

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07074

研究課題名（和文）ヘリコバクター・シネディの特定のクローンに存在する新規のゲノム修飾の役割解明

研究課題名（英文）Role of a novel genomic modification found in a specific clone of *Helicobacter cinaedi*.

研究代表者

林原 絵美子（Rimbara, Emiko）

国立感染症研究所・細菌第二部・室長

研究者番号：20349822

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）：*Helicobacter cinaedi*の院内感染由来クローンに特異的に存在するPhosphorothioate化修飾（PT化修飾）を行うdnd遺伝子群について、欠損株を作製し研究を行った。まずSMRT法によりPT化を解析した結果、全標的モチーフのうち8.9%がPT化されていた。トランスクリプトーム解析の結果、欠損株ではDccSRやPtmGをコードする遺伝子が有意に発現減少していた。またCaco-2細胞への感染実験により、dnd遺伝子群の欠損により細胞障害性は増加することが分かった。以上の研究成果はPT化修飾が*H. cinaedi*の環境適応および病原性発現に寄与している可能性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PT化修飾は近年明らかになったばかりの細菌特有のDNA修飾であり、本研究ではPT化修飾が環境応答や病原性に寄与している可能性を示した。*Helicobacter cinaedi*は菌血症や蜂窩織炎の原因となる細菌であり、時に院内感染を引き起こす。今後*H. cinaedi*の菌株間の環境適応能や病原性の違いにおけるPT化修飾の新たな役割が解明されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The contribution of Phosphorothioate (PT) modification to pathogenicity and environmental responsiveness in bacteria is unclear.

We analyzed the PT modification of the dnd gene knockout *Helicobacter cinaedi* MRY08-1234 strain, and found that 8.9% of all target motifs were PT-modified. Expression of genes encoding DccSR and PtmG was significantly decreased by the dnd gene knockout. In addition, infection experiments with Caco-2 cells showed that knockout of the dnd gene increased cytotoxicity. These results indicate that PT modifications may contribute to environmental adaptation and virulence of *H. cinaedi*.

研究分野：細菌学

キーワード：*Helicobacter cinaedi* Phosphorothioate DNA

## 1. 研究開始当初の背景

細菌にはメチル化以外に第二の DNA 修飾として Phosphorothioate 化修飾 (PT 化修飾) が存在する (Wang, L *et al.* Nat Chem Biol 2007. 図 1). PT 化修飾は *dnd* 遺伝子群が担っており、メチル化修飾同様、標的配列を認識し PT 化修飾する。メチル化修飾と同様に自己 DNA を防御する役割が示唆されている (Xiong X *et al.* Nat Microbiol 2020) が、興味深いことに PT 化修飾ではメチル化修飾とは異なり、標的配列のうち完全に修飾されているのは 10% 程度であり、多くの標的配列の PT 化修飾率は 5% 以下である (Chen LJ *et al.* PLOS Genetics, 2019)。このような不均一な DNA 修飾が細菌にとってどのような役割をもつのかは不明な点が多い。

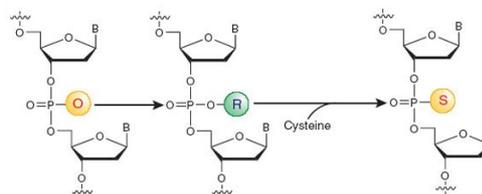


図 1. DNA の Phosphorothioate 化 (Nature Chemical Biology 2007)

一方研究代表者は *Helicobacter cinaedi* の院内感染由来クローン CC9 に着目し、CC9 に特異的な因子を探索した結果、*dnd* 遺伝子群の存在を見出した。メチル化修飾は様々な病原細菌でその病原性に関連していることが分っている (Sánchez-Romero *et al.* Curr Opin Microbiol. 2015) が、PT 化修飾については病原性や環境応答性への寄与は不明である。

## 2. 研究の目的

*Helicobacter cinaedi* の院内感染由来クローン CC9 が特異的に *dnd* 遺伝子群を持つこと着目し、Phosphorothioate (PT) 化修飾の役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

