

幽门螺杆菌毒力因子 CagA 的生物活性取决于酪氨酸磷酸化位点的变化

Hideaki Higashi^{*}、Ryouhei Tsutsumi^{*}、Akiko Fujita^{*}、Shiho Yamazaki[†]、Masahiro Asaka[‡]、Takeshi Azuma[†] 和 Masanori Hatakeyama^{*§}

^{*}日本札幌 060-0815 北海道大学研究生院医学系研究生院遗传医学研究所分子肿瘤学研究室；日本福井 910-1193 福井医科大学第二内科医学部。

加利福尼亚州斯坦福大学 Stanley Falkow 编辑，2002 年 9 月 5 日批准（2002 年 6 月 24 日收到审阅件）

*幽门螺杆菌*是胃炎和消化性溃疡的致病菌。*cagA*⁺ *幽门螺杆菌*菌株比 *cagA*⁻ 菌株毒性更强，并与胃癌有关。*cagA* 基因产物 CagA 被细菌注入胃上皮细胞，随后发生酪氨酸磷酸化。磷酸化的 CagA 与 SHP-2 磷酸酶特异性结合，激活磷酸酶活性，从而诱导细胞发生形态转化。大多数西方*幽门螺杆菌*分离株的 CagA 蛋白具有 34 个氨基酸序列，不同菌株之间的重复序列各不相同。在这里，我们发现该重复序列包含一个酪氨酸磷酸化位点。研究发现，重复序列越多的 CagA 蛋白，其酪氨酸磷酸化程度越高，与 SHP-2 的结合力越强，诱导的形态变化也越大。与此相反，在胃癌盛行的东亚地区分离出的*幽门螺杆菌*菌株所特有的主要 CagA 蛋白在与西方 CagA 蛋白重复序列相对应的区域具有独特的酪氨酸磷酸化序列。这种东亚特异性序列赋予西方 CagA 更强的 SHP-2 结合力和形态转化活性。最后，我们确定了一个决定不同 CagA 蛋白之间 SHP-2 结合活性的关键氨基酸残基。我们的研究表明，单个 CagA 干扰宿主细胞功能的潜力取决于 SHP-2 结合活性的程度，而 SHP-2 结合活性又取决于酪氨酸磷酸化位点的数量和序列。西方和东亚的*幽门螺杆菌*分离物中存在结构不同的 CagA 蛋白，这可能是这两个地区胃癌发病率截然不同的原因。

A 全球至少有一半人口的胃中存在螺旋状革兰氏阴性微嗜酸细菌--*幽门螺旋杆菌*。它导致慢性炎症，常常与萎缩性胃炎和消化性溃疡病有关。流行病学研究表明，*幽门螺杆菌*慢性感染是胃癌发病的重要危险因素，动物实验也证实了这一点（1-5）。因此，世界卫生组织将*幽门螺杆菌*列为一级致癌物。功能性 *cag* 致病性岛（*cagPAI*）是整合在*幽门螺杆菌*染色体上的一个 40 kb DNA 片段（6，7），它的存在与粘膜炎症所测量的毒力增强有关（8，9）。*cagPAI* DNA 片段包含以下基因

构成 IV 型分泌装置，以及 *cagA*

该基因编码~145-kDa 的 CagA 蛋白（6、7、10）。与 *cagA*⁻ *幽门螺杆菌*菌株相比，*cagA*⁺ 菌株会显著增加患严重胃炎和胃癌的风险（11-13）。

（14，15）。在细菌与胃上皮细胞相互作用的过程中，*幽门螺杆菌*通过细菌 IV 型分泌装置将 CagA 直接注入附着细胞（16-19）。转运的 CagA 蛋白定位于质膜内表面，随后在宿主细胞中被 Src 家族蛋白酪氨酸激酶进行酪氨酸磷酸化（20，21）。我们最近发现，CagA 以酪氨酸磷酸化依赖的方式与含 Src 同源体 2（SH2）的酪氨酸磷酸酶 SHP-2 结合，并刺激 SHP-2 的磷酸酶活性（22）。酪氨酸磷酸化的 CagA 对 SHP-2 的膜拴系和激活是诱导蜂鸟表型的必要且充分条件。由于 SHP-2 在细胞生长和细胞运动中发挥重要作用，CagA 对 SHP-2 的失调可能参与诱导胃上皮细胞的异常增殖和运动，这种细胞状况最终会导致胃炎和胃癌。

虽然 CagA 是*幽门螺杆菌*的毒力因子，但 CagA 的存在并不足以预测*幽门螺杆菌*感染的疾病结果。结构分析表明，不同菌株的 CagA 蛋白大小不同（10、23-25）。大小变化与位于 CagA C 端区域的重复序列数量不同有关，还涉及重复区域内外的氨基酸序列多样性。这些序列变异提出了一个令人感兴趣的可能性，即不同菌株的 CagA 的生物活性可能不同，这可能会影响不同 *cagA*⁺ *幽门螺杆菌*菌株的致病性。

在这里，我们发现单个 CagA 干扰宿主细胞功能的潜力取决于 SHP-2 结合活性的程度，而这又取决于酪氨酸磷酸化位点的数量和序列。我们还提供证据表明，东亚国家流行的 CagA 蛋白在结合 SHP-2 和诱导细胞形态逻辑变化方面的作用明显强于西方分离的 CagA 蛋白。西方和东亚 CagA 蛋白的生物活性差异可能是这两个地区胃癌发病率存在显著差异的原因。

