

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301  
研究種目：奨励研究  
研究期間：2023～2023  
課題番号：23H05330  
研究課題名 薬剤耐性ピロリ菌の除菌をめざした治療用ファージの感染機構の研究

## 研究代表者

内山 伊代 (Uchiyama, Iyo)

岡山大学・医学部・客員研究員

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 480,000円

研究成果の概要：ピロリ菌は、胃炎・胃潰瘍や胃がんを発症することが知られている。近年、薬剤耐性ピロリ菌の増加により除菌困難となり、細菌を溶菌するバクテリオファージを利用した感染症治療法の可能性が期待されている。我々はピロリ菌に感染するファージKHP30を世界に先駆けて分離した。本研究では、優れた治療用ファージの創出のための基礎的情報収集のために、吸着機構の解明を行った。はじめに、KHP30の構造情報から、吸着に関するタンパク質を予測した。次に、候補タンパク質の吸着性を検討した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、KHP30ファージには、他のファージ一般的に見られるスパイクタンパク質などの吸着に関わるタンパク質が見つからなかった。構造情報より、吸着に関わると予測された構造体が3つ予測された。このようなファージの構造は、これまでに報告されておらず、世界で初めてのファージの構造であり、このファージの吸着機構の解明は学術的な意義は極めて高い。また、ファージの吸着機構が明らかにされれば、将来、導入されるであろうファージ療法の開発に大きく寄与すると考えられる。そのため、社会的意義は高い。

研究分野：細菌

キーワード：ピロリ菌 バクテリオファージ ピロリ菌ファージ

1. 研究の目的

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は、グラム陰性らせん桿菌であり、胃粘膜に持続感染する。日本人の約 25% が感染している。ピロリ菌感染により、胃炎・胃潰瘍・十二指腸炎や胃がんを発症する。現在では抗菌薬を使用した除菌が主流であるが、薬剤耐性ピロリ菌 (特にクラリスロマイシン耐性) の増加で除菌が困難となり問題となっている。そのため、新規の治療法の開発が急務である。

ファージ療法とは、バクテリオファージ (ファージ) の溶菌活性を利用した感染症治療法である。ファージは抗菌薬とは作用機序が異なるため、薬剤耐性菌にも有効である。近年、欧米諸国では薬剤耐性菌に対するヒトへの臨床試験も行われはじめ、今後、期待される治療法である。より優れた治療用ファージの創出には細菌への感染効率を上げることが重要である。感染効率の向上には、ファージの宿主菌への吸着が第一義的に重要であり、その機構を詳細に理解する必要があると考えられる。

我々はピロリ菌に感染するファージ KHP30 を世界に先駆けて分離し、KHP30 の研究を行ってきた [1-7]。ピロリ菌においても薬剤耐性が問題となっており、KHP30 を利用したファージ療法の可能性が考えられる。ピロリ菌ファージ療法の研究開発には、吸着機構を解明する必要がある。本研究では、ピロリ菌に対するファージ療法の研究開発を目指して、KHP30 構造情報を基にして、ピロリ菌ファージの吸着機構を研究する。

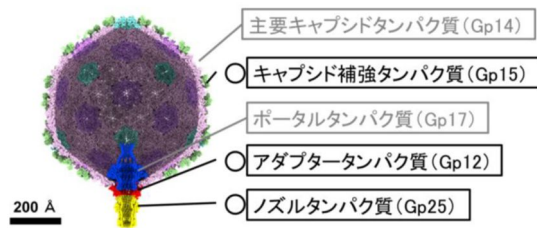


図 1. KHP30 の全構造 .

2. 研究成果

本研究では、クライオ電顕による KHP30 単粒子解析により、KHP30 全構造を解明した。申請者は、ファージの大量培養を行い、ファージの精製を行った。クライオ電子顕微鏡 (Titan Krios; Thermo Fisher Scientific) を使用し、6,364 画像から 32,655 粒子を解析し、3次元再構成に成功した [8, 9]。その結果、Gp14 は主要キャプシドタンパク質、Gp15 はキャプシド補強タンパク質、Gp17 はポータルタンパク質、Gp12 はアダプタータンパク質、Gp25 がノズルタンパク質であることを明らかにした。構造の特徴から、吸着に關与するタンパク質 (Gp12, Gp15, Gp25) を予想した (図 1)。KHP30 の頭部タンパク質が細菌表層に付着し、転がって尾部 (Gp12, Gp25) が吸着する新しい感染モデルを考えた。

次に、Gp12, Gp15, Gp25 のタンパク質をピロリ菌に対する吸着能を確認すべく、大腸菌を使用したタンパク質発現を行った。はじめに、大腸菌体内での可溶化する可能性を検証すべく、Soluprot v1.0 を使用して、大腸菌体内で可溶化の可能性を検証した。その結果、Solubility score はそれぞれ、Gp12 は 0.476、Gp15 は 0.795、Gp25 は 0.527 と予測され、Gp15 のみが可溶化する可能性が高いことが示唆された。また、Gp12, Gp15, Gp25 の予想分子量は、それぞれ 22.6 kDa、13.5 kDa、29.7 kDa であった。

pUC19 ベクターへ Gp12, Gp15, Gp25 遺伝子の PCR クローニングを行った。使用したプライマーは表 1 に示した。また、クローニングしたタンパク質をコールドショックタンパク質発現用ベクター-pColdII (N 末端に 6xHis が結合した融合タンパク質発現ベクター) へ組み込み、BL21 株の中で IPTG 誘導した場合としなかった場合の大腸菌を SDS-PAGE で電気泳動した (図 2A)。その結果、IPTG の誘導により、Gp12, Gp15, Gp25 の発現が見られた。次に、IPTG 誘導した大腸菌のペレットを超音波破碎により、破碎し、不溶化画分 (ペレット) と上清に分け、SDS-PAGE で分

表 1. 研究に使用したプライマー .

