

最終講義抄録



研究からの学習

青山俊文

信州大学医学部医学科代謝制御学教室

青山俊文 教授 略歴

- 1978年 3月 上智大学理工学部化学科卒業（生物化学教室）
1978年 4月 大阪大学大学院理学研究科生物化学専攻（修士課程）入学
（蛋白質研究所生理機能部門）
1980年 4月 同上（博士課程）入学（同上）
1983年 4月 大阪大学蛋白質研究所特定領域研究員（同上）
1985年 4月 アメリカ国立衛生研究所（NIH）国立癌研究所（NCI）
Visiting Associate（分子発癌部門）
1990年10月 信州大学医学部 助教授（生化学教室）
1998年 8月 信州大学医学部 教授
（脂質生化学教室→加齢生化学教室→代謝制御学教室）
現在に至る

研究からの学習

青山俊文

信州大学医学部医学科代謝制御学教室

はじめに

最終講義を行える見込みに到ったことに安堵すると同時に、これまでの小生の活動を支えてくださった教員・職員・学生・共同研究者・友人の方々に深謝致します。

一貫して生命科学研究に携わってきた経緯を有するも、各段階において得られた成果と、そこから学んだ内容には格段の乖離がある。各々を羅列し、後に纏めてみたい。

(1) 高校における研究

横浜市の聖光学院はカトリック系の中高一貫教育校であり、その生物部でプラナリアの再生実験を行った。当時は関東ロー層の切り通し道がそこかしこに在り、地下水の溜まり場である澱みに沈む落葉の裏から多数採取した。ガラスシャーレに入れて、餌となるゆで卵の黄身を与えると、裏側の全身長の1/3あたりにある口から取り込み、黄身の色がグラデーション化して全身に拡がるのが興味深かった。両眼を結ぶ線と垂直方向に頭部を切断する、所謂、真向唐竹割りを行うと、10%程度の個体に再生が生じ、双頭の個体となる。イギリスの研究者が4頭の個体に再生させた例が知られていたが、当方は両眼を結ぶ線に約45度の角度から切断する実験を行った。50~60匹を処理して、1匹だけ頭部が1.5個・眼が3個の個体を得た。奈良興福寺の阿修羅像頭部を半分に切断した様なモンスターを創ったことに大変興奮したが、再現性の乏しい自己満足であった。ここで学んだことは、他者の行わない試みが新たな発見に繋がることを僅かに経験したことであった。その後、カトリック系の学校で幾つかの暴挙を重ねた報いが訪れ、大学受験期に本態性高血圧症を呈して、惨憺たる受験結果を浴びた。取りあえず、広く化学全般を学べる進路を選択した。

(2) 大学における研究

東京四ッ谷の上智大学はイエズス会系の大学であり、世界標準から判断すれば、医学部を持たなくても神学・哲学・科学が揃っている日本最初の総合大学である。入学直後から本態性高血圧症は雲散霧消し、受験

勉強とは異なる向学心が湧出した。高血圧・サプリメント・運動法・精神修養法等々健康に関する入門書・大衆書を大量読破した。約40年経過した現時点で判断すると、ほとんどの内容は消滅している。〇〇茶・ビタミン類・タウリンの様な一部のサプリメントは他の製品に組み込まれて存続しているが、〇〇運動法や〇〇健康法の類は全滅している。発案者の強い啓蒙活動が下火になる時に消滅・衰退する虚学と断じざるを得ない。大学前期で学んだことは、虚学を排し実学に向かうことであった。神経化学教室と筋蛋白化学教室しか選択余地がなかったため、泥臭そうな後者を選んだ。研究室に入ると、設備や予算の貧弱さを痛感したため、ドイツ語を3,000単語くらい記憶して国立大学大学院を目指した。当時、日本の生化学研究は西高東低と言われ、迷わず京都大学と大阪大学を受験した。合格者の半数近くが浪人(所謂、院浪)である難度を乗り越えて両方とも合格したが、配属教室を自由に選べる大阪大学大学院に進学した。

(3) 大阪大学蛋白質研究所における研究

阪神淡路大震災にも構造的損害を殆ど被らなかつた9階建てビルの7階部分にある生理機能部門に配属となり、一安堵した。佐藤了教授は薬物・毒物代謝の初発律速酵素であるチトクローム P450 (CYP) を発見・命名した偉業を持ち、1964年のJBC誌に掲載された連報は合計被引用数が16,000を超え、日本から出された科学論文引用回数ランキングの五指に入るものである。

CYPは広く異なる基質特異性を有するアイソザイム群であり、ウサギ肝臓だけでも20分子種以上存在する。誘導剤で発現増加される2分子種は蛋白的に純化されていたが、誘導剤を投与しない雄ウサギ肝臓から出来るだけ多種のCYP分子を精製する課題に着手した。4℃の低温室で、4種の疎水クロマトグラフィーを数週間かけて行うというブラック企業顔負けの作業を10数回繰り返して、8分子種の精製に成功した。学会発表にて好評を博し、朝日新聞に掲載される等のプチ幸福感に浸れた。ところが、英語論文原稿を教授に提出して、数か月ごとに遠慮気味に催促したが、2年間経

でも未投稿状態のままであり、失望を禁じえなかった。高名な教授の処世術の一例であるが、多数の国内・国外学会に招聘されるたびに新たなデータを発表して役割を果たすが、積みあがったデータを論文化する時間的・労力的余裕がない。しかし、英文表現に強く拘るため、学生や助手レベルの表現では満足出来ず、結果的に未投稿論文の山を築くことに帰する。蛋白質研究所における活動で学んだことは、理不尽が通用する偏向した教育方法が存在し得ることであり、publish or perish という欧米人の合理的思考に及ぶべくもないことであった。この反面教師的学習が将来の自分の教員活動を律することになるとは想像だに出来なかった。礼節を尽くした恩師から推薦状をもらい、研究者生命を賭して、アメリカ国立癌研究所に赴いた。

(4) アメリカ国立癌研究所における研究

メリーランド州ベセスダ市内にある国立衛生研究所・国立癌研究所は世界有数の巨大生命科学研究機関であるが、赴任当初はカルチャーショックを感じなかった。この機関のレベルの高さを理解するには未熟であったことを意味する。当節、遺伝子クローニングが最先端研究として人気を集めていた。CYP 各分子種の cDNA クローニングを行うことを期待していたが、ボスの命令は絶対的であり、当初2年間は CYP に対するモノクローナル抗体のエピトープ解析という地味で低レベルの研究に消費された。3年目から、ようやく、(i) CYP4A5 の cDNA クローニングと(ii) ヒト CYP 8 分子種各々のワクシニアウイルスによる cDNA 発現法の構築から成る二本立て研究を始められた。連日14時間程度のベンチワークを休日無しで1年間続け、両方の研究で良好な結果が得られた。続く2.5年間はベンチワークと論文作製に没頭した結果、12編の筆頭著者論文と21編の共著論文を雑誌に掲載出来た。これにて、研究者として立ち上がることが出来たため、非常に幸せであった。これら33編の論文は当時のインパクトファクター：10あたりがベストスコアであるが、後日、論文引用回数が500を超えるもの2編；200を超えるもの5編；100を超えるもの多数という秀抜な外的評価を得た。要するに、薬物代謝・毒物代謝・脂質代謝等の分野の研究者の役に立ったことが立証され、十分な満足感を享受出来た。最初の論文を出した10年後に、信州大学医学部教授になるとは夢想だにできなかった。これらから学んだことは、正直に研究に専念すれば成果が得られる立ち位置・環境に居ることの重要さであった。

