

# ヘリコバクター・ピロリの空胞化致死毒素の 宿主ターゲット分子と作用機序解析

研究課題名：ヘリコバクター・ピロリの空胞化致死毒素の作用機序解析と新しい治療戦略

和田 昭裕

長崎大学熱帯医学研究所 病原因子機能解析分野 講師

## 研究のねらい（はじめに）

世界人口の半数以上の方がヘリコバクター・ピロリに感染しており、現在では、胃炎、消化性潰瘍、MALTリンパ腫、胃癌の病因は、本菌なしでは論じられなくなっている。胃潰瘍や十二指腸潰瘍の患者において VacA 毒素を産生するヘリコバクター・ピロリが高率に分離されることなどから、本菌感染による病態成立に VacA 毒素が重要な役割を担うと考えられた。本研究では、VacA 毒素の初期効果の解析として、VacA 毒素とその受容体との相互作用をしらべる。その結果生じる細胞内での空胞形成とミトコンドリア障害から細胞死に至る病原メカニズムを明らかにする基礎的研究を展開し、本菌感染症の新たな予防・治療法の開発につながる基盤構築を目指すことを目的とした。

## 研究結果と考察

VacA によるヒトの胃の病変形成を防御するためには、VacA が最初に結合する VacA 受容体との結合を阻止すること、もしくは胃の病変形成に至る情報伝達の流れを遮断する必要がある。VacA が VacA 受容体と結合するのを阻害するためには VacA が認識する構造を明らかにし、その構造を基にした結合阻害剤の開発が考えられる。

従って、VacA が認識する受容体の構造を明らかにすることを最初の研究として試みた。VacA は以前に我々が明らかにした RPTPβ を受容体とするのみならず、VacA の結合する受容体として 140kDa 蛋白質 (p140) を免疫沈降をおこなった際に見出した。p140 の発現量が多く認められた G401 細胞においては RPTPβ の mRNA および蛋白質の発現は認められなかった。この p140 をビーナッツレクチンカラムなどを用いて分離精製し、酵素消化およびアミノ酸配列の解析をおこなった結果、p140 は RPTPα に一致した。リコンビナントの RPTPα を Cos-7 細胞に発現させ解析してみると、RPTPα は VacA との結合が認められた。以上の結果より、VacA は RPTPβ のみならず RPTPα とも結合することがわかった。

RPTPα と RPTPβ はいずれも O-リンクの糖鎖結合部位を持ち、どちらも共通して MAA, PNA, DSA レクチンにより認識される。これらレクチンのうち、MAA のみが VacA の AZ-521 細胞における空胞化活性を阻害したことから、VacA は MAA の認識する末端糖鎖の α(2-3) 結合したシアル酸を認識すると示唆された。この MAA の認識する構造はガングリオシドが持っている構造であり、種々のガングリオシドをアッセイ系に添加すると VacA の空胞化活性の阻害が認められ、なかでも GM1 が最も強い空胞化阻害を示した。GM1 のリソ体を樹脂に固相化して VacA との結合を調べてみたところ、VacA との結合が確認された。さらには、ヘリコバクター・ピロリの培養上清中で GM1 と結合する蛋白質を解析したところ、VacA が顕著に結合する蛋白質として認められた。以上の結果より、VacA はガングリオシドとも結合することがわかり、VacA の認識する構造として末端糖鎖の α(2-3) 結合したシアル酸および O-リンクの糖鎖結合が重要であることがわかった。

次に、VacA による RPTPβ を介したシグナル伝達、そしてそれに続く胃の病変形成機構を明らかにする目的で、RPTPβ の siRNA を恒常的に発現した RPTPβ のノックダウン AZ-521 細胞を作製した。細胞増殖に与える影響に違いは認められなかった。VacA による空胞化活性は、RPTPβ のノックダウン細胞においては AZ-521 細胞に比べて空胞化形成が弱くなっていた。また、VacA によるチャネルの活性も弱くなっており、RPTPβ は VacA によるチャネル形成および空胞化形成に関与する事が示唆された。一方、VacA は AZ-521 細胞において MAP キナーゼである p38 や Erk1/2 の活性化を引き起こすが、RPTPβ をノックダウンしても VacA による MAP キナーゼの活性化が認められ、これら MAP キナーゼの活性化に RPTPβ が関与していないことが示唆された。

VacA による胃潰瘍形成には、VacA による細胞死や細胞剥離等が関わってくると思われる。また、VacA による細胞死には VacA がミトコンドリアに局在することによりチトクローム C の放出する経路が関与することが指摘されている。そこで、VacA の経時変化に伴う細胞内局在を AZ-521 細胞において調べてみた結果、まず VacA は細胞表面上の RPTPβ に結合し、RPTPβ を介してラフトに集まり、細胞内への侵入が認められた。しかしながら、細胞内の VacA の

局在に関しては、ほとんどの VacA はミトコンドリアに局在することなく、空胞上に局在していた。主として VacA は空胞上に存在するにもかかわらず、チトクローム C の放出が認められたことより、VacA による細胞死にはシグナル伝達に関与していることが考えられた。そこで、チトクローム C 遊離に関与することが指摘されている Bax および Bak を調べてみた結果、VacA による Bax および Bak の活性化が認められた。VacA による Bax の活性化を AZ-521 細胞および RPTPβ のノックダウン細胞において比較してみた結果、AZ-521 細胞のほうが有意な Bax の活性化が認められ、Bax の活性化に RPTPβ の関与が示唆された。

