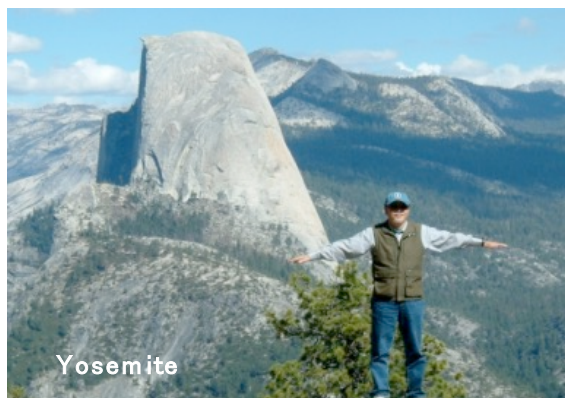


遊び心の研究人生

—興味のとくままに—



室岡義勝

生い立ち

僕が生まれたのは、1942年1月7日。その1年前の1941年12月7日(米国時間)が真珠湾攻撃の日である。それから28年後、当時勤務していた米国NIH研究所の研究室に朝出勤した途端、「Happy Birthday」の洗礼を受けた。その日は、12月7日であった。「僕の誕生日は来月の1月7日、今日は真珠湾攻撃記念日だ」といった勘違いで、Pearl Harbor Memorial Dayを研究室仲間と準備してくれたバースデーケーキで祝う羽目になった。僕は、広島県加茂郡西条町大字土与丸に生まれた。家は、旧山陽道の道沿いにあり、向かいには賀茂鶴の酒蔵があった。僕の家は、牛万長者の末裔と言われてきて、土与丸一番地に大きな屋敷(古い写真を基にスケッチ)が、^{むろやでん}室屋田という田んぼに囲まれて建っていたが、僕が生まれる前に、屋敷を売り払い、今のところに新しい家建てていた。屋号は、室屋といわれ、かつては麴蔵があったらしい。小学校5年生になった時、広島市に移住した。西条の家屋敷、田畑全てを売り払い、父は材木会社を広島市で始めたのだった。原爆投下7年後の復興需要をあてこんでのことだったのだろう。父は新しがり屋で、戦前西条の駅前に加茂郡で始めてタクシーやバス会社を起こしたが、木炭車からの切り替えを期に止めてしまった。肥料も商って満州に肥料を買い付けに行き船が沈んで(多分だまされた)大損をして資産を減



らしていった。母の実家は志和にあり、屋号は「たたら」で、たたら製鉄の炭焼きの広大な山林を持っていたが、こちらでも衰退してしまっ

た。広島に移って、舟入小学校から中高一環校の修道学園に進学した。修道高校では、化学班に属していたので、大学は早稲田の理工学部か北大に行きたいと思っていたが、父親の

会社がその後の材木関連業者の乱立で思わしくなく、経済的に困窮してきたので、地元広島大学の工学部醗酵工学科に行くことにした。学友と、「醗酵工学科では化学も生物も学べる」という話をしたのがきっかけである。その時は、かつて先祖が麴を扱っていたとは知らなかったし、バイオテク

ノロジーの本流になるとも想像しなかった。

僕の学生時代は、ワンダーフォーゲルの部活漬けで、1年次の飯豊山一朝日岳縦走に始まり、2年次の屋久島、3年次の八幡平-岩手山などの夏合宿の他に、冬のスキー合宿、春合宿、秋合宿などワンゲル仲間と日本の山を渡り歩いていた。



遊び心の研究人生 —興味を越くままに—

- グリーンケミストリー (阪大)
- 分子遺伝制御機構 (NIH, 広大, 阪大)
- 遺伝子操作系の開発 (NIH, 広大, 阪大)
- 酵素の多角利用と機能改変 (広大, 阪大)
- バイオレメディエーション (阪大)
- 食品微生物研究 (阪大)
- 共生工学の創生 (阪大)
- 伝統発酵食品の科学 (阪大, 広工大)



3年次に、醗酵工学会と農芸化学会の学生会員になった。送られてくる学会誌の論文の多くが東大、京大、阪大や国公立研究所の方々のものだったので、阪大の大学院を目指すことにした。卒論は、ワックスマン博士の研究室から帰国されたばかりの能美良作先生のもとで、ストレプトマイシンの研究を行った。その前年に、広島大学工学部に新制大学として戦後始めて大学院設置が認められて、同級生の5人が広大の大学院に進学した。

