

doi: 10.3969/j.issn.1672-5565.2014.03.09

Helicobacter pylori 26695 基因组尺度代谢研究进展

游丽斌¹, 刘冬娟¹, 李娟^{2*}, 方慧生^{1*}

(1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏南京 210009; 2. 南京市鼓楼医院血液科, 江苏南京 210008)

摘要: 代谢网络在代谢功能研究、生物代谢过程控制、疾病诊断分析和药物靶标设计等方面具有重要理论和实践意义。生物信息学研究利用序列同源、结构模拟、对接等手段与生化实验有效结合促进了生物体代谢网络的进一步完善。本文作者在构建幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori* 26695, *H.pylori* 26695)代谢网络的工作基础上综合了近年来研究者对*H.pylori* 26695 代谢通路关键酶的研究成果,并结合基因组信息,综述了*H.pylori* 26695 特异性的重要代谢通路。本文从基因组水平阐明代谢通路与基因的关系,并详细分析了关键酶对*H.pylori* 26695 生理的重要作用,最后探讨了重构一个连续、完整的代谢网络面临的困难及其在药物靶标设计方面的研究前景。

关键词: 幽门螺杆菌 26695; 基因组; 代谢通路; 分子靶标; 抗菌

中图分类号: Q591, Q936 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2014)-03-206-07

Progress in genome-scale metabolism of *Helicobacter pylori* 26695

YOU Libin¹, LIU Dongjuan¹, LI Juan^{2*}, FANG Huisheng^{1*}

(1. School of life science and technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. Hematology Department, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008, China)

Abstract: Metabolic network is widely used in metabolic studies, biological metabolic process control, disease diagnosis and drug target design. Bioinformatics studies are now combined with biochemical experiments effectively by the means of sequence homologous, structure simulation and docking to promote the completion of organism metabolic network. Based on the knowledge of genome-scale metabolic network reconstruction for *H. pylori*, we reviewed several important metabolic pathways by combining the recent achievements on key enzyme researches of *Helicobacter pylori* 26695 (*H.pylori*) as well as genome information. We revealed the relationship between genes and metabolic pathway and analyzed the vital functions of key enzymes in *H. pylori*. Lastly, the challenges in reconstructing a coherent, complete metabolic network are introduced in this paper and the perspectives in drug target designing are also discussed.

Keywords: *H. pylori* 26695; Genome; Metabolic pathway; Molecular target; Anti-microbial

近些年,基因组学的迅速发展为科学家们探究生命规律提供全新的方法。全基因组测序拓宽了我们对细菌基因组的了解,序列信息为研究细菌的遗传学改变和适应性突变体的特征带来新的启发。另一方面,利用序列信息可以识别功能基因、重构功能单位网络甚至整个通路网络。在基因组测序和海量注释的基础上,基因组尺度代谢网络的重构发展成熟起来,它通过结合序列和基因功能注释信息,把基

因编码的蛋白质所催化的生化反应构建成代谢网络,反映出参与代谢过程的基因-蛋白质-反应之间的相互关系,并有效地转化为数学模型在计算机上进行模拟、分析^[1]。基因组尺度代谢网络模型可应用于:与高通量技术结合并有效地分析、处理高通量数据;指导代谢工程;基于假设指导有目的性的发现研究;探究物种间关系;分析网络特性^[2]。

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*),是从

收稿日期:2014-03-10;修回日期:2014-04-22.

作者简介:游丽斌,女,在读硕士研究生,研究方向:系统生物学;E-mail:liya_u@163.com.

* 通信作者:方慧生,男,教授,研究方向:生命科学,虚拟生命科学;E-mail:hsfang889@163.com;

李娟,女,副主任医师,研究方向:虚拟生命科学、信号转导;E-mail:juanli67@hotmail.com.

胃黏膜中分离出来的一种弯曲样杆菌。它是导致慢性胃炎和消化性溃疡的主要原因,1994年世界卫生组织/国际癌症研究机构(WHO/IARC)将幽门螺杆菌定为I类致癌原。1997年,*H.pylori* 26695菌株的全基因组测序完成,2003年,Boneca^[6]进行了第一次*H.pylori* 26695基因组注释工作,该版本注释包含编码序列1590条,其中功能基因1080个。Schilling和Thiele等先后在2002年和2005年重构了*H.pylori* 26695的代谢网络模型,分别是iCS291^[4]和iT341^[5]。iT341模型对目的基因预测的准确率不高,模型的质量仍有待进一步提高。2013年,Resende等^[6]对*H.pylori* 26695基因组进行了重新注释,该版本包含1573个CDS,功能基因1212个,与代谢相关基因712个,并找到191个新功能蛋白,该版本注释可为构建新的高质量代谢网络模型提供基础。一般重构过程分为三个步骤:初步构建、验证完善、数学模拟。第一步一般可编程或用软件自动完成,最重要的验证完善步骤贯穿重构始终,数学模拟的目的也包括评估网络的质量。目前完善一个高质量的代谢网络仍需要大量人工校对工作,如验证基因-蛋白质-反应关系需要查阅大量相关文献。结合更多幽门螺杆菌特异性的研究成果,将基因的预测信息和实验结果结合有助于指导针对*H.pylori*的治疗。

