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

平成 ３０ 年　 ６ 月 １１ 日現在

機関番号：８２１１８
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2017
課題番号：１６Ｋ１９１３０

研究課題名（和文）ピロリ菌CagAによるがんタンパク質SHP2脱制御機構の構造生物学的解析

研究課題名（英文）Structural analysis of the deregulation mechanism of SHP2 phosphatase by Helicobacter pylori CagA

研究代表者
長瀬　里沙（Nagase, Lisa）

大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・研究員

研究者番号：６０７６８０３４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究において、ピロリ菌CagAタンパク質由来のEPIYA-Dペプチドと SHP2のN-SH2との複合体の結晶が得られ、X線回折実験を行った。データを解析した結果、この結晶はEPIYA-Dペプチドと N-SH2の複合体であることが確認された。
　本研究を通して、EPIYAペプチドとN-SH2の複合体結晶が取得できたことは、今後、CagAによるSHP2活性化の分子基盤を解明するために非常に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：　In this study, a crystal of complex of EPIYA-D peptide derived from Helicobacter pylori CagA protein and N-SH2 domain of SHP2 was obtained and X-ray diffraction experiment was performed. As a result of analyzing the data, it was confirmed that this crystal was a complex of EPIYA-D peptide and N-SH2.
　Through this study, it was found that the crystal of the complex of peptide and SH2 was obtained, which is extremely useful for research to elucidate the molecular basis of SHP2 activation by CagA.

研究分野：生化学、構造生物学

キーワード：CagA　ピロリ菌

1．研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）は世界人口の約半数が感染しているとされるグラム陰性桿菌で、その慢性持続性感染は種々の胃粘膜病変を引き起こす。さらに近年の研究からピロリ菌感染が胃がんの発症に重要な役割を担うことが明らかになってきた。特に、ピロリ菌 ***cagA*** 遺伝子陽性株は胃がん発症の危険率を著しく高める(Blaser M. J. et al., Cancer Res,1995; Parsonnet J. et al., Gut, 1997)。

cagA 遺伝子産物である CagA は高次構造を保持する N 末側領域と特定の高次構造を持たない天然変性構造である C 末側領域からなるタンパク質であり(Hayashi T., et al, Cell Host Microbe, 2012；図 1)、ピロリ菌体内で産生された後に注射針様装置である IV 型分泌機構を介して胃上皮細胞内に侵入する。次いで、その C 末側領域に複数存在する EPIYA(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)モチーフ内のチロシン残基を 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 C 末側領域は、EPIYA モチーフ周辺のアミノ酸配列を異にする 4 つのセグメント(EPIYA-A, -B, -C, -D)が種々に組み合わされ構成される。CagA は EPIYA-C セグメントを持つ欧米型 CagA と EPIYA-D セグメントを持つ東アジア型 CagA に大別される（図 1)。欧米型 CagA においては EPIYA-C セグメントを複数回繰り返して持つものが存在し、最大 6 回繰り返して持つものが発見されている(Karlsson, A. et al., BMC microbiol, 2012；図 1)。

