

令和元年6月17日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08787

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリの緊縮応答の生残、定着および病原性発現における役割の解析

研究課題名(英文) Role of stringent response in survival, colonization and expression of pathogenesis in *Helicobacter pylori*

研究代表者

神谷 茂 (Kamiya, Shigeru)

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号：10177587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細菌は栄養が枯渇すると guanosine pentaphosphate および guanosine tetraphosphate (両者を合わせて(p)ppGpp)を細胞内に蓄積し、多岐に渡る遺伝子の発現を制御することにより様々な生理的变化を引き起こす。緊縮応答とよばれるこの反応は細菌の病原性発現にも関わっていると考えられている。

本課題では、(p)ppGpp合成酵素欠損変異株を用いて慢性胃炎、胃がんの原因となるピロリ菌の定着への関与について検討を行った。その結果、本菌の緊縮応答はストレス環境への適応に加え、鞭毛形成の制御に関わることでバイオフィーム形成に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌は慢性感染することで胃がんの発生要因となる。従って、除菌治療を行うことは重要であり、現在ピロリ菌感染者には抗菌薬の投与が行われている。一方で、耐性菌は増加しており、今後さらに治療が困難となることが考えられる。

本菌の定着には多くの因子が関与しているが、本課題により(p)ppGppが鞭毛形成を介してバイオフィーム形成に関与していることが示唆された。今後、(p)ppGppアナログや合成酵素阻害剤の開発により、これまでの抗菌薬と異なる治療法の開発につながるものと期待している。

研究成果の概要(英文)：Stringent response is a bacterial response to adapt nutrient deprivation environment. When bacteria starve, guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate (collectively named (p)ppGpp) are accumulated in the cell and start to modulate gene expressions. Thereby, various physiological changes such as tolerance to stresses, induction of second metabolites and expression of virulence factors are occurred. Infection of *Helicobacter pylori* causes gastritis and increases a risk of gastric cancer. In the present study, we investigated the role of (p)ppGpp in *H. pylori* using a mutant lacking (p)ppGpp production. Accordingly, (p)ppGpp was shown to be important for formation of biofilm in addition to adaptation under oxidative and acidic stress environments. Furthermore, (p)ppGpp related to motility and formation of flagella. Taken together, (p)ppGpp is suggested to regulate biofilm formation via flagella formation.

研究分野：細菌学

キーワード：ピロリ菌 緊縮応答 バイオフィーム 病原性 鞭毛 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

緊縮応答は栄養飢餓等に順応するための細菌細胞の応答であり、細胞内に蓄積した ppGpp により栄養源の取り込み亢進および安定な細胞内高分子の合成の停止、酸や酸化物に対するトランスの上昇など栄養源の枯渇を含めた生育環境の悪化に対し生残に必要な反応を担っている。

細菌の細胞内 ppGpp 濃度は RelA/SpoT ホモログ(RSH)によって合成および分解されて調節されている。大腸菌では RelA および SpoT という ppGpp 合成活性を有する 2 つのタンパク質を保有しており、さらに SpoT には分解活性もあることからこれらにより細菌細胞内の ppGpp 濃度が調節されているものと考えられている。一方、慢性胃炎や胃がんの原因となる *Helicobacter pylori* (ピロリ菌) には *spoT* 遺伝子のみが存在し、その欠損株では ppGpp の蓄積は消失する (Mouery et al., J Bacteriol. 2006)。spoT 欠損株では酸などのストレスに対する耐性の低下、定常期における生残率の減少がみられる (Mouery et al., J Bacteriol. 2006; 2006, Park et al., BMC Microbiol. 2011)。また、spoT 欠損株は無血清培地による貧栄養に適應できないこと (Zhou et al., J Bacteriol. 2008)、低二酸化炭素分圧、無血清培地を用いた培養により ppGpp の蓄積がみられることも示されている (Park et al., BMC Microbiol. 2011)。これらの報告は緊縮応答が低栄養環境である宿主の胃内での定着に關与している可能性を示唆するものである。

