

## 細菌由来 Lipomannan, Lipoarabinomannan の構造と宿主応答

The structures of bacterial Lipomannan, Lipoarabinomannan  
and their host responses

藤原 永年\*, 中 崇\*\*

Nagatoshi Fujiwara and Takashi Naka

Mycobacteria produce characteristic lipid components. Recently, it is reported that mycobacterial lipids have lots of biological activities correlated with the virulence and pathogenicity in host infection. In this study, we purified lipomannan (LM) and lipoarabinomannan (LAM) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG, and *Saccharothrix aerocolonigenes*, and analyzed the relationship between structural features and pattern recognition receptor. *S. aerocolonigenes* produced only LM (Sac-LM), and the structure was different from mycobacterial LMs. The mannose core in Sac-LM branched two mannoses and the tri-acyl group was composed of two isoC16, and C16 fatty acids. LM and LAM were recognized by murine bone-marrow macrophages (BMM) via TLR2. Sac-LM activated murine cells much higher than mycobacterial LMs. The activity of Sac-LM via TLR2 did not reduced completely in TLR2-KO BMM. Although H37Rv-LM and BCG-LM did not recognize by TLR4-KO, Sac-LM activated partly via TLR4. Otherwise, LAM is recognized via TLR2, and the level is weak, compare to LM. As the results, the structures of LM and LAM play important roles in the recognition by the host cells. This study partly clarified the insight of structure-activity relationships in LM and LAM.

### 1. 緒言

結核菌を始めとする抗酸菌は、細胞表層がワックス様の脂質分子に富むことが最大の特徴であり、これら脂質分子により色素にも染色され難く一旦染色されると脱色され難い抗酸性を呈する。また、これら細胞表層脂質分子はタンパク質と異なる疎水性分子であるが、宿主と最初に出会う分子であり、免疫応答を惹起して抗酸菌感染症の発症や病変の進展に寄与していることが想定される。現在、cord factor, sulfolipid, glycopeptidolipid, phenolglycolipid, lipomannan (LM), lipoarabinomannan (LAM) を含む抗酸菌に特有な脂質分子のアジュバンド活性、肺肉芽腫形成能、抗腫瘍活性、アポトーシス誘導能、マクロファージ活性化能等が報告されている<sup>1)</sup>。

これら糖脂質分子の中で特にLM, LAMは、抗酸菌細胞表層成分としてグラム陰性細菌の lipopolysaccharide に匹敵する両親媒性の lipoglycan であり、強力な免疫惹起物質と考えられる。構造的には、mannosyl-phosphatidyl-myo-inositol (MPI) anchor が mannose core と結合したものが LM であり、さらに arabinan polymer と結合伸長して LAM となる。LM, LAM は抗酸菌に偏在しているが、LM では mannose core のサイズや側鎖の程度が菌種特異的である<sup>2)</sup>。抗酸菌以外の *Saccharothrix aerocolonigenes* には MPI anchor に結合する mannose core の側鎖が 2 個からなるユニークな LM (Sac-LM) が存在し、強力な炎症性サイトカイン誘導能を有することが報告された<sup>3)</sup>。また、LAM は arabinose 側鎖の非還元末端の capping motif により 3 種類に分類され、*Mycobacterium tuberculosis* を含む遅発育菌は capping motif が 1 - 3 個の mannose からなり、ManLAM と呼ばれる。非病原性の *M. smegmatis* 等の迅速発育菌は、capping motif が inositol phosphate caps からなり PILAM として特徴づけられている。Manno-oligosaccharide, inositol

\* 食物栄養学科・教授

\*\* 食物栄養学科・准教授

phosphate capsの両方を持たない第3のAraLAMも*M. chelonae*で同定されている。本研究では、LM, LAMの宿主免疫応答機序の一端を明らかにするため、菌種特異的なLM, LAMを単離精製し、マウス骨髄性マクロファージ (BMM) の活性化機序を中心に構造相関について検討した。

