

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07026

研究課題名(和文)ヘリコバクター・シネディにおけるVI型分泌系の生理生態学的役割の解明

研究課題名(英文)Physiological and ecological roles of type VI secretion system in *Helicobacter cinaedi*.

研究代表者

後藤 恭宏 (Gotoh, Yasuhiro)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20558358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：*Helicobacter cinaedi*のコードするVI型分泌系エフェクターを検索し、大腸菌で致死的な作用を示す可能性のある遺伝子を単独で発現させたところ、microbial ribonuclease様ドメインをコードする1つの遺伝子が増殖抑制を示した。しかし、この遺伝子は大腸菌の増殖を抑制するにもかかわらず、この遺伝子を有する株は他の*H. cinaedi*株や、*H. cinaedi*に次いでヒト腸管からの分離例が多い近縁菌種*H. fennelliae*には増殖阻害を示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで*Helicobacter cinaedi*のVI型分泌系の生理生態学的な役割は不明であったが、本研究で大腸菌に致死的な作用を示す遺伝子を見つけたことにより本菌のT6SSが少なくとも細菌-細菌間競争に関わることが明らかになった。本菌種のような存在量の乏しい菌種が、生存競争の激しいヒト腸内で常在性を維持する機構の解明は、ヒト腸内エコシステムの理解に貢献するだけでなく、本菌の制御法の開発にもつながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：For searching effectors of the type VI secretion system of *Helicobacter cinaedi*, the 48 candidate genes with lethal effects on *Escherichia coli* were expressed alone. The gene encoding the microbial ribonuclease-like domain repressed *E. coli* growth. Although the gene repressed the growth of *E. coli*, the strain did not inhibit the growth of other lineages or the closely related species of *H. cinaedi* strains, and *H. fennelliae*, the second most frequently isolated species next to *H. cinaedi* from the human intestinal tract.

研究分野：細菌学

キーワード：*Helicobacter cinaedi* VI型分泌系 エフェクター 常在性 病原性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter cinaedi 感染症は 1984 年に初めて米国の AIDS 患者で報告され、我が国でも免疫抑制状態の患者での発症が報告されて以降、菌血症、蜂窩織炎、腸炎等の症例が次々と報告されている。本菌は、げっ歯類やイヌ等からの分離例やヒトでの発症が愛玩動物由来と推測された報告があり、人獣共通感染症の可能性も示唆されていたが、イヌから分離された株はヒト由来の標準株と性状が異なるとして *H. canicola* とすることが提案された (Syst Appl Microbiol. 2016)。しかし、*H. canicola* を含めた近縁菌株集団の中で、*H. cinaedi* がどのような系統に属し、どのような特性を有するのかが不明である。本菌のヒトに対する病原性メカニズムもほとんど解析が進んでいない。

研究代表者は、ゲノム疫学手法を用いて本菌による院内集団感染でのクローンの伝播経路を明らかにし、本菌の伝播への無症候キャリアの関与を示唆するデータを得た (Microb Genom. 2018)。また別の研究では、同一クローンによる本菌感染症の再燃を明らかにした (Open Forum Infect Dis. 2019)。これらの知見は本菌がヒト体内に長期間定着しうることを示唆する。

一方、近縁菌株を含めたゲノム解析から、臨床分離株はイヌやハムスター等から分離された株とは異なる系統 (以下、厳密な意味で *H. cinaedi* 系統と呼ぶ) に属することが明らかになり、*H. cinaedi* 系統に特異的なゲノム配列は健康人の糞便メタゲノムデータ中からも検出された。この知見は、ヒト腸内に常在する *H. cinaedi* に病原性のポテンシャルがあることを示唆した。

2. 研究の目的

遺伝子レパートリ解析から、*H. cinaedi* には VI 型分泌系 (T6SS) が特異的に存在する (*H. canicola* を含む近縁株には存在しない) ことが明らかになった。また、T6SS 遺伝子群の近傍領域には、*H. cinaedi* 内の亜系統に沿って高度な配列多様性がみられた。T6SS は標的細胞にエフェクターを注入し、宿主-細菌間相互作用や細菌-細菌間競争に関与する。一般的に T6SS 装置は 13 遺伝子で構成され、エフェクターについては真核細胞を標的にするものもあり、細菌の付着や細胞内侵入、病原性等への関与も報告されている、しかし、多くのエフェクターは抗菌活性を示すため (Curr Opin Microbiol. 2016)、本菌の T6SS は病原性だけでなくヒト腸管での常在性にも関与する可能性が考えられる。そこで、*H. cinaedi* における T6SS の生理生態学的役割の解明するために、本菌の T6SS のエフェクタータンパク質とその免疫タンパク質の同定、T6SS によって排除される近縁菌種 (本菌と競合する近縁菌種) の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌でのエフェクター候補をコードする領域のスクリーニング

H. cinaedi を血液寒天培地で 37°C で 3 日間培養し、集菌した後、Monarch Genomic DNA Purification Kit (New England Biolabs 社) を用いてゲノム DNA を精製した。*H. cinaedi* のゲノム DNA (1000 ng) を超音波破碎により 2.5 kb 程度に断片化し、DNA 末端を平滑化処理した。DNA 断片は、厳密な発現制御が可能な pBAD33 ベクターにランダムショットガンクローニングし、エレクトロポレーション法によりプラスミドを大腸菌に導入し、LB 寒天培地に塗布して約 20000 コロニーを得た。コロニーは全て掻き集め、その懸濁液を LB 培地に植菌し、0.2% L-アラビノースによる発現誘導下で 4 時間培養し集菌したのちプラスミドを精製した。精製したプラスミドは、プラスミド丸ごとを使って NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs 社) を用いてライブラリ調製し Illumina 社 MiSeq で配列取得した。さらに、プラスミドにクローニングされた領域を PCR で増幅し、Ligation Sequencing Kit V14 (Oxford Nanopore Technology (ONT) 社) でライブラリ調製し、Nanopore (ONT 社) で配列取得した。得られたリード配列は、アダプタ配列や低品質部分を除去した後、*H. cinaedi* の完全長ゲノム配列にマッピングし、培養時の発現誘導の有無によるシーケンス深度の比率を指標にしてエフェクター候補がコードされる領域をスクリーニングした。

(2) エフェクター候補の大腸菌で単独発現

スクリーニングでエフェクター候補をコードする領域として同定された領域にコードされた遺伝子は、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix (NEB 社) を用いて大腸菌で厳密な発現制御が可能な pBAD33 ベクターにそれぞれ単独でクローニングした。これらのプラスミドを導入した大腸菌の菌液は $OD_{600}=1$ に調整したのち、LB 培地を用いて 10 倍希釈系列 (10^{-1} - 10^{-6}) を作成した。クローニング遺伝子を発現誘導するため 0.2% L-アラビノースを含んだ LB 寒天培地上に希釈液を 5 μ L ずつ滴下し 37°C で 20 時間培養した。遺伝子の大腸菌に対する増殖抑制作用は、

L-アラビノース含有/非含有寒天培地上のコロニー数を比較して判定した。

(3) VI 型分泌系の破壊株の作成

VI 型分泌系に必須である遺伝子 *tssC* および *tssD* を欠失させる遺伝子の標的に選んだ。欠失体の選択マーカーになるクロラムフェニコール遺伝子発現カセットを挟んで、標的遺伝子の上流と下流のそれぞれ 1 kb をつなげた配列を pUC18 ベクターにクローニングし、欠失用のプラスミドを作成した。大腸菌を用いて精製したプラスミドをエレクトロポレーション法により *H. cinaedi* に導入しクロラムフェニコール含有血液寒天培地を用いて分離した。組換え体は、標的遺伝子が欠失されていることを PCR により確認した。

(4) 共培養での競合実験

遺伝子欠失株と親株を対象株[(1) *H. cinaedi* の他系統株、(2) ハムスター由来株、(3) イヌ由来株、(4) *H. fennelliae*]と共培養して、2 条件での生残菌数を比較した。別々に培養した 2 菌の懸濁液をそれぞれ調整した後、菌数が等しくなるよう 10 mL の TSB 液体培地に加えよく混合した。混合菌液をフィルターろ過し、メンブレンフィルターに菌体を捕捉した。そのメンブレンフィルターを回収し、血液寒天培地に移し密着させて 37°C で 16 時間培養した。寒天培地上のフィルターは 50 mL チューブに回収し、生理食塩水を 30 mL 加えて、よく攪拌し菌体を回収した。フィルターを取り除いた後、遠心分離により集菌し、生理食塩水で洗浄した後、QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen 社)を用いてビーズ破砕法によりゲノム DNA を精製した。ゲノム DNA を鋳型にして、各株に特異的なプライマーを用いて、QX200 Droplet Digital PCR (Bio-社)をもちいてデジタル PCR 解析を行うことにより菌数を測定した。