本文以几个重要代谢通路为主线,结合近几年*H.pylori* 26695与代谢有关的酶与基因组关系的研究成果,阐述*H.pylori* 26695的主要代谢通路及其特点。除另有说明外,本文讨论的*H.pylori*即*H.pylori* 26695。以“HP”开头的基因号和以“Hp”开头的蛋白质名称表示*H.pylori*特有的基因编号和蛋白质名称。

1 *H.pylori* 的营养需要

*H.pylori*是一种嗜二氧化碳并且微量需氧的微生物,在大气中需提供5%~10%CO₂,它即可适应微氧条件(<5%O₂),也可适应有氧条件(一般为21%O₂)。*H.pylori*某些特性会随着培养环境中氧含量而变化,包括溶血素的产生、甲硝唑耐药性、铁氧还蛋白氧化还原酶活性、诱导上皮细胞的改变的能力^[7]。目前认为*H.pylori*生长必需氨基酸包括:精氨酸、组氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、丙氨酸、半胱氨酸、脯氨酸。Testerman等^[8]进一步研究发现,在以上氨基酸为基础的化学限定培养基上同时加入非必需的色氨酸和异亮氨酸有助于细菌生长,而单独加入时没有效果,而且在有色氨酸和异亮氨酸的培养基上再加入谷氨酸或谷氨酰胺都能大

大加速细菌生长。离子浓度是影响细菌生长的限制性因素,而氨基酸浓度对细菌生长没有影响。该研究证明*H.pylori*生长还需要钠、氯化钾、硫酸素、铁、锌、镁、次黄嘌呤和丙酮酸,而铜不是其生长所需。

关于*H.pylori*生长必需氨基酸,基因组分析从另一个角度为以上结果做出佐证。比如,重构*H.pylori*甲硫氨酸的从头合成途径时发现,在*H.pylori*基因组中只找到一个编码硫醚 γ -合成酶的基因——HP0106,而缺少编码从头合成过程其他酶的基因。另一方面,虽然甲硫氨酸补充途径普遍存在于所有类型生物体中,但在*H.pylori*基因组中除了HP0089,还未发现其他编码甲硫氨酸补充途径所需酶的基因,故认为*H.pylori*无法合成甲硫氨酸。再如,苏氨酸脱氨和乙酰醇酸合成是亮氨酸合成的前提,但*H.pylori*基因组中缺少编码以上两种酶的基因,所以亮氨酸是维持菌株生长所必需。*H.pylori*无法从分支酸合成苯丙氨酸,也是因为缺少编码磷酸甘油酸脱水酶的基因。*H.pylori*基因组缺少合成硫酸素前体的几个关键酶的基因,但是Barison等^[9]发现HP1287所编码的4-氨基-2-甲基-5-(氨甲基)嘧啶氨基水解酶可能参与了合成硫酸素前体的补充途径,他们克隆纯化了该蛋白,其晶体结构显示酶活性位点改变,而且酶活力实验显示该酶对4-氨基-2-甲基-5-(氨甲基)嘧啶底物的亲和力不强,这些变化所具有的重要意义需要进一步证实。

2 *H.pylori* 重要代谢通路

2.1 中心代谢

2.1.1 糖代谢

*H.pylori*所属的弯曲杆菌属的其他细菌大都无法分解代谢碳水化合物,但*H.pylori*可以通过氧化和发酵方式代谢D-葡萄糖或D-半乳糖。HP1174编码一种钠离子依赖性转运蛋白,*H.pylori*利用该转运蛋白将D-葡萄糖或D-半乳糖主动转运至细胞内进而参与代谢^[10]。基因分析结果也表明*H.pylori*糖代谢途径与大肠杆菌相同,包括糖酵解/糖异生途径、磷酸戊糖途径、杜德洛夫途径(Entner-Doudoroff pathway)。参与上述途径的相应基因在*H.pylori*基因组中几乎都能找到,除了糖酵解途径中编码磷酸果糖激酶的基因(*pfk*)和编码丙酮酸激酶的基因(*pyk*),还有糖异生途径中编码葡萄糖-6-磷酸酶的基因(*g6p*)和磷酸戊糖途径中编码6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的基因(*gnd*)^[11]。丙酮酸是糖酵解和杜德洛夫途径的共同产物,它可能代谢为乳酸、乙酸进而与三羧酸循环、呼吸链联系起来。

