

井本先生のリゾチームに関する蛋白質研究の足跡

井本 泰治 (いもと たいじ)

聞き手：九州大学薬学研究院 植田 正 (うえだ ただし)

植田：本日は井本先生に、ここ半世紀以上にわたり蛋白質研究のロゼッタストーンでありえたニワトリ卵白リゾチーム（以下リゾチームと記す）に関する蛋白質研究の成果を振り返り、蛋白質科学研究者の参考に供して頂くことにさせていただきます。

先生はリゾチームの研究で有名であったアリゾナ大学の J. A. Rupley 教授のもとに共同研究員として留学(1967-1970)されました。Rupley 教授、リゾチームの X 線解析で有名な Phillips 教授と共著で The Enzyme にあの有名な “Vertebrate Lysozymes” (1) を執筆 (1972 年) されておしま

す。先生は卒業研究から 40 年以上一貫してリゾチームの研究に邁進してこられました。報告数は 250 報を超え、その内 180 報以上がリゾチームの報告ということです。また、先生は、Protein Engineering の創刊から Associate Editor を勤められ、Cell. Mol. Life Sci. の Editorial Board を長年勤められました。さらに、本蛋白質科学会の前身の一つである蛋白工学会の創設・発展にも御尽力なされました。

では先生のご研究の足跡をたどる第一歩として、どのようにしてリゾチームの研究を始められたのかをお伺いしたいと思います。

井本：私の研究生生活は 1960 年九大農学部農芸化学科生物化学研究室に所属を許され、船津勝先生のもとでの卒業研究で始まりました。船津先生が阪大蛋白研の共同研究員の時に浜口浩三先生と共同でリゾチームの可溶性基質として、グリコールキチンを開発されたこともあって、当研究室でもリゾチームの研究を始めようということで、私と、同僚であった山崎信行君とがリゾチームとグリコールキチンの調製のために、卵の白身をお菓子屋さんに、海老のむき殻を東中洲の寿司屋さんにもらいに行くことからリゾチームの研究は始まりました(共同研究の重要性)。

植田：当時は研究材料を先生が自ら入手されていたのですね。

井本：そうです。翌年夏に、林勝哉助教授が米国留学からお帰りになり、米国で UV 差スペクト



九大農学部大学院時代
悪戦苦闘して組み立てたリゾチームの立体モデルを眺めています。

「ヤジローベ式フラクションコレクター」

この当時、本邦では目的試料を分取する最強のマシンがこのヤジローベ式フラクションコレクターでした。これは無電力完全自動フラクションコレクターでした。錘をつけた釣り糸を巻きつけてこの重力でアームが回転します。アームの先の水ためにカラムからの水滴がたまると、その重みで水ためが多少下方移動し、その際受けがねを押していたアームの縦がねの小さな隙間を通して水ためが試験管一本分移動する。水ためにある程度液がたまるとサイホン原理で試験管に液が流出する。軽くなってアームが跳ね上がる。これで流出液が試験管一本分分取されます。実に日本人の巧みの技の結集ではありませんか。

私がアリゾナに行くと見ると、巧みの技が勝るとも思えんのに、もう電動フラクションコレクターがごろごろしていました。

ちなみにこのフラクションコレクターは私が九大定年後熊本の崇城大学にいたとき、前任教授であられた船津先生が倉庫に保管されていたのを、十数年前に見付け出し、手入れたものです。現在は天野製薬の資料館に保管していただいております。



ルが蛋白質構造研究に利用できるという最新情報をお持ち帰りになった(外国留学の重要性)。早速、林先生のご指導のもとに、リゾチームと可溶性基質グリコールキチンとのES-複合体の差スペクトルをキャッチして、差スペクトルの原因がトリプトファン残基(Trp)であることも証明した。これが私の最初の報告となりました(2)。この論文にこぎ付くまでにかかなりの苦労をしました。何しろUVの測定装置としては旧式のシングルビーム分光光度計 Beckmann DU が学科共同機器として1台あるだけで、隣に置かれている冷凍遠心機の冷凍機の冷却スイッチが入るたびに針が振れるのを気にしながら小さなUV吸収の差を追跡したのです(研究環境の重要性)。

植田：リゾチーム(酵素)と基質類似体の世界初の低分解能X線結晶解析(6Å)の結果がNatureに報告されたのが1965年ですから、先生の研究報告では、その前にリゾチームの活性部位のTrpと基質類似体の相互作用を示唆していることとなりますね。蛋白質機能研究法が確立してない時代の研究成果としては注目すべきものです。さて、近年、科学におけるセレンディピティーとか言って偶然性が重視されていますが、先生は講義でもこの点に付いて話されていましたが。

井本：はい。くしくも、リゾチームも、アレキサンダーフレミングがシャーレに落とした鼻汁の回りの菌が溶けていたことから、**偶然に発見**したと言われています。偶然については以前に、「化学と生物」に「リゾチームの研究における偶然物語」(3)という小文を書きましたが、それをかいつまんで紹介しましょう。

かのパスツールが言っています「**偶然は準備された心にのみ微笑む**」と。

(1) リゾチーム中のトリプトファン残基に関して

先にも述べたように、船津先生、林先生そしてリゾチームとの出会い、グリコールキチンというリゾチームの可溶性基質を調製する技術を持ち合わ

せていたこと、お粗末ながら UV 差スペクトルを何とか測定できる装置が存在したこと、折も折り、Witkop が N-bromosuccinimide を用いての Trp の特異的酸化反応を報じていた(4)。これらどの一つが欠けてもこの研究成果は実現しなかった。この**偶然の結果**、Trp がリゾチームの酵素反応で重要な役割を果たすことを見出すことが出来た(2)。引き続きこの残基が Trp62 であることも証明した(5)。当時、非極性のアミノ酸残基が酵素反応に関与すると言う考えは全くなかったので、この発見の意義は大きかった。リゾチームの酵素-基質複合体形成への Trp62 の関与については 1966 年の Phillips 等の X 線解析結果により、確実に証明された(6)。

一方、アリゾナ大学の Rupley 教授等は、ヨード酸化により、1 個の Trp が特異的に酸化されリゾチーム活性が失われる事を報じた。しかも、その Trp は 62 ではなく 108 であった(7)。Trp62 はリゾチーム表面に露出した残基でその選択的修飾は



