

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82118

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15155

研究課題名（和文）ヘリコバクター・ピロリCagAタンパク質の発がん活性を規定する分子構造基盤

研究課題名（英文）Molecular structural basis for the oncogenic activity of Helicobacter pylori CagA protein

研究代表者

長瀬 里沙（Nagase, Lisa）

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：60768034

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヘリコバクター・ピロリCagAタンパク質の分子多型である欧米型CagAと東アジア型CagAの間のSHP2結合能の差異を、X線結晶構造解析を用いて構造生物学的側面から解析するために、CagA-SHP2複合体の結晶化を試みた。複合体の安定性解析や変異体の作成などを行ったが、結晶を得ることはできなかった。そこで、クライオ電子顕微鏡での立体構造解明を目指し、ナノディスク膜を用いた脂質二重膜-CagA-SHP2複合体の調整を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのCagA-SHP2複合体研究は、培養細胞に発現させたCagAを用いた生化学的実験によるものであり、構造学的解析は多くない。本研究により、構造解析に必須なCagAの組換えタンパク質をチロシンリン酸化体の精製が可能となったことにより、CagA-SHP2複合体の構造生物学的解析を世界に先駆けて遂行することが可能となった。今後、本研究の成果を起点としてCagAの発がん生物活性発現機序の構造学的知見が得られれば、ピロリ菌感染を起因とする胃癌に対する治療薬の開発に繋がります。胃癌患者の98%以上がピロリ菌感染陽性であることを考慮すると、本研究の学術的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In order to analyze the difference in SHP2 binding affinity between European CagA and East Asian CagA, a molecular polymorphism of Helicobacter pylori CagA protein, from a structural biology using X-ray crystallography, we attempted to crystallize the CagA-SHP2 complex. Although we analyzed the stability of the complex and created mutants, we could not obtain crystals. Therefore, we are now adjusting the lipid bilayer-CagA-SHP2 complex using nanodisc membranes with the aim of elucidating the three-dimensional structure by cryo-electron microscopy.

研究分野：構造生物学

キーワード：ピロリ菌 CagA

1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)は世界人口の約半数が感染しているとされるグラム陰性桿菌で、その慢性持続性感染は胃がんを含む種々の胃粘膜病変を引き起こす。特に、ピロリ菌 *cagA* 遺伝子陽性株は胃がん発症の危険率を著しく高めることがわかっている。*cagA* 遺伝子産物である CagA は胃上皮細胞内に侵入した後、Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化される。CagA はチロシンリン酸化依存的にがんタンパク質 SHP2 と特異的に結合する。CagA は SHP2 と結合することで SHP2 のホスファターゼ活性を異常に亢進し、細胞増殖および細胞運動に関わる細胞内シグナルを脱制御する。このことから、CagA-SHP2 複合体の形成が胃がんの発症に重要な役割を担うと考えられており、CagA と SHP2 との結合親和性が胃がんの発症を決定する分子基盤となっている可能性がある。そこで、CagA の発がん生物活性の発現機序を理解するためには、CagA の SHP2 結合強度を規定する分子機構を解明する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、CagA の分子多型である欧米型 CagA と東アジア型 CagA の間の SHP2 結合能の差異を、X 線結晶構造解析を用いて構造生物学的側面から解析することを目的とした。CagA チロシンリン酸化部位は C 末側領域に複数存在する EPIYA(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)モチーフ内のチロシン残基である。CagA の C 末側領域は、EPIYA モチーフ周辺のアミノ酸配列を異にする 4 つのセグメント(EPIYA-A, -B, -C, -D)が種々に組み合わせられ構成されており、欧米型 CagA は EPIYA-C セグメントを持つ、東アジア型 CagA は EPIYA-D セグメントを持つ。欧米型 CagA においては EPIYA-C セグメントを複数回繰り返して持つものが存在し、最大 6 回繰り返して持つものが発見されている。これまでに、EPIYA-D セグメントを単一で持つ東アジア型 CagA は EPIYA-C セグメントを単一で持つ欧米型 CagA と比較して SHP2 結合活性が強いことが明らかとなっている。また、欧米型 CagA においては、EPIYA-C セグメント数が増すに従い SHP2 結合能が増強する。

本研究では、これらの CagA 分子多型と SHP2 との複合体の構造学的解析により、CagA と SHP2 との結合能の強弱と CagA の発がん活性の強弱との相関を解明することを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、ピロリ菌病原因子 CagA の SHP2 結合活性を構造生物学的に解析することで、CagA 分子多型が示す SHP2 結合能の差異の分子基盤の解明を目指す。そこでまず、チロシンリン酸化 CagA-SHP2 複合体の結晶構造解析を行った。

4. 研究成果

初めに、チロシンリン酸化 CagA ペプチド-SHP2 複合体の結晶構造解析を行なった。まず、EPIYA-D ペプチド-SHP2 複合体の結晶化スクリーニングから開始した。嫌気チャンパー内でのスクリーニングの結果、結晶が得られる条件が見つかったが、得られた結晶は非常に脆く X 線回折実験に用いることができなかった。また、結晶化の再現性が非常に低く、安定的に結晶が得られる条件は見つからなかった。そこで、CagA の別の宿主細胞内標的分子である PAR1 キナーゼを加えた CagA-SHP2-PAR1 三者複合体を形成させることで CagA-SHP2 間の結合が安定化するということが示唆されていたため、次に、CagA の EPIYA-D セグメントならびに CagA の PAR1 結合部位である CM 配列を模したペプチド(EPIYA-D-CM ペプチド)と SHP2 および PAR1 との三者複合体の結晶化に着手した。この複合体を用いて結晶化スクリーニングを行なったが、複合体の結晶は得られなかった。

