

私の研究歴

飯島 洋

[はじめに]

私は 2022 年 3 月末に定年退職を迎えました。お世話になった本学の皆様に深く感謝申し上げます。退職にあたり、学部紀要寄稿の依頼をいただきました。感謝を込めて、研究を中心に今までの思い出を絡めて書いてみることにしました。研究の内容は多くの方にはあまり関係がないと思いますが、その時代の研究の雰囲気や私の経験は、若い人には知らない古い時代の世界として、中堅の方には今後の研究生活の参考に、ベテランの方には共感を持っていただけるかもしれない思い出話として、本稿に少しは意味があることを祈っています。

[本学赴任の経緯]

本学に勤めるきっかけは、2006 年に薬学会年会で北中進先生（本学生薬学 2015 年 3 月ご定年）にバツリと再会したことから始まった。北中先生とはその三十年前、東京大学の生薬学植物化学教室（三川潮先生）における学生と研究生の間柄で、研究だけでなく一緒に旅行したり懇意にしていた。薬学教育六年制課程への移行対応のため、2007 年度採用で有機化学系教授を補充することになっているので応募してみないかとお声をかけられた。企業出身で医薬品開発やバイオ系知識がある基礎系の教員が一人くらいいた方が教育研究の多様性の面でもいいというお考えであったと思う。当時、私はキリンビール（株）の医薬探索研究所に勤務していたが、その一年半前にそれまで関わっていた研究プロジェクトが廃され、研究現場から研究推進という研究所の運営をする部門に異動していた。研究プロジェクトの進捗を取りまとめたり、委託受託契約、予算策定管理、RI 廃棄物、遺伝子組換え実験管理など、実験現場と事務担当者の間を取り持つ業務であった。研究組織には不可欠な部門であったが、やはり実験室で研究したいという気持ちは残っていた。進行中の企業研究では一切が秘密であるので、順調に進行しているプロジェクトの内容を論文発表しないし、特許もギリギリまで申請しない。そのため、有望なプロジェクトに関わっている企業研究者が論文を出せるのはプロジェクト終了から数年後である。幸い（?）、私はそういう運命になかったので本学の教授基準を満たす論文数を出せていて、応募することができたのである。企業出身ということだと思うが、辞令交付の際に「講義と実習、教室配属学生の指導（国試合格も含む）はきちんとやってください」と強く強調された後、にっこりと「あとはいくらでも研究して本学のアカデミアとしてのステータスを上げてください」と当時学部長であった安西偕二郎先生に言われたことをよく覚えている。

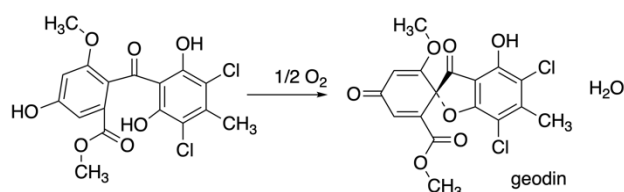
3 号館の 3 階、335A から C までのまとまった研究室を全くの「更地」の状態でもらった。赴任当時は不思議に思わなかったが、今から振り返ると、非常に幸運で恵まれたスタートを用意してもらった。研究室名もテーマも自由に決めさせてもらえた。まだ机しかなかった 335A 教授

室から日没時の富士山の赤い色を初めて見た記憶はいまだに鮮やかである。(2015年に薬草園西側にマンションが建ったため富士山は見えなくなってしまった)。

[学生時代の研究]

私は東京大学薬学部生薬学植物化学研究室において、卒業研究配属以来博士課程を含めて6年間、三川潮教授と海老塚豊先生(当時助手)のご指導を頂いた。

卒業研究：フェノール酸化カップリング反応酵素



Aspergillus terreus が産生する geodin の生合成の最終段階は、立体選択的なフェノールカップリング反応である。フェノールカップリング反応は、モルヒネの生合成、リグニンやアフマトキシンの生合成など、天然化合物の生合成では普遍的な反応の一つである。

この反応を司る酵素を精製し、反応機構を調べるのがテーマであった。私が研究室配属になった春に修了した先輩の修論の研究から引き継いだもので、酵素の存在と酵素反応の立体収率が100%であること、分子状酸素と dihydrogeodin を基質にすることが解明されていた。卒研の着手にあたり、先輩の修士論文を読んでその優秀さに圧倒されたが、その先輩が月田早智子先生であった。酵素反応は生成物の吸光度変化を測定して実施できた。酵素反応は速く、安定な酵素だった。当時助手で私の実質的指導者だった海老塚豊先生は、この反応の酸素消費量を酸素電極を使って検出できないかというアイデアを思いつかれた。最小限の大きさで酸素電極を装備できる反応セルが必要になった。ガラス細工職人の方に相談して全容積 2 mL の気密セルを作っていただいた。結果、この反応は 1/2 分子の酸素を使うことがわかった。実験道具を自分たちで作るという事に非常に感激した。その後先輩(藤井勲先生)によってこの酵素は均一に精製された。さらに原子吸光解析で銅を含むことが証明された。有機化学反応の基本通りの一電子移動を基軸にした酸化反応であると考えられる。精製中にカラムに青いバンドが見えたという手紙を当時 Vancouver にいた私あてにいただいたことを覚えている。

Chem Pharm Bull **31**, 337-340, 1983

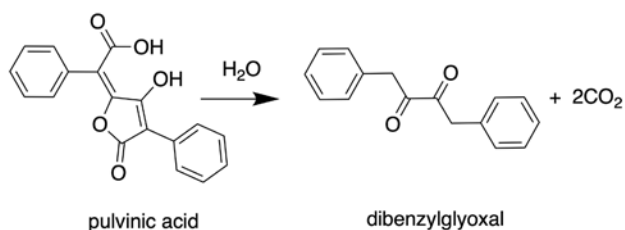
J. Biochem **101**, 11-18, 1987

修士論文：地位成分の分解酵素

修士課程の一年に上がったとき、学部の廊下に文科省の交換留学のポスターを見つけた。海老塚先生の留学先であった University of British Columbia が提携校であった。三川先生のお薦めもあって海老塚先生の留学先だった Towers 先生を受け入れ教授として応募し内定した。その後しばらくして水野伝一学部長に呼び出された。水野先生の迫力に押されて記憶はほとんどないが、なぜ留学を希望したかと聞かれたのだと思う。答えは覚えていないが、水野先生に納得していただけるほどの研究人生哲学を持っていなかったことは確実であった。水野先生は、選択は君にある

が、修士課程は研究者の基礎を培う大事な時期なので安易に留学していいのか。ちゃんとトレーニングを完成してから考えるべきだとおっしゃられたことだけははっきりと覚えている。そのご心配の意味さえも当時の私はわかっていなかった。細部にこだわるくせに大局的には楽観的な性格の私は9月に出国した。初めての実家を離れての生活が Vancouver であった。UBC では実験室には学生用のオフィススペースがあり、ポスドクや PhD の学生と一緒にあった。当時、イラン革命で亡命してきた多分王族出身の人もいたし、ケンタッキーの田舎からきた陽気で南部訛りで私にはほとんど話を聞き取ることができなかった男はブルースギターの名手だった。修士の同級生は30歳を過ぎていたが、彼とは受講科目も重なることが多く、おかげで無事科目単位を集めることができた。多様性という言葉が最近よく聞くが、1979年のカナダではむしろ当たり前だった。

Towers 先生は、私が朝比奈泰彦・柴田承二先生の部屋出身の学生ということで、地衣の研究がよかろうとお考えになり、地衣成分の生態系分解の研究をすることになった。採集に行くぞということで数時間自ら運転していただき、車のトランク一杯に地面に落ちこちている地衣が付着した枯れ枝を積んで帰ってきた。地衣成分の標品化合物、合成方法の蓄積などもあり、研究条件に恵まれていた。



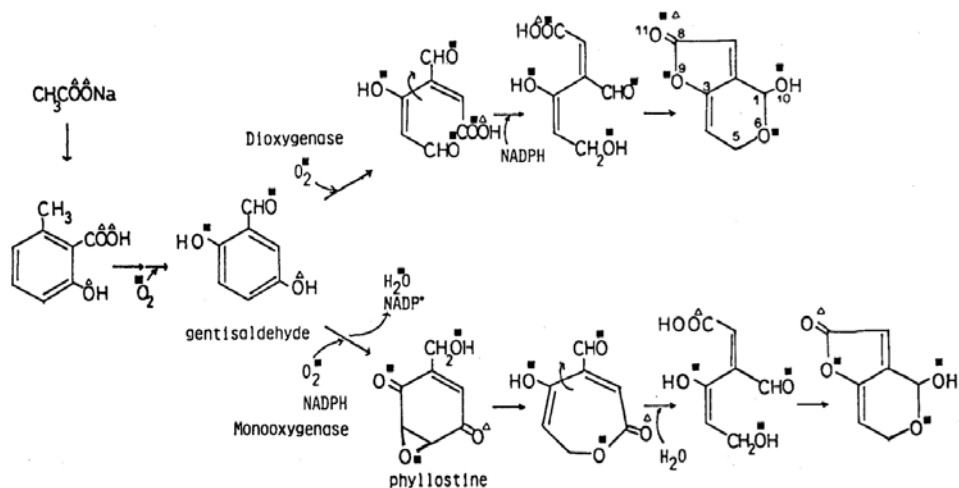
研究室には日本人のポスドク山本悦雄さんがおられて、実験の面倒を非常に丁寧に見ていただいた。山本さんには私生活もお世話になり、下宿が見つかるまで、新婚だった山本さんのアパートに転がり込んでお弁

当まで作ってもらったし、よく夕食にも呼んでもらった。地衣の化学成分には抗菌・抗細菌活性を持つものが多く、森林土壌には特定の細菌が住んでいる。地衣が生息する森林の土壌から菌を分離・培養し、その菌に地衣の抽出物（黄色）を与えてみると、見る見るうちに色が消えてゆくのは驚いた。色の消滅を目安に、この酵素を単離して性質を調べた。翌年8月に帰国し、反応生成物の構造決定をしたら、加水分解して生じるカルボン酸が（多分非酵素的に）脱炭酸したものであった。印象的な出来事があった。帰国後の実験では酵素活性がガクンと落ちた。UBCがある Vancouver では、信じられないことだが、当時の水道水は山からの湧水がそのまま使われていた。精製水を得るためにイオン交換処理をすると樹脂がすぐ死んでしまう。ラボでは蒸留水を作ってからそれをイオン交換していた。ただ、放線菌の培地には蒸留の段階の水を使っていた。このことを思い出し、菌の培養培地に東京都の水道水を混ぜたら酵素活性が戻ったのは印象的だった。酵素はその辺にある原子量の小さな無機イオンをうまく反応に使っている。筆頭著者として初めて書いた論文となった。

Phytochemistry **22**, 371-3374, 1983

博士：カビ毒の生合成機構

Patulin は過去の国試問題にも登場した普遍的なカビ毒の1つである。構造式からは簡単には想像できないが polyketide であり、6-methylsallicilic acid の環の酸化開裂により生じる。この環酸化開

