

蛋白質のかたち、立体構造の安定性研究

----- 50 余年の私の研究の歩み -----

油谷 克英 (ゆたに かつひで)

1. 「銅鉄的研究」の教えに学ぶ

日米安全保障条約改定に反対するいわゆる 60 年安保反対闘争の真っ只中 1960 年に、大阪大学理学部生物学科の 4 年生の卒業研究で生物物理化学講座の伊勢村寿三教授の研究室に配属された。テーマは「蛋白質の変性とその可逆性」。私の名前が出た最初の論文は、先輩の大学院生、前田安昭さんの仕事を手伝ったもので、「8 モル尿素中で全ての SS 結合を切断した完全変性タカアミラーゼの再生研究」であった。しかし、この研究の評判はすこぶる悪かった。Anfinsen らの変性リボヌクレアーゼの再生研究の 2 番煎じであると。当時は、安保闘争、大学紛争で大学は荒れていたが、良い意味では「研究とは何か」をいやが上でも真剣に考えさせられた時代であった。どのような経緯か忘れてしまったが、江上不二夫教授が「銅鉄的研究(牛馬的研究)」を薦められていることを知った(1)。銅でやった研究を鉄でやる研究も悪くない。つまり、リボヌクレアーゼの再生研究を他の蛋白質でも行うことを推奨しているのである。これには非常に勇気を与えられた。研究のやり方を初心者にも十分に納得させるものであった。

そこで、SS 結合を有するタカアミラーゼと SS 結合を有しないバクテリアのアミラーゼを材料に変性とその可逆性の研究に取り組んだ。その中で、Goldberger(1963)らがラット肝ミクロソームの中に、SS 交換酵素が含まれていて、その酵素が還元リボヌクレアーゼの再生を促進するという報文を見つけた。しかし、よく論文を読むと酵素としては考えられないほどの大量を必要としていることが分かった。それを確認するために、自身で、その酵

素をウサギ肝臓から抽出した。その酵素が、SS 結合を含まないバクテリアのアミラーゼの尿素変性の再生も促進させることを見出した。促進効果には BSA など大変有効であることが分かった(2)。更に、還元タカアミラーゼの再生も蛋白質のある濃度範囲では蛋白質濃度に比例して再生速度が上昇することを認めた(3)。これらの研究から、当時は、一分子だけなら蛋白質の変性は可逆的でないかと真剣に考えていた。蛋白質の社会学をどのように進めるべきか、未熟な知識で無駄な実験に多くの時間を費やした。SS 交換酵素よりもっと有効な再生促進蛋白質の探索にも多くの時間を費やしたことを覚えている。何十年も経た今日では、分子シャペロンとか蛋白質の crowding 効果による安定化などとして学問的に確立されているが、当時の私としては発展の方向を見いだせなかった。



図1. 伊勢村研究室のハイキング。
1963 年ごろ 上段左から二人目浜口浩三さん、三人目高木俊夫さん、下段右から二人目が著者。

2. 好熱菌由来の蛋白質はなぜ高い安定性を示すか

1961年に、好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* 由来の α -アミラーゼの天然状態の旋光性の値が、8M尿素または5M塩酸グアニジンなどの変性剤中での値と変わらないので、好熱菌蛋白質の天然構造は変性状態のようなセミランダムかランダム状態の構造である。そのため、高い温度でも構造が壊れた状態で機能を有するとする論文が発表されていた。当時、研究室の大学院生の小笠原京子さんがこの結果を検証すべく追試実験を行っていた。実験結果は好熱菌 α -アミラーゼも常温菌由来のものと似た特徴ある立体構造を有していることを明ら

かにした(4)。

「変性と再生」の研究から何を引き出すべきなのかを考える中で、どのような機構で立体構造が維持、安定化されているかを明らかにすることが重要な課題の一つであると捕えるようになっていた。そこで、私自身も好熱菌由来の蛋白質の研究にも着手した。具体的には、好熱菌由来と常温菌由来の α -アミラーゼの安定性の比較実験であった。1975年8月にスイスのチューリッヒでETHのZuberの主催する国際会議“Enzymes and Proteins from Thermophilic Microorganism: Structure and Function”があった。初めての海外旅行であったが、「好熱菌由来と常温菌由来の α -ア



図2. “Biochemistry of Thermophily” の日米ジョイントセミナー (1977年、ハワイ)
写真のうち日本人参加者、1. T. Saiki, 3. Y. Kagawa, 5. M. Yaguchi, 7. Y. Nosoh, 8. K. Yutani,
10. K. Imahori, 13. M. Oshima, 15. T. Oshima, 16. Y. Kaziro, 17. M. Tsuboi,

ミラーゼの Ca イオンの結合の強さを定量的に比較して、好熱菌蛋白質の熱安定化の原因は Ca 結合定数の差異による」という論文(5)を持って参加した。すべての発表は oral で、5 日間に及ぶものであった。その論文集は *Experientia Supplementum*, 26 として出版されている(5)。ページ数は 450 ページ近くあり、“Round table and general discussion”の記録も含まれている。英語も十分に聞き取れなかったが、会議に参加して、自分の研究発表との関係で、アミラーゼの熱安定化の差異である Ca 結合定数の差は、両者のわずかなアミノ酸の差異に依存するであろうと確信できた。会議では“Round table...”の議論は全く理解できなかつたと記憶しているが、今あらためてその記録を読み返してみると、その重要な部分を聞き取っていたことになる。

3. アミノ酸一残基置換の研究

好熱菌蛋白質が僅か数残基のアミノ酸置換が重要なポイントとなって熱安定化していることを追究しようとする時、好熱菌と常温生物蛋白質間には熱安定化に関係のない多くの残基の差異が存在するので、どの残基が重要かを特定するのは大変困難である。いろいろと検討をしていたが、確か職員組合のハイキングの時、松代愛三教授(阪大微研、φ80 フェージの発見者)に相談したところ、トリプトファン合成酵素αサブユニットなら多くの一残基変異型の株が分離されているし、彼自身もいくらかの株は所有している。また、他の株が必要なら簡単に航空便(Yanofsky などから)で入手できるとのことであった。トリプトファン合成酵素αサブユニットは、“蛋白質安定化機構をアミノ酸置換から解明する”ために必要と考えていた次の 3 条件に適っていた。①多くの変異型が分離されている。②SS 結合を含まない単量体蛋白質である。③立体構造が近く期待できる。当時、大腸菌トリプトファン合成酵素αサブユニットの X 線解析のための結晶の論文が既に(1969, EJB)発表されていたが、私達が 2001 年に結晶構造を発表するまでαサブユニット単独の構造は解かれなかった。この研究には、同期の杉野義信さん(阪大理、分子遺伝学)も

参加してくれ、論文作成にもいろいろと重要な役割を果たしてくれた。この成果を 1977 年に Nature に発表(6)することができたが、彼が参加していなければ *J. Biochem.* に投稿していたであろう。表 1 は、大腸菌トリプトファン合成酵素αサブユニットの 49 位の Glu を Gln に置換すると野生型よりも安定性が低下し、Met に置換すると安定性が向上することを示している。同じ 49 位での置換が置換残基の種類によって、安定性を高くも低くもさせることが分かった。このように、同じ部位での置換が安定性を著しく変化させるので、49 位で一揃い 19 種の変異型の安定性研究が完成すれば安定性の理解は飛躍的に進むであろうと思い、ぜひ定年までの 25 年間に完成させたいと強く決心したことを覚えている。

当時可能な分子生物学の手法を駆使して得られた、49 位での一残基変異型を徐々に増やしていったが、残っていた 13 種の変異型は合成 oligonucleotide を用いた site-directed mutagenesis によるものであった。Ulmer が *Science* に“Protein engineering”の展望を記載したのは 1983 年である。時代の流れに乗れたので、一揃いの変異型が完成して、論文として発表できたのは 10 年後の 1987 年であった(7)。その結論は、49 位は分子内部にあり、分子内部での置換は、置

表 1 大腸菌トリプトファン合成酵素αサブユニット変異型の熱安定性の比較 (6)

大腸菌株	置換アミノ酸の位置	残存活性(%)
<i>trpA</i> 218	22 Phe → Leu	10±1
<i>trpA</i> 11	49 Glu → Gln	22±3
<i>trpA</i> 33	49 Glu → Met	88±13
<i>trpA</i> 446	175 Tyr → Cys	60±1
<i>trpA</i> 487	177 Leu → Arg	16±7
<i>trpA</i> 223	183 Thr → Ile	35±2
<i>trpA</i> 23	211 Gly → Arg	13±2
<i>trpA</i> 46	211 Gly → Glu	76±13
<i>trpA</i> 187	213 Gly → Val	12±4
<i>trpA</i> 78	234 Gly → Cys	40±8
<i>trpA</i> 58	234 Gly → Asp	85±10
<i>trpA</i> 169	235 Ser → Leu	30±4
<i>trpB</i> 8	(野生型)	49±4

pH 8.0, 58°C で 20 分間放置後の残存活性を示す。

換残基の疎水性に比例して安定性が高くなるということであった。これらの一連の研究によって、49Glu が α サブユニットの活性必須アミノ酸であることも判明した。当初、精製 α サブユニットを得るために、大腸菌を 200L のタンクで培養していて、小さな工場での作業のようであった。だが、遺伝子操作技術の進展に伴って、5L のフラスコのレベルまで低下できたことはありがたかった。

4. 安定性の定量的評価---カロリメータの導入

α サブユニット変異型の安定性の定量的評価は、塩酸グアニジンによる変性を2次構造の指標となる 220nm 付近の CD スペクトルの変化から追跡した。 α サブユニットの変性曲線は安定な中間状態をもつ3状態変性のカーブであった。このカーブを curve fitting によって平衡定数を求め、それから変

性のギブスエネルギー変化(ΔG)を求めた。平衡定数を得るための非線形解析のプログラムは岩崎裕さん(阪大産研)の援助を得て自身で作成した(8)。その時のプログラム作成の経験はその後の研究にいろいろと役立っている。しかし、いくつかの仮定を含む 3 状態の変性剤変性から求めた ΔG の値の信頼性を得るために、他の方法による検証が必要であった。最も信頼性の高い熱力学的パラメータの求め方は、精度の高い熱量計で直接変性の熱量を求めることである。当時、それが可能な装置はソ連の Privalov らが開発した断熱型示差走査熱量計 (Differential Scanning Calorimeter; DSC)、DACM1 のみであった(9)。そこで、試料を持参して彼の研究室で測定することを決意した。日本学術振興会とソ連科学アカデミー間の交流プログラムがあったのでそのグラントを利用して、モスクワオリンピックが開催された翌年の 1981 年 3 月

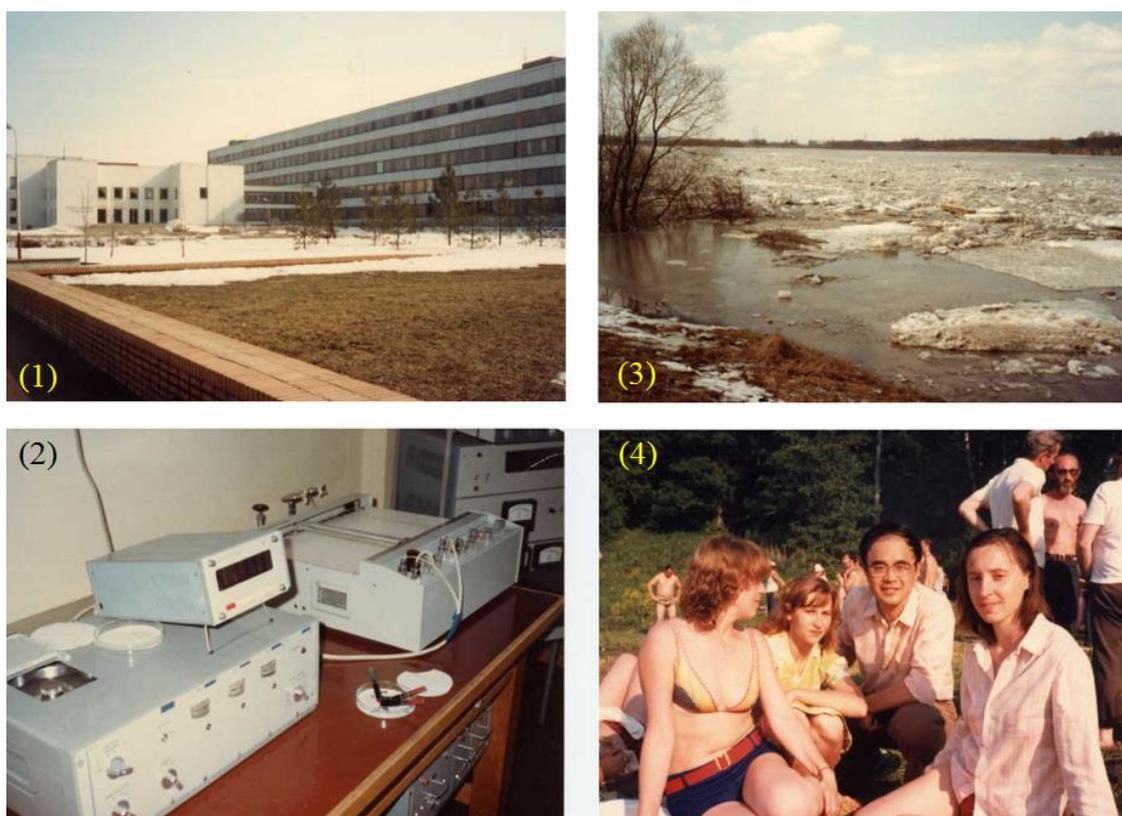


図3. ソ連科学アカデミー蛋白質研究所滞在時の写真(1981年3月~6月)

(1) 研究所全景、残雪が見られるが、到着した3月中旬には一面に数十センチほどの雪が積もっていた。(2) カロリメータ、DACM1、左側が本体、右側はXYレコーダー、(3) 4月中旬、研究所の近くに流れるOka川の氷が解け始めた様子、(4) 6月上旬の研究所創立記念日に上図の川に船でハイキング。参加者は川での水浴を楽しんでいた。写真は川岸でPrivalov研の女性たちと。

中旬から6月末まで、モスクワから南方120-130km離れた研究都市、Poustchinoにあるソ連科学アカデミー蛋白質研究所を訪問した。当時のソ連は、食糧難などネガティブな情報ばかりであったが、予想外に、食糧、住居などの環境も申し分なく、研究室の最も調子のよいカロリメータを使って測定も手伝ってくれた（実質は測定してもらった）。得られたデータは変性剤変性から得られたデータを確証してくれるものであった。カロリメータに魅せられ、その後の安定性の定量評価は熱測定が中心となった。しかし、ソ連のカロリメータをすぐ購入したわけではない。アメリカの知人によると、DACM1を輸入すると3か月で故障して、修理に1年かかるとのことであった。そのことを、真空理工の岸 証さんに話すと、回路部分の修理は真空理工で対応するとのことなのでDACM1を購入した。真空理工の技師によるとDACM1の回路部分は30年遅れているがDSC本体のセル部分は日本では作れない精巧なものであるとのことだった。ある特化した部分に優れているのは、流石に、最初に人工衛星を飛ばせる国である。

5. ヒトリゾチームを用いた系統的で網羅的変異型の研究

1990-91年頃、阪大吹田キャンパスに隣接する蛋白質工学研究所(蛋工研)のThierry Herning、黒木良太、谷山良雄さんらがヒトリゾチーム変異型の熱測定に私どものDSC(示差走査熱量計)またはITC(等温滴定熱量計)を利用していた。トリプトファン合成酵素 α サブユニットは、大腸菌由来の蛋白質の中で最も早くその立体構造が解かれると期待されていたが10年たっても解析の見込みが立っていなかった。アミノ酸置換による安定性研究は、野生型は勿論のこと置換による変異型の構造変化の情報も必須である。蛋工研で用いていたヒトリゾチームは、変異型の作成方法とその発現系も確立され、変異型もX線構造解析に適した結晶が容易にでき、その上、熱測定に適した蛋白質であると確信できたので、ヒトリゾチームを用いた系統的で網羅的変異型の研究を始めた。表2には取り組んだ変異型の例を示す。1992年4月、4年生で研究室配属になった高野和文さんを蛋工研の菊池正和さんの研究室に派遣して、ヒトリゾチー

表2 系統的網羅的研究に用いたヒトリゾチーム変異型の種類

- a) エントロピー型: Pro変異型(6種)、S-S変異型(2種)
- b) 疎水性型: Ile変異型 Ile \rightarrow Val(5種)、Ile \rightarrow Ala(5種)、Ile \rightarrow Gly(2種)、
Val変異型 Val \rightarrow Ala(9種)
- c) 側鎖水素結合型: Tyr変異型; Tyr \rightarrow Phe(6種); Ser変異型; Ser \rightarrow Ala(6種)、
Thr変異型; Thr \rightarrow Val(5種)、Thr \rightarrow Ala(5種)
- d) イオン結合変異型: E7Q, D18N, D67N, D49N, D102N, D120N
- e) 分子内部極性型: L8T, L12T, A32S, A9S, A92S, V93T, A96S, V99T, V100T
- f) N端残基変異型: K1M, K1A, M, P, G, EAEA (アンダーラインはN端に付加)
- g) 削除型: Δ (L15/G16)、 Δ (A47/G48)、 Δ R101
- h) 左巻きヘリックス型: AまたはGへの変異11種
- i) Gly部位での変異: G \rightarrow A変異型(11種)
- j) 特定部位、分子内部型: 56位変異型(12種)、59位変異型(12種)
- k) 特定部位、分子表面型: 3箇所(V2, V74, V110)で一連(各19種)
- l) 3SS(C77A/C95A)二重変異型: Ile \rightarrow Val変異型(5種)、Val \rightarrow Ala変異型(9種)
- m) 3SS(C77A/C95A)二重変異型: I59A, I59G (水分子導入)
- n) 変異型安定性3Dプロフィール検証型(10種)
- o) アラカルト型: Q86D/A92D (Ca付加), I56T, D67H (アミロイド)

ムの変異型の作成法と発現、精製法を習得してもらった。X線結晶構造解析も習得するために、彼を阪大薬学部の山縣ゆり子さんの所に派遣した。蛋白研では物理化学的測定と研究室の雑誌会に参加した。彼は大学院生と学術振興会特別研究員として2001年まで在籍し、表2に掲げた多くの変異型の研究に後輩の学生、院生と取り組んだ。代表的な論文を2-3挙げておく(10-12)。それらの研究を総合的に解析して、アミノ酸置換による蛋白質の安定性変化に及ぼす各安定化因子の定量的パラメータを推定できた(12)。例えば、それらのパラメータを用いると、「置換により3Åの水素結合が1本増えれば8.6kJ/molの安定化を獲得できる。また、空洞に水分子が入り2本の水素結合ができれば、水素結合形成による安定化と水の挿入で得るエントロピーの減少で相殺され、安定性への影響はほとんどない。」ということが分かる。

6. アミロイド形成

表2のアラカルト型の2つの変異型(Ile56Thr、Asp67His)は、それぞれ2組の家系の遺伝性非神経性全身性アミロイドーシスの原因となっていると報告されているものである。大学院生の船橋順さんらはこの2種の変異型ヒトリゾチームを作製し、その立体構造と物性を調べた(13)。その結果は、アミロイド形成は、天然状態の構造に起因しているのではなく、変性状態をより安定化させることにより、変性状態での構造変化を通じて、導かれることを示した。更に、院生の郷田秀一郎さんらは、アミロイド形成のメカニズムを研究する中で、条件を選択することによって、野生型のヒトリゾチーム、野生型の卵白リゾチームもアミロイドを形成することを見つけた(14)。また、驚いたことに、超好熱菌由来の蛋白質からもアミロイド形成を確認した。院生の高山剛さんが、好熱菌蛋白質の酸性中での塩酸グアニジン変性を追跡していたところ、二次構造の破壊を期待したが、逆にβ構造の増加が確認された。このβ構造はアミロイドを形成していた(15)。蛋白質の天然構造はアミノ酸配列に規定された固有の構造をとり、ほどけた変性状態と平衡にあるが生理的条件下では著しく天然構造に偏

っている。しかし、変性状態を通じて形成されたアミロイドのコア構造は一次配列によらずに一様にクロスβ構造をとる。このβ構造は非常に安定で実質的に不可逆である。これら一連の実験結果から、アミロイド形成は蛋白質共通の普遍的な性質であると認識していた。アミロイド形成の物理化学は大変興味ある課題であるが、これ以上追及する余裕がなかった。

7. 超好熱菌由来の蛋白質を用いた研究

1970-80年代に、生育至適温度が100°C近くの微生物、超好熱菌(hyperthermophile)が次々に発見されていたので、いつかチャンスがあれば超好熱菌由来の蛋白質の安定化機構の研究をしたいと考えていた。1996-7年頃、宝酒造の加藤郁之進、網沢進さんなどの協力で超好熱菌 *Pyrococcus furiosus* 由来の Pyrrolidone carboxyl peptidase (以後 PCP と略す) と Methionine Aminopeptidase とを取り扱うことができた。これらの物性研究は小笠原京子さんが中心的に進めた(16-17)。また、月原富武研究室(阪大蛋白研)の田中秀明さんと Tahir Tahirov さんらによって、それぞれの立体構造が X 線結晶解析によって解かれた。これらの研究の中で、最も重要な発見は、超好熱菌由来の蛋白質の変性速度は一般に常温蛋白質に比べ遅いが、refolding 速度も大変に遅いということである。結果的には超好熱菌由来蛋白質もその生育至適温度においてはわずかなエネルギーバランス(37°C近傍では常温生物由来の蛋白質に比べればΔGは随分と高いが)で安定化されている。特に、PCPの場合、Jai Kaushik さん(学術振興会研究員)らは pH と温度を変化させるだけで、PCP の refolding 速度を大きく制御できることを見つけた(18)。pH2.3 で、30°Cでは24時間でほぼ intact な構造に refolding するが、4°Cでは1週間後でもほとんど refolding の進行がみられない。この結果は別の観点から大変興味を引いた。生理的条件下で天然(N)構造と平衡にある変性(D)構造の存在率は、安定化のΔGが50kJ/molの場合1/10⁸程度(一億分の一)である。そのため、N状態と平衡にあるD状態の構造研究は大変困難である。PCP の refolding

速度を自由に制御できることは、D 状態の構造研究及び D 状態から N 状態への refolding 過程を追跡できる貴重なサンプルであると思えた。

私の阪大での定年(2002年3月)も近づいていたので、定年後は PCP の refolding 過程を NMR で追跡する研究を行おうと決めて、関西学院大学理学部の瀬川新一教授の門を叩いた。研究生としての受け入れを断られたが、客員教授として働かせてもらうことになった。そして、大学院生の飯村哲史さんと一緒に研究を始めた。順調に研究は進展したが、非常に refolding 速度が遅いにもかかわらず、二状態転移であることが分かった(19)。定年後10年ほどかけて NMR で refolding 過程を研究しようと思っていたが、半年余りで refolding 過程の追跡は困難であることが分かりがっかりした。しかし、飯村さんは博士課程に進学し、N 状態と平衡にある D 状態 (D1 状態と呼んでいる) の構造を HD 交換の手法で明らかにした(20)。更に、富山大学薬学部の水口峰之教授からも D1 状態の構造研究に寄与した(21)。

8. 史上最高の熱安定性を有する蛋白質の発見

予測に反して PCP の refolding 過程が二状態でがっくりしていた時、理研播磨で年齢不問で人を探していると友人からの情報を得た。それも、文科省の大型プロジェクト「蛋白質 3000」関連であった。京都大学の郷信広教授を代表者とする重点領域研究「蛋白質の構築原理」(1995-1999年度)は、「蛋白質 3000」プロジェクトのプロトタイプ的な性格であったが、郷重点関係者は「蛋白質 3000」にはほとんど参加していなかった。私自身は郷重点に深くかかわっていたので、ぜひ、参加したかった。幸い採用(2003年2月)されたので、関学での実験は飯村さんに任し、週に1度程度 Discussion のために関学に出向いた。「蛋白質 3000」では、情報解析チームを任されたが、情報解析は素人で、その分野では十分に活躍できなかったが、自分の守備範囲での実質的な成果を上げるべく心がけた。有難いことに自動測定装置(VP-capillary DSC

platform; MicroCal)を2003年度に購入して頂いた。DSC の測定、維持管理は竹平美千代さんが担当した。「蛋白質 3000」においては、構造解析のために質の良い結晶を得ることが求められる。精製された多くの蛋白質を、純度検定と共に完全な folding 状態であるかどうかを確認するために DSC 測定を行った。

超好熱菌 *Pyrococcus horikoshii* 由来の CutA1(PhCutA1) を通常の方法で DSC 測定すると、熱変性を示すピークが現れない。単調な曲線のみが現れる。一方、高度好熱菌由来の CutA1 は 110°C 付近に変性ピークが現れた。このことは、PhCutA1 の変性温度は、DSC の測定限界の 130°C より高温にある可能性を示唆していた。PhCutA1 の変性温度を実測するため、130°C 以上の温度で測定可能な DSC が世界の何処にあるか、あらゆるコネを使って探した。製造元では既に廃盤になっていたが、幸いなことに、日本のつくばに 150°C まで測定可能な装置があることを業者が知らせてくれた。その業者(日本シーベルヘグナー)と加藤悦子主任研究員(農業生物資源研究所)の協力をえて、超好熱菌 PhCutA1 の変性温度が中性付近で 148.5°C であることを突き止めた。この変性温度はこれまで報告されていた蛋白質の実測熱変性温度より約 30°C 高い(22)。150°C 付近の高温での DSC 測定は 5-6 気圧の一定気圧内の密閉セル中で行われる。

150°C 近くに変性温度を持つ蛋白質の発見をきっかけに、熱安定性研究を CutA1 蛋白質に集中させた。CutA1 はバクテリアからヒトの脳に至るまで広範囲の生物に存在することが知られているが、その機能は、大腸菌では金属イオンとの関わりが、議論されているが、まだよくわかっていない。大腸菌、ヒト脳、イネ、高度好熱菌、超好熱菌由来の 5 種類の CutA1 の X 線結晶構造が解析された。大腸菌、ヒト脳、イネ由来の CutA1 の中性での変性温度は、それぞれ 89.0、96.2、98.9°C で、常温生物の他の球状蛋白質の変性温度に比べて、異常に高い。全ての CutA1 の高い安定性は、CutA1 の立体

構造が特徴のある共通のパターンをもつことに起因する。図4には、高度好熱菌 *T. thermophilus* 由来の CutA1 の立体構造を示す。その構造は、同一サブユニットの3量体構造で、一つのサブユニットが他の二つのサブユニットと絡み合うように、 β シートを互いに共有していた。また、3量体の中心部に β シートが集まり、そのまわりを α ヘリックスのらせん構造が覆っている。それぞれの起源の CutA1 は特徴ある安定化因子が見られるが、150°C 近くの高い熱安定性を示す超好熱菌由来の CutA1 は他の起源の CutA1 に比べ極めて多くのイオン対の形成が見られる。この多数のイオン-イオン相互作用（塩結合）は、CutA1 分子表面一面に広がった塩結合のネットワークを形成し、あたかも塩結合の層が断熱材の役割を果たし、異常に高い温度までこのタンパク質のかたちを保護しているかのようである。これらの研究は、理研の澤野雅英、Bagautdin Bagautdinov、田中智之、山本等、松浦祥悟、竹平美千代さんらによって行われた(22-26)。特に、松浦祥悟さんは大腸菌 CutA1 の変異型の安定性を 50°C 近く高めることに成功して、次に述べる 100°C 以上の温度領域での蛋白質変性の熱力学に貢献した。

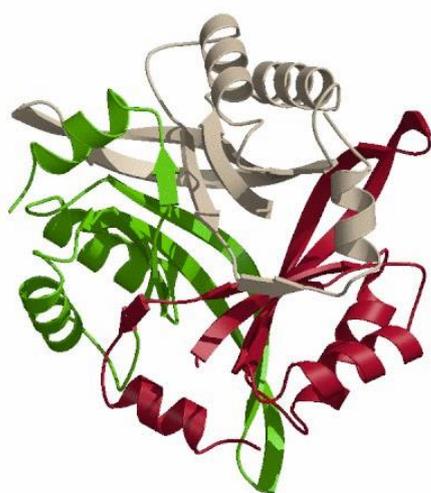


図4. 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来の CutA1 の立体構造(三量体) 赤、緑、茶色はそれぞれ3本の単量体の構造である。

9. 100°C以上の高温領域での蛋白質変性の熱力学

蛋白質の立体構造は熱力学的法則に従って安定化されているので、蛋白質の各安定化因子の役割を熱力学的に分析することが重要である。疎水性相互作用と静電的相互作用は蛋白質の主要な安定化因子である。低温における両安定化因子の熱力学的役割は、共にエントロピー効果によると説明されてきた。つまり、変性状態において疎水性残基に水和していた水分子は、天然構造（疎水性相互作用）が形成されると解放（脱水和）される。これに伴うエントロピー効果によって安定化される。また、静電的相互作用（塩結合）も変性状態において荷電性残基に配向する水分子が、塩結合形成によって解放されることによるエントロピー効果であると信じられている。しかし、高温領域でも、これら両相互作用が熱安定化に寄与しているのか。80°C以下の蛋白質変性の熱力学的解析から、高温では疎水性相互作用は安定化因子として機能しないと推定する報告もある。高温領域における蛋白質安定化の熱力学的機構を実験的に解析した例はない。それは、2つの技術的困難があったからである。一つは100°C近く又はそれ以上の温度では、熱変性に伴う凝集によって熱変性が不可逆となり、信頼のできる熱力学的パラメータの測定が困難であった。第二は、熱力学的解析において、要になるパラメータである変性に伴う比熱変化(ΔC_p)は、多くの蛋白質の実測値から判断して80°C以下では温度依存性を無視できるとされている。それ以上の温度では、 ΔC_p の温度依存性をどのように考慮すべきか、実質的に実測が困難であった。

超好熱菌蛋白質の100°C以上における安定化の熱力学的機構を追究するために、私たちは大腸菌の CutA1 (*EcCutA1*) の Cys を Ala に置換 (*EcCutA1_0SH*) することによって、非常に良好な可逆的熱変性を示す DSC 曲線を得ることができた。さらに、2残基を Val に置換した疎水性変異型 *EcCutA1_0SH_S11V/E61V* も良好な可逆性を示し、変性温度は 85.6 から 112.3°C に向上した。この2重変異型 (*Ec0VV* と略す) を鋳型として、種々

の荷電性残基を導入して、変性温度の改善を試みた。その結果、6個の荷電性残基を導入した変異型 *Ec0VV_A39D/S48K/H72K/S82K/Q87K/T88R* (*Ec0VV_6*と略す)の変性温度は136.8℃に上昇した。この変性温度は、*PhCutA1*の値に接近するものであった(まさに大腸菌から超好熱菌 *CutA1* への変換である)。*Ec0VV*と*Ec0VV_6*のDSC測定からそれぞれの ΔC_p の温度依存性を求め、これらの熱変性の熱力学的パラメータの温度関数を算出した(26)。その結果、100℃付近での疎水性相互作用による熱安定化は低温とは異なりエンタルピーの寄与に由来していること、さらにエントロピー的にはむしろ不利に働いていること、が判明した。また、113℃以上では、荷電性残基(塩結合形成)による熱安定化は、天然状態でのイオン-イオン相互作用によるエンタルピー効果と塩結合形成に伴うイオン(荷電)残基からの脱水和によるエントロピー効果の両方に依存していることがわかった(26)。

10. MD simulationの研究

系統的で網羅的なアミノ酸変異型蛋白質を用いた研究で、蛋白質の安定化機構を構成アミノ酸残基の役割から詳細に説明できるようになった。しかし、熱安定性の向上を意図した蛋白質の設計は、色々な方針が提案されているものの、設計指針通りには成功していないのが現状である。その主な理由は、蛋白質はN状態とD状態との平衡にあり、両状態の僅かなエネルギーバランスで立体構造が安定化されている(marginal stability)が、N状態の構造はX線結晶構造解析などにより詳細に解析されているが、D状態の研究はほとんど皆無である。先に述べたPCPのD1状態のNMR研究はそれに相当する僅かな例である。また、X線構造解析から得られる構造は個体の結晶構造である。N状態もD状態も水中では揺らいでいる。とりわけ水中におけるD状態の構造の揺らぎは大きいと推定される。この揺らぎを考慮した両状態の構造特性を知ることが重要であると考えた。これらの問題を解決する手法は、MD (Molecular dynamics) simulation であろうと思った。私はその分野の経験がなかったが、

幸いなことに同じキャンパス SPring8 の高輝度光科学研究センターのチームリーダー、その道のエキスパートの城地保昌さんから協力を受けることができた。

まず、低温菌、常温菌、高度好熱菌、超好熱菌由来の馴染みのトリプトファン合成酵素 α サブユニットについて、360Kと450KにおけるMD simulationを行った。結晶構造では決定できないループ構造の動態、安定性の違いによってどのようにMD simulationが変化するか、また揺らぎによって起こる構造変化と活性発現の関係などを明らかにして、2013年の蛋白質科学会で口頭発表した。続く実験が多忙で論文の作成には至っていない。