2.1.2 三羧酸循环

三羧酸循环在细胞代谢过程中主要有两种作用:为其他合成代谢提供小分子前体,如 α -酮戊二酸、乙酰乙酰辅酶A、草酰乙酸;氧化乙酰单位产生 CO_2 ,通过生成还原型核苷酸,将能量存于ATP中。因为*H. pylori*缺少编码 α -酮戊二酸脱氢酶复合物的基因,但存在编码铁氧还蛋白氧化还原酶的相似基因HP0588-HP0591,所以*H. pylori*三羧酸循环与标准型的三羧酸循环有所不同,*H. pylori*三羧酸循环如图1所示。*H. pylori*三羧酸循环中富马酸酶将富马酸转为苹果酸,实验表明,富马酸酶可与铋离子结合,而铋治疗是现今治疗胃炎的一种方法,该结果提示三羧酸循环通路可成为*H. pylori*铋治疗的靶标^[12]。Kather等提出,苹果酸生成草酰乙酸的反应由HP0086编码的醌氧化还原酶介导,该酶不同于苹果酸脱氢酶以 NAD^+ 为电子受体而以醌为电子受体^[13]。由于幽门螺杆菌临床分离株具有多样性和变异性,临床上还没有诊断和疫苗的“金标准”抗原,以 NAD(P) 为辅因子的异柠檬酸脱氢酶被认为是潜在的血清学诊断监测的分子靶标。Huang等利用克隆、表达、重组等技术研究*H. pylori* SS1菌株异柠檬酸脱氢酶的生化特性,为临床上诊断、监测*H. pylori*感染情况提供了有用信息^[14]。

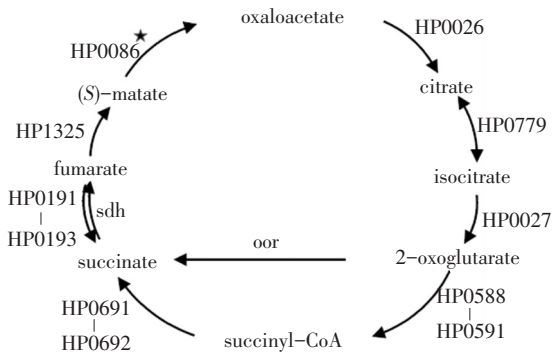


图1 *H. pylori* 三羧酸循环概略图

Fig.1 Krebs cycle of *H. pylori*

注:oor, α -酮戊二酸氧化酶;HP0588-HP0591:铁氧还蛋白氧化还原酶;HP0691-HP0692:乙酰乙酰辅酶A转移酶;sdh:琥珀酸脱氢酶;HP0191-HP0193:富马酸还原酶;HP1325:富马酸酶;HP0086:醌氧化还原酶;HP0026:柠檬酸合成酶;HP0779:顺乌头酸酶;HP0027:异柠檬酸脱氢酶。oor与sdh在*H. pylori*基因组中找不到相似基因,但oor对应的酶活力实验呈阳性。带星号的HP编号代表确证的酶—基因关系,不带星号的HP编号是相似基因。

Notes:oor, α -ketoglutarate:acceptor oxidoreductase;HP0588-HP0591,ferredoxin oxidoreductase;HP0691-HP0692,3-oxoacid CoA-transferase;sdh,succinate dehydrogenase;HP0191-HP0193,fumarate reductase;HP1325,fumarase;HP0086,malate dehydrogenase;HP0026,citrate synthase;HP0779,aconitase;HP0027,isocitrate dehydrogenase.The genes of oor and sdh were not identified in genome, but enzymatic activities of oor was observed. Asterisks denote confirmed enzymes and genes while others are similar genes.

2.2 氨基酸代谢

氨基酸代谢是*H. pylori*代谢的重要环节,因为它是碳、氮、能量的主要来源。*H. pylori*的大部分氨基酸代谢过程遵循与大肠杆菌一样的过程,体现一定的物种间保守性,但更重要的是有一部分基因体现出*H. pylori*的物种特异性,利用物种特异性可以发现分子靶标,开发抗菌药物。比如,HP0290编码合成赖氨酸所需的二氨基庚酸脱羧酶,它被认为是抗菌药物的靶点,分析晶体结构发现酶的诱导契合机理——下游活性位点loop区环住催化中间体进而释放产物,该结构分析有助于找到酶的特异性抑制剂^[15]。

Shibayama等发现,*H. pylori*无法吸收胞外的天冬酰胺,而是通过HP0723编码的天冬酰胺酶把胞外的天冬酰胺水解为天冬氨酸而运至细胞内^[16]。与天冬酰胺的情况类似,*H. pylori*也无法吸收谷氨酰胺和谷胱甘肽,而是将其在胞外水解为谷氨酸,水解谷氨酰胺的酶是 γ -谷氨酰转移酶,它由两个亚基组成,源于一个HP1118编码的前体蛋白^[17]。胞外水解产物谷氨酸由HP1506编码的钠离子依赖性谷氨酸转运蛋白转运至细胞内^[18]。以上两种水解酶与幽门螺杆菌感染的致病机制密切相关,天冬酰胺酶抑制T细胞增殖^[16], γ -谷氨酰转移酶诱发细胞凋亡、抑制胃细胞和T细胞的增殖^[19]。Rimbara等研究临床上幽门螺杆菌感染引起的胃癌、胃溃疡病人的分离株,并分析天冬酰胺酶与 γ -谷氨酰转移酶活性^[20]。他们提出, γ -谷氨酰转移酶的高活性而引起谷氨酰胺的消耗是导致强烈炎症反应的原因,并非谷胱甘肽和天冬酰胺的消耗。并且,在动物模型中添加额外的谷氨酰胺显示出积极效果^[21],但额外的谷氨酰胺是否能降低幽门螺杆菌感染后胃癌发生风险有待进一步分析。

