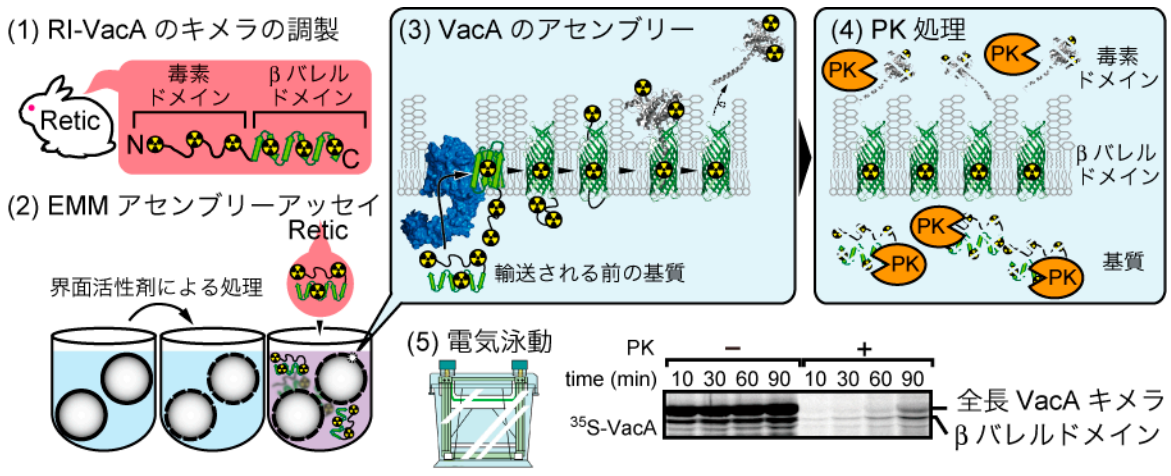
138　ピロリ菌の毒性タンパク質VacAの解析と阻害剤探索	塩田　拓也

【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



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

宮崎大学 テニュアトラック推進機室

Key words：ヘリコバクター・ピロリ，空胞化毒素，V 型分泌装置，*in vitro* スクリーニング

緒　言

ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）は、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。現在、この予防的治療法として、強力な抗菌薬による *H.pylori* の除菌法が取られている。しかし、近年、除菌に用いる抗菌薬のひとつであるクラリスロマイシンへの耐性菌が出現していることに加え、抗菌薬は、体内常在菌にも作用し、体内微生物叢を大きく毀損してしまうという問題を抱えている［1］。近年、体内微生物叢が人体に重要であることが明らかにされてきており、体内微生物叢を極力毀損しない治療法が求められている。この実現には、*H.pylori* がもつ特異的なシステムを理解した上でそれらに対する効果的な阻害剤を用いた治療が必要である。

H.pylori が産生するがん化に関わる重要な毒素のひとつに、空胞化毒素タンパク質 VacA がある。VacA は、*H.pylori* から分泌されなければ機能することが出来ない。*H.pylori* は、グラム陰性菌に属し、内膜、外膜の 2 枚の生体膜をもつ。したがって、VacA は、内膜、外膜の 2 枚の生体膜を通過しなければならない。グラム陰性菌では、毒素を細胞外へと輸送するための様々な分泌装置が存在し、VacA は、V 型分泌装置に属する。V 型分泌装置に属するタンパク質の多くは、N 末端側に毒素などの細胞外へと分泌されるドメイン（パッセンジャードメイン）をもち、C 末端側がβバレル型膜タンパク質というドメイン構造をもつ（図 1A）。これらは、サイトゾルのリボソームで合成され、Sec 複合体を利用して内膜を透過する。その後、外膜に存在する BAM 複合体の介添えを受けて、βバレル型膜タンパク質部分が外膜へと組込まれる。βバレルドメインは、内孔が輸送チャネルとして機能し、パッセンジャードメインを細胞外へと送り出す。送り出しが完了すると、パッセンジャードメインを切離して毒素を細胞外へと分泌する（図 1B）。