材料与方法

表达载体构建体。*cagA* 基因是从*幽门螺杆菌*标准菌株 NCTC11637 中分离出来的，并在 C- 末端进行了血凝

*幽门螺杆菌*至少部分是通过与目标胃上皮细胞直接接触来激发其病理活性的。值得注意的是，幽门螺杆菌会诱导一种类似于生长因子的细胞形态变化，这种变化被称为蜂鸟表型

，其特征是细胞急剧伸长，这种变化是通过 *cagA*⁺ 而非 *cagA*⁻ 幽门螺杆菌菌株附着在细胞上而发生的。

本论文直接提交给《美国国家科学院院刊》（PNAS）办公室（二轨道）。

缩写：缩写：HA，血凝素；WSS，西方 CagA 特异序列；ESS，东亚 CagA 特异序列；SH2，Src 同源 2；PY，磷酸酪氨酸。

数据存档：The sequences reported in this paper have been deposited in the GenBank database (accession nos.AB090073-AB090075、AB090079-AB090081、AB090085、AB090087-AB090089、AB090091-AB090098、AB090100、AB090101、AB090103-AB090105、AB090107-AB090113、AB090115、AB090117-AB090127、AB090129、AB090132-AB090139 和 AB090141-AB090154)。

§通信地址：日本札幌市北区北15西7号北海道大学遗传医学研究所分子肿瘤学部：地址：日本札幌市北区北15西7，札幌 060-0815，北海道大学遗传医学研究所分子肿瘤学部。电子邮件：mhata@imm.hokudai.ac.jp.

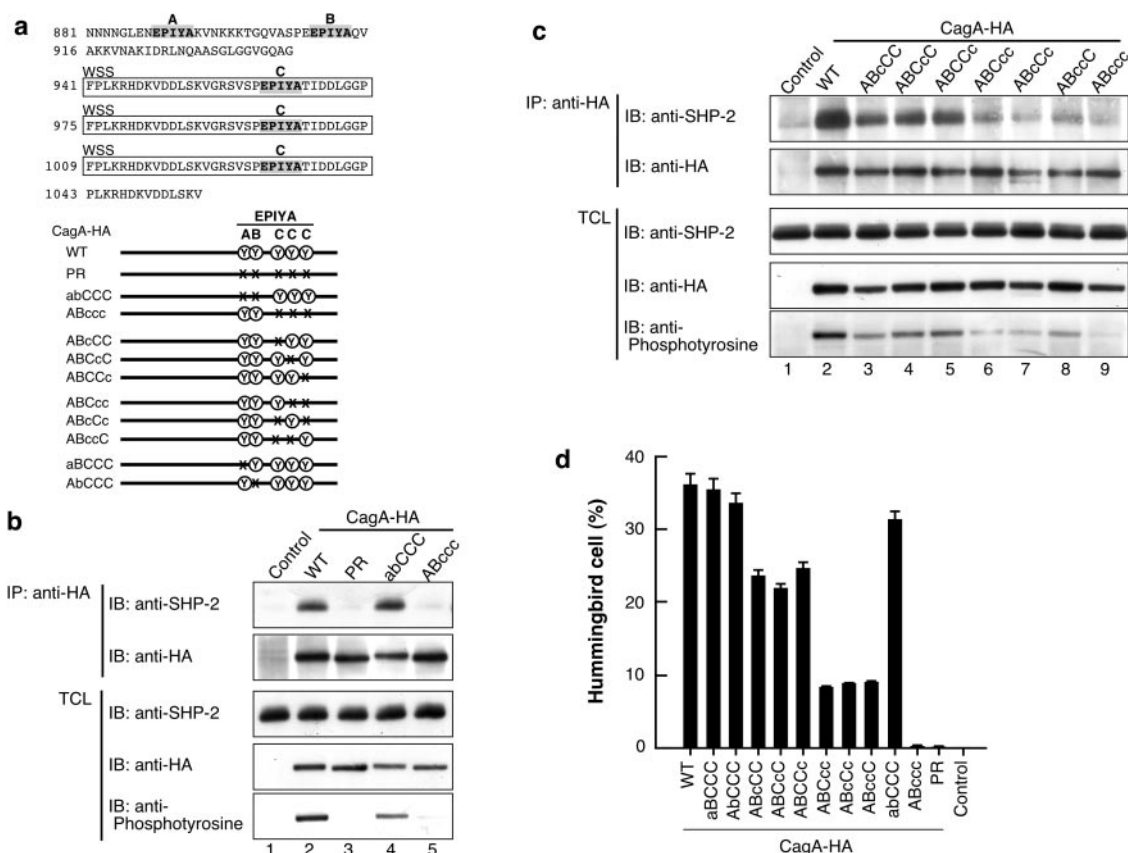


图 1.鉴定 CagA 的酪氨酸磷酸化位点及其在 SHP-2 结合和形态转化中的作用。(a) NCTC11637 CagA 中存在的 EPIYA 基序 (上图) 和 EPIYA 突变体的示意图 (下图)。Western CagA 特异序列 (WSS) 的三个重复序列分别置于方框内。所有 CagA 构建物均为 C 端 HA 标记。WT: WT 11637-CagA; PR: 磷酸化抗性 CagA。b 和 c) 用 WT-CagA、EPIYA 突变体或对照载体转染 AGS 细胞。然后用抗-HA 从细胞裂解液中免疫沉淀 CagA 蛋白。免疫沉淀物 (IP) 和总细胞裂解液 (TCL) 用所述抗体进行免疫印迹 (IB)。(d) 用 CagA WT 或 EPIYA 突变体的表达载体瞬时转染 AGS 细胞。对出现蜂鸟表型的细胞进行计数。

或 Flag 表位标记。通过使用 Cha-meleon 定点诱变试剂盒 (Stratagene), 从 HA 标记的 11637-CagA 生成 CagA 突变体。如前所述 (22), 人 SHP-2 cDNA 被标记为 Myc 表位。为了禁用 SHP-2 的 N 端 SH2 结构域 (SHP-2-SH2ΔN- Myc), 将 Arg-32 (R32) 和 His-53 (H53) 改为丙氨酸残基。同样, R138 和 H169 也被丙氨酸取代, 以禁用 C 端 SH2 结构域功能 (SHP-2-SH2ΔC- Myc)。用丙氨酸残基取代 R32、H53、R138 和 H169 后, 产生了 SHP-2-SH2ΔNC-Myc。DNA 被插入 PSP65SRA 哺乳动物表达载体。除另有说明外, 所有 CagA 构建物均为 HA 表位标记。

