

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390076

研究課題名(和文)ヘリコバクターピロリ病原因子CagAの病原生物活性に関わる分子構造基盤の解明

研究課題名(英文)Structure-based analysis of pathogenic activity of Helicobacter pylori CagA

研究代表者

東 秀明(Higashi, Hideaki)

北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授

研究者番号：20311227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円、(間接経費) 4,560,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌CagAタンパク質は宿主細胞内に注入され、C末端領域に存在するEPIYA領域を介して増殖シグナル伝達分子SHP-2及び細胞極性制御分子PAR1と相互作用し、その活性を脱制御する。CagA組換えタンパク質を用いた構造解析を進め、CagAが二つのドメインで構成され、CagA生物活性に重要なC末端領域においては高次構造が存在する一方で、自由度の高い不規則構造も併せて存在していることを示した。一方、CagAのN末端フラグメントを用いた結晶化スクリーニングを行い、タンパク質結晶を得ることに成功しX線構造解析を進めCagA分子立体構造を解明した。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori CagA protein is injected into gastric epithelial cells, where it interacts with cellular proteins such as SHP-2 and PAR1. CagA perturbs intracellular machineries involved in the regulation of cell growth and cell polarity through its C-terminal region containing Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motifs. To elucidate molecular basis for the pathogenic activity of CagA, we sought to determine three-dimensional structure of CagA. From results of proteolysis experiment, we found that CagA consists of the possible N-terminal and C-terminal structural domains. The CagA C-terminal fragment largely consists of an unfolded structure, although the fragment possesses an ability to bind with target molecules. Furthermore, at results of X-ray crystallographic analysis, the CagA N-terminal fragment indicate that the region has a structure comprised of three domains.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：タンパク質分子構造 細菌 胃がん

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクターピロリ菌の慢性感染は萎縮性胃炎、胃潰瘍、胃癌といった上部消化管疾病発症との関連が明らかにされている。特に本研究で着目した CagA タンパク質を産生するピロリ菌の感染は、*cagA* 陰性ピロリ菌に比べ強い胃病変を惹起することから、CagA はピロリ菌の病原性の強弱を規定する因子であると考えられている。これまでに申請者は、CagA 分子内の Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) 配列中のチロシン残基が細胞内チロシンキナーゼによりリン酸化を受け、癌タンパク質 SHP-2チロシンホスファターゼと複合体を形成しその活性を増加させ、細胞内シグナル伝達系を攪乱することを見出した。また、*cagA* 遺伝子導入マウスを作製し組織学的解析を行ったところ、生体内で CagA はリン酸化依存的に癌タンパク質として働き、上部消化管における腫瘍形成を誘導することを明らかにした。このような CagA 生物活性の発現には CagA の細胞膜移行および多量体化が必要であり、我々の解析により CagA は EPIYA 配列を構成する 5 アミノ酸により膜移行能を獲得し、また EPIYA 配列近傍の CagA 多量体化モチーフ依存的に多量体を形成していた。異なるピロリ菌株に由来する CagA 分子間において EPIYA 配列近傍の分子構造は多様性を示す。特に、胃病変の高い発生率を示す東アジアで単離されたピロリ菌の CagA は、欧米株由来の CagA より強い SHP-2 結合親和性を持ち、この事象が東アジア型 CagA のみに保存される一つのアミノ酸残基に起因する。これらの事実は、EPIYA 配列近傍の分子構造が上部消化管において組織傷害を誘導する CagA の生物活性制御に深く関与することを強く示唆する。

2. 研究の目的

ピロリ菌 CagA タンパク質は細胞内に注入され、分子内の EPIYA 領域を介して増殖シグナル伝達分子 SHP-2 及び細胞極性制御分子 PAR1 と相互作用し、その活性を脱制御する。このことから EPIYA 領域の分子構造は CagA 生物活性制御に深く関与する。CagA 結晶構造解析及び標的分子共存下における EPIYA 繰り返し領域の分子構造解析を進める。EPIYA 領域の詳細な構造を NMR 解析の手法により決定すると共に、分子間相互作用を介した CagA 生物活性発現と EPIYA 領域の分子構造との関係を明らかにする。また申請者は、CagA が二つのドメイン構造で構成され、個々のドメインは分子内相互作用し、その相互作用が生物活性発現に関与していることを見出した。そこで、分子内相互作用の意義を構造生物活性相関の観点から明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) CagA-C 末端領域の構造解析

