Helicobacter pylori の病原因子

—空胞化毒素 (VacA) と病原性遺伝子群 (cag PAI) について—

和田 昭 裕・平 山 壽 哉

長崎大学熱帯医学研究所 病原体解析部門 病原因子機能解析分野
〒852-8523 長崎県長崎市坂本1-12-4

〔受理：2001年5月7日〕

胃組織に生息する *H. pylori* の存在が明らかにされてから20年が経過し、*H. pylori* の生物学的、医学的知見が集積し、*H. pylori* が種々の消化器疾患や発癌と関連することが指摘されている。本稿では、本菌の病原性に関わる空胞化毒素 (VacA) と病原性遺伝子群 (cag Pathogenicity Island; cag PAI) についての最近の知見を概説する。

はじめに

胃液が示す強い殺菌作用のために、細菌が生息できないとされた胃内に *Helicobacter* が尿素からアンモニアを生成するウレアーゼを強く産生して、生息することが明らかにされた (22, 37)。とくに、*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) の持続感染は、慢性胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃癌、MALT リンパ腫などの疾患に高い疫学的関連性が指摘されている。

世界人口の半数以上の人々が *H. pylori* に感染し、本邦においては6000万以上の人々が *H. pylori* に感染していると推定されている。大多数の *H. pylori* 感染者は無症状のまま経過する。しかし、*H. pylori* 感染は無症状の場合においても、胃粘膜に組織学的胃炎を生じ、炎症の持続は、胃粘膜委縮・腸上皮化生などの2次的な変化を生じさせる。したがって、「*H. pylori* はすべて除菌する

べきだとする考え」があるが、本邦においては、消化性潰瘍、MALT リンパ腫、および早期胃癌切除後の *H. pylori* 陽性者が除菌対象として (40)、2000年11月に保険診療での *H. pylori* の感染診断と除菌療法が認められた。本稿では、*H. pylori* の病原因子について、特に、胃・十二指腸の病変との関連性が指摘されている空胞化毒素 (VacA) と病原性遺伝子群 (cag Pathogenicity Island; cag PAI) をとりあげて本菌感染症における役割について紹介したい。

1. 細胞致死空胞化毒素 (VacA)

1988年、Leunk らが、*H. pylori* の培養液中に空胞化活性を示す毒素 (VacA) の存在を初めて報告した (34)。その後、1992年、Cover らが VacA を精製し (11)、*vacA* 遺伝子の塩基配列を報告した (14, 48, 50, 58)。その遺伝子配列から推定される VacA の分子量は 139 kDa (ATCC49503株の場合は1287アミノ酸からなる) であり (図1)、33アミノ酸からなるN末端側のシグナルペプチドが切断を受け、さらには外膜を通過する際にプロテアーゼによって VacA のC末端側が切断を受け、821アミノ酸からなる87 kDa の成熟蛋白質 (34残基から854残基) として

Akihiro WADA and Toshiya HIRAYAMA
Vacuolating cytotoxin (VacA) and cag Pathogenicity Island (PAI) of *Helicobacter pylori*
Department of Bacteriology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, 1-12-4, Sakamoto, Nagasaki 852-8523

図1. *H. pylori* (ATCC49503株) が産生する VacA の構造。

1287アミノ酸からなる VacA は、33アミノ酸のシグナルペプチドをもち切断される。菌体外に分泌された成熟毒素はさらに C 末端が切断された821アミノ酸から構成されてる (39)。一般に、vacA 遺伝子にはシグナル配列 (S1 と S2)、mid-region (m1 と m2) にそれぞれ異なる 2つのタイプの配列がある。mid-region の約300アミノ酸には m1 と m2 の間で約55%の相同性が認められる。

分泌される (39)。この成熟 VacA は、N 末端部分の 34-37 kDa 蛋白質 (p37) と C 末端部分の 58 kDa 蛋白質 (p58) とに 2 分する分子内切断が、344残基めのアラニンと345残基めのリジンの間にある (39)。p37は空胞活性を (19, 20)、p58は細胞との結合に機能している (24)。成熟 VacA は 2 層からなる 6 量体もしくは 7 量体を形

成して、花びらのような構造をとっている (36)。VacA のこうした高次構造のためか、大腸菌で作製した空胞化活性の持つリコンビナント VacA が得られていない (64)。そのため主として微好気性条件下で培養した *H. pylori* の培養液から精製した微量の VacA を用いて研究が進められている。

図2. VacA 受容体に知られる RPTPβ の 3つのアイソフォームの模式図。

RPTPβ は、全長型 (long form) の RPTPβ-A、細胞外のセリン、グリシンに富む領域を欠いた (short form) RPTPβ-B、および膜一回貫通部分と細胞内領域を欠いた RPTPβ-S が知られている。CAH: 炭酸脱水酵素領域, FN: フィブロネクチン III 型領域, GAG: グリコサミングリカン, D1: チロシンフォスファターゼ D1 領域, D2: チロシンフォスファターゼ D2 領域を示す。