アリゾナ大学留学時代
大学の近くにあったチューソンのサボテン公園にて。

理解できるが、Trp108 はリゾチーム分子中深く埋もれた残基である。この奇妙な現象を解明すべく、私は、Rupley 教授のもとにポストドクターとして赴いた。

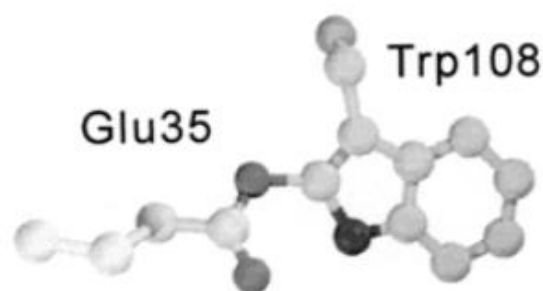


図 1. リゾチームのヨード酸化により生産される Trp108-Glu35 架橋中間体。

悪戦苦闘の結果、カルボン酸がインドールのヨードによる酸化を特異的に触媒する事を見出した。なんと Trp108 の格好の位置に Glu35 のカルボキシル基が存在しているのです。さらに驚いた事は、リゾチームのヨード酸化では Glu35 と Trp108 の間に共有結合した酸化中間体がかかなり安定に存在する(8)(図 1 参照)。このことは X 線解析によっても証明された(9)。

ここに調製された中間体リゾチームは活性を完全に失っており、外からなら置換基を導入すること無く活性基 (Glu35) を酵素内の別の基 (Trp108) に結び付けて不活性化するという理想的な触媒基の化学修飾が偶然にも実現できた事になる(10)。

植田：この分子内架橋リゾチームは私も調製したことがありますが、乱暴に精製すると加水分解されてしまいます。悪戦苦闘されたようですが、調製方法が確立した際の感動はさぞ素晴らしかったでしょうね。

井本：

(2) プロテアーゼ消化機構に関して

私は、卒論時代にリゾチームから要らない部分をプロテアーゼ消化により切り取って活性フラグメントを取り出す研究も行ってた。これは全く旨く行かなかった。ばらばらのペプチドとインタクトのリゾチームしか生じなかった。このことは、リゾチームの消化は **all or none** で進行している事を示している。**all or none** でプロテアーゼ消化が進行するためには二つの理由があり、一つは、蛋白質にニックが入りその蛋白質が爆発的に変性して優先的に消化される道筋と、いま一つは、蛋白質はネイティブ (N) 型と変性 (D) 型の平衡にあり、**D** 型のみが優先的に消化される道筋である。この二つを区別する事は当時の私には到底不可能に思えたので、ここで一応この研究は打ち切りにしたが、いつかは解明したいとの信念を持ち続けた(**準備された心**と言えましょう)。

数年後、私は上に述べた **Glu35-Trp108** エステル中間体リゾチームの証明の一環として、この部分のペプチドの分離を試みていた。この誘導体は頑強にプロテアーゼ消化に抵抗した。この瞬間、私は**偶然の微笑**を直感した。この誘導体では分子内への一本の共有結合の導入で蛋白分子構造が非常に安定になっている、しかも **X** 線解析結果ではこの架橋によってリゾチームの構造は全くと言っていいほど変化していないことも示されている(9)。ネイティブのリゾチームがかなり消化される条件にさらしてもこの誘導体は安定で、ニックの入ったものは全く無い事をカラムクロマトグラフィー解析により示すことが出来た(11)。かくして、リゾチームのプロテアーゼ消化は変性型を通して進行する事を証明できた。さらにこの事はプロテアーゼ消化の詳細な速度論的解析によっても確認できた(12)。

プロテアーゼ消化は一般にプロテアーゼにアクセシブルなランダム構造になったペプチド結合に対して進行する事が分かった。プロテアーゼの消化機構に関するこの発見は **T** 細胞エピトープの生成、アミロイド蛋白の発生等多くの生理機能の解明に寄与するところ大である。

植田：21世紀になって、プロテアーゼ消化法を用いて蛋白質の変性の遷移状態を評価する論文が *Nature* 姉妹紙に掲載されており、プロテアーゼを用いて蛋白質の物性を評価することが当たり前になっていますが、プロテアーゼ消化の仕組みがわかってこそその研究だと思います。

井本：

(3) 蛋白質の効率的な再生法に関して

蛋白質は容易に変性するし、また蛋白質工学的に大量生産させた蛋白質は往々にして変性蛋白質として生産される。これらを元の活性形に巻き戻させる(再生する)ことが蛋白質の有効利用には大切である。変性蛋白質は疎水面が表面に露出しており、そのため会合して沈殿しやすい。そこで、蛋白質の再生はアグリゲーションとの戦いである。これを防ぐために、最もよく使われるのは無限大希釈で会合を抑える方法である。しかしこれはあまり効率的方法ではない。1gの蛋白質を得るのに100Lの溶液となるほどの希釈が要求されるからである。そこで高濃度で効率よく再生する方法の開発が求められる。

我々のこの研究のきっかけとなったのも**偶然の発見**である。ある学生が8M尿素中で還元後再生操作を行って、あまりにも少量の外液で透析を行い、最終的に尿素が2M残ってしまった。すると意外なことに再生効率が抜群によかった。尿素はランダムなSS結合を生成させる例として当時の教科書にも載っていて、私としてはあまりにも強い**先入観**があって、尿素中での再生など思いもよらなかった。しかしよく考えてみると尿素はよい可溶化剤であり、うまくコントロールすればアグリゲーションを抑えながら効率的に再生させるためのよい試薬である。かくして我々は8M尿素中で蛋白質を還元変性後、透析外液(8M尿素)の尿素濃度を徐々に低下させながら透析することにより再生させるという画期的な高濃度での効率的再生法を開発することができた(13)。

