

## 私の蛋白質研究と蛋白質科学会

桑島 邦博 (くわじま くにひろ)

### 1. 蛋白質の変性研究

1970年の春に、私は、北海道大学・理学部高分子学科の4年生として、須貝新太郎教授の研究室(生体高分子学講座)に配属となった。その当時は、分子論の立場に立った、球状蛋白質の可逆変性の物理化学的研究が盛んになりつつあった。1968年に公表された、Duke大学 Charles Tanford の有名な総説 "Protein Denaturation" は [1]、研究室の4年生ゼミの教材であった(今から思うと、いきなり、ずいぶん専門的な総説を読まされたものである)。球状蛋白質の可逆変性の研究は、1930年代の M.L. Anson 等の研究までさかのぼるが [2]、その後、W. Kauzmann によって疎水結合の概念が導入され [3]、Tanford によって転移の定量的解析法が確立された [1, 4]。1970年代から80年代になると、X線結晶解析による蛋白質の立体構造が次々と明らかにされ、蛋白質変性の物理化学的研究も、分子構造に基づいた詳細な議論がなされるようになっていた。

Tanford 等の一連の研究で取り上げられた、卵白リゾチームは、蛋白質変性研究の代表的なモデル蛋白質であり、日本では、大阪大学・理学部の濱口浩三教授等の研究がよく知られていた [5]。丁度その頃は、1963年に米国 NIH の R.E. Canfield とフランス・パリの J. Jollés 等が、それぞれ独立に、リゾチームのアミノ酸配列を決定し、1965年に英国王立科学研究所の D.C. Phillips 等が、その 2 Å 分解能の X線結晶構造解析による三次元立体構造を報告した後であった [6]。リゾチームは、ミオグロビンやヘモグロビンに次いで立体構造の解かれた球状蛋白質であり、酵素蛋白質としては初めてであった。Tanford 等のリゾチーム変性反応の解析結果は、転移が協同的であり、天然状態と変性状態のみの二状態転移(転移領域で、天然状態と変性状態の二状態のみが存在する)で表されることを示してい

た。

1967年に Tanford と同じ Duke 大学の K. Brew 等は、牛乳の乳漿蛋白質である  $\alpha$ ラクトアルブミンのアミノ酸配列が卵白リゾチームのものと非常によく似ていることを報告した。1970年に公表された、 $\alpha$ ラクトアルブミンの全アミノ酸配列によれば、123個のアミノ酸残基中、実に49箇所ではリゾチームの配列と同一であり(同一性40%) [7]、それは、ヒト・ヘモグロビンの  $\alpha$ 鎖と  $\beta$ 鎖間の同一性(43%)に匹敵する。この、 $\alpha$ ラクトアルブミンとリゾチーム間の高い相同性は、当時の蛋白質科学の驚くべき発見であった。北大の須貝研究室も、この話で持ちきりであって、須貝教授と新田勝利助手(当時)が中心となって、 $\alpha$ ラクトアルブミンとリゾチームの変性反応の比較研究が始められていた。私は、学部4年の時に研究室に配属となり、このプロジェクトに加わることが出来たのは幸運であった。しかし、 $\alpha$ ラクトアルブミンの塩酸グアニジンによる変性反応の解析結果は意外なものであった。変性転移の解析から得られる、水中での安定化自由エネルギーと転移の協同性のパラメータは、いずれも、リゾチームに対して知られた値の半分程度にしかならない。特に、後者のパラメータは変性転移に伴う、蛋白質分子の平均露出度(average degree of exposure)の変化に対応しているので、上の結果は、 $\alpha$ ラクトアルブミンの天然立体構造がリゾチームのものとはずいぶん異なるという、容易には受け入れがたい結論を導くことになる。当時、私は、界面移動電気泳動法を用いて、 $\alpha$ ラクトアルブミンの酸変性を調べ、酸変性状態がコンパクトな形状を持った不完全変性状態であることを見つけていたので、上の矛盾は、 $\alpha$ ラクトアルブミンの塩酸グアニジン変性が、二状態転移ではなく、酸変性状態のような中間状態を伴っているとすれ

ば、説明できると考えた。しかし、この考えは、当初は研究室内でも余り受け入れられなかった。

大学院博士課程に進学後、1974年頃より、 $\alpha$ ラクトアルブミンの塩酸グアニジン変性の中間体を検出する研究に取りかかった。その当時、研究室の米山助教授が科研費で導入した、日本分光の J-20 型円二色性 (CD) 分散計をお借りして、塩酸グアニジン変性をペプチド領域 (222 nm) と芳香族領域 (270 nm と 296 nm) の CD を用いて追跡した。その結果、後に、モルテン・グロビュール状態として知られることになった、 $\alpha$ ラクトアルブミンの変性中間体の存在が明らかとなった [8]。したがって、この当時のわれわれの関心は、 $\alpha$ ラクトアルブミンとリゾチームとの間の変性挙動の違いが、どのような分子機構により説明されるかにあったのである。

$\alpha$ ラクトアルブミンの塩酸グアニジン変性の研究結果は、*J. Mol. Biol.*誌に投稿し採択されたが [8]、その時の論文のエディターが Stanford 大の Buzz Baldwin であった。Buzz は、われわれの観測した変性中間体と蛋白質のフォールディング中間体との関係を取り上げて、蛋白質のフォールディング問題を論ずるべきだと指摘した。これが、私が蛋白質のフォールディング研究を始めることとなったきっかけである。

## 2. 蛋白質のフォールディング中間体の探索

1958年に、J. Kendrew が X線結晶解析により、初めて、球状蛋白質 (ミオグロビン) の原子構造を明らかにし [9]、F.H.C. Crick が分子生物学のセントラルドグマを提唱すると [10]、蛋白質科学の分野においても、新たな研究の流れが生まれた。蛋白質のこのような特異的な天然三次元構造は、いかにして、その一次元的なアミノ酸配列 (= 遺伝情報) から構築されるのかという問題、すなわち、蛋白質のフォールディング問題である。米国 NIH の C.B. Anfinsen は、そのよく知られた、リボヌクレアーゼ A の巻き戻り実験の結果に基づいて、蛋白質フォールディングの熱力学仮説を提唱した [11, 12]。蛋白質の天然三次元構造は溶媒を含めた全系の最小自由エネルギー構造であり、したがって、蛋白質は

