

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460038

研究課題名(和文) NMRを用いたエイコサノイド代謝関連膜タンパク質群の動的構造解析

研究課題名(英文) Structural analyses of MAPEG family membrane proteins using NMR

研究代表者

坂倉 正義 (Sakakura, Masayoshi)

横浜市立大学・生命医科学研究科・助教

研究者番号：20334336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脂質に由来する生理活性物質であるエイコサノイドの代謝に関与する3個の膜タンパク質(FLAP, LTC4S, mPGES1)について、酵母を用いたリコンビナントタンパク質の発現・精製・疑似膜環境への再構成手法を確立した。得られたリコンビナントタンパク質について、NMR等の物理化学的手法を用いた性状解析・相互作用解析を行い、FLAPについては、阻害剤結合に伴い構造変化が誘起されることを見出した。本研究においては、膜タンパク質を脂質二重膜中に封入した状態でNMR解析を行う手法など、他の膜タンパク質研究に対しても応用可能な技術も開発した。

研究成果の概要(英文)：Eicosanoids are chemical mediators synthesized from arachidonic acid. Three tetra-span trimeric membrane proteins, FLAP, LTC4S, and mPGES1, are (co)-enzymes involved in this arachidonic acid metabolism, and are thought to be drug targets. To understand molecular mechanisms for these proteins to function, we performed structural analyses of these membrane proteins using NMR. We expressed these proteins by using the yeast *Pichia pastoris* expression system, and found the yield of FLAP is more than 30 times higher than that of the *E. coli* system. We then reconstituted these proteins in detergent micelles and/or nanolipoprotein particles. The NMR interaction study of FLAP and its inhibitor MK-591 revealed that amino acids located more than 10 angstrom apart from the ligand in the crystal structure experienced chemical shift change by the addition of the inhibitor, which suggests the MK-591 binding induces conformational changes around the transmembrane helices of FLAP.

研究分野：構造生物学

キーワード：構造生物学

1. 研究開始当初の背景

(1) エイコサノイドは、脂質に由来する生理活性物質群であり、生体膜から切り出された不飽和脂肪酸であるアラキドン酸(AA)がシクロオキシゲナーゼ(COX)により代謝を受けて生じるプロスタグランジン(PG)類と、5-リポキシゲナーゼ(5-LO)により代謝を受けるロイコトリエン(LT)類に分類される。(2) 抗PG薬としてはアスピリンなどが存在するが、副作用が強いことが知られている。アスピリンなどのCOX阻害薬に対して、PG合成カスケードの下流に存在する酵素、特に発熱・発痛作用を有するPGE₂の合成酵素1(mPGES1)を標的分子とすることにより、より副作用の小さい薬物を創出することが期待できる。

(3) 抗LT薬は、喘息、アレルギー性鼻炎などのアレルギー疾患において有効と考えられるが、抗PG薬と比較して開発が立ち遅れている。LTの生合成は、核膜中のAAが、5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) に結合することにより開始される。FLAPに結合したAAは、可溶性酵素である5-LOに受け渡され、5-LOにおいてLTA₄へと変換される。LTA₄は生合成カスケードの下流に存在する酵素群により、さらに代謝を受けるが、強い気管支収縮作用を有するLTC₄はLTC₄合成酵素(LTC₄S)により合成される。FLAP、LTC₄Sは、いずれも創薬標的分子として重要と考えられている。

(4) FLAP、LTC₄S、mPGES1は、MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione metabolism)スーパーファミリーに属する4回膜貫通タンパク質であり、3量体として存在する。これらのタンパク質の立体構造はすでに決定されているが、基質であるエイコサノイドの結合部位は明らかにされていない。またFLAPについては、その機能を理解する上で、5-LOとの相互作用機構を解明することが必要不可欠であると考えられるが、未だに解析が行われていない。