そこで次に、EPIYA-D ペプチド-SHP2 複合体および EPIYA-D-CM ペプチド-SHP2-PAR1 複合体の

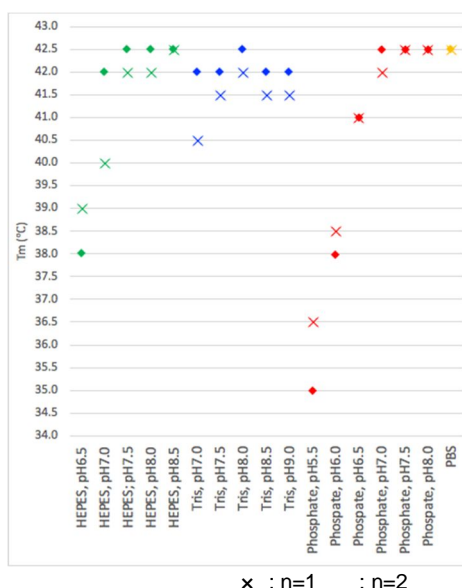


図 1 DSF 法により測定された Tm 値

安定性解析を行なった。緩衝液の種類、pH、NaCl濃度、温度、結合させる時間を変化させて、示差走査蛍光定量法(DSF)およびゲルろ過クロマトグラフィーを行なった結果、リン酸緩衝液、pH7.0-8.5においてCagA-pep-N-SH2-PAR1KD複合体の安定性が高くなる傾向があった(図1)。続いて、複合体安定性の高くなる傾向のあった緩衝液中でEPIYA-D-CMペプチド-SHP2-PAR1複合体を形成させた後、結晶化ロボットを使用して広範囲の結晶化条件を検討したところ結晶が得られる条件が見つかった(図2)。得られた結晶を用いてX線回折実験を行なった結果、これらの結晶はPAR1単独、あるいはN-SH2単独だった。

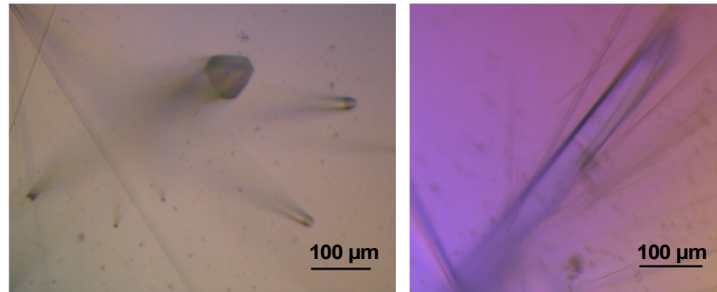


図2 結晶化ロボットにより得られた結晶

CagAは胃上皮細胞内で細胞膜に局在することがわかっており、CagA-SHP2-PA1複合体は膜上でより安定化する可能性がある。そこで、脂質二重膜をアポリポタンパク質で安定化したナノディスクを含めた複合体を用いて安定性解析を行うことを計画した。まず、ナノディスクの作製を試みた。脂質はCagAが局在していると考えられる細胞膜内葉を構成しているフォスファチジルセリン(POPS)を用いた。作製したナノディスクを負染色法により電子顕微鏡で観察した。その結果、丸い粒子が観察され、ナノディスクが再構成できていることが確認された(図3)。このナノディスクを用いてCagAとの複合体の形成を試みているが、現在までに安定して複合体が形成できる条件が見つからない。今後は、ナノディスク-CagA-SHP2複合体を形成させて、クライオ電子顕微鏡により立体構造の解明を目指していく。

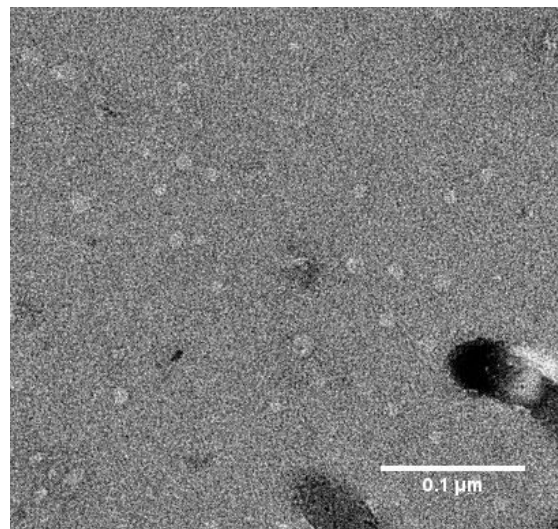


図3 ナノディスクの負染色像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長瀬里沙、千田美紀、千田俊哉
2. 発表標題 結晶化に向けたピロリ菌CagAタンパク質が構築する宿主細胞内シグナル攪乱複体の安定性解析
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長瀬里沙、千田美紀、千田俊哉
2. 発表標題 ピロリ菌CagAタンパク質が構築する宿主細胞内シグナル攪乱複体の結晶化
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長瀬里沙、千田美紀、千田俊哉
2. 発表標題 結晶化に向けたピロリ菌CagAタンパク質-細胞内標的分子複体の安定性解析
3. 学会等名 2018年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 東北放射光施設推進会議推進室	4. 発行年 2019年
2. 出版社 アグネ技術センター	5. 総ページ数 344
3. 書名 放射光利用の手引き	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------