

胃発がんに関与するピロリ菌 CagA-標的分子複合体の構造学的解析

Structural analysis of the *H. pylori* CagA-target complexes involved in gastric carcinogenesis

長瀬理沙¹, 千田美紀¹, 千田俊哉^{1*}

¹高エネ機構, 〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

Lisa Nagase¹, Miki Senda¹ and Toshiya Senda^{1*}

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

1 はじめに

ヘリコバクター・ピロリ (ピロリ菌) は世界人口の約半数が感染しているとされるグラム陰性桿菌で、その慢性持続性感染は種々の胃粘膜病変を引き起こす。近年の研究からピロリ菌感染が胃がんの発症に重要な役割を担うことが明らかになってきた。さらに、大規模疫学調査ならびに動物モデルを用いた研究から *cagA* 遺伝子陽性ピロリ菌感染と胃がんとの密接な関連が明らかとなった。このことから、胃がん発症機序への理解や胃がん治療への応用に *cagA* 遺伝子産物である CagA タンパク質の生物活性発現における分子機構の解明が重要な意義を持つものと期待される。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 (CagA-N) の結晶構造を世界に先駆けて決定した [1]。CagA がピロリ菌体内で産生された後に注射針様装置である IV 型分泌機構を介して胃上皮細胞内に侵入すると、次いでその C 末側領域に複数存在する EPIYA(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)モチーフ内のチロシン残基が Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化される。CagA は EPIYA モチーフ内のチロシンリン酸化依存的にがんタンパク質である SHP2 チロシンホスファターゼと特異的に結合する。CagA の C 末側領域は、EPIYA モチーフ周辺のアミノ酸配列を異にする 4 つのセグメント (EPIYA-A, -B, -C, -D) が種々に組み合わせられて構成される。SHP2 は N 末側に 2 つの SH2 ドメイン (タンデム SH2 ドメイン)、C 末側にホスファターゼ活性を担う PTP ドメインを持つ。CagA はチロシンリン酸化された EPIYA-C または EPIYA-D セグメントを介して SHP2 の SH2 ドメインに結合することで SHP2 を異常に活性化する。CagA はまた、チロシンリン酸化非依存的に EPIYA モチーフの近傍に存在する CagA-multimerization (CM) 配列を介して細胞極性を制御する PAR1 キナーゼの触媒ドメインに直接結合する。その結果、PAR1 のキナーゼ活性が抑制され、胃上皮細胞は密着結合を破壊して上皮細胞極性が喪失する。このように、CagA は SHP2 や PAR1 等の標的分子と複合体を形成することで発がんに関わる宿主細胞内シグナルを攪乱すると考えられている。以上のことから、CagA と標的

分子との相互作用を明らかにすることにより、CagA の病原性発現ならびに胃がん発症機序の理解が大きく進むことが期待される。

なお、本課題の関連課題 2014G676 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することに成功している [2]。

2 実験、結果および考察

【結晶化】

本研究では SHP2 (全長 597 残基) の N 末側 SH2 ドメイン (N-SH2) を使用した。また、PAR1 (全長 745 残基) は N 末端と C 末側を欠失させた変異体 (39-364 残基: PAR1KD) を用いた。これらの変異体の大量発現および精製を行い、高純度サンプルを取得した。CagA については CagA の EPIYA-D セグメントおよび CM 配列を含む領域を模倣したチロシンリン酸化ペプチド (CagA ペプチド) を用いた。高エネルギー加速器研究機構の構造生物学研究センターの結晶化ロボット PXS を用いた CagA ペプチド-PAR1KD-N-SH2 複合体の結晶化スクリーニングの結果、いくつかの条件で結晶が得られた。

【X 線回折データの収集】

PF のビームライン BL-1A を用いた X 線回折実験の結果、分解能は 6.6 Å と低いもののタンパク質結晶由来の回折像が取得でき、xds と aimless を用いたデータ処理の結果、空間群は $P2_1$, $a=133$, $b=281$, $c=283$ Å, $\beta=92^\circ$ であることが確認できた (Table 1)。

3 まとめ

PF の構造生物学ビームライン PF BL-1A で、N-SH2、PAR1KD、CagA ペプチドを混合した際に得られた結晶を用いてデータ収集を行い、6.6 Å 分解能のデータを得ることができた。現在、結晶化条件の最適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)	1.9000
Temperature (K)	95
Space group	$P2_1$
Unit-cell parameters (Å, °)	$a=133.3, b=281.0, c=283.8, \beta=91.8$
Resolution (Å)	50.27-6.62 (6.91-6.62)
Observations	142,025 (17,781)
Unique reflections	38,787 (4,725)
Completeness (%)	99.4(99.8)
Redundancy	3.7 (3.8)
Average $I/\sigma(I)$	6.0 (1.6)
R _{pim} (%)	0.066 (0.332)
Mosaicity (°)	0.14
B-factor (Å ²)	71.8

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).
 [2] Hayashi *et al.*, *Cell Reports* **20**, 2876-2890. (2017).

* toshiya.senda@kek.jp