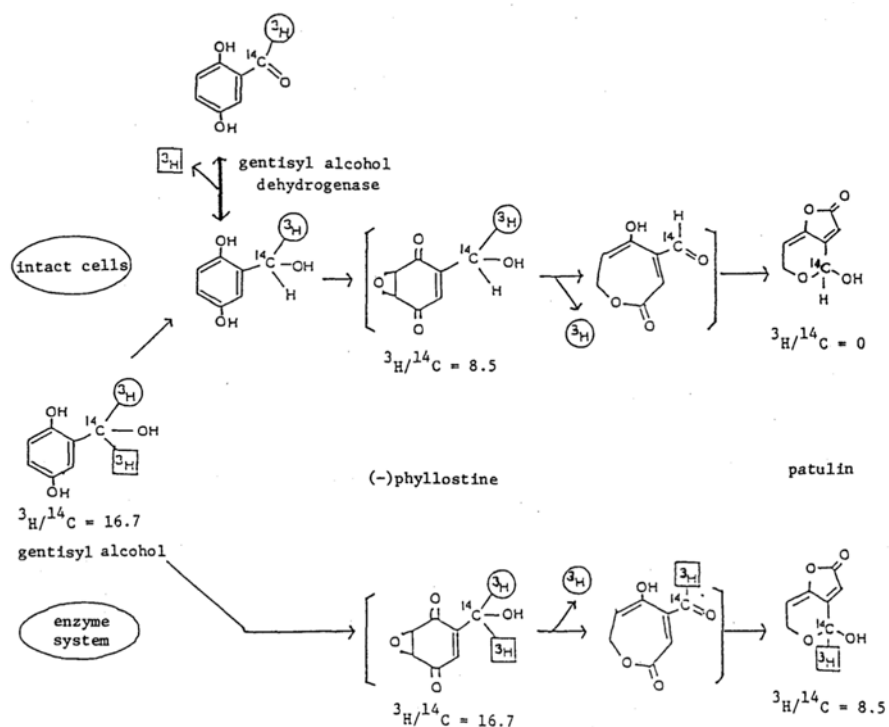


Patulin の C-8 位カルボニル酸素には分子状酸素 (■) は検出されず、酢酸由来 (polyketide 鎖由来) の酸素 (△) のみが保持された。Phyllostine を中間体とする monooxygenase 説が支持された。

裂反応には二つの可能性が考えられていた。一つは大御所である Oxford 大の Scott 先生の dioxxygenase 説で、Scott 研では gentisaldehyde を基質にこの反応を無細胞系で確認したと報告していた。もう一つは Calgary 大の Gaucher 先生と熊本工大の関口順一先生が突然変異株と標識した基質を使った実験から提唱する phyllostine を基質 (前駆体) とする monooxygenase 説であった (醗酵工学 61, 129-137, 1983)。

Gentisaldehyde を基質にすると patulin のヘミアセタールの形成が簡単に説明がつく。これに対して phyllostine から patulin に変換するには環開裂に加えて酸化反応が必要になるので複雑そうに思えた。しかし、無細胞系ではいつれの酵素活性も確認することができないうちに、博士課程の二年が過ぎようとしていた。そういう矢先、別の目的で三川先生が「 ^{18}O ガス」を入手すると伺った。 ^{18}O ガスというもの存在すら、それまで思いもつかなかったが、これを使えば推定される二つの酸化反応のどちらが正しいかを区別できるのではないかと気がついた。そこで高価なガスを一部流用させていただき、 $^{18}\text{O}_2$ と ^{13}C -酢酸を組み合わせ投与して、 ^{13}C - ^{18}O 結合の生成を ^{13}C -NMR で検出したところ、C8 位の酸素は分子状酸素由来ではないことが判明し、Gaucher らの monooxygenase 説を支持する結果を得た。 ^{13}C - ^{18}O シフトの検出は、NMR の大家の農学部瀬戸治夫先生のお力による最先端技術だった。この成果は、学部を越え電話一本で最新技術にアクセスできる環境のおかげであった。

Patulin 生合成に関する酵素のうち、結局私は一つの酵素も精製には至らなかったのだが、細胞抽出液を超速心によって膜画分 (一般的に P450 のような酸化酵素) と可溶画分 (アルコール脱水素酵素のような一般的な細胞質酵素) に分けることで解明できた課題があった。Monooxygenase 説では、patulin の前駆体は gentisaldehyde よりも phyllostine となるが、そうならば gntisylalcohol を菌体に投与すると側鎖一級アルコールの水素は patulin の C1 位に保持されるはずである。だが現実には保持されないことがいくつかのグループから指摘されていた。確かにこのことが dioxxygenase 説を優勢にしていた。そこで、水素を ^3H 、炭素を ^{14}C で標識した gntisyl alcohol



Phyllostineを経由するならば、C-1位へミアセタールの水素はgentisyl alcoholのカルビノールの二つの水素の一方は保持されるはずだが、細胞への投与実験ではどちらも脱落する。無細胞系で可溶性のアルコール脱水素酵素を除くと、保持される。培地中ではgentisaldehydeが優勢であるため、半分の水素はNADPHの水素と交換されると説明できる。

($^3\text{H}/^{14}\text{C} = 14$) を合成した。菌体に投与すると確かに ^3H は patulin には保持されなかった ($^3\text{H}/^{14}\text{C} = 0$) が、microsome 画分で試験管内で反応させると ^3H は保持されていた ($^3\text{H}/^{14}\text{C} = 7$)。菌体では gentisaldehyde と gentisyl alcohol の互変過程のために、プロキラルな一方の水素が失われると考えられることを示せ、2年間の苦労は無駄ではなくなった。この実験では芳香環を ^3H 標識した gentisaldehyde と gentisyl alcohol を調製したのだが、その反応は 1 Ci (10^{10} Bq) のトリチウム水を使った芳香環水素の交換反応であった。水はガスであるので液体窒素で冷却してトラップしながら実験した。緑茶をたくさん飲みながら実験したことを覚えている。ちなみに水分子の生体半減期は 10 日程度だそうだ。結構長い。おりしも本稿を書いているとき、福島第一原発事故の ^3H 水の海洋放出が決定された。

酵素と化学からのアプローチをとった私たちには苦労が多い研究だったが、関口先生の優れていたのは変異株とその成分分析で生合成経路を解明された点である。私たちは酵素=反応だったが、関口先生は遺伝子=反応である。遺伝子レベルでの生体「反応」研究の重要性を強く認識した。三川先生の喜寿講義(2011年)で、遺伝子でなく酵素で攻める研究をさせた学生は苦労したというお言葉があったが、 ^{13}C -NMR による生合成研究、 ^{18}O によるケミカルシフトの変化などは当時最先端の技術であり、幸運にもこれらを利用・応用できる環境と指導者がいたから私は学位を取れたのである。「技術」が科学的成果を上げるには非常に重要な要素であることを痛感している。

[キリンビール (株) への就職：遺伝子工学と分子設計との出会い]

博士課程を修了し、1984年キリンビールの医薬開発研究所に就職した。研究所が群馬県にあるということで殺人的な都内の通勤をしないで済むという点に、相変わらずの楽観的人生哲学で、魅力を感じたのである。もちろん、食品会社が製薬業界への新規参入を目指すという挑戦的な勢いを感じたし、ビールも天然物だし、遺伝子操作で酵母の研究は進むだろうから、自分にも楽しいだろうというのも感じた。(酒が飲めないという個人的な問題は大きいにあったが、)結果的に、安定した大企業の傘のもとで、若いメンバーでフレキシブルにのびのびと研究業務に励めたという事は幸運で大正解であったと思う。同期入社の研究員はいろいろな大学の農学部、薬学部出身者 20 名くらいいて多くは修士だったので博士課程の私は年寄りだったが、大学研究室のような雰囲気もあったし、私にとっては、遺伝子工学、免疫学などの知識のある多様性に富んだ年下の同期の存在は大いに視野を広くさせてくれた。入社前年 1983 年にキリンビールはまだ小さなベンチャーだった AMgen と合弁会社を設立したところで、私はちょうどエリスロポエチン (EPO) 開発を本格化させていた最中に入社したのであった。入社時にチームリーダーの鈴木隆元さんから、タンパクの精製 (人の EPO の糖鎖構造を決める実験) がいいか、遺伝子工学がいいかと聞かれて、やったこともない遺伝子工学の方を希望した。遺伝子工学チームに入れてもらって実際に触れてみると、酵素などタンパク質はそれぞれ性質が違うのに、DNA には酵素だろうが因子だろうが性質に違いがないから一つのプロトコルでなんでもできる上、一分子拾えればコピー増幅でき、しかも高い汎用性を持つ技術であることに驚いた。それまで経験してきた生理活性天然物の精製や酵素の精製などとは異次元であった衝撃は忘れられない。モノ取りや合成はアナログの世界 (いじると減るだけ、材料ごとに癖がある)、遺伝子はデジタルの世界 (コピーが作れる、性質は均一) と感じた。化学実験の知識があれば遺伝子を扱うのは簡単だった。三川先生/海老塚先生が化学-蛋白路線だけでなく化学-遺伝子の路線も組み込んだ研究に舵を切られたのもこの時期だった。

[構造活性相関、分子設計との出会い]

デジタルといえば、1980年代は計算機が普及し始めた時期でもあり、「遺伝子配列という大きなデータを入れる容器 (メモリー) も活用 (CPU) も今世紀中には整うことが明らかだ」という神沼二真先生 (当時都立臨床科学研究所) の言葉に感銘を受けた。神沼先生が設立された CBI 研究会 (Chemistry-Biology-Informatics : 化学-生物-情報学) では、多くの製薬会社の中堅や若手が集って計算化学の勉強をしていた。当時は古典的な定量的構造活性相関 (QSAR) が製薬企業の合成化学者の実践応用に定着した時期であった。QSARは京都大学の藤田稔夫先生が1970年代から推進してきた手法である。前述の dihydrogeodine oxidase の酵素活性は、当時薬化学研究室の助教授であった首藤紘一先生の部屋の UV 計を借用して測定させていただいていたのが、他の研究室の卒研生なのに 3 時になるとお茶とお菓子を出してくださってお話をしてくれた。その時に、化学構造を計算して生物活性を予測する構造活性相関という分野があると伺っていたが、CBI の勉

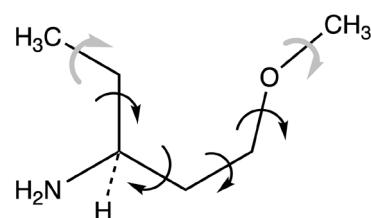
強会に参加してみると、まさにその話であった。CBI では薬物分子設計の最先端の技術として分子の三次元グラフィクスを利用した分子モデリングが注目を集めていた。第一世代の ACE 阻害剤エナラプリルが、結晶構造で解明されたサーモライシンの活性ポケットに結合するように分子モデリングも活用して生み出されたという話を製薬企業現場の研究員の方々が熱く話される姿にもインパクトがあった。遺伝子工学によって蛋白質の結晶構造解析は容易になる。 ^{14}N 標識もできるから NMR による立体構造解析も進むことも明白だった。計算機支援医薬分子設計 (Computer Aided Drug design) という言葉も流行語のようによく聞かれるようになり、私もその技術潮流に乗ることになり、1985 年秋から 2 年間、Washington 大学 (St. Louis) の Garland R. Marshall 先生の研究室にポスドクとして企業派遣されることになった。

