

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590410

研究課題名（和文）ヘリコバクターピロリの持続感染成立における菌の

代謝酵素アスパラギナーゼの関与

研究課題名（英文）Pathophysiological role of *Helicobacter pylori* asparaginase

研究代表者

柴山 恵吾 (SHIBAYAMA KEIGO)

国立感染症研究所・細菌第二部・部長

研究者番号：50283437

研究成果の概要（和文）：

*Helicobacter pylori* のアスパラギナーゼは、U937 細胞に顕著な細胞毒性を示した。菌のアスパラギナーゼを欠損させると、細胞毒性が低下し、砂ネズミへの定着能も低下した。*H. pylori* は菌体外のアスパラギンをアスパラギナーゼによりアスパラギン酸に変換し、そのアスパラギン酸を取り込むことでアスパラギンを利用していった。アスパラギナーゼ、GGT は菌の代謝酵素であるとともに、感染局所において細胞毒性を発揮して、宿主免疫からの回避と生存、そして病態形成に関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

*Helicobacter pylori* asparaginase exhibited striking cytotoxic activity against U937 cells via asparagine deprivation. The cytotoxic activity of live *H. pylori* cells against U937 cells was significantly diminished by deletion of the asparaginase gene. An asparaginase-deficient mutant strain was significantly less capable of colonizing Mongolian gerbils. *H. pylori* cells incorporated extracellular asparagine by transporting aspartate produced by the action of the asparaginase. *H. pylori* asparaginase may be involved in inhibition of normal lymphocyte function at the gastric niche, allowing *H. pylori* to evade the host immune system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	900,000	0	900,000
2012年度	900,000	0	900,000
年度			
年度			
総計	2,800,000		2,800,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：ヘリコバクターピロリ、アスパラギナーゼ、代謝酵素、病原性、感染成立、アスパラギン取り込み、免疫回避、胃がん

## 1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクターピロリ(*H. pylori*)の病原性については、これまでに CagA 蛋白、VacA 蛋白などが非常によく研究されているが、こ

れらの蛋白を欠損させた株でも病原性はある程度保持されているため、病原性には他にも重要な因子が存在すると考えられている。私は、これまでに新たに *H. pylori* の重要な

病原因子  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (GGT) を発見した (Shibayama K., et al., Mol. Microbiol. 47(2):443-51, 2003)。そして、この酵素の生化学的性状はヒトの GGT とは大きく異なり、転移活性はほとんどなく、一方でグルタミンとグルタチオンに対して顕著な加水分解活性を示し、これらの基質に対する Km 値は nM のレベルであることを報告した (Shibayama K., et al., Mol. Microbiol., 64(2). 396-406, 2007)。この酵素活性によりグルタミンとグルタチオンが枯渇することが胃の上皮細胞に対する細胞障害の一つの主要なメカニズムと考えられた。また後に他のグループから、この GGT が T cell の機能を抑制するという報告 (Gastroenterol., 2007, 132,1820-33) や、動物実験で GGT を欠損させた株は感染成立しないという報告 (Mol. Microbiol., 31(5)1359-72, 1999)、そしてさらに *H. pylori* に感染した動物にグルタミンを経口投与すると病態が軽減するという報告 (J. Nutr., 2009, 139(5), 912-8) がされ、私の発見が裏付けられた。この蛋白は宿主に対しては病原因子として作用する一方、菌にとってはグルタミン利用のために必須な代謝酵素であるという二面性をもつという特徴をもつものだった (Shibayama K., et al., Mol. Microbiol., 64(2). 396-406, 2007)。このように、菌にとって必須な代謝酵素が同時に宿主に対して積極的に病原性を発揮しているというのは、これまでによく解析が行われている毒素とは異なる病原性のメカニズムである。

我々は、*H. pylori* がアスパラギナーゼを恒常的に産生して分泌していることを見出した。*H. pylori* は細胞外のアスパラギンを取り込むトランスポーターを持たず、細胞外のアスパラギンをアスパラギナーゼの働きでアスパラギン酸に変換し、それを取り込んでいることを見出した。ところで、*H. pylori* のアスパラギナーゼは大腸菌のアスパラギナーゼと同一性が高いが、大腸菌のリコンビナントアスパラギナーゼはヒト T cell に対して細胞増殖を抑制する活性があり、古くから急性リンパ性白血病の治療薬として使われている。

