

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) モルテン・グロビュール状態オレイン酸複合体の抗腫瘍活性
- b) OspA のフォールディング機構
- c) ミニシャペロンの分子シャペロン活性とアミロイド形成
- d) GroEL/GroES 複合体の構造揺らぎと生物機能
- e) GroEL/GroES 複合体形成の熱力学的解析

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，安定なモルテン・グロビュール状態を形成する他の蛋白質 (イヌ乳リゾチーム，アポ・ミオグロビン， β_2 ミクログロブリン) とオレイン酸との複合体を作製し，それらの抗腫瘍細胞活性を調べた。その結果，作製した複合体は α ラクトアルブミン - オレイン酸複合体と同様な抗腫瘍細胞活性を示した。モルテン・グロビュール状態の蛋白質とオレイン酸との複合体の抗腫瘍活性は，オレイン酸によりもたらされており，蛋白質部分はオレイン酸を選択的に腫瘍細胞に導く担体 (carrier) として働いていると考えられる。
- b) 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。昨年蛍光と円二色性ストップフローを用いた解析から，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。これに基づいて N 末端と C 末端ドメインを単独でそれぞれ作製し，それらの巻き戻り過程を調べた。N 末端ドメイン単独ではアンフォールディング速度が加速し，安定性が減少していることが明らかになった。
- c) 大腸菌シャペロニン GroEL の頂上ドメインを遺伝子工学的に単離した蛋白質はミニシャペロンと呼ばれ，それ自身で独立に折り畳まる。ミニシャペロンは，天然条件下では， β_2 ミクログロブリンのアミロイド形成を抑制するなど，不完全ながらも分子シャペロンとしての働きを有する。しかし，ミニシャペロンの一次配列を Trovato 等が開発した PASTA で解析すると，アミロイド形成能の高い領域の存在することがわかった。そこで，チオフラビン T 結合に伴う蛍光測定，透過型電顕観察等の手法を用いて，さまざまな条件下でアミロイド形成を調べた。その結果，酸性条件下では，ミニシャペロン自身がアミロイド線維を形成することが明らかとなった。また，酸性条件下で β_2 ミクログロブリンも共存させると，反応初期には β_2 ミクログロブリンのアミロイドを抑制する分子シャペロンとしての働きも有するので，ミニシャペロンはそれ自身アミロイド形成能を持ちながら分子シャペロンとしても働く二面性を持っている。
- d) 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。昨年は，GroES 単独での H/D 交換反応を TROSY-NMR 法を用いて追跡した (20 mM KCl, 25 mM リン酸緩衝液, pH 6.5, 25 °C)。その結果，GroES 複合体のコア領域の交換反応は追跡できたが，モバイルループ領域は交換が速く追跡が不可能であった。交換速度の速いアミド水素の交換反応を解

析するため、天然条件下で水素交換反応を行った後、DMSO 停止 H/D 交換二次元 NMR 法と 920 MHz NMR 装置を用いて、各反応時間における残存アミド・プロトン強度を測定した。また、重水素化 DMSO 中の GroES の約 70 個のアミド水素の帰属を終えており、これらの帰属に基づいて各アミド水素の H/D 交換反応を解析している。

- e) ADP や ATP 等のヌクレオチド存在下では、GroEL は GroES と 1:1 の複合体を形成して分子シャペロンとしての完全な機能を発現する。しかし、GroEL と GroES の結合の熱力学パラメータについては、未だ十分に知られてはいない。¹⁵N 標識した GroES7 量体の二次元 HSQC NMR スペクトルは、GroES モバイルループにあるアミド水素の明確なクロスピークを示すが、ADP 存在下で GroEL と結合するとクロスピークが消失する。この性質を利用して、GroEL と GroES との結合の熱力学的解析を行っている。また、分子研に設置されている超高感度滴定型熱量計を用いた結合の熱力学的解析も合わせて行い、二次元 NMR を用いた結果と比較する。

B-1) 学術論文

J. CHEN, K. MAKABE, T. NAKAMURA, T. INOBE and K. KUWAJIMA, “Dissecting a Bimolecular Process of MgATP²⁻ Binding to the Chaperonin GroEL,” *J. Mol. Biol.* **410**, 343–356 (2011).

