

リゾチームの研究を楽しんで 42 年

井本 泰治

Enjoying Research on Lysozymes for 42 Years

Taiji IMOTO

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University 3-1-1 Maidashi,
Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received February 27, 2003)

I have pursued research on lysozymes for 42 years. During that time, I made several new findings, some of them by chance. My enjoyment of the following areas is reviewed: the story of tryptophan; protease digestion mechanisms; peptide mapping with RP-HPLC; gene engineering; renaturation of protein; catalytic residues; fluctuation and function; stabilization; folding; antigenicity; tolerance; and various lysozymes.

Key words—chemical modifications; pegylation; protein engineering; unfolding

1. はじめに

「これを学ぶものはこれを好むものに如（し）かず、これを好むものはこれを楽しむものに如かず」筆者が最も好きな孔子の言葉である。物事はいやいややるのではなくこれを楽しむべきだという意味ですが、学生に講義する場合にはたいていこの言葉で始めてきた。研究においても実にこれは正しい。筆者が 42 年間リゾチームの研究を楽しんできた軌跡を紹介したい。

筆者は今を去ること 42 年前 1961 年に九州大学農学部農芸化学科の船津勝教授の下で卒業論文実験としてリゾチームの研究を始めた。その当時は少し前に F. Sanger によるインシュリンの一次構造が決定されて他のタンパク質の構造決定が華々しく行われていた最中で、リゾチームの一次構造決定も着々と進行している最中であった。1963 年に突然米国の Canfield がリゾチームの一次構造を発表し、それまで伝統的に、この構造を手掛けていたフランスの Jolles のグループもあわてて一次構造を発表した。

衆知のごとく、リゾチームは酵素タンパク質としては初めての X 線解析が英国の Phillips らにより 1967 年に完成され、同時に基質である N-アセチル

グルコサミンオリゴマーとの複合体の解析も行われ、リゾチームの反応機構の詳細な議論がなされた。リガンドを結合させて解析すれば生理機能まで分かるという現在の構造生物学隆盛の糸口を作った画期的な成果である。この研究に対してノーベル賞が与えられていないことは実に不思議な結果である。筆者は Phillips 博士と共著で *The Enzyme* に 1972 年までのリゾチーム研究の成果を総説した。¹⁾ この総説においてリゾチームの X 線解析結果の座標をも公表した。それ以来リゾチームはタンパク質研究の手本としての地位を確保し続けた。このことはリゾチームが調製しやすいタンパク質で早期に研究がスタートしたこともあるが、今ひとつリゾチームが安定で非常に性質のよいタンパク質であることに起因している。“Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology” という本にこれらのことが一部集約されている。²⁾

幸いにも筆者はこの天恵的タンパク質に当初から出会い、絶え間なく愛でることができた。その過程でいくつかの偶然にめぐり合い、いくつかのタンパク質研究に役立つ成果を残すことができた。筆者は最近本誌に「タンパク質研究基盤の確立とその薬学分野への応用」という総説³⁾を書いたばかりで、そちらで詳しく解説した部分については本書では軽く触れるだけにする。

九州大学大学院薬学研究院（〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1）

*本総説は、平成 14 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

2. リゾチームのプロフィール

1922年の冬、A. Fleming 博士は長い間放置していた細菌培養のシャーレを洗っていた。あるシャーレの一面に生えた細菌の一部が透明になっているのに気がついた。これは先日風邪のため鼻水を落としたところであることを思い出した。細菌を溶かす物質を見出した。細菌学者としての博士の長年の夢、細菌をやっつける物質の発見の幕開けである。当時まだ抗生物質は1つも発見されておらず、それだけにこれは刺激的な発見なのである。その後の精力的な研究により、この物質は鼻水に限らず、唾液、涙などの体液に広く分布する酵素で、その溶菌作用から、lysis enzyme の意味で lysozyme と命名された。これがリゾチームの発見である。残念ながらリゾチームはグラムポジティブの細菌に作用するが、多くの有害菌がそうである、グラムネガティブの細菌にはあまり効果を示さなかった。しかしながら博士は同じような第2の偶然で青黴から抗生物質第1号のペニシリンを見出し、1945年度のノーベル賞に輝いた。このようにリゾチームの発見は、くしくも Pasteur の「偶然は準備された心のみ微笑む」という言葉を具現するものであった。

ニワトリリゾチームはアミノ酸 129 個からなる分子量約 15 kD の塩基性のタンパク質で、卵白から容易に精製できる。本書では特に断らない限り研究材料はニワトリリゾチームと理解していただきたい。

