

Molecular mechanism for the loss of epithelial cell polarity by the *Helicobacter pylori* CagA protein

(*Helicobacter pylori* CagA による上皮細胞極性破壊の分子メカニズム)

学位論文内容の要旨

Helicobacter pylori, the Gram-negative bacterial pathogen, is known as a major causative agent for the induction of chronic gastritis and gastroduodenal ulcer disease as well as gastric adenocarcinoma. The cytotoxin-associated gene A antigen (CagA) of *H. pylori* has been implicated to play an important role in the induction of pathogen-associated diseases. CagA is delivered into gastric epithelial cells via the type IV secretion system and undergoes tyrosine phosphorylation by Src family kinases at the Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) motif. CagA has been shown to interact with a number of host signaling molecules such as, SHP2 tyrosine phosphatase, C-terminal Src kinase (Csk), c-Met receptor or phospholipase C- α , adaptor molecules Crk, and adaptor molecules Grb-2 in both phosphorylation-dependent and -independent manners. Tyrosine-phosphorylated CagA specifically binds and activates SHP-2, which in turn dephosphorylates and inactivates focal adhesion kinase (FAK), thereby causing formation of an elongated cell shape termed as the “hummingbird” phenotype with elevated cell motility. *H. pylori* has also been shown to disrupt the organization and assembly of tight junctions in polarized epithelial cells in a CagA-dependent manner. In this study, the mechanisms by which CagA causes disruption of tight junctions were investigated in polarized epithelial cells. To this end, it was tried to find here-to-fore unidentified host proteins that specifically bind to CagA. By employing a proteomic approach with the use of the liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), it was demonstrated that seven host cellular proteins that specifically interacts with the identified CagA region. Among these proteins PAR1b/MARK2 kinase was the highest score. The PAR1 serine/threonine protein kinases are key polarity determinants that localizes to the basolateral membrane of polarized epithelial cells. It was also found that CagA interact with the PAR1 independently of CagA tyrosine phosphorylation. By using a series of PAR1b truncated mutants, it was determined that CagA binds to the 27 amino-acid sequence (residues 250-276) located at the C-terminal region of the catalytic domain of PAR1b, which is highly conserved among four members of the mammalian PAR1 family kinase. The effect of CagA binding on the PAR1 kinase activity was investigated and it was found that the PAR1b kinase activity is specifically inhibited by CagA in both in vivo and in vitro

kinase assay, indicating the interaction of CagA with the kinase domain of PAR1b suppresses the kinase activity. In mammalian epithelial cells, PAR1 is specifically localized to the baso-lateral membrane, whereas it is excluded from the tight junction as well as the apical membrane because aPKC at tight junction phosphorylate PAR1 and release it from the plasma membrane. Interaction of CagA with PAR1 prevents the aPKC-mediated phosphorylation of PAR1 at the tight junction, resulted mislocalization of PAR1 to and above the tight junction. Consequently, CagA suppresses PAR1 kinase activity in polarized epithelial cells and at the same time elicits mislocalization of PAR1 to tight junction area collectively causes junctional and polarity defects. By using a series of CagA mutants, it was found that PAR1b bind to the conserved 16 amino acids of CagA, which we termed CagA-multimerization (CM) sequence in both Western and East Asian spices. It has been shown that CM sequence is essential for CagA multimerization and subsequent CagA-SHP2 interaction. It was found in this work that expression of PAR1 promotes the CagA multimerization, indicating that CagA multimerizes through PAR1 in mammalian cells. It was also demonstrated that elevated levels of PAR1 increases the CagA-SHP2 interaction, indicating that the PAR1 is required for the stable CagA-SHP2 interaction. Because the induction of hummingbird phenotype is dependent on CagA-SHP2 interaction and PAR1 is involved in this CagA-SHP2 interaction, the effect of PAR1 on the morphogenetic activity of CagA was investigated. Despite the stimulatory role of PAR1 on the CagA-SHP2 complex formation, induction of hummingbird phenotype was inhibited by the elevated levels of PAR1b, indicating that the hummingbird phenotype requires inhibition of PAR1 kinase activity in addition to the activation of SHP2 by CagA. Taken together, the results revealed that CagA-PAR1 interaction is involved in the disruption of tight junction and loss of cell polarity as well as induction of cell morphological change. These results provide strong evidence that PAR1 is an important intracellular target for *H. pylori* CagA in gastric epithelial cells in the disorganization of epithelial architecture that promotes mucosal lesions leading to inflammation and gastric carcinoma.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 昌 則
副 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 谷 野 圭 持

学 位 論 文 題 名

Molecular mechanism for the loss of epithelial cell polarity by the *Helicobacter pylori* CagA protein

(*Helicobacter pylori* CagA による上皮細胞極性破壊の分子メカニズム)

博士学位論文審査等の結果について(報告)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) の持続感染は、胃炎、潰瘍から胃癌にいたる様々な胃粘膜病変を引き起こす。特に *H. pylori* 病原遺伝子の1つである *cagA* 遺伝子を保持する菌株は病原性が高く胃癌との密接な関連が報告されている。*cagA* 陽性 *H. pylori* は胃上皮細胞に接着した後、菌体内で産生した CagA を宿主細胞内に直接注入する。宿主胃上皮細胞内に侵入した CagA は Src ファミリーキナーゼによりチロシンリン酸化を受けた後、SHP-2 チロシンホスファターゼに代表される細胞内シグナル伝達分子と相互作用し、それらの機能を脱制御することにより細胞癌化につながる異常細胞増殖シグナルを生成する。一方、*cagA* 陽性 *H. pylori* は、極性化された上皮細胞層に感染させた場合、細胞間接着装置として知られるタイトジャンクションを破壊することが報告されている。タイトジャンクション破壊による胃粘膜傷害は *cagA* 陽性 *H. pylori* 感染にともなう初期の粘膜病変発に重要な意義を有すると考えられ、その機構解明には多大な関心が持たれていた。申請者は、これまで不明であった *H. pylori* CagA による粘膜上皮構築破壊の機構解明に取り組み、病原因子としての CagA の生物学的役割を検討した。本論文は、筆者が世界に先駆けて解明した CagA によるタイトジャンクション破壊と細胞極性喪失の分子機構に関して述べたものである。

第1章では、極性化された上皮細胞間に形成されるタイトジャンクション破壊に関わる *H. pylori* CagA の分子内領域を同定した。イヌの腎上皮に由来する MDCK 細胞をフィルター上で培養することにより、高度に極性化させた一層の上皮細胞層が構築される。MDCK 細胞を用いたこの系は、*in vitro* 上皮細胞の極性研究の中心をなすものである。申請者は、極性化させた MDCK 細胞に CagA 発現ベクターを一過性導入・発現させることに成功し、CagA がチロシンリン酸化非依存的にタイトジャンクションの破壊を誘導することを明らかにした。さらに、種々の CagA 欠変異体を発現させることにより、タイトジャンクション破壊に関与する CagA 領域として C 末側の約150アミノ酸か

らなる配列を同定した。さらに、CagA 発現細胞においては頂端側-基底側軸に沿った上皮細胞極性が喪失していることを明らかにするとともに、極性破壊された CagA 発現細胞はもはや極性化 MDCK 細胞層を構成できず、層内から容易に離脱してしまうことを見出した。

第2章では、上皮細胞のタイトジャンクションならびに極性破壊に関与する CagA の標的分子の単離・同定を行った。第1章で同定されたタイトジャンクション破壊に関わる CagA の分子内領域を用い、この領域に特異的に結合する細胞側タンパク質を LC/MS/MS を用いて網羅的に探索し、細胞極性のマスターレギュレーターとして知られる PAR1/MARK キナーゼの同定に成功するとともに、両分子の相互作用を細胞内で確認した。さらに CagA-PAR1 相互作用に関わる PAR1 ならびに CagA 分子内領域を検索し、両分子の結合に PAR1 のキナーゼドメイン C 末部位 (27 アミノ酸) ならびに CagA の二量体化に関与することが既に明らかにされている CM 配列 (16 アミノ酸) が直接関与することを明らかにした。

第3章では、CagA との相互作用により PAR1 のキナーゼ活性が抑制されることを *in vitro* ならびに *in vivo* kinase assay を用いて明らかにした。さらに、CagA および PAR1 のアデノウイルス発現系を樹立し、CagA による MDCK 細胞層のタイトジャンクションならびに極性破壊が PAR1 の共発現により阻止されることを明らかにした。この結果から、CagA は PAR1 を標的として細胞極性破壊を引き起こすと結論付けられた。

第4章では、CagA との複合体形成の結果、aPKC による PAR1 のリン酸化が阻害されることを示した。aPKC による PAR1 のリン酸化は、PAR1 の細胞内分布 (細胞膜側面ならびに基底面への分布) を制御する重要な修飾であり、この阻止の結果、CagA は本来分布することのない頂端側細胞膜にまで広く分布することが示された。

第5章では、CagA-PAR1 複合体形成が、CagA の多量体化 (二量体化) さらには CagA-SHP-2 相互作用に重要な役割を担うことを明らかにした。これまでに知られていた CagA の多量体化 (二量体化) は、PAR1 二量体に CagA が結合する結果間接的に引き起こされることが示された。

以上、本研究により CagA の新規標的分子として PAR1 が世界に先駆けて見出され、*H. pylori*-宿主細胞間相互作用理解に向けてのまったく新たな知見が得られた。さらに、CagA による上皮細胞構築破壊における CagA-PAR1 相互作用の役割が分子機構が明らかとなった。本研究から得られたこれらの一連の知見は、科学界でもっとも権威ある雑誌のひとつである英科学誌 *Nature* に発表され既に高い評価を得ており、*cagA* 陽性 *H. pylori* の感染により惹起される胃癌をはじめとする様々な胃粘膜病変発症の分子機構の解明に貢献するところがきわめて大きい。

よって著者は北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。