

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590697

研究課題名(和文)ピロリ菌固有の独自進化した細胞分裂システム(細胞死含)とその病原性の解明

研究課題名(英文)Molecular analysis of pathogenesis and the unique machinery of cell division in Helicobacter pylori

研究代表者

竹内 啓晃(TAKEUCHI, Hiroaki)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：90346560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌固有の細胞分裂機構の解析をminC,D,E遺伝子を中心に行った。MinC,D,Eは形態形成(伸長化)の制御に関与していた。さらに、各遺伝子破壊株を作成し免疫染色(FtsZ抗体)にて比較解析した結果、MinCはFtsZの凝集(Z-ring polymerization)に関与しMinDはnucleic occlusion制御作用を有すると考えられた。MinEはFtsZの局在や凝集に影響は与えなかったが、coccoid形成には重要な役割を担っていると思われた。また、遺伝子多型性に関与していると思われるピロリ菌ファージ(球形ファージ)を世界で最初に発見し報告した。

研究成果の概要(英文)：Bacterial cells precisely divide, coordinated by many molecular components including Min proteins and FtsZ. However, the role of Min proteins in *H. pylori* is little known. We investigated the function of Min proteins with a wild-type HPK5 and HPK5-derivative mutants constructed. All disruptants were filamentous with few minicells. These genes maintained the cell morphology. The lowest coccoid form appeared in minE-disruptant, indicating that MinE contributes to the coccoid conversion at the stationary phase. FtsZ was dispersed throughout a cell in only minD-disruptant by immunofluorescence microscopy, revealing that MinD is involved in conduct of FtsZ localization. These showed the intrinsic characteristics of *H. pylori* Min proteins and provided new insights to understand the cell division of *H. pylori*. Furthermore, we first discovered new spherical phages (KHP30 and KHP40) from 2 clinical isolates.

研究分野：臨床検査医学(微生物・感染症学)

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 細胞分裂制御システム 形態形成 minCDE ftsZ cdrA coccoid

1. 研究開始当初の背景

ヒト胃内に持続感染するピロリ菌は genetic diversity が強く機能不明遺伝子も多く、増殖様式や細胞分裂機序も不明である。その一方で我々が発見した本菌固有 *cdrA* 遺伝子等の存在が明らかとなり本菌固有の機能が示唆される。本菌には多くの細菌で認められる細胞分裂関連遺伝子 (*ftsZ*, *minC*, *minD*, *minE*) も存在するがその相同性は低い。

2. 研究の目的

本菌の細胞分裂機序を細胞分裂関連遺伝子 (*ftsZ*, *minC*, *minD*, *minE*) を中心に解析し本菌固有の機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子変異株の作成

野生株 HPK5 の遺伝子変異 (破壊) 株を Km 遺伝子にて insertion mutant として 5 株作成した (*minC*, *minD*, *minE*, *minCD*, *minDE*: 以下 *minC*, *minD*, *minE*, *minCD*, *minDE* 株)。

(2) 各種抗体の作成

遺伝子変異株の作成: 各抗原 (FtsZ, MinC, MinD, MinE) は目的遺伝子をクローニング後、His 融合蛋白を作成しウサギ免疫にて抗体を作成した。抗 MinE 抗体はペプチド合成を抗原として使用した。各種抗体の特異性を確認後、免疫染色やウェスタンブロット解析 (免疫沈降) に使用した。

(3) 形態観察

各種変異株はグラム染色および SEM (走化型電子顕微鏡) にてその形態を詳細に観察し野生株と比較解析を実施した。

(4) 免疫染色

野生株を含む 6 株にて FtsZ 抗体等でその蛋白局在・分布状態を解析し、菌体内での分子間相互作用の解析に免疫沈降後ウェスタンブロットを実施した。

(5) ウェスタンブロット解析

4 つの抗体 (抗 FtsZ, MinC, MinD, MinE 抗体) を使用し野生株にて免疫沈降後ウェスタンブロットを実施しその結合性を解析した。結合性を確認するために免疫沈降およびウェスタンブロットに使用した抗体は相互に交代使用し反応性 (分子間結合) を確認した。

(6) FtsZ の chase assay

FtsZ の細胞内動態を解析するため、野生株を含む各遺伝子破壊株 (1 遺伝子破壊株) の合計 4 株にて培養 72 時間まで FtsZ 動態をウェスタンブロットにて追跡した。

