法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

PDF issue: 2025-07-04

ピロリ菌の塩基切り出し型制限酵素は胃がんの原因か？

小林, 一三 / KOBAYASHI, Ichizo

(雑誌名 / Journal or Publication Title)
科学研究費助成事業 研究成果報告書
(開始ページ / Start Page)
1
(終了ページ / End Page)
7
(発行年 / Year)
2021-06-08

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　６ 月　８ 日現在

機関番号：３２６７５
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2019～2020
課題番号：１９Ｋ２２５４３

研究課題名（和文）ピロリ菌の塩基切り出し型制限酵素は胃がんの原因か？

研究課題名（英文）Does H. pylori base-excision restriction enzyme cause stomach cancer?

研究代表者
小林　一三（Kobayashi, Ichizo）

法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・研究員

研究者番号：３０１２６０５７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：私たちは、塩基を切り出す新型の制限酵素を発見し「ピロリ菌が、それをヒト細胞に送り込み、ゲノムに変異を作り癌を起こす」と提唱している。
　大腸菌の変異生成検出株で，この制限酵素を発現すると、変異頻度が２桁上がった。 胃がんのゲノム変異が、この制限酵素の認識配列で高い事を示した。ヒト胃上皮由来の細胞株への感染で，染色体切断に関与していることを示した。ピロリ菌ゲノムで、この遺伝子の存在と胃がん由来との高い関連を示した。この酵素で多様化選択が起きたサイトを調べ、それを立体構造・機能と結びつけ、ヒト細胞移行のモデルを得た。
　これらの結果は上の仮説を強く支持する。

研究成果の学術的意義や社会的意義
胃がんは，ヒトの生存に対する世界的な脅威である。その主因はピロリ菌であることは解明されたが，発がんのしくみは不明のままであった。私達は，塩基切り出し型という新しい制限酵素を発見し，「ピロリ菌が，その酵素によってヒトゲノムを作り変えることが，胃がんの原因」という仮説を提唱した。
　本研究では，この仮説を支持する強い証拠を，変異生成実験，ヒト染色体切断定量，胃がんゲノムの情報解析，タンパク機能進化解析から得た。
　結果は，胃がんの診療に貢献し，新薬／ワクチンで胃がんを根絶する展望を与える。「細菌によるヒトゲノム書き換え」の概念は，「マイクロバイオームとの共生体」としてのヒトと疾患の理解に新展望を開く。

研究成果の概要（英文）：We earlier discovered base-excision restriction enzyme family and proposed that H. pylori send its family member to human cells to cause stomach cancer. We demonstrated that induction of this enzyme increases mutagenesis by one to two orders of magnitude in an E. coli mutagenesis tester strain. We demonstrated that mutations in stomach cancer are elevated at its recognition site. We demonstrated that this enzyme contributes to chromosome breakage in H. pylori-infected human cells. We demonstrated strong association between the presence of its gene and stomach cancer in H. pylori genomes. We identified amino-acid residues of diversifying selection in this genes, related them to protein 3D structure and built a 3D model for transport to human cells.

研究分野：微生物ゲノム科学

キーワード：胃がん　ピロリ菌　制限酵素　塩基切り出し　変異生成　がんゲノム　DNA切断

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

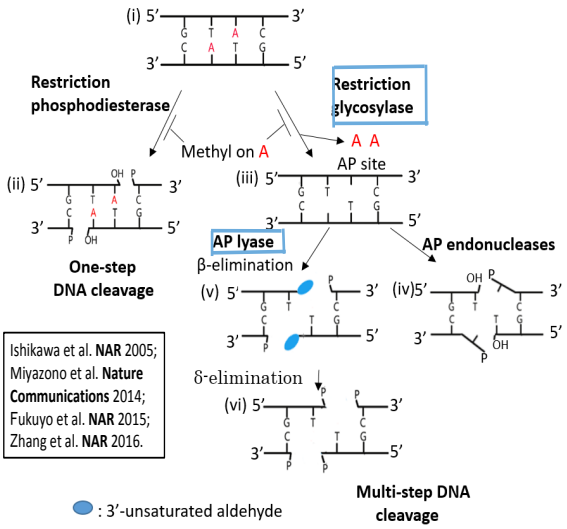
１．研究開始当初の背景

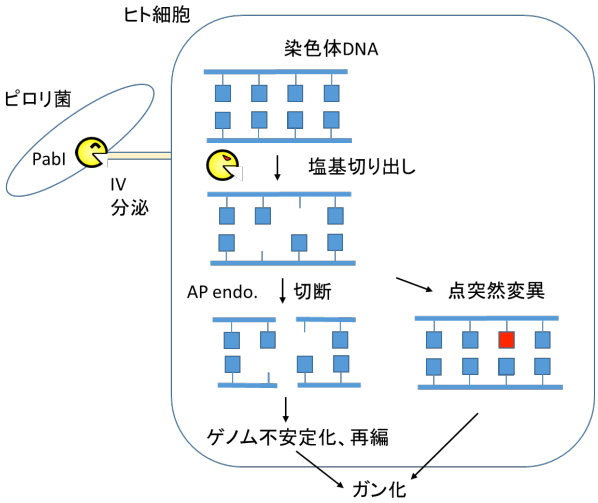
胃がんは，年に世界で 80 万人日本で 5 万人の命を奪っている。その主因は，世界人口の半数に感染するピロリ菌であることが明らかになったが，発がんに至るしくみはほとんど分かっていない。

