

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659199

研究課題名(和文)ピロリ菌毒素 VacA の遺伝子発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of gene expression of Helicobacter pylori VacA

研究代表者

平山 壽哉 (HIRAYAMA, Toshiya)

長崎大学・熱帯医学研究所・教授

研究者番号：50050696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌の VacA 産生について、ピロリ菌培養における種々の条件の検討によりこの毒素の産生を促す因子および培養条件の検討を加えてきた。種々の濃度のウシ血清、サイクロデキストリンを液体培地に添加し、ピロリ菌の生育および VacA 産生量の比較を検討した。その結果、血清濃度に比例してピロリ菌の増殖が増加し、5% ウシ血清に 0.1% サイクロデキストリンを添加した 37 度、72 時間、5% 二酸化炭素下の微好気培養条件において最も菌の生育と毒素産生が促されていた。さらに、VacA の発現と分泌に機能すると考えられるピロリ菌体内因子の検索についても抗 VacA 抗体を用いたアフィニティカラムを用いて検討を試している。

研究成果の概要(英文)：To define the stimulatory factor of VacA toxin production from Helicobacter pylori, we have examined the culture condition under controlling the concentration of some additions. The liquid culture medium containing 5% bovine serum plus 0.1% cyclodextrin conferred highest bacterial growth and toxin production at 37°C for 72 h-cultivation in ambient air containing 5% CO₂. We have also assessed whether bacterial cytosolic protein contributes gene expression and secretion of VacA focusing on interaction of mature and in mature toxin using anti-VacA antibody conjugated column chromatography.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ VacA 細菌毒素 毒素発現

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリは胃炎、消化性潰瘍、胃癌、MALTリンパ腫など各種消化器疾患の起病性が明らかになっている。我が国における本菌感染者は、5000万人以上と推定されているが、消化性潰瘍の患者数は約100万人であり、胃癌総患者数は数十万人にすぎず、その大半は無症候性の胃炎を起こすのみである。ピロリの小児で最も感染しやすいことから母子感染（感染している母親がかみ砕いた食物を与えるなど）であるとされていて、適切な除菌治療を施さなければ生涯にわたって持続感染している。したがって数十年の感染を経ての一部の成人に認められる潰瘍、癌、リンパ腫の発症とその後の臨床経過には本菌の病原因子とそれに対する宿主側の免疫を始めとする生体防御反応が重要であり、発症の病態生理の理解に基づく適切な治療が必要である。

最近の分子疫学的解析を通して、本菌の有する複数の遺伝子と病原性との関連が指摘され、なかでも4型分泌装置で宿主細胞へ注入されるエフェクター分子 CagA は胃癌との関連が強く示唆されている。一方、申請書らは、本菌が分泌する毒素 VacA がミトコンドリア障害と細胞死を引き起こすこと (J.Biol.Chem.(2006) 281:11250)、加えて VacA が胃炎、胃潰瘍を発症させることを、VacA の受容体 (受容体型チロシンホスファターゼ: RPTP□) 欠損マウスを用いて証明した (J.Biol.Chem.(1999)274:36693, Nat. Genet.(2003) 33:375, 総説: *Tohoku J Exp Med.* 2010)。興味深いことに、細胞増殖と胃癌に関係する *cagA* 遺伝子と細胞死及び胃潰瘍に関係する *vacA* 遺伝子はゲノム上まったく独立して存在するにもかかわらず、VacA 毒素産生菌株はほぼすべて *cagA* 陽性であり、CagA と VacA 毒素の共存が本菌感染において菌側に何らかの有利な状況(例えば、CagA が VacA の無秩序な胃組織の崩壊に因る「菌の生息場所の消失」を回避させるなど)を作り出す可能性が考えられる。一方 *vacA* 遺伝子はすべての菌株

が保有するが、VacA 毒素を産生・分泌する菌は全体の 50%程度にとどまる。このように VacA がピロリ感染による疾病に強く関わるにもかかわらず、*vacA* 遺伝子に関する研究は遺伝的多様性解析以外には、国内外ともにほとんど研究がない。

2. 研究の目的

VacA は唯一の蛋白毒素であり、菌体内での産生や分泌される過程で切断などの修飾を受け、更には分泌後においてもその高次構造を大きく変化させてホロ毒素として空胞化活性などの多様な毒性を発現している。しかしながら、「VacA 遺伝子はすべての菌株が保有するにもかかわらず、ホロの VacA 毒素を産生・分泌して細胞毒性などが検出できる菌は 50%程度にとどまる」ことが知られている。そこでこうした事実の背景と仕組みを知り、疾病予防と治療戦略立案に資する分子基盤を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 液体培養下での *vacA* 遺伝子発現の解析

vacA 遺伝子発現は現状として不明な点が多いのが現状であり、はじめに *vacA* 遺伝子発現に対するより多くの情報を収集することを目的として、*vacA* 遺伝子の各培養条件下(温度・pH・浸透圧・酸化的ストレス存在下・低栄養・各種栄養素存在下・金属イオン存在下など)液体培養における *vacA* 遺伝子発現パターンの経時変化を、空胞活性およびタンパク質レベルに反映された発現であるのかを念頭に VacA 抗体を用いたウエスタンブロット法にて解析を行った。

(2) *vacA* 遺伝子破壊株の作製と VacA タンパク質過剰発現株の作製

vacA 遺伝子を破壊したピロリ菌株は、相同組換え法によりその作製が終えて保有していた(J Biol Chem. 2009)。この株については VacA 抗体を用いた western blotting により確認した。また、かつて大腸菌での

VacA 大量発現実験ではインクルージョンボディとなり生物活性を殆ど有していなかったことから、発現ベクターの選択が課題である。

(3) VacA と相互作用する菌体内因子の同定

VacA 遺伝子破壊株と野生株を使用して、VacA と相互作用が認められるピロリ菌内の因子の存在を明らかにする。そのために、培養した各菌株から調製した菌体破砕液を、VacA 抗体を固定化したアフィニティカラムを調製し、このカラムに VacA を介して結合している VacA と相互作用をもつ蛋白質の同定を計画した。尚、2次元電気泳動法することにより発現量の変化が認められるタンパク質の有無を確認するとともに、その後、変化が認められたタンパク質のアミノ酸配列を決定し、因子の同定を行い、得られたデータを northern blotting にて検証することを計画した。

4. 研究成果

vacA 遺伝子発現制御に以下の研究に焦点を絞り取り組んだ。

(1) *vacA* 遺伝子の発現制御因子の同定：

vacA 遺伝子の発現制御する因子についての報告は全くない。そこで、本研究では様々な培養条件下における *vacA* 遺伝子の発現パターンを確認し、制御が認められる条件や因子の同定を試みた。

VacA の精製は無血清培地に 0.1%のサイクロデキストリンを加えて培地を作製し、用いた。これは血清添加培地では精製の過程で血清からの持ち込み物質およびその分解物などの除去が難しいために、VacA の産生が少なくてもその後の精製過程が少なくすむ無血清培地を用いた。しかし、ウシ血清など各種栄養素、サイクロデキストリン、鉄などの金属イオンをブルセラ培地に添加し、ピロリ菌の増殖の速度と生育

および VacA 産生量の比較を、2 4 時間、4 8 時間。そして7 2 時間まで培養を行って検討した。その結果、顕著に差が認められたのは、用いた血清濃度に比例してピロリ菌の増殖が著明に増加した群（無血清 / 0.1%のサイクロデキストリン培地に比べて生育速度が約3 倍増加していた）であり、培養中に生成される生育阻害物質の除去に有効と考えられているサイクロデキストリンの添加は毒素の産生を促した。VacA 産生量は対数増殖期から増加し、ピロリ菌の増殖に連動していた。この産生パターンは、対数増殖期の後期から培養上清中に放出される破傷風菌の破傷風毒素の産生パターンとは異なっていた。VacA 産生のとくに微好気条件下での液体浸透培養によるピロリ菌の培養は、他の好気性細菌と異なり生育が遅く、前培養として血液寒天培地での大量の菌の前培養と液体培地への植菌が必要とされた。そのために、菌の同調培養が期待通りに十分に行われているかどうか、さらに、培養中に認められる球形のピロリ菌の存在も、この培養法での VacA 毒素産生の検討に多くの複雑な条件検討が必要であること、実験の難しさを示唆していた。血清の如何なる因子がピロリ菌の生育と VacA 毒素産生を促しているかについては、クオラムセンシングに機能するオートインデューサーの関与を含め今後の課題となった。

(2) *vacA* 遺伝子発現制御メカニズムの解析：1 つの遺伝子が発現する際、多くの場合で他の因子との相互作用により発現が制御されている。そこで、本研究では *vacA* 遺伝子の発現を制御する菌体内因子の同定とその作用機序の解明を試みた。培養した各菌株から調製

した菌体破砕液を、VacA 抗体を固定化したアフィニティカラムを調製し、このカラムに VacA を介して結合している VacA と相互作用をもつ蛋白質の同定を計画した。そのために、まず、VacA 抗体を固定化したアフィニティカラムの調製を行った。抗 VacA 抗血清の調製は家兔に精製 VacA 標品を投与、獲得した血清を IgG に精製してカラム作製に供した。精製した IgG 画分を Coupling buffer に溶媒置換し、CNBr-activated Sepharose 4B と反応させた後に Blocking 処理して調製した。

