

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08618

研究課題名(和文)ピロリ菌の細胞分裂・形態制御機構とその関連病態(病原性)の解明

研究課題名(英文)Analyses for the unique machinery of cell division in Helicobacter pylori and pathogenesis of its associated disorders

研究代表者

竹内 啓晃(TAKEUCHI, Hiroaki)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：90346560

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)：ピロリ菌固有の細胞分裂機構をminC,D,E及びftsZの解析から、1.MinC,D,Eは形態伸長の制御。2.MinC,Dは分裂部位の制御。3.MinCはFtsZ凝集(Z-ring polymerization)の制御と分解・安定性。4.MinDはnucleic occlusion制御。5.MinEはcoccoïd形成に関与する、ことを報告した。また、ファージ感染ピロリ菌株からその脱落株を分離・獲得に成功し、比較解析した結果：1.病原性CagAに変異誘導していること、2.形態および運動性に影響すること、3.脱落株は再感染し、その繰り返しが生物多様性を進化させることなどを世界で最初に報告した。

研究成果の概要(英文)：The machinery of cell division in *H. pylori* is little known. We investigated the function of Min proteins and FtsZ, and provided new insights as follows; 1. All Min proteins (C, D and E) regulated the cell elongation, 2. MinC and D regulated the division site in cells, 3. MinC regulated the Z-ring polymerization and contributed to the FtsZ stability, 4. MinD involved in nucleic occlusion system, and 5. MinE involved in the coccoïd conversion at the stationary phase. We obtained prophage-cured derivative strains from NY43 strain infected with prophage KHP30. The comparative analyses with NY43 and its prophage-cured strains provided new insights as follows; 1. Prophage induced the genetic mutations in *cagA*, leading to CagA disruption, 2. Prophage influenced the morphology and motility, 3. The prophage-cured derivatives could re-infect with phage, indicating that the repeated/patterned phenomena would be involved in the development of *H. pylori* evolution with biological polymorphisms.

研究分野：臨床検査医学(感染症・微生物学)

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ *H. pylori* flora 細胞分裂制御機構 形態形成 minCDE ftsZ 生物学的多様性 ファージ

### 1. 研究開始当初の背景

強酸性胃内に慢性持続感染するピロリ菌は genetic diversity が著しく環境適応により様々な mutants が出現し mass として生存 (*H. pylori* flora) し、その結果生じる生物学的多様性は多彩な病態に深く関与していると考えられる。さらに、特殊な環境下で生育できるピロリ菌のゲノムサイズは大腸菌の約 1/3 程度で、我々が発見した *cdrA* 遺伝子など本菌固有の遺伝子・機能や生存戦略・機序を有すると思われる。しかし、本菌の細胞分裂機構および多様性に関しては未だ不明な点が多い。特に多くの細菌で認められる細胞分裂関連遺伝子 (*ftsZ*, *minC*, *minD*, *minE*) は本菌も保有するがその相同性は低い。

### 2. 研究の目的

1. 本菌の細胞分裂機序を細胞分裂関連遺伝子 (*ftsZ*, *minC*, *minD*, *minE*) を中心に解析し本菌固有の機序を解明する。2. ピロリ菌ファージの解析から本菌に及ぼす影響を genetic diversity および生物学的多様性から解明する。

### 3. 研究の方法

#### 1. 細胞分裂機序の解明

##### (1) 形態観察

各遺伝子破壊株 (*minC*, *minD*, *minE*, *minCD*, *minDE*) を作成し、グラム染色および SEM (走化型電子顕微鏡) で形態を、免疫染色で各種蛋白の菌体内分布を観察した。尚、免疫染色等に使用した各種抗体は各遺伝子をクローニング後、His 融合蛋白を作成しウサギ免疫にて獲得した。

