

## 2-4 生体分子物性

### 桑 島 邦 博 (教授)

1) 専門領域：蛋白質科学，生物物理学，生体分子科学

2) 研究課題：

- a)  $\alpha$  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)  $\alpha$  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  $\beta_2$  ミクログロブリンのフォールディング機構
- d) 自己組織化ナノ繊維の形成機構
- e) 大腸菌シャペロニンの機能発現の分子機構

3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 昨年までの研究で，ヤギ  $\alpha$  ラクトアルブミンとイヌ乳リゾチームは，互いに相同で立体構造も類似しているにもかかわらず，フォールディング経路の異なることが明らかになっている。本年は， $\alpha$  ラクトアルブミンとリゾチームの天然三次元構造をもとに，それぞれ全原子-全原子間の距離を計算し，相互作用の密度を調べた。その結果， $\alpha$  ラクトアルブミンでは C-ヘリックスと  $\beta$  ドメイン間，リゾチームでは B-ヘリックスと D-ヘリックス間において相互作用密度の高いことが明らかになった。このような天然構造における相互作用密度の違いが  $\alpha$  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の違いをもたらしたと推測される。
- b) 脂肪酸との複合体が腫瘍細胞選択的細胞死活性を持つとして知られる，ヤギ  $\alpha$  ラクトアルブミンのモルテン・グロビュール状態の構造解析を，NMR を用いて行っている。モルテン・グロビュール状態にあるヤギ  $\alpha$  ラクトアルブミンの三次元 NMR スペクトルを 920 MHz の NMR 装置を用いて測定し，80個から90個の分離したクロスピークが観測され，約40残基の主鎖アミドプロトンの帰属が完了した。
- c) 本年は， $\beta_2$  ミクログロブリンの複雑な巻き戻り過程を明確に特徴づけるために，数値シミュレーション解析を行い，実験結果をうまく説明できる反応スキームを決定した。また，弱酸性条件下 (pH 4) で形成される平衡論的中間体と巻き戻り過程で観測される速度論的中間体との関係を明らかにするために，ストップフローCD法を用いて巻き戻り反応を解析した。その結果，平衡論的中間体はバースト相中間体およびその後形成される速度論的中間体とは異なることがわかった。
- d) ポリペプチドが自己組織化したナノ繊維の形成過程を明らかにするため，単層  $\beta$  シートを持つモデル蛋白質，OspA のフォールディングを調査した。フォールディング過程は二つの指数関数でよくモデルされ，変性剤変性による滴定実験の結果と一致した。フォールディング過程をトリプトファン蛍光で追跡するため，変異体を数種類作製し，測定に適した変異体を見いだした。この変異体を用いた測定を現在進めている。
- e) シャペロニン GroEL の第二の ATP 結合部位の同定を目的に，azido-ADP 及び azido-ATP による光親和性標識を行い，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した。標識された蛋白質のプロテアーゼ分解後，HPLC によって単離されたペプチド断片のアミノ酸配列分析を行い，標識部位を同定した。標識部位から第二の ATP 結合サイトは GroEL 頂上ドメインに存在することが示された。詳細な結合部位同定

のため、頂上ドメイン単独の大腸菌組み換え体発現系を構築し、解析を進めている。また、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ことを目的に、DMSO溶液中におけるGroESのNMR測定を行った。分子研に設置されている920MHz NMR装置を用いることにより、500MHz NMR装置では分離困難であったHSQCシグナルの分離に成功した。現在、アミドプロトンシグナルの帰属を進めている。

#### 4) 学術論文

**T. Kanzaki, R. Iizuka, K. Takahashi, K. Maki, R. Masuda, M. Sahalan, H. Yebenes, J. M. Valpuesta, T. Oka, M. Furutani, N. Ishii, K. Kuwajima and M. Yuhda**, "Sequential Action of ATP-dependent Subunit Conformational Change and Interaction between Helical Protrusions in the Closure of the Built-in Lid of Group II Chaperonins," *J. Biol. Chem.*, **283**, 34773-34784 (2008).

**T. Ishii, Y. Murayama, A. Katano, K. Maki, K. Kuwajima and M. Sano**, "Probing force-induced unfolding intermediates of a single staphylococcal nuclease molecule and the effect of ligand binding", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **375**, 586-591 (2008).

#### 5) 総説, 著書

桑島邦博, "真性体および組換え体 $\alpha$ ラクトアルブミンの構造の安定性とダイナミクス", *Milk Science*, **56**, 119-122 (2008).

#### 6) 国際会議発表リスト

**K. Kuwajima**, "Folding Mechanisms of Homologous Proteins: A Comparative Study between Lysozyme and  $\alpha$ -Lactalbumin," 2<sup>nd</sup> Pacific Rim International Conference of Protein Science, Cairns (Australia), (2008.6)

#### 7) 招待講演

桑島邦博, "相同蛋白質のフォールディング機構? イヌ乳リゾチームとヤギ $\alpha$ ラクトアルブミンの比較研究", 次世代スーパーコンピュータプロジェクト「ナノ分野グランドチャレンジ研究開発」, 第2回公開シンポジウム, 岡崎コンファレンスセンター, (2008.3).

**K. Kuwajima**, "Folding Mechanism of Homologous Proteins: A Comparative Study of  $\alpha$ -Lactalbumin and Lysozyme", 膜蛋白質研究国際フロンティア国際シンポジウム, 千里ライフサイエンスセンター (吹田市), (2008.3).

**K. Kuwajima**, "Folding Mechanisms of Homologous Proteins: A Comparative Study between Lysozyme and  $\alpha$ -Lactalbumin", ACS 236<sup>th</sup> National Meeting Symposium *Protein Folding Dynamics: Experiment and Theory*, Philadelphia (U.S.A.), (2008.8).

**K. Kuwajima**, "Molecular Mechanisms of the Chaperone Function of GroEL," the 8<sup>th</sup> KIAS - Yonsei Conference on Protein Structure and Function, Seoul (Korea), (2008.10).

8) 学会および社会的活動

学協会役員, 委員

日本蛋白質科学会副会長 (2008年-)

日本生化学会評議員 (2005年-).

学会の組織委員

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

学会誌編集委員

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

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

*BIOPHYSICS*, Editorial Manager, (2005年-).

*Spectroscopy -- Biomedical Applications*, Editorial Board, (2002年-).

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

名古屋大学, 客員教授 (大学院理学研究科)

11) 外部獲得資金

科学研究費補助金 特定領域研究 水と生体分子 成果取りまとめ, 「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).

科学研究費補助金 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-).

科学研究費補助金 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-).

科学研究費補助金 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-).