受賞記念解説 —— 高圧力学会学会賞 ——

圧力軸からみた蛋白質—高圧 NMR がひらく
新しい世界

Proteins under Pressure — A New View from High-Pressure NMR

赤坂 一之*

Kazuyuki AKASAKA*

The combination of high-resolution NMR spectroscopy with pressure perturbation, known as variable-pressure NMR spectroscopy or simply high-pressure NMR spectroscopy, is a relatively recent accomplishment, but is now a technique expanding rapidly with high promise in future. The importance of the method is that it allows, for the first time in history, a systematic detection and analysis of structures of high-energy sub-states in proteins along with their equilibrium populations. Here I describe how the method discloses the new concept and roles of proteins in the biological world. Furthermore, I expect that the knowledge on high-energy sub-states of proteins obtained in this way will contribute to a more logical and efficient use of pressure in food and other applications. [*high-pressure NMR study of proteins, pressure-induced structural change, conformational fluctuations, high-energy sub-states, new concept of protein structure*]

1. 原子核の信号を捉える NMR

地球上のすべてのものは原子からできており、その原子が随時様々な分子を形成して地球上の様々な現象をつくっている。様々な分子をつくる仕事は、そのほとんどが地球上の生命によってなされている。分子をつくる原子は原子核を持ち、その一部は磁気モーメントを持っている。

1946 年 F. Bloch[1]は、原子核を調べるために核磁気共鳴 (NMR) の観測に成功した (E.M. Purcell と共にノーベル賞受賞 1952)。暫くして NMR は原子核 (核磁気モーメント) の現象でありながら、分子によってそれぞれ特徴的な信号を与えることがわかり、50 年代には化学に応用され、60-70 年代からは合成高分子、そして 80 年代技術の飛

躍的進歩 (R. Ernst, 1991 ノーベル化学賞)[2]と共に、生体高分子にも応用されるようになり、さらに現在では MRI として病院での診断に応用されるまでに至った。今や我々は、原子核の信号を観測する NMR 無しには生きていけない。

地球上の生命体も我々の身体も、すべて原子分子で出来ている。それを最前線で動かしているのは蛋白質という一群の高分子である。これまで私は蛋白質に集中してその原子核からの信号を観測してきた。人間には少なくとも 3 万種類の蛋白質が働いていると言われているが、その細胞から、いきなりこれらの原子核からの信号を観測しようとしても、蛋白質そのものの信号はよく見えない。通常は、観測したい蛋白質の分子を決めて、それを純粋にして mg 程度の量にしないとその NMR 信号は観測されない。最近では、生体から直接得るのではなく、その遺伝

〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930 近畿大学 先端技術総合研究所 高圧力蛋白質研究センター
High Pressure Protein Research Center, Institute of Advanced Technology, Kinki University, 930 Nishimitani, Kinokawa,
Wakayama 649-6493

* 現所属: 〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町 1-5 京都府立大学大学院 生命環境科学研究科
Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University, 1-5 Hangi-cho, Shimogamo, Sakyo-
ku, Kyoto 606-8522
Electronic address: akasaka@kpu.ac.jp

子から大腸菌等の助けを借りて蛋白質を発現し、精製する。その過程で、NMR 観測を可能にするため、天然には余り存在しない ^{15}N 、 ^{13}C などの磁気モーメントをもつ原子核で天然の ^{14}N や ^{12}C 原子を置き換えることも行われる。

原子核からの信号から、一体、蛋白質の何がわかるというのか？ そもそも蛋白質の NMR 観測から、しかもわざわざ圧力までかけて、この複雑で多様の限りを極める地球上の生命の何がわかるというのか？

2. 蛋白質の“パラドックス” (Fig. 1)

これには簡単に、私がなぜ蛋白質に興味を持ち出したか、そこから始めないといけない。私が大学生の頃 (1950 年代の後半) に、Watson-Crick による DNA 二重螺旋構造の発見[3]があった。それ以後、地球上の生命現象に共通する核酸と蛋白質の役割が

次第に明確になってきた。大まかには、DNA が生命の基本情報を保持し、世代や時間を超えてその情報を保持し伝え、細胞がそれを基にその情報の発現系である蛋白質をつくり、それが生命個体を“動かす”—この様式が生命の基本であることが明らかになった。つまり、“生命の現場”“生命の最前線”を受け持つのは“蛋白質”という一群の高分子である。

すなわち、DNA が化学物質としては 4 種の塩基を連ねた“ひも状”分子であるように、蛋白質もやはり、化学物質としてはアミノ酸を一系列に繋げた“ひも状”分子に過ぎない。この簡単な“ひも状”蛋白質分子のそれぞれが、どうして地球上の、互いに全く見かけも生き方も異なる、動物植物を含む多種多様のあらゆる生命体の、極めて個性的でダイナミックな生命現象を“動かす”、多様な能力を持つというのか？ その化学物質としての“単純性”から、それがもたらす機能の“多様性”は、化学合成によってつくられる通常の機能性分子のレベルをは

Fig. 1. The “paradox” of a protein. How does “life” come from “matter”? A protein molecule is a paradoxical existence, as it is a “simple chemical substance” consisting of a covalently bonded chain of amino acids on one hand, but is an “essential life substance” that keeps the life going on the other hand.

るかに超えている。この点で蛋白質は、我々が知っている他のどの分子とも一線を画している。単なるありふれた C, N, O, H 等の原子の集まりである“物質”が、どうしてこのような多様で巧妙な働きを持つことが出来るのか？ これは蛋白質のというより、この物質界の“パラドックス”であるように見える (Fig. 1)。もっといえば、人類が宇宙の原子・分子を支配する原理として見出した量子力学や統計力学あるいは熱力学から、演繹的に予測することが出来ないものであるように見える。

ではそれは、これまでの物理学には知られていない法則によるのだろうか？ 1940 年代、あの量子力学の創始者シュレーディンガーは自問自答した [4]。シュレーディンガーの生命の“パラドックス”—私にとってそれは蛋白質の“パラドックス”—が理解できなければ、宇宙に遍在する原子・分子と地球上で繁栄する生命との間のギャップは、科学では埋まらないことになる。

3. 蛋白質の構造と機能—これまでの研究の軌跡

このギャップを埋めるために、過去半世紀の蛋白質構造研究は何をしてきたのか。その軌跡を見てみよう。

蛋白質について、60 年代に重要な発見があった (Anfinsen's dogma, 1972 ノーベル化学賞) [5]。生体内で合成されたポリペプチド鎖はひとりでに、それぞれに特異な立体構造を形成し、その結果それぞれに特有の機能を発揮する、ということになった。有り体に言えば、蛋白質は生物の助けを借りなくとも、“無生物”のポリペプチド鎖から“生きた”蛋白質へと変身する。その行き着く先は蛋白質のそれぞれに特異な立体構造であるとするれば、その立体構造こそがそれぞれに特異な機能を発揮するものと考えられた。

ではどのようにして“生きた”蛋白質へと変身するのか？ その後 50 年、蛋白質の科学の関心は、「特異な機能は特異な立体構造にあり」との考えのもとに、一つは如何にして効率よくフォールドするのか？ であり、これは現在も続いている。もう一つはどのような“かたち”にフォールドするのか？ であり、これは蛋白質を結晶化して構造解析が行われた。その成果はうなぎのぼりに向上し、現在は 8 万を超す数の蛋白質構造の座標が Protein Data Bank に登録されている。蛋白質の構造情報は結晶

(X 線回折から) からだけのものではない。溶液中でも蛋白質の立体構造解析は近年 NMR によって途がつけられた [6]。その結果、多くの場合、NMR によって得られる構造は結晶中のそれと一致した。通常これらの構造は天然構造 (Native structure, N) と呼ばれ、基本的にこれが機能をもつ“生きた”蛋白質 (あるいはそれに近いもの) と考えられてきた。果たしてそうなのか？

蛋白質が“生きて”働くのは生物の身体の中の細胞質 (cytoplasm) や生体膜中である。特に近年、多くの同種蛋白質の生物種による機能特性の違い、天然または人工変異による蛋白質機能の変化、遺伝的変異による難病やアミロイド病などが明らかになるなど、これまでより広範でダイナミックな生物現象が問題となっている。これらの要因を結晶中の構造に求めても答が得られない、このようなことが多くの例で明らかになってきた。蛋白質の“生きた姿”をその結晶構造だけに求めることにはすでに限界がきている。そこには何か重要な情報が欠けている。欠けている情報があるとすれば、それは何か？ これまでの限界を打ち破り、欠けている情報を得る途はあるのか？ 当初、私の期待は、温度軸 [7,8]、変性剤軸 [9] と彷徨ったが、最終的に圧力軸がその答を与えてくれた。

4. 圧力軸からみた蛋白質研究—圧力変性とその利用

蛋白質に対する圧力の関わりは、ちょうど百年前の 1914 年、Bridgman による、蛋白質溶液 (卵白) の高圧力 700 MPa への加圧による不可逆的凝集現象の発見から始まる [10]。この現象を変性と一口に言うことがあるが、今から考えると実際は 2 つのことが重なって起こった現象である。

まず、蛋白質が単体の場合を例に取る。加圧により、まず蛋白質 (単体) が天然構造 (N) から変性構造 (単体 D) へと転移してから (①)、次に変性した単体 D が互いに凝集して D の集合体をつくる (②) :

1960 年ごろ世界に先駆けて、鈴木はこの反応過程を分子の現象として追求した [11]。この段階で圧力の効果はまだ不可逆であった。

その後、蛋白質濃度が十分低い状態では①の反応

は本来可逆的であることが示され、Brandts[12]、Hawley[13]らが初めて N, D 間の反応を、温度・圧力を変数とする熱力学平衡式で記述することに成功した：

今から思えば、これは 60 年代の蛋白質についての重要な発見 (Anfinsen's dogma)[5]「生体内で合成されたポリペプチド鎖は、熱力学原理により、そのアミノ酸配列固有の立体構造を形成する」に符合するものである。

すべての蛋白質は、生理条件下 (1 気圧) でも $\text{N} \rightleftharpoons \text{D}$ の平衡にあり、平衡濃度は通常 $[\text{N}] \gg [\text{D}]$ の関係にある。これが生体内で多くの蛋白質が反応し機能する時の基本的状態 (準備状態) であると考えられる。しかし加圧により、①の平衡濃度は $[\text{N}] \ll [\text{D}]$ の方向に傾く。これは、水溶液中の蛋白質の重要な特性 (生理条件下では通常 D の部分モル体積が N のそれより小さい) のために、ル・シャトリエの原理により平衡が右に傾くためである。従って、少なくとも「試験管内」で蛋白質濃度が低い時は、圧力を戻せば平衡濃度は元の状態 ($[\text{N}] \gg [\text{D}]$) に戻る。

生体内でも基本的には同じであるが、もし加圧中または減圧中に引き続き他の反応が起これば、反応は全体として不可逆になることが考えられる。他の反応の例の一つは、D の凝集反応である。可逆か不可逆か (上で反応 (1) か (2) か) は本来蛋白質そのものの性質というよりは、実験時の蛋白質濃度、溶液条件 (イオン強度)、温度などに強く依存するものであることを銘記すべきである。この認識があれば、圧力変性の利用の仕方も変わってくる。以下にその具体的な例を挙げておこう。

不可逆反応 (1) の利用

食品加工への圧力利用の一つは、不可逆反応 (1) の利用である。この場合、凝集反応が加圧中に起こるか減圧過程で起こるかは別として、凝集反応は低圧下では不可逆であり、圧力の効果は除圧後も残る。卵白その他蛋白質を多く含む食品の加圧によるゲル化はこの応用である。

可逆反応 (2) の利用

可逆反応 (2) では、加圧中に他の不可逆反応を

起こすことで、全体として反応を不可逆とすることが出来る。すなわち (2) では加圧下で $[\text{N}] \ll [\text{D}]$ となることを利用して、加圧したまま D に特異的に作用する加水分解酵素を有効に働かせ、難分解性の蛋白質を低分子に分解することが可能である [14] (赤坂一之, 特許第 5675063 号 [15])。筆者はこの原理を protease K 抵抗性のプリオン凝集体にも適用し、プリオン凝集体の加圧解離下で、その protease K による効率的加水分解にも成功した [16]。

しかしながら、(1) や (2) の単純な 2 状態反応に基づくだけでは、蛋白質の機能、高圧力による食品機能向上のすべてを理解することは出来ない。実は (1) や (2) の図式の多くは、1960 年代以来、高圧力下の光散乱、光吸収、赤外吸収、 ^1H NMR 測定等の様々な方法により得られたものである。これに代わる新しい記述 (次節) は、90 年代後半から現在までの筆者らによる多数の蛋白質についての高圧 NMR (特に多次元高圧 NMR) による研究によって、次第に確立されたものである [17–24]。以下ではそれらのエッセンスを提示し、さらに考察を深めたいと思う。

5. 圧力軸からみた蛋白質研究—“生きた”蛋白質の動きを捉える高圧 NMR

5.1 高分解能高圧 NMR の開発と進展

蛋白質の構造研究は、少なくとも私にとって、溶液中の蛋白質分子の高分解能測定が可能な高圧 NMR の開発によって一変した [26]。特別な高圧プローブを製作することなく、耐圧試料セルを用いる我々の方法は、石英セルをセル材料として最高 4 kbar まで、高い分解能での測定が可能である (例えば文献 [27] の Fig. 2a 参照)。またこの耐圧試料セルの場合、例え使用中に破裂しても、NMR プローブそのものには損傷を与えないように工夫されている。しかし基本的に手作りであり、またセルの容量が小さく S/N 比には限界があり、さらに試料溶液の充填等に難がある。そのため、最近ではジルコニアをセル材料とする寸胴型のより容量の大きなセルが市販され、蛋白質の高圧 NMR による研究が世界的に盛んになり始めた。後述するように、蛋白質科学および高圧力バイオサイエンス全般において、高圧 NMR の重要性は今後ますます大きくなると考えられる。高圧 NMR によって触発された高圧 X 線結晶学、高圧分子動力学等と共に、この技術と解

Fig. 2. Pressure effect on the ^1H NMR spectrum of hen lysozyme in the folded state (3.5 mM in 100 mM glycine buffer, 99.96% $^2\text{H}_2\text{O}$, pH 2.0), recorded at 750 MHz with a pressure-resistive quartz cell at 45°C at 500 bar intervals up to 2000 bar. Only the region for high-field shifted side-chain protons is shown. The spectral changes are fully reversible with pressure [29].

析法のさらなる発展が期待される。

5.2 加圧下の構造変化は蛋白質本来の構造揺らぎを示す

ここで高圧 NMR で観測される蛋白質構造の変化と、蛋白質が本来 1 気圧でも持っている構造の揺らぎとはどう関係するのか、について言及しておく必要がある。それは、“圧力をかけると確かに蛋白質の構造は変化するが、それは圧力が創り出した構造であり、もともと存在する構造ではないのではないか？”との疑問があるからである。

圧力をかけると確かに蛋白質の構造は変化するが、それは「圧力が創り出した構造でありもともと存在する構造ではない」との考えが蔓延していないか？この考えは、筆者が早くから主張してきた“高圧 NMR で検出される構造変化は、蛋白質が本来持っている揺らぎに基づく”とのコンセプト[17-25]とは相容れない。

高圧 NMR による原子レベルの構造変化を解釈する筆者のこの考えは、最近、平田らにより統計力学

→ Protein “alive”
(the folded state)

→ Protein “dead”
(the unfolded state in
8M urea)

Fig. 3. Spectral response of native and denatured hen lysozyme to high pressure studied by $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ HSQC NMR spectroscopy [30].

理論に基づいて証明された[28]。すなわち，“加圧による構造変化は，1 気圧で蛋白質が本来的に有する構造揺らぎを拡大したものである”。これにより，筆者が早くから主張してきた蛋白質高圧 NMR のコンセプトは厳密な理論的裏付けを得たことになる。

5.3 フォールド (N) 状態の揺らぎ，変性 (D) 状態の揺らぎ

高圧 ^1H NMR を用いた最初の論文[29]で，筆者らは，蛋白質ニワトリリゾチームのフォールド構造 (N 構造) 全体が加圧によってその“かたち”を変えて行くことを初めて明らかにした (Fig. 2)。この論文は，蛋白質のフォールド構造 (N 構造) そのものが常に揺らいで変化していることを示す初めての実験的証拠を示した。これは以前から予測されていたことではあるが，N 構造そのものが様々なミクロな構造 $N_1, N_2, N_3, N_4 \dots$ のアンサンブルであることを直接 NMR スペクトル上で示したものである：

当時，これは私にとっては衝撃的な出来事であった。それまでの温度軸での実験では，蛋白質について，

おしなべて二状態的転移が観測されていたからである。

さらに同位体標識ニワトリリゾチームについて行った二次元 NMR ($^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC) による実験では，すべての主鎖ペプチド NH の ^{15}N 及び ^1H 信号の圧力シフトが観測されたが，これらはフォールド状態 (“生きた状態” N) (Fig. 3a) と 8M urea 内での変性状態 (“死んだ状態” D) (Fig. 3b) では明確に異なる。すなわち前者では特定の部位からの信号が大きくシフトを示す (構造が揺らいでいる) のに対し，後者ではシフトの部位特異性が全く消失している。“生きた状態”を示す構造の揺らぎが消失している—観測されているのは主にペプチド NH と溶媒の水との間の水素結合の短縮 (揺らぎ) である—ことがはっきりわかる (Fig. 4)[30]。すなわち大げさに言うと，圧力をかけて観測することにより，蛋白質分子が“生きている”か“死んでいる”かがわかる。

さらに高圧 ^1H NMR のシフトデータを詳しく解析すると，蛋白質分子が“生きている”時はどのように動いているのかがわかる。その結果，“生きている”ニワトリリゾチームでは，2つのドメイン α - β 間にある空隙のまわりが特に揺らいでいることが

Fig. 4. Pressure-induced ^1H and ^{15}N shifts of the peptide NH groups of hen lysozyme in the folded (“alive”) and unfolded (“dead”) states [30].

明らかになった[31]。この空隙には水があることが X 線構造解析から、また水が常時出入りしていることが分子動力学計算から知られている。ドメイン間は基質の結合部位であり、ここには酵素の活性中心がある。これらのことから、上で見出された“生きている”ニワトリリゾチームの構造揺らぎは、酵素機能のために準備されたものと考えられる。

さらに驚くべきことは、水を含むこの空隙は、異なる生物種由来のすべてのリゾチーム分子で保存されている事実である[32]。このことから、すべての

“生きている”リゾチーム N 構造には、酵素機能に好都合なように、これらの空隙による揺らぎが進化の過程で生じてきたと考えるのが自然である。蛋白質の N 構造にはこのような秘密が隠されていることが、高圧 NMR の結果から明らかにされるのである。これこそが蛋白質に高圧 NMR を適用する理由である。次の節では、蛋白質にはこれよりもっと大きな揺らぎも沢山存在し、それらが機能のために重要であることが見えてくる。

Fig. 5. (Upper figure) Effects of pressure on $^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC spectra of the Ras-binding domain of RalGEF (11–97) measured at 297 K at 30 bar (blue), 1000 bar (green) and 2000 bar (red). The spectral changes were fully reversible with pressure. The spectra were recorded at a proton frequency of 750.13 MHz and a nitrogen frequency of 76.01 MHz for 1.2 mM RalGEF-RBD in 15 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM DTE, pH 7.3 in 95% $^1\text{H}_2\text{O}$ and 5% $^2\text{H}_2\text{O}$. (Lower figure) Conformational equilibrium in the Ras-binding domain of RalGEF deduced from the analysis of the data above. Conformers N (native), I (intermediate) and U (unfolded) are present in equilibrium at all pressures and are shown by ribbon models on the NMR structure of N at 1 bar. Note that the conformer (I) is locally disordered, while conformer (U) is fully disordered (both shown in red) (cf. Ref. [33]).

Fig. 6. The new view of proteins revealed from high-pressure NMR studies. Most functional proteins have high-energy sub-states above the basic folded sub-states in Gibbs energy. The structures of high-energy sub-states vary greatly from protein to protein. Populations of high-energy sub-states can be increased by applying pressure, as they normally have smaller partial molar volumes, thereby allowing direct measurement of their NMR spectra.

5.4 フォールド (N) 構造を超える揺らぎ

次に、ある種の蛋白質には、それまでの常識を破るもっと大きな構造変化を伴う揺らぎが存在し、やはりそれが機能と密接に結びついているらしいことが判明した。それは ^{15}N で標識した Ras-binding domain of Ral guanine dissociation stimulator (RalGDP-RBD) についての高圧 2 次元 NMR ($^{15}\text{N}/^1\text{H}$ HSQC spectra) 測定によって発見された (Fig. 5, 上図)[33]。すなわち 1000 bar 以上に加圧すると二次元交差信号の一部が消失し、代わりに変性位置に新しい信号が現れる (Fig. 5)。これは明らかに、蛋白質分子の一部が変性した中間体 (I) 構造が検出されたことを示した。さらに加圧すると分子全体が変性した変性体 (U) の信号が現れる。このことから、この蛋白質には少なくとも、

の構造間平衡があることが明らかになった (Fig. 5, 下図)。

これも筆者にとってはとても衝撃的な出来事であった。このような中間体構造はフォールディングの途中の構造として transient な構造として観測されることはあるものの、それまでの温度軸、変性剤軸実験ではこれらが安定的に観測されることはあまりなかったからである。この結果は、“生きている”

蛋白質にはもともといわゆる“N 構造”を超える揺らぎも存在し、ここで見出された中間体構造 I はそのような一つであり、RalGDP-RBD の信号伝達機能を果たすのに適した構造であると考えられた [33]。

6. 物質から生命へ：蛋白質の高エネルギー構造パラダイムとその役割

その後、すべての蛋白質には N 構造内の揺らぎがあり、さらに多くの蛋白質で N 構造を超える揺らぎが存在することが明らかになった [17–24]。これらを通じて、筆者のそれまでの比較的単純な蛋白質構造のコンセプトは大きく変化することになった。すなわち多くの蛋白質には、結晶の構造とほぼ同じ N 構造の他に、これを超える“高エネルギー構造”があり、これは光励起などで現れる電子励起構造ではなく、生物の生存環境で熱揺らぎによって生じる“熱励起構造”である (Fig. 6)。その最も具体的な例の一つは、高圧 NMR で平均座標が決定された蛋白質 ubiquitin の「機能型構造」に見ることが出来る。この構造では酵素分子と結合するために、ubiquitin 分子の構造が元々の閉じた構造から、開いた構造（高エネルギー構造）へとかたちを変えている [34]。これは ubiquitin が“生きている”証拠である。

蛋白質には結晶中で典型的に見られる“N 構造パラダイム”の他に、“高エネルギー構造のパラダイム”があり、これはそれぞれの蛋白質が生物の生存環境に適応して機能するために、長い進化の試行錯誤の過程で形成されてきたものに違いない。そこに真の蛋白質分子進化の軌跡をみることができる。

多くの蛋白質は、高エネルギー構造パラダイムにおいてその特異な反応や機能を果たしている [21,25]。その意味で蛋白質にとって、“高エネルギー構造パラダイム”は“機能パラダイム”と“フォールディングパラダイム”を含むものであると考えられる。それぞれの蛋白質が“高エネルギー構造のパラダイム”においてどういう構造を持つのかは、その機能と関連してそれぞれ個性的である。“高エネルギー構造のパラダイム”の探索にどのような圧力が必要かも、蛋白質毎に実に多様である。例えば、ある蛋白質は数百気圧でそこに入るのに対し [35]、他のある蛋白質は数千気圧かけてもほとんど“N 構造パラダイム”から出ようとはしない [36]。

従来の基底構造に偏った蛋白質概念から飛び出し、“高エネルギー構造パラダイム”に着目する、高圧 NMR がもたらしたこの新しい蛋白質コンセプトは、「そもそもなぜ物質（原子）が生命を生み出し得るのか」という基本命題についても、新しい視点を呼び起こす。すなわちこの“高エネルギー構造パラダイム”こそ、水や脂質の媒介を経て、単純な化学物質に過ぎない蛋白質（“もの”）を、生命機能を司る根幹の分子へと変換させるものである[21]。一蛋白質は“もの”であり、“いのち”である。

7. 圧力で蛋白質を操る

最後に、我々にとってなぜ圧力が蛋白質の構造とさらにその反応性を制御するための有用なパラメータとなり得るのか、これを次のように考えることも出来る。一般に蛋白質の状態は温度－圧力平面で記述されるとしても、深海はせいぜい1千気圧止まりであり、ましてや地表では重力場による圧力があるとしても、数千気圧は、長い進化の過程でおそらく生物が経験したことがない。その意味で、数千気圧の高圧力は「蛋白質の知らない世界」、もっと正確には、「蛋白質進化の神」が「使わなかった束縛条件」であるといえる。その意味で、温度と圧力は共に蛋白質の構造を大きく変える力があるが、地球上で進化を重ねた蛋白質にとって両者の持つ意味が違う。すなわち現存する蛋白質にとって、温度は進化の束縛条件であるが、高圧力は強い束縛条件とはなかった。その意味で高圧力はいわば“生物が知らない”世界である。一方で、数気圧～数百気圧の比較的低压は、細胞内外での情報伝達あるいは重力場での生理学を支配する新しい要因として注目されている[37]。

高圧 NMR を通じて、我々の蛋白質のコンセプトは、単純な二状態コンセプトあるいは基底状態に偏ったコンセプトから、高エネルギー構造パラダイムを含むより広いコンセプトへと変化を迫られている[17,18]。この蛋白質コンセプトは、圧力利用の面においても有用なコンセプトをもたらす。すなわち、1～数千気圧の圧力可変の高圧 NMR により、我々は体積を媒介として、蛋白質の基底状態（N 構造状態）から変性状態（D 構造状態）に至る広い構造空間「高エネルギーパラダイム」で蛋白質の、原則的に原子レベルでの構造と熱力学平衡を調べる手立てを得たことになる（Fig. 6）。

そこで高圧 NMR を始め様々な高圧分光法等によって明らかになる高エネルギー構造情報を基に、圧力軸で蛋白質の反応性を制御する途が開かれる[21]。実際、著者の特許や応用論文は、この論理的思考の下に実現したものである[14,15,16]。一口に言って、我々は圧力軸において生体高分子レベルの現象を、細胞レベルを含むマクロな現象につなげることが可能な、高圧力バイオサイエンスの新しい時代を迎えている。そこでは高圧力分子科学の基礎が、より効率的で新しい高圧力利用を生み出すことが期待される。この期待に答えるべく、高圧バイオサイエンスの新しい成書が、世界のトップサイエンティストの協力を得て間もなく刊行される[37]。

謝 辞

ここで紹介した研究は、神戸大学時代（文科省大学院先端研究プログラム、JSPS 交流事業）、近畿大学時代（JSPS Core-to-Core Program、文科省学術フロンティア事業ほか）の支援の下に行なわれたものです。その中で特に、初期の技術協力を惜しまなかった神戸大学の 山田 博昭 氏、理研播磨研究所に快く受け入れていただいた 横山 茂之 氏、それに早くから共同研究や討論を通じて刺激し合い知識を共有し合った世界のトップ研究者の方々に感謝します。また研究推進に格段のご努力ご協力をいただいた神戸大学関係者、近畿大学関係者の方々に感謝いたします。言うまでもなく、私の研究が今回の栄えある学会賞受賞に至る評価を受けることができたのは、この分野の研究の面白さに惹かれ私と共に情熱を傾けてくれた、数多くの大学院生、ポスドク、共同研究者の方々による成果集積の賜物です。この機会にあらためてこれらの皆様に厚く感謝いたします。

参考文献

- [1] F. Bloch: Phys. Rev., **70**, 460 (1946).
- [2] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1991/press.html
- [3] J.D. Watson, F.H.C. Crick: Nature, **171**, 737 (1953).
- [4] E. Schrödinger: *What is life?*, (Cambridge University Press, Cambridge, 1944).
- [5] C. Anfinsen: Science, **181**, 223 (1973).
- [6] K. Wüthrich: Nat. Struct. Biol., **8**, 923 (2001).

- [7] K. Akasaka, A. Naito, H. Nakatani, M. Imanari: *Rev. Sci. Instrum.*, **61**, 66 (1990).
- [8] M. Kawakami, K. Akasaka: *Rev. Sci. Instrum.*, **69**, 3365 (1998).
- [9] Y.O. Kamatari, T. Konno, M. Kataoka, K. Akasaka: *Protein Sci.*, **7**, 681 (1998).
- [10] P.W. Bridgman: *J. Biol. Chem.*, **19**, 511 (1914).
- [11] K. Suzuki: *Rev. Phys. Chem. Japan*, **29**, 91 (1960).
- [12] J.F. Brandts, R.J. Oliveira, C. Westort: *Biochemistry*, **9**, 1038 (1970).
- [13] S.A. Hawley: *Biochemistry*, **10**, 2436 (1971).
- [14] K. Akasaka, H. Nagahata, A. Maeno, K. Sasaki: *Biophysics*, **4**, 29 (2008).
- [15] 赤坂一之: 特許第 5675063 号, 蛋白質の分解方法.
- [16] K. Akasaka, A. Maeno, T. Murayama, H. Tachibana, Y. Fujita, H. Yamanaka, N. Nishida, R. Atarashi: *Prion*, **8**, 314 (2014).
- [17] K. Akasaka: *Pure Appli Chem.*, **75**, 927 (2003).
- [18] K. Akasaka: *Biochemistry*, **42**, 10875 (2003).
- [19] K. Akasaka: *Chem. Rev.*, **106**, 1814 (2006).
- [20] H. Li, K. Akasaka: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1764**, 331 (2006).
- [21] K. Akasaka: *High Press. Res.*, **30**, 453 (2010).
- [22] R. Fourme, E. Girard, K. Akasaka: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 1 (2012).
- [23] K. Akasaka, R. Kitahara, Y.O. Kamatari: *Arch. Biochem. Biophys.*, **531**, 110 (2013).
- [24] R. Kitahara, K. Hata, H. Li, M. Williamson, K. Akasaka: *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **71**, 35 (2013).
- [25] K. Akasaka: *High Press. Res.*, **34**, 222 (2014).
- [26] K. Akasaka, H. Yamada: *Methods Enzymol.*, **338**, 134 (2001).
- [27] A. Maeno, H. Matsuo, K. Akasaka: *BIOPHYSICS*, **5**, 1 (2009).
- [28] F. Hirata, K. Akasaka: *J. Chem. Phys.*, **142**, 044110 (2015).
- [29] K. Akasaka, T. Tezuka, H. Yamada: *J. Mol. Biol.*, **271**, 671 (1997).
- [30] Y.O. Kamatari, H. Yamada, K. Akasaka, J.A. Jones, C.M. Dobson, L.J. Smith: *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1782 (2001).
- [31] M. Refaee, T. Tezuka, K. Akasaka, M.P. Williamson: *J. Mol. Biol.*, **327**, 857 (2003).
- [32] Y.O. Kamatari, L.J. Smith, C.M. Dobson, K. Akasaka: *Biophys. Chem.*, **156**, 24 (2011).
- [33] K. Inoue, H. Yamada, K. Akasaka, C. Herrmann, W. Kremer, T. Maurer, R. Döker, H. R. Kalbitzer: *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 547 (2000).
- [34] R. Kitahara, S. Yokoyama, K. Akasaka: *J. Mol. Biol.*, **347**, 277 (2005).
- [35] A. Maeno, D. Sindhikara, F. Hirata, R. Otten, F.W. Dahlquist, S. Yokoyama, K. Akasaka, F.A.A. Mulder, R. Kitahara: *Biophys. J.*, **108**, 133 (2015).
- [36] A. Maeno, H. Matsuo, K. Akasaka: *Biophys. Chem.*, **183**, 57 (2013).
- [37] K. Akasaka, H. Matsuki, eds.: *High Pressure Bioscience-Basic Concepts, Applications and Frontiers* (Springer, Dordrecht, 2015).

[2015 年 3 月 9 日受付, 2015 年 3 月 23 日受理]

© 2015 日本高圧力学会