

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
  - ・ 哺乳動物細胞を用いた病原活性解析

### (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. 研究実施の概要

ピロリ菌由来タンパク質である CagA は特定の立体構造を持つ構造領域とランダムな構造からなる天然変性領域で構成される。CagA はヒトの胃の細胞に侵入すると天然変性領域が胃の様々なタンパク質分子と相互作用することで細胞内シグナルを攪乱し、がんなどの胃関連疾病を引き起こすと考えられている。これまでの我々の研究から、構造領域が分子内相互作用によって投げ縄様構造をとることで標的分子とより安定した複合体を形成し、効率よくシグナルを攪乱することができることが示唆されてきた。このモデルを検証するため、投げ縄構造領域を取り出して、円偏光二色性解析、X 線小角散乱、NMR 解析などによる溶液構造解析を行った。その結果、確かに天然変性領域と構造領域が相互作用し、特有の立体構造が誘起されていることを確認した。

シグナル攪乱複合体 (CagA-PAR1-SHP2 三者複合体) の解析に関しては、困難が予想される三者複合体の解析に先立ち、二者複合体の構造解析と機能解析を進めてきた。チロシンリン酸化された CagA は SHP2 と直接結合して異常活性化させることから、チロシンリン酸化 CagA ペプチドを用いて SHP2 の SH2 ドメインとの相互作用解析ならびに複合体の結晶構造解析を東アジア型、欧米型両者のリン酸化 CagA ペプチドを用いて行った。その結果、東アジア型 CagA ペプチドは欧米型 CagA ペプチドに比較して強く SHP2 と結合することがわかった。さらに、結晶構造解析から東アジア型 CagA と欧米型 CagA の間で SHP2 との結合様式に違いがあることを原子のレベルで示すことに成功した。また、SHP2 の酵素活性を指標とした解析からも、東アジア型 CagA は欧米型 CagA と比較して SHP2 のホスファターゼ活性をより激しく亢進させることを明らかにした。CagA による PAR1 活性の阻害に関しても解析を行い、欧米型 CagA に比較し東アジア型 CagA は PAR1 とより強く結合することを明らかにした。以上より、東アジア型 CagA は SHP2 の活性化ならびに PAR1 の不活性化の双方において、欧米型 CagA よりも強く細胞内シグナル攪乱を引き起こすものと推察される。

CagA の細胞内移行の解析に関しては、ASEM 観察法の基盤技術開発を中心にプロジェクトを進めた。ASEM の観察では、細胞の観察前処理に有機溶媒などによる疎水処理を必要とせず、細胞のデリケートな構造や抗原性を変化させずに免疫ラベルできる利点がある。これまでに開発してきた正チャージ金ラベル ASEM 法を応用し *H. pylori* を固定後に正チャージ金ラベルし金増感後に観察した結果、正チャージ金粒子はバクテリア観察に有用であることが判明した。また、金・蛍光粒子を用いた免疫ラベル法の開発に成功し、抗原の細胞膜からの内在化を、測定プログラムの開発により解明した。現在この技術を用いて、CagA が、*H. pylori* で生産され、ヒト細胞へと注入される様子の可視化を抗 CagA 抗体を使って行っている。また、培養系ではなく胃の組織を直接観察する手法の開発も行った。マウス胃の組織の一部を取り出し、固定後に直接電子線透過薄膜上に置くことで、胃の共生細菌を観察することに成功している。現在、*H. pylori* を感染させた胃粘膜細胞を、エポキシ樹脂包埋後に超薄切片にして TEM 観察を行い、*H. pylori* の注入装置の観察を行っている。