*H. pylori* は胃の粘膜に長期持続感染するため、我々は *H. pylori* のアスパラギナーゼは感染局所で持続的に宿主に作用していると予想した。アスパラギナーゼは胃粘膜において T cell の機能を抑制して、正常な免疫反応を阻害する役割を果たしていると予想した。そして、GGT とアスパラギナーゼ、及びその他の菌の代謝酵素が協調して同時に宿主に積極的に病原因子として働き、感染成立と病原性発揮に関与していると予想し、この研究を始めた。

## 2. 研究の目的

*H. pylori* のアスパラギナーゼが宿主の T cell の本来の正常な反応を抑制して、実際に宿主の免疫からの回避により感染成立に関与していることを、in vitro そして in vivo の実験を通して明らかにする。そしてさらに、アスパラギナーゼが我々が以前に見出した GGT と協調して宿主に対する病原性に積極的に関与していることを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### *H. pylori* のアスパラギナーゼの精製

菌を培養し、破碎して硫酸沈殿、イオン交換カラム、疎水カラム、ゲル濾過カラムなどにより精製した。

### 精製酵素の Characterization

精製アスパラギナーゼを用いて、酵素活性を調べた。測定は、我々が以前に確立した HPLC 法を用いた (Shibayama K., et al., Mol. Microbiol., 64(2). 396-406, 2007)。

また、精製アスパラギナーゼを用いて、U937 細胞、胃上皮由来 AGS 細胞、その他の細胞に対する細胞障害活性を調べた。細胞障害メカニズムは、アスパラギナーゼの作用によるアスパラギンの枯渇が予想されるので、培養液中にアスパラギンを補給したときの影響を調べた。

### アスパラギナーゼ欠損株の Characterization

*H. pylori* アスパラギナーゼ欠損株、及びアスパラギナーゼと GGT 両方の欠損株を作製した。我々が以前に確立したカナマイシン耐性遺伝子カセット、クロラムフェニコール耐性遺伝子カセットを用いた方法 (Shibayama K. et al., Mol. Microbiol. 47(2):443-51, 2003) で欠損株を作製した。そして、これらの欠損株と親株について、U937 細胞、AGS 細胞その他の細胞に対する細胞毒性を調べた。このようにして、まず in vitro で実際にアスパラギナーゼが *H. pylori* が示す細胞障害活性の中で重要なものであることを確認した。また、GGT との相乗効果についても明らかにした。

### 代謝酵素としてのアスパラギナーゼの機能の解析

RI ラベルのアスパラギン、アスパラギン酸を用いて、*H. pylori* のアスパラギナーゼによるアスパラギン代謝での生理代謝機能を調べた。親株、アスパラギナーゼ欠損株でのアスパラギン、アスパラギン酸の取り込みを調べ、*H. pylori* が細胞外のアスパラギンをアスパラギナーゼの働きでアスパラギン酸に変換した上で取り込んでいることを確認した。

菌体内に取り込まれた RI ラベルの基質を TLC 等で分析し、取り込まれた基質がどのように代謝されたのかも調べた。

#### 動物を用いた感染実験

*H. pylori* の感染モデルとして確立されているスナネズミを用いて、感染実験を行った。

まず、臨床から分離された *H. pylori* 株の中で、スナネズミに感染が成立する株を複数選び出した。そして、それらの株のアスパラギナーゼ遺伝子、GGT 遺伝子、または両方の遺伝子を欠損させた株を作成した。そしてそれらの株をスナネズミに感染させて定着を調べ、親株、欠損株との間での違いを調べた。胃で感染成立している菌数も調べ、親株と欠損株とで比較した。これにより、実際に *H. pylori* のアスパラギナーゼが感染成立と病態発生に関与していることを調べた。

このようにして、*H. pylori* のアスパラギナーゼが実際に *in vivo* で感染成立と病原性の発揮に働いていることを明らかにした。そして、そのメカニズムについて考察した。また GGT との相乗効果についても調べた。

