

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07660

研究課題名（和文）ピロリ菌CagA誘発胃がんにおける極性キナーゼPAR1bの新規制御機構とその役割

研究課題名（英文）New regulatory mechanism of polarity-regulating kinase PAR1b and its role in Helicobacter pylori CagA-induced gastric cancer

研究代表者

西川 裕子（Nishikawa, Hiroko）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・特任研究員

研究者番号：20583131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：胃がんの原因菌であるヘリコバクター・ピロリが産生する細菌性がんタンパク質であるCagAは宿主標的タンパク質であるPAR1bのキナーゼ活性を阻害することにより、胃粘膜上皮層の破壊や染色体不安定を引き起こす。くわえて、CagAはPAR1b多量体を介して間接的に多量体化することで、宿主がんタンパク質であるSHP2との結合を強化し、その活性を脱制御する。本研究ではPAR1bが核酸依存的に多量体化し、キナーゼ活性が賦活化するメカニズムを試験管内キナーゼ法と細胞系を用いて詳細に解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本において胃がんは部位別がん死亡者数第3位であり、その98%がピロリ菌感染によるものである。ピロリ菌CagA誘発胃がんにおいてPAR1b多量体とそのキナーゼ活性の抑制は中心的な役割を占める。本研究によりPAR1b多量体化とキナーゼ活性賦活化の分子メカニズムが詳細に解明されたことから、今後ピロリ菌を原因とする胃がんを含めた胃粘膜病変の発症機構が大いに進展する考えられる。また、PAR1bはアルツハイマー病の原因タンパク質であるタウのキナーゼでもあることから、胃粘膜病変のみならず、アルツハイマー病を含めたタウオパチーの解明にもインパクトを与えられよう。

研究成果の概要（英文）：The Helicobacter pylori oncoprotein CagA, a major etiological agent for gastric cancer, causes gastric mucosal damage and chromosomal instability by inhibiting the kinase activity of its host target protein PAR1b. Furthermore, CagA passively multimerizes via the PAR1b multimer, strengthening its binding with SHP2, the host oncoprotein, and thereby deregulating its activity. By using in vitro kinase assays and cell-based assays, I have elucidated the detailed mechanism behind nucleic acid-dependent multimerization and activation of the PAR1b kinase.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：ピロリ菌 胃がん キナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヘリコバクター・ピロリ(ピロリ菌)の慢性感染は、萎縮性胃炎、胃潰瘍に加え、部位別がん死亡者数の世界第3位を占める胃癌を引き起こす。とりわけ、がんタンパク質 CagA を産生する CagA 陽性ピロリ菌は激しい胃粘膜病変を惹起し、胃癌発症の主たる原因と考えられている。我々はピロリ菌 CagA の C 末端側を構成する天然変性構造領域には、Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala (EPIYA) モチーフならびに 16 アミノ酸残基からなる CagA multimerization (CM) モチーフという 2 つの繰り返し配列が存在し、CagA はこれらのモチーフを介して様々な宿主由来のタンパク質と相互作用をする異常な足場タンパク質として機能することを報告してきた (Hayashi, Morohashi et al., 2012 *Cell Host Microbe*; Nishikawa et al., 2016 *Sci. Rep.*)。CagA は注射針様の IV 型分泌機構を介して胃上皮細胞に注入されると EPIYA モチーフが宿主チロシンキナーゼによりチロシンリン酸化修飾を受け、ヒトがんタンパク質であるチロシンホスファターゼ SHP2 をはじめ、複数の SH2 ドメイン保有タンパク質と結合し、異常な増殖シグナル等を惹起する (Higashi et al., 2002 *Science*)。一方、16 アミノ酸残基の CM モチーフは細胞頂底極性の形成・維持を担う partitioning-defective 1 (PAR1) / microtubule affinity-regulating kinase (MARK) の活性部位にはまり込み、そのキナーゼ活性を阻害する (Saadat et al., 2007 *Nature*; Nestic et al., 2010 *Nat. Struct. Mol. Biol.*)。

PAR1 は真核生物において進化的に高度に保存されたセリン/スレオニンキナーゼである。哺乳動物には PAR1a、b、c、d の 4 つのパラログが存在し、上皮細胞には PAR1b が主に発現している。PAR1b は N 末端側に触媒領域を、そして C 末端側に制御領域を持つが、この制御領域の機能に関してはまだ不明な点が多い (図 1A)。PAR1b は極性化上皮細胞の側底膜内葉に局在し、その一部は多量体化している (図 1B 左; Nagase et al., 2011 *J. Biol. Chem.*)。ピロリ菌が CagA を宿主細胞内に注入し、PAR1b のキナーゼ活性が阻害されると、細胞の頂底極性が壊れ、タイトジャンクション等が維持できなくなる (図 1B 右)。くわえて CagA は PAR1b 多量体を介して間接的に多量体化することで CagA-SHP2 間の結合を安定化し、結果、SHP2 の脱制御を促進し、異常な増殖シグナルが増強する。このように CagA の病原活性に重大な役割を果たしているにもかかわらず、PAR1b 多量体の制御機構および生理的機能は全く不明であった。私は自身の先行研究から、PAR1b が RNA 依存的に多量体化し、キナーゼ活性を促進することを発見した。これは RNA を介した PAR1b の新規制御機構および生理的機能が存在し、ピロリ菌 CagA がその機能を攪乱していることを強く示唆している。

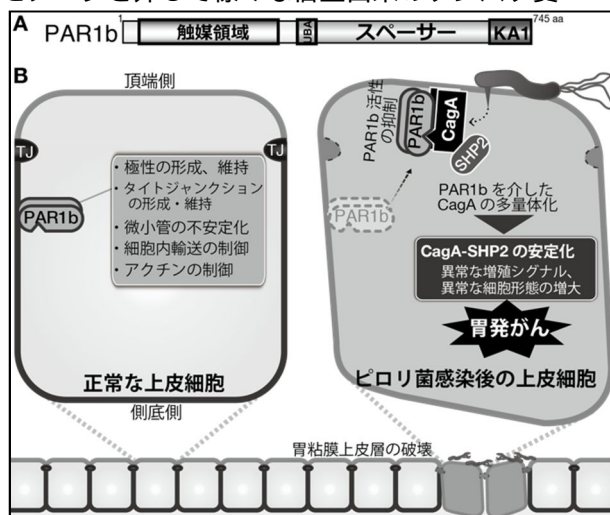


図 1.ピロリ菌 CagA 誘発胃癌における PAR1b 多量体の役割  
A PAR1b の模式図。B 正常胃上皮細胞における PAR1b の生理的機能(左)。ピロリ菌感染細胞では CagA が PAR1b の活性を抑制すると同時に PAR1b を介して多量体化し、CagA-SHP2 複合体を安定化させ、異常な増殖シグナル等が増大し、結果、胃癌を誘発している(右)。

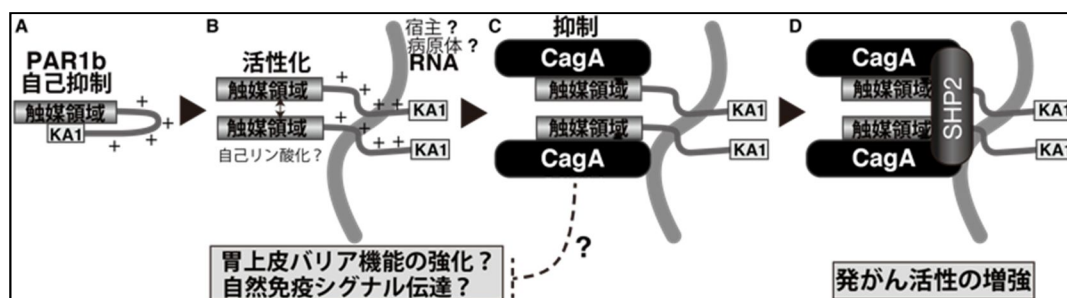


図 2. 本研究の作業仮説  
A 基底状態の PAR1b は KA1 領域が触媒領域を自己抑制する。B RNA が足場となり、PAR1b が多量体化する。スパーサー領域が RNA と相互作用することで KA1 領域が触媒領域より解離し、自己リン酸化が起こり、PAR1b が活性化される。C CagA は RNA 依存的な PAR1b の機能を遮断するために PAR1b を抑制する。D PAR1b-RNA 複合体が足場となり、CagA-SHP2 の結合が安定化し、その結果、発がん活性が増強する。

### 2. 研究の目的

本研究ではまず、細胞内で PAR1b を活性化する RNA 分子を同定し、RNA 依存的な PAR1b の新規制御機構および生理的機能の解明を目的とした。そして、CagA によるその生理的機能の遮断

が CagA の病原活性にどのように寄与しているのかを明らかにすることを目的とした。

PAR1b は C 末端領域の Kinase-associated 1 (KA1) 領域が触媒領域と分子内相互作用することでキナーゼ活性を自己抑制する (図 2A)。私は先行研究において PAR1b のスペーサー領域が RNA 依存的な多量体化に必須であることを見出したことから、RNA は足場として複数の PAR1b 分子のスペーサー領域と結合し、PAR1b の構造変化を引き起こすのではないかと考えた。その結果、KA1 領域による自己抑制が解除され、トランス自己リン酸化を促進し、PAR1b が活性化するのではないかと考えた (図 2B)。PAR1b の活性化は、上皮バリア機能の強化や、微小管を介した細胞内輸送の制御などを通して、病原体のバリア侵入や感染確立を防いでいる可能性があった。また、免疫シグナリング等、新規の機能に關与している可能性も考えられた。これらの機能を遮断するため、CagA は PAR1b 多量体に結合し、その活性を阻害している可能性があると考えた (図 2C, D)。このように PAR1b が細胞内で一種の RNA センサーとして働くという斬新かつ独創的な仮説を立てた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 様々な核酸を介した組換え型 PAR1b 多量体の再構成

胃上皮細胞を用いた先行研究から細胞内では PAR1b が RNA 依存的に多量体化することがわかっていたが、他の核酸も PAR1b の多量体化を媒介することができるのかを検討した。大腸菌より高純度に精製した組換え型全長 GST-PAR1b と PAR1b を全 RNA、メッセンジャー RNA、一本鎖 DNA、二本鎖 DNA 存在下で混合し、GST プルダウン法により PAR1b 多量体の形成を比較検討した。

#### (2) 試験管内キナーゼアッセイを用いた核酸による PAR1b キナーゼの賦活化

PAR1b のターゲット配列であるタウペプチドを用いて全 RNA、合成二重鎖 RNA である polyI:C、一本鎖 DNA、二本鎖 DNA の存在下で PAR1b キナーゼ活性が賦活化するかを比較検討した。また、PAR1b 多量体化責任領域である spacer region を欠失させた変異型 PAR1b の場合の影響について調べた。くわえて、PAR1b キナーゼ活性の賦活化が、核酸の長さに依存するかを検討した。

#### (3) 培養細胞系における核酸を介した PAR1b の多量体化

胃上皮培養細胞において、どのような核酸が PAR1b の多量体形成を促進するのかを検討した。また PAR1b が直接核酸と結合しうるのかを DNA 免疫沈降法を用いて検討した。

#### (4) 培養細胞系における核酸依存的な PAR1b キナーゼの賦活化

胃上皮培養細胞に様々な核酸を導入した時に、PAR1b キナーゼ活性の賦活化が起こりうるのかを PAR1b の基質であるタウタンパク質を用いて検討した。PAR1b はタウタンパク質の 262 番目のセリンをリン酸化することが知られている。タウタンパク質のリン酸化セリン 262 を認識する特異的な抗体を用いて細胞内における PAR1b キナーゼの不活化を定量化した。

(5) エプスタインバーウイルスの非コード RNA 依存的な PAR1b の多量体とキナーゼ活性の賦活化  
エプスタインバーウイルスが潜伏感染した胃上皮細胞は多量のウイルス由来の非コード RNA を産生する。なかでも 170 nt 程度の EBER は細胞内に多量に蓄積することが知られている。よって、EBER を胃上皮細胞に異所性発現させ、PAR1b の多量体化とキナーゼ活性に影響しうるかどうかを検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 核酸はポリアニオンとして組換え型 PAR1b を多量体化

当初、細胞系を用いた実験から RNA のみが PAR1b の多量体化を媒介すると考えていたが、GST プルダウン法では同じ質量の核酸を用いた場合、RNA か DNA かにかかわらず、二本鎖よりも一本鎖核酸の方が PAR1b 多量体化を促進することが判明した。同じ質量の場合、一本鎖核酸の方が二本鎖核酸よりも分子数が倍多いことから、核酸は配列非依存的に PAR1b の多量体化を促進していることが示された。このことにより、核酸は負の電荷を帯びたポリアニオンとして正の電荷を帯びた PAR1b spacer region と静電的に相互作用する可能性が示唆された。

#### (2) 核酸は試験管内キナーゼアッセイにおいて PAR1b キナーゼ活性を賦活化

試験管内キナーゼアッセイにおいても全 RNA や一本鎖 DNA などの一本鎖核酸が二本鎖核酸よりも PAR1b キナーゼ活性を賦活化することが判明した。また、spacer region を欠失させた変異型 PAR1b では核酸による賦活化が見られなかったことから spacer region を介して PAR1b キナーゼ活性の賦活化が起こることを示した。また、長鎖核酸のほうが短鎖核酸より PAR1b キナーゼ活性を賦活化する能力が高かったことから、PAR1b の協調的な結合がキナーゼ活性の賦活化に關与している可能性が示唆された。これは今後、核酸による PAR1b キナーゼの賦活化メカニズムを解明する上で重要な結果であると考えている。

#### (3) 二本鎖核酸が培養細胞系において PAR1b の多量体化を促進

興味深いことに胃上皮細胞内においては一本鎖ではなく二本鎖核酸の方が PAR1b 多量体の形成

を促進した。これは細胞内において一本鎖核酸が不安定であることを反映していると考えられる。また、DNA 免疫沈降法を用いて、PAR1b と DNA が spacer region 依存的に細胞内で直接結合することを示した。

(4) 二本鎖核酸が培養細胞系において PAR1b キナーゼ活性を促進

胃上皮細胞を用いて、二本鎖 DNA が PAR1b キナーゼ活性を最も効果的に賦活化することを示した。また、PAR1b をロックダウンし、タウのリン酸化が PAR1b 依存的であることも示した。

(5) エプスタインバーウイルスの非コード RNA EBER は PAR1b の多量体化を促進し、キナーゼ活性を賦活化

エプスタインバーウイルスの非コード RNA EBER を胃上皮細胞で異所性発現させるとによって、EBER が PAR1b の多量体化を促進し、キナーゼ活性も賦活化することを示した。

以上のことより、生理的な条件では細胞質の RNA が PAR1b の恒常的なキナーゼ活性を保っているが、DNA 損傷やウイルスの感染などによって細胞質内の核酸量が増加すると PAR1b キナーゼ活性が賦活化するメカニズムを本研究で解明した。くわえて、核酸依存的に賦活化するキナーゼは今まで DNA-PK と PKR 等、報告が少なく、今回の研究から PAR1b が数少ない核酸依存的キナーゼであることが判明し、重要な発見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大学院医学系研究科・医学部生物学教室ホームページ  
<http://www.microbiol.m.u-tokyo.ac.jp/research/>  
UTokyo FOCUS 「ピロリ菌の株間で胃を傷害する強さが異なる理由」  
[https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/a\\_00535.html](https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/a_00535.html)

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------