

Rhodococcus terrae 由来糖脂質による マウス肺肉芽腫炎症病変誘導

Mycoloyl glycolipids from *Rhodococcus terrae* induce granulomatous lesions
in mouse lungs

藤原 永年*

Nagatoshi Fujiwara

Rhodococcus terrae is one of the weakly acid-fast nocardioform actinomycete bacterium that is closely related to *Mycobacterium tuberculosis*. The specific feature of acid-fast bacteria is the presence of long chain fatty acids, so-called mycolic acids. *R. terrae* produced several mycoloyl glycolipids by culturing with specific sugar as carbon sources. Trehalose-6,6'-dimycolate (TDM), trehalose-6-monomycolate (TMM), glucose-6-monomycolate (GMM), fructose-6-monomycolate (FMM), and mannose-6-monomycolate (MMM) were purified from *R. terrae*, and the structures were analyzed by MALDI-TOF MS. It was estimated the activity of granuloma formation in mouse lungs by intravenous injection of each mycoloyl glycolipid. TDM significantly induced granulomatous lesions in mouse lungs that were composed of macrophages and neutrophils. TMM and GMM have middle-ranged activity of granuloma formation. FMM and MMM hardly induced granulomatous lesions. The TNF- α was produced in lung lesions, and we clarified that the granuloma formation was related with both the sugar moiety and the composition of mycolic acids.

1. 緒言

結核菌を始めとする抗酸菌、類縁抗酸菌はミコール酸を含む脂質成分に富むことが特徴である。*Rhodococcus terrae*は天然培地の炭素源を変えて培養することにより trehalose-6,6'-dimycolate (TDM), trehalose-6-monomycolate (TMM) に加え、糖部分が異なる glucose-6-monomycolate (GMM), fructose-6-monomycolate (FMM), mannose-6-monomycolate (MMM) を産生する。TDMは単独分子としてマウス尾静脈より投与すると、肺に結核類似性肉芽腫炎症病変を形成する性質があり、各種免疫薬理学的活性が報告されている¹⁾。最近、TDMに関して macrophage inducible C-type lectin (mincle) が重要なレセプター分子であることが明らかにされた²⁾。本研究では *R. terrae* が産生する各種ミコール酸含有糖脂質を単離精製し、その宿主応答をマウスの肉芽腫炎症病変形成を指標にして検討した。糖とミコール酸分子の宿主応答における重要性について報告する。

2. 方法

2.1 ミコール酸含有糖脂質の抽出・精製

*R. terrae*はYP培地 (0.5% yeast extract, 0.5% polypeptone) に炭素源としてグルコース、フルクトース、マンノースをそれぞれ1%加え37°C、3-4日培養した。集菌した各死菌体を超音波破碎し、Forch法に準じて総脂質画分を抽出した。Chloroform:methanol:acetone:acetic acid (90:10:6:1, by vols.) の展開溶媒を用いて薄層クロマトグラフィー (TLC) で展開し、単一スポットになるまで精製した。

* 食物栄養学科 教授

2.2 MALDI-TOF MSによる分子量決定と構造解析

ターゲットプレートに糖脂質を1 μ gずつのせて乾固した。さらにマトリックスとして10 mg/ml dihydroxy benzoic acid (DHB)/chloroform:methanol (1:1, by vols.) を添加してターゲットプレート上で混合・乾固した。MALDI-TOF MSを用いてpositive ion, reflectronモードで質量数を測定した。

2.3 W/o/w emulsionの作製とマウスへの投与

W/o/wミセル200 μ l当たりの作製は、*R. terrae*由来の各糖脂質300 μ gを乾固し、最終液量の3.2%に相当するFreund's incomplete adjuvant (FIA) に完全溶解させ、同量のリン酸緩衝液 (PBS) を加えてボルテックスミキサーで激しく混和した。さらに、0.2% Tween 80/生理食塩水を加えて液量を200 μ lに調整し、teflon grinderで完全ミセル化した。これをC57BL/6マウスの尾静脈より300 μ g/200 μ l/匹の割合で投与した。Controlとして糖脂質を含まないw/o/wミセルのみを投与した。マウスは投与後4, 7日目に解剖し、血清採取と肺を摘出した。各投与群はマウス5匹で実施した。10%ホルマリン固定した臓器の組織をHE染色して組織学的な変化を観察した。

