

博士論文

論文題目 *Helicobacter pylori* タンパク質 CagA の病原  
性・発がん性を規定する分子機構の研究

氏名 長瀬 里沙

## 目次

要旨	4
序文	5
方法	
発現ベクター	17
抗体	19
細胞培養と遺伝子導入	20
免疫染色	21
細胞形態変化の解析	22
免疫沈降およびイムノブロット	22
RNA 干渉	24
細胞運動の経時観察	24
コラーゲンゲル浸潤アッセイ	25
組換えチロシンリン酸化 CagA タンパク質の大腸菌発現	26
組換え CagA タンパク質の精製	26
SHP2-SH2 の発現と精製	28



GST プルダウンアッセイ	30
表面プラズモン共鳴	31
結果	
1 GyrB-CagA 融合タンパク質の作製と発現	32
2 CagA 変異体の細胞内局在とチロシンリン酸化	35
3 胃上皮細胞内における CagA の人為的二量体化	37
4 単量体 CagA および化学的二量体化 CagA の細胞形態変化誘導能	40
5 CagA による細胞形態変化誘導における PAR1 抑制の相乗効果	49
6 胃上皮細胞内での CagA-SHP2 複合体形成における EPIYA-C セグメント数の影響	54
7 EPIYA-C セグメントの繰り返し数と CagA の細胞形態変化誘導能	56
8 組換え CagA タンパク質のチロシンリン酸化	63
9 組換えチロシンリン酸化 CagA の SHP2 結合能解析	66
10 表面プラズモン共鳴法による CagA-SHP2 相互作用の結合親和性解析	68
考察	71
引用文献	83
謝辞	98

## 要旨

ピロリ菌 CagA タンパク質は胃癌発症に関わる様々な胃粘膜病変を引き起こす。ピロリ菌感染を起点とする胃癌においては、CagA-SHP2 複合体形成を介した SHP2 脱制御が重要な役割を果たすと考えられている。本研究では化学的分子二量体化法を用いて CagA 二量体化が CagA-SHP2 複合体形成に及ぼす影響を解析し、CagA 二量体化に依存して CagA-SHP2 複合体が安定化することを明らかにした。次に、SHP2 結合部位を複数個繰り返して保有する CagA 変異体を作製して細胞内及び *in vitro* 結合実験を行い、SHP2 結合部位数の増加が CagA の SHP2 結合能を指数関数的に増強することを明らかにした。

## 序文

*Helicobacter pylori* (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螺旋状桿菌である。1983年に Marshall と Warren によって報告されて以来 [1]、ピロリ菌は萎縮性胃炎や消化性潰瘍をはじめとした種々の胃粘膜病変の発症に関与することが示されてきた [2-5]。さらに、近年の大規模疫学調査ならびに動物モデルを用いた研究からピロリ菌感染が胃がんの発症に重要な役割を担うことが明らかになってきた [6-9]。ピロリ菌には病原因子である CagA タンパク質をコードする *cagA* 遺伝子陽性株と陰性株があり、*cagA* 遺伝子陽性ピロリ菌感染が胃がん発症と強く相関することが示されている [10, 11]。*cagA* 遺伝子は未知の生物種より水平伝搬でピロリ菌ゲノム内に持ち込まれたと考えられる *cag* pathogenicity island (*cagPAI*) と呼ばれる DNA 領域に存在する [12]。胃がん多発地域である日本、中国、韓国といった東アジア諸国で単離されるピロリ菌は 90% 以上が *cagPAI* 陽性株であるのに対し、胃がんの少ない欧米諸国から単離されるピロリ菌は約半数が *cagPAI* 陰性株である [13, 14]。このことから、胃がん発症頻度に地理的な差異が生じる要因としてピロリ菌の *cagPAI* の有無が考えられる。*cagPAI* には *cagA* 遺伝子の他に IV 型分泌機構と呼ばれる注射針用装置をコードする遺伝子群が存在する [15-17]。ピロリ菌体内で産生された CagA は IV 型分

泌機構を介して宿主胃上皮細胞内に侵入し、CagA 分子の Domain II 内に存在する塩基性残基に富んだ局所面（塩基性パッチ）と宿主細胞膜構成リン脂質であるホスファチジルセリンとの静電的相互作用を介して細胞膜内面に付着する [18, 19]。

次いで、CagA はその C 末側領域に複数存在する EPIYA（グルタミン酸-プロリン-イソロイシン-チロシン-アラニン）モチーフ内のチロシン残基が Src ファミリーキナーゼや Abl キナーゼによりチロシンリン酸化される [20, 21]。CagA は EPIYA モチーフ内のチロシンリン酸化依存的に SH2 ドメインを保有する様々なタンパク質と結合することが知られているが、中でも SHP2 チロシンホスファターゼとの結合は CagA の発がん活性にとって重要な役割を担うと考えられている [22-24]。SHP2 は体細胞に普遍的に発現する非受容体型チロシンホスファターゼとして知られ、Ras/MAPK 経路の活性化を促すシグナル増強因子としての機能などを通し [25]、細胞増殖および細胞運動に関与している [26, 27]。SHP2 は N 末側に 2 つの SH2 ドメイン (N-SH2、C-SH2)、C 末側にホスファターゼ活性を担う PTP ドメインを持つ。不活性化状態の SHP2 では、これら 2 つの SH2 ドメインが PTP ドメインを覆う構造をとる。一方、これら SH2 ドメインにチロシンリン酸化ペプチドが結合することにより SH2 ドメインと PTP ドメイン間の分子内相互作用が解除され、PTP ドメインの酵素活性中心が露出することで基質分子

の接近が可能となり、SHP2 はホスファターゼ活性を獲得する [26,27]。CagA はチロシンリン酸化依存的に SHP2 の SH2 ドメインに結合することでそのホスファターゼ活性を異常に亢進させ、Ras/MAPK 経路の異常活性化を介して細胞増殖を脱制御する [22,28]。また、CagA により活性化された SHP2 は細胞接着斑キナーゼ FAK を脱リン酸化することにより不活化し、細胞運動能の亢進を引き起こす (図 1) [29]。こうした生物活性を反映し、ヒト胃上皮由来 AGS 細胞に異所性発現させた CagA は hummingbird 表現型と呼ばれる細胞質の著しい伸長で特徴づけられる細胞形態変化を引き起こす (図 2) [22]。なお、本研究では CagA 発現により hummingbird 表現型を示した細胞を hummingbird 細胞と呼称する。

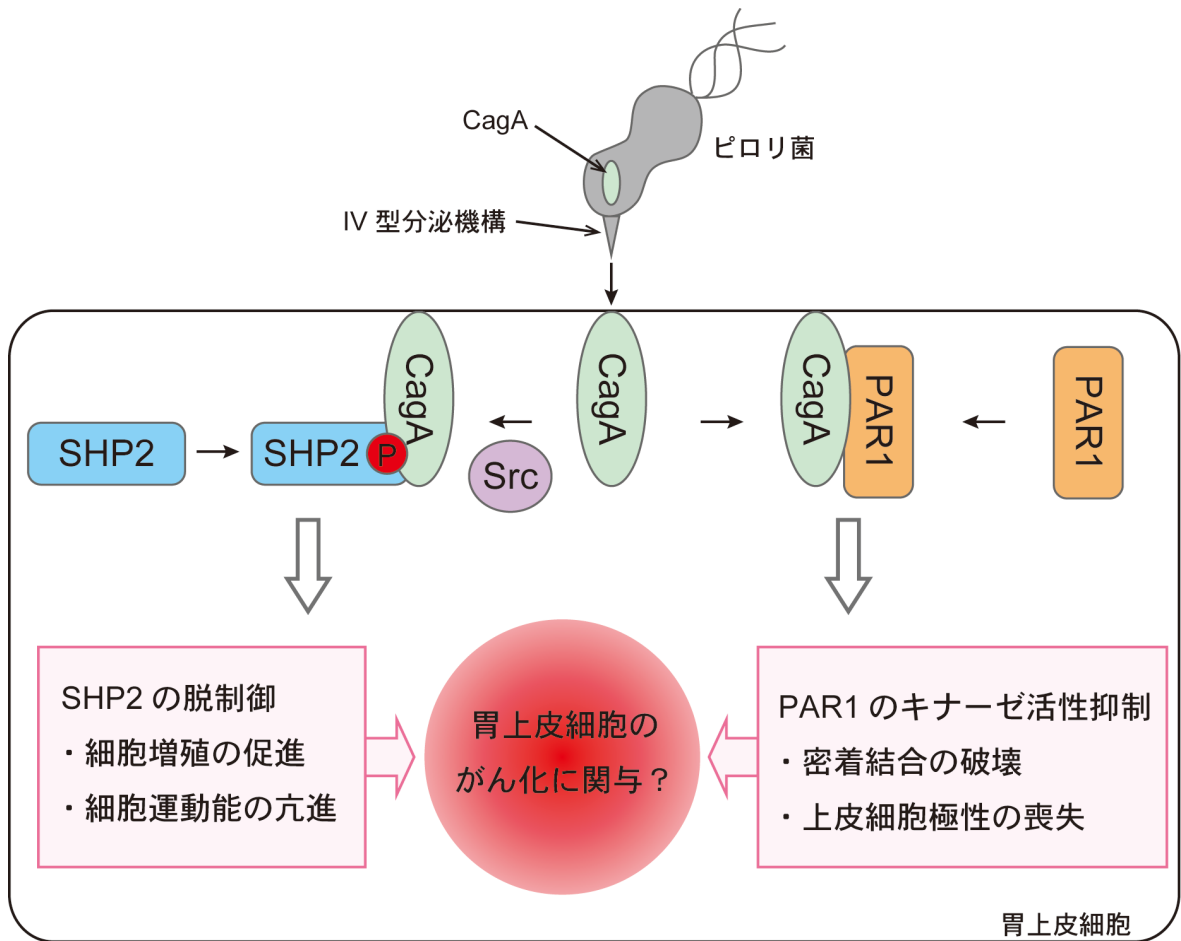


図 1. *cagA* 陽性ピロリ菌感染による胃上皮細胞内シグナルの攪乱

ピロリ菌の *cagA* 遺伝子産物である CagA タンパク質は注射針様装置である IV 型分泌機構を介して胃上皮細胞内に運ばれ、細胞膜内面に局在する。そこで CagA は 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 チロシンホスファターゼと特異的に結合し、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。CagA はまた、チロシンリン酸化非依存的に上皮細胞極性を制御する PAR1 キナーゼと特異的に結合し、そのキナーゼ活性を抑制する。その結果、胃上皮細胞は密着結合を破壊されて上皮細胞極性を喪失する。このようにして CagA は胃上皮細胞のがん化に関与すると考えられている。



## 図 2. hummingbird 表現型

胃上皮由来 AGS 細胞に CagA を発現させると細胞質が著しく伸長した細胞形態を示す(赤矢頭)。このような細胞形態は hummingbird 表現型と呼ばれる。AGS 細胞に CagA 発現ベクターを導入し、その 17 時間後に光学顕微鏡下で細胞形態を撮影した。赤矢頭は hummingbird 細胞を示している。

これまでの研究から、CagA は異なるピロリ菌株間において EPIYA 領域を含む C 末側領域に分子多型を示すことが明らかとなっている [30]。CagA の EPIYA 領域は周辺のアミノ酸配列の異なる EPIYA-A, -B, -C, -D の 4 つのセグメントが種々に組み合わされ構成される [31]。東アジア地域を除く全世界で単離されるピロリ菌由来の CagA (欧米型 CagA) は EPIYA-A, -B, -C セグメントからなり、東アジア諸国において単離されるピロリ菌由来の CagA (東アジア型 CagA) は EPIYA-A, -B, -D セグメントからなる(図 3)。これまでの臨床単離株において、欧米型 CagA では様々な数の EPIYA-C セグメントを繰り返して持つものが存在する。欧米型 CagA の 66.5 % は単一の EPIYA-C セグメントを保有する C1 型

であるが、2回繰り返して保有する C2 型が 20.3 %、3回繰り返して保有する C3 型が 4.0 % 存在する (図 3) [28, 32, 33]。さらに、非常に稀ではあるが EPIYA-C セグメントを 4回あるいは5回繰り返して保有する CagA も発見されている [33]。一方で、東アジア型 CagA においては2個の EPIYA-D セグメントを繰り返して持つものも存在するが、83.6 % が単一の EPIYA-D セグメントを保有するものである (図 3) [32, 33]。欧米型 CagA ではチロシンリン酸化された EPIYA-C セグメントが、また東アジア型 CagA ではチロシンリン酸化された EPIYA-D セグメントが SHP2 との結合部位となる。興味深いことに、EPIYA-C セグメントを持つ欧米型 CagA に比べて EPIYA-D セグメントを持つ東アジア型 CagA はより強い SHP2 結合活性を示す [28]。CagA の分子多型が示す SHP2 結合能の差異もまた胃がんが地理的な発症頻度の違いを示す要因の一つと考えられる。加えて、CagA の SHP2 結合能は EPIYA-C あるいは EPIYA-D セグメントの数が増すに従い増強することが明らかとなっている [28, 33]。



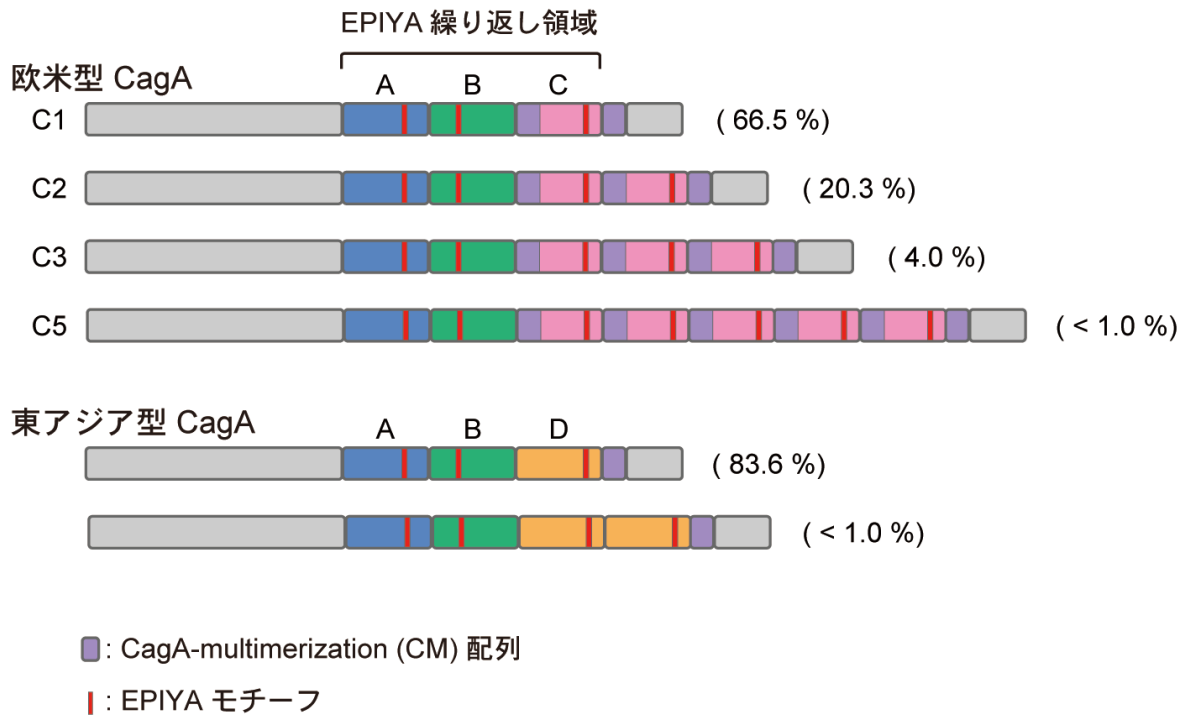


図 3. 欧米型 CagA および東アジア型 CagA の構造模式図

欧米型および東アジア型 CagA の典型的な構造の模式図を示す。CagA の C 末側は EPIYA モチーフ (赤) 周辺のアミノ酸配列が異なる EPIYA-A (青)、EPIYA-B (緑)、EPIYA-C (桃)、EPIYA-D (橙) セグメントが多様に組み合わせられ構成される (EPIYA 繰り返し領域)。欧米型 CagA では EPIYA-C セグメントを 1-5 個繰り返し持つもの (C1, C2, C3, C5) が存在する一方で、東アジア型 CagA は 2 個の EPIYA-D セグメントを繰り返し持つものもあるが、多くは単一の EPIYA-D セグメントを持つ。CagA-multimerization (CM) 配列 (紫) は EPIYA-C セグメント内と EPIYA-C または EPIYA-D セグメントの直後に存在する。括弧内の数値は CagA 分子多型の存在比を表している。

SHP2 に加え、CagA はチロシンリン酸化非依存的に細胞極性のマスターレギュレーターであるセリン/スレオニンキナーゼ PAR1 と結合する (図 1) [34-36]。胃粘膜を構成する上皮細胞は一層のシート状構造をしており、タイトジャンクションおよびアドヘレンスジャンクションと呼ばれる上皮細胞間接着装置を介して上

皮細胞同士が強く密着している。その結果、個々の細胞は上皮極性と呼ばれる構造的・機能的な非対称性を保持する。上皮細胞の細胞膜面はタイトジャンクションを境界とし、管腔側である頂端側、生体内部に接する基底側、細胞同士が接する側方側に分けられる。上皮極性維持の分子機構は未だ不明な点が多いが、非典型プロテインキナーゼ C (aPKC) と PAR1 の 2 つのキナーゼが重要な役割を担っていると考えられている [37, 38]。上皮細胞において PAR1 は側方ならびに基底側の細胞膜に局在し、PAR3、PAR6、aPKC からなる分子複合体 (PAR3/PAR6/aPKC 複合体) は頂端側の細胞膜に局在する。タイトジャンクション近傍では aPKC が PAR1 をリン酸化し細胞膜から遊離させる一方、PAR1 は PAR3 をリン酸化し PAR3/PAR6/aPKC 複合体を不安定化させる。すなわち、PAR1 と aPKC が対峙・拮抗することにより上皮細胞極性が維持されるというモデルが提唱されている [37, 38]。CagA は PAR1 の触媒ドメインに直接結合することによりそのキナーゼ活性を抑制し [35, 39]、その結果、上皮細胞極性を崩壊することが明らかとなっている [35, 40]。ほ乳動物細胞には 4 種類の PAR1 キナーゼファミリー (PAR1a、PAR1b、PAR1c、PAR1d) が存在する。これらファミリー分子は様々な細胞系において種々の組み合わせで共発現し、細胞極性を調節していると考えられており、上皮細胞では PAR1b が主たる PAR1 メンバーである [41]。CagA はこれら全て

の PAR1 キナーゼ (PAR1a、 PAR1b、 PAR1c、 PAR1d) と特異的に結合する能力を有することが示されている [34]。 CagA の PAR1 結合部位は、 EPIYA-C セグメント内および EPIYA-C あるいは EPIYA-D セグメント直下に存在する CagA-multimerization 配列 (CM 配列) と呼ばれる 16 アミノ酸残基である (図 3) [35, 39, 42]。この CM 配列は当初、 CagA が二量体 (多量体) 化するための責任領域として同定された。 CagA と SHP2 との安定的な結合には SHP2 が持つ 2 つの SH2 ドメインが共に必要であるのに対し、 EPIYA-C あるいは EPIYA-D セグメントを 1 つしか持たない CagA は SHP2 と安定的に結合しうることから [28]、 2 分子の CagA が 1 分子の SHP2 と結合する可能性が示唆されている [35, 43]。実際に、 CagA は細胞内で CM 配列を介して二量体を形成していることが明らかにされており、また PAR1 は二量体として存在する可能性が示唆されていることから、 2 分子の CagA が PAR1 二量体と各々結合することによって受動的に二量体化するというモデルが提示されている (図 4) [35, 44]。このモデルに従えば、 CagA の CM 配列は PAR1 との結合を介して上皮細胞極性を破壊するだけでなく、 CagA の二量体化を媒介することで安定的な CagA-SHP2 複合体形成を促す二重の役割を担うものと推察される。

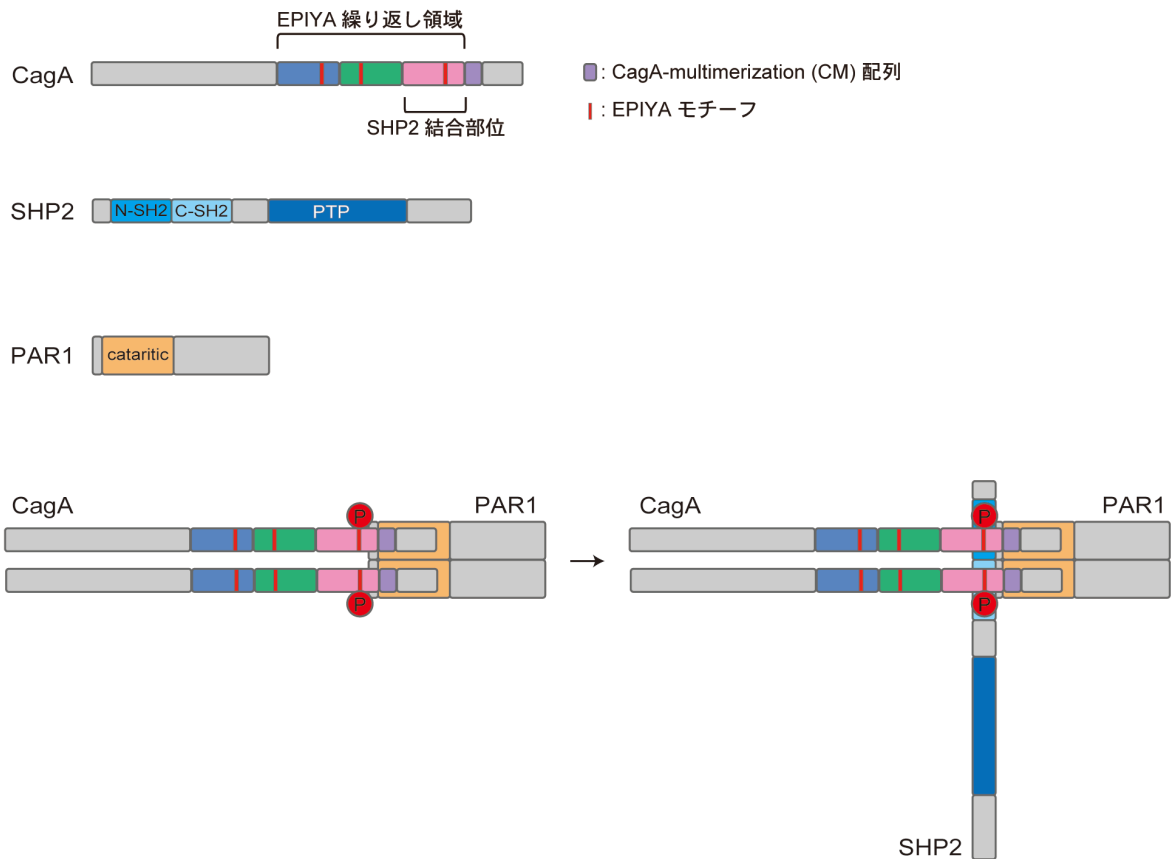


図 4. PAR1 を介した CagA 二量体化と CagA-SHP2 複合体形成のモデル  
 SHP2 は N 末側領域に CagA との結合部位である 2 つの SH2 ドメインを持ち、その C 末側にホスファターゼ活性を担う PTP ドメインを持つ。一方、CagA は CM 配列を介して PAR1 の触媒ドメインに結合し、PAR1 のキナーゼ活性を抑制する。CagA と SHP2 との結合には SHP2 の 2 つの SH2 ドメインが共に必要であるが、単一の SHP2 結合部位を持つ CagA が SHP2 と結合し得ることから、2 分子の CagA が 1 分子の SHP2 と結合している可能性が示唆されている。さらに、PAR1 は細胞内で二量体を形成する可能性が示されており、CagA は CM 配列を介して二量体を形成することから、2 分子の CagA が PAR1 二量体と各々結合することで受動的に二量体化し、その結果、安定した CagA-SHP2 複合体が形成されるというモデルが提示されている。

