

## 北大薬学部退任を迎えるに当たって

稲垣 冬彦

**On the Occasion of Retirement from Graduate School of  
Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University**

Fuyuhiko INAGAKI

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University,  
Kita 12, Nishi 6, Kita-ku, Sapporo 060-0812, Japan*

(Received June 22, 2010)

I have devoted my life to NMR research for nearly 40 years since I graduated from Tokyo University. Owing to innovative technical developments such as introduction of superconductive magnets into NMR, and development of FT-NMR and two-dimensional NMR, I have spent an interesting and inspired research life. When I look back on my life, I found myself starting from structural chemistry and doing research from the beginning of and all the way to the maturation of structural biology. I have been enjoying scientific challenges with my students and collaborators and I am proud that many young scientists grew up in my laboratory.

**Key words**—structural biology; NMR; signal transduction; innate immunity; autophagy

## はじめに

長いもので学生時代から数えると 40 年間 NMR の分野で研究生活を送ってきた。超電導磁石の導入、FTNMR や二次元 NMR の開発等、革新的な技術発展が NMR の分野には絶えずあったおかげで、刺激の多い研究生活を送ることができた。また、構造生物学の夜明けより、成熟期まで、新しい学問の発展を身近に体験できたことも研究者として幸せであった。退任を迎えるに当たり、構造化学から始まり、構造生物学へと移っていった私の研究の遍歴を振り返ってみたい。

**東京大学理学部化学科島内研究室時代 (1969 年–1972 年)**

東京大学では、教養課程 2 年時に進振りがある。将来は生命科学の分野で研究をしたいとの希望を持っていたので、理学部化学科か生物化学科へ進学するか迷った。いくつかの研究室を訪ねた結果、まずは、化学の基礎的な勉強をし、その後生命科学を研

究しようと思い化学科に進学した。今考えると、この選択はいろいろな点で以降の私の研究方向を決定づけたと思う。

卒業研究では物理化学第一研究室を主宰していた島内武彦教授に師事した。島内先生は Urey-Bradley-Shimanouchi 力場の一般化を目指しており、分子振動及びそれに基づく物性研究の世界的なリーダーであった。卒業研究テーマは遠赤外領域に現れる CO の捻じれ振動よりイソプロピルアルコールの水酸基の内部回転ポテンシャルを決定することであり、当時助手であった原田一誠先生（東北大薬教授、故人）の指導の下に研究を始めた。遠赤外領域はエネルギーが低いので、再現性を確かめるために徹夜実験を繰り返した。チオール類の内部回転ポテンシャルの決定を含めて *J. Mol. Spectrosc.* に報告した。<sup>1)</sup> この研究の過程で、原田先生より研究の進め方ばかりでなく研究者としての心構えを徹底的に叩き込まれた思いがある。修士 2 年になった時に、田隅三生先生（当時助手、東大名誉教授）がヨウ素—デンプン錯体について共鳴ラマンの実験を始めた。ポリビニールアルコールも同様のヨウ素錯体を形成することを知っていたので、早速この系について田隅先生と一緒に共鳴ラマンの実験を始めた。<sup>2)</sup>

北海道大学大学院薬学研究院 (〒060-0812 札幌市北区北 12 西 6)

e-mail: finagaki@pharm.hokudai.ac.jp

本総説は、平成 21 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

レーザーラマン分光計を作っていた川口電機という町工場のラマン分光計を借用して測定を行った。驚くべきことに10倍音に至るラマンバンドのプログレッションが観測された。研究の意外性を体験したことはその後の研究生生活の励みとなった。

博士課程進学に当たり、島内先生より、理学部生物化学科に新たに宮澤辰雄教授が赴任されたこと、田隅先生が助教授として生物化学科に移られることを伺った。当時生物化学教室の教授4名が同時に退官し、後任教授がなかなか決まらず「黄昏東大」といった記事が新聞に出るほどであった。結局、大阪大学蛋白研より宮澤辰雄教授、名古屋大学より岡崎怜治教授が兼任として赴任することとなった。宮澤先生は分子構造討論会で手厳しい質問をすることで有名であったが、直接の面識はなく、近づき難い印象を持っていた。しかし、田隅先生と一緒に生物化学教室で生体分子の構造化学的研究を行うのも悪くはないと思い、1972年4月に博士課程の学生として生物化学科に進学した。

#### 東京大学理学部生物化学科宮澤研究室時代 (1972年-1981年)

発足当時の宮澤研究室には実験台以外には何も無い状態であった。助手として東大理学部化学教室島村研究室で光化学反応を専攻していた中田敏夫さん(バイオジェン・アイデック・ジャパン社長)、東大薬学部坪井研究室で核酸の構造をラマン分光で研究していた高橋征三さん(日本女子大教授)が加わっていた。チミンダイマー生成の光化学反応機構の解明が宮澤研究室の中心テーマとして取り上げられ、高橋さんが鮭の精子よりTpTを精製する、中田さんがTpTを用いて光反応によるチミンダイマー生成の反応機構を明らかにする、稲垣がTpTの溶液構造をNMR法により明らかにするといった役割分担で研究を始めた。これまで、NMRの理論的なことはSlichterの教科書で勉強していたものの、実際にNMRを使ったこともなく、ゼロの状態からNMRを独学した。この経験は以後の研究生生活を送る上でよい経験となった。

NMR装置の導入まで時間があつたこともあり、田隅先生と相談して $\beta$ カロチンの共鳴ラマンの仕事始めた。生物化学教室の隣にある低温センターにアルゴンイオンレーザーを備えたラマン分光計が設置されていたので、これを使って仕事をするこ

とした。 $\beta$ カロチンはアルゴンイオンレーザーの発振線の領域に可視の吸収スペクトルを持つため、共鳴ラマン効果の励起波長依存性(励起プロフィール)を研究するのに適していた。液体窒素温度での共鳴ラマン効果の励起プロフィールは顕著な励起波長依存性を示した。また、お茶の水女子大学の細谷治夫先生の研究室より低温セルを借り受け、液体窒素温度における $\beta$ カロチンの可視吸収スペクトルを測定した。これらの測定結果より、 $\beta$ カロチンの共鳴ラマン散乱の機構を明らかにした。<sup>3)</sup>すべて借り物の装置で行った実験であったが、充実した時間であった。

$\beta$ カロチンの研究と並行してTpTの溶液構造を決定する方法論の検討を進めた。タイミングよく、オックスフォード大学のR. J. P. Williams教授のグループによる常磁性ランタニドイオンをプローブとしたAMPの溶液構造決定の論文がNatureに掲載された。常磁性ランタニドイオンにより誘起される偽コンタクトシフトを利用して溶液構造を決定する方法は、構造化学研究としても魅力的に思えた。当時ランタニド錯体はシフト試薬として有機NMR分野のトピックの1つであり、多くの研究が行われていた。そこで、シフト試薬の研究を精力的に行っていた味の素の甲斐荘正恒博士(都立大教授、現名大特任教授)の勧めで、アゼチジン酸を対象としてランタニドプローブ法の検討を行うことにした。カルボキシレートに配位した常磁性ランタニドイオンによる誘起シフトが構造を反映しているか検討し、ある研究会で報告したが、解釈の不備をシオノギの通和夫博士(故人)より指摘された。10日ほどして通さんより小包が届いた。重要な文献をコピーして送ってくれたものであった。通さんの励ましが嬉しかった。

1973年初めに永久磁石を用いた日立90MHz NMR装置が宮澤研究室に導入され、本格的にNMRの実験を行えるようになった。リジッドな分子である3',5'-cyclic TMPについてランタニドプローブ法を用いて構造を検討した結果、誘起シフトやスピン結合定数を含めて説明できることがわかり、ランタニドプローブ法を用いた溶液構造決定の筋道を立てることができた。<sup>4)</sup> ついで、5'-UMPにランタニドプローブ法を適用し、各コンホマーの存在率を明らかにした。<sup>5)</sup> かなりの計算量を必要とし

たが、解析プログラムはすべて自分でプログラミングした。通さんより水島研の伝統に基づく研究ですねという手紙を頂き、これまでのご厚意に対し恩返しができたと思った。これら一連の研究について、James Feeney 博士 (MRC, London) より依頼を受け、Progress in NMR Spectroscopy にランタニドプローブ法の総説を執筆した。<sup>6)</sup>

1974 年 4 月博士課程を中退して宮澤研究室の助手となった。修士 1 年の田之倉 優君 (東大農学部教授) に加えて中野明彦君 (東大理学部教授, 理研), 東島 勉君 (故人), 横山茂之君 (東大理学部教授, 現理研) が卒研生として参加し、一気に研究室がにぎやかになった。研究室の読書会では Raymond Dwek 博士の NMR in Biochemistry を読んだが、この本は常磁性イオンやスピラベルを用いた生体分子の解析法と研究成果を詳細に記述しており、磁気緩和理論とその生体系への応用をじっくり勉強するにはうってつけであった。しかし、誤植が多く、宮澤先生は丹念にすべての式をチェックされていた。こちらも宮澤先生に負けまいと必死になって輪講の準備をした。当時の輪講やセミナーは宮澤先生との真剣勝負のような緊張感があった。宮澤先生は数式に対して優れた感覚を持っていたので、式の導出等の間違いには大変敏感であった。

1976 年は私にとっていろいろな意味で記念すべき年となった。宮澤先生が文部省に提出していた超電導フーリエ変換 NMR 装置の概算要求が認められ、生物化学教室に Bruker 社製の WH-270 (270 MHz NMR 装置) が導入されることになった。私にとってもこれまで行ってきたランタニドプローブ法の研究をまとめて博士論文として東京大学理学系研究科に提出し、理学博士号が授与された。また、夏にはカナダで開催された「第 7 回生体系の磁気共鳴に関する国際会議 (ICMRBS)」に宮澤先生、田隅先生と一緒に参加し、ランタニドプローブ法による 5'-UMP のコンホメーション解析についてポスター発表を行った。論文で名前を知っている著名な研究者が案外若いのには驚いたし、彼らと直接話ができるのも収穫であった。11 月には WH-270 が生物化学教室に搬入された。Bruker 社の技術者により立ち上げが行われ、無事超電導状態に到達し、水の信号が現れたときにはほっとしたことを覚えている (Fig. 1)。NMR 管理者としてマニュアル類を精

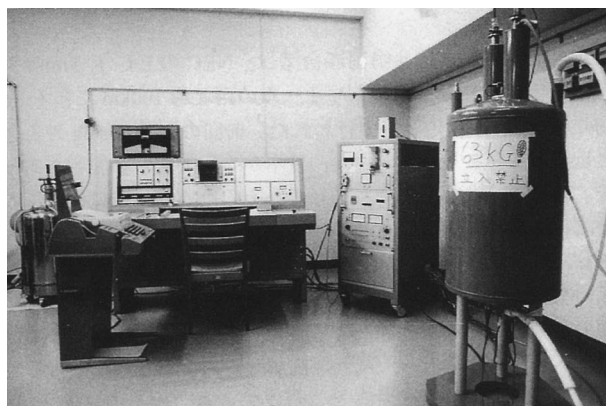


Fig. 1. Bruker WH-270 NMR Spectrometer Installed at the Basement of the Department of Biophysics and Biochemistry of Tokyo University

読し、実験に必要な種々のパルスプログラムの作成や使用マニュアルを整備した。これまで使用していた装置と比べると、S/N を含め性能は格段に向上しており、まさにパルスによりスピンを操作するという実感を持った。

WH-270 が導入されたおかげでタンパク質を対象とした本格的な NMR 研究を始める下地が作られた。しかし、田隅先生が島内先生の後任教授として 1977 年 4 月に化学教室に戻られたため、宮澤研究室の研究体制も変わる事となった。当時 Wüthrich 教授を中心とするスイス連邦工科大学グループが牛膝臓トリブシンインヒビター (BPTI, 分子量 $\sim$ 7 K) を対象として種々の方法論の開発を行うとともに、解剖学的な解析を進め、その素晴らしい成果は毎号のように J. Magn. Reson. に掲載されていた。宮澤研でもこれらの技術を習得し、独自のタンパク質研究を進めることが必要と考え、宮澤先生と相談し、田宮信雄先生 (当時東大理学部教授) より測定依頼を受けていた神経毒タンパク質エラプトキシン (分子量 $\sim$ 7 K) を対象として研究を進めることとした。予想通り、エラプトキシンの NMR スペクトルはメチル基やアミドプロトンのシグナルがよく分離されて観測されており、WH-270 を用いた NMR 研究に適していることは明らかであった。<sup>7)</sup> さらに林恭三先生 (当時京大薬学部助教授, その後岐阜薬大教授) よりの依頼を受け、当時卒研生として配属された遠藤斗志也君 (名大理学部教授) と一緒に台湾コブラやタイコブラの毒腺より採れるコブプロトキシンや $\alpha$ コブラトキシンの NMR 研究を進めた。<sup>8,9)</sup> 蛇

神経毒タンパク質研究は NMR としては大変面白い研究であったが、既に報告されていたエラプトキシンの結晶構造と比較しつつシグナル帰属を進めている点で、方法論的な欠陥は明白であった。のちに Wüthrich 教授のグループが連鎖帰属法を確立することにより、結晶構造に依存することなく NMR シグナルの帰属が可能となった。このことは NMR にとって画期的なことであった。神経毒タンパク質と並行して RNase T1 (分子量~11 K) の酵素反応機構を NMR 法により解明することを目的としたプロジェクトを立ち上げた。RNase T1 については、当時生物化学教室の講師であった高橋健治先生 (東大名誉教授) が一次構造決定を含め膨大な生化学的研究を行っており、NMR の研究対象としてふさわしいと思った。タカジアスターゼより RNase T1 を大量に調製し NMR スペクトルを観測したところ、3 個のヒスチジン残基のシグナルを明瞭に観測できた。これらのシグナルの pH 滴定の挙動より、RNase T1 の活性残基の相対配置をほぼ理解することができた。<sup>10)</sup> RNase T1 の研究は卒研生及び修士課程の学生であった嶋田一夫君 (東大薬教授) と一緒に行った。数年後、阪大薬にいた箱嶋敏雄博士 (奈良先端大学院大学教授) が RNase T1 の結晶構造を解いたことを聞き、嶋田君と一緒に結晶構造を見せてもらいに行ったが、活性残基の配置は私達が考えていた通りであった。

1978 年に藤原鎮男先生 (当時東大理教授) が中心となって第 8 回 ICMRBS が奈良ホテルで開催された。奈良という場所のせいも、海外から多くの NMR 研究者が参加した。Wüthrich 教授のグループからも多くのポスドクが参加しており、彼らとの意見交換は問題点を共有しているだけに有益であった。宮澤研からもエラプトキシン、RNase T1 を含め多くのポスター発表を行った。宮澤研究室の発表は海外からの参加者にとって印象的であつたらしく、Wüthrich 教授もこのような研究は自分の研究室と宮澤研究室でしかできないだろうと話されていたとのことである。帰りの新幹線の車中で、学会発表の成功を祝い宮澤先生と乾杯したことを昨日のこのように思い出す。

博士号取得後は海外留学が当然の時代であった。アメリカよりヨーロッパの文化、特にイギリスの伝統のもとに培われた正統的な学問に触れてみたいと

いう気持ちは強かった。奈良から戻ってしばらくして宮澤先生よりラムゼー奨学生に応募してはどうかというお話があり、応募することとした。ラムゼー奨学制度はロンドン大学の Ramsay (希ガスの発見者として知られる) を記念して作られた世界的にも伝統のある奨学制度であり、わが国からも戦前、戦後を通して 2 年に 1 度イギリス国内の大学に奨学生を送ってきた。当時、イギリスは世界の NMR 研究の中心であった。Rex Richards 教授や R. J. P. Williams 教授が率いる Oxford Enzyme Group は NMR の生化学への応用を目指しており、特に Campbell, Dobson, Williams の常磁性ランタニドイオンを利用したリゾチームの構造研究は NMR の方法論としてもタンパク質研究としても興味深く思われた。そこで、R. J. P. Williams 教授を引き受け手として Ramsay 奨学生に応募した。幸い Ramsay 奨学生に選ばれ、1979 年家族ともども Oxford へ向かった。

#### オックスフォード留学時代 (1979 年-1981 年)

オックスフォードに着いた翌日 R. J. P. Williams 教授 (Bob Williams) を無機化学教室のオフィスに訪ねた。Iain D. Campbell 博士や二次元 NMR の開発を行っていた Ray Freeman 博士との共同研究をアレンジしてくれていた。Bob Williams は当時 50 歳を少し超えたくらいであった。NMR 研究者としての面しか知らなかったが、当代きっての無機化学者であり生物無機化学の創始者であることをしばらくして知った。錯体形成の安定性を知る上で基本的な法則である Irving-Williams 系列の発見は卒業研究で行ったとのことであり、多くのデータの中から基本的な原理を見い出そうとする日本には数少ないタイプの研究者であった。

研究テーマはメチル基の緩和時間の解析からエラプトキシンの運動性を明らかにすることであった。タンパク質の運動性と機能の関連は当時から NMR 研究者の関心の 1 つであった。期待していた 470 MHz NMR 装置は安定性が悪く、ほとんど仕事には使えなかったため、旧式の 270 MHz NMR 装置を用いて緩和時間の測定を行った。また、周波数依存性を測定するために、ドイツの Bruker 本社に 500 MHz NMR の測定に行ったりした。Iain Campbell, Bob Williams と議論をしながら研究を進めたことも懐かしい思い出となっている。<sup>11)</sup> Bob や Iain

とは家族ぐるみのつきあいが始まり、現在も親しくつきあっている。Bob の 80 歳の退任のお祝いには、彼の多くの学生と一緒に参加した。Freeman グループのパーティにも何回か呼ばれた。デルフト大学から来た大学院生と初めて話したのもこのパーティであった。彼の先生がサバチカルで来る予定だったのが急にこれなくなり、代わりにやってきたとのことだったが、今思えば彼のオックスフォード滞在は彼にとっても NMR にとっても運命的なものとなった。Ad Bax の若き日の姿である。Bob の研究室では Geoff Moore 博士（イーストアングリア大学）とは、部屋が隣同士ということもあり、個人的にも親しくつきあった。また、徹夜実験の際には他の研究室の大学院生やポスドクと親しくなることも多く、彼らとの交流は今も私の大切な財産となっている。

#### 東レリサーチ時代（1981 年–1986 年）

オックスフォードより 1981 年 10 月に帰国した。かねてより懇意にしていた東レリサーチセンター額田健吉社長（わが国の初期の NMR 研究者として著名）の要請を受け、NMR グループのリーダーとして 12 月に東レリサーチセンターに移った。東レリサーチセンターは研究受託会社として発足したばかりのときであり、広大な東レ基礎研（鎌倉市手広）の敷地に鎌倉研究部は間借りしていた。日本電子製の 400 MHz NMR 装置 GX400 を導入し、新たに受託事業を始めようとしていた。当時、二次元 NMR がようやく有機化合物の構造解析に応用され始めたときであり、これらの手法を組み合わせることにより天然物の構造は完全に決定することができると確信していた。そこで、二次元 NMR を用いた天然物の構造解析を NMR 事業の目玉の 1 つにすることとし、パルス系列を整備するとともにセスキテルペンの構造解析を始めた。ユズ油成分であるスパチュレノールの完全解析は、二次元 NMR の有用性を示すのに十分であった。<sup>12)</sup> 荒田洋治先生（東大薬教授）の勧めにより化学の領域の NMR 特集号に二次元 NMR の解説を執筆したことも東レリサーチセンターのよい宣伝となった。<sup>13)</sup>

#### 財東京都臨床医学総合研究所時代（1986 年–1999 年）

1985 年夏、財東京都臨床医学総合研究所（臨床研）所長の山川民夫先生より生理活性物質研究部門室長

として移ってこないかとの打診を受けた。臨床研は鈴木紘一先生（東大教授、東レ先端研所長、故人）のグループがカルパインを中心として目覚ましい業績をあげており、私にとってあこがれの研究所でもあり、1986 年 2 月に臨床研に着任した。NMR 法による糖脂質の糖鎖構造の決定が臨床研での最初の仕事であり、鈴木明身生体膜研究部門部長（東海大医教授）と共同でこのプロジェクトを進めた。当時、Vliegthardt 教授（ユトレヒト大学）らが提案した経験則に基づく糖鎖構造の決定が一世を風靡しており、彼らの作った糖鎖の化学シフトデータベースに基づいて構成糖の種類と糖結合位置の同定が行われていた。糖タンパク質糖鎖についてはデータベースの蓄積が進んでいたものの、糖脂質については皆無の状態であり、経験的手法を適用することはできなかった。糖鎖の NMR スペクトルはシグナルの重なりが激しく、シグナルを分離して観測することは困難であった。しかし、比較的良好に分離したアノメリックプロトンからのスピン結合を介した磁化移動を利用すれば、各構成単糖のシグナルを分離できるはずである。タイミングよく、Ad Bax が HOHAHA（Homonuclear Hartman Hahn、現在では TOCSY と呼ばれている）法のパルス系列を発表しており、早速導入したばかりの日本電子製 GX500 の上で HOHAHA の測定を行った。パワーアンプの結線の変更等を行い、実験条件を検討し測定した HOHAHA スペクトルには、アノメリックプロトンからの磁化移動ピークが明瞭に観測されていた（Fig. 2）。これで糖脂質糖鎖の構成単糖のスペクトル上での抽出が可能となった。次は構成単糖間の結合位置の同定である。幸い NOESY スペクトルにはアノメリックプロトンからの NOE が観測されており、これより結合位置が同定できることがわかった。糖脂質糖鎖の構成単糖の同定と結合位置の同定が NMR 情報のみで行えるようになったことにより、糖脂質糖鎖化学構造の決定が非経験的に行えるようになった。<sup>14,15)</sup> 全国の糖脂質研究者の依頼を一手に引き受けて、新規糖脂質糖鎖の構造決定を行った。

糖鎖構造の決定と並行して、NMR によるタンパク質の構造研究を進めた。細胞生物研究部門部長矢原一郎先生、遺伝情報研究部門部長鈴木紘一先生に加えて、私と相前後して、野本明男さん（東大医名

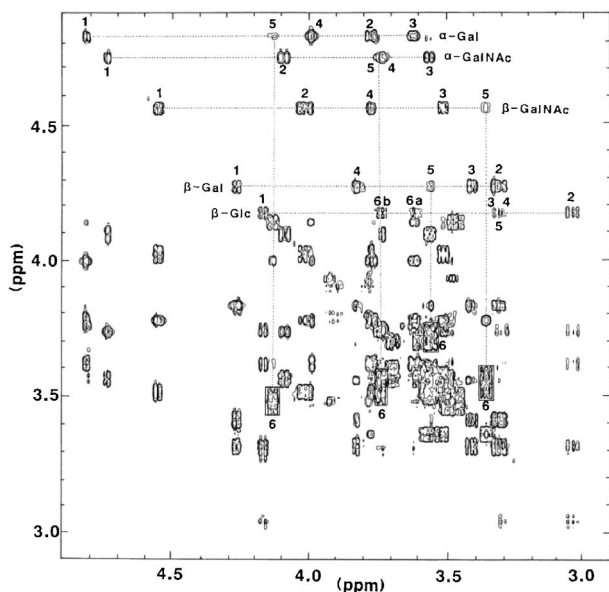


Fig. 2. 2D HOHAHA Spectrum of Forsman Antigen  
Magnetization transfer from anomeric protons is clearly identified.

誉教授), 月田承一郎さん(京大医教授, 故人), 宮坂昌之さん(阪大医教授), 米川博通さん(臨床研副所長)が加わり, 臨床研は糖脂質研究ばかりでなく基礎医学・細胞生物学の研究所としても高い評価を受けるようになっていた. このような環境の中で, 私の研究がより医学, 細胞生物学研究への志向を強めていったのは当然のことであった. Wüthrich 教授のグループより二次元 NMR とディスタンスジェオメトリーを用いたタンパク質の立体構造決定が初めて報告され, NMR が X 線結晶構造解析と並びタンパク質の立体構造を決定する実験手段として注目され始めたときであった. そこで細胞生物学にとってもインパクトの高いマウス上皮成長因子 (EGF, 分子量~7K) の立体構造を二次元 NMR とディスタンスジェオメトリー法により決定することとした. 東京大学理学部宮澤研より神田大輔君(九大生医研教授)が博士課程を修了し生理活性物質研究部門に参加したので, マウス顎下腺より EGF を精製し, 二次元 NMR の測定を行った. 当時の NMR 装置では軽水中のタンパク質の二次元 NMR スペクトルを観測することは困難であったが, 苦労を重ねた結果, 良好な二次元スペクトルを得ることができた. NOE に基づく距離情報より最初はマニュアルで分子模型を作り (Fig. 3), ついで郷 信弘先生(京大教授)と共同でディスタンスジェオメトリーに基づいて EGF の構造を決定した. EGF の NMR 構造

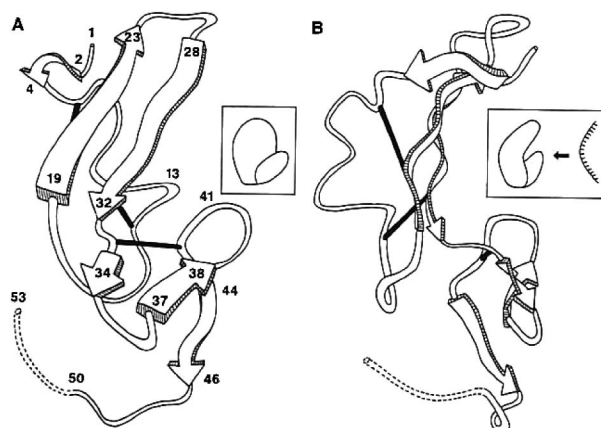


Fig. 3. Manual Model of Mouse EGF  
(A) a front view and (B) a side view.

決定はコーネル大学, オックスフォード大学, 臨床研の3カ所で独立に行われたが, シグナル帰属も含め3者の結果は一致した.<sup>16,17)</sup> NMR による溶液構造決定法が客観的な方法であることを国際的に印象付けた研究となった. EGF 研究は思わぬ方向に進展した. HFSP (Human Frontier Science Program) のグラントにニューヨーク大学 Joseph Schlessinger 教授(エール大学教授), ジェネンティック Axel Ullrich 博士(マックスプランク研究所)と共同申請を行い採択された. 当時, アメリカの東海岸を中心としてシグナル伝達研究が急速に進み出した. SH2, SH3 が発見され, シグナル伝達の分子機構の解明はホットな話題となっていた. Schlessinger 教授はシグナル伝達研究の中心研究者の1人であり, 彼を通してアメリカでの研究動向を含め最新の情報を得ることができたことは最大の収穫であった. そこで, SH3 の構造研究を進めることとし, 神田君が PLC $\gamma$  の SH3 の構造を決定した.<sup>18)</sup> ついで, 第一製薬から研究生として生理活性物質研究部門に参加した寺沢宏明君(熊大薬教授)が Grb2 の SH3 と Sos のプロリンに富むペプチドとの複合体の構造を決定した (Fig. 4).<sup>19)</sup> SH3 がプロリンに富むペプチドを認識することは知られていたが, この研究により認識機構を詳細に解明することができた. その後, SH3, SH2 を始め, シグナル伝達モジュールの構造とターゲット認識が私の研究テーマの1つとなった.

