

氏名(本籍)	<sup>エヴァ グレイブ</sup> Ewa Grave (ポーランド)
専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	工博甲第1号
学位授与の日付	平成28年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工学資源学研究科・生命科学専攻
学位論文題名	Studies on Geranylgeranylacetone selectively binds to the HSP70 of Helicobacter pylori and alters its coccoid morphology (Geranylgeranylacetone のヘリコバクター ピロリ菌 HSP70 への選択的結合及び形態変化促進機構に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 伊藤英晃 (副査) 教授 涌井秀樹 (副査) 教授 尾高雅文 (副査) 准教授 秋葉宇一

## 論文内容の要旨

ヘリコバクター・ピロリは、ヒト胃粘膜に感染する微好気性グラム陰性らせん状桿菌である。胃の内部は強い酸性生環境下にあるため、通常の微生物は長期間生存することができない。一方、ピロリ菌は自らが産生するウレアーゼにより胃内に存在する尿素からアンモニアを産生し、胃酸を中和することにより、胃の中での慢性感染を可能にしている。

ピロリ菌は全世界人口の約半数に感染しており、感染率は発展途上国で高く、先進国では低い。ピロリの主たる感染経路は口から口、糞便から口であり、幼小児期における感染が終生に及ぶ持続感染につながる。現在、日本人の感染者は5,000万～6,000万人と推察されている。ピロリ菌感染がヒトの胃がん発症にと密接な関連が示唆されており、細胞がん化におけるピロリ菌の役割を分子レベルで解明する研究が現在精力的に展開されている。

胃粘膜保護剤 GGA (Geranylgeranylacetone, 一般名:テプレノン) は急性胃炎、慢性胃炎、胃潰瘍治療薬として臨床で広く用いられており、ヘリコバクター・ピロリ陽性胃炎の治療薬としても知られている。GGA は胃粘膜保護剤であると共に、分子シャペロン HSP70 (70kDa of Heat Shock Protein) の誘導剤としても報告されている。分子シャペロンは、新規合成タンパク質固有の高次構造形成介助や、ステロイドホルモン受容体等の生理活性タンパク質の機能制御等、生体に必須のタンパク質である。以前の研究で、GGA 結合タンパク質は構成的に発現する分子シャペロン HSC70 (70kDa of Heat Shock Cognate Protein) であり、GGA は HSC70 のカルボキシ末端ペプチド結合ドメインと結合し、シャペロン活

性を抑制することを報告した。さらに、熱ショック転写因子 HSF1 (Heat Shock Factor 1) は通常 HSC70 と結合することにより不活性化されているが、GGA 投与により HSF1 に結合していた HSC70 は HSF1 から解離することにより、HSF1 が活性化し、HSE (Heat Shock Element) と結合し、転写が誘導され、その結果 HSP70 が誘導される機構を報告した。

本研究では、ヒト HSC70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK (原核生物の HSP70) を発現ベクターに構築し、精製を行い、各種生理機能を解明した。

① ヒト HSC70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK のアミノ酸配列の相同性は、全体として 47%であったが、アミノ末端 ATPase ドメインは 48%、カルボキシ末端ペプチド結合ドメインは 45%であった。BiaCore を用いて GGA のヒト HSC70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK に対する親和性を解析した結果、各々  $K_d = 2.00 \times 10^{-6} \text{ M}$  と  $K_d = 7.55 \times 10^{-8} \text{ M}$  であり、GGA のヘリコバクター・ピロリ DnaK に対する親和性はヒト HSC70 に対する親和性よりも約 26 倍高いことが判明した。

