

## 論文の内容の要旨

論文題目 *Helicobacter pylori* 持続感染における付着因子 BabA と菌体表面糖鎖の分子生物学的研究

氏名 黒田 英介

### 第1章 *Helicobacter pylori* 持続感染における BabA 機能変動メカニズムの解析及び新規付着因子の探索

#### 序論

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*、ピロリ菌) は、経口的に侵入し胃上皮細胞に付着すると、一生涯にわたる持続感染を成立させ、胃炎、胃潰瘍、胃がんなどの胃関連疾患を引き起こす。したがって、ピロリ菌の付着の分子機構を解明することは感染制御において重要である。ピロリ菌の外膜タンパク質 BabA (Blood group antigen binding adhesin A)は、胃上皮細胞に発現する Lewis 式血液型糖鎖 (Le) の Lewis b (Le<sup>b</sup>) と結合する付着因子として報告されている。さらに、この BabA-Le<sup>b</sup> 付着機構は、感染初期において重要な役割を担っていることが明らかにされている。しかしながら、臨床分離株における BabA の有無と病原性との関連のコンセンサスが得られていない状況であり、持続感染における BabA の機能的動態について不明な点が多い。そこで本研究の第1章では、スナネズミを用いたピロリ菌持続感染系を用いて、持続感染における BabA の機能的動態と、感染経時的な付着機構の解明を試みた。

#### 結果

##### 1. スナネズミ感染 5、8、16 週後の胃内ピロリ菌は、BabA 発現株が多いにも関わらず Le<sup>b</sup> 結合能が減弱した

ピロリ菌感染モデル生物であるスナネズミに *H. pylori* ATCC 43504 野生株を経口投与し、感染経時的 (1、5、8、16 週間後) に胃からピロリ菌を単離した。単離したピロリ菌の Le<sup>b</sup> 結合能を ELISA 法にて測定したところ、感染 5、8、16 週間後の株において減弱していることが明らかになった。次に、ウエスタンプロット法による菌体 BabA の発現を確認したところ、多くの菌株で BabA を発現しており、BabA タンパク質の顕著な減少は認められなかった。これらのことから、感染 5、8、16 週間後のピロリ菌の多くは BabA を発現しているにも関わらず、Le<sup>b</sup> 結合能が減弱していることが示された。

##### 2. 菌体表面に発現した Le<sup>b</sup> が BabA の付着機能を阻害した

スナネズミの胃から回収したピロリ菌の菌体表面 Le<sup>b</sup> 発現量を調べるために、菌体を抗 Le<sup>b</sup>

抗体と FITC 標識マウス抗 IgM 抗体にて免疫染色し、フローサイトメーターにて蛍光強度を測定した結果、感染 5、8、16 週後の菌株はピロリ菌野生株に比べて、Le<sup>b</sup> の菌体表面発現強度が増大していることが判明した。BabA による菌体の Le<sup>b</sup> 付着機能が、菌体表面に発現した Le<sup>b</sup> によって阻害されている可能性を検討するために、菌体表面 Le<sup>b</sup> の除去により、菌体の Le<sup>b</sup> 結合能が回復するか否かを精査した。Le<sup>b</sup> を除去する方法として、過ヨウ素酸ナトリウム処理、フコース分解酵素処理、Le<sup>b</sup> の合成に関わる糖転移酵素をコードする *jhp0563* 欠損の三種類の方法を採用した。Le<sup>b</sup> の除去処理を施した Le<sup>b</sup> 発現株の Le<sup>b</sup> 結合能を、ELISA 法によって測定したところ、Le<sup>b</sup> 結合能の上昇が認められた。以上の結果より、菌体表面に発現した Le<sup>b</sup> が BabA の付着機能を阻害している可能性が示唆された。

