

Helicobacter pylori vacA 대립유전자의 Mosaicism과 Signal Sequence의 한국고유 시발체

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 소아과학교실,
인하대학교 의과대학 ¹소아과학교실, ²병리학교실

안연화 · 김흥렬 · 이지은¹ · 황태숙² · 최연호

Helicobacter pylori vacA Mosaicism and New Primers for *vacA* Signal Sequence Indigenous to Korea

Yeon Hwa Ahn, M.D., Heung Ryel Kim, M.D., Ji Eun Lee, M.D.¹
Tae Sook Hwang, M.D.² and Yon Ho Choe, M.D.

Department of Pediatrics, Samsung Medical Center, Seoul, Korea
Departments of ¹Pediatrics and ²Pathology, Inha University College of Medicine,
Incheon, Korea

Purpose: *Helicobacter pylori* has been known to have diverse *vacA* allelic types. The purpose of the study was to identify *vacA* diversity in Korea and design new primers for signal sequence alleles indigenous to Korea.

Methods: Fifty antral biopsy specimens, which had been proven to be *H. pylori*-positive, were examined for *vacA* status; signal sequence and mid-region. After PCR amplification and DNA sequencing, *vacA* alleles of Korean *H. pylori* strains were compared with those from other countries.

Results: Among Korean *H. pylori* strains *vacA* alleles with all combinations of signal sequence and mid-region were found, with the exception of s1b or s2. *vacA* genotype s1c/m1 was predominant in Korea. We found that GGGAGCGTTR in s1a and GGGGYTATTG in s1c were the indigenous sequences to Korea and constructed the new Korean specific primers for the *vacA* signal sequence; VASK-F, VASK-R, S1AK-F, and S1CK-F.

Conclusion: This study showed that s1c/m1 is the predominant type of *vacA* allele in Korea. We designed new primers for the *vacA* signal sequence. (*Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 4: 155~160)

Key Words: *Helicobacter pylori*, *vacA*, Allele, Signal sequence, Mid-region

접수 : 2001년 6월 11일, 승인 : 2001년 7월 10일

책임저자 : 최연호, 135-710, 서울시 강남구 일원동 50, 삼성서울병원 소아과

Tel: 02-3410-3539, Fax: 02-3410-0043, E-mail: cyh@smc.samsung.co.kr

서 론

공포(vacuolation)를 유발해 상피세포를 손상시키는 87kDa의 *Helicobacter pylori vacA* 유전자는 s region (signal sequence; s1a, s1b, s1c)과 mid-region (m1, m2)으로 나누어진다¹⁾. s region 중에 s1 균주는 세포독소를 생성하는 것으로 알려져 있고, mid-region 중에서 m1 균주는 거의 항상 세포독소양성이며 m2 균주는 그렇지 않다²⁾. 약한 세포독소양성을 보이는 m2 균주는 모두 s1a 또는 s1b signal sequence를 갖는다. 그 중 s2/m2 균주의 공포화활성도는 미미하고, m1 균주 중에 s1a signal sequence를 가지면 s1b 균주보다 더 높은 공포화 활성도를 보이며, s1a/m1은 세포독소를 분비하는 모든 균주에서 발견된다.

CagA 단백질(cytotoxin associated gene A protein)은 *cagA* 유전자에 의해 생성되는 단백질로 성인에서 위전정부의 다핵구의 침윤과 상피세포의 변성 등 염증반응을 악화시키며 소화성 궤양환자에서 양성률이 높다고 알려져 있다^{3~6)}.

이들 유전자에 대한 동아시아의 대부분의 연구는 서구에서 만들어 놓은 시발체를 사용해 왔는데, 이는 전세계적으로 *vacA* 아형에 대한 시발체가 같다고 가정하여 연구를 시행했다는 것을 의미한다. 하지만 van Doorn 등은 *vacA* s region의 염기서열 연구에서 각 나라사이에 s2, s1a, s1b, s1c 아형의 차이가 있음을 보여주었다⁷⁾. 다시 말하면, 연구에 사용된 시발체도 nucleotide 서열이 지역에 따라 다를 가능성이 있으며 이에 따라 검출률에 차이를 가져올 수도 있을 것이다.

본 연구에서는 서구에서 보편적으로 쓰이는 *vacA* 대립유전자 시발체들을 우리 나라 소아의 *H. pylori* 감염에 적용하여 실제로 검출률이 높은지 알아보고, 검출된 유전자들을 분석하여 우리 나라 고유의 s/m mosaicism을 연구해 보고 *vacA* signal sequence 시발체를 만들어 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

상부 위내시경을 시행한 후 *H. pylori* 감염으로 진단된 50명의 환아를 대상으로 하였다. *H. pylori* 양성은 CLO test (Delta West, Perth, Australia) 양성 및 Giemsa 염색상 양성으로 정의하였다. 연령분포는 10세에서 18세였다.

2. 방법

1) 위조직 표본으로부터 DNA분리: DNA는 영하 70°C에서 냉동 보관해 온 전정부 조직으로부터 얻었다. 조직표본을 proteinase K의 혼합용액(10 mmol/L Tris-HCL[pH 8.5], 10 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid, 0.5% sodium dodecyl sulfate, 0.5 mg/ml proteinase K) 400 L에 균질화하였고, 한 시간동안 55°C에서 incubation했다. DNA는 phenol/chloroform과 ethanol 침전물을 이용하여 뽑아낸 상층액로부터 분리하여 PCR에 사용하였다.

2) PCR amplification: PCR amplification은 Atherton이 기술한 s region 시발체를 사용하여 시행하였다⁸⁾. s1은 VA1-F 5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3'와 VA1-R 5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3' (259bp), s2는 VA1-F와 VA1-R (286bp), s1a는 SS1-F 5'-GTCAGCATCACACCGCAAC-3'와 VA1-R (190bp), 그리고 s1b는 SS3-F 5'-AGCGCCATACCGCAAGAG-3'와 VA1-R (187 bp)을 이용하였다. PCR은 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)을 사용하였고, 반응액은 25 mmol/L N-tris [Hydroxymethyl] methyl-3-aminopropanesulfonic acid (pH 9.3 at 25°C), 50 mmol/L KCL, 2.0 mmol/L MgCl₂, 200μmol/L deoxynucleoside triphosphate, 0.25U TaKaRa Ex Taq polymerase (TaKaRa Shuzo Co., Shiga, Japan), 10 pmol primer (forward and reverse)를 포함하여 총 25 L였다. 이들을 5분간 94°C에서 preincubation하고, 94°C에서 1분간, 59°C에서 1분, 72°C에서 60초를 30 cycles하였으며,

72°C에서 마지막 5분 incubation 처리하였다.

50명 중 30명 환자에서 s region이 검출되었으며 mid-region은 Yamaoka⁹⁾가 기술한 VAG-F와 VAG-R 시발체를 사용하였고, *cagA*는 de Jong¹⁰⁾이 기술한 CAGF1과 CAGB1 시발체를 사용하였다.

3) DNA 염기분석 및 새로운 시발체 제작: DNA sequencing은 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)와 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit를 이용한 dideoxynucleotide chain-termination method로 시행하였다. 본 연구에서 밝혀낸 *H. pylori* 균주들의 s region nucleotide와 protein sequence를 van Doorn의 연구에서 기술된 U29401, NL3964, U07145, CH3, AU10, PE9012, PO76, PO70, HK43, JA3와 비교하였다⁷⁾. 비교된 결과를 토대로 한국고유의 signal sequence 시발체를 제작하였다.

서 양성하였고 s/m 조합분포는 Table 1과 같다. *cagA*는 92% (46/50)에서 양성이었다.

3. s1의 경우 deduced amino acid는 동일하나 우리 나라에 공통으로 발견되는 염기변이가 s1a, s1c에 있었다. s1a에서는 GGGAGCGTTR, s1c는 GGGGYTATTG가 고유의 염기서열이었다(Fig. 1).

4. 위에 언급한 sequence의 특이부분을 사용하여 새로운 시발체를 고안하였고(VASK-F, VASK-R, S1AK-F, S1CK-F) 이것을 Table 2에 기술하였다. s1b와 s2 시발체는 본 연구과정에서 s1b, s2를 발견하지 못해 제작하지 않았다. 새로이 제작된 시발체로 처음의 50개 조직을 재검한 결과 50개 모두에서 s region이 양성이었다.

결 과

1. 서구의 시발체를 사용한 50명 중 30명(60%)에서 s region이 검출되었으며 모두 s1이었다.

2. s1 중에서 s1a가 14명, s1c 15명이었고 s1b는 한 명도 발견되지 않았다. 한 명에서 s1a/s1c hybrid가 있었다. m1은 73.3% (22/30), m2는 10% (3/30)에

Table 1. Mosaicism in *vacA* Allelic Types

	Signal sequence type			
	s1a	s1b	s1c	s2
Mid-region type				
m1	10	0	12	0
m2	2	0	1	0

s1a	P L V S L A L V G A L V S I T P Q Q
U07145	CCTCTGGTTTCTCTCGCTTTAGTAGGAGCATTAGTCAGCATCACACCGCAACAA
CH3	———T———G———
KO1	———G———G———
s1c	P L V S L A L V G L L V S I T P Q K
HK43	—TA———GGTT—G———A—A—
JA3	—TA———GGTT—G———A—A—
KO2	———GGCT—G———A—A—
KO3	———GGTT—G———A—
s1a/s1c	P L V S L A L V G A L V S I T P Q K
KO4	———G———G———A—

Fig. 1. Divergence of sequences of the *vacA* s region, showing differences between s1a, and s1c subtypes. Each sequences starts at position 37 of the *vacA* open reading frame (U29401). KO means Korean strain.

Table 2. PCR Primers Used in Typing and Amplification of *H. pylori vacA* and *cagA* Sequences

Region amplified	Primer	Primer sequence	Size (bp) of PCR product
<i>vacA</i> s1	VASK-F	5 MTKRTTCTCTCGCTTT 3'	271 (445-715 ^a)
	VASK-R	5 GGGATYGTATAAGTCGTATT 3'	
<i>vacA</i> s1a	S1AK-F	5 TCTYGCTTTAGTAGGAGC 3'	212 (453-664 ^a)
	VA1-R	5 CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	
<i>vacA</i> s1c	S1CK-F	5 TTAGTTTCTCTCGCTTTAGTRGGGYT 3'	220 ^c
	VA1-R	5 CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	
<i>vacA</i> m1	VAG-F	5 CAATCTGTCCAATCAAGCGAG 3'	570 (2071-2640 ^d)
	VAG-R	5 GCGTCTAAATAATTCCAAGG 3'	
<i>vacA</i> m2	VAG-F	5 CAATCTGTCCAATCAAGCGAG 3'	645 (639-1283 ^e)
	VAG-R	5 GCGTCTAAATAATTCCAAGG 3'	
<i>cagA</i>	CAGF1	5 GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG 3'	349 (1228-1576 ^f)
	CAGB1	5 CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA 3'	

M is A or C, K is G or T, R is A or G, and Y is C or T.

^a Corresponding nucleotide positions in the *vacA* of *H. pylori* U07145.

^b Corresponding nucleotide positions in the *vacA* of *H. pylori* U29401.

^c No published coordinates for genes in strains of these types.

^d Nucleotide positions in the *vacA* of *H. pylori* 60190.

^e Nucleotide positions in the *vacA* of *H. pylori* Tx30a.

^f Nucleotide positions in the *vacA* of *H. pylori* ATCC 53726.

고 찰

*Helicobacter pylori*균은 1983년에 Warren과 Marshall¹¹⁾이 만성위염 환자의 위점막 생검조직에서 발견하여 알려지기 시작한 나선형의 그람음성간균으로 오랜 기간 위점막에서 염증을 일으켜서 점막의 위축과 장상피화생이 나타나게 되고, 소화성궤양, 위림프종 및 위암으로 진행하는 중요한자이다¹²⁾. 서구의 조사에서 *cagA*, *vacA* 등 cytotoxin을 보유한 균주가 궤양이나 위암환자에서 많이 발견되었기 때문에 이들이 주요독력인자로 생각되어 많은 연구가 진행되어 왔다. van Doorn 등¹³⁾이 *cagA* 양성 *vacA* s1 유전형양성은 소화성궤양과 관련있다고 보고하는 등 위십이지장질환에서 *cagA* 혹은 *vacA* 균주와 관련짓는 결과는 대부분 북미와 서유럽에서 주로 연구되었다^{14,15)}. 그러나 일본에서는 임상적 결과와 상관없이 가장 많은 유전형이 *cagA*

양성 및 *vacA* s1/m1이라고 보고했고^{16,17)}, 중국에서는 소화성궤양과 만성위염을 가진 환자들에게서 *cagA* 양성인 *H. pylori*의 유병률이 전반적으로 높게 나와있고 *vacA* 유전형과 이들 질환사이에는 연관성이 없다고 하였다^{18,19)}.

*H. pylori*균의 유전자가 종족과 지역에 따라 다른 분포를 나타내고 있는데 본 연구에서는 s1c/m1이 한국에서 *vacA*대립유전자의 주요형임을 보여주고 있다. 저자들이 본 연구에서 s1b와 s2를 발견하지 못하였는데, 최근에 발표된 한국의 *H. pylori* 균주를 연구한 다른 나라의 보고서에도 s1b나 s2는 발견하지 못하였다⁹⁾. s1b는 북미, 중미, 남미, 프랑스, 이탈리아, 포르투갈, 스페인에 우세한 형이고, 콜롬비아, 북유럽과 동유럽에서는 s1a가 우세한 signal sequence가 보고되고 있다²⁰⁾. 중국, 홍콩, 일본을 포함한 동아시아의 우세한 signal sequence는 저자들의 보고처럼 s1c이다^{9,20)}.

최근 일본과 중국의 연구는 *vacA* 대립유전자형

이 임상질환과는 관련이 없다는 것을 보여주고 있다^{16,17,19}). 그러나 그들은 *vacA* 대립유전자형에 대한 자기 나라의 고유의 시발체를 사용하지 않았다. 이에 저자들은 다른 나라와 차별화할 수 있는 염기서열을 기초로 하여 한국 고유의 signal sequence에 관한 시발체를 고안하였고, 원래의 표본에 적용해 본 결과 100%의 검출률을 얻을 수 있었다.

결론적으로 우리 나라의 주된 *vacA* 대립유전자형조합은 s1c/m1이었고, 저자들은 *vacA* signal sequence의 한국 고유의 시발체를 만들었음을 보고하는 바이다.

요 약

목 적: *H. pylori*의 *vacA* 대립유전자는 종족과 지역에 따라 다양하게 나타나고 있다. 저자들은 *H. pylori*에 감염된 소아의 위생검조직에서 *vacA* 대립유전자에 대한 중합효소연쇄반응과 유전자염기분석을 실시하여 한국의 signal sequence와 mid-region의 다형성 및 고유의 시발체를 연구하고자 하였다.

방 법: 상부 위내시경을 시행한 후 *H. pylori* 감염으로 진단된 10~18세 50명의 환아를 대상으로 위생검조직을 이용하여 *vacA* 대립유전자에 대한 PCR과 DNA 분석을 실시하였다. 이들 결과와 다른 나라의 *vacA* 대립유전자를 비교분석하였고 우리나라의 고유한 염기배열을 갖는 시발체를 제작하였다.

결 과:

1) 서구의 시발체를 사용한 50명 중 30명(60%)에서 모두 s1이 검출되었고 이중 s1a가 14명, s1c 15명, s1a/s1c hybrid가 한 명이었으며 s1b는 발견되지 않았다. s1c/m1이 가장 많은 형이었다.

