

令和 2 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17712

研究課題名(和文)ピロリ菌のシアル酸転移機構とその潜在的免疫修飾作用の解明

研究課題名(英文) Study on Helicobacter pylori sialylation and its potential immunomodulating activity

研究代表者

岩谷 駿 (IWATANI, SHUN)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：80608373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ある特定地域型のピロリ菌ゲノム上に、シアル酸転移機構関連の遺伝子クラスターが保存されていることを見出した。当該ピロリ菌株を用いた実験により、これら遺伝子クラスターが実際に発現していること、また、組換えタンパク質を用いた実験から、2種のシアル酸転移酵素(ST1/ST2)がそれぞれ酵素活性を有することが明らかとなった。これら一連の機構により、当該ピロリ菌は自身のもつリポ多糖(LPS)をシアリル化し、他のピロリ菌とは異なる抗原性を示すとともに、ヒト免疫細胞に対してより強い炎症性作用を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、一部のピロリ菌がシアル酸転移機構を有しており、自身の抗原性や病原性に影響を及ぼしていることが明らかとなった。これは、「ピロリ菌はシアル酸転移機構をもたない細菌である」という細菌学上の通説を覆す結果であり、同機構がピロリ菌の新たな病原因子であることを示す結果である。今後、同機構が新たな分子疫学マーカーとして評価されることで、新たなピロリ菌感染予防法、治療法の確立に貢献するものと期待する。

研究成果の概要(英文)：The present work has revealed that a gene cluster responsible for sialic acid synthetase (neuA, neuB, neuC) and sialyltransferase (ST1, ST2) is conserved in a particular type of Helicobacter pylori isolates. It has been confirmed that these genes are constitutively expressed in growing H. pylori, and that recombinant ST1 and ST2 proteins from H. pylori exhibit sialyltransferase activities. Due to the functions of these genes, ST positive H. pylori strains sialylated their lipopolysaccharides and showed different antigenicity from ST negative H. pylori strains. As compared to ST-negative H. pylori strains, ST-positive H. pylori strain induced higher amount of Interleukin 8, a key mediator associated with inflammation, from macrophage-like human cell lines.

研究分野：応用微生物学、医微生物学、分子微生物学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ ピロリ菌 シアル酸 シアル酸転移機構

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シアル酸は、ヒトをはじめとする哺乳動物の細胞表層糖鎖の先端に存在し、抗原認識や炎症反応、細胞のガン化、その他様々な生体反応に関与することが知られている。過去の研究から、一部の病原細菌がもつシアル酸転移機構(細胞表層糖鎖の先端にシアル酸を付加する)がヒトへの感染力や病原性を高めていることが明らかとなっている。

ヘリコバクター・ピロリ(以下、ピロリ菌)は、世界人口の約半数に感染する胃内病原細菌である。ピロリ菌のシアル酸転移機構に関する知見としては、1997~1999年の間に解読されたピロリ菌株ゲノム上に関連遺伝子の存在が認められなかったこと、これら基準株の糖鎖解析においてシアル酸修飾が確認されなかったことから、「ピロリ菌はシアル酸転移機構をもたない細菌である」が通説となっており、その後の再検証も行われていない。

2. 研究の目的

ピロリ菌は遺伝的多様性が高く、地域特異的に進化してきた細菌であることから、基準株とは異なる遺伝子情報、形質をもつものも多く存在すると考えられる。また、近年、他のヘリコバクター属細菌においてシアル酸転移機構に関与する遺伝子が発見されている。以上の背景から、本研究では「一部のピロリ菌にはシアル酸転移機構を有するものが存在し、これらはヒトへの感染性や病原性に影響を与えている」という作業仮説を立て、未だ全貌が明らかでないピロリ菌のシアル酸転移機構の有無、ならびにヒト免疫系への影響を分子疫学と分子生物学的手法の両面から検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シアル酸転移機構陽性ピロリ菌株の遺伝子スクリーニング

大分大学医学部環境予防医学講座の協力のもと、世界各地域から採取されたピロリ菌株を対象とした遺伝子スクリーニングを行い、シアル酸転移関連遺伝子(neuA, neuB, neuC, ST1/ST2)の有無とその発現パターンを解析した。

(2) 抗原抗体反応によるシアル化糖鎖の検出

各種ピロリ菌株からリポ多糖(LPS)を抽出し、抗シアルルLe^x抗体を用いたプロット解析を行った。また、ヒト由来シアル酸結合型レクチン(Siglec)との結合性試験を行った。

(3) ピロリ菌由来シアル酸転移酵素の発現・機能解析

各種ピロリ菌株から抽出したRNAを鋳型とする逆転写PCRを行い、シアル酸転移機構関連遺伝子の発現解析を行った。また、大腸菌発現系にピロリ菌由来ST1/ST2遺伝子をそれぞれクローニングし、精製した組換えタンパク質のシアル酸転移活性を確認した。

