

シリーズ「わが国の蛋白質科学研究発展の歴史」
第 27 回原稿配信のお知らせ

平成 30 年 12 月 27 日

今回は第 27 回原稿を配信いたします。

第 27 回 鏡山博行先生 「一次構造から高次構造探求への道 — 終点は新たな出発点」

なお、これまでに下記の 26 名の先生方による原稿を配信済みです。

- | | | | |
|--------|--------|--------|---|
| 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 |
| 第 7 回 | 八木達彦先生 | 第 8 回 | 崎山文夫先生 |
| | | | 崎山文夫先生「赤堀四郎先生 生誕 100 年に想う」
(蛋白質核酸酵素より転載) |
| 第 9 回 | 高橋健治先生 | 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 | 第 16 回 | 油谷克英先生 |
| 第 17 回 | 月原富武先生 | 第 18 回 | 阿久津秀雄先生 |
| 第 19 回 | 千谷晃一先生 | 第 20 回 | 坪井正道先生 |
| 第 21 回 | 吉田賢右先生 | 第 22 回 | 大島泰郎先生 |
| 第 23 回 | 荒田洋治先生 | 第 24 回 | 井本泰治先生 |
| 第 25 回 | 熊谷泉先生 | 第 26 回 | 下西康嗣先生 |

今後も、わが国の蛋白質科学研究発展の歴史について先生方に執筆をお願いしています。
ご期待下さい。

日本蛋白質科学会 広報担当 廣明 秀一、白井 宏樹

電子メール版ニュースレター発行

〒562-0015 大阪府箕面市稲 4-1-2 日本蛋白質科学会事務局

Tel : 072-729-4125 / Fax : 072-729-4165

E-mail : jimmu@pssj.jp URL : <http://www.pssj.jp>

編集責任者：廣明 秀一（名古屋大学大学院創薬科学研究科）

白井 宏樹（アステラス製薬株式会社）

一次構造から高次構造探求への道 — 終点は新たな出発点

鏡山博行（かがみやま ひろゆき）

日本蛋白質科学会発足の記念祝賀会で、日本生化学会会長として祝辞を述べたのが 2001 年、もう 20 年近く経ったのかとの思いです。当時我が国の蛋白質研究は国際的レベルに達していたと思いますが、私が学部教育（大阪大学医学部）を受けた昭和 30 年前半は、Sanger がインスリンのアミノ酸配列を決定して間もないころでした。講義では「蛋白質はアミノ酸の集合体である」というレベルで、「蛋白質の一次構造や高次構造」「構造と機能相関」などの言葉は全く出てきませんでした。

インターン、国家試験を終え、昭和 37 (1962) 年生化学第一教室の院生となりました。4 年勉強して学位を手にしたら内科医になるつもりでしたが、結局生化学者、蛋白化学者として定年を迎えることになってしまいました。細かい記憶は薄れていますが、その間の歩みを物語風に記すことで、当時のわが国の蛋白化学の歴史の一端に触れられればと思います。

研究者へのスタート

当時は酵素の時代でした。生命の根源は酵素である、酵素に関わらない者は生化学者ではないといった雰囲気、権威のある学術集会「酵素化学シンポジウム」には生化学の錚々たる先生方が競って発表されていました。しかし、内容は「Purification and Characterization of ...ase」と、新しい酵素を見つけ、精製して分子量を測定、至適 pH、基質特異性を調べ、 K_m や V_{max} を出し、阻害剤とその様式を調べるというレベルのものが多数を占めていました。不安定な酵素をいかに効率よく精製したかが評価される時代で、酵素活性の

正確な測定、酵素精製ができることが生化学者としての第一歩であったように思います。多くの酵素は生体内含量が少なく、10 mg も精製されれば御の字で、できることは限られていました。

一方、欧米では Sanger がインスリンのアミノ酸配列を、Perutz や Kendrew がヘモグロビンやミオグロビンの立体構造を決め、Hershey、Chais が DNA が遺伝子の本体であることを突き止め、Watson、Crick が DNA 二重らせん構造を提唱するなど、生命科学の新しい幕開けの時代に入っていました。

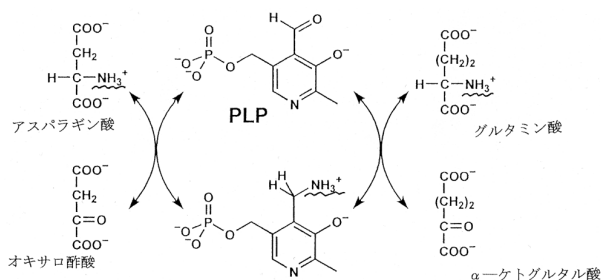
主任教授は早石修先生で、京都大学医学部医化学教授と 2 年間兼任された 2 年目でした。先生は NIH で、酸素分子を取り込んで行われる酸素添加反応、それを行う酵素である酸素添加酵素を発見されて帰国され、京大教授として迎えられています。大学院での最初の仕事は、米国留学から帰国され、助手として赴任されたばかりの野崎光洋先生を手伝って、カテコール環を開裂するメタピロカテカーゼという酸素添加酵素を緑膿菌から精製する事でした。酸素添加酵素は極めて不安定なため精製が難しく、安定化の条件を見出して精製し、その性質を調べることを世界的に競っていました。酵素精製の意味も分からず、その手段など見たことも聞いたこともない。「病態生理学的なことをしたい」との期待をもって生化学を選んだのに、「こんな舌を噛みそうな名前ものを細菌から精製して調べて何の役に立つのか」と割り切れない気持ちを抱きながら、「テクニックの習得と思えばいいか」と 2、3 か月野崎先生の後ろについて歩いていました。偶然に 10%アセトンで安定化することが分かり、結晶化に成功しました（結晶化は

