

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) ヒト及びヤギ α ラクトアルブミン変異体の結晶構造解析
- c) OspA のフォールディング機構
- d) 大腸菌シャペロニン GroEL の ATP 結合の速度論
- e) GroEL/GroES 複合体の構造揺らぎと生物機能
- f) tRNA メチル基転移酵素の前定常状態速度論

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 α ラクトアルブミン - 脂肪酸 (オレイン酸) 複合体は，蛋白質のフォールディング中間体 (モルテン・グロビュール) が脂肪酸と複合体を形成することによって新規な生物活性を発現する例であり，活性発現の分子機構に興味を持たれる。NMR を用いた昨年度までの研究で，ヤギとヒト α ラクトアルブミンのオレイン酸結合部位の同定に成功している。本年は，ヤギ α ラクトアルブミン - 脂肪酸複合体のオリゴマー形成を磁場勾配 NMR 法を用いて解析した。その結果，生理的条件下では複合体のモノマーと 10 量体程度のオリゴマーが共存していた。
- b) 大腸菌中で発現した組換え体 α ラクトアルブミンは乳より調製した真性体よりも著しく不安定であり，不安定化の分子機構に興味を持たれる。そこで，本年は，ヤギ α ラクトアルブミン N 末端残基欠失変異体 (E1M) と組み換え型ヒト α ラクトアルブミンの結晶構造を，それぞれ 1.60 Å, 1.81 Å の分解能で決定した。E1M の立体構造は真性体ヤギ α ラクトアルブミンの立体構造とほぼ一致していた。一方，組み換え型ヒト α ラクトアルブミンの立体構造は，N 末端領域のみが真性体とは顕著に異なっていた。昨年度までのヒト α ラクトアルブミン変異体 (K1M) の結果も含めて，ヤギおよびヒト α ラクトアルブミン組換え体は，いずれも，N 末端への Met 残基付加によって，N 末端域に局在化した立体構造変化が起こる，このような立体構造変化が蛋白質を著しく不安定化させる，N 末端残基欠失変異体 (E1M と K1M) では Met 残基付加によって N 末端の位置が真性体の位置に戻るため，立体構造も真性体の構造に戻り，安定性も回復することが分かった。
- c) ボレリア菌由来 Outer Surface Protein A (OspA) は N 末端ドメインと C 末端ドメイン間に単層 β シート領域を持つ特徴的な双ドメイン蛋白質であり， β シートそのものの物理化学的特性を調べる上で有用なモデルである。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法により調査している。昨年のストップフロー蛍光スペクトルによる解析に引き続き ストップフロー円二色性 (CD) を用いた解析を行った。巻き戻り反応に伴う CD 変化は 2 つの指数関数で表され，N 末端ドメインのみが形成した経路上の中間体を経由する，三状態の巻き戻り過程であることが明らかとなった。
- d) 大腸菌のシャペロニン GroEL は代表的な分子シャペロンであり 二重リング構造を持つ 14 量体の超分子複合体である。GroEL は ATP-Mg²⁺ との結合に伴って協同的な構造転移 (アロステリック転移) を示し，この転移がその機能発現にとって重要である。GroEL にトリプトファン残基を導入した変異体 (Y485W) の蛍光スペクトルを利用して，その ATP-Mg²⁺ 結合とアロステリック転移の速度論的な研究を行っている。本年は，蛍光ストップフロー法を用いて Y485W の

ATP-Mg²⁺ 結合過程を測定した。K⁺ 非存在下で、ATP-Mg²⁺ の結合に伴う蛍光強度変化が観察された。この反応は二分子反応として良く表され、結合と解離の反応速度定数を決定することが出来た。これらの速度定数から求められた結合定数は、等温滴定型熱量計により決定した結合定数と一致した。結合速度定数のアイリングプロットから求めた活性化エンタルピーは 14–15 kcal/mol と十分大きいので、ATP-Mg²⁺ の GroEL への結合は、拡散律速的な遭遇複合体形成の後、高エネルギーの遷移状態を通して進行することが分かった。

