

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590545

研究課題名(和文) 髄膜炎菌の宿主細胞侵入に関与するグルタミン酸取込を含むシグナル伝達系の網羅的解析

研究課題名(英文) Systematic analyses of signal transduction systems on GltT-GltM glutamate transporter mediated invasion into the host cell in *Neisseria meningitidis*

研究代表者

高橋 英之 (Takahashi, Hideyuki)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：60321866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：髄膜炎菌GltT-GltMグルタミン酸トランスポーターによるグルタミン酸の取り込みが髄膜炎菌の宿主細胞の侵入における作用機序に関して分子遺伝学的及び細胞生物学的解析を行なった。その結果、髄膜炎菌のGltT-GltMトランスポーターは宿主細胞へ接着・侵入する際に自身の環境中(マイクロコロニー内)のグルタミン酸濃度を一過的に低下させて髄膜炎菌の細胞侵入を促進している可能性を見出した。さらには細胞接着時のみに宿主細胞内の抗酸化物質として作用するグルタチオンの髄膜炎菌内での量が増加することも見出し、GltT-GltMの病原因子としてのマルチな機能を解明した。

研究成果の概要(英文)：We found that, 1) the *gltT- gltM* invasion defect in assay medium (AM) was alleviated in AM without 10% FBS [AM(-S)], 2) the alleviation disappeared again in AM(-S) supplemented with 500 μ M glutamate, 3) glutamate uptake by the *gltT- gltM* mutant was less efficient than that by the wild type strain, 4) both the GltT-GltM-dependent invasion and accumulation of ezrin were more pronounced when *N. meningitidis* formed larger colonies on human brain microvascular endothelial cells (HBMEC). These results suggested that GltT-GltM-dependent meningococcal internalization into HBMEC might be induced by the reduced environmental glutamate concentration upon infection. We also found that the amount of glutathione within the *gltT- gltM* mutant was much lower than that within the wild type *N. meningitidis* strain only upon HBMEC infection, and was correlated with intracellular survival, showing that L-glutamate uptake via GltT-GltM plays multiple roles.

研究分野：細菌学、分子生物学

キーワード：髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis* グルタミン酸 トランスポーター 細胞侵入

期間番号：82603
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012~2014
課題番号：24590545
研究課題名(和文)：髄膜炎菌の宿主細胞侵入に関するグルタミン酸取込を含むシグナル伝達系の網羅的解析
研究課題名(英文)：Comprehensive analyses for signal transduction system upon *Neisseria meningitidis* invasion to the host cells via GltT-M glutamate transporter

研究代表者

高橋 英之 (TAKAHASHI, Hideyuki)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号：60321866

交付決定額(研究期間全体)(直接経費)：4,200,000 円

研究成果の概要(和文)：髄膜炎菌 GltT-GltM グルタミン酸トランスポーターによるグルタミン酸の取り込みが髄膜炎菌の宿主細胞の侵入における作用機序に関して分子遺伝学的及び細胞生物学的解析を行なった。その結果、髄膜炎菌の GltT-GltM トランスポーターは宿主細胞へ接着・侵入する際に自身の環境中(マイクロコロニー内)のグルタミン酸濃度を一過的に低下させて髄膜炎菌の細胞侵入を促進している可能性を見出した。さらには細胞接着時のみに宿主細胞内の抗酸化物質として作用するグルタチオンの髄膜炎菌内での量が増加することも見出し、GltT-GltM の病原因子としてのマルチな機能を解明した。

研究成果の概要(英文)：We found that, 1) the Δ *gltT*- Δ *gltM* invasion defect in assay medium (AM) was alleviated in AM without 10% FBS [AM(-S)], 2) the alleviation disappeared again in AM(-S) supplemented with 500 μ M glutamate, 3) glutamate uptake by the Δ *gltT*- Δ *gltM* mutant was less efficient than that by the wild type strain, 4) both the GltT-GltM-dependent invasion and accumulation of ezrin were more pronounced when *N. meningitidis* formed larger colonies on human brain microvasocular endothelial cells (HBMEC). These results suggested that GltT-GltM-dependent meningococcal internalization into HBMEC might be induced by the reduced environmental glutamate concentration upon infection. We also found that the amount of glutathione within the Δ *gltT*- Δ *gltM* mutant was much lower than that within the wild type *Neisseria meningitidis* strain only upon HBMEC infection, and was correlated with intracellular survival, showing that L-glutamate uptake via GltT-GltM plays multiple roles.

研究分野：細菌学

キーワード：髄膜炎菌 宿主細胞侵入、グルタミン酸、トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

(1)髄膜炎菌は数%~数十%のヒト健康保菌者の鼻咽頭上皮細胞に定着しているが、未解明の要因が作用した場合に髄膜炎菌は上皮細胞層、血管内皮細胞層を通過して血液内に侵入して敗血症を引き起こし、さらに

血液脳幹門を通過して髄液に侵入して髄膜炎を引き起こす。

これまでに分子疫学的手法 (Multilocus sequence typing; MLST)を用いて日本の臨床分離株を解析し、海外流行株や患者由来株は特定の遺伝子型 (ST) に分類されるこ

とを見出しており (Takahashi *et al.*, *J. Med. Microbiol.*, 2004)、ヒト培養細胞を用いた *in vitro* 感染実験においても海外流行株や患者から高頻度で分離される高病原性 ST-2032 株は健常者からのみ分離される低病原性株に比べてヒト培養細胞に対する接着能・侵入能が非常に高いことも明らかにした (Takahashi *et al.*, *FEMS Immun. Med. Microbiol.*, 2008)。

(2) 髄膜炎菌の病原性機構をさらに解明する目的で高病原性 ST-2032 株に対して signature tag mutagenesis (STM) 法を適用した、病原性因子の網羅的な探索を行なった (H21-23 科研費 若手研究 B)。その結果、髄膜炎菌の宿主細胞侵入において GltT-GltM transporter を介した一過的なグルタミン酸の取込みが必須であることを明らかにした (Takahashi *et al.*, *Infect. Immun.*, 2011)。この結果から髄膜炎菌の細胞侵入には GltT-GltM transporter を介したグルタミン酸の取込みを一つのコンポーネントとするシグナル伝達系が関与する可能性が強く推測された。

2. 研究の目的

髄膜炎菌が宿主細胞へ侵入する際の GltT-GltM transporter を介したグルタミン酸の取込みに伴って発生する様々な髄膜炎菌内の変化を野生株、*gltT-gltM* 変異株を用いて、1) 遺伝子発現レベル、2) タンパク発現レベル、3) 代謝産物レベルを比較解析することにより宿主細胞への侵入機構における髄膜炎菌内の質的・動的変化を網羅的に探索し、その細胞侵入機構に関与するシグナル伝達系の因子を同定し、その分子機構を解明する。

3. 研究の方法

髄膜炎菌の宿主細胞への侵入に関与する GltT-GltM transporter を介したグルタミン酸の取込みを一つのコンポーネントとするシグナル伝達系の解明のために、ヒト脳内皮血管細胞 (HBMEC) に *in vitro* で感染させた野生型株と *gltT-gltM* 変異株を回収し、その

の 1) RNA、2) タンパク、3) 細菌抽出液を精製し、RNA は RNAseq、タンパクは Tandem Mass Tag (TMT) をラベル及び LC-MS/MS による相互比較、グルタチオン濃度を測定した。さらには各種条件下で髄膜炎菌の宿主細胞内侵入効率や感染状態を免疫染色を利用した顕微鏡観察で確認した。

