

蛋白質の分子集合と構造生物学

有坂 文雄（ありさか ふみお）

1. 大学入学から修士修了まで

私が大学に入学した 1968 年という年は、東大医学部の学生処分問題から始まって、全国で大学闘争が始まり、大学は閉鎖されて 8 か月間授業のない時期がありました。クラス討論が続く中、自分を含む数人の学生が教官にセミナーをお願いしたりしました。その中で、生物学担当の丸山工作先生が輪読セミナーという形で引き受けてくださり、週 1 回集まって、Scientific American を読むことになりました。現在では日経サイエンスの日本語版がありますが、当時はなく、丸善から各論文が別刷として市販されていました。Hue Huxley の Muscle Contraction や Arthur Kornberg の DNA Replication などを読んだことを今でも覚えています。大学 1 年で初めて読んだ英語の論文で、辞書を片手に四苦八苦して読んだものです。生物物理学という分野があることを知ったのもこの時でした。この時の印象が強烈で、それから「生物科学」を目指すようになりました。

高校の頃は物理にあこがれていましたが、大学に入って学んでみると、どうも物理学はものになりそうになく、どうしようかと思悩んでいた時でしたから、これだ！と思いました。卒業研究は教養学部基礎科学科の丸山研でアクトミオシンの ATP による収縮を調べました。ウサギの筋肉からアクトミオシンを抽出し、収縮力の ATP 濃度依存性を測定しました。丸山先生がよく言われたことで思い出すのは、「生物学では材料に何を選ぶかが大切だ。同じ筋肉の研究でも、電気生理学がやりたかったらカエル、筋肉蛋白質がやりたかったらウサギだ。」ということでした。

大学院に進むとき、丸山先生は京都大学に転出されたので、さて自分はどうしたものかと相談したと

ころ、「生物化学科の野田春彦先生のところに行きなさい。」と言われました。修士ではアクチンの重合の反応速度論を研究しました (Arisaka, Noda, Maruyama, 1974)。確か修士 2 年になった頃、C. Tanford のところで学位を取って帰国され、野田研究室の助手になられたのが猪飼篤さん (東京工業大学名誉教授) でした。私はだいたい前からいつか留学したいと思っていたのですが、猪飼さんの話を聴いているうちに、学生として留学するのもよさそうだと思うようになりました。猪飼さんが名前を挙げてくれた 3 人の米国の教授に手紙を書いて打診したところ、オレゴン州立大学 (OSU, Oregon State University) の K. E. Van Holde 教授から 1 年目から Research Assistantship を与えることができる、という返事もらったので、Van Holde 教授のところに行くことに決めました。既に父が他界し、留学の費用をどうするかが問題だったのですが、学術振興会 JSPS の米国大学院留学生に応募したところ運良く採用されました。奨学金は渡航費だけでなく、授業



1973 年 10 月御岳山頂上 前列左から (敬称略) 黒田正明、丸山工作、木村澄子、有坂文雄 後列 山本啓一、石井哲郎

料と若干の生活費も出してもらえることになっていて、ありがたいことでした。1972 年の 6 月に渡米しました。成田空港がまだ完成していなくて出発は羽田空港でした。

JSPS の規定で、留学に先立って目的の大学とは別の大学で英語の研修を受けることになり、テキサス大学のオースチン校に 6 週間滞在しました。テキサスというとサボテンとカウボーイ位しか頭に浮かばなかったのですが、あまり期待しなかったのですが、なんでも大学の敷地から石油が湧いたそうで、大変立派な建物ばかりで学生寮も素晴らしいものでした。後にオレゴン州立大学 OSU の寮に入って、米国の大学の寮がどこでもそれほどいい施設という訳ではないことが分かりましたが、研修では英語だけでなく、アメリカの歴史や文化についても若干学びました。「ホストファミリー」の家では宗教を話題にするのは全く構わないが、政治についてはあまり話題にしない方がいいと聞いた覚えがあります。民主党を支持するか、共和党を支持するかなどは微妙な話題のようでした。丁度その頃、当時のニクソン大統領が例の Watergate 事件を受けて辞任し、テキサス州のジョンソンが大統領に就任するために、ヘリコプターでホワイトハウスに降り立った様子がテレビで報道されていました。

6 週間の英語の研修を終えて、東海岸に飛び、当時ポストドクで Johns Hopkins 大学におられた野田研の先輩の須藤和夫さんと、Maryland 大学の博士課程に在籍しておられた野田研の 1 年上の水谷広さんを訪ねました。須藤さんは William Harrington 教授のところでもオシンを、水谷さんは Cyril

Ponamperuma 教授のところでも生命の起源の研究をしておられました。

訪問が終わって再び、今度は東から西に向かって大陸を横断してオレゴン州の Corvallis に着いたのは 9 月も終わりの頃でした。

2. 「ヘモシアニンにおける酸素の協同的結合とサブユニット間の解離会合」

Ph.D. コース (オレゴン州立大学博士課程)

