

Helicobacter pylori ロシア株が持つ *cagA* 遺伝子 EPIYA モチーフの解析

Konstantin Makhinov (コンスタンチン マヒノフ)

極東医科大学 4 年

Reva Ivan ・樋口 渉 ・高野 智洋

西山 晃史 ・山本 達男

指導：細菌学教室

Characterization of the *cagA* gene EPIYA motif of *Helicobacter pylori* from Russia

Konstantin MAKHINOV

Far Eastern State Medical University (the fourth grade)

Reva IVAN, Wataru HIGUCHI, Tomomi TAKANO

Akihito NISHIYAMA and Tatsuo YAMAMOTO

Division of Bacteriology,

Department of Infectious Disease Control and International Medicine,

Niigata University Graduate School of Medical and

Dental Sciences; Niigata University School of Medicine

要 旨

Helicobacter pylori は胃癌の細菌性リスク因子で、*H. pylori* が分泌する CagA タンパク質の EPIYA モチーフでのリン酸化レベルが *H. pylori* の発癌作用に関連すると考えられている。今回、*H. pylori* ロシア株の CagA タンパク質 EPIYA モチーフについて DNA 解析した結果、日本（新潟）の *H. pylori* 株と同様の結果が得られた。ロシア株は日本株と同様で、発癌能力の高い強毒株である可能性がある。

Reprint requests to: Tatsuo YAMAMOTO
Division of Bacteriology Department of Infectious
Disease Control and International Medicine
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座
細菌学分野 山本達男

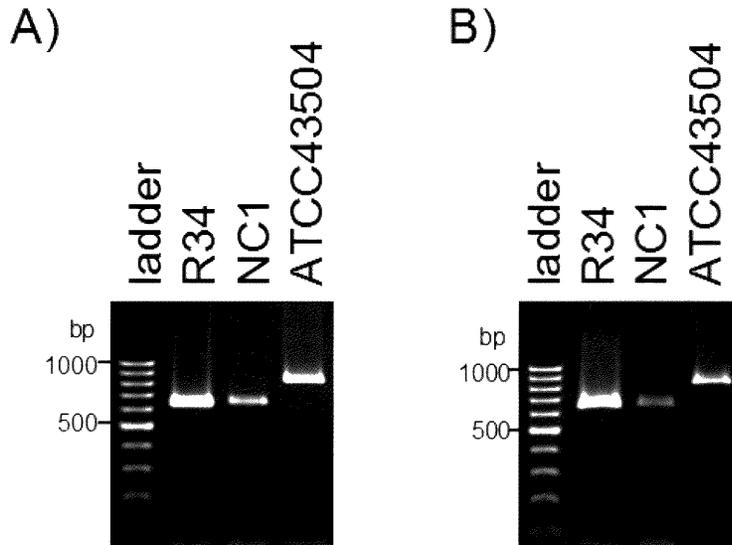


図1 *H. pylori* ロシア株と新潟株がもつ CagA タンパク質 EPIYA モチーフの PCR 法による DNA 解析

セット1 (A) またはセット2 (B) のプライマーを用いて *cagA* 遺伝子の EPIYA モチーフを増幅した。

はじめに

胃癌は癌死亡数で第2位にランクされる (WHO, 2002)。日本の場合新規患者数は毎年10万件以上に達する。ロシアでもほぼ同様で、10万人あたりの死亡率は男性では38.2名 (日本では53.0名)、女性の場合15.4名 (日本では27.4名) である (WHO, 2002; 国立がんセンターがん対策情報センター, 2006)。

Helicobacter pylori はヒトの胃粘膜に定着して増殖するグラム陰性のらせん菌で、胃癌との強い関連が指摘されている (class I carcinogen)¹⁾。CagA は *H. pylori* が産生する主要な病原タンパク質 (分泌タンパク質) で、type IV 分泌システムを通してヒト胃上皮細胞に注入される²⁾³⁾。ヒト上皮細胞内では CagA タンパク質の3'-末端に位置する Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) モチーフがリン酸化され、上皮細胞の癌化に関連すると考えられている³⁾⁻⁵⁾。EPIYA モチーフには A, B, C, D の4種類があり、リン酸化の程度が異なる³⁾。

本研究では *H. pylori* ロシア株の病原性を検討する目的で、ロシア株の EPIYA モチーフ解析を行った。

方 法

菌株と培養: ロシアで分離された R34 株, 新潟で分離された NC1 株そして標準株 ATCC43504 株を用いた。培養は微好気環境下 36°C で、血液平板上で4日間行った。

菌体 DNA の調製: 菌体を水に浮遊させ、5分間煮沸、遠心後上清を DNA 検体とした。

PCR プライマーと PCR 反応: *cagA* 遺伝子の EPIYA モチーフを増幅する PCR プライマーとして以下2セットを使用した。

セット1⁶⁾

(CAG1) 5'-ACCCTAGTCGGTAATGGGTTA-3'

(CAG2) 5'-GTAATTGTCTAGT TTCGC-3'

セット2⁷⁾

(cag2) 5'-GGAACCCTAGTCGGTAATG-3'

