ヘリコバクターピロリの病原性に関する研究

柴 山 恵 吾¹

¹ 国立感染症研究所細菌第二部
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

Helicobacter pylori は胃に持続感染し、胃炎、胃潰瘍、胃癌の発症の原因となる。我々は、*H. pylori* が産生する蛋白で胃上皮細胞にアポトーシスを誘導する活性を持つものを精製、同定した。この蛋白は γ -glutamyltranspeptidase (GGT) だった。GGT は分泌蛋白で、菌体外に存在する物質を基質としていた。GGT は、グルタミンとグルタチオンに対して非常に強い加水分解活性を示し、 K_m 値が $1 \mu\text{M}$ 以下だった。宿主細胞にとって、環境中のグルタミンとグルタチオンが加水分解により消費される事は、細胞内でそれらを合成するために ATP の消費を課することになるとともに、グルタチオンの欠乏は、宿主細胞を酸化ストレスにさらすことになる。これらのことは、宿主細胞に対する障害メカニズムの一つと考えられる。一方 *H. pylori* はグルタミントランスポーターを持たず、細胞外のグルタミンを GGT の働きによりグルタミン酸に加水分解して取り込んでいた。*H. pylori* の GGT による病原性は、菌自身の代謝に必要な酵素が同時に宿主に対して障害性を示すというものだった。

はじめに

Helicobacter pylori が Marshall らにより 1984 年に報告され (5)、その後この菌と胃疾患との関連について多くの疫学的、生化学的な研究が行われ、この菌の感染が胃炎、胃十二指腸潰瘍、そして胃癌の発症に関わっていることが明らかになってきた。*H. pylori* は他の多くの病原細菌と異なり、感染が長期に持続して様々な病態が形成される。*H. pylori* は様々な病原因子を産生し、胃粘膜細胞に対し様々な生理作用を及ぼす (11)。我々は、*H. pylori* が産生する蛋白で胃上皮細胞にアポトーシスを誘導する活性を持つものを精製、同定した。この蛋白は γ -glutamyltranspeptidase (GGT) だった。これまでに我々はこの蛋白の生理、病理的機能の解析を行ってきた。この論文では、この蛋白に関してこれまでに得られた知見を紹介し、*H. pylori* による病原性メカニズムとの関わりを考察する。

1. *H. pylori* より新たに見出されたアポトーシス誘導蛋白

我々は、*H. pylori* が産生する蛋白成分に AGS 細胞に対してアポトーシス誘導活性を示すものが存在することを見出

した (図 1) (12)。そしてその蛋白を *H. pylori* 26695 株より精製、同定した (図 2) (13)。この蛋白は CagA, VacA などのそれまでに知られていた病原因子とは全く異なるものだった。この蛋白は HP1118 遺伝子にコードされているもので、GGT だった。この蛋白は Large subunit と Small subunit からなり、N 末端にシグナル配列を持つ分泌蛋白でペリプラズムに存在する事が分かった。一般に、GGT はグルタチオンなど γ -glutamyl 基を持つものを基質として、その γ -

図 1. *H. pylori* による AGS 細胞のアポトーシスの誘導
AGS 細胞を *H. pylori* 26695 株と 24 時間培養後、回収し、Hoechst33342 で染色、蛍光顕微鏡で観察した。核が濃縮、断片化したアポトーシス細胞が認められる (矢印)。

Keigo SHIBAYAMA
Molecular mechanism of *Helicobacter pylori*-mediated pathogenesis
Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National
Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama,
Tokyo 208-0011

図2. 各精製段階の画分の SDS-PAGE profile
Lane 1, 分子量マーカー; Lane 2, 粗抽出画分; Lane 3, 陽イオン交換カラム精製画分; Lane 4, 疎水カラム精製画分; Lane 5, ゲル濾過カラム精製画分; Lane 6, 陽イオン交換カラム精製画分。最終的に2本のバンドに精製された。N末端シーケンスの結果, これらのバンドは GGT の Large subunit と Small subunit であることが分かった。