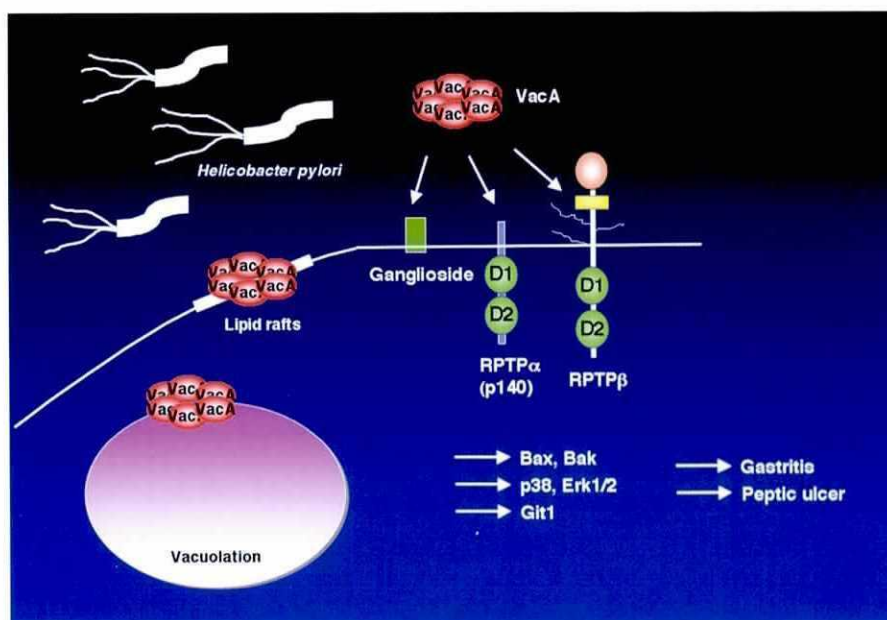


図. 空胞化致死毒素 (VacA) の作用機序

## 今後の展望

本研究で VacA が RPTPβ のみならず、RPTPα およびガングリオシドとも結合することがわかった。また、VacA が認識する構造として、末端糖鎖の  $\alpha(2-3)$  結合したシアル酸および O-リンクの糖鎖結合が重要であることがわかった。VacA の認識する構造の詳細をさらに明らかにすることが今後の重要課題である。その成果は VacA 特異的な阻害剤の開発、検出プローブの開発につながる。また、VacA のそれぞれの受容体が如何なる VacA の毒性の情報伝達に関わり病態形成を引き起こすのか、詳細な機構の解明・有効な遮断薬の検索などが必要と考えられる。

## 主要論文リスト

- (1) Yahiro, K., Wada, A., Nakayama, M., Kimura, T., Ogushi, K., Niidome, T., Aoyagi, H., Yoshino, K., Yonezawa, K., Moss, J., and Hirayama, T., Protein-tyrosine phosphatase  $\alpha$ , RPTP $\alpha$ , is a *Helicobacter pylori* VacA receptor., *J. Biol. Chem.*, 278(21), 19183-19189, 2003.
- (2) Nakayama, M., Kimura, M., Wada, A., Yahiro, K., Ogushi, K., Niidome, T., Fujikawa, A., Shirasaka, D., Aoyama, N., Kurazono, H., Noda, M., Moss, J., and Hirayama, T., *Helicobacter pylori* VacA activates the p38/ATF-2-mediated signal pathway in AZ-521 cells., *J. Biol. Chem.*, 279(8), 7024-7028, 2004.
- (3) Yahiro, K., Wada, A., Yamasaki, E., Nakayama, M., Nishi, Y., Hisatsune, J., Morinaga, N., Sap, J., Noda, M., Moss, J., and Hirayama, T., Essential domain of receptor tyrosine phosphatase  $\beta$ , RPTP $\beta$ , for interaction with *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin., *J. Biol. Chem.*, 279(49), 51013-51021, 2004.
- (4) Wada, A., Yamasaki, E., and Hirayama, T., *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA, is responsible for gastric ulceration., *J. Biochem.*, 136(6), 741-746, 2004.

- 
- (5) De Guzman, B., Hisatsune, J., Nakayama, M., Yahiro, K., Wada, A., Yamasaki, E., Nishi, Y., Yasazaki, S., Azuma, T., Ito, Y., Ohtani, M., van der Wijk, T., den Hertog, J., Moss, J., and Hirayama, T., Cytotoxicity and recognition of receptor-like protein tyrosine phosphatase, RPTP $\alpha$  and RPTP $\beta$ , by *Helicobacter pylori* m2VacA., Cell. Microbiol., 7(9), 1285-1293, 2005.

#### 特許

- (1) 和田昭裕、長谷川慎、平山壽哉、山崎栄樹、前田香代、ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素に対する結合剤（出願番号 2005-241771）
- (2) 和田昭裕、長谷川慎、平山壽哉、山崎栄樹、ヘリコバクター・ピロリの空胞化毒素の検出試薬および検出方法（出願番号 2005-241772）