

論文の内容の要旨

論文題目 ヘリコバクターピロリ菌の病原性タンパク質 CagA の分子細胞生物学的解析

氏名 三室 仁美

ヘリコバクターピロリ (*Helicobacter pylori*) は胃上皮細胞へ付着した後に、CagA タンパク質を IV 型分泌装置によって胃上皮細胞内へ注入する。細胞内に移行した CagA は宿主因子に作用して、細胞運動能を亢進させて細長く伸展した形態変化 (スキッターリング) を引き起こす。このような形態変化は肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) で刺激した細胞にも認められ、CagA は細胞に何らかの増殖因子様刺激を与えている可能性が示唆されていた。CagA タンパク質を発現しているピロリ菌の感染は、萎縮性胃炎や胃がんのリスクファクターとして注目されており、CagA タンパク質により引き起こされる宿主細胞応答が、ピロリ菌の感染とその病態に密接に関わっていることが示唆されている。本研究では、ピロリ菌が胃上皮細胞に感染して引き起こす宿主応答反応の全容を明らかにすることを究極の目的として、第1章では CagA タンパク質機能領域の解析及び宿主細胞側の結合因子との相互作用について、第2章では CagA タンパク質の宿主上皮細胞における作用についてそれぞれ検討した結果、以下のような知見を得た。

CagA タンパク質の機能領域の解析

CagA は、免疫原性の高いタンパク質であり、分離株間で分子量は 130-145kDa と異なる。特に、C 末端近傍の Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) 配列モチーフを含む領域のアミノ酸配列やくり返し数は株間により異なり、ピロリ菌の病原性との関連も示唆されている。宿主細胞内に注入された CagA は Src ファミリーチロシンキナーゼによって EPIYA モチーフ内のチロシン残基 (Y) がリン酸化されることが報告されている。一般に動物細胞内においては、チロシンリン酸化によるタンパク質の活性制御は細胞の増殖・分化・運動等の様々な局面において重要であ

ることから、CagA のチロシンリン酸化状態が病原性と関連するのではないかと推定されていた。そこで、チロシンリン酸化修飾される領域を同定するために、N 末端側領域および C 末端側領域を分割した様々な CagA 変異タンパク質を上皮細胞に異所性に発現させて、それぞれの細胞溶解液中のチロシンリン酸化 CagA タンパク質をウェスタンブロットにより解析した結果、チロシンリン酸化は C 末端近傍の EPIYA 繰り返し配列を含む PY 領域内において検出された。

次に各種 GFP-CagA 融合タンパク質を胃上皮細胞株 AGS に異所性に発現させると、野生型 CagA や CagA の C 末端側領域を発現する細胞ではスキュアリングが誘導されたが、PY 領域欠損変異 (Δ PY) CagA を発現する上皮細胞ではスキュアリングは誘導されなかった。また、5 ヶ所の EPIYA モチーフすべてを含む領域 (PY 領域) 全体を 2 つにわけて、前半の 2 つの EPIYA モチーフ領域と後半の 3 つのモチーフ領域を欠失した変異 CagA は、十分な形態変化誘導能がないものの、弱いながらも EPIYA モチーフの数に応じた活性を保持していた。これらのことから、CagA が細胞にスキュアリングを誘導するためには PY 領域の EPIYA モチーフを含む領域が必要であることが明らかになった。

CagA のチロシンリン酸化と形態変化

CagA タンパク質が引き起こすスキュアリングは、PY 領域内のチロシン残基のリン酸化が不可欠であるかを調べるために、5 ヶ所の EPIYA モチーフのすべてのチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したチロシンリン酸化耐性 CagA (F5-CagA) を発現するピロリ菌を作製した。フェニルアラニン残基はチロシン残基と立体構造上類似しており、周囲のポリペプチド鎖の立体構造に影響を与えずにリン酸化修飾耐性にできるアミノ酸である。この F5-CagA タンパク質を発現するピロリ菌を AGS 細胞へ 5 時間感染させると、野生型のチロシン残基型 CagA (Y5-CagA) を持つピロリ菌と同様にスキュアリングが誘導されることを見出した。この形態変化が CagA タンパク質に依存して誘導されることを確認するために、GFP-CagA 融合タンパク質を胃上皮細胞に異所性に発現させると、F5-CagA は野生型の Y5-CagA と同様にスキュアリングを誘導した。これらのことから、CagA が細胞にスキュアリングを誘導するためには、これまでの予想に反して、PY 領域のチロシンリン酸化は必ずしも必要ではないことが示唆された。

CagA タンパク質と相互作用する宿主因子の同定

CagA が引き起こすスキュアリングは、HGF の刺激によって誘導される細胞形態変化と似ていることから、細胞内で CagA は、HGF のレセプターである c-Met と同じようなシグナルカスケード伝達分子をリクルートする可能性が考えられた。そこで、CagA タンパク質と、c-Met に関わるシグナル伝達分子である Gab1、PI3K (p85-SH2 ドメイン)、Grb2、Nck、SHP-2 を GST に各々結合した組み換えタンパク質を結合させたビーズを、ピロリ菌を感染させた AGS 細胞の溶解液と混合して、CagA タンパク質と各々の宿主因子の結合性を調べた。細胞溶解液を調製する時にチロシンホスファターゼ阻害剤を添加して、チロシンリン酸化 CagA を用いた場合には、Grb2、Nck および SHP-2 に CagA が結合した。一方チロシンホスファターゼ阻害剤の存在しない状態では、非リン酸化 CagA は、Grb2 および Nck のみと結合した。

前述のようにチロシンリン酸化耐性の F5-CagA もスキュアリングを誘導することができたことから、非リン酸化 CagA にも結合する Grb2 に焦点を絞り、さらに検討した。GFP-CagA

を異所的に発現した細胞内においても CagA と Grb2 が会合しているかどうかを調べるために、Myc 標識 Grb2 と GFP-CagA を共に COS7 細胞に発現させ、細胞溶解液に含まれる CagA 複合体を、抗 CagA 抗体による免疫沈降法により調べた。野生型 Y5-CagA とチロシンリン酸化耐性 F5-CagA のいずれも Myc-Grb2 と複合体を形成したが、 Δ PY-CagA とは結合しなかった。すなわち、Grb2 は PY 領域のチロシンリン酸化とは無関係に、CagA の PY 領域と結合することがわかった。

Grb2 タンパク質のスキュアタリングにおける役割

Grb2 は、分子量約 25kDa のユビキタスなタンパク質であり、アダプタータンパク質としてシグナル伝達経路を仲介する分子である。リン酸化チロシン残基をもつアミノ酸配列を認識して結合する SH2 ドメインを中央にもち、N 末端および C 末端側に 2 つの SH3 ドメインをもつ。これらの SH3 ドメインが、Ras の GTP-GDP 交換因子である Sos のプロリンに富む領域に結合する。*in vitro* で解析したところ、CagA は、Grb2 の中央の SH2 ドメインと C 末端側の SH3 ドメインの 2 つのドメインにまたがって結合していた。さらに CagA が結合した Grb2 分子は、Sos と機能的に結合してスキュアタリングを誘導するかを調べた。Sos との結合に重要な 2 ヶ所の SH3 ドメイン内に各々点変異を導入した Grb2 変異体は、Sos との結合能が失われているが CagA との結合能は保持している。この Grb2 変異体を細胞内に強発現させると、ドミナントネガティブ体として正常な Grb2-CagA の結合を競合的に阻害して、Grb2 から Sos へのシグナル伝達効率を低下させることが予想された。ピロリ菌の感染によって、野生型 Grb2 発現細胞では 80% ほどの細胞がスキュアタリングを引き起こしたのに比べて、Grb2 変異体発現細胞では僅かに 16.5% の細胞しか形態変化を誘導しなかった。従って CagA がリクルートした Grb2 分子は、シグナル変換器として Sos へシグナルを伝達する重要な役割を果たしていることが示された。