透析外液の尿素濃度を低下させる希釈液に安定化剤を高濃度に溶解させておき、透析外液の尿素

濃度の低下と共に安定化剤の濃度を上げる事でより効率的な再生が可能なることも示した(14)。

植田：透析法を用いて蛋白質を再生することは以前から報告されていましたが、ここで示された、一連の研究により導かれた蛋白質の効率的な再生に関する考え方は、単鎖 Fv の効率的な再生法にも利用されています。

井本：

(4) 抗原性と免疫寛容に関して

ある時(1992)私の研究室名が薬品製造工学から免疫薬品学に変更された。**これを契機に、常々気がかりであった**免疫の研究にもとりかかる事となった。

医薬としての蛋白質の利用に当たって、大きな障害となるのが抗原性の問題である。我々は、ニワトリリゾチームの抗原ペプチドのアミノ酸配列を持たせることのできるたった1残基の変異をマウスリゾチームにあたえると、このマウスリゾチームがマウスの抗原となって抗体が生産される事を見出した(15)。かくしてたったの1残基の変異



九大在任中。学会中に植田助教授とわんこそばで英気をつけています。

でも自己蛋白質が抗原となり得ることが分かった。より性能の向上した蛋白質の生産に向けて遺伝子操作が加えられることは多々ある。ヒト型の蛋白質でも医薬として投与すると抗原となる場合

があることも見出されており、新規にデザインして創製した蛋白質は当然抗原以外の何者でもない。このような状況のもとで、蛋白質に抗原性を失わせること、すなわち、免疫寛容を与えることはとてつもなく大切なことである。

古くからポリエチレングリコール(PEG)修飾により抗原性がやわらげられることが知られていた。確かにニワトリリゾチームをPEG化してマウスに投与すると抗体生産が抑えられる。さらに、PEG化ニワトリリゾチームの投与処理後ネイティブニワトリリゾチームを投与しても抗体が生産されないという驚くべき結果が**偶然にも得られた**。このことはPEG化ニワトリリゾチームがニワトリリゾチームに対する免疫寛容を引き起こしたことを意味する(16)。

次いでこの免疫寛容が起こる原因について検討を行った。ネイティブニワトリリゾチームは投与後1日で血中濃度が検出限界以下に低下するが、PEG修飾ニワトリリゾチームは28日間も血中濃度が検出可能なレベルに維持される。この間は免疫寛容が維持され、この後、徐々に寛容が低下する。再度の投与で寛容が再現する。血中にその蛋白質が存在すれば寛容が実現するらしいことが伺えたので、少し乱暴であったが、マウス1匹当たり毎日10mgのネイティブニワトリリゾチームを投与し続けた。血中濃度は維持され、免疫寛容が成立した(17)。以上の結果から蛋白質を安定にして、血中濃度を長期間あるレベルに保たせると、その蛋白質に対して免疫寛容が成立する可能性を示すことができた。このことは蛋白質の医薬としての利用に対して無限の可能性を示すものである。

植田：今年の日本蛋白質科学会で、抗体医薬品の免疫原性に関するワークショップがありました。中和抗体の産生により、治療にはより多量の蛋白質医薬品の投与が必要となりますから、医療費削減の観点から、免疫寛容機構を医療現場に持ちこむことができればよいのですが。

井本：

(5) 結論

研究における新発見は、基盤となる幅広い基礎知識の上に着々と準備された計画の下で必然的に現れることもあり、偶然現れることもある。新発見の最も大きな出現確率は、必然と偶然の狭間にあるのではないだろうか。新発見のためには周到に準備された研究基盤と偶然のチャンスを増やすための幅広く多大な実験量、さらにはこだわりのない柔軟な適応力が必要である。その上その目的に向けた、あくなき求心力を保つことが大切である。**(偶然を生かすためには準備が重要)**

植田：最初に話されましたリゾチームの活性部位の Trp の役割の仕事に加え、先生は実に多くの蛋白質研究の手段に先鞭をつけておられますね。X線解析に関しましては九大薬学部にありました有機化合物解析用の4軸X線解析装置を改良して、リゾチームの解析を始められました。NMRにつきましても、600MHzの装置は世界に数台しかない時期に九大薬学部を設置することに成功されています。特に現在蛋白質研究の主流をなしております遺伝子工学をその黎明期に蛋白質研究に取り込まれてこられたようですが、この辺の状況についてお聞かせください。

井本：私が遺伝子工学を蛋白質研究の手段に取り入れたきっかけは実に**よき共同研究者にめぐり合った**おかげです。九大薬学部の三木健良先生のご指導のもとに、まさに黎明期にあった遺伝子工学の手法をリゾチームの研究に取り入れる事で蛋白質工学をリードする事が出来ました。

当時(1985年)高度発現ベクターとしては pKK223-3 しか市販されておりませんでした。これではリゾチームはほとんど発現しなかったので、温度感受的にコピー数が格段に増加する発現ベクター-pKP1500を開発し、大量のニワトリリゾチームを大腸菌に発現させました(18)。次いで、酵母での分泌系を構築し、ニワトリリゾチームを活性型で培地から得られるようにしました(19)。さらに、*Pichia* 酵母による大量発現系のためのプロトコルを確立し、NMR測定のための重原子置換蛋

白質の大量調製のための効率よい発現系に発展させました(20)。

植田：あと蛋白質の安定化の問題や、蛋白質の揺らぎの問題その酵素活性との関係等まだまだ先生のお仕事に関連してお聞きしたい事も多々ありますが、最後に、21世紀になり再燃しておりますリゾチームの反応機構に関して先生のお考えをご披露願いたいのですが。

井本：ニワトリリゾチームの反応機構に関しては Phillips 等が、1960年中盤に主にX線解析の結果を基に、次のように提案した(6)。

基質 N-アセチルグルコサミンの6量体{(NAG)₆}がリゾチームの結合サイトであるクレフト(A-F)にぴったりと結合する。触媒点は触媒基とみなせる Asp52 と Glu35 が向かい合って存在する D と E の糖の間であり、両酸残基のカルボキシル酸素と D 糖の C1 原子の距離が離れすぎている事から、共有結合中間体機構ではなく、オキソカルベニウムイオン中間体機構を提唱した。