Marshall 研の論文用の作図などを手伝っている女性の紹介で、その人の隣家の Helen Birch という 70 位の女性の家に下宿することになった。引っ越した翌朝、Helen から「大学に行くなら車に乗るか」から尋ねられた。なんと Helen は Washington 大の元教授で大学を退職したがまだラボを持っていて研究をしているのだという。途中で「彼も一緒に行くので」ともう一人お年寄りの男性をピックアップしたが、その人が蛋白定量法で有名な Lowry 先生だと聞いて驚いた。Marshall 研はラボメンバー全員がポスドクで、アメリカ 2、イギリス 1、クロアチア (当時はユーゴスラビア) 1、インド 1、イタリア 1、香港 1 と国際色も豊かであったし、私を含めて独身者が多く色々と一緒に多くの思い出を作れた。Helen は音楽が好きで、St. Louis 市街中心部にあるコンサートホールのチケットを買っては、女性をエスコートする大役兼ドライバーとして私を同伴してくれたのは貴重な経験だった。

[配座発生ツール]

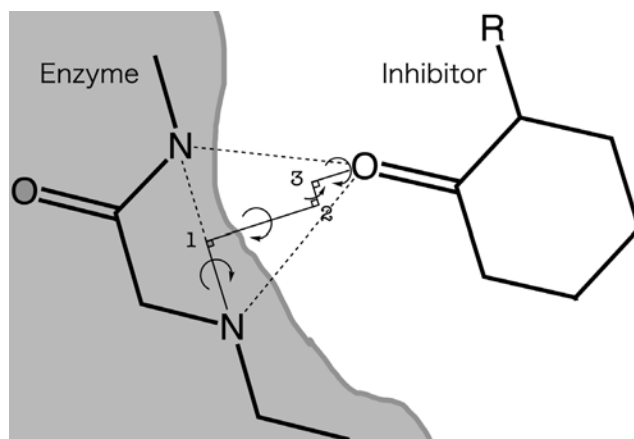
1984 年のノーベル賞はペプチド固相合成 (Merrifield 教授) だったが、Marshall 教授は Merrifield 教授の受賞研究に貢献した CalTech の大学院生だった。固相合成が生理活性物質研究の発展に与えた影響を見てきて、自分は柔軟なペプチドの膨大な配座解析のためのツールとして計算化学を始めたと同った。先生は Tripos という会社を立ち上げ、SYBYL という分子モデリングツールを開発した。1985 年当時は計算やグラフィクス表示には高価なハードウェアが必要で SYBYL 自体も高価なソフトウェアであった。2000 年になるころには SYBYL は安価な Linux のワークステーションで十分稼働するようになったが、2017 年にその販売・保守が打ち切られた。

当時の SYBYL には、分子力学計算と配座発生 (SYSTEMATIC SEARCH) などの「分子模型感覚のツール」が主力だった。SYSTEMATIC SEARCH は分子モデルの回転結合を一定の角度で刻んで回転させ、しらみつぶしに配座を発生させるツールである。発生配座の中から不安定配座を除去する一般的な方法は、その配座のポテンシャルエネルギーを見積もることだが、SYSTEMATIC SEARCH では発生した配座モデルにおいて原子間の

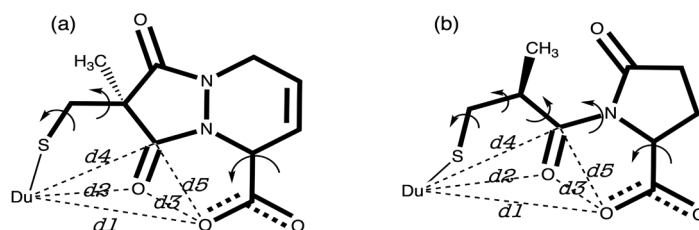


SYSTEMATIC SEARCH : 指定した回転結合を例えば 10° ずつ回転させて配座を発生する。

衝突がないというシンプルな基準で絶対に不安定な配座は排除する方法が標準である。単純に配座を発生するという用途だけでなく、分子の方向づけやファーマコフォアの共通配置の探索などに有用である。例えば成戸俊二博士（三共）は酵素の活性中心の中で阻害剤のドッキングポーズの探索に応用した。4本の結合（うち2本、2-3と3-O、は阻害剤分子を回転させるためのもので長さは0.01Å。）を探索空間の中心、x軸、y軸、z軸方向に連結し、それらを回転することで酵素ポケット内の阻害剤分子の配向を決めるというアイデアであった（*J. Amer. Chem. Soc.* **107**, 5262-5270, 1985）。計算機の使い方という観点で目から鱗であったことを今でも覚えている。Marshall 研で同僚だった Naylor と Mayer は ACE 阻害剤はカルボン酸、カルボニル、金属配位子の三つのファーマコフォアを使って ACE に結合するという考えから、三つの官能基の位置が共通な配座が活性配座であるとして活性配座とファーマコフォア間の距離を決定した（*J Comput Aided Mol Des.* **1**, 3-16, 1987）。回転結合を一定幅で刻んで捻ってゆくだけのツールだが、分子動力学などのようにエネルギー障壁、サンプリング密度などの問題はないので案外とその応用幅は広く、曖昧さがない。



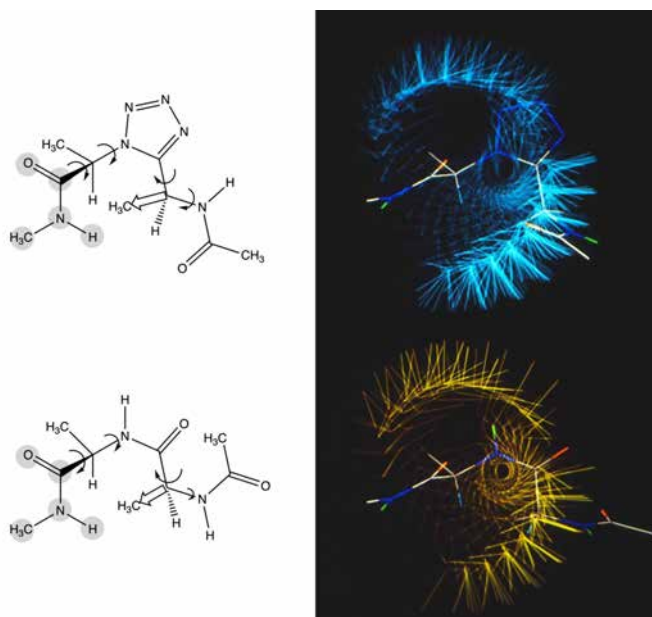
ダミー結合で阻害剤のカルボニル基を酵素に固定する。三つのダミー結合 1-2、2-3、3-O で阻害剤を回転させる。



2つの ACE 阻害剤 (a) および (b) は、3つおよび5つの回転可能な結合を有する。それらのファーマコフォアは、カルボキシル基、中心カルボニル基、および ACE の触媒ポケット内の亜鉛原子への配位配位子であるスルフィニル基である。硫黄原子に連結されたダミー原子は亜鉛原子を表す。5つの距離 d1~d5 は、ファーマコフォアの相対配向 (距離マッピング) を記述する。複数の活性分子間の共通マッピングを抽出すると、両分子に共通な活性立体配座を絞り込める。

[ペプチドの配座解析とそのための原子半径パラメーター]

一般的に生理活性ペプチドはそのままでは医薬品にはなり難い。特に経口投与には向いていない。いわゆる脱ペプチド戦略が必要でその一つはアミド結合を置き換えることである。cis-アミドをテトラゾール環で代用する戦略の合理性を計算で示すために SYSTEMATIC SEARCH を利用した。テトラゾールが cis-アミドと類似する結合長や結合角を持つことは明らかであるが、この置き換え戦略が cis-アミドペプチドとテトラゾールで置き換えた類似体の間に「ファーマコフォア配置の立体的な互換性」があるかという点が本質的に重要である。そこで、cis-アミドペプチド



テトラゾールペプチド模倣体(上)およびシス結合ペプチド(下)の C α -C β 結合ベクター(矢印)を 10° 刻みでプロットした。灰色の丸で印した原子は、共通の基準系として用いられるメチルアミド部分の固定座標を示す。

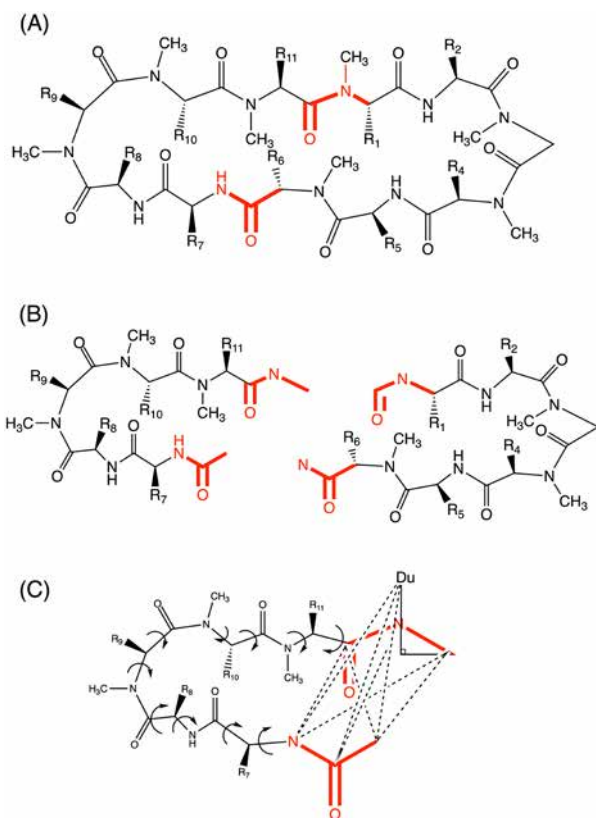
とテトラゾール置換体におけるコンフォーメーションの三次元的類似性を両者の一番目のアミノ酸の C α -C β ベクトルの位置の共通性を比較した。その類似性は 88%、つまり、*cis*-アミドペプチドに可能な配置の 88%をテトラゾール誘導体は再現できることを示した。この論文の成功の影には基盤となる研究がある。先に述べたように SYSTEMATIC SEARCH では原子間の衝突、つまり二つの原子間距離と両原子の van der Waals 半径の和の比較、で不安定な配座を排除する。このことは、「現実を再現できる最大の半径」を決定しておくことが重要であることを意味する。ペプチド用の原子半径のパラメーターセットは、タンパク質およびペプチド結晶構造に見られる立体構造を正確に反映するように調整して導いたものである。

J. Amer. Chem. Soc. **110**, 5875-5880, 1988.

Proteins. **2**, 330-239, 1987

[大環状ペプチドの配座解析]

NMR による溶液状態のペプチドの配座解析では、一般的には NOE やカップリング定数などを満たすように原子座標が数学的に算出される。11 残基からなる環状ペプチドであるシクロスポリン A については NMR データから、distance geometry 法と分子動力学法で立体構造モデルが示されていた。ともに結果は一致しており、 β -II'型のターンを持つとされていた。シクロスポリンは主鎖に 22 個の回転結合をもつ (ペプチド平面は固定) ので、これを 2 つの直鎖ペプチドに分け、それぞれの直鎖構造で発生させた配座の末端同士の距離を記録し、2 つの距離マップを作成した。環状に結合できる配座は、2 組のマップで共通の距離を持つ配座だけのはずである。結果、我々



(A)シクロスポリン A は 11 残基の環状ペプチドである。太字の結合で示された 2 つのアミド面を接着タグとして定義した。(b)分子を 2 つの断片に分割した。二組のペプチド平面は接着タグである。(C)結合を回転させることで配座体を生成し、「接着タグ」間の距離マップを記録した。アミド平面の Si 側にダミー原子を添加した。このダミー原子は、系のキラリティーを維持するために必要である。

は β -II'型のターンに加え β -I 型の構造も可能であることを示せた。広く使われている計算手法では見落とす構造を見出せる点でしらみつぶしの効果が発揮された。

Biochem Pharmacol. **40**, 173-175, 1990.