##### (2) ウェスタンブロット解析

4 抗体 (抗 FtsZ, MinC, MinD, MinE 抗体) を使用し免疫沈降後ウェスタンブロットで結合性を解析した。

#### 2. 生物学的多様性の解明

##### (1) prophage-cured 株の作成

NY43 株 (prophage KHP30 感染株) から様々な培養・刺激条件下 (経時培養 (液体)、1.4% 寒天培地、マイトマイシン C 刺激など) で KHP30 が脱落した cured 株を作成した。また、ファージ感染はプラークアッセイで検証した。

##### (2) ファージの菌体に及ぼす影響の解析

野生株 NY43 株とその prophage-cured 株を使用して種々の方法 (経時培養 (液体)、CFU、形態 (グラム染色)、運動性 (0.35% 軟寒天培地)、薬剤感受性試験 (AMPC、CAM、MNZ、STFX)、病原因子 *cagA* への変異・影響と発現 (ウェスタンブロット)) で解析した。

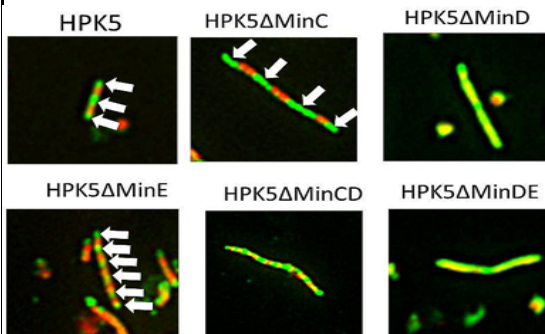
### 4. 研究成果

#### 1. 細胞分裂機序

全破壊株 5 株は野生株より有意に伸長化し、

*minC*, *D* 破壊株は顕著だった。経時培養では stationary 期の *minE* 破壊株は coccoid の出現数が少なく高い CFU を維持していた。SEM では、*minC*, *D* 破壊株は細胞中央を外れて分裂が起こっていた。以上より、*minC*, *D*, *E* は形態形成 (長軸制御) に関与し、さらに *minE* は変態 (coccoid conversion) 誘導を制御していることが強く示唆された。また、*minC*, *D* は分裂部位の決定に強く関わっていることを明らかにした。

さらに、作成したピロリ菌特異的 FtsZ 抗体を使用した免疫染色により FtsZ の細胞内局在を解析した (Fig. 1)。野生株と *minE* 破壊株は同様に細胞中央および細胞両極にリクルートされた FtsZ がドット状に観察された。*minC* 破壊株は染色体を避け FtsZ が局在するが、その染色性は 2 株 (野生株と *minE* 破壊株) と異なり diffuse した状態だった。*minD* 破壊株は染色体の存在には無関係に細胞内全体に disperse して観察された。以上より、*minC* は FtsZ の凝集 (重合 Z-polymerization) に関与し、*minD* は nucleic occlusion を制御していると考えられた。*minC*, *D* 破壊株で認められた異常分裂部位での細胞分裂は、このような細胞内の FtsZ 局在・重合の不安定状態に起因している可能性が強く示唆された。



(Fig. 1) 作成抗体 (抗 FtsZ 抗体) による免疫染色所見

菌体内の FtsZ は緑色で観察され局在を示す (矢印)。染色体は赤く観察され、overlap した場所は黄色として観察される。全 5 破壊株は野生株同様に染色体の複製および分離は認められる。*minD* 破壊株は染色体の位置に関係なく FtsZ が細胞内全体に disperse しているのが観察される。*minC* 破壊株は FtsZ が染色体間に diffuse して存在している。

次に各種抗体を使用し免疫沈降後にウェスタンブロットを実施し、Min 蛋白と FtsZ 蛋白間の菌体内分子相互作用・結合性について解析した。その結果、2 株 (HPK5 株と 26695 株) とともに FtsZ と各 Min 蛋白の細胞内での結合が確認された。従来報告では一部、検出困難との報告もあったが、我々が作成した抗体を使用することで蛋白間の結合が明らかにできた。ただ、直接的か間接的結合かの問

