

研究者としての歩み

第二回 小竹 敬久

(埼玉大学大学院理工学研究科・准教授)

植物細胞壁との出会い（広島大での学部、修士・博士課程）

私が広島大学総合科学部に入学したのは1991年で、バブル経済にかげりが見え始めた頃だった。当時の総合科学部は文理併せて7つのコースからなり、2年次に一つを選択するシステムだったが、私は自然環境研究コースを選んだ。コース全体が「環境科学」寄りで、生化学、分子生物学系の講義はあまり履修できなかったが、「大気環境化学」や「基盤地質学」といった講義も面白く聴講した。2年次に聴いた櫻井直樹先生の講義「植物生理学」や、3年次の植物ホルモンを使った学生実験が面白かったので、研究室配属では櫻井研究室を選んだ。卒業研究のテーマは、「伸長成長に関わる細胞壁結合型グルカナーゼの精製及び同定」で、細胞壁の物性を制御する β -1,3:1,4-グルカンの分解酵素をオオムギから精製・同定するという内容だった。オオムギの芽生えを育ててはすりつぶし、細胞壁結合タンパク質を抽出してカラムクロマトグラフィーにかける、という毎日だったが、自分の性に合っていたようで実験が楽しく、特に迷いもなく大学院に進学することにした。大学院入試ではひどい成績で恥をかいた。専門試験で意地を張って他コースの生化学、分子生物学系の問題を選択したために、半分も解答できなかったのである。面接試験で、ある先生から「君は専門でどれだけ点を取れているのか分かっているのか！」と叱られ、遠慮気味に「2, 3割かもしれません」と答えると、その先生が「君はなかなか鋭いな」とおっしゃった時は、本当に落ちたかも知れない、と思った。幸い他の科目が多少ましな点だったおかげでかろうじて合格した。恐ろしいもので、そんな私が今、理学部分子生物学科で、「糖質・脂質生化学」を教えている。ただし補足すると、大学院入試が終わってからコーンスタンプ生化学を一生懸命読んだ。自分の研究テーマと関連があったので、よく頭に入った。

修士にあがっても同じテーマで研究を続け、M1の時に酵素のN末端アミノ酸配列29残基を決めることができた。当時はデータベースがあまり整備されていなかったが、似ている配列がなく、新種のタンパク質かもしれない、と大いに期待した。cDNAライブラリーのスクリーニングを始めたころに、同じような酵素の論文がJBCに出ていることを研究室の中川直樹先生から聞いた。論文を読んでみると、なんとオオムギから全く同じ酵素が精製され、cDNAも単離されていた。自分が決めた29残基のアミノ酸配列と全く同じ配列がその論文に載っていた衝撃は今でも忘れられない。非常に落胆したが、なんとか気を取り直して論文にまとめてPCPに発表した。私が書いた最初の論文となった。この経験がトラウマとなり、今でも良い実験結果が出ると「また誰かに先を越されるのでは、早く論文にしないで」という妙な強迫観念に襲われる。これも悪い経験ではなかったかもしれない。

博士課程に進学するか就職するか悩んでいたが、就職活動はしなくなかった。公務員試験も受けたが合格できなかった。将来のことはあまり考えていなかったが、幸い学振の特別研究員に採択されたので、M2の冬頃、「研究者を目指してみようかな」という気持ちが芽生えた。博士課程では、研究の興味はグルカナーゼの遺伝子発現、活性調節にシフトした。（前出のJBC論文を出した）オーストラリアのFincher

教授から cDNA プローブや配列情報の提供を受け、5種類のグルカナーゼの遺伝子発現を調べたところ、あるグルカナーゼ遺伝子がオーキシン処理により発現することが分かった。この酵素がイネ科植物の成長を制御しているかもしれない、と期待したが、詳しく調べると少なくともオーキシン処理後2時間目までは発現が見られず、処理後15分以内に始まる成長を説明できないことがわかった。そこで次に、主要な β -1,3:1,4-グルカン分解酵素群が至適 pH を酸性側に持つことに着目した。オーキシンは早い段階から原形質膜 H⁺-ATPase を刺激するため、これらの分解酵素の活性が高められていると考えた。原形質膜 H⁺-ATPase の活性化剤フシコクシンで処理してみると、オーキシンによる初期の成長や β -1,3:1,4-グルカンの低分子化をミミックできた。当初自分が立てた仮説とは違う結果となったが、成長初期の細胞壁酸性化（至適 pH を酸性側に持つグルカナーゼの活性化）とその後起こるグルカナーゼ遺伝子の発現で論文をまとめ、博士号を取得した。

