

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370049

研究課題名(和文) 外向き型及び内向き型バンド3 / 抗体複合体の三次元結晶構造解析

研究課題名(英文) Crystal structure of human Band3 (anion exchanger)

研究代表者

小林 拓也 (KOBAYASHI, TAKUY)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20311730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：2008～2010年の基盤研究(B)では、バンド3に対する構造認識抗体を作製し、アニオン輸送の阻害剤を嚙ませて外向き型に固定化したバンド3 / 抗体(Fab)複合体を結晶化し、分解能3.4 Åの電子密度図に対しモデル構築と精密化を進めた。2011～2013年の基盤研究(B)では前回のモデルでは見えなかった部位の構造を明らかにするため、外向き型バンド3 / Fab複合体の結晶化条件の最適化、抗体分子を使わないバンド3単独による結晶化の検討、さらに内向き型バンド3の結晶化及び構造解析を目指した。これまでの蒸気拡散法だけでなく、脂質キュービックフェーズ法など異なる結晶化方法を検討した。

研究成果の概要(英文)：Human AE1 is a 110kDa glycoprotein. It is built from two domains, a cytosolic N-terminal domain (residues 1-360) and an integral membrane domain (residues 361-911). Anion exchange is catalysed by the C-terminal domain. However, only the crystal structure of the cytosolic N-terminal domain, important as an anchoring point for other proteins including the scaffolding protein ankyrin and deoxy-hemoglobin, has been determined. As such the details of the topology, the substrate recognition, and the anion-transport mechanism of this fundamental protein remain unclear. We analyzed the crystal structure at 3.4 Å resolution of the membrane domain of human AE1 locked in an outward open conformation by a covalently bound H2DIDS-inhibitor in complex with a Fab fragment from a monoclonal antibody. We also need the structure of an inward-facing open conformation or an outward-facing open conformation at higher resolution to understand the fully anion exchange mechanism of AE1.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：X線結晶構造解析 アニオントランスポーター バンド3

1. 研究開始当初の背景

1974年 Cabantchik と Rothstein によって、世界で初めて赤血球に発現する陰イオン透過性分子としてバンド3が同定された (J. Membr. Biol. 15, 207-48)。バンド3は赤血球膜タンパク質の25%を占める主要膜タンパク質であり、世界中でこれまで30年以上、多くの研究者によって研究がなされている。赤血球膜タンパク質バンド3は、陰イオン交換トランスポーター (Anion Exchanger) ファミリーの一員であり、塩化物イオン (Cl⁻) と重炭酸イオン (HCO₃⁻) など一価の陰イオンを交換輸送することが知られている (Fig. 1.)。バンド3 (AE1) は分子量約100 kDaで、大きく二つのドメインから構成されている。バンド3は細胞質に突出したN末ドメイン (40kDa) を介して、アンキリンやスペクトリンなどの細胞骨格タンパク質ネットワークを細胞膜に繋ぎ止め、赤血球の形態を維持している。また、膜貫通部分であるC末ドメイン (55kDa) はCl⁻とHCO₃⁻の交換反応を司り、炭酸脱水素酵素と協調して組織や細胞の必要酸素量を検出するメタボリックセンサーとして機能し、赤血球の酸素と二酸化炭素運搬に必須の役割を果たしている (Fig. 1.)。従って、C末ドメインの構造異常は陰イオン透過活性だけでなく細胞膜裏打ちタンパク質ネットワーク全体の破綻にも結びついていると考えられる。我々はバンド3の膜貫通ドメインの立体構造を解明し、バンド3タンパクの陰イオン透過機構の解明を目的としている。

バンド3の三次元結晶構造の解析に関する国内・国外の研究動向については、1995年に Sekler らが *Saccharomyces* を用いてヒト由来のバンド3の大量発現・精製に成功した (J. Biol. Chem. 270, 21028-34)。2000年には、Zhang らが親水性のN末端ドメインを *E. coli* で発現、精製、結晶化し、2.6Åの分解能で結晶構造を解明した (Blood 96, 2925-33)。2002年には Lemieux らがヒトの赤血球から精製したバンド3のC末ドメインを結晶化し、14Åの分解能を持った結晶を作製した (J. Struct. Biol. 37, 322-32)。さらに、2010年には、二次元結晶の電子線回折構造が報告されたが、膜貫通ヘリックスの位置が分かる程度で、原子レベルの構造は全く未知である (J. Mol. Biol. 397, 179-89)。これまでにヒトおよびその他の種のバンド3ホモログでC末の膜貫通ドメインの結晶構造は解明されていない。このような状況の中、濱崎と康らは、1980年代から生化学および分子生物学的手法を用いてバンド3の陰イオン透過分子機序の解明を試みてきた。その結果、陰イオンの取り込み活性に重要な

アミノ酸をいくつか同定することに成功した。

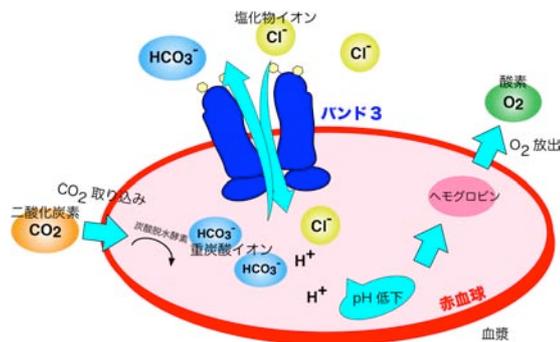


Fig. 1 赤血球膜タンパク質バンド3の模式図

しかし、生化学的に重要なアミノ酸の同定だけでは詳細な陰イオン透過分子機序の解明には至らず、さらに構造生物学的アプローチを試みることとなった。2000年以降、濱崎、康らはヒト赤血球よりバンド3の膜貫通ドメインを単一に精製する方法を確立し、2005年から岩田 想教授 (京都大学 医学研究科) 指導の下、研究代表者である小林とバンド3の結晶構造解析に向けて共同研究がスタートした。2008~2010年の基盤研究 (B) (代表者小林) では、バンド3に対する構造認識抗体を作製し、アニオン輸送の阻害剤を嚙ませて外向き型に固定化したバンド3/抗体 (Fab) 複合体を結晶化した。その結果、マイクロフォーカスビームやピクセル検出器を用いた低振動角測定/ラインスキャンをはじめとしたビームラインの特長を生かして3.4Å程度の分解能でデータを収集することに成功した (Fig. 2)。さらに、バンド3のシステイン残基を水銀化合物で標識した結晶を準備し、重原子同型置換/異常分散 (SIRAS) により、1量体あたり3箇所のサイトを同定したうえで位相計算を行った。その結果、バンド3の4Åの実験位相を計算することができ、それに基づく電子密度図を得た (Fig. 3)。

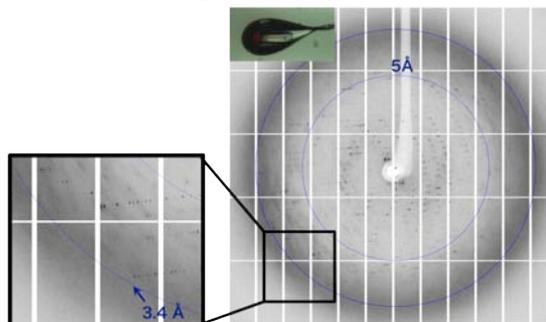


Fig. 2 バンド3のX線回折データ。

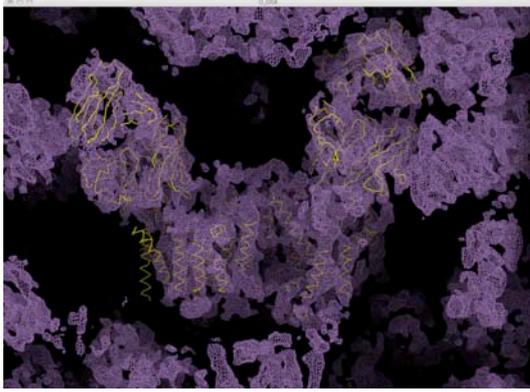


Fig. 3 バンド 3 の電子密度図.

