

ピロリ菌がんタンパク質の1アミノ酸多型が日本人胃がん多発の背景に  
～ピロリ菌の発がん活性を規定する分子構造基盤～

1. 発表者：

畠山 昌則（東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 微生物学分野 教授）

千田 俊哉（高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆ ピロリ菌がんタンパク質 CagA とその発がん標的分子である SHP2 間の複合体形成を担う結晶構造を解明し、複合体の安定性と発がん活性の連関を明らかにしました。
- ◆ 日本を含む東アジアに蔓延するピロリ菌 CagA のみが保有するユニークかつ強力な SHP2 結合様式を発見し、その結合様式が胃がん発症を著しく促すことを解明しました。
- ◆ 本研究の成果は、ナノスケールでの胃がん発症機構の理解を前進させるとともに、構造情報を基盤にした革新的な胃がん予防法・早期治療法の開発に繋がることが期待されます。

3. 発表概要：

ほぼ全ての胃がんはヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌、注1）感染を背景に発症し、その発がん過程にはピロリ菌が産生する病原因子 CagA タンパク質が重要な役割を果たします（図1）。東アジア諸国（日本、中国、韓国）は世界的な胃がんの最多発地域として知られています。疫学調査から東アジアで見られるピロリ菌が保有する東アジア型 CagA は、それ以外の地域で見られる欧米型（世界標準型）CagA に比べ、胃がん発症に、より深く関与することが指摘されていますが、これら2種の CagA 間の発がん活性に違いが生じる構造基盤は不明でした。

今回、東京大学大学院医学系研究科の畠山昌則教授、高エネルギー加速器研究機構の千田俊哉教授らの研究グループは、X線結晶構造解析（注2）を通して CagA が標的とする発がんタンパク質 SHP2（注3）との複合体の構造を原子レベルで解明し、東アジア型 CagA と欧米型 CagA の間に存在する1つのアミノ酸残基の違いによる立体構造の差異が CagA の SHP2 結合能に大きな影響を与えることを明らかにしました（図2）。さらに、東アジア型 CagA が示す欧米型 CagA に比べて圧倒的に強固な SHP2 結合が、SHP2 の酵素活性を著しく増強し、胃の細胞のがん化を促す異常なシグナルを強力に誘導することを見出しました（図3）。本研究の成果は、革新的な胃がんの予防法・早期治療法の開発に繋がることが期待されます。

本研究成果は Cell Reports（9月19日オンライン版）に掲載されました。

4. 発表内容：

日本を含む東アジアは世界的に胃がんが最も多発する地域として知られています。胃がんは部位別がん死亡の世界第三位を占め、毎年約72万人の命を奪っています。その過半数を占める約39万人は東アジア諸国に由来し、日本における胃がん死亡者数は年間5万人にも上ります。近年、ピロリ菌の慢性感染が種々の胃粘膜病変の原因となっていることが明らかにされてきました。なかでも、胃がんの発症にはピロリ菌が産生する病原因子 CagA タンパク質が深く関与しています（図1）。ピロリ菌の菌体内で産生された CagA は、菌が保有するミクロの注射針様装置を通してヒトの胃の細胞に直接注入されます。細胞内に侵入した CagA はチロシン残基にリン酸化修飾を受けることで、ヒトタンパク質 SHP2 と結合する能力を獲得します。

SHP2 は、チロシンリン酸化タンパク質と結合できる 2 つの領域（N-SH2 ドメインならびに C-SH2 ドメイン、注 3）を有するチロシン脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）で、点突然変異（注 4）による異常な酵素活性の亢進が起こると細胞のがん化を促進することが知られています。CagA はリン酸化チロシン残基を介して SHP2 と結合することにより SHP2 の異常活性化を引き起こして発がん活性を発揮すると考えられています（図 1）。

興味深いことに、東アジアで単離されるピロリ菌が保有する CagA（東アジア型 CagA）と、その他の地域で単離されるピロリ菌が保有する CagA（欧米型 CagA）の間では SHP2 結合に関わるリン酸化チロシン残基周辺のアミノ酸配列に違い（多型）が存在することが知られており、半定量的な解析から両者が異なる SHP2 結合能を有することが示されていました。しかしながら、CagA-SHP2 間の複合体形成がどのような構造基盤によって規定され、CagA の発がん生物活性に如何に影響を与えるのかという重要な問いに対する明確な解答は得られていませんでした。そこで本研究では東アジア型 CagA ならびに欧米型 CagA の各々に関し、SHP2 との複合体形成を担う立体構造を明らかにし、CagA の発がん活性の強さを規定する分子構造基盤の解明を目指しました。

