

## 論文の内容の要旨

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

*Helicobacter pylori* (ピロリ菌) は世界人口の約半数が感染していると推定されるグラム陰性螺旋状桿菌であり、種々の胃粘膜病変の発症に関与している。さらに近年の研究から、ピロリ菌が胃がんの発症に重要な役割を担うことが明らかとなってきた。特に、ピロリ菌 *cagA* 遺伝子陽性株への感染は胃がんの発症リスクを著しく高める。*cagA* 遺伝子産物である CagA タンパク質はピロリ菌体内で産生された後、IV 型分泌機構と呼ばれる注射針様装置を介して宿主胃上皮細胞内に運ばれる。CagA はそこで Src ファミリーキナーゼおよび Abl キナーゼにより、その C 末側に複数存在する EPIYA (Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala) モチーフ内のチロシン残基をリン酸化される。CagA はチロシンリン酸化依存的に SHP2 チロシンホスファターゼと特異的に結合し、細胞運動と細胞増殖に関わる細胞内シグナルを脱制御する。その結果、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。CagA はまた、チロシンリン酸化非依存的に EPIYA モチーフ近傍に存在する CagA-multimerization (CM) 配列を介して細胞極性の主要制御因子である 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、タイトジャンクションが破壊され、上皮細胞極性が失われる。このようにして CagA は胃上皮細胞をがん化させる。CagA は異なるピロリ菌株間において EPIYA 領域を含む C 末側に分子多型性を示す。CagA の EPIYA 領域は周辺のアミノ酸配列の違いから、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。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 は EPIYA-A,-B,-C セグメントからなり、東アジア諸国で単離されるピロリ菌由来の CagA は EPIYA-A,-B,-D セグメントからなる。CagA の SHP2 結合部位はチロシンリン酸化された EPIYA-C または EPIYA-D セグメントである。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 または EPIYA-D セグメントを 1 つしか持たない CagA は SHP2 と安定的に結合し得ることから、2 分子の CagA が 1 分子の SHP2 と結合することが推測される。一方で、PAR1 は細胞内で二量体として存在していると考えられていることから、2 分

子の CagA が PAR1 二量体とそれぞれ結合することにより受動的に二量体化すると考えられる。このように、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、CagA の生物活性発現における CagA 二量体化の意義を解明するため、PAR1 結合能を持たない CagA の人為的二量体化を試みた。CagA の人為的二量体化には、放射菌ストレプトマイセス属由来の抗生物質 coumermycin と大腸菌 DNA ジャイレースの B サブユニット (GyrB) が化学量論的に 1 : 2 で結合する性質を利用した。CM 配列を欠失した CagA 変異体 CagA $\Delta$ CM の N 末端に GyrB を融合させた GyrB-CagA $\Delta$ CM を作製し、coumermycin を用いて細胞内で人為的に二量体化させた。FLAG タグあるいは HA タグを付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM をヒト胃上皮由来 AGS 細胞に共発現させ、coumermycin 存在下で培養した。抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験の結果、FLAG タグを付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM の共沈降物中に HA タグを付加した GyrB-CagA $\Delta$ CM が検出され、coumermycin 処理により GyrB-CagA $\Delta$ CM が細胞内で人為的に二量体化することが示された。

次に、単量体 CagA ならびに化学的に二量体化した CagA の SHP2 結合能を解析した。その結果、CagA $\Delta$ CM においても非常に不安定ながら SHP2 と複合体を形成した。一方、人為的に二量体化した GyrB-CagA $\Delta$ CM においては CagA-SHP2 複合体形成量が著しく増加し、野生型 CagA と同等量だった。従って、CagA の二量体化により PAR1 非依存的に安定な CagA-SHP2 複合体が形成されることが明らかとなった。

続いて、単量体ならびに化学的に二量体化した CagA の細胞形態変化誘導能を比較検討したところ、単量体 CagA $\Delta$ CM 発現細胞においても hummingbird 表現型が誘導された。しかし、CagA $\Delta$ CM においては hummingbird 表現型を示す細胞 (hummingbird 細胞) 数の割合が野生型 CagA と比較して有意に低いことが示された。次に、GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現細胞で同様の解析を行ったところ、coumermycin 存在下で hummingbird 細胞数が有意に増加した。しかし、人為的二量体化 CagA による hummingbird 細胞誘導活性は野生型 CagA と比較して依然低かった。

そこで、野生型 CagA と人為的二量体化 GyrB-CagA $\Delta$ CM により誘導された hummingbird 細胞の質的な差異を検討した。hummingbird 細胞の定性的解析のため、GyrB-CagA $\Delta$ CM を発現させた AGS 細胞の長径を測定した。その結果、coumermycin 処理により人為的に二量体化した GyrB-CagA $\Delta$ CM 発現細胞は野生型 CagA と比較して細胞長径が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 二量体化による SHP2 の脱制御のみでは不十分であり、PAR1 のキナーゼ活性の抑制もまた必要である可能性が示唆された。

この可能性を検証するため、siRNA の導入により PAR1 をノックダウンした細胞を用いて 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。結果、人為的に二量体化した GyrB-CagA $\Delta$ CM は PAR1 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 細胞を誘導した。従って、十分に伸長した hummingbird 細胞の誘導には CagA の二量体化と PAR1 のキナーゼ活性の抑制が共に必要であることが明らかとなった。

ここまで SHP2 結合部位を単一に保有する CagA は二量体形成により SHP2 結合能が増強することを明らかにした。一方、CagA の SHP2 結合能は EPIYA-C または EPIYA-D セグメント数が増加するに従って増強することが明らかとなっている。そこで、EPIYA-C セグメント数を最大 8 個まで持つ一連の CagA 変異体を作製し、EPIYA-C セグメント数が SHP2 結合能に及ぼす影響の定量的な解析を試みた。一連の CagA 変異体を AGS 細胞に発現させて免疫沈降法により SHP2 結合能を解析したところ、EPIYA-C セグメント数の増加に伴い SHP2 結合量が飛躍的に増加した。

続いて、一連の CagA 変異体の hummingbird 細胞誘導能およびコラーゲンゲル浸潤能を解析したところ、EPIYA-C セグメント数の増加により hummingbird 細胞誘導活性が有意に上昇し、コラーゲンゲル浸潤能も増強する傾向が認められた。

次に、組換え CagA タンパク質と組換え SHP2 タンパク質を用いて CagA-SHP2 複合体形成に及ぼす EPIYA-C セグメント数の影響をより定量的に解析することを目指した。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ため、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。N 末端に GST タグ、C 末端に 6xHis タグを付加した CagA と CagA のチロシンリン酸化酵素である Src キナーゼを大腸菌 BL21 (DE3) に共発現させ、大腸菌体内で CagA をチロシンリン酸化させた。続いて、Ni-NTA およびグルタチオンセファロースビーズを利用したアフィニティ精製により CagA を精製した。CBB 染色および抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロットの結果、チロシンリン酸化された CagA が高純度に精製されていることが示された。

次に、精製したチロシンリン酸化 CagA と SHP2 の 2 つの SH2 ドメインの組換えタンパク質 (SHP2-SH2) を用いて表面プラズモン共鳴法により解離定数を測定した。その結果、EPIYA-C セグメントを複数持つ CagA と SHP2-SH2 との親和性は EPIYA-C セグメントの増加に従い指数関数的に高くなることが示された。しかし、EPIYA-C セグメントを 1 つ持つ CagA は他の CagA 変異体と比較して SHP2-SH2 との親和性が著しく低いことが明らかとなった。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 と関連することが示されている。従って、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た。

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。