題は不明であり今後は *in vitro* での解析にてその点を明らかにしていく予定である。また、断定はできないが、FtsZ 抗体で免疫沈降後 Min 蛋白を検出すると、そのバンド強度が Min 蛋白間で異なることから、FtsZ に対する親和性および結合モルが各 Min 蛋白間で異なることが示唆された。

## 2. 生物学的多様性の解明

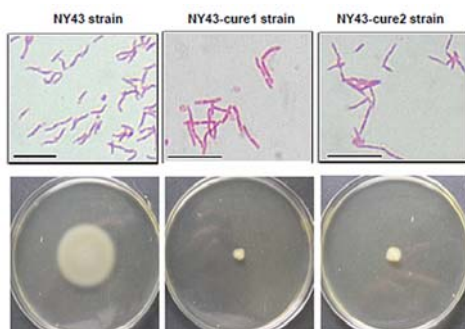
NY43 株 (prophage KHP30 感染株) を液体培養し exponential および stationary phase 期の菌体を段階希釈、isolate 後に KHP30 脱落株 (cured 株) の獲得を試みて成功した。cured 株はファージ特異的プライマーを使用し PCR にて確認した。また、培養 2 日目 (寒天培地) から同様に実施したところ、培養条件に応じてその分離率 (cure 率) が異なることを明らかにした (Table 1)。すなわち、KHP30 は本菌の分裂・増殖時に自然脱落 (exponential phase) し stationary phase まで維持されていた。さらに、exponential phase の培養液を使用した実験で、cured 株に再感染することを実証した。ゆえに、この exponential phase の培養液中には感染可能なファージ完全体が放出され、かつそれは cured 株に再感染可能であることを初めて証明した。

Each curing ratio is expressed by percentage in parentheses.

Liquid culture condition	
Exponential phase	Stationary phase
63/110 (57%)	15/30 (50%)
Non-liquid culture condition (solid agar plate)	
45/50 (90%)	

(Table 1) 各培養条件による NY43 株からの cure 率  
液体培養条件下は exponential で約 57% (63/110)、stationary で約 50% (15/30)、とほぼ同程度の cure 率に対し、固形培地では約 90% (45/50) に KHP30 の自然脱落が認められる。固形培地よりも液体培養の方が動きがあり再感染の頻度が向上することが示唆される。

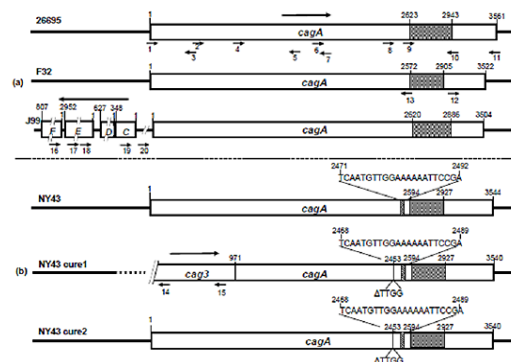
次に、これら cure 株 (2 株: NY43-cure1 と NY43-cure2) を使用し野生株 NY43 株との生物学的相違を解析した。結果、cure 株は共にやや膨化した直線的な形態を呈し、その運動性は顕著に低下していた (Fig. 1a, b)。



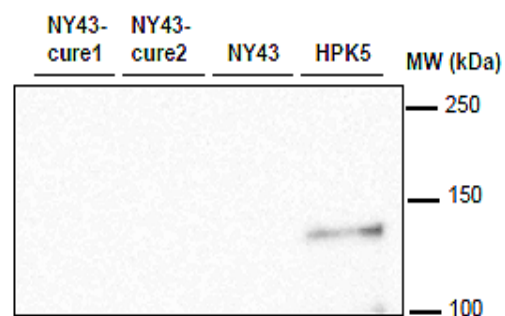
(Fig. 1) 形態 (グラム染色) と運動性  
NY43-cure 株は両株とも軽度膨化しより直線的な形態を呈する。軟寒天培地による運動性試験では 2 株とも顕著な低下を認める。

