

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
 - ・ タンパク質間相互作用能の解析
 - ・ 酵素活性解析
 - ・ 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

ピロリ菌は種々の胃粘膜病変の発症に関与している。近年の研究から、ピロリ菌が産生するタンパク質である CagA が IV 型分泌機構を介して胃上皮細胞内に侵入した後、細胞内の様々なタンパク質と複合体を形成することで胃がんを含む胃粘膜疾患を引き起こすことが明らかとなってきた。

CagA の C 末側領域に存在する EPIYA モチーフはチロシンリン酸化されることで SH2 ドメインを持つタンパク質と結合することが明らかとなっている。これまでに CagA の EPIYA セグメントを模したペプチドとがんタンパク質 SHP2 の SH2 ドメインとの複合体構造を決定している。そこで、CagA 以外のタンパク質由来の EPIYA モチーフを模倣したペプチド(ペプチド A, B)と SHP2 の SH2 ドメインとの複合体の X 線結晶構造解析を行った。SH2-CagA EPIYA セグメント複合体との構造比較を行った結果、EPIYA ペプチド A, B は SH2 ドメインのほぼ同じ位置に結合することが明らかとなった。

我々の先行研究から、CagA の C 末側の天然変性領域に存在する CBS(C-terminal binding site)と N 末側の構造領域に存在する NBS(N-terminal binding site)が分子内相互作用して投げ縄様構造を形成することにより標的分子との相互作用が安定化することが示唆された。そこで、投げ縄様構造と標的タンパク質の相互作用解析を行った結果、CagA 投げ縄様部分構造と標的タンパク質との複合体の形成が確認された。また、溶液中において NBS は単独で立体構造を維持している一方、CBS は単独では特定の構造をとらないが、NBS と相互作用することでより硬い構造をとることが NMR 解析により示唆された。

CagA は EPIYA モチーフ近傍に存在する CM 配列を介して PAR1b キナーゼと結合する。CagA と SHP2 との結合は PAR1b との結合により安定化されることが示されているため、CagA-SHP2-PAR1b 複合体の形成が CagA の病原活性を増強すると考えられる。そこで、CagA、SHP2、PAR1b の試験管内再構成を確認するため、ゲルろ過クロマトグラフィーを行った後に負染色し透過電子顕微鏡(TEM)で撮影した結果、CagA-SHP2-PAR1b 三者複合体の形成が認められた。

興味深いことに東アジアで蔓延している東アジア型 CagA とそれ以外の地域で発見される欧米型 CagA との間には分子構造に違い(多型)があり、この違いが胃粘膜疾患に影響していると考えられた。今回、CagA 分子内の CM 配列の多型に着目し、CM 配列が標的とする細胞極性キナーゼ PAR1b との結合能の違いについて定量的に解析したところ、欧米型 CagA では欧米型 CagA に特有の CM 配列が繰り返し増加することによって PAR1b への結合能が顕著に増強した。また、高病原性の東アジア型 CagA 分子には東アジア型 CM 配列が通常一個しか存在しないが、CagA 分子内に 2 個の欧米型 CM 配列をもつ欧米型 CagA と同等の PAR1b 結合能を発揮した。一方で、アマゾン流域で発見された低病原性の CagA は PAR1b 結合能を喪失していた。この PAR1b 結合能を反映して、CagA 依存的な細胞形態異常や細胞間接着の破壊が引き起こされた。以上のこ

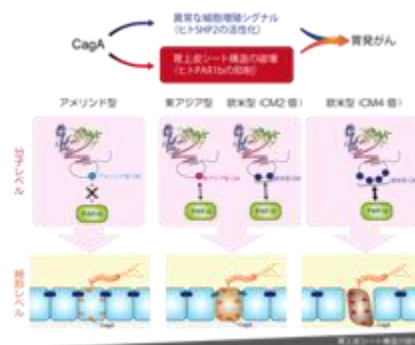


図 1. CagACM 配列の分子多型と胃上皮傷害活性

とから、ピロリ菌 CagA における CM 配列の多型がピロリ菌の胃上皮傷害活性を規定すると結論づけた(図1)。

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でのみ長い注射針を細胞外へ出し、CagA はその中を通して胃粘膜細胞へ注入されると提唱されていた(Kwok et al., Nature 2007)。しかし、提唱から 8 年経った現在でも、注入器官は長い注射針か短い筒の様な構造かで論争は続いており決着はついていない。本研究では、大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)を中心とし、様々な顕微鏡で相関観察することで CagA の細胞への運搬機構を観察した。その結果、感染に伴い胃粘膜細胞の性質が変化し、微小な突起が伸びてより密にピロリ菌と結合するようになる現象が観察された。

代表的な原著論文

1). Hiroko Nishikawa, Takeru Hayashi, Fumio Arisaka, Toshiya Senda and Masanori Hatakeyama, "Impact of structural polymorphism for the Helicobacter pylori CagA oncoprotein on binding to polarity-regulating kinase PAR1b", *Scientific Reports*, vol. 6, Article No. 30031, 2016