- e) シャペロニン複合体 GroEL/GroES の構造揺らぎと機能発現との関係を明らかにするために水素 / 重水素 (H/D) 交換二次元 NMR を用いた研究を行っている。本年は GroES 単独での H/D 交換反応を TROSY-NMR 法を用いて追跡した。結果、モバイルループ領域の大きな構造揺らぎが観察された。しかし、交換速度が速いため、DMSO 停止 H/D 交換二次元 NMR 法による測定結果と合わせて解析する必要があり、現在、その測定を進めている。
- f) tRNA (Gm18) メチル基転移酵素 (TrmH) は、S アデノシルメチオニンから tRNA の G18 へのメチル基転移を触媒する。酵素反応速度論、ゲルシフトアッセイ、さまざまな tRNA^{Phe} 変異体を用いた阻害実験などから、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の TrmH によるグアニン塩基認識部位の柔軟性や、認識部位の原子団に関する知見が得られていた。酵素による基質認識の分子機構をさらに明らかにするため、ストップフロー蛍光スペクトルを用いて、前定常状態における酵素反応の速度論的解析を行った。その結果、TrmH と tRNA との結合反応は少なくとも 3 段階より成り、最初の 2 分子結合反応の後、2 段の 1 分子反応的な誘導適合 (induced-fit) 過程の起こることが分かった。

B-1) 学術論文

T. KANZAKI, S. USHIOKU, A. NAKAGAWA, T. OKA, K. TAKAHASHI, T. NAKAMURA, K. KUWAJIMA, A. YAMAGISHI and M. YOHDA, “Adaptation of a Hyperthermophilic Group II Chaperonin to Relatively Moderate Temperatures,” *Protein Eng., Des. Sel.* **23**, 393–402 (2010).

T. NAKAMURA, K. MAKABE, K. TOMOYORI, K. MAKI, A. MUKAIYAMA and K. KUWAJIMA, “Different Folding Pathways Taken by Highly Homologous Proteins, Goat α -Lactalbumin and Canine Milk Lysozyme,” *J. Mol. Biol.* **396**, 1361–1378 (2010).

A. OCHI, K. MAKABE, K. KUWAJIMA and H. HORI, “Flexible Recognition of the tRNA G18 Methylation Target Site by TrmH Methyltransferase through First Binding and Induced Fit Processes,” *J. Biol. Chem.* **285**, 9018–9029 (2010).

B-3) 総説, 著書

中村敬, 真壁幸樹, 桑島邦博, 「何がタンパク質のフォールディング経路を決めるのか?」*MedicalBio* 10月別冊「揺らぎと生体機能」寺嶋正秀監修, オーム社, pp. 49–54 (2010).

B-4) 招待講演

K. KUWAJIMA, “Hydrogen-exchange kinetics of the *Escherichia coli* chaperonin complex,” 2nd Japan–Korea Seminar on Biomolecular Science—Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposium Hall, Nagoya University, December 2009.

K. MAKABE, “Role of the Main-Chain Hydrogen Bonding in β -Sheet Register,” 2nd Japan–Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposium Hall, Nagoya University, December 2009.

T. NAKAMURA, “The molten globule state and its biological function in α -lactalbumin,” 2nd Japan–Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposium Hall, Nagoya University, December 2009.

J. CHEN, “A Potassium Switch of ATP-Induced GroEL Conformational Changes,” 2nd Japan–Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations (Asian Core Program by JSPS), Symposium Hall, Nagoya University, December 2009.

K. KUWAJIMA, “Molecular mechanisms of protein folding,” 2010 Annual Meeting of Asian CORE Program “Frontiers of Materials, Photo-, and Theoretical Molecular Sciences,” Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica, Taipei (Taiwan), February–March 2010.

K. KUWAJIMA, “Is the Folding Pathway Conserved in Homologous Proteins?” Bit Life Science’s 3rd Annual Protein and Peptide Conference “After a Solution of the Machines of Life,” Beijing International Convention Center, Beijing (China), March 2010.

桑島邦博, 「蛋白質フォールディング問題とバイオサイエンス」 蛋白研 - 統合バイオ共同セミナー, 大阪大学蛋白質研究所, 2010年4月.

