

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461504

研究課題名(和文)ピロリ菌の病原性発現へのファージの関与機構の解明とその殺菌力を用いる除菌法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of a relationship of bacteriophage to pathogenicity of Helicobacter pylori and development of eradication system to H. pylori using bacteriophage.

研究代表者

松崎 茂展 (MATSUZAKI, Shigenobu)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授

研究者番号：00190439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バクテリオファージ(ファージ)KHP30、KHP40を利用する、薬剤耐性ピロリ菌の胃内からの効果的除菌法の開発を行うために必要な、菌保有のファージ排除機構である制限-修飾系に関する情報の収集を目指した。その結果、ファージの感染効率を著しく減衰させる制限-修飾系が、ピロリ菌には複数存在していることが明らかとなった。そのため、本ファージを含むピロリ菌ファージを除菌に使用するためには、これらの制限-修飾系に適応したファージセットの構築をする必要があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at collection of information about a bacteriophage-exclusion system (restriction-modification system) in Helicobacter pylori, to develop an effective sterilization method of drug-resistant H. pylori from the stomach using bacteriophages KHP30 and KHP40. The results indicated that H. pylori had multiple functional restriction-modification systems, suggesting strongly that the bacteriophages must be adapted to all H. pylori-possessed restriction-modification systems for effective sterilization.

研究分野：Microbiology

キーワード：ピロリ菌 バクテリオファージ 除菌

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は、慢性胃炎、胃潰瘍の起病菌であり、かつ胃がんのリスクファクターであることは衆知である。胃がんの99%以上に本菌が関与していると予測されていることから、胃にピロリ菌保有が明らかになった場合、除菌することが推奨されている。しかし、本菌の除菌のために使用されている抗菌薬クラリスロマイシンに対する耐性菌の増加に伴い、除菌が困難になりつつある。このような状況に対処するためには、抗菌薬に依存しないピロリ菌除菌法の導入が有効であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 申請者らは、ピロリ菌に感染するファージ KHP30、KHP40 を保有しており、これを利用して、胃からのピロリ菌除菌法の開発を目指している。その過程で、ピロリ菌には制限-修飾系と予想される強力なファージ排除システムが存在していることが明らかになった。そのため、ピロリ菌における制限-修飾系の種類、強度、数について検討した。(2) ファージを利用して除菌を行う場合、ファージの生活環についての情報は重要である。ファージ KHP40 は、溶菌サイクル以外に偽溶原サイクル(菌細胞内にエピソードとして存在)を保有しているか否か、さらに KHP30 の場合と同様に、高頻度でファージ DNA の脱落がみられるか否かを検討した。

3. 研究の方法

I. ピロリ菌保有の制限 - 修飾系の推定

(1) ファージ KHP30 を、ピロリ菌株 NO.1 に感染させ、溶菌液を作成する。(2) この溶菌液を、NO.1 株および他の菌株 NO.2 に感染させ、プラーク形成能を検討する。(3) NO.2 株で増殖させたファージを、NO.1 株および NO.2 株でプラーク形成能を検討する。(適応性検討)(4) NO.1 株で増殖させたファージを、NO.1 株および NO.2 株でプラーク形成能を検討する。(可逆性検討)(5) 増殖に用いた菌株で増殖させた場合に、この菌株でのプラーク形成能が上昇し(適応) 続いても他の菌株で増殖させた場合、プラーク形成能が低下した場合(可逆性) 制限 - 修飾現象の可能性が高いと判断した。(6) 8 株のピロリ菌を使用して実験を行った。

II. ピロリ菌保有の制限 - 修飾系の認識部位の検討

(1) 菌株で増殖させたファージを、塩化セシウム密度勾配超遠心法により生成し、フェノール抽出により、ファージ DNA を抽出する。(2) ファージ DNA を、4 塩基認識の制限酵素と作用させ、電気泳動パターンを相互に比較する。

III. ファージ KHP40 のライフサイクルの検討

(1) パルスフィールド電気泳動による KHP40 保有菌株 DNA の分離と、ファージ KHP30 主要タンパク質遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション法により、菌ゲノムへのファージ DNA 挿入の有無を検討した。

