

シリーズ「わが国の蛋白質科学研究発展の歴史」 第7~9回原稿配信のお知らせ

平成27年7月21日

今回は、第7回から第9回原稿を配信いたします。

今回配信原稿

- 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

今後配信予定原稿

- 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

配信済み原稿

- 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

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。

私の蛋白研究、ヒドロゲナーゼとその周辺

八木 達彦 (やぎ たつひこ)

蛋白質の重要性に初めて気づいたオランダの Johannes Mulder がギリシャ語の *πρωτεϊος* (第一級の重要性) から protein という言葉をつくったのは 1838 年、日本では宇田川榕庵が《舎密開宗》の出版を始めたころだ。Mulder の研究に対する評価が高いとは思えないが、命名の先見性は称賛に値する。Emil Fischer が蛋白の化学構造としてペプチド説をとったのが 20 世紀初め、ジケトピペラジン説が葬られて蛋白化学が軌道に乗ってきたのは 1930 年代だろう。当時の日本では高峰讓吉博士のアドレナリン発見(1900)、鈴木梅太郎教授のオリザニン(ビタミン B₁)発見(1910)など生命科学の研究で世界に燦たる成果も出始めてはいたが、蛋白化学はまだ未熟な段階だった。しかし地道な研究は始まっていたようで、大阪大学の赤堀四郎先生は太平洋戦争中に《アミノ酸及蛋白質、共立出版 1944》、戦後間もなく谷久也^{当時}助教授との共著で小冊子《蛋白質、三共出版 1948》を上梓されている。Linus Pauling の α ヘリックスと Frederick Sanger のインスリン B 鎖アミノ酸配列決定はともに 1951 年、赤堀先生と水島三一郎先生の共同編集になる本格的な専門書《蛋白質化学、全 5 巻、共立出版》が刊行されたのは 1954 年から 1957 年にかけてである。

私が東大理学部化学科で授業を受けていた 1954-1955 年頃は蛋白化学をメインとする授業はなかった。生化学を担当していらした左右田徳郎教授が定年退官されたあと後任の生化学専門の教授は着任されず、赤堀先生が東大理学部化学科と応用微生物研究所(現分子細胞生物学研究所)の教授を併任する形で着任された。赤堀先生が蛋白化学に関して指示された方針は、当時のレベルを考慮し『簡単な基質に働く酵素を選びなさい。または、簡単な蛋白質を選びなさい』というものであった。先生は阪大での蛋白質研究所(発見時たんぱく質研究所)設置の準備が忙しく、4 年時の生物化学の授業は先生が大阪から連れてこられた佐竹一夫助教授(のち東京都立大教授)が担当された。先生の著書《クロマトグラフ、共立出版 1952》を読んだ印象から楽しみにしていた授業は酵素と代謝がメインで、期待通り秩序だって分かりやすく興味深いものであった。私が生化学に引きずり込まれる主因の一つは佐竹先生の授業だったが、蛋白化学に触れる機会は少なく、卒業研究で千谷晃一君(のち藤田保健衛生大教授)が N 末端アミノ酸の決定法など実験していたのを横目で見える程度だった。

大学院で生化学を基礎から指導して下さったのは石本眞助手(のち北大教授)、硫酸還元菌から新シトクロムを発見(1954)した直後である。彼は、非光合成嫌気細菌にはシトクロムが存在しないという当時の定説を覆したと意気軒昂だったが、論文発表がイギリスの John Postgate より少し遅れたことを悔しがっていた(このシトクロムは Postgate がシトクロム c₃ と命名)。当然、研究テーマはこの菌の酸化還元代謝系におけるシトクロム c₃ の役割である。硫酸還元菌は乳酸イオンを炭素源と電子供与体、硫酸イオンを電子受容体として生育する嫌気細菌だが、水素による硫酸イオン、亜硫酸イオン、チオ硫酸イオンなど硫黄オキシ酸イオンの還元も活発に行って硫化水素を発生する。菌体を破壊して無細胞抽出液にすると、水素による硫酸イオンの還元活性は失われるが亜硫酸イオンとチオ硫酸イオンの還元活性は残るので、これからシトクロム c₃ を除去し、精製シトクロム c₃ を加えて亜硫酸イオンとチオ硫酸イオンの水素による還元活性が復活するかどうかというのが最初の論文[1]だ。いま読み返してみるとせっかく精製したシトクロム c₃ の分子量も、ヘム含量、鉄含量も測ってない。そ

の頃はゲル濾過クロマトグラフィも SDS-PAGE もなくて、分子量測定には分析用超遠心機が必須、これは港区の伝染病研究所(現東大医科学研究所)に行かないと使えない、ということでパスしてしまった。その後、石本さんに反発するようになり、一人で新発見の酵素、一酸化炭素デヒドロゲナーゼの研究に専念したが、蛋白精製が苦手で、新酵素の K_m や最適 pH など通り一遍のデータはとったが[2]、精製はあきらめていたようだ。DEAE セルロースをつくろうとしたことは覚えているが、これを使って酵素精製を試みたかどうかは記憶がない。嫌気条件で精製するなどの工夫も足りなかった。見るに見かねた田宮信雄助教授は、東京医科歯科大学硬組織生理研究施設(現難治疾患研究所)に新設される生化学講座に教授として迎えられるときに助手として連れて来てくださった(1958)。石本さんと隔離すれば少しはましな研究者になるだろう、というありがたい思召しだ。田宮先生はアメリカ留学時代に David Rittenberg 教授の研究室でヒドロゲナーゼをテーマに選ばれた。赤堀先生のいう《簡単な基質に働く酵素》だ。Stanley Miller との共同研究の成果は Rittenberg 教授に高く評価され、帰国土産に旧式の質量分析計(マス)を贈られた。これを医科歯科大の研究室に自力でセットし

てマスを使う研究を始めようとしていたときである。マスといえば今では蛋白構造決定の重要手段だが、当時のマスは小分子専用だから H_2 とか CO_2 などの同位体分析が主な用途だった。

アメリカ留学と帰国

その頃急にアメリカ留学の話がもち上がった(1960、写真1)。Melvin Calvin 教授の光合成研究を支えた Andrew Benson 教授(Pennsylvania State University、のち University of California, San Diego)の研究室で、テーマは植物スルホリピドの研究である。この糖脂質は彼が発見し PNAS に論文も発表していたが、推定構造に自信がなかったようで、構造をきっちり確かめよ、というのがテーマ。慣れない有機合成で糖部分が PNAS に出ていた 6-スルホフコースではないこと、リゾ型ではなく通常のジアシルグリセロ構造であることを証明してしまった。ここで Benson 先生が有機合成の名人として連れてきた宮野真光さん(Dr Masateru Miyano)にバトンタッチ、糖部分の構造は彼が合成した 6-スルホキノボースと一致した。そのあとはリコイル ^{32}P 原子の化学、つまりリン酸に中性子をあてて ^{31}P を ^{32}P に変換するとリン酸分子から ^{32}P が飛び出して周囲の有機分子と反応、生じた有機ホスホン酸



写真1. 当時は外国留学が珍しく、大勢で羽田まで見送りに来てくださった。左から大島泰郎君、小沢均助教授、田宮先生、高橋健治君、筆者、妹道子、母薫、細田淳子さん(のち渡米して細胞分子生物学で成果)、石田美穂子さん(のち横浜でクリニックを開業)、西村暹君(RNAの修飾塩基で有名)。1960年5月羽田空港にて。



写真2. Benson 先生、1988 ころの来日時に妻宏子と用宗の寿司国にご案内。時期は違うが¹⁴Cの生みの親 Martin Kamen 教授もここの寿司を喜んで下さった。

やホスフィン酸の構造を決定してリコイル反応メカニズムを探るとい研究に熱中し、あつという間に留学期間が終了、医科歯科大の田宮研に戻った(1962)。その後 Benson 先生は何度も来日された(写真2)。

田宮研では、藤本大三郎君(のち東京農工大教授)がマスを駆使してコラーゲンのヒドロキシプロリンのOHがO₂に由来するという論文を発表したところである。翻訳後修飾という言葉さえなかった時代だから画期的な成果で、藤本君はその後コラーゲン研究のオーソリティになった。私は田宮先生のお勧めでヒドロゲナーゼの研究に切り替えた。先生はコラーゲンでの成功後もヒドロゲナーゼには愛着があったようだが、同僚の加納六郎教授に誘われて海蛇毒素(のちエラプトキシンと命名される62残基蛋白)の研究に転換された。赤堀先生のもう一つの助言《簡単な蛋白》に巡り合ったわけだ。田宮先生は赤堀先生の強い要請で東北大理学部へ転出後も蛇毒素を愛し続け、トキシコロジーのオーソリティになられたことは御承知の通り。後のことだが、北大の稲垣冬彦教授と組んでエラプトキシンのNMR主要シグナルのアサインメントに成功し[3]、これはすごいことなんだぞ、と無邪気に興奮しておられたのを思い出す。医科歯科大ではコラーゲンとコラゲナーゼの研究で成果を上げた永井裕助教授がゲル濾過、Disc電気泳動など蛋白

