

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840052

研究課題名(和文)ピロリ菌発がん因子Tipの構造と活性の相関

研究課題名(英文)Structure-activity relationship of carcinogenic factor, Tip-alpha, from Helicobacter pylori

研究代表者

鶴村 俊治 (TSURUMURA, Toshiharu)

京都産業大学・総合生命科学部・研究員

研究者番号：50450250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Tipは、ピロリ菌が分泌し胃がんを誘発する原因となる二量体のタンパク質である。N末端を欠損した変異体del-Tipについて結晶構造を明らかにした。結晶化条件のpHによりその二量体がオープン、クローズの二状態あることが明らかとなった。本研究では二量体構造と機能の相関を調べるため固定化したTipの二量体を作製し、構造解析および機能解析を行うことを目的とした。固定化二量体を作製を試みたところ解離しない二量体を確認した。また、異なるpHでX線小角散乱法にて形態評価を行った結果、結晶中と同様に溶液中においても、酸性、中性条件下の構造は異なる。さらに中性下のTipがクローズ型である結果を得た。

研究成果の概要(英文)：TNF inducing protein (Tip) is secreted by Helicobacter pylori and it induces gastritis and gastric cancer. Tip forms homo-dimer with two disulfide bonds via two cysteine residues at N-terminus. I and colleagues revealed the crystal structure of N-terminus deletion mutant (del-Tip). Based on our del-Tip structure and other Tip and del-Tip structures, Tip forms the open dimer to closed one at acidic and neutral condition, respectively. In this study, we evaluated the dimer formations of Tip and del-Tip by small angle X-ray scattering technique. The results indicated that the dimer formations in the crystals at both acidic and neutral pH are same as the formations in the solution, and furthermore, the dimer of Tip at neutral condition, which has not been revealed, is the closed-form dimer.

研究分野：X線結晶構造解析

キーワード：ピロリ菌 胃がん

1. 研究開始当初の背景

ピロリ菌 (*Helicobacter pylori*) は、世界人口の約半分が保菌者であり、ピロリ菌の感染によって TNF などの炎症性サイトカインや様々なケモカインが誘導され炎症を引き起こし、胃炎や胃潰瘍、胃がんの原因となる。WHO においてピロリ菌が「胃がんリスク確実群 1」に分類され、さらに J.R.Warren 博士と B.J.Marshall 博士によるピロリ菌発見の経緯と彼らのノーベル賞受賞から専門家のみならず一般の人々の間でもその重要性が注目されている。ピロリ菌は、感染後、胃上皮細胞に作用し胃潰瘍や胃がんの進行促進に関わる CagA や VacA、ウレアーゼなどは別に、TNF- $\alpha$  を誘導するタンパク質 Tip (TNF inducing protein) を発現することが、共同研究者の菅沼博士らによって同定され、Tip が TNF を誘導することを実証した (Fig.1A)。

Tip がヌクレオリンと結合することも菅沼らによって明らかにされている。本来、核内に存在するヌクレオリンがピロリ菌感染による Ras 活性化の影響でがん細胞において一時的に細胞表面に移行することが明らかにされており、ヌクレオリンが細胞表面で

