

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 5月 24日現在

機関番号：12601
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2011～2012
課題番号：23890037
研究課題名（和文）ピロリ菌がん蛋白質 CagA の胃上皮細胞内プロセッシングとその病態生理学的意義
研究課題名（英文）The pathophysiological function of <i>Helicobacter pylori</i> CagA oncoprotein that is processed in gastric epithelial cells
研究代表者
齊藤 康弘（SAITO YASUHIRO）
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30613004

研究成果の概要（和文）：*cagA* 陽性のヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）の胃内持続感染は胃がん発症と密接に関わる。*cagA* 陽性ピロリ菌はがんタンパク質 CagA を菌体内で産生し、宿主胃上皮細胞へ直接注入する。宿主細胞内における CagA の局在とその機能的意義について検討し、CagA が宿主細胞内の細胞膜に加えて、核にも局在する可能性を見出した。また、CagA の宿主細胞内標的分子 SHP2 が核にて Wnt シグナルを制御することから、CagA は核内にて SHP2 を介して Wnt シグナルを脱制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Infection of the *cagA*-positive *Helicobacter pylori* relates to the induction of gastric cancer. The *cagA*-positive *H. pylori* produces CagA protein in the bacterial cells and injects it into gastric epithelial cells. The translocated CagA targets SHP2 oncoprotein and deregulates the function of SHP2. The subcellular distribution of CagA in gastric epithelial cells was investigated in this study and CagA was observed in the nucleus as well as cytoplasmic membrane. Since nuclear SHP2 activates Wnt signaling, the results implicate that nuclear CagA aberrantly activates the Wnt pathway via deregulation of nuclear SHP2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011	1,300,000	390,000	1,690,000
2012	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：胃がん、ピロリ菌、CagA

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）は微好気性らせん状グラム陰性細菌であり、その胃内慢性感染は胃がんなど胃粘膜病変の発症に深く関わる。中でも *cagA* 遺伝子陽性ピロリ菌株は激しい胃粘膜病変を惹起し、胃がん発症との間に強い因果関係を示す。*cagA* 陽性ピロリ菌は菌体内で産生した CagA タンパク質を注射針様の IV 型分泌機構を介して

胃上皮細胞内へ直接注入する。胃上皮細胞内に侵入した CagA は Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化される。

CagA のチロシンリン酸化部位は、C 末端側領域に複数存在するグルタミン酸-プロリン-イソロイシン-チロシン-アラニンからなる EPIYA モチーフである。チロシンリン酸化された CagA は広範な細胞種に発現しているがんタンパク質 SHP2 と結合し、その機能

を脱制御する結果、胃上皮細胞の細胞増殖能を異常に亢進する (Higashi et al., Science 295, 683-686, 2002)。

一方、機能獲得型変異による SHP2 の機能的脱制御は多くのヒトがん発症に関わることが明らかにされており、SHP2 は Ras 同様、重要なヒトがんタンパク質として位置づけられている (Neel et al., Trends Biochem. Sci. 28, 284-293, 2003)。これまで SHP2 基質と細胞悪性化を関連づける分子機構は不明であったが、当研究室では遺伝子転写機構の調節に重要な役割を果たす PAF (RNA polymerase II-associated factor) 複合体の主要構成因子 Parafibromin を SHP2 の新規基質として同定した。SHP2 が核内にて Parafibromin の脱リン酸化を介して Wnt/ β -catenin シグナルを制御し、その脱制御が SHP2 による細胞悪性化に重要であることが明らかとなった (Takahashi et al., Mol. Cell 43, 45-56, 2011)。

2. 研究の目的

CagA は宿主細胞内に侵入後、細胞膜内面においてその病原生物活性を発揮すると考えられてきたため、CagA の核局在やその機能的意義を積極的に検証した研究報告はこれまでにない。したがって、CagA の細胞内標的である SHP2 の核内における新たな機能が明らかになったことをふまえ、本研究課題では胃上皮細胞における CagA の細胞内局在を詳細に解析し、核局在 CagA の存在や核局在 CagA の病態生理学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CagA の細胞内局在の生化学的、細胞生物学的解析