尚、申請時に計画に挙げた *vacA* 遺伝子を破壊したピロリ菌株は調製できたが、VacA 毒素過剰発現株の作製については、以前大腸菌での VacA 大量発現実験ではインクルージョンボディとなり生物活性を殆ど有していなかったことから、発現ベクターの選択が課題として残った。この実験では、*vacA* 遺伝子破壊株と野生株との比較で研究を進めることとしている。

一方、*vacA* 遺伝子のプロモーター領域や転写開始点はすでに明らかになっている (Infect Immun, 1998) 。加えて、ゲノム情報からピロリ菌に存在する数多くの遺伝子が明らかとなっていて、遺伝子発現調節機能を保持する因子（もしくは推測される因子）の存在も明らかとなっている (PLoS Pathog, 2010) 。しかし、これまでに明らかとなっているピロリ菌の発現調節因子は約 20 個程度と他の菌と比較して著しく少ない。ピロリ菌に認められる発現調節因子の個々について遺伝子破壊株を作製し、*vacA* 遺伝子発現への影響を調べることにより、*vacA* 遺伝子との関係性を明らかにする課題が残っている。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Akazawa Y, Isomoto H, Matsushima K, Kanda T, Minami H, Yamaguchi N, Taura N, Shiozawa K, Ohnita K, Takeshima F, Nakano M, Moss J, Hirayama T, Nakao K: Endoplasmic Reticulum Stress Contributes to *Helicobacter Pylori* VacA-induced Apoptosis. (2013) PLoS One 8(12):e82322 査読有

平山壽哉、中野政之 連載・私達の研究
ピロリ菌感染における vacuolating cytotoxin (VacA)の役割に関する研究。「化学療法の領域」vol. 29(12) 117-123, 2013. 査読なし

Satoh K, Hirayama T, Takano K, Suzuki-Inoue K, Sato T, Ohta M, Nakagomi J, Ozaki Y.: VacA, the vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, binds to multimerin 1 on human platelets. (2013) Thromb J. 11: 23. 査読有

中野政之 , 八尋錦之助 平山壽哉 : *Helicobacter pylori*の病原因子。「臨床と微生物」, vol. 40、p. 178-181、2013. 査読なし

中野政之、平山壽哉 : ピロリ菌の空胞化毒素 VacA の病原性に関する新たな洞察。「日本ヘリコバクター学会誌」 vol. 15、p. 12-21、2013. 査読なし

Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, Hatakeyama M, Hirayama T, Hirata K, Nagano O, Matsuzaki J, Hibi T.: Reactive Oxygen Species-Induced Autophagic Degradation of *Helicobacter pylori* CagA Is Specifically Suppressed in Cancer Stem-like Cells. (2012) Cell Host Microbe. 12: 764-777. 査読有

Yahiro K, Satoh M, Nakano M, Hisatsune J, Isomoto H, Sap J, Suzuki H, Nomura F, Noda M, Moss J, Hirayama T.: Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein-1 (LRP1) Mediates Autophagy and Apoptosis

Caused by *Helicobacter pylori* VacA. (2012) J Biol Chem. 287: 3104-3115. 査読有

Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada JK, Nakamura K, Moss J, Hirayama T, Kurazono H.: *Salmonella* enterotoxin (Stn) regulates membrane composition and integrity. (2012) Dis Model Mech. 5: 515-521. 査読有

Isomoto H, Matsushima K, Inoue N, Hayashi T, Nakayama T, Kunizaki M, Hidaka S, Nakayama M, Hisatsune J, Nakashima M, Nagayasu T, Nakao K, Hirayama T: Interweaving microRNAs and proinflammatory cytokines in gastric mucosa with reference to *H. pylori* infection. (2012) J Clin Immunol. 32:290-299. 査読有

[学会発表](計 20 件)

中野政之、八尋錦之助、久恒順三、赤田純子、野田公俊、平山壽哉。ピロリ菌が産生するVacAはRPTP を介してc-Srcを活性化する。第 87 回日本細菌学会総会。東京都。2014年3月26日～3月28日
津川仁、鈴木秀和、佐藤聡、三好佐和子、森英毅、正岡建洋、金井隆典、水島徹、井本正哉、平山壽哉。ピロリ菌がん蛋白質CagAを分解するオートファージを誘導するLRP1シグナル。第 87 回日本細菌学会総会。東京都。2014年3月26日～3月28日

Hirayama T, Nakano M, Noda M, Yahiroy K. LRP-1 mediates autophagy and apoptosis caused by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. XXVth International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Madrid. 2013年9月12日～9月14日

Nakashima S., Kakugawa T., Harada T., Hara S., Sakamoto N., Nakano M., Ishimatsu Y., Isomoto H., Mukae H., Kurazono H., Hirayama T., Kohno S. Identification of *Helicobacter pylori* VacA in human lung and its effects on airway epithelial cells. ERS Annual Congress 2013. Barcelona. 2013年9月7日～9月11日