Glu35 は一般酸触媒としてグリコシル結合酸素にプロトンを供与し、グリコシル結合の切断が起こり、カルボニウムイオンが生成し、D 糖の歪によってオキソカルベニウムイオンとして安定化され、このプラスイオンを Glu35 とともに Asp52 の負イオンがさらに安定化する。ついで、Glu35 が水分子からプロトンを引き抜きながら、OH を D 糖の C1 に結合させる。かくして、リゾチーム反応がスムーズに進行する。

その後、約10年間の研究成果をも踏まえて、我々は1972年に798報もの文献を網羅した The Enzyme の総説(1)でこの説を支持した。当然、共有結合中間体説に対する対応も十分に行いながら書き上げたつもりであった。ところが最近、Asp52-糖共有結合中間体が取れたと言う報告がなされた(21)。これはアフィニティーラベリングにより Asp52 ラベルリゾチームが調製できた事の報告に過ぎないと、軽く受け止めていたが、中間体機構が主流のような流れになりつつある事に驚いている。

「白いカラスがいたよ」という発言は、哲学的には、総てのカラスが白くない事を証明する必要があると言う厄介な事態である。科学的には「それは突然変異だ」で済まされる問題かもしれないが、「やはりある程度の対応を試みるべきかな」と言う気がします。そこでまずは明らかにカルベニウムイオン中間体機構を強く支持すると思われる結果をいくつかピックアップすることを試みたい。

(1) カルベニウムイオン中間体で進んでいる証拠

リゾチームの糖転移反応に於けるアクセプターとしての水分子に対する有効性を14種のラジオアクティブ求核試薬について詳細に検討した結果は、全てがカルベニウムイオン中間体経由で反応が進行している事を支持した(22)。

(2) Asp52 は必ずしもクリティカルな触媒基ではない。

クリティカルな触媒基であればその消失は活性の完全な消失に帰結するはずである。両機構でクリティカルな触媒基と見なされているGlu35はその修飾で完全に活性の消失が確認されている(10, 23)。一方、Asp52の方はAla{0.24% (24)}、Ser{0.63% (24)}への変換でそれぞれ括弧内の活性が残存した。ホモセリンへの注意深い化学修飾によってもpH6.7において10%活性を示した(25)。Aspよりサイズが小さくなっており、pKaから考えても共有結合では説明がつかない。電気陰性度を大きくする残基への変換が活性を少し高めていそうな傾向は、Asp52がマイナス電荷でカルベニウム正イオンを安定化するという説を支持する結果である。

クリティカルな触媒基の一方が失われても何とか微々たる活性の発現の可能性があると云い逃れは、とりもなおさず共有結合以外でも反応が進んだ事のサポートを与える事になるのではないか。

Glu35相当残基は必須だがAsp52が存在しないリゾチーム類似酵素がかなり存在することも見出されている(26)。

(3) 歪の問題

多くのD結合部位への基質結合力の解析から、D結合部位への糖の結合には不都合な結合エネルギーがかかる事が見出されている(1)。D結合部位を含む複合体の結晶作成が困難を究めた事からもその実情がうかがい知れる。

Strynadka と James はニワトリリゾチームとNAM-NAG-NAMの複合体の1.5Åでの詳細な解析から、D糖が歪んで半椅子構造をとることを強調している(27)。

種々の単糖-p-ニトロフェノールを(NAG)₄に結合させた基質の分解パターンから、Dサイトの糖は(C2)NAcと(C5)CH₂OHを有することが重要で、これらが糖に歪を与え、カルベニウムイオンの安定な生産に寄与していることを示唆した(28)。

β-Glycoside Hydrolaseでは結合エネルギーで基質への歪を保障する事で活性半椅子構造を取らせ糖分解反応を加速することが示されている(29)。

(4) その他の証拠

25°C、pH 7で290nm光励起し320nmの蛍光でリゾチーム触媒反応を追跡した(30)。ES-複合体生成の早い蛍光変化(数ミリ秒)の後、約100秒にわたって、ややゆっくりとした単調な加水分解反応が進行した。Asp52による共有結合機構であればその負電荷の消失と再出現の影響を受けて{-CO⁻ + -C⁺- → -CO-C- → -CO⁻ + -C-(OH)}この反応段階全体にかけて単調な蛍光変化が展開されるはずは無い。

このようにカルベニウムイオン中間体機構を支持する論文は枚挙に暇が無いが、リゾチームの研究を引き継ぐ(ぐ)事の重要性)いでくれた君のグループが大変な事を見出してしまいましたね。アサリガイのリゾチームでは酸性領域での通常反応で共有結合中間体が質量分析で検出できたというものです(31)。既に我々はニワトリリゾチームのAsp52のカルボキシル基の枝を延長してGluに換える事で共有結合中間体を捕捉出来る事を示してはいたが(32)、議論の矛先を多少変更する必要に迫られた。

植田：アサリガイリゾチームは活性部位の一つが、ニワトリリゾチームと異なり、リゾチームの分子内に唯一存在するβシートのβ1ストランドに存在しました。ニワトリリゾチームはβシートのβ2ストランドに存在するので、アサリリゾチームの結果がニワトリリゾチームの触媒機構を否定するものではないと考えていました。この考えは最近受理された論文(35)でも実証されました。

井本：それでもこの結果は中間体機構を勢いづけるものでしたよね。そこで、D結合部位に糖が結合したニワトリリゾチームのX線構造解析の結果を精査した(表1、図2)。**[A]**はTrp62のTyrまたはPheへの変換体と(NAG)₃の複合体解析結果から演繹したもの(33)、**[B_A]**は2-Fluorochitobiose複合体(21)、**[B_B]**は**[B_A]**の別構造体、**[C_A]**は4-O-β-tri-N-acetylchitotriosyl moranolineとの複合体(34)、**[C_B]**は**[C_A]**の別構造体、**[D]**はNAM-NAG-NAMとの複合体(27)からのデータである。まず**[A]**での糖のC2に付いたNAcグループと