2. 研究の目的

研究期間内に以下の三つの項目を明らかにしたいと考えた。

- 1) これまでに得られている回折データから外向き型バンド 3 のモデルを構築し結晶構造を決定する。
- 2) バンド 3 の高分解能 (3.4Å以上) の結晶を得るために、多種類の界面活性剤について精製・結晶化を検討する他、脂質キュービックフェーズ法等、異なる結晶化方法による結晶化も検討する。
- 3) 内向き型に固定化したバンド 3 を結晶化し、高分解能で結晶構造を決定する。

3. 研究の方法

バンド 3 のような膜タンパク質の構造解析は非常に難しく、一般的に長い年月を要することが多い。その理由として界面活性剤で可溶化した膜タンパク質の疎水性領域がミセルで覆われ、結晶格子が形成されにくいという点が挙げられる。そこで、我々は「結晶化リガンド」として膜タンパク質の親水性表面の立体構造を特異的に認識して高親和性で結合するモノクローナル抗体の免疫及びスクリーニング方法を確立した (PCT/JP2010/57631、小林ら)。本抗体を用いることにより、膜タンパク質分子は構造的なゆらぎ (動的構造) を生じない特定のコンフォメーションに安定化され、膜タンパク質/抗体複合体の全体としての親水性表面が拡大し、結晶性が向上する (Fig. 4)。本抗体を用いて高分解能で結晶構造を解くことに大きな特色がある。生化学的な手法だけでなく、構造生物学的な手法を用いることで、構造を基盤としたバンド 3 の陰イオン透過分子機序が明らかとなるだけでなく、バンド 3 特異的な阻害剤の開発にも繋がると思われる。

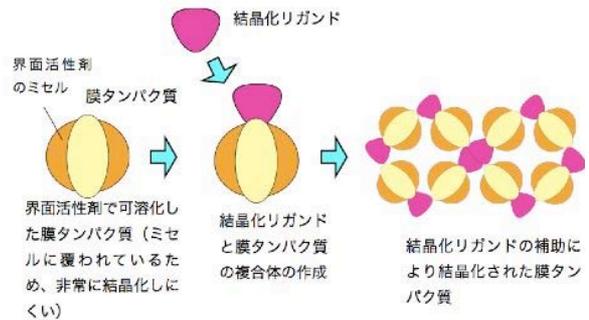


Fig. 4 結晶化リガンドを用いた膜タンパク質の結晶化原理.

【外向き型バンド 3/抗体複合体の結晶構造の決定】

濱崎らはヒト赤血球よりバンド 3 を単一に精製する方法を確立している。バンド 3 は糖鎖修飾された膜タンパク質で、SDS-PAGE ではブロードなバンドとして検出される。精製中にグリコシダーゼを処理することにより、殆どの糖鎖を切断することができたが、わずかな糖鎖の切れ残りは結晶化にとって致命的であった。そこで、小林らはさらに精製方法を改良することでより完全に糖鎖を切断する方法を確立した。この精製バンド 3 を用いて三次元結晶化を試みる。

膜タンパク質を結晶化するには、界面活性剤のミセル中に膜タンパク質を取り込んだ状態で結晶化する必要がある。この状態では膜タンパク質の疎水的な表面は特定の構造をもたないミセルで覆われているため、結晶格子の形成に寄与できない。従って、膜の外に飛び出した親水性部分が大きい膜タンパク質ほど結晶化しやすい傾向がある。そこで、小林らは抗バンド 3 モノクローナル抗体の Fab フラグメントと精製バンド 3 を複合体として共結晶化することで親水性部分を拡大し、外向き型バンド 3/抗体複合体結晶を得ることに成功し、分解能 3.4Å程度でデータを取得した。

既に、重原子同型置換/異常分散 (SIRAS) により、1 量体あたり 3 箇所のシステイン残基を同定し 4Åの位相を決定しており、モデル構築と精密化を進める。

【ヒトの赤血球バンド 3 の高分解能結晶の取得】

脂質キュービックフェーズは、三次元的に連続した水相と脂質相を併せ持つ。膜タンパク質を脂質キュービックフェーズの二重膜へ再構成することで、脂質膜に埋め込まれた状態にも関わらず、あたかも水相における親水性タンパク質のように、三次元的に自由に拡散しうる環境を構築できる (Fig. 5)。結晶化には、脂質キュービックフェーズ法以外にもいくつかの結晶化方法を検討する。



Caffrey M. and Cherezov V. Nat. Protoc. (2009) 4, 706-731

Fig. 5 脂質キュービックフェーズの構造

【内向き型バンド 3 の立体構造認識抗体の作製】

結晶化リガンド分子は、膜タンパク質の親水性表面の立体構造を特異的に認識して結合し、親水性領域を拡張するとともに、膜タンパク質分子に構造的なゆらぎ(動的構造)が生じないようにある特定のコンフォメーションを安定化することによって結晶中の分子パッキングを改善することが必要である(Fig. 6)。従って、膜タンパク質の結晶化リガンドとして利用可能な抗体とは少なくとも次のような条件をクリアするものと考えられる。

- 膜タンパク質との親和性が高く、解離速度が小さい。
- 膜タンパク質の親水性表面の立体構造に特異的に結合して構造を安定化する。

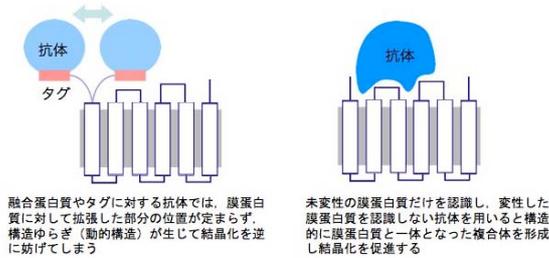


Fig. 6 結晶化リガンドとして利用可能な抗体の概念図

精製標品をプロテオリポソームとして再構築し、抗原として利用することで、機能的な構造を保持した膜タンパク質をマウスに免疫することが可能となった。抗体の一次スクリーニングには、リポソーム ELISA 法を利用する(小林ら、PCT/JP2010/57631)。従来の ELISA 法は、抗原をプラスチックプレートに固相化し、これを認識する抗体を検出していた。しかし、精製した膜タンパク質を抗原とする場合、界面活性剤存在下での操作となるため、抗原がプラスチックプレートに固相化されないか、あるいは繰り返しの洗浄操作により膜タンパク質が変性してしまい立体構

造を認識する抗体を得ることができなかった。そこで、膜タンパク質の安定化および固相化を効率よく行うために、膜タンパク質をビオチン化脂質含有リポソーム中に再構成した上でストレプトアビジンプレートへ固相化し、ELISA を行う方法(リポソーム ELISA 法)を開発した(Fig. 7)。

さらに、変性ドットブロット法を組み合わせることにより、フレキシブルな領域を認識する抗体と膜タンパク質の立体構造を認識する抗体を区別することが可能となった(小林ら、PCT/JP2010/57631)。即ち、変性させた膜タンパク質を提示するドットブロット法に陰性の抗体は、ゆらぎの少ない立体構造を認識する抗体と考えた。実際にこの手法を用いて、外向き型バンド 3 の立体構造を認識するモノクローナル抗体をスクリーニングし、結晶化に成功している。本法により内向き型バンド 3 の立体構造認識抗体を取得することも可能になる。

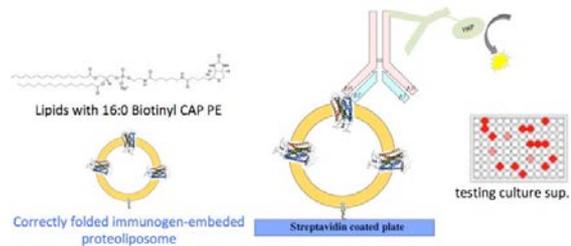


Fig. 7 リポソーム ELISA 法の概略図

4. 研究成果

2000 年以降、濱崎らはヒトの赤血球よりバンド 3 の膜貫通ドメインを単一に精製する方法を確立し、2005 年から小林らとバンド 3 の結晶構造解析に向けて共同研究がスタートした。2008~2010 年の基盤研究(B)(代表者 小林)では、バンド 3 に対する構造認識抗体を作製し、アニオン輸送の阻害剤を嚙ませて外向き型に固定化したバンド 3/抗体(Fab)複合体を結晶化した。本基盤研究(B)(2011 年~2013 年)では、これまでに得られた分解能約 3.4Å を超えるデータ収集を目指した。これまでに得られたデータでは、どうしても見えてこない構造が残されていることも、モデルの精密化で明らかになってきた。そこで、バンド 3 の精製法の改良、これまでに結晶化に用いてきた方法(蒸気拡散法)による(さらなる)結晶化条件の最適化、微小重力環境における結晶化を目指した Counter Diffusion(CD)法(ゲル・カウンタ・ディフュージョン法など)、膜蛋白質の結晶化に適した方法(脂質キュービックフェーズ法)を順番に検討した。

その結果、バンド 3/抗体(Fab)複合体として、蒸気拡散法による分解能 3.4Å 以上の回折データを集めることはできなかった。しかし、バンド 3

単体での結晶化に適した精製法が確立され、蒸気拡散法や CD 法でも、再現良く定常的に結晶化できるようになった (Fig. 8)。分解能としては、まだ 7Å 程度の解像度しかないが、新しい結晶化条件として、さらに検討を進めている。膜タンパク質の結晶化に及ぼす微小重力環境の影響は、国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」において、本研究期間中に1回実験を行ったが、残念ながら結晶は得られていない。地上実験では Fig. 8(右)に示すような単結晶と思われる結晶が再現よくできている。この条件で、本研究期間より後にはなるが、平成 26 年 3 月 26 日に「きぼう」へ打ち上げたサンプルで、地上対照実験サンプルで結晶が確認されており、平成 26 年 5 月 14 日に回収されるサンプルに期待している。

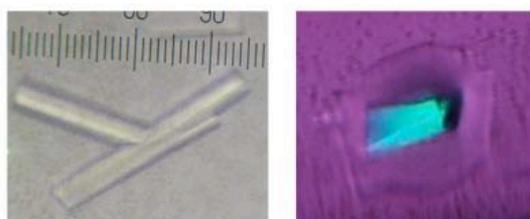


Fig. 8 バンド 3 単体の結晶。(左)蒸気拡散法による結晶、(右)CD 法による結晶

膜タンパク質に適した脂質キュービックフェーズ法についても検討を試みた。既に、我々の研究室でも、いくつかの GPCR において結晶化・構造解析に成功しており、同様な方法をバンド 3 にも応用した。バンド 3/抗体 (Fab) 複合体から結晶が得られているものの、再現性が低いため、精製方法の改善を試みている。バンド 3 単独についても同様に検討しているが、現在のところ結晶は得られていない。これまでに精製したバンド 3 は、外向き型に固定化する阻害剤を使用している。阻害剤の種類を変えることにより、バンド 3 は内向き型に固定化されることも、生化学的な実験により明らかになっており、現在も精製・結晶化を試みている。

今後も、これらの結晶構造を起点として血液の pH 及びイオン恒常性、バンド 3 タンパク質変異で発症する疾患 (溶血性球状赤血球貧血や尿管アジドーシスなど) の発症機序を理解するための土台を築いていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Murai, Y., Masuda, K., Ogasawara, Y., Wang, L., Hashidoko, Y., Hatanaka, Y., Iwata, S., Kobayashi, T., and Hashimoto, M. Synthesis of photoreactive 2-phenethylamine derivatives -

Synthesis of adenosine derivative enabling functional analysis of adenosine receptors by photoaffinity labeling. *Eur. J. Org. Chem.* 2013: 2428-2433 (2013).

2. Haga, K., Kruse, A.C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W.I., Okada, T., *Kobilka, B.K., *Haga, T. and *Kobayashi, T. Structure of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482: 547-551 (2012).
3. Shiroishi, M., Tsujimoto, H., Makyio, H., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shimamura, T., Nomura, N., Haga, T., *Iwata, S. and *Kobayashi, T. Platform for the rapid construction and evaluation of GPCRs for crystallography in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 11: 78 (2012).
4. Shiroishi, M., Kobayashi, T., Ogasawara, S., Tsujimoto, H., Ikeda-Suno, C., Iwata, S. and Shimamura, T. Production of the stable human histamine H1 receptor in *Pichia pastoris* for structural determination. *Methods* 55: 281-286 (2012).
5. Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., Kusano-Arai, O., Weyand, S., Shimamura, T., Nomura, N., Cameron, A.D., Kobayashi, T., Hamakubo, T., Iwata, S. and Murata, T. G protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody. *Nature* 482: 237-240 (2012).
6. Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G.W., *Kobayashi, T., *Stevens, R.C. and *Iwata, S. Structure of the human histamine H₁ receptor complex with doxepin. *Nature* 475: 65-70 (2011).
7. Tokuda, N., Igarashi, K., Shimamura, T., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Ito, K., Sugawara, T., Asada, H., Murata, T., Nomura, N., *Iwata, S. and *Kobayashi, T. Cloning, expression and purification of the anion exchanger 1 homologue from basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Protein Expr. Purif.* 79: 81-87 (2011).
8. Asada, H., Uemura, T., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Shimamura, T., Tsujimoto, H., Ito, K., Sugawara, T., Nakane, T., Nomura, N., Murata, T., Haga, T., *Iwata, S. and *Kobayashi, T. Evaluation of the *Pichia pastoris* expression system for the production of GPCRs for structural analysis. *Microb. Cell Fact.* 10: 24 (2011).
9. Ito, K., Sugawara, T., Koizumi, A., Nakajima, K., Shimizu-Ibuka, A., Shiroishi, M., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shimamura, T., Asada, T., Misaka, T., Iwata, S., *Kobayashi, T. and *Abe, K. Cysteine-to-serine shuffling using a yeast expression system improves protein secretion: case of a nonglycosylated mutant of miracullin, a taste-modifying protein. *Biotech. Lett.* 33: 103-107 (2011).
10. Ito, K., Ito, S., Shimamura, T., Weyand, S., Kawarasaki, Y., Misaka, T., Abe, K., Kobayashi, T., Cameron, A.D., and Iwata S.

Crystal structure of Glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. **J. Molecular Biology** 408: 177-186 (2011).

[学会発表] (計 13 件)

1. Kobayashi, T., Crystallization of human membrane proteins using antibody fragments (Invited Lecture). Protein Island Matsuyama (PIM) International Symposium 2013, Matsuyama, 2013
2. Kobayashi, T., Crystallization of mammalian membrane proteins using antibody fragments (Invited Lecture). 4th International Symposium on Diffraction Structural Biology, Nagoya, 2013
3. Kobayashi, T., Towards Structure Based GPCRs Pharmacology; From Knockout Mice to Crystal Structures (Invited Lecture). Gordon Research Conference, Venture, CA, USA, 2012
4. 小林拓也, 機能性抗体を利用した GPCR の X 線結晶構造解析への試み(シンポジウム)、千里ライフサイエンスセミナー、大阪、2013 年
5. 小林拓也, 「GPCR の構造解析」から創薬は可能か? (教育講演)、持田製薬株式会社、静岡、2013 年
6. 小林拓也, GPCR のシグナル伝達分子機構の解明から創薬に向けて(シンポジウム)、第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013 年
7. 小林拓也, GPCR の X 線結晶構造解析と創薬に必要な GPCR の構造情報について(シンポジウム)、よこはま NMR 構造生物学研究会 第 47 回ワークショップ、横浜、2013 年
8. 小林拓也, GPCR をターゲットにした X 線結晶構造解析の現状と今後の展望(シンポジウム)、2012 年日本神経化学会公開シンポジウム、神戸、2012 年
9. 小林拓也, GPCR をターゲットにした「構造に指南された創薬」を目指すための三つの戦略(教育講演)、構造活性フォーラム 2012、京都、2012 年
10. 小林拓也, G 蛋白共役受容体(GPCR)の X 線結晶構造解析を成功させるための戦略(シンポジウム)、第 85 回日本薬理学会年会、京都、2012 年
11. 小林拓也, ムスカリン性アセチルコリン受容体 M2 サブタイプ of 三次元結晶構造解析に向けた試み(シンポジウム)、第 84 回日本生化学会大会、京都、2011 年
12. 小林拓也, Molecular Basis of Antihistamine Specificity Against Human Histamine H1 Receptor(シンポジウム)、第 84 回日本生化学会大会、京都、2011 年
13. 小林拓也, G 蛋白共役受容体(GPCR)の結晶構造解析に向けた試み(シンポジウム)、第 84 回日本薬理学会年会、横浜、2011 年

[図書] (計 8 件)

1. GPCR の立体構造から解き明かす生命科学、小林拓也、岩田 想、実験医学増刊、発行年 2014 年 6 月、羊土社
2. G 蛋白質共役受容体の X 線結晶構造解析の進歩、小林拓也、血栓と循環 Vol. 21、No. 3、PP. 34-40、発行年 2013 年、メディカルレビュー

社

3. 「膜タンパク質」の重要性とその構造が拓く未来、村田武士、小林拓也、野村紀通、岩田 想、膜タンパク質構造研究 最前線 PP. 1-10、発行年 2013 年、化学同人
4. ムスカリン性アセチルコリン受容体の構造解析から創薬に向けて、小林拓也、膜タンパク質構造研究 最前線 PP. 19-25、発行年 2013 年、化学同人
5. 膜タンパク質の発現と精製 「昆虫細胞による生産」、浅田秀基、小林拓也、膜タンパク質構造研究 最前線 PP. 96-102、発行年 2013 年、化学同人
6. GPCR の X 線結晶構造解析に成功するための技術的進展、小林拓也、岩田 想、実験医学 Vol. 31、No. 3、PP. 358-366、発行年 2013 年 2 月、羊土社
7. ムスカリン受容体の立体構造が明らかに、小林拓也、医学のあゆみ Vol. 243、Nos. 11, 12、PP. 983-984、発行年 2012 年 12 月、医歯薬出版
8. G タンパク共役受容体(GPCR)の三次元結晶構造解析への試み、小林拓也、バイオインダストリー、2011 年 3 月、シーエムシー出版

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: 「抗ヒトバンド 3 モノクローナル抗体」
発明者: 小林拓也、小林貴美、荒川孝俊、日野智也、村田武士、野村紀通、岩田想、浜窪隆雄、岩成宏子、望月康弘、濱崎直孝
権利者: 独立行政法人科学技術振興機構
種類: 特願 2011-246364
出願年月日: 2011 年 11 月 10 日
2. 名称: 「アゴニストの親和性を亢進する抗ヒトアデニン A2a 受容体モノクローナル抗体」
発明者: 小笠原諭、日野智也、島村達郎、荒川孝俊、万木貴美、寿野千代、村田武士、小林拓也、岩田想
権利者: 独立行政法人科学技術振興機構
種類: 特願 2012-49812
出願年月日: 2012 年 3 月 6 日

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://cell.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林拓也 (TAKUYA KOBAYASHI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 20311730

(2) 研究分担者

濱崎直孝 (NAOTAKA HAMASAKI)
長崎国際大学・薬学部・名誉教授
研究者番号: 00091265