

ピロリ菌由来 CagA の結晶構造に基づいた胃発癌機構の解明 Crystal structure analysis of CagA derived from *Helicobacter pylori*

千田美紀¹, 林剛瑠², 畠山昌則², 千田俊哉^{1*},

¹放射光科学研究施設, 〒305-0801 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, Masanori Hatakeyama² and Toshiya Senda¹

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

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

ピロリ菌が産生する CagA は胃がんの発症に重要な役割を担うタンパク質として注目されているが、その立体構造は未知であった。我々は、CagA が「がんタンパク質」として働く仕組みをその分子構造から理解するための第一歩として CagA の結晶構造を決定した。CagA 結晶の質は非常に悪く当初構造決定が困難であると思われたが、結晶工学的処理の条件を検討することにより最終的に 3.3 Å 分解能で結晶構造を決定できた。

1 はじめに

胃がんは全世界の部位別がん死亡の第二位を占めており、毎年約70万人が胃がんにより命を落としている。また、胃がん発症への関与が一般に知られるようになったピロリ菌は、世界人口の半数以上に感染していると言われており、実際の疾病予防や治療という観点からも発癌メカニズムの理解が待ち望まれている。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様々なタンパク質と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。このように、胃がんの発症に重要な役割を担うタンパク質としてCagAは大きく注目されるようになったが、その立体構造はこれまで未知のままであった。我々は、CagAが「がんタンパク質」として働くしくみをその分子構造から理解するための第一歩としてCagAの結晶構造決定に着手した。CagAは約1200個のアミノ酸からなる大きなタンパク質であるが、限定分解で得られたフラグメントをNMRやCDで解析した結果からN末端部分（分子全体の70%; 以降、CagA-N領域）は高次構造をとっているのに対し、標的タンパク質と相互作用するC末端部分（分子全体の約30%; 以降、CagA-C領域）は固有の立体構造を持たない天然変性領域であることが明らかになった。そのため、本課題ではCagAが単体で高次構造を持つCagA-N領域（1-876番）のX線結晶構造解析を行った。

2 実験

CagA(1-876)及びCagA(261-829)の精製と結晶化は参考文献[1]で報告した方法で行った。CagA(1-876)結晶とCagA(261-829)結晶はエタノールを沈殿剤とする結晶化条件で再現性良く得られたが、回折実験を行った結果、どちらも10 Å分解能の回折しか生じなかった。そこで、我々は二段階、三段階で複数の

種類のクライオプロテクタントを組み合わせる新しい結晶工学的処理の方法「multi-step soaking method」を開発し結晶の質を大きく改善することを試みた。クライオ条件の探索と最適化、及び回折強度データの収集は、PF-ARのNE3Aを中心とした構造生物学ビームラインを用いて行った。CagA(261-829)の構造はSe-Met誘導体結晶を用いたMAD法で、CagA(1-876)の構造はCagA(261-829)をモデルとした分子置換法で決定した。

3 結果と考察

クライオプロテクタントを用いた結晶工学的処理「multi-step soaking method」により CagA(1-876)及び CagA(261-829)結晶の質はそれぞれ 3.30 Å, 3.19 Å 分解能まで大きく改善され、結晶構造を決定することができた（表 1）。その結果、CagA-N 領域は 3 つのドメインから構成され、既知のタンパク質分子とは類似性のない N 字型のコアを持つ新規の立体構造を有することが明らかになった（図 1）。また、中央のドメイン II には多数の塩基性アミノ酸が集まって構成される塩基性パッチが存在していた（図 2）。この正電荷の塩基性パッチは細胞内膜の負電荷のホスファチジルセリンとの静電相互作用により CagA が細胞内膜上に局在化するために働いていると考えられる。

今回結晶構造を決定した CagA-N 領域(1-876 番)は、結晶中で NBS(N-terminal binding sequence)同士がヘリックスバンドルを形成していたため、CagA が直接二量体を形成する可能性が考えられたが、ゲル濾過クロマトグラフィーやブルダウンアッセイの結果からは CagA が直接二量体を形成する証拠が得られず結晶のパッキングによるアーティファクトと結論した。その後のアミノ酸配列の解析から今回構造を決定していない C 末端領域に NBS と相同性の高い領域が見つかったため、この領域を CBS(C-terminal binding sequence)と呼ぶことにし、NBS-CBS

が NBS-NBS 相互作用様式と類似したヘリックスバンドルを形成するという仮説を立てて実験を行った。その結果、NBS-CBS 相互作用が標的分子である PAR1 との複合体形成を安定化することが明らかになり、細胞を用いた実験では NBS-CBS 相互作用が CagA の細胞に対する病原活性を促進することも示された。このことから、フレキシブルな CagA-C 領域中に存在する CBS が、CagA-N 領域中の NBS と相互作用することにより投げ縄状のループが形成され、このループ構造が CagA と標的分子との複合体形成を安定化すると考えられる (図 3)。