4. 研究成果

(1) トランスクリプトーム解析及びプロテオーム解析

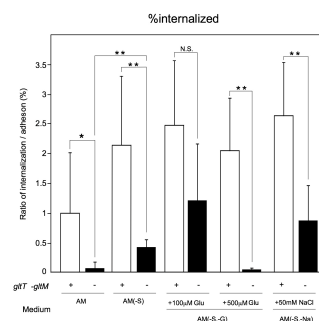
髄膜炎菌が宿主細胞へ侵入する際の GltT-GltM transporter を介したグルタミン酸の取込みに伴って発生する転写制御を解析するために、HBMEC に感染した野生株 HT1125、*ΔgltT-ΔgltM* 変異株 HT1414 の遺伝子発現及びタンパク発現の変化を検証した。その結果、RNA レベルでは感染した HT1125 と HT1414 の遺伝子発現量を比較すると、100 以下の遺伝子が数倍の範囲でしかその発現量が変化しておらず、タンパクレベルに至っては 61 の因子のタンパクの 2 倍以下の変化しか観察されなかった。この結果から GltT-GltM 依存的な細胞侵入に伴う発現制御はない可能性が示唆された。

(2) メタボローム解析を実施する予備実験にて見出された変化

メタボローム解析を行うための予備実験を行なう過程で、FBS を添加しない培地 AM (-S) でも GltT-GltM 依存的な髄膜炎菌の宿主細胞侵入が認められるかを検証した。その結果、通常培地 (AM) では *gltT-gltM* 欠損株 HT1414 は野生株 HT1125 に比べ、約 1/100 までの細胞侵入能

の低下が認められるが、驚いたことに血清を抜いた培地

[AM(-S)]



ではその細胞侵入能の低下の程度が約 1/10 まで軽減されていた。その欠損は 500 μ M のグルタミン酸の添加で約 1/100 まで戻ることが確認された(図 1)。以上の結果から GltT-GltM 依存的な髄膜炎菌の宿主細胞侵入は髄膜炎菌-HBMEC を取り巻く環境中のグルタミン酸濃度の変化に起因する可能性が見出された。

(3) 培地中のグルタミン酸濃度の測定

前項の実験結果から環境中のグルタミン酸濃度の低下度が高い場合には髄膜炎菌の HBMEC への侵入能が高いことが推測され、それを GltM-GltT トランスポーターを介して行っていることが推測された。この仮説からすれば AM と AM(-S)に含まれるグルタミン酸濃度に差異が認められるはずである。そこで、アッセイ後の各培地中のグルタミン酸濃度を測定した。その結果、AM に比べて AM(-S)の方がグルタミン酸濃度の低いことがあきらかとなった。

(4) GltT-GltM 依存的な細胞侵入は宿主細胞上のコロニーが大きい場合には最大効率を示す

宿主細胞上のコロニーの大きさと GltT-GltM 依存的な細胞侵入の効率の相関性を観察した。その結果、Multiple of infection (MOI: 宿主細胞に対する細菌の数)を高くすると髄膜炎菌の宿主細胞上のコロニーの大きさが大きくなり、その大きさが大きいほど GltT-GltM 依存的な細胞侵入の

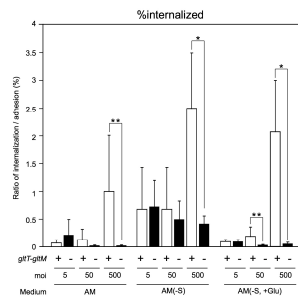


図2

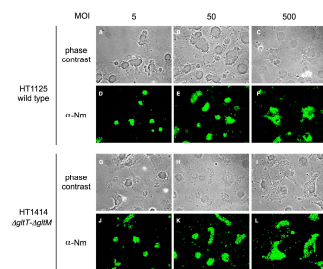


図3

効率が高いことがあきらかとなった(図 2,3)。この結果から髄膜炎菌は宿主細胞上でコロニーを作り、そこで GltT-GltM 依存的にグルタミン酸の欠乏状態を作り出し、それにより宿主細胞への侵入をより効率的に行っている可能性が示唆された。

(5) 環境中のグルタミン酸濃度、細胞侵入効率及び HBMEC の ezrin 集積の相関性

ezrin の集積は髄膜炎菌の宿主細胞侵入に必須の現象であることが明らかとなっているため、環境中のグルタミン酸濃度、細胞侵入効率及び HBMEC の ezrin 集積の相関性に関して解析を行なった。その結果、グルタミン酸の環境中の濃度が低下した時に GltT-GltM 依存的な細胞侵入が影響を受け、それは ezrin 集積度と非常に相関していることが明らかとなった。

(6) GltT-GltM によって取り込まれたグルタミンはグルタチン合成及び、細胞内生存に寄与する

さらに GltT-GltM 依存的な細胞侵入の現象を解明するため、グルタチオン合成酵素遺伝子を欠損した株で HBMEC への感染を検証した。その結果、グルタチン依存的な細胞侵入の現象が認められ、それは AM 及び AM(-S)の両培地で確認された。一方で、グルタチン非依存的な細胞侵入は AM(-S)においては優位に観察出来なかった。このことから、GltT-GltM

依存的な細胞侵入にはグルタチオン依存的及び非依存的の両機構が関与しており、グルタチオン非依存的な細胞侵入機構は

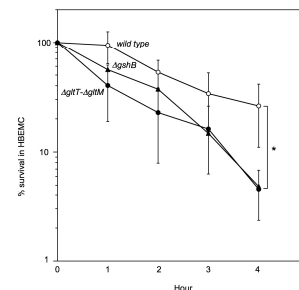
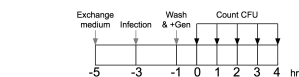


図4

環境中のグルタミン酸濃度に影響されることが明らかとなった。

さらにグルタチオン依存的な細胞侵入の現象を解明するために細胞内での髄膜炎菌の生存率を測定した。その結果、野生株に比べ、*glitT-glitM* 変異株は優位に生存率が低く、その低さはグルタチオン合成酵素欠損株と同様であった(図4)。

さらにはグルタチオンの合成量は髄膜炎菌感染時に増強されることも確認された。

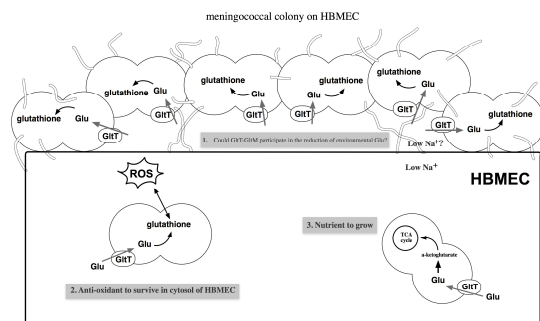
このことから、髄膜炎菌は GlitT-GlitM トランスポーターからグルタミン酸を取り込み、それをグルタチオンに合成することにより、細胞内の生存率を高めている機構が明らかとなった。

(9) GlitT-GlitM は細胞侵入の際にマルチプルな機能を果たしている。

本研究により、髄膜炎菌 GlitT-GlitM グルタミン酸トランスポーターは

- 1) 宿主細胞接着時に局所的にグルタミン酸濃度を低下させて宿主細胞侵入効率を向上させる
- 2) グルタミン酸の取込とリンクしたグルタチオンの合成量の増加により細胞内生存率を向上させている
- 3) 転写及び翻訳の制御機構には影響しないことが明らかとなり、GlitT-GlitM を介した髄膜炎菌の細胞侵入機構の分子機序を解明した。さらに、
- 4) GlitT-GlitM を介して取り込まれるグルタミン酸を栄養源として細胞内増殖をサポートしている(引用文献)

も明らかとなっており、GlitT-GlitM グルタミン酸トランスポーターのマルチプルな機能



を發揮して、髄膜炎菌の宿主細胞侵入に関与

していることも明らかとなった(図5)。

<引用文献>

Monaco C, Tala A, Spinosa MR, Progidia C, De Nitto E, Gaballo A, Bruni CB, Bucci C, Alifano P. 2006. Identification of a meningococcal L-glutamate ABC transporter operon essential for growth in low-sodium environments. *Infect Immun.* 74:1725-1740.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Hideyuki Takahashi, Tatsuo Yanagisawa, Kwang Sik Kim, Shigeyuki Yokoyama and Makoto Ohnishi. Meningococcal PilV potentiates *Neisseria meningitidis* type IV pilus-mediated internalization into human endothelial and epithelial cells. *Infect Immun.* (査読あり) 2012, 80(12): 4154-4166.

Kei Yamamoto, Yasuyuki Kato, Takuma Shindo, Mugen Ujiie, Nozomi Takeshita, Shuzo Kanagawa, Junwa Kunimatsu, Yuiichi Tamori, Toshikazu Kano, Rumi Okuno, Hideyuki Takahashi, Norio Ohmagari. Meningococemia due to the 2000 Hajj-Associated Outbreak Strain (Serogroup W-135 ST-11) with Immunoreactive Complications. *Jpn J. Infect Dis.* (査読あり) 2013, 66 (5):443-445.

Multilocus Sequence Typing and DNA similarity analysis implicates that a *Borrelia valaisiana*-relates sp. isolated in Japan is distinguishable from European *B. valaisiana*. Hiroki Kawabata, Ai Takano, Teruki Kadosaka, Hiromi Fujita, Yoshiki Nitta, Mutsuyo Gokugen, Toshiro Honda, Junko Tomida, Yoshiaki Kawamura, Toshiyuki Masuzawa, Fubito Ishiguro, Nobuhiro Takada, Tasuhiro Yano, Masako

Andoh, Shuji Andoh, Kazuo Sato, Hideyuki Takahashi, and Makoto Ohnishi. *J. Vet. Med. Sci.* (査読あり) 2013, 75(9):1201-1207.

Hayakawa K, Itoda I, Shimuta K, Takahashi H, Morita M, Ohnishi M. Urethritis Caused by Novel *Neisseria meningitidis* Serogroup W in Man Who Has Sex with Men, Japan. *Emerg Infect Dis* (査読あり) 20(9):1585-1587, 2014.

DoKyung Lee, Eun Jin Kim, Paul E. Kilgore, Soon Ae Kim, Hideyuki Takahashi, Makoto Ohnishi, Dang Duc Anh, Bai Qing Dong, Jung Soo Kim, Jun Tomono, Shigehiko Miyamoto, Tsugunori Notomi, Dong Wook Kim, Mitsuko Seki. Clinical Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of *Neisseria meningitidis* in Cerebrospinal Fluid. *Plos One* (査読あり) 10(4):e0122922, 2015.

〔学会発表〕(計 2 件)

高橋英之、大西真：GltT-GltM トランスポーターを介した髄膜炎菌の宿主細胞侵入に関する遺伝子の転写及び翻訳レベルでの網羅的解析、第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月

高橋英之、大西真：髄膜炎菌 GltT-GltM トランスポーターの宿主細胞侵入における作用機序の解明、第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月

〔図書〕(計 7 件)

高橋英之、髄膜炎菌性髄膜炎菌、Medical Technology, Vol.40 No.4, 351-352, 2012

高橋英之、大西真、侵襲性髄膜炎菌感染症の最近の問題点、小児科、Vol.53 No.5, 615-621, 2012.

高橋英之、大西真、侵襲性髄膜炎菌感染症、別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ、No.26, 765-768, 2013.

高橋英之、大西真、髄膜炎菌、病原体の今日的意味 改訂 4 版、312-319、2013.

高橋英之、大西真、2005～2012 年までの髄膜炎菌性髄膜炎の起炎菌の血清学的及び分子疫学的解析、IASR、Vol.34 No.2, 363-364, 2013.

高橋英之、髄膜炎菌性髄膜炎(侵襲性髄膜炎菌感染症)第 1 回～第 3 回、小学保健ニュース(中学保健ニュース)[高校保健ニュース]、少年写真新聞、10 月号～12 月号、4-5、2013.

高橋英之、大西真、髄膜炎菌感染症、小児疾患診療のための病態生理、1、831-834、2014.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋英之(TAKAHASHI, Hideyuki)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号：60321866

(3) 連携研究者

柳沢 達男(YANAGISAWA, Tatsuo)
理化学研究所・横山構造生物学教室・研究員
研究者番号：10450420