

失敗と思った実験も役立つ場合あり

永尾 寿浩



今回、本コーナーに執筆させて頂く機会を承り、何を書こうか迷いました。当初、趣味（ガーデニング）に関連した話を書こうと思いましたが、しかし、執筆要綱には「若手研究者・学生がこれから参考になるようなこと」と明記されており、頂いた見本誌はすべて研究について書かれていたことから、研究の話について執筆しようと心変わりしました。私のこれまでの研究に関する微弱な体験が、少しでも読者の方々の今後の参考になればと思い、「失敗と思った実験も役立つ場合あり」という題目で筆を取りました。

2001年までの研究テーマは、糸状菌 *Fusarium* 属が生産するリパーゼの構造と安定性でした。リパーゼ遺伝子をクローニングし、酵母で発現させました。発現したリパーゼを精製すると、元菌が生産する酵素と同じリパーゼAと、SDS-PAGEでの分子量が少し大きいリパーゼBの2種類に分かれました。興味深いことに、酵母での発現で初めて発見したリパーゼBは、至適温度は同じなのに、リパーゼAより熱安定性が15°Cも向上していました。そこで、リパーゼBの構造について色々調べたことにしましたが、耐熱性の原因はすぐに解明できず、壁にぶつかっていました。リパーゼBのN末アミノ酸配列を、日頃から故障の多い旧モデルのプロテインシーケンサーで調べたのですが、遺伝子情報より推定されるN末配列と同じでした。コントロールとしてリパーゼAのN末配列も調べると、複数ピークが存在し、理解に苦しみました。酵素は精製したはずなのに……。故障の多いプロテインシーケンサーに責任転嫁し、「実験失敗だ、装置たたき壊したろか」と思いました。ある日、複数ピーク（実際は2アミノ酸ずつだった）が存在するチャートを眺め、エドマン分解の各ステップにおいて、本来のN末配列以外に出てくる夾雑ピークを整理すると、何と、遺伝子のC末端側にある26残基の配列と一致するではありませんか。この時、目先の霧が晴れました。研究を進めていった結果、*Fusarium* のリパーゼは、275残基からなる成熟酵素よりも更にC末端側に位置する26残基がシャペロンのような働きをしており、これがないと活性のあるリパーゼとして発現しないこと、C末端26残基が耐熱性に関与していることが分かりました。酵素の発現後、275+26残基からなるリパーゼBのC末端26残基は不要となり、切断され、275と26残基からなる2本のペプチド鎖が絡んだままのリパーゼAとなっていることを明らかにしました。このように、失敗と疑ったN末配列の結果から新たな発見が生まれ、*J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 446 (2000)などの論文に発展し、博士号を取得しました。

リパーゼの基礎研究を行った後は、応用研究も行うようになりました。脂肪酸の1種である共役リノール酸

(CLA)は、リノール酸の2ヶ所の二重結合が共役化・位置異性化したリノール酸の異性体で、異性体は8種類あります。サフラワー油から工業的に生産されているCLAは、8種類の異性体のうちの2種類が主成分で、9*cis*,11*trans*-CLAと10*trans*,12*cis*-CLAの等量混合物です。これらのCLAは、抗がんや体脂肪低減、血圧上昇抑制などの生理活性を保持します。CLA工業製品には、主成分である2種類の異性体以外にも、数%のマイナーなCLA異性体と、パルミチン酸などの飽和脂肪酸も含まれています。リパーゼが専門の我々は、酵素反応を用いて、CLA工業製品に含まれる9*cis*,11*trans*-CLAと10*trans*,12*cis*-CLAをそれぞれ個別に分画し、各CLA異性体の純度を93%以上に精製することに成功しています。この研究の途中過程において、10*trans*,12*cis*-CLA画分に混在するマイナーCLAがまったく除去できず、壁にぶつかっていました。精製工程の途中段階には、飽和脂肪酸を除去する尿素付加という工程があります。尿素が溶けたメタノールを60°Cに加熱後、10*trans*,12*cis*-CLAを含む試料を添加します。この時、溶液は一旦濁りますが、すぐに透明になります。一晩かけて4°Cまで徐冷すると尿素が析出しますが、尿素に巻き込まれて飽和脂肪酸も析出するため、上清を回収すれば飽和脂肪酸が除去された標品が得られます。ある時、メタノールをちょうど切らしていたので、エタノールに変更して尿素付加を行いました。加熱した溶液に少しずつ試料を入れると、溶液が普段よりも激しく濁りました。いつもと違う。不安に駆られると同時に、「エタノールはダメなのか、失敗したのか」と思い、貴重な試料の添加はもったいなくなり、半分量を添加した段階で止めました。溶液を捨てよう、と思ったのですが踏み止まり、徐冷後の上清中の脂肪酸組成を測定しました。驚くことに、マイナーCLAが殆ど除去され、10*trans*,12*cis*-CLAがきれいに精製されているではありませんか。つまり、エタノール溶液を用い、さらに試料添加量を減らしたことが味噌であり、「失敗した！捨てよう！」と思った実験結果が転じて、それまでクリアできなかった課題が解決されたのでした。この発見は、*Biosci. Biotech. Biochem.*, **67**, 1429 (2003)の論文になりました。

私は若手の域を脱しておりますが、まだまだ経験は浅く、偉そうなことを言える立場にはありません。しかし、読者の皆さん、失敗と思い込み、捨てようと思った実験結果も、時には振り返って良く観察してみてください。実は成功である、いや新たな発見の種が隠れている場合があります。

