

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15598

研究課題名(和文)イルカの胃病変にヘリコバクター属細菌は関与するか? -VacAを指標に-

研究課題名(英文) Are *Helicobacter cetorum* and *Helicobacter delphinicola* involved in the gastric diseases of dolphins? -VacA as an indicator-

研究代表者

瀬川 太雄 (SEGAWA, Takao)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：50755600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：イルカに感染する*Helicobacter cetorum*(HC)および*Helicobacter delphinicola*(HD)の病原性を推測するために、両種が産生するVacA様毒素に対する受容体の同定を試みた。その結果、一部のHCはスフィンゴミエリンを介して毒素活性を示すことが明らかになった。HDは培養細胞にVacA様の毒素活性を示すことは明らかになっているが、その遺伝子配列は明らかになっていない。そこでHDの全ゲノム解析を行い、vacA様遺伝子を明らかにすることを試み、VacA様遺伝子を同定することに成功した。今後、HDのゲノム配列から予想されたVacA様遺伝子の機能解析を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イルカにおいて胃潰瘍や胃炎は難治性疾患の一つである。しかし、その主原因は解明されていないため、適切な診断法や治療・予防法の開発が進まず、多くの飼育下イルカが胃病変を患っている現状がある。本研究により一部のHCがイルカに対して病原性を示す可能性がある結果が得られた。今後病原性を示すHCを特異的に検出する簡易診断法や適切な治療・予防法が開発することで世界中で飼育されているイルカを今より健康的に飼育することが可能になる。従って本研究は、世界的にイルカの動物愛護に関して批判の声が多い日本が世界に先駆けて発信できる成果になると期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to evaluate the virulence of *Helicobacter cetorum* (HC) and *Helicobacter delphinicola* (HD) to dolphins, we attempted to identify the receptors for the VacA-like toxins produced by both species. We found that some HC exhibits sphingomyelin-mediated toxin activity. HD showed VacA-like toxin activity in some culture cells, but the gene sequence has not been determined. We attempted to identify that vacA-like genes by whole genome analysis of HD, and succeeded in identifying the vacA-like gene. In the future, we plan to perform functional analysis of the vacA-like gene predicted from the HD genome sequence.

研究分野：海洋細菌学

キーワード：イルカ ヘリコバクター VacA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イルカにおいて胃潰瘍や胃炎は難治性疾患の一つであり、その原因としてヘリコバクター属細菌の関与が 20 年以上疑われている。これまでにイルカは、ヒトの胃病変に關与する *Helicobacter pylori* (ピロリ菌) と近縁関係にある *Helicobacter cetorum* (HC) に感染することが明らかになっている (Harper *et al.*, 2000)。HC の発見時から、イルカは HC 以外のヘリコバクター属細菌にも感染していることが遺伝子解析により示唆され、申請者は独自に考案した特殊な培地を用いることでイルカから HC 以外のヘリコバクター属細菌を分離することに成功した。解析の末、本細菌はピロリ菌と近縁関係にある新種のヘリコバクター属細菌であることが判明し、イルカから分離されたことに因んで本細菌を *Helicobacter delphinicola* (HD) と命名した (Segawa *et al.*, 2020)。

HC および HD が胃病変の原因になるのであれば、これらは胃病変の発生に關わる物質を産生すると考えられる。事実、ピロリ菌は胃病変を惹起する物質を複数産生している。そこで本研究は、「HC および HD は、イルカの胃病変を惹起する物質を産生するか？」を研究課題の核心をなす学術的「問い」として設定した。

この問いに応えるため、申請者はまず HC および HD が哺乳類細胞を傷害する物質を産生するか調べた。その結果、HC および HD はサル腎臓由来の Vero 細胞を膨化させ、細胞内に空胞を形成させる物質を産生し、さらに HC はヒト子宮頸由来の HeLa 細胞を死滅させる物質を産生することが確認された (Segawa *et al.*, 2020)。

