

私の研究歴

草間國子

私の研究歴について文章を書く貴重な機会を戴きましたが、研究分野は細分化されており、込み入った古い話は当該分野以外にはインパクトが殆ど無いと思われまので、代わりにこの場をお借りして私が昭和 52(1977)年に本学理工学部の教員となって以来の歩いてきた 42 年間を振り返ってみたいと思います。なお、私の研究の主要な部分は本年薬学雑誌の招待総説にまとめ、2019 年には刊行される予定ですので、ご興味ある方はそちらをご高覧ください。

学生・院生時代：本学理工学部薬学科に私が入学した 1971 年は、所謂全共闘による大学紛争が終息した直後であり、わからないままそれを見た我々世代の学生は政治に無関心のしらせ時代、一方国は高度成長の真ただ中で、新宿の高層ビル第一号である京王プラザができた年です。国内の出来事としては成田空港建設反対派による三里塚闘争、マクドナルド 1 号店オープンなどです。当時 Mac ハンバーガーは 1 個 180 円で、学生にはちょっとした贅沢でした。

昭和 49 (1974)年、大学での勉強を通じていろいろ思うところがあり 4 年生の前期からドイツ語や有機化学、物理化学を猛勉強して千葉大学大学院（定員 24 名位）に合格、翌年春入学しました。院全体でも紅三点の一人として生化学教室での大学院修士課程を過ごしました。修了を前に受験した某製薬企業では女子修士の給与体系は無いと断られて困っていた所、卒研のご指導を頂いた恩師村越善衛先生の薬物学教室（薬理学研究室の前身）に幸いにも入れて頂きました。私の修士論文のテーマは、タンパク質生合成の第一段階アミノアシル化反応に対する調節因子ポリアミンの作用に関するものでした。まだ三十代前半だった恩師五十嵐一衛講師（当時）がとてもアクティブでしたので、修士の研究成果は *Eur. J. Biochem.* に 2 報、*BBRC* 1 報になりました。内容的には、細胞増殖時に合成が上昇するポリアミン（spermine と spermidine）が真核細胞系タンパク質生合成を促進する作用点の 1 つは、イソロイシル(Ile)-tRNA の合成反応である、というラボの先行研究に基づいて、この Ile-tRNA 合成酵素のラット肝臓からの精製、tRNA^{MIX} をフェノール何十リットルも使って精製、そしてラジオアイソトープ(RI)を使って酵素反応を行い、解析するという研究でした。親の猛反対を潜り抜けて進学したため埼玉から通っていた千葉大の西千葉キャンパスでは、低温室とアイソトープ施設ばかりで過ごしました。今は知りませんが、当時の国立大学の薬学部は研究オンリーでした。セミナーでは準備に毎回最低 10 報位の参考論文を読んで臨んで来る周りの院生学部生のハイス

ペックさに圧倒されたものです。こちらは紹介する論文だけようやく1度読む始末。出身校では最大の関心事であった薬剤師国家試験など、誰一人気にしていませんでした。また助手さんたちは学生実習には殆ど出ず、自室で自分の研究をしていました。我々院生が「今後の為だよ」といわれ、(無給で)学生実習を見ておりました。

薬物学教室時代：村越善衛先生は科学者として非常に視野が広く、何が重要かを鋭く見分ける方でした。学問を愛し、ドイツ観念論に則って真実を追究し、人を愛するお考えに接する機会も多く、人生を通じて誰よりも尊敬に値する方でした。この師との巡り合いが無ければ私の今日は無かったと思っています。

着任した薬物学教室では、毎日朝早くから日付が変わる時間まで勤務しました、セブンイレブンの異名をとっていました。仕事は学生の卒研指導、学生実習(前・後期2科目)、教授の補助や研究室の業務、そして自己の研究で、この順に時間を費やしましたが、実はそれよりも週3,4回の飲み会の時間が長大でした。理工学部駿河台校舎8号館に教員の居室がありましたが、実験するには手狭で来客も多いので、研究は同じフロアの学生実習室で行っていました。従って実習の時期は卒研生もろとも毎週実験台や装置を片づけねばならず、不自由でした。それでも、薬理実験に欠かせない実験動物は2号館の動物飼育室が整備されて専任の管理者がおられたので、研究室の先輩の先生方のご苦勞(日祭日も動物を世話されていた)に比べ、助手として随分楽になっていた事を後で知りました。実習室には冷房も無く夏はドラフトを強く引く位が暑さへの対応策でした(夜10時までやっていた薬理の実習では、大ヤカンで麦茶を作り、彼らに振舞いました)。RI施設が無かったので、道を渡って歯学部の施設をお借りしました。卒業研究は4年次の4月(希望により数か月前倒し)から翌年1月頃までびっしりやっていました。この頃の私の研究テーマは、モルヒネ依存性発現機構でした。ちょうど脳内オピオイドが英国のKosterlitzらにより1975年に発見され、さらにオピオイドの受容体が米国のSnyderらにより1973年に(μ , κ , δ , σ ; 当時の分類)が解明されたすぐ後でした。論文を参考にしながら、オピオイド(モルヒネ)依存性の解明をするため、研究室の平滑筋研究ともからませてマウス輸精管 δ 受容体の性状を研究対象にしました。輸精管スライスのまま受容体結合実験系を新たに試みたところ、特異的結合が通常の膜標品よりもかなり高かったため、この系でSchatchard解析を行ってKd, Bmaxなどを決めました。さらに依存性とのかかわりを追い求めて、セカンドメッセンジャー系を、依存性動物などについて研究しました。卒研生で入ってこられた村山(山縣)琮明さんや石毛久美子さんなど、その後教授として学部を支える事になる素晴らしい方々も学生におられ、卒研生の皆さんは研究に没頭していました。彼らの若い力も加わって新事実がほんの少し明らかになりま

した。これらはその後、教室に私と入れ替わりに入られた伊藤芳久先生による κ オピオイド受容体の優れたお仕事に発展したと思っています。駿河台時代の成果は諸事情で論文にはなりませんでしたが、1981年に京都で開催された **International Narcotic Research Conference** で発表し、憧れの **Snyder** 先生ともお会いしました（奇しくも **JHU** で再会）。その時の **Procedure** の本が残っています。この5年間を振り返ると、まず時間的にユトリのない生活だったと思います。そして研究面ではある一点に **concentrate** すべきであったと思います。さらに、ラボにばかり長く居るのが能ではなかったこと、どんな成果でも兎に角まとめなくてはだめだと今更ながら思います。数を稼ぐというよりも、自らの研究を振り返る為だったのです。

理工学部一般教育時代： 1982年、個人的事情により理工学部一般教育部生物学研究室（野本義雄，渡邊和子両先生）に移籍させて頂きました。ここでは薬学科1年の実習が主な仕事でした。パワフルで皆のアイドルだった渡邊先生と2人で、入学直後の西も東も分からない学生が相手、動物実験もあり、薬学科とは違う設備の不便さ等もあった中、ここでも家庭を忘れて働きました。慣れた頃に許可を得て、自分の学位の仕事の模索を始めました。話し合いの上、古巣千葉大で、既に独立されていた五十嵐教授の主宰する病態生化学研究室（千葉大猪鼻キャンパス）に車で通い、修士の時のテーマを深めたらという話になりました。前述のアミノアシル化へのポリアミンの関与を分子レベルで解明するため、ラットと小麦胚の **tRNA^{Ile}** (Ile を結合しリボソームに運ぶ分子) を完全に精製し、未決定だった 77 個の塩基配列を **RNA シークエンス法** (DNA の **Maxam-Gilbert** 法に類似) で決定しました。またその中に含まれる **minor base** は、東大理学部横山研で当時としては珍しい **photodiode array** のディテクターを使わせて頂き、無事 16 個全て決定しました。この頃 **array** の膨大なスペクトルデータはカセットテープに入れて保存していました。配列が分った **tRNA^{Ile}** のアミノ酸ステム部分にあたる 5 位と 69 位には水素結合できない **G-G** 塩基（対）があり、ここがポリアミンの結合部位になって安定化されているという事を、二重鎖特異的な **RNA 切断酵素 RNase V₁** の作用の違い等から結論づけました。今考えると、もう一步踏み込んで、**X** 線などで正確な結合の三次元構造を決め研究の価値を高めるべきでした。一方、精製した酵素（8 種類のアミノアシル - **tRNA** 合成酵素の複合体）と精製 **tRNA^{Ile}** によるアミノアシル化反応では、私が修士時代に行ったデータ通り **Ile-tRNA** 合成酵素だけがポリアミンにより強く促進を受ける事を確認しました。次に、**Ile-tRNA** 合成反応は基質が 3 種類のため、ポリアミンが存在している時、どのような順序で酵素に結合するかに関して **Cleland-type kinetics** を行いました。その結果、興味深いことに、ポリアミン単独添加の反応は **concerted mechanism** に従い、基質の