细胞培养和转染。人 AGS 胃上皮细胞和猴 COS-7 细胞分别在含 10% (体积分数) FBS 的 RPMI 培养基 1640 和 DMEM 中培养。按照描述 (22) 将 CagA 和 SHP-2 表达载体转染到细胞中。按照生产商的操作规程, 使用 30 μL Lipofectamine 2000 试剂 (Invitrogen 公司) 将 30 μg 质粒转染到 AGS 细胞 (1.8×10^6 个细胞) 中。用磷酸钙法将 20 μg 质粒转染 COS-7 细胞 (1.5×10^6 个细胞)。转染后 17 小时观察 AGS 细胞的形态。用 WT 或突变型 CagA 的表达载体瞬时转染 AGS 细

胞 ($n = 3$)。在三个培养皿中的每个培养皿的 10 个不同区域 (一个区域的面积 = 0.25 平方毫米) 对出现蜂鸟表型的细胞进行计数。

抗体。HA 表位特异性多克隆抗体 Y-11 (Santa Cruz) 和抗 HA 单克隆抗体 12CA5 分别用作免疫印迹和免疫沉淀 HA 标记 CagA 的一抗。抗霉单克隆抗体 9E10 和抗旗单克隆抗体 M2 (Sigma) 用于免疫印迹和免疫沉淀。抗磷酸化酪氨酸单克隆抗体 4G10 购自 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY), 用于免疫印迹。

免疫沉淀和免疫印迹。转染后 36 小时收获 AGS 或 COS-7 细胞, 并在含有 2 mM Na VO₃₄、2 mM PMSF、10 µg/ml leupeptin、10 µg/ml trypsin inhibitor 和 10 µg/ml aprotinin 的裂解缓冲液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5/100 mM NaCl/5 mM

EDTA/1% Brij-35) 中裂解。

(22). 用适当的抗体处理细胞裂解物, 然后将免疫复合物截留在蛋白 A 或蛋白 Gephrose 微珠上。免疫沉淀物经 SDS/PAGE 检测。转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜滤器上的蛋白质在含有 0.6% Tween-20、1% 脱脂奶和 0.1% BSA 的 PBS 中与 0.3 µg/ml 的一抗 (抗-HA、抗-SHP-2、抗-Myc 或抗- 磷脂酰酪氨酸抗体) 或 6 µg/ml 的一抗 (抗-Flag 抗体) 孵育, 然后用 Western Blot 化学发光试剂 (NEN) 显色。使用发光图像分析仪 (LAS-1000, Fuji) 对印迹滤光片上的化学发光强度进行量化。

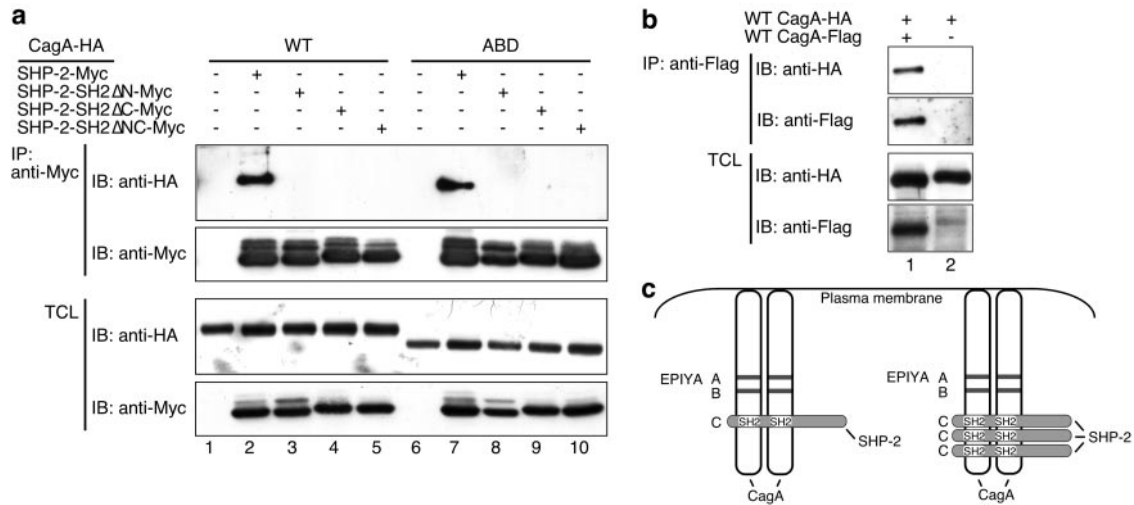


图 2. SHP-2 SH2 结构域在 SHP-2 与 CagA 相互作用中的作用。(a) 用 HA 标记的 CagA 和 Myc 标记、WT 或缺少一个或两个功能 SH2 结构域的突变体 SHP-2 的表达载体共转染 COS-7 细胞。用抗-Myc 对细胞裂解液进行免疫沉淀 (IP)。免疫沉淀物和细胞总裂解液 (TCL) 用指定抗体进行免疫印迹 (IB)。在 SH2ΔN-Myc、SH2ΔC-Myc 和 SH2ΔNC-Myc 中, N-SH2 结构域、C-SH2 结构域和两个 SH2 结构域分别失活。WT: WT 11637-CagA。ABD 变体由 WT 11637-CagA 的整个 EPIYA 区域替换为 F32-CagA 的 EPIYA 区域而产生。(b) 用 HA 标记 CagA 和 Flag 标记 CagA 的表达载体共转染 COS-7 细胞。细胞裂解液与抗 Flag 进行免疫沉淀 (IP)。免疫沉淀物和细胞总裂解液 (TCL) 用指定抗体进行免疫印迹 (IB)。(c) CagA-SHP-2 相互作用模型。