2. 研究の目的

HC はピロリ菌で知られる唯一の外毒素である細胞空胞化毒素 (VacA) の類似遺伝子を持つことが報告されている (Kersulyte *et al.*, 2013)。ピロリ菌の VacA に暴露した Vero 細胞の所見は、申請者が調査した HC および HD の産生する物質に暴露した Vero 細胞の所見と極めて類似していることから、HC および HD は VacA 様物質を産生すると考えられる。

そこで本研究は、HC および HD が産生する VacA 様物質によりイルカの胃組織は傷害されるかを調べ、イルカに感染するヘリコバクター属細菌が胃病変の発症に關わるか推測することを目的とする。

3. 研究の方法

2020 年度はコロナ禍の影響により、試薬類の入手遅延・委託の遅れがあり、思うような実験ができなかった。研究当初の予定では、HC および HD 産生 VacA 様毒素に対する受容体はアフリカミドリサルの培養細胞等、イルカ類以外の培養細胞を用いて受容体を同定し、イルカ類からクローニングした本受容体を VacA 様毒素非感受性細胞に強制発現させ、

これに VacA 様毒素を暴露することで、イルカ類が VacA 様毒素に感受性を持つ受容体を有するか検討していく予定であった。本研究はイルカ類の培養細胞があれば直接的に評価が可能で、より正確なデータを得られるが、研究計画当初に長期的に利用できるイルカ類の培養細胞が存在しなかったため、上記のような計画にせざるを得なかった。このような中、申請者が 2021 年度に着任した日本大学生物資源科学部獣医衛生学研究室には長期的に利用可能なバンドウイルカの腎由来培養細胞 (TK-ST) が樹立されていた (未発表データ)。そこで本培養細胞を用いて、まず (1) 本培養細胞が HC および HD 産生の VacA 様毒素に感受性を示すかを調査した。そして感受性を示した場合は (2) 受容体の同定を行い、イルカへの毒性を評価した。また (3) HD に関しては全ゲノム解析を実施し、毒素遺伝子の探索を行った。

4. 研究成果

(1) バンドウイルカ腎由来培養細胞 (TK-ST) を用いた HC および HD 細胞毒性試験

HC の培養上清に暴露した TK-ST の生存率は有意に低下した。細胞死が起こった培養細胞の形態をギムザ染色を用いて観察したところ、細胞質内に明瞭な空胞が形成されていた。この空胞はニュートラルレッド取り込み試験から VacA により形成された細胞変化と推測された。これらの結果から、TK-ST は HC が産生する VacA 様毒素に対して受容体を持つことが明らかになった。一方で HD では有意な細胞生存率の低下や細胞形態の変化は確認されなかった。このことから TK-ST は HD 産生の VacA 様毒素に対する受容体を持たないことが推測された。

(2) HC 産生 VacA 様毒素の受容体解析

HC が産生する VacA 様毒素は *Helicobacter pylori* が産生する VacA と類似した構造を持つことが明らかになっている (Segawa et al., 2020)。*Helicobacter pylori* で明らかになっている VacA 受容体の遺伝子発現 (RPTPα, EGFR, LRP1 および SMS1 and 2) を HC 産生 VacA 様毒素感受性の HeLa 細胞、非感受性の SCH 細胞および TK-ST を用いて調べた。HC 産生 VacA 様毒素に感受性を示した TK-ST および HeLa 細胞は対象とした全ての遺伝子が検出された (図 1)。一方、HC 産生 VacA 様毒素に対して非感受性の SCH 細胞では、スフィンゴミエリン合成酵素である SMS 遺伝子が検出されなかった。この結果からスフィンゴミエリンが HC 産生 VacA 様毒素の受容体であると推測された。そこで次に TK-