経時培養による CFU 測定では、両 cure 株が NY43 株よりも常に高値を示した (10~100 倍)。これは NY43 株から lytic event による KHP30 放出によるものと考えられた。実際に培養液中に感染可能な KHP30 の存在を証明したことから明らかであった。他の生物学的解析 (ウレアーゼ試験、薬剤感受性試験) に差は認めなかった。

病原因子 (*cagA*) への影響はシーケンスおよびウェスタンブロットで解析した。その結果、NY43 株と両 cure 株に共通した 22-bp の挿入を認めた。その結果、NY43 株の *cagA* 遺伝子はフレームシフトにより破壊されていた。また、両 cure 株共に 4-bp の欠失配列を認めた。さらに NY43-cure1 株の N 末領域は他遺伝子 (*cag3*) と融合していた (Fig. 2)。一方、NY43-cure2 株の *cagA* 遺伝子はシーケンス上インフレームであったが、ウェスタンブロットの結果、蛋白の発現は認められなかった (Fig. 3)。

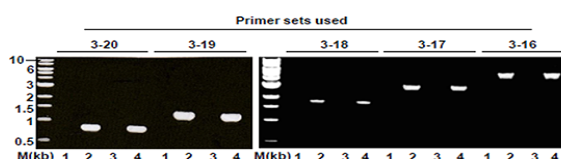


(Fig. 2) *cagA* 領域のシーケンスの比較  
他 3 株との比較 (a) および NY43 とその cured 株 (b) の比較を示す。  
3 株には共通した 22-bp (5-tcaatgttggaaaaaattccga-3) の挿入配列を認め、さらに両 cured 株は共通した 4-bp の欠失配列 (Δ 5-ttgg-3) を認める。



(Fig. 3) ウェスタンブロット  
3 株共 CagA 発現は認められない。HPK5 株は CagA 発現を認める (陽性コントロール)。

そこで、NY43-cure2 株について *cagA* 遺伝子上流領域の genetic rearrangement を考え 5 種類のプライマーセットを用いて PCR を実施した結果 (Fig. 4)、全て陰性であり、この上流に相当な rearrangement が起こっていることが示唆された。



(Fig. 4) *cagA* 遺伝子上流領域の PCR 4 株の gDNA を使用して 5 種類のプライマーセットで PCR を実施した。NY43 株と HPK5 株は陽性となるが、NY43-cure2 株は全て陰性であった。

1, negative (no DNA); 2, NY43; 3, NY43-cure2; 4, HPK5

以上より、ピロリ菌におけるファージ感染および自然脱落による cure 株の出現と再感染の繰り返しプロセスにより菌体宿主に生物学多様性を創出していることが明らかとなった。

## 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 12 件)

① Takeuchi H, Kira M, Konishi S, Uchiyama J, Matsuzaki S, Matsumura Y. Polymorphisms in the *Helicobacter pylori* NY43 strain and its prophage-cured derivatives. *Microbiology*. 査読有、In press 2018.

DOI: 10.1099/mic.0.000665.

② Takeuchi H, Ishizuka S, Higuchi K, Yoshikane Y, Takagi R, Takenaka K, Matsumura Y. An improvement of the human gut ecosystem by drinking refined-deep-seawater (RDSW). *J Food Process Technol*. 査読有、9:81 2018. DOI:10.4172/2157-7110-C1-078

③ 森本徳仁、竹内啓晃、西田愛恵、森本みゆき、上岡彩椰、森田珠恵、小倉克巳、杉浦哲朗、松村敬久. *Helicobacter pylori* 関連免疫性血小板減少症における *H. pylori* 外膜蛋白を用いた検査法の開発. *臨床病理* 査読有、65(11):1169-1176 2017.

④ 竹内啓晃、松村敬久. 調製海洋深層水飲用による生体効果. *海洋深層水研究*. 査読有、17(1):17-22. 2016.