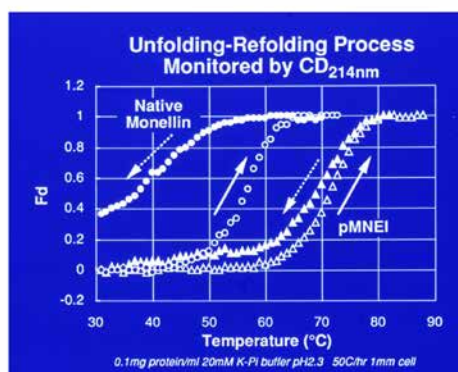
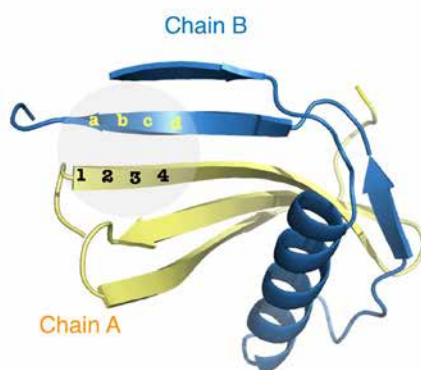
[新研究所建築の経験]

2 年間の派遣を終えて帰国した。キリンビールには医薬、ビール、食品（ビバレッジ、小岩井乳業など）の部門ごとに各研究所が設置されていたが、派遣期間中に全社全領域の技術向上と交流を目的にした基盤技術研究所が新設され、私は蛋白工学グループに配属になった。研究棟を金沢文庫の埋立地に新設することになり、その建設チームの一員にもなった。Marshall 研でのイーサネット LAN の知識が役に立ち、所内 LAN を敷設した。ただし、1989 年時点では国内ではインターネットは普及しておらず、あくまでも LAN（研究所内のみ）だった。Web browser も普及していなかったが、Macintosh の付属ソフトであった HyperCard というツールを使って、所内掲示板、会議室予約などを運用した。Macintosh IIsx を研究員一人一台という体制も実現できた。皆が早くネットに慣れるようにと、昼食の弁当発注（社食がなかった）をネット予約のみにした。今ではプリンターは LAN 接続するのが常識だが、当時、Apple の LaserWriter がネットに対応した実用的なプリンターとして市販された。その綺麗な出力はその価格を上司に納得させるには十分であった。マウスを活用したソフト、ChemDraw や Excel、も Mac 版で実用化されていた。また、インターネットのドメイン名 (kirin.co.jp) を取得して米国の研究員とメールのやり取りもできる

ようになった。メールソフトは日本語は使えず、ローマ字でのやり取りであったが、時差を利用して楽に情報交換できるようになったのも感激的だった。短期間だったが建設現場の事務所に駐在し、実験台設置や電源の配置、水道水の配管などを設備工事の視点で理解する訓練になった。元々が職人仕事のものが好きだったので、建築会社の現場の方々からも色々と教わった。これらの知識は大学での新研究室の立ち上げに大いに役立った。建築チームに配属されたときは雑用が増えたと思ったが、新研究所の推進者であった山本康副社長からは「どうせやるならば、面白く、一生懸命にやれ」と言われて、なるほどと思って取り組んだのが正しかったようだ。

[蛋白質工学：一本鎖化モネリン]

2本のペプチド鎖からなる植物由来の甘味蛋白質は重量当たりの甘味が砂糖の3000倍である。天然のモネリンの結晶構造が明らかにされ、B鎖のC末端とA鎖のN末端が逆平行 β -シートであることがわかった。そこで既知蛋白質の構造からB鎖のC末端とA鎖のN末端の相対配置に類似した構造を探し出し、その配列を参考に一本鎖に融合した。2つの分子フラグメントの相対配置の一致するものを探すという手法はCsAの研究で使った距離マッピングの応用である。タンパク質用の距離マップ処理プログラムは研究所のコンピューターを管理するために駐在していたシステム部の岩城孝則さんをお願いして書いていただいた。彼のツールを利用して設計したアミノ酸配列を持つ遺伝子を合成してもらい、大腸菌に組み込んで発現させた一本鎖化モネリン（我々はMNEIと命名した）は熱安定性が大きく向上し、100°Cで処理しても甘味を失わなくなった。熱変性によりほどけたポリペプチド鎖の自己巻き戻し能力の向上によるものである。この性質を利用して酵母に分泌型で生産し、その培養液を熱処理、さらに酸沈殿処理するだけで高純度に精製できることもわかった。組換え甘味蛋白質を事業化する意思はなかったため、このプロジェクトはあっけなく終了したが、興味を持ってくださったTemussi先生（Napoli大）に発現大腸菌を提供した。学術的には良い材料であることは間違いないと思っていたので、何ら契約上の制限をつけない代わりに、キリンビール由来であるメモリーとして名前（MNEI）は変えないで欲しいとお



天然モネリンの立体構造では、B鎖のC末端とA鎖のN末端が β -シートを形成している。これを利用して一本鎖化したMNEIは加熱すると構造が壊れるが、温度を下げると元に戻る。天然の二本鎖のモネリンは回復できない。

願いした。この約束は先生の後継者にも引き継がれているようで南イタリアの仁義を感じる。合成遺伝子の DNA 配列を決めるにあたって、大腸菌の codon usage に合わせたり、N 末側の融点を下げたり、ヘアピン防止を考慮したり、今日のようにソフトが揃っていなかったのも、同期の酵母の遺伝子操作の専門家曾根秀隆さんが手作業でやってくれたことや、MNEI を初めて精製した時に低温室のフラコレの試験管から少しとって舐めたらすごく甘く、即時に成功を確信した時の喜びなど、自分で設計した分子が生理活性を示した感激は忘れられない。

Nature Biotechnol. **15**, 453-457, 1997.

[遺伝アルゴリズム：タンパク質の側鎖パッキング]

蛋白質の主鎖の座標が与えられた場合、蛋白質の内部にあるアミノ酸残基の側鎖の配座を求める手法を開発した。N 末端から一残基ずつ、側鎖の二面角 (ψ_1, ψ_2, \dots) について配座を発生させ、遺伝アルゴリズムで最適化しながら延長して全長にする。計算で発生するモデルは van der Waals 衝突をまず優先し、順位づけを露出面積による溶媒和エネルギーで評価した。主鎖の構造が正しければ蛋白内部にある残基の側鎖配座は複雑な分子動力学計算などを使わずに、van der Waals 接触のみで推定できることを確認できた。この研究は内藤祐介さん（株：人工生命研究所）との共同研究で、内藤氏が熱心にタンパク質の構造学に興味を持ってくださったことが成果につながった。遺伝アルゴリズム、隠れマルコフモデル、ニューラルネットワークなどは今日の AI につながる技術の一つであるが、20 年後にここまで発展するとは思っていなかった。

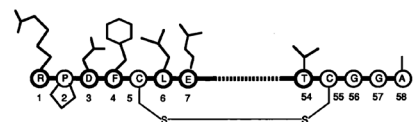
US patent 5725542, 1998.

[α -ガラクトシルセラミドの CD-1 へのドッキング]

α -Galactosyl ceramide (α -GalCer) は細胞免疫を高めることで強い抗腫瘍作用を高める海産物由来のセラミドである。キリンの研究者チームが沖縄の海綿から抽出したエキスから混合リンパ球反応強化活性物質として発見した。 α -GalCer は抗原提示細胞（樹状細胞）の CD1 分子に結合し、ナチュラルキラー T (NKT) 細胞を活性化することが解明された。その構造活性相関から、脂肪酸側鎖を除いた部分の活性配座を求めた。その結果、7 つの異なる配座を算出できた。おりしも CD1 の結晶解析座標が公開された。そこで CD1 の抗原提示ポケットにある極性残基と、重要な水酸基が相互作用すると仮定した。先にもとめた配座において、水酸基酸素、エーテル酸素の先 2.8Å にダミー原子をつけ、これらダミー原子間の距離が、CD1 上の極性残基と一致するものを探索した。一致した場合、その配向をもってリガンドを CD1 にドッキングし、van der Waals 接触を評価した。つまり、7 つの配座のうち、CD1 にドッキングできる配座を探した。その結果、 α -

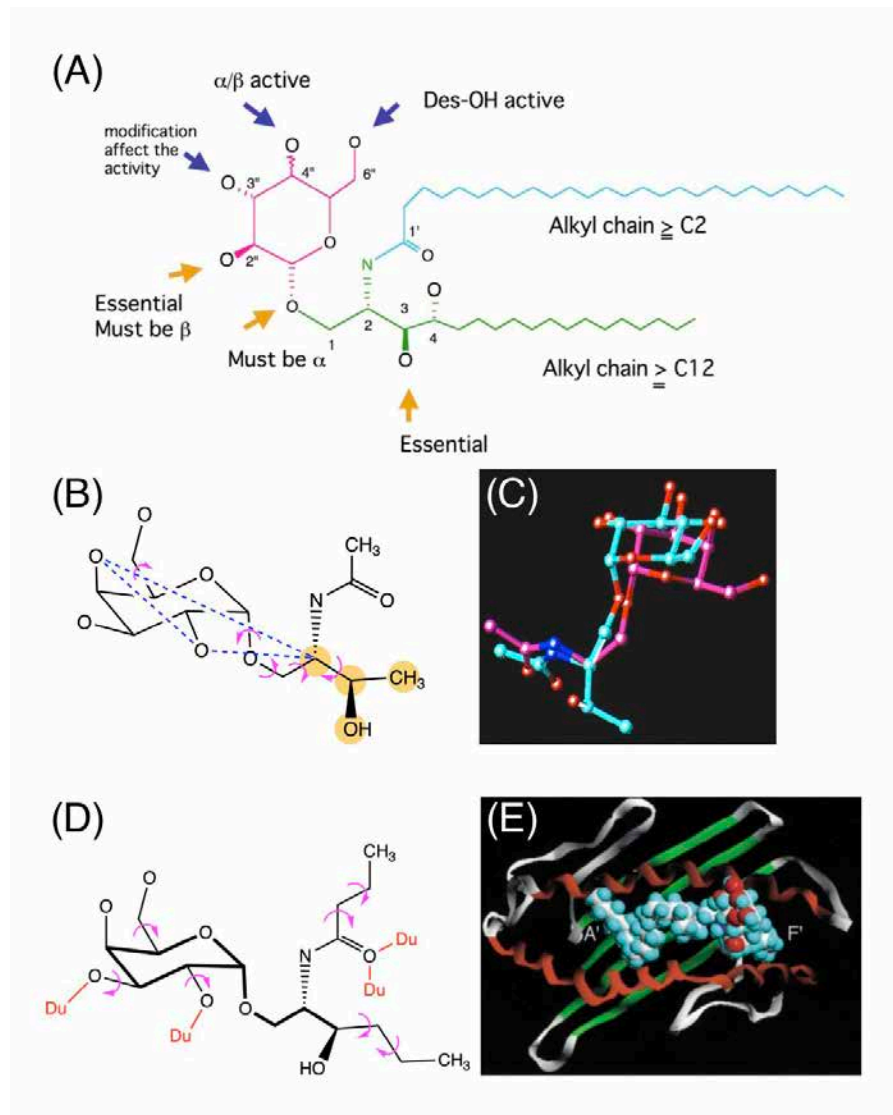
Genotype

x1	x2	x3	x4	x1	x2	x1	x2	x1	x2	...	x1
Arg-1	Asp3	Phe4	Leu6	...	Thr54						



Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor

タンパク質のアミノ酸配列順に、側鎖の配座を二面角の行列で表現した。この数値の配列を遺伝子配列する。うまく折りたたまれているかを van der Waals 接触の量で評価する。評価値が良くなるように、計算機の中で変異や組み換えを繰り返す、進化させる。



