

## *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

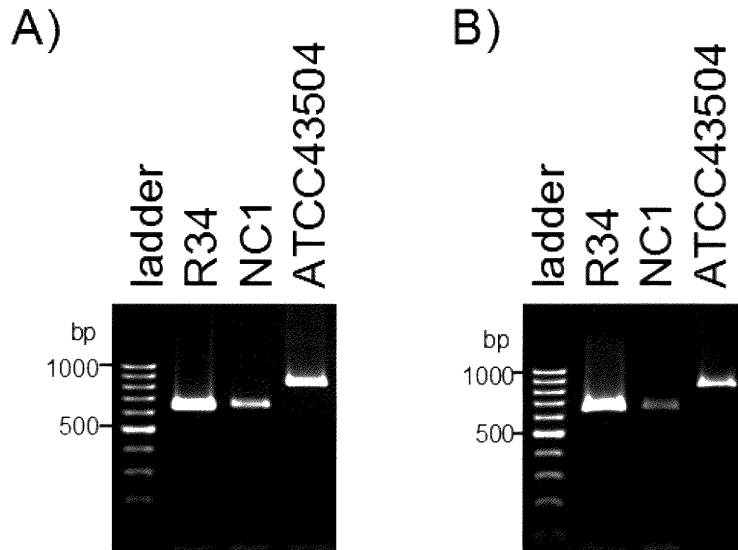


図1 *H. pylori* ロシア株と新潟株がもつ CagA タンパク質 EPIYA モチーフの PCR 法による DNA 解析

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)<sup>1)</sup>。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<sup>2)3)</sup>。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<sup>3)-5)</sup>。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<sup>3)</sup>。

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1<sup>6)</sup>

(CAG1) 5'-ACCCTAGTCGGTAATGGGTTA-3'

(CAG2) 5'-GTAATTGTCTAGT TTCGC-3'

セット2<sup>7)</sup>

(cag2) 5'-GGAACCCTAGTCGGTAATG-3'

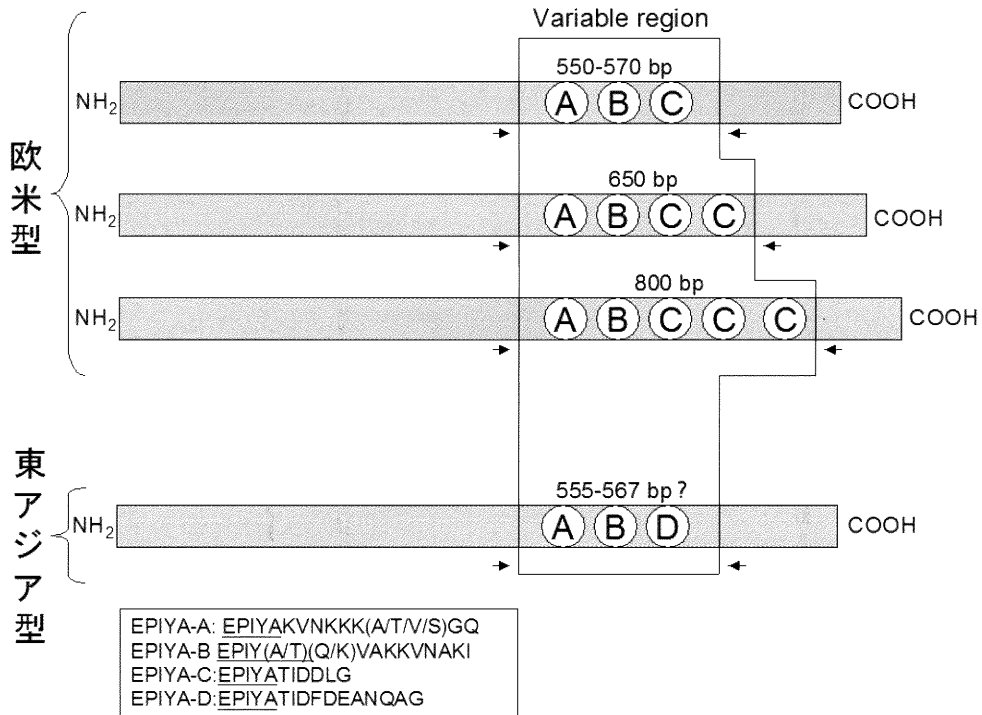


図2 *H. pylori* が分泌する CagA タンパク質の構造と主要な EPIYA モチーフ<sup>8)</sup>

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<sup>3)</sup>。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)<sup>8)</sup> 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<sup>3)</sup>。

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)