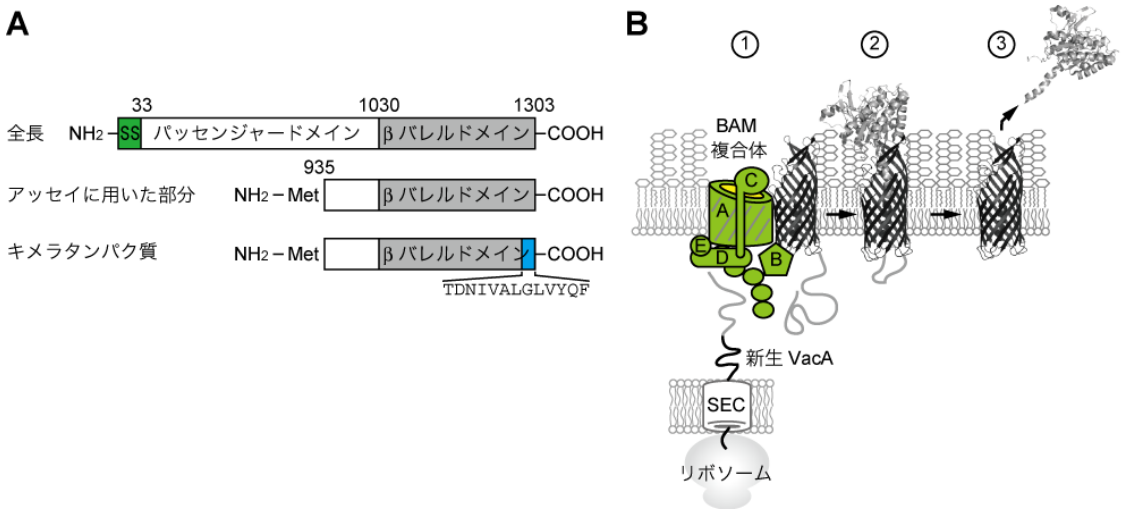


図 1. VacA のドメイン構造と毒素分泌機構の模式図

A）VacA の全長のドメイン構造と、アッセイに用いた範囲と、キメラタンパク質の模式図。

B）VacA の毒素分泌経路の模式図。BAM 複合体中のアルファベットはサブユニットを示す。

VacA を阻害するには、βバレルドメインの膜組込みやパッセンジャードメインの送り出しといった分泌機構を阻害するのが最も効果的である。しかし、VacA に関するこれまでの研究は、リコンビナントタンパク質が得られやすいパッセンジャードメインについて、その構造や、宿主細胞内での作用機構に関するものが中心で、分泌に関わる分子機構の研究はあまり行われてこなかった［2］。その理由として、*H.pylori* は生化学実験に不向きであり、詳細な解析が行われてこなかったことが大きい。我々は近年、グラム陰性菌のモデル生物、*E.coli* を用いたβバレル型膜タンパク質膜組込み *in vitro* 再構築実験系「EMM アセンブリーアッセイ」を開発した［3］。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、*in vitro* 合成した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定量的に解析できる方法である。この手法では、輸送するβバレル型膜タンパク質は、*in vitro* 合成が出来れば使用可能であるため、種を越えて様々なβバレル型膜タンパク質の膜組込みを解析できるという利点をもつ。本研究では、この利点を活かし、EMM アセンブリーアッセイを用いて VacA の膜組込みの分子機構の解析および、阻害剤探索を行った。

方　法

1.　EMM アセンブリーアッセイ（図 2）

E.coli、BL21（DE3）株および、これを親株とした BAM 複合体のサブユニット、*bamB*、*bamC*、*bamE* の遺伝子をそれぞれ欠損した株を LB 培地にて培養した。得られた菌体を超音波破砕し、未破砕細胞を低速遠心分離によって除去した後、その上清を高速遠心分離にかけて得られる膜画分を EMM とした。βバレルドメインをもつタンパク質は、ウサギ網状赤血球ライセートを用いて、35S 放射性メチオニン、システインラベルしたものを合成した。EMM を 0.09% Triton X-100 で処理し、タンパク質輸送能を向上させてから、合成した基質タンパク質を加え、30℃で所定の時間インキュベートし、サンプルを氷上に移すことで輸送反応を停止した。反応停止後、プロテインナーゼ K（PK）を終濃度 100μM となるように加え、EMM に取込まれなかったβバレルドメインを分解除去した。Phenylmethylsulfonyl fluoride（PMSF）を終濃度 1.0 mM となるように加え分解反応を停止し、その後、遠心分離により回収した EMM の全タンパク質の SDS-PAGE で展開し、ラジオイメージングにより検出した。

