

Mycobacterium smegmatis における脂質分布の多様性と宿主応答

The heterogeneity and host responses of lipids in *Mycobacterium smegmatis*

藤原 永年*

Nagatoshi Fujiwara

Mycobacteria produced species-specific lipid components. Recently, it is reported that the virulence and pathogenicity of acid-fast bacteria are correlated with these lipids in the cell envelope. In this study, we checked the heterogeneity of lipid components in rapid-growing mycobacteria. *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 and J15cs strains produced trehalose-6,6'-dimycolate (TDM), trehalose-monomycolate (TMM), cardiolipin (CL), and phosphatidylinositol-mannosides (PIMs). The glycopeptidolipid (GPL) was detected only in the *M. smegmatis* mc² 155. We discussed the role of lipid components in the stage of mycobacterial infection. The GPL was recognized via toll-like receptor-2 and plays important roles in host-pathogen interaction. *M. smegmatis* J15cs deleted the GPL as cell wall component, and the bacterial morphology was the rough-type, compare to the smooth type of *M. smegmatis* mc² 155. *M. smegmatis* J15cs survives for 6 days in the host cells. As the results, the heterogeneity of cell wall components affects the bacterial morphology and host immune system. This study clarified the insight of GPL correlated bacterial pathogenicity.

1. 緒言

非結核性抗酸菌である *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC) は環境中から分離される呼吸器やリンパ系疾患の起原菌である。特に多剤耐性菌の出現、後天性免疫不全症候群 (AIDS) における合併症として重要である。MAC菌は細胞内寄生菌として宿主マクロファージ内で増殖し、長期間生存することが知られている。

一方、MAC菌や一部の迅速発育抗酸菌は細胞表層に結核菌には存在しない糖ペプチド脂質 (glycopeptidolipid, GPL) を産生する。血清型特異GPLはコア部分のapolar GPLと6-deoxy-taloseから伸長した血清型特異糖鎖部分からなり、その糖鎖構造の違いから現在28種類の血清型に分類されている¹⁻³⁾ (Fig. 1)。

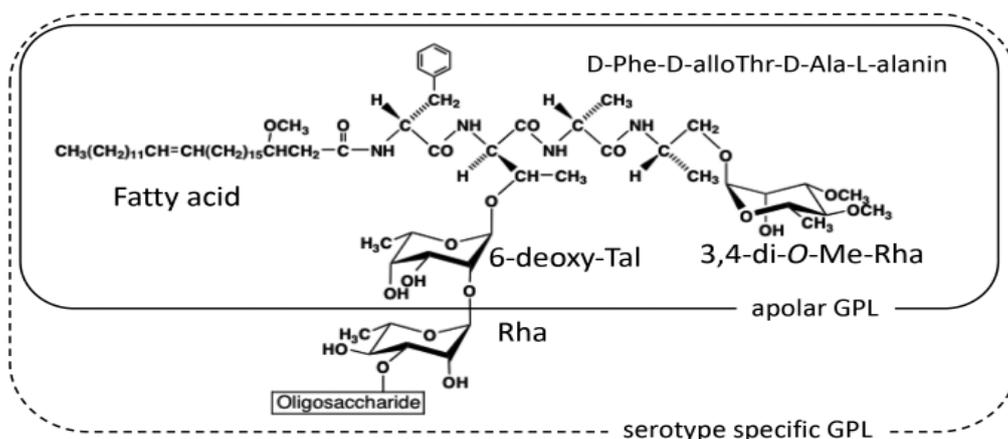


Fig. 1 Structure of glycopeptidolipids (GPLs)

