

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：34601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460543

研究課題名(和文)血清型特異糖ペプチド脂質抗原に制御されるMAC菌の宿主内増殖機構

研究課題名(英文)The host-pathogen interaction controlled by MAC glycopeptidolipid

研究代表者

藤原 永年 (Fujiwara, Nagatoshi)

帝塚山大学・現代生活学部・教授

研究者番号：80326256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：MAC症の起因菌であるMAC菌は糖ペプチド脂質抗原GPLにより28種類の血清型が規定されている。臨床分離株Ku11株由来新規GPLの糖鎖構造、生合成遺伝子を解析した。GPLの宿主認識は、糖鎖のアセチル基修飾が重要で修飾位置によりTLR 2を介した宿主認識機構から回避されることを明らかにした。また、*M. smegmatis* J15cs株はGPL生合成遺伝子*mps1*の変異によりGPLが欠失し、細胞形態がrough型に変化し、宿主内で長期に生存することを証明した。以上の結果から、MAC菌は血清型特異GPLにより感染性・病原性が制御されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC) is the most common pathogen of nontuberculous mycobacteria which causes pulmonary disease. MAC species are classified 28 serotypes according to the species-specific glycopeptidolipid (GPL) antigen. In this study, we identified a novel GPL in structure and biosynthesis gene cluster from clinical isolate. The host recognition of GPLs by toll-like receptor-2 (TLR2) was escaped by the position of acetyl groups in the oligosaccharide. On the other hand, Mycobacterium smegmatis J15cs strain deleted GPLs by the mutation of *mps1* gene. The bacterial morphology of J15cs strain changed the rough type from smooth type, and can survived longer in the host cells. These results implied that serotype-specific GPLs play important roles in MAC infections and pathogenesis.

研究分野：細菌学、微生物学、脂質生化学、食品衛生学

キーワード：非結核性抗酸菌症 宿主応答 糖ペプチド異質

1. 研究開始当初の背景

(1) 非結核性抗酸菌症の主要起因菌である MAC 菌の特徴

MAC 症は、非結核性抗酸菌症の約 8 割を占め、抗結核薬の効き難い難治性の呼吸器感染症である。特に AIDS 患者を含む易感染性宿主に甚大な被害を与えている。MAC 菌は細胞壁が強固な脂質成分に富む(菌体の約 40%) ことが最大の特徴であり、結核菌に存在しない糖ペプチド脂質である GPL 抗原を細胞表層に有している。GPL 構造と血清反応から 28 種類の血清型に分類され、血清型により MAC 菌の感染性が異なり、血清型と病原性の連関が指摘されている。

(2) GPL に関する国内外の研究動向

MAC 症は疫学的調査から血清型に偏在性があり、GPL を抗原とした血清学的迅速診断法が開発され、病態との連関が指摘されている。現在のところ、血清型特異 GPL の化学構造は 17 種類のみ同定され、生合成経路は共通糖の糖転移酵素遺伝子 (*gtfB*, *rtfA*) がクローニングされているが、完全糖鎖の生合成経路の解明には至っていない。貪食細胞の活性化、TLR を介した宿主認識、サイトカイン産生能 (IFN- γ , TNF- α , IL-10 等) が報告され、血清型により宿主応答に差があり、GPL は MAC 菌の病原性・感染性を反映する重要な菌側因子である。我々は MAC 症の宿主感染機序を脂質生化学・宿主免疫応答の両側面から検討を行っている。

2. 研究の目的

我々は GPL 構造の違いや天然型 GPL の TLR2 を介した宿主認識機構から、MAC 菌の感染性や病原性への GPL 関与を報告した。本研究では、MAC 菌が感染宿主内で GPL のアセチル基修飾の変化により、宿主免疫応答から逃避して長期生存を可能にすることを分子機序から実証する。新規臨床分離 Ku11 株を含む MAC 菌 GPL の構造解析、生合成遺伝子からの生合成経路を解明する。これらの結果を基に GPL のアセチル基修飾の位置や個数による宿主応答への影響を解析することで、MAC 菌の宿主内生存戦略を脂質免疫学的に解明する。これらの知見から、新規抗菌薬・ワクチンの開発を目指した新思考を提案する。

