

## シリーズ「わが国の蛋白質科学研究発展の歴史」配信開始のお知らせ

---

平成 27 年 6 月 19 日

この度、「わが国の蛋白質科学研究発展の歴史」について、諸先輩の先生方にご執筆いただいた文章を定期的に配信させていただくこととなりました。

現時点で配信が決定しているのは下記の先生方の原稿ですが、さらに他の先生方にも執筆を依頼しており、順次配信予定です。

- 第 1 回 石井信一先生
- 第 2 回 大村恒夫先生
- 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
- 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

2 週間毎の配信を予定しており、今回は、会長からの「巻頭言」と第 1 回から第 3 回の原稿を配信いたします。

日本蛋白質科学会 広報担当  
内山 進  
稲葉謙次



## シリーズ「わが国の蛋白質科学研究発展の歴史」

### 巻頭言

日本蛋白質科学会は、2001年に設立された若い学会です。しかしその設立にあたっては、日本蛋白工学会、蛋白質構造討論会など複数の蛋白質科学関連の組織や研究集会が合流してできたという経緯があります。なかでも蛋白質構造討論会は1950年の討論会にまで遡ることができます。こうした経緯から、本学会には、わが国の、そして世界の蛋白質科学の研究を黎明期から先導されてきた多くの方々関わってこられました。ところが、そうした諸先輩の先生方が、いま少しずつ現役を退いていかれています。情報過多の時代だからこそ、逆にわが国の蛋白質科学研究発展の歴史を記録し、諸先輩方の研究の足跡を知り、そのお考えを継承していくことの重要性が高まっています。そこで日本蛋白質科学会では、本学会に関連の深い先生方に、わが国の蛋白質科学研究の歴史とご自身の研究史を振り返っていただき、エッセイをご執筆いただくことをお願いすることにしました。幸い多くの先生方がこのお願いを快諾され、すでに多くの貴重なお原稿が集まってきております。ご執筆いただいた文章は、順次、本学会のニュースレターで配信させていただくとともに、本学会のホームページのアーカイブに収録し、いつでも皆さんに読んでいただけるようにします。会員の皆さんには、ぜひ本企画を楽しんでいただければ幸いです。

最後に今回、当学会の依頼に応じて「わが国の蛋白質科学研究発展の歴史」に関するエッセイをご執筆いただいた諸先輩の先生方に、本学会および有坂文雄先生を中心とした企画編集委員会、広報委員会を代表いたしまして、厚く感謝申し上げます。

日本蛋白質科学会会長 遠藤斗志也

## 揺籃期

### 石井 信一（いしい しんいち）

私の手元に、赤堀四郎先生(当時大阪帝国大学理学部化学科)が共立出版から 1944 年(初版)に発行された「アミノ酸及蛋白質」と題する B5 版 610 頁の名著がある。引用文献数 1800 を越える力作だが、その中で日本人の手になる文献は 90 篇以下、5%にも及ばない。大戦勃発で雑誌や書籍の輸入が殆ど途絶えてしまったため、外国論文の引用は 1940 年迄しかできなかつたとの序文の断り書きを考慮すれば、当時この研究分野における日本人の世界的寄与はこの数字よりずっと低率のはずで、我が国における蛋白質構造研究は、実質的には 70 年前の敗戦で訪れた平和の希望と共にスタートしたと言っても過言でなからう。

#### ゼロから出発する安藤先生の意気込み

1945 年 4 月私は東京帝国大学理学部化学科に入学した。敗戦を目の前にしたその頃、東京下町はすでに壊滅状態。通学路の本郷界限もその後の空襲で焼野原と化していた。それから 3 度目の春に卒業したが、その時大学の名前からは帝国の重石が取れていた。

幸いなことに、卒業後すぐ放射線化学研究所の安藤鋭郎先生に入門を許された。ステロイドの有機化学研究者として名をあげ、戦後蛋白質化学へと方向変換された安藤先生は、最初の研究対象にクルペインを選び、前年の春北海道で採取したニシン精子からこの蛋白質を精製して、その化学構造研究に着手したばかり。クルペインに代表されるプロタミン類は、19 世紀末に F. Miescher 博士や A. Kossel 博士により DNA 結合蛋白質として見いだされた後もドイツでの化学研究が盛んで、戦時下にあっても K. Felix 博士や E. Waldschmidt-Leitz 博士らが新しい解析成果を次々と上げていたようである。先生からは、これらの先行者に少しでも早く追いつき追い越そうとの意気込みが強く感じられた。もっとも蛋白質研究室に相応しい装備として手元にあるのは Kjeldahl 全窒素定量装置と Van Slyke 遊離アミノ基定量装置だけ、ほとんどゼロからの出発というのが実情だった。

水島三一郎先生が所長をしておられたこの放射線化学研究所は、安藤先生の他にも、渡辺格先生、野田春彦先生、長倉三郎先生など水島先生に物理化学をしこまれた錚々たるメンバーを擁し、入手困難な新装置は自作してでも研究を遂行しようという水島研の伝統から、小さな組織でありながら金属加工の機械類や専門の職人さん迄揃っていた。

#### 分配クロマトグラフィーとの出会い

仕事を始めるにあたって私がバイブルとしたのは、言うまでもなく冒頭で述べた赤堀先生の本である。最新の外国雑誌に接しうる窓口の方と言えば、それは当時東京ではただ一つ、有楽町駅近くの日東紅茶店舗跡に進駐軍の文化情報機関が開設した図書室だった。ここには足繁く通り刺激的な新知識の大集団に興奮させられた。蛋白質化学の道に踏み込んだばかりの私は、まず英国の A. J. P. Martin 博士と R. L. M. Synge 博士が 1941 年に発表した論文(1)に引き付けられた。そこに書かれていたのは、シリカゲル充填カラムに水飽和クロロフォルム(少量のブタノール含有)を流すという方式のクロマトグラフィーを使ったアセチルアミノ酸の分離分析。シリカゲルに含まれる水と流される有機溶媒との 2 液相間分配係数が、アセチルアミノ酸の種類によって違うことを多段的に活用した、分配クロマトグラフィーとよばれる新しいタ

イブのクロマトグラフィーである。

1947年には、この方法やその発展版である濾紙(分配)クロマトグラフィー(2)によって抗生物質グラミシジンSのアミノ酸配列が決定された。インスリンの化学構造研究の進捗を伝える F. Sanger 博士の論文シリーズ(1949年(3)以降)にも惹かれた。アミノ末端残基を決めるために Sanger 博士自身が開発したDNP法と並んで、ここでも濾紙クロマトグラフィーが大活躍していた。

まずはこの新しいアミノ酸分析法を我が物にせねばならぬと思立った私は、その頃日本橋室町にあった東洋濾紙の本店(?)に出かけて大きな四角い濾紙を求め、標本保存用や蓄電池用の大型ガラス槽も用意した。しかし濾紙上でアミノ酸の存在位置を検出するために必須な発色試薬ニンヒドリンがない。これは無水フタル酸から何とか合成した。カゼイン加水分解物を濾紙の一隅に添加し、それをガラス槽の中で溶媒展開した初めての時、自作のニンヒドリン液を吹きかけオープン内で加熱している間の待ち遠しさ。取り出した濾紙の上に沢山の紫色斑点が綺麗に分かれて見えた瞬間の喜びは、今も鮮明に思い出される。早速クルペイン加水分解物の分析に応用した。展開溶媒の種類をいろいろ変えて検討する内に、水飽和 tert-アミルアルコールがイソロイシンとロイシンの分離に有効であることを知り、これを使って、クルペイン構成成分中にイソロイシンを初めて仲間入りさせることが出来た。

ところでシリカゲルカラム分配クロマトグラフィーは、分配係数が小さすぎる酸性アミノ酸や塩基性アミノ酸(のアセチル化体)の分析が不可能。濾紙クロマトグラフィーには、その欠点がないけれども正確な定量分析は不得手である。両者の難点を克服するため、濾紙とは同じ高分子多糖の澱粉をつめたカラムによる分配クロマトグラフィーに目が向けられた。だがシリカゲル使用の場合は、予めゲルにメチルオレンジを含ませておくので、酸性物質であるアセチルアミノ酸の存在位置は黄色のカラム上にオレンジ色のバンドとして検出できたのに対し、澱粉カラムの場合は遊離アミノ酸が相手なので pH 指示薬のお世話にはなれない。

1948年米国の W. H. Stein 博士と M. Moore 博士は、展開液をカラムから流れ出るままにして一定量ずつ試験管に分け取る自動装置、いわゆるフラクションコレクターを作り、分取した試験管中のアミノ酸をニンヒドリン比色法で定量するというシステムを開発した(4)。フラクションコレクターは間もなく米国の Technicon 社から市販された。赤堀先生の研究室ではいち早くこの装置を購入して、成田耕造さん達が澱粉カラムのクロマトグラフィーに挑戦しておられたようである。安藤研究室の方は、田村孝章先輩が分別蒸留器からの凝縮液を分取する目的のコレクターをすでに試作し活用していたので、それを溶出クロマトグラフィー向きに大型化したものを所内で製作することとした。出来上がったものを図1に示す。

