

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008~2010

課題番号：20590441

研究課題名 (和文) マイコバクテリアによる宿主免疫の修飾：細胞壁構成糖脂質の役割

研究課題名 (英文) Modification of host immunity by mycobacteria: role of cell wall glycolipids

研究代表者

森田 康裕 (Morita Yasuhiro)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70397769

研究成果の概要 (和文)：

マイコバクテリアの細胞壁に存在する糖脂質は免疫修飾に重要であると示唆されている。本研究ではまずスメグマ菌由来糖脂質の生合成に関して直鎖伸長にかかわる糖転移酵素と側鎖を合成する糖転移酵素の発現レベルの制御が重要であることを明らかにした。更にスメグマ菌と結核菌において、これらの糖脂質の構造的異常が細胞壁の透過性に関する異常を引き起こしていることを明らかにした。また、関連するリン脂質として、これまで細菌において未知であったホスファチジルイノシトール 3 リン酸の存在をスメグマ菌において初めて明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Cell wall glycolipids of mycobacteria have been suggested to be important for host immune modulation. In this study, we first clarified the importance of controlling the expression levels of two glycosyltransferases involved in the biosynthesis of these glycolipids. We then revealed that the structural alterations of these glycolipids make both *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis* vulnerable in terms of cell wall permeability. In addition, we demonstrated the presence of phosphatidylinositol 3-phosphate in *Mycobacterium smegmatis* for the first time.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：(1)感染免疫 (2)マイコバクテリア (3)細胞壁 (4)糖脂質

1. 研究開始当初の背景

結核菌とその細胞壁：現在、発展途上国を中心に約20億人が結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) に感染し、年間約200万人が結核を原因として死亡している。BCG ワクチンは小児の重篤な結核には予防効果があるが、成人の肺結核に対する効果は限定的である。治療に有効な抗生物質はあるが、多剤耐性菌出現もあり新薬開発が急務である。有効な予防・治療法開発のためにも、結核菌がいかに宿主の免疫から逃れるのかを理解することは重要である。結核菌の免疫回避機構の中核を担う構造として細胞壁が挙げられる。結核菌の細胞壁はミコール酸と糖脂質からなる疎水性の高い外膜構造を有する。この高疎水性の細胞壁は抗生物質の菌体へ浸透を阻止するなどの物理的バリアー機能を持つ一方、その構成分子は免疫修飾にも関与しており、中でも重要な分子として PIM、LM 及び LAM が挙げられる。

PIM/LM/LAM の構造: PIM/LM/LAM は、マイコバクテリア属に広く存在し、Phosphatidylinositol (PI) を脂質アンカーとする糖脂質である。PIM は、PI のイノシトールに2または6個のマンノースが結合した分子である (AcPIM2 & AcPIM6)。LM は、20 残基以上のマンノースが PI に結合した分子であり、 α 1,6 直鎖のマンナンコアと α 1,2 マンノース側鎖から成る。LAM は LM がさらにアラビノース側鎖によって修飾された構造を持つ。アラビナンの非還元末端は感染性の種ではマンノースキャップと呼ばれる構造によって修飾されており Man-LAM と呼ばれるのに対し、非感染性の種ではイノシトールリン酸で修飾され PI-LAM と呼ばれる。これらの糖脂質は細胞膜に存在し、LM と LAM についてはその長い糖鎖が細胞壁を貫通して、先端部が細胞表面に露出していると考えられている。

マクロファージ (M Φ) に対する PIM/LM/LAM の免疫修飾活性: PIM/LM/LAM は病原性の種では宿主感染において様々な役割を果たす。免疫修飾活性としては、精製した PI-LAM や LM は、M Φ による TNF- α や IL-12 などの炎症性サイトカインの産生を促進する。この炎症誘発効果は、Toll-like レセプター-2 (TLR2) をレセプターとし、LM の場合脂質アンカーの脂肪酸数とマンナンコア構造が活性に重要である。PIM についても TNF- α の産生を促進するとする報告がある一方で、LM と比べると数倍以上の高濃度で添加する必要があることから生理的意義については否定的な見解もある。一方 Man-LAM については、抗炎症作用を示す。すなわちリポ多糖 (LPS) による TLR4 シグナ

ル伝達経路の活性化で促進される M Φ のサイトカイン産生が、Man-LAM 存在下では抑制される¹。この抑制作用は TLR2 に依存せず、Man-LAM 認識の機構は不明である。

樹状細胞 (DC) に対する LAM の免疫修飾活性: DC においても Man-LAM は LPS によって誘導された炎症性サイトカインの産生を抑制するなどの抗炎症作用を示す。Man-LAM は、DC の細胞表面に存在する DC-SIGN と呼ばれる C 型レクチンによって認識され、セリンスレオニンキナーゼ Raf-1 を介したシグナル伝達系を活性化する。この経路は TLR を介したシグナル伝達で活性型となった NF- κ B をアセチル化し、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生を増強する。

PIM/LM/LAM の生合成: 私はこれまで PIM/LM/LAM の生合成経路の全容解明を目指して研究を行ってきた。まず、マイコバクテリア研究のモデル生物となっている *M. smegmatis* で無細胞アッセイ系を確立し、AcPIM6 が AcPIM2 に4個のマンノースを順次付加することによって産生される事を明らかにし、ポリプレノールリン酸マンノース (PPM) がマンノース供与体であることを示した。また、ショ糖密度勾配を用いた細胞分画法により、この生合成経路が、AcPIM2 までの前半部と AcPIM6 までの後半部で異なる膜画分に局在することを見いだした。さらに PIM と LM/LAM の合成経路は AcPIM4 を境に分岐する事を明らかにし、PIM の生合成に関わる5番目のマンノース転移酵素 PimE を同定した。一方コロラド大学のグループが、これまでに LM のマンナンコアの伸長、 α 1,2 マンノース側鎖の付加、及びマンノースキャップ合成に関与するマンノース転移酵素を同定している。このように生合成の経路が明らかになり、関与する酵素が複数同定されたことから、LM や LAM の構造を変異させた BCG 菌や結核菌の変異株を作成し、PIM/LM/LAM の生理的重要性を直接検証することが可能な状況になっている。

2. 研究の目的

マイコバクテリアの細胞壁に存在する糖脂質 Phosphatidylinositol Mannosides (PIM)、Lipomannan (LM)、Lipoarabinomannan (LAM) は免疫修飾に重要であると示唆されている。これらの糖脂質の生合成酵素を欠損したマイコバクテリア変異株を利用して、これらの糖脂質の持つ免疫修飾活性に必須な構造モチーフを決定し、またこれらの糖脂質の生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

変異株における LM/LAM の精製と構造解析

α 1,2 マンノース側鎖を欠損した LM/LAM を産生する *M. smegmatis* から LM と LAM を精製し

た。LM と LAM の精製の過程と結果は、LM と LAM を SDS-PAGE によって分離し、過ヨウ素酸シッフ塩基法の原理に基づく糖染色法によって検出することによりモニターした。構造については α 1,2 特異的マンノシダーゼなどの糖分解酵素で処理した試料の SDS-PAGE における移動度の変化を調べたり、アラビナン部分の特異的に分解できる弱酸処理の影響を調べたりすることで検討した。さらに詳細な構造解析を行うために、MALDI-TOF マススペクトロスコピーによって LM と LAM の分子量を決定した。また、糖の結合様式を調べるために HPLC を行い、LM や LAM を構成する糖の成分を求め、 α 1,2 マンノースが欠損していることを証明した。結核菌の LM/LAM についても同様に解析した。

変異株の生理的な異常の解析

変異株の細胞壁の異常については、疎水性の毒物に対する感受性、浸透圧の変化に対する感受性、抗生物質に対する感受性、エチジウムブロミドの透過性、抗酸染色などによって調べた。

PI3P の構造と性質の解析

PI3P の構造は、酵素的な処理、薄層クロマトグラフィー、HPLC、マススペクとロスコピーなどによって調べた。性質については放射性同位元素で標識したイノシトールによる代謝標識や無細胞系における PI3P 生合成の再構築によって検討した。

