

非結核性抗酸菌の血清型分布と 糖ペプチド脂質の構造

The diversity of serotype-specific glycopeptidolipids
from *Mycobacterium avium-intracellulare*
complex isolated from patients

合 田 麗 奈^{1,2)}・久場川 早 紀³⁾
古 郷 加 奈⁴⁾・森 谷 竜 太³⁾
山 本 祐 樹・小 林 貴美子¹⁾
藤 原 永 年²⁾・中 崇^{2,5)}
前 田 伸 司⁶⁾・水 野 淨 子^{1,2)}

1. 緒 言

Mycobacterium avium-intracellulare complex (MAC) はヒトや動物に感染する呼吸器系疾患、非結核性抗酸菌症の主要起因菌である。抗酸菌は脂質画分に富み、MAC 菌は細胞表面に抗原性をもつ特徴的な糖ペプチド脂質 (glycopeptidolipid, GPL) (Fig. 1) を産生する。全ての GPL は *N*-acylated tetrapeptide-amino alcohol の C 末端に 3,4-di-*O*-methyl rhamnose, *D*-allo-threonine に 6-deoxy-talose を付加したコア部分を有している。さらに 6-deoxy-talose からグリコシド結合により糖鎖が伸長し、この糖鎖 (oligosaccharide, OSE) の構造によって菌種特異的な血清型が規定されている。現在、OSE の構造に基づいて 31 種類の血清型が報告されており、そのうち 16 種類の GPL 構造が明らかにされてい

¹⁾相愛大学人間発達学部発達栄養学科

²⁾大阪市立大学大学院医学研究科細菌学分野

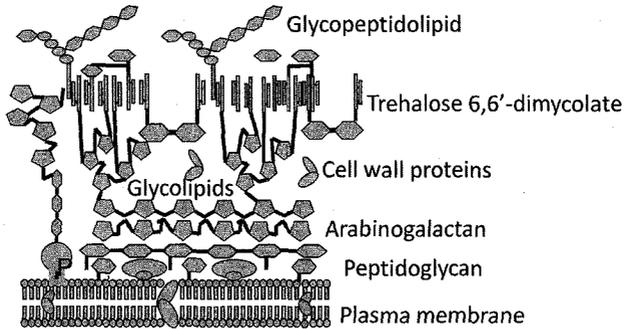
³⁾カネ美食品株式会社

⁴⁾アイビス株式会社

⁵⁾株式会社 MBR

⁶⁾結核予防会結核研究所抗酸菌リファレンス部

Schematic representation of the mycobacterial cell wall



Chatterjee D, Khoo KH. Cell Mol Life Sci. 2001 Dec;58(14):2018-42. Review.

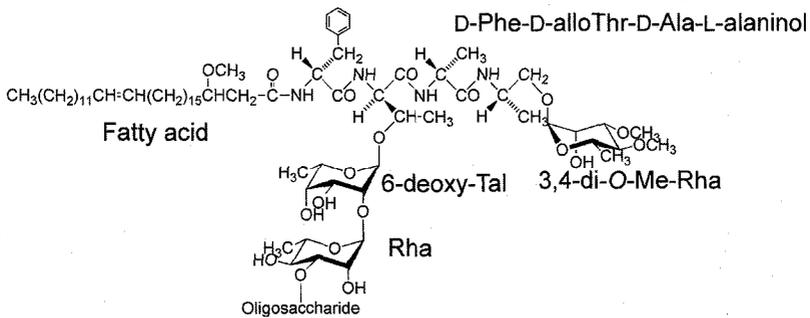


Fig. 1 Structure of glycopeptidolipids (GPL)

る¹⁻³)。また、ヒトからの分離頻度には偏りがあり、特にエイズ患者では4型菌が最も多く、次いで8型、1型と報告されている^{4,5})。本研究では、日本国内の臨床分離株 MAC 94 株について GPL を抽出し、薄層クロマトグラフィー (TLC) 及び質量分析 (MALDI-TOF/MS) により、MAC 血清型の同定と、その偏在性について検討した。