結合順序がランダムとであることがわかりました。それに対して、 Mg^{2+} または Mg^{2+} & spermine では基質が決まった順序で結合し、中間体（教科書にある通りの Ile-AMP-酵素複合体）を介する ping-pong メカニズムで進行していました。また院生で、その後厚生省に入られた渡邊伸一氏と協力し、ポリアミンの生体内の主なターゲット分子（DNA, tRNA, 16S rRNA, リン脂質, ATP）に対する結合定数を平衡透析法で測定・算出しました。JBCに掲載されたこの論文は今でも数多く引用されています。

これらの内容を完了するのに尚 5 年の年月を費やしましたが、最終的に ABB 2 報と JBC 1 報, BBRC 1 報にまとめ、修士時代の 3 報と合わせた 7 報で博士論文を書き、1991 年に千葉大学から論文博士（薬学）を頂きました。思い出として、その当時 WordStar というソフトを載せた NEC PC9801RX を使って学位論文に打ち込んでいましたが、締め切りをにらみながらの作業中急な停電に遭い、その日の入力が全て失われて呆然としました。5 inch の FD にいれておかなかったのです・・・

薬学部生物学時代：本学理工学部薬学科から薬学部への分離独立という大きな出来事があり、理工学部習志野(現、船橋)校舎 4 号館から新設薬学部 3 号館 1 階に引っ越しをしました。薬学部開設年度の 1988 年（昭和 63 年）の事です。外壁が「ソメイヨシノ色」の校舎での、すがすがしい出発でした。このコンセプトは初代の桐澤誠学部長の御趣味だったのでしょうか、キャンパス内には全ての季節に咲く桜も植えられました。東葉高速線は平成 8 年開業ですから、学部設置当時はまだ走っていませんでした。当初生物学研究室は 4 人体制で、ご指導頂いてきた渡邊和子先生と共に、新たに上司として筑波大学を退官された椿啓介教授、同僚に小川吉夫助手（翌年専任講師）が着任され、全く予想外な事に菌類の研究者と合流することになりました。（写真は薬学部の生物学実習風景、平成 8 年ごろ）



翌 89 年 1 月に裕仁天皇の崩御がありました。天皇の下血と大量輸血の報道が前年秋から毎日の様に行われたのを憶い出します。昭和 64 年明けすぐ、元号

が平成となりました。その後理工学部薬学科籍の先生方も一年ごとに新薬学部に移行されてこられ(給与を理工に依存するため)、学生も学年が進んで増え、食堂は満員(味は不評)でしたが、御茶ノ水時代と違って、学生が皆ひとつのキャンパス内で過ごすので、若い声やボール遊びなど活気にあふれた新学部でした。今でも中庭の光景が目に浮かびます。平成7年に私は専任講師を拝命し、講義の準備や担任の仕事、委員会等に追われる様になりました。研究室の新たな体制の下で真菌を何とか研究に組み込みたいと考え、新たに酵母の細胞骨格の研究および真菌由来の向神経性天然物の探索という2テーマを提案しました。これは大きなギアチェンジで、今思うと大胆すぎたなと感じます。前者の仕事は得意な生化学分野であり、その当時、細胞運動研究者が競って追い求めているアクチン結合タンパク質に関して、やられていなかったサッカロミセス酵母から単離するのが目標でした。酵母でしたら、その後遺伝学や細胞生物学的検討ができる為です。そこで酵母を大量に培養しまして、細胞壁を壊し、途中DNase I-Sepharose がとても有効なクロマトの手段となって、シングルバンドで目的物が取れました。この時も低温室の人になりました。こうして yeast cofilin (分子量 19K) を無事誰よりも早く単離でき学会発表し、抗体も取りました。その後の仕事は、その頃東大医学部附属病院研修を終えて着任された須田篤博助手にバトンタッチしたのですが、これも論文を書かずに放ってしまいました。今度は、上の立場としての push が足りず優勝を逃した気分です。後者の仕事は神経系ということで私も力が入りましたが、後で思うと暗中模索から抜け出られていませんでした。狙いはグルタミン酸受容体の内 NMDA 受容体に働く新物質でした。この受容体は海馬の学習・記憶過程に絡む一方、脳梗塞などの際の神経細胞死にも中心的に関与している重要度の非常に高い系だったからです。当時、我が国の誇る中西重忠氏(京大)、三品昌美氏(東大)がほぼ全てクローニングされておりました。NMDA 受容体の分子上には調節部位があり、グリシンの他ポリアミン結合部位もあり、私の学位の研究とも不思議なつながりがありました。真菌由来物質について、MK-801 結合との競合、さらにこのポリアミン部位に作用する神経保護薬 ifenprodil との競合活性を、副手で入られた山田智恵子さんの協力を得て行いました。しかし、この馴れない「モノ取り」作業は年月、資金と労力を費やした割には良いものが取れずに終わりました。