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* 先端医学社. 査読無、20(5):50(470)-54(474) 2016.

⑥ Sugiura T, Okumiya T, Kubo T, Takeuchi H, Matsumura Y. Evaluation of Intravascular Hemolysis with erythrocyte creatine in patients with aortic stenosis. *International Heart Journal*. 査読有、57(4):430-433. 2016.

DOI: 10.1536/ihj.15-433.

⑦ 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 Microbiology Lett*. 査読有、363(16) 2016. DOI: 10.1093/femsle/fnw157

⑧ Matsumura Y, Wada M, Hirakawa D, Yasuoka Y, Morimoto N, Takeuchi H, Kitaoka H, Orihashi K, Sugiura T. Clinical utility of transthoracic echocardiography for screening abdominal aortic aneurysm: A prospective study in a Japanese population. *Cardiovasc Ultrasound*. Feb 12, 査読有、14(8) 2016. DOI: 10.1186/s12947-016-0051-x

⑨ Nishida Y, Takeuchi H, Morimoto N, Umeda A, Kadota Y, Kira M, Okazaki A, Matsumura Y, Sugiura T. Intrinsic characteristics of Min proteins on the cell division of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett*. [Epub ahead of print] 査読有、363(6) 2016. DOI: 10.1093/femsle/fnw025

⑩ Nishida Y, Morimoto N, Korenaga M, Komatsu Y, Takeuchi H, Matsumura Y, Sugiura T. Genotyping *Giardia intestinalis* using DNA extracted from long-term-preserved human specimens stained with chlorazol black E. *Jpn J Infect Dis*. [pub ahead of print] 査読有、Aug 7. 2015. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2014.543

[学会発表] (計 51 件) 招待講演 4 件、WS/シンポジウム 3 件、受賞 2 件含む

[国際学会]

① Takeuchi H, Ishizuka S, Higuchi K, Yoshikane Y, Takagi R, Takenaka K, Matsumura Y. An improvement of the human

- gut ecosystem by drinking refined-deep-seawater (RDSW). 21<sup>st</sup> Euro-Global Summit on Food and Beverages. 3.7-10 2018 Berlin(Germany) (招待講演)
- ② Takeuchi H. 深層水飲水による腸内環境改善効果 = 臨床試験成績 = The Founding Conference for the Taiwan Deep Sea Water Industry Consortium and 2017 Deep Sea Water International Seminar. 10.30-31 2017 台湾大学 (台湾) (招待特別講演)
- ③ Takeuchi H., Ishizuka S., Higuchi K., Takagi R., Takenaka K., Matsumura Y. The effects of drinking refined-deep-seawater (RDSW) on the human body. 16<sup>th</sup> Euro-Global Summit on Food and Beverages. 3.2-4 2017. Amsterdam(Netherlands) (Best Poster Award 受賞)
- ④ Yano Y., Mizuta H., Kira M., Matsumura Y., Kitagawa T., Hashiba M., Okamoto N., Takeuchi H., Ono M., Saibara T. Potassium-competitive acid blocker-based third-line triple therapy in *Helicobacter pylori* eradication and study of the diversity of antimicrobial susceptibilities. The 24th United European Gastroenterology Week, Gastroenterology conference. 10.15-19 2016 Vienna(Austria)
- ⑤ Nishida Y., Takeuchi H., Morimoto N., Kira M., Okazaki A., Matsumura Y., Sugiura T. Intrinsic Role of *Helicobacter pylori* Min Proteins. ASM Microbe 6.16-20 2016 Boston(USA)
- ⑥ 竹内啓晃 海洋深層水による生体効果の検証 =がん細胞の増殖抑制効果について= 台湾深層海洋水資源利用学会 2015 大会 10.29-30 2015 台湾大学 (台湾) (招待講演)
- ⑦ Nishida Y., Kira M., Morimoto N., Matsumura Y., Sugiura T., Takeuchi H. The molecular insights into *Helicobacter pylori* Min and FtsZ proteins. 115<sup>th</sup> ASM General Meeting. 5.29-6.2 2015 LA(USA)