アミノ酸配列が決まれば、一意的かつ見かけ上自発的に、天然構造に折り畳まれるというわけである。この主張が展開された、1963年の彼等の論文のタイトルは、"The Genetic Control of Tertiary Protein Structure"である [11]。しかし、熱力学仮説のみでは蛋白質のフォールディング問題を解くことは出来ない。1968年に、Levinthal は、蛋白質ポリペプチド鎖の取り得る可能なコンフォメーションは超天文学的な数に及ぶので、天然の蛋白質はその内の極々一部を経験しながら巻き戻ることを示し (Levinthal Paradox)、蛋白質にはそのアミノ酸配列によって規定されたフォールディング経路があると主張した [13]。この Levinthal の主張が契機となり、蛋白質のフォールディング経路上にある、フォールディング中間体を実験的に検出し特徴付ける研究が数多くなされるようになった。中間体の構造が明らかになれば、フォールディング分子機構が明らかになると考えられたのである。

### (1) $\alpha$ ラクトアルブミンのフォールディングモデル

このような流れの中で、私は、前述の  $\alpha$ ラクトアルブミンの中間体を伴う三状態変性の実験結果に基づいて、この蛋白質のフォールディングモデルを提唱し、これが *J. Mol. Biol.*に掲載された [14]。1977年のことである。これは、私にとって、最も思い入れのある仕事の一つであり、私の博士の学位論文となったものである。このモデルに対する評価は、いろいろあり、Stanford の Buzz Baldwin や当時ソ連科学アカデミー蛋白質研究所の Oleg B. Ptitsyn は高く評価してくれた。一方、当時、英国 Cambridge の Thomas E. Creighton は、その論文の中で私の上記の論文を引用し、以下のように評している [15] : *Even if a third conformation state, other than native and fully unfolded, were to be detected in equilibrium populations, its significance for the folding transition would not be obvious, as this can only be deduced from kinetic studies. In spite of this, there is an unfortunate tendency for a presumptive third conformational state detected at intermediate denaturant concentrations to be considered to have intermediate conformational properties and to be an intermediate on*

*the folding pathway*. その当時は、蛋白質の二状態転移の概念は十分確立されたと考え、フォールディング経路上に中間体が存在しても、熱力学的に安定な状態としては観測されないはずだと考える研究者も多かった。

1978年に、京都で、第6回国際生物物理学会が開催されたが、私のポスター発表の場所に Oleg Ptitsyn が訪れてきて、いろいろ質問されたのを今でも鮮明に覚えている。この京都の国際生物物理学会の後、幾つかのサテライトミーティングが開催され、幸い、私は二つのミーティングで発表することが出来た。一つは、その当時の上司であった須貝教授と名大・理の今井宣久先生がオーガナイズされた、「生体高分子系のダイナミクス」に関するシンポジウムであり、他の一つは、京大・化研の大井龍夫教授と、当時、九大・理の郷信広先生がオーガナイズされた、「球状蛋白質の折れたたみの機構」に関するシンポジウムであった。これらのシンポジウムでの発表は、私にとって、最初の英語での口頭発表であった。シンポジウムで、Buzz Baldwin、Oleg Ptitsyn、Tom Creighton 等の研究者と知り合いになれたことは、私にとって大変大きな収穫であった。

この当時、日本で、蛋白質フォールディングの研究に携わっていたグループは、私の知る限り、前出の阪大・理の濱口浩三、京大・化研の大井龍夫、九大・理の郷信広に加え、広大・総合科学の内山敬康、東大・理の和田昭允、東大・理の猪飼篤、早大・理工・斎藤信彦などの先生方のグループがあったが、フォールディング研究はまだ黎明期であった。

1979年に、広大の内山教授が、フォールディング研究の振興を目的として、科研費・総合研究(A)「蛋白質の構造形成」を実施され、その班員に加えて頂いたことは大変光栄であり、励みになったことを記憶している。東大の和田先生とソ連の Oleg Ptitsyn 等が、イタリアの国際会議のディスカッションの中で、 $\alpha$ ラクトアルブミンの変性中間体のように、側鎖の規則構造はこわれているが、天然様二次構造を持ったコンパクトな状態を、球状蛋白質に普遍的な中間構造状態であると考え、モルテン・グロビュール状態と名付けたのも丁度この頃であ

り、1982年の6月のことと報告されている [16]。

## (2) ストップフローCD

1980年前後の、私の研究上、最大の関心事は、いかにして、 $\alpha$ ラクトアルブミンの変性中間体がフォールディング経路上にあるはずの、過渡的な速度論的中间体と同一であることを証明するかであった。理論的には、平衡中間体の検出に用いられたCDスペクトルの高速時分割測定を行い、巻き戻り反応の速度論的な中间体を検出すればよい。しかし、その当時、ペプチド領域の測定に用いるCD装置(日本分光 J-20型)の時定数は0.5秒程度であり、このような高速測定には向いていなかった。幸い、その当時、われわれは、ある意味偶然にも、 $\alpha$ ラクトアルブミンがカルシウム結合蛋白質であり、カルシウムイオンのはずれたアポ状態では、巻き戻り速度が著しく減速することを見出していた [17]。さらに、温度4°Cでは、カルシウムのついたホロ状態でも、また相同蛋白質である卵白リゾチームでも、時定数0.5秒の装置で巻き戻り速度過程を追跡可能であることが分かった。そこで、その当時、須貝研の大学院生であった、平岡芳樹君(現、慶応大)や池口雅道君(現、創価大・教授)等と共に、CD装置による、 $\alpha$ ラクトアルブミンとリゾチームの巻き戻りの速度論的測定を行った [18, 19]。結果は予想通りであり、変性中间体は巻き戻りの初期に形成される過渡的中间体と同一であった。さらに、平衡論的には二状態変性を示すリゾチームにおいても、巻き戻り反応の初期には、 $\alpha$ ラクトアルブミンの中间体と同様の過渡的中间体が観測された。私は、このような中间体の存在が、球状蛋白質のフォールディングに普遍的な現象ではないかと考えた。この考えは、Oleg Ptitsyn 等が主張していた、モルテン・グロビュール説とよく符合するものであった。

その後、須貝研に、時定数が1ミリ秒以下の高速CD装置(日本分光 J-500型)が入り、われわれは、(株)ユニソクの長村俊彦社長の協力を得て、高速CD測定のためのストップフロー装置を試作した。この装置を使って、シトクロムc、 $\beta$ ラクトグロブリン、パルブアルブミン、黄色ブドウ球菌(黄

ブ菌)ヌクレアーゼ、ジヒドロ葉酸還元酵素など、さまざまな球状蛋白質の巻き戻り反応を追跡し、いずれも、反応初期に二次構造の回復した中間体が観測されることがわかった [20]。

