

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：82118

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18495

研究課題名(和文)ヘリコバクター・ピロリ菌CagAの投げ縄構造による機能調節機構の解明

研究課題名(英文)Structural biology of the intrinsically disordered region of CagA

研究代表者

鈴木 喜大 (Suzuki, Nobuhiro)

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・研究員

研究者番号：40712659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌由来のCagAは胃がんや胃潰瘍などの原因因子として知られている。CagA分子は硬い構造を持つ構造領域と特定の構造を持たない天然変性領域からできている。これまでの研究から天然変性領域が構造領域と分子内で相互作用することによって投げ縄のような構造を形成することでCagAの機能発現を調整していることが示唆されている。本研究ではこの調節機構の詳細を明らかにするため、NMRやX線小角散乱、円偏光二色性解析などの手法を組み合わせ、投げ縄構造形成時の動的構造を解析した。その結果、天然変性領域の分子内相互作用部位は投げ縄構造形成時に構造変化を起こし、ヘリックス構造をとることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：CagA is a protein produced by *Helicobacter pylori* and is known to cause gastric ulcer and gastric cancer. When injected into the target cell by the bacterium, CagA interacts with many different signaling molecules and deregulate the bound targets. CagA is composed of N-terminal structured region and C-terminal intrinsically disordered region. It has been suggested that the intrinsically disordered region forms a loop like structure by intramolecularly interacting with the structured region. Here we performed solution structure analysis of this loop like structure to elucidate the significance of the structure for its function by means of NMR, SAXS, CD analyses and other structural studies with functional analysis. To be noted, CD and NMR analyses revealed that, upon intramolecular interaction between the structured region and intrinsically disordered region, the interaction site in the intrinsically disordered region formed helices likely to form helix bundles with structured region.

研究分野：構造生物化学

キーワード：ピロリ菌 CagA 天然変性領域

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリは胃がんや胃潰瘍などの胃粘膜関連疾病の原因菌として知られる。ピロリ菌は胃粘膜に侵入すると自身が持つ型分泌機構と呼ばれる注射針で上皮細胞内に CagA と呼ばれるタンパク質を打ち込む。CagA はヒト細胞でチロシンリン酸化を受けて、リン酸化依存のあるいは非依存的に様々な細胞内の標的タンパク質に結合し、標的タンパク質の機能を脱制御する。CagA により細胞内シグナルが攪乱された結果、胃粘膜細胞の極性が破壊され、異常な増殖などが起こり、胃粘膜関連の疾病が引き起こされる一因になっていると考えられている。したがって、CagA の機能発現の分子メカニズムを詳細に明らかにすることは医学的見地からも疾病の予防や治療法の開発という点で非常に重要であると言える。

CagA はおよそ 1200 アミノ酸残基からなるタンパク質で、N 末端側の全体の 7 割からなる構造領域と C 末端側の残りの 3 割からなる天然変性領域に分けられる。特に N 末端側の構造領域に関しては、結晶構造がすでに決定され、これまでに知られていなかった、新規の構造を持っていることが明らかにされた。構造領域は三つのドメインで形成されており、比較的可動性の高いドメイン と塩基性パッチを持ち細胞内膜との相互作用による CagA の内膜への局在に重要なドメイン と天然変性領域に続くドメイン に分けられる。一方で、C 末端側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おり、その機能において重要な役割を担っている。興味深いことに天然変性領域はドメイン と分子内相互作用することで投げ縄のような構造を形成することが示唆された。この際、ドメイン は細胞の内側に面していることで投げ縄構造の標的タンパク質結合サイトが安定して細胞内に向いていることで、様々な標的タンパク質と相互作用が促進され、つまり投げ縄構造の形成が CagA の機能発現を調整していることが示唆された。したがって、この投げ縄様の立体構造を明らかにし、CagA の機能発現の分子メカニズムを明らかにすることは、ピロリ菌による胃粘膜関連疾病の発症メカニズムを解明することにつながり、医学的見地からもこれら疾病の予防法や治療法の開発につながるものと期待される。

2. 研究の目的

(1) CagA は構造領域と本天然変性領域の分子内相互作用により投げ縄様構造を形成し、それが起点となって標的タンパク質との高次複合体を形成して細胞内シグナルを攪乱する。本研究では、この起点である CagA の投げ縄様構造の構造解析を行うことで CagA の機能調節機構を明らかにすることを目的とする。そのために、投げ縄構造の形成過程を明らかにするため CagA の動的構造解

析を行うことで、投げ縄構造形成時の構造変化の詳細を解明する。

(2) 実際に構造解析を行う際にできるだけ必要最小限の投げ縄部分構造の取得が肝要である。そして、取得した投げ縄部分構造が機能を保持していることの確認も必要であるが、同時に投げ縄部分構造の機能解析を行うことで実際にどの様に投げ縄構造の形成によって機能調節されているかという点についても明らかにする必要があり、本研究では投げ縄部分構造を用いた標的タンパク質との相互作用解析も行っていく。