(5) mPGES1とFLAPについて、分子内部に運動性・構造多型が存在することが示唆されている。これらのタンパク質の運動性は、mPGES1の酵素活性、FLAPのリガンド受け渡しの機能の発現において重要な役割を担うと考えられるが、その詳細は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、3個のMAPEGファミリータンパク質(FLAP、LTC₄S、mPGES1)を標的とした新規薬物デザインを行う上で基盤情報となり得る、高次構造情報・相互作用情報を取得すること、および他の膜タンパク質を対象とした創薬研究にも応用可能なNMR研究手法を開発することを目的とする。具体的な研究目的を以下に示す。

(1) 3個のMAPEGファミリータンパク質(FLAP、LTC₄S、mPGES1)について、NMRを

用いた構造生物学的解析を行うためのサンプル調製方法を確立する。

(2) 各MAPEGファミリータンパク質について、リガンド分子(各種ロイコトリエン、阻害剤、相互作用タンパク質(5-LO))との相互作用解析を行い、相互作用メカニズムを明らかにする。

(3) 各MAPEGファミリータンパク質について、NMRを用いた運動性解析を行い、運動性がタンパク質の機能に対して及ぼす影響を考察する。

3. 研究の方法

(1) 酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いた、各MAPEGファミリータンパク質の発現系を構築し、酵母の膜中に目的タンパク質を発現させる。NMRを用いた構造解析、相互作用解析を行うため、安定同位体標識化合物を含む最小培地中で培養を行う。

(2) 酵母膜に発現したリコンビナントMAPEGファミリータンパク質を可溶化し、精製する。目的膜タンパク質を可溶化する疑似膜環境として、界面活性剤ミセル及びナノリポプロテイン粒子(NLP:またはナノディスク)を用いる。

(3) 500 MHz および 800 MHz の NMR を用いて MAPEG ファミリータンパク質のスペクトルを測定し、性状解析を行う。十分な安定性を有するサンプルについては、リガンドを添加し、スペクトル変化を解析する。

(4) FLAP との相互作用解析を行うために、大腸菌を用いてリコンビナント 5-LO を調製する。

(5) サイズ排除クロマトグラフィーにより、界面活性剤ミセル中および NLP 中に可溶化した FLAP と 5-LO との相互作用解析を行う。

4. 研究成果

(1) FLAP の解析

界面活性剤ミセル中の FLAP の解析
FLAP の発現・精製・性状解析

本研究を開始した段階で、研究代表者らは大腸菌を用いたリコンビナント FLAP 発現系を構築していたが、収量が少なく (< 1 mg / L culture) 膜タンパク質の NMR 解析において必要不可欠となる重水素標識が困難である等の問題点が存在した。そこで、より高い発現量が期待できる酵母 *Pichia pastoris* を用いた FLAP 発現系の構築を行った。ヒト FLAP の遺伝子をタンパク質発現用プラスミド (pPICZB, Invitrogen) に組み込み、酵母 *Pichia pastoris* の KM71H 株に導入した。得られた形質転換株を培養した結果、酵母の膜画分に FLAP が含まれていることが明らかとなった。酵母膜中の FLAP について界面活性剤を用いた可溶化の条件検討を行った結果、DDM(1%)/DOC(0.5%)混合物を用いることにより、効率よく FLAP を可溶化できることを見出した。可溶化した FLAP を Ni²⁺アフィニテ

イークロマトグラフィーにより精製すると同時に、DDM/DOC を NMR 解析により適した界面活性剤である LMPG に置換し、溶出させた。溶出したリコンビナント FLAP の収量は、1 L 培養当たり約 27 mg であり、大腸菌発現系の収量の 30 倍以上であった。

LMPG ミセル中に可溶化した FLAP (FLAP/LMPG) をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により分析した結果、単一の溶出ピークが出現した。また、グルタルアルデヒドによる架橋反応を行った FLAP/LMPG を SDS-PAGE により分析した結果、FLAP に由来するバンドが 3 個出現した。これらのバンドは、FLAP の単量体、2 量体、3 量体に相当すると考えられる。さらに、FLAP/LMPG のネガティブ染色電子顕微鏡像を解析した結果、FLAP/LMPG が、直径約 6 nm の分散した均一な球状粒子として存在していることが明らかとなった。以上の結果から、LMPG ミセル中において FLAP 分子のほとんどが 3 量体として存在していると結論した。

FLAP/LMPG について CD を用いた 2 次構造解析を行った結果、FLAP が、 α ヘリックスを多く含むことが示された。

FLAP の膜貫通領域に存在する残基の構造情報を抽出することを目的として、メチオニン残基のメチル基に ^{13}C を導入したサンプルを調製し、NMR スペクトル (^1H - ^{13}C HSQC) の測定を行った。サンプルの安定性を評価するため、経時的なスペクトル変化を解析した結果、FLAP/LMPG のスペクトルは、12 時間経過しても変化が観測されず、LMPG ミセル中において、FLAP が 12 時間程度安定に存在することが示された。一方、大腸菌発現系を用いて調製した FLAP/LMPG についても同様の解析を行った。この結果、測定開始の 3 時間後に、膜貫通ヘリックス 4 (TMH4) 上に存在する M125 由来シグナルの広幅化が観測され、大腸菌から調製した FLAP の安定性が酵母から調製した FLAP と比較して低いことが示された。可溶化・精製段階において、界面活性剤により除去されない程度に強く FLAP に結合する脂質が酵母膜中に存在し、FLAP の安定化に寄与した可能性が考えられる。このような脂質の候補として、ステロール類などが考えられる。

LMPG と比較してよりマイルド (膜タンパク質の構造に与える影響が小さい) と考えられている DDM ミセル中に可溶化した FLAP (FLAP/DDM) についてもサンプルを調製し、性状解析を行った。グルタルアルデヒドによる架橋反応を行った FLAP/DDM を SDS-PAGE により分析した結果、FLAP/LMPG の場合と比較して、2 量体、3 量体に相当すると考えられるバンドが強く現れ、DDM ミセル中の方が、LMPG と比較して FLAP3 量体の安定性が高いことが示唆された。NMR スペクトルの経時変化については、DDM と LMPG との間で顕著な差は観測されなかった。

MK-591 との相互作用解析

阻害剤である MK-591 との結合が FLAP の構造に対して及ぼす影響を明らかにするため、MK-591 添加に伴う FLAP の NMR スペクトルの変化を解析した。解析プローブとして、測定感度の高い Ile, Met, Val 残基のメチル基を選択した。Ile, Met, Val 残基のメチル基に ^{13}C を導入した FLAP/LMPG を調製し、 ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを測定した結果、Ile, Met, Val 領域において、それぞれ 6, 4, 9 個のシグナルが観測された。これらのうち、Met 由来シグナルは、大腸菌発現系と酵母発現系を用いて、3 個の Met 残基の変異体 (M1A (大腸菌発現系のみ), M89V, M125V) を調製し、LMPG ミセル中における変異型 FLAP の NMR スペクトルを野生型 FLAP のスペクトルと比較することにより帰属した。

FLAP/LMPG に対して MK-591 を添加した結果、M1, M89, M125 の全てについて、僅かな化学シフト変化が観測された。スペクトルの ILV 領域については、MK-591 添加に伴い化学シフトが変化したシグナルが 3 個以上、消失したシグナルが 3 個存在した。

FLAP/DDM について、MK-591 非存在下、存在化の各状態において ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを測定し、両者を比較した結果、FLAP に結合した状態の MK-591 の tert-メチル基に由来するシグナルが観測された (図 1)。本結果は、FLAP/DDM が MK-591 に対する結合活性を有していることを直接的に示すと考えられる。

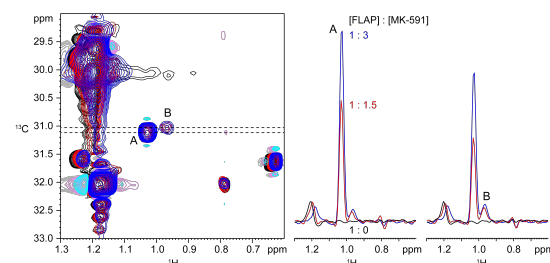


図 1、MK-591 非存在下 (黒) 存在下 (赤および青) の各状態において測定した FLAP/DDM/MK-591 混合サンプルの ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル。

さらに、Ile, Met 残基のメチル基 ^{13}C 標識に加えて重水素標識を行った FLAP を重水素化 DDM ミセルに可溶化したサンプルを調製し、MK-591 添加に伴うスペクトルの変化を解析した。この結果、M125 に由来すると考えられるシグナルが化学シフト変化を示すことが明らかとなった (図 2)。また、Ile 領域においても、MK-591 添加に伴い化学シフトが変化したシグナルが観測された。今後 Ile 領域のスペクトル変化を詳細に解析するためには、変異体等を用いたシグナルの帰属が必要である。

FLAP/LMPG および FLAP/DDM に共通して化学シフト変化が観測された M125 は、FLAP の結晶構造において TMH4 の中央部分に位

置しており、MK-591 からは 10 Å 以上離れている。したがって、MK-591 添加に伴う M125 由来シグナルの化学シフト変化は、MK-591 結合に伴う M125 周辺の構造変化を示唆していると考えられる。

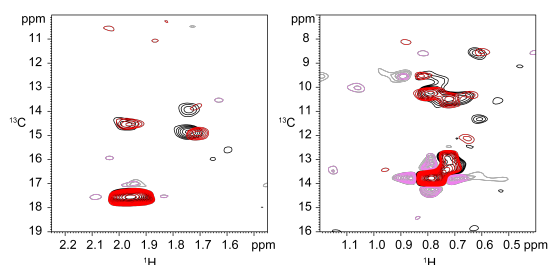


図2、MK-591 非存在下（黒）存在下（赤）の各状態において測定した [Ile-¹³C₃, Met-¹³C₃, u-²H] FLAP / d₂₅-DDM の ¹H-¹³C HSQC スペクトルのメチオニン領域（左）とイソロイシン領域（右）。

ナノリポタンパク質粒子（NLP）を利用した脂質二重膜中の FLAP の解析

FLAP/NLP の調製

界面活性剤ミセルと比較して、より細胞環境に近い、脂質二重膜中において FLAP の解析を行うために、脂質二重膜を可溶性の粒子として取り扱うことが可能な、ナノリポタンパク質粒子（NLP または ナノディスク）中に FLAP を再構成するための条件検討を行った。酵母膜に発現した FLAP を DDM/DOC により可溶化した後、脂質および膜外周タンパク質（MSP1）と混合し、ポリスチレンビーズを用いて界面活性剤を吸着除去することにより NLP を自発的に再構成させた。FLAP が封入された NLP (FLAP/NLP) を、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーおよび SEC により精製した。この結果、約 270 ml 培養分の酵母膜画分から、1.7 mg の FLAP/NLP を得ることに成功した。本調製プロトコルを確立する過程において、MSP1E3D1 を用いた直径約 13 nm の NLP の再構成効率が、MSP1D1 を用いた直径約 10 nm の NLP の形成効率と比較して高いことが明らかとなった。

再構成した FLAP/NLP をネガティブ染色し、電子顕微鏡像を解析した結果、FLAP/NLP が、直径約 13 nm の分散した粒子として存在していることが明らかとなった。

Ile, Met 残基のメチル基に ¹³C を導入した FLAP/NLP を調製し、¹H-¹³C HSQC スペクトルを測定した結果、Ile, Met 領域において、それぞれ 2, 1 個のシグナルが観測された。本スペクトルを、FLAP/LMPG について得られたスペクトルと比較した結果、FLAP/NLP の Met 領域のシグナルが M125 に由来することが示唆された。一方、Ile 領域に観測された 2 個のシグナルは、膜外に位置する、C 末端の構造非形成領域の Ile に由来すると考えられる。

MK-591 との相互作用解析

FLAP/NLP に対して MK-591 を添加した結果、M125 に由来すると予想されるシグナルについて、強度減少が観測された（図3）。また、膜外に存在する Ile に由来すると考えられるシグナルについては変化が観測されなかった。これらの結果は、FLAP/NLP が MK-591 に対する結合活性を有していることを示唆すると考えた。

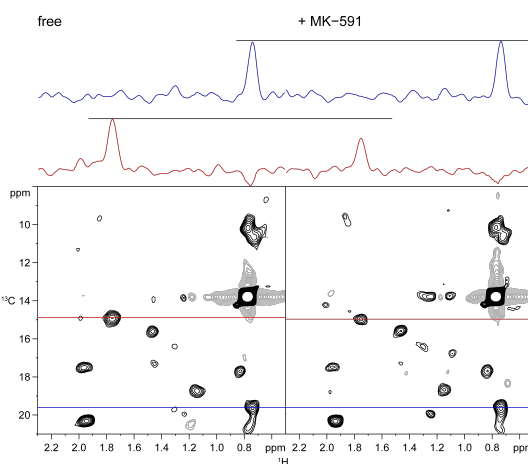


図3、MK-591 非存在下（左）および存在下（右）において測定した FLAP/NLP の ¹H-¹³C HSQC スペクトルの比較。

5-LO との相互作用解析

ヒト 5-LO については、これまでに結晶構造が報告されており、この結晶構造解析において用いられている水溶性を向上させた可溶性 5-LO 変異体 (s-5-LO) の調製を試みた。S-5-LO 遺伝子を含むプラスミドを大腸菌に導入した後、IPTG を加えずに培養を行うことにより、正しい立体構造を形成した s-5-LO を発現させた。大腸菌の可溶性画分中に発現した s-5-LO を、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーおよび SEC により精製した。

精製した s-5-LO と FLAP/NLP を 1:1 および 5:1 のモル比で混合し、それぞれ SEC による分析を行った。しかし、s-5-LO-FLAP/NLP 複合体に由来すると考えられる溶出ピークは出現せず、両者の相互作用は観測されなかった。

s-5-LO と FLAP/NLP の相互作用が観測されなかった要因の一つとして、s-5-LO では、水溶性を向上させるために、5-LO と脂質膜との相互作用形成に重要であると考えられている疎水性残基が親水性残基に置換されていることが考えられた。そこで、これらの疎水性残基を再導入した野生型 5-LO (w-5-LO) の発現系を構築し、大腸菌による発現・精製を試みた。この結果、w-5-LO は水溶性が低く、精製を行うためには、界面活性剤 (DDM) を共存させる必要があることが明らかとなった。

DDM 存在下において精製した w-5-LO を、Ca²⁺非存在下および存在下の各条件において、FLAP を含まない NLP と混合し、SEC により分析した。NLP の溶出フラクションを

SDS-PAGE により分析した結果、MSP に加えて w-5-LO のバンドが検出された。Ca²⁺ 存在下において混合したサンプルにおいて、より強い w-5-LO 由来バンドが観測されたことから、w-5-LO と脂質膜の Ca²⁺ 依存的な結合が観測されたと考えた。次に、Ca²⁺ 存在下において、w-5-LO と FLAP/NLP を混合し、SEC により分析した。FLAP/NLP の溶出フラクションに含まれる成分を SDS-PAGE により分析した結果、FLAP、MSP に加えて w-5-LO のバンドが検出された。しかし、w-5-LO のバンド強度は、コントロール実験において FLAP を含まない NLP と共に溶出した w-5-LO と同等であり、FLAP と w-5-LO の特異的な相互作用の有無についてはさらなる検証が必要であると結論した。

(2) LTC₄S の解析

LTC₄S の遺伝子を導入した酵母 *Pichia pastoris*/KM71H 株をファーマンタを用いて培養し、菌体の膜画分中に含まれる LTC₄S について界面活性剤を用いた可溶性の条件検討を行った。この結果、DPC を用いた場合に最も効率よく目的タンパク質が可溶化されることが明らかとなった。DPC を用いて可溶化した LTC₄S を Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーにより精製し、溶出液を SDS-PAGE により分析した結果、3 個のバンドが出現した。これらのバンドは、LTC₄S の単量体、2 量体、3 量体に相当すると考えられ、SDS を含む溶液中においても 2 量体・3 量体由来バンドが出現することから、FLAP と比較してサブユニット間の相互作用が強いことが示唆された。

DPC ミセル中に可溶化した LTC₄S (LTC₄S/DPC) について CD スペクトルを測定した結果、αヘリックスを含むタンパク質に特徴的なスペクトルパターンが得られ、リコンビナント LTC₄S が αヘリックス構造を形成していることが示された。サイズ排除クロマトグラフィーにより LTC₄S/DPC の見かけの分子サイズを解析した結果、分子量 44K のマーカータンパク質と同じ溶出体積であることが示された。この結果は、上記 SDS-PAGE の結果と異なり、DPC ミセル中の LTC₄S の多くが単量体もしくは 2 量体として存在し、3 量体を形成している分子は少ないことを示唆する。

¹⁵N 標識を行った LTC₄S/DPC を調製し、¹H-¹⁵N TROSY スペクトルを測定した。得られたスペクトル上には、膜外の構造非形成領域のアミノ酸残基に由来すると考えられる約 20 個のシグナルのみが出現し、今後詳細な NMR 解析を行うためには、リコンビナントタンパク質の発現量・収量を増加させ、NMR サンプル濃度を上昇させることが必要不可欠であると考えた。

(3) mPGES1 の解析

酵母 *Pichia pastoris*/X33 株の膜画分中に発

現させた mPGES1 を DDM(1%)/DOC(0.5%)を用いて可溶化し、FLAP の場合と同様にして NLP に再構成した。Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより mPGES1 が導入された NLP (mPGES1/NLP) を精製した。

mPGES1/NLP と、mPGES1 の基質であるグルタチオンを 1:10 のモル比で混合し、飽和移動差スペクトル (STD) 法を用いた、相互作用解析を行った。しかし、mPGES1/NLP の選択的飽和に伴うグルタチオン由来シグナルの強度減少は観測されず、両者の結合を確認することができなかった。この理由として mPGES1 が精製段階で失活している可能性と、これとは逆に、脂質中に埋め込まれた mPGES1 とグルタチオンの親和性が、界面活性剤ミセル中の親和性 (K_d = 0.7 mM ; Thoren, JBC, 2003) よりも高く、STD 法の検出限界を超えた可能性が考えられる。今後、グルタチオンカラムに対する吸着実験等、他の手法で活性評価を行う必要がある。

(4) 研究の総括

本研究において、3 個の MAPEG ファミリータンパク質について、それぞれ酵母 *Pichia pastoris* を用いたリコンビナントタンパク質発現系を構築し、FLAP に関して、従来までに報告されていた大腸菌発現系をはるかに上回る収率でリコンビナントタンパク質を得ることに成功した。本成果は、ヒト膜タンパク質の構造生物学研究における酵母発現系の有用性を示す一例として位置づけられる。

