

学 位 論 文 題 名

Regulation of Src family kinases by Pragmin via the
EPIYA tyrosine-phosphorylation motif, which is utilized
by bacterial effectors

(細菌エフェクターが模倣する EPIYA チロシンリン酸化モチーフを介した
Pragmin による Src ファミリーキナーゼの制御)

学位論文内容の要旨

A number of bacterial pathogens injected effector proteins into host cells by a bacterial type III or type IV secretion system. After translocation, these effectors undergo tyrosine phosphorylation at Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) or EPIYA-like sequence motif by host kinases. This EPIYA phosphorylation triggers complex formation of bacterial effectors with SH2 domain-containing proteins that results in perturbation of eukaryotic signal transduction pathways and subversion host cell functions for the benefit of the pathogen. So far, no molecule has been reported in mammals which utilizes the EPIYA motif for the possible biological function. In this work, it was explored a mammalian protein possessing a functional EPIYA motif that may be exploited or evaded by bacterial EPIYA effectors. To this end, by searching of the human proteome with the NCBI BLAST program, six proteins which have a perfect EPIYA motif were identified. It was hypothesized that mammalian EPIYA effectors, if they exist, should have a scaffold/adaptor function involved in intracellular signal transduction. Pragmin, a cytoplasmic pseudokinase, was chosen for further analysis in this study. Because many pseudokinases have been known to act as scaffolds or adaptors in the cells. It was found that Pragmin undergoes tyrosine phosphorylation by SFKs or in response to EGF stimulation at the EPIYA motif. Tyrosine phosphorylation at EPIYA motif of pragmin makes complex formation with the

C-terminal Src kinase (Csk), a negative regulator of SFKs. Pragmin is a cytoplasmic protein and the Pragmin-Csk complex formation sequesters Csk to the cytoplasm, preventing SH2 domain-dependent recruitment of Csk to the membrane and subsequent inactivation of SFKs. Since SFKs are kinases that phosphorylate Pragmin, therefore, these results indicated the presence of a positive feedback loop that ensures sustained SFK activation by the Pragmin-Csk complex. It was also shown unlike bacterial EPIYA motifs which can display promiscuous specificity for multiple SH2 domains, however, the Pragmin EPIYA motif exhibited strict binding specificity to the SH2 domain of Csk. Interestingly, *Helicobacter pylori* EPIYA effector CagA has been shown to bind to Csk in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. In this study, It was demonstrated that the level of the Pragmin-Csk complex substantially reduced in the presence of a *H. pylori* CagA. However, *H. pylori* EPIYA effector CagA binds to Csk SH2 domain in place of Pragmin and thereby enforces recruitment of Csk to the membrane to inhibit SFKs. These results introduced Pragmin as the first mammalian EPIYA effector and suggests that bacterial EPIYA effectors impair the function of Pragmin to subvert SFKs for successful infection.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 高 岡 晃 教
副 査 教 授 谷 野 圭 持
副 査 教 授 藤 田 恭 之 (総合化学院)
副 査 教 授 畠 山 昌 則

(東京大学大学院医学系研究科)

学 位 論 文 題 名

Regulation of Src family kinases by Pragmin via the EPIYA tyrosine-phosphorylation motif, which is utilized by bacterial effectors

(細菌エフェクターが模倣する EPIYA チロシンリン酸化モチーフを介した
Pragmin による Src ファミリーキナーゼの制御)

Helicobacter pylori (*H. pylori*) の胃内持続感染は萎縮性胃炎、消化性潰瘍、さらには胃がん発症と密接に関わっている。中でも、*cagA* 遺伝子陽性の *H. pylori* は激しい胃粘膜病変を惹起し、胃がん発症と強く相関する。*cagA* 陽性 *H. pylori* は菌体内で CagA タンパク質を産生し、IV 型分泌機構を介して胃上皮細胞に直接 CagA タンパク質を注入する。

CagA は C 末端側にグルタミン酸-プロリン-イソロイシン-チロシン-アラニンからなる EPIYA モチーフを複数有し、このモチーフ内のチロシン残基が Src ファミリーキナーゼによりリン酸化される。チロシンリン酸化された CagA は宿主細胞内標的タンパク質と相互作用し、正常な細胞内情報伝達をかく乱する。最近の研究より、CagA のみならず、他の病原性細菌エフェクターにおいても EPIYA モチーフが存在することが明らかとなった。それら細菌エフェクターもまた、CagA 同様、EPIYA モチーフのチロシンリン酸化依存的に様々な宿主細胞内標的分子と結合し、その病原性を発揮する。

そこで本研究では、CagA に代表される細菌エフェクターが EPIYA モチーフを用いて宿主細胞内タンパク質を模倣し、正常な細胞内情報伝達をかく乱するという仮説に基づき、哺乳動物細胞内にて EPIYA モチーフを有するタンパク質の探索、ならびにその機能的解析を行った。

第1章では、哺乳動物細胞内において EPIYA モチーフを有するタンパク質のプロテオーム解析を行い、Pragmin を同定した。細胞内で Pragmin は Src ファミリーキナーゼもしくは EGF 刺激により EPIYA モチーフのチロシンがリン酸化されることを示した。

第2章では、EPIYA チロシンリン酸化依存的な Pragmin の細胞内標的分子の探索を行った。Pragmin は EPIYA モチーフのチロシンリン酸化依存的に Src ファミリーキナーゼ活性抑制分子 C-terminal Src kinase (Csk) と相互作用することを示した。

第3章では、Pragmin-Csk 相互作用の生物学的意義を明らかにするため、c-Src の活性に着目して解析を行った。Pragmin は細胞質において Csk と相互作用することにより、Csk の細胞膜移行を抑制し、細胞膜に局在する c-Src の活性を上昇させることを示した。

第4章では、*H. pylori* CagA による Pragmin-Csk 相互作用への影響を検討した。細胞膜に局在する CagA は Pragmin と競合的に Csk と結合し、細胞質に局在する Csk を細胞膜へ移行させる。その結果、CagA は Csk を介して Src ファミリーキナーゼの活性を抑制することを示した。

これを要するに、著者は、本論文にて Pragmin が EPIYA モチーフのリン酸化を介して Csk と結合し、Csk の細胞膜移行を抑制する結果、Src ファミリーキナーゼ活性を上昇させることを示した。さらに、胃がん発症と密接に関与する *H. pylori* CagA は Pragmin と競合的に Csk と結合し、細胞質に局在する Csk を細胞膜へ移行させる結果、CagA は宿主細胞内の Src ファミリーキナーゼ活性を抑制することを明らかにした。これらの成果は権威ある国際学術雑誌、全米科学アカデミー紀要に報告しており、*H. pylori* CagA をはじめとした EPIYA モチーフを有する全ての細菌エフェクターの病態生理学的意義の解明に貢献するところ大なるものがある。

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。