研究の新技术をいろいろと教えてくださった。田宮先生の転出後に永井さんが後任教授に昇進、私は静岡大学に赴任して(1966)、初めて自分の研究室をもった。

静岡大学で

研究テーマは硫酸還元菌 *Desulfovibrio* のヒドロゲナーゼ、シトクロム *c*₃、および関連蛋白に絞った。シトクロム *c*₃ は特に新しい方法を工夫、開発しなくても陽イオン交換体で簡単に精製できた。この精製シトクロム *c*₃ を使い、Postgate の報告にある分子内ヘム2個を4個に、平均標準還元電位-205 mV を-290 mV に大幅修正する結果を出した[4]。C型シトクロムの標準還元電位としてマイナス側の新記録である。そのころ東大物性研の井口洋夫先生(のち分子科学研究所長)が有機半導体によるH₂活性化との関連でヒドロゲナーゼに大きな関心を示され、先生の逝去(2014)までの息の長い共同研究が始まった。なおシトクロム *c*₃ の4個のヘムの標準還元電位は、だいぶのちになるが、フランス Université de Provence の Gayda 教授グループとの共同研究で電位差滴定とEPRを組み合わせ-235, -323, -337, -357 mV と測定された[5]。シトクロム *c*₃ を電子受容体とするヒドロゲナーゼの精製では阪大蛋白研の堀尾武一助教授(のち教授)に教えていただいた等電点電気泳動や、蛋白溶液を透析しながら濃縮できるDiaflo cellが威力を発揮し、1976年には当時の最高純度のヒドロゲナーゼ標品を得ることができた[6]。ヒドロゲナーゼ研究の初期の総説[7]はヒドロゲナーゼ研究の入門書として評判が良い。定年後に研究を振り返った集大成も総説[8]としてまとめた。《ヒドロゲナーゼ》という本も書きたかったが、進歩が速すぎて手に負えなくなってしまった。

静大教育学部化学教室では教授、助教授、助手、みんな独立な研究者で全く別テーマで好きな研究をしている。研究の自由は満喫できるが、卒業研究の学生さん達に教えながら一人で行う研究はたかが知れている。しかし幸運にも1976年に教養部に赴任してきた物理化学の尾形照彦助教授(のち教授)の奥様、真理さん(写真3)が東京での研究職を辞して来静され、生化学の研究を続けたい、ということ



写真3. 尾形真理さん。静大の八木研実験室で(1983)。

で研究メンバーに加わってくださった。尾形さんには非常勤講師として学生実験なども担当していただき、研究、教育の面でどれだけ助けていただいたか計り知れない。おかげで硫酸還元菌のシトクロム c_3 以外の電子キャリア蛋白にも手を広げることができ、この菌に存在することだけは分かっていたがヒドロゲナーゼとは反応しないフェレドキシンを始め、数々の電子キャリア蛋白を単離精製し、物性や機能解析を行うことができた[9]。しかしアミノ酸配列はできなかつたので、卒論の学生さんを阪大の松原央教授の研究室に派遣して配列決定した[10]。配列決定でのトピック一つ：理学部から当研究室に来て卒論を書き、阪大福井俊郎教授のところに進学し、ポテトホスホリラーゼ(916 残基)の配列決定に奮闘中の中野憲一君がシトクロム $c-553$ の配列を決めたときのことだ。硫酸還元菌 Hildenborough 株のシトクロム $c-553$ の既発表配列とはN端とC端付近以外が全く似ていない。しかしトリプシンペプチドどうしはよく似ていたのので、Hildenborough 株の論文にはトリプシンペプチドのつなぎ間違えの可能性があり、配列再検討の必要性を指摘した[11]。DNA 配列からアミノ酸配列を決める現在の方法ではあり得ないできごとだ。

井口先生との共同研究では、広い視野と人脈をもつ先生のおかげで、自力では解決できない問題にも取り組むことができた。ヒドロゲナーゼの電子キャリアであると同時に有機半導体としての性質ももつシトクロム c_3 の立体構造決定は、井口先生と親しい阪大蛋白研角戸正夫所長のご紹介で安岡

則武助教授(のち姫路工大教授)、院生の樋口芳樹さん(現兵庫県立大教授)が中心になり 1981 年に成功した[12]。ヨーロッパグループが 1979 年に決定した他の菌株のシトクロム c_3 の構造[13]には 2 残基の見逃しがあり、NMR、EPR などを総合して出した 1974 年の構造モデル[14]には大きな間違いがあったから、正しい構造は私たちが最初である。当時の NMR は今ほどの信頼性がなかったのだろうか？安岡-樋口グループはその後ヒドロゲナーゼの X 線構造も決定した[15]。ヒドロゲナーゼ立体構造のカラー写真は、まず田宮先生にお贈りした。

再び田宮先生と

ある日、田宮先生から電話がかかり《非分散進化論》の共同提案者に誘われた。あとで知ったことだがお膝元の東北大では不評で、みんなに振られた後のお誘いだったようだ。進化の系統樹はオルトログ蛋白の配列比較でつくるから異なる蛋白からつくる系統樹は同じになるはずなのに、そうとは限らない。硫酸還元菌でいえば日本の宮崎株とイギリスの Hildenborough 株のシトクロム c_3 とシトクロム $c-553$ は高い相同性を示すのにヒドロゲナーゼは全く違うという矛盾を抱えていたので、すぐ飛び乗ることにした。仙台でのタンパク質構造討論会(1985)発表後の休憩時間では『あの考えには無理がある』という会話を耳にしたが、自然界での遺伝子の種を超えた伝播が原核生物だけでなく真核生物間でも広がりを見せ、horizontal transfer of genes も当たり前になってきた。突然変異に起因する進化と並んで、複数祖先から発生した生物間の遺伝子交流で新たな情報をもつ生物へと進化する可能性を考えるべきではないか？言語や文化も祖先からの縦の流れだけでなく、交易、観光、布教、侵略といった横との交流の影響が大きい。人類の言語や文化が単一オリジンからの変異だけで今の形になったわけではあるまい。田宮説を補強する証拠集めもお手伝いし先生との共著論文[16]も発表した。この論文では遺伝子の水平移動の重要性を強調し、同時に生命が複数オリジンでもよいという議論を展開するとともに、生命の起源に関する非標準的な説もいくつか紹介した。今では進化

における遠縁種間の遺伝子の水平移動の役割は理解されてきたが、生命が複数オリジンから進化したとの主張は孤立無援だ。地球上に生命が誕生するような環境(地球表面の分子組成、温度、圧、電磁波など)を整えば、あちこちで生命が誕生し、遺伝子(といえるほど完成したものではないだろうが)、その他の成分を交換しながら進化してきたはずだ。地球の歴史のある時期にただ一度の《The most improbable and the most significant event in the history of Universe; FG Hopkins, 1933》が起きたといえは奇跡と同じこと、科学的説明がない点で《神様がおつくりになった》というのと変わらない。ビッグバンは神の為せる御業だと説く宗教もあるようだが、それ以降のできごとはサイエンスだけで説明したい。

定年退官前後から今日まで

定年直前だが、シトクロム、フェレドキシン、ルブレドキシンなど多くの電子キャリア蛋白が共通な Cys-X-Y-Cys 配列をもちながら互いに S-S 間距離の異なる補因子を結合し、チオレドキシンでは補因子なしでジスルフィド結合するほど S-S 間距離が近い理由を説明するため、コンピュータ化学の広田文彦教授に協力を求め、いろいろな Cys-X-Y-Cys テトラペプチドの安定コンホメーションを半経験的分子軌道法により求めた。その結果、X-Y の組合せにより S-S 間距離が決定されて補因子選択の決め手になること、これが蛋白フォールディングの核になりうるという議論を展開した[17]。

定年退官後は生化学研究を続ける実験室がないので、アメリカ留学時代の放射化学を活かし、静大の澤渡千枝助教授(現教授、副学長)と共同でポリエチレン、ポリエステル、ポリアミドなど合成ポリマのガンマ線照射による化学修飾で特定リガンドへの親和性や触媒活性、消炎性、染色性、濡れ性などの機能を付与する研究を行っている[18]。蛋白以外にも面白いポリマはある。ヒドロゲナーゼ活性をもつ合成ポリマができれば嬉しいが、とりあえずは日本蛋白質科学会で発表できるレベルの成果を目指している。

文 献

1. Ishimoto M, Yagi T, Shiraki M (1957) J Biochem 44, 413-423, 707-714. (オリジナル論文)
2. Yagi T (1959) J Biochem 46, 949-955. (オリジナル論文)
3. Inagaki F, Tamiya N, Miyazawa T (1980) Eur J Biochem 109, 129-138. (オリジナル論文)
4. Yagi T, Maruyama K (1971) Biochim Biophys Acta 243, 214-224. (オリジナル論文)
5. Benosman H, Asso M, Bertrand P, Yagi T, Gayda JP (1989) Eur J Biochem 182, 51-55. (オリジナル論文)
6. Yagi T, Kimura K, Daidoji H, Sakai F, Tamura S, Inokuchi H (1976) J Biochem 79, 661-671. (オリジナル論文)
7. 八木達彦 (1975) ヒドロゲナーゼ 蛋白質核酸酵素 20, 493-515. (総説・解説)
8. Yagi T, Higuchi Y (2013) Proc Japan Acad B89, 16-33. (レビュー)
9. Ogata M, Kondo S, Okawara N, Yagi T (1988) J Biochem 103, 121-125. (オリジナル論文)
10. Okawara N, Ogata M, Yagi T, Wakabayashi S, Matsubara H (1988) Biochimie 70, 1815-1820. (オリジナル論文)
11. Nakano K, Kikumoto Y, Yagi T (1983) J Biol Chem 258, 12409-12412. (オリジナル論文)
12. Higuchi Y, Bando S, Kusunoki M, Matsuura Y, Yasuoka N, Kakudo M, Yamanaka T, Yagi T, Inokuchi H (1981) J Biochem 89, 1659-1662. (オリジナル論文)
13. Haser R, Pierrot M, Frey M, Payan F, Astier JP, Bruschi M, Le Gall J (1979) Nature 282, 806-810. (オリジナル論文)
14. Dobson CM, Hoyle NJ, Gerald CF, Wright PE, Williams RJ, Bruschi M, LeGall J (1974) Nature 249, 425-429. (オリジナル論文)
15. Higuchi Y, Yagi T, Yasuoka N (1997) Structure 5, 1671-1680. (オリジナル論文)
16. Yagi T, Tamiya N (2009) Viva Origino 37, 73-82. (オリジナル論文)
17. Shimura M, Hirota F, Yagi T (1994) Biochimie 76, 614-621. (オリジナル論文)
18. Nakada S, Sawatari C, Tamura K, Yagi T (2001) Colloid Polym Sci 279, 754-762. (オリジナル論文)

八木達彦先生ご略歴：

- 1933年 唐津市に生まれる
- 1955年 東京大学理学部化学科卒業
- 1958年 東京大学大学院博士課程中退
- 1958年 東京医科歯科大学助手
- 1966年 東京大学、理学博士
- 1966年 静岡大学助教授
- 1972年 静岡大学教授
- 1993年 静岡大学大学院教授併任
- 1996年 静岡大学名誉教授



ペプチド — 酵素 — 不和合性

蛋白質化学の一断面*¹

崎山文夫 (さきやま ふみお)

蛋白質化学の初期 (ペプチドの化学)

私が大阪大学理学部化学科の赤堀四郎先生のもとで蛋白質の化学的研究を始めた頃は、Frederick Sanger (1918-2013) がアミノ酸 51 残基からなるインスリンの全一次構造を決めた 1955 年とほぼ重なり⁽¹⁾、蛋白質化学 (protein chemistry) の揺籃期とっていい時代でした。Sanger はこの研究のために 1945 年に DNP 法として知られる N 末端アミノ酸同定法を自ら開発しています。1950 年には早くも DNP 法に替わる、Pehr Edman (1917-1977) による N 末端アミノ酸の逐次分解・同定法が提案され、急速に普及しました⁽²⁾。それから間もない 1952 年に赤堀先生は N 末端の反対側の C 末端アミノ酸同定法としてヒドラジン分解法を発見されました⁽³⁾。その頃、私は大川乾次先生 (後に関西学院大学理学部長) のもとでヒスチジン (His) を含むペプチドの合成法について研究していました。当時、His のイミダゾール環の保護基の開発は、ペプチド化学の優先課題の一つでした。私の修士課程の研究で、His の α -アミノ基とイミダゾール基の両方をベンジルオキシカルボニル化した誘導体がペプチド合成に適していることを見つけ、その論文が *Nature* 誌 (1958 年) に掲載された背景には、国際的な激しい競争があったと思われます⁽⁴⁾。一方、His にアルカリ性で塩化ベンジルオキシカルボニルを過剰

に反応させると、保護されるはずのイミダゾール環が開環 (Bamberger 分解) してしまいます。この反応についてはまた後に触れます。

それから間もない 1960 年に大阪大学蛋白質研究所 (阪大蛋白研) が全国共同利用研究所として発足しました。赤堀先生が初代所長で、私が所属した蛋白質化学構造部門は成田耕造教授が担当されました。成田先生は、当時としては非常に困難であったタカアミラーゼ A の一次構造の決定に取り組んでおられました。残基数の合計が 478 にもなるタカアミラーゼ A の全アミノ酸配列は、1981 年に成田先生が亡くなって間もなく、ようやく解明されました。このような非常に大きな蛋白質の一次構造を決定するには、まずトリプシンやキモトリプシンのような基質特異性の異なるプロテアーゼで適当な長さに断片化してから、生じるペプチドごとに Edman 法を適用しなければなりません。このような限定的分解には、プロテアーゼとともに化学的開裂法 (chemical cleavage) が役に立ちます。中でも Bernhard Witkop (1917-2010) によるメチオニン (Met) のカルボキシル基側でペプチド結合を切断する BrCN 分解は今でも使われることがあります⁽⁵⁾。私はまず、先ほど触れた His の Bamberger 分解で γ -ケトアミノ酸が生じることに注目して、 γ -ケト基とヒドラジンとの反応を経る分子

¹ この原稿は 2013 年 6 月 14 日に行われた第 13 回蛋白質科学会 (鳥取)・ヒストリカルレビューの講演を、使われた 34 枚のスライドと司会をした私の怪しい記憶と少々の思い込みをもとに大幅に圧縮したものである。読者の多くはこの講演を記憶されていることと思う。後日崎山先生に全面改訂していただくことを期待して、しばらくはこの不完全なダイジェスト版でご辛抱願いたい。なお、会員の一部から強い要望のあった崎山先生ご自身による「赤堀四郎先生生誕 100 年に想う」(2001, 蛋白質核酸酵素 51, pp. 273-275) を、本稿の補足として末尾に加えた。転載を許可下さった共立出版株式会社のご厚意に深く感謝する。中沢 隆 (奈良女子大学理学部)

内環化によって、ケトアミノ酸のカルボキシル基側でペプチド結合を切断する方法を試みました。その後、トリプトファン (Trp) のオゾン酸化によって、N'-ホルミルキヌレニン (NFK) やキヌレニン (Kyn) の γ -位にもケト基がより簡単に生じることがわかりました。1962年から約2年半、NIHのWitkop先生のもとでの研究をはさんでTrpの化学修飾の研究を始めました。

蛋白質の化学修飾

ニワトリの卵白リゾチームには6つのTrp残基がありますが、水溶液中でオゾン酸化するとTrp 62が優先的にNFKに変換されると同時に酵素活性(溶菌活性)が元の20%程度に低下します。ところがNFKのホルミル基を選択的に加水分解して得られるKyn 62-リゾチームでは活性が約80%まで回復しました⁽⁶⁾。これは、Kynの σ -アミノフェニルケトン基部分が分子内水素結合によってTrpのインドール環と非常によく似た平面構造をとることを示しています。これが蛋白質の構造と機能の関連についての研究につながりました。例えばKynは波長360 nmの紫外線で励起すると、波長480 nmに蛍光極大を示しますが、蛋白質の内部では周辺の疎水性基や極性基のイオン化状態に大きく依存してこの蛍光特性が変化するため、Kynは蛋白質内部の蛍光プローブとして使えます。また、NFKは $K^{13}CN$ との反応で環化して、その環化生成物を高濃度のLiCl溶液中、 $NaBH_4$ で還元すると、元のインドール環が再生すると同時にC2位が ^{13}C で標識できることがわかりました⁽⁷⁾。普通、ある化学修飾によって酵素が失活すると、蛋白質の構造維持や機能発現に必須なアミノ酸残基が特定できますが、そのアミノ酸残基が天然の酵素の中でどのように振る舞い、どのような役割を果たしていたかを知ることは困難です。ところがTrpの同位体標識やKynへの変換は、側鎖の構造が全くあるいは微妙にしか変わらないので、基質や阻害剤との相互作用や、周辺の環境変化、さらにインドール環自体の動的挙動も適当な方法で追跡することが可能になるという利点があります。このようにして、1970年代後半から数年間、リゾチームのTrp 62や、タカアミ

ラーゼAと同じく麹菌が生産するリボ核酸分解酵素 (RNase T₁) のTrp 59を相手に、酵素の機能発現とTrp残基の役割について、オゾン酸化と ^{13}C NMRや円偏光二色性 (CD) など各種分光法を組み合わせた研究を展開していました⁽⁸⁾。