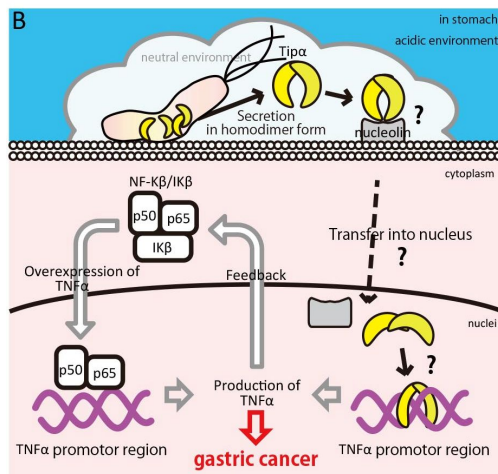
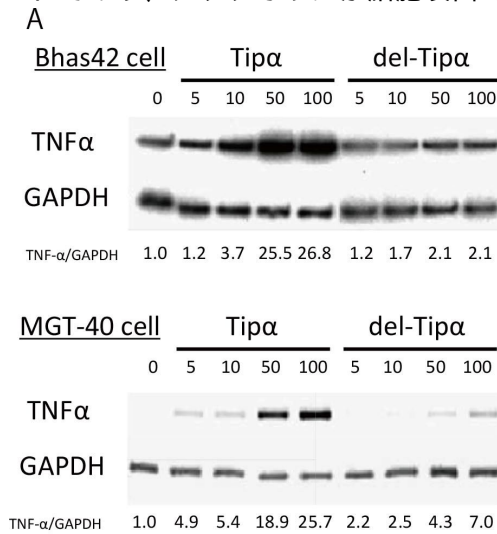


Figure 1 Tip による TNF 誘導と機構

Tip と結合し、細胞内および核内へ移行すると示唆されている。さらに Tip は TNF 遺伝子のプロモータ領域に結合することが明らかにされている。

これらの結果から Tip は細胞表面でヌクレオリンと結合し核内まで移行し、TNF- 遺伝子プロモータと結合、TNF を誘導し炎症を誘発すると考えられる。それに加え、ピロリ菌の感染によって NF- $\kappa$ B も活性化されていることから、誘導された TNF が NF- $\kappa$ B の活性化を亢進し更なる TNF の産生を誘導し胃がんを発症すると考えられる (Fig.1B)。

TNF は活性型である野生型の Tip に誘導されるが、不活性型である N 末端欠損変異体 (del-Tip ) では TNF は誘導されない (Fig.1A)。

del-Tip では 2.9 の構造を解析するに至った (Fig.2) Tip ではその沈殿しやすさから結晶を得ることが容易ではなかったが、条件の改良を続けアミノ酸欠損も変異もない全長で 2.9 のデータを得ることができ、解明に向け精密化中であった。これまでに報告されている構造から、Tip (del-Tip ) の二量体は N 末端を蝶番として、塩基性側 (pH8 程度) のクローズ構造と酸性側 (pH5 程度) のオープン構造の異なる形をとることが示

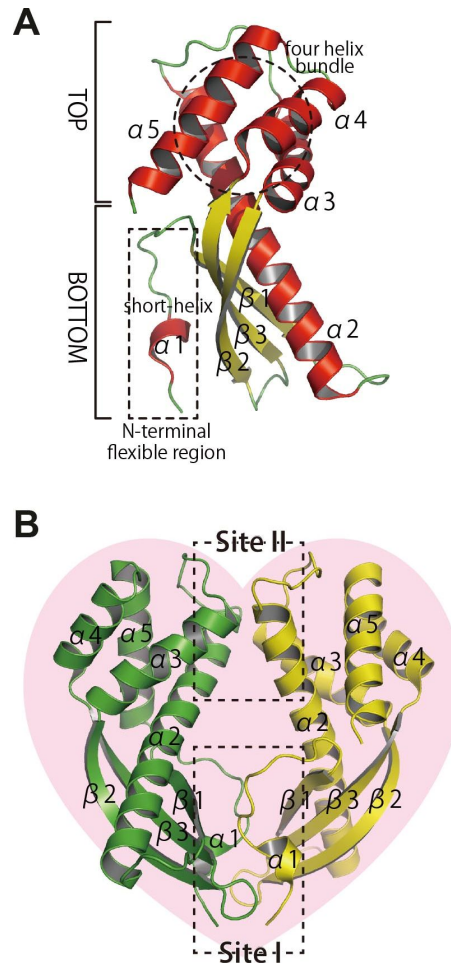


Figure 2 del-Tip の結晶構造

唆される。TNF 遺伝子プロモータやヌクレオリンとの複合体構造はいまだ解析されておらず、いつのタイミングで構造変化を起こすのか、また、どのような形で TNF と結合するかは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

