

シリーズ「わが国の蛋白質科学研究発展の歴史」 第 16～18 回原稿配信のお知らせ

平成 27 年 10 月 20 日

本年、7 月に始まった本シリーズですが、今回は第 16 回から第 18 回の原稿を配信いたします。

今回は下記の 3 先生方の原稿を配信いたします。

- 第 16 回 油谷克英先生
- 第 17 回 月原富武先生
- 第 18 回 阿久津秀雄先生

なお、これまでに下記の 15 名の先生方による原稿を配信済みです。

- 第 1 回 石井信一先生
- 第 2 回 大村恒雄先生
- 第 3 回 福井俊郎先生
- 第 4 回 香川靖雄先生
- 第 5 回 岩永貞昭先生
- 第 6 回 高木俊夫先生
- 第 7 回 八木達彦先生
- 第 8 回 崎山文夫先生
崎山文夫先生「赤堀四郎先生 生誕 100 年に思う」(蛋白質核酸酵素より転載)
- 第 9 回 高橋健治先生
- 第 10 回 田隅三生先生
- 第 11 回 北川禎三先生
- 第 12 回 森川耿右先生
- 第 13 回 伊藤維昭先生
- 第 14 回 福山恵一先生
- 第 15 回 桑島邦博先生

さらに、現時点で下記の先生方に執筆をお願いしています。ご期待下さい。

- 坪井正道先生
- 大島泰郎先生
- 井本泰治先生

日本蛋白質科学会 広報担当 内山 進、池口満徳

本文は PDF をご覧ください。

電子メール版ニュースレター発行
〒562-8686 大阪府箕面市稲 4-1-2 千里インターナショナル内
日本蛋白質科学会事務局
Tel: 072-729-4125, Fax: 072-729-4165
E-mail: pssj@senri-inter.jp URL: <http://www.pssj.jp>
編集: 内山 進 (大阪大学大学院工学研究科)

蛋白質のかたち、立体構造の安定性研究

----- 50 余年の私の研究の歩み -----

油谷 克英 (ゆたに かつひで)

1. 「銅鉄的研究」の教えに学ぶ

日米安全保障条約改定に反対するいわゆる 60 年安保反対闘争の真っ只中 1960 年に、大阪大学理学部生物学科の 4 年生の卒業研究で生物物理化学講座の伊勢村寿三教授の研究室に配属された。テーマは「蛋白質の変性とその可逆性」。私の名前が出た最初の論文は、先輩の大学院生、前田安昭さんの仕事を手伝ったもので、「8 モル尿素中で全ての SS 結合を切断した完全変性タカアミラーゼの再生研究」であった。しかし、この研究の評判はすこぶる悪かった。Anfinsen らの変性リボヌクレアーゼの再生研究の 2 番煎じであると。当時は、安保闘争、大学紛争で大学は荒れていたが、良い意味では「研究とは何か」をいやが上でも真剣に考えさせられた時代であった。どのような経緯か忘れてしまったが、江上不二夫教授が「銅鉄的研究(牛馬的研究)」を薦められていることを知った(1)。銅でやった研究を鉄でやる研究も悪くない。つまり、リボヌクレアーゼの再生研究を他の蛋白質でも行うことを推奨しているのである。これには非常に勇気を与えられた。研究のやり方を初心者にも十分に納得させるものであった。

そこで、SS 結合を有するタカアミラーゼと SS 結合を有しないバクテリアのアミラーゼを材料に変性とその可逆性の研究に取り組んだ。その中で、Goldberger(1963)らがラット肝ミクロソームの中に、SS 交換酵素が含まれていて、その酵素が還元リボヌクレアーゼの再生を促進するという報文を見つけた。しかし、よく論文を読むと酵素としては考えられないほどの大量を必要としていることが分かった。それを確認するために、自身で、その酵

素をウサギ肝臓から抽出した。その酵素が、SS 結合を含まないバクテリアのアミラーゼの尿素変性の再生も促進させることを見出した。促進効果には BSA なども大変有効であることが分かった(2)。更に、還元タカアミラーゼの再生も蛋白質のある濃度範囲では蛋白質濃度に比例して再生速度が上昇することを認めた(3)。これらの研究から、当時は、一分子だけなら蛋白質の変性は可逆的でないかと真剣に考えていた。蛋白質の社会学をどのように進めるべきか、未熟な知識で無駄な実験に多くの時間を費やした。SS 交換酵素よりもっと有効な再生促進蛋白質の探索にも多くの時間を費やしたことを覚えている。何十年も経た今日では、分子シャペロンとか蛋白質の crowding 効果による安定化などとして学問的に確立されているが、当時の私としては発展の方向を見いだせなかった。



図1. 伊勢村研究室のハイキング。
1963 年ごろ 上段左から二人目浜口浩三さん、三人目高木俊夫さん、下段右から二人目が著者。

2. 好熱菌由来の蛋白質はなぜ高い安定性を示すか

1961年に、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来の α -アミラーゼの天然状態の旋光性の値が、8M尿素または5M塩酸グアニジンなどの変性剤中での値と変わらないので、好熱菌蛋白質の天然構造は変性状態のようなセミランダムかランダム状態の構造である。そのため、高い温度でも構造が壊れた状態で機能を有するとする論文が発表されていた。当時、研究室の大学院生の小笠原京子さんがこの結果を検証すべく追試実験を行っていた。実験結果は好熱菌 α -アミラーゼも常温菌由来のものと似た特徴ある立体構造を有していることを明ら

かにした(4)。

「変性と再生」の研究から何を引き出すべきなのかを考える中で、どのような機構で立体構造が維持、安定化されているかを明らかにすることが重要な課題の一つであると捕えるようになっていた。そこで、私自身も好熱菌由来の蛋白質の研究にも着手した。具体的には、好熱菌由来と常温菌由来の α -アミラーゼの安定性の比較実験であった。1975年8月にスイスのチューリッヒでETHのZuberの主催する国際会議“Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganism: Structure and Function”があった。初めての海外旅行であったが、「好熱菌由来と常温菌由来の α -ア



図2. “Biochemistry of Thermophily”の日米ジョイントセミナー(1977年、ハワイ)
写真のうち日本人参加者、1. T. Saiki, 3. Y. Kagawa, 5. M. Yaguchi, 7. Y. Nosoh, 8. K. Yutani,
10. K. Imahori, 13. M. Oshima, 15. T. Oshima, 16. Y. Kaziro, 17. M. Tsuboi,

ミラーゼの Ca イオンの結合の強さを定量的に比較して、好熱菌蛋白質の熱安定化の原因は Ca 結合定数の差異による」という論文(5)を持って参加した。すべての発表は oral で、5 日間に及ぶものであった。その論文集は *Experientia Supplementum*, 26 として出版されている(5)。ページ数は 450 ページ近くあり、“Round table and general discussion”の記録も含まれている。英語も十分に聞き取れなかったが、会議に参加して、自分の研究発表との関係で、アミラーゼの熱安定化の差異である Ca 結合定数の差は、両者のわずかなアミノ酸の差異に依存するであろうと確信できた。会議では“Round table...”の議論は全く理解できなかつたと記憶しているが、今あらためてその記録を読み返してみると、その重要な部分を聞き取っていたことになる。

3. アミノ酸一残基置換の研究

好熱菌蛋白質が僅か数残基のアミノ酸置換が重要なポイントとなって熱安定化していることを追究しようとする時、好熱菌と常温生物蛋白質間には熱安定化に関係のない多くの残基の差異が存在するので、どの残基が重要かを特定するのは大変困難である。いろいろと検討をしていたが、確か職員組合のハイキングの時、松代愛三教授(阪大微研、 $\phi 80$ フェージの発見者)に相談したところ、トリプトファン合成酵素 α サブユニットなら多くの一残基変異型の株が分離されているし、彼自身もいくらかの株は所有している。また、他の株が必要なら簡単に航空便(Yanofsky などから)で入手できるとのことであった。トリプトファン合成酵素 α サブユニットは、“蛋白質安定化機構をアミノ酸置換から解明する”ために必要と考えていた次の 3 条件に適っていた。①多くの変異型が分離されている。②SS 結合を含まない単量体蛋白質である。③立体構造が近く期待できる。当時、大腸菌トリプトファン合成酵素 α サブユニットの X 線解析のための結晶の論文が既に(1969, EJB)発表されていたが、私達が 2001 年に結晶構造を発表するまで α サブユニット単独の構造は解かれなかった。この研究には、同期の杉野義信さん(阪大理、分子遺伝学)も

参加してくれ、論文作成にもいろいろと重要な役割を果たしてくれた。この成果を 1977 年に Nature に発表(6)することができたが、彼が参加していなければ *J. Biochem.* に投稿していたであろう。表 1 は、大腸菌トリプトファン合成酵素 α サブユニットの 49 位の Glu を Gln に置換すると野生型よりも安定性が低下し、Met に置換すると安定性が向上することを示している。同じ 49 位での置換が置換残基の種類によって、安定性を高くも低くもさせることが分かった。このように、同じ部位での置換が安定性を著しく変化させるので、49 位で一揃い 19 種の変異型の安定性研究が完成すれば安定性の理解は飛躍的に進むであろうと思い、ぜひ定年までの 25 年間に完成させたいと強く決心したことを覚えている。

当時可能な分子生物学の手法を駆使して得られた、49 位での一残基変異型を徐々に増やしていったが、残っていた 13 種の変異型は合成 oligonucleotide を用いた site-directed mutagenesis によるものであった。Ulmer が *Science* に“Protein engineering”の展望を記載したのは 1983 年である。時代の流れに乗れたので、一揃いの変異型が完成して、論文として発表できたのは 10 年後の 1987 年であった(7)。その結論は、49 位は分子内部にあり、分子内部での置換は、置

表 1 大腸菌トリプトファン合成酵素 α サブユニット変異型の熱安定性の比較 (6)