K. KUWAJIMA, “Identification of fatty-acid binding site in the anti-tumor complex of α -lactalbumin by 920-MHz NMR spectroscopy,” IPR Seminar “Cooperation in Protein Science between Asian and Pacific Countries,” the Institute for Protein Research, Osaka University, June 2010.

桑島邦博, 「蛋白質フォールディング経路の速度論的理解」 2010年日本物理学会秋季大会シンポジウム「揺らぎが決める生体分子の構造形成と機能発現」 大阪府立大学・中百舌鳥キャンパス, 2010年9月.

K. KUWAJIMA, “Identification of fatty-acid binding site in the anti-tumor complex of α -lactalbumin by 920-MHz NMR spectroscopy,” The 10th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Korea Institute for Advanced Study (KIAS), Seoul (Korea), September–October 2010.

J. CHEN, “Alpha-crystallin domain assembly and GroEL dynamics,” Workshop on Recent Advances in Protein Folding and Molecular Chaperones, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing (China), October 2010.

K. KUWAJIMA, “Molecular Mechanisms of Protein Folding,” The Overseas Sokendai Lecture in Bangkok FY2010 & The Inaugural CU-IMS Joint Symposium, Chulalongkorn University, Bangkok (Thailand), October 2010.

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

日本蛋白質科学会会長 (2010–).

日本蛋白質科学会副会長 (2008–2009).

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

日本学術振興会科学研究費委員会専門委員 (2009, 2010).

文部科学省科学研究費審査部会専門委員会委員 (2002, 2004, 2009).

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., Associate Editor (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 (2008.4–2010.3).

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), 「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).

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).

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).

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).

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).

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).

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).

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–2010年).

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–).

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–2009年).

科研費基盤研究(S) 分担(代表 東北大学大学院 熊谷泉)「ナノ世界のインターフェースとしてのタンパク質工学的デザイン学」真壁幸樹 (2010年–).

アステラス病態代謝研究会,「蛋白質工学的なアプローチによるアミロイドの基本骨格構造形成の物理化学的基盤の解明」真壁幸樹 (2010年–2011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。現在までの研究から,われわれはヤギ 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)を二次元NMRを用いて調べ,それぞれの蛋白質でオレイン酸結合部位を同定することに成功している。今後は,水素/重水素(H/D)交換二次元NMR法の手法を用いて,GAMLETとHAMLETの複合体の構造揺らぎを調べ,構造揺らぎと複合体の抗腫瘍活性との関連性について調べる。複合体の状態でのH/D交換反応を行なった後,DMSOで反応を停止し,ペプチドアミドプロトンの交換挙動を二次元NMRを用いて追跡する。このようにして得られた複合体の蛋白質部分のH/D交換プロフィールを,遊離した α ラクトアルブミンのモルテン・グロビュール状態のH/D交換プロフィールと比較し,両者で構造揺らぎに大きな違いがあるか否か,またあるとすれば,それは複合体の抗腫瘍活性に関係があるかないかなどを検討する。また,もし蛋白質部分が「運び屋」として働いているだけならば,他のモルテン・グロビュール状態を示す蛋白質,例えば,アポミオグロビン,シトクロームc,カルボニックアンヒドラーゼなどでも,オレイン酸と複合体を形成することにより同様の抗腫瘍活性が発現される可能性がある。培養腫瘍細胞を用いた実験によりこれらの複合体の抗腫瘍活性についても調べる。

既に,DMSO中のGroESの94個のアミドプロトン中70個のNMRシグナルの帰属を終え,遊離7量体GroESのH/D交換プロフィールを得ている。また,新たな知見として,GroELへのATP結合の二分子反応速度過程の定量的解析を終えている。今後,さまざまな機能的に異なるGroEL/GroES複合体のアミドプロトンのH/D交換反応を二次元NMRを用いて追跡するとともに,ATP結合により誘導されるGroELのアロステリック転移の速度論的解析を進める。シャペロニン複合体の機能発現にその構造揺らぎがどのように関わっているかを明らかにする。