

厚生省厚生科学研究費補助金
厚生科学特別研究事業

H10-特別-023
*H. pylori*の活性酸素代謝特性と遺伝子
変異機構の分子論的解析

平成10年度 研究報告書

平成11年3月

大阪市立大学医学部
佐藤英介

H. pylori の活性酸素代謝特性と遺伝子変異機構の分子論的解析

主任研究者 佐藤英介 大阪市立大学医学部

研究要旨 本菌は生育環境の変化によって形態を変化させる。通常、胃内では桿状構造を示すが、生育環境が悪化すると球状化する。本菌は、活性酸素を産生するが、形態変化に伴いその産生量と質が大きく異なることが判明した。すなわち、桿状の Bacillari 型は主にスーパーオキシドを、球状の Coccoid は主にヒドロキシラジカルを産生する。さらに、球状化にともない、タンパク質の酸化修飾体であるカルボニル産物が著明に蓄積し、DNA の酸化指標である 8-OH-G も増加した。従って、感染局所の環境変化に伴い、H. pylori が産生した活性酸素は自身にも酸化ストレスとして作用し、蛋白や DNA を変化させること、およびこれが本菌の遺伝子多型性獲得に関与する可能性が示唆される。菌体の形態変化に伴う活性酸素産生増加が胃粘膜にも強い酸化ストレスを負荷し、これが癌原性を示す可能性も考えられる。

分担研究者 井上正康
大阪市立大学医学部教授

A. 研究目的

唾液や野菜に含まれる多量の亜硝酸は酸性下で強い抗菌作用を示す一酸化窒素(NO)に変化する。食物中の細菌の多くは強酸性胃液と NO により有効に殺菌される。しかし、H. pylori のごとく、酸性環境下でも生育して粘膜を障害する細菌もいる。高いウレアーゼ活性が本菌の胃内棲息に重要と考えられているが、NO 抵抗性の分子機構は不明である。我々は、本菌が積極的にスーパーオキシドを産生して胃液中の NO を消去し、変異原性を有するパーオキシナイトライトが生ずることを見出した。本研究は、H. pylori の活性酸素産生機構、本菌と胃粘膜細胞の遺伝子に対するその影響、本菌の形態および生化学的変化との関係から解明することを目的とする。

B. 研究方法

H. pylori の正常な桿状 (Bacillari 型) 構造と長期培養により球状化した菌体 (Coccoid 型) を用いて解析した。活性酸素産生能は主にスーパーオキシドを検出する化学発光試薬 MCLA とヒドロキシラジカルを検出する L-012 を用いて解析した。タンパク質の酸化修飾体であるカルボニル化蛋白とペルオキシナイトライトの蛋白チロシン残基のニトロ化をウエスタンブロッティングにより検出した。DNA の酸化は電気化学検出器を用いた HPLC 法により解析した。

C. 研究結果

1) H. pylori の活性酸素産生能を主にスーパーオキシドを検出する化学発光試薬 MCLA とヒドロキシラジカルを検出する L-012 を用いて解析した結果、桿状菌は主にスーパーオキシドを、球状菌はヒドロキシラジカルを産生していることが判明した。2) タンパク質の酸化修飾体であるカルボニル化蛋白をウエスタンブロッティングにより検出した結果、球状化に伴い多量のカルボニル化蛋白が増加することが判明した。3) 電気化学検出器を用いた HPLC 法により解析した結果、球状化に伴い DNA の酸化指標である 8-OH-G 量が増加した。4) スーパーオキシドと NO の反応産物であるペルオキシナイトライトの蛋白チロシン残基のニトロ化をウエスタンブロッティングにより検出した結果、球状化に伴いニトロ化チロシンが増加していた。

D. 考察

H. pylori は、胃内の環境変化に伴い活性酸素代謝の性状が大きく変化すること予想される。遺伝子変異原性の高いペルオキシナイトライトやヒドロキシラジカルが増加して、菌体自体に酸化ストレスとなり遺伝子多型や宿主に対する癌原性の原因となる可能性が考えられた。

E. 結論

H. pylori の活性酸素代謝特性を解析した結果、形態変化に伴い大きく変化することが判明した。この際、酸化ストレスの指標となる蛋白のカルボニル化や 8-OH-dG が増加して遺伝子変異原性や遺伝子多型の原因となり胃ガンの原因となる可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishikawa, M., Sato, E. F., Kashiba, M., Kuroki, T., Utsumi, K., and Inoue, M. (1998). Role of glutathione in nitric oxide-dependent regulation of energy metabolism in rat hepatoma cells. *Hepatology* 27, 422-6.

