

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04340

研究課題名(和文) ヒト由来膜タンパク質の機能構造解明に向けたNMRアプローチ

研究課題名(英文) NMR approach for the functional structural analyses of human membrane proteins

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々は、ヒト由来膜タンパク質などの高分子量タンパク質を対象とした、NMR法による機能構造解析を可能とする、酵母*P. pastoris*発現系を利用したメチル基選択的なラベル技術を確立することに成功した。さらに、脂質二重膜中における膜タンパク質の機能構造解析を行うために、膜タンパク質をナノリポタンパク質粒子に再構成する手法を確立し、異なる脂質中におけるヒト由来膜タンパク質の動的特性の相違をNMR法により観測することが可能となった。本研究により確立したアプローチは、NMRによるヒト膜タンパク質の機能構造解明に広く活用できるものであると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a novel and cost-effective strategy for *P. pastoris* expression systems to selectively incorporate ^{13}C into methyl groups of Val and Leu by using the alpha-ketoacid precursor. Methyl-specific isotopically-labeled samples are quite pivotal for investigating the structures and interactions of large macromolecules such as membrane proteins by solution NMR. We further established an experimental procedure to prepare NLP-reconstituted human membrane protein (C99) which allows analyzing membrane proteins in lipid bilayer membranes by solution NMR. Our NMR analysis revealed that the lipid composition in the bilayer remarkably influences structure and dynamics of the transmembrane helix region.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR 膜タンパク質 酵母

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の X 線結晶構造解析技術の進展により、可溶性タンパク質に比べ立体構造解析が遅れていた膜タンパク質複合体についても、その構造生物学的知見が数多く得られるようになってきている。しかしながら、実際に機能する膜タンパク質は決して静的なものではなく、リガンド結合などに伴い、大きく構造変換したり、構造平衡をシフトしてその活性を制御していることも知られてきた。このような構造変化が誘起されるのは、膜タンパク質のもつ可動性・柔軟性が関係している。したがって、膜タンパク質の真の姿を知るためには静的な構造のみならず、その局所的なダイナミクスも含めた、膜タンパク質が機能するための構造情報 = 「機能構造」情報を得ることが重要になる。そのような「機能構造」は、膜タンパク質を取り巻く環境(可溶化に用いられる界面活性剤の種類、あるいは脂質二重膜の組成、等)によっても変化することが予想されることから、様々な条件下で機能発現の鍵となる構造的因子を解明していく必要がある。

(2) NMR 法は、上述のダイナミクスも考慮したタンパク質の「機能構造」を解明するのに適した解析手法である。しかしながら、NMR による膜タンパク質の立体構造決定が報告された例は、大腸菌膜画分への発現が可能な微生物由来のもの、大腸菌で不溶性画分に発現されるガリフォールディングが可能なもの、が大部分である。創薬の主要な標的となるヒト由来膜タンパク質に関しては、未だ汎用的に NMR 解析が行えるとは言い難い状況にある。

(3) これに対し、ロバストな真核細胞である酵母発現系は、GPCR などのヒト由来膜タンパク質の膜画分への発現、および X 線結晶構造解析による立体構造決定に成功した例が複数報告されている (Shimamura et al., *Nature*, 2011 等)。これまでに我々は、酵母 *K. lactis* 発現系を用い、二重 (^{13}C , ^{15}N) ラベルタンパク質を低コストで調製するシステムを開発するとともに (Sugiki et al., *Meth. Mol. Biol.*, 2012)、メチル選択的ラベル試料調製法の検討を進めるとともに、アミノ酸代謝系に関する知見も得てきた (Miyazawa et al., *J. Biomol. NMR*, 2013)。これらの知見をもとに、ヒト由来膜タンパク質発現等に実績があり、より汎用的に利用されている酵母発現系である *P. pastoris* を用いた発現、安定同位体ラベル試料調製法の開拓に取り組む基盤が整いつつあった。

(4) 一方で、発現したヒト由来膜タンパク質の機能構造を解明する目的で溶液 NMR 解析を行うためには、疎水性の高い膜タンパク質を可溶化する必要がある。多くの場合、疑似膜環境である各種界面活性剤ミセルを用

