

千田俊哉

大学共同利用機関法人 高エネルギー加速器研究機構・物質構造科学研究所・構造生物学
研究センター・教授((独)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)

ピロリ菌の感染と発現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 (東京大学大学院医学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ 組替えタンパク質の大量発現・精製 (特にリン酸化された CagA (全体と部分) の調製)・結晶化
 - ・ CagA の細胞内移行とシグナル攪乱に関する構造-機能相関解析
 - ・ CagA の相互作用因子の同定と新規生物学的機能の解明

(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部門、グループ長)
- ② 研究項目
 - ・ ASEM を用いた、CagA の細胞内への移行経路の解析
 - ・ 極低温電子顕微鏡を用いたシグナル攪乱複合体の単粒子解析

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

ピロリ菌 CagA とその細胞内標的分子であるがんタンパク質 SHP2 の複合体の相互作用解析ならびに結晶構造解析を目的とし、各種組換えタンパク質の調製を行った。CagA は宿主細胞内に侵入した後、Src ファミリーキナーゼによって C 末領域にある EPIYA 配列内のチロシンがリン酸化修飾を受け、この修飾依存的に SHP2 の SH2 ドメインに結合することで SHP2 を活性化する。したがって CagA-SHP2 複合体の解析のためには高効率かつ均一にチロシンリン酸化された CagA を大量に発現し精製することが必要である。そこでまず、ピロリ菌標準株である 26695 株の全長 CagA を用い、チロシンリン酸化 CagA の大腸菌発現系の構築を試みた。CagA とチロシンキナーゼ v-Src を大腸菌体内で共発現させて培養・誘導条件を検討したところ、ほぼ全ての CagA を均一なチロシンリン酸化状態で可溶画分に発現させることに成功した。発現させたチロシンリン酸化 CagA を、GST タグとヒスチジンタグの2段階のアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、GST タグを除去後、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製することで、大腸菌培養液 1 L あたり約 0.5 mg の高度に精製されたチロシンリン酸化 CagA を得ることに成功した(図1)。また、ヒト SHP2 は N 末端領域にタンデムに連なった 2 つの SH2 ドメインを保有しており、両方の SH2 ドメインが CagA との相互作用に必要な十分であることがわかっている。このタンデム SH2 ドメインの大腸菌発現系も確立し、培養液 1 L あたり約 7 mg のタンデム SH2 ドメインを精製した。精製したタンデム SH2 ドメインは、チロシンリン酸化依存的に CagA と結合することが示された。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により、両者は約 500 nM の解離定数で結合することがわかった。CagA-SH2 相互作用が確認できたため、同複合体の構造決定を目的とし、現在共結晶化を行っている。

上記の全長 CagA に加え、2つのリン酸化チロシンを持つ CagA の EPIYA セグメントを合成し、これと SH2 ドメインとの相互作用解析実験および結晶化実験を開始した。約 90 アミノ酸にもおよぶ EPIYA セグメントの大量合成は困難であるため、2つの EPIYA 配列を PEG のリンカーでつないだペプチドを設計して実験に用いた。SPR 法により、両者の相互作用は解離定数が 1 nM 以下の強固な結合であることがわかった。この結果に基づき、チロシンリン酸化 CagA ペプチドと SH2 ドメインの共結晶化のスクリーニングを行ったところ、薄い板状晶を得た。高エネ研の PF-AR NE3A で回折実験を行い、約 4 Å 分解能の回

