

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870567

研究課題名(和文) H. pyloriの原生動物を介した環境への分布に関する研究

研究課題名(英文) Study on distribution of H. pylori co-cultured with amoeba in environments

研究代表者

北条 史 (Hojo, Fuhito)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：40580569

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 pyloriはAcanthamoeba castellaniiの体内では、培養7時間までその生存性を確認したが、培養24時間後では検出できなかった。アメーバ共培養系内では、培養24時間後においても細菌単独培養系と比較してH. pyloriの生存性が向上した。共培養系内のH. pyloriの形態を観察した結果、単独培養系においてはほとんどの菌体が球状化したが、共培養系においては螺旋状の菌体が確認された。共培養時と単独培養時にてのH. pyloriの発現遺伝子に差が見られた。以上より本菌がA. castellaniiを利用して環境中に生存している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Viable H. pylori was detected in A. castellanii until 7 hours after infection, but 24 hours or later, no colonies were detected. In whole co-culture with amoeba, viable H. pylori was detected even at 24 hours after infection. Morphological analysis revealed that almost all bacteria formed coccoid in single-culture of H. pylori. However spiral-formed bacteria remained in co-culture with A. castellanii. Transcriptome analysis showed that there was significant difference in gene expressions between single-culture and co-culture, implying that H. pylori took advantage of A. castellanii to survive in environment.

研究分野：微生物学

キーワード：Helicobacter pylori Acanthamoeba castellanii 共生 感染経路

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 十二指腸潰瘍の起因菌であると同時に胃癌のリスクファクターとされている *Helicobacter pylori* は、水系環境への分布が指摘されているがその生存様式などの詳細は明らかにされていない。

(2) 自由生活性アメーバなどの原生動物は土壌・水系環境に普遍的に分布し、通常は細菌を捕食している。

(3) 一部の細菌は原生動物の消化殺菌機構に抵抗性を示す。これらの細菌は原生動物を自身の生存に利用していることが報告されている。*H. pylori* も同様に原生動物を利用して環境に分布している可能性がある。

### 2. 研究の目的

*H. pylori* が環境に分布するために原生動物を利用していることを証明し、本菌の環境への分布について検討を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用細菌株・原生動物株

使用細菌には胃・十二指腸潰瘍患者由来臨床分離株 *H. pylori* TK1402 株と *H. pylori* ATCC43504 株を用いた。原生動物には *Acanthamoeba castellanii* Neff 株を用いた。*H. pylori* は 7% 馬血清加 Brucella 寒天培地を用いて好気条件、37 °C にて継代培養を行った。実験開始時の前培養は 7% 馬血清加 Brucella 液体培地を用いて好気条件下、37 °C にて 1 晩行い、得られた培養液は最終濃度が OD600=0.8 となるよう PBS(Phosphate buffered saline:リン酸緩衝液)によって遠心洗浄して調整し、菌液として使用した。*A. castellanii* Neff 株は PYG(Peptone Yeast extract Glucose)液体培地を用いて好気条件、30 °C にて 2 日間行った。PYG 液体培地でアメーバ培養液を約 10 倍に希釈し、6 穴プレートウェルのウェルに各 2ml ずつ加えた。好気条件、30 °C にてコンフルエントになるまで 2 - 3 日間培養した。

#### (2) 共培養系

*A. castellanii* を培養した 6 穴マイクロプレートウェルから、PYG 液体培地を除去し、PBS にて洗浄した。この 6 穴マイクロプレートウェルに、前培養した *H. pylori* 菌液を PBS にて遠心洗浄後、PBS に再浮遊させたものを添加した(共培養系)。また、菌液添加後、プレート遠心機にて 1500rpm(250G、5分)で遠心し、*A. castellanii* に吸着させた。対照の *H. pylori* 単独培養系は、空の 6 穴マイクロプレートウェルに *H. pylori* の終濃度が共培養系と同じになるよう菌液を PBS で希釈し添加した。いずれの培養系も容量 2ml となるようにした。