[国内学会]

- ⑧ 竹内啓晃. 海洋深層水の飲用による健康増進効果 =腸内フローラへの影響= 日本海水学会西日本支部秋季講演会. 11.30 2017 かるぼーと高知(招聘講演)
- ⑨ 竹内啓晃、上岡樹生、杉浦哲朗、松村敬久. 調整海洋深層水飲料と腸内環境 *Helicobacter pylori* Prophage (KHP30) の宿主細菌(NY43)に及ぼす影響. 第64回日本臨床検査医学会学術集会. 11.16-19 2017 国立京都国際会館
- ⑩ 竹内啓晃、石塚悟史、吉金優、樋口慶郎、松村敬久、竹中幸市. 調整海洋深層水飲料と腸内環境 = 高知県産学官民連携 project = 第21回海洋深層水利用学会.

- 10.12-13 2017 北海道羅臼公民館
- ⑪ 矢野有佳里、津田尚子、北川達也、羽柴基、吉良瑞喜、水田洋、竹内啓晃、小野正文、松村敬久、西原利治. 薬剤感受性の検討からみた *H. pylori* の多様性について. 第25回消化器関連学会週間. 10.12-15 2017 福岡国際センター(ポスター優秀演題受賞)
- ⑫ 矢野有佳里、津田尚子、北川達也、羽柴基、吉良瑞喜、水田洋、岡本宣人、竹内啓晃、小野正文、松村敬久、西原利治. Diversity of antimicrobial susceptibility of *H. pylori* in individual patients. 第23回日本ヘリコバクター学会学術集会. 6.30-7.2 2017 函館アリーナ(WS発表)
- ⑬ 吉良瑞喜、岡崎亜美、森本徳仁、上岡樹生、松村敬久、杉浦哲朗、竹内啓晃. 同一患者における *Helicobacter pylori* の生化学的および遺伝子多様性の検討. 第63回日本臨床検査医学会学術集会. 9.1-4 2016 神戸国際会議場(座長推薦論文投稿受ける)
- ⑭ 竹内啓晃、西田愛恵、吉良瑞喜、岡崎亜美、森本徳仁、松村敬久. ヘリコバクターピロリ Min 蛋白の細胞分裂における固有特性. 第22回日本ヘリコバクター学会学術集会. 6.24-26 2016 別府ビーコンプラザ
- ⑮ 内山淳平、内山(竹村)伊代、阪口義彦、竹内啓晃、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. 3.26-28 2016 大阪国際交流センター(WS発表)
- ⑯ 岡崎亜美、竹内啓晃、吉良瑞喜、森本徳仁、松村敬久、杉浦哲朗. *omp* 遺伝子が *Helicobacter pylori* の生物学的機能に与える影響の解析. 第62回日本臨床検査医学会学術集会. 11.19-22 2015 長良川国際会場
- ⑰ 吉良瑞喜、岡崎亜美、森本徳仁、松村敬久、杉浦哲朗、竹内啓晃. 同一胃内から分離された *Helicobacter pylori* の genetic diversity の検討. 第47回日本臨床検査自動化学会. 10.8-10 2015 パンフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 啓晃 (TAKEUCHI, Hiroaki)  
高知大学・教育研究部医療学系・講師  
研究者番号：90346560

(2) 研究分担者

松村 敬久 (MATSUMURA, Yoshihisa)  
高知大学・教育研究部医療学系・教授  
研究者番号：10274391

杉浦 哲朗 (SUGIURA, Tetsuro)  
高知大学・医学部附属病院・特任教授  
研究者番号：50171145

森本 徳仁 (MORIMOTO, Norihito)

高知大学・医学部附属病院・臨床検査技師  
研究者番号：60398055