理想的な分配クロマトグラフィーなら、カラムから溶出される検体の濃度分布は、カラム充填剤中の水と溶離液との2液相間分配係数から(理論段数を与えれば)数式的に予測されるはずである。しかし実際のクロマトグラフィーでは、水の保持体であるシリカゲルや澱粉と分析対象物質との間の予測困難な相互作用(しかもその度合いは物質の種類によって変わる)が数式的予測を妨げる場合が多い。水保持体を抜きにして純粋に2液相間の分配を何回も繰り返させる向流分配法(図2参照)ならこの難点はない。L. C. Craig 博士らは全自動式の向流分配装置を開発し、これがバシトラシンなどペプチド性抗生物質の分離精製に有用であることを示した(5)。1955年、赤堀研究室では次田皓さんが中心になって300段の自動向流分配装置を製作し、DNP-タカアミラーゼAを部分加水分解した産物の分別などに活用しており(6)、安藤研究室でも52段の装置でクルペインの単一分子種の分離を試みている。

## 輻射研→理工研第4部の人々

この間、1950年には輻射線化学研究所が理工学研究所へ吸収合併され、理工研第4部になっていた。施設はもともと駒場の理工研キャンパス内にあったので、この変更は組織上だけのこと。水島

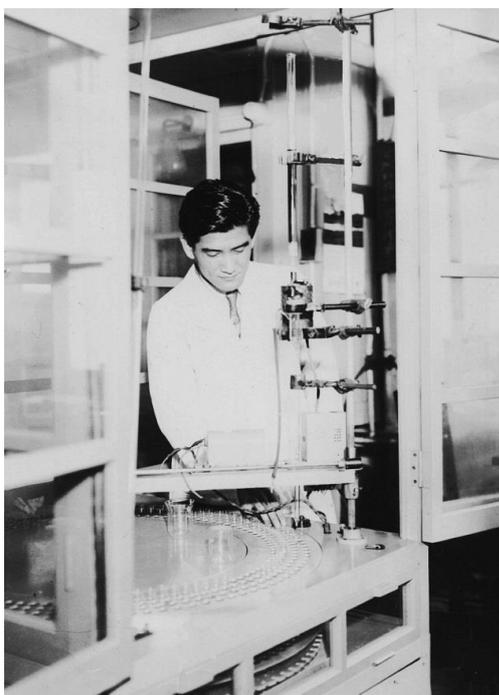


図 1 溶出クロマトグラフ用の国産第1号フラクションコレクター

当時安藤研の実験室は窓枠が隙間だらけだったので、試験管を収納するターンテーブルばかりでなくクロマトグラフ・カラムの部分にまで埃よけをかぶせてある。四方のガラス戸を閉めると、ちょうど電話ボックスといった感じ。Technicon社の製品は、カラム流出液の滴数が規定値に達すると受けとった試験管を1枠動かす方式だったが、この国産品は流出液をまず小さなビュレットに溜め、メニスカスが一定の高さに達するとビュレットの底の光感知式電磁弁が開いて液を試験管に落とし、1枠移動させる方式である。

先生は所長でなくなった後も以前と変わらず頻繁に顔をお見せになり、欧米視察時のホットな土産話などお聞かせ下さっていた。Cambridge大学のCavendish Laboratoryで蛋白質を対象とした結晶X線解析の仕事が着実に進められているというお話を新鮮な気持ちで伺った記憶は、長く脳裏に留まった。

文部省科研費総合研究班の事業として製作された分析用超遠心機が、渡辺格先生の研究室に設置されたのもこの頃である。遠心機本体は床を掘り下げた低位置にあって、ローターを下から垂直上方へと貫く光は上部の鏡で水平方向に導かれ、それが到達する隣室で沈降パターンを観測するという大規模な装置であった。この装置の活用には主

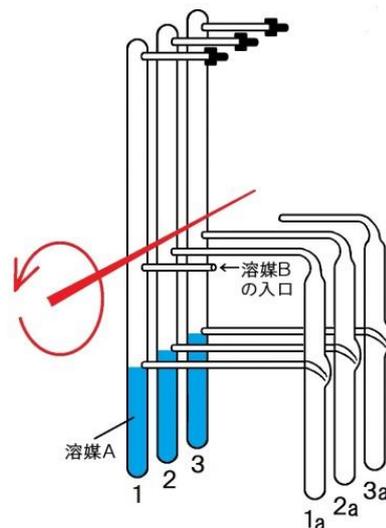


図2 向流分配の仕組み

向流分配は、図のようなガラス管を沢山連ねて構成された装置を使い、互いに溶け合うことのないAとBの2種類の溶媒(比重は $A > B$ )間で、対象の物質の分配を何回も繰り返して行われる。まず図の通り、左側のすべての管に溶媒A(青色)を入れる。ただし No.1 の管に入れる溶媒Aにだけは試料を溶かし込んでおく。全体を赤い矢印の方向に90度倒し、No.1 に規定量の溶媒Bを注入してから、シーソーのような上下運動を与えて両溶媒をよく混ぜ合わせる。混ぜ合わせは、試料が両溶媒間の分配平衡に達するまで続ける。その後45度の傾斜で静置して、両溶媒を完全に分離させてから図のような直立位置に戻せば、No.1中の溶媒Bは1aの管に移る。再び左に90度倒せば1aにあった溶媒BはNo.2に入る。再びNo.1に溶媒Bを注入して次の上下運動に進む。溶媒の混ぜ合わせ(と試料の分配)は、No.1と同時にNo.2の管でも起こる。Craigが開発したのは、数百個ものガラス管を並べてこのサイクルを自動的に繰返す装置であった。図からわかるように複雑なガラス細工を要する装置だが、我が国ではこの種の細工を得意とする職人さんが古くから珍しくなかったので、国産化はわりと短期間で可能となったのである。

に川出由巳さんがあたっていたらしい。同研究室ではまた、宇井信生さんがTiseliusの電気泳動装置を、中村正好さんがPolsonの拡散定数の測定装置を作製し、揃って当時の日本としては先端的な実験を進めていた。

1953年になって、渡辺先生は2年程California大に留学された。ちょうどその頃先生をお慕いして大学院に進まれた三浦謹一郎さんは、このお留守期間中、安藤研で私と研究生活を共にした。その折二人の



図3 東大理工学研究所第4部メンバー集合写真(お名前は敬称略)

1 水島三一郎\*(当時東大理学部化学科物理化学教授)。2 左右田徳郎\*(当時東大理学部化学科生物化学教授を退官されたばかり。理工研近くにお住まいで4部には良くお見えになった)。3 安藤鋭郎\*(後に東大理学部生物化学科教授)。4 長倉三郎(後に分子科学研所長、第23代日本学士院院長)。5 宇井信生\*(後に群馬大内分秘研教授)。6 倉谷健治(後に宇宙科学研教授)。7 野田春彦(後に東大理学部生物化学科教授)。8 三浦謹一郎\*(後に東大工学部教授)。9 山崎誠\*(後に東大教養学部教授)。10 川出由己(後に京大ウイルス研教授)。11 筆者。12 渡辺格\*(後に慶応義塾大学医学部教授)。13 岩井浩一\*(後に群馬大内分秘研教授)。\*は故人。三浦氏を除く以上のメンバーおよび白丸を付けた化学科水島研所属の人達は、すべて共立出版社刊「蛋白質化学」分担執筆者である。

間に育まれた友情は、彼に先立たれた今も貴重な思い出として私の心を温め続けている。Harvard大での研鑽を終えて近くの教養学部に戻ったばかり(1958年)の今堀和友先生が、蛋白質の旋光分散にまつわる新知識を熱く語って下さったお顔も忘れられない。

赤堀先生は、初版発行から10年程も経つ「アミノ酸及蛋白質」に全面的な改訂が必要とお考えになった。だが戦後この分野の研究の進展は目覚ましく、解析手法も極めて多岐に広がっていたので、編集に物理化学の大家水島先生の参加を求められた。こうして、主に大阪と東京地区にいた蛋白質

研究者のほとんどを分担執筆者とした「蛋白質化学」全3巻が、1954年から1955年にかけて共立出版社から発行されたのである。理工研4部からも、沢山の人たちが(図3)が本書の作成に参画した。

この事業が完成した後も、更に増加の一途をたどる研究論文の洪水を遅滞なく読者に届けることは至難の業である。とりあえず「蛋白質化学」続編として1956年に第4巻、翌年に第5巻を発行したが、これを続けるよりは月刊雑誌の形にする方が良いと判断された。「蛋白質 核酸 酵素」は、同様な必要性を感じた核酸や酵素研究分野の人達からの要望をも取り入れて1956年10月に誕生した雑

誌である(当初は隔月刊)。もっとも同誌は2010年1月号で休刊となつたらしい。整備されたデータベースへのネット接続が容易になって、紙媒体はその役目を終えたと言うことか。ちなみに蛋白質構造討論会は1951年に始まっている(2001年に日本蛋白質科学会年会となるまで毎年1回の開催が原則だったが、たしかK.Felix博士(前出)来日の年だけ特例として2回開かれた)。

## Moore らのアミノ酸定量分析法をマスターし その先へ

話をアミノ酸分析に戻そう。フラクションコレクターはできたが、これで分取した溶出液中に含まれるアミノ酸を比色定量するための光度計も作らなくてはならない。これにはまず、アミノ酸がニンヒドリンと反応して生成する色素 Ruhemann's purple の吸収極大に相当する570 nmの光源が必要だが、分光器は勿論のこと、この光のみを通すフィルターも手に入れ難い。旋光計の光源として当時使われていたナトリウムランプは590 nmのD線を発光する。文献に出ているRuhemann's purpleの吸収スペクトルから、この波長の光でも極大値の90%は吸収されることが分かったので、目的とする光度計用光源として使えると判断した。次いで厚さ1cmで3×6cm程の矩形のベークライト板に直径15mmの穴を2個並べてくり抜き、それぞれの穴の両面にカバーガラスを接着剤で張り付けて、検体溶液を入れるセルとした。検体出し入れ用の小穴も空けた。このベークライト板を架台に載せ、セルのガラス面に光源からの光束を直角させた。2個のセルでの測定が交互にできるよう、架台はスライド式である。なお受光部には硫化カドミウムのフォトセルを使用した。

こうして当方の準備がすべて整った1951年には、MooreとSteinのアミノ酸分析法はすでに澱粉をスルホン酸型イオン交換樹脂(ポリスチレン系)に替えた新原理のクロマトグラフィーへと進化していた(7)。当然こちらを採用する。その頃入手できたスルホン酸型交換樹脂は純水製造用のものだけだった。これはビーズ状なので乳鉢を使って粉末化し、粒の大きさを篩で揃えて充填カラムを作る。

それを使ったアミノ酸のイオン交換クロマトグラフィーは、自家製のフラクションコレクターが確実に作動してくれたおかげもあって文献の記載通り支障なく進行した。

しかし自家製光度計を使ったニンヒドリン比色分析の方は、その頃供給されていた電力の電圧や周波数が非常に不安定だったため電流計の針が落ち着かず、セルへの検体の出し入れにも手間取って、コレクターから出てくる数百本の試験管を相手に連日忍耐の限りを強いられた。練習分析を繰り返す内、たまたまコタキ製作所という町工場から570 nmフィルター付き光度計が発売されたことを知り、早速これを導入した。と言っても電力事情が変わるわけでもなく、苦難の度合いが多少は減ったかという程度。試料にニンヒドリン試薬溶液を一定量ずつ添加するために工夫した半自動ピペット(8)(図4)に助けられたりして、何とかクルペインのアミノ酸組成値決定にたどり着いたのである。Mooreらの方法では、通常のアミノ酸の分析に長さ100 cmのスルホン酸型樹脂カラムを用いているが、塩基性アミノ酸類はこのカラムへの吸着性が強すぎて定量的溶出が難しいため、それらの分析には、別に用意した15 cmのカラムを使用している。それならば酸性度の低い交換樹脂の方が

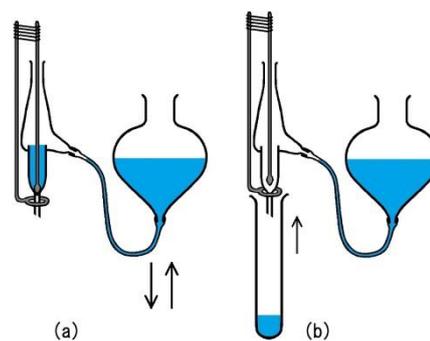


図4 半自動ピペット

フラクションコレクター(図1)で使われているビュレットの仕組みにヒントを得て編み出したこのピペットは、以下の2動作で容器内の試薬溶液を一定量だけ試験管内に移すことができる。(a)右側の容器をいったん持ち上げて元の位置に戻せば、一定量の溶液が左側のビュレット内に溜まる。(b)ビュレットを下から試験管で突き上げる。ビュレットの底を塞いでいた摺合わせの弁が上にずれて、溜まっていた溶液は試験管内に注入される。

塩基性アミノ酸分析には向いているであろう。そう考えた私は、カルボン酸型イオン交換樹脂(アクリル系)のカラムを使って検討し、3種の塩基性アミノ酸(+アンモニア)を手早く完全に分離させる溶出条件を見出した(9)。ちょうど宇井信生さんがヒストンを精製なさったところで、早速その塩基性アミノ酸分析に適用した。しかし間もなく Moore らの全分析操作を自動化した装置が発表され(10)、市販もされるようになったので、残念ながら私の塩基性アミノ酸分析法は広く普及するには至らなかったが、クルペインのトリプシン加水分解物中に含まれるアルギニン含有ペプチド群の分別には、極めて有用であった(11)。

### クルペインの化学構造決定へ

クルペイン分子のアミノ酸配列を決定する上で越えねばならぬハードルが三つあった。①まず立ちだかっていたのは、構成全アミノ酸の2/3をアルギニンが占めるこの蛋白質を、トリプシンで加水分解した時に生じる性質が似かよった多種類のアルギニン含有ペプチド群の分別だが、このハードルはすでに述べた通り、カルボン酸型イオン交換樹脂クロマトグラフィーで乗り越えた。②もう一つは、不均一なクルペイン試料から単一分子種を分け取らねばならぬという課題。不均一性は、イソロイシン含量が少なすぎることや、DNP法で検出されるアミノ末端残基の種類が複数だという事実に加えて、向流分配実験で得られた濃度分布からも示唆されていた。このハードルは、古典的なアルミナ吸着クロマトグラフィーでクルペインZとよぶ成分が単離され、とりあえず突破できた。③最後のハードルは、分子を選択的に切断する方法がそれ迄トリプシンの作用ただ一つであり、異なる選択性をもつ第2の切断法を探さねばならぬということ。その解決には、岩井浩一先輩の選んだ方法が功を奏した。濃硫酸中でセリンやトレオニン残基のアミノ基でつながるペプチド結合を側鎖の水酸基にいったんN→O転移させ、そこだけを化学的に切断させるという荒業である。

これらの努力を積み重ねてクルペインZの化学

構造研究は完成した(12)。終戦直後で貧弱な設備しかない研究室の一隅で、安藤先生がひそかに立てられた「ドイツ勢に追いつき追い越せ」との志は、こうして達成されたのである。なお、これが分子量4千余という小型であるとはいえ、我が国で化学構造が決定された初めての蛋白質だということも申し添えて置く。

### 生物化学科の活動開始を見届けて NIHへ留学

1958年理工学研究所が前身の航空研究所へ復帰するのに伴い、第4部の安藤、渡辺、野田の3研究室(2講座)は、理学部生物学科植物学教室からの2講座(高宮篤、小倉安之両教授)、化学科の1講座(江上不二夫教授)と合流して、生物化学科を新設することとなった(1959年に渡辺先生は京都大学ウイルス研に転出)。新学科の活動が実質的に始まったのは、鈴木紘一君、笠井猷一君など6名の学生を教養から受け入れた1960年春である。私はその年の7月、米国国立衛生研究所(NIH)のB. Witkop先生のもとで留学生活に入った。ちょうど安藤研に待望のBeckman社製全自動アミノ酸分析装置が届いて、その試運転を目前に控えたあわただしい渡米であった。

Witkop先生からは、最近見つけたN-プロモコハク酸イミドによるTrp-X間ペプチド結合の選択的切断反応を使って、グラミシジンの化学構造決定を目指すのがテーマだと予めお聞きしていた。この抗菌性ペプチドは、早々と構造が決定されたグラミシジンSよりも先の1939年R. Dubos博士によって発見されたいわば本家筋にあたり、ノーベル化学賞を1952年に受けたあのSynge博士が、一度はその構造決定を試みて断念した難物である。その正体を最新式の手法で解明する。なんと魅力的なテーマではないか。意気込んで扉をあけたWitkop先生のお部屋で紹介されたのは、これから実験室の同僚となるErhard Gross博士であった。彼がRockefeller研究所のCraig研に出向き、向流分配機を使って分離精製してきたグラミシジンAとよぶ主成分の結晶をそこで手渡された。自分は、臭化シアンによるMet-X結合の選択的切断反応を、

最近化学構造が決定されたばかりのリボヌクレアーゼAに適用するのが目下の最大関心事なので、グラミシジンAの方はお任せするというのが Erhard の意向だった。

その頃 Witkop 研にはまだ自動アミノ酸分析機がなかったので、とりあえず定性的にでもそのアミノ酸組成を Synge 博士の報告と比較するつもりで、加水分解物の濾紙クロマトグラフィーを行った。その結果、Synge 博士は記載していなかった少量のイソロイシンの存在が、クルペインの時にも使った水飽和 tert-アミルアルコールのクロマトグラフィーで明らかになった。これはこの結晶標品がまだ不均一であることを示唆している。向流分配実験での濃度分布曲線が理論曲線とよく一致したことを根拠に、グラミシジンA標品の均一性を主張する Erhard と私との間で大論争になったが、結局この抗生物質は、アミノ末端がフォルミル化され、カルボキシル末端がアミノエタノールで保護された極めて疎水性に富むペンタデカ・ペプチドであって、我々が対象としていた結晶標品は、アミノ末端位を Val が占める分子と Ileu が占める分子との混合物であるということで決着した。2番目の Gly 残基以降の配列は両分子とも全く同じで、仮にこの残基を D 型の光学異性体と見なせば、L-(D-L)<sub>7</sub> の繰り返し配列になっていることも分かった。このユニークな化学構造の決定に到る長い話は、日本で行われた仕事でもないし、総説(13)に詳しいので省略する。

NIHではその頃、M. W. Nirenberg 博士がポリウリジル酸などを鋳型とした無細胞蛋白合成系の産物を解析して遺伝暗号を決める仕事に没頭していた。殆どの溶媒に溶けないポリフェニルアラニンらしい産物の分子量はどうしたら測定できるのかとの相談を、人を介して持ちかけられたことがあった。渡米する前、私は C. Anfinsen 先生のご著者(14)に強い感銘を受けてお手紙を差し上げ、お返事も頂戴していたので、NIHに入ってからすぐ先生の元へご挨拶に伺い、以後永くご厚誼を賜ることとなった。この他グラミシジンA構成アミノ酸の光学異性を、DおよびLアミノ酸酸化酵素の作用を使って決めるため、Warburg 検圧計のあ

る早石修先生の研究室に出入りさせて頂いたことなど、NIHでの思い出は尽きることなく浮かんでくる。

## 帰国後に待っていたこと そして第7回国際生化学会議東京

1963年に帰国した時、安藤研は駒場から本郷浅野地区に移転していた。新築ホヤホヤの建物で研究環境は格段と向上。鈴木絃一さんは大学院に進学していて、残されたクルペインのYI、YII両成分を、その頃使えるようになったカルボキシセルロース・クロマトグラフィーなどを使って分離精製し、これも当時発見されたばかり、しかも日本生まれの蛋白分解酵素サーモリシンを、N→O転移に替わる第2の選択的切断法に採用して、それぞれの化学構造研究を進めていた(15)し、高橋健治さんは江上研から、アミノ酸分析機が自由に使える安藤研に移籍して、リボヌクレアーゼT<sub>1</sub>の化学構造解析に熱中していた(16)。

私はといえば、NIH滞在中セミナーの席で聞いた時から注目していた E. Shaw 博士らの酵素活性部位指向性(アフィニティラベル)試薬を発展させて、蛋白分解酵素の活性・構造関連研究を目指すつもりでいたが、たまたま江上先生から緑膿菌バクテリオシンの一種、ピオシンRを対象とする研究をしてみないかとのお誘いを頂いた。電子顕微鏡の下で、大腸菌バクテリオファージT4の尾部とそっくりなピオシンRの姿を見た(17)時、この種の超分子構造をもつ蛋白質の研究に、この装置が欠かせぬ手段であることを痛感した。国産電子顕微鏡がすでに普及し始めていた頃のことである。

この時期に日本の生化学界が迎えた最大のイベントは、1967年8月に東京で開かれた第7回国際生化学会議であろう。この会で特に印象に残ったのは、Oxford大のD. C. Phillips博士がX線結晶解析法で明らかにしたリゾチームの立体構造である。この話には、15年以上も前に水島先生からうかがった Cavendish Lab. のことが思い出されて、大変興味深く聞き入った。また講演集に付属していた立体眼鏡でつぶさに観察したこの蛋白質の立体構造から、これまで我々が繰り返してきた蛋白

質の活性・構造相関をめぐる論議は、「群盲象を評す」の類であったことを思い知らされた。

この会議では、日本で発見され単離されたタカアミラーゼAやズブチリシンBPN'などの純品の展示もあった。諸外国から来た多数の研究者たちが、ポンド瓶の中で光り輝く結晶に好奇と羨望の視線を投げかけているのを見て、今や日本の蛋白質研究も、揺り箒を離れ自分の足で堂々と歩き出したことを実感したのである。

## おわりに

この度「我が国蛋白質科学研究の発展の歴史」の企画にあたり執筆を依頼された方々のリストを見ると、私は最年長の部類に属しているらしい。そこで私の担当は、70年にわたるこの歴史の中でもごく初期の、いわば揺籃期だと勝手に解釈させて頂いた。その趣旨に沿って綴った以上の記述は、当時主に東京で励んでいた1人の生物有機化学研究者が身近で体験したもろもろの出来事を、限られた資料を頼りに繋ぎ合わせたもので、極めて偏っていることは否めない。殊に赤堀研で1952年に開発されたヒドラジン分解法に触れなかったことは、これがカルボキシル末端決定法として、終戦後わずか7年ですでに世界をリードした優れた業績であるだけに、大きな手落ちである。また分子量1万以上の蛋白質としては日本で初めて、パン酵母チトクロムcの化学構造が、やはり赤堀研(正確には、赤堀先生を所長として1958年に設立されていた阪大蛋白質研究所の成田耕造研究室)所属の千谷晃一さんによって決定されたということにも触れなかった。しかしこれらの話題の紹介には、私よりずっとふさわしい方々がおられると思い、あえて目をつぶったのである。その他についても、種々見方の違う揺籃史が寄稿されることを期待している。

## 文献

1. Martin, A. J. P. and Synge, R. L. M. (1941) *Biochem. J.* 35, 1358-1368. (オリジナル論文)
2. Conden, R., Gordon, A. H. and Martin, A. J. P. (1944) *Biochem. J.* 38, 224-232. (オリジナル論文)
3. Sanger, F. (1949) *Biochem. J.* 45, 563-574. (オリジナル論文)
4. Stein, W. H. and Moore, S. (1948) *J. Biol. Chem.* 176, 337-365. (オリジナル論文)
5. Craig, L. C., Weisiger, J. R., Haumann, W. and Harfenist, E. J. (1952) *J. Biol. Chem.* 199, 259-266. (オリジナル論文)
6. Akabori, S., Tani, H. and Tugita, H. (1955) *Japan Analyst* 4, 119-126. (日本語総説)
7. Moore, S. and Stein, W. H. (1951) *J. Biol. Chem.* 192, 663-681. (オリジナル論文)
8. 石井信一 (1957) 日本化学会編・実験化学講座 第23巻(生物化学I) 102-130. (日本語解説)
9. Ishii, S. (1956) *J. Biochem.* 43, 531-537. (オリジナル論文)
10. Spackman, D. H., Stein, W. H. and Moore, S. (1958) *Anal. Chem.* 30, 1190-1206. (オリジナル論文)
11. Ando, T., Ishii, S. and Yamasaki, M. (1959) *Biochim. Biophys. Acta* 34, 600-601. (オリジナル論文)
12. Ando, T., Iwai, K., Ishii, S., Azegami, M. and Nakahara, C. (1962) *Biochim. Biophys. Acta* 56, 628-630. (オリジナル論文)
13. 石井信一 (1967) 化学の領域増刊 第80巻(天然物化学'67) 133-155. (日本語総説)
14. Anfinsen, C. B. (1959) *The Molecular Basis of Evolution* (John & Wiley, Inc.) (単行本)
15. Suzuki, K. and Ando, T. (1972) *J. Biochem. (Tokyo)* 72, 1419-1432, 1433-1446. (オリジナル論文)
16. Takahashi, K. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 4117-4119. (オリジナル論文)
17. Ishii, S., Nishi, Y. and Egami, F. (1965) *J. Mol. Biol.* 13, 428-431. (オリジナル論文)

## 石井信一先生ご略歴

- 1927 年 東京に生まれる
- 1948 年 東京大学理学部化学科卒業
- 1948 年 東京大学放射線化学研究所研究員、  
翌年助手
- 1950 年 東京大学工学研究所助手
- 1958 年 東京大学理学部生物化学科助手
- 1965 年 東北大学理学部化学第二学科助教授
- 1967 年 北海道大学薬学部製薬化学科教授
- 1975 年—1978 年 北海道大学薬学部長
- 1988 年 アメリカ生化学分子生物学会名誉会員
- 1990 年 北海道大学名誉教授



企画担当の方から筆者の近影をとのご要望ではあるが、老醜をさらすよりは本文に関係のある比較的新しい写真を選ばせて頂いた。これは1991年に横浜で開いた9th International Symposium on Affinity Chromatography and Biological Recognitionの晩餐会で主催者挨拶している処である。聴衆の内、頭をかいているのはC. Anfinsen 博士(1972年ノーベル化学賞受賞者)、その右の白髪の紳士がポリアミノ酸の研究で有名なE. Katchalski-Katzir 博士(第4代イスラエル国大統領)である。

## Cytochrome P450 の発見

大村恒雄（おおむら つねお）

"Cytochrome P450" (P450 と略称) が発見され最初の論文 (1) が発表されたのは 1962 年です。50 年以上も昔のことになりますが、現在でも P450 に関連した論文が毎年 1,500~1,700 も発表されて活発な研究が進められている "幸運な蛋白質" です。P450 の発見の経緯について話題なども含めて解説させていただきますが、詳しい研究経過などは他の総説 (2, 3) を御参照下さい。

私は 1953 年に東京大学理学部化学科を卒業して静岡大学文理学部化学科の助手になりました。静岡大学文理学部は旧制静岡高等学校が昇格した新制大学の学部で、旧制静岡高等学校の最後の卒業生の一人だった私には母校への帰還でした。静岡は漆器産業が盛んでしたので私は漆に興味をもって文献を調べたところ、漆の固化を触媒する酵素 laccase については立ち込んだ研究がほとんどないことがわかりました。私は漆の laccase の精製から研究を始め、精製した酵素の性質や反応機構の解析などについて 4 報の論文を書き、これが私の博士論文になりました。植物の銅酵素 laccase が私の研究者としての出発点です。

### P450 研究への思いがけない転機

私が静岡大学に赴任して 7 年たった 1960 年に、思いがけない転機が訪れました。生化学分野の全国共同利用研究所として 1958 年に大阪大学に新設された蛋白質研究所の佐藤教授から助教授として来ないかという誘いが来たのです。佐藤教授は金沢大学理学部から蛋白質研究所の「蛋白質生理機能部門」担当の教授に赴任したばかりで新設部門の助教授の人選中だったのですが、私を助教授に選定したいとのこと。これは私にとっては全く予想もしていなかったことでした。佐藤教授も東京大学理学部化学科の卒業ですが、私は佐藤教授とは研究上の関係も個人的な面識もなく、地方の大学で目立たない研究をしている私を助教授に希望される理由がわかりませんでした。静岡は私の生まれ故郷ですし、卒業した旧制静岡高等学校が母体の静岡大学には愛着がありました。私は人生の岐路に立って迷ったのですが、大学で卒業研究を指導して下さった石本真先生などが強く勧めて下さるので佐藤教授の誘いを受けることにしました。

私は 1960 年 7 月に蛋白質研究所に赴任しまし

た。超遠心分離器、自記分光光度計、自動アミノ酸分析装置など当時の最新の研究機器が揃った国内では最も恵まれた環境の研究所で、私がそれまで 7 年間に過ごした静岡大学の研究室とは比べものになりませんでした。佐藤教授は「本当はミトコンドリアの電子伝達系と酸化的リン酸化系に興味があるのだけれど、競争が激しい分野でとても競り勝てるとは思えない。当面は機能がほとんど不明で注目もされていないミクロソームの酸化還元酵素を研究することにしたい。」とのこと。私は佐藤教授と相談の結果、佐藤教授がアメリカの Pennsylvania 大学に留学していた時に研究室の同僚だった Martin Klingenberg が見つけながら本態不明のままになっているという肝臓ミクロソームの "Carbon monoxide-binding pigment" の研究をすることになりました。これが P450 の発見につながるようになりますが、佐藤教授との出会いがなかったら私は静岡大学で銅酵素の研究を続けていたことでしょう。

### P450 の発見と命名

Klingenberg がラット肝臓のミクロソームに一酸化

炭素と結合して 450nm に光吸収極大を示す "Carbon monoxide-binding pigment" の存在を見出したのは偶然の発見だったようです。Klingenberg はドイツの Marburg 大学を卒業して気体反応論を研究していた物理化学分野の若い研究者でしたが、1954 年にアメリカに留学する機会を得て Pennsylvania 大学の Britton Chance 教授の研究室で生化学の研究を始めました。同じ研究室には訪問研究員の佐藤了の他にポストドクの Ronald Estabrook が居て、若い三人は仲が良かったそうです。この三人の偶然の出会いはその後の P450 研究の大きな伏線となります。

Chance の研究室の主要な研究テーマはミトコンドリアの電子伝達系でしたが、Klingenberg には生化学の研究経験がなかったので、生化学実験を勉強するためラットの肝臓からミトコンドリアを分離する時に副産物として得られるマイクロソームを使って吸収スペクトルを記録する実験をすることになり、マイクロソームを NADH や NADPH で還元して cytochrome b5 の酸化還元差スペクトルをとる実験などを始めました。たまたま Klingenberg はミトコンドリアの吸収スペクトルを研究している周囲の人達が一酸化炭素を使っているのを見て、還元したマイクロソームに一酸化炭素を加えてみるところ 450nm に大きな吸収極大を示す変な差スペクトルが現れたのです。Chance は酵素や蛋白質の吸収スペクトルの研究では当時の第一人者でしたが、Klingenberg から見せられたマイクロソームの CO-結合性色素のスペクトルは Chance もこれまで見たことがない奇妙なものでした。とにかく本態がわからなければ論文として発表もできないということで Klingenberg は "CO-binding pigment" の精製を試みることになりましたが、マイクロソームを界面活性剤で処理すると 450nm の吸収ピークが消えてしまうという奇妙な性質があって可溶化、精製ができず研究は難航し、Klingenberg は本態不明のまま論文を書いて論文原稿を Chance に託し 1956 年にドイツに帰りました。論文は Chance が修正をして 1958 年に発表されましたが (4)、ドイツに帰った Klingenberg は別の研究テーマで仕事をする事になり、Chance も CO-binding pigment の研究は続

けませんでした。

私は Klingenberg の論文を読み、それに記載されている実験の追試から研究を始めました。もっとも論文の大部分は cytochrome b5 の酸化還元についてで、肝心の CO-binding pigment については吸収スペクトルの他には 1 ページほどの簡単な記載しかなく "The nature of the microsomal CO addition compound is still obscure." が結論でした。佐藤教授の話では Klingenberg は可溶化、精製を色々試みたらしいのですが、論文に書くような結果は得られなかったのでしょう。

私はウサギの肝臓からマイクロソームをとり、NADH や NADPH で還元してから CO を加えて見ましたら Klingenberg の論文に記載されている通り 450nm に大きな吸収極大をもつ差スペクトルが現れました。界面活性剤を加えるとこのスペクトルが消失するというので、コール酸を加えてみたら確かに 450nm の吸収極大は消失したのですが、驚いたことに 420nm に大きな吸収極大が現れました。この新しいスペクトルはヘモグロビンの CO 結合物のスペクトルとよく似ていて、ヘム蛋白質のスペクトルであることは明らかでした。コール酸添加ではスペクトル変化が瞬間的に起こるので、フォスフォリパーゼ処理でマイクロソームをゆっくりと可溶化して 450nm の吸収極大の低下が 420nm の吸収極大の増加と定量的に平行して進むことも証明できました。私は CO-binding pigment を "COP" と略称していましたが、マイクロソームに存在する型と界面活性剤などで可溶化された型とを区別するために、マイクロソーム型を "COP-450"、可溶化型を "COP-420" と呼ぶことにし、Klingenberg がみつけた本態不明の CO-binding pigment はヘム蛋白質であると推定しました。蛋白質研究所で研究を始めて半年ほどの仕事で、この結果を 1961 年に開催された「第 13 回 酵素化学シンポジウム」や生化学会大会で発表しました。

可溶化された COP-420 は精製することが可能でした。マイクロソームをデオキシコール酸で可溶化し、ゲル濾過とイオン交換クロマトで部分精製した COP-420 の酸化型、還元型は b 型チトクロームの吸収スペクトルを示しました。COP がヘム蛋白

質であることは間違いないと確信できたので佐藤教授と論文を書き、COP がヘム蛋白質であることを1962年にJBCに(1)、COP-420の精製と性質については1963年にBBAに(5)、いずれも速報で発表しました。論文を書く時に"COP"ではCOが結合しているような印象を与えると思われましたので、"P-450"、"P-420"と書くことにしました。

その後半年ほどかけてP-450の分子吸光係数、NAD(P)Hによる還元とO<sub>2</sub>による再酸化、COとの結合定数、などを調べ、P-450とb5でミクロソームのヘム含量が説明できることも確かめて、2報の論文を書きJBCに投稿しました。レフェリーから色々なコメントがついて採択されるまで1年以上かかりましたが、論文は1964年に発表されました(6,7)。これがP450の発見経過です。

## P450の酵素活性の発見

P450にとって幸運だったことは発見後すぐに機能が発見されたことです。生化学の歴史を見ますと新しい蛋白質が発見されても機能が不明のために注目を集めることもなく何年もすぎた例がubiquitinなど数多くありますが、P450は最初の論文が発表された翌年にオキシゲナーゼ活性を持つことがRonald Estabrook, David Cooper, Otto Rosenthalによって報告されました(8)。佐藤教授と同じくKlingenbergの友人だったEstabrookがP450を研究するようになったのも実は偶然でした。

Cooperは外科医で1950年代の半ばからPennsylvania大学医学部の薬理学の研究者Rosenthal教授の研究室で副腎のステロイドホルモン合成がアドレナリンの影響を受けるかどうかを研究していましたが、当時はステロイドホルモンを合成する酵素の本態が不明でしたので研究は難航していました。RosenthalはCooperに生化学研究の適当な助言者が必要と考えて同じ大学の生化学者Chanceに相談し、Chanceの研究グループのEstabrookがCooperに協力することになったのです。