ワクシニアウイルス cDNA 発現法は、ほとんど全種の哺乳動物由来の培養細胞 (in vitro 系細胞) 及びマウス/ラットの腹水中で増殖した癌細胞 (in vivo 系細胞) に感染し、細胞内蛋白成分の0.1~0.2% (w/w) を発現蛋白で占め得る有力な技術である。発現蛋白が正常のプロセッシングを受けて機能蛋白として作動することは CYP 各分子種について実証した。より高度のプロセッシングについては、インスリンを標的として調べたところ、HepG2細胞に感染させて36時間後に回収した場合、約20%のインスリン分子はジスルフィド橋と分子内 SS ループを有する機能型であることが分かった。弱毒化天然痘ウイルス由来のワクシニアウイルスは前室を持つ陰圧室で自由に使用できた。途方もない邪心の産物として、機能を有する蛋白系細菌毒素を生産できるリコンビナントワクシニアウイルスの調製を思いついた。直径1cmのシャーレ内の培養細胞で生産すると、ヒトの致死量に達する計算となり、vivo で感染すれば敵も味方も死滅する相殺ウイルス兵器となり得るものと思った。この発案は、リコンビナントウイルス作製中に自分が感染して死亡するリスクがあることと、家族も全滅することの悲惨さを考えて、実行できなかった。ワクシニアウイルス構築系のフルセットを携えて本学医学部生化学教室に移った。10種の脂肪酸分解系酵素を発現するリコンビナントウイルスを容易に作製し、成果を論文化してきた。法規制が厳しくなり、通達のあった1999年にオートクレーヴに入れて浄化するまで、基礎棟のフリーザー内に存在していたことは事実である。一連のことから学んだことは、科学技術の周辺には深淵で危険な闇が存在し、一度踏み込めば破局に到り得ることであった。防止手段が後手にまわる場合が多いことも憂慮された。現在の IT 犯罪と一脈通じるような気がする。

(5) 本学部生化学教室における研究

当時、生体肝移植の実績により、本学部は開学以来最高の評価を得ていた。生体肝移植成功率と密接な関連研究を行っていたにもかかわらず、橋本隆教授は超然と我が道を行く研究に没頭していた。言われるままに研究・教育に没頭した結果、(i) 8種の脂肪酸代謝関連蛋白をコードする cDNA を単離し (ii) 2種のヒトゲノム配列を決定し (iii) 新たな遺伝病 (極長鎖脂肪酸アシル CoA 脱水素酵素欠損症) を発見し、患者9名の遺伝子変異を同定した。この遺伝病の発見と変異点同定は、本学部における初めてのタイプの研究業績であった。Nature Genetics 誌が存在していなかった

ことが残念であった。8年弱の間に学んだことは、医学に臨んで研究視野が大きく広がったこと・学生への研究指導は自分の成長促進につながること・流行り廃りを気にせず、地方大学での独自色を確立することの重要性を理解したこと等である。謹厳実直な教授に感化されて、最も真面目に行動出来たことは素晴らしい経験であった。

(6) 代謝制御学教室における研究

当初、研究主体を *in vitro* から *in vivo* に切り替えて、生化学・分子生物学研究の激動期に臨もうとした。幸運なことに、アメリカ国立癌研究所のボスから核内受容体：PPAR α のノックアウトマウスが供給された。1990年に偶然クローン化された PPAR α は、その機能が全く未解明の状態であった。ノックアウトマウスを用いた研究により、当研究室は1998年に脂肪酸代謝系のマスターレギュレーターであることを JBC 誌に掲載した。同年、フランスのパスツール研究所グループは炎症シグナル抑制因子であることを Nature 誌に掲載した。ノーベル賞獲得を目標に据えた研究グループ（約40名）に対抗する無謀を知悉していたため、我々は PPAR α に特化する道を選択した。当時、アイソザイムである PPAR γ の配位子に注目した武田薬品が、糖尿病治療薬：ピオグリタゾン（商品名：アクトス）を上程し、研究者の注目度は PPAR γ >> PPAR α であった。PPAR γ に多くのグループの注目が集まるのを尻目に、小生一人+学生数名の弱小グループはノックアウトマウスを唯一の頼りとして研究展開した。対象臓器を心臓・腎臓・脂肪組織・精巣等に広げ、配位子として環境攪乱物質や薬物を投与し、エタノール・アルブミン・コレステロール・脂肪酸誘導体等を投与してノックアウトマウスに負荷をかける等を試みた。20年間の成果として、掲載時のインパクトファクターが4.5以上の論文を23編（10以上の論文6編を含む）出すことが出来た。教員定数2名の基礎系教室として、その独自色を発揮出来たものと自惚れている。外的評価はより長い時間を要するが、1998年に JBC 誌に掲載した論文の引用回数は650を超えている。現在も6編の論文を作製中であるが、痛感するのはキリが無いということであり、学問には収束はあっても終焉は無いということである。

