

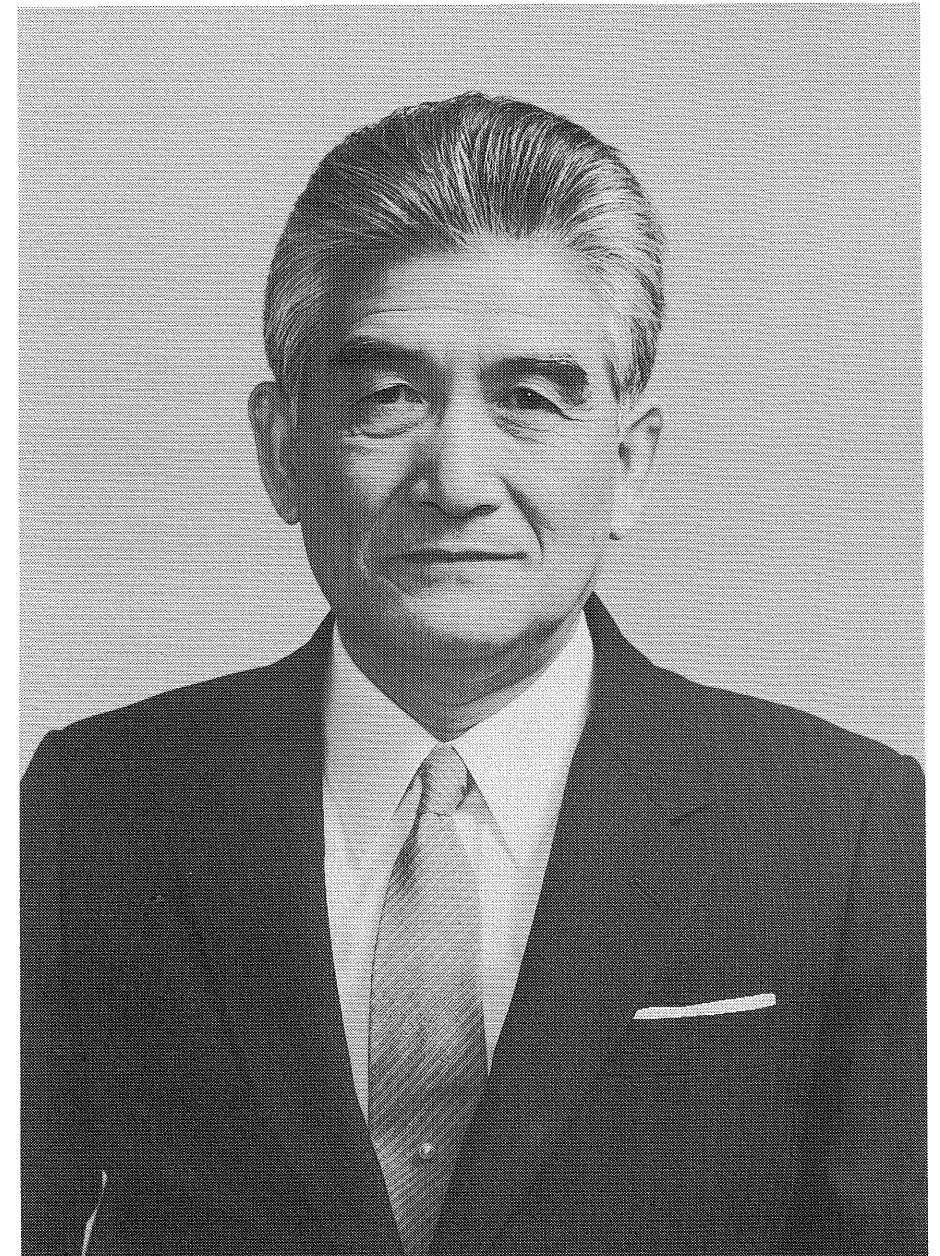
石井 信一教授退官記念

業 績 集

1990年4月

北海道大学薬学部

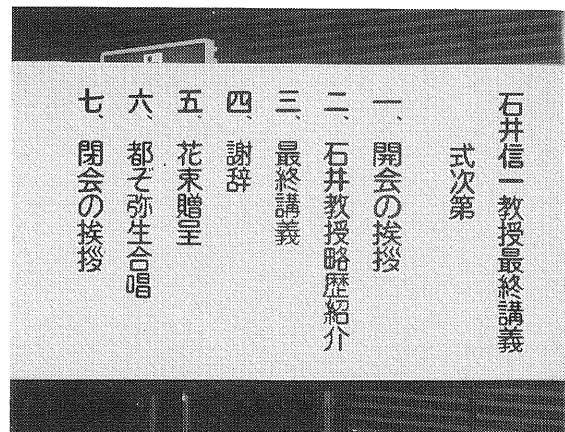
石井 信一教授定年退官記念会



石井信一

石井信一教授 略歴

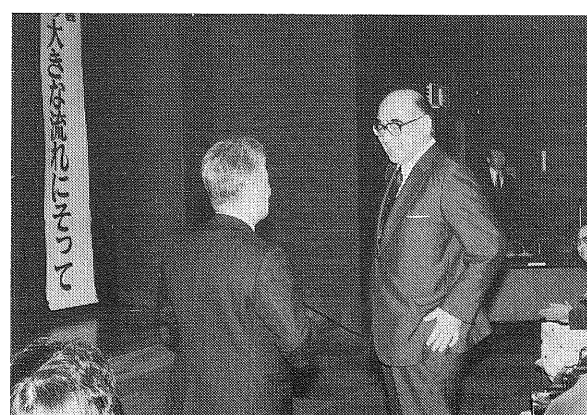
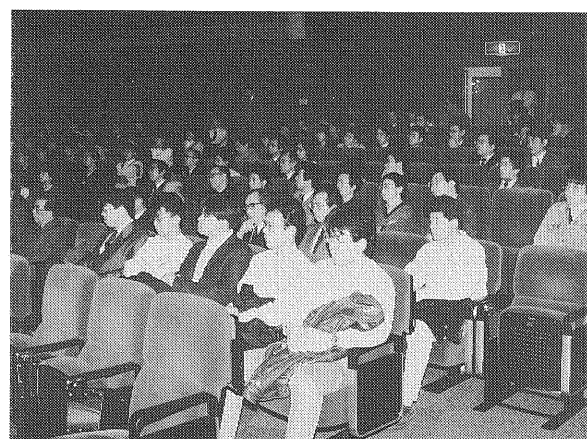
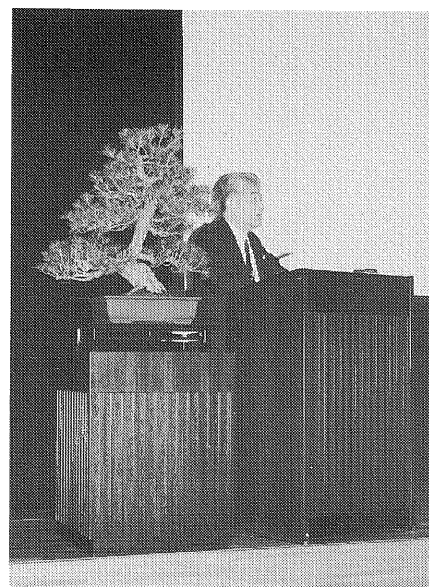
- 1927 年 東京都墨田区に生まれる
- 1948 年 東京大学理学部化学科卒業
東京大学大学院入学
同 中退
東京大学放射線化学研究所研究員
- 1949 年 同 助手
- 1950 年 東京大学理工学研究所助手
- 1957 年 東京大学理学部生物化学科助手
- 1960 年 アメリカ合衆国国立衛生研究所（ワシントン）留学 （3年間）
- 1965 年 東北大学理学部化学第二学科助教授
東京大学理学部生物化学科助教授併任
- 1967 年 北海道大学薬学部製薬化学科教授
- 1972 年 日本薬学会北海道支部長
- 1975 年 北海道大学評議員 （3年間）
北海道大学薬学部長 （3年間）
- 1976 年 北海道大学共同利用施設等管理委員会委員長 （2年間）
第27回蛋白質構造討論会主宰
- 1979 年 北海道大学評議員 （4年間）
北海道大学機器分析センター長 （4年間）
北海道大学学生部委員 （1年間）
- 1982 年 日本生物物理学会北海道支部長 （2年間）
- 1984 年 International Society for Biorecognition Technology 組織委員
（現在まで）
- 1986 年 日本薬学会北海道支部長
同 理事 （2年間）
- 1987 年 日本生化学会北海道支部長 （2年間）
同 理事 （2年間）
- 1988 年 アメリカ生化学分子生物学会名誉会員
- 



最終講義



祝賀会



蛋白質研究の大きな流れにそって

最 終 講 義

1. はじめに

ほぼ23年もの長い間、北大薬学部にて奉職させて頂いたことになります。この間たくさんの皆様の暖かいお支えによりまして大変楽しく仕事を続けることが出来ました。本日は又、ご多忙中にもかかわらずお集まり下さいました多数の方々の前で最終講義をする機会を頂戴致し

1948-60年：安藤鋭郎教授の研究室(東大)に所属
プロタミン(魚類精子細胞核蛋白質)の化学構造研究

1960-63年：B. Witkop博士の研究室(NIH)に所属
グラミシジンA(ペプチド性抗生物質)の化学構造研究

1963-65年：安藤研と江上不二夫教授の研究室とに所属
セリンプロテアーゼの活性構造相関研究
ピオシンR(緑膿菌のバクテリオシン)の活性構造相関研究

1965-67年：田宮信雄教授の研究室(東北大)に所属
セリンプロテアーゼの活性構造相関研究
エラプトキシン(海蛇毒素蛋白質)の活性構造相関研究

図 1 北海道大学に赴任するまで

1941年：J. P. Martin & R. L. M. Synge
分配クロマトグラフ(アミノ酸分析)法の開発

1945年：F. Sanger
DNP法(蛋白質のN末端分析法)の開発

1949年：P. Edman
PTC法(N末端からの配列分析法)の開発

1951年：F. Sanger
インシュリンA鎖(ウシ)の一次構造決定

1951年：S. Moore & W. H. Stein
イオン交換原理によるアミノ酸定量分析法の開発

1952年：A. D. Hershey & M. Chase
遺伝子はDNAである。T2ファージでの証明

図 2 流れ その1

ました。この感激の気持ちをも含めて厚く御礼申し上げます。時間が限られておりますので、この23年間たずさわってきた研究の内容だけを中心にした話を進めるべきかとも存じますが、このような場に立たされると、どうしても個人的な感傷に動かされたくなくなります。東京生まれの私が、42年前に大学を卒業して研究の真似事をしはじめた頃、早くも北海道とのつながりを持ったいきさつも知って戴きたいと考えまして、蛋白質研究者としての私の生い立ちの記から話し始めることをお許し願います(図1参照)。

2. 北大に赴任するまで

1948年大学卒業後直ちに、私は好運にも安藤鋭郎先生の研究室に入門を許されました。その頃安藤先生は、それまで研究対象としておられたステロイドから蛋白質へと180度の方向転換を企てておられたのであります。蛋白質がアミノ酸のペプチド結合によるポリマーであることは、Sanger博士がインシュリンの化学構造を決定した時初めて確定した訳であります。その構造の半分に当たるインシュリンA鎖のアミノ酸配列についての報告が世に出されたのは図

2に示した通り1951年のことで、私自身の蛋白質事始めの方がそれより3年ほど早いことになります。その頃安藤研で扱っていた蛋白質はプロタミンというもので、現在では脊椎動物の精子の細胞核にある主要蛋白質として広くその存在が知られておりますが、当時は魚類の精子すなわち白子の中のプロタミンしか問題にされておりました。遺伝子の化学的本体がDNAであることを示す証明の一つとして有名なバクテリオファージT2についての Hershey、Chase 両博士の実験結果が報告されたのが1952年であります(図2参照)。精子細胞核の中でDNAと対をなしているプロタミンに安藤先生が注目なされたことは、当時として大変な炯眼であったといえることができます。その頃北海道各地ではまだニシンが沢山採れておりました。ニシンのプロタミンをクルペイン、サケのプロタミンをサルミンと申しますが、この両者が安藤研の主な研究対象になったのであります。1950年、私は単身で北海道に出張を命ぜられました。サケの白子採取のためです。千歳のサケ採卵場で目的物を充分量分けていただき、これを北大低温科学研究所のお世話で冷凍してから、大きな魔法瓶に入れて東京まで持ち返りました。この時山好きの私が、北海道の広大な山野や北大の伸びやかな緑のキャンパスから初めて受けた感銘は、今でも私の脳裏に強く刻み込まれたままです。

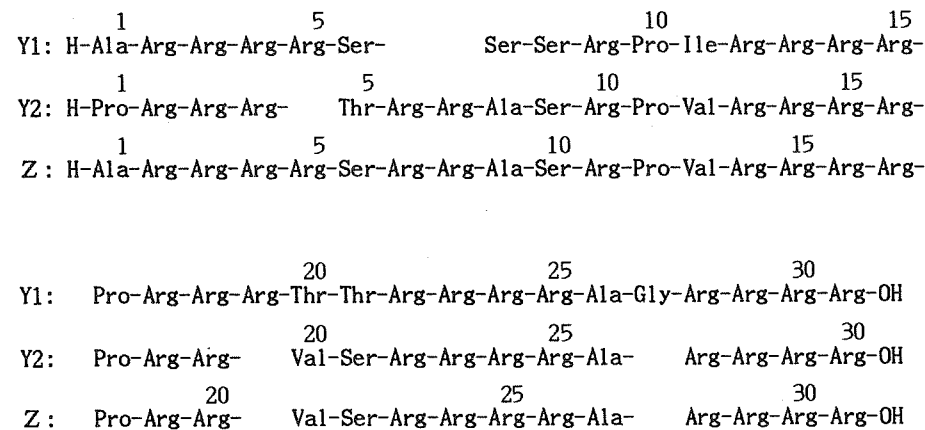


図 3 クルペインY1、Y2、Zのアミノ酸配列順序

安藤研で決定されたニシンのプロタミン、クルペインの化学構造を図3に示します。この様にアミノ酸残基数30程度の極く小さな蛋白質ですが、その構造決定の前には解決せねばならない2つの難問がありました。第1はマイクロヘテロジェニティーの存在、すなわちここに見る通り、よく似た少なくとも3種類の分子の混合物であったということ、第2は構成全アミノ酸残基の約2/3を塩基性の強いアルギニンが占めていたということでもあります。現在でもアミノ酸配列分析のためには、先ず蛋白質を酵素で適当な長さの断片に切り取り、各断片を分別し

て、それぞれにつき分析を進めるというのが定石ですが、Sanger博士がインシュリンの解析をした時がそうであったように、当時ペプチド断片の分別に用いられるのは専らペーパークロマトグラフ法でありました。1951年に Moore、Stein 両博士が、はじめてイオン交換クロマトグラフ法によるアミノ酸の分別定量法を発表しました(図2)。それがペプチドの分別にも適用可能であれば、この方がペーパークロマトグラフ法よりも沢山の試料が扱えるし、分離度もずっと優れているものと期待できます。そこで、私は、トリプシン分解したクルペイン断片のイオン交換法により分別を検討しました。しかし Moore博士らが使ったのと同じスルフォ

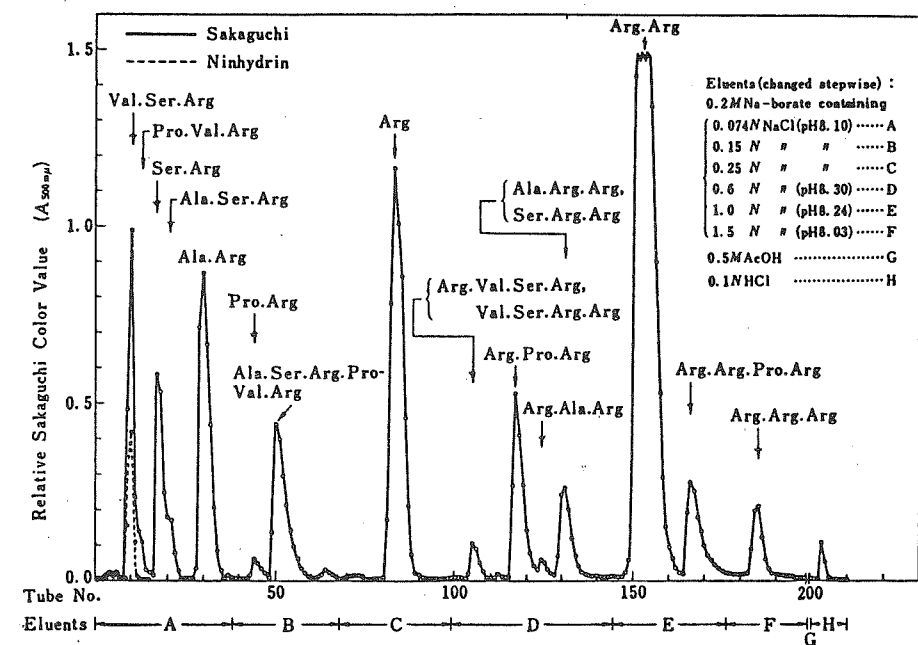
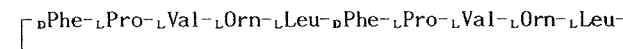
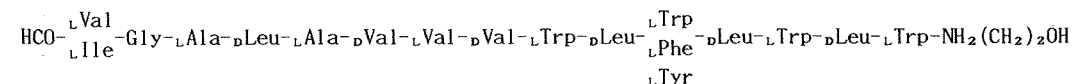


図 4 クルペインZからトリプシン分解によって生成したArg含有ペプチドのイオン交換クロマトグラフィーによる分別(カルボン酸型交換樹脂 Amberlite CG-50使用)



Gramicidin S



Gramicidin Dubos-A (B, C)

図 5 1価カチオンの生体膜透過作用をもつ抗生物質

ン酸型の陽イオン交換樹脂は、酸性度が強すぎてアルギニンを含む強塩基性小ペプチドの分別には不都合であることが判ったのです(図4)。代わりにカルボン酸型の陽イオン交換樹脂を採用し、適当な溶出条件を検討することによって目的を達成できました。その結果は図4に示してありますが、この図は後でまた話題としますので、説明はその時に回したいと思います。

1960年から3年間、アメリカの国立衛生研究所NIHに留学できました。研究室のボスはWitkop先生で、金岡先生とはここで初めてお会いした訳であります。Witkop先生から戴いたテーマはグラミシジンDubosの化学構造の解析でした。これは小さなペプチド性の抗生物質です(図5参照)。Na⁺やK⁺に対するイオノフォア的作用を持つことが、後になってわかりました。同じ名前を与えられているグラミシジンSの構造は、ペーパークロマトグラフ法の元である分配クロマトグラフ法の創始者の一人で、1952年にはMartin博士と共に、ノーベル賞を授賞されているSynge博士らの手により、すでに1945年決定済みだったのでありますが、グラミシジンDubosの方は、彼等も途中で解析を放棄していたと言うなかなかの難物でした。しかも、クルベインと同じようにマイクロヘテロジェニティーを持っておりました。この難物を料理するまでの苦心談は省略いたしますが、ただ決定されたこの構造は、L型のアミノ酸残基とD型のアミノ酸残基とをグリシン以外完全に交互の配列で持っているということに御注目願いたいと存じます。

1961年: M. W. Nirenberg ら
ヌクレオチド三連子コドンの解読

1963年: E. Shaw ら
アフィニティーラベル試薬の開発

1964年: B. S. Hartley ら
キモトリプシン(ウシ)の一次構造決定

1967年: D. M. Blow ら
α-キモトリプシン(ウシ)の三次構造決定

1968年: C. B. Anfinsen ら
アフィニティークロマトグラフ法の開発

1969年: 梅沢沢夫ら
ロイペプチンの発見

図6 流れ その2

さてその頃のNIHは、丁度Nirenberg博士が各アミノ酸に対応するトリプレットコドンの解読を進めていたという一つの記念すべき時期でありました(図6参照)。ポリUの指令で作られたポリフェニルアラニンの分子量測定はどうしたらよいだろうかとこの相談を持ち込まれたことなど懐かしく思い出されます。NIHでは当時から著名な学者の訪問が非常に頻繁で、RNAポリメラーゼについてのHurwitz博士のセミナーなど最先端の分子生物学の躍動を生々しく聞くことが出来たのも幸いでした。

やはりその頃聞いた酵素化学上の新知識、活性部位を占めるアミノ酸残基を特異的に修飾で

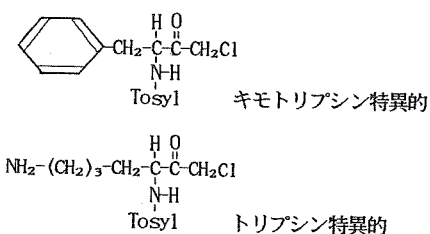


図7 アフィニティーラベル試薬
活性部位指向性試薬
(E. Shawら, 1963, 1965)

きるアフィニティーラベル試薬の話も私にとって大変刺激的でありました(図7参照)。クルベインのトリプシン分解などにたずさわっていた時から、蛋白質分解酵素すなわちプロテアーゼが示す高度な基質特異性の不思議に惹かれ始めていた私は、この話を聞いて、東京に帰ったらこの種の方法論を武器としてプロテアーゼの研究を始めようと思い定めたのであります。

帰国後間もなく、シオノギの研究所の吉田信男さんと、その頃はまだ大学院の学生さんだった北大の谷沢和隆先生とが内地留学生として安藤研にこられたので、早速お二人と組んでキモトリプシンやトリプシンなどセリンプロテアーゼを対象とした仕事を始めました。またちょうどその頃、同じ学科の江上不二夫先生から先生の研究室の客員としての研究も行わないかとの有難いお申し出を戴きましたので、私が一人で直接携わる実験としては、江上先生が提示してくださったテーマであるピオシンRを対象に選んだのであります(図1参照)。ピオシンとは緑膿菌が生産するバクテリオシン、つまり一種の殺菌性物質で、本体が蛋白質である点と、極めて限られた種類のバクテリアしか攻撃対象としない点で通常の抗生物質と違います。それまで江上研では、景山眞さん、上田享先生のお兄さんに当たる方ですが、この方がピオシンRの研究に従事してこれ、丁度その精製に成功して、1千万に近い巨大な分子量を持つことを明らかにされたところでありました。こんな大きな分子は複雑なサブユニット構成を持つに違いないと考えまして、私はいろいろな側面からの構造解析に着手いたしました。そして陰性染色した試料の電子顕微鏡観察を行った結果、ピオシンRがバクテリオファージの尾部に相当する構造物であることを突き止めたのであります(図8ピオシンR、図9大腸菌バクテリオファージT4、両者を比較されたい)。電子顕微鏡の視野の中でこの姿に初めて対面したときの感動が忘れられず、ピオシンRとのお付き合いは、結局現在まで続くことになりました。

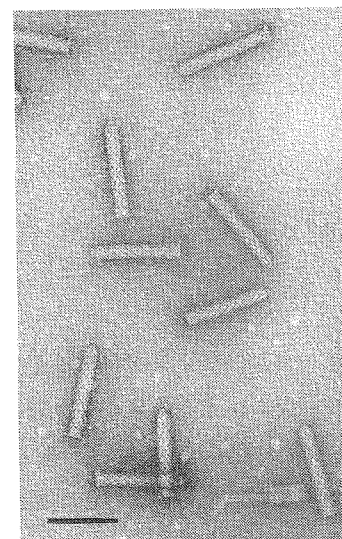


図8 ピオシンR

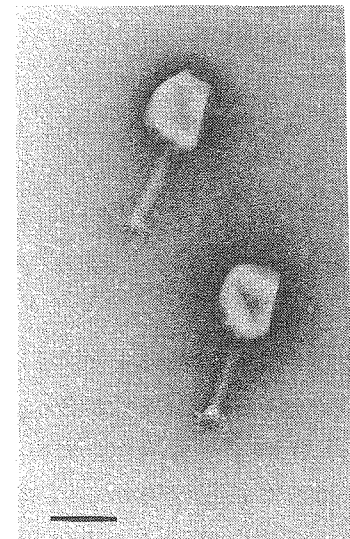


図9 大腸菌バクテリオファージT4

3. 北大薬学部での研究

3-1. 3つの主要テーマ

その後、東北大学の田宮信雄先生の研究室に所属して、海蛇毒蛋白の研究に参加することを許された一時期を経て、1967年北大薬学部で新しい研究室をもたせて戴くことになったのですが、この年はX線結晶学的手法で解明されたキモトリプシンの立体構造が発表されるというプロテアーゼ研究の歴史においても特筆すべき年でありました（図6参照）。新研究室では図10に示した三つを主要テーマとして取り上げることとしました。三つとも蛋白質の特異的分子識別能を中心課題としてまとめたつもりであります。第1のテーマを選んだ理由の説明はもう必要ないでしょう。

1. 蛋白分解酵素

セリンプロテアーゼ、メタロプロテアーゼ等
(蛋白-蛋白間 相互作用)

2. バクテリオファージ尾部

ピオシンR 1~R 5, T 4 ファージ尾部
(蛋白-蛋白間 動的相互作用)
(蛋白-糖質間 相互作用)

3. レクチン

コンカナバリンA 等
(蛋白-糖質間 相互作用)
(蛋白-蛋白間 相互作用)

図 10 北海道大学薬学部での研究
蛋白質の分子識別能

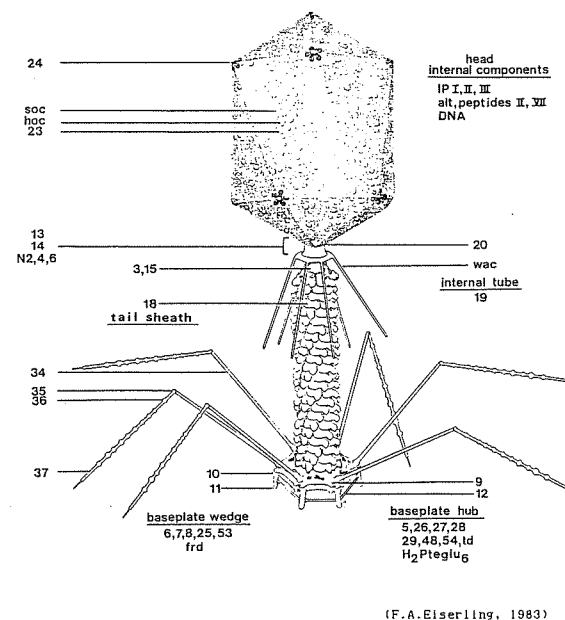


図 11 バクテリオファージT 4

第2のテーマについてはちょっと補足させて戴きます。当初はピオシンRのみを対象としておりましたが、分子遺伝学的研究が進んでいるT 4 ファージの尾部を対象とした方が、問題によってはずっと解析がしやすいので、有坂文雄君がスタッフに加わった1980年以降は、T 4 ファージ尾部の研究がこのテーマ全体の牽引役をつとめる形で現在にいたっております。尾部の主要部は二重円筒の形を持ち、外側を尾鞘 (tail sheath)、内側を尾管 (tail tube) と呼びます

(図11参照) が、T 4 の場合どちらも144個のサブユニットからなる四次構造体であります。宿主バクテリアへの感染の際、尾鞘円筒は急激に収縮し、DNAが頭部から尾管を通して宿主細胞内へ注入されるのを促しているのです。この収縮には尾鞘サブユニット蛋白質間の大きな四次構造変化を伴っているはずですが、つまりこのユニークな系における動的な蛋白質-蛋白質間特異的相互作用のメカニズムに興味を持たれる訳であります。一方尾繊維は宿主細胞を識別するセンサーです。ここでの特異的分子識別の問題の方は専らピオシンRを対象として進めて参りました。ピオシンRの場合、尾繊維の相手は感受性バクテリアの細胞表層に存在する糖質であると思われております。

糖質に対する蛋白質の分子識別能を解析する上でより単純化できそうな系として、第3のテーマであるレクチンも新たに採用いたしました。もっとも後で述べます通り、最近ではこのテーマも、プロテアーゼの問題に急接近しつつあります。この三つのテーマを平等にお話するだけの時間はとてもございません。以後の話は、プロテアーゼを中心として進めさせて戴くことになります。ご了承下さい。

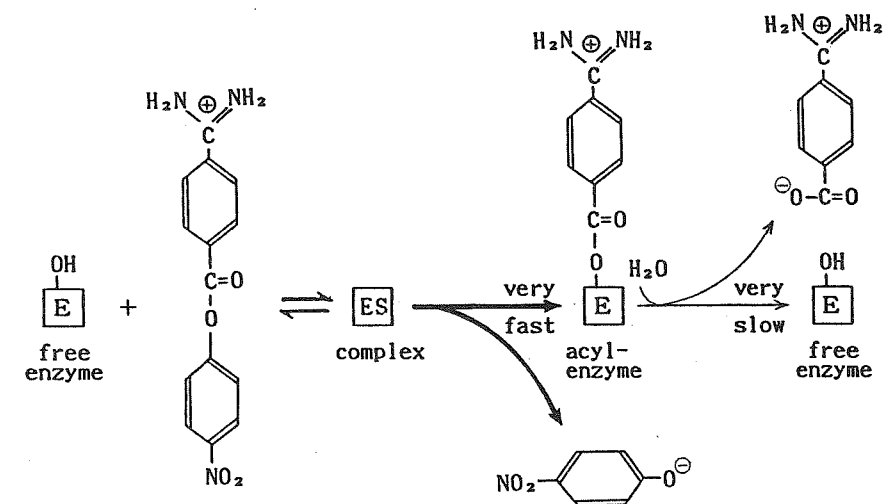


図 12 Normarity titration of trypsin active-site by
p-nitrophenyl p'-amidinobenzoate (K. Tanizawa et al., 1968)

3-2. トリプシンの規定度測定とアフィニティークロマトグラフィー

北大で仕事を始めることになってから最初に公表できた私の名前入りの論文は、実は新研究室独自の活動に関するものではなく、谷沢さんが安藤研留学時以来展開なさった仕事の成果です。この頃すでに Bender 博士らによって、セリンプロテアーゼは、活性部位セリンの水酸

基において基質アシル部分とエステル結合した形の間体を経てその触媒反応を進めるという考え方が提示され、広く認められておりました。図12に示した新化合物 p-アミジノ安息香酸 p-ニトロフェニルエステルは、トリプシンに特異的な基質の一種ですが、アシル化中間体までは容易に進行するけれども、その後エステル結合の加水分解により元の遊離水酸基をもつ酵素へ復帰する過程の進行速度が非常に遅いという際だった特殊性を持っております。それ故トリプシンの活性部位量すなわち酵素の規定度が、この基質からアシル化時に脱離される p-ニトロフェノール量を測定することによって求めうると言うのがこの論文の骨子であります。その後谷沢さんは、この基質とはアシル部と脱離基部との関係が逆転した、つまりアミジノ基をフェノール部に付けた化合物も興味深い性格をもつ基質となりうることを発見され、逆性基質という酵素研究における独自の新領域を開拓されつつあることは、ご同慶のいたりであります。

この規定度測定基質を活用することになって驚いたのは、ウシ膵臓トリプシン市販標品の活性酵素純度が60から70%位しかないということであります。トリプシンを対象としてその分子識別能の詳細な解析を進めるためには、どうしても先ず純度の高い酵素標品を得るための効率的な精製法を確立する必要がある。そこで着目したのが、その頃ちょうどクロムアップされ始めたアフィニティクロマトグラフィー、つまり特異的に相互を識別して引き付け合う二つの分子の一方を固定相に、他方を移動相に配置した新しいクロマトグラフ法であります（図6参照）。創始者の一人 Anfinsen は、1972年に先程一寸触れた Moore や Stein と共にノーベル賞を授与されております。

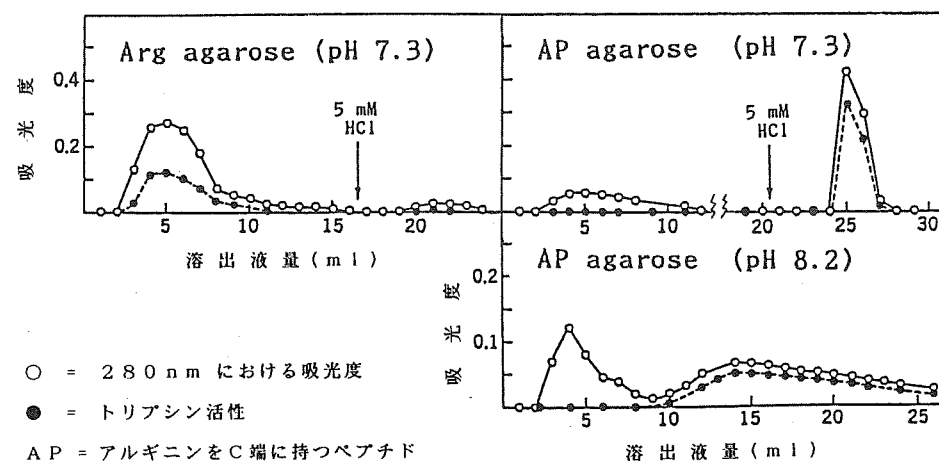
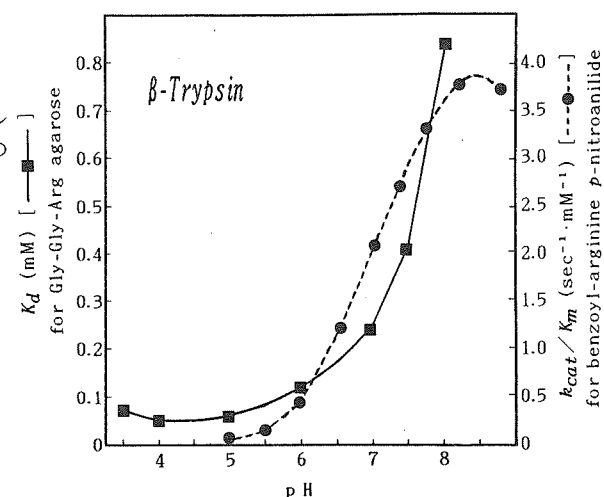


図 13 アルギニンやアルギニンペプチドを固定化したアガロースのカラムを用いるトリプシン（ウシ膵）のアフィニティクロマトグラフィー

図 14 ウシβ-トリプシンとGly

-Gly-Arg・アガロースとの解離定数(Kd)値のpH依存性並びにウシβ-トリプシンのベンゾイル-アルギニン p-ニトロアニリド水解の kcat/Km の pH 依存性



早速ためしにアルギニンを臭化シアン法によりその α -アミノ基でアガロース粒子に固定化し、これをカラムにつめて市販トリプシンのクロマトグラフィーを行ったのですが、殆どすべての酵素活性と蛋白質とが素通り画分に溶出されてしまい失敗に終わりました（図13参照）。後で分かったことですが、十の実効電荷を持つアルギニンを付けられたアガロースは、陽イオン交換体のような性格のみを持つことになっているため、塩基性蛋白質であるウシ膵トリプシンを吸着できる筈がなかったのです。それならアルギニンを含むペプチドを代わりに使えば良いだろうと考えましたが、まだ幼年期のわれわれ生化学の研究室では、この種のペプチドをすぐさま合成するだけの力がありません。一番手っとり早くこれを手にする方策として頭に浮かんだのが、昔とった杵づか、プロタミンのトリプシン分解物中に豊富に含まれているアルギニンペプチドであります。この分解物はアルギニンも沢山含んでおります。少なくともこれを除去する必要がある、それには、前にも図4で見ていただいたカルボン酸型陽イオン交換樹脂を使うクロマトグラフィーが切札になります。この頃すでにニシンは入手困難であったので、原料のプロタミンとしてはサケのサルミンを使いました。しかしそのトリプシン分解物の分別パターンも、基本的には図4と同様のはずです。すこし不経済ではありますが、原料は豊富なので、このクロマトグラムでアルギニンが現れるまでに溶出されるペプチド画分だけを一まとめにプールし、アガロースに固定化しました。これをAPアガロースと呼びますが、市販トリプシンの精製に大変有効でありました（図13参照）。

ところでこの実験を進める間に奇妙な現象に気付きました。トリプシンを pH 7 付近の緩衝液に溶かしてカラムに添加し、同じ緩衝液で洗浄した場合には、活性酵素だけがカラムにしっかり吸着していて、その精製も（5 mM HCl溶出によって）うまく行くのですが、これを酵素活性の至適条件である pH 8.2 で行くと、洗浄中に活性トリプシンもカラムから漏れ出て

しまうという現象であります。この実験に従事していた現在帝京大学で教授をしておられる笠井献一さんは、この謎解きに挑戦し、アルギニンペプチドとトリプシンとの親和力のpH依存性を定量的アフィニティークロマトグラフィーという独自の手法を駆使して解析したのであります。このような定量的実験には単一のペプチドを固定化したカラムを使うべきであります。そのペプチド Gly-Gly-Arg は当時まだ4年生だった熊崎隆君が合成しました。図14では固定相に置かれた Gly-Gly-Arg と移動相にあるトリプシンとの間の解離定数のpH依存性と、ベンゾイルアルギニン p-ニトロアニリドと呼ぶ基質に対するトリプシンの触媒効率 k_{cat}/K_m のpH依存性とを重ね書きしてあり、二つの曲線がよく似た傾向を示すことにお気づきと思います。触媒効率が酸性側からpH 8に向かって上昇して行くのは、活性部位から1個のプロトンが外れるその度合に対応していると思われます。それと並行して、Gly-Gly-Arg に対する親和性が低下して行く。Gly-Gly-Arg は基質ではなく、酵素反応の結果基質から生じた生産物に相当します。酵素は作った生産物を活性部位から早く追いついて新しい基質を迎え入れなくては触媒になりません。pH上昇とともに、(C末端部にCOO⁻がある)生産物を追いつきやすくする状況が、活性部位の牙の砥ぎ上がりが進むのと歩調を合わせて作られて行く。効率的に加水分解を繰り返すプロテアーゼに仕組まれた巧妙なからくり、つくづく感心させられた次第であります。

3-3. アンヒドロトリプシンの特性

1973年には横沢英良君が助手として研究室に仲間入りしてくれました。横沢君に取り組んでもらった最初の研究テーマの目的は、牙を抜いたトリプシンを作って、それと基質との相互作用を解析すると言うものです。牙なしトリプシンは、図15に示した反応経路によって作成しま

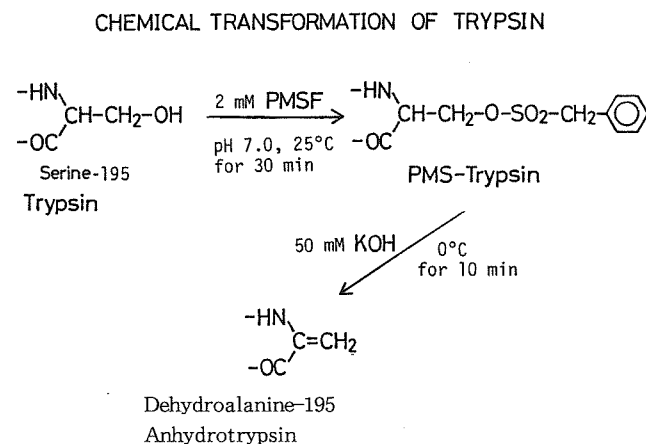


図 15 CHEMICAL TRANSFORMATION OF TRYPSIN

す。活性部位セリンから水を奪ってこれをデヒドロアラニンにしたということで、この生成物

を以後アンヒドロトリプシンと呼ばせて戴きますが、これと同じ反応経路はすでに Koshland 博士らがキモトリプシンからアンヒドロキモトリプシンを作るのに適用した成功例をもってあります。このような酵素誘導体は、触媒能こそ喪失しているものの、基質や阻害剤、更には生産物に対する特異的親和性には殆ど支障を来していないことが期待されます。ところでこの図の経路の中には、低温下ではあるものの 50 mM KOH 処理というかなり過激な反応過程があるため、実際反応後に得られたのは、目的のアンヒドロトリプシンばかりでなく、完全に変性してしまったものや、脱水ではなく加水分解を受けて元の触媒能を還元してしまったものなど色々の分子種を含む複雑な混合物でありました。この混合物からアンヒドロトリプシンを単離するために、APアガロースのアフィニティークロマトグラフィーを利用したのですが、ここでまた意外な現象にぶつかりました。アンヒドロトリプシンの方が、天然のトリプシンよりもこの種のアガロース誘導体に強く吸着されるという実験結果であります。

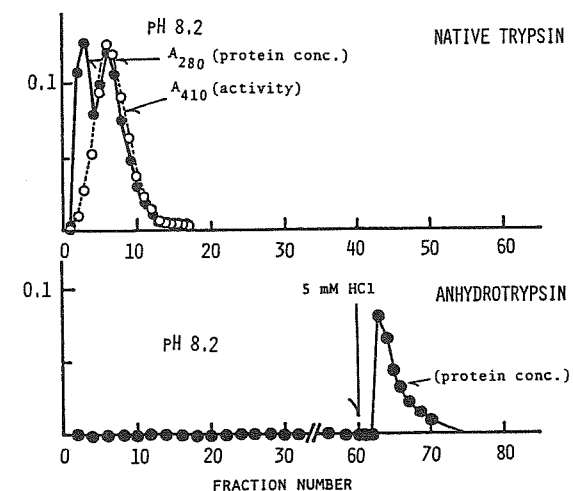


図 16 Gly-Gly-Arg Sepharose affinity chromatography of trypsin and anhydrotrypsin

図16には Gly-Gly-Argアガロース (市販品名 Sepharose) を使用した実験の一例を示しましたが、これからもアンヒドロトリプシンの方により強い結合能の見られることがお分かりいただけると思います。常識的に考えて、これだけ過激な反応条件で痛めつけられた後ですから、元の能力を維持していれば上々、元より向上しているわけがない。アンヒドロトリプシンは固相のアガロースに非特異的な吸着を起こし易いのではないかと、この疑いを先ず持ち、その点をはっきりさせるため均一な溶液系で、基質の ベンゾイル-L-アルギニンアミド (Bz-L-Arg-NH₂) とそれからの生産物にあたるベンゾイル-L-アルギニン (Bz-L-Arg-OH) とに対するトリプシン、アンヒドロトリプシンの親和性を比較測定しました。その結果を解離定数の形で示したのが表1です。

表 1 Comparison of Dissociation Constants (Kd)
(pH 8.2, 25°C)

	Kd (mM) of Complex with	
	Bz-L-Arg-OH	Bz-L-Arg-NH ₂
Native Trypsin	5.9 ± 0.1	3.3 ± 0.1
Anhydrotrypsin	0.20 ± 0.02	4.6 ± 0.2

基質に対する親和性は、トリプシンとアンヒドロトリプシンとで大差ありませんが、アンヒドロ体の場合、生産物に対する親和性が飛び抜けて強くなっている。トリプシンの生産物との親和性に較べると30倍ほどにもなっているという結果であります。しかもこの強い親和性は、この表には示してありませんが、相手がL型の光学異性体である時に限って発揮されるのです。先ほどのアフィニティクロマトグラフィーで得た意外な現象も、決して固相への非特異的な吸着などというものではなく、アンヒドロトリプシンに付与された特別な性質の現れであると結

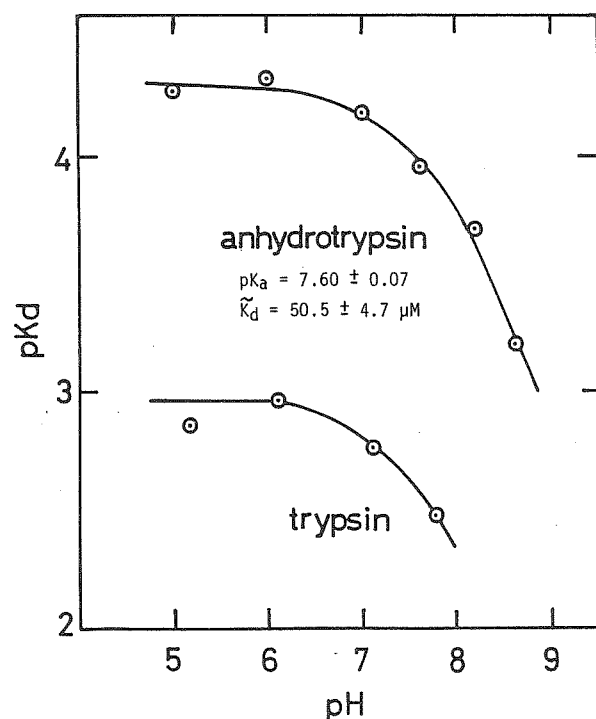


図 17 pH Dependence of dissociation constant (Kd) of Bz-Arg-OH complexes

論してもよいと思われます。逆に活性をもつトリプシンの側に立ってみれば、牙の存在は生産物の追い出しにも重要な意味を持っていたということが出来ましょう。

表1に示したのはpH 8.2での測定値だったのですが、図17は、いろいろなpHで求められた生産物 ベンゾイル-L-アルギニンに対する解離定数の値を、トリプシン、アンヒドロトリプシンとの間で比較してあります。但し縦軸は、解離定数そのままではなくその $-\log$ の値で目盛ってあることに注意下さい。トリプシンと同様アンヒドロトリプシンも、弱酸性の条件下(pH 5~6)の方が生産物をより強く引き付けることが明らかです。そしてこの図に示したpH全領域にわたってアンヒドロトリプシンの優位が保たれていることも判りました。

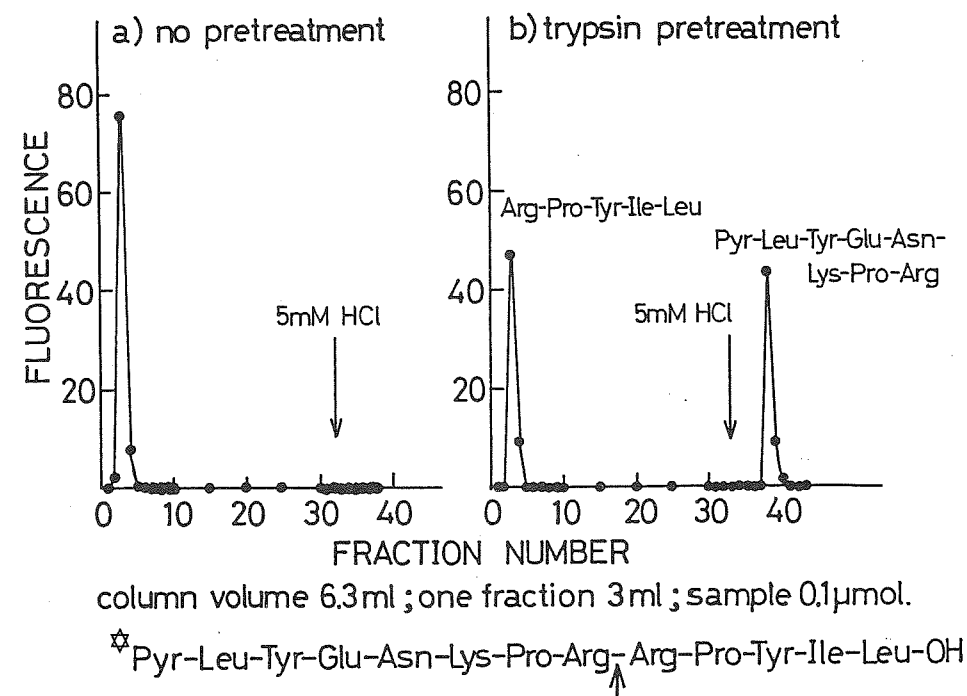


図 18 Affinity chromatography of neurotensin on anhydrotrypsin-Sepharose at pH 5.0

アンヒドロトリプシンのこのような特性は、これを固定相においた形のアフィニティクロマトグラフ実験によっても実証されました(図18参照)。ニューロテンシンは、C末端位にロイシン、内部にアルギニン2個とリシン1個とを持つトリデカペプチドで、トリプシンの作用により1個所だけが加水分解を受けて、N末端側断片オクタペプチドとC末端側断片ペンタペプチドとに切り離されます。C末端にアルギニンをもつオクタペプチド断片は、pH 5の条件下で固定化アンヒドロトリプシン・カラムに吸着され、5 mM HClによって脱着されました

が、C末端ロイシンの元のニューロテンシンやC末端側ペプタド断片はこのカラムから素通りしました。以上の結果からも予想されることですが、固定化アンヒドロトリプシン・カラムは、図19から明かな通り、アルギニンをC末端に持つ各種生理活性ペプチドのアフィニティクロマトグラフィーにも好適でありました。

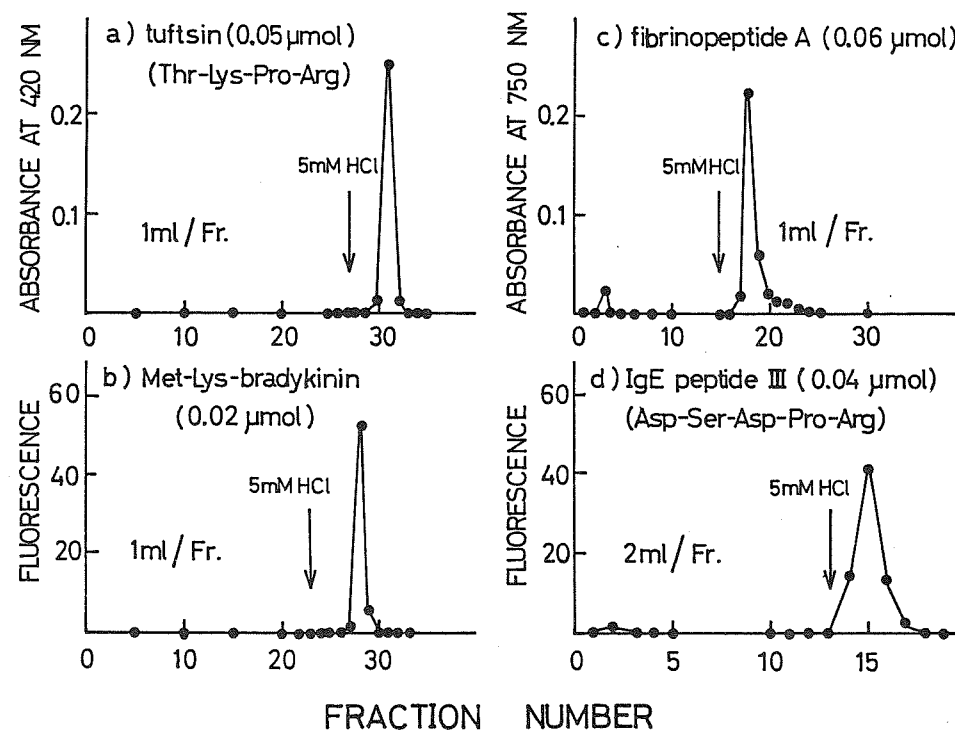


図 19 Chromatography on anhydrotrypsin-Sepharose(2ml) at pH 5.0

3-4. ロイペプチンの阻害機構とロイペプチン・アナログの効用

さて話の筋を、生きた触媒活性を持ったままのトリプシンやそれと近縁関係にあるプロテアーゼの上に戻しましょう。先程来しばしば出てくるAPや Gly-Gly-Arg は生産物型リガンドであって、これらが示すプロテアーゼとの相互作用は元来それほど強いものではありません。その点、1969年に梅沢浜夫先生の微生物化学研究所で発見されたロイペプチンは、低分子でありながらトリプシンを非常に強く阻害する興味深い化合物です。その構造は、図20に示した通り基本的にはトリプシンに対する生産物型ペプチドとほとんど同じで、ただ一点、C末端部にカルボキシル基でなくアルデヒド基を持っていることが違います。それだけの違いで、

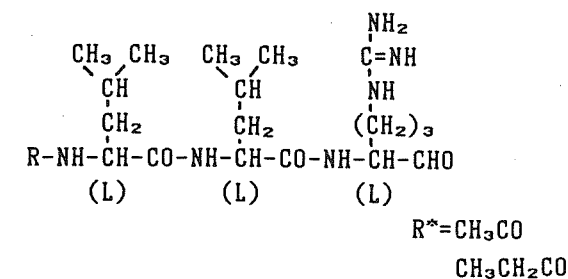


図 20 ロイペプチンの構造

表 2 Dissociation Constants of Trypsin and Anhydrotrypsin Complexes with Bz-Arg-OH and Leupeptin

	Kd (μM)			
	Native Trypsin		Anhydrotrypsin	
	pH 8.2	pH 5.0	pH 8.2	pH 5.0
Bz-L-Arg-OH (25°C)	3400*	1400**	200	53
Leupeptin (15°C)	0.024	0.49	4300	19500

*, at pH 7.8; **, at pH 5.2

ロイペプチンはトリプシンと非常に強い複合体を作る。すなわちその解離定数は、この表2に示した通り、生産物型の化合物ベンゾイル-L-アルギニンが作る複合体の解離定数と比べて4桁から5桁も小さな値を与えているのです。しかもその値はpH 8.2の方がpH 5.0でよりも小さいし、ロイペプチン-アンヒドロトリプシン複合体の解離定数はこれらより遙かに大きい。つまりロイペプチンのトリプシンに対する異常に強い結合性は、酵素が活性部位の牙を研ぎすましている時にしか現れないことになります。これらの状況は、牙つまり活性部位のセリン水酸基とロイペプチンのアルデヒド基との間に何らかの化学反応、一番可能性の高いの

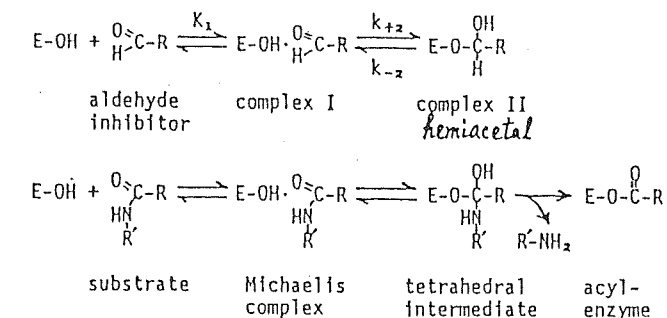


図 21 セリンプロテアーゼとアルデヒド型インヒビターあるいはペプチド基質との反応機構

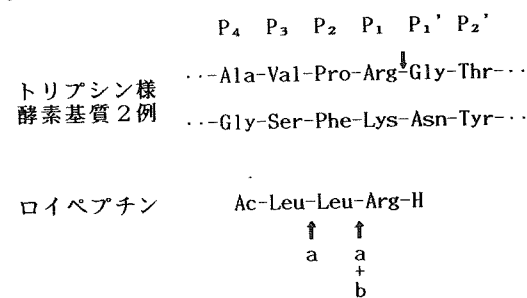
表 3 Kinetic constants for the association of leupeptin with bovine trypsin at 15°C

p H	K_1 (mM)	k_{+2} (s ⁻¹)	k_{-2} (s ⁻¹)
5.0	5.26	57.1	0.00431
6.5	2.46	87.2	0.00229
8.2	1.24	166	0.00175

は、図21に示すようなヘミアセタール形成反応が起こっていると判断させるのに十分なものでありました。

この頃セリンプロテアーゼによる基質加水分解の反応機構として、先にも述べたアシル中間体に至るまでの間に、正四面体型中間体が一旦現れるという考え方が提出され、注目を集めておりましたが、ロイペプチンが作ると判断したヘミアセタール複合体 (complex II) は、図21から明らかなように、この正四面体型中間体のモデルと考えてもよいような構造をしているのであります。当時修士課程在学中だった倉持君（現在日本化薬中央研究所）は、トリプシン（ウシ）とロイペプチンとの間でできるとされる complex I（これは基質の場合の Michaelis complex に相当）の解離定数 K_1 、これから complex II への反応速度定数 k_{+2} および逆行反応の速度定数 k_{-2} の測定に挑み、応用電気研究所生体物理部門のストップフロー装置を借用するなどした末、表3に示す通りの結果を得ることに成功しました。

これから明らかになったのは、解離定数 K_d 自身は mM オーダーであり、アンヒドロトリプシン-ロイペプチン複合体の解離定数と大差はない。問題なのは complex I と complex II との間の平衡で、pH 8.2 では、これが約 1 : 10 万比率で大きく右に片寄っている。それがロイペプチンの強いトリプシン阻害能の主因だと結論できると言うことであります。その後、直接ロイペプチンではありませんが、類似のアルデヒド型ペプチド性阻害物質とある種のセリンプロテアーゼとの複合体の立体構造が X 線結晶学的に解析され、ヘミアセタール様結合の形成が証明されております。



[a=サーモリシン; b=アミノペプチダーゼ]

図 22 トリプシン様酵素基質とロイペプチンの比較

自然界にはウシのトリプシンによく似た性格のプロテアーゼがいろいろあります。まとめてトリプシン様酵素と呼ばれます。図22の上部には、これらの酵素の基質になり得るものを適当に2例選んで示しました。ウシのトリプシンの基質になるためには、P1位にアルギニンまたはリシン残基を持つことが必要ですが、P2、P3 やP1'、P2' など他の位置を占めるアミノ酸残基に関しては余り厳密なことが要求されません。しかし動物の体内で重要な働きをしているトリプシン様酵素の中には、これらP1 以外の位置を占める残基の種類をも厳密に識別しているものがいろいろあります。ですから、そのような酵素に対する阻害剤としては、残念ながらロイペプチンは余り有能でないことが多いのです。そこでこの種の酵素それぞれに選択的な阻害能を発揮する各種ロイペプチン・アナログの作成を企てました。この意図は、出来たアナログを固定化して、個々のトリプシン様酵素の精製に適したアフィニティクロマトグラフ法を開発することにもつながります。勿論この計画は、ロイペプチンのP2、P3を占めるロイシンを他の適切なアミノ酸に置き換えることによって達成される訳ですが、有機化学があまり得意でないわれわれは、ロイペプチンを出発原料として、これに酵素反応の力も借りた改造作業を施そうと考えたのであります。最初に利用したのはサーモリシンとよぶ金属プロテアーゼです。ただし、いきなりロイペプチンそれ自身に酵素反応と言う訳には行きません。アミノ基などとの反応性が高いアルデヒド基を保護するため、まずこれを一旦ジブチルアセタール体しておく必要があります。それからサーモリシンを作用させると、P2とP3 の間で効率的に切断されました。必要に応じて、更にアミノペプチダーゼの作用でP1-P2 間も切断します。その後は有機化学的手法でアミノ酸を結合させたり、アガロースに固定化したりして、最後にアルデヒド基を還元させるという段取りであります。アミノ酸を結合させる有機合成の仕事は、主として日本化薬中央研究所の染野哲也さんに担当して戴きました。得られたロイペプチン・アナログの活用による研究成果を、以下2例お話ししましょう。

その第1は、図23に示した形の固定化ロイペプチン・アナログによるウロキナーゼのアフィニティクロマトグラフィーです。尿中に含まれるプロテアーゼ以外の蛋白質はもちろん、尿性

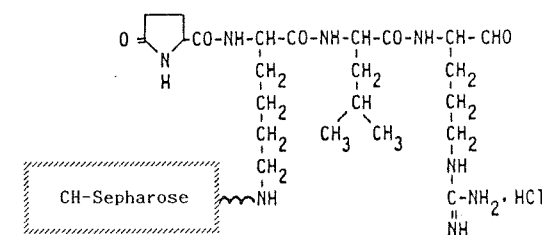


図 23 ウロキナーゼに対する特異的吸着体

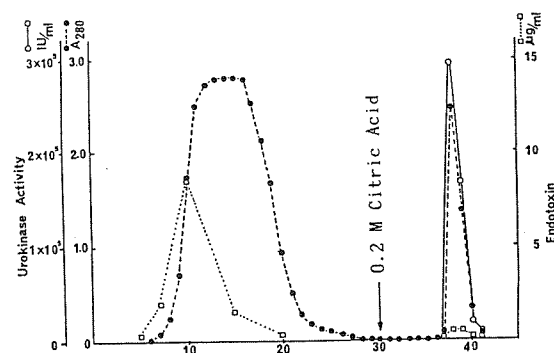


図 24 アフィニティクロマトグラフィーによるウロキナーゼの精製
●; 280nmの吸光度, ○ウロキナーゼ活性, □; エンドトキシン(μg/ml)
分画; 1.5ml/本, 流速; 2ml/h

カリクレインなど他のトリプシン様プロテアーゼからの分別も容易に出来る効率的な精製法として実用化され、医薬としてのエンドトキシン・フリーなウロキナーゼの工場生産に大変活躍したとの事です(図24参照)。

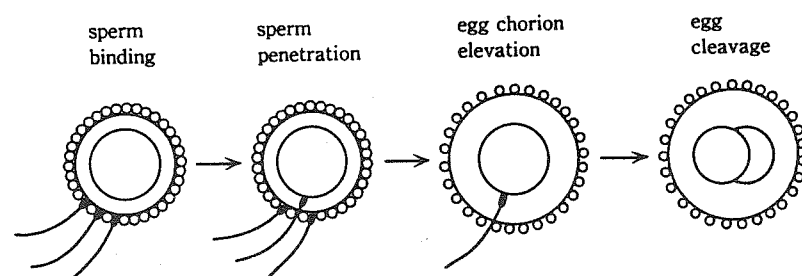


図 25 マボヤの受精プロセス

表 4 Inhibitory effects of leupeptin and its analogs on vitelline coat elevation of ascidian eggs induced by Ca^{2+} ionophore

Argininal Compound	Concentration	
	3.7 μM	11 μM
Z-Phe-Leu-ArgH	+	+
Z-Val-Pro-ArgH	±	+
Ac-Leu-Leu-ArgH*	± ~ -	+ ~ ±
< Glu-Leu-ArgH	± ~ -	+ ~ ±
Ac-Phe-Leu-ArgH	± ~ -	+ ~ ±
Z-Phe-ArgH	-	±
Z-Pro-ArgH	-	-

* Leupeptin

3-5. 受精現象とプロテアーゼ

第2の例は、表4に示したようないろいろな種類のロイペプチン・アナログ(この場合はすべて固定化していない形のもの)の添加効果を比較して、受精現象のある段階におけるプロテアーゼの役割を解析したというものであります。この実験では、マボヤとよぶ海産無脊椎動物の受精を対象にしました。これがいくつかの特徴をもつ有利な研究対象であることをお話する時間的余裕はとてありませんが、その受精が成立するまでにたどる道筋を、四つの段階に分けた形で図25に示しましたので、それを簡単にご説明いたします。最初は精子が卵を取り囲む保護層(濾胞細胞、テスト細胞および卵黄膜からなる)へ結合する段階、それからこの層を突破して進入してゆく段階です。次いで、どれか1匹の精子が卵黄膜(英語では vitelline coat または chorion) 通過の一番乗りをすると、膜の内側に存在する表層粒とよぶ顆粒の崩壊にもなって卵黄膜は上昇し、後からきた精子の通過を許さない形に変化します。いわゆる多精拒否の状況を作り出すのです。その後精子細胞核と卵細胞核との融合、細胞分裂の段階へと進んで行きます。これらの各段階には、それぞれいろいろなプロテアーゼの働きが密接にからんでいるらしい。それを解析しようというのがわれわれの意図した一連の研究であります。ここでは、卵黄膜上昇の段階にのみ目的を絞った仕事について述べさせて戴きます。

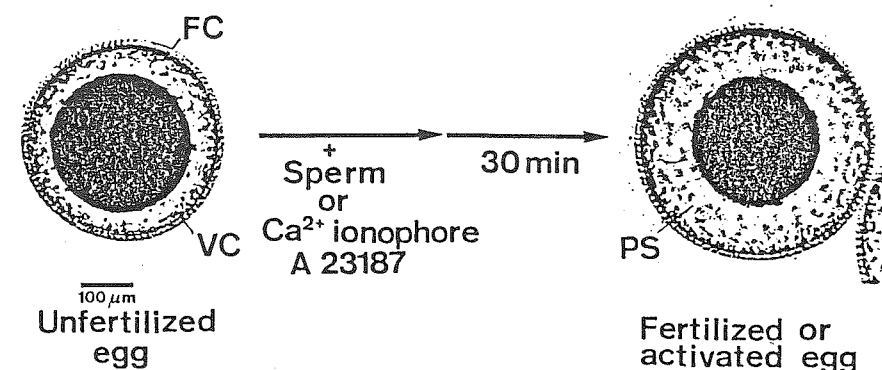


図 26 Elevation of Vitelline Coat of the Egg of the Ascidian, *H. roretzi*

図26中に書き込んである通り、卵黄膜上昇のプロセスは、精子の代わりにカルシウムイオンフォア即ちカルシウムイオンの膜透過を促す物質を使うことによっても発現可能です。このような代用品を使えば、精子側の因子の関与を排除した単純な系を研究対象とすることが出来ます。この系での卵黄膜上昇現象に及ぼす各種ロイペプチン・アナログの添加効果を表4に示し

ました。この実験結果から、おそらく表層粒の中に存在していたある種のトリプシン様プロテアーゼが、このプロセスに重要な係わりを持っていることが想像できます。しかもこのプロテアーゼには、基質のP1 残基ばかりでなくP2、P3、P4 残基をも識別する特性があるらしい。そこでこの想像を確かめるため、マボヤ卵からこのような性質をもつプロテアーゼを単離しようということになったのであります。

表 5 Effects of Leupeptin Analogs on the Purified Trypsin-like Enzyme and on the Elevation of Vitelline Coat

	% Inhibition toward the purified enzyme*	IC ₅₀ values on the elevation of vitelline coat
	%	μM
Z-Phe-Leu-Arg-H	80	0.4-1.2
Z-Val-Pro-Arg-H	73	3.7
Ac-Leu-Leu-Arg-H (Leupeptin)	70	3.7-11
<Glu-Leu-Arg-H	53	3.7-11
Ac-Phe-Leu-Arg-H	38	1.2-11
Z-Phe-Arg-H	38	11
Z-Pro-Arg-H	0	100

*Inhibitor concentration, 1 μM .

得られた精製酵素の活性に対する各種ロイペプチン・アナログの阻害効果を表5に示してあります。予想通り、これらアナログ間の酵素活性阻害度のランクは、卵黄膜上昇に対する阻害度のランクとよく一致しており、この卵由来のプロテアーゼが、マボヤの受精における多精拒否プロセスのどこかで重要な役割を担っている、との考えを裏付けることに成功したわけであります。

この成果は、現在東京工業大学理学部で助教授をしておられる沢田均君の努力によるものでありますが、受精の各段階で大切な働きをしているプロテアーゼ類についての研究は、その後とも横沢助教授を中心とするグループが続けており、興味深いいろいろな新酵素の発見など大きな展開を見せております。

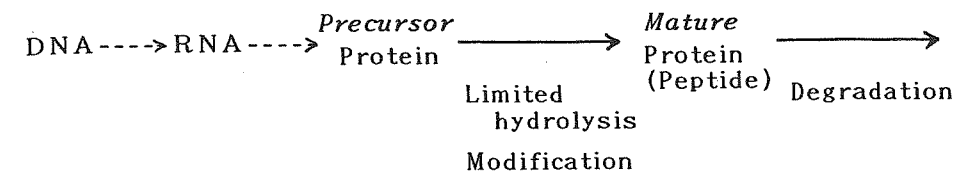


図 27 セントラルドグマ

図27は、よくご存じの分子生物学のセントラルドグマですが、右半分にはプラス α の部分があります。mRNAの読み取り、いわゆる翻訳の作業で作られた蛋白質は、多くの場合前駆体であって、それが限定的な加水分解反応や糖を付加するなどの修飾反応を受けて、初めて実際の機能蛋白質として成熟するということを実線の矢印で示したつもりであります。ここでの限定的加水分解におけるプロテアーゼの役割が、最近いろいろな場面でクローズアップされるようになってきました。いまお話し致しました受精もその場面の一つであることは言うまでもありません。横沢助教授は現在神経伝達作用ペプチドの生成や分解を司る脳内プロテアーゼの研究にも精力的に取り組んでおられ、一層の発展を期待している次第であります。

3-6. 固定化アンヒドロトリプシンによるC末端ペプチド断片の単離とそれによって裏付けられたファージ尾鞘蛋白質の一次構造

- 1978年: F. Sanger ら
バクテリオファージ ϕ X174 DNAの一次構造決定
(塩基配列からの蛋白一次構造推定が一般化)
- 1981年: M. W. Hunkapiller ら
気相・蛋白質アミノ酸配列自動分析機の開発 (市販品が爆発的に普及)
- 1982年: T. R. Cech ら
リボザイム(RNA酵素)の提唱; RNAスプライシングでの働き
- 1985年: D. M. Carrington ら
コンカナバリンAの成熟過程に蛋白質スプライシングが存在
- 1989年: A. Yoshida ら
グルコース-6-リン酸脱水素酵素(赤血球)合成に2種類のmRNAが必要

図 28 流れ その3

さて1978年、Sangerはバクテリオファージ ϕ X174DNAの塩基配列順序を発表しました(図28参照)。これが、天然に存在する遺伝子DNAの全一次構造解明第1号であります。DNAの一次構造が分かれば、それによって指令される蛋白質の一次構造も分かる。必ずしも今までのように、蛋白質を相手にした泥臭い作業をしなくとも良いし、仕事の大幅なスピードアップにもつながるということで、最近では、遺伝子DNAもしくはcDNAについての解析結果から、蛋白質の一次構造を間接的に判定した論文の方が、直接決定の論文よりも多くなってきております。しかし、間接法で得られるのはあくまでも推定構造ですし、その構造も、先のセン

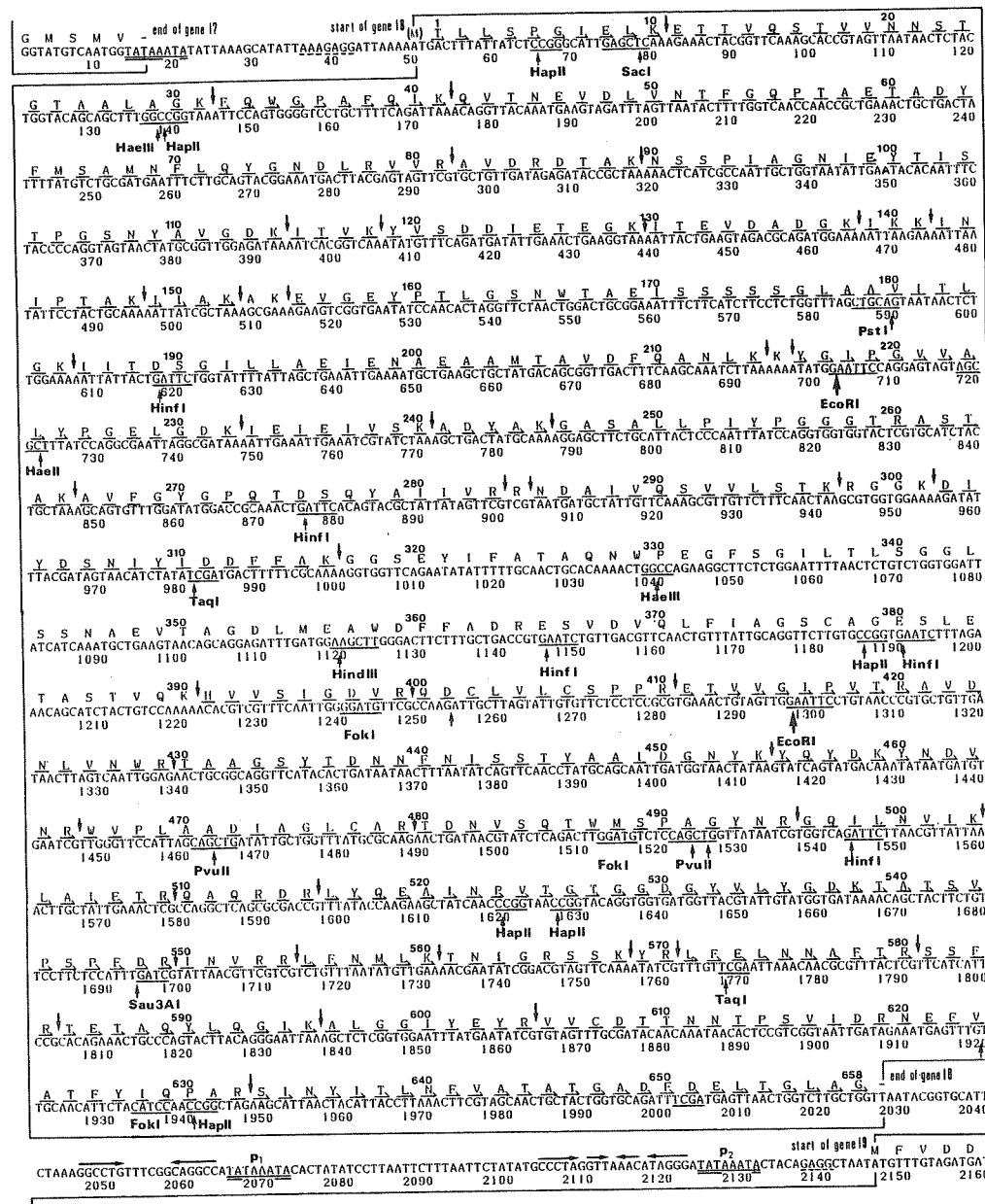


図 29 バクテリオファージT4遺伝子18の塩基配列順序と、それから推定される尾鞘サブユニット蛋白質のアミノ酸配列順序。この実験では、同時に遺伝子19（尾管蛋白質の遺伝子）の塩基配列も解析できたのであるが、紙面の都合で、それはこの図の右下に始まりの部分15残基分だけ記すのに留めた。

トラッドグマの図式（図27）における蛋白質前駆体についてのものです。成熟蛋白質を直接の対象として、少なくともN、C両末端付近のアミノ酸配列順序を決定して、推定構造の裏付けを取ることが必要なのですが、N末端配列分析はしてはいても、C末端配列まで調べている研究者は殆どおりません。それは、N末端配列決定にはEdman法という良い方法があり、特に1981年、Hunkapiller博士らが気相の反応条件を使って極微量化に成功した自動化機械を発表（図28参照）、これが操作も簡単で信頼性も高い市販品として忽ち世界的に普及したのに対して、C末端配列決定のためには依然として信頼できる方法がなかったからであります。

図29に示したのは、バクテリオファージT4尾部の外側円筒すなわち尾鞘のサブユニット蛋白質に対する情報を担う遺伝子（gene 18）の塩基配列であります。この蛋白質は分子量7万と大きく、蛋白質側から直接その一次構造決定をするのは中々の大仕事なので、われわれの研究室でもDNAから間接的に決めることにしたわけです。有坂君が行った実験であります、この結果から、尾鞘ばかりでなく内部円筒つまり尾管のサブユニット尾管蛋白質の一次構造も一挙に知ることが出来ました。しかし、この種の分析は初めての経験で、塩基の読み落としなどどこにあるかも知れない。蛋白質側からの裏付けデータが是非欲しいところです。N末端付近のアミノ酸配列はすぐ分かりましたが、C末端近傍の解析はやはり容易ではありません。

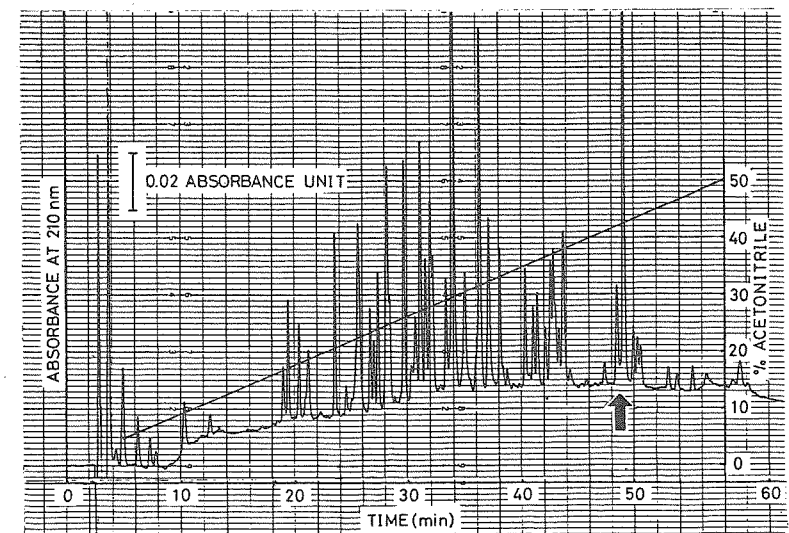


図 30 逆相系高速液体クロマトグラフィーによるT4ファージ尾鞘蛋白質のトリプシン分解物の分離（矢印は固定化アンビドロトリプシンカラムの素通り画分から回収されたC末端ペプチド断片を示す）

図30は、尾鞘蛋白質のトリプシン分解物を逆相系的高速液体クロマトグラフィーで分析した結果を示したものです。沢山のペプチド断片に分かれており、この中に元の蛋白質でC末端部

を占めていたものがある筈ですが、それがどれなのかを見分けることは至難の技です。これだけの数の中から、どのようにしてそれを効率的に選り出すか。この難問を解く鍵として、アンヒドロトリプシンの特性を思い出したのです。

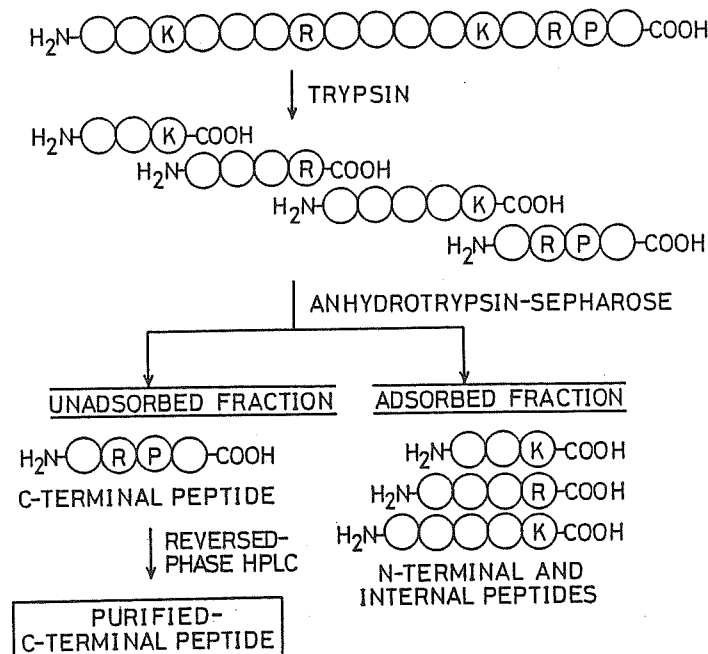


図 31 STRATEGY FOR SELECTIVE ISOLATION OF C-TERMINAL PEPTIDES FROM TRYPSIN DIGESTS OF PROTEINS

蛋白質をトリプシン分解したときに生成する沢山のペプチド断片は、通常、C末端に由来するもの以外すべてアルギニンまたはリシンをC末端にもつ所謂生産物型ペプチドであります。ですから、図31に示したようにトリプシン分解物を固定化アンヒドロトリプシンのアフィニティークロマトグラフィーにかけると、生産物型ペプチドはどれも吸着し、C末端由来のペプチドだけが素通り画分に現れるはずです。この方法で、T4ファージの尾鞘蛋白質トリプシン分解物中に含まれるペプチド断片の分離図(図30)中、矢印をつけたのが求めるC末端由来のものであることを突き止め、その全アミノ酸配列を自動Edman分析機によって決定しました。

```

1  TLLSPGIELKETTVQSTVVNNSTGTAALAGKFQWGPAPQIKQVTNEVDLV
51  NTFGQPTAETADYFMSAMNFLQYGNDLRVVRAVDRDTAKNSSPIAGNIEY
101 TISTPGSNYAVGDKITVKYVSDDIETEGKITEVDADGKIKKINIPTAKII
151 AKAKEVGEYPTLGSNWTAEISSSSSGLAAVITLGKIIITDSGILLAEIENA
201 EAAMTAVDFQANLKKYGIPGVVALYPGELGDKIEIEIVSKADYAKGASAL
251 LPIYPGGGTRASTAKAVFGYGPQTD SQYAIIVRRNDAIVQSVVLSTKRGG
301 KDIYDSNIYIDFFAKGGSEYIFATAQNWPEGFSGILTSLGGLSSNAEVT
351 AGDLMEAWDFFADRESVDVQLFIAGSCAGESLETASTVQKHVVSIGDVRQ
401 DCLVLCSPPRETVVGIPVTRAVDNLVNWRTAAGSYTDNNFNISSTYAAID
451 GNYKYQYDKYNDVNRWVPLAADIAGLCARTDNVSQTMSPAGYNRGQILN
501 VIKLAIETRQAQRDRLYQEAINPVTGTGGDGYVLYGDKTATSVPSPFDR I
551 NVRRLFNMLKTNIGRSSKYRLFELNNAFTRSSFRTEETAQYLQGIKALGGI
601 YEYRVVCDTTNNTPSVIDRNEFVATFYIQPAR SINYITLNFVATATGADF
651 DELTGLAG

