

学 位 論 文 題 名

Influence of EPIYA-repeat Polymorphism
on the Phosphorylation-dependent Biological Activity
of *Helicobacter pylori* CagA

（ヘリコバクターピロリ病原因子 CagA のリン酸化依存的生物活性に
及ぼす EPIYA-repeat 領域多型の影響に関する研究）

学位論文内容の要旨

背景と目的

cagA 遺伝子陽性ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）は、胃炎・消化性潰瘍さらには胃癌発症に深く関与する。*cagA* 遺伝子産物である CagA は胃上皮細胞内に侵入後、C 末端側の EPIYA-repeat 領域に複数個存在する EPIYA モチーフ内のチロシン残基が Src ファミリーキナーゼ (SFK) によりリン酸化される。リン酸化された CagA は細胞内標的分子である SHP-2 および Csk と結合しそれらの酵素活性を脱制御する結果、疾病発症に関わる細胞内シグナルの異常を引き起こす。CagA の EPIYA-repeat 領域内には各 EPIYA モチーフ周辺のアミノ酸配列の違いにより定義される4種類の EPIYA セグメント (A-D) が存在し、ピロリ菌欧米単離株が保有する CagA の EPIYA-repeat 領域は EPIYA-A、-B ならびに -C セグメント、ピロリ菌東アジア型単離株が保有する CagA の EPIYA-repeat 領域は EPIYA-A、-B ならびに -D セグメントの多様な組み合わせにより構成される。さらに SHP-2 との結合には欧米型 CagA 特異的な EPIYA-C セグメントおよび東アジア型 CagA 特異的な EPIYA-D セグメントが利用され、Csk との結合には欧米型、東アジア型 CagA 双方でみられる EPIYA-A ないし -B セグメントが利用される。本研究では、臨床単離されたピロリ菌 CagA が示す EPIYA-repeat 領域の構造多型が、SHP-2 および Csk との複合体形成能に及ぼす影響を比較検討することで、CagA 分子多型とリン酸化依存的な CagA 生物活性強度、さらには *cagA* 陽性ピロリ菌感染と疾患の病態形式との関係を明らかにすることを目的とした。

方法

プラスミド DNA の作製：東アジア型 F75 ピロリ菌株由来 ABDD-type *cagA* を人工合成し、発現ベクター pSP65SRα にクローニングした。各東アジア型 CagA バリエントは ABDD-type *cagA* を基に Chameleon site-directed mutagenesis キットを用いて作製した。同様に各欧米型 CagA バリエントは NCTC11637 ピロリ菌株由来の ABGCC-type *cagA* を基に作製した。

細胞培養および遺伝子導入：AGS ヒト胃上皮細胞株は、10%FCS 添加 RPMI 1640 培地で培養した。プラスミド DNA の遺伝子導入には、LipofectAMINE 2000 試薬を用いた。

免疫沈降ならびにウェスタンブロット：免疫沈降物ならびに細胞抽出液を SDS-PAGE により分離した後ウェスタンブロットを行った。得られたバンドの強度は luminescence image analyzer を用いて測定した。

結果

1. CagA EPIYA-repeat 領域の構造多型：臨床単離されたピロリ菌由来の CagA の EPIYA-repeat 領域

における分子多型を解析した結果、ほとんど全ての欧米型 CagA は EPIYA-C セグメントが直列に繰り返される ABCn-type (n は繰り返しの数) であった。一方、東アジア型 CagA においては ABD-type が最も多く認められたが、少数ながら EPIYA-A、-B、-D 各セグメントが複雑に組み合わせられたバリエーションの存在も認められた。

2. CagA チロシンリン酸化量と EPIYA-repeat 領域多型: 各 CagA バリエーションのチロシンリン酸化量は、EPIYA-C および D セグメントの数に依存して増加した。EPIYA-A および B セグメントも弱いながらチロシンリン酸化を受けるため、これらのセグメントをより多く保有する CagA においてもチロシンリン酸化量の増加が認められた。

3. CagA-SHP-2 相互作用に及ぼす EPIYA-repeat 領域多型の影響: 各 CagA バリエーションに対する SHP-2 結合量は、欧米型 CagA では EPIYA-C セグメントの数に、東アジア型 CagA では EPIYA-D セグメントの数にそれぞれ依存して増加した。さらに CagA への SHP-2 結合量は EPIYA セグメントの数に対して相乗的に増加することが示された。