HP0549编码谷氨酰盐消旋酶,该酶介导D-型和L-型谷氨酰盐的可逆转换,它是细胞壁合成的必需酶。Mixcoha等用分子动力学模拟揭示谷氨酰盐消旋酶的催化机理,催化反应用三至四步完成四次连续的质子转移^[22]。吡唑并嘧啶二酮类化合物是谷氨酰盐消旋酶的选择性抑制剂^[23],在化合物中心支架加上咪唑环能够增加药物口服生物利用度^[24]。

分支酸是合成芳香族氨基酸的前体,分支酸合成途径又叫做“莽草酸途径”——以磷酸烯醇丙酮酸和磷酸赤藓糖为起点,经过7种酶的介导合成分支酸(见图2)。莽草酸途径是所有微生物和植物的基本代谢功能,而动物体内不存在,所以该通路的所有酶成为抗菌药物设计的靶标。例如,第二步与第四步酶分别对 NAD^+ 和 NADP^+ 具有依赖性,可通过

找到抑制物阻碍酶与 NAD⁺、NADP⁺结合从而阻断莽草酸途径。Liu 等^[25]测定 *H. pylori* 脱氢奎尼酸合成酶-NAD⁺复合物晶体结构,找到了抑制物结合口袋,最后利用 GOLD 对接软件筛选出可能的抑制物。Han 等^[26]则是通过表达、分离纯化莽草酸脱氢酶,高通量筛选出五个可能是酶抑制剂的化合物。通过研究酶结构与活性的关系有助于抑制剂的开发,如 Cheng 等^[27]找到 *H. pylori* 莽草酸激酶结构与莽草酸直接作用的重要保守残基(D33、F48、R57、R116、R132),并详细分析酶催化活性位点的配体结合与构象柔性变化。

其他必需、非必需氨基酸的生物合成与代谢通路虽然通过基因组分析可以找到编码大部分酶的相似基因,但还需通过进一步实验证明。

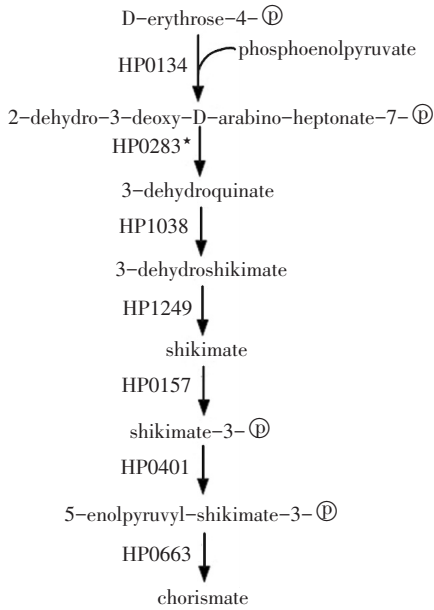


图2 *H. pylori* 分支酸合成概略图

Fig.2 Chorismate synthesis pathway of *H. pylori*

注:*H. pylori* 完整的分支酸合成过程需要7种酶,依次是:①醛缩酶;②脱氢奎尼酸合成酶;③脱氢奎尼酸脱水酶;④莽草酸脱氢酶;⑤莽草酸激酶;⑥3-磷酸莽草酸-1-羧基乙烯基转移酶⑦分支酸合成酶。带星号的HP编号代表确证的酶-基因关系,不带星号的HP编号是相似基因。

Notes: Complete chorismate synthesis consists of seven enzymes. They are 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase, 3-dehydroquinate synthase, 3-dehydroquinate dehydratase, shikimate dehydrogenase, shikimate kinase, 3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase, chorismate synthase. Asterisks denote confirmed enzymes and genes while others are similar genes.

2.3 维生素与辅因子的生物合成

甲基萘醌,即维生素 K₂,是作为病原菌呼吸链中电子转运链的电子载体。大部分细菌都采用以大肠杆菌为模板的甲基萘醌生物合成通路,而 Hiratsuka 等^[28]在链霉菌属发现了一种新的甲基萘醌生物合成通路——Futalosine Pathway。Dairi^[29]进一步证

明了 *H. pylori* 采用 Futalosine 通路的变型通路,首先由 mqnA 编码的酶介导生成 AFL(6-amino-6-deoxyfutalosine),继而在甲基硫代腺苷核苷酶(Methylthioadenosine Nucleosidase, MTAN)作用下直接形成 DHFL(dehydropoxanthine futalosine)。基因组中找不到 mqnA 的相似基因,而 HP0089 编码 MTAN。MTAN 是一种多功能酶,它位于7个基本细胞代谢通路的节点,包括甲基萘醌合成、甲硫氨酸补充途径、S-腺苷甲硫氨酸利用、聚胺合成、嘌呤补充合成、S-腺苷甲硫氨酸自由基通路、II类自诱导分子合成,特异性的抑制 MTAN 活性可能抑制 *H. pylori* 生长^[30]。HpMTAN 晶体结构中5'-巯基硫醇结合位点与底物(S-腺苷同型半胱氨酸)的相互作用特点可为发现 MTAN 抑制剂提供思路^[30]。DHFL 先后转为 cyclic DHFL、1,4-Dihydroxy-2-naphthoate,最后生成甲基萘醌^[30]。*H. pylori* 变型的 Futalosine 通路的具体过程有待进一步研究。