### 3. 感染により発現増大する胃上皮の ITGB1 が、T4SS のリガンドとして菌体付着に寄与した

これまでの研究から、ピロリ菌が上皮細胞に BabA-Le<sup>b</sup> 付着を形成すると、菌体の IV 型分泌装置 (Type IV Secretion System、T4SS) を介した主要病原因子 Cytotoxin associated gene A (CagA) の分泌活性が増大し、CagA による宿主細胞の様々な転写因子活性が増大することが報告されている。多くの株の BabA が付着機能を喪失する感染後期においても、ピロリ菌はスナネズミ胃粘膜に付着していたことから、ピロリ菌の感染によって発現増大する宿主因子が、感染後期に作動する菌体付着のリガンドとなる可能性が考えられた。ピロリ菌の菌体外に露出する分子群に結合する宿主リガンド分子としてこれまでに報告されている分子は糖鎖とインテグリンであることから、糖転移酵素群、プロテオグリカン群、およびインテグリン群に着目して、ピロリ菌感染により発現が変動するヒト胃上皮細胞株 AGS の宿主因子をマイクロアレイにより網羅的に解析した。その結果、各種インテグリン分子群の発現が増大することが判明した。AGS、Le<sup>b</sup> 発現細胞株、および Le<sup>b</sup> 発現陰性細胞株を用いて RT-PCR 法にてこの結果を検証した結果、インテグリン  $\beta$  1 (*ITGB1*)、インテグリン  $\alpha$  v (*ITGAV*)、およびインテグリン  $\beta$  8 (*ITGB8*) の mRNA 発現が、CagA、T4SS、および BabA に依存して亢進することが明らかとなった。次に、Cre-loxP システムにより作製した、*ITGB1* 欠損および発現マウス胃上皮細胞へのピロリ菌結合を検証した結果、ピロリ菌 T4SS は *ITGB1* をリガンドとする菌体の付着因子として機能することが示唆された。

実際にスナネズミ胃上皮で *ITGB1* が、菌体付着因子リガンドとして作用しうるかを検証するため、ピロリ菌感染スナネズミの胃組織中の *ITGB1* mRNA 発現量を RT-PCR により測定したところ、感染 8 週後に菌体の T4SS および BabA に依存した増大が認められた。また、ピロリ菌感染 8 週後のスナネズミ胃上皮における *ITGB1* タンパク質の発現を、免疫蛍光組織染色により確認したところ、野生株感染動物の胃組織においては、*ITGB1* タンパク質の強い発現が見られた。以上の結果から、スナネズミ胃粘膜ではピロリ菌感染にともない、T4SS および BabA に依存してインテグリンの発現が増大し、感染後期のピロリ菌付着リガンドとなりうることが示唆された。

感染 8 週後におけるピロリ菌菌体付着因子として、菌体の T4SS が作用するか否かを検証するために、ピロリ菌感染スナネズミの胃内定着菌数を測定した。感染 1 週の *babA* 欠損変異株の胃内定着菌数は、野生株および T4SS 欠損変異株に比べて有意に低値を示した。感染 8 週後では、野生株は感染 1 週後よりも胃内定着菌数が増大していたものの、*babA* 欠損変異株および T4SS 欠損変異株の胃内定着菌数は野生株よりも有意に低かった。したがって、スナネズミ感染モデルにおいて、感染 1 週後での胃組織への菌体付着は BabA に依存している一方で、感染 8 週後では T4SS が付着因子として作用する可能性が示唆された。

## 結論

以上の結果から、ピロリ菌は感染過程で、菌体表面に発現した Le<sup>b</sup> が菌体表面の BabA をマスクすることで、BabA の付着機能を抑制することが明らかになった。さらに、感染後期に作用する付着機構として、T4SS と BabA 依存的な感染によって発現誘導された ITGB1 が T4SS のリガンドとして機能する可能性が示唆された。

## 第 2 章 *H. pylori* 菌体表面糖鎖の発現メカニズムの解析

### 序論

グラム陰性細菌であるピロリ菌の菌体表面は糖質や糖脂質などから構成される Lipopolysaccharide (LPS) に覆われている。ピロリ菌の LPS は lipid A、Core Oligosaccharide (Core OS)、O 抗原の 3 領域から構成されており、末端の O 抗原には Le 構造を有している。Le は Galactose (Gal)-N-acetylglucosamine (GlcNAc) を骨格鎖とする構造体であり、Type 1 と Type 2 に大別される。Type 1 は GlcNAc に  $\beta$ -1,3 結合で Gal が結合した骨格を、Type 2 は GlcNAc に  $\beta$ -1,4 結合で Gal が結合した骨格を成す。それぞれの骨格の GlcNAc に  $\alpha$ -1,3/4 Fucosyltransferase (Fuc T) によって Fuc が 1 つ付加すると Le<sup>a</sup> もしくは Le<sup>x</sup> に、さらに、Gal に  $\alpha$ -1,2 Fuc T によって Fuc が付加すると Le<sup>b</sup> もしくは Le<sup>y</sup> となる。また、それぞれの骨格の Gal に Fuc のみが  $\alpha$ -1,2 結合で付加するとそれぞれ H-Type 1 および H-Type 2 となる。