* 食物栄養学科 教授

抗酸菌の研究には、迅速発育菌*Mycobacterium smegmatis*が広く利用され、特に遺伝子挿入効率の高い*M. smegmatis* mc² 155株が汎用されている。*M. smegmatis* mc² 155株はマウスマクロファージ系細胞内において感染後2日程度で排除されるが、*M. smegmatis* J15cs株は感染後6日目でも生存出来ることから抗酸菌感染モデルとして有用である。*M. smegmatis* J15cs株は細胞表層の構造が*M. smegmatis* mc² 155株と異なることが報告され⁴⁾、マクロファージ内での生存に細胞表層分子に対する宿主応答の違いが影響していると考えられた。本研究は、これらの知見を基に*M. smegmatis* mc² 155, *M. smegmatis* J15cs株の脂質画分を比較し、その違いを明らかにする。脂質画分に対する宿主応答についてtoll-like receptor (TLR) を中心に検討し、MAC菌の病原因子の一端を解明することを目的とした。

2. 方法

2.1 サンプルの調製

加熱死菌体をchloroform:methanol/2:1 (by vols.) に懸濁し、超音波破碎した。蒸留水を全量の1/20加え、二層分配により有機層を分取した。得られた有機層を遠心エバポレーターにて濃縮乾固した。同様の抽出を2回施し、総脂質画分crude lipidとした。次にacetoneを加えて遠心分離し、acetone溶解層と沈澱層に分離した。Acetone溶解層をchloroform:methanol/90:10 (by vols.) の展開溶媒で薄層クロマトグラフィー (TLC) を行いGPL画分を精製した。Crude lipidの一部を0.2 M NaOHで16時間、弱アルカリ加水分解処理したアルカリ安定脂質 (alkaline-stable lipid, AS) についても、acetone抽出、TLC精製を実施し、同様の画分を精製した。

各精製画分はpolysorbate80 (PS80) をサンプル重量の1/4添加後、蒸留水で1 mg/mlに調整した。

以上の操作により、総脂質画分crude lipid, acetone沈澱画分 (acetone ppt), GPL画分 (GPL Fr), アルカリ安定GPL (AS-GPL Fr) の各サンプルを調製した。

2.2 細胞の刺激条件

ヒトTLR2を発現させたHEK-blue 2 cellとヒトTLR4を発現させたHEK-blue 4 cell、さらに6週齢のwild type (C57BL/6), TLR2-KO, TLR4-KOマウスの骨髄から採取分化させたbone marrow macrophage (BMM) を刺激細胞として用いた。各細胞を96穴マイクロプレートに 1×10^5 cells/ml、200 μ l巻き、overnight接着させた後、適宜希釈した各サンプルを添加して24時間培養した。刺激濃度はHEK細胞では0.01-10 μ g/ml、BMMでは1-100 μ g/mlとした。PS80のみで刺激した細胞を陰性コントロール、Pam3CSK (TLR2), LPS (TLR4) で刺激した細胞を陽性コントロールとした。

2.3 細胞刺激の評価

HEK blue細胞には、TLR刺激によりalkaline phosphatase (AP) が分泌されるレポーター遺伝子が組み込まれている。培養上清中に分泌されたAPを発色キットQUANTI blue で反応させて吸光度A₆₃₀を測定し、検量線から活性を定量した。

BMMでは、刺激によって産生される炎症性サイトカインTNF- α をDuoSet (R&D SYSTEMS, MN, USA) によるELISA法で定量した。

3. 結果

3.1 脂質画分の抽出精製

M. smegmatis mc² 155株, *M. smegmatis* J15cs株から脂質画分を各々抽出精製した。精製純度はTLCで展開して確認した。展開溶媒は、極性の低い系 chloroform:methanol/90:10 (by vols.) と極性の高い系 chloroform:methanol:water/60:30:6 (by vols.) の2種類で行った。

M. smegmatis mc² 155株のcrude lipidには、極性の低い系でGPL, trehalose-6,6'-dimycolate (TDM), cardiolipin (CL) 及びtrehalose-monomycolate (TMM) のスポットが検出された。Acetone pptにはTDM, CL, TMMが含まれた。さらに、極性の高い系で各画分を展開すると、crude lipid, acetone ppt画分に前者の展開溶媒系では極性が低く原点に留まっていた phosphatidylinositol-mannosides (PIMs) が検出された。GPL fractionへのPIMの混入はなかった。以上から、脂質画分の抽出精製が適切に行われたことを確認した。*M. smegmatis* J15cs株はGPL fractionにスポットは検出されず、GPLが産生されていないことが明らかとなった。GPL以外の主要脂質分子については*M. smegmatis* mc² 155株と一致していた (Fig. 2)。