これら一連の研究から、ピロリ菌 CagA を介した胃がんの発症において

CagA-SHP2 複合体形成による SHP2 の機能的脱制御および CagA-PAR1 複合体

形成による PAR1 のキナーゼ活性抑制は極めて重要な役割を担うと考えられる。

そこで本研究では、CagA の病原性発現における PAR1 を介した CagA ホモ二量体化の生物学的意義を解明することを第 1 の目的とした。CagA 二量体化の意義を解明するために、PAR1 結合能を持たない CagA を人為的に二量体化させることを試みた。まず、PAR1 を介した CagA の二量体化を阻止するために、東アジア型の野生型 CagA の CM 配列を欠失させた CagA 変異分子 [CagA $\Delta$ CM] を作製した。この CagA 変異体を人為的に二量体化する手段として、放射菌ストレプトマイセス属由来の抗生物質 coumermycin を利用した。coumermycin は大腸菌が持つ DNA トポイソメラーゼ II 型の 1 種である DNA ジャイレースに結合し、その酵素活性を阻害することで大腸菌の増殖を抑制する [45-47]。このとき coumermycin は DNA ジャイレースの B サブユニット (GyrB) と化学量論的に 1:2 で結合することが示されている [45]。そこで、この性質を CagA $\Delta$ CM の人為的二量体化に応用することを目指した。すなわち、CagA $\Delta$ CM に GyrB を融合させた GyrB-CagA $\Delta$ CM を作製した後、ヒト胃上皮由来 AGS 細胞に一過性発現させ、coumermycin 添加による人為的二量体化が CagA の生物活性へ及ぼす効果を解析した。CagA の生物活性評価には、SHP2 の脱制御により誘導される hummingbird 表現型を指標とした。

一方、欧米型 CagA に特異的な EPIYA-C セグメント数の増加は胃粘膜病変の重症度と有意な相関関係が示されている [28, 32]。そこで、CagA の EPIYA-C セグメント数と CagA の SHP2 結合能との関連を解析することを本研究における第 2 の目的とした。まず、自然界に存在する CagA 分子多型である EPIYA-C セグメントを 1 個から 5 個保有する CagA 変異体 [CagA(C1)、CagA(C2)、CagA(C3)、CagA(C5)] に加えて (図 3)、自然界には存在しない EPIYA-C セグメントを 8 個保有する CagA 変異体 [CagA(C8)] を作製した。これらの変異体を AGS 細胞に発現させ、免疫沈降実験による SHP2 結合量の解析および hummingbird 表現型誘導能の解析を行った。さらに、一連の CagA 変異体を組換え型タンパク質として発現・精製し、SHP2 との *in vitro* 結合実験および表面プラズモン共鳴法による SHP2 結合能の定量的解析を試みた。

尚、本論文に記載する研究内容の一部は以下の文献に公表済みである。

Nagase, L., Murata-Kamiya, N., Hatakeyama, M.

Potentiation of *Helicobacter pylori* CagA Protein Virulence through Homodimerization.

*Journal of Biological Chemistry*. 286, 33622-33631. 2011

## 方法

### 発現ベクター

東アジア型の野生型 CagA の哺乳動物細胞発現ベクターである pSP65SR $\alpha$ -CagA および CM 配列を欠いた PAR1 結合能を持たない変異型 CagA [CagA $\Delta$ CM] の哺乳動物細胞発現ベクター pSP65SR $\alpha$ -CagA $\Delta$ CM は既に当研究室で作製されていたものであり、*cagA* 遺伝子の 3' 末端には HA タグをコードする塩基配列が付加されている [42, 43]。CagA の EPIYA-D セグメントの EPIYA モチーフを EPIFA に置換した変異型 CagA [CagA(ABd)] は Chameleon site-directed mutagenesis 法 (stratagene 社) を用いて作製した。CagA(ABd) をコードする遺伝子は 3' 末端に HA あるいは FLAG タグを付加して pSP65SR $\alpha$  に挿入した。pSP65SR $\alpha$ -CagA $\Delta$ CM を *Sac* I で処理し、*cagA* 遺伝子の 5' 末端に GyrB の coumermycin 結合部位である 1-219 番アミノ酸残基をコードする遺伝子配列を導入し、coumermycin 添加により人為的に二量体化する GyrB 融合型 CagA [GyrB-CagA $\Delta$ CM] 遺伝子を PCR 法にて作製した。3' 末端に FLAG タグを付加した東アジア型の野生型 CagA、3' 末端に HA あるいは FLAG タグを付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM をコードする遺伝子を pSP65SR $\alpha$  に挿入した。T7 タグを付加したヒト PAR1b の哺乳動物細胞発現ベクターである pEF-PAR1b-T7 は既に報告されているものを用いた [34, 35]。FLAG タグを付加したヒト PAR1b

をコードする cDNA 断片を pSP65SR $\alpha$  に挿入して pSP65SR $\alpha$ -PAR1b-FLAG を作製した。EGFP の哺乳動物細胞発現ベクターは EGFP をコードする遺伝子断片を pSP65SR $\alpha$  に挿入して作製した。EPIYA-C セグメントを 1 個または 3 個保有する欧米型の野生型 CagA [CagA(C1)], [CagA(C3)] の哺乳動物細胞発現ベクター pSP65SR $\alpha$ -CagA(C1)、pSP65SR $\alpha$ -CagA(C3) は当研究室で既に作製されたものであり、それぞれ 3' 末端に HA タグが付加されている [22, 32]。CagA(C3) は 3 回連続する EPIYA-C セグメントの中央の EPIYA-C セグメントの前後に *ApaI* サイトが挿入されている。EPIYA-C セグメントを 2 個持つ CagA 変異体 CagA(C2) の哺乳動物細胞発現ベクターは pSP65SR $\alpha$ -CagA(C3) を *ApaI* で切断して EPIYA-C セグメントを 1 個取り除くことにより作製した。EPIYA-C セグメントを 5 個または 8 個持つ CagA 変異体、CagA(C5)、CagA(C8) の哺乳動物細胞発現ベクターは pSP65SR $\alpha$ -CagA(C3) を *ApaI* で切断して EPIYA-C セグメントを 1 個取り除いた後、3'、5' 両末端に *ApaI* サイトを挿入した EPIYA-C セグメントを 3 回連続させた人工合成遺伝子断片を 1 個挿入して pSP65SR $\alpha$ -CagA(C5) を作製し、連続して 2 個挿入して pSP65SR $\alpha$ -CagA(C8) を作製した。組換え CagA(C3) タンパク質の大腸菌発現ベクター pGEX6P2-CagA(C3) は既に当研究室で作製されており、5' 末端に GST タグ、3' 末端にヘキサヒス



チジン (6xHis) タグが付加されている [19]。一連の EPIYA-C セグメントを増加させた CagA の大腸菌発現ベクターは、pGEX6P2-CagA(C3) を EPIYA 繰り返し領域の前後に存在する *Bgl*III、*Xba*I サイトで切断し、同様に切断した各変異体の EPIYA 繰り返し領域を挿入することにより作製した。組換え v-Src タンパク質の大腸菌発現ベクター pACYCDuet1-v-Src は *v-src* 遺伝子を pACYCDuet1 ベクターに挿入して作製した。ヒト SHP2 の 2 つの SH2 ドメインである 1-220 アミノ酸残基 [SHP2-SH2] の大腸菌発現ベクター pGEX6P2-SHP2(1-220aa) および 32 番アルギニン、53 番ヒスチジン、138 番アルギニン、169 番ヒスチジン残基をアラニン残基に置換してリン酸化チロシンとの結合能を欠損させた SHP2 の SH2 ドメイン変異体 [SHP2-SH2dead] の大腸菌発現ベクター pGEX6P2-SHP2(1-220aa; SH2dead) は既に当研究室で作製されていたものである [28]。

## 抗体

免疫沈降、イムノブロット、および免疫染色の一次抗体として、抗 HA モノクローナル抗体 (3F10; Roche 社)、免疫沈降、およびイムノブロットの一次抗体として、抗 FLAG モノクローナル抗体 (M2; Sigma 社)、イムノブロット、および免疫

染色の一次抗体として、抗 T7 ポリクローナル抗体 (M21; Santa Cruz Biotechnology 社)、イムノブロットの一次抗体として抗 SHP2 ポリクローナル抗体 (C-18; Santa Cruz Biotechnology 社)、抗リン酸化チロシンモノクローナル抗体 (4G10; Millipore 社)、抗 actin ポリクローナル抗体 (C-11; Santa Cruz Biotechnology 社)、抗 His-tag モノクローナル抗体 (6C4; Medical & Biological Laboratories 社)、抗 PAR1b 抗体 (横浜市立大学・大野茂男先生より供与) を用いた。免疫染色の一次抗体として、抗 FAK Y576 リン酸化特異的ポリクローナル抗体 (BioSource 社) を用いた。イムノブロットの二次抗体として、西洋ワサビペルオキシダーゼを融合した、抗ラット IgG 抗体 (GE Healthcare 社)、抗ラビット IgG 抗体 (GE Healthcare 社)、抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare 社)、抗ゴート IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) を用いた。また、免疫染色の二次抗体として、Alexa Fluor 488 融合抗ラット IgG 抗体 (Invitrogen 社)、Alexa Fluor 546 融合抗ラット IgG 抗体 (Invitrogen 社)、Alexa Fluor 488 融合抗ラビット IgG 抗体 (Invitrogen 社) を用いた。

#### 細胞培養と遺伝子導入

ヒト胃上皮由来 AGS 細胞は 10 %非働化ウシ胎児血清 (FBS) を含む RPMI 1640 培地 (日水製薬株式会社) を用いて、5 % CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下で培養した。

遺伝子導入は AGS 細胞を播種して 12 時間培養後、Lipofectamine2000 (Invitrogen 社) を用いて推奨プロトコルに従って行った。GyrB-CagAΔCM 変異体の二量体化実験では遺伝子導入の 8 時間後に 700 nM coumermycin (Sigma 社) を含む RPMI 1640 培地に交換し、その 9 時間後にそれぞれの解析に利用した。

### 免疫染色

AGS 細胞を 8 well Permanox Slide (Thermo Fisher Scientific 社) に 1 ウェルあたり  $0.24 \times 10^5$  個播種し、12 時間培養後、発現ベクター 0.24 mg を導入した。遺伝子導入の 17 時間後または 24 時間後に Mildform 10N (Wako 社) で 20 分間処理して固定した後、0.5 % Triton X-100 で 20 分間透過処理を行った。さらに、ブロッキング液 [PBS, 0.1 % Tween20, 0.5 %  $\text{NaN}_3$ , 5 % BSA] 中で室温、60 分間振盪した。0.1 % Tween20 を含む PBS で洗浄後、一次抗体を含むブロッキング液中で 4 °C、終夜振盪した。続いて、0.1 % Tween20 を含む PBS で洗浄した後、Alexa Fluor を付加した二次抗体を含むブロッキング液中で室温、60 分間振盪した。細胞核は DAPI で染色し、F-actin は Alexa Fluor 546-phalloidin (Invitrogen 社) で染色した。染色像は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SPE, Leica 社、FV1200, OLYMPUS 社) で観察した。

### 細胞形態変化の解析

AGS 細胞を 35 mm ディッシュ (Greiner 社) に  $1.2 \times 10^5$  個播種し、12 時間培養後、発現ベクター 5  $\mu\text{g}$  を導入した。遺伝子導入の 17 時間後に倒立顕微鏡下で細胞形態変化の観察像を撮影した。hummingbird 表現型は、突起の長さが細胞短径の 2 倍以上のものと定義した。任意の 10 ヶ所の 0.25 mm<sup>2</sup> 範囲内における総細胞数に対する hummingbird 表現型を示す細胞数の割合を算出し、3 回の実験の平均を示した。

細胞形態変化の詳細な解析は以下の方法により行った。AGS 細胞を 35 mm ディッシュ (Greiner 社) に  $0.6 \times 10^5$  個播種し、12 時間培養後、各種 CagA 発現ベクター 4.5  $\mu\text{g}$  および EGFP 発現ベクター 0.5  $\mu\text{M}$  を導入した。遺伝子導入の 4 時間後にトリプシン処理した後、細胞を懸濁し 35 mm ディッシュ (ibidi 社) に再播種した。その 4 時間後に coumermycin を添加し 9 時間培養した後、共焦点レーザー顕微鏡下 (TCS-SPE, Leica 社) で細胞形態変化の観察像を撮影した。細胞形態の解析には ImageJ software (NIH, rsbweb.nih.gov) を用いた。

### 免疫沈降およびイムノブロット

AGS 細胞を 10 cm ディッシュ (Greiner 社) に  $1.8 \times 10^6$  個播種し、12 時間培

養後に 30  $\mu\text{g}$  の発現ベクターを導入した。遺伝子導入の 17 時間後あるいは 24 時間後に細胞を回収して免疫沈降およびイムノブロットに用いた。細胞を Lysis buffer [50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Brij-35, 2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM NaF, 10 mM b-glycerophosphate, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml trypsin inhibitor, 2 mM PMSF] 中で、4  $^{\circ}\text{C}$ 、20 分間振盪して溶解した。得られた細胞溶解液の濃度を Protein Assay CBB 溶液 (nacalai tesque 社) を用いて Bradford 法により測定した。全細胞抽出液 (Total Cell Lysate; TCL) として 50  $\mu\text{g}$  のタンパク質を用いた。免疫沈降には 1200  $\mu\text{g}$  のタンパク質を用い、溶解バッファーで平衡化したプロテイン G セファロースビーズ (GE Healthcare 社) を加え 4  $^{\circ}\text{C}$  で 20 分間振盪して非特異的に吸着するタンパク質を除去した後、一次抗体 4  $\mu\text{l}$  を加え、4  $^{\circ}\text{C}$  で 90 分間振盪した。さらにプロテイン G セファロースビーズを加え 4  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間振盪した。Lysis buffer で 5 回洗浄した後、2xSDS 20  $\mu\text{l}$  を加えて攪拌し、さらに 1xSDS 60  $\mu\text{l}$  を加えて SDS-PAGE の試料とした。SDS-PAGE のランニングゲルとして 8 % アクリルアミドゲルを用いて蛋白質を分離した後、エレクトロブロッティングによりタンパク質を PVDF 膜 (Millipore 社) に転写した。転写後の膜をブロッキング液 [10 % スキムミルク (雪印社)、1 % BSA (nacalai tesque 社) を含む TBS-T (トリス緩衝液、0.1 % Tween20)]

中で室温、60 分間振盪した。TBS-T で洗浄後、一次抗体中で室温、90 分間振盪した。続いて、TBS-T で洗浄後、二次抗体中で室温、45 分間振盪した。処理後の膜を Western Blot Chemiluminescence Reagent (NEN 社) を用いて発光させた。得られたバンドの強度は LAS-4000 システム (Fuji Film 社) を用いて定量した。

### RNA 干渉

siRNA の導入は Lipofectamine2000 (Invitrogen 社) を用いて推奨プロトコルに従って行った。siRNA 導入の 24 時間後、各発現ベクターの遺伝子導入を行った。その 17 時間後、細胞形態変化の解析を行った。使用した PAR1b 特異的 siRNA [PAR1b-si709] は既に当研究室で作製されていたものである。

### 細胞運動の経時観察

AGS 細胞を 35 mm ディッシュ (ibidi 社) に  $1.2 \times 10^5$  個播種し、12 時間培養後、各 CagA 変異体発現ベクターを 5  $\mu\text{g}$  導入した。遺伝子導入の 17 時間後を開始点として 2 分間隔で 3 時間、共焦点レーザー顕微鏡 (FW1200, OLYMPUS 社) を用いて細胞の観察像を撮影した。撮影中、細胞を Stage Top Incubator (TOKAI HIT 社) にて 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$  条件下で培養した。

### コラーゲンゲル浸潤アッセイ

AGS 細胞を 6.0 cm ディッシュに  $6.0 \times 10^5$  個播種し、その 12 時間後に各 CagA 発現ベクターを導入した。水中で Cellmatrix Type I-A (新田ゼラチン株式会社) と 5 x RPMI 1640 培地、再構成用バッファー [0.05 N NaOH, 2.2 %  $\text{NaHCO}_3$ , 20 mM HEPES] を 7:2:1 の割合で混和してコラーゲン溶液を調整した。8  $\mu\text{m}$  ポアサイズの 6.5 mm セルカルチャーインサート (Becton, Dickinson and Company 社) にコラーゲン溶液を 100  $\mu\text{l}$  添加して、37 °C で 1 時間静置してコラーゲンをゲル化させた。細胞を遺伝子導入の 4 時間後にトリプシン処理して 10 % FBS を含む RPMI 1640 培地で懸濁し、反転したコラーゲンゲルを含むセルカルチャーインサートの底面フィルター上に  $4.0 \times 10^4$  個再播種した。再播種の 4 時間後にセルカルチャーインサートを反転し、FBS を含まない RPMI 1640 培地 1 ml で 2 回洗浄した。下部のウェルに FBS を含まない RPMI 1640 培地を、セルカルチャーインサート内のコラーゲンゲルの上部に 10 % FBS、30 nM EGF を含む RPMI 1640 培地を添加し、37 °C で 5 日間培養した。培養後、4  $\mu\text{M}$  Calcein-AM 溶液で生細胞を染色して、共焦点レーザー顕微鏡 (FW1200, OLYMPUS 社) を用いてフィルター一面より 5  $\mu\text{m}$  間隔で蛍光画像を撮影した。

### 組換えチロシンリン酸化 CagA タンパク質の大腸菌発現

CagA を大腸菌体内でチロシンリン酸化するため、各組換え CagA タンパク質発現ベクターと組換え v-Src タンパク質発現ベクターで大腸菌 BL21(DE3) 株を同時形質転換した。これを LB 培地にて 37 °C で振盪培養して種培養とした。この種培養を TB 培地に  $OD_{600}=0.02$  となるように植菌して、 $OD_{600}=1.0$  に至るまで 37 °C で培養した。最終濃度 0.1 mM になるように IPTG を添加した後、18 °C で終夜振盪培養して組換えタンパク質の発現を誘導した。

### 組換え CagA タンパク質の精製

組換えチロシンリン酸化 CagA タンパク質を発現させた大腸菌培養液を 6,000xg で 15 分間遠心分離して菌体を回収した。Ni 結合バッファー [20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM  $MgCl_2$ , 10 mM imidazole] で菌体を懸濁した後、再び遠心分離して菌体を回収した。0.3 mg/ml benzamidine を加えた Ni 結合バッファーで再懸濁し、Astrason Processor XL2020 (Heat Systems Incorporated 社)、Q700 超音波ホモジナイザー (QSONICA 社) を用いて菌体を超音波破碎した。超音波破碎後、20,000xg で 15 分間遠心分離して上清画分を大腸菌破碎液とした。そこへ Ni-NTA アガロースビーズ (QIAGEN 社) を添加して 4 °C で 1 時間混和し、



CagA に付加してある 6xHis タグを吸着させた。Ni-NTA ビーズを含む大腸菌破砕液をエコノパックカラム (BIO-RAD 社) に充填して非吸着画分を取り除いた後、Ni 洗浄バッファー [20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM imidazole] で Ni-NTA ビーズを洗浄した。洗浄後の Ni-NTA ビーズに Ni 溶出バッファー [20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 mM imidazole] を添加し、吸着した CagA タンパク質を溶出した。続いて、回収したタンパク質溶出液に DTT を最終濃度 2 mM となるように加え、さらに GST 結合バッファー [50 mM Tris-HCl, pH 7.3, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT] で平衡化したグルタチオンセファロース 4B ビーズを添加した。4 °C で 1 時間混和して GST をビーズに吸着した後、エコノパックカラム (BIO-RAD 社) に充填して非吸着画分を除去した。GST 結合バッファーで洗浄後さらに GST cleavage バッファー [50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT] で洗浄して、PreScission protease (GE Healthcare 社) を添加した。4 °C で 16 時間プロテアーゼ処理して GST タグを切断し、GST cleavage バッファーで CagA を溶出した。回収した溶出液を HiPrep 26/10 Desalting カラム (GE Healthcare 社) で HisTrap 結合バッファー [20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl] に交換した後、ÄKTA Avant 25 (GE Healthcare 社) を用いて精製した。バッファー交換した CagA 溶液を HisTrap HP 5 ml カラム (GE

Healthcare 社) に充填し、HisTrap 結合バッファー中で imidazole 濃度を 0 mM から 60 mM まで上昇させた後、そのまま 10 ml 灌流して夾雑タンパク質を取り除いた。続いて、20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole のバッファーで 6xHis タグを付加してある CagA を溶出した。回収した CagA タンパク質溶液を精製バッファー [20mM Tris-HCl, pH 8.0, 500mM NaCl] 中で Superose 6 カラム (GE Healthcare 社) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、最終精製物とした。

### SHP2-SH2 の発現と精製

組換え SHP2-SH2 あるいは組換え SHP2-SH2dead タンパク質の発現ベクターを用いて形質転換した大腸菌 BL21 株を LB 培地にて 37 °C で振盪培養した。これを  $OD_{600}=0.02$  となるように LB 培地へ植菌して 37 °C で  $OD_{600}=0.8$  まで振盪培養した。最終濃度 0.1 mM になるように IPTG を添加して 25 °C で 16 時間振盪培養し、タンパク質を発現誘導した。これを 6,000xg で 15 分間遠心分離して菌体を回収し、平衡化バッファー [25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol] で懸濁した。再び遠心分離して菌体を回収して平衡化バッファーで懸濁した後、Astrason Processor XL2020 (Heat Systems

Incorporated 社) を用いて菌体を超音波破碎した。破碎後、 30,000xg で 20 分間遠心分離して上清画分を回収し、そこへ平衡化バッファーで平衡化したグルタチオセファロース 4B ビーズ (GE Healthcare 社) を添加した。4 °C で 1 時間混和してビーズに GST タグを吸着させ、その後エコノパックカラム (BIO-RAD 社) に充填した。非吸着画分を除去して洗浄バッファー W1 [25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % TritonX-100, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol] で洗浄した。さらに洗浄バッファー W2 [25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol] で洗浄後、10 mM 還元型グルタチオンを含む洗浄バッファー W2 で GST 融合 SHP2-SH2 または SHP2-SH2dead を溶出した。この溶出液を Amicon Ultra-4 (MWCO 10,000、 Millipore 社) を用いて W2 バッファーに置換して GST プルダウンアッセイに用いた。また、表面プラズモン共鳴に用いた GST タグを切断した SHP2-SH2 はグルタチオセファロース 4B ビーズ (GE Healthcare 社) に GST 融合タンパク質を吸着させて W2 バッファーで洗浄後、 PreScission protease (GE Healthcare 社) を添加した。4 °C で 16 時間プロテアーゼ処理した後、GST タグが切断された SHP2-SH2 あるいは SHP2-SH2dead を W2 バッファーで溶出した。溶出液を HiPrep 26/10 Desalting カラム (GE Healthcare 社) で精製バッファー [20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl] に交換し、 ÄKTA Avant 25 (GE Healthcare 社)

を用いて精製した。バッファー交換した SHP2-SH2 溶液または SHP2-SH2dead 溶液を HisTrap HP 5ml カラム (GE Healthcare 社) に充填し、精製バッファー中で imidazole 濃度を 0 mM から 60 mM まで上昇させた後、そのまま 10 ml 灌流して夾雑タンパク質を取り除いた。続いて、20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 250 mM imidazole のバッファーで 6xHis タグを付加してある SHP2-SH2 あるいは SHP2-SH2dead を溶出した。回収したタンパク質溶液をゲル濾過クロマトグラフィー Superose 6 カラム (GE Healthcare 社) を用いて最終精製した。

#### GST プルダウンアッセイ

プルダウンバッファー [50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01 % TritonX-100] に最終濃度 20 nM となるように精製したチロシンリン酸化 CagA と GST 融合 SHP2-SH2 または SHP2-SH2dead を加え、4 °C で 1 時間転倒混和した。そこへ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 2.5 % スラリーとなるように加えてさらに 1 時間 4 °C で転倒混和した。1,000xg で 1 分間遠心分離してビーズを回収し、プルダウンバッファー 1 ml で懸濁して非特異的にビーズへ吸着したタンパク

質を洗浄した。洗浄を 5 回繰り返した後、1xSDS を加えて SDS-PAGE の試料とした。SDS-PAGE で展開後、銀染色法にてタンパク質を検出した。

### 表面プラズモン共鳴

Biacore X100 (GE Healthcare 社) を用いてチロシンリン酸化 CagA と SHP2-SH2 との結合親和性を測定した。各組換えチロシンリン酸化 CagA をリガンドとしてセンサーチップ CM5 (GE Healthcare 社) にアミンカップリング法にて推奨プロトコルに従い固定化した。推奨バッファーである HBS-EP+ バッファー [10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05 % (v/v) SurfactantP20] 中でアナライトである任意の濃度に調整した組換え SHP2-SH2 を 30  $\mu$ l/min の流速でフローセルに添加した。解離定数は Biacore X100 Evaluation Software (GE Healthcare 社) を用いてアナライト濃度に対する平衡値のプロットから算出した。

## 結果

### 1 GyrB-CagA 融合タンパク質の作製と発現

宿主胃上皮細胞内に侵入した CagA は、二量化した PAR1 の各々と結合することにより受動的に二量体化すると考えられている [35, 44]。そこでまず、PAR1 が細胞内でホモ二量体として存在することを検証するため、ヒト胃上皮由来 AGS 細胞に FLAG タグを付加した PAR1b と T7 タグを付加した PAR1b を共発現させた。抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った後、免疫沈降物および全細胞抽出液に対して抗 T7 抗体を用いてイムノブロットを行った。その結果、FLAG タグが付加された PAR1b と T7 タグが付加された PAR1b の共沈が検出された (図 5)。この実験から、PAR1 が AGS 細胞内で二量体を形成することが示唆された。

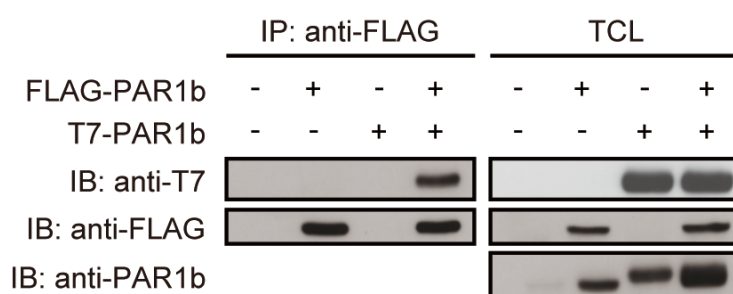


図 5. 胃上皮細胞内における PAR1b のホモ二量体化

AGS 細胞に FLAG タグを付加した PAR1b および T7 タグを付加した PAR1b 発現ベクターを導入し、細胞抽出液を用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降物 (IP) および全細胞抽出液 (Total Cell Lysate: TCL) に対して、抗 T7 抗体、抗 FLAG 抗体、抗 PAR1b 抗体を用いてイムノブロット (IB) を行った。

次に、CagA 二量体化の意義を解析するため、PAR1 を介さずに CagA を二量体化させる手法を検討した。CagA の CM 配列は EPIYA-C セグメント内および EPIYA-C または EPIYA-D セグメントの直後に位置する (図 3)。よって、欧米型 CagA は少なくとも 2 つの CM 配列を持つのに対し、東アジア型 CagA は単一の CM 配列しか持たない。このような構造上の差異を考慮に入れ、東アジア型 CagA [CagA(ABD)] が保有する単一の CM 配列を欠失させた変異体 CagA $\Delta$ CM を以降の実験に供することとした。CagA $\Delta$ CM を人為的に二量体化する手段として、ストレプトマイセス属から単離された抗生物質である coumermycin を用いることにした。coumermycin はメチルピロールで繋がれた 2 つのクマリン環を持ち [47]、ジャイレース B の N 末側サブドメインと化学量論的に 1:2 で特異的に結合する [45]。この coumermycin-ジャイレース B 相互作用はこれまでも様々なタンパク質の人為的二量体化に利用されている [48-52]。そこで、CagA $\Delta$ CM の N 末端にジャイレース B を付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM を作製し、coumermycin 添加による CagA の人為的二量体化を試みることにした (図 6)。まず初めに、C 末端に HA タグを付加した野生型 CagA、CagA $\Delta$ CM、GyrB-CagA $\Delta$ CM の哺乳動物細胞発現ベクターを作製し、ヒト胃上皮由来 AGS 細胞におけるベクター由来タンパク質の発現を調べた。AGS 細胞に野生型 CagA、

CagA $\Delta$ CM、GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターをそれぞれ導入し、17 時間後に回収した細胞の全細胞抽出液に対して抗 HA 抗体を用いてイムノブロットを行った結果、野生型 CagA あるいは CagA $\Delta$ CM 発現ベクターを導入した細胞抽出液では約 130 kDa 付近に、GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターを導入した細胞抽出液では約 155 kDa 付近に特異的な CagA バンドが検出された (図 7)。これらの分子量はアミノ酸一次配列から予想される値と概ね一致した。

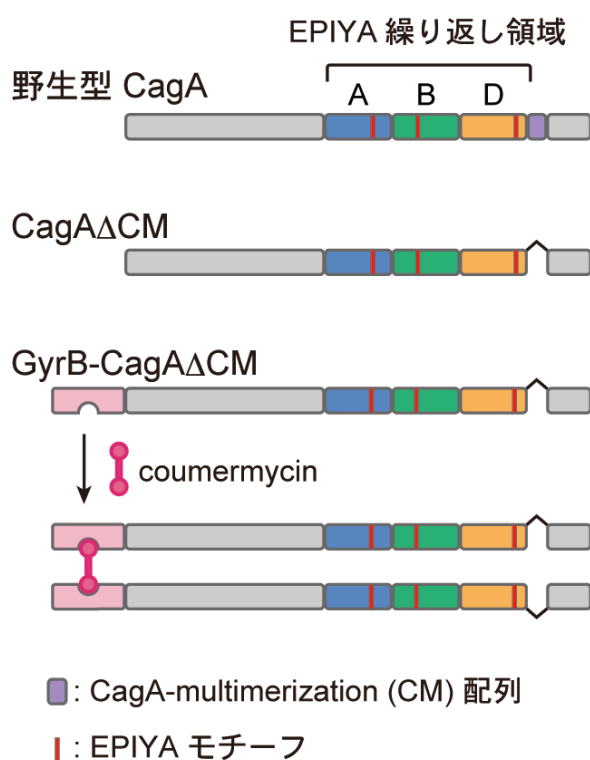


図 6. GyrB-coumermycin を用いた CagA の人為的二量体化

CagA の人為的二量体化法を模式図で示す。CM 配列を欠失した PAR1 結合能を持たない CagA 変異体 (CagA $\Delta$ CM) の N 末端に GyrB の 1-219 アミノ酸残基を融合した GyrB-CagA $\Delta$ CM を作製した。coumermycin は GyrB と 1:2 で結合するため、coumermycin の添加により GyrB-CagA $\Delta$ CM を人為的に二量体させる。



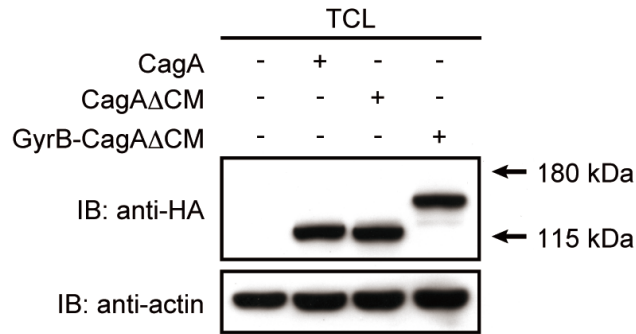


図 7. AGS 細胞における CagA の発現

AGS 細胞に HA タグを付加した野生型 CagA、CagA $\Delta$ CM、または GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターを導入した。遺伝子導入の 17 時間後に細胞を回収して溶解し、全細胞抽出液に対して抗 HA 抗体、抗 actin 抗体を用いてイムノブロットした。

## 2 CagA 変異体の細胞内局在とチロシンリン酸化

ピロリ菌体内から胃上皮細胞内に侵入した CagA は宿主細胞膜内面に局在することが知られている [19, 53]。細胞膜への CagA 局在は hummingbird 表現型の誘導に必須であり、さらに hummingbird 表現型の誘導には細胞膜近傍において CagA が Src ファミリーキナーゼまたは Abl キナーゼによりチロシンリン酸化された後、複合体形成を介して SHP2 を活性化することが不可欠である。そこで、本研究で使用する各 CagA 変異体の AGS 細胞内での局在を調べた。免疫染色の結果、CagA $\Delta$ CM、GyrB-CagA $\Delta$ CM はいずれも野生型 CagA と同様に細胞膜に局在することが明らかとなった (図 8)。また、AGS 細胞に各 CagA 変異体を発現させ、全細胞抽出液に対して抗リン酸化チロシン抗体を用いてイムノブロットを

行った結果、GyrB-CagA $\Delta$ CM は AGS 細胞内において野生型 CagA と同程度にチロシンリン酸化されることが明らかとなった (図 9)。さらに、GyrB-CagA $\Delta$ CM のチロシンリン酸化レベルは coumermycin 処理で変化しなかった (図 9)。これらの結果から、野生型 CagA および GyrB-CagA $\Delta$ CM は共に胃上皮細胞膜内面に局在し、そこでチロシンリン酸化修飾を受けることが示された。

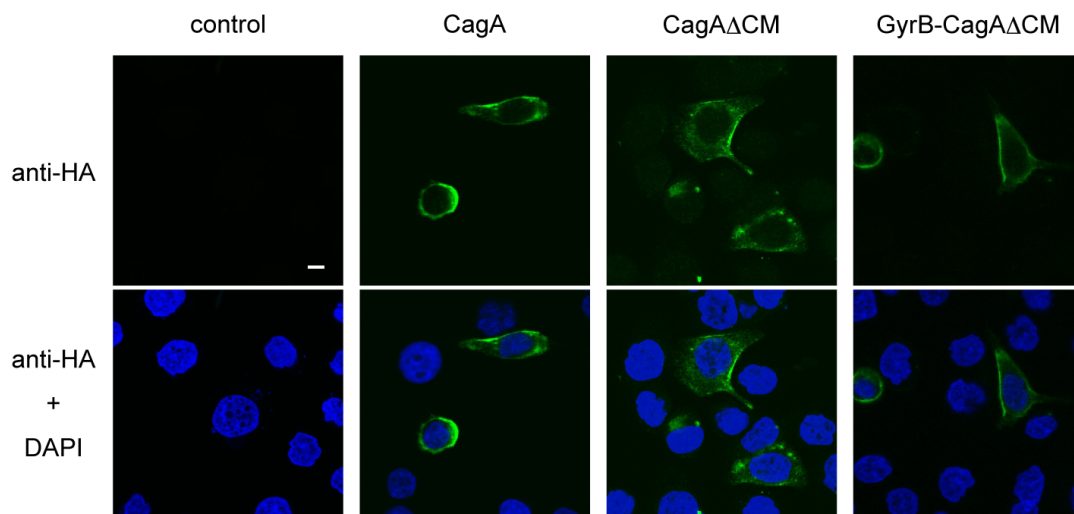
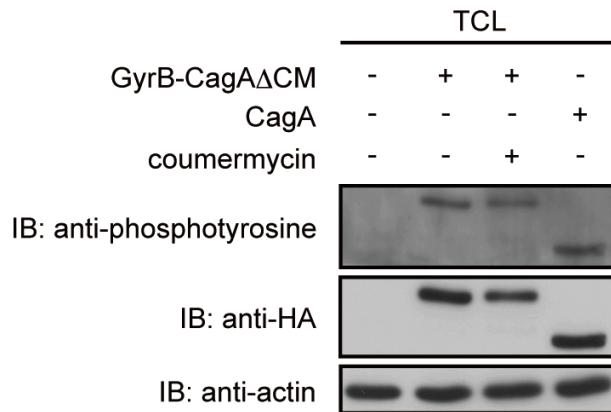


図 8. GyrB-CagA $\Delta$ CM の細胞内局在

AGS 細胞に野生型 CagA、CagA $\Delta$ CM、GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターを導入した。遺伝子導入の 17 時間後に細胞を固定し、抗 HA 抗体 (緑) を用いて免疫染色した。細胞核は DAPI (青) で染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて CagA、CagA $\Delta$ CM、GyrB-CagA $\Delta$ CM の細胞内局在を観察した。Scale bar, 10  $\mu$ m



### 図 9. CagA 変異体のチロシンリン酸化

AGS 細胞に野生型 CagA、CagA $\Delta$ CM、GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターを導入し、その 17 時間後に細胞を回収して溶解した。全細胞抽出液に対して抗リン酸化チロシン抗体、抗 HA 抗体、抗 actin 抗体を用いてイムノブロットした。

### 3 胃上皮細胞内における CagA の人為的二量体化

胃上皮細胞において GyrB-CagA $\Delta$ CM 変異体が野生型 CagA と同様に細胞膜に局在し、野生型 CagA と同等にチロシンリン酸化されたことから、次に AGS 細胞に発現させた GyrB-CagA $\Delta$ CM が coumermycin 存在下で二量体化するか否かを検討した。まず、陽性対照実験として HA タグを付加した野生型 CagA と FLAG タグを付加した野生型 CagA を AGS 細胞に共発現させ、細胞抽出液を用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降物および全細胞抽出液を SDS-PAGE で分離後、抗 HA 抗体によるイムノブロットを行った結果、FLAG タグを付加した野生型 CagA の共沈降物として HA タグが付加された野生型

CagA が検出された (図 10)。このことから、野生型 CagA は AGS 細胞内で二量体化することが推察された。次に、HA タグを付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターと FLAG タグを付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターを AGS 細胞へ共導入し、遺伝子導入の 8 時間後に最終濃度 700 nM の coumermycin を添加した。その 9 時間後に細胞を回収し、細胞抽出液を用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降実験を行った。免疫沈降物および全細胞抽出液を用いて抗 HA 抗体によるイムノブロットを行った結果、coumermycin 存在下において FLAG タグが付加された GyrB-CagA $\Delta$ CM と HA タグが付加された GyaB-CagA $\Delta$ CM との共沈が認められた。一方、coumermycin 非存在下では HA タグを付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM の共沈降は認められなかった (図 10)。以上の結果から、GyrB-CagA $\Delta$ CM 変異体は coumermycin 添加により AGS 細胞内で二量体を形成することが示唆された。

次に、人為的二量体化が CagA の SHP2 結合能に及ぼす効果を検討した。AGS 細胞に HA タグを付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM と FLAG タグを付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM を共発現させ、細胞抽出液を用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行った。その結果、coumermycin 非存在下においても非常に弱いながらも GyrB-CagA $\Delta$ CM-FLAG と SHP2 との共沈が認められた。一方、coumermycin 存

在下では FLAG タグが付加された GyrB-CagA $\Delta$ CM と共沈した SHP2 量が coumermycin 非存在下と比較して著しく増加し、これは野生型 CagA と同等量だった (図 10)。これらの結果から、CagA を強制的に二量体化することにより安定な CagA-SHP2 複合体が形成されることが明らかとなった。

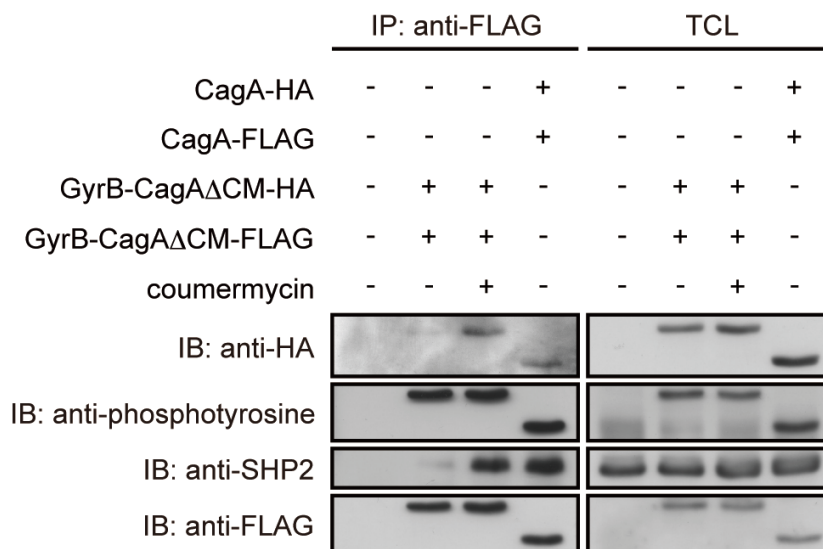


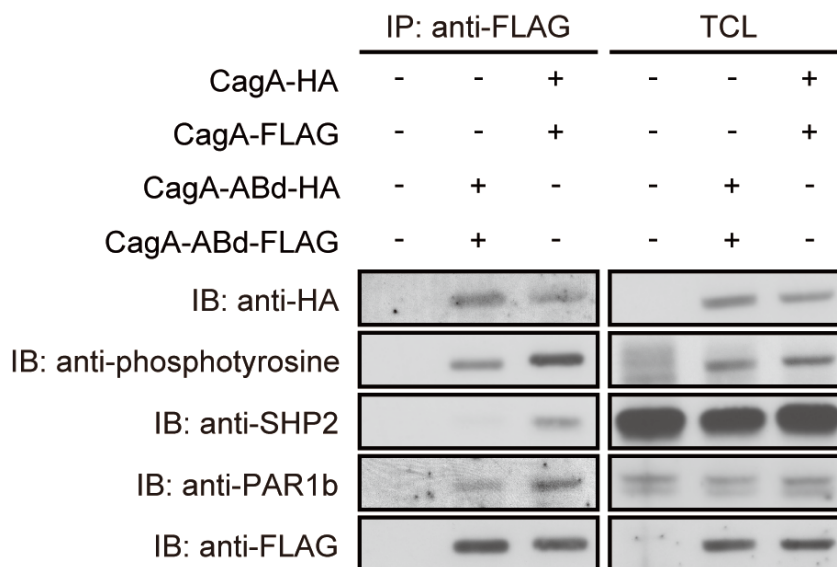
図 10. coumermycin による GyrB-CagA $\Delta$ CM の化学的二量体化

AGS 細胞に HA タグを付加した野生型 CagA および FLAG タグを付加した野生型 CagA、または HA タグを付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM および FLAG タグを付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM を共導入した。その 8 時間後に最終濃度 700 nM の coumermycin を添加し、さらに 9 時間培養した。細胞を回収して溶解した後、細胞抽出液を用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降物および全細胞抽出液に対して抗 HA 抗体、抗リン酸化チロシン抗体、抗 SHP2 抗体、抗 FLAG 抗体を用いてイムノブロットを行った。