4. CagA-Csk 相互作用に及ぼす EPIYA-repeat 領域多型の影響: 各 CagA バリエーションに対する Csk の結合量は、EPIYA-A ないし B セグメントの数に依存して増加した。例外的に ABDABD 型および ABDBD 型 CagA は、他の CagA バリエーションと比較して Csk 結合量の著しい増加を認めた。この結合量の著しい増加には EPIYA-D セグメントのチロシンリン酸化は関与せず、EPIYA-B および D セグメントの連続した構造が EPIYA-B セグメントの Csk 結合親和性を増大させる可能性が示唆された。

5. 欧米型 CagA と東アジア型 CagA 間における生物活性の直接比較: 過去の報告通り SHP-2 結合能は東アジア型 CagA が欧米型 CagA に比べ有意に強いことが示された。一方、Csk 結合能は欧米型 CagA の方が東アジア型 CagA に比べ強いことが示された。東アジア型 CagA は欧米型 CagA に比較し SHP-2 とより強く結合する結果、CagA-Csk 複合体形成がより強く競合阻害されるためであると考えられた。

6. Csk による CagA-SHP-2 相互作用の抑制: 構成的活性型 Csk を CagA と共発現させたところ、CagA のチロシンリン酸化量ならびに SHP-2 結合量はともに低下した。

7. EPIYA-repeat 領域多型が CagA の生物活性に及ぼす影響: CagA は SHP-2 依存的に細胞質の著しい伸長で特徴づけられる細胞形態変化 (ハミングバード表現型) を誘導する。一方、CagA により活性化された Csk は SFK を不活化することで CagA-SHP-2 複合体形成を抑制する。CagA の分子多型が生物活性に及ぼす影響を検討するためにハミングバード表現型誘導を経時的に観察したところ、より強く SHP-2 と結合する CagA を発現させた細胞ではより早期からハミングバード表現型が誘導された。一方、より強く Csk と結合する CagA を発現させた細胞ではハミングバード表現型の持続時間の短縮ならびに CagA のチロシンリン酸化量の低下が認められるとともに、SFK の活性化レベルもより強く抑制された。以上の結果から、CagA-Csk 相互作用を介する SFK の不活化が、CagA のチロシンリン酸化抑制とそれに続く CagA-SHP-2 相互作用の減弱を引き起こすことが明らかとなった。

まとめ

本研究から、各々のピロリ菌 CagA 分子が発揮する CagA のリン酸化依存的な生物活性は EPIYA セグメントの数やチロシンリン酸化量の単純な比較のみでは決められず、各 EPIYA セグメントの並び方が活性の強弱に大きく影響することが示された。得られた成果から、EPIYA-C および D セグメントをより多く持つとともに EPIYA-A および B セグメントの数がより少ない CagA ほど SHP-2 をより強く脱制御することが推察された。EPIYA-repeat 領域における CagA の構造多型が各々の *cagA* 陽性ピロリ菌株間における胃粘膜傷害誘導活性の強さ、さらには発癌活性の程度に影響を及ぼすことが示唆される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 瀬 谷 司

副 査 教 授 三 輪 聡 一

副 査 教 授 小 野 江 和 則

副 査 教 授 畠 山 昌 則

学 位 論 文 題 名

Influence of EPIYA-repeat Polymorphism on the Phosphorylation-dependent Biological Activity of *Helicobacter pylori* CagA

(ヘリコバクターピロリ病原因子 CagA のリン酸化依存的生物活性に
及ぼす EPIYA-repeat 領域多型の影響に関する研究)

cagA 遺伝子陽性ヘリコバクター・ピロリ (ピロリ菌) は、胃炎・消化性潰瘍さらには胃癌発症に深く関与する。*cagA* 遺伝子産物である CagA は胃上皮細胞内に侵入後、C 末端側の EPIYA-repeat 領域に複数個存在する EPIYA モチーフ内のチロシン残基がリン酸化され、細胞内標的分子である SHP-2 および Csk と結合しそれらの酵素活性を脱制御する結果、疾病発症に関わる細胞内シグナルの異常を引き起こす。CagA の EPIYA-repeat 領域内には各 EPIYA モチーフ周辺のアミノ酸配列の違いにより定義される 4 種類の EPIYA セグメント (A-D) が存在し、分離されるピロリ菌株間で多様な組み合わせが存在する。本研究では、臨床単離されたピロリ菌 CagA が示す EPIYA-repeat 領域の構造多型に沿った各人工改変分子を作製し、CagA の分子多型が SHP-2 および Csk との複合体形成能に及ぼす影響、さらにはリン酸化依存的な CagA の生物活性に及ぼす影響に関して詳細な比較検討を行った。

1) CagA の EPIYA-repeat 領域における分子多型を解析した結果、ほとんどの欧米型 CagA は ABC_n-type (n は繰り返しの数) であった。東アジア型 CagA においては ABD-type が最も多く認められたが、少数ながら EPIYA-A、-B、-D 各セグメントが複雑に組み合わせられたバリエーションも存在した。

