様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３年　５月３１日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2018～2020
課題番号：１８K０７１０５
研究課題名（和文）ピロリ菌CagAタンパク質による病原シグナル生成の構造-機能連関解析

研究課題名（英文）Structure-function analysis for the induction of pathogenic signaling by H. pylori CagA oncoprotein

研究代表者
林　剛瑠（Hayashi, Takeru）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・助教

研究者番号：１０７２２２０９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,400,000円

研究成果の概要（和文）：胃がんに関わるピロリ菌病原タンパク質CagA が細胞内で形成する複数のヒトタンパク質との複合体を再構成することに成功した。CagA-SHP2相互作用はCagA-PAR1b相互作用によって増強される一方、CagA-Csk相互作用によって抑制された。また、CagA-Csk相互作用にはCskの二量体化が必要であり、予想モデル以上に複雑な複合体形成様式であることが判明した。また、特に重要なCagA標的分子としてがんタンパク質SHP2に作用する低分子阻害剤を探索し、新規の分子骨格を有する阻害剤候補分子を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ピロリ菌CagAは胃がんに深く関わり、CagAによるヒトタンパク質の脱制御がその病原活性の本態と考えられる。本研究の解析により、CagAが細胞内のPAR1b、SHP2ならびにCskと形成するシグナル撹乱複合体の生化学的性質が新たに明らかになった。また、がんタンパク質として明確な位置づけにあるSHP2は、依然としてその機能に不明な点が多いものの近年創薬の標的としても大きな注目を浴びている。本研究ではSHP2の新たな機能を明らかにするとともに、新規創薬への展開が期待できる結果を得た。

研究成果の概要（英文）：Helicobacter pylori CagA oncoprotein is closely associated with gastric carcinogenesis. In this study, I succeeded in reconstitution of the complex formation of CagA with multiple human proteins. CagA-SHP2 complex formation was promoted by CagA-PAR1b interaction and, in contrast, suppressed by CagA-Csk interaction, which required homo-dimerization of Csk. Thus, a series of analyses revealed that the CagA interacts with multiple proteins in a more complicated manner than expected. Furthermore, I found small compounds with novel chemical structures that selectively inhibit SHP2 oncoprotein, which is aberrantly activated by CagA.

研究分野：胃がん発症の分子機構

キーワード：胃がん　ピロリ菌　CagA　新規創薬

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

胃がん発症には、ピロリ菌の産生する CagA タンパク質が決定的な役割を果たすと考えられている。CagA はピロリ菌の保有する IV 型分泌機構により菌体から直接宿主細胞内に注入される。細胞内に移行した CagA は上皮細胞極性の形成・維持に必須な制御分子である Ser／Thr キナーゼ PAR1b と相互作用することにより上皮細胞極性を破壊する（Saadat et al., Nature, 2007; Nishikawa, **Hayashi** et al., Scientific Reports, 2016）。また、CagA は C 末端領域に存在する Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) モチーフおいて Src ファミリーキナーゼ（SFKs）および Abl キナーゼによるチロシンリン酸化修飾を受ける。リン酸化された CagA は、Ras-MAP キナーゼ経路を促進するがんタンパク質として知られる SHP2 と結合し、細胞増殖・運動シグナル経路を脱制御する（Higashi et al., Science, 2002; Nagase, **Hayashi** et al., Scientific Reports, 2015; **Hayashi** et al., Cell Reports, 2017）。これらの知見に加え、CagA を全身性に発現する *cagA* トランスジェニックマウスが胃がんを発症することが報告されており（Ohnishi et al., PNAS, 2008）、胃発がん過程において CagA が極めて重要な役割を果たすことは明白である。その分子背景には CagA による PAR1b と SHP2 の脱制御が潜んでいると考えられるが、この CagA と PAR1b、SHP2 との相互作用形成ならびにその機能には未だ不明な点が多い。CagA は PAR1b および SHP2 と同時に結合することで三者複合体を形成し、CagA-PAR1b 相互作用は CagA-SHP2 相互作用を増強することが示されている（Saadat et al., Nature, 2007）。さらに、CagA は N 末端側の構造ドメインと C 末端側の EPIYA モチーフを含む立体構造的にフレキシブルな領域から構成され、その N 末端／C 末端間に分子内相互作用が存在する（**Hayashi** et al., Cell Host Microbe, 2012）。この分子内相互作用がスイッチ機構となって CagA と PAR1b ならびに SHP2 との相互作用に影響を与えることから、三者複合体形成メカニズムは極めて複雑である。こうした背景から、これまでの解析では、どのように CagA との複合体が形成され、どのような機構で PAR1b ならびに SHP2 を脱制御するかといった詳細な分子制御の理解には至っていない。