2. 方 法

①菌の培養

ヒト臨床分離株 *M. avium* 94 株を₇H₁₁ プレートで 37℃、2 週間培養し

た。

②GPL の抽出・精製

定常期に達した菌体を 6 ml の chloroform/methanol (2 : 1, by vol.) が入ったねじ口試験管に回収し、15 分間超音波破碎した。2 ml の H₂O を加え二層分配し、有機層を回収・濃縮して総脂質画分を得た。乾固後、0.2 M NaOH/methanol、2.5 ml を加え、37℃、16 時間、弱アルカリ加水分解した。6.0 M HCl 83 μl で酸性化し、chloroform/methanol (2 : 1, by vol.)、H₂O を加えて二層分配し、GPL を含む有機層をアルカリ安定脂質として得た。これらを乾固し、acetone 2 ml を加えリン脂質等を沈澱化させて除去した。chloroform/methanol (95 : 5, by vol.) 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添加した。chloroform/methanol (95 : 5, by vol.) 1 ml で洗浄し、chloroform/methanol (1 : 1, by vol.) 1 ml で溶出して最終的に GPL 画分を得た。

③GPL の TLC 分析

前項で得られた臨床分離株の GPL 画分と血清型既知 GPL を TLC にスポットし、展開溶媒 (Chloroform : methanol : H₂O/60 : 16 : 2, by vol.) で 45 分間展開した。20% H₂SO₄/ethanol を噴霧し、180℃、3 分間加熱して黄褐色に発色した GPL スポットの移動度を血清型既知 GPL と比較して血清型を分析した。

④MALDI-TOF/MS による GPL の分子量検定

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 vol.) で溶出した。遠心分離によりシリカゲルを除去し、上清を濃縮乾固した。GPL 濃縮液 1 μl/20 μl をターゲットプレートにスポットし、さらに matrix として 10 mg/ml の 2,5-dihydroxybenzoic acid を 1 μl 添加した。MALDI-TOF/MS (Ultraflex II, Bruker Daltonics) により分子量を検定した。

3. 結果及び考察

臨床分離株 94 株から抽出した GPL 画分と血清型 1、4、7、8、12、16、17 型 GPL を TLC で展開した。臨床分離株由来 GPL の移動度を血清型既知の GPL と比較すると、1 型 GPL と同じものが 11 株、4 型 GPL と同じものが 17 株、8 型 GPL と同じものが 10 株、12 型 GPL と同じものが 3 株、16 型 GPL と同じものが 3 株、血清型不明のものが 46 株、GPL の検出できなかったものが 4 株あった (Fig. 2)。血清型 1、4、8、12、16 型 GPL の TLC における移動度が特徴的であり、血清型 GPL の同定が可能であった。

各移動度の同じ GPL のスポットのうち産生量が明瞭で代表的な臨床分離株 GPL について MALDI-TOF/MS を利用した質量分析を中心に構造を解析し、血清型を確認した。Fig. 3 には血清型既知 GPL の検出質量数を示した。本研究で得られた臨床分離株の GPL スポットの検出質量数には、血清型既知 GPL に相当する質量数が検出され、それに基づいて臨床分離株の血清型を同定した。1 型 GPL に特徴的な質量数は 1372、4 型 GPL では 1694、7 型 GPL では 1897、8 型 GPL では 1649、12 型 GPL

