

# ピロリ菌発がん因子 Tip $\alpha$ による DNA 捕獲機構

## Snapshots of DNA capture by carcinogenic factor, Tip $\alpha$ of *Helicobacter pylori*

鶴村俊治<sup>1,\*</sup>, 吉田徹<sup>1</sup>, 津守耶良<sup>1</sup>, 津下英明<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都産業大学総合生命科学部, 〒603-8555 京都府京都市北区上賀茂本山

Toshiharu Tsurumura<sup>1,\*</sup>, Toru Yoshida<sup>1</sup>, Yayoi Tsumori<sup>1</sup>, Hideaki Tsuge<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Life Sciences, Kyoto Sangyo University,

〒603-8555 Kamigamo-Motoyama, Kita-ku, Kyoto

### 1 はじめに

ピロリ菌は胃上皮細胞に感染し様々な炎症性サイトカインなどを誘導することで胃炎や胃潰瘍などを引き起こす。ピロリ菌においてこれまでに CagA など様々な病原因子が特定されてきたが、2005年に菅沼らによって新規の発がん因子である Tip  $\alpha$  が見出された。Tip  $\alpha$  は TNF  $\alpha$  を誘導するタンパク質であり、分子量 17kDa の分子が N 末端で S-S 結合を介した二量体を形成する。この S-S 結合を含む N 末端領域の欠損変異体である del-Tip  $\alpha$  は、TNF  $\alpha$  誘導能を失うことも明らかにされていた。Tip  $\alpha$  の結晶化が困難であったため、我々は del-Tip  $\alpha$  を用いこの構造解析に成功した (BBRC, 2009)。また、Tip  $\alpha$  と del-Tip  $\alpha$  の CD スペクトルの結果から両者はほぼ同じ構造をとることが示唆された。

同時期に海外のグループが同様に del-Tip  $\alpha$  の構造を明らかにしている。結晶化条件と二量体構造について我々の構造と比較した結果、我々の二量体は、結晶化条件が中性付近でクローズ型を示したのに対し、酸性でオープン型の構造が明らかにされており、pH 依存的に Tip  $\alpha$  の二量体は構造変化することが示唆された。

また、Tip  $\alpha$  は TNF  $\alpha$  プロモーター配列との結合が確認されていることから Tip  $\alpha$  は直接相互作用し TNF  $\alpha$  を誘導することが示唆されている。しかし依然、どのように、いずれの構造で TNF  $\alpha$  プロモーターと結合し TNF  $\alpha$  を誘導するかは明らかになっていない。

本研究では Tip  $\alpha$  による DNA の捕獲と TNF  $\alpha$  誘導についての機構を明らかにするために、Tip  $\alpha$  と DNA の共結晶化と X 線回折実験、DNA 結合型サンプル獲得のための変異体作製と発現精製を行った。

### 2 実験および結果

大腸菌を用いて野生型である Tip  $\alpha$  を発現精製し、得られたタンパク質に TNF  $\alpha$  プロモーター配列の oligo-DNA を加え共結晶化を試みた。Single strand および Double strand の DNA との共結晶化を試したが

Tip  $\alpha$  のみの平板状の単結晶は得られたものの (図 1)、DNA との共結晶を得ることができなかった。

そこで、2 状態ある二量体をオープンまたはクローズのみどちらか 1 状態に揃え二量体の状態を分別するため、del-Tip  $\alpha$  の変異体とリンカーを用いて二量体構造を固定したサンプルの作製を試みた。つまり、オープン型の時のみ接近する残基、クローズ型の時のみ接近する残基についてそれぞれ変異体を作製する。さらにその変異アミノ酸に特異的なリンカーと反応させることで、それぞれの型に固定された二量体の作製を試みた。その結果、オープン固定用 1 種類、クローズ固定用の変異体 2 種類の作製とそれぞれのタンパク質の発現精製に成功した。さらにこれらの変異体とリンカーを反応させたが、すべての分子がリンカーによる二量体を形成しなかったため、現在単量体と二量体への分離を行っている。

得られた Tip  $\alpha$  の単結晶については、酸性条件下で生成された結晶であり、以前明らかにした中性条件下の del-Tip  $\alpha$  のクローズ型二量体と比較するために、PF-AR NW-12A にて X 線回折実験を行い、データを収集した (表 1)。3.05 Å までの回折データを HKL2000 で処理し、空間群は R3 と判明した。Matthews coefficient から非対称単位には 4 分子存在すると推測され、これまでの del-Tip  $\alpha$  の構造をもとに分子置換法にて解を得て、現在精密化を行っている (図 2)。精密化途中ではあるが、この構造はオープン型であった。野生型である Tip  $\alpha$  においても先に明らかにされた del-Tip  $\alpha$  と同様に、pH 依存的に構造変化をすればと考えられ、今後まだ明らかにされていない中性条件下における Tip  $\alpha$  の構造も明らかにする予定である。

さらにリンカーによりオープン型、クローズ型に固定した二量体について DNA との共結晶化・構造解析を行うことで、Tip  $\alpha$  がどちらの形で DNA と結合するか、その捕獲の瞬間を捉えたいと考えている。

表 1 : 回折データの統計値

X-Ray source	PF-AR NW-12A
Wavelength	1.0000 Å
Space group	R3
Unit cell parameters	a=195.2, b=195.2, c=63.6, $\alpha = \beta = 90.0, \gamma = 120.0$
Max. resolution	3.05
Multiplicity	5.7 (5.9)
$\langle I/\sigma I \rangle$	23.4 (4.1)
R-merge	0.075 (0.41)

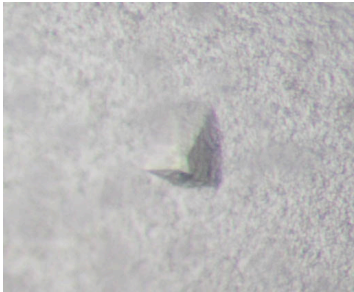


図 1 : Tip  $\alpha$  の結晶

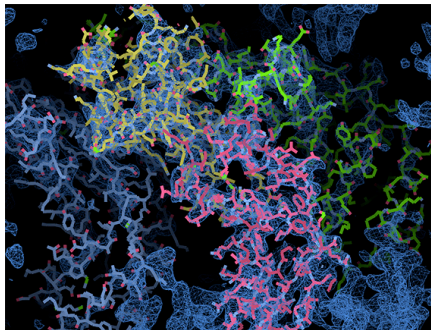


図 2 : 精密化中の Tip  $\alpha$

### 3 まとめ

固定された二量体を得るための del-Tip  $\alpha$  変異体の作製に成功し、今後リンカーで結合した二量体について精製・結晶化を行う。また、Tip  $\alpha$  について結晶を得て、さらに NW-12A において 3Å の回折データを収集し解析中である。さらに今後リンカーで固定された二量体の精製後、DNA との共結晶化を行う。

### 参考文献

[1] H. Tsuge, T. Tsurumura *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* (2009) 388(2):193-8.

\* [ttsuru@cc.kyoto-su.ac.jp](mailto:ttsuru@cc.kyoto-su.ac.jp)