

国際共同研究事業
国際化学研究協力事業
共同研究報告書

平成 27 年 9 月 28 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

所属機関・部局 京都大学大学院・医学研究科

(ふりがな)

職・氏名 准教授 小林 拓也

1. 事業名 国際化学研究協力事業
2. 研究課題名 (和文) G 蛋白共役受容体のアロステリック制御を目的とした新しい化学的基盤の確立
(英文) The Chemical Basis for Allosteric Regulation of G Protein Coupled Receptors

3. 共同研究実施期間 (全採用期間)

平成 24 年 9 月 1 日 ~ 平成 27 年 8 月 31 日 (3 年 ヶ月)

4. 研究経費総額

- (1) 本事業により交付された研究経費

総額 46,840 千円

初年度	(平成 24 年度) 経費	<u>7,600</u> 千円
第 2 年度	(平成 25 年度) 経費	<u>15,700</u> 千円
第 3 年度	(平成 26 年度) 経費	<u>15,520</u> 千円
第 4 年度	(平成 27 年度) 経費	<u>8,020</u> 千円

- (2) 本事業による経費以外の国内研究経費総額 0 円

* 10 ページ<備考> 1. 参照

5. 研究組織

(1) 日本側参加者（代表者を除く）（共同研究実施期間中の日本側参加者を全員記入してください。）

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	専門及び本研究における役割
ゆゑぎ たかみ 方木 貴美	京都大学・研究員	内科学、生化学、GPCR の生産及び結晶化
つじもと ひろかず 辻本 浩一	京都大学・研究員	生化学、分子生物学、GPCR の生産及び結晶化
すの りょうじ 寿野 良二	京都大学・研究員	生化学、構造生物学、GPCR の結晶化及び構造解析
まえだ しょうじ 前田 将司	京都大学・研究員	生化学、構造生物学、GPCR の生産、結晶化及び構造解析

(2) 米国側参加者（代表者を含む*）（共同研究実施期間中の米国側参加者を全員記入してください。）

氏名	所属・職名	研究協力テーマ
○Brian Kobilka	スタンフォード大学・教授	生化学、構造生物学、結晶化実験をマネジメント
Brian Shoichet	カリフォルニア大学サンフランシスコ校・教授	バイオインフォマティクス、ドッキングシミュレーションをマネジメント
Thor Thorsen	スタンフォード大学・研究員	生化学、分子生物学、GPCR の生産及び結晶化
Dahlia Weiss	カリフォルニア大学サンフランシスコ校・研究員	バイオインフォマティクス、ドッキングシミュレーション

* 米国側代表者の氏名の前に、「○」のマークをつけてください。

6. 研究概要（研究の目的・内容・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

※ 申請書の内容を踏まえて、日本語にて記入してください。

※ 経費との関連がわかるように具体的に記入してください。

【目的】

G タンパク質共役受容体 (GPCR) はヒトゲノムにコードされるタンパク質全体の 3% を占め、視覚、味覚、嗅覚といった感覚器のほか、神経伝達、内分泌活動の制御、筋収縮の調節など、GPCR が重要な役割を担う生理機能は非常に多岐にわたる。GPCR の機能は主に細胞外環境からのシグナル（例：光、ホルモン、神経伝達物質）を直接受け取り、細胞内の三量体 G タンパク質あるいはアレスチンを活性化し、さらに下流のエフェクター分子へとシグナルが伝達・増幅されることによって果たされる。GPCR を標的にした市販薬は全体の 30% を占めており、基礎生物学研究の観点からのみならず、医学・創薬の観点からも GPCR は大きな注目を集めている。代表的な GPCR の一つであるムスカリン性アセチルコリン受容体は神経伝達物質であるアセチルコリンの受容体で、全部で 5 つのサブタイプ (M1-M5) が見つかっており、これらは中枢神経系・末梢神経系全般で機能している。M1-M5 受容体それぞれが異なる発現分布と機能を担っており、サブタイプ特異的に作用する分子の設計は、副作用の少ない薬剤の開発につながる。近年の構造解析の成功により M2 と M3 受容体の不活性型構造が解かれたが、内在性リガンド結合部位（オルソステリックサイト）を形成するアミノ酸残基は非常に似通っており、このサイトを標的としたサブタイプ特異的リガンドの設計は非常に困難と思われる。一方でファミリー間での相同性が低いアロステリックサイトを標的とした分子は、より特異性の高い、すなわち副作用の少ない薬剤の開発に繋がることが期待される。

【内容】

我々の研究目的は、M2 受容体のアロステリックサイトに結合し、受容体の阻害剤であるアンタゴニストの効果を高めることが実験的にわかっているアロステリックモジュレータ (positive allosteric modulator: PAM) と、その逆に効果を低下させることが実験的にわかっているアロステリックモジュレータ (negative allosteric modulator: NAM) を用いて、アロステリックモジュレータの結合様式を原子レベルで捉えることである。そこで、まず始めにアンタゴニスト存在下で、PAM or NAM を作用させた M2 受容体の結晶化を行った。また、この実験と平行して、(アンタゴニストではなく) 受容体の賦活剤であるアゴニスト存在下で、PAM or NAM を作用させた M2 受容体の結晶化も視野に入れた研究も進めた。アンタゴニスト存在下の GPCR とは異なり、アゴニストの結合した活性型 GPCR は非常にタンパク質のダイナミクスが大きく結晶化が難しい。さらに、共同研究者である Kobilka 博士らの研究により、 β_2 アドレナリン受容体においては、単にアゴニストを結合させただけでは、アンタゴニスト結合型とアゴニスト結合型の構造がほぼ同一であることが判明した (Rosenbaum D. M. et al., Nature 469: 236-240, 2011)。アゴニストの結合した活性型構造により近づけるためには、M2 受容体の細胞内側に G-protein や nanobody (G-protein mimetic nanobody) を結合させる必要がある (Kruse A. C. et al., Nature 504: 101-106, 2013)。しかし、nanobody を結合させた場合は、厳密に言えば、完全な活性化状態ではなく (活性化途中の) 中間構造と考えられる。結合したアゴニストがどのようにそのシグナルを G-protein にシグナルを伝達しているのか理解することはできない。G-protein の共役した完全な活性型構造を基に、活性型 GPCR 特異的な PAM or NAM を設計する必要である。受容体単独では非常にダイナミクスの大きな GPCR であるが、共役タンパクである G-protein 結合下では、その構造が均一となることが知られている。G-protein 結合時の GPCR の構造は、活性型 GPCR がその機能を果たしている姿であり、この構造を基に PAM を設計することは生理活性をモジュレート (調節) するという観点からも非常に

理に叶っている。そこで、我々はM2受容体と共役タンパクであるG-proteinとの複合体構造解析を目指して、この分野の先駆者であり、これまで唯一、GPCR/G-protein複合体構造解析に成功しているKobilka博士と共同研究を進めた。米国側の技術を速やかに導入するために、研究員の寿野を雇用し、Kobilka博士の主催するGPCR workshop（ハワイ）に参加してKobilka博士と研究の打ち合わせを行ったり、Kobilka研究室（スタンフォード大）に中期滞在（38日間）した。次に、米国側の技術をさらに高度化させながら、同時平行で日本側に技術移転するため、海外留学経験のある研究員の前田を雇用し、Kobilka研究室に二回（354日間と144日間）、長期滞在させた。

【成果】

①ムスカリン受容体のアロステリック部位を明確にするために、アロステリック化合物の結合したM2受容体の結晶構造を決定したいと考え、M2受容体をアンタゴニストとアロステリックモジュレータ（LY2033298、Strychnine、Brucine、Alcuronium、Gallamineなど）存在下で共結晶化した。結晶化で使用するムスカリンM2受容体の生産は、京都大学で行った。大量培養には昆虫細胞を用いて、オートクレーブ可能なプラスチック製のフラスコを使用した。大量培養する前に少量スケールで感染させ、バキュロウイルスの最適な感染量を決定することで、培養溶液1リッターあたり1~2mgの受容体を発現させることが可能になった。精製には、抗FLAG抗体をレジンに結合させたアフィニティーカラムを作製し、受容体のN末端に融合したFLAGタグを利用して精製した。プラスチック製のフラスコとイノーバ インキュベーターシェーカーを使用して、これまでに数百リッターの培養（一回あたり約10リッターのスケール）を行ってきた。結晶化には、モノオレインなどの脂質とコレステロールを混ぜて創成した脂質キュービックフェーズ（Lipidic Cubic Phase: LCP）と呼ばれる中間相にM2受容体を結晶化した。その結果、オルソステリックリガンド（化合物A）とアロステリックモジュレータ（化合物B）の両方が結合したM2受容体の高分解能結晶を得ることに成功した（化合物Aはアンタゴニスト、化合物Bは化合物Aの結合親和性を向上させるPAM）（図1）。その他の化合物については度重なる結晶化条件の最適化を経ても両者の結合した結晶構造を得るには至らなかった。現在、化合物A + 化合物Bについては2.9 Åで、化合物A単独については分解能3.2 Åで構造を決定し、アロステリックモジュレータの結合様式を比較した論文を作成している（いずれも新規構造として米国側と共同で執筆中）。一方、NAMとM2受容体との共結晶化については、アゴニスト存在下およびアンタゴニスト存在下で未だ構造を決定するに至っていないが、（別のプロジェクトで取得した）M2受容体の細胞内領域を認識する立体構造認識抗体を結晶化用の分子シャペロンとして利用することで、微結晶が得られ始めている。

