

21世紀初頭の2002年は我が国分析化学界にとって特別で、真に喜ばしい年となりました。それは、ノーベル化学賞が分析化学分野の田中耕一氏、John B. Fenn氏、Kurt Wüthrich氏に授与されたのみならず、物理学賞・小柴昌俊氏のご業績も分析機器と深くかかわっていたからです。「ぶんせき」誌も、この慶事に鑑み、昨年11号に柘植 新本会会長の祝辞、12号に大谷 肇、佐藤浩昭両氏による特別記事、本年1号の談話室にも関連記事を掲載しました。本号からは、特別連載として、3人のノーベル化学賞受賞者とその周辺科学者によって達成された、タンパク質をはじめとする高分子の構造解析の進歩をさらに多角的に紹介いたします。また、田中氏については、同氏の小学校、大学の恩師にご執筆いただいた玉稿も紹介します。さらに、大型光電子増倍管の開発にかかわる記事も予定しています。

「ぶんせき」編集委員会

## 特別連載



## 分析化学分野へのノーベル賞

# タンパク質の構造解析

その現状と将来展望

大西正健

### 1 はじめに

編集委員会からいただいた趣旨を踏まえ、1)タンパク質構造分析の現状、2)化学賞受賞者三人の違い、を考究しよう。受賞対象はいずれも高分子分析で、すでに本誌でも詳報されている<sup>1)2)</sup>。高分子には、合成高分子と天然高分子が含まれるが、天然高分子のうち生物がつくるもの(生物質)を生物高分子(biological macromolecules)と呼んで、鉱物質のものと区別している<sup>3)</sup>。

#### 1.1 生物高分子

従前生体高分子と呼ばれてもきたが、生体機能に直接かかわらない高分子は量的質的に多く、農学や資源化学など産業生物学の領域では看過できない。そこで、多糖質、タンパク質、生物膜、細胞壁、遺伝子も含めて、生物高分子と呼ぼうと日本生物高分子学会が設立された。本稿でも「生物高分子」を用いた。要するに、“生体高分子”とか、“生体高分子化学”はもう時代遅れということである。タンパク質は代表的な生物高分子である。

#### 1.2 タンパク質の構造

主な存在形態には三つある。1)溶解した形。酵素などの球状(globular)タンパク質である。2)繊維状(fibrous)に伸びた形。コラーゲンなどである。3)生物膜(membrane)に設置されて細胞情報(シグナル)の受容と伝達(生物・生命応答)に関与する膜タンパク質。BSEの根源プリオンは有名である。タンパク質の

分析、構造解析と言え、たちまちその存在態様がかかわってくる。ところで、タンパク質の構造とは何か。タンパク質を組み立てるアミノ酸残基の配列順序を一次構造と言う。一次構造が折れ畳まれて立体的な形をつくる立体構造には規則的な形が各種あって二次構造といわれ、二次構造がさらに組み合わせられて三次構造を形成する。さらに、複数個のタンパク質が集積して四次構造となる。集積するタンパク質の各個を単量体(サブユニット)と言う。二次構造~四次構造を一纏めにして高次構造と言っている。したがって、どの構造観点なのかが問題となる。

### 2 タンパク質分析の現状

各種技法が開発されたが、1)ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)、2)キャピラリー電気泳動(CE)、3)高速液体クロマトグラフィー(HPLC)が、現在専ら用いられる。ほかに、光散乱測定も有用な手法である。

#### 2.1 PAGE

種類と分子量を検するが質量は求まらない。アクリルアミドに可塑剤を添加し重合させて高分子ゲルを作製する。ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を添加するSDS-PAGEがよく用いられるが、四次構造は解かれ単量体を分析することになる。native PAGEと組み合わせると単量体の数と種類が検定できる。泳動に要する時間は60分ほどで、ゲルの調製、泳動後のタンパク質染色を含めると時間を要し、1日1検体とみるべきである。試

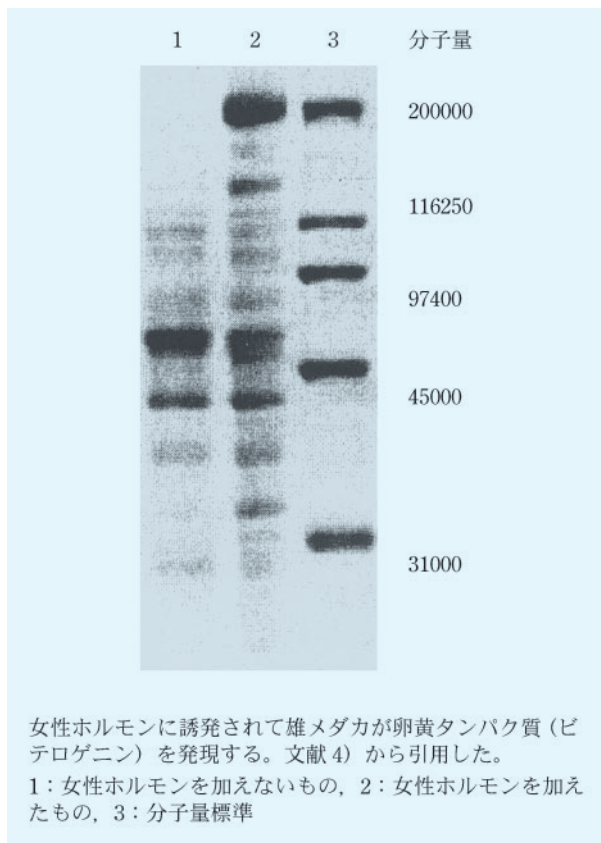


図1 メダカ血清のタンパク鑑定

料は 100 ng, 数  $\mu$ l でよい。染色は Coomassie brilliant blue R250 を用いるが、銀染色で約 10 倍高感度となる。10 cm 四方程度の大きさをもつ装置が重宝され、多くの製品が数万円程度で普及率の高い分析技法である。泳動図を写し絵のように写し取るプロット (blotting) 法も有用である。PAGE の実例を一つ挙げておこう。

雌メダカは女性ホルモンによりタンパク質 (例えばビテロゲニン) を発現する<sup>4)</sup>。もちろん、雄メダカはビテロゲニンを発現する必要がない。ところが、飼育水に ppt レベルの女性ホルモンを投入してみると、数日のうちにビテロゲニンを発現するようになる (図1)。我々はタンパク鑑定と呼んでいる。内分泌攪乱化学物質 (ビスフェノール A, トリブチルスズ TBT など) についても、メダカのタンパク鑑定で攪乱を確認できる。水環境の評価に有用となろう。攪乱化学物質 ppt, ppq の測定は容易でなくても、メダカに発現するタンパク質 (ng オーダー) を測定すれば検出が容易になる。

## 2.2 CE

緩衝液を充填したキャピラリー (シリカ,  $\phi$ 100  $\mu$ m 以下, 80 cm 程度) に試料 ( ~ 数 100 nl) を注入し電気泳動する装置である。泳動時間 30 分ほどで、実験の準備など操作の総時間は PAGE より少ない。CE の原理と操作の詳細は文献で検証していただきたい<sup>5)-7)</sup>。

## 2.3 HPLC

カラムクロマトグラフィーである。PAGE とともに普及率が高い。各社から市販されていて数百万円程度と PAGE より高価である。試料量も PAGE より一桁多く要するが、カラム溶出時間は 40 分ほどで、PAGE や CE とおおむね同じである。紫外・可視吸収、蛍光、屈折率 (RI) などの光学的な特性が検出に用いられ、溶出パターン (クロマトグラム) は自動記録となる。実験操作の総時間は PAGE より格段に少ない。

## 3 タンパク質分析の最先端

タンパク質分析の先端技法とは、1) K. Wüthrich 氏の核磁気共鳴 (NMR), 2) John B. Fenn 氏のエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry), 3) 田中耕一氏のマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOFMS, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) である。

### 3.1 NMR

NMR は溶液系 (液相) で分析できる。これが他二者との決定的な違いである。NMR は酵素反応のように液相で立体構造がどうなのかを究明する有効手段であるが、試料と時間を多く要する難点もある。立体構造といえば X 線結晶解析となるが、結晶は生体と異なっている点に課題が残る。Wüthrich はタンパク質のアミノ酸残基各個に依拠して構造解析を進め、きわめて精密な分析技法の確立に成功している<sup>8)</sup>。TROSY (transverse relaxation-optimized spectroscopy) の手法による液相のタンパク質など生物高分子の立体構造、とくに生物高分子間の相互作用を詳しく解析できる。質の高い多くの論文が発表されていて、日本の研究者との共同研究もみられる<sup>9)-18)</sup>。

### 3.2 ESI-MS と MALDI-TOFMS

ESI-MS (ES 法と略称する)<sup>19)20)</sup> と、MALDI-TOFMS (MT 法と略称する)<sup>21)-26)</sup> は質量分析である。試料をイオン化することは基本的に両者同じである。問題はイオン化の仕方と、イオン化した試料をどう測定するかである。 $z$  個の電荷 (イオン) をもつ質量  $m$  のイオン化物質は電位差  $V$  の電場に置いたとき、エネルギー保存則にのっとって運動する。

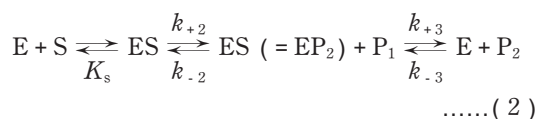
$$1/2 mv^2 = zIV \dots\dots\dots (1)$$

$v$  は速度で  $I$  は定数である。電場をかけてイオン化分子を運動させるわけである。式 (1) は厳密には正しくないが概念は掴めよう。電場を一定の大きさに負荷した装置では運動速度は  $m$  と  $z$  に依存する。ここで、質量と電荷数との比  $m/z$  は質量の単位 Da (dalton) をもつこ

とになり、比が小さいほど  $v$  は大きい。運動速度(時間)に着目した分析の手法が飛行時間型分析 TOFMS である。電場でイオン化するのは両者に共通しているが MT 法では検体にレーザーを照射する。レーザーにどんな効果があるかマトリックスが試料をどう支援するのは文献で確認してほしい。レーザーを使わない ES 法では検体を溶液の形で装置に注入する。これは実験を計画するときの決め手となる。

#### 4 質量分析で観える酵素の反応

では MT 法と ES 法とはどう違うのか。酵素の反応で実検しよう。まず、基質 S は酵素 E に取り込まれて Michaelis 複合体 ES を形成する。ところが、ES から続いて基質 S の断片  $P_2$  が活性部位に共有結合して中間体  $EP_2$  を形成する酵素の反応がある。



三段階機構であり、プロテアーゼが典型例である。問題は中間体  $EP_2$  を実験でどう捕獲するかである。もたもたしては反応が進行してしまい観ることはできない。そこで、迅速反応測定法が必要である。 $EP_2$  が観えるか否かは素過程の速度定数によって決まる。 $k_{+2}$   $k_{+3}$  のとき観えるが、本来の自然基質では、通常  $EP_2$  を直接観ることは困難である。速いことと観る目をもたないからである。仕方がないので、 $EP_2$  と同時にリリースする  $P_1$  を観る工夫をする。パースト法である。専ら  $P_1$  の紫外・可視吸収、蛍光、旋光など分光学的性質に頼る。従前、*p*-ニトロフェノール (NP) 基のような吸収をもつ化合物を合成し偽基質として使用された。

##### 4.1 実証！ MALDI でホスファターゼ反応を観る

酵素ホスファターゼはリン酸化タンパク質(基質)の脱リン酸反応を触媒する。細胞活動に不可欠で、その挙動は生体を診る重要なチェックポイントとなる。そこで *Schizosaccharomyces pombe* のホスファターゼ (Stp 1) を観よう。式(2)で生成物  $P_2$  がリン酸である。したがって、通常的手法では  $EP_2$  を観ることはできない。そこで、*p*-ニトロフェニルリン酸 (pNPP) を基質として使う。すると、 $EP_2$  は観えないが  $P_1$  は pNP なので観える。このようにして従前、ストップフロー法を用いて  $P_1$  を測定し、速度論解析を行ってきた。遷移相速度論である。言うまでもなく、pNPP は本来の基質ではないが、こうするしかなかった。偽の基質であり下手すると化学修飾など厄介な問題が生じてしまう。

そこで、MALDI-TOFMS の登場である<sup>27)</sup>。Houston らが用いた装置が図 2 である。酵素 (14  $\mu$ l) と基質 (15  $\mu$ l) を混合して開始した反応を停止液 (140

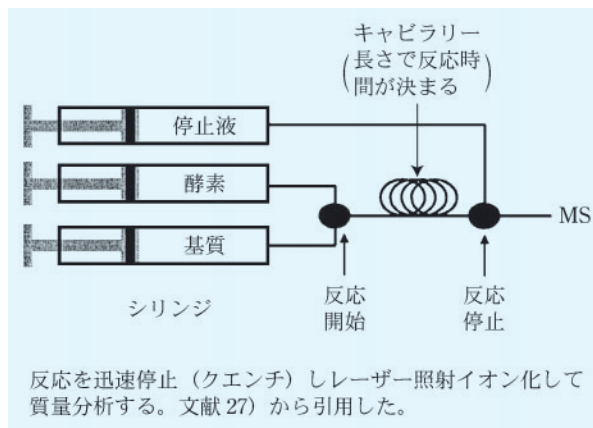
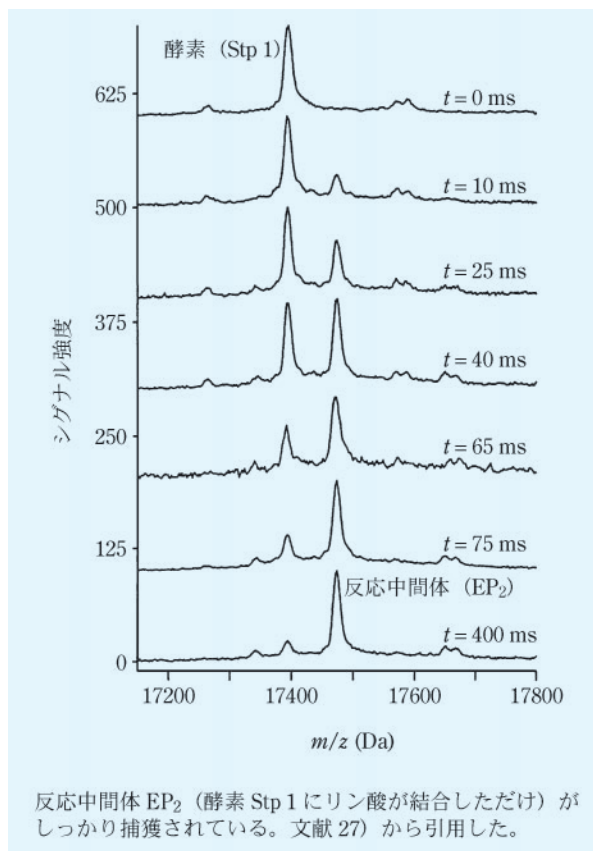


図 2 MALDI-TOFMS で観る反応装置



反応中間体  $EP_2$  (酵素 Stp 1 にリン酸が結合しただけ) がしっかり捕獲されている。文献 27) から引用した。

図 3 MALDI-TOFMS で観る酵素の反応

$\mu$ l) で一旦停止 (クエンチ) する。迅速停止法である。この反応液 (1  $\mu$ l) にマトリックス (9  $\mu$ l) を加えた試料を 1  $\mu$ l とり、レーザー照射して質量測定する。したがって、彼らは、 $P_1$  ではなく  $EP_2$  を直接測定したことになる。図 3 が実験結果である。きわめて短い時間に生じる反応中間体のみごとに捕獲されている。酵素 (濃度 120  $\mu$ M) など試料の量と観測に要する時間はきわめて少ない。さらに、リン酸相当のわずかな質量差が捕獲されている。質量分析がどれほど優れているかがわかる。ただ、MT 法では反応の迅速停止 (クエンチ) が不

可欠である。質量測定に問題はないが、クエンチする操作に限界もみえる。

#### 4.2 実証！ ESI でザイラナーゼ反応を観る

E と S を混合後に反応をクエンチせず質量分析する。これが ES 法である。反応系と分析系を直接続（オンライン）して中間体を捕獲できる。連続流動法とストップフロー法が可能となり、前者の概略が図 4 である。後者は混合後の流動を停止液は使わず停止して観測する。Zechel らは基質ザイラン ( $X_n$ ) の加水分解を触媒する酵素ザイラナーゼの反応を連続流動法で測定している<sup>28)</sup>。酵素濃度 0.17 mg/ml、各シリンジ容量は 1 ml である。ここでも、ジニトロフェニルザイロピオース ( $DNPX_2$ ) を基質として用いている。従前は  $P_1$  である DNP を観測するしかなかった。ところが、彼らの ES 法では  $P_1$  を観る必要はない。EP<sub>2</sub> を測定できるからである。その結果 (図 5)、時間経過とともにザイロピオース  $X_2$  ( $P_2$ ) の相当分だけ質量が多い中間体をみごとに獲得した。実験に基づいて描いた触媒機構が図 6 である。糖質酵素の触媒機構については議論も多い<sup>29)~31)</sup>。しかし、ES 法を用いれば合成基質を使うことなく本来の基質で酵素の反応を研究できることになる。

酵素二例を取り上げたが、いずれも吸収をもつ合成基質が使われている。これは従前法と新規法の成績を比較

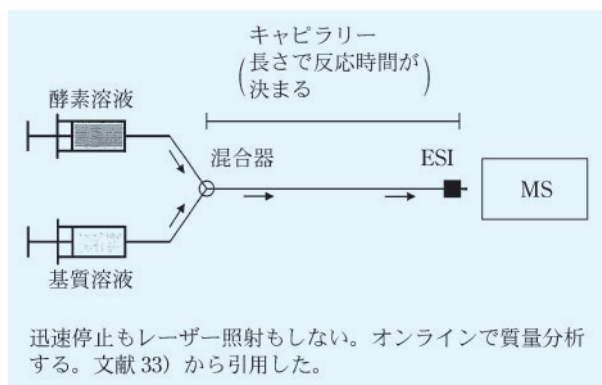


図 4 ESI-MS で観る反応装置

する目的からである。何度も指摘したように、質量分析では合成基質は必要ない。吸収も蛍光ももたない物質はあるが質量をもたない物質は決して存在しない。質量分析がどれほどのものか理解できるだろう<sup>32)33)</sup>。

図 5 のスペクトルにはイオン化 (数) の違う分子種が観測されている。文献 28) には明確な論議はないが構造の違いを反映すると考えられる。すなわち、ES 法が生物高分子の微妙な構造変化を捕らえる有力な手法になることを示唆している<sup>34)35)</sup>。さらに、重要なことは、分子量数万の酵素にリン酸基とか単糖あるいは二糖が結合しただけのきわめて微小な質量変化を迅速にしかも微量で測定できることである。事実、プロトンとか金属イオンの置換といった微小なタンパク質構造の変化が捕らえられている<sup>33)</sup>。驚異的な分析手法の進歩と言えるのではないか。

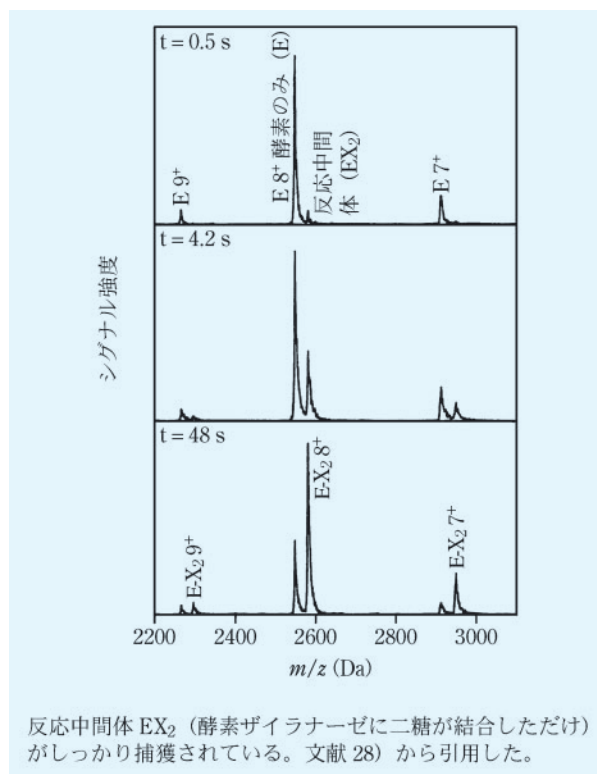


図 5 ESI-MS で観る酵素の反応

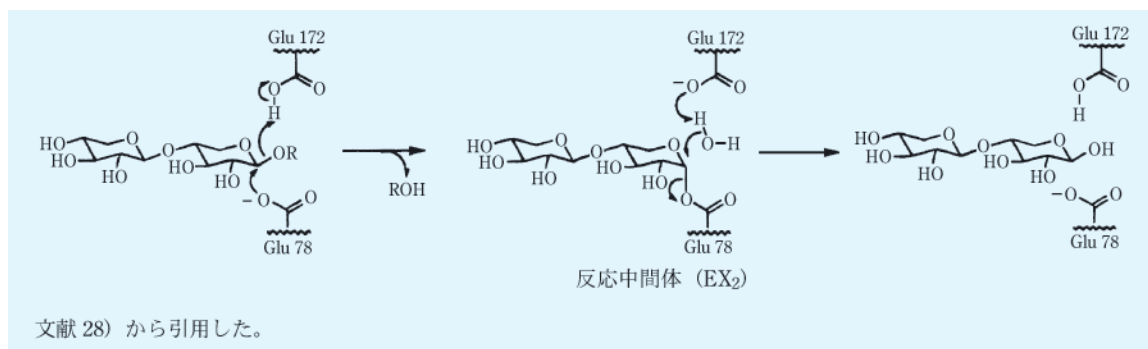


図 6 ザイラナーゼの触媒機構

## 5 質の分析がもたらすタンパク質新世界

質量分析が明らかにしたことは、生物・生命機能に直結するタンパク質の構造が解析できることである。活性な構造と呼んでおこう。活性な構造は、冒頭で説明したタンパク質構造のどれにも該当しない。一次構造でも高次構造でもないのである。したがって、タンパク質構造に新しい概念を提案したことになる。これは重要である。臨床におけるリアルタイムの診断、創薬などの製造工程における即刻な確認など、従前法にできなかったまったく新規で、しかも有力な手法となるだろう。タンパク質新世界である。冒頭で説明したように、タンパク質には主な三つの存在形態があった。質量分析は従前法と違って、溶解した形で在る必要はなく、どれにも適用できる。したがって、タンパク質のみならず多糖質、糖鎖など生物高分子のすべてが分析の対象になってくる。分析の時代は、ただ単に量を測ることから、質を量ることに間違いなく流れている。また、迅速、高感度、微量は分析究極の願いである。今回の受賞研究が展開する応用の世界もまた計り知れない。

## 6 あとがき

ノーベル化学賞受賞三者の違いを見極める目標は、十分に達成できなかったが紙数に余裕がないとは言い訳になる。かつて、廣海啓太郎先生とともにアミラーゼの中間体を捕獲しようと取り組んだことがあって、酵素の反応をその見極めの主題にさせていただいた。また、現状のタンパク質分析法を説明して、今回の受賞法との違いを際立たせようと企図した。これも果たせていないように思う。執筆の機会を与えてくださった編集委員長ならびに関係の先生方に御礼を申し上げます。記述の間違いとか誤解もありかもしれませんが、今後本誌の中で皆さんに訂正していただきますよう勝手なお願いをいたします。

### 文 献

- 1) 大谷 肇, 佐藤浩昭: *ぶんせき*, **2002**, 668.
- 2) 佐藤浩昭, 大谷 肇: *ぶんせき*, **2001**, 467.
- 3) 大西正健: “生物高分子”, (2001), (学会出版センター).
- 4) A. Notide, M. Sugiura, M. Saka, M. Ohnishi: *J. Biol. Macromol.*, **2**, 95 (2002).
- 5) 北岸恵子, 山田浩美: 蛋白質核酸酵素, **44**, 194 (1999).
- 6) 北岸恵子, 山田浩美: 蛋白質核酸酵素, **44**, 714 (1999).
- 7) 星野 仁: CE アドバンス, **5**, 52 (2001).
- 8) K. Wüthrich, G. Wider, G. Wagner, W. Braun: *J. Mol. Biol.*, **155**, 311 (1982). H. W. E. Rattle: *Nature*, **296**, 489 (1982).
- 9) A. Dubs, G. Wagner, K. Wüthrich: *Biochim. Biophys. Acta*, **577**, 177 (1979).
- 10) G. Otting, E. Liepinsh, K. Wüthrich: *Science*, **254**, 974 (1991).
- 11) M. Billeter, P. Guntert, P. Luginbuhl, K. Wüthrich: *Cell*,

**85**, 1057 (1996).

- 12) R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, K. Wüthrich: *Nature*, **382**, 180 (1996).
- 13) K. Pervushin, R. Riek, G. Wider, K. Wüthrich: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 12366 (1997).
- 14) K. Pervushin, A. Ono, C. Fernandez, T. Szyperski, M. Kainosho, K. Wüthrich: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 14147 (1998).
- 15) R. Riek, G. Wider, K. Pervushin, K. Wüthrich: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 4918 (1999).
- 16) M. Salzmann, K. Pervushin, G. Wider, H. Senn, K. Wüthrich: *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 7543 (2000).
- 17) F. L. Garcia, R. Zahn, R. Riek, K. Wüthrich: *PNAS*, **97**, 8334 (2000).
- 18) C. Fernandez, K. Adeishvili, K. Wüthrich: *PNAS*, **98**, 2358 (2001).
- 19) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse: *Science*, **246**, 64 (1989).
- 20) C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn: *Anal. Chem.*, **57**, 675 (1985).
- 21) K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151 (1988).
- 22) 田中耕一: 島津評論, **54**, 9 (1997).
- 23) 田中耕一: *ぶんせき*, **1996**, 253.
- 24) U. Bahr, A. Deppe, M. Karas, F. Hillenkamp: *Anal. Chem.*, **64**, 2866 (1992).
- 25) M. Karas, F. Hillenkamp: *Anal. Chem.*, **60**, 2299 (1988).
- 26) M. Karas, F. Hillenkamp: *Anal. Chem.*, **60**, 2301 (1988).
- 27) C. T. Houston, W. P. Yaylor, T. S. Widlanski, J. P. Reilly: *Anal. Chem.*, **72**, 3311 (2000).
- 28) D. L. Zechel, L. Konermann, S. G. Withers, D. J. Douglas: *Biochemistry*, **37**, 7664 (1998).
- 29) L. Konermann, F. I. Rosell, A. G. Mauk, D. J. Douglas: *Biochemistry*, **36**, 6448 (1997).
- 30) R. Mosi, S. He, J. Uitdehaag, B. W. Dijkstra, S. G. Withers: *Biochemistry*, **36**, 9927 (1997).
- 31) T. Kuriki: *Glycoenzymes*, **2000**, 3.
- 32) J. W. Gross, P. A. Frey: *Methods in Enzymology*, **354**, 27 (2002).
- 33) L. Konermann, D. J. Douglas: *Methods in Enzymology*, **354**, 50 (2002).
- 34) H. Orsnes, T. Graf, H. Degn: *Anal. Chem.*, **70**, 4751 (1998).
- 35) B. M. Kolakowski, L. Konermann: *Anal. Biochem.*, **292**, 107 (2001).



大西正健 (Masatake OHNISHI)

京都府立大学大学院農学研究科生物機能学専攻 (〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町)。京都大学大学院理学研究科化学専攻博士課程終了。理学博士。現在のテーマ 遷移相速度論を主軸とした酵素反応の高度解析, 細胞高分子の構造/機能と生物・生命応答, 産業生物学における産官学連携による研究開発。主な著書 “酵素反応速度論実験入門”(学会出版センター)。趣味 カメラと撮影(日本ライカ学会, 光画作家協会)。