図3. VacA による細胞空胞形成に及ぼす dynamine の効果。

ベクター (コントロール), ドミナントネガティブ dynamine 1, Wild-type dynamine 1 を それぞれ一過性に発現させた HeLa 細胞に, VacA を作用させて, 空胞形成が生じた細胞数を数えて, その割合 (%) を示している (57)。

VacA のシグナルペプチド (s) には特徴があり, シグナルペプチドと約300アミノ酸からなる mid-region の配列 (m) の組み合わせによりいくつかのモザイク構造をもつ VacA に分けられる。すなわち, シグナルペプチドの配列には, s1 (s1a, s1b, s1c) と s2 の大別される 2 つの異なる配列があり, s1 配列をもつ VacA は s2 配列をもつ VacA より速やかに分泌される。また, p58 の一部分である mid-region 配列には, 2 つの異なる配列 (m1, m2) があり, m1 と m2 アミノ酸配列の相同性は55%である (3)。m1, m2 のアミノ酸配列の違いが毒素の細胞特異性の違いと関係することが報告されている (43)。つまり, m1 配

列をもつ VacA (m1-VacA) は HeLa 細胞および RK-13 細胞に空胞化活性を示すのに対して, m2 配列をもつ VacA (m2-VacA) は HeLa 細胞には空胞化活性を示さない (43)。シグナルペプチドおよび mid-region の配列の組み合わせから, VacA は, s1/m1, s1/m2, s2/m1 (s2/m1 は報告されてない), s2/m2 に分類される。さらに, s1 配列をもつ VacA は VacA 分泌量が多いので消化性潰瘍との関連が示されている。本邦で分類される *H. pylori* の VacA はほとんどが強毒型である s1/m1 あるが, 沖縄においては欧米と同様に s1/m2 と s2/m2 が認められる (29, 54)。

VacA を酸性 (pH 1.5-5.5) で処理後に中性に戻した VacA は空胞化形成能が増強され, さらにペプシンに対しても耐性になる (30)。この現象は, 6 量体の 2 層構造を取る VacA が酸処理により一旦モノマーに解離し, 中性に戻すことでより強い空胞化活性を示す立体構造に変化したと考えられ, ペプシン抵抗性の獲得と合わせて十二指腸での病巣の拡大と潰瘍形成に重要である (18)。VacA の活性化はアルカリにさらすことでも酸の時と同じように高次構造の変化が起こり, 活性型 VacA になる (68)。

我々は, VacA の毒性の初期作用に関与する宿

表1. ミトコンドリアの膜電位に及ぼす VacA の効果 (32)

サンプル	蛍光強度 (Mean)
Control	52±3
VacA	24±3
VacA + bafilomycin A1	22±3

DiOC₆ をミトコンドリアの膜電位を測る蛍光プローブとして用いた。

bafilomycin A1 は, VacA の空胞化を阻害する試薬である。

主受容体の解明を試み、精製した m1-VacA と抗 VacA 抗体を用いた免疫沈降法により、ヒト胃上皮由来株化細胞 (AZ-521細胞) の 250 kDa 蛋白質 (p250) が VacA 結合蛋白であることを見だし、p250 がプロテインチロシンフォスファターゼ β (RPTP β) (33, 35) であることを明らかにした (68, 69)。事実、VacA に非感受性である BHK 細胞に RPTP β 遺伝子をトランスフェクションして RPTP β を発現させると、VacA に対する感受性を獲得したことから、RPTP β が VacA の受容体として機能していることが判る (42)。RPTP β は膜一回貫通型蛋白質であり、その細胞外領域には炭酸脱水素酵素領域 (CAH 領域) とフィブロネクチン III 型領域 (FN 領域) がある。細胞内領域には、2つのフォスファターゼ領域 (D1 と D2) があり、そのうち細胞膜に近い D1 領域がチロシンフォスファターゼ活性を示す (47, 68)。RPTP β は3つのアイソフォームが知られており、全長型 (long form) の RPTP β -A、細胞外のセリンとグリシンに富む領域の欠いた (short form) RPTP β -B、および膜貫通部分と細胞内部分を欠いた RPTP β -S がある (図2)。VacA はこれら3つのアイソフォームすべてと結合することができると考えられている。従来、RPTP β の発現は脳で著明であったが、胃での発現も確認している。最近、細胞表層に分布するある種の GPI アンカー蛋白質が VacA の空

胞化に関わるとの報告がある (49)。このような蛋白質が RPTP β といかに関わっているのかを明らかにすることは今後の課題である。

図4. *H. pylori* に推察されるタイプ4分泌機構。
cag PAI 中に存在する少なくとも6つの ORF, HP0524, HP0525, HP0527, HP0528, HP0532 (cagT), HP0544 (cagE) がタイプ4分泌機構を構成している。HP0524, HP0525 および CagE は ATPase 活性をもち、HP0528 と CagT はジスルフィド結合により結ばれている。HP0525 は、6量体を形成している。

α -ディフェンシン

HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGT	CIYQGR	LWAFCC
HNP-2	CYCRIPACIAGERRYGT	CIYQGR	LWAFCC
HNP-3	DCYCRIPACIAGERRYGT	CIYQGR	LWAFCC
HNP-4	VCSCRLVFCR	TELRVGNCLIGGV	SFTYCCTRV
HD-5	ARATCYCRTGRC	TRESLSGVCEISGR	LYRLCCR
HD-6	TRAFTHCRR-SC	YSTEYSYGTCTVMG	INHRFCCL