研究グループは、表面プラズモン共鳴分析法（注 5）を用いて東アジア型 CagA ならびに欧米型 CagA と SHP2 間の結合の強さ（結合親和性）を定量的に測定しました。その結果、欧米型 CagA と比較し東アジア型 CagA は SHP2 に対して 100 倍以上高い結合能を示すことがわかりました。この結合の強さを反映し、東アジア型 CagA は SHP2 の脱リン酸化酵素活性を著しく増強する一方、欧米型 CagA の SHP2 活性化能は極めて弱いことが明らかになりました。

次に、東アジア型 CagA ならびに欧米型 CagA と SHP2 間の複合体形成の構造基盤を X 線結晶構造解析により三次元的に決定しました。東アジア型 CagA は、リン酸化チロシン残基から 5 残基下流の位置にフェニルアラニン（Phe）というベンゼン環を側鎖に保有するアミノ酸残基を有しますが、欧米型 CagA は同位置にアスパラギン酸（Asp）残基を有します。結晶構造から、東アジア型 CagA では、この Phe 残基の側鎖が SHP2 分子表面のくぼみにはまり込むことにより、リン酸化チロシン依存的な CagA-SHP2 結合を強く安定化するのに対し、欧米型 CagA の Asp 残基は SHP2 との結合安定化には全く寄与しないことを見出しました（図 2）。

さらに Phe 残基による結合の安定化が発がんに関わるピロリ菌 CagA の生物活性発揮に重要か否かを検討するため、東アジア型 CagA の Phe 残基を欧米型 CagA が同部位に保有する Asp 残基に置換した変異体を作製したところ、この CagA 変異体は著しい SHP2 結合能の低下を示し、発がん関連生物活性も欧米型 CagA と同等レベルにまで減弱しました。これに対し、欧米型 CagA の Asp 残基を東アジア CagA に特異的な Phe 残基へと置換することにより、SHP2 結合能の増大とともに、CagA の発がん関連生物活性は顕著に増強されました。

以上の結果から、ピロリ菌 CagA がタンパク質のある特定の一ヶ所のアミノ酸残基の違いにより CagA-SHP2 結合の強弱が決定され、東アジア型 CagA に強い発がん生物活性が付与される構造生物学的仕組みが明らかになりました（図 3）。これまでの我が国の歴史の中で、徳川家康、武田信玄、山岡鉄舟、桂太郎、伊藤整、尾崎紅葉、岩崎弥太郎、手塚治虫、越路吹雪、武見太郎などの著名人を含む多くの日本人の命がアスパラギン酸ではなくフェニルアラニンを保有する CagA により奪われてきたことになります。

ピロリ菌が有する CagA のタイプと胃がんの発症頻度の地域分布との関連は疫学調査から明らかにされていましたが、胃がん発症リスクの違いを生み出す原動力となる分子構造の理解には至っていませんでした。本研究では CagA のタイプによって発がん活性に差異が生じる仕組み

みを原子レベルのタンパク質立体構造から初めて明らかにしました。本研究で明らかにされた CagA-SHP2 結合の分子構造的な知見は胃がん発症メカニズムを科学的に理解するための基盤情報となるのみならず、胃がんの予防や早期病変の治療といった今後の革新的な臨床技術の開拓に役立つことが期待されます。

本研究は、科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業 CREST、文部科学省・科学研究費補助金、日本医療研究開発機構・次世代がん医療創生研究事業、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム事業ならびに創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業による支援の下に実施されました。

## 5. 発表雑誌：

雑誌名：「Cell Reports」 (アメリカ東部時間 9 月 19 日オンライン版)

論文タイトル：Differential Mechanisms for SHP2 Binding and Activation Are Exploited by Geographically Distinct *Helicobacter pylori* CagA Oncoproteins.

著者：Takeru Hayashi, Miki Senda, Nobuhiro Suzuki, Hiroko Nishikawa, Chi Ben, Chao Tang, Lisa Nagase, Kaori Inoue, Toshiya Senda\* and Masanori Hatakeyama\*

DOI 番号：10.1016/j.celrep.2017.08.080

アブストラクト URL：http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.080

## 6. 問い合わせ先：

東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 微生物学分野

教授 畠山 昌則 (はたけやま まさのり)

TEL：03-5841-3408 FAX：03-5841-3406

E-mail：mhata@m.u-tokyo.ac.jp

高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 構造生物学研究センター

教授 千田 俊哉 (せんだ としや)

