

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790435

研究課題名（和文）STM法を用いた髄膜炎菌の新規病原性因子の網羅的探索

研究課題名（英文）Screening for a new meningococcal pathogenic factor by STM

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

研究成果の概要（和文）：Signature tag mutagenesis (STM)法を用いて約 5000 個の独立したトランスポゾン挿入変異株のライブラリーを構築し、ヒト脳内皮血管細胞への接着もしくは侵入能が低下した変異株のスクリーニングを行なった。その結果、最終的に 31 個の宿主細胞への接着もしくは侵入が低下した変異株を同定することが出来た。

研究成果の概要（英文）：I constructed a transposon-inserted meningococcal mutant library by STM and screened adhesion or invasion-defective mutants to human brain microvasocular endothelial cells. By the 5<sup>th</sup> steps of screening, 31 mutants were finally selected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	0	1,500,000
2010 年度	1,200,000	0	1,200,000
2011 年度	600,000	0	600,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：感染症・微生物

## 1. 研究開始当初の背景

髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*) は化膿性髄膜炎の起炎菌の中で唯一ヒト-ヒト間の伝播による流行性髄膜炎を引き起こす危険な病原菌である。髄膜炎菌は数%～数十%のヒトの鼻咽頭上皮細胞に不顕性感染しているが、上皮細胞層、血管内皮細胞層を通過して血液内に侵入すると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すると髄膜炎を引き起こす。髄膜炎菌はヒトを唯一の宿主とするために動物感染モデルでの解析が不可能であり、髄膜炎菌の病原性は主に培養細

胞を用いて解析されてきた。現在までに髄膜炎菌の病原因子として線毛や外膜タンパク、莢膜、リポ多糖等の細菌の表層因子や自己分泌型タンパクが解明されてきている。しかし、それらの殆どは表層タンパクでヒト細胞への接着に関与するものであり、ヒトの血中や髄液にまで侵入する髄膜炎菌の病原性に関してはその感染機序を含めて殆どが未解明である。また、既に解読されている髄膜炎菌及びその類縁ナイセリア属菌の全ゲノム塩基配列を基にした *in silico* 解析によっても pathogenic island 及び病原性因子の遺伝子クラスターは検出されておらず、髄膜炎菌は

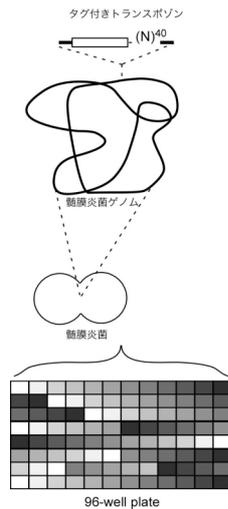
そのゲノム上に散在している既知及び未知の病原因子がモザイク状に発現し、相乗的に機能しながらその病原性を発揮していることが推測されていた。

## 2. 研究の目的

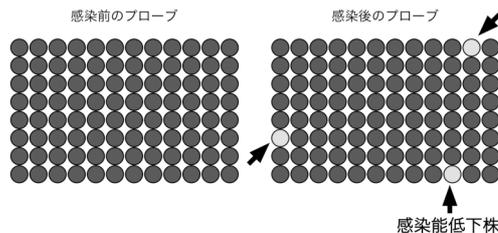
髄膜炎菌のゲノム上に散在している病原因子を網羅的に探索し、髄膜炎菌の感染（殊に細胞侵入）機構をより詳細に解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

STM はランダムな塩基配列を導入した 40mer の合成 DNA を付加したトランスポゾンを用いる変異導入法であり、各挿入変異株は各々異なる 40mer の「個体識別用配列 (DNA タグ)」が導入され、1 株ずつ 96 ウェルプレートを利用して単独で保存すれば Southern blotting を用いたスクリーニング過程において各変異株の個体識別が可能となる。



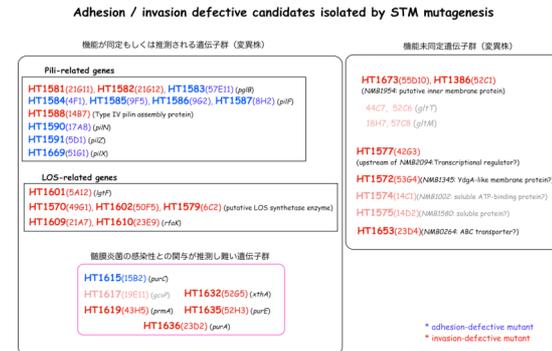
高病原性株 ST-2032 株を signature tag mutagenesis (STM) により ST-2032 株のトランスポゾン挿入変異体ライブラリーを作成し、ヒト脳血管内皮細胞 (HBMEC) への感染性 (細胞侵入性) が低下する変異体を単離するネガティブスクリーニングを行なった。



## 4. 研究成果

約 5000 個の独立したトランスポゾン挿入変異株のライブラリーを構築し、ヒト脳内皮血管細胞への接着もしくは侵入能が低下した変異株のスクリーニングを行なった。その結果、最終的に 31 個の宿主細胞への接着もしくは侵入が低下した第 5 次候補変異株を同定することが出来た。それらの変異株の中には線毛や LOS の合成や修飾に関与する遺伝子、また栄養源の合成に関わる遺伝子の他、機能が全く未知の遺伝子が破壊された候補株も 9 株含まれ、それらが髄膜炎菌の新規病原性因

子である可能性が示唆された。特に NMB1964 及び NMB1965 とゲノムシーケンスから命名された遺伝子が破壊された株が 4 株得られており、それらの挿入変異株は細胞接着能は低下していないが細胞侵入能は野生株の約 1% までに低下しており、この二つの遺伝子群が髄膜炎菌の細胞侵入に深く関与する可能性を見出すことが出来た。



## 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 2 件)

- ① M. Matsuura, H. Takahashi, H. Watanabe and K. Kawahara. Immunomodulatory effects of *Yersinia pestis* Lipopolysaccharides on human Macrophages. *Clinical and Vaccine Immunology* 査読有 17:49-55, 2010. doi:10.1128/CVI.00336-09
- ② H. Takahashi, K. S. Kim and H. Watanabe. Meningococcal internalization into human endothelial and epithelial cells is triggered by the influx of extracellular L-glutamate via GltT L-glutamate ABC transporter in *Neisseria meningitidis* *Infection and Immunity* 査読有 79:380-392, 2011. doi:10.1128/IAI.00497-10

[学会発表] (計 3 件)

- ① 高橋英之 国内分離された髄膜炎菌株の分子疫学的解析とそれらを用いた *Neisseria meningitidis* の病原因子の解析 第 92 回細菌学会関東支部会シンポジウム 平成 21 年 11 月 8 日 東京医科歯科大学
- ② 高橋英之、渡邊治雄 細菌感染時の髄膜炎菌の一過的なグルタミン酸の取込みが宿主細胞への侵入に必須である 第 83 回日本細菌学会総会 平成 22 年 3 月 24 日 横浜
- ③ 高橋英之、大西真 髄膜炎菌の線毛のマイナータンパク PilV の宿主細胞感染における遺伝学的及び物理化学的手法を用

いた機能解析 第 85 回日本細菌学会総会  
平成 24 年 3 月 27 日 長崎

[図書] (計 2 件)

- ① 高橋英之、大西真 病原菌の今日的意味  
14.髄膜炎菌 2011 年、医薬ジャーナル社
- ② 川端寛樹、高橋英之 感染症辞典 3-27  
ベスト 2012 年 オーム社

## 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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :