

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390089

研究課題名(和文)

ヘリコバクターピロリ病原因子 CagA 生物活性に依存した胃組織傷害発症機構の解明

研究課題名(英文)

Structure-based analysis of biological 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

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 の分子構造解析を進めたところ、CagA は EPIYA 繰り返し領域近傍で分子構造が二分され、*in vitro* の分子再構成実験により二分された個々のドメインが強力に分子内相互作用していることが明らかとなった。さらに、CagA 分子内相互作用は N 末側領域における 2 つの領域が近接した立体構造をとり、この部位に対して C 末側領域が相互作用することで形成され、その結果、細胞内標的分子の脱制御を介した CagA 生物活性の発現調節に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

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 through its C-terminal region containing Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motifs. Consequently, CagA perturbs intracellular machineries involved in the regulation of cell growth and cell polarity. To elucidate molecular basis for the pathophysiological activity of CagA, we sought to determine three-dimensional structure of CagA. We performed a limited proteolysis experiment of CagA and identified a specific cleavage site, which could represent a linker region that connects the possible N-terminal and C-terminal structural domains of CagA. Intriguingly, the C-terminal proteolytic fragment of CagA was bound to the remaining N-terminal proteolytic fragment. Furthermore, we found that N-terminal fragment enhances CagA biological activity that induces cell morphological changes in depending on the C-terminal region of CagA. Our finding indicates that an intramolecular interaction between the N-terminal and C-terminal domains plays an important role in the structural integrity of the biologically active CagA protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：胃がん、チロシンフォスファターゼ、分子立体構造、ピロリ菌、チロシンリン酸化

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。CagA は、感染成立後宿主細胞内に注入され分子内に存在する Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) 配列内のチロシン残基がリン酸化を受ける。申請者は、チロシンリン酸化を受けた CagA が増殖シグナル伝達分子 SHP-2 を増殖因子非依存的に活性化し、Ras 非依存的な MAP キナーゼの活性化および FAK の不活化を通して増殖刺激様の細胞形態変化誘導ならび細胞運動能を亢進していることを明らかにした。機能獲得型変異にともなう SHP-2 の脱制御がヒト癌発症の原因となることが明らかにされ、CagA による SHP-2 活性調節機構の破綻が胃細胞の癌化を引き起こす要因の一つであることが強く示唆される。さらに、CagA の多量体形成は細胞極性制御に関わる PAR1 キナーゼとの相互作用に依存しており、この時 CagA は PAR1 キナーゼ活性を抑制し細胞極性の崩壊を引き起こすことが明らかとなった。CagA による細胞極性の崩壊は粘膜上皮組織の構造破綻を引き起こし、*cagA* 陽性ピロリ菌感染による重篤な組織傷害と密接に関連していることが推察される。一方、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し、EPIYA 配列の繰り返し回数ならびにそのアミノ酸配列多型は個々のピロリ菌の胃粘膜傷害活性と密接に関連する。この事実は、EPIYA 配列近傍の分子構造が CagA 病原生物活性と深く関与することを強く示唆する。CagA 分子における構造生物活性相関を明らかにしていくことで CagA 生物活性に依存したピロリ菌の病原性、ひいては *cagA* 陽性ピロリ菌感染により引き起こされる胃組織傷害の発症機構に関する重要な情報が得られるものと考えた。

2. 研究の目的

CagA 発現細胞を用いた細胞生物学的解析を通して、*cagA* 陽性ピロリ菌感染後細胞内に侵入した CagA により脱制御される細胞内制御機構、ならびにその現象に関わる分子機構の解明を目的とする。CagA の標的となる SHP-2 および PAR1 の機能に依存した細胞内シグナル系を中心に解析を進め、*cagA* 陽性ピロリ菌感染がどのように重篤な組織傷害を誘導し細胞を癌化に向かわせるのか、

CagA 分子機能の解析から検討していく。また、細胞内標的分子との複合体形成能に深く関わる EPIYA 配列近傍の CagA 分子構造に着目し、異なる菌株間で見られる EPIYA 配列近傍の構造多様性と CagA 生物活性の相関を明らかにしていく。その結果に基づき、CagA を分子標的とした創薬の可能性を検討し、*cagA* 陽性ピロリ菌感染により発症する疾病、特に胃癌の予防薬および治療薬の発見、開発を目標として研究を遂行する。

3. 研究の方法

(1) CagA 分子内相互作用機構の解析 精製 CagA を用いた構造解析の過程において、CagA 分子構造は生物活性発現に重要な EPIYA 繰り返し領域近傍を中心に N 末端側および C 末端側それぞれに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示唆された。

①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。

②変異導入により分子内相互作用ができない変異型 CagA 分子ならびに N 末端側と C 末端側を構成するペプチド断片を用い、これまでに明らかにされている CagA 生物活性ならびに CagA の細胞膜局在に関して検討する。得られた結果を踏まえ、分子内相互作用に対して阻害活性を有する物質が抗 CagA 活性物質として有効であるか考察する。

③異なる CagA 分子間で見られる EPIYA 配列近傍の分子多型が分子内相互作用に及ぼす影響を比較する。臨床単離株より得られた EPIYA 配列近傍の構造の異なる CagA 分子を用いて解析を進める。CagA 分子型と感染者が発症していた胃病態との相関を検討し、CagA 分子構造と病態発症の関連を考察する。

(2) C 末端領域の構造解析

CagA の生物活性発現に深く関わる C 末端領域の構造解析を行うため、C 末端領域全長を複数のペプチド断片として作製し NMR 及び CD による構造解析を行う。個々のペプチド構造情報を基に、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。

(3) CagA 生物活性に依存した胃病変発症機構の検討

CagA 生物活性により干渉される細胞内制御機構を明らかにするため、CagA または SHP-2 と相互作用する分子の情報をもとに生化学的解析を進める。この時、CagA 分子

構造の差異が CagA 生物活性に及ぼす影響を併せて検討するため、臨床検体から単離されたピロリ菌に由来する CagA の分子多型に基づく一連の人工改変分子を用い、構造の異なる CagA 分子間の複合体形成能等の比較、検討を行う。

4. 研究成果

(1) CagA 分子内相互作用機構の解析

CagA 分子内相互作用に関わる構造基盤の解明を目的として、CagA 分子内相互作用に分子機構に関する解析を行った。CagA の N 末側領域に対する一連の欠失変異体を用いた *in vitro* 再構成実験の結果から、CagA の N 末側領域(アミノ酸 1-876)におけるアミノ酸配列 554-617 及び 708-821 の双方が、CagA C 末側領域(アミノ酸 877-1186)との分子内相互作用に必要であった。一方、CagA C 末側領域配列を基に合成されたペプチドによる競合阻害実験から、CagA アミノ酸配列 977-1077 に相当するペプチドの存在により、CagA N 末側及び CagA C 末側フラグメント間の結合が抑制された。アミノ酸配列 977-1077 領域における一連の欠失変異体を用いた解析から、アミノ酸配列 1027-1038 に相当する 11 個のアミノ酸が、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。これらのことから、CagA は N 末側領域における 2 つの領域が近接した立体構造をとり、この部位に対してアミノ酸 C 末側領域が分子内相互作用すると推察された。また、アミノ酸配列 998-1038 を欠失させた変異型 CagA を胃上皮 AGS 細胞に発現させたところ、野生型 CagA に比べ細胞形態変化を示した細胞数及び細胞の伸長率が大きく減少した。この時、変異型 CagA のチロシンリン酸化レベルは野生型 CagA と差は見られなかったが、リン酸化型 CagA の細胞内標的分子である SHP-2 との複合体形成量が低下していた。このことから、CagA における分子内相互作用は構造的に SHP-2 複合体形成に深く関与し、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。

(2) CagA-C 末端領域の構造解析

C 末端領域フラグメントを ¹H NMR 及び CD スペクトル解析による構造解析をすすめたところ、CagA の C 末端領域は顕著な高次構造は形成されず、その全般が不規則構造で構成されていることが明らかとなった。一方、マイクロインジェクション法を用いて、組換え C 末端フラグメントを胃上皮細胞へ直接注入し、その生物活性を細胞形態変化誘導活性を指標に検討した。その結果、不規則構造から構成されている C 末端フラグメントは

全長 CagA タンパク質と同様に細胞形態変化を誘導した。このことから、CagA は主要な生物活性に重要な EPIYA 領域周辺を不定形構造として持つ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。

(3) CagA 生物活性に依存した胃病変発症機構の検討

CagA 分子内相互作用に関わるアミノ酸配列を、臨床検体より単離されたピロリ菌由来 CagA において比較検討した。その結果、分子内相互作用に関わる責任領域は、各 CagA 分子間において高度に保存されていた。これまでの研究結果から CagA は、C 末側の自由度の高い領域を介すことで多様な分子群との相互作用を獲得し、また、EPIYA 配列の繰り返し回数及びその前後の一次構造が生物活性に影響を与えることが明らかとなっている。その際、N 末側領域は分子内相互作用を通して EPIYA 配列近傍の構造に影響を与え、宿主細胞のシグナル伝達系の脱制御に関わる CagA 生物活性を増強していることが予想された。

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 6 件)

- ① Murata-Kamiya N., Kikuchi K., Hayashi T., Higashi H., Hatakeyama M.: *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. *Cell Host Microbe*, 査読有, **7**, 399-411 (2010)
- ② Lamb A., Yang X.D., Tsang Y.H., Li J.D., Higashi H., Hatakeyama M., Peek R.M., Blanke S.R., Chen L.F.: *Helicobacter pylori* CagA activates NF-kappaB by targeting TAK1 for TRAF6-mediated Lys 63 ubiquitination. *EMBO Rep.*, 査読有, **10**, 1242-1249 (2009)
- ③ Lu H., Saito Y., Umeda M., Murata-Kamiya N., Zhang H., Higashi H., Hatakeyama M.: Structural and functional diversity in the PAR1b/MARK2-binding region of *Helicobacter pylori* CagA. *Cancer Sci.*, 査読有, **99**, 2004-2011 (2008)
- ④ Miyamoto D., Miyamoto M., Takahashi A., Yomogita Y., Higashi H., Kondo S., Hatakeyama M.: Isolation of a distinct class of gain-of-function SHP-2 mutants with oncogenic RAS-like transforming activity from solid tumors. *Oncogene*,

査読有, 27, 3508-3515 (2008)

- ⑤ Ohnishi N., Yuasa H., Tanaka S., Sawa H., Miura M., Matsui A., Higashi H., Musashi M., Iwabuchi K., Suzuki M., Yamada G., Azuma T., Hatakeyama M.: Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 査読有, 105, 1003-1008 (2008)
- ⑥ Kurashima Y., Murata-Kamiya N., Kikuchi K., Higashi H., Azuma T., Kondo S., Hatakeyama M.: Deregulation of beta-catenin signal by *Helicobacter pylori* CagA requires the CagA-multimerization sequence. *Int. J. Cancer*, 査読有, 122, 823-831 (2008)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 東秀明、ヘリコバクターピロリ病原因子 CagA の分子構造と生物活性、第 11 回進化学会大会、2009 年 9 月 2 日-4 日、札幌
- ② Hideaki Higashi、Structural Basis for Oncogenesis by *Helicobacter pylori* CagA、International Symposium New Frontiers in Cancer Research、2009 年 3 月 18 日-19 日、札幌
- ③ 東秀明、*Helicobacter pylori* CagA protein and gastric cancer、第 82 回細菌学会、2009 年 3 月 12 日-14 日、名古屋
- ④ 東秀明、北海道大学グローバル COE プログラム Kick off シンポジウム、病原体および宿主因子の分子構造解析と治療薬の開発、2009 年 2 月 23 日、札幌
- ⑤ Hideaki Higashi、*Helicobacter pylori* CagA protein and gastric carcinogenesis、第 67 回日本癌学会、2008 年 10 月 28 日-30 日、名古屋
- ⑥ Hideaki Higashi, Takeru Hayashi, Masafumi Horio, Hiroyuki Kumeta, Shigeo Hara, Fuyuhiko Inagaki and Masanori Hatakeyama、Structural analysis of the *Helicobacter pylori* CagA protein、第 8 回あわじしま感染症・免疫国際フォーラム 2008 年 9 月 7 日-10 日、淡路島
- ⑦ 東秀明、畠山昌則、ヘリコバクターピロリと癌、第 48 回日本リンパ網内系学会総会、2008 年 6 月 13 日-14 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