たまたま1961年に"5th Congress of International Union of Biochemistry"がMoscowで開催されまし

た。佐藤教授は日本からの参加者の一人に選ばれて出席し、ミクロソームのCO-binding pigmentがヘム蛋白質であるという得られたばかりの実験結果を発表しました。CongressにはKlingenbergもEstabrookも来ていて佐藤教授と三人で再会を喜び合ったのですが、ミクロソームのCO-binding pigmentがヘム蛋白質だという情報はEstabrookにとって驚きだったようです。なぜなら副腎のステロイドホルモン合成活性がCOで強く阻害され光照射で阻害が回復するという報告が1957年に他の研究者によって報告されていたからです。Estabrookはステロイドホルモン合成にP450が関与する可能性があると考え、Cooperと一緒に副腎皮質ミクロソームの吸収スペクトルを調べP450の存在を確かめました。RosenthalがかつてO. Warburgの研究室に居た経験があることも幸いして、EstabrookとCooperはステロイドホルモン合成活性のCO阻害が光照射で回復する現象のphotochemical action spectrumを調べる実験を計画します。Warburgが有名な"Atmungs Ferment"の証明に使った実験手段です。

EstabrookとCooperはウシ副腎皮質のミクロソームが触媒する17-hydroxyprogesteroneのC-21水酸化反応のCO阻害が光照射で回復する現象を調べ、回復のaction spectrumが450nmに極大を示すことを確かめました。更にCOによる阻害がO<sub>2</sub>と拮抗する現象を解析しP450がステロイド水酸化反応でO<sub>2</sub>の活性化を触媒する酵素であると結論しました(8,9)。更に同じ実験手段で肝臓のミクロソームが触媒する薬物の酸化的代謝活性もP450が触媒することを見出しました(10)。

副腎でのステロイドホルモン合成と肝臓での薬物の酸化的代謝とは医学、薬学分野での重要な研究課題で1940年代から多くの研究者により研究され、1950年代にはNADPHとO<sub>2</sub>を必要とするオキシゲナーゼ型の反応であることが見出されていましたが、どちらの酵素活性もミクロソームやミトコンドリアの膜に結合しており界面活性剤で可溶化しようとするとう完全に失活するため精製できず酵素の本態が不明でした。それがP450の活性であることがわかったのですから、それらの分野の多

数の研究者が一斉に P450 の研究を始めて P450 の研究分野はにわかに賑やかになり、P450 の研究は急速に発展します。1968 年には P450 についての最初の国際シンポジウム "International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations" が Bethesda で開催されました。

## P450 から生体膜研究へ

私は P450 を研究する過程で膜蛋白質に興味を持つようになりました。1960 年代初期は "細胞生物学" の勃興期で動物細胞の内部に膜でできた様々なオルガネラが存在するという新知識は物質代謝を研究する生化学者達にも大きな影響を与えていました。私は当時の細胞生物学研究の中心だった Rockefeller 大学に留学して生体膜の勉強をしたく思い、Rockefeller 大学細胞生物学部門の Philip Siekevitz 博士に手紙を書きましたら「一年待ってくれば訪問研究員の席が空くので受け入れる」との返事が来ました。ところがちょうどその時に Estabrook から「訪問研究員として来て P450 の研究に加わってくれないか」との誘いが来ました。佐藤教授も勧めるので私は Rockefeller 大学に行く前の 1 年間だけ Estabrook 教授の研究室に行くことにしました。

Estabrook と Cooper は副腎ミクロソームの P450 がオキシゲナーゼ活性を持つことを photochemical action spectrum 法で証明したのですが、副腎ミトコンドリアのステロイド水酸化活性については同じ実験手段で良い結果が得られず困っていました。私は 1964 年に Estabrook の研究室に行き、副腎ミトコンドリアの P450 について研究を始めました。ミトコンドリアの音波破砕物を P450 を含む膜画分と NADPH で P450 を還元する活性を持つ上清画分とに分けることに成功し、上清の P450 還元活性が FAD を含むフラビン酵素とフェレドキシン型の鉄硫黄蛋白質から成ることを証明できました。この三成分でステロイド水酸化活性が再構成できることも確かめましたので、ミトコンドリアの P450 もステロイド水酸化活性をもつことが証明でき、P450 酵素系の構成を明らかにした最初の例にもなりました (11)。

Estabrook の研究室でミトコンドリアを扱ったのは私にとって貴重な経験となりました。私は Siekevitz の研究室で 1 年間小胞体膜の研究をして帰国してから異なった分子種の P450 が細胞内で小胞体とミトコンドリアに選択的に組み込まれる機構の研究を始め、念願だった細胞生物学分野に仲間入りすることができましたが、これは Estabrook の研究室でミトコンドリアの P450 について研究する機会を得たおかげです。たまたま Estabrook の研究グループに加わる機会を得たことは私にとって大きな幸運でした。

## P450 研究の話題 : "Cytochrome P450" の命名

新しい蛋白質を発見して自分で命名するのは生化学者にとっての大きな夢です。私はこの幸運に恵まれたのですが、"P450" が広く使われるまでにはいくつかの変遷がありました。1961 年に最初に学会で発表した時には "COP-450" でしたが、論文として速報するため佐藤教授と相談して "P-450" とすることになり、この名前が広く使われることになりました。ところが 1989 年に International Union of Biochemistry の "Enzyme Nomenclature Committee" から "Cytochrome P450" という名称は委員会の命名法の規定に反するから "Heme-thiolate protein" に変更するように」という勧告が来ました。当時の Nomenclature Committee の権限は絶大で、広く使われていた "DPN, TPN" を "NAD, NADP" に変えてしまったほどでしたから、この勧告は P450 分野の研究者にとっては大問題でした。勧告は Estabrook 宛てに送られて来ましたので、彼が P450 分野の代表的な研究者を集めて相談したのですが「この研究分野では "Cytochrome P450" という呼称は既に定着し多数の論文も出されているので名称は変えない」との結論になり、"P450" の名前は消滅を免れました。当時はへムに thiolate anion が配位してい

るヘム蛋白質は P450 だけだったのですが、その後になって構造も機能も P450 と違う heme-thiolate protein が Nitric oxide synthase など次々と発見され、現在では "Heme-thiolate protein" は P450 を含む一群のヘム蛋白質の総称となっています (12)。"Cytochrome P450" を "Heme-thiolate protein" に改名しなかったのは正解でした。

### **P450 研究の教訓 : "Purify first, and then think"**

過去 50 年の P450 研究には色々な曲折がありました。その一つに 1970 年前後に大きな問題となった「肝臓ミクロソームの P450 は 1 種類か多数の種類があるのか」という議論がありました。肝臓ミクロソームによる薬物代謝の研究が進むと分子構造上類似性のない多様な薬物が皆 P450 で酸化されるので、それが 1 種類の P450 の活性なのか基質特異性が異なる何種類もの P450 が存在するのか、という数年間にわたる議論になったのです。学会でも議論が続き、双方の考えをそれぞれ支持する実験証拠を記載した数多くの論文も出されたのですが、1970 年代はじめに P420 への変換を防いでミクロソームから P450 を可溶化する方法が考案され、1970 年代半ばになって肝臓ミクロソームから基質特異性が異なる数種類の P450 が次々と精製されてこの議論は決着しました。"Purify first, and then think."

"Don't waste your clear thinking on dirty materials." はある学会の講演で E. Racker が述べた言葉で、私が強い感銘を受けた警句です。今でも通用する教訓でしょう。

### **あとがき**

P450 の研究を振り返ってみますと、人と人の偶然の出会いが P450 の発見と初期の研究の展開に決定的に重要だったことに驚きます。Chance の研究室で Klingenberg、佐藤、Estabrook の三人が出会ったのも、佐藤教授が私を新設の研究室の助教授に誘ってくれたのも偶然の運命的な出会いでしたし、Estabrook が Cooper との共同研究で P450 を研究するようになったのも偶然でした。運命の女神に導かれたような出会いの上に築かれた研究でした。

2014 年に Stuttgart で "20th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations" が開催され、P450 研究 50 周年を記念して Special Session "Cytochrome P450: Five Decades from Discovery to Present" がありました。Klingenberg は自宅のある München から Stuttgart に来てこの Session に出席してくれ、私は久しぶりに Klingenberg に会うことができました (写真 1)。佐藤、Estabrook、Cooper など P450 研究の基礎を築いた人達の多くは故人となりましたが、健在な Klingenberg に会えたのは私にとって何より嬉しいことでした。



写真 1 Martin Klingenberg と著者。2014 年に Stuttgart で開催された学会の会場で。

文 献

1. Omura, T. and Sato, R. (1962) *J. Biol. Chem.*, 237, PC1375-1376
2. Omura, T. (2011) *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 87, 617-640
3. Estabrook, R.W. (2003) *Drug. Metab. Dispos.*, 31, 1461-1473
4. Klingenberg, M. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.*, 75, 376-386
5. Omura, T. and Sato, R. (1963) *Biochem. Biophys. Acta*, 71, 224-226
6. Omura, T. and Sato, R. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378
7. Omura, T. and Sato, R. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 2379-2385
8. Estabrook, R.W., Cooper, D.Y. and Rosenthal, O. (1963) *Biochem. Z.*, 338, 741-755
9. Cooper, D.Y., Estabrook, R.W. and Rosenthal, O. (1963) *J. Biol. Chem.*, 238, 1320-1323
10. Cooper, D.Y., Levin, S.S., Narasimhulu, S., Rosenthal, O. and Estabrook, R.W. (1965) *Science*, 147, 400-402
11. Omura, T., Sanders, E., Estabrook, R.W., Cooper, D.Y., and Rosenthal, O. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.*, 117, 660-673
12. Omura, T. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338, 404-409.