到着した Corvallis の空はどんよりとして、雨期が近いことを思わせる天気でした。ホテルから Van Holde 教授に電話しましたが、初めての英語での電話で緊張したことを覚えています。次の日、研究室を訪れ、博士論文のテーマなどについて説明を受けました。当時研究室ではメインのクロマチングループとマイナーのヘモシアニングループの 2 つに分かれて、どちらを選んでもよい、ということでした。私は、はじめから競争の激しいクロマチンの分野に飛び込む自信がなく、ヘモシアニンの方が物理化学的にきれいな仕事が出来そうだったため、ヘモシアニン (*Calianassa Californiensis* = スナモグリエビ) を選びました。前任者の仕事でこのヘモシアニンは協同的に酸素を結合すること、安定な 6 量体 (以下、単量体と呼びます) と 24 量体 (以下四量体) が動的平衡にあることが示されていました。大学院の 1 年目は科目を取らなくてはならないため、あまり実験に集中できませんでしたが、1 年目の後半からは実験に取り組みました。

石英セルを端に結合したトノメーターというガ



KE Van Holde 教授

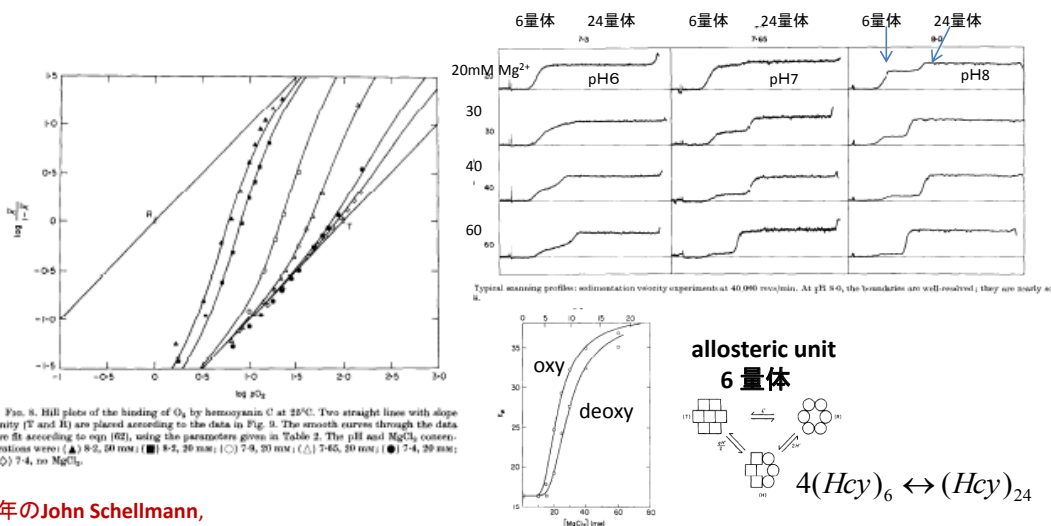


“Shrimp Gun” でスナモグリエビを採集する筆者

ラスの器具を使って、pH と Mg²⁺ イオン濃度を交えて酸素の結合を調べました。pH と Mg²⁺ イオン濃度は単量体 (17 S) と四量体 (39 S) 間の平衡に影響を与えます。17 S と 39 S の間の平衡は沈降速度法で調べることが出来ました。酸素の結合も単量体 (17 S) から四量体 (39 S) への会合に影響があるので、酸素存在下と非存在下でも平衡定数を調べました。

こうして、酸素の結合曲線データの取得は比較的順調に進み、超遠心分析を使ったサブユニット間相互作用の測定も順調に進みました。しかし、このサブユニット間の解離会合と、リガンドである酸素の結合を定量的に統合できないとあまり新しいことはなく、論文は面白みに欠けると感じました。1-2 か月経って、ふと思い出したのが 1 年以上前に J. A. Schellmann が Biopolymers に発表した論文 Macromolecular Binding で、コピーして引き出しに入れたままになっていました。ヘモグロビンの 2 量体- 4 量体間の平衡が酸素の結合によって 4 量体側に傾くことを理論的に定式化したもので、初めに読

んだときは、詳細は理解できなかったのですが、もう一度読み直してみたところ、やっとなんとか理解することができ、これはヘモシアニンの系に応用できると思いました。定式化や計算を始める前に、既に系の中で何が起きているかがほぼ理解できたと感じ、大変嬉しく思いました。興奮冷めやらぬうちに、ヘモシアニンの結合多項式 (Binding Polynomial) を O₂、H⁺ および Mg²⁺ の 3 つのリガンドの濃度を用いて定式化し、ヘモシアニンの単量体 (6 量体) と 4 量体 (24 量体) の間の平衡定数を各リガンドの濃度で表すことができました。それにより、実験データに理論曲線を当てはめることができました。Van Holde 教授 (Ken) もこの結果をたいそう喜んでくれ、しばらくして、そろそろ学位論文を書いたらどうか、と言われたので、これは学位が何とかなるという意味だと思ってたいそうほっとしたことを覚えています。論文は Journal of Molecular Biology 誌に受理されました (Arisaka and Van Holde, 1979)。1977 年 6 月 21 日の卒業式で学位 Ph.D. が授与されました。