大腸菌株	置換アミノ酸の位置	残存活性(%)
<i>trpA</i> 218	22 Phe → Leu	10±1
<i>trpA</i> 11	49 Glu → Gln	22±3
<i>trpA</i> 33	49 Glu → Met	88±13
<i>trpA</i> 446	175 Tyr → Cys	60±1
<i>trpA</i> 487	177 Leu → Arg	16±7
<i>trpA</i> 223	183 Thr → Ile	35±2
<i>trpA</i> 23	211 Gly → Arg	13±2
<i>trpA</i> 46	211 Gly → Glu	76±13
<i>trpA</i> 187	213 Gly → Val	12±4
<i>trpA</i> 78	234 Gly → Cys	40±8
<i>trpA</i> 58	234 Gly → Asp	85±10
<i>trpA</i> 169	235 Ser → Leu	30±4
<i>trpB</i> 8	(野生型)	49±4

pH 8.0, 58°C で 20 分間放置後の残存活性を示す。

換残基の疎水性に比例して安定性が高くなるということであった。これらの一連の研究によって、49Glu が α サブユニットの活性必須アミノ酸であることも判明した。当初、精製 α サブユニットを得るために、大腸菌を 200L のタンクで培養していて、小さな工場での作業のようであった。だが、遺伝子操作技術の進展に伴って、5L のフラスコのレベルまで低下できたことはありがたかった。

4. 安定性の定量的評価---カロリメータの導入

α サブユニット変異型の安定性の定量的評価は、塩酸グアニジンによる変性を2次構造の指標となる 220nm 付近の CD スペクトルの変化から追跡した。 α サブユニットの変性曲線は安定な中間状態をもつ3状態変性のカーブであった。このカーブを curve fitting によって平衡定数を求め、それから変

性のギブスエネルギー変化(ΔG)を求めた。平衡定数を得るための非線形解析のプログラムは岩崎裕さん(阪大産研)の援助を得て自身で作成した(8)。その時のプログラム作成の経験はその後の研究にいろいろと役立っている。しかし、いくつかの仮定を含む 3 状態の変性剤変性から求めた ΔG の値の信頼性を得るために、他の方法による検証が必要であった。最も信頼性の高い熱力学的パラメータの求め方は、精度の高い熱量計で直接変性の熱量を求めることである。当時、それが可能な装置はソ連の Privalov らが開発した断熱型示差走査熱量計(Differential Scanning Calorimeter; DSC)、DACM1 のみであった(9)。そこで、試料を持参して彼の研究室で測定することを決意した。日本学術振興会とソ連科学アカデミー間の交流プログラムがあったのでそのグラントを利用して、モスクワオリンピックが開催された翌年の 1981 年 3 月

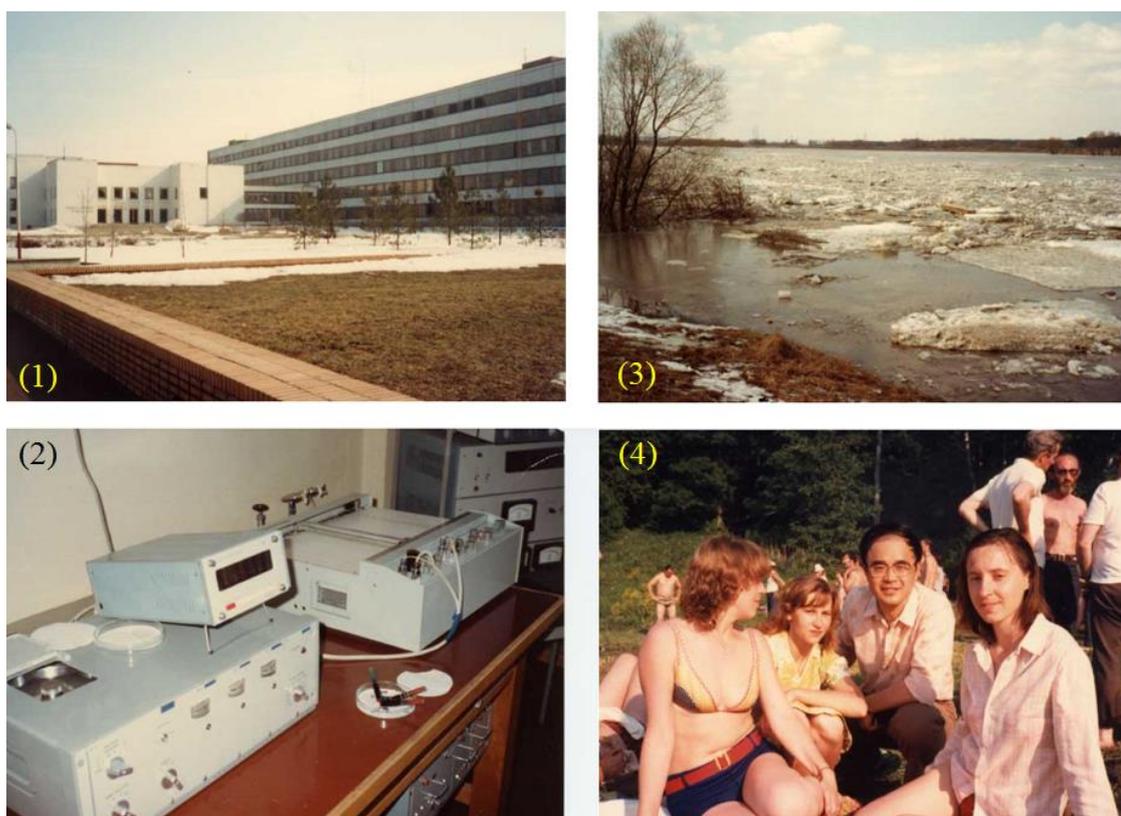


図3. ソ連科学アカデミー蛋白質研究所滞在時の写真(1981年3月~6月)

(1) 研究所全景、残雪が見られるが、到着した3月中旬には一面に数十センチほどの雪が積もっていた。(2) カロリメータ、DACM1、左側が本体、右側はXYレコーダー、(3) 4月中旬、研究所の近くに流れるOka川の氷が解け始めた様子、(4) 6月上旬の研究所創立記念日に上図の川に船でハイキング。参加者は川での水浴を楽しんでいた。写真は川岸でPrivalov研の女性たちと。

中旬から6月末まで、モスクワから南方120-130km離れた研究都市、Poustchinoにあるソ連科学アカデミー蛋白質研究所を訪問した。当時のソ連は、食糧難などネガティブな情報ばかりであったが、予想外に、食糧、住居などの環境も申し分なく、研究室の最も調子のよいカロリメータを使って測定も手伝ってくれた（実質は測定してもらった）。得られたデータは変性剤変性から得られたデータを確証してくれるものであった。カロリメータに魅せられ、その後の安定性の定量評価は熱測定が中心となった。しかし、ソ連のカロリメータをすぐ購入したわけではない。アメリカの知人によると、DACM1を輸入すると3か月で故障して、修理に1年かかるとのことであった。そのことを、真空理工の岸 証さんに話すと、回路部分の修理は真空理工で対応するとのことなのでDACM1を購入した。真空理工の技師によるとDACM1の回路部分は30年遅れているがDSC本体のセル部分は日本では作れない精巧なものであるとのことだった。ある特化した部分に優れているのは、流石に、最初に人工衛星を飛ばせる国である。

5. ヒトリゾチームを用いた系統的で網羅的変異型の研究

1990-91年頃、阪大吹田キャンパスに隣接する蛋白質工学研究所（蛋工研）のThierry Herning、黒木良太、谷山良雄さんらがヒトリゾチーム変異型の熱測定に私どものDSC（示差走査熱量計）またはITC（等温滴定熱量計）を利用していた。トリプトファン合成酵素 α サブユニットは、大腸菌由来の蛋白質の中で最も早くその立体構造が解かれると期待されていたが10年たっても解析の見込みが立っていなかった。アミノ酸置換による安定性研究は、野生型は勿論のこと置換による変異型の構造変化の情報も必須である。蛋工研で用いていたヒトリゾチームは、変異型の作成方法とその発現系も確立され、変異型もX線構造解析に適した結晶が容易にでき、その上、熱測定に適した蛋白質であると確信できたので、ヒトリゾチームを用いた系統的で網羅的変異型の研究を始めた。表2には取り組んだ変異型の例を示す。1992年4月、4年生で研究室配属になった高野和文さんを蛋工研の菊池正和さんの研究室に派遣して、ヒトリゾチー

表2 系統的網羅的研究に用いたヒトリゾチーム変異型の種類

- a) エントロピー型：Pro変異型(6種)、S-S変異型(2種)
- b) 疎水性型：Ile変異型 Ile \rightarrow Val(5種)、Ile \rightarrow Ala(5種)、Ile \rightarrow Gly(2種)、
Val変異型 Val \rightarrow Ala(9種)
- c) 側鎖水素結合型：Tyr変異型; Tyr \rightarrow Phe(6種)；Ser変異型; Ser \rightarrow Ala(6種)、
Thr変異型; Thr \rightarrow Val(5種)、Thr \rightarrow Ala(5種)
- d) イオン結合変異型：E7Q, D18N, D67N, D49N, D102N, D120N
- e) 分子内部極性型：L8T, L12T, A32S, A9S, A92S, V93T, A96S, V99T, V100T
- f) N端残基変異型：K1M, K1A, M, P, G, EAEA（アンダーラインはN端に付加）
- g) 削除型： Δ (L15/G16)、 Δ (A47/G48)、 Δ R101
- h) 左巻きヘリックス型：AまたはGへの変異11種
- i) Gly部位での変異：G \rightarrow A変異型(11種)
- j) 特定部位、分子内部型：56位変異型(12種)、59位変異型(12種)
- k) 特定部位、分子表面型：3箇所(V2, V74, V110)で一連(各19種)
- l) 3SS(C77A/C95A)二重変異型：Ile \rightarrow Val変異型(5種)、Val \rightarrow Ala変異型(9種)
- m) 3SS(C77A/C95A)二重変異型：I59A, I59G（水分子導入）
- n) 変異型安定性3Dプロフィール検証型(10種)
- o) アラカルト型：Q86D/A92D（Ca付加）, I56T、D67H（アミロイド）