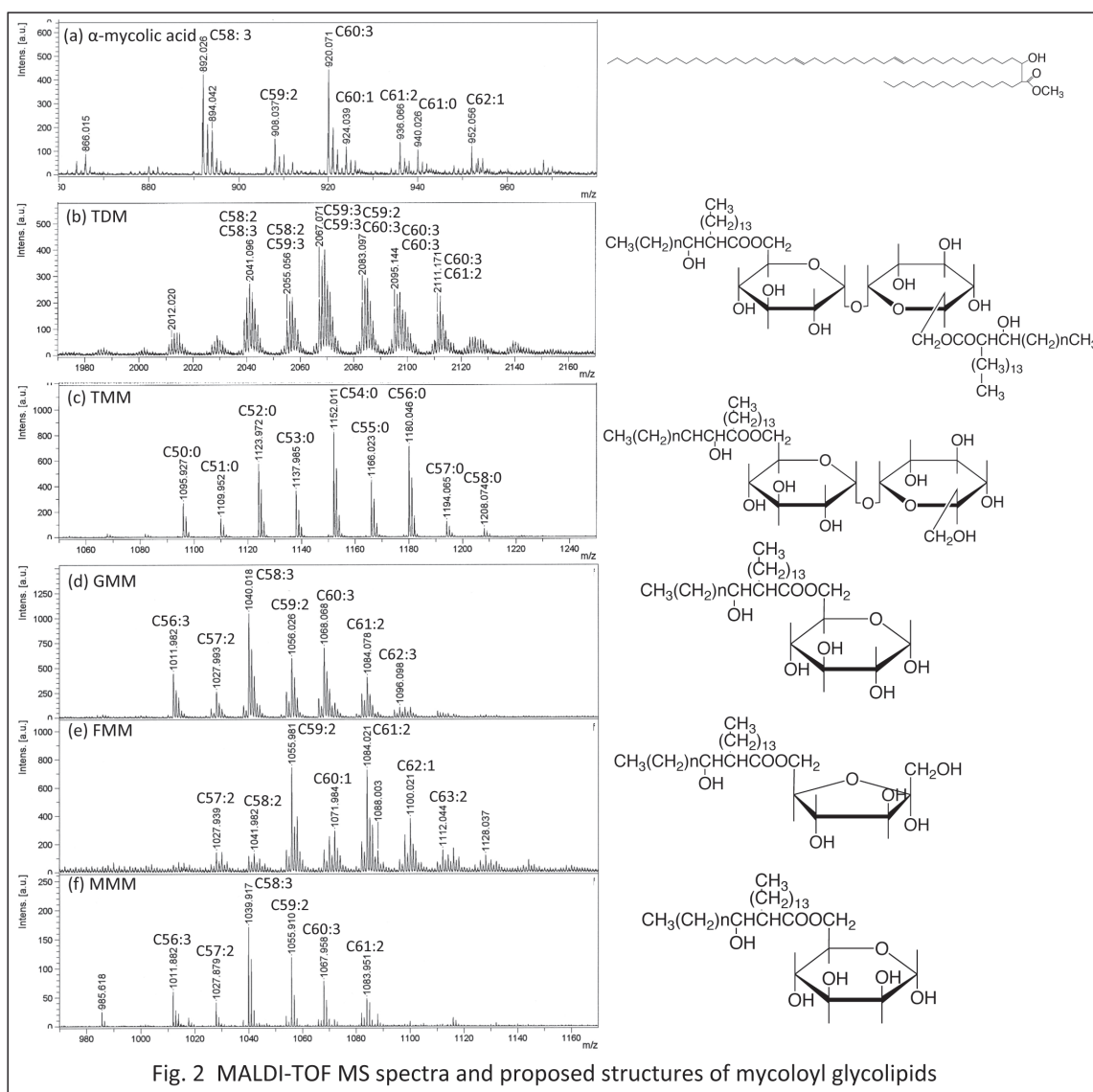
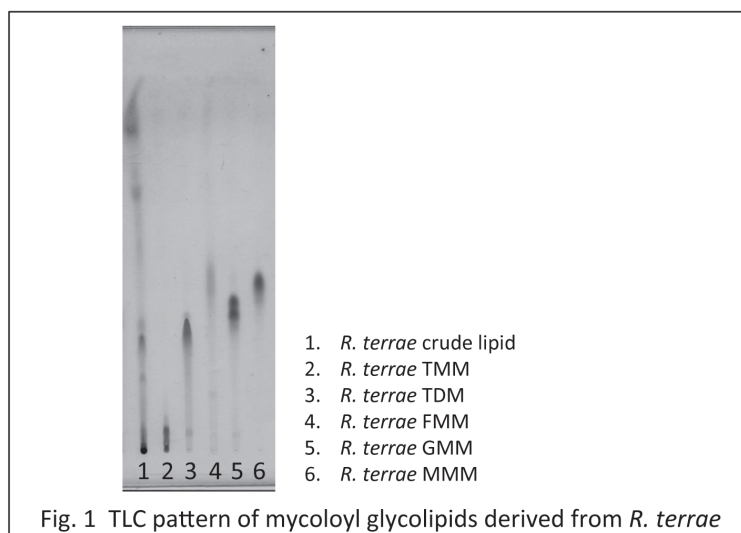
2.4 ELISA法によるtumor necrosis factor (TNF)- α の定量

解剖したマウス肺の全量をgrinderですりつぶし、PBSを500 μ l加えて遠心分離した。得られた上清のTNF- α をDuo Set (R&D SYSTEMS, MN, USA) を用いたELISA法で測定した。Streptavidin-HRPをラベルした2次抗体を使用し、H₂O₂とtetramethyl-benzidineの混合液で発色反応させた。各ウェルの吸光度 (A₄₅₀) を測定し、標準曲線から各検体のTNF- α 量を算出した。

3. 結果

炭素源を変えて培養した*R. terrae*から個々にcrude lipidを得た。各種ミコール酸含有糖脂質をTLCを用いて単離精製した。精製できた糖脂質をTLCで展開することで、単一スポットに精製できていることを確認した (Fig.1)。糖鎖の違いにより、各ミコール酸含有糖脂質のRf値が異なっていた。さらに、ミコール酸および各糖脂質の質量数をMALDI-TOF MSで測定し、その分子量からミコール酸含有糖脂質の構造を推定した。まず、菌体からアルカリ加水分解、メチルエステル化で得られたミコール酸メチルエステルのTLC解析では、 α -ミコール酸のスポットが確認された (data not shown)。その分子種をMALDI-TOF MSにより解析した結果、ミコール酸はC₅₈, C₆₀を中心にC₅₈₋₆₂の分子種が分布していた。これらのミコール酸は二重結合を0-3個有することが質量数から明らかとなった (Fig. 2a)。各ミコール酸含有糖脂質の分子量は、ミコール酸分子が各糖にエステル結合した構造と一致した。TDMはトレハロースの6,6'位にミコール酸が2分子エステル結合した構造で、ミコール酸分子種は不規則に結合していたが、m/z 2067のC_{59.3}が2分子結合したものが主であった (Fig. 2b)。TMMはミコール酸の分子種が他のミコール酸含有糖脂質に比べ短鎖となっており、C_{54.0}, C_{56.0}が中心であった (Fig. 2c)。また、全て飽和ミコール酸であることが特徴であった。GMM, FMM, MMMは各単糖にミコール酸が1分子エステル結合した構造であり、MALDI-TOF MSで検出される質量数はミコール酸分子種が同じであれば全て同一となった。主にC₅₆₋₆₃の不飽和脂肪酸がメインのピークとして検出された (Fig. 2d-f)。

次に、各糖脂質を尾静脈より投与したマウスの肺肉芽腫炎症病変形成とTNF- α 発現量について検討した。経静脈的に糖脂質含有w/o/wミセルを投与すると、C57BL/6マウスでは、TDM, TMM, GMM投与群においてマクロファージ、好中球を中心とした細胞浸潤を伴う肉芽腫炎症病



変を肺に誘発した。これはTDMにおいて特に顕著であった。FMM, MMM投与群においては、コントロールのw/o/wミセル群に比べて微弱な細胞浸潤を認めるのみで、正常組織に近かった (Fig. 3)。TNF- α 産生については、w/o/wミセルのみを投与したマウス肺に比べ、TDMを投与したマウス肺では発現量が有意に高値を示した。GMM, MMM投与群では中程度の産生量であり、TMM, FMMについてはw/o/wミセル群と比較して有意な増加は見られなかった (Fig. 4)。