#### 4 単量体 CagA および化学的二量体化 CagA の細胞形態変化誘導能

CagA を AGS 細胞に異所性発現させると細胞質の著しい伸長で特徴付けられる hummingbird 表現型と呼ばれる細胞形態変化を引き起こす。本研究では hummingbird 細胞を突起の長さが短径の 2 倍以上のものと定義した。hummingbird 細胞の誘導には CagA の EPIYA-C セグメントまたは EPIYA-D セグメントのチロシンリン酸化とそれに引き続く CagA-SHP2 複合体形成を介した SHP2 の脱制御が不可欠である [22]。そこでまず、CagA EPIYA-D セグメント内のチロシン残基をフェニルアラニンに置換したリン酸化抵抗性 CagA 変異体 [CagA(ABd)] を作製し、hummingbird 細胞の誘導能を解析した。CagA(ABd) 変異体は CM 配列を持ち PAR1 結合能を有するため二量体化するが、SHP2 と結合できないために hummingbird 細胞を誘導できなかった (図 11、12)。

この結果を受けて、次に CagA の hummingbird 細胞誘導能における CagA 二量体化の寄与を解析した。まず、単量体 CagA $\Delta$ CM の hummingbird 細胞誘導活性を検討したところ、野生型 CagA 発現細胞だけでなく CagA $\Delta$ CM 発現細胞においても hummingbird 細胞が誘導された。しかしながら、CagA $\Delta$ CM においては hummingbird 細胞数の割合は野生型 CagA の場合と比較して有意に低いことが示された (図 13)。



**図 11. CagA(ABd) 変異体の SHP2 結合能**

AGS 細胞に HA タグを付加した野生型 CagA および FLAG タグを付加した野生型 CagA、もしくは HA タグを付加した CagA(ABd) 変異体および FLAG タグを付加した CagA(ABd) 変異体を共導入した。遺伝子導入の 17 時間後に細胞を回収、溶解して、抗 FLAG タグによる免疫沈降を行った。免疫沈降物および全細胞抽出液に対して抗 HA 抗体、抗リン酸化チロシン抗体、抗 SHP2 抗体、抗 PAR1b 抗体、抗 FLAG 抗体を用いてイムノブロットを行った。

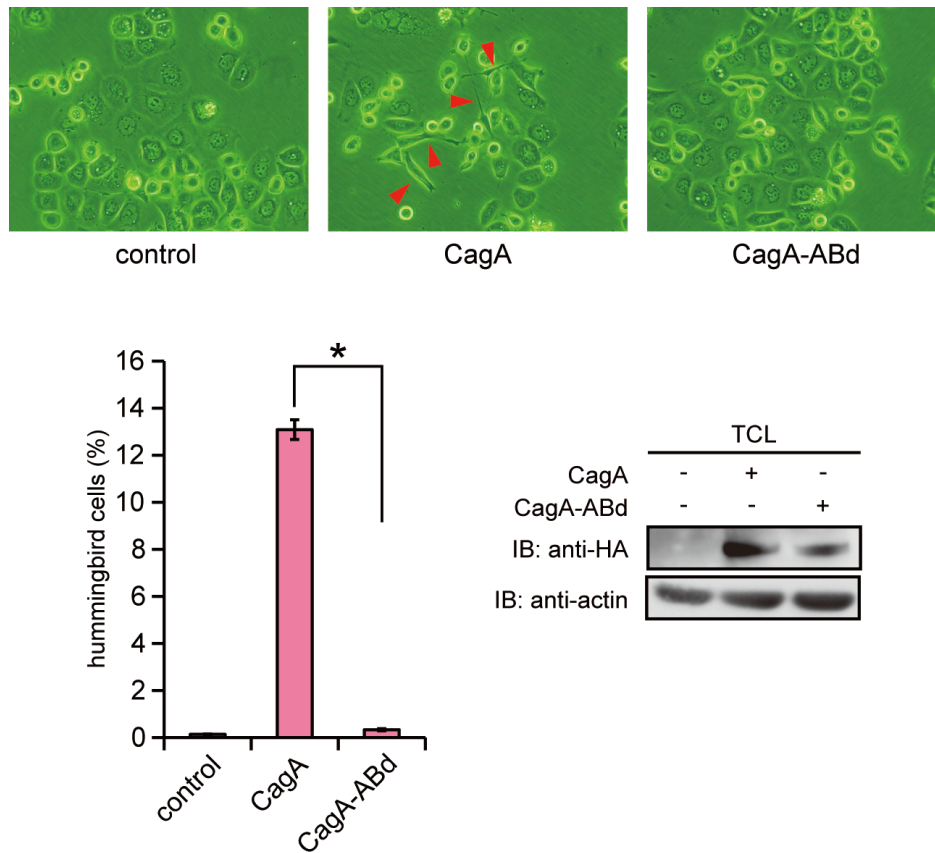


図 12. CagA(ABd) 変異体の細胞形態変化誘導能

AGS 細胞に野生型 CagA あるいは CagA(ABd) 変異体発現ベクターを導入して、その 17 時間後に光学顕微鏡下で細胞形態変化を観察した (上)。赤矢頭は CagA により hummingbird 表現型が誘導された細胞を示している。左下は総細胞数に対する CagA により誘導された hummingbird 細胞数の割合を示している。それぞれ 3 回の実験の平均を示した。Error bars,  $\pm$ S.D. (n=3), \* $p < 0.01$ , Student's *t* test. またこの時点で細胞を回収し、全細胞抽出液に対して抗 HA 抗体または抗 actin 抗体を用いてイムノブロットを行った (右下)。



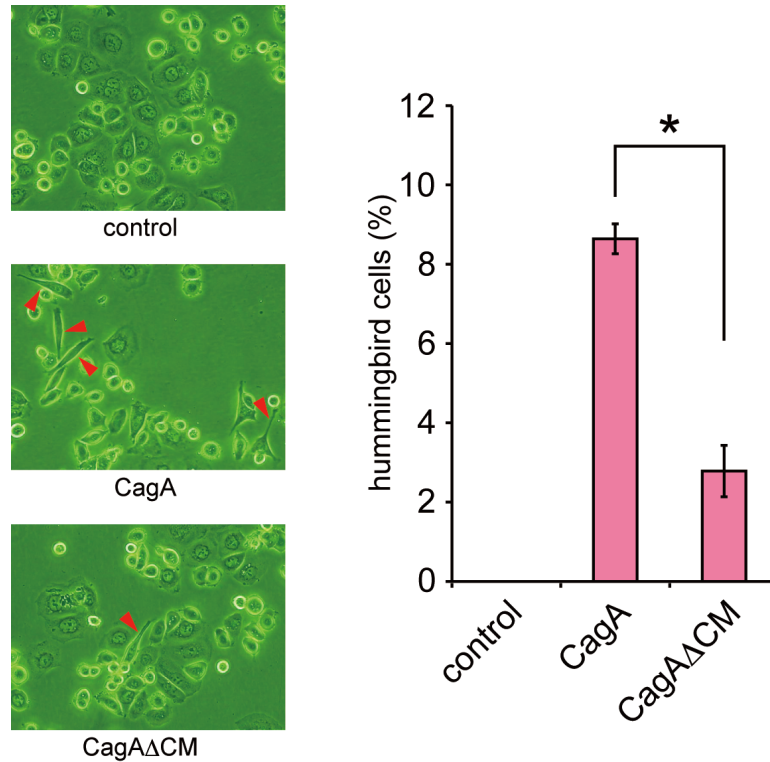


図 13. CagA $\Delta$ CM 変異体の hummingbird 表現型誘導能

AGS 細胞に野生型 CagA または CagA $\Delta$ CM 発現ベクターを導入し、その 17 時間後に光学顕微鏡にて細胞形態変化を観察した (左)。赤矢頭は CagA により誘導された hummingbird 細胞を示している。総細胞数に対する hummingbird 細胞の割合を算出した (右)。グラフは 3 回の実験結果の平均を示している。Error bars,  $\pm$ S.D. (n=3), \* $p < 0.01$ , Student's  $t$  test

同様に、coumermycin 非存在下で培養した GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現細胞においても、非常に僅かながら hummingbird 細胞の誘導が観察された (図 14)。これらの結果は、免疫沈降実験において coumermycin 非存在下でも微量ながら GyrB-CagA $\Delta$ CM が SHP2 と結合していたという事実と一致する所見である (図 10)。これらの所見は、CagA $\Delta$ CM が高親和性の SHP2 結合部位である EPIYA-D

セグメントを保有するために SHP2 の N-SH2 あるいは C-SH2 のどちらか一方と結合して不安定ながら CagA-SHP2 複合体を形成し、その結果として、低頻度ながら hummingbird 細胞を誘導しうることを示唆している。次に、CagA を二量体化して CagA の hummingbird 細胞誘導能を解析した。GyrB-CagA $\Delta$ CM を AGS 細胞に発現させ、coumermycin を添加して細胞形態変化を観察した。coumermycin 非添加時と比較して、coumermycin 添加により hummingbird 細胞数は有意に増加した (図 14)。

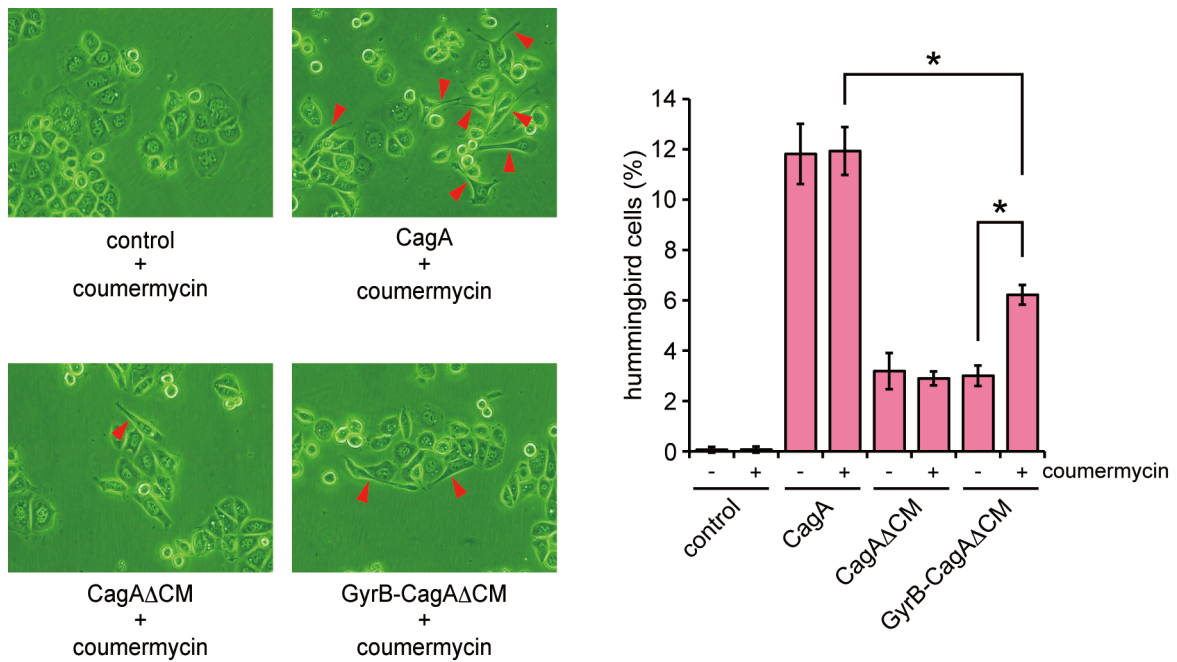


図 14. CagA の人為的二量体化が細胞形態変化に及ぼす効果

AGS 細胞に野生型 CagA、CagAΔCM、または GyrB-CagAΔCM 発現ベクターを導入した。遺伝子導入の 8 時間後に coumermycin を最終濃度 700 nM となるように添加した。その 9 時間後、光学顕微鏡下で細胞形態変化を観察した (左)。赤矢頭は hummingbird 細胞を示している。総細胞数に対する hummingbird 表現型を示す細胞数の割合を算出し、3 回の実験結果の平均をグラフ化した (右)。Error bars,  $\pm$ S.D. (n=3), \*p < 0.01, Student's *t* test

hummingbird 細胞において、CagA は細胞膜内面に広く分布するが、伸長した細胞突起の先端には存在しないことが知られている。対照的に、細胞接着斑キナーゼ FAK は CagA により脱制御された SHP2 から逃れて細胞突出末端に集積する [29]。そこで CagAΔCM を発現させた AGS 細胞における活性化 FAK の局在を調べた。抗 FAK Y576 リン酸化特異的抗体を用いて免疫染色を行った結果、

hummingbird 細胞の伸長突端に活性化 FAK の集積が認められた。

GyrB-CagA $\Delta$ CM においても同様の解析を行ったところ、coumermycin の有無によらず細胞の伸長末端に活性化 FAK が集積していた (図 15)。このことから、二量体化非依存的に CagA は FAK を不活化することが明らかとなった。

人為的に二量体化させた CagA による hummingbird 細胞の発現頻度が野生型 CagA の場合に比較して依然低頻度であったことから (図 14)、野生型 CagA と人為的二量体化 CagA により誘導された hummingbird 細胞の質的な差異を検討した。AGS 細胞に野生型 CagA あるいは GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターと EGFP 発現ベクターをモル比 10:1 で共導入し、coumermycin 存在下または非存在下で培養を行った。hummingbird 細胞の定性的解析のため、EGFP 陽性細胞の長径を ImageJ software を用いて自動計測した (図 16)。解析の結果、化学的に二量体化した GyrB-CagA $\Delta$ CM の長径は野生型 CagA の長径に比較して有意に短いことが明らかとなった。

以上の結果から、十分に伸長した hummingbird 細胞の誘導には CagA の二量体化による SHP2 の機能的脱制御のみでは不十分であることが示唆された。

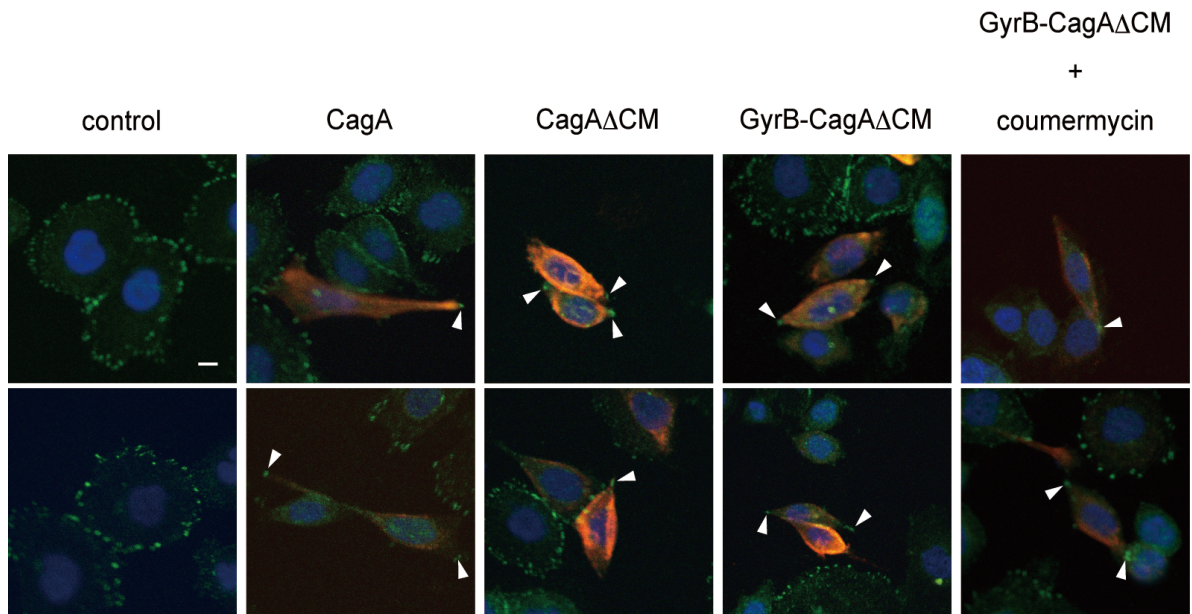


図 15. 人為的二量体化 CagA による活性化型 FAK の細胞内局在変化

AGS 細胞に野生型 CagA、CagA $\Delta$ CM、あるいは GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターを導入し、その 8 時間後に最終濃度 700 nM になるように coumermycin を加えた。さらに 9 時間培養した後、細胞を固定して抗 FAK Y576 リン酸化特異的抗体（緑）、抗 HA 抗体（赤）を用いて免疫染色を行った。細胞核は DAPI（青）で染色した。白矢頭は細胞の伸長突端に集積した活性化 FAK を示している。 Scale bar, 10  $\mu$ m

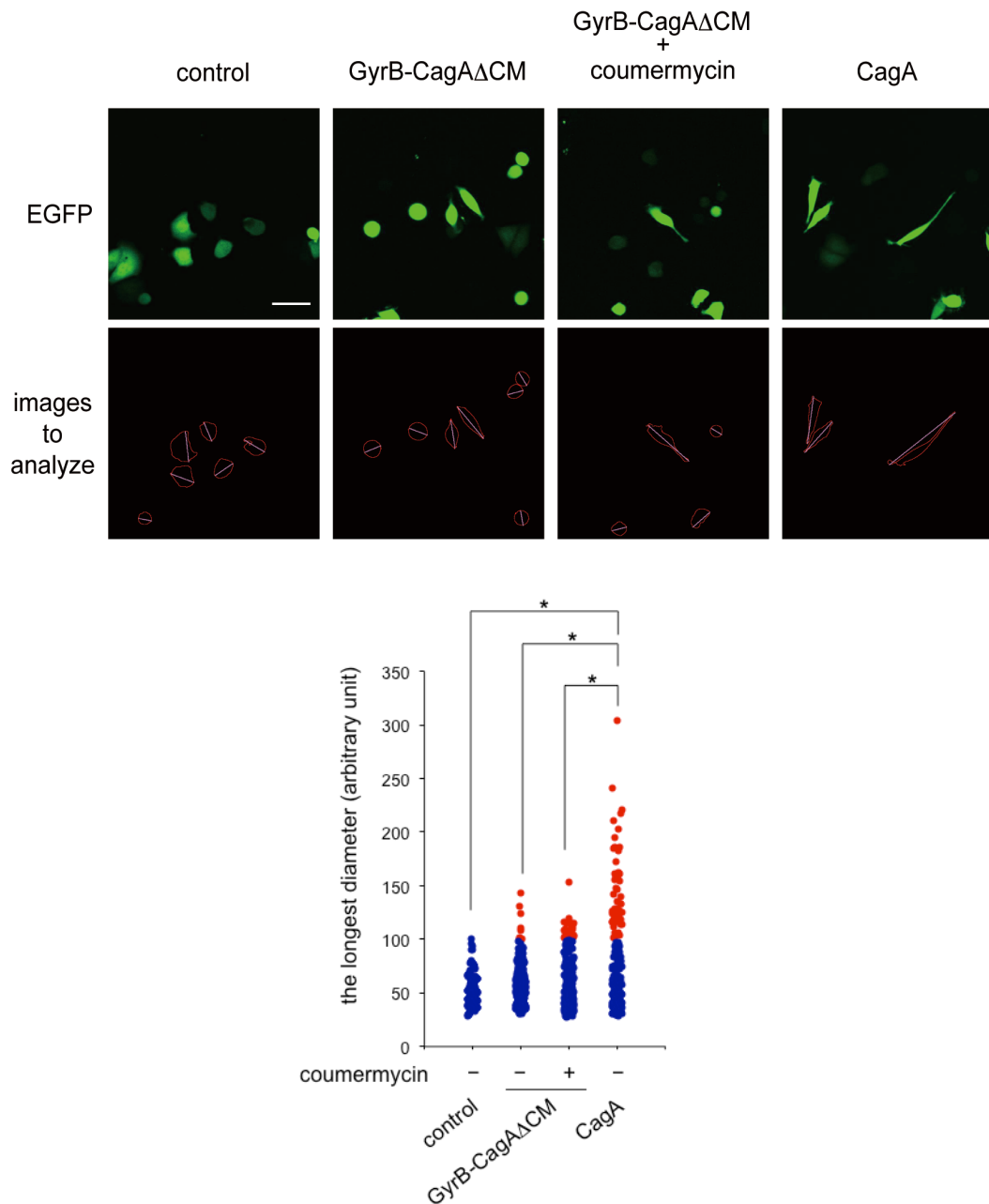


図 16. 人為的二量体化 CagA により誘導された hummingbird 細胞の質的解析

AGS 細胞に野生型 CagA または GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターと EGFP 発現ベクターをモル比 10 : 1 で共導入し、遺伝子導入の 8 時間後に coumermycin を最終濃度 700 nM となるように添加した。その 9 時間後に共焦点レーザー顕微鏡下で細胞形態を観察した (上、上段、Scale bar, 100  $\mu$ m)。ImageJ software を用いて細胞の最長径を測定した (上、下段)。各種 CagA を発現した細胞の最長径をドットで示した (下)。赤いドットはコントロール細胞の最長径よりも長いものを示す。

Error bars,  $\pm$ S.D. (n=200), \*p < 0.01, Mann-Whitney *U* test

## 5 CagA による細胞形態変化誘導における PAR1 抑制の相乗効果

野生型 CagA により誘導された hummingbird 細胞に比べ、人為的に二量体化した GyrB-CagA $\Delta$ CM により誘導された hummingbird 細胞は伸長度が不十分であった。CM 配列は CagA の二量体化にだけでなく PAR1 のキナーゼ活性抑制にも関与していることから、細胞がより伸長した hummingbird 細胞の誘導には SHP2 の脱制御に加えて CM 配列を介した PAR1 のキナーゼ活性抑制もまた必要である可能性が考えられた。この可能性を検証するため、AGS 細胞で主要な PAR1 アイソフォームである PAR1b を siRNA でノックダウンした細胞 (図 17) を用い、CagA の人為的二量体化が細胞形態変化誘導能に及ぼす効果を解析した。PAR1b をノックダウンした AGS 細胞に野生型 CagA または GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターと EGFP 発現ベクターを共導入した後、coumermycin の有無による細胞の形態変化を観察した (図 18)。細胞の長径を計測した結果、人為的に二量体化した GyrB-CagA $\Delta$ CM は PAR1b の発現を同時に抑制することで野生型 CagA と同程度の著しく伸長した細胞突起を持つ hummingbird 細胞を誘導することができた (図 18)。

次に逆の実験として、PAR1b を過剰発現させた AGS 細胞における CagA 依存的な細胞形態変化を観察した。その結果、PAR1b を過剰発現させた AGS 細胞

は PAR1 非発現細胞に比べてわずかに丸みを帯びた細胞形態を示した (図 19)。

この PAR1 過剰発現細胞に野生型 CagA または CagA $\Delta$ CM をさらに異所性発現させたところ、CagA による hummingbird 細胞の誘導が強く抑制された (図 20)。

以上の実験結果から、CagA による hummingbird 細胞の誘導には CM 配列が保有する 2 つの独立した機能、すなわち CagA の二量体化による SHP2 の機能的脱制御と PAR1 のキナーゼ活性抑制、が共に必要であることが示された。

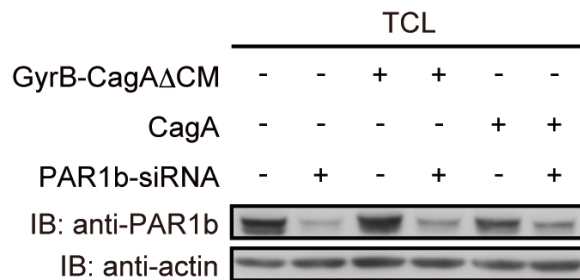


図 17. 特異的 siRNA による PAR1b のノックダウン

AGS 細胞に PAR1b 特異的 siRNA を導入し、その 24 時間後に野生型 CagA または GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現ベクターを導入した。遺伝子導入の 17 時間後に細胞を回収して溶解し、全細胞抽出液に対して抗 PAR1b 抗体または抗 actin 抗体を用いてイムノブロットを行った。



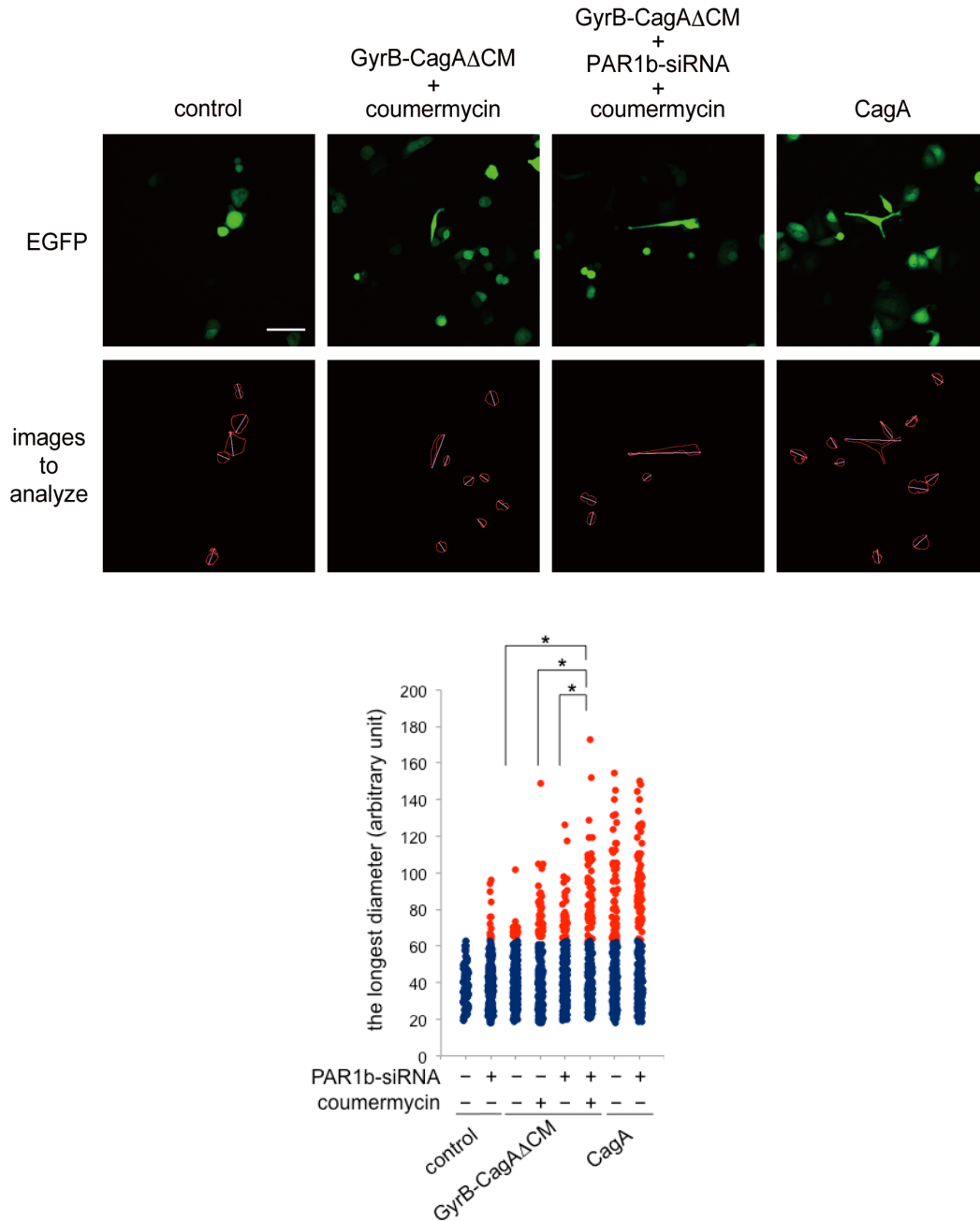


図 18. 人為的二量体化 **CagA** の細胞形態変化誘導能に及ぼす **PAR1** ノックダウンの効果

AGS 細胞に PAR1b 特異的 siRNA を導入し、その 24 時間後に野生型 CagA または GyrB-CagAΔCM 発現ベクターと EGFP 発現ベクターを共導入した。遺伝子導入の 8 時間後に最終濃度 700 nM の coumermycin を加え、さらに 9 時間培養した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞形態変化を観察した (上、上段、Scale bar, 100 μm)。ImageJ software を用いて細胞の最長径を測定した (上、下段)。細胞の最長径をドットで示した (下)。赤いドットはコントロール細胞の最長径よりも長いものを示す。 Error bars, ±S.D. (n=200), \*p < 0.01, Mann-Whitney *U* test

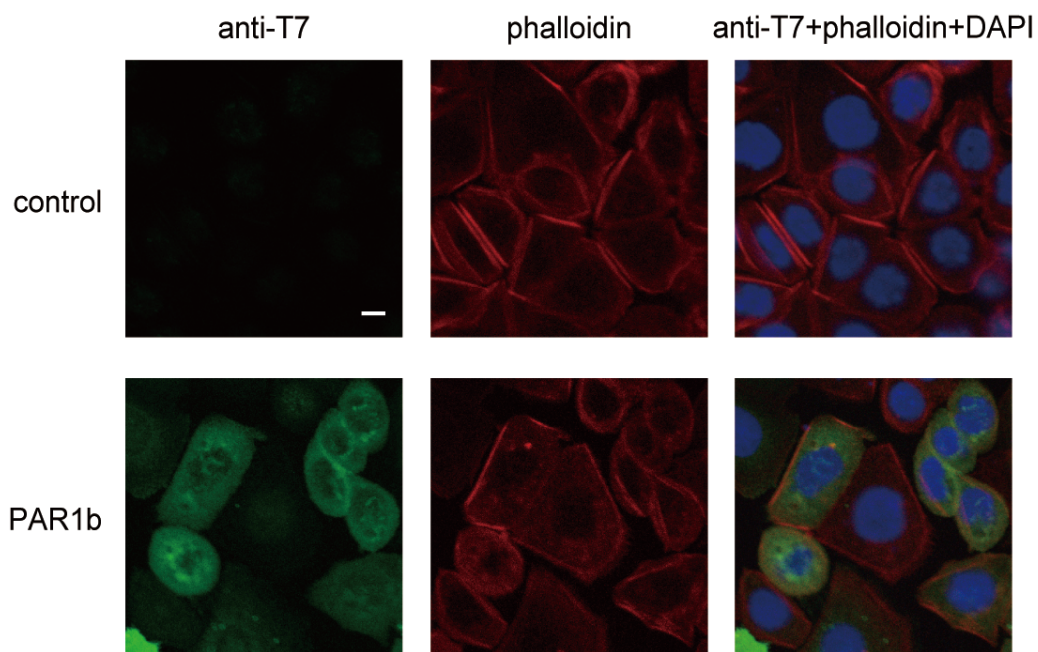


図 19. PAR1b 過剰発現による細胞形態変化

AGS 細胞に PAR1b 発現ベクターを導入し、17 時間後に細胞を固定した。抗 T7 抗体 (緑) を用いて免疫染色した。細胞核は DAPI (青)、F-actin は phalloidin (赤) で染色した。 Scale bar, 10  $\mu$ m

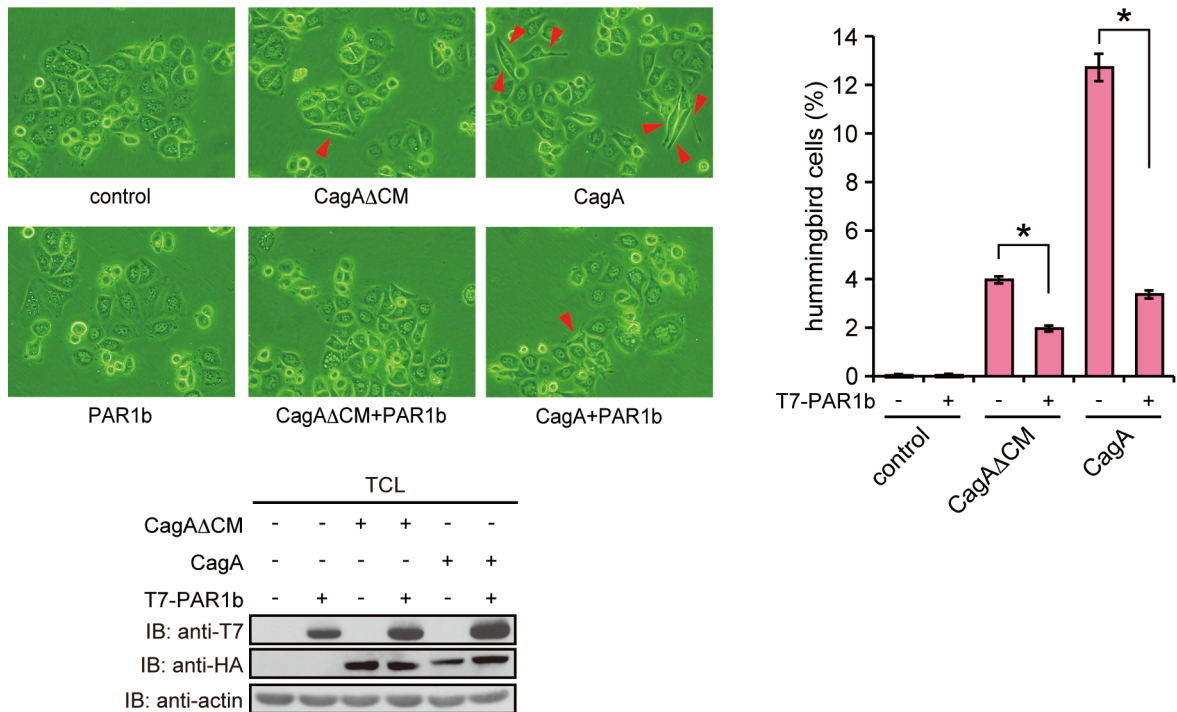


図 20. PAR1b 過剰発現が CagA の hummingbird 表現型誘導能に及ぼす効果

AGS 細胞に野生型 CagA あるいは CagA $\Delta$ CM 発現ベクターと PAR1b 発現ベクターを共導入し、その 8 時間後に coumermycin を最終濃度 700 nM になるように添加した。さらに 9 時間培養した後、光学顕微鏡下で細胞形態変化を観察した (左上)。赤矢頭は hummingbird 細胞を示している。総細胞数に対する hummingbird 細胞数の割合を算出した (右)。グラフは 3 回の平均値を示している。Error bars,  $\pm$ S.D. (n=3), \*p < 0.01, Student's *t* test この時点で細胞を回収して溶解し、全細胞抽出液に対して抗 T7 抗体、抗 HA 抗体、抗 actin 抗体を用いて免疫ブロットを行った (左下)。

## 6 胃上皮細胞内での CagA-SHP2 複合体形成における EPIYA-C セグメント数の影響

上述の研究成果から、SHP2 結合部位である EPIYA-D セグメントを単一に保有する東アジア型 CagA は二量体化することにより SHP2 結合能が増強することが明らかにされた。これは二量体化した CagA の EPIYA-D セグメントが単一の SHP2 分子上に存在する N-SH2 ドメインならびに C-SH2 ドメインとそれぞれ結合することで、安定した CagA-SHP2 複合体が形成されたことに起因すると考えられる。一方、CagA の SHP2 結合能は EPIYA-C あるいは EPIYA-D セグメント数が増加するに伴い増強することが明らかとなっている [28, 33]。このことから SHP2 結合領域を複数持つ CagA は単独で SHP2 の 2 つの SH2 ドメインに結合でき、その結果 CagA と SHP2 が互いに 1 分子で複合体を形成できるのではないかと推察される。欧米型 CagA においては多様な EPIYA-C セグメント数の CagA が単離されており、これまでの臨床単離株では最大で EPIYA-C セグメントを 5 個持つ CagA が発見されている [31, 33]。そこで、欧米型 CagA の EPIYA-C セグメントを自然界には存在しない 8 個まで増加した一連の CagA 変異体 [CagA(C1)、CagA(C2)、CagA(C3)、CagA(C5)、CagA(C8)] を作製し(図 21)、CagA の SHP2 結合能に及ぼす EPIYA-C セグメント数の影響の定量的な解析を

試みた。

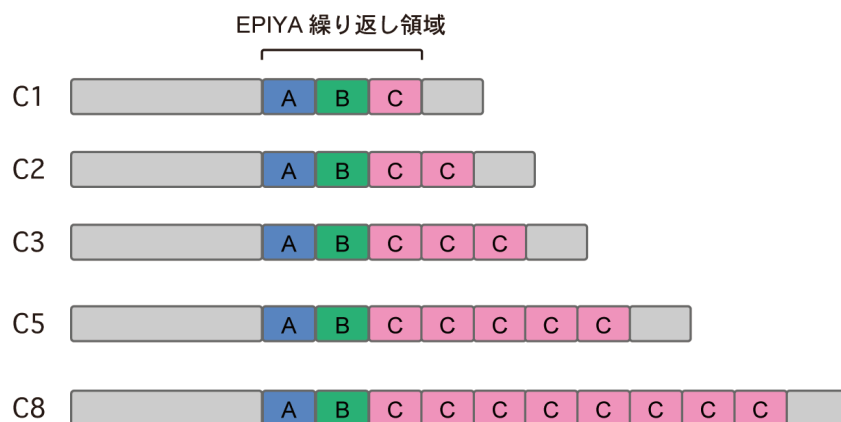


図 21. EPIYA-C セグメント数を増加した CagA 変異体の模式図

本研究で使用した EPIYA-C セグメントを増加させた一連の CagA 変異体の構造を模式図で示した。全ての変異体が各 1 個の EPIYA-A セグメント（青）と EPIYA-B セグメント（緑）を持ち、EPIYA-C セグメント（桃）は繰り返しで最大 8 個まで持つ。それぞれを EPIYA-C セグメント数に応じて C1、C2、C3、C5、C8 と表記する。

まず初めに、C 末端に HA タグを付加した各 CagA 変異体を AGS 細胞に発現させ、細胞抽出液を用いて抗 HA 抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降物および全細胞抽出液に対して抗 SHP2 抗体によるイムノブロット解析を行った結果、EPIYA-C セグメントを 1 つだけ持つ通常の CagA と比較して、EPIYA-C セグメントを複数有する CagA に対する SHP2 の共沈量は飛躍的に増加した（図 22）。このことから、CagA の EPIYA-C セグメント数と SHP2 結合量の関係は単純な線形相関ではない可能性が示唆された。

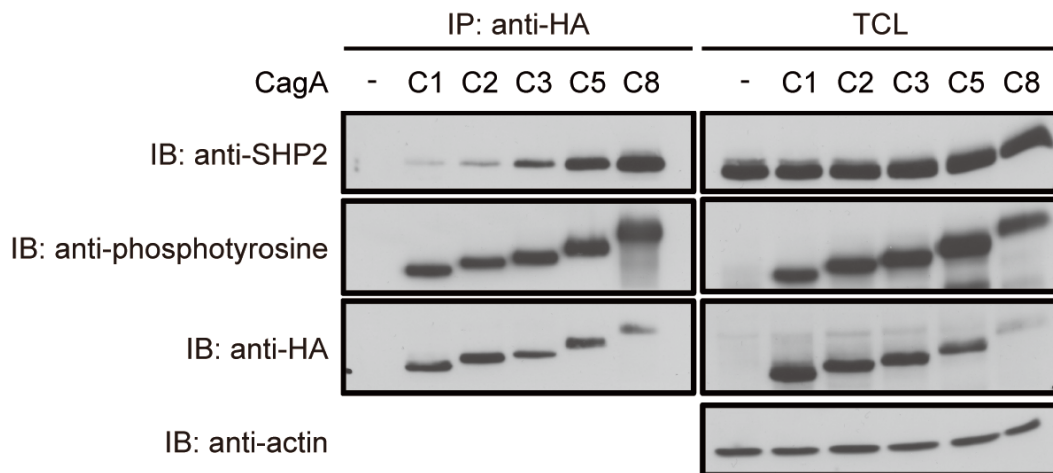


図 22. 胃上皮細胞内における EPIYA-C セグメント数と CagA の SHP2 結合能

AGS 細胞に C 末端に HA タグを付加した一連の CagA 変異体発現ベクターを導入し、遺伝子導入の 24 時間後に細胞を回収した。細胞を溶解後、細胞抽出液を用いて抗 HA 抗体による免疫沈降を行った。免疫沈降物および全細胞抽出液に対して抗 SHP2 抗体、抗リン酸化チロシン抗体、抗 HA 抗体、抗 actin 抗体を用いてイムノブロットを行った。

## 7 EPIYA-C セグメントの繰り返し数と CagA の細胞形態変化誘導能

既に述べたように、SHP2 結合部位を一つしか持たない CagA は、PAR1 を介した二量体を形成することで SHP2 と安定した複合体を形成し、その結果として AGS 細胞における hummingbird 細胞を誘導することができる。一方、免疫沈降実験の結果から、EPIYA-C セグメント数の増加は SHP2 結合能を著しく増強したことから、EPIYA-C セグメント数と hummingbird 細胞誘導活性の間にも正

の連関が存在することが予測された。これを検証するため、EPIYA-C セグメント数を増加させた一連の CagA 変異体発現ベクターを AGS 細胞に導入して、遺伝子導入 17 時間後における全細胞数に対する hummingbird 細胞数の割合を算出した。その結果、CagA(C1) から CagA(C5) においては EPIYA-C セグメント数の増加に伴い hummingbird 細胞数の割合は有意に増加することが明らかとなった (図 23)。CagA(C5) と CagA(C8) の間には有意差は認められなかったが、AGS 細胞における CagA の発現量は EPIYA-C セグメントが増加するに従い減少することから (図 23)、EPIYA-C セグメントの増加による hummingbird 細胞誘導活性の増強は算出された hummingbird 細胞数の存在比以上に大きな差異であると考えられる。また、細胞運動が激しく誘導された場合、細胞突出末端の細胞接着斑が剥離して細胞が丸くなることが細胞運動の経時観察により明らかとなった (図 24)。

CagA を発現させた AGS 細胞において全細胞数に占める球状細胞数の割合を算出したところ、EPIYA-C セグメントの増加により球状細胞が有意に増加した (図 25)。

CagA の病原性および発がん性へ及ぼす EPIYA-C セグメント数の影響をさらに解析するため、各 CagA 変異体発現細胞のコラーゲンゲル浸潤能を解析した。その結果、EPIYA-C セグメント数の増加により発現細胞数およびタンパク質の発

現量が大きく減少するにも関わらず、CagA(C1) から CagA(C5) においては EPIYA-C セグメント数の増加により、コラーゲンゲル内部へより深く浸潤する傾向が認められた (図 26)。CagA(C8) においては大きく浸潤する細胞が少数認められたものの、全体的な浸潤能の増強は認められなかった。しかし、CagA(C8) は発現細胞数が著しく少なく、また発現量も極めて少ないことを考慮すると、CagA(C8) においては僅かながら存在する CagA 発現細胞が大きく浸潤した細胞として観察されたのではないかと推察される。これらの結果から、EPIYA-C セグメント数の増加は CagA によるコラーゲンゲル浸潤能の増強に重要な役割を担う可能性が示唆された。

以上の結果から、細胞形態変化およびコラーゲンゲル浸潤能を指標とした CagA 分子種間の相対的な病原生物活性の強さを決定する上で EPIYA-C セグメントの数が重要な意義を有することが示唆された。



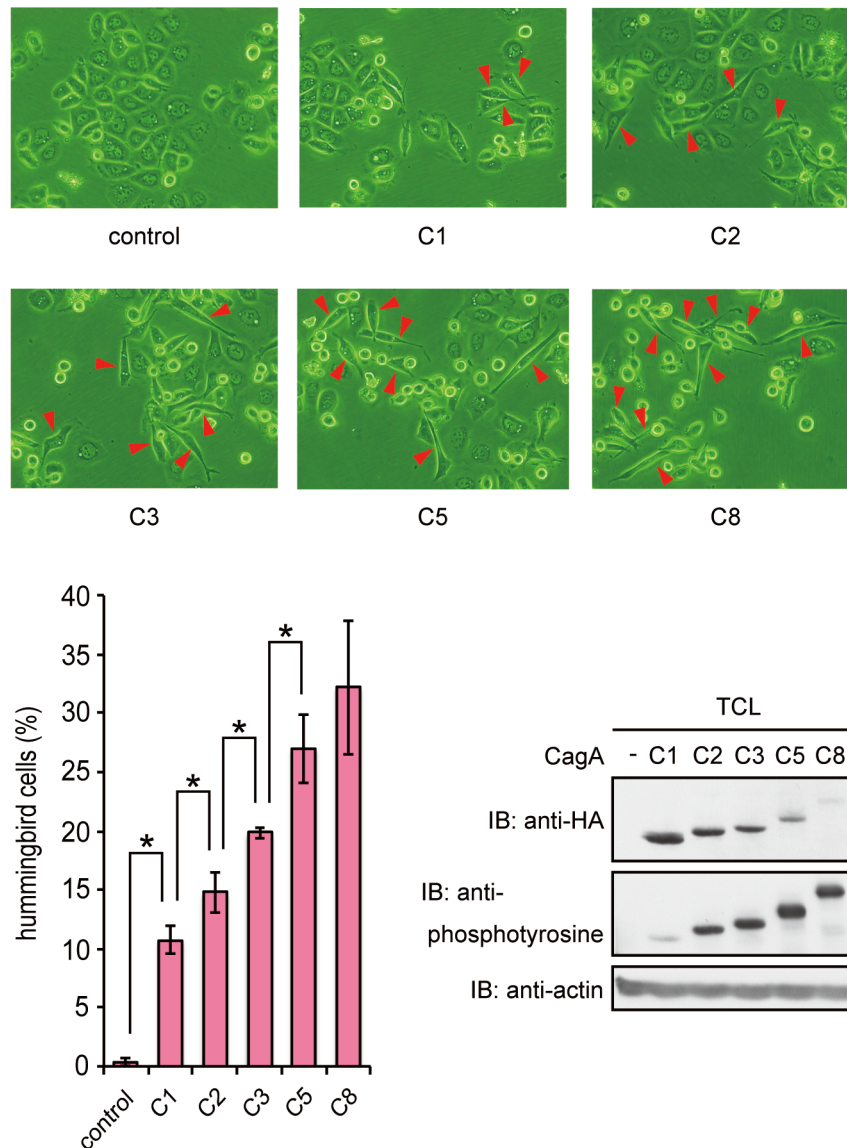


図 23. EPIYA-C セグメント数と CagA の細胞形態変化誘導能の関係

AGS 細胞に一連の CagA 変異体発現ベクターを導入し、その 17 時間後に光学顕微鏡下で細胞形態変化を観察した (上)。赤矢頭は hummingbird 細胞を示す。総細胞数に対する hummingbird 細胞数の割合を算出し、それぞれ 3 回の実験結果の平均値をグラフに示した (左下)。Error bars,  $\pm$ S.D. (n=3), \*p < 0.05, Student's *t* test この時点で細胞を回収して溶解し、全細胞抽出液に対して抗 HA 抗体、抗リン酸化チロシン抗体、抗 actin 抗体を用いてイムノブロットを行った (右下)。

