

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19390122  
 研究課題名 (和文) プロテオミクスを用いたヘリコバクター・ピロリ CagA による胃粘膜破壊機構の解明  
 研究課題名 (英文) Proteomic study on the mechanism underlying mucosal destruction by *Helicobacter pylori* CagA  
 研究代表者  
 畠山 昌則 (HATAKEYAMA MASANORI)  
 北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授  
 研究者番号：40189551

## 研究成果の概要：

ヘリコバクター・ピロリ菌は、自らが保有する IV 型分泌機構を介して病原タンパク質 CagA を宿主胃上皮細胞内に注入する。本研究を通して、胃上皮細胞内に侵入したピロリ菌 CagA の細胞内標的分子として、上皮細胞極性制御のマスターレギュレーターである PAR1 ファミリーキナーゼが同定された。CagA は PAR1 と結合しそのキナーゼ活性を抑制する結果、胃粘膜を構成する極性化上皮細胞層の崩壊を引き起こし、胃粘膜を傷害することが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

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：感染症・細菌・シグナル伝達・プロテオーム

## 1. 研究開始当初の背景

*cagA* 遺伝子陽性ヘリコバクター・ピロリ (ピロリ菌) の胃内持続感染は慢性萎縮性胃炎、消化性潰瘍さらには胃癌発症に深く関わる。*cagA* 遺伝子産物である CagA タンパク質はピロリ菌体内で産生・蓄積された後、菌が保有するミクロの注射針 (IV 型分泌機構) を介して胃上皮細胞内に直接注入

され、Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化される。申請者はこれまで、胃上皮細胞内に侵入した CagA がチロシンリン酸化特異的に癌タンパクとして知られる SHP-2 ホスファターゼや C-terminal Src キナーゼを脱制御し、MAP キナーゼの持続的活性化を介する異常な細胞増殖シグナルならびに FAK キナーゼの脱リン酸化を介す

る異常な細胞運動シグナルを生成させることを明らかにしてきた。CagAによるこれら一連の細胞内シグナル伝達系脱制御が、ピロリ菌の持続感染に曝される胃上皮細胞の多段階発癌プロセス進行に重要な意義を持つと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、*cagA*陽性ピロリ菌感染にともなう胃粘膜傷害の分子機構を明らかにするため、胃上皮細胞内に侵入したピロリ菌 CagA が標的とする細胞極性制御関連宿主細胞タンパク質の単離・同定を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 上皮細胞の極性形成ならびに細胞間相互作用を阻害するCagA分子内領域の同定

MDCK細胞を多孔質フィルター上で培養することにより頂端側-基底側極性を示す単層上皮を形成させた後、種々のピロリ菌 CagA欠失変異分子を発現させ、各々のCagA変異体の極性形成に及ぼす影響を検討した。一連のCagA欠失変異体パネルを用いた解析から、上皮細胞の頂端側-基底側極性に関するCagA分子内責任領域を同定した。

### (2) 質量分析 (LC/MS/MS) による新規CagA結合タンパク質の網羅的解析

N末側ならびにC末側エピトープtagを付加したCagAをAGS細胞内に異所性発現させた後、CagA分子をtandem-affinity精製 (TAP) した。TAPにより高度精製したCagA結合タンパク質をSDS-PAGEにて展開後、30-KDaから200-KDaにいたるタンパク質を含むゲル領域を1mmスライス片に分け、各々のゲル内に含まれるタンパクをトリプシン処理後、液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS/MS) を行った。得られたペプチド断片アミノ酸配列をタンパクデータベースを用いて解析し、上皮細胞の極性破壊に関するCagA分子内領域に特異的に結合する宿主細胞由来タンパクを同定した。

### (3) 質量分析で同定された候補タンパクのCagAに対する結合特異性解析

LC/MS/MS解析から得られたCagA結合タン

パク質の生化学的活性ならびに細胞生物学的役割を解析するとともに、CagAとの生化学的・細胞生物学的相互作用を検討した。

### (4) 上皮細胞の細胞極性形成・維持におけるCagA結合タンパクの役割

新規同定されたCagA結合タンパクを極性化MDCK上皮細胞に異所性過剰発現させ、頂端側-基底側極性形成に及ぼす影響を検討することにより、細胞の極性形成・維持に関する新規CagA結合タンパクを最終的に明らかにした。

### (5) チロシンリン酸化依存的CagA活性に及ぼす新規CagA結合タンパクの検討

新規CagA結合タンパクを構成的あるいは条件依存的に過剰発現あるいは発現抑制させたAGS細胞にCagAを発現させ、細胞の増殖・運動に対するチロシンリン酸化依存的なCagA活性に及ぼすリン酸化非依存的CagA活性 (細胞極性破壊・細胞間相互作用低下) の影響の有無を検討した。