### (3) 水素交換標識法

水素交換標識法は、蛋白質のフォールディング中間体を検出し特徴付ける大変優れた方法である。私は、1980年夏より二年間、StanfordのBuzz Baldwinの研究室で、NIH奨励研究員(博士研究員)として、リボヌクレアーゼのフォールディング機構に関わる研究に従事した。その頃、Buzzの研究室では、Franz X. SchmidやPeter S. Kim等が、トリチウム交換標識を用いて、リボヌクレアーゼAの巻き戻り中間体の検出に関する成果を挙げていた [21]。Buzzは、これを、水素-重水素交換標識と二次元NMRを用いて行えば、画期的な成果が得られると考えていた。しかし、当時は、まだ、蛋白質の二次元NMR測定の黎明期であり、リボヌクレアーゼAのNMRシグナルの同定はなされていなかった。私は、リボヌクレアーゼSのSペプチド部分の水素-重水素交換反応解析を、NMRを用いて行った [22]。

1988年に、Jayant UdgaonkarとBuzz Baldwinが、二次元NMR(COSY)スペクトル中の各アミドプロトンのクロスピークを同定し、水素-重水素交換パルス標識法を用いて、リボヌクレアーゼAの巻き戻り中間体の構造を明らかとした [23]。この論文が公表された*Nature*誌の同じ号に、Heiner RoderとS. Walter Englander等が、同様の水素交換パルス標識二次元NMR法を用いて、シトクロムcの巻き戻り中間体について報告している [24]。水素交換パルス標識二次元NMR法は、フォールディング経路上に蓄積する中間体の構造を、アミノ酸残基レベルの分解能で、スナップショットを取るように観測できる画期的な方法である。現在では、 $\alpha$ ラクトアルブミンやリゾチームも含め、多くの球状蛋白質のフォールディング中間体が、この方法、あるいは、マス・スペクトル解析を利用した同様の水素交換標識

法により、明らかにされている [20]。1980年代終わりから90年代初めにかけて、このように中間体の構造が次々と明らかにされてゆくことより、最終的には、蛋白質のフォールディング問題も解けるのではないかと期待されたこともある。

しかし、話は、それほど簡単ではなかった。理論・シミュレーション研究から、フォールディングのファネル・モデルが提唱され [25]、実験的研究からも、中間体のない二状態フォールディングする蛋白質の例が、次々、明らかとなった [26]。そのため、今まで、フォールディング中間体といわれていたものは、実は、間違ったフォールディングをした状態、あるいは、アグリゲーションを見ていたのではないかと主張する研究者も現れた。この議論は、現在もなお続いているが、最近では、実験的に観測された中間体の大半はフォールディング経路上のプロダクティブな中間体であったということで収まりつつある [27-29]。

### (4) X線溶液散乱

X線溶液散乱法は、溶液中の蛋白質の形状、特にその広がりやコンパクトさを知ることが出来る有効な実験手段である。私は、木下彦氏(理研)が代表をされた、1984-85年度科研費・総合研究(A)「生命現象素過程の時間軸上への展開」などを通して、当時、自治医大にいらした木原裕氏が、ストップフローX線散乱による蛋白質構造転移の研究をしていることを知り、これがきっかけとなって、木原さんと共同研究を進めることとなった。しかし、この共同研究が本格化したのは、私が東大・理・物理教室に移った1992年以降であり、特に、1993年春から三年間実施された、ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム(HFSP)のプロジェクトの中においてであった。このプロジェクトは、当時ロシア・蛋白研のOleg Ptitsynのグループ、米国・ニューヨーク大のNeville Kallenbach等のグループと日本のグループ(桑島(東大)、木原(自治医大)、雨宮(高エネ研)、木村(獨協医大)、池口(創価大))と間の国際共同プロジェクトであった。プロジェクトのタイトルは、"Role of the Molten Globule State in the Folding of Globular

Proteins"であり、フォールディング初期に形成されるモルテン・グロビュール状態をストップフローX線散乱法によって解析することが一つの柱であった。Ptitsyn グループから、Gennady Semisotnov氏が、しばしば来日し、われわれと一緒に、つくばの高エネ研・放射光実験施設でX線散乱を用いた蛋白質フォールディングの共同実験が行われ、その成果が幾つかの論文として纏められた [30, 31]。ストップフローX線散乱を用いた、蛋白質フォールディングに関する共同研究は、HFSP プロジェクト終了後も続けられ、特に、東大・工に移られた雨宮慶幸氏のところの伊藤和輝さんと、私のところで助手をしていた新井宗仁君（現、東大・総合文化）が中心となって、CCD を使った二次元X線検出器の実験を立ち上げた。この検出器を使って、 $\alpha$ ラクトアルブミンの巻き戻りを追跡し、巻き戻りの初期状態が分子サイズの面から見てもモルテン・グロビュールと同一であることが最終的に証明された [32]。また、フォールディングの律速過程が脱水和過程であることも明らかとなった。ところで、最近では、二次元X線検出器としては、CCD を

使ったものより、より高感度で時間分解能も優れた、PILATUS ピクセル検出器が使われるようになったそうであり、今は昔の感がする。

### 3. 蛋白質工学の幕開けと蛋白質科学への展開

1980 年代後半になると、遺伝子組み換え技術を利用した、蛋白質工学が始まり、蛋白質研究の新たな潮流が生まれた。日本でも、第三セクター方式の蛋白質工学研究所が1986年春に設立され、日本蛋白質学会の設立は、私の記憶に間違いなければ、1988年であった。一方、欧文学術雑誌の *Protein Engineering* の創刊が1986年10月、*Proteins* の創刊が1986年1月、*Protein Science* の創刊が1992年1月であり、学会 The Protein Society の最初のシンポジウムは1985年に米国の San Diego で開催された。このように、次々と、蛋白質関連の新しい学術雑誌や組織が出来たのは、蛋白質工学という、その当時の全く新しい技術と学問領域が生まれたことによる。この頃、私は、北大・理の須貝研の助手であったが、蛋白質工学を自分の研究



写真1 HFSP プロジェクトのミーティングで、東大・理・物理の桑島研を訪問された Oleg Ptitsyn 教授等と。1995年12月。左より Valentina Bychkova、桑島邦博、Oleg B. Ptitsyn、伊倉貞吉。

に取り入れるために、遺伝子組み換え技術の習得が深刻な課題となっていた。何しろ、大腸菌の培養など、何も経験のないことばかりであった。幸い、1985年春に、東大と筑波大に次いで、北大に遺伝子実験施設が学内共同教育研究施設として設置された。私は、この施設で実施された遺伝子組み換え実験の講習会に参加し、遺伝子組み換え技術を習得することが出来た。

1983年に、David Shortleが、*Gene*誌に黄ブ菌ヌクレアーゼ遺伝子のクローニングと全塩基配列決定の報告をした [33]。黄ブ菌ヌクレアーゼは、NIHのAnfinsenとTaniuchi等の研究で知られるように、フォールディング研究のよいモデル蛋白質である [12]。そこで、私は、黄ブ菌 Foggi 株 (ATCC27735) を取り寄せ、遺伝子実験施設のベンチの一部をお借りして、北大の学部4年生や修士の学生と一緒に、ヌクレアーゼ遺伝子のクローニングと大腸菌による発現の実験に取り組んだ。この当時は、プラスミド調製のアルカリ SDS 法の溶液等も全て自分で作成し、変異導入のためのプライマーも、ファルマシア製の Gene Assembler という DNA 合成機で合成し、自分で精製して使用した。今とは隔世の感がある。このとき作成したヌクレアーゼ発現系は、その後、私の研究の一つの柱となった [34]。皮肉なことに、David Shortle も、その後、蛋白質のフォールディング研究に転向し、安定性や協同性の変化した、さまざまなヌクレアーゼ変異体に関する研究で知られている [35] (あるいは、最初から、そのつもりで遺伝子クローニングしたのかも知れない)。

### (1) 蛋白質科学の新たな展開

蛋白質工学の勃興は、蛋白質の物理化学的な研究にも革命的な変化をもたらすものであった。1990年頃のStanfordのBuzz Baldwinの研究室は、私がいた1980年当時と比べると、研究室人員などの規模が倍以上に大きくなって、蛋白質研究の熱意にあふれていた。一方、日本においては、蛋白質工学の応用面への活用は熱心に議論されていたが、物理化学的な基礎研究は、以前に比べ、むしろ縮小

傾向にあるというのが、当時 (1990年頃)、私が抱いていた印象だった。例えば、米国に比べ、日本の国立大学の、蛋白質研究の研究設備等の充実度においても、その差がますます開きつつあったと思われる。何がきっかけであったか憶えていないが、このようなことを、当時、阪大・蛋白研にいらした油谷克英氏と何度か議論したことがある。油谷さんが、1991年に科研費・総合研究 (B) 「タンパク質立体構造の構築原理を解明するための基礎研究」を実施して、当時、京大・理の郷信広教授を領域代表とする、重点領域研究「タンパク質立体構造の構築原理」の領域申請と採択を目指すこととなり、私がお手伝いをさせて頂くことになった。この総合研究 (B) のメンバーは、油谷克英 (代表者、阪大・蛋白研)、郷信広 (京大・理)、大島泰郎 (東工大・生命理工)、阿久津秀雄 (横浜国大・工)、月原富武 (徳島大・工)、桑島邦博 (北大・理) の6名であった。総合研究 (B) では、主にアンケートによる学術調査「タンパク質の構造・物性・機能研究の現状と将来—何が問題で何をすべきか」を実施した。その後、総合研究 (B) による準備研究をさらに行って、1995年度より4年間、重点領域研究「タンパク質立体構造の構築原理」(領域代表・郷信広 (京大・理)) が実施された。この重点領域研究が終了後も、領域に参加したメンバーにより、蛋白質立体構造構築原理研究会が作られ、この会が、その後の蛋白質科学会の設立に向けた準備にも関わった。この当時の重点領域研究は、班員数と予算の、いずれにおいても、現在の新学術領域研究の二倍以上はあった。文科省の予算がトップダウンのプロジェクトに大きく割かれるようになり、最近では、以前に比べ基礎研究への予算が縮小しているのである。

上の重点領域研究の準備を進める中で、大変印象に残ったこととして、当時、名大・理にいらした野口俊之氏が、*Nature* 誌の News and Views に掲載された、Cyrus Chothia の「蛋白質ファミリー数 (主鎖フォールドの数) はたかだか千種類のオーダーである」とする説を紹介し [36]、大議論になったことがあった。郷さんが、それが本当なら、大変重要だといって興奮気味だったのを覚えている。そ

の当時（1992年）のPDBに登録された蛋白質立体構造の数は、まだ、数百のオーダーで、フォールドの数は百程度であった。現在、PDBに登録された蛋白質立体構造の数は十万を超えたが、SCOPにより定義されるフォールド数は、2008年に1393になって以来、頭打ちとなって増えていない。Chothiaの予測は的中したのである。

蛋白質フォールディング研究にとっても蛋白質工学の手法はなくてはならないものとなったが、ストップフロー法等の実験では数100 mg以上の蛋白質試料を必要とするため、当初は、大腸菌による発現量が十分ではなかった。この問題は、1990年に米国BrookhavenのF.W. Studier等が、バクテ

リオファージT7のプロモータ/T7 RNAポリメラーゼとT7リゾチームを利用した発現系（pETシステム）を確立したことによって解決した[37]。私は、1991年夏に、当時、MITにいたPeter Kimの研究室を訪問したとき、この情報を入手し、早速、Studierからライセンスを頂いて、pETシステムによる発現系を用いることとした（現在、pETシステムはNovagen/Merckが販売している）。1992年に、私は、北大より東大・理の物理教室に異動となり、生物物理の研究室を主宰することとなった。当時、研究室の助手であった伊倉貞吉君（現、東京医科歯科大）と一緒に、黄ブ菌ヌクレアーゼのpETシステムによる発現系の構築を行った[38]。また、その



THE 24th TANIGUCHI INTERNATIONAL SYMPOSIUM

写真2 第24回谷口国際シンポジウム集合写真。1999年3月。

1列目左から、油谷克英、Terrence Oas, Zheng-yu Peng, James Hofrichter, Heiner Roder, Jayant Udgaonkar, 桑島邦博、Valerie Daggett, Eugene Shakhnovich, Mrs. Shakhnovich。2列目左から、依田隆夫、新井宗仁、後藤祐児、片岡幹雄、郷通子、高橋卓也、Vincent Forge, 曾田邦嗣、赤坂一之、榎互介。3列目左から、福田宏幸、中尾正治、伊野部智由、榎尾匡、中村春木、巖倉正寛、池口満徳、杉田有治、星野大、寺田智樹。4列目左から、高田彰二、瀬川新一、高橋聡、田村厚夫、笹井理生、木寺詔紀、水谷泰久、岡本祐幸、池口雅道。

当時、東大・工にいらした、熊谷泉氏からヤギ  $\alpha$  ラクトアルブミンの遺伝子を譲り受け、 $\alpha$  ラクトアルブミンの pET システムによる発現系の構築も行った。このようにして、桑島研究室における、蛋白質工学に基づく研究の基盤が出来上がった。

蛋白質フォールディング研究への蛋白質工学の活用として、最も大きなインパクト与えたのは、英国 Cambridge の Alan R. Fersht 等によって始められた、 $\Phi$  値解析である。 $\Phi$  値解析により、フォールディング経路上の中間体のみならず、通常の方法では観測不可能な、遷移状態の立体構造をアミノ酸残基レベルの分解能で解き明かすことが出来るようになった。 $\Phi$  値解析が最初に報告されたのは、バルナーゼに対してであり、1989 年であった [39]。その後、いろいろな蛋白質に対して  $\Phi$  値解析を用いた実験的研究が行われ、現在では、60 種以上の球状蛋白質について、それらのフォールディング遷移状態の立体構造が明らかとされている。1990 年代後半になると、水素交換標識法や  $\Phi$  値解析法により実験的に解き明かされた、中間体や遷移状態の立体構造を、分子動力学などの分子シミュレーションを用いて再現する試みも数多くなされるようになった。われわれも、ヤギ  $\alpha$  ラクトアルブミンの  $\Phi$  値解析を行い、横浜市立大の木寺詔紀教授と池口満徳氏との共同研究で、分子動力学による遷移状態の構造解析を行った [40]。

1999 年の 3 月 3 日-7 日の 5 日間、その当時、上総の木更津市に新設された、かずさアカデミアパークにて、第 24 回谷口国際シンポジウムが開催され、私がお世話人を務めさせて頂いた (写真 2)。このシンポジウムは、生物物理学分野における最後の谷口国際シンポジウムとなり、シンポジウムのタイトルは "Old and new views of protein folding" であった [41]。その頃は、蛋白質のフォールディング研究が花咲いていた時期でもあり、Levinthal の主張に基づく「経路モデル (Old view)」とエネルギー地形理論に基づく「ファネル・モデル (New view)」との間で活発な議論がなされていた。丁度このようなタイミングで、このシンポジウムを開催することができ、海外からは、Valerie Daggett (Univ. Washington)、James Hofrichter

(NIH)、Terry Oas (Duke Univ.)、Zheng-yu Peng (Univ. Connecticut)、Heiner Roder (Fox Chase Inst.)、Eugene Shakhnovich (Harvard Univ.)、Jayant Udgaonkar (NCBS, India) の 7 名が招待講演者として参加した。Hofrichter 氏以外は、私よりも若手であった。日本からも、30 代から 40 代の研究者を中心に参加頂き、全演題数は 33 題であった。写真 2 は、その時の集合写真であるが、当時若手だった参加者の多くが、現在、蛋白質フォールディング研究の第一線で活躍している。

## (2) 蛋白質学会の設立に向けて

重点領域研究「タンパク質立体構造の構築原理」は 1999 年度で終了したが、この頃になると、ヒト・ゲノム計画が完了を迎えつつあり、ポスト・ゲノムの重要な研究領域として、蛋白質科学がますます注目されるようになった。日本には、その当時、日本蛋白質学会があったが、日本の蛋白質科学全体を代表するような規模ではなかった。また、蛋白質科学の分野では、1950 年頃より、年に一回の割合で、タンパク質構造討論会が実施されていた。この討論会は、講演内容を投稿すると審査され、採択されたものだけが討論会で口頭発表出来るという厳しさがあり、纏まった話をじっくり聞けるという良さもあった。しかし、タンパク質構造討論会は学会組織ではなく、毎回、討論会当日の昼食時に、蛋白質科学分野の主だったメンバーが集まって開催される昼食会で、次年度の開催場所と世話人を決めるという形で運営されていた。

そこで、日本における蛋白質科学の纏まった組織を作ることを目指して、「蛋白質科学関係の学会組織を検討する委員会」が設けられ、1998 年より、日本蛋白質学会とタンパク質構造討論会の合同年会在が開催されるようになった。1998 年と 99 年に、それぞれ、長岡と横浜で蛋白質合同年会在が開かれ、2000 年に三浦謹一郎先生 (学習院大・理) が世話人となって、学習院創立 100 周年記念会館にて、蛋白質合同年会・東京 2000 が開催された。この 2000 年の年会は、蛋白質立体構造構築原理研究会のワークショップとの合同ともなり、「第 51 回タンパク



質構造討論会+第12回日本蛋白工学会年会+第7回タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ)のように、三つのグループの合同年会であった。どのような経緯であったかはもう憶えていないが、有坂文雄氏(東工大・生命理工)と私が、合同年会のプログラム作りで、三浦先生のお手伝いをさせて頂くこととなり、学習院の三浦先生のお部屋に何度か集まったことがある。2000年6月7日から10日の4日間、合同年会が開催され、年会参加者は約530名であった。最後に、合同年会を実施した三グループは、2001年に創立予定の日本蛋白質科学会に合流することがアナウンスされ、新学会となる日本蛋白質科学会への参加呼びかけがなされた。

以上のような経緯で2000年に入ってから、「蛋白質科学関係の学会組織を検討する委員会」が「新学会準備委員会」に切り替わり、三浦先生が委員会の世話人を務められた。2000年8月5日より9日まで、米国 San Diego で 14th Protein Society Symposium が開かれ、有坂さんと私がポスター発表する予定であった。そこで、三浦先生とご相談の上、新学会が出来たときに、Protein Society とスムーズな関係が結ばれることを目的として、この機会に、Protein Society 執行部メンバーと有坂、桑島が会談を持つこととなり、2000年8月8日 Symposium 会場で、Chris Dobson (Protein Society 会長)、Bill DeGrado (Protein Society 次期会長)、Robert Newburgh (Protein Society 専属事務局長)、有坂、桑島の5名が会談を行った。Protein Society の Dobson 会長からは、以下の4つの提案があった。(1) Protein Society 執行部メンバー (Council member) 候補者を2名推薦して欲しい。選挙により、その中から1名を選ぶ。(2) Protein Science 誌に日本から上限5名として Editorial Advisory Board のメンバーを出して欲しい。(3) 次年の 15th Protein Society Symposium (Philadelphia) の招待講演者として、日本から2名のスピーカーを推薦した欲しい。(4) 日本、極東アジアの研究者達と Protein Society との間の国際的なジョイント・ミーティングの開催を提案するが、その際、どのような形のものにするかは日本側の主体的な判断に任せる。

一方、日本側からは、三浦先生からのメッセージをお渡しすると共に、2001年の日本蛋白質科学会第1回年会実行委員会の方から、Dobson 会長を記念講演の講演者として招待したい旨の手紙が届けられていた。

なお、上の Dobson 会長のジョイント・ミーティングの提案に関しては、これ以前にも Protein Society 側から提案があったが、Protein Society の財政事情がよくなかったこと、日本蛋白工学会が日本の蛋白質科学全体を必ずしも代表しているわけではなかったこと等のために実現されていなかった。