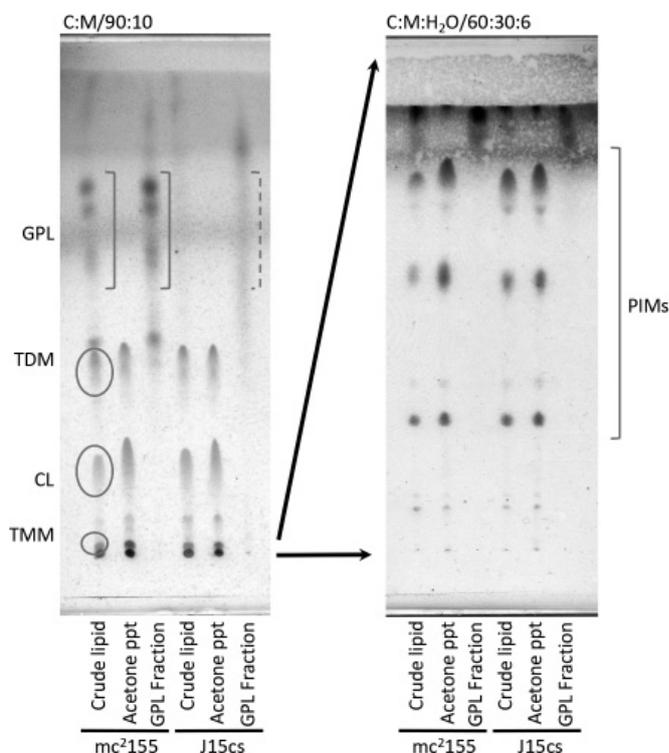


Fig. 2 Distribution of lipid components from *M. smegmatis* strains

3.2 脂質刺激による細胞の活性化

3.2.1 HEK-blue cell

TLR2, 4遺伝子を組み込んだHEK細胞を刺激した培養上清のAP分泌量をQUANTI blueで定量した。全てのサンプルにおいてTLR4を介した反応は見られなかった。*M. smegmatis* mc² 155, *M. smegmatis* J15cs両株のcrude lipidはTLR2で濃度依存的に反応し、脂質画分中にTLR2を介して細胞に認識される脂質分子の存在が明らかになった。*M. smegmatis* mc² 155株は、分画したacetone ppt, GPL fractionでTLR-2依存的に活性化されていたが、弱アルカリ加水分解したGPL fractionは活性が消失していた。一方、*M. smegmatis* J15cs株ではacetone pptにのみTLR2依存的な細胞活性化が見られ、GPL fractionにはその活性はなかった。両株ともacetone

ppt画分にはTLR2アゴニストであるPIMsが含まれていた。以上より、PIMsと*M. smegmatis* mc² 155株のみ発現しているapolar GPLがTLR2依存的に細胞認識される抗原であることが明らかになった。また、apolar GPLは弱アルカリ水解することによってTLR2アゴニストとしての活性が消失していた (Fig. 3)。