3. 研究の方法

(1) GPL の精製と構造、生合成遺伝子群の解明

MAC 菌を培養集菌後、Forch 法に準じて脂質画分を抽出し、弱アルカリ加水分解、アセト

ン沈澱、Sep-pack カラムクロマト、TLC により GPL を精製純化した。新規 GPL は MALDI-TOF MS から質量数、MS/MS 解析から糖配列、アルジトールアセテート誘導体の GC/MS から糖の分子種、部分メチル化アルジトールアセテート誘導体の GC/MS から糖鎖結合位置、NMR 解析 (COSY, HMQC) からアノマー体同定を実施し、最終的に構造を決定した。*rtfA* 遺伝子を標的に GPL 生合成遺伝子群をクローニングした。生合成遺伝子群の open reading frame (*orf*) を決定し、各 *orf* のデータベース相同性検索と *orf* 欠失株の産生 GPL 構造相関から、個々の *orf* の機能を推定した。

(2) GPL の宿主認識機序、構造相関の解明

天然型、アルカリ安定型 GPL の構造比較から、天然型 GPL の糖鎖修飾基、部位を特定した。天然型 GPL のアセチル基修飾は MALDI-TOF MS で質量数変化 (43 マス, CH₃CO-) から解析した。TLR2, 4 を形質導入した HEK293 細胞を天然型、アルカリ安定型 GPL で刺激し、レポーター遺伝子アッセイで NF- κ B 活性化を検討し、宿主認識の構造相関を解明した。

4. 研究成果

(1) *M. intracellulare* ku11 株由来新規 GPL

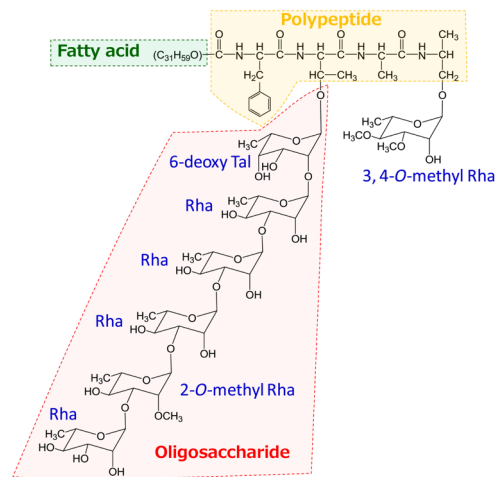


図 1. Ku11 株由来新規 GPL の構造

非結核性抗酸菌症の臨床分離株 Ku11 株を 16S rRNA, *rpoB*, *hsp65* の相同性試験から系統樹を作成し *M. intracellulare* であることを確認した。7H11 寒天培地で培養した菌体から総脂質画分を抽出し、弱アルカリ加水分解を施してアルカリ安定脂質を回収した。アセトン沈澱法、カラムクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーにより Ku11 株特異 GPL を精製純化した。MALDI-TOF/MS (分子量決定)、MALDI-TOF/MS-MS (糖配列決定)、GC/MS (糖の

アルジトールアセテート誘導体から糖の分子種・結合位置決定)、NMR (アノマー体決定) 等の各種分析から Ku11 株特異 GPL の糖鎖構造を α -Rha-(1 \rightarrow 3)-2-O-Me- α -Rha-(1 \rightarrow 3)- α -Rha-(1 \rightarrow 3)- α -Rha-(1 \rightarrow 3)- α -Rha-(1 \rightarrow 2)-6-d- α -Tal と決定した (図 1)。