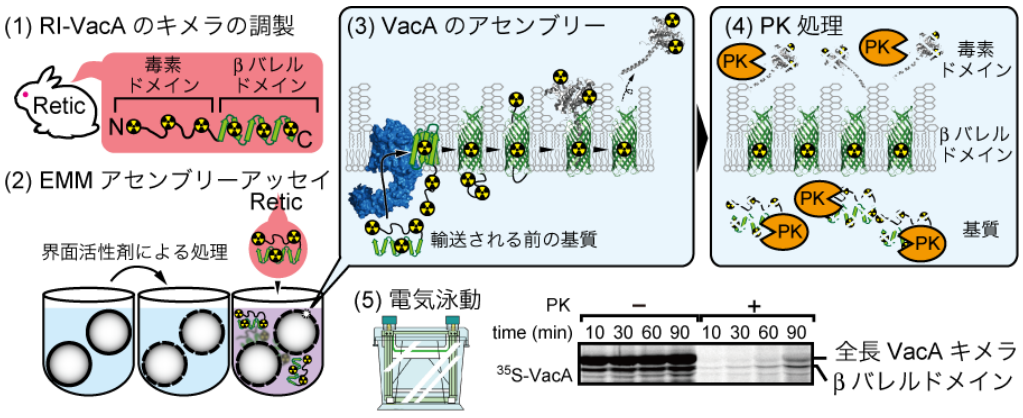


図 2.　EMM アセンブリーアッセイの模式図

2.　VacA およびキメラタンパク質の作製

EMM アセンブリーアッセイに用いた VacA は、βバレルドメイン（1,030～1,303 アミノ酸）とその上流 91 アミノ酸を含んだ領域に開始メチオニンを付加した（図 1A）。キメラタンパク質は、前述の VacA の C 末端側から 13 アミノ酸残基（GHFASNLGMRYSF）を *E.coli* OmpC の C 末端側から 13 アミノ酸残基（TDNIVALGLVYQF）に置換したものを作製した。PCR によりプライマーを用いて、VacA および、キメラタンパク質の 5'側に Sp6 プロモーター、3'側に PolyA を付加した DNA 断片を増幅し、これを鋳型に、Sp6 RNA polymerase を用いて mRNA

を合成した。合成した mRNA 断片をウサギ網状赤血球ライセートに加え、VacA および、キメラタンパク質を合成した。

3. 阻害ペプチドスクリーニング

ペプチドライブラリーは、MIMOTOPES（オーストラリア）に合成を依頼し、精製度 80%のものを購入した。個々のペプチドは、30 mM の濃度となるように DMSO に溶解し、分注後、−20℃で保存した。EMM アセンブリーアッセイの反応溶液に、各ペプチドを終濃度 100μM となるように加えた。コントロールとして、等量の DMSO を加えた。

結　果

1. キメラタンパク質を用いることで VacA の膜組込みを EMM アセンブリーアッセイで解析できる

VacA の外膜組込みを詳細に解析するため、EMM アセンブリーアッセイによる解析を試みた。VacA は、全長が 1,303 アミノ酸、141 kDa もの巨大なタンパク質である。ウサギ網状赤血球ライセートは、タンパク質の種類に依存するが、一般的にそのサイズに反比例して合成効率が低下する。腸管出血性大腸菌の V 型分泌装置、EspP をはじめとした、他の V 型分泌装置の解析から、パッセンジャードメインは、一部のみでも膜透過、切断反応が起こる［4］。そこで、効率よく基質タンパク質を合成するため、VacA の N 末端側 934 アミノ酸を欠損したタンパク質を合成した。この VacA を基質として利用した場合、EMM への効率的な膜組込みは観察されなかった（図 3A）。*H.pylori* は、酸性度の高い環境下で生育している。そこで、EMM アセンブリーアッセイのバッファーの pH を通常の 7.5 に加え、6.2、5.8 と変更したが、膜組込みは確認されなかった。