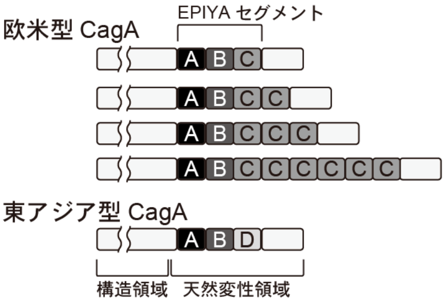

図 1 欧米型 CagA および東アジア型 CagA の構造模式図

CagA は EPIYA-C または-D セグメントのチロシンリン酸化依存的にがんタンパク質 SHP2 と特異的に結合する。SHP2 は N 末端に存在する 2 つの SH2 ドメインを介して CagA と結合する。これまでに、EPIYA-D セグメントを単一で持つ東アジア型 CagA は EPIYA-C セグメントを単一で持つ欧米型 CagA と比較して SHP2 結合活性が強いことが明らかとなっている。また、欧米型 CagA においては、EPIYA-C セグメント数が増すに従い SHP2 結合能が増強する (Higashi H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 2002)。CagA は SHP2 と結合することで SHP2 のホスファターゼ活性を異常に亢進し、細胞増殖および細胞運動に関わる細胞内シグナルを脱制御する (Higashi H. et al., Science, 2002)。このことから、CagA-SHP2 複合体の形成が胃がんの発症に重要な役割を担うと考えられている。事実、CagA を全身性に発現する遺伝子改変マウスは消化管および血液系腫瘍を発症するが、対照的に、SHP2 と結合できないリン酸化抵抗性 CagA を発現するマウスでは腫瘍発症は認められない(Ohnishi N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 2008; Miura M. et al., Int. J. Cancer, 2009)。このことから、CagA による SHP2 の異常な活性化が ***cagA*** 陽性ピロリ菌感染による胃がんの発症に本質的に関与していることを強く示唆している。さらに、大規模疫学調査の結果、2 個以上の EPIYA-C セグメントを持つ CagA を保有するピロリ菌への感染により胃がん発症のリスクが高まることが多数報告されている(Basso D. et al., Gastroenterology, 2008, Batista S.A. et al., BMC Micfrobiol, 2011, Beltran-Anaya F. T. et al, BMC Gastroenterol, 2014, Ferreira R. M. et al.,Histopathology, 2012, Sicinschi L. A. et al., Clin. Microbiol. Infect., 2010；図 2)。申請者は CagA の組換えタンパク質をチロシンリン酸化体として精製する手法を新たに構築し、解離定数を指標として CagA の SHP2 結合活性を定量的に測定した。その結果、EPIYA-C セグメントが 1 個から 2 個へ増加することで、CagA の SHP2 結合能が 100 倍以上も増強することを明らかにした(図 2)。さらに、EPIYA-C セグメントを 2 個以上保有する欧米型 CagA を発現させた細胞はマトリックス浸潤能を示すことが明らかとなった (Nagase L. et al., Sci. Rep., 2015)。この結果と疫学調査の結果を総合すると、CagA と SHP2 との結合親和性が胃がんの発症を決定する分子基盤となっている可能性が考えられる（図 2)。

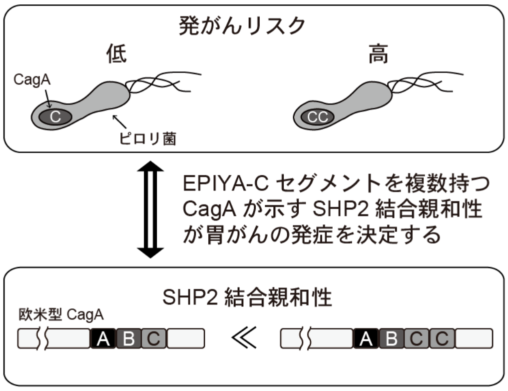

図 2 EPIYA-C セグメント数が欧米型 CagA の発がん生物活性を決定する

以上のことから、CagA の発がん生物活性の発現機序を理解するためには、CagA の SHP2 結合強度を規定する分子機構を解明する必要がある。そこで本研究では、CagA 分子多型間の SHP2 結合能の差異、特に EPIYA-C セグメントを 1 つ持つ CagA と 2 つ持つ CagA の間

の差異を、X 線結晶構造解析を用いて構造生物学的側面から解析することを目的とした。

２．研究の目的

ピロリ菌 CagA タンパク質は胃がんの発症に関わる種々の胃粘膜病変を引き起こす。CagA は胃上皮細胞内へ侵入後、がんタンパク質 SHP2 チロシンホスファターゼと特異的に結合し、SHP2 を脱制御する。CagA-SHP2 複合体の形成による SHP2 の異常活性化はピロリ菌感染を起点とした胃発がんに本質的に関与していると考えられており、CagA-SHP2 複合体の詳細な構造情報は胃がん予防・治療薬開発のために活用できる可能性がある。そこで本研究は、X 線結晶構造解析により CagA-SHP2 複合体の立体構造を解析することで、CagA による SHP2 活性化の分子基盤を解明することを目的とした。

３．研究の方法

（1）組換え型チロシンリン酸化 CagA および組み替え型 SHP2 の調整

SHP2 との共結晶化に必須であるチロシンリン酸化された組換え型 CagA の調整は、申請者が樹立した大腸菌体内で組換えタンパク質をチロシンリン酸化して精製する手法を用いる（Nagase L. et al., Sci. Rep., 2015)。共結晶化に使用する CagA（全長 1186 残基）は CagA-N 末側 (1-829 残基) の結晶構造解析を行った際に結晶化の妨げとなった 1-260 残基を欠失させた。さらに、長い天然変性領域もまた結晶化の妨げとなる可能性があるため、CagA-C 末端の SHP2 との結合に関与しない部位も欠失させた (1077-1186 残基) 。また、CagA をチロシンリン酸化する過程で、哺乳動物細胞内では認められない EPIYA モチーフ以外のチロシン残基のリン酸化が一部で起きていることが明らかとなっている（Nagase L. et al., Sci. Rep., 2015)。この分子の不均一性もまた結晶化の妨げとなる可能性が考えられるため、高次構造を保持する CagA-N 末側においては立体構造の形成に関与しないと予測されるチロシン残基および天然変性領域である CagA-C 末側においては SHP2 との結合に関与しないチロシン残基を全てフェニルアラニンに置換した変異体 (CagA-YF) を共結晶化に用いることとし、既に EPIYA-D セグメントを保有するものを作製済みである。EPIYA-C セグメント数の異なる一連の CagA 変異体に関しては、CagA-YF 変異体の EPIYA-D セグメントを様々な数の EPIYA-C セグメント（まずは 1 個あるいは 2 個持つものを作製する）に置換して作製する。

また本研究ではチロシンリン酸化 CagA ペプチドと SHP2 との共結晶化を予定しているが、その際に使用する EPIYA-C セグメントを 2 回繰り返して持つペプチドの調整にも組換えタンパク質の大腸菌体内チロシンリン酸化システムを応用する。

また、SHP2（全長 597 残基）は過去の報告で SHP2 の結晶構造解析に用いられた配列を使用する（1-527 残基、Hof P. et al., Cell, 1998)。申請者は既に全長 SHP2 の精製に成功しており（Nagase L. et al., Sci. Rep., 2015)、その手法を SHP2(1-527 残基)の精製に活用する。

（2）チロシンリン酸化 CagA ペプチド-SHP2 複合体の結晶構造解析

本研究ではまず、SHP2 と CagA の EPIYA 領域のペプチドとの共結晶化を試みる。SHP2 は活性化により立体構造が変化すると考えられているため、異なる CagA の EPIYA 領域のペプチドが結合した場合に SHP2 の構造変化に違いが見られるかを解析する。申請者の所属研究室で既に CagA の EPIYA 領域のチロシンリン酸化ペプチドと SHP2 の 2 つの SH2 ドメイン（1-220 残基）との複合体の結晶構造が決定している。そこで、その際に使用した EPIYA 領域の合成ペプチド[EPIYA-C ペプチド (VSPEPIpYATIDDL)および EPIYA-D ペプチド (ASPEPIpYATIDFD)]を用いる。さらに、(1)で調整した EPIYA-C セグメントを 2 回繰り返して持つペプチドも使用する。CagA の各 EPIYA ペプチドおよび SHP2 の精製タンパク質の調整が完了し次第、順次、結晶化スクリーニングを開始する。SHP2 の SH2 ドメインと CagA の EPIYA ペプチドとの結晶化において、好気条件下では結晶化ドロップ内でタンパク質が凝集して大量の酸化膜を生じてしまい結晶化が困難であった。そこで、嫌気条件下で結晶化が行える嫌気チャンバー内で結晶化を行ったところ、構造解析に適した結晶が得られたという経緯がある。従って、本研究においても嫌気チャンバー内で結晶化を行うことを予定している。また、SHP2 の単結晶を作製し、それを利用して結晶の成長を促すためのヘテロマイクロシーディングも試みる。結晶が得られた場合、随時 X 線結晶構造解析を行う。

