

学 位 論 文 題 名

Mechanisms and functions of the *Helicobacter pylori* CagA-PAR1 polarity-regulating kinase interaction

(ヘリコバクター・ピロリ CagA-PAR1 極性制御キナーゼ
相互作用機構とその機能)

学位論文内容の要旨

Helicobacter pylori (*H. pylori*) cagA-positive strains are associated with gastritis, peptic ulcerations, and gastric adenocarcinoma. Upon delivery into gastric epithelial cells via the bacterial type IV secretion system, the cagA-encoded CagA protein binds and aberrantly activates SHP-2 phosphatase, a *bona-fide* oncoprotein, in a manner that is dependent on CagA tyrosine phosphorylation. CagA-deregulated SHP-2 elicits sustained Erk MAP kinase activation while causing an elongated cell shape known as the “hummingbird phenotype”. In the host gastric cells, CagA homo-multimerizes, most probably homo-dimerizes, via a conserved 16-aa sequence (FPLXRXVXDLSKVG) referred to as the CagA-multimerization (CM) sequence and this multimerization is crucial for induction of the hummingbird phenotype by CagA. In addition to SHP-2, CagA also binds to partitioning-defective 1b/ microtubule affinity-regulating kinase 2 (PAR1b/MARK2) and inhibits its kinase activity, thereby causing disruption of the tight junctions and the loss of apical-basolateral polarity in polarized epithelial monolayer. PAR1b is a member of PAR1/MARK kinases, a highly conserved serine/threonine kinase family playing a critical role in the regulation of cell polarity and microtubules dynamics from yeast to human. Notably, PAR1b has been reported to be present as a homo-dimer in cells. Since CagA multimerization occurs only after delivery into the host cells, it is likely that the CagA multimerization is mediated by a host cell protein that is already present as a multimer in cells. An intriguing possibility is therefore that the PAR1b dimer is involved in CagA dimerization and, accordingly, CagA-PAR1b interaction underlies the morphogenetic activity of CagA to induce the hummingbird phenotype. Also notably, mammalian PAR1 family consists of four distinct isoforms, from PAR1a to PAR1d. Thus, potential interaction of CagA with PAR1 members other than PAR1b also needs to be investigated.

In this work, I demonstrate that the CM sequence is responsible for the interaction of CagA, either Western or East Asian type, with PAR1b and provide evidence that the PAR1 dimer binds two CagA proteins to passively dimerize CagA. I also demonstrate that the CM sequence is not only

essential for the CagA-mediated junctional defect, which is caused upon inhibition of PAR1 by CagA, but also plays an important role in induction of the hummingbird phenotype through potentiating CagA-SHP-2 complex formation. The CM sequence exhibits polymorphism among distinct CagA species both at the amino acid sequences and at the number. The prevalent East Asian CagA (CagA-ABD) that contains one East Asian CM sequence (E-CM: FPLRRSAAVNDLSKVG) distal to the EPIYA segment binds to PAR1b at the level that is comparable to that of the prevalent Western CagA (CagA-ABC) possessing two identical Western CM sequences (W-CM: FPLKRHDKVDDLSKVG, one within the EPIYA-C segment and the other distal to the EPIYA-C segment), indicating that E-CM is twice as strong as W-CM in PAR1b interaction. Among Western CagA proteins carrying variable numbers of W-CM sequences (because W-CM is present in the repeatable EPIYA-C segment), the ability of CagA to bind PAR1b is proportional to the number of W-CM. Furthermore, the degree of PAR1b-binding activity of CagA correlates with the magnitudes of junctional defects and of hummingbird phenotype induction by CagA. I also show that all the human PAR1/MARK isoforms bind CagA. Thus, CagA is a universal inhibitor of the PAR1 kinases. Furthermore, each of the PAR1 isoforms exhibits distinct binding activity to CagA. Nevertheless, all the PAR1 isoforms could rescue the CagA-induced junctional defect in polarized MDCK II cells and abolish hummingbird phenotype in AGS cells to comparable levels, indicating that the PAR1 isoforms are functionally redundant in terms of CagA targets.

I show in this work the importance of the CM sequence and its polymorphism in the formation and functions of the CagA-PAR1 complex. I also show the role of the CagA-PAR1 complex in the pathophysiological activities of CagA. This work provides new insights into our understanding for the mechanism of the *cagA* positive *H. pylori*-mediated gastric lesions that promote gastric carcinogenesis.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 昌 則
副 査 教 授 石 森 浩一郎
副 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 高 岡 晃 教

学 位 論 文 題 名

Mechanisms and functions of the *Helicobacter pylori* CagA-PAR1 polarity-regulating kinase interaction

(ヘリコバクター・ピロリ CagA-PAR1 極性制御キナーゼ
相互作用機構とその機能)