(2) *M. smegmatis* J15cs 株の特徴

M. smegmatis J15cs 株は *M. smegmatis* mc² 155 株に比べ宿主細胞内で長期に生存することが明らかになった。脂質生化学的特徴を検討した結果、J15cs 株が mc² 155 と相違する点は GPL が欠損していることが明らかとなり、宿主細胞内での J15cs 株の長期生存は GPL に起因することを立証した。J15cs 株の GPL 生合成遺伝子 *mps1* 遺伝子が mc² 155 に比較して 18 bp 欠損しており、J15cs 株に mc² 155 株の *mps1* 遺伝子を入れ戻した変異株は GPL 産生を回復した。この変異株の特徴を精査したところ、細胞形態が J15cs 株本来の rough 型から mc² 155 株の smooth 型に変化し、宿主細胞内での生存期間も mc² 155 株と同様の挙動を示し、J15cs 株本来の長期生存が認められなかった。以上より、J15cs 株は細胞表層に存在する特徴的な GPL 分子を欠損により形態が smooth 型から rough 型に変化し、宿主認識に支障を来したこと、また、GPL 欠損により TLR2 レセプターによる認識機構から回避したことにより宿主細胞内で長期生存することが示唆された (図 2)。

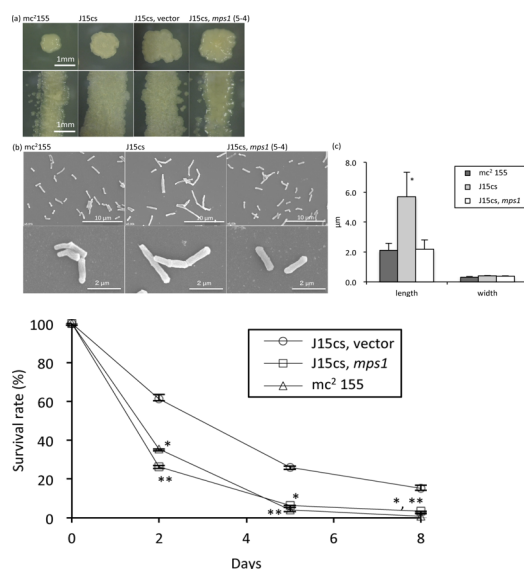


図 2. J15cs 株の形態と細胞内長期生存

(3) Ku11 株由来新規 GPL の宿主応答機序

MAC 菌は弱アルカリ加水分解して得られた GPL の糖鎖構造と血清反応の違いから 28 種類の血清型に分類されるが、天然では、GPL 糖鎖

水酸基の一部がアセチル化された天然型 GPL (intact GPL) を保有していた。MALDI-TOF MS 解析の結果、Ku11 株の intact GPL は、6-deoxy Tal および 2-O-methyl Rha に 1 から 3 個のアセチル基が結合し、その結合位置と結合数の違いにより 6 種類の intact GPL が同定された。Ku11 株が含有する intact GPL のアセチル化パターンと宿主応答について検討したところ、2-O-methyl Rha にアセチル基修飾がない intact GPL は、TLR2 を介して宿主認識されたが、アセチル化 2-O-methyl Rha を持つ intact GPL は、TLR2 によって宿主認識されなかった。このことから、TLR2 による認識を回避するために、Ku11 株は GPL 糖鎖の 2-O-methyl Rha をアセチル基で修飾している可能性が示唆された (図 3)

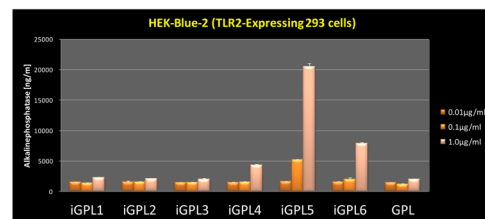
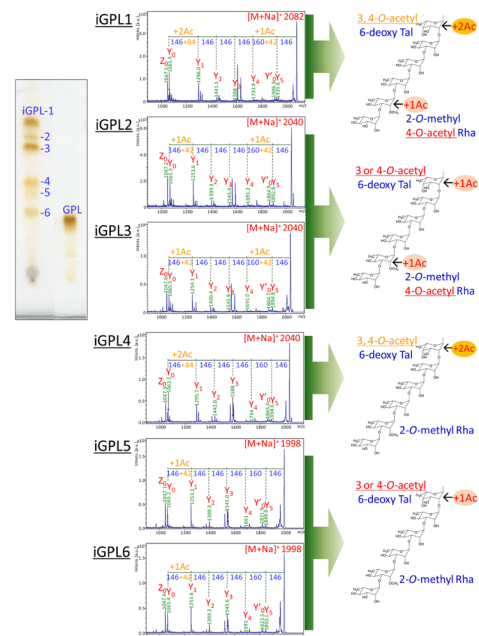