①CagA の細胞内局在の生化学的解析

細胞分画法を用いて CagA 発現細胞を細胞質・細胞膜画分と核画分に分け、異所性発現させた CagA の細胞内分布パターンを解析した。また、本実験では細胞分画の精度を評価するため、複数の膜タンパク質、細胞質タンパク質、核タンパク質を内部コントロールとして用いた。

②細胞イメージングによる CagA の細胞内局在の解析

CagA の細胞内動態や核内移行を動的に追跡するため、CagA の N 末端側および C 末端側に、それぞれ波長の異なる蛍光タンパク質を融合させた CagA を作成し、胃上皮細胞内における蛍光タンパク質の局在解析を行った。

(2) SHP2 相互作用を中心とした C 末端側

CagA 断片の機能解析

胃上皮細胞内にて、CagA は C 末端側にある EPIYA モチーフにおいて Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化を受ける。CagA はチロシンリン酸化依存的に SHP2 がタンパク質と結合し、その機能を脱制御する。CagA の細胞内局在を解析する過程で、胃上皮細胞内における CagA は N 末端側と C 末端側の断片に分断されることが明らかとなった。よって、本実験では、この C 末端側 CagA 断片の機能的意義を明らかにするため、タンパク質相互作用に着目した以下の解析を行った。

胃上皮由来 AGS 細胞に CagA を異所性発現させ、内在性の SHP2 による免疫沈降・イムノプロットを行い、C 末端側 CagA 断片がチロシンリン酸化依存的に SHP2 と結合するか否かを調べた。

(3) *cagA* 陽性ピロリ菌感染による CagA 断片化の検討

cagA 陽性ピロリ菌感染では CagA のみならず、ピロリ菌が産生する他の毒素タンパク質またはエフェクター分子が複合的に関与することにより胃がんなどの胃粘膜病変が引き起こされると考えられている。したがって、本実験では *cagA* 遺伝子のトランスフェクション法を用いて進められた実験より得られた研究成果が、*cagA* 陽性 NCTC11637 株ピロリ菌を用いた感染実験においても誠実に再現できるか否かを検討した。

(4) CagA-SHP2 複合体の細胞内局在の解析

タンパク質複合体の細胞内局在を調べる手段として、免疫染色法がよく用いられる。近年では、Proximity Ligation assay (PLA) が開発され、タンパク質複合体の細胞内局在を一分子レベルで直接検出することが可能となり、これまでの蛍光免疫染色法よりも好感度かつ高解像度な検出が可能となった。本実験では、この PLA 法を用いて胃上皮細胞内における CagA-SHP2 複合体の細胞内局在を検討した。

4. 研究成果

(1) CagA の細胞内局在の生化学的、細胞生物学的解析

胃上皮由来の AGS 細胞に CagA を異所性発現させ、蛍光免疫染色法により CagA と細胞核の検出を行った。得られた共焦点顕微鏡画像を用いて CagA のシグナルを定量的に評価した。AGS 細胞において、CagA は主に細胞膜近傍に強くシグナルが認められたが、一部の CagA 発現細胞では細胞質ならびに、核にもシグナルが認められ、CagA が核内にも

存在する可能性が示唆された (図 1)。

また、CagA の N 末端と C 末端にそれぞれ異なる蛍光タンパク質を付加し、その細胞内局在を観察したが、N 末端側と C 末端側の蛍光シグナルに差を見出すことができなかった。

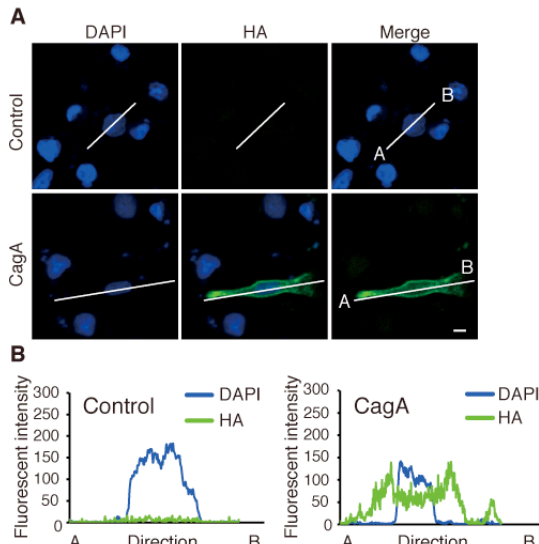


図 1 CagA 発現細胞の共焦点画像解析 (A) CagA 発現細胞の共焦点画像 (B) 共焦点画像の白線部のシグナル定量結果。青線：核、緑線：CagA のシグナルを記す。左：コントロール、右：CagA 発現細胞