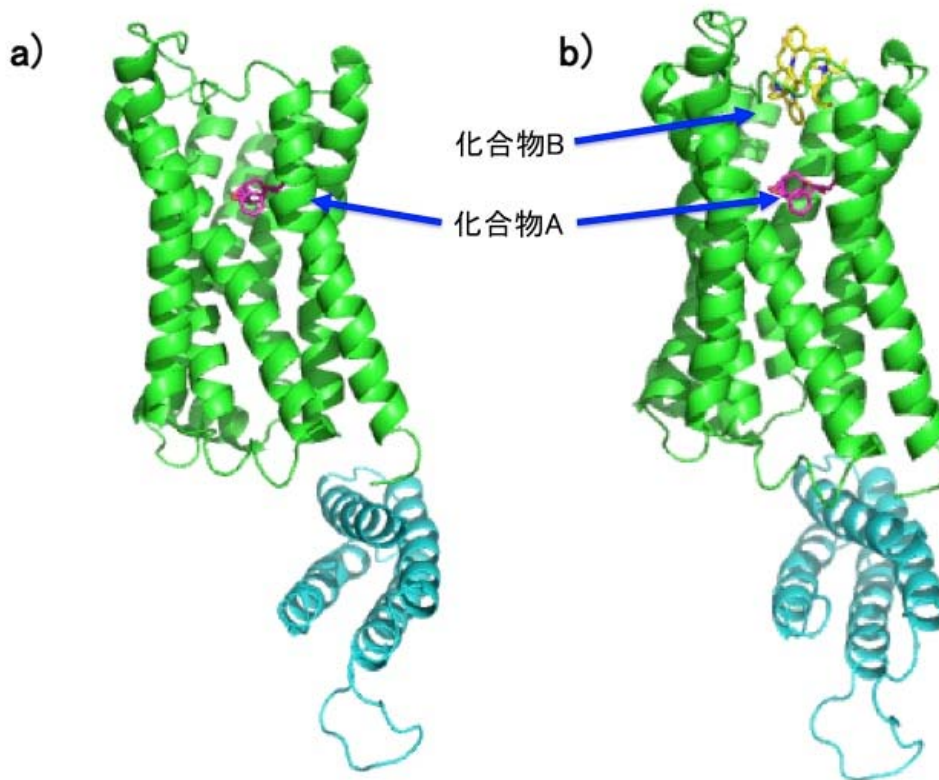


図1. ムスカリン M2 受容体の結晶構造. a) アンタゴニストの結合したムスカリン M2 受容体 (化合物 A), b) アロステリックモジュレータの結合したムスカリン M2 受容体 (化合物 A+化合物 B). ムスカリン M2 受容体; 黄緑色, ICL3 に挿入した融合タンパク (bRIL); 水色.

②ムスカリン受容体ファミリーは、他の GPCR と比べ、大きな第3細胞内ループ領域 (ICL3) を持つ。この領域はフレキシブルで決まった構造を取らず、結晶構造解析には不利に働くことが過去の研究から知られている。そこで、アンタゴニスト結合型 M2 受容体の構造解析では、この ICL3 の大部分を削り、結晶化のメディエーターとして働く T4 lysozyme (T4L) や bRIL などのタンパク質を挿入したキメラ体を用いた。ICL3 に T4L や bRIL などのタンパク質を融合したキメラ体は、G-protein 活性化能が失われることが、これまでの研究で分かっている。さらに、この ICL3 のない M2 受容体はアゴニストへの結合定数が野生型のそれと比べて高い (結合アフィニティーが低い) ことが、(放射性同位体標識) リガンド結合実験によって明らかになった。そこで、ICL3 を C 末端側すなわち第6膜貫通領域 (TM6) 側から 5、10、15 残基ずつ伸張したところ、15 残基伸ばすことで、アフィニティーが野生型のものと同等に回復することが明らかとなった (図 2)。M2 受容体と G-protein の複合体形成には、アゴニスト結合が不可欠であり、結合アフィニティーが高い条件が好まれる。また、Kobilka 博士らの研究データによると、GPCR が G-protein を活性化する際に GPCR の ICL3 の一部が G-protein と直接相互作用をしていることが分かってきた。これらのことから、複合体形成には ICL3 の長さを再調整した新しいコンストラクトを用いることとした。

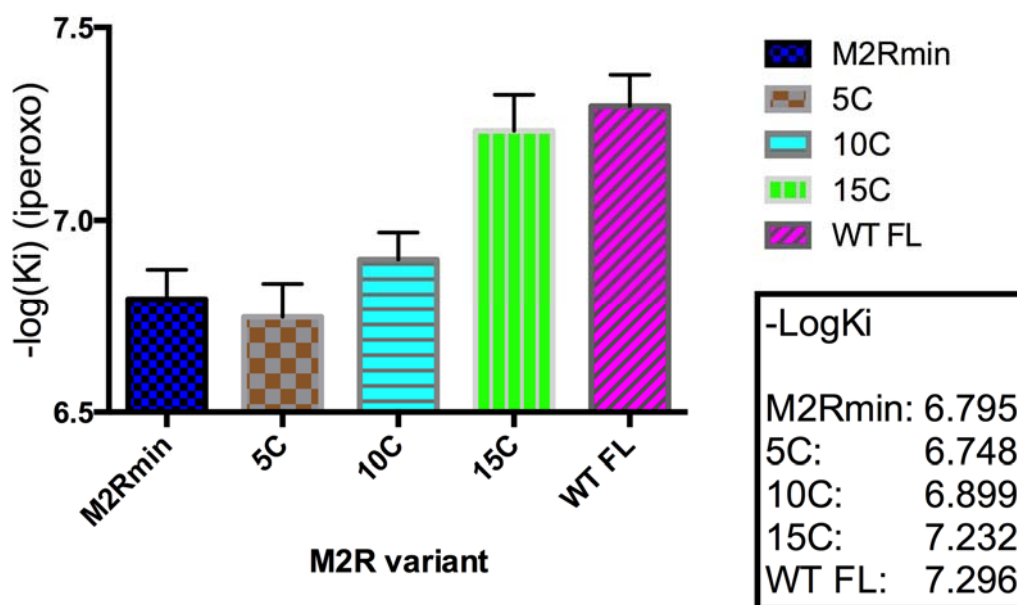
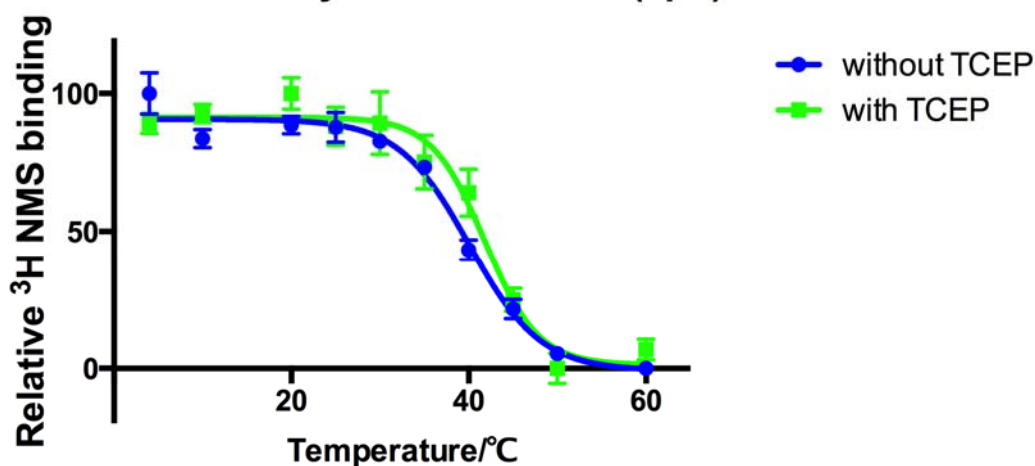


図 2. ICL3 ループ伸張 (5C, 10C, 15C : それぞれ TM6 側から 5, 10, 15 残基伸ばしたもの) によるアゴニスト (Iperoxo) のアフィニティー変化

③還元的環境下である細胞内に存在する G-protein の機能と安定性には、バッファー中の還元剤が不可欠である。一方、GPCR は細胞外にジスルフィド結合を持つため、一般的には還元剤を好まないとされている。GPCR/G-protein 複合体の形成にあたっての一つの困難な点が、この一つのタンパク質複合体に存在する酸化・還元志向の異なるユニットの共存である。Kobilka 博士らが β_2 -adrenergic receptor/Gs 複合体の結晶構造解析 (Rasmussen S.G. et al., Nature 477: 549-555, 2011) を成功させた際には、バッファー中の還元剤濃度の調節に細心の注意を払い、これが高分解能結晶創成に重要なポイントとなった。M2 受容体においても、細胞外に 2 つのジスルフィド結合が存在する。今回、我々の実験結果から M2 受容体は、還元剤存在下でも非存在下と同等か、それ以上の熱安定性を持ち、リガンド結合能に至っては、還元剤存在下の方が、アゴニスト結合能が上昇することが明らかとなった (図 3)。立体構造的に細胞外領域にどのような影響があるのかは、未だ不明であるため注意が必要であるが、機能的には還元剤の存在は M2 受容体にとって不利には働かない。今後、M2/G-protein の複合体形成にあたって、少なくとも還元剤による GPCR の不安定化・不活化は避けられる。

Thermal decay of M2Rmin-15C (apo)



	without TCEP	with TCEP
LogIC50	40.10	41.84

Competition w/ and w/o TCEP

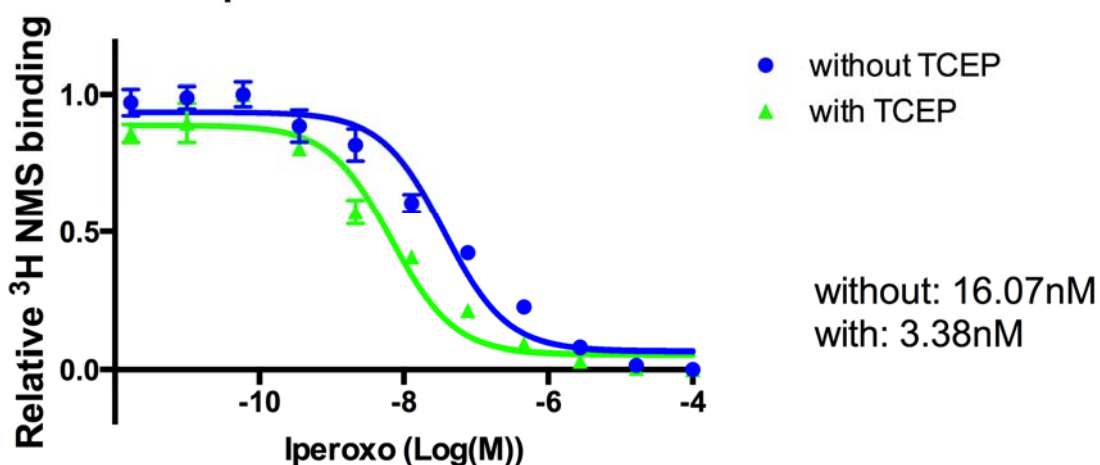


図3. ムスカリン M2 受容体の熱安定性（上段）とアゴニストに対する結合親和性（下段）.（上段）還元剤 TCEP 存在下・非存在下での粗精製 M2 受容体の熱安定性を比較. 熱安定性は熱処理後のアンタゴニストの結合能で評価した.（下段）還元剤 TCEP 存在下・非存在下での M2 受容体のアゴニストに対する結合親和性を比較.

④複合体形成にあたって、一つの方針が M2 受容体の C 末端に G-protein の α サブユニットを融合させることである。2 つのタンパク質が常に近傍で存在することが可能となり、複合体形成を促進できるというアイデアに基づいている。そこで、次にこのアイデアを検証してみた。その結果、M2 受容体の C 末端に G-protein の α サブユニットを融合すると、M2 受容体の発現量は 2 倍程度上昇することが明らかとなった（図 4）。しかし、その後の実験で、この発現上昇効果は、 α サブユニット特有のものではなく、タンパク質モニターに汎用され M2 受容体とは機能的に関連のない EGFP（蛍光タンパク分子）を融合した場合でも、同様の効果が得られた（図 4）。これにより、従来の半分のスケールで同量（同等）の精製タンパクが得られるようになった。C 末端融合タンパク質による発現量の増加効果が、果たして M2 受容体特異的なものなのか、それとも GPCR 一般にも当てはまることなのか、また、さらなる発現上昇効果をもたらす他の融合タンパク質が存在するのか否かは、興味深いところである。

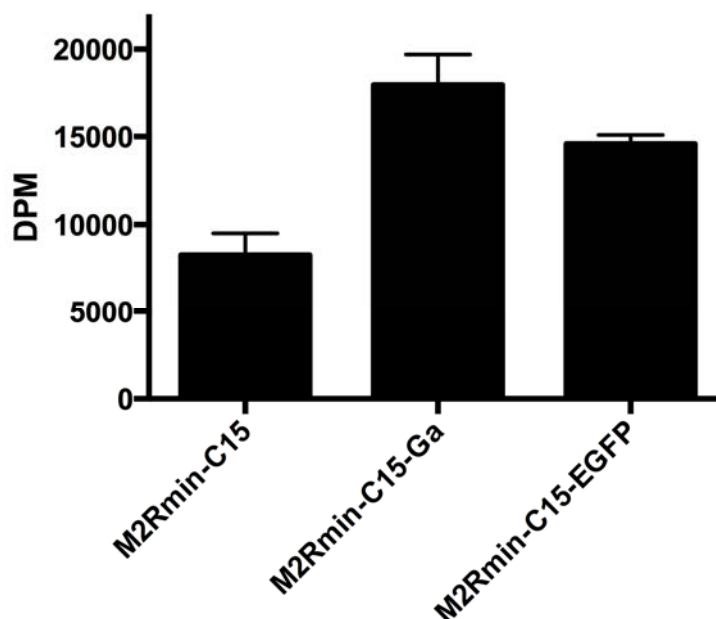


図4. Whole cell を用いた M2 単独と M2-Galpa または M2-EGFP 融合タンパクの発現量の比較. アンタゴニストを使ったりリガンド結合実験により発現量を比較した.

⑤M2 受容体と G-protein 各々精製タンパク質を用いて in vitro で M2/G-protein 複合体が安定に形成されるバッファー条件、コンストラクトなどを検討した。その結果、M2/G-protein 複合体が、標準的な結晶化温度である 20°C で、一週間、乖離が確認されない条件を見つけることに成功した。G-protein に結合して複合体を乖離させる GTP・S に感受性のあることから、この複合体が生化学的にも機能性を保持した複合体であることも確認した (図5)。現在は、この複合体の結晶構造解析を目指して結晶化を試みている。また、京都大学では、この M2/G-protein 複合体の立体構造を認識する抗体取得を目指して準備を進めている。研究員の前田は、過去に別の種類の GPCR/G-protein を用いて立体構造認識抗体を取得することに成功しており、同様の戦略を用いて M2/G-protein 複合体に対する立体構造認識抗体が取得できると期待している。

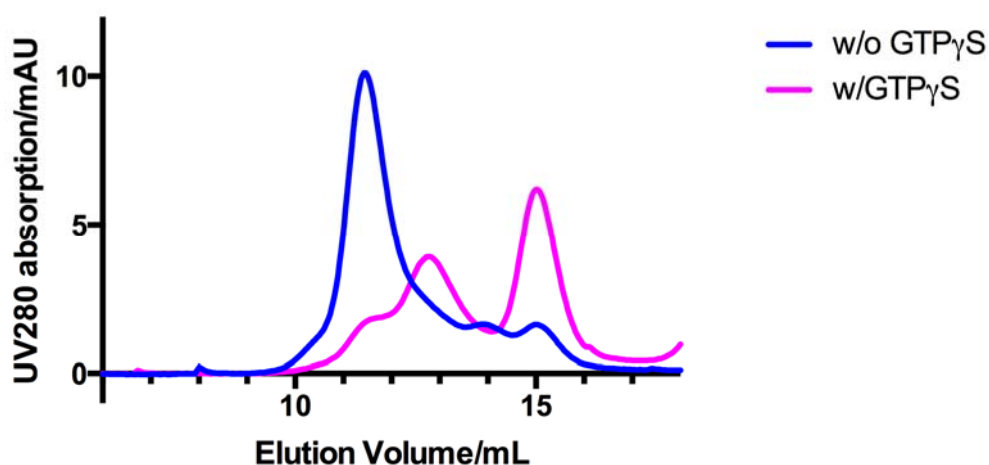


図5. 単離した M2/G-protein 複合体の GTP・S 存在下・非存在下でのゲルろ過クロマトグラフィー.

8. 研究の成果（「6. 研究概要」の内容と対応させつつ、本研究によって得られた新たな知見、成果を平易な表現で記述してください。）

(1) 学術的価値（本研究により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果）

M2 受容体にオルソステリックリガンド（化合物 A：アンタゴニスト）とアロステリックモジュレータ（化合物 B：PAM）の両方が結合した立体構造を解くことに成功した（米国側と共同で論文作成中）。これにより、GPCR を不活性型（アンタゴニスト結合型）に安定化するサブタイプ選択的なアロステリックモジュレータを設計することが可能になる（成果①）。一方、内在性のアゴニストによる GPCR のシグナル伝達を正または負にコントロールするアロステリックモジュレータ（PAM と NAM）を設計するには、GPCR/G-protein 複合体の高分解能の立体構造が必要となる（成果⑤）。M2 受容体の活性化やアゴニストに対する結合親和性に、リガンド結合サイトから離れた第 3 細胞内ループが関与していることは非常に興味深い結果となった（成果②）。また、G-protein が結合する M2 受容体を複合体として単離することができた（成果⑤）。精製した M2/G-protein 複合体は結晶化などの構造解析に向けて、十分な質（室温で一週間乖離しない）と量（ミリグラムオーダーの精製が可能）を兼ね備えており、Gi/o タイプが結合した GPCR 複合体の構造解析に成功すれば世界初の結果となる。今後、構造解析研究をさらに進めることで、これまで解かれている Gs タイプの活性化機構との比較、共通メカニズムまたは各々の特異性などを明らかにすることができる。また、受容体側からは、高い相同性をもつ M2 と M3 受容体が、各々異なる G-protein と特異的に共役する認識機構について知見がもたらされるものと期待される。

(2) 米国との交流実績（本研究による国際共同研究の活性化や、両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果）

本プロジェクトによる国際共同研究により、論文には記載されていない重要な情報を知ることができた。例えば、唯一の成功例である β_2 -adrenergic receptor/Gs 複合体の結晶構造解析では、バッファー中の還元剤濃度の調節に細心の注意が払われ、これが高分解能結晶創成に繋がったことである。GPCR は細胞外にジスルフィド結合が存在していることから発現・精製には、還元剤を添加してはいけないと考えられてきた。実際に還元剤を添加してリガンド結合を調べるとリガンドの結合が弱くなるという報告も数多くあり、ムスカリン受容体でも同様の結果が得られると考えていた。しかし、少なくとも M2 受容体の場合、還元剤存在下では、非存在下と同等か、それ以上の熱安定性を持ち、リガンド結合能に至っては、還元剤存在下の方が、アゴニスト結合能が上昇することが明らかとなった（成果③）。還元剤によるリガンド結合への影響は、GPCR によって異なる可能性が示唆された。この結果は、両国の研究者の学術交流によって初めて確認された結果と言える。また、GPCR のコンフォメーションを安定化する目的で、C 末端に G-protein の α サブユニットを融合させたところ、M2 受容体の発現量が 2 倍程度上昇した。そこで、日本側でも試しに GPCR のコンフォメーション安定化には全く関与しないと思われる EGFP（蛍光タンパク分子）を融合させてみたところ、予想に反して α サブユニットと同様の効果が得られた（成果④）。発現量が上昇する理由は分かっていないが、M2 受容体の C 末端に可溶性タンパク質を融合すると発現量が上昇した。同様の効果は、米国側の別の受容体でも確認されていることから、これが GPCR の発現量を上昇させる上で汎用性のある戦略である可能性が高い。

(3) 社会的貢献（社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか）

一般的に、結合実験や機能アッセイを用いた化合物のランダムスクリーニングでは、最初のヒット化合物の

活性は弱いことが多く、強活性化化合物を取得するためには多くの化合物を合成しなければならない。また、多くの化合物を合成しても、強活性化化合物を取得できないことも少なくない。そこで、ムスカリン受容体の立体構造をモデルとして、「効率的な創薬開発の基盤」の構築を目指した。インシリコスクリーニングにより、数万種類からなる化合物ライブラリーの中からアロステリック部位に結合する候補化合物を高いヒットレートでスクリーニングするためには、(アゴニストの結合した GPCR 単独の構造では不十分で) G-protein の結合した GPCR の構造が必要となることも分かってきた。さらに、取得された候補化合物とムスカリン受容体の共結晶構造を解析することにより、強活性化化合物の合理的な最適化が可能になると期待される。将来的には、ムスカリン受容体をモデルとしたファーマコフォアモデルを構築し、バーチャルスクリーニングを用いた効率的な化合物スクリーニングも可能にすることで、その他の GPCR にも応用できる技術とし、新薬開発のコストや時間を削減したい。

(4) 若手研究者養成への貢献 (若手研究者養成への取り組み、成果)

平成 25 年度には、研究員の寿野を雇用し、Kobilka 博士の主催する GPCR workshop (ハワイ) に参加したり、Kobilka 研究室に中期滞在したことで、米国側のメンバーと知り合いとなり、その後の研究打ち合わせやサンプルの供与がスムーズに行えた。寿野は留学経験がなかったが、英語でコミュニケーションを取りながら最先端の技術を学ぶことができた。平成 26 年度と 27 年度に研究員の前田を雇用し、Kobilka 研究室に長期滞在した。前田は、これまでにスイスで三年間研究を行ってきた経験があり、Kobilka 研究室では即戦力として、高難易度の研究 (M2/G-protein 複合体形成) の立ち上げから日本側への技術導入を行うことができた。

(5) 将来発展可能性 (本研究・交流事業を実施したことにより、当初見込んでいた将来的な発展は認められたか)

本プロジェクト期間内に、M2/G-protein 複合体の構造解析までは辿り着かなかったものの、安定な複合体を形成させるという点については、十分に結晶化に使用することのできる質と量の複合体を単離することができた。ターゲットとなる複合体が生体内では非常に一時的にしか存在せず (本来) 不安定なものであることを考えると、これは特筆すべき成果といえる。複合体単離に至るまでの試行錯誤とそこから派生した知見は、今後の GPCR/G-protein 研究にとっても有用なものとなる。また、構造研究とは別に、この複合体を用いて構造認識抗体及び機能制御抗体を探索することが可能となり、これからの同分野にとって極めて貴重なツールを生み出す可能性を秘めている。

(6) その他 (上記(1)～(5)以外に得られた成果があれば記述してください)

研究員の寿野と前田は、異なる時期に継投する形で雇用し、Kobilka 研究室に順に派遣した。同じプロジェクトで雇用されたこと、同じ Kobilka 研究室に派遣されたこと、ムスカリン受容体という同じターゲットについて研究することで、二人の間には自然と連帯感が生まれ、日本側と米国側を結びつける潤滑油として活躍してくれた。国際共同研究は、一般的に代表者同士の面識はあるが、研究員同士は研究以外の連絡はなく、ポストに指示されて動くだけことが多い。しかし、本プロジェクトは、研究費を人件費にも使えたことで、雇用された研究員は、派遣先の研究室でも、所属する日本側の研究室と同じ一つのラボとして、米国側のメンバーとタイトに協力して、プロジェクトを発展させることができた。このような研究員、一人一人の意識 (心理) は、本プロジェクト申請前には予想していなかった。国際共同研究において、お互いの研究員が (単に) メールや電話だけで仕事のやりとりをするのではなく、(単純なことではあるが) 直接、顔を合わせ、一緒に食事をしたり、会話を楽しむことの重要性を改めて認識することができた。

9. 研究発表（本共同研究の一環として発表したもの、又は、発表予定のものについて記入してください。なお、印刷物がある場合は1部添付してください。）

【雑誌論文】 計（8）件 うち査読付論文 計（3）件

共著の有無*	著者名	論文標題			
無	小林拓也	ムスカリン受容体の立体構造が明らかに			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
	医学のあゆみ 医歯薬出版	無	Vol.243 No.11,12	2012	983-984
無	著者名	論文標題			
	小林拓也	GPCRのX線結晶構造解析に成功するための技術的進展			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
実験医学 羊土社	無	Vol.31 No.3	2013	358-366	
無	著者名	論文標題			
	Murai Y., et al.	Synthesis of photoreactive 2-phenethylamine derivatives - Synthesis of adenosine derivative enabling functional analysis of adenosine receptors by photoaffinity labeling.			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Eur. J. Org. Chem.	有	2013	2013	2428-2433	
無	著者名	論文標題			
	小林拓也	G蛋白質共役受容体のX線結晶構造解析の進歩			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
血栓と循環 メディカルレビュー社	無	Vol.21, No.3	2013	33-40	
無	著者名	論文標題			
	小林拓也、岩田想	GPCRの立体構造から解き明かす生命科学			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
実験医学増刊 羊土社	無	32	2014	84-91	
無	著者名	論文標題			
	Suharni et al.	Proteoliposome-based selection of a recombinant antibody fragment against the human M2 muscarinic acetylcholine receptor.			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.	有	33	2014	378-385	
無	著者名	論文標題			
	小林拓也	ムスカリン性アセチルコリン受容体の種類と役割			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Clinical Neuroscience	無	Vol. 33 No. 9	2015	978-979	
無	著者名	論文標題			
	Nomura et al.	Structure and transport mechanism of the mammalian fructose transporter GLUT5.			
	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Nature	有		2015	In press	

* 10 ページ<備考>6. 参照

備考：必要に応じて、欄を追加してください。

【学会発表】計（12）件 うち招待講演 計（7）件

①	発表者名	発表標 題	
	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	
	学会等名	発表年月日	発表場 所
	神経化学会公開シンポジウム2012	2012年9月30日	兵庫県 神戸市
②	発表者名	発表標 題	
	Kobayashi T.	Crystallization of mammalian membrane proteins using antibody fragments.	
	学会等名	発表年月日	発表場 所
	4 th International Symposium on Diffraction Structural Biology	2013年5月29日	愛知県 名古屋市
③	発表者名	発表標 題	
	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	
	学会等名	発表年月日	発表場 所
	よこはまNMR構造生物学研究会 第47回ワークショップ	2013年7月3日	神奈川県 横浜市
④	発表者名	発表標 題	
	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	
	学会等名	発表年月日	発表場 所
	第86回日本生化学会大会	2013年9月12日	神奈川県 横浜市
⑤	発表者名	発表標 題	
	Kobayashi T.	Crystallization of human membrane proteins using antibody fragments.	
	学会等名	発表年月日	発表場 所
	Protein Island Matsuyama (PIM) International Symposium 2013	2013年9月18日	愛媛県 松山市
⑥	発表者名	発表標 題	
	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	
	学会等名	発表年月日	発表場 所
	千里ライフサイエンスセミナー	2013年10月16日	大阪府 大阪市
⑦	発表者名	発表標 題	
	小林拓也	G蛋白質共役受容体の構造生物学の進展とその創薬への応用	
	学会等名	発表年月日	発表場 所
	第87回日本内分泌学会学術総会	2014年4月25日	福岡県 福岡市
⑧	発表者名	発表標 題	
	小林拓也	GPCRの立体構造を認識する抗体から広がる新たな生命科学	
	学会等名	発表年月日	発表場 所
	第87回日本内分泌学会学術総会	2014年4月25日	福岡県 福岡市
⑨	発表者名	発表標 題	
	Takuya Kobayashi	Structural biology of membrane proteins and drug discovery -GPCR structure determination-	
	学会等名	発表年月日	発表場 所
	2 nd International Symposium Kyoto University-National Taiwan University	1 st Sep., 2014	Kyoto
⑩	発表者名	発表標 題	
	Takuya Kobayashi	Crystallization of human GPCRs using antibody fragment.	
	学会等名	発表年月日	発表場 所
	6 th Special Conference of the International Society for Neurochemistry	21 st Sep., 2014	Tokyo
⑪	発表者名	発表標 題	

	小林拓也	シグナル伝達の選択的な制御を指向したGPCRの構造生命科学を目指して		
	学 会 等 名	発 表 年 月 日	発 表 場 所	
	ERATO末松ガスバイオロジー最終研究成果報告会	2015年1月29日	東京	
⑫	発 表 者 名	発 表 標 題		
	小林拓也	シグナル伝達の選択的な制御を指向したGPCRの構造生命科学		
	学 会 等 名	発 表 年 月 日	発 表 場 所	
	日本薬学会第135年会	2015年3月27日	兵庫県 神戸市	

備考：必要に応じて、欄を追加してください。

【図 書】 計 (5) 件

共著の有無*	著 者 名	出 版 社		
無	村田武士、小林拓也、野村紀通、岩田想	化学同人		
	書 名	発 行 年	総ページ数	
	「膜タンパク質」の重要性とその構造が拓く未来 膜タンパク質構造研究 最前線	2013	pp.1-10	
無	著 者 名	出 版 社		
	小林拓也	化学同人		
	書 名	発 行 年	総ページ数	
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 膜タンパク質構造研究 最前線	2013	pp.19-25		
無	著 者 名	出 版 社		
	浅田秀基、小林拓也	化学同人		
	書 名	発 行 年	総ページ数	
膜タンパク質の発現と精製「昆虫細胞による生産」膜タンパク質構造研究 最前線	2013	pp.96-102		
無	著 者 名	出 版 社		
	Shiroishi M. and Kobayashi T.	Methods in Molecular Biology, Springer Protocols, Human Press, DOI 10.1007/9781-4939-2230-7		
	書 名	発 行 年	総ページ数	
Structural Proteomics High-Through Methods Chapter 9 “Screening of stable G-protein-coupled receptor variants in Saccharomyces cerevisiae.”	2015	159-170/37 5		
無	著 者 名	出 版 社		
	Suno, Asada, and Kobayashi	Neuromethods, Springer Protocols, Human Press, DOI 10.1007/978-1-4939-2858-3		
	書 名	発 行 年	総ページ数	
Muscarinic Receptor; From Structure to Animal Models, Chapter 1 “Towards the Crystal Structure Determination of Muscarinic Acetylcholine Receptors”	2015	1-13/282		

備考：必要に応じて、欄を追加してください。

* 10 ページ<備考>6. 参照