

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659200

研究課題名(和文)ピロリ菌病原因子OipA相互作用分子の生化学的探索

研究課題名(英文)Biological searches for factors interacted with Helicobacter pylori virulence factor OipA

研究代表者

山岡 吉生 (Yamaoka, Yoshio)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00544248

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)：ピロリ菌には複数の病原因子を有することが知られており、その相乗効果により重篤な疾患を導くと考えられる。本研究で、胃に炎症を引き起こすOipAタンパク質を得ることに成功した。また、OipAタンパク質はピロリ菌の細胞膜でBabAタンパク質(胃に接着する働きを持つタンパク質)と複合体を形成していることが分かった。

本研究の成果により、今後OipAタンパク質と胃のタンパク質との作用、またはOipAタンパク質と他の病原因子との相互作用が明らかになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is known that Helicobacter pylori has various virulence factors. I hypothesized that severe disease was occurred by multiple effects of virulence factors. In this study, I succeeded in purification of OipA protein, which caused gastric inflammation. It became clear that OipA protein constituted a protein super complex with BabA protein, had ability to adhesion with stomach cells, in H. pylori outer membrane.

In the near future, human stomach protein(s) interacting with OipA protein will be identified. Furthermore, the mechanism will be revealed that OipA protein collaborate with the other virulence factors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ 胃癌 病原因子

1. 研究開始当初の背景

Outer inflammatory protein A (OipA) は *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の Outer membrane protein (OMP) family の 1 つである。私は、OipA は胃上皮細胞から炎症性サイトカイン(特に IL-8)産生を誘導することを報告した。さらに分子疫学研究では、OipA 遺伝子は Cytotoxin associated gene A (CagA) Vacuolating cytotoxin A (VacA), Blood group antigen binding adhesion (BabA)などの病原因子と高い相関を持っていることが分かっている。このことから、OipA は重要な病原因子であると考えられるが、直接的な機能や相互作用分子は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

複数の病原因子が相乗的に作用しあって重篤な疾患を導くと考え、OipA および OipA を含む超分子複合体を生化学的に精製することで OipA の相互作用分子を明らかにすることを目的とした。これにより、*H. pylori* の胃上皮細胞への感染から炎症惹起に至る各病原因子のクロストークという新しいパラダイムの構築が期待できる。

3. 研究の方法

(1)OipA タンパク質の 3 次元構造予測

ホモロジーモデリング法のバイオインフォマティック解析により OipA タンパク質の 3 次元構造の予測を行った。

(2) rOipA タンパク質の発現・精製

① rOipA タンパク質の発現

H. pylori 26695 株から N 末端に 6×His タグをつけた全長 OipA 遺伝子をクローニングし in vitro 発現系と大腸菌発現系で rOipA タンパク質発現を行った。In vitro 発現系ではコムギ胚芽無細胞発現系を使用した。大腸菌発現系では pET28a ベクターで発現ベクターを構築した。そして、*E. coli* Rosetta Blue (DE3)を形質転換し、IPTG で発現誘導を行い、rOipA タンパク質を合成した。

rOipA タンパク質の可溶化

大腸菌を超音波破碎し、超遠心で rOipA タンパク質を含む膜画分を調整した。これを、様々な界面活性剤と NaCl、タンパク質濃度を可溶化に影響を与える因子として rOipA タンパク質の可溶化条件を検討した。

rOipA タンパク質の精製

His タグのアフィニティー精製を行った。1%(w/v)コール酸ナトリウムで rOipA タンパク質を可溶化後、0.1%(w/v)DDM または 0.8%(w/v)OG を含んだイミダゾールバッファーで溶出した。その後、rOipA タンパク質精製標品を Superdex 200(GE ヘルスケア)を用いて、ゲル濾過解析を行った。