次に、CagA 発現細胞を用いて免疫ブロットを行ったところ全長 140 kDa の CagA は胃上皮細胞内で約 100 kDa の N 末端側断片と約 40 kDa の C 末端側断片に切断され、その C 末端側 CagA 断片はチロシンリン酸化されていることが明らかとなった。

CagA の細胞内局在をより詳細に検討するため CagA 発現細胞の細胞分画を行った (図 2)。

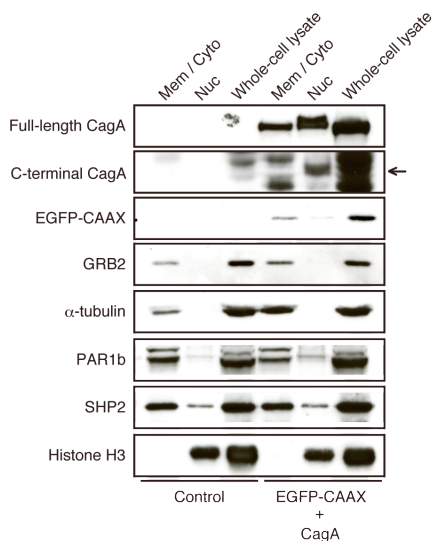


図 2 CagA 発現細胞の細胞分画 Mem/Cyto：細胞質・細胞膜画分、Nuc：核画分

細胞膜タンパク質マーカーとして EGFP-CAAX を AGS 細胞に CagA と共発現させ、細胞分画を行った。細胞質・細胞膜マーカーである EGFP-CAAX、GRB2、 α -tubulin が細胞膜・細胞質画分に、そして、核画分に核タンパク質 Histone H3 が濃縮された条件にて全長 CagA の検出を行った。全長 CagA は細胞膜・細胞質に加え、核画分においても検出され、さらに、およそ 40 kDa の C 末端側 CagA 断片もまた、核に認められた。

(2) SHP2 相互作用を中心とした C 末端側 CagA 断片の機能解析

核にも局在が認められた C 末端側 CagA 断片が SHP2 と結合する可能性を検討するため、抗 SHP2 抗体による免疫沈降を行ったところ、全長 CagA のみならず C 末端側 CagA 断片もまた SHP2 と結合していることが明らかとなった (図 3)。

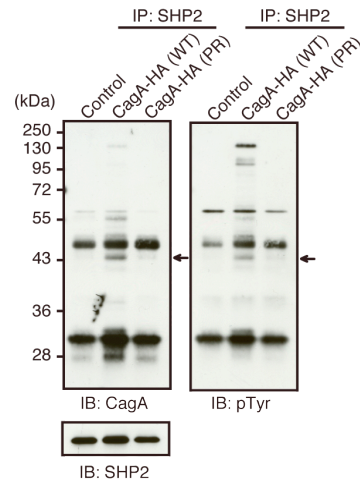


図 3 CagA-SHP2 複合体の検出 WT:野生型、PR:リン酸化耐性型、IB:免疫ブロット、IP:免疫沈降

(3) cagA 陽性ピロリ菌感染による CagA 断片化の検討

11637 株ピロリ菌を AGS 細胞に感染させ免疫ブロットによる CagA の検出を行ったところトランスフェクション実験と同様にリン酸化された CagA の C 末端側断片が認められた。

(4) CagA-SHP2 複合体の細胞内局在の解析

CagA-SHP2 複合体の細胞内局在を調べるため、タンパク質-タンパク質相互作用を細胞内で検出する Proximity ligation assay にて細胞内における CagA-SHP2 複合体の検出を行った。AGS 細胞に CagA ならびに SHP2 を共発現させたところ、大部分の CagA-SHP2 複合体は細胞膜に認められたが、一部の CagA-SHP2 複合体は核に局在していることが示唆された (図 4)。

