

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：34517

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08053

研究課題名(和文)ピロリ菌のビタミンB1取り込み機構解明と感染症補完療法への展開

研究課題名(英文) Mechanism of thiamin transport in *Helicobacter pylori* providing a basis for complementary therapy for the infection.

研究代表者

野坂 和人 (Nosaka, Kazuto)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号：10228314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌はチアミンのde novo生合成酵素群の遺伝子が欠失しているため、生育するために外界からチアミンを取り込む必要がある。今回、ピロリ菌SS1株のチアミン取り込み機構について検討した。その結果、ピロリ菌のチアミン輸送系はチアミンのピリミジン部を認識し、促進拡散によりチアミンを取り込むことが示唆された。また、ピロリ菌には複数のチアミン輸送系が存在し、PnuTは高親和性チアミン輸送タンパク質であることが明らかとなった。さらに、ピロリ菌pnuT欠損株は野生株に比べて100倍濃度のチアミンを要することから、PnuTを阻害する化合物は抗ピロリ菌剤として有望と思われた。

研究成果の概要(英文)： *Helicobacter pylori* lacks the genes involved in the de novo synthesis of thiamin, and therefore is a thiamin auxotroph. In this study, we found that thiamin is incorporated into *H. pylori* SS1 strain via a facilitated diffusion with an apparent K_m value of $19 \mu\text{M}$, and that the transport system seems to recognize the pyrimidine moiety of thiamin. In addition, when the pnuT gene was expressed in a thiamin transport-deficient *Escherichia coli* strain, the transport activity with a K_m value of $3.5 \mu\text{M}$ was restored. Further, the pnuT-deficient *H. pylori* strain exhibited reducing thiamin transport activity to less than 20% of the wild-type strain, and required 100 times more thiamin than the wild-type strain to achieve growth equal to that of the wild-type. These findings reflect the presence of multiple routes for entry of thiamin into *H. pylori*, and it is likely that PnuT is responsible for the high affinity thiamin transport and serves as target for antimicrobial agent for *H. pylori*.

研究分野：環境・衛生系薬学、代謝生化学

キーワード：ヘリコバクター・ピロリ チアミン トランスポーター PnuT 感染

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界人口の半数以上が感染しているとされるピロリ菌 *Helicobacter pylori* は、胃粘膜に長期間持続感染して、胃炎、胃潰瘍、胃癌を誘発する。現在、除菌療法としてプロトンポンプ阻害剤と抗生物質による併用療法が普及しているが、耐性菌の出現や再感染が臨床問題となっている。

(2) ビタミン B₁ (チアミン) は全ての生物にとって必須の栄養素である。ほとんどの細菌、真核微生物、植物などはチアミンの新規 (de novo) 合成経路を有している。図に示すように、チアミン合成では、ピリミジン部 (hydroxymethylpyrimidine, HMP) とチアゾール部 (hydroxyethylthiazole, HET) が独立した経路で合成され、それぞれのリン酸エステル化合物が縮合してチアミン骨格が形成される。しかし、ゲノム配列の比較から、ピロリ菌にはピリミジン部及びチアゾール部合成経路が欠失していることが強く示唆される。つまり、ピロリ菌はチアミンの供給を外界からの取り込みかサルベージ経路による合成に依存しており、チアミンの輸送系やサルベージ経路を阻害する化合物は抗ピロリ菌剤として有望と思われる。

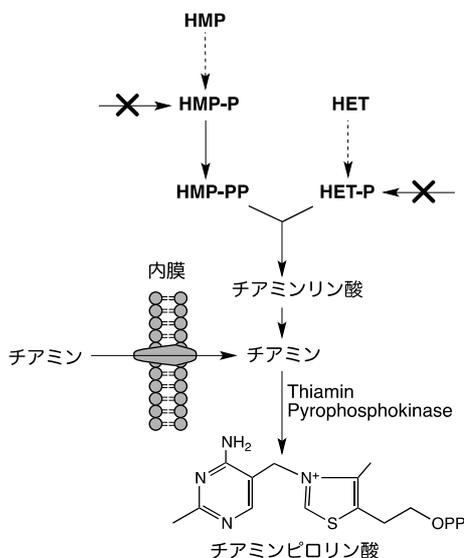


図 ピロリ菌のチアミンの生合成経路
破線はサルベージ経路を示す。

(3) ピロリ菌 SS1 株のゲノムにおいて、チアミンピロホスホキナーゼ遺伝子 (*thi80*) の上流に nicotinamide riboside 輸送タンパク質 (*pnuC*) 相同遺伝子 (*pnuT*) が存在している。Pnu (pyridine nucleoside uptake) transporters は微生物に広く存在する 8 回膜貫通タンパク質である。*thi80* と *pnuT* の塩基配列の一部は重なりあっており、両遺伝子は単一の mRNA として転写されるものと思われる。しかも、チアミンの細胞内取り込みとピロリン酸化は連続する反応である。これらのことから、PnuT はピロリ菌のチアミン膜輸送タンパク質であることが推定される。

