

学位論文題名

立体構造に基づいたヘリコバクター・ピロリがんタンパク質 CagA の機能制御機構に関する研究

学位論文内容の要旨

ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）は、ヒト胃上皮細胞に感染する螺旋状短桿菌であり、特に CagA タンパク質を産生するピロリ菌の感染は胃がん発症と強く相関する。CagA の C 末端領域には Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala の 5 つのアミノ酸残基から成る EPIYA モチーフが複数繰り返し出現し、その近傍には CagA-Multimerization (CM) モチーフと呼ばれる 16 残基から成る配列が存在する。ピロリ菌 CagA は、菌に由来する IV 型分泌機構を介して直接宿主細胞内に注入される。その後 CagA は中央部に存在する 2 つのアルギニン残基と宿主細胞の細胞膜構成成分ホスファチジルセリンとの結合を介して細胞膜内面に局在する。CagA は細胞内の Src ファミリーキナーゼあるいは Abl キナーゼにより EPIYA モチーフ内のチロシン残基にリン酸化修飾を受け、このチロシンリン酸化依存的にがんタンパク質 SHP2 と複合体を形成する。一方、CagA は CM モチーフを介し、チロシンリン酸化非依存的に上皮細胞極性の制御キナーゼ PAR1 と結合する。CagA はこれらの複合体形成を通して SHP2 を異常活性化ならびに PAR1 を抑制することで異常な増殖・運動シグナルを生成し、細胞極性を破壊する。また CagA は Csk、Crk、Grb2、c-Met などの宿主タンパク質とも相互作用することにより、様々な細胞内シグナルを攪乱する。このように CagA の多様な機能が明らかにされる一方、その構造生物学的知見はほとんど得られていない。そこで本研究ではこれらの CagA-細胞内標的分子間の相互作用に関わる構造基盤を明らかにすることを目的とし、CagA の立体構造解析を行った。

第 1 章では、組換え CagA の発現・精製系を樹立し、精製 CagA を用いてドメイン構造を探索した。EPIYA 繰り返し領域を含む C 末端側約 30%に相当する C 末端領域と、残りの約 70%に相当する N 末端領域をそれぞれドメインと推定し、CagA の C 末端側は天然変性領域であることを明らかにした。

第2章では、N末端領域とC末端領域が分子内で相互作用することを示した。その責任領域中に2つの相同配列を見出し、それぞれN-terminal binding sequence (NBS) ならびにC-terminal binding sequence (CBS) と命名した。さらにこの分子内N末端/C末端相互作用はCagAの病原生物活性を促進する分子機構であることを明らかにした。

第3章では、X線結晶構造解析によりCagAのN末端領域の立体構造を決定した。CagAのN末端領域はDomain I-IIIの異なる3つのドメインから構成されることを示し、それぞれの構造的特徴について解析した。

第4章では、結晶構造に基いてCagAの細胞膜局在機構における構造基盤を示した。細胞膜ホスファチジルセリンとの結合に必要として報告された2つのアルギニン残基を含むその周辺は塩基性残基に富む局所面（塩基性パッチ）を構成していた。CagAの細胞膜局在には塩基性パッチ中の正味の正電荷が重要であることを示した。

第5章では、第2章で見出したCagAの分子内N末端/C末端相互作用の構造基盤を示した。CagAのNBSとCBSが疎水性相互作用により直接結合することで天然変性C末端領域が投げ輪（ラリアート）様のループ構造を形成することを見出した。このループ構造の形成によりCagAの病原生物活性が促進されることを示した。

以上、本研究はピロリ菌CagAタンパク質の立体構造を包括的に明らかにした初めての報告である。EPIYA繰り返し領域を含むC末端領域の天然変性構造はCagAと多彩な細胞内分子群との相互作用を担うための柔軟性を与えていると考えられた。一方、N末端領域の結晶構造に基づいた機能解析より、CagAの細胞膜局在機構ならびに分子内N末端/C末端相互作用によるCagA機能制御機構の構造基盤を解明した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	坂口和靖
副査	教授	村上洋太
副査	教授	石森浩一郎
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

立体構造に基づいたヘリコバクター・ピロリがんタンパク質 CagA の機能制御機構に関する研究

ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）CagA は菌体内から宿主であるヒト胃上皮細胞に移行し、胃がん発症に密接に関与する細菌由来のがんタンパク質である。近年、CagA について細胞生物学ならびに分子生物学的アプローチを用いた研究が盛んに行われ、CagA が多数の細胞内標的分子と相互作用する足場タンパク質として働き、宿主細胞内シグナルを攪乱することが示されてきた。しかし、その多くは CagA が脱制御する相互作用因子の同定或いは細胞・生体に及ぼす表現型の解析に基づいて生物学的役割を明らかにすることを目的としており、その機能を理解する上で極めて重要な意義を持つ CagA の立体構造は未だ明らかにされていなかった。このような背景から CagA が引き起こす発がんの分子メカニズムの解明には更なる研究成果が待たれる状況にある。

本研究は、CagA タンパク質の立体構造を明らかにし、その構造に基づく詳細な機能解析を通して CagA による胃がん発症の分子メカニズムを解明することを目的としており、著者は上記目的を達する以下の有益な知見を得てその研究成果を本学位論文として纏めている。

第1章では、組換え CagA の大量発現・高純度精製系の樹立し、プロテアーゼ限定分解解析を用いて CagA のドメイン構造を見出した。また、そのドメイン構造に基づいた NMR 解析から、主な生物活性を担う CagA の C 末端領域は天然変性構造であることを明らかにし、CagA の多様な相互作用を直接媒介する性質として構造的柔軟性を保持することを見出した。

第2章では、CagA の主要な標的分子の1つであるがんタンパク質 SHP2 の脱制御を促進する分子機構として、CagA の N 末端領域と C 末端領域との間に分子内相互作用が存在することを明ら

かにした。さらに、この相互作用の責任領域は *cagA* 遺伝子内で配列の重複が生じた結果生まれたと推測される 2 つの相同配列 N-terminal binding sequence (NBS) と C-terminal binding sequence (CBS) に依存することを見出した。

第 3 章では、CagA の N 末端領域の結晶構造の決定に成功し、Domain I-III の 3 つの異なるドメインから構成されることを明らかにした。Domain II は 11 本の β ストランドから成る大きな逆平行 β シートを含む N 末端領域のコアとなる構造を構築している一方、Domain I は 10 本の α ヘリックスから構成され、ゆらぎのある構造体であることを見出した。また、C 末端領域に繋がる Domain III は 5 本の α ヘリックスから成るバンドル構造を形成することを見出した。

第 4 章では、結晶構造に基づき、16 残基の塩基性アミノ酸が局所的に集中する特徴的な表面構造として Domain II に塩基性パッチが存在することを見出した。CagA の細胞膜内面への付着は塩基性パッチと細胞膜ホスファチジルセリンとの静電的相互作用に依存していることを明らかにし、宿主細胞内において CagA の生物活性発揮に寄与すると考えられる分子配向を見出した。

第 5 章では、第 2 章で同定した NBS と CBS により形成される 4 ヘリックスバンドルが CagA の N 末端領域と C 末端領域との分子内相互作用の実体であることを見出した。この相互作用により天然変性 C 末端領域が投げ縄構造を形成することで、CagA と細胞内標的分子であるセリン/スレオニンキナーゼ PAR1 や SHP2 との複合体が安定化する結果、これら標的分子の脱制御が促進されるという CagA の活性制御機構を見出した。

これを要するに、本論文はピロリ菌 CagA の宿主細胞内における標的分子 PAR1 ならびに SHP2 との相互作用を促進する高次構造基盤を解明し、CagA の三次元的な全体構造に依存した細胞内シグナル脱制御機構を世界に先駆けて明らかにしたものである。PAR1 および SHP2 は上皮細胞極性ならびに細胞増殖の制御に関わり、CagA によるその脱制御は胃がん発症に密接に関与すると考えられることから、著者が本研究で得た新たな知見は *cagA* 遺伝子陽性ピロリ菌感染に起因した発がんの分子メカニズムの解明のみならず、その予防から治療に至る今後の胃がん研究に対して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。