

## *Helicobacter pylori* の産生する VacA 毒素受容体 RPTP $\beta$ の結合領域の解析

○八尋錦之助<sup>1</sup>、和田昭裕<sup>2,3</sup>、中山真彰<sup>2</sup>、倉園久生<sup>4</sup>、野田公俊<sup>1</sup>、平山壽哉<sup>2</sup>

<sup>1</sup>千葉大・院・医、<sup>2</sup>長崎大・熱研、<sup>3</sup>PRESTO, JST、<sup>4</sup>岡山大・医

研究目的 ヒトの胃に生息するグラム陰性桿菌である *Helicobacter pylori* の産生する空胞化致死毒素 (VacA) は標的細胞の細胞質内に空胞を形成し、死滅させる。我々は VacA の宿主への初期作用を理解するため、VacA 受容体を免疫沈降法を用いて同定し、結果、宿主受容体が受容体型のチロシンホスファターゼ (RPTP)  $\beta$  であることをヒト胃癌由来株化細胞 AZ-521 細胞より精製して報告した。また、我々は VacA 感受性細胞 G401 細胞から、もう一つの VacA 受容体として p140 を精製し、RPTP  $\alpha$  であることを明らかにした。また、RPTP  $\beta$  が胃炎、胃潰瘍の発症と密接に関連することも判明した。そこで、本研究では、RPTP  $\beta$  と RPTP  $\alpha$  との細胞外領域の相同性を考慮し、VacA の RPTP  $\beta$  への結合部位の解析をした。材料と方法 RPTP  $\beta$  変異体の構築と発現: VacA との結合領域を解析するため動物細胞発現用ベクター pEF-BOS に RPTP  $\beta$  の細胞外領域を削った変異体を挿入した。また、シグナル配列の後方に HA のタグを付加し、同ベクターに組み込んだ。これらの遺伝子を、COS-7 細胞に導入し、VacA 結合能及び空胞化活性を調べた。蛋白質の発現は抗 RPTP  $\beta$  モノクローナル抗体を用いた Western blotting 法により確認した。RPTP  $\beta$  変異体の VacA 結合能の評価: RPTP  $\beta$  の細胞外領域を削った変異体を COS-7 細胞に発現させ、Triton-X 100 を含む可溶化溶液で可溶化した。この細胞可溶化溶液に、VacA あるいは熱失活した VacA を添加し、免疫沈降反応を行った。免疫複合体を SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、細胞内領域を認識する抗 RPTP  $\beta$  モノクローナル抗体を用いた Western blotting により確認した。結果と考察 RPTP  $\beta$  と RPTP  $\alpha$  との相同性のある領域を削った変異体 RPTP  $\beta$  の結合実験から、VacA は RPTP  $\beta$  wild type (B-WT) の細胞膜近傍の 700-716 番目のアミノ酸領域と結合していることが示唆された。また、B-WT、RPTP  $\beta$  変異体共に 2 本の蛋白発現バンドが認められるが、高分子量の RPTP  $\beta$  変異体に VacA は結合することが分かった。この 2 本のバンドの違いは糖鎖の付加状態の違いであると推察された。