CagA-C 末端領域の構造解析を行うため、CagA-C 末端領域フラグメントを用いた NMR 及び CD による構造解析を行う。構造情報を基に、構造的に自由度の高い EPIYA 繰り返し領域外の分子高次構造を明らかにし、CagA-C 末端領域全体の高次構造モデリングを行う。

(2) CagA 分子内相互作用機構の解析

これまでの研究結果より、CagA は EPIYA 繰り返し領域近傍で二分された二つのドメイン構造を有し、N-末端側と C-末端側それぞれを構成するペプチド断片間で相互作用していることが明らかとなった。また CagA 生物活性に影響を及ぼすことが示唆され、この分子内相互作用は、全長 CagA が分子構造を維持していく上で必要不可欠と予想された。そこで変異型 CagA 分子を用い両ドメイン間の結合に必要なとされる部位を同定する。

(3) CagA 結晶構造解析

先行研究に於いて CagA タンパク質の結晶化に成功し、X 結晶構造解析により全長の約 80%に相当する分子構造情報を得ている。結晶構造のさらなる解析を進め、CagA 構造活性相関の詳細を明らかにする。これまでの解析結果から、限定された分子領域内に多く存在する塩基性アミノ酸残基が X 線回折に影響を与えていることが示唆されている。そこで、遺伝子的にアミノ酸置換を導入した変異型 CagA 分子の結晶を作成し、構造解析に用いる。

4. 研究成果

(1) CagA-C 末端領域の構造解析

NMR 法による C 末端フラグメントと CagA の標的分子である PAR1 分子間相互作用の解析を進め、PAR1 による NMR 分子滴定の結果から CagA C 末端フラグメントは標的分子と相互作用することで一定の構造を維持する内因性不規則構造タンパク質であることが明らかとなった。さらに N15/C13 ラベル CagA 分子を用いた NMR 滴定解析を進め、PAR1 との相互作用に関わるアミノ酸残基の同定を行った。

(2) CagA 分子内相互作用機構の解析

CagA 分子内相互作用に分子機構に関する解析を行った。先行研究において、CagA N 末側領域 (アミノ酸 1-876) における一連の欠失変異体の解析結果から、アミノ酸配列 554-617 及び 708-821 の双方が、分子内相互作用に必要であることが示唆されていた。一方、CagA C 末側領域配列 (アミノ酸 877-1186) においてはペプチドを用いた競合実験より 977-1077 領域の分子内相互作用への関与が予想されていた。そこで、アミノ

酸配列 977-1077 領域の欠失変異体を作成し解析を進めたところ、アミノ酸配列 1027-1038 が、CagA C 末側領域の分子内相互作用に関わる責任部位であることが明らかとなった。アミノ酸配列 998-1038 を欠失させた分子内相互作用を示さないと予想される変異型 CagA を胃上皮 AGS 細胞に発現させたところ、野生型 CagA に比べ SHP-2 活性化を介した細胞形態変化誘導活性に有意な低下が見られた。CagA における分子内相互作用は SHP-2 複合体形成に関与し、SHP-2 の異常活性化を必要とする CagA の癌タンパク質としての機能発現に深く関わっているものと推察される。

(3) CagA 結晶構造解析

CagA N 末端フラグメントの結晶構造解析を進め、約 3.5Å の解析像を得たが、分子構造の詳細を明らかにするには至らなかった。そこで、N 末端フラグメントのさらなる構造解析を進めるため、CagA ドメイン構造情報に基づき、複数の欠失変異体を作成し、それらの結晶化に成功した。個々の欠失変異体の構造解析の結果から、限定された分子領域内に存在する塩基性アミノ酸残基が X 線構造回折に影響を与えていることが示唆された。そこで、遺伝子的にアミノ酸置換を導入した一連の変異型 CagA 分子の結晶を作成し構造解析に用いた。その結果、CagA N 末端領域は 3 つのドメインから構成されており、CagA N 末端領域はその一次構造と同様に既知の分子構造と全く相同性を示さない、新規の立体構造を示すことが明らかとなった。また申請者は、CagA 生物活性の発現に重要な C-末端領域が N 末端領域との間で分子内相互作用を示し、その相互作用により CagA 生物活性が影響を受けること示してきた。N 末端領域の立体構造情報が明らかとなり、分子内相互作用が CagA 生物活性発現に及ぼす分子機構を明らかにするに至った。