β -ディフェンシン

hBD-1	DHYN	CVSSGGQCLYSACPI	FTKI	QGT	CYRGKAKCCK
hBD-2	GIGDPVT	CLKSGAICH	VPVFC	PRRYKQIGTCGL	PGTKCCKKKP
hBD-3	GIINTLQKYY	CRVRGGRC	AVLSCLPKEE	QIGKCSTRGRK	CCRRKK

図5. ヒトディフェンシンのアミノ酸配列。

3つのジスルフィド結合のパターンの違いにより、 α -ディフェンシンと β -ディフェンシンに分類される。

VacA を pH5 以下の酸性で脂質 2 重膜とインキュベートすると、6 量体の 2 層からなる VacA として脂質 2 重膜に組み込まれる (17)。この組み込まれた VacA は電位依存性の陰イオンチャンネル活性を示す (30, 60)。また、HeLa 細胞にも、空胞形成を引き起こさない少量の VacA を添加したときに、VacA に依存した電流は引き起こされる。VacA によって引き起こされた電流と空胞形成はともに、クロライドチャンネルの阻害剤、NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid) によって阻害される (56)。

VacA によって形成される空胞は、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rab7 (44) や lgp110 (38) が膜上に認められることから後期エンドソームとリソソームの融合した空胞であると考えられている。VacA の空胞形成はアンモニアなどの弱塩基を添加すると増強される (12, 13)。さらに、VacA の空胞形成は V 型 ATPase の特異的阻害剤である bafilomycin A1 (12, 13, 15) や微小管の脱

重合試薬であるノコダゾールやコルシチンにより阻害される (44)。これらの結果から、VacA の空胞形成には V 型 ATPase や細胞骨格の機能に関わる蛋白質が関与していることが推察される。とくに、Rab7 のドミナントネガティブ変異体を HeLa 細胞に発現させた細胞では VacA による空胞形成が阻害されることから、空胞形成には Rab7 が機能している (45)。さらに、Rho ファミリーの一つである Rac1 のドミナントネガティブを発現させた MDCK 細胞においても VacA の空胞形成が阻害される。加えて、常に活性化状態にある Rac1 を高発現させた細胞では、空胞形成がより著明になることから (27)、VacA は標的細胞の細胞内小胞輸送や細胞骨格の制御に関与する低分子量 GTP 結合蛋白質の機能を変化させていることが推察される。我々は、GTP 結合蛋白質の一種であり小胞輸送に関わる dynamine が VacA による空胞形成に関与することをドミナントネガティブ dynamine を発現させた細胞への

図 6. *H. pylori* によるヒト胃上皮癌由来株化細胞 (MKN45細胞) での hBD-2 発現誘導 (62)。

cag PAI を持つ *H. pylori* (ATCC49503, OHPC0001, OHPC0003) あるいは *cag* PAI を持たない *H. pylori* (OHPC0002) を MKN45 細胞に添加して、6 時間後に hBD-2 の mRNA の発現を RT-PCR 法にて解析した。*cag* PAI を欠く *H. pylori* (Lane 4) では hBD-2 の発現誘導が認められない (A)。同時に行った GAPDH mRNA 発現の比較 (B)。

VacA の作用を解析して明らかにした (図 3)。一方, de Bernard らは, 酵母の two-hybrid system を用いて, VacA と相互作用する細胞内蛋白質 VIP54 (VacA-interacting protein of 54kDa, or vimentin-interacting protein of 54kDa) を明らかにした (21)。VIP54 は, 中間系フィラメントのビメンチンやデスミンと同じ局在を示す蛋白質であるが, VacA の作用にどのように関与するのかは不明であり, 今後これらの蛋白質が VacA の毒作用の情報伝達をどのようにして担っているのかの解明が必要である。

VacA による細胞死について調べるために, 我々は VacA を作用させ細胞内の ATP 量を調べたところ, VacA がミトコンドリアの膜電位を低下させ ATP レベルを下げることで, このミトコンドリアの障害が bafilomycin A1 では阻害されないことが判明し, 致死活性と空胞形成とは異なる作用であると考えた (表 1) (32)。最近, Galmiche

らは, 動物細胞発現ベクターに VacA 遺伝子を組み込み発現させた VacA は, ミトコンドリアの中に局在し (23), ミトコンドリアからの cytochrome *c* の放出と caspase 3 の活性化を引き起こし, 細胞をアポトーシス死させることを示した (23)。VacA の空胞化作用と致死活性との詳細な分子レベルでの解析が待たれる。