ムの変異型の作成法と発現、精製法を習得してもらった。X線結晶構造解析も習得するために、彼を阪大薬学部の山縣ゆり子さんの所に派遣した。蛋白研では物理化学的測定と研究室の雑誌会に参加した。彼は大学院生と学術振興会特別研究員として2001年まで在籍し、表2に掲げた多くの変異型の研究に後輩の学生、院生と取り組んだ。代表的な論文を2-3挙げておく(10-12)。それらの研究を総合的に解析して、アミノ酸置換による蛋白質の安定性変化に及ぼす各安定化因子の定量的パラメータを推定できた(12)。例えば、それらのパラメータを用いると、「置換により3Åの水素結合が1本増えれば8.6kJ/molの安定化を獲得できる。また、空洞に水分子が入り2本の水素結合ができれば、水素結合形成による安定化と水の挿入で得るエントロピーの減少で相殺され、安定性への影響はほとんどない。」ということが分かる。

6. アミロイド形成

表2のアラカルト型の2つの変異型(Ile56Thr、Asp67His)は、それぞれ2組の家系の遺伝性非神経性全身性アミロイドーシスの原因となっていると報告されているものである。大学院生の船橋順さんらはこの2種の変異型ヒトリゾチームを作製し、その立体構造と物性を調べた(13)。その結果は、アミロイド形成は、天然状態の構造に起因しているのではなく、変性状態をより安定化させることにより、変性状態での構造変化を通じて、導かれることを示した。更に、院生の郷田秀一郎さんらは、アミロイド形成のメカニズムを研究する中で、条件を選択することによって、野生型のヒトリゾチーム、野生型の卵白リゾチームもアミロイドを形成することを見つけた(14)。また、驚いたことに、超好熱菌由来の蛋白質からもアミロイド形成を確認した。院生の高山剛さんが、好熱菌蛋白質の酸性中での塩酸グアニジン変性を追跡していたところ、二次構造の破壊を期待したが、逆にβ構造の増加が確認された。このβ構造はアミロイドを形成していた(15)。蛋白質の天然構造はアミノ酸配列に規定された固有の構造をとり、ほどけた変性状態と平衡にあるが生理的条件下では著しく天然構造に偏

っている。しかし、変性状態を通じて形成されたアミロイドのコア構造は一次配列によらずに一様にクロスβ構造をとる。このβ構造は非常に安定で実質的に不可逆である。これら一連の実験結果から、アミロイド形成は蛋白質共通の普遍的な性質であると認識していた。アミロイド形成の物理化学は大変興味ある課題であるが、これ以上追及する余裕がなかった。

7. 超好熱菌由来の蛋白質を用いた研究

1970-80年代に、生育至適温度が100°C近くの微生物、超好熱菌(hyperthermophile)が次々に発見されていたので、いつかチャンスがあれば超好熱菌由来の蛋白質の安定化機構の研究をしたいと考えていた。1996-7年頃、宝酒造の加藤郁之進、網沢進さんなどの協力で超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の Pyrrolidone carboxyl peptidase (以後 PCP と略す) と Methionine Aminopeptidase とを取り扱うことができた。これらの物性研究は小笠原京子さんが中心的に進めた(16-17)。また、月原富武研究室(阪大蛋白研)の田中秀明さんと Tahir Tahirov さんらによって、それぞれの立体構造が X 線結晶解析によって解かれた。これらの研究の中で、最も重要な発見は、超好熱菌由来の蛋白質の変性速度は一般に常温蛋白質に比べ遅いが、refolding 速度も大変に遅いということである。結果的には超好熱菌由来蛋白質もその生育至適温度においてはわずかなエネルギーバランス(37°C近傍では常温生物由来の蛋白質に比べればΔGは随分と高いが)で安定化されている。特に、PCPの場合、Jai Kaushik さん(学術振興会研究員)らは pH と温度を変化させるだけで、PCP の refolding 速度を大きく制御できることを見つけた(18)。pH2.3 で、30°Cでは24時間でほぼ intact な構造に refolding するが、4°Cでは1週間後でもほとんど refolding の進行がみられない。この結果は別の観点から大変興味を引いた。生理的条件下で天然(N)構造と平衡にある変性(D)構造の存在率は、安定化のΔGが50kJ/molの場合1/10⁸程度(一億分の一)である。そのため、N状態と平衡にあるD状態の構造研究は大変困難である。PCP の refolding

速度を自由に制御できることは、D 状態の構造研究及び D 状態から N 状態への refolding 過程を追跡できる貴重なサンプルであると思えた。

私の阪大での定年(2002年3月)も近づいていたので、定年後は PCP の refolding 過程を NMR で追跡する研究を行おうと決めて、関西学院大学理学部の瀬川新一教授の門を叩いた。研究生としての受け入れを断られたが、客員教授として働かせてもらうことになった。そして、大学院生の飯村哲史さんと一緒に研究を始めた。順調に研究は進展したが、非常に refolding 速度が遅いにもかかわらず、二状態転移であることが分かった(19)。定年後10年ほどかけて NMR で refolding 過程を研究しようと思っていたが、半年余りで refolding 過程の追跡は困難であることが分かりがっかりした。しかし、飯村さんは博士課程に進学し、N 状態と平衡にある D 状態(D1 状態と呼んでいる)の構造を HD 交換の手法で明らかにした(20)。更に、富山大学薬学部の水口峰之教授からも D1 状態の構造研究に寄与した(21)。

8. 史上最高の熱安定性を有する蛋白質の発見

予測に反して PCP の refolding 過程が二状態でがっくりしていた時、理研播磨で年齢不問で人を探していると友人からの情報を得た。それも、文科省の大型プロジェクト「蛋白質 3000」関連であった。京都大学の郷信広教授を代表者とする重点領域研究「蛋白質の構築原理」(1995-1999年度)は、「蛋白質 3000」プロジェクトのプロトタイプ的な性格であったが、郷重点関係者は「蛋白質 3000」にはほとんど参加していなかった。私自身は郷重点に深くかかわっていたので、ぜひ、参加したかった。幸い採用(2003年2月)されたので、関学での実験は飯村さんに任し、週に1度程度 Discussion のために関学に出向いた。「蛋白質 3000」では、情報解析チームを任されたが、情報解析は素人で、その分野では十分に活躍できなかったが、自分の守備範囲での実質的な成果を上げるべく心がけた。有難いことに自動測定装置(VP-capillary DSC

platform; MicroCal)を2003年度に購入して頂いた。DSC の測定、維持管理は竹平美千代さんが担当した。「蛋白質 3000」においては、構造解析のために質の良い結晶を得ることが求められる。精製された多くの蛋白質を、純度検定と共に完全な folding 状態であるかどうかを確認するために DSC 測定を行った。

超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の CutA1(*PhCutA1*) を通常の方法で DSC 測定すると、熱変性を示すピークが現れない。単調な曲線のみが現れる。一方、高度好熱菌由来の CutA1 は 110°C 付近に変性ピークが現れた。このことは、*PhCutA1* の変性温度は、DSC の測定限界の 130°C より高温にある可能性を示唆していた。*PhCutA1* の変性温度を実測するため、130°C 以上の温度で測定可能な DSC が世界の何処にあるか、あらゆるコネを使って探した。製造元では既に廃盤になっていたが、幸いなことに、日本のつくばに 150°C まで測定可能な装置があることを業者が知らせてくれた。その業者(日本シーベルヘグナー)と加藤悦子主任研究員(農業生物資源研究所)の協力をえて、超好熱菌 *PhCutA1* の変性温度が中性付近で 148.5°C であることを突き止めた。この変性温度はこれまで報告されていた蛋白質の実測熱変性温度より約 30°C 高い(22)。150°C 付近の高温での DSC 測定は 5-6 気圧の一定気圧内の密閉セル中で行われる。

150°C 近くに変性温度を持つ蛋白質の発見をきっかけに、熱安定性研究を CutA1 蛋白質に集中させた。CutA1 はバクテリアからヒトの脳に至るまで広範囲の生物に存在することが知られているが、その機能は、大腸菌では金属イオンとの関わりが、議論されているが、まだよくわかっていない。大腸菌、ヒト脳、イネ、高度好熱菌、超好熱菌由来の 5 種類の CutA1 の X 線結晶構造が解析された。大腸菌、ヒト脳、イネ由来の CutA1 の中性での変性温度は、それぞれ 89.0、96.2、98.9°C で、常温生物の他の球状蛋白質の変性温度に比べて、異常に高い。全ての CutA1 の高い安定性は、CutA1 の立体

構造が特徴のある共通のパターンをもつことに起因する。図4には、高度好熱菌 *T. thermophilus* 由来の CutA1 の立体構造を示す。その構造は、同一サブユニットの3量体構造で、一つのサブユニットが他の二つのサブユニットと絡み合うように、 β シートを互いに共有していた。また、3量体の中心部に β シートが集まり、そのまわりを α ヘリックスのらせん構造が覆っている。それぞれの起源の CutA1 は特徴ある安定化因子が見られるが、150°C 近くの高い熱安定性を示す超好熱菌由来の CutA1 は他の起源の CutA1 に比べ極めて多くのイオン対の形成が見られる。この多数のイオン-イオン相互作用（塩結合）は、CutA1 分子表面一面に広がった塩結合のネットワークを形成し、あたかも塩結合の層が断熱材の役割を果たし、異常に高い温度までこのタンパク質のかたちを保護しているかのようである。これらの研究は、理研の澤野雅英、Bagautdin Bagautdinov、田中智之、山本等、松浦祥悟、竹平美千代さんらによって行われた(22-26)。特に、松浦祥悟さんは大腸菌 CutA1 の変異型の安定性を 50°C 近く高めることに成功して、次に述べる 100°C 以上の温度領域での蛋白質変性の熱力学に貢献した。

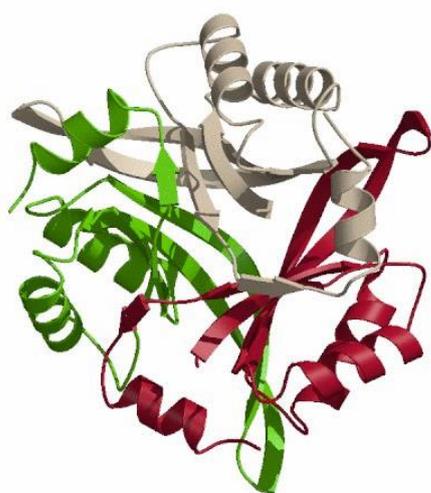


図4. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の CutA1 の立体構造(三量体) 赤、緑、茶色はそれぞれ3本の単量体の構造である。

9. 100°C以上の高温領域での蛋白質変性の熱力学

蛋白質の立体構造は熱力学的法則に従って安定化されているので、蛋白質の各安定化因子の役割を熱力学的に分析することが重要である。疎水性相互作用と静電的相互作用は蛋白質の主要な安定化因子である。低温における両安定化因子の熱力学的役割は、共にエントロピー効果によると説明されてきた。つまり、変性状態において疎水性残基に水和していた水分子は、天然構造（疎水性相互作用）が形成されると解放（脱水和）される。これに伴うエントロピー効果によって安定化される。また、静電的相互作用（塩結合）も変性状態において荷電性残基に配向する水分子が、塩結合形成によって解放されることによるエントロピー効果であると信じられている。しかし、高温領域でも、これら両相互作用が熱安定化に寄与しているのか。80°C以下の蛋白質変性の熱力学的解析から、高温では疎水性相互作用は安定化因子として機能しないと推定する報告もある。高温領域における蛋白質安定化の熱力学的機構を実験的に解析した例はない。それは、2つの技術的困難があったからである。一つは100°C近く又はそれ以上の温度では、熱変性に伴う凝集によって熱変性が不可逆となり、信頼のできる熱力学的パラメータの測定が困難であった。第二は、熱力学的解析において、要になるパラメータである変性に伴う比熱変化(ΔC_p)は、多くの蛋白質の実測値から判断して80°C以下では温度依存性を無視できるとされている。それ以上の温度では、 ΔC_p の温度依存性をどのように考慮すべきか、実質的に実測が困難であった。

超好熱菌蛋白質の100°C以上における安定化の熱力学的機構を追究するために、私たちは大腸菌の CutA1 (*EcCutA1*) の Cys を Ala に置換 (*EcCutA1_0SH*) することによって、非常に良好な可逆的熱変性を示す DSC 曲線を得ることができた。さらに、2残基を Val に置換した疎水性変異型 *EcCutA1_0SH_S11V/E61V* も良好な可逆性を示し、変性温度は 85.6 から 112.3°C に向上した。この2重変異型 (*Ec0VV* と略す) を鋳型として、種々

の荷電性残基を導入して、変性温度の改善を試みた。その結果、6個の荷電性残基を導入した変異型 *Ec0VV_A39D/S48K/H72K/S82K/Q87K/T88R* (*Ec0VV_6*と略す)の変性温度は136.8℃に上昇した。この変性温度は、*PhCutA1*の値に接近するものであった(まさに大腸菌から超好熱菌 *CutA1* への変換である)。*Ec0VV*と*Ec0VV_6*のDSC測定からそれぞれの ΔC_p の温度依存性を求め、これらの熱変性の熱力学的パラメータの温度関数を算出した(26)。その結果、100℃付近での疎水性相互作用による熱安定化は低温とは異なりエンタルピーの寄与に由来していること、さらにエントロピー的にはむしろ不利に働いていること、が判明した。また、113℃以上では、荷電性残基(塩結合形成)による熱安定化は、天然状態でのイオン-イオン相互作用によるエンタルピー効果と塩結合形成に伴うイオン(荷電)残基からの脱水和によるエントロピー効果の両方に依存していることがわかった(26)。

10. MD simulation の研究

系統的で網羅的なアミノ酸変異型蛋白質を用いた研究で、蛋白質の安定化機構を構成アミノ酸残基の役割から詳細に説明できるようになった。しかし、熱安定性の向上を意図した蛋白質の設計は、色々な方針が提案されているものの、設計指針通りには成功していないのが現状である。その主な理由は、蛋白質はN状態とD状態との平衡にあり、両状態の僅かなエネルギーバランスで立体構造が安定化されている(marginal stability)が、N状態の構造はX線結晶構造解析などにより詳細に解析されているが、D状態の研究はほとんど皆無である。先に述べたPCPのD1状態のNMR研究はそれに相当する僅かな例である。また、X線構造解析から得られる構造は個体の結晶構造である。N状態もD状態も水中では揺らいでいる。とりわけ水中におけるD状態の構造の揺らぎは大きいと推定される。この揺らぎを考慮した両状態の構造特性を知ることが重要であると考えた。これらの問題を解決する手法は、MD (Molecular dynamics) simulation であろうと思った。私はその分野の経験がなかったが、

幸いなことに同じキャンパス SPring8 の高輝度光科学研究センターのチームリーダー、その道のエキスパートの城地保昌さんから協力を受けることができた。

まず、低温菌、常温菌、高度好熱菌、超好熱菌由来の馴染みのトリプトファン合成酵素 α サブユニットについて、360Kと450KにおけるMD simulation を行った。結晶構造では決定できないループ構造の動態、安定性の違いによってどのようにMD simulation が変化するか、また揺らぎによって起こる構造変化と活性発現の関係などを明らかにして、2013年の蛋白質科学会で口頭発表した。続く実験が多忙で論文の作成には至っていない。

続いて、N状態と平衡にある天然条件下での変性(D)構造の特性を明らかにするためにMD simulation を行っている。述べてきたように、PCPのD1状態の構造がNMRによって詳細に研究されているので、MD simulation 研究に有利であると考えた。具体的には、PCPのD1状態の構造をMD simulation を用いて、再現することを試みた。GROMACSを用いてAMBER99sb力場によるMDを行っている。MD計算には、理研播磨のmini-K、和光のRICC、神戸のSCLSのスーパーコンピュータと研究室の数台のワークステーションを用いている。NMR実験で見られたD1状態に存在する α -4、 α -6ヘリックスがMD simulation においても確認されるなどいくつかの興味ある知見が得られたので2015年の蛋白質科学会でポスター発表した。しかし、現状では、N状態と平衡にあるD状態を提示できるレベルには程遠い。ただ、その糸口でも見つければと、スパコンから出てくる大量のデータと悪戦苦闘しているのが今日の現状である。

11. おわりに

50余年間の研究生活を振り返ってみて、実によい環境で研究を続けてこられたと思う。よい研究施設で、比較的潤沢な研究費に加えて、先輩、国内

外の研究者、同僚、後輩にその時々に適した多くのことを教えてもらいながら研究を進めることができた。そのよい環境の中でも、とりわけ、「銅鉄的研究の薦め」(1)に最初に出会ったのは幸運であった。

「銅鉄的研究」は、最初は真似た研究でも、自分の行っている研究をよく観察し、その評価を冷静に受け止め、自分でよく考え、その中から新しい価値を見出し、自分自身で独創的(オリジナル)な研究に発展させることである。そのような態度で研究を進めていくと、よく考えると必ず解決の糸口が見つかるという自信めいたものができる。これは長い研究者生活から獲得できる研究者ならではの役得だと思っている。阪大定年の際、PRC 編集部依頼の、雑文「研究者の役得」(PRC News letter No.2002.50、2002年8月29日号)にも記載したが、この考え方は、日常生活の種々の問題に接した時にも活用できるのが有難い。

最後に言っておきたいことは、このように、50余年間、楽しい研究生活を続けてこられたのは、やはり、日本が平和であったからだと思う。憲法9条のお蔭で、日本は戦後70年間戦争に参加しないで済んだ。最近、それが怪しくなっている。何とか止められないかと思う昨今である。

(2015年9月9日記)

文 献

1. 笠井献一「科学者の卵たちに贈る言葉-----江上不二夫が伝えたかったこと」岩波科学ライブラリー210、岩波書店 (2013)。
2. Yutani, K., Yutani, A. and Isemura, T. Accelerating Effect of Proteins on Renaturation of Denatured Bacterial α -Amylase. *J. Biochem.* **62**, 578-583 (1967).
3. Yutani, K., Yutani, A. and Isemura, T. The Study of Renaturation Process of Reduced Taka-Amylase A: Dependence of Rate of Renaturation on Protein Concentration. *J. Biochem.* **66**, 823-829 (1969).
4. Ogasahara, K., Imanishi, A. and Isemura, T. Studies on Thermophilic α -Amylase from *Bacillus stearothermophile*. I. Some General and Physico-chemical Properties of Thermophilic α -amylase. *J. Biochem.* **67**, 65-75 (1970).
5. Yutani, K. Role of Calcium Ion in the Thermostability of α -Amylase Produced from *Bacillus Stearothrmophilus*. *Experientia Suppl.* **26**, 91-103 (1976).
6. Yutani, K., Ogasahara, K., Sugino, Y. and Matsusiro, A. Effect of a Single Amino Acid Substitution on Stability of Conformation of a Protein. *Nature* **267**, 274-275 (1977).
7. Yutani, K., Ogasahara, K., Tsujita, T. and Sugino, Y. The Dependence of Conformational Stability on the Hydrophobicity of the Amino Acid Residue in a Series of Variant Proteins Substituted at a Unique Position of the Tryptophan Synthase α -Subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4441-4444 (1987).
8. Yutani, K., Ogasahara, K., Suzuki, M. and Sugino, Y. Comparison of Denaturation by Guanidine Hydrochloride of the Wild Type Tryptophan Synthase α -Subunit of *E. coli*. and Two Mutant Proteins (Glu49->Met or Gln). *J. Biochem.* **85**, 915-921 (1979).
9. Privalov, P.L. and Khechinashvili, N.N. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J. Mol. Biol.* **86**, 665-684 (1974).
10. Takano, K., Ogasahara, K., Kaneda, H., Yamagata, Y., Fujii, S., Kanaya, E., Kikuchi, M., Oobatake, M. and Yutani, K. Contribution of Hydrophobic Residues to the Stability of Human Lysozyme: Calorimetric Studies and X-ray Structural Analysis of the Five Isoleucine to Valine Mutants. *J. Mol. Biol.* **254**, 62-76 (1995).
11. Takano, K., Funahashi, J., Yamagata, Y., Fujii, S. and Yutani, K. Contribution of Water Molecules in the Interior of a Protein to the Conformational Stability. *J. Mol. Biol.* **274**, 132-142 (1997).
12. Funahashi, J., Takano, K. and Yutani, K. Are the parameters of various stabilization factors estimated from mutant human lysozymes compatible with other proteins? *Protein Eng.* **14**, 127-134 (2001).
13. Funahashi, J., Takano, K., Ogasahara, K., Yamagata, Y.

