

## 胃がんを引き起こすピロリ菌の発がんタンパク質 CagA の X 線結晶構造解析

千田美紀<sup>1,2</sup>, 林剛瑠<sup>2,3</sup>, 畠山昌則<sup>2,3</sup>, 千田俊哉<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所, <sup>2</sup>JST, CREST, <sup>3</sup> 東京大学・大学院医学系研究科

### Crystal structure of the CagA oncoprotein from *Helicobacter pylori*

Miki SENDA<sup>1,2</sup>, Takeru HAYASHI<sup>2,3</sup>, Masanori HATAKEYAMA<sup>2,3</sup>, Toshiya SENDA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Materials Structure Science, KEK, <sup>2</sup>JST, CREST, <sup>3</sup>Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

#### Abstract

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と累計されている。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。今回、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 の結晶構造を決定した [1]。得られた結晶構造をもとに細胞生物学的解析や生化学的解析を行うことにより、CagA がヒトの胃粘膜上皮細胞内で足場を形成しターゲットとなるタンパク質との複合体形成を促進するしくみを明らかにすることができた。本稿では、当初 10 Å 程度の分解能の回折しか生じなかった CagA 結晶の質を、最終的には 3.3 Å 分解能にまで高めるために有効であった複数のクライオプロテクタントを段階的に用いる新しい「結晶工学的処理」の方法についても紹介したい。

#### 2. ピロリ菌の発がんタンパク質 CagA

CagA はピロリ菌内で産生される約 130-145 kDa のタンパク質であり、IV 型分泌機構と呼ばれるミクロの注射針を通して胃粘膜上皮細胞内に侵入すると [2], 細胞膜内

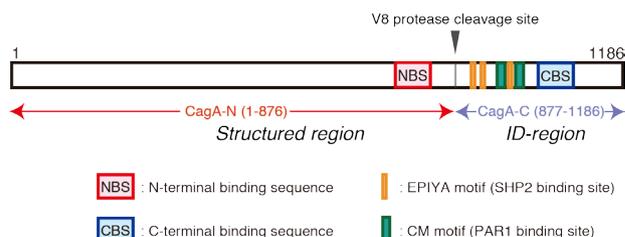


Figure 1 Schematic representation of the primary structure of CagA.

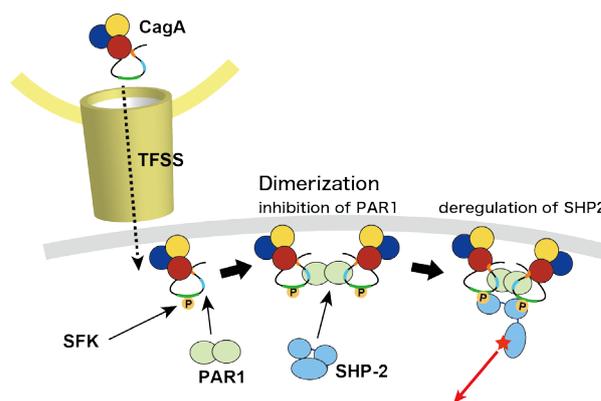


Figure 2 CagA interacts with PAR1 and SHP2 for signal perturbation.

面に局在化して存在することが知られている [3]。CagA の C 末端側には、チロシンリン酸化を受ける EPIYA 配列 (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala 配列) や多量体化に関わる CM (CagA-Multimerization) モチーフと呼ばれる配列が存在する (Fig. 1)。EPIYA 配列を含む EPIYA セグメントは、EPIYA 配列の前後のアミノ酸配列の違いにより大きく分けて A, B, C, D の 4 種類が同定されており、単離された菌株間で多種多様な EPIYA セグメントの繰り返し配列パターンを持つ

[4]。欧米型の CagA では A-B-C の順番で EPIYA セグメントが繰り返しており、EPIYA-C セグメントの繰り返しが多いほど病原生物活性が増すことが明らかになっている。一方、東アジア型では A-B-D の順番で EPIYA セグメントを持ち EPIYA-D セグメントの存在が東アジア型ピロリ菌の高い病原性 / 発がん性と関係していることが示されている。胃粘膜上皮細胞内に移した CagA は、Src ファミリーキナーゼにより EPIYA 配列のチロシンがリン酸化されることでヒトのがんタンパク質として知られるチロシンホスファターゼ SHP2 と結合できるようになる [5, 6, 7]。SHP2 は CagA と結合することで異常に活性化され、細胞のがん化につながる異常な分裂・増殖シグナルを生じる。また、上皮細胞の極性を制御するためのシグナリング分子として働いているセリン/スレオニンキナーゼの PAR1 が CM モチーフと結合することにより PAR1 の働きが抑制され胃粘膜上皮の細胞極性を破壊することも知られている [8, 9]。このように、胃粘膜上皮細胞内に移した CagA は、PAR1 や SHP2 との複合体形成を通じて細胞内シグナルを攪乱することが明らかになっている (Fig. 2)。