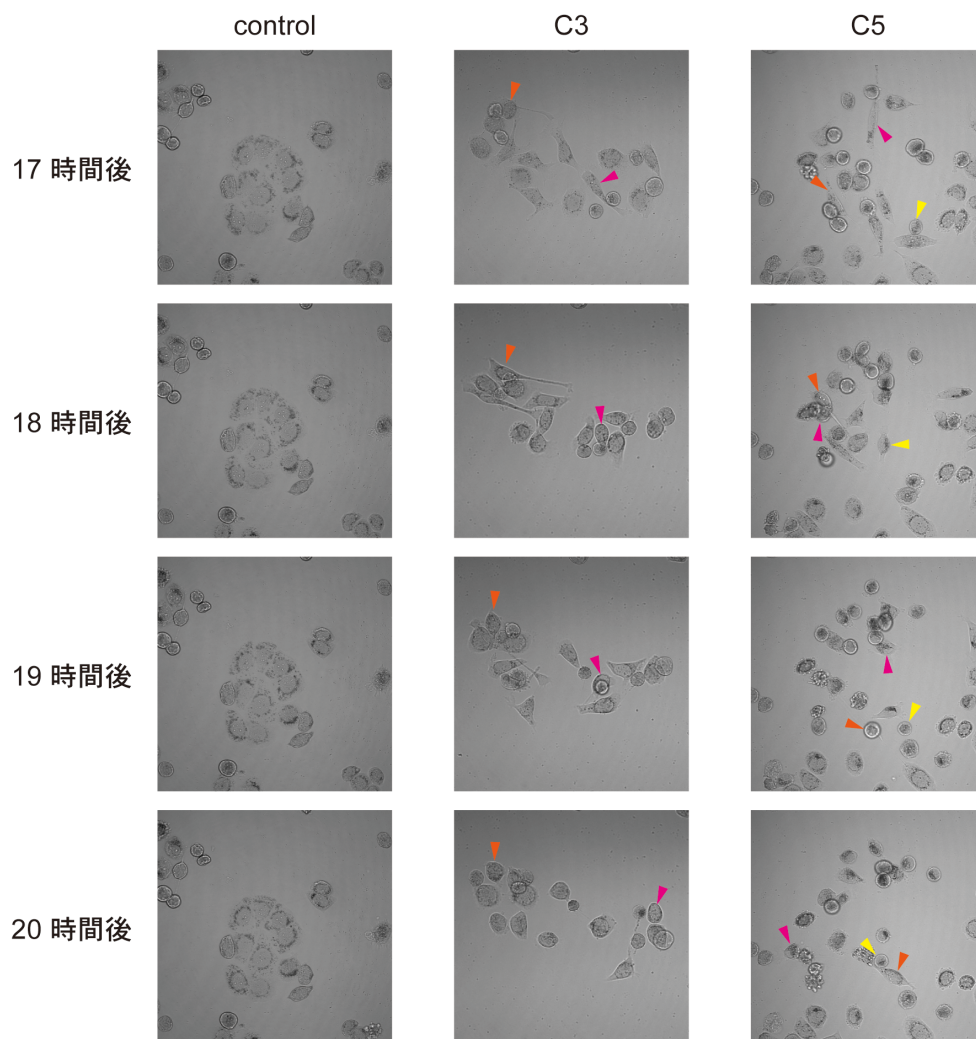


図 24. CagA による細胞形態変化の経時観察

AGS 細胞に CagA(C3) または CagA(C5) 発現ベクターを導入し、その 17 時間後を開始点として細胞形態変化を経時的に観察した。微分干渉像を 2 分間隔で 3 時間撮影した。細胞運動能の亢進により球状となった細胞を矢頭で示した。同色の矢頭は同一の細胞を示している。

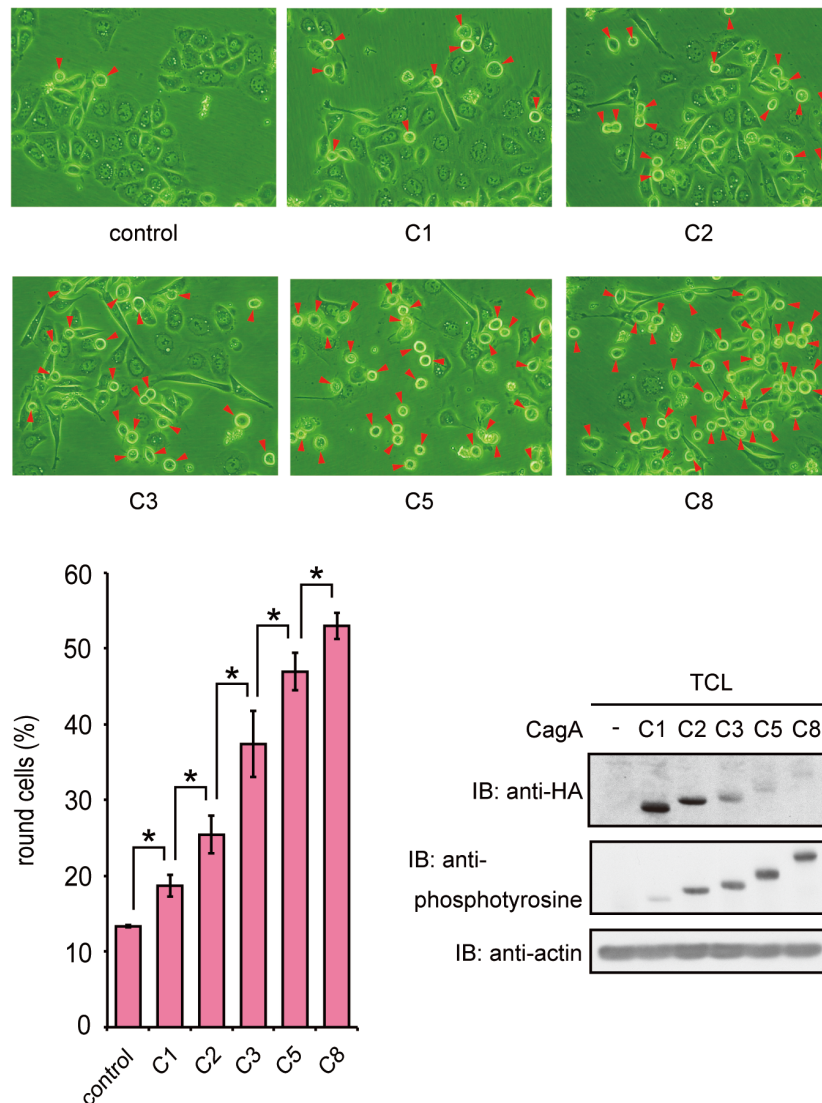


図 25. CagA による細胞運動能亢進への EPIYA-C セグメント数の関与  
 AGS 細胞に一連の CagA 変異体発現ベクターを導入し、その 17 時間後に光学顕微鏡下で細胞形態変化を観察した (上)。赤矢頭は球状細胞を示している。総細胞数に対する球状細胞数の割合を算出し、それぞれ 3 回の実験結果の平均値をグラフに示した (左下)。 Error bars,  $\pm$ S.D. (n=3), \* $p < 0.05$ , Student's *t* test この時点で細胞を回収して溶解し、全細胞抽出液に対して抗 HA 抗体、抗リン酸化チロシン抗体、抗 actin 抗体を用いてイムノブロットを行った (右下)。

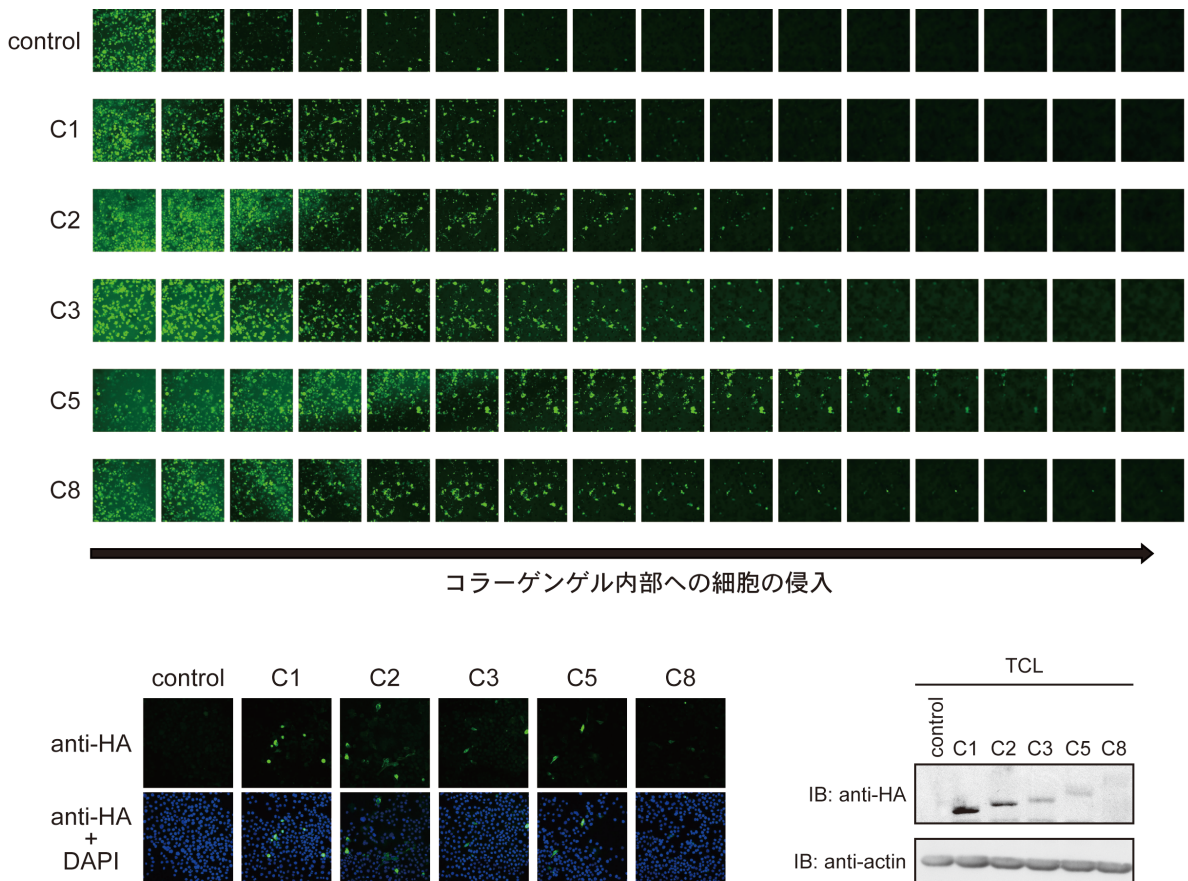


図 26. CagA 発現細胞のコラーゲンゲル浸潤能

8  $\mu\text{m}$  ポアサイズのセルカルチャーインサートに Cellmatrix Type I-A (新田ゼラチン株式会社) 溶液を添加し、37  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間静置してコラーゲンをゲル化させた。AGS 細胞に一連の CagA 発現ベクターを導入し、その 4 時間後に細胞をトリプシン処理して懸濁し、コラーゲンゲルを添加したセルカルチャーインサートの底面に再播種した。細胞を播種した 4 時間後にセルカルチャーインサート下部のウェルに血清を含まない培地を添加し、コラーゲンゲル上部に 10% 血清、30 nM EGF を含む培地を添加した。5 日間培養した後、Calcein-AM 溶液で細胞を染色した。共焦点レーザー顕微鏡にてセルカルチャーインサート底面より 5  $\mu\text{m}$  間隔でコラーゲンゲル内部に侵入した細胞を観察した (上)。セルカルチャーインサート底面への再播種時に同時に細胞を播種し、その 24 時間後に細胞を固定または回収した。固定した細胞を抗 HA 抗体で免疫染色した (左下)。核は DAPI で染色した。一方、回収した細胞は溶解し、全細胞抽出液に対して抗 HA 抗体、抗 actin 抗体を用いてイムノブロットを行った (右下)。

## 8 組換え CagA タンパク質のチロシンリン酸化

胃上皮細胞内での発現実験において CagA の EPIYA-C セグメント数の増加が CagA の SHP2 結合能を増強することが明らかとなったことから、CagA-SHP2 複合体形成における EPIYA-C セグメント数の影響をより定量的に解析することを目指した。この定量的解析を進めるため、組換え CagA タンパク質と組換え SHP2 タンパク質を用いた表面プラズモン共鳴法による親和性解析を行うこととした。CagA と SHP2 との結合には CagA のチロシンリン酸化が必要である。そこでまず、組換え CagA タンパク質のチロシンリン酸化とその精製を試みた。当研究室では既に組換え CagA タンパク質の大量発現系の構築および高純度精製に成功しており、その手法を応用することとした [18]。まず、アンピシリン耐性遺伝子を選択マーカーとして持つ pGEX6P2 ベクターに、N 末端に GST タグ、C 末端に 6xHis タグを付加した GST-CagA-His 融合タンパク質をコードする遺伝子を挿入し、CagA のチロシンリン酸化酵素である Src キナーゼをコードする遺伝子を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 pACYC ベクターに挿入した。この 2 つの大腸菌発現ベクターで大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換してアンピシリンおよびクロラムフェニコールを含む培地中で培養することで、大腸菌体内で GST-CagA-His 融合タンパク質をチロシンリン酸化させた (図

27)。次に、Ni イオンと 6xHis タグの親和性を利用したアフィニティー精製を行い、続いてグルタチオンセファロースビーズに GST タグを吸着させた。

PreScission protease により GST タグを切断し、組換え CagA-His タンパク質を得た。これを SDS-PAGE で展開後、CBB 染色および抗チロシンリン酸化抗体を用いてイムノブロットした。その結果、チロシンリン酸化された一連の組換え CagA-His タンパク質が高純度に精製されていることが示された (図 27)。



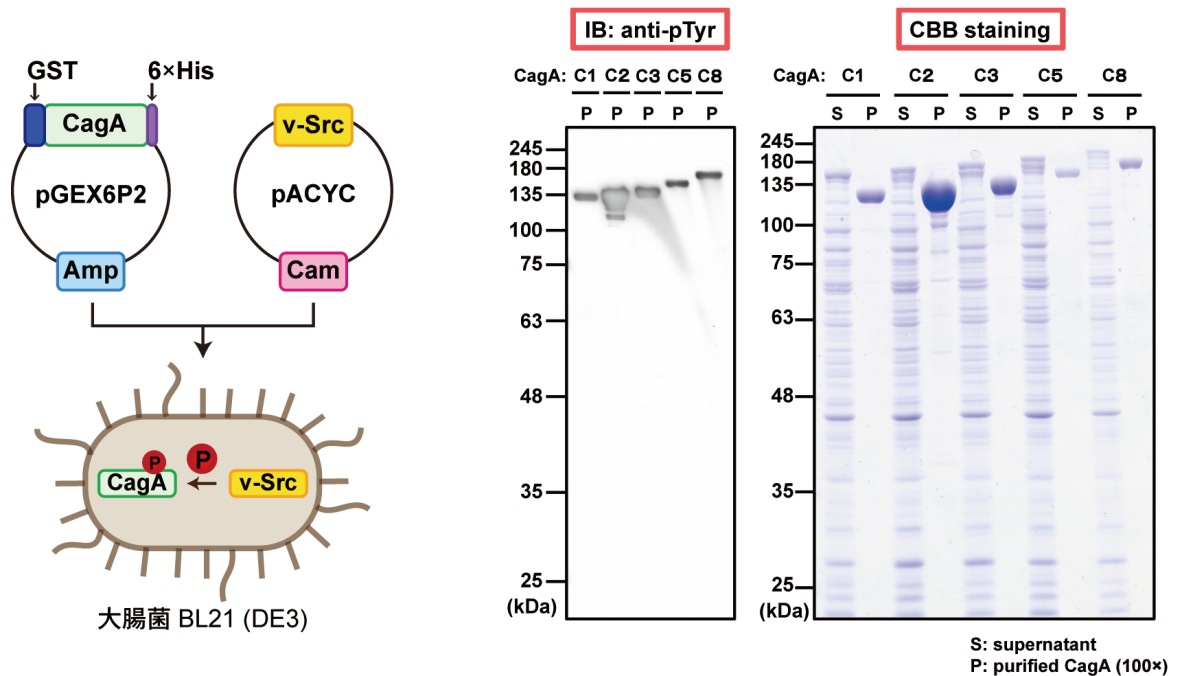


図 27. 組換えチロシンリン酸化 CagA の発現と精製

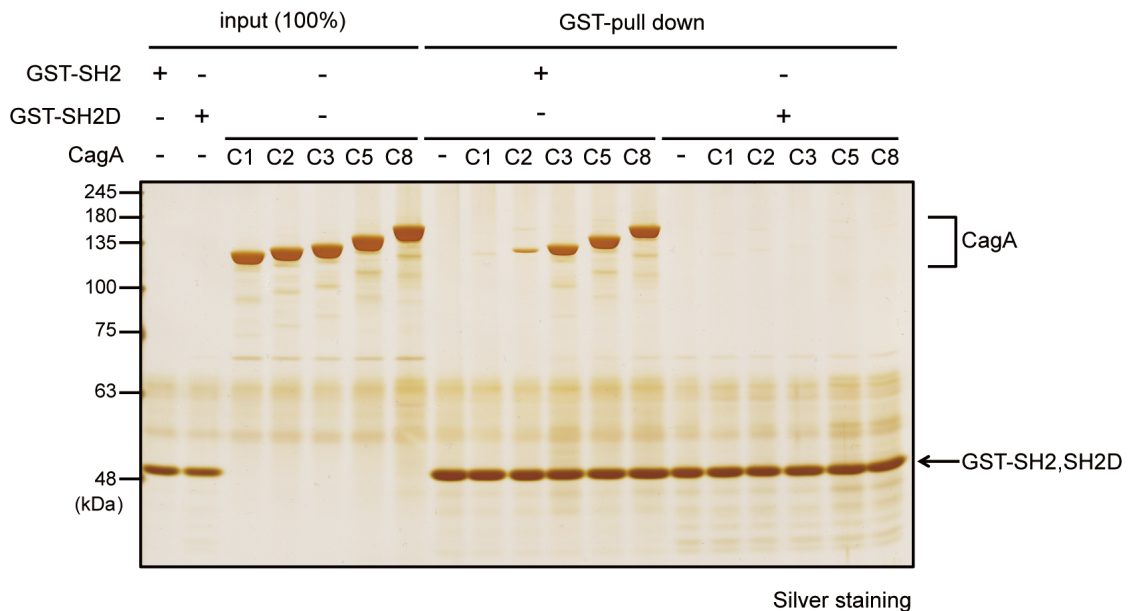
組換え CagA タンパク質の大腸菌体内チロシンリン酸化の手法を模式図で示した (左)。大腸菌 BL21(DE3) 株を GST-CagA-His 融合タンパク質の大腸菌発現ベクターおよび CagA のチロシンリン酸化酵素である Src キナーゼの大腸菌発現ベクターを用いて共形質転換し、大腸菌体内で CagA をチロシンリン酸化させた。Ni-NTA およびグルタチオンセファロースビーズを用いたアフィニティー精製により各 CagA 変異体の組換えタンパク質を精製した。大腸菌破碎液の遠心分離後の上清 (s: supernatant) および最終精製物 (p: purified) を SDS-PAGE で展開後、抗リン酸化チロシン抗体を用いてイムノブロット (中) または CBB 染色 (右) を行った。

## 9 組換えチロシンリン酸化 CagA の SHP2 結合能解析

組換えチロシンリン酸化 CagA タンパク質の発現と精製に成功したことから、次にこの精製タンパク質の SHP2 結合能を解析した。SHP2 の CagA 結合部位である 2 つの SH2 ドメイン (1-220 アミノ酸残基) の N 末端に GST タグを付加した組換え SHP2-SH2 タンパク質を精製して、GST プルダウンアッセイを行った。その結果、チロシンリン酸化した一連の CagA 変異体のいずれにおいても SHP2-SH2 との結合が認められた (図 28)。この結合は EPIYA-C セグメント数が増加するに従って増加し、アッセイに用いたタンパク質濃度においては CagA(C5) で飽和状態となった。一方、SHP2-SH2 の 32 番および 138 番のアルギニン残基と 53 番および 169 番のヒスチジン残基をアラニン残基に置換してリン酸化チロシンとの結合能を欠損させた変異体である SHP2-SH2dead とは結合が認められなかった。従って、組換えチロシンリン酸化 CagA は SHP2 の SH2 ドメインとの結合能を保持し、その結合能は胃上皮細胞内での免疫沈降実験の結果と同様に EPIYA-C セグメント数の増加により増大することが明らかとなった。さらに、単一の EPIYA-C セグメントを保有する CagA(C1) と SHP2-SH2 との間では極めて僅かな結合しか認められなかった一方、EPIYA-C セグメントを 2 個持つ CagA(C2) は CagA(C1) と比較して SHP2-SH2 と効率良く相互作用した (図 28)。