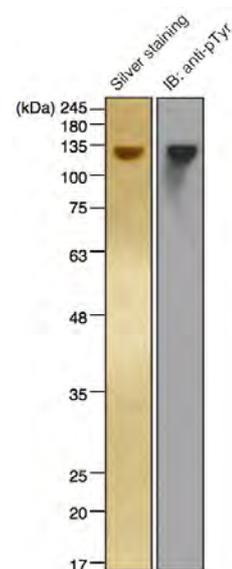


図1 精製されたチロシンリン酸化 CagA。左が銀染色、右が抗リン酸化チロシン抗体による染色。

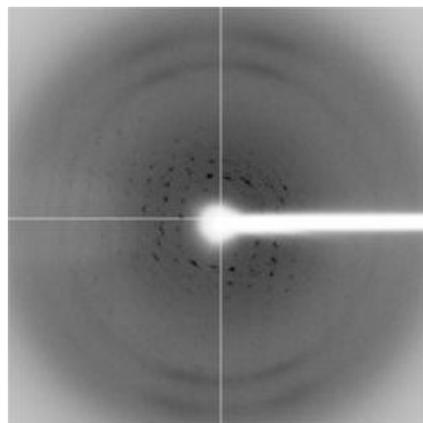


図2 得られた板状結晶からの回折像

折を確認した(図2)。今後は、結晶内に含まれる分子種の分析を行い、目的の複合体であることが確認できれば構造解析を進める予定である。

これまでの我々の研究から、シグナル攪乱複合体は CagA の天然変性領域内に存在する CBS と構造領域内の NBS の相互作用による投げ縄様のループ構造の形成を起点として、段階的に形成されていくと予想されている。本研究では、このモデルを CagA の部分構造を用いて検証する計画である。H24 年度は、投げ縄様の構造を有する CagA の部分構造領域(以後、投げ縄構造領域と呼ぶ)の組換えタンパク質の設計と発現系の構築を行い、大腸菌の小規模培養系において投げ縄構造領域の発現に成功している。現在、精製を進めている。

これらのX線結晶構造解析に加え、透過型電子顕微鏡による解析と、それに必要な解析ツールの開発も進めた。CagA単量体は分子量130kDaと電顕解析にとっては比較的分子量であるためコントラストが小さく微かにしか見えない。その画像拾い上げを実現するために、自動拾い上げアルゴリズムの開発を行った¹⁾(図3)。現在、本プログラムを用いて粒子の拾い上げを進めている。また、単粒子解析では、粒子像ライブラリーを構築した後に初期3次元構造を構築し、初期構造と画像ライブラリーとを照らし合わせながら、繰り返し計算によって構造を改善してゆく。この過程では、使用するアルゴリズムも含め様々なパラメーターを最適化する必要がある。このワークフロー最適化を最短時間で進めるために、ワークフローの最適化を大幅に自動化するプログラムも構築した²⁾。

CagAとSHP2等の相互作用因子の複合体の結晶化では、どのようなCagAの変異体を用いればより高い確率で複合体の結晶が得られるかの情報を得る事も重要である。その場合、個々の粒子を観察できる電顕画像は結晶化に多大なヒントを与える。そこで、既に原子構造が決定されているCagAのコアドメイン、CagA全長タンパク質に対しても電顕撮影を進めている。今後は既に得られているX線構造と電顕像との対応付けを行い、複合体の電顕観察の結果を結晶化スクリーニングに活用していく計画である。

これらに加え、ピロリ菌内で生産されたCagAが、ヒト細胞へと注入される様子を大気圧走査型電子顕微鏡(ASEM)により水溶液中で可視化する試みも開始した。ASEMは水溶液中の細胞を有機溶媒などによる疎水的な処理なしに直接観察できるため、変性しやすい抗原に対しても効率良く免疫電顕ができる。ASEM観察用の薄膜dish中で、ヒト胃粘膜株細胞であるAGS細胞を培養し、ピロリ菌を感染させた。4%パラホルムアルデ

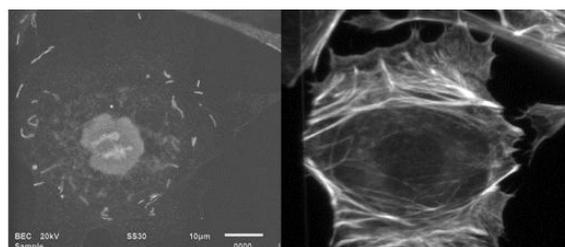


図3 ASEMによるCagAの免疫電顕。(左)AGS細胞の周りに付着したピロリ菌が強くラベルされた。菌の多くは細長い、一部は丸い。重金属染色により、核が浮き出て見えている。(右)同エリアでF-actin細胞骨格の蛍光観察。

ヒドで固定した後、Triton X-100で細胞膜の透過処理を行い、抗CagA抗体を用いて細菌内および粘膜細胞内のCagAのラベルを行った。2次抗体にはFluoroNanogoldで標識した抗体を用いた。金増感後に観察したところ、強くラベルされた細長いピロリ菌が、一部丸い菌と共に宿主細胞に貼り付いて観察された(図3)。宿主細胞にも薄いシグナルが見られたが、高分解能での観察には、重点的な条件検討が必要と思われる。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. M.Kawata, C.Sato. “Multi-reference-based multiple alignment statistics enables accurate protein particle pickup from noisy images”, *Microscopy*. DOI:10.1093/jmicro/dfs075. (In press).

2. T.Moriya, K.Mio, C.Sato. “Novel Convergence-Oriented Approach for Evaluation and Optimization of Workflow in Single Particle 2D Averaging of Electron Microscope Images”, *Microscopy*. (In press).