1975年のJohn Schellmann, *Macromolecular binding*, Biopolymers, 14, 999-1018 (1975)

$$RT \ln \frac{[Te]}{[M]^4} = -\mu_{Te}^0 + 4\mu_M^0 + RT \ln \frac{(\sum_{Te})}{(\sum_M)^4}$$

$$\frac{[Te]}{[M]^4} = K = \exp \left\{ -\frac{1}{RT} \left(\mu_{Te}^0 - 4\mu_M^0 - RT \ln \frac{\sum_{Te}}{(\sum_M)^4} \right) \right\}$$

$$= K_0 \frac{\sum_{Te}}{(\sum_M)^4}$$

$$K = K_0 \frac{\left\{ \frac{(1 + L'_M)}{(1 + L'_{Te})} \cdot \frac{(1 + \alpha)^6 + L'_{Te}(1 + c\alpha)^6}{(1 + \alpha)^6 + L'_M(1 + c\alpha)^6} \right\}^4 (1 + k_y y)^{4p}}{(1 + k_z z)^{8p}}$$

F. Arisaka & K.E. (Van) Holde, Allosteric Properties and the Association Equilibria of Hemocyanin from *Calianassa californiensis*, *J. Mol. Biol.*, **234**, 41-73 (1979)

後から考えてみますと、*Calianassa* のヘモシアニンはヘテロで一次構造もわからない蛋白質でした。今でしたら、解離会合が定量的に測定できたとしても、一次構造のわからない蛋白質の解析は、いい雑誌には載らなかったのではないかと思います。当時は、DNA の塩基配列決定法は確立されていましたが、大きな蛋白質の一次構造を核酸から決定することはまだそれほど一般的になっていませんでした。今でしたら、まず mRNA を単離し、逆転写で DNA を合成してから塩基配列を決定し、アミノ酸配列を推定することになったと思います。

東海岸の Woods Hole では毎年 Physiology コースが開かれていました。Physiology といっても、内容は生化学から生物物理まで多岐にわたっていました。これに応募したところ、ちょうどその年は Van Holde 教授がオーガナイザーだったこともあったと思いますが、採用されて 7 月から 8 月にかけてマサチューセッツ州は Woods Hole の臨海実験所でコースに参加しました。午前中は毎日いろいろなところから当地を訪れている研究者を中心に、講師の講義があり、午後は実験を行いました。午前中の講義はどれも興味深く、大変勉強になりました。

オレゴン州立大学の Van Holde 研究室には当時、ドイツ人の Wolfgang Weischet がポストドクでクロマチンの研究をしていました。彼に、ヨーロッパで自分のポストドクの研究室としていいところはないだろうか、と相談してみたところ、彼は自分が Ph.D. の学生として過ごしたバーゼル大学ピオツェントルムの生物物理学研究室の Jürgen Engel 教授を勧めてくれました。そこで、Engel 教授に手紙を書いてポストドクとして雇用してもらえる可能性を聞いてみたところ、運よくすぐに、来たければいらっしやい、という返事をもらうことができました。Engel 教授は Van Holde 教授を高く評価しておられたのと、以前に前田悠さん（九州大学名誉教授）が博士研究員として滞在されたことも有利に働いたと思います。

3. T4 ファージ尾鞘の再構成

（バーゼル大学ピオツェントルム、博士研究員）

Woods Holde での Physiology コースを終えて 8 月に帰国し、婚約者と結婚後、二人で日本を発って、1977 年の 9 月にバーゼル大学に着任しました。ちなみに、1 年後に阿久津秀雄さん（大阪大学名誉教授）がご家族と共にバーゼルに来られて、同じ階の J. Seelig 教授の研究室のポストドクに着任されました。

当時 Engel 研ではコラーゲンや基底膜蛋白質ラミニンが主な研究対象でしたが、Kellenberger 教授の研究室との共同研究で T4 ファージ尾部、尾鞘蛋白質の研究が始まっていました。私は T4 ファージ尾部の研究に魅力を感じました。微生物学に関しては知識がなく、不安なところがありましたが、Eduard Kellenberger 教授が階下におられ、そこにオランダ人の Roel van Driel というポストドクがいました。van Driel さんとは会うのは初めてでしたが、以前からヘモシアニンの分野でお互いに名前を知っていました。そこで、彼と話してみたところ、微生物学は知らなくても大丈夫、必要なことは意外とシンプルだから、と言われて、同じヘモシアニン出身の彼がそう言うのなら大丈夫だろう、と若干安心しました。ちなみに、Kellenberger 教授の研究室にはジュネーブ大学の時は野田研出身の柳田充弘さん（京都大学名誉教授）が留学しておられ、バーゼル大学に来られてからは同じく野田研の先輩の桂勲さん（国立遺伝研名誉教授）、がポストドクで留学されました。