3. トリプトファン物語

まだリゾチームの X 線解析が完了する少し前の 1962 年、リゾチームに可溶性基質のグリコールキチンを共存させると、顕著な紫外部の差スペクトルが観察されることを見出した。⁴⁾ これは基質の結合でリゾチーム中の Trp 残基が影響を受けることを示していた。ちょうどそのころ、アメリカの Witkop が Trp を特異的に酸化する N-プロモサクシイミドと言う試薬を開発した。この試薬を用いてリゾチームを酸化すると、1 個の Trp の酸化で 80% も活性が低下する。この低下は基質の共存でやわらげられる。これらのことから、リゾチームには 6 個の Trp が存在するが、そのうちの特定の 1 個が基質との結合に関与しており、これが活性の発現に非常に重要であることを示している。この Trp は N-末端から 62 番目の Trp であることも決めた。⁵⁾ 1967 年にリゾチームの X 線解析が完了し、確

かにこの Trp は基質の結合に重要な役目を果たしていることが確認された。

一方、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て差スペクトル、ヨードを用いて Trp の酸化など、我々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の酸化された Trp は Trp108 であることを突き詰めた。筆者はこの酸化に大変興味をそそられた。何となれば我々の Trp62 は最も溶媒に飛び出た Trp で (Fig. 1) 酸化され易いことは納得できる。しかしながら 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。これを解明すべく筆者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分かったことは、この Trp108 のすぐ近くに Glu35 のカルボキシル基があり (Fig. 1)、これがヨードによる Trp 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 Trp はない。もっと面白いことにはリゾチームのヨード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 (Fig. 2A)。このことはこの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はっきりと証明された (Fig. 2B)。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ている。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ことになった。⁶⁾

4. タンパク質のプロテアーゼ消化は変性型で進む

先の実験より前、すなわち 1961 年筆者が卒論実習の時、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言うものである。来る日も来る日もリゾチームを色々なプロテアーゼで、色々な条件下で消化し、カラムで分析することを繰り返したが、結

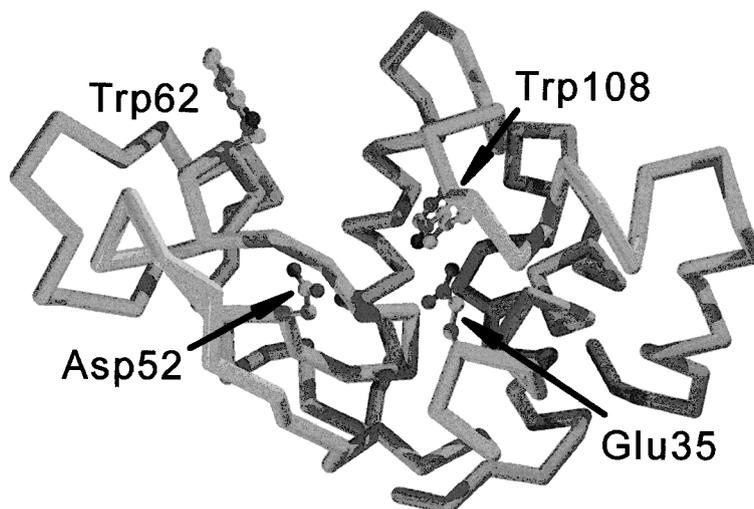


Fig. 1. Structure of Lysozyme

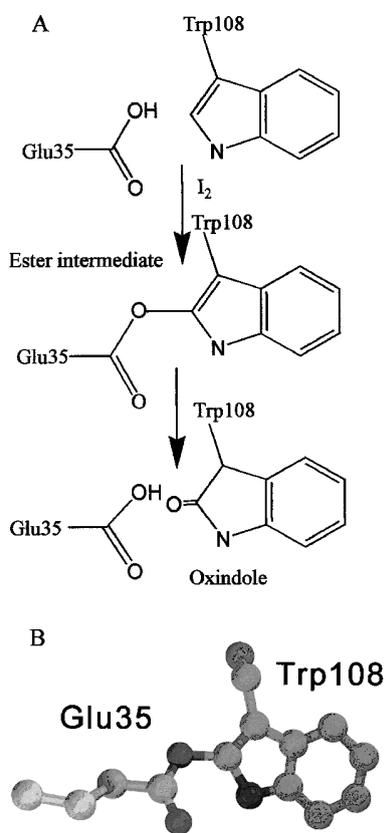


Fig. 2. Oxidation of Tryptophan108 with Iodine

A : Reaction mechanism, B : Ester intermediate proved by X-ray crystallography.