TEL：029-879-6178

E-mail：toshiya.senda@kek.jp

## 7. 用語解説：

### 注1. ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）

ヒトの胃粘膜に慢性感染する病原細菌であり、世界人口の約半数に上る 30 億人に感染していると推定されています。ピロリ菌の感染は萎縮性胃炎ならびに胃潰瘍などの胃粘膜病変の原因であることが証明され、2005 年にはノーベル生理学・医学賞の授賞対象となりました。ピロリ菌は CagA タンパク質を産生する菌株と産生しない菌株に大別されます。さらに、産生される CagA のタイプは検出される地域によって異なり、日本を含む東アジアで見られる CagA は東アジア型 CagA と呼ばれ、世界中のその他の地域で見られる世界標準型 CagA（欧米型 CagA）とアミノ酸配列が一部異なることから区別されています。CagA 産生ピロリ菌は非産生菌と比較してより激しい萎縮性胃炎ならびに消化性潰瘍を引き起こし胃がんの原因となることが示されていますが、CagA 産生菌の中でも東アジア型 CagA 産生菌は欧米型 CagA 産生菌に比較して胃がん発症リスクをさらに上昇させることが報告されています。

### 注2. X線結晶構造解析

タンパク質に限らず様々な分子の立体構造を決定するための手法の 1 つです。通常溶液中で存在するタンパク質あるいはタンパク質複合体のなかには、特定の条件化で結晶を形成するものが存在します。その結晶に X 線を照射して得られる特殊な投影パターンを解析することにより、タンパク質の立体構造を原子レベルで可視化することが可能です。

### 注3. 発がんタンパク質 SHP2、N-SH2 ドメインならびに C-SH2 ドメイン

細胞運動・細胞増殖といった発がんに関与する細胞内シグナル伝達を促進するチロシン脱リン酸化酵素です。白血病をはじめとする多くの悪性腫瘍において、SHP2 タンパク質の設計図となる遺伝子の点突然変異による異常な酵素活性の亢進が報告されており、細胞の発がんプロセスに深く関わる発がんタンパク質として知られています。分子構造的な特徴として、チロシンリン酸化タンパク質との結合に関与する SH2 ドメインと呼ばれる構造ユニットが 2 つ並んだタンデム SH2 ドメインを保有します。分子内の相対的な位置関係から上流側の SH2 ドメインを N-SH2 ドメイン、下流側を C-SH2 ドメインと言い、さらにその下流に脱リン酸化酵素活性を担う触媒ドメイン（PTP ドメイン）を有します（図 3 参照）。

### 注4. 点突然変異

タンパク質の設計図となる遺伝子の一部に傷（情報の書き換え）が生じることを指します。その結果作られる変異型タンパク質の変異部位が元のタンパク質にとって機能的に重要である場合に、異常な機能獲得或いは機能欠損が生じます。

### 注5. 表面プラズモン共鳴分析法

金属と液体の界面に生じる微量な質量変化によって変動する表面プラズモン共鳴と呼ばれる物理現象を利用して任意の 2 分子間の結合の強さならびに結合の早さをリアルタイムで測定する方法です。タンパク質や核酸等の生体高分子あるいは薬剤等の低分子化合物といった様々な分子間の結合プロファイルを決定することができます。