Hirayama T., Yahiroy K., Nakano M., Noda M., Moss J. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) mediates autophagy and apoptosis caused by *Helicobacter pylori* VacA. 15th International Congress of Immunology. Milan. 2013年8月22日～8月27日

Hirayama T. *Helicobacter pylori* VacA cause autophagy and apoptosis Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013). Leipzig. 2013年7月21日～7月25日

赤澤祐子、磯本一、松島加代子、南ひとみ、山口直之、塩澤健、大仁田賢、竹島史直、平山壽哉、中尾一彦。VacAは小胞体ストレスの活性化により胃上皮細胞にアポトーシスを誘導する。第19回日本ヘリコバクター学会学術集会。長崎市。2013年6月28日～6月29日

松島加代子、磯本一、赤澤祐子、大仁田賢、平山壽哉。*H. pylori*感染胃粘膜の背景：miRNA発現変動と炎症。第19回日本ヘリコバクター学会学術集会。長崎市。2013年6月28日～6月29日

松島加代子、磯本一、赤澤祐子、大仁田賢、中尾一彦、平山壽哉。胃MALTリンパ腫における拡大内視鏡所見の検討。第19回日本ヘリコバクター学会学術集会。長崎市。2013年6月28日～6月29日

津川仁、鈴木秀和、佐谷秀行、松崎潤太郎、平田賢郎、福原誠一郎、岡田佐和子、正岡建洋、畠山昌則、平山壽哉、日比紀文。細胞内CagA安定性を規定する細胞表面LRP1のautophagy制御機構。第19回日本ヘリコバクター学会学術集会。長崎市。2013年6月28日～6月29日

平山壽哉：ヘリコバクター・ピロリ感染症と毒素病態学的研究アプローチ。第86回日本感染症学会総会。長崎市。2012年4月26日

八尋錦之助、中野政之、野田公俊、平山壽哉。ヘリコバクター・ピロリVacAのLRP1を介したオートファージとアポトーシスを誘導。第86回日本細菌学会総会。幕張市。2013年3月17日～3月20日

Masayuki Nakano, Toshiya Hirayama. *Salmonella* Stn regulates membrane composition and integrity. The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases & The 11th

Nagasaki-Singapore Medical Symposium.
長崎市。2012年12月10日～12月12日
Toshiya Hirayama and Masayuki Nakano.
Low-density lipoprotein
receptor-related protein-1 (LRP-1)
mediates autophagy and apoptosis
caused by *Helicobacter pylori* VacA. The
6th Nagasaki Symposium on Tropical and
Emerging Infectious Diseases & The 11th
Nagasaki-Singapore Medical Symposium.
長崎市。2012年12月10日～12月12日
Akazawa Y., Isomoto H., Matsushima K.,
Shiozawa K., Yamaguchi N., Ohnita K.,
Takeshima F., Hirayama T., Nakao K. ER
stress contributes to VacA induced
gastric epithelial cell death. UEGW
2012. Amsterdam. 2012年10月20日～10月
24日
Kinno Suke Yahiro, Masayuki Nakano,
Masatoshi Noda, Jan Sap, Joel Moss,
Toshiya Hirayama. Low-density
lipoprotein receptor-related
protein-1 (LRP-1) mediates autophagy
and apoptosis caused by *Helicobacter
pylori* VacA. EMBO 2012 meeting. Nice.
2012年9月22日～9月25日
Masayuki Nakano, Eiki Yamasaki, Takaaki
Shimamoto, Akira Takahashi, Hisao
Kurazono, Toshiya Hirayama. Evaluation
of the Function of Stn produced by
salmonella. The 11th Awaji
International Forum on Infection and
Immunity. 淡路市。2012年9月11日～9月
14日
Toshiya Hirayama and Masayuki Nakano.
Salmonella Stn regulates membrane
composition and integrity. 14th
International Symposium on Microbial
Ecology. Copenhagen. 2012年8月19日～8
月24日
Nakano M., Yamasaki E., Shimohata T.,
Takahashi A., Moss J., Kurazono, H.,
Hirayama T. A new insight into the
function of of Stn produced by
Salmonella. ASM2012 112th General
Meeting. San Francisco. 2012年6月16
日～6月19日
平山壽哉：ヘリコバクター・ピロリ感染
症と毒素病態学の研究アプローチ。第86
回日本感染症学会総会。長崎市。2012
年4月26日

平山 壽哉 (HIRAYAMA Toshiya)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号：50050696

(2)研究分担者

中野 政之 (NAKANO Masayuki)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号：60398005

6. 研究組織
(1)研究代表者