

構造を基礎とした生命機能理解の試み

阿久津 秀雄（あくつ ひでお）

1. 研究を志した頃

私が大学院に進学したのは1967年で、Watson-CrickのDNA二重らせん構造モデルの提案から始まった生物学の革命が全く新しい生命科学を切り開きつつあった。当時在籍していた東大薬学の坪井正道研究室にはその一端を担っているとの空気が流れていた。三井幸雄さんや森川耿右さんなどに、時には坪井先生も加わって活発な学問談義が行われていた。私は分子構造を基礎に生命を理解したいと思って坪井研に加わり、最初は研究室の主流である核酸から入ったが、やがて生体膜に興

味を持つようになった。生体膜は生命の必須の構成成分であるが、よく分かっていないというところが魅力的であった。また細胞膜は生命を外界から峻別しながら、さまざまな形で外界との相互作用を仲介する役割を果たしているところが面白い。生体膜の主要な構成成分は脂質と蛋白質であることは分かっていたが、膜蛋白質はととも物理化学的な研究の対象になる状況ではなかった。脂質については単分子膜等の研究があったので、埼玉大学の福田清成教授（当時）・中原弘雄先生のご指導を得て、単分子膜を累積することにより脂質二重



写真1. 坪井研遠足（1967年）

右から、坪井、松崎、（1人）、川島、森川、玉懸、京極、飯高、（2人）、市川、濱田
前列右から、平川、武田、樋口、秋元。著者撮影、敬称略

膜モデルを作り、その構造解析を行うことを博士課程のテーマとした。幸いなことに、フォスファチジルエタノールアミンを使うと水相上に広げた単分子膜から交互配向の累積膜を作れることを見いだした。交互配向中の（極性—炭化水素鎖—炭化水素鎖—極性）の部分を生体膜中の二重膜構造モデルと考え、赤外線二色性を用いて構造解析を行った。

2. 固体 NMR との出会い

指導を受けていた京極好正先生が大阪大学蛋白質研究所の教授となって移ったあと、助手に採用していただいて私も蛋白研に移った。同時に主要な手法も振動スペクトルから核磁気共鳴 (NMR) に変わった。後者の方が生理的条件に近い環境で解析することができる。しかし、当時使っていた 100 MHz の NMR による蛋白質や膜の研究は容易ではなかった。膜系の研究には固体 NMR を使う必要があるのではないかと考え、選択的重水素化脂質膜の研究で活躍していたバーゼル大学バイオセンターの J. Seelig 教授の下に 1978 年に留学して固体 NMR を学んだ。

この留学はいろいろな意味で実り多かった。仕事の面では、固体 NMR を用いて液晶状態における

フォスファチジルコリン二重膜極性基が金属イオンとの相互作用により構造変化することを見だし、少し後になるが、その様子を原子の分解能で明らかにすることができた。また、佐竹博士・R. M. Franklin との共同研究で PM2 という脂質含有ウィルスをインタクトな状態で固体 NMR を用いて解析でき、固体 NMR の威力を実感した。この時期は ETH の Wüthrich, Ernst 教授による 2 次元 NMR を用いたタンパク質構造決定法の開発が始まった頃であり、NMR 方法論の劇的発展を目の当たりにすることができた。Wüthrich 研で活躍していた永山国昭さん（現生理研名誉教授）を訪ねて伺った話は実に興味深かった。

1980 年に蛋白研に戻ると 360 MHz の超伝導 NMR の導入が決まり、国際レベルの実験ができるようになっていた。それまでに超伝導 NMR は大学関係では京大と東大（本シリーズ第 10 回田隅先生の項参照）に入って活躍していた。蛋白研は共同利用研究所であるため導入した超伝導 NMR 装置は全国の研究者に開放されるので、全国的なレベルアップにつながった。こうしてわが国における蛋白質の NMR 研究が本格的に始まった。この時期、私は研究室の北川禎三さん（現分子研名誉教授）の影響でこの装置を用いて電子伝達蛋白質の研究に手を染めた。