(2) KHP40 保有株について単一コロニー分離を行い、それらを個別に増殖後、DNA 抽出を行い、菌保有の *vacA* 遺伝子とファージ保有のファージタンパク質遺伝子について PCR 解析を行なった。

4. 研究成果

I. ピロリ菌保有の制限 - 修飾系

(1) いくつもの菌株で増殖させても、高いプラーク形成能を示す菌株が存在した。これは、ファージ KHP30 菌株に対して作用する制限-修飾系を持たない菌株であることを意味する。逆に本菌株で増殖させたファージは、他の菌株のほとんどで、プラーク形成能が著しく抑制された。

(2) 2 つの菌株で増殖させたファージが、相手側の菌株で強力なプラーク形成抑制を示す菌株ペアが複数存在した。また、この現象は相互に可逆的であることから、突然変異ではなく、異なる制限-修飾系によるものと考えられた。

(3) 第 1 の菌株で増殖させたファージが、第 2 の菌株で強い制限を受けたが、第 2 の菌株で増殖させたファージは、第 1、および第 2 の両方の菌株でも高いプラーク形成能を示す菌株ペアが存在した。これは、第 2 の菌株が独自の制限-修飾系を保有していることに加え、第 1 の菌株と同じ制限 - 修飾系をも保有していることを示している。これは、第 2 の菌株においては、2 つの異なる制限-修飾系が同時に機能していることを示している。

(4) プラーク形成能を相互に比較することにより、1 つの菌株に少なくとも 3 個の機能的な制限-修飾系を保有するものが存在すると予想された。

(5) ピロリ菌のゲノムプロジェクトは、他の菌種よりも進んでおり、数多くのゲノム塩基配列が明らかにされている。その特徴の一つが、同じゲノム上に複数の制限-修飾関連遺伝子が存在していることである。しかし、それらの制限 - 修飾関連遺伝子の存在理由やこれらが実際に機能的であるのかは明らかではない。本研究では、ファージを利用して、実際に機能する制限-修飾系がピロリ菌に存在していることを明らかにした。

(6) 本研究により、ピロリ菌には機能的な制限-修飾系が複数存在することが明らかとなった。そのため、KHP30 や KHP40 ファージを利用するピロリ菌除菌のためには、これらの制限-修飾系すべてに適応したファージを準備する必要があると考えられた。

II. ピロリ菌保有の制限 - 修飾系の認識部位の検討

(1) 制限-修飾系における適応現象は、通常標的塩基配列における特定塩基のメチル化によって生ずることが知られている。そのため、制限酵素の切断パターンの比較により、制限-修飾系の認識配列を推定できる可能性がある。

(2) 相互に異なる制限修飾系を保有すると予想された代表 2 株について、ファージ KHP30 を増殖させ、DNA の抽出を行い、4 種類の 4 塩基認識の制限酵素で切断し、電気泳動でパターンを比較すると、一方の DNA は全く切断されないのに対し、他方は予想通りの個所で切断された。これは、作用させた制限酵素と同じ配列を認識しているためと考えられた。

(3) 他の制限酵素では、逆に上記の酵素で切断されなかった DNA が切断されたが、他方は部分的に切断されない断片が存在した。これは、当該制限酵素と認識塩基配列が部分的に重なっている可能性を示唆している。

(4) 以上から、ピロリ菌保有の制限-修飾系は、特定塩基の修飾（おそらくメチル化）により、適応していると考えられた。

III. ファージ KHP40 のライフサイクルの検討

(1) KHP40 が KHP30 と同様に細菌細胞内にエピソードと存在するサイクル、すなわち偽溶原サイクルを保有しているか否かを検討した。その結果、KHP40 も KHP30 と同様に、ファージ DNA が細菌染色体外に存在しており、偽溶原サイクルを保有することが示唆された。

(2) KHP40 保有株に由来するコロニーを分離し、PCR によりファージ DNA の検出を行ったところ、ファージ DNA の脱落率は低く、KHP30 よりも安定に保持されると考えられた。

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 13 件)

