

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 千田淑恵

【背景】

胃がんは世界の部位別がん死亡率の上位を占め、特に東アジア諸国（日本、韓国、中国）では死亡率が高い。胃がんの発症にはピロリ菌が胃の細胞に注入する CagA タンパク質が深く関与すると考えられている。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 モチーフにおいてチロシンリン酸化される。CagA はチロシンリン酸化 EPIYA モチーフを介してチロシンホスファターゼ SHP2 や Src family kinases (SFK) を不活性化する C-terminal Src kinase (Csk) 等、細胞内分子と結合しその機能を脱制御することで細胞内のシグナル伝達経路を攪乱する。

ピロリ菌 CagA のみならず、病原性大腸菌の Tir や軟性下疳菌の LspA1 と LspA2 等、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」を保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。多様な病原性細菌がピロリ菌 CagA に代表される細菌 EPIYA エフェクターを保有するという事実から、これら分子が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る。

当研究室におけるヒトプロテオーム探索により、EPIYA モチーフを保有するタンパク質 (EPIYA タンパク質) はヒトプロテオームに5つしか存在せず、予想される出現率に比べて実際の存在比は極端に低いことが明らかになった。翻すと、細胞の秩序形成・維持において EPIYA

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が存在し、外因性の EPIYA タンパク質である CagA はそのネットワークを攪乱して発がんを促す」ことが予想される。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。

EPIYA モチーフが司るシグナル経路の解明に向けて、同定された 5 つの EPIYA タンパク質の 1 つである Pragmin/Sgk223/NACK (以下 Pragmin) に着目した。Pragmin は分子量 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、C 末端側にシュードキナーゼドメインを保有している。先行研究により Pragmin は RhoA-Rho kinase シグナル経路、Notch シグナル経路、JAK/Stat シグナル経路に関与することが明らかにされている。また、Pragmin の脱制御は発がんまたはがんの浸潤・転移と関連することが報告されている。しかしながら、Pragmin がどのように複数のシグナル経路に関与するのか、また発がんや浸潤・転移にどのように関与するのか、詳細な分子機構は明らかにされていない。さらに、Pragmin の生理学的知見は非常に乏しい。

当研究室の研究により、Pragmin はピロリ菌 CagA によって標的にされているキナーゼ Csk と細胞質で複合体を形成することが明らかにされた。Csk は細胞膜近傍に局在する SFK の不活性化キナーゼであるが、Pragmin は Csk と複合体を形成することで Csk を細胞質に留め置き SFK の不活性化を妨げることがわかった。しかし、Pragmin と Csk が複合体を形成することで果たす機能は不明である。

【目的】

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。

【結果】

Pragmin-Csk 複合体形成は直接的な結合によるものか否かを検討するため、組換えタンパク質を用いた *in vitro* 結合試験を行った。まず、大腸菌タンパク質発現系により全長組換え Pragmin タンパク質ならびに、大腸菌体内における v-Src 共発現によりチロシンリン酸化全長組換え Pragmin タンパク質を作製した。組換え Csk タンパク質も同様に大腸菌タンパク質発現系を用いて作製した。次に、作製した組換えタンパク質を用いた *in vitro* 結合試験により、Pragmin と Csk はチロシンリン酸化された EPIYA モチーフを介して直接的に結合することを示した。

Pragmin-Csk 複合体形成の機能的意義を明らかにするために、ヒト胃上皮腺癌由来 AGS 細胞に Pragmin と Csk の発現ベクターを一過性に導入した。細胞内タンパク質のチロシンリン酸化量の変化を抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロットで解析した結果、Pragmin と Csk の共発現により Pragmin 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。キナーゼ活性欠損型 Csk 発現ベクターを用いて同様の実験を行った結果、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た。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 細胞における Csk の発現抑制実験により 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。そこで、組換え Pragmin タンパク質と組換え Csk タンパク質を用いた *in vitro* キナーゼ試験を行った結果、Pragmin は Csk の新規基質であることが示唆された。

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 の各種変異体を作製して AGS 細胞に遺伝子導入し、細胞抽出液のチロシンリン酸化量変化の解析を行った。まず、Pragmin の部分欠損変異体を用いた解析により、Csk によってリン酸化されるチロシン残基は N 末端側約半分の領域に存在することが示唆された。次に、この領域に存在する計 9 個のチロシン残基に点変異を導入した各種 Pragmin 変異体を用いて解析を行った。その結果、Csk による Pragmin のチロシンリン酸化部位は EPIYA モチーフを含む 3 個のチロシン残基であることが示唆された。

Pragmin-Csk 複合体形成による Csk のキナーゼ活性の変化を調べるために、c-Src の C 末端領域の 13 アミノ酸残基に GST タグを付加した GST-Src-tail を Csk の基質として用いて *in vitro* キナーゼ試験を行った。その結果、チロシンリン酸化野生型組換え Pragmin の存在下で Csk による GST-Src-tail のチロシンリン酸化量が著しく向上した。一方、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型 Pragmin の存在下では Csk による GST-Src-tail のチロシンリン酸化量の向上は認められなかった。したがって、Pragmin はチロシンリン酸化された EPIYA モチーフ依存的に 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意義を解明することを試みた。まず、AGS 細胞を用いて内在性 Pragmin と内在性 Csk の細胞内局在を蛍光免疫染色により調べた。その結果、Pragmin と Csk は細胞接着斑に共局在することが示唆された。次に、ヒト胃上皮腺癌細胞 MKN7 細胞に Pragmin 遺伝子および Csk 遺伝子をレンチウイルスベクターにより導入し、細胞形態および細胞運動を観察した。その結果、Pragmin と Csk の共導入により細胞形態の著しい変化ならびに運動

の亢進が観察された。

【総括】

本研究では、病原細菌の EPIYA エフェクターによって機能攪乱の標的とされたと考えられる哺乳動物の 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1つとして **Pragmin** に着目し、その機能解明を目指した。

組換えタンパク質を用いた *in vitro* の実験ならびに哺乳動物細胞を用いた実験の結果から、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 の活性化は強力な正のフィードバックループを形成すると考えられる。さらに、**Pragmin** と Csk の共発現は MKN7 細胞の形態変化と運動の亢進を誘導したことから、**Pragmin** による Csk の活性制御の正のフィードバックループは細胞の形態・運動を制御していると考えられる。今後は **Pragmin-Csk** 複合体による細胞の形態・運動制御の詳細な分子機構の解明が必要である。

将来的な発展の方向性として、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、胃癌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。