(4) ヒト免疫細胞に対する反応性試験

ヒト単球由来細胞株 THP-1 をマクロファージ様細胞に分化させ、各種ピロリ菌株に対する貪食作用、およびピロリ菌感染後の炎症性サイトカイン(IL-8)産生量を評価した。

4. 研究成果

(1) シアル酸転移機構陽性ピロリ菌株の遺伝子スクリーニング

ST遺伝子をターゲットとしたPCR検出、および周辺の遺伝子配列解析により計8株のST陽性株を見出した。これら8株のゲノム上に、シアル酸合成関連遺伝子(neuA, neuB, neuC)とシアル酸転移酵素遺伝子(ST1 および ST2 がタンデムに存在)が遺伝子クラスターを形成していることを確認した(図1)。MLST解析の結果から、これら8株はいずれもアメリカ・インディアン型(hspAmerind)に分類されるピロリ菌株であることが判明し、その他の地域グループに属するピロリ菌株からはST遺伝子群は検出されなかったことから、ピロリ菌とシアル酸転移機構との間には強い地域特異性が存在することが明らかとなった。

(2) 抗原抗体反応によるシアル化糖鎖の検出

上記の8株から抽出したLPSに対し、抗シアリルLe^x抗体を用いたブロット解析を行ったところ、8株中5株が陽性、3株が陰性という結果を得た。そこで、あらためて8株のST遺伝子群の詳細な配列解析を行ったところ、これら陰性の3株では、ST1/ST2がいずれも完全長で存在しない、または塩基欠損によるフレームシフトが起きていることが確認された。一方、ST1のみを完全長で有する株は、シアリルLe^x陽性を示したことから、ST1/ST2いずれか単独でもシアリル酸転移機能を有することが示唆された(図1)。また、ヒト由来Siglecに対する結合性試験の結果、ST陽性ピロリ菌はSiglec-4およびSiglec-11に対して高い親和性を示したことから、ピロリ菌の有するシアリル酸転移酵素は、α2,3型およびα2,6型でシアリル酸を転移することが示唆された。

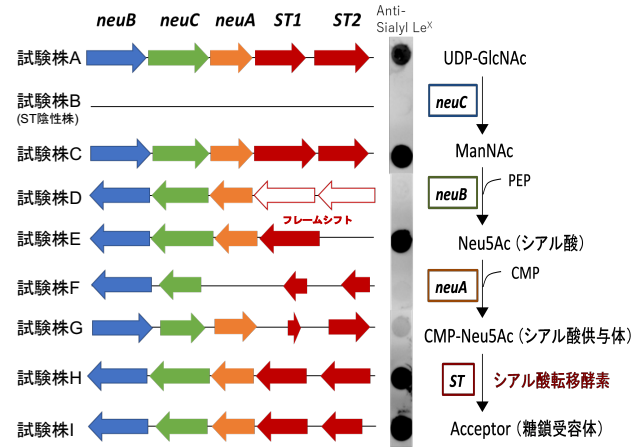


図1 試験株ゲノム上に確認されたシアリル酸転移機構関連遺伝子群(ST遺伝子群)と各試験株から抽出したLPSに対する抗シアリルLe^x抗体を用いたブロット解析結果

(3) ピロリ菌由来シアリル酸転移酵素の発現・機能解析

各試験株から抽出した mRNA を鋳型とする逆転写PCRの結果から、neuA, neuB, neuC, ST1, ST2 全ての遺伝子の発現を確認した。そこで、大腸菌発現系に試験株AのST1/ST2遺伝子をそれぞれクローニングし、精製組換えタンパク質の取得を試みた。精製用タグ2種(Hisタグ、GSTタグ)、大腸菌宿主4株(BL21(DE3)、Shuffle、C41(DE3)、C43(DE3))の組み合わせを試験し、もっとも可溶性画分の収量が大きかったC43(DE3)/GST-ST1、C43(DE3)/GST-ST2から組換えタンパク質の精製を行った。LacNAc(シアリル酸受容体)、CMP-Neu5Ac(シアリル酸供与体)の存在下で、組換えST1/ST2タンパク質のシアリル酸転移活性を確認した(図2)。