Asn46のアミド基との密接なコンタクトに注目してみよう。先にもこのコンタクトがD糖の歪の要因の一つであるとした文献(28)を紹介したが、うなずけるところである。**[C]**ではこのNAcグループがOに置き換えられており、この込み合いが解消されて、歪なしにD糖が安定に結合している(34)。**[B]**の場合はNAcグループがFに置き換えられており、このことがD糖のC1とAsp52のカルボキシル酸素との結合を何とか可能にしているものと考えられる。それでも**[B_A]**における(C2)-FとAsn46のNβ2が1.9 Åと異常接近しており、Asn46はこの込み合いが緩和される(3.9Å)別構造体を取ったものが見られるようになる。しかしD糖にNAcグループが存在する場合にはたとえこの形ででも安定な複合体の形成は望めそうに無い。

以上の考察から、D糖にNAcグループを持たない糖を基質としたニワトリリゾチームの反応機構の解明は意味をなさないと考えられる。

一方、これらの考察から、D糖のNAcグループとAsn46の密接なコンタクトはC1とAsp52のカルボキシル酸素の距離を3Å以内に近づけない事

表1 Dサイトに結合した糖とニワトリリゾチームの各原子間距離(4Å以内のもの)。

Lysozyme complex	D-sugar						
	C1	C1	C2	C2-(Atom)	C7	O7	C8
	Asp52 ^a	Asn46 ^b					
A	3.3	3.9	3.7	3.4 (N)	3.7		3.5
B_A	3.0	3.7	3.7	2.9 (O)	-	-	-
B_B	3.2	3.7	3.7	2.9 (O)	-	-	-
C_A	1.4	4.0	3.2	1.9 (F)	-	-	-
C_B	1.4	4.0	3.7	3.2 (F)	-	-	-
D	3.2			3.2 (N)		2.8	

^aAsp52βカルボキシル基のより近い酸素。

^bAsn46βアミド基のより近い原子。

^aA: Try62 修飾体との基質複合体から推定した構造(1LZC, 分解能1.80Å)。B_A: 2-Fluorochitobiose 複合体(1H6M, 1.64Å)。B_B: B_Aの別構造体。C_A: 4-O-β-tri-N-acetylchitotriosyl moranoline との複合体(4HP0, 1.19Å)。C_B: C_Aの別構造体。D: NAM-NAG-NAM との複合体(1.5Å, コオーディネートは未発表)(27)。

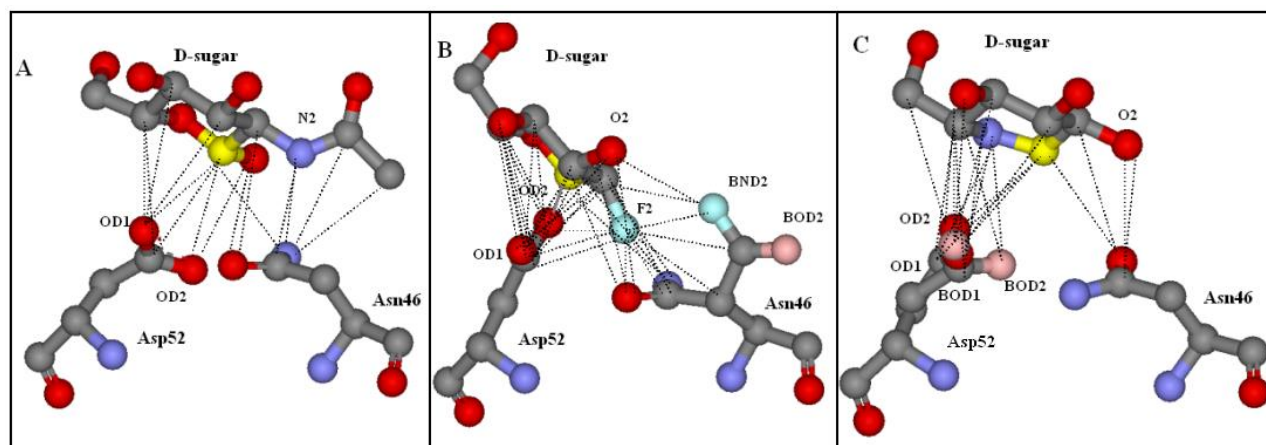


図2 種々のDサイト結合糖とリゾチームのAsn46とAsp52との原子配置。A, B, Cは表1のリゾチームの座標。4Å以内の距離にある原子間は破線で示した。D糖のC1は黄色で、別構造酸素は桃色、別構造窒素は空色で示した。

にも寄与している事が伺える。

実は共有結合機構で反応が進行するための要は、Asp52のカルボキシル酸素がD糖のC1炭素に約1.5Åの距離に近づくかどうかである。この点に明確な回答を与える結果を我々はごく最近提出することが出来た(35)。

表2に種々に修飾したニワトリリゾチームの二つのカルボキシル触媒基間距離を示した。D糖のC1との距離で示したいが、D糖複合体の解析が済んでいないものもあるので、この値で示してある。

中間にあるC1とAsp52のOδ1の距離がワイルドリゾチームで3.3Å(表1)であることから、表2の値からC1とAsp52相当残基のカルボキシル酸素の大体の距離は推測できる。

先ずワイルドリゾチームでは天然基質を用いた場合に共有結合中間体は見出されていない。もちろん、Asp52をつぶして代わりにAsn46をAspにしてAsp52相当残基を1Å程度遠ざけたAsn46Asp/Asp52Serにおいても共有結合中間体は見つかっていない。しかも、この変換体は2.5%の活性を示し、Asp46が解離型で反応を触媒してい

表2 修飾ニワトリリゾチームの対をなす触媒基間距離と共有結合中間体生成の有無^a

リゾチーム	D52E	N46E/D52S	ワイルド	N46D/D52S
A. 酸・塩基触媒基	Glu35(Oε1)	Glu35(Oε1)	Glu35(Oε1)	Glu35(Oε1)
B. 求核・離脱基／ 負電荷供与基	Glu52(Oε1)	Glu46(Oε1)	Asp52(Oδ1)	Asp46(Oδ1)
A-B 距離, Å	4.6	5.6	6.1	7.8
共有結合体の生産	+	+	-	-

^a文献35より改変。

ることが、その活性の pH 依存性からはっきりと示された(35)。この距離での共有結合の可能性は全く考えられない。この事実は、ワイルドリゾチームでは Asp52 が共有結合を生成することなく、静電相互作用で反応をアシストしていることを明確に示している。

