

異なる分野との融合研究のメリット

— 定年退職最終講義より —¹

Merits of Integrated Research with Different Field - From the Last Lecture-

芳本 忠² 摂南大学名誉教授

YOSHIMOTO, Tadashi, Emeritus Professor, Setsunan University

Abstract

I have studied two fixed projects through 40 years research life. In order to develop these studies, I introduced latest techniques (peptide synthesis, computer technology, gene technology and X-ray crystallography) as early as possible. Cooperative research with different field of scientists sometimes produced breakthrough of these studies. This article is a record of my last lecture.

キーワード: 酵素、医薬品、臨床診断、遺伝子組換え、X線結晶構造解析

Keywords: enzyme medicine, diagnosis, recombinant of gene, X-ray crystallography

1. はじめに

摂南大学を退職するにあたり振り返ってみると、40年あまりの研究生活を通じほぼ同じテーマで研究してきた。これは最初から望んだことで、研究の種を自ら見出して大きく育て、独自の研究を続けることを理想とした。しかし、研究を続けると必ず行き詰まるもので、人より早く最新の技術を導入し研究のブレークスルーとした。

図1に40年の経過をまとめた。1973年、恩師の鶴大典先生が長崎大学薬学部の教授となられた時、私は講師として赴任した。ご配慮から研究は自由にしてよいとのことであった。大学で生きていくためには「長続きすると共に、本当に役立つ研究テーマ」を求めた。しかし、生命科学の将来を予測することは容易ではない。そのため、生命は進化の過程で無駄なものを作っていない、必ず何か役に立つと信じ、一般に見向きもされない酵素を研究テーマとした。この時が研究生活の中で一番苦しんだ時期であった。

¹ 【原稿受付】2016年7月20日、【掲載決定】2016年9月30日

² 【主著者連絡先】芳本 忠 摂南大学、名誉教授 e-mail: ja3onr@yahoo.co.jp
〒636-0052 奈良県北葛城郡河合町長楽 198-3

テーマの1つは、既に化学的方法で安価な診断法が一般化しているのに、敢えて酵素法を用いる診断法の研究である。法隆寺周辺の土壌から得た微生物がクレアチニンを分解する酵素系を持つことを見出し、酵素の基質特異性を信じ、その中の3つの酵素を組合せ腎機能の診断に利用するキットを考えた。東洋紡と組んで開発したが、費用がかかるためと既に使っている方法を変更することを嫌い、なかなか利用されなかった。しかし、医師会サーベランス委員会が化学法に比べて酵素法は正確であると認められ、急速に入れ替り、現在全国の健康診断に用いられ年商30億円以上の商品となっている。皆さんの健康診断の腎機能項目(Cre)を参照していただきたい。

もう1つは、長崎大学へ赴任直後にイリノイ大学医学部(シカゴ校)の生理学研究室(ワルター教授)へ留学し、新規のプロリン特異性酵素(ペプチダーゼ)を研究したことに始まる。その酵素の生理的役割が不明で、活性測定も容易でなく、更に分子量が10万近くと大きく、当時の常識では研究者が皆敬遠する酵素であった。ワルター教授が早く癌で亡くなったあと、テーマを引き継ぎ、日本で研究を発展させた。その後、この研究成果の一部はマルチンルター大学のデムート教授の2型糖尿病の治療薬開発に役立ち(2011年、摂南大学での国際シンポジウムで講演)、更に摂南大学での歯周病予防薬の研究となっている。

これらの研究に、学部や学科を超えた多くの研究者との融合研究や、新技術の導入にそれら研究者に助けられ、研究を発展できた。

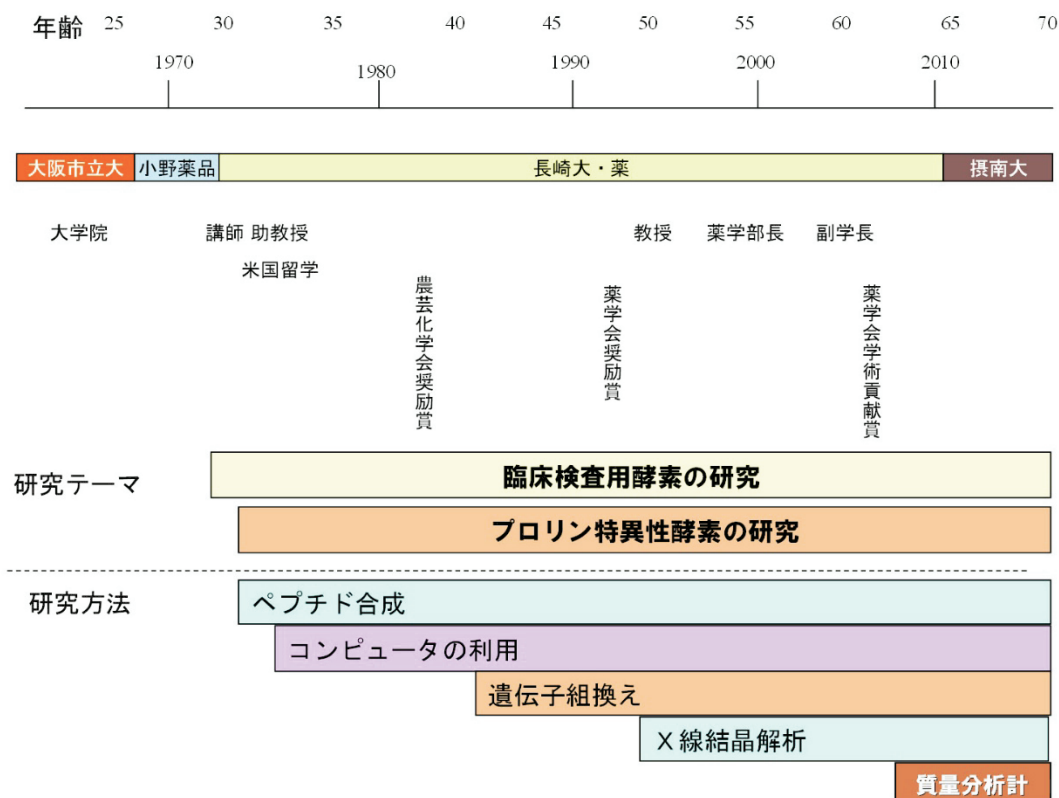


図1 研究テーマと研究手段の経過

2. ペプチド合成の導入で新酵素を発見 (1975~)

上述のごとく、1975年プロリン特異性ペプチダーゼが生涯の研究テーマとなった。最初は放射標識したオキシトシンを分解することで見出し、基質として市販のペプチド Z-Gly-Pro-Leu-Gly を用い、プロリンの後で分解され生じた Leu-Gly をニンヒドリン法で測定する方法を用いていたが、ニンヒドリン法は測定する酵素サンプルが不純の場合、混在するアミノ酸が発色し問題があった。

新しい測定法として、雑物が存在しても鮮明に正確に測定できる発色団を持つペプチド合成に挑戦し、薬学部や工学部の合成化学の教員のお世話になった。化学合成そのものは通常の実験室にあるロータリーエバポレーターとろ過装置で行えるが、化学の知識の少ない者にとっては色々トラブルが生じ、すぐには行かなかったが、徐々に習得し、Z-Gly-Pro-β-NAをはじめ多くのペプチドを合成できた。この化合物は画期的で、それまで測定困難であった粗抽出物での酵素活性が可能となった。これによって、新しいプロリン特異性ペプチダーゼを次々と発見でき、さらに系統だった基質特異性の研究ができるなど、競争なく研究でき成果が上がった (図2上)。後に世界のあちこちで本酵素の研究者が増え、試薬会社から合成基質が販売されるようになった (図2下)。

合成したペプチドによるシステムだった解析

Substrate S5 S4 S3 S2 S1 S1'	Prolyl aminopeptidase			Dipeptidyl peptidase IV			Prolyl tripeptidyl peptidase		
	K_m mM	k_{cat} sec ⁻¹	k_{cat}/K_m mM ⁻¹ sec ⁻¹	K_m mM	k_{cat} sec ⁻¹	k_{cat}/K_m mM ⁻¹ sec ⁻¹	K_m mM	k_{cat} sec ⁻¹	k_{cat}/K_m mM ⁻¹ sec ⁻¹
Pro-β NA	0.42	9.81	23.4		ND			ND	
Gly-Pro-β NA		ND		0.28	110	391		ND	
Z-Gly-Pro-β NA		ND			ND			ND	
Gly-Ala-Pro-β NA		ND			ND		0.42	364	866
Z-Gly-Ala-Pro-β NA		ND			ND			ND	
Z-Ala-Gly-Pro-β NA		ND			ND			ND	
Gly-Ala-Gly-Pro-β NA		ND			ND			ND	
Z-Gly-Ala-Gly-Pro-β NA		ND			ND			ND	
Ala-Gly-Ala-Gly-Pro-β NA		ND			ND			ND	

BACHEM					
Bachem. Leading beyond peptides					
20 ± 5 °C	Z-Gly-Pro-AMC	$M_r: 463.49$ [68542-93-8]	J-1145.0050	50 mg	175.-
	$C_{12}H_{17}N_3O_4$		J-1145.0250	250 mg	700.-
	Fluorogenic substrate for the determination of post-proline cleaving enzyme (prolyl endopeptidase). Lit. T.Yoshimoto et al., <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 569 , 184 (1979)/ F.Checler et al., <i>J. Neurochem.</i> 43 , 1295 (1984)/ C.E.Ojaya et al., <i>Biochem. Pharmacol.</i> 36 , 39 (1987)/ J.Monand and S.Clarke, <i>Biochemistry</i> 26 , 7798 (1987).				
20 ± 5 °C	Z-Gly-Pro-4MBNA	$M_r: 461.52$ [201983-16-6]	J-1365.0250	250 mg	350.-
	$C_{12}H_{17}N_3O_5$		J-1365.1000	1 g	1051.-
	Specific fluorogenic substrate for prolyl endopeptidase (post-proline cleaving enzyme). Lit. T.Yoshimoto et al., <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 569 , 184 (1979)/ H.Knisatschek et al., <i>FEBS Lett.</i> 111 , 157 (1980)/ T.Yoshimoto et al., <i>J. Biochem. (Tokyo)</i> 90 , 325 (1981)/ K.Hauzer et al., <i>Coll. Czech. Chem. Commun.</i> 47 , 1139 (1982).				
20 ± 5 °C	Z-Gly-Pro-βNA	$M_r: 431.49$ [67336-99-6]	K-1190.0001	1 g	412.-
	$C_{12}H_{17}N_3O_4$		K-1190.0005	5 g	1648.-
	Specific fluorogenic substrate for prolyl endopeptidase (post-proline cleaving enzyme). Lit. T.Yoshimoto et al., <i>Biochim. Biophys. Acta</i> 569 , 184 (1979)/ H.Knisatschek et al., <i>FEBS Lett.</i> 111 , 157 (1980)/ T.Yoshimoto et al., <i>J. Biochem. (Tokyo)</i> 90 , 325 (1981)/ K.Hauzer et al., <i>Coll. Czech. Chem. Commun.</i> 47 , 1139 (1982).				

BACHEM社 (スイス)
のカタログ

図2 合成した基質を用いたシステム立った解析 (上) と市販された基質 (下)

3. 早い時期に計算機の導入 (1976~)

私は若いころアマチュア無線に興味を持ち、電子回路や語学力の向上を理由づけして楽しみ、1級のライセンスをとり退職まで大学のクラブの顧問などしていた。そのため、工学部の教員と学生にはよく接し、興味を持ったのが計算機分野である。当時ほどの大学に

も計算機センターがあり、国策の富士通 FACOM が設置され、入力パンチカード式でプログラムやデータを一行ごとに1枚のカードに記入し（穴をあけ）、カードを順番に重ね輪ゴムで束ね、ジョブ申請書と共に依頼するシステムであった。結果を次の朝受け取りに行くと、エラーでそのまま返却され、間違いを必死に探し再依頼し、次の日また別のところで引っかかり、その繰り返しでうんざりした記憶がある。

1975年アメリカへ留学した折、プログラムとデータをCRTの画面上で作成、編集し、結果が即座に画面上に返されてくるシステムを見て、計算機はこれだと思った。更に、2度目の留学の折、個人が扱える計算機、コモドール社のPETがまず開発され、パソコン（当時はマイコンと呼んでいた、micro と my の掛け言葉）時代が始まった。

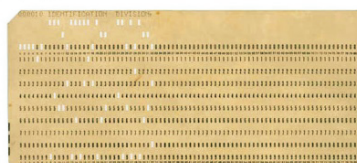
酵素研究への計算機の導入

1970年頃、大学に富士通のFACOMが設置されていた。

FORTTRAN言語とカード入力に悩まされた



1982年 コモドール社のPET
を導入、言語BASIC



ソフト

- 1、通信ソフト（TSS）
- 2、ワープロソフト
- 3、酵素反応速度解析
- 4、タンパク質の3Dソフト

ハード

- 1、スイッチ操作（培養装置制御）
- 2、AD変換（比色計→パソコン）
- 3、XY-プロッター

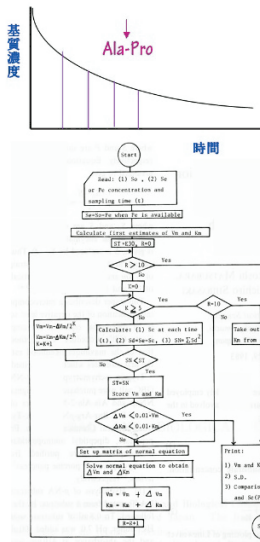
図3 酵素研究への計算機の導入

非常に高価であったが、魅力を感じPETを購入した（図3）。当時は自分でプログラムを組まなければならなかったが、言語はFORTRANを簡単にしたBASICで使いよく私でもすぐ慣れ必要なプログラムが作れた。更に工学部の電気電子の研究室へ出入りし、TSSやワープロのプログラムを開発したり、ADコンバータを用いて比色計のデータを取込んだり、XYプロッターでタンパク質の図を描くなど様々に役立てた。

一番の成果は、酵素反応の基質濃度の減少を継時的に測定して動力学パラメータを算出するプログラムの開発である。それまでラインウィーバーク・プロットが用いられるが、逆数を計算に用いるため基質濃度の濃い部分で誤差が大きくなる問題があった。プロリダーゼの場合、基質Ala-Proのペプチド結合量を示す220nm吸収を連続で測定し、開発したプログラムとそれを用いたプロリダーゼ反応の解析を論文として発表した（図4）。

新規酵素を見出し、ペプチド合成と電算機技術の導入による研究成果は日本農芸化学会奨励賞の受賞につながった。

基質の減少から直接解くプログラム の開発し、プロリダーゼ の解析に用いる



Convenient Method for Estimation
of Kinetic Parameters from
Time Course Analysis of
Enzyme Reactions with
a Microcomputer[†]

Tadashi YOSHIMOTO, Futoshi MATSUBARA,
Daisuke TSURU and Juichiro SHIBASAKI

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Nagasaki University, Bunkyo-machi,
Nagasaki, Nagasaki 852, Japan

Received June 29, 1983

Various graphical methods have been widely employed
for the determination of kinetic parameters involved in the
Michaelis-Menten¹⁾ equation (1):

$$v = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S} \quad (1)$$

where v is velocity and S is substrate concentration.

Equation (1) is rearranged to:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_m} \quad (2)$$

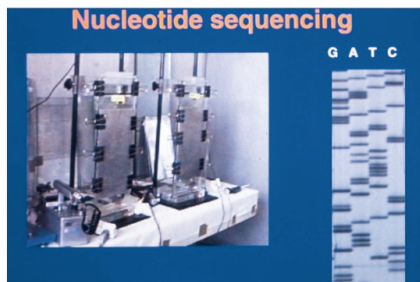
図4 酵素反応動力学解析へのプログラムの開発

4. 早い時期に遺伝子組換え技術を導入 (1985~)

医学系教員との交流により技術の導入ができた。上述のごとく新しい基質を合成することにより種々のプロリン特異性ペプチダーゼを新規に見出し、プロテアーゼ研究分野で知られるようになってきたが、まだまだ古典的な方法での成果であった。学会でトリプシン系酵素(分子量3万前後)を中心にエドマン法で一次構造(アミノ酸配列)を示すことが先端的発表であった。私の酵素は分子量が10万近いためこの方法では不可能であった。ちょうどその頃、遺伝子組換え法が開発され、サンガーによってDNAの塩基配列法が開発されたことから、高分子量の酵素でも塩基配列からアミノ酸配列を決定する方法が伝わってきた。

遺伝子組換え法の導入

遺伝子クローニングと配列決定はこれまで不可能とされた高分子タンパク(分子量10万)が可能となった。



最初、手作りの装置で、放射線同位元素³²Pを用いて配列決定した。現在では色素を用い自動化されている。

```
1  APTCCAGGAAAGGCGGCGGCTACGCGATCCAGGCGGGCGGAGCGACGAC  -19  GCACCAAGGAGCGCGC   -1
2  ...
61  ...
121  ...
181  ...
241  ...
301  ...
361  ...
421  ...
481  ...
541  ...
601  ...
661  ...
721  ...
781  ...
841  ...
901  ...
961  ...
1021  ...
1081  ...
1141  ...
1201  ...
1261  ...
1321  ...
1381  ...
1441  ...
1501  ...
1561  ...
1621  ...
1681  ...
1741  ...
1801  ...
1861  ...
1921  ...
1981  ...
2041  ...
2101  ...
2161  ...
2181  ...
```

図5 遺伝子組換えによる塩基配列の決定

日本でまだ遺伝子組換えが一般化していない時期、九州大学医学部の高木教授が日本で数少ない成果をあげつつあることを知り、ブレークスルーを狙って春休み期間技術習得のため訪問した。しかし、基本技術だけを知るのみで研究室へ戻り自分で努力するしかなかった。なかなか目的の遺伝子をクローニングできず2年ほどかかり、追い詰められ何度か諦めようと思ったが、やっとの思いでクローニングに成功した。当時は手作りの装置で、 ^{32}P を用いフィルムに感光したスポットを目で読み取り DNA 配列を決定、配列の断片を組み合わせる全配列を決める方法で、体力勝負であった (図5)。それでもやはり遺伝子組換え技術は画期的で、次々と高分子の酵素でもアミノ酸配列を明らかにすることができた。その結果、プロリン特異性ペプチダーゼは新しいファミリー酵素を形成することを明らかにし、日本薬学会奨励賞をいただいた。

この遺伝子組換え法による成果はおまけがついてきた。生体内の微量酵素でも遺伝子を大腸菌で高発現させ何万倍ものタンパク質が容易に得られた。こうなると、高純度の酵素を容易に大量に精製でき、結晶学者でない我々でも回折に向く大型の結晶を得ることが可能となった (図6)。このことが次の X 線結晶構造解析の導入に繋がった。

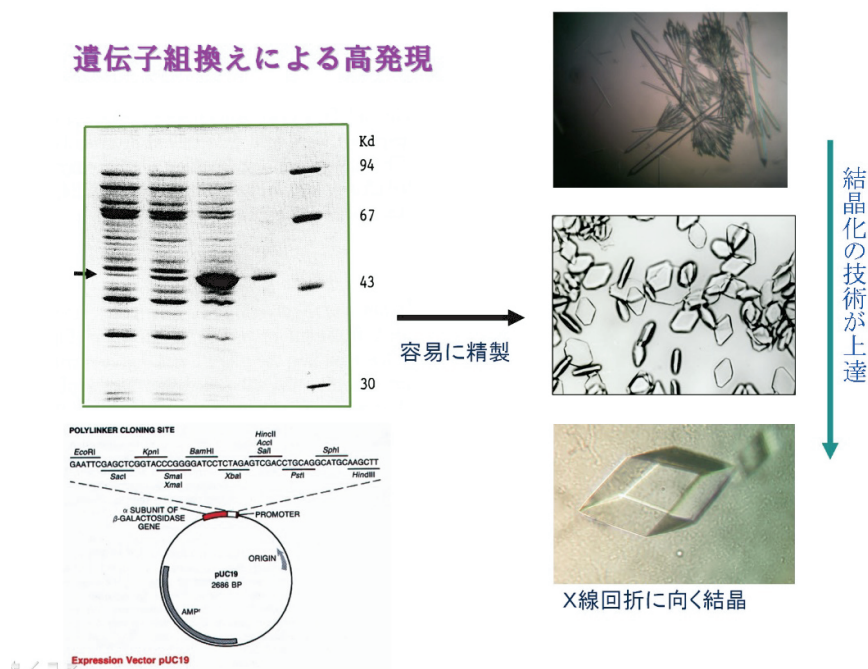


図6 遺伝子組換えによる高発現と結晶化

5. 早い時期の X 線結晶構造解析法の導入 (1993~)

1990年頃、私は遺伝子組換えで一次構造 (アミノ酸配列) を次々と成功していたが、それだけでは触媒機構の解明は困難で、研究対象の酵素の立体構造情報が欲しくなってきた時期である。工学部の教授が低分子化合物の構造解析のために文科省に X 線回折装置を申請していたがなかなか採用されなかった。そこで、説得力を増すため生命科学分野も入れたいと話があり、結晶もでき協力の気持ちで記入したところ当たった。競争入札で予定の低分子化合物用の回折装置におまけとして、より高価なタンパク質用の回折装置までついてきた。タンパク質用は他に利用者がいないため、私が単独使用することになった。設置された装置

は最新型で、回転冷却式で X 線が強力で且つイメージングプレートを備え自動読み取りができ、メンテナンスが楽との売込みであった(図7)。しかし、設置後の取扱説明から数式の羅列で大変であった。特に解析のフーリエ変換の部分では何度も挫折感を覚えた。タンパク質解析ソフト CCPM が付いていたが、UNIX とソフトを使いこなすのにもずいぶん時間がかかった。前述のごとく遺伝子組換えは早い時期に導入して苦しんだが、X 線結晶解析でもまた、性懲りもなく数年成果の無い苦しい年が続きやつの思いで成功した。

1つ解析に成功すると、多くの酵素とその遺伝子発現による結晶を持っていたので、次々と解析が進んだ。国家戦略のタンパク 3000 プロジェクトに参加し、グループ内で一番成果が上がったと評価され、文科省の最終報告会で代表として発表した。立体構造の解明は酵素研究の過程で一番興奮するものであった。それまで不明の現象が立体化学的に明確に説明でき、インパクトファクターの高い雑誌に投稿できた。更に、腎機能検査キットのクレアチナーゼの安定化や活性化に役立ち(図8)、ジペプチジルペプチダーゼ 4 (DPP4) の阻害剤が 2 型糖尿病治療薬として開発される過程で構造が役立つ(図9)。

これらの成果により、日本薬学会学術貢献賞を受賞した。

X線結晶解析への挑戦

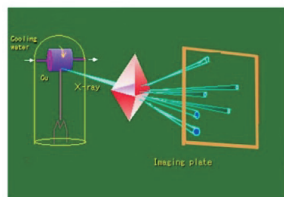
1992年 工学部応用化学科の大西教授の依頼で参加、文科省へ1台申請。当たる。

1993年 メーカーの割引競争となり、2台(低分子とタンパク用)購入決定

回転冷却発生装置(メンテナンスが容易)

CCPM(結晶解析ソフト)が無料入手

1994年 最新鋭タンパク用X線回折装置が九州で最初に芳本の研究室に設置



$$F(hkl) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(xyz) \exp[2\pi i(hx+ky+lz)] dx dy dz$$

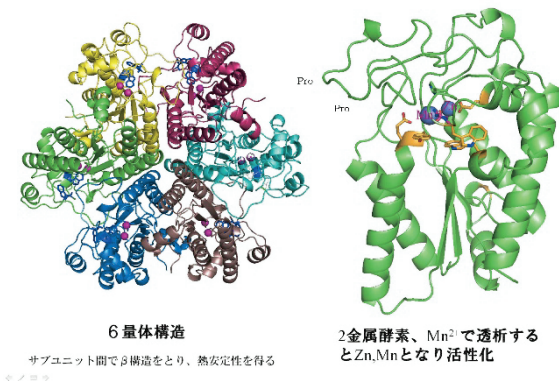
$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(hkl)| \exp[-2\pi i(hx+ky+lz) + i\phi(hkl)]$$

☺ / ☺ ☺

図7 生命系研究者を悩ます X 線結晶解析のフーリエ変換式

クレアチナーゼの立体構造

立体構造から酵素の詳細な作用機構の解明



☺ / ☺ ☺

図8 酵素の立体構造

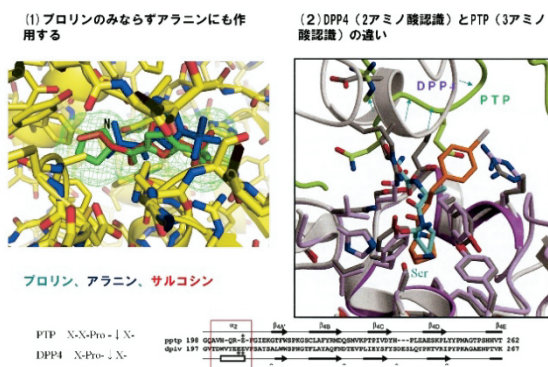


図9 酵素の作用機構の解明

6. 最後に

2010年、工学部を改組し理工学部とし、生命科学科を設置するのが私の役割であった。その時の申請は基礎研究に重点を置く理学と応用に重点を置く工学の融合にあり、生命科学科は基礎研究に基づく応用の重要性を書いた。ただ、発足時は生命科学科の教員は出身分野が異なるため、まず理学として「真理の追究」を学科の方向付けとした。今日、大学院博士後期課程ができ全ての設置計画が完成したことから、次のステップとして他学科との融合を進め、理工学部として基礎と応用を併せ持つ学科の特色を示していくことが必要であろう。

私は理学部生物学科で学んだが、所属した研究室は応用酵素学研究室で企業との共同研究が多かった。理学で応用を掲げたため、在学した大学紛争の激しい時代はずいぶんヘルメットの活動家から批判を受けた。しかし、教授の福本先生は「応用あつての基礎研究」であると貫かれた。福本先生はすでに亡くなられているが、今の産学連携の推進状況を見て、あの世から「言った通りであろう」と笑っておられる気がする。このような背景からか、研究者となっても応用を頭に基礎研究を行ってきた。

旧帝大のように大きな組織で恵まれた環境ならともかく、地方大学や私学で研究を続け常に成果をあげ研究費（科学研究費）を獲得し続けるのは容易ではない。私学は更に教育が重要視され研究に割く時間が制限される。その中で生きていくために、学部や学科の垣根を超えた融合研究が重要と思える。意外と他分野から見ると新しいネタが見つかるものである。在職中、研究支援センター長を務めたおり、摂南大学に研究所が1つもないことから、研究の活性化のために学長、学長室長、理工学部長に研究所の設置を提案した。多分以前から皆思っておられたためと思うが、比較的早く設置された。現在着実に進展しており、今後の発展を期待する。

ついでに、文科省は時々全国の大学を研究大学か教育大学に分けようとする。それを先取りしてか何人かの教員から「これまで上から教育だけやっておればよいと言われてきた」と聞いたことがある。またある方からも科研費獲得に力を入れてもらおうと教員は教育をしなくなると言われた。確かに教育は大事である。一番大事と言った方がよい。しかし、教育と研究は車の両輪である。良い研究をする教員は良い講義（学生受けではなく）をするのを見てきた。摂南大学の研究環境で個人ができる研究と成果は限られる、研究領域を超えた融合研究こそが適した研究法と思える。

謝辞

本稿の執筆の機会を与えていただきました融合科学研究所長の久保司郎先生にお礼申し上げます。

付録

最終講義は最初、通常のプレゼンを考えていましたが、3月に入り研究室の片付け中に偏光メガネが出てきました。20年ほど前、タンパク質の立体構造を講義で示すために買ったものです。映画館やイベントの3D映画と同じで、左右の目にあたる図をスライドにし、それぞれのスライドを直角の偏光フィルター付きの2台のプロジェクターで投影し、偏光メガネで立体視するものです。しかし、当時の投影装置では左右の図がずれたりしてトラブルが多く、立体的に見えないと言う学生に、見える気になれば見ると分けのわからないことを

言い、数回講義に用いたままで終わっていました。懐かしく廃棄の前に液晶プロジェクターでやってみると、非常に鮮明に簡単に3D表示できるではありませんか。これを最終講義に用いようと考えたのは講演日3月18日の1週間前でした。急ぎデータを立体表示用に変更していきました。

1つ問題がありました、プチテアトルに設置されているスクリーンは布製のもので、偏光が当たると自然光にもどり立体視にはなりません。3Dのためには偏光がそのまま反射するメタルスクリーンが必要です（映画館はこのスクリーンが用いられ「銀幕の女王」などの言葉はここからきています）。そのため、プラスチック建材3枚と金属粉の入った塗料をホームセンターで購入、スプレー塗装してホワイトボードの上に立てることで解決しました。予定以上の観客数で補助椅子を追加し、見づらい角度があったかも知れませんが、立体視できたとの言葉に安心しました。これだったらタンパク質の立体構造の講義で教育効果が大きいと思いましたが、時遅しです。