(A) グリコシルセラミドの構造活性相関。(B) 重要な酸素原子(すなわち、ヘキソース環上の 2'-および 4'-酸素と主鎖のヒドロキシ基)の配置を共有する立体配座を見つけるために、指定された結合を回転させることによって距離マップを生成した。破線はマッピングで使用された距離を示す。7つの配座が共通なファーマコフォア配置を持つ配座として特定された。(c) α -ガラクトシルセラミドと α -グルコシルセラミドの立体構造の一例。ファーマコフォアである酸素原子は重なっている。(d) 糖鎖セラミドの 7つの立体構造について、ファーマコフォア酸素原子の先にダミー原子を付加した。このダミー原子は CD1d の水素結合パートナーを表している。回転角を回転させ、距離マップを記録し、そのマップが CD1d の表面上の極性アミノ酸残基の配置に一致するものを選択した。(E) ドッキングモデルの例。

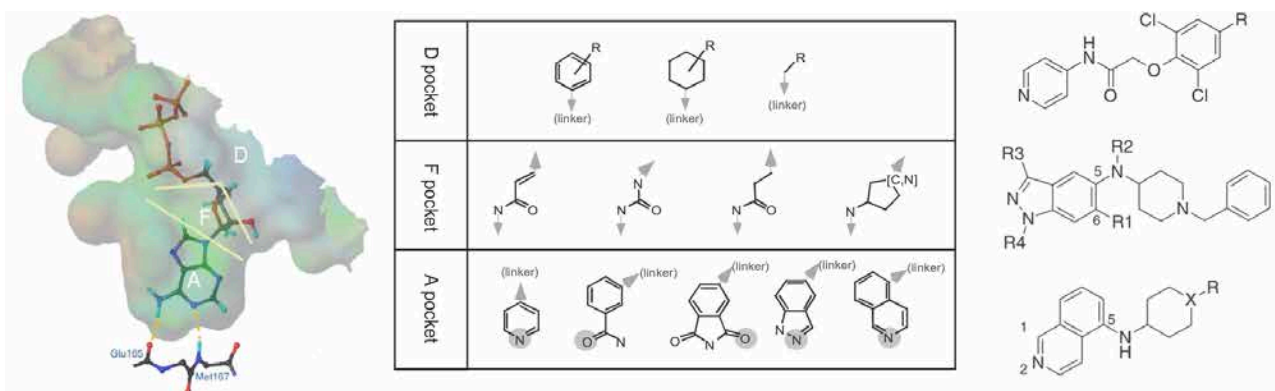
GalCer/CD1 複合体モデルを構築できた。このモデルに従って予測された残基を Ala に置き換えると NKT 細胞の活性化が失われた。距離マップを使ったドッキングである。定性的な構造活性相関で求めた配座の距離マップから受容体の距離制限を満たすものを探し出すという方策で、エネルギー評価を一切含まないという特徴がある。

Bioorg. Med. Chem. **6**, 1905-1910, 1998.

Int. Immunol. **13**, 853-61, 2001.

[Rho-kinase 阻害剤の複数骨格並行開発]

Rho Kinase は細胞骨格形成を制御する重要な kinase である。Rho kinase 阻害剤は細胞運動が関与する様々な生体现象、例えば、血管収縮、細胞遊走などの抑制に役立つと考えられる。Rho kinase は基盤研の技術でクローニングされたので、キリン社はおそらく世界のどの製薬よりも先に、in vitro の酵素反応系を構築し、社内化合物ライブラリのスクリーニングを実施したはずである。しかし、強いヒット化合物は得られなかった（弱いヒットは得られた）。その矢先、Rho kinase にホモロジーがある PKA (c-AMP dependent Protein kinase) の結晶構造が公開されたので、Rho kinase のホモロジーモデリングを行い、このモデルと弱いヒット化合物の構造をもとに考えられる合成可能な阻害剤を多数設計した。この候補分子の分子モデルからなる仮想化合物ライブラリを Rho kinase モデルへのドッキングシミュレーションを行い、有望な構造を選定すると同時に活性がないと予測できる類似体も合成し、自分たちのモデルの妥当性も確認した。不活性であることを積極的に予測モデルの検証に使った点は特徴的だと思う。計算の効果は劇的で、きわめて短期間に構造的に独立した阻害剤基本骨格を複数種類 (pyridine, 1*H*-indazole, isoquinoline, phthalimide, benzoamine) を見出すことに成功した。この中から vivo でのプロパティ (代謝安定性、吸収性) の良い骨格として indazole に絞りこみ、最適化をした。このテーマに関与した合成研究員の人数は決して多くなかったが、化合物を計算機のモニターで酵素のモデルに入れてみながら議論を重ねたこと、活性測定結果と予測があったときの合成担当者の目が輝いた瞬間など、懐かしい思い出である。また、計算化学の及ばないいわゆるプロパティ最適化 (溶解度、代謝安定性、細胞吸収性) では、医薬を始めたばかりの当時のキリンビールにはいわゆる長老がいなかったが、CBI で知り合った他社の経験豊かなメディシナルケミストの方から折りに触れノウハウ



ホモロジーモデリングで標的である Rho kinase の ATP 結合ポケットを構築した。一番底の部分では ATP のアデニン環が 2 本の水素結合を形成している。アデニン環のポケットを A、リボース環のポケットを F、リン酸の収まる溝を D 領域とした。A pocket は平面で疎水性をもち、水素結合アクセプターになるもの、D の溝はさまざまな構造が結合できる広さと中庸な疎水性を持つ。F は丸形状で疎水的なので A と D を繋ぐ合成上のリンカーが入るように考えた。

を聞いていたことも役立った。一本目の論文は 2004 年度の *Bioorg Med Chem* 誌の Top 25 downloaded article になって、Elsevier 社から銀のブックマークをもらった。

Bioorg. Med. Chem. **12**, 2115-2137, 2004.

Bioorg. Med. Chem. **15**, 350-364, 2007.

Bioorg. Med. Chem. **15**, 1022-1033, 2007.

[大学へ転職]

企業では研究テーマは何らかの企業利益（製品）を目指す必要がある。新薬創出には長期的な探索・開発の過程に対する投資が必要であるので、失敗リスクに対する担保、逆に言えばテーマの確実性が、研究テーマ選定あるいは資本投下の意思決定に大きな比重を持つ。つまり根拠が弱いテーマは採用されない/できないのである。大学では企業ではできない創薬につながる研究をしたいと思っていた。

分野としては腎分野の創薬を考えていた。キリンが一番最初に上市した医薬品が EPO というブロックバスターだったことから、透析医療関連領域がキリンの研究開発の標的領域であったため、私自身もこの分野の研究を指向していた。透析領域では、従来は糸球体腎炎から透析に入る患者さんが主体であったが、1990 年代からは糖尿病を起点とする慢性腎疾患から透析に入る患者さんが急増し、1998 年には新規の透析導入原疾患としてそれまで首位であった慢性糸球体腎炎を上回った。さらに近年は高血圧から発展した腎硬化症からの透析導入が急増しており、生活習慣病の延長に透析があるという図式に変わった。腎機能低下から透析開始までの間にはある程度の時間があり保存期と呼ばれる。保存期を長くすることができれば、患者さんだけでなく、保健医療経済にも大きな福音になるはずである。（2021 年統計：透析患者 35 万人、年間費用 400 万円強/人：総医療費 40 兆円の 3.5%）透析患者の死因は、心不全 22%、感染症 22%、悪性腫瘍 8%、悪液質/尿毒症/老衰等 6%、脳血管障害 6%である（2021 統計）。心不全、脳血管障害、心筋梗塞を併せると 31.5%である。生活習慣病-血管系障害-腎機能障害-透析-心不全という連鎖がある。

私は catechol *O*-methyltransferase (COMT) がこの連鎖に関与していると考えていた。企業では認められ得ない POC (proof of concept) のないハイリスクな研究である。流石にこれ一本では逃げ場がないので、大学では、COMT の研究に並行する形で、より論文にできる可能性が高い研究も走らせるという方針であった。

[血管内皮前駆細胞保護物質]

赴任早々、北中先生に腎臓分野で化学者ができるテーマを探していると話すと、先生も同行して下さって医学部腎臓内科の松本絢一先生に相談にあがった。松本先生からは福田昇先生と東洋医学の矢久保修嗣先生（現在明治薬科大学）をご紹介いただいた。福田先生は血管内皮前駆細胞 (EPC) を検出する評価系をお持ちであった。EPC は単球として抹消循環していて血管に障害部位を見つけるとそこで内皮に分化して修復する。このことから福田先生は EPC 保護は自己再生細胞治療だと表現されていた。自然発生高血圧ラット (SHR) や高食塩食、喫煙、マグネシウム欠乏などは EPC の減少を起し、アンギオテンシン受容体ブロッカーや一部の β -ブロッカー、タウ