## 4. 研究成果

CagAタンパク質を極性化MDCK上皮細胞に異所性発現させることにより、タイトジャンクションならびに頂端側-基底側細胞極性が破壊され、CagA発現細胞は極性化細胞層から離脱することを見出した。一連のCagA変異体発現実験から、CagAによるタイトジャンクションの破壊にはCagA分子内の1009残基-1086残基が必須であることが明らかになった。そこでLC/MS/MS質量分析法を用い、同定したCagA領域に特異的に結合する細胞由来タンパクを検索した結果、上皮細胞極性制御のマスターレギュレーターとして知られるPAR1b/MARK2セリン・スレオニンキナーゼを単離した。CagAはチロシンリン酸化非依存的にPAR1bキナーゼドメイン内の27アミノ酸残基に結合する。CagAとの複合体形成を介してPAR1bのキナーゼ活性は抑制され、タイトジャンクションならびに細胞極性の破壊が誘導されることが

明らかになった。

一方、PAR1b との複合体形成には、CagA の EPIYA 領域内に存在する 16 個のアミノ酸からなる配列が関与することが明らかになった。この配列は我々が既に CagA が細胞内でホモ二量化するために必要な配列として報告していた CM (CagA-multimerization) 配列と完全に一致した。PAR1b は細胞内で二量体として存在することが確認されたことから、2 分子の CagA が CM 配列を介して PAR1b ダイマーに結合する結果、CagA が受動的に二量体化するものと推察された。CagA のホモ二量体化は、その後のチロシンリン酸化依存的な CagA-SHP-2 複合体形成を増強・安定化する。従って、CagA-PAR1b 複合体形成は上皮細胞の極性破壊のみならず、CagA-PAR1b-SHP-2 複合体形成によるチロシンリン酸化依存的な CagA 活性にも重要な役割を担うものと考えられた。

哺乳動物細胞において、PAR1 は 4 種類の相同分子 (PAR1a/MARK3, PAR1b/MARK2, PAR1c/MARK1, PAR1d/MARK4) から構成されるキナーゼファミリーとして存在する。これらファミリー分子のうち、細胞極性制御における PAR1b の役割は比較的よく研究されているが、他のメンバーの機能に関しては未だ十分な解析がなされていない。PAR1b は、細胞骨格系を構成する microtubules を束ねる microtubule-binding protein (MAP) をリン酸化することにより、microtubules を不安定化することが知られている。よって、PAR1b は microtubules の機能制御を通して細胞極性を制御しているものと推察される。CagA の結合部位となる PAR1b キナーゼドメイン C 末領域は他の PAR1 ファミリーメンバーにおいても高度に保存されていることから、CagA と他の PAR1 分子との結合能を *in vitro* 結合試験により検討した。その結果、

CagA はすべての PAR1 ファミリー分子と結合することが明らかとなった (CagA との結合活性の強さは PAR1b>PAR1a>PAR1d>PAR1c の順)。さらに、CagA によるタイトジャンクションの破壊は、PAR1b のみならず他の PAR1 キナーゼを共発現させることにより阻止され、CagA は PAR1 ファミリーキナーゼの活性を包括的に抑制することにより上皮細胞極性を破壊することが示された。また、microtubules の不安定化は、PAR1b のみならず他の PAR1 キナーゼ分子を異所性発現させても認められる一方、その効果は CagA を共発現させることにより阻止されることから、PAR1 ファミリー分子群はいずれも microtubules の不安定化に関与していることが示された。

PAR1 との結合に関与する 16 アミノ酸からなる CagA の CM 配列は、胃癌の多い東アジア地域で単離されるピロリ菌由来 CagA (東アジア型 CagA) ならびに胃癌の比較的少ない欧米諸国で単離されるピロリ菌由来 CagA (欧米型 CagA) 間で、約 70% 程度の相同性しか示さない。そこで、東アジア型 CagA ならびに欧米型 CagA 間における PAR1 結合活性の差異を検討した。その結果、東アジア型 CagA 由来 CM 配列は欧米型 CagA 由来 CM 配列に比較し、より強く PAR1 と結合することが明らかとなった。一方、欧米型 CagA 分子内には CM 配列が複数個が重複して存在するのに対し、東アジア型 CagA には単一の CM 配列しか存在しない。そのため、CagA 分子全体で比較すると、PAR1 結合能は東アジア型ならびに欧米型 CagA 分子間でほぼ同程度であると結論づけられた。