櫻井研究室では、本線のテーマ以外のわき道的な実験も好きなようにやらせて頂いた。また、学会、研究会、セミナーに積極的に参加し、この分野（成長生理・細胞壁）の先生・先輩方から可愛がっていただいた。この世界に残ろうと思った一番の理由が研究の面白さなら、二番目は間違いなく居心地の良さである。懇親会、飲み会、休憩室での茶飲み話が、その後の研究者人生、研究の進展にプラスに働いた。



1年3ヶ月お世話になった RIBS

初めて訪れた時は、建物の斬新さに圧倒された。研究設備・環境がとても整備されている。

花成の分野へ（RIBS でのポストク）

研究者になりたいと強く思っていたが、細胞壁分野ではポストクの口が見つからなかった。D3の冬に植物学会で募集案内が出ていた岡山県生物科学研究所（RIBS）の流動研究員に応募し、なんとか採用された。RIBSでは後藤弘爾先生のもとで花形態形成や花成の仕事をした。最初は、酵母ツーハイブリッド法で FLOWERING LOCUS T (FT) や TERMINAL FLOWER 1 (TFL1) の相互作用因子を探索した。慣れない実験で苦労もあったが、未知の因子を探索する仕事は宝探しのようで面白かった。しばらくしてポジティブクローンが数個得られたが、どれも 14-3-3 というタンパク質だった。花成や花序を制御する FT や TFL1 の相互作用因子として転写調節因子や情報伝達因子が取れると思っていたので、期待はずれだった。躍起になってスクリーニングを続けたが、結局 14-3-3 タンパク質以外は取れず、この実験はやめてしまった。ちょうどその頃、*tf11* 同様に有限花序となる早咲きの変異体、*tf12* のことを後藤先生から聞いた。*TFL2* 遺伝子の単離や変異体解析をやってみては、という提案に私はすぐに「やりたい」と飛びついた。有り難いことに基生研の大藤雅章先生が作成された T-DNA 挿入ラインに *tf12* 変異体があり、既に大藤先生が T-DNA 挿入部位 (HP1) も特定していた。私はアレルの変異部位決定と相補実験から始めることができたので、実験が非常にスムーズに進んだ。タグライン作り、変異体単離、挿入部位決定という一番時間がかかる仕事を大藤先生がやってくくださったおかげである。*tf12* 変異体で様々な花成調節因子の発現を調

べてみると、TFL2がFTの発現を抑制するという面白いことがわかり、とてもインパクトのある仕事となった。その後、私とほぼ入れ違いで後藤研究室に来られた高田忍さんがこの仕事を引継ぎ、2003年にPCPのRapid Reportで発表した。2005年には、この論文で植物生理学会の論文賞を受賞した。

再び細胞壁へ（埼玉大）

花成や花形態形成の研究は権威ある雑誌に論文を出すチャンスがあり、文字通り「華やか」な世界だったが、日々更新される情報についていくのが大変で、競争も激しかった。自分にはじっくりと自分のアイデアで取り組める研究が合っているかもしれないと感じていた。2000年の冬に細胞壁分野に戻るチャンスがおとずれた。埼玉大理学部で細胞壁の仕事をしている円谷陽一先生の部屋で助手の話があり、2001年7月に埼玉大に入れていただいたのである。細胞壁を離れたのはわずか1年3ヶ月だったが、細胞壁を扱う実験が懐かしく、またこの分野にもどって来られたことがとても嬉しかった。当時は助手や助教の任期制が導入される前だったので、「少し時間をかけてこの分野でオリジナリティーのある仕事がしたいな」と思った。任期制があったら、たぶんこうは思わなかった。