PT 化およびメチル化の検出と標的モチーフの決定

$\Delta dnd$  遺伝子群のノックアウト株 ( $\Delta dnd$  株) を作製し、SMRT 法による PT 化の標的モチーフ決定と PT 化の頻度の算出を行った。

*dnd* 遺伝子群の欠損による遺伝子発現変動の解析

$\Delta dnd$  株と野生株の遺伝子発現を RNA-Seq により比較解析した。また、発現に変化のあった遺伝子群と で明らかになる PT 化修飾部位との位置関係を精査した。

*dnd* 遺伝子群欠損株を用いた細胞感染実験

$\Delta dnd$  株と野生株の *in vitro* 感染実験により、細胞障害性を評価した。

## 4. 研究成果

PT 化およびメチル化の検出と標的モチーフの決定

SMRT 法により  $\Delta dnd$  株と野生株の DNA 修飾を比較することにより、PT 化の標的モチーフ決定を行った結果、モチーフは RGAGCY であることが分かった (図 2)。全モチーフ (4229 か所) のうち、PT 化されているのは 8.9% (376 か所) であった。*Vibrio cyclitrophicus* FF75 株 (PT 化の標的モチーフ: CCA) では全標的モチーフのうち 14%、*Escherichia coli* B7A 株 (標的モチーフ: GAAC/GTTC) では 12% しか PT 化されていないことが報告されており (Cao *et al.* Nat Commun. 2014) *H. cinaedi* においても同等の程度で標的モチーフが PT 化されていることが明らかになった。

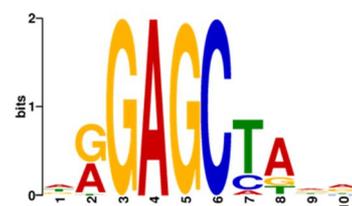


図 2. *H. cinaedi* MRY08-1234 株の PT 化標的配列

### *dnd* 遺伝子群の欠損による遺伝子発現変動の解析

$\Delta dnd$  株と野生株のトランスクリプトームを比較した結果、*Campylobacter* 属菌において感染成立に寄与する因子である二成分制御系 DccSR や鞭毛の糖鎖修飾に関連する PtmG をコードする遺伝子が有意に発現減少していた。さらに PT 化標的配列と PT 化が検出された部位の関係を精査した結果、PT 化標的配列は発現の減少が認められた遺伝子の CDS 内にも多く存在していた(図 3)。PT 化がどのように遺伝子発現変動をもたらすかは多くの疑問点があるが、細菌の PT 化修飾が宿主適応に関連する因子の発現を調節している可能性が考えられた。

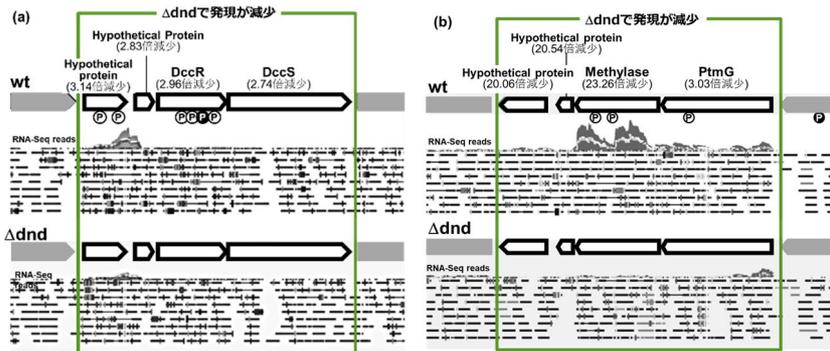


図 3 . *H. cinaedi* MRY08-1234 株の野生株 (wt) と *dnd* 遺伝子群欠損株 ( $\Delta dnd$ ) の RNA-Seq 解析で発現減少が認められた遺伝子 (a) DccSR と (b) PtmG における PT 化標的配列の位置  
 (○): PT 化標的配列であるが、PT 化が検出限界以下であった部位 . (●): PT 化標的配列で、PT 化が検出された部位