本研究を通して、ピロリ菌 CagA の重要な細胞内標的分子として PAR1 ファミリーキナーゼが同定された。CagA は PAR1 キナーゼ活性を抑制することにより、microtubules を

過度に安定化し、細胞極性に関わる分子群の非対称的な細胞内分布を阻害すると考えられる。その結果、上皮細胞極性は失われ、胃炎や潰瘍につながる粘膜傷害が誘導されると考えられる。本研究は、ピロリ菌感染による胃炎・潰瘍の発症基盤となる粘膜破壊機構を分子レベルで明らかにした先駆的かつ独創性の高い研究であり、この分野で世界を大きくリードするものであるとともに、ピロリ菌感染症克服へ向けた臨床的意義もきわめて高いものとする。

#### 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 17 件)

- ① Hatakeyama, M. Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Oncogene*, 27, 7047-7054 (2008) 査読有
- ② Lu, H., Saito, Y., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Zhang, H., Higashi, H. and Hatakeyama, M. Structural and functional diversity in the PAR1b/MARK2-binding region of *Helicobacter pylori* CagA. *Cancer Science*, 99, 2004-2011(2008) 査読有
- ③ Nakajima, J., Ishikawa, S., Hamada, J., Yanagihara, M., Koike, T. and Hatakeyama, M. Anti-tumor activity of ESX1 on cancer cells harboring oncogenic *K-ras* mutation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 370, 189-194 (2008) 査読有
- ④ Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Yamada, G., Azuma, T. and Hatakeyama, M. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105, 1003-1008(2008) 査読有
- ⑤ Hatakeyama, M. Saga of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cur. Opin. Microbiol.*, 11, 30-37 (2008) 査読有
- ⑥ Miyamoto, D., Miyamoto, M., Takahashi, A., Yomogita, Y., Higashi, H., Kondo, S. and Hatakeyama, M. Isolation of a distinct class of gain-of-function SHP-2 mutants with oncogenic RAS-like transforming activity from solid tumors. *Oncogene*, 27, 3508-3515 (2008) 査読有
- ⑦ Kurashima, Y., Murata-Kamiya, N., Kikuchi, K., Higashi, H., Azuma, T., Kondo, S. and Hatakeyama, M. Deregulation of  $\beta$ -catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA-multimerization sequence. *International Journal of Cancer*, 122, 823-831 (2008) 査読有
- ⑧ Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Lu, H., Ohnishi, N., Azuma, T., Suzuki, A., Ohno, S. and Hatakeyama, M. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*, 447, 330-333(2007) 査読有
- ⑨ Murata-Kamiya, N., Kurashima, Y., Teishikata, Y., Yamahashi, Y., Saito, Y., Higashi, H., Aburatani, H., Akiyama, T., Peek, R. M., Jr., Azuma, T. and Hatakeyama, M. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the  $\beta$ -catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene*, 26, 4617-4626 (2007) 査読有
- ⑩ 菊地健司、畠山昌則 : *H. pylori*除菌と3剤併用療法。医薬ジャーナル 44, S-1, 263-268 (2008) 査読無
- ⑪ 齊藤康弘、紙谷尚子、畠山昌則 : ヘリコバクター・ピロリCagAによる細胞がん化メカニズム。実験医学 26, 2445-2452 (2008) 査読無
- ⑫ 齊藤康弘、紙谷尚子、畠山昌則 : 胃がん発症における*Helicobacter pylori* CagAの意義。血液・腫瘍科 56, 219-225(2008) 査読無
- ⑬ 畠山昌則 : *H. pylori* CagAによる細胞癌化のメカニズム。医学のあゆみ 224, 704-710 (2008) 査読無
- ⑭ 畠山昌則 : ピロリ菌がつくるタンパク質の発がん活性を証明。Medical Bio (March), 14-15 (2008) 査読無
- ⑮ 紙谷尚子、畠山昌則 : *Helicobacter pylori* CagAはPAR1b/MARK2 キナーゼを標的として上皮細胞の極性を破壊する。分子消化器病学 4, 114-118 (2007) 査読無
- ⑯ 畠山昌則 : ヘリコバクター・ピロリCagAによる上皮細胞極性破壊と細胞癌化のカップリング。細胞工学 27, 172-177 (2007) 査読無
- ⑰ 畠山昌則 : ヘリコバクター・ピロリと胃癌。日本消化器病学会雑誌-総説 104 635-643 (2007) 査読無

[学会発表] (計 21 件)

- ① Hatakeyama, M. Oncogenic mechanisms of *Helicobacter pylori* CagA, The G-COE First International Symposium, 2009年3月23日, 神戸-神戸大学医学部.
- ② 畠山昌則, The role of SHP-2 tyrosine phosphatase in human cancers, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大

会, 2008年12月9-11日, 神戸-神戸国際会議場.

