

胃発がんに関わるピロリ菌 CagA-細胞内標的分子複合体の構造学的解析 Structural analysis of the *Helicobacter pylori* CagA-intracellular target complex involved in gastric carcinogenesis

長瀬里沙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、*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、胃がん発症機序への理解や胃がん治療への応用に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 (CaA-N) の結晶構造を世界に先駆けて決定した [1]（課題番号 2010G616）。ピロリ菌体内で産生された CagA は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した後、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 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) が種々に組み合わされて構成される。CagA は EPIYA-C セグメントを持つ欧米型 CagA と EPIYA-D セグメントを持つ東アジア型 CagA に大別される。CagA は EPIYA-C または EPIYA-D セグメント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。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 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。一方で、CagA は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の主要制御因子である PAR1 キナーゼの触媒ドメインと結合する。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が破壊されて上皮細胞極

性を喪失する。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 は異なる領域で SHP2、PAR1 それぞれと結合して三者複合体を形成することで、ピロリ菌感染を起点とした胃発がんに関与していると考えられており、この複合体の詳細な構造情報は胃がん予防・治療薬開発のために活用できる可能性がある。

なお、本課題の関連課題 2017G115 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を行った。

【X 線回折データの収集】

結晶化スクリーニングで得られた結晶を用いて、PF のビームライン BL-1A、BL-17A において X 線回折実験を行った。

3 結果および考察

N-SH2、PAR1KD、CagA ペプチドを混合したタンパク質の結晶化スクリーニングの結果、複数の条件

で結晶が得られた。PF の構造生物学ビームライン PF BL-1A で、得られた結晶を用いて X 線回折実験を行った結果、異なる結晶化条件で得られた 2 つの結晶から回折データが収集できた。分解能はそれぞれ 4.3 Å、5.5 Å であった。xds と aimless を用いたデータ処理の結果、前者の空間群は $P312$, $a=b=110$, $c=42$ Å であった(表 1)。格子定数から、N-SH2 単独の結晶であることが推察された。後者の空間群は $P2_1$, $a=84$, $b=190$, $c=117$ Å, $\beta=110^\circ$ であった(表 2)。この結果から、複合体である可能性が考えられたが、分解能が低いと解析が困難であった。そこで、得られた結晶を溶解し、それに対して抗 His タグ抗体を用いてイムノブロットを行った。その結果、この結晶は PAR1KD 単独の結晶であることがわかった。

4 まとめ

今回得られた結晶は、N-SH2 単独あるいは PAR1KD 単独であった。目的の複合体結晶ではなかったが、今回の結果から複合体の安定性に問題があることがわかり、今後の実験計画に大変有用だった。現在、結晶化に用いる複合体の安定性が向上する条件の検討を進めている。

表 1: Crystallographic summary 1

Data collection	
X-ray source	PF
Beamline	BL-1A
Osc. angle ($^\circ$)	0.5
Exposure time (s)	0.3
Wavelength (Å)	1.9000
Temperature (K)	95
Space group	$P312$
Unit-cell parameters (Å)	$a=b=110.23$, $c=42.01$
Resolution (Å)	47.73–4.33 (4.84–4.33)
Observations	19,069 (4,812)
Unique reflections	1,993 (546)
Completeness (%)	99.6 (99.4)
Redundancy	9.6 (8.8)
Average $I/\sigma(I)$	7.2 (3.7)
Rpim (%)	7.7 (22.4)
Mosaicity ($^\circ$)	0.53
B-factor (Å ²)	10.50

表 2: Crystallographic summary 2

Data collection	
X-ray source	PF
Beamline	BL-1A
Osc. angle ($^\circ$)	0.5
Exposure time (s)	1
Wavelength (Å)	1.9000
Temperature (K)	95
Space group	$P2_1$
Unit-cell parameters (Å, $^\circ$)	$a=83.77$, $b=190.82$, $c=116.93$, $\beta=109.53$
Resolution (Å)	49.53–5.51 (6.16–5.51)
Observations	81,885 (23,859)
Unique reflections	11,189 (3,183)
Completeness (%)	99.2 (99.6)
Redundancy	7.3 (7.5)
Average $I/\sigma(I)$	5.0 (2.3)
Rpim (%)	8.4 (29.8)
Mosaicity ($^\circ$)	0.42
B-factor (Å ²)	61.68

参考文献

- [1] T. Hayashi *et al.*, *Cell Host and Microbe*. **12**, 20–33 (2012).
- [2] T. Hayashi *et al.*, *Cell Reports* **20**, 2876–2890 (2017).

* toshiya.senda@kek.jp