成果

鉴定 CagA 含 EPIYA 重复序列中的体内酪氨酸磷酸化位点。 *幽门螺杆菌* 标准菌株 NCTC11637 的 CagA 蛋白 (11637-CagA, 见图 5, 作为佐证信息发表在 PNAS 网站 www.pnas.org 上) 具有五个谷氨酸-脯氨酸-异亮氨酸-酪氨酸-丙氨酸 (EPIYA/D1/R1) 基序, 这些基序是酪氨酸磷酸化的潜在靶点 (10, 23)。11637-CagA 的磷酸化在 WT 而非突变体中被观察到, 在突变体中, 所有 EPIYA 基团中的酪氨酸残基都被丙氨酸取代 (22)。这一结果表明, 至少有一个 EPIYA 基团在体内被磷酸化。此外, 酪氨酸磷酸化对于 CagA 与 SHP-2 的相互作用至关重要。

首先, 我们想知道哪一个或哪几个 EPIYA 基团被 phosphorylated 并参与体内 SHP-2 的结合。第一个和第二个 EPIYA 基序 (分别命名为 EPIYA-A 和 EPIYA-B) 存在于几乎所有 *幽门螺杆菌* 分离株指定的 CagA 蛋白中, 而其余三个 EPIYA 基序 (EPIYA-C) 则是通过重复含有 34 个氨基酸的 EPIYA 序列片段而形成的 (10)。由于在欧洲、美国和澳大利亚等西方国家分离出的大多数 *幽门螺杆菌* 的 CagA 蛋白中, 该序列以 0 至 3 的不同编号存在 (图 5 和表 1, 作为佐证信息发表在 PNAS 网站上; 参考文献 23-25), 我们将其命名为 EPIYA-C。23-25), 我们将其命名为 "西方 CagA 特异序列" (WSS; 图 1a)。Western 分离物携带的主要 CagA 蛋白只有一个 WSS, 因此被归类为 EPIYA-A-B-C 型 (23, 24), 而 11637-CagA 被归类为 EPIYA-A-B-C-C 型, 因为它有三个重复的 WSS。

为了确定酪氨酸在体内的磷酸化位点

从 11637-CagA 到 Western CagA, 我们生成了 EPIYA 突变体 abCCC 和 ABccc (图 1a)。在 abCCC 突变体中, EPIYA-A 和 EPIYA-B 被转换成抗磷酸化的 EPIAA 序列。同样, 三个 EPIYA-C 基序也被 EPIAA 取代, 形成 ABccc 突变体。在 AGS 细胞中, abCCC 被有效地磷酸化, 而 ABccc 没有被磷酸化 (图 1b), 这表明 EPIYA-C 中的酪氨酸残基在磷酸化过程中起着重要作用。

在 AGS 细胞中，WSS 的基团是 Western CagA 的主要（如果不是唯一）体内磷酸化位点。最近，Backert 等人和 Stein 等人也报告了类似的结论（20, 26）。接下来，我们生成了一系列 11637-CagA 突变体，其中三个 EPIYA-C 基序以所有可能的组合被转化为 EPIAA（图 1a）。在 AGS 人胃上皮细胞中表达时，CagA 磷酸化水平与 EPIYA-C 的数量成正比，但与 EPIYA-C 的位置无关（图 1c），这表明 11637-CagA 中的三个 EPIYA-C 基序在 AGS 细胞中的磷酸化水平相同。

酪氨酸磷酸化位点数量、SHP-2 结合活性与 CagA 的蜂鸟表型诱导之间的相关性。 CagA 以酪氨酸磷酸化依赖的方式结合 SHP-2（22）。结合后，CagA 会激活 SHP-2，并诱导胃上皮细胞出现被称为蜂鸟表型的高度拉长的细胞形态（22）。为了确定 CagA 磷酸化程度与 CagA 生物活性之间的关系，我们

研究了 SHP-2 复合物的形成和 EPIYA 突变体诱导的蜂鸟表型。不出所料，未发生酪氨酸磷酸化的 ABccc 未能与 SHP-2 结合。相反，具有单个 EPIYA-C 的 CagA 蛋白在接受酪氨酸磷酸化的同时，能够与 SHP-2 结合。EPIYA-C 数量的增加导致 CagA 磷酸化程度提高，从而显著增加了 CagA-SHP-2 复合物的形成，并增强了 CagA 诱导蜂鸟表型的能力（图 1c 和 d）。因此，在西方 CagA 蛋白中，EPIYA-C 的数量因 WSS 复制而增加，是 CagA 作为毒力因子干扰细胞信号传递的关键决定因素。

SHP-2 的 SH2 结构域参与 CagA 结合。 SHP-2 有两个 SH2 结构域，即 N-SH2 和 C-SH2，每个结构域都能独立结合含磷酸酪氨酸的肽（27）。观察到带有单个 EPIYA-C 的 CagA 仍能与 SHP-2 结合，这表明占据 SHP-2 两个 SH2 结构域中的一个就足以在 CagA 和 SHP-2 之间形成复合物。出乎我们意料的是

然而，通过引入点突变使其中一个 SH2 结构域失活，就会取消 SHP-2 与 CagA 结合的活性（图 2a）。这一结果表明，与 CagA 形成稳定的复合物需要两个 SH2 结构域。有鉴于此，我们想知道宿主细胞中的 CagA 蛋白是否以二聚体等多聚体形式存在。为了解决这个问题，我们进行了共转染实验，发现 HA 标记的 CagA 和 Flag 标记的 CagA 能够在细胞内形成物理复合物（图 2b）。这一结果表明，单个 SHP-2 蛋白可通过其两个 SH2 结构域与酪氨酸磷酸化的 CagA 二聚体同时相互作用，形成稳定的复合物（图 2c）。由于异位共表达 SHP-2 并未增加 CagA-CagA 复合物的形成，因此 CagA 的寡聚似乎并不需要 SHP-2（数据未显示）。

