



展 TENBO 望

ピロリ菌由来胃癌発症因子 CagA の立体構造解明



島山 昌則

Hatakeyama Masanori

(東京大学医学系研究科 微生物学分野 教授)

1 はじめに

胃癌は部位別がん死亡の世界第2位を占め、世界中で毎年約70万人がこの悪性腫瘍で命を落としていると推計されている。中でも日本は胃癌の最多発国として知られ、毎年5万人が胃癌で死亡する状況が続いている。近年の研究から、大多数の胃癌はピロリ菌感染者にのみ発症することが明らかにされ、胃癌の原因菌としてのピロリ菌の役割に大きな注目が集まっている。特に、CagAと呼ばれるタンパク質を産生するピロリ菌の感染は胃癌発症に深く関わることから、胃癌発症におけるピロリ菌CagAの役割は極めて重要な研究テーマとなっている¹⁾。CagAは、約1,200個のアミノ酸が連なって作り出される分子量約13万の大きなタンパク質で、そのC末端側領域にはCM (CagA-multiplication) モチーフ並びにEPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) モチーフと呼ばれる特徴的な繰り返し配列が存在する (図1)²⁾。CagAはピロリ菌の体内で産生された後、IV型分泌機構と呼ばれる細菌の注射針様装置を介して胃上皮細胞内に直接注入される。細胞膜の内面 (細胞質側の面) にはホスファチジルセリン (PS) というリン脂質が特異的に分布し、標的細胞内に侵入

したCagAはこのPSと結合することで細胞膜内面に付着する³⁾。細胞膜に付着したCagAは、CMモチーフを介して上皮細胞の極性形成・維持に必須の役割を担うセリン/スレオニンキナーゼPAR1と結合し、そのキナーゼ活性を抑制することで上皮極性を破壊する⁴⁾。一方、CagAはSrcファミリーキナーゼ並びにAblキナーゼによりEPIYAモチーフ中のチロシン残基がリン酸化されることにより、ヒトがんタンパク質として知られるチロシンホスファターゼSHP2と結合する能力を獲得する⁵⁾。CagAとの複合体形成によりSHP2は異常に活性化され、細胞をがん化するシグナルを生成する。このように、ピロリ菌CagAは胃上皮細胞に侵入後、多様な宿主細胞側の分子と相互作用しそれらの機能を攪乱することで胃の細胞をがん化させると考えられている。しかしながら、CagAが多様な分子と相互作用し発がん活性を発揮する分子構造基盤はこれまで全く不明であった。我々は最近、X線結晶構造解析法並びに核磁気共鳴 (NMR) 法を駆使してピロリ菌CagAの立体構造を決定し、CagAが“がんタンパク質”として働くための分子構造基盤解明に成功した⁶⁾。

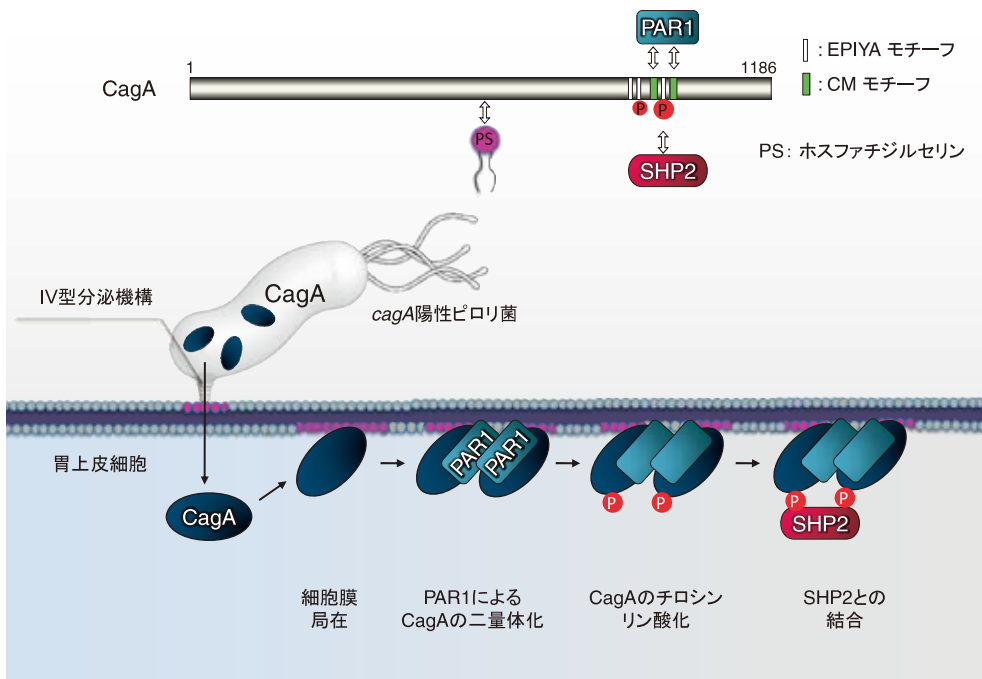


図1 ピロリ菌 CagA の胃上皮細胞内移行とシグナル脱制御

ピロリ菌が接触した胃上皮細胞表面にはホスファチジルセリン (PS) が一過性に反転露出する。一方、CagA タンパク質はピロリ菌表面のIV型分泌機構先端に送り出される。ピロリ菌体表面に固定された CagA と標的細胞膜上に露出した PS が物理的に相互作用することにより、CagA の細胞内移行が開始される。このプロセスには ATP 依存的な標的細胞側の機構が関与するが、既知のエンドサイトーシスやマクロピノサイトーシスは使われない。最終的な CagA の移行には、細胞膜構造の変化 (pore/チャンネル様構造の形成、特殊なエンドソーム形成など) が必要と考えられる。細胞内に侵入した CagA は、CM 配列を介して PAR1 ダイマーと結合し、間接的に二量体化する。CagA-PAR1 複合体形成により PAR1 のキナーゼ活性は抑制され、タイトジャンクション並びに上皮細胞極性が破壊される。PAR1 により二量体化された CagA は Src あるいは c-Abl によりチロシンリン酸化を受け、SHP2 ホスファターゼの 2 つの SH2 ドメインと安定的に結合する。CagA との結合により SHP2 のホスファターゼ活性は脱制御される

2 X線とタンパク構造解析

X線を物質に照射した場合、多くはそのまま物質を突き抜けるが、一部は吸収されたり原子核の周りを回っている電子によって散乱されたりする。X線解析とは、散乱されたX線を観測することにより、物質の中の電子の分布を明らかにし、物質の3次元構造を解析するものがある。X線は電磁波の一種であるため、波としての性質を持っている。この波の性質の1つに干渉が挙げられる。干渉により、ある特定の向き

だけX線が強くなり、ほかの向きでは観測されるX線が減弱する。この現象が回折である。得られた回折像の位置や強さから、物質の構造についての情報を計算で求めることができる。回折は気体や液体でも起こるが、特に単独の結晶による回折像は、多数のシャープな斑点として現れる。これは、結晶内では原子や分子が3次元的に規則正しく並んでいるためであり、回折斑の強度や位置情報を基に、原子や分子の空間配置を算出することができる。高度に精製したタンパク質は結晶化することができ、結晶化

タンパク質はX線による構造解析が可能となる。

3 天然変性領域としてのピロリ菌 CagA C末側ドメイン

分子量13万を超すCagA分子の生化学的なドメイン構造推定は、立体構造解明へ向けての大きな足がかりとなる。そこでまず、高度精製した大腸菌由来組換え型全長CagAタンパク質(1186アミノ酸)を用い、V8タンパク分解酵素による限定分解実験を行った。その結果、CagAは残基1-876から成るN末側ドメインと残基877-1186から成るC末側ドメインから構成されると予想された。そこで次に組換え型CagA(877-1186)断片を作成し、CagA C末側ドメインの高次構造解析を試みた。円二色性(CD)スペクトル解析から、同領域は α ヘリックス並びに β シートから成る高次構造をほとんど有していないことが示唆された。次に、CagA C末側領域の1次元 ^1H NMRスペクトルを測定した。精製したCagA(877-1186)の ^1H NMRスペクトルはタンパク質中のアミドプロトンに由来する8 ppm付近のシグナルの分散に極めて乏しく、CagA全長の約30%を占めるC末側領域は固有の高次構造を持たない天然変性領域(intrinsically disordered region)であることが判明した。

4 ピロリ菌 CagA N末側ドメインの結晶構造解析

次に、CagA全長の70%を占めるN末側ドメインを構成するCagA(1-876)の結晶下並びにX線構造解析を進め、3.5 Å分解能のX線回折像を得た。この結晶解析データから得られたCagA(1-876)は $100 \times 80 \times 55 \text{ \AA}^3$ の大きさを有する板状構造を呈していた(図2)。この高次構造を基に、CagAのN末側領域内に3つのドメイン(Domain I-III)を定義した。N末端に

位置するDomain I(残基24-221)は10本の α ヘリックスから構成される。Domain Iはほかの2つのドメインとは立体構造的に離れており、Domain II(残基303-644)とは 374 \AA^2 の狭い相互作用表面積しか持たず、Domain III(残基645-824)とは全く接触しない。こうしたほかのドメインとの相互作用の弱さから、Domain Iは比較的可動性に富む性質を持つと考えられた。Domain IIとDomain IIIは、60残基から成る長いヘリックス $\alpha 19$ によって2つの構造モジュールが繋がれた“N”字形の構造を形成していた。Domain IIは11本の β ストランドから成る大きな逆平行 β シートを含有し、 $\beta 5$ と $\beta 8$ の鎖間にサブドメイン(残基370-446)が挿入されていた。このサブドメインはCagA N末端領域の立体構造の中心に位置し、逆平行 β シートと強く相互作用していた。また $\alpha 17$ と $\alpha 18$ の2本のヘリックスも逆平行 β シートと強く相互作用していた。これらの構造(残基303-543)は強い相互作用によりCagAの堅固な核構造となっていると考えられる。対照的に、Domain IIから繋がるDomain IIIの長いヘリックス $\alpha 19$ は柔軟性が高いと考えられる。Domain IIIは、 $\alpha 19$ から $\alpha 23$ までの5本の α ヘリックスから成る。この結果から、CagAの全体構造はN末端側約70%に相当する固有の高次構造を有する領域とC末端側約30%に相当する柔軟な天然変性領域から構成されることが示された。

CagAが細胞膜リン脂質PSと結合する際に重要なアルギニン(R)624並びにR626はヘリックス $\alpha 18$ に存在する。このヘリックス $\alpha 18$ を含むCagA Domain IIは塩基性残基を多く含むという特徴を有する。とりわけ、R624及びR626が存在するヘリックス $\alpha 18$ の周辺にはほかに454, 455, 458, 476, 613, 614, 617, 621, 625, 631, 635, 636, 646, 650番の位置にリジン残基が存在し、塩基性残基に富む局所面(塩基性パッチ)を構成する(図3)。CagAの細胞膜への局在にはこの塩基性パッチ中の正味

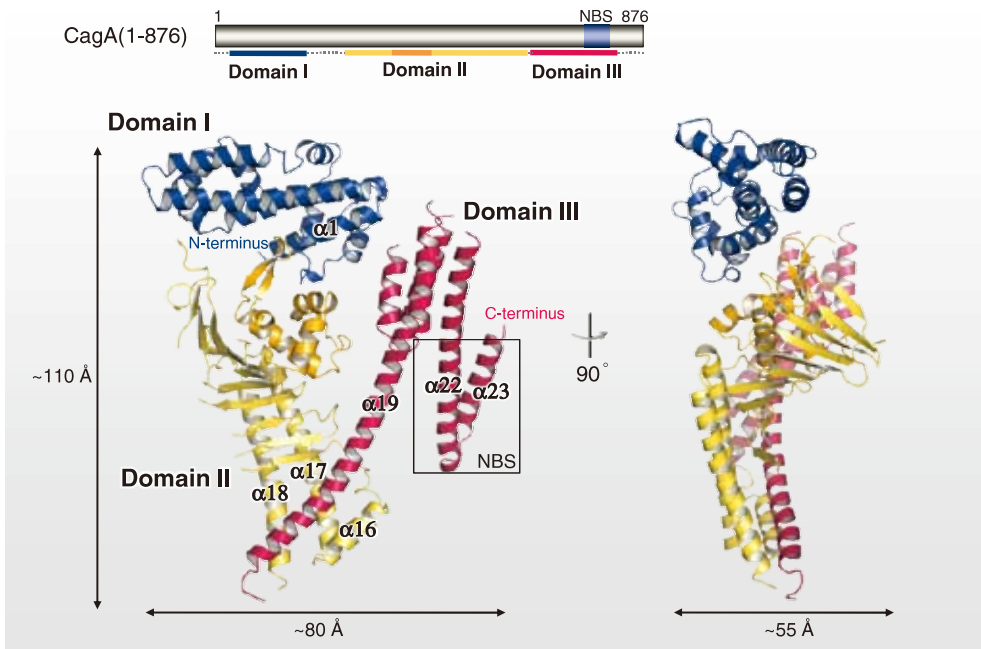


図2 N末側 CagA 領域 (残基 1-876) の結晶構造
 ピロリ菌が CagA (1-876) の結晶構造。正面図 (左) 及び側面図 (右) をリボン描画モデルで示した。フォールディングからドメイン構造を定義し, Domain I (残基 24-221) を濃青色, Domain II (残基 303-644) を黄色, Domain II 内のサブドメイン (残基 370-446) をオレンジ色, Domain III (残基 645-824) を赤色で示した