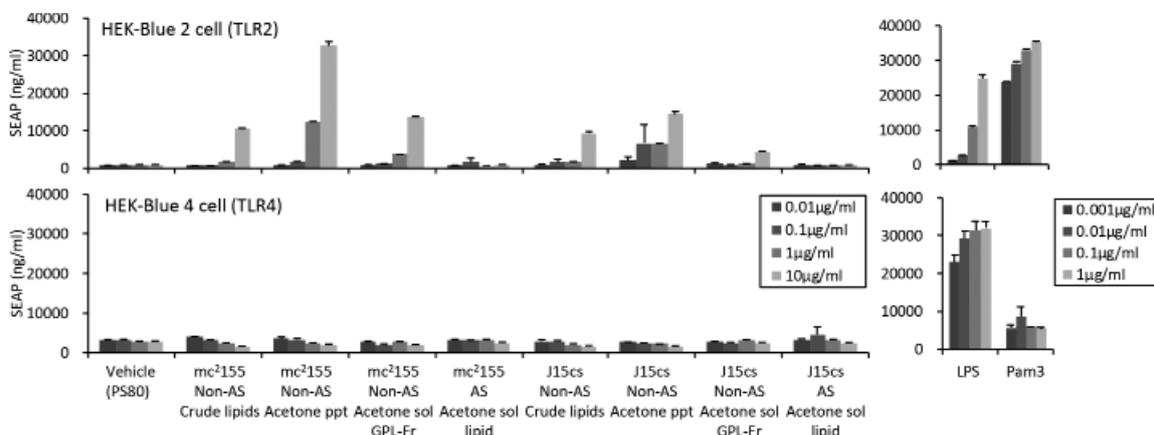


Fig. 3 Responses of HEK-blue cell stimulated with mycobacterial lipids

3. 2. 2 マウスBMM

TLR2-KO, TLR4-KOマウスBMMを刺激した培養上清のTNF- α 産生量を定量した。TLR2-KOでは非特異的な反応しか検出されなかったが、wild type及びTLR4-KOでは濃度依存的なTNF- α 産生が認められた。HEK細胞の場合と同様にacetone pptで両者とも強く反応したが、GPL fractionでは*M. smegmatis* mc² 155株のみマウスBMMが活性化された。アルカリ加水分解処理したGPL fractionは両者ともTNF- α の産生を認めなかった (Fig. 4)。

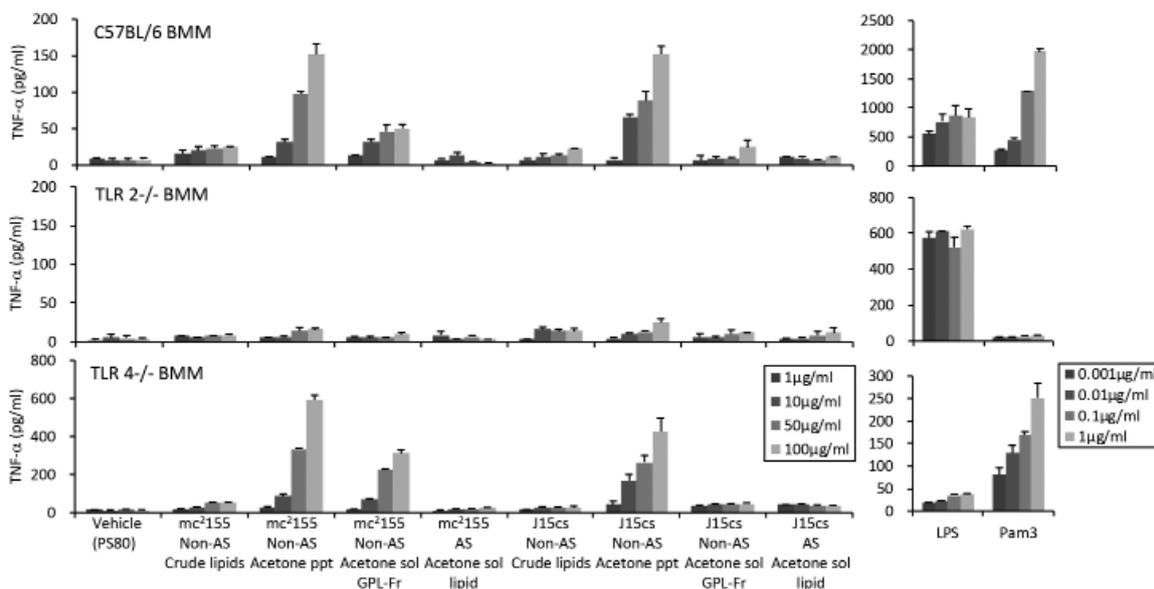


Fig. 4 Responses of murine bone marrow macrophage stimulated with mycobacterial lipids