いて可溶化した粒子を解析対象とするが、このような膜タンパク質 - 界面活性剤複合体の構造が、脂質二重膜中における膜タンパク質の本来の構造とは異なると指摘する報告も存在する (Zhou et al., *Annu. Rev. Biophys.*, 2013)。これに対し、Sliger らは、コレステロール輸送に関係するアポリポタンパク質 A-1 の改変体タンパク質を活用することで、脂質二重膜を溶液中において可溶性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 (Nano-lipoprotein particle: NLP / 通称 Nanodisc) を報告している (Ritchie et al., *Meth. Enzymol.*, 2009)。NLP を活用することで、脂質二重膜中におけるヒト由来膜タンパク質の動態、機能構造の解明に向けた方向性が拓けてきている。

2. 研究の目的

(1) ヒト由来膜タンパク質を含む高分子量タンパク質の機能構造解析を可能とする、NMR 試料調製系の確立。特に、真核細胞由来タンパク質の発現系の実績があるとともに、重水培養等も可能なロバストな発現系である、酵母 *P. pastoris* 発現系を活用した安定同位体ラベル技術を確立する。

(2) 脂質二重膜環境におけるヒト由来膜タンパク質の溶液 NMR 解析を実施するため、NLP に再構成した試料調製法を確立する。膜タンパク質に対する膜周辺環境の影響を解明する目的で、異なる脂質組成の NLP に再構成したヒト由来膜タンパク質を調製し、NMR による動的構造情報を取得する。

3. 研究の方法

(1) 高分子量タンパク質の NMR 解析に適応する安定同位体ラベル技術開発：大腸菌発現系で汎用されている、高感度なメチル選択的 ^{13}C ラベル法は、膜タンパク質等、高分子量タンパク質の NMR 解析に有効な手法であることから、酵母 *P. pastoris* 発現系において活用できるような培養戦略を確立する。ラベル技術の有効性については、NMR スペクトルの良否のみならず、質量分析により、発現タンパク質のラベル化率を定量化することにより行う。

(2) NMR による NLP に再構成したヒト由来膜タンパク質 C99 の調製とその構造特性の解析：異なる鎖長の PC、PG 系の混合脂質、界面活性剤、膜タンパク質 (^2H , ^{15}N) C99 または [Met- ^{13}C] ^3H C99) を混合し、NLP の調製を行う。各種クロマトグラフィーにより C99 が組み込まれた NLP を単離・精製する。膜タンパク質を含む NLP を高収率で得るために、脂質、界面活性剤、膜タンパク質の量比の検討を行う。調製した NLP 試料の NMR 測定には、Bruker 社 AvanceIII-500 / 800 を用いた。

4. 研究成果

(1) 酵母 *P. pastoris* 発現系を活用した Val/Leu 選択的 ^{13}C ラベル技術の確立

大腸菌発現系においてこれまでに開拓されてきた膜タンパク質等、高分子量タンパク質の NMR 構造解析に適応したラベル技術のうち、もっとも高感度で NMR 解析を行える、メチル基選択的 ^{13}C ラベル法に注力することとした。特にラベル化アミノ酸前駆体 (α -ケト酸)を用いた Ile, Leu, Val-選択的 ^{13}C ラベル技術は、重水素ラベル法と併用することで、分子量数十万におよぶ高分子量タンパク質の NMR 解析を行ってきた多くの実績がある。酵母 *P. pastoris* 発現系においては、Ile の前駆体である α -ketobutyrate を用いるアプローチについては、大腸菌発現系と同様な標的タンパク質のラベルが可能であったが (Clark et al., *J. Biomol. NMR*, 2015)、Val/Leu のメチル基選択的ラベルに関して成功した例はなかった。我々は、大腸菌発現系と同等な多様な解析を可能にするため、Val/Leu 選択的 ^{13}C ラベル技術の確立を目指した。

前駆体 α -ketoisovalerate の細胞内取り込みの検証：酵母 *P. pastoris* 培養液中における、Val/Leu 残基の前駆体である α -ketoisovalerate の細胞内の残存量を調べたところ、通常の培養条件では、培養中にほとんど前駆体量が減少していないことが明らかとなった。酵母細胞における Val/Leu 残基のラベル化率が低いのは、前駆体が細胞内に取り込まれていないことが原因であると考えられた。培養条件の検討を行ったところ、培地の pH が低い (~3.5 程度) 条件であれば、培地中の α -ketoisovalerate が減少する、すなわち細胞内に取り込まれることが示唆された。

質量分析によるラベル化率の検証および NMR 測定： β -ラクトグロブリン (β -LG) を発現する酵母 *P. pastoris* 細胞 (KM71H 株) を用い、低 pH 培養条件における ^{13}C ラベル化前駆体によるラベル化率の検証を行った。発現した β -LG を精製後、還元アルキル化・リシルエンドペプチダーゼ処理した試料を用い、MALDI-TOF-MS 解析による同位体シフトパターンからラベル化率を算出した結果、Val/Leu 残基のメチル基の ^{13}C ラベル化率は、74% (Val) / 10% (Leu) となることが判明した。本培養法によりラベル化した β -LG の NMR 測定を行ったところ、Val/Leu- ^{13}C 領域、特に Val- ^{13}C 領域に強いシグナルが観測されたことから、これまで不可能とされてきた Val/Leu 残基のメチル基選択的 ^{13}C ラベル試料調製、およびその NMR 構造解析が可能であることが示された。本アプローチを X33 細胞株にも適用したところ、そのラベル化効率が、68% (Val) / 28% (Leu) であったことから、異なるタイプの *P. pastoris* 発現系にも適用可能であることも示された (図 1)。

高収量に向けた培養方法への改良：酵母 *P. pastoris* 細胞は、低 pH 条件でも生育可能であり、そのメチル前駆体の取り込みは向上するが、発現タンパク質 β -LG の収量は半程

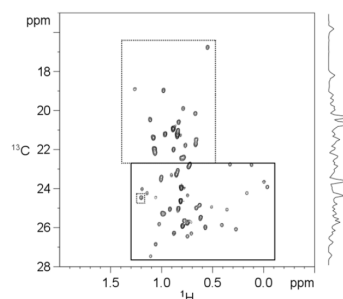


図 1 : ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of [Val/Leu- ^{13}C] β -LG expressed using the yeast *P. pastoris* and medium with 100 mg/L [4- ^{13}C , 3,4',4',4'- $^2\text{H}_4$] α -ketoisovalerate.

度まで減少することも明らかとなった。これは、低 pH 条件におけるリコンビナントタンパク質合成系の活性低下、 β -LG の安定性低下等が要因と考えられ、他のリコンビナントタンパク質発現を行う際にも、同様な収量低下が起こる可能性がある。そこで、前駆体取り込みは低 pH 条件で行い、その後のタンパク質発現誘導時の pH を中性付近で行うという、2 ステップの培養法を試みたところ、 β -LG はこれまでと同様の収量で得ることができた。本培養法を実施した際のラベル化率は、57% (Val) / 14% (Leu) であった。2 ステップ培養とすることで、低 pH 培養と比較しラベル化率はやや低下したものの、発現タンパク質量は増大したことから、絶対的なスペクトル感度としては 70% 程度の増加が見込めることになる。

Val 選択的 ^{13}C ラベル法の開発：前駆体 α -ketoisovalerate を用いたラベル法では、ラベル率に違いはあるものの、Val と Leu 両残基とも ^{13}C ラベルされる。膜タンパク質の膜貫通領域には、Val/Leu 残基が多数含まれるため、Val 選択的なラベルができれば、得られる NMR スペクトルが簡略化されることが期待できる。そこで、前駆体を含む培地に、非標識 Leu を添加することで、Leu 残基由来のシグナルの抑制を試みた。低 pH での前駆体取り込み期の培養後、200mg/L の非標識 Leu を含む pH6.0 の培地に交換し、発現誘導を行った。得られた β -LG のスペクトルにおいて、 β -LG に含まれる 10 個の Val 残基に対応すると考えられる 18 個のシグナルが観測された (図 2)。質量分析を行った結果、Val メチル基のラベル化率が 56% であるのに対し、Leu

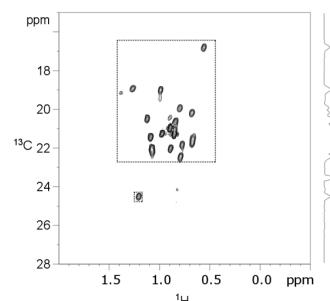


図 2 : ^1H - ^{13}C HSQC spectrum of β -LG expressed by the modified labeling scheme with the optional supplementation of unlabeled Leu.

のラベル化率は 1%以下であったことから、Val 選択的 $^{13}\text{CH}_3$ ラベル法が確立できたと結論した。

本研究で開発した手法により、これまでに酵母 *P. pastoris* 発現系を用いた場合、Ile 残基にのみ導入できた $^{13}\text{CH}_3$ ラベルが、Val/Leu 残基についても導入可能となった。Val/Leu 残基は、膜タンパク質の膜貫通ヘリックスの構成残基の約 24%を占めることが知られている (Liu et al., *Genome Biol.* 2002)。従って本安定同位体ラベル技術の開発により、NMR 法を用いたヒト由来膜タンパク質の機能構造解析における *P. pastoris* 発現系の有用性が高まったと考える。(本成果については論文投稿し、現在印刷中)

(2) 溶液 NMR による脂質二重膜中におけるヒト由来膜タンパク質の機能構造解析

本研究では、 γ -セクレターゼの基質であり、アミロイド β ($\text{A}\beta$) の前駆体であるヒト一回膜貫通型タンパク質 C99 を対象とし、脂質二重膜環境の相違が膜タンパク質の動態に与える影響について解析した。

C99 を組み込んだ NLP の調製: C99 の遺伝子を含む pET21a プラスミドを大腸菌 BL21(DE3)に形質転換し、 ^2H , ^{15}N により均一標識した C99 (^{2}H , ^{15}N C99) または Met 残基のメチル基を選択的に ^{13}C ラベルした C99 ($[\text{Met-}^{13}\text{CH}_3]\text{C99}$) を既報 (Barrett et al., *Science*, 2012) を参考にして調製した。調製した C99 を、界面活性剤で可溶化した混合脂質 (DMPC/DMPG=4/1、POPC/POPG=4/1) および Membrane Scaffold Protein (MSP1D1) とともに混合し、透析により界面活性剤を除去することにより、自発的に NLP を形成させた。 Ni^{2+} -アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーによって、C99 が組み込まれた NLP (C99/NLP) を精製した。

調製した C99/NLP の溶液中における存在状態を明らかにするために、電子顕微鏡による単粒子解析を行った。その結果、POPC/POPG=4/1 を用いて調製した C99/NLP は、溶液中において直径約 10nm の均一な円盤状の粒子として分散して存在していることが証明された (電顕測定に関しては、産総研・三尾和弘先生に御協力いただいた)。

また、C99 が膜中において二量体を形成し得る報告もあることから、調製した NLP 中における C99 の存在様式を解明するため、化学架橋実験を行った。0~1.5mM のグルタルアルデヒドにより架橋反応を行い、SDS-PAGE による検出を行った結果、グルタルアルデヒド濃度増加に伴う二量体形成を示唆するバンドは観測されなかった。この結果、現状の最適化した NLP 調製条件では、ほとんどの C99 分子は単量体として存在していることが示された。

C99 を組み込んだ NLP の NMR 解析: ^{2}H , ^{15}N C99/NLP について、 ^1H - ^{15}N CRINEPT-HMQC 測定を行った結果、複数のシグナルが

観測されたが、膜貫通ヘリックス (TMH) に由来するシグナルが観測されていないことが明らかとなった。C 末端側細胞内領域を欠損した C99 を用いて NLP を調製したところ、TMH 由来のシグナルも観測されるようになったことから、C99 の細胞内領域は TMH あるいは MSP と何らかの相互作用を行っており、野生型 C99 の TMH 由来の ^1H - ^{15}N 相関シグナルは、その影響を鋭敏に反映したため広幅化したことが示唆された。

一方、 $[\text{Met-}^{13}\text{CH}_3]\text{C99/NLP}$ の ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルを解析したところ、C99 に存在する 5 個の Met 残基に由来すると考えられる 5 個の NMR シグナルが観測された。メチル基検出による NMR 解析は、NLP に再構成した膜タンパク質においても高感度なシグナル検出が可能であることが示された。NMR シグナルの帰属については、各 Met を Ala に置換した改変体を含む NLP 試料を調製し、その NMR スペクトルを野生型のスペクトルと比較することで行った。

脂質の組成が膜タンパク質の構造に与える影響を明らかにすることを目的として、3 種類の混合脂質 (DPPC、DMPC/DMPG(4/1)、POPC/POPG(4/1)) を用いて NLP を調製し、20、37、45 の温度条件下において NMR 測定を行った。POPC/POPG(4/1)中の C99 では、20~45 の温度域において、シグナルの変化はほとんど観測されなかった。これに対し、DMPC/DMPG(4/1)および DPPC 中の C99 については、C99 の膜貫通ヘリックス上に存在する Met706 のシグナルが、温度低下に伴い顕著に広幅化する現象が観測された。また、37 および 45 では、異なる脂質中の Met706 のメチル基由来シグナルについて、化学シフトの違いが観測された。この Met706 のメチル基由来シグナルの線幅の温度依存性は、C99 の周囲の脂質が、相転移温度が -2 と報告されている POPC/POPG 含有 NLP の場合には観測されず、相転移温度がそれぞれ 24、41 の DMPC/DMPG、DPPC の場合に観測されたことから、周囲の脂質のゲル層と液晶相の相転移を反映していることが考えられる。脂質が液晶状態で存在している相転移温度よりも高い温度域では、脂質の流動性が高いため、Met706 のメチル基周辺の化学環境は平均化され、先鋭化されたシグナルが観測されたと考えられる。一方、脂質がゲル状態で存在している相転移温度よりも低い温度域では、脂質の流動性が低下してメチル基周辺の化学環境が十分に平均化されず、シグナルが広幅化したと想定される。この結果は、溶液中における膜タンパク質の運動性が脂質二重膜の運動性と連動していることを直接的に示したものであり、将来的に膜タンパク質の機能構造解明に関する研究を進めていくうえで重要な知見になると考える。

^{15}N 核観測 TROSY 測定法による NMR 解析: 研究分担者が開発した ^{15}N 核観測 TROSY アプローチが、高分子量タンパク質

の主鎖アミド基検出において有効であることが示されたことから (Takeuchi et al., *J. Biomol. NMR*, 2015) NLP に再構成した膜タンパク質試料 (C99/NLP) に対する適用を行った。¹⁵N 核観測 TROSY においては、タンパク質試料の重水素化をしなくても高感度の検出が可能であるという特長があることから、非重水素化 [¹H, ¹⁵N]C99/NLP 試料を調製し、通常の ¹H 核観測 TROSY 法と ¹⁵N 核観測 TROSY 法の比較を行った。その結果、¹⁵N 核観測法では、¹H 核観測では検出が困難な TMH 由来のシグナルをより高感度に検出できることが判明した。¹⁵N 核観測 TROSY 測定法により、これまで検出が容易ではなかった NLP に再構成した膜タンパク質の TMH 由来主鎖アミド基の NMR シグナルが検出できたことから、メチル基を活用した NMR 解析に加え、主鎖アミド基からの構造・ダイナミクスの情報をもとにした膜タンパク質の機能構造解析への道が拓かれた。

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 11 件)

- (1) Y. Mizukoshi, K. Takeuchi, M. Arutaki, T. Takizawa, H. Hanzawa, H. Takahashi, and I. Shimada, "Suppression of problematic compound oligomerization by cosolubilization of nondetergent sulfobetaines", *ChemMedChem*, **10**, 736-741 (2015)
- (2) 高橋栄夫, "創薬研究への応用を指向した NMR 相互作用解析技術", *Bulletin of the Nuclear Magnetic Resonance Society of Japan*, **6**, 23-30 (2015)
- (3) K. Takeuchi, H. Arthanari, I. Shimada, and G. Wagner, "Nitrogen detected TROSY at high field yields high resolution and sensitivity for protein NMR", *J. Biomol NMR*, **63**, 323-331 (2015)
- (4) S. Kiyonaka, R. Kubota, Y. Michibata, M. Sakakura, H. Takahashi, T. Numata, R. Inoue, M. Yuzaki, and I. Hamachi, "Allosteric activation of membrane-bound glutamate receptors using coordination chemistry within living cells", *Nature Chemistry*, **8**, 958-967 (2016)
- (5) K. Takeuchi, H. Arthanari, M. Imai, G. Wagner, and I. Shimada, "Nitrogen-detected TROSY yields comparable sensitivity to protein-detected TROSY for non-deuterated, large proteins under physiological salt conditions", *J. Biomol. NMR*, **64**, 143-151 (2016)
- (6) K. Takeuchi, H. Arthanari, and G. Wagner, "Revisiting the field dependence of TROSY sensitivity", *J. Biomol NMR*, **66**, 221-225 (2016)
- (7) K. Takeuchi, M. Senda, Y. H. Lo, S. Kofuji, Y. Ikeda, A. T. Sasaki, and T. Senda, "Structural reverse genetics study of the PI5P4K β -nucleotide complexes reveals the presence of the GTP bioenergetics system in mammalian cells", *FEBS J.*, **283**, 3556-3652 (2016)

- (8) M. Sakakura, M. Tamura, N. Fujii, T. Takeuchi, T. Hatanaka, S. Kishimoto, Y. Arata, and H. Takahashi, "Structural mechanism for the S-nitrosylation-derived protection of mouse galectin-2 from oxidation-induced inactivation revealed by NMR", *FEBS J.*, **285**, 1129-1145 (2018)
- (9) S. Robson, K. Takeuchi, A. Boeszoermyeni, P. Coote, A. Dubey, S. Hyberts, G. Wagner, and H. Arthanari, "Mixed pyruvate labeling enables backbone resonance assignment of large proteins using a single experiment", *Nat. Commun.*, **9**, 356 (2018)
- (10) S. Chhabra, P. Fischer, K. Takeuchi, A. Dubey, J. J. Ziarek, A. Boeszoermyeni, D. Mathieu, W. Bermel, N. E. Davey, G. Wagner, and H. Arthanari, "¹⁵N detection harnesses the slow relaxation property of nitrogen: Delivering enhanced resolution for intrinsically disordered proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 1710-1719 (2018)
- (11) R. Suzuki, M. Sakakura, M. Mori, M. Fujii, S. Akashi, and H. Takahashi, "Methyl-selective isotope labeling using α -ketoisovalerate for the yeast *Pichia pastoris* recombinant protein expression system", *J. Biomol. NMR*, in press.

[学会発表](計 25 件)

- (1) 高橋栄夫, "創薬研究における NMR の活用", 第 33 回メディスナルケミストリーシンポジウム, 2015 年 11 月 27 日, 千葉
- (2) 竹内恒, "高分解能, 高感度な ¹⁵N 窒素核観測を可能にする高磁場 TROSY 測定", 第 54 回 NMR 討論会, 2015 年 11 月 6 日, 千葉
- (3) 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・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 1 日, 神戸
- (4) 鈴木里佳, 坂倉正義, 太田修平, 伏見威俊, 高橋栄夫, "NMR 構造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", 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 1 日, 神戸
- (5) H. Takahashi, "NMR approach for biomedical application", Pacificchem 2015 Biomolecular Structure and Dynamics: Recent Advances in NMR, 2015 年 12 月 18 日, Hawaii, USA
- (6) 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, 横浜
- (7) 鈴木里佳, 坂倉正義, 藤井萌, 森雅樹, 高橋栄夫, "NMR 解析を指向した酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いた安定同位体標識試料の調製", 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016 年 6 月 8 日, 福岡
- (8) 高橋栄夫, "NMR による分子間相互作用解