一方、お役御免になった 100 MHz の装置を固体 NMR 用に改造して、クロマチン、ウィルス、脂質小胞のような巨大システム系の測定も行った。これらは手作りの面白さがあったが、超伝導溶液 NMR に比べて情報量が限られることを痛感させられた。

3. 電気化学との出会い

1985 年には横浜国大工学部の仁木克己教授の研究室の助教授に採用していただいた。仁木先生の専門は蛋白質の電気化学で、特に硫酸還元菌 (*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F) の四ヘムタンパク質であるシトクロム c_3 (cyt c_3) に興味を持っておられた。そこで電気化学と NMR が協力して cyt c_3 の酸化還元機構を調べようということになった。膜を介してのエネルギー変換との関係にも興味があった。しかし、当時の横浜国大工学部には生

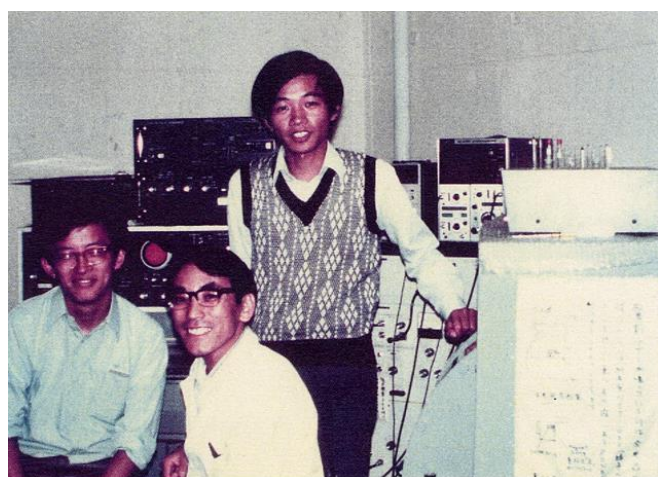


写真 2. 阪大蛋白研の 100 MHz FT-NMR 装置 (JMN PFT-100) 掃引式の本体にフーリエ変換測定のためのアタッチメント (右側の電磁石の奥) がついた当時の最新装置。著者 (中央) と学生の河野 (左)、岩橋。

物系の研究室がなく、嫌気性バクテリアの培養システム、蛋白質精製用の諸装置等全て零から立ち上げた。この時は蛋白研で手作りの研究をしていたのが大変役に立った。蛋白質を測定・解析できる NMR 装置もなかったため、全国共同利用研である蛋白研には大変お世話になった。cyt c₃ についての電気化学との共同研究は大変実りあるものになった。NMR は電子の動きを直接見ることができる強みがあり、電気化学の情報と樋口・安岡の結晶構造を合わせるにより精緻な議論をすることができた。この研究は 2000 年に阪大蛋白研に移ってからも続いた。小澤潔博士による c 型シトクロム発現系の開発が研究の発展に重要な役割を果たした。最終的には Accounts of Chemical Research から invite されて結果のまとめを報告した (1)。また、アメリカの研究者からの申し入れで日本の硫酸還元菌宮崎株 DNA を提供し、その全塩基配列が決定・公開された。こうしてわが国の宮崎株は硫酸還元菌の国際的リストの仲間入りをした。これは八木達彦先生 (静岡大名誉教授)、樋口芳樹兵庫県立大教授等による日本での宮崎株関連蛋白質研究が評価されたためと思われる。

4. 固体 NMR への本格的取り組み

1980 年代の終わりには固体 NMR でマジック角試料回転によるシグナルの先鋭化と、磁氣的相互作用の再結合による構造情報の獲得を結びつけた研究が Griffin, Schaeffer らによって始まり、蛋白質を意識した高分解能構造解析が具体的課題になっていた。1991 年に私が横浜国大で自分の研究室を持つようになった時、このような状況を考慮して生体膜の重要なシステムに本格的に取り組もうと考えた。固体 NMR はまだ方法論開発の段階であったので京極研出身の藤原敏道博士に助教授としてチームに加わってもらった。幸い 400 MHz の固体 NMR 装置を導入できたので、若松馨先生 (当時群大助教授) との共同研究で G タンパク質共役受容体のモデルである G タンパク質活性化ペプチド、マストパラン X の構造解析に取り組んだ。これは 14 残基のペプチドで、測定法の開発に適していた。マストパラン X の G タンパク質活性化効率は脂質

膜存在下で上昇することが分かっていたので、脂質膜結合マストパラン X について解析した。アミノ酸の種類同定、アミノ酸同士のつながりの同定を行う 2 次元、3 次元のパルス系列を開発し、アミノ酸の配列帰属が可能になった。この ¹³C, ¹⁵N シグナルの帰属から骨格の二面角情報を得た。次に選択的安定同位体標識のマストパラン X を化学合成し、5 つの距離情報を得た。この距離情報と化学シフトから得た二面角を拘束条件として構造を得た。さらに、リン脂質膜のリン、あるいは脂肪酸重水素の核スピントペプチドのプロトンの間の距離情報を得る測定法を開発してマストパラン X が膜とどのように結合しているかを明らかにした。

5. H⁺-ATP 合成酵素 F₁ の NMR による研究

本格的な膜蛋白質としてはそれまでやっていた電子伝達系とも関わりがある H⁺-ATP 合成酵素に的を絞った。この酵素に関する歴史は本シリーズ第 4 回の香川靖雄先生 (現女子栄養大副学長) のお話に詳しい。当時、結晶構造は知られていなかったし、回転説論争の渦中にあった。この酵素は分子量が 50 万を超える巨大な膜タンパク質で NMR にとっては巨大すぎる分子複合体であったが、電気化学ポテンシャルと ATP の間のユニークなエネルギー変換機構に興味を持った。本酵素は膜外の水相に突きだした F₁、膜に埋まった F₀ 部分からなり、バクテリアではそれぞれ $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, ab_2c_n のサブユニット組成を持っていた。われわれが研究を始めて間もなく発表された Walker らのミトコンドリア F₁ の結晶構造によれば触媒サブユニットである β は細長いサブユニットでヌクレオチド結合型では Closed 構造をとり非結合型では Open 構造 (N 末端・C 末端ドメインの相対的配向角が Closed 型より開いている) をとっていた。また ATP の加水分解に伴って $\alpha_3\beta_3$ リングを貫く γ サブユニットが回転することを野地・吉田・木下らが示した。NMR の分子量の壁を考慮して、まずはこれをサブユニットに分解して研究を始めることにした。F₁ 部分は溶液 NMR 解析を基本とし、F₀ 部分や F₀F₁ は固体 NMR でやると

いう方針で研究に取りかかった。東工大の吉田賢右教授（当時）の協力を得ることができたので、材料としては好熱菌の H^+ -ATP 合成酵素を使った。この酵素は丈夫であるという点でも利点があった。F₁ 関係の仕事は八木宏昌博士が中心となって取り組んだ。

分子モーターである F₁ における γ サブユニットの回転には β サブユニットの Open 型と Closed 型間の構造変化が関係すると推定された。この構造変化が β サブユニット固有の性質であれば、これは F₁ 回転の重要な駆動力となる。そこで、 β サブユニットモノマー（52 kDa）におけるリガンド結合の影響を安定同位体区分標識法で帰属された骨格アミドの ¹H, ¹⁵N シグナル全体を用いて解析した。次にこの帰属を用いてヌクレオチド非結合状態と結合状態での N 末端ドメインと C 末端ドメインの相対的配向角を NMR により決定したところ、モノマーでも結晶構造での Open 型と Closed 型に対応する構造をとっていることが明らかになった（2）。このことは F₁ を回転させる駆動力の一つが ATP の結合による β サブユニットの構造変化であることを示す。同時に、これは F₁ の回転における ATP 分解のエネルギーが β サブユニットの構造変化に使われているのではなく、回転方向の決定に使われていることを示唆するものである。われわれはさらに、ヌクレオチド結合による構造変化がリン酸基結合によって誘発される活性部位水素結合ネットワークの再構成によって誘起されることを明らかにした（3）。しかし、モノマーと F₁ は違うのではないかと誰しも思う。そこで、結晶化条件と同じ溶液中の $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon'$ 複合体（再構成 F₁）で β の C 末端領域を解析した。NMR 的に見てモノマーと同じ Open 型が F₁ 中にも観測されたのでモノマーの Open 型は複合体中の Open 型と同じであることが確認された。一方、非 Open 型のシグナルも存在し、Closed 型と思われる。こちらはサブユニット間相互作用を反映してモノマーとは異なる部分があった。この研究は 360 kDa の大きさのタンパク質でも溶液 NMR によ

る解析が可能となったことを示した。結晶構造解析との連携では ϵ サブユニットでも面白い仕事ができる。 ϵ サブユニットは γ サブユニットが ATP 分解方向に回転するのを抑制するブレーキではないかと言われている。好熱菌 ϵ サブユニットは ATP の結合下で結晶ができ、ヘリックス部分が折りたたまれた構造をとっていた。溶液中 ATP 存在下では NMR でも同様の構造が観測されたが、ATP がないと折りたたまれていたヘリックスは伸びてふらふらした構造をとっていた。これは好熱菌細胞内の ATP 濃度が下がると ATP 分解を抑制するためにヘリックス部分が伸びて ATP 分解のブレーキとして働くという生化学的な解析結果を支持するものであった

（4）。

上記の研究が本格化する頃、私は縁あって再び阪大蛋白研に戻った。その翌年 2001 年に日本蛋白質科学会が創立された。思い出すと、先輩である長岡技術科学大の三井幸雄教授はわが国で蛋白質研究を飛躍的に発展させるためにはタンパク質構造討論会と蛋白工学会を基礎として新しい学会を作る必要があると機会あるごとに説いておられた。この考えに沿って、1998 年には三井さんが長岡でタンパク質構造討論会と日本蛋白工学会の合同年会（98'蛋白合同年会）を開催した。当時熱狂的な参加者を集めていた郷信広京大教授（当時）の重点領域研究

「タンパク質の立体構造構築原理」のグループも新しい学術団体を模索していた。そこで、翌年に第 50 回タンパク質構造討論会を記念した蛋白合同年会横浜 99' を私がお世話した際に、日程を重ねて同じ場所でタンパク質の立体構造構築原理研究会第 6 回ワークショップを開いていただいて交流を行った。その翌年には三浦謹一郎先生（当時学習院大教授、遺伝研・東大名誉教授）が蛋白合同年会東京 2000 という形で 3 団体をまとめてくださった。その後、構造生物学シンポジウム等他の団体も加わって学会が創立されるに至った。この流れを作り出す上で重要な役割を果たしたのは三井さんの新しい学会への情熱だったように思う。しかし、悲しい

ことに三井さんは病に倒れ、日本蛋白質科学会の創立を見ることなく他界された。三井さん自身の研究も発展段階にあり、心中さぞかし無念であったろうと拝察する。改めてその努力に感謝したい。

6. H^+ -ATP 合成酵素 F_0 の NMR による研究

膜内に存在する F_0 は戦略的には固体 NMR の対象であると考えていたが、好熱菌サブユニット c については既に発表されている大腸菌にならって有機溶媒の疎水環境中での溶液構造を決定した。大腸菌のサブユニット c 構造を基に、プロトン移動・回転モデルが提案されていた。われわれの基本構造は大腸菌のものと似ていたが、プロトン移動と深い関係のある pH 変化に対する挙動は全く異なっていた。サブユニット c リングについては本来、脂質膜中の構造決定をすべきである。そこで、固体 NMR を用いてこれに取り組んだ。まず、蛋白研の相本三郎教授の協力を得て大腸菌のサブユニット c の選択的標識を行い、これをリングとして脂質膜に再構成し、その活性部位構造と大腸菌モノマー構造を基に提案されたリング構造を比較したが、提案構造とはやはり一致しなかった。視点を変えて大腸菌 c-リングと液晶状態における脂質二重膜の相互作用を脂質の側から固体 NMR で見ると、その相互作用が非常に滑らかでリングの回転によるエネルギーロスが少ないことが明らかになった (5)。