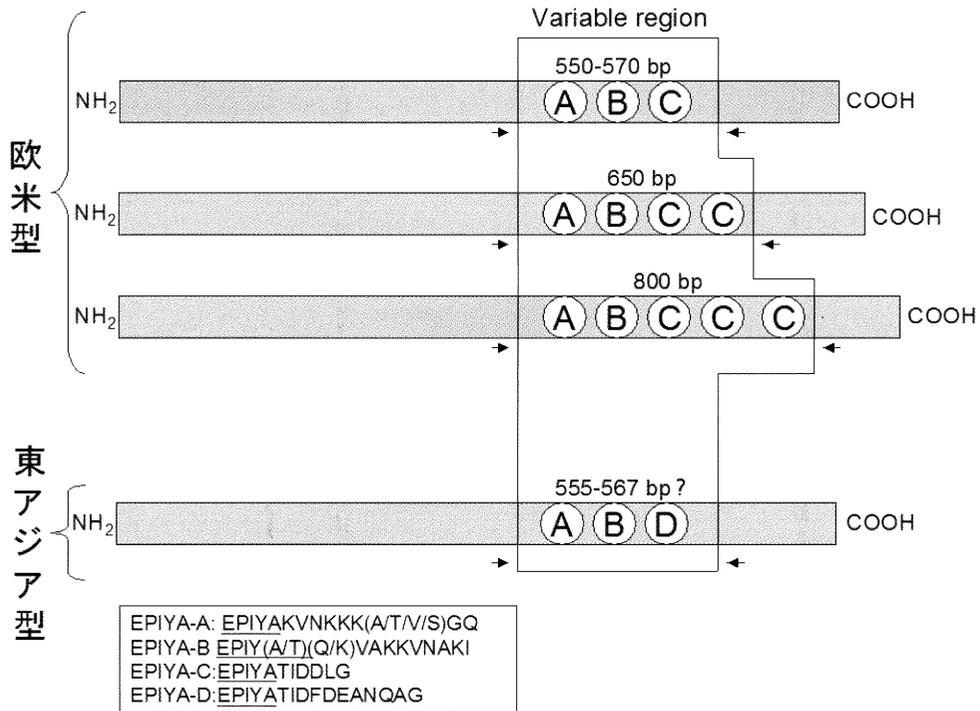


図2 *H. pylori* が分泌する CagA タンパク質の構造と主要な EPIYA モチーフ⁸⁾

文献3, 4および6の情報をもとに CagA タンパク質の EPIYA モチーフを模式的に表した。図中の A, B, C, D はそれぞれ EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C, EPIYA-D を表す。矢印は図1のプライマーの位置を示す。

(*cag4*) 5'-ATCTTTGAGCTTGTCTATCG-3'

PCR 反応 (95 °C 30s, 55 °C 2 min, 72 °C 2 min を 30 サイクル) 後, 1.5 % アガロース寒天ゲル上で電気泳動を行い, 泳動パターンをエチジウムブロマイド染色によって可視化した。

結 果

H. pylori DNA を材料に *cagA* 遺伝子の EPIYA モチーフを PCR によって増幅した結果, セット1の PCR プライマーを用いた場合でも, セット2の PCR プライマーを用いた場合でも同様の単一バンドが得られた (図1)。PCR 産物のサイズはロシア株 (R34) でも新潟株 (NC1) でも同様 (650 塩基対) で, ATCC43504 株の場合 (800 塩

基対) より小さかった。

考 察

H. pylori ロシア株 (R34) が, 新潟株 (NC1) と同サイズの *cagA* 遺伝子 EPIYA モチーフを持っていることが明らかとなった。*H. pylori* 欧米株と異なって, 日本を含むアジア諸国の *H. pylori* は胃癌をより強く誘発する強毒株と考えられている³⁾。従って *cagA* 遺伝子 EPIYA モチーフの観点から推定すると, ロシアの *H. pylori* は日本と同様に胃癌を強く誘発する強毒株であると考えられる。

CagA タンパク質に存在する EPIYA モチーフ配列の繰り返し構造 (可変領域)⁸⁾ を図2にまとめた。ABC タイプの場合, C の繰り返しが多い程り

ン酸化活性が高いと考えられている³⁾。

今回増幅された産物のサイズは ATCC43504 株の場合 (ABCCC 相当) よりも小さく, ABC, ABD あるいは ABCC 型と考えられた。さらに PCR 産物の塩基配列を決定して解析を進める必要がある。

文 献

- 1) IRAC Working Group: Infection with *Helicobacter pylori*. In: IRAC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 61, Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, p177 - 241, 1994.
- 2) Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W and Haas R: Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 287: 1497 - 1500, 2000.
- 3) Hatakeyama M and Higashi H: *Helicobacter pylori* CagA: a new paradigm for bacterial carcinogenesis. *Cancer Sci* 96: 835 - 843, 2005.
- 4) Higashi H, Tsutsumi R, Fujita A, Yamazaki S, Asaka M, Azuma T and Hatakeyama M: Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14428 - 14433, 2002.
- 5) Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata - Kamiya N, Saito Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuki A, Ohno S and Hatakeyama M: *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature* 447: 330 - 333, 2007.
- 6) Yamaoka Y, Kodama T, Kashima K, Graham DY and Sepulveda AR: Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different H. pylori - associated diseases. *J Clin Microbiol* 36: 2258 - 2263, 1998.
- 7) Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle PR and Stremmel W: Diversity of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. *J Clin Microbiol* 36: 944 - 948, 1998.
- 8) Reyes - Leon A, Atherton JC, Argent RH, Puente JL and Torres J: Heterogeneity in the activity of Mexican *Helicobacter pylori* strains in gastric epithelial cells and its association with diversity in the *cagA* gene. *Infect Immun* 3445 - 3454, 2007.

(平成20年9月22日受付)