図3. *H. pylori* 26695 株と, その GGT 欠損株 *H. pylori* KS-1 との AGS 細胞に対するアポトーシス誘導能の比較。AGS 細胞をそれぞれの株と24時間インキュベートし, 細胞を回収後アポトーシス細胞の割合を蛍光顕微鏡下で観察し算出した。GGT 欠損株のアポトーシス誘導能は, 親株に比べて有意に低下していた。

glutamyl 基を他のアミノ酸に転移する酵素であり, 多くの細菌あるいは動植物細胞に普遍的に存在する酵素である。ヒトでは, 肝細胞において活性が高く, 臨床的には γ -GTP と略されて肝機能の指標として用いられているものである。この蛋白の一般的な機能は細胞内へのアミノ酸の取り込みが提唱されている(8)。この酵素がアポトーシス誘導活性を持つということはこれまでに報告が無く, 新しい知見である。*H. pylori* より精製したこの蛋白の GGT 活性を, GGT の不可逆的阻害剤で前処理したところ, この蛋白のアポトーシス誘導活性は失われた。このことから, GGT の酵素活性がアポトーシスの誘導に関与していると考えられた。また, GGT をコードする HP1118 遺伝子を欠損させた変異株は, 親株に比べて有意にアポトーシス誘導活性が低下した(図3)。このことから, GGT は *H. pylori* の持つアポトーシス誘導活性の中でも重要な役割を果たすものと考えられた。

2. *H. pylori* の GGT の生化学的, 生理的機能

H. pylori の GGT の機能を解析するために, 大腸菌を用いてリコンビナント蛋白を作成し, 生化学的性状を調べた(14)。一般的に GGT は転移酵素として知られているが, *H. pylori* の GGT は転移反応に関しては, γ -glutamyl 基の acceptor 基質の K_m 値が数十から数百 mM であったので, in vivo における生理的条件下では主要な反応ではないと考えられた。一方グルタミンとグルタチオンの加水分解反応においては K_m 値が $1 \mu\text{M}$ 以下であり, これらの基質に非常に強い加水分解活性を示すことが分かった。ところで, *H. pylori* はグルタミンを取り込むトランスポーターを持たない。*H. pylori* は菌体外のグルタミンを GGT の働きでグルタミン酸に変換し, そのグルタミン酸をグルタミン酸トランスポーターにより菌体内に取り込み, 利用していることが分かった。菌体内に取り込まれたグルタミン酸は, 一部はグルタミンの合成に利用され, その他は α -ketoglutarate に変換された後, TCA cycle に入り, エネルギー産生に利用されていることが分かった。In vitro での培地による培養など, 環境中にグルタミン酸が十分に存在する環境では, GGT の欠損株は親株と同様に生育する。しかし, 動物実験でこの蛋白は感染の成立に必要なことが明らかになっている(2, 6)。in vivo の栄養が限られる環境中では, この蛋白の活性がグルタミン酸の獲得に必須であると考えられる。ところで同時に, この酵素の活性により感染局所ではグルタミン, グルタチオンが非常に低い K_m 値で加水分解されるため, 感染局所ではこれらの基質の濃度が非常に低下すると予想される。宿主の細胞にとっては, グルタミンは必須アミノ酸ではないものの, その合成には ATP を必要とするため, 細胞外におけるグルタミンの欠乏は, 結果的に細胞自身に ATP の消費を課すことになる。また, グルタチオンは, 細胞を酸化から守る重要な役割を果たす抗酸化物質であり, またその生合成は ATP を必要とする。そのため, グルタチオンの欠乏は, 細胞の酸化還元バランスを酸化状態に傾かせるとともに細胞に ATP の消費を課すことになると考えられる。これらのことは, 宿主細胞のアポトーシス誘導のメカニズムの一つと考えられる(9)。GGT の菌の代謝における機能と宿主細胞に対する作用を図4に示す。このように, *H. pylori* の GGT は菌にとって必要な生理機能を持つ酵素であるが, 同時に宿主にとって害を及ぼす働きをしているという側面を持つ。