構造計算プログラムの整備は東大理学部植物学教室から博士課程1年の学生として参加した畠中秀樹君(ライフサイエンス統合データベースセンター特

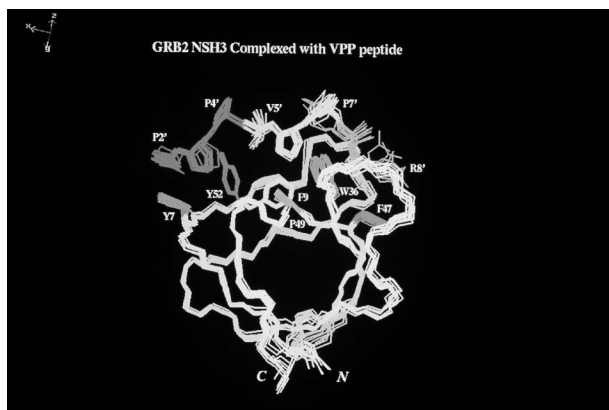


Fig. 4. Structure of Grb2 N-terminal Domain Complexed with the Proline Rich Peptide from Sos

任准教授)が行った。畠中君はプログラム能力に秀でており、構造計算のプロトコールを作成した。NOE 情報の一貫性のチェックをプログラムに取り込み、収束のよいエラプトキシンの NMR 構造を得ることができた。<sup>20)</sup> 発展させていけば、標準的な構造計算プログラムになったのではと悔やまれる。

80年代後半より安定同位体利用が NMR 研究者の注目を集めた。安定同位体利用では先駆的な研究を行っていた甲斐荘さんが主査となり、科学技術庁振興調整費で安定同位体利用の研究班が組織された。甲斐荘さんのグループで <sup>15</sup>N ラベルしたアミノ酸を取り込ませたタンパク質を調製し、臨床研で HMQC スペクトルを測定した。日本電子製の GX500 NMR 装置ではあったが、研究員の楯真一君(広大理教授)と測定条件をチューンアップし、当時としては素晴らしいスペクトルをとることができた。90年代になって安定同位体利用 NMR 技術に大きなブレークスルーが起きた。NIH の Ad Bax のグループによる <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N 同位体ラベルタンパク質を用いた 3 核 3 次元 NMR 法の開発である。3 核 3 次元 NMR を含む多次元 NMR 法の開発により、安定同位体利用技術は一挙に普及化し、NMR による構造決定の分子量の壁も 2 万までに引き上げられた。同時に NMR 装置についても非常に厳しい性能が要求されるようになった。当時は NMR の調査も兼ね、アシロマーで開催された Experimental NMR Conference (ENC) に度々参加した。NMR より一時撤退していた Varian が長い間の沈黙を破り、素晴らしいコンセプトを持った NMR 分光計 UNITY を発表し、その性能の素晴らしさに驚いた。シグナ

ル伝達の構造生物学の分野は世界競争が激しく、もはや旧式の NMR 装置では立ち行けないことは明らかであり、帰国早々 Varian の日本支社と連絡を取り、UNITY500 を導入し、多次元 NMR の測定をルーチンに行えるようにした。多次元 NMR の開発時期に蚊帳の外に置かれていたことは今も残念に思っている。

1996 年は記念すべき年となった。ICMRBS でこれまで行ってきた SH2, SH3 を中心としたシグナル伝達の構造生物学について基調講演を依頼された。研究室全員で参加し、コロラド川でラフティングを楽しむ等思い出深い旅行となった。もう 1 つは第 11 回臨床研国際カンファレンスを東京白金の都ホテルで開催したことである。構造生物学といった言葉がわが国でも定着しかけていたときでもあり、NMR と X 線結晶構造解析の研究者を集めて構造生物学を主題とした国際会議を開きたいと思い、タンパク質工学研究所の森川耿右博士(阪大蛋白研教授)に X 線結晶学分野の第一線の研究者を紹介してもらった。私の関心は NMR と X 線結晶構造解析を相補的に使い、いかにして機能構造を知ることができるかといった点であり、この点は今も変わっていない。基調講演者として Wüthrich 教授(スイス連邦工科大学, スクリプス研究所)と Huber 博士(マックスプランク研究所)を選んだ。Wüthrich 教授が NMR により初めてタンパク質の構造を決定したとき、NMR によりタンパク質の構造決定ができる事実を受け入れる研究者は少なかったとのことである。Huber 博士は Wüthrich 教授にテングミスタットというアミラーゼインヒビターの構造決定を NMR と X 線結晶構造解析により独立に行い、back-to-back で同じ雑誌に投稿することを提案した。その結果は 1986 年 J. Mol. Biol. に発表されたが、細部を含めて驚くほど一致しており、NMR 法が X 線結晶構造解析と並びタンパク質構造決定の方法として広く認知されるきっかけを作った。Wüthrich 教授、Huber 博士に加えて海外からの講演者としては NMR では旧知の Iain Campbell (オックスフォード大)、Chris Dobson (オックスフォード大)、Ad Bax (NIH)、Gerhard Wagner (ハーバード大)、Stephen Fesik (アボット)、Angela Gronenborn (NIH)、Peter Wright (スクリプス研究所)及び伊倉さん(トロント大)、結晶では

Wayne Hendrikson (コロンビア大), John Kuriyan (ロックフェラー大), David Stuart (オックスフォード大), John Walker (MRC) を招待した。国内からも荒田先生, 京極先生 (阪大名誉教授, 故人), 甲斐荘さん, 森川さん, 西村さん (横市大教授), 月原さん (阪大名誉教授), 横山さんも加わり大変華やかな雰囲気の中でカンファレンスは行われた。400名を超える参加者があり, わが国の構造生物学の立ち上げの決起集会という感を抱いた。当時, 海外でも X 線と NMR の研究者と一緒に集まる機会はなかったようで, 海外の研究者からも臨床研国際カンファレンスは高い評価を受けた (Fig. 5)。

1997年, 戦略的基礎研究推進事業 (CREST) 「生命活動のプログラム」に応募し, 採択された。研究課題は「構造生物学に基づくシグナル伝達系の解明とその制御」である。シグナル伝達タンパク質の機能ドメインによる標的認識を明らかにするとともにマルチドメインより構成されるシグナル伝達タンパク質の機能を構造生物学的に明らかにすることを目的とした。バキュロウィルスを用いたタンパク質発現系やタンパク質のドメイン化の検討等これまでできなかった研究も立ち上げることもできた。翌年には特定領域研究「多元的情報伝達」が採択され, 領域代表として, 阿久津秀雄博士 (阪大名誉教授)