（3）全長 CagA-全長 SHP2 複合体の結晶構造解析

CagA-YF と SHP2(1-527 残基)を用いて、共結晶化条件を検討する。さらに、項目(2)と同様に結晶化の妨げとなる酸化膜の発生を防ぐため、嫌気チャンバー内での結晶化を予定している。また、通常の結晶化スクリーニングに加えて、結晶成長を促進するために CagA (1-829 残基) の結晶を用いたヘテロマイクロシーディングを試みる。本項目においては最初に SHP2 との結合活性が強い東アジア型 CagA を使用する予定だが、結晶が得られる条件が確定した場合、それを参考に単一の EPIYA-C セグメントを持つ欧米型 CagA ならびに、EPIYA-C セグメントを 2 つ持つ欧米型 CagA に関しても結晶化スクリーニングを開始する。結晶が得られ次第、随時 X 線結晶構造解析を行う。

（4）CagA-SHP2 複合体形成を阻害する CagA 変異体分子の作製

(2)、(3)の結晶構造解析により立体構造情報が得られた場合、その立体構造を詳細に解析することで、CagA 分子多型間にあらわれる SHP 結合能の差異への関与が予測される特定の部位を探索する。続いて、それらの部位へ変異を導入した分子をそれぞれ作製して GST プルダウン実験による試験管内結合実験や表面プラズモン共鳴法による結合親和性の定量化等、生化学的な相互作用解析を行う。その結果に基づき、CagA と SHP2 との相互作用を特異的に弱める（強める）変異体を作製する。

（5）立体構造解析より得られた CagA 変異体分子の生物学的機能の解析

立体構造に基づき作製した CagA 変異体分子の生物学的機能の解析を行う。得られた CagA 変異体を培養細胞に発現させ、野生型 CagA との表現型の比較によりその生物学的意義を解明する。具体的には、免疫沈降実験による野生型 CagA と CagA 変異体との培養細胞内における SHP2 結合能の比較および野生型 CagA と CagA 変異体を発現させた細胞のマトリックス浸潤能の解析を行う。

４．研究成果

本研究では、初めに組換え型チロシンリン酸化 CagA および組み換え型 SHP2 の調整を行い、全ての変異体の発現・精製が完了した。次に、SHP2 結合能が高い東アジア型 CagA の EPIYA-D ペプチド-SHP2 複合体の結晶化スクリーニングを行なった結果、結晶が得られる条件が見つかったが、得られた結晶は非常に脆く X 線回折実験に用いることができなかった。そこで、結晶化条件の最適化を行なったが、再現性良く結晶が得られなかったため、SHP2 を CagA との結合部位である 2 つの SH2 ドメイン(N-SH2 および C-SH2)のみに変更して EPIYA-D ペプチドとの共結晶化を行なったが、結晶が得られなかった。そこで次に、SHP2 の 2 つある SH2 ドメインを１つにした N-SH2 ドメインと EPIYA-D ペプチドとの複合体の結晶化を試みたところ、結晶が得られたため、X 線回折実験を行った。構造解析の結果、EPIYA-D ペプチドと N-SH2 の複合体であることが確認された。

CagA ペプチドと SHP2 との結晶を得るまでに多くの時間を費やしたため、本研究期間中に当初の目的であった CagA 分子多型の SHP2 活性化機構の違いを解析することはできなかったが、本研究を通して、これまで困難であった組換え型チロシンリン酸化 CagA タンパク質の発現・精製法の確立ならびに EPIYA ペプチド-NSH2 結晶が取得できたことは、今後の CagA による SHP2 活性化機構研究において非常に有用であると考えられる。

