

My Thesis (私の学位論文)

生物資源産業学研究部 生体分子機能学分野 赤松徹也

Tetsuya Akamatsu

Histochemical and Cytochemical Studies on Processing Protease PACE4 (SPC4)

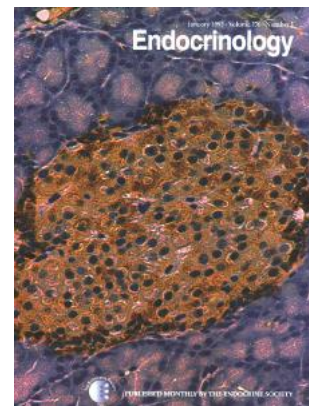
(プロセシング酵素 PACE4 (SPC4)に関する組織化学的・細胞化学的研究)

徳島大学博士論文 (博士 (工学) 平成9年9月5日授与 (徳島大学 甲工 第九六号)) [本文へのリンク](#)

主論文: [Tetsuya Akamatsu, Shigeo Daikoku, Hideaki Nagamune, Shigeru Yoshida, Kenji Mori, Akihiko Tsuji, and Yoshiko Matsuda. Developmental expression of a novel Kexin family protease, PACE4E, in the rat olfactory system. *Histochemistry and Cell Biology*, 108 \(2\), 95-103, 1997.](#) [本文へのリンク](#)

私は1988年(S63年)に新設された徳島大学工学部生物工学科に第一期生として入学しました。元々、医学に興味があったこともありますが、当時は様々な生命科学・基礎医学系分野の第一線でご活躍の先生方の非常勤講義を受ける機会に恵まれ、より一層、生命科学に興味を持ちました。卒業研究は、本学酵素科学研究センター(現先端酵素学研究所)から着任されていた松田佳子教授(現名誉教授)研究室配属を希望しました。当時はまだ建物も実験スペースもなく、医学部学生実習室と酵素科学研究センター(勝沼研)を使用させて頂いてのスタートでした。研究テーマは、当時の辻明彦助教授(現生物資源産業学研究部長)のテーマ、リソゾーム酵素欠損症である「ポンペ病に対する酵素補充療法の開発」に興味があり、同級生と指導頂くことになりました。本研究ではまず、実験に必要な血清タンパク質、 α -マクログロブリン(α M)の精製と抗 α M特異抗体の作成から行うことになりました。 α Mは生体内でラッピング機構により種々の酵素を捕捉すると立体構造が変化し、肝細胞に取り込まれてリソゾームで分解される性質があり、前述の酵素補充療法はこの α Mの性質に着目したものです。研究を進める中で、私の最終的な卒業研究テーマは「ラット肝 α -マクログロブリン-プロテアーゼ複合体の精製とその性質」になりました。当初の希望とは違いましたが、自分の実験結果を基に論文発表して頂き([Tsuji A., Akamatsu T., Nagamune H., and Matsuda Y. *Biochem. J.* 298 \(Pt1\), 79-85, 1994](#))、より一層、基礎研究に対する興味を持ちました。本研究を通し、タンパク質の精製、酵素活性の測定、ポリクローナル抗体の作成等を含む生化学的実験手法や動物実験の基礎を身につけることができ、この経験がその後の大学院進学、学位取得を目指す原点になったと思います。大学院進学後も関連する研究を継続したいと考えていましたが、当時の研究室の主要テーマはプロセシング酵素に関するものでした。ホルモンや増殖・分化因子等の生理活性ペプチド・タンパク質の多くは、不活性な前駆体タンパク質として合成された後、組織・細胞特異的に、また、発生過程等では時期・空間特異的に限定切断され活性化されます。この限定切断部位は塩基性アミノ酸が多く位置しており(KR, RR, RXKR, RXXR等)、これらの配列を特異的に切断するプロセシング酵素の探索・機能解明が世界各国で競って行われていました。今でこそ各種教科書等にも記載されていますが、当時はインスリンを活性化する酵素も明らかではありませんでした。研究室でも新規プロセシング酵素の遺伝子クローニングから、培養細胞での基質候補タンパク質との共発現実験等が行われていましたが、私の修士課程での研究は、それらプロセシング酵素の生理機能解明のための組織・細胞局在の解析に関するものになりました。タンパク質の局在は特異抗体を用いた免疫組織染色法により解析しますが、発見されて間もない酵素に対する特異抗体は市販されておらず、自分で作成しなければなりません。研究室でも前述のインスリンのプロセシング酵素有力候補等に対する特異抗体の作成に着手しており、長宗秀明助教(現生物資源産業学研究部教授)の指導の下、これらの局在解析に携わることになり、結果、世界に先駆けてインスリンやグルカゴンのプロセシング酵素の膵臓ランゲルハンス島における局在を明らかにし、雑誌の表紙