### 3. CagA-N 領域の結晶構造

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、プロテアーゼによる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, SHP2 や PAR1 と相互作用する C 末端部分(分子全体の 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示された [1]。そのため, 我々は CagA が「がんタンパク質」として働くしくみを分子構造から探るための第一歩として 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。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 (Fig. 3)。また, 中央部のドメイン 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 (Fig. 4)。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 が細胞膜上に局在化するために働いていると考えられた。そのため, 細胞生物学的解析により, 実際の細胞

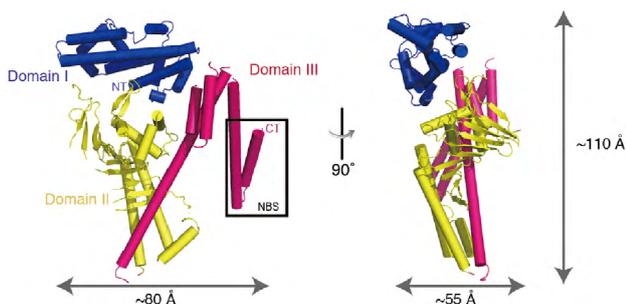


Figure 3 Crystal structure of CagA-N.

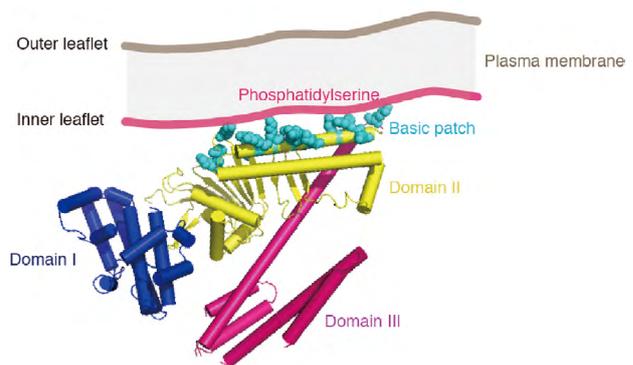
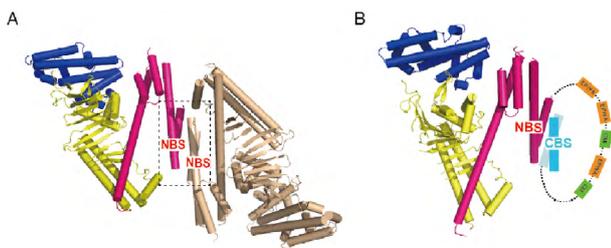


Figure 4 The Basic patch in Domain II interacts with the inner leaflet of the plasma membrane.

内で CagA が細胞膜内面に局在化するためにこの塩基性パッチが関与しているかを確認した。具体的には上皮細胞極性を形成させた MDCK 細胞 (イヌ腎臓尿管上皮細胞) に CagA 変異体 (K613/614/617/621A や K631/635/636A) を発現させ, 細胞内の局在を観察した。その結果, 野生型 CagA は MDCK II 細胞の細胞膜に局在化しているのに対し, 塩基性パッチの変異体では細胞質への拡散が確認された。このことから, CagA-N 領域のドメイン II に存在している塩基性パッチは, CagA が細胞膜内面に局在化しターゲット分子と相互作用するための足場を形成するために重要な役割を果たしていると考えられた。

今回, 我々が結晶構造を決定した領域は CagA-N 領域と呼んでいる 1-876 番の部分であるが, 結晶中では Fig.1 の模式図中に示す NBS(N-terminal binding sequence) 同士がヘリックスバンドルを形成していることが観察されたことから, 当初は NBS-NBS 間の相互作用により CagA が直接二量体を形成する可能性が考えられた (Fig. 5-A)。しかしながら, ゲル濾過クロマトグラフィーやプルダウンアッセイ法による分析では CagA が直接二量体を形成している証拠が得られなかったため, 結晶中で二量体のように見える構造は結晶のパッキングによるアーティファクトであると結論した。その後の解析により, 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 相互作用様式に類似したヘリックスバンドル構造を形成するという仮説を立てた。この仮説を検証するために, 結晶構造の NBS-NBS 相互作用の中心に位置するロイシン 792 番及びロイシン 812 番をアルギニンに置換した変異体を作成し, NBS と CBS の分子内相互作用をプルダウンアッセイにより解析した。その結果, ロイシンをアルギニンに置換した変異体では NBS と CBS との相互作用能が大きく低下することが明らかになった。さらに NBS-CBS 相互作用が CagA と 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 領域の一部に存在する CBS が, 構造領域である CagA-N 領域の一部に存在する NBS とヘリク