Nishikawa, M., Takeda, K., Sato, E. F., Kuroki, T., and Inoue, M. (1998). Nitric oxide regulates energy metabolism and Bcl-2 expression in intestinal epithelial cells. *Am-J-Physiol* 274, G797-801.

Nakanishi, T., Nishi, Y., Sato, E. F., Ishii, M., Hamada, T., and Inoue, M. (1998). Thermal injury induces thymocyte apoptosis in the rat. *J-Trauma* 44, 143-8.

Nagata, K., Yu, H., Nishikawa, M., Kashiba, M., Nakamura, A., Sato, E. F., Tamura, T., and Inoue, M. (1998). *Helicobacter pylori* generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J-Biol-Chem* 273, 14071-3.

Morishita, S., Sato, E. F., Takahashi, K., Manabe, M., and Inoue, M. (1998). Insulin-induced hypoglycemia elicits apoptosis in the rat. *Diabetic Res. Clin. Pract.* 40, 1-7.

Dunlap, W. C., Yamamoto, Y., Inoue, M., Kashiba, M., and Tomita, K. (1998). Uric acid photo-oxidation assay: in vitro comparison of sunscreens. *International Journal of Cosmetic Science* 20, 1-18.

Minamiyama, Y., Takemura, S., Toyokuni, S., Tanimoto, Y., Sato, E. F., and Inoue, M. (1998). A processed grain food inhibits hepatic injury in endotoxemic rats. *J. Nutr Sci Vitaminol* 44, 547-59.

Minamiyama, Y., Takemura, S., Kawada, N., and Inoue, M. (1998). Role of nitric oxide in extracellular nucleotide-induced contractile status of assorted vessels including parts of the portal vasculature. *J-Hepatol* 28, 314-9.

Konaka, R., Kasahara, E., Dunlap, W. C., Yamamoto, Y., Chein, K., and Inoue, M. (1998). Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and

superoxide radicals. *International Journal of Cosmetic Science* 20, 1-18.

Yamada, T., Yukioka, H., Hayashi, M., Asada, A., and Inoue, M. (1998). Effects of inhaled nitric oxide on platelet-activating factor-induced pulmonary hypertension in dogs. *Acta-Anaesthesiol-Scand* 42, 358-68.

Kawada, N., Seki, S., Inoue, M., and Kuroki, T. (1998). Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 27, 1265-74.

Takemura, S., Minamiyama, Y., Kawada, N., Inoue, M., Kudo, S., Hirohashi, K., and Kinoshita, H. (1998). Extracellular nucleotides modulate the portal circulation with generation of nitric oxide. *Hepatology Research* 13, 29-36.

Kaneko, H., Koshi, S., Hirota, T., Miyauchi, Y., Kitamura, N., and Inoue, M. (1998). Inhibition of post-ischemic reperfusion injury of the kidney by diamine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1407, 193-99.

Sasaki, J., Yamamoto, H., Nomura, T., Matsuura, J., Seno, M., Sato, E. F., and Inoue, M. (1998). Multiple-labeling of oligonucleotide probes for in situ hybridization. *Acta Histochem. Cytochem.* 31, 275-79.

Ishisaka, R., Utsumi, T., Yabuki, M., Kanno, T., Furuno, T., Inoue, M., and Utsumi, K. (1998). Activation of caspase-3-like protease by digitonin-treated lysosomes. *FEBS Letters* 435, 233-36.

2. 学会発表

M. Inoue (1998) Role of cross-talk of reactive oxygen species, nitric oxide, antioxidants, and vitamins in health and diseases. 1st Japan-China Conference on Vitamins (Peigin)

M. Inoue (1998) Role of cross-talk of nitric oxide, reactive oxygen species, GSH and related antioxidants in the regulation of energy metabolism. 11th Int. Conf. Pathophysiology (Finland, Alton Meister Symposium)

M. Inoue (1998) Role of nitric oxide and related

oxyradicals in the regulation of energy metabolism and circulatory status. VIIIth Ann. I. M. Arias Symposium "Bridging Basic Science and Liver Disease" American Liver Foundation (Boston)

M. Inoue (1998) Role of nitric oxide and related oxyradicals in the regulation of energy metabolism and enteric bacteria. IInd Japan-UK Conference (Tsukuba)

M. Inoue (1998) Nitric oxide and related oxyradicals, majesties of aerobic life. IInd Cong. SFRR Asia "Emerging potential of Antioxidant Therapy" (Goa)

井上正康 (1998) 「活性酸素病態」日本呼吸器学会・シンポジウム講演 (熊本)

井上正康 (1998) 活性酸素・NO 病態：生体防御機構の源流を探る 日本炎症学会・教育講演 (東京)

H. pylori の形態変化による酸化修飾と遺伝子変異

分担研究者 佐藤英介 大阪市立大学医学部

研究要旨 *H. pylori* は生育環境の変化によって形態を変化させる。通常、胃内では桿状構造を示すが、生育環境が悪化すると球状化する。球状化にともない、タンパク質の酸化修飾体であるカルボニル産物が著明に蓄積し、DNA の酸化指標である 8-OH-G も増加した。従って、感染局所の環境変化に伴い、*H. pylori* が産生した活性酸素は自身にも酸化ストレスとして作用し、蛋白や DNA を変化させること、およびこれが本菌の遺伝子多型性獲得に関与する可能性が示唆される。菌体の形態変化に伴う活性酸素産生増加が胃粘膜にも強い酸化ストレスを負荷し、これが癌原性を示す可能性も考えられる。

A. 研究目的

一酸化窒素(NO)は抗菌作用を有するが、その分子機構は不明である。NO 合成酵素は胃粘膜上皮や消化管神経にも存在し、生じたNOが消化管内外で機能すると考えられているが、短寿命分子(数秒)であるが故にその体内動態や作用は不明な点が多い。これまで、低酸素環境下ではNOの寿命が著明に延長し、ミトコンドリア、細胞、および *E. coli* などの呼吸を強く可逆的に抑制するが、微好気性の *H. pylori* に対する阻害作用は極めて弱いこと、本菌がスーパーオキシドラジカル(O₂⁻)を産生する事、およびその低感受性がO₂⁻によるNOの不活化(ONOO⁻形成)に起因することを世界に先駆けて明らかにした。本菌の遺伝子は異常に広い多型性を示すが、その分子機構と医学的意義は不明である。本研究は、*H. pylori* の活性酸素代謝特性からその感染成立機構や病巣粘膜細胞の遺伝子変異機構を解明し、本菌関連病態の新予防治療法開発に必要な理論基盤を確立することを目的とする。

B. 研究方法

H. pylori の正常な桿状 (Bacillari 型) 構造と長期培養により球状化した菌体 (Cocoid 型) を用いて解析した。タンパク質の酸化修飾体であるカルボニル化蛋白とペルオキシナイトライドの蛋白チロシン残基のニトロ化をウエスタンブロットングにより検出した。DNA の酸化は電気化学検出器を用いた HPLC 法により解析した。

C. 研究結果と考察

1) タンパク質の酸化修飾体であるカルボニル化蛋白をウエスタンブロットングにより検出し

た結果、球状化に伴い多量のカルボニル化蛋白が増加することが判明した。2) 電気化学検出器を用いた HPLC 法により解析した結果、球状化に伴い DNA の酸化指標である 8-OH-G 量が増加した。3) スーパーオキシドと NO の反応産物であるペルオキシナイトライドの蛋白チロシン残基のニトロ化をウエスタンブロットングにより検出した結果、球状化に伴いニトロ化チロシンが増加していた。

E. 結論

H. pylori の活性酸素代謝特性を解析した結果、形態変化に伴い大きく変化することが判明した。この際、酸化ストレスの指標となる蛋白のカルボニル化や 8-OH-dG が増加して遺伝子変異原性や遺伝子多型の原因となり胃ガンの原因となる可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishikawa, M., Sato, E. F., Kashiba, M., Kuroki, T., Utsumi, K., and Inoue, M. (1998). Role of glutathione in nitric oxide-dependent regulation of energy metabolism in rat hepatoma cells. *Hepatology* 27, 422-6.

Nishikawa, M., Takeda, K., Sato, E. F., Kuroki, T., and Inoue, M. (1998). Nitric oxide regulates energy metabolism and Bcl-2 expression in intestinal epithelial cells. *Am-J-Physiol* 274, G797-801.

Nakanishi, T., Nishi, Y., Sato, E. F., Ishii, M., Hamada, T., and Inoue, M. (1998). Thermal injury induces thymocyte apoptosis in the rat. *J-Trauma* 44, 143-8.

Nagata, K., Yu, H., Nishikawa, M., Kashiba, M., Nakamura, A., Sato, E. F., Tamura, T., and Inoue, M. (1998). Helicobacter pylori generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J-Biol-Chem* 273, 14071-3.

Morishita, S., Sato, E. F., Takahashi, K., Manabe, M., and Inoue, M. (1998). Insulin-induces hypoglycemia elicits apoptosis in the rat. *Diabetic Res. Clin. Pract.* 40, 1-7.

Minamiyama, Y., Takemura, S., Toyokuni, S., Tanimoto, Y., Sato, E. F., and Inoue, M. (1998). A processed grain food inhibits hepatic injury in endotoxemic rats. *J. Nutr Sci Vitaminol* 44, 547-59.

Sasaki, J., Yamamoto, H., Nomura, T., Matsuura, J., Seno, M., Sato, E. F., and Inoue, M. (1998). Multiple-labeling of oligonucleotide probes for in situ hybridization. *Acta Histochem. Cytochem.* 31, 275-79.

2. 学会発表

M. Inoue, EF Sato et al. (1998) Role of cross-talk of reactive oxygen species, nitric oxide, antioxidants, and vitamins in health and diseases. Ist Japan-China Conference on Vitamins (Peigin)

M. Inoue, EF Sato et al. (1998) Role of cross-talk of nitric oxide, reactive oxygen species, GSH and related antioxidants in the regulation of energy metabolism. IInd. Int. Conf. Pathophysiology (Finland, Alton Meister Symposium)

M. Inoue, EF Sato et al. (1998) Role of nitric oxide and related oxyradicals in the regulation of energy metabolism and enteric bacteria. IInd Japan-UK Conference (Tsukuba)

M. Inoue, EF Sato et al. (1998) Nitric oxide and related oxyradicals, majesties of aerobic life. IInd Cong. SFRR Asia "Emerging potential of Antioxidant Therapy" (Goa)

H. pylori の形態変化に伴う活性酸素代謝特性の変化

分担研究者 井上正康 大阪市立大学医学部

研究要旨 *H. pylori* は生育環境の変化によって形態を変化させる。通常、胃内では桿状構造を示すが、生育環境が悪化すると球状化する。本菌は、活性酸素を産生するが、形態変化に伴いその産生量と質が大きく異なることが判明した。すなわち、桿状の Bacillari 型は主にスーパーオキシドを、球状の Coccoid は主にヒドロキシラジカルを産生する。*H. pylori* が産生した活性酸素は自身にも酸化ストレスとして作用し、これが本菌の遺伝子多型性獲得に関与する可能性が示唆される。菌体の形態変化に伴う活性酸素産生増加が胃粘膜にも強い酸化ストレスを負荷し、これが癌原性を示す可能性も考えられる。

A. 研究目的

唾液や野菜に含まれる多量の亜硝酸は酸性下で強い抗菌作用を示す一酸化窒素 (NO) に変化するので、食物中の細菌の多くは強酸性胃液と NO により有効に殺菌される。しかし、*H. pylori* のごとく、酸性環境下でも生育して粘膜を障害する細菌もいる。高いウレアーゼ活性が本菌の胃内棲息に重要と考えられているが、NO 抵抗性の分子機構は不明である。我々は、本菌が積極的にスーパーオキシドを産生して胃液中の NO を消去し、変異原性を有するパーオキシナイトライトが生ずることを見出した。本研究は、*H. pylori* の活性酸素産生機構と形態変化との関係を解明することを目的とする。

B. 研究方法

H. pylori の正常な桿状 (Bacillari 型) 構造と長期培養により球状化した菌体 (Coccoid 型) を用いて解析した。Bacillari 型と Coccoid 型の菌はパーコールを用いた密度勾配遠沈法を用いて分離した。活性酸素産生能は主にスーパーオキシドを検出する化学発光試薬 MCLA とヒドロキシラジカルを検出する L-012 を

用いて解析した。さらに ESR (電子スピン共鳴) を用いてスピントラップとして DMPO を用いて活性酸素種を同定した。

C. 研究結果

1) *H. pylori* の活性酸素産生能を主にスーパーオキシドを検出する化学発光試薬 MCLA とヒドロキシラジカルを検出する L-012 を用いて解析した結果、桿状菌は主にスーパーオキシドを、球状菌はヒドロキシラジカルを産生していることが判明した。

2) ESR を用いた解析においても同様に桿状菌は主にスーパーオキシドを、球状菌はヒドロキシラジカルを産生していることが判明した。

D. 考察

H. pylori は、胃内の環境変化に伴い活性酸素代謝の性状が大きく変化すること予想される。遺伝子変異原性の高いペルオキシナイトライトやヒドロキシラジカルが増加して、菌体自体に酸化ストレスとなり遺伝子多型や宿主に対する癌原性の原因となる可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Nishikawa, M., Sato, E. F., Kashiba, M., Kuroki, T., Utsumi, K., and Inoue, M. (1998). Role of glutathione in nitric oxide-dependent regulation of energy metabolism in rat hepatoma cells. *Hepatology* 27, 422-6.

