

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790133

研究課題名(和文)

メトロニダゾール耐性 *H. pylori* の酸化ストレス感受性異常の分子機序

研究課題名(英文)

The role of the transcriptional regulator, Ferric uptake regulator (Fur), in *H. pylori* resistance to metronidazole

研究代表者

津川 仁 (TSUGAWA HITOSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30468483

研究成果の概要(和文):

H. pylori の二次除菌療法に用いられる抗菌薬メトロニダゾール(Mtz)に耐性化した臨床分離 *H. pylori* は SodB の転写制御因子である Ferric uptake regulator (Fur) にアミノ酸変異(C78Y、P114S)が導入された変異型 Fur をコードしている。変異型 Fur は、*sodB* の promoter 領域 (Fur-Box) への結合活性が有意に低下し、SodB の強発現を誘導するため、メトロニダゾール由来 superoxide 消去活性が亢進し、その結果メトロニダゾールに耐性を示す。以上のように、本研究課題では、バクテリアの抗酸化能亢進が薬剤耐性に寄与する新しい機序を明確にした。

研究成果の概要(英文):

Metronidazole (Mtz) is a prodrug that is converted to its active form and superoxide radicals are generated. The transcriptional regulator, ferric uptake regulator (Fur), of *H. pylori* is a direct suppressor of the iron-cofactored superoxide dismutase (SodB), which is essential for protection against superoxide attack. In some Mtz-resistant strains, SodB activity is induced in a dose-dependent manner on exposure to Mtz. These Mtz-resistant strains were found to carry amino acid mutation of Fur (C78Y, P114S; mutant-type Fur). The binding affinity of the mutant-type Fur to the *sodB* promoter (Fur-Box) was significantly reduced. Our approach demonstrated that SodB expression is derepressed by mutant-type Fur, which is associated with the development of Mtz resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：薬剤耐性、酸化ストレス、ferric uptake regulator (Fur)、superoxide dismutase (SOD)

1. 研究開始当初の背景

微好気性細菌の *Helicobacter pylori* は酸素量が大气より少ない状態(5-10%)でのみ発育するが、好気性細菌同様、代謝過程で酸素が最終の電子受容体となり活性酸素が発生し($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$)、酸化ストレスに曝露される。更に、*H. pylori* 感染胃粘膜上皮において、

宿主による異物排除応答(宿主胃粘膜の微小循環系より遊走してきた多形核白血球)による活性酸素種(ROS)産生を受けることでも酸化ストレスに曝される。

H. pylori の二次除菌療法に用いられる抗菌薬メトロニダゾール(Mtz)も、菌体内に取り込まれた後、*H. pylori* の還元酵素であるニトロ

レダクターゼ (RdxA) によって還元活性化され、superoxide を生じ、菌体は酸化ストレス刺激により致命的なダメージを受ける。従って、rdxA 遺伝子変異による RdxA タンパク質の失活は、Mtz 耐性化につながる事が知られている。しかしながら、Mtz 耐性臨床分離株 (耐性株) の中には、rdxA 遺伝子変異を持たずに耐性化を示す菌株も多数認められ、「臨床重要な *H. pylori* の Mtz 耐性化は RdxA 非依存的な機序による」と考えられた。そこで、研究代表者は、「耐性株では、sodB 発現が亢進し、活性酸素消去活性が高まっているのではないかと推測した。そこで、Mtz 存在下での sodB 発現状態を Mtz 感受性株 (ATCC 700392) と耐性株 (KS0033, KS0048 及び KS0145) とで比較した。その結果、感受性株に比べ、耐性株では sodB の発現が高く誘導されてくることを見いだした。sodB の発現調節は、転写制御因子 Ferric uptake regulator (Fur) が sodB promoter 領域の Fur-Box に結合し sodB の転写を抑制することが知られている。従って、耐性株では Fur の構造変異により、Fur 機能が正に破綻し、sodB 強発現が誘導される結果、Mtz 耐性化に寄与するのではないかと推測された。

2. 研究の目的

sodB 強発現を示す耐性株の Fur の 1 次構造を解析すると、耐性株固有の C78Y 変異及び P114S 変異 (変異型 Fur) が確認された。従って、「Fur のアミノ酸変異が sodB 遺伝子の発現制御機構を破綻させ、sodB 発現誘導能が亢進し、結果として、superoxide 消去活性が亢進することにより Mtz 耐性化を獲得しているのではないかと考えられたため、本研究課題では、「変異型 Fur による sodB 発現亢進機序を明確にし、これに伴う Mtz 耐性化を明らかにする。」

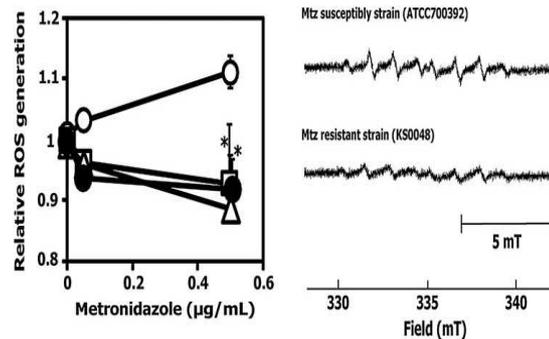
3. 研究の方法

変異型 Fur による Mtz 耐性化機序の解析；
 (1) 変異型 Fur 保持 Mtz 耐性株で、SodB 活性の比較を行い、また、Mtz 曝露時の菌体内 superoxide 蓄積量を、スピントラップ剤として、テンポール及び CYPMPO を用いた Electron Spin Resonance assay (ESR) により菌体内活性酸素量を野生型 Fur 保持 Mtz 感受性株と比較検討する。
 (2) Mtz 感受性株に、sodB 遺伝子を ligation した *H. pylori* 用発現 vector である pHel 3 vector を transformation した *H. pylori* 菌株 (*H. pylori* pHel 3::sodB) を構築し、SodB 強発現による Mtz 耐性獲得の有無について明確にする。
 (3) 変異型 Fur 及び野生型 Fur をそれぞれ pET31(b) vector を用いて recombinant Fur 蛋白質を構築し、His タグを用いて分離精製し

た後、各 Fur 蛋白質の Fur-Box への結合能の変化を Biacore2000 分子間相互作用解析装置により検討する。

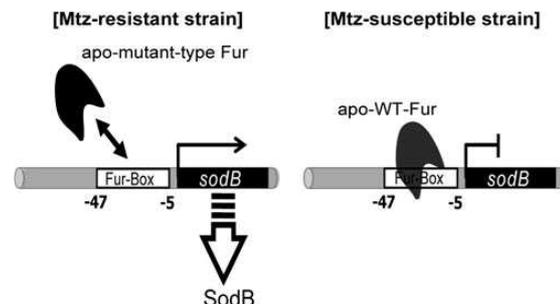
4. 研究成果

変異型 Fur を保持する Mtz 耐性株では、Mtz 曝露時に SodB 発現が転写レベル及び活性レベルともに Mtz 容量依存的に亢進した。それに伴って、菌体内 superoxide の蓄積が野生型 Fur 保持 Mtz 感受性株に比べ有意に低下した (図 .1) (Antioxidant Redox Signal, 14;15-23, 2011)。



(図 1. 野生型 Fur 保持 Mtz 感受性株と変異型 Fur 保持耐性株を用いた ESR による Mtz 曝露時の菌体内 superoxide の蓄積. (左) スピントラップ剤テンポールによる菌体内 ROS 蓄積. ○; 野生型 Fur 保持 Mtz 感受性株, ●, □, △; 変異型 Fur 保持耐性株. (右) スピントラップ剤 CYPMPO を用いた菌体内 superoxide の蓄積. Antioxidant Redox Signal, 14;15-23, 2011 より引用)

H. pylori pHel 3::sodB 株では、SodB 活性が亢進し、Mtz に対する MIC 値が 2 から 32 µg/mL へ上昇し、SodB 強発現と共に Mtz 耐性化を示したため、SodB 機能亢進が Mtz 由来 superoxide 消去を促進させ耐性化できることが示された。次に、大腸菌にて発現・精製した変異型及び野生型の各 recombinant Fur を用いて、sodB promoter (Fur-Box) への結合活性を Biacore2000 を用いて比較検討した結果、変異型 Fur は野生型 Fur に比べ Fur-Box への結合活性が有意に低下 (Kd 値の有意に亢進) していることが明らかとなった。



(図 2. Fur のアミノ酸変異による sodB 転写制御機構破綻. 左; 変異型 Fur, 右; 野生型 Fur.