表 1: Crystallographic summary

Data collection		
Crystal form	CagA(1-876)	CagA(261-829)
X-ray source	PF-AR	PF-AR
Beamline	NE3A	NE3A
Osc. angle (°)	0.2	0.4
Exposure time (s)	1	2
Wavelength (Å)	0.97900	0.98057
Temperature (K)	95	95
Space group	<i>P</i> 4 ₁ 2 ₁ 2	<i>P</i> 3 ₁ 21
Unit-cell parameters (Å, °)	<i>a</i> =97.31,	<i>a</i> =95.67,
	<i>b</i> =97.31,	<i>b</i> =95.67,
	<i>c</i> =244.76,	<i>c</i> =167.92,
	α =90,	α =90,
	β =90,	β =90,
	γ =90	γ =120
Resolution (Å)	90.42-3.30 (3.58-3.30)	74.3-3.19 (3.37-3.19)
Observations	235,084	161,399
Unique reflections	18,403	15,243
Completeness (%)	99.5 (100.0)	99.3 (100.0)
Redundancy	7.6 (7.7)	10.5 (11.0)
Average <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	25.2 (4.4)	33.4 (6.0)
Rmerge (%)	0.054 (0.505)	0.059 (0.468)
Mosaicity (°)	0.2	0.2
B-factor (Å ²)	102.9	80.7
Crystallographic refinement		
Resolution	90.42-3.30 (3.58-3.30)	74.3-3.19 (3.41-3.19)
Rwork/Rfree	0.191/0.248 (0.224/0.282)	0.222/0.279 (0.248/0.304)

括弧内は最外殻分解能の値を示す

4 まとめ

本申請で決定した CagA-N 領域(1-876 番)の結晶構造から、CagA が胃の細胞膜内面に局在化し標的分子と相互作用するための足場を形成するしくみ、標的分子との複合体形成を促進するスイッチとなりうる投げ縄状ループの形成が明らかになった。

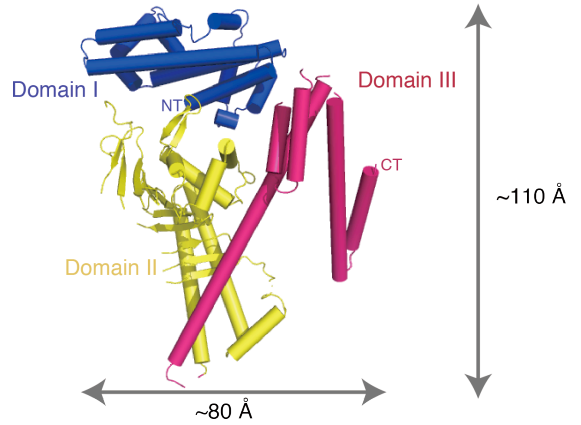


図 1 : CagA の結晶構造

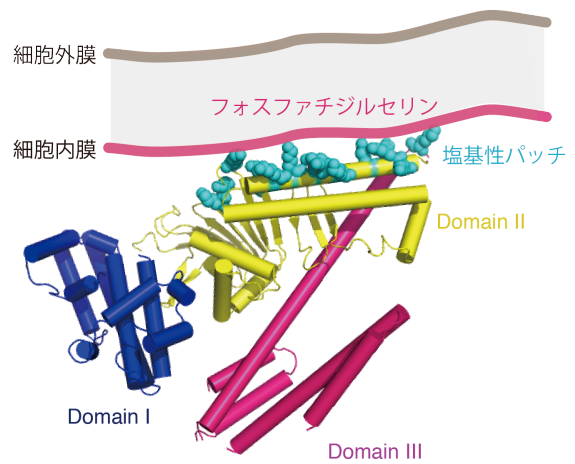


図 2 : 塩基性パッチによる細胞内膜への局在化

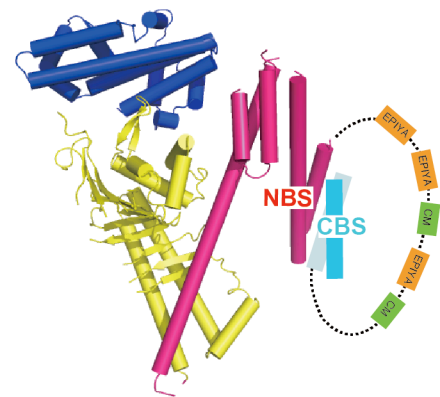


図 3 : 分子内で形成される投げ縄状ループ

参考文献

[1] Hayashi, T., Senda, M., Morohashi, H., Higashi, H., Horio, M., Kashiba, Y., Nagase, L., Sasaya, D., Shimizu, T., Venugopalan, N., Kumeta, H., Noda, N., Inagaki, F., Senda, T. and Hatakeyama, M. *Cell Host and Microbe*. **12**, 20-33 (2012).

* toshiya.senda@kek.jp