---

大村 恒雄 先生ご略歴

- 1930年 静岡県に生まれる  
1953年 東京大学 理学部 化学科 卒業  
1953年 静岡大学 文理学部 化学科 助手  
1960年 大阪大学 蛋白質研究所 助教授  
1970年 九州大学 理学部 生物学科 教授  
1986年 九州大学大学院 医学系研究科 教授  
1994年 九州大学 名誉教授



## 我々がたどった道：ホスホリラーゼから始めて

福井俊郎（ふくい としお）

1953年に私は大阪大学理学部化学科を卒業した。Watson - Crick が DNA の二重らせんモデルを発表した年である。敗戦から8年、わが国の社会は大学を含めてまだひどい混乱期にあった。私はデンプンを看板とする研究室で育ったが、デンプンはグルコースから成る枝分かれをもつ複雑な巨大分子で、食品として重要であっても生物学的な機能をもたない。私の興味は徐々にデンプンに働く酵素の方に移って行った。

### 1. 一次構造<sup>1,2</sup>

$\alpha$ -グルカン ホスホリラーゼは、グリコーゲンやデンプンのような $\alpha$ -グルカンを加リン酸分解して、 $\alpha$ -グルコース 1-リン酸を生成する酵素である。哺乳動物の筋肉では、活性なリン酸化型と不活性な脱リン酸化型の2種で存在するが、植物組織にはリン酸化されない活性型だけが存在する。筋肉ホスホリラーゼは典型的な調節酵素として、1950年頃から活発に研究されていた。

我々のホスホリラーゼ研究は、動物酵素と植物酵素の酵素学的な特性を比較することによって、酵素の調節性に関する理解を深めようとして始まった。1960年後半のことであったが、それだけでは酵素の本質的なところまで到達できそうになかった。米国ワシントン大学で、ウサギ筋肉酵素の全一次構造決定が進められているという情報に刺激されて、1976年頃から我々はジャガイモ塊茎酵素の一次構造の研究を始めた。蛋白質の構造研究にまったく経験がなかったので、当初は大阪大学理学部松原グループの全面的な協力を得た。当時は蛋白質一次構造決定の自動化はまだ進んでいなくて、蛋白質の部分加水分解物から単離したペプチドを、試験管内でEdman分解して、生じたPTH-アミノ酸を1個ずつTLCで同定する手法が一般的であった。

ほとんど無謀であったと思うが、中野らによる10年近くの努力が実って、ジャガイモ塊茎ホスホリラーゼの全一次構造(916残基)の決定が完成した。この結果は、調節性の異なる2種のホスホリ

ラーゼの構造比較を可能にただけでなく、分子量が10万を越す巨大な蛋白質の全一次構造を、化学的手法によって決定した希少な例としても評価された。

動物と植物のホスホリラーゼの一次構造を比較すると、全体としてかなり高い類似性が認められたが、筋肉酵素のアミノ末端に近いリン酸化部位の構造はジャガイモ酵素では全く異なっていて、両酵素の調節性の差を裏付けることが出来た。また、ジャガイモ酵素のポリペプチド鎖の中央部分に、78残基から成る特徴的な挿入配列が見つかった。同じ頃に、ウサギ筋肉ホスホリラーゼの6Å分解能での立体構造が、カナダのアルバータ大学グループによって決定された。その結果に今回の一次構造比較を当てはめると、ジャガイモ酵素の巨大な挿入配列は、ウサギ筋肉酵素の活性部位クレバスの入口付近にあつて、基質グルカンを優先的に結合する“グリコーゲン貯蔵部位”を被うように見えた。

筋肉酵素では、枝分れが多いグリコーゲン分子は、一つの枝が“グリコーゲン貯蔵部位”に優先的に結合して、他の枝がそこから離れた触媒部位で反応を受けるものと考えられていた。それに対して、ジャガイモ酵素では、“グリコーゲン貯蔵部位”が巨大な挿入部分によって被われているため、グルカン分子はここに結合しなくて、直接に触媒部位で反応を受けると考えられる。直鎖のグルカン分子は、筋肉酵素でこのようなまたがった結合が出来ないために良い基質になれない。それに対

して、植物酵素ではグルカン分子が直接に活性部位に入り、触媒反応を受けるようである。

## 2. 分子生物学的手法<sup>3,4</sup>

1980年頃から、分子生物学的な手法を蛋白質科学に取り入れることが、一般的になって来た。高等植物の組織には、少なくとも2種のホスホリラーゼ・アイソザイムが存在している。我々は、これまで研究してきたL型アイソザイムと、もう一つのH型アイソザイムをコードする2種のcDNAをジャガイモ塊茎から単離して、それぞれのヌクレオチド配列を決定した。L型アイソザイムには、アミロプラストへのシグナル・ペプチドと考えられる、アミノ末端の伸長配列(50残基)があったが、それを除いた成熟蛋白質部分916残基の配列は、先の化学的構造決定の結果と完全に一致した。

ジャガイモ塊茎の2つのアイソザイムの一次構造はよく類似していたが、先にL型アイソザイムに見つけたポリペプチドの中央部分の挿入配列は、H型アイソザイムには見当たらず、H型アイソザイムの構造は、むしろウサギ筋肉酵素の構造に類似していた。H型アイソザイムのグルカン分子に対する高親和性は、筋肉酵素と同じような“グリコーゲン貯蔵部位”の存在に起因するものと推定された。

そのことを確かめるために、L型アイソザイムの“グリコーゲン貯蔵部位”に相当する領域を、H型アイソザイムあるいはウサギ筋肉酵素の相当する領域で置換したキメラ酵素を作製して、それらのグルカン分子に対する親和性を比較した。作製したキメラ酵素では、すべてのグルカン分子に対する親和性が予想通りに大きく上昇していた。このようにして、この挿入部分がL型アイソザイムのグルカン親和性を支配していることを確かめることができた。

## 3. 補酵素の役割<sup>5-7</sup>

すべての $\alpha$ -グルカンホスホリラーゼには、起源によらず、ピリドキサル5'-リン酸を共有結合している。この化合物は、アミノ酸代謝に関連する酵素の間では広く存在していて、触媒作用に直

接的に関与するが、ホスホリラーゼは例外的な存在であった。ある教科書では「酵素学上の興味ある謎」として取り上げられていて、この謎を解くための研究が広く行われていた。

下村らはピリドキサル5'-リン酸の種々の誘導体を合成して、ウサギ筋肉ホスホリラーゼから調製したアポ酵素との結合性を調べていたが、ピリドキサル5'-二リン酸-5'-ピリドキサルが、2つのLys残基にまたがって結合することを見出した。一つの残基はもともとピリドキサル5'-リン酸が結合していた残基で、もう一つの残基はLys574と同定できた。このLys残基は、ジャガイモ酵素にも保存されていた。

多くのアミノ酸代謝関連酵素では、ピリドキサル5'-リン酸のアルデヒド基に基質アミノ酸が結合して触媒反応が起こる。それに対して、ホスホリラーゼでは、結合ピリドキサル5'-リン酸のアルデヒド基ではなくて、5'-リン酸基が必須である。我々は、ピリドキサル5'-リン酸と $\alpha$ -グルコース1-リン酸とがピロリン酸結合で縮合した化合物である、ピリドキサル5'-二リン酸- $\alpha$ -グルコースを合成して、アポ酵素に再構成させた。この再構成酵素にグリコーゲンを加えると、触媒反応が起こって、合成化合物のグルコース残基がグリコーゲンに転移することを見出した。

この発見は、補酵素ピリドキサル5'-リン酸のリン酸基と基質 $\alpha$ -グルコース1-リン酸のリン酸基が、直接的に相互作用することによって、触媒反応が起こるとする仮説に対する直接的な証拠となった。X線結晶解析から決められたホスホリラーゼの立体構造では、結合ピリドキサル5'-リン酸のリン酸基と基質のリン酸基との距離は7~8Åであったが、これは酵素の不活性状態での結果であって、活性状態ではもっと近づいて相互作用が起こるのだろう。

## 4. 親和標識<sup>8-10</sup>

ピリドキサル5'-リン酸は蛋白質のリン残基の一般的な修飾剤としても用いられてきた。多賀谷は、ピリドキサル5'-リン酸のリン酸基にピロリン酸結合で基質を結合させることによ