２．研究の目的

本研究は PAR1b、SHP2 を含む CagA 関連複合体（シグナル撹乱複合体）を構造生物学知見に基づいて解析することにより、CagA による胃発がんプロセスの基本原理を解明することを目的とする。また、CagA によって異常活性化される SHP2 を特異的に阻害する低分子化合物を探索し、胃がんの予防および早期胃がんの治療、あるいは SHP2 変異によって発症するその他の悪性腫瘍に対する新規創薬のためのシード化合物の取得を目指す。

３．研究の方法

CagA を含むシグナル撹乱複合体を生化学的に解析するため、複数ある EPIYA サイト中のチロシン残基がリン酸化された組換え CagA タンパク質を調製した。GST-融合型 CagA と c-Src を大腸菌菌体内で共発現させ、GST 融合型のチロシンリン酸化全長 CagA の調製を試みた。野生型 CagA に加え、CagA が有する 3 つの異なる EPIYA サイト（EPIYA-A、EPIYA-B、EPIYA-C）について全通りの組み合わせで個別のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体を作成し、計 8 種のチロシンリン酸化 CagA を発現・精製した。また、SHP2、SHP1、PAR1b、Csk の全長組換えタンパク質ならびに各種点変異体、truncation 変異体をそれぞれ精製した。組換えタンパク質間

の相互作用を生化学的に解析した。また、既知の結晶構造を利用したモデリングにより CagA-PAR1 相互作用を検討した。一方、異常に亢進した SHP2 の酵素活性を阻害する化合物探索のため、p-nitrophenylphosphate (pNPP)を人工基質としたホスファターゼ比色定量をベースとしたハイスループットスクリーニング実験系を構築した。化合物ライブラリーを用いて SHP2 を阻害する候補化合物の探索を実施した。

４．研究成果

チロシンリン酸化型および非リン酸化型の欧米型全長 CagA を大腸菌体内で発現させ大量に調製する方法を樹立した。また、CagA が標的とする宿主 PAR1b、SHP2 および Csk の組み換えタンパク質をそれぞれ大量に調製した。欧米型 CagA 結合における各因子間の影響を検討した結果、CagA-PAR1b 相互作用は CagA-SHP2 相互作用を促進する一方、CagA-Csk 相互作用は顕著に CagA-SHP2 相互作用を低下させることを見出した。過去の報告から、Csk は SH3 ドメインを介してホモダイマーを形成しうることが示されており、この Csk の二量体化が CagA-Csk 相互作用に及ぼす影響を検討した。SH3 ドメインに点変異を導入した 3 つの組換え Csk 変異体を精製した。精製した Csk 変異体は野生型 Csk に比較し、ゲルろ過クロマトグラフィー解析において顕著に溶出ピークが後方へシフトした。また野生型 Csk と Csk 変異体はそれぞれ単一の溶出ピークを示した。この結果は、本実験条件下において SH3 ドメイン間の相互作用が極めて強固であり野生型 Csk 分子のほとんどは二量体として存在し、その二量体化には SH3 ドメインが責任的に働くことを強く示唆した。GST プルダウン実験により CagA と Csk の相互作用を解析したところ、野生型 Csk に比較し SH3 ドメインに変異を導入した Csk 変異体では CagA との相互作用能が著しく低下した。したがって、CagA-Csk 相互作用は Csk の二量体化により促進されることが示唆された。

