

岩永貞昭先生が歩いてこられた道

岩 永 貞 昭 (いわながさだあき)

聞き手 国立循環器病研究センター 宮田敏行 (みやたとしゆき)

宮田：今日は岩永先生のこれまでの蛋白質科学に関するお仕事を振り返っていただき、当時の我が国あるいは世界における蛋白質科学研究の状況を絡ませた文章を日本蛋白質科学会のニューズレターに掲載するというので、どうぞよろしくお願いたします。

先生は昭和35年(1960年)3月に京都大学大学院薬学研究科を修了された後、同大学薬学部次いで大阪大学蛋白質研究所の助手として教育と研究をはじめられました。その頃はヘビ毒を使ったお仕事をされておられたと伺っています(図)。先生のご研究の大きなターニングポイントとして留学があると伺っています。まずは、昭和40年(1965年)のスウェーデン王立カロリンスカ研究所への留学のお話をお聞かせ頂けますか。

なお、先生からのご回答は、かつて齋藤英彦先生



写真1 スウェーデン王立カロリンスカ研究所近くの Carlsberg 駅でのスナップ、長女・桂子と共に(1965年11月)

(当時、名古屋セントラル病院、院長、名古屋大・医・卒)と対談された記録も参考にしてまとめました(最新医学、第64巻、第5号、111-118頁、2009年、5月)。

岩永：昭和40年(1965年)10月にスウェーデン王立カロリンスカ研究所の Birger Blombäck 教授(血液凝固研究部)のもとに留学しました。お会いするのははじめてでした。初対面の教授から止血や血栓に関連した10題あまりのテーマ(S.Iwanaga: Ann. N. Y. Acad. Sci. 408, 11-12 (1983)に一部記載)を出されました。そのなかから自分のやりたいテーマを選ぶようにいわれましたが、すぐには決められませんでした。そこで Birger に「あなたが最もやりたいテーマはどれでしょうか」と尋ねたところ、「今までフィブリノペプチドの構造研究をやってきたが、フィブリン側の構造が全く分かっていない。だからフィブリノーゲンの全化学構造をやりたい。Fibrinogen is my life」という答えが返ってきました。

当時は、リボヌクレアーゼやリゾチームといった分子量が1万~1.5万くらいの蛋白質の一次構造がやっと決った時代で、まだ構造解析の手法が確立していませんでした。そういう時代に分子量34万というフィブリノーゲンの構造を決めるのは、相当困難を伴う仕事になると思いました。しかし、Birger の挑戦と熱意に惚れて覚悟を決め、それを留学中のテーマに選びました。フィブリノーゲンの構造解析のストラテジーには触れませんが、その間の研究の戦略や方法は文献(末尾原著論文1,2)に詳しく述べています。この間の経験はその後の研究に大きな影響を及ぼしました。ここで学んだのは、一言でいえば先の見えない研究に Challenge

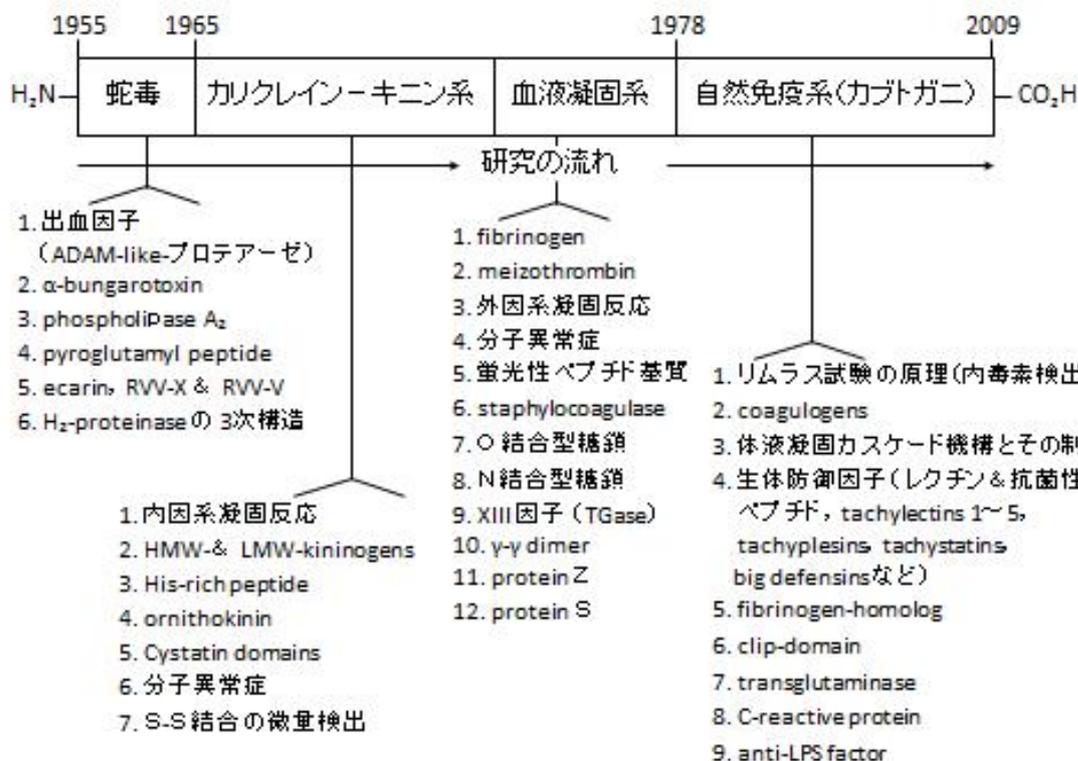


図 岩永貞昭先生の歩んでこられた道

するという姿勢でしょうか。

その後、ヒトフィブリノーゲンの構造については、末尾原著論文 1, 2 の研究をきっかけに、スウェーデンおよびドイツ、米国の研究グループによって全アミノ酸配列（蛋白質と cDNA レベル）はもとより 3次元立体構造も明らかにされています。

宮田：1965年頃の蛋白質の構造解析法をお話いただけますか？

岩永：当時は、Edman 分解法はまだ確立されていませんでした。Birger は Edman 教授と非常に親しく、私がカロリンスカ研に留学したときは Edman 教授のところでその方法を習って帰ってきたところでした。Birger は Edman 教授が開発したフェニルイソチオシアナート (PTC) 化法 (Edman 法とも呼ばれる) はアミノ酸配列を決める唯一の方法だと言っていました。ところが、副産物がとても多く出るのが問題でした。ですから、当時は (1) Edman 法の原理にしたがい、N 末端から形成され

る各段階の PTH (フェニルチオヒダントイン) をろ紙や薄層クロマトグラフィーなどで同定しつつ配列を決定する、(2) Edman 消去法とも呼ばれ、各段階で残るペプチドのアミノ酸組成を調べつつ PTH として消去された残基を知る、(3) Edman-ダンシル法とも呼ばれ、PTC 分解で切断したあとに現れる残存ペプチドの末端アミノ酸をダンシル誘導体として同定しつつ配列を調べる、という方法がありました。Stein と Moore は (2) を使ってリボタクレアーゼの構造を決めていった訳です。少し遅れて Hartley は (3) を考案してトリプシンやキモトリプシン、 α -トロンビンの構造を決めようとしていました。Edman 法をもっと微量化しないと、フィブリノーゲンのような大きな蛋白質の構造は決まりません。Birger とかなりの時間をかけて微量化に取り組みました。その時、Edman 教授が非常に良いアドバイスをくれました。「Edman 法は原理的に全く問題ない。副産物が増えるのは Edman 試薬に共雑している不純物が原因だ。だから、使用する試薬を自分たちで精製しなさい」と言

ってくれました。そこで試薬を徹底的に精製して使ったら、確かにうまくいくようになりました。この辺りのことは蛋白質・核酸・酵素の実験講座(15巻10号、1037-1054、1970)に紹介しています。

宮田:私のはじめての論文(1982年)ではEdman-ダンシル法でアミノ酸配列を決めました(末尾原著論文3)。とても懐かしいです。その後、先生は高分子キニノーゲンやプロトロンビンの研究、凝固異常症の研究などを進められ(末尾原著論文3-5, 13)、1970年代からカプトガニの体液凝固の研究を始められています。

岩永:カプトガニの研究のきっかけは、1970年頃だったと思うが、丹羽允先生(当時、大阪市立大学細菌学教室)が蛋白研に訪ねて来られ、カプトガニの体液が固まった時のゲル繊維の電子顕微鏡写真を見せてくださったことでした。それは止血の時に働くフィブリンノーゲンの原繊維構造の電顕像に非常に似ていてとても驚きました。カプトガニの血球抽出液は当時から細菌内毒素(リポ多糖、LPSと略)の検出に使われていて、一般に「リムルス試験」として知られていましたが、内毒素の添加によって起きるゲル形成の分子機構は全く分っていませんでした。当時は「リムルス試験」の原理は不明のまま、カプトガニ体液が内毒素に極めて鋭敏に反応するという現象を掘りどころに、リムルス試験は使われていた訳です。