以上の、C 末端領域の NMR 解析による分子間相互作用を伴った構造情報、分子内相互作用に関する知見、および N 末端領域の結晶構造情報を総じて、CagA の分子構造および構造活性相関を明らかにするに至り、得られた知見を論文に公表した (Hayashi T *et al.* *Cell Host Microbe* **12**, 20-33, 2012)。

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 5 件)

1. Ohnishi N., Maruyama F., Ogawa H., Kachi H., Yamada S., Fujikura D., Nakagawa I., Hang'ombe B.M., Thomas Y., Mweene A.S., Higashi H.: Genome

Sequence of *Bacillus anthracis* outbreak strain in Zambia, 2011. *Genome Announc.*, 査読有, **2**: e00116-14 (2014)

doi: 10.1128/genomeA.00116-14.

2. Yamada K., Sudo H., Iwasaki K., Sasaki N., Higashi H., Kameda Y., Ito M., Takahata M., Abumi K., Minami A., Iwasaki N.: Caspase 3 Silencing Inhibits Biomechanical Overload-Induced Intervertebral Disk Degeneration. *Am. J. Pathol.*, 査読有, **184**, 753-764 (2014)
doi: 10.1016/j.ajpath.2013.11.010.
3. Sudo H., Yamada K., Iwasaki K., Higashi H., Ito M., Minami A., Iwasaki N.: Global identification of genes related to nutrient deficiency in intervertebral disc cells in an experimental nutrient deprivation mode. *PLoS One*, 査読有, **8**: e58806. (2013)
doi: 10.1371/journal.pone.0058806
4. Hayashi T., Senda M., Morohashi H., Higashi H., Horio M., Kashiba Y., Nagase L., Sasaya D., Shimizu T., Venugopalan N., Kumeta H., Noda N.N., Inagaki F., Senda T., Hatakeyama M.: Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA. *Cell Host Microbe*, 査読有, **12**, 20-33 (2012)
doi: 10.1016/j.chom.2012.05.010.
5. Hang'ombe B.M., Mwansa J.C.L., Muwowa S., Mulenga P., Kapina M., Musenga E., Squarre D., Mataa L., Thomas S.Y., Ogawa H., Sawa H., Higashi H.: Human – Animal Anthrax outbreak in the Luangwa valley of Zambia in 2011. *Trop. Doct.*, 査読有, **42**, 136-139 (2012)
doi: 10.1258/td.2012.110454.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Hideaki Higashi, Control and prevention of anthrax in human and animals, 2013 年 9 月 26 日, 第 13 回日本バイオセーフティ学会総会, 札幌
2. 大西 なおみ, 武藤 芽未, 藤倉 大輔, 五十嵐 学, 東 秀明, *De novo* designed molecule to develop structure-based vaccine against Anthrax, 2013 年 7 月 17 日, 第 60 回毒素シンポジウム, 兵庫
3. Hideaki Higashi, Control and prevention of anthrax in human and animals, 2013 年 6 月 24 日, International Conference in Medicine and Public Health 2013 (ICMPH2013), バンコク
4. Ohnishi Naomi, Memi Muto, Manabu Igarashi, Daisuke Fujikura, Hideaki Higashi, *De novo* designed molecule to develop structure-based vaccine against, 2013 年 3 月 18 日, 第 86 回日本細菌学会総会, 千葉

5. 東 秀明, 「今アフリカでは ~ 細菌感染症の克服を目指して ~」, 2013 年 2 月 10 日, 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター市民公開講座「人獣共通感染症の克服戦略」, 札幌
6. Naomi Ohnishi, Daisuke Fujikura, Memi Muto, Manabu Igarashi, Bernard M. Hang'ombe, Hirofumi Sawa and Hideaki Higashi, Development of *de novo* designed molecular for structure-based Anthrax vaccine, 2013 年 1 月 23 日, Asian-African Research Forum on Emerging and Reemerging Infections 2013, 東京
7. 東 秀明, Structural basis for biological activity of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein, 2012 年 3 月 28 日, 第 85 回日本細菌学会総会, 長崎
8. 東 秀明, ピロリ菌病原因子 CagA の分子機能と胃粘膜傷害, 日本生化学会北海道支部例会, 2011 年 8 月 5 日, 札幌

6 . 研究組織

(1)研究代表者

東 秀明 (HIGASHI Hideaki)
北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・教授
研究者番号 : 20311227