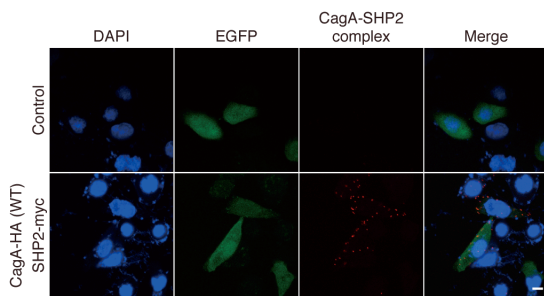


図4 胃上皮細胞における CagA-SHP2 複合体の細胞内局在。

以上の結果より、胃上皮細胞内に侵入した約 140 kDa の CagA は胃上皮細胞内においてその一部はプロセッシングを受け、約 100 kDa の N 末端断片と約 40 kDa の C 末端断片に分断される。胃上皮細胞内では、全長 CagA と同様 C 末端側 CagA 断片もまたチロシンリン酸化されており、リン酸化依存的に SHP2 と結合する。また、CagA の一部は核に局在することが示唆され、核内においても CagA-SHP2 複合体が存在する可能性が示唆された。

核内の SHP2 は核内タンパク質 Parafibromin の脱リン酸化を介して、Wnt/ β -catenin シグナルを制御することから、CagA の一部は核内において SHP2 と複合体を形成し、その機能的脱制御を通じて Wnt/ β -catenin シグナルを脱制御している可能性が示唆される。

しかしながら、本研究では胃上皮細胞内に局在する CagA の細胞膜と核におけるシグナル分布の相対量が細胞分画における分布相対量が相関もしくは一致しているようには見られなかった。したがって、今後は核局在 CagA の存在については、CagA 蛍光タンパク質プローブを開発し時空間的な解析による証明が必要であると考えられる。

加えて、この核局在 CagA の病態生理学的意義は未だ明らかになっていない。CagA はリン酸化非依存的に E-cadherin と結合し、 β -catenin シグナルを脱制御することが明らかとなっている (Murata-Kamiya et al., *Oncogene* 26, 4617-4626, 2007)。よって、核局在 CagA の病態生理学的役割を明らかにするため、CagA のリン酸化依存的な β -catenin シグナルの亢進を評価する必要があるといえる。

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 1 件)

1. Yamahashi Y, Saito Y, Murata-Kamiya N, Hatakeyama M. Polarity-regulating kinase partitioning-defective 1b (PAR1b) phosphorylates guanine nucleotide

exchange factor H1 (GEF-H1) to regulate RhoA-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J. Biol. Chem.* 286, 44576-44584 (2011). 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- 齊藤康弘、紙谷尚子、畠山昌則 「*Helicobacter pylori* CagA oncoprotein targets epithelial polarity to elicit aberrant cell proliferation.

Helicobacter pylori CagA は上皮細胞極性破壊により異常な細胞増殖を誘導する。」

第 70 回日本癌学会学術総会 (2011, 名古屋)

- サファリファテメ、紙谷尚子、齊藤康弘、畠山昌則 「Pragmin is a human EPIYA-containing protein targeted by *H. pylori* CagA oncoprotein.

胃がん発症におけるヘリコバクター・ピロリ CagA とヒト Pragmin の EPIYA 配列を介した競合作用の意義」

第 70 回日本癌学会学術総会 (2011, 名古屋)

- 齊藤康弘、畠山昌則 「Interaction of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein with SHP2 in the nucleus.

核内における *Helicobacter pylori* CagA が核内タンパク質 - SHP2 相互作用」

第 71 回日本癌学会学術総会 (2012, 札幌)

- 高橋昌史、齊藤康弘、畠山昌則

「Involvement of multiple tyrosine kinases in antagonizing parafibromin-mediated activation of Wnt signaling by SHP2 複数のチロシンキナーゼによる SHP2/parafibromin 依存的 Wnt シグナル活性化の拮抗制御」

第 71 回日本癌学会学術総会 (2012, 札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 康弘 (SAITO YASUHIRO)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30613004

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし