

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860284

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリ病原因子CagAによるCsk攪乱の構造生物学的解析

研究課題名(英文)Structural and functional analysis of the mechanism underlying perturbation of Csk by Helicobacter pylori virulence factor CagA

研究代表者

林 剛瑠 (Hayashi, Takeru)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10722209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌発現系を用いてピロリ菌CagAがタンパク質のチロシンリン酸化体を発現・精製する方法を樹立した。精製タンパク質を用いることでCagAとその標的分子であるCskとの相互作用が物理的な結合であることを明らかにし、CagAとの複合体形成によってCskが異常活性化することを見出した。CagA分子内に存在する複数のチロシンリン酸化モチーフ(EPIYAモチーフ)のうち、CagA-Csk複合体形成に重要なモチーフを同定した。さらに結晶構造解析によりCagA-Csk相互作用の様子を構造学的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We established the experimental method for expression and purification of tyrosine-phosphorylated CagA oncoprotein from Helicobacter pylori by employing bacterial expression system. Using the purified tyrosine-phosphorylated CagA protein, we elucidated that the interaction of CagA with Csk, one of the intracellular targets of CagA, is due to direct binding and that the CagA-bound Csk is aberrantly activated. Among multiple tyrosine-phosphorylation motifs in a single CagA molecule, we identified the key motif for the interaction of CagA with Csk. Furthermore, crystal structure analysis revealed that the interaction mode of CagA-Csk complex.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ピロリ菌 CagA 細胞内シグナル攪乱 構造-機能解析

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)は世界最大規模の約 30 億人への感染が推定されている病原細菌である。ピロリ菌の感染は胃がんを含む種々の胃粘膜病変発症の原因であることが様々な研究から明らかにされており、毎年約 100 万人が新たに胃がんを発症している。胃がん発症に深く関わる病原因子としてピロリ菌の産生する CagA は細菌由来のがんタンパク質であると理解されている。CagA は IV 型分泌機構を介して胃上皮細胞内に侵入後、細胞膜内面に局在し、様々な細胞内標的分子と相互作用することによりその病原作用を発揮する。CagA の C 末端領域には Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) 配列が複数繰り返し存在しており、CagA は Src family kinases (SFKs) および Abl kinase により EPIYA 配列中のチロシン残基にリン酸化修飾を受ける。チロシンリン酸化 CagA は、チロシンホスファターゼ SHP2 と結合し、SHP2 の酵素活性を亢進させる。SHP2 は Ras-MAP キナーゼ経路および Wnt/-catenin 経路を促進するがんタンパク質として知られ、CagA は SHP2 の異常活性化を介して細胞運動・増殖シグナルを脱制御する。

一方、チロシンリン酸化 CagA は SFKs を抑制する C-terminal Src kinase (Csk) とも相互作用する。通常、Csk は細胞質に分布するが、CagA は Csk と結合することで SFKs が局在する細胞膜直下に Csk をリクルートし、SFKs の活性抑制を誘導する。SFKs は自然免疫の活性化に関わることが知られる。したがって、CagA が Csk を介して SFKs の活性を抑制することは、免疫応答を攪乱することによりピロリ菌の感染成立に寄与すると推察される。一方、CagA 以外に EPIYA 配列またはその類似配列を持つ他の病原細菌エフェクタータンパク質

(EPIYA エフェクター)が見つかっているが、これらのうちいくつかの EPIYA エフェクターは Csk と結合することが既に示されていることから、Csk を一次標的として SFKs を抑制することが、EPIYA エフェクターを持つ病原細菌に共通した生存戦略である可能性が浮かび上がる。

2. 研究の目的

本研究では、分子生物学的解析が最も進む EPIYA エフェクターとしてヘリコバクター・ピロリ病原因子 CagA を典型モデルに採用し、生化学的および構造生物学的アプローチから、EPIYA エフェクターによる Csk 攪乱の構造と機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌発現系を用いたチロシンリン酸化 CagA の発現・精製法の樹立

N 末端に GST タグ、C 末端に 6xHis タグを付加した CagA の大腸菌発現ベクターとチロシンキナーゼ c-Src の発現ベクターを大腸菌 BL21 に共導入した。同時に、過剰発現による非特異的且つ不均一な CagA のチロシンリン酸化を防ぐため、CagA の立体構造情報に基づき、EPIYA モチーフ以外の分子表面に存在するチロシン残基をフェニルアラニン置換した CagA 変異体を作成した。チロシンリン酸化効率の良い発現条件を検討後、既に確立していた非リン酸化 CagA の精製プロトコルに従ってチロシンリン酸化 CagA を精製した。

(2) CagA と Csk の相互作用解析

精製したチロシンリン酸化 GST 融合型 CagA ならびに Csk を用いて、GST プルダウン実験により CagA と Csk の物理的相互作用を検討した。また、精製したチロシンリン酸化 CagA と Csk を混合し、ゲルろ過

クロマトグラフィーにより複合体形成を検討した。さらに、CagA 分子内に複数存在する EPIYA モチーフ (EPIYA-A、-B、-C) 内のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体をそれぞれ作成し、CagA-Csk 複合体形成に重要な EPIYA モチーフの同定を試みた。

(3) Csk のキナーゼ活性に及ぼす CagA の影響

人工ポリペプチドである Poly(Glu:Tyr=4:1)を Csk の基質として用い、チロシンリン酸化 CagA 存在下における Csk のキナーゼ活性を検討した。また、Csk の生理的な基質である c-Src の C 末端尾部を GST に融合した GST-c-Src(尾部)タンパク質を新たに調製し、これを基質としてチロシンリン酸化 CagA および CagA 変異体、ならびにチロシンリン酸化 CagA ペプチド存在下における Csk のキナーゼ活性を検討した。

(4) CagA-Csk 複合体の構造解析

全長 CagA を用いた Csk との共結晶化は困難が予想されることから、CagA のチロシンリン酸化ペプチドを用いて、全長 Csk との共結晶化条件を検討するスクリーニングを行った。結晶化スクリーニングにより結晶作成条件を見出した後、高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーにて X 線回折実験を行い、構造解析プログラムにて複合体の結晶構造を決定した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌発現系を用いたチロシンリン酸化 CagA の発現・精製法の樹立

大腸菌菌体内における CagA と c-Src との共発現条件を検討し、チロシンリン酸化効率ならびに収率良く CagA をチロシンリン酸化できる発現系を樹立した。また、研

究代表者らにより既に報告されている CagA 単独の立体構造情報に基づいて、CagA 分子表面に存在する EPIYA モチーフ以外のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体を作成することで、非特異的且つ不均一な CagA のチロシンリン酸化を抑制し、高純度のチロシンリン酸化 CagA を得ることに成功した。

(2) CagA と Csk の相互作用解析

チロシンリン酸化野生型 CagA ならびに全ての EPIYA モチーフ内のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したチロシンリン酸化耐性型 (PR) CagA の GST 融合タンパク質を調製し、GST プルダウン法を用いて EPIYA モチーフのチロシンリン酸化依存的に CagA が Csk と直接結合することを明らかにした。またプロテアーゼ処理により GST タグを除去したチロシンリン酸化 CagA を用いてゲルろ過クロマトグラフィー解析を行い、同様に CagA のチロシンリン酸化に依存した CagA-Csk 複合体形成を確認した。さらに CagA 1 分子内に 3 つ存在する EPIYA モチーフの内、それぞれ 1 つを残して他の 2 つの EPIYA モチーフ中のチロシン残基をフェニルアラニン置換した変異体コンストラクトを作成し、チロシンリン酸化された各 CagA 変異体を調製した。この変異体を用いた GST プルダウンおよびゲルろ過クロマトグラフィーの解析から、EPIYA-A サイトのチロシンリン酸化が CagA-Csk 相互作用に強く関与することを見出した。

(3) Csk のキナーゼ活性に及ぼす CagA の影響

はじめに、Poly(Glu:Tyr=4:1)ペプチドを基質とした Csk のキナーゼアッセイを行い、CagA との結合が Csk のキナーゼ活性を顕著に亢進することを示した。また、よ

り生理的な Csk の活性を検討するため、GST-c-Src(尾部) タンパク質を基質とした Csk のキナーゼアッセイを行い、チロシンリン酸化された EPIYA-A サイトを介した CagA との結合により Csk の活性が異常に亢進することを明らかにした。

(4) CagA-Csk 複合体の構造解析

CagA の EPIYA-A サイトを含む 13 残基長のチロシンリン酸化ペプチドと全長 Csk との複合体の結晶化条件を見出すことに成功した。得られた結晶を用いて X 線結晶構造解析を行い、複合体の立体構造を解明することに成功した。原子レベルの構造解析から、CagA-Csk 相互作用はリン酸化チロシンに続く塩基性アミノ酸と Csk の SH2 ドメインの酸性アミノ酸の間の静電的相互作用が強固な結合を生み出していることが推察された。

以上より、CagA と Csk は他の細胞内のコンポーネントに依存せず直接二者で複合体を形成することを明らかにした。この結合が CagA の EPIYA-A サイトに強く関連することが示され、EPIYA モチーフ周辺のアミノ酸配列が CagA-Csk 相互作用に大きな影響を与えていることを見出した。また、CagA との結合により Csk のキナーゼ活性が顕著に亢進することが明らかになり、ピロリ菌の病原因子が Csk を介して細胞内のチロシンリン酸化シグナルを直接攪乱することが示唆された。SH2 ドメインにリガンドが結合した状態の全長 Csk の立体構造はこれまで明らかにされておらず、本研究は世界に先駆けて CagA-Csk 複合体の構造決定に成功した。今後、ピロリ菌 CagA 以外の EPIYA エフェクタータンパク質と Csk との相互作用の有無ならびにその生物学的意義を各種生化学的解析、細胞生物学的解析および構造解析から明らかにしていくことが望まれる。

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4件)

Saju P, Murata-Kamiya N, Hayashi T, Senda Y, Nagase L, Noda S, Matusaka K, Funata S, Kunita A, Urabe M, Seto Y, Fukayama M, Kaneda A, Hatakeyama M. Host SHP1 phosphatase antagonizes *Helicobacter pylori* CagA and can be downregulated by Epstein-Barr virus. *Nature Microbiology*, vol.1, Article No. 16026, 2016

Senda M, Hayashi T, Hatakeyama M, Takeuchi K, Sasaki AT, Senda T. Use of multiple cryoprotectants to improve diffraction quality from protein crystals. *Crystal Growth and Design*, vol.16, 1565-1571, 2016

Noda S, Takahashi A, Hayashi T, Tanuma S, Hatakeyama M. Determination of the catalytic activity of LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutants toward parafibromin, a *bona fide* SHP2 substrate involved in Wnt signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol.469, 1133-1139, 2016

Nagase L, Hayashi T, Senda T, Hatakeyama M. Dramatic increase in SHP2 binding activity of *Helicobacter pylori* Western CagA by EPIYA-C duplication: its implications in gastric carcinogenesis. *Scientific Reports*, vol.5, Article No. 15749, 2015

〔学会発表〕(計6件)

野田沙織、高橋昌史、林剛瑠、田沼靖一、
畠山昌則、LEOPARD 症候群由来変異型
SHP2 の *in vivo* 脱リン酸化試験による
酵素活性解析、日本薬学会第136回年会、
2016/03/29、パシフィコ横浜
鈴木喜大、千田美紀、長瀬里沙、林剛瑠、
畠山昌則、千田俊哉、ピロリ菌 CagA の
C 末端天然変性領域による投げ縄様構造
の解析、BMB2015、2015/12/1-4、神戸
ポートアイランド
千田俊哉、千田美紀、鈴木喜大、林剛瑠、
長瀬里沙、畠山昌則、ピロリ菌由来のが
んタンパク質 CagA の構造-機能相関研
究、大 87 回日本生化学会大会、
2014/10/15-18、国立京都国際会館
林剛瑠、長瀬里沙、千田美紀、千田俊哉、
畠山昌則、ピロリ菌 CagA による宿主分
子攪乱機構の構造と機能、第 73 回日本
癌学会学術総会、2014/09/25/27、パシフ
ィコ横浜
林剛瑠、畠山昌則、ピロリ菌がんタンパ
ク質 CagA と標的分子 Csk との相互作用
における生物物理化学的解析、第 73 回
日本癌学会学術総会、2014/09/25-27、パ
シフィコ横浜
ブリヤサジュ、林剛瑠、野田沙織、畠山
昌則、SHP2 is a cytoplasmic tyrosine
phosphatase that dephosphorylates
the *Helicobacter pylori* CagA
oncoprotein、第 73 回日本癌学会学術総
会、2014/09/25-27、パシフィコ横浜

〔図書〕(計1件)

千田俊哉、千田美紀、林剛瑠、畠山昌則、
ピロリ菌の発がんタンパク質 CagA の構造
と機能、実験医学(増刊) 32 巻、1651-1655、
2014

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.microbiol.m.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 剛瑠 (Hayashi, Takeru)
東京大学大学院医学系研究科・助教
研究者番号：10722209

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし