

博 士 論 文

ピロリ菌病原因子 CagA と EPIYA モチーフを共有する
哺乳動物タンパク質 Pragmin の機能解析

千 田 淑 恵

目次

目次	2
要旨	4
序文	5
胃がんとピロリ菌	5
EPIYA タンパク質	7
Pragmin/Sgk223/NACK	9
Pragmin-Csk 複合体	12
目的	15
方法	16
発現ベクター	16
哺乳動物細胞用発現ベクター	16
大腸菌用発現ベクター	18
抗体	19
組換えタンパク質の発現と精製	20
組換え Pragmin タンパク質	20
組換えチロシンリン酸化 Pragmin タンパク質	21
組換え Csk タンパク質	22
組換え Src-tail タンパク質	23
ゲル染色とイムノプロット	24
GST プルダウンアッセイ	25
<i>in vitro</i> キナーゼ試験	25
Pragmin の自己リン酸化試験	25

Pragmin のキナーゼ活性試験	26
Csk による Pragmin のリン酸化試験	26
Csk のキナーゼ活性試験 (基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1) 使用)	27
Csk のキナーゼ活性試験 (GST- <i>Src</i> -tail 使用)	27
哺乳動物細胞の培養と遺伝子導入	28
細胞抽出液の調整	29
免疫沈降	29
RNA 干渉	30
免疫蛍光染色	30
細胞形態変化の解析	31
細胞運動能の測定	31
統計学的解析	31
結果	32
組換えタンパク質の作製と <i>in vitro</i> 結合試験	32
Csk による Pragmin のチロシンリン酸化	40
Csk による Pragmin のチロシンリン酸化部位の同定	55
Pragmin-Csk 複合体形成による Csk の活性化	66
Pragmin-Csk 複合体形成の生物学的機能	73
考察	80
組換え Pragmin タンパク質の作製とチロシンリン酸化	81
Pragmin-Csk 複合体の機能的意義	82
足場タンパク質としての Pragmin	90
引用文献	94
謝辞	103

要旨

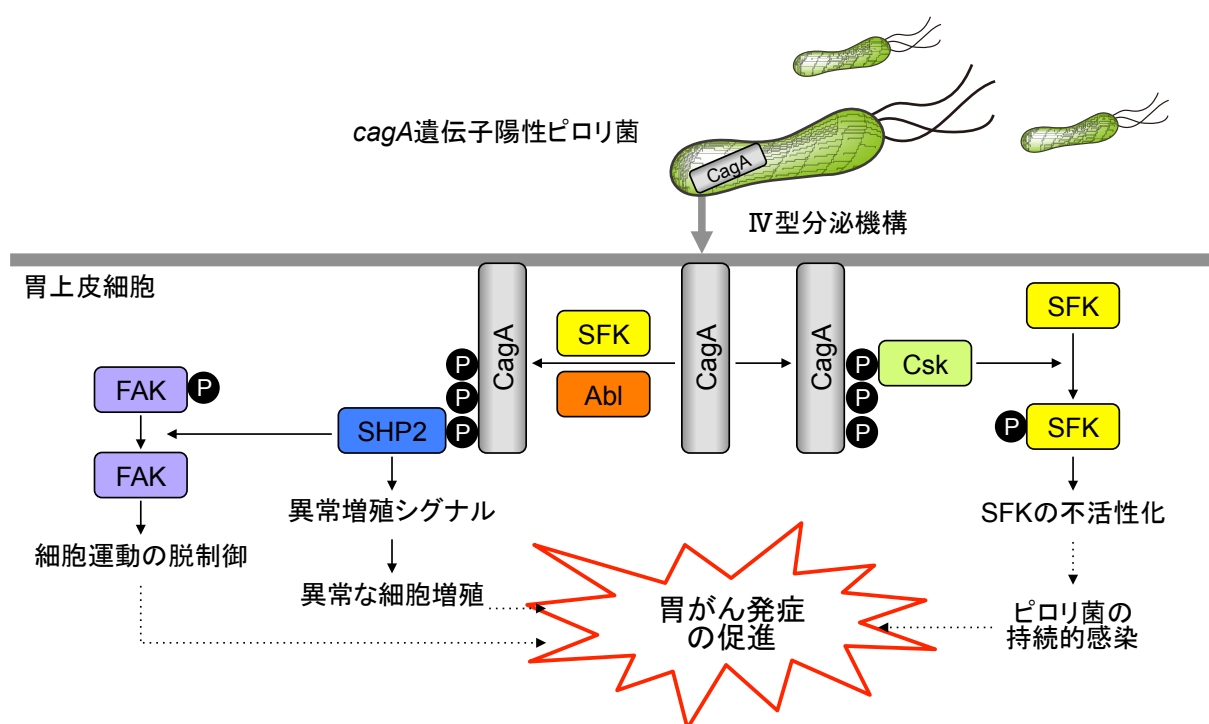
ピロリ菌を含む病原性細菌は、特徴的なアミノ酸配列「EPIYA モチーフ」を有するタンパク質を宿主細胞内に送り込み、シグナル伝達を攪乱する。一方、本研究では宿主細胞内には EPIYA モチーフによる未知のシグナルネットワークが存在すると提案し、EPIYA モチーフ含有タンパク質の一つである Pragmin の機能解明を目指した。Pragmin はチロシンリン酸化 EPIYA モチーフ依存的に Csk を活性化し、細胞の形態変化や運動能亢進に関与することを示した。本研究は EPIYA シグナルネットワーク解明の第一歩であり、シグナル経路の破綻によって引き起こされる疾患発症の解明ならびに創薬標的の発見への応用が期待される。

序文

胃がんとピロリ菌

胃がんは世界の部位別がん死亡率の第3位を占め、特に東アジア諸国（日本、韓国、中国）では死亡率が高い [1, 2]。胃がんの発症にはヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）が産生する CagA タンパク質が深く関与すると考えられている [3]。ピロリ菌は注射針様の IV 型分泌機構を介して CagA をヒトの胃上皮細胞に直接注入する (序図 1) [4-6]。CagA はカルボキシル (C) 末端領域にグルタミン酸 (E)-プロリン (P)-イソロイシン (I)-チロシン (Y)-アラニン (A) からなる「EPIYA モチーフ」を複数繰り返し保有する特徴を持ち、胃上皮細胞内へ侵入後 EPIYA モチーフにおいて Src family kinases (SFK) や c-Abl によってチロシンリン酸化される [7]。チロシンリン酸化された CagA は SH2 ドメインを持つ複数の細胞内タンパク質と相互作用する能力を獲得し、その機能を攪乱することで細胞のがん化を促進する [8, 9]。例えば、CagA はがんタンパク質であるチロシンホスファターゼ SHP2 と結合し、脱制御することで胃上皮細胞の増殖能を異常に亢進する [10, 11]。また、CagA によって脱制御された SHP2 は接着斑キナーゼ (FAK) を脱リン酸化し細胞の運動能を脱制御する (序図 1) [12]。一方で、CagA は SFK を不活性化する C-terminal Src kinase (Csk) と結合するこ

とで、Csk を SFK が存在する細胞膜近傍に引き寄せ、Csk の活性を刺激する。活性化された Csk は SFK を不活性化する結果、SHP2 の脱制御によって生じる過度の細胞ダメージを妨げる。CagA-Csk によるネガティブフィードバックは CagA による毒性を避けながらピロリ菌がヒトの胃に持続的に感染することを可能にしている [13]。



序図 1 ピロリ菌 CagA タンパク質による胃上皮細胞内のシグナル伝達攪乱

cagA 遺伝子陽性ピロリ菌によってヒト胃上皮細胞内に注入された CagA タンパク質は、宿主細胞のキナーゼである Src family kinases (SFK) や c-Abl によって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チロシンホスファターゼ SHP2 と結合し細胞の異常増殖を誘導することや、SHP2 による接着斑キナーゼ (FAK) の脱リン酸化を促進し細胞運動を脱制御することが知られている。一方で、チロシンリン酸化された CagA は C-terminal Src kinase (Csk) と結合して活性化することで SFK を不活性化し、CagA-SHP2 による過度の細胞ダメージを妨げることで、ピロリ菌の持続的感染を可能にしている。

EPIYA タンパク質

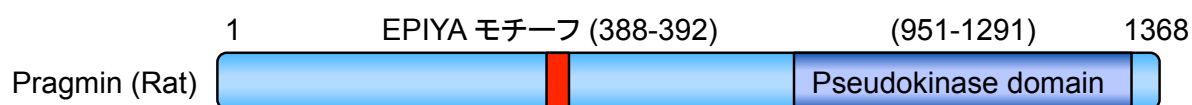
ピロリ菌 CagA のみならず、病原性大腸菌の Tir やヘモフィルス・デュークレイ菌の LspA1 と LspA2、アナプラズマ・ファゴサイトフィラム菌の AnkA など他の病原性細菌もまた EPIYA モチーフと非常に良く似たアミノ酸配列「EPIYA-like モチーフ」を有する細菌エフェクター（細菌 EPIYA エフェクター）を持つ。細菌 EPIYA エフェクターは CagA と同様にチロシンリン酸化依存的に宿主細胞のシグナル伝達を攪乱する [14, 15]。多様な病原細菌はピロリ菌 CagA に代表される細菌 EPIYA エフェクターを保有するが、細菌 EPIYA エフェクター同士は EPIYA モチーフ以外に共通の配列を持たない。したがって細菌 EPIYA エフェクターは共通の祖先から進化したのではなく、収斂進化してきたと考えられる。さらに興味深いことに、細菌 EPIYA エフェクターが菌体内においてチロシンリン酸化を受けているという知見は報告されていない。加えて、細菌プロテオーム内には SH2 ドメインを保有するタンパク質はわずかな例外を除いて存在しない。よって、細菌 EPIYA タンパク質は宿主細胞内で本来働いている EPIYA モチーフ保有タンパク質 (EPIYA タンパク質) を模倣して宿主細胞内シグナル伝達を攪乱し、細菌にとってより有利な環境を作り出していることが推察された [15]。

宿主細胞内で働く EPIYA タンパク質を同定するために、当研究室ではヒトプロテ

オーム探索を行った。その結果 EPIYA モチーフを持つヒトタンパク質は 5 個同定された (General transcription factor TFIIIE, α subunit、Solute carrier family 2/facilitated glucose transporter member 3、Transmembrane protein 218、Pragmin/Sgk223/NACK、Coiled-coil domain-containing protein 146) [16]。また、Safari らによって EPIYA-like モチーフを持つヒトタンパク質は 45 個同定された [17]。興味深いことに、ヒトプロテオームから同定されたこれらの EPIYA タンパク質のうち EPIYA (-like) モチーフにおいてチロシンリン酸化を受けるタンパク質は極めて少ない。EPIYA (-like) モチーフはチロシンリン酸化依存的に SH2 ドメインを保有するタンパク質と相互作用する能力を獲得することから、チロシンリン酸化 EPIYA (-like) モチーフは機能的 EPIYA (functional EPIYA) モチーフと定義されている [17]。即ち、細胞の秩序形成・維持において EPIYA (-like) モチーフはその存在を極めて厳密に制御しなければならないほど高度な機能を司っている可能性が考えられる。この観点から、「内因性 EPIYA タンパク質が司る細胞内シグナル (EPIYA シグナル) 経路が存在し、外因性の細菌 EPIYA エフェクター CagA はそのネットワークを攪乱して発がんを促す」と予想される。しかしながら、EPIYA タンパク質の機能は未解明な点が多く、新規シグナル経路解明のためには EPIYA タンパク質の機能の早急な解明が必要である。

Pragmin/Sgk223/NACK

本研究ではチロシンリン酸化される EPIYA タンパク質の 1 つである Pragmin/Sgk223/NACK (以下 Pragmin) に着目した。Pragmin は全長約 150 kDa 程度のシュードキナーゼで、アミノ (N) 末端側に EPIYA モチーフ、そして C 末端側にシュードキナーゼドメインを保有している (序図 2)。シュードキナーゼとは、構造的にはキナーゼドメインを持つが、活性のあるキナーゼに保存されている 3 つのモチーフ (ATP 結合モチーフ : VAIK、触媒モチーフ : HRD、Mg イオン結合モチーフ : DFG) のうち少なくとも 1 つを持たないためにリン酸基転移機能を持たないとされるタンパク質である [18]。Pragmin は DFG モチーフを持たないが VAIK、HRD モチーフを持つ [18]。



序図 2 Pragmin の分子構造

数字は Pragmin (ラット) のアミノ酸残基番号を示す。Pragmin は全長 1368 アミノ酸残基からなり、アミノ (N) 末端側に EPIYA モチーフ (388-392) を、カルボキシル (C) 末端側にシュードキナーゼドメイン (951-1291) を持つ。

近年、シュードキナーゼによるキナーゼの活性制御やシュードキナーゼがシグナル経路の足場タンパク質として機能すること等が報告されている。例えば、シュードキナーゼである STRAD と、活性を持つキナーゼである LKB1 が結合することによって LKB1 の活性を制御することや、JAK キナーゼ内にあるシュードキナーゼドメインが自身のキナーゼドメインに結合し、そのキナーゼ活性を制御するなど、シュードキナーゼドメインが機能的キナーゼの活性を制御することが明らかにされている [19-21]。

また、シュードキナーゼ KSR は MAPK/ERK シグナル経路の Raf、MEK、ERK と相互作用して、シグナル伝達を調節する複合体を形成するための足場タンパク質として機能する [22, 23]。Pragmin に関しても、①他のキナーゼの活性を制御する、②足場タンパク質としてシグナル経路を制御する可能性が期待される。

Tanaka らは神経細胞特異的に発現している Rnd2 のエフェクタータンパク質として Pragmin を同定した。成体ラット組織の mRNA 解析から、Pragmin は少なくとも脳、腎臓、脾臓、小腸、大腸で発現していることが明らかにされている。Pragmin-Rnd2 複合体は RhoA を活性化し、Rho-kinase 経路を介して神経細胞の収縮を引き起こす [24]。

Leroy らによると、shRNA を用いた Pragmin の発現抑制は Src を過剰発現させたヒト大腸がん由来 SW620 (SW620-Src) 細胞の足場非依存的増殖能と浸潤能を抑制する。

shRNA 抵抗性 Pragmin を発現させると SW620-Src 細胞の浸潤能が回復する。しかし Pragmin の EPIYA モチーフのチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体では SW620-Src 細胞の浸潤能は回復しなかった [25]。

Weaver らによると、Pragmin は Notch シグナルの転写活性化複合体の構成分子であり、Notch シグナルの共活性化因子として機能する。Pragmin は Notch の標的遺伝子でもあり、Notch が関与する腫瘍形成に必要である。また、Pragmin はマウスの胎生期で Notch1 と共発現しており、Pragmin のノックアウトマウスは胎生致死を示す [26]。

Tactacan らは、膵管腺癌において Pragmin の発現量が有意に増加していることを報告している。膵管腺癌に由来する複数の細胞株におけるヒト Pragmin のチロシン残基 159 番と 411 番 (EPIYA モチーフ) のリン酸化状態を解析すると、細胞株によって強くリン酸化を受けるチロシン残基が異なることが明らかになった。ヒト膵管上皮由来 HPDE 細胞に、レトロウイルスで Pragmin 遺伝子を導入して作製した HPDE 細胞の Pragmin 安定発現株は細胞形態が伸長し、細胞の運動能と浸潤能が向上する。Pragmin による細胞運動と浸潤の増加は JAK1/Stat3 シグナルを介していた [27]。

Leroy ら、Weaver ら、Tactacan らの研究から Pragmin は発がんに関与することが示唆されるが、Pragmin の生理学的側面からの知見は未だ少ない。

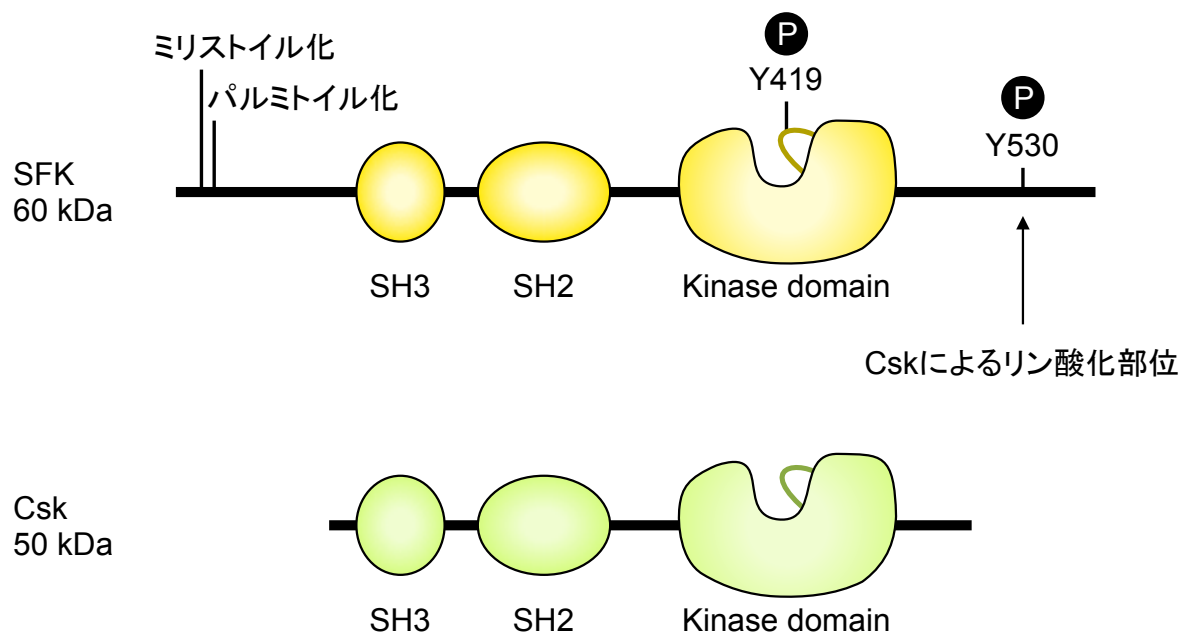
Pragmin-Csk 複合体

Pragmin は前述した複数のシグナル経路への関与や発がんとの関連に加え、Csk と EPIYA モチーフのチロシンリン酸化依存的に複合体を形成することが当研究室の研究により明らかになった [16]。Pragmin と CagA は EPIYA モチーフを介して Csk と競合的に相互作用する。Csk はヘモフィルス・デュークレイ菌の LspA やバルトネラ・ヘンセラ菌の Bep といった複数の細菌 EPIYA エフェクターの結合標的であることが報告されている [15]。したがって、Csk は細菌 EPIYA エフェクターにとって有益な結合パートナーであり、EPIYA モチーフを介した Pragmin-Csk 複合体の生理的機能を明らかにすることは病原性細菌の感染戦略を明らかにすることにつながると考えられる。

Csk は SFK と良く似たドメイン構造をしており、N 末端側からプロリンリッチ配列と結合する SH3 ドメイン、リン酸化チロシン残基と結合する SH2 ドメイン、キナーゼドメインを保有している (序図 3)。両者の違いは SFK のみが持ち細胞膜への局在を可能にする N 末端の脂肪酸修飾と、Csk のリン酸化部位である SFK の C 末端の不活性化チロシン残基である。Csk は SFK の C 末端に存在するチロシン残基を特異的に認識してリン酸化し、SFK の分子内相互作用を可能にすることで SFK を不活性化する [28]。一方、Csk は SFK とは異なり C 末端領域に不活性化部位を持たない (序

図 3)。したがって Csk は恒常的に活性を持つキナーゼであり、細胞内局在の変化によって機能制御されている [28]。具体的には、Csk は SH2 ドメインを介してチロシンリン酸化タンパク質と結合し、細胞質から基質である SFK が存在する細胞膜近傍へ局在が変化する。また、Csk は立体構造の変化によって活性化の程度が変化することが報告されている [28, 29]。

Pragmin は Csk と複合体を形成することで Csk を細胞内に留め置き、細胞膜近傍で行なわれる Csk 依存的な SFK の不活性化を抑制する [16]。興味深いことに、Csk の細胞膜における SFK 活性制御機構は良く研究されているにもかかわらず、細胞質における生理学的機能は不明な点が多い。