## 2. 方法

### 2-1. LM, LAMの精製

*M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG Tokyo 172, *S. aerocolonigenes* の菌体からフェノール抽出によりlipoglycan画分を分取し、ゲル濾過法によりLM, LAMを単離精製した。精製度はSDS-PAGEで確認した。Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) により脂肪酸組成を分析し、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計, MALDI-TOF/MS) による質量分析から化学構造式を解析した。

### 2-2. マウス骨髄性マクロファージの分取

6-8週齢、雌C57BL/6, TLR2-KO, TLR4-KOのマウスを脊椎脱臼して屠殺し、70%エタノールで消毒した脛骨部分の皮膚を切開した。脛骨遠位部を切断し、脛骨に付着している筋肉を剥離した。膝関節部を切断し、PBSを骨髄に注射器で注入し、押し出された骨髄細胞を回収した。赤血球lysing bufferを加えて溶血させ、PBSで洗浄、遠心することで骨髄系前駆細胞を回収した。20% L929 cell-conditioned mediumを添加したDMEM培地で、7日間5% CO<sub>2</sub> 存在下37℃で培養し、BMMを分化誘導した。5 mM EDTA/PBSにより付着細胞を剥がし、PBSで十分洗浄した後、細胞数を5×10<sup>5</sup> cells/mlに調整した。

### 2-3. LM, LAMによる骨髄性マクロファージの刺激

前項で得られた5×10<sup>5</sup> cells/mlのBMMを細胞培養用平底96穴マイクロプレートに200 μl添加し、1, 10, 20 μg/mlの各種LM, LAMで刺激した。5% CO<sub>2</sub> 存在下37℃で培養し、24時間後に培養上清を回収した。

### 2-4. ELISA法によるtumor necrosis factor (TNF)-αの定量

一次抗体 (capture antibody) としてAnti-mouse TNF-α 抗体 (Biosource, CA, USA) を0.2 M リン酸ナトリウム溶液 (pH 6.5) で希釈し、100 μlを96穴プレートに加え、4℃で一晩吸着させた。1% BSA/PBSで1-2時間ブロッキングし、適宜希釈した検体およびstandard (0-2000 pg/ml) 100 μlを各wellに加え、2時間室温で静置反応させた。洗浄後、二次抗体 (detection antibody) としてbiotin-conjugated anti-mouse TNF-α 抗体 (Biosource, CA, USA) を100 μl加え、1.5時間室温で静置反応させた。洗浄後、Horseradish peroxidase conjugated-streptavidin 100 μlを添加し、45分間室温で静置反応させた。洗浄後、基質溶液3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) を100 μl添加し、30分間室温で発色反応させ、2N-硫酸 50 μlで反応を停止した。各wellの吸光度 (A<sub>450</sub>) を測定し、標準曲線から各検体のTNF-α量を算出した。

### 2-5 FACSによるTNF-α産生細胞の検出

1.5 ml容無菌エッペンドルフチューブにBMMを1×10<sup>6</sup> cells/0.5 ml加え、10 μg/mlの各種LM, LAMで刺激して5% CO<sub>2</sub> 存在下37℃で5時間培養した。培地にタンパク輸送阻害剤

brefeldin Aを含むGolgiPlug (BD biosciences, CA, USA) を1  $\mu$ l/mlとなるように加え、産生サイトカインを細胞内に留めた。FACS bufferで洗浄後、Fcレセプターで抗体の非特異的結合によるバックグラウンドを抑え、BMM細胞表面に発現しているCD11b抗原をCD11b-FITC抗体で染色した。さらにCytotfix/Cytoperm (BD biosciences) で細胞膜透過処理をしてTNF- $\alpha$ -PE抗体で細胞内TNF- $\alpha$ 抗原を染色し、FACS Caliber (BD biosciences) で蛍光染色陽性細胞を測定した。

## 2-6. HEK Blue2, 4 cellによる反応性

HEK Blue2, 4 cellには、各々 TLR2, 4 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A<sub>630</sub>を測定し、検量線から活性を定量した。

