

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・グロビュール状態蛋白質化学療法剤複合体の抗腫瘍活性
- b) DMSO 停止水素 / 重水素交換二次元 NMR 法の改良
- c) GroEL/GroES 複合体の構造揺らぎと生物機能
- d) GroEL/GroES 複合体形成の熱力学的解析
- e) 質量分析を用いた野生型 GroEL の水素 / 重水素交換反応解析

A-3) 研究活動の概要と主な成果

- a) これまでの我々の研究から，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。そこで，今年度はモルテン・グロビュール状態の α ラクトアルブミンの運び屋としての特性を利用した新しい抗腫瘍複合体の作製を試みた。不飽和脂肪酸の代わりに抗癌剤とモルテン・グロビュール状態にある α ラクトアルブミンとの複合体を作製し，その抗腫瘍細胞活性を検討した。その結果，特にアドリマイシンやパクリタキセルと α ラクトアルブミンとの複合体は，抗癌剤単独で処理した場合に比べ顕著に高い抗腫瘍細胞活性を示したのに対して，正常細胞に対する毒性は低下した。
- b) ジメチルスルフォキシド (DMSO) 停止水素 / 重水素 (H/D) 交換二次元 NMR 法は，蛋白質のペプチド・アミド水素の H/D 交換反応を実施後，重水素化 DMSO (DMSO-d₆) 溶液中で H/D 交換反応を停止させ，DMSO 溶液中で変性し H/D 交換も停止した蛋白質の二次元 NMR スペクトルを取ることで，各アミド水素の交換反応を追跡する方法である。そのままでは良好な NMR スペクトルの得られない，蛋白質超分子複合体やアミロイド線維，H/D 交換反応が速すぎてアミド水素の NMR 信号が十分得られない，変性蛋白質などの H/D 交換反応測定に用いられてきた。しかし，これまでの DMSO 停止 H/D 交換法では凍結乾燥を溶媒交換に用いるため，変性剤中の蛋白質や高濃度の塩存在下の H/D 交換反応には適用できない難点があった。そこで，凍結乾燥の代わりにスピン脱塩カラムを用いることによりこの難点を克服した。6.0 M 塩酸グアニジン中で変性した ¹⁵N 標識ユビキチンの H/D 交換反応を測定し，スピン脱塩カラムを用いた方法が有効であることを確認した。
- c) シャペロン複合体 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 H/D 交換二次元 NMR を用いた研究を行っている。昨年に引き続き，GroES 単独での H/D 交換反応を DMSO 停止 H/D 交換二次元 NMR 法と 920 MHz NMR 装置を用いて追跡した (20 mM KCl, 25 mM リン酸緩衝液, pH 6.5, 25 °C)。その結果，GroES の 94 個のペプチド・アミド水素中 33 個の交換反応を定量的に求め，それらの水素交換保護因子を決定した。残りの 61 残基については，水素交換反応速度定数の下限が求められた。最も強く保護されているアミド水素の保護因子は 10⁶–10⁷ のオーダーであり，通常の球状蛋白質の保護因子と同程度であったが，保護因子 10⁶ 以上の非常に強く保護されたアミド水素の数はわずか 10 個で，通常の小さな球状蛋白質について知られている数よりも著しく少なかった。このことは，7 量体 GroES 中のかなりの部分がフレキシブルで天然変性状態にあることを示している。保護因子 10⁵ 以上の強く保護されたアミノ酸残基は疎水性コアを形成する 3 本の β ストランドに集中しており，残基 17–34 の可動性ループ領域はあまり保護されていなかった。先行研究において，GroES の熱や変性剤によるアンフォールディング転移の熱力学的解析が報告されており，それらの熱力学パラメータから期待される保護因子は 10²–10⁴ のオーダーで H/D 交換で求

められた最も強く保護されている残基の保護因子よりも数桁小さいことがわかった。このことは、GroES のアンフォールディング転移が、先行研究で仮定されているような単純な二状態や三状態の転移ではないことを示している。

- d) ADP や ATP の存在下では、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。昨年度に引き続き、分子研に設置されている超高感度滴定型熱量計を用いて、GroEL の単一リング変異体 (SR1) と GroES の結合の熱力学的解析を行った。GroES を SR1 で滴定し、3 mM ADP 存在下 25.0 °C で、結合定数 $K_b = 6.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、エンタルピー変化 $\Delta H_b = 37 \text{ kcal/mol}$ 、エントロピー変化 $\Delta S_b = 156 \text{ cal/mol/K}$ を得た (pH 7.5, 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2)。 ΔH_b 、 ΔS_b ともに正で、結合がエントロピー駆動であることがわかった。 ^{15}N 標識した GroES と二次元 NMR (HSQC) スペクトルを用いた滴定実験でも 3 mM ADP 存在下で 10^5 M^{-1} のオーダーの結合定数が得られたが、3.0 mM ATP 存在下では測定限界を超えて結合定数が大きくなった ($K_b \gg 10^6 \text{ M}^{-1}$)。
- e) H/D 交換質量分析法を用いて野生型 GroEL (分子量約 80 万) の溶液中のコンフォメーション解析を、フロリダ州立大学の Marshall 教授のグループとの共同研究として行った。アポ型 GroEL と ATP アナログ (ATP γ S) 結合 GroEL の H/D 交換反応を数残基レベルの分解能で観測し、ヌクレオチド結合に伴ったコンフォメーション変化を分子全体にわたって特徴付けることが出来た。

B-1) 学術論文

K. TOMOYORI, T. NAKAMURA, K. MAKABE, K. MAKI, K. SAEKI and K. KUWAJIMA, “Sequential Four-State Folding/Unfolding of Goat α -Lactalbumin and Its N-Terminal Variants,” *Proteins* **80**, 2192–2206 (2012).

J. CHEN, H. YAGI, P. SORMANNI, M. VENDRUSCOLO, K. MAKABE, T. NAKAMURA, Y. GOTO and K. KUWAJIMA, “Fibrillogenic Propensity of the GroEL Apical Domain: A Janus-Faced Minichaperone,” *FEBS Lett.* **586**, 1120–1127 (2012).

B-4) 招待講演

K. KUWAJIMA, “Some remaining questions about the mechanism of protein folding,” 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations, Cultural Center of Todaiji-Temple, Nara, January 2012.

T. NAKAMURA, K. MAKABE, T. AIZAWA, K. KAWANO, M. DEMURA and K. KUWAJIMA, “Structure and biological function of anti-tumor complexes between oleic acid and proteins in the molten globule state,” 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations, Cultural Center of Todaiji-Temple, Nara, January 2012.

K. MAKABE, T. NAKAMURA and K. KUWAJIMA, “Structural insights into the stability perturbations by N-terminal variations in human and goat α -lactalbumin,” 4th Japan-Korea Seminar on Biomolecular Sciences—Experiments and Simulations, Cultural Center of Todaiji-Temple, Nara, January 2012.

K. KUWAJIMA, “Some remaining questions about the mechanism of protein folding,” The International Conference on Statistical Mechanics of Liquids: From Water to Biomolecules, Okazaki Conference Center, Institute for Molecular Science, Okazaki, February 2012.

K. KUWAJIMA, “Molecular mechanisms of cytotoxicity of HAMLET and other protein-oleic acid complexes,” IGER International Symposium on Science of Molecular Assembly and Biomolecular Systems 2012, Nagoya University, Nagoya, September 2012.

K. KUWAJIMA, “Molecular mechanisms of cytotoxicity of HAMLET and other protein-oleic acid complexes,” The 12th KIAS Conference on Protein Structure, Korea Institute for Advanced Study, Seoul (Korea), October 2012.

桑島邦博,「シャペロン超分子複合体の水素交換反応」大阪大学蛋白質研究所セミナー「分子シャペロンの機能発現の展開と細胞制御」大阪大学蛋白質研究所,大阪,2012年11月.

K. KUWAJIMA, “Structural fluctuations and functional expression of the chaperonin complexes,” The 6th International Symposium “Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions,” Kyoto TERRSA, Kyoto, December 2012.

K. KUWAJIMA, “The structure and function of HAMLET and its related protein complexes,” The 3rd HAMLET Conference, Lund University, Lund (Sweden), December 2012.

B-5) 特許出願

特願 2012-147492,「蛋白質—化学療法剤複合体及びその製造方法,並びに医薬」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)岡田誠治(熊本大学)2012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(2010–2011).

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 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(2009,2010,2011,2012).

文部科学省科学研究費審査部会専門委員会委員(2002,2004,2009,2011).

JST 若手個人研究推進事業(さきがけ)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 (2002–2011).

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-8) 大学での講義，客員

総合研究大学院大学物理科学研究科，「生体分子科学」2012年5月1日，8日（統合生命科学教育プログラム授業科目を兼ねる）

総合研究大学院大学アジア冬の学校，「Molecular Mechanisms of Protein Folding」岡崎コンファレンスセンター，2012年1月12日.

The 11th KIAS Protein Folding Winter School, “Molecular Mechanisms of Protein Folding,” High1 Resort, Kanwon-do (Korea), February 5–10.

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。この仮説を確かめるため,本年度は,アドリアマイシンやパクリタキセル等の抗癌剤をモルテン・グロビュール状態の α ラクトアルブミンに結合させた複合体を作製し,その抗腫瘍活性を調べた。その結果,期待通りに複合体の抗腫瘍活性増強の観測された。現在共同研究先である熊本大学・エイズ学研究センター・岡田誠治教授の研究室において複合体を用いた動物実験が進行中である。

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。GroEL/GroES複合体中のGroES部分の水素交換反応の実験も終わっている,今後これらの実験データを解析し,シャペロ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。