２．研究の目的

私たちは，塩基を切り出す新しい型の制限酵素を発見し，ピロリ菌がそれをヒト細胞に送り込みゲノムを書き換えることが，胃がんの原因であるという仮説を提唱した。この仮説を多面的に検証することを目的とした。

塩基切り出し型制限酵素





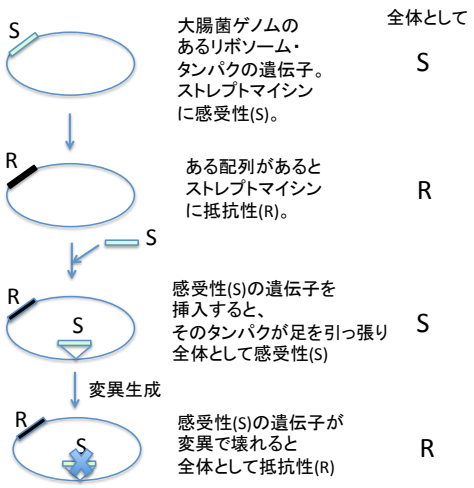
３．研究の方法

(1) 大腸菌での変異生成実験，
(2) ヒト細胞感染での染色体切断，
(3) 胃がんゲノムでのこの酵素の認識配列での変異生成，
(4) この遺伝子の存在と胃がんとの関連，
(5) この酵素の分子進化解析，立体構造予測を行なった。

４．研究成果

(1) 大腸菌での変異生成実験

変異生成実験。大腸菌のリボソームタンパク遺伝子の不活化をストレプトマイシン耐性変異生成によって検出する変異レポーターが作られている。この菌の遺伝子型を、塩基切り出し制限酵素を誘導発現させる大腸菌に組み込んだ。誘導しない時には、クロレラ由来 DNA メチル化酵素をアラビノースで発現させて染色体損傷を防ぐ。この制限酵素を発現すると、ストレプトマイシン耐性変異頻度が 2 桁上がることを示した。耐性クローンの集合について、Illumina シーケンサーの解読による標的遺伝子の変異スペクトルを「ゲノム支援」と解析中である。



大腸菌での変異スペクトルの測定

(2) ヒト細胞感染での染色体切断
塩基切り出し制限酵素遺伝子を持つピロリ菌標準株とその遺伝子を KO した株とを、ヒト胃上皮由来の細胞株に感染させ、染色体切断(DNA 両鎖切断)の程度を比較した。染色体切断は、パルスフィールドゲル電気泳動と DNA の切断末端に形成される gamma-H2AX の出現を抗体での可視化することで検出した。それによって、HpPabI がヒトの染色体切断に関与していることを示した。
HpPabI を介した染色体切断には AP 部位を切断する AP エンドヌクレアーゼが関与することが予測される。そこで、ヒト AP エンドヌクレアーゼ APE1 が染色体切断に関与しているか検証した。APE 1 をノックダウンした細胞に PabI 発現ベクターをトランスフェクションさせ、HpPabI を発現させると、APE 1 をノックダウンしたときにヒト染色体の切断が抑制される効果が見られた。この結果から、HpPabI によるヒト染色体の切断は、ヒトの AP エンドヌクレアーゼを介して発生していることを明らかにした。

(3) 胃がんゲノムでのこの酵素の認識配列での変異生成,

公開データベース中の胃がんのゲノム変異が、この制限酵素の認識配列で高い事を示した。特に MIS (microsatellite instability)タイプでは、それが高かった。