## 3. 結果

### 3.1 LM, LAMの抽出精製と構造解析

各菌株からフェノール抽出、ゲル濾過法を用いてSac-LM, *M. bovis* BCG-LM (BCG-LM), *M. bovis* BCG-LAM (BCG-LAM), *M. tuberculosis* H37Rv-LM (H37Rv-LM), *M. tuberculosis* H37Rv-LAM (H37Rv-LAM) を精製した。精製度はSDS-PAGEで単一スポットであることを確認した (Fig. 1)。

BCG-LM, H37Rv-LM, Sac-LMについて、構造の相違を検討した。GC/MSにより、菌体の脂肪酸組成を分析したところ、Table 1 に示したように、BCG-LM, LAMはC16:0, C19:0の分子種が中心であったのに対し、Sac-LMはisoC16:0, C16:0が主要分子種であった。MPI anchor部分のアシル基はBCG-LM, H37Rv-LMが2×C16, C19であるのに対し、Sac-LMは2×isoC16, C16であると考えられた。Mannose coreのmannose側鎖はBCG-LM, H37Rv-LMがmannose 1 個に対してSac-LMは2 個であり、推定構造式をFig. 2 に示した。構造式を基にMALDI-TOF/MSにより検出されたm/zからmannose数を決定した (Fig. 3)。Mannose coreのmannose数の分布は、BCG-LMが24-44個、H37Rv-LMが22-39個、Sac-LMが17-32個であった。これらの結果から、BCG-LM, H37Rv-LMは構造的に類似し、主な違いはmannose coreのサイズ (mannose

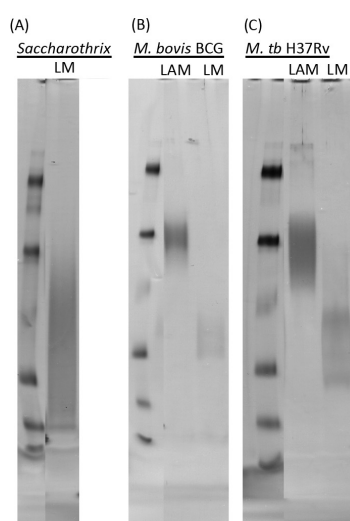


Fig. 1 SDS-PAGE gel of purified LM and LAM derived from *S. aerocolonigenes* (A), *M. bovis* BCG (B), and *M. tuberculosis* H37Rv (C), strains. The left lane is MW marker.

Table 1. Fatty acid composition of LM and LAM

Fatty acids	<i>M. bovis</i> BCG		<i>Saccharothrix aerocolonigenes</i>
	LM	LAM	LM
<i>anteiso</i> C14:0	-	-	0.3
C14:0	3.2	1.2	1.6
<i>iso</i> C15:0	-	-	2.2
<i>anteiso</i> C15:0	-	-	1.5
C15:0	1.1	0.3	0.8
<i>iso</i> C16:0	-	-	36.2
C16:1	-	-	1.6
C16:0	39.4	49.5	17.6
<i>iso</i> C17:0	-	-	1.5
<i>anteiso</i> C17:0	-	-	14.8
C17:0	-	-	3.4
C18:1	1.7	3.0	9.4
C18:1	-	-	1.3
C18:0	8.0	6.2	5.3
C19:0	46.6	39.9	2.5
Total	100	100	100

の数)のみと考えられた。Sac-LMは抗酸菌由来のLMに比べ、アシル基、側鎖の数も異なり、mannose coreのサイズも小さかった。さらに、14マス大きいピークが確認され、メチル化糖の存在が示唆される結果であった。BCG-LAM, H37Rv-LAMについてMALDI-TOF/MSによる質量数の分析を行ったところ、分子量が12,000-17,000程度に分布していることを確認したが、mannose, arabinoseの数を決定するには至らなかった。BCG-LAM分子量がH37Rv-LAMより大きい傾向にあり、前駆体であるBCG-LM, H37Rv-LMのmannose数を反映していた。

