

## ペプチド — 酵素 — 不和合性

### 蛋白質化学の一断面\*<sup>1</sup>

崎山文夫 (さきやま ふみお)

#### 蛋白質化学の初期 (ペプチドの化学)

私が大阪大学理学部化学科の赤堀四郎先生のもとで蛋白質の化学的研究を始めた頃は、Frederick Sanger (1918-2013) がアミノ酸 51 残基からなるインスリンの全一次構造を決めた 1955 年とほぼ重なり<sup>(1)</sup>、蛋白質化学 (protein chemistry) の揺籃期とっていい時代でした。Sanger はこの研究のために 1945 年に DNP 法として知られる N 末端アミノ酸同定法を自ら開発しています。1950 年には早くも DNP 法に替わる、Pehr Edman (1917-1977) による N 末端アミノ酸の逐次分解・同定法が提案され、急速に普及しました<sup>(2)</sup>。それから間もない 1952 年に赤堀先生は N 末端の反対側の C 末端アミノ酸同定法としてヒドラジン分解法を発見されました<sup>(3)</sup>。その頃、私は大川乾次先生 (後に関西学院大学理学部長) のもとでヒスチジン (His) を含むペプチドの合成法について研究していました。当時、His のイミダゾール環の保護基の開発は、ペプチド化学の優先課題の一つでした。私の修士課程の研究で、His の $\alpha$ -アミノ基とイミダゾール基の両方をベンジルオキシカルボニル化した誘導体がペプチド合成に適していることを見つけ、その論文が *Nature* 誌 (1958 年) に掲載された背景には、国際的な激しい競争があったと思われます<sup>(4)</sup>。一方、His にアルカリ性で塩化ベンジルオキシカルボニルを過剰

に反応させると、保護されるはずのイミダゾール環が開環 (Bamberger 分解) してしまいます。この反応についてはまた後に触れます。

それから間もない 1960 年に大阪大学蛋白質研究所 (阪大蛋白研) が全国共同利用研究所として発足しました。赤堀先生が初代所長で、私が所属した蛋白質化学構造部門は成田耕造教授が担当されました。成田先生は、当時としては非常に困難であったタカアミラーゼ A の一次構造の決定に取り組んでおられました。残基数の合計が 478 にもなるタカアミラーゼ A の全アミノ酸配列は、1981 年に成田先生が亡くなって間もなく、ようやく解明されました。このような非常に大きな蛋白質の一次構造を決定するには、まずトリプシンやキモトリプシンのような基質特異性の異なるプロテアーゼで適当な長さに断片化してから、生じるペプチドごとに Edman 法を適用しなければなりません。このような限定的分解には、プロテアーゼとともに化学的開裂法 (chemical cleavage) が役に立ちます。中でも Bernhard Witkop (1917-2010) によるメチオニン (Met) のカルボキシル基側でペプチド結合を切断する BrCN 分解は今でも使われることがあります<sup>(5)</sup>。私はまず、先ほど触れた His の Bamberger 分解で $\gamma$ -ケトアミノ酸が生じることに注目して、 $\gamma$ -ケト基とヒドラジンとの反応を経る分子

<sup>1</sup> この原稿は 2013 年 6 月 14 日に行われた第 13 回蛋白質科学会 (鳥取)・ヒストリカルレビューの講演を、使われた 34 枚のスライドと司会をした私の怪しい記憶と少々の思い込みをもとに大幅に圧縮したものである。読者の多くはこの講演を記憶されていることと思う。後日崎山先生に全面改訂していただくことを期待して、しばらくはこの不完全なダイジェスト版でご辛抱願いたい。なお、会員の一部から強い要望のあった崎山先生ご自身による「赤堀四郎先生生誕 100 年に想う」(2001, 蛋白質核酸酵素 51, pp. 273-275) を、本稿の補足として末尾に加えた。転載を許可下さった共立出版株式会社のご厚意に深く感謝する。中沢 隆 (奈良女子大学理学部)

内環化によって、ケトアミノ酸のカルボキシル基側でペプチド結合を切断する方法を試みました。その後、トリプトファン (Trp) のオゾン酸化によって、N'-ホルミルキヌレニン (NFK) やキヌレニン (Kyn) の $\gamma$ -位にもケト基がより簡単に生じることがわかりました。1962年から約2年半、NIHのWitkop先生のもとでの研究をはさんでTrpの化学修飾の研究を始めました。

## 蛋白質の化学修飾

ニワトリの卵白リゾチームには6つのTrp残基がありますが、水溶液中でオゾン酸化するとTrp 62が優先的にNFKに変換されると同時に酵素活性(溶菌活性)が元の20%程度に低下します。ところがNFKのホルミル基を選択的に加水分解して得られるKyn 62-リゾチームでは活性が約80%まで回復しました<sup>(6)</sup>。これは、Kynの $\sigma$ -アミノフェニルケトン基部分が分子内水素結合によってTrpのインドール環と非常によく似た平面構造をとることを示しています。これが蛋白質の構造と機能の関連についての研究につながりました。例えばKynは波長360 nmの紫外線で励起すると、波長480 nmに蛍光極大を示しますが、蛋白質の内部では周辺の疎水性基や極性基のイオン化状態に大きく依存してこの蛍光特性が変化するため、Kynは蛋白質内部の蛍光プローブとして使えます。また、NFKは $K^{13}CN$ との反応で環化して、その環化生成物を高濃度のLiCl溶液中、 $NaBH_4$ で還元すると、元のインドール環が再生すると同時にC2位が $^{13}C$ で標識できることがわかりました<sup>(7)</sup>。普通、ある化学修飾によって酵素が失活すると、蛋白質の構造維持や機能発現に必須なアミノ酸残基が特定できますが、そのアミノ酸残基が天然の酵素の中でどのように振る舞い、どのような役割を果たしていたかを知ることは困難です。ところがTrpの同位体標識やKynへの変換は、側鎖の構造が全くあるいは微妙にしか変わらないので、基質や阻害剤との相互作用や、周辺の環境変化、さらにインドール環自体の動的挙動も適当な方法で追跡することが可能になるという利点があります。このようにして、1970年代後半から数年間、リゾチームのTrp 62や、タカアミ

ラーゼAと同じく麹菌が生産するリボ核酸分解酵素 (RNase T<sub>1</sub>) のTrp 59を相手に、酵素の機能発現とTrp残基の役割について、オゾン酸化と $^{13}C$  NMRや円偏光二色性 (CD) など各種分光法を組み合わせた研究を展開していました<sup>(8)</sup>。

私たちがTrp残基の化学修飾をもとに蛋白質の構造機能相関の研究に力を入れていた頃、蛋白質の一次構造決定をはじめとするprotein chemistryは冬の時代を迎えていました。Sangerのジデオキシ法のようなDNAの塩基配列決定法の急速な発展により、核酸の塩基配列解析が蛋白質のアミノ酸配列分析より簡単になったためです。1978年には*Nature*誌に「protein chemistryは衰退するのか?」と題する記事が掲載されました<sup>(9)</sup>。実際、タカアミラーゼAよりも大きな蛋白質の遺伝子解析が次々と進み、蛋白質の化学修飾も遺伝子工学の手法によるsite-directed mutagenesisで置き換えられようとしていました。それでも特定のアミノ酸残基のみを同位体標識するといった化学修飾を使わないとできないこともあるし、蛋白質の翻訳後修飾も遺伝情報からは予測できません。同じ*Nature*誌に「protein chemistryはessentialである」という記事で蛋白質を単なる配列情報でなく、物質として認識する必要性を述べた記事<sup>(10)</sup>が出るまで、約10年かかりました。この間私たちは、リゾチームやRNase T<sub>1</sub>から次のテーマとなるプロテアーゼに研究対象を広げつつ、酵素の触媒機構や構造・機能相関の研究を続けていました。

## 蛋白質の構造と機能 - *Achromobacter protease I* と RNase T<sub>2</sub> -

私たちが手がけた酵素の中でも特に興味深いものは、副島・正木両先生(茨城大学)らによって発見されたLys-Xの結合に特異性をもつ*Achromobacter protease I* (API)です。この酵素はウシ・トリプシン (BT) より活性が一桁高く、蛋白質の一次構造解析に汎用されるようになりました。APIをAPI自身とV8 protease、それにBrCN分解した断片の一次構造を解析した結果、この酵素はアミノ酸268残基からなり、触媒部位のcatalytic

triad が Asp 113、His 57、および Ser 194 で構成されるセリンプロテアーゼであることがわかりました<sup>(11)</sup>。API と BT の X 線結晶構造を比べると、API の触媒部位の Asp 113 は His 210 と Trp 169 によって溶媒から遮蔽されていて、API の His 210 と Trp 169 に相当するアミノ酸は BT では Ser 214 と Trp 215 です<sup>(12)</sup>。X 線結晶構造から、API の Asp 113 と His 210 の間に何らかの相互作用があり、この構造が API の高い酵素活性に関係すると考えられたので、site-directed mutagenesis により His 210 を Ser に変換した変異酵素 (H210S) を調製しました。すると、H210S は Lys に対する基質特異性を保持したままで、活性が至適 pH の 7-9 の領域で天然型 API より数倍も増大するという意外な結果が得られました<sup>(13)</sup>。その後の研究で、API の活性の調節に His 210 と Asp 113 の静電相互作用が重要な役割を果たしていることは突きとめられたと思いますが、それ以外の His 57 と His 210、His 210 と Trp 169 の相互

作用の解明は今後の課題として残りました。

API の研究と同じ頃、私たちは麹菌が分泌する RNase T<sub>2</sub> のアミノ酸配列を決定し、さらにピロ炭酸ジエチルやヨード酢酸による化学修飾実験から、この酵素の触媒基を His 53 と His 115 と同定しました<sup>(14)</sup>。ところが、同じ麹菌が分泌する RNase T<sub>1</sub> のアミノ酸配列にはこれらに相当する His がありません。そこで、アミノ酸配列の相同性の検索を西川建博士 (蛋白質工学研) に依頼した結果、タバコ属 (*Nicotiana alata*) の花柱に存在する S 遺伝子特異的糖タンパク質に、高い類似性が認められました。面白いことに、私たちが RNase T<sub>2</sub> の触媒基に同定した His 53 と His 115 に相当する 2 つの His 残基もこの S-糖蛋白質で保存されていた上に、その周辺のアミノ酸配列まで一致していたのです。そこで、1989 年の 6 月に、RNase T<sub>2</sub> の触媒基に関する論文<sup>(14)</sup>を投稿してから、問題の S-糖蛋白質の一次構造を研究している Richard Simpson 博士 (Melbourne)



メルボルンの Richard Simpson 邸にて (1992 年 2 月 24 日)。文献 14 の主著者である河田康志・鳥取大学教授 (右から 2 人目)、Richard Simpson (同 2 人目)。写真提供：河田教授

に、「タバコの S-糖蛋白質は RNase なのではないか」と問い合わせました。それから一月も経たないうちに、電話がありました。「RNase 活性があった！」という知らせです。S-RNase は、*N. alata* の自己と非自己の認識に関わる蛋白質だったのです<sup>(15)</sup>。こうして機能が不明であった S-糖蛋白質は S-RNase と呼ぶことになりました。写真は 1992 年に私の家族と Simpson 先生のお宅に伺った時のものです。

同じ品種の植物間では自家受精が妨げられて結実しない遺伝的性質を自家不和合性 (self-incompatibility) といいます。私たちは自家不和合性といった生命現象が、S-RNase の酵素作用として分子レベルで説明できると期待して、次の研究対象にニホンナシの S-RNase を選びました。ナシ (*Pyrus pyrifolia*) は普通自家不和合性のため人工授粉が必要ですが、「おさ二十世紀ナシ」は自家受粉で実をつけられるという面白い性質があります。実際に調べてみると、ナシには主に糖鎖構造の違いによって S<sub>1</sub>-RNase、S<sub>2</sub>-RNase、・・・のように多くの S-RNase が存在することがわかりました。ところが「おさ二十世紀ナシ」は S-RNase を欠いていました。こうなると自家不和合性に S-RNase が関係することはほぼ間違いなさそうです。一方、S<sub>3</sub>-RNase の X 線結晶構造から、RNase T<sub>2</sub> の His 53 と His 115 に相当する触媒基を、それぞれ His 33 と His 88 と推定しました。アミノ酸配列の相同性から見てもこの推定は妥当であったと思われ (図 1)<sup>(16)</sup>。アミノ酸配列の相同性が高く、共通の触媒基が保存されている点を除いて、分子量も至適 pH もあまり共通しない RNase T<sub>2</sub> Family の中で、ある一群の

酵素は、リボソーム RNA のターンオーバーを通じて細胞の恒常性を保つ“housekeeping”の役割や、他の微生物に対する防御の機能をもつとされています<sup>(17)</sup>。S-RNase の機能もまた多様で、RNase T<sub>2</sub> Family の酵素群がこれほど多様な生体機能を示すことは驚くばかりです。S-RNase の多様な機能が自家不和合性にどう関係するか、蛋白質部分の相同性が高い以上、糖鎖構造による機能の違いを明らかにするために、今後は糖鎖構造解析の重要性がより一層高まると予想されます<sup>(18)</sup>。このように多様な役割を担う RNase T<sub>2</sub> Family の酵素は、動物や植物ばかりでなく、細菌、原生動物からウイルスに至るまで広く存在することが知られています<sup>(19)</sup>。これらの多様な生命現象を解明するには、protein chemistry の立場から酵素を物質として認識することが非常に大切だと思います。

これまでの研究を振り返ると、当然のことながら赤堀先生と Witkop 先生の影響を強く感じます。そのほか、私の蛋白質への興味をかき立てた本が「生命の起源と生化学」(オパーリン著、江上不二夫編、岩波新書 1956) で、その中には赤堀先生のポリグリシン説が紹介されています。最後に、蛋白質の研究の歴史を探る貴重な資料として、赤堀先生の「生命の世界 - タンパク質と生命の起源 - (なにわ塾叢書 15, 1984) と、Witkop 先生の 2 編<sup>(5, 20)</sup>を挙げておきたいと思います。

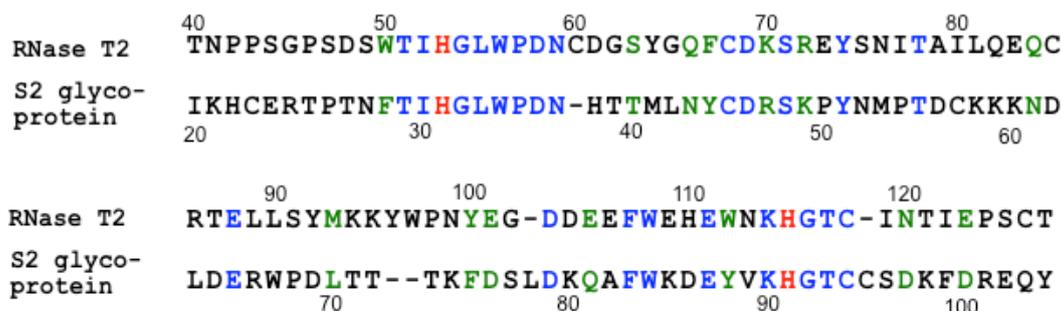


図 1. RNase T<sub>2</sub> と S<sub>2</sub>-RNase のアミノ酸配列の比較。触媒基 (H) は RNase T<sub>2</sub> で 53 と 115 位、S<sub>2</sub>-RNase では 31 と 91 位。配列を H が重なるように並べると、同一のアミノ酸 (青) と類似するアミノ酸 (緑) が H の近傍に集中して並ぶ。

## 文献

1. Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F., and Kitai, R. (1955) "The disulphide bonds of insulin" *Biochem. J.* **60**, 541-556.
2. Edman, P., Högfeldt, E., Sillén, L. G., and Kinell, P.-O. (1950) "Method for determination of the amino acid sequence in peptides" *Acta Chem. Scand.* **4**, 283-293.
3. Akabori, S., Ohno, K., and Narita, K. (1952) "Hydrazinolysis of proteins and peptides: method for the characterization of carboxyl terminal amino acids in proteins" *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **25**, 214-218.
4. Akabori, S., Okawa, K., and Sakiyama, F. (1958) "A new synthesis of histidine peptides" *Nature* **181**, 772-773.
5. Witkop, B. (1984) "11 Organic chemistry in a biomedical research organization" in *NIH: An Account of Research in Its Laboratories and Clinics* (Stetten, D. and Carrigan, W. T. eds.), Academic Press, 193-219.
6. Yamasaki, N., Tsujita, T., Sakiyama, F., and Narita, K. (1976) "Enrichment of enzyme activity on deformylation of 1-NFK-lysozyme" *J. Biochem.* **80**, 409-412.
7. Nakazawa, T., and Sakiyama, F. (1991) "Site-specific  $^{13}\text{C}$ -labeling of Trp 62 in hen egg-white lysozyme: preparation and  $^{13}\text{C}$ -NMR titration of  $[\delta_1\text{-}^{13}\text{C}]\text{Trp 62-lysozyme}$ " *J. Biochem.* **110**, 295-300.
8. Malcolm, A. D. (1978) "The Decline and fall of protein chemistry?" *Nature* **275**, 90-91.
9. 崎山文夫 (1982) "タンパク質の機能発現とトリプトファン残基の役割" *蛋白質 核酸 酵素* **27**, 1626-1637.
10. Treston, A. M., and Mulshine, J. L. (1989) "Peptide structure. Beyond transcriptional events" *Nature* **337**, 406-406.
11. Norioka, S., Ohta, S., Ohara, T., Lim, S.-I., and Sakiyama, F. (1994) "Identification of three catalytic triad constituents and Asp-225 essential for function of lysine-specific serine protease, *Achromobacter* protease I" *J. Biol. Chem.* **269**, 17025-17029.
12. Ohnishi, Y., Yamada, T., Kurihara, K., Tanaka, I., Sakiyama, F., Masaki, T., and Niimura, N. (2013) "Neutron and X-ray crystallographic analysis of *Achromobacter* protease I at pD 8.0: protonation states and hydration structure in the free-form" *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 1642-1647.
13. Shiraki, K., and Sakiyama, F. (2002) "Histidine 210 mutant of a trypsin-type *Achromobacter* protease I shows broad optimum pH range" *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 331-333.
14. Kawata, Y., Sakiyama, F., Hayashi, F., and Kyogoku, Y. (1990) "Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*" *Eur. J. Biochem.* **187**, 255-262.
15. McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., and Clarke, A. E. (1989) "Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases" *Nature* **342**, 955-957.
16. Matsuura, T., Sakai, H., Unno, M., Ida, K., Sato, M., Sakiyama, F., and Norioka, S. (2001) "Crystal structure at 1.5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility" *J. Biol. Chem.* **276**, 45261-45269.
17. MacIntosh, G. (2011) "RNase T2 family: enzymatic properties, functional diversity, and evolution of ancient ribonucleases" in *Ribonucleases* (Nicholson, A. W., ed.), Chapter 4. *Nucleic Acids and Molecular Biology* **26**, 89-114.
18. Ishimizu, T., Mitsukami, Y., Shinkawa, T., Natsuka, S., Hase, S., Miyagi, M., Sakiyama, F., and Norioka, S. (1999) "Presence of asparagine-linked *N*-acetylglucosamine and chitobiose in *Pyrus pyrifolia* S-RNases associated with

- gametophytic self-incompatibility" *Eur. J. Biochem.* **263**, 624-634.
19. Luhtala, N., and Parker, R. (2010) "T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles" *Trends Biochem. Sci.* **35**, 253-259.
20. Witkop, B. (1995) "Stepping stones – building bridges" in *Comprehensive Biochemistry* (Slater, E. C., Rainer, J., and Giorgio, S., eds), Chapter 3: A History of Biochemistry: Selected topics in the history of biochemistry. Personal recollections. Elsevier Science Ltd., 4, **38**, 109-162.
- 

#### 崎山文夫先生ご略歴

- 1934年 大阪に生まれる。
- 1956年 大阪大学理学部化学科卒業
- 1958年 大阪大学大学院理学研究科修士課程修了
- 1960年 大阪大学蛋白質研究所助手
- 1962年 米国 NIH, B. Witkop 研究室にて研究
- 1962年 理学博士 (大阪大学) : 学位論文題目は「ヒステジルペプチドの合成研究」
- 1971年 大阪大学蛋白質研究所助教授
- 1982年 大阪大学蛋白質研究所教授
- 1995年 大阪大学蛋白質研究所所長
- 1997年 大阪大学名誉教授
- 1998年 四天王寺国際仏教大学教授