円谷先生は細胞壁多糖類の合成酵素（糖転移酵素）の研究の一環として糖ヌクレオチド（糖転移酵素の基質）の調製もされていた。当時UDP-キシロースという糖ヌクレオチドが販売中止になっていたため、トウモロコシ（エンドウマメの芽生え）から部分精製したUDP-グルクロン酸デカルボキシラーゼ（UDP-グルクロン酸をUDP-キシロースに変換する酵素）を使って、UDP-グルクロン酸から酵素的に調製していた。この方法は京大の間藤徹先生、小林優先生に教えていただいた。ある時、イオン交換クロマトグラフィーで得た別の画分に妙な酵素活性があることに気が付いた。その画分の酵素は、L-アラビノース 1-リン酸とUTPを与えると、UDP-L-アラビノースを合成した。興味をもって精製してみると、この酵素は様々な糖 1-リン酸を各種UDP-糖に変換する新種の酵素（UDP-糖ピロホスホリラーゼ、USP）であることがわかった。通常、糖ヌクレオチドピロホスホリラーゼは基質特異性が厳密で、1種類か2種類の糖ヌクレオチドしか合成しない。USPのように幅広い特異性を持つ糖ヌクレオチドピロホスホリラーゼは非常に珍しい。植物生体内にはそれぞれの糖 1-リン酸に特異的な糖ヌクレオチドピロホスホリラーゼが存在すると考えられていたため、USPの発見は植物生化学の常識を覆すような重要な発見だった。生体内の代謝で生じる様々な単糖を効率的に再利用するために、植物はこのような変わった酵素を獲得したのかもしれない。2004年に論文をまとめてJBCに投稿すると、わずかな修正（単語3カ所の修正）だけですぐにアクセプトとなった。2006年にはIUBMBの酵素命名委員会にEC番号(2.7.7.64)をつけてもらった。トウモロコシからは別の酵素も見つかった。当時、UDP-キシロースからUDP-L-アラビノースを合成する酵素（UDP-キシロース 4-エピメラーゼ）は、ゴルジ体に局在する膜結合性の酵素（MUR4）だけだと考えられていた。トウモロコシから精製したPsUGE1はMUR4と異なる細胞質基質性のUDP-キシロース 4-エピメラーゼであった。高等植物では、これまで知られていたゴルジ体経路の他に細胞質基質経路でもUDP-L-アラビノースが合成されることが示唆された。現在、変異体を利用して細胞質基質経路の生理的重要性を調べている。他にも、ゲノムデータベースを利用して、連続する2つの反応を触媒するGDP-L-フコース合成酵素（FKGP）も同定した。面白いことに、FKGP遺伝子を欠損したシロイヌナズナ変異体ではL-フコースが再利用されずに蓄積することもわかった。これらの仕事は（自分では大事だと信じていても）マニアックで説明してもなかなか理解してもらえない。しかしながら、世界には少なからず同じようなマニアがいるようで、これらの酵素に関する問い合わせ（主にプラスミドのリクエストと組換え酵素調製に

関する質問だが)をたくさん頂いている。また、東京糖鎖研究会と植物学会からこの研究で奨励賞を頂いた。わかりにくい地味な研究に光を当ててくださったことに心から感謝している。

埼玉大では、着任当初からアラビノガラクトサン-プロテイン (AGP) の糖鎖分解酵素の仕事にも関わっている。円谷先生はカビやキノコから AGP 糖鎖分解酵素を何種類も発見、単離されていた。これらはクローニングされていなかったため、cDNA クローニングや組換え酵素の作成をやらせていただいた。食総研の金子哲先生、東大の五十嵐圭日子先生のご協力も頂いて、全ての酵素 (エキソ- β -1,3-ガラクトナーゼ、エンド- β -1,6-ガラクトナーゼ、 α -L-アラビノフラノシダーゼ、 β -グルクロニダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ) をクローニングし、組換え酵素も調製できた。クローニングペーパーをたくさん書かせていただいたが、この仕事は円谷先生が長い年月をかけて調製された酵素、多糖、オリゴ糖がベースになっており、私のコントリビューションは小さい。ただ、今まで趣味的に進めていたこの仕事が最近海外の研究者から注目されるようになってきたことは、とても嬉しい。現在は特異的分解酵素を使って AGP の機能解析ができないか、検討しているところである。

今の私があるのも...

こうして振り返ってみると、私の研究は「犬も歩けば...」という要素が強いかもしれない。ただ、棒に当たるために積極的に「歩く」のにも時間や余裕が必要で、時間的制約や厳しい競争があったら、「面白そうだからちょっと糖ヌクレオチド合成酵素やってみようかな」などとは決して考えなかった。任期制のない良い時代に助手・助教をやらせていただいたと思っている。また、今の自分があるのは、櫻井先生、円谷先生はじめ、この分野の先生・先輩方が可愛がってくださったおかげである。今度は自分が若い方のために何か (飲み会、茶飲み話含む) しなければ、と考えている。

著者紹介

平成7年広島大学総合科学部卒、平成12年同生物圏科学研究科博士課程修了・博士 (学術)。

岡山県生物科学総合研究所・流動研究員などを経て、平成13年埼玉大学理学部・助手、平成21年1月より現職。

現在の研究テーマは「植物細胞壁の代謝・構築制御」。趣味はスポーツ全般、学生時代は山歩き。