东亚 CagA 独特的酪氨酸磷酸化序列的鉴定和特征。东亚国家是世界上胃癌发病率最高的国家之一，在这些国家中分离出的幽门螺杆菌菌株所特有的 CagA 蛋白的氨基酸序列与西方 CagA 蛋白的氨基酸序列有很大不同（23-25，28-30）。最值得注意的是，东亚主要的 CagA 蛋白不具有 WSS，而是在相应区域具有我们命名为“东亚 CagA 特异序列（ESS）”的独特序列（图 3a，另见图 5；参考文献 23 和 24）。这一观察结果提出了一种耐人寻味的可能性，即东亚 CagA 在功能上并不等同于西方 CagA，这种差异可能会影响不同 *cagA*⁺ 的致病性和临床结果。

*幽门螺杆菌*菌株。

针对上述可能性，我们希望确定东亚 CagA 蛋白的酪氨酸磷酸化位点，因为它们没有 WSS。耐人寻味的是，ESS 具有一个 EPIYA 基序，即 EPIYA-D，而且 ESS 的 EPIYA-D 上的序列与 WSS 的 EPIYA-C 上的序列高度同源（图 3a）。这些序列信息表明，EPIYA-D 会发生酪氨酸磷酸化，随后构成东亚 CagA 特有的 SHP-2 结合位点。为了确定 EPIYA-D 是否确实是这样一个位点，我们生成了一个 11637-CagA 突变体 ABD，其中整个 EPIYA 区域（从残基 868 到残基 1,086，包含 EPIYA-A、EPIYA-B 和三个 EPIYA-C 基序）被 F32-CagA 区域（从残基 856 到残基 1,012，包含 EPIYA-A、-B 和 -D 基序；见图 6）取代。见图 6，该图作为佐证信息发表在美国国家科学院院刊网站上）。我们还生成了一系列 ABD 衍生物：aBD、AbD 和 ABd，其中每个 EPIYA 都被 EPIAA 取代。在 AGS 细胞中表达后，ABD 在 EPIYA-D 的酪氨酸残基上发生磷酸化（图 3b）。这种酪氨酸磷酸化是 ABD 与 SHP-2 相互作用的必要先决条件（图 3b），同样，这种结合也需要 SHP-2 的两个 SH2 结构域（图 2a）。为了直接比较 ESS 和 WSS 的 SHP-2 结合活性，SHP-2 与 ABD（1xESS）、ABCcc（1xWSS）、ABcCc（1xWSS）、ABCCc

（2xWSS）或 WT 11637-CagA（3xWSS）进行了检测（图 3c）。在 AGS 细胞中，ABD 的酪氨酸磷酸化水平明显低于 WT 11637-CagA 或 ABCCc 的水平，但与 ABCcc 或 AbcCc 的水平相当，这表明 ESS 和 WSS 在 AGS 细胞中的磷酸化能力相当。另一方面，ABD 与 SHP-2 形成复合物的能力大大高于任何测试类型的 Western CagA，包括具有 3 倍 WSS 的 11637-CagA（图 3c）。这一结果表明，ESS 的 SHP-2 结合亲和力明显高于 WSS。