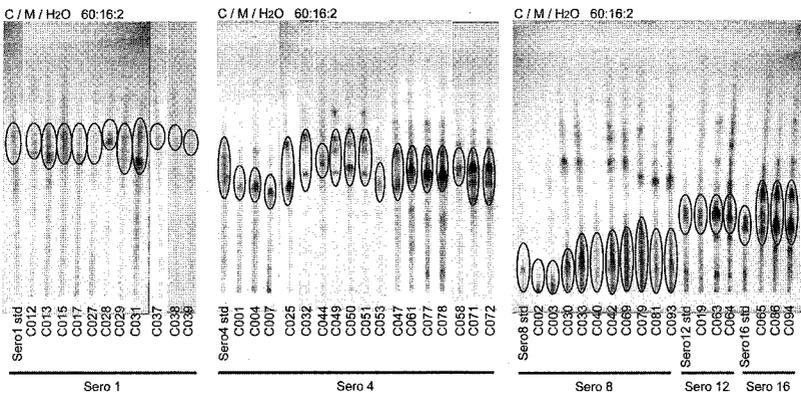


Fig. 2 TLC patterns of predominant MAC serotypes isolated from patients

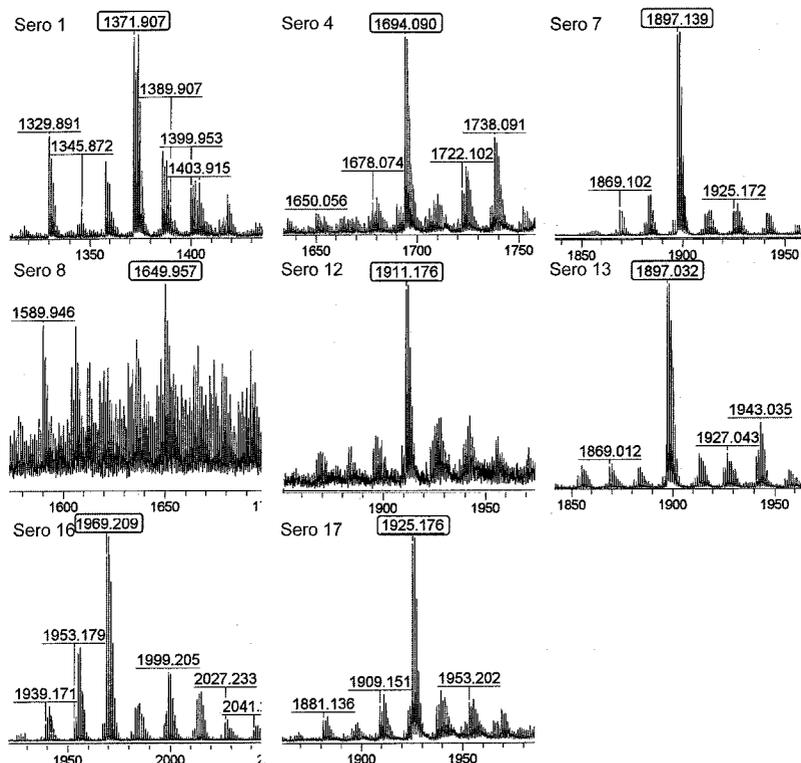


Fig. 3 MALDI-TOF MS spectra

では 1911、13 型 GPL では 1897、16 型 GPL では 1969、17 型 GPL では 1925 であった。

したがって、本研究で得られた臨床分離株の質量数と比較して考えると、今回質量分析を行った臨床分離株 94 株において、No.12、13、15、17、27、28、29、31、37、38、39 は 1 型、1、4、7、25、32、44、47、49、50、51、53、58、61、71、72、77、78 は 4 型、2、3、30、33、40、42、69、79、81、93 は 8 型、19、63、64 は 12 型、65、86、94 は 16 型、その他は血清型不明または GPL が検出されなかった。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であり、全ての臨床分離株の血清型を確定できた。

Table 1 Distribution of MAC serotypes isolated from 94 patients

Serotype	Numbers of isolates	%
1	11	12
4	17	18
7	—	
8	10	11
12	3	3
16	3	3
17	—	
unknown	50	53
Total	94	

非結核性抗酸菌 MAC の血清型分布は、過去の報告では 4 型が最多で次いで 8 型、1 型となっているが³⁵⁾、本研究で実施した 94 株の MAC 株の解析でも、4 型が最も多く、次いで 1 型、8 型であり、12 型、16 型も検出された (Table 1)。血清型 GPL のスポットは存在するが、現状では同定できない株、また GPL スポットの脱落した株も散見された。

今後はこれら血清型の偏在性が宿主病原性に関連していること、則ち血清型特異 GPL による宿主応答の差異について検証し、血清型による MAC 菌の病原性の違いを明らかにしたい。

参考文献

- 1) Chatterjee, D., and K. H. Khoo. 2001. The surface glycopeptidolipids of mycobacteria: structures and biological properties. *Cell Mol. Life Sci.* **58**: 2018–2042.
- 2) Fujiwara, N., N. Nakata, S. Maeda, T. Naka, M. Doe, I. Yano, and K. Kobayashi. 2007. 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.
- 3) Fujiwara, N., N. Nakata, T. Naka, I. Yano, M. Doe, D. Chatterjee, M. McNeil, P. J. Brennan, K. Kobayashi, M. Makino, S. Matsumoto, H. Ogura, and S. Maeda. 2008. Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium in-*

tracellulare. J. Bacteriol. **190**: 3613–3621.

- 4) Torrelles, J. B., D. Chatterjee, J. G. Lonca, J. M. Manterola, V. R. Ausina, and P. J. Brennan. 2000. Serovars of *Mycobacterium avium* complex isolated from AIDS and non-AIDS patients in Spain. J Appl Microbiol **88**: 266–79.
- 5) Tsang, A. Y., J. C. Denner, P. J. Brennan, and J. K. McClatchy. 1992. Clinical and epidemiological importance of typing of *Mycobacterium avium* complex isolates. J. Clin. Microbiol. **30**: 479–484.