リゾチームの研究における偶然物語

井本泰治

崇城大学工学部

研究における大発見は偶然に支配されたことが多々あった。その意義を考察するとともに、私の40数年に及ぶリゾチームの研究の中で出会った、いくつかのささやかな偶然について紹介する。

1979年パスツールは、たまたましまい忘れたシャーレのニワトリコレラ菌をニワトリに接種したことで、弱毒ワクチンの大発見に至った。この出来事は偶然にのみ支配されて起こった出来事だろうか？ いやそうではない、ニワトリコレラの問題を解決したいというパスツールの強い信念と、細菌学・生化学領域での幅広い基礎知識、さらには深い洞察力によりこの偶然の出来事が生かされた結果である。パスツールの有名な言葉、「偶然は準備された心にも微笑む (Chance favors the prepared mind.)」が実にみごとにこのことを表現している。

偶然に支配された科学的大発見は、天然ゴムの利用 (グッドイヤー)、レーヨン (シュワイツァー)、リンゲル液 (リンゲル)、インスリン (メーリングとミンコフスキー)、テフロン (ブランケット)、細胞凍結保存法 (パークス)、アスパルテーム (シュラッターとマザー

ル)、シスプラチン (ローゼンバーク)、電導プラスチック (白川)、生体高分子の質量分析法 (田中) の発見など、枚挙にいとまがない。このことは、科学的大発見が偶然に支配されたことが如何に多かったかを示している。偶然はその性格上めったに起こらない。よい偶然に出会うためにはできるだけ多くの研究を行なうことが必要である。

一方、これら的大発見に共通していることは、偶然を生かすために、その方面でのしっかりした基礎知識と、そのことをやり遂げたいとの強い信念と、その偶然の出来事に対する深い洞察力が生かされたことである。これらの準備なしでは偶然は何事もなく通り過ぎてしまう。研究者には幅広い基礎知識と、その研究に対する強い執念が必須である。さらに必要なものは、意外な実験結果が出たら、実験ミスと簡単にあきらめずにとことん追求することである。教科書通りにいかなかった結果が教科書を書き換える大発見につながるのである。

特に若い研究者は、基礎知識の蓄積を怠らず、失敗を恐れず、信念をもってできるだけ多くの実験を果敢に行なうことが大発見へのルートである。基礎知識の蓄積は

雪ダルマ式である。最初小さい間はなかなか大きくならないが、少し大きくなり始めると、ひとこがしで一気に大きくなる。できるだけ早い時期に知識を大きく膨らませることが大切である。

私は幸いなことに、卒業研究以来 40 数年にわたり一貫して酵素リゾチームの研究を行なうことができた。その過程で、いくつかの偶然にめぐり合い、ささやかな発見をしてきた。これらの点を中心に、私の偶然物語を紹介させていただくことにする。

まずはリゾチームの発見そのものが偶然物語のプロローグにふさわしいものである。1922 年の冬、細菌学者フレミングは偶然に雑菌の生えたシャーレの所々で菌が溶けているのに気づいた。これは数日前に風邪をひいていて鼻水を落としたあとであることを思い出した。このことから体液に広く抗菌酵素が存在することを見いだした。この酵素は後に、溶菌 (lysis) 酵素 (enzyme) の意味でリゾチームと命名された。この後のエポックメイキングな抗生物質第 1 号のペニシリンの発見も、同じようなストーリーによる偶然の出来事である。フレミングの菌をやっつける物質を発見したいという執念と、細菌学に対する博識と、深い洞察力によりみごとに偶然が花咲いた例であろう。私にとってのリゾチームとの出会いは、九大農学部農芸化学科で恩師船津勝先生がリゾチームの研究をされていたという偶然の幸運によるものである。

酵素作用へのトリプトファン残基の関与の発見

私が船津研究室で卒論研究を始めたばかりの 1962 年の夏、米国留学から林勝哉助教授が帰国され、ちょうどそのころ米国ではやり始めた紫外部差スペクトルの技法を幸運にもいち早く伝授していただいた。さらに幸運なことに、船津先生が阪大の浜口先生と共同で可溶性のリゾチーム基質のグリコールキチンを開発されており、この基質の共存下で顕著なリゾチームの酵素-基質複合体の紫外部差スペクトルを検出できた。当時としては酵素-基質複合体の検出の例はほとんどなく、私をしてリゾチームの研究にのめりこませる引き金となった出来事である。

複合体の生成で紫外部差スペクトルが得られることは、複合体形成にトリプトファン残基が関与していることを示唆している。そこで、何とかトリプトファン残基の酵素作用への寄与を直接的に証明したいとの願望を抱いて研究の構想を練っていた。折しも折り、『*Advances in Protein Chemistry*』誌の最新号に米国の Witkop が *N*-bromosuccinimide を用いてのトリプトファン残基

の特異的酸化反応を紹介している⁽¹⁾ のを見つけた。現在の学生にとってこれは偶然の発見に見えるかもしれないが、当時私は、図書館にきていた新刊書や総説には有機化学のものを含めて全部目を通していたので、むしろこれは偶然というよりは必然の発見であった。研究のためには幅広い知識をいち早く身につけることの大切さを強調したい。

この試薬を用いてリゾチームを修飾すると、1 個のトリプトファンの酸化で 80% も活性が低下するが、この低下は基質の共存でやわらげられる。リゾチーム中にはトリプトファン残基が 6 個存在するが、そのうちの特定の 1 個が基質との結合に強く関与しており、これが活性の発現に非常に重要なことがわかった。ここまでをまとめて 1963 年に報告した⁽²⁾。さらに、このトリプトファンが N 末端から 62 番目のトリプトファン (Trp62) であることも決定し、1965 年に報告した⁽³⁾。当時、酵素活性に重要な残基としてはヒスチジン、セリン、リシンといった解離性残基のみが注目されており、トリプトファン残基が酵素作用に関与するという発見は、その当時重要視され始めた、疎水性相互作用への注目とあいまって画期的な発見であった。その証拠に、リゾチームのトリプトファンを 2-hydroxy-5-nitrobenzylbromide で修飾して酵素活性が低下したという Bewley と Li の簡単な報告が 1965 年の *Nature* に掲載された⁽⁴⁾。リゾチームの酵素-基質複合体形成への Trp62 の関与については、1966 年 Phillips たちの X 線解析により確実に証明された⁽⁵⁾。

話は多少横道にそれるが、アリゾナ大学の Rupley のグループは低分子可溶性基質を用いた差スペクトルの測定、ヨードを用いたトリプトファンの酸化など、私たちと同じような研究を一步遅れて追隨していた。そして最終的に彼らは、ヨードにより Trp108 が選択的に酸化されて酵素活性がなくなることを見いだした⁽⁶⁾。私はこの酸化に大変興味をそそられた。何となれば私たちの Trp62 は最も溶媒に飛び出たトリプトファンであり、酸化されやすいことは納得できる。しかし、Trp108 はほとんど埋もれており、これがヨードにより特異的に酸化されるメカニズムは何か。これを解明すべく私はアリゾナ大学に博士共同研究員として赴いた。

3 年間の悪戦苦闘の結果わかったことは、この Trp108 のすぐ近くに Glu35 のカルボキシル基があり、これがヨードによるトリプトファンの酸化を触媒することを突き止めた。Trp108 以外にこれほどカルボキシル基に接近したトリプトファンはない。もっと面白いことには、リゾチームのヨードによる酸化で、酸化の一步手前のエステル中間体が生成していた (図 1)⁽⁷⁾。このことは、この

図 1 ■ リゾチームのヨード酸化で Glu35 と Trp108 の間に形成されるエステル結合⁽⁸⁾

誘導体が共有結合の導入により非常に安定になっていることやその他の化学的証拠から証明し、また共同研究をしていた英国の X 線解析グループによる解析結果からもしっかりと証明された⁽⁸⁾。全体的にはほとんど構造変化なしにエステル結合の生成が実現されている。この結果は、実は偶然に触媒基 Glu35 の理想的な化学修飾となった⁽⁹⁾。触媒基 Glu35 をタンパク質内の別の基に結びつけることで、外からなんら置換基を導入することなく不活性化できたことになる。当然酵素活性はほとんどなく、基質との結合力はほとんど損なわれていない。かくして偶然にリゾチームの触媒基の理想的修飾が実現できた。

