

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

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(研究機関別)

- 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(研究機関別)

- 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(研究機関別)

- 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. 研究実施の概要

ヘリコバクターピロリ(以下ピロリ菌)は、世界人口の約半数に感染している、胃がんや胃潰瘍などの原因として広く一般に知られる細菌である。ピロリ菌が産生する CagA タンパク質がこれらの疾病に大きく関わっている。CagA はピロリ菌内でつくられ、胃の中の胃粘膜上皮細胞に打ち込まれて細胞内に侵入し、細胞内の様々なタンパク質と結合し、巨大な分子集合体(複合体)となる。そして結合した細胞内タンパク質は正常な働きが阻害され、異常なシグナルを細胞内外に伝えることになり、異常な形をした細胞が形成され、さらに進行すると細胞ががん化すると考えられている。

そこで我々は、CagA と胃粘膜細胞内で結合するヒトのタンパク質からなる(シグナル攪乱)複合体に着目し、感染から発がんに至る過程を説明するタンパク質複合体の3次元構造を明らかにすることで CagA によるがん化プロセスを解明するための研究を行っている。具体的には、図1に示すような CagA(ドメイン I-III および天然変性領域)と PAR1、SHP2 といったヒトのタンパク質からなるシグナル攪乱複合体全体の結晶構造の決定を目指す。これに加え電子顕微鏡や NMR 法を併用した物理化学的な解析により、天然変性領域が関与する逐次的なシグナル攪乱複合体の形成機構の解明も行う。この中

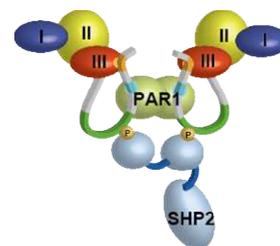


図1 シグナル攪乱複合体の模式図

には我々が提唱している C 末端領域の投げ縄構造モデルの検証も含んでおり、さらにリン酸化 EPIYA 配列と各種相互作用ドメインの複合体構造についても構造情報を取得し、CagA と疾病の関係を立体構造に基づき解明していく。また、これまでに詳しい分子メカニズムの分かっていない CagA の細胞内移行の電子顕微鏡を用いた解析も計画している。

今年度は、まずヒト SHP2-SH2 ドメインを大腸菌で大量に発現・調製し、化学合成したリン酸化 EPIYA 配列ペプチドとの相互作用を表面プラズモン共鳴法で確認し、立体構造解析に必要な複合体の結晶化実験を行った。その結果、最大で 2.6 Å 分解能の結晶を得ることに成功し、X 線回折データの収集にも成功した。現在、データの解析を進めている。投げ縄構造モデルの検証については、投げ縄構造領域を含む、出来るだけ小さな領域を大腸菌で調整すること肝要であるが、試行錯誤の結果 CagA674-1076 という長さで調製することに成功した。また投げ縄構造の形成を阻害するアミノ酸置換体の作成にも成功し、CD、ゲル濾過クロマトグラフィーあるいは X 線小角散乱を用いて投げ縄構造を形成する場合としない場合の立体構造の違いを明らかにした。今後の NMR 実験用には安定同位体でラベルしたタンパク質の調製が必要なため、そのための予備実験を行っている。またシグナル攪乱複合体の全体の立体構造解析を念頭に置いたサンプルの調製法の開発を行っており、そのための均質なリン酸化 CagA の調製を進めている。これまでのところリン酸化酵素の存在下の大腸菌での調製では複数のリン酸化パターンが確認され、リン酸化サイトの特定を急いでいる。早急に均質なリン酸化 CagA の調製を進めていきたい。またシグナル攪乱複合体の一部であるヒトタンパク質 PAR1b の大腸菌での調製を進めている。構成タンパク質の調製が難航した場合、培養細胞の導入も視野に入れて進めていく予定でいる。シグナル攪乱複合体は電子顕微鏡での撮影には単粒子解析を用いるが、コントラストの小さな画像から解析を行うには膨大な数の粒子を自動的に拾い上げるための技術開発が必要である。今年度はそのための画像

処理プログラムの開発を集中的に行った。さらに CagA の細胞内への移行経路の解析は ASEM による水中観察を実施する予定でいる。今年度はそのための基盤技術開発も実施しており、その中で標準生物の大腸菌・サルモネラ菌・乳酸菌を用いて正チャージ金粒子が効果的であることを示した。

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### 論文詳細情報(国内)

該当なし

##### 論文詳細情報(国際)

- B-1. Ryouhei Tsutsumi, Mohammad Masoudi, Atsushi Takahashi, Yumiko Fujii, Takeru Hayashi, Ippei Kikuchi, Yumeko Satou, Masanori Taira, Masanori Hatakeyama. “YAP and TAZ, Hippo signaling targets, act as a rheostat for nuclear SHP2 function”, *Dev Cell*, vol. 26, No. 6, pp.658-665, 2013 (DOI: 10.1016/j.devcel.2013.08.013)
- B-2. Miura K, Wakayama Y, Tanino M, Orba Y, Sawa H, Hatakeyama M, Tanaka S, Sabe H and Mochizuki N. “Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase”. *Oncogene*, vol. 32, No. 45, pp.5292-5301, 2013 (DOI: 10.1038/onc.2012.571)
- B-3. Takeru Hayashi, Hiroko Morohashi, and Masanori Hatakeyama. “Bacterial EPIYA effectors - Where do they come from? What are they? Where are they going?” *Cell Microbiol*, vol. 15, No. 3, pp.377-385, 2013 (DOI: 10.1111/cmi.12040)
- B-4. Yukie Yamahashi and Masanori Hatakeyama. “PAR1b takes the stage in the morphogenetic and motogenetic activity of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein”. *Cell Adh Migr*, vol. 7, No. 1, 11-18, 2013 (DOI: 10.4161/cam.21936)
- B-5. Kana Hashi, Naoko Murata-Kamiya, Christine Varon, Francis Mégraud, Maria Gloria Dominguez-Bello and Masanori Hatakeyama. “A natural variant of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein that lost the ability to interact with PAR1”. *Cancer Sci*, vol. 105, No. 3, pp.245-251, 2014 (DOI: 10.1111/cas.12342)
- B-6. Masanori Hatakeyama. “*Helicobacter pylori* CagA and Gastric Cancer: A Paradigm for Hit-and-Run Carcinogenesis”. *Cell Host Microbe*, vol. 15, No. 3,

pp.306-316, 2014 (DOI: 10.1016/j.chom.2014.02.008)

- B-7. Bessède E, Staedel C, Amador LAA, Nguyen PH, Chambonnier L, Hatakeyama M, Belleannée G, Megraud F and Varon, C. “*Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes”. *Oncogene*, in press (DOI: 10.1038/onc.2013.380)
- C-1. Toshio Moriya, Kazuhiro Mio and Chikara Sato. “Novel Convergence-Oriented Approach for Evaluation and Optimization of Workflow in Single Particle 2D Averaging of Electron Microscope Images”, *Microscopy*. Vol. 62, No. 5, pp. 491-513, 2013 (DOI: 10.1093/jmicro/dft026)
- C-2. Masaaki Kawata and Chikara Sato, “Multi-reference-based multiple alignment statistics enables accurate protein particle pickup from noisy images”, *Microscopy*. Vol. 62, No. 2 ,pp. 303-315, 2013 (DOI: 10.1093/jmicro/dfs075)
- C-3. Tatsuhiko Ebihara, Hidetoshi Nishiyama, Mituo Suga and Chikara Sato. “Electron-light Correlative Microscopy in Open Solution by Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) ” , *Advances in Imaging and Electron Physics*, Vol. 179, pp. 152-154, 2013
- C-4. Hidetoshi Nishiyama, Kanae Teramoto, Mitsuo Suga and Chikara Sato, “Positively Charged Nanogold Label Allows the Observation of Fine Cell Filopodia and Flagella in Solution by Atmospheric Scanning Electron Microscopy”, *Microscopy Research and Technique*, Vol. 77, No. 2, pp. 153-160, 2014 (DOI : 10.1002/jemt.22322)
- C-5. Kazumi Hirano, Takaaki Kinoshita, Takeshi Uemura, Hozumi Motohashi, Yohei Watanabe, Tatsuhiko Ebihara, Hidetoshi Nishiyama, Mari Sato, Mitsuo Suga, Yuusuke Maruyama, Noriko M. Tsuji, Masayuki Yamamoto, Shoko Nishihara and Chikara Sato, “Electron microscopy of primary cell cultures in solution and correlative optical microscopy using ASEM”, *Ultramicroscopy*. (in press) (DOI : org/10.1016/j.ultramic.2013.10.010i)
- C-6. Kazuhiro Mio, Tomoya Tsukazaki, Hiroyuki Mori, Masaaki Kawata, Toshio Moriya, Yoshikazu Sasaki, Ryuichiro Ishitani, Koreaki Ito, Osamu Nureki and Chikara Sato, “Conformational variation of the translocon enhancing chaperone SecDF”, *J Struct Funct Genomics*, (in press) (DOI : 10.1007/s10969-013-9168-4)
- C-7. Takaaki Kinoshita, Yosio Mori, Kazumi Hirano, Shinya Sugimoto, Ken-ichi Okuda, Shunsuke Matsumoto, Takeshi Namiki, Tatsuhiko Ebihara, Masaaki Kawata, Hidetoshi Nishiyama, Mari Sato, Mitsuo Suga, Kenichi Higashiyama, Kenji Sonomoto, Yoshimitsu Mizunoe, Shoko Nishihara, and Chikara Sato, “Immuno-Electron Microscopy of Primary Cell Cultures from Genetically

Modified Animals in Liquid by Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM)", Microscopy and Microanalysis, (in press) (DOI : 10.1017/S1431927614000178)