

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 については立ち入った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、精製を色々試みましたが、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、フォスホ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O₂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O₂と拮抗する現象を解析しP450がステロイド水酸化反応でO₂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O₂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、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。当時はへむに 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