c-リング構造の本格的解析は好熱菌サブユニット c を用いて行った。固体 NMR の弱点は多くの試料が必要なことで、しかもインタクトなリング構造を脂質膜に再構成するのが最も重要なポイントである。そこで、大腸菌で採用されているようなモノマーからの再構成ではなく、吉田研の協力を得て酵素本体 (F_0F_1) からインタクトなリングを精製して再構成する方法を確立した。もう一つの方法は無細胞系を使うもので、選択的標識に向いている。X 線結晶構造解析で他の生物種について界面活性剤中でのリング構造が報告されたので、それとの対比で脂質膜中の活性部位の構造を甲斐荘正恒先生 (首都大名誉教授) が開発した SAIL アミ

ノ酸 (最小限のプロトン以外を重水素に置き換えた $^{13}C,^{15}N$ -標識アミノ酸) を用いて解析した。脂質リポソーム存在下、無細胞系で発現したサブユニット c は一定条件下で脂質膜に取り込まれて自動的に正常なリング (この場合は c_{10}) をつくるよう F_0F_1 に再構成すると活性を持つリングを精製することができた。これを脂質膜に再構成して活性部位の構造を調べた。脂質膜中での活性部位でのプロトン保存の方法が大腸菌と好熱菌で異なる可能性があるという興味深い結果が得られた (6)。大腸菌に発現した F_0F_1 からインタクトな状態のリングを精製することにも成功し、全体の構造決定に利用している。

7. まとめ

生命科学全体で見ると生命活動への理解は私が研究を始めた頃と比べると非常に進んだ。それはまたさまざまな研究方法論の発展に支えられている。私は構造生物学と呼ばれる分野で研究をしてきたが、問題意識と方法論と実験設備が揃うのはなかなか難しいと感じた。また、生命機能の個人的理解についてはなお道は遠いと感じている。

文 献

- 1) H. Akutsu and Y. Takayama, *Accounts Chem. Res.*, **40**, 171-178 (2007).
- 2) H. Yagi, T. Tsujimoto, T. Yamazaki, M. Yoshida, and H. Akutsu, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 16632-16638 (2004).
- 3) H. Yagi, N. Kajiwara, T. Iwabuchi, K. Izumi, M. Yoshida, and H. Akutsu, *J. Biol. Chem.*, **284**, 2374-2382 (2009).
- 4) H. Yagi, N. Kajiwara, H. Tanaka, T. Tsukihara, Y. Kato-Yamada, M. Yoshida and H. Akutsu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 11233-11238 (2007).
- 5) M. Kobayashi, A. V. Struts, T. Fujiwara, M. F. Brown,

and H. Akutsu, *Biophys. J.*, **94**, 4339-4347 (2008).

- 6) S.-J. Kang, Y. Todokoro, I. Yumen, B. Shen, I. Iwasaki, T. Suzuki, A. Miyagi, M. Yoshida, T. Fujiwara, and H. Akutsu, *Biophys. J.*, **106**, 390-398 (2014).
-

阿久津秀雄先生ご略歴：

- 1944年 東京に生まれる
1967年 東京大学理学部生物化学科卒業
1972年 同上理学系研究科博士課程単位修得退学
(73年理学博士)
1972年 大阪大学蛋白質研究所助手
1985年 横浜国立大学工学部助教授
1991年 横浜国立大学工学部教授
2000年 大阪大学蛋白質研究所教授
2006年- 横浜市立大学客員教授
2006-2008年 日本蛋白質科学会会長
2007年 大阪大学名誉教授
2007-2014年 大阪大学蛋白質研究所客員教授
2009-2013年 ソウル国立大学 WCU 教授
2014年 日本学術振興会ストックホルム研究連絡センター長