果はいつもずたずたに切れたペプチドと、全く切れていないインタクト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全く得られなかった。結論として、タンパク質のプロテアーゼ消化は all or none で進み、消化の中間体は得られないと

言うことであった。ここでタンパク質のプロテアーゼ消化は変性 (D) 型で進むのではなかろうかと思ひ、何とかこれを証明したいと思つた。しかし、all or none で進む機構としては2通りあり、1つはD型でのみ消化が起こるためと、今1つは、ネイティブ (N) 型にニックが入り構造が不安定になり、それが優先的に消化されると言う機構である。この2つの機構を区別することは当面難しいと言うことで諦めていた。しかしながらいつもこれを証明したいという気持ちは持ち続けていた。これが準備された心というものであろうか。

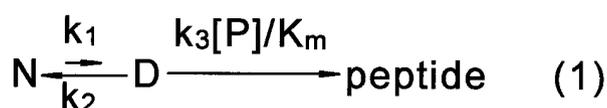
ここに偶然が顔を出す。前回アリゾナで安定な Glu35-Trp108 エステル中間体を調整できたことを述べたが、プロテアーゼで消化してこのエステル結合したペプチドをとってこの結合を証明しようと消化をやってみて、驚いたことにこのエステル中間体は強くプロテアーゼ抵抗性を示してほとんど消化を受けなかった。ここで筆者は先のプロテアーゼ消化機構を解明するために必要な誘導体を偶然にも得ることができたことを直感した。そこで筆者はこの結果を温存して日本に帰った。

この誘導体は強くプロテアーゼ抵抗性を示すが、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ので、ネイティブが半分ほど消化される時間消化すると、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が安定に進まないはずであるから、ニックが入った中間体は得られるはずである。ニックが入れば確實

に分離できるクロマトシステムで分離したが、全くニックが入った中間体は得られなかった。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、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、ニックが入って爆発するのではないことが証明できた。⁷⁾

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出していた。これは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、実はタンパク質がほどける速度 k_1 が見えていたのであった。偶然は早くから顔を出していたのに気づかなかった例である。

この観点から、プロテアーゼ消化の式を近似的に解くと Fig. 3. 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、基質濃度無限大 ($1/[P]=0$) 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、タンパク質がほどける速度定数の逆数が得られ



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

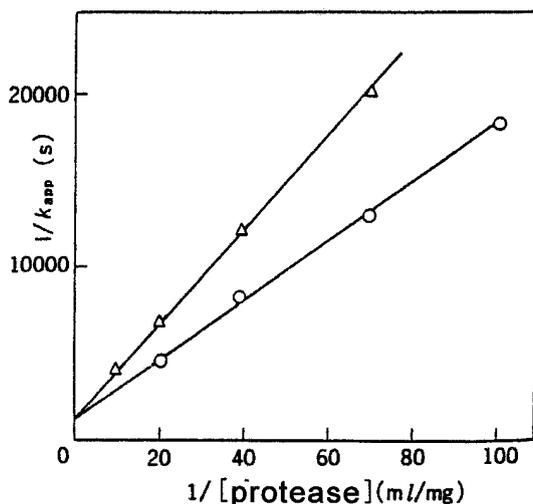


Fig. 3. Kinetic Analysis of Protease Digestion of Protein⁸⁾
Lysozyme was digested with Pronase (Δ) and subtilisin (○).

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分かった。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 (Fig. 3)。

いくつか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 は良い一致を示した。消化法の方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この方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。⁸⁾

5. 逆相クロマトグラフィーによるペプチドの分離

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行程である。我々も長年リゾチームの修飾位置決定の際にこの行程で悩まされ続けた。逆相クロマトグラフィーの適応によりこの行程が画期的に改善された。このペプチドマッピングへの逆相クロマトグラフィーの適応を筆者は 1970 年代後半に独自に見出した。

当時、筆者はリゾチームで初期にアセチル化されるアミノ基の位置を決めていた。アセチル化されたアミノ基を決めるのではなくアセチル化後のフリーのアミノ基をトリニトロベンジル (TNB) 化してこれを決めることにした。このペプチドは着色しており、疎水性がかなり大きくなるので逆相クロマトで簡単に単離できると思った。軽くアセチル化した後、トリニトロベンゼンスルホン酸で修飾後、SS結合を切ってアルキル化ブロック後、酵素消化し、ペプチドを逆相カラムに吸着させ、よく緩衝液で洗った後、有機溶媒で溶出した。当然、ニトロベンゼンの付いていないペプチドは緩衝液で全部溶出され、TNB-ペプチドのみを展開できると思った。ところが、ほとんどのペプチドが吸着されていて、有機溶媒での展開でそれらが溶出されることを偶然にも見出した。そこでこれはペプチドの分離に使えるので

はないかと考えた。当時使っていたローバーカラム RP-8 でペプチドの分離システムを作り上げた。⁹⁾ ちょうど高速液体クロマトグラフィーが研究室に入ったので逆相 HPLC でも系を組み上げた。¹⁰⁾ これが 1979 年のことでさっそく報告をと言うことで文献検索して見ると、残念なことにすでに 2 報ほど報告が出たばかりであった。もう少し早く偶然が顔を出してくれていたらと、悔やまれるケースである。しかし、かなり早い時期にこれらの報告を出すことができたので、この分野での開発に貢献した者として、ペプチドの RP-HPLC について、*Molecular Cellular Biochemistry* に総説、¹¹⁾ *CRC Hand Book* にも一章¹²⁾ を書くことを依頼された。

6. 遺伝子工学

我々は早くからタンパク質工学における遺伝子工学の重要性を察知して、ドイツの Schultz 博士からニワトリリゾチームの遺伝子を手し満を持していた。DNA 合成機の普及に及びいち早く 1985 年に遺伝子工学を開始した。当時高度発現ベクターとしては pKK223-3 しか市販されておらず、これでは発現がほとんどなかったもので、温度感受的にコピー数が格段に増加する発現ベクター pKP1500 を開発し、大量のニワトリリゾチームを大腸菌に発現させた。¹³⁾ ついで、酵母での分泌発現系を構築し、ニワトリリゾチームを活性型で培地から得られるようにした。¹⁴⁾ さらに、*Pichia* 酵母による大量発現のためのプロトコルを確立した。¹⁵⁾ この場合には染色体 DNA への相同組み替えであるため、プラスミド DNA の場合と異なり、産物は複数で、この中から分泌効率のよいものを選び出すことがポイントである。このようにして、100 mg/l 以上の収率でリゾチームが得られるようになり、重原子置換のための最小培地を用いた場合でも 20 mg/l 程度の収率でリゾチームが得られ、詳細な NMR 測定のための基盤を確立した。

タンパク質工学の研究では、ある性質が欠落したクローンを選択したい場合がある。この場合、目的遺伝子が入っていないクローンも選択される。ストレプトマイシン耐性遺伝子を置き換える形で目的遺伝子を挿入し、このプラスミドをストレプトマイシン要求性大腸菌に形質転換する形で、目的遺伝子を持たないクローンを確実に排除する系を確立した¹⁶⁾。

7. タンパク質の再生

タンパク質の再生はタンパク質の研究、特にタンパク質工学において重要な研究テーマである。最近、タンパク質医薬の生産も、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往々にしてこの再生が問題となる。

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殿しやすく、タンパク質の再生はアグリゲーションとの戦いである。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。そこで高濃度で再生するために、再生タンパク質の総電荷を多くして、可溶化、反発により会合を抑えたり、¹⁷⁾ 安定化、可溶化のための添加剤を種々検討した。¹⁸⁾

ここで偶然が顔を出した。ある学生が 8M 尿素中でタンパク質を還元後再生操作を行ってあまりにも少量の外液で透析を行ったため尿素が 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、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。かくして我々は 8M 尿素中で還元後再生系として、透析により徐々に尿素濃度を低下させながら再生する方法を開発した。¹⁹⁾

8. リゾチームの触媒基

筆者は 42 年前に卒論研究を始めた当時からリゾチームの触媒基については当然強い関心を持っており、リゾチーム中に 1 個しかない His に大いに注目していた。当時 His を修飾する試薬では同時に Trp が修飾され、先ほど述べたように Trp はリゾチームの活性部位にあり基質結合で重要な働きをしている。そこでいつも活性が低下して His の関与を断ち切ることができなかった。修飾による副作用には注意が必要である。さらに当時 (1960 年代前半) Trp が酵素作用に関与するという意識が全くなかったことにも起因する。我々のリゾチームの Trp62 が酵素作用に関与するという発見⁴⁾ は Trp の酵素作用への関与を指摘した最初のものではないかと思う。X 線解析が済んでみると His は活性部位

の裏側に存在しており、活性にそれほど関与しないことが明らかになった。触媒基は Glu35 と Asp52 であることが推定された。触媒基の同定を X 線解析に先を越された最大の理由は、当時カルボキシル基の化学修飾は全く幼稚なもので、塩酸-メタノール中でのエステル化くらいであったことに起因する。

化学修飾による触媒基の確認が始まった。化学修飾による反応基のブロックのためには一般に置換基を導入してブロックする。カルボキシル基であればエステル化によるアルコキシ基の導入のごときものである。しかしながら、触媒基の修飾では、かさばった置換基の導入は立体障害により不適當である。この意味で先に述べたリゾチームのヨード酸化の中間体として得られた Glu35-Trp108 エステル中間体は、なんら置換基を持ち込まない理想的な触媒基 Glu35 の修飾と言える。さらに確実に触媒基 Glu35 と Asp52 を証明するために、カルボキシル基のアミド化を試みた。アミド化によりたった 1 ダルトンのサイズの減少でカルボキシル基をブロックできる。Figure 4 に示したようにそれぞれのカルボキシル基を特異的にエステル化した後、低温液体アンモニア中で加アンモニア分解によりアミド化した。得られた Gln35 及び Asn52 リゾチームはいずれもほとんど活性を示さず、X 線解析による推定以来 20 年にして (1986 年) やっとリゾチームの触媒基の証明が完成した。²⁰⁾ 我々はこの修飾に 3 年を費やした。しかしこれは Glu を Gln, Asp を Asn と行ったアミノ酸の変換であり、これを我々は Chemical Mutation と呼んだがこの種の変換であれば現在の

遺伝子工学を用いれば 1—2 週間でいとも簡単に実現できる。この結果はアミノ酸の修飾がいかに簡単になったかを示すよい例である。当然、これが最後の Chemical Mutation 実験となった。詳しい反応機構の研究結果については先の総説³⁾を参照いただきたい。

9. タンパク質の生理機能発現と揺らぎ

タンパク質の生理機能の発現にはその揺らぎが大切であることをタンパク質工学的手法と構造生物学的手法を駆使して解明した。幸いにも筆者の研究室では X 線解析装置、600 MHz NMR 装置、分子グラフィックスコンピュータを自由に使える環境が 10 年程前から整備されている。

酵素活性の温度依存性の低温側での立ち上がりは、主にその酵素が活性を発現するのに十分な揺らぎが実現できたかどうかを反映していることを示した。²¹⁾ さらに、酵素基質複合体の形成で酵素構造は引き締まり揺らぎが小さくなると思われていたが、実は揺らぎがむしろ大きくなる部分がかかなり広範に存在することも示した。²²⁾ 詳しくは先の総説³⁾を参照願いたい。

10. タンパク質の安定化

我々は遺伝子工学が導入される以前から化学修飾によりタンパク質を安定化することを試みてきた。原子間距離に合わせて 2 価性試薬を合成し、リゾチーム分子内に架橋を施した。Lys1 と His15 間²³⁾ や、Trp62 と Asp101 間²⁴⁾ などである。この時代からタンパク質工学を行っていたことになる。その後遺伝子工学を用いての安定化も種々試みたが、さきに偶然調製した Glu35-Trp108 エステル架橋リゾチームの安定性を超えるものは作成できなかった。Glu35-Trp108 架橋リゾチームはネイティブより 14 度も安定である。Lys1-His15 架橋リゾチームはネイティブより 5 度安定で、この両架橋を同時に持つリゾチームを調製したところ、ネイティブより 20 度も安定な 2 重架橋リゾチームを得ることができた。²⁵⁾

一般に安定化と言えば平衡的安定化と理解されている。しかしながら、先ほど示したようにタンパク質のプロテアーゼ消化は変性型で進行するので、ある程度プロテアーゼ濃度が高くなると変性タンパク質が生成してくる速度が律速となる。このように変性タンパク質に共役した不可逆変性に対してタンパ

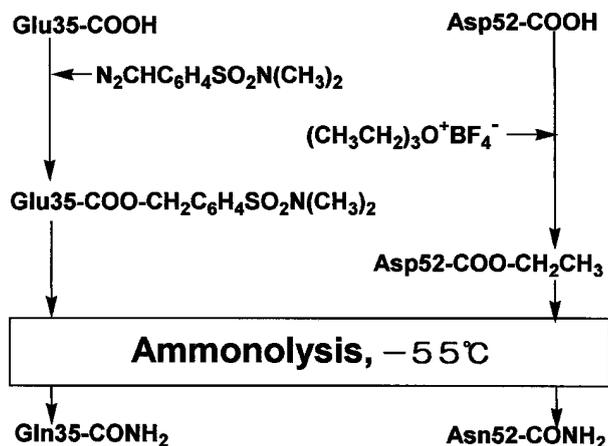


Fig. 4. Amidation of Catalytic Residues, Glu35 and Asp52

ク質を安定化するには、平衡的安定化より変性速度そのものを落とすような速度論的安定化が必要なことを指摘してきた。²⁶⁾ 一方長期保存や過激な条件下でのタンパク質の劣化に対する安定化に対して考察し、方策を打ち出した。²⁶⁾

11. タンパク質のフォールディング

我々は今や多くのタンパク質の一次構造、二次構造、立体構造に関する情報を持ち合わせており、目的の立体構造を構築させるための一次構造のデザインは可能と思われる。しかしながらデザインした一次構造から目的の立体構造を持つタンパク質を組み上げることは非常に難しい。タンパク質は一本のポリペプチドで合成され、それがとてつもなく複雑なフォールディング過程を経て目的の立体構造へたどり着く。そこでこのフォールディング過程をうまく通り抜ける工夫を織り込んでおく必要がある。このためにフォールディング情報の蓄積が大切である。現時点で我々は全くこの情報を持ち合わせていない。

天然のタンパク質には一次構造の中に立体構造の情報とともにこのフォールディングの情報も組み込まれている。そのようなタンパク質のみが進化の過程を生き延びてきたのである。そこで我々は天然のタンパク質からこのフォールディングの情報を読み出すべく努力を行っている。

リゾチームの Trp62 を修飾すると、再生にラグタイムが見えたり、再生収率が落ちたり、²⁷⁾ ある場合には再生によりネイティブとは多少異なる構造に帰結したりする。²⁸⁾ 一方、我々はペプチドフラグメント (59-105) を用いたフォールディング情報の解読も行っている。理由は小さい方が解析しやすいこと、タンパク質は頑強で多少の修飾では強引にフォールディングするので、ペプチドフラグメントの方がファインな情報を取り出せるからである。この研究でも Trp62 がなくなると 2 個の SS 結合の掛け違いが起こる。²⁹⁾ このように、ネイティブ構造では外に飛び出している Trp62 が (Fig. 1) フォールディングに強く関与している理由が不明であった。

これに対する答えが、ドイツの Schwalbe 博士との共同研究で明らかになった。再生開始構造を模して、SS 結合を切断して変性剤非存在下でのリゾチームの構造を NMR で観測した。いくつかの領域でクラスターを作っているように見えた。しかし Trp62Gly 変換体ではこのクラスターが一気に消失

した。このことはこのクラスターはいくつかの領域が集まった 1 つのクラスターからなり、Trp62 がこのクラスターの形成にコアとして重要な働きをしていたことを示している。³⁰⁾ かくしてタンパク質の再生には再生開始構造が重要であることを初めて示すことができた。再生開始構造すなわち生理条件下での変性タンパク質構造は、最近富に注目されているコンフォーメーションアルディーズにおいても重視されている。

12. タンパク質の抗原性

タンパク質の性質の向上を目指してのタンパク質工学による修飾がおおはやりであるが、私ども薬学分野でタンパク質工学をやっていていつも気になることはタンパク質の抗原性の問題である。筆者が免疫の教官となった機会 (1992 年) にこの点に踏み込んだ。

マウスにとってニワトリリゾチームは抗原で、これの投与で強烈に抗体生産が起こる。自己タンパク質であるマウスリゾチームでは抗体生産は全く起こらない。この両者ではアミノ酸が 130 個中 56 個も異なる。Ala114Asn/His115Arg/Gln117Lys の 3 残基変異でマウスリゾチームをニワトリリゾチームに似せただけで抗体生産が起こり、³¹⁾ ある種のマウスではたった 1 残基 (Phe57Leu) ニワトリリゾチームに似せるだけで抗体生産が起こった。³²⁾ たったの 1 残基の変異でも自己タンパク質のマウスリゾチームが抗原となる可能性を証明した。

13. タンパク質に免疫寛容を付与する

タンパク質は修飾により容易に抗原となり得るし、新規にデザインして構築したタンパク質は当然抗原となる。このような状況で、タンパク質を医薬として利用するためにはタンパク質に免疫寛容を付与する方法を確立することが必要である。マウスに未修飾ニワトリリゾチームを投与すると抗体が生産される。ポリエチレングリコール (PEG) 修飾したニワトリリゾチームは抗体を生産しなかった。さらに驚いたことに、PEG 修飾ニワトリリゾチーム投与後未修飾ニワトリリゾチームを投与しても抗体は生産されなかった。³³⁾ このことは PEG 修飾タンパク質がそのタンパク質に対する免疫寛容を惹起したことになる。タンパク質に対し重量比で 1.5 倍量の PEG 修飾が最適で、いくつかのタンパク質で普遍的にそのタンパク質に対する免疫寛容が惹起され

ることを証明した。³⁴⁾

PEG 修飾で免疫寛容が実現する理由を追及して、画期的な結論に達した。それは PEG 修飾で安定化され、そのタンパク質の血中濃度が長期間あるレベルに保たれることが免疫寛容の原因の 1 つであると言うものである。³⁵⁾ 未修飾ニワトリリゾチームは 1 日で血中濃度が検出限界以下に低下する。ところが、PEG 修飾リゾチームは 28 日間も血中濃度があるレベルに保たれ、この間は免疫寛容が成立している。この後寛容は薄れるが、再度 PEG 修飾リゾチームの投与で寛容が成立する。未修飾ニワトリリゾチームでも、高濃度に打ち続けければ血中濃度を維持でき、寛容が成立する。この原理にたてば、タンパク質を安定化して血中濃度を保たせれば、そのタンパク質を抗原性の心配なく使用できるというもので、タンパク質の医薬としての利用に無限の可能性を与えるものである。

14. 色々なリゾチーム

タンパク質の一次構造を決定する仕事は骨が折れるけれどもほぼ確実に完成できるだけに楽しみも大きい研究である。色々な起源からの同種タンパク質の一次構造を決定することで、種の系統樹を形成できるのみならず、頑強に保存されている領域から生理機能に重要な残基を絞り込むこともできるので古くから比較生化学は重要な研究である。最近ではタンパク質工学で、安定性や活性の向上などの性質の向上をデザインするためのヒントを得るためにも使用され、バイオインフォーマティックスの一翼を担う研究である。