## 8. 添付資料：

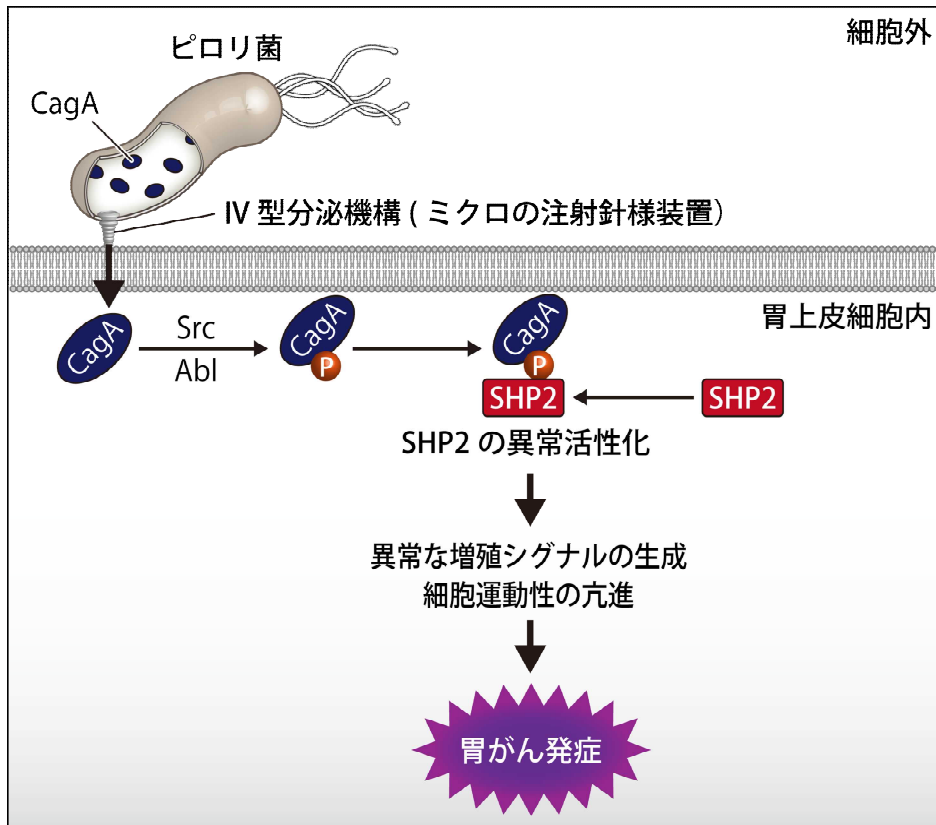


図1. ピロリ菌 CagA の胃上皮細胞内への侵入と細胞内シグナル攪乱

CagA タンパク質はピロリ菌の菌体内で産生され、菌の有する IV 型分泌機構と呼ばれるミクロの注射針様装置によりヒト胃上皮細胞内に注入されます。細胞内に侵入した CagA は、Src ファミリーキナーゼや Abl キナーゼによりチロシンリン酸化修飾を受けます（図中、「P」で表示）。リン酸化 CagA はチロシン脱リン酸化酵素 SHP2 と特異的に結合することで SHP2 の酵素活性を異常に亢進します。SHP2 は細胞増殖や細胞運動といった発がんに関与する細胞内シグナル伝達を促進する酵素です。先行研究から、CagA による胃発がんには SHP2 の活性亢進が重要であることが示されています。

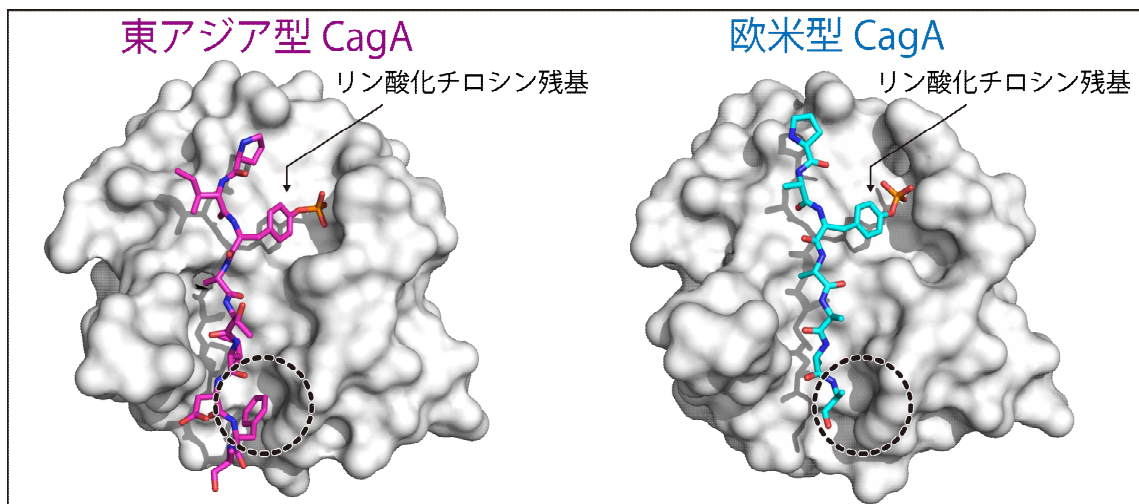


図2. 東アジア型 CagA ならびに欧米型 CagA と SHP2 との複合体の結晶構造

SHP2 の N-SH2 ドメイン（グレーの分子表面描画モデル）に結合した東アジア型 CagA（左、マゼンタ）ならびに欧米型 CagA（右、シアン）の立体構造を解明しました。点線の丸で囲った部位において、東アジア型 CagA ではリン酸化チロシン残基から 5 残基下流に位置するフェニルアラニン残基の側鎖（ベンゼン環）がくぼみにはまり込み、CagA-SHP2 複合体を安定化する様子が観察されました。これに対して同位置にアスパラギン酸残基を有する欧米型 CagA では同様の安定化構造が見られません。

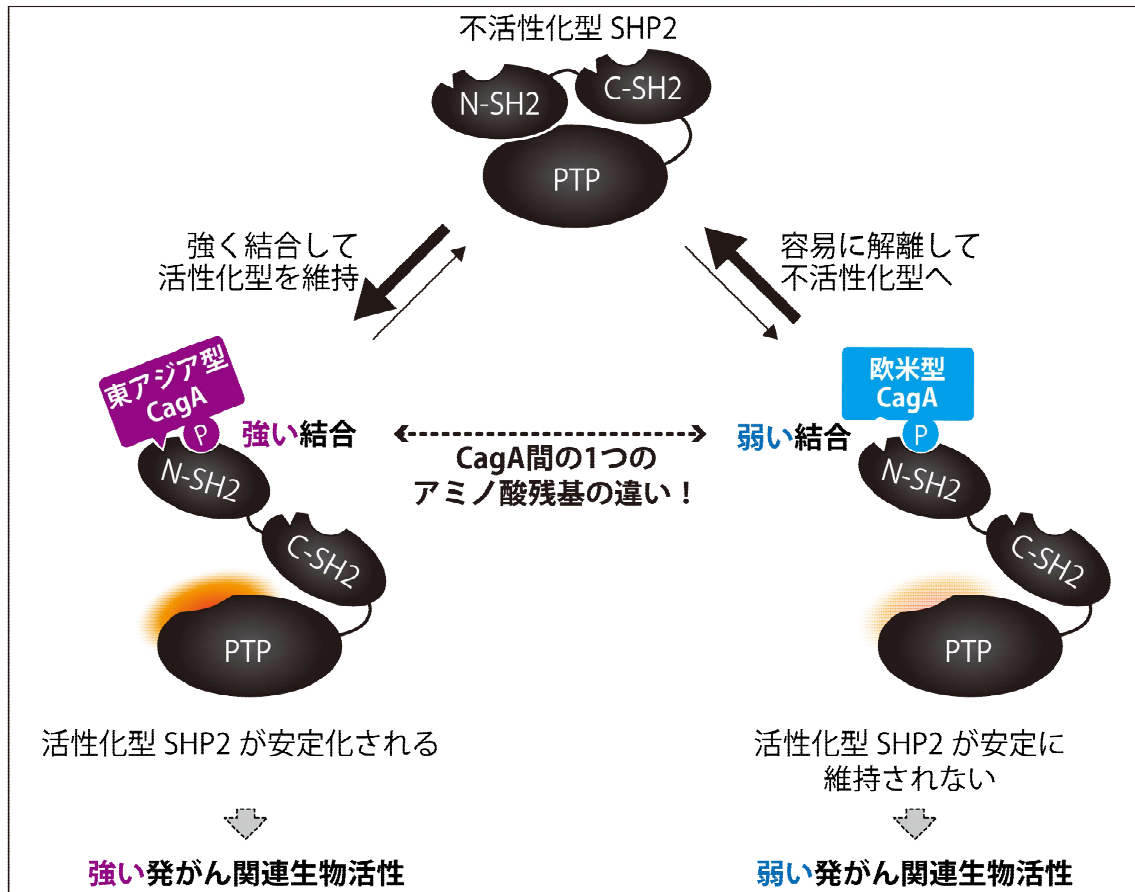


図3. 1 アミノ酸残基の違いにより増強される CagA の発がんシグナル誘導

SHP2 酵素は 2 つの SH2 ドメイン（N-SH2、C-SH2 ドメイン）と 1 つのチロシン脱リン酸化触媒ドメイン（PTP ドメイン）から構成されます。SHP2 は、結合パートナーが無い場合において同一分子内の N-SH2 ドメインによって酵素活性中心が覆われることにより「閉じた構造」を形成し不活性化型 SHP2 として存在します（中央上）。一方、東アジア型 CagA による強い SHP2 結合によって、PTP ドメインから N-SH2 ドメインが遊離し酵素活性中心が露出した「開いた構造」が安定化され、SHP2 は活性化します（左下）。これに対し、弱い SHP2 結合能を示す欧米型 CagA は SHP2 の活性化構造を安定化することができず、SHP2 酵素活性は低い状態で維持されます（右下）。本研究で明らかにした東アジア型 CagA と欧米型 CagA の間の 1 アミノ酸残基の置換による CagA-SHP2 複合体構造の違いが、結果として SHP2 の酵素活性に依存した CagA の発がん関連生物活性の強弱に大きな差を生じさせることが明らかになりました。