また、PnuT は PnuC と相同性が認められることから、ヌクレオシド誘導体はチアミンの取り込みを阻害する可能性が考えられる。

申請者はこれまで主に発芽酵母と動物のチアミン代謝とその調節機構についての研究に従事してきた。その過程でチアミン膜輸送タンパク質遺伝子である *THI10* (Enjo et al, *J Biol Chem*, 1997) や *hTHTR1* (Labay et al, *Nature Genet*, 1999) を同定し、その性質を生化学的、分子生物学的に明らかにした。今回、上述した臨床上的の問題点を鑑みて、ピロリ菌のチアミン取り込み系を生化学的に解析し、その分子機構をピロリ菌感染の補完療法や予防法開発に応用することを着想した。

2. 研究の目的

ピロリ菌 *Helicobacter pylori* はチアミン生合成酵素遺伝子を欠失するため、生育するためには細胞外からチアミンを取り込む必要がある。そこで、当研究では、チアミン輸送系を標的とするピロリ菌感染に対する補完療法のための基盤となる知見を得ることを目的とする。具体的には、ピロリ菌のチアミン細胞膜輸送タンパク質を同定し、チアミン取り込み機構の生化学的性質を明らかにする。さらに、チアミン関連化合物、ヌクレオシドさらにはヌクレオシド誘導体のピロリ菌におけるチアミン取り込みに対する影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 菌株

ピロリ菌は *Helicobacter pylori* SS1 株を用いた。また、相同組み換えを利用して、*pnuT* 遺伝子をカナマイシン耐性遺伝子 (*aphA3*) 遺伝子と置きかえて、SS1 株 *pnuT* 欠損株を作成した。大腸菌はチアミン輸送系欠損株 NEB10β (*thiBPQ*) を使用した。また、大腸菌 BL21(DE3)pLysS 株を組換えタンパク質の発現に用いた。

(2) チアミン輸送活性の測定

ピロリ菌および大腸菌のいずれも、0.2 M マニトールと 0.5% グルコースを含有する 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.0) で洗浄及び懸濁した。³Hチアミンを添加、37 °C で保温後、ガラスフィルターろ過法により細胞内に取り込まれた放射能を液体シンチレーションカウンターで計測した。

(3) チアミンピロホスホキナーゼ活性の測定

組換え Thi80 タンパク質を 1.0 mM ATP、10 mM MgCl₂ を含有する 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) で懸濁し、チアミンを添加、37 °C で保温した。生成するチアミンピロリン

酸をチオクローム化した後、その蛍光を HPLC で定量した。

(4) 化合物

nicotinamide riboside は、nicotinamide ribotide (Sigma-Aldrich) をアルカリホスファターゼで加水分解した後、HPLC で精製した。HMP は、チアミン水溶液をオートクレープ処理 (130 °C、計 30 時間) 後、濃縮して生じる粗結晶を冷エタノールで数回洗い (HET を除く) 再結晶を得た。その他の化合物は市販の特級品を使用した。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌のチアミン要求性

5% FBS 含有 Brucella Broth 培地 (チアミン濃度約 0.2 μM) で培養したピロリ菌をチアミン除去 Ham's F-12 培地 (合成培地) で 2 回継代すると生育不能になった。しかし、合成培地にチアミンを 1 nM 添加すると生育可能になり、10 nM 以上のチアミン含有培地で増殖が飽和に達した時の吸光度の約半分程度の吸光度まで増殖した。チアミンの代わりに、チアミンリン酸 (TP) やチアミンピロリン酸 (TPP) を添加すると、チアミン添加時と同程度の生育曲線が観察された。また、HMP と HET をそれぞれ 10 nM 同時に添加すると生育したことから、ピロリ菌はこれらのチアミン前駆体を取り込んで、菌体内でチアミンを合成できることが示唆された。

(2) ピロリ菌のチアミン取り込み活性の諸性質

ピロリ菌における 10 μM [^3H]チアミン取り込み活性の最適 pH は 7.0、最適温度は 40 °C であり、4 °C ではほとんど放射能の取り込みは認められなかった。また、グルコース、 Na^+ 、 K^+ の添加によって有意な取り込み活性の上昇は観察されなかった。100 μM [^3H]チアミンの取り込みの時間的経過を調べると、2 分まで直線的に進み、10 分後ほぼ最高に達した。最大取り込み時における細胞内外のチアミンの濃度比は、菌体内チアミン量と菌体サイズから計算された菌体容積より求めると、1.3 であったことから、ピロリ菌は促進拡散によりチアミンを取り込んでいることが示唆された。

また、取り込み初速度に及ぼす [^3H]チアミン濃度の影響を調べると、200 μM 付近で活性がほぼ飽和になり、 K_m 値は 19 μM 、 V_{max} 値は 3.0 pmol (10^8 cells) $^{-1}$ min $^{-1}$ であった。しかし、取り込み活性はその後上昇し、チアミン濃度 1 mM における活性は 4.6 pmol (10^8 cells) $^{-1}$ min $^{-1}$ であった。この結果から、ピロリ菌には複数のチアミン輸送系が存在することが示唆された。

次に、基質特異性を明らかにするため、チアミン取り込みに対するチアミン構造類似体の影響を調べた。HMP とピリチアミン

は、標識したチアミンの 10 倍濃度を同時に添加すると、活性はそれぞれ 40% および 47% 阻害された。一方、HET とオキシチアミンはチアミンの取り込みにほとんど影響を及ぼさなかった。この結果から、ピロリ菌のチアミン輸送系はチアミンのピリミジン部を認識していることが示唆された。そこで、ピリミジン塩基 (ウラシル、シトシン、チミン) とピリミジンヌクレオシド (ウリジン、シチジン、チミジン) のチアミン取り込みに対する影響を検討したが、唯一ウラシルが約 30% の取り込み阻害活性を表す程度であった。また、PnuC の基質である nicotinamide riboside は全くチアミン取り込みに影響を及ぼさなかった。

さらに、TP と TPP といったリン酸エステルを [^3H]チアミンと同時に添加しても、ほとんど取り込み活性は低下しなかったが、チアミンを加える前に TP や TPP を 60 分保温すると放射活性の取り込みがほとんど消失した。この結果から、ピロリ菌はチアミンをリン酸エステルの形では直接取り込むことが出来ないが、菌体表層にチアミンリン酸エステルを脱リン酸化するホスファターゼが存在することが明らかとなった。

(3) ピロリ菌の *thi80-pnuT* オペロン

ピロリ菌ゲノムにある *thi80* と *pnuT* が単一の mRNA として発現されていることを RT-PCR で確認した。次に、*thi80* 遺伝子を単離し、大腸菌で発現させた組換えタンパク質のチアミンピロホスホキナーゼ活性を検出した。本活性のチアミンに対する K_m 値は 0.40 μM で、輸送系のそれよりも約 50 倍低い値であったことから、菌体内に取り込まれたチアミンは効率的にピロリン酸化されることが示唆された。

次に、*pnuT* 遺伝子を大腸菌のチアミン輸送系欠損株で発現させると、 [^3H]チアミン取り込み活性が著しく増加した。大腸菌における PnuT のチアミン取り込み活性も HMP とピリチアミンにより阻害され、またチアミンに対する K_m 値は 3.5 μM であった。これらの結果から、ピロリ菌の *thi80-pnuT* オペロンは、外界のチアミンからの補酵素チアミンピロリン酸生成のために機能していることが明らかとなった。

(4) ピロリ菌の *pnuT* 欠損株の性質

構築した *pnuT* 欠損株は、10 μM [^3H]チアミン取り込み活性が野生型株の約 20% まで低下したが、完全には失われなかった。本欠損株のチアミン輸送活性の K_m 値は 81 μM 、 V_{max} 値は 1.5 pmol (10^8 cells) $^{-1}$ min $^{-1}$ であった。また、*pnuT* 欠損株が野生型株と同様の生育曲線を示すためには、野生型株の約 100 倍濃度のチアミンが必要であった。以上の結果より、ピロリ菌には PnuT 以外にもチアミンを取り込む系が存在すること、PnuT は高親和性チアミン輸送タンパク質であること

が判明した。

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 0 件)

現在、当該成果については投稿準備中です。

〔学会発表〕(計 4 件)

只野響, 内山良介, 小林数也, 林麻利亜, 遠藤祐里奈, 赤路健一, 野坂和人: ピロリ菌のチアミン輸送タンパク質 PnuT の生化学的性質と基質認識部位 .日本薬学会第 138 年会, 金沢, 2018.3.26.

野坂和人, 林麻利亜, 遠藤祐里奈, 内山良介, 三室仁美: ピロリ菌のチアミン要求性とチアミンピロリン酸オペロンの同定 . 日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017.3.27.

野坂和人, 内山良介, 三室仁美: ピロリ菌のチアミン輸送系の性質 . 第 447 回ビタミン B 研究協議会, 大阪, 2017.3.4.

野坂和人, 内山良介: ピロリ菌のチアミン要求性とチアミン輸送系について . 第 443 回ビタミン B 研究協議会, 京都, 2016.1.30.

〔その他〕

ホームページ等

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~seika2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野坂 和人 (NOSAKA, Kazuto)

武庫川女子大学・薬学部・教授

研究者番号: 10228314

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

今野 博行 (KONNO, Hiroyuki)

山形大学・理工学研究科・教授

研究者番号: 50325247