図 3. Ku11 株 intact GPL のアセチル修飾

以上より、MAC臨床分離株Ku11のGPLは新規 GPLであり、アセチル基付加により宿主応答が異なったこと、*M. smegmatis* J15cs株は、GPL 欠損により菌体形態が変化し、宿主内での長期生存が可能となったことを明らかにした。特定の糖脂質分子がMAC菌の形態、宿主応答に関与し、感染性・病原性の発現に重要な役割を果たしている。これらの知見は糖脂質分子が病原性発揮や汗腺をコントロールするター

ゲット分子となり感染症制圧に貢献できることが示唆されたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計11件)

- ① Hashimoto M., M. Mizukami, K. Osuki, N. Fujiwara, Y. Suda, and T. Uchiumi. 2017. Characterization of O-antigen polysaccharide backbone derived from nitric oxide-inducing *Mesorhizobium loti* MAFF 303099 lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* 445: 44-50. doi: 10.1016/j.carres.2017.04.002.
- ② Matsushima H., Y. Kumagai, A. Vandenberg, H. Kataoka, M. Kadana, H. Fukamachi, T. Arimoto, H. Morisaki, N. Fujiwara, N. Okahashi, and H. Kuwata. 2017. Microarray analysis of macrophage response to infection with *Streptococcus oralis* reveals the immune-suppressive effect of hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 485(2):461-467. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.048.
- ③ Singh, A., C Varela, K. Bhatt, N. Veerapen, O.Y. Lee, H.H. Wu, G.S. Besra, D.E. Minnikin, N. Fujiwara, K. Teramoto, A. Bhatt. 2016. Identification of a desaturase involved in mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium smegmatis*. *PLoS One.* 11(10): e0164253. doi: 10.1371/journal.pone.0164253.
- ④ T. Sato, J. Tomida, T. Naka, N. Fujiwara, A. Hasegawa, Y. Hoshikawa, J. Matsuyama, N. Ishida, T. Kondo, K. Tanaka, N. Takahashi, Y. Kawamura. 2015. *Porphyromonas bronchialis* sp. nov. Isolated from Intraoperative Bronchial Fluids of a Patient with Non-Small Cell Lung Cancer. *Tohoku J. Exp. Med.* 237(1):31-37. doi: 10.1620/tjem.237.31.
- ⑤ N. Fujiwara, N. Ohara, M. Ogawa, S. Maeda, T. Naka, H. Taniguchi, S. Yamamoto, and M. Ayata. 2015. Glycopeptidolipid of *Mycobacterium smegmatis* J15cs affects morphology and survival in host cells. *PLoS One* 10:e0126813. doi: 10.1371/journal.pone.0126813.
- ⑥ K. Teramoto, M. Suga, T. Sato, T. Wada, A. Yamamoto, and N. Fujiwara. 2015. Characterization of mycolic acids in total fatty acid methyl ester fractions from *Mycobacterium* species by high resolution MALDI-TOFMS. *Mass Spectrometry.* Vol.4 A0035 doi: 10.5702/massspectrometry.A0035.
- ⑦ Y. Kawamura, S. Kuwabara, S.A. Kania, H. Kato, M. Hamagishi, N. Fujiwara, T. Sato, J. Tomida, K. Tanaka, and D.A. Bemis. 2015. *Porphyromonas pogonae* sp. nov., an anaerobic but low concentration oxygen adapted coccobacillus isolated from lizards (*Pogona vitticeps*) or human clinical specimens, and emended description of the genus *Porphyromonas* Shah and Collins 1988. *Syst. Appl. Microbiol.* 38(2):104-109. doi: 10.1016/j.syapm.2014.11.004.
- ⑧ Y. Hattori, D. Morita, N. Fujiwara, D. Mori, T. Nakamura, H. Harashima, S. Yamasaki, and M. Sugita. 2014. Glycerol monomycolate is a novel ligand for the human, but not mouse macrophage inducible C-type lectin, mincle. *J. Biol. Chem.* 289 (22): 15405-15412. doi: 10.1074/jbc.M114.566489.
- ⑨ N. Fujiwara, S.A. Porcelli, T. Naka, I. Yano, S. Maeda, H. Kuwata, S. Akira, S. Uematsu, T. Takii, H. Ogura, and K. Kobayashi. 2013. Bacterial sphingophospholipids containing non-hydroxy fatty acid activate murine macrophages via Toll-like receptor 4 and stimulate bacterial clearance. *Biochim. Biophys. Acta.* 1831 (6): 1177-1184. doi: 10.1016/j.bbali.2013.03.008.
- ⑩ 藤原永年. 2013. BCG 亜株の脂質生化学的特徴. *医学のあゆみ.* 247 (7): 627-628.
- ⑪ 藤原永年. 2013. 非結核性抗酸菌由来糖ペプチド脂質抗原の構造、生合成経路、宿主応答機序. *The Lung Perspectives* 22 (1): 65-72.

