

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370048

研究課題名(和文) ヒト由来膜タンパク質のNMR構造解析に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental research for NMR structural analysis of human membrane proteins

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：酵母発現系を用いることで、大腸菌発現系では調製することが困難なヒト由来膜タンパク質について、NMRを用いた構造解析を行うための試料調製手法の開拓を行った。この結果、複数のヒト膜タンパク質を酵母の細胞膜中に発現させることに成功するとともに、様々なバリエーションの安定同位体ラベル手法を確立し、NMRを用いた膜タンパク質の構造解析に利用できることを示した。本研究により確立した酵母を用いた膜タンパク質の安定同位体ラベル手法は、様々な膜タンパク質に対して応用可能であり、汎用性が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：Human membrane proteins (hMPs) are important targets in the structural biology field because they contain a lot of drug targets. However, expression of recombinant hMPs by conventional prokaryotic cells is usually difficult. In this study, we constructed a robust strategy to express hMPs using two yeast species, *P. pastoris* and *K. lactis*. We further developed a variety of methods to isotopically label recombinant hMPs for structural studies using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. We expressed six hMPs in the yeast membranes, and some of them were labeled with 2H , 15N , and 13C in a methyl-group selective manner. Using these samples, we could obtain molecular properties and structural information of several hMPs. The protocol established in this study is a widely applicable method and will contribute to following NMR studies of hMPs.

研究分野：構造生物学

キーワード：NMR 膜タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の放射光利用 X 線結晶構造解析の進展により、各種イオンチャネル、GPCR、トランスポーター等の複雑な膜タンパク質複合体の立体構造決定が進められており、これまでの生化学的知見を立体構造の視点で解釈することも可能となりつつある。しかしながら、膜タンパク質を含む機能する生体分子マシナリーの分子機構を解明していくためには、静的な立体構造情報に加え、その局所的可動性・運動性に基づく構造変換メカニズム、および他分子との相互作用機構解明などに焦点をあてた研究が、今後より一層重要になっていくと考えられている。

(2) NMR 法は、生体高分子のダイナミクスの情報を得る上で、極めて有用な解析手法である。従来溶液 NMR 法は、分子量 30K 以下の比較的小さいタンパク質の構造解析に利用されてきたが、近年の重水素ラベル試料調製法の活用、および測定法の進歩により、“メガダルトン”サイズの超分子複合体に対する構造解析、相互作用解析も可能になってきており、原核生物由来の膜タンパク質の解析も行われている。しかしながら、高分子量膜タンパク質複合体の溶液 NMR 解析において必須となる、完全重水素ラベルをベースとした選択的 ^{13}C ラベル法など、高度なラベル手法を駆使できるのは、各種タンパク質発現系の中でも大腸菌発現系に限定されているため、NMR 構造解析の対象となっているのは、大腸菌での発現が可能な原核生物や古細菌由来の高分子量複合体試料が大多数であり、特に、創薬標的の約 50% を占めるヒト由来膜タンパク質を対象とした NMR 構造解析は現状では困難である。

(3) 最近では、酵母発現系、例えば *P. pastoris* では、大腸菌発現系では発現困難だったヒト由来 GPCR 発現についての成功例が複数報告されてきている。その一方で、酵母発現系は、大腸菌ほど扱いやすく低コストではなかったこともあり、低分子量タンパク質を対象とする NMR 構造解析の分野においては、限定的に利用されるのみであった。真核細胞である酵母発現系は、アミノ酸生合成経路も大腸菌とは異なる点があるため、現状、酵母発現系では完全重水素化をベースとする様々な高度安定同位体ラベル手法が利用できる状況にはないといえる。

(4) このような背景のもと、我々は、酵母発現系に活用できる高度な安定同位体ラベル手法を開拓し、大腸菌では発現が困難なヒト由来膜タンパク質を対象とした NMR 構造解析に取り組むこととした。