序図 3 SFK と Csk の分子構造

SFK と Csk は共に SH3 ドメイン、SH2 ドメイン、キナーゼドメインを保有している。両者の違いは N 末端の脂肪酸修飾の有無と C 末端における Csk によるチロシンリン酸化部位の有無である。

目的

EPIYA モチーフが司るシグナル経路の解明に向けて、EPIYA タンパク質の一つである Pragmin に着目した。Pragmin に関する先行研究の知見を統合すると、Pragmin は状況依存的に少なくとも RhoA-Rho kinase シグナル経路、Notch シグナル経路、JAK/Stat シグナル経路に関連し、シグナル伝達を調節する可能性が推察される [24, 26, 27]。また、Leroy ら、Weaver ら、Tactacan らの研究から Pragmin は発がんまたはがんの転移・浸潤に関与することが予測される [25-27]。しかし、Pragmin の機能の生理学的知見は未だ少ない。

Pragmin はピロリ菌 CagA の標的分子 Csk と細胞質で複合体を形成している [16]。Pragmin は Csk を細胞質に隔離し SFK の不活性化を抑制すると考えられている。しかし、Pragmin と結合した Csk が細胞質で果たす役割は不明である。

そこで本研究では Pragmin-Csk 複合体は未知の機能を司っていると考え、複合体の機能的意義を明らかにすることで Pragmin の機能を解明することを目的とした。

方法

発現ベクター

哺乳動物細胞用発現ベクター

野生型 *Pragmin* 発現ベクターは、ラット *Pragmin* 遺伝子をコードする cDNA を pCMV-Myc ベクターのマルチクローニングサイト内に挿入したものを用いた [16, 24]。pCMV-Myc ベクターはマルチクローニングサイトの 5'末端側に Myc タグをコードする配列が付加されている。*Pragmin* の部分欠損変異体 (1-829 アミノ酸残基、830-1368 アミノ酸残基) を発現するベクターは、*Pragmin* の 1-829 番目のアミノ酸残基をコードする cDNA または 830-1368 番目のアミノ酸残基をコードする cDNA をそれぞれ pCMV-Myc ベクターのマルチクローニングサイト内に挿入したものを用いた [24]。pCMV-Myc-*Pragmin*、pCMV-Myc-*Pragmin*-1-829、pCMV-Myc-*Pragmin*-830-1368 は京都大学の根岸学教授に分与して頂いた。変異型 *Pragmin*-Y391F 発現ベクターは野生型 *Pragmin* 発現ベクターを基に、391 番目のチロシン残基をコードする塩基配列からフェニルアラニン残基をコードする塩基配列に置換したものを用いた [16]。*Pragmin* の 1-829 番目のアミノ酸残基の間に存在する 9 個のチロシン残基をコードする塩基配列から次の組み合わせによりフェニルアラニン残基をコードする塩基配列

に置換した変異型 Pragmin を作製した。変異型 Pragmin-Y66/119/146F、Y238/343/368F、Y391/465/599F、Y238F、Y343F、Y368F 発現ベクターは野生型 Pragmin 発現ベクターを基に Chameleon Site-Directed Mutagenesis キット (Stratagene 社) を用いて、プロトコルに準じて作製した。変異型 Pragmin-Y66/119/146/238/343/368/391/465/599F (9F) 発現ベクターは変異型 Pragmin-Y66/119/146F、Y238/343/368F、Y391/465/599F を基にサブクローニングした。変異型 Pragmin-Y238/391F、Y343/391F、Y368/391F 発現ベクターはそれぞれの単独変異体発現ベクターを基にサブクローニングした。変異型 Pragmin-Y238/343/391F 発現ベクターは、まず野生型 Pragmin 発現ベクターを基に Chameleon Site-Directed Mutagenesis キット (Stratagene 社) を用い、プロトコルに準じて作製した変異型 Pragmin-Y238/343F 発現ベクターと、変異型 Pragmin-Y391F 発現ベクターを基にサブクローニングした。Pragmin の ATP 結合部位と予測されている 997 番目のリジン残基をコードする塩基配列からアルギニン残基をコードする塩基配列に置換した変異型 Pragmin-K997R 発現ベクターは野生型 Pragmin 発現ベクターを基に PCR 法にて点変異を導入することにより作製した。野生型 Csk 発現ベクターは、ラット *Csk* 遺伝子をコードする cDNA の 3'末端に Flag タグをコードする配列を付加し、pSP65SR α ベクターの SR α プロモーター下流のマルチクローニングサイトに挿入したものを用いた [16]。キナーゼ活性欠損型 Csk 発現ベクターは野生型を基に ATP 結合

部位である 222 番目のリジン残基をコードする塩基配列からアルギニン残基をコードする塩基配列に置換することで作製した。野生型 *Pragmin*、変異型 *Pragmin-Y391F* を発現させる組換えレンチウイルスは 5'末端に *Myc* タグをコードする配列を付加し、レンチベクター発現システム (System Biosciences) を用い、プロトコルに準じて作製した。野生型 *Csk* を発現させるレンチウイルスは 3'末端に *Flag* タグをコードする配列を付加し、レンチベクター発現システムを用いて同様に作製した。

大腸菌用発現ベクター

GST 融合野生型 *Pragmin* 発現ベクターは哺乳動物細胞用野生型 *Pragmin* 発現ベクターを基に、3'末端にヘキサヒスチジンタグ (6xHis) をコードする配列を付加した後、GST 融合タンパク質大腸菌用発現ベクター pGEX6P2 (GE Healthcare 社) のマルチクローニングサイトに挿入して作製した。GST 融合変異型 *Pragmin-Y391F* 発現ベクターは GST 融合野生型 *Pragmin* 発現ベクターと変異型 *Pragmin-Y391F* 哺乳動物細胞用発現ベクターを基にサブクローニングした。GST 融合野生型 *Csk* 発現ベクターは哺乳動物細胞用野生型 *Csk* 発現ベクターを基に *Csk* 遺伝子の 3'末端にヘキサヒスチジンタグ (6xHis) をコードする配列を付加した後、pGEX6P2 ベクターのマルチクローニングサイトに挿入して作製した。GST 融合 *Src-tail* 発現ベクターはヒト *c-Src* の 524

番目のアミノ酸残基から 536 番目のアミノ酸残基をコードする塩基配列を pGEX6P2 ベクターのマルチクローニングサイトに挿入して作製した。v-Src 発現ベクターは *V-SRC* 遺伝子をコードする cDNA 配列を pACYCDuet-1 ベクター (Novagen 社) に挿入したものを用いた [30]。

抗体

抗リン酸化チロシン抗体 (4G10、Millipore 社)、抗 GST 抗体 (B-14、Santa Cruz Biotechnology 社)、抗 His 抗体 (6C4、Medical & Biological Laboratories 社)、抗 His 抗体 (OGHis、Medical & Biological Laboratories 社)、抗 Csk 抗体 (C-20、Santa Cruz Biotechnology 社)、抗 Myc 抗体 (9E10、Santa Cruz Biotechnology 社)、抗 Flag 抗体 (M2、SIGMA-ALDRICH 社)、抗 DDDDK 抗体 (PM020、Medical & Biological Laboratories 社)、抗 Actin 抗体 (C-11、Santa Cruz Biotechnology 社)、抗 Pragmin 抗体 (A302-675A、Bethyl Laboratories 社)、抗 Src 抗体 (36D10、Cell Signaling Technology 社)、抗 Src リン酸化チロシン残基 416 番抗体 (#2101、Cell Signaling Technology 社)、抗 Src リン酸化チロシン残基 530 番抗体 (sc-101803、Santa Cruz Biotechnology 社)、抗 Vinculin 抗体 (hVIN-1、SIGMA-ALDRICH 社)をイムノブロット、免疫沈降または免疫蛍光染色における一次抗体として用いた。イムノブロットの二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ

(HRP) を付加した抗マウス、抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare 社)、ならびに抗ヤギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) を用いた。蛍光免疫染色の二次抗体には Alexa Fluor 488 融合抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen 社)および Alexa Fluor 546 融合抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen 社)を用いた。

組換えタンパク質の発現と精製

組換え Pragmin タンパク質

GST 融合野生型 Pragmin 発現ベクターまたは GST 融合変異型 Pragmin-Y391F 発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌 Rosetta2 (DE3) 株 (Novagen 社) を LB 培地 (Affymetrix 社) にて 37 度で振盪培養し、これを種培養とした。種培養から $OD_{600} = 0.02$ となるように LB 培地に植菌し、 $OD_{600} = 1.0$ に達するまで 37 度で振盪培養した。IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) を終濃度 0.1 mM となるように添加し、18 度で 16 時間振盪培養し GST 融合組換え Pragmin タンパク質を誘導発現させた。組換えタンパク質誘導後の大腸菌培養液を 6000x g で 15 分間遠心分離し菌体を沈殿として回収し、Ni 結合バッファー [8 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , 2.7 mM KCl, 400 mM NaCl, 0.1% TritonX-100] に懸濁した。再度遠心分離により菌体を回収し、0.3 mg/ml Benzamidine を添加した Ni 結合バッファーに再懸濁した。超音波ホモジェナイザー

(Qsonica 社または Heat Systems Incorporated 社) を用いて菌体を破碎後、30,000x g で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。上清を Ni セファロース excel ビーズ (GE Healthcare 社) と 4 度で 1 時間 30 分混和後、エコノカラム (BIO-RAD 社) に充填し、非吸着画分を除去した。Ni 洗浄バッファー [8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 400 mM NaCl, 1% TritonX-100, 30 mM Imidazole] で洗浄後、Ni 溶出バッファー [8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 400 mM NaCl, 500 mM Imidazole] を添加し、吸着タンパク質を溶出させ回収した。溶出液を Amicon Ultra-4 および-0.5 (Millipore 社) を用いて限外濾過を行い濃縮した。

組換えチロシンリン酸化 Pragmin タンパク質

v-Src 発現ベクターと、GST 融合野生型 Pragmin 発現ベクターまたは GST 融合変異型 Pragmin-Y391F 発現ベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換した [30]。組換え Pragmin タンパク質 (非リン酸化体) のプロトコルと同様に、組換え v-Src タンパク質ならびに GST 融合組換え Pragmin タンパク質を同一菌体内に誘導発現させ、大腸菌体内で v-Src により GST 融合組換え Pragmin タンパク質をチロシンリン酸化させた。組換え Pragmin タンパク質 (非リン酸化体) のプロトコルと同様に組換えチロシンリン酸化 Pragmin タンパク質の精製を行った。ただし、菌体を Ni 結合バッファ

一に再懸濁する際に、0.3 mg/ml Benzamidine および 0.2 mM Na₃VO₄ を添加した。

組換え Csk タンパク質

GST 融合野生型 Csk 発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) 株を LB 培地 (Affymetrix 社) にて 37 度で振盪培養し、これを種培養とした。種培養から OD₆₀₀ = 0.02 となるように LB 培地に植菌し、OD₆₀₀ = 1.0 に達するまで 37 度で振盪培養した。IPTG を終濃度 0.1 mM となるように添加し、25 度で 16 時間振盪培養し GST 融合組換え Csk タンパク質を誘導発現させた。組換え Pragmin タンパク質 (非リン酸化体) のプロトコルと同様に菌体を回収した。ただし、菌体の懸濁および再懸濁には GST 結合バッファー [25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol] を用いた。再懸濁時には、0.3 mg/ml Benzamidine を添加した。超音波ホモジェナイザー (Qsonica 社または Heat Systems Incorporated 社) で菌体を破碎後、30,000x g で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。上清をグルタチオンセファロース 4B ビーズ (GE Healthcare 社) と 4 度で 2 時間混和後、エコノパックカラム (BIO-RAD 社) に充填し、非吸着画分を除去した。GST 洗浄バッファー (W1) [25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% TrionX-100, 10 mM β-Mercaptoethanol] で洗浄後、GST 洗浄バッファー (W2) [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM

β -Mercaptoethanol] で洗浄およびバッファー置換を行った。ビーズに 50% スラリーとなるよう GST 洗浄バッファー (W2) を加え、PreScission protease (GE Healthcare 社) を添加した。4 度で 14 時間のプロテアーゼ処理により GST 融合野生型 Csk から GST タグを切断した。ビーズからの遊離画分を回収し、Amicon Ultra-4 および-0.5 (Millipore 社) を用いて限外濾過を行い濃縮した。

組換え Src-tail タンパク質

GST 融合 Src-tail 発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) 株を LB 培地 (Affymetrix 社) にて 37 度で振盪培養し、これを種培養とした。種培養から $OD_{600} = 0.02$ となるように LB 培地に植菌し、 $OD_{600} = 0.7$ に達するまで 37 度で振盪培養した。IPTG を終濃度 0.4 mM となるように添加し、37 度で 7 時間振盪培養し GST 融合組換え Src-tail タンパク質を誘導発現させた。組換え Pragmin タンパク質 (非リン酸化体) のプロトコルと同様に菌体を回収した。ただし、菌体の懸濁および再懸濁には GST 結合バッファー [50 mM Tris-HCl, pH 7.3, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT] を用いた。再懸濁時には、0.3 mg/ml Benzamidine を添加した。超音波破碎後、遠心分離した上清をグルタチオンセファロース 4B ビーズ (GE Healthcare 社) と 4 度で 3 時間混和後、エコノパックカラム (BIO-RAD 社) に充填し、非吸着画分を除去した。

GST 結合バッファーで洗浄後、GST 溶出バッファー [50 mM Tris-HCl, pH 7.3, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 20 mM Glutathione] を用いて吸着している GST 融合 Src-tail を溶出した。溶出液を Amicon Ultra-4 による限外濾過で濃縮ならびにバッファー置換 [20 mM Tris-HCl, pH8.0, 100 mM NaCl]を行った。

ゲル染色とイムノブロット

Laemmli の方法に準じて SDS-PAGE を行い、タンパク質を分離した。Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色にあたっては、泳動後のゲルを固定液 [20% Methanol, 7.5% Acetic acid] 中で 30 分振盪後、染色液 [50% Methanol, 5% Acetic acid, 0.25 % CBB-R250] で振盪して染色し、脱染液 [50% Methanol, 10% Acetic acid]で脱染色してタンパク質を検出した。銀染色にあたっては、2D-銀染色試薬・II (コスモバイオ社) を用いプロトコルに準じてタンパク質を検出した。イムノブロットにあたっては、泳動後のゲルから PVDF 膜 (Millipore 社) へタンパク質を転写した。PVDF 膜をブロッッキング処理後、適切な一次抗体で処理し、続いて HRP を付加した適切な二次抗体で処理した。抗体処理後の PVDF 膜を Western Blotting Substrate (Pierce 社) または Western Lightning Plus-ECL (Perkin-Elmer 社) を用いて発光させ、Hyperfilm (GE Healthcare 社) または X線フィルム (Fujifilm 社) を用いてイムノブロット像の検出を行った。また、

ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm 社) によりイムノブロット像の検出・定量を行った。

GST プルダウンアッセイ

大腸菌タンパク質発現系より精製したチロシンリン酸化 GST 融合野生型組換え Pragmin またはチロシンリン酸化 GST 融合 Y391F 変異型組換え Pragmin を 2 nmol、組換え Csk を 0.2 nmol ずつプルダウンバッファー [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0.01% TritonX-100] 800 μ l に添加した。このタンパク質の混合試料を Input とした。続いて 4 度で 1 時間転倒混和後、プルダウンバッファーで平衡化したグルタチオンセファロース 4B ビーズ (GE Healthcare 社) を 2% スラリーとなるよう添加、さらに 4 度で 1 時間転倒混和し、Pragmin タンパク質に付加した GST タグによるプルダウンを行った。プルダウンバッファーを用いて 8 回希釈洗浄後、プルダウン試料を SDS-PAGE により展開し、銀染色によりゲル中のタンパク質を染色・検出した。

***in vitro* キナーゼ試験**

Pragmin の自己リン酸化試験

大腸菌タンパク質発現系より精製した 800 nM の非リン酸化 GST 融合野生型組換え

Pragmin をキナーゼバッファー [50 mM HEPES-NaOH, pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM Na₃VO₄, 20 μM ATP-Na] 25 μl に懸濁し、30 度で 60 分反応させた [13]。SDS サンプルバッファーを添加して反応を停止後、SDS-PAGE により展開しイムノブロットを行った。

Pragmin のキナーゼ活性試験

大腸菌タンパク質発現系より精製した 2 μM の非リン酸化 GST 融合野生型組換え Pragmin を 2 μg poly (Glu: Tyr = 4: 1) (SIGMA 社) を含むキナーゼバッファー 25 μl に懸濁し、30 度で 120 分反応させた。SDS サンプルバッファーを添加して反応を停止後、SDS-PAGE により展開し銀染色およびイムノブロットを行った。

Csk による Pragmin のリン酸化試験

大腸菌タンパク質発現系より精製した 500 nM の非リン酸化 GST 融合野生型組換え Pragmin または非リン酸化 GST 融合 Y391F 変異型組換え Pragmin と大腸菌タンパク質発現系より精製した 50 nM の組換え Csk をキナーゼバッファー 25 μl に懸濁し 30 度で 0 分、30 分または 60 分反応させた。SDS サンプルバッファーを添加して反応を停止後、SDS-PAGE により展開しイムノブロットを行った。

Csk のキナーゼ活性試験 (基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1) 使用)

大腸菌タンパク質発現系より精製した 50 nM のチロシンリン酸化 GST 融合野生型組換え Pragmin またはチロシンリン酸化 GST 融合 Y391F 変異型組換え Pragmin と、大腸菌タンパク質発現系より精製した 5 nM の組換え Csk を 2 µg poly (Glu: Tyr = 4: 1) (SIGMA 社) を含むキナーゼバッファー 25 µl に懸濁し 30 度で 60 分反応させた。SDS サンプルバッファーを添加して反応を停止後、SDS-PAGE により展開しイムノブロットを行った。

Csk のキナーゼ活性試験 (GST-*Src*-tail 使用)

大腸菌タンパク質発現系より精製した 400 nM の非リン酸化 GST 融合野生型組換え Pragmin、非リン酸化 GST 融合 Y391F 変異型組換え Pragmin、チロシンリン酸化 GST 融合野生型組換え Pragmin またはチロシンリン酸化 GST 融合 Y391F 変異型組換え Pragmin と、大腸菌タンパク質発現系より精製した 40 nM の組換え Csk を 400 nM GST-*Src*-tail を含むキナーゼバッファー 25 µl に懸濁し 30 度で 15 分、30 分または 60 分反応させた。SDS サンプルバッファーを添加して反応を停止後、SDS-PAGE により展開し銀染色およびイムノブロットを行った。チロシンリン酸化された

GST-Src-tail を ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm 社) により定量した。

哺乳動物細胞の培養と遺伝子導入

哺乳動物細胞は全て 5% CO₂、37 度の条件下で培養した。ヒト胃上皮腺癌由来 AGS 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) (BioWest 社, Lot. S08067S1820) を添加した RPMI-1640 培地 (日水製薬株式会社) で培養した。Src、Yes、Fyn 欠損マウス線維芽細胞由来 SYF 細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS) (BioWest 社, Lot. S08067S1820) を添加した DMEM 培地 (日水製薬株式会社) に、グルコースを 4.5 g/L になるよう加えて培養した。ヒト胃上皮腺癌由来 MKN7 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) (Gibco 社, Lot. 41F0346K) を添加した RPMI-1640 培地 (日水製薬株式会社) で培養した。

AGS 細胞、SYF 細胞への遺伝子導入は Lopofectamin 2000 reagent (Invitrogen 社) を用い、製品プロトコルに準拠して行った。

AGS 細胞、MKN7 細胞へのレンチウイルス感染による遺伝子導入はレンチベクター発現システム (System Biosciences) のプロトコルに準じて行った。

遺伝子導入後、各実験に適した時間で解析を行った。

細胞抽出液の調整

細胞の回収・溶解にあたっては、ホスファターゼインヒビター添加 PBS [PBS (8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 138 mM NaCl), 2 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 10 mM β-Glycerophosphate] で洗浄し回収後、細胞溶解バッファー [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% TritonX-100, 10% Glycerol, 2 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 10 mM β-Glycerophosphate, 10 μg/ml Leupeptin, 10 μg/ml Trypsin inhibitor, 10 μg/ml Aprotinin, 2 mM PMSF] または [50 mM Tris-HCl, pH7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Brij-35, 2 mM Na₃VO₄, 10 mM NaF, 10 mM β-Glycerophosphate, 10 μg/ml Leupeptin, 10 μg/ml Trypsin inhibitor, 10 μg/ml Aprotinin, 2 mM PMSF] で 20 分間処理し、遠心分離により上清画分として細胞抽出液を得た。この細胞抽出液のタンパク質濃度を Bradford 法により測定し、イムノブロットまたは免疫沈降に供した。

免疫沈降

AGS 細胞に Flag タグを付加した Csk (Csk-Flag) 発現ベクターを一過性に導入し 24 時間後に細胞抽出液を調整し、抗 Pragmin 抗体を添加して 4 度で 16 時間転倒混和した。続いて細胞溶解バッファーで平衡化した Protein G Sepharose 4 Fast Flow ビーズ (GE Healthcare 社) を 2% スラリーとなるよう添加後、4 度で 2 時間転倒混和した。

細胞溶解バッファーで3回希釈洗浄し、免疫沈降物を得た。免疫沈降物は SDS-PAGE で分離後、イムノブロットで検出した。

RNA 干渉

Csk 特異的 siRNA は 5'-AGUACCCAGCAAAUGGGCATT-3'を用いた [31]。コントロールとして Control siRNA Luciferase (GL2) (コスモバイオ社) を用いた。細胞への siRNA の導入は Lopofectamin 2000 reagent (Invitrogen 社) を用い、製品プロトコルに準拠して行った。

免疫蛍光染色

Lab-Tek Chamber Slide (8 well) (Thermo Fisher Scientific 社) に 1 well あたり 1×10^4 個の AGS 細胞を播種した。18 時間培養後に Mildform 10N (Wako 社) で 10 分間固定し、0.25% Triton X-100 含有 PBS で 10 分間透過処理を行った。固定・透過処理を行った細胞を 5% BSA、0.1% Tween20 含有 PBS で 1 時間ブロッキング処理した。Signal Enhancer HIKARI for Immunostain Solution B (nacalai tesque 社) で希釈した一次抗体と 4 度で一晩反応させ、続いて Signal Enhancer HIKARI for Immunostain Solution B (nacalai tesque 社) で希釈した Alexa Fluor 色素融合二次抗体 (Invitrogen 社) と室温で 1 時間反応させた。細胞核は DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) で染色した。染色像は共焦点

レーザー走査型顕微鏡 (FV1200、OLYMPUS 社) で観察した。

細胞形態変化の解析

6 cm dish に 1.6×10^5 個の MKN7 細胞を播種し、18 時間後に野生型 Pragmin および変異型 Pragmin-Y391F、Csk を発現させるレンチウイルスを感染させ、48 時間後に倒立顕微鏡 (Nikon 社) により細胞形態変化を観察した。伸長細胞の定義は、細胞の伸長部分を長径、細胞核を横切る最短距離を短径とした時、長径が短径の 2 倍以上である細胞とした。

細胞運動能の測定

3.5 cm dish に 1×10^3 個の MKN7 細胞を播種し 96 時間培養してコロニーを形成させた。野生型 Pragmin および変異型 Pragmin-Y391F、Csk を発現させるレンチウイルスを感染させ、48 時間後に倒立顕微鏡 (Nikon 社) によりコロニーを観察した。

統計学的解析

統計学的解析は Student's t-test を用いて行った。

結果

組換えタンパク質の作製と *in vitro* 結合試験

哺乳動物細胞を用いた先行研究から、Pragmin は EPIYA モチーフのチロシンリン酸化依存的に Csk と複合体を形成することが明らかにされている [16]。しかし、Pragmin-Csk 複合体は直接的な相互作用によるものか、介在するタンパク質によるものか不明である。ヒト胃上皮腺癌由来 AGS 細胞を用いた当研究室の研究によると、Pragmin の EPIYA モチーフ内のチロシン残基 (391 番) をフェニルアラニン残基に置換した Pragmin-Y391F 変異体および Csk の SH2 ドメインのセリン残基 (109 番) をスチレン残基に置換した Csk-S109C 変異体は Pragmin-Csk 複合体を形成しない [16]。よって、両者は直接結合する可能性が高いと推察し、Pragmin および Csk の組換えタンパク質を用いて *in vitro* 結合試験を行った。

組換えタンパク質作製には大腸菌タンパク質発現系を用いた。Pragmin-Csk 複合体形成には Pragmin のチロシンリン酸化が必須であるため、組換え Pragmin のチロシンリン酸化と精製を試みた。アンピシリン耐性遺伝子を選択マーカーとして持つ大腸菌用発現ベクター pGEX6P2 のマルチクローニングサイト内に、3'末端に 6xHis タグをコードする配列を付加したラット由来 *Pragmin* の野生型 cDNA を挿入した。pGEX6P2

ベクターは GST タグをコードする配列を 5'末端に持つため、GST-Pragmin-His 融合タンパク質 (以下 GST-Pragmin-Wild-Type (WT) -His) となる。同様に Pragmin の EPIYA モチーフのチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した Y391F 変異型 Pragmin をコードする cDNA を pGEX6P2 ベクターに挿入した (以下 GST-Pragmin-Y391F-His)。

野生型および変異型 GST-Pragmin-His のチロシンリン酸化は当研究室で既に確立されたチロシンリン酸化組換え CagA の作製方法を応用し [30]、大腸菌体内における v-Src 共発現システムを用いた。v-Src をコードする cDNA はクロラムフェニコール耐性遺伝子を選択マーカーとして持つ大腸菌用発現ベクター pACYCDuet-1 のマルチクローニングサイト内に挿入されている。v-Src 発現ベクターで形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) 株を、さらに野生型または変異型 GST-Pragmin-His 発現ベクターで形質転換し、クロラムフェニコールおよびアンピシリンを含む培地中で培養することで、大腸菌体内で GST-Pragmin-His をチロシンリン酸化した。ニッケルイオンと 6xHis タグの親和性を利用して野生型および変異型 GST-Pragmin-His のアフィニティー精製を行い、SDS-PAGE で展開後、CBB 染色および各種抗体を用いたイムノブロットを行った (図 1)。CBB 染色では野生型・変異型型ともに複数のバンドが観察され、両者にバンドパターンの差はなかった (図 1)。複数存在するバンドのうち、Pragmin の N 末端に付加した GST タグおよび C 末端に付加した His タグに対するイムノブロットで検出さ

れた最も分子量の大きいバンドが全長の **Pragmin** だと考えられる (図 1 矢頭)。また、抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロットの結果からは、**Pragmin** の野生型と変異型は **v-Src** によって同程度チロシンリン酸化されていることが明らかになった。即ち 391 番目のチロシン残基の変異によるリン酸化量の変化は確認できなかった (図 1)。

以上の結果から、野生型および **Y391F** 変異型チロシンリン酸化組換え **Pragmin** は単一のタンパク質の集団ではないものの、組換え体の作製とそのチロシンリン酸化、並びに精製方法を確立することができた。

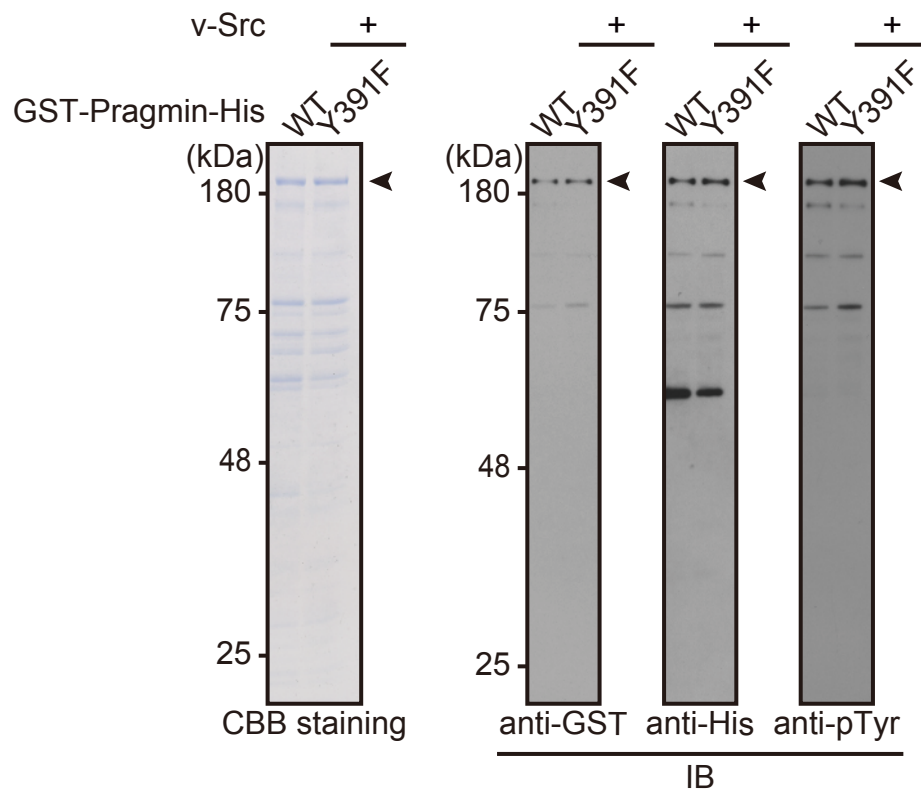


図 1 チロシンリン酸化組換え Pragmin タンパク質の作製

大腸菌 BL21 (DE3) 株を GST-Pragmin-His 融合タンパク質発現ベクターと v-Src 発現ベクターで形質転換し、組換えタンパク質を発現ならびにチロシンリン酸化させた。ニッケルセファロースビーズを用いて GST-Pragmin-His をアフィニティー精製後、SDS-PAGE で展開し、CBB 染色と各種抗体によるイムノブロットを行った。野生型 GST-Pragmin-His 融合タンパク質を WT、Pragmin の EPIYA モチーフのチロシン残基 (Y) をフェニルアラニン残基 (F) に置換した変異型を Y391F と表記する。矢頭は全長 GST-Pragmin-His を示す。

Csk の組換えタンパク質の作製および精製は当研究室の組換え SHP2 のプロトコルを応用した [30]。pGEX6P2 ベクターのマルチクローニングサイト内に、3'末端に 6xHis タグをコードする配列を付加したラット由来 *Csk* の cDNA を挿入した。

GST-Csk-His 発現ベクターで大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、アンピシリンを含む培地で培養して GST-Csk-His 融合タンパク質を発現させた。グルタチオンと GST タグの親和性を利用して GST-Csk-His のアフィニティー精製を行った。グルタチオンセファロースビーズの洗浄後、ビーズに GST-Csk-His を吸着させた状態で PreScission Protease により GST タグの切断を行った。得られた Csk-His および PreScission Protease 処理前の GST-Csk-His を SDS-PAGE で展開後、イムノブロットを行った (図 2)。抗 GST 抗体と抗 His 抗体で検出される GST-Csk-His はプロテインマーカーと比較したとき、理論値 (78 kDa) より低い位置にバンドが観察された (図 2)。一方で、GST タグ切断後の Csk-His は理論値 (52 kDa) と考えられる位置に検出された (図 2)。抗 Csk 抗体を用いたイムノブロットの結果、AGS 細胞に Flag タグを付加した Csk を発現させた細胞抽出液の Csk-Flag と組換えタンパク質 Csk-His の分子量は同程度であった (図 2)。以上の結果から、組換え Csk の作製、精製方法を確立することができた。

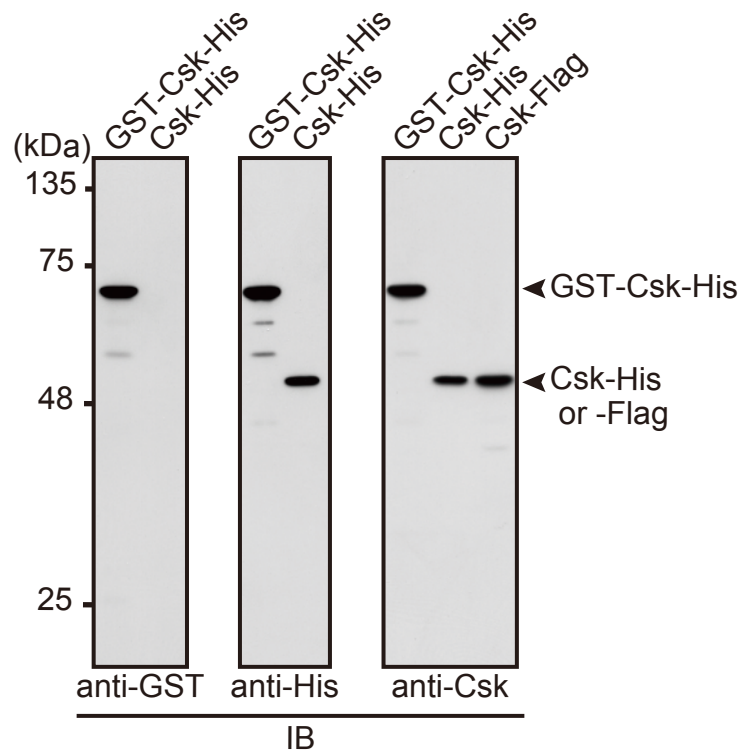


図 2 組換え Csk タンパク質の作製

大腸菌 BL21 (DE3) 株を GST-Csk-His 融合タンパク質発現ベクターで形質転換し、組換えタンパク質を発現させた。グルタチオンセファロースビーズで GST-Csk-His をアフィニティー精製し、PreScission protease を用いて GST タグを切断した。SDS-PAGE で展開後、各種抗体でイムノブロットを行った。GST-Csk-His 融合タンパク質を GST-Csk-His、PreScission protease による GST タグ切断後を Csk-His と表記する。AGS 細胞に発現させた Flag タグを付加した Csk を Csk-Flag と表記する。矢頭はそれぞれのタンパク質のバンドの位置を示す。

得られたチロシンリン酸化組換え Pragmin と、組換え Csk を用いて GST プルダウンアッセイを行い、その結果を SDS-PAGE で展開後、銀染色像で示した (図 3)。図 3 の左側 5 レーンは組換えタンパク質のインプットを、右側 5 レーンは GST プルダウン後の産物を展開したものである。チロシンリン酸化野生型 Pragmin は Csk と特異的に結合したが、Y391F 変異型 Pragmin と Csk は結合しなかった。したがって、Pragmin-Csk 複合体はチロシンリン酸化された EPIYA モチーフに依存した直接的な結合によることが示された。

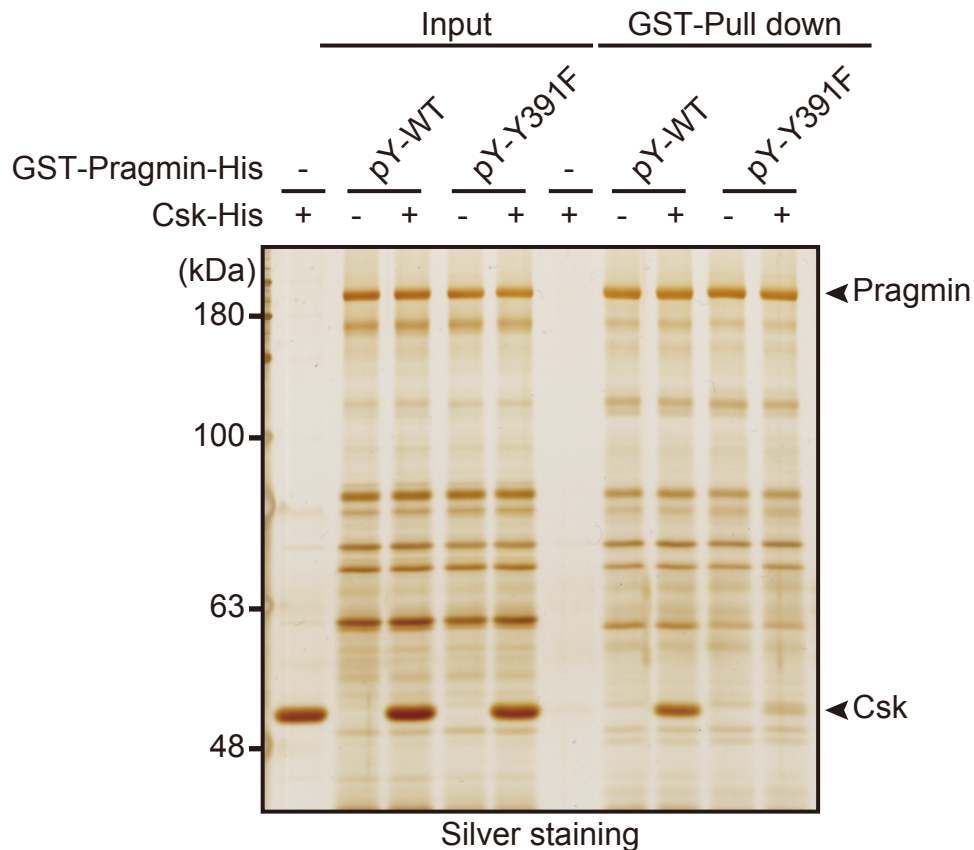


図 3 組換えタンパク質を用いた *in vitro* 結合試験

野生型 GST-Pragmin-His 融合タンパク質を WT、Pragmin の EPIYA モチーフのチロシン残基 (Y) をフェニルアラニン残基 (F) 置換した変異型を Y391F と表記する。チロシンリン酸化を pY と表記する。野生型および Y391F 変異型チロシンリン酸化組換え Pragmin をそれぞれ Csk-His と 4 度で 60 分混合し、グルタチオンセファロースビーズを用いた GST プルダウンアッセイを行った。ビーズへ結合したタンパク質画分を SDS-PAGE にて展開し、銀染色を行った。矢頭はそれぞれのタンパク質のバンドの位置を示す。

Csk による Pragmin のチロシンリン酸化

ピロリ菌 CagA は Csk を細胞膜近傍に引き寄せ SFK を不活性化する [13]。一方、Pragmin は細胞質に Csk を留め置き SFK の不活性化を妨げる [16]。Pragmin は Csk の局在を制御するが、Pragmin-Csk 複合体の細胞質における機能は未だ明らかにされていない。そこで、AGS 細胞に Myc タグを付加した Pragmin と Flag タグを付加した Csk の発現ベクターを一過性に導入し、細胞抽出液をイムノブロットで解析した (図 4)。その結果、Myc-Pragmin と Csk-Flag の共発現により著しくチロシンリン酸化量が増加したバンドが確認された (図 4 矢頭)。抗 Myc 抗体で検出された Myc-Pragmin のバンドと分子量が等しかったことから、Myc-Pragmin と Csk-Flag の共発現によりチロシンリン酸化量が著しく増加したタンパク質は Myc-Pragmin であるとし、以降の解析を行った。

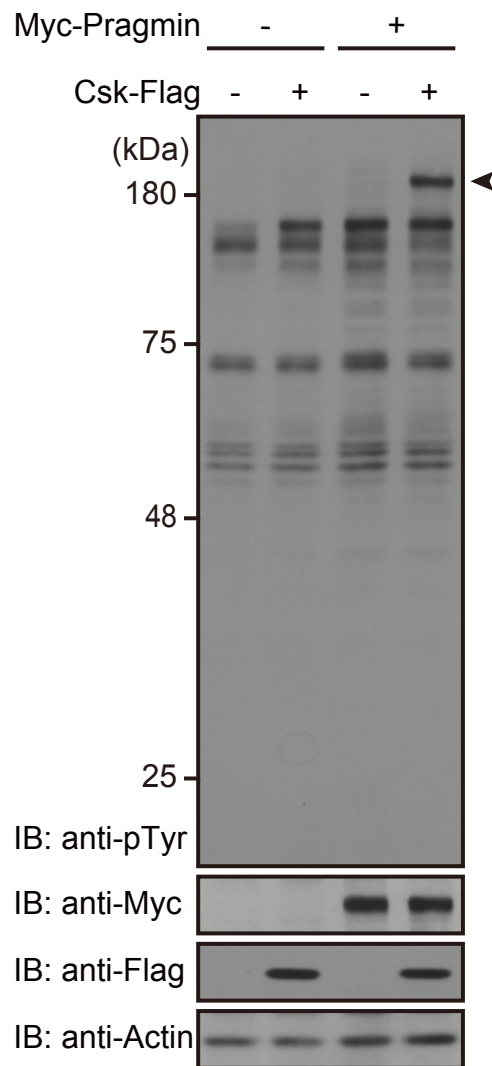


図 4 Pragmin と Csk の共発現による細胞内タンパク質のチロシンリン酸化量の変化

AGS 細胞に Myc タグを付加した Pragmin (Myc-Pragmin) と Flag タグを付加した Csk (Csk-Flag) の発現ベクターを一過性に導入し、24 時間後に細胞抽出液を調整した。得られた細胞抽出液を SDS-PAGE で展開後、各種抗体によるイムノブロットを行った。矢頭は Myc-Pragmin と Csk-Flag を共発現させたとき、チロシンリン酸化量が増加した Myc-Pragmin と考えられるバンドを示す。

図 4 より Myc-Pragmin と Csk-Flag の共発現によりチロシンリン酸化量が著しく増加したタンパク質は Myc-Pragmin であることが示唆されたので、次に内在性 Pragmin のチロシンリン酸化量に対する Csk の影響を検討した。AGS 細胞に Csk-Flag 発現ベクターを一過性に導入し、抗 Pragmin 抗体を用いた免疫沈降 (IP) を行い、イムノブロットで解析した (図 5)。その結果、Csk-Flag の一過性発現により内在性 Pragmin のチロシンリン酸化量が増加していることが明らかになった。

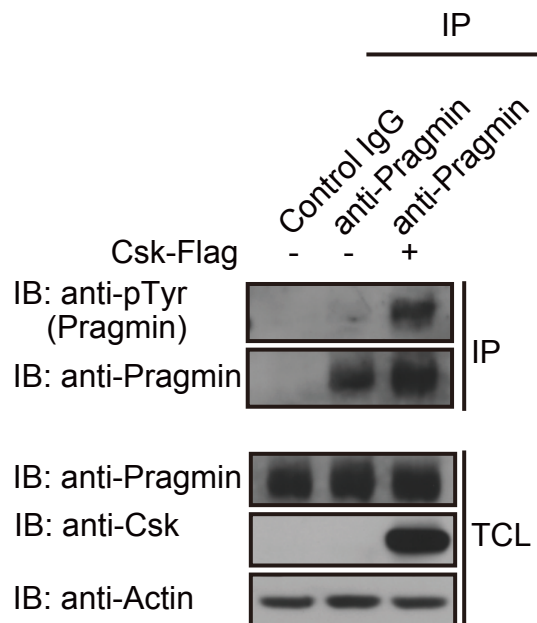


図 5 Csk 過剰発現による内在性 Pragmin のチロシンリン酸化量の増加

AGS 細胞に Flag タグを付加した Csk (Csk-Flag) の発現ベクターを一過性に導入し、24 時間後に細胞抽出液 (Total cell lysate: TCL) を調整した。得られた細胞抽出液を用いてコントロールウサギ IgG 抗体あるいは抗 Pragmin 抗体による免疫沈降を行い、得られた免疫沈降物 (Immunoprecipitate: IP) および TCL を SDS-PAGE により展開し、各種抗体によるイムノブロットを行った。

次に、内在性 Csk の発現抑制が Pragmin のチロシンリン酸化量に与える影響を検討した。Pragmin は SFK からチロシンリン酸化を受けることが報告されている [16]。Csk は SFK のネガティブレギュレーターであるため、Csk の発現抑制は SFK の活性化を引き起こす [28]。したがって、内在性 Csk の発現を抑制した時、Pragmin のチロシンリン酸化量は SFK の作用によって増加することが予想された。そこで、本実験では SFK のうち広範に発現している Src、Yes、Fyn をノックアウトしたマウス胎児の線維芽細胞 (MEF) 由来 SYF 細胞を用いた [32]。SYF 細胞に Csk 特異的 siRNA (si Csk) と Myc-Pragmin の発現ベクターを一過性に導入し、細胞抽出液をイムノブロットで解析した (図 6)。その結果、内在性 Csk の発現抑制により Myc-Pragmin のチロシンリン酸化量が著しく減少した。AGS 細胞ならびに SYF 細胞を用いた結果より (図 4-6)、Pragmin は Csk によってリン酸化されている可能性が示された。

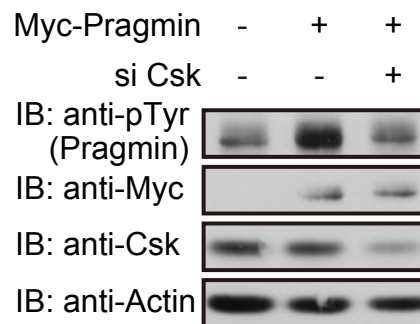


図 6 内在性 Csk の発現抑制による Pragmin のチロシンリン酸化量の減少

Src、Yes、Fyn トリプルノックアウトマウス胎児の線維芽細胞 (MEF) 由来 SYF 細胞に Csk 特異的 siRNA (siCsk) またはコントロール siRNA としてホタルルシフェラーゼ特異的 siRNA (siGL2) を導入し、12 時間後に細胞を再播種した。再播種 12 時間後に siRNA と Myc-Pragmin の発現ベクターを導入し、24 時間培養後に細胞抽出液を調整した。得られた細胞抽出液を SDS-PAGE で展開し、各種抗体によるイムノブロットを行った。

哺乳動物細胞を用いた実験の結果から、Pragmin は Csk によってチロシンリン酸化されることが示唆されたので、次に組換えタンパク質を用いた *in vitro* キナーゼ試験を行った。本実験では図 3 で行った *in vitro* 結合試験とは異なり Pragmin の非リン酸化体を作製する必要があった。そこで、図 1 で用いた GST-Pragmin-WT-His または GST-Pragmin-Y391F-His 発現ベクターで大腸菌 Rosetta2 (DE3) 株を形質転換し、培養後アフィニティー精製を行った。得られた組換えタンパク質は SDS-PAGE で展開し、CBB 染色と各種抗体によるイムノブロットを行った (図 7)。精製度は低い、野生型・変異型共に全長の GST-Pragmin-His 融合タンパク質を得ることに成功した。

野生型および Y391F 変異型組換え Pragmin および図 2 で作製した組換え Csk を混和し 30 度で 60 分反応を進行させた後、SDS-PAGE で展開し各種抗体によるイムノブロットを行った (図 8)。その結果、野生型組換え Pragmin は Csk によって明らかにチロシンリン酸化されていた。一方、Y391F 変異型組換え Pragmin は Csk によってチロシンリン酸化されていたが、野生型と比較してチロシンリン酸化量は少なかった (図 8)。したがって、Pragmin は Csk の新規基質であり、Csk は Pragmin の EPIYA モチーフに含まれる 391 番目のチロシン残基を含む複数のチロシン残基をリン酸化することが示唆された。

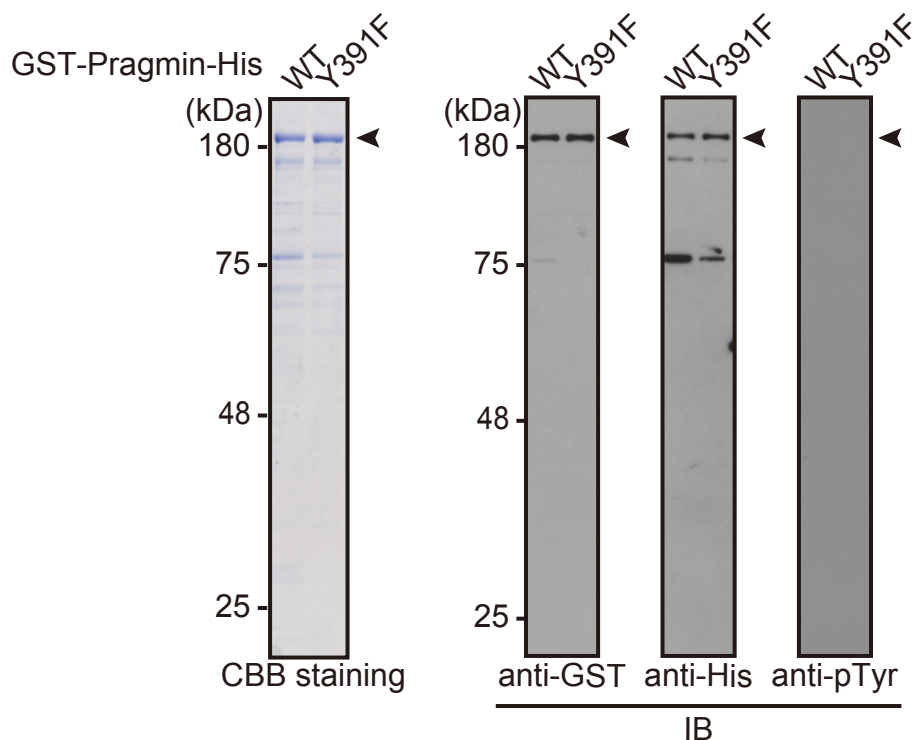


図 7 非リン酸化組換え Pragmin タンパク質の作製

大腸菌 Rosetta2 (DE3) 株を GST-Pragmin-WT-His または GST-Pragmin-Y391F-His 発現ベクターで形質転換し、培養して組換えタンパク質を発現させた。ニックルセファロースビーズでアフィニティー精製し、得られた組換えタンパク質を SDS-PAGE で展開し、CBB 染色と各種抗体によるイムノブロットを行った。野生型 GST-Pragmin-His 融合タンパク質を WT、Pragmin の EPIYA モチーフのチロシン残基 (Y) をフェニルアラニン残基 (F) 置換した変異型を Y391F と表記する。矢頭は全長 GST-Pragmin-His を示す。

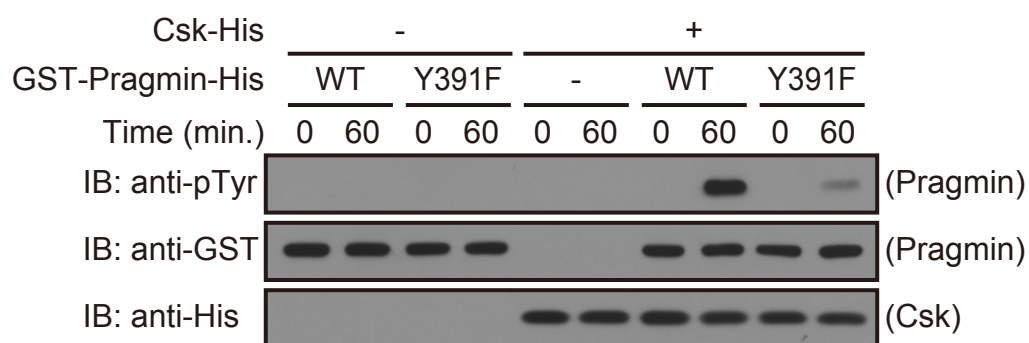


図 8 組換えタンパク質を用いた *in vitro* キナーゼ試験

野生型 GST-Pragmin-His 融合タンパク質を WT、Pragmin の EPIYA モチーフのチロシン残基 (Y) をフェニルアラニン残基 (F) 置換した変異型を Y391F と表記する。野生型および Y391F 変異型 Pragmin と Csk を混合し、30 度で 60 分反応させた。反応液を SDS-PAGE で展開し、各種抗体によるイムノブロットを行った。

Pragmin は Mg イオン結合モチーフを持たないため、シュードキナーゼに分類される。Pragmin には唯一のファミリータンパク質 Sgk269/PEAK1 が存在する [33]。PEAK1 も Pragmin と同様に Mg イオン結合モチーフを持たないが、実験的にキナーゼ活性を持つことが示されている [34]。そこで、組換えタンパク質を用いて *in vitro* キナーゼ試験を行った図 8 と同じ条件下で、Pragmin 同士の自己リン酸化の有無を確認した。野生型組換え Pragmin を 30 度で 60 分反応させ、ATP 添加の有無でチロシンリン酸化量を比較した (図 9)。その結果、少なくとも同条件下では Pragmin は自己リン酸化しないことが明らかになった。次に Pragmin が自己リン酸化ではなく他の基質を持つ可能性を検討するために野生型組換え Pragmin をチロシンキナーゼの広範な人工基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1) と混合し、ATP 添加の有無でチロシンリン酸化量を比較した (図 10)。その結果、Pragmin は基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1) をリン酸化しなかった。以上の結果から、Pragmin は少なくとも図 8、図 9、図 10 の実験条件下ではキナーゼ活性を保持していないことが示された。よって、図 8 において観察された組換え Pragmin のチロシンリン酸化量の増加は、Csk による直接的なチロシンリン酸化であることが示唆された。

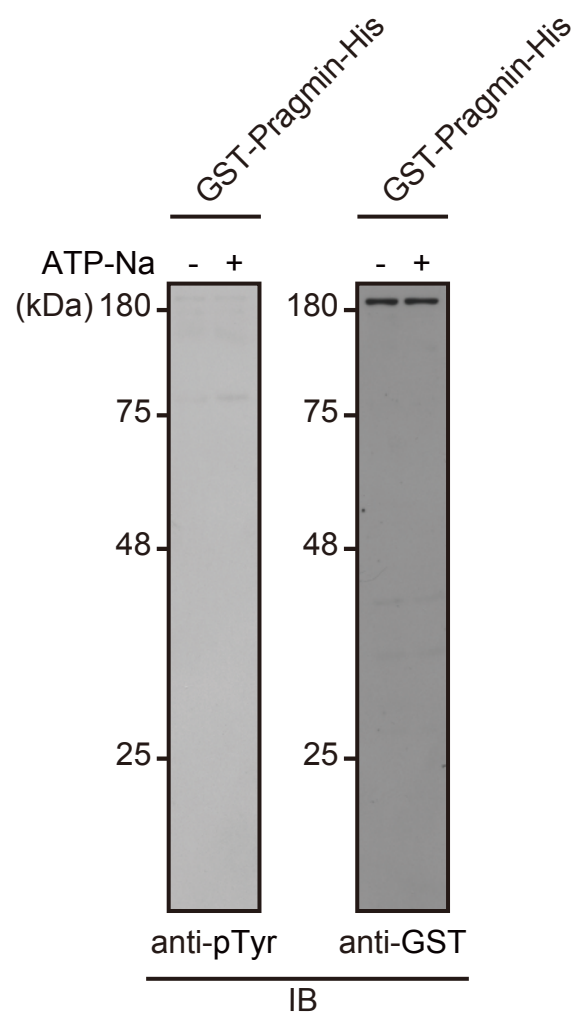


図 9 Pragmin の自己リン酸化試験

野生型組換え Pragmin を ATP-Na 添加なし (-)、あり (+) の条件下で 30 度 60 分反応させた後、SDS-PAGE で展開し、各種抗体によるイムノブロットを行った。

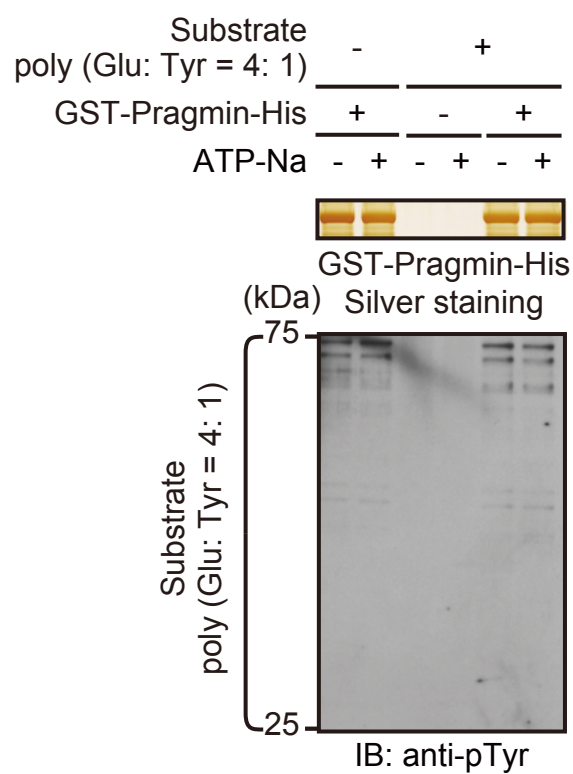


図 10 Pragmin のチロシンリン酸化試験

野生型組換え Pragmin を人工基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1)と混合し ATP-Na 添加なし (-)、あり (+) の条件下で 30 度 120 分反応させた後、SDS-PAGE で展開し、銀染色または抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロットを行った。

哺乳動物細胞を用いた実験および組換えタンパク質を用いた実験より Pragmin は Csk の新規基質であることが示唆された。そこで、図 4 における Myc-Pragmin と Csk-Flag の共発現による Myc-Pragmin のチロシンリン酸化量の増加は Csk のキナーゼ活性に依存しているか否かを検討するため、キナーゼ活性を欠損させた Csk を用いた。キナーゼ活性欠損型 Csk は野生型 (以下 Csk-WT-Flag) を基に ATP 結合部位である 222 番目のリジン (K) 残基をアルギニン (R) 残基に置換することで作製した (以下 Csk-K222R-Flag) [35]。AGS 細胞に Myc-Pragmin と Csk-WT-Flag または Csk-K222R-Flag の発現ベクターを一過性に導入し、細胞抽出液をイムノブロットで解析した (図 11・1-3 レーン目)。また、イムノブロットの結果を ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm 社) を用いて定量した。その結果、野生型 Csk との共発現により Myc-Pragmin のチロシンリン酸化量は著しく増加した (図 11・2 レーン目)。一方、キナーゼ活性欠損型 Csk と共発現させたとき、Myc-Pragmin のチロシンリン酸化量は Myc-Pragmin の単独発現 (図 11・1 レーン目) と比較してわずかに増加した (図 11・3 レーン目)。

図 9 および図 10 の結果より、Pragmin は少なくとも *in vitro* キナーゼ試験を行った条件下ではキナーゼ活性を持たないことが示されたが、他の条件や哺乳動物細胞においては不明である。したがって図 11 においてキナーゼ活性欠損型 Csk との共発現による Myc-Pragmin のチロシンリン酸化量のわずかな増加 (図 11・3 レーン目) には次

の 3 つの可能性が考えられる。1 つ目は、Pragmin は哺乳動物細胞内でキナーゼ活性を持ち自己リン酸化すること、2 つ目は、Pragmin と Csk の複合体形成により Pragmin の立体構造の変化等が生じ、Pragmin がキナーゼ活性を獲得すること、3 つ目は、Pragmin と Csk の複合体形成により Pragmin のシュードキナーゼドメインが引き寄せる ATP を Csk が利用可能になることである。1 つ目の可能性は、Myc-Pragmin の単独発現時のチロシンリン酸化量が Myc-Pragmin とキナーゼ活性欠損型 Csk 共発現時より低いことから否定される。次に 2 つ目と 3 つ目の可能性を検討するために、Pragmin の ATP 結合部位と予測されている 997 番目のリジン (K) 残基をアルギニン (R) 残基に置換した変異体を作製した (以下 Myc-Pragmin-K997R)。AGS 細胞に Myc-Pragmin-K997R と Csk-WT-Flag または Csk-K222R-Flag の発現ベクターを一過性に導入し、細胞抽出液をイムノブロットで解析し (図 11・4-6 レーン目)、その結果を定量した (図 11)。野生型およびキナーゼ活性欠損型 Csk との共発現による Myc-Pragmin-K997R のチロシンリン酸化量の増加は Myc-Pragmin-WT を用いた場合と同程度だった。したがって、Pragmin と Csk の複合体形成により Pragmin がキナーゼ活性を獲得する可能性や Pragmin のシュードキナーゼドメインが引き寄せる ATP を Csk が利用する可能性は否定される。したがって、Myc-Pragmin のチロシンリン酸化量の増加は Csk のキナーゼ活性に依存していることが強く示唆された。キナーゼ活

性欠損型 Csk の共発現による Myc-Pragmin のチロシンリン酸化量のわずかな増加に関しては、キナーゼ活性欠損型 Csk が内在性 Csk と競合して細胞膜に局在するチロシンリン酸化タンパク質 (Cbp 等) と結合したために SFK が不活性化されず、SFK による Pragmin のチロシンリン酸化が亢進した可能性が考えられる。

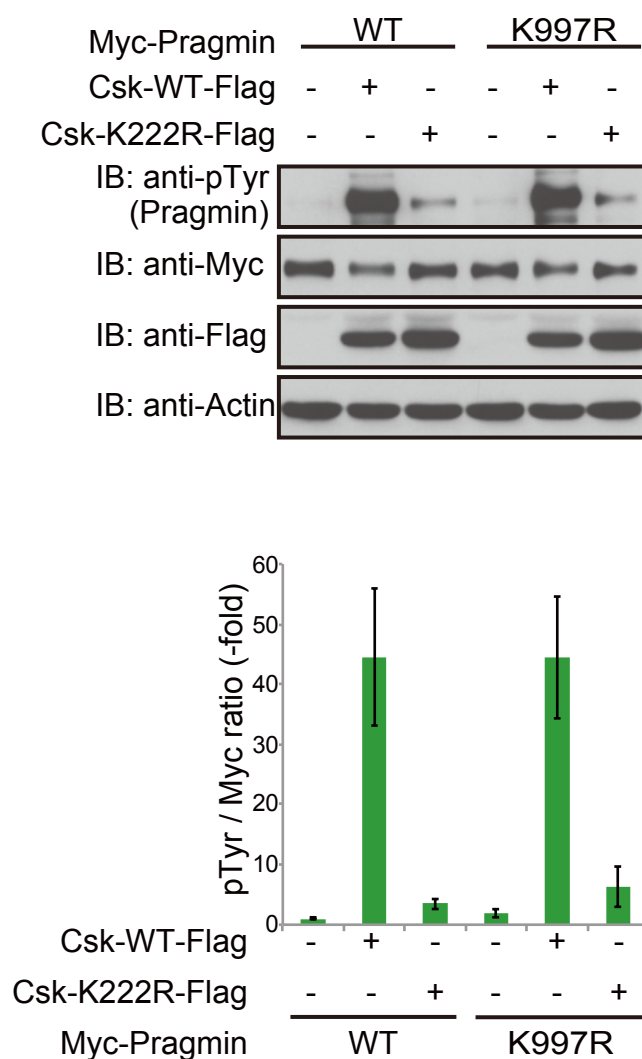


図 11 Csk のキナーゼ活性に依存した Pragmin のチロシンリン酸化量の増加

AGS 細胞に Myc タグを付加した野生型 Pragmin (Myc-Pragmin- WT) または ATP 結合部位と予測される 997 番目のリジン (K) 残基をアルギニン (R) 残基に置換したキナーゼ活性欠損型 Pragmin (Myc-Pragmin-K997R) と Flag タグを付加した野生型 Csk (Csk-WT-Flag) または ATP 結合部位である 222 番目のリジン (K) 残基をアルギニン (R) 残基に置換したキナーゼ活性欠損型 Csk (Csk-K222R-Flag) の発現ベクターを一過性に導入し、24 時間後に細胞抽出液を調整した。得られた細胞抽出液を SDS-PAGE で展開後、各種抗体でイムノブロットを行った。イムノブロットのバンド強度を ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm 社) で定量した。グラフは 3 回の実験の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。

Csk による Pragmin のチロシンリン酸化部位の同定

組換えタンパク質を用いた *in vitro* キナーゼ試験より Pragmin は Csk の新規基質であることが示唆されたため、次に Csk による Pragmin のチロシンリン酸化部位の同定を試みた。Pragmin (ラット配列) は分子内に 22 個のチロシン残基を保有する。そこで、Csk による Pragmin のチロシンリン酸化部位を同定するために、Pragmin の各種変異体を用いてスクリーニングを行った。まず、Pragmin の 1 から 829 番目のアミノ酸残基までの部分欠損変異体 (N 末端領域: Pragmin (1-829)) および 830 から 1368 番目のアミノ酸残基までの部分欠損変異体 (C 末端領域: Pragmin (830-1368)) を用いた。Pragmin (1-829) は EPIYA モチーフを含む 9 個のチロシン残基を有する。一方、Pragmin (830-1368) はシュードキナーゼドメインを保有し、13 個のチロシン残基を有する (図 12)。

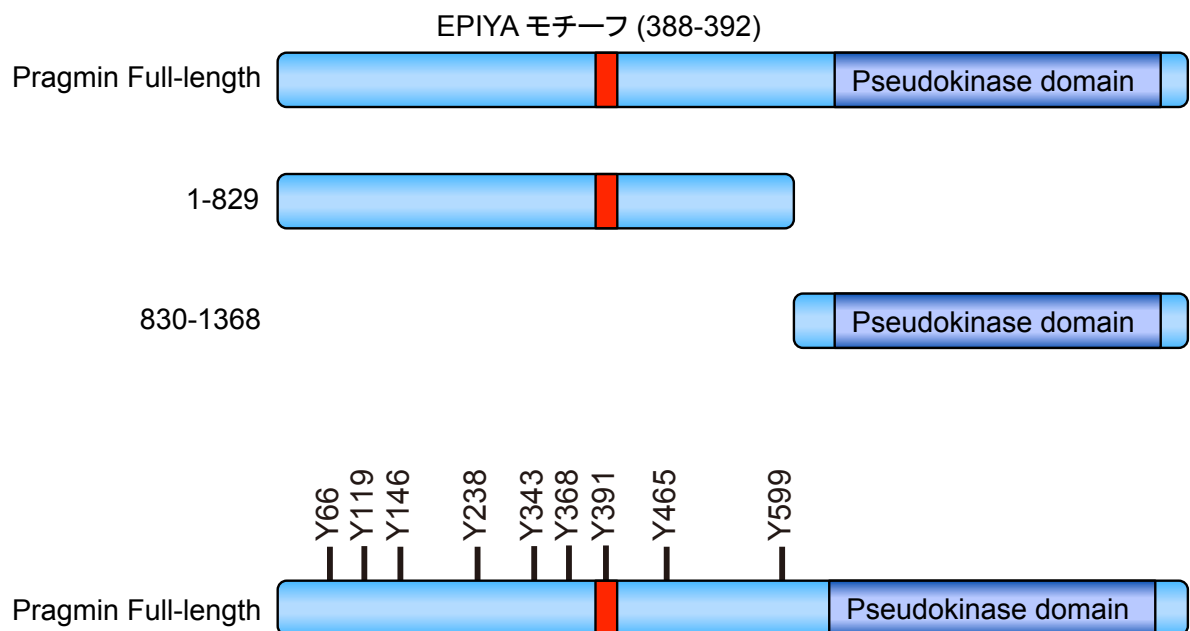


図 12 Pragmin 変異体の模式図

数字はラット Pragmin のアミノ酸残基番号を示す。全長 (Full-length) ならびに、部分欠損変異体 (N 末端領域: 1-829 アミノ酸残基、C 末端領域: 830-1368 アミノ酸残基) と Pragmin の N 末端領域に存在する 9 個のチロシン残基を表記した。

AGS 細胞に Myc タグを付加した野生型 Pragmin および Pragmin (1-829)、Pragmin (830-1368) と Falg タグを付加した Csk の発現ベクターを一過性に導入し、細胞抽出液を SDS-PAGE で展開し、イムノブロットで変異体のチロシンリン酸化量の変化を解析した (図 13)。その結果、野生型 Pragmin と Pragmin (1-829) のチロシンリン酸化量が著しく増加していることが明らかになった。一方、Pragmin (830-1368) は 13 個ものチロシン残基を持つにも関わらず、Csk との共発現による顕著なリン酸化量の増加は確認できなかった (図 13)。よって、Csk による Pragmin のチロシンリン酸化部位は Pragmin (1-829) に集中していると予想し、1-829 アミノ酸残基の間に存在する 9 個のチロシン残基を全てフェニルアラニン残基に置換した (Y66/119/146/238/343/368/391/465/599F) (以下 Pragmin-9F) (図 12)。AGS 細胞に野生型 Myc-Pragmin および Myc-Pragmin-9F と Csk-Flag の発現ベクターを一過性に導入し、その細胞抽出液をイムノブロットで解析した (図 14)。その結果、9F 変異体は野生型と比較してほぼチロシンリン酸化されないことが明らかになった (図 14)。

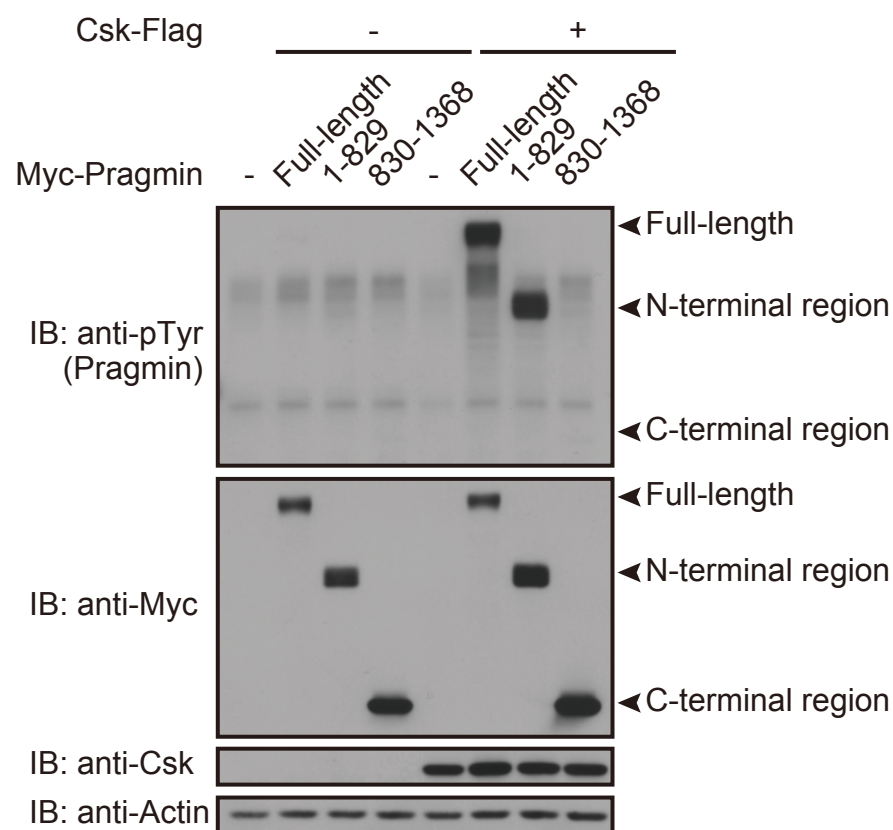


図 13 **Pragmin** の部分欠損変異体を用いたチロシンリン酸化部位のスクリーニング

AGS 細胞に Myc タグを付加した野生型 **Pragmin**、N 末端領域: 1-829、C 末端領域: 830-1368 と Flag タグを付加した **Csk** の発現ベクターを一過性に導入し 24 時間後に細胞抽出液を調整した。得られた細胞抽出液を SDS-PAGE により展開し、各種抗体によるイムノブロットを行った。矢頭は各種 **Pragmin** を示す。

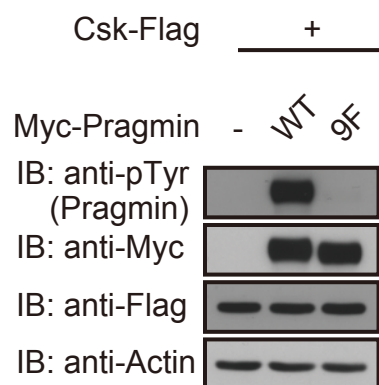


図 14 点変異導入による Pragmin のチロシンリン酸化量の変化 (1)

AGS 細胞に Myc タグを付加した野生型 Pragmin、N 末端領域: 1-829 のチロシン (Y) 残基をすべてフェニルアラニン (F) 残基に置換した変異型 Pragmin-9F (Y66/119/146/238/343/368/391/465/599F) と Flag タグを付加した Csk の発現ベクターを一過性に導入し、24 時間後に細胞抽出液を調整した。得られた細胞抽出液を SDS-PAGE により展開し、各種抗体によるイムノブロットを行った。

図 13 および 14 の結果より、Csk による Pragmin のチロシンリン酸化部位は Pragmin の 1-829 アミノ酸残基に存在する可能性が極めて高い。そこで、Pragmin (1-829) に存在する 9 個のチロシン残基を N 末端側から順に 3 個ずつフェニルアラニン残基に置換した変異体 (Y66/119/146F、Y238/343/368F、Y391/465/599F) を作製した。AGS 細胞に野生型 Myc-Pragmin および Myc-Pragmin-Y66/119/146F、Myc-Pragmin-Y238/343/368F、Myc-Pragmin-Y391/465/599F、Myc-Pragmin-9F と Csk-Flag の発現ベクターを一過性に導入し、その細胞抽出液をイムノブロットで解析した (図 15)。野生型 Pragmin と比較して、Y66/119/146F 変異体はチロシンリン酸化量の有意な減少は見られなかった。一方、Y238/343/368F 変異体と Y391/465/599F 変異体は野生型 Pragmin と比較して、チロシンリン酸化量が有意に減少していた。9F 変異体の結果と合わせて考えると、Csk による Pragmin のチロシンリン酸化部位は 238/343/368 番目のチロシン残基および 391/465/599 番目のチロシン残基の中にそれぞれ 1 個以上存在すると推察された。

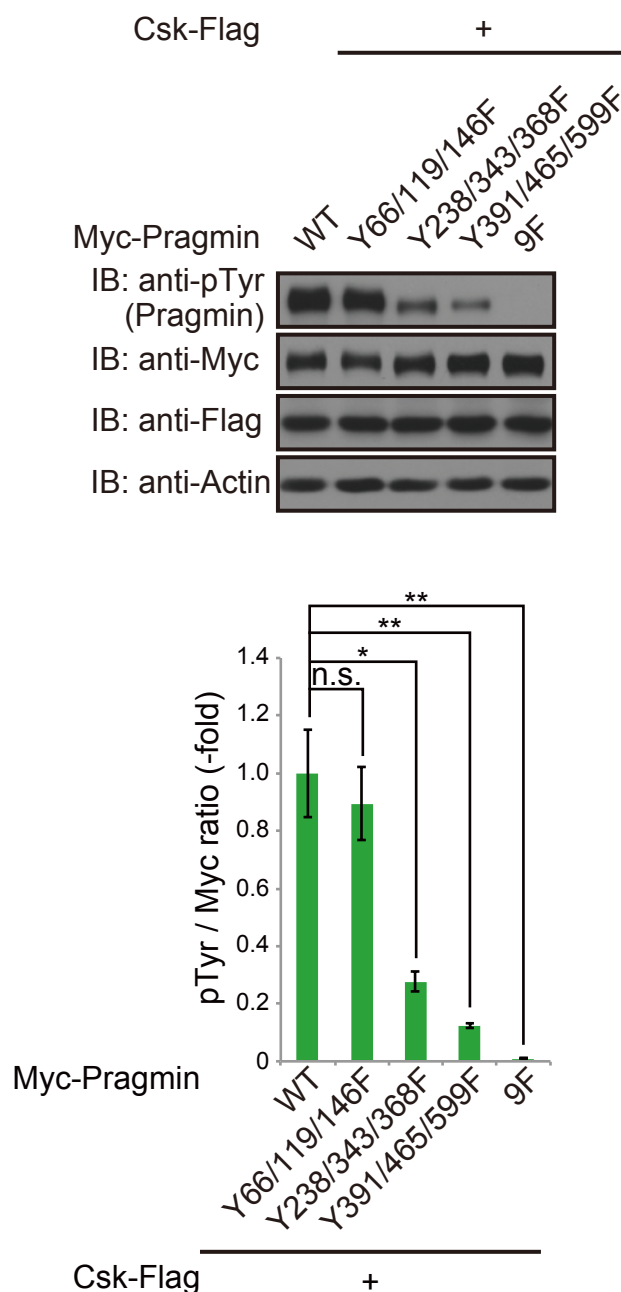


図 15 点変異導入による Pragmin のチロシンリン酸化量の変化 (2)

AGS 細胞に Myc タグを付加した野生型 Pragmin、点変異を導入した各種変異型 Pragmin と Flag タグを付加した Csk の発現ベクターを一過性に導入し、24 時間後に細胞抽出液を調整した。得られた細胞抽出液を SDS-PAGE により展開し、各種抗体によるイムノブロットを行った。イムノブロットのバンド強度を ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm 社) で定量した。グラフは 3 回の実験の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、n.s. not significant。

図 15 の結果をふまえ、238/343/368 番目のチロシン残基を個別にフェニルアラニン残基に置換した変異体 (Y238F、Y343F、Y368F) を作製した。また、図 8 より 391 番目のチロシン残基は Csk によってリン酸化されると推察される。したがって、Y391/465/599F 変異体に関しては 391 番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した Y391F 変異体のみ解析に用いた。加えて、Y238F、Y343F、Y368F 変異と Y391F 変異を組み合わせた二重変異体を作製した。図 16 に示した通り野生型 Myc-Pragmin および各種変異体と Csk-Flag の発現ベクターを AGS 細胞に一過性に導入し、細胞抽出液を調整後イムノブロットで解析した (図 16)。バンドの強度を ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm 社) にて定量し、野生型 Pragmin を 1.0 とした場合の各種変異体の相対比を算出した。また、Y391F 変異体を 1.0 とした場合の二重変異体の相対比も算出した。野生型と比較して、Y391F 変異体は単独変異でチロシンリン酸化量が半減した。Y238F、Y343F、Y368F 変異体は単独変異では顕著なチロシンリン酸化量の減少は見られなかった。しかし、Y238/391F と Y343/391F 二重変異体のチロシンリン酸化量は Y391F 単独変異体の約半分程度に減少した。Y368/391F 変異体はバンド強度定量の結果、Y391F 単独変異体と同程度のチロシンリン酸化量であることが明らかになった。

図 16 において、Y391F との二重変異体でチロシンリン酸化量の減少が認められた Y238F および Y343F 変異と Y391F 変異と組み合わせて Y238/343/391F 三重変異体を作製した (図 17)。野生型および図 17 に示した各種変異型 Myc-Pragmin と Csk-Flag を AGS 細胞に一過性に導入し、細胞抽出液をイムノブロットで解析した結果、Y238/343/391F 三重変異体ではチロシンリン酸化量の著しい減少が認められた (図 17・上)。ヒト・マウス・ラットの Pragmin アミノ酸配列を Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) によりアライメントすると 238/343/391 番目のチロシン残基は種間で保存されている (図 17・下)。一方、368 番目のチロシン残基はラット配列にのみ存在し、ヒトおよびマウスには存在しない。図 16 および図 17 の結果と Pragmin アミノ酸配列のアライメント結果から、Csk による Pragmin のリン酸化部位は 238 番目、343 番目、391 番目のチロシン残基であることが強く示唆される。

Pragmin-Csk 複合体形成による Csk の活性化

Csk は恒常的に活性を持つキナーゼであるが、チロシンリン酸化された細胞膜局在タンパク質 (例えば Csk binding protein (Cbp) や CagA など) と結合することで機能および活性の制御を受ける [13, 29]。膜局在チロシンリン酸化タンパク質との結合は Csk を細胞質から細胞膜近傍へ局在を変化させ、Csk による SFK のチロシンリン酸化を促進する。また、チロシンリン酸化タンパク質との結合は Csk の立体構造を低活性型から高活性型に変化させる [28]。

ピロリ菌 CagA やヘモフィルス・デュクレー菌の LspA1 など複数の細菌 EPIYA エフェクターは Csk を結合標的としている。CagA ならびに LspA 1 は Csk と結合することで Csk を活性化し、SFK を不活性化する。細菌エフェクターによる Csk を介した SFK の不活性化は細菌自身の生存を有利にするものだと考えられる[13, 36]。

一方、哺乳動物 EPIYA タンパク質である Pragmin は複合体形成により細胞質に Csk を隔離することで、SFK の不活性化を抑制することが明らかにされている [16]。しかし、細胞質に隔離された Csk の活性および機能に関する知見はない。細菌 EPIYA エフェクターは Csk の活性を刺激することから、Pragmin もまた EPIYA モチーフを介して Csk と複合体を形成することで Csk のキナーゼ活性に影響を与えると推察し、*in vitro* キナーゼ試験を行った。

図 1、2 にて作製したチロシンリン酸化組換え Pragmin の野生型および Y391F 変異型と組換え Csk を人工基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1) と混合し 30 度で 60 分反応後、SDS-PAGE で展開し、抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロットを行った (図 18)。図示した混合物の組み合わせのうちチロシンリン酸化されている Pragmin のバンド以外に、人工基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1) のチロシンリン酸化のシグナルが確認されたのは、チロシンリン酸化野生型 Pragmin (pY-WT)、Csk、人工基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1) の 3 種を添加した時のみであった (図 18・10 レーン目)。人工基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1) のチロシンリン酸化のバンドは 25 kDa から 75 kDa にかけてスメア状に検出された。

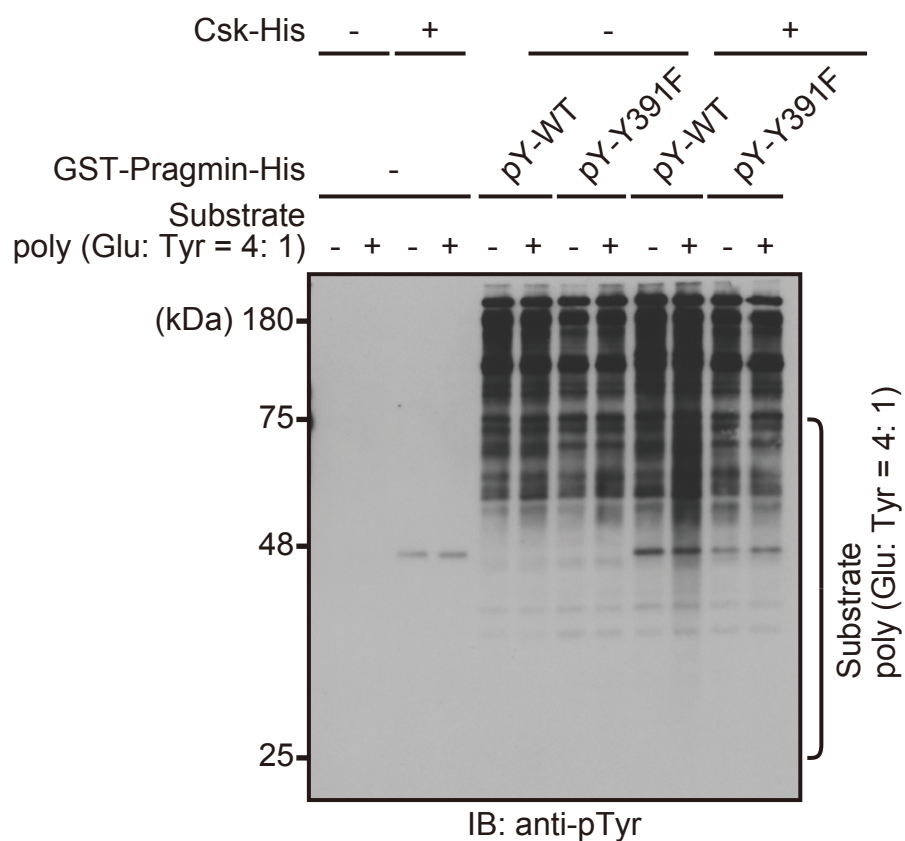


図 18 人工基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1) を用いた *in vitro* キナーゼ試験

チロシンリン酸化野生型または Y391F 変異型組換え Pragmin と組換え Csk を人工基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1) と混合し、30 度で 60 分反応させた後、SDS-PAGE で展開し、抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロットを行った。

人工基質 poly (Glu: Tyr = 4: 1) のチロシンリン酸化量の増加はチロシンリン酸化野生型 Pragmin による Csk の活性化を示唆する。Csk の活性化の状態を定量的に調べるために、Csk の基質として一般的に知られている c-Src の C 末端領域 (tail) を用いた (図 19 上) [28]。Csk によるチロシンリン酸化部位である c-Src (ヒト) の 530 番目のチロシン残基を含む 13 アミノ酸残基 (TSTEPQYQPGENL) をコードする配列を大腸菌用発現ベクター pGEX6P2 に挿入し、GST-Src-tail 融合タンパク質 (以下 GST-Src-tail) を発現させ、グルタチオンセファロースビーズによるアフィニティー精製を行った。得られた GST-Src-tail を Csk の基質として、図 19 下に示した通り非リン酸化 Pragmin の野生型および Y391F 変異型、チロシンリン酸化 Pragmin の野生型および Y391F 変異型と組換え Csk を混合し、30 度で反応させた。反応開始後 15 分、30 分、60 分の反応液をサンプリングし、SDS-PAGE で展開、抗 Src リン酸化チロシン残基 530 番抗体を用いたイムノブロットを行った (図 19 下)。その結果、Csk と基質のみ混合した場合、本実験の条件では基質のリン酸化量に顕著な増加は見られなかった。しかし、非リン酸化およびチロシンリン酸化野生型 Pragmin を添加した場合は、基質のリン酸化量が増加していた。特に、チロシンリン酸化野生型 Pragmin を添加したサンプルは反応開始後 15 分でも基質のチロシンリン酸化が確認できた。一方、Y391F 変異型 Pragmin を添加した場合は非リン酸化、チロシンリン酸化に関わらず基質のチロシン

リン酸化の増加は見られなかった (図 19 下)。

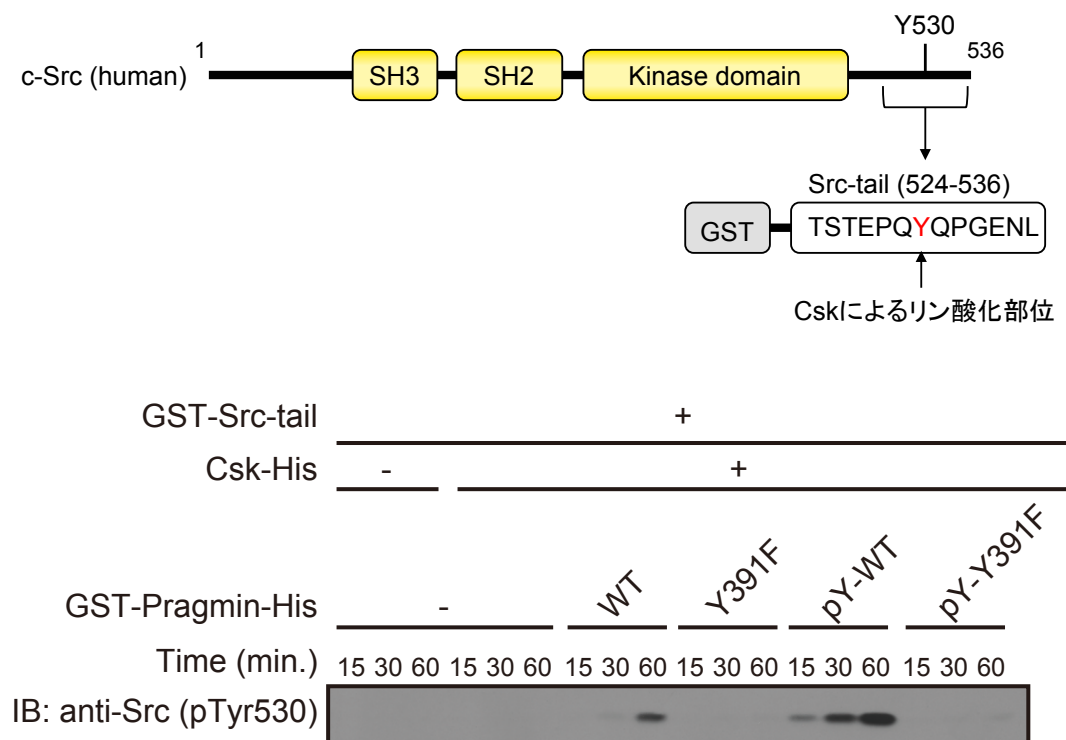


図 19 Src-tail を用いた *in vitro* キナーゼ試験

(上) c-Src の模式図を示す。数字はヒト c-Src のアミノ酸残基番号を表す。Csk の標的的部位である 530 番目のチロシン残基を含む 13 アミノ酸残基 (TSTEPQYQPGENL) を Src-tail とした。

(下) 非リン酸化またはチロシンリン酸化野生型、Y391F 変異型組換え Pragmin と組換え Csk を GST-Src-tail と混合し、30 度で 15 分、30 分、60 分反応させた。反応物を SDS-PAGE で展開し、抗 Src リン酸化チロシン残基 530 番抗体によるイムノブロットを行った。

図 19 において GST-*Src*-tail は Csk の基質として十分に機能することが示されたので、GST-*Src*-tail を基質としチロシンリン酸化検出のタイムポイントを反応開始後 60 分に設定して定量化を試みた (図 20)。図 20 に示した通り、組換えタンパク質を混合した。反応終了後、SDS-PAGE で展開しイムノブロットおよび銀染色にて解析した。抗 *Src* リン酸化チロシン残基 530 番抗体によるイムノブロットの結果、Pragmin と GST-*Src*-tail のみでは GST-*Src*-tail のチロシンリン酸化は確認できなかった (図 20・1-5 レーン)。一方、Pragmin、GST-*Src*-tail と Csk を混合した場合、GST-*Src*-tail のチロシンリン酸化が確認された (図 20・6-10 レーン)。特に、チロシンリン酸化野生型 Pragmin と混合した時、GST-*Src*-tail は著しくチロシンリン酸化された (図 20・9 レーン目)。GST-*Src*-tail のチロシンリン酸化量を ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm 社) を用いて定量し、図 20 下に示した。また、本実験に用いた GST-*Src*-tail、Pragmin、Csk のタンパク質量を銀染色像にて示した。以上の結果からチロシンリン酸化野生型 Pragmin は Csk を活性化することが示唆された。

Pragmin-Csk 複合体形成の生物学的機能

図 1 から図 20 までの結果より、Pragmin は Csk の新規基質であり、チロシンリン酸化された EPIYA モチーフを介して Csk と直接結合し、Csk を活性化することが示唆された。次に、Pragmin-Csk 複合体形成が持つ生物学的機能を明らかにするため、AGS 細胞を用いて免疫蛍光染色を行った (図 21)。内在性 Pragmin に対する抗体による染色の結果、内在性 Pragmin はスポット状の局在を示した。そこで、細胞接着斑に局在するタンパク質 Vinculin と共染色を行った結果、内在性 Pragmin は細胞接着斑に局在することが示唆された (図 21)。次に内在性 Csk と Vinculin を共染色した結果、内在性 Csk は部分的ではあるが細胞接着斑に局在することが示唆された (図 21)。Bergman らは過剰発現させた Csk が細胞接着斑に局在することを示している [35]。したがって、Csk は何らかの刺激により細胞接着斑へと局在が変化し、Pragmin と複合体を形成する可能性がある。

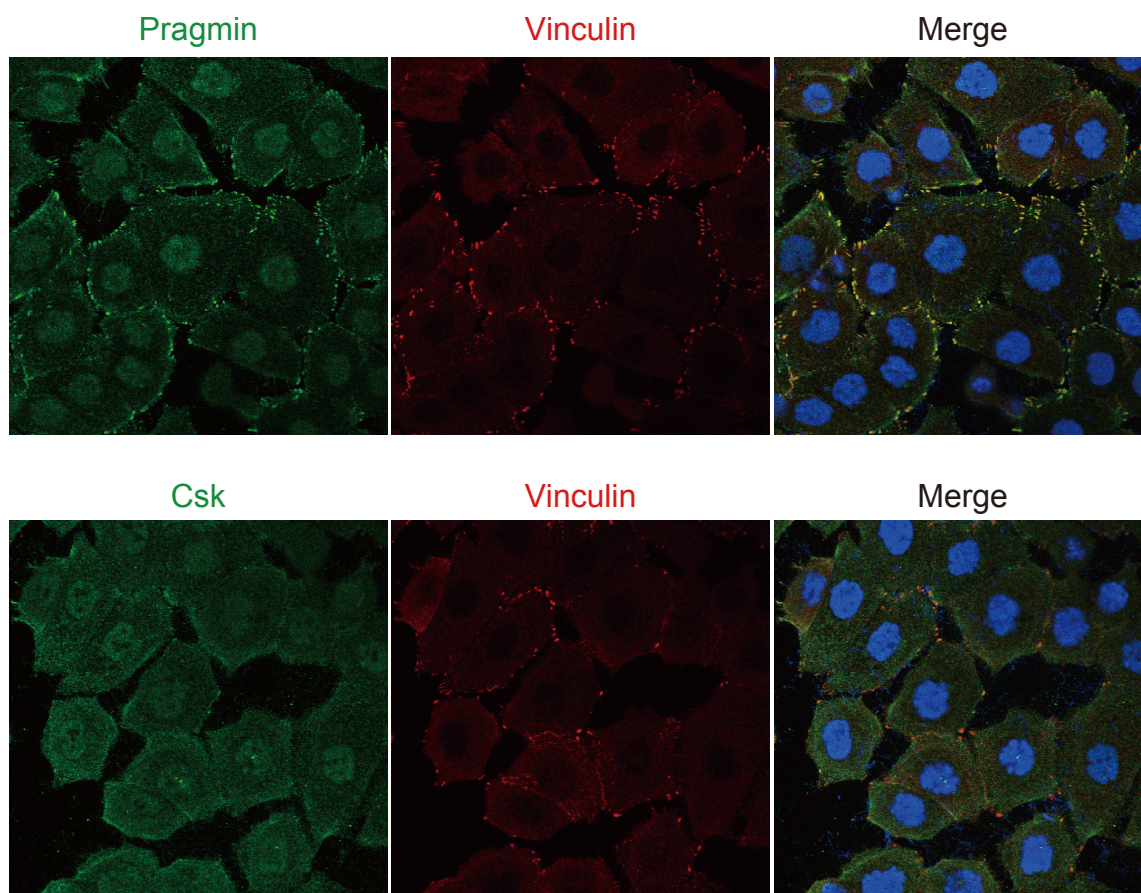


図 21 Pragmin と Csk の細胞内局在

(上) AGS 細胞を抗 Pragmin 抗体 (緑)、抗 Vinculin 抗体 (赤) を用いて免疫蛍光染色した。細胞核は DAPI (青) で染色した。

(下) AGS 細胞を抗 Csk 抗体 (緑)、抗 Vinculin 抗体 (赤)を用いて免疫蛍光染色した。細胞核は DAPI (青) で染色した。

Pragmin の過剰発現は AGS 細胞や HPDE 細胞の伸長を誘導することが Safari ら、Tactacan らによって報告されている [16, 27]。そこで、Pragmin による Csk の活性化は細胞形態の変化に関与するか否かを検討するために、レンチウイルスベクターを用いてヒト胃上皮腺癌由来 MKN7 細胞に野生型および Y391F 変異型 *Pragmin* 遺伝子と *Csk* 遺伝子を導入し、2 日後に細胞形態の変化を観察した。細胞の伸長部を長径、細胞核を横切る最短距離を短径とし、長径が短径の 2 倍以上である細胞を伸長細胞として数えた結果、野生型 *Pragmin* の単独発現では 10.8%の細胞で伸長が観察されたが、Y391F 変異型 *Pragmin* を発現させた場合の伸長細胞は 4.4%であった。また、*Csk* の単独発現においても 5.5%の細胞に伸長が認められた。野生型 *Pragmin* と *Csk* を共発現させた場合は 27.6%の細胞で伸長が観察された。一方で、Y391F 変異型 *Pragmin* と *Csk* を共発現させた場合の伸長細胞は 10.3%であった。以上の結果から、MKN7 細胞において *Pragmin* による *Csk* の活性化は細胞形態の伸長を有意に誘導することが示唆された。*Pragmin* は EPIYA モチーフである 391 番目のチロシン残基に加えて 238、343 番目のチロシン残基も *Csk* によってリン酸化される (図 17)。Y391F 変異型 *Pragmin* と *Csk* の共発現により 10.3%の細胞伸長が誘導されたことから、238、343 番目のチロシン残基もまた細胞形態の変化に関与している可能性が考えられる。また、チロシンリン酸化非依存的に細胞形態の変化に関与している可能性もある。しかし、図 22

では野生型 Pragmin と Csk 共発現は最も激しい細胞形態の変化を誘導した。したがって、EPIYA モチーフを介した Pragmin と Csk の複合体形成と Pragmin による Csk の活性化は細胞形態の伸長に強い影響を与えていることが示唆された。

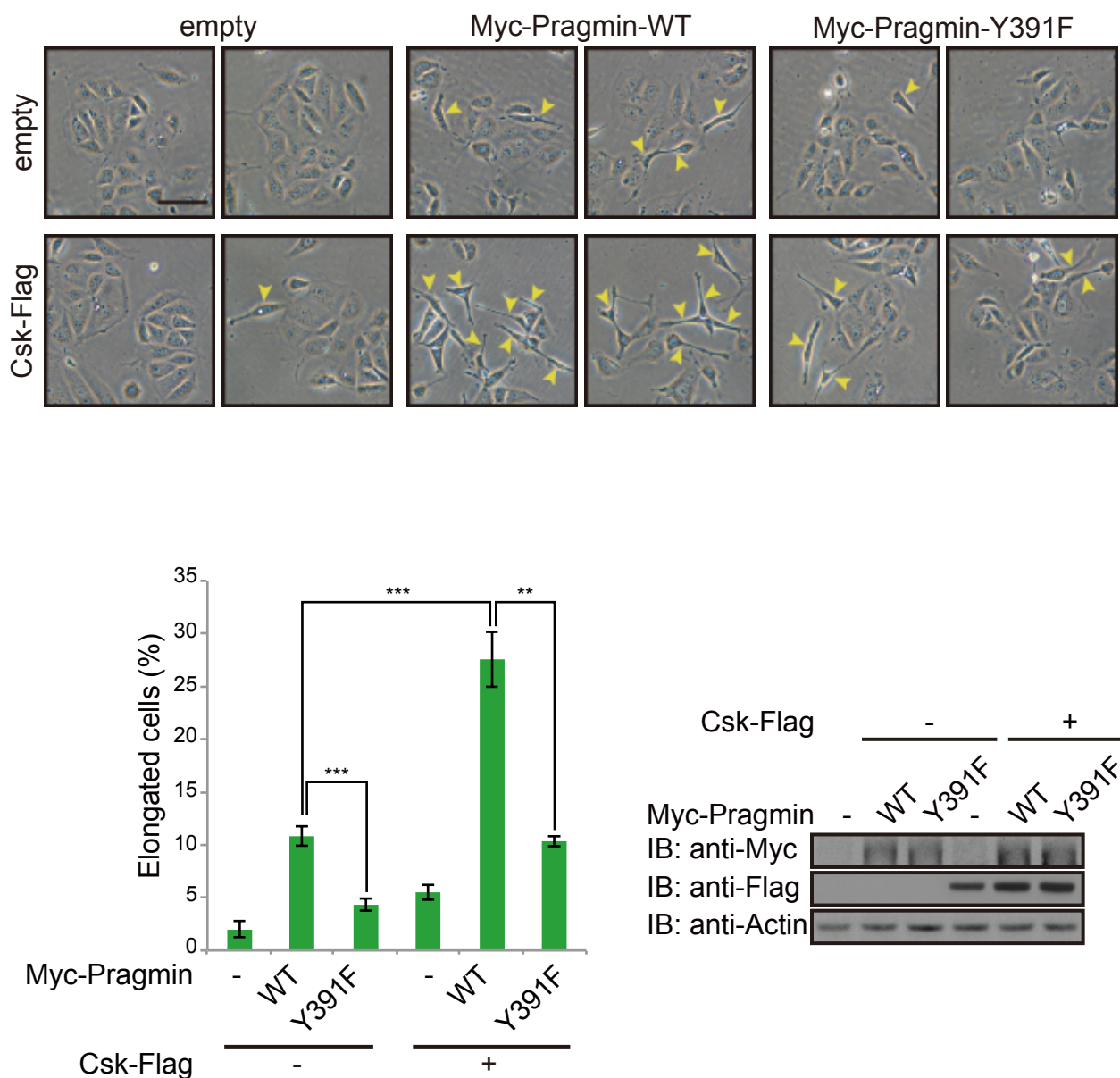


図 22 Pragmin と Csk の共発現による細胞形態の変化

(上) MKN7 細胞にレンチウイルスベクターを用いて Myc タグを付加した野生型または Y391F 変異型 *Pragmin* 遺伝子と Flag タグを付加した *Csk* 遺伝子を導入し 48 時間後に細胞形態変化を観察した。スケールバーは 0.1 mm を、矢頭は伸長した細胞を示す。

