

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07550

研究課題名(和文) 非天然型アミノ酸を用いた髄膜炎菌の病原性に関与する機能未知因子の網羅的な機能解明

研究課題名(英文) Functional analyses of unknown factors related to meningococcal pathogenesis with unnatural amino acids

研究代表者

高橋 英之 (Takahashi, Hideyuki)

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号：60321866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：クロスリンカーとしての機能を持つ非天然アミノ酸を導入する方法を髄膜炎菌において確立し、髄膜炎菌における解析方法の拡大に成功した。また、それらの方法を用いて、遺伝学的手法により髄膜炎菌の宿主細胞に深く関与すると推測されたNMB1345の機能解明を実行し、髄膜炎菌の宿主細胞感染に主要な機能を果たす線毛の主成分であるPileタンパクと密接に生体内におけるNMB1345(Pile-assisiated molecule A: PamAと命名)とPileの相互作用により、PamAは髄膜炎菌の線毛形成に関与する新規の髄膜炎菌の病原性機構を明らかにすることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能未知な髄膜炎菌の病原性因子の機能を解明することにより、新たな髄膜炎菌の病原性機構の分子機序を明らかにし、新規の髄膜炎菌感染症の治療薬の開発の礎を基礎研究側から提供出来ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Our previous genetic analyses revealed that the hypothetical protein, NMB1345, plays a crucial role in meningococcal infection in human brain microvascular endothelial cells; In the present study, we developed a new method to genetically incorporate ncAAs-encoded photocrosslinking probes into *N. meningitidis* by utilizing a pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNAPyl pair and elucidated the biological function(s) of the NMB1345 protein. The results revealed that the NMB1345 protein directly interacts with Pile, a major component of meningococcal pili, and further physicochemical and genetic analyses showed that the interaction between the NMB1345 protein and Pile was important for both functional pilus formation and meningococcal infectious ability in *N. meningitidis*. The present study using this new methodology for *N. meningitidis* provides novel insights into meningococcal pathogenesis by assigning the function of a hypothetical protein.

研究分野：細菌学

キーワード：髄膜炎菌 侵襲性感染症 非天然アミノ酸 病原性因子

1. 研究開始当初の背景

髄膜炎菌の既知病原因子は全て細菌表面に局在しているが、それらの因子のみでは髄膜炎菌の病原性の発症機序の全てを説明するのは困難であり、未解明因子の存在が示唆されている。一方で、髄膜炎菌ゲノム解読によって同定されたタンパク因子の約 30 % は機能未知因子 (hypothetical protein) であるが、申請者の遺伝学的解析によって同定された「髄膜炎菌の宿主細胞感染に關与する遺伝子」がその HP 因子群に多くマッピングされたことから、HP 因子群がその未解明因子に相当する可能性が推測された。しかし、実験手法が乏少な髄膜炎菌では既存の *in vivo* 及び *in vitro* の解析手法を用いてもその HP 因子群の機能解明を進展させることは困難であった。

2. 研究の目的

髄膜炎菌の新規の病原性機構に深く関与すると推測される HP 因子群の機能解析に、近年新手法として広い生物種で適用され始めた遺伝暗号拡張による非天然型アミノ酸導入法を髄膜炎菌に適用し、非天然型アミノ酸 UV クロスリンカーを HP 分子中に特異的に導入して HP 因子群と相互作用する因子を生化学的・物理化学手法を用いて髄膜炎菌 *in vivo* で網羅的に探索・同定し、HP 因子群の機能解明及び髄膜炎菌の病原性機構の分子機序の未解部分を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

15 個の HP 因子群のアミノ酸の一次配列から立体構造を予測し、HP 因子群の分子表面に存在し、他のタンパク因子と相互作用する可能性が高いと推測されるアミノ酸残基を各因子数個特定し (協力研究者・柳沢博士に依頼)、そのアミノ酸コドンの非天然型アミノ酸導入用 アンバー 変異への置換及び C 末部分にヒスタグを導入した変異体を構築し、分離同定済の Signature tag mutagenesis 変異株の染色体内に導入した髄膜炎菌変異株を作成する。さらに Pyl tRNA ($tRNA^{pyl}$) 及び Pyl を $tRNA^{pyl}$ にチャージする tRNA 合成酵素 (PylRS) をコードする遺伝子群 (*pylT+pylRS*) を保持させた髄膜炎菌用のプラスミドを構築し、をそれらの髄膜炎菌変異株に導入する。非天然型アミノ酸 UV クロスリンカー pBP_a (以下 pBP_a) の取込み条件を最適化した後、それらの髄膜炎菌株を pBP_a 存在下で大量培養、UV 処理、分子中に pBP_a が取り込まれた HP 因子 (以下 HP+pBP_a) とクロスリンクした相互作用因子群タンパク (以下 CR 因子) をヒスタグを用いて生化学的に精製、その CR 因子タンパク-HP+pBP_a 複合体の SDS-PAGE バンドを単離し、LC-MS/MS により CR 因子を同定する (協力研究者・堂前博士に依頼)。それらの CR 因子の遺伝子に FLAG タグを付加した髄膜炎菌変異株を分子遺伝学的に構築し、CR-FLAG タンパクがその HP+pBP_a 因子群と髄膜炎菌 *in vivo* でクロスリンクするかを Western blotting 法により再検証し、HP 因子群と相互作用する CR 因子群を確定する。それらの CR 因子群の生物学的機能から HP 因子群の機能を解析し、そ