```

図 32 Primary Structure of T4 Phage Sheath Protein (gp18)

図32の枠で囲った部分がこうして捕まえたC末端ペプチド断片です。そのアミノ酸配列はDNA側の分析結果から推定されていた配列に一致し、658残基全体にわたっての推定一次構造の正しさを裏付けることが出来ました。同様に、DNA分析から推定されていた尾管蛋白質の一次構造も確認致しました。

すでにお話した通り、ファージの尾部は感染に際して尾鞘の急激な収縮をおこす、すなわち尾鞘のサブユニット蛋白質には動的な四次構造形成というおもしろい問題があります。収縮性尾鞘をもつファージはこの他にもいろいろ知られています。ファージではありませんがピオシンRの尾鞘ももちろん収縮します。これらの尾鞘蛋白質の内、分子量が分かっているものを並べてみますと、T4ファージのものが一番大きく、ピオシンRの尾鞘(約4万)が最小でありました。ですからピオシンRの尾鞘蛋白質の中には、動的四次構造形成に必要な要素が一番無駄なく詰め込まれていると考えられます。それまで当研究室でのピオシンR研究は、熊崎君を中心として推進されてきた尾繊維に関するものなどが主体だったのですが、ここでその尾鞘蛋白質の一次構造を解析する必要にも迫られたわけです。

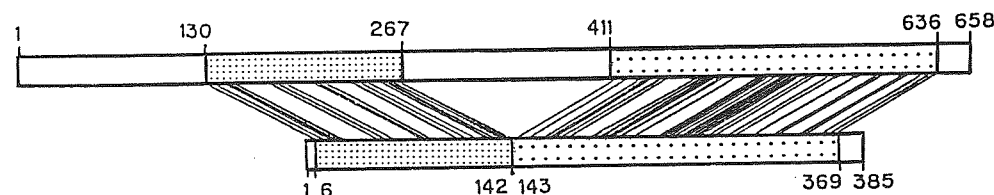


図 33 T4 ファージ尾鞘蛋白質(上)とピオシンR尾鞘蛋白質^{*}(下)との間に見られる一次構造上の相同領域。同一アミノ酸を直線で結んだ(IDEASによる検索結果)。
^{*}ピオシンRは、PS17 ファージに酷似したファージの頭部欠損変異株であると考えられており、両尾鞘蛋白質の構造もよく似ている。ここでは先に一次構造解析の進んだPS17 ファージ尾鞘蛋白質についてのデータに基づいて示した。

解析結果をT4 ファージ尾鞘蛋白質の一次構造と比較した処、両者の間には、かなりの長さの類似構造領域が2箇所見つかりました。この2箇所を抜き出して関係づけたのが図33です。予想通り、ピオシンRの方には、この2箇所以外のエクストラの領域が殆どなく、必須要素をきわめてコンパクトにまとめた形であることを思わせます。

さて、話を固定化アンヒドロトリプシンによる蛋白質のC末端断片単離法に戻させて戴きます。この方法が他の蛋白質に対しても広く適用できることは、熊崎君のその後の努力で明らかになってきました。蛋白質の中には、もともとアルギニンやリシンをC末端にもっているものもあります(例えば α_1 -アンチトリプシン)。そのような蛋白質では、このスライドの方式によってそのC末端ペプチド断片を単離することはできません。しかしその場合でも、問題の蛋白質をトリプシンではなくキモトリプシンで分解すれば、図34に示した通りの方式で、C末端由来のペプチド断片が得られるのです。

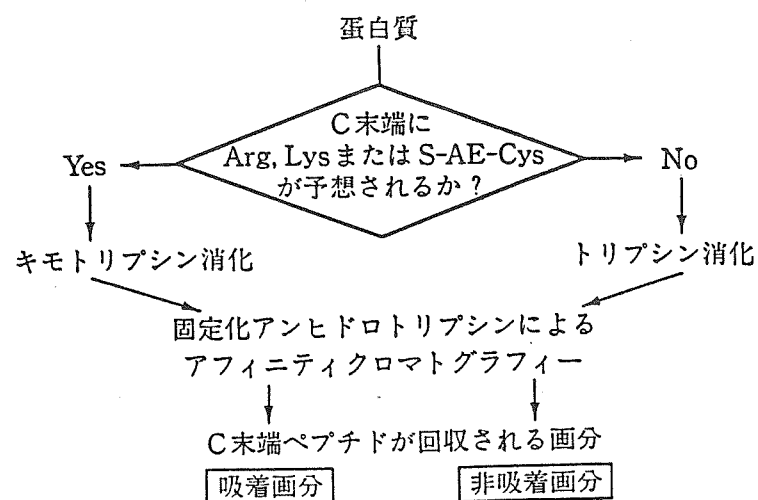


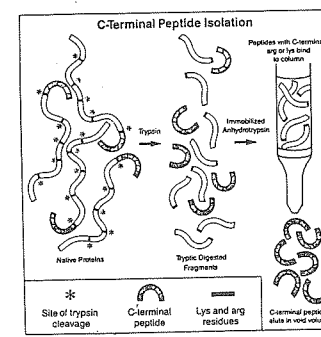
図 34 蛋白質のC末端ペプチド単離のスキーム

固定化アンヒドロトリプシンの一般的適用性が知られるようになると共に、他の研究機関からこの試料の提供に対するご要望が次第に増加し、自分の処で細々と作っているのではとてもそれに応じきれなくなっていました。そこで一昨年春からある国内企業に作成頒布をお願いすることにしたのですが、昨年秋からは外国企業経由による更に広い頒布へと発展することになりました。図35はその外国企業が作った説明用イラストで、お笑い草までにご覧下さい。

GO FOR THE GOLD....

Immobilized Anhydrotrypsin lets you isolate your valuable C-terminal peptide.

Are DNA deduced protein sequences accurate?
 Using a protein's complementary DNA to deduce a protein's amino acid sequence is an indirect method. Because it is indirect, there should be some doubt about the accuracy of the deduced sequence. If the protein of interest had undergone any post-translational modification, the deduced sequence would be a precursor, not the actual protein. In addition, mistakes can be made in determining the reading frame of a long base sequence.
 To test the accuracy of a deduced amino acid sequence, it is helpful to determine the N- and C-terminal sequences. N-terminal sequencing is accomplished by traditional Edman degradation. C-terminal sequencing is more difficult. Carboxypeptidase can be used to sequence two or three C-terminal amino acids, but this may not be sufficient.
C-terminal peptides...worth their weight in gold.
 Immobilized Anhydrotrypsin is used to isolate the C-terminal peptide from a tryptic digested protein. Once the C-terminal peptide is isolated, Edman degradation is used to sequence



it. Then the C-terminal and N-terminal sequences are compared to the deduced protein sequences.

Anhydrotrypsin—How it works.
 Anhydrotrypsin is trypsin that has been altered at the active site residue, serine 195. Anhydrotrypsin is catalytically inert and selectively binds peptides that have Arginine, Lysine, or S-Amino-Ethyl Cysteine at their C-terminus. Free amino acids, dipeptides or peptides that do not have these amino acids at their C-terminus will not bind Anhydrotrypsin.
 Trypsin selectively cleaves proteins at the carboxylic acid side of Arginine or Lysine, resulting in peptides which have a C-terminal Arg or Lys. If the C-terminal amino acid of the protein is neither Arg or Lys, the peptide containing the C-terminus will not bind Anhydrotrypsin. Applying the tryptic digested protein to a column of immobilized Anhydrotrypsin results in the C-terminal peptide eluting in the void volume, while the remainder of the peptides are bound to the column (Figure 1). The C-terminal peptide can then be sequenced. The remainder of the peptides can be eluted and the column reused.

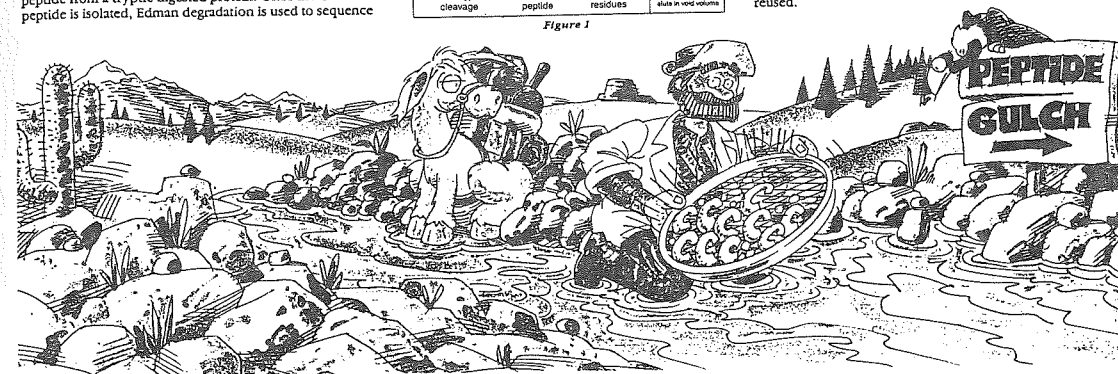


図 35 GO FOR THE GOLD....

考えてみますと、アンヒドロトリプシンが生産物型ペプチドに対する強い特異的結合能を獲得しているという事実は、北海道産プロタミンのトリプシン分解生産物を使うアフィニティクロマトグラフィーでこれを精製しようとしたからこそ発見できたのです。そしてこの発見なしには、C末端アミノ酸配列決定法の開発はあり得なかった筈です。昔、江上先生から「真似ごとでない仕事をしようと思ったら、自分が発見した事実を大切にしろ」とのお教えを戴きました。不肖の弟子ではありますが、私からも若い皆さんに同じことをお伝えしたいと思います。

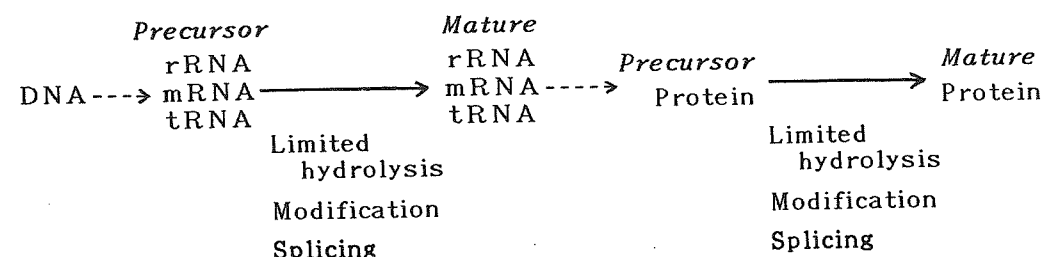


図 36 セントラルドグマ (改訂版)

4. おわりに (新しい流れのほとりに立って)

もう一度セントラルドグマの図を見ていただきます。今度は図36で、この図にはRNAのところにも前駆体から成熟型へのプロセスがあるという主旨の矢印を付け加えてあります。このプロセスには限定的加水分解や修飾に加えてスプライシング (すなわち鎖を切ってまた別の所と繋ぎ合わせる反応) もあること、この種の反応に関連してRNA酵素即ちリボザイムの存在がクローズアップされ、その発見者の Cech 博士と Altman 博士とが昨年度のノーベル賞を授賞したことなど、皆様もよくご存じの通りであります (図28参照)。しかし、図36には、蛋白質前駆体からの成熟プロセスのところにもスプライシングの文字が書き加えてあることに不審の念を抱かれた方も多いのではないかと思えます。蛋白質でのこのスプライシング反応は、阿部勇吉君を中心に我々が長年研究してきたタチナタマメのレクチン、コンカナバリンAにおける新しい問題として、最近にわかに注目を集めつつあるものです。この蛋白質の前駆体成熟に単なる限定的加水分解だけでなくスプライシングも必須な過程として介在しているということであります。このことは1985年に出された Carrington 博士らの研究報告がその端緒となっておりますが、昨年 City of Hope 研究所の吉田昭博士が示された赤血球のグルコース-6-リン酸脱水素酵素の合成には2種類のmRNAが必要であるという事実も、ペプチド鎖におけるスプライシング反応が広く存在していることを示唆しております (図28参照)。マメの場合、このスプライシング反応にはアスパラギン残基特異的エンドペプチダーゼが重要な役割を果たしていると考え、阿部君たちはすぐその研究に着手しました。すでに本酵素のしっぽを確実に捕まえたという段階にまで入っておりますが、その全容を明らかにするにはもう少しの努力が必要で、私と致しましても乗りかかった舟であり、新しい一分野の立て役者となりうるこの酵素の成長に今後も何らかの形で寄与して行きたいと考えております。

もう一つ、私には明年9月に迫った International Symposium on Affinity Chromatography and Biological Recognition の横浜開催に関する仕事が残っております。これは、昔NIHの Anfinsen 研でアフィニティークロマトグラフィーの先駆的研究に直接携わった Wilchek 博士のお世話で昨年秋開かれたイスラエル会議の後を引き継ぐ形の、第9回

会議に当たるものであります。まだまだ多くの方々のお支えなくしては立って行けない身でございます。

何はともあれ、長い間皆様のご厚情のおかげで充実した生活を続けて来る事ができました。本当に有難うございます。また本日は、かつて生物化学研究室で活躍された多くの方々のお名前を当然お話すべきであるのにもかかわらず、時間の関係で省かせて戴きました。御礼と同時に詫言申し上げます。最後に薬品生物化学講座を代表致しまして、23年間、この講座に寄せられました絶大なご支援、心から感謝申し上げます。



付 記

時間が限られていましたし、また出来るだけ1本の筋にそった話をさせて戴こうと考えたため、この23年間、薬品生物化学講座で展開されてきたプロテアーゼ以外の以外の研究内容は、大幅にカットせざるを得ませんでした。これらのものをも含め、すべての研究成果が、同講座に現在在籍中もしくはかつて在籍されたスタッフ、大学院生、学部卒研究生の汗の結晶であることは言うまでもありません。他講座、他機関研究室の皆様のご協力で初めて成立した研究もかなりあります。特にコンカナバリンAに光化学反応を適用して、元来、糖結合価数4の4量体分子であったものを1価単量体分子に誘導し、それが各種細胞に対して示す新しい作用の解析を行った一連の研究においては、非常に広範囲の方々のお世話になりました。北大薬学部の中に限っても米光幸先生、浜田辰夫先生、板谷幸一先生（現札幌医大）、加茂直樹先生のお名前があがって参ります。私にとって誠に楽しい実り多いお付き合いをさせて戴きました。皆さん本当に有り難うございます。

なお、われわれの講座の幼年期を支えて下さった故畔上政雄（助教授）、故金沢正道（助手）両博士のお仕事ぶりについて、いくら時間の制限があったからと言って、最終講義の中で一言も触れなかったことは大変悔やまれます。畔上博士はバクテリオファージ ϕ X174 DNAの複製について、金沢博士はトリプシンの特異的化学修飾について大きな成果を上げられました。殊に、 ϕ X174 DNAの非宿主細菌へのトランスフェクションに関する畔上博士の論文[Nature, 252, 319(1974)]は、現在隆盛を極めている遺伝子操作研究の先駆けとして位置付けされるべきものであり、その後の大きな発展が期待できた方のご妖逝には、今となって益々痛惜の念がつのります。

随 想

大学卒業と同時に、その頃新しく蛋白質の研究に挑戦しようとしておられた安藤鋭郎先生の研究室の一隅に仕事の場を与えていただいていた以来、早いものでもう38年近くの間、蛋白質の構造-活性相関の研究を続けて来たことになります。振り返って見ると、これだけの長い間、研究推進の主力となっていた実験手段は終始クロマトグラフィーであったことを、つくづく思い知らされます。研究を始めて間もなく入った新知識は、戦時中英国で開発された濾紙クロマトグラフィーとよぶ方法がアミノ酸の分離に素晴らしい性能を発揮すると言うものでした。早速やってみようと思ったのですが、当時はニンヒドリンがまだ市販されておらず、先ず自分で合成することから始めなくてはなりません。濾紙も研究室には丸型のものしかなかったので、東洋濾紙の本社に行き大きな四角い濾紙を分けてもらいました。ようやく初めてクロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリンを吹きかけてからオープン中で加熱している間の待ち遠しさ、取り出した濾紙の上にアミノ酸の紫色の斑点がいくつもきれいに分れて見えた時の喜びは、今でも鮮明に思い出されます。その後しばらくして、米国のStein、Moore両博士のイオン交換クロマトグラフィーによるアミノ酸定量分析の論文に接しました。これも自分のものにしたと言ふことで、純水製造用の大粒のカチオン交換樹脂をすり潰してカラムにつめ、自家製のフラクションコレクターと、これも自家製のニンヒドリン比色用吸光度計とを使ってまかりなりにも論文通りの実験を行ない、ニシン精子プロタミンの組成分析を実施したのでした。プロタミンのトリプシン分解ペプチドのイオン交換クロマトグラフィーにも成功しました。ただし一回の実験に一週間はかかるという悠長なものでした。



研究室に初めてベックマンの全自動アミノ酸分析計が入って来たのは昭和35年春のことです。腕組みをしていても記録計の上にクロマトグラムが書かれて行く、今なら何でもない事が当時は全く驚異で、一つのアミノ酸のピークが出終る迄20分以上もかかるのに、飽きずに記録計のペンの動きを眺めていたものです。その年の夏、チャンスに恵まれて米国NIHに留学しました。ボスのWitkop博士に与えられた研究対象はグラミシジンAというペプチド性抗生物質です。その頃 Witkop 研には自動アミノ酸分析計がまだ無かったので、私は丁度導入されたばかりのガスクロマトグラフ装置に目をつけました。アミノ酸のアミノ基をDNP化、カルボキシ基をエステル化すればガスクロマトグラフィー出来ることを発見し、早速グラミシジンAの組成分析に適用したわけです。この方法では、記録計ペンの動きはアミノ酸分析計のものより遥かに早く、一分間の内に一つのピークが書き出されてしまいます。それを見ながら、このような迅速化をペプチドの分別にまで適用できれば、蛋白質の構造研究はぐんと容易になるだろう、そんな夢をふくらませたりしたものでした。しかし、まさか蛋白質のクロマトグラフィーがTSK-GELのおかげで同じように速くなるなど、とてもそこ迄思いを致すことは出来なかったのです。

今、蛋白質の構造-活性相関の研究はますます重要性を高め、全く新しい局面を開きつつあります。遺伝子操作技術の急速な進展もさることながら、私がNIHにいた頃画いた夢を遙かに凌駕するHPLCのすばらしい威力がその裏付けになっていることは言うまでもありません。今後10年間にHPLCがどんな進歩を遂げ、蛋白質研究からどのような成果が上がるか、全く楽しみです。

道ばたで拾ったコイン

石井 信一

北海道大学薬学部

学部を卒業してすぐ、安藤鋭郎先生のお導きで蛋白質研究の道に入ってから、ちょうど40年になる。最初の研究対象は魚類の精子核にあるプロタミンとよぶ小型の蛋白質。組成も単純なため、当時の幼稚な実験技術でも解析可能だろうとの期待で選ばれた。しかし、組成は簡単でも全アミノ酸残基の2/3がアルギニンであるという点で、むしろ大変な難物だった。ともかく、この蛋白質のトリプシン消化で生じる多種類のアルギニン含有ペプチドを分離する方法の確立から、地道に仕事を進めて行ったのであるが、この際、トリプシンが如何に厳格な基質特異性と高い反応効率とで蛋白質を消化して行くのかを実感して、機会があれば酵素作用の仕組みについても研究したいとひそかな希望を抱いたものである。

昭和42年、縁あって現職につく機会に恵まれた。縁とは、私が研究生活に入ったばかりの頃、プロタミンの原料となる鮭の白子の採集のために単身訪れたゆかりの地の職だと言う意味も含まれている。新研究室のテーマの一つとしてトリプシンを選んだことは言うまでもない。その頃世界的に注目され始めていたアフィニティクロマトグラフ法を活用して、この酵素の基質特異性発現機構を解析するのが目標である。クロマト用吸着体としては、それまでの研

究体験を生かせるし第一安上がりだという理由で、プロタミンのトリプシン消化物中からC末端にアルギニンを持つペプチド(AP)を分け、これをアガロース粒子に固定化して作った。幸いこのAPアガロースはトリプシンの特異的吸着体として優れた性能を示し、この酵素と低分子インヒビターとの相互作用の定量的解析にも威力を発揮した。

アンヒドロトリプシンとよぶトリプシンの誘導体がある。活性中心を占めるセリンから、その水酸基を化学処理により脱離させて得たもので、触媒活性は失っているものの、基質との特異性結合能に関しては元のトリプシンのままと予想された誘導体である。上に述べた目標に向けて、基質や蛋白性インヒビターにまで研究対象の幅を広げるのには、トリプシンよりもアンヒドロトリプシンを使った方がよからう、と考えてこれを作ることにし、その精製にAPアガロースのクロマトを利用した。ところが意外にも、トリプシンとこの誘導体とのクロマト的挙動が全く違うという結果が得られたのである。誘導体の方が吸着度が弱いというのなら特に驚かないけれども、事実はその逆であった。APはトリプシン反応の生産物である。この発見が契機となって、アンヒドロトリプシンは、特異的基質との結合においてトリプシンとほぼ同じ能力を示すが、

生産物(C末端にアルギニンまたはリシンを持つペプチド)との結合能では遙かに優れていることを証明できた。10年余り昔の話である。

近頃は、蛋白質の一次構造をそのDNAの塩基配列分析から調べることが多い。しかしこの結論はあくまでも推定一次構造であって、直接その蛋白質から少なくともN、C両末端近傍のアミノ酸配列情報を得て、この推定を確認する必要がある。N末端配列決定にはエドマン法という優れた方法があるけれども、C末端配列分析には信頼できる方法はなく、エアポケットの状態が残されている。そこで10年前の発見の活用を思い付いた。固定化アンヒドロトリプシンは、蛋白質のトリプシン消化物中の大部分のペプチドを吸着するだろう、しかしC末端に由来するペプチドだけは吸着しないはず、後者を分取してエドマン分析すれば、元の蛋白質のC末端近傍配列がわかる、とのアイディアである。実際この手法は大変うまく働き、すでに他研究室からのものも含めて多数の成功例が得られている。各地でこの方法の紹介をしたあと、どのような経緯でこんな奇妙な現象を見つけたのかとよく聞かれる。そんな時私は「道ばたで拾ったコインのようなもの」と答えるのが常である。金貨なのか銅貨なのかは皆さんに決めて頂くより他ないと思いながら。

オクテット

早いもので、私が蛋白質化学の研究の道をたどり始めてから今年でちょうど40年。言うまでもないことだけれども、研究環境の変化はこの分野でも非常に大きい。初期には徒歩で、それも少し歩いては一服という調子であったのが、今は新幹線で目的地に向かって一気にすっとばす、といったくらいの違いはある。活動範囲の拡大も著しく、今や核酸化学との間の壁も随分と薄くなってしまった。

新しいデータが素晴らしいスピードで集積されつつある現状は大変喜ばしい反面、気になることがある。それは、少なくとも私どもが関係している分野で走っている新幹線の車両はすべて外国製ではないだろうか、ということである。日本人は原理の発見には不得手だが、その応用・技術化はお手のものと言われるが、残念ながらこの分野では、どちらの面でも日本人の(少なくとも日本人が日本で発揮した)力がまだまだ弱すぎる。べつに国粋主義で言っているつもりはない。欧州を旅行する度に、科学的風土の豊かさを痛感する。底力をつけるには、もっと歴史が必要なのだろうか。

私は、これまで何人もの恩師に恵まれている。40年前に蛋白質化学の道にお導き下さった安藤鋭郎先生は、勿論第一の恩師であるが、故江上不二夫先生からも多くのことをお教え頂いた。たとえば「実験から計画通りの結果が得られなかったら、むしろ喜びなさい。計画通りならそんな実験をする必要はなかったのです。」と言う主旨のお言葉は印象に強い。ところで、私共は10年ほど前、トリプシンの化学修飾実験をしていて非常に奇妙な現象を発見し、最近この現象の原理を活用した新しい技術を開発することにも成功した。この技術は、蛋白質研究行きの新幹線で検札の役を果たすのに好都合と言った程度のごくささやかなものではあるが、先日ある雑誌から「研究うらばなし」という欄の執筆を依頼された機会に、この発見の経緯を題材とした小文を書き、最後に、これは「道ばたで拾ったコイン」のようなものと締めくくった。実験結果が全く予想はずれで、頭を抱え込んでいる時、ふと足もとを見直すような気分で発想を切り替えた結果、初めて見だし得た事実だからである。

超高速で走っている新幹線の車窓からよく見えるのは遠くの景色だけである。この景色は誰も見ている。列車が故障でストップした時こそ、普段は問題にされない線路わきの美しい花を見付けるチャンスかも知れない。勿論一服ばかりしていた昔の方が重要な発見が多かったと言うつもりはない。速度は大事である。ただスピード感に酔ってばかりいないで欲しい。最近のバイオブームで蛋白質の研究にたずさわる若い方々の数が激増したことは非常に心強い。願わくば、単なるブームに終わらせず、足もとにも注意しながら独創力を身に付けて、早く自作の飛行機で世界の空を飛び回ってもらいたい。

石井 信一

SHIN-ICHI ISHII

北海道大学薬学部教授

編集後記

薬学部薬品生物化学講座教授石井信一先生は、去る3月31日、北海道大学を定年退官されました。これに先立って、3月3日には、本学部関係者をはじめ多数の方々に御参加をいただき、最終講義ならびに記念祝賀会が盛大に行われました。ここにあらためて、御参加下さいました方々に厚く御礼申し上げます。

本業績集の「蛋白質研究の大きな流れにそって」はその時の講義録で、約40年にわたる石井先生の研究活動の中で、主に北海道大学での23年間の研究成果を中心にまとめられております。当講座の卒業生にとっては、在籍中に行った研究について、講座での研究の流れに於ける位置づけに新ためて思いあたるところがあるのではないのでしょうか。それにしましても、先生御自身も述べておられますように、広範な研究成果について1時間余りでまとめるということは至難の技であり、そこで触れられなかった成果も多々ございます。それについては論文リストを参照していただきたいと存じます。

先生は生物有機化学の分野から御自身の研究をスタートされ、当時まだ創世期であった蛋白質化学の分野に進まれました。北海道大学での先生の研究対象は多岐にわたっておりますが、常に「蛋白質の分子認識」という主題のもとに、蛋白質化学に限らず、生物物理化学的、分子生物学的手法も取り入れられ、多くの業績をあげられました。

御退官とはいえ、明年横浜で開催される予定の「アフィニティクロマトグラフィー及び生体分子識別に関する第8回国際会議」をひかえ、主催者として御活躍中でありまして、やり残されたプロテアーゼの研究に今後とも取り組んでいかれると伺っております。

末筆ながら、石井先生はじめ、皆様方の御健康と御活躍を心からお祈り致しまして、ご挨拶といたします。

1990年 5月

石井信一教授定年退官記念会

石井信一教授退官記念 業績集

1990年 6月発行

発行者 札幌市北区北12条西6丁目
北海道大学薬学部薬化学教室
印刷 北海道大学生協同組合
印刷事業部 「北大印刷」