(3) rOipA の IL-8 産生誘導の評価

0.8%(w/v)OG を含む精製標品に透析を行うことで、OG を 0.1%(w/v)DDM に置換し、これを共培養に用いた。様々な濃度の rOipA タンパク質(5µg/ml,10µg/ml,20µg/ml)と AGS 細胞の共培養を行った。24 時間共培養後の上清中の IL-8 産生量は ELISA で測定した。培養液は 10%(v/v)FBS を加えた RPMI 1640 medium を使用した。

(4) OipA 超分子複合体の解析

0.5%(w/v)DDM で可溶化した *H. pylori* 26695 株の膜タンパク質を二次元電気泳動で解析した。一次元目には 7%High Resolution Clear Native PAGE(hr-CN-PAGE)を行い、二次元目には 12%SDS-PAGE を行った。さらに、抗 CagA 抗体、抗 BabA 抗体、抗 OipA 抗体でのウエスタンブロットによりタンパク質の同定を行った。

4. 研究成果

(1) OipA タンパク質の 3 次元構造予測

ホモロジーモデリング法を用いた 3 次元構造予測により OipA タンパク質は 8 本の逆平行鎖を有する β パレル構造モデルを構築できた。このことから、OipA タンパク質は多彩な生物機能を有することが考えられる。

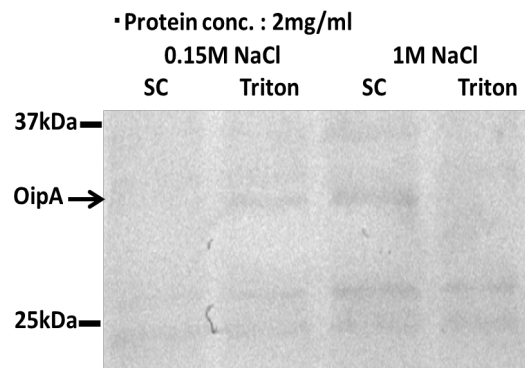
(2) rOipA タンパク質の発現・精製

① rOipA の発現

コムギ胚芽無細胞系発現系では rOipA タンパク質は不溶性タンパク質として、CBB 染色で確認できる程度の発現量があった。大腸菌発現系では rOipA タンパク質は膜画分に局在して発現しており、抗 OipA 抗体でのウエスタンブロットで確認できる程度の微量な発現量であった。発現温度、発現時間、IPTG 濃度は発現量に影響しなかった。

rOipA タンパク質の可溶化

様々な界面活性剤で rOipA の可溶化条件を検討した結果、コール酸ナトリウムが有効であることが分かった。また、NaCl 濃度とタンパク質濃度が可溶化に大きく影響を与えることが分かり、可溶化の最適条件を決定した(図 1)。



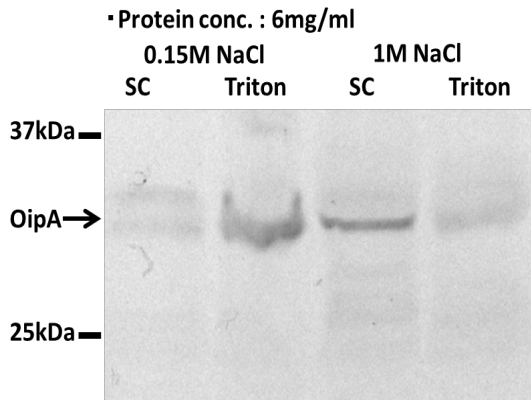
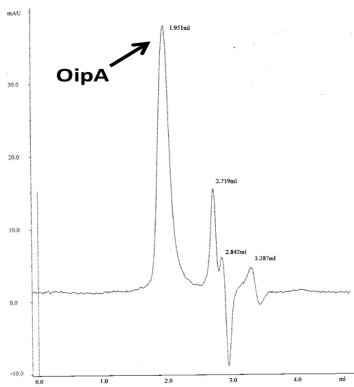