2. *cag* 病原性遺伝子群 (*cag* PAI; *cag* Pathogenicity Island)

cag PAI を構成する遺伝子 (約 40kbp) には約 35 の ORF が存在し, GC 含量 (35%) は, 他の *H. pylori* ゲノム遺伝子 (GC 含量 39%) と比較して低いことから, 外来性の遺伝子と考えられている (5, 59)。*H. pylori* には *cag* PAI を持つ菌株と持たない菌株の 2 種類に大別され, *cag* PAI を持つ菌株は, 消化性潰瘍, 胃癌, MALT リンパ腫の患者から高い割合で分離される (7, 15, 65, 67)。興味深いことに, 日本における *H. pylori* 臨床分離株のほぼ 100% が *cag* PAI を持つ菌株であるのに対して, 欧米諸国のそれは 50–70% である。*cag* PAI のほぼ 3' 側の端に位置する *cag A* は, *cag* PAI 中で最初に見つけられた免疫原性の高い 128–145 kDa の蛋白質をコードしている。*CagA* 発見当初, *cag A* をもつ菌が VacA を良く分泌していたことから, VacA の分泌と関連があると考えられた (8, 10, 60)。このことが, Cytotoxin Associated Gene (サイトトキシン関連遺伝子), すなわち *cag* の名称の由来である。しかし, *H. pylori* の *cagA* 遺伝子を欠損させても VacA の分泌には影響を与えない。

cag PAI 中の ORF のうち, 少なくとも 6 つの ORF が *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella suis*, *Bordetella pertussis* および *E. coli* 等に知られるタイプ 4 分泌機構に関わる蛋白質の ORF と相同性を示し, タイプ 4 分泌機構に関連する遺伝子と考えられる (図 4) (6)。タイプ 4 分泌機構は, グラム陰性菌の蛋白質分泌機構のひとつであり, タイプ 1–3 の分泌機構と異なる。すなわち, タイプ 1 分泌機構は, ひとつの蛋白質同志が内膜と外膜を貫いていて, その中を通して分泌する。大腸菌の α -ヘモリシン, 百日咳菌のアデニル酸シクラーゼなどがこの仕組みで分泌される。

図 7. *H. pylori* 感染患者の胃組織での hBD-2 の免疫染色 (26)。除菌前 (A) および除菌後 (B)。

H. pylori 感染患者の胃上皮細胞に hBD-2 の発現が認められる (A) が, 除菌後に hBD-2 の発現は認められなくなる (B)。スケールバーは 200 μ m を示している。

図8. *H. pylori* による宿主細胞からの hBD-2 誘導と NF-κB 活性化 (63)。

A: 種々の hBD-2 のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼ活性を示すレポーター遺伝子。B: *H. pylori* (ATCC49503) の添加あるいは無添加における種々のレポーター遺伝子をトランスフェクションした MKN45 細胞のルシフェラーゼ活性。C: *H. pylori* の無添加と添加時のルシフェラーゼ活性の比。hBD-2 レポーター遺伝子に NF-κB サイトがあるときのみ, *H. pylori* を添加したときにルシフェラーゼ活性の上昇が認められる。

タイプ2分泌機構はグラム陰性菌の主たる分泌機構で, 分泌機構の詳細が研究されている *Klebsiella oxytoca* のプルナーゼなどさまざまな蛋白質が分泌される。タイプ2分泌機構は, 内膜通

過の際に N 末端にシグナル配列をもつ蛋白質が, Sec システムに認識されて切断を受け, ペリプラズムに放出された後に内膜と外膜に局在する複数の蛋白質が分泌に関与する。タイプ3分泌機構

図9. *cag* PAI を持つ *H. pylori* の病原因子の宿主細胞内における情報伝達。

cag PAI を持つ *H. pylori* は、タイプ4分泌機構を介して、CagA を宿主細胞室内に打ち込む。CagA は、宿主細胞内でチロシンリン酸化を受け、アクチン再構成を促す。一方、*cag* PAI がコードする単一あるいは複数の蛋白質が NF-κB の活性化に関わると考えられている (文献9の図を改変)。

は、エルシニア菌、緑膿菌、赤痢菌、サルモネラ菌、大腸菌などにおいて知られ、エルシニア菌では24種の蛋白質から構成されている。タイプ3分泌機構の構成する遺伝子は、鞭毛を構成する遺伝子と相同性があり、鞭毛と共通の遺伝子から派生したと考えられる。タイプ4分泌機構も、また多くの蛋白質から成り、接合線毛を構成する遺伝子と相同性をもち、蛋白質だけでなく DNA の分泌 (移行) にも機能する。これら4つの蛋白質分泌機構のなかでは、タイプ3分泌機構とタイプ4分泌機構が、宿主細胞の細胞質に直接蛋白質を注入することが可能であり、*cag* PAI は *H. pylori* の病原性と密接な関係がある。

cag PAI を持つ *H. pylori* は、細胞骨格の再編成ならびに台座形成を促し (51, 52, 53)、顕著に

IL-8 の誘導を引き起こす (16, 28, 46)。我々は、*H. pylori* と接触させた宿主細胞のディフェンシン産生に、*cag* PAI が関わっていることを最近明らかにした (62)。抗菌性ペプチドであるディフェンシンには、システイン残基の存在パターンの違いにより、α-ディフェンシンとβ-ディフェンシンとに大別される (図5)。6種のα-ディフェンシン (HD-1, HD-2, HD-3, HD-4, HD-5 および HD-6) のうちで、HD-1, HD-2, HD-3 および HD-4 は貪食細胞の顆粒球に発現が認められ、HD-5 と HD-6 は腸管上皮細胞に発現している。β-ディフェンシンには、hBD-1, hBD-2, hBD-3 がある。いずれも上皮細胞に発現が認められる。hBD-1 は宿主細胞に恒常的に発現しているのに対して、hBD-2 は細菌感染に伴ない発現が誘導

される。*H. pylori* では *cag* PAI を持つ菌株 (ATCC49503, OHPC0001, OHPC0003) だけが、胃株化細胞から hBD-2 を誘導する (図6) (63)。事実、*H. pylori* 感染患者の胃組織にも特異的に hBD-2 の発現が認められ、*H. pylori* 除菌によって、hBD-2 の発現が消失する (図7) (26)。このように、*H. pylori* 感染による胃上皮細胞からの hBD-2 発現は *H. pylori* の *cag* PAI と関係する。

H. pylori による hBD-2 の発現誘導に、いかなる転写因子が関与するのかを知るために、hBD-2 のプロモーター領域の遺伝子 (−1 から −2110) を分取し、ルシフェラーゼのレポーター遺伝子を作製し、MKN45 細胞にトランスフェクションして解析した (図8)。*H. pylori* による hBD-2 の発現誘導には、NF- κ B が関与し、*cag* PAI を持つ菌株だけが NF- κ B を活性化させ、hBD-2 のレポーター遺伝子のルシフェラーゼ活性を上昇させた (62)。従って、*cag* PAI を持つ菌株は、胃上皮細胞に NF- κ B の活性化を引き起こして、IL-8 (1, 31) や hBD-2 を強く誘導する。*cag* PAI 中の *cagA* 以外の遺伝子産物が NF- κ B の活性化に関わると考えられている。

H. pylori のいかなる遺伝子産物が IL-8 の活性化に重要であるのかを、*cag* PAI の個々の ORF を壊した *H. pylori* を用いて調べた報告がある。すなわち、HP0524, HP0538 (*cagN*), HP0547 (*cagA*) を壊しても IL-8 の誘導は認められたが、HP0521, HP0525, HP0527, HP0528, HP0529, HP0531, HP0532, HP0534 (*cagS*), HP0537 (*cagM*), HP0539 (*cagL*), HP0540 (*cagI*), HP0541 (*cagH*), HP0542 (*cagG*), HP0543 (*cagF*), HP0544 (*cagE/picB*), HP0545–0546 (*cagBCD*) をそれぞれ破壊した *H. pylori* は IL-8 誘導を引き起こさない (9, 14, 25)。このことは *cag* PAI に存在する多くの遺伝子産物が IL-8 誘導に直接あるいは間接的に関わっていることを示している。今後とも、NF- κ B などの転写因子を直接活性化する遺伝子産物を同定することは、本菌による炎症反応を知るために重要な課題である (図9)。

Segel ら (51, 52) は、*cag* PAI を持つ菌株を胃の上皮細胞とインキュベーションすると、細胞画分の約 145 kDa の蛋白質がチロシンリン酸化

されて、細胞骨格の再構成が促されることを報告した。次いで、この細胞画分に認められた 145 kDa 蛋白質がチロシンリン酸化された CagA であることが示された (図9) (2, 4, 41, 53, 55)。タイプ4分泌機構を介して宿主細胞に注入された CagA のチロシンリン酸化が、細胞骨格の再構成や台座形成に関わると考えられているが、その詳細は明らかでない。

終 わ り に

H. pylori の全ゲノム配列が2種の菌株においてすでに明らかにされている。しかし、*H. pylori* の全ゲノムの約40%の遺伝子については既知の蛋白との相同性は無く、依然としてそれらの機能はブラックボックスの中にある。このブラックボックスの解明は、*H. pylori* の病原性を知る上に必要なだけでなく、他の病原細菌の遺伝子機能を理解するのに役立つ。また一方では、*H. pylori* 感染成立の宿主側因子についても並行して進める必要がある。

文 献

- 1) Aihara, M., Tsuchimoto, D., Takizawa, H., Azuma, A., Wakebe, H., Ohmoto, Y., Imagawa, K., Kikuchi, M., Mukaida, N., Matsushima, K. (1997): Mechanism involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect. Immun.* **65**, 3218–3224.
- 2) Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., Suzuki, T., Sasakawa, C. (2000): *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J. Exp. Med.* **191**, 593–602.
- 3) Atherton, J.C., Cao, P., Peek, R.M. Jr., Tummuru, M.K., Blaser, M.J., Cover, T.L. (1995): Mosaicism vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori* association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J. Biol. Chem.* **270**, 17771–17777.
- 4) Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconnier, A., Jungblut, P.R., Naumann, M., Meyer, T.F. (2000): Translocation of the *Helicobacter pylori* CagA protein in gastric epithelial cells by a type IV secretion apparatus. *Cell. Microbiol.* **2**, 155–164.