タンパク質のプロテアーゼ消化機構の解明

先の研究より前、すなわち卒論当初、私に与えられたテーマは「リゾチームの活性フラグメントの調製」であった。活性発現に必要な最小単位をプロテアーゼ切断により得ることで、酵素機能を単純化して調べようというものである。リゾチームをいろいろなプロテアーゼで、いろいろな条件下で消化し、カラムで分析することを繰り返したが、結果はいつもわずたわずたに切れたペプチドと、まったく切れていない intact のリゾチームが得られるだけで、中間的に消化を受けたものはまったく得られなかった。結論として、タンパク質のプロテアーゼ消化はオール・オア・ナンで進み、消化の中間体は得られないということであった。そこで、タンパク質のプロテアーゼ消化は変性 (D) 型でのみ進むのではなかろうかと思い、何とかこれを証明したいと思った。しかし、オール・オア・ナンで進む機構としては 2 通りある。1 つは D

型でのみ消化が起こるためと、もう 1 つは、ネイティブ (N) 型にニックが入って構造が不安定になり、それが優先的に消化されるという機構である。この 2 つの機構を区別することは当面難しいということで諦めていた。しかし、いつもこれを証明したいという気持ちはもち続けていた。これが準備された心というものであろうか。

ここに偶然が顔を出した。先にアリゾナで Trp108-Glu35 エステル中間体リゾチームを調製できたことを述べたが、このエステル結合を証明するために、プロテアーゼ消化によりエステル結合したペプチドを取り出すことを試みた。しかし、この中間体リゾチームは強いプロテアーゼ消化抵抗性を示し、ネイティブタンパク質がある程度消化される条件下でもほとんど消化されなかった。この瞬間、私はタンパク質のプロテアーゼ消化機構を解明するためのロゼッタストーンが得られたと直感した。この中間体リゾチームは強くプロテアーゼ消化抵抗性を示すが、全体構造はネイティブと変わらないことが X 線解析結果から示されている⁽⁸⁾。そこで、この安定な中間体をネイティブと同じ時間消化すると、ニックが入るのであればネイティブと同じようにニックが入ってその先の消化が安定で進まないようになっているはずであるから、その段階でニックが入った中間体が得られるはずである。ネイティブがある程度消化される時間同じように消化した中間体リゾチームをニックが入れば確実に分離できるクロマトシステムで分離したが、ニックが入った中間体はまったく得られなかった。このことは、タンパク質のプロテアーゼ消化は D 型が消化されるという形で進んでおり、安定化により D の生成が遅くなったために消化が遅くなったことを示している。すなわち、この偶然得られた安定化中間体を用いることで、タンパク質のプロテアーゼ消化は D 型を経て進行するのであって、N 型にニックが入って爆発するのではないことが証明できた⁽¹⁰⁾。

実は私たちは以前から、プロテアーゼ濃度が少し高くなるとタンパク質のプロテアーゼ消化速度が頭打ちになることを見いだしていた。すでに偶然が以前から顔を出していたのに見過ごしていたのである。プロテアーゼ濃度が増してくると D のタンパク質はたちまち消化され、タンパク質がほどける速度 (変性速度, $k_1 \times [N]$, N はネイティブ型タンパク質) が見えていたのである。この観点から、プロテアーゼ消化の式を近似的に解くと図 2 の (2) 式のようになり、プロテアーゼ濃度の逆数と見かけの消化速度定数の逆数プロットは直線を与え、プロテアーゼ濃度無限大 ($1/[P]=0$, P はプロテアーゼ) に外挿すると、見かけの速度定数の逆数は $1/k_1$ に収斂し、タン

$$\frac{1}{k_{app}} = \frac{k_2 K_m}{k_1 k_3} \cdot \frac{1}{[P]} + \frac{1}{k_1} \quad (2)$$

図2 ■変性型で消化される場合のタンパク質のプロテアーゼ消化の近似式と逆数-逆数プロット

ニワトリリゾチームを基質として、プロナーゼ (△) およびブチリシン (○) で消化した結果。

パク質がほどける速度定数の逆数が得られる。

2種のプロテアーゼでリゾチームを消化して逆数プロットしてみると直線を与え、この式が正しいことがわかった(図2)。また、Y切片は基質として用いたリゾチームの変性速度定数の逆数なので同じ点を切る。いくつか別のタンパク質について同様に k_1 を求めることができた。 k_1 は往々にして緩和法により求められているが、この方法では限られた変性剤濃度範囲での測定しかできず、変性剤濃度ゼロの生理条件下に外挿するのにかなり誤差が入る。両方法で求めた k_1 はよい一致を示した。消化法のほうが誤差が一桁小さかった。かくして生理条件下でのタンパク質のほどける(変性)速度を簡単に求める方法を開発できた。さらに、いくつかのタンパク質でもD型でプロテアーゼ消化が進行することを前提としたこの k_1 の測定法が成り立ったことは、タンパク質のプロテアーゼ消化がD型を経て進行していることを普遍的に証明できたことにもなる⁽¹¹⁾。

ペプチドマッピング法の確立

タンパク質の一次構造の決定や、修飾アミノ酸の位置決定のために、ペプチドマッピングは必須のステップである。私たちも長年リゾチームの修飾位置決定の際にこのステップで悩まされつづけた。ペプチドは一般に低分子であるので、透析やゲルクロマトでの脱塩が困難なこともあって揮発性の緩衝液を用いたイオン交換クロマト

が必要で、臭気ぶんぶんたる公害を撒き散らしながらの実験となり、実に苦労した。何かよい方法はないものかといつも腐心していた。スマートなペプチドマッピング法を開発したい。これが準備された心として私に住み着いていた。

その当時、私はリゾチーム分子中7個のアミノ基の無水酢酸によるアセチル化の順序を決めようとしていた。アセチル化されたものとそうでないものを分けることも区別することも厄介であったので、アセチル化されていないアミノ基をトリニトロベンジル(TNB)化して調べることにした。TNB化されたペプチドは着色しており、疎水性もかなり大きくなるので、逆相カラムに吸着し普通のペプチドを溶出した後に簡単に分離できると思った。当時、逆相カラムとして、ローバーカラム RP-8 が市販されていたのでこれを用いて分析した。

リゾチームを部分的にアセチル化して、遊離のアミノ基をTNB化し還元カルボキシメチル化後トリプシン消化してこの逆相カラムにかけた。十分緩衝液で洗浄してTNB化されていないペプチドを溶出後、有機溶媒のグラジエントで溶出した。黄色の吸収で単離したピークを解析してみると、驚いたことにいくつかのペプチドの混合物であった。しかも、TNB化されていないはずのペプチドがそここに有機溶媒で溶出されていた。かくして、ペプチドは逆相カラムに吸着し、有機溶媒で溶出できることを偶然に見いだすことができた。水、有機溶媒は理想的な揮発性溶媒である。さっそくローバーカラムを用いたペプチドマッピングのシステムを作り上げた⁽¹²⁾。さらに、ちょうど高速液体クロマトグラフィーの装置が手に入ったので、逆相樹脂をパックして逆相HPLCのペプチドマッピングのシステムを完成した⁽¹³⁾。

さっそく報告しようと文献検索してみると、残念ながら1,2報の逆相カラムによるペプチドマッピングの報告が出たばかりであることがわかった。もう少し早く偶然が顔を出してしてくれたらと悔やまれた例である。それでも私は独自に逆相クロマトによるペプチドマッピングの手法を見だし、早い時期にいくつかの逆相クロマトに関する報告をしたので、ペプチドのRP-HPLCについて、『*Molecular Cellular Biochemistry*』に総説⁽¹⁴⁾、CRC Hand Bookにも一章を書くことを依頼された⁽¹⁵⁾。

タンパク質の効率的再生法を求めて

タンパク質は容易に変性するし、またタンパク質工学

的に大量生産させたタンパク質は往々にして変性タンパク質として生産される。これらを元の活性型に巻き戻させる（再生する）ことがタンパク質の有効利用には大切である。最近、タンパク質性医薬の生産は、バイオハザードの問題などで動物細胞での発現が問題視され、大腸菌での発現が見直されつつある。大腸菌で外来性タンパク質を発現した場合には一般に変性タンパク質の封入体で生産され、この再生という厄介な問題にぶつかる。

変性タンパク質は疎水面が表面に露出しており、そのため会合して沈澱しやすい。そこで、タンパク質の再生はアグリゲーションとの戦いである。これを防ぐために、最もよく使われるのは無限大希釈で会合を抑える方法である。しかし、これはあまり効率的方法ではない。1gのタンパク質を得るのに100lの溶液となるほどの希釈が要求されるからである。そこで高濃度で効率よく再生する方法の開発が求められることになる。

まずは疎水性をできるだけ増やさないことが大切である。大腸菌に目的タンパク質を発現させるときに、目的タンパク質のN末端アミノ酸の種類によっては開始コドンから翻訳されたメチオニンがプロセスされずに残ることが往々にしてある。プロセスされずに残ったメチオニンは疎水性が大きく、再生に障害をきたす。そこで、“Met(−2)−Ser(−1)−目的タンパク質のN末端アミノ酸(1)…”のようにデザインした遺伝子で発現すると効率よくメチオニンは切り取られ、“Ser(−1)−目的タンパク質”が得られる。これは再生効率も物理性も格段に改善されたものとなる⁽¹⁶⁾。

変性タンパク質のアグリゲーションを抑えるもう一つの方法は、タンパク質の総電荷を大きくして溶解度を大きくするとともに、電荷による反発で凝集を抑えることである。しかし、このためだけに変異で総電荷を増やすことも問題がある。そこで、タンパク質を還元後、酸化に用いる酸化剤(酸化型SS交換剤)に電荷のある試薬を用いてミクスドダイサルファイドタンパク質としての総電荷を増やすことで、かなりアグリゲーションを抑えることができる⁽¹⁷⁾。

この他にも、可溶化剤の添加によってもアグリゲーションは抑えられる。私たちのこの研究のきっかけとなったのも偶然の発見である。ある学生が8M尿素中で還元後再生操作を行なって、あまりにも少量の外液で透析を行ない、最終的に尿素が1M残ってしまった。すると意外なことに、再生効率が抜群によかった。尿素はランダムなSS結合を生成させる例として教科書にも載っており、私としてはあまりにも強い先入観があって、尿素中での再生など思いもよらなかった。しかしよく考えてみ

ると、尿素はよい可溶化剤であり、うまくコントロールすればアグリゲーションを抑えながら効率的に再生させるためのよい試薬である。かくして私たちは、8M尿素中でタンパク質を還元後、再生系とし、透析バッグに入れて透析外液の尿素濃度を徐々に低下させながら透析することにより再生させるという画期的な高濃度での効率的再生法を開発することができた^(18,19)。

抗原性と免疫寛容

ヒューマングénomプロジェクトも終焉を迎え、タンパク質をいかに有効に利用するかが今世紀最大の課題であろう。その一翼を担う医薬としてのタンパク質の利用にあたって、大きな障害となるのが抗原性の問題である。まずは遺伝子操作で自己タンパク質に変異を加えたときにどれほどの変異が抗原性の原因になるのかをマウスで調べた。ニワトリリゾチームを外來抗原とし、マウスリゾチームを自己タンパク質として用いた。両タンパク質では130個中56個のアミノ酸が異なる。当然ニワトリリゾチームは強く抗体産生をひき起こす。しかし、自己タンパク質のマウスリゾチームは抗体を産生させない。できるだけ少ない変異で自己タンパク質を抗原に転換させるために、ホットスポットとしてニワトリリゾチームで抗原ペプチドとして認識されているT細胞エピトープ部分を選んだ。最初BALB/cマウスではニワトリリゾチームのペプチド107-116が最も強いエピトープであり⁽²⁰⁾、この部分の配列はニワトリとマウスで3箇所だけ異なる。そこで、この3箇所をニワトリリゾチームに合わせたマウスリゾチーム変換体を作製して投与したところ、みごとに抗体が産生された⁽²¹⁾。

さらに好都合なエピトープを見いだした。それはB10.AおよびC3Hマウスではニワトリリゾチームのペプチド50-61がT細胞抗原エピトープで⁽²²⁾、この場合はマウスリゾチームのPhe57Leuのたった1残基変異でニワトリリゾチームのT細胞抗原エピトープを形成できる。このマウス変換体をこれらのマウスに投与すると、明らかに抗体が産生された。当然これらの変換体ではネイティブマウスリゾチームと立体構造はほとんど変わらない⁽²³⁾。こうして、たったの1残基の変異でも自己タンパク質が抗原となりうることがわかった。より性能の向上したタンパク質の生産に向けて遺伝子操作が加えられることは多々ある。ヒト型のタンパク質でも、医薬として投与すると抗原となる場合があることも知らされており、新規にデザインして創製したタンパク質は当然抗原以外の何者でもない。このような状況のもと