試験管内結合実験では PAR1 が存在しないため、CagA(C1) は二量体が形成できず SHP2-SH2 との結合が非常に不安定であるのに対して、EPIYA-C セグメントを 2 個有する CagA(C2) は PAR1 非存在下で SHP2-SH2 の 2 つの SH2 ドメインと相互作用し、安定した複合体を形成できる可能性が示唆された。



**図 28. 組換えチロシンリン酸化 CagA タンパク質の SHP2 結合能解析**  
 GST タグを付加した SHP2 の 2 つの SH2 ドメイン (1-220 アミノ酸残基: GST-SH2) と各チロシンリン酸化 CagA 変異体をモル比 1:1 (最終濃度 20 nM) で混和して 4 °C で 1 時間インキュベートした後、グルタチオンセファロースビーズを添加してさらに 4 °C で 1 時間混和した。ビーズに吸着したタンパク質を SDS-PAGE で展開後、銀染色で検出した。尚、リン酸化チロシンとの結合能を持たない SHP2 の SH2 ドメイン (GST-SH2D = SH2 dead) を陰性対照として利用した。

## 10 表面プラズモン共鳴法による CagA-SHP2 相互作用の結合親和性解析

細胞を用いた免疫沈降実験および精製タンパク質を用いた試験管内結合実験から、CagA の EPIYA-C セグメント数の増加は CagA の SHP2 結合量の増大と強く相関することが示された (図 22、28)。そこで、CagA の SHP2 結合能に及ぼす EPIYA-C セグメント数の影響をより定量的に解析するため、表面プラズモン共鳴法にて一連の CagA 変異体と SHP2-SH2 との解離定数を測定した。解析には Biacore X100 (GE Healthcare 社) を使用した。センサーチップに各 CagA 変異体をリガンドとして固定化し、任意の濃度の SHP2-SH2 をアナライトとしてフローセルに添加した。Biacore X100 Evaluation Software (GE Healthcare 社) を用いて各 SHP2-SH2 濃度での平衡状態における結合量をプロットしたスキッチャードプロットから解離定数を算出した (図 29)。それぞれ 3 回の測定結果から、EPIYA-C セグメントの増加に伴い CagA と SHP2-SH2 との結合親和性が飛躍的に高くなることが明らかとなり、SHP2-SH2 との解離定数はそれぞれ CagA(C1) で  $24100 \pm 924$  nM、CagA(C2) で  $208 \pm 7.13$  nM、CagA(C3) で  $123 \pm 1.47$  nM、CagA(C5) で  $77.8 \pm 0.706$  nM、CagA(C8) で  $40.1 \pm 0.710$  nM となり、C1 と C2 の間には 100 倍以上の差があった。また、x 軸に EPIYA-C セグメント数を取り、y 軸に 10 を底とした対数値で解離定数を取った片対数グラフを作製したところ、

CagA(C2)、CagA(C3)、CagA(C5)、CagA(C8) の SHP2-SH2 との解離定数は EPIYA-C セグメントの増加に伴い指数関数的 ( $y = 305.38e^{-0.261x}$ ) に減少することが示された。一方、CagA(C1) の SHP2-SH2 との解離定数は回帰直線上から大きく逸脱し、他の CagA 変異体と比較して著しく親和性が低いことが明らかとなった (図 29)。このことから PAR1 非存在下における CagA の SHP2-SH2 結合能は CagA(C1) と CagA(C2) の間で最も大きな差異があることが示された。

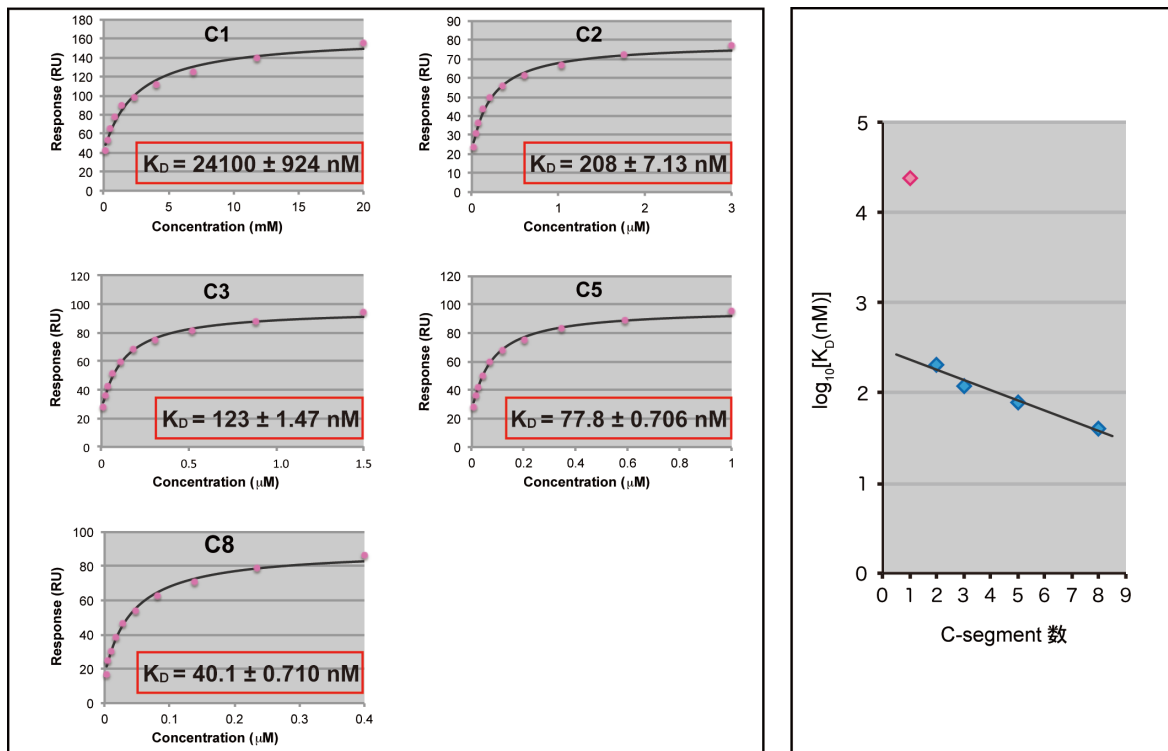


図 29. 表面プラズモン共鳴法による CagA-SHP2 結合親和性の測定  
 一連の CagA 変異体の SHP2 相互作用を表面プラズモン共鳴法にて解析した。測定には Biacore X100 (GE Healthcare 社) を使用した。精製したチロシンリン酸化 CagA を CM5 センサーチップに固定化し、任意の濃度の SHP2-SH2 をアナライトとしてフローセルに添加した。Biacore X100 Evaluation Software (GE Healthcare 社) を用いて、各 SHP2-SH2 濃度における平衡値のプロットから解離定数を算出した (左、Mean $\pm$ S.E.M., n=3)。y 軸に 10 を底とした対数値で解離定数を取り、x 軸に EPIYA-C セグメント数を取った片対数グラフを作製した (右)。

## 考察

本研究を通して、PAR1 を介さずに人為的に二量体化される CagA 変異体を用いた実験から、CagA の二量体化は CagA の SHP2 結合能を著しく増強し、その結果 CagA による SHP2 の機能的脱制御により引き起こされる hummingbird 細胞誘導も大きく促進されることが明らかとなった。さらに、欧米型 CagA に特異的な EPIYA-C セグメント数の増加は CagA の SHP2 結合能を指数関数的に増強し、hummingbird 細胞の誘導活性も EPIYA-C セグメント数の増加と共に高くなることを明らかにした。

hummingbird 細胞の誘導には CagA の SHP2 結合領域である EPIYA-C または EPIYA-D セグメントのチロシンリン酸化が必要である [22, 28, 30]。興味深いことに、EPIYA-A、-B、-D セグメントから構成される CagA を保有する東アジア諸国で単離されるピロリ菌は EPIYA-A、-B、-C セグメントで構成される CagA を持つ欧米諸国で単離されるピロリ菌と比較してより重症な胃粘膜病変を引き起こし、胃がんの発症頻度も高い [54, 55]。また、欧米諸国で単離されるピロリ菌においては EPIYA-C セグメントの数が腸上皮化生や胃がんの発症と有意の相関が示されている [56-59]。さらに *cagA* をトランスジーンとして保有する遺伝子改変マウスを用いた研究から、欧米型 CagA と比較して東アジア型 CagA はより発がん活性が高いことが示されている [60, 61]。これらの所見と一致して、東アジア型

CagA は欧米型 CagA に比べて SHP2 結合能がより高く、hummingbird 細胞の誘導能もより強いことが示されている [28, 32]。また同様に、欧米型 CagA は EPIYA-C セグメント数の増加により hummingbird 細胞の誘導活性が増強することも示されている [28, 32]。従って、*cagA* 陽性ピロリ菌感染が引き起こす胃粘膜病変の重症度と CagA タンパク質が持つ SHP2 結合能およびその結果として起こる hummingbird 細胞の誘導能は強く相関する。

CagA による hummingbird 細胞の誘導には、EPIYA 配列に加え CM 配列も影響を及ぼす。CM 配列は CagA の C 末側に存在する 16 アミノ酸残基からなる配列であり、当初、CagA が二量体（多量体）化する際に必須な領域として同定された [42]。その後の研究から、CM 配列は上皮細胞極性の制御に関与する PAR1 ファミリーセリン/スレオニンキナーゼの触媒ドメインに結合し、その酵素活性を抑制する部位であることが明らかにされた [34, 35]。PAR1 は細胞内で二量体として存在するため (図 5)、2 分子の CagA が 1 つの PAR1 二量体と CM 配列を介してそれぞれ結合することで受動的に二量体化するモデルが提唱されている。一方、CagA 二量体化の責任領域と CagA の PAR1 結合部位が共に CM 配列であることから、CM 配列に依存したこれら 2 つの活性が CagA の生物活性に果たす役割を各々個別に検討することは実験的にこれまで困難であった。そこ

で本研究では、 PAR1 の影響を排除した CagA の生物活性発現における CagA 分子の単純なホモ二量体化の意義を解明するため、化学的二量体化剤 coumermycin 存在下で PAR1 非依存的に二量体化する CagA 変異体分子を作製した。 coumermycin は大腸菌 GyrB ドメインと化学量論的に 1 : 2 で結合して GyrB を二量体化する。この GyrB-coumermycin 複合体形成を利用した人為的分子二量体化法は c-Raf-1、 ASK1、 L-selectin、 STAT3、 JAK キナーゼ等、多様な二量体化タンパク質の研究にこれまでに用いられ成功を収めている [48-52]。CM 配列を欠失した CagA は非常に弱いながら SHP2 との結合能を保持していた。これはチロシンリン酸化された CagA 単量体が SHP2 の 2 つの SH2 ドメインのどちらか一方と結合することで不安定な CagA-SHP2 複合体を形成するためと考えられる。これに対し、 CagA を人為的に二量体化することにより CagA-SHP2 複合体の形成量は著しく増加した。従って、 CagA 二量体化それ自身が安定した CagA-SHP2 複合体形成を促すことが示された。この結果は、 PAR1 との結合依存的に EPIYA-C または EPIYA-D セグメントを 1 つだけ持つ 2 分子の CagA が 1 分子の SHP2 の 2 つの SH2 ドメインと同時に結合するというこれまでに提出されている PAR1-CagA-SHP2 複合体モデルを支持するものである [35, 44]。

CagA の人為的二量体化は SHP2 結合能の増強のみならず hummingbird 細胞誘

導活性も増強した。この結果は、CagA による hummingbird 細胞誘導の効率が、CagA による SHP2 の機能的脱制御の強弱に依存するというこれまでの報告と一致する [35, 62]。しかしながら、人為的に二量体化した CagA の hummingbird 細胞誘導能は野生型 CagA の場合と比較して依然低く、細胞の伸長度も不十分であることが明らかになった(図 12、14)。この結果から、十分に伸長した hummingbird 細胞の誘導には SHP2 の機能的脱制御のみでは不十分であることが示唆された。

この可能性は、CagA の人為的二量体化に加え、siRNA で PAR1 の発現を同時に抑制することで野生型 CagA と同等の hummingbird 細胞が誘導されるという実験結果により強く支持される。つまり、SHP2 結合部位を単一に保有する CagA が病原生物活性を十分に発揮するためには SHP2 と PAR1 という 2 つの個別のエフェクタータンパク質の機能を同時に攪乱することが必要となのであろう(図 30)。



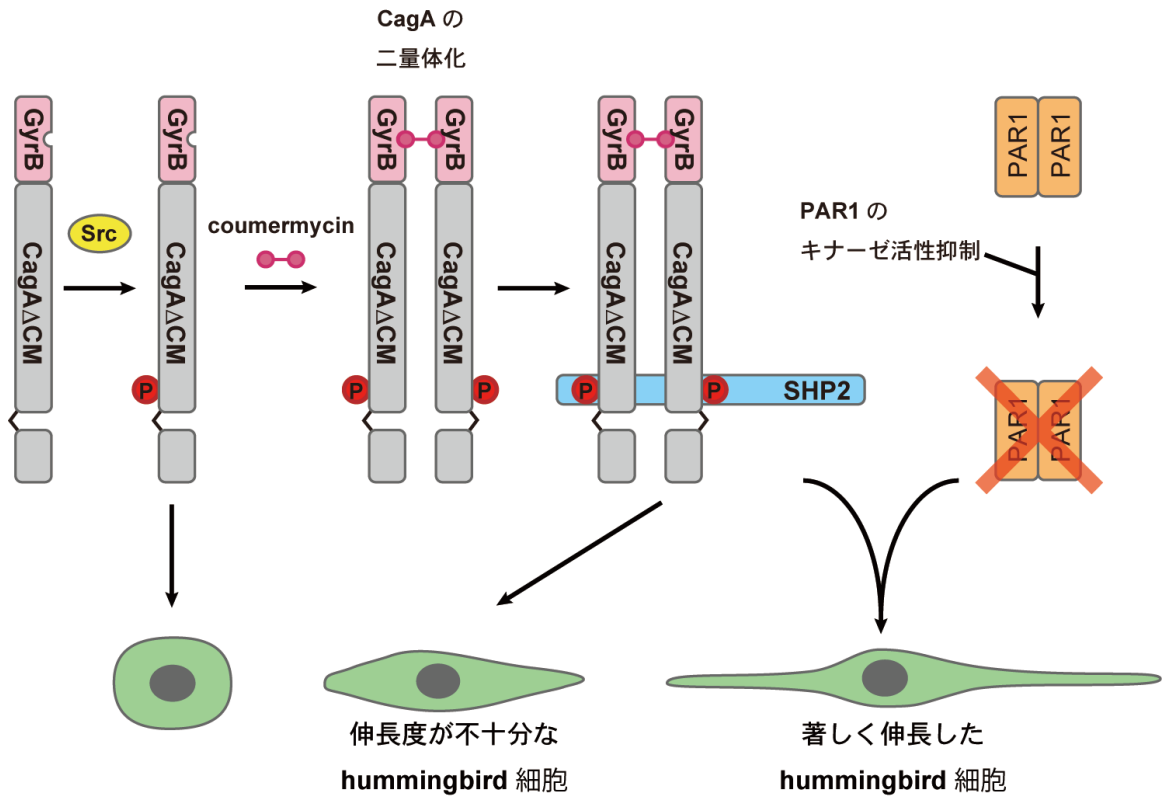


図 30. 人為的二量体化 CagA による細胞形態変化の誘導

Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化された GyrB-CagAΔΔCM は単量体では hummingbird 細胞をほとんど誘導しないが、coumermycin 添加により人為的に二量体化することで GyrB-CagAΔΔCM-SHP2 複合体を形成し、その結果、hummingbird 細胞誘導活性が有意に増強する。しかし、人為的二量体化 CagA により誘導された hummingbird 細胞は細胞の伸長度が不十分だった。CagA の二量体化と同時に PAR1 のキナーゼ活性を抑制することで、著しく伸長した hummingbird 細胞が誘導されたことから、伸長度の著しい hummingbird 細胞の誘導には CM 配列の 2 つの機能、すなわち、CagA の二量体化と PAR1 のキナーゼ活性抑制が共に必要であることが明らかとなった。

EPIYA-C セグメントを 1 つだけ持つ CagA は組換えタンパク質を用いた実験において SHP2 の SH2 ドメインとの結合量が極端に少なく、EPIYA-C セグメントを 2 つ以上持つ CagA に比べて解離定数も著しく高かった (図 28、29)。こ

の結果は CagA の人為的二量体化実験の結果と合致しており、組換えタンパク質を用いた *in vitro* の結合実験では、PAR1 が存在しないために CagA が二量体化できず、EPIYA-C セグメントを 1 つ持つ CagA においては安定した CagA-SHP2 複合体が形成されなかったものと考えられる。一方、この結果は、EPIYA-C セグメントを複数持つ CagA は SHP2 結合のために必ずしもホモ二量体を形成する必要がなく、単一分子で SHP2 と安定した複合体が形成できる可能性を強く示唆している。また、CM 配列を欠失した東アジア型 CagA は AGS 細胞内で僅かながら SHP2 と複合体を形成し、野生型 CagA と比較して弱いながら hummingbird 細胞誘導活性を保持したが (図 10、13)、単一の EPIYA-C セグメントを持つ欧米型 CagA は *in vitro* 結合実験において SHP2-SH2 とほとんど結合しなかった (図 28)。当研究室の最新の研究により明らかにされた、単一の EPIYA-D セグメントの合成ペプチドは単一の EPIYA-C セグメントの合成ペプチドと比較して SHP2-SH2 との解離定数が約 40 倍小さいという実験結果も踏まえると (林、未発表データ)、EPIYA-D セグメントは単独でも SHP2 と弱く結合するが EPIYA-C セグメントは単独では SHP2 と結合できず、これが欧米型 CagA と比較して東アジア型 CagA が高い発がん生物活性を示す一因となっている可能性が考えられる。今後、構造生物学的解析を含めた CagA-SHP2 複合体形成の詳細

な解析が待たれるが、その際に本研究で確立した組換え CagA タンパク質のチロシンリン酸化とその精製法が強力な手段となることが期待される。

前述の通り、欧米型 CagA においては EPIYA-C セグメント数と胃粘膜病変の重症度との間には有意な相関関係が認められている [28, 32]。そこで本研究では、欧米型 CagA の SHP2 結合能に及ぼす EPIYA-C セグメント数の影響を定量的に解析した。胃上皮細胞において、CagA-SHP2 複合体の形成量は EPIYA-C セグメントの増加により飛躍的に増加し (図 22)、EPIYA-C セグメントが 2 個から 8 個へ増加するのに伴い SHP2-SH2 との解離定数は指数関数的に減少した (図 29)。

当研究室の先行研究により欧米型 CagA (全長 1186 残基) の N 末側 1-829 残基の結晶構造が明らかとなり、既知の他のタンパク質と相同性を持たない新規の高次構造を持つことが示されている [18]。一方、EPIYA セグメントならびに CM 配列を含む CagA(877-1186) フラグメントの <sup>1</sup>H-NMR の解析結果から CagA の C 末側領域は特定の高次構造を形成しないことが明らかとなっている [18]。近年、一定の高次構造を持たず不規則な状態で存在する天然変性タンパク質 (intrinsically disordered protein) が多数報告されており、その不規則性がゆえに多くの標的分子と相互作用し得ることが明らかになりつつある。酵母における細胞周期の調節因子である Sic1 は標的分子である Cdc4 と結合した状態でも不規則構造

をとっており、一定の動的平衡 (dynamic equilibrium) の中で Sic1 の 6 つのリン酸基が Cdc4 の 1 つの結合ポケットに次々と結合することで十分な結合強度が得られることが NMR による動的立体構造解析により示されている [63, 64]。これらの研究結果から、EPIYA-C セグメント数の増加と CagA の SHP2 結合能の関係が相乗的な非線形相関を示す構造基盤として、複数の EPIYA-C セグメントを持つ CagA においては CagA の C 末側領域が天然変性領域としての可動性を示すことで、異なるリン酸化された EPIYA モチーフが SHP2 の SH2 ドメインに連続的に次々と結合することで結合強度が著しく増大する可能性が考えられる (図 31)。

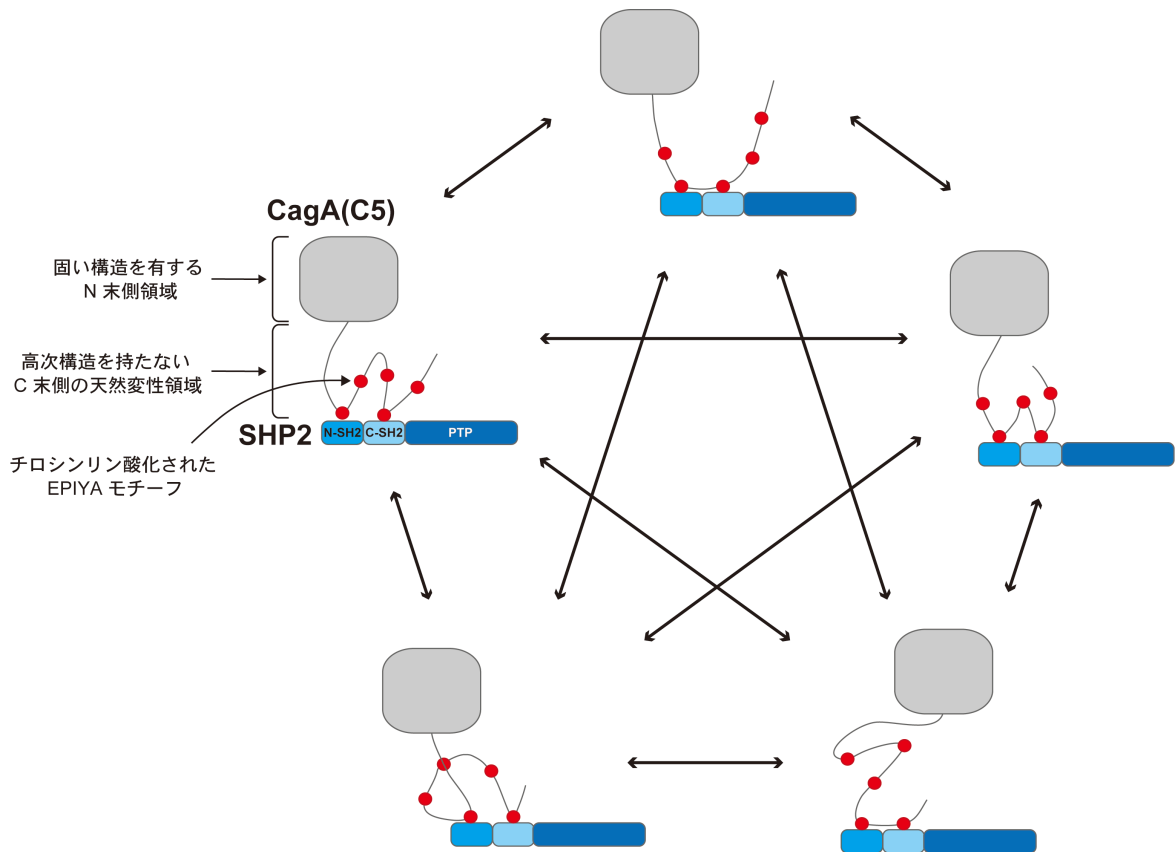


図 31. CagA の天然変性構造が SHP2 結合能へ及ぼす効果

欧米型 CagA の N 末側は結晶構造から既知のタンパク質と相同性を持たない高次構造を持つことが明らかとなっている。一方、EPIYA セグメントを含む C 末側領域は NMR の解析結果から特定の高次構造を形成しない天然変性構造であることが示されている。EPIYA-C セグメントを複数保有する CagA においては異なるチロシンリン酸化された EPIYA モチーフが自由に形を変えながら SHP2 の 2 つの SH2 ドメインに連続的に次々と結合する可能性が推察される。

本研究では hummingbird 細胞誘導活性を CagA の病原活性の指標として用いている。EPIYA-C セグメント数の増加は CagA の hummingbird 細胞誘導活性も増強した (図 23)。これまでの研究で CagA の病原性の指標に hummingbird 表現型が広く利用されてきたが、本研究により疫学研究において胃粘膜病変の重症度と

の関連が示されている EPIYA-C セグメント数と hummingbird 細胞誘導活性の間の相関関係が明らかとなったことで、CagA の病原性を評価する指標として hummingbird 表現型を用いることの妥当性が示された。また、EPIYA-C セグメントの繰り返し数が増すに従って胃上皮細胞内での CagA の発現量が減少すること、および AGS 細胞に CagA を一過性発現させる本研究で用いた手法においては CagA 発現細胞数が全細胞の 4 割程度であることを考慮すると、本研究結果で示された EPIYA-C セグメント数の増加による CagA の hummingbird 細胞誘導活性の促進以上に CagA の病原活性が著しく亢進している可能性が示唆される。また、コラーゲンゲル浸潤アッセイにおいて EPIYA-C セグメント数の増加は CagA が誘導する細胞の浸潤能を増強する傾向が認められたことからこの可能性が強く示唆される。今後はこの可能性を検証するために hummingbird 表現型や細胞浸潤能の強弱に関する質的な解析を含め、CagA の発がん性・病原性への EPIYA-C セグメント数の関与を詳細に解析していきたい。

本研究を通して、EPIYA-C セグメント数の変動が規定する CagA 生物活性を定量化することに成功した。欧米諸国における臨床疫学調査から、胃がんは EPIYA-C セグメントを 2 個以上有する欧米型 CagA と関連することが多数報告されている [33, 56-59, 65-67]。本研究では、EPIYA-C セグメントの重複が CagA

の SHP2 結合能を指数関数的に増強させること、またこの増強は EPIYA-C セグメント数が 1 個から 2 個へ増加する際に最大となることを明らかにした。この結果から、細胞のがん化には、2 個以上の EPIYA-C セグメントを保有する CagA のみが達成しうるレベルの SHP2 結合強度が必要となることが推察される。特定のアミノ酸の繰り返し数により表現型が規定される疾患としてハンチントン病などのトリプレット病が知られている [68, 69]。このトリプレット同様、ピロリ菌 CagA の EPIYA-C セグメント数の変動が規定する SHP2 の脱制御レベルが臨床病態としての胃がん発症を決定するというシナリオはきわめて興味深い可能性と考える。今後は構造生物学的解析を含め、CagA-SHP2 複合体形成の強度を決定する分子機構のさらなる解析を進めたい。

CagA を全身性に発現する遺伝子改変マウスは消化管および血液系腫瘍を発症する [60, 61]。対照的に、SHP2 と結合できないリン酸化抵抗性 CagA を発現するマウスでは腫瘍発症は認められない [60]。この事実は、CagA による SHP2 の異常な活性化が *cagA* 陽性ピロリ菌感染による胃がんの発症に本質的に関与していることを強く示唆している [30, 31, 44]。本研究では、ピロリ菌 CagA タンパク質の病原活性の発現に CagA の二量体化および EPIYA-C セグメント数の増加が重要な役割を果たすことを明らかにした。今後、本研究成果を基盤に CagA-SHP2

複合体形成の分子機序のより詳細な解析が推し進められ、その成果がピロリ菌感染に起因する胃がんへの治療に応用されることが期待される。



## 引用文献

1. Marshall, B.J. and J.R. Warren, Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, **1**:1311-5, 1984
2. Dooley, C.P., H. Cohen, P.L. Fitzgibbons, M. Bauer, M.D. Appleman, G.I. Perez-Perez, and M.J. Blaser, Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med*, **321**:1562-6, 1989
3. NIH Consens Conference, *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *J Am Med Assoc*, **272**:65-69, 1994
4. Huang, J.Q., S. Sridhar, Y. Chen, and R.H. Hunt, Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology*, **114**:1169-79, 1998
5. Danesh, J., *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Aliment Pharmacol Ther*, **13**:851-6, 1999
6. Honda, S., T. Fujioka, M. Tokieda, R. Satoh, A. Nishizono, and M. Nasu,

- Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils. *Cancer Res*, **58**:4255-9, 1998
7. Watanabe, T., M. Tada, H. Nagai, S. Sasaki, and M. Nakao, *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology*, **115**:642-8, 1998
  8. Hirayama, F., S. Takagi, E. Iwao, Y. Yokoyama, K. Haga, and S. Hanada, Development of poorly differentiated adenocarcinoma and carcinoid due to long-term *Helicobacter pylori* colonization in Mongolian gerbils. *J Gastroenterol*, **34**:450-4, 1999
  9. Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, S. Yamaguchi, M. Yamakido, K. Taniyama, N. Sasaki, and R.J. Schlemper, *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med*, **345**:784-9, 2001
  10. Parsonnet, J., G.D. Friedman, N. Orentreich, and H. Vogelman, Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut*, **40**:297-301, 1997
  11. Rugge, M., G. Busatto, M. Cassaro, Y.H. Shiao, V. Russo, G. Leandro, C.

- Avellini, A. Fabiano, A. Sidoni, and A. Covacci, Patients younger than 40 years with gastric carcinoma: *Helicobacter pylori* genotype and associated gastritis phenotype. *Cancer*, **85**:2506-11, 1999
12. Tummuru, M.K., T.L. Cover, and M.J. Blaser, Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: evidence of linkage to cytotoxin production. *Infect Immun*, **61**:1799-809, 1993
13. Ito, Y., T. Azuma, S. Ito, H. Miyaji, M. Hirai, Y. Yamazaki, F. Sato, T. Kato, Y. Kohli, and M. Kuriyama, Analysis and typing of the vacA gene from cagA-positive strains of *Helicobacter pylori* isolated in Japan. *J Clin Microbiol*, **35**:1710-4, 1997
14. Maeda, S., K. Ogura, H. Yoshida, F. Kanai, T. Ikenoue, N. Kato, Y. Shiratori, and M. Omata, Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. *Gut*, **42**:338-43, 1998
15. Covacci, A., S. Falkow, D.E. Berg, and R. Rappuoli, Did the inheritance of a pathogenicity island modify the virulence of *Helicobacter pylori*? *Trends Microbiol*, **5**:205-8, 1997

16. Covacci, A., J.L. Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet, and R. Rappuoli, *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, **284**:1328-33, 1999
17. Tomb, J.F., O. White, A.R. Kerlavage, R.A. Clayton, G.G. Sutton, R.D. Fleischmann, K.A. Ketchum, H.P. Klenk, S. Gill, B.A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E.F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H.G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L.M. Fitzgerald, N. Lee, M.D. Adams, E.K. Hickey, D.E. Berg, J.D. Gocayne, T.R. Utterback, J.D. Peterson, J.M. Kelley, M.D. Cotton, J.M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W.S. Hayes, M. Borodovsky, P.D. Karp, H.O. Smith, C.M. Fraser, and J.C. Venter, The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, **388**:539-47, 1997
18. Hayashi, T., M. Senda, H. Morohashi, H. Higashi, M. Horio, Y. Kashiba, L. Nagase, D. Sasaya, T. Shimizu, N. Venugopalan, H. Kumeta, N.N. Noda, F. Inagaki, T. Senda, and M. Hatakeyama, Tertiary structure-function analysis reveals the pathogenic signaling potentiation

- mechanism of *Helicobacter pylori* oncogenic effector CagA. *Cell Host Microbe*, **12**:20-33, 2012
19. Murata-Kamiya, N., K. Kikuchi, T. Hayashi, H. Higashi, and M. Hatakeyama, *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. *Cell Host Microbe*, **7**:399-411, 2010
  20. Selbach, M., S. Moese, C.R. Hauck, T.F. Meyer, and S. Backert, Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **277**:6775-8, 2002
  21. Stein, M., F. Bagnoli, R. Halenbeck, R. Rappuoli, W.J. Fantl, and A. Covacci, c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol*, **43**:971-80, 2002
  22. Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, and M. Hatakeyama, SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, **295**:683-6, 2002
  23. Tsutsumi, R., H. Higashi, M. Higuchi, M. Okada, and M. Hatakeyama,

- Attenuation of *Helicobacter pylori* CagA x SHP-2 signaling by interaction between CagA and C-terminal Src kinase. *J Biol Chem*, **278**:3664-70, 2003
24. Suzuki, M., H. Mimuro, T. Suzuki, M. Park, T. Yamamoto, and C. Sasakawa, Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J Exp Med*, **202**:1235-47, 2005
25. Mohi, M.G. and B.G. Neel, The role of Shp2 (PTPN11) in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **17**:23-30, 2007
26. Gu, H. and B.G. Neel, The "Gab" in signal transduction. *Trends Cell Biol*, **13**:122-30, 2003
27. Neel, B.G., H. Gu, and L. Pao, The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling. *Trends Biochem Sci*, **28**:284-93, 2003
28. Higashi, H., R. Tsutsumi, A. Fujita, S. Yamazaki, M. Asaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama, Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine

- phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**:14428-33, 2002
29. Tsutsumi, R., A. Takahashi, T. Azuma, H. Higashi, and M. Hatakeyama, Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol Cell Biol*, **26**:261-76, 2006
30. Hatakeyama, M., Oncogenic mechanisms of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Nat Rev Cancer*, **4**:688-94, 2004
31. Hatakeyama, M., Anthropological and clinical implications for the structural diversity of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. *Cancer Sci*, **102**:36-43, 2011
32. Naito, M., T. Yamazaki, R. Tsutsumi, H. Higashi, K. Onoe, S. Yamazaki, T. Azuma, and M. Hatakeyama, Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*, **130**:1181-90, 2006
33. Xia, Y., Y. Yamaoka, Q. Zhu, I. Matha, and X. Gao, A comprehensive sequence and disease correlation analyses for the C-terminal region of CagA protein of *Helicobacter pylori*. *PLoS One*, **4**:e7736, 2009
34. Lu, H., N. Murata-Kamiya, Y. Saito, and M. Hatakeyama, Role of

- partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinases in the morphogenetic activity of *Helicobacter pylori* CagA. *J Biol Chem*, **284**:23024-36, 2009
35. Saadat, I., H. Higashi, C. Obuse, M. Umeda, N. Murata-Kamiya, Y. Saito, H. Lu, N. Ohnishi, T. Azuma, A. Suzuki, S. Ohno, and M. Hatakeyama, *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*, **447**:330-3, 2007
36. Zeaiter, Z., D. Cohen, A. Musch, F. Bagnoli, A. Covacci, and M. Stein, Analysis of detergent-resistant membranes of *Helicobacter pylori* infected gastric adenocarcinoma cells reveals a role for MARK2/Par1b in CagA-mediated disruption of cellular polarity. *Cell Microbiol*, **10**:781-94, 2008
37. Suzuki, A. and S. Ohno, The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *J Cell Sci*, **119**:979-87, 2006
38. Suzuki, A., M. Hirata, K. Kamimura, R. Maniwa, T. Yamanaka, K. Mizuno, M. Kishikawa, H. Hirose, Y. Amano, N. Izumi, Y. Miwa, and S. Ohno, aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and



- maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr Biol*, **14**:1425-35, 2004
39. Nesic, D., M.C. Miller, Z.T. Quinkert, M. Stein, B.T. Chait, and C.E. Stebbins, *Helicobacter pylori* CagA inhibits PAR1-MARK family kinases by mimicking host substrates. *Nat Struct Mol Biol*, **17**:130-2, 2010
40. Amieva, M.R., R. Vogelmann, A. Covacci, L.S. Tompkins, W.J. Nelson, and S. Falkow, Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*, **300**:1430-4, 2003
41. Ebner, A., G. Drewes, E.M. Mandelkow, and E. Mandelkow, Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, **44**:209-24, 1999
42. Ren, S., H. Higashi, H. Lu, T. Azuma, and M. Hatakeyama, Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. *J Biol Chem*, **281**:32344-52, 2006
43. Lu, H.S., Y. Saito, M. Umeda, N. Murata-Kamiya, H.M. Zhang, H. Higashi, and M. Hatakeyama, Structural and functional diversity in the

- PAR1b/MARK2-binding region of *Helicobacter pylori* CagA. *Cancer Sci*, **99**:2004-11, 2008
44. Hatakeyama, M., Linking epithelial polarity and carcinogenesis by multitasking *Helicobacter pylori* virulence factor CagA. *Oncogene*, **27**:7047-54, 2008
45. Hooper, D.C., J.S. Wolfson, G.L. McHugh, M.B. Winters, and M.N. Swartz, Effects of novobiocin, coumermycin A1, clorobiocin, and their analogs on *Escherichia coli* DNA gyrase and bacterial growth. *Antimicrob Agents Chemother*, **22**:662-71, 1982
46. Gellert, M., M.H. O'Dea, T. Itoh, and J. Tomizawa, Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **73**:4474-8, 1976
47. Olson, S.H., Slossberg, Llnon H., Synthesis of coumermycin A1. *Elsevier Science*, **44**:61-63, 2002
48. Mohi, M.G., K. Arai, and S. Watanabe, Activation and functional analysis of Janus kinase 2 in BA/F3 cells using the coumermycin/gyrase B system. *Mol Biol Cell*, **9**:3299-308, 1998

49. Mizuguchi, R. and M. Hatakeyama, Conditional activation of Janus kinase (JAK) confers factor independence upon interleukin-3-dependent cells. Essential role of Ras in JAK-triggered mitogenesis. *J Biol Chem*, **273**:32297-303, 1998
50. Li, X., D.A. Steeber, M.L. Tang, M.A. Farrar, R.M. Perlmutter, and T.F. Tedder, Regulation of L-selectin-mediated rolling through receptor dimerization. *J Exp Med*, **188**:1385-90, 1998
51. Farrar, M.A., J. Tian, and R.M. Perlmutter, Membrane localization of Raf assists engagement of downstream effectors. *J Biol Chem*, **275**:31318-24, 2000
52. Farrar, M.A., J. Alberol-Ila, and R.M. Perlmutter, Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature*, **383**:178-81, 1996
53. Higashi, H., K. Yokoyama, Y. Fujii, S. Ren, H. Yuasa, I. Saadat, N. Murata-Kamiya, T. Azuma, and M. Hatakeyama, EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol Chem*, **280**:23130-7, 2005

54. Azuma, T., S. Yamazaki, A. Yamakawa, M. Ohtani, A. Muramatsu, H. Suto, Y. Ito, M. Dojo, Y. Yamazaki, M. Kuriyama, Y. Keida, H. Higashi, and M. Hatakeyama, Association between diversity in the Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase binding site of *Helicobacter pylori* CagA protein and gastric atrophy and cancer. *J Infect Dis*, **189**:820-7, 2004
55. Schmidt, H.M., K.L. Goh, K.M. Fock, I. Hilmi, S. Dhamodaran, D. Forman, and H. Mitchell, Distinct cagA EPIYA motifs are associated with ethnic diversity in Malaysia and Singapore. *Helicobacter*, **14**:256-63, 2009
56. Argent, R.H., J.L. Hale, E.M. El-Omar, and J.C. Atherton, Differences in *Helicobacter pylori* CagA tyrosine phosphorylation motif patterns between western and East Asian strains, and influences on interleukin-8 secretion. *J Med Microbiol*, **57**:1062-7, 2008
57. Argent, R.H., M. Kidd, R.J. Owen, R.J. Thomas, M.C. Limb, and J.C. Atherton, Determinants and consequences of different levels of CagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*.

- Gastroenterology*, **127**:514-23, 2004
58. Basso, D., C.F. Zambon, D.P. Letley, A. Stranges, A. Marchet, J.L. Rhead, S. Schiavon, G. Guariso, M. Ceroti, D. Nitti, M. Rugge, M. Plebani, and J.C. Atherton, Clinical relevance of *Helicobacter pylori cagA* and *vacA* gene polymorphisms. *Gastroenterology*, **135**:91-9, 2008
59. Batista, S.A., G.A. Rocha, A.M. Rocha, I.E. Saraiva, M.M. Cabral, R.C. Oliveira, and D.M. Queiroz, Higher number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C phosphorylation sites increases the risk of gastric cancer, but not duodenal ulcer. *BMC Microbiol*, **11**:61, 2011
60. Ohnishi, N., H. Yuasa, S. Tanaka, H. Sawa, M. Miura, A. Matsui, H. Higashi, M. Musashi, K. Iwabuchi, M. Suzuki, G. Yamada, T. Azuma, and M. Hatakeyama, Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**:1003-8, 2008
61. Miura, M., N. Ohnishi, S. Tanaka, K. Yanagiya, and M. Hatakeyama, Differential oncogenic potential of geographically distinct *Helicobacter pylori* CagA isoforms in mice. *Int J Cancer*, **125**:2497-504, 2009

62. Higuchi, M., R. Tsutsumi, H. Higashi, and M. Hatakeyama, Conditional gene silencing utilizing the lac repressor reveals a role of SHP-2 in cagA-positive *Helicobacter pylori* pathogenicity. *Cancer Sci*, **95**:442-7, 2004
63. Mittag, T., S. Orlicky, W.Y. Choy, X. Tang, H. Lin, F. Sicheri, L.E. Kay, M. Tyers, and J.D. Forman-Kay, Dynamic equilibrium engagement of a polyvalent ligand with a single-site receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**:17772-7, 2008
64. Mittag, T., J. Marsh, A. Grishaev, S. Orlicky, H. Lin, F. Sicheri, M. Tyers, and J.D. Forman-Kay, Structure/function implications in a dynamic complex of the intrinsically disordered Sic1 with the Cdc4 subunit of an SCF ubiquitin ligase. *Structure*, **18**:494-506, 2010
65. Beltran-Anaya, F., T. Poblete, A. Roman-Roman, S. Reyes, J. de Sampedro, O. Peralta-Zaragoza, M. Rodriguez, O. Del Moral-Hernandez, B. Illades-Aguilar, and G. Fernandez-Tilapa, The EPIYA-ABCC motif pattern in CagA of *Helicobacter pylori* is associated with peptic ulcer and gastric cancer in Mexican population. *BMC Gastroenterol*, **14**:2, 2014

66. Ferreira, R.M., J.C. Machado, M. Leite, F. Carneiro, and C. Figueiredo, The number of *Helicobacter pylori* CagA EPIYA C tyrosine phosphorylation motifs influences the pattern of gastritis and the development of gastric carcinoma. *Histopathology*, **60**:992-8, 2012
67. Queiroz, D.M., C.I. Silva, M.H. Goncalves, M.B. Braga-Neto, A.B. Fialho, A.M. Fialho, G.A. Rocha, A.M. Rocha, S.A. Batista, R.L. Guerrant, A.A. Lima, and L.L. Braga, Higher frequency of cagA EPIYA-C phosphorylation sites in *H. pylori* strains from first-degree relatives of gastric cancer patients. *BMC Gastroenterol*, **12**:107, 2012
68. Ross, C.A., When more is less: pathogenesis of glutamine repeat neurodegenerative diseases. *Neuron*, **15**:493-6, 1995
69. La Spada, A.R., H.L. Paulson, and K.H. Fischbeck, Trinucleotide repeat expansion in neurological disease. *Ann Neurol*, **36**:814-22, 1994

## 謝辞

本研究を遂行するにあたりご懇切なご指導と恵まれた研究環境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座 畠山昌則教授に深く感謝致します。畠山先生のもとで研究者としての第一歩を踏み出せたこと、また研究への情熱と喜びをご教授いただいたことは私の今後の人生において大きな財産となりました。ここに深く御礼申し上げます。

本学位論文の審査において主査をお引き受けいただきました東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻疾患生命工学センター動物資源学部門 饗場篤教授に深く感謝致します。論文をご校閲いただき貴重なご助言を賜りました。心より御礼申し上げます。

本学位論文の副査としてご校閲賜りました東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻分子腫瘍学分野 中村卓郎連携教授、東京大学大学院医学系研究科国際保健学専攻国際生物医科学講座生物医化学分野 北潔教授、東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻病理学講座人体病理学・病理診断学分野 牛久哲男准教授、ならびに東京大学大学院医学系研究科外科学専攻臓器病態外科学講座消化管外科学分野 野村幸世准教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行う過程で多くのご助言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座 紙谷尚子講師ならびに林剛瑠助教に深く感謝致します。研究方針から実験手法にいたるまで詳細にわたってご指導、ご協力いただきました。心より御礼申し上げます。



日々の研究生生活において公私共にご支援頂きました東京大学大学院医学系研究科  
病因・病理学専攻微生物学講座の皆様へ深く感謝致します。

常に理解し応援してくれた兄弟たち、また、姉妹同然に互いに励まし合った神奈川  
大学大学院理学研究科 橋友理香さんに深く御礼申し上げます。

最後に研究の道へ進むことを許し、常に支えてくれた両親へ深く感謝致します。両  
親の支援なくしては研究に邁進することもかないませんでした。深く御礼申し上げ  
ます。本論文が僅少なりとも二人への恩返しとなれば幸いです。

平成 27 年 1 月

長瀬 里沙