我々を取り巻く土壌・水系環境には原生動物、真菌、細菌など多様な微生物が分布している。これらのうち、自由生活性アメーバ (Acanthamoeba はその一種)、繊毛虫、細胞性粘菌などの原生動物は細菌を餌として捕食して生きている。一方、Legionella, Pseudomonas, Mycobacterium などの細菌はこの捕食消化作用から逃れ (Amoeba Resistant Bacteria: ARB とよばれる)、原生動物内で生存することが知られる。ピロリ菌は Acanthamoeba castellanii の内部で増殖できるという報告 (Winicka-Krusnell et al., Scand J Infect Dis 2002) がなされ、申請も河川水中の Acanthamoeba および Helicobacter spp. の検出率がそれぞれ 61% および 88% と高値であることを報告した (Kawaguchi et al., Lett Appl Microbiol 2009)。しかしながら Smith & Ashbolt (Curr Microbiol 2012) は Acanthamoeba polyphaga 用いた実験でピロリ菌のアメーバ内増殖は見られないことを示しており、見解は一致していない。

しかしながら 2015 年、水系感染症をおこすコレラ菌が *A. castellanii* 内で増殖することが報告された (Henst et al., ISME J. 2015)。この結果は上記細菌以外の細菌以外でもアメーバが自然界での niche となり、感染源となる可能性を示唆するものである。

ピロリ菌は生育環境が悪化するとらせん型の菌の形態が U 字型となり、最終的に coccoid とよばれる球状となることが知られている。この coccoid は環境中での生残やヒトへの水系感染の原因ともされている。これまで spoT 変異により coccoid の形成および定常期における影響が報告されていることから coccoid 形成に緊縮応答が關与しているものと考えられる。

環境中の菌はしばしばバイオフィームを形成することが知られている。Biofilm 形成能はほぼ全ての細菌に保存されており、細菌の変化に富んだ環境への応答に重要であるものと考えられている。申請者らはこれまでピロリ菌の形成するバイオフィームには Outer Membrane Vesicle (OMV) が多数存在しており (Yonezawa et al., BMC Microbiol 2009; Yonezawa et al., J Gastroenterol Hepatol 2010) (図 2) 細胞外マトリックスの構成成分である可能性を提示している。また、日本人胃・十二指腸潰瘍患者より分離した TK1402 株は *in vitro* は強いバイオフィーム形成能を示すが (Yonezawa et al., Anaerobe 2011)、本株を用いてバイオフィーム形成が臨床におけるクラリスロマイシンに対する耐性菌増加の一因である可能性を示した (Yonezawa et al., PLoS One 2013)。これらの結果からピロリ菌のバイオフィームの形成は臨床の上重要な課題であることを示している。

### 2. 研究の目的

緊縮応答は多くの細菌が有する栄養枯渇に対する応答系であり、シグナル因子であるグアノシン 4 リン酸および 5 リン酸 (合わせて (p)ppGpp と表記) が細胞内で蓄積することにより遺伝子の発現が変化する。(p)ppGpp は、栄養枯渇下での細菌の生残に重要であると共に、ストレス耐性や病原性を含む多くの生理機能に關わっていることが知られている。

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は、グラム陰性のらせん形細菌であり、鞭毛により胃粘液下に移動し、定着することで慢性胃炎や胃がんを引き起こす。また、ピロリ菌は感染宿主の胃内でバイオフィームを形成することが知られており、定着に重要な因子であると考えられている。本研究では、ピロリ菌を用いて緊縮応答の詳細を解明することを目的とし、ピロリ菌の定着及び病原性発現における (p)ppGpp の役割を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 使用菌株および培養条件

ピロリ菌は十二指腸潰瘍・胃潰瘍患者由来の臨床分離株である TK1402 株を使用した。ピロリ菌の培養は、固形培地に 7% ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) 含有 Brucella 寒天培地を、液体培地に 10% FBS 含有 Brucella broth を用い、O<sub>2</sub> 濃度 6-12 %、CO<sub>2</sub> 濃度 5-8 % の微好気条件下、37 °C で行った。実験には、2 日間培養後のピロリ菌のコロニーを液体培地に懸濁し、一晚振とう培養したものをを用いた。