### *dnd* 遺伝子群欠損株を用いた細胞感染実験

$\Delta dnd$  株と野生株について、Caco-2 細胞への感染実験により、細胞障害性を LDH アッセイにより評価した。その結果、野生株の *H. cinaedi* 感染により認められる細胞障害活性は *dnd* 遺伝子群の欠損によりさらに増加することが分かった(図 4)。本現象は Caco-2 細胞だけでなく THP-1 細胞を用いた場合でも同様であった(図 4)。

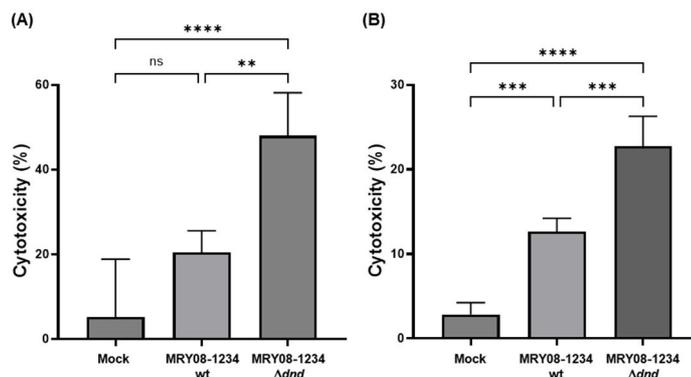


図 4 . Caco-2 細胞 (A) と THP-1 細胞 (B) における *H. cinaedi* MRY08-1234 株野生株 (wt) と *dnd* 遺伝子群欠損株 ( $\Delta dnd$ ) 感染による細胞障害性感染 24 時間後に LDH アッセイにより細胞障害性を評価した。

