

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：82603
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2019
課題番号：16K18928
研究課題名(和文)ヘリコバクター・シネディの病原因子に関する研究

研究課題名(英文)Virulence factors of *Helicobacter cinaedi*

研究代表者

林原 絵美子 (Rimbara, Emiko)

国立感染症研究所・細菌第二部・主任研究官

研究者番号：20349822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：*Helicobacter cinaedi*はヒトや動物の腸に生息し、菌血症や蜂窩織炎の原因菌として分離される病原細菌である。本研究では大腸菌などに存在するSerine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs)に類似する*H. cinaedi*のautotransporter proteinである膜タンパク質Xに着目し、ノックアウト株を用いたin vitro感染実験等によりその機能を解析した。その結果、Xは細胞接着因子として*H. cinaedi*感染病態に寄与していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*Helicobacter cinaedi*は近年その分離が増加している病原細菌である。さらに*H. cinaedi*は人から人へと伝播し院内感染を引き起こす。病原因子としてcytolethal distending toxin (CDT)を持つことがわかっているが、それ以外の病原因子はほとんど明らかになっていなかった。本研究ではAutotransporter proteinが細胞接着に寄与することにより*H. cinaedi*の感染病態に関連する病原因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：*Helicobacter cinaedi* infects colon in human and animals, and causes bacteremia and cellulitis in human. To identify a virulence factor of *H. cinaedi*, we focused on an autotransporter protein X of *H. cinaedi* in this study. Structure of protein X is predicted to be similar to Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs), most of which are secreted. However, protein X is suggested to remain on bacterial surface by immunoblotting assay using peptide antibody against protein X. By in vitro infection experiments using protein X knockout strains, protein X was found to contribute to cell adherence. In addition we found the RGD motif in protein X may play an important role to adhere cell.

研究分野：細菌学

キーワード：*Helicobacter cinaedi* Autotransporter protein

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter cinaedi は近年その分離が増加している病原細菌であり、ヒトや動物の腸に生息し、菌血症や蜂窩織炎の原因菌として分離される。さらに *H. cinaedi* は人から人へと伝播し院内感染を引き起こす。*Helicobacter* 属菌のうち、人から分離される代表的な **Gastric Helicobacter** である *Helicobacter pylori* は *CagA* や *VacA* などの病原因子が明らかになり、病原性について多くの知見が得られている。しかし一方、**Enterohepatic Helicobacter** の中で、最もヒトからの分離が多く報告されている *H. cinaedi* については、病原因子として **cytolethal distending toxin (CDT)** を持つことがわかっているが、それ以外の病原因子はほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

H. cinaedi の感染病態に寄与する新たな病原因子 **X** を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

CDT ノックアウト株を用いた検討

H. cinaedi のノックアウト株を作製し、*in vitro* 感染実験により細胞障害活性等を野生株と比較した。

病原因子 **X** の選定

病原性に寄与する可能性のある遺伝子のノックアウト株を作製し、*in vitro* 感染実験により細胞障害活性等を評価することにより、病原性に寄与する遺伝子を選定した。

病原因子 **X** の機能解析

大腸菌を用い、病原因子 **X** の菌体外排出領域の大量発現系を構築した。得られたタンパク質は結晶化のスクリーニングを行うとともに、機能解析に用いた。病原因子 **X** の菌体外排出領域に対するペプチド抗体を用い、**X** の局在を調べた。さらに複数の株で病原因子 **X** のノックアウト株を作製し、*in vitro* 感染実験により、細胞障害活性、細胞接着能の比較を行った。

4. 研究成果

CDT ノックアウト株を用いた検討

H. cinaedi の標準株である **CCUG18818** 株を用い、CDT ノックアウト株を作製し、ヒト結腸癌由来細胞 **Caco-2** およびヒト単球系細胞 **U937** を用い、*in vitro* 感染実験を行った。その結果、**Caco-2** 細胞を用いた感染実験では CDT ノックアウト株において優位に細胞障害活性の低下が認められたが、未分化 **U937** 細胞を用いた感染実験では CDT ノックアウト株は野生株と同等の細胞障害活性が認められ、CDT 以外の因子が寄与していることが示唆された。*H. cinaedi* 感染病態に寄与する CDT 以外の因子のスクリーニングには本実験系を用いることとした。

病原因子 **X** の選定

研究開始当初はトランスポゾンを用いたランダム変異導入を行う計画であったが、実験系の確立が困難であったため、ゲノム比較により病原性に関連する可能性のある候補遺伝子を選定した。ゲノムは院内感染由来株であり完全ゲノムを解読した日本由来 *H. cinaedi* 株 **MR08-12347** 株のゲノム情報や *H. cinaedi* と同様に菌血症患者より分離される *Helicobacter fennelliae* **MR12-0050** 株のゲノム情報を利用した。候補遺伝子は **RNA-Seq** 解析により当該遺伝子が十分発現していることを確認した。完全ゲノムを解読した **MR08-1234** 株を用いたノックアウト株の作製が困難であったことから、ノックアウト株の作製には日本由来 **MR12-0027** 株を用い、**17** 個の選定した遺伝子のうち **15** 個の遺伝子についてノックアウト株を作製することができた。**15** 遺伝子のノックアウト株を作製し、未分化 **U937** 細胞を用いた感染実験を行ったところ、大腸菌の **Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs)** である **EspC** 類似のタンパク質をコードする遺伝子 (**MR08-1234** 株の **Locus tag: HC081234_20550**) をノックアウトした場合に優位に細胞障害活性の低下が認められた。そこで、本研究ではこの遺伝子を病原因子 **X** とし着目していくこととした。

