

*Helicobacter pylori*外膜タンパク質 AlpBの多様性が及ぼす ヒト上皮細胞付着への影響

米澤 英雄

杏林大学医学部感染症学

*Helicobacter pylori*は急性および慢性胃炎の原因細菌であり、胃炎・十二指腸潰瘍の再発因子、胃がんのリスク因子として作用する。本邦では60代以上では感染率約46%と約半数の値を示すのに対して0-8歳では約2%と低い。本菌の主要な感染時期は5才以下であるため、今後本邦では*H. pylori*感染者は減少すると考えられている。しかし近年夫婦間における*H. pylori*感染事例が報告されるなど、感染力の強い*H. pylori*が蔓延し始め、今後日本では感染力の強い菌株が主流な感染菌株となることが推測出来る。*H. pylori*はその遺伝子系統解析より、それぞれ地域性により分類され、日本を含む東アジア型の*H. pylori*はその遺伝子配列および含まれるコンテックスから、胃がん発生率の高い*H. pylori*に分類されることが報告されるなど、非常に高い遺伝子の多様性を示す。そこで本研究は感染力の強い*H. pylori*菌株を、付着因子の遺伝子レベルで選定できるかについて検討を行なった。

本菌の付着・定着因子の1つであるAlpBは、全ての*H. pylori*が保有する膜貫通型の外膜タンパク質であり、細胞付着に強く関与していることが報告されている。AlpBのアミノ酸配列は膜貫通型タンパク質であることから予測できるように、非常に保存性の高いタンパク質であるものの、そのアミノ酸残基121-146領域だけは、これまで遺伝子解析が行われている全ての*H. pylori*で異なる配列を示す多様性領域である。この多様性領域が存在する意味、その機能の違いに興味を持たれる。そこで本領域が、AlpBが持つ細胞付着能に、どのような役割をしているかについて検討した。

日本人胃・十二指腸潰瘍患者由来のTK1402株は、*in vitro*バイオフィーム形成能が強いことを報告している。そこで本株のAlpB多様性領域を、バイオフィーム形成能の低い株の多様性領域のアミノ酸配列に置き換えると、そのバイオフィーム形成能は有意に減少した(図1A)。また

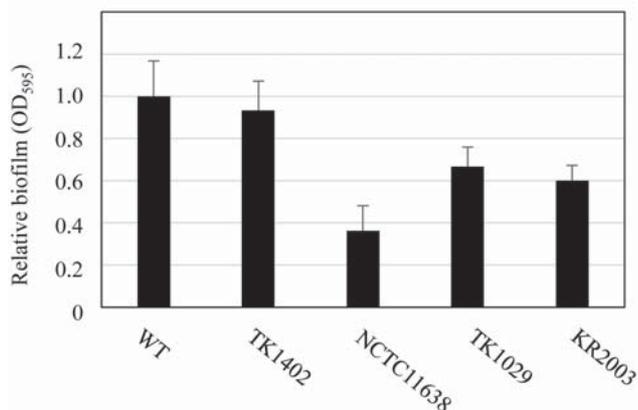


図1A TK1402株AlpB多様性領域置き換え体のバイオフィーム形成

TK1402株の多様性領域をグラフ下に表記した株の多様性領域に置き換え、その置き換え体のバイオフィーム形成能を調べた。図は親株であるTK1402株のバイオフィーム(WT)との相対値を表している。