4. 研究成果

LM/LAM の生合成に関与するマンノース転移酵素の重要性を明らかにした。すなわちマンノース転移酵素 MSMEG_4247 の酵素活性が厳密に制御されていることが LM と LAM の生合成、特にポリマーの伸長制御に、きわめて重要であることを示した。さらに、MSMEG_4247 強制発現株に、伸長を司るマンノース転移酵素 MSMEG_4241 の発現を人為的に操作できる発現ベクターを導入した変異株の表現型を解析することにより、二つのマンノース転移酵素の発現のバランスが重要であることを示した。また、結核菌で作製した変異株が、同様の表現型を示すことを示した。

次に作成した変異株の生理的な性質を特に細胞壁の機能に注目して解析したところ細胞膜の透過性にはそれほどの異常がないのに対して、細胞壁の透過性に一定の異常が見られることが明らかとなった。

最後に、放射性同位元素で標識したイノシトールによる代謝標識の実験から新規のイノシトール含有脂質の存在が示唆されたのでその構造を調べたところ、ホスファターゼ処

理することにより構造が変化することや薄層クロマトグラフィーにおける移動度などから phosphoinositide の可能性が示唆された。更に脱アシル化したサンプルを HPLC で解析することにより PI3P であることが明らかになった。またマススペクとロスコピーによる解析によって脂質部分の脂肪酸組成についても明らかにした。これらの解析により PI3P であることが明らかになった。さらに高濃度の塩で処理することにより PI3P の生合成レベルが上がることを見だし、この分子がストレス応答に関与している可能性を示唆した。

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 5 件)

- ① Morita, Y.S., Fukuda, T., Sena, C.B., Yamaryo-Botte, Y., McConville, M.J., and Kinoshita, T. (2011) Inositol lipid metabolism in mycobacteria: biosynthesis and regulatory mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta*, in press. 査読有り
- ② Morita, Y.S., Yamaryo-Botte, Y., Miyanagi, K., Callaghan, J.M., Patterson, J.H., Crellin, P.K., Coppel, R.L., Billman-Jacobe, H., Kinoshita, T., and McConville, M.J. (2010) Stress-induced synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate in mycobacteria. *J. Biol. Chem.*, 285, 16643-50. 査読有り
- ③ Sena, C.B., Fukuda, T., Miyanagi, K., Matsumoto, S., Kobayashi, K., Murakami, Y., Maeda, Y., Kinoshita, T., and Morita, Y.S. (2010) Controlled expression of branch-forming mannosyltransferase is critical for mycobacterial lipoarabinomannan biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 285, 13326-36. 査読有り
- ④ Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y.S., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O., Kinoshita, T., Akira, S., Yoshikai, Y., and Yamasaki, S. (2009) Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle: Mincle is a receptor for mycobacterial glycolipid. *J. Exp. Med.*, 206, 2879-88.

査読有り

- ⑤ Crellin, P.K., Kovacevic, S., Martin, K.L., Brammananth, R., Morita, Y.S., Billman-Jacobe, H., McConville, M.J., and Coppel, R.L. (2008) Mutations in *pimE* restore lipoarabinomannan synthesis and growth in a *Mycobacterium smegmatis* *lpqW* mutant. *J. Bacteriol.*, 190, 3690-3699. 査読有り

[学会発表] (計14件)