図3 ■ニワトリリゾチーム(HEL)およびそのPEG誘導体をマウスに投与したときの抗体産生

で、タンパク質に抗原性を失わせること、すなわち免疫寛容を与えることはとても大切なことである。

古くからポリエチレングリコール (PEG) 修飾により抗原性がやわらげられることが知られていた。このことは抗原にレインコートを着せるという意味で納得できる。確かにニワトリリゾチームをPEG化してマウスに投与すると抗体産生が抑えられる(図3)。しかし、PEG化は立体障害により生理機能の低下も心配なところである。ところが、この心配を吹き飛ばす結果が得られた。PEG化ニワトリリゾチーム処理後ネイティブニワトリリゾチームを投与しても抗体が産生されないという、驚くべききれいな結果が得られたのである(図3)。このことはPEG化ニワトリリゾチームがニワトリリゾチームに対する免疫寛容をひき起こしたことを意味する⁽²⁴⁾。PEG化の程度はタンパク質の重量の1.5~2倍くらいが最適であることがわかった⁽²⁵⁾。PEG修飾して安定化することは大切であるが、あまり修飾しすぎて、抗体に対するエピトープやTCRに対するエピトープがつぶれてしまって免疫不応答になってしまうとまずいことを示している⁽²⁵⁾。

次いで、この免疫寛容が起こる原因について検討を行った。種々検討の結果原点に戻って、このPEG修飾タンパク質がプロテアーゼ消化に対して安定になっていることから⁽²⁶⁾、血中濃度の維持が原因ではないかと発想した。ネイティブニワトリリゾチームは投与後1日で血中濃度が検出限界以下に低下するが、PEG修飾ニワトリリゾチームは28日間も血中濃度が検出可能なレベルに維持される。この間は免疫寛容が維持され、その後徐々に

に寛容が低下する。再度の投与で寛容が再現する。血中にそのタンパク質が存在すれば寛容が実現するらしいことが同えたので、少し乱暴であったが、1匹当たり毎日10mgのネイティブニワトリリゾチームを投与し続けた。血中濃度は維持され、免疫寛容が成立した⁽²⁷⁾。以上の結果から、タンパク質を安定にして、血中濃度を長期間あるレベルに保たせると、そのタンパク質に対して免疫寛容が成立する可能性を示すことができた。このことはタンパク質の医薬としての利用に対して無限の可能性を示すものである。

■ アサリ貝のリゾチームがイソペプチダーゼ活性を併わせもっていたこと

私は長年リゾチームの研究をやってきたが、その間に多くの起源からのリゾチームを精製し、20種を越すリゾチームの一次構造を新しく決めた。海産動物のリゾチームにも興味をもち、魚類のリゾチームの単離も散々試みたが、成功しなかった。しかし、アサリ貝のリゾチームについては、その単離に成功し、性質を検討し、一次構造をタンパク質から決定して報告した。無脊椎動物のリゾチームとしては初めての報告であった⁽²⁸⁾。ホモロジー検索で従来のリゾチームとはまったく類似性がなく、ヒルのデスタビラーゼとのみある程度(46%)の類似性があった。私たちの報告を見てデスタビラーゼの研究者が、リゾチームと似ているのであればデスタビラーゼに溶菌活性があるのではと測定して、溶菌活性を検出した⁽²⁹⁾。そこで私たちも逆転の発想で、アサリリゾチームにデスタビラーゼ活性があるのではないかと測定したところ、

デスタビラーゼ活性が検出された。デスタビラーゼ活性とはイソペプチダーゼ活性のことで、これは Glu $\cdot$ γ - ϵ $\cdot$ Lys 結合を加水分解する活性で、血栓溶解にも関わっており、医薬としても大いに興味ある活性である。アサリリゾチームは小さな分子量 (14 kDa) で 7 個の SS 結合をもつ安定なタンパク質で、キチナーゼ活性とイソペプチダーゼ活性を併わせもち、しかも両活性部位が異なった部位に存在する大変興味あるタンパク質である⁽³⁰⁾。アサリリゾチームを中心にデスタビラーゼを含めて無脊椎動物型 (i-型) リゾチームという新しいリゾチームファミリーが確立された⁽³¹⁾。

*

研究における大発見は、基盤となる幅広い基礎知識の上に着々と準備された計画の下で必然的に現われることもあり、偶然現われることもある。大発見の最も大きな出現確率は、必然と偶然の狭間にあるのではないだろうか。大発見のためには周到に準備された研究基盤と偶然のチャンスを増やすための幅広く多大な実験量、さらにはこだわりのない柔軟な適応力が必要である。その上で、その目的に向けた、あくなき求心力を保つことが大切である。