図 1 : 界面活性剤、NaCl 濃度、タンパク質濃度の rOipA タンパク質可溶化への影響

rOipA タンパク質の精製
 0.8%(w/v)OG での溶出と比較して 0.1%(w/v)DDM を含む精製標品は、純度が 90%以上と高純度なものであった。また、両精製標品中には分子量 35kDa の単量体 rOipA タンパク質が含まれることが分かった(図 2)。*H. pylori* の OMP family の精製では本研究が世界で初めての成功である。今後は OipA の生化学的機能やヒトの相互作用分子が明らかになることで、炎症惹起メカニズムの解明が期待できる。

・ 0.1%(w/v)DDM バッファーを用いた精製標品



・ 0.8%(w/v)OG バッファーを用いた精製標品

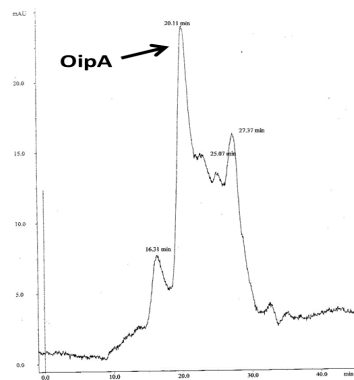


図 2 : rOipA タンパク質精製標品のゲル濾過解析

(3) rOipA の IL-8 産生誘導の評価
 様々な濃度で rOipA タンパク質と AGS 細胞を共培養した結果、IL-8 の産生量に有意差はなかった(図 3)。

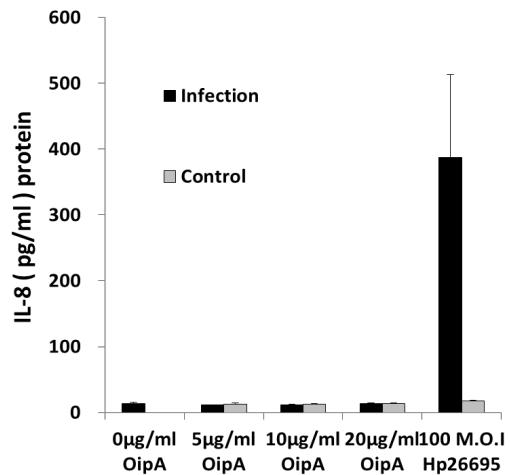


図 3 : AGS 細胞の IL-8 産生量

単量体の OipA タンパク質では IL-8 産生誘導がないことから、OipA タンパク質は多量体または、複合体を形成することにより機能的 OipA タンパク質として働くことが考えられる。

(4) OipA 超分子複合体の解析

hr-CN-PAGE で約 700kDa の超分子複合体のバンドが確認できた。さらに、二次元 SDS-PAGE を行うことで超分子複合体を構成するタンパク質を分離した。その結果、約 700kDa の超分子複合体には OipA タンパク質とその他 4 つのタンパク質(94kDa, 83kDa, 78kDa, 68kDa)で構成される。そして、ウエスタンブロットにより OipA 超分子複合体を形成するタンパク質の 1 つが BabA(78kDa)タンパク質であることが分かった(図 4)。他の 3 つのタンパク質については同定を進めている。

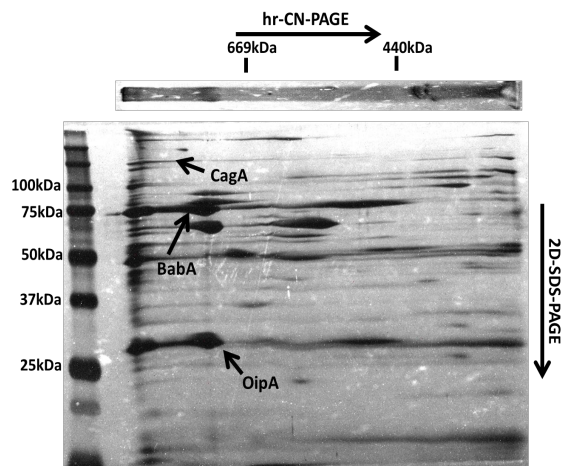


図 4 : *H. pylori* 26695 株の膜タンパク質の二次元電気泳動

BabA は胃上皮細胞への接着に関する重要な分子であることからこの超分子複合体は、感染から炎症惹起への重要な機能を有することが考えられる。さらに今後、OipA 超分子複合体を構成する他の分子が同定されることにより新たな病原因子の発見または、感染から炎症惹起への各病原因子のクロストークが明らかになることが期待できる。

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](計国際医学誌 23 件)

Wu JY, Wang SS, Lee YC, Yamaoka Y, Graham DY, Jan CM, Wang WM, Wu DC. Detection of genotypic clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* by string tests. World J Gastroenterol. 2014 Mar 28;20(12):3343-9. doi:10.3748/wjg.v20.i12.3343.

Binh TT, Shiota S, Suzuki R, Matsuda M, Trang TT, Kwon DH, Iwatani S, Yamaoka Y. Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* by using next-generation sequencing. J Antimicrob Chemother. 2014 Mar 19. [Epub ahead of print]

Shiota S, Murakami K, Okimoto T, Kodama M, Yamaoka Y. Serum *Helicobacter pylori* CagA antibody titer as a useful marker for advanced inflammation in the stomach in Japan. J Gastroenterol Hepatol. 2014 Jan;29(1):67-73. doi:10.1111/jgh.12359.

Lind J, Backert S, Pflieger K, Berg DE, Yamaoka Y, Sticht H, Tegtmeyer N. Systematic Analysis of Phosphotyrosine Antibodies Recognizing Single Phosphorylated EPIYA-Motifs in CagA of Western-Type *Helicobacter pylori* Strains. PLoS One. 2014 May 6;9(5):e96488. doi: 10.1371/journal.pone.0096488.

Binh TT, Suzuki R, Shiota S, Kwon DH, Yamaoka Y. Complete Genome Sequences of *Helicobacter pylori* Clarithromycin-Resistant Strains. Genome Announc. 2013 Nov 14;1(6). pii: e00912-13. doi: 10.1128/genomeA.00912-13.

Shiota S, Yamaoka Y. Strategy for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. Curr Pharm Des. 2013 Oct 14. [Epub ahead of print]

Lina TT, Pinchuk IV, House J, Yamaoka Y, Graham DY, Beswick EJ, Reyes VE. CagA-dependent downregulation of B7-H2 expression on gastric mucosa and inhibition of Th17 responses during *Helicobacter pylori* infection. J Immunol. 2013 Oct 1;191(7):3838-46. doi: 10.4049/jimmunol.1300524.

Shiota S, Mahachai V, Vilaichone RK, Ratanachu-ek T, Tshering L, Uchida T, Matsunari O, Yamaoka Y. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection and gastric mucosal atrophy in Bhutan, a country with a high prevalence of gastric cancer. J Med Microbiol. 2013 Oct;62(Pt 10):1571-8. doi: 10.1099/jmm.0.060905-0.

Vaziri F, Najar Peerayeh S, Alebouyeh M, Mirzaei T, Yamaoka Y, Molaei M, Maghsoudi N, Zali MR. Diversity of *Helicobacter pylori* genotypes in Iranian patients with different gastroduodenal disorders. World J Gastroenterol. 2013 Sep 14;19(34):5685-92. doi: 10.3748/wjg.v19.i34.5685.

Vilaichone RK, Yamaoka Y, Shiota S, Ratanachu-ek T, Tshering L, Uchida T, Fujioka T, Mahachai V. Antibiotics resistance rate of *Helicobacter pylori* in Bhutan. World J Gastroenterol. 2013 Sep 7;19(33):5508-12. doi:10.3748/wjg.v19.i33.5508.