リン（システインの誘導体）にはEPC保護作用がある。最初はこの系を使って活性物質をと期待したのだが、実際にやってみると全くの vivo 実験系であり、検体を SHR に経口投与する制約があるので化合物のスクリーニングには適しているとは考えられなかった。効果が期待できる漢方処方を受久保先生に相談したところ、柴胡加竜骨牡蛎湯（さいこかりゅうこつぼれいとう SKB）を勧められた。SKB は、精神不安、動悸、不眠、神経症などのメンタル系の疾病に対する処方だが、先生の臨床経験から高血圧や生活習慣病に伴う様々な血管系障害に改善があるとのことであった。大根谷章浩先生（当時助教 小太郎製薬）の協力をいただいて SKB を使った動物実験を開始した。面白いエピソードがある。最初の実験では SKB 投与群の体重増加がコントロールを上回った。SKB は美味しいのかなと動物舎の浅倉好宣さんにその話をすると、餌の硬さではないかとの指摘を受けた。そこでコントロール餌と SKB 餌の硬度を揃えてみると、次の実験からは餌による体重差が全く無くなった。実験には経験に基づくノウハウが大事ということが多いものである。エキスパートとの会話が大事だと思う。結果、SKB は SHR の体重や血圧には影響しないが、EPC保護活性を示した。既知の活性化化合物はARB（アンギオテンシン受容体ブロッカー）やβ-ブロッカーであり、血圧降下やNADPH oxidase 発現低下を伴う医薬品だった。SKB は血圧やNADPH oxidase 発現には影響はないが、NADPH oxidase の酵素活性をおそらく阻害性化合物の効果により阻害することで酸化ストレスを低減していた。言うまでもないが遺伝子発現の低下よりも酵素阻害は強烈な抑制作用である。サイトカインでは血清IL-6の発現の低下が認められた。IL-6の転写促進因子STAT3の発現には変化がなかったが、STAT-3のリン酸化は増加していた。STAT3の下で発現するIL-6産生抑制因子Socs3の発現も低下した。SKBのEPC保護作用はβ-ブロッカーやARB、ACEIとは異なる機構に基づくと思われる。

	既知保護物質 (ARB, β-blocker, aldosterone blocker)	柴胡加竜骨牡蛎湯
EPC colony	増加	増加
血圧	下げる	影響なし
過酸化脂質(TBARS)	低下	低下傾向
細胞内活性酸素		低い
NADPH oxidase	発現低下	発現影響なし・酵素活性低下
サイトカイン		IL-6 低下

SKB の EPC 保護作用に関する有効成分を検出する挑戦も行ったが、残念ながら全て不発に終わった。DNA チップによる遺伝子変動も調べたが、論文にまとめることはできなかった。他の漢方処方である八味地黄丸やリアアザミなど、血管保護作用があると期待した素材も評価したが、現在までに EPC 保護活性を示した漢方処方や生薬は SKB 以外には無かった。何かブレークスルーするアイデアや技術があれば、SHR/SKB の系にはお宝がある気がする。この研究では動物解剖、EPC コロニーアッセイ、血清調製、肝臓・腎臓・大動脈弓摘出、臓器保存、mRNA 調製などを一気にこなさなくてはならなかった。高松智先生（現在平成帝京大学）や当時は大学院生だった

矢作忠弘先生と矢倉尚幸さん、和田平先生も巻き込んで、卒研生たちは上級生下級生ともに力を合わせて協力して実験を行った。分刻みで各作業の進行を管理するタイムキーパーを置いて、昼食は私の妻が買い出し、動物舎と3号館の実験室を同時に使って実験した。素晴らしいチームワークだった。

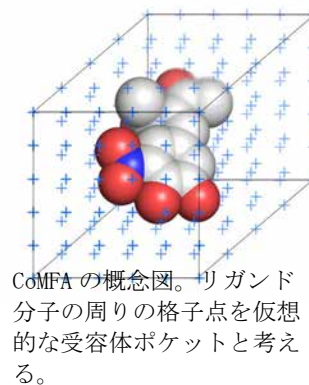
その後、SKBについては草間國子先生との共同研究において、妊娠中からSKBの投与を受けていた母ラットは、出産後その乳児がアフリカの豆科植物由来の神経毒性アミノ酸、L-β-N-oxalyl-α,β-diaminopropionic acid (L-β-ODAP) を投与されてラチリズムを起こす過程で子ラットを殺すことが有意に少なくなることを見出された。本来は胎盤・母乳経路でのSKBによる子ラットの神経保護（ラチリズムの低減）を期待していたのだが、草間先生は丁寧な観察から大変面白い現象を発見された。SKBは本来メンタルの処方であり漢方の実力を実感した。EPC保護作用も精神の作用なのかもしれない。同じ考え方は人間にも当てはまるのではないか。ストレスは健康によろしくない。こうして原稿を書いている。草間先生のラットの血液をいただいて $[NMN]/([NE]+[NMN])$ 比率（後述）を測定しておくべきだった。

Phytomedicine **20**, 196–201, 2013.

Traditional & Kampo Medicine **3**, 107–111, 2016.

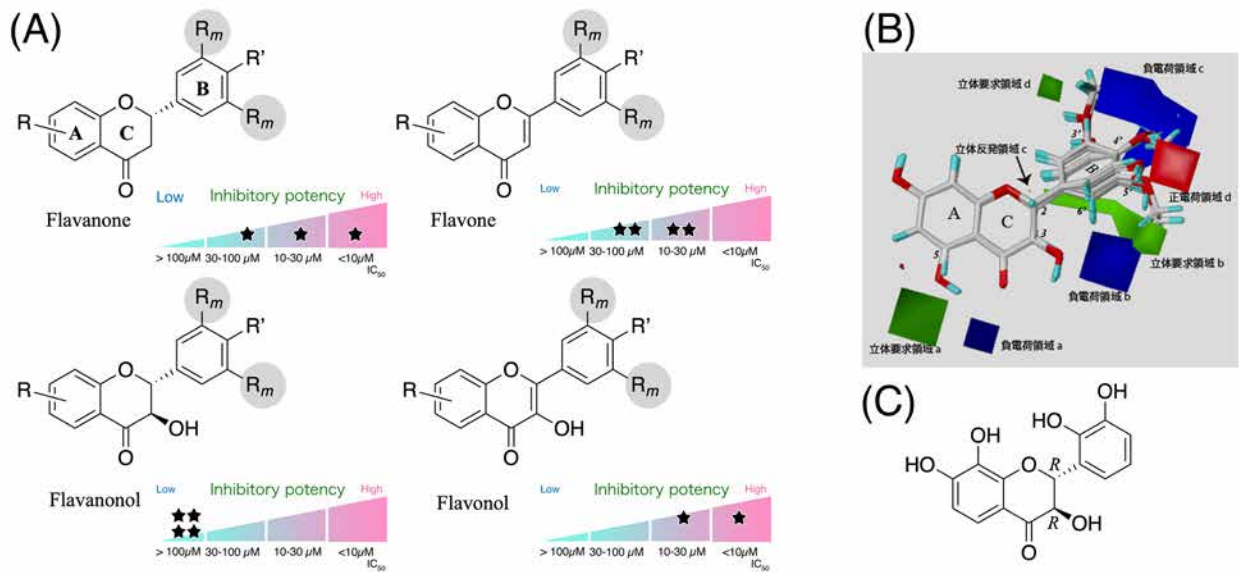
[Flavonoidの一酸化窒素産生抑制:構造活性相関から非天然型活性化合物の合成]

炎症には外来性非自己に対する生体防御を中心にした急性炎症と低レベルの炎症反応が長期間にわたり継続する慢性炎症がある。慢性炎症は、動脈硬化巣におけるマクロファージの浸潤、心不全患者血中の炎症性サイトカインの上昇など、現代社会で増加している疾病の発症に深く関与すると考えられている。大根谷先生は一酸化窒素(NO)産生を肥満細胞活性化の指標として、NO産生抑制成分としてシソ科の植物から13個のフラボノイドを単離されていた。このデータセットの構造式をみると偶然にもB環の3',5'-位の置換基(Rm)に対称性があったことから、フラボノイドのNO産生抑制活性の構造活性相関をCoMFA(comparative molecular field analysis)によって解析できると直感した。



CoMFAの概念図。リガンド分子の周りの格子点を仮想的な受容体ポケットと考える。

CoMFA法は、活性物質が作用する受容体を想定し、化合物の周りに格子点を配置し、各格子点と分子の間に働く非共有結合性相互作用（分散力と静電相互作用）を計算し、どの格子の相互作用が活性をよく説明するかを判別することで、仮想的な受容体ポケットを構築する方法である。具体的には、各格子点にsp³炭素カチオンプローブ原子が配置されている。化合物とプローブ原子との相互作用エネルギーを計算する。算出した分子相互作用場と生理活性をPLS回帰により相関付けし、相互作用に重要な領域（格子点）を見出す。CoMFAでは、比較すべき類縁体の構造を重ね合わせておくことが重要で、「正しい立体構造の重ね合わせ」を導けるかが本質的な課題と



(a) 13 個のフラボノイドの一酸化窒素産生抑制の構造と阻害活性。骨格ごとに阻害活性の分布を星印でインジケータに示した。フラバノノールはすべて低活性だった。(IC₅₀ > 100 μM)。 (B) CoMFA の結果。青い領域は正電荷との相互作用が有利な領域、赤い領域は負電荷との相互作用が有利な領域を示す。B 環のパラ位周辺には電荷分布のギャップがある。 (C) 高い活性を持つ合成の非天然型フラバノノール。

言っても過言ではない。B 環の 3', 5'-位の置換基対称性のおかげで、分子の重ね合わせは 48 通りに絞られた。その全てについて CoMFA を実施し、最も統計的に有望な構造活性相関モデルを得ることができた。

このモデルに基づいて、蔣文君さん（博士課程）はフラバノノールの合成を行った。合成展開の基本骨格にフラバノノールを選んだ理由は、この骨格には活性化合物が一つも見出されていなかったこと、合成ならば立体異性体の活性も調べられると考えたからである。高い活性 (IC₅₀ = 17 μM) を有する非天然型のフラバノノール (2-*R*, 3-*R*) を合成できた。その立体異性体 (2-*S*, 3-*S*) は不活性 (IC₅₀ > 100 μM) であった。類似構造の誘導體では、(2-*R*, 3-*R*) 体の阻害活性が高いほど、対応する (2-*S*, 3-*S*) 体の活性が低くなるという構造活性相関が見出されたことから、フラボノイドの NO 産生抑制活性の発現には生体標的分子を介する可能性が考えられた。その標的の同定には至っていない点は残念である。

Bioorg. Med. Chem. **25**, 779-788, 2017.

Bioorg. Med. Chem. **23**, 6922-6929, 2015.

Bioorg. Med. Chem. **25**, 4277-4284, 2017.