T. RATHNAYAKA, M. TAWA, T. NAKAMURA, S. SOHYA, K. KUWAJIMA, M. YOHDA and Y. KURODA, “Solubilization and Folding of a Fully Active Recombinant *Gaussia* Luciferase with Native Disulfide Bonds by Using a SEP-Tag,” *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **1814**, 1775–1778 (2011).

B-4) 招待講演

A. MUKAIYAMA, K. MAKI, T. NAKAMURA, K. MAKABE, Y. GOTO and K. KUWAJIMA, “Folding mechanism of β_2 -microglobulin and its relationship to dialysis-related amyloidosis,” 3rd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations, Lotte Hotel Jeju, Jeju (Korea), February–March 2011.

T. NAKAMURA, K. MAKABE, T. AIZAWA, K. KAWANO, M. DEMURA and K. KUWAJIMA, “NMR and biological studies of anti-tumor complex between oleic acid and protein in the molten globule state,” 3rd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations, Lotte Hotel Jeju, Jeju (Korea), February–March 2011.

J. CHEN, K. MAKABE and K. KUWAJIMA, “Dissecting a bimolecular process of ATP binding to the chaperonin GroEL,” 3rd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations, Lotte Hotel Jeju, Jeju (Korea), February–March 2011.

C. KOBAYASHI, T. OROGUCHI, M. IKEGUCHI, T. NAKAMURA, K. MAKABE, K. KUWAJIMA and S. SAITO, “A theoretical study of unfolding pathway of canine milk lysozyme,” 3rd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations, Lotte Hotel Jeju, Jeju (Korea), February–March 2011.

K. MAKABE, S. KOIDE and K. KUWAJIMA, “Structure and folding of a β -sheet rich model protein,” 3rd Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations, Lotte Hotel Jeju, Jeju (Korea), February–March 2011.

K. KUWAJIMA, “Molecular Mechanisms of the *Escherichia coli* Chaperonin Function,” The 3rd Asia Pacific Protein Association (APPA) Conference in conjunction with the 3rd Symposium of the Chinese Protein Society (CPS), Shanghai University, Shanghai (China), May 2011.

K. KUWAJIMA, “Molecular Mechanisms of the *Escherichia coli* Chaperonin Function,” The 11th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Korea Institute for Advanced Study (KIAS), Seoul (Korea), October 2011.

M. CHANDAK, "Dynamic structural fluctuation of free heptameric GroES studied by the use of hydrogen-exchange technique and 2D NMR," 総合研究大学院大学第8回生命科学リトリート, ヤマハリゾートつま恋, 掛川市, 2011年12月.

B-5) 特許出願

特願 2011-238611, 「球状蛋白質の準安定状態を用いた抗癌細胞作用のある分子の作成」桑島邦博, 中村敬, 真壁幸樹(大学共同利用機関法人自然科学研究機構) 2011年.

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 (2009-2010).

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 (2004-2011).

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。昨年の研究からモルテン・グロビュール状態を示す他の蛋白質、イヌ乳リゾチーム、アポミオグロビン、 β_2 ミクログロブリンなどでも、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の発現されることが明らかとなった。モルテン・グロビュール状態にある蛋白質は、オレイン酸を腫瘍細胞選択的に運ぶ担体として働いていると考えられる。この仮説が正しいならば、オレイン酸のみならず、抗がん剤をモルテン・グロビュール状態の蛋白質に結合させ、腫瘍細胞選択的にこれを導入することが可能と考えられる。今後このような観点からも研究に取り組みたい。既に、TROSY-NMR法とDMSO停止H/D交換二次元NMR法を用いて、遊離7量体GroESのH/D交換プロフィールを得ている。DMSO停止H/D交換二次元NMR法を用いることにより、GroEL/GroES複合体中のGroES部分の水素交換反応を追跡し、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。