

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ライフサイエンスの革新を目指した構造
生命科学と先端的基盤技術」
研究課題「ピロリ菌の感染と発がん機構の構造学的
解明」

研究終了報告書

研究期間 平成 24 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究代表者：千田 俊哉
(高エネルギー加速器研究機構
物質構造科学研究所、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

ピロリ菌が産生するタンパク質 CagA は、胃がんを含む種々の胃粘膜病変の発症に重要な役割を担うと考えられている。本プロジェクトは、CagA とヒト胃上皮細胞内タンパク質からなるシグナル攪乱複合体を構造生物学的側面から研究することで、CagA により引き起こされる宿主細胞内でのシグナル攪乱複合体の基本原則を明らかにすることを目的とした。この目的を達成するため、シグナル攪乱複合体の形成に関わるタンパク質の生産方法を確立し、それらのタンパク質と CagA との相互作用を生化学的に解析してきた。その結果、CagA の EPIYA 繰り返し領域の多型が、がんタンパク質として知られる SHP2 の SH2 ドメインとの結合に密接に関連することを明らかにし、この SHP2 結合能が大規模臨床疫学調査の結果と強く関連することを見出した(畠山グループ)。この結果に基づき、CagA の EPIYA セグメントと SHP2 の SH2 ドメインとの複合体の結晶構造を決定し、CagA の SHP2 結合強度と SHP2 脱制御機構が立体構造と関連することを明らかにした(千田グループ)。さらに、CagA の天然変性領域と構造領域とが分子内相互作用により投げ縄構造を取り、シグナル攪乱複合体の安定化に寄与しているという機能発現に関するモデルを生化学的、物理学的に解析した結果、天然変性領域は構造領域と結合することで induced-folding を引き起こし、構造が安定化されることが明らかとなった(千田グループ)。以上の成果を基に、シグナル攪乱複合体の立体構造決定に向けて、試験管内再構成実験および結晶化に着手した(千田グループ)。シグナル攪乱複合体の試験管内再構成が確認されたため、千田グループにより精製された複合体サンプルを用いて佐藤グループにより負染色電子顕微鏡法による単粒子解析を行った結果、CagA-SHP2-PAR1b 複合体の分子量から推定されるサイズと矛盾しない電顕像が得られた。今後はクライオ電顕を用いることで分解能の向上を目指す。シグナル攪乱複合体の結晶化については、様々な組み合わせの精製タンパク質およびペプチドを用いて結晶化条件の検討を行っている。CagA の EPIYA セグメントのペプチドと SHP2、または、CagA の EPIYA セグメントおよび CM 配列を模倣したペプチドと PAR1b のキナーゼドメインにおいては結晶が得られており、結晶化条件の最適化を行っている。また、CagA の SHP2 活性化メカニズムを明らかにするため X 線小角散乱法を用いて溶液構造を解析した。その結果、EPIYA が SH2 ドメインに結合すると SHP2 のドメインの配置が大きく移動し、定常状態では隠れている活性部位が溶媒に露出することで基質が活性部位にアクセスしやすくなることを直接的に捉えることに成功した(千田グループ)。

さらに、CagA の CM モチーフにおける構造多型が PAR1b との結合に与える影響を、定量的に解析した(畠山グループ)。その結果、CagA の CM モチーフ数の増加に従って PAR1b 結合能が指数関数的に増強することを明らかにし、CagA の PAR1b 結合能の強弱が細胞間接着の破壊の程度に反映されていることを見出した。以上の成果から、CM モチーフの構造多型が CagA を介した胃上皮傷害活性の度合いを規定する因子であることが明らかになった。

一方、佐藤グループによる大気圧電子顕微鏡観察による CagA の標的細胞内移行経路の解析では、これまでに報告されている注射針様注入装置は認められず、胃上皮細胞から細胞突起がピロリ菌に向かって伸びていることが明らかとなった。今後は新たな経路の探索など CagA 移行のメカニズムの検証を行っていく予定である。

(2) 顕著な成果

1.

概要: 胃がん発症の鍵を握るピロリ菌 CagA ががんタンパク質とその細胞内標的である SHP2 ががんタンパク質間の相互作用を担う CagA のチロシンリン酸化セグメントと SHP2 SH2 ドメインからなる複合体の結晶構造を決定し、発がん活性の強い東アジア型 CagA と発がん活性の弱い欧米型 CagA との間では SHP2 との結合様式、SHP2 の活性脱制御機構が

異なることを原子レベルで明らかにした。一連の組換え型 CagA バリエーションタンパク質ならびに SHP2 タンパク質を用いた試験管内結合実験と酵素活性解析から、胃発がんリスクを高めるために必要な CagA-SHP2 結合親和性の閾値を定量的に決定し、大規模な臨床疫学調査から得られた結果を分子レベルで説明することに成功した。

2.

概要:ピロリ菌 CagA の CM モチーフにおける構造多型が CagA-PAR1b 相互作用に与える影響を、一連の組換えタンパク質を用いた試験管内結合実験を通して定量的に解明した。CagA との相互作用による PAR1b のキナーゼ活性阻害が胃粘膜破壊を引き起こすことから、CagA の CM モチーフにおける分子多型がピロリ菌による胃上皮傷害活性の強弱を規定する因子であることを明らかにした。本成果が、ピロリ菌による胃の粘膜への傷害に対する新しい予防法や治療法の開発につながると期待される。

3.

概要:胃をモデルに、その粘膜細胞と共生細菌が相互作用している様子を、水環境中で高分解能観察するシステムの開発に成功した。腸内での細菌フローラ・自然免疫促進の様子の観察が可能で、細菌共生の研究に貢献する。さらに、水中で組織を薄膜窓上で滑らせながらスキャンすることで、組織の広範囲観察が可能になった。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1.

概要:本研究成果は、発がんを引き起こす細菌由来病原タンパク質が宿主細胞内標的分子の機能を脱制御する分子間相互作用を他に先駆けて原子スケールの世界で明らかにしたもので、今後の分子感染症学・分子腫瘍学研究の分野開拓につながる。また、本研究から得られた構造情報は、CagA-SHP2 発がん複合体形成阻止により胃発がんを予防する低分子化合物探索への出発点となる。本研究で樹立した大腸菌（細菌は真核生物型チロシンキナーゼを持たない）におけるチロシンリン酸化タンパク質の大量生産技術と高度精製技術は、高等真核生物が保有する細胞内シグナル伝達機構の構造生物学的解明に必須の実験材料を安定的に供することを可能にし、生命科学の科学技術イノベーションに大きく貢献する。

2.

概要:タンパク質結晶化の再現性を高めるための嫌気条件下での結晶化技術、結晶の性質を改善するための multi-step soaking 法を開発し、良質な結晶を得ることが困難なタンパク質の X 線結晶構造解析を成功させた。また、迅速に X 線結晶構造解析を行うために、低エネルギー X 線を用いた native SAD データと分子置換法で得られた部分構造を組み合わせた MR-native SAD 法を積極的に活用し、その技術をルーチン的に利用できるようにした。これらの結晶化技術や結晶構造解析技術は、大学だけではなく企業からも注目されており、既に幾つかの企業との共同研究がスタートしている。

3.

概要:ASEM と PTA 染色を組み合わせると、組織の核が迅速に観察できた。本法は、時間がかかる凍結薄切は必要なく、癌細胞の大きな核をマーカーとして、正常細胞との癌細胞の識別を可能にする。そのため、新しい術中迅速診断の可能性を拓くことが期待される。細菌の染色法の開発により、腸内細菌フローラや、感染症の迅速診断への道が拓かれた。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「千田」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
千田 俊哉	高エネルギー加速器研究機構	教授	H24.10～
千田 美紀	同上	特任助教	H24.10～
長瀬 里沙	同上	研究員	H27.7～
鈴木 喜大	同上	研究員	H24.10～H29.3
原田 彩佳	同上	D1～3、研究員	H24.10～H29.3

研究項目

- ・ 構造領域と天然変性領域の相互作用による CagA 機能調節機構の解明
- ・ チロシンリン酸化 EPIYA セグメントと Tandem SH2ドメインとの複合体の X 線結晶構造解析
- ・ Tandem SH2ドメインとチロシンリン酸化 EPIYA ペプチド複合体の X 線小角散乱解析
- ・ チロシンリン酸化 EPIYA-A セグメント及びプラグミン EPIYA セグメントと Csk との複合体の X 線結晶構造解析
- ・ 組換え型チロシンリン酸化 CagA の発現と精製

② 「畠山」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
畠山 昌則	東京大学大学院医学系研究科	教授	H24.10～
林 剛留	同上	CREST 特任助教 助教	H24.10～ H25.4～
西川 裕子	同上	学術支援職員 CREST 特任助教 CREST 研究員	H24.10～ H26.4～ H27.4～
長瀬 里沙	同上	大学院生、特任研究員	H24.10～H27.6
林 汇亨 (Huiheng Lin)	同上	大学院生	H25.1～H26.3
井上 賀央里	同上	大学院生	H27.11～

研究項目

- ・ 欧米型 CagA の分子多型に依存した SHP2 相互作用の解析
- ・ 欧米型ならびに東アジア型 CagA-SHP2 相互作用の構造活性相関解析
- ・ CagA による Csk 脱制御の構造活性相関解析

③「佐藤」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
佐藤主税	産総研バイオメディカル	グループ長	H24.10～
佐藤真理	同上	研究補助員	H24.10～
柳原真佐子	同上	研究補助員	H24.10～
三尾宗代	同上	研究補助員	H24.10～H26.3

研究項目

- ・複合体の単粒子解析
- ・ASEMによる観察条件確立
- ・CagA の細胞移行経路の観察

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について
(研究チーム外での連携や協働についてご記入ください。ライフ分野では臨床医等を含みます。)

PDIS *in silico* スクリーニンググループ（産総研・広川貴次先生、理研・本間光貴先生）と CagA-SHP2 結合阻害剤のインシリコ探索において共同研究を開始した。
愛媛大学・澤崎達也先生と CagA-SHP2 結合阻害剤のハイスループット探索において共同研究を開始した。

CagA の投げ縄構造部分の解析では、小角散乱の部分に関しては高エネ機構・清水伸隆准教授と、NMR 部分に関しては、産総研・竹内恒主任研究員と密接な共同研究を行うことで研究を遂行してきた。

§ 3 研究実施内容及び成果

[1] 組換え型チロシンリン酸化 CagA の発現と精製(東京大 畠山グループ、高エネ機構 千田グループ)

① 研究のねらい

本研究項目では CagA-SHP2 複合体の共結晶を作製し、結晶構造の決定を目指す際に必要となるリン酸化 CagA を調製すること、SHP2 などの標的タンパク質との結晶を得ることを目的とする。CagA と SHP2 との結合には CagA の EPIYA モチーフのチロシンリン酸化が必要となる。そこでまず、組換え型 CagA タンパク質のチロシンリン酸化とその精製を試みる。CagA と SHP2 との共結晶の作製において、CagA のチロシンリン酸化状態に均一性が必要とされるが、CagA には複数の EPIYA モチーフ(EPIYA-A,-B,-C)が存在するため、CagA が高効率および高均一にリン酸化される条件を検討する。

② 実施方法と成果

アンピシリン耐性遺伝子を選択マーカーとして持つ GST 融合タンパク質発現ベクター(pGEX6P2)に、3' 末端に 6xHis タグ配列を付加した *cagA* 遺伝子を挿入した。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子を選択マーカーとして持つ pACYC ベクターに、チロシンリン酸化酵素である *v-Src*(あるいは *c-Src*) 遺伝子を挿入した。この 2 つの大腸菌発現ベクターで大腸菌 BL21(DE3) 株を共形質転換し、大腸菌体内で GST-CagA-His 融合タンパク質ならびに Src を共発現させ CagA をチロシンリン酸化させた。続いて Ni-NTA およびグルタチオンセファロースビーズを用いたアフィニティークロマトグラフィーによりチロシンリン酸化 CagA を精製した。

<組換え型チロシンリン酸化 CagA の SHP2 結合能> 精製したチロシンリン酸化 CagA をウェスタンブロットおよび銀染色で検出した結果、CagA が高純度に精製されており、さらに精製後もチロシンリン酸化状態を保持していることが示された(図 2-1A)。続いて、精製したチロシンリン酸化 CagA の SHP2 結合能を解析した。SHP2 の Tandem SH2 ドメインに GST タグを付加した GST-SH2 を精製し、GST ブルダウンアッセイを行った。その結果、チロシンリン酸化特異的に CagA と Tandem SH2 ドメインとの結合が認められた(図 1-1B)

<チロシンリン酸化 CagA(261-1076) の発現と精製> 全長 CagA と Tandem SH2 ドメインとの共結晶が得られなかったことから、結晶化の妨げとなることが予想される CagA の N 末端の 1-260 アミノ酸残基(Domain I)と C 末端の天然変性領域中の 1077-1186 アミノ酸残基を除いた CagA(261-1076)をベースとして発現

コンストラクトの最適化を試みた。まず、CagA(261-1076)を Src と共発現し精製したところ、SDS-PAGE で移動度の異なる複数のチロシンリン酸化 CagA のバンドがウェスタンブロットで検出された。CagA(261-1076)は EPIYA-A,-B,-C の 3 つの EPIYA サイトを持つためチロシンリン酸化された EPIYA サイトの数が異なる CagA が混在している可能性があると考え、SHP2 との結合に関与しない EPIYA-A および-B サイトのチロシンをフェニルアラニンに置換した CagA(261-1076)abC を作製して同様の解析を行った。その結果、CagA(261-1076)abC においてもチロシンリン酸化された CagA のバンドが複数検出された。

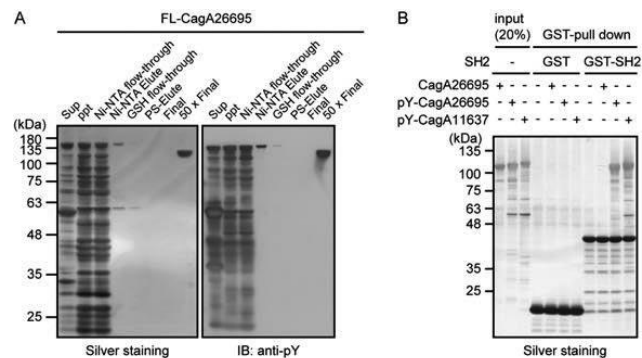


図 1-1 全長チロシンリン酸化 CagA の精製 (A) 精製したチロシンリン酸化 CagA の抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロット (右) と銀染色 (左)。 (B) 全長 CagA の SHP2 結合能。GST タグを付加した SHP2 の 2 つの SH2 ドメインによるチロシンリン酸化 CagA のブルダウン。

＜CagA(261-1076)abD_YF のチロシンリン酸化と精製＞ 上記の結果から、大腸菌内で EPIYA モチーフ以外のチロシン残基がリン酸化されていると考えられた。この不均一性が結晶化の妨げとなる可能性があるため、N 末側の構造の維持に関与しないと予測されるチロシン残基および C 末端の天然変性領域に存在するチロシン残基をフェニルアラニンに置換した YF 変異体を作製した。また、この YF 変異体においては EPIYA-C セグメントをより SHP2 結合能が高い EPIYA-D セグメントに置換した [CagA(261-1076)abD_YF]。CagA(261-1076)abD_YF をチロシンリン酸化して精製したところ、CBB 染色およびウェスタンブロットにおいて単一のパンドとして検出された(図 1-2A)。次に、この精製したチロシンリン酸化 CagA(261-1076)abD_YF の SHP2 結合能を解析した。GST-SH2 を用いて GST プルダウンアッセイを行った結果、CagA(261-1076)abD_YF は SH2 ドメインとの結合能を有し、CagA(261-1076)abC と比較して顕著に結合能が強いことを確認した(図 1-2B)。一方、リン酸化チロシンとの結合能を持たない変異体である SH2-dead の Tandem SH2 ドメイン(GST-SH2D)を用いた場合にはチロシンリン酸化 CagA との結合は認められなかった。現在、このチロシンリン酸化 CagA(261-1076)abD_YF 変異体を用いて、SHP2 の Tandem SH2 ドメインおよび PAR1b との共結晶化の条件検討を行っている。それと平行して、CagA のチロシンリン酸化した EPIYA-D セグメントと CM モチーフを模倣したペプチドと Tandem SH2 ドメインおよび PAR1b との三者複合体の共結晶化も既に開始している。この研究内容については後述する。

[2] CagA による SHP2 脱制御の構造活性相関研究 (東京大 畠山グループ)

① 研究のねらい

胃がんの多発地域である東アジア諸国で単離される東アジア型 CagA とその他の地域で単離される欧米型(世界標準型) CagA では SHP2 の結合部位となる EPIYA モチーフ周辺の配列が異なり、欧米型

CagA の SHP2 結合領域は EPIYA-C セグメント、東アジア型 CagA の SHP2 結合領域は EPIYA-D セグメントと命名されている。ほぼ全ての東アジア型 CagA が EPIYA-D セグメントを1つしか保有しないのに対し、欧米型 CagA においては分子内での繰返しにより、最も一般的な1コピーから最高6コピーの EPIYA-C セグメントを保有する CagA が報告されている。また、疫学的には、C セグメントを 2 つ以上保有する CagA と胃発がんとの関連が示されている。チロシンリン酸化された EPIYA-C および-D セグメントを介して CagA はチロシンホスファターゼ SHP2 と結合し、SHP2 を異常に活性化。ここで東アジア型 CagA は欧米型 CagA に比較して SHP2 結合能がより強いことを畠山グループの先行研究で報告している。一方、遺伝子改変マウスを用いた解析から、CagA のチロシンリン酸化が生体内での発がん活性に極めて重要であることが明らかになっている。このことから、CagA は SHP2 との相互作用を介して発がん活性を発揮することが強く示唆される。そこで本研究項目では、CagA の SHP2 結合能および SHP2 活性化能を定量的に解析し、CagA の配列多型と発がん活性との関連を明らかにすることを目指した。

② 実施方法

＜欧米型 CagA の分子多型に依存した SHP2 相互作用の定量的解析＞

EPIYA-C セグメントを 1、2、3、5、8 個保有する CagA (C1-C8) 発現ベクターを構築し、大腸菌菌体

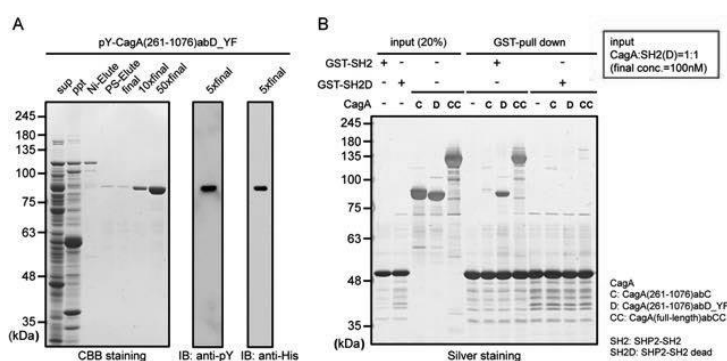


図 1-2 チロシンリン酸化 CagA(261-1076)abD_YF の精製 (A) 精製したチロシンリン酸化 CagA(261-1076)abD_YF の SDS-PAGE。(左) CBB 染色と (右) 抗リン酸化チロシン抗体を用いたイムノブロットを行った。(B) CagA(261-1076)abD_YF の SHP2 結合能。GST-SH2 または GST-SH2dead (GST-SH2D) によるチロシンリン酸化 CagA(261-1076)abD_YF、CagA(261-1076)abC のプルダウン。

内における v-Src との共発現によりチロシンリン酸化させた各全長 CagA を発現・精製した。ウェスタンブロット法にて各種 CagA がチロシンリン酸化されていることを確認後、GST プルダウンならびに平成 24 年度 CREST 予算で購入した Biacore X100 を用いて、SHP2 の Tandem SH2 ドメインに対する CagA の結合能を表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により定量的に解析し、SHP2 結合能と EPIYA-C セグメント数との関係を定式化した。また、胃上皮由来の培養細胞を用いた細胞浸潤アッセイ系を新規に構築し、CagA を一過性に発現した細胞のコラーゲンマトリックス浸潤能の亢進と EPIYA-C セグメント数との関連を検討した。

<欧米型ならびに東アジア型 CagA-SHP2 相互作用の構造活性相関解析>

欧米型 CagA および東アジア型 CagA に由来する EPIYA モチーフを含有した 13 残基のチロシンリン酸化 EPIYA-C ペプチド (EPIpYA-C: ASPEIpYATIDDL)、EPIYA-D ペプチド (EPIpYA-D: VSPEIpYATIDFD) ならびにリン酸化チロシンから 5 残基下流 (pY+5 位) の残基に変異を導入した各種ペプチドを合成した。さらに欧米型 CagA のタンデム EPIYA-C セグメント (EPIYA-C セグメントを 2 個直列に持つ配列) を模倣する 46 残基のチロシンリン酸化ペプチド (EPIpYA-CC: SPEIpYATIDDLGGPFPLKRHDKVDDL SKVGLSASPEIpYATIDD) を合成した。また、全長 SHP2 ならびに単離した N-SH2 ドメイン、C-SH2 ドメインおよび Tandem SH2 ドメインの組換えタンパク質を精製した。CagA-SHP2 相互作用を定量的に検討するため、Biacore X100 を用い N-SH2 ドメインおよび C-SH2 ドメインと EPIpYA-C および -D ペプチドとの結合解離定数を測定した。また、測定した CagA-SHP2 相互作用の親和性の違いが CagA による SHP2 の活性化制御に与える影響を検討するため SHP2 の基質として p-nitrophenylphosphate (pNPP) を用いた脱リン酸化試験を行い、リン酸化 CagA ペプチド存在下での全長 SHP2 の酵素活性を解析した。このとき N-SH2 および C-SH2 ドメインのリン酸化チロシン結合能を機能的に欠損させた点変異体 (N-SH2-dead および C-SH2-dead) を用いて、CagA による SHP2 の活性化に及ぼす SH2 ドメインの影響を検討した。さらに、これらの生化学試験による定量的検討が細胞レベルでの CagA の病原活性に反映されるか検討するため、SHP2 結合に重要な残基における各種 CagA 点変異体ならびに SHP2 の SH2 ドメイン変異体を一過性にヒト胃上皮細胞に発現させた。細胞伸長、細胞運動およびコラーゲンマトリックス浸潤アッセイにより CagA および SHP2 の各変異体の細胞生物学的影響を検証した。

③ 研究の成果

<欧米型 CagA の分子多型に依存した SHP2 相互作用の定量的解析>

欧米型 CagA で見られる C セグメントの繰り返し数の変動がどのように CagA-SHP2 相互作用に反映されるか検討した。まず GST プルダウン実験を行い、GST 融合型 Tandem SH2 ドメインに対し、チロシンリン酸化依存的に全長 CagA (C1-C8) が結合することを確認した。SPR 法による定量的解析の結果、CagA (C1) は Tandem SH2 ドメインに対し、解離定数 $24,100 \pm 924$ nM の非常に低い親和性を示した。一方、CagA (C2)、CagA (C3)、CagA (C5) および CagA (C8) はそれぞれ 208 ± 7.13 nM、 123 ± 1.47 nM、 77.8 ± 0.706 nM および 40.1 ± 0.710 nM の解離定数で EPIYA-C セグメント数の増加に伴い徐々に強く

Tandem SH2 ドメインに結合した。これらの値を対数プロットすることにより、CagA (C1) と CagA (C2-C8) の間に SHP2 相互作用タイプの明確な違いが存在することが明らかになった (図 2-1)。次に、この SHP2 結合能が示す違いが、実際に細胞レベルの表現型に影響するか否かを検討した。CagA の生物活性を検討する上で最も良く使用されて

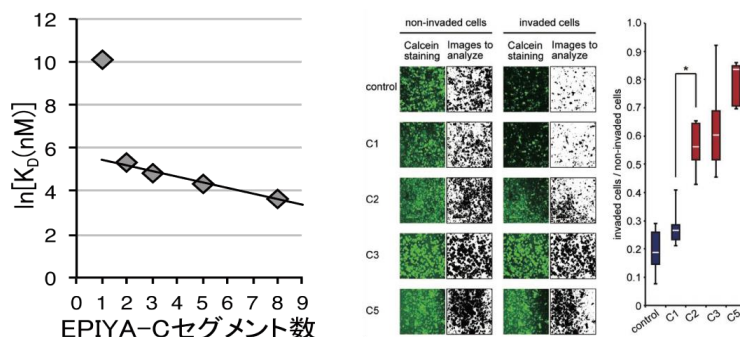


図 2-1 (左)全長 CagA の EPIYA-C セグメント数と Tandem SH2 ドメイン結合能との関連。C2-C8 間の相関を黒色の近似直線で示した。(右)CagA の一過性発現による細胞浸潤能の亢進と EPIYA-C セグメント数との相関

いる細胞形態変化は CagA の活性が極めて強い場合にはその解析が困難であることから、新たに生物活性を測る指標として CagA を発現する胃上皮細胞のマトリックス浸潤能の亢進を検出する実験系を構築した。この細胞浸潤アッセイの結果、CagA-SHP2 結合タイプに一致して、CagA(C2-C5)を発現する細胞は有意にマトリックス浸潤能が亢進する一方、CagA(C1)はコントロールと同程度であることを見出した。これらの結果から、EPIYA-C セグメントを 1 つのみ有する CagA と 2 つ以上保有する CagA との間には明確な病原活性の差があることを見出し、前者を Type I 欧米型 CagA、後者を Type II 欧米型と定義した。本成果は CagA の C セグメントの繰り返し数と胃がんとの関連を示す臨床データを分子レベルで裏打ちする重要な知見である。また細胞レベルでの CagA の構造活性相関を検討する上で今後有用な細胞生物学的実験系を新たに構築することが出来た。以上の結果は、論文発表した[文献(1)-15]。

<欧米型ならびに東アジア型 CagA-SHP2 相互作用の定量的解析>

SPR 解析の結果 EPIpYA-D ペプチドは、EPIpYA-C ペプチドに比較し、SHP2 の N-SH2 ドメインとの親和性が約 120 倍高く、C-SH2 ドメインとの親和性が約 42 倍高いことが明らかになった(図 2-2)。また、いずれの場合も C-SH2 ドメインに比較し N-SH2 ドメインの方がリン酸化ペプチドとの結合能が高いことがわかった。EPIpYA-CC/Tandem SH2 相互作用は、EPIpYA-C/N-SH2 相互作用に比較し約 35 倍高い親和性を示す一方、EPIpYA-D/N-SH2 相互作用は EPIpYA-CC/Tandem SH2 相互作用よりもさらに高親和性であることが明らかになった。加えて、Tandem SH2 の N-SH2-dead 或いは C-SH2-dead 変異体を用いた解析から、EPIpYA-CC/Tandem SH2 相互作用の高親和性には N-SH2 ならびに C-SH2 の両ドメインが必要であり、シス型の二価相互作用の形成によって結合が強化されることが明らかになった。また、酵素活性解析の結果、EPIpYA-D ペプチドが野生型 SHP2 を顕著に活性化することに対し、EPIpYA-C ペプチドはほとんど野生型 SHP2 を活性化しなかった(図 2-3)。これらの結果は、Tandem SH2-CagA ペプチド複合体の結晶構造から得られた pY+5 位にある残基(欧米型 CagA では Asp、東アジア型 CagA では Phe)が SHP2 の SH2 ドメインとの結合能に強く影響しているという構造学的知見と極めて良く一致した。一方、SH2 ドメイン変異体を用いた解析から、EPIpYA-D ペプチドによる SHP2 の活性化には N-SH2 への結合が必須であり、EPIpYA-CC ペプチドによる活性化には N-SH2 ならびに C-SH2 両ドメインが必要であることが明らかになった。これらの、相互作用解析ならびに酵素活性解析から、EPIYA-D セグメントを有する東アジア型 CagA は N-SH2 ドメインへの一価の相互作用により SHP2 を活性化する一方、EPIYA-C セグメントを有する欧米型 CagA が SHP2 を活性化するためには両 SH2 ドメインに対する二価相互作用が重要であると考えられた。次に、CagA ペプチドにおける pY+5 位の残基が SHP2 に与える影響を直接検討するため、これら

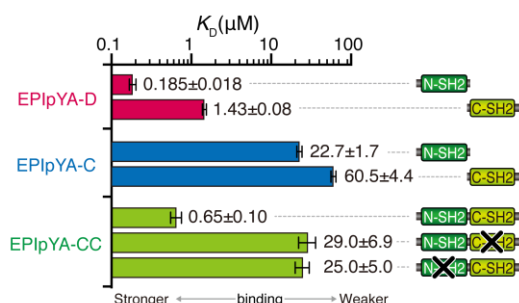


図 2-2 SPR 解析による CagA ペプチドと SHP2-SH2 ドメインとの結合能の比較。

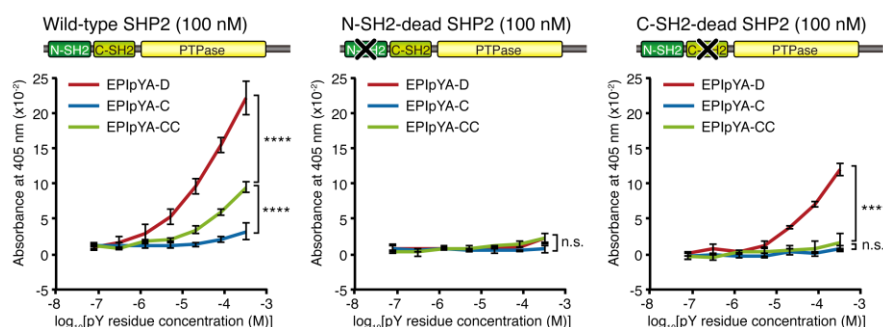


図 2-3 チロシンリン酸化 CagA ペプチド存在下における野生型および変異型 SHP2 の活性。反応生成物である p-nitrophenolate の 405 nm における吸光度を脱リン酸化活性の指標とし、ペプチド濃度依存性を検討した。

の pY+5 位の残基に点変異を導入したペプチドを作製し、N-SH2 ドメインとの結合ならびに SHP2 の活性亢進作用を検討した。その結果、野生型 EPIpYA-D ペプチドが pY+5 位に有する Phe 残基を Ala 残基に置換した EPIpYA-D F/A 変異体あるいは Asp 残基に置換した EPIpYA-D F/D 変異体では N-SH2 結合活性が顕著に低下した。

対照的に、野生型 EPIpYA-C ペプチドの pY+5 位に存在する Asp 残基を Phe 置換した EPIpYA-C F/D 変異体あるいは Trp 置換した EPIpYA-C D/W 変異体では N-SH2 結合活性が顕著に上昇した(図 2-4 左)。同様に、変異型 CagA ペプチド存在下における SHP2 の脱リン酸化活性を検討したところ、pY+5 位の残基に強く依存して SHP2 の活性が制御されることを明らかにした(図 2-4 右)。さらにこれら CagA の pY+5 位の残基が細胞レベルでの CagA の生物活性に与える影響を検討するため、各種 CagA 点変異体を一過性に胃上皮細胞に導入した。その結果、CagA 発現細胞の細胞伸長、細胞運動ならびにコラーゲンゲル浸潤活性は、生化学的データに一致して CagA-SHP2 相互作用の強度ならびに CagA による SHP2 の活性亢進作用を反映することが明らかになった。これら一連の解析を通して CagA の配列多型と病態生理学的活性との関連を分子レベルで定量的に評価することができた(図 2-5)。

一方 SHP2 側の観点から、欧米型 CagA による SHP2 の活性化には N-SH2 および C-SH2 両ドメインが必要であるのに対し、東アジア型 CagA による SHP2 の活性化には C-SH2 ドメインは必須ではないことを上述した。このことが細胞レベルでの CagA-SHP2 相互作用にも反映されるか検証するため、内因性の SHP2 を IPTG 誘導性の shRNA 発現によりノックダウンした胃上皮細胞に東アジア型 CagA (ABD タイプ)あるいは Type II 欧米型 CagA (ABCC タイプ)と SHP2 の SH2 ドメイン変異体を共発現させ、SHP2 の活性亢進に依存した細胞形態変化を観察した。その結果、東アジア型 CagA は、C-SH2-dead SHP2 との共発現では顕著な細胞形態変化を誘導せず、N-SH2-dead

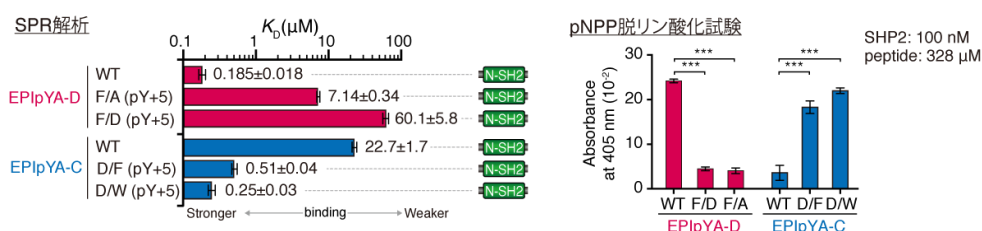


図 2-4 変異型 CagA ペプチドの N-SH2 ドメイン結合能 (左) ならびに SHP2 活性化能 (右) の比較。

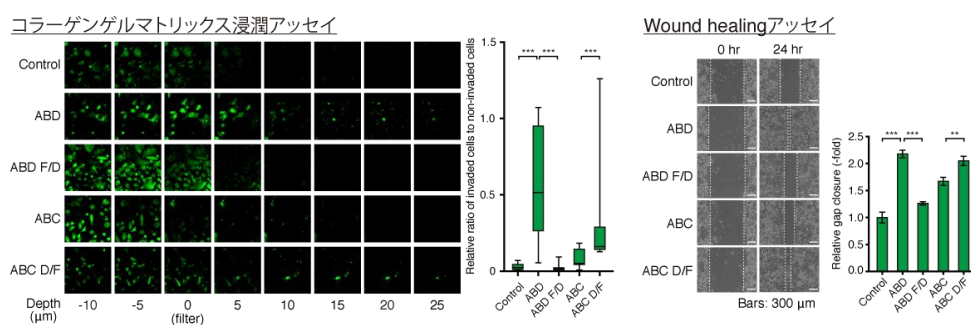


図 2-5 CagA の pY+5 位の残基に依存した生物活性の検討。野生型の東アジア型 CagA (ABD) および欧米型 CagA (ABC) ならびにこれらの点変異体を胃上皮細胞へ導入した。細胞浸潤ならびに細胞運動をコラーゲンゲルマトリックス浸潤アッセイ (左) ならびに Wound healing アッセイ (右) により解析した。

SHP2 との共発現により有意に形態変化を誘導した。対照的に、Type II 欧米型 CagA は N-SH2-dead および C-SH2-dead どちらの変異型 SHP2 と共発現しても有意な細胞形態変化を誘導しなかった(図 2-6)。以上のことは細胞レベルにおいても、欧米型 CagA は 2 つ以上の EPIYA-C セグメントと 2 つの SH2 ドメインを介した二価相互作用によって SHP2 を活性化する一方、東アジア型 CagA は EPIYA-D セグメントと N-SH2 ドメイン間の強い一価相互作用により SHP2 を活性化できることを示す。ことことから、欧米型 CagA と東アジア型 CagA は異なる 2 つの結合メカニズムにより SHP2 を異常活性化し、病態生理学的活性を発揮することが明らかになった。以上の一連の成果

は、Cell Reports 誌に発表した [文献 (1)-34]。

[3] チロシンリン酸化 CagA ペプチドと SHP2-SH2 との複合体の X 線結晶構造解析 (高エネ機構 千田グループ、東京大 畠山グループ)

① 研究のねらい

CagA の ID-C 部分には EPIYA セグメントが含まれ、その領域のアミノ酸配列の違いが病原生物活性の強さの違いを生じる原因となっていることが知られている。特に、欧米型 CagA の持つ EPIYA-C

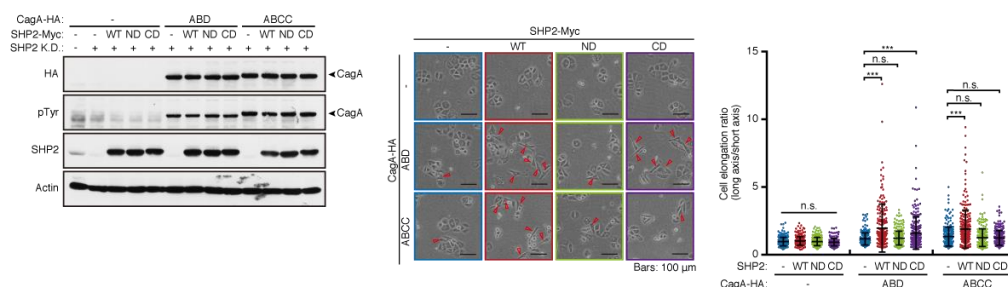


図 2-6 内因性の SHP2 をノックダウンした胃上皮細胞に東アジア型 CagA (ABD) あるいは Type II 欧米型 CagA (ABCC) と SHP2 変異体を共発現させた。(左) ウェスタンブロットによる発現解析、(中央) 細胞形態の顕微鏡像、(右) 細胞形態の定量解析。

セグメントと東アジア型 CagA の持つ EPIYA-D セグメントは CagA の病原生物活性と密接に関連することが知られており、これらは CagA の細胞内標的分子である SHP2 の SH2 ドメインと相互作用することが知られている。その相互作用について構造生物学的に解析するため、チロシンリン酸化 CagA ペプチドを用いて SHP2 の Tandem SH2 ドメイン (以下 Tandem SH2 ドメイン) との複合体の X 線結晶構造解析を行った。Tandem SH2 ドメインと EPIYA-C セグメント及び EPIYA-D セグメントとの複合体構造を決定し、これらの構造を比較することにより、東アジア型 CagA が高い毒性を持つ原因を探ることを目的として研究を進めた。

② 実施方法

欧米型 CagA 及び東アジア型 CagA に由来する EPIYA モチーフを含む 13 残基のチロシンリン酸化 EPIYA-C ペプチド (ASPEPIpYATIDDL) 及び EPIYA-D ペプチド (VSPEPIpYATIDFD) を合成した。畠山グループにより精製された SHP2 の Tandem SH2 ドメインの組み換えタンパク質と EPIYA-C ペプチド及び EPIYA-D ペプチドをモル比で 1:4 になるように混合し、結晶化スクリーニングを行った。Tandem SH2 ドメインは非常に酸化され易く、通常の好気条件下での結晶化では、タンデム SH2 ドメインが凝集し大量の酸化膜を生じてしまったため結晶化が困難であった。そのため、我々のグループで結晶化の一連の実験が行えるように整備してきた嫌気チャンバーを用いて嫌気条件下での結晶化を行った (図 3-1)。X 線回折強度データの収集は、Photon Factory (PF、高エネ機構) の BL-17A 及び BL-5A で行った。Tandem SH2 ドメイン-EPIYA-D ペプチド複合体の構造決定は、既に報告されている SHP2 の SH2 ドメイン (PDB ID: 4JE4, 4JEG) をサーチモデルとして用いた分子置換法により行った。また、Tandem SH2 ドメイン-EPIYA-C ペプチド複合体の構造決定は、SH2 ドメイン-EPIYA-D ペプチド複合体をサーチモデルとして用いた分子置換法により行った。モデルの構築はプログラム Coot を用いて行い、結晶学的構造精密化はプログラム Phenix_refine を用いて行った。



図 3-1 タンパク質結晶化用の嫌気チャンバー

③ 当初の研究計画に対する現在の進捗状況

Tandem SH2ドメインの酸化を避けるために嫌気条件下での結晶化を行うことで、欧米型 CagA 由来の EPIYA-C ペプチド及び東アジア型 CagA 由来の EPIYA-D ペプチドと SHP2 の Tandem SH2ドメインとの複合体結晶を得ることに成功し(図 3-2)、各々2.45 Å 分解能、2.60Å 分解能の X 線回折強度データを得ることができた。EPIYA-D ペプチド複合体については結晶が双晶になってしまう問題があり、20 セット程度のデータを収集し、その中から twin fraction の割合が低いデータを選び出して最終的な構造精密化に用いた。結晶学的構造精密化の結果、EPIYA-C ペプチド複合体については 2.45 Å 分解能で R/freeR=0.225/0.278、EPIYA-D ペプチド複合体については 2.6 Å 分解能で R/freeR=0.157/0.246 という値を得ており、欧米型 CagA の EPIYA-C ペプチド複合体、東アジア型 CagA の EPIYA-D ペプチド複合体ともにチロシンリン酸化 CagA ペプチドの結合を確認することができた(図 3-3、図 3-4)。欧米型 CagA の EPIYA-C ペプチド複合体では、EPIYA-D ペプチド複合体と比較して確認できたペプチドの領域が少ないが、この結果は畠山グループによる Biacore 及び ITC を用いた相互作用解析で、東アジア型の EPIYA-D ペプチドが欧米型の EPIYA-C ペプチドよりも SH2ドメインに対して数十倍のオーダーで高い相互作用を示した結果と矛盾しない。また、SH2ドメインのポケットと EPIYA-D の Ile と Phe がしっかりと相互作用している様子が確認されており(図 3-5)、この相互作用が東アジア型 CagA の毒性が高い一因となっていることが示唆された。この項目については、当初の研究計画通りに研究を進めることができた。以上の一連の成果は、Cell Reports 誌に発表した [文献 (1)-34]。



図 3-2 SHP2 の Tandem-SH2-EPIYA-C ペプチド複合体結晶(左)と EPIYA-D ペプチド複合体結晶(右)

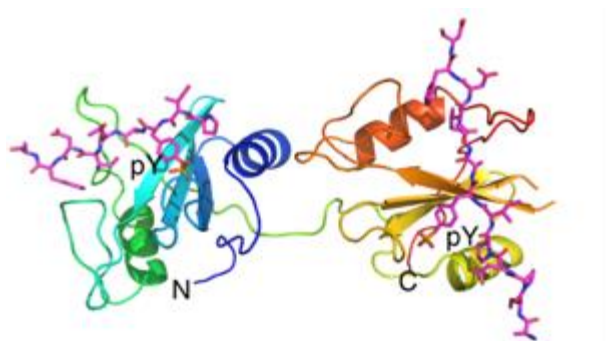


図 3-3 東アジア型 CagA のチロシンリン酸化 EPIYA-D ペプチドと Tandem SH2ドメインとの複合体構造

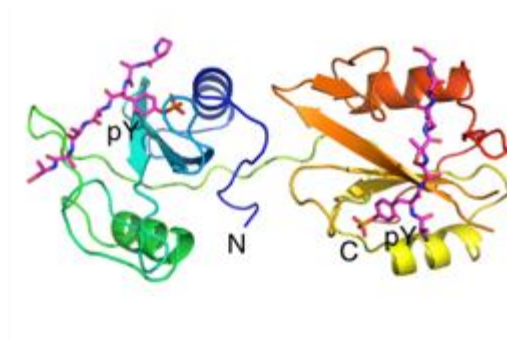


図 3-4 欧米型 CagA のチロシンリン酸化 EPIYA-C ペプチドと Tandem SH2ドメインとの複合体構造

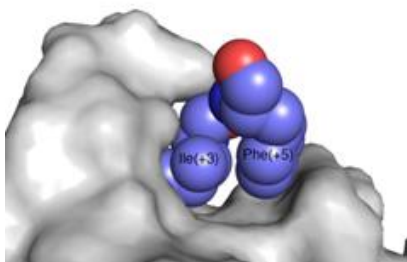


図 3-5 東アジア型 CagA と SH2ドメインとの強い相互作用のために重要な Ile と Phe。

[4] CagA 分子内相互作用および CagA による SHP2 活性化機構の溶液構造解析(高エネ機構 千田グループ)

① 研究のねらい

本研究実施前の我々の研究から、CagA は分子内の天然変性領域内に存在する CBS (C-terminal binding site) と構造領域内の NBS (N-terminal binding site) の分子内相互作用により投げ縄様構造をとることが示唆された。そしてこの投げ縄用構造形成を起点として、シグナル攪乱複合体は段階的に形成されていくことが予想された。我々のこのモデルを検証するため、投げ縄構造領域を取り出して、円偏光二色性解析、X 線小角散乱、NMR 解析などによる溶液構造解析を行い、また投げ縄構造を用いてシグナル攪乱複合体の形成過程を生化学的、物理化学的に解析した。

② 実施方法と成果

まず、投げ縄構造領域の取得を試み、764-1076 のコンストラクトを得た。この投げ縄構造領域の溶液構造を CD と NMR を用いて解析し、およそ 60% 程度が変性状態で、40% 程度がヘリックスであり、現行のモデルと整合性が取れていた。さらに Chemical shift indexing から SHP2 との相互作用部位である EPIYA 配列は extended な構造であることが判明し、SHP2 との相互作用に有利な状況であることが示された。一方、この投げ縄領域の分子内相互作用を阻害した変異体(L812R)の CD 解析を行ったところヘリックス含量の大幅な低下が観測された(図 4-1 左)。これは全長の CagA でも同様の結果が得られたことから、投げ縄領域の分子内相互作用時に構造変化があることを示している。さらに詳細な CD を用いた熱変性解析から、温度を上昇させると投げ縄構造領域は 2 段階で(図 4-1 中央)、一方の変異体(L812R)では 1 段階で変性し(図 4-1 右)、野生体では、まず NBS-CBS 間相互作用が破壊されて変異体と同様の構造になり、さらに温度を上昇させると NBS を含む構造領域の構造が破壊されることを示唆している。さらに NBS-CBS 間分子内相互作用による CBS の構造変化を NBS あるいはその変異体(L812R)と CBS のみを用いた CD 解析を行った。その結果、CBS 単独では天然変性状態であるが、NBS と混合させるとヘリックス構造へと induced-folding を引き起こし、NBS の L812R 変異体を混合させた場合は CBS に構造変化が起これないことが判明した(図 4-2 左)。NMR でも同様の結果が得られており(図 4-2 中央)、現行モデルが正しいことが検証された。

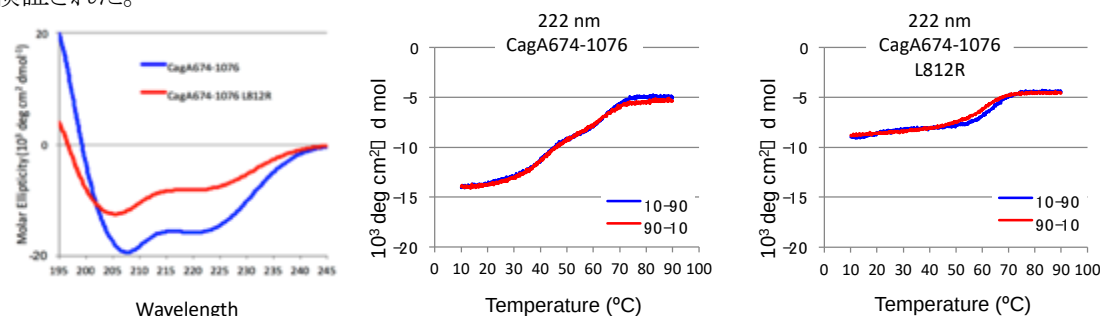


図 4-1. CagA 投げ縄領域の CD 解析。野生体 (青) と L812R 変異体の CD スペクトル (左) を測定し、野生体の熱変性曲線 (中央) 及び L812R の熱変性曲線 (右) を 222 nm で解析した。

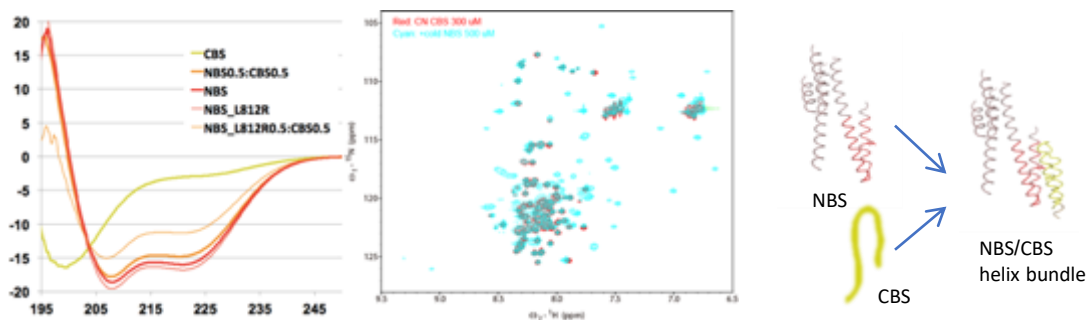


図 4-2. NBS-CBS 相互作用による構造変化を CD (左) と NMR (中央) を用いて解析した。NBS-CBS 相互作用時の induced-folding の概念図 (右)。

続いて、投げ縄構造領域を用いたシグナル攪乱複体の再構成実験も行った。CagA のシグナル攪乱複体の形成には EPIYA 配列のチロシンがリン酸化されている必要があり、大腸菌内で v-Src を用いた共発現系でリン酸化投げ縄構造の取得を試みたが、EPIYA 以外の露出したチロシン残基も不均一にリン酸化されることが判明した。そこで EPIYA-C 配列の以外のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体を作成し、均一なチロシンリン酸化体の取得に成功した。このリン酸化投げ縄構造を用いて、まず標的分子である SHP2 と PAR1b とのプルダウン相互作用解析と SPR 解析(図 4-3 右)を行い SHP2 との相互作用はプルダウンと SPR の双方でリン酸化依存的な相互作用を確認し、PAR1b との相互作用はプルダウン相互作用解析からリン酸化非依存的な相互作用を確認した。その後三者を混合してシグナル攪乱複体の再構成を試み、複合体の形成をプルダウン解析と(図 4-3 左)、ゲルろ過解析で確認することに成功した。現在、以上の CagA 投げ縄構造に関する成果をまとめた論文を執筆中である。

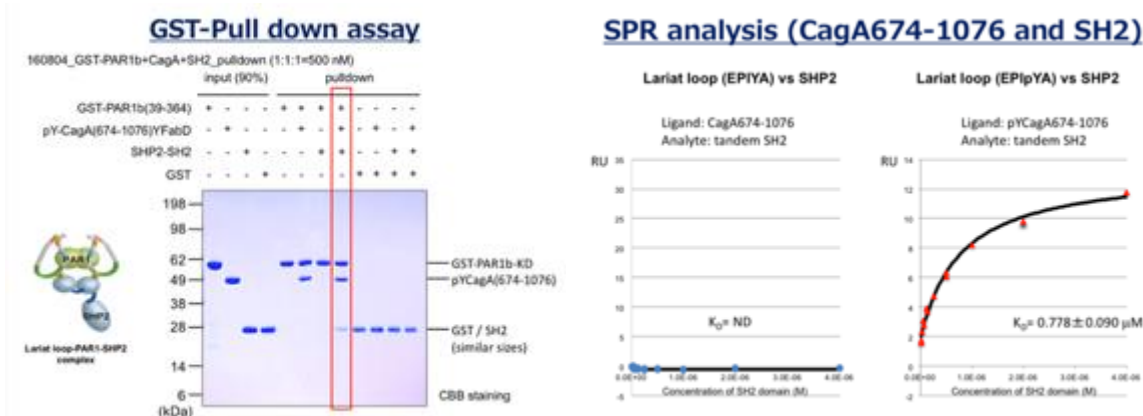


図 4-3 CagA 投げ縄構造によるシグナル攪乱複体の再構成。まず GST-プルダウンで 3 者複合体の形成を確認し(左)、その後投げ縄構造と SH2 の SPR による定量解析を行った(右)。

CagA の SHP2 に対する活性の亢進メカニズムを明らかにするため、本研究中で SH2 ドメインと EPIYA 配列の複合体の結晶構造解析を行った。より詳細に分子機構を明らかにするため、SHP2 と EPIYA 配列を用いて X 線小角散乱法を用いて溶液構造を解析した。その結果、EPIYA が N-SH2 と結合すると大きくドメインの配置が移動し、定常状態では隠れている活性部位が溶媒に露出することで、基質が活性部位に容易にアクセスできることを直接的に捉えることに成功した(図 4-4)。本研究では、当研究グループが所属する高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory に新たに導入されたゲルろ過と X 線小角散乱を組み合わせた SEC-SAXS を用いて初めて良好なデータを取得することができた。

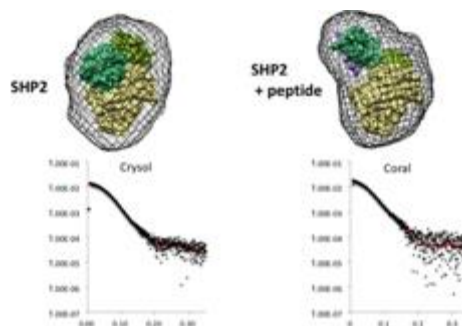


図 4-4 SHP2 (左) と SHP2/EPIYA 複合体の SAXS 解析。

[5] CagA シグナル攪乱複体の立体構造解析(高エネ機構 千田グループ)

① 研究のねらい

本項目ではシグナル攪乱複体(リン酸化 CagA-SHP2-PAR1b 複合体)の立体構造の解明を目指している。千田グループおよび畠山グループの研究成果によりシグナル攪乱複体を構成するタンパク質が全て調製可能となったため、共結晶化を目指して複合体の再構成実験を行った。

③ 実施方法と成果

ゲルろ過クロマトグラフィーを行ったところ、CagA-SHP2-PAR1b 複合体の再構成が確認された(図

5-1)。この複合体は理論上、分子量 300kDa 以上の巨大分子複合体であると考えられる。そこで、佐藤グループと共同で、複合体の負染色像を透過電子顕微鏡にて観察し、単粒子解析を行った。結果は後述する。精製タンパク質を用いた CagA-SHP2-PAR1b 複合体の結晶化に先立ち、チロシンリン酸化 EPIYA モチーフおよび CM 配列を模したペプチド (36 残基:EPIpYA_CM ペプチド)と SHP2、PAR1b との複合体の結晶構造解析を目指した。初めに、EPIpYA_CM ペプチド-SHP2 二者複合体の結晶化から開始した。SHP2 は EPIpYA_CM ペプチドが脱リン酸化されるのを防ぐためにホスファターゼ活性を持たない SHP2 変異体 (C459A)を使用した。SHP2(C459A)は好気条件下で結晶化した場合、非常に酸化されやすかったため、嫌気チャンバー内で EPIpYA_CM ペプチドとの共結晶化を行った。その結果、非常に脆く回折実験に用いることはできない結晶ではあったが、結晶が得られる条件が見つかった(図 5-2)。今後は回折データの取得が可能な結晶を得るために、結晶化条件の最適化を行う。また、EPIpYA_CM ペプチドと PAR1b 複合体についても結晶化スクリーニングを行った。その結果、約 20 ミクロンの微小結晶が得られた。この結晶を用いて PF BL-1A にて回折実験を行ったところ、最大で 3.2 Å 分解能の回折が生じ(図 5-3)、プログラム xds と xscale を用いたデータ処理の結果、空間群が $F6_1$ または $F6_5$ 、格子定数が $a=b=121$ Å, $c=100$ Å であることが確認できた。今後は分解能の高い回折強度データの取得を目指して、より質の高い結晶が得られる結晶化条件を探索する。EPIpYA_CM ペプチド-SHP2-PAR1b 複合体においても結晶化スクリーニングを開始しているが、現在までに結晶は得られていないため、引き続きスクリーニングを行う。また、EPIpYA_CM ペプチド-SHP2 あるいは EPIpYA_CM ペプチド-PAR1b 複合体の結晶を用いたヘテロマイクロシーディングも試みる。

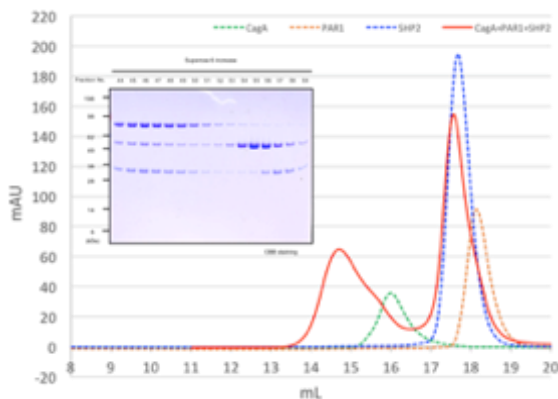


図 5-1 シグナル伝達複合体のゲルろ過クロマトグラフィー

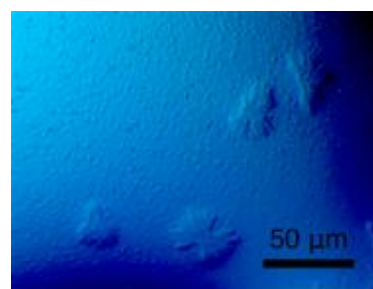


図 5-2 EPIpYA_CM ペプチドと SHP2 複合体の結晶。

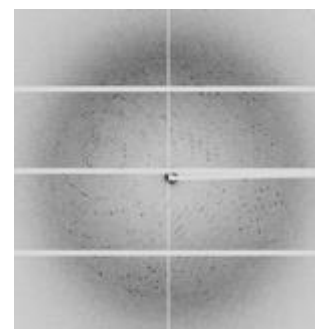
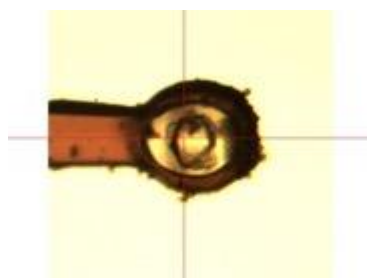


図 5-3. EPIpYA_CM ペプチド-PAR1b 複合体の結晶(左)と回折像(右)

[6] 単粒子解析法による CagA 全複合体構造の研究(産総研 佐藤グループ)

①実施方法

千田グループが調製した CagA 複合体サンプルをゲルろ過で最終精製し、負染色透過電子顕微鏡法による単粒子解析を行った。さらに、クライオ電子顕微鏡による単粒子解析によって構造解析を行っている。

②研究成果

単粒子解析のアルゴリズム開発を進め、CagA 全長タンパク質と結合サブユニットとの完全複合体を cryo-TEM で撮影することにより CagA 複合体の全体構造の解明を進めている。まず、千田グループによって CagA 複合体の個々のサブユニット、すなわち CagA、PAR1、SHP2 が精製された。

これらを迅速に産総研に移動して、混合することにより複合体を形成させ、さらにゲルろ過精製を単粒子解析のアルゴリズム開発を進め、CagA 全長タンパク質と結合サブユニットとの完全複合体を cryo-TEM で撮影することにより CagA 複合体の全体構造の解明を進めている。まず、千田グループによって CagA 複合体の個々のサブユニット、すなわち CagA、PAR1、SHP2 が精製された。これらを迅速に産総研に移動して、混合することにより複合体を形成させ、さらにゲルろ過精製を行った(図 6-1)。赤矢印で示す複合体のピーク以外にも、各サブユニット単体のピーク(青矢印)もこれらを迅速に産総研に移動して、混合することにより複合体を形成させ、さらにゲルろ過精製を行った(図 6-1)。赤矢印で示す複合体のピーク以外にも、各サブユニット単体のピーク(青矢印)も複数見える。複合体のフラクションを重金属溶液で負染色した後に透過電顕(TEM)撮影により、カーボン膜上で複合体の姿を捉えた。

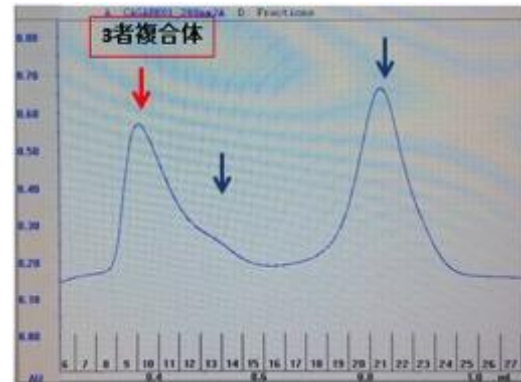


図 6-1 CagA と PAR1 と SHP2 を混合し、ゲルろ過。矢印は複合体とサブユニットのピーク。

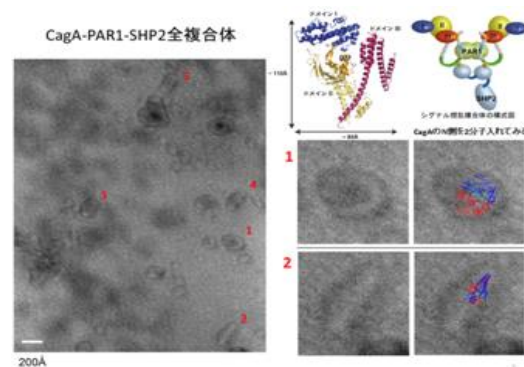


図 6-2 CagA・PAR1・SHP2 複合体の負染色透過

[7] CagA の構造多型が細胞極性制御因子 PAR1b の結合に及ぼす影響(東京大 畠山グループ)

① 研究のねらい

ピロリ菌 CagA C 末端領域の繰り返し構造内に含まれる CagA Multimerization (CM) モチーフは細胞極性制御に関わるセリン・スレオニンキナーゼ PAR1b と結合し、そのキナーゼ活性を阻害する。PAR1b の活性阻害は胃上皮細胞の細胞骨格系再編成を介してタイトジャンクションと細胞極性を破壊することが畠山グループの先行研究から明らかとなっている。興味深いことに、CagA の単離される地域によって CM モチーフの繰り返しの数やモチーフの配列にバリエーションが存在する。欧米型 CagA は欧米型 CM モチーフ (CM^W) を一般的には 2-4 コピー有するが、日本で単離されるほとんどの東アジア型 CagA は東アジア型 CM モチーフ (CM^E) を 1 コピーしか持たない。近年では、アマゾン流域の原住民から単離されたアメリンド型 CM モチーフ (CM^{AmI} と CM^{AmII}) が 2 種見つかっているが、これらの CM モチーフの病態生理学的活性はまだ不明である。胃炎及び胃がんの発症率の違いの背景にこれらの CM モチーフの多様性が寄与していると考えられることから、本研究ではこれらの CagA-CM 多型の PAR1b 結合能を定量的に解析し、胃炎及び胃がん発症メカニズムの分子基盤を解明することを目指した。

② 実施方法

欧米型 CagA タンパク質中の CM モチーフ (CM^W) を CM^E、CM^{AmI}、CM^{AmII} モチーフに置換した組換え CagA タンパク質を GST 融合タンパク質 (GST-CagA) として発現・精製した。一方、PAR1b のキナーゼドメインと UBA ドメインから成る領域の組換えタンパク質を調製し、これらの GST-CagA 変異体ならびに PAR1b 精製タンパク質を用い、定量的 GST プルダウンにより CagA-PAR1b 相互作用を解析した。また、異なる数の CM^W モチーフあるいは CM^E モチーフを持つキメラ型 CagA をそれぞれ胃がん培養細胞である AGS 株に一過性発現させ、アクチンフィラメントをファロイジン染色して

細胞の収縮性に関係するストレスファバーの形成を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。上皮細胞極性の破壊を定量的に測定するため、極性化 MDCK 上皮単層培養モデルにおいて、CM^W モチーフの数が異なる CagA をレンチウイルスを用いて強制発現させ、経上皮電気抵抗 (TER) を指標として細胞間接着の強度を計測した。

③ 研究の成果

組換え CagA タンパク質を用いて CM^W、CM^E、CM^{AmI}、CM^{AmII} モチーフそれぞれの PAR1b 結合能を比較検討した結果、CM^W と CM^E モチーフは PAR1b と結合したが、CM^{AmI} と CM^{AmII} モチーフは PAR1b 結合能を消失していることが明らかとなった。これはアマゾン流域で発見されたピロリ菌の毒性が低いことと一致する。さらに定量的 GST プルダウン法を用いて PAR1b に対する解離定数を求めた結果、CM^W モチーフのコピー数が増加するにつれ、PAR1b に対する結合能が指数関数的に増加した。また、CM^E モチーフと CM^W モチーフの解離定数を比較検討した結果、CM^E モチーフを一個有する CagA は CM^W モチーフを二個有する CagA に相当する PAR1b 結合能を発揮した。また、ストレスファイバー形成アッセイにおいて、それぞれの CagA の PAR1b 結合能の強弱がストレスファイバーの形成に反映されることを明らかにした。さらに CagA の PAR1b 結合能の強弱が細胞間接着の破壊の程度に反映されていることを見出した。以上の成果を論文にまとめ、2016 年 7 月に Scientific Reports 誌に発表した。

本研究では CM モチーフの多型と PAR1b への結合能の関係性を明らかにし、その強弱が培養細胞におけるストレスファイバーの形成や細胞間接着に反映されていることを示した。これまで、CagA は PAR1b の阻害を介して、微小管細胞骨格に影響を及ぼすことは示唆されてきたが、本研究で初めてアクチン細胞骨格系にも影響することを明らかにした。以上のことから、CM モチーフの構造多型は CagA を介した細胞骨格再編成、および細胞間接着の破壊の度合いを決定し、胃腸管系の病気に影響を及ぼしていると考えられ、今後病気の診断と治療に役立つと考えられる。

[8] 胃上皮由来 AGS 細胞とピロリ菌を用いた CagA 運搬機構の可視化および胃組織と細菌の相互作用の観察(産総研 佐藤グループ)

① 実施方法

＜胃上皮由来の株細胞 AGS とピロリ菌を用いた CagA 運搬機構の可視化＞輸送装置の有無(*cag* PAI(+))と *cag* PAI(-))の特徴を持つ2つのタイプのピロリ菌を、ASEM、Epon 薄切 TEM、SEM により比較観察を行う。ASEM では、細胞を化学固定するだけで水中観察が可能のため、細胞のデリケートな構造や抗原性を変化させずに免疫ラベルできる。そこで細胞の奥までラベルできる標識システムを構築し、ASEM 免疫電顕法を開発する。さらに、ラベル周辺の細胞構造の情報を得るための方法も開発する。開発した方法を、ピロリ菌に感染したヒト胃粘膜培養細胞 AGS 株の培養系に適用し、CagA が注入される様子と細胞内の Csk および SHP2 の局在がどう変化するかを ASEM で観察した。

＜胃組織と細菌の相互作用の観察＞ より実際に近い細胞でピロリ菌による粘膜組織への CagA 運搬機構を研究するために、マウスの胃組織の粘膜細胞上での細菌活動を水環境中において高分解能で迅速観察する方法を開発する。具体的には、組織切片の作製法と固定法と染色法、限られた面積を最大限利用した広域観察法とを開発する。これは全く新しい電顕法の構築で、様々な組織を用いた研究に適用できる汎用の観察法となる。この系を用いて、より自然に近い状況で撮影・解析する。

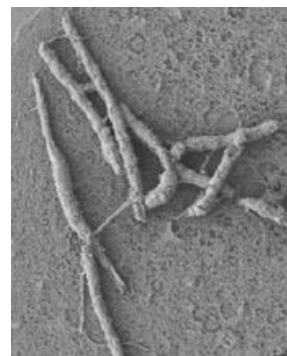


図 8-1 細菌の突起は、鞭毛を除き細胞からの突出と思われる。

② 研究の成果

＜胃上皮由来の株細胞 AGS とピロリ菌を用いた CagA 運搬機構の可視化＞

CagA の輸送機構に関する先行研究では、顕微鏡像などからピロリ菌は胃粘膜細胞と共存すると長い注射針を粘膜細胞へ注入し、CagA はその中を通して胃粘膜細胞へ注入されると提唱されて

いた(Kwok et al., Nature 2007)。しかし、提唱から8年経った現在でも、長い注射針を支持するデータは表れず、ピロリ菌から長い針状の注入装置が出るわけでは無さそうで、むしろ観察法を Kwok 等と揃えて、Pt コーティングの後に FE-SEM 観察へと変えても、やはり同じく胃粘膜細胞からピロリ菌に向かって伸びる細胞突起が見られるばかりでピロリ菌から伸びる注射針様の構造は見られなかった(図 8-1)。

また、本研究では、ASEM により細菌を観察するために、乳酸菌・大腸菌などをモデル細菌として染色法とラベル法を開発し(図 8-2)、Microscopy & Microanalysis 誌等に掲載された(文献(1)-7, 8, 9, 11)。さらに、モデル細菌が形成するバイオフィーム等をモデル系として ASEM 用の免疫電顕法/カウンター染色法の開発を行い Scientific reports 誌等に掲載された(文献(1)-29, 9)。本法では、1次抗体ラベル後に、FluoroNanogold による2次ラベルを行い、さらに金増感法を組み合わせる。これらの方法を、CagA に適用し免疫ラベルできる条件を試行錯誤の中から見つけ出し、ピロリ菌が CagA をヒト AGS 細胞へと注入し、細胞内へ移行した様子を金ラベルの分布として観察したのが(図 9-2)である。

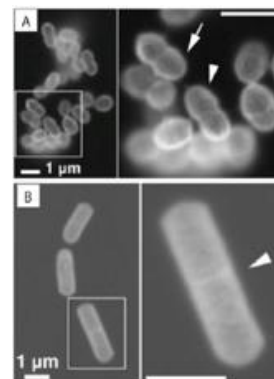


図 8-2 正電荷チャージ金ラベル法による乳酸菌の観察。(A)球菌、(B)桿菌

＜胃組織と細菌の相互作用の観察＞

培養株細胞よりも実際に近い状況で観察を行うために、胃として組織化された状態で、その粘膜細胞に対するピロリ菌による CagA 注入を観察できるシステムを構築した[文献(2)-9]。マウスの胃をモデルに、その表面の細菌と粘膜細胞が相互作用している様子を、水環境中で高分解能観察するシステムを開発する。胃の切片の作製法と固定法・染色法ならびに密着法、そして ASEM dish の小さな薄膜窓にも関わらず、広域が観察できる方法を開発した。これは ASEM のサンプルホルダーが広いことを活用している。胃は、本プロジェクトで購入した DohanPro7 リニアモータースライサーで厚い組織切片に切断した。切片は、2%のパラホルムアルデヒドと 2.5%のグルタルアルデヒドの混合溶液で固定後、連続切片 SEM 染色法の改変法によって染色した。観察時に薄膜に密着させるため、薄膜 dish に組織を載せて遠心できるローターを開発し、また組織上に重りを載せる方法を開発した。これらの方法を組み合わせ、マウス胃粘膜組織表面に自然共生する細菌の水中観察が可能になった(図 8-3)。

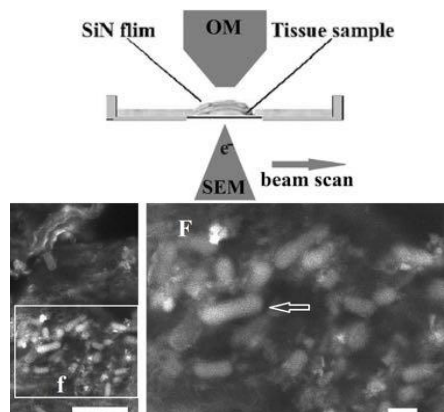


図 8-3 マウス胃内部表面の直接観察により胃粘膜上で見られた共生桿菌の像[文献(1)-16]。

本観察法で欠点となるのが、視野の狭さである。一般的に、電子顕微鏡は光顕よりも一度に観察できる視野が限られる。その克服のために、ASEM dish 上の組織を ASEM dish の底面積の広さを活用して、薄膜窓上で移動しながら電子線走査を連続して繰り返す[文献(2)-9]。後から画像を統合することで、限られた薄膜窓からでもより広い領域の観察が可能になった。今後は、組織を機械により移動し電子線スキャンをシステムチックに組み合わせることで、より広い領域の観察を可能にする。今後、この系を用いて、新たにより自然に近い水中で CagA の移行機構を撮影し解析する。今回作製した系は、全く新しい観察系の構築であり、様々な組織を用いた研究に用いられる汎用の観察法である。

④ 当初の計画で想定されていなかった新たな展開

胃でのピロリ菌の片利共生と発癌の様子を ASEM で観察しようと試みるうちに、組織の中の癌細胞そのものが、ASEM と PTA 染色との組み合わせで可能であることが判明した(図 8-4 [文献(1)-16])。しかも、水中観察であるため、必要な前処理はアルデヒド固定と PTA 染色だけであり、迅速な観察が可能になった。さらに、個々の癌細胞の核が認識できるため、少数の細胞の転移も検出可能である。そのため、癌術中迅速診断に ASEM を用いることが可能と思われ、診断そのものを早めるのではと病理学分野から注目されている。癌術中迅速診断の現状は、技術的に難しい数ミクロン厚での凍結薄切後に染色し光顕で核のサイズを観察して判定するため、1サンプルあたり 20 分程度の時間がかかっている(図 8-4)。そのため、診断の間外科手術は中断し、患者の体力的負担が大きい。さらに診断できるサンプル数も限られる。本 ASEM による組織観察法では、簡単な厚切り切片で十分であり、時間がかかる凍結薄切は必要ない。現在、迅速な重金属溶液染色法の開発により ASEM 観察法を加速する研究を引き続き行っている。

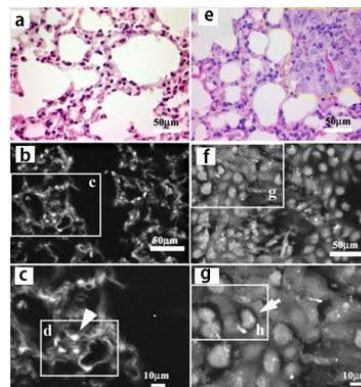


図 8-4 白黒 ASEM による正常マウス肺(左)と乳癌転移肺(右)の比較像。最上段は別途、薄切後 HE 染色による光顕像。正常細胞の核(白矢頭)に較べ癌細胞の核(白矢印)は大きい[文献 (1)-16]。

[9] チロシンリン酸化 CagA EPIYA-A ペプチド及びプラグミン EPIYA ペプチドと Csk との複合体の X 線結晶構造解析(高エネ機構 千田グループ、東京大 畠山グループ)

① 研究のねらい

CagA はチロシンリン酸化された EPIYA-A サイトを用いて Csk と安定的に結合し、Csk のキナーゼ活性を顕著に増大させることが畠山グループにより明らかにされている。また、ヒトのタンパク質であるプラグミンも EPIYA セグメントを持ち、チロシンのリン酸化依存的に Csk と複合体を形成することで Src Family Kinase の活性化を促すことが示されている。CagA 由来の外因性 EPIYA セグメントとヒトのタンパク質であるプラグミン由来の内因性 EPIYA セグメントの性質の違いを明らかにするために、EPIYA セグメントと Csk との相互作用に注目し、Csk-CagA EPIYA-A ペプチド複合体及び Csk-プラグミン EPIYA ペプチド複合体の X 線結晶構造解析を行った。

② 実施方法

CagA の EPIYA-A セグメント及びプラグミンの EPIYA セグメントを含む 13 残基のチロシンリン酸化 EPIYA-A ペプチド(LENEPIpYAKVNKK)及びプラグミン EPIYA ペプチド(TQPEPIpYAESTKR)を合成した。畠山グループにより精製された全長 Csk の組み換えタンパク質と CagA EPIYA-A ペプチド及びプラグミン EPIYA ペプチドをそれぞれモル比で 1:2 になるように混合し、結晶化スクリーニングを行った。X 線回折強度データの収集は、Photon Factory (PF、高エネ機構)の BL-17A 及び PF-AR NW12A で行った。Csk-CagA EPIYA-A ペプチド複合体の構造決定は、既に報告されている全長 Csk (PDB ID: 1K9A)をサーチモデルとして用いた分子置換法で行ったが、部分構造のみしか得られなかった。そのため、BL-17A で低エネルギーの X 線($\lambda=1.9 \text{ \AA}$)を用いて回折データを収集し、硫黄原子の異常分散効果を用いた native-SAD 法と分子置換法を組み合わせた MR-native SAD 法で構造決定を行った。Csk-プラグミン EPIYA ペプチド複合体の構造決定は、Csk-CagA EPIYA-A ペプチド複合体をサーチモデルとして用いた分子置換法で行った。モデルの構築はプログラム Coot を用いて行い、結晶学的構造精密化はプログラム Phenix_refine を用いて行った。

③ 当初の研究計画に対する現在の進捗状況

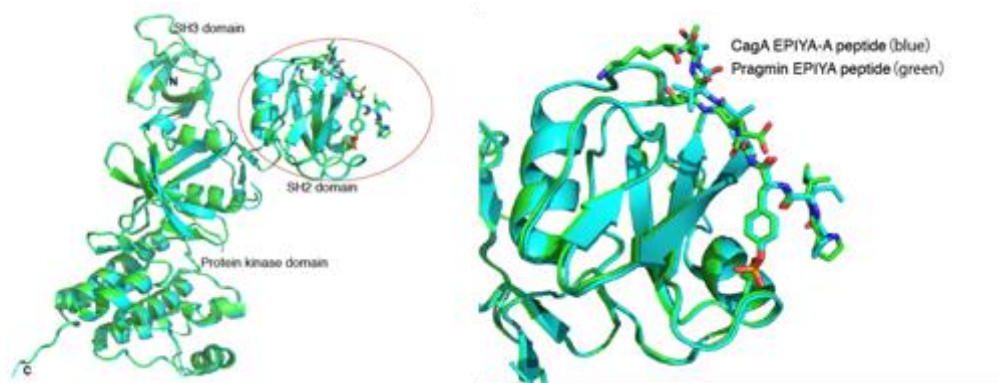


図 9-3 Csk-CagA EPIYA-A ペプチド-複合体(青)と Csk-プラグミン EPIYA ペプチド複合体(緑)の全体構造とペプチド結合部位

Csk-CagA EPIYA-A ペプチド複合体及び Csk-プラグミン EPIYA ペプチド複合体の結晶化に成功し、結晶構造をそれぞれ 2.25Å 分解能、2.15Å 分解能で決定することができた。Csk-CagA EPIYA-A ペプチド複合体の構造決定は、分子置換法で得られた部分構造に含まれる硫黄原子を Substructure として与えた MR-native SAD 法で行った。 $\lambda=1.9 \text{ \AA}$ で X 線回折強度データを測定した場合、硫黄原子の $f''=0.82$, $f'=0.37$ であるが、図 9-1 に示すように異常分散差フーリエマップに Met 残基と Cys 残基の硫黄原子及びリン酸化 Tyr のリン原子の明瞭なピークを確認することができ、native SAD による 3.1 Å 分解能の位相を用いて図 9-2 のような明瞭な電子密度を得ることができた。結晶学的構造精密化の結果、Csk-CagA EPIYA-A ペプチド複合体については 2.25 Å 分解能で $R/\text{free}R=0.212/0.253$ 、Csk-プラグミン EPIYA ペプチド複合体については 2.15 Å で $R/\text{free}R=0.203/0.254$ という値を得ており、図 7 に示すように CagA EPIYA-A ペプチド、プラグミン EPIYA ペプチドは Csk の SH2 ドメインのほぼ同じ位置に結合することが確認できた(図 9-3)。この項目については、当初の研究計画通りに研究を進めることができた。

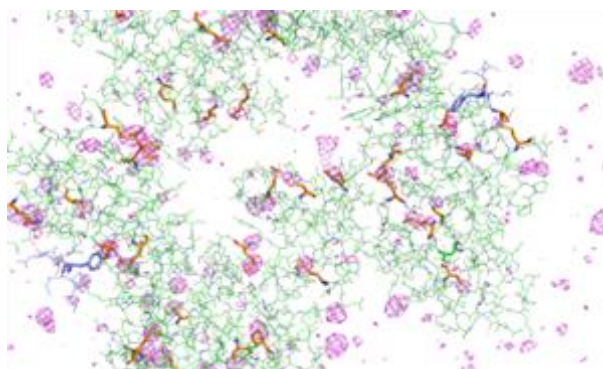


図 9-1 硫黄原子の異常分散差フーリエマップ (3σ)、橙は Met 残基、Cys 残基、リン酸化 Tyr を示す。

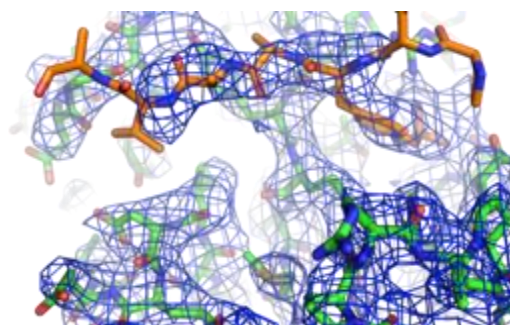


図 9-2 MR と S-SAD の併用で得られた CagA EPIYA-A ペプチド(橙)と Csk(緑)との複合体の電子密度図

[10] EPIYA モチーフを持つ CagA 以外のがん関連タンパク質由来のチロシンリン酸化ペプチドと SHP2-SH2 との複合体の X 線結晶構造解析 (高エネ機構 千田グループ、東京大 畠山グループ)

① 研究のねらい

CagA の EPIYA モチーフと SH2 との相互作用は、がん関連創薬において注目されている CagA 以外のタンパク質から SHP2 へのシグナリングと共通点が多いことが我々の研究から明らかになりつつある。その仮説を確かめるために、EPIYA モチーフを持ち SHP2 と相互作用することが確認できた CagA 以外のタンパク質由来のペプチド2種類(ペプチド A, B)と SHP2 の Tandem SH2 ドメイン(以下、Tandem SH2ドメイン)との複合体の X 線結晶構造解析を行った。

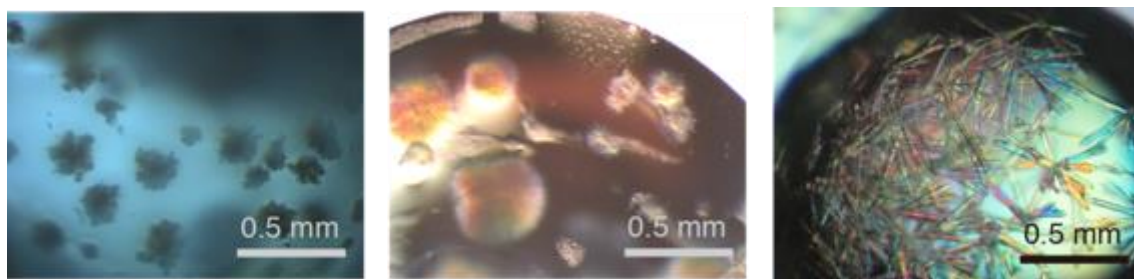


図 10-1 Tandem-SH2 と EPIYA モチーフを持つ CagA 以外のがん関連タンパク質由来のペプチド A 及び B 複合体の結晶化スクリーニングで得られた微小結晶(左: ペプチド A、中央: ペプチド B)、及び結晶化条件の最適化により得られたペプチド A 複合体結晶(右)

② 実施方法

EPIYA モチーフを含む 8 残基のチロシンリン酸化ペプチド(以下、ペプチド A)と 7 残基のチロシンリン酸化ペプチド(以下、ペプチド B)を合成した。畠山グループにより精製された Tandem SH2ドメインの組み換えタンパク質とペプチド A 及びペプチド B をモル比で 1:4 になるように混合し、結晶化スクリーニングを行った。平成 27 年度までの研究結果から Tandem SH2ドメインは非常に酸化されやすく、通常の好気条件下での結晶化では、Tandem SH2ドメインが凝集し大量の酸化膜を生じてしまうことが明らかになっていたため、すべての結晶化は嫌気チャンバーを用いて嫌気条件下で行った。X 線回折強度データの収集は、Photon Factory(PF、高エネ研)の BL-17A で行った。Tandem SH2ドメイン-ペプチド A 複合体の構造決定は、既知の SH2ドメインをサーチモデルとした分子置換法により行った。また、Tandem SH2ドメイン-ペプチド B 複合体の構造決定は、Tandem SH2ドメイン-ペプチド A 複合体をサーチモデルとした分子置換法により行った。モデルの構築はプログラム Coot を用いて行い、結晶学的構造精密化はプログラム Phenix_refine を用いて行った。

③ 当初の研究計画に対する現在の進捗状況

Tandem SH2ドメインの酸化を避けるために嫌気条件下での結晶化を行うことで、Tandem SH2ドメインと CagA 以外のタンパク質由来のチロシンリン酸化ペプチド A 及び B との複合体結晶を得ることに成功した。結晶化の初期スクリーニングでは微小結晶しか得られなかったが、additive screeningを含む結晶化条件の最適化を行うことにより、回折実験が可能な大きさまで結晶を成長させることができた(図 10-1)。得られたペプチド A 及びペプチド B 複合体結晶を用いて、PF BL-17A で各々 2.5 Å 分解能、3.1 Å 分解能の X 線回折強度データを得た。ペプチド A 複合体については 2.5 Å 分解能で freeR/R=0.286/0.213、ペプチド B 複合体については 3.1 Å 分解能で freeR/R=0.244/0.202 まで構造精密化が進んでおり、ペプチド A, B 共にペプチドの明瞭な電子密度が確認できた(図 10-2)。これらの構造を平成 27 年度までに得られた Tandem SH2-CagA EPIYA-C ペプチド複合体及び Tandem SH2-CagA EPIYA-D ペプチド複合体と Tandem SH2 の N-SH2ドメインで重ね合わせて比較した結果、ペプチドの結合位置はほぼ同じであることが確認できた(図 10-3)。この項目については、当初の研究計画通りに研究を進めることができた。

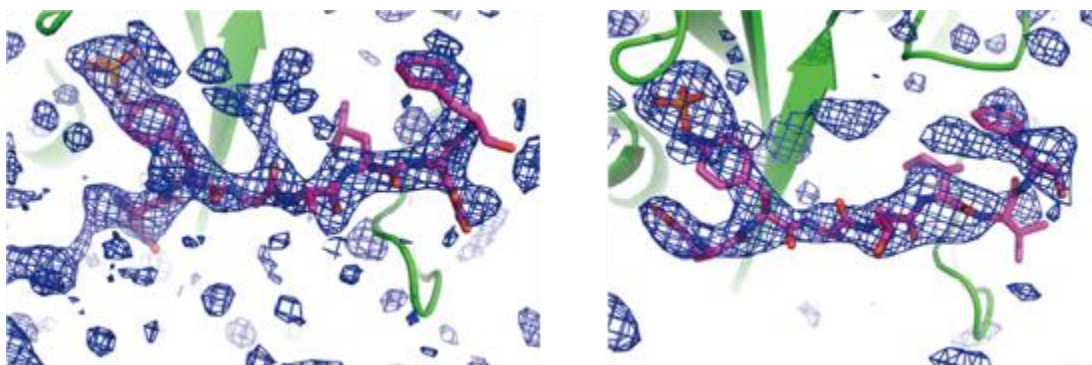


図 10-2 CagA 以外のがん関連タンパク質由来のペプチド A 及び B と Tandem SH2 との複合体の N-SH2 ドメインに確認できた電子密度を SA-omit map (2.5σ) で示す(左:ペプチド A、右:ペプチド B)

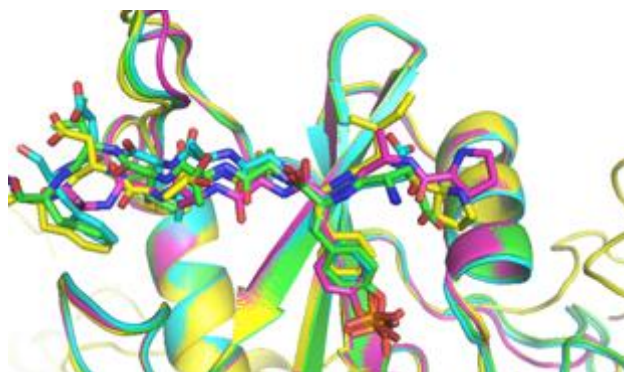


図 10-3 CagA 以外のがん関連タンパク質由来のペプチド A 複合体(緑)及びペプチド B 複合体(青)を CagA EPIYA-C ペプチド複合体(ピンク)及び CagA EPIYA-D ペプチド複合体(黄)の Tandem SH2 ドメインの N-SH2 で重ね合わせて比較した結果を示す

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 38 件)

1. Miura K, Wakayama Y, Tanino M, Orba Y, Sawa H, Hatakeyama M, Tanaka S, Sabe H and Mochizuki N. “Involvement of EphA2-mediated tyrosine phosphorylation of Shp2 in Shp2-regulated activation of extracellular signal-regulated kinase”. *Oncogene*, vol. 32, No. 45, pp.5292-5301, 2013 (DOI: 10.1038/onc.2012.571)
2. Ryouhei Tsutsumi, Mohammad Masoudi, Atsushi Takahashi, Yumiko Fujii, Takeru Hayashi, Ippei Kikuchi, Yumeko Satou, Masanori Taira, Masanori Hatakeyama. “YAP and TAZ, Hippo signaling targets, act as a rheostat for nuclear SHP2 function”, *Dev Cell*, vol. 26, No. 6, pp.658-665, 2013 (DOI: 10.1016/j.devcel.2013.08.013)
3. Masaaki Kawata and Chikara Sato, “Multi-reference-based multiple alignment statistics enables accurate protein particle pickup from noisy images”, *Microscopy*. Vol. 62, No. 2 ,pp. 303-315, 2013
4. Toshio Moriya, Kazuhiro Mio and Chikara Sato. “Novel Convergence-Oriented Approach for Evaluation and Optimization of Workflow in Single Particle 2D Averaging of Electron Microscope Images”, *Microscopy*. Vol. 62, No. 5, pp. 491-513, 2013
5. Tatsuhiko Ebihara, Hidetoshi Nishiyama, Mitsuo Suga and Chikara Sato. “Electron-light Correlative Microscopy in Open Solution by Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) ” , *Advances in Imaging and Electron Physics*, Vol. 179, pp. 152-154, 2013
6. Aya Kotake, Genichi Tajima, Yuusuke Maruyama, Jun Nakamura and Chikara Sato, “Susceptibility test of two ca-atpase conformers to denaturants and polyols to outline their structural difference”, *J.Membr.Biol.* Vol. 246,No. 2,pp.141-149,2013
7. Hidetoshi Nishiyama, Kanae Teramoto, Mitsuo Suga and Chikara Sato Sato, “Positively Charged Nanogold Label Allows the Observation of Fine Cell Filopodia and Flagella in Solution by Atmospheric Scanning Electron Microscopy”, *Microscopy Research and Technique*, Vol. 77, No. 2, pp. 153-160, 2014
8. Kazumi Hirano, Takaaki Kinoshita, Takeshi Uemura, Hozumi Motohashi, Yohei Watanabe, Tatsuhiko Ebihara, Hidetoshi Nishiyama, Mari Sato, Mitsuo Suga, Yuusuke Maruyama, Noriko M. Tsuji, Masayuki Yamamoto, Shoko Nishihara and Chikara Sato, “Electron microscopy of primary cell cultures in solution and correlative optical microscopy using ASEM”, *Ultramicroscopy* vol.143, pp.52-66, 2014
9. Takaaki Kinoshita, Yosio Mori, Kazumi Hirano, Shinya Sugimoto, Ken-ichi Okuda, Shunsuke Matsumoto, Takeshi Namiki, Tatsuhiko Ebihara, Masaaki Kawata, Hidetoshi Nishiyama, Mari Sato, Mitsuo Suga, Kenichi Higashiyama, Kenji Sonomoto, Yoshimitsu Mizunoe, Shoko Nishihara and Chikara Sato, “Immuno-Electron Microscopy of Primary Cell Cultures from Genetically Modified Animals in Liquid by Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM)”, *Microscopy and Microanalysis*, vol.20, pp.469-483, 2014
10. Toshihiko Ogura, Hiroaki Yajima, Ryo Nitta, Nobutaka Hirokawa and Chikara Sato, “New simulated annealing approach considering helix bending applied to determine the 8.8 Å structure of 15-protofilament microtubules”, *Journal of Structural Biology*, vol. 188, pp. 165-176, 2014
11. Hidetoshi Nishiyama, Mitsuru Koizumi, Koji Ogawa, Shinich Kitamura, Yuji Konyuba, Yoshiyuki Watanabe, Norihiko Ohbayashi, Mitsunori Fukuda, Mitsuo Suga and Chikara Sato, “Atmospheric scanning electron microscope system with an open sample chamber: Configuration and applications”, *Ultramicroscopy*, vol. 147, pp.86-97, 2014
12. Bessède E, Staedel C, Amador LA, Nguyen PH, Chambonnier L, Hatakeyama M, Belleannée G, Mégraud F and Varon C. *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial-mesenchymal transition-like changes. *Oncogene*, 33, 4123-4131, 2014 (DOI: 10.1038/onc.2013.380)
13. Hashi K, Murata-Kamiya N, Varon C, Mégraud F, Dominguez-Bello MG and Hatakeyama M. A natural variant of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein that lost the ability to interact with PAR1. *Cancer Sci*, 105, 245-251, 2014 (DOI: 10.1111/cas.12342)

14. Suzuki N, Murata-Kamiya N, Yanagiya K, Suda W, Hattori M, Kanda H, Bingo A, Fujii Y, Maeda S, Koike K. and Hatakeyama M. Mutual reinforcement of inflammation and carcinogenesis by the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. **Sci Rep**, 5, 10024, 2015 (DOI: 10.1038/srep10024)
15. Lisa Nagase, Takeru Hayashi, Toshiya Senda, and Masanori Hatakeyama, Dramatic increase in SHP2 binding activity of *Helicobacter pylori* Western CagA by EPIYA-C duplication: its implications in gastric carcinogenesis. **Sci. Rep.** vol:5, 15749, 2015
16. Nassirhadjy Memtily, Tomoko Okada, Tatsuhiko Ebihara, Mari Sato, Atsushi Kurabayashi, Mutsuo Furihata, Mitsuo Suga, Hidetoshi Nishiyama, Kazuhiro Mio And Chikara Sato, "Observation of tissues in open aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy: applicability to intraoperative cancer diagnosis" **International Journal of Oncology**, vol: 46, pp.1872-1882, 2015
17. Saori Noda, Atsushi Takahashi, Takeru Hayashi, Sei-ichi Tanuma, Masanori Hatakeyama, "Determination of the catalytic activity of LEOPARD syndrome-associated SHP2 mutants toward parafibromin, a *bone fide* SHP2 substrate involved in Wnt signaling", Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 469, No. 4, pp.1133-1139, 2016
18. Asako Shimoda, Koji Ueda, Shin Nishiumi, Naoko Murata-Kamiya, Sada-atsu Mukai, Shin-ichi Sawada, Takeshi Azuma, Masanori Hatakeyama, Kazunari Akiyoshi, "Exosomes as nanocarriers for systemic delivery of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA", Scientific Reports, vol. 6, Article number: 18346, 2016
19. Shoichiro Kameoka, Takeshi Kameyama, Takaya Hayashi, Seiichi Sato, Naomi Ohnishi, Takeru Hayashi, Naoko Murata-Kamiya, Hideaki Higashi, Masanori Hatakeyama and Akinori Takaoka, "*Helicobacter pylori* induces IL-1 β protein through the inflammasome activation in differentiated macrophagic cells", Biomedical Research, vol. 37, No. 1, pp.21-27, 2016
20. Ben J. Lang, Rebecca J. Gorrell, Mona Tafreshi, Masanori Hatakeyama, Terry Kwok and John T. Price, "The *Helicobacter pylori* cytotoxin CagA is essential for suppressing host heat shock protein expression", Cell Stress and Chaperones, vol. 21, No. 3, pp.523-533, 2016
21. Rony K. Roy, Michal M. Hoppe, Supriya Srivastava, Animesh Samanta, Neel Sharma, Kar Tong Tan, Henry Yang, Dominic C. Voon, Brendan Pang, Ming Teh, Naoko Murata-Kamiya, Masanori Hatakeyama, Young-Tae Chang, Wei Peng Yong, Yoshiaki Ito, Khek Yu Ho, Patrick Tan, Richie Soong, Phillip H. Koeffler, Khay Guan Yeoh and Anand D. Jeyasekharan, "CEACAM6 is upregulated by *Helicobacter pylori* CagA and is a biomarker for early gastric cancer", Oncotarget, vol. 7, No. 34, pp.55290-55301, 2016
22. Priya Saju, Naoko Murata-Kamiya, Takeru Hayashi, Yoshie Senda, Lisa Nagase, Saori Noda, Keisuke Matsusaka, Sayaka Funata, Akiko Kunita, Masayuki Urabe, Yasuyuki Seto, Masahi Fukayama, Atsushi, Kaneda, Masanori Hatakeyama, "Host SHP1 phosphatase antagonizes *Helicobacter pylori* CagA and can be downregulated by Epstein-Barr virus", Nature Microbiology, vol. 1, Article number: 16026, 2016
23. Miki Senda, Takeru Hayashi, Masanori Hatakeyama, Koh Takeuchi, Atsuo Sasaki, and Toshiya Senda. "Use of multiple cryoprotectants to improve diffraction quality from protein crystals." Crystal Growth & Design vol. 16, pp. 1565-1571, 2016
24. Dorothee Liebschner, Yusuke Yamada, Naohiro Matsugaki, Miki Senda and Toshiya Senda, "On the influence of crystal size and wavelength on native SAD phasing" Acta Crystallogr. D72, pp.728–741, 2016
25. Yoshie Senda, Naoko Murata-Kamiya and Masanori Hatakeyama, "C-terminal Src kinase-mediated EPIYA phosphorylation of Pragmin creates a feed-forward C-terminal Src kinase activation loop that promotes cell motility", Cancer Science, vol. 107, No. 7, pp.972-980, 2016
26. Hiroko Nishikawa, Takeru Hayashi, Fumio Arisaka, Toshiya Senda and Masanori Hatakeyama, "Impact of structural polymorphism for the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein on binding to polarity-regulating kinase PAR1b", Scientific Reports, vol. 6, Article No. 30031, 2016
27. Ippei Kikuchi, Atsushi Takahashi-Kanemitsu, Natsuki Sakiyama, Chao Tang, Pei-Jung

- Tang, Saori Noda, Kazuki Nakao, Hidetoshi Kassai, Toshiro Sato, Atsu Aiba and Masanori Hatakeyama, "Dephosphorylated parafibromin is a transcriptional coactivator of the Wnt/Hedgehog/Notch pathways", Nature Communications, vol. 7, Article No. 12887, 2016
28. Masayuki Nakano, KinnosukeYahiro, Eiki Yamazaki, Hisao Kurazono, Junko Akada, Yoshio Yamaoka, Takuro Niidome, Masanori Hatakeyama, Hidekazu Suzuki, Taro Yamamoto, Joel Moss, Hajime Isomoto and Toshiya Hirayama, "*Helicobacter pylori* VacA, acting through receptor tyrosine phosphatase α , is crucial for CagA phosphorylation in human duodenum carcinoma cell line AZ-521", Disease Models & Mechanisms, vol. 9, pp.1473-1481, 2016
 29. S.Sugimoto, K.Okuda, R.Miyakawa, M.Sato, K.Arita-Morioka, A.Chiba, K.Yamanaka, T.Ogura, Y.Mizunoe, C.Sato. Imaging of bacterial multicellular behaviour in biofilms in liquid by atmospheric scanning electron microscopy., Scientific Reports, 6:25889, 1-13, 2016
 30. T.Yamazawa, N.Nakamura, M.Sato, C.Sato. Secretory glands and microvascular systems imaged in aqueous solution by atmospheric scanning electron microscopy (ASEM). Microsc Res Tech, 79(12), 1179-1187, 2016
 31. C.Sato, M.Suga. Observations in Liquids using an Inverted SEM. Chapter 5 in "Liquid Cell Electron Microscopy", edited by Frances Ross, University Press, pp106-126, 2016
 32. Takeharu Shiroki, Misa Yokoyama, Nobuhiro Tanuma, Ryuhei Maejima, Keiichi Tamai, Kazunori Yamaguchi, Tomoyuki Oikawa, Tetsuya Noguchi, Koh Miura, Tsuneaki Fujiya, Hiroshi Shima, Ikuro Sato, Naoko Murata-Kamiya, Masanori Hatakeyama, Katsunori Iijima, Toru Shimosegawa and Kennichi Satoh, "The enhanced expression of PKM2 is involved in the gastric cancer development via regulating cancer specific metabolism", Cancer Science, 108, 931-940, 2017
 33. T.Kinoshita, C.Sato, TJ.Fuwa, S.Nishihara. Short stop mediates axonal compartmentalization of mucin-type core 1 glycans. Scientific Reports, 7: 41455, 1-14, 2017
 34. Takeru Hayashi, Miki Senda, Nobuhiro Suzuki, Hiroko Nishikawa, Chi Ben, Chao Tang, Lisa Nagase, Kaori Inoue, Toshiya Senda, Masanori Hatakeyama, "Differential mechanisms for SHP2 binding and activation are exploited by geographically distinct *Helicobacter pylori* CagA oncoproteins", Cell Reports, 20(12), 2876-2890, 2017.
 35. Miki Senda, Toshiya Senda, "Anaerobic crystallization of proteins." Biophysical Reviews, <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0345-8>
 36. Chao Tang, Atsushi Takahashi-Kanemitsu, Ippei Kikuchi, Chi Ben, Masanori Hatakeyama, "Transcriptional co-activator functions of YAP and TAZ are inversely regulated by tyrosine phosphorylation status of Parafibromin. iScience, 1, 1-15, 2018
 37. C.Sato, M.Sato, S.Ogawa. Imaging of immunogold labeling in cells and tissues by helium ion microscopy. Int J Mol Med, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3604>
 38. K Mio, C.Sato. Lipid environment of membrane proteins in cryo-EM based structural analysis. Biophysical Reviews, <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0371-6>

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Yukie Yamahashi and Masanori Hatakeyama, "PAR1b takes the stage in the morphogenetic and motogenetic activity of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein" Cell Adh Migr, vol. 7, No. 1, 11-18, 2013 (DOI: 10.4161/cam.21936)
2. Takeru Hayashi, Hiroko Morohashi and Masanori Hatakeyama, "Bacterial EPIYA effectors – Where do they come from? What are they? Where are they going?", Cellular Microbiology, Vol. 15, No. 3, pp.377-385, 2013 (DOI: 10.1111/cmi.12040)
3. 畠山昌則、「ヘリコバクター・ピロリ癌タンパク質 CagA—その分子構造と機能—」、日本臨床、Vol. 72、増刊号1、pp.92-99, 2013
4. 畠山昌則、「ヘリコバクター・ピロリ菌およびその胃炎や胃潰瘍における役割の発見」、Surgery Frontier、Vol. 20、pp.15-18、2013
5. 畠山昌則、「*H. pylori* による腸上皮化生の誘導機構と発癌」、消化器の臨床、Vol.

- 16、 pp.351-356、2013
6. 藤井裕美子、畠山昌則、「胃がん発症の基盤となる限定的細胞リプログラミング」、実験医学、Vol. 31、 pp.2095-2100、2013
7. 林剛瑠、「発がんタンパク質 CagA の病原活性増強メカニズム」、Helicobacter Research、Vol. 17、No.5、pp.39-45、2013
8. 西山英利、寺本華奈江、須賀三雄、佐藤主税, “正帯電金ナノ粒子標識法による鞭毛・線毛・細胞突起の大気圧走査電子顕微鏡観察”, 顕微鏡, vol. 48, pp. 190-194, 2013
9. 海老原達彦、村井稔幸、西山英利、佐藤真理、須賀三雄、佐藤主税, “大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)による水中免疫電顕法:タンパク質複合体のダイナミックな離合集散と細胞内移動”, 顕微鏡, vol. 48, pp. 107-112, 2013
10. 須賀三雄、西山英利、寺本華奈江、渡部善幸、佐藤主税, “簡単・迅速前処理の大気圧走査電子顕微鏡 JASM-6200 Atmospheric Scanning Electron Microscope JASM-6200 with easy and rapid sample preparation”, 生物試料分析, vol. 36, pp. 235-244, 2013
11. 佐藤主税、西山英利、須賀三雄、佐藤真理、海老原達彦, “大気圧電子顕微鏡(ASEM)による抗体を選ばない水中免疫電顕法 CRAC チャネルの引き金となる、ER 内 Ca^{2+} 枯渇による STIM1 凝集の可視化”, 日薬理誌, vol. 141, pp. 245-250, 2013
12. 佐藤主税, “単粒子構造解析法と水中観察電顕 ASEM による膜タンパク質複合体の研究”, ファルマシア(日本薬学会和文誌), vol.50, pp.423-427, 2014
13. 佐藤主税, “水の中の世界を電子顕微鏡で観る”, 顕微鏡, vol.49, No. 1, pp.2-2, 2014
14. 西山英利、小泉充、小川康司、北村真一、小入羽祐治、須賀三雄、佐藤主税. “大気に開放された試料室を持つ大気圧走査電子顕微鏡の開発”, 顕微鏡, vol.49, No. 1, pp.3 -6, 2014
15. 佐藤主税、渡邊要平、丸山雄介、佐藤真理、山本雅之、辻典子、本橋ほづみ, “巨核球による血小板産生と樹状細胞による細菌貪食の液中電顕観察”, 顕微鏡, vol.49, No. 1, pp.14-17, 2014
16. 三尾和弘、丸山雄介、小椋俊彦、佐藤主税, “TRP チャネルとOrai-STIM 複合体系の構造と局在の解析”, 実験医学, vol. 32, pp. 540-548, 2014
17. 海老原達彦、西山英利、佐藤真理、千田俊哉、須賀三雄、佐藤主税, “大気圧電子顕微鏡(ASEM)による抗体を選ばない水中免疫電顕法:細胞・タンパク質ミクロ結晶の液中観察”, 生化学, vol. 86, pp. 103-110, 2014
18. Masanori Hatakeyama, “*Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis”, Cell Host Microbe 15, 306-316, 2014 (doi: 10.1016/j.chom.2014.02.008)
19. 千田美紀、林剛瑠、畠山昌則、千田俊哉, 胃がんを引き起こすピロリ菌の発がんタンパク質 CagA の X 線結晶構造解析、PF ニュース, Vol 31, 17-20, 2013
20. 千田俊哉、千田美紀、林剛瑠、畠山昌則、ピロリ菌の発がんタンパク質 CagA の構造と機能、実験医学(増刊)構造生命科学で何がわかるのか、何ができるのか、Vol. 32(10), 1651-1655、2014
21. 小椋俊彦、西山英利、須賀三雄、佐藤主税. 大気圧電子顕微鏡 ASEM による水中観察法の開発 ―半導体の超薄膜技術とバイオ顕微鏡の融合研究―. Synthesiology, 8, 116-126, 2015
22. 清水健、藤永由佳子、高屋明子、芦田浩、児玉年央、畠山昌則, “細菌エフェクター・細菌毒素の分子標的と疾病脆弱性”, 日本細菌学雑誌, vol. 70、No. 2、pp.319-328、2015
23. Yoshie Senda and Masanori Hatakeyama, "CagA", pp33-47. In “*Helicobacter pylori*”. ed. Hidekazu Suzuki, Robin Warren and Barry Marshall, Springer, 2016

24. Miki Senda and Toshiya Senda, "Screening of cryoprotectants and the multistep soaking method", *Advanced Method in Structural Biology*, Springer, pp139-152, 2016
25. Masanori Hatakeyama, "A sour relationship between BabA and Lewis b", *Cell Host & Microbe*, vol. 21, No. 3, 2017
26. Masanori Hatakeyama, "Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial oncoprotein involved in human cancer", *Proceedings of the Japan Academy. Series B*, vol. 93, No.4, 2017
27. Hiroko Nishikawa and Masanori Hatakeyama, "Sequence polymorphism and intrinsic structural disorder as related to in pathobiological performance of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein", *Toxins*, vol. 9, No.4, 2017
28. Toshiya Senda and Miki Senda, An introduction to the crystallographic study of enzymes for organic chemists, with a sample analysis of extradiol ring-cleavage dioxygenases, Elsevier, <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63743-7.00020-2>.

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 62 件、国際会議 46 件)

1. Toshiya Senda (AIST), Tertiary structure and functional analysis of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein. The 3rd international symposium on drug discovery and design by NMR, Yokohama, Japan, October 11-12, 2012
2. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), *Helicobacter pylori* CagA acts as an oncogenic scaffold/hub in mammalian cells, 2nd Japanese-French Cancer Workshop, Naruto, Japan, November 30, 2012
3. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), *Helicobacter pylori*, a bacterial protein acting as an oncogenic scaffold/hub in mammalian cells, 3rd International Symposium on Carcinogenic Spiral, Kanazawa, Japan, January 24, 2013
4. 畠山昌則(東京大学)、ピロリ菌がんタンパク質 CagA の3次元構造と機能、文科省「がん支援」シンポジウム、東京、2013 年 1 月 29 日
5. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Mechanisms determining subcellular localization of SHP2 tyrosine phosphatase, 10th International Conference on Protein Phosphatase/Special Lecture, Tokyo, Japan, February 8, 2013
6. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), *Helicobacter pylori* CagA, a bacterial oncoprotein that directs gastric carcinogenesis, 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research, Kagoshima, Japan, February 15, 2013
7. 千田俊哉(高エネ機構)、タンパク質複合体の結晶構造から解き明かす細胞機能、物講研サイエンスフェスタ、つくば、2013 年 3 月 14 日
8. 千田俊哉(高エネ機構)、ピロリ菌発がんタンパク質 CagA の構造と機能、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月 28 日
9. 畠山昌則(東京大学)、ピロリ菌がんタンパク質 CagA による胃がん発症機構、第 155 回日本獣医学会学術総会／特別講演、東京、2013 年 3 月 29 日
10. 畠山昌則(東京大学)、「発がん性足場タンパク質としてのピロリ菌 CagA の機能と構造」、第 50 回日本臨床医学会学術集会シンポジウム、東京国際フォーラム(東京)、2013 年 4 月 12 日
11. 畠山昌則(東京大学)、「ピロリ菌癌タンパク質 CagA の構造と機能」、第 44 回広島消化管研究会特別講演、ホテルグランヴィア広島(広島)、2013 年 5 月 14 日
12. 林剛瑠(東京大学)、「ピロリ菌がんタンパク質 CagA の高次構造に依存した機能制御機構」、東京大学大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 若手講演会、東京大学(東京)、2013 年 5 月 25 日
13. 畠山昌則(東京大学)、「Structure and function of the *H. pylori* CagA oncoprotein」、40th Institute of Medical Science, The University of Tokyo (IMSUT) Commemorative Symposium、東京大学医科学研究所(東京)、2013 年 5 月 31 日
14. 千田俊哉(高エネ機構)、「PF の現状とピロリ菌発がん蛋白質 CagA の結晶構造解析」、第13回日本蛋白質科学会年会(鳥取)、2013 年 6 月 14 日

15. 千田俊哉(高エネ機構)、「ピロリ菌がんタンパク質 CagA の結晶構造解析と昨日解析」、2013 年度第1回日本農芸化学会関東支部例会、東京農大(東京)、2013 年7月6日
16. 畠山昌則(東京大学)、「ヘリコバクター・ピロリによる胃癌発症機構」、第49回姫路市医師会夏期大会、姫路市医師会館(姫路)、2013 年7月21日
17. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “*Helicobacter pylori* and gastric cancer: recent development”, 6th Annual Scientific Meeting of Singapore Gastric Cancer Consortium Scientific Program, Singapore (Singapore), July 25, 2013
18. Toshiya Senda (KEK), Crystal quality improvement with cryoprotectants、International Conference on Structural Genomics 2013 –Structural Life Science、Sapporo (Japan), July 30, 2013
19. 畠山昌則(東京大学)、「ヘリコバクター・ピロリ CagA を介する胃がん発症機構」、平成25年度文科省がん支援「がん若手研究者ワークショップ」特別講演、蓼科グランドホテル(蓼科)、2013 年9月5日
20. 佐藤主税(産総研)、水中が見れる大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)の臨床診断化にむけて、第757回千葉県がんセンター研究所セミナー、千葉、2013 年09月11日
21. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “*Helicobacter pylori* CagA directs gastric intestinal metaplasia by inducing stemness-related reprogramming factors”, European *Helicobacter* study group 26th International Workshop (EHSg 2013) Symposium, Madrid (Spain), September 13, 2013
22. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Oncogenic mechanism of *Helicobacter pylori*”, Seminar Series at Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid (Spain), September 16, 2013
23. 畠山昌則(東京大学)、「Function and regulation of SHP2 phosphatase, a cellular target of *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA」、第72回日本癌学会学術総会シンポジウム、パシフィコ横浜(横浜)、2013 年10月4日
24. 畠山昌則(東京大学)、「F *Helicobacter pylori* and gastric cancer」、第72回日本癌学会学術総会モーニングレクチャー、パシフィコ横浜(横浜)、2013 年10月5日
25. 千田美紀(高エネ機構)、千田俊哉(高エネ機構)、無酸素条件下での結晶化、平成25年度日本結晶学会年会、熊本大学黒髪南地区(熊本)、2013 年10月13日
26. 畠山昌則(東京大学)、「ヘリコバクター・ピロリ菌による胃がん発症機構」第61回日本ウイルス学会学術集会・特別講演、神戸国際会議場(神戸)、2013 年11月10日
27. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Role of *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis”, UTokyo Forum in Brazil 2013, Sao Paulo (Brazil), November 11, 2013
28. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Mechanisms determining subcellular localization of the oncogenic protein tyrosine phosphatase SHP2”, The 3rd French-Japanese Cancer Workshop, Toulouse (France), November 22, 2013
29. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Function and regulation of SHP2 tyrosine phosphatase”, The 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatases, National Health Research Institute Zhunan (Taiwan), November 29, 2013
30. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Role of *Helicobacter pylori* CagA in Gastric Carcinogenesis”, The 4th JCA-AACR Special Joint Conference-The Latest Advances in Gastric Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics, Urayasu (Japan), December 16, 2013
31. 畠山昌則(東京大学)、「ピロリ菌がんタンパク質 CagA の構造と機能」、宮城県立がんセンターセミナー、宮城県立がんセンター(名取)、2014 年1月10日
32. 畠山昌則(東京大学)、「ヘリコバクター・ピロリと胃がん」、京都大学霊長類研究所セミナー、京都大学霊長類研究所(犬山)、2014 年1月31日
33. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Role of *Helicobacter pylori* CagA in Gastric Carcinogenesis”, The 4th International Symposium on Carcinogenic Spiral, Sapporo

- (Japan), February 11, 2014
34. 畠山昌則(東京大学)、「胃発がんにおけるピロリ菌がんタンパク質 CagA の役割」、愛媛大学プロテオサイエンスセンター 第一回学術シンポジウム、愛媛大学南加ホール(松山)、2014 年 3 月 1 日
 35. 畠山昌則(東京大学)、「ピロリ菌エフェクターによる細胞がん化機構」、第87回日本細菌学会総会 シンポジウム、タワーホール船堀(東京)、2014 年 3 月 26 日
 36. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Role of *Helicobacter pylori* CagA in inflammation and carcinogenesis, AACR Annual Meeting 2014 AACR-JCA Joint Symposium: Inflammation in Gastric Cancer, San Diego, USA, April 8, 2014
 37. 畠山昌則(東京大学)、ピロリ菌による胃がん発症の分子機構、第 24 回 感染研シンポジウム、国立感染症研究所、2014 年 5 月 21 日
 38. 佐藤主税(産総研)、水や氷中の細胞・複合体をそのまま観ることができる電子顕微鏡. 第4回理研 GSC セタミーティング. 横浜市 2014 年 7 月 11 日
 39. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Enhanced carcinogenesis by mutual reinforcement between *Helicobacter pylori* CagA and inflammation, Singapore Gastric Cancer Consortium 7th Annual Scientific Meeting, Singapore, July 24, 2014
 40. 畠山昌則(東京大学)、ピロリ菌感染と炎症・発癌、第 38 回 阿蘇シンポジウム、阿蘇リゾートグランドヴィリオホテル、2014 年 7 月 26 日
 41. 畠山昌則(東京大学)、ピロリ菌による上皮極性破壊と胃発がん、千里ライフサイエンスセミナー〜上皮極性シグナル制御とその異常による病態〜、大阪、2014 年 7 月 28 日
 42. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), *H. pylori* and gastric mucosa re-programming, European Helicobacter Study Group XXVIIth International Workshop on Helicobacter & Microbiota in Inflammation & Cancer, Rome, Italy, September 12, 2014
 43. 佐藤主税(産総研)、大気圧 SEM (Atmospheric SEM: ASEM). SCAN TECH 2014、東京都市大学、2014 年 9 月 12 日
 44. Toshiya Senda (KEK)、Structure and function of an oncoprotein CagA from *Helicobacter pylori*, 8th Asia-Oceania Forum for Synchrotron Radiation Research, NSRRC, Hsinchu, Taiwan, September 16, 2014
 45. 畠山昌則(東京大学)、ピロリ菌がんタンパク質 CagA と炎症による発がんスパイラルの形成、第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2014 年 9 月 25 日
 46. 林剛瑠(東京大学)、長瀬里沙(東京大学)、千田美紀(高エネ機構)、千田俊哉(高エネ機構)、畠山昌則(東京大学)、ピロリ菌 CagA による宿主分子攪乱機構の構造と機能、第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 26 日
 47. Chikara Sato (AIST), Atmospheric scanning electron microscopy (ASEM) of axonal segmentation in neurons and phagocytosis of dendritic cells. 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine, Athens-Greece, October 11, 2014
 48. 千田俊哉(高エネ機構)、鈴木喜大(高エネ機構)、千田美紀(高エネ機構)、林剛瑠(東京大学)、長瀬里沙(東京大学)、畠山昌則(東京大学)、ピロリ菌由来のがんタンパク質 CagA の構造-機能相関研究、第 87 回、日本生化学会大会、国立京都国際会館、2014 年 10 月 16 日
 49. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Instigation of carcinogenesis by mutual reinforcement of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein and inflammation, The 5th Asian Pacific Topic Conference, Kobe. October 22, 2014
 50. Chikara Sato (AIST), Electron microscopy of proteins and cells in water and ice. 12th International Conference on X-Ray Microscopy 2014, Melbourne Convention

and Exhibition Centre, October 30, 2014

51. 千田俊哉 (高エネ機構)、エピジェネティクおよび疾病関連タンパク質の構造生物学研究、平成 26 年度日本結晶学会年会、東京大学農学部、2014 年 11 月 1 日
52. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), *Helicobacter pylori* CagA as a bacterial oncoprotein、Children's Hospital Los Angeles Wednesday Research Seminar、Los Angeles, USA、November 5, 2014
53. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Opposing roles for SHP1 and SHP2 phosphatases in the oncogenic action of *Helicobacter pylori* CagA protein、The 11th International Conference on Protein Phosphatase、Sendai、November 13, 2014
54. 畠山昌則 (東京大学)、胃癌発症におけるピロリ菌がんタンパク質 CagA の役割、第 5 回 癌と炎症と抗酸化研究会、大分 別府コンベンションセンター、2014 年 11 月 15 日
55. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Protein tyrosine phosphatase SHP1 negatively regulates the oncogenic action of the *Helicobacter pylori* CagA protein、The 4th Japan-French Cancer Workshop、Kyoto、November 20, 2014
56. 畠山昌則 (東京大学)、ピロリ菌感染による胃上皮細胞リプログラミングと発がん、第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014 年 11 月 25 日
57. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Role of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein in gastric carcinogenesis、VI Simposio Internacional *Helicobacter pylori*: Historia natural e implicaciones en la salud humana、San Jose, Costa Rica、December 5, 2014
58. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Infection, Inflammation and Cancer: the eternal triangle?、The 1st Symposium of Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammolgy、Berlin、Germany、December 16, 2014
59. Toshiya Senda (KEK), Structure and function of the CagA oncoprotein from *Helicobacter pylori*、The 2nd T-LSI symposium –Frontiers of Drug Discovery by Protein Structure Analysis–、AIST (Tsukuba)、January 21, 2015
60. Chikara Sato (AIST) Observation of Cells and Tissues immersed in aqueous solution using Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM). IGER International Symposium on Frontiers in Biological Research with Advanced Electron Microscope Technologies、Nagoya Univ. January 15, 2015
61. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Structural basis for the interaction of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein with cellular targets、The 5th International Symposium on Carcinogenic Spiral、Kobe、February 27, 2015
62. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Linking inflammation and carcinogenesis by *Helicobacter pylori* CagA、Seoul National University Cancer Research Institute Cancer Symposium 2015、Hwasun Kumho Resort、Jeollanam-do、Korea、April 3, 2015
63. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), *Helicobacter pylori* and gastric cancer、Academia Sinica Conference of Frontiers in Biological Chemistry、National Cheng Kung University、Tainan、Taiwan、April 18, 2015
64. 畠山昌則 (東京大学)、ピロリ菌がんタンパク質 CagA の機能とその制御、第 21 回日本ヘリコバクター学会学術集会、神戸、2015 年 6 月 26 日
65. 畠山昌則、胃マイクロバイオータと胃がん、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月 9 日
66. 千田美紀 (高エネ機構)、中性子結晶構造解析に向けたタンパク質結晶成長技術、平成 27 年度第 1 回生物構造学研究会、東京、2015 年 11 月 17 日
67. 畠山昌則 (東京大学)、「感染が引き起こすヒトのがん」、日本癌学会・高校生のため

のがんセミナー、2016 年 2 月 27 日

68. 畠山昌則(東京大学)、「ピロリ菌がんタンパク質 CagA～「胃がん」から「全身病へ」～」、島根大学医学部セミナー、島根大学医学部、出雲(島根)、2016 年 7 月 5 日
69. 畠山昌則(東京大学)、「[特別講演]ピロリ菌がんタンパク質 CagA による胃発がん機構」、第 27 回三河感染・免疫研究会、ホテルアソシア豊橋、豊橋(愛知)、2016 年 7 月 16 日
70. Toshiya Senda (KEK), [Invited Talk] Structure and function of the C-terminal ID resion of onco-protein CagA, Stuctural Biology 2016, Hilton New Orleans Airport Hotel, USA, August 23, 2016
71. Miki Senda (KEK), [Invited Talk] A comprehensive strategy to obtain high quality crystals., Stuctural Biology 2016, Hilton New Orleans Airport Hotel, USA, August 23, 2016
72. 佐藤主税(産総研)、電子顕微鏡による親水環境での組織・細胞・分子の構造観察. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 札幌市、2016 年 8 月 25 日
73. *Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Collaboration between *Helicobacter pylori* CagA and EBV in gastric carcinogenesis”, XXIXth International Workshop on the European Helicobacter & Microbiota in Inflammation and Cancer, Magdeburg, Germany, September 16, 2016
74. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “SHP1 links *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus in gastric carcinogenesis”, The 15th Awaji International Forum of Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan, September 8, 2016
75. 畠山昌則(東京大学)、「[シンポジウム]SHP1 ホスファターゼを介したピロリ菌の発がん抑制活性と EB ウイルスによるその解除」、第 89 回日本生化学会大会、仙台国際センター、仙台(宮城)、2016 年 9 月 25 日
76. Chikara Sato (AIST), MEMTILY Nassirhadjy(Xinjiang Med Univ), Tatsuhiko Ebihara(AIST), Tomoko Okada(AIST), Mari Sato(AIST), Toshiko Yamazawa(Jikei Medical school), Observation of tissues in solution using atmospheric SEM: Applicability for quick intraoperative cancer diagnosis. 21th World Congress on Advances in Oncology and 19th International Symposium on Molecular Medicine, Athens-Greece, October 6, 2016
77. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “[Symposium] Inactivation of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein – A potential strategy for prevention of gastric cancer –”, The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Pacifico Yokohama, Yokohama, Japan, October 7, 2016
78. 畠山昌則(東京大学)、「細菌感染と発がん」、2016 年東京大学医科学研究所セミナーシリーズ、東京大学医科学研究所、2016 年 10 月 17 日
79. 畠山昌則(東京大学)、「ピロリ菌による胃発がん機構とその予防的介入」、翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成 第 7 回公開シンポジウム、横浜情報文化センター・情文ホール、2016 年 10 月 26 日
80. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Parafibromin, asubstrate of SHP2, is a transcriptional platform that integrates morphogen signalin pathways”, 12th International Conference on Protein Phosphatase, Kindai University, Osaka, Japan, October 27, 2016
81. 畠山昌則(東京大学)、「[特別講演]ピロリ菌感染を基盤とする胃癌発症機構」、日本消化器病学会関東支部回第 342 回例会、海運ビル(東京)、2016 年 12 月 3 日
82. 畠山昌則(東京大学)、「Wnt, Hedgehog, Notch シグナルを細胞内で統合制御する機構」、北海道大学遺伝子病制御研究所セミナー、北海道大学遺伝子病制御研究所・講堂(札幌)、2017 年 1 月 20 日
83. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Collaboration between *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein in gastric carcinogenesis”, 19th International Conference on Emerging

Infectious Diseases in the Pacific Rim, Novotel Ambassador Hotel Seoul Gangnam, Seoul, republic of Korea, February 8, 2017

84. 畠山昌則(東京大学)、「[Lecture Series1] Role of the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein in gastric carcinogenesis」、第 89 回日本胃癌学会総会、広島国際会議場(広島)、2017 年 3 月 9 日
85. 畠山昌則(東京大学)、「ピロリ菌と胃がんをつなぐ分子機構」、岡崎外科医学会学術講演会、岡崎(愛知)、2017 年 4 月 19 日
86. 佐藤 主税(産総研)、TEM と SEM による組織・細胞・タンパク質の親水環境での観察. 第 37 回日本骨形態計測学会、大阪市、2017 年 6 月 23 日
87. 佐藤主税(産総研)、大気圧電子顕微鏡技術. 粉体工学会、つくば市、2017 年 7 月 19 日
88. *Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), "Oncogenic collaboration between *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus in gastric carcinogenesis", Singapore Gastric Cancer Consortium 9th Annual Scientific Meeting, NUHS Auditorium, Singapore, July 21, 2017
89. 佐藤 主税(産総研)、親水環境での生物試料の電子顕微鏡観察:クライオ電顕と大気圧走査電顕. 第 6 回 蛍光イメージングミニシンポジウム、札幌、2017 年 7 月 27 日
90. 佐藤 主税(産総研)、親水環境での電子顕微鏡学:クライオ電顕と大気圧走査電顕. 北海道医療大学 薬学・薬理学合同セミナー、2017 年 7 月 28 日
91. 千田美紀(高エネ機構)、良質な結晶を得るための手法, 平成 29 年度 iBIX-JAXA 合同タンパク質研究会、東京、2017 年 8 月 4 日
92. 佐藤 主税(産総研)、環境型ハイブリッド SEM の基礎と応用、第 28 回電顕サマースクール 2017、東京慈恵会医科大学(東京)、2017 年 8 月 5 日
93. 畠山昌則(東京大学)、「[特別講演]ピロリ菌の発がん活性を規定する分子機構」、第 16 回神戸がん研究会、神戸大学医学部・新緑会館、神戸(兵庫)、2017 年 9 月 1 日
94. *Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), "Deciphering molecular structure underlying CagA-mediated oncogenic SHP2 deregulation", XXXth International Workshop on *Helicobacter* & Microbiota in Inflammation & Cancer, Palais des Congrès de Bordeaux, Bordeaux, France, September 8, 2017
95. 西川裕子(東京大学)、「CagA がんタンパク質の構造多型が極性制御因子 PAR1b 結合に及ぼす影響」、第 55 回日本生物物理学会年会、熊本大学黒髪北地区、熊本、2017 年 9 月 19 日
96. 畠山昌則(東京大学)、福島民報健康フォーラム「ピロリ菌が胃がんを引き起こす仕組み」、郡山ビューホテル、郡山(福島)、2017 年 9 月 23 日
97. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), "Molecular polymorphisms determining oncogenic performance of *Helicobacter pylori* CagA", Symposium "Dysbiosis that predisposes to cancer" at the 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Pacific Yokohama, Yokohama, September 28, 2017.
98. 佐藤 主税(産総研)、Cryo-TEM と大気圧走査電顕(ASEM)による親水環境での観察:タンパク質・細胞・組織を中心として、第 67 回 UV/EB 研究会、住友クラブ(大阪)、2017 年 11 月 10 日
99. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), "[Keynote Lecture] Geographically distinct *H. pylori* CagA oncoproteins exploit different mechanisms for SHP2 binding and activation", 3rd Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatase. Sakura Hall, Katahira Campus, Tohoku University, Sendai, November 19, 2017.
100. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), "Role of geographical polymorphism in determining oncogenic performance of *Helicobacter pylori*. The 4th Symposium of Max Planck-University of Tokyo Center for Integrative Inflammolgy", Ito

International Research Center, The University of Tokyo, Tokyo, November 21, 2017.

101. 畠山昌則 (東京大学)、日本消化器病学会中国支部・第26回教育講演「ピロリ菌が産生する発がんタンパク質 CagA-構造と機能ならびにその制御」、ANA クラウンプラザホテル宇部、山口、2017年11月26日
102. Masanori Hatakeyama (U. Tokyo) *Helicobacter pylori* in gastric cancer. Seoul International Gastric Cancer Forum 2017. Lee Kun Hee Auditorium, Cancer Research Institute, Seoul National University Hospital, December 2, 2017.
103. 千田俊哉 (高エネ機構)、生命科学における放射光利用の将来像、第31回日本放射光学会年会、つくば国際会議場、茨城、2018年1月9日
104. 佐藤 主税 (産総研)、電子顕微鏡による親水環境での観察:Cryo-TEM と ASEM、第13回先端表面技術展・会議、東京ビックサイト(東京)、2018年2月14日
105. 畠山昌則 (東京大学)、徳島大学先端酵素研究所・免疫制御学セミナー「ピロリ菌発がんタンパク質 CagA- 構造・機能ならびにその制御」、徳島大学先端酵素学研究所・交流ホール、徳島、2018年3月2日
106. 畠山昌則 (東京大学)、NPO 法人ゲノム徳島 第14回公開講演会「ピロリ菌と胃がん」、徳島大学藤井記念医科学センター、徳島、2018年3月3日
107. 佐藤 主税 (産総研)、親水環境での電子顕微鏡観察:クライオ透過電顕と大気圧走査電顕、第123回日本解剖学会総会・全国学術集会、日本医科大学武蔵境校舎・日本獣医生命科学大学第一校舎(東京)、2018年3月28日
108. 畠山昌則 (東京大学)、平成29年度第2回生物構造学研究会「ピロリ菌がんタンパク質 CagA の構造・機能とその制御」、研究社英語センター、東京、2018年3月29日

② 口頭発表 (国内会議 32 件、国際会議 19 件)

1. 千田美紀 (高エネ機構)、林剛瑠 (東京大学)、畠山昌則 (東京大学)、千田俊哉 (高エネ機構)、胃がんを引き起こすピロリ菌発がんタンパク質 CagA の X 線結晶構造解析、第85回日本生化学会、福岡、2012年12月15日
2. 海老原 達彦 (産総研)、西山 英利 (日本電子)、須賀 三雄 (日本電子)、佐藤 主税 (産総研)、大気圧電子顕微鏡 ASEM による水中の試料の観察法:迅速免疫電顕法、日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会、ホテル阪急エキスポパーク(大阪)、2013年5月20日
3. 佐藤主税 (産総研)、西山英利 (日本電子)、海老原達彦 (産総研)、須賀三雄 (日本電子)、大気圧走査電子顕微鏡、日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会、ホテル阪急エキスポパーク(大阪)、2013年05月21日
4. Tatsuhiko Ebihara(AIST), Hidetoshi Nishiyama(JEOL), Mituo Suga(JEOL) and Chikara Sato(AIST), "The atmospheric scanning electron microscope (ASEM) observes cells and tissues in open solution: Wet Immuno-EM". The 86th Annual Meeting of the Japanese Tissue Culture Association, Tsukuba (Japan), May 30, 2013
5. T. Ebihara(AIST), H. Nishiyama(JEOL), M. Suga(JEOL), C. Sato(AIST), The atmospheric scanning electron microscope (ASEM) observes cells and tissues in open solution: Wet Immuno-EM. 日本組織培養学会 第 86 回大会, つくば, 2013 年 5 月 30 日
6. Memtily Nassirhadjy (産総研)、三尾和弘 (産総研)、小椋俊彦 (産総研)、清中茂樹 (京都大学)、森泰夫 (京都大学)、佐藤主税 (産総研)、透過型電子顕微鏡を用いた三次元再構成法によって明らかにされた TRPC5 イオンチャネルの構造、岡崎、2013年6月13日
7. 海老原 達彦 (産総研)、西山 英利 (日本電子)、佐藤 真理 (産総研)、須賀 三雄 (日本電子)、佐藤 主税 (産総研)、水中を観察できる新型電子顕微鏡 ASEM を用いたマウスの研究:神経細胞初代培養やイオンチャネルを中心として. 第 27 回モロシヌス研究会, つくば, 2013 年 6 月 29 日

8. Chikara Sato (AIST), Masaaki Kawata (AIST), Hidetoshi Nishiyama (JEOL), Mitsuo Suga (JEOL), Mari Sato (AIST), Toshiya Senda (KEK), Tatsuhiko Ebihara (AIST) and Kazuhiro Mio (AIST), “3D transmission electron microscopy of membrane proteins and direct observation of cells, tissues and crystals in solution using ASEM”. ICSG2013-SLS, Sapporo (Japan), July 30, 2013
9. C. Sato (AIST), H. Nishiyama (JEOL), Y. Maruyama (AIST), T. Ebihara (AIST), M. Suga (JEOL), M. Yamamoto (Tohoku Univ.), H. Motohashi (Tohoku Univ.), The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) Observes the Critical Moment of Platelet Generation from Megakaryocytes in Solution. M&M2013, Indianapolis, August 8, 2013.
10. 野田沙織(東京大学)、高橋昌史(東京大学)、林剛瑠(東京大学)、堤良平(東京大学)、畠山昌則(東京大学)、「LEOPARD 症候群由来変異型 SHP2 ホスファターゼの *in vitro* 酵素活性解析」、第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(横浜)、2013 年 10 月 3-5 日
11. 長瀬里沙(東京大学)、林剛瑠(東京大学)、畠山昌則(東京大学)、ヘリコバクター・ピロリがんタンパク質 CagA の分子多型と生物活性、第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、2013 年 10 月 3-5 日
12. 橋香奈(東京大学)、紙谷尚子(東京大学)、畠山昌則(東京大学)、「*Helicobacter pylori* アメリンド株由来 CagA の病態生理学的活性」、第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(横浜)、2013 年 10 月 3-5 日
13. 藤井裕美子(東京大学)、鈴木秀和(慶應大学)、油谷浩幸(東京大学)、畠山昌則(東京大学)、「転写因子 CDX1 による幹細胞性リプログラミング因子の発現誘導を介した胃上皮細胞の腸上皮細胞様分化形質転換」、第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(横浜)、2013 年 10 月 3-5 日
14. 吉山裕規(北海道大学)、地主将久(北海道大学)、林泰弘(北海道大学)、高田賢蔵(北海道大学)、畠山昌則(東京大学)、田中伸哉(北海道大学)、深山正久(東京大学)、「EB ウィルスによる上皮腫瘍化における癌幹細胞の存在について」、第 72 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(横浜)、2013 年 10 月 3-5 日
15. 海老原 達彦(産総研)、川田 正晃(産総研)、西山英利(日本電子)、千田美紀(高エネ機構)、佐藤 真理(産総研)、須賀三雄(日本電子)、千田俊哉(高エネ機構)、佐藤 主税(産総研)、大気圧電子顕微鏡(ASEM)によるタンパク質微結晶と細胞内複合体の液中観察. 第 51 回日本生物物理学会年会, 京都、2013 年 10 月 30 日
16. Takeru Hayashi (U. Tokyo), Lisa Nagase (U. Tokyo), Miki Senda (KEK), Toshiya Senda (KEK), Masnaori Hatakeyama (KEK), Biochemical and biophysical analysis for the oncogenic interaction between *H. pylori* CagA and SHP2, 3rd GDRI French-Japan Cancer Meeting, Toulouse (France), November 20-23, 2013
17. 杉本真也(慈恵医大)、奥田賢一(慈恵医大)、東山堅一(サントリー)、並木健(サントリー)、佐藤 真理(産総研)、西山英利(日本電子)、須賀三雄(日本電子)、松本俊介(九州大学)、園元謙二(九州大学)、水之江義充(慈恵医大)、佐藤 主税(産総研)、大気圧走査電子顕微鏡による水中での細胞の観察: 乳酸菌と細胞外構造. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸、2013 年 12 月 5 日
18. 植村健(信州大学)、佐藤 真理(産総研)、西山英利(日本電子)、須賀三雄(日本電子)、佐藤 主税(産総研)、受容体でコートした磁気ビーズによる初代培養シナプス形成誘導の ASEM 水中免疫電顕. 日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会、千葉市、2014 年 5 月 11 日
19. 三尾和弘(産総研)、マミテリ ナシルハン(産総研)、小椋俊彦(産総研)、丸山雄介(産総研)、守屋俊夫(産総研)、清中茂樹(京都大学)、森泰生(京都大学)、佐藤主税(産総研)、透過型電子顕微鏡を用いた TRP イオンチャネルの立体構造解析. 第 10 回 TRP 研究会、岡崎、2014 年 6 月 6 日

20. 海老原 達彦(産総研)、Memtily Nassirhadiy(産総研)、西山英利(日本電子)、佐藤 真理(産総研)、須賀三雄(日本電子)、佐藤 主税(産総研)、大気圧走査電子顕微鏡(ASEM) による培養神経細胞の観察. 第 28 回モロシマス研究会. 伊豆修善寺、2014 月 6 月 28 日
21. N. Memtily (AIST), K. Mio (AIST), M. Sato (AIST), T. Ebihara (AIST), C. Sato (AIST), Observation of Tissues in Solution by Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM). M&M2014, Hartford, August 5, 2014.
22. C. Sato (AIST), M. Sato (AIST), T. Kinoshita (Soka Univ.), K. Hiarno (Soka Univ.), S. Nishihara (Soka Univ.), T. Uemura (Shinsyu Univ.), H. Nishiyama (JEOL), M. Suga (JEOL), The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) Observes Axonal Segmentation and Synaptic Induction in Solution. M&M2014, Hartford, August 5, 2014.
23. T. Kinoshita (Soka Univ.), H. Motohashi (Tohoku Univ.), K. Hirano (Soka Univ.), Y. Maruyama (AIST), M. Kawata (AIST), T. Ebihara (AIST), M. Sato (AIST), H. Nishiyama (JEOL), M. Suga (JEOL), M. Yamamoto (Tohoku Univ.), S Nishihara (Soka Univ.) and C. Sato (AIST), The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) Observes Axonal Segmentation and Platelet Generation in Solution. IMC2014, Prague, September 10, 2014.
24. 佐藤主税(産総研)、大気圧 SEM (Atmospheric SEM: ASEM). SCAN TECH 2014, 東京都市大学(世田谷) , 2014 年 9 月 12 日
25. 林剛瑠(東京大学)、畠山昌則(東京大学)、ピロリ菌がんタンパク質 CagA と標的分子 Csk との相互作用における生物物理化学的解析、第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、2014 年 9 月 25-27 日
26. 佐藤主税(産総研)、三尾和弘(産総研)、マミテリナシルハジ(産総研)、佐藤真理(産総研)、海老原達彦(産総研)、小椋俊彦(産総研)、TEM 単粒子解析と大気圧電子顕微鏡 (ASEM) によるタンパク質複合体形成の観察. TEM Single particle reconstruction and Atmospheric SEM of protein complex formations. 第 52 回日本生物物理学会年会 (BSJ2014)、札幌コンベンションセンター、2014 年 9 月 27 日
27. S. Sugimoto (Jikei Medical school), K.-I. Okuda (Jikei Medical school), M. Sato (AIST), C. Sato (AIST), Y. Mizunoe (Jikei Medical school), Fine structures of biofilms in solution visualized by atmospheric scanning electron microscopy. 9th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine, Athens-Greece, October 11, 2014
28. 千田美紀(高エネ機構)、千田俊哉(高エネ機構)、MR-SAD 法によるタンパク質-ペプチド複合体の迅速な X 線結晶構造解析、結晶学会平成 27 年度年会、大阪、2014 年 10 月 18 日
29. Hiroko Nishikawa (U. Tokyo), *Helicobacter pylori* CagA polymorphisms and their implication in cancer, The 1st Symposium of Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammolgy, Berlin, Germany, December 17, 2014
30. 佐藤主税(産総研)、川田正晃(産総研)、佐藤真理(産総研)、西山英利(日本電子)、須賀三雄(日本電子)、Memtily Nassirhadjy. 大気圧電子顕微鏡 ASEM による組織の水中迅速観察: 癌術中診断への応用の可能性. 日本顕微鏡学会第 71 回学術講演会、国立京都国際会館、2015 年 5 月 13 日
31. 千田美紀(高エネ機構)、千田俊哉(高エネ機構)、タンパク質結晶の質を効率良く改善するための結晶工学的処理の手法、第 15 回日本蛋白質科学会年会、徳島、2015 年 6 月 26 日
32. 佐藤主税(産総研)、佐藤真理(産総研)、海老原達彦(産総研)、西山英利(日本電子)、須賀三雄(日本電子)、Memtily Nassirhadjy. Immuno-Electron Microscopy of Brain Tissues and Neuron Primary Cultures using ASEM. 第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場、2015 年 7 月 28 日

33. Miki Senda (KEK), Toshiya Senda (KEK), A comprehensive strategy to obtain high quality crystals. American Crystallographic Association (ACA) 2015, Philadelphia, July 29, 2015
34. Memtily Nassirhadjy (Xinjiang Med Univ.), M. Sato (AIST), T. Okada (AIST), T. Ebihara (AIST), K. Mio (AIST), M. Suga (JEOL), H. Nishiyama (JEOL), C. Sato (AIST), Quick Observation of Tissues in Solution by Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM), M&M2015, Portland, August 3, 2015
35. T. Ebihara (AIST), H. Nishiyama (JEOL), M. Suga (JEOL), C. Sato (AIST), The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) observes the Cultured Fluorescent Neuron, M&M2015, Portland, August 4, 2015
36. C. Sato (AIST), M. Sato (AIST), T. Ebihara (AIST), H. Nishiyama (JEOL), M. Suga (JEOL), Memtily Nassirhadjy (Xinjiang Med Univ.), Wide Area Observation of Fully Hydrophilic Tissue Achieved by Sliding It on the Dish of the Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM), M&M2015, Portland, August 5, 2015
37. 佐藤主税(産総研)、海老原達彦(産総研)、Memtily Nassirhadjy (Xinjiang Med. Univ.)、佐藤真理(産総研)、岡田知子(産総研)、川田正晃(産総研)、大気圧電子顕微鏡ASEMによる水中深さ方向の観察:神経の細胞輸送研究や組織の癌術中迅速診断への可能性、第53回日本生物物理学会年会、金沢、2015/09/13
38. 佐藤主税(産総研)、三尾和弘(産総研)、海老原達彦(産総研)、佐藤真理(産総研)、川田正晃(産総研)、電顕単粒子解析法と大気圧走査電顕 ASEM によるタンパク質・細胞・組織の親水環境での構造決定、日本動物学会第 86 回新潟大会、新潟、2015 年 9 月 19 日
39. 長瀬里沙(東京大学、高エネ機構)、林剛瑠(東京大学)、千田俊哉(高エネ機構)、畠山昌則(東京大学)、EPIYA-C セグメント数が規定するピロリ CagA タンパク質の発がん生物活性、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月 8 日
40. 千田美紀(高エネ機構)、千田俊哉(高エネ機構)、嫌気条件下で結晶化の成功率を高める手法、BMB2015、神戸、2015 年 12 月 3 日
41. 佐藤主税(産総研)、MEMTILY Nassirhadjy(Xinjiang Med. Univ.)、岡田知子(産総研)、佐藤真理(産総研)、海老原 達彦(産総研)、川田正晃(産総研)、山澤徳志子(慈恵医大)、大気圧電子顕微鏡 ASEM による消化管組織の水中迅速観察、日本顕微鏡学会 第 72 回学術講演会、仙台市、2016 年 6 月 16 日
42. Miki Senda (KEK), Improvement of protein crystal quality by multi-step soaking method., American Crystallographic Association (ACA) 2016, Denver Sheraton downtown hotel, July 25, 2016
43. 佐藤主税(産総研)、海老原達彦(産総研)、MEMTILY Nassirhadjy (Xinjiang Med. Univ.)、岡田知子(産総研)、佐藤真理(産総研)、川田正晃(産総研)、クライオ TEM 単粒子解析と ASEM による親水環境での電子顕微鏡観察、第 89 回日本生化学会大会、仙台市、2016 年 9 月 25 日
44. 佐藤主税(産総研)、MEMTILY Nassirhadjy (Xinjiang Med. Univ.)、佐藤真理(産総研)、山澤徳志子(慈恵医大)、杉本真也(慈恵医大)、Development of atmospheric scanning electron microscope (ASEM) and its applications. 日本顕微鏡学会第 59 回シンポジウム、東京、2016 年 11 月 19 日
45. S. Sugimoto(産総研) , K. Okuda(産総研) , R. Miyakawa, M. Sato(産総研), A. Chiba(慈恵医大), Y. Muzunoe(慈恵医大), and C. Sato(産総研), Imaging of bacterial biofilms in solution by atmospheric scanning electron microscopy. 日本顕微鏡学会第 59 回シンポジウム、東京、2016 年 11 月 19 日
46. T. Yamazawa(慈恵医大)、N. Nakamura(京都大学)、Y. Mikami(東邦大学)、H. Sekiya(東京大学)、M. Sato(産総研)、and C. Sato(産総研)、Exocrine Organs Imaged in Aqueous Solution by Atmospheric Scanning Electron Microscopy (ASEM).

日本顕微鏡学会第 59 回シンポジウム、東京、2016 年 11 月 19 日

47. 佐藤 主税(産総研)、大気圧電子顕微鏡 ASEM による組織・細胞の水中迅速観察. 第 73 回日本顕微鏡学会学術講演会、札幌市、2017 年 6 月 1 日
48. Hiroko Nishikawa (U. Tokyo), “Impact of structural polymorphism for the *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein on binding to polarity-regulating kinase PAR1b”, The 3rd Symposium Max Planck-The University of Tokyo center for Integrative Inflammation, Berlin, Germany, November 29, 2016
49. Miki Senda (KEK), Takeru Hayashi (U. Tokyo), Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Toshiya Senda (KEK), Anaerobic crystallization for protein crystallography. American Crystallographic Association (ACA) 2017, New Orleans, USA, May 29, 2017
50. Miki Senda (KEK), Takeru Hayashi (U. Tokyo), Nobuhiro Suzuki (KEK), Lisa Nagase (KEK), Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Toshiya Senda (KEK), Molecular mechanism of SHP2 activation by CagA from *Helicobacter pylori*. Structural Biology 2017, Zurich, Switzerland, September 18, 2017
51. Hiroko Nishikawa (U. Tokyo), “Biochemical analysis of PAR1b, a target of *H. pylori* CagA oncoprotein”, The 4th Symposium Max Planck-The University of Tokyo Center for Integrative Inflammation, Ito International Research Center, The University of Tokyo, Tokyo, November 21, 2017

③ ポスター発表 (国内会議 22 件、国際会議 15 件)

1. 林剛瑠(東京大学)、千田美紀(高エネ機構)、諸橋裕子(東京大学)、長瀬里沙(東京大学)、柏葉結(東京大学)、千田俊哉(高エネ機構)、畠山昌則(東京大学)、ヘリコバクター・ピロリがんタンパク質 CagA の構造-機能解析、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、2012 年 12 月 11-14 日
2. 千田美紀(高エネ機構)、林剛瑠(東京大学)、畠山昌則(東京大学)、千田俊哉(高エネ機構)、胃がんを引き起こすピロリ菌の発がんタンパク質 CagA の X 線結晶構造解析、物構研サイエンスフェスタ、つくば、2013 年 3 月 14 日
3. 千田美紀(高エネ機構)、林剛瑠(東京大学)、竹内恒(産総研)、畠山昌則(東京大学)、千田俊哉(高エネ機構)、『multi-step soaking method』によるピロリ菌の発がんタンパク質 CagA 結晶の改善、第 13 回日本蛋白質科学会年会、とりぎん文化会館(鳥取)、2013 年 6 月 12 日
4. Miki Senda (KEK), Takeru Hayashi (U. Tokyo), Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Toshiya Senda (KEK), Improvement of *Helicobacter pylori* CagA crystals by the multi-step soaking method, Nagoya Symposium Frontiers in Structural Physiology, Nagoya, Japan, January 22-24, 2013
5. Miki Senda (KEK) and Toshiya Senda (KEK), A novel approach of crystal-quality improvement by “the multi-step soaking method, American Crystallographic Association Annual Meeting 2013, Honolulu (USA), July 24, 2013
6. Miki Senda (KEK), Takeru Hayashi (U. Tokyo), Masanori Hatakeyama (U. Tokyo) and Toshiya Senda (KEK), Crystal structure of the CagA oncoprotein from *Helicobacter pylori*, International Conference on Structural Genomics 2013 – Structural Life Science, Sapporo (Japan), July 30, 2013
7. 海老原 達彦(産総研)、川田 正晃(産総研)、西山英利(日本電子)、千田美紀(高エネ機構)、佐藤 真理(産総研)、須賀三雄(日本電子)、千田俊哉(高エネ機構)、佐藤 主税(産総研)、「大気圧電子顕微鏡(ASEM)によるタンパク質微結晶と細胞内複合体の液中観察」. 第 51 回日本生物物理学会年会. 京都大学(京都)、2013 年 10 月 30 日
8. 杉本真也(慈恵医大)、奥田賢一(慈恵医大)、東山堅一、並木健、佐藤 真理(産総研)、西山英利(日本電子)、須賀三雄(日本電子)、松本俊介、園元謙二、水之江義充(慈恵医大)、佐藤 主税(産総研)、「大気圧走査電子顕微鏡による水中での細胞の観察: 乳酸菌と細胞外構造」. 第 36 回日本分子生物学会年会. 神戸ポ

- トアイランド(神戸)、2013 年 12 月 05 日
9. 杉本真也(慈恵医大)、奥田賢一(慈恵医大)、千葉明生(慈恵医大)、佐藤主税(産総研)、水之江義充(慈恵医大)、大気圧走査電子顕微鏡によるバクテリアの多細胞的形態“バイオフィルム”の液中高分解能観察. 第 36 回日本分子生物学会年会. 神戸, 2013 年 12 月 5 日
 10. Kana Hashi (U. Tokyo), Naoko Kamiya (U. Tokyo) and Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “A natural variant of *Helicobacter pylori* carrying CagA with a reduced oncogenic potential”, The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, Urayasu (Japan), December 16-18, 2013
 11. Mohammad Masoudi (U. Tokyo), Ryouhei Tsutsumi (U. Tokyo), Takeru Hayashi (U. Tokyo), Atsushi Takahashi (U. Tokyo) and Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Regulation of SHP2-YAP interaction by differential splicing of *YAP* mRNA”, The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, Urayasu (Japan), December 16-18, 2013
 12. Lisa Nagase (U. Tokyo) and Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Influence of EPIYA-C repeat number on the interaction of *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA with SHP2 phosphatase”, The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, Urayasu (Japan), December 16-18, 2013
 13. Yumiko Fujii (U. Tokyo), Hidekazu Suzuki (Keio Univ.), Hiroyuki Aburatani (U. Tokyo) and Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Involvement of Stemness Factors in the Intestinal Transdifferentiation of Gastric Epithelial Cells”, The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, Urayasu (Japan), December 16-18, 2013
 14. Saori Noda (U. Tokyo), Atsushi Takahashi (U. Tokyo), Takeru Hayashi (U. Tokyo), Ryouhei Tsutsumi (U. Tokyo) and Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), “Tyrosine Phosphatase Activity of SHP2 Mutants Derived from LEOPARD Syndrome”, The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, Urayasu (Japan), December 16-18, 2013
 15. 高橋昌史(東京大学)、堤良平(東京大学)、Mohammad Masoudi(東京大学)、林剛瑠(東京大学)、畠山昌則(東京大学)、「*YAP1-mRNA* の選択的スプライシングによる SHP2/YAP1 相互作用の制御」、がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動公開シンポジウム、学術総合センター(東京)、2014 年 1 月 30 日—1 月 31 日
 16. 野田沙織(東京大学)、高橋昌史(東京大学)、林剛瑠(東京大学)、畠山昌則(東京大学)、「LEOPARD 症候群特異的変異型 SHP2 のチロシンホスファターゼ活性解析」、第 6 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、三重大学(津)、2014 年 2 月 20 日(木)~2 月 21 日(金)
 17. Toshiya Senda (KEK), Miki Senda (KEK), Takeru Hayashi, (U. Tokyo) Masanori Hatakeyama (U. Tokyo), Structure and function of the CagA oncoprotein from *Helicobacter pylori*, 23rd Congress of the IUCr, Montreal (Canada), August 11, 2014
 18. Miki Senda (KEK), Toshiya Senda(KEK)、Anaerobic crystallization for protein crystallography, 23rd Congress of the IUCr, Montreal (Canada), August 11, 2014
 19. T. Kinoshita (Soka Univ.), H. Motohashi, (Tohoku Univ.) K. Hirano (Soka Univ.), Y. Maruyama (AIST), M. Kawata (AIST), T. Ebihara (AIST), M. Sato (AIST), H. Nishiyama (JEOL), M. Suga (JEOL), M. Yamamoto, S. Nishihara (Soka Univ.) and C. Sato (AIST), The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) Observes Axonal Segmentation and Platelet Generation in Solution. IMC2014, Prague, September 10, 2014
 20. 佐藤主税(産総研)、三尾和弘(産総研)、マミテリナシルハジ、佐藤真理(産総研)、海老原達彦(産総研)、小椋俊彦(産総研)、TEM 単粒子解析と大気圧電子顕微鏡(ASEM)によるタンパク質複合体形成の観察. TEM Single particle reconstruction and Atmospheric SEM of protein complex formations. 第 52 回日本生物物理学会年会(BSJ2014)、札幌コンベンションセンター、2014 年 9 月 27 日
 21. N. Memtily (Xinjiang Med Univ.), M. Sato (AIST), T. Okada (AIST), T. Ebihara (AIST), K. Mio (AIST), M. Suga (JEOL), H. Nishiyama (JEOL), C. Sato (AIST), Quick Observation of Tissues in Solution by Atmospheric Scanning Electron

- Microscopy (ASEM), M&M2015, Portland, USA, August 3, 2015
22. T. Ebihara (AIST), H. Nishiyama (JEOL), M. Suga (JEOL), C. Sato (AIST), The Atmospheric Scanning Electron Microscope (ASEM) observes the Cultured Fluorescent Neuron, M&M2015, Portland, USA, August 4, 2015
 23. 西川裕子(東京大学)、林剛瑠(東京大学)、畠山昌則(東京大学)、ピロリ菌 CagA がタンパク質の構造多型が極性制御因子 PAR1b 結合に及ぼす影響、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月 8 日
 24. 鈴木 喜大(高エネ機構)、千田 美紀(高エネ機構)、長瀬 里沙(高エネ機構)、林 剛瑠(東京大学)、畠山 昌則(東京大学)、千田 俊哉、ピロリ菌 CagA の C 末端天然変性領域による投げ縄様構造の解析、BMB2015、神戸国際展示場、2015 年 12 月 1 日
 25. 佐藤 主税(産総研)、佐藤 真理(産総研)、ナシル・ハジ・マミテリ、海老原 達彦、川田 正晃. 透過電顕と走査電顕による膜たんぱく質・細胞・組織の親水環境での観察. 第 38 回日本分子生物学会年会. 神戸, 2015 年 12 月 3 日
 26. 千田美紀(高エネ機構)、Multi-step soaking 法によるタンパク質結晶の改善、日本蛋白質科学会、福岡国際会議場、2016 年 6 月 7 日
 27. 林剛瑠(東京大学)、「*Helicobacter pylori* がタンパク質 CagA によるチロシンホスファターゼ SHP2 活性化機構の構造学的考察」、第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2016 年 10 月 7 日
 28. Chikara Sato (AIST), Masaaki Kawata (AIST), Mari Sato (AIST), Tatsuhiko Ebihara (AIST), Electromicroscopy of protein complex rearrangements in hydrophilic conditions and in cells and tissues. Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of the Zoological Society of Japan, 沖縄, 2016 年 11 月 17 日
 29. 佐藤主税(産総研)、MEMTILY Nassirhadjy、佐藤真理(産総研)、山澤徳志子、川田 正晃. Electromicroscopy of protein complexes, cells and tissues in hydrophilic environment. 第 54 回日本生物物理学会年会、つくば市、2016 年 11 月 27 日
 30. 長瀬里沙(東京大学、高エネ機構)、林剛瑠(東京大学)、千田俊哉(高エネ機構)、畠山昌則(東京大学)、EPIYA-C セグメントの重複が規定するピロリ菌 CagA タンパク質の胃発がんリスク、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016 年 12 月 2 日
 31. 鈴木 喜大(高エネ機構)、林 剛瑠(東京大学)、千田 美紀(高エネ機構)、長瀬 里沙(高エネ機構)、畠山 昌則(東京大学)、千田 俊哉(高エネ機構)、ピロリ菌 CagA EPIYA 領域と複合体を形成した SHP2 の溶液構造解析、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016 年 11 月 30 日
 32. 鈴木 喜大(高エネ機構)、林 剛瑠(東京大学)、千田 美紀(高エネ機構)、長瀬 里沙(高エネ機構)、畠山 昌則(東京大学)、千田 俊哉(高エネ機構)、ピロリ菌 CagA EPIYA セグメントと複合体を形成した SHP2 の SAXS 解析、2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ、エポカルつくば(茨城)、2017 年 3 月 14 日
 33. 千田美紀(高エネ機構)、千田俊哉(高エネ機構)、嫌気条件下で結晶化の成功率を高める手法、第 17 回日本蛋白質科学会年会、仙台、2017 年 6 月 21 日
 34. 長瀬里沙(高エネ機構)、千田美紀(高エネ機構)、鈴木喜大(高エネ機構)、林剛瑠(東京大学)、畠山昌則(東京大学)、千田俊哉(高エネ機構)、ピロリ菌発がんタンパク質 CagA-宿主細胞内標的分子複合体の構造解析に向けた試験管内再構成系の確立、第 17 回日本蛋白質科学会年会、仙台、2017 年 6 月 22 日
 35. Takeru Hayashi (U. Tokyo), 「Structural and functional mechanisms underlying activation of SHP2 by geographically distinct *Helicobacter pylori* CagA oncoproteins」, Europhosphatase 2017: Phosphatases in cell fates and decisions, Paris (France), July 24, 2017
 36. C.Sato (AIST), M.Kawata (AIST), M.Ohashi (AIST), M.Ikeda (AIST), M.Koshino

- (AIST), T.Yamazawa (AIST), T.Ebihara (AIST), M.Sato (AIST), N.Memtily (Xinjiang Med. Univ.), Microscopy of Molecular Complexes, Cells and Tissues in Hydrophilic Environments Using Cryo-TEM and ASEM、日本顕微鏡学会第60回記念シンポジウム、ニューウェルシティ宮崎(宮崎)、2017年12月1日
37. 長瀬里沙(高エネ機構)、千田美紀(高エネ機構)、千田俊哉(高エネ機構)、ピロリ菌 CagA タンパク質-細胞内標的分子複合体の結晶化、2017年度量子ビームサイエンスフェスタ、茨城県立県民文化センター(茨城)、2018年3月4日

(4)知財出願

①国内出願 (0 件)

②海外出願 (0 件)

③その他の知的財産権

(5)受賞・報道等

①受賞

- ・ 鈴木紘一メモリアル賞(第85回日本生化学会)、千田美紀、2012年12月15日
- ・ American Crystallographic Association Annual Meeting 2013, Oxford Cryosystems Low Temperature Poster Prize、千田美紀、2013年7月24日
- ・ *平成26年度 日本結晶学会学術賞、千田俊哉、11月1日
- ・ 平成26年度 日本医師会医学賞、畠山昌則、11月1日
- ・ *畠山昌則 第59回野口英世記念医学賞、畠山昌則、2016年11月5日

②マスコミ(新聞・TV等)報道

- ・ 週刊東京大学新聞「研究室散歩@微生物学」、2013年9月3日
- ・ マイナビニュース「細胞密度の調節には酵素 SHP2 の存在がカギー東大が解明」、2013年9月20日
- ・ 日本経済産業新聞「胃がん増殖の一端解明 東大、酵素・運び手が細胞へ」、2013年10月4日
- ・ 朝日新聞「胃がん発症抑える酵素発見 東大院「予防につながる」、2016年3月15日
- ・ 北海道新聞「ピロリ菌の胃癌発症抑制 東大大学院・畠山教授ら、体内酵素を発見」、2016年3月15日
- ・ 毎日新聞「ピロリ菌 胃がん発症抑制の酵素発見 東大研究チーム」、2016年3月24日
- ・ 毎日新聞「ピロリ菌 胃がん以外にも 狭心症、心筋梗塞の危険高める」、2016年5月5日
- ・ 福島民友、静岡新聞、琉球新報等「病原タンパク質全身へーピロリ菌研究で明らかに」、2016年8月1日
- ・ サンケイスポーツ「胃がんの主犯ピロリ菌を倒せ」、2016年9月8日
- ・ 毎日新聞「ピロリ菌 東アジア強力 他地域より胃がん多い要因 東大研究チーム解明」、2017年9月20日
- ・ 北海道新聞「ピロリ菌が作る物質に違い 東アジア胃がん多発解明 畠山教授ら」、2017年9月20日

- ・ ITmedia News「胃がんの多い日本人 原因はピロリ菌が作るタンパク質 東大の研究で判明」、2017 年 9 月 20 日
- ・ TBS・ひるおび!「東アジアに流行するピロリ菌強力」、2017 年 9 月 20 日
- ・ フジテレビ・直撃 LIVE グッディ!「発表 日本人“胃がん”多いナゾ 東大が解明!」、2017 年 9 月 21 日

③その他

- ・ 東奥日報「ピロリ菌から胃を守ろう／青森でフォーラム」、2016 年 9 月 10 日
- ・ 福島民報「畠山教授の功績たたえる 野口医学賞の授賞式」、2016 年 11 月 9 日
- ・ 読売新聞「細菌とウイルス 異なる大きさ・増殖方法」、2016 年 12 月 15 日
- ・ Nature Microbiology 著者インタビュー「ピロリ菌による胃がん発症を抑制する酵素発見—EB ウイルスの共感染では、酵素活性が弱められて胃がん形成が進む」、2016 年 4 月号

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

- ・ タンパク質の結晶化技術についての依頼講演を北海道大学、九州大学、蛋白質科学会、iBIX-JAXA 合同タンパク質研究会等で行なった。

②社会還元的な展開活動

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2012 年 10 月 25 日	第 1 回チーム内ミーティング(非公開)	東大医学部	5 人	研究進捗報告のためのミーティング
2012 年 11 月 22 日	第 2 回チーム内ミーティング(非公開)	東大医学部	4 人	研究進捗報告のためのミーティング
2013 年 8 月 13 日	第 3 回チーム内ミーティング(非公開)	東大医学部	7 人	研究進捗報告のためのミーティング
2014 年 3 月 6 日	第 4 回チーム内ミーティング(非公開)	東大医学部	6 人	研究進捗報告のためのミーティング
2014 年 7 月 31 日	第 5 回チーム内ミーティング(非公開)	東大医学部	7 人	研究進捗報告のためのミーティング
2014 年 10 月 1 日	第 6 回チーム内ミーティング(非公開)	高エネ機構	4 人	研究進捗報告のためのミーティング
2014 年 12 月 13 日	第 7 回チーム内ミーティング(非公開)	東大医学部	7 人	研究進捗報告のためのミーティング
2015 年 2 月 20 日	第 8 回チーム内ミーティング(非公開)	高エネ機構	3 人	研究進捗報告のためのミーティング

2016 年 2 月 3 日	第 9 回チーム内ミーティング(非公開)	東大医学部	8 人	研究進捗報告のためのミーティング
2016 年 5 月 26 日	第 10 回チーム内ミーティング(非公開)	高エネ機構	5 人	論文作成に関する打ち合わせ
2016 年 6 月 14 日	第 11 回チーム内ミーティング(非公開)	高エネ機構	5 人	論文作成に関する打ち合わせ
2016 年 7 月 11 日	第 12 回チーム内ミーティング(非公開)	高エネ機構	5 人	論文作成に関する打ち合わせ
2016 年 11 月 15 日	第 13 回チーム内ミーティング(非公開)	東大医学部	8 人	研究進捗報告のためのミーティング
2017 年 2 月 1 日	第 14 回チーム内ミーティング(非公開)	高エネ機構	5 人	論文作成に関する打ち合わせ
2017 年 2 月 13 日	第 15 回チーム内ミーティング(非公開)	東大医学部	6 人	論文作成に関する打ち合わせ
2017 年 10 月 30 日	第 16 回チーム内ミーティング(非公開)	東大医学部	6 人	研究進捗報告のためのミーティング
2018 年 3 月 23 日	第 17 回チーム内ミーティング(非公開)	東大医学部	6 人	研究進捗報告のためのミーティング

§ 6 最後に

これまでの研究は順調に進行しており、当初の目的はほぼ達成されている。特に、Tandem SH2 ドメイン-EPIpYA-C/D 複合体の結晶構造を決定し、発がん活性の強い EPIYA-D と発がん活性の弱い EPIYA-C との間では結合様式が異なり、SHP2 の脱制御機構も全く異なることを原子レベルで明らかにしたことにより、ピロリ菌感染に起因する胃がんの発症を阻害する薬剤の開発への第一歩を踏み出したことは特筆すべき成果である。実際に、本研究課題において既に CagA-SHP2 結合阻害剤のスクリーニングを開始している。また、疫学調査から類推されていた CagA 分子多型と胃がん発症の相関関係を試験管内での CagA-SHP2 結合実験を通じて確実なものとしたことは、CagA により引き起こされる宿主細胞内でのシグナル攪乱複合体の基本原則を明らかにするという目的達成のために極めて重要な前進であり意義が大きい。この成果により、実際の病態と分子レベルの過程が乖離定数という物理化学的パラメータを用いて結びついたことは、創薬への応用が期待できる大きな成果である。さらに、ピロリ菌 CagA の CM モチーフにおける構造多型と PAR1b 結合能との関連を明らかにしたことにより、CagA-PAR1b 相互作用の強弱が胃上皮細胞傷害の度合いを規定する因子であることが示された。本成果は、ピロリ菌による胃粘膜疾患の診断、治療に役立つものと期待される。一方、ピロリ菌による胃上皮細胞への CagA 注入の様子を ASEM で観察しようと試みるうちに、ASEM と PTA 染色を組み合わせると、正常細胞と癌細胞を迅速に識別できることが明らかとなった。この技術は、新しい術中迅速診断の可能性を拓くことが期待されるため、科学技術イノベーションに大きく貢献するものと思われる。

本研究課題の遂行において、千田グループと畠山グループはサンプルの調製、結晶化、および構造解析等で緊密に協力してきた。また、千田グループで調製したサンプルを用いて佐藤グループにより電子顕微鏡観察を行うなど、チーム間の連携により研究が効率化した。さらに、各グループにおいて研究費で多くの研究員を雇用したことによっても研究の効率化が図られたと考えている。以上のことから、本研究課題実施期間に多数の論文を国際的学術雑誌に発表するに至り、論文投稿中・執筆中の成果も多く得られた。

本研究課題を遂行する過程で多くの汎用的な手法が新たに構築された。CagA 生物活性の解析に際して新たに構築したマトリクス浸潤能を指標とした実験系は、多くのがん研究に応用可能な技

術であると考えられる。また、シグナル攪乱複合体全体の結晶は未だ得られていないが、その結晶化スクリーニングの過程で嫌気チャンバーを用いた嫌気条件下での結晶化技術(写真1、2)により、これまで結晶化が困難だったタンパク質の結晶化に成功し、嫌気条件下での結晶化の有用性を実証した。EPIYA セグメントと SH2 ドメインとの共結晶の構造解析においては、嫌気条件下での結晶化技術に加えて、結晶の性質を改善するために multi-step soaking 法を開発し、構造の決定に至った。尚、本研究課題の初期より迅速な X 線結晶構造解析のために、低エネルギー X 線を用いた native SAD と分子置換法を組み合わせた MR-native SAD 法を使用しており、現在では定常的な使用が可能となった(写真3)。このことで、他のプロジェクトにおいて大学や企業との共同研究の開始につながった。

今後は、ピロリ菌 CagA-宿主細胞内標的分子複合体の全体構造を決定して機能的相互作用を解析することで、CagA により引き起こされる標的細胞内シグナル攪乱の基本原理を明らかにしたい。また、胃がんの発症を阻害するような化合物の取得を目指すという部分も研究を展開させていこうと考えている。



写真1 嫌気チャンバー内インキュベーター



写真2 嫌気チャンバーでの結晶化の様子

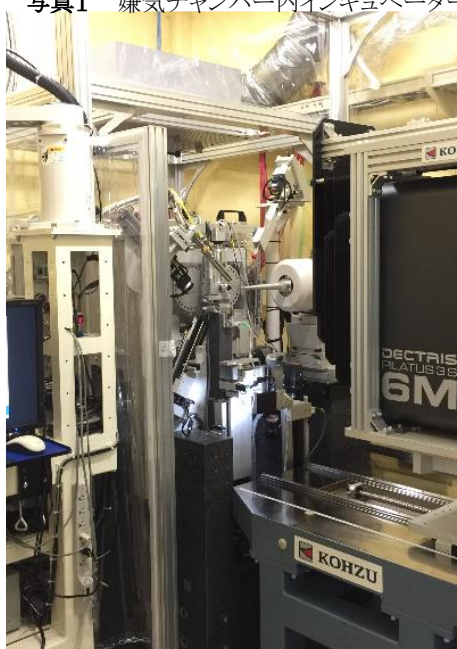


写真3 Native-SAD 法で利用した BL-17A