

機関番号： 82603

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2008~2010

課題番号： 20790347

研究課題名 (和文) 病原性に関与する抗酸菌糖脂質の生合成及び機能の解析

研究課題名 (英文) Biosynthetic and functional analysis of mycobacterial glycolipid

研究代表者

宮本 友司 (MIYAMOTO YUJI)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センター感染制御部・主任研究官

研究者番号： 40392328

研究成果の概要 (和文)：非結核性抗酸菌症の代表的原因細菌である *Mycobacterium avium* complex (MAC) には主要糖脂質成分として glycopeptidolipid (GPL) が存在する。本研究においては、これまで不明であった高病原性型 GPL の糖鎖生合成を明らかにし、さらに、MAC の病原性に関わる菌体性状の変化が GPL の糖鎖構造の違いによって引き起こされていることを示した。

研究成果の概要 (英文)： *Mycobacterium avium* complex contains the glycopeptidolipid as one of major components of cell envelope. This study revealed the glycosylation pathways of some specific glycopeptidolipids showing high pathogenicity and that their oligosaccharide portion determined biochemical properties of cell envelope, which was associated with pathogenicity.

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	0	1,500,000
2009年度	1,000,000	0	1,000,000
2010年度	800,000	0	800,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

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：抗酸菌、糖脂質、糖鎖、生合成

1. 研究開始当初の背景

Mycobacterium avium complex (MAC) に代表される非結核性抗酸菌は、土壌や水中などの自然環境に広く存在し、結核様症状を誘導する。非結核性抗酸菌症は、加齢や HIV-1 感染等により免疫力が低下すると、容易に日和見感染して発症する重要な慢性感染症である。一方、人から人への感染が成立しにくい

反面、未だ有効な治療薬やワクチンが存在しないため、一旦発症するとその制御は極めて難しい疾患である。従って、有効な予防・治療法の開発は重要な課題となっているが、これらの解決へ不可欠な発症機構の解明も早急な対応が望まれている。

2. 研究の目的

結核菌やらい菌を含む抗酸菌の菌体成分には、様々な種類の糖脂質成分が豊富に含まれる。この性質は他の細菌とは異なった点であり、抗酸菌の病原性発揮の一端を担うと考えられている。非結核性抗酸菌症は、結核やハンセン病などと並ぶ主要な抗酸菌感染症の一つであり、*Mycobacterium avium* complex (MAC) に属す菌群による感染が最も多くを占める。これまでの研究により、MAC の病原性には、菌体に含まれる糖脂質成分 glycopeptidolipid (GPL) が深く関与することが明らかとなっている。GPL は、菌種及び分離株によって特異的な糖鎖構造 (oligosaccharide) を持つため、その種類は約 30 に及ぶ。また、GPL は宿主液性免疫を刺激し、患者血清中に特異抗体を産生するなど抗原性に富んだ分子であることから、菌種の血清型を規定している。また、MAC の疫学的調査により、分離株の血清型 (糖鎖構造) と臨床症状との間には関連性があることが報告されている。従って、MAC の病原性及び病変誘導機構において、GPL の糖鎖構造が強く影響を与えていることが推察できるが、糖鎖と宿主の相互作用等の詳細な機構は未解明である。そこで、本研究においては、AIDS 患者に偏在し、深刻な合併症を引き起こす高病原性血清型 GPL (4 型及び 8 型) に焦点を絞り、未だ解明されていないこれらの糖鎖生合成及び糖鎖構造が宿主に与えるメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

4 及び 8 型血清型株から、それぞれの GPL 糖鎖生合成への関与が予測されるゲノム領域を獲得するために、配列が解明されている他血清型株の情報を基にプライマーを設計し、これらを用いてそれぞれゲノム領域を PCR により増幅した。増幅産物の塩基配列を決定した後、そこに含まれる各遺伝子を抗酸菌発現ベクターへ組み込み、血清型糖鎖を持たない GPL を生産する非病原性抗酸菌 *Mycobacterium smegmatis* に導入し組換え株として構築した。各組換え株より GPL 成分を単離・精製し、TLC、MALDI-TOF/MS、さらに GC/MS 解析に供することで各組換え株由来 GPL の糖鎖構造を決定した。得られた糖鎖構造の情報より、各遺伝子の機能及び糖鎖生合成における役割を推定した。