4. 考察

HEK-blue, マウスBMM刺激の結果から、apolar GPLにはTLR2のアゴニストとして自然免疫応答を惹起する活性があることが明らかとなった。即ち、血清型特異的糖鎖に関係なくcoreそのものにも宿主免疫応答惹起活性があり、病原因子の一端を担っていると考えられた。Crude

lipidではHEK-blue, マウスBMM細胞とも顕著な反応性を示さないが、GPL fractionとして精製濃縮して刺激することで反応性が確認できた。実際に*M. smegmatis*はヒトの泌尿器から分離されているが、ヒトに疾患を引き起こさない非病原性であることから、MACなどでは血清型特異的糖鎖による修飾によって病原性が高められている可能性が考えられた。

GPLはアルカリ安定脂質として取り扱うが、本研究ではapolar GPLを弱アルカリ加水分解することによりTLR2アゴニストとしての活性が消失していた。TLCでGPLのスポットを弱アルカリ加水分解前後で比較してみると、弱アルカリ加水分解前には多数のスポットがラダー状に検出されるが、弱アルカリ加水分解後は数個のスポットに収束した。質量分析を実施すると、天然型GPLの質量数がアルカリ安定GPLより43マス (CH_3CO^-) の整数倍増加していた。天然においてはGPLの糖鎖部分にある一部の水酸基がアセチル化していることが考えられた。GPLのTLR2を介した宿主認識にはこれらアセチル基修飾が必須であることが示唆された。今後は詳細な構造-宿主応答相関を検討する必要がある。

M. smegmatis mc² 155株と*M. smegmatis* J15cs株の相違点はapolar GPLの有無にあることが本研究で明らかとなったが、*M. smegmatis* mc² 155株はそのGPL成分によって免疫系を刺激し、排除機構を司る宿主防御機構を惹起してしまうため、*M. smegmatis* J15cs株に比べ、感染細胞内での生存が困難になっていることが推測された。このことからapolar GPLは宿主応答と貪食細胞内生存機構に重要な役割を果たしていることが考えられた。

本研究では、*M. smegmatis* mc² 155株と*M. smegmatis* J15cs株の2株を検証し、apolar GPLの有無による違いについて解明した。他の細胞表層脂質分子についても同様の宿主免疫応答への関与が想定され、継続的な検討により、菌排除の阻害メカニズムを解明し、抗酸菌感染症に対する有効な治療法を模索することが可能になると考えられる。菌体表層成分と形態との関連性、および、感染性や病原性への関与については、*Mycobacterium massiliense*, *Mycobacterium abscessus*においても近年報告され⁵⁻⁷⁾、今後の進展が期待される。

5. 参考文献

- 1) Chatterjee D, Khoo KH. The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(14):2018-42.
- 2) Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:29-63.
- 3) Kobayashi K. Serodiagnosis of *Mycobacterium avium* complex disease in humans: translational research from basic mycobacteriology to clinical medicine. *Jpn J Infect. Dis.* 2014;67(5):329-32.
- 4) Nomoto M, Ogawa M, Fukuda K, Miyamoto H, Taniguchi H. A host-vector system for molecular study of the intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in phagocytic cells. *Microbiol Immunol.* 2009;53:550-558.
- 5) Fujiwara N, Ohara N, Ogawa M, Maeda S, Naka T, Taniguchi H, Yamamoto S, Ayata M. Glycopeptidolipid of *Mycobacterium smegmatis* J15cs affects morphology and survival in host cells. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126813.
- 6) Kim BJ, Kim BR, Lee SY, Kook YH, Kim BJ. Rough colony morphology of *Mycobacterium massiliense* Type II genotype is due to the deletion of glycopeptidolipid locus within its genome. *BMC Genomics.* 2013;14:890.
- 7) Whang J, Back YW, Lee KI, Fujiwara N, Paik S, Choi CH, Park JK, Kim HJ. *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipids inhibit macrophage apoptosis and bacterial spreading by targeting mitochondrial cyclophilin D. *Cell Death Dis.* 2017;8(8):e3012.