- ③ Hatakeyama, M. SHP-2 phosphatase and human cancer, The 8<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase, 2008年11月12-14日, 前橋-前橋テレサ.
- ④ 島山昌則, *H. pylori* と胃発がん, 第67回日本癌学会学術総会, 2008年10月28-30日, 名古屋-名古屋国際会議場.
- ⑤ Hatakeyama, M. Does cag cause cancer and if so how?, UEGW Vienna 2008/16th United European gastroenterology Week, 2008年10月18-22日, Vienna, Austria, Austria Center Vienna.
- ⑥ Hatakeyama, M. The role of SHP2 phosphatase in *H. pylori*-mediated gastric carcinogenesis. 2008 FASEB Summer Research Conferences, 2008年7月13-18日, Colorado, USA, Snowmass Village.
- ⑦ 島山昌則, 細菌性癌タンパク質としてのピロリ菌CagA, Joint Conference in Sapporo 2008, 2008年7月10-11日, 札幌-北大学術交流会館.
- ⑧ Hatakeyama, M. The role of SHP2 phosphatase in *H. pylori*-mediated gastric carcinogenesis, IMBA主催生物学セミナーシリーズ, 2008年6月8-16日, Vienna, Austria, Vienna Biocenter
- ⑨ 島山昌則, ピロリ菌感染症としての胃がん, 第3回学習院大学生命科学シンポジウム, 2008年5月24日, 東京-学習院大学.
- ⑩ Hatakeyama, M. *Helicobacter pylori* and molecular pathogenesis. AACR Annual meeting 2008, 2008年4月12-16日, USA, San Diego convention center.
- ⑪ Hatakeyama, M. Gastric Cancer as a Bacterial Disease, 未来創薬・医療イノベーション拠点形成シンポジウム, 2008年3月14日, 北大・学術交流会館.
- ⑫ Hatakeyama, M. *H. pylori* and gastric carcinogenesis, JSPS Asia Africa Science Platform Program and The Fourth LiverCare Center Symposium, 2008年2月19-20日, Charoen Thani Princess Hotel, Khon Kaen, Thailand.
- ⑬ 島山昌則, Cellular targets of *Helicobacter pylori* CagA in gastric carcinogenesis, 金沢がん生物学国際シンポジウム 2008, 2008年1月24日, 金沢大学医学部.
- ⑭ Hatakeyama, M. Disruption of epithelial cell polarity by *Helicobacter pylori* virulence factor CagA, BMB 2007 Symposium, 2007年12月11-13日, パシフィコ横浜.
- ⑮ Hatakeyama, M. Disruption of epithelial cell polarity by *Helicobacter pylori* virulence factor CagA, International Symposium on Cell Polarity System and Future Medicine, 2007年12月3日, 湘南国際村・Shonan Village Center.
- ⑯ Hatakeyama, M. Microbial-host interactions in infectious cancer, International Symposium of the DFG graduate program 1167, 2007年11

月29-30日, Otto von Guericke University, Magdeburg, Germany.

- ⑰ Hatakeyama, M. The role of *Helicobacter pylori* CagA in gastric carcinogenesis, Seoul International Digestive Disease Symposium 2007, 2007年11月22日, Seoul National University, Korea.
- ⑱ Hatakeyama, M. Oncogenic protenital of the *Helicobacter pylori* CagA, Seoul International Digestive Disease Symposium 2007, 2007年11月21日, Seoul National University, Korea.
- ⑲ Hatakeyama, M. Oncogenic mechnism of *Helicobacter pylori* CagA, The 14<sup>th</sup> Seoul International Cancer Symposium, 2007年11月19日, Seoul National University, Korea.
- ⑳ 島山昌則, *H. pylori* による胃粘膜破壊の分子機構, 第19回広島ヘリコバクター研究会, 2007年10月2日, 広島大学医学部.
- ㉑ Hatakeyama, M. The role of *Helicobacter pylori* CagA in gastric carcinogenesis, The 19<sup>th</sup> FAOBMB Seoul Conference, 2007年5月29日, COEX Center, Seoul, Korea.

[図書] (計1件)

- ① 島山昌則: 北海道大学発行, バイオとナノの融合Ⅱ新生命科学の応用, 26(2007)

[その他]

ホームページ等

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/oncology/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島山 昌則 (HATAKEYAMA MASANORI)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授  
研究者番号: 40189551

### (2) 研究分担者

無

### (3) 連携研究者

無