Shiota S, Suzuki R, Yamaoka Y. The significance of virulence factors in *Helicobacter pylori*. J Dig Dis. 2013 Jul;14(7):341-9. doi:10.1111/1751-2980.12054.

Vilaichone RK, Mahachai V, Shiota S, Uchida T, Ratanachu-ek T, Tshering L, Tung NL, Fujioka T, Moriyama M, Yamaoka Y. Extremely high prevalence of *Helicobacter pylori* infection in Bhutan. World J Gastroenterol. 2013 May 14;19(18):2806-10. doi: 10.3748/wjg.v19.i18.2806.

Binh TT, Shiota S, Nguyen LT, Ho DD, Hoang HH, Ta L, Trinh DT, Fujioka T, Yamaoka Y. The incidence of primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Vietnam. J Clin Gastroenterol. 2013 Mar;47(3):233-8. doi:10.1097/MCG.0b013e3182676e2b.

Takahashi A, Shiota S, Matsunari O, Watada M, Suzuki R, Nakachi S, Kinjo N,

- Kinjo F, Yamaoka Y. Intact long-type *dupA* as a marker for gastroduodenal diseases in Okinawan subpopulation, Japan. *Helicobacter*. 2013 Feb;18(1):66-72. doi:10.1111/j.1523-5378.2012.00994.x.
- Matsuo Y, Shiota S, Matsunari O, Suzuki R, Watada M, Binh TT, Kinjo N, Kinjo F, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori cagA* 12-bp insertion can be a marker for duodenal ulcer in Okinawa, Japan. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Feb;28(2):291-6. doi: 10.1111/jgh.12067.
- Shiota S, Murakami K, Suzuki R, Fujioka T, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* infection in Japan. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013 Jan;7(1):35-40. doi:10.1586/egh.12.67.
- Franceschi F, Di Simone N, D'Ippolito S, Castellani R, Di Nicuolo F, Gasbarrini G, Yamaoka Y, Todros T, Scambia G, Gasbarrini A. Antibodies anti-CagA cross-react with trophoblast cells: a risk factor for pre-eclampsia? *Helicobacter*. 2012 Dec;17(6):426-34. doi: 10.1111/j.1523-5378.2012.00966.x.
- Sahara S, Sugimoto M, Vilaichone RK, Mahachai V, Miyajima H, Furuta T, Yamaoka Y. Role of *Helicobacter pylori cagA* EPIYA motif and *vacA* genotypes for the development of gastrointestinal diseases in Southeast Asian countries: a meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2012 Sep 21;12:223. doi: 10.1186/1471-2334-12-223.
- Vollan HS, Tannaes T, Yamaoka Y, Bukholm G. In silico evolutionary analysis of *Helicobacter pylori* outer membrane phospholipase A (OMPLA). *BMC Microbiol*. 2012 Sep 13;12:206. doi: 10.1186/1471-2180-12-206.
- Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori*-associated regulation of forkhead transcription factors FoxO1/3a in human gastric cells. *Helicobacter*. 2012 Jun;17(3):193-202. doi: 10.1111/j.1523-5378.2012.00939.x.
- 21 Mueller D, Tegtmeyer N, Brandt S, Yamaoka Y, De Poire E, Sgouras D, Wessler S, Torres J, Smolka A, Backert S. c-Src and c-Abl kinases control hierarchic phosphorylation and function of the CagA effector protein in Western and East Asian *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Invest*. 2012 Apr 2;122(4):1553-66. doi:10.1172/JCI161143.
- 22 Shiota S, Nguyen LT, Murakami K, Kuroda A, Mizukami K, Okimoto T, Kodama M, Fujioka T, Yamaoka Y. Association of *Helicobacter pylori dupA* with the failure of primary eradication. *J Clin Gastroenterol*. 2012 Apr;46(4):297-301. doi:10.1097/MCG.0b013e318243201c.
- 23 Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-Related Gastroduodenal Diseases from Molecular Epidemiological Studies. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:371503. doi: 10.1155/2012/371503.
- 〔学会発表〕(計 17 件)
 城戸 康年、松尾 祐一、山岡 吉生 *Helicobacter pylori* の Outer inflammatory protein A (OipA) による病原性発現機構の分子基盤、第 100 回日本消化器病学会総会 (2014 年 4 月 24 日) 東京
- Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* genomes: from pathogenesis to tool for human migration. The 87th Annual meeting of Japanese Society for Bacteriology (2014 年 3 月 28 日) 招待講演、東京
- Yamaoka Y. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori* infection. The 3rd Dong-A International Medical Symposium (2014 年 2 月 8 日) 招待講演、釜山、韓国
- Yamaoka Y. Genotypes of *Helicobacter pylori* in Asian countries. Mongolia-Japan joint symposium for *Helicobacter pylori* (2013 年 11 月 22 日) 招待講演、ウランバートル、モンゴル
- 山岡吉生、ピロリ菌感染症の臨床と研究。第 303 回日本内科学会地方会 生涯教育講演会 (2013 年 11 月 17 日) 招待講演、那覇、沖縄県
- Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* genotypes in Asian countries. XXVIth International Workshop on *Helicobacter pylori* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer (2013 年 9 月 14 日) 招待講演、マドリード、スペイン
- Yamaoka Y. The Mongolian gerbil model. XXVIth International Workshop on *Helicobacter pylori* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer (2013 年 9 月 12 日) 招待講演、マドリード、スペイン