以上の研究成果は PT 化修飾が *H. cinaedi* の環境適応および病原性発現に寄与している可能性を示すものであり、今後 PT 化修飾がどのような機構で遺伝子発現制御などを介して Phenotype の変化をもたらしているのかを明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Aoki Sae, Mori Shigetaru, Matsui Hidenori, Shibayama Keigo, Kenri Tsuyoshi, Rimbara Emiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of HcaA, a novel autotransporter protein in <i>Helicobacter cinaedi</i> , and its role in host cell adhesion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 517170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.11.18.517170	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Jien Saito, Emiko Rimbara, Shingo Inaguma, Chihiro Hasegawa, Shinji Kamiya, Akihiro Mizuno, Yoshiaki Sone, Tatsuhiro Ogawa, Yukihide Numata, Satoru Takahashi, Miki Asano	4. 巻 28
2. 論文標題 Determining Infected Aortic Aneurysm Treatment Using Focused Detection of <i>Helicobacter cinaedi</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1494 ~ 1498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid2807.212505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 林原 絵美子	4. 巻 33
2. 論文標題 ヒトに感染する <i>Helicobacter</i> 属菌について	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本臨床微生物学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Kenji Yokota, Takako Osaki, Shunji Hayashi, Shin-Ichi Yokota, Hiroaki Takeuchi, Emiko Rimbara, Hinako Ojima, Toyotaka Sato, Hideo Yonezawa, Keigo Shibayama, Kengo Tokunaga, Shigeru Kamiya, Kazunari Murakami, Mototsugu Kato, Toshiro Sugiyama	4. 巻 Jun;27(3)
2. 論文標題 Establishment of a reference panel of <i>Helicobacter pylori</i> strains for antimicrobial susceptibility testing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 <i>Helicobacter</i>	6. 最初と最後の頁 e12874
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hel.12874	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tomohiko Yasuda, Hyun Seok Lee, Su Youn Nam, Hiroto Katoh, Yuko Ishibashi, Somay Yamagata Murayama, Hidenori Matsui, Hiroki Masuda, Emiko Rimbara, Nobuyuki Sakurazawa, Hideyuki Suzuki, Hiroshi Yoshida, Yasuyuki Seto, Shumpei Ishikawa, Seong Woo Jeon, Masahiko Nakamura, Sachiyo Nomura	4. 巻 Mar 21;12(1)
2. 論文標題 Non-Helicobacter pylori Helicobacter (NHPH) positive gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-08962-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Rimbara Emiko, Suzuki Masato, Matsui Hidenori, Nakamura Masahiko, Morimoto Misako, Sasakawa Chihiro, Masuda Hiroki, Nomura Sachiyo, Osaki Takako, Nagata Noriyo, Shibayama Keigo, Tokunaga Kengo	4. 巻 118
2. 論文標題 Isolation and characterization of Helicobacter suis from human stomach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2026337118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2026337118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Rimbara Emiko, Suzuki Masato, Matsui Hidenori, Nakamura Masahiko, Kobayashi Hirota, Mori Shigetaro, Shibayama Keigo	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Helicobacter suis Strain SNTW101c, Originally Isolated from a Patient with Nodular Gastritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01340-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mra.01340-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Sae Aoki, Shigetaro Mori, Hidenori Matsui, Keigo Shibayama, Tsuyoshi Kenri, Emiko Rimbara
2. 発表標題 Characterization of novel autotransporter protein HcaA in Helicobacter cinaedi
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Emiko Rimbara
2. 発表標題 Isolation and characterization of non-Helicobacter pylori Helicobacter species infecting human stomach
3. 学会等名 The 21th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rimbara E, Suzuki M, H. Matsui, M. Nakamura, M. Morimoto, C. Sasakawa, H. Masuda, S. Nomura, T. Osaki, N. Nagata, K. Shibayama, K. Tokunaga
2. 発表標題 Characterization Of Helicobacter Suis Isolated From Human Stomach
3. 学会等名 World Microbe Forum (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林原絵美子
2. 発表標題 ヒト胃に感染するヘリコバクター・スイスについて
3. 学会等名 第91回日本感染症学会西日本地方会学術集会、第64回日本感染症学会中日本地方会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木 沙恵、鈴木 仁人、森 茂太郎、柴山 恵吾、大野 耕一、見理 剛、林原 絵美子
2. 発表標題 3. イヌおよびネコの胃生検組織から分離された2つの新種Helicobacter属菌
3. 学会等名 第104回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rimbara E, Suzuki M, Tokunaga K, Mabe K, Nanjo S, Aoki S, Matsui H, Ohno K, Shibayama K, Kenri T.
2. 発表標題 Bacterial and genomic characteristics of non-Helicobacter pylori Helicobacter species, including Helicobacter suis
3. 学会等名 第27回日本ヘリコバクター学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 徳永 健吾， 林原 絵美子， 松井 英則， 鈴木 仁人， 大崎 敬子， 井田 陽介， 三好 佐和子， 長濱 清隆， 大野 亜希子， 三好 潤， 柴山 恵吾， 久松 理一， 岡本 晋
2. 発表標題 胃MALTリンパ腫におけるHelicobacter suis感染の関与
3. 学会等名 第100回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 仁人, 林原 絵美子, 松井 英則, 徳永 健吾, 柴山 恵吾
2. 発表標題 Helicobacter suis胃粘膜感染と病態発症
3. 学会等名 日本ヘリコバクター学会第26回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林原 絵美子(国立感染症研究所 細菌第二部), 松井 英則, 鈴木 仁人, 中村 正彦, 柴山 恵吾, 徳永 健吾
2. 発表標題 Helicobacter suis SNTW101株の培養成功と完全ゲノム配列の決定
3. 学会等名 日本ヘリコバクター学会第26回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林原絵美子、松井英則、鈴木仁人、中村正彦、柴山恵吾
2. 発表標題 Helicobacter suis SNTW101株の培養成功と完全ゲノム配列の決定
3. 学会等名 第25回日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井 英則, 林原 絵美子, 鈴木 仁人, 柴山 恵吾, 村山 そう明, 寺尾 秀一, 下山 克, 間部 克裕, 中村 正彦
2. 発表標題 培養、血清抗体を含めた新たな診断法- ヘリコバクター・スイス感染の迅速検査法の開発(II)
3. 学会等名 第25回日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林原絵美子、森茂太郎、金玄、鈴木仁人、柴山恵吾
2. 発表標題 Antimicrobial resistance in Helicobacter cinaedi
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井 英則, 林原 絵美子, 鈴木 仁人, 柴山 恵吾
2. 発表標題 ヘリコバクター・スイス感染症の診断のための定期健康診断の提案
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020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	青木 沙恵  (Aoki Sae)  (10908453)	国立感染症研究所・細菌第二部・研究員	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------