私たちがTrp残基の化学修飾をもとに蛋白質の構造機能相関の研究に力を入れていた頃、蛋白質の一次構造決定をはじめとするprotein chemistryは冬の時代を迎えていました。Sangerのジデオキシ法のようなDNAの塩基配列決定法の急速な発展により、核酸の塩基配列解析が蛋白質のアミノ酸配列分析より簡単になったためです。1978年には*Nature*誌に「protein chemistryは衰退するのか?」と題する記事が掲載されました⁽⁹⁾。実際、タカアミラーゼAよりも大きな蛋白質の遺伝子解析が次々と進み、蛋白質の化学修飾も遺伝子工学の手法によるsite-directed mutagenesisで置き換えられようとしていました。それでも特定のアミノ酸残基のみを同位体標識するといった化学修飾を使わないとできないこともあるし、蛋白質の翻訳後修飾も遺伝情報からは予測できません。同じ*Nature*誌に「protein chemistryはessentialである」という記事で蛋白質を単なる配列情報でなく、物質として認識する必要性を述べた記事⁽¹⁰⁾が出るまで、約10年かかりました。この間私たちは、リゾチームやRNase T₁から次のテーマとなるプロテアーゼに研究対象を広げつつ、酵素の触媒機構や構造・機能相関の研究を続けていました。

蛋白質の構造と機能 - *Achromobacter protease I* と RNase T₂ -

私たちが手がけた酵素の中でも特に興味深いものは、副島・正木両先生(茨城大学)らによって発見されたLys-Xの結合に特異性をもつ*Achromobacter protease I* (API)です。この酵素はウシ・トリプシン (BT) より活性が一桁高く、蛋白質の一次構造解析に汎用されるようになりました。APIをAPI自身とV8 protease、それにBrCN分解した断片の一次構造を解析した結果、この酵素はアミノ酸268残基からなり、触媒部位のcatalytic

triad が Asp 113、His 57、および Ser 194 で構成されるセリンプロテアーゼであることがわかりました⁽¹¹⁾。API と BT の X 線結晶構造を比べると、API の触媒部位の Asp 113 は His 210 と Trp 169 によって溶媒から遮蔽されていて、API の His 210 と Trp 169 に相当するアミノ酸は BT では Ser 214 と Trp 215 です⁽¹²⁾。X 線結晶構造から、API の Asp 113 と His 210 の間に何らかの相互作用があり、この構造が API の高い酵素活性に関係すると考えられたので、site-directed mutagenesis により His 210 を Ser に変換した変異酵素 (H210S) を調製しました。すると、H210S は Lys に対する基質特異性を保持したままで、活性が至適 pH の 7-9 の領域で天然型 API より数倍も増大するという意外な結果が得られました⁽¹³⁾。その後の研究で、API の活性の調節に His 210 と Asp 113 の静電相互作用が重要な役割を果たしていることは突きとめられたと思いますが、それ以外の His 57 と His 210、His 210 と Trp 169 の相互

作用の解明は今後の課題として残りました。

API の研究と同じ頃、私たちは麹菌が分泌する RNase T₂ のアミノ酸配列を決定し、さらにピロ炭酸ジエチルやヨード酢酸による化学修飾実験から、この酵素の触媒基を His 53 と His 115 と同定しました⁽¹⁴⁾。ところが、同じ麹菌が分泌する RNase T₁ のアミノ酸配列にはこれらに相当する His がありません。そこで、アミノ酸配列の相同性の検索を西川建博士 (蛋白質工学研) に依頼した結果、タバコ属 (*Nicotiana alata*) の花柱に存在する S 遺伝子特異的糖タンパク質に、高い類似性が認められました。面白いことに、私たちが RNase T₂ の触媒基に同定した His 53 と His 115 に相当する 2 つの His 残基もこの S-糖蛋白質で保存されていた上に、その周辺のアミノ酸配列まで一致していたのです。そこで、1989 年の 6 月に、RNase T₂ の触媒基に関する論文⁽¹⁴⁾を投稿してから、問題の S-糖蛋白質の一次構造を研究している Richard Simpson 博士 (Melbourne)



メルボルンの Richard Simpson 邸にて (1992 年 2 月 24 日)。文献 14 の主著者である河田康志・鳥取大学教授 (右から 2 人目)、Richard Simpson (同 2 人目)。写真提供：河田教授

に、「タバコの S-糖蛋白質は RNase なのではないか」と問い合わせました。それから一月も経たないうちに、電話がありました。「RNase 活性があった！」という知らせです。S-RNase は、*N. alata* の自己と非自己の認識に関わる蛋白質だったのです⁽¹⁵⁾。こうして機能が不明であった S-糖蛋白質は S-RNase と呼ぶことになりました。写真は 1992 年に私の家族と Simpson 先生のお宅に伺った時のものです。

同じ品種の植物間では自家受精が妨げられて結実しない遺伝的性質を自家不和合性 (self-incompatibility) といいます。私たちは自家不和合性といった生命現象が、S-RNase の酵素作用として分子レベルで説明できると期待して、次の研究対象にニホンナシの S-RNase を選びました。ナシ (*Pyrus pyrifolia*) は普通自家不和合性のため人工授粉が必要ですが、「おさ二十世紀ナシ」は自家受粉で実をつけられるという面白い性質があります。実際に調べてみると、ナシには主に糖鎖構造の違いによって S₁-RNase、S₂-RNase、・・・のように多くの S-RNase が存在することがわかりました。ところが「おさ二十世紀ナシ」は S-RNase を欠いていました。こうなると自家不和合性に S-RNase が関係することはほぼ間違いなさそうです。一方、S₃-RNase の X 線結晶構造から、RNase T₂ の His 53 と His 115 に相当する触媒基を、それぞれ His 33 と His 88 と推定しました。アミノ酸配列の相同性から見てもこの推定は妥当であったと思われま (図 1)⁽¹⁶⁾。アミノ酸配列の相同性が高く、共通の触媒基が保存されている点を除いて、分子量も至適 pH もあまり共通しない RNase T₂ Family の中で、ある一群の

酵素は、リボソーム RNA のターンオーバーを通じて細胞の恒常性を保つ“housekeeping”の役割や、他の微生物に対する防御の機能をもつとされています⁽¹⁷⁾。S-RNase の機能もまた多様で、RNase T₂ Family の酵素群がこれほど多様な生体機能を示すことは驚くばかりです。S-RNase の多様な機能が自家不和合性にどう関係するか、蛋白質部分の相同性が高い以上、糖鎖構造による機能の違いを明らかにするために、今後は糖鎖構造解析の重要性がより一層高まると予想されます⁽¹⁸⁾。このように多様な役割を担う RNase T₂ Family の酵素は、動物や植物ばかりでなく、細菌、原生動物からウイルスに至るまで広く存在することが知られています⁽¹⁹⁾。これらの多様な生命現象を解明するには、protein chemistry の立場から酵素を物質として認識することが非常に大切だと思います。

これまでの研究を振り返ると、当然のことながら赤堀先生と Witkop 先生の影響を強く感じます。そのほか、私の蛋白質への興味をかき立てた本が「生命の起源と生化学」(オパーリン著、江上不二夫編、岩波新書 1956) で、その中には赤堀先生のポリグリシン説が紹介されています。最後に、蛋白質の研究の歴史を探る貴重な資料として、赤堀先生の「生命の世界 - タンパク質と生命の起源 - (なにわ塾叢書 15, 1984) と、Witkop 先生の 2 編^(5, 20)を挙げておきたいと思います。

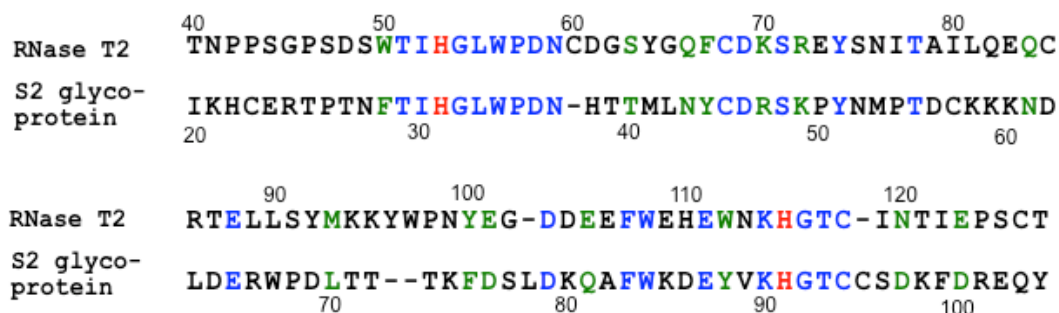


図 1. RNase T₂ と S₂-RNase のアミノ酸配列の比較。触媒基 (H) は RNase T₂ で 53 と 115 位、S₂-RNase では 31 と 91 位。配列を H が重なるように並べると、同一のアミノ酸 (青) と類似するアミノ酸 (緑) が H の近傍に集中して並ぶ。