当時工学部長であった佐藤静一教授から「やっと大学院を作ったのに君は他の大学に行くのか」と言われた。夜行列車に乗って文部省に日参された苦勞は今だからよく分かる。

先駆け グリーンケミストリー研究

- 石油化学製品の微生物変換 (エタノールアミンからグリシン生産、酢酸からグルタミン酸生産)
 - エーテル結合新規アミノ酸の発見アルコールからO-アルキルホモセリン)
 - セルロースからアルコール生産
 - コレステロール
 - ALA・ビタミンB₁₂
- 農芸化学(原田研)と発酵工学(原井研)の土壤で育つ



大学院時代

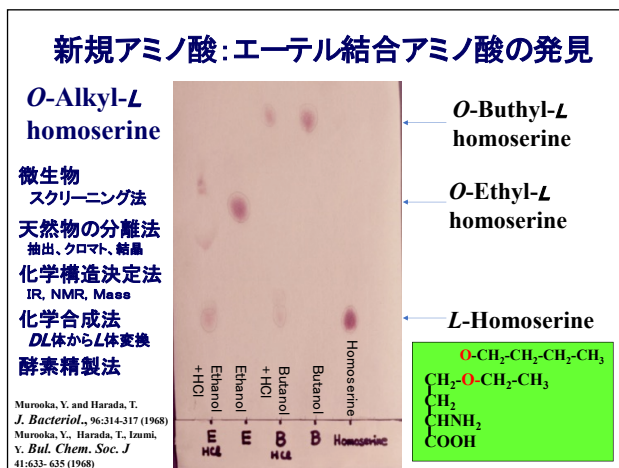
その後の50年間の雑多な研究をあえてまとめると、このような分類になるかと思う。興味の赴くままに研究を進めてきたので、ライフワークの決定が遅すぎた。

阪大大学院では、当時は石油化学工業全盛時代だったので、石油化学製品の微生物変換という、今で言うグリーンケミストリーの先駆的研究を行った。エタノールアミンで生育する菌を分離して、エタノールアミンからグリシンを作った。これ

を醗酵工学会誌に発表したのが僕の最初の論文となった。最初に所属した阪大産業科学研究所の二国二郎教授は、東大農芸化学の鈴木梅太郎先生の助手をされていた方で、デンプン化学の

大家だった。指導を受けた原田篤也先生は坂口謹一郎先生の研究室出身で、僕は醗酵工学専攻の照井堯造先生のゼミにも所属していたので、農芸化学と醗酵工学の薫陶を受けた。照井ゼミの雑誌会や輪読では、創明期の分子生物学の熱気に触れ高揚感でわくわくした。

研究では、アルコール利用細菌にエタノールを加えると、ニンヒドリン反応で未知物質が現われた。ブタノールを入れるとさ



らに違う位置にもスポットが現われた。6N塩酸で加水分解すると、ホモセリンが検出された。そこでこの物質を大量培養して、抽出し、精製した後、当時は阪大産研にもなかったマススペクトルとNMR分析を武田薬品工業の研究所に頼み、そのチャートを読んで、構造を決定した。赤外分光分析から酸素結合があることが分かり、エーテル結合を持った新規アミノ酸であることを突き止めた。エタノールから O-Ethylhomoserine をブタノールから O-Buthylhomoserine といった具合に、メタノール、プロパノールを含め、五種類の O-Alkylhomoserine を発見した。

さらに構造を確認するため、タンパク質研究所の泉美春教授にアミノ酸の化学合成の教えを請うた。合成したラセミ体の DL-から酵素法によって L-体に分離する技術は、泉研究室だからできたことだった。こうした研究によって多くの研究技術、有用菌株の分離と分類、天然物の分離法、化学構造決定法などを学び研究に自信がついた。この研究によって論文博士となり、助手に採用された。

初期分子生物学の隆盛期 分子遺伝制御機構研究

- rRNAの定量法の開発^(NIH)
- rRNAの試験管内合成に成功^(IH)
- RNA合成促進因子の発見^(NIH)
- 緊縮制御機構 ppGpp^(NIH)
- サルフェートレギュロン解明^(阪大)
- モノアミンレギュロン発見^(阪大、阪大)
- 共生情報伝達機構^(阪大)