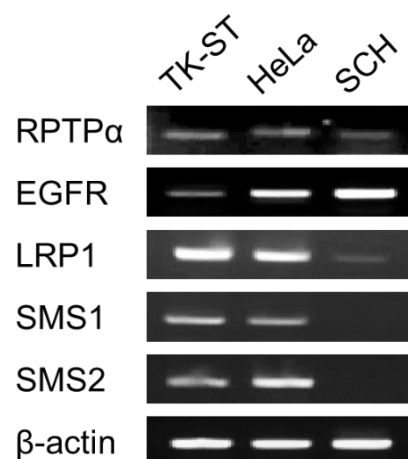


図 1. VacA 受容体遺伝子の発現解析

ST をスフィンゴミエリン分解酵素 (SMase) で処理することで VacA 様の毒素活性が消失

するか 2 株の HC (TSW 株および OM 株) を用いて検討した . その結果 , TSW 株では , SMase 処理 TK-ST において VacA 様の毒素活性が有意に低下したが , OM 株ではその活性に変化は認められず , HC の株間で VacA 様毒素の受容体が異なる可能性が示唆された . 以上 , 本解析よりスフィンゴミエリンが HC 産生 VacA 様毒素の受容体の一つであることが明らかになった . また HC はスフィンゴミエリン以外の受容体を介して毒性を発揮することが推測されたため , 今後 HC のイルカへの毒性を明らかにするためには , スフィンゴミエリン以外の受容体を特定する必要がある .

(3) HD の全ゲノム解析

Helicobacter delphinicola TSB 株および TSZ 株の全ゲノム解析を実施した . TSB 株および TSZ 株の完全長ゲノムサイズは , それぞれ 1.49Mb および 1.47Mb であり , GC 含量は 39.5% と 39.6% であった . また TSB 株および TSZ 株からそれぞれ 1,409 と 1,395 種の CDS が同定され , TSB 株で 299 種 (21.2%) , TSZ 株で 295 種 (21.1%) が機能不明の CDS であった . TSB 株および TSZ 株の CDS を比較した際 , TSB で 99 種 , TSZ で 86 種の独自 CDS を保有していたが , 機能的な差異を示す CDS は見出せなかった . 平均ヌクレオチド同一性 (ANI) 解析では , TSB 株と TSZ 株で 98.4% の , 類縁種である HC とは 71% の同一性を示した . 次に TSB 株および TSZ 株のゲノム中に VacA 様遺伝子があるか探索した . *Helicobacter pylori* や HC の *vacA* 遺伝子は *cysS* 遺伝子と連結して配置している特徴があるが , TSB 株および TSZ 株の *cysS* 遺伝子の近傍に *vacA* 様遺伝子は存在しなかった . 次に TSB 株および TSZ 株のゲノム中に *Helicobacter pylori* および HC の *vacA* 遺伝子と 30 ~ 40% の相同性を示す VacA 様タンパク質が存在した . だが類似タンパク質の推定アミノ酸配列上にはシグナルペプチドが存在せず , 分泌性のタンパク質でない可能性があった . 今後 , HD のゲノム配列から予想された VacA 様タンパク質の組換え体を作成し , その機能を調査していく予定である .

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Segawa T, Ohno Y, Tsuchida S, Ushida K, Yoshioka M	4. 巻 141
2. 論文標題 Helicobacter delphinicola sp. nov., isolated from common bottlenose dolphins Tursiops truncatus with gastric diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diseases of Aquatic Organisms	6. 最初と最後の頁 157 ~ 169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3354/dao03511	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

1. 著者名 Takahashi Rikiya, Sakai Mai, Kogi Kazunobu, Morisaka Tadamichi, Segawa Takao, Ohizumi Hiroshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Prey Species and Foraging Behaviour of Indo-Pacific Bottlenose Dolphins (Tursiops aduncus) Around Mikura Island in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquatic Mammals	6. 最初と最後の頁 531 ~ 541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1578/AM.46.6.2020.531	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀬川太雄
2. 発表標題 イルカの感染症予防に寄与するドルフィンフードの開発
3. 学会等名 第4回つくみイルカ研究シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀬川太雄
2. 発表標題 鯨類に感染するヘリコバクター属細菌の病原性
3. 学会等名 飼育野生動物栄養研究会2020年度大会（招待講演）
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------