- 1) Hashida Y, Nakajima K, Nakajima H, Shiga T, Tanaka M, Murakami M, Matsuzaki S, Naganuma S, Kuroda N, Seki Y, Katano H, Sano S, Daibata M. High load of Merkel cell polyomavirus DNA detected in the normal skin of Japanese patients with Merkel cell carcinoma. *J Clin Virol*. 2016 Sep;82:101-7. doi: 10.1016/j.jcv.2016.07.011. (査読有)
- 2) Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Kato S, Takeuchi H, Sakaguchi Y, Ujihara T, Daibata M, Shimakura H, Okamoto N, Sakaguchi M, Matsuzaki S. Screening of KHP30-like prophages among Japanese

Helicobacter pylori strains, and genetic analysis of a defective KHP30-like prophage sequence integrated in the genome of the *H. pylori* strain NY40. *FEMS Microbiol Lett*. 2016 Aug;363(16). pii: fnw157. doi: 10.1093/femsle/fnw157. (査読有)

- 3) Uchiyama J, Suzuki M, Nishifuji K, Kato S, Miyata R, Nasukawa T, Yamaguchi K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Shimakura H, Murakami H, Okamoto N, Sakaguchi Y, Shibayama K, Sakaguchi M, Matsuzaki S. Analyses of Short-Term Antagonistic evolution of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 and phage KPP22 (Myoviridae Family, PB1-Like Virus Genus). *Appl Environ Microbiol*. 2016 Jul 15;82(15):4482-91. doi: 10.1128/AEM.00090-16. (査読有)
- 4) Shigehisa R, Uchiyama J, Kato S, Takemura-Uchiyama I, Yamaguchi K, Miyata R, Ujihara T, Sakaguchi Y, Okamoto N, Shimakura H, Daibata M, Sakaguchi M, Matsuzaki S. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage KPP21 belonging to family Podoviridae genus N4-like viruses isolated in Japan. *Microbiol Immunol*. 2016 Jan;60(1):64-7. doi: 10.1111/1348-0421.12347. (査読有)
- 5) 内山淳平, 竹内啓晃, 平山隆一郎, 島倉秀勝, 阪口雅弘, 松崎茂展: *Helicobacter pylori* ファージとそのゲノム. *Helicobacter Research* 20(5):470-474. 2016. (査読無 招請論文)
- 6) 松崎茂展, 氏原隆子, 村上雅尚, 大畑雅典: ウイローム バクテリオファージ療法 臨床と微生物 6: 697-701, 2015. (査読無 招請論文)
- 7) Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Sakaguchi Y, Gamoh K, Kato S, Daibata M, Ujihara T, Misawa N, Matsuzaki S. Intragenus generalized transduction in *Staphylococcus* spp. by a novel giant phage. *ISME J*. 2014 Sep;8(9):1949-52. doi: 10.1038/ismej.2014.29. (査読有)
- 8) Miyata R, Yamaguchi K, Uchiyama J, Shigehisa R, Takemura-Uchiyama I, Kato S, Ujihara T, Sakaguchi Y, Daibata M, Matsuzaki S. Characterization of a novel *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage, KPP25, of the family Podoviridae. *Virus Res*. 2014 Aug 30; 189:43-6. doi: 10.1016/j.virusres.2014.04.019. (査読有)
- 9) Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Osanai M, Morimoto N, Asagiri T, Ujihara T, Daibata M, Sugiura T, Matsuzaki S: Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by *Staphylococcus aureus* in mice. *Microbes Infect*. 2014 Jun;16(6):512-7. doi: 10.1016/j.micinf.2014.02.011. (査読有)