ベトナム反戦運動の真っただ中
1970~1972 米国NIH
(米国立保健研究所)

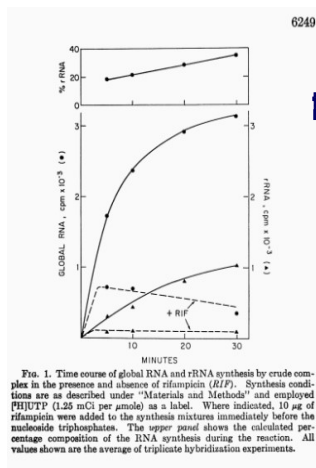


その頃、70年安保闘争と大学紛争でいささか活躍したので、頭を冷やしてこいとアメリカ留学を勧められた。安保闘争やベトナム戦争を通して悪の根源と思っていた敵国米国は、僕にとって新天地の素晴らしい国だった。米国国立保健研究所のNIHは、ワシントンDC郊外にあったから、週末はベトナム戦争反対デモに毎週ワシントンDCに通い、ヒッピーを交えた数十万人をこえるデモ

隊とともに、ジョンソン大統領を引きずり下ろし、2年後にニクソン大統領による戦争終結へと導いた。

一方で、研究は面白く、本格的な分子生物学をNIHで学んだ。2年間でラボの仲間が一目置いてくれる成果を出した。まず、リボゾーマル RNA (rRNA) 定量法を開発し、試験管内で全RNAの

30%以上のrRNAを合成する系の作成にはじめて成功した。この系を使って、マジックスポットと呼ばれていた ppGpp がRNA合成を抑制することを証明した。尤も、アイデアや技術はすべてボスのロバート・ラザリニ博士が指示してくれたものである。この *In vitro* での rRNA 合成系開発中に、新しい転写促進因子を発見し、Y1, YII と名付けた。この2つの因子を入れることにより、RNA合成が飛躍的に高まった。



リボゾーマルRNAの 試験管内合成に成功

In vitro rRNA 合成系の開発

Enzyme系	rRNA/RNA (%)
RNA polymerase	2.8
DNA-RNA complex	30.7

ppGppが
RNA合成を抑制することを証明
緊縮制御機構

Murooka and Lazzarini,
J. Biol. Chem. . 248:62486250 (1973)

RNA合成活性化因子 Y_I と Y_{II} の発見

Y. Murooka and R. Lazzarini,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA
69:2336-2340 (1972)

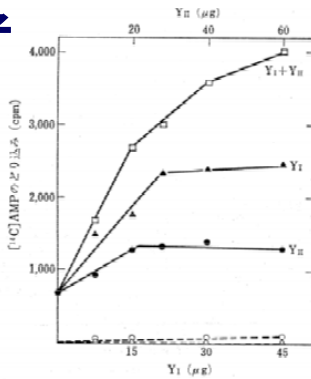


図4. *E. coli* DNA の RNA ポリメラーゼによる転写に及ぼす Y₁Y₂ 濃度の影響。RNA ポリメラーゼ無添加で Y₁ のみ (△) と Y₂ のみ (○) をコントロールとして示した。

研究室の皆は Yoshi の factor と呼んでこの発見を祝ってくれた。この成果は、J. Biol. Chem. と Proc. N.A.S. に掲載された。

2年間の海外出張を経て、帰国した。ボスのラザリニ博士も ppGpp 発見者のキャセール博士も NIH でそのまま研究を続けるように薦めてくれたが、日本で自分の研究をやろうと思い帰国を決めた。しかし、せつかくここまで来ているのだから、僕は一人でヨーロッパを回っ

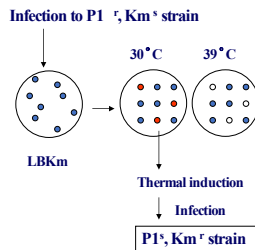
て帰ることにした。結局、2年間かけて東回り世界一周したことになる。ボスの計らいで、一ヶ月の休暇そして帰国旅費を NIH が支払ってくれた。一方家族は、家内の父親が迎えに来て、ハワイ経由で帰国した。

