

シリーズ「わが国の蛋白質科学研究発展の歴史」 第4～6回原稿配信のお知らせ

平成27年7月3日

今回は、第4回から第6回原稿を配信いたします。なお、前回配信の蛋白質科学会ニュースレターでは、大村恒雄先生のお名前を誤って大村恒夫先生と表記していました。ここに深くお詫びを申し上げます。

今回配信原稿

- 第4回 香川靖雄先生
- 第5回 岩永貞昭先生
- 第6回 高木俊夫先生

今後配信予定原稿

- 第7回 八木達彦先生
- 第8回 崎山文夫先生
- 第9回 高橋健治先生
- 第10回 田隅三生先生
- 第11回 北川禎三先生
- 第12回 森川耿右先生
- 第13回 伊藤維昭先生
- 第14回 福山恵一先生
- 第15回 桑島邦博先生

配信済み原稿

- 第1回 石井信一先生
- 第2回 大村恒雄先生
- 第3回 福井俊郎先生

日本蛋白質科学会 広報担当
内山 進
池口満徳

本文はPDFをご覧ください。

ATP 合成酵素の発見から人体エネルギー学まで

香川 靖雄 (かがわ やすお)

I. 生体膜学と ATP 合成酵素

筆者が院生の 1961 年に P.D. Mitchell は、酸化的リン酸化 (OxPhos) の化学浸透圧説を提案し蛋白質科学に衝撃を与えました(1)。それまでの仮説は既知の解糖系に似た可溶性酵素による高エネルギー中間化合物を介する化学説でした。化学浸透圧説では膜を貫通する仮想の ATP 合成酵素が電子伝達による H^+ 輸送で生じた膜内外の電気化学ポテンシャル差 ($\Delta \mu H^+$) で駆動され ATP を合成すると仮定したのです。人並み外れて頑固な Mitchell は、化学説を納得できず、膜輸送の博士論文に Cambridge 大学で 7 年もかかってしまったので、大学に留まらず自宅を Glynn 研究所と名付け実験を進めたのです。Mitchell は後に自治医大客員教授として日本の生化学会に活力を与えてくれました。写真は 1984 年 10 月に自宅で撮影されたものです (図 1)。筆者はその大胆な仮説に感銘を受け、E.Racker の下に留学してその仮想の ATP 合成酵素 (F_0F_1) を単離してリポソーム膜に再構成して $\Delta \mu H^+$ 形成を実証しました(2)。Racker は 1960 年にミトコンドリアから F_1 (共役因子 1)



図 1. Mitchell 先生と筆者の自宅での対話



図 2. 楽しい Racker 先生と同じ教授実験室で過ごす

を精製して F_1 除去後のミトコンドリア膜に加え OxPhos を回復させ、化学説を支持していました。Racker は大変楽しい人柄で、写真は 1970 年に教授実験室で私と一緒に研究している場面です (図 2)。研究の助手は金髪の Ann と私の家内でした。しかし、ミトコンドリア ATPase は OxPhos 阻害剤オリゴマイシンに感受性なのに F_1 の ATPase は非感受性です。 F_1 を膜に結合させれば感受性となったので、 F_1 に結合する膜蛋白質 F_0 (オリゴマイシン感受性付与因子: エフ・ゼロとも読むがエフ・オーが正しい) があるはずでした。この F_0 を界面活性剤で可溶化し (図 3 左下)、 F_1 に結合させて F_0F_1 を再構成しました (図 3 上) (3)。さらに F_0F_1 をリン脂質と共に透析可能で親水疎水比 (HLB) の高い ^{14}C コール酸で透析速度を検討しながら、水-コール酸-リン脂質の状態図を考慮して臨界ミセル濃度 (cmc) 近傍で加えて透析して H^+ 輸送性 F_0F_1 リポソームを再構成しました(2,4) (図 3 右下)。これが決定的実証となり Mitchell はノーベル化学賞(5)を受

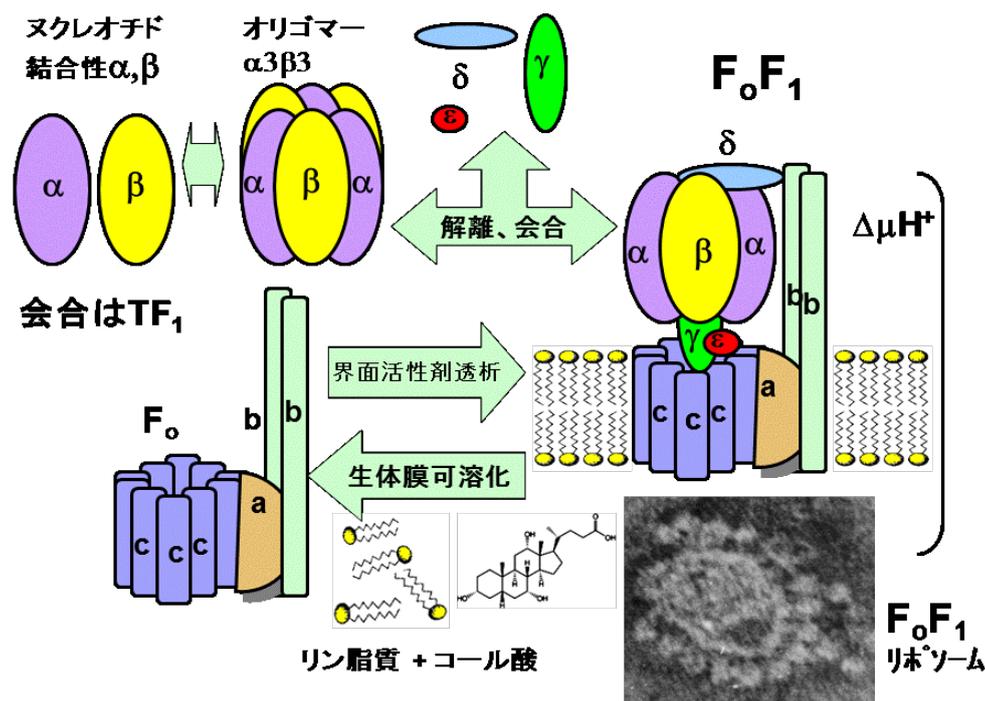


図3. F₀F₁ 合成酵素の再構成

賞し、翌年の国際生化学会議では、Mitchell と並んでシンポジウムで講演しました。膜蛋白質を小胞に再構成して機能解析をするという Breakthrough のこの原著(4)は記録的な Science Citation を続け、各種の生体膜貫通蛋白質の機能が実測できるようになりました。F₀F₁ の他に P-ATPase, V-ATPase などの ATP 依存能動輸送体、糖質やアミノ酸の Na 依存輸送体、受動的輸送体などの溶質輸送、さらに情報を伝える受容体、脂溶性基質の代謝を担う膜酵素等、未知であった各種の膜蛋白質の解明が飛躍的に進み「生体膜学」という新分野が誕生しました(6)。不溶性プリオンの精製に F₀ の経験を私が伝授した SB.Prusiner は核酸でなく変性プリオンが未変性のプリオンを変性させて感染症が起こるという蛋白質科学の変革を起こしました(7)。

可溶性蛋白質の酵素反応論では古典熱力学の均一な閉鎖系の時間軸のない準平衡状態が計算の基礎でした。しかし細胞やミトコンドリアは膜で仕切られた不均一な開放系です。そこで、溶質とエネルギーの流束×力を扱う非可逆過程の熱力学(L. Onsager, 1968)と散逸構造の生命理論(I. Prigogine, 1977)が膜を介するエネルギー変換の基礎理論と

なりました(6)。そして F₀F₁ 脂質平面膜の両側に入れた電極での ATP による $\Delta \mu H^+$ と H⁺ 流の発生が実証されました(8)。結論は図3のように F₁ は ATP のエネルギーで高次構造を変え、 γ を回転させるモーター、F₀ は c リングの回転が $\Delta \mu H^+$ で駆動される H⁺ 流で生じ、そのトルクを γ に伝えるモーターです。したがって F₀F₁ は $\Delta \mu H^+$ で駆動される H⁺ 流で毎秒 100 回転で 300 分子の ATP を合成するモーターでした(8)。なお H⁺ の阻害剤の DCCD は全生物共通に F₀ の c サブユニットの H⁺ 結合性の Glu58 (ウシ F₀ の残基) を修飾しますが、動物 F₀ に有効なオリゴマイシンは後述の F₀ 6 と 9 の界面に結合します。

II. 好熱性 F₀F₁ の refolding と再会合

巨大な蛋白質複合体は容易に高次構造が変性するため、F₀F₁ の構造と機能の解析は困難を極めました。「一次構造が決まれば高次構造が決まる」という Anfinsen のドグマが成立するのは RNase のような 100 残基程度の低分子量蛋白質の refolding の場合で、変性蛋白質の高次構造の再構成は蛋白質科学全体の重要課題です。遺伝子技術の未発達

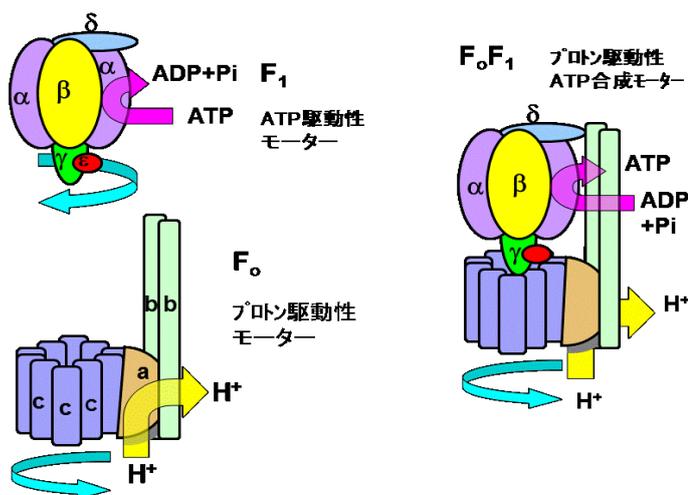


図4. $\Delta \mu H^+$ で駆動される H イオンが c-サブユニットの輪を回転させ、 γ サブユニットに伝え $\alpha \beta$ の高次構造を変え ATP を合成する。

な当時、蛋白質科学のためには大量の F_0F_1 を精製する必要がありましたので、冷凍したイワシクジラの心臓を電動鋸で刻んで作ったこともありましたが、高等動物の F_1 は低温にするだけで解離するという特に不安定な酵素です。そこで、その困難の一部を好熱菌の蛋白質によって克服しました。自治医大生化学教室の初代教授として 1972 年以降、好熱菌 PS3 から好熱 F_0F_1 (TF_0F_1) と好熱 F_1 (TF_1) を単離しました。単に熱や低温に強いだけではなく、試みた全ての失活剤にも耐性でした (50%失活濃度 $F_1:TF_1$; 尿素 0.85M:5.52M, LiCl 0.43M:3.95M)。

グラム単位で TF_0F_1 を精製して結晶化による高次構造の解析や単離サブユニットの物性測定をするために、1 トンタンクで好熱菌を高温で培養して、シャープレスという連続遠心機で集菌して TF_0F_1 を精製しました。冬には培養タンクの高温の湯気で実験室の窓には水滴が流れ落ちました。教室の全教員は構内宿舎にいましたから昼夜兼行で作業をしました。その結果、 F_1 は $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ の 5 種のサブユニットからなることを初めて報告したのです(9)。4 次構造を変性させて解離するのは容易ですが、機能を持った 4 次構造に再構成できるのは好熱菌蛋白質などに限られています。 TF_1 を SDS で一次構造まで変性させ 5 種のサブユニット

$\alpha \beta \gamma \delta \epsilon$ に分け、尿素溶液中でイオン交換クロマトグラフィーによって SDS を除き、尿素を透析で除くと、 TF_1 のサブユニットの二次、三次構造、さらに $\alpha_3\beta_3$ や $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ の四次構造まで再構成されたのです(9) (図3左上、図4)。後述のように好熱菌の安定な遺伝子構造が始めて私と大島泰朗によって解明されると(10)、蛋白質工学に広く応用されました。ポリマーゼ連鎖反応の耐熱性の Taq ポリマーゼ (現在は Phusion High-Fidelity DNA ポリマーゼ等) のほか、軽部征夫教授との共同でバイオセンサー電極用好熱菌蛋白質も開発されたのです。この安定な TF_1 を加工して後述の野地博行らが γ の回転を実証したのです。

その後 F_0F_1 はミトコンドリア、葉緑体から微生物の形質膜に至るまで、 F_1 は触媒部で $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 、 F_0 は H^+ 透過部で ab_2c_8-15 の基本構造が確立したのです (図4)。 F_1 の触媒部は $\alpha_1\beta_1$ プロトマーと、共同性を示す $\alpha_3\beta_3$ オリゴマーですが、 TF_1 以外の F_1 では両者は得られていません(8)。常温生物、例えば酵母の F_0F_1 の形成に Hsp90 シャペロンが必要です。

III. ATP 合成酵素の結晶学：シンクロトロン放射光

X 線結晶解析は蛋白質内の個々の原子の位置が判るので、詳細な分子機構の解明には決定的な手段です。しかし、 F_0F_1 にはすぐには応用できませんでした。その理由は第一には膜蛋白質であって界面活性剤存在下で初めて結晶すること、そして第二には分子量が F_1 だけでも分子量 371,056 と従来の蛋白質よりも飛躍的に大きい事でした。その反面、電子顕微鏡で見えるという利点があり、1965 年にはミトコンドリア内膜に細い柄で結合された直径 10nm の球状粒子が F_1 であることを 3H -アセチル F_1 を F_0 に再構成して初めて立証しました(3,8)。1977 年に精製 TF_1 の 2 次元結晶の電頭電算機解析像を東大の若林健之らと共に筆者が初めて報告し、それまで 4 ~ 5 量体と言われた 4 次構造に正しい $\alpha_3\beta_3$ の 6 角の高次構造を確定しました(8)。そして TF_1 と $\alpha_3\beta_3$ オリゴマーの 3 次元結晶を図 5 右のように白木原らとの共同で得ました。これら巨大蛋

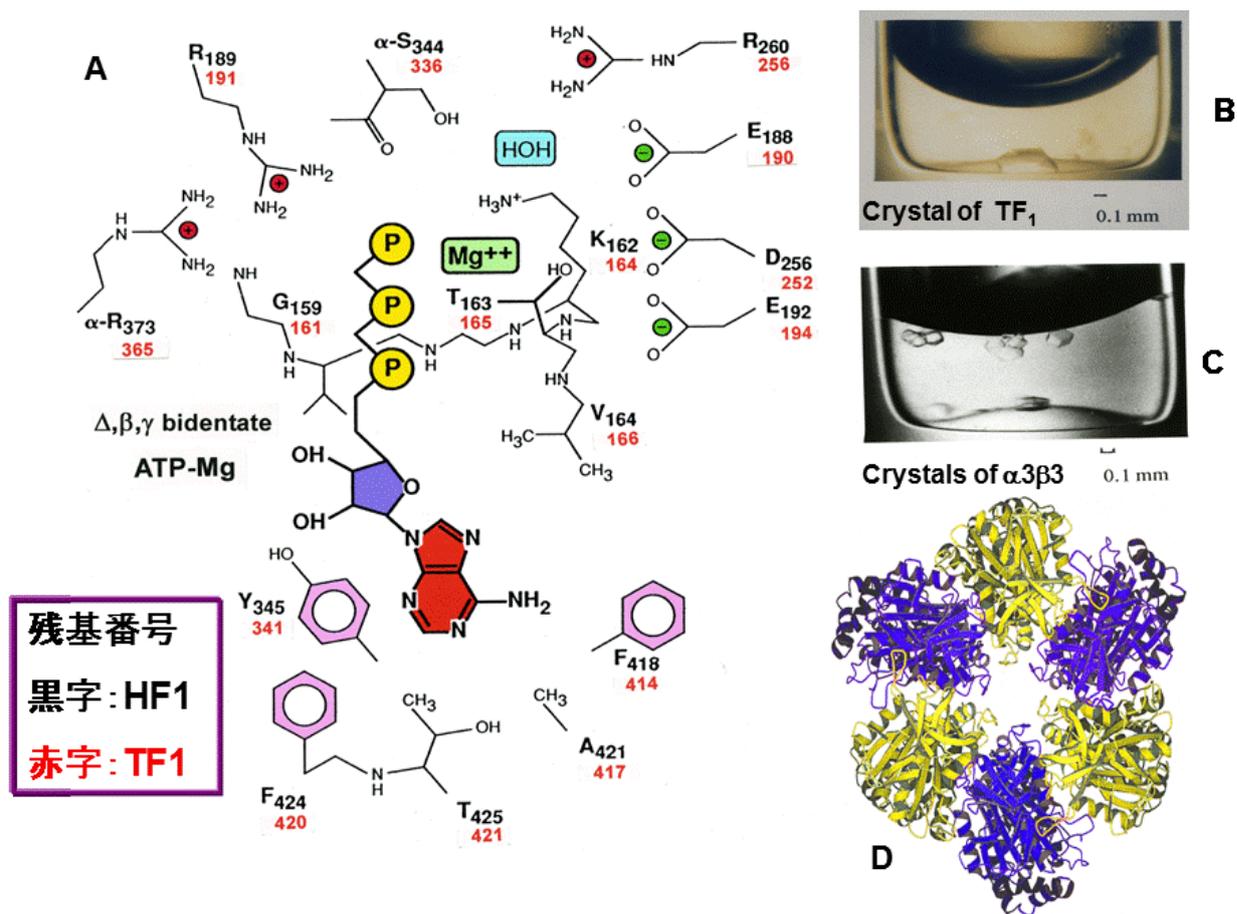


図5. A. F₁の活性中心 B. TF₁ 結晶 C. α₃β₃ 構造

白質の解析にはシンクロトロン放射光が不可欠です。いくつかの報告の中でJ.WalkerらのウシF₁の解析結果が決定的でした(11)(図5左)。続いて白木原, Walker, 筆者らが共著で筑波の高エネルギー研究所のシンクロトロン放射光でα₃β₃結晶を解明しました(12)(図5右下)。結論として、TF₁も後述のヒトF₁(HF₁)も活性中心のアミノ酸残基の立体構造はWalkerの報告と共通で、その真の基質構造は筆者の実測結果通りΔ,β,γ-bidentate ATP・Mgでした(図5左)(8)。図5の左下に示す3回対称の基質を含まないα₃β₃結晶はその後の多数の生物種から得られたF₁結晶の中で唯一の貴重な基本型です(12)。Walkerは筆者同様、現在も研究を指導する現役教授で、図6は2014年のATPaseワークショップでの討論風景です。WalkerのF₁結晶では、γサブユニットを含む非対称型で、1分子内にAMPNPを結合したβTP、ADPを結合したβDP、そ

して何も結合していないβEの3種のβがあり、そのβはそれぞれαと結合し、α₃β₃の中心はγが貫いていました(11)。この3種の異なる構造の共存は次節のボイヤーの回転説を裏付けました(13)。ATP分解時にはγがβTP→βDP→βEと回転すると考えました。γの回転がβの変形を起し、ATPを放出する過程はβの下半分がγ軸から離れる歪みを生じATP結合部へ変形を伝える事です(8,13)。変形が閾値に達すれば結合したATPが活性中心から放出されると推定されました。高等動物のF₀部分の結晶学はようやく2010年に完成しF₀のcリング部分が動物ではリングのc数は8個でした(14)。これは他の生物の10-15個より少なく、ウシcのGlu⁵⁸にH⁺が結合して回転するので、ATP1分子の合成には2.7個のH⁺という高い効率でした(14)。しかし、本当にγが回転しているのか、どの程度のトルクが生じるのかなどは、静止した画像でなくて、直接

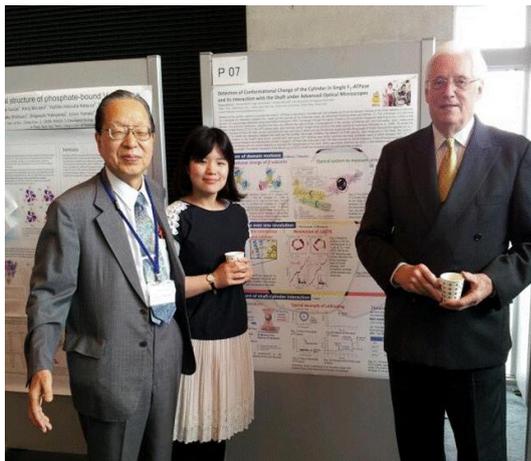


図6. ノーベル賞受賞者で共著者のケンブリッジ大学医学研究評議会 (MRC) 分子生物学研究所栄養学部門 J. Walker 教授と F_0F_1 のエネルギー変換を討議。

に蛋白質分子の運動状態を計測する必要があったのです。

IV. ATP 合成酵素の動態と回転説

F_1 は $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ という非対称構造ですが、それまでは4次構造はヘモグロビンの $\alpha_2\beta_2$ のように対称性がある、アロステリック効果が説明されていたので、 F_1 の非対称性の理由は大きな謎でした。一般酵素と異なる特徴は、 $\alpha_3\beta_3\gamma$ の γ が回転する点です(図4、図7)。ATP 合成酵素の中で c リングと $\gamma\epsilon$ は $\alpha_3\beta_3$ オリゴマーの中心部で回転する回転子、 $\alpha_3\beta_3$ オリゴマーを固定する δ と ab サブユニットが固定子です。Boyer は酵素学者で F_1 の共同性と反応論の詳細な研究から、 $\alpha_2\beta_2$ 構造の結合変換説を提出しました(13)。その後、筆者らの $\alpha_3\beta_3$ 構造が確認されたので結合変換が γ 軸の回転と共に行われる回転説に変容しました(13)。ADP + Pi は外部エネルギーなしに $\alpha\beta$ 界面に結合し ATP に合成されます。 γ の回転が $\alpha\beta$ の高次構造を変え、活性中心(図5左)の結合 ATP が放出されるのです。筆者らはこの ATP 解離に要する回転のトルクを $42\text{pN}\cdot\text{nm}$ と算出していました(8)。そして、遂に好熱菌 $\alpha_3\beta_3\gamma$ を用いて γ に結合した蛍光アクチン(長さ $1\sim 3\mu\text{m}$)の回転を顕微鏡下で実測することに野

地博行らが成功したのです(15)。アクチン糸の長さによる抵抗負荷で回転速度が遅くなることから、上記トルクも算出、確認されました。回転の方向は F_0 側を上にした ATP 分解反応では反時計方向で、しかも ATP 濃度を低くすると 120° 毎に停止するのです(15)。一方、 F_0 の c 環は $360^\circ \div c$ 数 $= 45^\circ$ (HF_0F_1 の場合)で回るので、 F_0 と F_1 の回転の間には蛋白質の弾性機構があり力学的エネルギーを一時保存することを筆者が指摘しました(16)。この F_0F_1 の動態については、吉田賢右教授の別の項があり、蛍光プローブや NMR による詳細な研究についてはその項を読んで頂きたいのです。

V. ATP 合成酵素の遺伝子構造：好熱菌からヒトへ

蛋白質の一次構造の決定は遺伝子技術の導入で飛躍的に改善されました。筆者は自分の手で初歩から遺伝子操作を学び、分析の困難な高度好熱菌の遺伝子の基本的性質を初めて解明しました(10)。DNA 構造そのものに熱安定性を与えるために GC 含量がコドンの許す限り多いため、配列決定のゲル中で GC コンプレッションを起こすので、高温で 1m もある電気泳動ゲル板を使用して解決しました。TF $_0F_1$ 遺伝子の単離、部位特異的変異、DNA のヌクレオチド配列決定、サブユニットの大量発現、細胞内翻訳が可能になりました。Fo F_1 のオペロンは大腸菌や好熱菌では Fo 部分に続いて F_1 部分があり、上流からプロモーター、I, Fo(acb の順)、 $F_1(\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ の順)、ターミネーターの構造です。1981

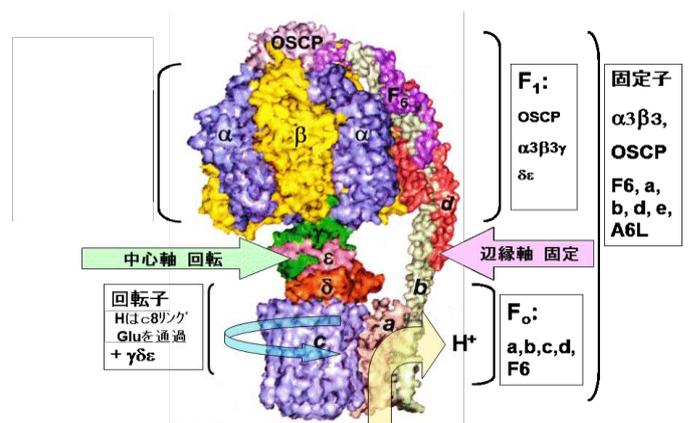


図7. F_0F_1 ATP 合成酵素の立体構造

年には二井将光が Walker より一步早く大腸菌 FoF₁ の遺伝子構造を決定しました。TF₁ の遺伝子構造からアミノ酸配列が決定できましたので、TF₁ の X 線解析像との厳密な照合が行われ、TF₁ の安定性の原因も確認されました(16)。特に部位特異的の変異を TF₁ の活性中心のアミノ酸残基に応用して図 5 左を確認しました(8,16)。その後、遺伝子操作の容易な大腸菌 F₁ を中心に部位特異的の変異による無数のアミノ酸残基の機能解析を行った歴大な論文の洪水となりました。しかし、結晶学者の Walker は部位特異的変異法の限界を厳しく指摘しました。事実、この変異研究のグループは 1997 年まで F₀F₁ の回転説に否定的な総説を書いていたのです。

遺伝子解析が可能になったので、医学研究者としては念願のヒト F₀F₁ (HF₀F₁) の研究に移りました。先ず HF₀F₁ の β と α の遺伝子構造を世界に先駆けて決定しました(8, 17)。真核細胞ではエクソンは広いイントロン部分に散在しているのです。このため β 遺伝子(ATP5B)が細菌の全 F₀F₁ 遺伝子と

大体同じ 9kbp もあるので解析は大変でした。ATP5B のエクソンは 10 個で、それぞれ蛋白質の機能単位 (モジュール) にはほぼ対応しています(17)。ATP5B のイントロンにはヒト固有の Alu 反復配列が多数あり、エクソンの 5' 上流には多数の制御因子の特異的塩基配列があります(17)。細菌 F₁ と異なり HF₁ には臓器特異性があり、代謝の激しい筋肉 F_{1γ} は他臓器の γ と異なり γ 遺伝子の交替スプライシングで筋発生時に形成されることを実証しました(18)。HF₀ の a と A6L はミトコンドリア DNA(mtDNA)にあり、残りの F₀ と F₁ の全遺伝子は核 DNA(nDNA)の各染色体に分散していました(8)。細菌の F₀F₁ の一次構造は遺伝子から決定できます。しかし、HF₀F₁ の一次構造は遺伝子からの推測ではプレ配列や修飾が不明です。合計 16 種のサブユニットの一次構造確定にはゲル電気泳動の斑点を切出し MALDI-TOF によるプロテオミックスが必要です(19)。HF₀F₁ の基本構造は TF₀F₁ と共通の触媒部、回転子(c リングは 8 個)、固定子ですが、多様

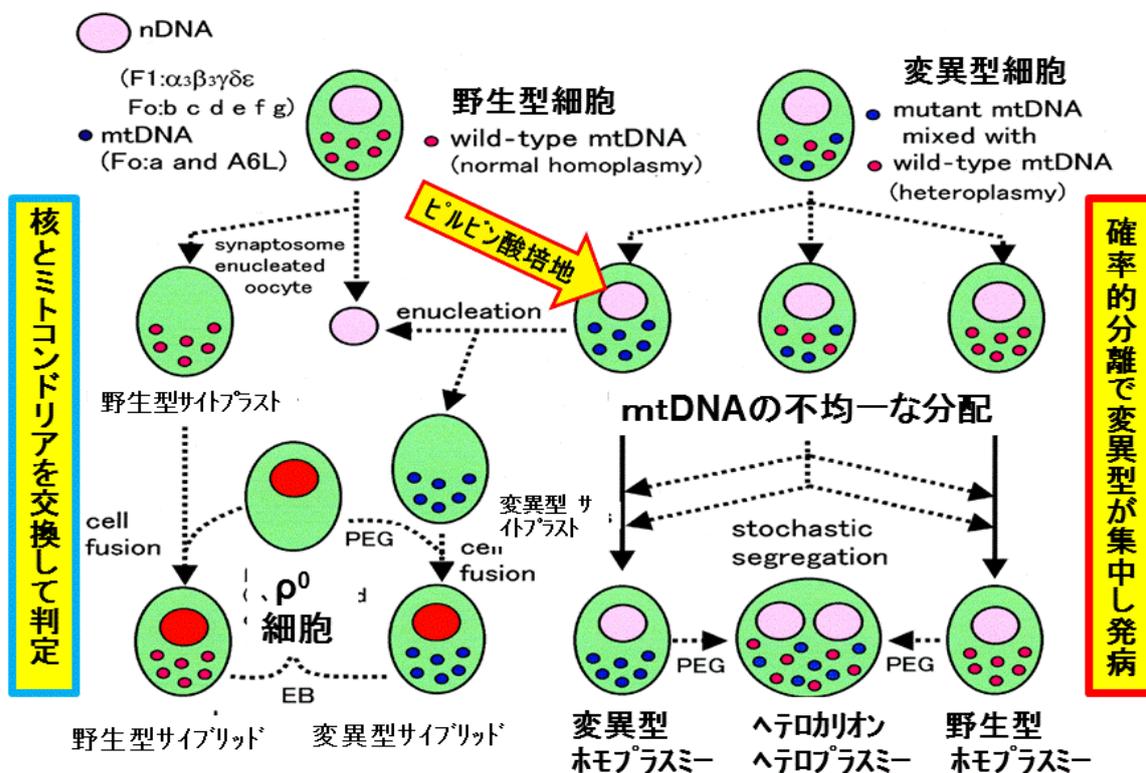


図 8. ミトコンドリア疾患解析: ρ⁰ 細胞 (mtDNA 無し) + サイトプラスト (核無し) でサイブリッドを作る。

な調節機能を持つサブユニットをウシ X 線解析像(14)と電顕像(3,4,8)を参考に配位してあります(図7)(8)。また、HF₀F₁の翻訳後修飾の代表は多くのサブユニットのアセチル化で、Sirt3による脱アセチル化は後述の人体内でのアセチローム制御の意義があります(図7左、上)。

VI. 細胞工学と ATP 合成酵素

F₀F₁の高次構造、分子内回転、遺伝子の解明が終る頃に古典的な分子生物学は歴史的役割を終え、日本でも隆盛を誇った「蛋白質・核酸・酵素」誌もすでにありません。これに対し Cell 誌の Science Citation は激増しています。そこで 1982 年に細胞融合の岡田善雄教授と私共が「細胞工学」誌を創刊したのです。学生時代から組織培養に取り組み、合成培地の開発とそのミトコンドリア機能を解析してきた筆者は、エチジウムブロマイドによって mtDNA を除いた ρ⁰細胞を作りました(図8)(20)。ヒト mtDNA には F₀の 2 種と、電子伝達系の 11 の計 13 の遺伝子がコードされているのですから、ρ⁰細胞は解糖系の ATP に依存するはずですが、しかし ρ⁰細胞は電子伝達系も欠くので、グルコース培地では細胞が還元状態となり生存できません。そこでピルビン酸を電子受容体とする培地を開発しました。次に細胞核を除去してミトコンドリアを残したサイトプラスト(核除去細胞片)を作りました(図8)(20)。野生型(健常)や変異型(疾患)のサイトプラスと ρ⁰細胞とをポリエチレングリコールで融合させてサイブリッドを作りました(図7)(8,20)。こうして変異が mtDNA か nDNA かを判定し、多くのミトコンドリア疾患を解明しました(8)。ρ⁰細胞に F₀が無くても HF₁は形成されるなど、HF₀F₁の蛋白質科学にも大きな寄与がありました(19)。1992年には富永薫らと mtDNA の複製と転写を同時に行う転写因子のヒト mtTFA の構造を決定し、HF₀F₁形成における核-ミトコンドリア相互関連を解明しました(8)。

HF₀F₁の制御と mtDNA の基本が解明されると(8,17,20)、発生、特に分化初期には、HF₀F₁の律速段階の F₁β 遺伝子(ATP5B)プロモーターのエピジェネティックなメチル化による抑制をうけ、一方、解

糖系が優位となることが判明しました(21)。そして、遂に iPS 細胞が解糖優位条件下で山中カクテル(POUSF1, SOX2, KLF4, MYC)を使い体細胞から形成されて、再生医療の新時代が拓かれました。受精卵の分化初期には解糖が優位なのは低酸素誘導因子(HIF1)の作用であり、HIF1の酸素によるユビキチン分解でミトコンドリアが発達して各種の体細胞が形成されます(22)。HF₀F₁の抑制による解糖優位は iPS 細胞も癌も共通です(21,22)。したがって未分化な癌細胞の治療には HIF1 阻害剤とオリゴマイシンによる F₀F₁阻害の併用、心筋梗塞には HF₀F₁の ATPase 活性阻害剤(8)と HIF1 促進剤による血管形成促進が試みられるようになりました。

VII. 人体内の ATP 合成酵素

HF₀F₁の本来の意義は個体におけるエネルギー代謝です。1日の HF₀F₁の ATP 合成量は体重とほぼ同量で、これが諸活動で分解されています(8)。エネルギー需要の大幅な変動を短期間の環境の変化を予測し、適当な時期に応じてあらかじめ内部調整しておく時計遺伝子が必要です(23)。さらに栄養素の脱水素で生じる NADH が HF₀F₁で ATP を生じ、心身活動の結果 NAD と AMP が生じます(図8下)。NAD は SIRT1 の脱アセチル化能(図8左下)、AMP は AMP キナーゼのリン酸化能を高めて(図8右上)、マスター転写因子 PGC1α を活性化します(23)。活性化 PGC1α は活性酸素産生を阻害し、ミトコンドリアを増加させて肥満を防ぎ、テロメアを維持し健康寿命が延伸されます(図8左下)(23)。全身のエネルギー状態を HF₀F₁の活性に反映する蛋白質化学の例がアセチローム制御です(24)。HF₀F₁の OSCP の K¹³⁹のアセチル化によって活性が下がり、Sirt3 による脱アセチル化で活性化するのは(24)。肥満抑制手術では図6のような多数のアセチル化部位の脱アセチル化も確認されています(24)。

個体レベルの応用では、健常なミトコンドリアをミトコンドリア疾患の体細胞や卵子に導入する新しい遺伝子治療法を開発し、遺伝子治療学会長

を務めました(25)。これによって現代の高齢出産の最大の難関である卵子老化を、体外受精で余剰となった若い卵子のミトコンドリア移入で解決できるのです(法規上米国でのみ可能)(25)。個体レベルでの機能確認の例として、ATPase 阻害ペプチド

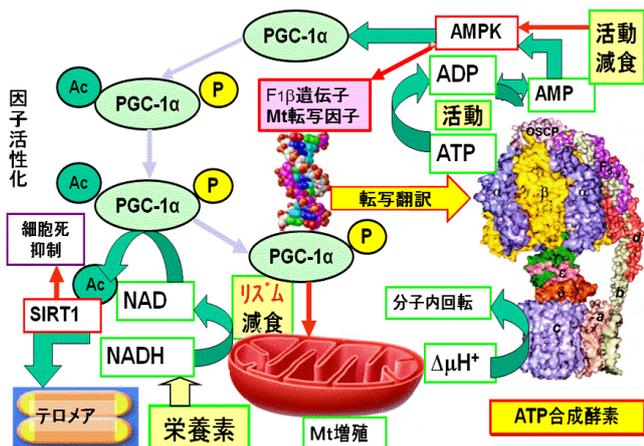


図9. エネルギー制限と運動によるAMPとNADの増加が寿命延長

(IF₁) が F₁ による ATP 消費を防ぐと考えられますが、IF₁ ノックアウトマウスは、少なくとも平常時は健全でした(26)。IF₁ と F₁ の結合の詳細な結晶学的解析と細胞生物学の知見から、IF₁ はアポトーシスの抑制など、緊急時に初めて必要とされる

ペプチドであると推測されています(27)。個体レベルのデータの解釈は極めて複雑です。現在ではノックアウトマウスのように煩雑な手段ではなくて、siRNA ベクターを用いて RNA 干渉で特定の蛋白質の複雑なヒトミトコンドリア内での機能を解析するようになりました(28)。

最後に、精神も HF₀F₁ に依存している例を挙げましょう。禅僧は精神活動が高く、長寿ですが、宗教家の瞑想後のトランスクリプトーム中で最も増加したのは HF₀F₁ とテロメア維持の諸酵素、最も減少したのはストレスの中核の NFκB でした(29)。

VIII. おわりに

ATP 合成酵素の研究は、従来の可溶性蛋白質の単離、高次構造の解析、遺伝子構造からの残基機能の解明という蛋白質科学の常識を次の7つのレベルで変革しました。①生体膜レベル: F₀F₁ リポソーム再構成法による生体膜学の創立。②膜蛋白質レベル: F₀ 可溶化法による不溶性膜蛋白質の機能解析③高次構造レベル: 安定な TF₀F₁ とその遺伝子発現による refolding、サブユニット会合、加工による機能解明。④原子レベル: F₀F₁ の巨大蛋白質複合体のシンクロトロン放射光による全原子位置の解明。⑤残基動態レベル: F₀F₁ の ΔμH⁺ 駆動分子内回転



図10. ヒトATP合成酵素とミトコンドリア時代の教室員、自宅にて

モーターの発見。⑥細胞レベル： ρ^0 細胞、サイトプラスト、サイブリッド作成。HF₀F₁ エピジェネティック制御による iPS 細胞形成。⑦個体レベル：HF₀F₁ の高次機能のエネルギー学、ミトコンドリア導入マウス、HF₀F₁ のプロテオミックスとアセチローム等の制御。

F₀F₁ はエネルギー代謝の中心となる酵素ですから、回転説で 1997 年に Walker と共にノーベル化学賞を授与された PD. Boyer によると "All enzymes are beautiful, but ATP synthase is one of the most beautiful as well as one of the most unusual and important." 「全ての酵素は美しいが ATP 合成酵素は最も美しいだけでなく最も特殊で重要である」と述べています(13)。Boyer は 1998 年に私の定年の祝賀シンポジウムで私や F₀F₁ 研究を助けて下さった多数の研究協力者と共に講演をして下さいました。最後になりますが、この研究は多数の教室員の努力のたまものです。1990 年の自宅での教室員のパーティーの写真を最後に示します (図 10)。

文 献

- Mitchell, P. (1961) *Nature* 191, 144-148.
- Kagawa, Y (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 265, 297-338.
- Kagawa, Y. and Racker, E. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2461-2482(3 編連続) .
- Kagawa, Y. and Racker, E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5477-5487.
- Mitchell, P. (1979) *Science* 206, 1148-1159.
- 香川靖雄(1978)岩波全書「生体膜」 岩波書店.
- 香川靖雄(1998)現代化学 1998, 26-31.
- Kagawa Y (2010) *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 86, 667-693.
- Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H. and Kagawa, Y. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 7910-7916.
- Kagawa, Y., Nojima, H., Nukiwa, N., et al. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2956-2960.
- Abrahams J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., Walker, J.E. (1994) *Nature* 370: 621-628.
- Shirakihara, Y., Leslie, A.G., Walker, J.E., Kagawa, Y. et al. (1997) *Structure* 5, 825-836.
- Boyer, P.D (1997) *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717-749.
- Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J. et al. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107(39):16823-16827.
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinoshita, K. Jr. (1997) *Nature* 386, 299-302.
- Kagawa, Y., Hamamoto, T. and Endo, H. (2000) *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 471-484.
- Ohta, S., Tomura, H., Matsuda, K. and Kagawa, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11257-11262.
- Matsuda, C., Endo, H., Ohta, S. and Kagawa, Y. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 24950-24958.
- Wittig, I., Meyer, B., Heide, H., et al. (2010) *Biochim. Biophys. Acta* 1797 1004-1011.
- Hayashi, J-I., Ohta, S., Kagawa, Y., et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 6878-6888.
- Vazquez-Martin, A., Corominas-Faja, B., Cufi, S. et al. (2013) *Cell Cycle*. 12, 207-218.
- Teslaa, T., Teitell, M.A. (2015) *EMBO J.* 34: 138-153.
- Kagawa, Y. (2012) *Nutr Rev* 70 (8):459-471.
- Vassilopoulos, A., Pennington, J.D., Andresson, T., et al. (2013) *Antioxid Redox Signal* 21, 551-564
- Kagawa, Y. and Hayashi, J.-I. (1997) *Gene Therapy*. 4, 6-10.
- Nakamura, J., Fujikawa, M., Yoshida, M. (2013) *Biosci Rep.* 17; 33(5) e00067.
- Bason, J.V., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. et al. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:11305-11310.
- Kasashima, K., Ohta, E., Kagawa, Y., et al. (2006) *J. Biol. Chem.* 281: 36401-36410.
- Bhasin, M.K., Dusek, J.A., Chang, B.H., et al. (2013) *PLoS ONE*. 8, e62817.

香川靖雄先生ご略歴

- 1932年 東京府に生まれる。
- 1957年 東京大学医学部医学科卒業
- 1957年 聖路加国際病院医師実地修練
- 1962年 東京大学生物系研究科第二基礎医学専門課程修了、医学博士
- 1963年 フルブライト講師研究員、Public Health Research Institute of NY. Biochemistry
- 1965年 東京大学医学部生化学教室助手
- 1970年 Cornell University, Section of Biochemistry and Molecular Biology, Visiting Professor
- 1972年 自治医科大学生化学教室教授
- 1999年 女子栄養大学医化学教室教授、副学長、研究所長 現在に至る



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

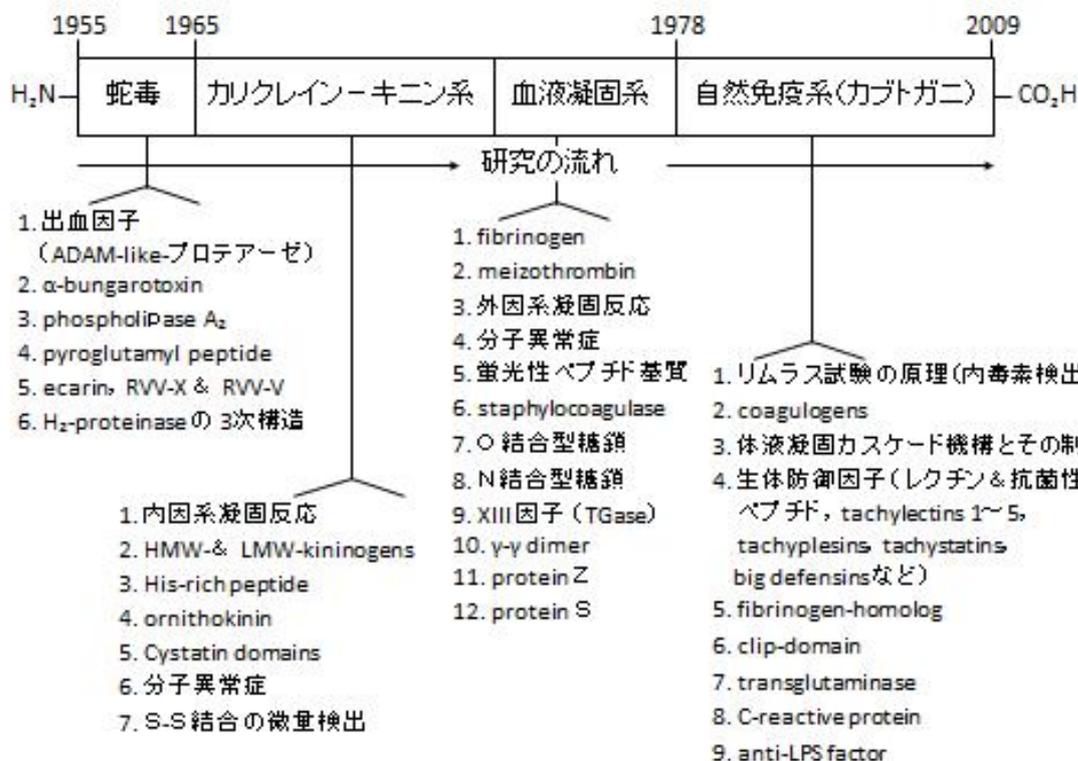


図 岩永貞昭先生の歩んでこられた道

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か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。ここに至ってもう一度フィブリノーゲンに出会うとは思っていませんでした。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）

模索の頃の蛋白質科学

高木俊夫（たかぎ としお）

私が、蛋白質の研究を始めた1950年代、この国には、まだ蛋白質科学（その頃は“化学”であった）は、深くは根付いていなかった。蛋白質化学は、有機化学の延長線上に存在しているにすぎなかった。私は、大阪大学理学部化学科の学生であったが、幾つかの講義の中で、蛋白質に触れられたのは、赤堀四郎教授のみで、それも、“ポリペプチド説”の紹介であった。これに関連して、奥山が記憶している、大阪大学理学部化学科のコロキウム後の茶話会での、小竹無二雄教授が赤堀四郎教授を皮肉った以下の言葉が印象的である：「赤堀君も蛋白質のような訳の分からないものをやって、人生を無駄にするかも知れない」（1）。1950年代後半の事であったろう。両教授（当時）とも、既に著名な有機化学者であった。しかし、その頃、赤堀先生は、既に蛋白質研究所の創設（1956年、研究施設として発足）を、念頭に置いておられたのであろう。当時、同教授の研究室では、コウジカビが生産する、 α -アミラーゼの結晶化に成功していた。結晶として得られると云うことは、蛋白質が化学の対象となり得るものであるとの、確信を与えていた様に、感じられる。

私は、1990年代後半のある日、ウプサラ大学（スウェーデン）の中央図書館でThe Svedbergが遺した資料類（Svedberg Archives）の中に、一群の手紙を見出した。ちなみに、“The”は定冠詞ではなく、Theodorに相当する北欧風の名前である。それらの手紙には、蛋白質の結晶化に成功した研究者から、その単一性そして可能なら、分子量を、超遠心分析に掛けて明らかにしたいという、嘆願に近い要請が記されていた。その頃、超遠心機は、それを開発したSvedbergの元にしか存在しなかった。1938年に開催さ

れたRoyal Societyの“The Protein Molecule”と題された討論会で、Svedbergは、超遠心機で検討して得られた60種類の蛋白質の特性を、提示したという。蛋白質の分子像を描き出す上で、Svedbergの果たした役割は偉大であった。彼の業績は、Edsallによって、簡潔に紹介されている（2）。

蛋白質の分子像を描く上で、それとは全く無関係な物質が役立ったかも知れない。それは、天然の樹脂あるいは金の粒子であった。それらの懸濁液（suspension）を静かに置くと、粒子が沈降して境界が見られる。

粒子の組成がおなじ、つまり密度が等しい場合、大きさが揃っているほど、鋭い境界が得られた。この種の粒子についての研究の動機は、分子の実在性（molecular reality）を巡る模索であった。この分野で、偉大な業績を残したのは、Jean Perrin（3）であった。

Svedbergをして、分析用超遠心機の開発に駆り立てたのは、何とかして、蛋白質の水溶液について、同じような観察を行う事であった。

分析用超遠心機を用いての測定が可能になった頃、Svedbergはカゼインを対象にしていた。カゼインは分子量の分布のある混合物的蛋白質であったから、明確な境界を与えなかったであろう。その頃、彼を訪れたEdwin J. Cohn（文献1）の著者、Edsallの指導者で、前任者）にSvedbergは、「蛋白質の溶液を掛けたら、どんな境界が見られるか」と訊ねた。Cohnは即座に、鋭い境界と答えた。Svedbergには意外であったようである。しかし、その頃、そのような蛋白質像が、描かれる素地ができていたのである。それには、当時、既に数多くの種類の蛋白質が、結晶として得られていた事が、大きく寄与していた。

Svedberg の分析用超遠心機は、いわば“決め手”として期待されたのである。

蛋白質の研究の歴史を通観すると、上記の事情が理解できる。蛋白質に、特化した研究史として、私の知る唯一のものは、Tanford と Reynolds の著作（4）があり、同書では Svedberg の役割の重要性が明示されている。Tanford を科学史に導いたのは、かつて彼の指導者であった Edsall の科学史全般に対する深い関心であったろう。

Svedberg の分析用超遠心機の開発の最終段階に関わるという貴重な経験した日本人がいた。桂井富之助（5）である。彼は膨大な量の日記を残しており、現在は、東京大学教養学部の科学史研究室に保存されている。それ以前、私は、多大の関心を抱いて、彼が超遠心機に関わった期間の日記を読もうとした。しかし、真に残念な事に、その間の日記だけが、ウプサラの地で、焼却されていた。その理由は、全く定かでない。

さて、私が蛋白質の研究を始めた頃、この国で、蛋白質それ自体を研究している人の数は、極めて少なかった。他方、米国では多数の研究者が蛋白質の基礎的研究に従事し、着々と業績を積み重ねていた。その要因の一つを、私は次の様に考えている。それは、1940年前後の、あの動乱の時代、血液蛋白質の分画・精製が、多数の若者を動員して研究されていた事である。それは、Cohn と Edsall が既に行っていた蛋白質の基礎研究の成果を基盤としていた。この間の研究経験が、後年に花開いたと考えられる。他方、私達の後方には、蛋白質の基礎研究の空白の時代が広がっていたと云えよう。血液蛋白質の分画・精製に関する当時の状況は、一冊の書物にまとめられている（6）。本の副題には Cohn の名のみが挙げられている。しかし、実際に同課題を集約していたのは、Cohn の弟子で後継者であった Edsall である。

私は、Harvard 大学で、Edsall と2時間ほど会話を交わした事があった。往時の研究に使った装置などが残されていると思って、訊ねた。意外にも、何も残されていなかった。「輸送船に血液を積むより、分画し乾燥すれば、場所取らない

から」と答え、話題を他に転換されてしまった。私が日本人である事を気遣ったのであろうか。しかし、その時の彼の姿からは、蛋白質に関する Gordon Conference の入口で、一人で北ベトナム爆撃反対の文書を配っていた彼の姿が連想された。膨大な国費を投入して行われた研究プロジェクトには、思いたしたくない側面も多々あったのであろう。

蛋白質学会の幹部諸氏が、“わが国の蛋白質科学研究発展の歴史”に関心を抱かれた事は、結構である。でき得れば、どなたかが、科学史の立場から、全体を見渡した文章をものにする事であろう。そのためには、今回、集めようとされている原稿が、基礎データとして役立つかも知れない。個人の研究史の提示の仕方は、著者の性格で、様々であろう。総合と、取捨選択が必要である。

第二次大戦以前、この国で蛋白質に、まず関心を抱いたのは、食品化学あるいは、栄養学の分野の研究者であったろう。“ポリペプチド説”の検証あたりから、蛋白質は有機化学の研究対象として、浮かび上がってきた。それは、既に戦後の事であった。

蛋白質の分子像を描く上での、分析用超遠心機が果たした役割は、大きかった。また、Svedberg の後継者であった Tiselius は、Svedberg が活用した光学系を利用して、蛋白質の電気泳動法の開発に、大きく貢献した。これらの影響であろう。有機化学的な接近と共に始まった、この国の蛋白質研究の開始時には、分析的な超遠心機法あるいは電気泳動法が、重視された。蛋白質の研究に必要な、分析用超遠心機や電気泳動装置は、輸入され始めたが、他方では、日立製作所的那加工場で製作・販売され始めた。高速回転部分を持つ点で、かつて同所で製造していた機関銃と、超遠心機は共通していた。これらの測定装置において境界を視認するには、シュリーレン光学系が用いられた。それは、弾丸の飛翔状況を撮影するのに使われていた。夏目漱石の「三四郎」には、“野々宮”が物理学の実験室を訪れる場面がある。小説では脚色されてい

るが、漱石が実際に訪問したのは、寺田寅彦の研究室であり、そこで行われていたのは、弾丸の飛翔状態の、シュリーレン法による撮影であった（7）。

蛋白質の研究は、総論の時代から、各論の時代に、移行しつつある。分析用超遠心機から得られる情報の理論的解析に貢献した藤田は、以下のように述べて、研究の縦の流れを知ることの重要性を指摘している（8）：「どの学問でもそうであるが、過去の発展の過程を知ることには、現状を正しく理解し将来を展望するために不可欠である。研究者はしばしば横のひろがりを目をうばわれ、縦の歴史的な時間の流れの中で自己を見つめことを忘れがちである」。傾聴すべき意見である。振り返ると、第二次大戦終結直後に、蛋白質の基礎的研究を志した人達の多くは、在世でない。彼らの直後に、この研究分野に参入した世代が、書き残すべきなのかも知れない。

文 献

- 1) 奥山典生、バイオテクノロジー標準化支援協会ジャーナル、No. 0071 (2015年3月/WEB上で配布)：「昨日・今日・明日：無細胞蛋白質合成に向けて」（定例会での講演の記録）。
- 2) J. T. Edsall, TIBS, May 1978, 114-115 (1978); "50 Years Ago: The Svedberg and the ultracentrifuge".
- 3) Mary J. Nye, "Molecular Reality: A perspective on scientific work of Jean Perrin", McDonald and American Elsevier, 1972.
- 4) Charles Tanford and Jacqueline Reynolds, "nature's robots: a history of proteins", Oxford University Press, 2001.
- 5) <編>桂井仁(ひとし)、"親愛なる「ユニークな」一研究者 桂井富之助の記録"、(有)ワニプラン、2002.
- 6) Douglas M. Surgenor, "Edwin J. Cohn and the Development of Protein Chemistry : With a detailed account of his work of the fractionation of blood during and after World War II", Center for Blood Research Inc., 2002.
- 7) 中谷宇吉郎、「寺田寅彦：わが師の追想」（133-143頁）、講談社学術文庫、2014(再刊)：小山慶太、「漱石が見た物理学：首くくりの力学から相対性理論まで」、中公新書 1053 (1991)。後者の108頁に、弾丸の飛翔時のシュリーレン写真を撮影するための装置の一部らしい、漱石が描いた素描が引用掲載されている。シュリーレン (Schlieren) は“縞”などの意味を持つドイツ語である。
- 8) 藤田博、蛋白質・核酸・酵素、20, 649-660 (1975)；「超遠心法の発展：超遠心機誕生からの半世紀を回顧して」。

高木俊夫先生ご略歴：

- 1933年 京都府に生まれる。
- 1956年 大阪大学理学部化学科卒業
- 1961年 日本学術振興会奨励研究生
- 1962年 理学博士（大阪大学）
- 1963年 大阪大学助手
- 1971年 大阪大学助教授
- 1982年 大阪大学教授
- 1997年 大阪大学名誉教授