第11回 臨床研国際カンファレンス

構造生物学の最前線

A. Bax (USA)  
 I.D. Campbell (UK)  
 C.M. Dobson (UK)  
 S. Frenk (USA)  
 A. Gronenborn (USA)  
 W.A. Hendrikson (USA)  
 R. Huber (Germany)  
 M. Ikura (Canada)  
 J. Kuriyan (USA)  
 D. Stuart (UK)  
 G. Wagner (USA)  
 J. Walker (UK)  
 P.E. Wright (USA)  
 K. Wuthrich (Switzerland)

荒田 洋治 (臨床研)  
 京極 正彦 (阪大)  
 京極 村正 (阪大)  
 森川 彰 (生物化学)  
 西村 義文 (阪大)  
 月原 富武 (阪大)  
 横山 茂之 (阪大)  
 細田 冬彦 (臨床研)

日時: 平成8年11月5日(火)~7日(木)  
 会場: 都ホテル東京 (東京都港区白金台 1-1-50)  
 参加費: 5,150円 (要予約)

問い合わせ先/財団法人 東京都臨床医学総合研究所  
 〒113 東京都豊島区池袋 3-19-22 TEL:03-3823-2101(内) FAX:03-3823-2965  
 E-mail: inagak@rinshoken.or.jp  
 WWW: http://www.rinshoken.or.jp/rinshoken/IC11/cond.html  
 東京都立総合研究センター 臨床研 (内線 5261) または, 管理課 (内線 5127)

主催/財団法人 東京都臨床医学総合研究所

THE ELEVENTH RINSHOKEN INTERNATIONAL CONFERENCE  
 Frontiers of Structural Biology

Fig. 5. Poster of the 11th Rinshoken International Conference "Frontiers of Structural Biology"

や白川昌宏博士 (京大工教授) と構造生物学と細胞生物学研究者との新しい共同研究の枠組みを模索した。班員には NMR, X 線研究者と並んで多くの細胞生物学研究者が加わり, お互いの領域間の垣根も徐々に低くなっていった。当時としては新しい試みであった。

私にとって臨床研の 14 年間の研究生活は実り多いものであった。在任中の所長であった山川民夫先生, 永井克孝先生, 宇井理生先生は医学とは縁の遠い NMR 研究を応援して下さいました。現在の構造生物学を支える研究者が臨床研から育っていったのもご支援の賜物と感謝している (Fig. 6)。また, 素晴らしい仲間と知り合い, 互いに切磋琢磨し合った経験もよい思い出となっている。

#### 北海道大学薬学部時代 (1999年-2010年)

1999年4月より北海道大学大学院薬学研究科ゲノム機能学講座・構造生物学分野の教授として赴任した。CRESTの研究費の中から引越し代を出せたのもありがたかった。赴任を機会に, かねてからの念願であった X 線結晶構造解析をグループ内に立ち上げた。野田展生博士 (北大薬講師) が中心となって X 線結晶構造解析を進めた。これにより NMR, X 線回折の双方を用いた研究を行うことが可能となり, 研究の幅が広がった。個々のタンパク質の構造研究ではなくシステムとして構造生物学を展開したいと思い, 新たな研究課題として自然免疫を設定した。第一はインターフェロン産生に係わる



Fig. 6. Members of Molecular Physiology at Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science in 1990

Prof. J. M. Lancelin (Lyon University), Prof. Daisuke Kohda (Kyushu University), Prof. Shinichi Tate (Hiroshima University), Prof. Fuyuhiko Inagaki (Hokkaido University), Prof. Ichio Shimada (Tokyo University) and Assoc. Prof. Masafumi Odaka (Tokyo University of Agriculture and Technology) from right to left.



転写因子 IRF-3 の活性化機構の構造生物学的解明である。IRF-3 の転写活性化ドメインの構造を X 線結晶構造解析により明らかにし、インターフェロン産生遺伝子転写活性化の機構を議論した。<sup>21)</sup> この研究は臨床研時代からの友人である藤田尚志博士 (京大ウィルス研教授) との共同研究であり、その後、IRF-3 の上流に位置する細胞質内の RNA レセプターである RIG-I へと展開している。<sup>22)</sup> また、瀬谷 司教授が北大医学部へ赴任されたのを機会に、TLR3, TLR4 下流のシグナル伝達、特にインターフェロン産生に係わるアダプタータンパク質 TRIF/TICAM-1, TRAM/TICAM-2 の TIR ドメインの構造解析と TIR ドメインを介するシグナル伝達機構の解明を進めた。第二は好中球活性酸素発生系の構造生物学である。この研究についてはかねてより、九大生体防御医学研究所住本英樹教授と研究連絡を続けていたが、北大赴任を機会に本格的にこのテーマを始めることにした。好中球は血液中に侵入した細菌を貪食し、ファゴソーム膜上の NADPH 酸化酵素が発生した活性酸素により殺菌する。文字通り、細菌感染の第一線を担っている血球細胞である。しかし、活性酸素は生体にとって危険なため、その発生は厳重に制御されている必要がある。活性酸素発生系の本体は膜タンパク質であるフラボシトクローム b558 である。通常は活性酸素の発生は抑制されているが、細菌が貪食されると、膜タンパク質は細胞質因子 p47, p67, p40 及び Rac と相互作用することにより活性化される。細胞質因子は典型的なマルチドメインタンパク質であり、各ドメインの機能については住本先生のグループにより徹底的な機能研究が行われていたこともあり、構造生物学研究は喫緊の研究課題となっていた。活性化の過程で重要なことは p47 が閉構造より開構造に変わり、フラボシトクローム b558 の細胞質ドメインのプロリンに富む領域と相互作用することであり、SH3 ドメインが制御に係わっているよい例と思った。閉構造、開構造に対応する構造を明らかにしたが、結果は思いがけないものであった。活性化に伴いタンデム SH3 ドメインは閉構造から開構造へと大きな構造変化が誘起されるが、いずれもプロリンに富む領域が p47 の 2 つの SH3 ドメインにはさまれて認識されていた。<sup>23,24)</sup> SH3 ドメインのターゲット認識は既に研究としては終わったものと受け取られてい

るが、認識ばかりでなく制御にも SH3 が関与することを示すよい例となった。また、好中球活性酸素発生系のタンパク質に含まれる新規ドメインとして PB1 ドメインの構造解析も進めた。PB1 ドメインはタンパク質相互作用を担うドメインであり、極性発現に重要な役割を果たしている。最近では、オリゴマー化を促進するドメインとして変性タンパク質の凝集にも働いていることが明らかにされている。PB1 ドメインの構造決定を行うとともに特異的な相互作用機構を明らかにした。PB1 ドメインは住本先生のグループで発見された新規ドメインであり、機能解析から構造解析まで、わが国が中心となって研究を進めた数少ないドメインの 1 つである。<sup>25,26)</sup>

2001 年の秋、思いがけない連絡が入った。文部科学省より北大に 800 MHz NMR を備えた NMR 施設を造れとのことであった。当時、構造ゲノムプロジェクトが日、米、欧の三極で計画された。タンパク質のフォールドはせいぜい 10000 程度であり、これらのフォールドの構造を三極で決定することが提案された。いわゆるタンパク 3000 プロジェクトである。このプログラムの一環として北大に NMR 施設を整備することとなった。当初は薬学部隣に隣接して NMR 施設を造ることを計画したが、次世代ポストゲノム研究棟が北キャンパスに建設されることになり、これに付属させて NMR 棟を造った。800 MHz NMR を 2 台備えた関東以北最大の NMR 施設が 2003 年 3 月に完成し、薬学部から北キャンパスへと研究室を移した (Fig. 7)。

タンパク 3000 プロジェクトが 2002 年から始まった。理研が網羅的構造解析を行い、5 年間で 2500 個のタンパク質、8 つの大学側拠点で個別的構造解析を行い、500 個のタンパク質の構造決定を行うことがプロジェクトの目的であった。大学側拠点の 1 つとして「細胞内シグナル伝達」グループを組織し、10 のサブ機関と協力し、システムとしての構造生物学を目指してプロジェクトを推進した。基生研の大隅良典教授 (東工大特任教授) と新たにオートファジーの構造生物学を立ち上げた。大隅先生とは 1994 年の高遠シンポジウムで初めてお会いした。飢餓に反応して酵母にオートファジーが誘導され、細胞質成分が二重膜よりなるオートファゴソームにより取り囲まれ、ついで液胞内に内膜成分を放出し

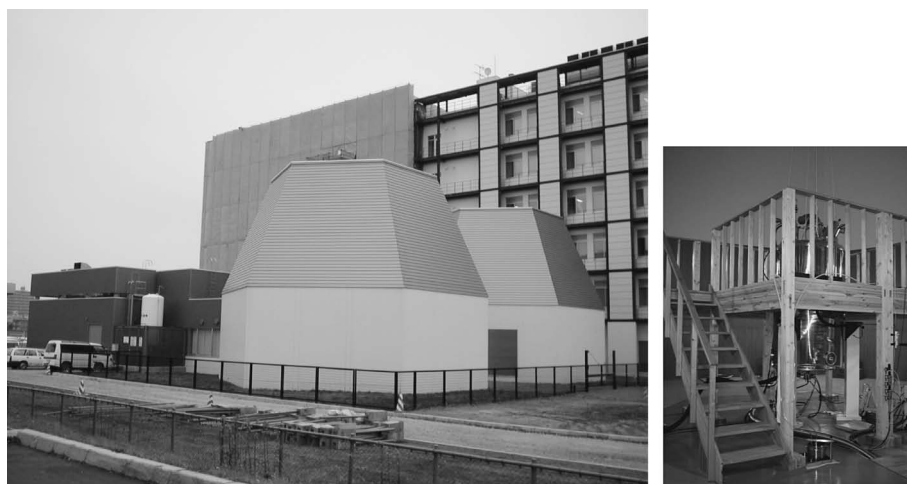


Fig. 7. NMR Facility in the Northern Campus of Hokkaido University  
Two 800 MHz NMR spectrometers are installed at the NMR facility.

ている興味深い電顕写真を示された。面白い現象だなと気にかかっていたが、北大赴任後しばらくして大隅先生が訪ねて来られた。Atg8の構造研究についての相談であったが、大隅グループによりオートファジー関連タンパク質が次々と同定されていたこともあり、オートファジー関連タンパク質の網羅的構造解析を行うこととした。「タンパク3000」引き続いて「ターゲットタンパク」においてオートファジーの構造生物学研究を進めている。<sup>27)</sup>最近ではオートファジーは飢餓応答だけではなく、恒常的に低レベルで行われており、医学的に重要な役割を果たしていることが報告され、オートファジーはにわかには注目を集める領域となった。自然免疫との関連も示唆されており、オートファジーと自然免疫研究をいかに融合して研究を展開していくか、今後の楽しみとなっている。

Crkはロックフェラー大学の花房三郎先生のグループにより発見された最初のアダプタータンパク質であり、Crk IIはSH2-SH3-SH3、Crk IはSH2-SH3のドメイン構造を持つ。Crk Iは高いがん化能を持つのに対し、Crk IIは正常細胞に必須であり、生理的機能の差異は長い間謎であった。北大医病理の田中伸哉教授とCrkについて共同研究を進め、Crk I、Crk IIの機能の差異を構造に基づいて明らかにした。<sup>28)</sup>この仕事は*Nat. Struct. Mol. Biol.*に掲載され、表紙を飾った。花房先生(大阪バイオ所長、故人)もこの結果を大変喜ばれたと田中伸哉教授より伺った。

NMRに必要な技術開発も並行して進めた。セルフリー発現系はNMR試料の同位体ラベルを行うために必須である。私達も独自にセルフリー発現系を検討し、効率のよい発現系を立ち上げることができた。Grb2 SH2の阻害剤は乳がん等に有効な薬剤となることが期待され注目されているが、重水素化タンパク質を調製し、高親和性阻害剤のシグナル帰属を行い、結合様式を詳細に決定した。<sup>29)</sup>これらの技術はNMRを用いた薬剤探索に有効な手法となることが期待される。

NMR解析プラットフォームOliviaの開発を行った。Oliviaを使うことによりシグナル帰属や構造解析が効率的に行えるようになった。甲斐荘さんのグループで調製したSAILカルモジュリンの構造をOliviaを用いて解析したところ、スペクトル解析から始めて2-3日で収束のよい構造を得た。SAILタンパク質とOliviaの組み合わせは効率のよいタンパク質構造解析を可能とした。Oliviaの国際的認知度も最近ではかなり上がり、多くの研究者がダウンロードして使用している。

最近、私が学生時代に行っていた常磁性ランタニドプローブ法を再開した。金属結合タンパク質については多くの適用例が報告されているが、非金属結合タンパク質について常磁性ランタニドプローブ法の適用は少ない。そこでランタニド結合タグをタンパク質に固定することにより非金属結合タンパク質の場合でも常磁性ランタニドプローブ法を適用できるようにした。低分子の場合には、常磁性イオンの

磁化率テンソルは見掛け上軸対称性を持つことが知られているが、これは対象軸周りの運動性により磁化率テンソルの異方性が平均化され、見掛け上の軸対称性が成立するためとわかった。これで学生時代からの懸案に、一区切りをつけた。<sup>30)</sup> 今後、常磁性ランタニドプローブ法を長距離情報の取得やリガンドスクリーニング等新しい課題に展開することを楽しみにしている。

最近、東レリサーチセンター時代より旧知の間柄であった内海 潤博士（当時東レ基礎研）が北大知財の教授として赴任してきた。内海さんは特許アドバイザーとして「タンパク 3000」にも参加してもらったこともある。内海さんと一緒に質量分析を用いたアルツハイマー等の神経変性疾患のプロテオミクス研究をさっぽろバイオクラスター“Bio-S”で立ち上げた。この研究は私にとって臨床研究との連携や産学連携という未知の領域での研究であったが、質量分析の専門家である藤井清永博士が国立がんセンターより特任准教授として参加し、東海林幹夫先生（弘前大医教授）、佐々木秀直先生（北大医教授）、三菱メディエンス、シミックス、アトーと共同研究の枠組みを作った。また、北大第二外科近藤 哲教授研究室と共同で胆管ガンのプロテオミクス研究を行った。

北大在任時、3つの学会を主催した。まず、2003年に第3回タンパク質科学学会年会を札幌コンベンションセンターで開催した。前年に Wüthrich 教授と島津製作所の田中耕一博士がノーベル化学賞を受賞したので、2人を基調講演者として招待した（Fig. 8）。その際、Wüthrich 教授が私達の NMR 施設を訪れた（Fig. 9）。プロテオミクス研究への期待もあり、1000人近い参加者があった。2006年には第2回札幌国際カンファレンスを開催し、私の旧知の NMR 研究者を札幌に招待した。また、2007年には NMR 討論会を主催した。

#### 今後のこと

退任後もしくは北キャンパス次世代ポストゲノム研究センターで過ごし、残された仕事をやり遂げたいと思っている。1つは、これまで行ってきたシグナル伝達、自然免疫、オートファジー研究を統合的な視点から自分なりにまとめてみることである。もう1つは、タンパク 3000 プロジェクトを機会に次世代ポストゲノム研究センターに蓄積された

Fig. 8. Poster of the 3rd Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan



Fig. 9. Group Photo of Inagaki's Laboratory at the NMR Facility of Hokkaido University with Prof. K. Wüthrich  
On the occasion of the 3rd Annual Meeting of the Protein Science Society of Japan.

800 MHz NMR を始めとする装置や専門的技術を全学の医学生物学研究に活用することである。北大のみならず、北日本の構造生物学研究のセンターとして、研究者の交流の場とすることも含めて検討したいと思っている。

#### REFERENCES

- 1) Inagaki F., Harada I., Shimanouchi T., *J. Mol. Spectrosc.*, **46**, 381–396 (1973).

- 2) Inagaki F., Harada I., Shimanouchi T., Tasumi M., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **45**, 3384–3388 (1972).
- 3) Inagaki F., Tasumi M., Miyazawa T., *J. Mol. Spectrosc.*, **50**, 286–303 (1974).
- 4) Inagaki F., Takahashi S., Tasumi M., Miyazawa T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **49**, 611–616 (1976).
- 5) Inagaki F., Tasumi M., Miyazawa T., *Biopolymers*, **17**, 267–289 (1978).
- 6) Inagaki F., Miyazawa T., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, **14**, 67–111 (1981).
- 7) Inagaki F., Miyazawa T., Hori H., Tamiya N., *Eur. J. Biochem.*, **89**, 433–442 (1978).
- 8) Endo T., Inagaki F., Hayashi K., Miyazawa T., *Eur. J. Biochem.*, **102**, 417–430 (1979).
- 9) Hider R. C., Drake A. F., Inagaki F., Williams R. J. P., Endo T., Miyazawa T., *J. Mol. Biol.*, **158**, 275–291 (1982).
- 10) Inagaki F., Kawano Y., Shimada I., Takahashi K., Miyazawa T., *J. Biochem.* (Tokyo), **89**, 1185–1195 (1981).
- 11) Inagaki F., *J. Toxicol. Toxin Rev.*, **5**, 105–123 (1986).
- 12) Inagaki F., Abe A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1773–1778 (1985).
- 13) Inagaki F., *Kagakuno Ryouiki*, **141**, 1–32 (1983).
- 14) Inagaki F., Kohda D., Kodama C., Suzuki A., *FEBS Lett.*, **212**, 91–97 (1987).
- 15) Inagaki F., *Magn. Reson. Chem.*, **30**, 125–133 (1992).
- 16) Kohda D., Go N., Hayashi K., Inagaki F., *J. Biochem.* (Tokyo), **103**, 741–743 (1988).
- 17) Kohda D., Shimada I., Miyake T., Fuwa T., Inagaki F., *Biochemistry*, **28**, 953–958 (1989).
- 18) Kohda D., Hatanaka H., Odaka M., Mandiyan V., Ullrich A., Schlessinger J., Inagaki F., *Cell*, **72**, 953–960 (1993).
- 19) Terasawa H., Kohda D., Hatanaka H., Tsuchiya S., Ogura K., Nagata K., Ishii S., Mandiyan V., Ullrich A., Schlessinger J., Inagaki F., *Nat. Struct. Biol.*, **1**, 891–897 (1994).
- 20) Hatanaka H., Oka M., Kohda D., Tate S., Suda A., Tamiya N., Inagaki F., *J. Mol. Biol.*, **240**, 155–166 (1994).
- 21) Takahasi K., Suzuki N. N., Horiuchi M., Mori M., Suhara W., Okabe Y., Fukuhara Y., Terasawa H., Akira S., Fujita T., Inagaki F., *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 922–927 (2003).
- 22) Takahasi K., Yoneyama M., Nishihori T., Hirai R., Kumeta H., Narita R., Gale M. Jr., Inagaki F., Fujita T., *Mol. Cell*, **29**, 428–440 (2008).
- 23) Yuzawa S., Suzuki N. N., Fujioka Y., Ogura K., Kamikubo H., Kataoka M., Sumimoto H., Inagaki F., *Genes Cells*, **9**, 443–456 (2004).
- 24) Ogura K., Nobuhisa I., Yuzawa S., Takeya R., Torikai S., Saikawa K., Sumimoto H., Inagaki F., *J. Biol. Chem.*, **281**, 3660–3668 (2006).
- 25) Terasawa H., Noda Y., Ito T., Hatanaka H., Ichikawa S., Ogura K., Sumimoto H., Inagaki F., *EMBO J.*, **20**, 3947–3956 (2001).
- 26) Yoshinaga S., Kohjima M., Ogura K., Yokochi M., Takeya R., Ito T., Sumimoto H., Inagaki F., *EMBO J.*, **22**, 4888–4897 (2003).
- 27) Noda N. N., Ohsumi Y., Inagaki F., *Chem Rev.*, **109**, 1587–1598 (2009).
- 28) Kobashigawa Y., Sakai M., Naito N., Yokochi M., Kumeta H., Makino Y., Ogura K., Tanaka S., Inagaki F., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 503–510 (2007).
- 29) Ogura K., Shiga T., Yokochi M., Yuzawa S., Burke T. R. Jr., Inagaki F., *J. Biomol. NMR*, **42**, 197–207 (2008).
- 30) Saio T., Ogura K., Yokochi M., Kobashigawa Y., Inagaki F., *J. Biomol. NMR*, **44**, 157–166 (2009).