P1ファージによる in vivo 遺伝子導入系の開発

遺伝子導入を可能にした菌種

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella aerogenes*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Citrobacter freundii*
- *Salmonella typhimurium*
- *Serratia marcescens*
- *Proteus Inconstans*
- *Proteus mirabilis*
- *Proteus vulgaris*
- *Erwinia carotovora*
- *Acetobacter suboxydans*
- *Alcaligenes faecalis*
- *Agrobacterium tumefaciens*
- *Flavobacterium sp.*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Pseudomonas amyloclavata*

P1_{cr100KM}
温度感受性・KM耐性ファージ



P1ファージが大腸菌以外で形質転換できることを示す大腸菌は微生物の代表ではない
Murooka, Y. and Harada, T.,
Appl. Environ. Microbiol. 34:757 (1979)

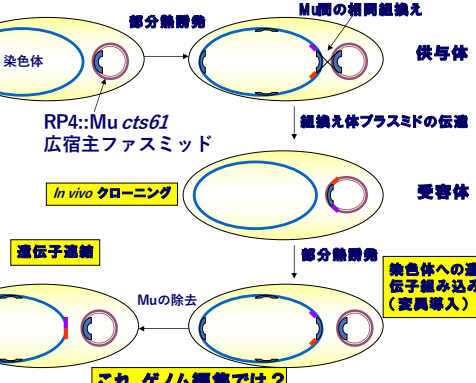
阪大に帰った後、温度感受性 Km 耐性 P1 ファージを用いて、大腸菌以外のグラム陰性細菌で遺伝子操作ができるようにした。P1 ファージを細菌に感染させ、Km 耐性コロニーを選択し 39°C で溶菌するコロニーを選ぶことにより P1 感受性すなわち P1 ファージに感染し、遺伝子導入できる株が選択できる。この結果、今まで大腸菌でしか形質導入できなかったものを、ほとんどのグラム陰性菌において遺伝子導入できるようになった。当時分子生物学は、大腸菌を使っただけの研究がほとんどだったから、この研究は、農芸化学的発想からきたものである。

次いで、RP4::Mu プラスミドを用いた生体内遺伝子操作法を開発した。温度感受性 Mu ファージと広宿主薬剤耐性 RP4 プラスミドの特性を利用して、相同組換えとプラスミド伝達により、細菌染色体への遺伝子の組み込み、変異導入、遺伝子の連結、in vivo

RP4::Muファスミッドによる in vivo クローニングと 遺伝子組換え系の開発

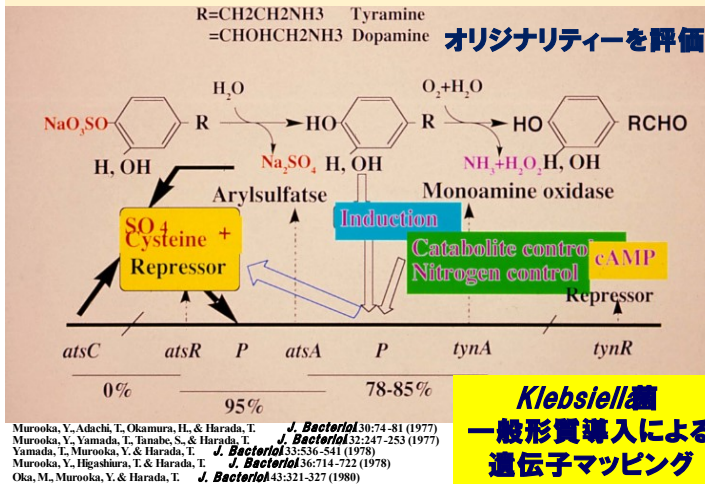
遺伝子組換え可能な菌種

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella aerogenes*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Enterobacter aerogenes*
- *Citrobacter freundii*
- *Salmonella typhimurium*
- *Serratia marcescens*
- *Proteus inconstans*
- *Proteus mirabilis*
- *Proteus vulgaris*
- *Erwinia carotovora*
- *Alcaligenes faecalis*
- *Agrobacterium tumefaciens*
- *Flavobacterium sp.*
- *Acetobacter suboxydans*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Pseudomonas amyloclavata*
- *Bradyrhizobium japonicum*
- *Mesorhizobium lotii*



これ ゲノム編集では？
Murooka, Y., Takizawa, N., and Harada, T.,
J. Bacteriol., 145:356-368 (1981)

サルフェート・レギュロンの説明

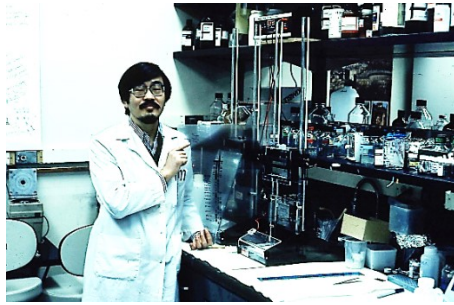


cloning をこれらの菌で可能にした。現在行われている遺伝子破壊法や遺伝子連結法は、原理的に同じものである。接合伝達法は今でも、大腸菌以外では多く使用されている。この技術は、今はやりのゲノム編集技術の先駆けではないだろうか。

恩師の原田教授は、Arylsulfatase という酵素の合成が硫黄化合物により抑制され、チラミンやドーパミンなどによりその抑制が解除されるという酵素合成の制御機構を発見されていた。そこで、この制御メカニズムを P1*clr100KM*一般形質導入法により、*Klebsiella* 菌で遺伝子マッピングを行って、アールスルファターゼ遺伝子がチラミンなどモノアミン酸化酵素遺伝子と隣合っていること、アールスルファターゼの抑制遺伝子(レプレサー)がそのすぐ上流にあることなどを突き止め、サルフェート・レギュロンを解明

試験管内遺伝子組み換え研究 再度NIHへ

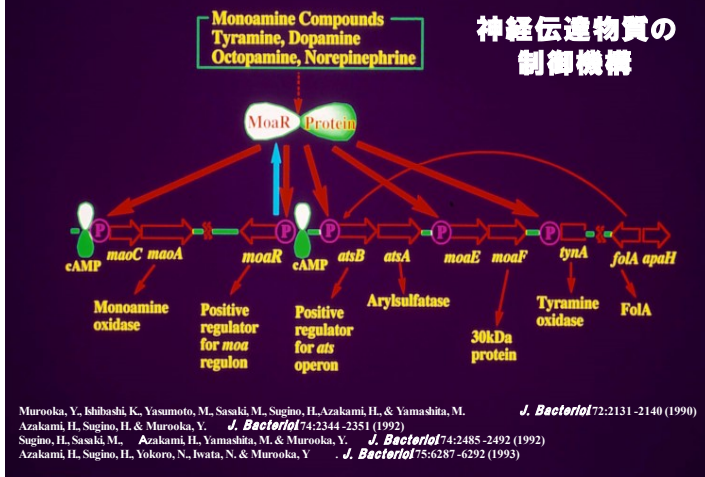
1980-1981



した。この研究は、日本では余り注目されなかったが、国外ではそのオリジナリティーが高く評価され、米国微生物学会の権威ある雑誌、Journal of Bacteriology だけでも 10 報以上の論文が採択された。足立君、岡村君、山田君、山下君、岡君などがこの研究に関わり後に博士号を取得した。

広大に移って、後で述べる遺伝子工学研究の論文を投稿したところ、論文査読者からの査読に“あの Arylsulfatase 研究はどうなった”というノートが添えられていた。僕ははっとした。「次々と遺伝子をクローニングする銅鉄科学より、あのオリジナリティーの高い研究を進めてはどうか」という暗示であることに気がついた。そこで再び、arylsulfatase 合成の遺伝

モノアミン・レギュロンの発見



子制御機構研究を再開し、阿座上君、杉野君、石橋君達とモノアミンレギュロンを発見し、MorR が制御タンパクとして、中心的役割を担っていることを突き止めた。この研究も海外では、そのオリジナリティーを評価してくれて、Journal of Bacteriology に採択された。一見マイナーな酵素でも生体内では幾つもの酵素合成が絡み合ってネットワークを形成している。一体、腸内細菌がどうしてサルフェートレギュロンを持っているのか、しかもドーパミンやエピネフィリンなど神経伝達物質のモノアミンレギュロンと絡み合っているのだろうか。最近、腸内細菌が脳の自律神経に関与しているという『脳腸相関』が話題となっているが、その機構の一部を解明していたのではないかと思っている。この細菌内の神経伝達物質による制御機構は進化して脳の中で働いているかも知れない。とすると、このレギュロン研究は、とてつもなく重要なものだったのではないか。しかし当時の僕は、この研究だけでは、なにか物足りなさを感じていた。