

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 長瀬 里沙

本研究は *Helicobacter pylori* (ピロリ菌) の病原タンパク質である CagA の病原性および発がん性を規定する分子機序を解明するため、CagA の人為的分子二量体化法や CagA の標的分子の 1 つである SHP2 との結合部位 (EPIYA-C セグメント) を複数繰り返して持つ CagA を用いて CagA の病原生物活性の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 放射菌ストレプトマイセス属由来の抗生物質である coumermycin の添加により人為的に二量体化することで知られる大腸菌 DNA ジャイレースの B サブユニットを CagA の N 末端に融合することで、ヒト胃上皮由来 AGS 細胞において coumermycin 添加により CagA を人為的に二量体化することに成功した。
2. AGS 細胞において CagA を人為的に二量体化することにより、安定した CagA-SHP2 複合体が形成されることが免疫沈降実験により明らかにされた。
3. AGS 細胞において CagA を人為的に二量体化することにより、CagA-SHP2 複合体形成とそれに引き続く SHP2 の脱制御により誘導される細胞形態変化である hummingbird 表現型を示す細胞 (hummingbird 細胞) の数が有意に増加することが明らかにされた。
4. hummingbird 細胞の質的解析を行ったところ、野生型 CagA と比較して人為的に二量体化した CagA により誘導された hummingbird 細胞は細胞の伸長度が低いことが示された。CagA の人為的二量体化に加えて CagA 二量体化の責任領域と共通の部位で結合してその酵素活性が抑制されることが知られている分子である PAR1 キナーゼを同時にノックダウンすることで野生型 CagA と同程度に伸長した hummingbird 細胞が誘導された。したがって、CagA が病原生物活性を十分に発揮するためには 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にされた。

5. AGS 細胞において EPIYA-C セグメントを最大 8 個まで増加させた一連の CagA 変異体は EPIYA-C セグメントの増加に伴い SHP2 結合能が飛躍的に増強することが免疫沈降実験により明らかにされた。
6. AGS 細胞において EPIYA-C セグメント数の増加により CagA の hummingbird 細胞誘導活性が有意に増強し、CagA によるコラーゲンゲル浸潤能も増強する傾向が示された。
7. 大腸菌 BL21(DE3)株に CagA のチロシンリン酸化酵素である Src キナーゼと共発現させることで組換え CagA タンパク質をチロシンリン酸化し、それをアフィニティークロマトグラフィーにより高純度に精製することに成功した。
8. 一連の組換えチロシンリン酸化 CagA 変異体と SHP2 の CagA 結合部位である SH2 ドメインとの結合能は EPIYA-C セグメント数の増加に伴い増強することが GST プルダウンアッセイにより明らかにされた。また、このとき単一の EPIYA-C セグメントを持つ CagA は EPIYA-C セグメントを複数持つ CagA と比較して SH2 との結合能が低いことが明らかにされた。
9. 表面プラズモン共鳴法による解離定数の測定から、EPIYA-C セグメント数が 2 個から 8 個へ増加するのに伴い、CagA の SHP2 結合能が指数関数的に増強することが示された。一方、単一の EPIYA-C セグメントを持つ CagA においては他の EPIYA-C セグメントを複数持つ CagA と比較して親和性が著しく低いことが明らかにされた。

以上、本論文はこれまで解析されてこなかった CagA-SHP2 複合体形成の詳細な分子機構を明らかにした。本研究成果はピロリ菌感染を起点とする胃がんの新たな治療法の開発につながり得る重要な知見であると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。