- and Yutani, K. The Structure, Stability, and Folding Process of Amyloidogenic Mutant Human Lysozyme. *J. Biochem.* **120**, 1216-1223 (1996).
14. Goda, S., Takano, K., Yamagata, Y., Nagata, R., Akutsu, H., Maki, S., Namba, K. and Yutani, K. Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution. *Protein Sci.* **9**, 369-375 (2000).
 15. Yutani, K., Takayama, G., Goda, S., Yamagata, Y., Maki, S., Namba, K., Tsunasawa, S. and Ogasahara, K. The Process of Amyloid-like Fibril Formation by Methionine Aminopeptidase from a Hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* **39**, 2769-2777 (2000).
 16. Ogasahara, K., Lapshina, E.A., Sakai, M., Izu, Y., Tsunasawa, S., Kato, I. and Yutani, K. Electrostatic Stabilization in Methionine Aminopeptidase from Hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* **37**, 5939-5946 (1998).
 17. Ogasahara, K., Nakamura, M., Nakura, S., Tsunasawa, S., Kato, I., Yoshimoto, T. and Yutani, K. Unusually Slow Unfolding Rate Causes the High Stability of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from a Hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: Equilibrium and Kinetic Studies of Guanidine Hydrochloride-Induced Unfolding and Refolding. *Biochemistry* **37**, 17535-17544 (1998).
 18. Kaushik, J.K., Ogasahara, K. and Yutani, K. The unusually slow relaxation kinetics of the folding-unfolding of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.* **316**, 991-1003 (2002).
 19. Iimura, S., Yagi, H., Ogasahara, K., Akutsu, H., Noda, Y., Segawa, S. and Yutani, K. Unusually Slow Denaturation and Refolding Processes of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from a Hyperthermophile are Highly Cooperative: Real-Time NMR Studies. *Biochemistry* **43**, 11906-11915 (2004).
 20. Iimura, S., Umezaki, T., Takeuchi, M., Mizuguchi, M., Yagi, H., Ogasahara, K., Akutsu, H., Noda, Y., Segawa, S. and Yutani, K. Characterization of the denatured structure of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile under non-denaturing conditions: role of the C-terminal alpha-helix of the protein in folding and stability. *Biochemistry* **46**, 3664-3672 (2007).
 21. Mizuguchi, M., Takeuchi, M., Ohki, S., Nabeshima, Y., Kouno, T., Aizawa, T., Demura, M., Kawano, K. and Yutani, K. Structural Characterization of a Trapped Folding Intermediate of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from a Hyperthermophile. *Biochemistry* **51**, 6089-6096 (2012).
 22. Tanaka, T., Sawano, M., Ogasahara, K., Sakaguchi, Y., Bagautdinov, B., Katoh, E., Kuroishi, C., Shinkai, A., Yokoyama, S. and Yutani, K. Hyper-thermostability of CutA1 protein, with a denaturation temperature of nearly 150 °C. *FEBS Lett.* **580**, 4224-4230 (2006).
 23. Sawano, M., Yamamoto, H., Ogasahara, K., Kidokoro, S.-i., Katoh, S., Ohnuma, T., Katoh, E., Yokoyama, S. and Yutani, K. Thermodynamic basis for the stabilities of three CutA1s from *Pyrococcus horikoshii*, *Thermus thermophilus*, and *Oryza sativa*, with unusually high denaturation temperatures. *Biochemistry* **47**, 721-730 (2008).
 24. Matsuura, Y., Ota, M., Tanaka, T., Takehira, M., Ogasahara, K., Bagautdinov, B., Kunishima, N. and Yutani, K. Remarkable improvement in the heat stability of CutA1 from *Escherichia coli* by rational protein design. *J. Biochem.* **148**, 449-458 (2010).
 25. Matsuura, Y., Takehira, M., Sawano, M., Ogasahara, K., Tanaka, T., Yamamoto, H., Kunishima, N., Katoh, E. and Yutani, K. Role of charged residues in stabilization of *Pyrococcus horikoshii* CutA1, which has a denaturation temperature of nearly 150°C. *FEBS J.* **279**, 78-90 (2012).
 26. Matsuura, Y., Takehira, M., Joti, Y., Ogasahara, K., Tanaka, T., Ono, N., Kunishima, N. and Yutani, K. Thermodynamics of protein denaturation at temperatures over 100°C: CutA1 mutant proteins substituted with hydrophobic and charged residues. *Scientific Reports* (*in press*)

油谷克英先生ご略歴

- 1938年7月 大阪市で誕生
- 1961年3月 大阪大学理学部生物学科卒業
- 1962年5月 大阪大学蛋白質研究所教務員
- 1969年9月 大阪大学理学博士
- 1981年3月 ソ連科学アカデミー蛋白質研究所、
日本学術振興会特定国派遣研究員（約4
ヶ月）
- 1982年5月 アメリカ合衆国、国立衛生研究所(NIH)の
Visiting Scientist(6ヶ月)
- 1983年7月 大阪大学蛋白質研究所助手
- 1987年3月 アメリカ合衆国、国立衛生研究所(NIH)の
Visiting Scientist(3ヶ月)
- 1990年6月 大阪大学蛋白質研究所助教授、
- 1993年3月 文部省在外研究員（短期2ヶ月）パリ、
パスツール研究所など
- 2002年3月 大阪大学定年退官
- 2002年4月 関西学院大学大学院理学研究科客員教授
(2ヶ年)
- 2003年2月 理化学研究所播磨研究所上級研究員、
現在に至る
(2003年度、情報解析チーム、チームリーダー)



2015年8月26日理研にて

蛋白質結晶学取り組んだ最初の頃

月原 富武 (つきはら とみたけ)

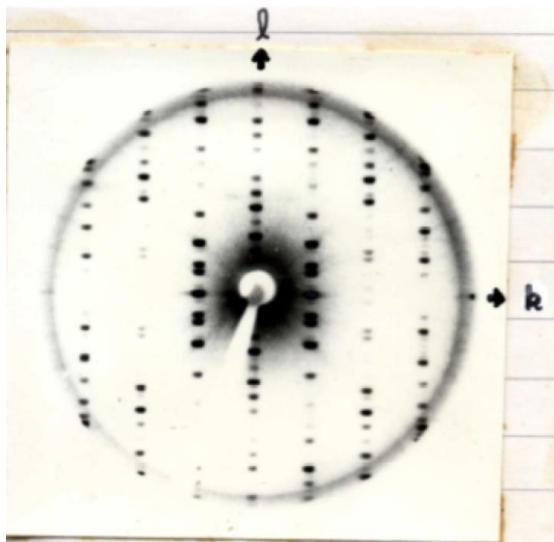
私は大阪大学薬学部でX線結晶構造解析の手ほどきを受けた後、1968年に理学研究科に進学して蛋白質研究所で蛋白質結晶学の研究を始めた。その頃、ヘモグロビン、ミオグロビンに続いてリゾチームが酵素蛋白質として初めて構造決定され、蛋白質結晶学が英国から世界に広がって行った。我が国では1960年代前半に、笹田義夫先生（阪大蛋白研、後に東工大）が英国MRCのM. F. Perutzの所で仕事をされた。帰国後、実験化学講座続8巻（1965年）に結晶化から回折実験、位相決定まで蛋白質結晶学の全容を書かれた(1)。この総説は、黎明期の蛋白質結晶学について詳しく述べられており、蛋白質結晶構造解析の理解が一層深まる内容が随所にあり、今でも推奨したい論文である。1960年代後半には、蛋白質研究所がチトクロームc、名古屋大学の坂部知平先生のグループがインスリンのX線結晶構造解析を軌道に乗せようとしていた。当時は、あらゆることを自分たちで構築しなければならない時代であった。そうした時代から1980年初頭まで、私自身が経験した今では考えられない蛋白質結晶学について、役に立つことがあることを願って述べてみよう。

チトクロームcの結晶化

1960年代後半、蛋白質研究所では高野常広先生を中心に18リットル缶一杯のカツオの心臓からチトクロームcを10グラム以上精製し、15mlの試験管を使って硫酸塩析法で結晶化していた。細かく砕いた硫酸粉末を少しずつ加えながら蛋白質の沈殿の出方と氷上で冷やした時の沈殿の消え方を見て飽和度を推し量り、適当なところで室温に静置する。数日経つとゲル化して不透明になり、試験管を逆さにしてもこぼれない状態になる。ゲルの中から小さな核が出来てゆっくり大きくなる。大きくなるにつれて結晶の周囲が徐々に透明性を増す。結晶が十分大きく成長した時点で試験管の壁を軽く叩くと、液中に浮いていた結晶が試験管の底に落下し結晶成長が止まる。（この結晶化の過程は録画されており、高野先生にお願いしてどこかで見ることができるようになっていたと思う。）こうして大量の結晶を準備することができて、重原子誘導体の調製や回折強度測定を存分に行う準備ができた。いずれも試行錯誤によって方法を確立しなければならなかったもので、今では考えられないくらいの多くの結晶が必要であった。

回折強度データ収集

1960初頭までは、蛋白質結晶の回折データ収集はプレセッション写真法が一般的であった（第1図）。この方法では逆格子の形がそのまま現れるので、直ちに指数付けを行うことができる利点があるが、撮影に時間を要して強度の読み取り精度も高くなかった。徐々に線形回折計など正確に強度を測定できるカウンターによる回折データ収集も行われるようになった。蛋白質研究所でもゼネラルエレクトリック（GE）社の3軸型手動回折計があって、1斑点ごとに結晶の方位とカウンターの位置を変えて強度を測定した。しかし、それではチトクロームcの高分解能のデータ収集を行うのは困難であり、植木龍夫先生を中心に4軸型自動回折計(AFC)を理学電気と共同で開発した。その後、このAFCは長く分子量数万以下の小さい蛋白質結晶の回折データ収集を実験室で行うために使用された。

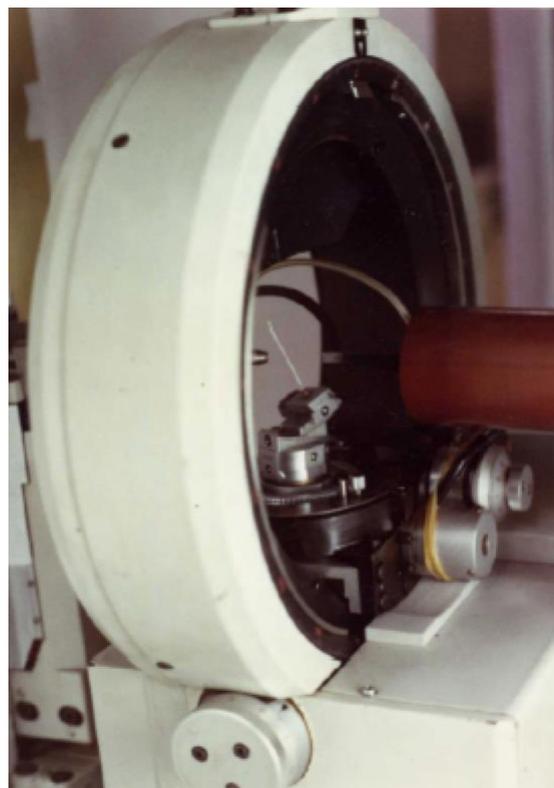


第1図 プレセッション写真 後述するスピルリナのフェレドキシンのプレセッション写真。斑点の並びに沿って指数をつけることができる。この写真を撮るためには結晶の軸をX線に対して特定の方向に向けなければならない。そのために何度も回折像を撮影して軸の方向を調整する。さらに撮影にあたっては目的の反射以外を除くために、フィルムの前面の特定の位置にスクリーンを入れる。

結晶全体にX線を照射するか、結晶の一部に当てるかということも問題になった。どの方位でも結晶全体からの回折が得られる前者の完浴法を採用した。回折強度の相対値が方位によって影響を受けることを少なくするためである。今でも中性子回折はこの方法を採用している。X線は最も強い強度が得られる波長 1.54Å の $\text{CuK}\alpha$ 線を使用した。しかし、この波長では、回折強度が結晶や結晶を封入しているガラスキャピラリーによる吸収の影響を強く受けるので、測定後吸収補正をしなければならない。そのために任意の方位での回折ではなく特定の結晶軸を回折計の ϕ 軸（結晶の回転軸）に一致させなければならなかった（第2図）。チトクロム c はアミノ酸残基数が 103 の小さい蛋白質であり、最大の格子定数も 100Å に満たないのであったが、a, b, c どの軸でも ϕ 軸に合わせて良いわけではなかった。長い軸を ϕ 軸に合わせると特定の方位で2つの反射が同時にカウンターに入る重なりの問題が生じた。完浴法を採用するためにビームサイズを大きくしたためである。そのた

め、最も短い c 軸を ϕ 軸に合わせて反射の重なりを回避した。現在は ϕ 軸を振動させる振動法で、結晶の一部分に X 線を照射して回折データ収集が行われている。吸収の大きさは ϕ の値に最も強く依存する。また、振動幅も小さいので同じイメージ内の反射はほぼ同じ ϕ であると見做せて、イメージ間のスケールングの際に実質的に吸収補正も行われているので、こうした幾何学を考慮する必要はない。ただ、格子が 1000Å 近い場合には斑点の重なりを避けるために、こうした幾何学を考慮することは有用である。

反射強度を計数する方法にはピーク値を強度とする方法、特定の角度範囲を走査して積分値を採用する方法がある。GE社の3軸型回折計を用いて手で測定していた時はピーク値を採用していた



第2図 4軸回折計にキャピラリーに封入した結晶をセットしている。大きな白い円形の部分をXサークルと呼ぶ。キャピラリーの左側に少しだけ見えているのがゴリメーターの先端で、ここからX線が出てくる。キャピラリーを乗せているのがオメーターヘッドという部分で、2つのアークがあってキャピラリーの傾きを変えることができる。そうすることによって結晶の軸をX線に対して特定の方向に合わせることができる。

が、AFC ではより正確な強度を見積もることができる積分法を採用した。走査方法では ω 軸と 2θ 軸を連動して走査する $\omega/2\theta$ 走査法と、 2θ を固定して ω 軸を走査する ω 走査法が検討された。重原子誘導体ではモザイク幅が大きくなり、 $\omega/2\theta$ 走査法では反射の重なりの問題が深刻になる。(回折計の幾何学等及びモザイクの詳細は注釈を参照してください。)そこで、モザイク幅が変化しても正しい強度が得られる ω 走査法を採用した。現在の振動法でのイメージ間で強度を足し合わせる方法は3次元の積分が行われており、理想的な積分法である。ただ、ピーク値だけでも結構まともな強度測定になっていたことは、現在取り組んでいるX線自由電子レーザー(XFEL)による静止法による回折強度データ収集法の開発の際にも念頭に入れている。

プロトタイプのAFCは紙テープ制御であった。結晶を回折計に乗せて方位を調整して格子定数等を決める。それらをコンピュータに入力して任意の反射の4軸の設定角を計算し、その値を紙テープに出力した。紙テープを回折計側で読み込ませて4軸角を設定し強度を測定した。後にコンピュータから直接回折計を制御するようになり随分楽に測定できるようになった。その後、このAFCは急速に普及して低分子用に利用者を拡大した。しかし、原理的に0次元の計数装置であり、蛋白質の分子量が大きくなるにつれて測定効率が低下する弱点が深刻になる。そのため、大きな蛋白質では振動写真法が主流になった。

構造解析プログラム

重原子同型置換法の原理は確立されていたが、位相の確率分布を求める際の誤差の取り扱い、重原子パラメータの精密化の際の反射データごとの重みなど未確立であり、個々の蛋白質で検討しなければならぬことが多くあった。こうしたことを検討しながら位相決定のためのプログラム開発が、芦田玉一先生を中心にして行われた。毎週の雑誌会は殆どが位相決定法に関する原論文の紹介であった。当時、大阪大学では豊中に大型計算機センターがあり、研究所のあった中之島からは学内便でプログラムとデータがセットになったカードを

送ると、1~2日後に計算結果が返ってきた。大型といえども、今日感覚では主メモリーも恐ろしく小さく、計算速度も遅いものであった。そのために電子密度計算も任意の間隔でなく特定の間隔に限定して行った。三角関数は計算機に組み込まれている関数を使うと時間がかかるので、前もってテーブルを作っておいてそのテーブルから引き出した。より一般性のあるプログラムシステムの構築も視野にあったと思うが、何よりもチトクロムcの構造解析を早く成功させることが優先された。等高線を作図するプロッターではなく、電子密度値を印字したものをもとに手で描いた。こうして作成した等高線に基づいて阪口健一技官に協力してもらって作った2つの木のモデル蛋白質研究所の玄関にある(第3図)。一つは6Å分解能でもう一つは4Å分解能のモデルである。6Å分解能のモデルでは、計算間隔を適切な値に選択できなかったために水平面内と垂直方向での縮尺にずれがあり、少し縦長になっている。4Å分解能の時にはほぼ一致させる計算が可能になり、正確なモデルになっている。

重原子誘導体

蛋白質研究所での大学院時代に、揺籃期の蛋白質結晶学をじっくり学ぶことができた。チトクロムcの構造解析で私が最も貢献できたと自負しているのは、 $K_3UO_2F_5$ 修飾が良好な重原子誘導体となることを見つけたことである。当時、重原子誘導体としては K_2PtCl_4 が見つかったが、Ptそのものの電子密度に異方性が高くて良質の重原子誘導体結晶ではなかった。これはよくあることで、PtがMetのSの2つの孤立電子対に50%ずつの確率で入るためである。私はフローセルという装置を作って重原子誘導体を検索した。その装置のキャピラリーに結晶をいれて外から重原子試薬溶液を流し込みながら、回折像の変化を調べた。重原子を流すことによって変化の可能性があるかと判断すると、5Å分解能のデータを収集し、ネイティブ結晶との差のパターソン関数を計算した。チトクロムcの結晶は溶媒含量が40%に満たない隙間の少ない結晶である。それでも3分以内に外の溶媒が内部

に浸み込む。この結晶では 10 Åより低い分解能の斑点の強度は溶媒領域の電子密度の変化と共に変化するので、10 Åより低角側の反射強度の変化で溶媒が置換される様子を観測できた。修士課程2年の時、重原子検索実験を毎日繰り返していたが、回折強度変化があっても低分解能側だけとか、同型性が崩れるなどで、良好な重原子誘導体を見つけることができないまま12月末になった。小さい蛋白質は隙間が小さいために良好な重原子誘導体を作るのが難しいことが多いのである。初期の蛋白質構造解析では、できるだけ小さい分子量の蛋白質が研究対象にされたこともあって、いづこも重原子誘導体調製に苦労することが多かった。

修士論文のためのデータを得るために、冬休みを返上して重原子誘導体検索を行っていた。大晦日に $K_3UO_2F_5$ 誘導体がこれまでにない良さそうな回折プロフィールを示した。急遽、GE社の3軸