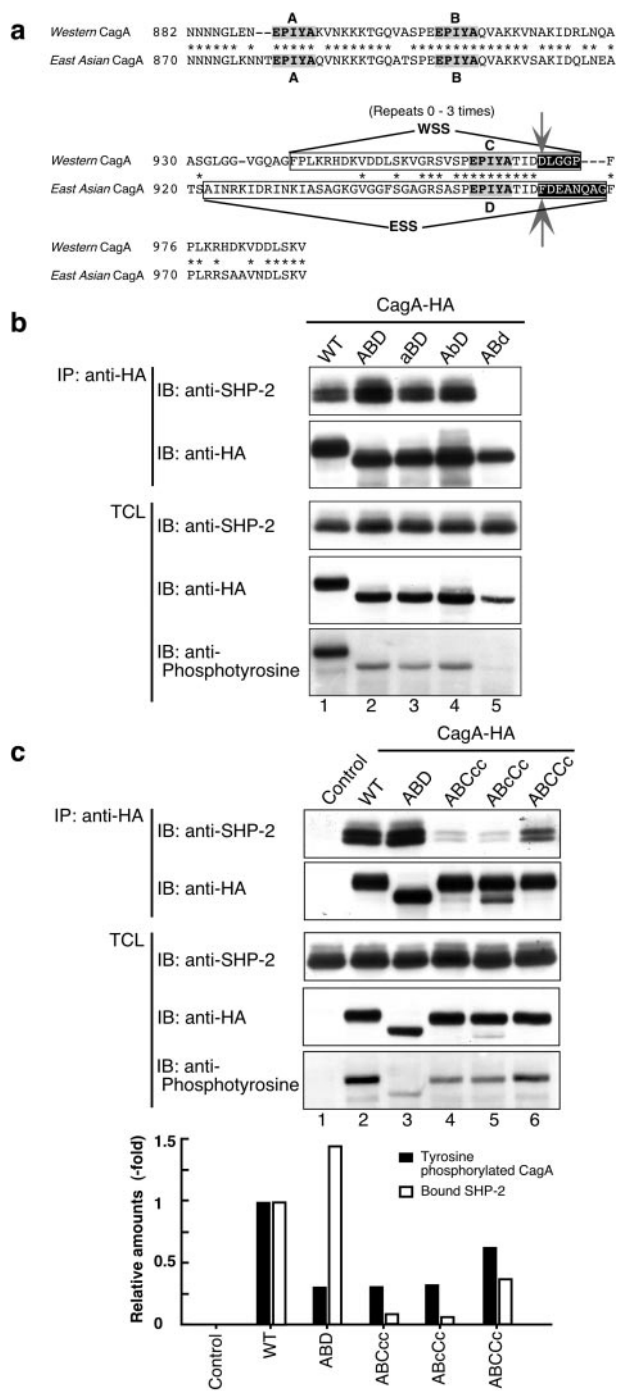


图 3. 东亚 CagA 酪氨酸磷酸化特异序列的鉴定和功能表征。(a) 西方 (11637 株) 和东亚 CagA 蛋白 EPIYA 区域的序列比对。西方 CagA 特异序列 (WSS) 和东亚 (F32 株) CagA 特异序列 (ESS) 被框住。EPIYA-C 和 EPIYA-D C 端区域的非保留残基为黑框。箭头表示为生成 CagA 的 ABC970DFcc 和 ABD961FD 突变体而替换的残基。b 和 c) 用 WT-CagA、EPIYA 突变体或对照空载体转染 AGS 细胞。用抗-HA 免疫沉淀细胞裂解液中的 CagA 蛋白。免疫沉淀物 (IP) 和总细胞裂解液 (TCL) 用所述抗体进行免疫印迹 (IB)。各 CagA 变体的蛋白表达水平与抗-HA 免疫印迹的条带强度进行归一化。酪氨酸磷酸化的 CagA (黑条) 和 CagA 结合的 SHP-2 (白条) 的相对量以 WT 11637-CagA 的值为 1 计算。aBD、AbD 和 ABd 变体是由 ABD 分别用丙氨酸残基取代构成 EPIYA-A、-B 和 -D 的酪氨酸残基生成的。

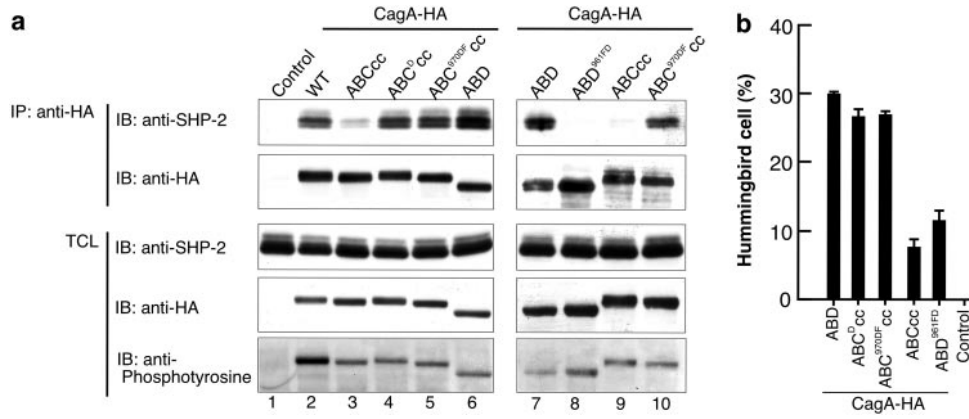


图 4. 参与 SHP-2 相互作用的 CagA 氨基酸序列的划分。(a) AGS 细胞转染指定的 CagA 表达载体。然后用抗-HA 从细胞裂解液中免疫沉淀 WT 或突变的 CagA 蛋白。免疫沉淀物 (IP) 和总细胞裂解液 (TCL) 用所述抗体进行免疫印迹 (IB)。用来自 F32-CagA 相应区域的 8-aa 序列替换紧随磷酸酪氨酸 (pY) 之后的 5-aa 序列, 制成 ABCcc 的 ABCDcc 突变体 (见图 3a, 黑框序列)。ABCcc 的点突变体 ABC^{970DF}cc 是用苯丙氨酸取代 pY + 5 位置的天冬氨酸, 以模拟 ESS 序列 (图 3a 箭头)。反过来, 用天冬氨酸取代 ABD 在 pY + 5 位置的苯丙氨酸来模拟 WSS, 从而制成 ABD^{961FD}。(b) 然后检查用于诱导蜂鸟表型的 AGS 细胞。

在结构不同的 CagA 蛋白中确定 SHP-2 结合亲和力的氨基酸残基的划分。SH2 结构域可识别由磷酸酪氨酸 (pY) 和几个 C 端残基组成的磷酸肽基团。有鉴于此, 我们通过替换紧随 pY 之后的五个残基 (即 pY + 1 至 pY + 5 位置), 从 ABCcc 生成了 ABCDcc, 它代表了具有单一 WSS 的主要西方 CagA 蛋白。

+5) 与来自 F32-CagA 相应区域的 8 个氨基酸序列 (见图 3a, 黑框序列)。我们还生成了 ABCcc 的点突变体 ABC^{970DF}cc, 其中 pY + 5 位置的天冬氨酸残基是 WSS 与 ESS 在 C 端距 pY 的五个残基内唯一不同的氨基酸, 我们用苯丙氨酸取代了该残基, 以模拟 ESS 序列 (图 3a 箭头)。反过来, ABD^{961FD} CagA 突变体是用天冬氨酸取代 pY + 5 位上的苯丙氨酸残基来模拟 WSS。在 AGS 细胞中表达时, ABCDcc、ABC^{970DF}cc 和 ABD^{961FD} 发生酪氨酸磷酸化的水平与具有单个磷酸化位点的 ABCcc 或 ABD 相似, 但明显低于具有三个磷酸化位点的 11637-CagA (图 4a)。尽管如此, 与 ABCcc 的复合物形成活性相比, ABCDcc 和 ABC^{970DF}cc 与 SHP-2 形成复合物的能力要强得多 (图 4a)。事实上, 它们的 SHP-2 结合活性甚至高于 11637-CagA。另一方面, 与 ABD 相比, ABD^{961FD} 与 SHP-2 的结合大大减少。因此, 西方 CagA 与东亚 CagA 之间不同的 SHP-2 结合活性可归因于 pY + 5 位的氨基酸差异。最后, 我们比较了这些 CagA 衍生物对蜂鸟表型的诱导作用。不出所料, 与 SHP-2 结合活性较弱的衍生物 (ABCcc 和 ABD^{961FD}) 相比, SHP-2 结合活性较强的衍生物 (ABD、ABC^{970DF}cc 和 ABCDcc) 诱导蜂鸟表型的活性要强得多 (图 4b)。这一发现表明, 与大多数西方 CagA 蛋白相比, 东亚流行的 CagA 蛋白在扰乱宿主细胞信号传导途径方面具有更强的生物活性。

讨论

我们在这项工作中证明, CagA 在发生酪氨酸磷酸化、SHP-2 结合和诱导细胞形态变化的潜力方面具有异质性。

不同 CagA 蛋白之间的生物多样性是由该分子中酪氨酸磷酸化位点的数量和序列变化造成的。西方国家（如欧洲、美洲和澳大利亚）分离出来的*幽门螺杆菌*菌株所特有的 CagA 蛋白的特点是存在一个称为 WSS 的 SHP-2 结合序列。西方分离株中的主要 CagA 蛋白只有一个 WSS，而有些则有两个或三个 WSS 重复序列，这些重复序列是由 C 端重复区域的序列复制形成的（10, 23-25）。我们的研究表明，WSS 中构成 EPIYA 矩阵的酪氨酸残基会发生磷酸化，并成为 SHP-2 的 SH2 结构域的对接口。因此，具有大量 WSS 的 CagA 蛋白的生物活性预计会高于具有少量 WSS 的 CagA 蛋白，因为它们能更有效地与 SHP-2 磷酸化酶相互作用，更严重地干扰 SHP-2 依赖性信号通路。CagA 诱导蜂鸟表型（CagA 生物活性的标志）的能力与 WSS 数量成正比，这一观察结果有力地支持了上述观点。这种比例关系反过来又表明，根据 CagA 的生物活性，存在着不同毒力水平的 *cagA*⁺ *幽门螺杆菌*菌株。我们的结论与最近的流行病学研

究结果高度一致，这些研究表明，携带多重复序列 CagA 蛋白的*幽门螺杆菌*菌株与严重的胃粘膜萎缩、肠化生和胃癌有关（23, 24）。

与以存在 WSS 为特征的西方 CagA 蛋白不同，分离自日本和韩国等东亚国家的*幽门螺杆菌*菌株所特有的流行 CagA 蛋白在与 WSS 相对应的区域具有称为 ESS 的独特序列。用 ESS 取代 WSS 可赋予西方 CagA 蛋白更强的 SHP-2 结合活性和更高的形态转化活性。因此，我们的结果表明，WSS 是一个低亲和力的 SHP-2 结合位点，而 ESS 则是一个高亲和力的 SHP-2 结合位点。大多数 Western CagA 蛋白的活性较低，因为它们只有一个 WSS，只能微弱地结合 SHP-2，而一些具有多个 WSS 的 CagA 蛋白则表现出更高的 SHP-2 结合活性，因此比那些只有一个 WSS 的蛋白更活跃。与此相反，在东亚流通的主要 CagA 蛋白在 ESS 中具有一个高亲和力的 SHP-2 结合位点，其生物活性高于大多数（如果不是全部的话）西方 CagA 蛋白。CagA-SHP-2 相互作用需要 SH2

结构域。De Souza 和同事 (31) 最近报告说, SHP-2 的两个 SH2 结构域与高度相关的序列结合, SHP-2 的 N 和 C-SH2 结构域的配体结合共识基序为 pY-(S/T/A/V/I)-X-(V/I/L)-X-(W/F)。耐人寻味的是, 该共识结构完全符合东亚 CagA 的 SHP-2 结合位点 pY-A-T-I-D-F。此外, 用任何其他氨基酸 (如西方 CagA 中 WSS 的天冬氨酸) 替换 W/F 的 pY + 5 位点, 都会降低与 SHP-2 的结合亲和力。因此, 在 CagA 蛋白的 WSS 和 ESS 之间观察到的不同的 SHP-2 结合活性是由 pY + 5 位上的单个氨基酸的差异造成的。本研究中提出的参与 SHP-2 结合的关键氨基酸残基的鉴定可能对幽门螺杆菌感染具有重要的临床价值, 因为它使我们能够根据 CagA 序列预测单个 cagA⁺ 菌株的毒力。

我们为 CagA-SHP-2 的相互作用提出了一个以前未曾描述过的模型: 单个 SHP-2 能够结合两个酪氨酸磷酸化的 CagA 蛋白。这一模型基于以下观察结果: SHP-2 与具有单个酪氨酸磷酸化位点的 CagA 的相互作用需要 SHP-2 的 N- 和 C-SH2 结构域, 最近的研究也支持了这一观点。

如上所述 (31), 发现两个 SH2 结构域都能识别非常相似的酪氨酸磷酸化序列。显然, 该模型并不排除 SHP-2 分子也能结合具有两个或更多 WSS 的单个 CagA 蛋白的可能性, 一旦它们被酪氨酸磷酸化。无论是哪种情况, SHP-2 的两个 SH2 结构域同时占据都可能会稳定 CagA-SHP-2 复合物, 并有效地刺激 SHP-2 磷酸酶的活性, 正如已有报道所指出的那样 (22, 32-35)。我们的研究表明, 结构上的差异与东亚和西方 CagA 蛋白的功能差异密切相关。在胃癌发病率居世界前列的日本和韩国等东亚国家, 携带生物活性更强的 CagA 蛋白的幽门螺杆菌种群在当地流行, 这可能与增加这些国家的胃癌发病风险有关。

这些地理区域。

我们感谢罗伯特-A-温伯格博士 (Dr. Robert A. Weinberg) 对手稿的严格审阅。这项工作得到了日本文部科学省科学研究补助金、人类前沿科学计划组织研究补助金、日本勃林格殷格翰公司老龄化虚拟研究所补助金以及秋山基金会补助金的支持。

- Huang, J. Q., Sridhar, S., Chen, Y. & Hunt, R. H. (1998) *Gastroenterology* **114**, 1169-1179.
- Danesh, J. (1999) *Aliment. Pharmacol. Ther.* **13**, 851-856.
- Watanabe, T., Tada, M., Nagai, H., Sasaki, S. & Nakao, M. (1998) *Gastroenterology* **115**, 642-648.
- Honda, S., Fujioka, T., Tokieda, M., Satoh, R., Nishizono, A. & Nasu, M. (1998) *Cancer Res.* **58**, 4255-4259.
- Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N. & Schlemper, R. J. (2001) *N. Engl. J. Med.* **345**, 784-789.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R. & Covacci, A. (1996) *Proc. Natl. USA* **93**, 14648-14653.
- Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Kersulyte, D., Crabtree, J. E., Youree, B. E., Reece, C. A., Bukanov, N. O., Drazek, E. S., Roe, B. A. & Berg, D. E. (1998) *Mol. Microbiol.* **28**, 37-53.
- Kuipers, E. J., Perez-Perez, G. I., Meuwissen, S. G. & Blaser, M. J. (1995) *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 1777-1780.
- Peek, R. M., Jr., Miller, G. G., Tham, K. T., Perez-Perez, G. I., Zhao, X., Atherton, J. C. & Blaser, M. J. (1995) *Lab. Invest.* **73**, 760-770.
- Covacci, A., Censini, S., Bugnoli, M., Petracca, R., Burrioni, D., Macchia, G., Massone, A., Papini, E., Xiang, Z., Figura, N., et al. (1993) *Proc. Natl.* **90**, 5791-5795.
- Blaser, M. J., Perez-Perez, G. I., Kleanthous, H., Cover, T. L., Peek, R. M., Chyou, P. H., Stemmermann, G. N. & Nomura, A. (1995) *Cancer Res.* **55**, 2111-2115.
- Parsonnet, J., Friedman, G. D., Orentreich, N. & Vogelman, H. (1997) *Gut* **40**, 297-301.
- Rugge, M., Busatto, G., Cassaro, M., Shiao, Y. H., Russo, V., Leandro, G., Avellini, C., Fabiano, A., Sidoni, A. & Covacci, A. (1999) *Cancer* **85**, 2506-2511.
- Segal, E. D., Lange, C., Covacci, A., Tompkins, L. S. & Falkow, S. (1997) *Proc. Natl. USA* **94**, 7595-7599.
- Segal, E. D., Cha, J., Lo, J., Falkow, S. & Tompkins, L. S. (1999) *Proc. Natl. USA* **96**, 14559-14564.
- Asahi, M., Azuma, T., Ito, S., Ito, Y., Suto, H., Nagai, Y., Tsubokawa, M., Tohyama, Y., Maeda, S., Omata, M., et al. (2000) *J. Exp. Med.* **191**, 593-602.
- Stein, M., Rappuoli, R. & Covacci, A. (2000) *Proc. Natl. USA* **97**, 1263-1268.
- Odenbreit, S., Puls, J., Sedlmaier, B., Gerland, E., Fischer, W. & Haas, R. (2000) *Science* **287**, 1497-1500.
- Backert, S., Ziska, E., Brinkmann, V., Zimny-Arndt, U., Fauconier, A., Jungblut, P. R., Naumann, M. & Meyer, T. F. (2000) *Cell. Microbiol.* **2**, 155-164.
- Stein, M., Bagnoli, F., Halenbeck, R., Rappuoli, R., Fantl, W. J. & Covacci, A. (2002) *Mol. Microbiol.* **43**, 971-980.
- Selbach, M., Moese, S., Hauck, C. R., Meyer, T. F. & Backert, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 6775-6778.
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. & Hatakeyama, M. (2002) *Science* **295**, 683-686.
- Yamaoka, Y., Kodama, T., Kashima, K., Graham, D. Y. & Sepulveda, A. R. (1998) *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2258-2263.
- Yamaoka, Y., El-Zimaity, H. M., Gutierrez, O., Figura, N., Kim, J. G., Kodama, T., Kashima, K., Graham, D. Y. & Kim, J. K. (1999) *Gastroenterology* **117**, 342-349.
- Yamaoka, Y., Osato, M. S., Sepulveda, A. R., Gutierrez, O., Figura, N., Kim, J. G., Kodama, T., Kashima, K. & Graham, D. Y. (2000) *Epidemiol. Infect.* **124**, 91-96.
- Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V. & Meyer, T. F. (2001) *Mol. Microbiol.* **42**, 631-644.
- Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M. J. & Shoelson, S. E. (1998) *Cell* **92**, 441-450.
- Miehlke, S., Kibler, K., Kim, J. G., Figura, N., Small, S. M., Graham, D. Y. & Go, M. F. (1996) *Am. J. Gastroenterol.* **91**, 1322-1325.
- Alm, R. A., Ling, L. S., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R., Noonan, B., Guild, B. C., deJonge, B. L., et al. (1999) *Nature* **397**, 176-180.
- Kersulyte, D., Mukhopadhyay, A. K., Velapatino, B., Su, W., Pan, Z., Garcia, C., Hernandez, V., Valdez, Y., Mistry, R. S., Gilman, R. H., et al. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 3210-3218.
- De Souza, D., Fabri, L. J., Nash, A., Hilton, D. J., Nicola, N. A. & Baca, M. (2002) *Biochemistry* **41**, 9229-9236.
- Lechleider, R. J., Sugimoto, S., Bennett, A. M., Kashishian, A. S., Cooper, J. A., Shoelson, S. E., Walsh, C. T. & Neel, B. G. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 21478-21481.
- Sugimoto, S., Wandless, T. J., Shoelson, S. E., Neel, B. G. & Walsh, C. T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 13614-13622.
- Pluskey, S., Wandless, T. J., Walsh, C. T. & Shoelson, S. E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 2897-2900.
- Eck, M. J., Pluskey, S., Trub, T., Harrison, S. C. & Shoelson, S. E. (1996) *Nature* **379**, 277-280.