(下・左) グラフは伸長した細胞数の割合であり、3 回の実験の平均値、エラーバーは標準偏差を示す。**p < 0.01、***p < 0.001。

(下・右) 形態変化を観察した後、細胞抽出液を調整した。得られた細胞抽出液を SDS-PAGE で展開後、各種抗体でイムノブロットを行った。

図 22 において Pragmin-Csk 複合体形成は Pragmin が誘導する細胞形態の変化を増強することが示唆された。次に Pragmin と Csk の共発現による細胞形態の変化は細胞の運動能に関与しているかを調べるために Cell scatter assay を行った。MKN7 細胞にコロニーを形成させた後、野生型および Y391F 変異型 *Pragmin* 遺伝子と *Csk* 遺伝子をレンチウイルスベクターで導入し 2 日後にコロニーを観察した。その結果、野生型 Pragmin と Csk を共発現させた時、激しい細胞の遊走が観察された (図 23)。一方で、コントロール、野生型 Pragmin または Y391F 変異型 Pragmin を単独発現させた場合、および Y391F 変異型 Pragmin と Csk を共発現させた場合は、コロニーは維持されていた。野生型 Pragmin を単独で発現させた場合、コロニーから離脱した細胞が複数認められた。以上の結果から、Pragmin と Csk の複合体形成と Pragmin による Csk の活性化は細胞の運動能を亢進することが示唆された。

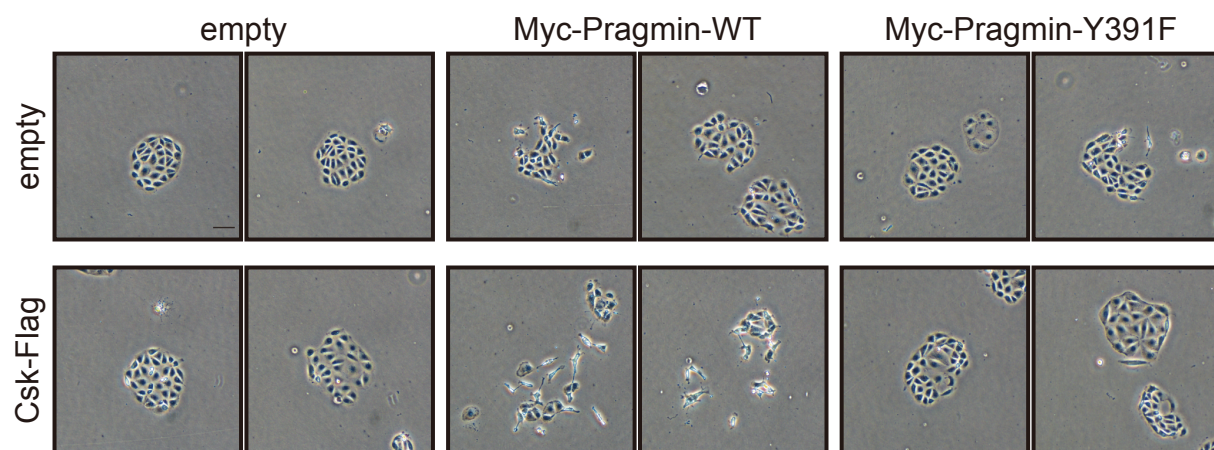


図 23 Pragmin と Csk の共発現による細胞運動の変化

MKN7 細胞にコロニーを形成させた後、レンチウイルスベクターを用いて Myc タグを付加した野生型または Y391F 変異型 *Pragmin* 遺伝子と Flag タグを付加した *Csk* 遺伝子を導入し、48 時間後にコロニーを観察した。スケールバーは 0.1 mm を示す。

考察

本研究では、EPIYA タンパク質による未知のシグナルネットワークの存在を提案した。EPIYA タンパク質の一つとして Pragmin/Sgk223/NACK に着目し、その生理学的機能解明を目指し、組換えタンパク質を用いた *in vitro* 実験ならびに哺乳動物細胞を用いた実験から以下の新知見を得た。

- 大腸菌タンパク質発現系により組換え Pragmin タンパク質ならびにチロシンリン酸化組換え Pragmin タンパク質の作製に成功した。
- *in vitro* 結合試験により、チロシンリン酸化 Pragmin は EPIYA モチーフ依存的に Csk と直接結合することを明らかにした。
- Pragmin は Csk の新規基質であることを明らかにした。
- Csk による Pragmin のリン酸化部位は 238 番目、343 番目、391 番目 (EPIYA モチーフ) のチロシン残基であることを明らかにした。
- チロシンリン酸化された Pragmin は Csk と複合体を形成し、Csk のキナーゼ活性を促進することを明らかにした。
- Pragmin と Csk は細胞の接着斑に局在することを明らかにした。
- MKN7 細胞における Pragmin と Csk の共発現は激しい細胞形態の変化を誘導し、細胞の運動能を亢進させることを明らかにした。

組換え Pragmin タンパク質の作製とチロシンリン酸化

本研究は全長組換え Pragmin の作製および全長組換え Pragmin のチロシンリン酸化を初めて報告する。Pragmin は明確なドメイン構造を持たない N 末端領域とシュードキナーゼドメイン構造を持つ C 末端領域の大きく二つに分けられる。先行研究では Murphy らがシュードキナーゼドメインのみの組換えタンパク質作製を行っている [37]。Pragmin に着目するきっかけとなった EPIYA モチーフは N 末端領域に存在するが、EPIYA モチーフ周辺だけではなくシュードキナーゼドメインを含む Pragmin の機能解析を目指し、本研究では全長組換え Pragmin の作製を試みた (図 1)。また、チロシンリン酸化 Pragmin の機能を解析するために、組換え Pragmin のチロシンリン酸化を試みた (図 1)。全長組換え Pragmin およびチロシンリン酸化組換え Pragmin はシグナル伝達経路における Pragmin の役割を明らかにするための強力なツールとなり得る。例えば、*in vitro* 相互作用解析を行うことで Pragmin が関与するシグナル伝達経路分子を明らかにすること、抗原として用いることで特異性の高い抗体を得ること、立体構造を解明することが可能となる。

しかし、現状の問題点として 1. 組換えタンパク質の精製度が低いこと、2. v-*Src* 共発現システムを用いたことによる非特異的チロシンリン酸化が挙げられる。今後の Pragmin 研究の発展に向けた解決策として、1. に関しては Ni セファロース excel ビーズ (GE Healthcare 社)を用いたアフィニティークロマトグラフィーに加え、グルタ

チオンアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー等、複数の精製方法を組み合わせることや、用いたバッファー組成の検討等が挙げられる。2. に関しては、v-Src は c-Src より活性が高いことや、基質特異性が低いことが考えられるため、c-Src を Pragmin のリン酸化酵素として共発現させることや、本研究において Pragmin をリン酸化することが明らかとなった Csk を共発現させることが解決策として考えられる。ただし、c-Src および Csk の Pragmin に対するリン酸化部位が異なる可能性は十分に考え得るため、詳細な検討が必要である。また、Pragmin と Csk は複合体を形成するため、Csk を組換え Pragmin の *in vitro* におけるリン酸化酵素として用いる場合は、Csk の SH2 ドメイン変異体やキナーゼドメインのみを用いる必要がある。

Pragmin-Csk 複合体の機能的意義

Pragmin は Csk から EPIYA モチーフを含む 3 つのチロシン残基にリン酸化を受ける。続いて Pragmin と Csk はチロシンリン酸化された EPIYA モチーフを介して複合体を形成し、Csk を活性化する。活性化された Csk はより効率的に Pragmin をチロシンリン酸化すると考えられる。興味深いことに、図 19 においてチロシンリン酸化野生型 Pragmin を反応液に添加した場合は、反応開始後わずか 15 分の時点で GST-Src-tail のチロシンリン酸化の増加、即ち Csk の活性化が確認された。一方で、

非リン酸化野生型 Pragmin を反応液に添加した場合は、反応開始後 60 分で GST-Src-tail のチロシンリン酸化の増加が確認された。チロシンリン酸化 Pragmin と非リン酸化 Pragmin における Csk 活性化の時間の違いは、チロシンリン酸化 Pragmin は Csk と即座に複合体を形成することができるのに対し、非リン酸化 Pragmin はまず Csk によってチロシンリン酸化された後、Csk と複合体を形成することによると考えられる。また、図 16 において Pragmin の Csk によるチロシンリン酸化部位である Y238 と Y343 の単独変異体はチロシンリン酸化量の減少がわずかであったのに対し、Y391 (EPIYA モチーフ) との二重変異体ではチロシンリン酸化量が著しく減少した。これらの事実は、Csk による Pragmin のチロシンリン酸化と、続く Pragmin-Csk 複合体形成と Csk の活性化が強力な正のフィードバックループを形成することを示唆する (図 24)。

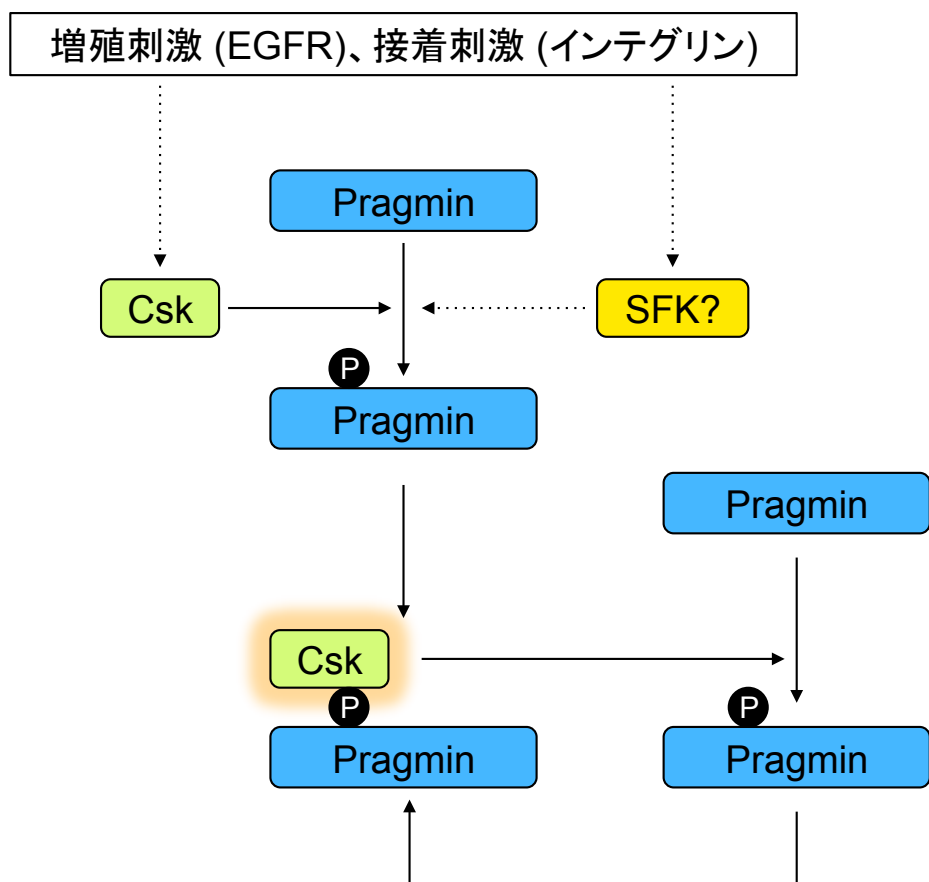


図 24 Pragmin-Csk 複合体形成と Csk 活性化の正のフィードバックループモデル

増殖刺激や接着刺激等の下流で Pragmin は Csk や SFK 等によってチロシンリン酸化される。Pragmin と Csk はチロシンリン酸化された Pragmin の EPIYA モチーフを介して結合し、Csk を活性化する。活性化された Csk はさらに Pragmin をチロシンリン酸化し、Csk を活性化する正のフィードバックループを形成すると考えられる。

Pragmin と Csk の複合体形成と Csk 活性化の正のフィードバックループがもつ生物学的意義を明らかにするために、Pragmin と Csk の細胞内局在を免疫蛍光染色により調べた。その結果、Pragmin と Csk は接着斑に共局在することが明らかになった (図 21)。この事実から、Pragmin と Csk は細胞の接着機構や細胞の運動に関与することが推察された。実際、Pragmin の過剰発現は MKN7 細胞の伸長を誘導した (図 22)。さらに Pragmin と Csk の共発現により伸長した細胞数は Pragmin 単独発現と比較して有意に増加した (図 22)。また、Pragmin と Csk を共発現させた MKN7 細胞は激しい遊走を示した (図 23)。これらの結果から、Pragmin と Csk の複合体形成と Csk 活性化の正のフィードバックループは細胞運動を制御していると考えられる (図 25)。

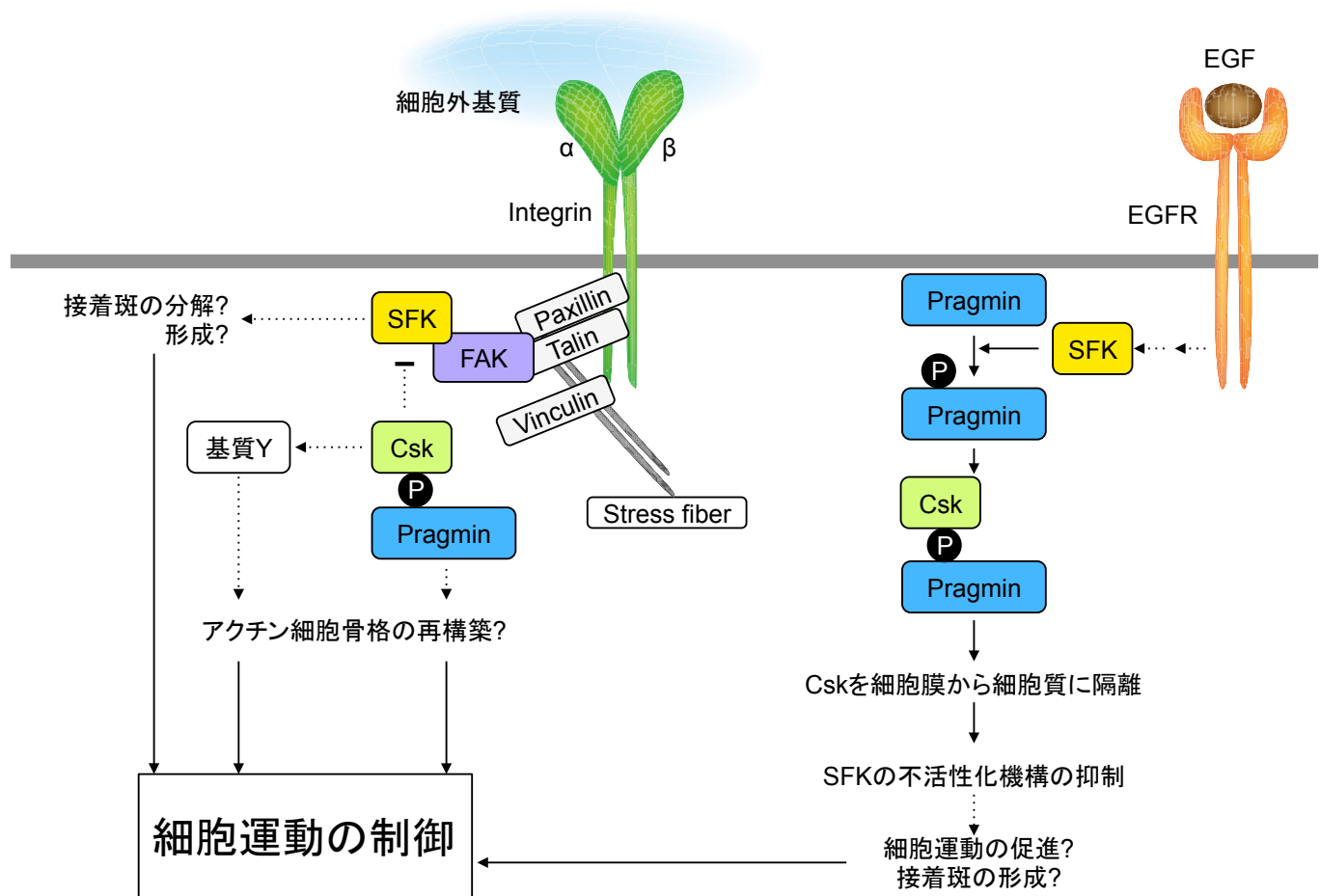


図 25 Pragmin と Csk による細胞運動の制御

細胞接着斑において Pragmin と Csk は複合体を形成し、Csk を活性化する正のフィードバックループを形成する。Pragmin と Csk は SFK の活性を制御し、細胞接着斑の分解や形成を促進する。また、Pragmin によって活性化された Csk は未知の基質をチロシンリン酸化し、アクチン細胞骨格の再構築に関与する可能性、Pragmin 自身もまたアクチン細胞骨格の再構築に関与する可能性がある。

EGF 刺激の下流で SFK によってチロシンリン酸化された Pragmin は Csk と複合体を形成し、SFK の不活性化を抑制する。Pragmin による SFK の活性維持機構は細胞運動の促進や細胞接着斑の形成に関与する可能性がある。

Pragmin-Csk 複合体は細胞接着斑において局所的に SFK の活性を制御することで接着斑の分解または形成を促進している可能性がある。細胞接着斑は細胞運動の過程で絶えず形成・分解が繰り返されており、SFK の活性の変動が重要だと考えられている。Tactacan によると、ヒト膀胱管上皮由来 HPDE 細胞に、レトロウイルスで Pragmin 遺伝子を導入して作製した HPDE 細胞の Pragmin 安定発現株は細胞が伸長し、細胞の運動能と浸潤能が向上する [27]。さらに、Pragmin 安定発現 HPDE 細胞株は Csk の発現が増加し、Src の活性が低下していることを彼らは報告している。彼らの知見は、本研究の図 22 で示した Pragmin 過剰発現細胞に Csk を遺伝子導入すると細胞形態の伸長がより激しくなるという結果と一致すると考える。

Tanaka によるとヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞やラット副腎褐色細胞腫由来 PC12 細胞では、Pragmin の過剰発現は細胞収縮を引き起こす [24]。Pragmin は神経細胞において Rnd2 と結合し RhoA シグナルを活性化することで細胞を収縮させている [24]。Rnd2 が属する低分子量 G タンパク質の Rho ファミリーの中の Rnd サブファミリーは常時活性型の G タンパク質であり、脳や神経系特異的に発現している。したがって、Pragmin と Rnd2 が上皮細胞において結合する可能性は極めて低い。Pragmin と、Rnd サブファミリー以外の Rho ファミリー低分子量 G タンパク質と相互作用してアクチン細胞骨格の再構築に関与する可能性は否定できない (図 25)。