析 Screening and beyond”, 平成 28 年度日本分光学会 NMR 分光部会集中講義, 2016 年 9 月 14 日, 東京

(9)K. Takeuchi, Y. Tokunaga, M. Imai, H. Takahashi, and I Shimada, “Dynamic multidrug recognition and transcriptional regulation by a multidrug transcriptional repressor LmrR”, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological System, 2016 年 8 月 22 日, Kyoto

(10)M. Sakakura, T. Mashima, M. Fujii, K. Mio, C. R. Sanders, and H. Takahashi, “NMR analyses of human transmembrane protein C99 in lipid bilayers”, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological System, 2016 年 8 月 23 日, Kyoto

(11)R. Suzuki, M. Sakakura, and H. Takahashi, “Methyl-selective isotope labeling strategy using the yeast *Pichia pastoris*”, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological System, 2016 年 8 月 25 日, Kyoto

(12)H. Takahashi, “Isotope labeling strategies for the study of large proteins using yeast expression systems”, The 5th International Symposium on Drug Discovery and Design, 2016 年 8 月 30 日, Yokohama

(13)真嶋健大, 坂倉正義, 藤井萌, 三尾和弘, Charles R. Sanders, 高橋栄夫, “NMR を用いた脂質二重膜における 1 回膜貫通型タンパク質 C99 の構造解析”, 第 55 回 NMR 討論会, 2016 年 11 月 16 日, 広島

(14)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, 広島

(15)栗原美里, 坂倉正義, 真木孝尚, 村山泰斗, 岩崎博史, 高橋栄夫, “NMR を用いた相同組換え反応の補助因子 Sfr1 とリコンビナーゼ Rad51 の相互作用解析”, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日, 横浜

(16)杉木俊彦, 熊谷圭吾, 江川大地, 児嶋長次郎, 藤原敏道, 竹内恒, 嶋田一夫, 花田賢太郎, 高橋栄夫, “セラミド輸送蛋白質 CERT の PH ドメイン - Golgi 体間結合が CERT のリン酸化によって抑制される構造基盤: 溶液 NMR による解析”, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 2 日, 横浜

(17)畠山彩由子, 坂倉正義, 太田修平, 藤井萌, 高橋栄夫, “NMR を用いたロンポイドプロテアーゼの生物物理学的解析”, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 25 日, 仙台

(18)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 25 日, 仙台

(19)坂倉正義, 亀浦友斗, 大久保優美, 山田有紗, 伊東優弘, 藤井萌, 高橋栄夫, “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機能構造解析”, 第 17 回日

本蛋白質科学会年会, 2017 年 6 月 22 日, 仙台
(20)H. Takahashi, “Isotope labeling strategies for the NMR study of large proteins using yeast expression systems”, J-PARC Workshop “Deuterated Materials Enhancing Neutron Science for Structure Function Applications”, 2017 年 10 月 20 日, 茨城

(21)鈴木里佳, 坂倉正義, 森雅樹, 藤井萌, 高橋栄夫, “酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いたメチル基選択的 ¹³C 標識タンパク質試料の調製と NMR 解析”, 第 56 回 NMR 討論会, 2017 年 11 月 16 日, 東京

(22)坂倉正義, 田村真由美, 武内智春, 荒田洋一郎, 高橋栄夫, “NMR を用いた S-ニトロソ化によるガレクチン-2 の酸化的失活防御メカニズムの解明”, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月 6 日, 神戸

(23)森雅樹, 坂倉正義, 鈴木里佳, 高橋栄夫, “酵母発現系を用いて調製したヒト膜タンパク質の物理化学的性状解析”, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月 7 日, 神戸

(24)畠山彩由子, 坂倉正義, 太田修平, 藤井萌, 高橋栄夫, “好熱性細菌由来 rhomboid protease の機能・構造解析”, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月 7 日, 神戸

(25)坂倉正義, 大久保優美, 亀浦友斗, 藤井萌, 高橋栄夫, “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機能構造解析”, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月 28 日, 金沢

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

竹内 恒 (TAKEUCHI Koh)

産業技術総合研究所・生命工学領域・研究チーム長

研究者番号: 20581284

(3)連携研究者

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