2) 우리 나라에 공통으로 발견되는 염기변이가 s1a에서는 GGGAGCGTTR, s1c는 GGGGYTATTG이었으며 이들을 이용하여 새로운 시발체를 고안하였다(VASK-F, VASK-R, S1AK-F, S1CK-F). 새로이 제작된 시발체로 처음의 50개 조직을 재검한 결과 50개 모두에서 s region이 양성이었다.

결 론: 우리 나라의 주된 *vacA* 대립유전자형조합

은 s1c/m1이었고, *vacA* signal sequence의 한국 고유의 시발체를 만들었음을 보고하는 바이다.

참 고 문 헌

- 1) Cover TL. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. Mol Microbiol 1996;20:241-6.
- 2) Van der Ende A, Rauws EAJ, Feller M, Mulder CJJ, Tytgat GNJ, Dankert J. Heterogeneous *Helicobacter pylori* isolates from members of a family with a history of peptic ulcer disease. Gastroenterology 1996; 111:638-47.
- 3) Tummuru MKR, Cao P, Thomson SA, Blaser MJ. Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. Infect Immun 1993; 61:1799-809.
- 4) Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burrone D, Macchia G, et al. Molecular characterization of the 128kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:5791-5.
- 5) Censini S, Lange C, Xiang A, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M, et al. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:14648-53.
- 6) Tummuru MKR, Shama SA, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* *picB*, a homologue of *Bordetella pertussis* toxin secretion proteins, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells. Mol Microbiol 1995;18:867-76.
- 7) Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P, Ng EK, et al. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori vacA*. J Clin Microbiol 1998;36: 2597-603.
- 8) Atherton JC, Cao P, Peek RMJ, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem 1995;270:17771-7.
- 9) Yamaoka Y, Kodama T, Gutierrez O, Kim JG, Kashima K, Graham DY. Relationship between *Helicobacter pylori* *iceA*, *cagA*, and *vacA* status and clinical outcome: studies in four different countries. J Clin Microbiol 1999;37:2274-9.

- 10) de jong D, van der Hulst RWM, Pals G, van der Ende A, Tytgat GNJ, Taal BG, et al. Gastric non-hodgkin lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue are not associated with more aggressive *Helicobacter pylori* strains as identified by *cagA*. Am J Clin Pathol 1996;106:670-5.
 - 11) Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984;1:1311-5.
 - 12) Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. Clin Microbiol Rev 1997;10:720-41.
 - 13) Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Pena S, Midolo P, Ng EK, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1998;115:58-66.
 - 14) Tee W, Lambert JR, Dwyer B. Cytotoxin production by *Helicobacter pylori* from patients with upper gastrointestinal tract disease. J Clin Microbiol 1995; 33:1203-5.
 - 15) Weel JFL, van der Hulst RWM, Gerrits Y, Roorda P, Feller M, Dankert J, et al. The interrelationship between cytotoxin-associated gene A, vacuolating cytotoxin, and *Helicobacter pylori*-related disease. J Infect Dis 1996;173:1172-5.
 - 16) Ito Y, Azuma T, Ito S, Miyaji H, Hirai M, Yamazaki Y, et al. Analysis and typing of the *vacA* gene from *cagA*-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. J Clin Microbiol 1997;35:1710-4.
 - 17) Maeda S, Ogura K, Yoshida H, Funai F, Ikenoue T, Kato N, et al. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. Gut 1998;42:338-43.
 - 18) Pan Z, van der Hulst RWM, Feller M, Xiao S, Tytgat GNJ, Dankert J, et al. Equally high prevalences of infection with *cagA*-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patient with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. J Clin Microbiol 1997;35:1344-7.
 - 19) Pan Z, Berg DE, van der Hulst RWM, Su W, Raudokiene A, Xiao S, et al. Prevalence of vacuolating cytotoxin production and distribution of distinct *vacA* alleles in *Helicobacter pylori* from China. J Infect Dis 1998;178:220-6.
 - 20) Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DM, et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology 1999;116:823-30.
-