② GGA のヒト HSC70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK に対する二次構造変化を円偏光二色性分散計 (CD) にて解析した。ヒト HSC70 は GGA 非存在下、存在下において  $\beta$ -sheet 構造が  $27.0 \pm 0.7$  から  $24.4 \pm 2.9$ , Random 構造が  $20.4 \pm 1.7$  から  $22.4 \pm 4.6$  と、ヒト HSC70 の二次構造に対する GGA の影響は比較的軽微なことが判明した。一方、ヘリコバクター・ピロリ DnaK は、GGA 非存在下、存在下において  $\alpha$ -sheet 構造が  $16.2 \pm 2.3$  から  $9.4 \pm 3.0$ ,  $\beta$ -turn 構造が  $25.2 \pm 1.4$  から  $28.3 \pm 1.6$  と激変し、GGA はヘリコバクター・ピロリ DnaK の二次構造を変化させることが判明した。る影響を解析した。

③ クエン酸合成酵素は、熱に不安定で、 $50^\circ\text{C}$  10 分で失活し、凝集する。分子シャペロンは、クエン酸合成酵素の熱凝集を阻止する。クエン酸合成酵素を用いて、GGA のヒト HSC70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK のシャペロン活性に対すヒト HSC70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK も、クエン酸合成酵素の熱凝集を阻止した。GGA は、濃度依存的にヘリコバクター・ピロリ DnaK のシャペロン活性を抑制した。一方、同一濃度の GGA はヒト HSC70 のシャペロン活性にはほとんど影響しなかった。

④ ヘリコバクター・ピロリ菌を GGA 非存在下、存在下で培養した結果、GGA 存在下では約 2 倍増殖した。GGA はヘリコバクター・ピロリ菌の増殖を促進した。

⑤ ピロリ菌が糞便中などで取る形態に、coccoid form がある。ピロリ菌は本来らせん形であるが、coccoid form は不利な環境で取る形態的・機能的変化、いわゆる VNC (viable but not culturable) で培養できない。グラム染色によりヘリコバクター・ピロリ菌を染色した結果、GGA 非存在下では coccoid form が検出されたが、GGA 1 mM, 5 mM 存在下ではすべてらせん型の活性型を示した。

⑥ ヒト胃がん細胞 MKN28 cell と MKN45 cell にヘリコバクター・ピロリ菌を感染させ、炎症度を IL-8 (Interleukin-8) 産生を解析した。両細胞共に GGA 1 mM, 5 mM 存在下で培養したヘリコバクター・ピロリ菌の IL-8 産生量は、GGA 非存在下のヘリコバクター・ピロリ菌と比較し、最大約 50%減少した。

現在、日本におけるピロリ菌除菌の第一選択は、proton pump inhibitor と amoxicillin と clarithromycin (CAM) の 3 剤併用である。CAM 耐性化が進んでいる現状では、CAM の代わりに metronidazole, もしくは sitafloxacin に置き換えるというのが我が国のガイドラインである。従って、ピロリ菌除菌には amoxicillin は必須であり、ペニシリン ( $\beta$ -ラクタム) 系抗菌薬は細胞壁合成阻害薬であり分裂増殖が活発な菌ほど効果が高い典型的な抗菌薬である。GGA にさらされて増殖が活発になったピロリ菌ほど amoxicillin の効きがよいことが臨床的に報告されているが、作用機序は十分には解明されていなかった。

本研究結果より、GGA はヒト HSP70 と比較して、選択的にヘリコバクター・ピロリ DnaK と結合し、DnaK の二次構造を変化させ、シャペロン活性を抑制した。また、GGA 存在下ではヘリコバクター・ピロリ菌はすべて活性型として増殖するため、抗生剤を用いた除菌効果が増大する可能性を分子レベルで解明した。

## 論文審査結果の要旨

ヘリコバクター・ピロリは、ヒト胃粘膜に感染する微好気性グラム陰性らせん状桿菌である。胃の内部は強い酸性生環境下にあるため、通常の微生物は長期間生存することができない。一方、ピロリ菌は自らが産生するウレアーゼにより胃内に存在する尿素からアンモニアを産生し、胃酸を中和することにより、胃の中での慢性感染を可能にしている。ピロリ菌は全世界人口の約半数に感染しており、感染率は発展途上国で高く、先進国では低い。ピロリの主たる感染経路は口から口、糞便から口であり、幼小児期における感染が終生に及ぶ持続感染につながる。現在、日本人の感染者は 5,000 万～6,000 万人と推察されている。ピロリ菌感染がヒトの胃がん発症にと密接な関連が示唆されており、細胞がん化におけるピロリ菌の役割を分子レベルで解明する研究が現在精力的に展開されている。