#### 4. 研究成果

##### *H. pylori* のアスパラギナーゼ活性

*H. pylori* 26695 株とアスパラギナーゼ欠損株の生菌を 1mM アスパラギンを含む buffer に懸濁し、37°C で 2 時間 incubate 後菌を遠心により除き buffer 中のアスパラギンの変化を調べた。欠損株は、*ansB* 遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子を挿入して作成した。*H. pylori* 26695 株ではアスパラギンがほとんどアスパラギン酸に変換されていたが、アスパラギナーゼ欠損株ではアスパラギンのアスパラギン酸への変換はほとんどみられなかった(図 1)。

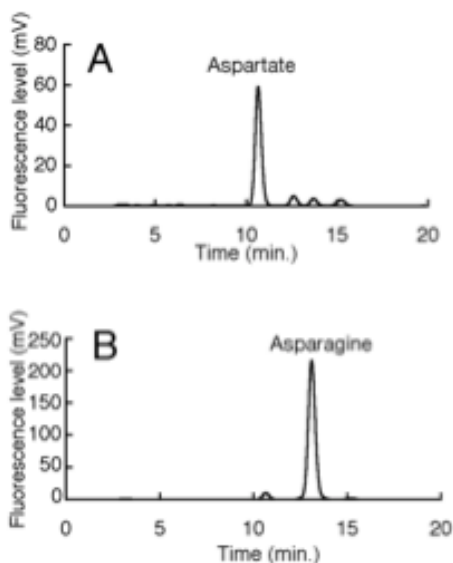


図 1 *H. pylori* 生菌による菌体外のアスパラ

ギンのアスパラギン酸への変換の解析。アスパラギンとアスパラギン酸の組成は HPLC で解析した。

#### アスパラギナーゼの精製

*H. pylori* 26695 より、アスパラギナーゼを精製した。酵素は菌体に存在するときは安定していたが、精製を進めると非常に不安定となり、途中過程で容易に分解された。精製の工程で Buffer に高濃度のアスパラギン酸を加えることで、安定して酵素を精製することに成功した(図 2)。

精製酵素はアスパラギン酸を除去すると速やかに分解されたため、酵素活性は粗精製酵素で測定した。pH 7.0 でアスパラギンの  $K_m$  値は、 $9.75 \pm 1.81 \mu\text{M}$  で、至適 pH は中性付近で比較的広がった。なお、*H. pylori* のアスパラギナーゼのリコンビナント蛋白を精製し、Characterization を行ったという発表が海外のグループから出ていて (BBRC, 37:1222-6, 2008, PLoS One 5:e13892, 2010)、我々の結果と食い違いがある。彼らの結果は再現性が確認出来ず、また図に不適切な使い回しがあり、内容にも不自然な点があるので、解釈に注意を要すると考えられる。この点について、我々は論文でも明らかにした。

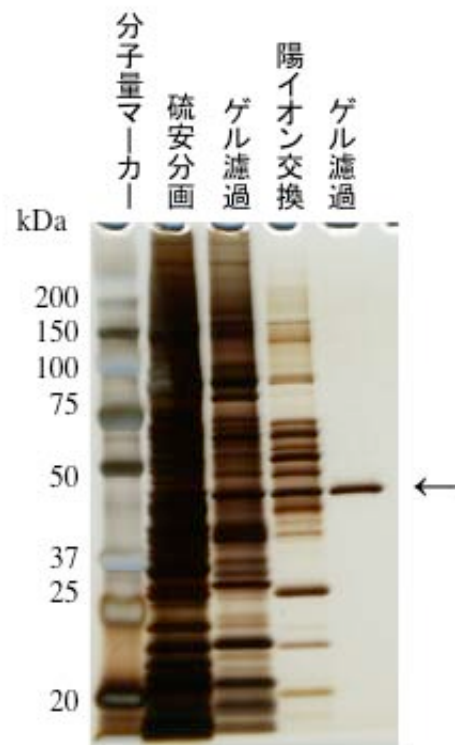


図 2 *H. pylori* から精製したアスパラギナーゼの各画分の SDS-PAGE

#### アスパラギナーゼの細胞毒性

精製アスパラギナーゼ及び生菌を用いて

U937 細胞に対する細胞毒性を測定した。アスパラギナーゼは、明らかな細胞毒性を示した(図 3)。細胞毒性は、培地中にアスパラギンを添加することで低下した(図 3)ため、アスパラギンの加水分解がその原因であると考えられた。

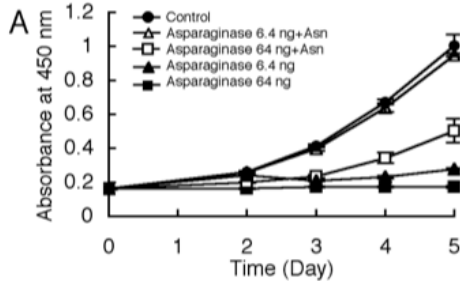
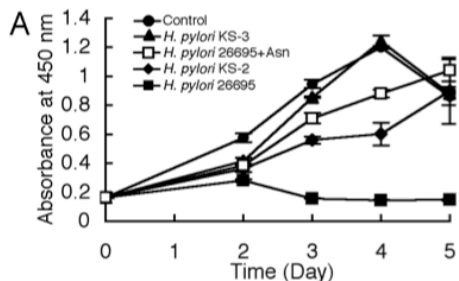


図 3 精製アスパラギナーゼの細胞毒性

生菌による U937 細胞に対する細胞毒性

*H. pylori* 26695 と、アスパラギナーゼ欠損株、及びアスパラギナーゼと GGT の欠損株の cell line に対する細胞毒性を解析した。親株が、U937 細胞に対して顕著な細胞毒性を示したのに対して、アスパラギナーゼ欠損株(KS-2)では、その毒性は減弱していた。さらに、アスパラギナーゼと GGT 両方の欠損株(KS-3)では、細胞毒性はほとんど見られず、U937 細胞は培地のみコントロールと同程度に増殖した。する細胞毒性が有意に減少した(図 4)。

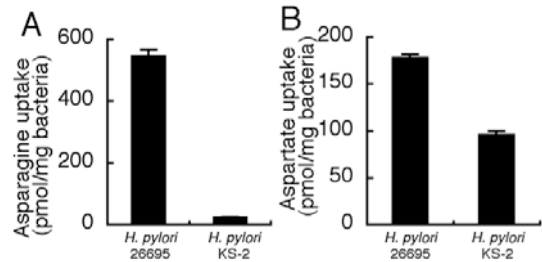
図 4 生菌の U937 細胞に対する細胞毒性。



KS-2, アスパラギナーゼ欠損株。KS-3, アスパラギナーゼ及び GGT の欠損株。

*H. pylori* のアスパラギナーゼの代謝酵素としての機能

RI ラベルの基質を用いてアスパラギナーゼが、*H. pylori* 菌体においてアスパラギン及びアスパラギン酸の細胞内への取り込みにどのような役割を果たしているか解析した。親株は、アスパラギン、アスパラギン酸ともに細胞内に取り込むことが出来た。一方、アスパラギナーゼ欠損株(KS-2)は、アスパラギンを取り込むことが出来ず、アスパラギン酸のみを取り込むことが出来た(図 5)。つまり、*H. pylori* は細胞外のアスパラギンを細胞外でアスパラギナーゼの働きでアスパラギン酸に変換して細胞内に取り込んでいる



ことが分かった。

図 5 RI ラベルしたアスパラギン(A)、アスパラギン酸(B)の *H. pylori* 菌体内への取り込み。 *H. pylori* 26695 株とアスパラギナーゼ欠損株(*H. pylori* KS-2)を RI ラベルしたアスパラギンまたはアスパラギン酸を含む buffer に懸濁し、5 分後に菌体を洗浄して RI の取り込みを液体シンチレーションカウンターで定量した。

以上のことから、*H. pylori* のアスパラギナーゼは、菌が環境中のアスパラギンを利用するのに必須の代謝酵素であることが明らかになった。

□ アスパラギナーゼは同時に、感染宿主の細胞に対して細胞毒性を示すことがわかった。

□ In vivo においては、*H. pylori* は恒常的にアスパラギナーゼを産生して必要な栄養源として菌体外に存在するアスパラギンをアスパラギン酸に変換し取り込んで利用しつつ、その酵素が同時に宿主に対して病原性を発揮しているメカニズムが考えられた(図 6)。