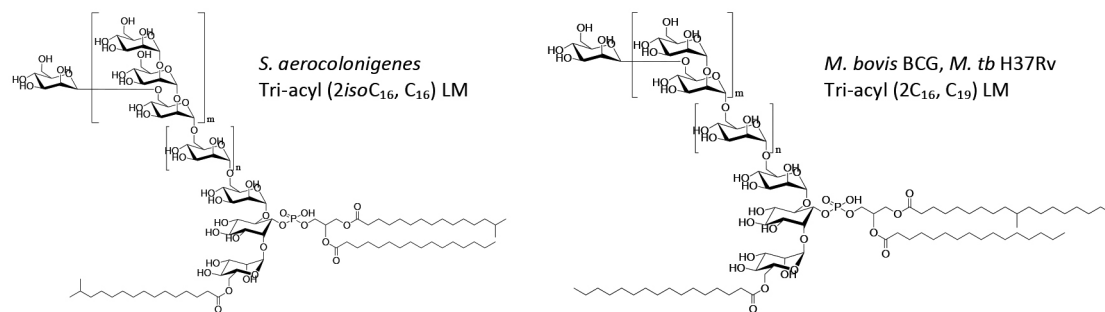


Fig. 2 The proposed structures of LM derived from *S. aerocolonigenes*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* H37Rv

