

私の蛋白研究、ヒドロゲナーゼとその周辺

八木 達彦 (やぎ たつひこ)

蛋白質の重要性に初めて気づいたオランダの Johannes Mulder がギリシャ語の $\pi\rho\omicron\tau\epsilon\iota\omicron\varsigma$ (第一級の重要性) から protein という言葉をつくったのは 1838 年、日本では宇田川榕庵が《舎密開宗》の出版を始めたころだ。Mulder の研究に対する評価が高いとは思えないが、命名の先見性は称賛に値する。Emil Fischer が蛋白の化学構造としてペプチド説をとったのが 20 世紀初め、ジケトピペラジン説が葬られて蛋白化学が軌道に乗ってきたのは 1930 年代だろう。当時の日本では高峰讓吉博士のアドレナリン発見(1900)、鈴木梅太郎教授のオリザニン(ビタミン B₁)発見(1910)など生命科学の研究で世界に燦たる成果も出始めてはいたが、蛋白化学はまだ未熟な段階だった。しかし地道な研究は始まっていたようで、大阪大学の赤堀四郎先生は太平洋戦争中に《アミノ酸及蛋白質、共立出版 1944》、戦後間もなく谷久也^{当時}助教授との共著で小冊子《蛋白質、三共出版 1948》を上梓されている。Linus Pauling の α ヘリックスと Frederick Sanger のインスリン B 鎖アミノ酸配列決定はともに 1951 年、赤堀先生と水島三一郎先生の共同編集になる本格的な専門書《蛋白質化学、全 5 巻、共立出版》が刊行されたのは 1954 年から 1957 年にかけてである。

私が東大理学部化学科で授業を受けていた 1954-1955 年頃は蛋白化学をメインとする授業はなかった。生化学を担当していらした左右田徳郎教授が定年退官されたあと後任の生化学専門の教授は着任されず、赤堀先生が東大理学部化学科と応用微生物研究所(現分子細胞生物学研究所)の教授を併任する形で着任された。赤堀先生が蛋白化学に関して指示された方針は、当時のレベルを考慮し『簡単な基質に働く酵素を選びなさい。または、簡単な蛋白質を選びなさい』というものであった。先生は阪大での蛋白質研究所(発見時たんぱく質研究所)設置の準備が忙しく、4 年時の生物化学の授業は先生が大阪から連れてこられた佐竹一夫助教授(のち東京都立大教授)が担当された。先生の著書《クロマトグラフ、共立出版 1952》を読んだ印象から楽しみにしていた授業は酵素と代謝がメインで、期待通り秩序だって分かりやすく興味深いものであった。私が生化学に引きずり込まれる主因の一つは佐竹先生の授業だったが、蛋白化学に触れる機会は少なく、卒業研究で千谷晃一君(のち藤田保健衛生大教授)が N 末端アミノ酸の決定法など実験していたのを横目で見える程度だった。

大学院で生化学を基礎から指導して下さったのは石本眞助手(のち北大教授)、硫酸還元菌から新シトクロムを発見(1954)した直後である。彼は、非光合成嫌気細菌にはシトクロムが存在しないという当時の定説を覆したと意気軒昂だったが、論文発表がイギリスの John Postgate より少し遅れたことを悔しがっていた(このシトクロムは Postgate がシトクロム c₃ と命名)。当然、研究テーマはこの菌の酸化還元代謝系におけるシトクロム c₃ の役割である。硫酸還元菌は乳酸イオンを炭素源と電子供与体、硫酸イオンを電子受容体として生育する嫌気細菌だが、水素による硫酸イオン、亜硫酸イオン、チオ硫酸イオンなど硫黄オキシ酸イオンの還元も活発に行って硫化水素を発生する。菌体を破壊して無細胞抽出液にすると、水素による硫酸イオンの還元活性は失われるが亜硫酸イオンとチオ硫酸イオンの還元活性は残るので、これからシトクロム c₃ を除去し、精製シトクロム c₃ を加えて亜硫酸イオンとチオ硫酸イオンの水素による還元活性が復活するかどうかというのが最初の論文[1]だ。いま読み返してみるとせっかく精製したシトクロム c₃ の分子量も、ヘム含量、鉄含量も測ってない。そ

の頃はゲル濾過クロマトグラフィも SDS-PAGE もなくて、分子量測定には分析用超遠心機が必須、これは港区の伝染病研究所(現東大医科学研究所)に行かないと使えない、ということでパスしてしまった。その後、石本さんに反発するようになり、一人で新発見の酵素、一酸化炭素デヒドロゲナーゼの研究に専念したが、蛋白精製が苦手で、新酵素の K_m や最適 pH など通り一遍のデータはとったが[2]、精製はあきらめていたようだ。DEAE セルロースをつくろうとしたことは覚えているが、これを使って酵素精製を試みたかどうかは記憶がない。嫌気条件で精製するなどの工夫も足りなかった。見るに見かねた田宮信雄助教授は、東京医科歯科大学硬組織生理研究施設(現難治疾患研究所)に新設される生化学講座に教授として迎えられるときに助手として連れてってくださった(1958)。石本さんと隔離すれば少しはましな研究者になるだろう、というありがたい思召しだ。田宮先生はアメリカ留学時代に David Rittenberg 教授の研究室でヒドロゲナーゼをテーマに選ばれた。赤堀先生のいう《簡単な基質に働く酵素》だ。Stanley Miller との共同研究の成果は Rittenberg 教授に高く評価され、帰国土産に旧式の質量分析計(マス)を贈られた。これを医科歯科大の研究室に自力でセットし

てマスを使う研究を始めようとしていたときである。マスといえば今では蛋白構造決定の重要手段だが、当時のマスは小分子専用だから H_2 とか CO_2 などの同位体分析が主な用途だった。

アメリカ留学と帰国

その頃急にアメリカ留学の話がもち上がった(1960、写真1)。Melvin Calvin 教授の光合成研究を支えた Andrew Benson 教授(Pennsylvania State University、のち University of California, San Diego)の研究室で、テーマは植物スルホリピドの研究である。この糖脂質は彼が発見し PNAS に論文も発表していたが、推定構造に自信がなかったようで、構造をきっちり確かめよ、というのがテーマ。慣れない有機合成で糖部分が PNAS に出ていた 6-スルホフコースではないこと、リゾ型ではなく通常のジアシルグリセロ構造であることを証明してしまった。ここで Benson 先生が有機合成の名人として連れてきた宮野真光さん(Dr Masateru Miyano)にバトンタッチ、糖部分の構造は彼が合成した 6-スルホキノボースと一致した。そのあとはリコイル ^{32}P 原子の化学、つまりリン酸に中性子をあてて ^{31}P を ^{32}P に変換するとリン酸分子から ^{32}P が飛び出して周囲の有機分子と反応、生じた有機ホスホン酸



写真1. 当時は外国留学が珍しく、大勢で羽田まで見送りに来てくださった。左から大島泰郎君、小沢均助教授、田宮先生、高橋健治君、筆者、妹道子、母薫、細田淳子さん(のち渡米して細胞分子生物学で成果)、石田美穂子さん(のち横浜でクリニックを開業)、西村暹君(RNAの修飾塩基で有名)。1960年5月羽田空港にて。



写真2. Benson 先生、1988 ころの来日時に妻宏子と用宗の寿司国にご案内。時期は違うが¹⁴Cの生みの親 Martin Kamen 教授もここの寿司を喜んで下さった。

やホスフィン酸の構造を決定してリコイル反応メカニズムを探るとい研究に熱中し、あつという間に留学期間が終了、医科歯科大の田宮研に戻った(1962)。その後 Benson 先生は何度も来日された(写真2)。

田宮研では、藤本大三郎君(のち東京農工大教授)がマスを駆使してコラーゲンのヒドロキシプロリンのOHがO₂に由来するという論文を発表したところである。翻訳後修飾という言葉さえなかった時代だから画期的な成果で、藤本君はその後コラーゲン研究のオーソリティになった。私は田宮先生のお勧めでヒドロゲナーゼの研究に切り替えた。先生はコラーゲンでの成功後もヒドロゲナーゼには愛着があったようだが、同僚の加納六郎教授に誘われて海蛇毒素(のちエラプトキシンと命名される62残基蛋白)の研究に転換された。赤堀先生のもう一つの助言《簡単な蛋白》に巡り合ったわけだ。田宮先生は赤堀先生の強い要請で東北大理学部に移転後も蛇毒素を愛し続け、トキシコロジーのオーソリティになられたことは御承知の通り。後のことだが、北大の稲垣冬彦教授と組んでエラプトキシンのNMR主要シグナルのアサインメントに成功し[3]、これはすごいことなんだぞ、と無邪気に興奮しておられたのを思い出す。医科歯科大ではコラーゲンとコラゲナーゼの研究で成果を上げた永井裕助教授がゲル濾過、Disc電気泳動など蛋白

研究の新技术をいろいろと教えてくださった。田宮先生の転出後に永井さんが後任教授に昇進、私は静岡大学に赴任して(1966)、初めて自分の研究室をもった。

静岡大学で

研究テーマは硫酸還元菌 *Desulfovibrio* のヒドロゲナーゼ、シトクロム *c*₃、および関連蛋白に絞った。シトクロム *c*₃ は特に新しい方法を工夫、開発しなくても陽イオン交換体で簡単に精製できた。この精製シトクロム *c*₃ を使い、Postgate の報告にある分子内ヘム2個を4個に、平均標準還元電位-205 mV を-290 mV に大幅修正する結果を出した[4]。C型シトクロムの標準還元電位としてマイナス側の新記録である。そのころ東大物性研の井口洋夫先生(のち分子科学研究所長)が有機半導体によるH₂活性化との関連でヒドロゲナーゼに大きな関心を示され、先生の逝去(2014)までの息の長い共同研究が始まった。なおシトクロム *c*₃ の4個のヘムの標準還元電位は、だいぶのちになるが、フランス Université de Provence の Gayda 教授グループとの共同研究で電位差滴定とEPRを組み合わせ-235, -323, -337, -357 mV と測定された[5]。シトクロム *c*₃ を電子受容体とするヒドロゲナーゼの精製では阪大蛋白研の堀尾武一助教授(のち教授)に教えていただいた等電点電気泳動や、蛋白溶液を透析しながら濃縮できるDiaflo cell が威力を發揮し、1976年には当時の最高純度のヒドロゲナーゼ標品を得ることができた[6]。ヒドロゲナーゼ研究の初期の総説[7]はヒドロゲナーゼ研究の入門書として評判が良い。定年後に研究を振り返った集大成も総説[8]としてまとめた。《ヒドロゲナーゼ》という本も書きたかったが、進歩が速すぎて手に負えなくなってしまった。

静大教育学部化学教室では教授、助教授、助手、みんな独立な研究者で全く別テーマで好きな研究をしている。研究の自由は満喫できるが、卒業研究の学生さん達に教えながら一人で行う研究はたかが知れている。しかし幸運にも1976年に教養部に赴任してきた物理化学の尾形照彦助教授(のち教授)の奥様、真理さん(写真3)が東京での研究職を辞して来静され、生化学の研究を続けたい、ということ



写真3. 尾形真理さん。静大の八木研実験室で(1983)。

で研究メンバーに加わってくださった。尾形さんには非常勤講師として学生実験なども担当していただき、研究、教育の面でどれだけ助けていただいたか計り知れない。おかげで硫酸還元菌のシトクロム c_3 以外の電子キャリア蛋白にも手を広げることができ、この菌に存在することだけは分かっていたがヒドロゲナーゼとは反応しないフェレドキシンを始め、数々の電子キャリア蛋白を単離精製し、物性や機能解析を行うことができた[9]。しかしアミノ酸配列はできなかつたので、卒論の学生さんを阪大の松原忠教授の研究室に派遣して配列決定した[10]。配列決定でのトピック一つ：理学部から当研究室に来て卒論を書き、阪大福井俊郎教授のところに進学し、ポテトホスホリラーゼ(916 残基)の配列決定に奮闘中の中野憲一君がシトクロム $c-553$ の配列を決めたときのことだ。硫酸還元菌 Hildenborough 株のシトクロム $c-553$ の既発表配列とはN端とC端付近以外が全く似ていない。しかしトリプシンペプチドどうしはよく似ていたのので、Hildenborough 株の論文にはトリプシンペプチドのつなぎ間違えの可能性があり、配列再検討の必要性を指摘した[11]。DNA 配列からアミノ酸配列を決める現在の方法ではあり得ないできごとだ。

井口先生との共同研究では、広い視野と人脈をもつ先生のおかげで、自力では解決できない問題にも取り組むことができた。ヒドロゲナーゼの電子キャリアであると同時に有機半導体としての性質ももつシトクロム c_3 の立体構造決定は、井口先生と親しい阪大蛋白研角戸正夫所長のご紹介で安岡

則武助教授(のち姫路工大教授)、院生の樋口芳樹さん(現兵庫県立大教授)が中心になり 1981 年に成功した[12]。ヨーロッパグループが 1979 年に決定した他の菌株のシトクロム c_3 の構造[13]には 2 残基の見逃しがあり、NMR、EPR などを総合して出した 1974 年の構造モデル[14]には大きな間違いがあったから、正しい構造は私たちのが最初である。当時の NMR は今ほどの信頼性がなかったのだろうか？安岡-樋口グループはその後ヒドロゲナーゼの X 線構造も決定した[15]。ヒドロゲナーゼ立体構造のカラー写真は、まず田宮先生にお贈りした。

再び田宮先生と

ある日、田宮先生から電話がかかり《非分散進化論》の共同提案者に誘われた。あとで知ったことだがお膝元の東北大では不評で、みんなに振られた後のお誘いだったようだ。進化の系統樹はオルトログ蛋白の配列比較でつくるから異なる蛋白からつくる系統樹は同じになるはずなのに、そうとは限らない。硫酸還元菌でいえば日本の宮崎株とイギリスの Hildenborough 株のシトクロム c_3 とシトクロム $c-553$ は高い相同性を示すのにヒドロゲナーゼは全く違うという矛盾を抱えていたので、すぐ飛び乗ることにした。仙台でのタンパク質構造討論会(1985)発表後の休憩時間では『あの考えには無理がある』という会話を耳にしたが、自然界での遺伝子の種を超えた伝播が原核生物だけでなく真核生物間でも広がりを見せ、horizontal transfer of genes も当たり前になってきた。突然変異に起因する進化と並んで、複数祖先から発生した生物間の遺伝子交流で新たな情報をもつ生物へと進化する可能性を考えるべきではないか？言語や文化も祖先からの縦の流れだけでなく、交易、観光、布教、侵略といった横との交流の影響が大きい。人類の言語や文化が単一オリジンからの変異だけで今の形になったわけではあるまい。田宮説を補強する証拠集めもお手伝いし先生との共著論文[16]も発表した。この論文では遺伝子の水平移動の重要性を強調し、同時に生命が複数オリジンでもよいという議論を展開するとともに、生命の起源に関する非標準的な説もいくつか紹介した。今では進化

における遠縁種間の遺伝子の水平移動の役割は理解されてきたが、生命が複数オリジンから進化したとの主張は孤立無援だ。地球上に生命が誕生するような環境(地球表面の分子組成、温度、圧、電磁波など)を整えば、あちこちで生命が誕生し、遺伝子(といえるほど完成したものではないだろうが)、その他の成分を交換しながら進化してきたはずだ。地球の歴史のある時期にただ一度の《The most improbable and the most significant event in the history of Universe; FG Hopkins, 1933》が起きたといえは奇跡と同じこと、科学的説明がない点で《神様がおつくりになった》というのと変わらない。ビッグバンは神の為せる御業だと説く宗教もあるようだが、それ以降のできごとはサイエンスだけで説明したい。

定年退官前後から今日まで

定年直前だが、シトクロム、フェレドキシン、ルブレドキシンなど多くの電子キャリア蛋白が共通な Cys-X-Y-Cys 配列をもちながら互いに S-S 間距離の異なる補因子を結合し、チオレドキシンでは補因子なしでジスルフィド結合するほど S-S 間距離が近い理由を説明するため、コンピュータ化学の広田文彦教授に協力を求め、いろいろな Cys-X-Y-Cys テトラペプチドの安定コンホメーションを半経験的分子軌道法により求めた。その結果、X-Y の組合せにより S-S 間距離が決定されて補因子選択の決め手になること、これが蛋白フォールディングの核になりうるという議論を展開した[17]。

定年退官後は生化学研究を続ける実験室がないので、アメリカ留学時代の放射化学を活かし、静大の澤渡千枝助教授(現教授、副学長)と共同でポリエチレン、ポリエステル、ポリアミドなど合成ポリマのガンマ線照射による化学修飾で特定リガンドへの親和性や触媒活性、消炎性、染色性、濡れ性などの機能を付与する研究を行っている[18]。蛋白以外にも面白いポリマはある。ヒドロゲナーゼ活性をもつ合成ポリマができれば嬉しいが、とりあえずは日本蛋白質科学会で発表できるレベルの成果を目指している。

文 献

1. Ishimoto M, Yagi T, Shiraki M (1957) J Biochem 44, 413-423, 707-714. (オリジナル論文)
2. Yagi T (1959) J Biochem 46, 949-955. (オリジナル論文)
3. Inagaki F, Tamiya N, Miyazawa T (1980) Eur J Biochem 109, 129-138. (オリジナル論文)
4. Yagi T, Maruyama K (1971) Biochim Biophys Acta 243, 214-224. (オリジナル論文)
5. Benosman H, Asso M, Bertrand P, Yagi T, Gayda JP (1989) Eur J Biochem 182, 51-55. (オリジナル論文)
6. Yagi T, Kimura K, Daidoji H, Sakai F, Tamura S, Inokuchi H (1976) J Biochem 79, 661-671. (オリジナル論文)
7. 八木達彦 (1975) ヒドロゲナーゼ 蛋白質核酸酵素 20, 493-515. (総説・解説)
8. Yagi T, Higuchi Y (2013) Proc Japan Acad B89, 16-33. (レビュー)
9. Ogata M, Kondo S, Okawara N, Yagi T (1988) J Biochem 103, 121-125. (オリジナル論文)
10. Okawara N, Ogata M, Yagi T, Wakabayashi S, Matsubara H (1988) Biochimie 70, 1815-1820. (オリジナル論文)
11. Nakano K, Kikumoto Y, Yagi T (1983) J Biol Chem 258, 12409-12412. (オリジナル論文)
12. Higuchi Y, Bando S, Kusunoki M, Matsuura Y, Yasuoka N, Kakudo M, Yamanaka T, Yagi T, Inokuchi H (1981) J Biochem 89, 1659-1662. (オリジナル論文)
13. Haser R, Pierrot M, Frey M, Payan F, Astier JP, Bruschi M, Le Gall J (1979) Nature 282, 806-810. (オリジナル論文)
14. Dobson CM, Hoyle NJ, Gerald CF, Wright PE, Williams RJ, Bruschi M, LeGall J (1974) Nature 249, 425-429. (オリジナル論文)
15. Higuchi Y, Yagi T, Yasuoka N (1997) Structure 5, 1671-1680. (オリジナル論文)
16. Yagi T, Tamiya N (2009) Viva Origino 37, 73-82. (オリジナル論文)
17. Shimura M, Hirota F, Yagi T (1994) Biochimie 76, 614-621. (オリジナル論文)
18. Nakada S, Sawatari C, Tamura K, Yagi T (2001) Colloid Polym Sci 279, 754-762. (オリジナル論文)

八木達彦先生ご略歴：

- 1933年 唐津市に生まれる
- 1955年 東京大学理学部化学科卒業
- 1958年 東京大学大学院博士課程中退
- 1958年 東京医科歯科大学助手
- 1966年 東京大学、理学博士
- 1966年 静岡大学助教授
- 1972年 静岡大学教授
- 1993年 静岡大学大学院教授併任
- 1996年 静岡大学名誉教授