3. *H. pylori* における GGT の発現

GGT の酵素活性は *H. pylori* の特徴的な生化学性状の一つであり, この菌の同定の指標となることが報告されている(7)。我々も, 臨床分離株 83 株を用いた実験で, 全ての株が GGT を産生していることを確認した。また, GGT の発現量は growth phase, pH, その他様々な条件下でもほぼ一定で, 常時ある一定の量が発現されていることが分かった。GGT の機能は菌の生理的代謝の中で常に必要であるため, 常時

図4. GGTの*H. pylori*の代謝における役割と、病原性との関連性。GGTは菌自体のグルタミン、グルタチオン利用に必須な生理活性をもつ酵素であると同時に、その活性がグルタミン、グルタチオンの枯渇と活性酸素（ROS）の増加を通して細胞障害を起こすと考えられる。ROS；Reactive oxygen species.

ある程度の量が発現されているのではないかと考えられる。また一方、病原因子という視点では、*H. pylori*の感染に伴い宿主細胞は常にこの蛋白の作用を受けている状態にあると考えられる。このように病原因子が宿主に長期持続的に作用し続けるという点は、他の多くの病原細菌の毒素など、強力な生理作用を持ち宿主に重篤な急性症状を起こすものとは大きく異なる特徴である。

4. GGTの宿主細胞に対する様々な病理的作用

我々が*H. pylori*の病原因子としてのGGTを報告して以降、他のグループにおいてもこの蛋白の宿主細胞に対する作用について研究が進められた。Busielloらは*H. pylori*のGGTが宿主細胞のCyclooxygenase(COX)-2とEGF-related peptideの発現を亢進させることを報告した(1)。これらのシグナルは細胞のmitogenic活性を上昇させるため、*H. pylori*による宿主細胞の癌化への関与が考えられている。一方、GGTは宿主細胞にアポトーシスを誘導する活性を示すので、GGTは宿主細胞に細胞死と細胞増殖の両方のシグナルを活性化させる機能をもつと考えられる。細胞内でのこれらのシグナルの総合的なバランスで最終的に細胞としてどのような変化が起こるかが決まると考えられる。また、*H. pylori*はT cellの増殖を抑制して宿主の免疫を回避する機構を持つ事が知られているが、Schmeesらは*H. pylori*が産生するGGTがその活性を担う本体であることを示した(10)。彼らは、GGTがT cellに細胞周期のG1 arrestを誘導すること、またGGTの欠損株ではその活性が全く失われたことから、GGTがその活性に必要かつ十分であることを示した。このことは、GGTが感染の成立に必須であるという結

果とも一致するものである。

5. 今後の展望

我々は、*H. pylori*のGGTは胃粘膜において上皮細胞と免疫系細胞の両方に作用を及ぼし、持続感染の成立と病態形成に関わっていると考え研究を進めている。ところで*H. pylori*による病態の形成は多様で、それは菌側の因子だけでなく宿主の遺伝子的背景や食生活などの環境要因が多様であることも大きく影響していると考えられている。病態形成メカニズムの解明には、これらの要素を総合的に考えていく必要があるだろう。我々は現在、GGTと形成される病態との関連について、GGTの作用とそれに対する宿主細胞の反応性という観点で病態形成メカニズムの解析を進め、形成される病態と相関がある宿主側のバイオマーカー物質

図5. GGTの結晶

の探索を行っている。

ところで、GGTは一般にアミノ酸の取り込みに関与しているとされているものの、生理活性について未だ分かっていないものが多く存在する可能性がある。我々が明らかにした *H. pylori* の GGT のアポトーシス誘導活性の他、最近人の GGT において破骨細胞の形成を促進する活性が報告されている (3, 4)。GGT は、多彩な生理活性を持ち、様々な病態形成に関わっている可能性があると思われる。