#### (3) *A. castellanii* 内における *H. pylori* の培養法による検出

培養法による *A. castellanii* 内 *H. pylori* の検出

には平板希釈培養法を用いた。前項目の方法と同様に培養を実施し、ゲンタマイシン処理、PBS 洗浄後、径 0.3mm ガラスビーズを加えてマルチビーズショッカーで 1500rpm 震盪破砕 60 秒間、クールダウン 10 秒間を 3 セット行い、*A. castellanii* を破壊し、細胞内の *H. pylori* を取り出しサンプル液とした。サンプル液を適宜希釈して 7% 馬血清加 Brucella 寒天培地に塗布し、好気条件、37 °C にて培養した。サンプル塗布から 5 日後に形成されたコロニーをカウントし、サンプル中の菌数(CFU(Colony Forming Unit)/ml)を算出した。

#### (4) 共培養系内における *H. pylori* の培養法による検出

共培養系内全体における *H. pylori* の検出は共培養系を開始した後、好気条件下に 6 穴マイクロプレートを静置し、3 時間の接触時間を設け、各培養時間後に *A. castellanii* をガラスビーズによって破壊したサンプル液を回収した。サンプル液の菌数の算定は、前述の方法と同様に実施した。

#### (5) 電子顕微鏡による共培養時の *A. castellanii* および *H. pylori* の形態観察

SEM(Scanning Electron Microscope: 走査型電子顕微鏡)による *H. pylori* の形態観察のためのサンプル調整は、グルタルアルデヒドを 2.5% となるように加えて、18 時間以上固定を行い、1% 四酸化オスmiumによる後固定、エタノールによる脱水の後、ブチルアルコールの凍結乾燥によって乾燥を行い、標本作製した。

#### (6) トランスクリプトーム解析

各共培養系あるいは単独培養系の培養開始 24 時間後サンプルは、*A. castellanii* 由来の RNA の混入を除くため、Percoll 試薬 45% を用いた密度勾配遠心(4 °C、3500g で 15 分間)を行い、*H. pylori* を収集した。総 RNA を抽出した後、rRNA 除去キットを用いて全ての rRNA を除去した。さらに、この RNA をフラグメント化した後 cDNA を合成し、トランスクリプトームライブラリの作製を行った。本サンプルをエマージョン PCR によってテンプレート作製を行い次世代シーケンサーを用いて、シーケンスを解析した。データ解析には Genomics workbench(CLC 社、デンマーク、Aarhus)を用いた。*A. castellanii* 由来の核酸を参照配列にマッピングして解析から排除した後、*H. pylori* 由来の核酸について de novo アセンブリを行って contig を作製した。作製 contig を Uniprot (www.uniprot.org)にて *H. pylori* F30 株と *A. castellanii* における既知のタンパク情報を元に BLAST サーチを行い、各 contig がコードする mRNA について特定した。Baggerley の方法により各遺伝子発現差を解析した。各遺伝子の機能解析は WebMGA (www.weizhong-lab.ucsd.edu/metagenomic-analysis/) による COG (Clusters of Orthologous Groups of proteins) 解析または Uniprot 検索により得られた情報に基づいて行っ

た。

#### 4. 研究成果

(1) *H. pylori* の *A. castellanii* 体内における生存性の解析

*A. castellanii* 体内の *H. pylori* の生存性を検討したところ、培養開始後7時間までのサンプルから *H. pylori* のコロニーの発育を認め、*H. pylori* が *A. castellanii* 体内にて生存していることが明らかとなった。しかしながら培養開始7時間後のサンプルは *H. pylori* の生菌数が  $10^{4.73 \pm 0.30}$  CFU/ml と、培養開始5時間後のサンプルの生菌数  $10^{6.12 \pm 0.01}$  CFU/ml と比較してその生菌数は有意に減少していた。培養開始から24時間以降の本菌のコロニーの発育は認められず、*H. pylori* の生存性の確認はできなかった。