CagA は細胞内において PAR1b 二量体（多量体）との相互作用により間接的に二量体化する結果、SH2 ドメインを 2 つ有する SHP2 との相互作用が増強するモデルが提唱されているが、本研究の遂行過程で組換え PAR1b は単独では二量体化せず、因子 X が二量体化に必要であることがわかった。しかしながら、上述の結果から因子 X 非存在下においても PAR1b は CagA-SHP2 相互作用を促進したことから、従来の CagA-PAR1b-SHP2 複合体形成モデルとは異なる相互作用機序が存在していることが示唆された。複雑な相互作用様式から、本研究ではシグナル撹乱複合体の構造決定には至らなかった。一方、CagA-PAR1b 相互作用ならびに CagA-SHP2 相互作用に関して既知の単体の X 線結晶構造より、CagA サブタイプ間における PAR1b および SHP2 結合能の違いを検討し、その構造-機能連関を Scientific Reports 誌に報告した。また、SHP2 の細胞内機能制御機構の解明のため、SHP2 と直接結合する YAP 分子との複合体形成様式を解析した。SHP2-YAP 相互作用に必要と考えられる YAP 二量体形成に関わる分子間ロイシンジッパーモチーフの構築を in silico で検討し、YAP の特定のスプライスバリアントによってロイシンジッパー構造が破壊されることを見出した。本成果を含む論文を Journal of Biological Chemistry 誌に報告した。

CagA による SHP2 の異常活性化を特異的に抑制する低分子阻害剤を開発するため、延べ約 48,000 種の化合物ライブラリーを用いた阻害剤探索を実施した。チロシンホスファターゼの触媒ドメインは異なる分子間でよく保存されていることから、触媒ドメインに作用する化合物は標的選択性が極めて低いことが予想される。そのため、触媒ドメインのみを単離したトランケート SHP2 を作製し、触媒ドメインへ直接作用する化合物を除外した。加えて、SHP2 の最近縁タンパク質

であり唯一のパラログ分子である SHP1 **に対する阻害活性を検討した。これら検討から、**SHP2 **への選択性の高い阻害剤候補を取得することに成功した。本候補化合物は阻害活性強度については決して高くないものの、**SHP2 **阻害剤として報告されている既存化合物の分子構造とは全く異なっている。今後、化合物構造最適化を通して活性改善を図り、新規の作用機序を示す阻害剤として創薬展開が見込まれる。**

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　3件）

１．著者名 林剛瑠	４．巻 112
２．論文標題 ピロリ菌の遺伝子多型と胃がん発症リスクを結びつける分子構造解析	５．発行年 2019年
３．雑誌名 日本ペプチド学会ニュースレター	６．最初と最後の頁 5-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

１．著者名 Kana Hashi, Chihiro Imai, Koji Yahara, Kamrunnesa Tahmina, Takeru Hayashi, Takeshi Azuma, Takako Miyabe-Nishiwaki, Hideyuki Sato, Masao Matsuoka, Sachi Niimi, Munehiro Okamoto, Masanori Hatakeyama	４．巻 8
２．論文標題 Evaluating the origin and virulence of a Helicobacter pylori cagApositive strain isolated from a non-human primate	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 15981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34425-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

１．著者名 Ben Chi、Wu Xiaojing、Takahashi-Kanemitsu Atsushi、Knight Christopher Takaya、Hayashi Takeru、Hatakeyama Masanori	４．巻 295
２．論文標題 Alternative splicing reverses the cell-intrinsic and cell-extrinsic pro-oncogenic potentials of YAP1	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Journal of Biological Chemistry	６．最初と最後の頁 13965～13980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.013820	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 Takeru Hayashi, Miki Senda, Nobuhiro Suzuki, Chi Ben, Toshiya Senda, Masanori Hatakeyama
２．発表標題 Structure-function analysis for deregulation of SHP2 by geographically distinct variants of Helicobacter pylori CagA
３．学会等名 The 37th Sapporo International Cancer Symposium（国際学会）
４．発表年 2018年

〔図書〕　計1件

1．著者名	4．発行年
Takeru Hayashi, Miki Senda, Nobuhiro Suzuki, Toshiya Senda, Masanori Hatakeyama	2018年
2．出版社	5．総ページ数
High Energy Accelerator Research Organization (KEK)	2
3．書名	
Photon Factory Highlights 2017	

〔産業財産権〕

〔その他〕

1つのアミノ酸の違いが日本人胃がん多発の背景に -ピロリ菌の発がん活性を規定する分子構造基盤-
https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/a_00617.html

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関