純化の一つの目安)。酸素添加酵素で世界のトップに躍り出たわけで、周囲からは「すごい仕事したな」と言われて、何がどうすごいのかも分からず、戸惑っていたのが当時の私でした。おかげで、均一性の確認や分子量の測定に、チゼリウス電気泳動、スピスコ超遠心機など大型機械を必要としますので、理学部や蛋白質研究所の専門の先生方をお願いして回り、夏休みがなくなってしまったことも懐かしい思い出となっています。これが私の研究者としての最初の論文になりました¹⁾。早石先生は兼任期間が切れて京大に戻られ、野崎先生も一緒に京大へ移られたので、講師の和田博(→阪大薬理学教授)、助手の森野能昌(→熊大生化学教授→同学長)両先生を中心に成果が出つつあったトランスアミナーゼのグループに参加することになりました。

余談になりますが、滋賀医科大学が新設された時、生化学第1講座の教授に京大から推薦された野崎先生、助教授には阪大から推薦された私が就任することになり、また後に私が大阪医大の教授として赴任して間もなく早石先生を学長にお迎え



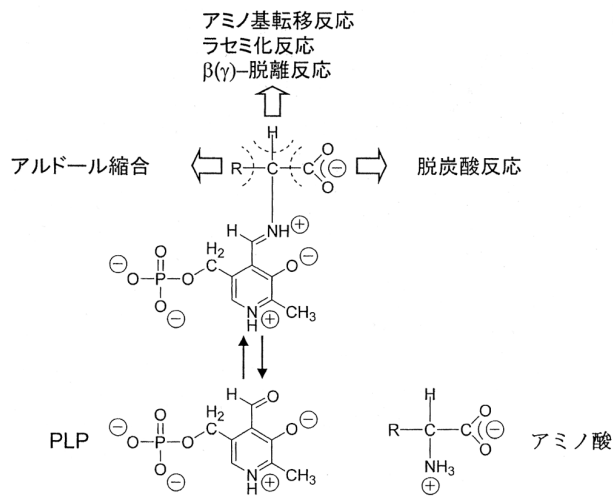
左から和田博先生、私、一人おいて右端森野能昌先生



することになりました。人生の奇しき縁というものを実感しました。

ライフワークへのスタート

それから 40 年付き合うことになるのが、トランスアミナーゼの主流といえる GOT (Glutamate-Oxaloacetic Transaminase、現在は Aspartate Aminotransferase で AST と呼ばれるが、以後も GOT を用いることとする) です。アスパラギン酸のアミノ基を α -ケトグルタル酸に移し、オキサロ酢酸とグルタミン酸を産生する可逆反応を触媒する酵素で、補酵素としてピリドキサルリン酸 (PLP) を用いてアミノ基の移動を中継します (図 1)。PLP 自体極めて多様な反応を行うことが Snell によって見いだされていました。『金属イオン共存下でアミノ酸と反応させると、アミノ酸のアミノ基と PLP のアルデヒド基の間に Schiff 塩基が形成される。ピリジン環が α 炭素周辺から電子を引っ張るので α 炭素の三つの結合が切れやすくなる。カルボキシル基が外れると脱炭酸反応、 α 水素との結合が切れるとプロトンが外れるとともに以後の電子の動きによってトランスアミナーゼ、ラセミ化、側鎖からの原子団の脱離や置換、側鎖が切れるとアルドール開裂反応が起こる (図 2)』という説明でした。Dunathan は、軌道の重なりから、ピリジン環に垂直になった結合が切れると考察し



ました。Jencks は著書「Catalysis in Chemistry and Enzymology」で、「神は、生物学者が生命を持つものの生理学についてどんな質問にも答えを見つられるように生命体を創造したといわれている。もしそうなら、PLP は電子を動かすことに楽しみを感じる酵素学者や化学者に満足と啓発を与えるように創造されたものと言わねばならない。というのは、この補酵素の化学的性質からうまく解釈できるような広い範囲の反応が、酵素系にもモデル系にも関与しているような補酵素は他にないからである。表面的には全く違うように見えるこれらの反応の大部分は、ある一つの共通の構造的特徴によって起こりうる」と述べました。このような多才な PLP も補酵素として特定の蛋白質と結合すると、切れやすい結合が決まり基質特異性とともに関与特異性が決まり、反応効率もけた違いに増大します。PLP 酵素のアポ蛋白質の働きに興味が集まるのは当然ですが、多くの酵素と同様生体内含量が僅かであり、蛋白質部分の研究には手が届かない状態でした。

GOT はソ連の Braunstein によって発見された酵素で、心臓や肝臓に比較的多く含まれているため、米国の Jenkins により早くから精製され (1959)、物理化学的手法によって詳細な研究が進められ、2、3 年にわたって J. Biol. Chem. に 10 報を超える発表がありましたので、それを勉強することから始めました。ほぼ時を同じくして世界の複数のグループによって、血中に電気泳動で区別される 2 種の GOT が存在することが認められ、一つはミトコンドリア分画、他方は細胞可溶性分画に存在し、各々 mGOT、sGOT と呼ばれていました。和田、森野両先生がブタ心筋の二つの細胞分画から両 GOT を別々に精製され、その性質を調べておられたところで、それを手伝うところから GOT との長い付き合いが始まりました。