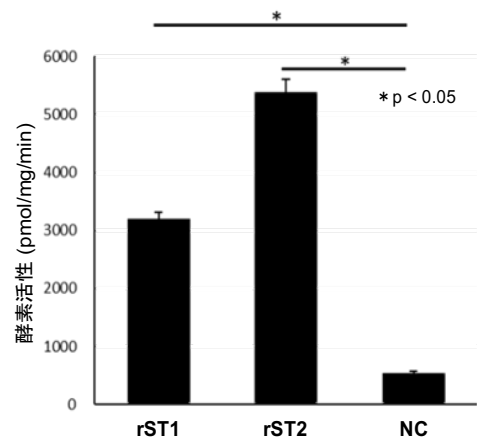


図2 組換えST1/ST2タンパク質のシアリル酸転移活性

(4) ヒト免疫細胞に対する反応性試験

マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞に対し、各種ピロリ菌試験株を反応させた結果、THP-1 細胞内への取り込み効率、およびその後の貪食効率に有意な差は確認されなかった。一方、パラホルムアルデヒド固定により死菌化したピロリ菌試験株を分化 THP-1 細胞に反応させ、24時間後のIL-8産生量をELISAにより測定した結果、ST陽性菌株において有意なIL-8産生量の増加が確認された。そこで、各種ピロリ菌株からLPSを抽出精製し、THP-1細胞感作によるIL-8産生誘導を確認したところ、ST陽性菌株から抽出精製したシアリル化LPSにおいて、顕著に高いIL-8産生誘導が確認された(図3)。

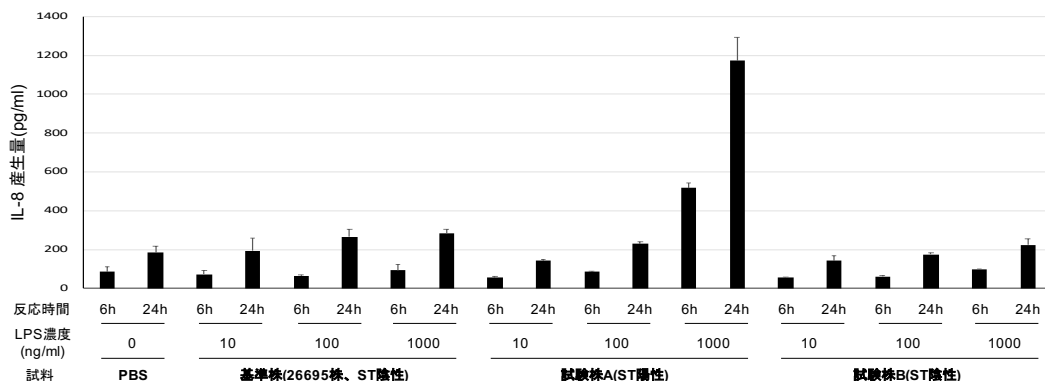


図3 各種抽出LPS感作後のTHP-1細胞におけるIL-8産生量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tejima Kengo, Ishiai Masanori, Murayama Somay O., Iwatani Shun, Kajiwara Susumu	4. 巻 64
2. 論文標題 Candida albicans fatty acyl-CoA synthetase, CaFaa4p, is involved in the uptake of exogenous long-chain fatty acids and cell activity in the biofilm	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 429 ~ 441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-017-0751-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shrestha Ronak, Shrestha Rajan, Qin Xian-Yang, Kuo Ting-Fang, Oshima Yugo, Iwatani Shun, Teraoka Ryutaro, Fujii Keisuke, Hara Mitsuko, Li Mengqian, Takahashi-Nakaguchi Azusa, Chibana Hiroji, Lu Jun, Cai Muyi, Kajiwara Susumu, Kojima Soichi	4. 巻 7
2. 論文標題 Fungus-derived hydroxyl radicals kill hepatic cells by enhancing nuclear transglutaminase	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-04630-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 船津光平、岩谷駿、梶原将
2. 発表標題 ヘリコバクター・ピロリのシアル酸転移機構に関する研究
3. 学会等名 第17回 微生物研究会「微生物分子生物学のフロンティア」
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Omar N, Iwatani S, Kajiwara S
2. 発表標題 Isolation and characterization of Cryptococcus neoformans urease complex.
3. 学会等名 The International Society for Human & Animal Mycology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nguyen HT, Inokawa N, Zhang R, Iwatani S, Holmes AR, Cannon RD, Kajiwara S
2. 発表標題 Involvement of <i>Candida albicans</i> Bgl2p, Ecm33p and Als1p in adherence to saliva-coated surfaces.
3. 学会等名 The International Society for Human & Animal Mycology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tenagy, Ishiai M, Iwatani S, Kajiwara S
2. 発表標題 Characterization of Acyl-CoA Synthetase Faa1p Involved in Fatty Acid Utilization of <i>Malassezia</i> spp..
3. 学会等名 The International Society for Human & Animal Mycology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Widiyanto TW, Chen X, Iwatani S, Chibana H, Kajiwara S
2. 発表標題 Role of MFS Transporter QDR2 in a Pathogen <i>Candida glabrata</i> .
3. 学会等名 The International Society for Human & Animal Mycology (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究協力者	山岡 吉生 (YAMAOKA YOSHIO)		