生物素,也叫做维生素 H,是所有生物体生长必不可少的辅因子。Lin 等^[31]提出大肠杆菌的生物素合成途径如图3所示,他们认为生物素合成途径的开端模仿脂肪酸合成途径。最后四步生成生物素的过程在所有生物体中保守,依次经过 BioF、BioA、BioD、BioB 的作用合成生物素^[32]。在 *H. pylori* 基因组中几乎都找到了上述酶的相似基因(见图3的括号内),但针对 *H. pylori* 生物素合成通路的研究还很少。Przemyslaw 等^[33]纯化了 HpBioD 的结构,并与其他物种的 BioD 比较分析,总结出 BioD 的家族特点,提出该酶是抗菌药物设计的新靶点。

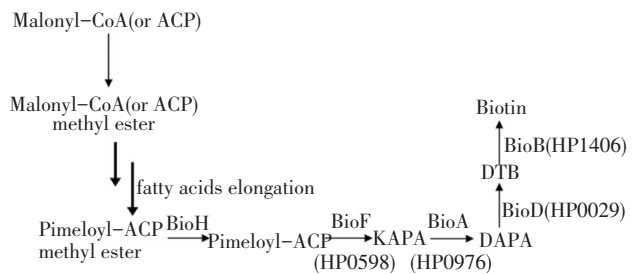


图3 大肠杆菌生物素合成通路

Fig.3 Biotin synthesis of *E. coli*

注:BioC:甲基转移酶;BioH:庚二酰-ACP 甲酯酯酶;BioF:8-氨基-7-氧代壬酸化合物酶;BioA:7,8-二氨基壬酸合酶;BioD:生物素合酶;BioB:生物素合酶。第二步以丙二酰基硫代酸酯甲酯为引物进入两次迭代的脂肪酸延长途径。括号里为 *H. pylori* 基因组中编码相应酶的相似基因。

Notes: BioC, malonyl-CoA methyltransferase; BioH, pimeloyl-ACP methyl ester esterase; BioF, 8-amino-7-oxononanoate synthase; BioA, adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate transaminase; BioD, dethiobiotin synthase; BioB, biotin synthase. The malonyl thioester ester is used as primer in the next two iterative fatty acids elongation. Those in brackets are genes identified in *H. pylori* correspond to enzymes.

维生素 B6 被公认为许多细胞代谢反应的辅因子, Grubman 等^[34]首次提出维生素 B6 与细菌致病机制密切相关。他们证明维生素 B6 对人类病原体的鞭毛结构、糖基化、运动能力具有重要作用, 并找到 *H. pylori* 的两个致病因子——HpPdxA 和 HpPdxJ, 分别由 HP1583 和 HP1582 编码。

2.4 核苷酸代谢

嘌呤和嘧啶是合成核苷三磷酸(NTPs)的基础, 是核酸的前体。*H. pylori* 无法从头合成嘌呤, 而是通过补充途径合成嘌呤。一方面,*H. pylori* 的生长需要嘌呤(Abstract no. 2273, Miller EF. & Maier RJ, Annual Meeting of the American Society for Microbiology, May 2011), 而生物信息学分析表明, 嘌呤从头合成

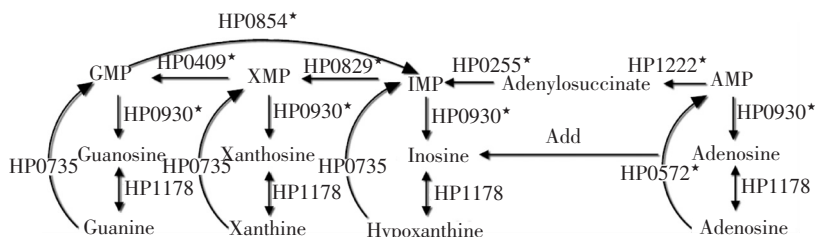


图4 *H. pylori* 嘌呤补充合成途径概略图

Fig.4 Purine salvage pathway of *H. pylori*

注:*H. pylori* 不能通过从头合成途径合成嘌呤, 但能利用环境中的肌苷(inosine)、腺苷(adenosine)、鸟嘌呤(guanine)、鸟苷(guanosine)、黄嘌呤(xanthine)、黄苷(xanthosine)为原料, 经过补充途径合成 IMP, IMP 继而分别生成 ATP、GTP。除了 Add 基因在 *H. pylori* 找不到相似基因, 其他基因都能找到并实验验证其功能。带星号的 HP 编号代表验证的酶—基因关系, 不带星号的 HP 编号是相似基因。

Notes:*H. pylori* cannot obtain purine in De novo synthesis pathway, but it utilizes inosine, adenosine, guanine, guanosine, xanthine and xanthosine to synthesize IMP in salvage pathway. The IMP then generates ATP, GTP respectively. All genes of salvage pathway can be found in *H. pylori* and protein functions are confirmed except for Add. Asterisks denote confirmed enzymes and genes while others are similar genes.