〔学会発表〕(計30件)

国際学会

- ① N. Fujiwara, T. Naka, H. Kuwata, S. Maeda. Bacterial sphingophospholipids activate murine macrophages via Toll-like receptor 4 and stimulate bacterial clearance. *FEMS 2013 The 5th*

- Congress of European Microbiologists. July 21-25, 2013: Reipzig, Germany.
- ② K. Teramoto, T. Sato, T. Wada, A. Yamamoto, N. Fujiwara. Application of MALDI Spiral-TOF MS with high mass resolving power to assign mycolic acid subclasses in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS 2013 The 5th Congress of European Microbiologists. July 21-25, 2013: Reipzig, Germany.
- ③ N. Fujiwara, T. Naka, M. Ayata, M. Shibata, H. Kuwata, H. Ogura, and S. Maeda. Novel serotype-specific glycol-peptidolipid from *Mycobacterium intracellulare* clinical isolate. The 5th EMBO meeting. September 21-24, 2013.: Amsterdam, The Netherlands.
- ④ S. Maeda, T. Wada, T. Naka, M. Shibata, N. Fujiwara. Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), especially Beijing genotype MTB, in Japan by using the variable-number of tandem repeats (VNTR) and a next generation sequencer (NGS). The 5th EMBO meeting. September 21-24, 2013.: Amsterdam, The Netherlands.
- ⑤ M. Shibata, T. Naka, S. Maeda, and N. Fujiwara. Production of anti-lipid IgG antibodies in rabbit immunized with mycobacterial lipid antigens. The 5th EMBO meeting. September 21-24, 2013.: Amsterdam, The Netherlands.
- ⑥ Y. Kawamura, S. Kuwabara, S. A. Kania, H. Kato, M. Hamagishi, S. Hayakawa, N. Fujiwara, T. Naka, T. Sato, J. Tomida, K. Tanaka, T. Yoshida, Y. Morita, D. A. Bemis. *Porphyromonas pogonae* sp. nov.: A Strong Beta-Hemolytic, Low Concentration Oxygen Tolerant Species from Lizards and Human Clinical Specimens. 114th General Meeting, The American Society for Microbiology. May 17-20, 2014: Boston, USA.
- ⑦ K. Teramoto, N. Fujiwara. Rapid identification of *Mycobacterium* using mycolic acids by MALDI spiral-TOFMS with ultra high mass-resolving power. International Unions of Microbiological Societies Congress 2014. July 27-August 1, 2014: Montreal, Canada.
- ⑧ K. Teramoto, T. Sato, N. Fujiwara, T. Tamura, M. Hamada, Ken-ichiro Suzuki. Characterization of Bacterial Fatty Acids by MALDI spiral-TOFMS Combined with Kendrick Mass Defect Plot Analysis. 20th International Mass Spectrometry Conference (IMSC). August 24-29, 2014: Genova, Switzerland.
- ⑨ N. Fujiwara, T. Naka, H. Kuwata, S. Maeda. Identification of bacterial sphingophospholipids and their activation of murine macrophages via Toll-like receptor 4. FEBS EMBO 2014. August 30-September 4, 2014: Paris, France.
- ⑩ S. Maeda, N. Nakata, T. Naka, M. Kai, N. Fujiwara. Isolation of mycobacterial mutants that disrupted the phospholipid synthetase gene, and their properties. FEBS EMBO 2014. August 30-September 4, 2014: Paris, France.
- ⑪ N. Fujiwara, M. Ayata, N. Ohara, M. Ogawa, T. Naka, H. Taniguchi, S. Yamamoto, and S. Maeda. The deletion of glycopeptidolipid in *Mycobacterium smegmatis* J15cs strain affects morphology and survival in host cells. 40th FEBS Congress. July 3-10, 2015: Berlin, Germany.
- ⑫ M. Shibata, T. Naka, S. Maeda, N. Fujiwara. Production and characterization of antibodies to Mycobacterial lipid antigens in rabbit. 40th FEBS Congress. July 3-10, 2015: Berlin, Germany.
- ⑬ S. Maeda, N. Nakata, H. Yamada, N. Fujiwara. Genetic analysis of the glycopeptidolipids (GPLs) synthetic pathway in *Mycobacterium intracellulare*. 40th FEBS Congress. July 3-10, 2015: Berlin, Germany.
- ⑭ N. Fujiwara, M. Ayata, T. Naka, H. Kuwata, and S. Maeda. The characterization of a novel serotype-specific glycopeptidolipid from clinical non-tuberculous mycobacteria. The 16th Asia-Pacific Congress of Clinical Microbiology and Infection. November 30-December 3, 2016: Melbourne, Australia.

