

戦略的方法論研究領域
(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) 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

3) 研究活動の概略と主な成果

- 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, 特にアドリア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 10^6 - 10^7 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 10^6 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中のかん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 10^5 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 10^2 - 10^4 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。

4) 学術論文

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).

K. Tomoyori, T. Nakamura, K. Makabe, K. Maki, K. Saeki and K. Kuwajima, "Sequential four-state folding/unfolding of goat alpha-lactalbumin and its N-terminal variants," *Proteins* **80**, 2191-2206 (2012).

A. Mukaiyama, T. Nakamura, K. Makabe, K. Maki, Y. Goto and K. Kuwajima, "Native-state heterogeneity of β_2 -microglobulin as revealed by kinetic folding and real-time NMR experiments," *J. Mol. Biol.* **425**, 257-272 (2013).

A. Mukaiyama, T. Nakamura, K. Makabe, K. Maki, Y. Goto and K. Kuwajima, "The molten globule of β_2 -microglobulin accumulated at pH 4 and its role in protein folding," *J. Mol. Biol.* **425**, 273-291 (2013).

K. Makabe, T. Nakamura and K. Kuwajima, "Structural insights into the stability perturbations induced by N-terminal variation in human and goat alpha-lactalbumin," *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 165-170 (2013).

Q. Zhang, J. Chen, K. Kuwajima, H. Zhang, F. Xian, N.L. Young and A.G. Marshall, "Nucleotide-induced conformational changes of tetradecameric GroEL mapped by hydrogen/deuterium exchange monitored by FT-ICR mass spectrometry," *Sci. Reports* **3**, 1247 doi: 10.1038/srep01247 (2013).

6) 国際会議発表リスト

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 9–11, 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 9–11, 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 9–11, 2012.

M. Chandak, T. Nakamura, K. Makabe, T. Takenaka, A. Mukaiyama, T. K. Caudhuri, J. Chen, K. Kato, K. Kuwajima, "Structural fluctuation of free GroES and the GroES-SR1 complex studied by the use of hydrogen/deuterium (H/D) exchange," 57th Annual Meeting of the Biophysical Society, Philadelphia, Pennsylvania, USA, February 2-6, 2013.

7) 招待講演

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 13–14, 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 4–5, 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 11–13, 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新展開と細胞制御」, 大阪大学・蛋白質研究所セミナー, 大阪, 2012年11月15–16日.

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 5–6, 2012.

K. Kuwajima, "The structure and function of HAMLET and its related protein complexes," The 3rd HAMLET Conference, Lund University, Lund, Sweden, December 7–8, 2012.

8) 学会および社会的活動

学協会役員, 委員

日本蛋白質科学会理事 (2012)

日本生化学会評議員 (2005–).

学会の組織委員

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

文部科学省, 学術振興会等の役員等

日本学術振興会科学研究費委員会専門委員 (2011, 2012)

学会誌編集委員

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).

9) 他大学での非常勤講師、客員教授

The 11th KIAS (Korea Institute for Advanced Study) Winter School of Protein Folding, High1 Resort, Korea, January 21-25, 2013.

11) 外部獲得資金

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-).

12) 特許

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.