

## 私のタンパク質科学回顧：RNase T<sub>1</sub>の一次構造研究に関わった頃

高橋 健治（たかはし けんじ）

私がタンパク質に関する研究に初めて関与して以来、すでに60年近くが経過した(1)。本稿では、1960年代前後に私が関わったリボヌクレアーゼ T<sub>1</sub>（以下 RNase T<sub>1</sub> または T<sub>1</sub>）の一次構造に関連する研究を回顧し、我が国内外におけるタンパク質科学研究の発展の歴史の一端を、垣間見る事にさせて戴く。

タンパク質の一次構造研究における最初の輝かしい業績は、1955年、英国のF. Sanger博士らによるウシインシュリン（51残基）の全構造決定である（1958年ノーベル化学賞受賞）(2)。彼等はこの研究に、DNP法によるN末端分析や、ペーパークロマトグラフィー、ろ紙電気泳動などの手法を用いていた。しかし、その後タンパク質の一次構造決定の主流は、分子量一万以上のタンパク質の構造決定に移り、用いる手法もEdman法によるN末端配列分析、イオン交換カラムクロマトグラフィーによるペプチドの分離やアミノ酸分析など、より近代的な手法に取って代わって行った。1950年代後半、米国ではS. Moore、W.H. Steinらによるウスイ臓リボヌクレアーゼA（以下RNase A）に関する研究などが、新規な研究手法の開発も含め、先端を切って進んでいた。しかし、1960年以前には、分子量が一万前後を越えるタンパク質で完全一次構造が決定されたものはまだ無かった。

### 「タンパク質科学に関連する初めての実験」

私は学部四年の卒業研究では生物化学研究室を選び、そこで初めてタンパク質科学関連の研究として酵素化学実験を経験することになった。指導教授はタンパク質のC末端残基決定法の一つであるヒドラジン分解法の開発でも著名な赤堀四郎先生で、大阪大学を兼任されていた。与えられた研究テーマは「気体水素と人工複合酵素系を用いる $\alpha$ -ケトグルタル酸からのL-グルタミン酸の合成」というものだった。ヒドロゲナーゼ、ジアフォラーゼ（リポ酸デヒドロゲナーゼ）、L-グルタミン酸デ

ヒドロゲナーゼを共役させ、分子状水素とアンモニウムイオンにより $\alpha$ -ケトグルタル酸を還元的にアミノ化してL-グルタミン酸を合成する事が目的だった。この研究テーマはすでに先輩が挑戦して成功しなかったものだったが、その主な原因は用いた酵素の純度にあるように思われた。当時化学教室には低温実験室など無く、地階に粗末な氷冷倉庫があるだけだったので、酵素の調製実験には至極不便だったが、実際、それぞれの酵素を十分精製して用いることにより、所期の目的を初めて達成できた(3)。酵素の精製と活性測定、変性による不安定化などの体験を通して、タンパク質の本体に僅かながら触れられたような気がした。個々の酵素の精製については、関連原著論文を参考にしたが、赤堀四郎編「酵素研究法」（朝倉書店、1955）の部厚な書も大いに役立ったことを覚えている。

### 「チトクロームcの構造と機能に関する研究」

卒業研究を通じて私の興味は酵素の化学構造と構造・機能相関の研究に次第に傾いて行った。当時赤堀研究室でそのような目的でなされていた研究は唯一「チトクロームcの構造と機能に関する研究」だった。チトクロームcは酵素ではないが機能タンパク質として十分興味をひくものだったから修士課程のテーマとしてこれを選ぶことにした。チトクロームcの研究は二年先輩の千谷晃一氏が中心となって進められていた。私の最初の実験は「チトクロームcのグアニジン化」というもので、この塩基性タンパク質が持つ多数のアミノ基が活

性発現に関与するか否かを、アミノ基の特異的化學修飾の一つであるグアニジン化により調べるといったものだった。この場合も、修飾試薬の *o*-メチルイソ尿素を純粋に合成して用いることがきめ手となった。結果は Lys のアミノ基は活性発現に必須ではないというものだった。当時は機能タンパク質中の特定残基が必ずしも必須でないことを明瞭に示した例はほとんど知られていない時代だったので、結構目新しい成果だったと思う。

修士一年の初夏に東京と京都で国際酵素化学会議が開催され、チトクローム *c* の構造と機能に関する研究発表の協同研究者としてこれに参加できた(4)。私にとっては初めての国際学会であり、そのインパクトは絶大だった。当時、生化学研究の主流は酵素化学にあり、多数の錚々たる生化学者が世界中から参加し学会は壯観を極めた。これに関連して同年秋に東京で “Symposium on Chemical Structure of Proteins” が開催され、一次構造関係では、赤堀教授ら(阪大)、佐竹一夫教授ら(都立大)がそれぞれ、タカアミラーゼ A およびヘモグロビンの N-末端配列について、安藤鋭郎教授(東大)らがクルペインおよびサルミンのトリプシンペプチドについて、また C. Fromageot 教授(パリ大)が招待講演で卵白リゾチームのトリプシンペプチドの構造について講演した。

その後、私の研究はチトクローム *c* の化学構造(一次構造)決定を目指して進み出した。当時我が国では、東大の安藤研究室でニシン精子核のポリペプチド性タンパク質クルペインの一次構造研究が進められていたが、分子量一万前後以上のタンパク質の全化学構造を目指した本格的な研究はまだ例がなかった。従来の構造分析は Sanger 以来の DNP 法やペーパークロマトグラフィー、ろ紙電気泳動などを主力としていたが、分子量一万を超えるタンパク質の構造決定には、より定量的な手法の導入が求められていた。1950年代の後半より欧米における一次構造決定法の主流は、RNase A の研究に代表されるカラムクロマトグラフィーを主力とする方法に取って代わりつつあった。したがって、我が国でもそのための基本技術を導入する事が、まず先決課題であった。定量的アミノ酸分析法や

ペプチド断片の分画法、Edman 法によるアミノ酸配列分析法など、基本的手法の殆どを新たに導入する必要があり、一つ一つがわが国においては初めての導入だった。それだけに当時は、タンパク質のアミノ酸組成や N 末端アミノ酸残基を決めただけでも論文が書けるほどの時代だった。このようにして、カラムクロマトグラフィーによるアミノ酸分析やペプチドの分画が可能となり、ウマ心筋およびパン酵母のチトクローム *c* について研究を進めた。当時はコピー機もパソコンも無い時代で、RNase A の構造決定に関する原著論文の要所を大学ノートにびっしりと写し取って参照したことを覚えている。これは、論文内容を細部まで理解するのに役立つだけでなく、参照した論文が優れた文章で書かれていたので、図らずも英文科学論文の作製力の向上にも大いに役立ってくれた。タンパク質についての理解を深めるため、研究室内では H. Neurath, K. Bailey 編 “The Proteins” (Academic Press, 1953)などを毎週輪講した事を覚えている。

### 「チトクローム *c* から RNase T<sub>1</sub>へ」

修士二年時、赤堀教授が兼任を辞められ、江上不二夫教授が着任された時点でチトクローム *c* グループはほぼ発展的に解散し、千谷氏はやがて新設された阪大蛋白質研究所(初代所長赤堀教授)の化学構造部門に助教授として転出した。その後のチトクローム *c* の一次構造研究は成田耕造教授、千谷氏らにより進められ、1963年にパン酵母チトクローム *c* の一次構造が決定された。これは我が国における最初の分子量一万を超える蛋白質の一次構造決定となった。

一方、私は江上教授を指導教官として新しいテーマ「RNase T<sub>1</sub>の構造と機能に関する研究」に取り組むことになった。この酵素は1957年、江上教授らによりタカジアスターゼ (*Aspergillus oryzae* 由来)中に発見された RNA 分解酵素である。従来よく研究されていた RNase A (ピリミジン特異的)とは塩基特異性が異なる(グアニン特異的)ことから、RNA の構造決定において特異的分解試薬として役

立つ可能性がある点、また酵素の構造・機能関連の研究対象として興味深い点から当時国の内外で注目を集めていた。既に一次構造決定の予備的研究を進めていたチトクローム c にいささか後ろ髪を引かれつつも、これこそ研究すべき本物の酵素だと思った。

T<sub>1</sub>の研究をさらに進めるためには、まず純粋な酵素が必要だった。従来の古典的精製法は不十分で、新たな精製法の導入が不可欠だった。当時は T<sub>1</sub>のような酸性タンパク質の精製に有効なイオン交換クロマトグラフィー法は皆無だった。しかし、幸運にも 1956 年に米国で開発された DEAE-セルロースを用いる陰イオン交換クロマトグラフィー法が有効である事が判明した。この方法の導入により、ついに本酵素を初めてタンパク質として完全精製することができた(5)。

精製酵素について、光酸化の実験から、本酵素が活性発現に必須な His 残基を持つこと、8 M 尿素存在下で 2-メルカプトエタノールにより 2 個の S-S 結合を還元、切断し、酵素を変性、失活させた後、尿素を除去し、空気酸化することにより正しいコンホメーションを再構築させ、活性を回復させられることなどの知見が得られた(6)。これらの実験は、RNase A についての実験に範を得たものであり、両酵素がこれらの点では類似することを示した興味深い結果だった。

しかし、より精確な結論を得るためには、T<sub>1</sub>の完全一次構造を決定し、その上に立って分析を進める必要があるという信念から、私は一次構造決定に挑戦する決意をした。ここでは幸い、チトクローム c の研究で得た技術が役に立った。当時一次構造決定には現在と比べて少なくとも百倍程度以上の試料が必要だった。そこで、5 グラムの酵素の精製をめざし、数ヶ月をかけて、数十キログラムのタカジアスターゼ原末より、最終的に約 3 グラムの完全精製酵素を得た。この精製酵素の一部は米国の R. W. Holley 博士に送られ、Ala-tRNA の全塩基配列決定(1968 年ノーベル生理学・医学賞受賞)に不可欠な分解酵素として役立つことにもなった。余談ではあるが、T<sub>1</sub>という優れた武器に恵まれながら、tRNA の構造を世界に先駆けて我が国で決めら

れなかった主因は、tRNA の精製に遅れをとったためであり、極めて遺憾であった。

一次構造決定には博士課程二年頃からとりかかった。この年(1960年)、S-S 結合の位置も含めた RNase A の完全一次構造が C. H. W. Hirs, Moore, Stein らによって発表された(7)。これは、分子量一万を越えるタンパク質として、また酵素として初めての構造決定であった(1972年、Moore と Stein はノーベル化学賞受賞)。私は三年の後半からは、籍を江上研に残して新設された理学部三号館の安藤研に席を移した。当時はクルペインの構造研究を進めていた安藤研に、幸運にも D. H. Spackman, Stein, Moore によって開発された Beckman-Spinco 社の自動アミノ酸分析機が日本で初めて導入されて間もない頃だった。使用希望が多いため私の分析はほとんどが深夜か休日に回ることになったが、これを有効に利用することができた。その結果、二年余で部分一次構造に到達し、大学院を修了した。研究方法は主に Moore-Stein らの方法に準拠したが、必要に応じ高圧ろ紙電気泳動やペーパークロマトなども併用した。当時は Edman 法での PTH アミノ酸の同定が難しかったので、Edman 分解後の残存ペプチド鎖の N 末端残基を DNP 法で順次決定する「DNP-Edman 法」を考案し、これは T<sub>1</sub>の N 末端配列決定に有効に利用できた。しかしこの方法は、後年 B. S. Hartley(1970)によって開発されたダンシル-Edman 法に比べ感度が低かったため、一般に普及するには至らなかった。なお、当時は微生物のタンパク質の一次構造決定例が無く、微生物酵素の場合にはおそらく多様性が著しいために、特定のアミノ酸配列を決めることは難しいだろうと考える人さえいる状況だった。

### 「RNase T<sub>1</sub>の全一次構造決定と国内外の状況」

日本学術振興会奨励研究生として一年、同学科安藤研究室の助手として一年余を T<sub>1</sub>の構造研究に費やした。またこの間に、F. Sanger 博士、S. Moore 博士、H. Fraenkel-Conrat 博士などが研究室に来訪され、仕事の話をする機会が持てたのは大変刺激になった。研究が本格的に進んだのは学振の奨

励研究生になった前後からだったと思う。T<sub>1</sub>の場合、酵素の原料が日本産のタカジアスターゼであり、自分の手で完全精製も行ったわけで、当面試料については完全独走態勢にあったことが最も有利な点であった。T<sub>1</sub>は後年三共株式会社から市販されたが、初めから市販されていたら別の展開になっていた可能性も強い。

全構造決定のためには、各種のプロテアーゼ分解で生じたペプチドを分別精製し、それらの構造決定を行い、それらの結果を組み合わせることで全構造を推定するというのが常套手段であった。RNase A と比べ、不利な点が二つあった。第一点はプロテアーゼ分解に通常最初に用いられるプロテアーゼで、特異性が最も厳密だったトリプシンがあまり役に立たなかったことである。これは T<sub>1</sub> が酸性タンパクであり、トリプシンが作用する Lys および Arg を各一残基しか含まず、分解点が少ないためにトリプシン処理で大型ペプチド片が不溶化してしまい、その後の分析を難しくしたためである。第二点はそれほど大きな問題ではないが T<sub>1</sub> がトリプトファンを一残基含み、これが S-S 結合切断の常法であった過蟻酸酸化では酸化分解し、同定困難だったことである。

このためまず過蟻酸酸化 T<sub>1</sub> を用い、そのトリプシン分解で得られたペプチドも利用しつつ、主にキモトリプシン分解で得られるペプチドを詳しく分析した。また、これに加えて未変性 T<sub>1</sub> のペプシン、パパイインおよびサチライシンによる個別分解も併用した。各酵素分解で得られたペプチド混合物は Dowex 50 X-2 のカラム (0.9 x 150 cm) を用い、ピリジン・酢酸緩衝液のグラジエント溶出により分画した。カラムからの溶離液はヤジロベエ式の日本式フラクションコレクター (東洋濾紙社製) を用いて集め、アルカリ分解有無下でニンヒドリン比色分析した。各ピーク分画について高圧ろ紙電気泳動とペーパークロマトグラフィーにより純度を検査し、複数のペプチドを含む分画はさらにこれらの方法により構成ペプチドを分離精製した。各精製ペプチドの配列分析は、そのままあるいはさらにプロテアーゼによる小断片化後、アミノ酸分析を利用する subtractive Edman 法を主に用い、

さらにアミノペプチダーゼによる N 末端配列分析およびカルボキシペプチダーゼ A とヒドラジン分解による C 末端域配列分析を併用して全配列を決定していった。

これらのペプチド分画とアミノ酸配列分析法は基本的には Moore-Stein らの方法に準拠するものであったが、一種類の酵素分解物のカラムクロマトグラフィーに十日間近くかかり、分画を集めた試験管も千本近くに達した。HPLC もまともなフラクションコレクターも無い時代で、日本式の非電動型、回転式フラクションコレクターが故障なく十日間も連続して回り続けるのを調整、監視するのも大変な仕事だった。夜間コレクターの横に添い寝して、時々目を覚ましてはその正常な作動を確認したことを覚えている。ポリエチレンラップもパラフィルムも、またボルテックス・ミキサーも無い時代で、ニンヒドリン反応をする際、反応前に試料液と試薬液を混ぜるために試験管に直接親指で蓋をして振り混ぜたため、数時間後に親指とそのまわりが青紫色に染め上がり、その後一週間ほど色が消えなかったこともしばしばだった。

T<sub>1</sub> の全構造はキモトリプシンペプチドとトリプシンペプチドの分析結果から決定されたが、別の方法によっても確認されることが望ましいと考え、特異性の異なるペプシン、パパイインおよびサチライシンによる分解で得られるペプチドの分析も行った。この結果、キモトリプシンペプチドとペプシンペプチドおよび一個のパパイインペプチドの分析結果だけからも同一の完全アミノ酸配列が得られることが示された。またサチライシンペプチドの配列も矛盾がなかった。これらの結果は最終決定配列の正当性を強く支持するものであった。また、S-S 結合の位置は、サチライシンペプチドの分析から決定できた。

このようにして、昭和 40 年 (1965 年) T<sub>1</sub> の完全構造に到達することができた (8)。最初の本格的な構造決定実験として T<sub>1</sub> 約 200mg を過蟻酸酸化したのが、大学院博士課程三年生の二月 (昭和 37 年) であったから、それから三年余のことだった。T<sub>1</sub> の全構造決定の論文はまず速報として短くまとめ、J. Biol. Chem. に投稿した。T<sub>1</sub> の構造に関する中間報

告は、蛋白質構造討論会（第10回、1959年 - 第15回、1964年）や日本生化学会大会で行い、それぞれの予講集に概略が載っている。なお、蛋白質構造討論会は、日本化学会主催で、タンパク質化学を中心としたタンパク質の構造と機能に関する討論会（年一回開催）である。2000年（第51回）まで続き、翌年日本蛋白工学会、蛋白質立体構造構築原理研究会などと共に母体となり、日本蛋白質科学会が新たな学会として創設された。我が国の蛋白質科学研究発展への蛋白質構造討論会の寄与は極めて大きい。

この結果、 $T_1$ は104個のアミノ酸残基を含む一本のポリペプチド鎖からなり、2個のS-S結合を持つタンパク質であることが明らかになった。また、アミノ酸配列はRNase Aとは全く異なり、両者は進化上無関係なタンパク質であることが判明した。酵素としては、すでにRNase A（124残基、Hirs, Moore, Stein, 1960年）のS-S結合の位置を含む全一次構造が報告されていたので、これに次いでニワトリ卵白リゾチーム（129残基、Canfield, Jollèsら、1965年）と並ぶことになった。因に、1960年から1965年までの間に完全一次構造が報告されたタンパク質（分子量約一万以上）としては、他にタバコモザイクウイルスコートタンパク質、ヒトヘモグロビン（ $\alpha$ 鎖+ $\beta$ 鎖）、チトクロームc（ウマ、ブタ、*P. aeruginosa*、パン酵母）、マッコウクジラミオグロビンがある(9)。これらの構造決定の殆どは米国を中心とした欧米諸国でなされたものであり、我が国で決定されたものは、パン酵母チトクロームc（104残基、1963）とRNase  $T_1$ のみである。なお、タバコモザイクウイルスコートタンパクの構造決定には、次田 皓氏（阪大）が留学先でのH. Fraenkel-Conratらとの協同研究において重要な寄与をしている。従って、1960-1965年間に完全構造が報告された分子量約一万以上のタンパク質は、ヘモグロビンあるいはチトクロームcなどをそれぞれまとめて1種として数えると7種類（異なる生物種由来の同種タンパク質を別々に数えると10種類）となる。この数はその後加速度的に増加し、1982年までには約200種（同種タンパク質を別々に数えると1100種類余）に達している(10)。また、

この間我が国では安藤教授、岩井浩一、石井信一氏（東大）らによりタンパク性ポリペプチドであるクルペインZ（31残基、1962）が構造決定されている。これは、我が国で構造決定された最初のタンパク性ポリペプチドである。また、1965年までにヒトチトクロームc（E. Smith 研で松原 央氏（阪大）が構造決定に寄与）、ウシトリプシノゲンおよびキモトリプシノゲンなどの構造も大部分決まっており、ウマヘモグロビン $\alpha$ 鎖（G. Braunitzer 研で松田源治氏（長崎大）が構造決定に寄与）の構造も決まっていた。1965年にM. O. Dayhoffにより”Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 1”（National Biomedical Research Foundation）が出版され、1978年迄続刊された。タンパク質のアミノ酸配列に関する最初のデータベースとも言うべきものであり、後のGenBankなどのデータベースのモデルとなった。

### 「化学修飾法による $T_1$ の活性部位の研究」

1965年より三年間、米国ロックフェラー大学のMoore-Stein 研に留学し、 $T_1$ の活性部位の研究をさらに続けることになった。当時、同大にはR. B. Merrifield（1984年、RNase Aの固相法化学合成などによりノーベル化学賞受賞）、G. M. Edelman（1972年、抗体分子の構造解明によりノーベル生理学・医学賞受賞）、L. C. Craig（向流分配法の創始者）などを筆頭に多数の著名なタンパク質科学関連の研究者がいた。また、G. Blobel（1999年、タンパク質の細胞内局在化シグナルの発見でノーベル生理学・医学賞受賞）はまだ大学院生だった。Moore-Stein 研ではすでに、A. M. Crestfieldらのヨード酢酸による化学修飾実験（His残基の特異的カルボキシメチル化による失活）から、RNase Aの活性部位残基としてHis12とHis119が推定されていた。当時、化学修飾法はX線結晶構造解析とともに、最も有力な活性部位残基の特定法であった。一方、 $T_1$ も同様な条件下でヨード酢酸により不活性化することが日本での予備実験で分かっていたが、反応するアミノ酸残基は不明であった。

$T_1$ でのヨード酢酸の反応部位を明らかにするた

めに、 $^{14}\text{C}$  標識試薬を用いたところ、反応は1:1のモル比で起こり、反応産物は酸加水分解で完全に分解して $^{14}\text{C}$  標識グリコール酸を生じることが判明した。この結果から、当時想定外であったが、諸般の証拠から反応はカルボキシル基との間に起こっている可能性が最も高いと推定された。そこで、カルボキシメチル化  $\text{T}_1$  をプロテアーゼ分解し、カルボキシメチル化ペプチド断片を得て、反応残基を同定することにした。断片化とその後のクロマトの際に、 $^{14}\text{C}$  標識カルボキシメチル基が容易にペプチドからはずれてしまう事実が悩まされながら、最終的には比較的安定な限定分解/単離条件を見出し、ついに修飾された残基の同定ができた。何とこのアミノ酸は Glu58 であり、反応産物は $\gamma$ -カルボキシメチルグルタミン酸だった (11)。タンパク質中のカルボキシル基にヨード酢酸が作用してこれをエステル化(カルボキシメチル化)した例は初めてであった。この結果を得るのに $^{14}\text{C}$  標識ヨード酢酸を使ったことは決定的に重要だった。当時東大の生物化学教室には液体シンチレーションカウンターが一台も無く、放射性実験は不可能だった。

ニワトリ卵白リゾチームについては、D. Phillips らが1965年にX線結晶構造解析による立体構造研究から Glu35 と Asp52 を触媒残基として推定していたが、タンパク分子中の特定位置にある残基のカルボキシル基が活性発現に必須な基として化学修飾により同定された例は  $\text{T}_1$  が初めてである。当時、Moore-Stein 研をはじめ他のいくつかの研究グループによってブタペプシンならびに類縁酵素の活性部位残基の同定が進められており、特定の Asp 残基(後にブタペプシンでは Asp32 と判明)が触媒残基の一つである証拠が得られつつあった。現在、触媒基としてカルボキシル基を持つ酵素(12)は極めて多数知られているが、その草分け時代の仕事ということになる。

$\text{T}_1$  についてのもう一つ興味深い点は、この酵素が酸性タンパク質であり、塩基性アミノ酸としては Lys 1 個、His 3 個、Arg 1 個のみを含むことである。初期の実験から Lys は活性発現に関与せず、His は全3個のうちいずれか1, 2 個が重要であることが推定されていた。しかし、Arg についてはま

ったくその役割は不明だった。当時、タンパク質中の特定の Arg 残基の役割を明らかにした研究は皆無だった。その理由の一つは中性付近の温和な pH 下で Arg 残基を特異的に化学修飾出来る試薬がほとんど無かったからである。そこで、このような試薬を探し、まず  $\text{T}_1$  に応用することをめざした。

当時、グリオキサールのようなジカルボニル化合物が Arg のグアニジン基と特異性は低いながらも反応することが、柴田和雄氏(東工大)らの研究により知られていた。これにヒントを得て、多数のジカルボニル化合物の反応性と特異性を、タンパク質としては RNase A を用いて、比較解析した結果、フェニルグリオキサール (PGO) が目的に最も合う化合物であるとの結論を得た (13)。Arg の PGO 誘導体は、通常の酸加水分解では変化はするものの、遊離の Arg を生じないので、Arg の修飾度は酸加水分解後のアミノ酸分析で、Arg の減少として定量できる。また、PGO と Arg は 2:1 のモル比で反応することが判った。

後にこの試薬による  $\text{T}_1$  の修飾を行った結果、Arg77 が特異的に修飾されることにより活性が失われることを示すことができた (14)。タンパク分子中の特定の Arg 残基が酵素活性発現に関与することを化学修飾法によって示したのはこれが最初の例である。リン酸化合物など負の荷電を持つ化合物は生体内に非常に多く、それと特異的に結合するタンパク質や酵素がしばしばその結合部位に特定の Arg 残基を持つ例は珍しくない、以後、この試薬は、同時期に米国で研究されていたジアセチル (2,3-ブタンジオン) とともに、多数のタンパク質や酵素に応用され、機能残基としての Arg 残基の同定に広く役立っている。

その後、活性部位 His 残基の同定の方向に仕事を進めた。まず、光酸化の実験で、3 個の His の中で、His 1, 2 個が活性発現に関与することが示唆された。そして、これらの結果を総合して、1970 年に  $\text{T}_1$  の推定反応機構を提案した (15)。これは、Glu58 と His が一般塩基、一般酸として関与するという機構である。更にその後の光酸化およびヨードアセトアミドによるアルキル化の実験から、活性部位に His40 と His92 が関与する事が示唆された

(16-18)。

また、 $T_1$ と基質との相互作用のメカニズムを解明するために、J. P. Hummel と W. J. Dreyer によって開発されたゲルろ過法を用いて、多数のヌクレオチド、ヌクレオシドおよびそれらの誘導体等との結合を測定した。この結果、グアニン塩基のN1位、2-アミノ基、6-オキソ基、7-アミノ基およびリン酸基(特に3'位)が酵素との結合に関与することが推定された(19, 20)。しかし、酵素側のグループについてはグアニン部分との特異的結合に関与するアミノ酸残基を推定するところまでは至らなかった。なお、この分野では、今堀和友、大島泰郎氏(東大)らなども差スペクトル法を用い、有意な結果を得ている。

後に、 $T_1$ と類縁酵素  $U_1$ および $N_1$ の一次構造比較から一箇所  $T_1$ の配列中に問題があることに気付いた。そこで、 $T_1$ の全配列を再検討したところ、71-73位のPro-Gly-SerはGly-Ser-Proが正しいと結論された。残念ながら誌上で修正した。1960年代に化学的方法で構造決定されたものには、RNase Aを含めその後の訂正がしばしばあったものである。この間、U. Heinemann, W. Saenger (1982)が $T_1$ -2'-GMP複合体のX線結晶構造解析に成功し、活性部位の立体構造が明らかになった(21)。彼らの結果は、私が先に提案した反応機構(15)を支持するものであった。また、Tyr42-Tyr45の領域が多数の水素結合を介してグアニン部位との特異的結合に関与し、Tyr45がグアニンとstackingすることが示された。ゲルろ過法で先に推定したグアニン側の推定水素結合部位はこれらの結果とよく一致した。後年、部位特異的突然変異導入体の解析から、反応機構におけるGlu58, His40, His92の役割については種々議論されることになるが、Glu58の触媒残基としての重要性に変わりはない(12)。なお、立体構造解析を目的とした $T_1$ の結晶化は早くから三井幸雄氏ら(東大)により試みられていたが、成功せず、我が国で最初に達成出来なかったことは実に残念だった。

## 「RNase $T_1$ からプロテアーゼおよび関連タンパク質へ」

一方、1970年代以降、私の興味は次第にプロテアーゼおよびその関連タンパク質に移って行った(12)。Moore-Stein研でペプシン等のプロテアーゼに関する研究を見聞きしたことも引き金となったが、また、生理的機能という観点からもより興味をひかれて行った。その後、京大・霊長類研、次いで東大・理学部、最後は東京薬科大・生命科学部で延べ三十年余にわたり研究に従事し、多くのタンパク質や酵素の構造や機能、構造・機能相関の研究に携わった(1)。特に力を入れたのは、ペプシノゲン/ペプシンと類縁カルボキシルペプチダーゼおよびグルタチオン S-トランスフェラーゼなどである。この間、一次構造研究はプロテインシーケンサーやHPLCの導入などで迅速化し、また分子生物学の目覚ましい発展とともに、一次構造研究もDNAレベルでなされる事が多くなり、化学修飾による研究も部位特異的変異法に取って代わっていった。残念ながら、この間の研究については紙面の制限のため割愛させて戴く。

1960年前後、タンパク質の一次構造研究の草創期に参画できた幸運に感謝している。

## 文 献

1. Takahashi, K. (2015) ResearchGate ([https://www.researchgate.net/profile/Kenji\\_Takahashi7](https://www.researchgate.net/profile/Kenji_Takahashi7)).
2. 高橋健治 (2014) 生化学 86, No. 1, i-ii.
3. Takahashi, K. and Kondo, Y. (1959) Bull. Agr. Chem. Soc Jpn, 23, 249-252.
4. Minakami, S., Titani, K., Ishikura, H. and Takahashi, K. (1958) Proc. Internatl. Symp. Enz. Chem. Tokyo & Kyoto 1957, 211-215.
5. Takahashi, K. (1961) J. Biochem. 49, 1-8.
6. Egami, F., Takahashi, K. and Uchida, T. (1964) Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. Vol. 3, pp. 59-101.
7. 高橋健治 (1972) 現代化学 12月号 8-17.
8. Takahashi, K. (1965) J. Biol. Chem. 240, 4117-4119.
9. Dayhoff, M.O. ed. (1972) Atlas of Protein Sequence and Structure 1972, Vol. 5, National Biomedical Research Foundation.
10. 高橋健治 (1982) 蛋白質核酸酵素 27, 698-713.
11. Takahashi, K., Stein, W.H. and Moore, S. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4682-4690.
12. Takahashi, K. (2013) Proc. Japan Acad. Ser B 89, 201-225.
13. Takahashi, K. (1968) J. Biol. Chem. 243, 6171-6179.
14. Takahashi, K. (1970) J. Biochem. 68, 659-664.
15. Takahashi, K. (1970) J. Biochem. 67, 833-839.
16. Takahashi, K. (1971) J. Biochem. 69, 331-338.
17. Takahashi, K. (1973) J. Biochem. 74, 1279-1282.
18. Takahashi, K. (1976) J. Biochem. 80, 1267-1275.
19. Takahashi, K. (1972) J. Biochem. 72, 1469-1481.
20. Takahashi, K. and Moore, S. (1982) The Enzymes, 3<sup>rd</sup> ed., Vol. XV, Part B, pp. 435-468.
21. Heinemann, U. and Saenger, W. (1982) Nature 200, 27-31.

### 高橋健治先生ご略歴：

- 1934年 長野県に生まれる。
- 1957年 東京大学理学部化学科卒業
- 1962年 東京大学大学院理学系研究科生物化学専門課程博士課程修了，理学博士
- 1962年 日本学術振興会奨励研究生
- 1963年 東京大学理学部生物化学科助手
- 1965年 ロックフェラー大学博士研究員（～1968）
- 1973年 東京大学理学部生物化学科講師
- 1974年 京都大学霊長類研究所生化学研究部門教授
- 1984年 東京大学理学部生物化学科教授
- 1993年 東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻教授
- 1995年 東京大学名誉教授
- 1995年 東京薬科大学生命科学部教授
- 2005年 東京薬科大学名誉教授
- 2005年 首都大学東京客員教授