4. 研究成果

大腸菌を用いたスクリーニングで得られた *H. cinaedi* のゲノム DNA をランダムショットガンクローニングしたプラスミドは、Illumina MiSeq をもちいて 2.1-2.4 Gb (7.7-9.5 M リード) と ONT Nanopore をもちいて 1.5-2.1 Gb (0.9-1.3 M リード) の配列データを取得した。リード配列のマッピング解析から T6SS 関連領域内の複数箇所が同定された。これらの領域にコードされた 48 遺伝子をエフェクター候補として、それぞれ単独に大腸菌で発現誘導させたところ、microbial ribonuclease 様ドメインをコードする 1 つの遺伝子 (候補 3) が増殖抑制を示した (図 1)。しかし、この遺伝子は大腸菌の増殖を抑制したにもかかわらず、この遺伝子を有する株は他の *H. cinaedi* 株や、*H. cinaedi* に次いでヒト腸管からの分離例が多い近縁菌種 *H. fennelliae* には増殖阻害を示さなかった。

この結果は、本菌の T6SS の標的が大腸菌のような他の腸内細菌である可能性を示唆する。また、単独ではなく複数のエフェクターが協調して作用する可能性も考えられた。したがって、本菌の T6SS が細菌-細菌/真菌間競争を介してヒト腸管での常在性に関与する可能性も考えられた。本研究で見出した大腸菌に増殖抑制を示したエフェクターとペアとなる免疫タンパク質の同定のために、その上流下流に位置する遺伝子について現在解析中である。

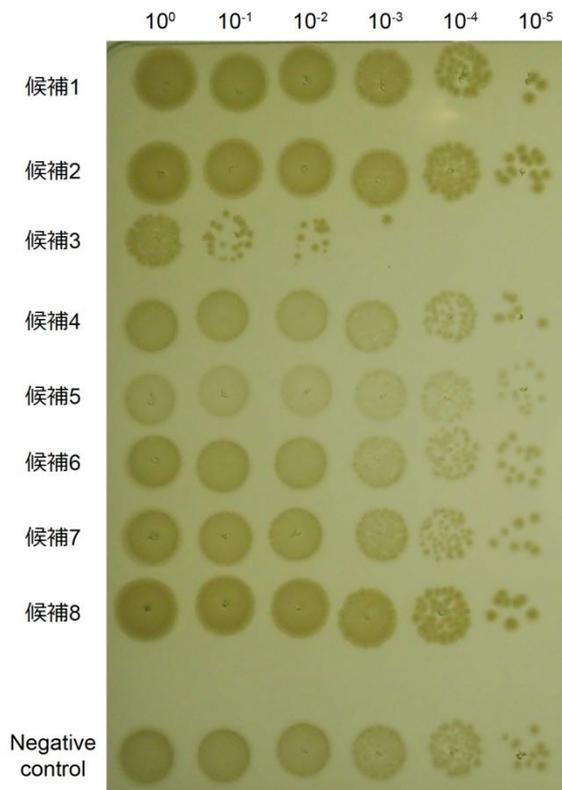


図1. エフェクター候補の大腸菌での増殖抑制活性

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 Gotoh Yasuhiro, Atsuta Yuya, Taniguchi Takako, Nishida Ruriko, Nakamura Keiji, Ogura Yoshitoshi, Misawa Naoaki, Hayashi Tetsuya	4. 巻 8
2. 論文標題 Helicobacter cinaedi is a human-adapted lineage in the Helicobacter cinaedi/canicola/ 'magdeburgensis' complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbial Genomics	6. 最初と最後の頁 mgen000830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/mgen.0.000830	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤恭宏、谷口喬子、中村佳司、三澤尚明、林哲也
2. 発表標題 タヌキから分離された Helicobacter cinaedi 近縁菌種のゲノム解析
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 後藤 恭宏、熱田 雄也、谷口 喬子、西田 留梨子、中村 佳司、小椋 義俊、三澤 尚明、林 哲也
2. 発表標題 ヘリコバクターシネジはH. cinaedi/canicola/magdeburgensis complexの中のヒトに適応した系統である
3. 学会等名 第95回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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