

「ライフサイエンスの革新を目指した構造生命科学と先端的基盤」
平成24年度採択研究代表者

H27 年度
実績報告書

千田 俊哉

高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所
教授

ピロリ菌の感染と発がん機構の構造学的解明

§ 1. 研究実施体制

(1)「千田」グループ

- ① 研究代表者: 千田 俊哉 (高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・ 構造解析用組替えタンパク質の大量発現・精製・結晶化
 - ・ シグナル攪乱複合体および各種複合体の X 線結晶構造解析
 - ・ 精製タンパク質の相互作用解析 (ITC, 静的光散乱、超遠心分析、NMR など)

(2)「畠山」グループ

- ① 主たる共同研究者: 畠山 昌則 (東京大学医学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ 哺乳動物細胞を用いた病原活性解析
 - ・ 組換えタンパク質の発現・精製法の開発および最適化
 - ・ タンパク質間相互作用能の解析
 - ・ 酵素活性解析
 - ・ タンパク質複合体の結晶化
 - ・ シグナル攪乱複合体形成を遮断する分子標的阻害剤の探索

(3)「佐藤」グループ

- ① 主たる共同研究者: 佐藤主税 (産業技術総合研究所バイオメディカル、研究グループ長)
- ② 研究項目
 - ・ CagA の標的細胞内移行の分子レベル観察

§ 2. 研究実施の概要

ピロリ菌は、ヒトの胃粘膜に生息し、胃がんや胃潰瘍などの原因菌として知られている。近年の研究から、IV型分泌機構を介して胃細胞内に侵入した CagA が、様々なタンパク質と相互作用して細胞内シグナルを攪乱し、様々な病気を引き起こすことが明らかになってきた。

我々の先行研究から、分子の C 末端部の天然変性領域と N 末端側の構造領域と分子内相互作用を介して投げ縄様構造を形成し、標的分子との複合体の形成を安定化することが示唆された。そして、天然変性領域の相互作用部位(CBS)は構造領域内の相互作用部位(NBS)と分子内相互作用する際に構造変化を起こし、NBS とヘリックスバンドルを形成するが予測された。そこで NBS と CBS をそれぞれ単離し、この構造変化を円偏光二色性解析と NMR 解析を用いて解析した。その結果、単独では天然変性状態の CBS に NBS を加えると、予測通りに二次構造誘起され、構造変化が起こることが確認された。

CagA の天然変性領域には標的分子との相互作用部位が集まっている。このうち EPIYA セグメントは様々な標的分子の SH2 ドメインとの相互作用介して標的分子を脱制御する。これまでに我々はこの脱制御機構の分子基盤を明らかにするため、EPIYA セグメントと標的タンパク質との複合体の構造解析を行ってきた。一方で、内在性のタンパク質であるプラグミンにも類似の EPIYA セグメントが見られる。今年度はこのプラグミンの EPIYA セグメントと標的分子の一つである Csk との複合体の結晶構造を決定した。現在標的分子による EPIYA 認識機構の違いについて詳細に解析している。

興味深いことに EPIYA セグメントや同じ天然変性領域中にあるキナーゼ結合部位である CM 配列には単離される地域によって多型が見られる。さらに、この多型が地域の胃がん発症率に深く関わることが示唆されている。そこで CagA の EPIYA セグメントおよび CM 配列における地域多型と標的分子との結合能の関連を定量的に解析した。その結果、欧米型 CagA でみられる EPIYA-C セグメント数の変動と CagA-SHP2 結合能には強い相関があり、EPIYA-C セグメントを 2 つ以上有する CagA は非常に強い SHP2 結合親和性を示した¹⁾。また、欧米型と東アジア型の CagA の比較では、東アジア型 CagA がより強い SHP2 結合能を示し、SHP2 がより強度に活性化することを示した。CM 配列の多型解析では、東アジア型 CM 配列を有する CagA は、欧米型に比べて、標的分子 PAR1b に対して著しく強い結合能を示した。これらの生化学的知見を反映し、培養細胞レベルで CagA の分子多型に依存した病原活性を示すことが出来た。この結果は、ピロリ菌感染と胃がんに関する臨床データを分子レベルで説明する重要な知見である。これらの結果を踏まえ、CagA-PAR1b-SHP2 シグナル攪乱複合体の機能を詳細な構造解析に基づいて解明したいと考えている。

CagA の輸送機構に関する先行研究では、顕微鏡像などからピロリ菌は胃粘膜細胞との共存状態に長い注射針を用いて CagA を胃粘膜細胞へ注入すると提唱されていた[Kwok et al, Nature 2007]。しかし、いまだに注入器官は長い注射針か短い筒の様な構造かで論争は決着していない。本研究では、ASEM を中心とした水中で観察できる電子顕微鏡法を開発し、様々な顕微鏡とともに CagA の細胞への運搬機構を相関観察した。その結果、感染に伴い

細胞から微小な突起が伸び、密にピロリ菌を取り囲む機構が示唆された。また、本顕微鏡を用いた組織の観察法を開発し、胃表面の共生細菌を高分解能で観察できることを示した。さらに、ASEM と PTA 染色を組み合わせると、組織の核が迅速に観察できた。本法は、時間がかかる凍結薄切は必要なく、新しい術中迅速診断の可能性を拓くことが期待される。

代表的な原著論文

- 1). Nagase, L., Hayashi, T., Senda, T., Hatakeyama, M. "Dramatic increase in SHP2 binding activity of Helicobacter pylori Western CagA by EPIYA-C duplication: its implications in gastric carcinogenesis." *Sci Rep.* vol: 5, 15749, 2015.
- 2). Miki Senda, Takeru Hayashi, Masanori Hatakeyama, Koh Takeuchi, Atsuo Sasaki, and Toshiya Senda. "Use of multiple cryoprotectants to improve diffraction quality from protein crystals." *Crystal Growth & Design*, vol. 16, pp. 1565-1571, 2016.