2. 研究の目的

(1) 酵母細胞を用いて、大腸菌では発現不可能なヒト由来膜タンパク質の発現を行う。
(2) 大腸菌で発現した高分子量試料の NMR

解析の際に用いられる高度なラベル化技術（重水素ラベル、メチル選択的 ^{13}C ラベル、等）を酵母発現系においても確立する。

(3) 酵母細胞における各種炭素源のアミノ酸代謝経路を明らかにし、酵母発現系を活用した多様な選択 ^{13}C ラベル試料調製を可能にする。

(4) 確立したラベル化技術を(1)の膜タンパク質に適用し、NMR 構造解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト由来膜タンパク質発現系の構築および精製法の確立：安定同位体ラベル利用 NMR 構造解析に供する複数のヒト由来膜タンパク質の酵母発現系構築を行う。発現した膜タンパク質については、溶液 NMR 試料とするための可溶化法の検討（界面活性剤のスクリーニング等）を行うとともに、それぞれの膜タンパク質に対し、安定性の評価、適切な機能アッセイ（阻害剤結合活性等）を行い、その活性を検証する。

(2) 酵母発現系による安定同位体ラベル技術開発：上記の膜タンパク質発現系構築と平行して、可溶性モデルタンパク質を用いた酵母発現系による安定同位体ラベル法に関する検討を行う。高分子量タンパク質試料の溶液 NMR 解析を進めるうえでは、高純度の重水素ラベル試料の調製が必要となる。大腸菌では、重水中の培養・タンパク質発現は可能であることが知られているが、高等動物細胞では重水培養は致死的に働く。他の真核細胞に比べ頑健である酵母においても、重水中は劣悪な環境であることから、細胞の生育速度や発現タンパク質の収量の観点から培養方法の至適化を進める。

(3) 酵母発現系による安定同位体ラベル技術開発：重水素ラベル法と組み合わせ、高分子量 NMR 解析プローブとして大腸菌発現系で活用されている、高感度な Ile(δ 1)/Leu(δ)/Val(γ)メチル選択的 ^{13}C ラベル (ILV ラベル) 法に取り組む。酵母におけるアミノ酸代謝は、大腸菌の場合と異なるため、当初は大腸菌発現系の場合と同様のアミノ酸前駆体 (α -ケト酸) を用いて行うが、検討状況により、異なる前駆体の利用によるメチルラベル法も考慮する。

(4) ヒト由来膜タンパク質群の NMR 測定・解析：酵母発現系が確立したヒト由来膜タンパク質を対象とした NMR 構造解析を行う。これまでに行ったラベル化法検討に基づき、重水素ラベルをベースとした ^{15}N 均一- ^{13}C メチルラベルを第一選択肢として試料調製を行う。観測された NMR シグナルについては、部位特異変異等を活用して帰属を進める。帰属完了後、機能に関わる外的条件の変化 (pH・塩濃度・温度変化、およびリガンド・阻害剤結合、等) に伴う、化学シフト変化、線形変化、等の NMR 構造情報を総合的に活用することで、分子の安定性や機能的構造変

換メカニズム等を解明する研究を行う。

4. 研究成果

(1) 酵母 *P. pastoris* を用いたリコンビナント膜タンパク質の発現条件の最適化

複数のヒト由来膜タンパク質および安定同位体ラベル条件検討用の分泌タンパク質について、*P. pastoris*による発現系構築を行った。菌株としてはX33またはKM71Hを用いた。形質転換法の検討により、1回の形質転換実験で、10~20個の形質転換株を安定して得ることが可能なプロトコルを確立することができた。

発現系を構築したヒト膜タンパク質 (AQP1, C99, FLAP, KCNE1, PMP22, TARPγ-2) について、*P. pastoris*を用いた発現実験を行った結果、いずれの膜タンパク質も酵母の膜画分に発現していることが明らかとなった。今回解析した膜タンパク質のうち、C99, KCNE1, PMP22は、大腸菌発現系では膜画分に発現しないことが知られており、本酵母発現系はこれらのヒト膜タンパク質発現に有効であることが示された。膜画分への発現が確認された膜タンパク質のうち、主にAQP1, PMP22を用いて安定同位体ラベルの導入を指向した最少培地中における大量発現の条件検討を行った。以下に条件検討内容と結果を示す。

培養方法：ファーメンター培養により、培養中の培地のpHや酸素供給量を制御することで、フラスコを用いた振とう培養に比べ、高菌体数（約40%増）で安定な培養が行えることが実証された。さらに、溶存酸素量をモニターすることで、適切なタイミングで誘導剤兼炭素源であるメタノールの添加が可能となり、培養実験の確実性・再現性が増加したとともに、安定同位体ラベルを行う際に高効率なラベリングが可能となった。

Mutフェノタイプ：PMP22について、Mut⁺フェノタイプを示すX33株におけるタンパク質発現量とMut^Sフェノタイプを示すKM71H株における発現量の比較を行った結果、KM71Hにおける発現量は、X33における発現量の約1.5倍となった。Mut^Sフェノタイプの菌株は、メタノールの消費速度およびタンパク質の発現速度が遅くなることから、正しく折りたたまれたタンパク質の割合が増加し、リコンビナントタンパク質の収量が増加したと考えられる。メタノール消費量が少ないMut^Sフェノタイプは、安定同位体ラベルサンプルの調製においても、有用性が高いと考えられる。

遺伝子最適化（マイナーコドンの除去）：PMP22について、マイナーコドン除去等の最適化を行った人工遺伝子を合成して酵母に導入し、タンパク質の発現を行った結果、収量が約2倍に増加した。酵母によるリコンビナントヒト膜タンパク質の発現においても、

遺伝子の最適化が有効であると結論した。

(2) リコンビナント膜タンパク質の精製条件の最適化

酵母膜中への発現に成功した複数の膜タンパク質について、精製条件の最適化を行い、膜タンパク質の精製に共通する最適化条件を見出した。

酵母の破碎条件：ガラスビーズを用いた破碎方法と比較して、連続圧力式ホモジナイザーを用いることにより、サンプルを冷却した状態で、大量 (>10 g) の菌体を、効率よく安定して破碎することが可能となった。

酵母膜画分の洗浄：酵母細胞破碎液から抽出した膜画分について、2種類の緩衝液を用いて洗浄することにより、標的膜タンパク質の分解が抑制され、収量が増加することを見出した。

膜タンパク質の可溶化条件の検討：各種界面活性剤による膜タンパク質の可溶化の検討を行った。タンパク質変性作用の強いEmpigen, DPC等の両性界面活性剤は、可溶化効率が高く、タンパク質変性作用の弱いDDMやβ-OG等の非イオン性界面活性剤は、可溶化効率が低い傾向が見られた。検討の過程で、DDMにコール酸またはデオキシコール酸を加えることにより、可溶化効率が上昇することを見出した。

(3) *P. pastoris*発現系を用いたリコンビナントタンパク質の安定同位体ラベル

膜タンパク質発現・精製法の検討と平行して、酵母発現系における安定同位体ラベル法の検討を行った。効率良い検討を進めるために、可溶性タンパク質 HEL (ニワトリ卵白リゾチーム) をモデルタンパク質として用いることとした。

重水素ラベル：95%の重水 (²H₂O) を含む培地中における酵母の培養について検討を行った結果、プレカルチャーと本培養の間に、重水素化培地を用いた中間培養をはさみ、細胞を馴化することによって、通常非ラベル培養時の50%程度まで菌体数を維持できることが明らかとなった。培地中に発現したHELについて、質量分析およびNMR法により、²H標識率を測定した結果、標識率は90%であり、主鎖アミド基やメチル基の観測を行うために十分な標識率が達成できた。標識率の低下は、空気中からの水分の混入が主要因と考えており、供給空気の除湿を行うことで改善が可能であると考えている。

メチル基選択的¹³Cラベル：可溶化した膜タンパク質は高分子量となるため、通常の¹⁵Nラベル試料に加え、メチル選択的に¹³Cを導入して観測するアプローチが有効であると考えられる。最初の試みとして、メチオニン残基のメチル基に選択的に¹³Cを導入する方法について検討を行った。ε-¹³Cラベルさ

れたメチオニンを含む培地を用いて HEL を発現したところ、HEL に 2 残基存在するメチオニンに対応すると考えられる 2 個の NMR シグナルが検出されたことから、メチル基の選択的 ^{13}C ラベルが可能となった。次に、大腸菌発現系において活用されている、メチル選択的 ^{13}C ラベル (ILV ラベル) を試みた。アミノ酸前駆体 (100 mg/L α -ketoisovalerate, 50 mg/L α -ketobutyrate) を含む培地を用いて HEL の発現を試みたが、酵母株が十分に増殖せず、NMR を測定するために十分なりコンビナントタンパク質が得られなかった。

(4) *K. lactis* 発現系を用いたリコンビナントタンパク質の安定同位体ラベル

汎用的にタンパク質発現に用いられる酵母株である *P. pastoris* による安定同位体ラベル検討と平行して、異なるタイプの酵母株である *K. lactis* を用いた安定同位体ラベル試料調製法の検討も行った。我々は、これまでに *K. lactis* 株を活用した効率的な均一 ^{15}N , ^{13}C ラベル試料調製法を確立しているが (Sugiki et al., *J. Biomol. NMR* (2008))、本研究では、膜タンパク質などの高分子量タンパク質の NMR 解析に適応できる重水素ラベル、およびメチル選択的 ^{13}C ラベル試料調製法の確立を試みた。

K. lactis の重水培養時には生育速度が低下し、発現タンパク質収量の減少が見られたが、前培養での重水に対する馴化、および流加培養法を併用することで収量を増大させることに成功した。さらに、 ^2H , ^{13}C ラベルした α ケト酸を用いた、メチル選択ラベルについて検討を行った結果、ILV メチル選択的に ^{13}C ラベルを導入することに成功したが、*K. lactis* は、大腸菌とは異なる代謝経路であるため、Val、Leu のメチル ^{13}C 標識率が低くなるという事実が判明した。この結果は、*K. lactis* や *P. pastoris* などの酵母では、通常、 α ケト酸は、ミトコンドリア内で酵素的に生成され、メチル含有アミノ酸へと変換されるが、本ラベル実験で与えたラベル化 α ケト酸が、ミトコンドリアへ取り込まれにくいことが原因であると推察された。これを克服する目的で、形質転換時に酵母細胞質内に新たにアミノ酸基転移酵素 (大腸菌および *S. cerevisiae* 由来) を共発現させる試みを行ったところ、顕著な標識率の向上が見られた。一方で、 ^{13}C ラベルした α ケト酸に代え、アミノ酸である ^{13}C ラベルしたバリンを添加して培養したところ、高い標識率で Val, Leu ともラベルされることが明らかとなった (M. Miyazawa-Onami et al., *J. Biomol. NMR* (2012))。

よって、酵母 *K. lactis* で発現可能な膜タンパク質系については、本アプローチを適用することで、ILV ラベルを実施できる状況が整ってきたといえる。しかしながら、我々の経験で

は、*K. lactis* 発現系による標的タンパク質発現量は、*P. pastoris* 発現系を上回るとは稀であったため、今後、*K. lactis* で開拓した本アプローチを、*P. pastoris* 発現系に適応させていきたいと考えている。本研究から得られた代謝経路に関する考察は、*P. pastoris* 発現系にもあてはまると考えられるため、同様のアプローチを、*P. pastoris* 発現系に適用することは十分可能であると考えられる。

(5) *P. pastoris* を用いて安定同位体ラベルを行った膜タンパク質の NMR 構造解析

AQP1: ^{15}N 均一ラベル、およびメチオニン残基のメチル基選択的 ^{13}C ラベルを行った AQP1 をそれぞれ発現、精製し、 β -OG ミセルに可溶化した状態で NMR スペクトルの測定を行った。この結果、AQP1 の C 末端膜外領域に由来すると考えられるシグナルが出現し、膜内残基に由来するシグナルについては観測されなかったが、基本的には、酵母発現系によるヒト膜タンパク質の安定同位体ラベルおよび NMR 観測自体には成功していると考えられた。膜貫通領域由来のシグナルが観測できない理由としては、AQP1 自身の分子量 (>100K) に加え、 β -OG ミセルのサイズも大きいため、みかけの分子量が増大し、スペクトル感度が低下したことが主要因であると推察される。

PMP22: これまで PMP22 は、大腸菌発現系で封入体として発現した後、可溶化して構造解析が行われた例 (Sakakura et al., *Structure* (2011)) があるが、酵母発現系を用いることで、構造解析が可能なレベルでの膜画分への発現に初めて成功した。DH₇PC ミセルに可溶化した ^{15}N 均一ラベル化 PMP22 について NMR スペクトルを測定したところ、長い細胞外ループである ECL1 ループ由来と考えられるシグナルのみが出現し、膜貫通領域についてはシグナルが観測されなかった。精製した PMP22 を分析した結果、一部、二量体として存在していることが示された。今後、明らかになった二量体成分の分離可能性の検討、さらにその意義について別途解析する必要があり、その後、重水素ラベル・メチル選択的ラベルなどの高感度な NMR 解析を実施していく。

FLAP: FLAP に関しては、これまで大腸菌での発現が報告されていたが、新たに酵母発現系を構築することにより、従来の約 50 倍の収量での発現が可能となった。様々な可溶化条件の検討を行った結果、比較的良好な NMR スペクトルが得られた、界面活性剤 LMPG を用いた可溶化試料の NMR 解析を行った。メチオニン残基のメチル基を選択的に ^{13}C ラベルした FLAP を調製し、LMPG ミセルに可溶化した状態で NMR 観測を行ったところ、膜貫通領域を含む、全てのメチオニン残基に由来するシグナルを検出することができた。さらに、複数の部位特異変異体を作

製することで、各 NMR シグナルの帰属を完了した。

可溶化したリコンビナント FLAP の安定性を検証する目的で、酵母発現系で調製した FLAP と大腸菌発現系で調製した FLAP の安定性の比較を行ったところ、大腸菌膜から抽出し、LMPG ミセルで可溶化した FLAP については、経時的なスペクトル変化が観測されたが、酵母膜から抽出した FLAP については 12 時間経過しても、スペクトル変化が現れなかった。この結果から、酵母発現系により膜画分に発現させた FLAP が、大腸菌を用いて発現させた FLAP と比較して安定であることが示された。ステロール類など酵母の膜中に存在する特徴的な脂質成分が、可溶化した FLAP 表面に残存し、その安定性を高めている可能性が示唆された。このような観点での膜タンパク質の安定性の評価は、これまで行われておらず、今後の構造解析に供する膜タンパク質試料調製において重要な視点を与えるものと考えている。

(6) 総括と今後の展望

本研究は、NMR 解析を指向した酵母発現系によるヒト由来膜タンパク質調製系、および安定同位体ラベル技術の確立、を目指して行われた。NMR 解析を行うためには、安定同位体ラベルが必須であるため、最少培地での培養が必要となる。これは、一般に用いられる富栄養培地での培養とは、生育状況が大きく異なってくるため、最適な膜タンパク質発現条件検討、精製条件検討に多くの時間が割かれることとなったが、最終的には効率の良い酵母発現系による膜タンパク質発現および精製プロトコルが確立できたと考えている。

また、これまでに行われてきた膜タンパク質の NMR 解析でも複数報告されているように、 ^{15}N ラベルを施し可溶化した膜タンパク質では、(たとえ重水素ラベルを併用したとしても)その膜貫通領域の ^1H - ^{15}N シグナルが検出できない、という事例に遭遇した。これは、分子量の問題というより、膜タンパク質特有の運動性の影響による、という感触を得ている。この点については、今後、部位特異変異を導入し運動性を抑制した試料の NMR 解析、などを通して明らかにしていくとともに、メチルラベルなどの高感度の ^1H - ^{13}C シグナル観測が、実践的には有効であると考えられる。

一方、酵母 *P. pastoris* や *K. lactis* における炭素源の代謝は、大腸菌とは様相が異なり、ラベルパターンや効率の相違が見られることが判明した。これに対し、共発現により細胞質内にアミノ基転移酵素の導入を行うことや、適切なアミノ酸を添加することで、代謝経路の相違を克服できることを示したが、今後、さらなる代謝経路の解明が必要になると考えられる。

X 線結晶構造の進展により、膜タンパク質の静的立体構造情報は多く得られるように

なってきたが、今後は、膜タンパク質の機能解明に必須となる、局所的可動性・運動性に基づく構造変換メカニズム、および他分子との相互作用機構の解明、といった研究が重要となる。このような研究において主要な役割を果たすべき NMR 構造解析において、本研究で確立してきたアプローチが有効に活かせると確信し、現在も研究をさらに発展的に継続している。

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 8 件)

K. Takeuchi, Y. Tokunaga, M. Imai, H. Takahashi, and I. Shimada, Dynamic multidrug recognition by multidrug transcriptional repressor LmrR, *Scientific Reports*, 査読有, 4, (2014) doi:10.1038/srep06922

Y. Tokunaga, K. Takeuchi, H. Takahashi, and I. Shimada, Allosteric enhancement of MAP kinase p38 alpha's activity and substrate selectivity by docking interactions, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 査読有, 21, (2014), pp.704-711, doi:10.1038/nsmb.2861

K. Ono, K. Takeuchi, H. Ueda, Y. Morita, R. Tanimura, I. Shimada, and H. Takahashi, Structure-Based Approach To Improve a Small Molecule Inhibitor by the Use of a Competitive Peptide Ligand, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, 53, (2014), pp.2597-2601, DOI: 10.1002/anie.201310749

Y. Kodama, K. Takeuchi, N. Shimba, K. Ishikawa, E. Suzuki, I. Shimada, and H. Takahashi, Rapid identification of ligand-binding sites by using an assignment-free NMR approach, *J. Med. Chem.*, 査読有, 56, (2013), pp.9342-9350, DOI: 10.1021/jm4014357

M. Miyazawa-Onami, K. Takeuchi, T. Takano, T. Sugiki, I. Shimada, and H. Takahashi, Perdeuteration and methyl-selective ^1H , ^{13}C -labeling by using a *Kluyveromyces lactis* expression system, *J. Biomol. NMR*, 査読有, 57, (2013), pp.297-304, DOI: 10.1007/s10858-013-9789-8

高橋栄夫, NMR でリガンド分子の活性部位を探索する, 化学, 査読無, 68, (2013), pp.39-43

T. Sugiki, K. Takeuchi, T. Yamaji, T. Takano, Y. Tokunaga, K. Kumagai, K. Hanada, H. Takahashi, and I. Shimada, Structural Basis for the Golgi Association by the Pleckstrin Homology Domain of the Ceramide Trafficking Protein (CERT), *J. Biol. Chem.*, 査読有, 287, (2012), pp.33706-33718, doi: 10.1074/jbc.M112.367730

T. Onizuka, H. Shimizu, Y. Moriwaki, T. Nakano, S. Kanai, I. Shimada, and H. Takahashi, NMR study of ligand release from asialoglycoprotein receptor under solution conditions in early endosomes, *FEBS J.*, 査読有,

279, (2012), pp.2645-2656, DOI: 10.1111/j.1742-4658.2012.08643.x

〔学会発表〕(計 20 件)

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 27 日, 神戸

H. Takahashi, An NMR approach to improve a small-molecule inhibitor, The 4th International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR, Yokohama, 2015 年 2 月 5 日, 横浜

高橋栄夫, 創薬と NMR と計算科学, 第 358 回 CBI 学会講演会 バイオ NMR 創薬活用への新展開, 2015 年 1 月 14 日, 東京

H. Takahashi, An NMR-based approach to improve a small-molecule inhibitor, IPR seminar: International NMR Symposium on Pharmaceutical NMR, 2014 年 12 月 20 日, 大阪

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 26 日, 横浜

高橋栄夫, 大浪真由美, 杉木俊彦, 坂倉正義, 竹内恒, 嶋田一夫, 高難度タンパク質の NMR 解析に向けた酵母発現系の活用, 2014 年 11 月 4 日, 大阪

高橋栄夫, Drug Discovery and Design by NMR, よこはま NMR 研究会 第 50 回記念ワークショップ, 2014 年 7 月 9 日, 横浜

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 27 日, 横浜

高橋栄夫, NMR によるタンパク質被認識部位の同定法, 日本蛋白質科学会 第 1 回蛋白質工学研究会ワークショップ, 2014 年 6 月 24 日, 横浜

坂倉正義, 白石佑太, 伏見威俊, 小池賢一郎, 高橋栄夫, NMR 構造解析を指向したヒト膜タンパク質の酵母発現系の構築, 日本薬学会第 134 年回, 2014 年 3 月 29 日, 熊本

伊東優弘, 坂倉正義, 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とそのリガンドの相互作用解析, 日本薬学会第 134 年回, 2014 年 3 月 29 日, 熊本

五百磐徹, 坂倉正義, 高橋栄夫, NMR による高分子量タンパク質を標的としたリガンドエピトープ解析, 日本薬学会第 134 年回, 2014 年 3 月 28 日, 熊本

H. Takahashi, NMR for Drug Discovery, RRR Workshop 2014, 2014 年 2 月 2 日, 京都

高橋栄夫, NMR によるタンパク質相互作用とそのアロステリック阻害機構の解明, 第 35 回日本分子生物学会年会・ワークショップ「NMR で見るタンパク質の機能発現」, 2012 年 12 月 12 日, 福岡

H. Takahashi, Pharmaceutical NMR techniques: NMR approach for ligand-based drug discovery, Pharmaceutical NMR lecture series in Osaka, 2012 年 10 月 25 日, 大阪

H. Takahashi, NMR approach for ligand-based drug discovery: DIRECTION approach for the pharmacophore mapping of drug candidates, The 3rd International Symposium on Drug Discovery and Design by NMR, 2012 年 10 月 12 日, 横浜

Y. Mizukoshi, K. Takeuchi, Y. Fukunishi, I. Shimada, and H. Takahashi, A pharmacophore mapping by DIRECTION approach, 25th International Conference of Magnetic Resonance in Biological System, 2012 年 8 月 23 日, リヨン

大浪真由美, 竹内恒, 杉木俊彦, 高野等寛, 嶋田一夫, 高橋栄夫, 酵母 *K.lactis* 発現系を用いた高分子量蛋白質の重水素化およびメチル選択標識, 第 51 回 NMR 討論会, 2012 年 11 月 10 日, 名古屋

小玉優哉, M. L. Reese, 榛葉信久, 小野克輝, 金森英司, V. Dötsch, 福西快文, 鈴木榮一郎, 高橋栄夫, 部位特異的アミノ酸選択標識とタンパク質立体構造を活用した相互作用界面の同定, 第 51 回 NMR 討論会, 2012 年 11 月 8 日, 名古屋

徳永裕二, 竹内恒, 高橋栄夫, 嶋田一夫, MAP キナーゼ p38 α の活性および基質選択性のアロステリックな調節機構の解明, 第 51 回 NMR 討論会, 2012 年 11 月 8 日, 名古屋

〔図書〕(計 1 件)

高橋栄夫, 嶋田一夫, 東京化学同人, 生体有機化学 第 7 章「タンパク質と生体小分子の相互作用 2」, 2012 年, pp.76-83

〔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・創薬分子プロファイリング研究センター・主任研究員

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