[COMT 賦活化物質に興味を持つ]

簡単に言ってしまうと、「腎臓病を含む血管系障害が関与する疾病では、COMT の活性がさまざまな要因で低下している。COMT の活性を高めることができれば腎臓を保護する治療に役立つ」と勝手に独自に考えたのである。そう考えた根拠を簡潔に書くことにする。

(1) 腎機能障害と交感神経系の亢進：

腎臓には交感神経終末（遠心性、求心性）が豊富にある。交感神経活動が亢進すると、血管収縮、尿細管におけるナトリウム排泄抑制、レニンの分泌亢進が起こる。一方、ネフローゼ症候群の患者では糸球体濾過率は正常であっても交感神経活動が亢進している。このようなことから腎障害の発症に交感神経の亢進が影響すると考えられている。ただし、交感神経系の亢進と腎機能低下の関係は「鶏と卵」の関係でどちらも原因であり結果であると捉えられている。腎機能低下と交感神経系の亢進の相関には腎臓からの求心性神経の影響、脳内の NO センサー、RAS 系（局所も含めて）などの影響を受けていることが明らかになっている。近年は腎性高血圧や腎保護に有用であるため、腎臓の除神経（遠心/求心）手術が注目されているし、ノルアドレナリン（NE）の影響を抑える β -ブロッカーの使用が有効であると示唆されている（*Sympathetic Hyperactivity in Chronic Renal Failure: A Wake-up Call. J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 524–537, 2004.）

(2) COMT ノックアウトマウス

COMT のノックアウトはマウスにおいて妊娠高血圧を誘発する。ヒトでは妊娠高血圧は糖尿病、肥満である人におこりやすく、血圧上昇だけでなく、蛋白尿、けいれん発作（子癇）、脳出血、肝臓や腎臓の機能障害、溶血と血小板減少を伴うことがある。慢性腎機能障害に至ることもあり、生活習慣病由来の腎機能低下と類似していると考えられている。2-hydroxyestradiol の COMT による代謝物である 2-methoxyestradiol（2ME）がそれらを改善することが判明している。

（Deficiency in catechol-*O*-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature* **454**, 1117-1123, 2008）

(3) S-adenosylmethionine と血管系障害

2000 年ごろから、動脈硬化、高血圧、心/脳血管系障害、糖尿病性腎症などの広範な血管系疾病において、血中 S-adenosylhomocysteine（SAH）濃度が最も強力な risk factor であることが相次いで報告されるようになった。SAH は多くの生体制御メチル化酵素反応（DNA、RNA、ヒストン、リン脂質など）の生成物であり、それらメチル化酵素を強く阻害する。共通な生成物である SAH による相互阻害を通じて、これらの酵素活性同士がお互いに影響しあっている。（*Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism. Int. J. Biochem. Cell Biol.* **67**, 158–166, 2015）

(4) Mg 欠乏と高血圧

Mg は体内に Na、K に次いで多い金属イオンである。カテコール基質は Mg と配位結合して COMT の活性ポケットに結合する。さらに Mg はカテコール水酸基を活性化するルイス酸触媒としても働く。我々の測定では反応液中の Mg 濃度が 1.5 mM を下回ると COMT 活性は低下する。そしてこの 1.5mM という濃度はヒトの血液中の Mg 濃度の標準値である。低 Mg 血症は高血圧、動脈硬化などのリスクとして知られている。また、妊娠高血圧患者に Mg の投与は有効であることも知られている。金崎先生との共同研究で Mg 欠乏による COMT 活性低下と食塩感受性高血圧

が関連することを動物実験で確かめた。(Dietary Magnesium Insufficiency Induces Salt-Sensitive Hypertension in Mice Associated With Reduced Kidney Catechol-O-Methyl Transferase Activity. *Hypertension* **177**, 138-150, 2021)

(5) COMT 低活性と心腎連関疾患症候群

2009 年以降、COMT の遺伝子多型 (Val108 が Met に変異した COMT は低活性) と心臓手術後に往々にして起こることがある急性腎不全との間に相関 (いわゆる心腎連関症候群) があるという疫学的な報告もなされている。(Decreased catecholamine degradation associates with shock and kidney injury after cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol.* **20**, 1393-403, 2009)

[偶然]

文献を調べているだけだったそんな時、東大薬学部の今井一洋先生から、突然大学卒業後初めて電話をいただいた。先生はカテコールアミン類を誘導体に導いて高感度を実施する手法論を研究されてきた。その方法を応用して、HTS (high-throughput screening) 系で酵素の阻害剤のスクリーニングを行ってみたいということで、多くの大手製薬企業に化合物の提供を打診したが断られているとのことだった。お話を伺うと、酵素は COMT、基質はノルアドレナリン (NE)、かつ生成物 (NMN) を HPLC で同定/定量するという。COMT の阻害剤を HTS で探すだけ (活性が阻害されればいだけ) ならば基質としては扱いやすい 3,4-dihydroxy 安息香酸を使うのが普通であるし、活性測定は古くは ^{14}C 標識の SAM を使って有機層へ移動した放射能を検出するのが普通だったし、当時としてはまだ実績は少なかったものの、放射性基質を使わないで生じた SAH を定量するキットもあった。阻害物質を見つける場合と違い、賦活化を評価するためには、基質は天然基質でなくては意味がないし、メチル化されて本来の生成物が生成する量を測定しないと意味がない。今井先生の分析系を使えば賦活物質も探せるので、社内の許可を受け、社内のライブラリからランダムに化合物を選択した「お試しプレート」をお送りした。結果、阻害物質の出現比率に比べると極めて低確率ながら 2 つの化合物において生成物が 20% 増えることが見出された。思わぬタイミングで COMT の実験にアクセスできることになった。

「お試しプレート」を作っていたことも幸運な巡り合わせだった。設立したばかりのスタートアップの製薬会社には自前の化合物は少ししかない。当時のキリンビールも同様に、HTS 化合物ライブラリは購入に頼っていた。購入する化合物は詰め合わせで来るから、マスターライブラリには特定の会社の化合物が一箇所にまとまって保管管理されることになる。そこで、全体から満遍なく一部をサンプリングしたセットを組んでおき、そのセットで HTS をすれば効率的だろうと、手間はかかるが人手をかけてもらって「お試しセット」を作ったところであった。これでかなり広い構造多様性を持つ 5000 化合物を提供できたのであった。

[動物実験で実感]

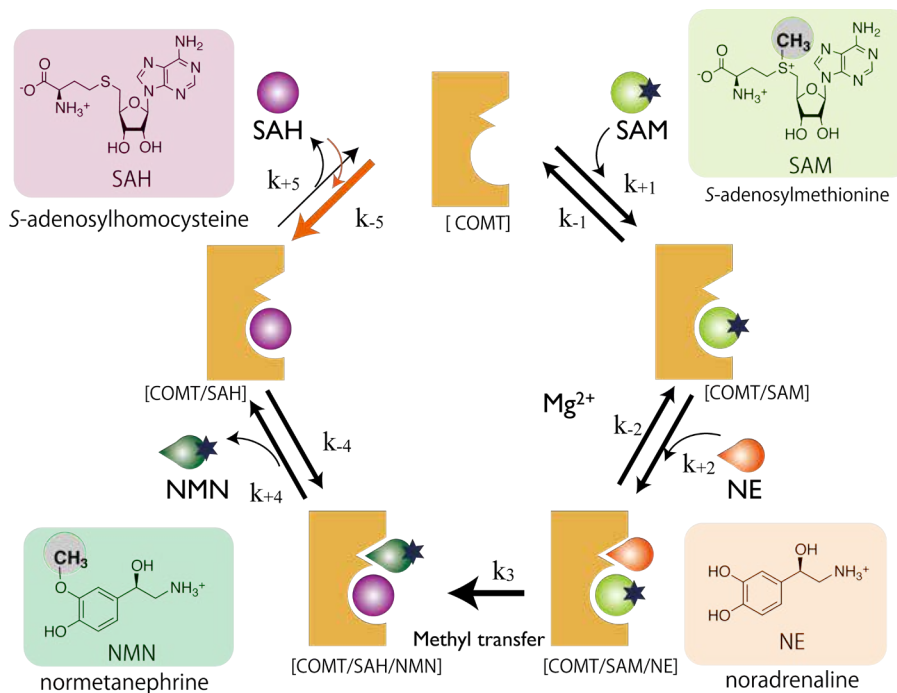
腎臓機能低下のモデル動物として「6 分の 5 腎臓摘出 (5/6 Nx)」ラットの系は定番である。血流を低下させ一部の糸球体に高負荷をかけ、臓器の虚血部分を作ることで酸化ストレスもかける

モデルである。実験は労力と時間がかかる（手術から 8 週間で腎臓機能低下が顕著化）評価方法である。他のプロジェクトでこのモデルを用意すると聞き、8 週間目の 5/6Nx ラットと sham 手術ラットの血液を採取してもらった。これを今井先生にお送りし、血中の NE と NMN 濃度の測定を行っていただいたところ、血中の $[NMN]/([NE]+[NMN])$ 比と腎臓機能低下が相関することを確認できた。5/6 Nx は腕前のいる実験であるし、カテコールアミンの採取は腕が悪いとラットが興奮して正確にできない。腕のいい薬理の岡田雄治さんにこの潜り実験に協力してもらえたこと、血清レベルの[NE]、[NMN]の定量も今井先生とのご縁があってこそその結果であった。私が本学に移籍するにあたり、今井先生からはこの HPLC 装置一式（使い込んだものだがこの一式を自前で揃えるのは不可能）を引き継がせていただくことになった。

Nephron Physiol **116**, 9–16, 2010.

[日大での研究]

本学に移籍すると、まず COMT を発現する組換え大腸菌を作成し、その精製を実施した。基質親和性 (K_m) や既知阻害剤 3,5-dinitrocatechol の阻害定数 (K_i) などを比較し、組換え蛋白が天然型 COMT と同等であることを確認した。一番印象的なのは、COMT の触媒回転数である。酵素と聞くと、炭酸脱水酵素やカタラーゼのように一秒間に 10^5 回転もする高機能触媒の印象であるが、COMT の場合は基質飽和、至適 pH、至適温度でも一分間で 12 回転程度である。COMT の反応サイクルからも分かるように、SAH は SAM の結合部位を競合する。ラット COMT の測定では、 $K_m^{SAM} = 20-30 \mu M$ であるのに対して $K_i^{SAH} = 2-5 \mu M$ で、SAH は SAM よりも 3-15 倍強い競争力を持つ。COMT は反応回転過程において必ず COMT/SAH 複合体を経由する。さらに反応が進めば



COMT の反応サイクル

生成物である SAH の濃度も上がるので反応はますます阻害を受けるようになる。そこで、反応系から即座に SAH を消去するために、SAH-加水分解酵素とアデノシンデアミナーゼを COMT 反応系に共存させてみたところ、単位時間あたりの反応量（見かけの反応速度）が 140% 程度まで増えることを確認できた。

スクリーニングを重ね、2023 年 1 月現在までに二つの賦活化化合物（compd18：分子量 457 と A607：同 307）を取得した。両者に構造の明らかな類似性はない。compd18 については類似構造化合物には活性を示すものが少ないが、A607 については類似構造化合物には活性を示すものもあり、大雑把な構造活性相関も成立する。有機化学の斉藤弘明先生とその卒研生には、A607、A013、A232 などの誘導体合成でご支援いただいた。A232 では、森永製菓の池田正幸氏との共同研究でこの化合物の類似構造体が COMT の基質になることも判明した。一部の化合物は基質結合部位と相互作用できることが示唆され、結果はネガティブなのだが、励まされた。

そのほか、少数だが既存の医薬品についてもスクリーニング評価をした。COMT の基質、高血圧とか生活習慣病などを理由に、 β -遮断薬、HMG-CoA 還元酵素阻害薬、エストロン類（宮入伸一先生から頂いた）などを評価したが、強い活性を持つものは無かった。ただ、エストロン系化合物では弱い賦活化活性、弱い阻害活性を示すものが多かった。キリン化合物の最初のヒットの 1 つはジテルペンであった。A607 もジテルペンであり、骨格的にはステロイドに近い構造である点は興味深い。現在もテルペン系の化合物を評価しているところである。

研究の本質には直接関係しないことだが、いくつか書き残しておきたいことがある。一つはゲル濾過カラムである。大阪大学の蛋白質研究所に行ったとき評判が良かった Superdex というゲル濾過カラムを研究費が当たったので使ってみたら、ふたこぶラクダだった COMT のピークが綺麗に分離できた。二量体と単量体がほぼ半々（モル比では 1:2）であった。この分離のおかげで二量体には酵素活性がないことがわかったし、綺麗な単量体を使ってその後の実験ができるようになった。実験/研究には最新ツールが使えるか使えないかで大きな差が出る。

