

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590399

研究課題名（和文）非結核性抗酸菌由来糖ペプチド脂質抗原の構造、生合成経路と宿主応答機序

研究課題名（英文）The structure and biosynthesis of glycopeptidolipid antigens from non-tuberculous acid-fast bacteria, and their host 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）：難治性の呼吸器感染症 MAC 症の起因菌である *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) 菌は糖ペプチド脂質抗原 glycopeptidolipid (GPL) により 28 種類の血清型が規定される。本研究では、構造類似の血清型特異 7, 12, 13 型について糖鎖構造を明らかにし、生合成遺伝子の解析を行った。さらに、これら血清型特異 GPL が Toll-like receptor 2 (TLR 2) を介して宿主認識されることを解明した。宿主認識には GPL の糖鎖のアセチル基修飾が重要であった。以上の結果から、MAC 菌は血清型特異 GPL の違いにより感染性・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), which causes pulmonary and extrapulmonary diseases, is the most common isolate of nontuberculous mycobacteria. MAC species are classifiable into 28 serotypes according to the epitopic oligosaccharide structure of the species-specific glycopeptidolipid (GPL) antigen. A GPL consists of a serotype-common fatty acyl peptide core and serotype-specific oligosaccharides extending from the 6-deoxy-talose. In this study, we defined the serotype 7-, 12-, and 13-specific GPL structures and biosynthesis gene cluster, and clarified the host recognition of GPLs by toll-like receptor-2 (TLR2). These results implied that serotype-specific GPLs play important roles in MAC infections.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：構造・生理、非結核性抗酸菌症、宿主応答、脂質分子

1. 研究開始当初の背景

(1) 非結核性抗酸菌症（含、MAC 症）の特徴  
抗酸菌感染症（結核、非結核性抗酸菌症）

は約 200 万人／年が死亡する世界三大感染症の一つであり、MAC 症は非結核性抗酸菌症の

約 80%を占める抗結核薬の効力が低い難治性の呼吸器感染症である。一方、抗酸菌は菌体の 40%以上が脂質成分からなり、抗酸菌の宿主感染論をこれら脂質分子の関与を排して論じることは適切でない。MAC 菌は細胞表層に結核菌にはない糖ペプチド脂質抗原 glycopeptidolipid (GPL) を発現し、その糖鎖構造から 28 種類の血清型に分類され、疫学的偏在性から血清型による病原性・感染性への差異が示唆されていた。

## (2) 国内外の研究動向

GPL は MAC 菌の形態、バイオフィルム形成に関与し、宿主免疫応答との連関が指摘された。しかしながら、血清型は GPL 抗原の薄層クロマトグラフィー (TLC) と抗血清反応から同定され、16 種類の血清型特異 GPL の化学構造が報告されているのみで、それ以外は構造未同定であった。

我々は GPL の宿主感染における役割の解析を目的に、生化学的特徴 (GPL の構造特異性、生合成経路) と宿主免疫応答機序の両側面からアプローチしてきた。

## 2. 研究の目的

我々の MAC 菌における脂質分子の生化学的、脂質免疫学的な取り組みの発展により、新規血清型 13 型 GPL の構造解析と生合成経路の解明が可能である。さらに、GPL 糖鎖構造の差異が宿主免疫応答の制御因子として MAC 菌の病原性・感染性に関与していると仮定した。本研究では 3 つの観点 (血清型特異 GPL 構造の差異、生合成経路、宿主免疫応答) から本仮定を実証し、脂質分子をターゲットとした新規抗菌薬、新規ワクチンの開発を可能にする脂質免疫学的新思考を提案する。

## 3. 研究の方法

### (1) 血清型 13 型 GPL の精製と構造解析

血清型 13 型菌を培養集菌後、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 カラムクロマトグラフィー、TLC により GPL を精製純化した。

血清型 13 型 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。

### (2) 生合成遺伝子群による生合成経路の解明

コスミドライブラリーを作製し、*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。血清型 7, 12 型 GPL 生合成遺伝子群は既にクローニング済みであり、本研究では血清型 13 型についてクローニングした。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* の機能を決定した。