現在、我々は生化学的な機能解析とともに、この蛋白を結晶化し、基質との結合様式について構造解析を進めている (図 5)。構造解析は他のグループでも研究が進められており今後、構造面からの機能の解明も期待出来ると思われる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり多大なるご指導を賜りました国立感染症研究所細菌第二部部長荒川宜親先生に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Busiello, I., Acquaviva, R., Di Popolo, A., T.G. Blanchard, T.G., Ricci, V., Romano, M., Zarrilli, R. (2004): *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase upregulates COX-2 and EGF-related peptide expression in human gastric cells. *Cell Microbiol.* **6**, 255–267.
- 2) Chevalier, C., Thiberge, J.M., Ferrero, R.L., Labigne, A. (1999): Essential role of *Helicobacter pylori* gamma-glutamyltranspeptidase for the colonization of the gastric mucosa of mice. *Mol. Microbiol.* **31**, 1359–1372.
- 3) Hiramatsu, K., Asaba, Y., Takeshita, S., Nimura, Y., Tatsumi, S., Katagiri, N., Niida, S., Nakajima, T., Tanaka, S., Ito, M., Karsenty, G., Ikeda, K. (2007): Overexpression of gamma-glutamyltransferase in transgenic mice accelerates bone resorption and causes osteoporosis. *Endocrinology* **148**, 2708–2715.
- 4) Ishizuka, Y., Moriwaki, S., Kawahara-Hanaoka, M., Uemura, Y., Serizawa, I., Miyauchi, M., Shibata, S., Kanaya, T., Takata, T., Taniguchi, N., Niida, S. (2007): Treatment with anti-gamma-glutamyl transpeptidase antibody attenuates osteolysis in collagen-induced arthritis mice. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 1933–1942.
- 5) Marshall, B.J., Warren, J.R. (1984): Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**, 1311–1315.
- 6) McGovern, K.J., Blanchard, T.G., Gutierrez, J.A., Czinn, S.J., Krakowka, S., Youngman, P. (2001): gamma-Glutamyltransferase is a *Helicobacter pylori* virulence factor but is not essential for colonization. *Infect. Immun.* **69**, 4168–4173.
- 7) Megraud, F., Bonnet, F., Garnier, M., Lamouliatte, H. (1985): Characterization of “*Campylobacter pyloridis*” by culture, enzymatic profile, and protein content. *J. Clin. Microbiol.* **22**, 1007–1010.
- 8) Meister, A. (1973): On the enzymology of amino acid transport. *Science* **180**, 33–39.
- 9) Romano, M., Ricci, V., Zarrilli, R. (2006): Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori*-related gastric carcinogenesis—implications for chemoprevention. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **3**, 622–632.
- 10) Schmees, C., Prinz, C., Treptau, T., Rad, R., Hengst, L., Volland, P., Bauer, S., Brenner, L., Schmid, R.M., Gerhard, M. (2007): Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase. *Gastroenterology* **132**, 1820–1833.
- 11) 柴山恵吾, 荒川宜親 (2004): *Helicobacter pylori* 感染と細胞内シグナル伝達. *日本細菌学雑誌* **59**, 415–424.
- 12) Shibayama, K., Doi, Y., Shibata, N., Yagi, T., Nada, T., Iinuma, Y., Arakawa, Y. (2001): Apoptotic signaling pathway activated by *Helicobacter pylori* infection and increase of apoptosis-inducing activity under serum-starved conditions. *Infect. Immun.* **69**, 3181–3189.
- 13) Shibayama, K., Kamachi, K., Nagata, N., Yagi, T., Nada, T., Doi, Y., Shibata, N., Yokoyama, K., Yamane, K., Kato, H., Iinuma, Y., Arakawa, Y. (2003): A novel apoptosis-inducing protein from *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **47**, 443–451.
- 14) Shibayama, K., Wachino, J., Arakawa, Y., Saidijam, M., Rutherford, N.G., Henderson, P.J. (2007): Metabolism of glutamine and glutathione via gamma-glutamyltranspeptidase and glutamate transport in *Helicobacter pylori*: possible significance in the pathophysiology of the organism. *Mol. Microbiol.* **64**, 396–406.