続いて、N状態と平衡にある天然条件下での変性(D)構造の特性を明らかにするためにMD simulationを行っている。述べてきたように、PCPのD1状態の構造がNMRによって詳細に研究されているので、MD simulation研究に有利であると考えた。具体的には、PCPのD1状態の構造をMD simulationを用いて、再現することを試みた。GROMACSを用いてAMBER99sb力場によるMDを行っている。MD計算には、理研播磨のmini-K、和光のRICC、神戸のSCLSのスーパーコンピュータと研究室の数台のワークステーションを用いている。NMR実験で見られたD1状態に存在する α -4、 α -6ヘリックスがMD simulationにおいても確認されるなどいくつかの興味ある知見が得られたので2015年の蛋白質科学会でポスター発表した。しかし、現状では、N状態と平衡にあるD状態を提示できるレベルには程遠い。ただ、その糸口でも見つかればと、スパコンから出てくる大量のデータと悪戦苦闘しているのが今日の現状である。

11. おわりに

50余年間の研究生活を振り返ってみて、実によい環境で研究を続けてこられたと思う。よい研究施設で、比較的潤沢な研究費に加えて、先輩、国内

外の研究者、同僚、後輩にその時々に適した多くのことを教えてもらいながら研究を進めることができた。そのよい環境の中でも、とりわけ、「銅鉄的研究の薦め」(1)に最初に出会ったのは幸運であった。

「銅鉄的研究」は、最初は真似た研究でも、自分の行っている研究をよく観察し、その評価を冷静に受け止め、自分でよく考え、その中から新しい価値を見出し、自分自身で独創的(オリジナル)な研究に発展させることである。そのような態度で研究を進めていくと、よく考えると必ず解決の糸口が見つかるという自信めいたものができる。これは長い研究者生活から獲得できる研究者ならではの役得だと思っている。阪大定年の際、PRC 編集部依頼の、雑文「研究者の役得」(PRC News letter No.2002.50、2002年8月29日号)にも記載したが、この考え方は、日常生活の種々の問題に接した時にも活用できるのが有難い。

最後に言っておきたいことは、このように、50余年間、楽しい研究生活を続けてこられたのは、やはり、日本が平和であったからだと思う。憲法9条のお蔭で、日本は戦後70年間戦争に参加しないで済んだ。最近、それが怪しくなっている。何とか止められないかと思う昨今である。

(2015年9月9日記)

文 献

1. 笠井献一「科学者の卵たちに贈る言葉-----江上不二夫が伝えたかったこと」岩波科学ライブラリー210、岩波書店 (2013)。
2. Yutani, K., Yutani, A. and Isemura, T. Accelerating Effect of Proteins on Renaturation of Denatured Bacterial α -Amylase. *J. Biochem.* **62**, 578-583 (1967).
3. Yutani, K., Yutani, A. and Isemura, T. The Study of Renaturation Process of Reduced Taka-Amylase A: Dependence of Rate of Renaturation on Protein Concentration. *J. Biochem.* **66**, 823-829 (1969).
4. Ogasahara, K., Imanishi, A. and Isemura, T. Studies on Thermophilic α -Amylase from *Bacillus stearothermophile*. I. Some General and Physico-chemical Properties of Thermophilic α -amylase. *J. Biochem.* **67**, 65-75 (1970).
5. Yutani, K. Role of Calcium Ion in the Thermostability of α -Amylase Produced from *Bacillus Stearothermophilus*. *Experientia Suppl.* **26**, 91-103 (1976).
6. Yutani, K., Ogasahara, K., Sugino, Y. and Matsusiro, A. Effect of a Single Amino Acid Substitution on Stability of Conformation of a Protein. *Nature* **267**, 274-275 (1977).
7. Yutani, K., Ogasahara, K., Tsujita, T. and Sugino, Y. The Dependence of Conformational Stability on the Hydrophobicity of the Amino Acid Residue in a Series of Variant Proteins Substituted at a Unique Position of the Tryptophan Synthase α -Subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4441-4444 (1987).
8. Yutani, K., Ogasahara, K., Suzuki, M. and Sugino, Y. Comparison of Denaturation by Guanidine Hydrochloride of the Wild Type Tryptophan Synthase α -Subunit of *E. coli*. and Two Mutant Proteins (Glu49->Met or Gln). *J. Biochem.* **85**, 915-921 (1979).
9. Privalov, P.L. and Khechinashvili, N.N. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J. Mol. Biol.* **86**, 665-684 (1974).
10. Takano, K., Ogasahara, K., Kaneda, H., Yamagata, Y., Fujii, S., Kanaya, E., Kikuchi, M., Oobatake, M. and Yutani, K. Contribution of Hydrophobic Residues to the Stability of Human Lysozyme: Calorimetric Studies and X-ray Structural Analysis of the Five Isoleucine to Valine Mutants. *J. Mol. Biol.* **254**, 62-76 (1995).
11. Takano, K., Funahashi, J., Yamagata, Y., Fujii, S. and Yutani, K. Contribution of Water Molecules in the Interior of a Protein to the Conformational Stability. *J. Mol. Biol.* **274**, 132-142 (1997).
12. Funahashi, J., Takano, K. and Yutani, K. Are the parameters of various stabilization factors estimated from mutant human lysozymes compatible with other proteins? *Protein Eng.* **14**, 127-134 (2001).
13. Funahashi, J., Takano, K., Ogasahara, K., Yamagata, Y.

- and Yutani, K. The Structure, Stability, and Folding Process of Amyloidogenic Mutant Human Lysozyme. *J. Biochem.* **120**, 1216-1223 (1996).
14. Goda, S., Takano, K., Yamagata, Y., Nagata, R., Akutsu, H., Maki, S., Namba, K. and Yutani, K. Amyloid protofilament formation of hen egg lysozyme in highly concentrated ethanol solution. *Protein Sci.* **9**, 369-375 (2000).
 15. Yutani, K., Takayama, G., Goda, S., Yamagata, Y., Maki, S., Namba, K., Tsunasawa, S. and Ogasahara, K. The Process of Amyloid-like Fibril Formation by Methionine Aminopeptidase from a Hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* **39**, 2769-2777 (2000).
 16. Ogasahara, K., Lapshina, E.A., Sakai, M., Izu, Y., Tsunasawa, S., Kato, I. and Yutani, K. Electrostatic Stabilization in Methionine Aminopeptidase from Hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *Biochemistry* **37**, 5939-5946 (1998).
 17. Ogasahara, K., Nakamura, M., Nakura, S., Tsunasawa, S., Kato, I., Yoshimoto, T. and Yutani, K. Unusually Slow Unfolding Rate Causes the High Stability of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from a Hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*: Equilibrium and Kinetic Studies of Guanidine Hydrochloride-Induced Unfolding and Refolding. *Biochemistry* **37**, 17535-17544 (1998).
 18. Kaushik, J.K., Ogasahara, K. and Yutani, K. The unusually slow relaxation kinetics of the folding-unfolding of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.* **316**, 991-1003 (2002).
 19. Iimura, S., Yagi, H., Ogasahara, K., Akutsu, H., Noda, Y., Segawa, S. and Yutani, K. Unusually Slow Denaturation and Refolding Processes of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from a Hyperthermophile are Highly Cooperative: Real-Time NMR Studies. *Biochemistry* **43**, 11906-11915 (2004).
 20. Iimura, S., Umezaki, T., Takeuchi, M., Mizuguchi, M., Yagi, H., Ogasahara, K., Akutsu, H., Noda, Y., Segawa, S. and Yutani, K. Characterization of the denatured structure of pyrrolidone carboxyl peptidase from a hyperthermophile under non-denaturing conditions: role of the C-terminal alpha-helix of the protein in folding and stability. *Biochemistry* **46**, 3664-3672 (2007).
 21. Mizuguchi, M., Takeuchi, M., Ohki, S., Nabeshima, Y., Kouno, T., Aizawa, T., Demura, M., Kawano, K. and Yutani, K. Structural Characterization of a Trapped Folding Intermediate of Pyrrolidone Carboxyl Peptidase from a Hyperthermophile. *Biochemistry* **51**, 6089-6096 (2012).
 22. Tanaka, T., Sawano, M., Ogasahara, K., Sakaguchi, Y., Bagautdinov, B., Katoh, E., Kuroishi, C., Shinkai, A., Yokoyama, S. and Yutani, K. Hyper-thermostability of CutA1 protein, with a denaturation temperature of nearly 150 °C. *FEBS Lett.* **580**, 4224-4230 (2006).
 23. Sawano, M., Yamamoto, H., Ogasahara, K., Kidokoro, S.-i., Katoh, S., Ohnuma, T., Katoh, E., Yokoyama, S. and Yutani, K. Thermodynamic basis for the stabilities of three CutA1s from *Pyrococcus horikoshii*, *Thermus thermophilus*, and *Oryza sativa*, with unusually high denaturation temperatures. *Biochemistry* **47**, 721-730 (2008).
 24. Matsuura, Y., Ota, M., Tanaka, T., Takehira, M., Ogasahara, K., Bagautdinov, B., Kunishima, N. and Yutani, K. Remarkable improvement in the heat stability of CutA1 from *Escherichia coli* by rational protein design. *J. Biochem.* **148**, 449-458 (2010).
 25. Matsuura, Y., Takehira, M., Sawano, M., Ogasahara, K., Tanaka, T., Yamamoto, H., Kunishima, N., Katoh, E. and Yutani, K. Role of charged residues in stabilization of *Pyrococcus horikoshii* CutA1, which has a denaturation temperature of nearly 150°C. *FEBS J.* **279**, 78-90 (2012).
 26. Matsuura, Y., Takehira, M., Joti, Y., Ogasahara, K., Tanaka, T., Ono, N., Kunishima, N. and Yutani, K. Thermodynamics of protein denaturation at temperatures over 100°C: CutA1 mutant proteins substituted with hydrophobic and charged residues. *Scientific Reports* (*in press*)

油谷克英先生ご略歴

- 1938年7月 大阪市で誕生
- 1961年3月 大阪大学理学部生物学科卒業
- 1962年5月 大阪大学蛋白質研究所教務員
- 1969年9月 大阪大学理学博士
- 1981年3月 ソ連科学アカデミー蛋白質研究所、
日本学術振興会特定国派遣研究員（約4
ヶ月）
- 1982年5月 アメリカ合衆国、国立衛生研究所(NIH)の
Visiting Scientist(6ヶ月)
- 1983年7月 大阪大学蛋白質研究所助手
- 1987年3月 アメリカ合衆国、国立衛生研究所(NIH)の
Visiting Scientist(3ヶ月)
- 1990年6月 大阪大学蛋白質研究所助教授、
- 1993年3月 文部省在外研究員（短期2ヶ月）パリ、
パスツール研究所など
- 2002年3月 大阪大学定年退官
- 2002年4月 関西学院大学大学院理学研究科客員教授
(2ヶ年)
- 2003年2月 理化学研究所播磨研究所上級研究員、
現在に至る
(2003年度、情報解析チーム、チームリーダー)



2015年8月26日理研にて