そうこうするうちに、1995 年位になって最後のテーマであるニューロラリズムに出会いました。これは運動神経疾患の一種ですが、エチオピアやバングラデシュなど途上国の最貧困層が罹患している疾患です。研究テーマとはひょんなところからも来るもので、これは日大の先輩で千葉大薬学部の助教授をされていた池上文雄博士の留学先の F. Lambein 教授が手掛けておられたテー

マで、私が扱っていたグルタミン酸神経伝達の系との関係も深い事から、お声がけに乗ることに致しました。

ジョンズホプキンス大学への留学：一度は海外で研究してみたいと若い頃から考えていたのが既に 45 歳近くになった事もあり、学内で募集される海外派遣研究員（中期）に応募しました。留学先は主人が留学した時にお世話になった Johns Hopkins 大学(JHU)医学部 Neurology 部門に属する Ted & Valina Dawson 夫妻の小さなラボです。1997年2月から、延長半年を含めて1年間研究させて頂きました。JHUの病院とキャンパスはボルチモアのダウンタウンがあるのですが、その辺は殺人多発地帯で避け、住居は日本人の留学してきた医者ばかりが住む郊外のアパート群の一隅に住みました。JHUは全米1,2の医学部です。利根川博士やクローン羊ドリーの Wilmot 博士など一流の人が毎日のように訪れ、講演があり刺激的でしたが、渡米後娘が5月に来るまでの3か月は何やら夢の中の様な不安定さで、他人に依存して生きてきたこれまでとは大違いでした。まずは行ってすぐに、外部の方が来る病院のカフェテリアで、その当時の大事件ペルーの日本大使館人質解放劇を夢中で見ていた所、帰りにビザを含めたパスポートを財布と共に置き忘れ無くしてしまうという大失敗をしました。お蔭で車を飛ばして片道90分かかるワシントンDC郊外の日本大使館に2往復する羽目になりました。ラボだけでなく米国での生活の安定化には色々な困難が伴いました。娘が来ると、今度は彼女の学校のことなどでわかりにくい手続きや交渉、より良い学校への転校などもあり時間がどんどん流れてゆきました。日大の方の留学の延長の申請は無事ご許可いただきましたが、気づけば半年が経っていました。夏になり、主人や毎夏米国に仕事に来られる歯学部の方の岩田幸一先生が慰問に来てくださった時には、ホッとするあまり、有名なワタリガニのレストランに行くため運転中、右折したとき間違えて左側のレーンに入って、乗っていた人々を凍り付かせてしまいました。

さて JHU の Dawson Lab では、大元締 S. Snyder の流れを汲み、夫妻、ポスドク(PD) 4-5名、テクニシャン2名でパーキンソン病、舞踏病、アルツハイマー病などをターゲットに神経細胞死の研究を行っていました。私は、初代培養皮質ニューロンの作製法を Valina 先生に習って、アルツハイマー病(AD)にかかわる高価な β -アミロイド(A β 1-40 と 1-42)を湯水のごとく使わせて頂いて作用を見たりしていましたが、有害作用が出るのは 10^{-5} g/mL オーダーと、かなり非生理的な濃度でした(今思えば、溶かし方に工夫が要った)。むしろ面白半分にやってみた初代ミクログリアがこの A β 液にも激しく反応する現象を追求すべきでした。この時もテーマの選択を誤りました。より難しいテーマだった、神経細胞死にかかわるとされたセラミドを産生する酵素・中性 sphingomyelinase に心惹かれ、こちらにのめり込んでまたアメリカの低温室

の人になってしまいました。こちらは大量の RI を使って基質の合成までしたりして手間取ったのですが、この酵素がかなり綺麗になった時点で、ドイツのグループの卓越した **cloning strategy** による PNAS 論文が出て先を越され、これも論文にはなりません。この時点で 1998 年冬の長野オリンピックの頃となり、ゆっくり見る暇も無く、帰国準備になりました。JHU では初代皮質ニューロンの培養手技の習得と、英語が上達し後で国際協力分野に進む原点を得た娘の成長が、ささやかなお土産でした。