文 献

1. Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F., and Kitai, R. (1955) "The disulphide bonds of insulin" *Biochem. J.* **60**, 541-556.
2. Edman, P., Högfeltd, E., Sillén, L. G., and Kinell, P.-O. (1950) "Method for determination of the amino acid sequence in peptides" *Acta Chem. Scand.* **4**, 283-293.
3. Akabori, S., Ohno, K., and Narita, K. (1952) "Hydrazinolysis of proteins and peptides: method for the characterization of carboxyl terminal amino acids in proteins" *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **25**, 214-218.
4. Akabori, S., Okawa, K., and Sakiyama, F. (1958) "A new synthesis of histidine peptides" *Nature* **181**, 772-773.
5. Witkop, B. (1984) "11 Organic chemistry in a biomedical research organization" in *NIH: An Account of Research in Its Laboratories and Clinics* (Stetten, D. and Carrigan, W. T. eds.), Academic Press, 193-219.
6. Yamasaki, N., Tsujita, T., Sakiyama, F., and Narita, K. (1976) "Enrichment of enzyme activity on deformylation of 1-NFK-lysozyme" *J. Biochem.* **80**, 409-412.
7. Nakazawa, T., and Sakiyama, F. (1991) "Site-specific ^{13}C -labeling of Trp 62 in hen egg-white lysozyme: preparation and ^{13}C -NMR titration of $[\delta_1\text{-}^{13}\text{C}]\text{Trp 62-lysozyme}$ " *J. Biochem.* **110**, 295-300.
8. Malcolm, A. D. (1978) "The Decline and fall of protein chemistry?" *Nature* **275**, 90-91.
9. 崎山文夫 (1982) "タンパク質の機能発現とトリプトファン残基の役割" *蛋白質 核酸 酵素* **27**, 1626-1637.
10. Treston, A. M., and Mulshine, J. L. (1989) "Peptide structure. Beyond transcriptional events" *Nature* **337**, 406-406.
11. Norioka, S., Ohta, S., Ohara, T., Lim, S.-I., and Sakiyama, F. (1994) "Identification of three catalytic triad constituents and Asp-225 essential for function of lysine-specific serine protease, *Achromobacter* protease I" *J. Biol. Chem.* **269**, 17025-17029.
12. Ohnishi, Y., Yamada, T., Kurihara, K., Tanaka, I., Sakiyama, F., Masaki, T., and Niimura, N. (2013) "Neutron and X-ray crystallographic analysis of *Achromobacter* protease I at pD 8.0: protonation states and hydration structure in the free-form" *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 1642-1647.
13. Shiraki, K., and Sakiyama, F. (2002) "Histidine 210 mutant of a trypsin-type *Achromobacter* protease I shows broad optimum pH range" *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 331-333.
14. Kawata, Y., Sakiyama, F., Hayashi, F., and Kyogoku, Y. (1990) "Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*" *Eur. J. Biochem.* **187**, 255-262.
15. McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., and Clarke, A. E. (1989) "Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases" *Nature* **342**, 955-957.
16. Matsuura, T., Sakai, H., Unno, M., Ida, K., Sato, M., Sakiyama, F., and Norioka, S. (2001) "Crystal structure at 1.5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility" *J. Biol. Chem.* **276**, 45261-45269.
17. MacIntosh, G. (2011) "RNase T2 family: enzymatic properties, functional diversity, and evolution of ancient ribonucleases" in *Ribonucleases* (Nicholson, A. W., ed.), Chapter 4. *Nucleic Acids and Molecular Biology* **26**, 89-114.
18. Ishimizu, T., Mitsukami, Y., Shinkawa, T., Natsuka, S., Hase, S., Miyagi, M., Sakiyama, F., and Norioka, S. (1999) "Presence of asparagine-linked *N*-acetylglucosamine and chitobiose in *Pyrus pyrifolia* S-RNases associated with

- gametophytic self-incompatibility" *Eur. J. Biochem.* **263**, 624-634.
19. Luhtala, N., and Parker, R. (2010) "T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles" *Trends Biochem. Sci.* **35**, 253-259.
20. Witkop, B. (1995) "Stepping stones – building bridges" in *Comprehensive Biochemistry* (Slater, E. C., Rainer, J., and Giorgio, S., eds), Chapter 3: A History of Biochemistry: Selected topics in the history of biochemistry. Personal recollections. Elsevier Science Ltd., 4, **38**, 109-162.
-

崎山文夫先生ご略歴

- 1934年 大阪に生まれる。
- 1956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修士課程修了
- 1960年 大阪大学蛋白質研究所助手
- 1962年 米国 NIH, B. Witkop 研究室にて研究
- 1962年 理学博士 (大阪大学) : 学位論文題目は「ヒステジルペプチドの合成研究」
- 1971年 大阪大学蛋白質研究所助教授
- 1982年 大阪大学蛋白質研究所教授
- 1995年 大阪大学蛋白質研究所所長
- 1997年 大阪大学名誉教授
- 1998年 四天王寺国際仏教大学教授



私のタンパク質科学回顧：RNase T₁の一次構造研究に関わった頃

高橋 健治（たかはし けんじ）

私がタンパク質に関する研究に初めて関与して以来、すでに60年近くが経過した(1)。本稿では、1960年代前後に私が関わったリボヌクレアーゼ T₁（以下 RNase T₁ または T₁）の一次構造に関連する研究を回顧し、我が国内外におけるタンパク質科学研究の発展の歴史の一端を、垣間見る事にさせて戴く。

タンパク質の一次構造研究における最初の輝かしい業績は、1955年、英国のF. Sanger博士らによるウシインシュリン（51残基）の全構造決定である（1958年ノーベル化学賞受賞）(2)。彼等はこの研究に、DNP法によるN末端分析や、ペーパークロマトグラフィー、ろ紙電気泳動などの手法を用いていた。しかし、その後タンパク質の一次構造決定の主流は、分子量一万以上のタンパク質の構造決定に移り、用いる手法もEdman法によるN末端配列分析、イオン交換カラムクロマトグラフィーによるペプチドの分離やアミノ酸分析など、より近代的な手法に取って代わって行った。1950年代後半、米国ではS. Moore、W.H. Steinらによるウスイ臓リボヌクレアーゼA（以下RNase A）に関する研究などが、新規な研究手法の開発も含め、先端を切って進んでいた。しかし、1960年以前には、分子量が一万前後を越えるタンパク質で完全一次構造が決定されたものはまだ無かった。

「タンパク質科学に関連する初めての実験」

私は学部四年の卒業研究では生物化学研究室を選び、そこで初めてタンパク質科学関連の研究として酵素化学実験を経験することになった。指導教授はタンパク質のC末端残基決定法の一つであるヒドラジン分解法の開発でも著名な赤堀四郎先生で、大阪大学を兼任されていた。与えられた研究テーマは「気体水素と人工複合酵素系を用いる α -ケトグルタル酸からのL-グルタミン酸の合成」というものだった。ヒドロゲナーゼ、ジアフォラーゼ（リポ酸デヒドロゲナーゼ）、L-グルタミン酸デ

ヒドロゲナーゼを共役させ、分子状水素とアンモニウムイオンにより α -ケトグルタル酸を還元的にアミノ化してL-グルタミン酸を合成する事が目的だった。この研究テーマはすでに先輩が挑戦して成功しなかったものだったが、その主な原因は用いた酵素の純度にあるように思われた。当時化学教室には低温実験室など無く、地階に粗末な氷冷倉庫があるだけだったので、酵素の調製実験には至極不便だったが、実際、それぞれの酵素を十分精製して用いることにより、所期の目的を初めて達成できた(3)。酵素の精製と活性測定、変性による不安定化などの体験を通して、タンパク質の本体に僅かながら触れられたような気がした。個々の酵素の精製については、関連原著論文を参考にしたが、赤堀四郎編「酵素研究法」（朝倉書店、1955）の部厚な書も大いに役立ったことを覚えている。

「チトクロームcの構造と機能に関する研究」

卒業研究を通じて私の興味は酵素の化学構造と構造・機能相関の研究に次第に傾いて行った。当時赤堀研究室でそのような目的でなされていた研究は唯一「チトクロームcの構造と機能に関する研究」だった。チトクロームcは酵素ではないが機能タンパク質として十分興味をひくものだったから修士課程のテーマとしてこれを選ぶことにした。チトクロームcの研究は二年先輩の千谷晃一氏が中心となって進められていた。私の最初の実験は「チトクロームcのグアニジン化」というもので、この塩基性タンパク質が持つ多数のアミノ基が活

性発現に関与するか否かを、アミノ基の特異的化學修飾の一つであるグアニジン化により調べるといったものだった。この場合も、修飾試薬の *o*-メチルイソ尿素を純粹に合成して用いることがきめ手となった。結果は Lys のアミノ基は活性発現に必須ではないというものだった。当時は機能タンパク質中の特定残基が必ずしも必須でないことを明瞭に示した例はほとんど知られていない時代だったので、結構目新しい成果だったと思う。