Pragmin によって活性化された Csk が未知の基質をリン酸化し、アクチン細胞骨格の再構築に関与している可能性や Pragmin が足場タンパク質となり Csk と基質の反応を補助する可能性も考えられる。Lowry らは、Csk はアクチンストレスファイバーの形成に関与することを報告している [38]。また、McGarrigle らは、Csk は MEF の運動に必要であり、Csk の欠損は細胞接着斑に障害を与えることを報告している [39]。一方、Rengifo-Cam らは大腸がん細胞を用いた実験により、Csk の過剰発現は細胞接着斑の数を減少させ、細胞運動を低下させることを報告している [40]。以上のことから、Pragmin-Csk 複合体形成と Csk 活性化のポジティブフィードバックループが適正に維持されている場合、細胞は基質と接着することができるが、Pragmin のチロシンリン酸化量の変化やタンパク質量の変化により前述のフィードバックループが破綻すると細胞形態の変化・運動能の亢進が誘導されると推察される (図 25)。

当研究室 Safari らの報告では、Pragmin は EGF 刺激等の下流によりチロシンリン酸化されて Csk と複合体を形成し、Csk を細胞質に隔離することで SFK の不活性化機構を抑制する [16]。EGF 刺激下における Csk による SFK の不活性化は脂質ラフトと呼ばれる微小領域にて起きると考えられる [29]。したがって、本研究で示した細胞接着斑における Pragmin と Csk 複合体形成と Csk 活性化の正のフィードバックループとは機能的に異なる機構である可能性がある。しかし、EGF 刺激を感知し細胞伸長

の先端で SFK の活性を維持し細胞運動や接着斑形成を促進することも考えられる (図 25)。以上のように、Pragmin は細胞の伸長または運動の先端および後端において巧妙に接着斑の形成やアクチン細胞骨格の再構築を制御していると考えられる。また、Pragmin が細胞形態の変化に及ぼす影響は、状況依存的で複数のシグナル経路を介していると推察される。今後、Pragmin-Csk 複合体形成と細胞形態、運動能に関わる詳細な分子機構の解明が望まれる。

EPIYA-like モチーフをもつ哺乳動物タンパク質である p140Cap/SRC kinase signaling inhibitor 1 (SNIP) もまた EPIYA-like モチーフのチロシンリン酸化依存的に Csk と結合し、インテグリンシグナルを制御することが報告されている [41-43]。Csk は高頻度に細菌 EPIYA エフェクターによって標的とされていることから、本研究で提案する EPIYA タンパク質による新規シグナルネットワークは Csk を軸に形成されている可能性が考えられる。哺乳動物の EPIYA タンパク質同士がいかにして Csk と相互作用し合い、シグナル経路を制御するのかを明らかにすることが今後の課題である。

足場タンパク質としての **Pragmin**

Pragmin は Mg イオン結合モチーフを持たないためシュードキナーゼに分類されるが、実験的にシュードキナーゼ (活性を持たない) であるか真のキナーゼ (活性を持つ) であるかについては議論の余地がある。Pragmin の唯一のファミリータンパク質に分類されている PEAK1/Sgk269 のシュードキナーゼドメインはキナーゼ活性を持つことが報告されている [34]。PEAK1 のシュードキナーゼドメインの *in vitro* キナーゼ試験によると、PEAK1 のシュードキナーゼドメインは自己リン酸化および基質 myelin basic protein をチロシンリン酸化する [34]。本研究では全長組み替え Pragmin を用いて *in vitro* キナーゼ試験により Pragmin の自己リン酸化の有無について調べたが、Pragmin の自己リン酸化は確認できなかった (図 9)。また人工基質 poly (Glu: Tyr) を用いた *in vitro* キナーゼ試験からも Pragmin のキナーゼ活性は確認できなかった (図 10)。この結果から、少なくとも本実験の条件下では Pragmin は活性を持たないシュードキナーゼであることが示唆された。Murphy らは thermal-shift 試験を提案し、31 個のシュードキナーゼを 4 つのグループ (Class1: ヌクレオチドおよびカチオンと結合しない、Class2: ヌクレオチドと結合する、Class3: カチオンと結合する、Class4: ヌクレオチドおよびカチオンと結合する) に分類している [37]。Pragmin はヌクレオチドおよびカチオンと結合しない Class1 に分類されるため、キナーゼ活性を持つ可能性は極めて低い。Murphy らの結果は本研究の *in vitro* キナーゼ試験と一致する。

以上の事実より、Pragmin は足場タンパク質としてシグナル経路で機能していると推察する。足場タンパク質としての Pragmin の機能に着目した場合は N 末端領域が重要な役割を果たすと考ええる。理由は以下の二つである。一つ目は Pragmin のチロシンリン酸化部位およびセリン／スレオニンリン酸化部位は N 末端領域に集中していること、二つ目は Pragmin の N 末端領域は明確なドメイン構造を持たないことである。

Pragmin のリン酸化部位のうち点変異を導入した変異体を用いて調べられているのは EPIYA モチーフ中に存在するチロシン残基のみであるが、Phosphosite (<http://www.phosphosite.org/homeAction.do>) によると、質量分析によるチロシンリン酸化およびセリン／スレオニンリン酸化が多数報告されている。興味深いことに、これらのリン酸化部位は C 末端領域のシュードキナーゼドメインを除いた N 末端領域に集中している。図 13 および図 14 から Csk による Pragmin のチロシンリン酸化部位は N 末端領域 (Pragmin 1-829) に集中していることが明らかであり、これは Phosphosite (<http://www.phosphosite.org/homeAction.do>) に報告されている質量分析の結果と一致する。タンパク質のリン酸化は特定のモジュールを含有するタンパク質との相互作用をもたらす。例えば、チロシンリン酸化部位は SH2 ドメイン含有タンパク質、PTB ドメイン含有タンパク質と相互作用する。また、セリン／スレオニンリ

ン酸化部位は 14-3-3 ドメイン含有タンパク質、FHA ドメイン含有タンパク質、FF ドメイン含有タンパク質、BRCT ドメイン含有タンパク質、MH2 ドメイン含有タンパク質、POLO-Box ドメイン含有タンパク質と相互作用する。加えて、Pragmin の N 末端領域は SH3 ドメイン含有タンパク質、GYF ドメイン含有タンパク質、EVH1 ドメイン含有タンパク質、WW ドメイン含有タンパク質と相互作用する可能性のあるポリプロリン残基配列を有している。

Pragmin の N 末端領域は明確なドメイン構造を持たない天然変性領域であることが RONN tool を用いた立体構造予測により報告されている [17]。天然変性領域は構造に柔軟性があるため、様々な分子と相互作用する能力を持つと考えられている [44, 45]。細菌 EPIYA エフェクターの EPIYA (-like) モチーフが存在する領域も立体構造予測により天然変性領域であることが報告されている [15]。ピロリ菌 CagA および EPEC Tir に関しては EPIYA (-like) モチーフが存在する周辺領域は天然変性領域であることが実験的に示されている [46, 47]。細菌 EPIYA エフェクターは哺乳動物細胞に侵入後、柔軟性のある EPIYA 領域を利用してマスターキーのように働き細胞内シグナル伝達を攪乱すると考えられている [48]。

現時点で、Pragmin と相互作用する分子は複数報告があるものの、結合部位が同定されている Pragmin のパートナー分子はチロシンリン酸化 EPIYA モチーフを介した

Cskのみである。しかし、PragminのN末端領域は柔軟な構造や豊富なリン酸化部位により様々なシグナル伝達分子に結合部位を提供する役割が期待される。本研究で作製したPragminの変異体を用いて、Pragminによるシグナル伝達制御の全容を明らかにしていきたい。

今後の発展の方向性

本研究で提案したEPIYAタンパク質による未知のシグナルネットワークの解明が期待される。Pragminを含むEPIYAタンパク質と相互作用するタンパク質を網羅的に探索し、EPIYAタンパク質が関与する細胞内シグナルネットワークの全容を明らかにすることが今後の挑戦的研究課題である。細菌EPIYAエフェクターによって攪乱される内因性EPIYAシグナルを明らかにすることができれば、胃がん発症の分子機構のみならずシグナル経路の破綻によって引き起こされる疾患発症の解明ならびに創薬標的の発見に応用が期待される。

引用文献

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. International journal of cancer. 2015;136(5):E359-86. doi:10.1002/ijc.29210.
2. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2015;65(2):87-108. doi:10.3322/caac.21262.
3. Shanks AM, El-Omar EM. *Helicobacter pylori* infection, host genetics and gastric cancer. Journal of digestive diseases. 2009;10(3):157-64. doi:10.1111/j.1751-2980.2009.00380.x.
4. Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. Science. 2000;287(5457):1497-500.
5. Rohde M, Püls J, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. Molecular Microbiology. 2003;49(1):219-34. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03549.x.
6. Fischer W. Assembly and molecular mode of action of the *Helicobacter pylori* Cag type

- IV secretion apparatus. The FEBS journal. 2011;278(8):1203-12.
doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08036.x.
7. Muller A. Multistep activation of the *Helicobacter pylori* effector CagA. The Journal of clinical investigation. 2012;122(4):1192-5. doi:10.1172/JCI61578.
 8. Hatakeyama M. Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. Nature reviews Cancer. 2004;4(9):688-94. doi:10.1038/nrc1433.
 9. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. Cell host & microbe. 2014;15(3):306-16.
doi:10.1016/j.chom.2014.02.008.
 10. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. Science. 2002;295(5555):683-6. doi:10.1126/science.1067147.
 11. Higashi H, Nakaya A, Tsutsumi R, Yokoyama K, Fujii Y, Ishikawa S et al. *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. The Journal of biological chemistry. 2004;279(17):17205-16.
doi:10.1074/jbc.M309964200.
 12. Tsutsumi R, Takahashi A, Azuma T, Higashi H, Hatakeyama M. Focal adhesion kinase is

a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA.

Molecular and cellular biology. 2006;26(1):261-76.

doi:10.1128/MCB.26.1.261-276.2006.

13. Tsutsumi R, Higashi H, Higuchi M, Okada M, Hatakeyama M. Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. The Journal of biological chemistry. 2003;278(6):3664-70.
doi:10.1074/jbc.M208155200.
14. Selbach M, Paul FE, Brandt S, Guye P, Daumke O, Backert S et al. Host cell interactome of tyrosine-phosphorylated bacterial proteins. Cell host & microbe. 2009;5(4):397-403.
doi:10.1016/j.chom.2009.03.004.
15. Hayashi T, Morohashi H, Hatakeyama M. Bacterial EPIYA effectors-where do they come from? What are they? Where are they going? Cellular microbiology. 2013;15(3):377-85.
doi:10.1111/cmi.12040.
16. Safari F, Murata-Kamiya N, Saito Y, Hatakeyama M. Mammalian Pragmin regulates Src family kinases via the Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motif that is exploited by bacterial effectors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2011;108(36):14938-43. doi:10.1073/pnas.1107740108.

17. Safari F. EPIYA (or -like) motifs in mammalian proteins. *Journal of King Saud University - Science*. 2014;26(4):276-84. doi:10.1016/j.jksus.2014.05.001.
18. Boudeau J, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Alessi DR. Emerging roles of pseudokinases. *Trends in cell biology*. 2006;16(9):443-52. doi:10.1016/j.tcb.2006.07.003.
19. Rajakulendran T, Sicheri F. Allosteric protein kinase regulation by pseudokinases: insights from STRAD. *Science signaling*. 2010;3(111):pe8. doi:10.1126/scisignal.3111pe8.
20. Babon JJ, Lucet IS, Murphy JM, Nicola NA, Varghese LN. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *The Biochemical journal*. 2014;462(1):1-13. doi:10.1042/BJ20140712.
21. Silvennoinen O, Ungureanu D, Niranjan Y, Hammaren H, Bandaranayake R, Hubbard SR. New insights into the structure and function of the pseudokinase domain in JAK2. *Biochemical Society transactions*. 2013;41(4):1002-7. doi:10.1042/BST20130005.
22. Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(11):827-37. doi:10.1038/nrm1743.
23. Zhang H, Koo CY, Stebbing J, Giamas G. The dual function of KSR1: a pseudokinase and beyond. *Biochemical Society transactions*. 2013;41(4):1078-82.

doi:10.1042/BST20130042.

24. Tanaka H, Katoh H, Negishi M. Pragmin, a novel effector of Rnd2 GTPase, stimulates RhoA activity. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(15):10355-64.

doi:10.1074/jbc.M511314200.

25. Leroy C, Fialin C, Sirvent A, Simon V, Urbach S, Poncet J et al. Quantitative phosphoproteomics reveals a cluster of tyrosine kinases that mediates SRC invasive activity in advanced colon carcinoma cells. *Cancer research*. 2009;69(6):2279-86.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2354.

26. Weaver KL, Alves-Guerra MC, Jin K, Wang Z, Han X, Ranganathan P et al. NACK is an integral component of the Notch transcriptional activation complex and is critical for development and tumorigenesis. *Cancer research*. 2014;74(17):4741-51.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1547.

27. Tactacan CM, Phua YW, Liu L, Zhang L, Humphrey ES, Cowley M et al. The pseudokinase SgK223 promotes invasion of pancreatic ductal epithelial cells through JAK1/Stat3 signaling. *Mol Cancer*. 2015;14:139. doi:10.1186/s12943-015-0412-3.

28. Okada M. Regulation of the SRC family kinases by Csk. *International journal of biological sciences*. 2012;8(10):1385-97. doi:10.7150/ijbs.5141.

29. Kawabuchi M, Satomi Y, Takao T, Shimonishi Y, Nada S, Nagai K et al.

Transmembrane phosphoprotein Cbp regulates the activities of Src-family tyrosine kinases. *Nature*. 2000;404(6781):999-1003. doi:10.1038/35010121.

30. Nagase L, Hayashi T, Senda T, Hatakeyama M. Dramatic increase in SHP2 binding

activity of *Helicobacter pylori* Western CagA by EPIYA-C duplication: its implications in gastric carcinogenesis. *Sci Rep*. 2015;5:15749. doi:10.1038/srep15749.

31. Baumeister U, Funke R, Ebnet K, Vorschmitt H, Koch S, Vestweber D. Association of

Csk to VE-cadherin and inhibition of cell proliferation. *The EMBO journal*. 2005;24(9):1686-95. doi:10.1038/sj.emboj.7600647.

32. Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA, Soriano P. Src family kinases are required

for integrin but not PDGFR signal transduction. *The EMBO journal*. 1999;18(9):2459-71. doi:10.1093/emboj/18.9.2459.

33. Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase

complement of the human genome. *Science*. 2002;298(5600):1912-34. doi:10.1126/science.1075762.

34. Wang Y, Kelber JA, Tran Cao HS, Cantin GT, Lin R, Wang W et al.

Pseudopodium-enriched atypical kinase 1 regulates the cytoskeleton and cancer

- progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(24):10920-5. doi:10.1073/pnas.0914776107.
35. Bergman M, Joukov V, Virtanen I, Alitalo K. Overexpressed Csk tyrosine kinase is localized in focal adhesions, causes reorganization of $\alpha_v\beta_5$ integrin, and interferes with HeLa cell spreading. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(2):711-22.
36. Dodd DA, Worth RG, Rosen MK, Grinstein S, van Oers NS, Hansen EJ. The *Haemophilus ducreyi* LspA1 protein inhibits phagocytosis by using a new mechanism involving activation of C-terminal Src kinase. *mBio*. 2014;5(3):e01178-14. doi:10.1128/mBio.01178-14.
37. Murphy JM, Zhang Q, Young SN, Reese ML, Bailey FP, Eyers PA et al. A robust methodology to subclassify pseudokinases based on their nucleotide-binding properties. *The Biochemical journal*. 2014;457(2):323-34. doi:10.1042/BJ20131174.
38. Lowry WE, Huang J, Ma YC, Ali S, Wang D, Williams DM et al. Csk, a critical link of G protein signals to actin cytoskeletal reorganization. *Developmental cell*. 2002;2(6):733-44.
39. McGarrigle D, Shan D, Yang S, Huang XY. Role of tyrosine kinase Csk in G protein-coupled receptor- and receptor tyrosine kinase-induced fibroblast cell migration.

The Journal of biological chemistry. 2006;281(15):10583-8.

doi:10.1074/jbc.M513002200.

40. Rengifo-Cam W, Konishi A, Morishita N, Matsuoka H, Yamori T, Nada S et al. Csk defines the ability of integrin-mediated cell adhesion and migration in human colon cancer cells: implication for a potential role in cancer metastasis. *Oncogene*. 2004;23(1):289-97. doi:10.1038/sj.onc.1207041.
41. Di Stefano P, Damiano L, Cabodi S, Aramu S, Tordella L, Praduroux A et al. p140Cap protein suppresses tumour cell properties, regulating Csk and Src kinase activity. *The EMBO journal*. 2007;26(12):2843-55. doi:10.1038/sj.emboj.7601724.
42. Damiano L, Di Stefano P, Camacho Leal MP, Barba M, Mainiero F, Cabodi S et al. p140Cap dual regulation of E-cadherin/EGFR cross-talk and Ras signalling in tumour cell scatter and proliferation. *Oncogene*. 2010;29(25):3677-90. doi:10.1038/onc.2010.128.
43. Repetto D, Aramu S, Boeri Erba E, Sharma N, Grasso S, Russo I et al. Mapping of p140Cap phosphorylation sites: the EPLYA and EGLYA motifs have a key role in tyrosine phosphorylation and Csk binding, and are substrates of the Abl kinase. *PloS one*. 2013;8(1):e54931. doi:10.1371/journal.pone.0054931.
44. Dyson HJ, Wright PE. Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature*

- reviews Molecular cell biology. 2005;6(3):197-208. doi:10.1038/nrm1589.
45. Dunker AK, Silman I, Uversky VN, Sussman JL. Function and structure of inherently disordered proteins. Current opinion in structural biology. 2008;18(6):756-64. doi:10.1016/j.sbi.2008.10.002.
46. Hayashi T, Senda M, Morohashi H, Higashi H, Horio M, Kashiba Y et al. Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA. Cell host & microbe. 2012;12(1):20-33. doi:10.1016/j.chom.2012.05.010.
47. Race PR, Solovyova AS, Banfield MJ. Conformation of the EPEC Tir protein in solution: investigating the impact of serine phosphorylation at positions 434/463. Biophys J. 2007;93(2):586-96. doi:10.1529/biophysj.106.101766.
48. Backert S, Tegtmeyer N, Selbach M. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. Helicobacter. 2010;15(3):163-76. doi:10.1111/j.1523-5378.2010.00759.x.

謝辞

本研究の遂行にあたり、大変恵まれた環境と懇切なるご指導、ご鞭撻を賜りました
東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻微生物学 教授 畠山昌則先生に深く
感謝申し上げます。

大変お忙しい中、本学位論文審査の主査を務めて頂きました東京大学大学院医学系
研究科病因・病理学専攻感染制御学 教授 森屋恭爾先生に心より感謝申し上げます。

本学位論文審査の副査を務めて頂きました東京大学大学院医学系研究科分子細胞
生物学専攻代謝生理化学 教授 栗原裕基先生、東京大学医科学研究所感染症国際研
究センター感染制御系細菌学分野 准教授 三室仁美先生、東京大学大学院医学系研
究科病因・病理学専攻分子病理学 准教授 鯉沼代造先生、東京大学大学院医学系研
究科内科学専攻消化器内科学 准教授 伊佐山浩通先生に厚くお礼申し上げます。

京都大学大学院生命科学研究科生体システム学分野 教授 根岸学先生には
Pragmin cDNA をご提供頂きました。心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり様々な面で、ご指導、ご支援、ご協力を賜りました東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻微生物学 講師 紙谷尚子先生、助教 高橋昌史先生、助教 林剛瑠先生、微生物学教室の皆様、実験の基礎からご指導頂きました齊藤康弘博士をはじめ卒業生の皆様に深く感謝申し上げます。微生物学教室の皆様に出会い、励まし合い支えられてきた4年間でした。深くお礼申し上げます。

最後に、博士課程への進学を許し、恵まれた環境を提供し続けてくれた両親に感謝の意を表します。

平成28年2月 千田淑恵