（様式 10）

【16am0101024j0005】

平成 29 年 5 月 23 日

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
（創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業）補助事業成果報告書

I. 基本情報

事　業　名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）最先端 NMR 構造解析に向けた蛋白質試料評価調製システムの高度化と外部支援
（英　語）Support and upgrade of sample evaluation/preparation system for advanced protein NMR study

補助事業担当者　（日本語）大阪大学　蛋白質研究所　教授　藤原敏道
所属 役職 氏名：（英　語）Toshimichi Fujiwara, Professor,
Institute for Protein Research, Osaka University

実　施　期　間：　平成 28 年 4 月 1 日　～　平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

【支援】

阪大グループが開発した大腸菌発現系 pCold-GST ベクターを平成 24 年 10 月にタカラバイオ社より発売するなど，大腸菌等を用いた蛋白質発現の支援技術を整備した。また，大腸菌 SPP 法を用いた安定同位体標識技術，還元耐性スピンラベル剤や還元耐性シフト剤を用いた化学標識技術，ナノディスク作成技術，薬剤蛋白質相互作用を網羅的に解析するための試料評価調製システム，蛋白質キナーゼの大腸菌および昆虫細胞を用いた生産技術など，阪大グループで高度化した技術を支援技術として確立し，実際に支援に適用した。支援の実績としては，コンサルティングが総計 28 件で，内 6 件はサイトビジットであった。コンサルティングを行った 28 件中 15 件で支援申請が行われ，その全てが受理された。受理された 15 件全てで支援作業を進め，内 9 件で支援作業を完了した。残り 6 件は共同研究として支援を継続している。

具体的な支援作業として，目的蛋白質の大腸菌発現用プラスミドベクターの構築から大腸菌発現系における発現量の確認，同位体標識のための培養，精製条件の検討，NMR 測定による性状確認ま

でを行い，検討結果はデータとともにレポートを作成した。目的蛋白質の大腸菌発現用プラスミドベクターとしては，阪大グループが開発した pCold-GST を選択し，通常ベクターでは発現困難であった蛋白質の発現を劇的に改善した。同位体標識，蛋白質精製，NMR 測定などの支援作業も順調で，15 件中 14 件で目的蛋白質の性状確認まで到達できた。さらに 19F を用いた化合物ライブラリを構築し，19F-NMR によるスクリーニング体制を整え，3 件の支援を行った。

【高度化】

大腸菌 SPP 法を用いた新規の安定同位体標識蛋白質の発現法の開発では，再現性よく目的蛋白質を発現させるプロトコールを確立することに成功し，膜貫通蛋白質 pHtrII の同位体標識に適用し，大腸菌の脂質膜中に高効率で標識された pHtrII の発現に成功した。さらに，大腸菌の固体 NMR 測定で，脂質膜中に生理的条件で存在する pHtrII の NMR 測定と立体構造情報の取得にも成功した。

化学的修飾法による安定同位体標識では，NMR の高感度観測を可能にする ^{13}C 標識メチル基を，翻訳後リジン側鎖に化学的に結合させて測定する方法を確立し，蛋白質間相互作用が極めて低濃度（0.2 μ M，世界最高感度）で解析可能になった。さらに，通常測定では解析困難な高分子量蛋白質に対して，この手法でシグナルの検出・解析可能であることを明らかにした。また，リジン側鎖に架かる塩橋が高精度に検出できることを見出し，NMR 法では初めてとなる塩橋を介した距離情報の取得とそれらを用いた構造解析に成功した。

大腸菌高密度培養法による安定同位体標識については，従来法の約 5 倍の効率で同位体標識に成功し，アミノ酸選択標識が可能な培養法に発展させた。これにより，高分子量化による NMR 解析のボトルネックが解消するだけでなく，高密度培養法によって培地量が少なくなり，同位体標識のコストが大幅に下がり，アミノ酸選択標識が現実的な手法へと発展した。また，これらの手法を支援に利用し，一般に有効と考えられているメチル基 ^{13}C 標識体では Met 以外で再現性が乏しいこと，分子量 5 万程度までであれば重水素標識していない主鎖 ^{15}N 標識体が Met/Lys などのアミノ酸で有効であることが明らかとなった。

NMR 性状評価においては，NMR によるインタクト Cell での構造評価が可能な支援技術の確立に着手し，測定に成功した。さらに，インタクト Cell 中の同位体標識蛋白質の直接観測法について，実験条件を検討した。その結果，試みた全ての蛋白質でスペクトルが改善する発現条件を発見した。さらに電気穿孔法によるヒト細胞への安定同位体標識蛋白質の導入にも成功している。さらに，簡便に NMR 試料の性状評価を行うために，完全自動 NMR 信号帰属システム MagRO の構築に成功した。

NMR 高度利用では，*In situ/in cell* NMR などを含む高度な NMR 測定を可能とする新規技術の確立に着手し，蛋白質の立体構造情報を取得する新手法として細胞内の還元条件下でも蛋白質に標識できるスピンラベル剤やシフト剤の開発を行った。本手法により新規スピンラベル剤やシフト剤を蛋白質に対して長時間安定に結合を維持させることが可能になり，還元条件下でも原子間距離を正確に測定することが可能になった。また，NOE 不足で立体構造決定できなかった蛋白質に，9 種のスピンラベル体から得た PRE 距離制限を用いることで，精密構造決定が可能であることを発見した。

[Support]

Support technology for protein expression using Escherichia coli etc. was developed. E. coli expression system pCold-GST vector developed by the Osaka University group is released from Takara Bio Inc. Stable isotope labeling technology using Escherichia coli SPP method, chemical labeling technology using reduction tolerant spin labeling agent and/or reduction resistance shift agent,

nanodisc production technology, drug protein interaction, sample evaluation system, and sample production technology for protein kinase using Escherichia coli, etc., are developed as a support technology, and applied it to support. As a result of the support, consulting totaled 28 cases, 6 of them were site visits. Applications for assistance were made in 15 of the 28 consulting companies, all of which were accepted. We carried out support work for all 15 cases accepted, and completed 9 support projects. The remaining six projects are continuing support as collaborative research.

As a concrete support operation, the following are performed, the construction of the plasmid vector for expressing Escherichia coli of the target protein, confirmation of expression level in the E. coli expression system, culture for isotope labeling, examination of purification conditions, and confirmation of properties by NMR measurement, and report production along with data. As a plasmid vector for expression of the target protein in Escherichia coli, pCold-GST developed by the Osaka University group was selected, and the expression of the protein which was difficult to express with ordinary vectors was dramatically improved. Isotope labeling, protein purification, NMR measurement, etc. were also performed, and 14 out of 15 cases were able to evaluate the properties of the target proteins. Furthermore, we constructed a library of chemical compounds possessing 19F, prepared a screening system for 19 F-NMR, and provided three supports.

[Upgrading]

Development of a novel stable isotope labeled protein expression method using Escherichia coli SPP method succeeded in establishing a protocol for expressing a target protein with good reproducibility and applied to isotope labeling of transmembrane protein pHtrII, We succeeded in expressing pHtrII labeled with high efficiency in the lipid membrane. In addition, NMR measurement of pHtrII present in physiological conditions in the lipid membrane and acquisition of three-dimensional structure information were also successful by solid-state NMR measurement of Escherichia coli.

In the stable isotope labeling by the chemical modification method, a method to chemically bond a 13C-labeled methyl group to a post-translational lysine side chain, which enables highly sensitive observation of NMR, was established, and the interaction between proteins It became analyzable with extremely low concentration (0.2 μM, world's highest sensitivity). Furthermore, we confirmed that this method can detect and analyze signals for high molecular weight proteins that are difficult to analyze in ordinary measurement. We also found that a salt bridge over the lysine side chain can be detected with high accuracy, and succeeded in acquiring distance information via salt bridge, which is the first time in NMR method, and structural analysis using them.

For stable isotope labeling by E. coli high density culture method, we succeeded in isotope labeling at about 5 times the efficiency of conventional methods, and developed it into a culture method which enables amino acid selection labeling. This not only eliminates the bottleneck of NMR analysis due to high molecular weight but also reduces the amount of medium by the high density culture method, the cost of isotope labeling drastically decreases, and the amino acid selection label becomes a practical method. In addition, by using these methods for support, it was found that methyl group 13C-labeled substance, which is generally considered to be effective, has poor reproducibility except for Met, and when the molecular weight is up to about 50,000. Instead, the main chain 15N labeling without deuterium labeling was effective for amino acids selective labeling of Met / Lys.

In the NMR characterization evaluation, we began establishment of assistive technology capable of structure evaluation in intact cell by NMR and succeeded in its measurement. Furthermore, the experimental conditions were examined for direct observation of isotope-labeled protein in intact cell. As a result, we discovered the expression condition that the spectrum improves for all proteins tried. We have also successfully introduced stable isotope-labeled proteins into human cells by electroporation. Furthermore, in order to evaluate the properties of the NMR sample conveniently, we succeeded in constructing a completely automated NMR signal assignment system MagRO.

In advanced use of NMR, we began establishing new technologies enabling advanced NMR measurements including in situ / in cell NMR etc, and as a new method to acquire information on the three-dimensional structure of proteins, even in intracellular reducing conditions, spin labeling agents and shift agents were developed. It became possible to accurately measure interatomic distances even under reducing conditions. We also discovered that precise structure determination is possible by using PRE distance limitation obtained from nine kinds of spin labels on proteins which could not be determined the structure due to NOE deficiency.

III. 成果の外部への発表

（１） 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌　2 件、国際誌　37 件）

1. Naohiro Kobayashi, Yoko Harano, Naoya Tochio, Eiichi Nakatani, Takanori Kigawa, Shigeyuki Yokoyama, Steve Mading, Eldon L. Ulrich, John L. Markley, Hideo Akutsu, and Toshimichi Fujiwara. An automated system designed for large scale NMR data deposition and annotation: application to over 600 assigned chemical shift data entries to the BioMagResBank from the Riken Structural Genomics/Proteomics Initiative internal database. Journal of Biomolecular NMR. 2012, 53, 311-320.
2. Yoh Matsuki, Keisuke Ueda, Toshitaka Idehara, Ryosuke Ikeda, Isamu Ogawa, Shinji Nakamura, Mitsuru Toda, Takahiro Anai, and Toshimichi Fujiwara. Helium-cooling and -spinning dynamic nuclear polarization for sensitivity-enhanced solid-state NMR at 14 T and 30 K. Journal of Magnetic Resonance. 2012, 225, 1-9.
3. Yoshikazu Hattori, Kyoko Furuita, Izuru Ohki, Takahisa Ikegami, Harumi Fukada, Masahiro Shirakawa, Toshimichi Fujiwara, and Chojiro Kojima. Utilization of lysine 13C-methylation NMR for protein-protein interaction studies. Journal of Biomolecular NMR. 2012, 55, 19-31.
4. Keisuke Ikeda, Ayako Egawa, and Toshimichi Fujiwara. Secondary Structural Analysis of Proteins Based on 13C Chemical Shift Assignments in Unresolved Solid-State NMR Spectra Enhanced by Fragmented Structure Database. Journal of Biomolecular NMR. 2012, 55, 189-200.
5. Rei Abe-Yoshizumi, Shiori Kobayashi, Mizuki Gohara, Kokoro Hayashi, Chojiro Kojima, Seiji Kojima, Yuki Sudo, Yasuo Asami and Michio Homma. Expression, purification and

biochemical characterization of the cytoplasmic loop of PomA, a stator component of the Na+ driven flagellar motor. Biophysics. 2012, 9, 21-29.

6. Ken-ichiro Taoka, Izuru Ohki, Hiroyuki Tsuji, Chojiro Kojima, and Ko Shimamoto. Structure and function of florigen and the receptor complex. Trends in Plant Science. 2013, 18, 287-294.
7. Jakub Sebera, Jaroslav Burda, Michal Straka, Akira Ono, Chojiro Kojima, Yoshiyuki Tanaka, and Vladimir Sychrovsky. Formation of the T-HgII-T Metal-Mediated DNA Base Pair; Proposal and Theoretical Calculation of the Reaction Pathway. Chemistry - A European Journal. 2013, 19, 9884-9894.
8. Hiroshi Yamaguchi, Jakub Sebera, Jiro Kondo, Shuji Oda, Tomoyuki Komuro, Takuya Kawamura, Takenori Dairaku, Yoshinori Kondo, Itaru Okamoto, Akira Ono, Jaroslav V. Burda, Chojiro Kojima, Vladimir Sychrovsky, and Yoshiyuki Tanaka. The structure of metallo-DNA with consecutive T-HgII-T base-pairs explains positive entropy for the metallo-base-pair formation. Nucleic Acids Research. 2013, 26, 1-6.
9. Suyeon Bak, Su-Jin Kang, Toshiharu Suzuki, Masasuke Yoshida, Toshimichi Fujiwara, and Hideo Akutsu. Improved Purification of Thermophilic FoF1-ATP Synthase c-Subunit Rings and Solid-State NMR Characterization of Them in Different Lipid Membranes. Journal of the Korean Magnetic Resonance Society. 2013, 17, 1-9.
10. Ken-ichi Kosami, Izuru Ohki, Kokoro Hayashi, Ryo Tabata, Sayaka Usugi, Tsutomu Kawasaki, Toshimichi Fujiwara, Atsushi Nakagawa, Ko Shimamoto, and Chojiro Kojima. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of a rice Rac/Rop GTPase, OsRac1. Acta Crystallographica Section F. 2013, 70, 113-115.
11. Su-Jin Kang, Yasuto Todokoro, Ikuko Yumen, Bo Shen, Iku Iwasaki, Toshiharu Suzuki, Atsushi Miyagi, Masasuke Yoshida, Toshimichi Fujiwara, and Hideo Akutsu. Active-Site Structure of Thermophilic Foc Subunit Ring in Membranes Elucidated by Solid-State NMR. Biophysical J. 2014, 106, 390-398.
12. Yoshinori Tatematsu, Yuusuke Yamaguchi, Toshitaka Idehara, Tatsuru Kawase, Ryoichi Ichioka, Isamu Ogawa, Teruo Saito, and Toshimichi Fujiwara. Development of second harmonic gyrotrons, Gyrotron FU CW GII and Gyrotron FU CW GIII, equipped with internal mode converters. Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves. 2014, 35(2), 169-178.
13. SUGIKI T, FUJIWARA T, KOJIMA C. Latest approaches for efficient protein production in drug discovery. Expert Opinion on Drug Discovery. 2014, 9, 1189-204.
14. KOSAMI K, OHKI I, NAGANO M, FURUITA K, SUGIKI T, KAWANO Y, KAWASAKI T, FUJIWARA T, NAKAGAWA A, SHIMAMOTO K, KOJIMA C. The crystal structure of the plant small GTPase OsRac1 reveals its mode of binding to NADPH oxidase. The Journal of Biological Chemistry. 2014, 289, 28569-78.
15. KATAOKA S, FURUITA K, HATTORI Y, KOBAYASHI N, IKEGAMI T, SHIOZAKI K, FUJIWARA T, KOJIMA C. (1)H, (15)N and (13)C resonance assignments of the conserved region in the middle domain of S. pombe Sin1 protein. Biomolecular NMR Assignments. 2015, 9, 89-92.

16. IDEHARA T, TATEMATSU Y, KHUTORYAN EM, KULESHOV AN, UEDA K, YAMAGUCHI Y, MATSUKI Y, FUJIWARA T. The development of 460 GHz gyrotrons for 700 MHz DNP-NMR spectroscopy. Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves. 2015, 36, 613-27.
17. IDEHARA T, KHUTORYAN EM, TATEMATSU Y, YAMAGUCHI Y, KULESHOV AN, DUMBRAJS O, MATSUKI Y, FUJIWARA T. High speed frequency modulation of a 460 GHz gyrotron for enhancement of 700 MHz DNP-NMR spectroscopy. Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves. 2015, 36, 819-29.
18. FURUITA K, KATAOKA S, SUGIKI T, HATTORI Y, KOBAYASHI N, IKEGAMI T, SHIOZAKI K, FUJIWARA T, KOJIMA C. Utilization of paramagnetic relaxation enhancements for high-resolution NMR structure determination of a soluble loop-rich protein with sparse NOE distance restraints. Journal of Biomolecular NMR. 2015, 61, 55-64.
19. DAIRAKU T, FURUITA K, SATO H, SEBERA J, YAMANAKA D, OTAKI H, KIKKAWA S, KONDO Y, KATAHIRA R, MATTHIAS BICKELHAUPT F, FONSECA GUERRA C, ONO A, SYCHROVSKY V, KOJIMA C, TANAKA Y. Direct detection of the mercury-nitrogen bond in the thymine-Hg(II)-thymine base pair with (199)Hg NMR spectroscopy. Chemical Communications. 2015, 18, 8488-91.
20. MATSUKI Y, NAKAMURA S, FUKUI S, SUEMATSU H, FUJIWARA T. Closed-cycle cold helium magic-angle spinning for sensitivity-enhanced multi-dimensional solid-state NMR. Journal of Magnetic Resonance. 2015, 259, 76-81.
21. KINOSHITA M, KIM JY, KUME S, SAKAKIBARA Y, SUGIKI T, KOJIMA C, KURISU G, IKEGAMI T, HASE T, KIMATA-ARIGA Y, LEE YH. Physicochemical nature of interfaces controlling ferredoxin NADP(+) reductase activity through its interprotein interactions with ferredoxin. Biochimica et Biophysica Acta. 2015, 1847, 1200-11.
22. DAIRAKU T, FURUITA K, SATO H, KONDO Y, KOJIMA C, ONO A, TANAKA Y. Exploring a DNA sequence for the three-dimensional structure determination of a silver(I)-mediated C-C base pair in a DNA duplex by 1H NMR spectroscopy. Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids. 2015, 34, 877-900.
23. GUTMANAS A, ADAMS PD, BARDIAUX B, BERMAN HM, CASE DA, FOGH RH, GUNTERT P, HENDRICKX PM, HERRMANN T, KLEYWEGT GJ, KOBAYASHI N, LANGE OF, MARKLEY JL, MONTELIONE GT, NILGES M, RAGAN TJ, SCHWIETERS CD, TEJERO R, ULRICH EL, VELANKER S, VRANKEN WF, WEDELL JR, WESTBROOK J, WISHART DS, VUISTER GM. NMR exchange format: a unified and open standard for representation of NMR restraint data. Nature Structural & Molecular Biology. 2015, 22, 433-4.
24. 循環型極低温ヘリウムガス駆動 DNP-MAS-NMR プローブの開発と応用. 松木陽. NMR 学会機関誌. 2015, Vol 6, 85-88 (2015)
25. TAMAKI H, EGAWA A, KIDO K, KAMEDA T, KAMIYA M, KIKUKAWA T, AIZAWA T, FUJIWARA T, DEMURA M. Structure determination of uniformly 13C, 15N labeled protein using qualitative distance restraints from MAS solid-state 13C-NMR observed paramagnetic relaxation enhancement. Journal of Biomolecular NMR. 2016, 64, 87-101.

26. MATSUKI Y, IDEHARA T, FUKAZAWA J, FUJIWARA T. Advanced instrumentation for DNP-enhanced MAS NMR for higher magnetic fields and lower temperatures. Journal of Magnetic Resonance. 2016, 264, 107-115.
27. YOKOCHI M, KOBAYASHI N, ULRICH EL, KINJO AR, IWATA T, IOANNIDIS YE, LIVNY M, MARKLEY JL, NAKAMURA H, KOJIMA C, FUJIWARA T. Publication of nuclear magnetic resonance experimental data with semantic web technology and the application thereof to biomedical research of proteins. Journal of Biomedical Semantics. 2016, 7, 16.
28. LIN Y, KARDOS J, IMAI M, IKENOUE T, KINOSHITA M, SUGIKI T, ISHIMORI K, GOTO Y, LEE YH. Amorphous aggregation of Cytochrome c with inherently low amyloidogenicity is characterized by the metastability of supersaturation and the phase diagram. Langmuir. 2016, 32, 2010-22.
29. OZAWA K, KRALICEK AV. Cell-free protein synthesis for NMR structural analysis of large proteins and complexes. In Application of NMR Spectroscopy. 2016, 4, 263-90.
30. HARADA K, YAMASHITA E, INOUE K, YAMAGUCHI K, FUJIWARA T, NAKAGAWA A, KAWASAKI T, KOJIMA C. Plant-specific DUF1110 protein from Oryza sativa: expression, purification and crystallization. Acta Crystallographica section F. 2016, 72, 480-4.
31. ALSANOUSI N, SUGIKI T, FURUITA K, SO M, LEE YH, FUJIWARA T, KOJIMA C. Solution NMR structure and inhibitory effect against amyloid-β fibrillation of Humanin containing a d-isomerized serine residue. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2016, 477, 647-53.
32. LEE YH, SUGIKI T. Advanced techniques to detect protein-protein interactions using solution nuclear magnetic resonance. Part I: chemical shift perturbation and residual dipolar coupling. Protein-Protein Interactions (PPIs). 2016, Chapter 1.
33. SUGIKI T, LEE YH. Advanced techniques to detect protein-protein interactions using solution nuclear magnetic resonance. Part II: cross-saturation, paramagnetic effects, and in-cell NMR. Protein-Protein Interactions (PPIs). 2016, Chapter 2.
34. KIM JY, KINOSHITA M, KUME S, GT H, SUGIKI T, LADBURY JE, KOJIMA C, IKEGAMI T, KURISU G, GOTO Y, HASE T, LEE YH. Non-covalent forces tune the electron transfer complex between ferredoxin and sulfite reductase to optimize enzymatic activity. Biochemical Journal. 2016, 473, 3837-54.
35. Sugiki T, Takeuchi K, Shimada I, Takahashi H. Preparation of isotopically-labeled recombinant proteins by using yeast Kluyveromyces lactis expression system. PSSJ Archives. 2016, 9, e082.
36. TATEBE H, MURAYAMA S, YONEKURA T, HATANO T, RICHTER D, FURUYA T, KATAOKA S, FURUITA K, KOJIMA C, SHIOZAKI K. Substrate specificity of TOR complex 2 is determined by a ubiquitin-fold domain of the Sin1 subunit. eLife. 2017, 7, e19594.
37. SEBERA J, HATTORI Y, SATO D, REHA D, NENCKA R, KOHNO T, KOJIMA C, TANAKA Y, SYCHROVSKY V. The mechanism of the glycosylase reaction with hOGG1 base-excision repair enzyme: concerted effect of Lys249 and Asp268 during excision of 8-oxoguanine. Nucleic Acid Research. 2017, in press.

38. SUGIKI T, FUJIWARA T, KOJIMA C. Cold-shock expression system in E. coli for protein NMR studies. Methods in Molecular Biology. 2017, in pres.
39. SUGIKI T, KOBAYASHI N, FUJIWARA T. Modern technologies of solution nuclear magnetic resonance spectroscopy for three-dimensional structure determination of proteins open avenues for life scientists. Computational and Structural Biotechnology Journal. 2017, in press.

（2） 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 精製蛋白質への標識導入技術の開発, 口頭, 児嶋長次郎, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/4, 国内.
2. 難発現蛋白質の安定同位体標識と大量発現を可能にする pCold-GST システムの技術開発, ポスター, 片岡沙織, 杉木俊彦, 古板恭子, 藤原敏道, 児嶋長次郎, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/5, 国内.
3. hOGG1 の遺伝子修復機構の解析と性状解析, ポスター, 佐藤大地, 米山桃子, 河原郁美, 古板恭子, 児嶋長次郎, 根東義則, 田中好幸, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/5, 国内.
4. 硬直な構造をもつ新規ランタニドキレート剤を用いたタンパク質の常磁性 NMR 研究, ポスター, 服部良一, 山口拓実, Ying Z, 亀田倫史, 加藤晃一, 藤原敏道, 児嶋長次郎, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/5, 国内.
5. ^{19}F 含有化合物ライブラリを用いた創薬 NMR スクリーニング技術の開発, ポスター, 片平律子, 古板恭子, 杉木俊彦, 李映昊, 服部良一, 木川隆則, 上村みどり, 藤原敏道, 児嶋長次郎, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/5, 国内.
6. 単一細胞あたりの特定タンパク質の分子数計測のための定量固体 NMR 法の開発, ポスター, 山田和哉, 江川文子, 藤原敏道, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/5, 国内.
7. 固体 NMR における常磁性緩和促進を用いたタンパク質立体構造解析, ポスター, 田巻初, 江川文子, 木戸浩貴, 亀田倫史, 神谷昌克, 菊川峰志, 相沢智康, 藤原敏道, 出村誠, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/5, 国内.
8. MagRO-NMRView, FLYA による高度に自動化された NMR データ解析, ポスター, 小林直宏, Sahoo BR, 永田崇, 服部良一, Schmidt E, Guntert P, 児嶋長次郎, 藤原敏道, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/5, 国内.
9. 高速高磁場 DNP 効率シミュレーション計算, ポスター, 深澤隼, 藤原敏道, 松木陽, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/5, 国内.
10. BMRB/XML and BMRB/RDF: common open representations of BMRB NMR-STAR data, ポスター, 横地政志, 小林直宏, 岩田武史, 高橋あみ, Ulrich EL, Ioannidis YE, Livny M, Markley JL, 金城玲, 中村春木, 児嶋長次郎, 藤原敏道, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/5, 国内.
11. Theoretical calculation of ^{1}H/^{13}C NMR shifts indicative of salt bridge between methylated Lys and CO_2 group of Asp or Glu residues in proteins, 口頭, Sebera Y, Hattori Y, Tanaka Y, Kojima C, Sychrovsky V, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/6, 国内.

12. $^{15}N/^{199}Hg$ NMR 分光法による水銀を介したチミン-チミン塩基対の構造決定および電子状態解析, 口頭, 田中好幸, 大楽武範, 古板恭子, 岡本到, 小野晶, 鳥越秀峰, Sychrovsky V, 児嶋長次郎, 第 53 回 NMR 討論会, 2014/11/6, 国内.
13. Drug screening using NMR to regulate protein function, 口頭, 児嶋長次郎, The First Trilateral Workshop For Frontier Protein Studies, 2015/4/23-25. 海外.
14. 創薬スクリーニングによる人工花成ホルモンの探索, 口頭, 児嶋長次郎, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「先端核磁気共鳴から展開する生命科学研究」, 2015/4/28, 国内.
15. Paramagnetic NMR techniques utilized for protein structure analysis, 口頭, 児嶋長次郎, The 3rd Awaji International Workshop on "Electron Spin Science & Technology: Biological and Materials Science Oriented Applications", 2015/6/14-17, 国内.
16. フロリゲン複合体形成を制御する化合物の探索, ポスター, 河原郁美, 田岡健一郎, 藤原敏道, 児嶋長次郎, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015/6/24-26, 国内.
17. 低濃度溶液 NMR 解析から明らかとなったイネフィトクロム B の HKRD ドメインの構造と機能, ポスター, 古板恭子, 西ヶ谷有輝, Jee JG, 田中利好, 河野俊之, 加藤悦子, 山崎俊正, 児嶋長次郎, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015/6/24-26, 国内.
18. 硬直な構造をもつ新規ランタニドキレート剤のタンパク質への導入およびその常磁性 NMR 研究, ポスター, 服部良一, 山口拓実, Zhang Y, 亀田倫史, 加藤晃一, 藤原敏道, 児嶋長次郎, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015/6/24-26, 国内.
19. 酵母発現系を用いた安定同位体標識試料の調製法, 口頭, 杉木俊彦, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015/6/24-26, 国内.
20. Utilization of paramagnetic NMR techniques for protein structure determination, 口頭, 児嶋長次郎, The 6th Asia-Pacific NMR Symposium, 2015/8/13-16, 海外.
21. New strategy for high-throughput NMR analysis of biomolecules using the NMR database BMRB and tools for automated NMR analysis, MagRO, FLYA and CYANA, 口頭, 小林直宏, 横地政史, 岩田武史, Sahoo BR, 永田崇, Markley JL, Ulrich EL, Schmidt E, Guntert P, 児嶋長次郎, 藤原敏道, International Society of Magnetic Resonance 2015, 2015/8/16-21, 海外.
22. In-cell solid-state NMR spectroscopy for probing site specificity of macromolecules in Escherichia coli cells, ポスター, Khampa C, Egawa A, Kojima C, Matsuki Y, Fujiwara T. International Society of Magnetic Resonance 2015, 2015/8/16-21, 海外.
23. NMR structure of a DNA duplex containing a silver-mediated C-C base pair, 口頭, Furuita K, Dairaku T, Kojima C, Tanaka Y, The 42th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2015/9/23-25, 国内.
24. フッ素含有化合物ライブラリーを用いた NMR 創薬研究, 口頭, 児嶋長次郎, 第 16 回若手 NMR 研究会, 2015/9/27-29, 国内.
25. 阪大蛋白研での先端固体 NMR 装置の開発と応用, 口頭, 江川文子, 松木陽, 深澤隼, 古板恭子, 児嶋長次郎, 藤原敏道, 第 58 回固体 NMR・材料フォーラム, 2015/10/22-23, 国内.
26. 新規ランタニドキレート剤を用いた蛋白質の NMR 構造解析法の開発, 口頭, 服部良一, 山口拓実, Zhang Y, 亀田倫史, 加藤晃一, 藤原敏道, 児嶋長次郎, 第 54 回 NMR 討論会, 2015/11/6-8, 国内.

27. Scrambling-free なアミノ酸選択的 ^{13}C 標識法と ^{13}C 標識の高選択性を利用したアミノ酸選択的 ^{15}N シグナル抽出法の開発, 口頭, 杉木俊彦, 藤原敏道, 児嶋長次郎, 第 54 回 NMR 討論会, 2015/11/6-8, 国内.
28. 循環型極低温ヘリウム駆動 DNP-MAS-NMR プローブの開発と応用, 口頭, 松木陽, 中村新治, 福居滋夫, 出原敏孝, Sirigiri J, 末松浩人, 藤原敏道, 第 54 回 NMR 討論会, 2015/11/6-8, 国内.
29. C-Ag(II)-C 塩基対を含むメタロ DNA の立体構造解析, 口頭, 古板恭子, 大楽武範, 児嶋長次郎, 田中好幸, 第 54 回 NMR 討論会, 2015/11/6-8, 国内.
30. 小胞体ストレスセンサーIre1p RNase ドメインの基質認識機構, ポスター, 河原郁美, 亀田倫史, 池端悠介, 芦原悠太, 古板恭子, 杉木俊彦, 浜田道昭, 藤原敏道, 河野憲二, 田中好幸, 児嶋長次郎, 第 54 回 NMR 討論会, 2015/11/6-8, 国内.
31. 固体 NMR 法を用いたナトリウムポンプ型ロドプシンの構造解析, ポスター, 斉藤優太, 田巻初, 江川文子, 菊川峰志, 神谷昌克, 相沢智康, 藤原敏道, 出村誠, 第 54 回 NMR 討論会, 2015/11/6-8, 国内.
32. 固体 NMR によるタンパク質測定への圧縮センシングの応用, ポスター, 田巻初, 斉藤優太, 江川文子, 菊川峰志, 神谷昌克, 相沢智康, 藤原敏道, 出村誠, 第 54 回 NMR 討論会, 2015/11/6-8, 国内.
33. 大腸菌によるユビキチン過剰発現時に合成される単一細胞当りの分子数評価を指向した定量固体 NMR, ポスター, 山田和哉, 江川文子, 藤原敏道, 第 54 回 NMR 討論会, 2015/11/6-8, 国内.
34. NMR データベース BioMagResBank の統合的拡張と公開, ポスター, 小林直宏, 横地政史, 岩田武史, 本野千恵, 廣明秀一, 児嶋長次郎, 藤原敏道, 第 54 回 NMR 討論会, 2015/11/6-8, 国内.
35. 高磁場 DNP によるマジック角回転下での核磁化増大を定量的かつ高速にシミュレーションする方法, ポスター, 深澤隼, 藤原敏道, 松木陽, 第 54 回 NMR 討論会, 2015/11/6-8, 国内.
36. ヒト内在性神経保護ペプチド Humanin の立体構造および機能発現に関する NMR 解析, ポスター, 杉木俊彦, Alsanousi N, 古板恭子, 李映昊, 後藤祐児, 藤原敏道, 児嶋長次郎, BMB2015, 2015/12/1-4, 国内.
37. 小胞体ストレスセンサーIRE1a による XBP1u mRNA スプライシングに必須な構造の解析, 口頭, 小池雅昭, 池端悠介, 柳谷耕太, 今川佑介, 河原郁美, 児嶋長次郎, 河野憲二, BMB2015, 2015/12/1-4, 国内.
38. NMR tools developed for drug discovery, 口頭, 児嶋長次郎, International Symposium on Structure and Folding of Disease Rerated Proteins, 2015/12/4-5, 海外.
39. PRE and PCS techniques utilized for high-resolution protein structure determination, 口頭, 児嶋長次郎, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015/12/15-20, 海外.
40. NMR で切り拓く構造生命科学, 口頭, 児嶋長次郎, 蛋白研コロキウム, 2016/3/10, 国内.
41. イネの花序形成制御におけるフロリゲン Hd3a とアンチフロリゲン RCN の競合, ポスター, 鈴木美穂, 田岡健一郎, 石川理恵, 寺川千晶, 米山桃子, 児嶋長次郎, 島本功, 第 57 回日本植物生理学会年会, 2016/3/18-20, 国内.
42. イネの耐病性応答に関与する OsPBI1 の結晶構造解析, ポスター, 原田健一, 山下栄樹, 井上健人, 山口公志, 藤原敏道, 中川敦史, 川崎努, 児嶋長次郎, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016/6/7-9, 国内.

43. ヒト内在性神経細胞保護ペプチド Humanin がβアミロイドの凝集を制御するメカニズムに関する構造生命科学的解析, ポスター, 杉木俊彦, Alsanousi N, 古板恭子, 宗正智, 李映昊, 後藤祐児, 藤原敏道, 児嶋長次郎, 第 16 回日本蛋白質科学会年会, 2016/6/7-9, 国内.
44. Application of the integrated life science databases to NMR analysis of biomacromolecules, 口頭, 小林直宏, 蛋白研国際セミナーProtein NMR beyond, 2016/6/3, 国内.
45. Solution NMR studies of molecular basis for structure and function of lipid transfer protein, 口頭, 杉木俊彦, 蛋白研国際セミナーProtein NMR beyond, 2016/6/3, 国内.
46. Sensitivity enhancement by DNP and solid-state NMR study of proteins, 口頭, 藤原敏道, 蛋白研国際セミナーProtein NMR beyond, 2016/6/3, 国内.
47. Paramagnetic NMR techniques developed for high-resolution protein structure determination, 口頭, Kojima C, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
48. Structural analysis of non-crystalline proteins from unresolved MAS solid-state NMR spectra by spectral fitting approach based on fragmented structure database, ポスター, Ikeda K, Egawa A, Tamaki H, Kameda T, Hayashi K, Kojima C, Fujiwara T, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
49. The salt bridge on protein surface: characterization using the $^{13}CH_3$ NMR probe, ポスター, Hattori Y, Sebera J, Sychrovsky V, Furuita K, Sugiki T, Ohki I, Ikegami T, Kobayashi N, Tanaka T, Fujiwara T, Kojima C, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
50. NMR-based interaction analysis of ^{19}F-containing inhibitors with tyrosine kinase, ポスター, Shinya S, Kobashigawa Y, Furuita K, Fujiwara T, Kojima C, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
51. Spectroscopic and theoretical approaches to the mechanism of RNA cleavage reaction catalyzed by hammerhead ribozyme, ポスター, Tanaka Y, Haruta K, Kawahara I, Ashihara Y, Yamanaka D, Kojima C, Sebera J, Sychrovsky V, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
52. Structure determination of metallo-base pairs with multinuclear NMR spectroscopy, ポスター, Dairaku T, Furuita K, Sato H, Sebera J, Kashiwagi Y, Ono A, Sychrovsky V, Kojima C, Tanaka Y, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
53. Noncovalent forces tune the electron transfer complex between Ferredoxin and sulfite reductase to optimize enzymatic activity, ポスター, Lee YH, Kim JY, Kinoshita M, Sugiki T, Kojima C, Ikegami T, Kurisu G, Goto Y, Hase T, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
54. Physicochemical nature of interfaces controlling Ferredoxin NADP+ reductase activity through its interproteininteractions with Ferredoxin, ポスター, Kinoshita M, Kim JY, Sugiki T, Kojima C, Kurisu G, Ikegami T, Ariga-Kimata Y, Hase T, Lee YH, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.

55. Publication of NMR data archived at BMRB with web standard technologies for federated and integrated search services, ポスター, Yokochi M, Kobayashi N, Iwata T, Ulrich EL, Markley JL, Kojima C, Fujiwara T, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
56. Identification of experimental parameters of which has direct and potent influence for high quality and reproducible *Escherichia coli* in-cell NMR measurements, ポスター, Sugiki T, Yamaguchi Y, Fujiwara T, Inouye M, Kojima C, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
57. The structure and function of plant phytochrome HKRD revealed by NMR analyses of low-concentration samples, ポスター, Furuita K, Nishigaya Y, Jee JG, Tanaka R, Kohno T, Katoh E, Yamazaki T, Kojima C, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
58. CS-Rosetta protein structure determination by solid-state NMR using paramagnetic restraints, ポスター, Tamaki H, Egawa A, Kido K, Kameda T, Kamiya M, Kikukawa T, Aizawa T, Demura M, Fujiwara T, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
59. Solid-state NMR Spectroscopy for exploring the location of macromolecules in living cells, ポスター, Khampa C, Egawa A, Fujiwara T, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
60. The development of the quantitative solid-state NMR and its application to the counting of the number of molecules in an intact *Escherichia coli* cell, ポスター, Yamada K, Egawa A, Fujiwara T, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
61. Assignment of 13C NMR signals of TF_{o}c-ring in lipid membranes and its structural implication, ポスター, Kang SJ, Todokoro Y, Bak S, Suzuki T, Yoshida M, Fujiwara T, Akutsu H, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
62. Advanced Instrumentation for biological DNP-enhanced MAS NMR for higher magnetic fields and lower temperatures, ポスター, Matsuki Y, Idehara T, Nakamura S, Fukui S, Sirigiri J, Suematsu H, Fujiwara T, XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems, 2016/8/21-26, 国内.
63. 深層学習に支援された NMR シグナルの自動解析, 口頭, 小林直宏, 服部良一, 永田崇, 児嶋長次郎, 藤原敏道, 第 55 回 NMR 討論会, 2016/11/16-18, 国内.
64. 高磁場 DNP の高速定量的シミュレーションによる高効率核磁化増大法の研究, 口頭, 深澤隼, 藤原敏道, 松木陽, 第 55 回 NMR 討論会, 2016/11/16-18, 国内.
65. 定量固体 NMR を用いた単一大腸菌細胞内で合成される分子種の同定および分子数の計測, 口頭, 山田和哉, 江川文子, 藤原敏道, 第 55 回 NMR 討論会, 2016/11/16-18, 国内.
66. 高磁場DNPの効率改善をめざした手法開発とその応用, 口頭, 松木陽, 中村新治, 福居滋夫, 出原敏孝, Sirigiri J, 末松浩人, 藤原敏道, 第 55 回 NMR 討論会, 2016/11/16-18, 国内.

67. 化学修飾によるタンパク質の新たな安定同位体標識法の開発, ポスター, 服部良一, Heidenreich D, 横山敬一, 鈴木榮一郎, 田中好幸, 藤原敏道, 児嶋長次郎, 第 55 回 NMR 討論会, 2016/11/16-18, 国内.
68. メチル基を利用した蛋白質の全自動 NMR 構造決定, ポスター, 新家粧子, 小林直宏, 藤原敏道, 児嶋長次郎, 第 55 回 NMR 討論会, 2016/11/16-18, 国内.
69. ナトリウムポンプ型ロドプシンにおけるイオン結合サイトの役割, ポスター, 田巻初, 斉藤優太, 江川文子, 菊川峰志, 相沢智康, 出村誠, 藤原敏道, 第 55 回 NMR 討論会, 2016/11/16-18, 国内.
70. Structural basis of laminopathy: comprehensive study of structure and dynamics of laminopathy-causing LMNA mutants, ポスター, 杉木俊彦, The 42nd Naito Conference, 2016/10/4-7, 国内.
71. A 型ラミン Ig-fold 領域変異によるラミノパチ―発症フェノタイプは DNA 結合活性の低下と関連する, ポスター, 三尾宗代, 杉木俊彦, 山下隼人, 林 由起子, 三尾和弘, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内.
72. 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 法による解析, ポスター, 杉木俊彦, 熊谷圭悟, 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, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内.

（３）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 阪大蛋白研 950 メガヘルツ核磁気共鳴装置の一般公開, 杉木俊彦, いちょう祭, 2015/5/2, 国内
2. 阪大蛋白質研究所の NMR 施設公開, 杉木俊彦, 深澤隼, 大阪教育大学附属天王寺高校の蛋白研訪問, 2015/12/17, 国内
3. 阪大蛋白研 950 メガヘルツ核磁気共鳴装置の一般公開, 杉木俊彦, いちょう祭, 2016/5/1, 国内

（４）特許出願