留学以降、ニューロラチリズム研究と抗 ALS 薬の探索：帰国後、皮質ニューロンの初代培養系を活用して、NL の研究(①)を再開しました。その後学部で獲得した大型予算である学術フロンティア推進事業(2002~2009)の仕事として、以前からの夢であった新しい薬のシーズを目指したテーマに取り組み、抗 ALS 薬(②)の探索に定年までチャレンジし続けました。

①の詳細は薬学雑誌に記しましたので、そちらをご覧ください。

以下に箇条書きで結果の概要をまとめました。この研究で有用なツールとなったのは「初代培養脊髄運動ニューロン」、そして「NL モデルラット」でした。前者は JHU の皮質ニューロンの経験を踏まえて苦労して自前で出来るようになり、後者は我々オリジナルです。

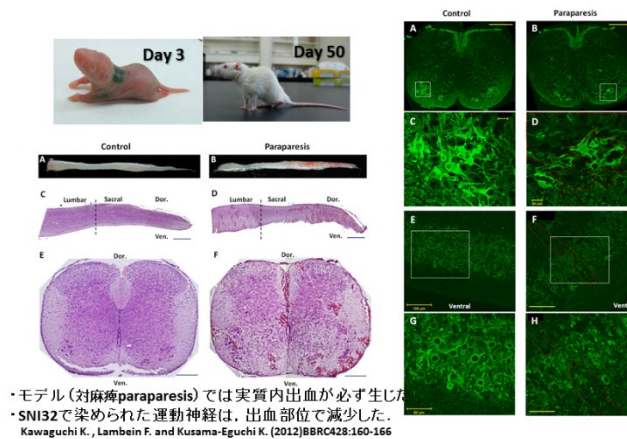
1. グラスピー豆の成分 L-β-ODAP は、初代培養運動神経の場合、約 4 割は AMPA 型グルタミン酸受容体の拮抗薬で押さえられなかったもので、単純に AMPA 受容体のみを介した作用ではない。

2. L-β-ODAP 毒性は細胞内グルタチオン含量が低下した時に著しく高まる。従って酸化ストレスや ROS の影響が大である。

3. 神経細胞死との関連が深い L-β-ODAP による細胞内カルシウム([Ca²⁺]_i)に関して、流入総量は対照の(S)-AMPA より大で、流入の特性は脱分極に依存しない。上昇機序として metabotropic グルタミン酸受容体活性化(小胞体からの Ca²⁺放出)、活性酸素種(ROS)活性化 transient receptor potential channel 等が大きくかかわっていた。

4. L-β-ODAP 連続皮下投与により NL ラットモデルが作成できた。このモデルでは脊髄運動神経の腰・仙髄が脱落すると共に後肢だけが不可逆的な痙性の対麻痺を生じた(写真)。

5. NL ラットモデルでは、腰・仙髄の腹側に実質内出血が必発した(写真)。この部位にミクログリアが集積し、また、炎症性サイトカインが上昇していた。



一方、②の成果として、学術フロンティアで廣瀬先生（須田氏の後任者）が作製された約 600 種の真菌エキスについて、運動神経特異的な保護活性を調べる 3 つの試験法でスクリーニングを行った所、14 種の菌株に絞り込まれました。この中の 1 つの菌から、院生の協力の下で活性分子の精製を行い、*in vitro* で有効性の高い新規物質 Mw. 182 をついに 2017 年の夏に見出し、YY-1 と名付けました。本化合物を ALS モデルマウス SOD1-G93A に投与したところ、生後 45 日、60 日からの投与でモデルマウスの寿命を延長し、一部では運動低下も抑えました。学術フロンティアの成果として約 10 年後の定年間際に手できた薬物候補物質です。（なお、ALS 治療薬候補探索ではこの他に、少なくとも 4 種も得られています。）最後の仕事は動物センターに居続けの数年間でした。

終わりに：私の様な者が研究者の端くれになる幸運を頂き、ささやかな成果を得て定年を迎えました。これはひとえに、恩師、先輩、同僚の先生方のご指導、大学院生、卒業研究生の皆さまの若い力、総じて大学という「ロドス島」で跳んだ記録です。しかし記してみても、失敗の歴史であったと痛感しています。光陰矢の如し。少年(女)老い易く学成り難し。皆様のご活躍の為の失敗例としてご参考になれば幸いです。