

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14986

研究課題名(和文)細胞極性キナーゼPAR1bの新規制御分子の同定および機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of novel regulatory molecules of polarity-regulating kinase PAR1b

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌はがんタンパク質CagAを宿主細胞に注入し、細胞極性キナーゼPAR1bの機能を阻害することでその病原性を発揮する。CagA誘発胃がんのメカニズムを解明するにはその標的であるPAR1bの生理的機能を解明する必要がある。しかしながら、PAR1bの生理的機能ならびに制御機構はまだ不明な点が多い。本研究ではPAR1bの新規相互作用分子を同定することに成功した。また培養細胞内でこの分子がPAR1bの多量体化に必須であることも示し、PAR1bにおけるその責任領域も特定した。大腸菌から組み換えPAR1bタンパク質を大量に精製する方法も確立し、PAR1b多量体の試験管内再構成にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロリ菌は萎縮性胃炎、胃潰瘍、胃がん等の原因菌である。日本国内において胃がんは部位別がん死亡者数第3位であり、年間約5万人が命を落としている。ピロリ菌はがんタンパク質CagAを宿主細胞内に注入し、極性キナーゼPAR1bの機能を阻害することによりその病原性を発揮する。また、CagAはPAR1b多量体を足場として間接的に多量体化し、がん化を促進する。本研究によりPAR1b多量体化を促進する分子が同定されたことにより、今後、PAR1b多量体化の分子メカニズムおよびその生物学的意義が解明され、ピロリ菌が原因の胃粘膜病変の発症機構の解明が大いに進展すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Helicobacter pylori exerts its virulence by injecting the CagA oncoprotein into the host cell, and inhibiting the function of the polarity-regulating kinase, PAR1b. Thus, elucidating the physiological roles of PAR1b is crucial in understanding the mechanism underlying CagA-induced carcinogenesis. However, much of the physiological roles and the regulatory mechanisms of PAR1b remain unclear. In this study, I successfully identified a novel molecule that interacts with PAR1b. I then showed that this molecule is required for the multimerization of PAR1b in cultured cells and identified the region of PAR1b responsible for the multimerization. Moreover, I established a protocol for purifying recombinant PAR1b protein on a large scale and was successful in reconstituting the PAR1b multimer in vitro.

研究分野：分子腫瘍学、細菌学

キーワード：ピロリ菌 胃がん がんタンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

世界人口の約半数が感染しているヘリコバクター・ピロリ (ピロリ菌) は萎縮性胃炎、胃潰瘍、十二指腸潰瘍等の胃粘膜病変を引き起こす。とくに日本人感染者が保有しているピロリ菌は CagA と呼ばれる細菌性がんタンパク質を産生し、胃がんの主たる原因と考えられている。

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 (図 1)。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。一方、CM モチーフはリン酸化非依存的に細胞頂底極性の形成・維持を担うセリン/スレオニンキナーゼ 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結果、上皮細胞の頂底極性を破壊する。SHP2 を介した異常な増殖シグナルの惹起と PAR1 抑制による上皮極性の喪失は協調して、CagA による胃発がんプロセスを促進すると考えられている。

PAR1 は進化的に高度に保存されたキナーゼである。哺乳動物には PAR1a, b, c, d の 4 つのパラログが存在し、上皮細胞には主に PAR1b が発現している。極性化上皮細胞において PAR1b は側底膜に局在するが、CagA によりその活性が阻害されると、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。さらに、PAR1b は microtubule-associated protein (MAP) をリン酸化して微小管を不安定化するとともに、アクチン骨格の再編成にも関与しており、CagA が PAR1b を抑制すると、細胞は顕著な細胞形態変化を起こす。このように、PAR1b は多機能なキナーゼであり、PAR1b を介した CagA の病原活性は胃粘膜破壊という結果を宿主にもたらす。ゆえに、PAR1b の生理的機能の解明は胃粘膜破壊機構及び胃発がんの病態を理解する上で必須である。

細胞極性における PAR1 の役割及び制御機構は線虫やショウジョウバエなどのモデルで異物を中心に発生生物学的に長年研究されてきた。また、ヒト PAR1b は 20 年余り前からアルツハイマー病患者の脳に蓄積する神経細胞特異的な MAP である tau タンパク質の過剰リン酸化責任キナーゼとして研究されてきたが、ヒト PAR1b の生理的機能や制御機構はいまだに不明な点が多い。よって、従来の生化学的、遺伝学的アプローチでは PAR1b の機能解析には限界があり、新たなアプローチが必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では PAR1b の新規相互作用分子を同定し、PAR1b の生理機能とその制御機構の解明を目的とした。PAR1b のような多機能なキナーゼの場合、その活性および基質の選択は、発生・分化の段階、細胞種、外部刺激、細胞内局在等、時空間的に厳密に制御されていると推測され、ゆえに PAR1b には機能特異的な制御分子が複数存在すると考えられる。独自の切り口から PAR1b の新規制御分子を同定し、PAR1b を介した CagA 依存的な粘膜破壊機構の解明ならびに胃発がんの病態を理解することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) PAR1b 多量体化責任分子の同定

PAR1b は培養細胞内では多量体として存在し、CagA が PAR1b に結合すると、CagA が間接的に多量体化することが当研究室の先行研究よりあきらかとなっていた (図 2)。PAR1b による CagA の間接的多量体化は CagA-SHP2 複合体を安定化させ、異常な増殖シグナルの増大を引き起こす。しかし、このように CagA の病原性に重大な役割を持っているにもかかわらず、PAR1b 多量体化のメカニズムについては全く不明なままであった。全長 PAR1b タンパク質が自発的に多量体を形成しうるか否かを調べるため、高純度の組み換え型全長 PAR1b タンパク質を精製し、SEC-MALS 法やプルダウン法で解析した。一方、精製過程で組換え型 PAR1b が大腸菌 RNA と強く結合したことをヒントに、ヒト培養細胞内における PAR1b 多量体形成にも RNA が必須か検討した。まず、FLAG と T7 という二つの異なるエピトプタグをつけた PAR1b を一過性発現させた AGS ヒト胃上皮細胞から細胞抽出液を作成し、RNase 処理を行った後、FLAG に対する免疫沈降を行い、T7-PAR1b の共沈降を調べた。

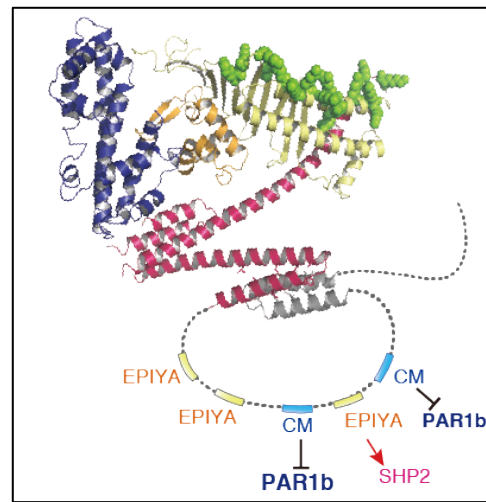


図 1. ピロリ菌 CagA タンパク質の構造

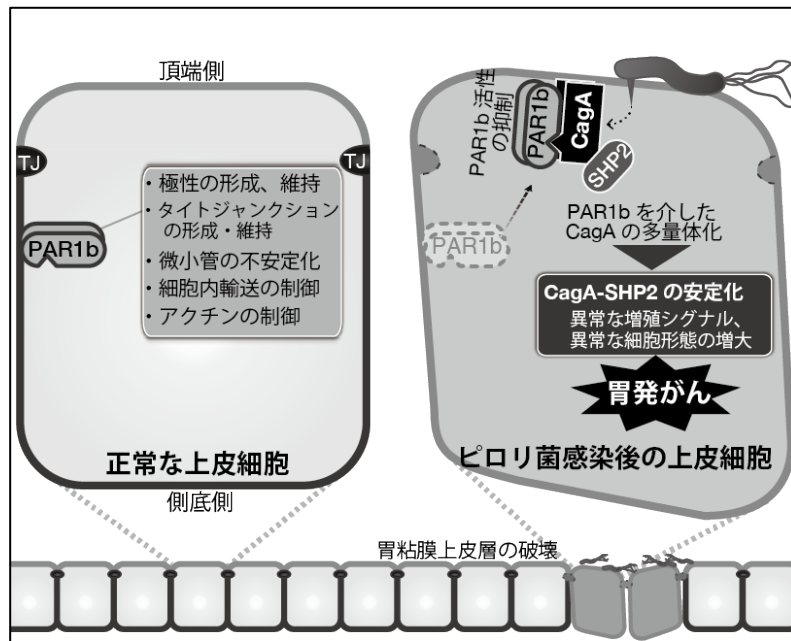


図 2. ピロリ菌 CagA 誘発がんにおける PAR1b 多量体の役割。正常胃上皮細胞における PAR1b の生理的機能 (左)。ピロリ菌感染細胞では CagA が PAR1b の機能阻害をすると同時に PAR1b 多量体を介して間接的に多量体化し、CagA-SHP2 複合体の安定化が起こる。それにより、異常な増殖シグナルが増大し、がんを誘発している(右)。

## (2) PAR1b 多量体化責任領域の同定

PAR1b 多量体化責任領域を特定するために FLAG タグを付加した PAR1b の部分欠失変異体の発現ベクターを数種構築した。これらの発現ベクターを用いて FLAG-PAR1b の部分欠失変異体と T7-PAR1b を AGS 細胞で一過性発現させ、免疫共沈降し、PAR1b 多量体化責任領域の特定を試みた。

## (3) ヌクレアーゼフリーな組み換え型 PAR1b タンパク質の精製

従来の組換え型 PAR1b タンパク質の精製法では大腸菌由来 RNA が PAR1b と強く結合し、精製を妨げてしまうため、RNA をヌクレアーゼで分解除去していた。しかしこの方法で精製した PAR1b タンパク質を用いて再構成実験を行うと、残存ヌクレアーゼ活性が RNA を分解してしまう可能性が高いため、ヌクレアーゼを使わない精製条件の検討を行った。

## (4) PAR1b 多量体の試験管内再構成

精製に成功したヌクレアーゼフリーな組換え型 GST-PAR1b と PAR1b タンパク質に RNA を添加して GST プルダウン法により PAR1b 多量体の試験管内再構成を行った。また、RNase 処理でこの複合体が消失するかを調べた。くわえて、PAR1b の多量体形成責任領域を欠失させた PAR1b 発現ベクターを作成し、組換え型 PAR1b 変異タンパク質を大腸菌より精製した。この PAR1b 変異タンパク質と GST-PAR1b が RNA 存在下で多量体を形成しうるか、GST プルダウン法で検討した。

## 4. 研究成果

### (1) RNA を PAR1b 多量体化責任分子として同定

SEC-MALS 法やプルダウン法で、組換え型全長 PAR1b タンパク質を解析したところ、PAR1b は単量体であった。これは PAR1b が細胞内では翻訳後修飾、あるいは未知の相互作用分子 X を介して多量体化することを示唆していた。一方で、組換え型全長 PAR1b を精製する際に大量の大腸菌 RNA が混入することから、ヒト培養細胞内でも PAR1b が RNA と結合する可能性があると考え、免疫沈降法で多量体を精製し RNase 処理を行ったところ、多量体は RNA 依存的に形成されることを新たに発見した。

### (2) PAR1b 多量体化責任領域の決定

PAR1b の部分的欠失変異体を AGS 細胞に一過性発現させ、免疫沈降を行なった結果、一部の変異体は、全長 PAR1b と多量体を作ることができず、PAR1b の多量体化責任領域を特定することに成功した。

### (3) ヌクレアーゼフリーな組換え型 PAR1b タンパク質の精製

まず、PAR1b 多量体の試験管内再構成を行うためには、ヌクレアーゼを使用しない方法で純度の高い PAR1b タンパク質を精製できることが必須であった。条件検討の結果、精製バッファーの塩濃度を上げることで、RNA フリーかつヌクレアーゼフリーな純度の高い PAR1b の精製に成功した。

#### (4) PAR1b 多量体の試験管内再構成

上記で精製したヌクレアーゼフリーな GST-PAR1b と PAR1b を用いて、GST プルダウン法を行ったところ、RNA 存在下で PAR1b 多量体の再構成に成功した。また多量体化責任領域を欠失させた変異 PAR1b の組換え型タンパク質を精製し、GST プルダウンに使ったところ、RNA 存在下でも多量体化することができなかった。これらのことから、PAR1b は多量体化責任領域に RNA が結合することにより間接的に多量体化することを示した。

PAR1b の新規相互作用分子として RNA を特定したというのは予想外の新たな展開であり、当初は非特異的な相互作用なのではないかと考えていたほどである。しかしながら、PAR1b 発見の歴史を遡ると線虫やショウジョウバエの発生において、ホモログである *par-1* が mRNA の局在制御に関与しているという報告があったことなどから、本研究では直接結合する可能性を調べた。また、PAR1b 多量体はピロリ菌の病原性に重大な役割を持ちながらも、その形成メカニズムは長らく不明であった。本研究では RNA が PAR1b 多量体形成に必須であることを示した。これは、ピロリ菌 CagA が原因である胃癌発症のメカニズムを理解する上で大きなインパクトをもつ。今後は PAR1b が結合する RNA を特定し、多量体化の生物学的意義について解明していく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① [Nishikawa, H.](#), Hatakeyama, M. Sequence polymorphism and intrinsic structural disorder as related to pathobiological performance of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. **Toxins**, 査読有, Vol. 9, 2017, 136  
DOI: 10.3390/toxins9040136

[学会発表] (計 4 件)

① [Nishikawa, H.](#), Biochemical characterization of the polarity-regulating kinase PAR1b multimer, a target of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. The 5th Symposium Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammolgy. 2018

② [Nishikawa, H.](#), Biochemical characterization of the polarity-regulating kinase PAR1b multimer, a target of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. The 37<sup>th</sup> Sapporo International Cancer Symposium. 2018

③ [Nishikawa, H.](#), Impact of the structural polymorphism of the *H. pylori* CagA oncoprotein on binding to polarity-regulating kinase PAR1b. 第 55 回日本物理学会年会. 2017

④ [Nishikawa, H.](#), Biochemical characterization of PAR1b, a target of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. The 4th Symposium Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammolgy. 2017

[その他]

東京大学大学院医学系研究科・医学部微生物学教室ホームページ

<http://www.microbiol.m.u-tokyo.ac.jp>

#### 6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。