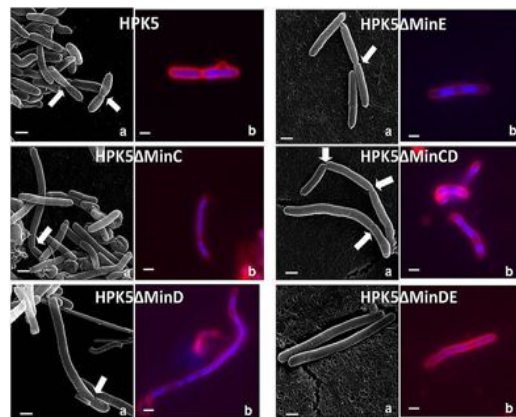
4. 研究成果

(1) 形態学的観察

グラム染色では全 5 破壊株は野生株に比し

有意に伸長化した。特に *minC*, *minD* の伸長化は著しかった。経時培養による形態変化では 24 時間以降の stationary 期になると *minE* 株は野生株に比べて coccoid の出現数が少なく高い CFU を認めた。また、SEM 所見では、*minE* 株以外の変異株は細胞中央部を外れた場所で分裂が起こっているが *minE* 株は野生株と差を認めず、細胞中心で分裂が行なわれていた (Fig.1)。

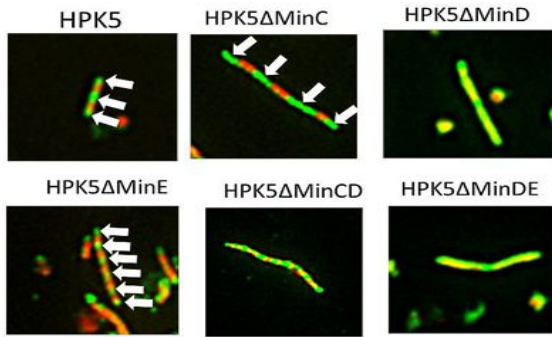
以上より、MinC,D,E は形態形成 (長軸制御) に関与し、さらに MinE は変態 (coccoid conversion) 誘導を制御していることが強く示唆された。また、MinC,D は分裂部位の決定に強く関わっていることを明らかにした。



(Fig.1) SEM (左) と免疫染色 (右) 所見。全 5 破壊株は伸長化し、SEM では菌体に括れた細胞分裂部位 (矢印) を認める。野生株と *minE* 株はほぼ菌体中央に認めるがそれ以外の破壊株では菌体中央を外れた位置で細胞分裂が行なわれている。免疫染色では染色体 (紫) と膜 (赤) を観察することができる。

(2) FtsZ の局在性解析

作成したピロリ菌特異的 FtsZ 抗体を使用し免疫染色を実施後、FtsZ の細胞内局在を解析した (Fig.2)。その結果、野生株と *minE* 株は細胞中央および細胞両極にリクルートされた FtsZ がドット状に観察された。一方で *minC* 株は染色体を避け野生株や *minE* 株と同様な位置に FtsZ は局在するが、その染色性は 2 株 (野生株と *minE* 株) とは異なり diffuse した状態であった。また、*minD* 株は染色体の存在には無関係に細胞内全体に disperse して観察された。以上より、MinC は FtsZ の凝集 (重合 Z-polymerization) に関与し、MinD は nucleic occlusion を制御していると考えられた。MinC と *minD* 株でランダムに認められた異常部位での細胞分裂 (細胞中心外) は、少なくともこのような細胞内の FtsZ 局在・重合の不安定状態に起因している可能性が強く示唆された。

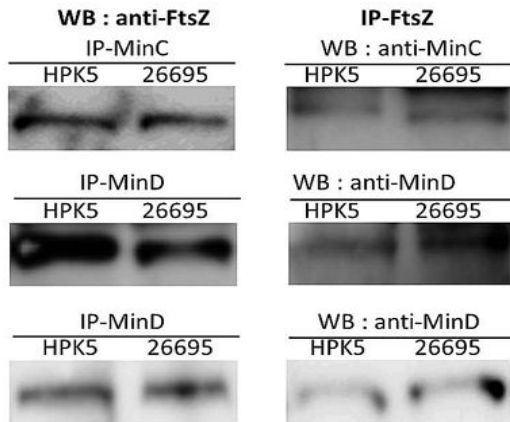


(Fig.2)作成抗体(抗 FtsZ 抗体)による免疫染色所見

菌体内の FtsZ は緑色で観察され局在を示す(矢印)。染色体は赤く観察され、overlap した場所は黄色として観察される。全 5 破壊株は野生株同様に染色体の複製および分離は認められる。minD を破壊した株では染色体の位置に関係なく FtsZ が細胞内全体に disperse しているのが観察される。MinC 株では FtsZ が染色体間に diffuse して存在している。

(3) 免疫沈降後ウェスタンプロット解析

作成した各種抗体を使用し免疫沈降後にウェスタンプロットを実施し、Min 蛋白と FtsZ 蛋白間の菌体内分子相互作用・結合性について解析した (Fig.3)。菌株は野生株 2 株 (HPK5 と 26695 株) を使用した。結果、2 株とも FtsZ と各 Min 蛋白の細胞内での結合が確認された。従来の報告では一部、検出困難との報告もあったが、我々が作成した抗体を使用することで蛋白間の結合が明らかにできた。ただ、直接的か間接的結合かの問題は不明であり今後は vitro での解析にてその点を明らかにしていく予定である。また、断定はできないが、FtsZ 抗体で免疫沈降後 Min 蛋白を検出すると、そのバンド強度が Min 蛋白間で異なることから、FtsZ に対する親和性および結合モルが各 Min 蛋白間で異なることが示唆された。

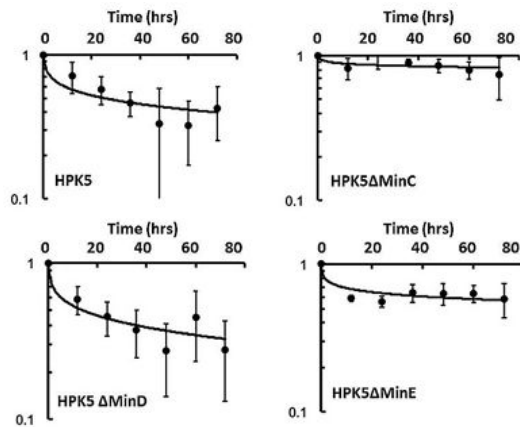


(Fig.3) 免疫沈降後ウェスタンプロット
左: 各種 Min 抗体で免疫沈降後、FtsZ 抗体でウェスタンプロットを実施した。右: FtsZ 抗

体で免疫沈降後、各種 Min 抗体でウェスタンプロットを実施した。共に結果は整合性があり各 Min 蛋白と FtsZ は菌体内で結合(補助成分・蛋白の存在は不明)することが明らかとなった。

(4) Chase assay (FtsZ)

細胞内 FtsZ degradation を解析するため野生株と各 Min 遺伝子破壊株を使用し経時的に測定を行ないその値を比較した (Fig.4)。MinE 株はやや遅延するが野生株と有意な差は認めなかった。一方で、MinC 株は著しく FtsZ degradation が遅延していた。逆に minD 株では野生株より FtsZ degradation は有意に亢進することが明らかとなった。以上より、MinC と D は細胞内 FtsZ degradation を相反的に制御している可能性が示唆された。特に minD 株は FtsZ の局在が細胞内に disperse することから MinD 欠損により FtsZ の安定性喪失(或いは積極的 degradation 亢進)が FtsZ の量的減少あるいは、構造的(質的)・機能的劣化を誘導し、その結果制御不能(破綻)となり正確な細胞分裂部位へのリクルートができずランダムな細胞内局在となっていると考えられた。



(Fig.4) FtsZ chase assay

72 時間まで各菌体内(野生株 HPK5 と 3 つの min 遺伝子破壊株)の FtsZ 量を定量的に追跡した。野生株と比較すると MinE 株は差を認めないが、MinC 株は著しく FtsZ の degradation が遅延し、MinD 株では著しく亢進している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

Sugiura T, Yamanaka S, Takeuchi H, Morimoto N, Kamioka M, Matsumura Y. Autoimmunity and pulmonary hypertension in patients with Graves' disease. Heart and vessels. 査読有、2014 [Epub ahead of print]

DOI:10.1007/s00380-014-0518-3

Morimoto N, Takeuchi H, Nishida Y,

Morisawa M, Yoshikawa T, Morita T, Morimoto M, Sugimoto C, Matsumura Y, Sugiura T. Clinical application of the DiversiLab microbial typing system using repetitive- sequence-based PCR for characterization of *Helicobacter pylori* in Japan. J Clin Lab Anal. 査読有、00:1-4.2014 [Epub ahead of print] DOI:10.1002/jcla.21758

Okamoto T, Nishikawa J, Yanai H, Nakamura H, Takeuchi H, Kurai S, Akada J, Sakaida I. In vitro bactericidal effects of near-ultraviolet light from light-emitting diodes on *Helicobacter pylori*. Scand J Gastroenterol. 査読有、48:1484-1486. 2013. DOI:10.3109/00365521.2013.837953)PMID :24063529

Trang VT, Son VH, Thanh LX, Sarter S, Shimamura T, Ukeda H, Takeuchi H. Functional properties of Maillard reaction product in food: Antimicrobial activity of aminoreductone against the pathogenic bacteria. Food Science and Technology Research. 査読有、19:833-841.2013

Uchiyama J, Takeuchi H, Kato S, Gamoh K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S. Characterization of *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30. Applied and Environmental Microbiology 査読有、79:3176-3184. 2013 DOI: 10.1128/AEM.03530-12

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. J. Virol. 査読有、86:11400-114001. 2012 DOI: 10.1128/JVI.01767-12.