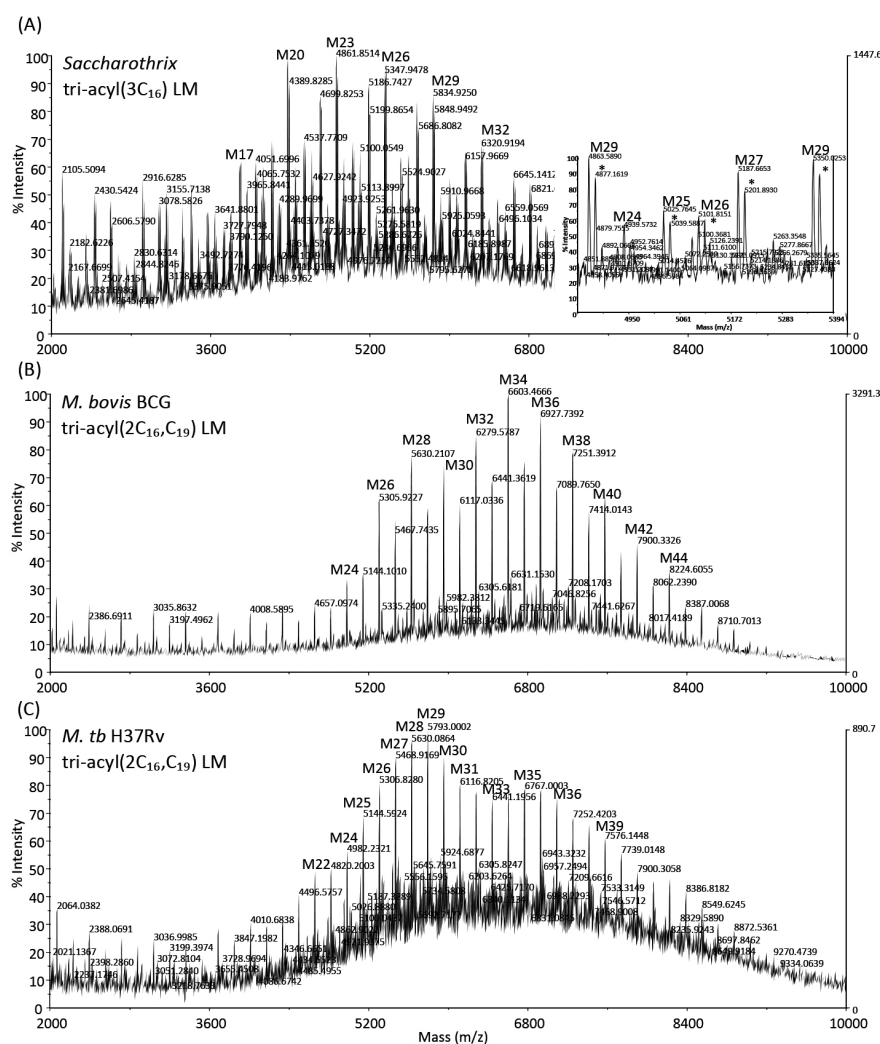


Fig. 3 The MALDI-TOF/MS spectra of purified LMs derived from *S. aerocolonigenes* (A), *M. bovis* BCG (B), and *M. tuberculosis* H37Rv (C), strains



### 3.2 LM, LAMによるマウスマクロファージの活性化

構造が明らかになった各種LM, LAMでマウスBMMを24時間刺激し、培養上清中に分泌される炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ 量からBMMの活性化を検討した。LM, LAMの刺激はTLRを介してシグナル伝達されるという報告を基に<sup>4)</sup>、C57BL/6, TLR2-KO及びTLR4-KOマウス由来のBMMを用いて比較した。*M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv由来LM, LAM刺激したC57BL/6マウスBMMにおいて濃度依存的にTNF- $\alpha$ が産生されており、LM, LAMによりBMMが活性化されていることが解った。LMがLAMより有意にTNF- $\alpha$ 産生量が高かった。*M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv由来LM, LAMはTLR2-KOマウスBMMでのTNF- $\alpha$ 産生が各濃度で抑制されていた (Fig. 4)。次に、Sac-LMについては同濃度のBCG-LM, H37Rv-LMに比べTNF- $\alpha$ 産生が約10倍高く、強力なBMM活性能を有していた。TLR2-KOマウスBMMではC57BL/6, TLR4-KOマウスBMMに比べTNF- $\alpha$ 産生量が約1/3に減少していたが、完全に抑制出来ていなかった。活性化によりTNF- $\alpha$ を産生するBMMの細胞集団をFACSにより分析した結果をFig. 5に示した。LAMについては、CD11b<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>細胞の割合がLM群より低かったことから、TNF- $\alpha$ 産生は認められるものの、刺激自体は強いものではないと考えられ、Fig. 4の結果と一致していた。LMについては、特にSac-LMで刺激したC57BL/6, TLR4-KOマウスBMMのCD11b<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>細胞が16-18%であるのに対し、TLR2-KOマウスBMMでは3.9%に減少していたが、TLR2のコントロールであるPma3CSK4の1.7%よりも高かった。

TLR2, 4遺伝子を組み込んだHEK Blue cellを刺激した培養上清のAP分泌量をQUANTI blueで定量した結果 (Fig. 6) においても、HEK Blue2 cellでは細胞の活性化がLM, LAM両方で認められ、TLR2を介した細胞認識であることが確認された。Sac-LMについては、HEK Blue4 cellでも低度に反応していることから、Fig. 4, 5の結果と合わせて、TLR4を介した宿主認識の関与も一部認められた。