胃粘膜保護剤 GGA (Geranylgeranylacetone, 一般名:テプレノン) は急性胃炎、慢性胃炎、胃潰瘍治療薬として臨床で広く用いられており、ヘリコバクター・ピロリ陽性胃炎の治療薬としても知られている。GGA は胃粘膜保護剤であると共に、分子シャペロン HSP70 (70kDa of Heat Shock Protein) の誘導剤としても報告されている。分子シャペロンは、新規合成タンパク質固有の高次構造形成介助や、ステロイドホルモン受容体等の生理活性タンパク質の機能制御等、生体に必須のタンパク質である。以前の研究で、GGA 結合タンパク質は構成的に発現する分子シャペロン HSP70 (70kDa of Heat Shock Cognate Protein) であり、GGA は HSP70 のカルボキシ末端ペプチド結合ドメインと結合し、シャペロン活性を抑制することを報告した。さらに、熱ショック転写因子 HSF1 (Heat Shock Factor 1) は通常 HSP70 と結合することにより不活性化されているが、GGA 投与により HSF1 に結合していた HSP70 は HSF1 から解離することにより、HSF1 が活性化し、HSE (Heat Shock Element) と結合し、転写が誘導され、その結果 HSP70 が誘導される機構を報告した。

本研究では、ヒト HSP70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK (原核生物の HSP70) を発現

ベクターに構築し、精製を行い、各種生理機能を解明した。

①ヒト HSP70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK のアミノ酸配列の相同性は、全体として 47%であったが、アミノ末端 ATPase ドメインは 48%、カルボキシ末端ペプチド結合ドメインは 45%であった。BiaCore を用いて GGA のヒト HSP70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK に対する親和性を解析した結果、各々  $K_d = 2.00 \times 10^{-6} \text{ M}$  と  $K_d = 7.55 \times 10^{-8} \text{ M}$  であり、GGA のヘリコバクター・ピロリ DnaK に対する親和性はヒト HSP70 に対する親和性よりも約 26 倍高いことが判明した。

②GGA のヒト HSP70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK に対する二次構造変化を円偏光二色性分散計 (CD) にて解析した。ヒト HSP70 は GGA 非存在下、存在下において  $\beta$ -sheet 構造が  $27.0 \pm 0.7$  から  $24.4 \pm 2.9$ , Random 構造が  $20.4 \pm 1.7$  から  $22.4 \pm 4.6$  と、ヒト HSP70 の二次構造に対する GGA の影響は比較的軽微なことが判明した。一方、ヘリコバクター・ピロリ DnaK は、GGA 非存在下、存在下において  $\beta$ -sheet 構造が  $16.2 \pm 2.3$  から  $9.4 \pm 3.0$ ,  $\beta$ -turn 構造が  $25.2 \pm 1.4$  から  $28.3 \pm 1.6$  と激変し、GGA はヘリコバクター・ピロリ DnaK の二次構造を変化させることが判明した。

③クエン酸合成酵素を用いて、GGA のヒト HSP70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK のシャペロン活性に対する影響を解析した。クエン酸合成酵素は、熱に不安定で、 $50^\circ\text{C}$  10 分で失活し、凝集する。分子シャペロンは、クエン酸合成酵素の熱凝集を阻止する。ヒト HSP70 とヘリコバクター・ピロリ DnaK も、クエン酸合成酵素の熱凝集を阻止した。GGA は、濃度依存的にヘリコバクター・ピロリ DnaK のシャペロン活性を抑制した。一方、同一濃度の GGA はヒト HSP70 のシャペロン活性にはほとんど影響しなかった。

④ヘリコバクター・ピロリ菌を GGA 非存在下、存在下で培養した結果、GGA 存在下では約 2 倍増殖した。GGA はヘリコバクター・ピロリ菌の増殖を促進した。

⑤ピロリ菌が糞便中などで取る形態に、coccoid form がある。ピロリ菌は本来らせん形であるが、coccoid form は不利な環境で取る形態的・機能的変化、いわゆる VNC (viable but not culturable) で培養できない。グラム染色によりヘリコバクター・ピロリ菌を染色した結果、GGA 非存在下では coccoid form が検出されたが、GGA 1 mM, 5 mM 存在下ではすべてらせん型の活性型を示した

⑥ヒト胃がん細胞 MKN28 cell と MKN45 cell にヘリコバクター・ピロリ菌を感染させ、炎症度を IL-8 (Interleukin-8) 産生を解析した。両細胞共に GGA 1 mM, 5 mM 存在下で培養したヘリコバクター・ピロリ菌の IL-8 産生量は、GGA 非存在下のヘリコバクター・ピロリ菌と比較し、最大約 50%減少した。

現在、日本におけるピロリ菌除菌の第一選択は、proton pump inhibitor と amoxicillin と clarithromycin (CAM) の 3 剤併用である。CAM 耐性化が進んでいる現状では、CAM の代わりに metronidazole, もしくは sitafloxacin に置き換えるというのが我が国のガイドラインである。従って、ピロリ菌除菌には amoxicillin は必須であり、ペニシリン ( $\beta$ -ラクタム) 系抗菌薬は細胞壁合成阻害薬であり分裂増殖が活発な菌ほど効果が高い典型的

な抗菌薬である。GGA にさらされて増殖が活発になったピロリ菌ほど amoxicillin の効きがよいことが臨床的に報告されているが、作用機序は十分には解明されていなかった。本研究結果より、GGA はヒト HSP70 と比較して、選択的にヘリコバクター・ピロリ DnaK と結合し、DnaK の二次構造を変化させ、シャペロン活性を抑制した。また、GGA 存在下ではヘリコバクター・ピロリ菌はすべて活性型として増殖するため、抗生剤を用いた除菌効果が増大する可能性を分子レベルで解明した。

申請者は、胃粘膜保護剤 GGA (Geranylgeranylacetone, 一般名:テプレノン) 特異的結合タンパク質である分子シャペロン HSP70 に対する生理機能の影響を解析した。申請者は、ヒト HSP70, 及びヘリコバクターピロリ菌 DnaK (原核生物の HSP70) を遺伝子組換え法により発現精製し、ヒトとピロリ菌の HSP70 に対する GGA の影響を解析した。その結果、GGA はヘリコバクターピロリ菌 HSP70 に対する親和性が、ヒト HSP70 に対する親和性と比較し、26 倍高いことを発見した。また、GGA はヒト HSP70 と結合してもその構造変化には殆ど影響しないが、ヘリコバクターピロリ菌 DnaK と結合した場合、二次構造を大きく変化させることを発見した。また、同一濃度の GGA では、選択的にヘリコバクターピロリ菌 DnaK のシャペロン活性を抑制することを発見した。即ち、GGA は選択的にヘリコバクターピロリ菌 DnaK と結合し、構造を変化させ、かつ生理機能を抑制することを初めて報告した。

さらに、GGA はヘリコバクターピロリ菌の Coccoid form から抗生剤が効果を発揮する活性型に変化させること、GGA 処理したヘリコバクターピロリ菌は、補体による殺傷効果が増大すること、胃がん細胞に感染させたヘリコバクターピロリ菌に GGA を投与しても、炎症性サイトカイン IL-8 の誘導が低下することを発見した。これは、臨床においてヘリコバクターピロリ菌感染者の患者さんの中でも GGA を服用している患者さんの除菌効率が高いものの、その作用機序は不明であったが、申請者の研究によって長年の問題が解決できた。

胃粘膜保護材 GGA のヒト HSP70 とヘリコバクターピロリ菌 DnaK に対する作用機構を解明した本研究は、斯界の発展に貢献すると共に、博士の学位に値する。