Nishikawa, M., Takeda, K., Sato, E. F., Kuroki, T., and Inoue, M. (1998). Nitric oxide regulates energy metabolism and Bcl-2 expression in intestinal epithelial cells. *Am-J-Physiol* 274, G797-801.

Nakanishi, T., Nishi, Y., Sato, E. F., Ishii, M., Hamada, T., and Inoue, M. (1998). Thermal injury induces thymocyte apoptosis in the rat. *J-Trauma* 44, 143-8.

Nagata, K., Yu, H., Nishikawa, M., Kashiba, M., Nakamura, A., Sato, E. F., Tamura, T., and Inoue, M. (1998). *Helicobacter pylori* generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism. *J-Biol-Chem* 273, 14071-3.

Morishita, S., Sato, E. F., Takahashi, K., Manabe, M., and Inoue, M. (1998). Insulin-induced hypoglycemia elicits apoptosis in the rat. *Diabetic Res. Clin. Pract.* 40, 1-7.

Dunlap, W. C., Yamamoto, Y., Inoue, M., Kashiba, M., and Tomita, K. (1998). Uric acid photo-oxidation assay: in vitro comparison of sunscreens agents. *International Journal of Cosmetic Science* 20, 1-18.

Minamiyama, Y., Takemura, S., Toyokuni, S., Tanimoto, Y., Sato, E. F., and Inoue, M. (1998). A processed grain food inhibits hepatic injury in endotoxemic rats. *J. Nutr Sci Vitaminol* 44, 547-59.

Minamiyama, Y., Takemura, S., Kawada, N., and Inoue, M. (1998). Role of nitric oxide in extracellular nucleotide-induced contractile status of assorted vessels including parts of the portal vasculature. *J-Hepatol* 28, 314-9.

Yamada, T., Yukioka, H., Hayashi, M., Asada, A., and Inoue, M. (1998). Effects of inhaled nitric oxide on platelet-activating factor-induced pulmonary hypertension in dogs. *Acta-Anaesthesiol-Scand* 42, 358-68.

Kawada, N., Seki, S., Inoue, M., and Kuroki, T. (1998). Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 27, 1265-74.

Takemura, S., Minamiyama, Y., Kawada, N., Inoue, M., Kudo, S., Hirohashi, K., and Kinoshita, H. (1998). Extracellular nucleotides modulate the portal circulation with generation of nitric oxide. *Hepatology Research* 13, 29-36.

Kaneko, H., Koshi, S., Hirota, T., Miyauchi, Y., Kitamura, N., and Inoue, M. (1998). Inhibition of post-ischemic reperfusion injury of the kidney by diamine oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1407, 193-99.

Sasaki, J., Yamamoto, H., Nomura, T., Matsuura, J., Seno, M., Sato, E. F., and Inoue, M. (1998). Multiple-labeling of oligonucleotide probes for in situ hybridization. *Acta Histochem. Cytochem.* 31, 275-79.

Ishisaka, R., Utsumi, T., Yabuki, M., Kanno, T., Furuno, T., Inoue, M., and Utsumi, K. (1998). Activation of caspase-3-like protease by digitonin-treated lysosomes. *FEBS Letters* 435, 233-36.

2. 学会発表

M. Inoue (1998) Role of cross-talk of reactive oxygen species, nitric oxide, antioxidants, and vitamins in health and diseases. Ist Japan-China Conference on Vitamins (Peigin)

M. Inoue (1998) Role of cross-talk of nitric oxide, reactive oxygen species, GSH and related antioxidants in the regulation of energy metabolism. IInd. Int. Conf. Pathophysiology (Finland, Alton Meister Symposium)

M. Inoue (1998) Role of nitric oxide and related oxyradicals in the regulation of energy metabolism and circulatory status. VIIIth Ann. I. M. Arias Symposium "Bridging Basic Science and Liver Disease" American Liver Foundation (Boston)

M. Inoue (1998) Role of nitric oxide and related oxyradicals in the regulation of energy metabolism and enteric bacteria. IInd Japan-UK Conference (Tsukuba)

M. Inoue (1998) Nitric oxide and related oxyradicals, majesties of aerobic life. IInd Cong. SFRR Asia
"Emerging potential of Antioxidant Therapy" (Goa)

井上正康 (1998) 「活性酸素病態」日本呼吸器学会・シンポジウム講演 (熊本)

井上正康 (1998) 活性酸素・NO病態：生体防御機構の源流を探る 日本炎症学会・教育講演 (東京)