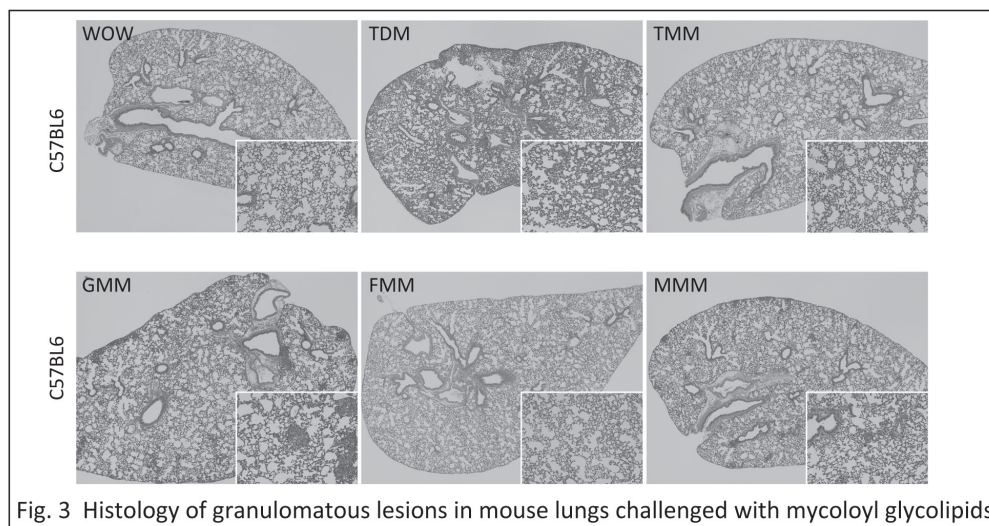


Fig. 3 Histology of granulomatous lesions in mouse lungs challenged with mycoloyl glycolipids

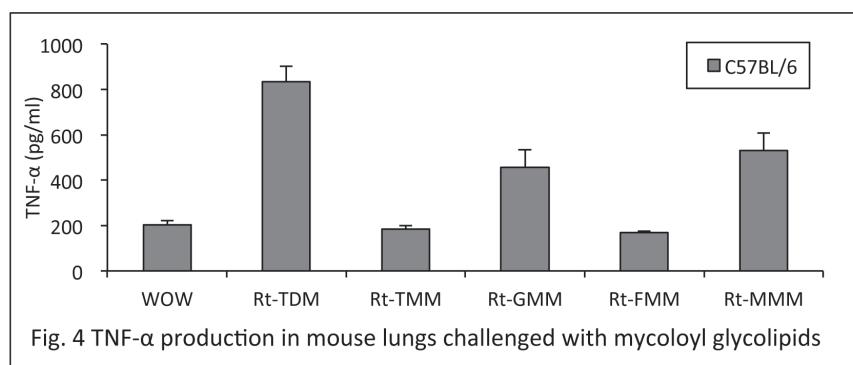


Fig. 4 TNF- α production in mouse lungs challenged with mycoloyl glycolipids

4. 考察

*R. terrae*が産生するミコール酸の炭素鎖長は、抗酸菌および類縁抗酸菌のなかでは中程度であり、 C_{52-62} から構成されていた。特筆すべきことは、本菌の構成ミコール酸に二重結合が3個存在するトリエンのピークが検出されたことである。結核菌を含む他の抗酸菌が産生するミコール酸は二重結合或いはシクロプロパン環が2個含まれるダイエンが主で、その生合成経路はFAS I, FAS IIの脂肪酸合成、伸長経路を介して合成されると考えられている³⁾。その生合成経路における酵素学的基質特異性が他の菌と異なることが示唆され、非常に興味深い。ミコール酸は抗酸菌および類縁抗酸菌に普遍的に存在し、抗酸性やコード紐状の形態にも関与していると考えられている分子であり、ミコール酸含有糖脂質であるTDMは病原因子の一つとして、単独で多彩な生理活性を有し、特に結核類似様肉芽腫炎症病変の形成は結核の宿主免疫応答を理解する上で重要である。本研究では、構成糖の異なるミコール酸含有糖脂質の肉芽腫炎症病変について検討した。TDM, TMM, GMMのグルコース骨格を含む糖脂質では、C57BL/6マウスにおいて肉芽腫炎症病変の形成が見られ、この中でもTDMは肉芽腫炎症病変の形成が最も顕著であった。

TMMはGMMよりも肉芽腫炎症病変が低いことから、肉芽腫炎症の形成にはミコール酸の結合数や組成の違いが関与していると考えられた。今回のMALDI-TOF MSの分析では、TMMのミコール酸分子種が他のミコール酸含有糖脂質と異なり、飽和脂肪酸が中心で炭素鎖長も2-8分子短鎖であることが肉芽腫炎症の病変形成能の低い一因と考えられた。一方、FMM, MMMのグルコースを含まない糖脂質では、肉芽腫炎症の病変形成が微弱であった。これは糖の種類が肉芽腫炎症の病変形成に関与していることを示唆する結果であった。肺病変部における炎症性サイトカインTNF- α の発現量を比較すると、肉芽腫炎症の病変形成の強かったTDM, GMM投与マウスにおいて顕著に増加していたことから、肉芽腫炎症の病変形成にTNF- α が大きく寄与していると考えられた。MMMについては肉芽腫炎症が組織学的に微弱であったにもかかわらず、TNF- α の産生がGMMと同程度であり、肉芽腫炎症病変以外の宿主応答の可能性が示唆される。我々は、TDMの肉芽腫炎症病変の形成はミコール酸の炭素鎖長に依存していることを報告している⁴⁾。一方、TDMのレセプターとして報告されたmincle分子はマクロファージにおいてストレス刺激により発現し、細胞外領域に炭水化物認識ドメインを持つので糖脂質の糖を認識するレセプター分子と考えられる。TDM以外のミコール酸含有糖脂質についてはmincle分子の関与は報告されていない。ミコール酸含有糖脂質の宿主応答については、本研究の結果による糖認識に加えて、ミコール酸分子の鎖長や修飾基によって異なることからミコール酸分子の関与も想定される。今後、これらの点について詳細な検討が必要である。

ヒトへの抗酸菌感染を考えた場合、TDM分子の存在により肉芽腫炎症病変や炎症性サイトカインの産生を惹起することは、宿主感染防御を誘導することになる反面、過度の反応が細胞壊死、組織破壊に繋がる負の側面も考えられる。最近、宿主に感染した結核菌において炎症応答惹起能の強いTDMが生体内でミコール酸転移酵素によりグルコースに転移してGMMが生成され、宿主免疫応答から逃れて長期生存できるという提唱もある⁵⁾。結核の宿主感染機構を理解するうえでTDM以外のミコール酸含有糖脂質の宿主反応を解明することが重要であると考えられる。

5. 参考文献

- 1) Fujiwara N: Distribution, characterization of mycobacterial glycolipids and host responses, glycosylation. Stefana Petrescu (Ed.), ISBN: 978-953-51-0771-2, InTech, Chapter 5; 101-126. 2012.
- 2) Ishikawa E, Ishikawa T, Morita YS, Toyonaga K, Yamada H, Takeuchi O, Kinoshita T, Akira S, Yoshikai Y, Yamasaki S: Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med.* 206: 2879-2888. 2009.
- 3) Bhatt A, Molle V, Besra GS, Jacobs WR Jr, Kremer L: The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Mol Microbiol.* 64(6): 1442-1454. 2007.
- 4) Ueda S, Fujiwara N, Naka T, Sakaguchi I, Ozeki Y, Yano I, Kasama T, Kobayashi K: Structure-activity relationship of mycoloyl glycolipids derived from *Rhodococcus* sp. 4306. *Micob Pathog.* 30: 91-99. 2001.
- 5) Matsunaga I, Naka T, Talekar RS, McConnell MJ, Katoh K, Nakao H, Otsuka A, Behar SM, Yano I, Moody DB, Sugita M: Mycolyltransferase-mediated glycolipid exchange in *Mycobacteria*. *J Biol Chem.* 283(43): 28835-28841. 2008.