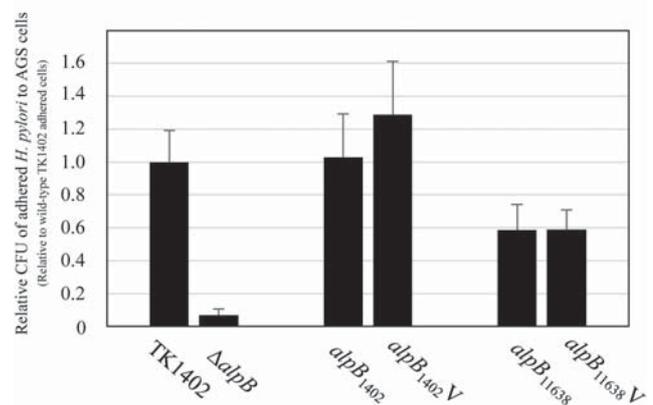


図1B TK1402株AlpB多様性領域をNCTC11638株多様性領域に置き換えた変異体のAGS細胞への付着能

TK1402株のAlpB全て(*alpB*₁₄₀₂または*alpB*₁₁₆₃₈と表記)、または多様性領域(*alpB*_{1402V}または*alpB*_{11638V}と表記)をNCTC11638株の*alpB*全て、または多様性領域に置き換え、AGS細胞への付着能を検討した。グラフはTK1402株の付着との相対値で表している。

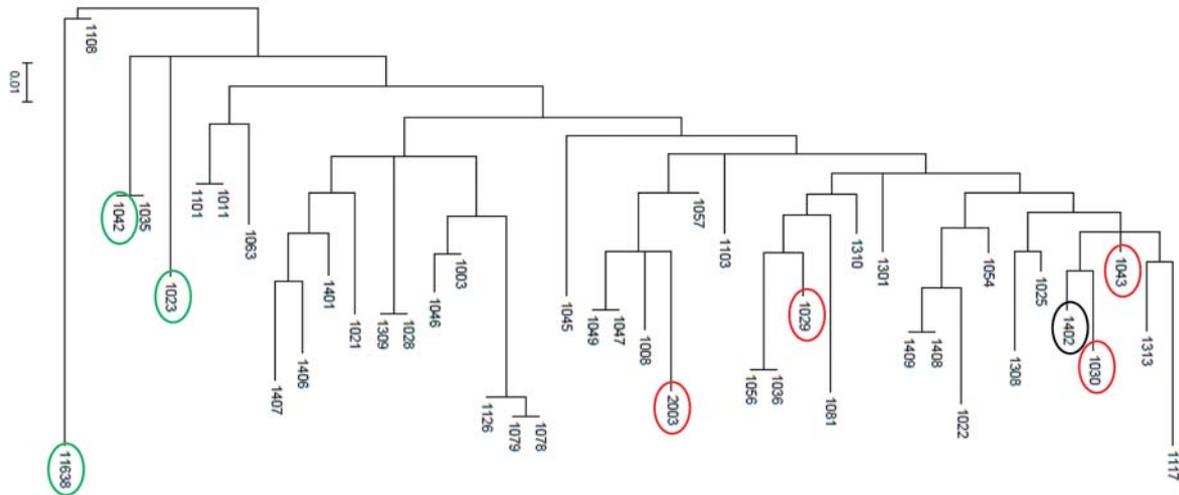


図2A AlpB多様性領域の系統樹

日本人患者由来の42株およびフランス株1株のAlpBアミノ酸残基121-146の系統樹解析を示す。株名はTKおよびKRは略してある。赤丸はTK1402株と近縁の株、緑丸は遠縁の株を表す。

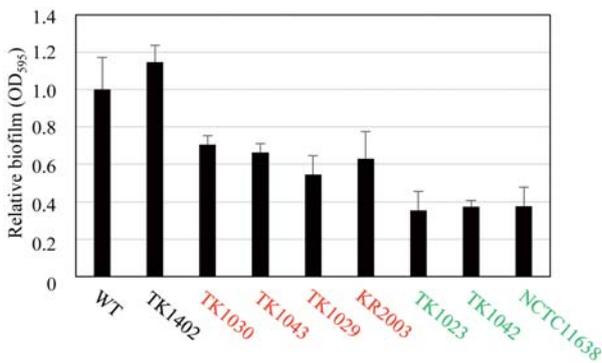


図2B TK1402株AlpB多様性領域置き換え体のバイオフィーム形成

TK1402株の多様性領域をグラフ下に表記した株の多様性領域に置き換え、その置き換え体のバイオフィーム形成能を調べた。図は親株であるTK1402株のバイオフィーム (WT) との相対値を表している。赤字で示した株はTK1402株と近縁の株、緑字で示した株は遠縁の株である。