20年間以上トランスジェニックマウスを用いた *in vivo* 系の生化学・分子生物学研究を行ってきた結果、この学問分野が曖昧さに満ちていることを学んだ。それ以前に行ってきた研究分野は曖昧さが少ない。例え

ば、cDNA クローニングと塩基配列の決定については、現在得られているデータは1000年後もほとんど変化しないと思われる。従って、論文を発表することは自分の名を1000年後にも残せることと同義であり、そこに強烈な動機を感じて挑戦した研究者が多かったに違いない。遺伝子変異点が疾患原因であることが証明された遺伝病研究結果も同様であろう。少しレベルは落ちるが、至適条件で解析された蛋白の活性や機能もデータとしての堅牢性を有している。一方、トランスジェニック動物を用いた *in vivo* 系研究の場合、遺伝子ノックアウトした後に胎生致死となる原因を胚の解析で究明できれば、それらのデータは遺伝子産物機能情報としての堅牢性を有している。一例を挙げると、PPAR γ ノックアウトマウスは胎生致死を呈するが、受精後14日目に強烈な心不全を生じることが知られている。しかし、PPAR α ノックアウトマウスの場合、流産率が高く出生数が少ないにもかかわらず繁殖可能であり、表現形質に関しては野生型マウスとの差異がない。前述した手法により、初めて、表現形質の変化が現れた。その表現形質の変化が、様々な要因により、更なる変化を呈することが難点である。即ち、データの堅牢性に問題がある。我々の知り得ている様々な要因とは、加齢に伴う PPAR α 発現量の低下・動物種差・マウス系統差・PPAR α 機能を代償するエストロゲン存在量・内性配位子濃度・外来性配位子濃度と投与期間・臓器間クロストーク・核内 PPAR α 複合体構成蛋白の発現変化・酸化ストレス強度変化等、枚挙にいとまがない程多岐にわたっている。このため、厳密な条件設定を要する難しさに戸惑ってきた。20年間を消耗戦に費やししながら成果を拾い上げてきた。最近、肝臓特異的 PPAR α ノックアウトマウスを用いて実験を行っているが、実験技術の進歩とはいえ、ヒトにおいては存在しない奇妙な特性を持つマウスを用いて得られる結果が、肝・小腸クロストークや PPAR α 複合体構成蛋白の発現変化の影響をどの程度被るかが心配である。結果オーライという呑気な構えを持つしかないが、科学の深みに嵌った状況は心地よいものを感じられない。重要なことは、この系のデータはファジーであり、一刀両断的な結果は得られていないことを認識すべきことである。試行錯誤を伴う猛烈な消耗戦を乗り越えて得られた結果がいても簡単に崩壊させられる実験系に辛さを感じるが、前向きに倒れる覚悟で進む者が次なる発見を成し遂げることを期待したい。

おわりに

様々な段階の研究活動を介して多様な学習を享受できたことに満足を感じている。生化学・分子生物学は、それらの激動期を経て多大な成果をおさめてきた。我々は科学的・医学的進歩の恩恵を受けてきたが、進歩に伴うリスクに晒されている。将来、良い方向に展開することを願うのみである。

前述したように、DNA クローニングと塩基配列の決定に基づく結果は非常に堅牢であると思う。しかし、

これらの結果はルールに従って作業したうえで得られたものである。どのようにしてA・T・G・Cからなる4種の塩基が選ばれたのか、なぜ3塩基がコドンとしてアミノ酸種や停止暗号を指定するのか、如何にしてhnRNAをmRNAにプロセッシングする仕組みが出来たのか等々、根源的ルールの出所は皆目不明である。入口も出口も分からない科学研究のゴミのように僅かな部分を担当した者として、独りよがりにならなかったことに安心している。科学研究者に求められることは謙虚に努力を重ねることと信じたい。