

My Thesis (私の学位論文)

生物資源産業学研究所 生体分子機能学分野 辻 明彦

(主論文)

Akihiko Tsuji, Yoshiko Matsuda and Nobuhiko Katunuma

Studies on the structure of γ -glutamyltranspeptidase. II. Location of the segment anchoring γ -glutamyltranspeptidase to the membrane.

The Journal of Biochemistry, Vol.87, No 6, pp.1567-1571, 1980. [本文へのリンク](#)

(副論文)

Akihiko Tsuji, Yoshiko Matsuda and Nobuhiko Katunuma

Purification and characterization of γ -glutamyltranspeptidase from human bile.

Biomedical Research, Vol.1, pp.410-416, 1980.

Akihiko Tsuji, Yoshiko Matsuda and Nobuhiko Katunuma

Characterization of human serum γ -glutamyltranspeptidase.

Clinica Chimica Acta, Vol.104, No.3, pp.361-366, 1980. [抄録へのリンク](#)

※冊子体は蔵本分館に所蔵あり

私は、昭和 51 年に栄養学研究科修士課程学生として、医学部附属酵素学研究施設酵素化学部門（勝沼教授）に入局し、研究者になるための修行がスタートしました。大学院入学（栄養学研究科修士課程と医学研究科博士課程）から学位取得までの経緯について、お話しさせていただきます。

大学院入学まで

私は長崎大学水産学部 4 年生の時に、学術雑誌「蛋白質・核酸・酵素」に掲載されていた勝沼先生の蛋白質の細胞内での代謝回転に関するレビューを読み、大学院は勝沼先生の研究室で勉強したいと決心しました。世界の先端研究では生きた細胞の中での特定の酵素の量や性質の変化を解析していることに強烈なインパクトを受けたことを覚えています。その当時は、地方大学出身者が博士号を取るには、修士課程を修了後、医学部の大学院へ進学するか、旧帝大の大学院へ進学するかの二つの道がありました。徳島大学は、医学部の中に栄養学科があったので、栄養学科の大学院生になれば、医学部附属研究施設で修士課程から研究ができるのが最大の魅力でした。ただ、栄養学科の院入試には、病態栄養学など栄養学専門科目の試験があり、これらの科目の勉強が難関でした。一次の入試では自信を持って挑戦しましたが、完敗でした。今でもしっかり覚えています。微生物学の形質転換に関する問題、病態栄養学の慢性腎炎患者に対する栄養療法の問題は、全くわかりませんでした。これまで水産学部で受けた講義で聞いたこともない専門用語が多く、このままではいけないと思っていた時に、面接試験の後、栄養学科の川田先生から、二次試験を受けるつもりなら、研究室の学生の講義ノートを借りて勉強しないかと声をかけてもらい、以後お借りしたノートで勉強させていただき、おかげで二次試験に合格することができました。川田先生は旧制中学校の親友が長崎大学水産学部教授にいらっしゃるということで、親切にさせていただき、私にとっては徳島大学での最初の恩人です。

大学院研究室の決定

さて、昭和 51 年 4 月に徳島へ引っ越しし、早速研究室を決めないといけないのですが、勝沼先生の酵素化学

研究室にはもう栄養の学生（現在、徳島文理大学教授の橋田君）が入っているので、無理なのではと川田先生の研究室の院生から話があり、別の研究室を探してみました。幾つかの研究室は、ほとんど門前払のような状況で、かなりショックでした。しかし気をとりなおし、勝沼教授に直談判する以外にないと思い、初対面でありながら自分の気持ちを聞いていただき、大学院生として指導をお願いしました。お願いの後、勝沼先生がスタッフ（真田助教授、松田助手、木南助手）と相談し、たまたま松田先生が秋の日本生化学会のアンモニア代謝に関するシンポジウムで講演することになっているので、その研究を支援することで入局が許可されることになりました。もし、松田先生がシンポジウムで講演する予定がなかったら、多分別の研究室に行くことになり、私の人生は今とは全く異なっていたと思います。以後、勝沼先生と松田先生は私の生涯の恩人となります。