### (3) 日本蛋白質科学会の設立とその後

2001年4月1日に日本蛋白質科学会が設立され、2001年6月1日-3日、大阪大学にて、月原富武教授(阪大・蛋白研)を年会会長として、第1回日本蛋白質科学会年会が開催された。予定されていた、Chris Dobson 教授 (Protein Society 会長) の記念講演はご家族の急病のため中止となったが、代わりに、副会長の Nick Pace 教授 (Texas A&M Univ.) が Protein Society を代表して来日し、蛋白質立体構造の安定性に関する記念講演を行った。4月の学会発足以来、新学会準備委員会委員が学会理事を務める仮執行部体制であったが、2001年8月に日本蛋白質科学会会員による役員選挙が行われ、当時、プロテオーム研究所の三浦謹一郎先生が初代学会長に選ばれた。

2000年8月の Dobson 氏らとの会談で提案された、Protein Society 執行部メンバーとしては、選挙によって、当時、生物分子工学研究所の森川耿右氏が選ばれた。この執行部メンバーは、その後も、日本から1名継続的に選出されており、森川氏の後、私、桑島が2004年から2007年まで務め、その後、阪大・蛋白研の後藤祐児教授に、次いで、同じく阪大・蛋白研の中村春木教授に、そして、現在は、東大・工の野地博行教授に引き継がれている。東アジア地区の蛋白質科学の国際的なジョイント・ミーティングも提案されていたが、これは、2004年に実現した。当時、東京薬科大学の大島泰郎先生を会議会長として、第1回環太平洋蛋白質科学国際会

議 (The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science (PRICPS)) が、2004年4月14日-18日の5日間、横浜の「みなとみらい」にあるパシフィコ横浜にて開催された。この会議は、日本学術会議と日本蛋白質科学会の共催として、また、Protein Society からサポートを受ける形で開催され、第4回日本蛋白質科学会年會を兼ねていた。国内から731名、国外から178名の参加があり、演題数は、ポスター発表471題、口頭発表118件(プレナリー講演3件を含む)であった。會議の諮問委員會は、日本のみならず、米国、カナダ、オーストラリア、中国、インド、韓国、台湾などのアジア環太

平洋地区からの委員で構成され、會期中の委員會で、今後4年おきにPRICPSの會議を開催すること、第2回の會議は2008年にオーストラリアで、第3回は中国で開催されることが決められた。

第2回のPRICPSの國際會議は、2008年6月22日-28日にオーストラリアのケアンズ(Cairns)で4th Asian and Oceanian Human Proteome Organisation Congressとのジョイントという形で開催された。第2回PRICPSの會議會期中の委員會で、PRICPSの名称をAsia Pacific Protein Association (APPA)に変更することが決められ、國際會議の開催頻度も4年毎ではなく3年毎に短縮された。阪大・蛋白研の後



International Conference on DYNAMICS and REGULATION of the STRESS RESPONSE  
March 9 - 12, 1998 Kyoto, Japan

写真3 International Conference on Dynamics and Regulation of the Stress Responseの集合写真。1998年3月、京都。最前列の左から5人目が、由良隆先生、6人目が、永田和宏教授。前より2列目左から2人目が、現、蛋白質科学會會長の遠藤斗志也教授(名大・理)。最後列左から3人目が、第5回日本蛋白質科学會年會會長の三原勝芳教授(九大・医)で、後ろから2列目の右端が、第8回年會會長の田中啓二氏(東京都臨床医学研)、左から4人目が、筆者、桑島である。

藤祐見教授が中心となって APPA の組織の取り纏めが行われて、現在、日本に加えて、オーストラリア、中国、台湾、インド、インドネシア、韓国、マレーシア、ニュージーランド、フィリピン、シンガポール、タイ、ベトナムの計 13 カ国/地域の組織が APPA に参加している。第 3 回 APPA 国際会議は 2011 年 5 月 6 日-9 日に中国の上海で開催され、第 4 回 APPA 国際会議は 2014 年 5 月 17 日-20 日に韓国の済州で開催された。第 5 回の会議は 2017 年に再び中国で開催される予定である。このように、APPA は日本蛋白質科学会と密接な関係にあるため、APPA のオフィスは日本蛋白質科学会の下に置かれることになっている。

#### 4. おわりに

以上、私の蛋白質研究について、蛋白質科学会の

設立に関係する部分を中心に書かせて頂いた。既に予定の長さを大幅に超過しているのので、これ以外の部分については、極簡潔に纏め、最後に、蛋白質科学会への期待と要望を述べて本稿を終えたい。

ストレス蛋白質や分子シャペロンの構造と機能に関する研究は、蛋白質のフォールディング問題を細胞レベル以上の生命現象と結びつける重要な研究分野を構成している。私は、大腸菌のシャペロニンを対象として、分子シャペロンの作用機構に関する研究も行ってきたが、東大・理に移った 1992 年以降は、研究全体の半分位を占めるようになり、この研究分野の幾つかの重点領域研究/特定領域研究などにも加えて頂き、いろいろな方々から学ぶことが出来た。この分野は、日本でも大変活発な研究分野であり、研究者の多くが日本蛋白質科学会会員である。写真 3 は、1998 年に、当時、HSP 研究所所長をされていた由良隆先生と京大・再生医

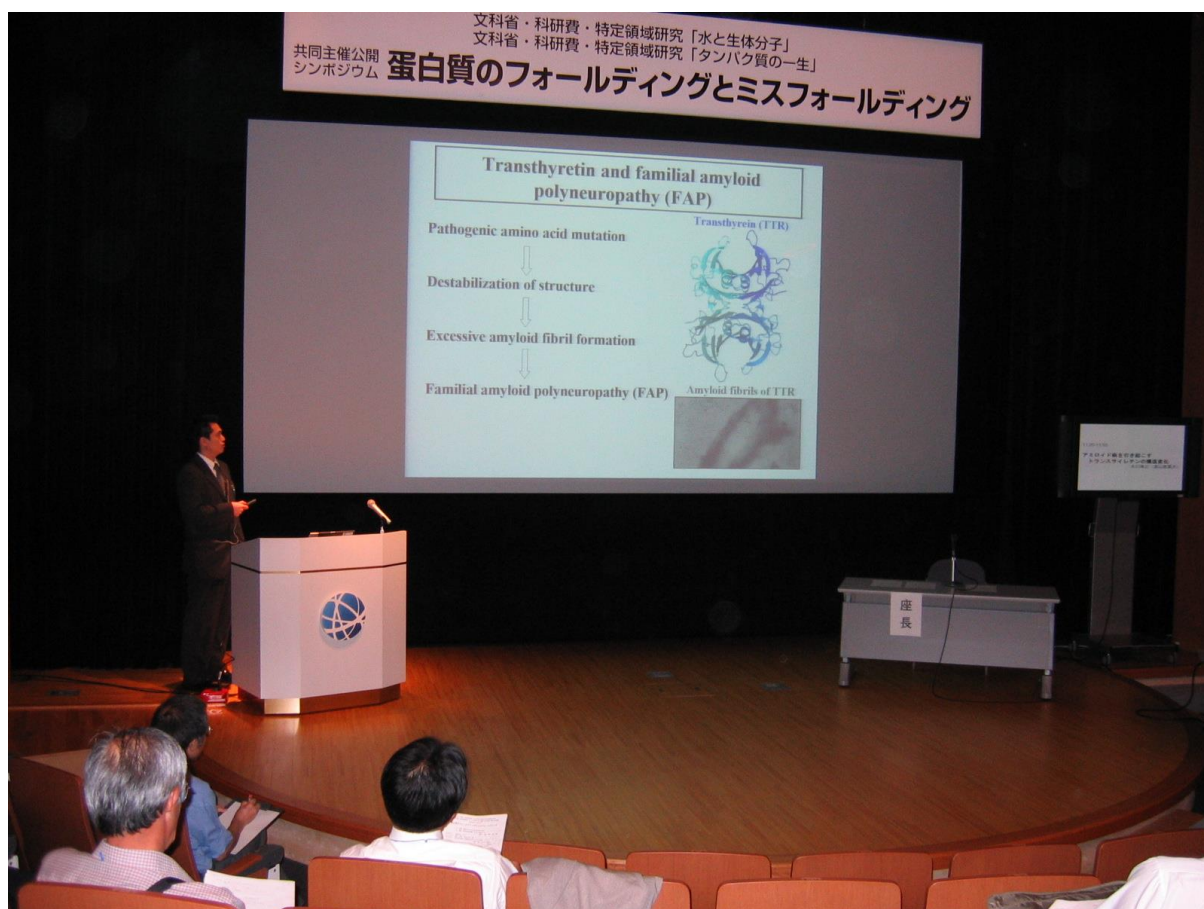


写真 4 特定領域研究「水と生体分子」と特定領域研究「タンパク質の一生」の共同主催公開シンポジウムの一コマ。2004 年 9 月、日本科学未来館。写真中の講演者は、水口峰之氏（富山医科薬科大）。

研の永田和宏教授がオーガナイズされた、*International Conference on Dynamics and Regulation of the Stress Response* の集合写真である。その当時のストレス蛋白質/分子シャペロン研究の主要なメンバーが一堂に会した。

特定領域研究「水と生体分子が織り成す生命現象の化学」が2003年度から07年度まで5年間実施された。これは、阪大・蛋白研の後藤祐児教授、分子研の平田文男教授、奈良先端大の片岡幹雄教授、京大・理の寺嶋正秀教授等のご協力を得て、私が領域代表を務めさせて頂いた。この特定領域研究の目標は、蛋白質などの生体分子の生物物理学分野と水・水溶液の物理化学分野の研究の融合によって、新しい研究領域を作り上げることであった。この研究領域には、研究代表者、研究分担者、班友を含む全体を通して、約180名の研究者が参加し、その多くが蛋白質学会の会員である。研究成果の一部が"Water and Biomolecules—Physical Chemistry of Life Phenomena"と題する本としてSpringer社から出版されている[42]。この特定領域研究の二年目、2004年9月に、吉田賢右教授（東工大・資源研）が領域代表の特定領域研究「タンパク質の一生」との共同主催公開シンポジウムを日本科学未来館で開催した。参加者数は177名であった。写真4はその時のスナップ写真である。

私は、2007年1月に岡崎統合バイオサイエンスセンター/分子科学研究所に異動となった。分子研も、現在では、35位ある研究グループの内3割近くが、何らかの形で、蛋白質などの生体分子に関わる研究を行っている。分子研では、920MHzの超高磁場NMR装置や超高感度熱分析装置などを用いた新しい研究を幾つか実施することが出来た[43-45]。

蛋白質学会は、蛋白質というモノを軸として、物理、化学から、分子生物学、生物工学、農学、薬学、医学に至るまでの幅広い分野の研究者が集まることの出来る、非常なヘテロな研究者集団であることが大きな特徴である。このような研究者集団のヘテロさを維持し、異分野の研究者との間の研究交流を進められることが、今後とも蛋白質学会の発展にとって重要であると考えます。私は、

2010年春から12年春まで二年間、蛋白質学会会長を務めさせて頂いたが、一つやり残したことは、学会年会発表の英文化である。現在、日本の大きな大学はどこも、国際競争力の強化を目指して、大学自身の国際化や海外の大学との連携を一層進めなくてはならない状況におかれている。今後、日本の大学の研究室における留学生の数や外国人研究員の数は、ますます、増えて行くのであり、これらの留学生や外国人研究員に対しても学会は開かれていなくてはならない。学会年会発表の英文化について、今一度、真面目な検討を始めて頂きたいと思う次第である。

## 文献

1. Tanford, C. (1968) *Adv. Protein Chem.* 23, 121-282. (レビュー)
2. Anson, M.L. (1945) *Adv. Protein Chem.* 2, 361-386. (レビュー)
3. Kauzmann, W. (1959) *Adv. Protein Chem.* 14, 1-63. (レビュー)
4. Tanford, C. (1970) *Adv. Protein Chem.* 24, 1-95. (レビュー)
5. 浜口浩三 (1976) 蛋白質機能の分子論 東京大学出版会 東京 (改訂版が1990年に学会事務センターより出版されている)。(書籍)
6. Blake, C.C., Koenig, D.F., Mair, G.A., North, A.C., Phillips, D.C. and Sarma, V.R. (1965) *Nature* 206, 757-761. (オリジナル論文)
7. Brew, K., Castellino, F.J., Vanaman, T.C. and Hill, R.L. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 4570-4582. (オリジナル論文)
8. Kuwajima, K., Nitta, K., Yoneyama, M. and Sugai, S. (1976) *J. Mol. Biol.* 106, 359-373. (オリジナル論文)
9. Kendrew, J.C., Bodo, G., Dintzis, H.M., Parrish, R.G., Wyckoff, H. and Phillips, D.C. (1958) *Nature* 181, 662-666. (オリジナル論文)
10. Crick, F.H.C. (1958) *Symp. Soc. Exp. Biol.* 12, 138-163. (レビュー)
11. Epstein, C.J., Goldberger, R.F. and Anfinsen, C.B. (1963) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 28, 439-449. (オリジナル論文)

- ジナル論文)
12. Anfinsen, C.B. and Scheraga, H.A. (1975) *Adv. Protein Chem.* 29, 205-300. (レビュー)
  13. Levinthal, C. (1968) *J. Chimie Physique* 65, 44-45. (オリジナル論文)
  14. Kuwajima, K. (1977) *J. Mol. Biol.* 114, 241-258. (オリジナル論文)
  15. Creighton, T.E. (1979) *J. Mol. Biol.* 129, 235-264. (オリジナル論文)
  16. Ohgushi, M. and Wada, A. (1983) *FEBS Lett.* 164, 21-24. (オリジナル論文)
  17. Hiraoka, Y., Segawa, T., Kuwajima, K., Sugai, S. and Murai, N. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1098-1104. (オリジナル論文)
  18. Kuwajima, K., Hiraoka, Y., Ikeguchi, M. and Sugai, S. (1985) *Biochemistry* 24, 874-881. (オリジナル論文)
  19. Ikeguchi, M., Kuwajima, K., Mitani, M. and Sugai, S. (1986) *Biochemistry* 25, 6965-6972. (オリジナル論文)
  20. Arai, M. and Kuwajima, K. (2000) *Adv. Protein Chem.* 53, 209-282. (レビュー)
  21. Kim, P.S. and Baldwin, R.L. (1982) *Annu. Rev. Biochem.* 51, 459-489. (レビュー)
  22. Kuwajima, K. and Baldwin, R.L. (1983) *J. Mol. Biol.* 169, 299-323. (オリジナル論文)
  23. Udgaonkar, J.B. and Baldwin, R.L. (1988) *Nature* 335, 694-699. (オリジナル論文)
  24. Roder, H., Elove, G.A. and Englander, S.W. (1988) *Nature* 335, 700-704. (オリジナル論文)
  25. Bryngelson, J.D., Onuchic, J.N., Socci, N.D. and Wolynes, P.G. (1995) *Proteins* 21, 167-195. (レビュー)
  26. Jackson, S.E. (1998) *Fold. Des.* 3, R81-R91. (レビュー)
  27. Kamagata, K., Arai, M. and Kuwajima, K. (2004) *J. Mol. Biol.* 339, 951-965. (オリジナル論文)
  28. Okabe, T., Tsukamoto, S., Fujiwara, K., Shibayama, N. and Ikeguchi, M. (2014) *Biochemistry* 53, 3858-3866. (オリジナル論文)
  29. Englander, S.W. and Mayne, L. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 15873-15880. (レビュー)
  30. Semisotnov, G.V., Kihara, H., Kotova, N.V., Kimura, K., Amemiya, Y., Wakabayashi, K., Serdyuk, I.N., Timchenko, A.A., Chiba, K., Nikaido, K., Ikura, T. and Kuwajima, K. (1996) *J. Mol. Biol.* 262, 559-574. (オリジナル論文)
  31. Arai, M., Ikura, T., Semisotnov, G.V., Kihara, H., Amemiya, Y. and Kuwajima, K. (1998) *J. Mol. Biol.* 275, 149-162. (オリジナル論文)
  32. Arai, M., Ito, K., Inobe, T., Nakao, M., Maki, K., Kamagata, K., Kihara, H., Amemiya, Y. and Kuwajima, K. (2002) *J. Mol. Biol.* 321, 121-132. (オリジナル論文)
  33. Shortle, D. (1983) *Gene* 22, 181-189. (オリジナル論文)
  34. Kuwajima, K., Okayama, N., Yamamoto, K., Ishihara, T. and Sugai, S. (1991) *FEBS Lett.* 290, 135-138. (オリジナル論文)
  35. Shortle, D. (2002) *Adv. Protein Chem.* 62, 1-23. (レビュー)
  36. Chothia, C. (1992) *Nature* 357, 543-544. (オリジナル論文)
  37. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) *Methods Enzymol.* 185, 60-89. (レビュー)
  38. Ikura, T., Tsurupa, G.P. and Kuwajima, K. (1997) *Biochemistry* 36, 6529-6538. (オリジナル論文)
  39. Matouschek, A., Kellis, J.T., Serrano, L. and Fersht, A.R. (1989) *Nature* 340, 122-126. (オリジナル論文)
  40. Oroguchi, T., Ikeguchi, M., Ota, M., Kuwajima, K. and Kidera, A. (2007) *J. Mol. Biol.* 371, 1354-1364. (オリジナル論文)
  41. Kuwajima, K. and Arai, M. eds. (1999) *Old and New Views of Protein Folding*, 318 pages, Elsevier, Amsterdam. (書籍)
  42. Kuwajima, K., Goto, Y., Hirata, F., Kataoka, M. and Terazima, M., eds. (2009) *Water and Biomolecules—Physical Chemistry of Life Phenomena*, 307 pages, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. (書籍)
  43. Chandak, M.S., Nakamura, T., Makabe, K., Takenaka, T., Mukaiyama, A., Chaudhuri, T.K., Kato, K. and Kuwajima, K. (2013) *J. Mol. Biol.* 425, 2541-2560. (オリジナル論文)
  44. Nakamura, T., Aizawa, T., Kariya, R., Okada, S., Demura, M., Kawano, K., Makabe, K. and Kuwajima, K. (2013) *J. Biol. Chem.* 288, 14408-14416. (オリジナル論文)
  45. Goyal, M., Chaudhuri, T.K. and Kuwajima, K. (2014) *PLoS One* 9, e115877. (オリジナル論文)

### 桑島邦博先生ご略歴

- 1948年 北海道に生まれる。
- 1971年 北海道大学理学部高分子学科卒業
- 1973年 北海道大学大学院理学研究科高分子学  
専攻修士課程修了
- 1974年 同博士課程進学
- 1975年 同博士課程退学
- 1975年 北海道大学理学部高分子学科・教務職員
- 1979年 理学博士（北海道大学・論文博士）  
この間、1980年8月～1982年8月 米国 NIH 奨励研  
究員として、スタンフォード大学生化学科（Robert  
L. Baldwin 教授）にて研究に従事。
- 1983年 北海道大学理学部高分子学科・助手
- 1992年 東京大学理学部物理学科（1993年4月より、  
東京大学大学院理学系研究科物理学専攻）・助  
教授
- 1999年 東京大学大学院理学系研究科物理学専攻・  
教授
- 2007年 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンス  
センター（分子科学研究所兼務）・教授
- 2013年 自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンス  
センター/分子科学研究所 定年退職
- 2013年4月～2015年3月 総合研究大学院大学学融合  
推進センター・特任教授
- 2013年4月～現在 韓国高等研究院（Korea Institute  
for Advanced Study）・KIAS スカラー
- 2013年4月～現在 東京理科大学基礎工学部生物工学  
科・非常勤講師
- 2013年 東京大学名誉教授
- 2013年 分子科学研究所名誉教授
- 2013年 総合研究大学院大学名誉教授
- この間、
- 2007年4月～2013年3月 総合研究大学院大学物  
理科学研究科機能分子科学専攻・教授。
- 2008年4月～2010年3月 総合研究大学院大学物  
理科学研究科長
- 2010年4月～2012年3月 日本蛋白質科学会会長