第 1 章の研究より、ピロリ菌は持続感染の過程で、菌体表面の Le<sup>b</sup> 糖鎖発現を増大させることで、菌体付着因子 BabA の結合能を調節することを見出した。菌体が LPS 末端の Le 抗原構造を微調整することで、胃粘膜付着機能を調節することから、ピロリ菌の胃粘膜持続感染における付着因子の全容を理解するためには、Le 抗原の生合成と調節機能の理解が重要である。

ピロリ菌は持続感染の過程で、糖転移酵素遺伝子に変異が生じ、遺伝子発現の ON/OFF がにより Le の表現型が変化すると考えられているが、菌株による遺伝子相違が多様なため、Le<sup>b</sup> の合成メカニズムについては未解明である。そこで本研究の第 2 章では、ピロリ菌菌体表面 Le<sup>b</sup> 発現に関わるピロリ菌糖転移酵素候補遺伝子を同定するために、第 1 章の研究でスナネズミの胃から単離した Le<sup>b</sup> 高発現株と、その親株である Le<sup>b</sup> 非発現株 ATCC43504 を用いて、Le<sup>b</sup> 発現メカニズムの解明を試みた。

## 結果

### 1. Le<sup>b</sup> の α-1,2 Fuc を付加している酵素は FutC が担っていた

第 1 章の研究にてスナネズミ感染 8 週後から単離された Le<sup>b</sup> 発現株の菌体表面発現 Le 糖鎖パターンをフローサイトメーターにより解析した結果、Le<sup>b</sup> 発現株は Le<sup>b</sup> と H-Type 1 を発現していた。Le<sup>b</sup> と H-Type 1 は共に α-1,2 Fuc を有しているため、Leb の α-1,2 Fuc を付加する酵素が α-1,2 Fuc T 活性を有すると報告のある FutC であるかどうかを確認するため、Le<sup>b</sup> 発現株の *futC* 欠損変異株を作製した。作製した菌株の表面糖鎖発現をフローサイトメーターにより解析した結果、*futC* 欠損変異株の菌体表面 Le<sup>b</sup> 発現量は有意に減少し、Le<sup>b</sup> の前駆体である Le<sup>a</sup> の発現量が増加した。したがって、Le<sup>b</sup> の α-1,2 Fuc 付加反応を担う酵素をコードする遺伝子は *futC* であることが示唆された。

### 2. Le<sup>b</sup> 発現株は、*futA* の mRNA 発現量が低下した

α-1,3/4 Fuc 付加反応活性を有する酵素である α-1,3/4 Fuc T をコードすると報告のある *futA* 及び *futB* の mRNA の発現量 RT-PCR 法により定量したところ、Le<sup>b</sup> 発現株において *futA* 発現量の著しい低下を認めた一方で、*futB* 発現量においては有意な差は認められなかった。この結果より、Le<sup>b</sup> 発現株では *futA* 発現量が有意に低下していることを見出した。

### 3. *futA* の欠損によって Le<sup>b</sup> が発現した

*futA* ORF の遺伝子配列解析の結果、Le<sup>b</sup> 発現株では *futA* に変異が導入されて、遺伝子発現が OFF となることで、mRNA 発現量が低下していた。野生株の *futA* 欠損変異株を作製し、菌体表面 Le<sup>b</sup> を測定したところ、Le<sup>b</sup> の発現増大が認められた。次に *futA* に変異が挿入導入されている Le<sup>b</sup> 発現株に、野生株由来の *futA* を導入した株の菌体表面 Le<sup>b</sup> の発現量は低下していたことから、ATCC 43504 株は *futA* が欠損することで、菌体表面に Le<sup>b</sup> を発現することが示唆された。

## 総括

本論文ではピロリ菌の持続感染において、ピロリ菌の *futA* 変異導入に伴い菌体表面に発現する Le<sup>b</sup> が菌体 BabA をマスクすることで、菌体の胃粘膜上皮付着機能を抑制することを明らかにした。さらに、ピロリ菌感染後に T4SS と BabA に依存して発現する宿主 ITGB1 が、感染後期の菌体 T4SS の付着リガンドとして機能することを明らかにした。