修士一年の初夏に東京と京都で国際酵素化学会議が開催され、チトクローム *c* の構造と機能に関する研究発表の協同研究者としてこれに参加できた(4)。私にとっては初めての国際学会であり、そのインパクトは絶大だった。当時、生化学研究の主流は酵素化学にあり、多数の錚々たる生化学者が世界中から参加し学会は壯観を極めた。これに関連して同年秋に東京で “Symposium on Chemical Structure of Proteins” が開催され、一次構造関係では、赤堀教授ら(阪大)、佐竹一夫教授ら(都立大)がそれぞれ、タカアミラーゼ A およびヘモグロビンの N-末端配列について、安藤鋭郎教授(東大)らがクルペインおよびサルミンのトリプシンペプチドについて、また C. Fromageot 教授(パリ大)が招待講演で卵白リゾチームのトリプシンペプチドの構造について講演した。

その後、私の研究はチトクローム *c* の化学構造(一次構造)決定を目指して進み出した。当時我が国では、東大の安藤研究室でニシン精子核のポリペプチド性タンパク質クルペインの一次構造研究が進められていたが、分子量一万前後以上のタンパク質の全化学構造を目指した本格的な研究はまだ例がなかった。従来の構造分析は Sanger 以来の DNP 法やペーパークロマトグラフィー、ろ紙電気泳動などを主力としていたが、分子量一万を超えるタンパク質の構造決定には、より定量的な手法の導入が求められていた。1950年代の後半より欧米における一次構造決定法の主流は、RNase A の研究に代表されるカラムクロマトグラフィーを主力とする方法に取って代わりつつあった。したがって、我が国でもそのための基本技術を導入する事が、まず先決課題であった。定量的アミノ酸分析法や

ペプチド断片の分画法、Edman 法によるアミノ酸配列分析法など、基本的手法の殆どを新たに導入する必要がある、一つ一つがわが国においては初めての導入だった。それだけに当時は、タンパク質のアミノ酸組成や N 末端アミノ酸残基を決めただけでも論文が書けるほどの時代だった。このようにして、カラムクロマトグラフィーによるアミノ酸分析やペプチドの分画が可能となり、ウマ心筋およびパン酵母のチトクローム *c* について研究を進めた。当時はコピー機もパソコンも無い時代で、RNase A の構造決定に関する原著論文の要所を大学ノートにびっしりと写し取って参照したことを覚えている。これは、論文内容を細部まで理解するのに役立つだけでなく、参照した論文が優れた文章で書かれていたので、図らずも英文科学論文の作製力の向上にも大いに役立ってくれた。タンパク質についての理解を深めるため、研究室内では H. Neurath, K. Bailey 編 “The Proteins” (Academic Press, 1953)などを毎週輪講した事を覚えている。

「チトクローム *c* から RNase T₁へ」

修士二年時、赤堀教授が兼任を辞められ、江上不二夫教授が着任された時点でチトクローム *c* グループはほぼ発展的に解散し、千谷氏はやがて新設された阪大蛋白質研究所(初代所長赤堀教授)の化学構造部門に助教授として転出した。その後のチトクローム *c* の一次構造研究は成田耕造教授、千谷氏らにより進められ、1963年にパン酵母チトクローム *c* の一次構造が決定された。これは我が国における最初の分子量一万を超える蛋白質の一次構造決定となった。

一方、私は江上教授を指導教官として新しいテーマ「RNase T₁の構造と機能に関する研究」に取り組むことになった。この酵素は1957年、江上教授らによりタカジアスターゼ (*Aspergillus oryzae* 由来)中に発見された RNA 分解酵素である。従来よく研究されていた RNase A (ピリミジン特異的)とは塩基特異性が異なる(グアニン特異的)ことから、RNA の構造決定において特異的分解試薬として役

立つ可能性がある点、また酵素の構造・機能関連の研究対象として興味深い点から当時国の内外で注目を集めていた。既に一次構造決定の予備的研究を進めていたチトクローム c にいささか後ろ髪を引かれつつも、これこそ研究すべき本物の酵素だと思った。

T₁の研究をさらに進めるためには、まず純粋な酵素が必要だった。従来の古典的精製法は不十分で、新たな精製法の導入が不可欠だった。当時は T₁のような酸性タンパク質の精製に有効なイオン交換クロマトグラフィー法は皆無だった。しかし、幸運にも 1956 年に米国で開発された DEAE-セルロースを用いる陰イオン交換クロマトグラフィー法が有効である事が判明した。この方法の導入により、ついに本酵素を初めてタンパク質として完全精製することができた(5)。

精製酵素について、光酸化の実験から、本酵素が活性発現に必須な His 残基を持つこと、8 M 尿素存在下で 2-メルカプトエタノールにより 2 個の S-S 結合を還元、切断し、酵素を変性、失活させた後、尿素を除去し、空気酸化することにより正しいコンホメーションを再構築させ、活性を回復させられることなどの知見が得られた(6)。これらの実験は、RNase A についての実験に範を得たものであり、両酵素がこれらの点では類似することを示した興味深い結果だった。

しかし、より精確な結論を得るためには、T₁の完全一次構造を決定し、その上に立って分析を進める必要があるという信念から、私は一次構造決定に挑戦する決意をした。ここでは幸い、チトクローム c の研究で得た技術が役に立った。当時一次構造決定には現在と比べて少なくとも百倍程度以上の試料が必要だった。そこで、5 グラムの酵素の精製をめざし、数ヶ月をかけて、数十キログラムのタカジアスターゼ原末より、最終的に約 3 グラムの完全精製酵素を得た。この精製酵素の一部は米国の R. W. Holley 博士に送られ、Ala-tRNA の全塩基配列決定(1968 年ノーベル生理学・医学賞受賞)に不可欠な分解酵素として役立つことにもなった。余談ではあるが、T₁という優れた武器に恵まれながら、tRNA の構造を世界に先駆けて我が国で決めら

れなかった主因は、tRNA の精製に遅れをとったためであり、極めて遺憾であった。

一次構造決定には博士課程二年頃からとりかかった。この年(1960年)、S-S 結合の位置も含めた RNase A の完全一次構造が C. H. W. Hirs, Moore, Stein らによって発表された(7)。これは、分子量一万を越えるタンパク質として、また酵素として初めての構造決定であった(1972年、Moore と Stein はノーベル化学賞受賞)。私は三年の後半からは、籍を江上研に残して新設された理学部三号館の安藤研に席を移した。当時はクルペインの構造研究を進めていた安藤研に、幸運にも D. H. Spackman, Stein, Moore によって開発された Beckman-Spinco 社の自動アミノ酸分析機が日本で初めて導入されて間もない頃だった。使用希望が多いため私の分析はほとんどが深夜か休日に回ることになったが、これを有効に利用することができた。その結果、二年余で部分一次構造に到達し、大学院を修了した。研究方法は主に Moore-Stein らの方法に準拠したが、必要に応じ高圧ろ紙電気泳動やペーパークロマトなども併用した。当時は Edman 法での PTH アミノ酸の同定が難しかったので、Edman 分解後の残存ペプチド鎖の N 末端残基を DNP 法で順次決定する「DNP-Edman 法」を考案し、これは T₁の N 末端配列決定に有効に利用できた。しかしこの方法は、後年 B. S. Hartley(1970)によって開発されたダンシル-Edman 法に比べ感度が低かったため、一般に普及するには至らなかった。なお、当時は微生物のタンパク質の一次構造決定例が無く、微生物酵素の場合にはおそらく多様性が著しいために、特定のアミノ酸配列を決めることは難しいだろうと考える人さえいる状況だった。

「RNase T₁の全一次構造決定と国内外の状況」

日本学術振興会奨励研究生として一年、同学科安藤研究室の助手として一年余を T₁の構造研究に費やした。またこの間に、F. Sanger 博士、S. Moore 博士、H. Fraenkel-Conrat 博士などが研究室に来訪され、仕事の話をする機会が持てたのは大変刺激になった。研究が本格的に進んだのは学振の奨

励研究生になった前後からだったと思う。T₁の場合、酵素の原料が日本産のタカジアスターゼであり、自分の手で完全精製も行ったわけで、当面試料については完全独走態勢にあったことが最も有利な点であった。T₁は後年三共株式会社から市販されたが、初めから市販されていたら別の展開になっていた可能性も強い。

全構造決定のためには、各種のプロテアーゼ分解で生じたペプチドを分別精製し、それらの構造決定を行い、それらの結果を組み合わせることで全構造を推定するというのが常套手段であった。RNase A と比べ、不利な点が二つあった。第一点はプロテアーゼ分解に通常最初に用いられるプロテアーゼで、特異性が最も厳密だったトリプシンがあまり役に立たなかったことである。これは T₁ が酸性タンパクであり、トリプシンが作用する Lys および Arg を各一残基しか含まず、分解点が少ないためにトリプシン処理で大型ペプチド片が不溶化してしまい、その後の分析を難しくしたためである。第二点はそれほど大きな問題ではないが T₁ がトリプトファンを一残基含み、これが S-S 結合切断の常法であった過蟻酸酸化では酸化分解し、同定困難だったことである。