- 5) Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovski, M., Rappouli, R., Covacci, A. (1996): *Cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14648–14653.
- 6) Covacci, A., Telford, J.L., Giudice, G.D., Parsonet, J., Rappouli, R. (1999): *Helicobacter pylori* virulence and gastric geography. *Science* **284**, 1328–1333.
- 7) Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., Rappouli, R. (1993): Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5791–5795.
- 8) Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burroni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., Rappouli, R. (1993): Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5791–5795.
- 9) Covacci, A., Rappouli, R. (2000): Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. *J. Exp. Med.* **191**, 587–592.
- 10) Cover, T.L., Dooley, C.P., Blaser, M.J. (1990): Characterization of and human serologic response to proteins in *Helicobacter pylori* broth culture supernatants with vacuolizing cytotoxin activity. *Infect. Immun.* **58**, 603–610.
- 11) Cover, T.L., Blaser, M.J. (1992): Purification and characterization of the vacuolating toxin from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **267**, 10570–10575.
- 12) Cover, T.L., Vaughn, S.G., Cao, P., Blaser, M.J. (1992): Potentiation of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin activity by nicotine and other weak bases. *J. Inf. Dis.* **166**, 1073–1078.
- 13) Cover, T.L., Reddy, L.Y., Blaser, M.J. (1993): Effects of ATPase inhibitors on the response of HeLa cells to *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect. Immun.* **61**, 1427–1431.
- 14) Cover, T.L., Tummuru, M.K.R., Cao, P., Thompson, S., Blaser, M.J. (1994): Divergence of genetic sequences for the vacuolating cytotoxin among *Helicobacter pylori* strains. *J. Biol. Chem.* **269**, 10566–10573.
- 15) Crabtree, J.E., Taylor, J.D., Wyatt, J.I., Heatley, R.V., Shallcross, T.M., Tompkins, D.S., Rathbone, B.J. (1991): Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration and gastric pathology. *Lancet* **338**, 332–335.
- 16) Crabtree, J.E., Farmery, S.M., Lindley, I.J.D., Figura, N., Peichl, P., Tompkins, D.S. (1994): *CagA*/cytotoxic strains of *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric epithelial cell lines. *J. Clin. Pathol.* **47**, 945–950.
- 17) Czajkowsky, D.M., Iwamoto, H., Cover, T.L., Shao, Z. (1999): The vacuolating toxin from *Helicobacter pylori* forms hexameric pores in lipid bilayers at low pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2001–2006.
- 18) de Bernard, M., Papini, E., de Filippis, V., Telford, J., Manetti, R., Fontana, A., Rappouli, R., Montecucco, C. (1995): Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid and pepsin resistant. *J. Biol. Chem.* **270**, 23937–23940.
- 19) de Bernard, M., Arico, B., Papini, E., Rizzuto, R., Grandi, G., Rappouli, R., Montecucco, C. (1997): *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. *Mol. Microb.* **26**, 665–674.
- 20) de Bernard, M., Burroni, D., Papini, E., Rappouli, R., Telford, J., Montecucco, C. (1998): Identification of the *Helicobacter pylori* VacA toxin domain active in the cell cytosol. *Infect. Immun.* **66**, 6014–6016.
- 21) de Bernard, M., Moshioni, M., Napolitani, G., Rappouli, R., Montecucco, C. (2000): The VacA toxin of *Helicobacter pylori* identifies a new intermediate filament-interacting protein. *EMBO J.* **19**, 48–56.
- 22) Fawcett, P.T., Gibney, K.M., Vinette, K.M.B. (1999): *Helicobacter pylori* can be induced to assume the morphology of *Helicobacter heilmannii*. *J. Clin. Microb.* **37**, 1045–1048.
- 23) Galmiche, A., Rassow, J., Doye, A., Cagnol, S., Chambard, S., Contamin, S., de Thillot, V., Just, I., Ricchi, V., Solcia, E., Obberghen, E.V., Boquet, P. (2000): The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome *c* release. *J. Biol. Chem.* **275**, 6361–6370.
- 24) Garner, J.A., Cover, T.L. (1996): Binding and internalization of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**,