我々もリゾチーム研究をリードするグループとして多くのリゾチームの一次構造を決定してきた。報告したものや報告しないままのものもあるが、モルモット、ヒツジ、³⁶⁾ ウシ、³⁶⁾ ハト、ウマ、イヌ、スナグ、ウサギ、³⁷⁾ ウサギ腸³⁸⁾ -1, -2, ハムスター、アザラシ、ブタ-1, -2, -3, イノシシ-1, -2, インドクジャク、ニホンウズラ-2, シロカン、イヌミルク、ネコミルク、イエバイ、³⁹⁾ アサリ、⁴⁰⁾ ミミズの 25 種について一次構造を決定した。さらにニワトリ、ラット、アヒル-1, -2, -3, ニホンウズラ-1, ヒチメンチョウについては構造を確認し、ニワトリ、⁴¹⁾ ラットとアヒル-3 については構造の修正を行った。大いにてこずってどうしても構造決定できなかったものに、魚類とナメクジのリゾチーム

がある。

ウサギのリゾチームは他のリゾチームより安定で、その構造を参考にデザインして、ニワトリリゾチームを安定化することができた。⁴²⁾ アサリリゾチームは他のリゾチームとは全くホモロジーがなく、すでに確立されているニワトリ型、フェージ型、黒鳥型、植物型に加えて新しく無脊椎動物型のリゾチームファミリーを確立させることができた。ミミズリゾチームも散々てこずって、つい最近塩基配列から一次構造を決定した。これも無脊椎動物型であった。

アサリリゾチームは大変興味あるリゾチームである。ホモロジー検索で唯一、ヒルのデスタビラーゼとある程度 (46%) ホモロジーがあることが分かった。⁴⁰⁾ 我々のこの報告を見て、デスタビラーゼの研究者がデスタビラーゼにリゾチーム活性があるのではないかと調べて、溶菌活性を検出した。そこで我々も逆転の発想で、このリゾチームにイソペプチダーゼ活性があるかどうかを検討した。確かにイソペプチダーゼ活性が検出された。イソペプチダーゼ活性とは Glu- γ - ϵ -Lys 結合を切断する活性で、血栓溶解に関与するもので医薬として大いに興味がある。アサリリゾチームは小さな分子 (14 kD) で 7 個の SS 結合を持ち、安定なタンパク質である。溶菌 (キチナーゼ) 活性とイソペプチダーゼ活性を併せ持ち、しかも両部位は異なった領域に存在していることから、俄然このタンパク質の構造と機能が面白くなった。血栓溶解酵素としての利用の道も開きたい……と、リゾチームを楽しむ未練はまだまだ尽きていない訳である。

15. おわりに

研究に限らず、物事はすべて楽しみに転化して楽しむことである。42 年間にわたり、リゾチームの研究を楽しんできたが、その中にはいくつかの新しい発見があり、しかもこれらは偶然に支配されることが多々あった。しかしながらやはり常に研究者の目と心をもってことに接することが大切である。再度 Pasteur の言葉を掲げたい。「偶然は準備された心にのみ微笑む」よい偶然に遭遇するためには多くの実験を行うこと、特に若い研究者はこれが大切で前例にとらわれず果敢にトライすることである。意外な結果が出たら失敗と諦めず、とことん原因を追求することである。偶然を生かすことも大切であ