手動回折計で回折データを収集するための設定角を計算しようとしたが、休み中で建物が冷え切って部屋の温度が低くて計算機が起動しなかった。計算機室にガストーブを持ち込んで数時間かけて20°C以上にして、やっとの思いで計算機を起動した。設定角を計算して、100反射弱の2次元(0kl)の5Å分解能の反射強度を測定し、ネイティブ結晶との差のパターソン関数を計算した。等高線を引いて確かに特定の位置に重原子が入っていることを確認できた時には、とっくに元日の朝になっていた。この上ない喜びに浸った元日であったことは、今でも鮮明に覚えている。修士論文は、 $K_3UO_2F_5$ 誘導体を見つけたという内容だけで書いた。その後 $K_3UO_2F_5$ は私にとってはマジック試薬で、フェレドキシン、ウイルス(SBMV)等使った結晶で100%成功している。しかし、その後ウランが核燃料物質であることから使用しなくなった。



第3図 チトクロムcの木製モデル カツオの心臓の還元型チトクロムcのモデルであり、左側は4 Å分解能、右側は6 Å分解能の電子密度に基づいて作成した。4 Å分解能のモデルで赤く塗っている部分はヘムである。赤色と黄色の球はそれぞれ導入した重原子Pt, Uの位置を示している。両者で見る方向が少し違っている。そのために4 Å分解能のモデルではPtが隠れている。

現在は SeMet 置換が普及して重原子試薬を浸漬させる重原子同型置換法は余り使われていない。扱う蛋白質が大きくなるほど重原子誘導体を調製するのは容易であることが忘れられている。SeMet 蛋白質の大量発現に苦勞している話を聞いた時に、なぜ重原子誘導体を調製しないかと思うことが多い。

鳥取大学

1970 年代初頭、鳥取大学には勝部幸輝先生がおられて天然物の X 線解析を行っておられた。その助手にならないかと角戸正夫先生から話があった。よく考えて蛋白質の X 線結晶構造解析をやっけて良いというお話を頂いたので決心し、博士課程を 2 年で中退して 1971 年 1 月に鳥取大学工学部に助手として就職した。任期のないポジションであり、これでじっくり蛋白質結晶学の研究をして一生食べていけると思い大変嬉しかった。しかし、1971 年当時研究条件は殆ど整っておらず、周囲の先輩もどなたも私が蛋白質の研究を鳥取で行うことが出来るとは考えておられなかった。

鳥取大学に就職する時に、当時阪大理学部にいた吉川信也さんに、チトクロム c の相手であるチトクロム酸化酵素の構造解析をやりたいと相談した。それがどんなに難しいことか十分に理解していたわけではない。ただ、大学院時代に蛋白研の生理機能部門の談話室で友達とお茶（お酒だったかも）を飲んでいた時に、佐藤了先生が「これからは膜蛋白質、蛋白質間相互作用だ」と 2 つのキーワードをあげられたことがいつも頭にあった。1962 年に米国ジョンソン研の米谷隆先生が結晶の写真を報告されているが、回折像は撮っておられず、吉川さんの所でもまだ精製法が確立されていなかった。結晶化に取り組むにはまだ早いので待っておれ、しばらくは別のことをやるようにということで、阪大理学部の松原央先生と神戸山手女子短大の新勝光先生を紹介して貰った。そこで、フェレドキシン(Fd)-フェレドキシン還元酵素(FNR)複合体の X 線結晶構造解析をすることにした。最初は冷室も遠心機も無い状態であったが、クロマト用の低温チャンバーは機械工場の指導のもと自分達で作

遠心機は農学部の設備を借りた。生物学的に重要な結晶を作れば何とかなるだろうと楽天的に取り組んだ。Fd-FNR 複合体の調製は新先生に鳥取まで指導に来て頂いてホーレンソウを用いて行った。数年間学生と一緒に試行錯誤したが、結晶を選ぶに到らなかった。

そうしているときに松原先生からスピルリナの 2 鉄フェレドキシンの結晶が出来たので見に来いという連絡があり、早速阪大に行って当時大学院生の長谷俊治先生が作った結晶を頂いて帰った。タイミング良く勝部先生がプレセッションカメラを科研費で購入されたので、空間群決定など予備実験は十分行うことが出来た。回折強度データ収集は蛋白研の安岡則武先生に便宜をはかって頂いて、AFC で収集した。当初、回折強度は紙テープにも出されたが、そのまま鳥取大学では読むことができなかつたので、紙に印字されたものを鳥取に持って帰り、紙テープに打ち込んだ。位相決定用のコンピュータは TOSBAC-3400 という主メモリーが 8K words (1 word = 64 bits) のテープコントロールのものが 1 台、鳥取大学共通の設備としてあった。今では誰も想像できないでしょうが、そろばんで計算していたことを考えれば不可能なわけではなく、上手にプログラムを書いて $K_3UO_2F_5$ 誘導体によって異常散乱を利用した単一重原子同型置換法で位相決定を行った。研究の殆どの時間は計算プログラム書きに費やしていた。このコンピュータは共通設備で、運用はオペレータの勤務時間中に限られていて仕事はかどらなかつた。しかし、大口ユーザーであったことで、特別に夜間使用を許可してもらって、[2 鉄 2 硫黄]フェレドキシンの活性中心の構造を決定することができた。これを論文にし (2)、構造解析に見通しを付けた。当時鳥取大学では勝部教授、月原講師、福山恵一助手の体制であった。天然物化合物の研究が中心であった勝部先生と福山先生もフェレドキシンの仕事をしてくれるというので、思い切って 2 年間米国パデュー大学に留学した。その間、福山先生を中心にした緻密な構造解析によって 2.8 Å 分解能の構造を得て、Nature 誌(1980 年)に掲載された (3)。

パデュー大学

フェレドキシンの構造解析である程度自信がついた頃、チトクロム c 酸化酵素はフェレドキシンよりも1桁以上大きいので、より大きな蛋白質複合体の構造解析を行う能力を養う必要性を痛感していた。田中信夫先生の紹介でパデュー大学の M. G. Rossmann 教授のところへウイルスの構造解析を行うことにした (1978-1980 年)。そこで最初に意外であったのは回折データ収集が古典的な写真法であったことである。しかし、分子量がフェレドキシンの百倍を超える巨大なウイルスでは、反射数は分子量に比例するので1斑点ずつ正確に測定するカウンター法では対応できないことは一目瞭然であった (第4図)。パデューでもっとも嬉しかったのは、義務から完全に解放されて24時間研究のことだけであったこと、お金の心配をしなくて良いことであった。

Rossmann 教授の所では T=3 ウイルスである SBMV の 3.5\AA 分解能構造決定が不成功で、もう一つ重原子誘導体を探し、 2.8\AA 分解能の構造解析を行う方針を立てたところであった。当時、重原子誘導体検索には撮影に時間が掛かるプレセッション写真法が適用されていて、1イメージの撮影に数日要していた。それを正確に配向させた振動写真法で1日以内に行うことを提案したが、「きけない、しゃべれない奴が何を言っているのだ」と言う雰囲気でも誰にも相手にされなかった。しかし、その方法で K3UO2F5 誘導体を作り、良い誘導体の可能性があることを実際に示した頃から信用してくれ始めて、仕事が随分やりやすくなった。とは言ってもこの誘導体が実際に使えるかどうかはフルセットのデータを収集しなければならない。それには、通常1年以上かかる。常温で回折実験を行うために1個の結晶で1照射すれば結晶は劣化する。

(凍結結晶で回折実験が最初に行われたのは1990年代半ばにリボソームに適用されたのが最初である。) 振動幅 0.5 度、全部で最低 90 度分、180 枚測定しなければならない。1照射毎に結晶

を取り替え、前の結晶に対して正確に次の角度領域になるように結晶の配向を合わせなくてはならない。この結晶の方位調整に1日、1枚の写真撮影に1日かけて、2日で1枚取るのが優秀なポストドクの仕事であった。これでは留学期間中に仕事が終わらない。そこで3枚の静止写真で、現像時間も入れて4時間で精密に結晶の方位を調整し、20



第4図 Southern Bean Mosaic Virus の 2.8\AA 分解能の振動写真。回転対陰極発生装置に2枚の全反射ミラーを装着して焦点を絞ったX線を用いて20時間照射、 0.6° 振動で撮影している。チトクロム c やフェレドキシンの回折像を見慣れていたのが最初にこの写真を撮ったときは、それなりのカルチャーショックを覚えた。しかし、チトクロム c やフェレドキシンで回折像撮影に際に苦勞した軸たては、ウイルスでは斑点が密にあるために容易であることにすぐ気がつき、写真法によるデータ収集は以外と難しくなかった。

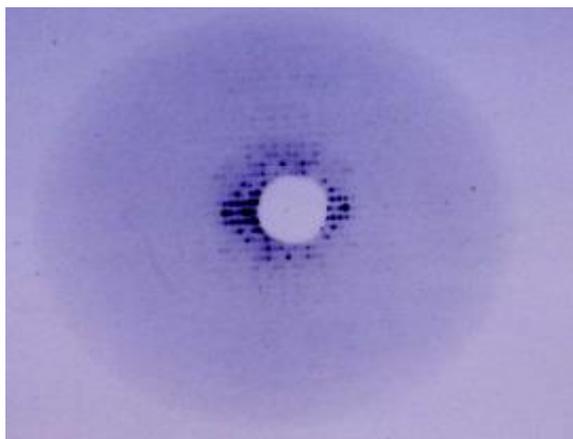
時間で1枚の振動写真を撮る計画を立てて、実行した。この辺は日本で結晶学の経験を積んでいたもので自信があった。1週間に6枚、 3.0 度分撮った。全く無駄がなければ30週で実験が完了することになる。実際には撮り直しや 0.5 度振動の他に低分解能用の 1.0 度振動のデータも収集したので、1年近くかかった。私が撮影した回折像は、ポストドク仲間では今は回折像の処理プログラムの作成者としても著名な Andrew G. W. Leslie が毎日1枚ずつ処理して、回折像の状況を知らせてくれた。