国内学会発表

- ① 中崇、前田伸司、柴田満、水野浄子、藤原永年. 細胞内感染した MAC 菌における糖ペプチド脂質抗原の分子種組成変化. 第 87 回

- 日本細菌学会総会. 2014年3月26-28日: 東京(タワーホール船堀)
- ② 寺本華奈江、藤原永年. 超高分解能 MALDI spiral-TOFMS による結核菌ミコール酸の迅速分析. 第87回日本細菌学会総会. 2014年3月26-28日: 東京(タワーホール船堀)
- ③ 小川翔大、山本龍二、堀田康弘、花村菜月、筑比地慧、宮田江里香、高見篤郎、徳田美季、富田陽香、小川賢二、八木哲也、大原直也、藤原永年、前田伸司、山崎利雄、西森敬、後藤義孝、伊藤佐生智、小野寄菊夫、瀧井猛将. *Mycobacterium avium* の酸性環境下におけるアルギニンデイミナーゼ誘導機構の解析. 第84回実験結核研究会総会. 2014年5月8日: 岐阜(長良川国際会議場)
- ④ 藤原永年、和田崇之、前田伸司. 超高分解能 MALDI Spiral-TOFMS によるミコール酸の簡易迅速分析法の開発. 第89回日本結核病学会総会. 2014年5月9-10日: 岐阜(長良川国際会議場)
- ⑤ 大原直也、趙娜、和田崇之、藤原永年、前田伸司、山本三郎、瀧井猛将、前山順一. BCG Tokyo172-1 に存在するサブポピュレーションの比率変化に関する検討. 第89回日本結核病学会総会. 2014年5月9-10日: 岐阜(長良川国際会議場)
- ⑥ 河村好章、佐藤拓一、富田純子、森田雄二、中崇、藤原永年、田中香里. 発育にビタミンKを要求する新しい *Porphyromonas* 属菌種の分類学的検討. 第88回日本細菌学会総会. 2015年3月26-28日: 岐阜(長良川国際会議場)
- ⑦ 柴田満、前田伸司、藤原永年. 結核菌由来脂質抗原の家兎免疫による抗脂質IgG抗体の産生とその性質. 第90回日本結核病学会総会. 2015年3月27-28日: 長崎(長崎ブリックホール)
- ⑧ 藤原永年、大原直也、小川みどり、前田伸司、中崇、谷口初美、山本三郎、綾田稔. *Mycobacterium smegmatis* J15cs 株の糖ペプチド脂質欠損による形態変化と宿主内生存. 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月23-25日: 大阪(国際交流センター)
