

# 非結核性抗酸菌症における臨床分離株の血清型分布と糖ペプチド脂質の構造

## Distribution of serotypes in clinical nontuberculous mycobacteria and their structures of serotype-specific glycopeptidolipids

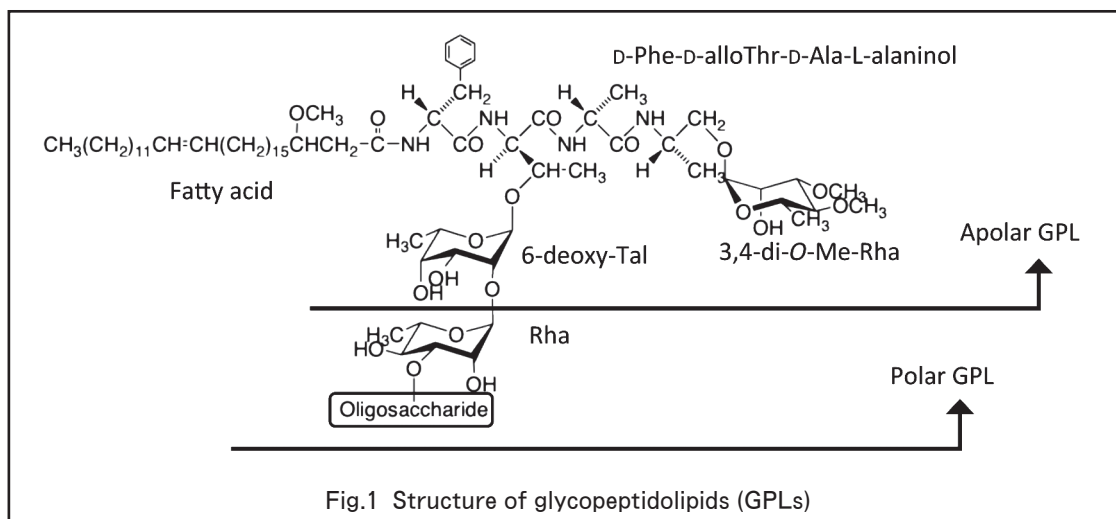
藤原 永年\*

Nagatoshi Fujiwara

*Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* (MAC) are the most common isolates of nontuberculous mycobacteria, which cause pulmonary diseases. MAC species are classifiable into 31 serotypes based on the epitopic oligosaccharide structure of the serotype-specific glycopeptidolipid (GPL) antigen. In this study, we showed the distribution of serotype-specific GPLs in clinical isolates and MALDI-TOF/MS-MS analysis of oligosaccharide.

### 1. 緒言

非結核性抗酸菌症は主にAIDS患者を始めとする免疫不全患者に日和見感染し、多剤耐性菌の出現頻度も高く難治性の呼吸器疾患で、近年増加傾向の著しい疾患である<sup>1)</sup>。非結核性抗酸菌症の主要起因菌である*Mycobacterium avium*や*Mycobacterium intracellulare*（これら2菌種をMAC菌と称する）は細胞表面に抗原性をもつ糖ペプチド脂質 (glycopeptidolipid, GPL) を産生する。全てのGPLは共通の*N*-acylated tetrapeptide-amino alcoholをcoreとして、C末端に3,4-di-*O*-methyl rhamnose、*D*-*allo*-threonineに6-deoxy-taloseを付加している。さらに6-deoxy-taloseからグリコシド結合により糖鎖 (oligosaccharide, OSE) が伸長し、このOSEの構造によって菌種特異的に血清型が規定されている (Fig.1)。現在のところ、31種類の血清型が報告され、そのうち17種類のGPL構造が明らかにされている<sup>2,3)</sup>。また、ヒトからの分離頻度は血清型により偏りがあり、特にAIDS患者では4型菌が最も多く、次いで8型、1型と報告されて



\* 食物栄養学科 教授

いる<sup>4)</sup>。本研究では、日本国内の非結核性抗酸菌症患者から分離された臨床分離株*M. avium*について血清型の分布とGPL構造を同定した。制限酵素断片長多型分析 (RFLP) から疫学的背景を明らかにした*M. avium* 52株について、GPLを抽出・精製し、薄層クロマトグラフィー (TLC) から血清型の偏在性を検討した。さらに、質量分析 (MALDI-TOF/MS) の手法を駆使してGPLの構造を解析した。