大学院での研究と学位論文

研究は、入局を許可された日からスタートしました。研究内容は、脳のグルタミン代謝調節におけるリン酸依存性グルタミナーゼの役割を明らかにすることに決まりました。肝臓や腎臓でのグルタミン酸代謝は勝沼研で実績のある研究でしたので、脳においても先端的なデータを出さないといけません。いきなり Meister 博士のアミノ酸代謝に関する分厚いテキストを 10 冊余り渡され、これを全部読めとの指示があり、必死で読んだことが思い出されます。1 年後、グルタミナーゼの仕事が大体目処がたった頃、松田先生は交換留学生として、メルボルン大学へ行くことになり、あとはかなり自由に自分の考えで研究を行うことができました。当時の勝沼研は、そうそうたるメンバーで構成され、研究については熱烈に、かつ自由に討論し、教室員間の競争も激しく、お互いに切磋琢磨できる大変素晴らしい環境でした。医学部附属の研究室としてはめずらしく、勝沼先生以外は、さんづけで呼び合い、研究者としては平等に議論できる関係であったと思います。松田先生は、メルボルン大学のシュライバー教授の研究室で血清蛋白質の生合成の研究を行い、最新の蛋白質プロセッシング研究の考え方と新規の高感度アミノ酸配列分析技術を導入されました。グルタミナーゼにはリン酸依存性酵素と非依存性酵素があります。後者の酵素は、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ(γ -GTP)で、この酵素は血清や尿に遊離し、診断マーカーとして利用されていますが、その構造や遊離機構はまだ不明でした。その頃、医学部総研に LKB 社のペプチドシーケンサーが購入され、松田先生と相談した結果、アミノ酸配列レベルで γ -GTP の膜結合様式を明らかにすることにし、これが私の学位論文「 γ -GTP の膜結合様式」になります。

ところが、この酵素については、ガン酵素マーカーの観点から北大のグループとグルタチオン代謝の観点から熊本大グループの研究が先行しており、どうやって逆転するかが問題でした。私たちは、酵素の膜結合様式を明らかにするため、トライトン X-100 で可溶化した酵素と、プロテアーゼであるパパインで膜結合ドメインを除去した水溶性の酵素の構造を比較することにしました。当時は、cDNA クローニングは一般的な技術にはなっておらず、エドマン分解以外に配列を解析できる方法はなく、しかも N 末アミノ酸同定には最低 5-10nmol の試料が必要でした。 γ -GTP は、重鎖(50kDa)と軽鎖 (23 kDa)のヘテロダイマーであるため、一回の配列分析には、各サブユニットが 10mg オーダー必要で、現在の方法と比べると、1000 倍以上の量が必要でした。そのため、研究の 90%は、連日ラット腎臓からの酵素とサブユニットの精製でした。学位の取得のために、1 万匹以上のラットが犠牲になりました。また、マニュアルのエドマンダンシル法では、試料を 5nmol ずつ、分析する配列の個数分の試験管に入れ、各試料を異なる回数のエドマン分解を行い、ダンシル化後、塩酸加水分解し、N 末残基をポリアミドシート薄層クロマトで解析します。また、LKB 社のシーケンサーは、今のようにコンピューター制御ではなく、プラスチックシートにキーパンチャーで穴を開けることで、各操作の内容、反応時間を制御する形式でした。英語のマニュアルを読みながら、苦勞して操作しました。連日ドラフト内でトリフロロ酢酸と格闘し、指はぼろぼろでしたが、マニュアル法とシーケンサーの結果が一致した時は、嬉しい気持ちでいっぱいでした。数回の再試でデータを確認しました。結局、重鎖の N 末側に膜結合ドメインがあり、パパインを作用

させると膜結合部位の下流が切断され、水溶性の機能ドメインが膜から遊離することが判明しました。即ち、分泌蛋白質の N 末に存在するシグナルペプチドは、翻訳過程で切断されますが、 γ -GTP ではシグナルペプチドが切断されず、膜結合部位として機能していることを初めて発見した研究になりました。当時はシグナルペプチドの役割についても明らかになっていない状況で、私たちの研究結果は、蛋白質ソーティングの観点からも画期的な発見であったと思います。さらに C 末側の配列解析やアミノ酸組成分析の結果もまとめて論文に発表することができました。さらに、副論文として、胆汁に分泌された酵素や血清酵素の遊離機構に関する論文もまとめることができ、学位を取得することができました。

徳島大学の若い大学院生へ

勝沼先生からは、最新の機器と十分な資金があればできるスマートな研究より、泥の中からダイヤモンドを探し出すような地道な研究を求められたと思います。これまで恩師の教えを守ってきたと考えていましたが、勝沼先生が評価しない研究が、はっきりわかったのは最近開催されたある学会の若手表彰者の講演でした。Nature 等に掲載されたレベルの高い内容ですが、なぜか感動しないのです。大学院生の頃、生化学会のある発表を素晴らしい研究であると勝沼先生に話したところ、お前は全くわかっていないと怒られたことがあります。教えを乞うて 40 年後、やっと恩師の考えを理解できた気がしました。地方大学の徳島大学で画期的な成果をあげるためには、自分たちが新たな土俵を作り、そこで勝負することが必要です。若い大学院生の皆さん、必死で頑張ればなんとかなるという楽天主義で、自分の土俵を作り、頑張ってください。