- ⑨ 山本龍二、伊藤佐生智、堀田康弘、大原直也、小川賢二、八木哲也、前田伸司、藤原永年、山崎利雄、西森敬、後藤義孝、肥田重明、小野寄菊夫、瀧井猛将. *Mycobacterium avium* の酸性環境下で誘導されるアルギニンデイミナーゼの解析. 第89回日本細菌学会総会. 2016年3月23-25日: 大阪(国際交流センター)
- ⑩ 藤原永年、大原直也、小川みどり、山本三郎、前田伸司. *M. smegmatis* J15cs 株の glycopeptido-lipid 欠損による形態変化と宿主内生存. 第91回日本結核病学会総会. 2016年5月27-28日: 金沢(石川県立音楽堂、ホテル日航金沢)
- ⑪ 伊藤佐生智、堀田康弘、大原直也、小川賢二、八木哲也、前田伸司、藤原永年、山崎利雄、西森敬、瀧井猛将. *Mycobacterium avium* の酸性環境下での適応能に関する研究. 第91回日本結核病学会総会. 2016年5月27-28日: 金沢(石川県立音楽堂、ホテル日航金沢)
- ⑫ 田村庄平、中山真彰、藤原永年、和田崇之、山本三郎、小崎弘貴、大原直也. BCG の細胞壁糖脂質 PDIM/PGL の胆汁酸に対する抵抗性への関与. 第69回日本細菌学会中国・四国支部総会. 2016年10月15-16日: 香川(かがわ国際会議場)
- ⑬ 前田伸司、和田崇之、藤原永年. 結核菌の遺伝系統と型別法. 第28回微生物シンポジウム. 2016年9月2-3日: 愛知(愛知学院大学薬学部)
- ⑭ 藤原永年、綾田稔、中崇、桑田啓貴、前田伸司. 非結核性抗酸菌臨床分離株から分離された新規糖ペプチド脂質抗原. 第90回日本細菌学会総会. 2017年3月19-21日: 仙台(仙台国際センター展示棟)
- ⑮ 田村庄平、中山真彰、藤原永年、和田崇之、山本三郎、小崎弘貴、飯田征二、大原直也. BCG の細胞壁糖脂質 PDIM/PGL の胆汁酸に対する抵抗性への関与. 2017年3月19-21日: 仙台(仙台国際センター展示棟)
- ⑯ 星野仁彦、吉田光範、深野華子、和田新平、藤原永年、鹿住祐子、御手洗聡. *Mycobacterium shigaense* の謎. 第92回日本結核病学会総会. 2017年3月23-24日: 東京(東京国際フォーラム)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 永年 (FUJIWARA NAGATOSHI)
 帝塚山大学・現代生活学部食物栄養学科・教授
 研究者番号: 80326256

(2) 研究分担者

綾田 稔 (AYATA MINORU)
 大阪市立大学大学院・医学研究科・ウイルス学分野・准教授
 研究者番号: 90222702