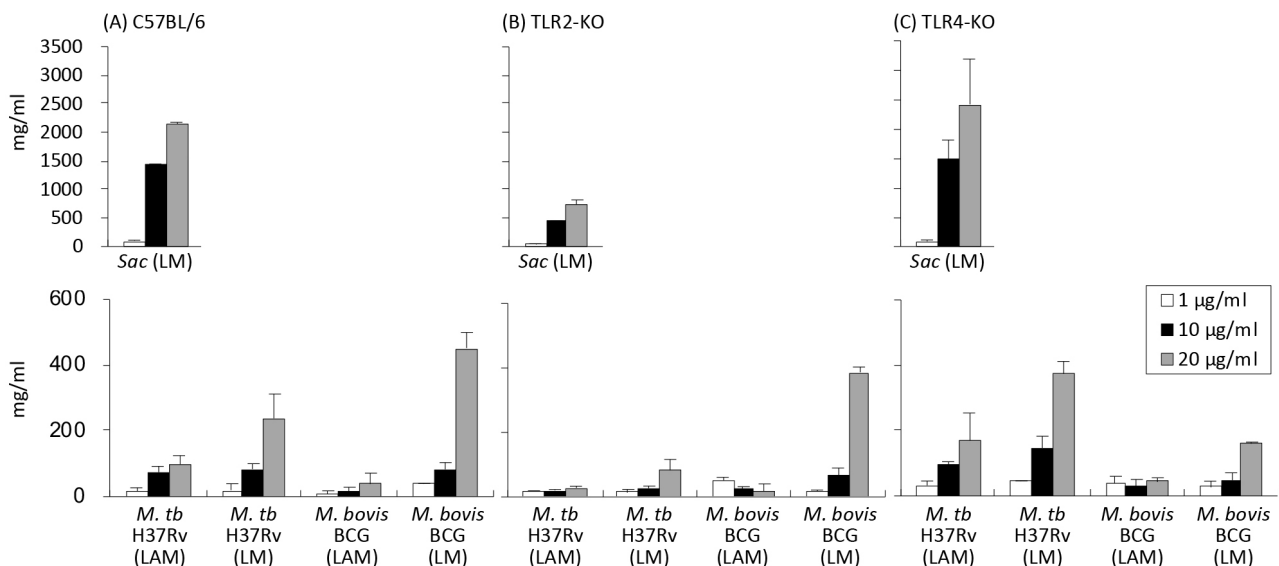


Fig. 4 TNF- $\alpha$  production by C57BL/6 BMM stimulated with LM and LAM ( $5.0 \times 10^5$ /ml, 24 hrs)