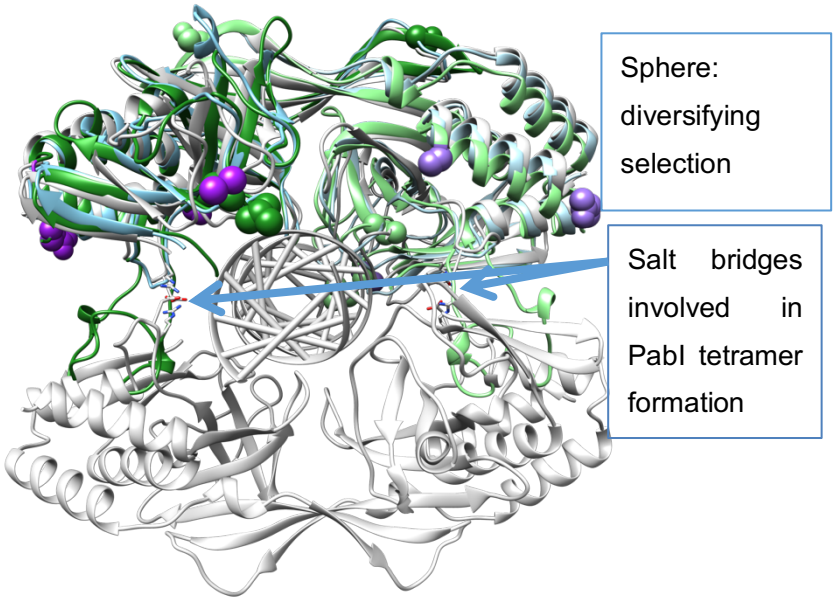
(4) この遺伝子の存在と胃がんとの関連,

東アジア由来のゲノム解読済みのピロリ菌で、由来する病態が「胃がん」か「非胃がん」かを調べた。それらの株で、この塩基切り出し制限酵素遺伝子の遺伝子サイズがインタクトであることと「胃がん」との関連が得られた。

(5) 分子進化解析, 立体構造予測

この酵素の変異の解析から、多様化選択が起きたサイト(dN/dS > 1)を明らかにした。立体構造決定済みの好熱菌ホモログを鋳型に,その立体構造を予測した。DNA にまたがって Cag 分泌装置からヒト細胞へ移行するというモデルを作った。

PabI dimer and HPAG1 model dimer
superimposed onto PabI tetramer bound to non-specific DNA



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計4件（うち査読付論文　0件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 Ichizo Kobayashi, Katsuhiro Hanada	４．巻 2119
２．論文標題 Detection of DNA double-strand breaks by pulsed-field gel electrophoresis of circular bacterial chromosomes	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Methods in Molecular Biology (DNA Electrophoresis: Methods and Protocols)	６．最初と最後の頁 145-154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0323-9_13	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 Katsuhiro Hanada	４．巻 2119
２．論文標題 Introduction and perspectives of DNA electrophoresis	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Methods in Molecular Biology (DNA Electrophoresis: Methods and Protocols)	６．最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0323-9_1	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 Inoue N, Narahara H, Nishida Y, Hanada K.	４．巻 2119
２．論文標題 Detection of bleomycin-induced DNA double-strand breaks in Escherichia coli by pulsed-field gel electrophoresis using a rotating gel electrophoresis system	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Methods in Molecular Biology (DNA Electrophoresis: Methods and Protocols)	６．最初と最後の頁 155-163
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0323-9_14	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 Terabayashi T, Tokumaru A, Ishizaki T, Hanada K.	４．巻 2119
２．論文標題 Analysis of chromosomal DNA fragmentation in apoptosis by pulsed-field gel electrophoresis	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Methods in Molecular Biology (DNA Electrophoresis: Methods and Protocols)	６．最初と最後の頁 89-99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0323-9_8	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 －

〔学会発表〕　計4件（うち招待講演　1件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 I. Kobayashi, K. Hanada, M. Fukuyo, K. Yahara, H. Yonezawa, Ceslovas Venclovas, Y. Katsura, H. Yano, N. Takahashi, A. Toyoda, S. Nishiumi, T. Azuma, M. Kato
２．発表標題 ピロリ菌の塩基切り出し型制限酵素が胃がんを起こす？
３．学会等名 第78回日本癌学会学術総会
４．発表年 2019年

１．発表者名 小林一三
２．発表標題 Base-excising Restriction Enzymes
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 I. Kobayashi, K. Hanada, M. Fukuyo, K. Yahara, H. Yonezawa, C. Venclovas, Y. Katsura, A. Toyoda, S. Nishiumi, T. Azuma, M. Kato
２．発表標題 H. pylori base-excision restriction enzyme: an oncoprotein?
３．学会等名 The 32nd International Workshop of the EHMSG (European Helicobacter and Microbiota Study Group)（国際学会）
４．発表年 2019年

１．発表者名 小林一三
２．発表標題 ピロリ菌1000株ゲノム比較から現れる100の病原因子
３．学会等名 第26回日本ヘリコバクター学会学術集会（招待講演）
４．発表年 2021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
研究分担者	花田　克浩 (Hanada Katsuhiro) (90581009)	大分大学・医学部・助教 (17501)	
研究分担者	大崎　敬子 (Osaki Takako) (90255406)	杏林大学・医学部・教授 (32610)	

	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	高橋　規子 (Takahashi Noriko)	杏林大学・医学部・研究員	
研究協力者	米澤　英雄 (Yonezawa Hideo) (60453528)	杏林大学・医学部・講師 (32610)	
研究協力者	福世　真樹 (Fukuyo Masaki) (40639085)	千葉大学・大学院医学研究院・助教 (12501)	
研究協力者	桂　有加子 (Katsura Yukako) (00624727)	京都大学・霊長類研究所・助教 (14301)	

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			
リトアニア	Vilnius University, Vilnius			