(2) *H. pylori* の *A. castellanii* 体外における生存性

*A. castellanii* の体内のみならず、*A. castellanii* 体外を含めた共培養系内全体での *H. pylori* の生存性の検討を行ったところ、対照である *H. pylori* の単独培養では、TK1402株で培養開始24時間後に  $10^{4.23 \pm 0.14}$  CFU/ml、ATCC43504株では検出限界以下(500CFU/ml)となり、菌数が大きく減少した。一方、*H. pylori* を *A. castellanii* と共培養した際、TK1402株は培養開始3時間後の菌数 ( $10^{8.58 \pm 0.31}$  CFU/ml) と比較してその菌数は減少したものの、培養開始24時間後に  $10^{6.13 \pm 0.30}$  CFU/ml で検出された。また、ATCC43504株を用いた場合は培養開始24時間後に  $10^{5.68 \pm 0.22}$  CFU/ml で検出された。両菌株とも単独培養と比較して *A. castellanii* との共培養における共培養で *H. pylori* の有意に高い菌数が確認された ( $P < 0.01$ )。以上のことから、*A. castellanii* 体外では *H. pylori* の生存性が向上することが確認された。

(3) *H. pylori* の *A. castellanii* 共培養系における形態変化

*H. pylori* と *A. castellanii* との共培養において SEM を用いて *H. pylori* の形態観察を行った。*H. pylori* を単独で培養した場合、培養開始直後はほぼ全ての菌体がらせん状の形態を呈していたが、培養開始24時間後にはほぼ全ての菌体が球状化していた(図1A)。一方で *H. pylori* と *A. castellanii* との共培養においては *H. pylori* のらせん状菌が培養開始24時間後に残存していた(図1B)。

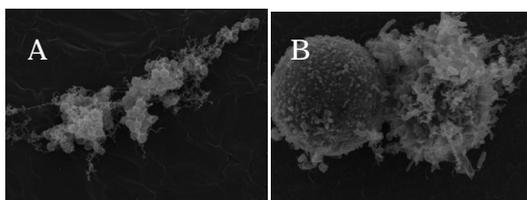


図1 単独培養系および共培養系内における *H. pylori* の形態

(4) *H. pylori* の *A. castellanii* 共培養系内におけるトランスクリプトーム解析

*H. pylori* と *A. castellanii* 共培養系、*H. pylori* 単独培養で比較した結果、286の遺伝子が共培養系で強発現しており、157本の遺伝子が単培養系で強発現していた。これらの遺伝子の機能的な解析を行ったところ、共培養系においては「翻訳・リボソーム構造および生合成」に関わる遺伝子が34遺伝子と最も多く発現増強し、次いで「エネルギーの産生と変換」に関わる遺伝子が多く発現増強していた。

#### 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)

Osaki T, Konno M, Yonezawa H, Hojo F, Zaman C, Takahashi M, Fujiwara S, Kamiya S, Analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori* in Japanese families, 査読有, J Med Microbiol, 64(Pt1), 67-73, 2015

Okuda M, Osaki T, Kikuchi S, Ueda J, Lin Y, Yonezawa H, Maekawa K, Hojo F, Kamiya S, Fukuda Y, Evaluation of a stool antigen test using a mAb for native catalase for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in children and adults, 査読有, J Med Microbiol, 63(Pt12), 6721-5, 2014

(学会発表) (計8件)

北条史, *Helicobacter pylori* の自由生活性アメーバ共培養系における生存性の向上と遺伝子発現差解析, 第89回日本細菌学会総会, 平成28年3月23-25日, 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

北条史, *Helicobacter pylori* の自由生活性アメーバ共培養系における生存性の向上と遺伝子発現について, 第49回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会, 平成28年1月29-30日, 仙台ガーデンパレス(宮城県仙台市)

Hojo F, Transcriptome and proteome analysis of *Helicobacter pylori* in co culture with *Acanthamoeba castellanii*, 18th International workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and related organisms, 平成27年11月1-5日, ロトルア(ニュージーランド)

北条史, *Helicobacter pylori* の自由生活性アメーバ *Acanthamoeba castellanii* 共培養時のトランスクリプトーム解析～*Helicobacter pylori* 生存性との関連, 第21回日本ヘリコバクター学会学術会議, 平成27年6月26-27日, 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

Hojo F, Effect of *Acanthamoeba castellanii* on

survival of *Helicobacter pylori* in co-culture,  
European *Helicobacter* Study Group XXVIIth  
International Workshop on *Helicobacter* &  
Microbiota in Inflammation & Cancer、平成 26  
年 9 月 10-13 日、ローマ(イタリア)

他3件

(図書)(計 0 件)

(産業財産権)

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

(その他)

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

北条 史 (HOJO, Fuhito )

杏林大学・医学部・助教

研究者番号:40580569

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号: