

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 ラクトアルブミンのモルテン・グロビュール状態の特性と生物機能
- b) ヒト α ラクトアルブミン変異体の結晶構造解析
- 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) 単層 β シート蛋白質のフォールディング機構
- e) 大腸菌シャペロニンの GroEL のアロステリック転移
- f) GroEL/GroES 複合体の構造揺らぎと生物機能

A-3) 研究活動の概要と主な成果

- a) 腫瘍細胞選択的細胞死活性を持つヤギ α ラクトアルブミン - 脂肪酸 (オレイン酸) 複合体の構造解析を，NMR を用いて行っている。蛋白質部分の構造特性はモルテン・グロビュール状態に類似している，本年は，ヤギ α ラクトアルブミン - 脂肪酸複合体とヒト α ラクトアルブミン - 脂肪酸複合体の NMR スペクトルを 920 MHz の NMR 装置を用いて測定し，解析を行った。その結果，同じ抗腫瘍活性があるにもかかわらず，ヤギとヒト α ラクトアルブミンでは脂肪酸結合部位が異なっていた。このことは，複合体の抗腫瘍活性をもたらす特定の脂肪酸結合部位が蛋白質中に存在するのではない，ということを示唆している。結合部位はヤギ及びヒト α ラクトアルブミンのモルテン・グロビュール状態において構造形成している領域と一致していたので，中間体中で疎水性凝縮した部分が結合部位となっている可能性がある。
- b) ヒト α ラクトアルブミン変異体 (K1M) の結晶構造を，1.61 Å の分解能で決定した。K1M の立体構造は真正体ヒト α ラクトアルブミンの立体構造とほぼ一致していた。
- c) 前年に引き続き，透析アミロイドーシスの原因蛋白質である β_2 ミクログロブリンの複雑な巻き戻り過程を明らかにするために，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，天然条件下において，プロリンのシス - トランスの異性化に起因する二つの分子種が存在することが明らかとなった。このことが生体内において， β_2 ミクログロブリンが他の蛋白質に比べてアミロイド線維を形成しやすい要因であると考えられる。
- d) 単層 β シートを持つモデル蛋白質，OspA のフォールディング機構を明らかにするため，尿素による変性状態からの巻き戻り反応をストップフロー蛍光スペクトルにより調査した。巻き戻り反応は遅延相とそれに続くトリプトファン蛍光強度の減少からなる二つの指数関数的過程で表された。遅延相の存在は，巻き戻り経路上の中間体の存在を示唆しており，現在，より詳細な解析を進めている。
- e) シャペロニン GroEL の ATP により誘起されるアロステリック転移の速度過程は ATP 濃度に対して二つのシグモイドで表され，今までの結果より，これは，GroEL 上に二つの ATP 結合部位があることによる。特に二つ目のシグモイダルな ATP 濃度依存性が溶液中のカリウム・イオン (K^+) 濃度に大きく依存することが明らかとなった。現在，ストップフロー法を用いて GroEL (Y485W 変異体) のアロステリック転移の速度過程をさまざまな K^+ 濃度下で解析している。
- f) DMSO 停止水素交換標識二次元 NMR を用いて GroEL/ES 複合体の構造ダイナミクスを解析するために，DMSO 溶液中における GroES のアミドプロトン・シグナルの帰属を行った。現在までに 7 割の帰属が完了している。また GroES 単独での水素交換反応を測定し，溶液中での構造ゆらぎを特徴づけることに成功した。今後は，GroEL/GroES 複合体の測定を行う予定である。

B-1) 学術論文

S. TSUKAMOTO, T. YAMASHITA, Y. YAMADA, K. FUJIWARA, K. MAKI, K. KUWAJIMA, Y. MATSUMURA, H. KIHARA, H. TSUGE and M. IKEGUCHI, “Non-Native α -Helix Formation Is Not Necessary for Folding of Lipocalin: Comparison of Burst-Phase Folding between Lipocalin and β -Lactoglobulin,” *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **76**, 226–236 (2009).

B-3) 総説, 著書

K. KUWAJIMA, T. OROGUCHI, T. NAKAMURA, M. IKEGUCHI and A. KIDERA, “Experimental and Simulation Studies of the Folding/Unfolding of Goat α -Lactalbumin,” in *Water and Biomolecules: Physical Chemistry of Life Phenomena*, K. KUWAJIMA, Y. GOTO, F. HIRATA, M. KATAOKA, M. TERAZIMA, Eds., Springer-Verlag; Berlin & Heidelberg, pp. 13–35 (2009).

B-4) 招待講演

桑島邦博, 「 α ラクトアルブミンとリゾチームのフォールディング経路はなぜ違うのか?」札幌生体高分子シンポジウム, 北海道大学・学術交流会館, 2008年12月.

桑島邦博, 「シャペロニンの構造揺らぎとフォールディング介助機能」科研費新学術領域研究「揺らぎと生体機能」第1回公開シンポジウム, 京都テレサ, 2009年1月.

K. KUWAJIMA, “Pathway vs. funnel perspectives of protein folding,” Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Korea Institute for Advanced Study (KIAS), Seoul (Korea), February–March 2009.

K. MAKABE, “Structures of β -sheet self-assembly mimics,” Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Korea Institute for Advanced Study (KIAS), Seoul (Korea), February–March 2009.

T. NAKAMURA, “Folding mechanism of homologous proteins: A comparative study of goat α -lactalbumin and canine milk lysozyme,” Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Korea Institute for Advanced Study (KIAS), Seoul (Korea), February–March 2009.

A. MUKAIYAMA, “Equilibrium and kinetics of the acid transition of β_2 -microglobulin,” Korea-Japan Seminars on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Korea Institute for Advanced Study (KIAS), Seoul (Korea), February–March 2009.

K. KUWAJIMA, “Folding mechanism of homologous proteins: A comparative study between α -lactalbumin and lysozyme,” 科研費特定領域研究「水と生体分子」成果取りまとめ公開シンポジウム, 岡崎コンファレンスセンター, 2009年3月.

桑島邦博, 「相同蛋白質のフォールディング機構: α ラクトアルブミンとリゾチームの比較研究」次世代スパコンプロジェクト・ナノ分野グランドチャレンジ研究開発・ナノ統合拠点分子科学WG 連続研究会「タンパク質制御(フォールディング)」, 東京医科歯科大学, 2009年3月.

K. MAKABE, “Protein design approach for beta-sheet characterization,” JSPS Exchange Program for East Asian Young Researchers, Hokkaido University–Mahidol University Joint Symposium, Sapporo (Japan), May 2009.

桑島邦博,「大腸菌シャペロニンの構造ダイナミクスと機能発現」第9回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「生体分子の揺らぎと機能」熊本全日空ホテル, 2009年5月.

K. KUWAJIMA, “Hydrogen-exchange kinetics of the *Escherichia coli* chaperonin complex,” Japan-Korea Symposium on Molecular Science 2009 “Chemical Dynamics in Materials and Biological Molecular Sciences,” (Asian Core Program by JSPS), Awaji Yumebutai International Conference Center, July 2009.

桑島邦博,「大腸菌シャペロニンの構造ダイナミクスと機能発現」第58高分子討論会シンポジウム「生体に学ぶセンシング, 物質輸送, 分離」熊本大学工学部, 2009年9月.

K. KUWAJIMA, “A minor component of native β_2 -microglobulin and its relationship to dialysis-related amyloidosis,” The 9th KIAS-SNU Conference on Protein Structure and Function, Seoul National University, Seoul (Korea), October 2009.

B-6) 受賞, 表彰

真壁幸樹, 2009年度日本蛋白質科学会若手奨励賞 (2009).

B-7) 学会および社会的活動

学協会役員等

日本蛋白質科学会副会長 (2008-).

日本生物物理学会中部支部長 (2009-).

日本蛋白質科学会理事 (2001.4-2005.3).

日本生物物理学会運営委員 (1992-1993, 1999-2000).

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

日本生化学会評議員 (2005-).

学会の組織委員等

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 Pasific-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(パシフィコ横浜) 年会長 (2007).

文部科学省, 学術振興会, 大学共同利用機関等の委員等

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 Board (1993-).

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

BIOPHYSICS, Associate Editor (2005–).

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

競争的資金等の領域長等

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

総合研究大学院大学物理科学研究科長 (2008–).

大阪大学蛋白質研究所外部評価委員 (2000, 2007).

B-10) 競争的資金

科研費基盤研究(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).

科研費基盤研究(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).

科研費基盤研究(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).

文部科学省科研費特定領域研究「蛋白質一生」(公募研究) 「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).

文部科学省科研費特定領域研究「ゲノム情報科学」(公募研究) 「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).

文部科学省科研費特定領域研究「水と生体分子」(計画研究(2)) 「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).

文部科学省科研費特定領域研究「水と生体分子」(計画研究(1)) 「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).

日本学術振興会科研費基盤研究(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).

文部科学省科研費特定領域研究(成果取りまとめ) 「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 (2008年).

日本学術振興会科研費基盤研究(B), 「シャペロニンGroELの第二のATP結合部位とその機能的役割」 桑島邦博 (2008年–).

文部科学省科研費新学術領域「揺らぎと生体機能」(計画研究) 「シャペロニンの構造揺らぎとフォールディング介助機能」 桑島邦博 (2008年–).

日本学術振興会科研費若手研究(スタートアップ) 「蛋白質デザインによる自己組織化ナノ繊維形成過程の解明」 真壁幸樹 (2008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、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。今年度の研究では、ヤギ α ラクトアルブミン-オレイン酸複合体(GAMLET)とヒト α ラクトアルブミン-オレイン酸複合体(HAMLET)のNMRスペクトル解析から、それぞれの複合体のオレイン酸結合部位を同定することができた。驚くべきことに、同等の抗腫瘍活性を示したにもかかわらず、GAMLETとHAMLETでは

オレイン酸の結合部位が全く異なっており、ヤギ α LA に対してはカルシウム結合部位近傍に、ヒト α LA に対してはA ヘリックスとB ヘリックスの間にオレイン酸が結合していた。現在のわれわれの仮説は、GAMLET やHAMLET 複合体における蛋白質部分の役割は、オレイン酸を腫瘍細胞内に導入する「運び屋」としての役割であり、細胞死をもたらす実体はオレイン酸であるということである。しかし、HAMLET 複合体中の蛋白質はオリゴマー状態になっていて、これが細胞死をもたらすという説もあり、これらの点については今後検証が必要である。

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。本年度の結果から、DMSO 溶液中におけるGroESのアミドプロトン・シグナルの帰属を行い、GroES単独での水素交換反応を測定して溶液中での構造ゆらぎを特徴づけることに成功した。今後は、GroEL/GroES複合体の測定を行う予定である。