これまでにまだ明らかにされていない中性付近における Tip の二量体構造を明らかにする (Fig.3)。また、まず X 線小角散乱で測定することで pH 変化に伴う二量体の構造変化を突き止める。システイン変異体とシステイン特異的リンカーを用いてオープンのみ、クローズのみの Tip を作製し、これらを用いて、Tip (del-Tip) の二状態のいずれの構造が TNF 遺伝子のプロモータやヌクレオリンと結合するかを明らかにし、その二状態と活性の相関を解明する。また、Tip と TNF プロモータ、Tip とヌクレオリンの複合体の構造解析を行い、その結合様式を明らかにする。


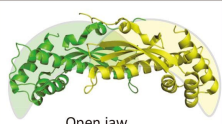
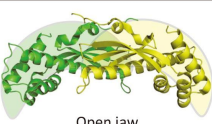
	Tip $\alpha$ wild type, active including two S-S bonds	del-Tip $\alpha$ deletion mutant, inactive no two S-S bonds
slightly basic neutral	UNKNOWN  Closed jaw ? or Open jaw ?	 Closed jaw
acidic	 Open jaw	 Open jaw

Figure 3 pH による Tip および del-Tip の構造変化

## 3. 研究の方法

### (1) タンパク質の発現と精製

Tip および del-Tip タンパク質を単一に精製するためにヒスチジンタグが付加されるように設計したプラスミドを作製した。プラスミドを大腸菌に形質転換し、大量にタンパク質を合成、発現させた。大腸菌を破碎し、その抽出物の中から Ni キレートカラムを用いてヒスチジンタグが付加されたタンパク質のみを取り出した。ヒスチジンタグを切断後、ゲルろ過クロマトグラフィーカラムによりヒスチジンタグを分離し、タンパク質のみを単離した。

発現量および精製純度は、SDS-PAGE により確認した。また Tip については、ジスルフィド結合により二量体を形成しているため、ジスルフィド結合を解離する還元剤を含まない SDS-PAGE を行い、二量体の形成を確認した。

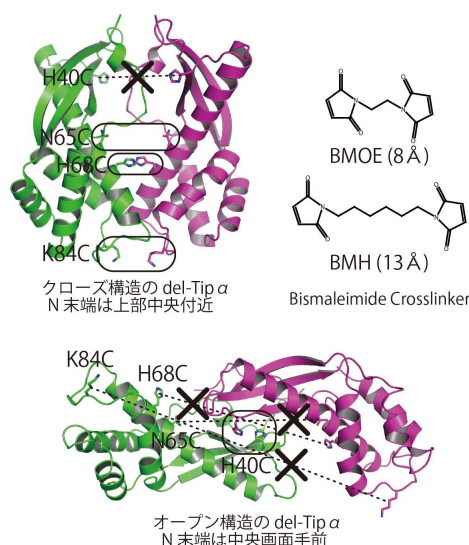
(2) Tip および del-Tip のシステイン点変異体の作製とタンパク質発現および精製

我々が報告したものを含め、これまでに明らかにされた del-Tip の構造をもとにシステイン特異的リンカーを架橋させるためのアミノ酸残基の候補部位を決定した。

Tip の発現系は上記と同様であり、これらを用いて各種アッセイや結晶化を行った。

### (3) システイン特異的リンカーを用いたシステイン変異体の二量体化

下図の通り、発現精製したタンパク質はいずれも変異部位によりオープン、クローズ、それぞれの構造でのみ特異的にリンカーが架橋できる場所を選んでおり、また、そのアミノ酸同士にあった長さのリンカーを使用するので非特異的な二量体形成は妨げられると考えている (Fig.4)。しかし、イオン交換カラムやゲル濾過カラムで多量体のような非特異的な分子は取り除く。