- 4197-4203.
- 25) Glocker, E., Lange, C., Covacci, A., Bereswill, S., Kist, M., Pahl, H.L. (1998): Proteins encoded by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF- κ B activation. *Infect. Immun.* **66**, 2346-2348.
 - 26) Hamanaka, Y., Nakashima, M., Ito, M., Wada, A., Kurazono, H., Hojo, H., Nakahara, Y., Kohno, S., Hirayama, T., Sekine, I. (2001): Expression of human β -defensin-2 (hBD-2) in *Helicobacter pylori*-induced gastritis: Antimicrobial effect of hBD-2 against *H. pylori*. *Gut*. in press.
 - 27) Hotchin, N.A., Cover, T.L., Akhtar, N. (2000): Cell vacuolation induced by the VacA cytotoxin of *Helicobacter pylori* is regulated by the *rac1* GTPase. *J. Biol. Chem.* **275**, 14009-14012.
 - 28) Huang, J., O'Toole, P.W., Doing, P., Trust, T.J. (1995): Stimulation of interleukin-8 production in epithelial cell lines by *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **63**, 1732-1738.
 - 29) Ito, Y., Azuma, T., Ito, S., Miyaji, H., Hirai, M., Yamazaki, Y., Sato, F., Kato, T., Kohli, Y., Kuriyama, M. (1977): Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1710-1714.
 - 30) Iwamoto, H., Czajkowski, D.M., Cover, T.L., Szabo, G., Shao, Z. (1999): VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett.* **450**, 101-104.
 - 31) Keates, S., Hitti, Y.S., Upton, M., Kelly, C.P. (1997): *Helicobacter pylori* infection activates NF- κ B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* **113**, 1099-1109.
 - 32) Kimura, M., Goto, S., Wada, A., Yahiro, K., Niidome, T., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Kondo, T. (1999): Vacuolating cytotoxin purified from *Helicobacter pylori* causes mitochondrial damage in human gastric cells. *Microbial. Pathog.* **26**, 45-52.
 - 33) Krueger, N.X., Saito, H. (1992): A human transmembrane protein-tyrosine-phosphatase, PTP zeta, is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbionic anhydrases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 7417-7421.
 - 34) Leunk, R.D., Johnson, P.T., David, B.C., Kraft, W.G., Morgan, D.R. (1988): Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **26**, 93-99.
 - 35) Levy, J.B., Canoll, P.D., Silvennoinen, O., Barnea, G., Morse, B., Honegger, A.M., Huang, J.T., Cannizzaro, L.A., Park, S.H., Druck, T., Huebner, K., Sap, J., Ehrlich, M., Musacchio, J.M., Schlessinger, J. (1993): The cloning of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in the central nervous system. *J. Biol. Chem.* **268**, 10573-10581.
 - 36) Lupetti, P., Heuser, J.E., Manetti, P., Massari, P., Lanzavecchia, S., Bellon, P.L., Dallai, R., Rappuoli, R., Telford, J.L. (1996): Oligomeric and subunit structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *J. Cell. Biol.* **133**, 801-807.
 - 37) Marshall, B.J., Goodwin, C.S., Warren, J.R., Murray, R., Blincow, E.D., Blackbourn, S.J., Phillips, M., Waters, T.E. (1988): Prospective double-blind trial of duodenal ulcer relapse after eradication of *Campylobacter pylori*. *Lancet* **2**, 1437-1442.
 - 38) Molinari, M., Galli, C., Norais, N., Telford, J.L., Rappuoli, R., Luzio, J.P., Montecucco, C. (1997): Vacuoles induced by *Helicobacter pylori* toxin contain both late endosomal and lysosomal markers. *J. Biol. Chem.* **272**, 25339-25344.
 - 39) Nguen, V.Q., Caprioli, R.M., Cover, T.L. (2001): Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infect. Immun.* **69**, 543-546.
 - 40) 日本消化器学会 *Helicobacter pylori* 治験検討委員会 (1999): *Helicobacter pylori* 治験ガイドライン 日本消化器病雑誌 **96**, 199-207.
 - 41) Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmair, B., Gerland, E., Fischer, W., Haas, R. (2000): Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by Type IV secretion. *Science* **287**, 1497-1500.
 - 42) Padilla, P.I., Wada, A., Yahiro, K., Kimura, M., Niidome, T., Aoyagi, H., Kumatori, A., Anami, M., Hayashi, T., Fujisawa, J., Saito, H., Moss, J., Hirayama, T. (2000): Morphologic differentiation of HL-60 cells is associated with appearance of RPTP β and induction of *Helicobacter pylori* VacA sensitivity. *J. Biol. Chem.* **275**, 15200-15206.
 - 43) Pagliaccia, C., de Bernard, M., Lupetti, P., Ji, X., Burrini, D., Cover, T.L., Papini, E., Rappuoli, R., Telford, J.L., Reyrat, J.M. (1998): The m2 form of the *Helicobacter pylori* cytotoxin has cell type-specific vacuolating activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10212-10217.
 - 44) Papini, E., de Bernard, M., Milia, E., Bugnoli, M., Zerial, M., Rappuoli, R., Montecucco, C. (1994): Cellular vacuoles induced by *Helicobacter pylori*