UTP、CTP 是 RNA 合成的前体, 经 9 种酶从头合成。暂时认为 *H. pylori* 嘧啶的从头合成通路以大肠杆菌为模板, 编码这 9 种酶的相似基因依次是: HP0919/HP1237、HP1084、HP0581/HP0266、HP1011、HP1257、HP0005、HP0777、HP0198、HP0349。HP0777 编码 UMP 激酶(UMPCK), 而且与其他物种以 Mg^{2+} 作为辅因子不同, 它更倾向于把 Mn^{2+} 作为辅因子^[37]。Chu 等^[38]进一步揭示 GTP 对 HpUMPCK 的别构调节机制, GTP 与 HpUMPCK 结合成一个稳定的六聚体, 该齐聚反应状态不易释放产物 UDP, 但 GTP 结合的同时引发 UDP 结合区域($\alpha 2$)变构而使紧密状态松散, 从而帮助释放 UDP。除了 HP0777, 其他酶—基因关系和脱氧核苷酸的生物合成途径还没有新的研究进展, 故不赘述。

3 *H. pylori* 其他特征

幽门螺旋杆菌的质子门控尿素通道即 HpUREI 是其能够生存在胃酸性环境中的重要原因。Strugatsky 等^[39]揭示了幽门螺旋杆菌 J99 尿素的质子门

第一步需要的 IMP 无法获得, 因为合成 IMP 需要 10 种酶, 但基因组中只能找到两种酶的相似基因(HP1218、HP1112)。另一方面, Liechti 等^[35]证实, *H. pylori* 从环境中吸收原料, 如: 肌苷、腺苷、鸟嘌呤、鸟苷、黄嘌呤、黄苷, 然后通过补充途径合成 IMP, IMP 继而分别生成 ATP、GTP(见图 4)。补充途径所需原料由 HP1180 编码的转运蛋白配合质子泵转运至胞内^[36]。HP0930 编码固定相生存蛋白, 它将 GMP、XMP、IMP、AMP 分别水解为相应的核苷^[35]。之前的研究认为 *H. pylori* 存在腺嘌呤脱氨酶活性, 但最新研究反驳了这一观点, 该酶的脱氨作用针对的是腺苷而不是腺嘌呤^[36], 但基因组中没找到对应的基因。

控通道, 这种六聚体结构是尿素及其他小酰胺溶质的新渗透模式的基础。通道在中性 pH 条件下关闭, 在酸性 pH 条件下打开, 并允许尿素迅速进入细胞质与脲酶接触。脲酶产生的 NH_3 和 CO_2 能够中和进入胞内的质子, 所以即使胃液 pH 低于 2.0, 细胞周质 pH 仍维持在 6.1 左右。HP0071 是编码该通道蛋白的相似基因。Cornally 等^[40]提出 HP1193 编码的醛酮还原酶可能也与细菌适应酸环境生长有关。

H. pylori 表达一种致病因子——CagA (cytotoxin-associated gene A), CagA 上调胃粘膜上皮细胞的精胺氧化酶水平^[41]。精胺氧化酶分解精胺产生 H_2O_2 , 从而导致细胞凋亡和 DNA 损伤。Lee 等在 *H. pylori* 没有检测到精胺, 而有亚精胺^[42]。亚精胺由 HP0832 编码的亚精胺合酶(spermidine synthase, SPMS)催化腐胺和脱羧的 S-腺苷甲硫氨酸而生成, 亚精胺合成通路是 *H. pylori* 聚胺的主要来源。HpSPMS 与其他物种的 SPMS 序列相似性低于 20%, 而且缺少一段信号序列。晶体结构显示 HpSPMS 有一个 N 端- β 折叠区和一个 C 端-罗斯曼样结构域^[43], 两个结构域间有一个与众不同的结合口袋,

且酸性静电表面电位较少,还有一个大的包藏空间,这些特点可能使 HpSPMS 成为潜在的抗菌药物靶标,因为 SPMS 是菌体细胞保持活力必不可少的。虽然亚精胺合成通路的前几个酶(speB、speC、speD)在基因组中没找到,但是不能排除也像 HpSPMS 一样序列相似性太低的情况。

4 总结与展望

全基因组尺度代谢网络的构建,从系统的角度,由生物体内各种分子的相互作用的研究到代谢通路、网络、模块,最终对整个生命活动的路线图有了完整的理解,进而对生物代谢功能进行重新设计和合理的工程改造。代谢网络模型重构过程非常复杂,尤其是基因-蛋白质-反应关系的鉴别、网络模型的评估验证等步骤工作量大,耗费时间长。利用代谢网络重构工具^[44]可以缩短一定时间,提高工作效率,但构建高精度代谢网络仍离不开大量人工验证工作。一般先利用生物数据库或软件对代谢网络进行初步重构,再根据生物文献和生物实验数据对初步重构的生物代谢网络模型进行验证和修正。目前 *H. pylori* 代谢网络模型对必需基因的预测准确性不高,重构更加连续、完整的高精度模型是最终目标。

