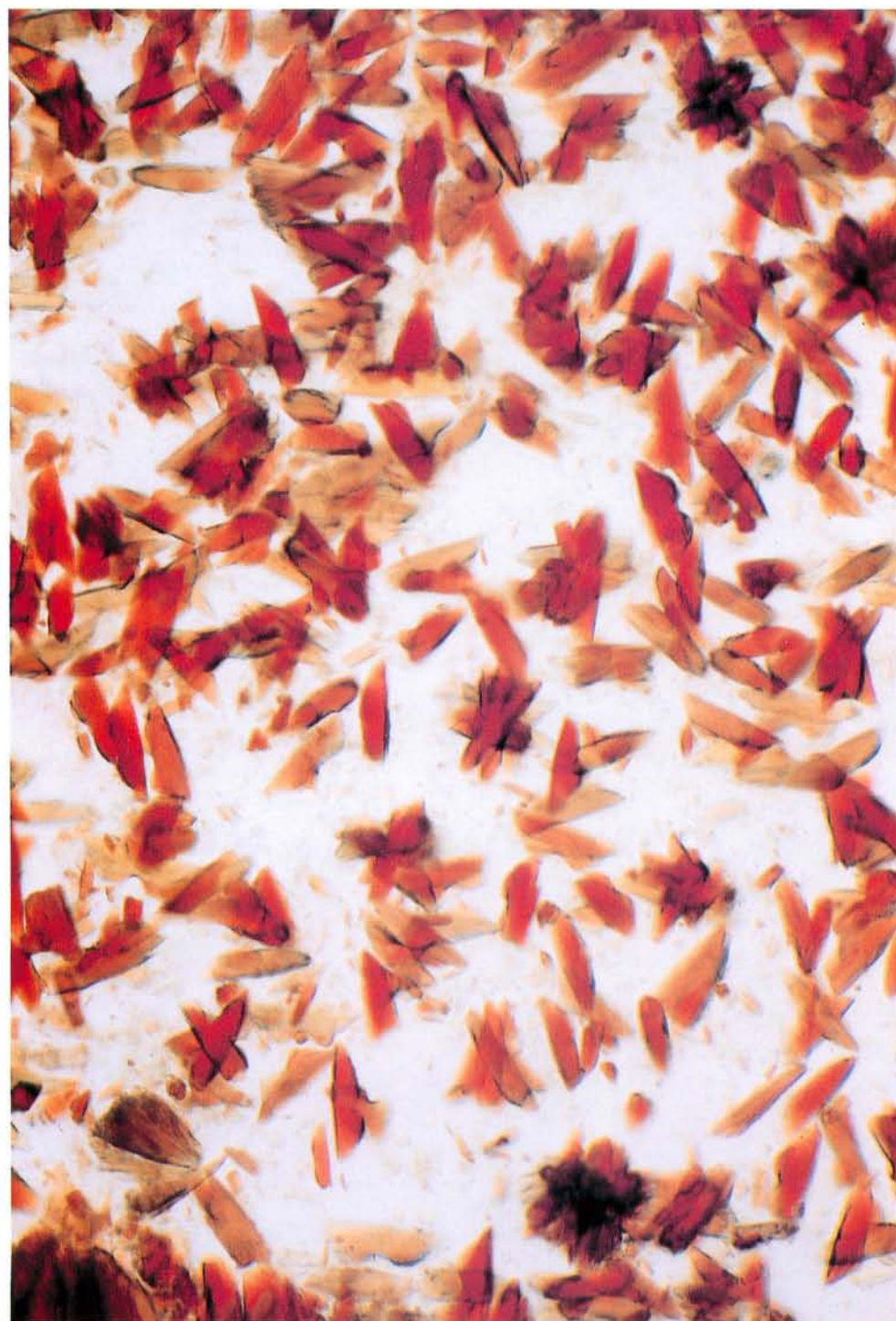


酵素の魅力に惹かれて

板垣英治先生最終講義

板垣英治先生停年退官記念

2000



大腸菌シトクロム b 562 の結晶

目次

	ページ
大腸菌シトクロム b562の結晶	見開き
まえがき	1
最終講義	
「酵素の魅力に惹かれて」	3
著書・論文一覧	33
油分解菌（平成9年3月7日）	40
重油が大好物 4 バクテリア	
（平成11年1月12日）	41
加賀藩の火薬原料量産	
「藩政期の五箇山の驚嘆のバイオ技術」	
（平成11年2月9日）	42
個人史	44
ウガンダの切手	

まえがき

金沢大学に着任以来、32年の年月が過ぎ、退官の時がまいりました。この年月を振り返ってみると、多くの事柄が思い出されます。米国での長い生活を終え、昭和43年夏に新設の薬学部製薬学科薬品物理化学講座の助手としてまいりました。実験室には実験台以外何も無い状態でのスタートです。まず、棚を作ること、机を作ることと毎日が大作業でした。当時の学生さんは、金沢弁でおしゃべりしていましたから、なおさら金沢に来たのだという実感がありました。まもなく起こった全国的な学園紛争、その影響が我が研究室にも波及してきました。ブタthyroglobulinの分子構造、ウシ血清ステロイド結合タンパクの単離・精製の研究に励んだものです。昭和52年11月に理学部化学科生物化学講座に移り、新たな研究をスタートさせました。忘れられないのは、同年12月におきた学生の交通事故による死亡です。生化学の学生実験の終わった日の夕方の出来事です。年が明けて小生の左眼に異常を気付き、診察の結果、眼底出血と診断され、一時はどうなるかと思っただけのものでした。長い通院の結果、再出血することも無い状態となり、現役復帰となりました。恒例の講座対抗ソフトボールも無事こなす事が出来、一安心したものです。カビ*Cylindrocarpou raditicola* を入手したのもこの頃です。まず、1957年のSihらのsteroid monooxygenaseの仕事を追ったものですが、論文に書かれた様にこの酵素はただでは単離精製の出来るものではありませんでした。その後多くの4年生の卒業研究を、また大学院修士課程の学生の課題研究を指導し今日に至りました。また、テニスを共に楽しんだ時期もありました。この間私も実験室に立ち、実験を最後まで続ける事が出来たことは大変幸せなことでした。学生諸君からのエネルギーの供給があっ

ての事と思います。卒業された皆さんに私の研究室の活動を知って頂くために、3月15日に行いました最終講義「酵素の魅力に惹かれて」に加筆したものとしてこの小文を作成いたしました。拙文であることを恥じずここに掲載させていただきます。ご高覧いただき、御批評いただければ幸いです。

平成12年4月

板垣 英治

最終講義「酵素の魅力に惹かれて」

平成12年3月15日 14:30-16:00

金沢大学理学部大講義室

本日は私にこのような機会をつくっていただきました事にお礼申し上げます。また、この様に大勢の方々がお越しいただいた事にもお礼申しあげます。

さて、早速ですが、私が卒業研究で名古屋大学理学部化学科生化学講座に配属して以来、今日までに扱ってまいりました酵素及び蛋白質はここに示しました19種になります。(図1) これらはチログロブリンとステロイド結合タンパクを除き、すべて生体酸化還元反応に関係したものであり、ヘムタンパク、フラビンタンパクが主なものです。今日は時間の関係でそれらの内の一部の酵素についてお話させていただきます。

本題に入る前に、私ども昭和1桁組の最後の者は、特別の履歴を持っています事をお話したいと思います。また、その生きてきた20世紀後半は生命科学において、急速な発展があった時代であり、輝かしい歴史があった事を見ていきたいと思えます。

私どもは小学校には入学していません。昭和16年に太平洋戦争が始まり、小学校は国民学校に代わり、戦時下の教育を受けてきました。戦後、教育制度の6・3・3制への移行に伴い、新制中学校の第1回生として入学し、さらに新制高等学校、新制大学での教育を受けて参りました。この間、学校の校舎は無し、教師は無し、教科書は無しという混乱した状態で、民主化教育が始まったのです。その結果、経験したものが、中学校、高等学校、大学での移転でした。中学校では炎天下、教室の机を各自持つ

て新しい校舎まで運びました。大学ではキャンパスが名古屋市に分散した「たこ足大学」で、卒業研究で配属した生化学講座は昭和15年建ての古びた木造の建物にあり、新しい建物の完成により、研究室の試薬・器具類をリング箱に入れて、リヤカーで運びました。大学院でも、新設の大阪大学蛋白質研究所が始動したばかりのため、初めは古い倉庫に仮住まいし、夏に中之島の新しい建物に移転しました。また、昭和43年8月に金沢

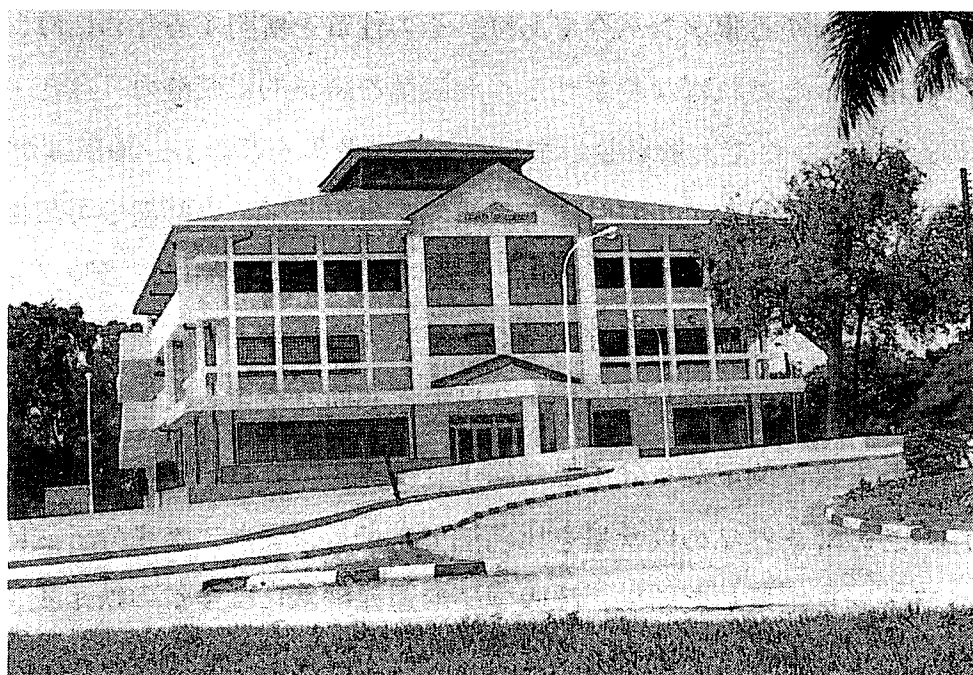
図1. 44年間に付き合った酵素たち

大腸菌	<u>呼吸型硝酸還元酵素</u>
<i>Escherichia coli</i>	<u>鐵酸脱水素酵素</u>
	シトクロム b ₁
	<u>シトクロム b₅₆₂</u>
<i>Pseudomonas putida</i>	<u>シトクロム P-450cam</u>
ブタ	チログロブリン
ウシ	血清テストステロン結合タンパク
ウシ	副腎ミトコンドリア
	シトクロム P-450 _{scc} .
	シトクロム P-450 _{11β}
ヒト	副腎ミトコンドリア
	シトクロム P-450 _{scc}
<i>Cylindrocarpus radlicicola</i>	<u>ステロイドモノオキシゲナーゼ</u>
	テストステロンアセテイト エステラーゼ
	17β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> (<i>Nocardia corallina</i>)	
	<u>3-ケトステロイド-Δ¹-脱水素酵素</u>
	シトクロム P-450 _{cal}
	<u>ステロイドモノオキシゲナーゼ</u>
<i>Pseudomonas putida</i> S1	サリチル酸水酸化酵素
<i>Cluvularia lunata</i>	ステロイド-11β-水酸化酵素 (シトクロム P-450 _{1un})
<i>Halomonas</i> sp	<u>(アルカン水酸化酵素)</u>

大学薬学部に着任した時も、新設講座のために、設営工事に追われた日々を過ごしました。そして、私にとって最後の移転人生となったのが、この角間移転でした。この間に平成元年に JICA からアフリカ、ウガンダ共和国のマケレレ大学理学部拡充計画プロジェクトに参加するように要請され、奇しくも東アフリカを訪れることになり、同大学理学部生化学科、地学科棟の建設のための基本設計に携わり、私の作った図面に基づいて、3階建ての建物が建設されました。(図2) これも本学部の建設の仕事を行っていたから出来た仕事と思っています。この間に私が行ってきた研究については、後ほどお話します。さて世界の方に目を移してみますと、生化学分野では、クレープスサイクルに始まり、サンガーによるインシュリ

ンの化学構造の決定があります。これは蛋白質の初めての一次構造の決定であり、記念すべきものです。続いて、核酸関係、タンパク質の構造に関する優れた研究が多く行われています。特に、ニーレンバーグ等による遺伝子コードの解読は20世紀の自然科学の4大成果の一つとされているものです。さらに、ミッチェルによるミトコンドリアでのATPの合成機構、サンガーによるジデオキシヌクレオチド法によるDNAの塩基配列の決定法の開発、マリスによるPCR（DNAポリメラーゼ連鎖反応）によるDNAの増幅などがあります。これらの優れた研究を私たちは直接、著者の論文を目にし、また講演を聴く機会に恵まれたことは幸せであり、また大きな刺激にもなったものです。

図2. 国際協力事業団無償援助により建設されたウガンダ共和国
カンパラ、マケレレ大学理学部生化学・地学棟（1992年1月完成）



呼吸型硝酸還元酵素：

私をはじめ取り組みました課題は、大腸菌の硝酸呼吸です。普通の酸素呼吸は、呼吸基質を酸化し、電子伝達系を介して、末端酸化酵素シトクロムオキシダーゼに電子を送り、酸素分子を還元して水を作っているのです。この間に酸化的リン酸化反応が共役しておこり、ADPからATPを合成しています。一方、細菌類には嫌気的条件下で硝酸塩を還元することにより、ATPを合成するものがあります。この反応を硝酸呼吸と呼び、その電子伝達系は酸素呼吸の場合と同様であることが現在知られています。硝酸呼吸は酸素呼吸に先だって、生物進化において出現した反応系と考えられています。

この硝酸呼吸における末端酸化還元酵素である呼吸型硝酸還元酵素の本体を明らかにするための研究を行いました。この酵素は細菌の細胞膜に強く結合した、いわゆる膜タンパクであり、その性質を解明するためには、可溶化し、精製しなければなりません。大腸菌を嫌気的に硝酸カリ存在下で100リットルタンクで大量培養しました。その菌体を摩砕し、抽出液から菌体膜成分を分離し、アルカリ性で熱処理する方法でこの酵素を可溶化し、精製する事が出来ました。このようにして得た酵素標品は、当時タンパク質の均一性を調べる、また分子量を測定する唯一の方法である超遠心分析法により分析し、超遠心的に均一な標品と判断されました。さらに沈降係数、拡散係数の測定から分子量は約 10^6 と推定され、非常に大きな値でした。この酵素標品の鉄含量を比色法で定量し、また、炎光分析法によりモリブデンを定量した結果、呼吸型硝酸還元酵素には多量の鉄イオンが含まれていること、また1原子のモリブデンイオンが存在することが、初めて明らかになりました。当時非ヘム鉄や、鉄イオウクラスターは知ら

れておらず、この多量の鉄イオンがどの様に存在しているのかは知りませんでした。その後、1974年に外国のグループにより、界面活性剤により可溶化した酵素が単離・精製され、非ヘム鉄、モリブデンの存在が再確認されました。

大腸菌の硝酸還元酵素に電子を直接送り込むのはシトクロム b_1 です。このシトクロムが非酸素依存型電子伝達系で働いていることを、初めて提唱されたのは、以前当生化学講座におられました佐藤了先生です。当時はシトクロムは酸素呼吸系にのみ働いていると考えられていました。この事を可溶化したシトクロム b_1 標品と硝酸還元酵素標品で再構成して実証し、さらに、1950年代末に動物、微生物に広く発見された

“p-キノン化合物” ユビキノン”

が大腸菌の硝酸還元酵素の電子伝達系にも働いていることを再構成系を用いて初めて明らかにしました。

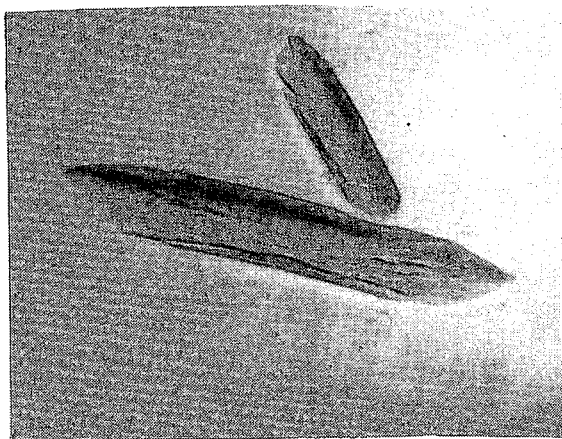
シトクロム b_{562} :

1964年8月末に米国イリノイ大学のLowell P. Hager先生のもとに、大腸菌のシトクロム b_1 の関係から留学することになりました。研究室で大型のフリーザーの扉を開けると、中には凍結した大腸菌の塊が大量にあるのを見て、まずは驚かされました。9月はじめに研究テーマとしてシトクロム b_1 の研究を行うか、或いは、他の事柄を行うか考えているとき、まずこの大腸菌の細胞抽出液を調べて見ることにしました。菌体を音波処理して破壊して粗抽出液を作り、その色を観察し、さらにCary15スペクトロメータによる可視部吸収スペクトルの測定をしたところ、この菌体には新しいヘムタンパクが微量であるが存在することが確認されました。その

分光的性質からシトクロム b562 と名付けました。このシトクロムの特徴は鉄プロトポルフィリン IX を補欠分子とする B 型シトクロムであること、それにも関わらず水溶性である事です。これまでに報告されている B 型シトクロムはすべて膜結合タンパクで不溶性です。早速、このシトクロムの精製を行い、1ヶ月足らずの間に結晶化することに成功しました。図3は酸化型シトクロム b562 の結晶できれいな結晶構造をしている事が読みとれます。この図は多くの結晶を観察したものです。シトクロムですから赤い結晶です。結晶条件の違いからか、先のものとは少し異なった形をしています。(見開きの図参照) 図3. 大腸菌シトクロム b562 の

このシトクロムの超遠心分析による分 結晶

分子量の測定には苦勞しました。沈降平衡の実験をした時に、夜中に遠心機を見に行った際には Univercity Police に尾行される事もありました。この結晶化は私のこの研究室での生活を大きく変えました。渡米早々のことで、英語に不便な私に対しての周りの評価が



すっかり変わったことです。1965年春の Federation Proceeding of Biochemistry において発表し、座長の Dr. Lucil Smith (シトクロムの総説の著者) よりお褒めの言葉を頂いたのは忘れられません。

次に、このシトクロムのアミノ酸配列を研究することになりました。私にとって初めての体験であり、また当時のそのための技術レベルからも大変な仕事となりました。今から35年前にタンパク質の一次構造を研究することがどれほど大変な仕事であったかを、皆様は想像することは出来な

と思います。まずアミノ酸分析機の性能、ペプチド分離技術、試験管内で行う全手動エドマン分解とその生成物PTHアミノ酸の同定といずれも現在から見ると大きな問題を抱えていました。いずれも大量の試料を必要とすること、分析時間がかかること、分析精度の問題などです。当時分子量1万のタンパク質の一次構造を決定するためには数グラムの純粋なタンパク試料が必要でした。これを調製するのは容易な事ではなく、そのために限られたタンパク質の一次構造しか決定されていなかったのです。まず、大量の大腸菌からシトクロム b562を精製・結晶化する事から仕事は始まりました。このシトクロムの菌体含量は低いために、大腸菌のアセトン粉末を大量に購入し、大型バケツでの抽出と、多数のカラムを使つての精製と、冷凍室での作業が続き大変でした。その結果、3年の月日をかけて、やっとこのタンパク質の一次構造が一部(2残基)を残して明らかになりました。このタンパク質はアラニンにはじまり、110番アルギニンで終わっています。その中に1分子の鉄プロトポルフィリンIXと結合する7番メチオニンと106番ヒスチジンがあります。その後、Dr. Scott MathewsによりX線結晶解析が行われ、このタンパク質は4本の α -ラセン構造より出来ていることが明らかになりました。

図4はX線結晶解析の結果を示しています。これは典型的な4本のラセン構造が束になった構造(Four Helix Bundle)です。一般にタンパク質分子の立体構造は大きく4つに分ける事が出来ます。1) α -ラセン構造と β -シート構造が互いに入り組んだ構造をしているもの、2) 複数の α -ラセン構造から出来ているもの、3) α -ラセン構造部分と β -シート構造部分が分かれて一つの分子内にあるもの、4) 複数の β -シート構造から出来ているものです。このシトクロムは代表的な4-Helix bundle モデ

ルであり、生化学の教科書にそのリボンモデルが紹介されています。このシトクロム b₅₆₂の研究で得られた成果は、生化学教科書：Mahler等の Biological Chemistry、White等の Principle of Biochemistry に引用されています。また、Eichhorn等の Bioinorganic Chemistry にも大きく引用されました。さらに、

Annual Review of Bacteriology (1968)にBartschにより、Annual Review of Biochemistry (1980)にvon Jagowと Sebaldにより引用されました。

また、Atlas of Protein Sequence and Structure 1969はタンパク質の一次構造のデータベースの始まりで Dayhoffにより出版されたものですが、これにも登録されています。この二つの本

(Lehninger 等の Principle of Biochemistry (1993), BrandenとToozeの Introduction to Protein Structure (1991)にはシトクロム b₅₆₂の3次構造が紹介されています。

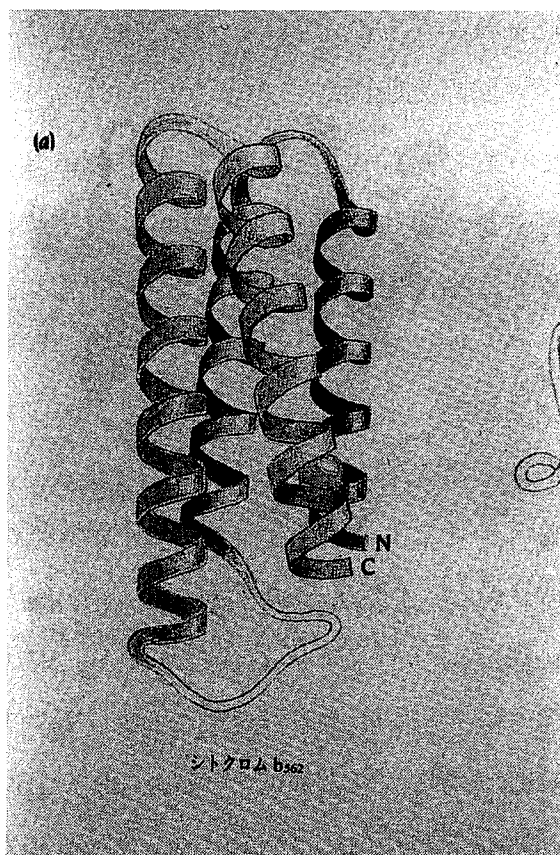


図4. 大腸菌シトクロム b₅₆₂のリボンモデル (Dr. S. Mathews による)

シトクロム P-450 :

次にシトクロム P-450の話に移ります。シトクロム P-450は鉄-プロトポルフィリン IXを補欠分子とするヘムタンパク質で、2価鉄型（還元型）のタンパクが一酸化炭素と結合するとソーレ帯の吸収が長波長側の450 nmに変化する性質を持ったものであり、他の一酸化炭素結合性タンパク（ヘモグロビン、ミオグロビン）とは異なった性質を持つものです。はじめ1962年に兎肝臓マイクロゾームに佐藤了先生らにより発見され、また1963年に副腎皮質マイクロソームからEstabrook等により発見されたタンパク質です。このタンパク質は動物では性ホルモン、副腎皮質ホルモン、胆汁酸、プロスタグランジンなどの生合成、薬物・外来異物の解毒代謝、一酸化窒素の生合成などに働く重要な一原子酸素添加酵素です。その後、植物における花の色素合成、植物成分の合成、微生物の物質代謝、抗菌物質の合成等にも働いていることが知られています。肝臓マイクロゾームや副腎皮質マイクロゾームに存在する P-450はいずれも膜結合性のタンパクであり、その単離、精製は非常に困難でありました。そのために、このヘムタンパクの特異な性質を詳しく研究することが出来なかったのです。

1967年10月に片桐先生がイリノイ大学のI. C. Gunsul先生の研究室にこられ、*Pseudomonas putida* のカンファー代謝酵素の研究をされる事になりました。この研究室は私のいた研究室とは隣会わせです。以前に行われていた研究の論文を手がかりに仕事を始めようとしたのですが、難問にぶつかり私に相談を持ちかけられました。それは確か10月16日金曜日の午後、Illini Hall のキャフテリアでのことです。そこで翌土曜日の午前に、このバクテリアの抽出液を用いて私のところで実験をすることにしたのです。

まずCary15で抽出液の酸化還元差スペクトルをとり、この抽出液には

多量のヘムタンパク質が含まれている事が解りました。次に私のデスクの横のフードにありました一酸化炭素ボンベからガスを取り、還元した試料に吹き込み、一酸化炭素差スペクトルを調べたところ、450nmにピークを持つ差スペクトルが得られました。この簡単な実験により、この *Pseudomonas putida* の抽出液には可溶性のシトクロムP-450が存在することが発見されたのです。わずか1時間足らずの実験です。その後、片桐先生はこのP-450を部分精製し、他の抽出画分と組み合わせて、カンファーの5 α -水酸化反応がこのP-450で触媒されることを示され、シトクロムP-450_{cam}と名付けられたのです。

この細菌の可溶性シトクロムP-450が発見されたことは、非常に大きな意味を持っています。まず、精製が容易であること、大量に入手出来ることであり、その結果、このP-450の一次構造の研究、反応機構の解析、結晶化と3次構造の研究が多くの研究者により直ちに行われ、P-450学の発展に大きく貢献しました。

1968年にP-450_{cam}の最初の論文が世に出て以来、非常に多くの論文が出ています。データベースMedlineにより調べた結果、80年代には84報、90年代には220報が検索されました。(60年代、70年代は医学部のMedlineにはデータが残念ながら挿入されていなかった。)これは未だにこのP-450_{cam}が動植物、微生物のP-450の研究に欠く事の出ないものとなっているからです。

Thyroglobulin からsteroidへ :

4年間の米国での研究生活を終え、1984年8月に金沢大学に参りました。初めは薬学部においてブタthyroglobulinについての研究を行いました。

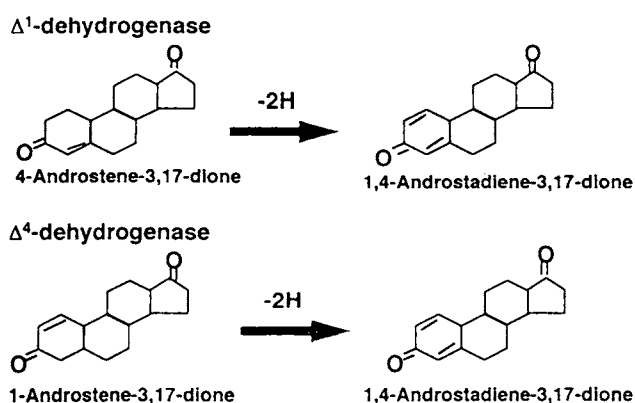
た。このタンパク質は甲状腺に大量に存在し、甲状腺ホルモンチロキシンの前駆体です。分子量約67万の糖タンパクです。続いて、理学部に移ってからは、動物・微生物でのステロイド合成代謝酵素の研究に移りました。

まず、動物では副腎でのコレステロールからグルココルチコイド、ミネラルコルチコイドを、性巣ではテストステロン、エストラジオールの性ホルモンが生合成され、内分泌されています。これらのステロイドホルモンの生合成反応はP-450による水酸化反応や、側鎖切断反応から成り立っています。側鎖切断反応にはP-450_{scc}, P-450_{17 α} , P-450_{14DM}, P-450_{arm}があります。微生物もまた、ステロールやステロイドを代謝することがよく知られています。これは有用ステロイドを微生物を使って生産するために、盛んに研究が行われたからです。現在、ピルや副腎皮質ホルモン等は微生物による反応によって生産されています。微生物のプロゲステロンの分解反応は、まず、17位側鎖の切断反応と続くA環の脱水素反応、さらに9位炭素の水酸化反応によるB環の開環反応をへて行くと言われています。しかし、各段階の酵素については詳しく研究は行われていませんでした。私どもは側鎖切断反応、芳香環化反応に的を絞り、かび、細菌類を調べた結果、*Cylindrocarpon radiculicola*による側鎖切断反応を、また *Rhodococcus rhodochrous*による側鎖切断反応と不飽和化反応を見つけ、研究を行ってきました。

研究を行った順とは違いますが、話を整理するために、*Rhodococcus rhodochrous*からの3-ケトステロイド- Δ^1 -脱水素酵素と3-ケトステロイド- Δ^4 -脱水素酵素についての話をします。これらの脱水素酵素は水酸基の酸化を行う例えば17 α -ヒドロキシステロイド脱水素酵素とは違い、

ステロイド環に不飽和結合を挿入する反応を触媒するものです。(図5) それぞれの酵素を単離・精製しました。私の実験ノートには1988年の8月15日のところに3-ケトステロイド- Δ^1 -脱水素酵素が精製され、そのフラビン酵素としての吸収スペクトルが貼られています。この年の夏休みは毎日実験と夕方のテニスで暮れたのです。二つの酵素は黄色をしています。 Δ^1 -脱水素酵素は3-ケトステロイドのA環の1 α 、2 β の水素を取り除く反応を触媒します。これに対し Δ^4 -脱水素酵素では、4、5位の水素を引き抜く反応を触媒し、二重結合を作ります。特に Δ^1 -脱水素酵素の反応は合成副腎皮質ホルモン-プレドニソロン、デキサメタゾンの生産には欠くことの出来ないものです。

図5.3-Ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase と3-Ketosteroid- Δ^4 -dehydrogenase の反応



Δ^1 -脱水素酵素は次にお話します、遺伝子のクローニングとその塩基配列の決定から、分子量54,949で、アミノ酸残基数510箇からなるFADを補欠分子とするフラビタンパクであることが明らかになりました。

これはこの酵素遺伝子を含む染色体DNAの断片の2,268塩基の配列を示しています。この酵素遺伝子は、ここにあります開始コドンATGより始まっています。これはこの遺伝子の後半部分の塩基配列であり、ここに

終止コドンTGAがあり、Open reading frameは終わっています。酵素遺伝子は1536塩基対から出来ていることが明らかになりました。これを解読したアミノ酸配列が下側に示してあります。また、この酵素の全アミノ酸配列を図6に示しました。この配列から、補欠分子FADはN-末端の近くに結合していることが明らかとなりました。他のアミノ酸残基については、後にお話いたします。これまでに他の細菌3種より3-ケトステロイド- Δ^1 -脱水素酵素の遺伝子の塩基配列が報告されていました。私どもの結果と合わせアミノ酸配列を比較することにより、この酵素の一次構造の保存性が明らかになりました。

図6. 3-Ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenaseの推定されたアミノ酸配列
(下線部はFAD結合モチーフを示す。)

```

1 AEWAECDVL VVGSGAGGCC GAYTPAREGL SVILVEASEY FGGTTAYSGG GGWFPTNAV 60
61 LQRAGDDDTI EDALTYYP RV VGDRTPH ELQ EAYVRGGAPL IDYLESDDL EFMVYPWPDY 120
121 FGKAPKARAQ GRHIVPSPLP IAGDPEL NES IRGPLGRERI GEPLPDLIG GRALVGRFLI 180
181 ALRKYPNVDL YRNTPLEELI VEDGVVVGAV VGNDGERRAI RARKGVVLA A GGFQNDEMR 240
241 GKYGVPGAAR DSMGPWSNLG KAHEAGIASG ADVDLMDQAW WSPGLTHPDG RSAFALCFTG 300
301 GIFVDQD GAR FTNEYAPYDR LGRDVIARME RGEMTLPFWM IYDDRNGEAP PVGATNVPLV 360
361 ETEKYVDAGL WKTADTLEEL AGQIGVPAES LKATVARWNE LAAKGVDEDF GRGDEPYDLA 420
421 FTGGGSALVP IEQGPFHAAQ FGISDLGTKG GLRTDTVGRV LDSEGAPIPG LYAAGNTMAA 480
481 PSGTVYPPGG NPIGASALFA HLSVMDAAGR 510

```

上から *Rhodococcus rhodochrous*, *Athrobacter simplex*, *Nocardia opaca*, *Pseudomonas testosteroni* のものです。細菌の間の相同性を見ますと、*R. rhodochrous* と *A. simplex* の間で 67.8% の高い値であり、二つの細菌が近い関係にあることを示しています。他の細菌のものは低い値でした。つぎに、N-末端付近、C-末端付近の配列に保存性の高い領域があります。しかし、300-400番の領域ではそれほど高くありません。このことから、N-末端領域には FAD の結合部位があること、また、おそらく C-末端領域に基質ステロイド結合部位があると考えられます。

酵素のアミノ酸残基の働きを知る方法として、部位指向変異体を用いる有力な方法があります。そのためには本酵素の遺伝子の大量発現系を組立てる必要があります。本酵素遺伝子 (*ksdD*) を T₄-プロモーターを持つ発現ベクターに組み込み、プラスミッド pDEX3 を作製しました。これで大腸菌を形質転換し、IPTG で発現した結果、大量の本酵素を発現している事を SDS-ゲル電気泳動により確認しました。この系を用いて組み替え型 3-ケトステロイド- Δ^1 -脱水素酵素を大量に単離・精製し、その性質が野生型酵素とは変わらないことを確認しました。

この酵素はニトロメタンによるチロシン残基の化学修飾により活性を失ってしまいます。生成したニトロチロシンの分析により 121 番のチロシン残基が修飾されていることが明らかとなりました。この残基は 4 種の酵素で保存されているものです。この残基の付近には 104 番、116 番にもチロシン残基があることから、これらの残基の部位指向変異体を作り、その酵素的性質の変化を調べました。(表 1) 酵素活性は組み換え酵素の値に比べ、Y104A では変化していません。Y116 変異体では A1a 変異体の

K_m 値が非常に大きくなり、このチロシン残基は基質ステロイドの活性中心への結合に働いているものと考えられます。Y121変異体では、活性の大きな低下が見られ、触媒効率の著しい減少となっています。この結果から、121番チロシン残基は脱水素反応に直接関係したアミノ酸残基であると考えられ、この残基は活性に必須なアミノ酸であることが明らかとなりました。

表 1. 3-Ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenaseのチロシン変異体酵素の触媒的性質

Enzyme	K_m^1	V_{max}^2	V_{max}/K_m	Ratio ³
Recombiant	21	4.6×10^3	219	100
Y104A	117	5.0×10^3	43	19.6
Y116F	166	6.5×10^3	39	18
Y116S	600	13.3×10^3	22	10
Y116A	>3000	>15 $\times 10^3$	~ 5	~2
Y121F	420	12	0.03	1.3×10^{-2}
Y121S	270	4.4×10^3	16	7.3
Y121A	695	80	0.12	5.4×10^{-2}

1 $K_m = \mu\text{M}$ for 4-androstene-3,17-dione

2 $V_{max} = \text{mol}/\text{min}/\text{mol enzyme}$

3 V_{max}/K_m of the mutant against that of the recombinant enzyme

ステロイド一原子酸素添加酵素：

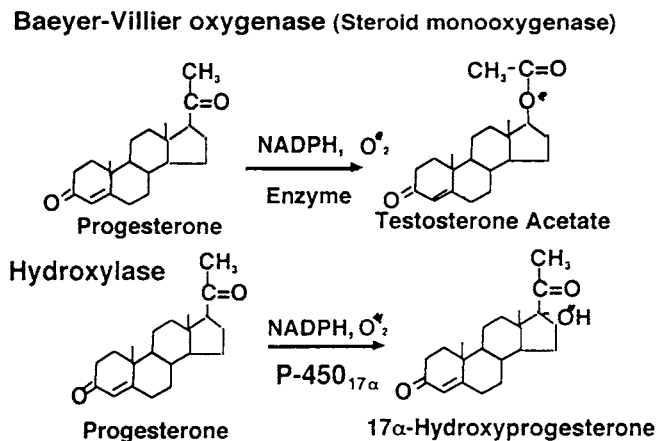
微生物による医薬品として有用なステロイドの合成は薬品工業にとっても重要な事柄です。そのためにはステロール、ステロイドの側鎖切断反応は重要な反応です。カビ *Cylindrocarpus radicialis* は1957年に Sih 等により progesterone の 17 位側鎖に反応し、testosterone acetate, testosterone を作る酵素を持つことが報告されました。また、他の研究室から *Penicillium* 属のカビにより androstenedione から testolactone が生成される事が報告されています。これらのステロイドの変換反応は、

Baeyer-Villiger反応によるものと考えられましたが、いずれもどのような酵素が触媒しているのかは明らかにされませんでした。

Baeyer-Villiger反応は1899年にスイスで、BaeyerとVilligerにより見つけられた反応で、過酸によるケトン、シクロケトンの酸化で、C-C結合が切断されて酸素を挿入して、それぞれエステル、ラク톤を生成する反応です。この型の反応は生物界にも存在することが明らかになり、特に *Acinetobacter* 種のシクロヘキサノン一原子酸素添加酵素による cyclohexanone の ϵ -caprolactone への変換が良く知られています。

微生物、動物は前にもお話ししました様に、ステロイドの水酸化反応を触媒します。例えば動物細胞のミクロゾームの P-450_{17 α} によるステロイドの 17 位の水酸化反応では、C17 α 位の水素が水酸基で置換されています。一方、Baeyer-Villiger反応を触媒するステロイド一原子酸素添加酵素では、熱力学的に安定な C17 位と C20 位の結合が切断され、1 原子の酸素がその間に挿入されており、通常多く見られる水酸化酵素反応とは大きく異なっています。(図7)

図7. steroid monooxygenaseによるBaeyer-Villiger反応と P-450_{17 α} による水酸化反応

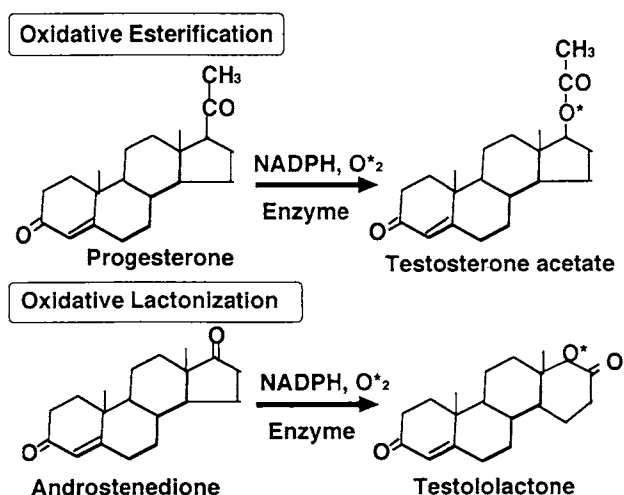


私どもはまず *Cylindrocarpon* からこの酵素の単離を試みましたが、普通のクロマト法では不可能でした。そこでステロイドをリガンドとするアフィニティゲルを開発し、この酵素を初めて単離・精製することに成功しました。このカビの酵素は、分子量11.5万の2量体分子であり、FADを補欠分子として持つことが明らかとなりました。さらにこの酵素は、基質特異性が広く、多種の21-ケトステロイドに対して反応すること、また、17-ケトステロイドとも反応し、テストロラクトンを生産する事が明らかになりました。これは *Cylindrocarpon* の酵素の触媒する反応です。(図8)

上の式はprogesteroneのC17-C20間への酸素原子の挿入する酸化エステル化反応です。下の式はandrostenedioneのC13-C17間に酸素を挿入する酸化ラクトン化反応であり、5員環の6員環への拡大が起きています。生成物テストロラクトンはかつて乳ガンの治療に使用された事があります。このよう

にこの酵素は”bifunctional enzyme”とすることが出来ます。この酵素についてより詳しく研究するためには多くの酵素が必要です。しかし *Cylindrocarpon* からこの酵素を大量に精製する事は困難でした。そこ

図8. *Cylindrocarpon radlicola* の steroid monooxygenase の反応



で、細菌からこの同じ反応を触媒する酵素を得るために色々調べましたが、見つかりませんでした。その時に、先にお話ししました3-ケトステロイド- Δ^1 -脱水素酵素を見つけ、その研究を始めたのです。さらに、その間にシトクロム P-450を*Rhodococcus* から発見し、その触媒する反応を調べていました時に、偶然、ステロイド一原子添加酵素を発見することが出来ました。細菌由来のステロイド一原子添加酵素はこれが初めてのものです。この細菌の酵素はprogesteroneの testosterone acetateへのBaeyer-Villiger酸化反応のみを触媒し、カビの酵素とは性質が大きく異なります。この*Rhodococcus*の酵素を単離し、フラビン酵素であることを確認し、さらに次にお話しします本酵素の遺伝子の解析から、分子量60,919、アミノ酸549個よりなるフラビタンパクであることを明らかにしました。この図は*Rhodococcus rhodochrous* の染色体DNAよりクローニングした酵素遺伝子を含む1.9 kbのDNA断片の塩基配列の前半部を示しています。本酵素の遺伝子はこのTTGより始まる1650 bpで出来ています。開始コドンがTTGではじまることも特徴的です。決定した塩基配列から推定したアミノ酸配列は、先に決めた本酵素のN末端配列及びペプチドの配列のデータと一致し、このORFがステロイド一原子添加酵素の遺伝子であることが確認されました。これは先の配列の後半部を示しています。図9はこの酵素の全一次構造を示しています。N末端側にFADのアデニル基部分の結合モチーフGXGXXGがあり、193番から後にNADPHの結合モチーフが存在することから、N末端側よりFAD, NADPH結合領域が作られており、C末端付近に基質ステロイド結合部位が存在すると考えられます。また本酵素は2残基のシステインを持っています。この残基については後程ふれます。*Rhodococcus*の二つの酵素遺伝子の前後の塩基配列から、これらの酵素は染色体上の近い位置

にコードされている事が明らかとなりました。しかしステロイド一原子酸素添加酵素遺伝子と3-ケトステロイド- Δ^1 -脱水素酵素遺伝子はステロイド代謝をする酵素で染色体上でクラスターを作っているのではなく、約4.2 kbp離れて、逆向きにそれぞれコードされている

図9. *Rhodococcus rhodochrous*の steroid monooxygenaseのアミノ酸配列

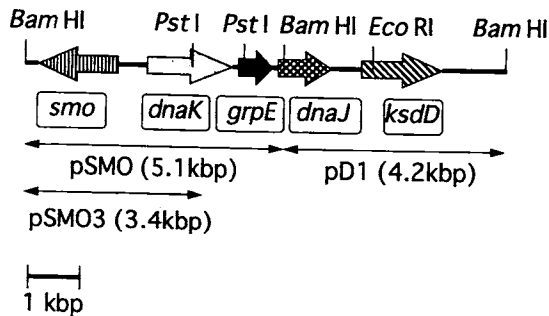
```

1  M N G Q H P R S V V T A P D A T T G T T S Y D V V V V G A G
31  I A G L Y A I H R F R S Q G L T V R A F E A A S G V G G V W
61  Y W N R Y P G A R C D V E S I D Y S Y S F S P E L E Q E W N
91  W S E K Y A T Q P E I L A Y L E H V A D R F D L R R D I R F
121 D T R V T S A V L D E E G L R W T V R T D R G D E V S A R F
151 L V V A A G P L S N A N T P A F D G L D R F T G D I V H T A
181 R W P H D G V D F T G K R V G V I G T G S S G I Q S I P I I
211 A E Q A E Q L F V F Q R S A N Y S I P A G N V P L D D A T R
241 A E Q K A N Y A E R R R L S R E S G G G S P H R P H P K S A
271 L E V S E E R R A V Y E E R W K L G G V L F S K A F P D Q
301 L T D P A A N D T A R A F N E E K I R A V V D D P A V A E L
331 L T P K D H A I G A K R I V T D S G Y Y E T Y N R D N V E L
361 V D L R S T P I V G M D E T G I V T T G A H Y D L D M I V L
391 A T G F D A M T G S L D K L E I V G R G G R T L K E T W A A
421 G P R T Y L G L G I D G F P N F F N L T G P G S P S V L A N
451 M V L H S E L H V D W V A D A I A Y L D A R G A A G I E G T
481 P E A V A D W V E E C R N R A E A S L L N S A N S W Y L G A
511 N I P G R P R V F M P F L G G F G V Y R E I I T E V A E S G
541 Y K G F A I L E G
  
```

事が明らかになり、二つの酵素遺伝子の間には heat shock proteinなど3個の遺伝子が存在します。(図10) この様な遺伝子配列をなぜしているのか、また二つの酵素の発現のための調節因子の配列についてはまだよく分かっていません。

ステロイド一原子酸素添加酵素のアミノ酸配列を他の一原子酸素添加酵素と比較すると、一般の水酸化酵素との間には相同性は見られません。ところが、Baeyer-Villiger反応を触媒するシクロヘキサノン一原子酸素添加酵素とは55.2%と言

図10. steroid monooxygenase遺伝子と3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase遺伝子の染色体DNA上での位置関係



smo: steroid monooxygenase 遺伝子

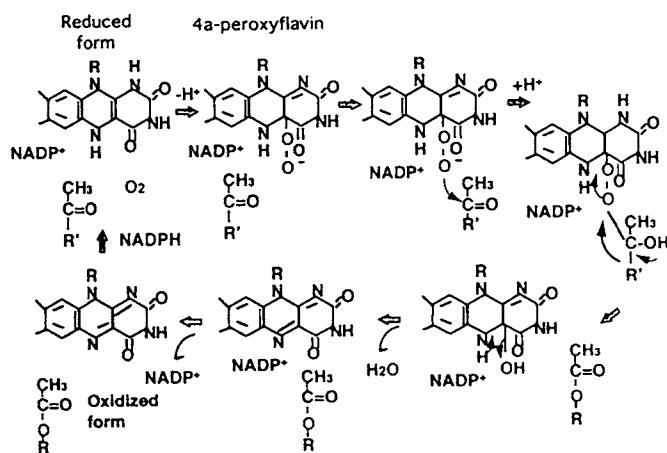
ksdD: 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase 遺伝子

う高い相同性が見られ、このことからBaeyer-Villiger反応を触媒する酵素には独特のアミノ酸配列が、さらに独特の立体構造が存在するものと考えられます。もし二つの酵素のX線結晶解析が行われたならば、この事は明らかになるでしょう。明らかにされたDNAの塩基配列が本当にこの酵素の遺伝子であることを確かめるために、本酵素の大量発現系を作りました。本酵素遺伝子 (*smo*)を含むプラスミドより、その部分をPCRにより増幅し、遺伝子断片を得ました。これを大量発現ベクターに組み込み、プラスミド pSMO-EXを得ました。このプラスミッドを大腸菌に入れて形質転換し、酵素遺伝子を発現した結果、このSDSゲル電気泳動図に示しました様に、菌体内に大量に発現していることが分かります。この菌体抽出液からDEAEセルロースクロマトグラフィ及びゲル電気泳動により、組み換え酵素を大量に得ることに成功しました。この発現系が出来たことにより、本酵素の部位指向変異体の作製が可能となりました。

このステロイド一原子酸素添加酵素はシステイン修飾試薬 pCMBやアフニティラベル試薬により修飾され、活性を失います。修飾されたアミノ酸の分析の結果、70番Cysが修飾されていることが明らかになりました。そこで70番CysをSer, Alaに置換した変異体酵素を作製し、また491番CysもSerに置き換えたものも作製しました。これらの変異体酵素で、70番の置換したものではオキシゲナーゼ活性の低下とNADPH酸化酵素活性の増加が見られ、反応の化学量論的關係が大きく低下していることが明らかとなりました。この結果から70番システイン残基の働きは次の様に考えられます。ステロイド一原子酸素添加酵素の反応機構は図11に示したものです。酵素への基質ステロイドの結合、NADPHによるFADの還元、酸素分子との反応による4 α -パーオキシフラビン中間体の生成、そして、基質のBaeyer-Villiger酸化よりなっていま

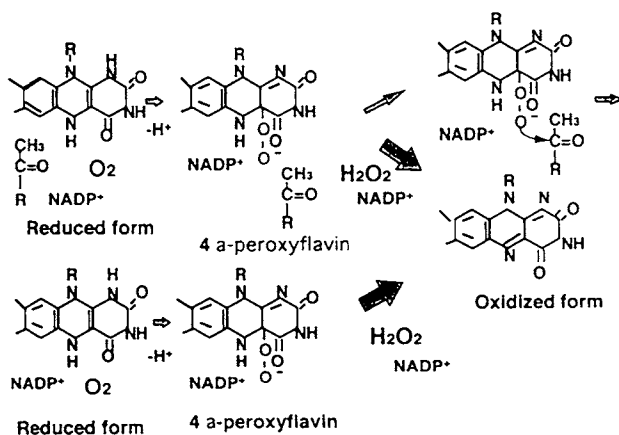
す。この反応の化学量論的關係は1 : 1 : 1です。ところが、C70A変異体酵素では、4 α -パーオキシフラビン中間体が安定でなく、分解し過酸化水素を生成する方向に進みます。また、この酵素は基質非依存のNADPHの酸化活性を強く持つことを示しています。

図11. steroid monooxygenaseの反応機構



(図12) これらの結果から、70番システイン残基は本酵素に必須なアミノ酸残基であり、その働きはフラビンのイソアロキサジン核と相互作用し、反応中間体パーオキシフラビンの安定化に寄与しているものと考えられます。

図12. Cys70Ala変異体酵素の反応

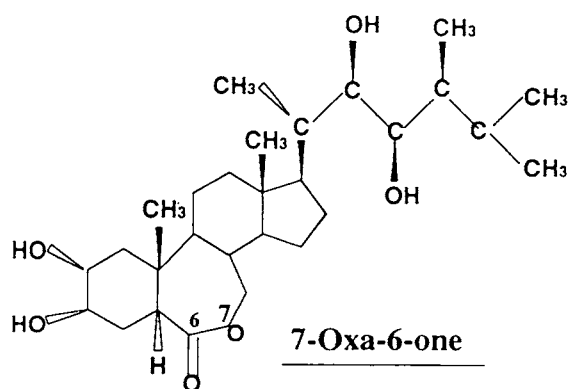


このステロイド一原子酸素添加酵素の研究の一部はすでにChemistry and Biochemistry of Flavoenzymes Vol. II (1991) と Angewant Chemie, Int. Ed. English (1988)に引用され、フラビン酵素としての市民権を得ています。ステロイド一原子酸素添加

酵素の触媒する様な反応は自然界では他にどの様なものが存在するかという疑問があります。まず、植物ステロイドホルモンとしてブラシノライドが知られています。これは初めナタネの花粉に発見されたステロイドです。その働きは植物の成長促進です。このB環の構造を見ますと7員環ラクトン構造であり、これは明らかに6-ケトステロイドのBaeyer-Villiger酸化により出来上がったものと考えられます。(図13)この植物ステロイドはカンペステロールを原料として、多段階の反応で生合成されていると考えられていますが、現在一部の反応しか明らかにされていません。合成反応にはP-450による水酸化反応、Baeyer-Villiger酸化による7員環の形成があります。植物のこのカスタステロンのBaeyer-Villiger酸化反応はまだ明らかにされていませんが、カビのステロイドD環の6員環への拡大反応と同様な酵素によって反応は進行することが予想されます。

これまでは、酵素化学、タンパク化学のお話をしましたが、ここから、少し話題を変えさせていただきます。

図13. Brassinolideの構造



重油炭化水素分解細菌：

次に平成9年1月に起きましたタンカー事故関係のお話をします。この事故はナホトカ号がC重油を満載し、1月2日深夜、日本海で荒波のために船体を破断・沈没し、船首部分が福井県三国町安島沖に漂着座礁した事故です。この漂流の間に積み荷の重油約3700k lが流出し、福井県、石川県などの海岸に漂着し、海岸汚染を引き起こしました。石川県では約20万人が出動し、2万2千k lを回収し、また金沢市では約2万人が重油の回収に当たり、ドラム缶900本分を回収しました。このように多くの人々により回収作業が行われたのですが、すべてを回収する事は不可能でした。一般に海洋での流出重油、原油の浄化は微生物によってなされると言われています。Bioremediationです。今回の重油は化学的には炭素数10-30の長鎖炭化水素の混合物です。これらの炭化水素を分解する能力をもつ細菌が汚染した地域に生息していることを確認することは重要なことです。日本海沿岸でのこのような細菌に関する研究はこれまでにありませんでした。そこで、重油炭化水素分解細菌を調べ、その細菌による重油の生物浄化の可能性を調べることを行いました。これは3月と5月に採取した重油塊です。(図14) 3月のものは柔らかく重油の回りに砂がついた状態ですが、5月のものでは油塊が脆く、壊れやすくなっています。この変化はこれからお話します重油分解細菌の働きによるものです。

図15は炭素数14の炭化水素(n-テトラデカン)を炭素源とする寒天培地に、重油塊を擦りつけて培養したものです。細菌の生育によるコロニーが、擦り付けた線に沿って出来ていることが分かります。このことは重油塊には炭化水素を炭素源として生育することが出来る細菌が多数増殖していることを示しています。

この図は金沢市環境部の依頼で行った仕事です。金沢市の4つの海岸に

重油塊の生物浄化を観測するために、2メートル4方の観測定点を設け、毎月重油を採取し、その重油含量と細菌個体数を調査したものです。(図16) 私が3月に採取した油塊では10³箇/グラムでしたが、気温の上昇にともなって、急激に細菌数が増加していることが見られました。図17は先の図の試料の油塊の重油含量をプロットしたもので、重油含量が

6か月で急激に低下したことがわかります。これは細菌による重油の分解によるものと考えられます。このような結果は事故が起きた当初には予測出来なかったことです。

採取した重油塊からは多くの細菌を単離することが出来ました。これは

図14. 金沢の海岸に漂着した重油塊

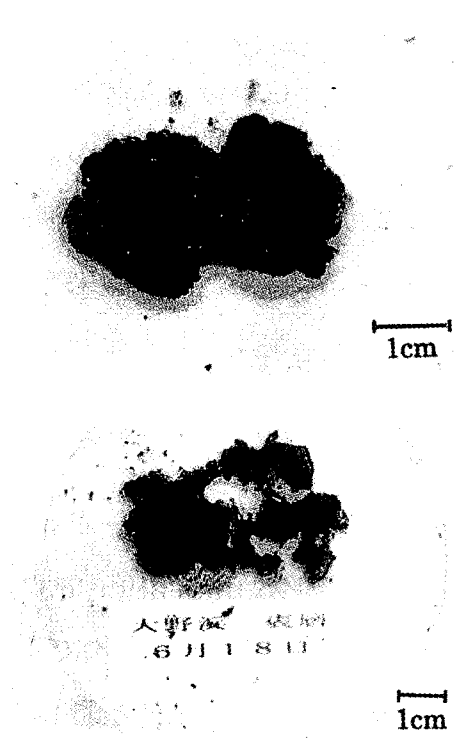


図15. 漂着した重油塊には細菌が生息する。

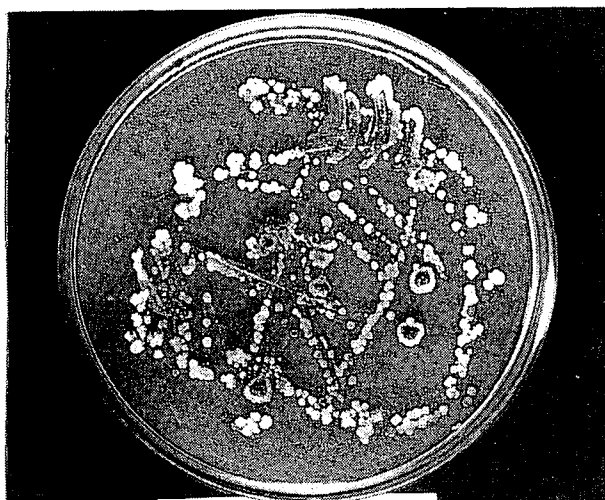


図 16. 漂着重油塊に生息する重油分解菌の菌数 (概数) 変化

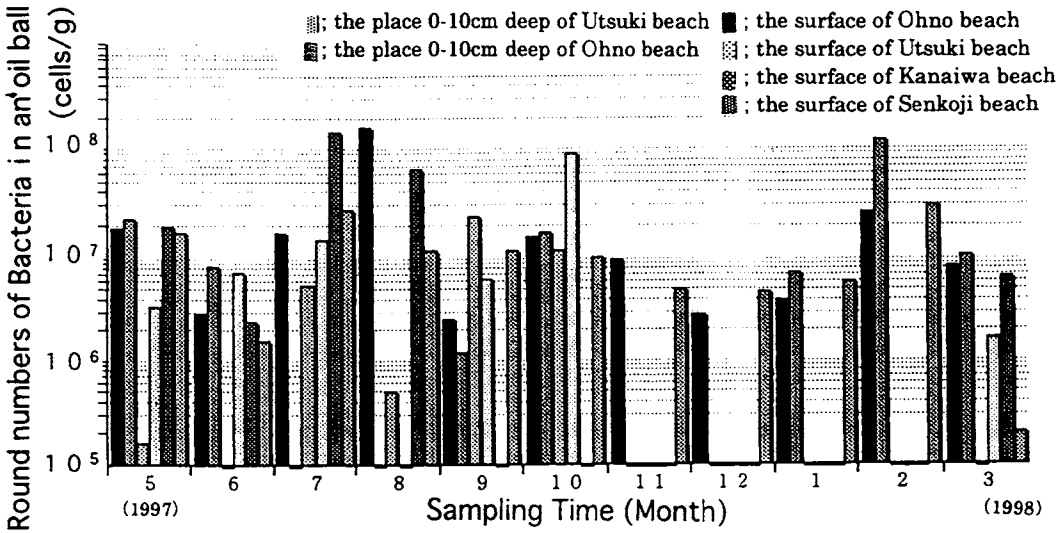
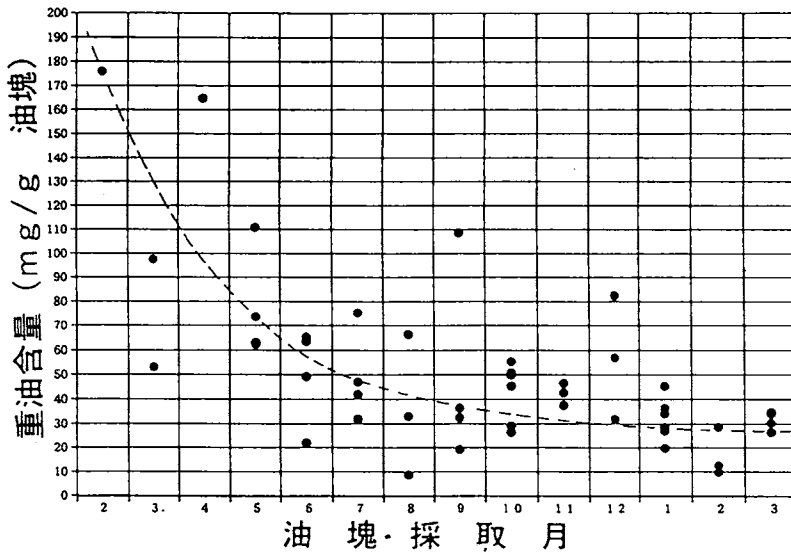


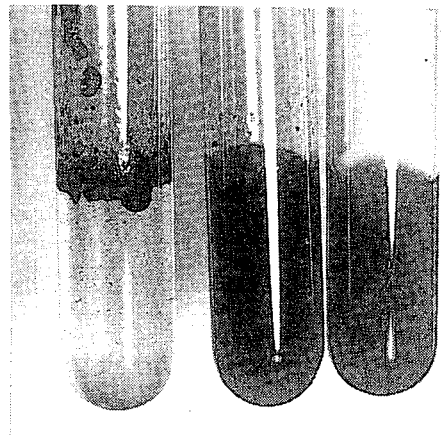
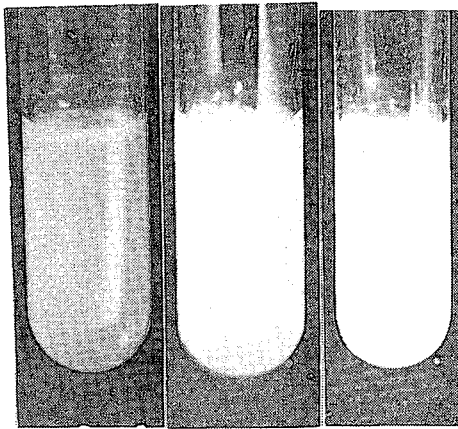
図 17. 漂着重油塊の重油含量変化



内灘海岸で採取した油塊からの細菌で、テトラデカン培地と栄養培地に培養したものです。この細菌は走査電子顕微鏡で観察したところ約 $2\mu\text{m}$ の短い桿菌でした。これは他の菌株をテトラデカン液体培地で振とう培養し

たものです。いずれもテトラデカンを炭素源・エネルギー源としてよく生育しています。（図18）この写真は重油を炭素源とした液体培地に2種の菌株を植えた結果です。（図19）左のものはコントロールで、液の表面に重油が浮いています。これに比べ、右側のUT103株では、液面に浮く重油は全く無くなり、液が黒褐色に変化しています。また、試験管の壁面がきれいになっていることが注目されます。O209株でも重油の分解がよく起きていることが分かります。

図18. テトラデカン液体培地に 図19. 重油液体培地に生育した
 生育した重油分解細菌 UT103株とO209株



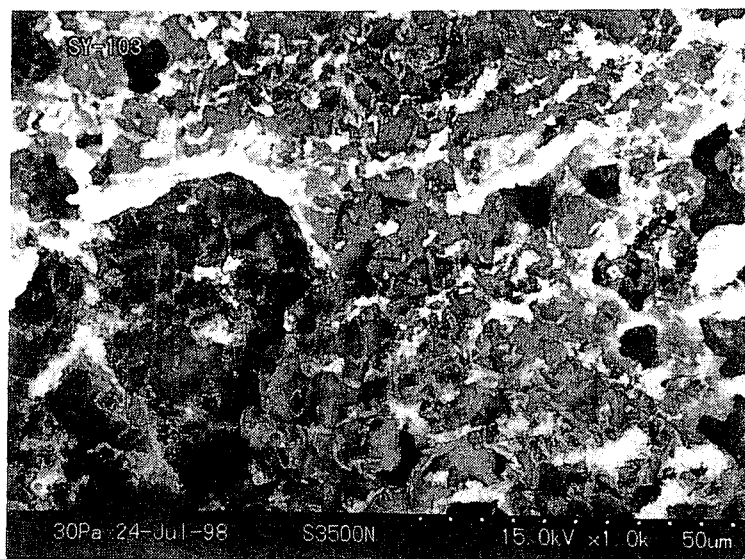
O209株 SY103株 UT103株

先ほどのUT103株でスケールを大きくして重油を用いて培養してみました。菌を植える前では重油は液面およびフラスコの壁面にべったりと付着しています。これに菌株を植え、攪拌して3日培養した結果がこの右側の写真です。ビーカーの壁面の重油が無くなり、液が先の写真と同様に黒褐色に変化し、バクテリアの働きがよくお解りいただけると思います。バクテリアは重油の炭化水素を摂取分解して生育しますが、重油中の褐色固体成分は分解しません。そのために固体成分が培養液中に懸濁状態になっ

ているのです。これは流動パラフィンを炭素源として培養した結果です。はじめ無色の流動パラフィンは液面に浮いていますが、バクテリアの生育によって消費されてしまい、バクテリアにより淡黄色に濁った溶液になっています。このようにこの菌株は高級炭化水素、重油を炭素源・エネルギー源としてよく生育し、高い分解能を持つことを示しています。

次に重油の主成分は炭素数20のn-エイコサンです。n-エイコサンは常温では固体です。液体培地にn-エイコサンを加え、細菌による分解を直接観察することを試みました。これは細菌を植えない状態のn-エイコサンの表面の様子であり板状です。これにSY103株を植え、一晩振とう培養後、n-エイコサンのディスクを取り出し、走査電子顕微鏡で観察しました。（図20）表面に多数の穴があき、穴の壁には細菌の群が観察されます。O209株でも同様に培養した結果、n-エイコサン表面に溝状

図20. 重油分解細菌SY103株によるn-エイコサンの分解摂取.



の構造がみられ、穴もみられます。他の菌株でも同様の結果を観察しています。このように重油分解細菌は固体のエイコサンを摂取し、分解して生育することが直接観察されました。このことは、油塊に付着した細菌がその油を摂取し分解して生育することを説明しています。この結果により、初めにお見せしました3月と5月の重油塊の変化は細菌により油が分解され、砂粒の接着剤として働いていた油が無くなったために、容易にバラバラに壊れてしまっていることを説明することが出来るのです。

今回分離しました細菌のうち最も油分解能力の高い菌株UT103を同定するために、16SリボソームRNAの遺伝子の塩基配列をしらべて、既知のバクテリアのデータと比較した結果、表2に示しましたように *Halomonas* 属のバクテリアに最も高い相同性が見つかりました。特に *Halomonas variabilis* とは94.6%と言う高い値です。ところが、このバクテリアを調べてみますと、性質が異なることから同一ではありません。

表2. 重油分解細菌UT103株の16Sリボソーム遺伝子の相同性

	(match%)
<i>Halomonas variabilis</i>	94.6
<i>Halomonas halodurans</i>	90.4
<i>Halomonas subglaciescola</i>	89.9
<i>Halomonas campusalis</i>	89.4
<i>Halomonas meridiana</i>	88.7
<i>Halomonas elengata</i>	87.5
<i>Flavobacterium halmophil</i>	87.6
<i>Marinobacter aquaeolei</i>	83.4
<i>Pseudomonas nautic MB</i>	83.4
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	82.8
<u><i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i></u>	81.7

また、一番下に示した細菌は地中海で見つかった炭化水素分解細菌です。しかし、遺伝子の相同性は低く同じものではありません。このような結果から今回分離したこの菌株は新しい種類のバクテリアと考えられます。

これまでに微生物による炭化水素アルカンの分解酵素が調べられています。これはアルカン水酸化酵素によるアルカンのアルコールへの酸化で始まります。還元酵素、ルブレドキシン、水酸化酵素の3つのタンパクによって構成されています。アルカンは水酸化反応によりアルコールに、さらに酸化され、アルデヒド、長鎖脂肪酸に酸化され、通常のエネルギー代謝系に取り入れられているのです。従ってアルカン水酸化酵素が長鎖炭化水素を分解するための決め手となっているのです。

おわりに：

最後にこのような問題を出さして戴きます。これは何を意味するのでしょうか？*Acetobacter*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Rhodococcus*とあります。微生物の系統樹の形をしています。実はこれは次ような意味をもっています。皆さんは現在の研究分野を選ばれた動機をそれぞれお持ちのことと思います。この図は私の生化学特に微生物を主体とする酵素化学を選んだ動機を説明するものです。これがその答えです。(図21)父をはじめ兄弟3人ともそれぞれ微生物を扱う仕事に携わっていました。結局父の影響を強く受け、兄弟3人はこのような結果になったのです。以上で私の話は終わらせていただきます。

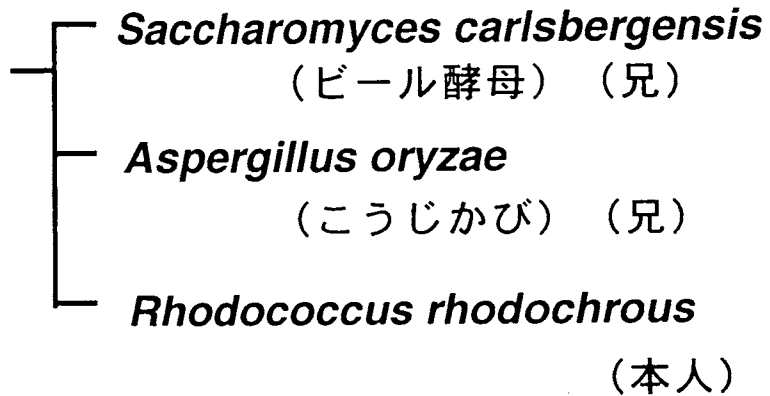
最後に若い方々に送る言葉として、これはよく耳にするものですが、次の言葉を送ります。ラチマーさんはシーラカンスの発見者です。「何事にも興味を持ち、広い視野にたって物事を判断する能力を持つことが、サイ

エンティストとして必要なことです。」

これまでの私の研究生活をご指導戴いた先生方、苦楽を共にし同僚、及び学生の方々に深く感謝します。ご静聴ありがとう御座いました。

図 2 1. 微生物の系統樹??

Acetobacter aceti (酢酸菌) (父)



板垣 英治 著書・論文一覧

(著書・解説)

1. 板垣英治 (1997) 科学風土記-加賀能登のサイエンス
北陸化学教育研究会編、裳華房
2. 板垣英治 (1997) 生化学事典 (第3版)、日本生化学会編 東京化学同人
3. 板垣英治 (1963) 無機窒素代謝の酵素化学-最近の進歩から
生物科学、15巻3号 p.97-105
4. 板垣英治 (1996) 化学の目で見る物質の世界「生命と物質」
金沢大学大学開放センター紀要 16巻 p. 3-8
5. 板垣英治 (1997) 重油による海の汚染と生物浄化-重油炭化水素を分解する細菌
化学と教育、45巻10号 p.560-561
6. 板垣英治 (1997) 重油分解細菌による環境復元-バイオリメディエーション
土木学会中部支部技術講座 p.34-41
7. 板垣英治 (1998) 五箇山の硝石。金沢大学大学開放センター紀要 18巻 p.31-41
8. 板垣英治 (1999) 加賀藩の火薬原料(塩硝) 量産-藩政期の五箇山に驚嘆のバイオ
北陸中日新聞 (2月9日版)

(論文)

1. E. Itagaki & S. Taniguchi (1959) Studies on nitrate reductase system of *Escherichia coli*. II. Soluble nitrate reductase system of aerobically grown cells in a synthetic medium. J. Biochem. 46, 1419-1436
2. S. Taniguchi & E. Itagaki (1959) Solubilization and purification of particulate nitrate reductase of anaerobically grown *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 31, 294
3. S. Taniguchi & E. Itagaki (1960) Nitrate reductase of nitrate respiration type from *E. coli*. 1. Solubilization and purification from the particulate system with molecular characterization as a metalloprotein. Biochim. Biophys. Acta 44, 263-279

4. E. Itagaki, T. Fujita, & R. Sato (1961) Solubilization and some properties of formic dehydrogenase from *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 5, 30-34
5. E. Itagaki, T. Fujita, & R. Sato (1961) Cytochrome b₁-nitrate reductase interaction in a solubilized system from *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 51, 390-391
6. E. Itagaki, T. Fujita, & R. Sato (1962) Solubilization and properties of formate dehydrogenase and cytochrome b₁ from *Escherichia coli*. J. Biochem. 52, 131-141
7. T. Fujita, E. Itagaki, & R. Sato (1963) Purification and properties of cytochrome b₁ from *Escherichia coli*. J. Biochem. 53, 282-290
8. E. Itagaki, T. Fujita, & R. Sato (1963) Reactions of cytochrome b₁ and nitrate reductase in a preparation solubilized from *Escherichia coli*. J. Biochem. 53, 389-397
9. E. Itagaki (1964) The role of lipophilic quinones in the electron transport system of *Escherichia coli*. J. Biochem. 55, 432-445
10. E. Itagaki & S. Suzuki (1964) Microdetermination of formic acid in periodate oxidation mixtures. J. Biochem. 56, 77-80
11. E. Itagaki & L. P. Hager (1966) Studies on cytochrome b₅₆₂ of *Escherichia coli*. I. Purification and crystallization of cytochrome b₅₆₂. J. Biol. Chem. 241, 3687-3695
12. E. Itagaki, G. Palmer, & L. P. Hager (1967) Studies on cytochrome b₅₆₂ of *Escherichia coli*. II. Reconstitution of cytochrome b₅₆₂ from apoprotein and hemin. J. Biol. Chem. 242, 2272-2277
13. L. P. Hager & E. Itagaki (1967) The preparation and properties of cytochrome b₅₆₂ from *Escherichia coli*. Methods in Enzymology. vol. X, 373-378

14. E. Itagaki & L. P. Hager (1968) The amino acid sequence of cytochrome b₅₆₂ of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **32**, 1013-1019
15. M. Katagiri, S. Takemori, E. Itagaki, K. Suhara, T. Gomi, & H. Sato (1974) Characterization of purified cytochrome P-450_{SCC} and P-450_{11β} from bovine adrenocortical mitochondria. *Iron and Copper Proteins, Adv. Exp. Med. Biol.* p.281
16. Y. Suzuki, E. Itagaki, H. Mori, & T. Hosoya (1975) Isolation of testosterone-binding globulin from bovine serum by affinity chromatography and its molecular characterization. *J. Biochem.* **81**, 1721-1731
17. S. Koizumi, S. Kyoya, T. Miyawaki, H. Kidani, T. Funabashi, H. Nakashima, Y. Nakamura, G. Ohta, E. Itagaki, & M. Katagiri (1977) Cholesterol side chain cleavage enzyme activity and cytochrome P-450 content in adrenal mitochondria of a patient with congenital lipid adrenal hyperplasia (Prader disease). *Clinica Chimica Acta* **77**, 301-306
18. 小泉晶一、京谷征三、宮脇利男、木谷洋、舟橋隆、佐藤保、中島博徳、中沼安二、太田五六、狩野哲次、板垣英治、片桐正之 (1977) 先天性副腎リポイド過形成 (Prader病)における副腎ミトコンドリアのチトクロムP-450定量とコレステロール側鎖切断酵素活性の測定。ホルモンと臨床 vol. 25, 882-888
19. E. Itagaki & T. Hosoya (1976) Effect of temperature and urea concentration on the chemical modification and iodization behavior of tyrosyl and iodoamino acid residues of porcine thyroglobulin. *Endocrinol. Japan* **25**, 43-53
20. E. Itagaki, M. Arisawa, & T. Hosoya (1976) Chemical and physical characterization of submolecular proteins of porcine thyroglobulin. *J. Biochem.* **84**, 597-606
21. K. Suhara, T. Gomi, H. Sato, E. Itagaki, & M. Katagiri (1976) Purification and immunochemical characterization of the two adrenal cortex mitochondrial cytochrome P-450 proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**, 290-299
22. O. Takikawa, T. Gomi, K. Suhara, E. Itagaki, S. Takemori, & M. Katagiri (1976) Properties of an adrenal cytochrome P-450 (P-450_{SCC}) for the side chain cleavage of cholesterol. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**, 300-306

23. H. Sato, N. Ashida, K. Suhara, E. Itagaki, S. Takemori, & M. Katagiri (1976) Properties of an adrenal cytochrome P-450 (P-450_{11β}) for hydroxylation of corticosteroids. *Arch. Biochem. Biophys.* **190**, 307-314
24. M. Katagiri, S. Takemori, E. Itagaki, & K. Suhara (1978) Purification of adrenal cytochrome P-450 (Cholesterol desmolase and steroid 11β and 18-hydroxylase). *Methods in Enzymology* vol. LII. Biomembranes, p.124-132
25. E. Itagaki & M. Katagiri (1984) Steroid monooxygenase from *Cylindrocarpon radicicola*. An FAD-containing Baeyer-Villiger type oxygenase. *Flavins and Flavoproteins* (1984) p. 639-642
26. 永井国雄、宮森勇、竹田亮祐、板垣英治、片桐正之 (1958) 精製チトクロム P-450_{11β}触媒反応に及ぼす副腎ステロイド生成阻害剤の作用-Ketoconazole を中心に- *日本内分泌学会雑誌* **61** 巻、p.90-96
27. E. Itagaki (1986) Studies on steroid monooxygenase from *Cylindrocarpon radicicola* ATCC11011. Purification and characterization *J. Biochem.* **99**, 815-824
28. E. Itagaki (1986) Studies on steroid monooxygenase from *Cylindrocarpon radicicola* ATCC11011. Oxygenative lactonization of androstenedione to testololactone. *J. Biochem.* **99**, 825-832
29. E. Itagaki & T. Iwaya (1988) Purification and characterization of 17β-hydroxysteroid dehydrogenase from *Cylindrocarpon radicicola*. *J. Biochem.* **103**, 1039-1044
30. E. Itagaki, T. Wakabayashi, & T. Hatta (1990) Purification and characterization of 3-ketosteroid-Δ¹-dehydrogenase from *Nocardia corallina*. *Biochim. Biophys. Acta* **1038**, 60-67
31. E. Itagaki, T. Hatta, T. Wakabayashi, & K. Suzuki (1990) Spectral properties of 3-ketosteroid-Δ¹-dehydrogenase from *Nocardia corallina*. *Biochim. Biophys. Acta* **1040**, 281-286

32. E. Itagaki, H. Matsushita, & T. Hatta (1990) Steroid transhydrogenase activity of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase from *Nocardia corallina*. J. Biochem. 108, 122-127
33. M. Katagiri & E. Itagaki (1991) A Steroid Ketone Monooxygenase from *Cylindrocarpon radiclecola*. Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes vol. II, p.101-108
34. K. Suzuki, T. Gomi, T. Kaidoh, & E. Itagaki (1991) Hydroxylation of o-halogenophenol and o-nitrophenol by salicylate hydroxylase. J. Biochem. 109, 348-353
35. T. Hatta, T. Wakabayashi, & E. Itagaki (1991) 3-Keto-5 α -steroid- Δ^4 -dehydrogenase from *Nocardia corallina*: Purification and characterization. J. Biochem. 109, 581-586
36. K. Suzuki, T. Gomi, & E. Itagaki (1991) Intermediate and mechanism of hydroxylation of o-iodophenol by salicylate hydroxylase J. Biochem. 109, 791-797
37. E. Itagaki, T. Hatta, & H. Matsushita (1991) Two Flavodehydrogenases catalyzing desaturation of A-ring of 3-ketosteroids: 3-Ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase and 3-Ketosteroid- Δ^4 -dehydrogenase from *Nocardia corallina*. Flavins and Flavoproteins 1990, 345-348
38. H. Matsushita & E. Itagaki (1992) Essential histidine residue in 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase J. Biochem. 111, 594-599
39. K. Suzuki, K. Sanga, Y. Chikaoka, & E. Itagaki (1993) Purification and properties of cytochrome P-450 (P-450_{lun}) catalyzing steroid 11 β -hydroxylation in *Curvularia lunata*. Biochim. Biophys. Acta 1203, 215-223
40. M. Kadode, H. Matsushita, K. Suzuki, & E. Itagaki (1994) Essential arginine residue(s) of 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase. Flavins and Flavoproteins 1993 p.339-342
41. K. Suzuki, M. Mizuguchi, T. Gomi, & E. Itagaki (1995) Identification of a lysine residue in NADH-binding site of salicylate hydroxylase from *Pseudomonas putida* S-1. J. Biochem. 117, 579-585

42. M. Miyamoto, J. Matsumoto, T. Iwaya, & E. Itagaki (1995) Bacterial steroid monooxygenase catalyzing the Baeyer-Villiger oxidation of C₂₁-ketosteroids from *Rhodococcus rhodochrous*. *Biochim. Biophys. Acta* 1251, 115-124
43. K. Suzuki, M. Mizuguchi, K. Ohnishi, & E. Itagaki (1996) Structure of chromosomal DNA coding for *Pseudomonas putida* S-1 salicylate hydroxylase. *Biochim. Biophys. Acta* 1275, 154-156
44. T. Yabuuchi, K. Suzuki, T. Sato, K. Ohnishi, E. Itagaki, & Y. Morimoto (1996) X-ray crystallography and preliminary X-ray analysis of salicylate hydroxylase from *Pseudomonas putida* S1. *J. Biochem.* 119, 829-831
45. K. Suzuki, M. Mizuguchi, K. Ohnishi, & E. Itagaki (1997) Structure of salicylate hydroxylase of *Pseudomonas putida* S1. Cloning and sequencing of chromosomal DNA of the enzyme. *Flavins and Flavoproteins* 1996 p. 387-390
46. S. Morii, C. Fujii, T. Miyoshi, M. Iwami, & E. Itagaki (1998) 3-Ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase of *Rhodococcus rhodochrous*: Sequencing of the genomic DNA and hyperexpression, purification and characterization of the recombinant enzyme. *J. Biochem.* 124, 1026-1032
47. E. Itagaki & H. Ishida (1998) Drift of C-heavy oil spilled from a russian tanker "Nakhodka" and its bioremediation by maine hydrocarbon degrading bacteria. (ナホトカ号重油漂着と重油分解細菌による生物浄化) 海岸工学論文集 45巻 p 951-955
48. 板垣英治 (1998) 「ナホトカ」号重油流出による環境汚染と生物浄化：重油炭化水素分解細菌の検出と分離 日本海域研究所 報告 29、p 1-12
49. 板垣英治 (1999) 新種の重油分解細菌の発見とその特性。海上への重油流出に対する環境保全技術の開発に関する委員会成果報告書。土木学会中部支部調査研究委員会 p 34-41
50. S. Morii, S. Sawamoto, Y. Yamauchi, M. Miyamoto, M. Iwami, & E. Itagaki (1999) Steroid monooxygenase of *Rhodococcus rhodochrous*: Sequencing of the genomic DNA, and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme. *J. Biochem.* 126, 624-631

51. C. Fujii, S. Morii, M. Kadode, S. Sawamoto, M. Iwami, & E. Itagaki (1999)
Essential tyrosine residues in 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase from
Rhodococcus rhodochrous. J. Biochem. 126, 662-667
52. E. Itagaki & H. Ishida (1999) Drift of C-heavy oil spilled from a russian
tanker "Nakhodka" on Kanazawa seashore and its bioremediation by maine
hydrocarbon degrading bacteria. Coastal Eng. J. 41, 107-119
53. 板垣英治 (2000) 「ナホトカ」号重油流出による環境汚染と生物浄化II. 漂着重油
の分解と*Halomonas*属重油炭化水素分解細菌の分離とその性状及び同定。
金沢大学日本海域研究 第31号 p. 121-133

板垣 英治 個人史

現住所 石川県金沢市

昭和 9年9月15日 兵庫県別府町で出生

「9月21日に第一室戸台風が関西地方に來襲、大きな被害でる」

昭和13年 大阪府池田市満寿美町に移転

昭和14年 池田市室町6丁目に移転

昭和14年 池田市立呉羽幼稚園に入園

昭和16年4月 池田市立呉羽国民学校に入学

(太平洋戦争勃発 12/8)

17年 (愛知県半田市更生町に移転)

17年11月 半田市立半田第一国民学校に転校

18年 (長兄 海軍予科練習生として出征)

19年12月7日 「東海道沖地震で半田地方も大きな被害を受ける。」

(次兄 学徒動員で中島飛行機製作所半田工場で殉死)

20年 (半田地方米軍機の爆撃、飛行機工場破壊される)

20年8月15日 「終戦 (勤労働員で肥料工場で半日作業)」

22年3月 半田市立第一小学校卒業

22年4月 半田市立半田中学校に第一回生として入学

(6・3・3制始まる)

23年9月 「愛知県教育委員会主催、名古屋タイムス後援

「植物・昆虫採集標本」展覧会で昆虫の部で特賞を受ける」

23年 半田中学校は旧商業学校跡に移転

24年 (レッドパージで恩師が教職を追放される)

25年4月 愛知県立半田高等学校普通科入学

(クラブ活動：生物部に入部。それ以後5回学校祭に参加)

26年3月 総合高校の商業科分離のために移転

28年3月 愛知県立半田高等学校普通科卒業

28年4月 名古屋大学理学部化学科入学

28年9月 (13号台風名古屋地方の襲来、被害でる)

30年4月 同 学部に進学

31年6月 同化学科生化学講座に配属

32年3月 名古屋大学理学部化学科卒業
 32年4月 名古屋大学理学部化学科研究生入学
 32年6月 学内での研究室移転
 32年10月 (国際酵素化学シンポジウム
 東京、京都で開催される)
 33年3月 名古屋大学理学部化学科研究生修了
 33年4月 名古屋大学大学院理学研究科化学専攻修士課程入学
 34年9月 (伊勢湾台風中部地方に襲来、大被害でる)
 35年3月 名古屋大学大学院理学研究科化学専攻修士課程修了
 35年4月 大阪大学大学院理学研究科生物化学専攻博士課程入学
 35年7月 大阪大学タンパク質研究所開所により移転
 37年9月 (第二室戸台風関西地方に襲来、大阪の被害大)
 38年3月 大阪大学大学院理学研究科生物化学専攻博士課程修了
 「学位：理学博士(大阪大学)(昭和38年3月)
 大腸菌の電子伝達系における脂溶性キノンの役割」

職歴

昭和38年4月 名古屋大学理学部助手に採用
 分子生物学研究施設生物学部門
 昭和39年8月 アメリカ合衆国イリノイ州立イリノイ大学在外研究員
 化学工学、化学部生物化学科 (Dr. L.P.Hager)
 細菌の呼吸酵素研究のため
 42年8月 名古屋大学理学部助手 退職
 43年8月 金沢大学薬学部助手 (製薬学科薬品物理化学講座)
 (新設講座のための設営工事を行う)
 52年11月 金沢大学理学部 助教授 (化学科生物化学講座)
 53年4月 金沢大学教養部 非常勤講師 化学担当
 58年4月 金沢大学教養部 非常勤講師 化学担当
 59年7月 英国サセックス大学に海外研修
 第8回国際フラビンおよびフラビントタンパクシンポジウム
 59年4月 金沢大学大学院理学研究科化学 担当
 61年4月 金沢大学大学院自然科学研究科 担当
 生命科学専攻分子生理講座

63年10月	金沢大学教育学部 講師 生物化学担当
平成 1年7月	国際協力事業団、ウガンダ共和国マケレレ大学理学部 拡充計画、基本調査団員としてマケレレ大学に出張
2年10月	金沢大学教育学部 講師 生物化学担当
2年7月	イタリア、コモに海外研修
第10回国際フラビンおよびフラビントキソチンシンポジウム	
3年6月	金沢大学理学部 教授
4年4月	化学科主任
4年7月	理学部角間新キャンパスへ移転（化学科建設委員）
4年10月	金沢大学教育学部 講師 生物化学担当
6年10月	金沢大学教育学部 講師 生物化学担当
6年4月	金沢大学教養部 講師 ハローケミストリー
6年11月	広島大学工学部 講師、発酵工学講座
7年10月	名古屋大学工学部 講師、工業化学科
8年10月	金沢大学教育学部 講師 生物化学担当
9年10月	金沢大学教養的科目総合科目 講師
9年11月	名古屋大学工学部 講師 工業化学科
10年10月	金沢大学教育学部 講師 生物化学担当
10年10月	金沢大学短期留学生プログラム 講師
10年10月	金沢大学教養的科目総合科目 講師
11年11月	金沢大学短期留学生プログラム 講師
12年3月	停年退官
平成 4年4月	金沢大学組み換えDNA実験安全委員会委員 金沢大学海外交流委員会委員
平成 5年1月	石川県トライアルセンター イブニングスクール講師
平成 6年2月	金沢大学 大学教育解放センター、大学公開講座講師 「化学の目でみる物質の世界」
平成 9年10月	金沢大学 大学教育解放センター、大学公開講座講師 「科学風土記・加賀能登のサイエンス」
平成 9年9月	日本土木学会中部支部技術講座 「タンカー事故に伴う重油流出事故の教訓と課題」講師

平成 9年10月 北陸大学大学祭講演会 講師

昭和32年4月 日本生化学会 会員(評議員)

43-50年 日本薬学会 会員

50-51年 日本内分泌学会 会員

59年9月-61年8月 日本生化学会 北陸支部 幹事(事務担当)

(第3、4回支部大会を開催)

昭和62年10月 第60回日本生化学会大会 運営委員

平成 9年10月 第70回日本生化学会大会 運営委員

平成 9年4月 金沢市油汚染対策検討委員会委員

平成 9年~ 金沢大学日本海海域研究所所員

酵素の魅力に惹かれて

(板垣英治先生最終講義)

編集 板垣 英治

発行 板垣英治先生停年退官記念会
金沢大学理学部化学科内
〒920-1192
金沢市角間町
電話 076-264-5683

印刷 田中昭文堂印刷株式会社
金沢市小坂町中75番地



ウガンダの切手(拡大)



グロリオーサ “ファイアーバード”