松尾 祐一、城戸 康年、山岡 吉生.
ピロリ菌外膜たんぱく質の Outer
inflammatory protein A の精製、第 86 回日
本生化学大会 (2013 年 9 月 13 日)、横浜、
神奈川県

Yamaoka Y. Genetic characteristics of
Helicobacter pylori and its relation to
gastric cancer. XXII Congreso Nacional de
Gastroenterologia (2013 年 9 月 7 日) 招待
講演、プンタカナ、ドミニカ共和国

Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* Current
status in Dominican Republic 1st phase.
(2013 年 9 月 7 日) 招待講演、プンタカ
ナ、ドミニカ共和国

山岡吉生、*Helicobacter pylori* と生体防御。
第 24 回日本生体防除学会 (2013 年 7 月
11 日) 招待講演、熊本、熊本県

Yamaoka Y. Molecular epidemiology of
Helicobacter pylori: Association between
Helicobacter pylori and disease outcomes.
Special Lecture. 43th Annual Meeting of
Gastroenterological Society of Taiwan.
(2013 年 3 月 16 日) 招待講演、高雄、台
湾

Yamaoka Y. Geographic differences of
Helicobacter pylori genotypes and gastric
cancer. Special lecture. VIII Congreso
Internacional Interdisciplinario de
Investigacion Cientifica. (2012 年 6 月 14
日) 招待講演(オープニングセミナー)
サントドミンゴ、ドミニカ共和国

山岡吉生、*Helicobacter pylori* の分子疫学
研究：次世代シーケンスも含めて、85
回日本細菌学会総会(2012 年 3 月 28 日)
招待講演、長崎、長崎県

Yamaoka Y. Bacterial virulence factors, The
2nd Asian Pacific Topic Conference (2012
年 1 月 15 日) 招待講演、クアラルンプ
ール、マレーシア

Yamaoka Y. Roles of virulence factors of
Helicobacter pylori: OipA and DupA, XIII
International Congress of Bacteriology and
Applied Microbiology (2011 年 9 月 8 日)
招待講演、札幌、日本

Yamaoka Y. *Helicobacter pylori*
pathogenesis and gastric cancer,
International gastric cancer congress (2011
年 4 月 21 日) 招待講演、ソウル、韓国

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.oita-u.ac.jp/phealth2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 吉生 (YAMAOKA YOSHIO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00544248

〔図書〕(計 0 件)