- ① Fukuda, T., Miyanagi, K., Hamasaki, M., Yoshimori, T., Murakami, Y., Maeda, Y., Kinoshita, T., and Morita, Y.S. (17 May 2011) Structural alterations of lipomannan and lipoarabinomannan affect the integrity of mycobacterial cell wall. *Keystone Symposia of Molecular and Cellular Biology: Mycobacteria: Physiology, Metabolism and Pathogenesis - Back to the Basics*, Vancouver, Canada.
- ② Fukuda, T., Miyanagi, K., Hamasaki, M., Yoshimori, T., Maeda, Y., Kinoshita, T., and Morita, Y.S. (9 Dec 2010) The effects of structural alterations of lipomannan and lipoarabinomannan on mycobacterial cell wall. The 83rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Kobe, Japan.
- ③ Morita, Y.S., Yamaro-Botte, Y., Miyanagi, K., Crellin, P., Coppel, R.L., Kinoshita, T., and McConville, M.J. (30 Sep 2010) Stress-induced synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate in mycobacteria. *OzBio2010* (incorporating the 12th IUBMB conference), Melbourne, Australia.
- ④ Sena, C.B., Fukuda, T., Miyanagi, K., Matsumoto, S., Kobayashi, K., Murakami, Y., Maeda, Y., Kinoshita, T., and Morita, Y.S. (5 Aug 2010) Controlled expression of branch-forming mannosyltransferase is critical for the biosynthesis of lipoarabinomannan in mycobacteria. *XXVth International Carbohydrate Symposium*, Chiba, Japan.
- ⑤ Morita, Y.S., and Kinoshita, T. (28 Mar 2010) Stress-induced biosynthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate in mycobacteria. The 83rd Annual Meeting

of the Japanese Society for Bacteriology, Yokohama, Japan.

- ⑥ Fukuda, T., Kinoshita, T., and Morita, Y.S. (28 Mar 2010) Inhibition of LAM biosynthesis accumulates a LM-like product and affects mycobacterial proliferation. The 83rd Annual Meeting of the Japanese Society for Bacteriology, Yokohama, Japan.
- ⑦ Fukuda, T., Maeda, Y., Kinoshita, T., and Morita, Y.S. (21 Oct 2009) Accumulation of an unknown product and effects on cell growth by inhibiting lipoarabinomannan biosynthesis in mycobacteria. The 82nd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Kobe, Japan.
- ⑧ Morita, Y.S., Fukuda, T., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (25 May 2009) Compartmentalization of glycolipid biosynthesis in mycobacteria. The First International Kishimoto Foundation Symposium "Immune Regulation: Present and Future", Osaka, Japan.
- ⑨ Morita, Y.S., and Kinoshita, T. (13 Mar 2009) Identification of phosphatidylinositol 3-phosphate in mycobacteria. The 82nd Annual Meeting of the Japanese Society for Bacteriology, Nagoya, Japan.
- ⑩ Fukuda, T., Kinoshita, T., and Morita, Y.S. (13 Mar 2009) Effect of suppressed lipoarabinomannan biosynthesis on mycobacterial growth. The 82nd Annual Meeting of the Japanese Society for Bacteriology, Nagoya, Japan.
- ⑪ Fukuda, T., Maeda, Y., Kinoshita, T., and Morita, Y.S. (10 Dec 2008) Subcellular localization of enzymes involved in the biosynthesis of GPI-like glycolipids in mycobacteria. The 81st Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Kobe, Japan.
- ⑫ Morita, Y.S., Nakatani, F., McMillan, B.N.I., Billman-Jacobe, H., McConville, M.J., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (7 Jul 2008) Compartmentalization of glycolipid biosynthesis in mycobacteria. Human

Frontier Science Program 8th Annual
Awardees Meeting, Berlin, Germany.

- ⑬ Sena, C.B., Matsumoto, S., Kobayashi, K., McConville, M.J., Maeda, Y., Kinoshita, T., and Morita, Y.S. (27 Jun 2008) Mannosyltransferase required for α 1,2-mannosylation of lipomannan and lipoarabinomannan in *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. The Seventh International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections, Stockholm, Sweden.
- ⑭ Morita, Y.S., Fukuda, T., Billman-Jacobe, H., McConville, M.J., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (27 Jun 2008) Subcellular compartmentalization of membrane-bound enzymes involved in the synthesis of phosphatidylinositol mannosides in *Mycobacterium smegmatis*. The Seventh International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections, Stockholm, Sweden.

[図書] (計1件)

Maeda, Y., and Morita, Y.S. (2009) Mannosylation. A chapter in "The Enzymes, Volume 26, Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchoring of Proteins". (Menon, A.K., Kinoshita, T., Orlean, P., and Tamanoi, F., Editors) Academic Press, 91-115.

[その他]

ホームページ等

<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/biken/men-eki-huzen/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 康裕 (Morita Yasuhiro)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：70397769