## 2. 方法

### 2.1 *M. avium*臨床分離菌の培養

DDHマイコバクテリア ‘極東’ (極東製薬株式会社) を用いてMycobacteriaの菌種を同定した。ヒトから分離された臨床分離株*M. avium* 52株を、Middlebrook OADC Enrichment (0.85% NaCl, 5% Albumin, 0.06% Sodium oleate, 2% Glucose,  $2 \times 10^{-4}$  % Catalase) 加  ${}^7\text{H}_{11}$  (BD Difco) 培地で37°C、2週間培養した。

### 2.2 *IS1245*制限酵素断片長多型分析 (RFLP)

アイソプラント (日本ジーン社) により個々の分離株からゲノムDNAを精製した。制限酵素 *Pvu* IIでゲノムDNAを切断し、0.8% アガロースゲル (1xTBE) で22 mA、30 Vで約16時間電気泳動した。ゲルはアルカリ変性後、ナイロン膜に接触させDNAを転写した。転写したDNAをUVライトで固定し、膜上のDNAとビオチン標識した*IS1245*プローブをハイブリダイゼーションした。その後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させ、ECL (GEヘルスケアバイオサイエンス) で酵素を化学発光し、X線フィルムを黒化させて画像を得た。

### 2.3 GPLの抽出・精製

十分に発育した菌体を6 mlのchloroform/methanol (2:1, by vols.) を予め加えたねじ口試験管に回収し、超音波破碎機で10分間菌体を破碎した。2 mlのH<sub>2</sub>Oを加えて二層分配し、有機層を回収して総脂質画分を得た。濃縮乾固後、0.2 M NaOH/methanol, 2.5 mlを加え、37°Cで16時間、アルカリ加水分解した。6 M HClで酸性化し、chloroform/methanol (2:1, by vols.) とH<sub>2</sub>Oを加えて再度二層分配し、GPLを含む有機層をアルカリ安定脂質として得た。これらを濃縮乾固し、acetone 2 mlを加えてリン脂質等を沈澱化させ、遠心除去した。Chloroform/methanol (95:5, by vols.) 1 mlで平衡化したSep-Pakカラム (Waters) にアルカリ安定脂質画分をアプライした。Chloroform/methanol (95:5, by vols.) 1 mlで洗浄した後、chloroform/methanol (1:1, by vols.) 1 mlで溶出して最終的にGPL画分を得た。

### 2.4 GPLのTLC分析

2.3項で得られた臨床分離株の各GPL画分と血清型既知のGPL標準品をTLCに並列してスポットし、展開溶媒 (chloroform:methanol:H<sub>2</sub>O/60:16:2, by vols.) で45分間展開した。20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ethanolを噴霧し、180°Cで3分間TLCプレートを加熱することによって茶褐色に発色したGPLの移動度を標準品と比較して血清型を決定した。

### 2.5 MALDI-TOF/MSによるGPLの分子量測定

展開したTLCからGPLスポット部分のシリカゲルを掻きとり、chloroform/methanol (2:1, by vols.) でGPLを抽出した。遠心分離によりシリカゲルを沈澱させて、GPLを含む上清を分取

して濃縮乾固した。1/20相当量 (1  $\mu$ l/20  $\mu$ l) をターゲットプレートにスポットした。さらに、10 mg/mlの2,5-dihydroxybenzoic acid, 1  $\mu$ lをmatrixとして混和した。MALDI-TOF/MS (Ultraflex II, Bruker Daltonics) により分子量を測定した。

## 2.6 $\beta$ -eliminationによるOSEの抽出

GPL画分にethanol 0.5 ml, sodium borodeuteride (NaBD<sub>4</sub>, 10 mg/ml 0.5 M NaOH) 0.5 mlを加えて、60°C、16時間攪拌した。室温まで冷却後、Dowex 50W-X8を加えて中和・脱塩した。ろ過によりDowex 50W-X8を分離し、ろ液を濃縮乾固後、chloroform/methanol (2:1, by vols.) 6 ml, H<sub>2</sub>O 1 mlを加えて二層分配した。上層の水層を回収し、濃縮乾固してOSE画分を得た。

## 2.7 OSEの構造解析

2.6項で得られたOSEの分子量を2.5項と同様にMALDI-TOF/MSで測定した。また、MALDI-TOF/MS-MS解析によりGPLのフラグメントイオンのパターンから糖鎖構造を推定した。

## 3. 結果

臨床分離株52株についてRFLPによる疫学的解析を行った結果、特徴的なクラスター群は形成されなかった。全体に不均一であったことから、集団感染等の事例が含まれていないことが確認された。本臨床分離株の母集団は偏りのない無作為抽出された集団であることが明らかとなった (Fig. 2)。