2.8Å分解能のデータ収集が完了し、重原子同型置換法による位相決定はボスが担当した。次はウイルスの対称性を利用した平均法による電子密度の精密化である。それを私が担当したが、2.8Å分解能になりコンピュータ容量の限界を超えて、それまで使っていた3.5Å分解能用のプログラムでは実行不可能であった。3.5Å分解能用のプログラムを作成し、Assistant Professor になって独立していた Jack Jhonson と議論した結果、プログラムを修正して直径約30cmの大きさの磁気テープを10数本使えば可能であることが判った。プログラムを根本的に作り替えて臨むか、プログラム修正で10数本のテープの交換という労力によって対処するかを選択であったが、躊躇せず労力によって解決する道を選択した。約200メートル離れた計算機センターに磁気テープ10数本を1日1サイクルの計算を行う度に運ぶのである。私にとって最も大きな問題は、計算の時に計算センターのアライメントの担当者が磁気テープの順番を間違えずに掛けるという厄介な仕事をしてくれるかどうかということであった。この件については、センターの最大の利用者である Rossmann が直接センターに掛け合ってくれて、センターが特段の配慮をして実施してくれることになった。こういう不細工な戦術をとる私の考え方は Rossmann の考え方とは必ずしも一致しなかったが、理解してくれた。しかし、今振り返ってみると、なんとかモデル作成はできる程度に電子密度は改善されていたが、平均法による精密化が十分収束するだけのサイクル数は行えていなかった。その後の高速化されたコンピュータによる計算では、完全に収束させるには数100サイクルは必要であることが判った。しかし、当時のコンピュータの性能では無理であった。今日ではコンピュータの進歩があつて、膨大な繰り返し計算を行うことが可能になり、ウイルスでは重原子誘導体を用意しなくても平均法のみによって構造決定が可能になっている。2.8Åの構造解析を Nature 誌(5)に掲載されるめどが立って2年間の留学期間を終えた。2年間で日本にいる時の10年分の仕事をした感じであった。また、10年を超える研究の集大成の時期にチームに加

わることができ、優れた研究者仲間と一緒に研究が出来たことは何よりの幸運であった。いかなる巨大な蛋白質の結晶構造解析を行う自信もついた。

チトクロム c 酸化酵素

パデュー大学に留学することになった頃チトクロム c 酸化酵素は、吉川さんが甲南大学理学部で反応機構の研究を続けると共に精製法の改善に取り組んでいた。鳥取大学で FNR やフェレドキシンと一緒にやっていた小川恵三さん（阪大薬学部の博士課程）にも協力して貰って、吉川さんの所で結晶化も始めた。小川さんが何回か結晶らしいものの回折像を撮ろうとしたが成功しなかった。1980年2月に帰国して、その春甲南大学の冷室でキラキラした輝きを見たときの感動は今でも鮮明である。顕微鏡下で結晶であることを確認できたが、濃縮法による塩溶領域（塩析とは異なり塩濃度の低いところ）での結晶化であるために、微妙な条件の変動によっても結晶が溶けてしまった。回折像を撮るのにも随分苦労した。吉川さんや甲南大学の学生さんがバスで鳥取まで結晶を運んで来て、実験室のプレセッションカメラで回折像の撮影を試みた。最初は結晶をキャピラリーの中に入れることもなかなか出来なかった。鳥取まで運んでいる途中で結晶が消えることも何度かあった。徐々に結晶の取り扱い方に習熟して、何とか空間群を決



第5図 ウシ心筋のチトクロム c 酸化酵素結晶のプレセッション写真。最高10 Åの斑点が見える。塩溶領域での結晶化されており壊れやすい結晶であったが、良質の蛋白質を精製できている証拠となった。

めることが出来る回折像を撮影できたのは 1983 年であった (第 5 図)。その後、1993 年の末に 2.8 Å 分解の回折像を得て約 1 年かけて構造決定を行った。1995 年に活性中心構造(5)、1996 年に全構造(6)、1998 年に H-パンプトンポンプ機構(7)について報告した。その後、反応中間体や高分解能の構造解析、部位特異的変異体の機能解析等によって H-パンプ説の正当性を示してきた。現在は、新しい X 線自由電子レーザー (XFEL) によって高速時分割 X 線結晶構造解析によって、酸素還元・プロトンポンプ機構の全容の解明を行っている(8)。後になれば、随分無駄なことをして時間がかかってしまったことが多くあり、反省することが多い。しかし、新しいことに挑む際には無駄も覚悟で取り組むことも必要ではないでしょうか。

あとがき

1980 年代前半まで、私に限らず我が国で蛋白質の X 線結晶構造解析を行っていた研究者は誰も計算プログラム作りに没頭していた。しかし、構造解析ソフト開発のエキスパートを生み出すことはなかった。この原因の一つは、構造解析結果は高く評価されるが、方法の開発者が評価される機会が少なく、方法の開発に没頭していると昇進の機会が少ないことであった。もう一つは積極的な異分野 (特に計算科学) との連携が弱く広くユーザーに使われる普遍性のあるプログラムを作りきれなかったことにある。(低分子結晶構造解析では優れたプログラム体系が作られた。) これらは今日でも克服されていない弱点である。XFEL や中性子、電子顕微鏡などによる構造研究の新しい展開が期待される今日、我が国においても回折データ処理及び構造解析のソフトウェア開発を一層推進させる必要性を痛感している。

注釈 4 軸回折計とモザイク幅

4 軸回折計はこのシリーズの福山恵一先生の文章の第 1 図にある。結晶による回折斑点が生じるためには結晶を X 線に対して特定の方向に向けなくてはならない。向きを変える操作としてよく使われるのがオイラー角 (α, β, γ) である。4 軸回折計

はこのオイラー角を採用し(α, β, γ)に対応する角を (ω, χ, ϕ)としている。4 軸角の残りの 2θ はカウンターの位置を決める角である。回折が生じる中心の位置では $\omega = \theta$ となるので、3 軸回折計では ω 軸と 2θ 軸は常時 1:2 になって連動して動くようになっている。

$\omega/2\theta$ 走査では ω 軸と 2θ 軸を連動して走査する。逆格子原点と逆格子点を結ぶ線に沿ったプロファイルが得られる。例えば(h00), (0k0), (00l), (nh nk nl)などのプロファイルがチャートに現れるので重原子誘導体検索に便利であった。

ω 走査ではカウンターの位置 2θ を固定して ω 軸を走査する。これは逆格子原点と逆格子点を結ぶ線分を半径とする円弧に沿ったプロファイルが得られる。構造解析の対象にしている結晶は完全な一つの結晶ではなくて、ほんの少し向きが違う小さな結晶の集まりであり、モザイク結晶と呼び、向きの違いの大きさをモザイク幅と呼ぶ。 ω 走査法ではこのモザイク幅の大きさが直接プロファイルに現れる。蛋白質の結晶ではその大きさは 100 分の数度から 1 度を超えるものもある。モザイク幅が小さいほど良い結晶である。

文献

- (1) 笹田義夫、角戸正夫、実験化学講座(続) 8 巻、450-506 (1996).
- (2) T. Tsukihara *et al.*, *J. Biochem.*, **84**, 1645-1647 (1978).
- (3) K. Fukuyam *et al.*, *Nature*, **286**, 522-524 (1980).
- (4) C. Abad-Zapatero *et al.*, *Nature*, **286**, 33-39 (1980)..
- (5) T. Tsukihara *et al.*, *Science*, **269**, 1069-1074 (1995).
- (6) T. Tsukihara *et al.*, *Science*, **272**, 1136-1144 (1996).
- (7) S. Yoshikawa *et al.*, *Science*, **280**, 1723-1729 (1998).
- (8) K. Hirata *et al.*, *Nature Methods*, **11**, 734-736 (2014).

月原富武先生ご略歴

- 1967年3月 大阪大学薬学部製薬化学科卒業
1969年3月 大阪大学大学院理学研究科高分子学専攻
終了
1969年4月～1970年12月 同上博士課程に在学
1971年1月～1973年1月 鳥取大学工学部工業
化学科助手
1973年2月～1978年3月 鳥取大学工学部工業
化学科講師
1978年4月～1991年3月 鳥取大学工学部工業
化学科助教授
(1978年2月～1980年2月 パデュー大学ロスマン
教授の元で在外研究)
1991年4月～1995年3月 徳島大学工学部生物
工学科教授
1995年4月～2008年3月 大阪大学蛋白質研究所
教授
2008年4月～現在 兵庫県立大学大学院生命理学
研究科 特任教授
大阪大学蛋白質研究所 客員教授



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、膜蛋白質はとて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

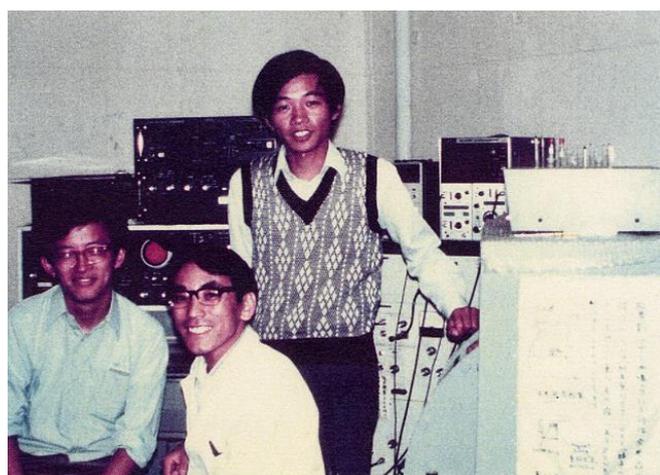


写真 2. 阪大蛋白研の 100 MHz FT-NMR 装置 (JMN PFT-100) 掃引式の本体にフーリエ変換測定のためのアタッチメント (右側の電磁石の奥) がついた当時の最新装置。著者 (中央) と学生の河野 (左)、岩橋。

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りうる。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