Morishita K, Takeuchi H, Morimoto N, Shimamura T, Kadota Y, Tsuda M, Taniguchi T, Ukeda H, Yamamoto T, Sugiura T. Superoxide dismutase (SOD) activity of *Helicobacter pylori per se* from 158 clinical isolates and the characteristics. Microbiol. Immunol. 査読有、56:262-272. 2012 DOI: 10.1111/j.1348-0421.2012.00433.x

[学会発表](計 48 件)招待講演 3 件含む
Nishida Y, Umeda A, Morimoto N, Matsumura N, Sugiura T, Takeuchi H. Functional analysis of Min system and

FtsZ in the cell division of *Helicobacter pylori*. 114th ASM General Meeting. 5.17-20.2014 MA(USA)

竹内啓晃 ヘリコバクター・ピロリ関連疾患の病態解析と臨床検査診断 第 60 回日本臨床検査医学会総会 10.31-11.3 2013 神戸・神戸国際会館(学術賞受賞講演)

竹内啓晃 *Helicobacter pylori* のファージに関する基礎的研究 第 19 回日本ヘリコバクター学会 6.29-30.2013 長崎・長崎大学(招待講演)

Uchiyama J, Takeuchi H, Sakaguchi Y, Gamo K, Kato S, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Daibata M, Matsuzaki S. A novel type of spherical bacteriophage, *Helicobacter pylori* bacteriophage KHP30. 5th Congress of European Microbiologists. 7.21-25.2013 Leipzig, Germany

Hataguchi Y, Takeuchi H, Nakagawa K, Ikegami Y, Sugiura T. Translational research based on the potential of Refined Deep-Seawater (RDSW) which may control tumor growth. 2nd International Conference on Translational Medicine. 8.5-7.2013. Chicago USA

Kadota Y, Takeuchi H, Umeda A, Morimoto N, Nishida Y, Sugiura T. Functional analysis of *minC*, *D* and *E* genes of *Helicobacter pylori*. 113th ASM General Meeting. 5.18-21.2013 Colorado USA

Takeuchi H. A privilege of sea and its application for human health -Evaluation of refined deep-seawater (RDSW) for *Helicobacter pylori* colonization and intestinal flora condition in human- The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference. 7.13-16.2012 Kochi Japan (招待講演)

Trang VT, Thanh LX, Takeuchi H. Study of Antimicrobial Activity of Aminoreductone against the Antibiotic Susceptibility and Resistant Pathogenic Bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. International Conference on Nutrition and Food Sciences. 7.23-24.2012 Singapore

Morimoto N, Takeuchi H, Kadota Y, Nishida Y, Kumon Y, Sugiura T. Analyzing for the pathophysiology of *Helicobacter pylori*-associated cITP via human platelet-*H. pylori* outer membrane

protein interaction. 112th ASM General meeting. 6.15-19.2012 CA(USA)

Morishita K, Takeuchi H, Shimamura T, Morimoto N, Kadota Y, Tsuda M, Taniguchi T, Ukeda H, Sugiura T, Yamamoto T. Superoxide dismutase (SOD) of *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients with gastroduodenal diseases. 112th ASM General meeting. 6.15-19.2012 CA(USA)

〔図書〕(計 5件)

竹内啓晃、森本徳仁、杉浦哲朗 Rinsho Byori p440-449. 2014

Takeuchi H, Trang VT, Morimoto N, Nishida Y, Matsumura Y, Sugiura T. World J. Gastroenterology. p8971-8978. 2014

竹内啓晃 日本ヘリコバクター学会誌 95 (34-35) 2014

Trang VT, Thanh LX, Takeuchi H. Nutrition and Food Sciences. International Association of Computer Science & Information Technology Singapore. 256 (183-187) 2012

Takeuchi H, Shimamura T, Kudo H, Ukeda H, Sugiura T Curr. Res. in Agriculture & food Chem. 85 (1-12) 2012 RESEARCH MEDIA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 啓晃 (TAKEUCHI, Hiroaki)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：90346560

(2) 研究分担者

公文 義雄 (KUMON, Yoshio)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：40215033
H24.4.1-H24.8.10 まで研究分担者

杉浦 哲朗 (SUGIURA, Tetsuro)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：50171145

森本 徳仁 (MORIMOTO, Norihito)
高知大学・医学部附属病院・その他
研究者番号：60398055