る。教科書どおりにいかなかった結果が教科書を書き変える大発見につながるのである。

最後になりますが、筆者の40数年にわたる研究生活には、多くの研究者、学生の方々の絶え間ない協力がありました。この機に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Imoto T., Johnson L. N., North A. T. C., Phillips D. C., Rupley J. A., *The Enzymes*, 3rd ed., **7**, 665–868 (1972).
- 2) “Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology,” ed. by Jolles P., Barkhauser, 1996, pp. 163–181.
- 3) Imoto T., *Yakugaku Zasshi*, **122**, 537–546 (2002).
- 4) Hayashi K., Imoto T., Funatsu M., *J. Biochem. (Tokyo)*, **54**, 381–387 (1963).
- 5) Hayashi K., Imoto T., Funatsu G., Funatsu M., *J. Biochem. (Tokyo)*, **58**, 227–235 (1965).
- 6) Imoto T., Rupley J. A., *J. Mol. Biol.*, **80**, 657–668 (1973).
- 7) Imoto T., Fukuda K., Yagishita K., *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 264–269 (1974).
- 8) Imoto T., Yamada H., Ueda T., *J. Mol. Biol.*, **190**, 647–649 (1986).
- 9) Imoto T., Okazaki K., *J. Biochem. (Tokyo)*, **89**, 437–441 (1981).
- 10) Yamada H., Imoto T., Fujita K., Okazaki K., Motomura M., *Biochemistry*, **20**, 4836–4842 (1981).
- 11) Imoto T., Yamada H., *Molecular Cellular Biochem.*, **51**, 111–121 (1983).
- 12) Imoto T., Yamada H. “CRC Handbook of HPCL for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins,” CRC Handbook, 1984, pp. 167–174.
- 13) Miki T., Yasukochi T., Nagatani H., Furuno M., Orita T., Yamada H., Imoto T., Horiuchi T., *Prot. Eng.*, **1**, 327–332 (1987).
- 14) Inoue M., Yamada H., Yasukochi T., Kuroki R., Miki T., Horiuchi T., Imoto T., *Biochemistry*, **31**, 5545–5553 (1992).
- 15) Mine S., Ueda T., Hashimoto Y., Tanake Y., Imoto T., *FEBS Lett.*, **488**, 33–37 (1999).
- 16) Hashimoto Y., Miki T., Mukae M., Ueda T., Imoto T., *Gene*, **207**, 167–170 (1998).
- 17) Maeda Y., Ueda T., Yamada H., Imoto T., *Prot. Eng.*, **7**, 1249–1254 (1994).
- 18) Maeda T., Yamada H., Ueda T., Imoto T., *Prot. Eng.*, **9**, 461–465 (1996).
- 19) Maeda Y., Koga H., Yamada H., Ueda T., Imoto T., *Prot. Eng.*, **8**, 201–205 (1995).
- 20) Kuroki R., Yamada H., Moriyama T., Imoto T., *J. Biol. Chem.*, **261**, 13571–13574 (1986).
- 21) Imoto T., Ueda T., Tamura T., Isakari Y., Abe Y., Inoue M., Miki T., Kawano K., Yamada H., *Prot. Eng.*, **7**, 743–748 (1994).
- 22) Mine S., Tate S., Ueda T., Kainosho M., Imoto T., *J. Mol. Biol.*, **286**, 1547–1565 (1999).
- 23) Ueda T., Yamada H., Hirata M., Imoto T., *Biochemistry*, **24**, 6316–6322 (1985).
- 24) Ueda T., Yamada H., Sakamoto N., Abe Y., Kawano K., Terada Y., Imoto T., *J. Biochem.*, **110**, 719–725 (1991).
- 25) Ueda T., Masumoto K., Ishibashi R., So T., Imoto T., *Prot. Eng.*, **13**, 193–196 (2000).
- 26) Imoto T., *Cell. Mol. Life Sci. (Experientia)*, **53**, 215–223 (1997).
- 27) Ueda T., Yamada H., Aoki H., Imoto T., *J. Biochem.*, **108**, 886–892 (1990).
- 28) Ueda T., Abe Y., Ohkuri T., Kawano K., Terada Y., Imoto T., *Biochemistry*, **34**, 16178–16185 (1995).
- 29) Ueda T., Ohkuri T., Imoto T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **228**, 203–208 (1996).
- 30) Kline-Seetharaman J., Oikawa M., Grimshaw S. B., Wirmer J., Duchardt E., Ueda T., Imoto T., Smith L. J., Dobson C. M., Schwalbe H., *Science*, **295**, 1719–1722 (2002).
- 31) Tsujihata Y., So T., Chijiwa Y., Hashimoto Y., Hirata M., Ueda T., Imoto T., *J. Immunol.*, **165**, 3606–3611 (2000).
- 32) Tsujihata Y., So T., Hashimoto Y., Ueda T., Imoto T., *Mol. Immunol.*, **38**, 375–381 (2001).
- 33) So T., Ito H.-O., Koga T., Ueda T., Imoto T., *Immunology Lett.*, **49**, 91–97 (1996).
- 34) So T., Ito H.-O., Tsujihata Y., Hirata M., Ueda T., Imoto T., *Prot. Eng.*, **12**, 701–705 (1999).
- 35) So T., Ito H.-O., Hirata T., Ueda T., Imoto T., *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 1187–1194 (1999).
- 36) Ito Y., Yamada H., Nakamura M., Yoshikawa A., Ueda T., Imoto T., *Eur. J. Biochem.*, **213**, 649–658 (1993).

-
- 37) Ito Y., Yamada H., Nakamura S., Imoto T., *J. Biochem.*, **107**, 236–241 (1990).
- 38) Ito Y., Hirashima M., Yamada H., Imoto T., *J. Biochem (Tokyo)*, **116**, 1346–1353 (1994).
- 39) Ito Y., Nakamura M., Hotani T., Imoto T., *J. Biochem.*, **118**, 546–551 (1995).
- 40) Ito Y., Yoshikawa A., Hotani T., Fukuda S., Sugimura K., Imoto T., *Eur. J. Biochem.*, **259**, 456–461 (1999).
- 41) Imoto T., Okazaki K., Yamada H., Fujita K., Yamato T., Koga D., *J. Biochem. (Tokyo)*, **90**, 991–995 (1981).
- 42) Motoshima M., Ueda T., Hashimoto Y., Tsutsumi M., Imoto T., *J. Biochem.*, **118**, 1138–1144 (1995).