VacA の EMM への膜組み込み効率を上昇させる必要が生じた。多くのβバレル型膜タンパク質は、C 末端側のβストランド中にβシグナルと呼ばれるよく保存されたシグナルを有している。基質タンパク質が、EMM に膜組込みされるためには、このβシグナルが EMM 中の *E.coli* BAM 複合体に認識される必要がある。そこで、VacA の C 末端 13 アミノ酸残基を、*E.coli* で最も多く存在する外膜タンパク質の OmpC の C 末端側 13 アミノ酸に置換することで、βシグナルを *E.coli* のものに置換したキメラタンパク質を作製し、EMM 中の BAM 複合体への被認識効率の上昇を試みた。その結果、C 末端側を、OmpC のβシグナルに置換したキメラタンパク質は、EMM に経時的に組込まれ、パッセンジャードメインの切断による分子量の低下が確認できた（図 3B）。以上の結果から、キメラタンパク質を用いることで VacA の部分的な膜挿入及び、パッセンジャードメインの膜透過および切離しを解析するアッセイ系の立ち上げに成功した。

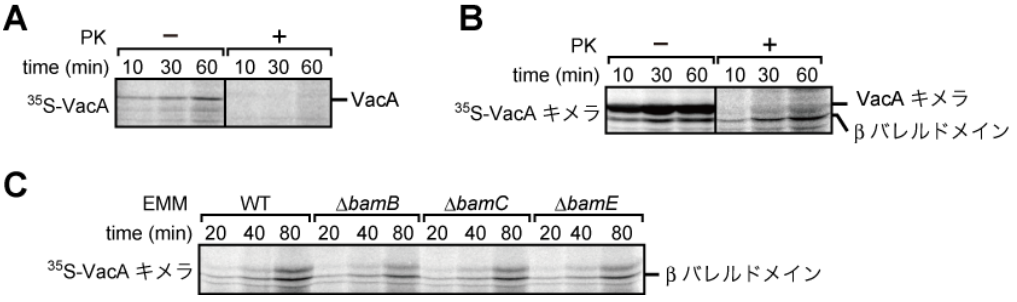


図 3. EMM アセンブリーアッセイによる VacA およびキメラタンパク質の解析

A) 図 1A に示す VacA の C 末端部分を合成し、EMM への取込みを試みた。膜への組込みが起こらず、PK 消化により全てのタンパク質が分解された。

B) キメラタンパク質を用いた EMM アセンブリーアッセイアッセイ。PK 耐性分子種の経時的な増加が確認できる。

C) 図上に示す BAM 複合体のサブユニット遺伝子欠損株から単離した EMM を用いて、キメラタンパク質の膜組込みを比較した。そこ結果、サブユニットの欠失に伴う膜組み込み効率の優位な低下は見られなかった。

2. *E.coli* BAM 複合体の補助因子は VacA キメラタンパク質の膜組込みには必須ではない

V 型分泌装置のβバレルドメインの膜組込みは BAM 複合体によって介添えを受ける。BAM 複合体は、*E.coli* では BamA、BamD という生育に必須なサブユニットと、BamB、BamC、BamE とよばれる補助因子から構成されている［5］。一方、近年の解析から *H.pylori* の BAM 複合体は、必須な因子である BamA と BamD の 2 つのみで、補助因子は存在しないことが示唆されている［6］。VacA が、実際に BAM 複合体の補助因子なしに膜組込みされるかを確認することで創薬ターゲットを絞り込むことが可能になる。*bamB*、*bamC*、*bamE* 遺伝子をそれぞれ欠損した *E.coli* 株から EMM を単離し、アセンブリーアッセイを行った。その結果、全ての EMM においてほぼ同等のアセンブリー効率であった（図 3C）。以上の結果から、VacA キメラタンパク質の膜組込みには、*E.coli* の BAM 複合体に存在する補助因子は必要でないことが示唆された。