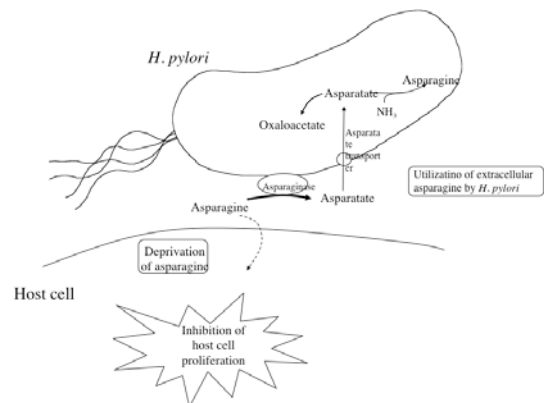


図 6 アスパラギナーゼの代謝酵素としての機能と病原性

□臨床分離株のアスパラギナーゼ活性、GGT 活性と胃がんとの関連性

胃がん患者由来の菌株では、慢性胃炎、及び胃潰瘍患者由来の菌株と比較して GGT の活性が有意に高かった。アスパラギナーゼの活性は、株によりバラツキが大きく、病態との間に有意な相関は認められなかった。アスパラギナーゼと GGT の活性が炎症を起こすのに関与しているかどうかを調べるために、それ

ぞれのタンパクの欠損株を作成し、AGS 細胞に感染させて IL-8 の産生の違いを調べた。GGTの欠損株では親株と比較してIL-8の産生が有意に少なかった。アスパラギナーゼの欠損株では有意な差は認められなかった。

この研究で、*H. pylori* のアスパラギナーゼが新たに病原因子として働いていることが明らかになった。今後、この酵素が胃がんなどの病態形成にどのように関与しているのか、分子レベルでの研究が進み、さらには胃がんの発生の予測や早期診断にも道が開けると考えられる。

#### 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 3 件)

##### (1) Shibayama K 査読無

Reply to Letter to the Editor regarding Shibayama et al.: Biochemical and pathophysiological characterization of *Helicobacter pylori* asparaginase.

*Microbiology and Immunology*. 56(6):422, 2012

doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00459.x

##### (2) Rimbara E, Mori S, Matsui M, Suzuki S, Wachino J, Kawamura Y, Shen Z, Fox JG, Shibayama K. 査読有

Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of *Helicobacter cinaedi* isolated from seven hospitals in Japan.

*J Clin Microbiol*. 2012 Aug;50(8):2553-60  
doi: 10.1128/JCM.06810-11

##### (3) Shibayama K, Takeuchi H, Wachino J, Mori S, Arakawa Y. 査読有

Biochemical and pathophysiological characterization of *Helicobacter pylori* asparaginase.

*Microbiol. Immunol.* 55(6):408-17, 2011  
doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00333.x.

[学会発表] (計 5 件)

##### (1) 林原 絵美子, 森 茂太郎, 金 玄, 柴山 恵吾

Role of gamma-glutamyl transpeptidase and asparaginase in the pathogenesis of *Helicobacter pylori*

第86回日本細菌学会総会、2013年3月18日-20日、幕張

##### (2) E. Rimbara, S. Mori, M. Matsui, S. Suzuki, J. Wachino, Y. Kawamura, Z. Shen,

J. G. Fox, K. Shibayama

Molecular epidemiologic analysis and antimicrobial resistance of *Helicobacter cinaedi* isolated from 7 hospitals in Japan.

XXVth International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer

September 13 - 15, 2012, Ljubljana, Slovenia

##### (3) 林原 絵美子, 森 茂太郎, 金 玄, 松井 真理, 鈴木 里和, 高橋 俊司, 山本 聡, 向井 正也, 柴山 恵吾

同一の病院で分離された *H. cinaedi* と *H. fennelliae* の分子疫学的解析と薬剤感受性  
第18回日本ヘリコバクター学会学術集会、2012年6月29日-30日、岡山

(4) Rimbara E, Shibayama K.: Molecular Epidemiology of *Helicobacter cinaedi* isolates in Japan. XIII International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS), September 2011, Sapporo, JAPAN.

(5) Shibayama K, Takeuchi H, Wachino J, Mori S, Arakawa Y. Pathophysiological Role of *Helicobacter pylori* Asparaginase. XIII International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS), September, 2011, Sapporo, Japan.

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柴山 恵吾 (SHIBAYAMA KEIGO)

国立感染症研究所・細菌第二部・部長

研究者番号：50283437

##### (2) 研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

該当なし ( )

研究者番号：