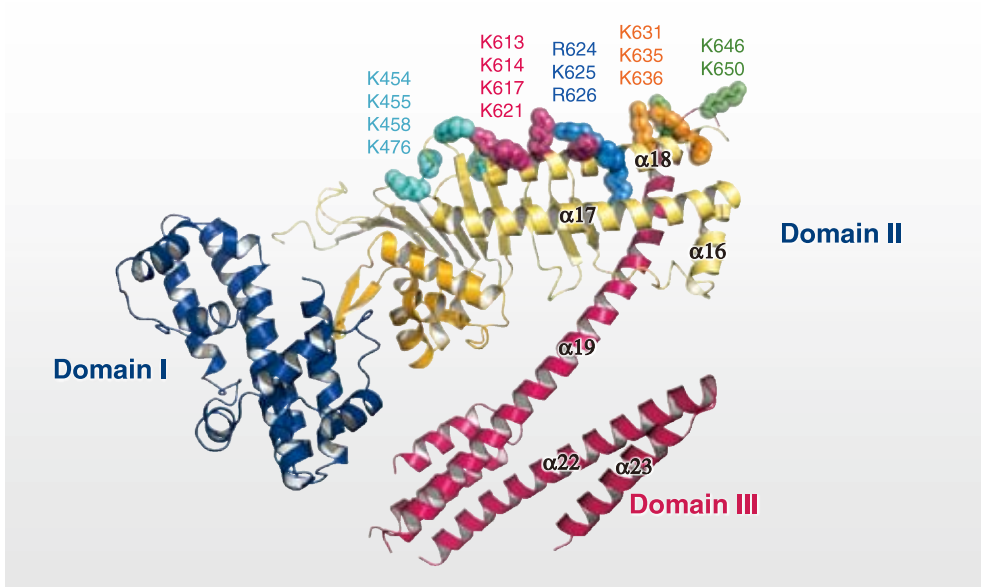


図3 CagA 分子上の塩基性アミノ酸クラスター (塩基性パッチ)
 CagA N 末側領域の Domain II には塩基性アミノ酸が集中して存在するパッチ状の表面構造が存在する。この塩基性パッチは、細胞膜内葉を構成する酸性リン脂質ホスファチジルセリンとの結合を担う

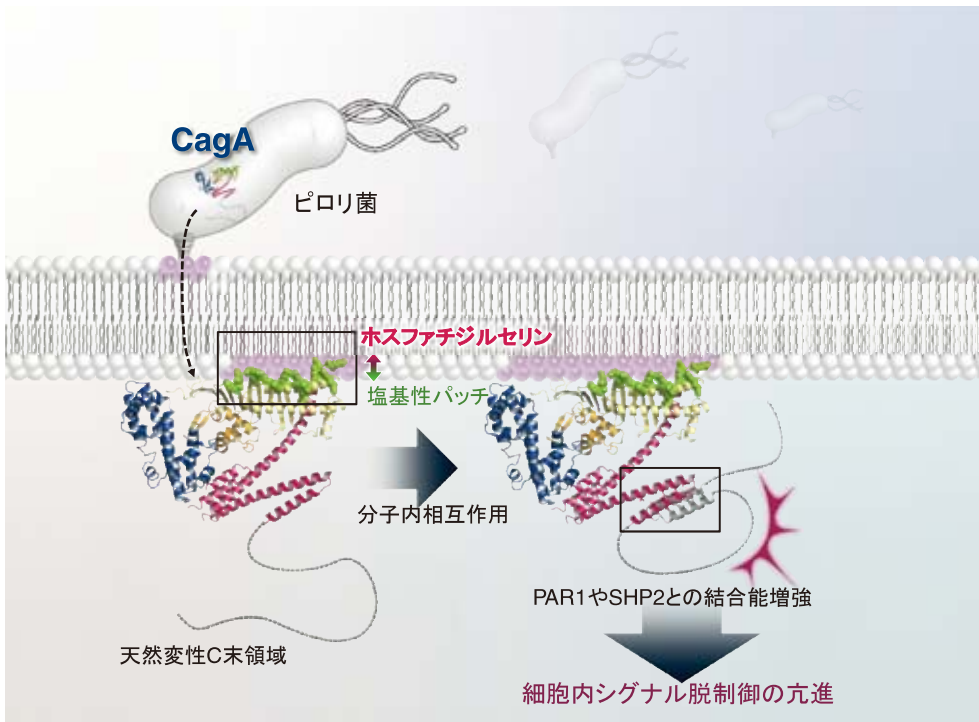


図4 立体構造に依存したピロリ菌 CagA の活性制御機構

細胞内に移行した CagA は塩基性パッチを用いて、標的細胞の細胞膜内葉を構成する酸性リン脂質 PS と静電的に結合し、細胞膜内面に付着する。CagA の C 末側変性領域は立体構造上、塩基性パッチと反対側に配向するため、多様な細胞内標的分子との結合を可能にする空間的位置取りが構築されると考えられる。CagA は 4 ヘリックス束構造の誘起を伴う分子内 NBS-CBS 相互作用を通して、天然変性領域内に投げ縄（ラリアート）構造を作り出す。このラリアート構造形成により、CM モチーフや EPIYA モチーフとの結合がより安定化し、CagA による細胞内シグナルの脱制御が促進されると考えられる

の正電荷が必要であり、CagA と細胞膜はマジックテープ様の結合様式を取って相互作用すると考えられた。また、CagA の直接的な生物活性を担う C 末領域は塩基性パッチとは立体構造上反対側に位置し、図 4 に示す塩基性パッチを介した CagA の細胞膜結合モデルにおいて CagA の C 末側領域は細胞膜側とは真逆の細胞質側に配向する。この空間的位置取りは、CagA の様々な機能を直接担う天然変性構造の C 末端領域が多様な標的分子と相互作用する場を与えると考えられる。

5 まとめ

X 線結晶構造解析並びに核磁気共鳴 (NMR) 法を駆使して得られた研究成果から、CM モチーフや EPIYA モチーフを含む CagA の C 末領域は、一定の高次構造を形成しない“天然変性領域”であることが明らかとなった。天然変性構造は、様々なほかのタンパク質に合わせて自己の形状を自在に変化させながら結合する構造体として近年注目を浴びているタンパク質の形状であり、その構造的な柔軟性から多種多様な分子と相互作用し得る領域として注目を浴びている⁷⁾。実際 CagA の C 末端領域は、PAR1 や SHP2 に加え、Src ファミリーキナーゼ (SFK)、

Abl, C-terminal Src キナーゼ (Csk), Crk, SHP1, Grb2, c-Met といった数々の細胞内タンパク質と直接相互作用する領域として報告されている²⁾。CagA はその C 末端領域の構造不規則性を利用することで、これら一連の宿主細胞内標的分子との相互作用を可能にしていると考えられる。一方、C 末側天然変性領域を除いた CagA の N 末側領域は 3 つの構造ドメインから成り、既知のタンパク質構造とは類似性を見ない新奇の立体構造を有する。CagA と細胞膜リン脂質ホスファチジルセリン (PS) の結合は、CagA 分子の中央部に多数集中して存在する塩基性アミノ酸から構成される“塩基性パッチ”によって担われ、CagA の細胞膜への付着は、CagA と PS との間で形成されるマジックテープ様の結合様式によると考えられる。さらに、CagA の C 末側天然変性領域は Domain III と分子内相互作用することで構造変化を引き起こす (図 4)。この分子内相互作用による CagA 尾部の構造変化の結果、PAR1 や SHP2 に対する CagA の結合活性が上昇し、より強いがん化シグナルが生成される。本研究から得られた構造情報は、ピロリ菌による胃癌発症メカニズム解明を通して、今も世界中で多くの命を奪う胃癌の撲滅に向けた新たな分子標的治療・予防法開発への道を拓くものとして期待される。

参考文献

- 1) Hatakeyama, M., Oncogenic mechanisms of *Helicobacter pylori* CagA protein, *Nat Rev Cancer*, **4**, 688–694 (2004)
- 2) Hatakeyama, M., Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA, *Oncogene*, **27**, 7047–7054 (2008)
- 3) Murata-Kamiya, N., Kikuchi, K., Hayashi, T., Higashi, H. and Hatakeyama, M., *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization and pathophysiological action of the CagA oncoprotein, *Cell Host Microbe*, **7**, 399–411 (2010)
- 4) Saadat, I., Higashi, H., Obuse, C., Umeda, M., Murata-Kamiya, N., Saito, Y., Lu, H., Ohnishi, N., Azuma, T., Suzuki, A., Ohno, S. and Hatakeyama, M., *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity, *Nature*, **447**, 330–333 (2007)
- 5) Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. and Hatakeyama, M., SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein, *Science*, **295**, 683–686 (2002)
- 6) Hayashi, T., Senda, M., Morohashi, H., Higashi, H., Horio, M., Nagase, L., Sasaya, D., Shimizu, T., Venugopalan, N., Kumeta, H., Noda, N. N., Inagaki, F., Senda, T. and Hatakeyama, M., Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA, *Cell Host Microbe*, **12**, 20–33 (2012)
- 7) Uversky, V. N., Intrinsically disordered proteins from A to Z, *Int J Biochem Cell Biol*, **43**, 1090–1103 (2011)