

桑 島 邦 博 (教授) (2007 年 1 月 1 日 着 任)

A-1) 専門領域：蛋白質科学、生物物理学、生体分子科学

A-2) 研究課題：

- a) α ラクトアルブミンとカルシウム結合性リゾチームのフォールディング機構
- b) α ラクトアルブミンのモルテン・グロビュール状態の特性と生物機能
- c) アミロイド形成能を持つ β_2 ミクログロブリンのフォールディング機構
- d) 大腸菌シャペロニンの機能発現の分子機

A-3) 研究活動の概要と主な成果

- a) α ラクトアルブミンとリゾチームは互いにアミノ酸配列の類似した相同蛋白質であり、それらのフォールディング反応が類似しているか否かを実験的に明らかにすることは、蛋白質のフォールディング問題を考える上で重要である。昨年までの研究で、ヤギ α ラクトアルブミンのフォールディング反応の速度論的解析を行い、フォールディングの遷移状態で構造化する領域は、C ヘリックスと α - β ドメイン境界にあるカルシウム結合部位近傍に局在化していることが明らかになっている。本年は、イヌ乳リゾチームのフォールディング反応の速度論的解析を行い、遷移状態ではカルシウム結合部位の構造は形成されていないことが明らかとなった。したがって、 α ラクトアルブミンとリゾチームは互いに相同で立体構造も類似しているがフォールディング経路が異なることになる。
- b) α ラクトアルブミンのモルテン・グロビュール状態はフォールディング反応の中間体として知られているが、脂肪酸と複合体を形成して腫瘍細胞を選択的に細胞死に導く働きのあることも知られている。このような α ラクトアルブミン - 脂肪酸複合体の物理化学的特性を明らかにすることを目的として、本年は、ヤギ α ラクトアルブミンの酸性条件下におけるモルテン・グロビュール状態の構造を、水素交換二次元 NMR スペクトルを用いて調べた。モルテン・グロビュール状態では C ヘリックス部分がわずかに（水素交換保護度にして 10 ~ 20 程度）安定化していることがわかった。
- c) 透析アミロイドーシスの原因となる β_2 ミクログロブリンのフォールディング機構を調べることを目的として、その酸変性状態からの巻き戻り反応を、ストップフロー法、実時間 NMR スペクトルを用いて解析した。その結果、巻き戻り反応には、不感時間内のバースト相に続いて 4 つの過程が観測された。変性状態では X-プロリンペプチド結合のシス - トランス異性化に由来する二つの分子種が存在し、これらが二つの並行経路に沿って巻き戻ってゆくことが明らかになった。非天然のトランス・プロリン異性体も実質上天然構造まで巻き戻り、その後、ゆっくりとトランス型からシス型へ変換することもわかった（これが 4 つの過程の最後に対応する）。
- d) 大腸菌シャペロニン GroEL は分子量 57 k のモノマーが二重リング状に積み重なった 14 量体であり、ATP 依存的にアロステリックな構造転移を起こして、コ・シャペロニン GroES と複合体を形成する。したがって、GroEL への ATP 結合はその生物機能発現にとって本質的であるが、GroEL モノマーあたりの ATP 結合部位は一つであると考えられている。しかし、最近われわれは、GroEL 単一リング変異体を用いて、ATP 結合によるアロステリック転移の速度論的解析を行い、GroEL モノマーあたり二つの ATP 結合部位があるとの予想をたてた。ATP により誘起される GroEL アロステリック転移の ADP による阻害実験から、400 μ M ATP-100 μ M ADP の条件下では第二 ATP 結合部位が ADP によって占有されることがわかった。この条件下で、azido-ADP による光親和性標識を行い、標識

GroEL を得た。蛍光性亜鉛錯体を用いて標識 GroEL 中のリン酸基の存在を確認できたので、第二 ATP 結合部位の存在が確認されたことになる。今後 第二 ATP 結合部位のアミノ酸配列上の位置を明らかにすることが必要である。

B-1) 学術論文

A. KATO, K. MAKI, T. EBINA, K. KUWAJIMA, K. SODA and Y. KURODA, “Mutational Analysis of Protein Solubility Enhancement Using Short Peptide Tags,” *Biopolymers* **85**, 12–18 (2007).

H. NAKATANI, K. MAKI, K. SAEKI, T. AIZAWA, M. DEMURA, K. KAWANO, S. TOMODA and K. KUWAJIMA, “Equilibrium and Kinetics of the Folding and Unfolding of Canine Milk Lysozyme,” *Biochemistry* **46**, 5238–5251 (2007).

T. OROGUCHI, M. IKEGUCHI, M. OTA, K. KUWAJIMA and A. KIDERA, “Unfolding Pathways of Goat α -Lactalbumin as Revealed in Multiple Alignment of Molecular Dynamics Trajectories,” *J. Mol. Biol.* **371**, 1354–1364 (2007).

B-3) 総説、著書

桑島邦博, 「タンパク質のアンフォールディングとフォールディング」生物物理ハンドブック, 石渡、桐野、美宅編, 分担執筆, 朝倉書店 (2007).

桑島邦博, 「リサーチ・ナビ 文部科学省——特定領域研究『水と生体分子が織り成す生命現象の化学』」未来材料, 2月号, 62–65 (2007).

B-4) 招待講演

桑島邦博, 「蛋白質のフォールディング問題:物質科学と生命科学の接点」日本化学会第87春季年会イブニングセッション「生体分子科学の進展」関西大学千里山キャンパス, 2007年3月.

K. KUWAJIMA, “Molecular Mechanism of Protein Folding,” 1st International Symposium on Nanomedicine-from Basic to Applications-(ISNM2007) & 2nd Molecule-Based Information Transmission and Reception (MB-ITR2007), Okazaki (Japan), April 2007.

桑島邦博, 「真性体および組換え体 ラクトアルブミンの構造の安定性とダイナミクス」平成19年度日本酪農科学シンポジウム, ホテルグランヴェール岐山, 岐阜市, 2007年8月.

K. KUWAJIMA, “Folding of Canine Milk Lysozyme: A Ca^{2+} -Binding Lysozyme,” The 7th KIAS—Soongsil Conference on Protein Structure and Function, Seoul (Korea), October 2007.

B-7) 学会および社会的活動

学協会役員、委員

日本生物物理学会運営委員 (1992–1993, 1999–2000).

日本蛋白質科学会理事 (2001.4–2005.3).

The Protein Society, Executive Council (2005.8–2007.7).

日本生化学会評議員 (2005–).

学会の組織委員

第24回谷口国際シンポジウム“ Old and New Views of Protein Folding, ”木更津(かずさアカデミアパーク)世話人 (1999).

The 1st International Conference on Biomedical Spectroscopy: From Molecule to Men, Cardiff (U.K.), 組織委員 (2002).

The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, Yokohama (Japan), 組織委員 (2004).

KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul (Korea), 組織委員 (2001-).

日本生物物理学会第45回年会, 横浜(パシフィック横浜)年会長 (2007).

文部科学省、学術振興会等の役員等

科学研究費審査部会専門委員会委員 (2002, 2004).

JST 若手個人研究推進事業(CREST)領域アドバイザー (2001-2005).

JST 戦略的創造研究推進事業評価委員 (2004, 2005).

学会誌編集委員

Folding & Design, Editorial Board (1996-1998).

Biochimica et Biophysica Acta, Editorial Board (1998-2003).

J. Biochem. (Tokyo), Editorial Board (1997-2002).

Protein Science, Editorial Board (2001-2006).

Proteins: Structure, Function & Bioinformatics, Editorial Manager (1993-).

J. Mol. Biol., Editorial Manager (2004-).

BIOPHYSICS, Editorial Manager (2005-).

Spectroscopy—Biomedical Applications, Editorial Board (2002-).

科学研究費の研究代表者、班長等

特定領域研究「水と生体分子が織り成す生命現象の化学」領域代表者 (2003-2007).

その他

大阪大学蛋白質研究所外部評価委員 (2000, 2007).

B-8) 大学での講義、客員

Lund 大学(スウェーデン)大学院医学研究科博士論文審査員(Opponent) Jenny Petterson, " Structure-Function Analysis of HAMLET- human α -lactalbumin made lethal to tumor cells, "2007年12月, Ph.D.

B-10)外部獲得資金

一般研究(A), 「シャペロニン GroEL の標的タンパク質認識の分子機構」 桑島邦博 (1995年-1997年).

基盤研究(B), 「シャペロニンの機能発現の分子メカニズム」 桑島邦博 (1998年-1999年).

基盤研究(B), 「高圧温度ジャンプ法と計算機シミュレーションによる蛋白質フォールディング研究」 桑島邦博 (2000年-2002年).

基盤研究(C) (企画調査) 「蛋白質フォールディング研究の企画調査」 桑島邦博 (2001年).

特定領域研究(公募) 「蛋白質一生」 「大腸菌シャペロニンの機能発現の速度論」 桑島邦博 (2002年-2003年).

特定領域研究(公募) 「ゲノム情報科学」 「蛋白質フォールディングの物理化学的解析」 桑島邦博 (2002年)

特定領域研究(計画(2)) 「水と生体分子」 「蛋白質フォールディング機構の物理化学的解明」 桑島邦博 (2003年-2007年).

特定領域研究(計画(1)) 「水と生体分子」 「水と生体分子が織り成す生命現象の化学に関する研究の総括」 桑島邦博 (2003年-2007年).

基盤研究(B), 「シャペロニンの機能発現の速度論的解析」 桑島邦博 (2005年-2007年).

C) 研究活動の課題と展望

蛋白質のフォールディング問題は物理化学としても興味深い¹が、生命科学や医学とも深い関わりを持っている。特に、フォールディング中間体であるモルテン・グロビュール状態の α ラクトアルブミンが脂肪酸(オレイン酸)と複合体(HAMLET)を形成すると抗腫瘍活性を発現するのは興味深い現象であるが、この現象の物理化学的基盤は、今のところ、全く不明である。来年の一つの目標は、水素交換標識と二次元NMRスペクトルを利用してHAMLET複合体の構造解析を行うことである。また、シャペロニンは細胞内の蛋白質フォールディングに関わっており、シャペロニンの作用の分子機構を明らかにすることは、蛋白質フォールディングとより高次の生命現象との関係を解き明かす上で重要である。GroELの第二のATP結合部位のアミノ酸配列上の位置を同定することは来年の大きな課題である。来年は、さらに、水素交換標識二次元NMRを用いてGroEL/ES複合体の構造のダイナミクスを解析する課題にも取り組んでゆきたい。