CagA による ERK カスケード活性化

ERK カスケードは、増殖や分化などのさまざまな生命現象に関与している。そこで Grb2 から下流へのシグナル伝達、すなわち、Grb2→Sos→Ras→Raf-1→MEK1/2→ERK1/2 経路を CagA が活性化することができるかどうかを調べた。ピロリ菌が感染した AGS 細胞の経時的な MEK の活性化を、活性化 MEK に特異的な抗体を用いたウェスタンブロットにより解析した。野生型ピロリ菌の感染により MEK の活性化は約 2 時間で増大し、その後減衰はするものの、24 時間後も活性を保持していた。一方、CagA 欠損変異 (Δ cagA) や、CagA の分泌ができない IV 型分泌装置変異 (Δ virD4) ピロリ菌は、野生型ピロリ菌を感染させた場合と同様に、感染初期は高い活性化を示すが、その後速やかに衰退した。すなわち CagA は宿主細胞内で、長期的に MEK の活性化を持続させることを見いだした。この MEK 活性の持続は、チロシンリン酸化耐性の F5-CagA 変異体発現ピロリ菌においても同様であった。興味深いことに、HGF による ERK カスケード活性化は、初期の一時的な活性と、その後長時間持続する活性の二つの段階があり、特に後期の長時間持続活性が、スキュアタリング誘導に必要であることが報告されている。従って ERK カスケードの持続活性化により、CagA の HGF 様活性が惹起されることが強く示唆された。

ピロリ菌によるスキュアタリング誘導は MEK による ERK の活性化に基づくことを確認する

ために、MEK の阻害剤である PD98059 存在下においてピロリ菌を感染させたときの AGS 細胞の形態を観察した。するとスキャタリングを引き起こした細胞の割合は、阻害剤がない場合には 81.5%であったのに対して、阻害剤を加えると 16.2%にまで減少した。これらのことから、CagA が誘導するスキャタリングには MEK の活性化が重要であることが明らかになった。

CagA による細胞増殖亢進活性の解析

HGF のシグナル研究によく用いられている MDCK 細胞は、HGF 刺激によってスキャタリング、管腔形成、そして細胞増殖を誘導することが知られており、上皮-間葉形質転換のモデル系であることが知られている。そこで Y5-CagA、F5-CagA、 Δ PY-CagA を恒常的に発現する MDCK 細胞株を作製した。Y5 や F5-CagA を発現する細胞は、HGF 添加した細胞と同様に細胞の運動能が亢進して 1 つずつの細胞が分散したような形態変化を示す一方で、 Δ PY 発現細胞は、細胞分散が全くみられなかった。さらに、Y5 あるいは F5-CagA 発現細胞は、 Δ PY-CagA 発現細胞やコントロール細胞に比べて 1.5 倍以上の細胞増殖活性を示した。これらのことから、CagA の PY 領域は、そのチロシンリン酸化に非依存的に、ERK カスケードを活性化させ宿主細胞にスキャタリングと細胞増殖活性を誘導することが明らかになった。

CagA によるアポトーシス抑制活性

次に、ピロリ菌の感染によって宿主細胞に注入された CagA タンパク質が、宿主細胞死を調節する作用があるかどうかを検討した。ピロリ菌が感染した胃上皮細胞にスタウロスポリンでアポトーシスを誘導すると、野生型ピロリ菌感染細胞に比べて、 Δ cagA ピロリ菌感染細胞の細胞死の頻度が高く、CagA タンパク質が宿主細胞内で抗アポトーシス活性を示すことが示唆された。この、CagA による宿主細胞の抗アポトーシス作用は、MEK 阻害剤を添加した場合にはみられなかったことから、CagA による ERK カスケードの活性化によって、宿主細胞に誘導されるアポトーシスが抑制されることが明らかになった。

ピロリ菌の感染に起因する胃がんの発症においても、他の胃がんと同様の多段階進行機構が考えられている。発がんに至る背景には、癌遺伝子や遺伝子修復機構などの素因、免疫系遺伝子の多型、生活環境など複雑な数多くの要因による生体恒常性維持機構の長期的な不均衡があると考えられている。ピロリ菌の胃粘膜長期定着を通じて、CagA タンパク質によって引き起こされるシグナル伝達カスケードの亢進が、正常な胃粘膜におけるアポトーシスと細胞増殖のバランスを崩し、長期的には発がんの危険性が増大する可能性が考えられる。