**Figure 5** (A) A CagA-N dimer in the crystal. An intermolecular 4-helix bundle is formed between two adjacent CagA-N monomers. (B) The NBS-CBS interaction creates a lariat-like loop.

空間の相互作用を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とターゲット分子間の複合体形成を安定化すると考えられる (Fig. 5-B)。

#### 4. クライオプロテクタントを用いた「結晶工学的処理」によるCagA結晶の改善

CagA-N領域の結晶構造から明らかになったことを前節までで述べたが、実際にはCagA-N領域の結晶の質は非常に悪く、当初は結晶構造決定が困難であると考えられた。この節では、PFのビームラインNE3A, NW12A, BL-5Aを用いてCagA-N領域の結晶の質を大きく改善した「結晶工学的処理」の手法について紹介したい。CagA-N領域(1-876)の結晶化の結果、0.3-0.4 mmの結晶を再現性良く得ることができた。しかし、X線を当ててみると、常温でキャピラリーに詰めて測定した場合、代表的な氷晶防止剤であるグリセロール入りの標準母液に結晶を浸けてから凍結し測定した場合のどちらについても10 Åから7.5 Å分解能程度の回折しか生じなかった。X線結晶構造解析で類似した構造が解かれていないタンパク質の結晶構造を決定するためには、最低でも4 Å分解能以上の回折を生じる結晶を得ることが望ましく、このままでは結晶構造を決定することが絶望的であると考えられた。しかし、このような場合でも、結晶が得られた後に結晶を凍結する条件の検討や低分子導入などの「結晶工学的処理」を行うことで結晶の質を大きく改善できる可能性がある。そこで、我々はクライオプロテクタントを用いた「結晶工学的処理」を行うことにより、結晶の質を大きく改善することを試みた。クライオプロテクタントは、一般的には結晶中の水が氷になってタンパク質結晶を破壊することを防ぐために用いられている。しかし、我々のグループで以前に結晶構造の決定に成功したヒストンシャペロンTAF-1βでの経験から、クライオプロテクタントには氷晶防止剤としての効果だけでなく、結晶中でタンパク質分子に結合して安定化する効果や、結晶中の分子のパッキングを変化させることで結晶の質を向上させる効果もあることがわかっていた [10, 11]。そこで今回、我々は二段階、三段階で様々な種類のクライオプロテクタント溶液に結晶をソーキングする multi-step soaking method で結晶の質を改善することを試みたが、この方法のポイントはクライオプロテクタントが単に氷晶防止剤としてだけでなく、結晶中のタンパク質分子を安定

化する安定化剤として働くことを期待して、複数のクライオプロテクタントを組み合わせ用いているという点である。この方法を用いることにより、最大分解能を3.1 Åまで改善することができただけでなく、3.5 Å分解能以上の回折を生じる結晶の割合を大幅に高めることができた。今回、我々は最終的に3.3 Å分解能の電子密度図を解釈してモデルの構築を行ったが、このような低分解能の電子密度図を用いて正しく残基位置をアサインすることは非常に難しいため、セレノメチオニンを導入した41種類の変異体結晶を作成することで残基位置のアサインを行った。このような理由もあり膨大なデータセットを収集することが必要になったため、突発的に良い結晶が出現するのではなく、3.5 Å分解能以上の回折を生じる結晶が2-3個に1個程度といった高い割合で得られるソーキング条件を見つけることが必須であった。また、今回、結晶構造を決定するまでの過程で100種類を超える様々なソーキング条件で2000個を超える結晶を凍結し1000個を超える結晶にX線を当てて試し撮りを行ったため、精製サンプルのロット→結晶化プレート(結晶化条件や変異体の種類)→データ収集までの全ての情報を一元化して管理し、結晶の質が少しでも良くなったり悪くなったりする兆候がある場合にその原因を見逃さないことが重要であった。

