

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15582

研究課題名（和文）水圏環境におけるピロリ菌の生存戦略と潜在的病原性に関する研究

研究課題名（英文）Survival strategies and potential pathogenicity of *H. pylori* in aquatic environments

研究代表者

高橋 迪子 (Takahashi, Michiko)

高知大学・医学部・特任助教

研究者番号：40868189

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：水圏試料からピロリ菌保有病原性関連遺伝子をターゲットとした特異的検出PCR系を構築した。また、比較解析用の臨床由来ピロリ菌株について、ショートリード解析およびロングリード解析を組み合わせることで、全ゲノム配列を決定した。本株をMulti-locus-sequence-typing (MLST) 解析に供したところ、1個を除く6個のハウスキーピング遺伝子については既存ST番号に分類されなかったことがわかった。このことから、当初の計画から方針を修正し、ピロリ菌の生存戦略の一つである外敵防御機構に注目し、解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌は世界人口の半数以上が保菌しており、多くは幼少期に感染するとされている。ピロリ菌の感染経路として経口・糞口感染が示唆されていることから、天然の水圏環境が本菌の感染経路においてリザーバーの役割を果たしている可能性も推察されるが、その実態は明らかになっていないのが現状である。本研究では、水圏環境でピロリ菌のモニタリングを行うための検出系を構築した。加えて、臨床由来株の全ゲノム配列を決定し、公共データベースに登録した。本成果を手がかりとして、ピロリ菌がどのような生存戦略を有しているのか解析を進めたい。

研究成果の概要（英文）：A detection PCR system targeting virulence genes of *H. pylori* was established and applied to aquatic samples. In addition, the whole genome sequence of a clinical strain of *H. pylori* was successfully determined by combining short- and long-read sequencing. As a result of multi-locus-sequence-typing (MLST) analysis, it was found that six housekeeping genes, except one, were not classified to the existing ST number. Then, we changed some parts of research plan from the original version and focused on restriction-modification system which is one of the survival strategies of *H. pylori* against phage invasion.

研究分野：微生物学

キーワード：ピロリ菌 *Helicobacter pylori*

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (ヘリコバクター・ピロリ) はヒトなどの胃粘膜に生息するらせん状細菌であり、急性および慢性胃炎を引き起こす。本菌はヒト胃内に持続感染することで、胃・十二指腸潰瘍や胃癌・食道癌などの発症に繋がることが知られている。現在、世界では人口の約半数が *H. pylori* を保菌している。

ピロリ菌は自然環境では動物の胃内でのみ増殖可能であり、その他の環境では長時間生存できないと報告されている。一方で、海洋をはじめとする水圏環境からは、ピロリ菌や *Helicobacter* sp. の DNA ならびに RNA の検出事例が多数報告されている。このことから、水圏環境中には *H. pylori* ならびに *Helicobacter* sp. がなんらかの状態が存在・生存しているものと推察されるが、これらがヒトに対して病原性を有しているのかどうかについてはまったく明らかになっていない。こうした背景の下、申請者は「水圏環境中における *H. pylori* 様細菌は潜在的な病原性を保持しているか？」という学術的問いに回答をもたらすべく、本課題を立案した。

2. 研究の目的

水圏環境中に存在するピロリ菌およびその近縁種と臨床由来ピロリ菌株を比較解析し、両者の共通性および差異を精査する。

3. 研究の方法

1) 水圏環境からの *H. pylori* 検出・分離系の確立

H. pylori 病原因子 (ウレアーゼ、アドヘジン (付着因子)、VacA サイトトキシン) の関連遺伝子を標的とした PCR 系を設計し、水圏試料へ適用した。PCR 陽性試料について、損傷回復・増菌培養を行い水圏由来ピロリ菌株として単離を試みた。

2) 臨床由来株の全ゲノム解析

1) で単離した水圏由来株の比較対象として、ピロリ菌の臨床由来株の全ゲノムを決定した。シーケンスには高品質なゲノム DNA を抽出し、MiSeq を用いたショートリードおよび MinION を用いたロングリードシーケンスに供した。得られたリードをハイブリッドアセンブリすることでゲノムを構築した。

3) 水圏由来株と臨床由来株の比較解析

1) で単離した株を 2) で実施した解析方法に倣い、水圏由来株がどのような特徴を有しているのか詳細に解析する。とくに、病原性関連遺伝子に注目し、その発現様態の差異を抽出する。

4. 研究成果

1) ピロリ菌の病原性関連遺伝子をターゲットとした特異的プライマーセットを設計し、水棲生物や海水、海底泥試料等から抽出したゲノム DNA を用いてスクリーニングを行った。下水処理施設から分与された活性汚泥等からは高頻度にピロリ菌が検出されたが、水生生物、海水試料等からは検出されなかった。

2) *H. pylori* 3401 株について、全ゲノムを決定した (Takahashi et al., 2021)。約 1.5 Mbp のゲノムは 1540 の CDS、4 の rRNA、36 の tRNA を保有していた。Multi-locus-sequence-typing (MLST) 解析の結果、*efp* のみ ST 番号 (2220) が付与されたが、その他のハウスキューピング遺伝子 (*atpA*, *mutY*, *ppa*, *trpC*, *ureI*, *yphC*) については既存 ST 番号に分類されなかった。多くのピロリ菌ゲノムにはプロファージ様配列がコードされているが、本株はファージ感染を受けておらず、また、これまでに報告されているピロリ菌感染性バクテリオファージ (KHP30 および KHP40) に対して感受性をもつ。したがって、本配列情報はピロリ菌が外敵 (ファージ) から感染を受けた際に、発現遺伝子にどのような変化が起こるか今後検証する上でも有用といえる。そこで、当初の計画から方針を修正し、ピロリ菌の保有する外敵防御機構を詳細に解析した。

3) 本研究では、制限修飾系は、細胞内の DNA について自己か非自己か見分け、非自己の DNA を切断する機構である。ピロリ菌は複数の制限修飾系を有し、その保有パターンは株ごとに多様であることが知られている。本研究では当初 2) で解析していた 3401 株に加え、他の 2 株についても解析を進めている。現時点で高純度・高収量のゲノム DNA の抽出を完了し、配列解析を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Takahashi Michiko, Matsumoto Yuki, Ujihara Takako, Maeda Hiromichi, Hanazaki Kazuhiro, Nagasaki Keizo, Takeuchi Hiroaki, Matsuzaki Shigenobu	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Helicobacter pylori Strain 3401, a Suitable Host for Bacteriophages KHP30 and KHP40	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0064721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00647-21	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------