T4 ファージの研究を始めたころに、前任者の Jürg Tschopp さんが兵役から帰還して博士論文を提出するところでした（当時スイスは国民皆兵でした。1996 年に兵役の代わりに社会奉仕ができるようになったということです）。Tschopp さんに尾鞘蛋白質などの精製法を教えてもらい、一定濃度の尾管-基盤複合体に濃度を変化させた単量体尾鞘蛋白質を加えて、尾鞘の形成を超遠心分析と電子顕微鏡（負染色）で測定しました。尾鞘蛋白質単量体の沈降係数は 4.2 S、尾管-基盤複合体は 72 S、尾管-基盤複

合体上に尾鞘が形成されてされると 120S 尾部となります。尾部の形成を超遠心分析で調べると、尾鞘の形成は非常に協同的で、中途半端に形成された尾鞘はほとんど見られず、72S 複合体と 120S 複合体のみが見られました。この結果は電子顕微鏡（負染色法）の結果と一致しました。論文は JMB に受理されました（Arisaka et al., 1979）。

3 年間のバーゼル滞在中にあった研究所の最大の出来事は微生物研究科の Werner Arber 教授が D. Nathans, H. O. Smith と共に「制限酵素の発見」に関する功績に対してノーベル生理学・医学賞を受賞されたことでした。お祝いに、ビオツェントルムの研究者たちは夜になって W. Arber 教授を先頭に列を作って街を歩きましたが、私も彼らに混じって街をねり歩きました。

1979 年の春に、北大の石井信一教授がビオツェントルムを訪問されて、コンカナバリン A について講演を行われました。講演の後で石井教授とお話する機会があり、日本で就職先を探している旨お話ししたところ、ちょうど助手を探している先生が

おられるので帰ったら話しておきましょう、ということでしたが、その後音沙汰がありませんでした。しかし、年末になって石井教授から家に電話があり、自分のところで助手が取れることになったが、来る気はありますか？というありがたいお話でした。すぐに、よろしくお願ひします、とお答えしました。

4. T4 ファージ gp5 および gp18

（1980-1990 北海道大学薬学部）

バーゼルでの仕事をまとめ、札幌に赴任したのは 1980 年の 4 月でした。石井信一教授の研究室ではプロテアーゼの研究が主で、コンカナバリン A とピオシン（緑膿菌のバクテリオシン）の研究も行なわれていました。私は石井研の助手となったからにはプロテアーゼをやることになるのではないかと、思っていました。石井教授は、T4 ファージの尾部の研究を続けたいならばそれでもよろしい、ということでした。それは願ってもいないことでしたので、T4 ファージの尾部の研究を続けることにしま

バーゼル大学ビオツェントルム



Arber 夫人

Jürgen Engel 教授

Werner Arber 教授



Eduard Kellenberger 教授



Arber 教授ノーベル賞受賞記念祝賀パレード

した。石井教授は 1963 年に電子顕微鏡でピオシン R を観察し、これが T4 ファージの尾部によく似ていることを見出され、その後もピオシンの研究を続けておられました。

ちょうどその年に Wisconsin 大学の Kao & McClain (1980) が“Lysis from without” (大腸菌に T4 ファージを高い moi で感染させると、ファージの増殖を待たずに数分で溶菌する) は gp5 (gp は遺伝子産物) によって引き起こされることを報告しました。私は札幌ではこの辺りから仕事を始めたいと思いました。尾管-基盤複合体を大量に単離して、そこから溶菌活性を指標に分子量 4 万 2 千の gp5 を単離することができました (Nakagawa et al., 1985)。

Mosig らによって遺伝子 5 のゲノム塩基配列が決定されたのは 1989 年のことで、その結果、テイルリゾチーム gp5 は 575 アミノ酸残基の蛋白質として発現され、分子集合後に Ser351 の C 末端で切断されたものであったことが分かりました。この 351 残基の領域の C 末端側の半分は T4 リゾチーム (gp e) と高い相同性があるリゾチームドメインです。切り離された C 末端の約 200 残基の中に VXGXXXXX という 8 残基が 12 回繰り返す部分が

ありましたが、この段階ではこれがどんな立体構造をとるかは不明でした。ただし、この領域は捨て去られるわけではなくて完成したファージ粒子の尾部基盤に、感染するまで存在していることが明らかになりました (Kanamaru et al., 1999)。