精製の過程は省きますが、一回、20 kg の心筋から一か月余りかければ、両酵素を 200 mg 前後得ることができました。大量精製の現場は研究室というより工場のようなものでした。両酵素ともに分子量約 10 万、PLP 含量から 2 量体であること、基質特

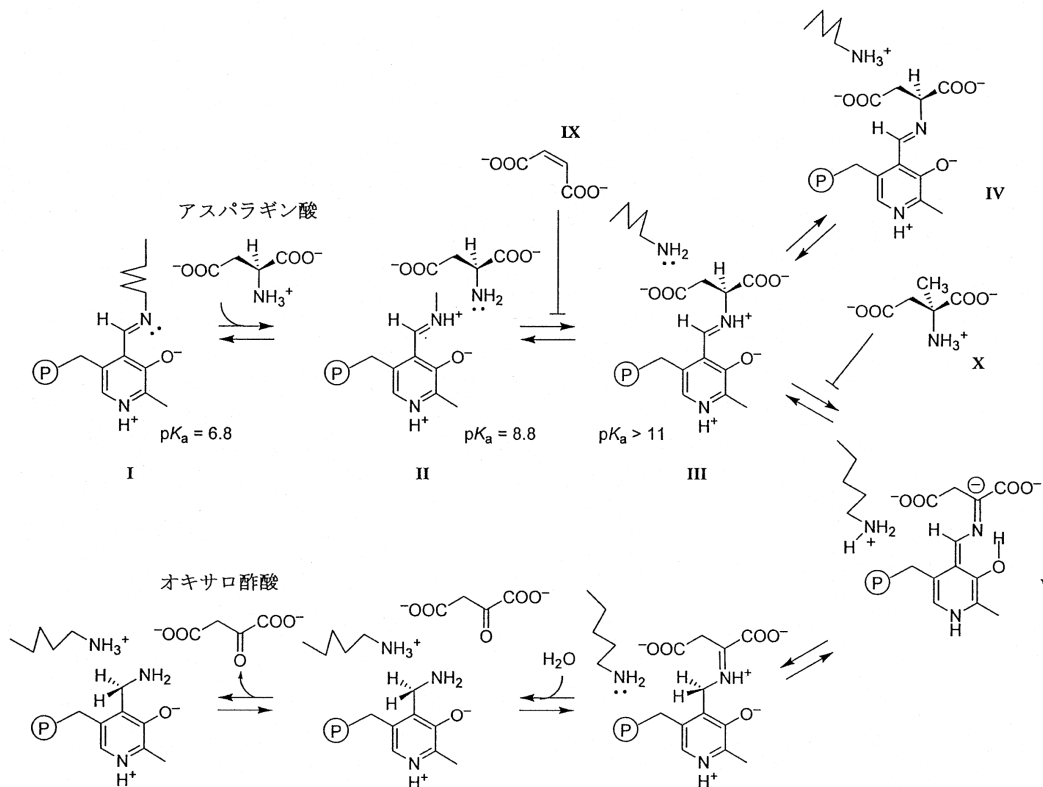


図 3. GOT の反応過程(半反応)

異性、基質に対する K_m にも大差ないが、電気泳動、熱安定性、尿素変性に対する抵抗性が異なり、免疫学的にもそれぞれの抗体に対して交叉反応しないなどから、当時 Kaplan が提唱していたアイソザイムであることが明らかになっていました。

Jenkins によって精製されたのは sGOT でしたが、数々の重要な特徴を提示していました (図 3)。PLP はリシン残基の ϵ アミノ基とシッフ塩基を形成している (内シッフ塩基) (図 3-I)。基質アミノ酸が活性中心に結合するとシッフ塩基交換反応が生じ、アミノ酸の α -アミノ基とのシッフ塩基に変わる (外シッフ塩基) (図 3-III)。さらに、遊離したリシン残基の ϵ アミノ基が基質アミノ酸の α H を引き抜き (図 3-V)、反応が進行して行きます。PLP 酵素はシッフ塩基に基づく特徴的な吸収スペクトルを示し、プロトン化、非プロトン化の状態に変化します。彼はそれを解析し、内シッフ塩基の pK_a が 6.8 (本来の pK_a は 12~13) で、活性中心では異常に低いことを示しました。ここへ基質アナログであるマレイン酸 (図 3-IX、アスパラギン酸と同じく炭素数 4 のジカルボン酸、アミノ基がないためシッフ塩基交換反応は起こらない) を結合すると pK_a は 8.8、 α -メチルアスパラギン酸 (図 3-X、シッフ塩基交換反応は生じ、外シッフ塩基はできるが、 α -水素がないのでその段階で止まる) を結合すると 11 以上になる、つまり反応が進行するにつれてシッフ塩基の塩基性が高まって行くという重要な知見を得ていました。

Snell のモデル反応や Jenkins らの sGOT の研究によって蓄積された、このような知見を基にソ連の Karpeisky という天才が GOT の反応機構を見事に説明しました (1966)。この機構の説明は省略しますが、多くの生化学の教科書に載っています。シッフ塩基の pK_a の変化については以下のように説明しています。『活性中心には基質のカルボキシル基を結合する正電荷がシッフ塩基の傍らにあるはず。そのために内シッフ塩基の pK_a は低くなっている。基質が結合してその正電荷を中和することによって pK_a は上昇する。基質の α アミノ基の

pK_a は、カルボキシル基の負電荷が中和されるために低くなり、プロトンが pK_a の上昇したシッフ塩基に移るので、正電荷のなくなったアミノ基がシッフ塩基の炭素を攻撃しやすくなってシッフ塩基交換反応がスムーズに進む。さらにリシン残基の ϵ -アミノ基が基質の α 水素を引き抜くためには、外シッフ塩基の pK_a がリシン残基の ϵ アミノ基の pK_a より高くないといけない。でないとシッフ塩基からプロトンが ϵ アミノ基に移ってしまい、基質の α プロトンを引き抜けなくなる (図 3-IV)。』初めからシッフ塩基が本来の高い pK_a を持っている水素が結合していると、アミノ酸のアミノ基の水素をいったんどこかへ移すという余分なステップを踏まなければならないわけで、この酵素にはうまい仕組みが設けられていると説明したのです。

Karpeisky によって出されたこの美しいスキームによってトランスアミナーゼの反応機構はすべてわかったと考えられたのでした。しかしながら、ここには酵素蛋白質の役割については何も語られていないのです。当時の利用できる技術、手段では他の多くの酵素同様、これ以上の情報を得るのは難しく、何を試みても「群盲象を撫でる」だけで、酵素の実体には迫れませんでした。一方で分子生物学や細胞生物学など興味をそそる新しい分野が拓かれたこともあって、多くの酵素ハンターが酵素を離れ、酵素学黄金期は去った、というのが当時の私の印象でした。

これ以上踏み込むためには構造を知るしかない、との思いは日を追って強くなりました。我々には構造は異なるが同じ特異性を持った二種類の酵素がある。その一次構造を比較したら、反応に関与する部分は類似し、細胞内局在を決めている部分は異なっているだろうという極めて単純な発想でした。立体構造決定は、酵素化学者にとってはまだ全く別世界の夢物語でした。ヘモグロビンやミオグロビンの立体構造はすでに決定されており、技術的には不可能ではなくなっていたのですが、分子量 10 万という大きな蛋白質に挑戦されてい

る方は、我が国にはまだおられなかったと思います。

未知の蛋白化学へ踏み出す

「やるしかない」と踏ん切りをつけましたが、スタッフ全員やったこともなければ、勉強したこともない。どんな試薬、どんな器具、どんな装置が要するのか想像もつかないという状況で、無謀といえれば無謀、よく決心したものと思います。ただ、医学部のすぐ裏に理学部、蛋白質研究所、酵素研究所があり、成田耕造、松原央、次田皓先生などからご指導、ご支援を受けることができました。先ずは、和田先生と親しかった松原先生への相談から始まりました。「Sanger の方法で N 末端を調べることから始めましょう。丁度 4 年生の学生が卒業実験でそれに取り組んでいるから一緒に勉強してみてもいい」ということになりました。その時 DNP 法の手ほどきをしてくれた 4 年生の学生さんが吉川信也さんで、後に兵庫県立大学の教授になられ、膜蛋白質の結晶解析の草分けとして脚光を浴びられました。sGOT の N 末端はアラニン（すでにイタリアのグループが報告していたので、技術習得の意味があった）、mGOT はセリンであることが同定でき、両者が異なった蛋白質であることを化学的に証明できました。定量の結果分子量 10 万につき 2 モルであることも分かりました。成田先生からメチオニンスルフォキサイドと鑑別しておく必要があるとのコメントをいただき、そのために数か月苦勞したのも懐かしく思い出されず。

C 末端アミノ酸残基の決定には手こずりました。ガイドブックに従ってカルボキシペプチダーゼを作用させ、経時的に遊離してくるアミノ酸をアミノ酸自動分析機で分析するのですが、全てのサンプルを成田先生が自ら分析機にかけてくださいました。新しい貴重な機械だったので他人に扱わせたくないのかなと勝手に推察していました。塩基性アミノ酸に特異的なカルボキシペプチダーゼ B 処理で、mGOT の C 末端がリシンであることは明

確に示されました。sGOT はカルボキシペプチダーゼ A の処理でイソロイシンがストイキオメトリックに出現するが、反応液を除蛋白し上清を塩酸で加水分解するとグルタミン酸が同程度に増加し、見えていたグルタミンが消失します。イソロイシンかグルタミンかということになりましたが、ヒドラジン分解ではイソロイシンはかけらも出ず、グルタミンにはこの方法は適用できないのです。

「グルタミンと思うが、技術的な問題ではないので証明は難しい」というのが成田先生のご意見でした。途方にくれたのですが、「この間ペプチドシンポジウムで理研の松尾さんが C 末端残基の特異的トリチウム標識という新しい方法を発表していたが、こんな大きな蛋白質には無理だろう」と成田先生がつぶやかれたのに飛びつき、「やってみんと分かりません。紹介してください」と頼み込んで、サンプル持参で東京へ行き、理研で数日お世話になりました。松尾壽之先生で、後に宮崎医科大学で数々の生理活性ペプチドを発見され、学長になられました。先生はすでに米国へ発たれた後で、お弟子さんの藤本博士に面倒見ていただき、mGOT リシン、sGOT はグルタミンであることが確認できました。この方法を大きな蛋白質に適用した最初の例になりました。この GOT アイソザイムの両末端残基の同定が私の蛋白化学者としてのスタートになりました²⁾。何も知らない医学部出の素人が、多くの先生方に助けられ、励まされ、時には叱られながら 2 年近くを要し、100 mg 前後の試料を用いるという、今では信じられない手間と材料を費やしました。

ここで、米国へ行くことになり、カリフォルニア大学バークレイ校、PLP のゴッドファーザー Snell 教授の研究室で 3 年余り過ごしました。これからは「蛋白質の構造と機能相関」が酵素学の主流になると考えておられ、大腸菌のトリプトファンナーゼという PLP 酵素（分子量 5 万のサブユニットからなる 2 量体）が大量に得られるので、その一次構造を手掛けることになりました。すぐ近くのスペースサイエンス研究所に松原先生が研究室を

構えておられたので、共同研究の形をとってもらい、蛋白質の一次構造決定のストラテジーを学習しました。トリプシン消化によって得られたペプチド断片のアミノ酸配列を決定して（全残基の 90%）帰国しましたが、後年 Snell 研で cDNA から全構造を推定した時、私の決めた配列に間違いはなかったと Snell 先生が言っていたと人伝に聞きました。分子量数万でも時間をかければできるという手ごたえを得ました。

1970 年の年末に帰国し、阪大医学部助手として構造決定に取り掛かることにしました。Braunstein の発見した酵素ということで、sGOT の一次構造決定をソ連共産党が国の威信をかけて手掛けていて、最終段階にあるとの情報が米国滞在中に入っていたので、mGOT に専念することにしました。sGOT は 1972 年 412 残基の全構造が報告されましたが、当時決定されたアミノ酸配列としては、β ガラクトシダーゼ、グルタミン酸脱水素酵素、IgG に次いで 4 番目に長い配列でした。当時はすでにながりの数の蛋白質の一次構造が報告されていましたが（それでも一次構造年間発表論文数は 50 もなく、ほぼすべての論文に目を通すことができました）、2~300 残基以下が圧倒的に多く、400 残基以上は極めて僅かでした（図 4）。我が国で蛋白質の一次構造決定に従事されていたのは、成田耕造、松田源治、高橋健治、次田皓、松原央、岩永貞昭、田宮信雄などの諸先生数名であったと思います。我が国の蛋白質化学の揺籃期あるいは黎明期と呼んでもいい時代でした。Sanger がインスリン 51 残基の構造決定にほぼ 10 年かかっており、素人の

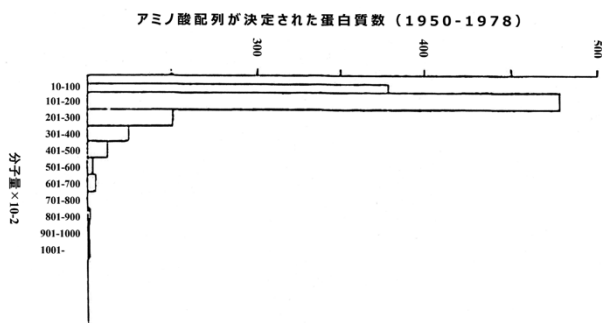


図 4. 1978 年時点での配列決定された蛋白質数と分子量 (Walsch, K.A. et al. Ann. Rev. Biochem. 1981 より)

私が一人で 400 残基余りの蛋白質を手掛けて、定年まで頑張っても終わらんだろうと考えられて当然でした。「ほんまにやるんか？そんなら一生テーマに困らんですむな」とからかわれたこともありますが、周囲の偽らざる見方だったと思います。

蛋白質の一次構造決定には全く無縁の研究室に米国の松原研の設計を思い出しながら、そして他のスタッフに遠慮しながら、器具、試薬、装置を揃え、ペーパークロマトグラフィーや高圧ろ紙電気泳動あるいはエドマン分解を行う場所の確保などに 1 年ほどかかりましたが、その間に mGOT を差し当たり 1 グラムを目途に溜めることを目指しました。米国で使っていた 1、2、5、10 μl のマイクロピペット、ガラス細管の先を細く引き伸ばした使い捨てのパスツールピペットも持ち帰り、一本一本洗っては何度も使ったのも、貧しいころの思い出です。

一次構造決定のストラテジーはほぼ完成していたと思います。蛋白質を断片化するために用いる特異性の異なるプロテアーゼとして、トリプシン、キモトリプシン、サーモライシン、スタフィロコッカスプロテアーゼ、化学的にメチオニンのカルボキシル側で切るブロムシアン、生成するペプチドを精製するためのイオン交換体 (Dowex1、50、DE52、ホスホセルロスなど)、ゲルろ過用ゲル (SephdexG25、50、Bio-Gel P2、4、10 など)、最終段階でのペーパークロマトグラフィー、高圧ろ紙電気泳動などが容易に利用でき、これ等をいかにうまく組み合わせて効率よく行うかが成功へのカギであり、研究者の腕の見せ所でした。イオン交換クロマトグラフィーではペプチドの分離に揮発性溶媒を用いる方法が確立しており、集めた分画を凍結乾燥して溶媒を容易に除去することができました。高速液クロはまだ影も形もなく、しかも数十個生成する断片を一つ残らず回収して均一の状態にまでもってくる、根気と気合と頭の使い方が必要でした。ゲルろ過も分離したいペプチドの長さに応じて適切なゲルを選択、直径 1 センチ、長さ 1.2 メートルほどのガラス管に詰め、1 分間

に 1 滴くらいの流速で 1~2 ml ずつ分取する。ペプチドの流出も自動的に記録されるのではなく、溶出液を試験管から分光器のセルに移し、220 nm の吸収を測定する。溶媒の都合では少しずつ取り出してニンヒドリン反応を行う。これらの結果をグラフ用紙にプロットして集める分画を決める。おそらく今では想像できないであろう手間がかかる仕事でした。エドマン分解法も一応出来上がっていました。PTH アミノ酸の検出も、蛍光シリカゲル上に紫外線を当てると紫外線を吸収して蛍光のバックに黒いスポットとして認められる方法ができ、3 種類の展開溶媒で全アミノ酸の同定ができるようになりました。しかし、投稿にあたってレフェリーは定量的データーを要求し、薄層クロマトで同定したという記述では通してくれません。1 段階ごとに反応液の一部をくみ出して加水分解し、アミノ酸分析で前段階から減ったアミノ酸を知るといった消去法を用いなければならず、量的にも時間的にも大変不経済でした。後に、遊離してくるアミノ酸のチアゾリノン誘導体を HI で分解して遊離のアミノ酸にしてアミノ酸分析機で定量する方法ができ³⁾、長いペプチドやシークエンサーによる蛋白質のアミノ末端配列決定に有効でした。アミノ酸分析も自動とは言うものの今のように全自動ではなく、記録紙に描き出されたピーク面積を計算して、標準試料と比較するところは手動でした。吸光度は自動記録計で経時的に記録紙

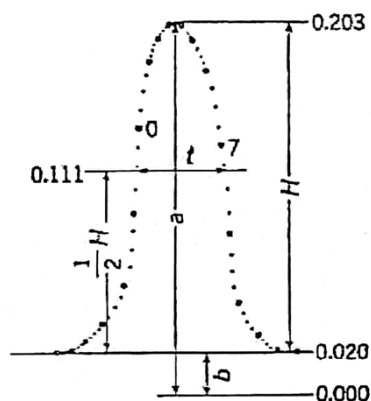


図 5. H×W 法による記録紙上でのアミノ酸数の計算例(「生化学実験講座 1 タンパク質の化学 II」日本生化学会編より)

上に打点され、ピークの高さとその 1/2 の所の幅(実際はそこから上の打点の間の数を数える)から求めるわけで(H×W 法、図 5)、電卓はまだなく、計算尺の扱いがうまくなりました。記録紙が少したまるとその計算だけでも半日ではすまない仕事でした。

詳細は省きます。39 トリプシンペプチドの 318 残基(全体の 80%)、12 ブロムシアンペプチドの 367 残基(全体の 90%)のアミノ酸配列を重ね合わせ、1977 年 401 残基を矛盾なく並べ終えることができました。当時の日本新記録でした。一生かかっても終わらないだろうといわれていましたが、7 年足らずで完成しました。「蛋白質構造討論会」での発表に胸躍らせていましたが、予稿集を見ますと私の前の演題が、ワシントン大学の Neurath の研究室から帰国された千谷晃一先生の、ホスホリラーゼ 800 余残基の完全構造となっていました。

「せっかくの日本記録も影が薄くなるなあ」との思いで演壇に上がったのですが、並み居る先生方の顔を拝見し、開口一番「これからの私の発表は純国産であります」とスッと言えたシーンを思い出します。数年後、成田研からタカアミラーゼ 500 数十残基が報告されて記録は破られました。

途中で伊・英国共同チームが同じ仕事を進めていることが分かり、それからは競走になりました。和田先生(薬理学の教授になっておられた)に薬理学の院生(榊原隆三君)をつけていただき、休日返上、連日ほぼ終電車といえる猛スピードで突っ走りました。JB の速報で報告しましたが、その 3 か月後相手も FEBS Lett に全構造を発表したのです。受付日からみて一か月くらいの差でした。JB の有難味を痛感しました。相手には数か所誤りがあり、「You win. Congratulation!」の手紙ももらいましたので、ゆっくり詳細を 3 報に分け、J. Biol. Chem. に報告しました⁴⁻⁶⁾。「働き方法案で労働時間云々」では競走には勝てなかったでしょう。疲れなど感じたこともありませんでした(若かったのでしょう)。ただ、苦労したのは 400 残基を間違いないくタイプ打ちすることでした。コンピュータ

一はなく、今のように自由に削除したり、挿入したり、行を変えたりできません。発表によってアミノ酸配列図のパターンを変えようしたり、またその時一字でもミスが見つかるると全てを最初から打ち直さなければならなくなるのです。

1975 年新設の滋賀医科大学に助教授として赴任することになりましたが、附属病院開院までの 2 年間は別の場所の仮校舎で授業のみ行われたので、研究はそのまま阪大で続け、1978 年に移りました。野崎教授が酸素添加酵素の一次構造決定を希望され、最初からそれなりに研究室を設計できました。酸素添加酵素では最初の一次構造決定を残すことができました。

さて、GOT アイソザイムの構造比較という世界的に初めての成果をあげ、所期の目的は達成できたのですが、並べてみると (図 6) 48% も類似性があり、何もわからないことに気づかされました。1980 年に教授として大阪医科大学に移りました。当時は財政的に余裕があったのか、イニシャルファンドとして数千万円準備していただけました。ペーパークロマトグラフィー、高圧ろ紙電気泳動装置、シークエンサー用の部屋も古い研究室の向かい側に作ってもらえ、高速液クロ、LKB 社の固相法シークエンサーも購入でき、仕事の微量化、迅速化はけた違いになりました。滋賀医大で精製していた大腸菌 GOT の構造も、新しく助手とし

て参加した近藤淑君が 2 年足らずで決定しました。

cDNA から蛋白質の一次構造が推定できる時代になっており、国際的に微生物からヒトまで 10 種余りの GOT の一次構造を並べることができましたが、機能を云々できる情報は得られず、立体構造に取り掛かからなければとの思いが日に日に強まりました。しかし、結晶解析に適切な結晶を得るのが容易ではなく、量的な問題もあって我が国の酵素研究者は二の足を踏んでいました。GOT には量的な問題はなく、sGOT は米国、mGOT はスイスで結晶解析が行われ、ともに 1977 年に報告されました^{7, 8)}。PLP とリシン残基が内シッフ塩基を形成している事、活性中心にマレイン酸が結合すると、活性中心を閉じるように小ドメインと呼ばれる部分が大ドメインと呼ばれる部分に向かって動く induced fit が生じること、外を向いていた、基質の ω カルボキシル基と結合するアルギニン残基の側鎖がそれを迎え入れるように活性中心の内方へ向きを変えるなどが示され、Karpeisky の説明、Danathan の仮説が裏付けられました。しかし、induced fit が生じる機構やその意味、活性中心の残基の役割など、酵素の真髄に迫れていないことに変わりはありませんでした。結晶構造を眺めているだけでは何も解決しないことは明らかでした。

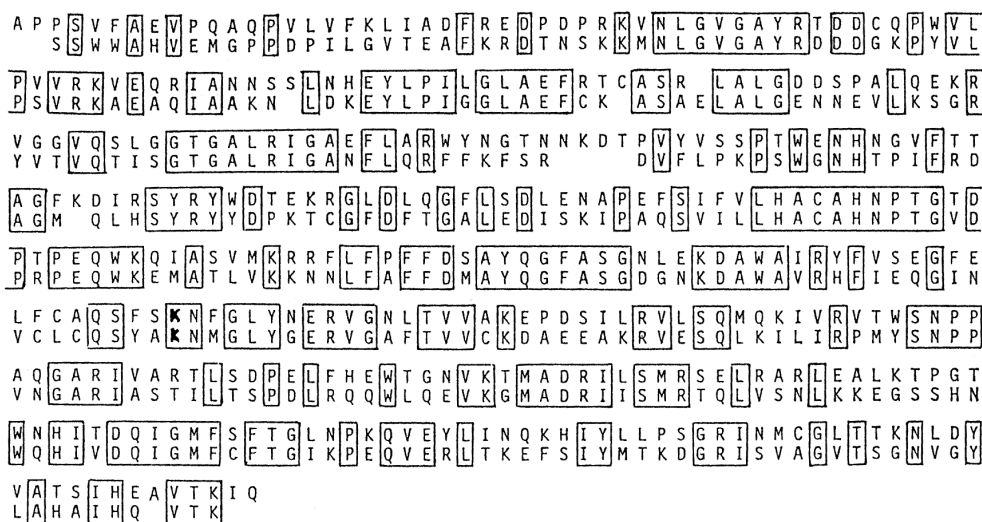


図 6. sGOT(上)とmGOT(下)の一次構造比較(太字の K は PLP とシッフ塩基を形成しているリシン)

立体構造決定から蛋白質工学へ

1980 年代にはいと遺伝子組み換え技術が一般化し、試料の大量生産が可能になり、専門家の協力さえ得られれば結晶構造解析に取り組むことができる時代になりました。GOT の反応機構を蛋白質の微細構造解析をもとに説明したい、そのためには、アミノ酸側鎖の役割を知るのに従来用いられていた化学修飾では駄目で、部位特異的突然変異を導入することが必要と確信し、遺伝子操作をしやすい大腸菌 GOT へと対象を変えました。丁度倉光成紀君をスタッフに迎えたところで、大腸菌の遺伝子を扱っておられた阪大理学部の小川英行教授の研究室に入り浸り、遺伝子操作技術を習得し、GOT の遺伝子をクローニングしてもらいました。そのころ大阪市立大学理学部の樋口泰一教授が訪ねてこれ、「これまで低分子の結晶解析を専らにしてきたが、これからは蛋白質の X 線結晶解析の時代と思うので一緒に勉強させてほしい」との申し入れがあり、「単に結晶構造を決めるだけでなく、それをもとに反応機構も一緒に議論していただける」ことを条件に受け入れました。以後大市大の広津健助教授が中心となって、大腸菌の大量精製、酵素精製など慣れない仕事からお手伝いいただきました。大腸菌酵素は、一次構造は mGOT との類似性は 50% ですが、立体構造を比較すると活性中心の残基、並びにその空間配置はほぼ同じで、induced fit も生じます。新たにスタッフとして林秀行君が加わり、数十種類の変異体を作り、マレイン酸、 α メチルアスパラギン酸を結合させ、構造変化を精密に観察し、反応速度論的手法も取り入れて、活性中心の残基の役割を中心に数々の新しい知見を発表しました。特に、遊離酵素におけるシッフ塩基の pK_a の低下が、PLP と周囲の残基との相互作用によって、内シッフ塩基が歪まされていることでもたらされていることを示しました。上述したシッフ塩基の pK_a の調節が、Karpeisky の予想したような単なる基質の静電効果でなく、PLP、基質、酵素蛋白質の相互作用でもたらされるシッフ塩基の歪みと、反応の進行に伴

う歪の解消によってもたらされていることを示し、反応効率を上昇させている仕組みが酵素蛋白質に仕込まれているという、酵素科学上新しい概念を提出し、この分野に大きな足跡を残すことができましたと自負していますが、これからは近現代史になりますので本稿では触れないことにします。

自分だけと置いていても、世界中で誰かが、同じころ、同じことを考えているものです。カリフォルニア大学の J. Kirsch と激しい競争になりました。変異を行う部位も同じころに同じことを考えるものです。林君がリーダーとなって互角以上の勝負をしてくれました。ともにこの分野では世界のトップグループを形成していたと思います。

「We have enjoyed and benefited from our collegial and friendly competition. This led to a much greater rate of discovery than if there had been no competition.」彼から私の退職記念誌に贈ってくれたメッセージです。

おわりに

今や、蛋白質の一次構造を化学的に決めるのは古い話になってしまいました。一次構造を決めるだけでは何ら評価されない時代です。しかし、そんなことに骨身を削る時代もあったのです。振り返ってみると、そんな時代から出発して「GOT の構造と機能相関」に最後まで関わり続けた推進力は「終点を新たな出発点」としてきたことと考えます。古典的酵素学は終点近くまで行ったが、何もわからない。一次構造を決めれば道は開けると、未知の世界に踏み込んで最後までやり遂げたが何も解決しない。それではと X 線結晶解析の道へと出発したが、立体構造を眺めるだけではそれで終わりになります。今は、立体構造を決めただけでは「それがどうした」といわれる時代になっているのではないのでしょうか。部位特異的変異を導入し、基質類似体を結合させ、構造変化を精密に解析するなりして酵素蛋白質の重要な役割を示し、酵素学への新しい概念を提出し、少しわかったような気になったのですが、まだまだ酵素の真髄に迫

るまでには至りません。新たな出発には新たな技術の導入が必要であることも実感しました。

蛋白質の機能は蛋白質と他の物質（他の蛋白質を含めて）との相互作用と、それに続いて生じる化学反応です。その時の蛋白質の動的变化をとらえ、精密に解析し、その変化の意義を解くことが必要です。そのためには化学的、物理的、物理化学的、分子生物学的、量子化学的手法、新しい技術、考え方などを駆使してよりベーシックな領域に踏み込んでいくことで道を開くことです。そうしないと欧米の後も追えないようになってしまいます。日本蛋白質科学会とその若いメンバーの方々に期待して稿を終えます。

文献

1. Nozaki, M., Kagamiyama, H. & Hayaishi, O. Crystallization and some properties of metapyrocatechase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11, 65-69 (1963)
2. Kagamiyama, H., Watanabe, T., Wada, H., Fujimoto, Y. & Tatsuno, T. Terminal amino acids of aspartate aminotransferase isozymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 678-684 (1968)
3. Mendez, E. & Lai, C. Y. *Anal. Biochem.* 68, 47-53 (1975)
4. Kagamiyama, H., Teranishi, K., Tanase, S., Morino, Y. & Wada, H. Complete amino acid sequence of mitochondrial aspartate aminotransferase from pig heart muscle. Tryptic peptides. *J. Biol. Chem.* 255, 6138-6143 (1980)
5. Sakakibara, R., Kagamiyama, H., Tanase, S., Morino, Y. & Wada, H. Complete amino acid sequence of mitochondrial aspartate aminotransferase from pig heart muscle. Cyanogen bromide peptides. *J. Biol. Chem.* 255, 6144-6152 (1980)
6. Kagamiyama, H., Sakakibara, R., Tanase, S., Morino, Y. & Wada, H. Complete amino acid sequence of mitochondrial aspartate aminotransferase from pig heart muscle. Peptide ordering procedures and the complete sequence. *J. Biol. Chem.* 255, 6153-6159 (1980)
7. Arnone, A., Rogers, P. H., Schmidt, J., Han, C. N.,

Harris, C. M. & Metzler, D. E. *J. Mol. Biol.* 112, 509-513 (1977)

8. Gehring, H., Christen, P., Eichele, G., Glor, M., Jansonius, J. N., Reimer, A. S., Smit, J. D. G. & Thaller, C. *J. Mol. Biol.* 115, 97-101 (1977)

鏡山 博行先生 ご略歴

- 昭和 10 年 大阪市に生まれる
昭和 36 年 大阪大学医学部卒業
インターン開始
昭和 41 年 大阪大学大学院医学研究科単位修得
退学（医学博士）
昭和 41 年 日本学術振興会奨励研究生
昭和 42 年 米国カリフォルニア大学バークレイ
校博士研究員
昭和 45 年 大阪大学助手（医学部）
昭和 50 年 滋賀医科大学助教授
昭和 55 年 大阪医科大学教授
平成 12 年 日本生化学会会長
平成 15 年 日本ビタミン学会会長
平成 16 年 大阪医科大学名誉教授