- 10) Yamaguchi K, Miyata R, Shigehisa R, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Kato S, Ujihara T, Sakaguchi Y, Daibata M, Matsuzaki S. Genome Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophage KPP23, Belonging to the Family *Siphoviridae*. Genome Announc. 2014 May 22;2(3). pii: e00233-14. doi: 10.1128/genomeA.00233-14. (査読有)
- 11) Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Daibata M: Perspective: The age of the phage. Nature. 2014 May 1; 509(7498):S9. doi: 10.1038/509S9a. (査読無 招請論文)
- 12) Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Kato S, Sato M, Ujihara T, Matsui H, Hanaki H, Daibata M, Matsuzaki S. In silico analysis of AHJD-like viruses, *Staphylococcus aureus* phages S24-1 and S13', and study of phage S24-1 adsorption. Microbiologyopen. 2014 Apr;3(2):257-70. doi: 10.1002/mbo3.166. (査読有)
- 13) 内山淳平, 松井秀仁, 内山(竹村)伊代, 渡辺茂, 花木秀明, 松崎茂展: ファージ吸着分子を利用した簡易迅速細菌検出技術 化学工業 65(8): 588-595. 2014. (査読無 招請論文)
- [学会発表](計 18 件)
- 1) 内山淳平, 黒川健児, 内山伊代, 氏原隆子, 坂口義彦, 松崎茂展, 坂口雅弘: Study of adsorption of AHJD-like phages infecting *Staphylococcus aureus*. 第90回日本細菌学会総会, 2017.03.19-21. 仙台国際センター展示棟(宮城県仙台市)
- 2) 松澤佑一, 内山淳平, 竹内啓晃, 氏原隆子, 橋田裕美子, 樋口知紀, 田中望紅, 富永宗一竜, 大畑雅典, 松崎茂展: バクテリオファージ KHP30 の感染能に及ぼすピロリ菌保有制限-修飾系の解析 第90回日本細菌学会総会, 2017.03.19-21. 仙台国際センター展示棟(宮城県仙台市)
- 3) 田中望紅, 橋田裕美子, 村上雅尚, 松崎茂展, 大畑雅典: Phylogenetic analysis of Merkel cell polyomavirus based on full-length *LT* and *VPI* sequences derived from normal skin of healthy individuals. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016.10.23-10.25.札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- 4) 橋田裕美子, 田中望紅, 村上雅尚, 松崎茂展, 大畑雅典: Epidemiological study of Merkel cell polyomavirus in healthy skin among healthy individuals in Japan. 第64回日本ウイルス学会学術集会, 2016.10.23-10.25.札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- 5) 那須川忠弥, 内山淳平, 鈴木仁人, 西藤公司, 加藤伸一郎, 内山伊代, 氏原隆子, 島倉秀勝, 村上裕信, 岡本憲明, 阪口義彦, 柴山恵吾, 阪口雅弘, 松崎茂展: 新規 PB1 様ファージ KPP22 と緑膿菌 PAO1 株を利用した前適応ファージ KPP22M 作製過程の遺伝的解析. ファージ・環境ウイルス研究会 合同シンポジウム(第6回ファージ研究会) 2016年10月21-22日. JAMSTEC(神奈川県横須賀市)
- 6) Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, Kato S, Takeuchi H, Sakaguchi Y, Ujihara T, Nasukawa T, Shimakura H, Okamoto N, Sakaguchi M, Matsuzaki S: Screening of KHP30-like prophage in *Helicobacter pylori* using Japanese strains, and analysis of their fate by in silico approach. ファージ・環境ウイルス研究会 合同シンポジウム(第6回ファージ研究会). 2016年10月21-22日. JAMSTEC(神奈川県横須賀市)
- 7) 松崎茂展, 内山淳平, 竹内啓晃, 氏原隆子, 大畑雅典: ピロリ菌ゲノムに溶原化した KHP30 様ファージ DNA への挿入配列の転移. 第69回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2016年10月15-16日. かがわ国際会議場(高松シンボルタワー)(香川県高松市)
- 8) 大畑雅典, 松澤佑一, 松崎茂展: バクテリオファージを利用するピロリ菌除菌法開発のための基礎的研究. 平成28年度中四国乳酸菌研究会・研究発表会, 2016年5月16日. ホテル グランヴィア岡山(岡山県岡山市)
- 9) 阪口義彦, 内山淳平, 小椋義俊, 山本友由弥子, 松崎茂展, 林哲也, 松下治, 小熊恵二, 林俊治: C型ボツリヌス毒素変換ファージのゲノム比較と遺伝子解析. 第89回日本細菌学会総会(一般発表), 2016年3月23-25日. 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)
- 10) 氏原隆子, 大原直也, 谷口初美, 山崎利雄, 大畑雅典, 松崎茂展: *Mycobacterium smegmatis* に感染するバクテリオファージの形態学的解析. 2016年3月23-25日. 第89回日本細菌学会総会(一般発表). 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)
- 11) 那須川忠弥, 内山淳平, 鈴木仁人, 宮田怜奈, 山口琴絵, 内山伊代, 阪口義彦, 柴山恵吾, 阪口雅弘, 松崎茂展: 緑膿菌 PAO1 株とファージ KPP22 の短期間進化的軍拡競争の解析. 第89回日本細菌学会総会(一般発表), 2016年3月23-25日. 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)
- 12) 内山淳平, 内山伊代, 竹内啓晃, 阪口義彦, 阪口雅弘, 松崎茂展: 活性型ピロリ菌ファージ KHP30 の特徴付けとその潜伏感染性の解析. 第89回日本細菌学会総会(ワークショップ ファージ・ルネッサンス - ファージ発見から100年たった今 -), 2016年3月23-25日. 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)
- 13) 松井秀仁, 内山淳平, 津田愛美, 松崎茂展, 花木秀明: ファージを利用した細菌検