(右図)にも掲載される幸運に巡り会うことができました ([Nagamune H., Muramatsu K., Akamatsu T., Tamai Y., Izumi K., Tsuji A., and Matsuda Y. *Endocrinology* 136 \(1\), 357-360, 1995](#))。この間、細胞培養やモノクローナル抗体の作成等も経験することができました。更に転機となったのは、生物工学科に野地澄晴教授(現徳島大学長)が赴任されたことでした。分子生物学の発達により、細胞レベルで遺伝子発現を検出する手法として *in situ hybridization* 法が確立されましたが、野地先生はその分野の第一人者でした。研究室でもこの技術を導入するべく、私が野地先生の研究室で学ぶ機会を得ました。この技術の習得はその後の修士論文・博士論文においても、結果的に大きなウェイトを占めることになり、野地先生との出会いがなければ、その後の研究生活も大きく変わっていたかも知れません。一連の流れの中で、博士課程での研究テーマは研究室で同定した新規プロセシング酵素の、特に中枢神経系における発現・局在に関するものになりました。この研究は、当時、本学名誉教授で大塚製薬研究所の顧問を務められていた大黒成夫先生との共同研究として進めることになりました。大黒先生は非常に厳しく怖い印象でしたので、先生の元に通う日々は緊張の連続でした。打合せのみでなく、普段の会話に至るまで、全て一字一句正確に記憶されているので、矛盾や失言がないよう随分気を使ったものでした。また、現在のようにあらゆるマニュアルが容易に入手できる訳でも、何から何まで説明・指導頂ける訳でもなく、ただ「見ていなさい」の一言で、先生の作業を見学することが多かったことを思い出します。しかし、要所で頂く説明・指導を頼りに、注意深く先生の作業を観察し、真似ることで、それまで全く知識や経験もなかった、例えば発生生物学的な作業やコツも身につけることができました。この経験は、現在も大いに役立っています。試行錯誤を繰り返して、データを積重ねて、論文投稿となる訳ですが、私の場合、別グループの新規プロセシング酵素のクローニングからキャラクタリゼーションに関する論文が発表されてようやく投稿できる立場でしたのでジレンマもありました。また、当時はまだ現在のようなオンライン投稿・査読システムではなく、論文原稿を国際郵便で郵送し、査読結果の手紙も国際郵便で受取る時代でした。論文原稿も必要部数用意するため、図の作成も写真を必要枚数、全く同じように切り貼りし、レタリングシートでアルファベットや矢印等を貼らないといけないので時間もかかり大変でした。どうにか論文投稿に漕ぎ着けましたが、査読結果は修正が認められることなくリジェクトでした。特に一人の査読者のコメントは論文内容を完全否定するもので、エディターがこの評価を一方向的に支持した結果に、先生方も「あり得ない」とのことでしたが、その直後、関連する論文が一大勢力グループから発表され、真偽の程は定かではありませんが、競争の激しい分野ではよくあることだということでした。事実、当時、関連分野の研究は世界各国で熾烈を極め、国際会議で熱心に質問され詳細を説明すると、瞬く間に膨大な資金と労力のあるグループに先を越され論文発表されたということもあったようです。結果的に単位取得退学となりましたが、別の雑誌への投稿・修正を経て無事に主論文は受理されました。しかし、学位論文は主論文・副論文を元に、改めてまとめる必要がありました。私が研究室の博士課程第一号でしたので、参考例がない点では苦労しましたが、松田先生からの助言を元に、論文化に至らなかったデータも盛り込み、まとめることができました。



研究は試行錯誤の繰り返しで、失敗することの方が多いと思いますが、その経験全てが次に繋がると思います。今は実験方法に関する指南書も便利なキット等も容易に入手できます。それらを活用することは効率よく研究を進める上で有効ですが、まずはやってみる事です。うまくいかなければ、よく考え、研究室のメンバーや指導教官とディスカッションし、条件等を改善して確認する。そうして1つ1つデータを積重ねて、1つの論文が完成します。自分で考え、工夫して、納得のいく結果が得られた時程、嬉しいことはありません。大学院生の皆さん、くじけそうになることもあるかも知れませんが、負けずに頑張ってください。きっと良い論文ができると思います。