他方、尾鞘蛋白質 gp18 と尾管蛋白質 gp19 の一次構造を決定すべく、札幌大藤永研で Maxam-Gilbert 法を習ってきて、遺伝子 18 と 19 (尾管遺伝子) の塩基配列決定を行いました。当時の塩基配列決定は現在より読みにくいところがあり、また、Maxam-Gilbert の化学決定法では読める塩基数に限りがあったため、最終的に塩基配列がほぼ完全に決定されるまでに数か月もかかりました。なお、塩基配列決定と同時に、蛋白質のペプチドの解析も行いました。この時期はペプチドの分析が HPLC で可能になった頃で、ペプチド解析も並行して行い、塩基配列を確認しました。ペプチド解析では同僚だった熊崎隆さん (青森大学名誉教授) や当時日科機 (株) におられた故銭場俊彦氏のお世話になりました。プロテインシーケンサーが出たのはこのころでした。PCR 法が現れたのも 80 年代で、筆者は米国のファージミーティングで Alberts の研究室の学生が PCR 法を



北大薬学部退職の頃 (80 年代後半) の薬品生物学教室

使った結果の報告をしたときに、質問が続出したのを覚えています。日本に帰って、温度を設定した恒温槽を 3 つ用意して PCR 法を試してみても意外とうまくいったことを覚えています。サイクルをあまり多く繰り返すと、今何回目だったか忘れてしまって困ったこともありました。

gp5 には am (アンバー) 変異以外に、ts (温度感受性)、cs (低温感受性)、hs (高音感受性: 60°C、30 分処理で失活) 変異株があり、もう一つの対象蛋白質である gp18 (尾鞘蛋白質) には ts、cs、hs の外に CBW (カーボワックス抵抗性変異株) が知られていました。これらの変異株を、単離した人たちから譲り受けて、変異株の変異部位を野生株と比較することによって変異部位を同定しました (Takeda et al., 1998)。この段階ではこの変異部位の決定は大きな意味を持つものではありませんでしたが、将来立体構造が決定されたときに立体構造上の変異部位と表現型の関係が明らかになると期待しました。また、尾鞘蛋白質 gp18 については、複合体形成によってサブユニット間に隠れる残基を差化学修飾法 (Differential chemical modification) によって同定しました (Takeda et al., 2004)。

当時は、ファージ蛋白質の結晶構造解析は夢のまた夢でした。ファージの構造蛋白質は各構成蛋白質それぞれを精製しても単量体として安定であるものはまれで、凝集体を形成してしまうものがほとんどでした。自分が現役のうちにはファージ尾部蛋白質の X 線結晶構造解析は難しく、それが、10 年後には現実のものになるとは想像もできませんでした。

5. T4 ファージ尾部構成蛋白質の構造生物学 (1990-2014 東京工業大学)

1990 年に石井教授が定年退職された年に、私は東京工業大学に新たに設立された生命理工学部の助教授として採用されて転任しました。

当時参加していた国際ミーティングが 2 つありました。一つはファージ生物学ミーティングで、1 年おきに Evergreen State College の Betty Kutter 教授

が主催していたもので、これはアッセムブリーだけでなく、複製・転写・翻訳の分野も取り上げていました。もう一つは、ファージ/ウイルスアッセムブリーミーティングで、これも 1 年おきに行われ、毎回異なる世話人が持ち回りで各地で開催していました。主だった世話人は Jonathan King, Fred Eiserling, Sherwood Casjens, 故 Roger Hendrix, などの人達でしたが、こちらは後年、FASEB Conference の一部に組み入れられ、ファージだけでなく、動物ウイルスや植物ウイルスも含まれました。

当時、ファージの分野は最盛期を過ぎたと思われ、動物ウイルスなどに分野を変えていく人たちが出てきて自分もこれからどうしたものかと思っていました。この頃 分野の指導的な立場だった J. King は上記のミーティングで、我々若手研究者に語りかけ、これからは蛋白質超分子の構造解析が盛んになっていくはずで、ファージは格好のターゲットであること、X 線結晶構造解析の研究者が興味を持ってくれるのを待つのではなく、自分で対象の蛋白質複合体を結晶化し、X 線の人達に共同研究を持ち掛ければ必ず彼らは興味を持つはずだ、ということを強調していました。しかし、自分が X 線結晶構造解析と直接関わりを持つまでにはさらに 10 年の月日が流れました。

1994 年になって、大島泰郎教授が学部のバイオ研究基盤支援総合センターに超遠心機を導入されるということだったので、強くお願いして、丁度少し前に市販されるようになっていた、新しい型の分析用超遠心機 XL-A を入れていただきました。超遠心分析機はその後の研究に大変重要な役割を果たしてくれました。

東工大に移ってしばらくして知り合い、退職までコミュニケーションを続けた人に、NIH の Allen Minton さんがいました。私が RASMB (Reversible Association in Structural and Molecular Biology) のインターネットフォーラムを通して蛋白質間相互作用の測定についてある質問をしたところ、すぐに応えてくれたのが Minton さんで、当時 Minton さんは阪大蛋白研に滞在していました。近いうちに東京に

出かけるのでそちらでセミナーをしてもいいよ、ということでした。Minton さんには後年(2001年に)特任教授として3か月間滞在してもらいました。

さて、1996年に米国の Vermont 州 Saxtons River で開催された上記の FASEB Phage/Virus Assembly Meeting に参加した際に大きな出会いがありました。Michel Rossmann 教授との出会いで、これがきっかけとなってその後 X 線結晶構造解析について真剣に考えるようになりました。Rossmann 教授は、上記集会で私の発表の後、休憩の際に私のところに来てくれて、君の研究は面白そうなのでよかったら共同研究をしないか、と申し出てくれました。当時、Rossmann 教授の研究室には2人の優秀なロシア人の学生 Petr Leiman と Victor Kostychenko がいました。2人はモスクワの Vadim Mesyanzhinov 教授の元学生でしたが、Mesyanzhinov 教授とは以前 Basel の Kellenberger 教授のところであつたことがありました。

それから間もない頃、九大の井本泰二教授のこ

ろで修士を終えた金丸周司君が当研究室の博士課程の学生として入ってきました。井本研ではリゾチームをやっていたということだったので、博士課程のテーマとしてテイルリゾチーム gp5 をやってもらうことにしました。1998年に博士号を授与された後、元々留学に興味を持っていたこともあり、Rossmann 教授と交渉した結果、ポストドクとして Rossmann 研に採用されることになりました。金丸君は遺伝子5と27の発現系を携えて Purdue 大学の Rossmann 研でポストドクを始めました。

他方、2001年、大阪府大の高橋克忠先生のお勧めがあつて、けいはんなで小規模の国際会議(the 7th Keihanna International Conference on Molecular Biophysics: New Approaches to Solution Interaction of Biological Molecules, July 27-29, Keihanna, Kyoto)を開催することができました。その時、上述の Allen Minton さんに超遠心分析の関係で米国で活躍している若い人を紹介してほしいと頼んだところ、NIH の Peter Schuck さんを紹介してくれました。そこで、Peter Schuck さんを講演者の一人として招聘するこ



大島泰郎教授



Prof. Vadim Mesyanzhinov



Prof. Betty Kutter



Prof. Michael G. Rossmann



Dr. Allen Minton



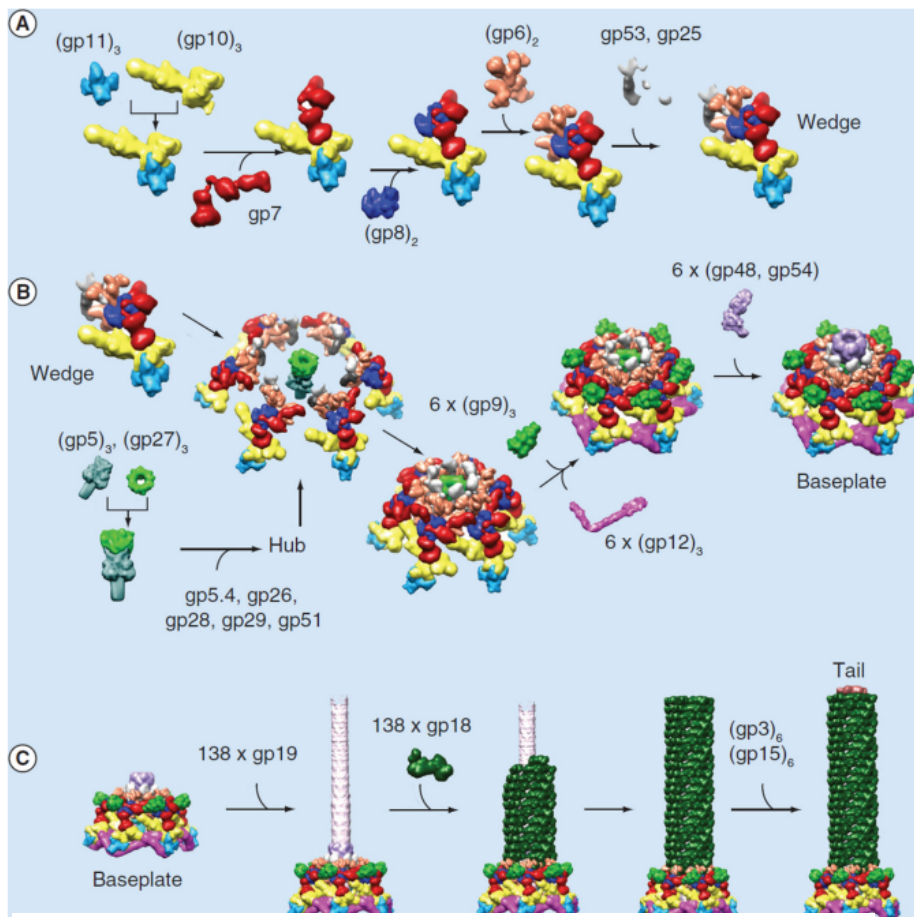
Dr. Peter Schuck (NIH)

とができました。彼の講演はその数年前に自ら開発した超遠心分析の解析プログラム SEDFIT に関するものでした。SEDFIT はまだそれほど世に知られていませんでしたが、私は大変感銘を受け、是非これを自分の研究に導入したいと思いました。その時から 20 年以上が経ち、SEDFIT は今では超遠心分析のデータ解析のスタンダードになっています。

さて、その間、金丸周司君は留学先の Rossmann 研究室で gp5-gp27 複合体の結晶化に成功し、Petr Leiman と構造解析を行って 2002 年に結果を Nature に発表することができました (Kanamaru et al., 2002)。構造を見ると、先述の 12 回の 8 残基

VXGXXXXX の繰り返し構造は新規の 3 本鎖 β ヘリックス構造を形成していることが分かりました。この棒状構造は感染の際に外膜に突き刺さり、穴を開ける構造と考えられます。なお、2006 年には Rossmann, Arisaka, Mesyanzhinov の 3 人がグループ代表者として申請した HFSP (Human Frontier Science Program) が採用され、研究費を 3 年間受けることができ、大変助かりました。

バクテリアの 6 型分泌系 (T6SS) は T4 ファージの収縮性尾部に類似した注射器のような構造の複合体を持ち、VgrG は細胞に穴を開ける gp27-gp5 複合体と相同です。VgrG はバクテリアの超分子 T6SS



尾部の分子集合 (A) Wedge の分子集合 (B) 中心ハブの周りに 6 個の wedge が集合し、さらに 6 つの小尾繊維が集合して尾部基盤が形成される。(C) 尾部基盤がプラットフォームとなって尾管と尾鞘が重合により集合する。さらにターミネーター蛋白質 gp15 と gp3 が結合して尾部が完成する。集合過程については既に明らかにされていたが、ここではすべての部品蛋白質の原子レベルの立体構造が明らかにされた (Yap & Rossmann, 2014)。

の先端に位置しています。当研究室博士課程の内田一也君は VgrG1 を大腸菌 O157 で大量発現しました。その結果、VgrG1 は溶液中で三量体を形成し、 β 構造に富むことが分かりました。さらに VgrG1 を結晶化し、1.95 Å の分解能で構造を決定することができました。その結果、VgrG1 は gp5 と同じく 3 本鎖 β ヘリックスを形成していることが分かりました (Uchida et al., 2014)。

当研究室で博士号を取得した留学生の Moh Lan Yap さんは 2012 年から 2017 年にかけて Michael Rossmann 教授の博士研究員として研究を行いました。Yap さんは博士課程で 3.3 MDa の、in vitro で再構成された複合体の原子構造決定に成功しました。ここでは、X 線結晶構造解析とクライオ電顕の両手法を用いましたが、最終的に、クライオ電顕の方が高い分解能を得ることができて大変驚きました。なお、クライオ電顕の分解能は X 線結晶構造解析と異なり、部位によって分解能が異なることが印象に残りました (Yap et al., 2016)。

6. まとめ

私は 2014 年に東京工業大学を退職しました。現職中の仕事を振り返ってみて第 1 に思うのは、研究の節目、節目でいろいろな研究者との出会いがあったことでした。パーゼルでの博士研究員までは物理化学の研究室を遍歴しましたが、北大は生化学の研究室でペプチドの分析を学び、蛋白質の研究では物理化学と共に化学が使えると大変有利であることを学びました。第 2 に、私にとっては共同研究が極めて重要でした。超遠心分析、X 線結晶構造解析、クライオ電顕法など、それぞれの手法の第一人者と

共同研究ができたことは幸いでした。

また、一つのことを続けていてよかったと思ったのは、研究が行き詰ったときに丁度新しい実験法が出現してきたことでした。ちょうど北大に移ったところに HPLC でのペプチドの解析、プロテインシーケンサーなど新しい手法が開発されてそれを利用してさらに研究が進んだこと、また、新しい手法ではありませんが、北大に移った時には、丁度必要とされていたリゾチームのアッセイの方法をそこで取り入れることができたこともありがたいことでした。

尾部基盤の構造は研究を始めた '78 年頃は電子顕微鏡の分解能 10 Å 程度の知見でしたが、最終的に原子レベルで構造を解き明かすことができたのは共同研究の成果で、研究の大きな目的が達成されて、大変嬉しく思いました。感染の際に基盤の構造変化と共に中から飛び出してくる小尾繊維が基盤内ではどのように格納されているかが明らかになったのは基盤の構造が原子レベルで明らかになった時でした (Kostyuchenko et al., 2003)

残った問題は、尾部の形成に必須な、gp26, gp28, gp51 の 3 つの遺伝子産物の機能です。gp51 は以前から構造形成において触媒的な働きをしていることが知られていました。gp26 と gp28 の電子密度に相当するものが基盤構造中に見えないので、構造を形成する部品ではないと思われませんが、構造形成には必須ですが、作用機構は未解決のまま残されました。また、gp29 は尾部 (尾管) の長さを決定していることは間違いないのですが、長さ決定のしくみなど詳細は不明のまま残されました。λ ファージにも '物差し蛋白質' (gpH) が知られていますが、T4 ファージの gp29 とは全く相同性はありません。

謝 辞 : 筆者を生物物理化学へ導いてくださった丸山工作教授に感謝します。また、共同研究でお世話になった Michael G. Rossmann 教授、ファージ研究を始めるにあたっていろいろご教授いただいた E. Kellenberger 教授に感謝します。またここですべ

てのお名前を挙げられませんが、多くの方々に共同研究を通じてお世話になりました。また、研究を推進してくれた研究室の助教、学生諸君にもお礼を申し上げます。

References

- Arisaka F. (2018) Forty years of research on the assembly and infection process of bacteriophage. *Biophys Rev* **10**, 131–136
- Arisaka F, Noda H, Maruyama K (1974) Kinetic analysis of the polymerization process of actin. *Biochim Biophys Acta* **400**, 263–274
- Arisaka F, Tschopp J, van Driel R, Engel J. (1979) Reassembly of the bacteriophage T4 tail from the core-baseplate and the monomeric sheath protein P18: a cooperative association process. *J Mol Biol* **132**, 369–386
- Arisaka F, Van Holde KE (1979) Allosteric properties and the association equilibria of hemocyanin from *Callianassa californiensis*. *J Mol Biol* **134**, 41–73
- Duda RL, Eiserling FA (1982) Evidence for an internal component of the bacteriophage T4D tail core: a possible length-determining template. *J Virol* **43**, 714–720
- Kanamaru S, Gassner NC, Ye N, Takeda S, Arisaka F (1999) C-terminal fragment of the precursor tail lysozyme of bacteriophage T4 stays as a structural component of the Baseplate after cleavage. *J Bacteriol* **181**, 2739–2744
- Kanamaru S, Leiman PG, Kostychenco VA, Chipman PR, Mesyanzhinov VV, Arisaka F, Rossmann MG (2002) Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. *Nature* **415**, 553–557
- Kao SH, McClain WH (1980) Baseplate protein of bacteriophage T4 with both structural and lytic functions. *J Virol* **34**, 95–103
- Kostyuchenko VA, Leiman PG, Chipman PR, Kanamaru S, van Raaij MJ, Arisaka F, Mesyanzhinov VV, Rossmann MG (2003) Three-dimensional structure of bacteriophage T4 baseplate. *Nat Struct Biol.* **10**, 688–93
- Nakagawa H, Arisaka F, Ishii S-I (1985) Isolation and characterization of the T4 phage tail-associated lysozyme. *J Virol* **54**, 460–466
- Schellman J A (1975) Macromolecular binding. *Biopolymers* **14**, 999–1018
- Takeda S, Hoshida K, Arisaka F (1998) Mapping of functional sites on the primary structure of the tail lysozyme of bacteriophage T4 by mutation analysis. *Biochem Biophys Acta* **1384**, 243–252
- Takeda S, Suzuki M, Yamada T, Kageyama M, Arisaka F (2004) Mapping of functional sites on the primary structure of the contractile tail sheath protein of bacteriophage T4 by mutation analysis. *Biochim Biophys Acta* **1699**, 163–171
- Uchida K, Leiman PG, Arisaka F, Kanamaru S (2014) Structure and properties of the C-terminal β -helical domain of VgrG protein from *Escherichia coli* O157. *J Biochem* **155**, 173–182
- Yap ML, Klose T, Arisaka F, Speir JA, Veisler D, Fokine A, Rossmann MG (2016) Role of bacteriophage T4 baseplate in regulating assembly and infection. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 2654–2659
- Yap ML, Rossmann MG. (2014) Structure and function of bacteriophage T4. *Future Microbiol* **9**, 1319–27

有坂文雄の略歴

- 1944年 鎌倉に生まれる
- 1972年 東京大学教養学部基礎科学科卒業
- 1974年 東京大学理学系研究科修士課程修了
- 1977年 米国オレゴン州立大学大学院博士課程修了、Ph.D.
- 1977年 スイスバーゼル大学ビオツェントルム博士研究員
- 1980年 北海道大学薬学部助手
- 1990年 東京工業大学生命理工学部助教授

シリーズ「わが国の蛋白質科学研究発展の歴史」第 28 回

2010 年 東京工業大学生命理工学部教授

2014 年 東京工業大学名誉教授