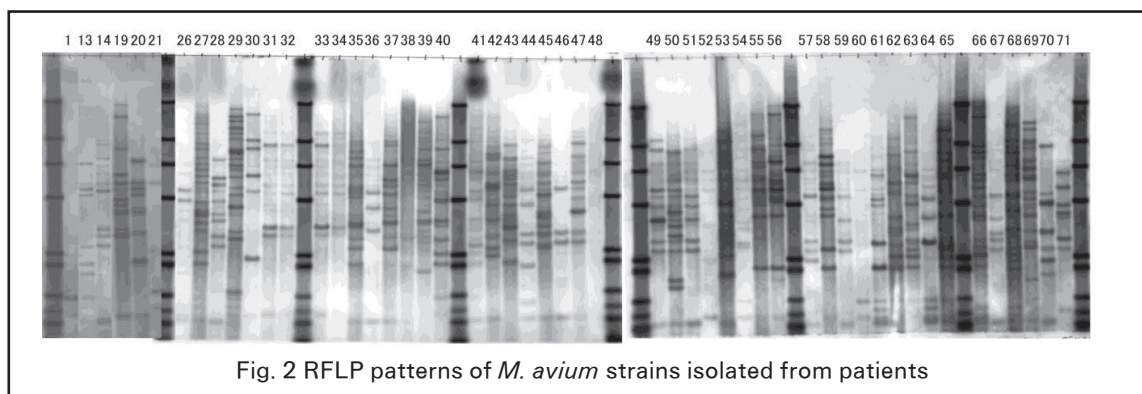


Fig. 2 RFLP patterns of *M. avium* strains isolated from patients

次に、各臨床分離株から抽出したGPL画分と血清型1, 4, 7, 8, 12, 16, 17型GPL標準品をTLCで並列して展開した。臨床分離株GPLの移動度を血清型既知のGPL標準品と比較すると、1型GPLと同じものが33株、4型GPLと同じものが8株、血清型不明のものが2株、GPLの検出できなかったものが9株あった (Fig. 3)。移動度の同じ各GPLのうち産生量が多くスポットが明瞭な臨床分離株のGPLについてMALDI-TOF/MSにより質量分析を行い、構造を解析して血清型の同定を試みた。Table 1には血清型既知のGPLとそのOSEのMALDI-TOF/MS, MS-MSにおける検出m/z、および本研究で得られた臨床分離株のGPLスポットから検出されたm/zを示した。血清型既知のGPL標準品とそのOSEにはそれぞれ特徴的な質量数が検出され、その値に基づいて臨床分離株の血清型を同定した。1型GPLに特徴的なm/zは1373、4型GPLでは1694であった。GPLの脂質部分の脂肪酸分子種の違いによる24マス刻みの変化も考慮して本研究で得られた臨床分離株の質量数と比較すると、今回質量分析を行った臨床分離株12株において、No. 13, 40, 55, 56, 58, 63は4型、14, 51, 52, 69, 70は1型、21は血清型不明となった。これらの結果は、TLCでの移動

度の比較による血清型の同定と同じ結果であり、全ての臨床分離株の血清型が確定した。

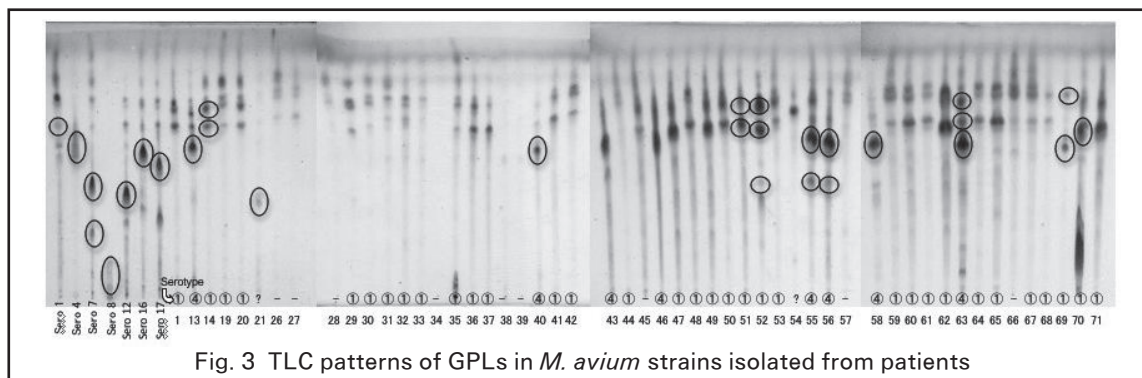


Fig. 3 TLC patterns of GPLs in *M. avium* strains isolated from patients

Table. 1 Relationship between mass numbers and serotypes from representative GPLs

検体番号 (NIID)	由来	Pseudomolecular ion of intact GPL (MALDI-TOF MS)	Pseudomolecular ion of OSE (MALDI-TOF/TOF MS)	serotype
STD serotype 1		1373	498	
STD serotype 4		1694	656	
STD serotype 7		1897	859	
STD serotype 8		1750	604	
STD serotype 12		1911	873	
STD serotype 16		1969	931	
STD serotype 17		1941	887	
13	ヒト	1678	816, 656, 496	serotype 4
14	ヒト	1343	416	serotype 1
21	ヒト	1139	498, 413	?
40	ヒト	1692, 1706	816, 656	serotype 4
51	ヒト	1357, 1343	413	serotype 1
52	ヒト	1357, 1343	413	serotype 1
55	ヒト	1762, 1517	656, 496	serotype 4
56	ヒト	1357	336	serotype 4
58	ヒト	1357	664, 413, 336	serotype 4
63	ヒト	1732, 1692	656	serotype 4
69	ヒト	—	336	serotype 1
70	ヒト	—	604, 582	serotype 1

さらに、7, 12, 16型GPLから得られたOSEの構造をMALDI-TOF/MS-MSのパターンから解析した。Chatterjeeらの報告<sup>2)</sup>にある各血清型GPLの構造と比較して、OSEのグリコシド結合毎に切断したフラグメントイオンが明確に検出されていることがわかった。アルカリ安定脂質からGPLを精製せずにβ-eliminationにより得られたOSE画分を直接MALDI-TOF/MS-MS分析すると、その検出されるフラグメントイオンのパターンから各々の血清型特異GPLの構造が容易に決定されることがわかった (Fig.4)。

#### 4. 考察

非結核性抗酸菌症の起原因菌である*M. avium*の血清型分布は、本研究で実施した日本国内の臨床分離株52株の解析においては、1型が最も多く、次いで4型であり、8型は見られなかった。4型菌より1型菌が多いこと、またGPLスポットの脱落した株も散見されたことは注視すべきであり、4型の分離頻度が高いとするTsangらの報告と異なっていた<sup>4)</sup>。1型GPLはOSE部分の構造が6-deoxy-talose-rhamnoseであり、OSEは2個の糖からなる。4, 8型を含む他の血清型は1型GPLにさらに糖鎖が2-3個付加した形で存在し、1型GPLは他の血清型の基本骨格のみを有することに

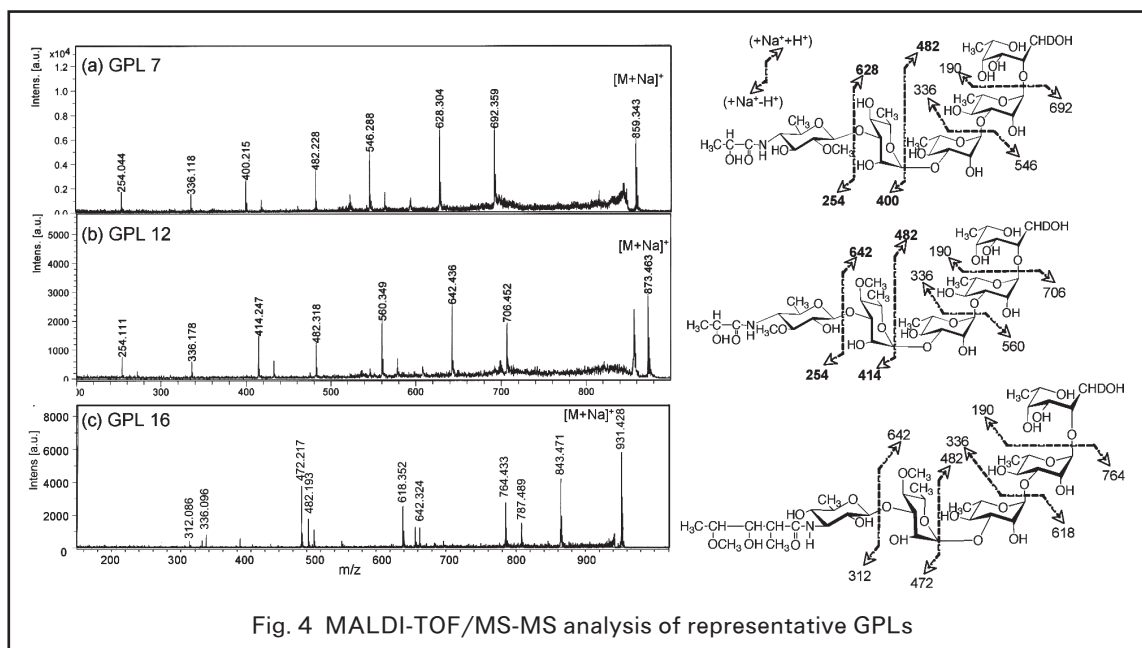


Fig. 4 MALDI-TOF/MS-MS analysis of representative GPLs

なる。GPLの生合成遺伝子群から考えると、1型GPLは糖鎖伸長の中間体として存在し、遺伝子の欠損・変異等により本来付加すべき糖鎖伸長が停止した可能性が考えられる。実際に、我々は血清型1型菌にコスミドライブラリーから得た7型GPLの生合成遺伝子群を挿入した変異株が7型GPLを産生したことを報告している<sup>5)</sup>。以前の報告に比べ、GPLの欠損株や各血清型GPLの中間体と考えられる1型GPL産生菌が多いことは、特筆すべき変化である。日本国内の特徴である可能性もあるが、抗微生物化学療法や環境変化による菌自体の変異等、病原体側の変化の可能性が推察される。

近年のGPLに関する研究においては、患者血清中に抗GPL抗体が有意に上昇していることからGPL抗原を用いた血清学的迅速診断法の開発が行われ、また、宿主免疫応答機序へのGPLの関わりとしてマクロファージの活性化機構、貪食活性、形態への影響等が報告されている<sup>3, 6)</sup>。さらに、GPLの生合成についてもGPL合成遺伝子群のクローニングが行われ、個々の糖転移、アシル基転移遺伝子の機能が明らかになりつつある<sup>7)</sup>。宿主感染におけるGPL抗原の役割については非結核性抗酸菌症の感染防御機構の解明において興味深い知見である。GPL構造の解析は非常に煩雑で、実際には血清型分類として31種類のGPLが同定されているにもかかわらず、構造既知のGPLは17種類に留まっている。今後、GPLの機能解析において構造解析は必須である。今回、GPLを精製することなく直接OSEをMALDI-TOF/MS-MS解析する試みで、グリコシド結合毎に切断されたフラグメントイオンの検出パターンからGPLの構造解析に有用な情報が得られたことは、今後の研究に活用できると考える。

以上より、本研究では*M. avium*菌におけるGPL抗原の偏在性、構造解析の簡便方法の一端を明らかにした。非結核性抗酸菌症において細胞壁に存在するGPL抗原は形態変化や宿主認識に重要な役割を果たすと考えられ、今後新たな展開を模索していきたい。

## 5. 謝辞

本研究の遂行にあたり、臨床分離株の供与及びRFLP解析でご指導頂きました公益財団法人結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科長 前田伸司博士に深謝致します。

## 6. 参考文献

- 1) Glassroth J: Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. *Chest*. 133:243-251. 2008.
- 2) Chatterjee D, Khoo KH: The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell Mol Life Sci*. 58: 2018-2042. 2001.
- 3) Naka T, Nakata N, Maeda S, Yamamoto R, Doe M, Mizuno S, Niki M, Kobayashi K, Ogura H, Makino M, Fujiwara N: Structure and host recognition of serotype 13 glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*. *J Bacteriol*. 193:5766-5774. 2011.
- 4) Tsang AY, Denner JC, Brennan PJ, and McClatchy JK: Clinical and epidemiological importance of typing *Mycobacterium avium* complex isolates. *J Clin Microbiol*. 30:479-484. 1992.
- 5) Fujiwara N, Nakata N, Maeda S, Naka T, Doe M, Yano I, and Kobayashi K: Structural characterization of a specific glycopeptidolipid containing a novel *N*-acyl-deoxy sugar from *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway. *J Bacteriol*. 189:1099-1108. 2007.
- 6) Kitada S, Kobayashi K, Ichiyama S, Takakura S, Sakatani M, Suzuki K, Takashima T, Nagai T, Sakurabayashi I, Ito M, Maekura R; Serodiagnosis of *Mycobacterium avium*-complex pulmonary disease using an enzyme immunoassay kit. *Am J Respir Crit Care Med*. 177:793-797. 2008.
- 7) Nakata N, Fujiwara N, Naka T, Yano I, Kobayashi K, and Maeda S: Identification and characterization of two novel methyltransferase genes that determine the serotype 12-specific structure of glycopeptidolipids of *Mycobacterium intracellulare*. *J Bacteriol*. 190:1064-1071. 2008.