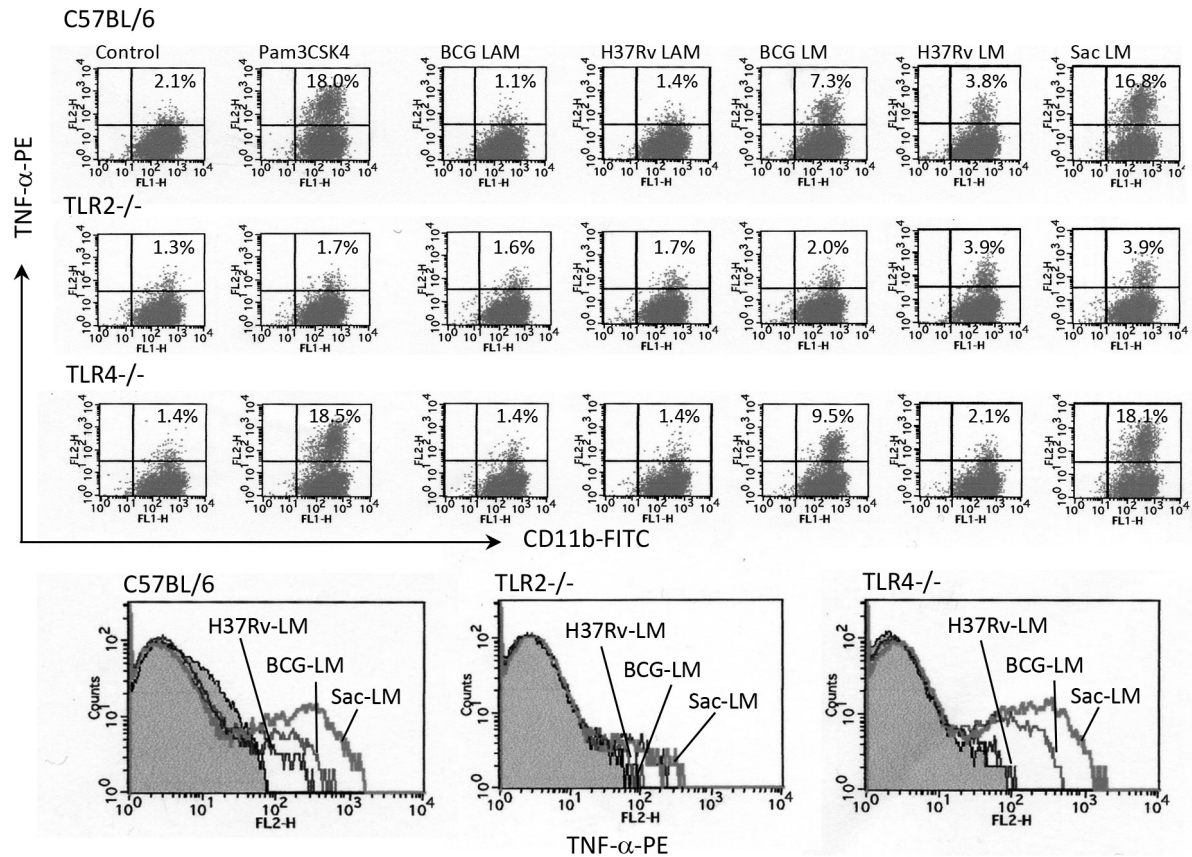


Fig. 5 Intracellular staining of TNF-α expression in C57BL/6 BMM stimulated with LM and LAM. BMMs ( $1.0 \times 10^6$  cells) co-cultured with  $10 \mu\text{g/ml}$  LM or LAM were incubated with brefeldin A for 5 h, and intracellular cytokine staining was performed with the Cytofix/Cytoperm system (BD Biosciences) using the FITC-labeled anti-CD11b (Mac-1) and PE-labeled anti-TNF-α antibodies. CD11b-positive cells were analyzed for the expression of TNF-α by flow cytometry. Pam3CSK4 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) was used as positive controls for TLR2.