4. 研究成果

(1) 約 30 種類に及ぶ血清型の中で、疫学的調査から 4 型及び 8 型血清型株は強い病原性を有することが判明している。しかしながら、これらの GPL 糖鎖生合成及びそれらの機能は解明されていない。そこで、両血清型株

の GPL 糖鎖が病原性とどのように関わるのかを明らかにするため、生合成の側面から解析を行った。8 型血清型株については、4.6-kb のゲノム領域が 8 型血清型 GPL の末端糖鎖 4,6-*O*-(1-carboxyethylidene)-3-*O*-methyl-glucose の形成に関与する 3 遺伝子 (glucose 転移酵素遺伝子、ピルビン酸転移酵素遺伝子及び glucose 3-*O*-methyl 化酵素遺伝子) を含むことが判明した。一方、4 型血清型株からは、6.8-kb のゲノム領域を絞り込み、4 型血清型 GPL 特異的糖鎖 4-*O*-methyl-rhamnose の形成に関与する 2 遺伝子、rhamnose 転移酵素遺伝子及び rhamnose 4-*O*-methyl 化酵素遺伝子を同定した。とりわけ、4 型血清型株において同定した rhamnose 転移酵素遺伝子は、他の細菌に存在する hemolysin 遺伝子と相同性を示したことから、4 型血清型株は特異な進化過程を経て 4-*O*-methyl-rhamnose を含む糖鎖生合成能を獲得したことが推測された。

(2) 遺伝子解析で構築した 4 型及び 8 型 GPL 糖鎖生合成遺伝子群を有する組換え株は、菌体表層に 4 型及び 8 型 GPL 糖鎖を発現している。これらの糖鎖機能を解析するため、比較対象として、血清型 1 型及び 2 型糖鎖を発現する株も構築した。これらを培養し、形態を比較した結果、4 型及び 8 型株は、1 型及び 2 型株に比べ、著しく菌体塊を形成する傾向を示した。各糖鎖構造は、
1 型 糖 鎖 に 4,6-*O*-(1-carboxyethylidene)-3-*O*-methyl-glucose が、さらに 2 型糖鎖に 4-*O*-methyl-rhamnose が末端糖鎖として結合することによりそれぞれ 8 型及び 4 型糖鎖となる。つまり、両末端糖鎖の存在が菌体性状を大きく変化させていることが明らかとなった。菌体の性状は宿主免疫の認識機構に影響を及ぼすことも知られていることから、4 型及び 8 型血清型株の病原性獲得には両糖鎖の構造が一因となっている可能性が示唆された。

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 7 件)

- 1) Kai, M, N. H. Nguyen Phuc, A. H. Nguyen, B. D. H. Pham Thi, K. H. Nguyen, Y. Miyamoto, Y. Maeda, Y. Fukutomi, N. Nakata, M. Matsuoka, M. Masahiko, and T. T. Nguyen. 2010. Analysis of drug-resistant strains of *Mycobacterium leprae* in an endemic area of Vietnam. Clin. Infect. Dis. 52:

- e127-e132.
- 2) Komine-Aizawa, S., T. Yamazaki, T. Yamazaki, S. Hattori, **Y. Miyamoto**, N. Yamamoto, S. Haga, M. Sugitani, M. Honda, S. Hayakawa, and S. Yamamoto. 2010. Influence of advanced age on *Mycobacterium bovis* BCG vaccination in guinea pigs aerogenically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Clin. Vaccine Immunol., 17:1500-1506.
 - 3) **Miyamoto, Y.**, T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. 2010. Novel rhamnosyltransferase involved in biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* complex. J. Bacteriol., 192: 5700-5708.
 - 4) Hatta M., M. Makino, M. Ratnawati, Mashudi, Yadi, M. Sabir, N. Tandirogang, L.M.M. Rusyati, M. Kai, Y. Fukutomi, **Y. Miyamoto**, T. Mukai, and Y. Maeda. 2009. Detection of serum antibodies to *M. leprae* Major Membrane Protein-II in leprosy patients from Indonesia. Leprosy Review. 80: 402-409.
 - 5) Mukai T., Y. Maeda, T. Tamura, **Y. Miyamoto**, and M. Makino. 2008. CD4+ T-cell activation by antigen-presenting cells infected with urease-deficient recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 53: 96-106.
 - 6) Kai, M., Phuc N. H. Nguyen, Thi T. H. Hoang, A. H. Nguyen, Y. Fukutomi, Y. Maeda, **Y. Miyamoto**, T. Mukai, T. Fujiwara, T. T. Nguyen, and M. Makino. 2008. Serological diagnosis of leprosy in patients in vietnam by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein II. Clin. Vaccine Immunol. 15: 1755-1759.
 - 7) **Miyamoto, Y.**, T. Mukai, Y. Maeda, M. Kai, T. Naka, I. Yano, and M. Makino. 2008. The *Mycobacterium avium* complex *gtfTB* gene encodes a glucosyltransferase required for the biosynthesis of serovar 8-specific glycopeptidolipid. J. Bacteriol. 190: 7918-7924.
- [学会発表] (計 11 件)
- 1) **Miyamoto, Y.** and M. Makino. 2010. Characterization of the glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium avium* complex serovar 20. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference. (Boston, United States of America, 7月14日)
 - 2) 向井 徹, 松岡正典, 前田百美, **宮本友司**, 福富康夫, 牧野正彦. 2010. 抗酸菌フェージプロモーターによるらい菌の蛍光蛋白発現. 第83回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (鹿児島、5月28日).
 - 3) 甲斐雅規, 松岡正典, **宮本友司**, 牧野正彦. 2010. 次世代シーケンス解析によるらい菌株のゲノム配列比較. 第83回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (鹿児島、5月28日).
 - 4) **Miyamoto, Y.** and M. Makino. 2009. Biosynthesis of serovar 4-specific glycopeptidolipid from *Mycobacterium avium* Complex. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 44th Tuberculosis and leprosy Research Conference (福岡、7月30日)
 - 5) 前田百美, Mochammad Hatta, Ratnawati, Mashudi, Yadi, Muhammad Sabir, Nataniel Tandirogang, Luh Made Mas Rusyati, 甲斐雅規, 向井徹, **宮本友司**, 福富康夫, 牧野正彦. 2009. Major Membrane Protein-II を用いた血清診断法. 第82回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (出雲、5月14日)
 - 6) 向井 徹, **宮本友司**, 前田百美, 牧野正彦. 2009. らい菌蛋白調整に用いる発現用プロモーターの同定. 第82回日本ハンセン病学会総会・学術大会 (出雲、5月14日)
 - 7) **宮本友司**, 向井 徹, 中 崇, 甲斐雅規, 前田百美, 矢野郁也, 牧野正彦. 2009. *Mycobacterium avium* complex における glycopeptidolipid 生合成遺伝子群の転写制御解析. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋、3月13日)
 - 8) 甲斐雅規, 藤原永年, **宮本友司**, 向井 徹, 矢野郁也, 牧野正彦. 2009. 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 (名古屋、3月13日)
 - 9) **Miyamoto, Y.**, Mukai, T., Maeda, Y., Makino, M. 2008. Characterization of the glycopeptidolipid biosynthesis in *Mycobacterium avium* complex serovar 8. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 43rd Tuberculosis and leprosy Research Conference. (Baltimore, United States of America, 7月8日)
 - 10) 向井徹, 和泉眞藏, Teky Budiawan, **宮本友司**, Cita Rosita, Indropo Agusni, 松

岡正典、牧野正彦．2008．常温輸送臨床
検体の LAMP 法によるらい菌遺伝子検出．
第 81 回日本ハンセン病学会総会・学術大
会（熊本、5 月 23 日）．

- 11) 甲斐雅規、前田百美、福富康夫、宮本友
司、向井 徹、牧野正彦．2008．らい菌
由来免疫原性タンパク、MMP-II を用い
た血清診断．第 81 回日本ハンセン病学会
総会・学術大会（熊本、5 月 23 日）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 友司 (MIYAMOTO YUJI)

国立感染症研究所・ハンセン病研究センタ

ー感染制御部・主任研究官

研究者番号：40392328

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：