○で囲んだアミノ酸をシステインに置換しクロスリンカーと結合することでオープンのみ、クローズのみの Tip  $\alpha$  を作製する  
…のアミノ酸では立体障害やリンカーの長さ不足のためクロスリンクできない (図中 ×)

↓つまり

N65C, H68C, K84C でのクロスリンク: クローズ構造ではリンカーが結合できるがオープン構造ではリンカーの長さ不足により結合できない  
H40C でのクロスリンク: クローズ構造では立体障害によりリンカーが結合できないがオープン構造ではリンカーが結合できる

Figure 4 システイン変異体とシステインリンカーによる二量体作製方法

(4) X 線小角散乱での二量体の形態評価  
それぞれの二量体の構成を明らかにするために X 線小角散乱で pH の違う状況でサンプルを測定した。

### (5) 結晶化及び構造解析

野生型、変異型の Tip および del-Tip について結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化を行った。

得られた結晶については本機関に導入されている X 線回折装置および大型放射光施設に

においてX線回折実験を行いデータ測定を試みた。得られたデータは構造解析ソフトウェアを用いて処理を行い、構造解析を試みた。

#### 4. 研究成果

Tip はピロリ菌によって分泌され、胃炎や胃がんを誘発する原因となる TNF を誘導するタンパク質である。Tip は N 末端にある 2 つのシステインを介してホモ二量体を形成する。この 2 つのシステインを含む N 末端を欠損した変異体 del-Tip を作製し、この結晶構造を明らかにした。他のグループからも del-Tip の構造が明らかにされ、結晶化条件の pH によりその二量体構造がオープン型とクローズ型の二状態あることが明らかとなった。そこで本研究では二量体構造と TNF 誘導能の機能活性相関を調べるためオープン型、クローズ型に固定した Tip および del-Tip を作製し、結晶構造解析および機能解析を行うこととした。

これまでに得られていた X 線回折データおよび新規に得られたデータを解析していたが、統計値が向上しなかった。ツインと呼ばれる結晶の質について解析、検討したが、ツインにも問題なく統計値が向上しない原因を明らかにすることができず、N 末端の構造を明らかにすることができなかつた。システイン変異体とシステインリンカーを用いて固定化二量体の作製を試みたところ解離しない二量体を確認することができた。本期間では、この固定化二量体と解離する二量体を分離しようと試みたが分離することができなかつた。このため TNF 誘導能やヌクレオリンとの相互作用実験に移行することができなかつた。

一方で、野生型の Tip、del-Tip について pH の異なる条件で X 線小角散乱法を用いて形態評価を行った。これまで明らかにされている構造は酸性条件下の Tip および del-Tip、中性条件下の del-Tip であり、酸性条件下における Tip の構造は明らかにされていない。X 線小角散乱により測定した結果、Tip、del-Tip とともに酸性条件下と中性条件下における構造は異なっていた。また酸性条件下における del-Tip と Tip はオープン型の結晶構造から算出した散乱データと同様の測定波形を示し、すなわち、オープン型であることが示唆された。同様に、中性条件下についても del-Tip、Tip とともにクローズ側の結晶構造から算出されたデータと同様の測定結果を示し、クローズ型であることが示唆された。これらの結果から、結晶中と同様に溶液中においても酸性、中性条件下において構造が異なることを明らかにし、さらにこれまで明らかになつていなかった酸性条件下における Tip がクローズ型であることを強く支持する結果を得ることができた。

5. 主な発表論文等  
特になし。

〔その他〕

京都産業大学津下研究室 HP  
<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~tsuge/tsugelab/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鶴村 俊治 (TSURUMURA, Toshiharu)  
京都産業大学・総合生命科学部・研究員  
研究者番号: 50450250

##### (2) 連携研究者

津下 英明 (TSUGE, Hideaki)  
京都産業大学・総合生命科学部・教授  
研究者番号: 40299342

池口 雅道 (IKEGUCHI, Masamichi)  
創価大学・理工学部・教授  
研究者番号: 00192477