Primer	Sequence (5' to 3')
KHP30_gp12_F	CGGTACCCGGGGATCCATATGATAGAAGTTAGCGAAGTTATAG
KHP30_gp12_R	CGACTCTAGAGGATCTCTAGAACTCGCACTACTTTACTAAAATGAA
KHP30_gp15_F	CGGTACCCGGGGATCCATATGAAACAAAAGTTACACAGCGTTA
KHP30_gp15_R	CGACTCTAGAGGATCTCTAGAACTCCACTTCAATTACGCCTC
KHP30_gp25_F	CGGTACCCGGGGATCCATATGGATACAACACGATTTATAAGG
KHP30_gp25_R	CGACTCTAGAGGATCTCTAGAGCTCATCCTTTCTTTAATTATTCCG

離した(図2B)。また、上清に Co2 + レジンへ吸着し、レジンを SDS-PAGE で電気泳動した。その結果、Gp12 および Gp25 は可溶化予測と同様に可溶化した状態で分離できなかった。一方、Gp15 は、予想と一致して、可溶化した状態で組み換えタンパク質が分離できることが明らかとなった。Gp12 および Gp25 に関しては、今後、GST などの可溶化タグを融合させたもので可溶化した Gp12 や Gp25 の作製を行っていきたい。

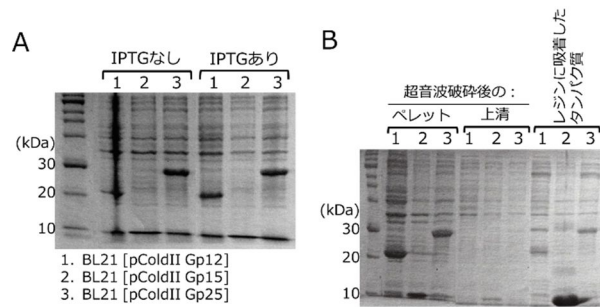


図2. KHP30 の Gp12, Gp15, Gp25 の組み換えタンパク質の作製.

最後に、Gp15 の細菌への非特異的な吸着の可能性を考え、Gp15 の吸着性の検討を行なった。Gp15 溶液と洗浄した細菌(ピロリ菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌)と混和し、30分37℃で培養したのち、遠心分離した上清をウエスタンブロットで検出した(図3)。その結果、黄色ブドウ球菌と大腸菌に対しては、弱い吸着性が認められた。ピロリ菌は、培養を固形培地で実施し、PBSで洗浄するときに凝集してしまったことが吸着性へ影響した可能性を考えた。今後、このタンパク質の更なる検討を行なうことを予定している。

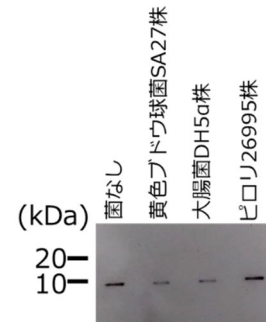


図3 Gp15, Gp25 の組み換えタンパク質の細菌への吸着性試験.

#### 参考文献

1. Uchiyama J, Takeuchi H, Kato S, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S. Complete genome sequences of two *Helicobacter pylori* bacteriophages isolated from Japanese patients. *Journal of Virology*, 86(20), 11400-11401, 2012.
2. Uchiyama J, Takeuchi H, Kato SI, Gamoh K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S. Characterization of *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(10), 3176-3184, 2013.
3. 竹内啓晃, 内山淳平, 松崎茂展, 森本徳仁, 杉浦哲郎. *Helicobacter pylori* のファージに関する基礎研究. *Helicobacter Research*, 17(5), 400-405, 2013.
4. 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 Letters*, 363(16), pii: fnw157, 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*, 20(5), 470-474, 2016.
6. 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*, 164(6), 877-882, 2018.
7. Kamiya R, Uchiyama J, Matsuzaki S, Murata K, Iwasaki K, Miyazaki N. Acid-stable capsid structure of *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30 by single-particle cryo-electron microscopy. *Structure*, 30, 300-312.e3, 2022.
8. 内山淳平, 神谷亮佑, 宮崎直幸, 村田和義, 岩崎憲治, 松崎茂展. ピロリ菌ファージ 分離から構造決定まで. *日本ヘリコバクター学会誌* 25(2), 68-73, 2024.
9. Naoyuki Miyazaki, Ryosuke Kamiya, Shigenobu Matsuzaki, Kazuyoshi Murata, Jumpei Uchiyama, Kenji Iwasaki. Cryo-EM structure of a short-tailed bacteriophage, *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30. *Communication Biology*, submitted, 2024.

主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

研究組織（研究協力者）

氏名	ローマ字氏名
----	--------