Antioxidant Redox Signal., 14;15-23, 2011 より引用)

以上のことから、変異型 Fur 保持 Mtz 耐性株では、転写制御因子 Fur にアミノ酸変異 (C78Y、P114S) が導入され、変異型 Fur では、Fur-Box への結合活性が有意に低下し、SodB の転写制御機構が正に破綻するため、SodB の強発現が誘導される (図. 2)(Antioxidant Redox Signal, 14;15-23, 2011)。その結果、Mtz 由来 superoxide 消去能が亢進し、Mtz 耐性を獲得している事が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1. Tsugawa H., Suzuki H., Muraoka H., Ikeda F., Hirata K., Matsuzaki J., Saito Y., Hibi T. Enhanced bacterial efflux system is the first step to the development of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 14;656-660, 2011. (査読有り)
2. Tsugawa H., Suzuki H., Satoh K., Hirata K., Matsuzaki J., Saito Y., Suematsu M., Hibi T. Two amino acids mutation of Ferric uptake regulator (Fur) determines *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole. **Antioxidants & Redox Signaling**, 14:15-23, 2011. (査読有り)
3. 津川仁, 鈴木秀和, 日比紀文. 酸化ストレス研究により明らかになった *Helicobacter pylori* 薬剤耐性獲得機構. **G.I.Reserch.** 19:38-43, 2011. (査読無し)
4. Suzuki, H., Nishizawa, T., Tsugawa, H., Hibi, T. Free Radicals in *Helicobacter pylori* infection. **Front Gastrointest Res.** 29: 111-120, 2011. (査読無し)

[学会発表](計10件)

国際学会

1. Tsugawa, H., Suzuki, H., Hirata, K., Matsuzaki, J., Okada, S., Fukuhara, S., Saito, Y. and Hibi, T. The iron uptake system for the antioxidant ability of *Helicobacter pylori*. International Symposium on Free Radical Research; Contribution to Medicine, Kyoto, 21th, Jan. 2011. (Poster Session)
2. Tsugawa, H., Suzuki, H., Suzuki, S., Hirata, K., Matsuzaki, J., Saito, Y., Hibi, T. The role of the Ferric uptake regulator (Fur) in *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole. Digestive

Disease Week 2010, Topic forum, New Orleans, USA, 4th, May, 2010. (Oral Session)

3. Tsugawa, H., Suzuki, H., Muraoka, H., Suzuki, S., Hirata, K., Matsuzaki, J., Saito, Y., Hibi, T. Induction of *H. pylori* resistance to metronidazole through enhanced expression of a bacterial efflux pump. Digestive Disease Week 2010, Research forum, New Orleans, USA, 2th, May, 2010. (Oral Session)
4. Tsugawa, H., Suzuki, H., Hirata K., Satoh, K. and Hibi, T. Mutation in the transcriptional repressor Fur contributes to the mechanism of metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*; implication of the structural-functional relationships of mutant-type Fur. 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related organisms (CHRO2009), Niigata, Japan, 4th, September, 2009. (Poster Session)
5. Tsugawa, H., Suzuki, H., Nakagawa, I., Hirata K., Nishizawa, T., Saito, Y., Juntaro M., Eisuke I., Suematsu, M. and Hibi, T. Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Helicobacter pylori* associated with the development of resistance to Metronidazole: implications for the structural-functional relationships of mutant-type Fur. Digestive Disease Week 2009, Research forum, Chicago, USA, 31th, May, 2009. (Oral Session)

国内学会

6. 津川仁, 鈴木秀和, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 岡田佐和子, 福原誠一郎, 齋藤義正, 日比紀文. 転写制御因子 Fur を介した効率的鉄奪取機構で維持される *H. pylori* の抗酸化システム. 日本薬学会 第131年会. 静岡. 3月29-31日2011年. (講演ハイライト演題)
7. 津川仁, 鈴木秀和, 松崎潤太郎, 平田賢郎, 福原誠一郎, 岡田佐和子, 日比紀文. 効率的鉄獲得機構により維持された *H. pylori* の抗酸化能は、慢性感染の成立に必須である. 第7回日本消化管学会総会. 京都. 2月19日2011年.
8. 津川仁, 鈴木秀和, 平田賢郎, 松崎潤太郎, 齋藤義正, 日比紀文. *H. pylori* の SodB (Fe-SOD) 活性発現をサポートする Ferric uptake regulator (Fur) による鉄イオン供給システム. 第63回日本酸化ストレス学会. 横浜. 6月25日2010年.

9. 津川仁、鈴木秀和、佐藤和恵、鈴木祥子、平田賢郎、松崎潤太郎、斎藤義正、日比紀文. メトロニダゾール耐性 *H. pylori* における転写制御因子 Ferric uptake regulator (Fur) 依存的な抗酸化能と鉄代謝. 第37回日本潰瘍学会. 東京. 11月6日25日2009年.
10. 津川仁、鈴木秀和、平田賢郎、佐藤和恵、日比紀文. *H. pylori* の Ferric uptake regulator (Fur) 変異による酸化ストレス耐性化. 第62回日本酸化ストレス学会. 福岡. 6月11日2009年.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津川 仁 (TSUGAWA HITOSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 30468483

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし