

「なぜチオレドキシン？」

「最近、チオレドキシンの研究をやっているんです」というと、私の研究を学生時代からご存知の方から「どうして？」といぶかるように聞かれることが多くある。私自身の中では十分に整合性が取れているのだけれど、私が葉緑体の ATP 合成酵素ばかりを研究していると思われている方にとっては、小さな酸化還元タンパク質の研究というのはちょっと意外なのかもしれない。私の興味の変遷に関心をもたれる方はあまりいないかもしれないが、光合成研究会の会報に研究紹介を書かせていただく機会を頂戴したので、「なぜチオレドキシン？」という一部の方の疑問にお答えしようと思う。

話は、私が現在在職している東京工業大学資源化学研究所生物資源部門（吉田研究室）に着任した8年前に遡る。吉田研究室は、当時から ATP 合成酵素の研究とともに分子シャペロンの研究でもよく知られていた。しかし、恥ずかしながら私は吉田研究室に来るまで分子シャペロンのことをまったくと言っていいほど知らなかった。現在では、生化学の教科書にも取り上げられている分子シャペロンであるが、当時は一部の生化学者がその重要性に気づいて先駆的な研究を行っている時代だった。この分子シャペロンの研究には、私にとっては非常にショッキングな研究手法が使われていた。というのは、好熱菌の分子シャペロンの研究をするのに、基質となるタンパク質が哺乳類由来であったり、よく知られている大腸菌の GroEL の基質タンパク質として利用されているのが、好熱菌のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素であったりと、とにかく都合のよい組み合わせで分子シャペロンに関する新しい知見が次々と明らかにされていた。門外漢の私は、しかし、このやり方ほどこか違うのではないかと、いつしか分子シャペロンの研究手法そのものに不信感を抱いてしまっていた。

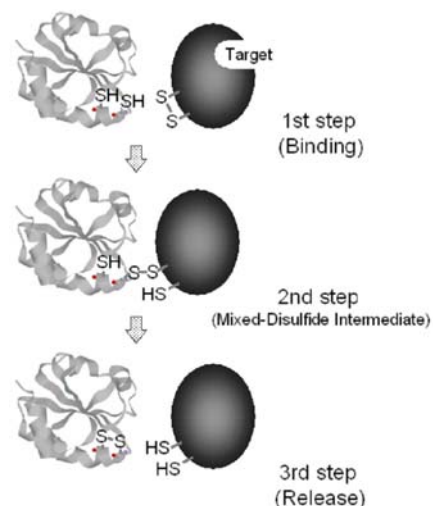
ところが、自分自身の研究を省みると、酸化還元調節をされる葉緑体 ATP 合成酵素に一般的に用いられる還元物質は昔からジチオスレイトールと相場が決まっている。そのことにあまり疑問を感じたことはなかった。が、分子シャペロンの研究に対する自らの批判を鑑みれば、「やはり、葉緑体の酵素の還元は葉緑体のチオレドキシンでやるべきである」、確信じみたものを私は感じて、チオレドキシンを手がけることにした。

ところがである。1997年当時、葉緑体チオレドキシンの研究というのは意外なほど情報が乏しいものだった。チオレドキシンは、原核生物から真核の高等動植物まで普遍的に存在するタンパク質で、その機能は生体内での酸化還元の媒介者である。分子量 12k ほど、アミノ酸にして 100 個くらいの小さなタンパク質で、4本の α -ヘリックスと 5本の β -シートからなる典型的なモチーフを持っている。活性中心は、WCGPCK (ないし R) で、この二つのシステイン間の酸化還元で還元力の伝達を行っている。葉緑体の場合、進化的に起源が異なるとされている二種類のチオレドキシン (f型とm型) があり、両者がどのように使い分けられているのかはよくわかっていなかった。酸化還元反応というのは、生体内でもっとも一般的に起こっている事象のひとつだと思うのだが、チオレドキシンが葉緑体の中のどのようなタンパク質を還元し、それによって何が起こるのかがよく判っていなかったのである。チオレドキシンに還元されることが知られていた葉緑体のタンパク質は、カルビン回路の4種類のタンパク質と ATP 合成酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコー

ス 6-リン酸脱水素酵素のわずか 7 種類だけだった。ようやく名古屋大学の佐々木幸子先生のアセチル CoA カルボキシラーゼのレドックス調節や植物のペルオキシレドキシンの存在が世に知られたところである。

生物界に普遍的にあって、機能的にも重要そうで、判っていないことが沢山あって、かつ研究者がほとんどいない。このような研究対象を放置しておく手はない。私は、日本で最初の葉緑体チオレドキシンの研究者になることを決心した（なんか響きがいいでしょ）。私たちの研究室では、対象とするタンパク質をまずリコンビナントタンパク質として調製してしまう、というのが常套手段である。材料は光合成研究に一番よく用いられるハウレンソウと決めて、全 RNA から RT-PCR 法でチオレドキシンの遺伝子をクローニングし、発現ベクターを構築して葉緑体型の二種類のチオレドキシンを手に入れた。最初にやろうと思っていた実験は、このチオレドキシンを「本来の」還元力として葉緑体 ATP 合成酵素がどのように還元されるかをみることである。チオレドキンによる標的酵素の還元の過程というのは、すでに大腸菌のチオレドキンとリボヌクレオチドリダクターゼでよく調べられている（図参照）。チオレドキンは標的となる酵素のジスルフィド結合を攻撃し、まずチオレドキン-標的酵素複合体を形成した後に、この分子間ジスルフィド結合を切って、自らが酸化され、標的が還元される。

このスキームを見ながら次の実験を考えていたときに、私はチオレドキシンの標的酵素を捕捉する方法をはたと思いついた。チオレドキシンの二番目に反応するシステインをセリンに置換しておけば、チオレドキン-標的酵素複合体を形成したところで反応が止まるだろう。チオレドキンをあらかじめゲル担体に固定しておけば、標的酵素だけを捕捉することが出来て、あとでジチオスレイトールでこの分子間ジスルフィド結合を還元すれば、標的酵素が特異的に得られるはずである。発想がシンプルすぎて逆に学生を説得



するのに時間がかかったのだが、素直な 4 年生が私の言うとおりに実験をやって、いとも簡単に新しい標的酵素を得ることに成功した^{注 1}。ところが、である。ハウレンソウで実験を始めたために、得られたタンパク質がいったい何であるのか、N 末端分析をしても皆目見当がつかないものが沢山あって、なかなか話をまとめることができない。それでも、私たちは 1999 年の夏までに、ルビスコ活性化酵素や細菌がもっている BCP(Bacterioferritin Comigratory Protein)のホモログなど数種類のタンパク質がチオレドキンと相互作用することを、捕捉されたタンパク質の N 末端アミノ酸の配列解析によって明らかにした。だが、新しい親和性クロマトグラフィーで得られたタンパク質が本当に酸化還元タンパク質であると結論するためには、生化学的に解析する必要がある。沢山の標的タンパク質候補の生化学的な解析までは「素直な 4 年生」ひとりの力だけではどうにもならない。困っていた私に生化学と分子生物学の得意なポストドクが加勢してくれて、2001 年、私たちはようやくこの仕事を世に送り出すことが出来た(*PNAS* (2001) **98**: 11224-11229)。発表が遅れたために、2000 年末に発表されたアラビドプシスの全ゲノム解析は福音となり、私たちの

ささやかな網羅的な解析も少しは格好のつくものになった。一方で、研究を進めていく過程で 1999 年 8 月にアメリカの Portis がルビスコ活性化酵素のチオレドキシシンによる活性化を発表し、2000 年春には九州大学歯学部の中山先生のグループに BCP ホモログが植物の新規のペルオキシレドキシシンという報告を先に出されてしまい、私たちの発見は少々しぼんでしまった^{注2}。残念無念である。

もう一つ残念なことがある。皆さんご存知のように米国科学アカデミー紀要 PNAS の表紙は、その号に掲載された論文の中から厳選されたトピックスが飾っている。私も勇んで応募した。題材は川合玉堂画伯の有名な「鵜飼」の図で、その脇に小さく私たちの捕捉方法の図を入れたもので、次のような解説文をつけた。



The new method to capture the target proteins for thioredoxin resembles the Japanese traditional piscatology named 'U-Ka-I', or cormorant fishing. The fisherman on boat fastens a number of cormorants to long ropes allowing the cormorants to then grab their quarries. The famous Japanese-style painting 'U-Ka-I' (in part) was drawn by Gyokudo Kawai in 1931.

残念ながら採用にはいたらず、日本画で PNAS の表紙を飾ろうという目論見は外れてしまった。採用されたのは、活性化された脳の領域を色表示したなんともグロテスクな図で、つくづく日米のセンスの違いを感じた^{注3}。

ところで、今回紹介したこの網羅的な解析手法は、ゲノムのわかっている生物には非常に有用である。しかも、同様の手法を容易に拡張することができる。現在、私の研究室では、葉緑体のチオレドキシシンだけでなく、シアノバクテリアから緑藻、細胞質型のものまでさまざまなチオレドキシシンのジスルフィド交換をする相手をまさしく網羅的に研究する一大プロジェクトを走らせている。これからどんな発見ができるのか、楽しみな研究である。

注1 私の研究室で最初にチオレドキシシン研究を立ち上げてくれたのは、M.T.Stumpff という非常に優秀なドイツ人留学生だった。彼は、私のアイデアに従ってチオレドキシシンのセリン変異体を作ったのだが、論理的な男で、まず ATP 合成酵素を使って本当に理屈どおりに捕捉する事が出来るかどうかを調べてしまった。実験がうまく行かず、彼はこの変異体を使った標的酵素の捕捉そのものを断念し、ATP 合成酵素とチオレドキシシンの相互作用という私が最初に目指した研究を行い、論文をまとめて帰国した。ATP 合成酵素とチオレドキシシンの相互作用は少々複雑で、ATP 合成酵素は私たちの変異体では簡単には捕まえることが出来ない標的酵素であることが後年判明したの

だが、彼はセオリーどおりにコントロールを取るところから実験を進めたばかりに大魚を逃してしまった。

- 注2 中山先生の論文を読むと、本来、DNA 結合タンパク質を CAM 植物から取ろうとしていて、BCP ホモログであるペルオキシレドキシンを偶然精製してしまったと書いている。この分野の競争相手ではなかったことに、二重のショックを受けた。
- 注3 他人の絵画には必ず著作権があるので、なんでもやみくもに使うわけには行かない。以前、ルノワールの「ムーラン・ド・ラ・ギャレット」を使って分子シャペロンのポスターを作った際に文化庁に問い合わせたところ、作者が没後 50 年経過すると断りなく使用してもよいとのことだった。川合画伯の場合には、没後 45 年くらいで基準にちょっと足らなかったために、手続きが面倒で PNAS が嫌がったのかな？