

ピロリ菌 CagA の EPIYA セグメントと SHP2-SH2 との複合体の結晶構造に基づいた胃発がん機構解明

Crystal structure analysis of the phosphorylated CagA EPIYA peptide-SHP2-SH2 domain complex

千田美紀¹, 林剛瑠², 長瀬理沙^{1,2}, 畠山昌則², 千田俊哉^{1,*}

¹ 高エネ機構, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

² 東京大学, 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

Miki Senda¹, Takeru Hayashi², Lisa Nagase^{1,2}, Masanori Hatakeyama² and Toshiya Senda^{1,*}

¹ Photon Factory, KEK, 1-1 Oho, Tsukuba, Ibaraki 305-0801, Japan

² The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

1 はじめに

胃がんは全世界の部位別がん死亡の第 3 位を占めており、毎年約 50 万人が胃がんにより命を落としていると累計されている。胃がんや胃潰瘍などの原因として一般に知られるようになったヘリコバクターピロリ（ピロリ菌）は、世界人口の半数以上に感染していると言われており、胃疾患の予防や治療という観点からもピロリ菌による胃疾患の発病メカニズムを理解することが求められている。近年の研究からピロリ菌が産生するタンパク質 CagA は、ヒトの胃粘膜上皮細胞内に侵入すると、ヒトが本来持っている SHP2 や PAR1 等のタンパク質を標的分子として複合体を形成することで細胞内シグナルを攪乱し、胃がんの発症を誘導することが明らかになってきた。我々のグループでは、CagA ががんタンパク質として働くしくみを理解するための第一歩として、CagA の N 末側構造領域 (CaA-N) の結晶構造を世界に先駆けて決定した (参考文献 1)。しかしながら、CagA の主要な機能であるシグナル攪乱機能は C 末側天然変性領域と標的分子との相互作用により発揮されるため、CagA が細胞をがん化するプロセスの核心に迫るためには、CagA と標的分子との相互作用についての知見を得ることが必要となる。CagA の C 末側領域には Src キナーゼによりリン酸化を受ける EPIYA 配列 (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) が存在し、リン酸化依存的にヒトのがんタンパク質 SHP2 のタンデム SH2 ドメインと結合することが示されている。EPIYA 配列の前後のアミノ酸配列の違いから EPIYA-A, B, C, D と呼ばれる 4 種類の EPIYA セグメントが同定されており、欧米型は A, B, C セグメントを持つものに対して東アジア型は A, B, D セグメントを持つことが明らかとなっている。東アジア型 CagA の強い生物活性は EPIYA-D セグメントの存在と関係があると考えられているが、その背景にある分子メカニズムは未解明である。本申請では、CagA の EPIYA-D セグメント及び EPIYA-C セグメントを模倣したリン酸化ペプチドと SHP2 のタンデ

ム SH2 ドメインとの複合体の結晶構造を明らかにし、それらの構造を比較することで、東アジア型 CagA が有する強い生物活性の分子メカニズムを解明したい。

2 実験、結果および考察

【結晶化】

SHP2 のタンデム SH2 ドメインと CagA EPIYA-D ペプチド複合体の結晶化スクリーニングは Wizard I & II を用いて行った。その結果、微小結晶を得ることができたため、その条件をもとに結晶化条件の最適化を行った結果、0.3 mm 程度の長さの棒状結晶を得ることができた。

【X 線回折データの収集】

PF の構造生物学ビームライン PF BL-1A, BL-17A, PF-AR NE3A を用いて X 線回折強度データの収集を行った。結晶化溶液に基づいて作成した標準母液に 30 秒ソーキングして凍結した場合に最大で 2.6 Å 分解能程度の回折が生じた。XDS を用いてデータ処理を行った結果、2.8 Å 分解能のデータを得ることができた (表 1)。

【構造解析】

PDB に登録されている SHP2 の SH2 ドメインをサーチモデルとしてプログラム MOLREP を用いた分子置換法による構造決定を行った。

3 まとめ

PF の構造生物学ビームライン PF BL-1A で SHP2 のタンデム SH2-CagA EPIYA-D ペプチド複合体結晶を用いて 2.8 Å 分解能のデータを収集することができた。SHP2 の SH2 ドメインをモデルとして用いた分子置換法により既に結晶構造を決定することができており、現在、結晶学的構造精密化を進めている段階である。

表 1: Crystallographic summary

Data collection	
X-ray source	PF
Beamline	BL-1A
Osc. angle (°)	0.5
Exposure time (s)	1
Wavelength (Å)	0.9789
Temperature (K)	95
Space group	$P2_1$
Unit-cell parameters (Å, °)	$a=28.1, b=121.9, c=71.5$
Resolution (Å)	70.16–2.80 (2.95–2.80)
Observations	65,444 (7,821)
Unique reflections	22,091 (3,022)
Completeness (%)	96.2 (92.0)
Redundancy	2.9 (2.5)
Average $I/\sigma(I)$	7.8 (1.9)
Rmerge (%)	0.117 (0.588)
Mosaicity (°)	0.8
B-factor (Å ²)	46.6

括弧内は最外殻分解能の値を示す

参考文献

[1] Hayashi *et al.*, *Cell Host Microbe* **12**, 20-33. (2012)

* toshiya.senda@kek.jp