#### 5. おわりに

今回我々が決定したCagA-N末端領域(1-876番)の結晶構造から、CagAが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。しかしながら、CagAの主要な機能であるシグナル攪乱はそれ自身では定まった構造を有しないC末端領域と標的分子との相互作用により発揮されるため、今後はCagAと標的分子からなるシグナル攪乱複合体の構造生物学的研究を進めることによりCagAが細胞をがん化するプロセスの核心に迫っていかねばならない。とはいえともこのような複数のタンパク質からなる複合体の結晶構造解析には困難が予想されるため、結晶化スクリーニングや結晶工学的処理の手法を新たに開発しながら迅速に原子分解能での構造解析ができるシステムを構築することも必要になると考えている。

#### 引用文献

- [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 Microbe* **12**, 20-33 (2012).
- [2] Covacci, A. and Rappuoli, R. *J. Exp. Med.* **191**, 587-592 (2000).
- [3] Murata-Kamiya, N., Kikuchi, K., Hayashi, T., Higashi, H., and Hatakeyama, M. *Cell Host Microbe* **7**, 399-411 (2010).

- [4] Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T. and Hatakeyama, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14428-14433 (2002).
- [5] Hatakeyama, M. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 688-694 (2004).
- [6] Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. and Hatakeyama, M. *Science* **295**, 683-686 (2002).
- [7] Suzuki, M., Mimuro, H., Suzuki, T., Park, M., Yamamoto, T. and Sasakawa, C. *J. Exp. Med.* **202**, 1235-1247 (2005).
- [8] Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Lu, H., Ohnishi, N., Azuma, T., Suzuki, A., Ohno, S. and Hatakeyama, M. *Nature* **447**, 330-333 (2007).
- [9] Nešić, D., Miller, M.C., Quinkert, Z.T., Stein, M., Chait, B.T. and Stebbins, C.E. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 130-132 (2010).
- [10] Muto, S., Senda, M., Akai, Y., Sato, L., Suzuki, T., Nagai, R., Senda, T. and Horikoshi, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4285-4290 (2007).
- [11] Senda, M., Muto, S., Horikoshi, M. and Senda, T. *Acta Crystallogr.* **F64**, 960-965 (2008).

(受付日: 2013年3月27日)

## 著者紹介

千田美紀 Miki SENDA



高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・放射光科学研究施設・構造生物学研究センター

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

TEL: 029-879-6181

e-mail: miki.senda@kek.jp

略歴: 1996年長岡技術科学大学修士課程修了, 2001年バイオ産業情報化コンソーシアム・研究員, 2008年長岡技術科学大学にて学位取得, 2013年4月より物質構造科学研究所特任助教。博士(工学)。

最近の研究: 結晶化スクリーニングに有効な「すぐ見る法」による結晶化。「結晶工学的処理」による結晶の質の改善。

趣味: 食べ歩き, クラシック音楽鑑賞。

林 剛瑠 Takeru HAYASHI



東京大学・大学院医学系研究科・微生物学分野

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

TEL: 03-5841-3408

e-mail: thaya@m.u-tokyo.ac.jp

略歴: 2012年12月北海道大学大学院博士課程修了, 2013年1月より東京大学大学院医学系研究科特任助教。博士(理学)。

最近の研究: ピロリ菌がんタンパク質 CagA の構造 - 機能解析。

趣味: 近所の下町散策, 読書(ミステリー)。

畠山昌則 Masanori HATAKEYAMA



東京大学・大学院医学系研究科・微生物学分野

〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

TEL: 03-5841-3632

e-mail: mhata@m.u-tokyo.ac.jp

略歴: 1981年北海道大学医学部・医学科卒, 85年同大学院・内科系修了(医博), 同年大阪大学細胞工学センター・助手, 91年MIT Whitehead 研究所・研究員, 95年(財)癌研究会癌研究所・部長, 99年北海道大学免疫科学研究所(2000年より遺伝子病制御研究所に改組)・教授, 09年より東京大学大学院医学系研究科・教授。

最近の研究: 胃がんを中心とする消化器がん発症機構。

趣味: 下町散策, ワイン。

千田俊哉 Toshiya SENDA



高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・放射光科学研究施設・構造生物学研究センター

〒305-0801 茨城県つくば市大穂 1-1

TEL: 029-879-6181

e-mail: toshiya.senda@kek.jp

略歴: 1995年長岡技術科学大学博士後期課程修了(博士(工学)), その後長岡技術科学大学生物系助手, 産業技術総合研究所・バイオメディシナル情報研究センター・主任研究員を経て2013年1月高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・教授。

最近の研究: クロマチン因子, 発がん蛋白質 CagA の構造生物学。

趣味: 美術鑑賞, 散歩。