- originate from late endosomal compartments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**, 9720–9724.
- 45) Papini, E., Satin, B., Bucci, C., de Bernard, M., Telford, J.L., Manetti, R., Rappuoli, R., Zerial, M., Montecucco, C. (1997): The small GTP-binding protein rab7 is essential for cellular vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. EMBO J. **16**, 15–24.
 - 46) Peek, R.M., Miller, G.G., Tham, K.T., Perez-Perez, G.I., Zhao, X., Atherton, J.C., Blaser, M.J. (1995): Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA⁺ *Helicobacter pylori* strains. Lab. Invest. **71**, 760–770.
 - 47) Peles, E., Schlessinger, J., Grumet, M. (1998): Multi-ligand interactions with receptor-like protein tyrosine phosphatase β : implications for intercellular signaling. TIBS **23**, 121–124.
 - 48) Phadnis, S.H., Ilver, D., Janzon, L., Normark, S., Westblom, T.U. (1994): Pathological significance and molecular characterization of the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. Infect. Immun. **62**, 1557–1565.
 - 49) Ricci, V., Galmiche, A., Doye, A., Necchi, V., Solcia, E., Boquet, P. (2000): High cell sensitivity to *Helicobacter pylori* VacA toxin depends on a GPI-anchored protein and is not blocked by inhibition of the clathrin-mediated pathway of endocytosis. Mol. Cell. Biol. **11**, 3897–3909.
 - 50) Schmitt, W., Haas, R. (1994): Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. Mol. Microb. **12**, 307–319.
 - 51) Segal, E.D., Falkow, S., Tompkins, L.S. (1996): *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 1259–1264.
 - 52) Segal, E.D., Lange, C., Covacci, A., Tompkins, L.S., Falkow, S. (1997): Induction of host signal transduction pathways by *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 7595–7599.
 - 53) Segal, E.D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S., Tompkins, L.S. (1999): Altered states: Involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 14559–14564.
 - 54) Shirasaka, D., Aoyama, N., Satonaka, K., Shirasaka, K., Yoshida, H., Sakai, T., Ikemura, T., Shinoda, Y., Sakashita, M., Miyamoto, M., Yahiro, K., Wada, A., Kurazono, H., Hirayama, T., Kasuga, M. (2000): Analysis of *Helicobacter pylori* vacA gene and serum antibodies to VacA in Japan. Dig. Dis. Sci. **45**, 789–795.
 - 55) Stein, M., Rappuoli, R., Covacci, A. (2000): Tyrosine phosphorylation of the *Helicobacter pylori* CagA antigen after cag-driven host cell translation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 1263–1268.
 - 56) Szabo, I., Brutsche, S., Tombola, F., Moschioni, M., Satin, B., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., Zoratti, M. (1999): Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. EMBO J. **18**, 5517–5527.
 - 57) Suzuki, J., Ohnishi, H., Shibata, H., Wada, A., Hirayama, T., Iiri, T., Ueda, N., Kanamaru, C., Tsuchida, T., Mashima, H., Yasuda, H., Fujita, H. (2001): Dynamin is involved in human epithelial cell vacuolation caused by the *Helicobacter pylori*-produced cytotoxin VacA. J. Clin. Invest. **107**, 363–370.
 - 58) Telford, J.L., Ghiara, P., Dell’Orco, M., Commanducci, M., Burroni, D., Bugnoli, M., Tecce, M.F., Censini, S., Covacci, A., Xiang, Z., Papini, E., Montecucco, C., Parente, L., Rappuoli, R. (1994): Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. J. Exp. Med. **179**, 1653–1658.
 - 59) Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A., Klenk, H.P., Gill, S., Dougherty, B.A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E.F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H.G., Glodek, A., McKenney, K., Fitzgerald, L.M., Lee, N., Adams, M.D., Venter, J.C. (1997): The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature **388**, 539–547.
 - 60) Tombola, F., Carlesso, C., Szabo, I., de Bernard, M., Reytrat, J.-M., Telford, J.L., Rappuoli, R., Montecucco, C., Papini, E., Zoratti, M. (1999): *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. Biophys. J. **76**, 1401–1409.
 - 61) Tummuru, M.K., Cover, T.L., Blaser, M.J. (1993): Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect. Immun. **61**, 1799–1809.

- 62) Wada, A., Mori, N., Oishi, K., Hojo, H., Nakahara, Y., Hamanaka, Y., Nakashima, Y., Sekine, I., Ogushi, K., Niidome, T., Nagatake, T., Moss, J., Hirayama, T. (1999): Induction of human β -defensin-2 mRNA expression by *Helicobacter pylori* in human gastric cell line MKN45 cells on *cag* Pathogenicity Island. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 770–774.
- 63) Wada, A., Ogushi, K., Kimura, T., Hojo, H., Mori, N., Suzuki, S., Kumatori, A., May Se, Nakamura, Y., Nakamura, M., Moss, J., Hirayama, T. (2001): *Helicobacter pylori*-mediated transcriptional regulation of the human β -defensin-2 gene requires NF- κ B. *Cell. Microbiol.* **3**, 115–123.
- 64) Wang, H.J., Wang, W.C. (2000): Expression and binding analysis of GST-VacA fusions reveals that the C-terminal~100-residue segment of exotoxin is crucial for binding in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **278**, 449–454.
- 65) Weel, J.F., van der Hulst, R.W., Gerrits, Y., Roorda, P., Feller, M., Dankert, J., Tytgat, G.N., van der Ende, A. (1996): The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related diseases. *J. Infect. Dis.* **173**, 1171–1175.
- 66) Weiss, A., Schlessinger, J. (1998): Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell* **94**, 277–280.
- 67) Xiang, Z., Censini, S., Bayeli, P.F., Telford, J.L., Figura, N., Rappuoli, R., Covacci, A. (1995): Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect. Immun.* **63**, 94–98.
- 68) Yahiro, K., Niidome, T., Kimura, M., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Kurazono, H., Imagawa, K., Wada, A., Moss, J., Hirayama, T. (1999): Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase β . *J. Biol. Chem.* **274**, 36693–36699.
- 69) Yahiro, K., Niidome, T., Hatakeyama, T., Aoyagi, H., Kurazono, H., Padilla, P.A., Wada, A., Hirayama, T. (1997): *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin binds to the 140-kDa protein in human gastric cancer cell lines, AZ-521 and AGS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 629–632.