3. ペプチドスクリーニングによる VacA 毒素放出阻害ペプチドの同定

これまでの条件検討からキメラタンパク質を用いることで、EMM アセンブリーアッセイにより、VacA の膜組込みおよびパッセンジャードメインの放出を解析することが可能となった。EMM アセンブリーアッセイは、*in vitro* 再構築実験であるため、阻害剤の候補物質を外部から簡便に添加できるという利点がある。そこで、当研究室が保有するペプチドライブラリーから、キメラタンパク質の輸送阻害能を有するペプチドの単離を試みた。ペプチドによる阻害実験の条件検討として、ペプチドライブラリー中の 23 番ペプチドが作用するかを確認した。23 番ペプチドは、βシグナル部分を含んでおり、EMM アセンブリーアッセイでは、BAM 複合体におけるβシグナル認識部位に対して競合阻害を引き起こす。キメラタンパク質の膜組込みは、23 番目ペプチドの添加により阻害されたことから、ペプチドライブラリーを用いたスクリーニングが可能であることが示された（図 4A）。

23 番ペプチドを用いて決定した条件をもとに、当研究室のペプチドライブラリーを用いたスクリーニングを行った。DMSO を加えた場合、キメラタンパク質は、パッセンジャードメインが切断除去された分子種が優位に検出された。一方、21 番のペプチドを加えた場合、VacA のキメラタンパク質は、パッセンジャードメインが切断された分子種よりもパッセンジャードメインを含む全長がより優位に検出された（図 4B）。21 番目で検出された、パッセンジャードメインを含む分子種は、PK 耐性であり、膜に組込まれていると考えられる。すなわち、21 番ペプチドは、膜組込みは阻害しないが、パッセンジャードメインの膜透過もしくは切断のいずれかを阻害することが示唆された。

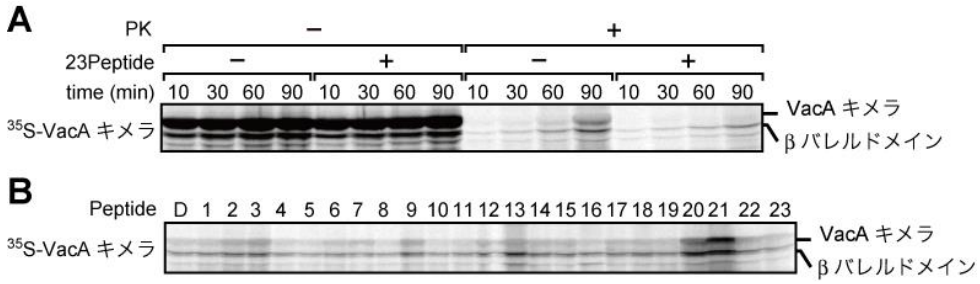


図 4. EMM アセンブリーアッセイを用いた VacA 分泌阻害ペプチドスクリーニング

A) VacA キメラタンパク質の EMM への膜組込みが 23 番のペプチドで阻害されるかを確認した。

B) 阻害ペプチドスクリーニングの結果。図上に示す番号のペプチドを添加し、80 分間の膜組込み反応を行った後に、氷上で PK 処理をした。分解を免れたタンパク質を SDS-PAGE とラジオイメージングにて検出した。

考　察

本研究により、キメラタンパク質を用いることで VacA の膜組込みから毒素部分の送り出しという、毒素分泌の初期段階に関する生化学的解析が可能となった。一方で、最後のβシグナルを置換しなければ EMM への膜組込みは起こらなかった。これは以前から指摘されている、*H.pylori* と *E.coli* のβシグナルに微妙な違いがあるという報告とも

一致する［7］。したがって、EMM アセンブリーアッセイをベースとした我々の手法では、*H.pylori* の BAM 複合体と VacA の相互作用を標的とした阻害剤の探索には使用できないことが明らかになった。今後、この部分を標的としたスクリーニングを実施するためには、*H.pylori* から単離した膜画分を用いた輸送アッセイ、もしくは *H.pylori* の BAM 複合体を発現させた *E.coli* から膜画分を単離して行うアッセイ系の構築が必要になると考えられる。