本研究においては、NLP を活用することにより、脂質二重膜中における FLAP の構造情報を取得することに成功した。また、mPGES1 についても NLP に封入したサンプルの調製に成功した。近年、生体において機能している膜タンパク質の情報を取得するためには、従来まで用いられてきた界面活性剤ミセルではなく、脂質二重膜中において膜タンパク質を解析する必要があるとの指摘がなされており、本研究において確立した FLAP/NLP, mPGES1/NLP の調製手法は、今後これらのタンパク質の機能解析を推進するための有用な研究ツールとなり得る。

NMR を用いた相互作用解析の結果、阻害剤である MK-591 の結合に伴い、FLAP に構造変化が誘起されることが示唆された。化学シフト変化が観測された M125 は FLAP の TMH4 上に位置しているが、このヘリックスは結晶中において、疎水部の多くが膜外に突き出した不安定な状態で存在している。本研究により得られた情報は、TMH4 が、リガンドとの相互作用により移動する可能性を示唆しており、このような構造変化が、FLAP から 5-LO へのアラキドン酸の輸送に重要な役割を果たす可能性がある。これまでに報告されている FLAP の結晶構造解析においては、リガンドとの相互作用に伴う FLAP の構造変

化については情報が得られておらず、本研究により FLAP の機能を理解する上において重要な知見が加えられたと考えた。

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 0 件)

[学会発表](計 9 件)

森雅樹、坂倉正義、鈴木里佳、伏見威俊、高橋栄夫、NMR を用いたヒト膜タンパク質 FLAP の物理化学的性状解析、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日～27 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

坂倉正義、鈴木里佳、森雅樹、藤井萌、高橋栄夫、酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いて調製した安定同位体標識ヒト膜タンパク質の NMR 解析、第 55 回 NMR 討論会、2016 年 11 月 16 日～18 日、広島国際会議場(広島県広島市)

R. Suzuki, M. Sakakura, M. Fujii, M. Mori, H. Takahashi, Methyl-selective isotope labeling strategy using the yeast *Pichia pastoris*, XXVth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 京都国際会館(京都府京都市)
真嶋健大、坂倉正義、藤井萌、三尾和弘、高橋栄夫、NMR を用いた脂質二重膜中におけるヒト膜タンパク質 C99 の解析、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 26 日～29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

鈴木里佳、坂倉正義、太田修平、伏見威俊、高橋栄夫、NMR 解析を指向した酵母発現系による安定同位体標識ヒト膜タンパク質の調製、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

坂倉正義、真嶋健大、藤井萌、太田修平、小池賢一郎、高橋栄夫、NMR を用いた脂質二重膜中におけるヒト膜タンパク質の解析、第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

鈴木里佳、坂倉正義、伏見威俊、小池賢一郎、高橋栄夫、NMR 解析を指向した酵母発現系による安定同位体標識ヒト膜タンパク質試料の調製、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 25 日～28 日、神戸サンボホール(兵庫県神戸市)

坂倉正義、伏見威俊、小池賢一郎、鈴木里佳、山田有紗、高橋栄夫、NMR 構造解析に向けたヒト膜タンパク質の酵母発現系の構築、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日～27 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

坂倉正義、伏見威俊、小池賢一郎、高橋

栄夫、NMR 解析を指向したヒト膜タンパク質の酵母発現系の構築、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 25 日～27 日、横浜産貿ホール(神奈川県横浜市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ

<http://www.tsurumi.yokohama-cu.ac.jp/fsb/takahashi/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂倉 正義 (SAKAKURA, Masayoshi)

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・助教

研究者番号：20334336

(2)研究分担者

高橋 栄夫 (TAKAHASHI, Hideo)

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・教授

研究者番号：60265717

(3)連携研究者

該当者なし

(4)研究協力者

藤井 萌 (FUJII, Moe)

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・技術補助員

伏見 威俊 (FUSHIMI, Taketoshi)

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・大学院生

小池 賢一郎 (KOIKE, Kenichiro)

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・大学院生

鈴木 里佳 (SUZUKI, Rika)

横浜市立大学・大学院生命医科学研究科・大学院生