胃上皮細胞であるAGS細胞への付着能も有意に減少した(図1B)。以上の結果からAlpBの多様性領域は、本菌の付着能およびバイオフィーム形成能に強く関与していることが明らかとなった。次に*H. pylori*日本人患者由来株を含む110株のAlpBアミノ酸配列121-146残基領域のアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った(図2A)。TK1402株のAlpB多様性領域のアミノ酸配列の系統に近い株であるTK1030, TK1043, TK1029, 遠い株であるTK1023, TK1042, NCTC11638のAlpB多様性領域をTK1402株の多様性領域に置き換え、そのバイオフィーム形成能を検討すると、全ての置き換え体においてバイオフィーム形成能、細胞付着能は減少したものの、AlpBの系統解析においてTK1402株に近いAlpBの多様性領域置き換え体は、遠いAlpB多様性領域置き換え体より回復は大きかった(図2B)。以上よりAlpBの多様性領域の遺伝子配列を調べる

ことで、*H. pylori*菌株の細胞への付着能を判定できる可能性が示唆された。現在AlpB多様性領域のアミノ酸配列の詳細な解析を行っているところである。さらに本菌の宿主細胞への付着に関与するBabA, SabA, AlpAなどにもやはりそのアミノ酸配列内に多様性を示す領域が存在している。AlpBだけでなく、これら付着因子の多様性領域が及ぼすバイオフィーム形成能、細胞付着能への影響を調べることで、本菌の定着性の判定ができるかもしれない。本菌の定着能の判定が、付着因子の遺伝子レベルで判定できるようになると、たとえば感染者の便由来の本菌DNAより、定着能そして感染力の強弱が判定でき、感染力の強い株の早期発見による完全な駆除を行なうことで、本菌の感染拡大の予防に繋がると考える。

List of publication

- 1) Yonezawa H, Osaki T, Fukutomi T, Hanawa T, Kurata S, Zaman C, Hojo F, Kamiya S : Diversification of the AlpB Outer Membrane Protein of *Helicobacter pylori* Affects Biofilm Formation and Cellular Adhesion. *J Bacteriol.* 28: 199(6). 2017.
- 2) Osaki T, Mabe K, Zaman C, Yonezawa H, Okuda M, Amagai K, Fujieda S, Goto M, Shibata W, Kato M, Kamiya S : Usefulness of detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from fecal specimens for young adults treated with eradication therapy. *Helicobacter.* 22, 2017.
- 3) 米澤英雄, 大崎敬子, 花輪智子, 蔵田訓, 神谷茂 : *Helicobacter pylori*外膜タンパク質AlpBの多様性とバイオフィーム形成. *Bacterial Adherence & Biofilm* 29:53-58, 2016.

講演記録

- 1) 米澤英雄, 大崎敬子, 北条史, ザマンシンシア, 神谷茂 : AlpABの多様性が及ぼす*Helicobacter pylori* TK1402株バイオフィーム形成への影響. 第22回日本ヘリコバクター学会学術集会, 別府, 2016年6月24-26日.

- 2) 米澤英雄, 大崎敬子, 花輪智子, 蔵田訓, 神谷茂: *Helicobacter pylori* AlpABの多様性がもたらすバイオフィルム形成への影響. 第30回日本バイオフィルム学会学術集会, 東京, 2016年7月2日.
- 3) Yonezawa H, Osaki T, Hojo F, Kamiya S: Critical role of AlpA and AlpB for biofilm formation and cell adhesion of *Helicobacter pylori*. European Helicobacter and Microbiota Study Group - EHMSG XXIXth International Workshop on Helicobacter and Microbiota in Inflammation and Cancer, Germany, September 15th-17th, 2016.
- 4) 米澤英雄, 大崎敬子, 花輪智子, 蔵田訓, ザマンシンシア, 北条史, 神谷茂: *Helicobacter pylori*外膜タンパク質 AlpAのバイオフィルム形成能への影響. 第90回日本細菌学会総会, 仙台, 2017年3月19-21日.