これらの CR 因子群と HP 因子群の分子機序に関して髄膜炎菌破壊株の構築、感染実験等の遺伝学的及び生化学的解析を遂行し、髄膜炎菌の病原機構の分子機構をさらに解明する。

4. 研究成果

髄膜炎菌における遺伝暗号拡張による非天然型アミノ酸導入法をさまざまな実験条件で検討し、導入する実験系を確立した。それらの実験手法を用いて、ヒト脳血管内皮細胞(HBMEC)への侵入能のみが著しく欠損した髄膜炎菌変異株を単離したが、その原因遺伝子は機能未知タンパクをコードした遺伝子 NMB1345 の機能解明を試みた。非天然型アミノ酸光クロスリンカーを NMB1345 分子内に特異的に導入し、NMB1345 と相互作用因子を生化学的・物理化学手法を用いて髄膜炎菌内で探索することを試みた。NMB1345 分子とクロスリンクした蛋白を生化学的に精製後、LC-MS/MS 及び MASCOT による同定を行い、線毛の主要蛋白である PilE であることが明らかとなった。線毛は髄膜炎菌の宿主細胞への接着及び侵襲に関して非常に重要な役割を担っている事が明らかとなっており、この結果は過去の知見とも非常に合致すると考えられた。NMB1345 を Pil associated molecule A (PamA)と命名し、さらに PamA と PilE の相互作用による機能解析を行うため、PamA と PilE のクロスリンクしているアミノ酸部位を LC-MS/MS を用いて同定した。その結果、PamA の 278 番目のリジンに導入した非天然アミノ酸型クロスリンカーは PilE の 12 番目のイソロイシン(I12)にクロスリンクしている事が明らかとなった。さらに PilE の I12 をアラニンに置換した pilE I12A 変異体を構築し、HBMEC への感染における影響を解析した結果、pilE I12A 変異体は野生株に比べて細胞侵襲能が低下しており、また生化学的解析から PamA と PilE I12A の相互作用は野生株に比べて著しく低下している事が明らかとなった。以上の結果から、機能未知であった髄膜炎菌 PamA 因子は線毛と相互作用することに髄膜炎菌の病原性を促進している分子機序が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi H, Dohmae N, Kim KS, Shimuta K, Ohnishi M, Yokoyama S, Yanagisawa T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Genetic incorporation of non-canonical amino acids photocrosslinkers in <i>Neisseria meningitidis</i> : New method provides insights into the physiological function of the function-unknown NMB1345 protein.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0237883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0237883.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Ken Shimuta, Shu-Ichi Nakayama, Hideyuki Takahashi, Makoto Ohnishi	4. 巻 64
2. 論文標題 A Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Targeting <i>Neisseria Gonorrhoeae</i> penA-60.001	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother .	6. 最初と最後の頁 e01663-19.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.01663-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋英之
2. 発表標題 「マスギャザリングと感染症事例から学ぶ」侵襲性髄膜炎菌感染症
3. 学会等名 第94会日本感染症学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋英之、横山茂之、柳沢達男
2. 発表標題 髄膜炎菌 <i>Neisseria meningitidis</i> の宿主細胞感染時における Nutrient virulence factor としてのシステイン輸送システムの機能解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋英之、大西真、横山茂之、柳沢達男
2. 発表標題 非天然アミノ酸を導入した髄膜炎菌における遺伝暗号拡張
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋英之
2. 発表標題 マスギャザリングと髄膜炎菌感染症
3. 学会等名 第32回地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 高橋英之、大西真	4. 発行年 2020年
2. 出版社 近代出版	5. 総ページ数 5
3. 書名 臨床と微生物 「侵襲性髄膜炎菌感染症」	

1. 著者名 高橋英之、大西真	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 5
3. 書名 小児疾患診療のための病態生理1 「侵襲性髄膜炎菌感染症」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------