て、基質結合部位に特異的な新しい親和標識剤をつくることを考案した。それを試すために、UDP - グルコースを基質とする筋肉グリコーゲン合成酵素を用いた。合成した新しい標識剤である UDP - ピリドキサル (図 1) は、筋肉酵素の基質結合部位に特異的に結合して、そこにある Lys574 を修飾することが明らかになった。

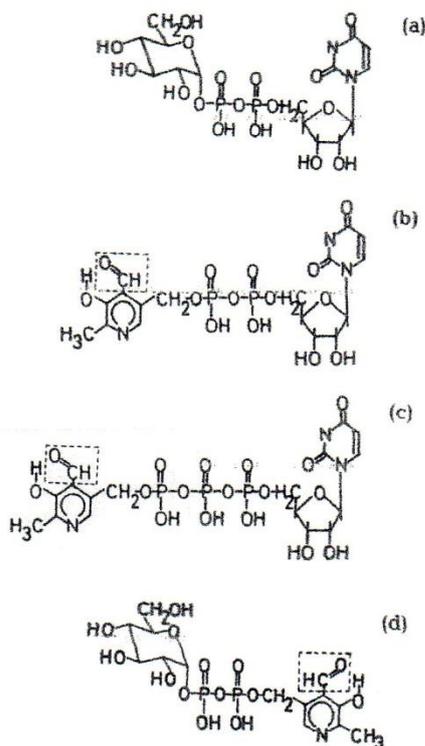


図 1. UDP - グルコース (a)、UDP - ピリドキサル (b)、UTP - ピリドキサル (c)、ピリドキサル ニリン酸 - グルコース (d) の化学構造

この成功に刺激されて、ウリジンの代わりにアデノシンまたはグアノシンをもち、さらにリン酸基の数が異なる修飾剤を合成した。これらの新しい親和標識剤は、アデニル酸キナーゼ、ATP 合成酵素、ホスホリラーゼ キナーゼ、アミノ酸 - tRNA 合成酵素、*ras* 遺伝子産物 p21 などを含む、多くの蛋白質に適用されて、それぞれの基質結合部位に存在するリシン残基を同定することが出来た。その多くは“Gly-リッチ領域”に含まれるものであっ

たが、“Gly-リッチ領域”に含まれる Lys 残基の反応性は、標識剤のリン酸基の数にあまり関係なかった。反応する Lys 残基がフレキシブルな“Gly-リッチ領域”に含まれていると、位置がかなり自由になるからであろう。親和標識によって同定された Lys 残基は、次に別のアミノ酸に置換されて、その役割が検討された。

## 5. 親和標識と変異導入の組合せ<sup>11~13</sup>

大腸菌グリコーゲン合成酵素は ADP - グルコースを基質とする。大腸菌酵素を ADP - ニリン酸ピリドキサルと反応させたところ、Lys - Thr - Gly - Gly 中にある Lys15 が標識された。大腸菌酵素と筋肉酵素 (UDP - グルコースを基質とする) との間には一次構造類似性がない。それにも関わらず、筋肉酵素で標識された Lys574 は、Lys - Val - Gly - Gly という類似した Gly リッチな配列の中にあつた。

大腸菌酵素の Lys15 を Arg に置換すると、基質に対する ADP - グルコースに対する  $K_m$  はあまり変わらなかったが、Gln または Glu に置換すると  $K_m$  は 30~40 倍大きくなった。 $k_{cat}$  はいずれもかなり下がったが、置換した残基の電荷とは関係なかった。これらの結果は Lys15 が基質とのイオン結合に関係していて、触媒反応には必須でないことを示している。さらに、Lys15 周辺の Gly 残基を 1 個ずつ Ala に置換すると、いずれでも  $k_{cat}$  が大きく下がった。これらの Gly 残基は活性部位領域の構造変化を助けるのだろう。

さらに、Lys15 を Gln に置換した大腸菌変異酵素を ADP - ニリン酸ピリドキサルと反応させると、新しく Lys277 が標識されることが分つた。この Lys 残基を Gln に置換すると、ADP - グルコースに対する  $K_m$  は余り変わらないのに、ほとんど完全に失活した。このように、親和標識と変異導入を組み合わせることによって、酵素反応についての有用な知見が得られた。

## 6. “比較親和標識法”<sup>14~16</sup>

我々が考案した親和標識剤では、親和基の種類と反応基との距離を任意に変えることが出来る。UDP - グルコース ピロホスホリラーゼは、UDP -

グルコースを加ピロリン酸分解する酵素である。ジャガイモ塊茎酵素に UDP - ピリドキサルまたは UTP - ピリドキサル (図 1) を作用させると、急速な失活が起こった。完全な失活は酵素モル当たり約 1 モルの試薬の結合に対応していたが、5 個の異なるリシン残基が標識された。このように多数の Lys 残基が同時に標識されるという結果は、UDP - グルコース ピロホスホリラーゼと共に、アミノ酸 tRNA 合成酵素のような基質が多くのリン酸基をもつ酵素の場合に見られた。

ピリドキサル ニリン酸グルコース (図 1) は、先の 2 つの標識剤と比べると、反応性ピリドキシル基がピロリン酸基を挟んで逆の位置にある。この標識剤も先と同じ 5 個の Lys 残基を標識したが、それぞれの Lys 残基が標識される度合いは、先の 2 つの標識剤の場合と明らかに異なっていた。標識剤の構造の違いから来るこれらの差違は、それぞれの Lys 残基の  $\epsilon$  - アミノ基と標識剤の反応基との距離を反映するものと想定して、活性部位におけるこれら 5 個の Lys 残基の位置を推定した (図 2)。

さらに、これら 5 個の Lys 残基をそれぞれ別個に Gln に置換した酵素を作成し、それぞれの性質を調べたが、それらの結果はこの仮想的なモデルによって、ほぼ矛盾なしに説明できた。また、

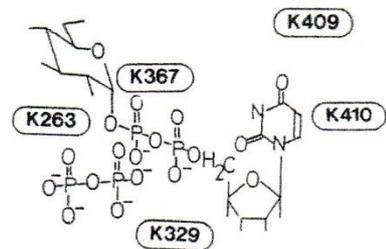


図 2. ジャガイモ塊茎 UDP - グルコースピロホスホリラーゼに結合する基質周辺にある 5 個のリシン残基の可能な配置。“比較親和標識法”に基づいて作成した仮想的なモデル

大阪大学蛋白質研究所楠木グループとの共同研究で得られた、本酵素の立体構造ともよく一致した。蛋白質がもつ分子認識能の高さを裏付けるものであろう。

今から 50 年ほど前に、蛋白質に全く素人であった我々が始めたホスホリラーゼに関する研究が、その後どのような道をたどったか、私が停年退官した 1995 年までをまとめてみた。長年にわたる多くの共同研究者及びこれを発表する機会を与えられた日本蛋白質科学会に感謝する。大阪大学時代の同級生であり、蛋白工学会の発足に際して中心的な役割を果たした次田 皓君にこの小文を捧げたい。



中野憲一・下村正二



良き先輩（濱口、池中）・同輩（松原）・後輩（高木）



研究室メンバー（1992年頃）

## 文献

1. Nakano, K. and Fukui, T. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9230-9236.
2. 福井俊郎, 中野憲一 (1986) *化学と生物* 23, 357-365.
3. Mori, H., Tanizawa, K., and Fukui, T. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 5574-5581.
4. Mori, H., Tanizawa, K., and Fukui, T. (1993) *Protein Sci.* 2, 1621-1629.
5. Shimomura, S. and Fukui, T. (1978) *Biochemistry* 17, 5359-5367
6. Takagi, M., Shimomura, S., and Fukui, T. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 3716-3719.
7. 福井俊郎 (1983) *生化学* 54, 444-447.
8. Tagaya, M. and Fukui, T. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 6670-6676.
9. Tagaya, M., Tanizawa, K. and Fukui, T. (1994) in *Molecular Aspects of Enzyme Catalysis* (Kodansha Scientific, Tokyo), pp. 73-86.
10. 多賀谷光男, 福井俊郎 (1987) *生化学* 59, 1020-1026.
11. Furukawa, K., Tagaya, M., Tanizawa, K., and Fukui, T. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 868-871.
12. 谷澤克行, 多賀谷光男, 福井俊郎 (1993) *化学と生物* 31, 797-806.
13. Fukui, T., Kazuta, Y., Katsube, T., Tagaya, M. and Tanizawa, K. (1993) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 18, 209-216.
14. Kazuta, Y., Tanizawa, K., and Fukui, T. (1991) *J. Biochem.* 110, 708-713.
15. Fukui, T. (1995) *J. Biochem.* 117, 1139-1144.
16. Tanizawa, K., Kusunoki, M. and Fukui, T. (2000) *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 5, 83-98.

福井俊郎先生ご略歴：

- 1931年 兵庫県に生まれる。
- 1953年 大阪大学理学部化学科卒業
- 1958年 大阪大学大学院理学研究科博士課程  
修了、理学博士
- 1958年 大阪大学助手
- 1958年 米国パデュー大学博士研究員
- 1964年 米国パデュー大学訪問助教授
- 1966年 大阪大学助教授
- 1970年 大阪大学教授
- 1995年 大阪大学名誉教授