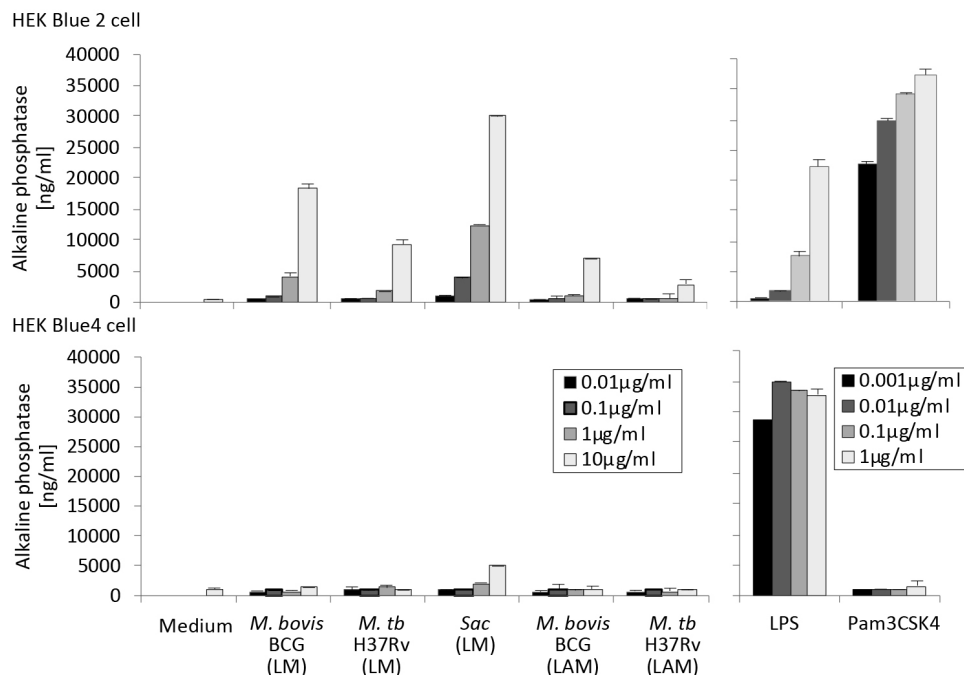


Fig. 6 Responses of HEK-Blue cells stimulated with LM and LAM

## 4. 考察

遅発育菌である *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCGは非常に構造の類似したLM, LAMを持っていた。MPI anchorに結合しているアシル基の組成, mannose側鎖の数も同一で、相違点はmannose coreのサイズのみであると考えられた。遅発育菌は一般的にManLAMを持ち、BMM活性化を抑制すると考えられているが、本研究においても、BCG-LAM, H37Rv-LAMはBCG-LM, H37Rv-LMに比べTNF- $\alpha$ 産生量が低かった、細胞内抗体染色の結果からも活性化BMMの割合が低く、過去の報告に合致するものであった<sup>5, 6)</sup>。BCG-LAM, H37Rv-LAMにおけるTNF- $\alpha$ 産生量はTLR2-KOマウスBMMで抑制され、TLR2がpattern recognition receptor (PRR) であることが明らかとなった。LMのPRRについては十分に解明されておらず、TLR2依存的にBMMを活性化しTLR2非依存的にLPSで誘導されたTNF- $\alpha$ を抑制する両面性を有するという報告がある<sup>4)</sup>。今回、H37Rv-LMはFig. 4-6からTLR2-KOマウスBMMの活性化が有意に抑えられていることが確認された。しかし、BCG-LMにおいてはこの傾向が必ずしも顕著ではなかった。構造の違いを精査するとmannose coreにおけるmannoseの分布がBCG-LMの場合、mannose数が偶数であり、その分布の偏りがBMM活性化に影響している可能性が考えられた。LAMの合成中間体がLMであり、BMM活性化にはLMの構造が強く反映されていることが示唆された。

次に、Sac-LMについては、抗酸菌由来のLMに比べて、アシル基の組成, mannose側鎖の数が異なった構造であり、BMMの活性化に強力なリガンドであることが示された。また、Sac-LMは、TNF- $\alpha$ 産生量およびCD11b<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>細胞がTLR2-KOマウスBMMで顕著に抑制されていたこと、HEK Blue2 cellが反応したことから、TLR2依存的であることが解った。PILAMはTLR2依存的であるのに対し、LMについては未だ十分に解明されていないが、ヒト由来THP細胞に予め抗TLR2抗体を加えた阻害実験でTNF- $\alpha$ 産生量が約1/2に抑えられたことからTLR2依存的であると報告されている<sup>3)</sup>。今回の結果と一致するものであった。しかし、TLR2-KOマウスBMMでの反応が完全に抑制されていないこと、HEK Blue4 cellにおいても反応性が認められたことから、Sac-LMはLAMのようなarabinan motifやmannose capping等の影響もなく、認識機構としてmannose, アシル基の違いが反映され、PRRとしてTLR2以外のmannose receptor等も考慮する必要があると考えられる。

この様にLMとLAMはBMM活性化において多彩である。LMはLAM合成の中間体であり抗酸菌の病原性にはcapping motifに加え、細胞表層のLM/LAM構成比の反映が示唆された。

## 5. 参照

- 1) Brennan, P. J., and Nikaido, H. (1995) Annu. Rev. Biochem. 64, 29-63.
- 2) Briken, V., Porcelli, S. A., Besra, G. S., and Kremer, L. (2004) Mol. Microbiol. 53, 391-403.
- 3) Gibson, K. J., Gilleron, M., Constant, P., Sichi, B., Puzo, G., Besra, G. S., and Nigou, J. (2005) J. Biol. Chem. 280, 28347-28356.
- 4) Quesniaux, V. J., Nicolle, D. M., Torres, D., Kremer, L., Guerardel, Y., Nigou, J., Puzo, G., Erard, F., and Ryffel, B. (2004) J. Immunol. 172, 4425-4434.
- 5) Mishra, A. K., Alves, J. E., Krumbach, K., Nigou, J., Castro A. G., Geurtsen J., Eggeling L., Saraiva M., and Besra G. S. (2012) J. Biol. Chem. 287(53):44173-44183.
- 6) Shukla S., Richardson E. T., Drage M. G., Boom W. H., and Harding C. V. (2018) Infect. Immun. 86(10). pii: e00450-18.