表2から明らかなように、Asp52 相当基を C1 にかなり近づけると共有結合中間体が見られるようになる。しかしながらこの共有結合中間体は酵素反応中間体とは言えないほどに安定で、カラムで分離でき、その分解速度はそのリゾチームの見かけの反応速度よりかなり遅い(35, 36)。その意味で表2ではこれらの場合にも Asp52 相当残基は負電荷供与基としても列記した。共有結合中間体機構では生成した中間体を速やかに分解する機構も同時に組み込まれていることが必要である。

以上の考察を基に、糖鎖の加水分解は共有結合中間体で進行する事を認めながらも、正常なニワトリリゾチームの反応はカルベニウムイオン中間体機構で進行していると言う事ができるのではないのでしょうか。

植田：詳細にリゾチームの触媒機構に関する考察をご教授いただきありがとうございます。昨年、先生の喜寿のお祝いをしましたので、先生のリゾチーム研究は半世紀を越えることになりですね。(リゾチームの反応機構に付いて簡単な説明を文末につけておりますのでご参考になさってください。)

井本：九大農学部での同僚である山崎信行先生、九大薬学部時代に私を支えてくれた山田秀徳先生、さらに植田先生を始め多くの教え子の皆さんの協力のもとにこれらの研究は生み出されてきたのです。

私の超半世紀にわたる研究生活で、**よき師、よき共同研究者、よき研究環境、そしてよき偶然に恵まれた事**を感謝しています。

植田：リゾチームを研究対象とされたことのある先生は蛋白質科学会には沢山おられると思いま

す。また、リゾチームの構造と機能の研究法は、多くの蛋白質の構造と機能研究の参考となっていますので、ここで紹介いただいた内容は本学会会員にとって興味深いものだと思います。本当にありがとうございました。

後記(聞き手から)：この原稿の依頼を井本先生が受諾され1年以上になります。この間、井本先生は印刷中である二つの論文(35, 37)の投稿と並行して頑張ってくださいました。特に、論文37に付いては、卒論研究始めたときから気になられていた、酵素反応論の問題点についての論文で「いかに受け入れがたい理論であるかを物語る、ここ10年あまりの大奮闘の結果、77歳にして、正しい酵素反応論を上掲することが出来た」(井本先生の言葉のまま)というもので、井本先生渾身の論文(37)でありますのでこちらも是非ご一読ください。

文 献

- 1) Imoto, T., Johnson, L. N., North, A. T. C., Phillips, D. C., and Rupley, J. A., "Vertebrate Lysozymes" *The Enzymes*, 3rd ed. **Vol.7** p665-868 (1972)
- 2) Hayashi, K., Imoto, T., and Funatsu, M., The Enzyme-Substrate Complex in a Muramidase (Lysozyme) Catalysed Reaction. I. Difference spectrum of Complex, *J. Biochem.* **54**, 381-387 (1963)
- 3) 井本泰治、*化学と生物* **42**, 694-700 (2004)
- 4) Witkop, B., Nonenzymatic methods for the preferential and selective cleavage and modification of proteins. *Adv. Protein Chem.*, **16**, 221-321 (1961)
- 5) Hayashi, K., Imoto, T., Funatsu, G., and Funatsu, M., The Position of the Active Tryptophan Residue in Lysozyme. *J. Biochem.* **58**, 227-235 (1965)

- 6) Phillips, D. C., The Three-dimensional Structure of an Enzyme Molecule. *Sci. American*, **215**, 78-90 (1966)
- 7) Hartdegen, F. J., and Rupley, J. A., The Oxidation by Iodine of Tryptophan 108 in Lysozyme. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 1743-1745 (1967)
- 8) Imoto, T., Hartdegen, F. J., and Rupley, J. A., Oxidation of Lysozyme by Iodine: Isolation of an Inactive Product and its Conversion to an Oxindolealanine-Lysozyme. *J. Mol. Biol.* **80**, 637-648 (1973)
- 9) Beddell, C. R., Blake, C. C. F., and Oatley, S. J., An X-ray study of the structure and binding properties of iodine-inactivated lysozyme. *J. Mol. Biol.* **97**, 643-654 (1975)
- 10) Imoto, T., and Rupley, J. A., Oxidation of Lysozyme by Iodine: Identification and Properties of an Oxindoyl Ester Intermediate: Evidence for Participation of Glutamic Acid 35 in Catalysis. *J. Mol. Biol.*, **80**, 657-668 (1973)
- 11) Imoto, T., Fukuda, K., and Yagishita, K., A Study of Native-Denatured (N-D) Transition in Lysozyme. I. Detection of the Transition by Product Analyses of Protease Digests. *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 264-269 (1974)
- 12) Imoto, T., Yamada, H., and Ueda, T., Unfolding Rates of Globular Proteins Determined by Kinetics of Proteolysis. *J. Mol. Biol.*, **190**, 647-649 (1986)
- 13) Maeda, Y., Koga, H., Yamada, H., Ueda, T., and Imoto, T., Effective renaturation of reduced lysozyme by gentle removal of urea. *Protein Eng.*, **8**, 201-205 (1995)
- 14) Kohyama, K., Matsumoto, T., and Imoto, T., Refolding of an unstable lysozyme by gradient removal of a solubilizer and gradient addition of a stabilizer. *J. Biochem.*, **147**, 427-431 (2010)
- 15) Tsujihata Y, So T, Hashimoto Y, Ueda T, and Imoto T., A single amino acid substitution in a self protein is sufficient to trigger autoantibody response. *Mol Immunol.* **38**, 375-381 (2001)
- 16) So, T., Ito, H.-O., Koga, T., Ueda, T., and Imoto, T., Reduced immunogenicity of monomethoxypolyethylene glycol-modified lysozyme for activation of T cells. *Immunology Lett.*, **49**, 91-97 (1996)
- 17) So, T., Ito, H.-O., Hirata, T., Ueda, T., and Imoto, T., Extended blood half-life of monomethoxypolyethylene glycol-conjugated hen lysozyme is a key parameter controlling immunological tolerogenicity. *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 1187-1194 (1999)
- 18) Miki, T., Yasukochi, T., Nagatani, H., Furuno, M., Orita, T., Yamada, H., Imoto, T., and Horiuchi, T., Construction of a Plasmid Vector for the Regulable High Level Expression of Eukaryotic Genes in Escherichia coli: An Application to Overproduction of Chicken Lysozyme. *Protein Eng.*, **1**, 327-332 (1987)
- 19) Hashimoto, Y., Koyabu, N., and Imoto, T., Effects of signal sequences on the secretion of hen lysozyme by yeast: Construction of four secretion cassette vectors. *Protein Eng.*, **11**, 75-77 (1998)
- 20) Mine, S., Ueda, T., Hashimoto, Y., Tanake, Y., and Imoto, T., High-level expression of uniformly ¹⁵N-labeled hen lysozyme in Pichia pastoris and identification of the site in hen lysozyme where phosphate ion binds by using NMR measurement. *FEBS Letters*, **488**, 33-37 (1999)
- 21) Vocadlo, D.J. et al., Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, **412**, 835-838 (2001)
- 22) Rupley, J. A., Gates, V., and Bilbrey R., Lysozyme Catalysis. Evidence for a Carbonium Ion Intermediate and Participation of Glutamic Acid 35. *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**. 5633-5635 (1968)
- 23) Malcolm, B. A., et al., Site-directed mutagenesis of the catalytic residues Asp-52 and Glu-35 of chicken egg white lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 133-137 (1989)
- 24) Hashimoto, Y., Yamada, K., Motoshima, H., Omura, T., Yamada, H., Yasukochi, T., Miki, T., Ueda, T., and Imoto, T., *J. Biochem.* **119**, 145-150

- (1996)
- 25) Eshdat, Y., Dunn, A., and Sharon, N., Chemical Conversion of Aspartic Acid 52, a Catalytic Residue in Hen Egg-White Lysozyme, to Homoserine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**, 1658-1662 (1974)
 - 26) Matsumura, I., and Kirsch, J. F., Is Aspartate 52 Essential for Catalysis by Chicken Egg White Lysozyme? The Role of Natural Substrate-Assisted Hydrolysis *Biochemistry*, **35**, 1881-1889 (1996)
 - 27) Strynadka, N. C., and James, M. N., Lysozyme revisited: crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue bound in site D. *J. Mol. Biol.*, **22**, 401-424. (1991)
 - 28) Raftery, M.A., and Rand-Meir, T., Distinguishing between possible mechanistic pathways during lysozyme-catalyzed cleavage of glycosidic bonds. *Biochemistry*, **7**, 3281-3289 (1968)
 - 29) Gideon J. Davies et al. Snapshots along an Enzymatic Reaction Coordinate: Analysis of a Retaining β -Glycoside Hydrolase. *Biochemistry*, **37**, 11707- 11713 (1998)
 - 30) Holler, E., Rupley, J. A., and Hess, G. P., Productive and Unproductive Lysozyme-Chitosaccharide Complexes. Kinetic Investigations. *Biochemistry*, **14**, 2377-2385 (1975)
 - 31) Goto, T., Abe, Y., Kakuta, Y., Takeshita, K., Imoto, T., and Ueda, T., Crystal Structure of *Tapes japonica* Lysozyme with Substrate Analogue. *J. Biol. Cham.*, **282**, 27459-27467 (2007)
 - 32) Kuroki, R., Ito, Y., Kato, Y., and Imoto, T., A Covalent Enzyme-Substrate Adduct in a Mutant Hen EggWhite Lysozyme (D52E). **272**, 19976-19981 (1997)
 - 33) Maenaka K., et al., Dissection of Protein-Carbohydrate Interactions in Mutant Hen Egg-white Lysozyme Complexes and their Hydrolytic Activity. *J. Mol. Biol.*, **247**, 281-293 (1995)
 - 34) Ogata, M., et al., A Novel Transition-state Analogue for Lysozyme, 4-*O*- β -Tri-*N*-acetylchitotriosyl Moranoline, Provided Evidence Supporting the Covalent Glycosyl-enzyme Intermediate *J. Biol. Cham.*, **288**, 6072-6082, (2013)
 - 35) Abe, Y., Kubota, M., Takazaki, S., Ito, Y., Yamamoto, H., Kang, D., Ueda, T., and Imoto, T., Effect on catalysis by replacement of catalytic residue from hen egg white lysozyme to *Venerupis philippinarum* lysozyme. *Prot. Sci.*, **25**, 1637-1647, (2016)
 - 36) Ito, Y., Kuroki, R., Ogata, Y., Hashimoto, Y., Sugimura, K., and Imoto, T., Analysis of a catalytic pathway *via* a covalent adduct of D52E hen egg white mutant lysozyme by further mutation. *Prot. Eng.* **12**, 327-331, (1999)
 - 37) Imoto, T., Derivation of a valid momentary first order rate constant for kinetic and energetic analyses of enzymatic reactions. *J. Biochem.*, in press, (2016)

(解説) リゾチームの触媒機構の変遷

聞き手 植田 正

ニワトリリゾチーム (以下リゾチーム) は酵素の中で最初に X 線結晶解析が成功した蛋白質である。リゾチームはグラム陽性菌の細胞壁に存在する N-アセチルグルコサミン(NAG)と N-アセチルムラミン酸の β -1,4 結合を加水分解する生理機能を持っているが、触媒機構を議論する場合は、カニなどの甲羅の成分であるキチンを可溶化した、NAG のオリゴマーを基質として用いている。触媒残基は Glu-35 と Asp-52 であることは、chemical mutation と部位特異的変異体解析により明らかとなっている。また、これらの酸・塩基触媒によって、NAG のオリゴマーが加水分解されることは共通した認識である。しかしながら、その触媒機構の詳細については、さまざまに議論されている。その主なものを紹介する。

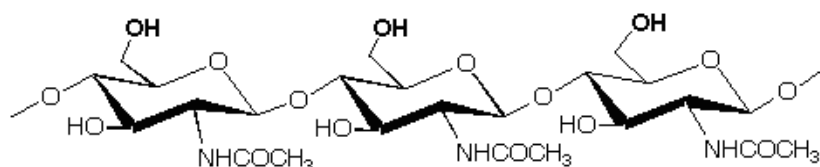


Fig. S1 キチンの構造

1953 年 Koshland は、NAG オリゴマーの加水分解において以下のような触媒機構を提唱した。H⁺ドナーの役割をする Glu-35 から解離した H⁺が切断部位にある NAG の酸素原子に結合し、Asp-52 のカルボキシレートイオンの求核攻撃により、NAG の 1 位の炭素と共有結合 (Fig.S2) を形成する際に、NAG-NAG 間の β 1,4 結合が切断される。次に、解離している Glu-35 が水から H⁺を受け取り、生じた OH⁻が糖-酵素共有結合を加水分解して反応が終了する。

一方、1967 年に X 線結晶解析を基に Phillips は異なる機構を提唱した。H⁺ドナーの役割をする Glu-35 から解離した H⁺が切断部位にある NAG の酸素原子に結合し、NAG-NAG 間の β 1,4 結合が切断される。この際に H⁺を受け取った NAG は、1 位の炭素原子カルボニウムイオンを生じ半椅子

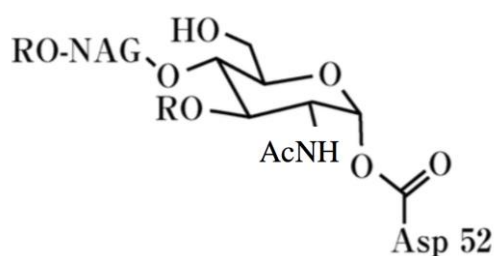


Fig. S2 糖-酵素中間体

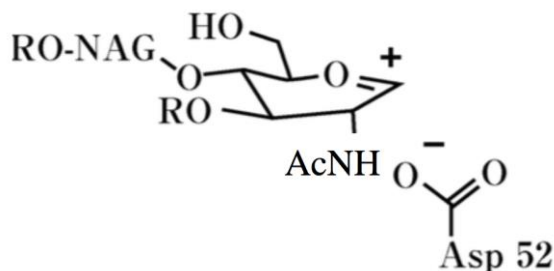


Fig. S3 カルベニウムイオン中間体

型構造をとる (Fig.S3)。半椅子型構造はカルベニウムイオンを安定化しやすい立体配座であるが、近傍に存在する Asp-52 のカルボキシレートイオンにより、さらに安定化される。次に、解離している Glu-35 が水から H⁺を受け取るとともに、生じた OH⁻ がカルベニウムイオンに付加して反応が終了する。

リゾチームの NAG オリゴマーの加水分解機構として、Phillips の機構が長い間受け入れられてきたが、2001 年 Vocadlo らは、リゾチームと 2-アセトアミド-2-デオキシβ-d-グルコピラノシル-(1→4)-2-デオキシ-2-フルオロ-β-d-グルコピラノシルフルオライド (NAG2FG1cF) を pH5.0 で共存させておくと、糖とリゾチームの間に共有結合が生じることを、質量分析、X 線結晶解析により示した (Fig.S4)。この論文が Nature 誌に発表された後、多くの生化学のテキストでは、次々とリゾチームの触媒機構が糖-酵素中間体を経て進むことに修正された。

しかし、筆者は Asp52 の酸素原子は切断点の糖の C1 に、共有結合の距離(約 1.5 Å)に近づくことは無理であること、さらに Asp52 を Ser とし、Asp52 よりさらに 1 Å 程度 C1 から離れたところに挿入した Asp が解離形でカルベニウム陽イオンを安定化することで活性向上に関与したことなどから、ニワトリリゾチームの触媒反応はカルベニウムイオン中間体機構で進行していると考えerほうが妥当であると主張している。

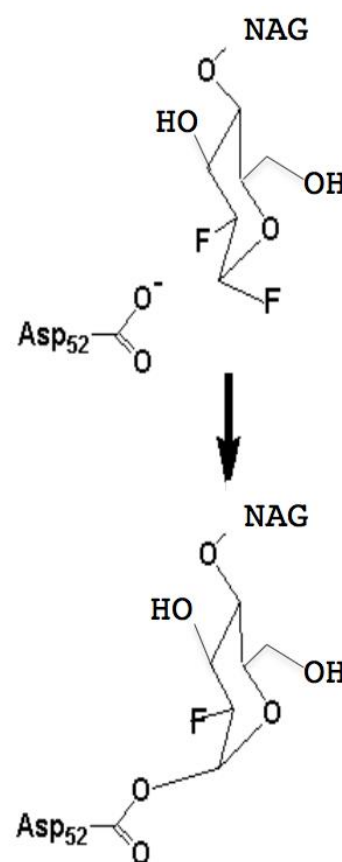


Fig. S4 Vocadlo らの主張
(報告を基に模式図を作成)

井本泰治先生ご略歴：

昭和 14 年 福岡県に生まれる。
昭和 33 年 県立宗像高校卒業
昭和 37 年 九州大学農学部農芸化学科卒業
昭和 39 年 九州大学農学研究科農芸化学専攻(修士課程)
修了
昭和 42 年 九州大学農学研究科農芸化学専攻(博士課程)
修了
昭和 42 年 農学博士(九州大学)
同年 アリゾナ大学化学部共同研究員
昭和 45 年 九州大学農学部農芸化学科助手
同年 山口大学農学部農芸化学科助教授
昭和 53 年 九州大学薬学部製薬学科教授
平成 4 年 九州大学大学院薬学研究科教授
平成 12 年 九州大学大学院薬学研究院教授
平成 15 年 同上定年退職
平成 15 年 崇城大学教授
平成 22 年 同上定年退職



この間

昭和 62 年 1 月 Protein Engineering の編集委員
平成 9 年 Cellular and Molecular Life Science の Editorial
Board
平成 13 年 10 月 日本生化学会九州支部長

植田 正 (聞き手)：

九州大学薬学部の 4 年次の卒業研究から井本教授の
研究室に所属。

大学院生博士課程、助手、助教授を通じて井本先生と
リゾチームを題材とした研究を実施。

2003 年九州大学大学院薬学研究院教授就任後も井本
先生との共同研究を継続する。

井本先生とのリゾチームを題材とした論文は約 100 報。