2) 各 CagA バリエーションのチロシンリン酸化量は、EPIYA-C および D セグメントの数に依存して増加した。EPIYA-A および B セグメントも弱いながらチロシンリン酸化を受けるため、これらのセグメントをより多く保有する CagA においてもチロシンリン酸化量の増加が認められた。

3) 各 CagA バリエーションに対する SHP-2 結合量は、欧米型 CagA では EPIYA-C セグメントの数に、東アジア型 CagA では EPIYA-D セグメントの数にそれぞれ依存して増加した。さらに CagA への SHP-2 結合量は EPIYA セグメントの数に対して相乗的に増加することが示された。

4) 各 CagA バリエーションに対する Csk の結合量は、EPIYA-A ないし B セグメントの数に依存して増加した。例外的に ABDABD 型および ABDBD 型 CagA は、他の CagA バリエーションと比較して Csk 結合量の著しい増加を認めた。この結合量の著しい増加には EPIYA-D セグメントのチロシンリン酸化は関与せず、EPIYA-B および D

セグメントの連続した構造がEPIYA-B セグメントのCsk 結合親和性を増大させる可能性が示唆された。

5) 欧米型CagA と東アジア型CagA 間における結合量の直接比較では、過去の報告通り SHP-2 結合能は東アジア型CagA が欧米型CagA に比べ有意に強いことが示された。一方、Csk 結合能は欧米型CagA の方が東アジア型CagA に比べ強いことが示された。東アジア型CagA は欧米型CagA に比較し SHP-2 とより強く結合する結果、CagA-Csk 複合体形成がより強く競合阻害されるためであると考えられた。

6) 構成的活性型Csk をCagA と共発現させたところ、CagA のチロシンリン酸化量ならびに SHP-2 結合量はともに低下した。

7) CagA は SHP-2 依存的に細胞質の著しい伸長で特徴づけられる細胞形態変化 (ハミングバード表現型) を誘導する。一方、CagA により活性化されたCsk は SFK を不活化することでCagA-SHP-2 複合体形成を抑制する。CagA の分子多型が生物活性に及ぼす影響を検討するためにハミングバード表現型誘導を経時的に観察したところ、より強く SHP-2 と結合するCagA を発現させた細胞ではより早期からハミングバード表現型が誘導された。一方、より強くCsk と結合するCagA を発現させた細胞ではハミングバード表現型の持続時間の短縮ならびにCagA のチロシンリン酸化量の低下が認められるとともに、SFK の活性化レベルもより強く抑制された。以上の結果から、CagA-Csk 相互作用を介する SFK の不活化が、CagA のチロシンリン酸化抑制とそれに続くCagA-SHP-2 相互作用の減弱を引き起こすことが明らかとなった。

本研究から、各々のピロリ菌CagA 分子が発揮するCagA のリン酸化依存的な生物活性はEPIYA セグメントの数やチロシンリン酸化量の単純な比較のみでは決められず、各EPIYA セグメントの並び方が活性の強弱に大きく影響することが示された。得られた成果から、EPIYA-repeat 領域におけるCagA の構造多型が各々のcagA 陽性ピロリ菌株間における胃粘膜傷害誘導活性の強さ、さらには発癌活性の程度に影響を及ぼすことが示唆された。

口頭発表において副査三輪聡一教授より、1) ハミングバード表現型の誘導における SHP-2 の重要性、2) 胃以外でのピロリ菌感染の可能性、3) 胃上皮細胞へのピロリ菌の付着機構に関する質問、副査小野江和則教授より、1) マクロファージへのCagA 導入の可能性、2) 同一患者におけるCagA の分子多型、3) ピロリ菌が持つIV型分泌機構に関する質問、さらに副査畠山昌則教授より、1) 特定のCagA 分子種におけるCsk 結合量増加のメカニズム、2) CagA のSHP-2 結合能と病態との関連についての質問があった。最後に主査瀬谷司教授より、1) CagA による SHP-2 活性化強度と胃癌との相関、2) SHP-2 とCsk のみでピロリ菌感染時の細胞内リン酸化/脱リン酸化のシミュレーションが可能か否かに関する質問があったが、いずれの質問に対しても申請者は主旨をよく理解し自らの研究データと文献的考察を混じえて適切な解答をした。

ピロリ菌感染と胃粘膜病変発症の関連を解明する上で本研究の意義は大きく、今後のオーダーメイド医療への臨床的応用の発展が期待される。審査員一同は協議の結果、申請者が博士(医学)の学位授与に値するものと判定した。