3. 研究の方法

(1) まず、投げ縄様構造解析を行うには、全長の CagA では NMR 解析による溶液構造解析に適したできるだけ分子量を抑えた部分構造の取得が、実際の構造解析での成否を左右する。従って、まず様々な長さのコンストラクトを作成し、投げ縄の安定な最小単位を決定する。次に各種構造解析に耐えうる純度で勝つ十分な量の投げ縄部分構造の取得を試みる。得られたサンプルをまず円偏光二色性 (CD) 解析やゲル濾過カラムクロマトグラフィー解析など物理化学的な解析を行うことで、その後の X 線小角散乱や ¹H NMR などによる構造解析に適しているかの確認を行う。その後、実際に NMR 解析や X 線小角散乱解析を行い、大まかな構造情報を取得する。さらに可能であれば安定同位体を導入し、より詳細な NMR 解析を行う。一方、より詳細な構造解析に関しては、分子内相互作用部位のみを取り出して、その投げ縄構造形成時 (つまり分子内相互作用時) に起こる構造変化についての構造情報を取得する。同時に分子内相互作用部位の複合体の結晶構造解析を目指した結晶化を行う。

(2) 上述の実験で安定した投げ縄様構造を取得したのち、標的タンパク質との相互作用解析を行う。その際、標的タンパク質のひとつである SHP2 とは投げ縄上にある EPIYA 配列がチロシンリン酸化されている必要がある。したがって、相互作用解析を行うためには均一なリン酸化体を取得が必須になる。そこで、Src との共発現によるリン酸化体の取得をまず試みる。実際に使用する投げ縄構造領域にはチロシン残基が複数存在しているため、均一なリン酸化体が得られない可能性がある。その場合は変異の導入、培養細胞の導入などにて検討を行う。相互作用解析は、まずプルダウンアッセイなどで定性的に相互作用解析を行って、実際の相互作用を確認する。相互作用が確認できれば、その後の詳細な定量的な解析を SPR 解析等で行う。

4. 研究成果

(1) 投げ縄部分構造の構造解析

これまでに構造解析に必要な最小限の投

げ縄部分構造を取得するため様々なコンストラクトを作成してきた。しかしながら、短いものは非常に分解されやすく、高い純度で効率よく調製することが困難であることから、その後の解析には適さないことが判明した。そこで、構造領域をある程度含む大きさの投げ縄部分構造を作成したところ、比較的高い純度で、効率よく調製することが可能になった。続いて、すでに投げ縄構造内の分子内相互作用部位は予測されているため、投げ縄構造を形成できないような変異を分子内相互作用部位に導入し、不完全な投げ縄部分構造を取得した。これらについてゲル濾過クロマトグラフィーやX線小角散乱解析を行ったところ、分子サイズや慣性半径が変異体の方でより大きくなることが観測された。これは分子内相互作用を阻害すると投げ縄様構造が影響を受けたためであると考えられた。

より詳細な溶液構造解析を行う為、CD解析を行った。まず野生型投げ縄部分構造は4割程度のヘリックス含量があることが判明した。さらにNMR解析でも同様に一定程度の二次構造があることが確認できた。これらのデータは、予測される投げ縄部分構造の構造領域と天然変性領域の分子内相互作用部位（おそらく構造領域とともにヘリックスバンドルを形成すると思われる）を合わせた分に相当する二次構造量とよく一致していた。またNMRの化学シフトインデックス法により、特に標的タンパク質との相互作用部位であるEPIYA配列は伸びた構造をしていることが示唆された。一方、変異体のCD解析では二次構造量が低下していた。これは、分子内相互作用時にあるヘリックス構造が、投げ縄構造の形成を阻害することでその分の二次構造量が減少している可能性を示唆していた。したがって上述の通り、分子内相互作用部位がヘリックスバンドルを形成しているという仮説とよく一致していた。

さらに詳細な二次構造解析を行う為、投げ縄部分構造とその変異体の熱変性をCDスペクトルの変化を観測することで解析した。熱変性解析ではサンプルを10度から90度に上昇させ、その間のCDスペクトルの変化、特にヘリックス由来のシグナルである222nmの強度変化を解析した。同様に90度から10度で下降させた時のデータも取得することで変性が可逆的かどうかを調べた。興味深いことに、野生型においては40度付近、及び60度付近の二段階による変性が起こるが、野生型においては60度付近の一段階での変性が起こることが判明した。これは投げ縄構造の分子内相互作用の破壊が40度付近で起こり、より固い構造領域の構造変化が60度付近で起こることを示唆している。またどちらの変性も可逆的に起こることが確認された。

この投げ縄構造の二段階変性の仮説を検証するため、投げ縄部分構造に含まれる構造領域のみ（天然変性領域を除外したもの）を

作製し、また分子内相互作用部位に変異を導入したものも同時に作製し、同様のCD解析を行った。まず構造領域では変異のあるなしに関わらず二次構造量に変化は見られず、熱変性解析でもどちらも60度付近で一段階変性が起こることが観測され、上述の投げ縄の二段階変性を裏付ける結果を得ることができた。

(2)本研究では投げ縄構造の部分構造をNMRで解析することを目的の一つとしている。一方で、すでに述べたように安定な部分構造が想定よりも大きい場合NMR解析には適していない。そこで詳細な部分構造解析は分子内相互作用部位に特化して行うこととした。そこでまず構造領域側の分子内相互作用部位として、先に使用した投げ縄部分構造の構造領域のみを構造領域側の分子内相互作用部位としてNMR解析に用いることとした。この領域はすでにX線結晶構造解析で立体構造が決定されているため、本研究では天然変性領域側の分子内相互作用部位の立体構造をNMRによって解析した。天然変性領域の分子内相互作用部位は比較的発現量が多く、容易に調製できた。まず二つの分子内相互作用部位を用いてCD解析を行った。その結果、両者を混ぜた際に、天然変性領域の分子内相互作用部位が構造変化を起こして二次構造量が増加することが確認された。これは構造領域の相互作用部位に変異を導入したものをを用いると観測されないことから相互作用による構造変化であることが確認できた。続いて、天然変性領域を標識してNMR解析を行ったところ、CDと同様の傾向が観測され二つの相互作用部位が合わさるとNMRシグナルが変化することが観測された。現在はより詳細な構造解析を行っており、天然変性領域の相互作用部位の相互作用時の立体構造の決定を目指している。

(3)本研究で構造解析に使用した投げ縄部分構造及びそのリン酸化体について相互作用解析を行った。まず、リン酸化体をv-Srcとの大腸菌内での共発現で作成し、リン酸化状態を確認した。その結果、リン酸化が均一ではなく、複数の分子種が得られることがFT-IRMS解析で判明した。そこで、相互作用に必要なEPIYAのチロシン以外のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体を作成し、同様に共発現させることで均一なリン酸化体を取得した。続いて、標的分子であるSHP2とPAR1bを用いてGSTプルダウンアッセイにより相互作用の定性的な解析を全長のCagAと同様の性質を持ち、機能的な投げ縄構造を取得できていることを示した。次に投げ縄部分構造とそのリン酸化体によるSHP2(SH2ドメイン)への結合能をSPRによる定量的な解析を行った。その結果、リン酸化していない投げ縄部分構造ではSH2ドメインへの結合が検出できなかったが、リン酸化

体については結合が確認でき、さらに解析を進めることで乖離定数を取得した。

(4) 標的分子である SHP2 の CagA による活性の異常亢進における分子メカニズムを明らかにするため、チロシンリン酸化した EPIYA 配列を含むペプチドを用いて溶液構造解析を行った。まず SHP2 単独で X 線小角散乱解析を行ったところ、すでに報告されている結晶構造から計算した理論散乱プロファイルとよく一致していた。一方で、ペプチドを加えたものについて同様の解析を行ったところ、分子サイズ、慣性半径ともに単体のものよりも増大しており、散乱プロファイルと結晶構造のドメイン構造を基に計算した rigid body モデルを解析したところ、ペプチドの SH2 ドメインへの結合により、単体では活性部位を覆っていた SH2 ドメインが乖離して、活性部位が溶媒に露出することによって SHP2 が活性化する様子が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 3 件)

鈴木 喜大、林 剛瑠、千田 美紀、長瀬 里沙、畠山 昌則、千田 俊哉. ピロリ菌 CagA EPIYA セグメントと複合体を形成した SHP2 の SAXS 解析. 2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ 2017 年 3 月 15 - 16 日 茨城県、つくば市

鈴木 喜大、林 剛瑠、千田 美紀、長瀬 里沙、畠山 昌則、千田 俊哉. ピロリ菌 CagA EPIYA 領域と複合体を形成した SHP2 の溶液構造解析. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日 神奈川県、横浜市

鈴木 喜大、千田 美紀、長瀬 里沙、林 剛瑠、畠山 昌則、千田 俊哉. ピロリ菌 CagA の C 末端天然変性領域による投げ縄様構造の解析. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会)2015 年 12 月 1 - 4 日 兵庫県、神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 喜大 (SUZUKI, Nobuhiro)

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・研究員
研究者番号：40712659

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

千田 俊哉 (SENDA, Toshiya)

清水 信隆 (SHIMIZU, Nobutaka)

畠山 昌則 (HATAKEYAMA, Masanori)

竹内 恒 (TAKEUCHI, Koh)