#### (2) spoT 欠損変異株の作成

(p)ppGpp 合成酵素遺伝子である *spoT* のヌクレオチド転移酵素活性ドメイン (nt 721-1096) を欠損させ、そこにクロラムフェニコール (Cm) 耐性遺伝子を挿入した DNA フラグメントを作成し、野生株である TK1402 株を形質転換し、相同組み換えにより Cm 耐性を示す  $\Delta spoT$  株を得た。

### (3) バイオフィーム形成能の測定

ピロリ菌を 12 穴プレートで 48 時間振とう培養後、ウェル内壁に形成されたバイオフィームを 1% クリスタルバイオレット溶液で染色し、洗浄後、バイオフィームに取り込まれた色素を抽出液 (酢酸:99.5% エタノール=1:9) で抽出し、595 nm における吸光度を測定することでバイオフィーム量を定量した。

### (4) バイオフィームの構造解析

12 穴プレートに菌液を分注し、そこにスライドグラスを入れて、48 時間振とう培養後、スライドグラス表面に形成されたバイオフィームを 2.5% グルタルアルデヒドで固定し、走査型電子顕微鏡 (SEM) により解析を行った。

### (5) 運動能の測定

0.4% 軟寒天培地に菌を接種して 7 日間培養し、形成された Swarming (遊走円) の直径を測定して運動能とした。

## 4. 研究成果

相同組み換えによって Cm 耐性となったピロリ菌のゲノム DNA を抽出し、PCR で目的の変異遺伝子が挿入されていることを確認し、*spoT* 株を得た。変異株における増殖能および過酸化物質感受性を調べた結果、増殖能は野生株 (WT) と比較して亢進し、高い過酸化物質感受性を示した。これは種々の菌にみられる (p)ppGpp 欠損株の性質と一致していることから、作成した変異株は合成能を欠損していると考えられた。

次に、定着における (p)ppGpp の関与を検討するために、変異株のバイオフィーム形成能を WT と比較した。その結果、WT に対して *spoT* で有意にバイオフィーム量が低かった。さらに、バイオフィームの構造を観察したところ、WT ではせん形の細菌が多く見られたのに対し、

*spoT* では球菌状の細菌が多く検出された。ピロリ菌はらせん状の形態を示すが、ストレス環境下で球菌に変化することが知られている。この球菌は Coccoid form とよばれ、生理活性を一部保持しているものの増殖できないことが報告されている。*spoT* の形成するバイオフィームには球菌の菌が多く検出されたが、*spoT* のもつ高いストレス感受性によりバイオフィーム中で多数の Coccoid form が出現したものと考えられる。一方、*spoT* のバイオフィーム中に鞭毛様構造が多数検出された。そこで、(p)ppGpp の欠損が運動能に影響を与える可能性を考え、検討したところ、*spoT* は WT に対して運動能が有意に亢進していることが明らかとなった。

細菌は、付着時に鞭毛発現が低下し、それによりバイオフィームの高次構造が形成されると考えられている。本研究において、*spoT* が形成するバイオフィーム中で鞭毛様構造が多く観察されたことから、(p)ppGpp の欠損により、鞭毛の発現が抑制されず、結果的に過形成が生じ、これによってバイオフィーム形成量が低下したものと推察される。以上のことから、(p)ppGpp は鞭毛の発現調節を介してバイオフィーム形成に関わっている可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Yonezawa H, Osaki T, Hojo F, Kamiya S: Effect of *Helicobacter pylori* biofilm formation on susceptibility to amoxicillin, metronidazole and clarithromycin. *Microb Pathog* 2019 Apr 26. pii: S0882-4010(19)30449-8. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.030. [Epub ahead of print] (査読有)
2. Kamiya S, Yonezawa H, Osaki T: Role of probiotics in eradication therapy for *Helicobacter pylori* infection. *Adv Exp Med Biol* 2019 Apr 24. doi: 10.1007/5584\_2019\_369. [Epub ahead of print] (査読有)
3. Zaman C, Osaki T, Furuta Y, Hojo F, Yonezawa H, Konno M, Kurata S, Hanawa T, Kamiya S: Enhanced infectivity of strains of *Helicobacter pylori* isolated from children compared with parental strains. *J Med Microbiol* 68(4):633-641, 2019 doi:10.1099/jmm.0.000918 (査読有)
4. Osaki T, Zaman C, Yonezawa H, Lin Y, Okuda M, Nozaki E, Hojo F, Kurata S, Hanawa T, Kikuchi S, Kamiya S: Influence of intestinal indigenous microbiota on intrafamilial infection by *Helicobacter pylori* in Japan. *Front Immunol* 9:287. doi:

10.3389/fimmu.2018.00287. eCollection 2018. ( 査読有 )

5. Kato S, Osaki T, Kamiya S, Zhang X-S, Blaser MJ: *Helicobacter pylori sabA* gene is associated with iron deficiency anemia in childhood and adolescence. PLoS ONE 2017 Aug 30, 12(8):e0184046. Doi:10.1371/journal.pone.0184046. ( 査読有 )
6. Osaki T, Mabe K, Zaman C, Yonezawa H, Okuda M, Amagai K, Fujieda S, Goto M, Shibata W, Kato M, Kamiya S :Usefulness of detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from fecal specimens for young adults treated with eradication therapy. Helicobacter. 2017 Oct;22(5). doi: 10.1111/hel.12396. Epub 2017 May 22. PMID:28544222 ( 査読有 )
7. Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Hanawa T, Kurata S, Zaman C, Hojo F, Kamiya S: Diversification of the AlpB outer membrane protein of *Helicobacter pylori* affects biofilm formation and cellular adhesion. J Bacteriol. 2017 Feb 28;199(6). pii: e00729-16. doi: 10.1128/JB.00729-16. Print 2017 March 15, PMID:28031283 ( 査読有 )
8. Okuda M, Kikuchi S, Mabe K, Osaki T, Kamiya S, Fukuda Y, Kato M: Nationwide survey of *Helicobacter pylori* treatment for children and adolescents in Japan. Pediatr Int 59(1):57-61, 2017 doi: 10.1111/ped.13038. ( 査読有 )
9. 神谷 茂, 大崎敬子:尿素呼気試験(UBT)陽性反応を起こす *Helicobacter pylori* 以外の細菌、日本ヘリコバクター学会誌 19(2):117-122, 2018 ( 査読無 )
10. 米澤英雄、大崎敬子、花輪智子、蔵田 訓、神谷 茂 : *Helicobacter pylori*外膜タンパク質 AlpAの直接的および間接的に及ぼすバイオフィーム形成への影響、Bacterial Adherence & Biofilm 31:51-55, 2017 ( 査読無 )

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) Kamiya S, Yonezawa H, Osaki T, Hanawa T: Oral session :Pathogenic role of stringent response in oxidative stress response and biofilm formation of *Helicobacter pylori*. The 30<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy and Infection 2017, 24-27<sup>th</sup> Nov., 2017, Taipei, Taiwan ( 発表 26, Nov. )
- 2) Kamiya S: Clinical significance of urease-positive bacterial infections(Plenary lecture). The 25<sup>th</sup> Korean College of *Helicobacter* and Upper Gastrointestinal Research Annual Scientific Meeting, 7-8, April, 2017, Conrad Hotel Seoul, Seoul, Korea ( 発表 : 4 月 7 日 )
- 3) 宮岡千尋 , 花輪智子 , 川上速人 , 河野洋平 , 青山隆夫 , 神谷茂 : ピロリ菌のバイオフィーム形成に対する ppGpp 欠損の影響 . 日本薬学会第 138 年会 , 金沢 2017 年 3 月 25-28 日 .
- 4) Kamiya S: Intrafamilial infection of *Helicobacter pylori* (Plenary lecture), The 2<sup>nd</sup> International Conference on Mongolian Medicine Industry Expo and the Eurasia-Pacific University Alliance of Mongolian Medicine Academic Forum, 16-17, August, 2016, Tongliao, China( 発表日 : 8 月 16 日 )

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：花輪 智子

ローマ字氏名：Hanawa Tomoko

所属研究機関名：杏林大学

部局名：医学部

職名： 准教授

研究者番号（8桁）：80255405

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。