このためまず過蟻酸酸化 T₁ を用い、そのトリプシン分解で得られたペプチドも利用しつつ、主にキモトリプシン分解で得られるペプチドを詳しく分析した。また、これに加えて未変性 T₁ のペプシン、パパインおよびサチライシンによる個別分解も併用した。各酵素分解で得られたペプチド混合物は Dowex 50 X-2 のカラム (0.9 x 150 cm) を用い、ピリジン・酢酸緩衝液のグラジエント溶出により分画した。カラムからの溶離液はヤジロベエ式の日本式フラクションコレクター (東洋濾紙社製) を用いて集め、アルカリ分解有無下でニンヒドリン比色分析した。各ピーク分画について高圧ろ紙電気泳動とペーパークロマトグラフィーにより純度を検査し、複数のペプチドを含む分画はさらにこれらの方法により構成ペプチドを分離精製した。各精製ペプチドの配列分析は、そのままあるいはさらにプロテアーゼによる小断片化後、アミノ酸分析を利用する subtractive Edman 法を主に用い、

さらにアミノペプチダーゼによる N 末端配列分析およびカルボキシペプチダーゼ A とヒドラジン分解による C 末端域配列分析を併用して全配列を決定していった。

これらのペプチド分画とアミノ酸配列分析法は基本的には Moore-Stein らの方法に準拠するものであったが、一種類の酵素分解物のカラムクロマトグラフィーに十日間近くかかり、分画を集めた試験管も千本近くに達した。HPLC もまともなフラクションコレクターも無い時代で、日本式の非電動型、回転式フラクションコレクターが故障なく十日間も連続して回り続けるのを調整、監視するのも大変な仕事だった。夜間コレクターの横に添い寝して、時々目を覚ましてはその正常な作動を確認したことを覚えている。ポリエチレンラップもパラフィルムも、またボルテックス・ミキサーも無い時代で、ニンヒドリン反応をする際、反応前に試料液と試薬液を混ぜるために試験管に直接親指で蓋をして振り混ぜたため、数時間後に親指とそのまわりが青紫色に染め上がり、その後一週間ほど色が消えなかったこともしばしばだった。

T₁ の全構造はキモトリプシンペプチドとトリプシンペプチドの分析結果から決定されたが、別の方法によっても確認されることが望ましいと考え、特異性の異なるペプシン、パパインおよびサチライシンによる分解で得られるペプチドの分析も行った。この結果、キモトリプシンペプチドとペプシンペプチドおよび一個のパパインペプチドの分析結果だけからも同一の完全アミノ酸配列が得られることが示された。またサチライシンペプチドの配列も矛盾がなかった。これらの結果は最終決定配列の正当性を強く支持するものであった。また、S-S 結合の位置は、サチライシンペプチドの分析から決定できた。

このようにして、昭和 40 年 (1965 年) T₁ の完全構造に到達することができた (8)。最初の本格的な構造決定実験として T₁ 約 200mg を過蟻酸酸化したのが、大学院博士課程三年生の二月 (昭和 37 年) であったから、それから三年余のことだった。T₁ の全構造決定の論文はまず速報として短くまとめ、J. Biol. Chem. に投稿した。T₁ の構造に関する中間報

告は、蛋白質構造討論会（第10回、1959年 - 第15回、1964年）や日本生化学会大会で行い、それぞれの予講集に概略が載っている。なお、蛋白質構造討論会は、日本化学会主催で、タンパク質化学を中心としたタンパク質の構造と機能に関する討論会（年一回開催）である。2000年（第51回）まで続き、翌年日本蛋白工学会、蛋白質立体構造構築原理研究会などと共に母体となり、日本蛋白質科学会が新たな学会として創設された。我が国の蛋白質科学研究発展への蛋白質構造討論会の寄与は極めて大きい。

この結果、T₁は104個のアミノ酸残基を含む一本のポリペプチド鎖からなり、2個のS-S結合を持つタンパク質であることが明らかになった。また、アミノ酸配列はRNase Aとは全く異なり、両者は進化上無関係なタンパク質であることが判明した。酵素としては、すでにRNase A（124残基、Hirs, Moore, Stein, 1960年）のS-S結合の位置を含む全一次構造が報告されていたので、これに次いでニワトリ卵白リゾチーム（129残基、Canfield, Jollèsら、1965年）と並ぶことになった。因に、1960年から1965年までの間に完全一次構造が報告されたタンパク質（分子量約一万以上）としては、他にタバコモザイクウイルスコートタンパク質、ヒトヘモグロビン（ α 鎖+ β 鎖）、チトクロームc（ウマ、ブタ、*P. aeruginosa*、パン酵母）、マッコウクジラミオグロビンがある(9)。これらの構造決定の殆どは米国を中心とした欧米諸国でなされたものであり、我が国で決定されたものは、パン酵母チトクロームc（104残基、1963）とRNase T₁のみである。なお、タバコモザイクウイルスコートタンパクの構造決定には、次田 皓氏（阪大）が留学先でのH. Fraenkel-Conratらとの協同研究において重要な寄与をしている。従って、1960-1965年間に完全構造が報告された分子量約一万以上のタンパク質は、ヘモグロビンあるいはチトクロームcなどをそれぞれまとめて1種として数えると7種類（異なる生物種由来の同種タンパク質を別々に数えると10種類）となる。この数はその後加速度的に増加し、1982年までには約200種（同種タンパク質を別々に数えると1100種類余）に達している(10)。また、

この間我が国では安藤教授、岩井浩一、石井信一氏（東大）らによりタンパク性ポリペプチドであるクルペインZ（31残基、1962）が構造決定されている。これは、我が国で構造決定された最初のタンパク性ポリペプチドである。また、1965年までにヒトチトクロームc（E. Smith 研で松原 央氏（阪大）が構造決定に寄与）、ウシトリプシノゲンおよびキモトリプシノゲンなどの構造も大部分決まっており、ウマヘモグロビン α 鎖（G. Braunitzer 研で松田源治氏（長崎大）が構造決定に寄与）の構造も決まっていた。1965年にM. O. Dayhoffにより”Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 1”（National Biomedical Research Foundation）が出版され、1978年迄続刊された。タンパク質のアミノ酸配列に関する最初のデータベースとも言うべきものであり、後のGenBankなどのデータベースのモデルとなった。

「化学修飾法によるT₁の活性部位の研究」

1965年より三年間、米国ロックフェラー大学のMoore-Stein 研に留学し、T₁の活性部位の研究をさらに続けることになった。当時、同大にはR. B. Merrifield（1984年、RNase Aの固相法化学合成などによりノーベル化学賞受賞）、G. M. Edelman（1972年、抗体分子の構造解明によりノーベル生理学・医学賞受賞）、L. C. Craig（向流分配法の創始者）などを筆頭に多数の著名なタンパク質科学関連の研究者がいた。また、G. Blobel（1999年、タンパク質の細胞内局在化シグナルの発見でノーベル生理学・医学賞受賞）はまだ大学院生だった。Moore-Stein 研ではすでに、A. M. Crestfieldらのヨード酢酸による化学修飾実験（His残基の特異的カルボキシメチル化による失活）から、RNase Aの活性部位残基としてHis12とHis119が推定されていた。当時、化学修飾法はX線結晶構造解析とともに、最も有力な活性部位残基の特定法であった。一方、T₁も同様な条件下でヨード酢酸により不活性化することが日本での予備実験で分かっていたが、反応するアミノ酸残基は不明であった。

T₁でのヨード酢酸の反応部位を明らかにするた

めに、 ^{14}C 標識試薬を用いたところ、反応は 1:1 のモル比で起こり、反応産物は酸加水分解で完全に分解して ^{14}C 標識グリコール酸を生じることが判明した。この結果から、当時想定外であったが、諸般の証拠から反応はカルボキシル基との間に起こっている可能性が最も高いと推定された。そこで、カルボキシメチル化 T_1 をプロテアーゼ分解し、カルボキシメチル化ペプチド断片を得て、反応残基を同定することにした。断片化とその後のクロマトの際に、 ^{14}C 標識カルボキシメチル基が容易にペプチドからはずれてしまう事実が悩まされながら、最終的には比較的安定な限定分解/単離条件を見出し、ついに修飾された残基の同定ができた。何とこのアミノ酸は Glu58 であり、反応産物は γ -カルボキシメチルグルタミン酸だった (11)。タンパク質中のカルボキシル基にヨード酢酸が作用してこれをエステル化(カルボキシメチル化)した例は初めてであった。この結果を得るのに ^{14}C 標識ヨード酢酸を使ったことは決定的に重要だった。当時東大の生物化学教室には液体シンチレーションカウンターが一台も無く、放射性実験は不可能だった。

ニワトリ卵白リゾチームについては、D. Phillips らが 1965 年に X 線結晶構造解析による立体構造研究から Glu35 と Asp52 を触媒残基として推定していたが、タンパク分子中の特定位置にある残基のカルボキシル基が活性発現に必須な基として化学修飾により同定された例は T_1 が初めてである。当時、Moore-Stein 研をはじめ他のいくつかの研究グループによってブタペプシンならびに類縁酵素の活性部位残基の同定が進められており、特定の Asp 残基(後にブタペプシンでは Asp32 と判明)が触媒残基の一つである証拠が得られつつあった。現在、触媒基としてカルボキシル基を持つ酵素(12)は極めて多数知られているが、その草分け時代の仕事ということになる。

T_1 についてのもう一つ興味深い点は、この酵素が酸性タンパク質であり、塩基性アミノ酸としては Lys 1 個、His 3 個、Arg 1 個のみを含むことである。初期の実験から Lys は活性発現に関与せず、His は全 3 個のうちいずれか 1, 2 個が重要であることが推定されていた。しかし、Arg についてはま

ったくその役割は不明だった。当時、タンパク質中の特定の Arg 残基の役割を明らかにした研究は皆無だった。その理由の一つは中性付近の温和な pH 下で Arg 残基を特異的に化学修飾出来る試薬がほとんど無かったからである。そこで、このような試薬を探し、まず T_1 に応用することをめざした。

当時、グリオキサールのようなジカルボニル化合物が Arg のグアニジン基と特異性は低い反応することが、柴田和雄氏(東工大)らの研究により知られていた。これにヒントを得て、多数のジカルボニル化合物の反応性と特異性を、タンパク質としては RNase A を用いて、比較解析した結果、フェニルグリオキサール (PGO) が目的に最も合う化合物であるとの結論を得た (13)。Arg の PGO 誘導体は、通常の酸加水分解では変化はするものの、遊離の Arg を生じないので、Arg の修飾度は酸加水分解後のアミノ酸分析で、Arg の減少として定量できる。また、PGO と Arg は 2:1 のモル比で反応することが判った。

後にこの試薬による T_1 の修飾を行った結果、Arg77 が特異的に修飾されることにより活性が失われることを示すことができた (14)。タンパク分子中の特定の Arg 残基が酵素活性発現に関与することを化学修飾法によって示したのはこれが最初の例である。リン酸化合物など負の荷電を持つ化合物は生体内に非常に多く、それと特異的に結合するタンパク質や酵素がしばしばその結合部位に特定の Arg 残基を持つ例は珍しくない、以後、この試薬は、同時期に米国で研究されていたジアセチル (2,3-ブタンジオン) とともに、多数のタンパク質や酵素に応用され、機能残基としての Arg 残基の同定に広く役立っている。

その後、活性部位 His 残基の同定の方向に仕事を進めた。まず、光酸化の実験で、3 個の His の中で、His 1, 2 個が活性発現に関与することが示唆された。そして、これらの結果を総合して、1970 年に T_1 の推定反応機構を提案した (15)。これは、Glu58 と His が一般塩基、一般酸として関与するという機構である。更にその後の光酸化およびヨードアセトアミドによるアルキル化の実験から、活性部位に His40 と His92 が関与する事が示唆された

(16-18)。

また、 T_1 と基質との相互作用のメカニズムを解明するために、J. P. Hummel と W. J. Dreyer によって開発されたゲルろ過法を用いて、多数のヌクレオチド、ヌクレオシドおよびそれらの誘導体等との結合を測定した。この結果、グアニン塩基のN1位、2-アミノ基、6-オキソ基、7-アミノ基およびリン酸基(特に3'位)が酵素との結合に関与することが推定された(19, 20)。しかし、酵素側のグループについてはグアニン部分との特異的結合に関与するアミノ酸残基を推定するところまでは至らなかった。なお、この分野では、今堀和友、大島泰郎氏(東大)らなども差スペクトル法を用い、有意な結果を得ている。

後に、 T_1 と類縁酵素 U_1 および N_1 の一次構造比較から一箇所 T_1 の配列中に問題があることに気付いた。そこで、 T_1 の全配列を再検討したところ、71-73位のPro-Gly-SerはGly-Ser-Proが正しいと結論された。残念ながら誌上で修正した。1960年代に化学的方法で構造決定されたものには、RNase Aを含めその後の訂正がしばしばあったものである。この間、U. Heinemann, W. Saenger (1982)が T_1 -2'-GMP複合体のX線結晶構造解析に成功し、活性部位の立体構造が明らかになった(21)。彼らの結果は、私が先に提案した反応機構(15)を支持するものであった。また、Tyr42-Tyr45の領域が多数の水素結合を介してグアニン部位との特異的結合に関与し、Tyr45がグアニンとstackingすることが示された。ゲルろ過法で先に推定したグアニン側の推定水素結合部位はこれらの結果とよく一致した。後年、部位特異的突然変異導入体の解析から、反応機構におけるGlu58, His40, His92の役割については種々議論されることになるが、Glu58の触媒残基としての重要性に変わりはない(12)。なお、立体構造解析を目的とした T_1 の結晶化は早くから三井幸雄氏ら(東大)により試みられていたが、成功せず、我が国で最初に達成出来なかったことは実に残念だった。

「RNase T_1 からプロテアーゼおよび関連タンパク質へ」

一方、1970年代以降、私の興味は次第にプロテアーゼおよびその関連タンパク質に移って行った(12)。Moore-Stein研でペプシン等のプロテアーゼに関する研究を見聞きしたことも引き金となったが、また、生理的機能という観点からもより興味をひかれて行った。その後、京大・霊長類研、次いで東大・理学部、最後は東京薬科大・生命科学部で延べ三十年余にわたり研究に従事し、多くのタンパク質や酵素の構造や機能、構造・機能相関の研究に携わった(1)。特に力を入れたのは、ペプシノゲン/ペプシンと類縁カルボキシルペプチダーゼおよびグルタチオン S-トランスフェラーゼなどである。この間、一次構造研究はプロテインシーケンサーやHPLCの導入などで迅速化し、また分子生物学の目覚ましい発展とともに、一次構造研究もDNAレベルでなされる事が多くなり、化学修飾による研究も部位特異的変異法に取って代わっていった。残念ながら、この間の研究については紙面の制限のため割愛させて戴く。

1960年前後、タンパク質の一次構造研究の草創期に参画できた幸運に感謝している。

文 献

1. Takahashi, K. (2015) ResearchGate (https://www.researchgate.net/profile/Kenji_Takahashi7).
2. 高橋健治 (2014) 生化学 86, No. 1, i-ii.
3. Takahashi, K. and Kondo, Y. (1959) Bull. Agr. Chem. Soc Jpn, 23, 249-252.
4. Minakami, S., Titani, K., Ishikura, H. and Takahashi, K. (1958) Proc. Internatl. Symp. Enz. Chem. Tokyo & Kyoto 1957, 211-215.
5. Takahashi, K. (1961) J. Biochem. 49, 1-8.
6. Egami, F., Takahashi, K. and Uchida, T. (1964) Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. Vol. 3, pp. 59-101.
7. 高橋健治 (1972) 現代化学 12月号 8-17.
8. Takahashi, K. (1965) J. Biol. Chem. 240, 4117-4119.
9. Dayhoff, M.O. ed. (1972) Atlas of Protein Sequence and Structure 1972, Vol. 5, National Biomedical Research Foundation.
10. 高橋健治 (1982) 蛋白質核酸酵素 27, 698-713.
11. Takahashi, K., Stein, W.H. and Moore, S. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4682-4690.
12. Takahashi, K. (2013) Proc. Japan Acad. Ser B 89, 201-225.
13. Takahashi, K. (1968) J. Biol. Chem. 243, 6171-6179.
14. Takahashi, K. (1970) J. Biochem. 68, 659-664.
15. Takahashi, K. (1970) J. Biochem. 67, 833-839.
16. Takahashi, K. (1971) J. Biochem. 69, 331-338.
17. Takahashi, K. (1973) J. Biochem. 74, 1279-1282.
18. Takahashi, K. (1976) J. Biochem. 80, 1267-1275.
19. Takahashi, K. (1972) J. Biochem. 72, 1469-1481.
20. Takahashi, K. and Moore, S. (1982) The Enzymes, 3rd ed., Vol. XV, Part B, pp. 435-468.
21. Heinemann, U. and Saenger, W. (1982) Nature 200, 27-31.

高橋健治先生ご略歴：

- 1934年 長野県に生まれる。
- 1957年 東京大学理学部化学科卒業
- 1962年 東京大学大学院理学系研究科生物化学専門課程博士課程修了，理学博士
- 1962年 日本学術振興会奨励研究生
- 1963年 東京大学理学部生物化学科助手
- 1965年 ロックフェラー大学博士研究員（～1968）
- 1973年 東京大学理学部生物化学科講師
- 1974年 京都大学霊長類研究所生化学研究部門教授
- 1984年 東京大学理学部生物化学科教授
- 1993年 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻教授
- 1995年 東京大学名誉教授
- 1995年 東京薬科大学生命科学部教授
- 2005年 東京薬科大学名誉教授
- 2005年 首都大学東京客員教授

