

138 ピロリ菌の毒性タンパク質VacAの解析と阻害剤探索 塩田 拓也

【目的】ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) は、グラム陰性菌に属する消化性潰瘍や胃癌の原因菌であり、その保菌者は全人類の約半数にのぼると推定されている。*H. pylori*の重要な病原因子に空胞化毒素タンパク質 VacA がある。VacA が毒素としての機能を発揮するためには、VacA が細胞外へと分泌されなければならない。VacA の分泌プロセスのひとつに、VacA の C 末端側に存在するβバレルドメインの外膜への組込みがある。グラム陰性菌では、βバレルドメインの膜組込みは、外膜に存在する分子装置、BAM 複合体を介して行われる。しかし、*H. pylori* は生化学実験が行いにくいいため、VacA のβバレルドメインの膜組込みにおける分子機構については不明な点が多い。そこで、本研究では、生化学実験が行いやすく、類似のBAM複合体を持つグラム陰性菌、*E. coli*を用いた生化学実験により、VacA の外膜組込みの解析および阻害剤探索を行った。

【方法】VacA の膜組込みを生化学的に解析するため、我々が開発したβバレルドメイン膜組込み *in vitro* 再構築実験系「EMM アセンブリーアッセイ」を VacA 解析のために最適化の検討を行った。EMM アセンブリーアッセイは、*E. coli* から簡便な方法で単離した膜画分 (*E. coli* Microsomal Membrane : EMM) に、βバレルドメインをもつタンパク質を加えてインキュベートすることで、βバレルドメインの膜組込みを高い時間分解能で定量的に解析できる方法である。VacA のβバレルドメインに加え、EMM に存在する *E. coli* のBAM複合体に認識されやすくするために、一部を *E. coli* のβバレルドメインに変更したキメラ変異体も同時に作製した。BAM複合体のサブユニット欠損変異体から単離したEMMを用いて、BAM複合体のどのサブユニットがVacAの輸送に必要なかを検討した。また、ペプチドライブラリーをEMMアセンブリーアッセイに添加し、阻害ペプチドスクリーニングを行った。

【結果】VacA のβバレルドメインの配列をそのまま用いた場合、EMM への膜組込みは確認できなかった。そこで、VacA のβバレルドメインの最後のβストランドを、*E. coli* で最も発現量の多いβバレル型膜タンパク質のひとつである OmpC の最後のβストランドに置換したキメラタンパク質を作製したところ、EMM への膜組込み、毒素ドメインの切断による分子量の減少が見られた。キメラタンパク質を用いたEMMアセンブリーアッセイにより、VacA の膜組込みに必要なBAM複合体のサブユニットを決定した。さらにペプチドライブラリーを添加したスクリーニングにより VacA の毒素放出阻害ペプチドの単離に成功した。

VacA の膜組込みと EMM アセンブリーアッセイ