もう一つは施設で、幸いなことに薬学部には 3L 三角フラスコが 9 つかかる大型のシェーカーが 2 台、500mL 6 本がけの冷却遠心が 2 台あったことだ。これらを使わせてもらえたから遺伝子組換え COMT を生産できた。自分のことは棚に上げて言うが、少しでもいい設備・文化を次の世代の後進の研究者へ「使える形で残す」ことを継続して行くことは学部の基礎底力として大事だと思う。

さて賦活化物質が見つかったので、賦活化の機構（どうして賦活化が起こるのか）を解析してみた。とにかく SAH による生成物阻害が強いので、それを含んだ酵素反応速度論式が必要だった。 $NE + SAM \rightarrow NMN + SAH$ の反応であるから、二基質二生成物反応機構に生成物阻害を盛り込んだ速度論式が本来のものであるはずだが、複雑すぎて実験できない。SAM \rightarrow SAH という一基質に簡略化すると実験できる式になった。これを用いて賦活化化合物存在下での K_m^{SAM} 、 K_i^{SAH} 、

(A) 酵素反応速度論定数

蛍光	K_i^{SAH} (μM)	K_m^{SAM} (μM)	V_{\max} (μMmin^{-1})	r^2
化合物なし	3.25 (1.32-5.16)	20.3 (8.35-32.3)	2.75 (2.41-3.10)	0.999
A607 100 μM	5.93 (3.67-8.20)	33.9 (21.4-46.4)	3.36 (2.97-3.75)	0.999

化学発光	K_i^{SAH} (μM)	K_m^{SAM} (μM)	V_{\max} (μMmin^{-1})	r^2
化合物なし	5.17 (1.52-8.82)	32.8 (9.61-56.0)	3.19 (2.91-3.75)	0.997
A607 100 μM	6.64 (3.37-9.91)	45.9 (22.8-69.0)	3.8 (3.05-4.54)	0.998

()内は95%信頼区間

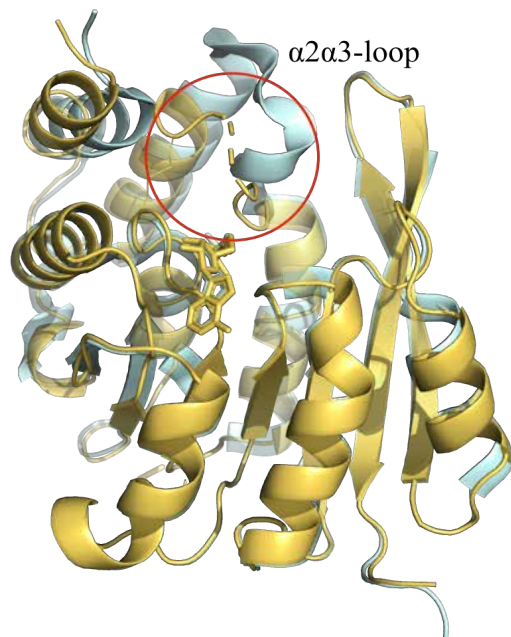
(B) 競合平衡透析 解離定数

K_d^{SAH} (μM)	K_d^{SAM} (μM)
0.452 (-0.98)	4.65 (-0.99)

()内はScatchrad Plot相関係数

$^{app}V_{\max}$ (見かけの V_{\max}) を非存在化の値と比較してみた。賦活化化合物存在下では、どのパラメーターも 20%程度大きくなった。すべての値が同等に大きくなるということは、見かけの酵素量が2割増えたことと同じである。これに対して、COMT/SAM 並びに COMT/SAH それぞれの解離定数 (K_d) には賦活化化合物の影響はなかった。このことは賦活化化合物は SAM あるいは SAH と COMT の親和性を変えてはいないことを意味している。速度論パラメーターと解離定数への影響から考えると、賦活化化合物は COMT/SAM 複合体でも、COMT/SAH 複合体でも、解離/結合の速度定数を大きくしていることを意味する。言い換えると、COMT 反応サイクルの律速段階である SAH の解離過程の活性化エネルギー障壁を低くすることで、酵素反応の全体としての触

媒能力を上げたこと（見かけの酵素量の増加）に匹敵する。速度論式の導出では数学の丹羽典朗



COMT/SAH の結晶構造の比較。

黄色：A607 存在下に生成した COMT/SAH 複合体の結晶

水色：A607 が共存しない場合に生成した COMT/SAH 複合体の結晶

両者は同じ COMT/SAH 複合体の結晶である。SAH 結合部位では変化していないが、 $\alpha 2 \alpha 3$ -loop において大きく構造が変化している。

先生に数年越しでお世話になった。

賦活化物質と COMT の複合体ないし共結晶を目指して、結晶化実験にも挑戦してきたが、得られる結晶には賦活化化合物の電子密度は見出されていない。このことは、賦活化物質は酵素に強く結合するのではなく、(i) 遷移状態の安定化に寄与しているか、(ii) COMT/SAH 複合体の解離の遷移状態のコンフォメーションを変えていることを意味していると考えている。賦活化物質の存在下に得られた COMT/SAH 複合体と非存在下に得られた COMT/SAH 複合体では、 $\alpha 2 \alpha 3$ -loop の配座が大きく異なっているので、(ii) の可能性が高いと考えられる。

賦活化物質が作用するのが遷移状態ならば、結晶化実験が成功しないことも説明がつく。とはいえ、結晶がでないという現実を実験をしている身には苦勞しても報われないことであり、辛いものである。自分たちの腕前も心配になってくる。そこで、COMT の阻害剤として知られている tolcapone と opicapone を使って結晶化実験も並行して行ったら、両方とも一回で結晶取得に成功して結晶構造解析ができてしまった。研究成果を出すという点では阻害剤ならば 2 本の論文を書くことができたのであるが、賦活化物質に関しては長く苦しい不毛なものであったと言える。このことは大学院時代の patulin の研究で経験した教訓と全く同じである。研究はうまくゆかないというのが正しい結果であるということは大いにありうる。方法論を変える、別の観点から調べるという作戦を用意しておくことが大事だという自分の研究生生活の最初にした経験を引退間近にまた経験した。

結晶構造解析でお世話になった大阪大学蛋白質研究所の鈴木守准教授との出会いは、本学赴任して間もないころ、オール日大での研究プロジェクト（健やか未来の創造：研究拠点形成）という企画があり、安西先生のご指導を受けながら複数学部の研究者の方々の連携したプロジェクトを企画し、薬学部、理工学部、松戸歯学部、歯学部、文理学部、生物資源学部の先生方に声を掛け

させていただいた。そのご縁で、松戸歯学部の安孫子宜光教授/柴田恭子専任講師が研究されていた歯周病菌のヘム結合蛋白 (HBP23) の研究で結晶構造から次の研究展開をどうするかという議論に加えていただいた。その時に HBP23 の構造を解かれた鈴木先生と顔馴染みになった。理工学部の量子研究所にいらした桑田楠瀬隆生先生とも知り合えた。桑田先生はその後松戸歯学部の生物学研究室に移られたが、この縁で COMT の結晶化実験は松戸歯学部で結晶化、高エネルギー研究所や SPring-8 での回析実験では鈴木先生のお力をお借りして進めることができた。阪大歯学部の学部学生で鈴木研で結晶構造解析を身につけた武部克希さんも協力してくれた。初めて会った時、彼は学部 2 年生だったが、現在は歯学系大学院の 3 年生になった。COMT と阻害剤の複合体構造に基づく相互作用解析で学位取得を目指している。

結局、COMT 賦活化に関する研究は、A607 の発見と賦活化機構の推定までで私の日大現役 15 年は終わった。論文はこれから書く。今の達成状態ではインパクトファクターの高い雑誌には通らないかと思うが、いつの日か COMT 賦活化が創薬標的と認められたときには最初の論文として「発掘」されることを夢見ている。

2023 年度は薬学研究所の上席研究員として、細々だが、A607 を上回る活性を求めてスクリーニングを再開できるようになった。現代社会は生物としての人間にとって本来の環境とは異なる環境である。腎臓、心臓、血管、生活習慣病、中枢系に関わる COMT の新しい展開の火種となってくれる化合物に巡り合えると期待している。依然として、仮説の範囲をでないアイデアであることには変わりはないが、*vivo* で COMT 活性を増加させることができる化合物があれば、薬理実験を行うことができ、COMT の賦活化が創薬標的になり得るかを検証することができるだろうという希望に合理性を持てるようにはなった。そういう化合物を世の中に示せれば、きっと生理活性を評価してもらえるだろうと思っている。あとどのくらいできるか不明だがご支援を賜れば幸いである。

Chem. Pharm. Bull. **68**, 447–451, 2020.

Hypertension **177**, 138-150, 2021.

[最後に]

研究生生活を振り返るはずだったが 最終的には「巡り合わせ」の妙に驚く。ここには書ききれなかった巡り合わせもまだまだたくさんある。私は Star Wars のファンであるが、最初は特撮アドベンチャー映画として惹かれていたが、巡り会った「師匠と弟子」(映画なので両者とも高い潜在能力の持ち主だが) が、共に失敗や過ちをしながら助け合って結局両方が成長する過程が魅力的なのだと思うようになった。「ハリーポッター」も似ていると思う。いわゆる長老は経験分だけ若者よりはアドバンテージを持っているが、決して、若者よりも優れているわけではない。Harvard や Oxford の教授は、自分の目の前にいる学生が自分よりも才能豊かな学生である可能性を前提に指導しているのだと思う。そんな高水準な世界はさておいても、「巡り合わせ」を活かせるか殺してしまうかは、相手に対し信頼と尊敬の念を持てる柔軟で合理的な心にあると思う。

[謝辞]

学部・大学院において研究者としての基礎をご指導いただいた三川潮先生、海老塚豊先生、Towers先生、山本悦雄博士、分子設計の世界に導いて下さった Marshall 先生に深く感謝いたします。一部の研究は筆者がキリンビール（株）で行ったものです。一緒に研究して下さった多くの方々に感謝いたします。特に日本大学薬学部で、14年間の長きにわたり助教・専任講師として研究を支えてくれた高宮知子先生に感謝します。また、本稿では触れなかった共同研究でも多くの方々にお世話になっております。お名前をあげきれませんが、学内学外の共同研究者の方々、学生諸氏に感謝いたします。薬学部の教職員の方々に感謝いたします。

卒業研究に一生懸命取り組んでくれた学生さんには特に感謝いたします。毎年、初歩からの技術指導をしなくてはならなかったですが、私、上級生と下級生が助け合って研究するスタイルをとったのはミニ Star Wars でした。Force のかけらは見つかったでしょうか。とにかく卒研生の熱意は私の大きな原動力になっていました。研究の常で、行った活動のうち、日の目を見る結果はほんの一部です。この振り返りに含まれなかった研究テーマの方がむしろ数としては多いです。学生さんの努力量の総計から見れば、ここに書いた内容は1%にも満たないと思います。100倍の感謝を申し上げます。

そして最後になりますが、定年まで（そして今も）支えてくれた妻と家族に感謝いたします。