文献

- 1) B. Witkop : *Adv. Protein Chem.*, **16**, 221 (1961).
- 2) K. Hayashi, T. Imoto & M. Funatsu : *J. Biochem.*, **54**, 381 (1963).
- 3) K. Hayashi, T. Imoto, G. Funatsu & M. Funatsu : *J. Biochem.*, **58**, 227 (1965).
- 4) T.A. Bewley & C.H. Li : *Nature*, **201**, 624 (1965).
- 5) D.C. Phillips : *Sci. Amer.*, **215**, 78 (1966).
- 6) F.J. Hartdegen & J.A. Rupley : *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 625 (1967).
- 7) T. Imoto, F.J. Hartdegen & J.A. Rupley : *J. Mol. Biol.*, **80**, 637 (1973).
- 8) C.R. Beddell, C.C.F. Blake & S.J. Oatley : *J. Mol. Biol.*, **97**, 643 (1975).
- 9) T. Imoto & J.A. Rupley : *J. Mol. Biol.*, **80**, 657 (1973).
- 10) T. Imoto, K. Fukuda & K. Yagishita : *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 264 (1974).
- 11) T. Imoto, H. Yamada & T. Ueda : *J. Mol. Biol.*, **190**, 647 (1986).
- 12) T. Imoto & K. Okazaki : *J. Biochem.*, **89**, 437 (1981).
- 13) H. Yamada, T. Imoto, K. Fujita, K. Okazaki & M. Motomura : *Biochemistry*, **20**, 4836 (1981).
- 14) T. Imoto & H. Yamada : *Mol. Cell. Biochem.*, **51**, 111 (1983).
- 15) T. Imoto & H. Yamada : "CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins", CRC Handbook, 1984, p.167.
- 16) S. Mine, T. Ueda, Y. Hashimoto & T. Imoto : *Protein Eng.*, **10**, 1333 (1997).
- 17) Y. Maeda, T. Ueda, H. Yamada & T. Imoto : *Protein Eng.*, **7**, 1249 (1994).
- 18) Y. Maeda, H. Koga, H. Yamada, T. Ueda & T. Imoto : *Protein Eng.*, **8**, 201 (1995).
- 19) Y. Maeda, T. Ueda & T. Imoto : *Protein Eng.*, **9**, 95 (1996).
- 20) A. Sette, L. Adrimi, E. Appella, S. Colon, C. Miles, S. Tanaka, C. Ehrhardt, G. Doria, Z.A. Nagy, S. Buus & H. M. Grey : *J. Immunol.*, **143**, 3289 (1989).
- 21) T. So, H.-O. Ito, T. Koga, S. Watanabe, T. Ueda & T. Imoto : *J. Biol. Chem.*, **272**, 32136 (1997).
- 22) P.M. Allen, G.R. Matsueda, E. Harber & E.R. Unanue : *J. Immunol.*, **135**, 368 (1985).
- 23) Y. Tsujihata, T. So, Y. Hashimoto, T. Ueda & T. Imoto : *Mol. Immunol.*, **38**, 375 (2001).
- 24) T. So, H.-O. Ito, T. Koga, T. Ueda & T. Imoto : *Immunol. Lett.*, **49**, 91 (1996).
- 25) T. So, H.-O. Ito, Y. Tsujihata, M. Hirata, T. Ueda & T. Imoto : *Protein Eng.*, **12**, 701 (1999).
- 26) T. So, H.-O. Ito, T. Koga, S. Watanabe, T. Ueda & T. Imoto : *J. Biol. Chem.*, **272**, 32136 (1997).
- 27) T. So, H.-O. Ito, T. Hirata, T. Ueda & T. Imoto : *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 1187 (1999).
- 28) Y. Ito, A. Yoshikawa, T. Hotani, S. Fukuda, K. Sugimura & T. Imoto : *Eur. J. Biochem.*, **259**, 456 (1999).
- 29) L.L. Zavalova *et al.* : *Biochim. Biophys. Acta*, **1478**, 69 (2000).
- 30) K. Takeshita, Y. Hashimoto, T. Ueda & T. Imoto : *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**, 1944 (2003).
- 31) S. Bachali, M. Jager, A. Hassanin, F. Schorentgen, P. Jolles, A. Fiala-Medioni & J.S. Deutsch : *J. Mol. Evol.*, **54**, 652 (2002).