今回、キメラタンパク質は、膜に組込まれた後に、パッセンジャードメインが切断されたと考えられる分子量の減少が観察された。また、この切断反応は、23 番ペプチドを加え、BAM 複合体のβシグナル認識部位を拮抗阻害させた場合に低下したことから、βバレルドメインの膜組込みと連動していることが示された。VacA のモデリング構造上、今回置換した最後のβストランドは、パッセンジャードメインの切断除去に関与しない。これらのことは、今回のキメラタンパク質であっても、パッセンジャードメインの膜透過と切断反応は、VacA の反応を再現できていることを示唆している。すなわち、我々のキメラタンパク質を用いたアッセイ系は、VacA のパッセンジャードメインの送り出しを標的とした阻害剤スクリーニングに利用できると考えられる。

E.coli に存在して *H.pylori* に存在しないと考えられている BAM 複合体の補助因子の BamB、BamC、BamE は、いずれも、キメラタンパク質の輸送に必須ではないことが明らかになった。これは、*H.pylori* がよりシンプルな輸送装置で V 型分泌装置の毒素分泌を実現していることを示唆している。また、ペプチドスクリーニングにより、毒素放出阻害ペプチドの単離に成功した。今後、このペプチドの作用機構を明らかにすることで、標的部位の絞り込みおよび、効果的な化合物デザインが可能となり、*H.pylori* の弱毒化薬の開発に道筋が立てられることが期待できる。

文　献

1) Mégraud F. Resistance of Helicobacter pylori to antibiotics. Aliment Pharmacol Ther. 1997 Apr ;11 Suppl 1:43-53. 1. PMID: 9146790 DOI: 10.1046/j.1365-2036.11.s1.11.x

2) Boquet P, Ricci V. Intoxication strategy of Helicobacter pylori VacA toxin. Trends Microbiol. 2012 Apr;20(4):165-74. Epub 2012 Feb 23. PMID: 22364673 DOI: 10.1016/j.tim.2012.01.008

3) Gunasinghe SD, Shiota T, Stubenrauch CJ, Schulze KE, Webb CT, Fulcher AJ, Dunstan RA, Hay ID, Naderer T, Whelan DR, Bell TDM, Elgass KD, Strugnell RA, Lithgow T. The WD40 Protein BamB Mediates Coupling of BAM Complexes into Assembly Precincts in the Bacterial Outer Membrane. Cell Rep. 2018 May 29;23(9):2782-2794. PMID: 29847806 DOI: 10.1016/j.celrep.2018.04.093

4) Roman-Hernandez G, Peterson JH, Bernstein HD. Reconstitution of bacterial autotransporter assembly using purified components. Elife. 2014 Sep 2;3:e04234. PMID: 25182416 PMCID: PMC4174580 DOI: 10.7554/eLife.04234

5) Wu R, Stephenson R, Gichaba A, Noinaj N. The big BAM theory: An open and closed case? Biochim Biophys Acta Biomembr. 2020 Jan 1;1862(1):183062. Epub 2019 Sep 11. PMID: 31520605 DOI: 10.1016/j.bbamem.2019.183062

6) Webb CT, Chandrapala D, Oslan SN, Bamert RS, Grinter RD, Dunstan RA, Gorrell RJ, Song J, Strugnell RA, Lithgow T, Kwok T. Reductive evolution in outer membrane protein biogenesis has not compromised cell surface complexity in Helicobacter pylori. Microbiologyopen. 2017 Dec;6(6). Epub 2017 Oct 21. PMID: 29055967 DOI: 10.1002/mbo3.513

7) Paramasivam N, Habeck M, Linke D. Is the C-terminal insertional signal in Gram-negative bacterial outer membrane proteins species-specific or not? BMC Genomics. 2012; 13: 510. Published online 2012 Sep 26. PMID: 23013516 DOI: 10.1186/1471-2164-13-510