 株間の脂質分布と脂質成分による宿主応答の差異. 第83回日本細菌学会総会. 2010年3月27-29日: 横浜.
- ② 宮本 友司、向井 徹、甲斐 雅規、前田 百美、中 崇、藤原 永年、水野 浄子、矢野 郁也、牧野 正彦. *Mycobacterium avium* complex 血清型 4 型株における glycopeptidolipid の生合成解析. 第83回日本細菌学会総会. 2010年3月27-29日: 横浜.
- ③ N. Fujiwara, T. Naka, R. Goda, S. Mizuno, M. Yoshimura, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. Structures and host recognitions of antigenic serotype 7, 13 glycopeptidolipids from *Mycobacterium intracellulare*. Infection 2009. November 11-13, 2009: Birmingham, UK.
- ④ 合田麗奈、中崇、前田伸司、水野浄子、小林貴美子、藤原永年. MAC 血清型 13 型菌由来糖ペプチド脂質の構造修飾と宿主応答. 第82回日本生化学会大会. 2009年10月21-24日: 神戸.
- ⑤ S.A. Hines, S.P. Harris. N. Fujiwara, R.H. Mealey, R. G. Dossa and D.C. Alperin. *Rhodococcus equi* - immunity and strategies for prevention. The 5th International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference (IVVDC). July 19-24, 2009: Madison, WI USA.
- ⑥ 山本龍二、堀田康弘、菅原勇、藤原永年、伊藤佐生智、瀧井猛将. *Mycobacterium avium* TMC724S の pH 依存的な集落形成の違いと免疫応答、薬剤感受性、細胞壁形成との相関. 第84回日本結核病学会総会. 2009年7月2-3日: 札幌.
- ⑦ 藤原永年、中田登、中崇、水野浄子、牧野正彦、松本壮吉、前田伸司. *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7, 12, 13 型糖ペプチド脂質の構造類似性とオリゴ糖解析. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月12-14日: 名古屋.
- ⑧ 堀田康弘、瀧井猛将、菅原勇、藤原永年、山本龍二、稲垣衣美、小野寄菊夫. *Mycobacterium avium* TMS724S の pH 依存的形態変化に関する研究. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月12-14日: 名古屋.
- ⑨ 林大介、安田恵実、瀧井猛将、藤原永年、山本三郎、矢野郁也、小野寄菊夫.

[学会発表] (計20件)

- ① 藤原永年、野本摩利、中崇、合田麗奈、小

- Mycobacterium bovis* BCG 亜株間の自然免疫誘導活性の差異とミコール酸の関与. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月 12-14 日: 名古屋.
- ⑩ 甲斐雅規、藤原永年、宮本友司、向井徹、矢野郁也、牧野正彦. BCG 菌のミコール酸サブクラス合成遺伝子の解析. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月 12-14 日: 名古屋.
- ⑪ 水野浄子、中崇、中田登、前田伸司、合田麗奈、小林貴美子、牧野正彦、藤原永年. *Mycobacterium intracellulare* serotype 13 由来新規特異糖ペプチド脂質の糖鎖構造と生合成. 第 81 回日本生化学会大会 第 31 回日本分子生物学会年会 合同大会. 2008 年 12 月 9-12 日: 神戸.
- ⑫ N. Fujiwara, N. Nakata, T. Naka, I. Yano, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, M. Yoshimura, S. Maeda. Structure and biosynthesis gene cluster of an antigenic serotype 16 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. 108th General Meeting, The American Society for Microbiology. 1-5 June 2008: Boston USA.
- ⑬ N. Nakata, N. Fujiwara, S. Maeda, T. Naka, I. Yano, M. Makino. Three methyltransferase genes determine the divergence between *Mycobacterium intracellulare* serotypes 7 and 12. 108th General Meeting, The American Society for Microbiology. 1-5 June 2008: Boston USA.
- ⑭ S. Maeda, N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Makino, N. Fujiwara. Genetic analysis of the glycosylation pathway of glycopeptidolipids in *Mycobacterium intracellulare* serotype 16 and serotype 17. 108th General Meeting, The American Society for Microbiology. 1-5 June 2008: Boston USA.
- ⑮ 藤原永年、松本壮吉、瀧井猛将、藤田由希子、矢野郁也、前田伸司、山本三郎. BCG 亜株の脂質生化学的比較研究. 第 83 回日本結核病学会総会. 2008 年 4 月 24-25 日: 東京.
- ⑯ 瀧井猛将、藤原永年、矢野郁也、山本三郎. *Mybacterium bovis* BCG 亜株間の生化学的、物理化学的性質と生物学的活性の比較研究. 第 83 回日本結核病学会総会. 2008 年 4 月 24-25 日: 東京.
- ⑰ 藤原永年、中田登、前田伸司、中崇、水野浄子、牧野正彦、松本壮吉、矢野郁也. *Mycobacterium intracellulare* 由来血清型 7, 12 型 glycopeptidolipid 糖鎖合成遺伝子の機能解析. 第 81 回日本細菌学会総会. 2008 年 3 月 24-26 日: 京都.
- ⑱ 中田登、藤原永年、前田伸司、中崇、矢野郁也、小林和夫、牧野正彦. *Mycobacterium intracellulare* 血清型 12 の glycopeptidolipid 生合成遺伝子領域の解析. 第 81 回日本細菌学会総会. 2008 年 3 月 24-26 日: 京都.
- ⑲ S. Mizuno, T. Naka, K. Kobayashi, M. Doe, S. Maeda, N. Fujiwara. Structural analysis of sphingoglycolipid from *Basidiomycota*. 第 80 回日本生化学会大会. 2007 年 12 月 11-15 日: 横浜.
- ⑳ 藤原永年、前田伸司、矢野郁也、松本壮吉、小林和夫. ミコール酸分子種の異なる cord factor の宿主応答. 第 82 回日本結核病学会総会. 2007 年 6 月 5-6 日: 大阪.

〔図書〕(計 2 件)

- ① N. Fujiwara, and K. Kobayashi. 2008. Mycobacterial glycolipids and host responses, p. 99-116 (Chapter IV). In E. Sasaki (ed.), Glycolipids: New Research. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge NY.
- ② 前田伸司、藤原永年. 2008. PCR 法 (抗酸菌) P. 246-247. 山口恵三・戸塚恭一 (編)、KEY WORD 感染症 [第 2 版]、先端医学社

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 永年 (FUJIWARA NAGATOSHI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 80326256

(2) 研究分担者

矢野 郁也 (YANO IKUYA)
日本ビーシー製造株式会社・中央研究所・顧問
研究者番号: 60047008
(H19→H20: 連携研究者)