そこで1974年頃から、カプトガニを材料に体液凝固を含めた無脊椎動物の生体防御機構の研究を始めました。特に、1978年に九州大学へ転任してからは、研究の柱の1つになりました。

カプトガニは博多湾や今津湾に生息していて、福岡では比較的容易に捕獲できました(写真2)。カプトガニから無菌的に体液を採取し血球細胞を調製できます。この血球細胞は1つの核と細胞質に多数の高密度顆粒を含んでいて、グラム陰性菌に触れると1-2分の間に形態が大きく変化し、脱顆粒とともに内容物が放出されます。ゲル化蛋白質のコアグロゲンおよび体液凝固因子群はすべて細胞内の大顆粒中に存在し、顆粒成分が放出さ

れるときに酵素系が活性化され、最終的に細胞のまわりに含水ゲルを生成します。このようなゲルマトリックスの形成は、体液の流出を防ぎ、かつグラム陰性菌の被包化に役立ちます。これらの一連の細胞応答、すなわち、遊走→異物接触→形態変化→血球凝集と崩壊→脱顆粒→凝固系の活性化→ゲル形成→被包化は、異物の侵入に対して生体防御の一環とみなすことができます。

前述した如く、カプトガニの体液はグラム陰性菌のLPSに敏感に反応して凝固することが知られており、その感度の鋭敏さから臨床をはじめ広くLPS定量法(リムルス試験、薬局法に掲載)として応用されてきました。LPSによって開始される凝固反応は、3種のセリンプロテアーゼ前駆体(factor C, factor B, proclotting enzyme)とゲル化蛋白質コアグロゲンのもとに進みます。すなわち、脱顆粒されたあと、factor Cが微量のLPSに触れると自己触媒的に活性化されつつカスケード反応が開始し、最終的にclotting enzymeがコアグロゲンを不溶性のコアグリンゲルに変換するのです。

宮田:先生はこれらの体液凝固にかかわる因子を全て精製し、cDNAクローニングを行うとともに、自然免疫系に働く各種の新しい生体防御レクチン、新規の抗菌蛋白質や抗菌ペプチドを発見して、無脊椎動物の生体防御機構の研究を進めてこられました。その中で印象に残る研究のお話しをお聞かせ下さい。

岩永:やはりまずは、カプトガニ研究のきっかけとなった蛋白質コアグロゲンのゲル化機構の研究です。コアグロゲンは175アミノ酸残基から成る塩基性蛋白質で、clotting enzymeによりN末端側の2ヶ所(Arg18-Thr19およびArg46-Gly47)が切断されると、内部のペプチドC(28残基)を遊離しつつコアグリンゲルを形成します。コアグリンゲルは2個のSS結合で連結された2本鎖からなり、それが自発的に会合してゲルを形成します。

1996年にMax-Planck研究所のBode教授らの協力を得てコアグロゲンの立体構造を決定し、ゲ



写真2 カブトガニの捕獲(1985年6月、福岡県今津湾にて、左は当時PDだった宮田敏行君)

ル化のメカニズムが解明できました(末尾原著論文10)。コアグロゲンはラグビーボール状の構造をとっていて、ペプチドCの下部には疎水性に富む領域が隠されていて、ペプチドCの遊離により、この領域が分子表面に露出されると、単量体から会合体に移行することが分りました。フィブリノーゲンの重合反応とは全くちがうメカニズムです。

宮田：私もコアグロゲンの構造解析にかかわったことがありますので、とても懐かしいです。その他の蛋白質はいかがでしょう。

岩永：カブトガニは身を守るために体内をくまなく循環する血球細胞を備えていて、この細胞に多数の生体防御因子が含まれることが分りました。この血球には大・小の2種類の分泌顆粒があって、大顆粒には感染菌やウイルスなどの異物を監視しバイオセンサーの役目を果たす酵素系やその制御系が存在し(リムルス反応の原理を支える要素)、一方、小顆粒には多種類のペプチド性抗菌物質が

貯蔵されていることなどが分りました。つまり、兜という外堀に加えて、二重、三重の生体防御システムを備えていました。

こういった多くの因子のなかでも、私を驚かせたのは、カブトガニ血漿中に発見したレクチンの構造でした(末尾原著論文15、16)。なかでも、アセチル化糖鎖を特異的に認識する Tachylectin (TL) 5A と 5B は、それぞれC末端側に「フィブリノーゲン様ドメイン」を含んでいることでした。ここにもう一度フィブリノーゲンに出会うとは思ってもみませんでした。TL5A は総 269 アミノ酸残基で、TL5B は 289 残基からなる糖蛋白質で、両者には分子全体にわたって約 45% の配列相同性があります。特に、C末端側の約 200 残基は両者ともにフィブリノーゲン様構造を示し、 β 鎖や γ 鎖のC末端側ドメインと、実に約 50% の配列相同性を有していました。また、TL5A の立体構造も明らかとなり、フィブリノーゲン γ 鎖と酷似することが分りました。

宮田：先生は無脊椎動物の生体防御機構の研究に加え、血液凝固系の研究も進められました。なかでも先生は血液凝固因子に特徴のある新規の糖鎖構造を同定されていますが、これらの糖鎖のお話しをお聞かせ願えますか。

岩永：我々の研究室では、主に蛋白質のアミノ酸配列決定を行っていました。研究室ではヒト凝固VII因子の精製法を改良してウシVII因子の大量精製法を確立し、その全一次構造を決定しました。その際、VII因子の第1EGF様ドメイン内の Ser52 が、PTH-Serとして検出されないことに気付きました。そこで組成分析をしたところ、この Ser 残基にキシロース (Xyl) とグルコース (Glc) から成る新しい糖鎖が結合していることが明らかになりました。さらに、IX因子やプロテインZの第1EGF様ドメインの Ser 残基にも同様の新規糖鎖が結合していることを明らかにしました。凝固因子にある EGF様ドメインはこれらの新規糖鎖に加えて Asp (Asn) 残基が水酸化されており、多くの翻訳後修飾を受けていることが分りました。なお、こうした糖鎖

構造の決定は、長谷純宏・教授（阪大・理・化学）、高尾敏文、下西康嗣（阪大・蛋白研）らとの共同研究でなされた成果です。また、我々の研究は加藤久雄、森田隆司、宮田敏行、川畑俊一郎、（故）牟田達史らの共同のもとに進められました。

宮田：私が在籍させていただいていたころは、国内でアミノ酸配列を決定するペプチドシーケンサーが稼働していた研究室が少なかったこともあって、先生の研究室では生物学科や化学科、医学部といった学内だけでなく、学外の研究にも門戸を開いておられ、できうる限りの協力支援をされておられました。本当に多くの研究を支えておられました。その中のお一人に田中啓二先生の初期のプロテアソーム研究があります。先生はキラリと光る研究の原石を見つけて来られて、研究を jump up して下さいました。

今後も後進に道標となるような助言をしていただいて、暖かく見守っていただければと思います。本日はどうもありがとうございました。



文 献

総説及び著書（和文）

1. 宮田敏行、岩永貞昭、「無脊椎動物の体液凝固に関与する蛋白質の構造と分子進化」、蛋白質・核酸・酵素、別冊 No.29、30-43 頁（1986）。
2. 岩永貞昭、「Currents in Hematoimmunology」、*“無脊椎動物の生体防御機構”*、12 巻、4 号、4-12 頁、*Excepta Medica*、東京（1996）。

原著及び総説、著書（英文）

1. Blombäck, B., Blombäck, M., Hessel, B., and Iwanaga, S. (1967) Structure of N-terminal fragments of fibrinogen and specificity of thrombin. *Nature*, 215, 1445-1448.
2. Blombäck, B., Blombäck, M., Henschen, A., Hessel, B., Iwanaga, S., and Woods, K. R. (1968) N-terminal disulphide knot of human fibrinogen. *Nature*, 218, 130-134.
3. Miyata, T., Iwanaga, S., Sakata, Y., and Aoki, N. (1982) Plasminogen Tochigi: Inactive plasmin resulting from replacement of alanine-600 by threonine in the active site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 6132-6136.
4. Müller-Esterl, W., Iwanaga, S., and Nakanishi, S. (1986) Kininogens Revisited. *Trends in Biological Science (TIBS)* 11, No.8, 336-339.
5. Miyata, T., Kawabata, S., Iwanaga, S., Takahashi, I., Alving, B., and Saito, H. (1989) Coagulation factor XII (Hageman factor) Washington D.C.: Inactive factor XIIa results from Cys-571-Ser substitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 8319-8322.
6. Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. (1992) Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. *Thromb Res*, 68, 1-32.
7. Iwanaga, S. (1993) Primitive coagulation systems and their message to modern biology. *Thromb Haemost*, 70, 48-55.
8. Iwanaga, S. (1993) The *limulus* clotting reaction. *Curr Opin Immunol*, 5, 74-82.
9. Iwanaga, S., Muta, T., Shigenaga, T., Seki, N.,

- Kawano, K., Katsu, T., and Kawabata, S. (1994) Structure-function relationships of tachyplesins and their analogues. *Ciba Found Symp*, 186, 160-174; discussion 174-165.
10. Bergner, A., Oganessyan, V., Muta, T., Iwanaga, S., Typke, D., Huber, R., and Bode, W. (1996) Crystal structure of a coagulogen, the clotting protein from horseshoe crab: a structural homologue of nerve growth factor. *EMBO J*, 15, 6789-6797.
11. Söderhäll, K., Iwanaga, S., and Vasta, C. R. (1996) *New Directions in Invertebrate Immunology*, 1-494, SOS Publication, Fair Haven, NJ 07704-3303, USA.
12. Muta, T., and Iwanaga, S. (1996) The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 8, 41-47.
13. Higashi, S., and Iwanaga, S. (1998) Molecular interaction between factor VII and tissue factor. *Int J Hematol*, 67, 229-241.
14. Iwanaga, S., Kawabata, S., and Muta, T. (1998) New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: Their structures and functions. *J Biochem*, 123, 1-15.
15. Gokudan, S., Muta, T., Tsuda, R., Koori, K., Kawahara, T., Seki, N., Mizunoe, Y., Wai, S. N., Iwanaga, S., and Kawabata, S. (1999) Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 10086-10091.
16. Kairies, N., Beisel, H. G., Fuentes-Prior, P., Tsuda, R., Muta, T., Iwanaga, S., Bode, W., Huber, R., and Kawabata, S. (2001) The 2.0-Å crystal structure of tachylectin 5A provides evidence for the common origin of the innate immunity and the blood coagulation systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13519-13524
17. Iwanaga, S. (2002) The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Curr Opin Immunol*, 14, 87-95.
18. Iwanaga, S., and Lee, B.L. (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals, *J Biochem Mol Biol*, 38 (No 1), 128-150.
19. Iwanaga, S. (2007) Biochemical principle of Limulus test for detecting bacterial endotoxins. *Proc Jpn Acad*, 83 (4), 110-119.
20. Takeda, S., Takeya, H., and Iwanaga, S. (2012) Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1824, 164-176.
21. Kawabata, S., and Muta, T. (2010) *JB Reflections and Perspectives*, Sadaaki Iwanaga: discovery of the lipopolysaccharide- and β -1,3-D-glucan-mediated proteolytic cascade and unique proteins in invertebrate immunity. *J Biochem*, 147, 611-618.

岩永貞昭先生ご略歴：

- 1933年 東京都に生まれる。
- 1955年 明治薬科大学卒業
- 1960年 京都大学大学院薬学研究科博士課程
修了、薬学博士
- 1960年 京都大学薬学部・助手
- 1963年 大阪大学蛋白質研究所・助手
- 1965年 スウェーデン王立カロリンスカ医学研究
所・訪問研究員
- 1968年 大阪大学蛋白質研究所・助教授
- 1978年 九州大学理学部・教授
- 1986年 九州大学大学院医学研究科・教授兼任
- 1996年 九州大学・名誉教授

この間

- 1980年1月～同年3月 中国科学院（北京市）・
北京大学医学部・客員教授
- 1994年4月 九州大学・遺伝情報研究施設長
- 1996年4月～現在 一般財団法人 化学及血清療法
研究所・顧問
- 1996年4月～2001年3月 藤田保健衛生大学・
総合医科学研究所・客員教授
- 1997年4月～12月 ワシントン大学(シアトル市)・
生化学研究室・客員教授

宮田敏行（聞き手）：

大阪大学蛋白質研究所および九州大学理学部生物学科で14年間にわたって岩永貞昭先生の薫陶を受ける。1991年、国立循環器病センター研究所に移動後も血液凝固・血栓の研究を継続する。



岩永貞昭先生、近影（金沢大学・薬・中西義信教授、現・日本生化学会・会長の研究室にて、2010年）