病原因子 **X** の機能解析

Autotransporter proteins (ATs) は **Type V** 型分泌装置としても知られ、**Autotransporter domain** (多くの場合 **ATs** の **C** 末端側に存在する) により菌体外に排出される膜タンパク質である。**ATs** は多くの病原細菌が保有し、細胞障害や細胞接着など、多彩な機能をもつ。*Helicobacter* 属菌の代表的な **ATs** の一つとして、*H. pylori* の **Vacuolating Toxin A (VacA)** がある。**VacA** は菌体外に排出されたのち、分泌され宿主細胞に対する空砲化活性等による細胞障害活性により *H. pylori* の病原性に寄与している。*H. pylori* は **VacA** の他に **3** つの **ATs (ImaA, VlpC, FaaA)** を保有し、それぞれ細胞接着や運動性に関わることにより *H. pylori* 感染病態に寄与していることが報告されている。

一方、*H. cinaedi* の病原因子 **X** は **SPATEs** と相同性がある。**SPATEs** は自身の **N** 末端領域の **Autotransporter domain** により菌体外に排出・分泌され、そのプロテアーゼ活性が細胞障害などを介して感染病態に寄与している。そこで、*H. cinaedi* の **ATs** である **X** の菌体外排出領域に対するペプチド抗体を作製し、ウェスタンブロッティングにより **X** の局在を調べたところ、

Xは菌体培養上清には検出されず、膜タンパク質画分にのみ検出された。従って**X**は、**SPATEs**とは異なり、菌体外に排出されたのち、分泌されずに菌体表面にとどまっていることが示唆された。

日本由来 *H. cinaedi* 株はそのゲノム情報に基づき大きく二つの **Clade** に分類される。**CCUG18818** 株や **MR12-0027** 株が含まれる **Clade II** の株はノックアウト株の作製ができたが、**MR12-0027** 株などの **Clade I** に分類される菌株群はノックアウト株の作製が困難であった。そこで、*H. cinaedi* のゲノム情報をもとに、ノックアウト株の作製に使用する薬剤耐性カセットの最適化を行った人工遺伝子を作製し、ノックアウト株の作製に用いたところ、**Clade I** に分類される **MR12-0027** 株でもノックアウト株を作製することができるようになった。

そこで、**MR12-0027** 株についても病原因子 **X** のノックアウト株を作製し、ヒト結腸癌由来細胞 **Caco-2** を用いて細胞接着能および細胞侵入能の評価を行った。その結果、病原因子 **X** のノックアウト株では野生株に比べ、細胞侵入能は有意な差はないものの、細胞接着能は優位に低下することがわかった。細胞接着能の低下は **MR12-0027** 株および **MR12-0027** 株の両方で確認された。そこで、ムチン産生性のヒト結腸癌由来細胞 **HT29-MTX** を用い、同様な検討を行ったところ、各菌株の細胞接着能は **Caco-2** に比べて増加したものの、**X** のノックアウトによる細胞接着能の低下は認められなかった。従って **X** は細胞接着に寄与しており、その標的はムチン以外である可能性が示唆された。

一方興味深いことに **X** の菌体外排出領域には **RGD** 配列が含まれていた。そこで、**RGD** 配列がタンパク質の構造上どのような位置にあるのかを明らかにするために、**X** の菌体外排出領域（約 **115 kDa**）について大腸菌での大量発現系を構築した。得られたたんぱく質の結晶構造解析を試みたが良好な結晶を得ることはできなかった。そこで、**X** の配列から **Robetta** (<http://robetta.bakerlab.org/>) によりその三次元構造を予測したところ、**X** の **RGD** 配列は立体構造の先端部位にあると予想された。そこで、**RGD** 配列を **RGA** あるいは **RAD** に置換した変異体を作製し、細胞接着能を評価したところ、変異体では細胞接着能が有意に低下することがわかった。

以上の結果より *H. cinaedi* の **ATs** である **X** は細胞接着に関わることにより、感染病態に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 林原 絵美子	4. 巻 20
2. 論文標題 ゲノムから見たnon-pylori Helicobacters	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Helicobacter research	6. 最初と最後の頁 497-505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Rimbara Emiko, Mori Shigetarou, Kim Hyun, Suzuki Masato, Shibayama Keigo	4. 巻 62
2. 論文標題 Mutations in Genes Encoding Penicillin-Binding Proteins and Efflux Pumps Play a Role in Lactam Resistance in Helicobacter cinaedi	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e02036-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1128/aac.02036-17	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 林原 絵美子, 豊田 敦, 森 茂太郎, 金 玄, 柴山 恵吾
2. 発表標題 Helicobacter cinaediのゲノム修飾関連遺伝子ノックアウト株における遺伝子発現変化
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 Emiko Rimbara, Shigetarou Mori, Masato Suzuki, Kim Hyun, Keigo Shibayama
2. 発表標題 Mechanism of resistance to ceftriaxone in Helicobacter cinaedi
3. 学会等名 the 19th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林原 絵美子, 柴山 恵吾
2. 発表標題 Helicobacter cinaedi における薬剤排出ポンプと薬剤耐性との関連
3. 学会等名 第23回日本ヘリコバクター学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林原 絵美子, 鈴木 仁人, 矢原 耕史, 森 茂太郎, 金 玄, 柴山 恵吾
2. 発表標題 Helicobacter cinaedi のアウトブレイク由来株を含むゲノム解析
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔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