### (3) GPL の宿主応答と認識機序、構造相関

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, CH<sub>3</sub>CO-) から明らかにした。

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、レポーターアッセイで NF- $\kappa$ B 活性化を検討した。また、TLR2, 4-KO マウスの骨髄性マクロファージの活性化を TNF- $\alpha$  の産生量で評価した。血清型 7, 12, 13 型 GPL を抗原とした比較検討を行い、宿主認識の構造相関を解明した。

## 4. 研究成果

(1) 血清型 7, 12, 13 型 GPL は 6-deoxy-Tal-Rha-Rha-Rha-4-*N*-acylated-4,6-dideoxy-Hex を共通の基本骨格とし、末端糖とそれにグリコシド結合した Rha に転移している *O*-メチル基の数と結合位置が相違点であった。末端 Hex は、7 型 GPL が 2 位、12 型 GPL が 3 位にメチル基転移し、13 型 GPL ではメチル基転移はなかった。末端から 2 番目の Rha は、12, 13 型 GPL が 4 位にメチル基転移し、7 型 GPL ではメチル基転移はなかった。コスミドライブラリーを作製し GPL 生合成関連遺伝子領域を同定した。血清型を規定している ORF で各 MAC を形質転換して機能解析したところ、これらメチル基転移反応は独立した 3 種類のメチル基転移酵素遺伝子 *orf2*, *orfA*, *orfB* により規定されていた。各遺伝子のメチル基転移は *orf2* が末端 Hex の 2 位に、*orfA* が末端から 2 番目の Rha の 4 位に、*orfB* が末端 Hex の 3 位に転移する基質特異性を示した。12, 13 型 MAC は共に *orfA*・*orfB* を有するが、13 型 MAC は *orfB* に 1 塩基置換を認め、機能欠失のため GPL 構造が変化していた。

(2) 血清型 GPL はアルカリ安定脂質であるが、天然では糖鎖にアセチル基が付加した状態で存在していた。血清型 13 型 GPL は付加するアセチル基の数と位置により TLC 上で 6 種類のスポットを確認し、質量分析から付加アセチル基の数を決定した (結合位置は未同定)。

弱アルカリ加水分解によりアセチル基は全て脱落し、薄層クロマトグラフィー上で1スポットに収束した。宿主応答機序の検討から、アルカリ安定 GPL でマウス脾臓細胞を刺激しても細胞は活性化されなかったが、天然型 GPL 刺激によりマウス脾臓細胞の活性化が認められた。この宿主認識は TLR2 依存的マクロファージの活性化であることを解明した。

(3) MAC 臨床分離株 Ku11 の GPL は新規 GPL であり、血清型 13 型 GPL と同様にアセチル基付加により宿主応答が異なった。Ku11 株 GPL は糖鎖へのアシル基付加がないため、天然型 GPL の宿主応答を検討することで TLR2 を介した宿主—構造相関が解明できると期待される。

以上より、MAC 菌に特徴的な血清型特異 GPL は宿主応答に関与して感染性・病原性の発現に重要な役割を果たしていると考えられた。GPL 構造、生合成遺伝子、宿主応答の解明は、MAC 症の診断のみならず、GPL 発現をコントロールする新規治療薬、新規ワクチン開発のターゲット分子として MAC 症制圧に貢献できると考える。

#### 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 9 件)

- ① N. Fujiwara, S.A. Porcelli, T. Naka, I. Yano, S. Maeda, H. Kuwata, S. Akira, S. Uematsu, T. Takii, H. Ogura, 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.* 1831:1177-1184.
- ② I. Matsunaga, S. Meda, N. Nakata, N. Fujiwara. 2012. The polyketide synthase-associated multidrug tolerance in *Mycobacterium intracellulare* clinical isolates. *Chemotherapy.* 58(5):341-348.
- ③ H. Yamada, A. Bhatt, R. Danev, N. Fujiwara, S. Maeda, S. Mitarai, K. Chikamatsu, A. Aono, K. Nitta, W.R. Jacobs Jr., K. Nagayama. 2012. Non-acid-fastness in *Mycobacterium tuberculosis*  $\Delta kasB$  mutant correlates with the cell envelope electron density. *Tuberculosis (Edinb).* 92: 351-357.
- ④ N. Fujiwara, T. Naka, M. Ogawa, R. Yamamoto, H. Ogura, and H. Taniguchi. 2012. Characteristics of *Mycobacterium smegmatis* J15cs strain lipids. *Tuberculosis (Edinb).* 92: 187-192.

- ⑤ T. Naka, S. Maeda, M. Niki, N. Ohara, S. Yamamoto, I. Yano, J. Maeyama, H. Ogura, K. Kobayashi, and N. Fujiwara. 2011. Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 substrain. *J. Biol. Chem.* 286(51): 44153-44161.
- ⑥ T. Naka, N. Nakata, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Doe, S. Mizuno, M. Niki, K. Kobayashi, H. Ogura, M. Makino, and N. Fujiwara. 2011. The structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J. Bacteriol.* 193: 5766-5774.
- ⑦ J. Arcos, S. J. Sasindran, N. Fujiwara, J. Turner, L. S. Schlesinger, and J. B. Torrelles. 2011. Human lung hydrolases delineate *Mycobacterium tuberculosis*-Macrophage interactions and the capacity to control infection. *J. Immunol.* 187: 372-381.
- ⑧ Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Naka, N. Fujiwara, Y. Maeda, M. Kai, S. Mizuno, I. Yano, and M. Makino. 2010. A novel rhamnosyltransferase involved in the biosynthesis of serovar 4-specific glycolipid from *Mycobacterium avium* complex. *J. Bacteriol.* 192: 5700-5708.
- ⑨ S. P. Harris, N. Fujiwara, R. H. Mealey, D. C. Alperin, T. Naka, R. Goda, and S. A. Hines. 2010. Identification of *Rhodococcus equi* lipids recognized by host cytotoxic T lymphocytes. *Microbiology* 156:1836-1847.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 藤原永年、中崇、柴田満、前田伸司. 抗酸菌における形態、宿主応答と関連した脂質生化学的一考察. 第 88 回日本結核病学会総会. 2013 年 3 月 28-29 日: 千葉(幕張メッセ 国際会議場)
- ② 中崇、前田伸司、柴田満、水野浄子、藤原永年. MAC 菌 Ku11 株の天然型糖ペプチド脂質と宿主応答. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 18-20 日: 千葉(幕張メッセ 国際会議場)
- ③ 前田伸司、中崇、藤原永年. 反復配列多型 (VNTR) 分析を利用した結核菌群の同定と型別. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 18-20 日: 千葉(幕張メッセ 国際会議場)
- ④ N. Fujiwara, T. Naka, M. Ayata, M. Ogawa, K. Fukuda, S. Maeda, H. Ogura, M. Shibata, Y. Ogura, T. Hayashi, and H. Taniguchi. Deletion of glycopeptidolipids in *Mycobacterium smegmatis* J15cs strain and its host responses. 112<sup>th</sup> General Meeting, The American Society for Microbiology. June

- 16-19, 2012: San Francisco, USA.
- ⑤ T. Naka, S. Maeda, M. Niki, N. Ohara, S. Yamamoto, I. Yano, J. Maeyama, H. Ogura, K. Kobayashi, M. Shibata, and N. Fujiwara. Lipid phenotypes of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin Tokyo 172 sub-strain and their host responses. 112<sup>th</sup> General Meeting, The American Society for Microbiology. June 16-19, 2012: San Francisco, USA.
- ⑥ M. Shibata, T. Naka, S. Maeda, H. Ogura, and N. Fujiwara. Production and characterization of polyclonal rabbit antibodies to mycobacterial lipid antigens. 112<sup>th</sup> General Meeting, The American Society for Microbiology. June 16-19, 2012: San Francisco, USA.
- ⑦ S. Maeda, N. Nakata, T. Naka, M. Kai, and N. Fujiwara. Isolation of the phosphatidylserine synthetase knock-out mutants from mycobacteria, and their properties. 112<sup>th</sup> General Meeting, The American Society for Microbiology. June 16-19, 2012: San Francisco, USA.
- ⑧ 藤原永年, 中崇, 前田伸司, 柴田満, 仁木満美子, 大原直也, 前山順一, 矢野郁也, 山本三郎. BCG Tokyo 172 type I, II株の形態及び脂質分子の分布と機能. 第 87 回日本結核病学会総会. 2012 年 5 月 10-11 日: 広島(広島国際会議場)
- ⑨ 中崇, 前田伸司, 柴田満, 水野浄子, 藤原永年. 臨床分離MAC菌の新規血清型特異糖ペプチド脂質抗原と宿主応答. 第85回日本細菌学会総会. 2012年3月27-29日: 長崎(長崎ブリックホール)
- ⑩ 松永勇, 前田伸司, 中田登, 中崇, 藤原永年, 杉田昌彦. マイコバクテリアのポリケチド合成酵素 Pks12 によるポリメチル脂肪酸の産生. 第 84 回日本生化学会大会. 2011 年 9 月 21-24 日: 京都(国立京都国際会館)
- ⑪ T. Naka, S. Maeda, R. Yamamoto, M. Niki, N. Ohara, I. Yano, S. Yamamoto, J. Maeyama, H. Ogura, and N. Fujiwara. Comparative phenotypes in two subpopulations of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Tokyo 172 substrain. International Unions of Microbiological Societies 2011 Congress. September 6-10, 2011: Sapporo Convention Center, Sapporo, Hokkaido, Japan.
- ⑫ 藤原永年, 合田麗奈, 佐藤明正, 矢野郁也, 前田伸司. 臨床分離MAC菌の血清型特異糖ペプチド脂質抗原の分布と新規構造. 第 86 回日本結核病学会総会. 2011 年 6 月 2-3 日: 東京(日本教育会館)
- ⑬ J. Arcos, S. Sasindran, N. Fujiwara, J.

Turner, L. S. Schlesinger, and J. B. Torrelles. Lung surfactant hydrolases alter the infection outcome of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. Tuberculosis: Immunology, Cell Biology and Novel Vaccination Strategies, Part of the Keystone Symposia Global Health Series. January 15-20, 2011: Fairmont Hotel Vancouver, Vancouver, British Columbia, Canada.

- ⑭ 藤原永年, 前田伸司, 吉村満美子, 大原直也, 前山順一, 瀧井猛将, 矢野郁也, 山本三郎. BCG Tokyo 172 type I, II間の脂質生化学的比較. 第85回日本結核病学会総会. 2010年5月20-21日: 京都(京都テルサ)

〔図書〕(計2件)

- ① Fujiwara, N. 2012. Distribution, Characterization of Mycobacterial Glycolipids and Host Responses, Glycosylation, Stefana Petrescu (Ed.), ISBN: 978-953-51-0771-2, InTech, Chapter 5; 101-126.
- ② Fujiwara, N., and I. Yano. 2011. Anticancer immunotherapeutics: mycoloyl glycolipids and lipoglycan in the cell wall, p. 193-212 (Chapter IV, 13). In T. Takii, J. Maeyama, S. Yamamoto (ed.), BCG-Vaccine and Adjuvant. Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo.

## 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

なし

### (3) 連携研究者

前田 伸司 (MAEDA SHINJI)  
結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部結核菌情報科・科長  
研究者番号: 50250212

矢野 郁也 (YANO IKUYA)  
日本 BCG 製造株式会社中央研究所・顧問  
研究者番号: 60047008

中 崇 (NAKA TAKASHI)  
株式会社 MBR 主任研究員  
研究者番号: 40426599