出～黄色ブドウ球菌ファージクロマト法の開発～第89回日本細菌学会総会（ワークショップ ファージ・ルネッサンス - ファージ発見から100年たった今 - ）、2016年3月23-25日、大阪国際交流センター（大阪府大阪市）

- 14) 松崎茂展, 大原直也, 谷口初美, 山崎利雄, 氏原隆子, 村上雅尚, 大畑雅典: *Mycobacterium smegmatis* バクテリオファージの長期保存状態における生存率 第68回日本細菌学会中国四国支部総会 2015年10月3～4日 岡山大学鹿田キャンパス（岡山県岡山市）
- 15) 坂口義彦, 内山淳平, 細見晃司, 幸田知子, 松崎茂展, 小椋義俊, 林哲也, 林俊治, 小崎俊司, 向本雅郁: B型ボツリヌス菌のボツリヌス毒素遺伝子をコードするプラスミド解析, 第88回日本細菌学会総会, 2015年3月26～28日・長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）
- 16) 内山淳平, 黒川健司, 坂口義彦, 内山（竹村）伊代, 氏原隆子, 村上雅尚, 大畑雅典, 松崎茂展: 各種ファージに対する黄色ブドウ球菌受容体の解析, 第88回日本細菌学会総会, 2015年3月26～28日・長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）
- 17) 重久 立, 内山淳平, 宮田玲奈, 山口琴絵, 内山伊代, 坂口義彦, 氏原隆子, 大畑雅典, 松崎茂展: 緑膿菌感染症に対するファージ療法と化学療法の併用療法の可能性検討, 第88回日本細菌学会総会, 2015年3月26～28日・長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）
- 18) 内山淳平, 内山（竹村）伊代, 坂口義彦, 竹内啓晃, 村上雅尚, 氏原隆子, 大畑雅典, 松崎茂展: ピロリ菌におけるKHP30様ファージの溶原性に関する研究, 第67回日本細菌学会中国四国支部総会 2014年10月4～5日 徳島文理大学（徳島県徳島市）

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, and Daibata M: Chapter 10. Phage therapy: experiments using animal infection models. Phage Therapy. Current Research and Applications. Editors: Jan Borysowski, Ryszard Międzybrodzki, Andrzej Górski (eds.), pp237-256, Caister Academic Press, Norfolk, UK. 2014. 総ページ数 378 ページ（掲載ページ 237-256 ページ）

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：黄色ブドウ球菌細菌に結合するタンパク質及びそのタンパク質を利用した黄色ブドウ球菌の測定法

発明者：大畑雅典, 松崎茂展, 内山淳平, 内山伊代

権利者：学校法人 麻布獣医学園

種類：

番号：特許第5925075号

取得年月日：平成28年4月28日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

松崎茂展, 氏原隆子, 橋田裕美子, 大畑雅典: 細菌感染症に対するファージ療法の可能性. Current Topic. BioScan for your Lab. No1. P.08. Beckman Coulter. 2016.7.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎茂展 (MATSUZAKI, Shigenobu)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・准教授

研究者番号：00190439

(2) 研究分担者

内山淳平 (UCHIYAMA, Jumpei)

麻生大学・獣医学部・講師

研究者番号：20574619

大畑雅典 (DAIBATA, Masanori)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・教授

研究者番号：50263976