本文对 *H. pylori* 特异性的重要代谢通路进行了较为全面的综述,一方面,从基因水平阐述代谢通路与基因的关系,为重构更高质量代谢网络提供参考;另一方面,本文详细分析了关键酶对 *H. pylori* 生理的重要作用,为开发抗幽门螺杆菌药物、诊断幽门螺杆菌感染情况带来启示。*H. pylori* 代谢网络大部分是保守的,多采用与大肠杆菌或其他近缘物种非常相似的代谢形式,然而,在进化过程中一部分 *H. pylori* 特异性的代谢过程对实际应用具有更大价值。生物体的代谢过程与转录调控、信号转导机制密切相关,为了更加精确地做出预测,更加真实地模拟生物体生命活动的路线图,需要在代谢网络基础上,整合转录调控网络和信号转导网络。整合的 *H. pylori* 调控网络、信号网络和代谢网络模型将是未来的一个研究方向。

参考文献(References)

- [1] THIELE I, PALSSON B Ø. A protocol for generating a high-quality genome-scale metabolic reconstruction [J]. Nat Protoc, 2010, 5(1): 93-121.
- [2] OBERHARDT M A, PALSSON B Ø, PAPIN J A. Applications of genome-scale metabolic reconstructions [J]. Mol Syst Biol, 2009, 5: 320.
- [3] BONECA I G, DE R H, EPINAT J C, et al. A revised annotation and comparative analysis of *Helicobacter pylori* genomes [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(6): 1704-1714.
- [4] SCHILLING C H, COVERT M W, FAMILI I, et al. Genome-scale metabolic model of *Helicobacter pylori* 26695 [J]. J Bacteriol, 2002, 184(16): 4582-4593.
- [5] THIELE I, VO T D, PRICE N D, et al. Expanded metabolic reconstruction of *Helicobacter pylori* (iT341 GSM/GPR): an in silico genome-scale characterization of single- and double-deletion mutants [J]. J Bacteriol, 2005, 187(16): 5818-5830.
- [6] RESENDE T, CORREIA D M, ROCHA M, et al. Re-annotation of the genome sequence of *Helicobacter pylori* 26695 [J]. J Integr Bioinform, 2013, 10(3): 233.
- [7] COVERT L. Perspectives on methodology for in vitro culture of *Helicobacter pylori* [J]. Methods Mol Biol, 2012, 921: 11-15.
- [8] TESTERMANT L, CONN P B, MOBLEY H L, et al. Nutritional requirements and antibiotic resistance patterns of *Helicobacter* species in chemically defined media [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(5): 1650-1658.
- [9] BARISON N, CENDRON L, TRENTO A, et al. Structural and mutational analysis of TenA protein (HP1287) from the *Helicobacter pylori* thiamin salvage pathway-evidence of a different substrate specificity [J]. FEBS J, 2009, 276(21): 6227-6235.
- [10] PSAKIS G, SAIDIJAM M, SHIBAYAMA K, et al. The sodium-dependent D-glucose transport protein of *Helicobacter pylori* [J]. Mol Microbiol, 2009, 71(2): 391-403.
- [11] MARAIS A, MENDZ G L, HAZELL S L, et al. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1999, 63(3): 642-674.
- [12] ZHUO C, QING L Z, RUI G G. Inhibition of fumarase by bismuth (III): Implications for the tricarboxylic acid cycle as a potential target of bismuth drugs in *Helicobacter pylori* [J]. Biometals, 2012, 25(1): 95-102.
- [13] KATHER B, STINGL K, VANDER R M, et al. Another unusual type of citric acid cycle enzyme in *Helicobacter pylori*: the malate: quinone oxidoreductase [J]. J Bacteriol, 2000, 182(11): 3204-3209.
- [14] HUANG D, LIU J, SHEN G. Cloning, expression, and enzymatic characterization of isocitrate dehydrogenase from *Helicobacter pylori* [J]. Protein J, 2009, 28(9-10): 443-447.
- [15] HU T, WU D, CHEN J, et al. The catalytic intermediate stabilized by a "down" active site loop for diaminopimelate decarboxylase from *Helicobacter pylori*. Enzymatic characterization with crystal structure analysis [J]. J Biol Chem, 2008, 283(30): 21284-21293.
- [16] SHIBAYAMA K, TAKEUCHI H, WACHINO J, et al. Biochemical and pathophysiological characterization of *Helicobacter pylori* asparaginase [J]. Microbiol Immunol,

- 2011,55(6):408-417.
- [17] SHIBAYAMA K, WACHINO J, ARAKAWA Y, et al. Metabolism of glutamine and glutathione via γ -glutamyl-transpeptidase and glutamate transport in *Helicobacter pylori*: possible significance in the pathophysiology of the organism [J]. *Mol Microbiol*, 2007, 64(2):369-406.
- [18] LEDUC D, GALLAUD J, STINGL K, et al. Coupled amino acid deamidase-transport systems essential for *Helicobacter pylori* colonization [J]. *Infect Immun*, 2010, 78(6):2782-2792.
- [19] SCHMEES C, PRINZ C, TREPTAU T, et al. Inhibition of T-cell proliferation by *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase [J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(5):1820-1833.
- [20] RIMBARA E, MORI S, KIM H, et al. Role of γ -glutamyltranspeptidase in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection [J]. *Microbiol Immunol*, 2013, 57(10):665-673.
- [21] HAGEN S J, OHTANI M, ZHOU J R, et al. Inflammation and foveolar hyperplasia are reduced by supplemental dietary glutamine during *Helicobacter pylori* infection in mice [J]. *J Nutr*, 2009, 139(5):912-918.
- [22] MIXCOHA E, GARCIA-VILOCA M, LLUCH J M, et al. Theoretical analysis of the catalytic mechanism of *Helicobacter pylori* glutamate racemase [J]. *J Phys Chem B*, 2012, 116(41):12406-12414.
- [23] DE JONGE B L, KUTSCHKE A, URIA-NICKELSEN M, et al. Pyrazolopyrimidinediones are selective agents for *Helicobacter pylori* that suppress growth through inhibition of glutamate racemase (MurI) [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(8):3331-3336.
- [24] BASARAB G S, HILL P, EYERMANN C J, et al. Design of inhibitors of *Helicobacter pylori* glutamate racemase as selective antibacterial agents: incorporation of imidazoles onto a core pyrazolopyrimidinedione scaffold to improve bioavailability [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(17):5600-5607.
- [25] LIU J S, CHENG W C, WANG H J, et al. Structure-based inhibitor discovery of *Helicobacter pylori* dehydroquinase synthase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(1):1-7.
- [26] HAN C, WANG L, YU K, et al. Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from *Helicobacter pylori* [J]. *FEBS J*, 2006, 273(20):4682-4692.
- [27] CHENG W C, CHEN Y F, WANG H J, et al. Structures of *Helicobacter pylori* shikimate kinase reveal a selective inhibitor-induced-fit mechanism [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e33481.
- [28] HIRATSUKA T, FURIHATA K, ISHIKAWA J, et al. An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms [J]. *Science*, 2008, 321:1670-1673.
- [29] DAIRI T. Menaquinone biosyntheses in microorganisms [J]. *Methods Enzymol*, 2012, 515:107-22.
- [30] MISHRA V, RONNING D R. Crystal structures of the *Helicobacter pylori* MTAN enzyme reveal specific interactions between S-Adenosylhomocysteine and the 5'-Alkylthio binding subsite [J]. *Biochemistry*, 2012, 51(48):9763-9772.
- [31] LIN S, HANSON R E, CRONAN J E. Biotin synthesis begins by hijacking the fatty acid synthetic pathway [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6:682-688.
- [32] COREY J F, JOSEPH T J. Biotin synthase: Insights into radical-mediated carbon-sulfur bond formation [J]. *Biochemistry*, 2012, 49(31):6746-6760.
- [33] POREBSKI P J, KLIMECKA M, CHRUSZCZ M, et al. Structural characterization of *Helicobacter pylori* dethiobiotin synthetase reveals differences between family members [J]. *FEBS J*, 2012, 279(6):1093-1105.
- [34] GRUBMAN A, PHILLIPS A, THIBONNIER M, et al. Vitamin B6 is required for full motility and virulence in *Helicobacter pylori* [J]. *Mbio*, 2010, 1(3):e00112-10.
- [35] LIECHTI G, GOLDBERG J B. *Helicobacter pylori* relies primarily on the purine salvage pathway for purine nucleotide biosynthesis [J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(4):839-854.
- [36] MILLER E F, VAISH S, MAIER R J. Efficiency of purine utilization by *Helicobacter pylori*: Roles for adenosine deaminase and a NupC homolog [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(6):e38727.
- [37] LEE M J, CHIEN-LIANG L, TSAI J Y, et al. Identification and biochemical characterization of a unique Mn^{2+} -dependent UMP kinase from *Helicobacter pylori* [J]. *Arch Microbiol*, 2010, 92(9):739-746.
- [38] CHU C H, LIU M H, CHEN P C, et al. Structures of *Helicobacter pylori* uridylyate kinase: insight into release of the product UDP [J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2012, 68(7):773-783.
- [39] STRUGATSKY D, MCNULTY R, MUNSON K, et al. Structure of the proton-gated urea channel from the gastric pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nature*, 2013, 493:255-258.
- [40] CORNALLY D, MEEB, MACDONAILL C, et al. Aldo-keto reductase from *Helicobacter pylori*-role in adaptation to growth at acid pH [J]. *FEBS J*, 2008, 275:3041-3050.
- [41] CHATURVEDI R, DE SABLET T, PEEK R M, et al. Spermine oxidase, a polyamine catabolic enzyme that links *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer risk [J]. *Gut Microbes*, 2012, 3(1):48-56.
- [42] LEE M J, HUANG C Y, SUN Y J, et al. Cloning and characterization of spermidine synthase and its implication in polyamine biosynthesis in *Helicobacter pylori* strain 26695 [J]. *Protein Expr Purif*, 2005, 43:140-148.
- [43] LU P K, TSAI J Y, CHIEN H Y, et al. Crystal structure of *Helicobacter pylori* spermidine synthase: a Rossmann-like fold with a distinct active site [J]. *Proteins*, 2007, 67(3):743-54.
- [44] PITKNEN E, ROUSU J, UKKONEN E. Computational methods for metabolic reconstruction [J]. *Current Opinion in Biotechnol*, 2010, 21(1):70.