

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02393

研究課題名(和文)膜環境変化に伴う膜タンパク質の機能 - ダイナミクス相関の解析

研究課題名(英文) Analysis of functional dynamics of membrane proteins in different membrane environments

研究代表者

高橋 栄夫 (Takahashi, Hideo)

横浜市立大学・生命医科学研究科・教授

研究者番号：60265717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は、膜内プロテアーゼを対象とした研究から、ロンボイドプロテアーゼが可溶化に用いる界面活性剤のアルキル鎖長、親水性頭部の性質により活性調節されることを示すとともに、熱安定性と酵素活性に逆相関関係が見られることを明らかにした。膜環境の相違が分子内部運動に影響を与え、活性に影響を与えている可能性が考えられた。さらに好熱真正細菌由来微生物型ロドプシンを対象として、脂質二重膜系を含む、系統的な物性解析を行い、安定性が高い膜環境の指標を示した。また、異なる膜環境におけるNMR解析結果から、膜周辺環境の相違は局所構造の相違を誘起し、分子の動的構造・安定性が変調される可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜タンパク質は高い疎水性を有し、水溶液中に単離することが困難であるため、その研究を進めるうえでは界面活性剤などの膜様物質とともに可溶化することが行われる。しかしながら、選択した膜環境において、構造・機能・安定性がどのように維持されるかという点は、学術的にも、創薬研究や分子工学研究などの応用研究を展開する上でも重要な問題となる。本研究で得られた知見は、他の膜タンパク質研究を進めるうえでの指標となるばかりでなく、周辺環境が膜タンパク質に及ぼす影響を原子レベルで理解するための端緒となる研究成果であるといえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed that the enzymatic activity of a rhomboid protease is regulated by the alkyl chain length and the properties of hydrophilic head groups of solubilized detergents. And it was found that the enzymatic activity is inversely correlated with the thermal stability of the molecule, which inferred that the internal dynamics of the rhomboid protease affects the enzymatic activities. Using microbial rhodopsin derived from thermophilic eubacteria, we performed a systematic analysis of the thermal stability in different membrane mimetics including bicelles and nanodiscs, which provides us a useful index of choices of membrane environments for functional and structural analyses of membrane proteins. Furthermore, NMR analysis of the rhodopsin in different environments revealed that the environmental difference induces local structural changes that affect the thermal stability of the molecule.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR 膜タンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の放射光を活用した X 線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡解析等の進展により、創薬ターゲットとして重要な多くの膜タンパク質について、その分子機能を立体構造の観点から議論することが可能となってきた。しかしながら、溶液 NMR の解析から、機能する膜タンパク質構造は決して静的なものではなく、複数のコンフォメーション間を動的に推移しており、リガンド・薬物結合などに伴い、構造平衡がシフトすることで、その活性が制御されるという結果も示されてきている。このような構造変換が誘起されるのは、膜タンパク質のもつ可動性・柔軟性に起因していると考えられることから、膜タンパク質の機能発現の実体を知るとともに、薬剤開発等、その機能制御を指向した研究を進めるためには、静的な構造のみならず、その局所的な動的構造、熱安定性も含めた、膜タンパク質の機能 - 構造 - ダイナミクスに関する理解を深めることが重要と考えられる。一方、膜タンパク質が、可溶性タンパク質以上に大きな構造転移を示す理由として、分子が複雑な流動性をもつ疎水的な脂質膜環境(あるいは界面活性剤等による疑似膜環境)に取り囲まれていることが挙げられる。しかしながら、膜タンパク質の構造生物学研究では、活性が担保されているわけではない膜様環境に再構成された試料を用いることも多い。よって、膜タンパク質の機能解明において、膜タンパク質を取り囲む膜様環境も含めた、構造、ダイナミクス、熱安定性などを理解することが求められる。

### 2. 研究の目的

本研究では、複数回膜貫通タンパク質をモデル系として、周辺膜環境が膜タンパク質の活性や熱安定性に与える影響を解析するとともに、多様な膜様環境における NMR 構造解析の情報を併せて活用することで、膜タンパク質における、膜環境 - 機能 - 構造に関する解明を目指す研究を行う。主たる研究対象としては、膜内プロテアーゼ、特にロンボイドプロテアーゼを選択するが、必要に応じて、他の複数回膜貫通タンパク質も活用し研究を推進する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 異なる膜様環境がロンボイドプロテアーゼの基質切断活性に与える影響の解析

ロンボイドプロテアーゼの活性が周辺環境にどのように依存するかを明らかにする目的で、様々な界面活性剤中における基質切断活性の評価を行った。好熱菌 *Aquifex aeolicus* 由来、および大腸菌由来のロンボイドプロテアーゼ(それぞれ、*Aa rhomboid*、GlpG と呼ぶ)を研究対象とした。基質としては、汎用的な蛍光標識可溶性基質(FL-casein (Invitrogen))に加え、ロンボイドプロテアーゼ基質として知られる、ショウジョウバエ由来 Gurken、緑膿菌由来 TatA、赤痢菌由来 HybA、および  $\gamma$  セクレターゼ基質である C99 の膜内領域の一部をロンボイドプロテアーゼ基質である Spitz 配列に改変した C99-Spitz、計 4 種の膜貫通型基質ペプチド発現系(ペプチド単体、および MBP 融合ペプチド)を構築し、実験に用いた。

*Aa rhomboid* の発現には大腸菌 Lemo21(DE3)株、GlpG の発現には C43(DE3)株を用いた。誘導発現後の菌体の膜画分を DDM で可溶化した後、Ni キレート樹脂により精製を行った。膜貫通型基質ペプチド発現系については、BL21(DE3)株により誘導発現を行った後、C99-Spitz については、菌体破碎後の沈殿画分を尿素と SDS を含む緩衝液で可溶化した。他の 3 種類の基質ペプチドについては、菌体破碎後の膜画分を DDM で可溶化した。いずれも Ni キレート樹脂による精製を行った。

可溶性基質(FL-casein)を用いたロンボイドプロテアーゼの活性評価は、485nm 励起波長における 528nm 蛍光波長をリアルタイムでモニターすることで行った。膜貫通型基質ペプチドについては、反応溶液を経時的にサンプリングし、SDS-PAGE による未切断バンドと切断バンドの分離を行い、バンド強度の比から活性評価を行った。

#### (2) 多様な膜様環境における微生物型ロドプシンの解析

高い熱安定性を示し、高分解能の NMR 解析を行うことが可能な、好熱真正細菌 *Rubrobacter xylanophilus* 由来 RxR を対象とし、界面活性剤、バイセル、ナノディスクなど多様な膜様環境における熱安定性の系統的解析、および NMR による比較構造解析を実施した。RxR は、大腸菌 BL21(DE3)株を用いて発現させ、得られた膜画分を DDM で可溶化したものを、Ni キレート樹脂、陽イオン交換樹脂を用いて精製した。熱安定性の評価は、DDM ミセル中に精製した RxR を異なる界面活性剤を含む緩衝液で希釈した後、85°C でインキュベートし、RxR 固有の吸収波長である 541nm の吸光度の時間変化を計測することで行った。

精製した RxR を脂質溶液(DMPC 等)に混合した後、透析により界面活性剤を除去し、プロテオリポソームを調製した後、DH<sub>6</sub>PC で可溶化することにより、RxR 含有バイセルを調製した。また、RxR、脂質溶液に Membrane Scaffold Protein (MSP) を混合することで、RxR を再構成したナノディスクの調製を行った。

NMR 解析のための安定同位体標識 RxR 試料は、安定同位体標識試薬(<sup>15</sup>N)塩化アンモニウム)を含有した M9 培地で RxR の発現を行い調製した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 異なる膜様環境がロンボイドプロテアーゼの基質切断活性に与える影響の解析

###### Aa ロンボイドプロテアーゼにおける酵素活性および熱安定性評価

DDM ミセル中に精製した *Aa rhomboid* を大容量の界面活性剤溶液 (DM、DDM、FC-10、FC-12、EMPIGEN BB、LMPG、SDS) に希釈することで界面活性剤の置換を行った後、可溶性基質 FL-casein を混合し、活性評価を行った (図 1)。

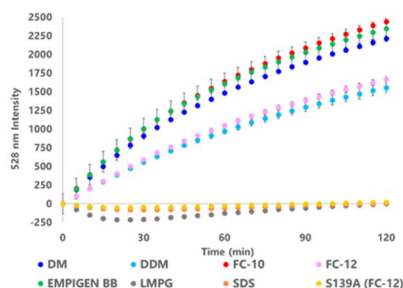


図 1: 様々な界面活性剤中における *Aa rhomboid* による FL-casein 切断反応 (蛍光強度変化) のプロット

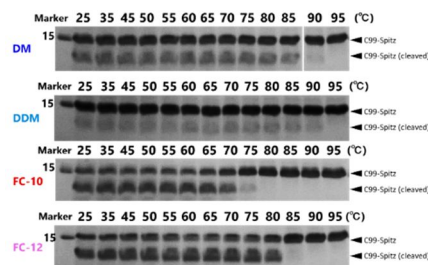


図 2: 各温度インキュベート後の C99-Spitz 切断活性の SDS-PAGE ゲル分析

その結果、DM、DDM、FC-10、FC-12、EMPIGEN BB において酵素活性を有したものの、SDS や LMPG においては活性を示さなかった。また、同じヘッドグループである界面活性剤における活性強度の比較から、アルキル鎖長が短い界面活性剤ミセル中において高い活性を示すことが示された。この傾向は、膜貫通型基質ペプチドである C99-Spitz を用いた活性評価でも同様であった。さらに、界面活性剤が *Aa rhomboid* の安定性に及ぼす影響を探るため、各界面活性剤ミセル中の *Aa rhomboid* について 25~95 °C で 20 分間インキュベートを行った後、37 °C で活性評価を行った結果、熱安定性は、DDM > DM > FC-12 > FC-10 の順であることが判明した (図 2)。以上の結果から、Mal 系界面活性剤よりも Fos-系界面活性剤ミセル中において、さらに、アルキル鎖長が短いミセル系において、*Aa rhomboid* は高い活性を示すことが明らかとなった。また、熱安定性実験結果は、酵素活性が低いものほど安定性が高く、切断活性と逆の相関関係にあることが示された。界面活性剤のアルキル鎖長は、ミセルサイズに変化をもたらすものであり、ミセルサイズと膜タンパク質の疎水性領域とのミスマッチは、膜タンパク質構造に摂動を引き起こすと考えられており (Columbus et al. 2009)、アルキル鎖長が短い界面活性剤ミセル中における高い活性は、分子内の運動性を含めた膜内構造の変化に起因すると考えられた。また、タンパク質の熱安定性の増加はポリペプチド鎖の柔軟性の低下と相関があること (Vihinen et al. 1987)、特に、FC-12 などの Fos-系界面活性剤は、膜タンパク質のヘリックス - ヘリックス間の相互作用を弱め、運動性を高めると考えられている (Chipot et al. 2018)。これらより、Fos-系界面活性剤は好熱性タンパク質特有の強固な構造に対し、酵素活性に必要とされる柔軟性を誘起することで、高い活性を示した可能性が考えられた。

###### GlpG における酵素活性評価

大腸菌由来のロンボイドプロテアーゼである GlpG の可溶性基質 (FL-casein) の切断活性を解析した結果、解析に用いた界面活性剤ミセル中における酵素活性の大きさは、DM~FC-12 > DDM > FC-10 > SDS~0 であった。報告されている界面活性剤ミセルサイズは、DDM > DM~FC-12 > FC-10 であることから (Columbus et al. 2009)、DM、FC-12 ミセルは GlpG の疎水性領域とミスマッチが起こりにくい最適な大きさであった一方、DDM ミセルは大きすぎ、FC-10 ミセルは小さすぎるため、GlpG の膜貫通ドメインの疎水性領域と一致しなかったことが酵素活性に影響を与えていると考察された。*Aa rhomboid* と GlpG の異なる依存性は、両プロテアーゼの熱安定性の相違に起因する可能性が考えられる。

一方、GlpG が天然由来の膜貫通型基質ペプチドである MBP 融合 TatA、MBP 融合 Gurken を切断する活性については、FC-12 ミセル中より DDM ミセル中の方が高かった。これに対し、MBP 融合 HybA を切断する活性は、FC-12 ミセル中の方が DDM ミセル中よりも高かった。この結果は、膜様環境の相違は、ロンボイドプロテアーゼ自体の活性に影響を与えるのみならず、各基質ペプチドの構造状態にも異なる影響を与え、全体として酵素活性の効率が定められていることを示している。

##### (2) 多様な膜様環境における微生物型ロドプシンの解析

### 異なる膜様環境における RxR の熱安定性の解析

好熱真正細菌 *Rubrobacter xylophilus* 由来 RxR は、レチナールの異性化を起点としてプロトンポンプとして働く微生物型ロドプシンであり、多様な膜環境においても高い熱安定性が期待される。そこで様々な界面活性剤中における熱安定性の系統的な解析を行った (図 3)。LMNG や DDM など、マルトシド系界面活性剤は、両性イオン性またはイオン性界面活性剤に比べて熱安定性が高かった。また、DDM と DM、NG と OG、DH<sub>7</sub>PC と DH<sub>6</sub>PC など、同じ親水性頭部を持ち、アルキル鎖長の異なる界面活性剤同士を比較すると、鎖長が長い方が、熱安定性が高いという傾向が見られた。

### 異なる膜様環境における RxR の NMR 解析

周辺膜様環境の違いによる、膜タンパク質の構造変化等を解明していくうえで、溶液 NMR を用いた解析は有効な手法となる。熱安定性が異なることが明らかになった 11 種類の界面活性剤ミセル中の [<sup>15</sup>N] 標識 RxR について、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N TROSY-HSQC スペクトルを測定した結果、界面活性剤の違いにより観測シグナル数に差が見られた (図 4)。DDM や LMNG、LMPC ミセル中の RxR のスペクトルでは観測予想シグナル数の半分以下のシグナルしか観測されなかった一方、4 種類 (OG、DPC、DH<sub>7</sub>PC、DH<sub>6</sub>PC) の界面活性剤ミセル中の RxR について、アミノ酸残基数から想定されたシグナル数が観測された。スペクトルの質は、おおよそミセルサイズを反映しており、熱安定性との相関は見られなかった。

アミノ酸改変体を活用することでシグナル帰属された、Trp 側鎖インドール環 NH 由来のシグナルに着目し、界面活性剤の相違による化学シフト変化を解析したのが図 5 である。グルコシド系やマルトシド系の界面活性剤では、ほとんどのシグナルの化学シフトがほぼ重なっているのに対し、ホスホコリン系の界面活性剤では複数のシグナルで大きな化学シフト変化が見られている。化学シフト変化が見られる残基は、W5、W7、W69、W117 など、脂質膜界面付近に存在すると考えられる残基であり、界面活性剤のヘッドグループの相違を顕著に反映しているものと考えられた。タンパク質分子内部でレチナール近傍に存在する、W75、W175 は膜様環境の相違による化学シフト変化は小さく、周辺環境の相違は、少なくとも基底状態の RxR 分子の内部構造に大きな変調を与えてはいないと考えられた。

一方で、W182 は OG ミセルと DH<sub>7</sub>PC において顕著な化学シフト変化を示した。その化学シフトの温度依存性 (温度係数) についても、それぞれ、-4.4 ppb/K、-2.1 ppb/K、と大きく異なっていた。結晶構造において、W182 はレチナールの β イオン環の近傍に位置し、ヘリックス C 上の Y72 の OH 基と水素結合を形成可能な距離に存在している (図 6)。本解析の結果から、この W182 と Y72 (ヘリックス C と F) の間の水素結合が、DH<sub>7</sub>PC ミセル中では形成されるが、OG ミセル中においては形成されていないか、または減弱していることが推定される。この膜表面に近い領域のヘリックス間のパッキング状態は、高温条件下における熱安定性に影響を与える可能性が考えられるとともに、プロトンポンプ機能への寄与も考えられた。

### 脂質二重膜中に再構成した RxR の熱安定性と NMR 解析

脂質膜中における RxR の安定性や構造への影響を解析するため、脂質二重膜系を含む膜様環

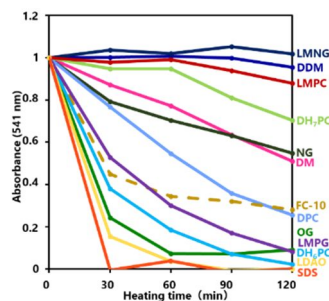


図 3: 異なる界面活性剤ミセル中における RxR を 85 °C で 2 時間加熱した際の 541 nm の吸光度

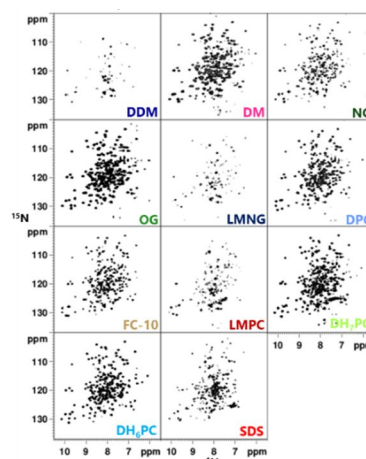


図 4: 各種界面活性剤ミセル中における [<sup>15</sup>N]RxR の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N TROSY-HSQC スペクトル

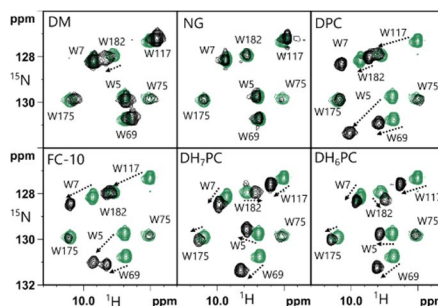


図 5: OG (緑) とその他の界面活性剤ミセル (黒) 中における [<sup>15</sup>N] RxR の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N TROSY-HSQC スペクトル (Trp 側鎖 NH 領域)。

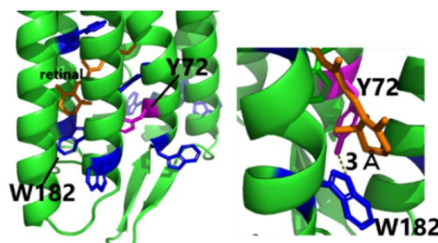


図 6: RxR の結晶構造 (PDB 6KFQ)。W182 周辺の様子 トリプトファン残基を青、チロシン残基をマゼンタ、レチナールをオレンジで示した。

プロトンポンプ機能への寄与も考え

境であるバイセル中に RxR を再構成した。4 種類の異なる脂質( DMPC、DMPG、DOPC、DOPG ) および DH<sub>6</sub>PC を用いて調製した RxR バイセル ( q=0.5 ) について、85 °C における安定性を解析した結果、いずれも界面活性剤 DH<sub>6</sub>PC 単体より高い熱安定性を示した一方で、親水基に負電荷を有する DMPG、DOPG で調製したものは、両性イオン性の DMPC、DOPC で調製したものより熱安定性が高いことが明らかとなった。脂質の有する負電荷が膜タンパク質 RxR の安定性に寄与することが示された。また、脂質の種類や MSP の異なる 6 種類のナノディスク中に再構成された RxR について、75 °C で加熱した際の熱安定性を解析したところ、いずれのナノディスクにおいても、高い熱安定性を示した。脂質の種類については、バイセルに再構成した RxR と同様、負電荷を有する脂質を用いたナノディスクの熱安定性が高い傾向が確認された。

次に NMR 測定を行い、DH<sub>7</sub>PC ミセル中の RxR のスペクトルと比較した結果を図 7 に示す。Trp 側鎖 NH 領域に着目すると、タンパク質表面に存在するトリプトファン残基( W5、W7、W69、W117 ) について、顕著な化学シフトの違いが観測された。いずれの試料においても使用した脂質、界面活性剤は全て同様の親水性頭部 ( PC ) を有するにも関わらず化学シフト変化が生じたことから、タンパク質表面と疑似膜分子との相互作用様式に違いがあることが示唆された。また、タンパク質の内部に存在する残基 ( W75、W182 ) についても、僅かな化学シフト変化が観測されたことから、膜周辺環境の相違が、膜タンパク質内部の構造にも影響を与えることが示唆された。W75 および W182 は RxR の機能発現において重要な役割を担うレチナール近傍に存在していることから、膜周辺環境の相違が RxR の機能に影響を与える可能性が示唆された。

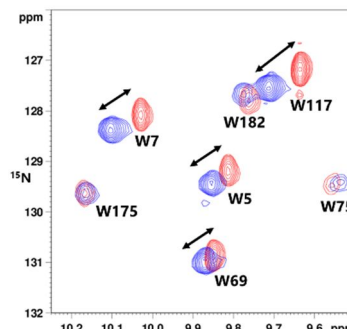


図 7： バイセル (青) および DH<sub>7</sub>PC ミセル中 (赤) に再構成した [15N]RxR の <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N TROSY-HSQC スペクトル。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeuchi K, Kofuku Y, Imai S, Ueda T, Tokunaga Y, Toyama Y, Shiraishi Y, Shimada I.	4. 巻 11
2. 論文標題 Function-Related Dynamics in Multi-Spanning Helical Membrane Proteins Revealed by Solution NMR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes11080604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Moritsugu K, Takeuchi K, Kamiya N, Higo J, Yasumatsu I, Fukunishi Y, Fukuda I	4. 巻 61
2. 論文標題 Flexibility and Cell Permeability of Cyclic Ras-Inhibitor Peptides Revealed by the Coupled Nose-Hoover Equation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Chem Inf Model	6. 最初と最後の頁 1921-1930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.0c01427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hanzawa H, Shimada T, Takahashi T. and Takahashi H.	4. 巻 74
2. 論文標題 Revisiting biomolecular NMR spectroscopy for promoting small-molecule drug discovery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biomol. NMR	6. 最初と最後の頁 501-508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10858-020-00314-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tokunaga Y, Takeuchi K, Okude J, Ori K, Torizawa T, Shimada I.	4. 巻 63
2. 論文標題 Structural Fingerprints of an Intact Monoclonal Antibody Acquired under Formulated Storage Conditions via <sup>15</sup> N Direct Detection Nuclear Magnetic Resonance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Med. Chem.	6. 最初と最後の頁 5360-5366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.0c00231	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizukoshi Y, Takeuchi K, Tokunaga Y, Matsuo H, Imai M, Fujisaki M, Kamoshida H, Takizawa T, Hanzawa H, Shimada I.	4. 巻 6
2. 論文標題 Targeting the cryptic sites: NMR-based strategy to improve protein druggability by controlling the conformational equilibrium.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Adv.	6. 最初と最後の頁 eabd0480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd0480	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Argunhan B, Sakakura M, Afshar N, Kurihara M, Ito K, Maki T, Kanamaru S, Murayama Y, Tsubouchi H, Takahashi M, Takahashi H, Iwasaki H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Cooperative interactions facilitate stimulation of Rad51 by the Swi5-Sfr1 auxiliary factor complex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e52566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.52566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakakura M, Ohkubo Y, Oshima H, Re S, Ito M, Sugita Y, Takahashi H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Structural mechanisms underlying activity changes in an AMPA-type glutamate receptor induced by substitutions in its ligand-binding domain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Structure	6. 最初と最後の頁 1698-1709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.str.2019.09.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi K, Imai M, Shimada I.	4. 巻 116
2. 論文標題 Conformational equilibrium defines the variable induction of the multidrug-binding transcriptional repressor QacR	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. USA	6. 最初と最後の頁 19963-19972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1906129116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arthanari H, Takeuchi K, Dubey A, Wagner G.	4. 巻 58
2. 論文標題 Emerging solution NMR methods to illuminate the structural and dynamic properties of proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr. Opin. Struct. Biol.	6. 最初と最後の頁 294-304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.sbi.2019.06.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Oshima H, Re S, Sakakura M, Takahashi H, Sugita Y.	4. 巻 116
2. 論文標題 Population shift mechanism for partial agonism of AMPA receptor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophys. J.	6. 最初と最後の頁 57-68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2018.11.3122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Boeszoermenyi A, Chhabra S, Dubey A, Radeva D. L, Burdzhiev N. T, Chanev C. D, Petrov O. I, Gelev V. M, Zhang M, Anklin C, Kovacs H, Wagner G, Kuprov I, Takeuchi K, Arthanari H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Aromatic 19F-13C TROSY: a background-free approach to probe biomolecular structure, function, and dynamics	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat. Methods	6. 最初と最後の頁 333-340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41592-019-0334-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sugiki T, Egawa D, Kumagai K, Kojima C, Fujiwara T, Takeuchi K, Shimada I, Hanada K, Takahashi H.	4. 巻 293
2. 論文標題 Phosphoinositide binding by the PH domain in ceramide transfer protein (CERT) is inhibited by hyperphosphorylation of an adjacent serine-repeat motif	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 11206-11217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.002465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



1. 著者名 Suzuki R, Sakakura M, Mori M, Fujii M, Akashi S, Takahashi H.	4. 巻 71
2. 論文標題 Methyl-selective isotope labeling using $\alpha$ -ketoisovalerate for the yeast <i>Pichia pastoris</i> recombinant protein expression system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biomol. NMR	6. 最初と最後の頁 213-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10858-018-0192-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計27件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Rika Suzuki, Masafumi Hirohata, Chika Hoyano, Keiichi Kojima, Yuki Sudo, and Hideo Takahashi
2. 発表標題 Solution NMR analysis of <i>Rubrobacter xylanophilus</i> rhodopsin in different membrane-mimetic environments
3. 学会等名 22nd ICMRBS & 9th APNMR (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木里佳、廣畑雅史、穂谷野知佳、藤田陽、高橋栄夫
2. 発表標題 生体発動分子の機能構造解析に向けた検討
3. 学会等名 第1回発動分子科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣畑雅史、鈴木里佳、穂谷野知佳、藤田陽、吉田真帆子、村田武士、小島慧一、須藤雄気、高橋栄夫
2. 発表標題 異なる膜様環境下におけるプロトンポンプ型ロドプシンRxRの機能および構造変化の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 穂谷野知佳、鈴木里佳、廣畑雅史、村田武士、小島慧一、須藤雄気、高橋栄夫
2. 発表標題 プロトンポンプ型ロドプシンTRのNMR解析に向けた試料調製法の確立
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂倉正義、三尾和弘、田辺幹雄、高橋栄夫
2. 発表標題 シャルコー・マリー・トゥース病関連変異がミエリンタンパク質ゼロの構造および機能に及ぼす影響の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木里佳、廣畑雅史、穂谷野知佳、藤田陽、高橋栄夫
2. 発表標題 溶液NMR法を用いた光駆動プロトンポンプRxRの機能構造解析
3. 学会等名 第2回発動分子科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂倉正義、三尾和弘、田辺幹雄、高橋栄夫
2. 発表標題 シャルコー・マリー・トゥース病関連変異型ミエリンタンパク質ゼロの機能構造解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内恒
2. 発表標題 MRを用いた動的な生命現象の理解と創薬への応用
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 廣畑雅史、鈴木里佳、小島慧一、吉田真帆子、村田武士、須藤雄気、高橋栄夫
2. 発表標題 溶液NMRを用いた微生物型プロトンポンプロドプシンRxRの機能・構造解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂倉正義、田辺幹雄、三尾和弘、高橋栄夫
2. 発表標題 脂質二重膜の重層化を担うミエリタンパク質ゼロ細胞外ドメインのホモ相互作用メカニズムの解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木里佳、登坂綺水、浴本亨、高橋真帆、山根努、坂倉正義、水越弓子、竹内恒、嶋田一夫、池口満徳、高橋栄夫
2. 発表標題 神経栄養因子NGF高親和性受容体TrkAドメイン5と新規結合ペプチドの相互作用解析
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂倉正義、田辺幹雄、三尾和弘、高橋栄夫
2. 発表標題 脂質二重膜の多重層化に重要なミエリントンバク質ゼロ細胞外ドメインのホモ相互作用メカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内恒
2. 発表標題 溶液NMRを用いた動的構造創薬
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内恒
2. 発表標題 溶液NMRを用いた動的構造創薬
3. 学会等名 2020年度 日本分光学会NMR分光部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋栄夫
2. 発表標題 NMR相互作用解析による創薬アプローチ
3. 学会等名 生有研シンポジウム「生体分子間に働く相互作用解析法の現状と今後の可能性」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木里佳、吉田真帆子、廣畑雅史、村田武士、小島慧一、須藤雄気、高橋栄夫
2. 発表標題 溶液NMR法を用いた界面活性剤ミセル中における膜タンパク質の比較構造解析
3. 学会等名 第58回NMR討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井出優希、坂倉正義、真木孝尚、岩崎博史、高橋栄夫
2. 発表標題 リコンビナーゼRad51と補助因子Swi5-Sfr1のNMR相互作用解析に向けた基盤研究
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葉袋勇樹、畠山彩由子、平島かれん、坂倉正義、高橋栄夫
2. 発表標題 Rhomboid proteaseの様々な膜環境変化における酵素活性と熱安定性の評価
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田真帆子、鈴木里佳、廣畑雅史、村田武士、小島慧一、須藤雄気、高橋栄夫
2. 発表標題 異なる疑似膜環境中における耐熱性膜タンパク質RxRの構造安定性と機能の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koh Takeuchi
2. 発表標題 Conformational equilibrium defines variable transcriptional repression of a multidrug binding transcriptional repressor, QacR
3. 学会等名 8th Asia-Pacific NMR Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koh Takeuchi
2. 発表標題 Targeting the cryptic sites: NMR-based strategy to improve the druggability of proteins by controlling the conformational equilibrium.
3. 学会等名 第57回生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大久保優美、坂倉正義、横井誠矢、高橋栄夫
2. 発表標題 NMRを用いたAMPA型グルタミン酸受容体リガンド結合ドメインの運動性解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 畠山彩由子、葉袋勇樹、長倉玲音、坂倉正義、高橋栄夫
2. 発表標題 Rhomboid proteaseの活性メカニズム解明に向けた機能・構造解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森雅樹、坂倉正義、三尾和弘、高橋栄夫
2. 発表標題 末梢神経ミエリンの膜重層化に関するタンパク質MPZと脂質との相互作用解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hideo Takahashi
2. 発表標題 NMR analysis of the structural and functional stability of proteins
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rika Suzuki, Masayoshi Sakakura, Hideo Takahashi
2. 発表標題 Methyl-selective <sup>13</sup> C incorporation using alpha-ketoisovalerate for the yeast <i>Pichia pastoris</i> expression system
3. 学会等名 XXVIII International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂倉正義、真嶋健大、三尾和弘、Charles Sanders、高橋栄夫
2. 発表標題 NMR を用いたアミロイド前駆蛋白質 C99 の構造解析
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 高橋栄夫	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 213-219
3. 書名 先端の分析法 第2版 第2章2. 多次元NMR測定	

1. 著者名 坂倉正義、高橋栄夫	4. 発行年 2021年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 566-577
3. 書名 NMRによる有機材料分析とその試料前処理、データ解釈 第6章第5節 NMRによるペプチドの立体構造解析	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	竹内 恒  (Takeuchi Koh)  (20581284)	東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授   (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------