＜引用文献＞

① Blaser, M. J. et al., Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. Cancer Res 55, 2111-2115 1995
② Parsonnet, J. et al., Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. Gut 40, 297-301, 1997
③ Hayashi, T. et al., Tertiary structure -function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of Helicobacter pylori oncogenic effector CagA. Cell host microbe 12, 20-33, 2012
④ Karlsson, A. et al., Association between cagA and vacA genotypes and pathogenesis in a Helicobacter pylori infected population from South-eastern Sweden. BMC Microbiol 12, 129, 2012
⑤ Higashi, H. et al., Biological activity of the Helicobacter pylori virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. Proc Natl Acad Sci USA 99, 14428-14433, 2002
⑥ Higashi, H. et al., SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. Science 295, 683-686, 2002
⑦ Ohnishi, N. et al., Transgenic expression of Helicobacter pylori CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. Proc Natl Acad Sci USA 105, 1003-1008, 2008
⑧ Miura, M. et al., Differential oncogenic potential of geographically distinct Helicobacter pylori CagA isoforms in mice. Int J Cancer, 125:2497-504, 2009
⑨ Basso, D. et al., Clinical relevance of Helicobacter pylori cagA and vacA gene polymorphisms. Gastroenterology 135, 91-99, 2008
⑩ Batista, S. A. et al., Higher number of Helicobacter pylori CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. BMC Microbiol 11, 61, 2011
⑪ Beltran-Anaya, F. et al., The EPIYA -ABCC motif pattern in CagA of Helicobacter pylori is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population. BMC

Gastroenterol 14, 2, 2014
⑫ Ferreira, R. M. et al., The number of Helicobacter pylori CagA EPIYA C tyrosine phosphorylation motifs influences the pattern of gastritis and the development of gastric carcinoma. Histopathology 60, 992-998, 2012
⑬ Sicinschi, L. A. et al., CagA C-terminal variations in Helicobacter pylori strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. Clin Microbiol Infect 16, 369-378, 2010
⑭ Nagase, L. et al., Dramatic increase in SHP2 binding activity of Helicobacter pylori Western CagA by EPIYA-C duplication: its implications in gastric carcinogenesis. Sci. Rep. vol:5, 15749, 2015
⑮ Hof, P. et al., Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2. Cell 92, 441-450, 1998

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 Takeru Hayashi, Miki Senda, Nobuhiro Suzuki, Hiroko Nishikawa, Chi Ben, Chao Tang, Lisa Nagase, Kaori Inoue, Toshiya Senda, Masanori Hatakeyama, "Differential mechanisms for SHP2 binding and activation are exploited by geographically distinct Helicobacter pylori CagA oncoproteins", Cell Reports, 20(12), 2876-2890, 2017.

〔**学会発表**〕（**計　5　件**）
① **長瀬里沙、千田美紀、千田俊哉、ピロリ菌CagAタンパク質-細胞内標的分子複合体の結晶化、2017年度量子ビームサイエンスフェスタ、茨城県立県民文化センター（茨城・水戸）、2018年3月4日**

② 長瀬里沙、千田美紀、鈴木喜大、林剛瑠、畠山昌則、千田俊哉、ピロリ菌発がんタンパク質 CagA-宿主細胞内標的分子複合体の構造解析に向けた試験管内再構成系の確立、第17回日本蛋白質科学会年会、仙台国際センター（宮城・仙台）、2017年6月22日

③ 鈴木 喜大、林 剛瑠、千田 美紀、長瀬里沙、畠山 昌則、千田 俊哉、ピロリ菌CagA EPIYA セグメントと複合体を形成したSHP2のSAXS解析、2016年度量子ビームサイエンスフェスタ、エポカルつくば（茨城・つくば）、2017年3月14日

④ 長瀬里沙、林剛瑠、千田俊哉、畠山昌則、EPIYA-C セグメントの重複が規定するピロリ菌 CagA タンパク質の胃発がんリスク、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（神奈川・横浜）、2016年12月2日

⑤ 鈴木 喜大、林 剛瑠、千田 美紀、長瀬里沙、畠山 昌則、千田 俊哉、ピロリ菌 CagA EPIYA 領域と複合体を形成した SHP2 の溶液構造解析、第39回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（神奈川・横浜）、2016年11月30日

６．研究組織
(1)研究代表者
長瀬　里沙　（NAGASE, Lisa）
高エネルギー加速器研究機構・物質構造化学研究所・研究員
研究者番号：60768034