ヘリコバクターピロリ（ピロリ菌）は全世界人口の約半数に感染が成立している人類最大の細菌感染症である。ピロリ菌感染は慢性胃炎・胃十二指腸潰瘍の主たる原因となり、さらに近年の研究から胃癌発症との密接な関係も明らかになってきた。ピロリ菌は自らが保有するミクロの注射針（4型分泌装置）を用いて病原タンパク質 CagA を胃上皮細胞内に注入する。細胞内に侵入した CagA は細胞膜内面に局在し、Src キナーゼによりチロシンリン酸化を受けた後、ヒト癌タンパク質として知られる SHP-2 チロシンホスファターゼと特異的に結合する。CagA との複合体形成を介して SHP-2 は異常に活性化され、Erk MAP キナーゼの持続的活性化ならびにハミングバード表現型とよばれる細胞質の著しい伸長をとともなう細胞運動の異常亢進を引き起こす。細胞内に侵入した CagA はホモ二量体として存在することが明らかにされている。この二量体化には、CagA 分子の C 末側領域に存在する CagA-multimerization (CM) 配列と呼ばれる 16 アミノ酸からなる配列が関与する。CM 配列は CagA によるハミングバード表現型誘導にも重要な役割を担う。

CagA は SHP-2 に加え、PAR1b/MARK2 セリン・スレオニンキナーゼとも相互作用することが知られている。PAR1b は酵母からヒトに至るまで高度に保存された PAR1 細胞極性制御キナーゼのメンバーである。CagA-PAR1b 複合体形成により PAR1b のキナーゼ活性は抑制され、その結果、上皮細胞のタイトジャンクションならびに頂端側-基底側細胞極性は失われる。CagA 二量体化は胃上皮細胞内に侵入した後に生じることから、二量体化のプロセスに宿主細胞由来の分子が関与することが考えられた。興味深いことに、PAR1b は細胞内で二量体として存在することが知られている。本論文は、CagA の二量体化と PAR1b との関連、さらには CagA の生物活性発現における CagA 二量体化ならびに CM 配列の意義を明らかにするとともに、細胞極性脱制御における CagA の CM 配列多型の役割ならびに PAR1 ファミリー全体に及ぼす CagA の機能的役割を検討したものである。

第一章では、COS 細胞ならびに AGS 胃上皮細胞における遺伝子共発現系に免疫沈降ならびに免疫ブロット法を組み合わせることにより、CagA-PAR1b 相互作用に関与する分子内領域が同定された。PAR1b との結合には、CagA 二量体化に必要な CM 配列が直接関与することが明らかとなった。この結果から、二分子の CagA が、CM 配列を介して PAR1b ダイマーと複合体形成する結果、受動的に二量体化することが明らかとなった。一方、CagA との結合には PAR1b のキナーゼドメイン C 末領域(250-269)が必須であることが示された。

第二章では、CagA の生物活性発現における CM 配列の役割が検討された。まず、極性化上皮細胞に CM 配列のみを選択的に欠失させた CagA 変異分子を発現することにより、CagA による細胞間接着機構の破壊ならびに上皮細胞極性の喪失に CM 配列の存在が必須であることを明らかにされた。さらに、この CagA 変異分子を AGS 胃上皮細胞に異所性発現させることにより、CM 配列が CagA-SHP-2 複合体形成ならびにそれに続くハミングバード細胞誘導にもきわめて重要な役割を担うことが示された。

第三章では、CagA CM 配列の構造多型と機能との関連が検討された。CM 配列は単離されるピロリ菌 CagA 分子間で、その数ばかりでなくアミノ酸配列にも多型を示す。この CM 配列多型は CagA 分子間の地理的分子多型とほぼ一致し、ABD 型に代表される東アジア型 CagA は「FPLRRSAAVNDLSKVG」で表される東アジア型 CM 配列を、また ABC 型に代表される欧米型 CagA は「FPLKRHDKVDDLSKVG」で表される欧米型 CM 配列を有する。なお、東アジア型 CM ならびに欧米型 CM におけるアミノ酸相同性は 70%。欧米型 CagA 分子種間においては、CM 配列の数は 2-5 個の間で変動することが知られているが、PAR1b との結合もまた CM 配列の数に応じて増強することが明らかとなった。さらに、東アジア型 CM 配列と欧米型 CM 配列間の PAR1b 結合能を直接比較したところ、東アジア型 CM 配列は欧米型 CM 配列に比べ約 2 倍の PAR1b 結合活性の強さを有することが明らかとなった。この結果から、CM 配列の多様性が CagA 分子種間の病原性の高低を決定する重要な要因となっている可能性が示唆された。

第四章では、CagA と PAR1 ファミリー分子 (PAR1a, PAR1b, PAR1c, PAR1d) 間の物理的・機能的相互作用が検討された。その結果、PAR1b>PAR1d>PAR1a>PAR1c の強さの順で CagA はすべての PAR1 ファミリー分子と結合することが明らかにされた。よって、CagA は PAR1b のみならず PAR1 ファミリーキナーゼを一括して抑制することにより細胞極性破壊を誘導することが示された。

以上、本研究により、癌タンパク質としての CagA の病原活性発現における CM 配列の機能的重要性が初めて明らかにされた。さらに、CagA 分子種間における CM 配列多型の生物学的意義が解明され、今後、CM 配列をもとにした個々の CagA 分子の病原・発癌活性評価法樹立につながる可能性が示された。よって、本研究は、ピロリ菌感染により惹起される潰瘍・胃癌等の発症機構解明ならびに診断・治療への応用に貢献するところがきわめて大である。

よって筆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。