

EGAMI GOROKU (Egami's Sayings). 3 “Bovine-Equine Research and Copper-Iron Research Are Not So Bad.”

江上語録 3

「牛馬の研究、銅鉄的研究も悪くない」

Kasai, Ken-ichi

Department of Biological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University
Sagamiko, Kanagawa, 199-0195, Japan
FAX: 81-426-85-3742, E-mail: kasai-k@pharm.teikyo-u.ac.jp

I planned a reckless challenge to the hypothesis of Pauling.

My first research in my final year as an undergraduate student in Prof. Egami's lab finished without any notable result. After that, I was allowed to continue research in the same lab as a graduate student on the master course, and given a new research project. Though I used the word “given”, we rather selected one from a number of projects which had been proposed by Prof. Egami. As usual, he proposed a much greater number of projects than those for the new graduate students.

“When you become a student on the doctor course, you have to plan a project by yourself. Then, you can do anything you wish provided that you give due consideration to the tradition of the lab. For the students of the master course, I will propose some projects and I suggest you choose one of them.”

When Prof. Egami generated research projects, he was only interested in whether they were interesting or not. He neglected all the minor factors such as whether it was possible or not. Since he did not consider at all the ability of the students who were going to take up the challenge, the level of proposed projects were irrelevant to the grade of students, *i.e.*, whether they were undergraduate or graduate students. He did not hesitate to propose very difficult projects, which seemed scarcely suitable for graduate students on the doctor course, even to undergraduate students. Therefore, it seemed that every project was too difficult to be completed during two years of the master course. Some of them were rather outrageous. It was unbelievable that I should choose the most outrageous one among them having been enchanted by Egami's magic. I totally forgot my bitter experience during the undergraduate course, and was caught up by a fantastic dream of success and admiration from the world.

It was a reckless challenge to examine the hypothesis of Pauling, that is, attempt to elucidate the mechanism of formation of the binding site of antibodies. Though it has become a historical episode in bioscience, Pauling once proposed the instruction theory. He tried to explain why it was possible for the

私は Pauling の仮説に挑戦しようとした。

江上研究室での私の卒業研究は、目に見える成果を何も挙げられずに終わったが、大学院の修士課程もそこで続けさせてもらうことになり、新しい研究テーマが与えられた。与えられたとはいっても、4年生のときと同じように、修士課程の大学院生の数よりもずっと多くの研究テーマを江上先生が提示して、そこから自分がやりたいものを選ぶのである。

「博士課程になったら自分で研究テーマを考えてもらう。そのときは研究室の伝統を十分に配慮しさえすれば、なんでも自分がやりたいことをやってよい。でも修士課程までは私がテーマを出すから、そこから選びなさい」

いつものことながら、江上先生が研究テーマを考え出すときは、「面白いが、どうか」だけが問題であり、「できそうか、どうか」などという低次元の要素は完全に配慮の外。実行する学生の能力などまるで意に介さないで、4年生であろうが修士課程であろうがテーマのレベルに差はない。博士課程の院生でもどうかな、と思うようなテーマであっても、4年生に平気で出してしまう。だから修士の2年間で片がつきそうな無難なものなどなく、例のごとくかなりとんでもないものもいくつも混じっていた。あろうことか、私はその中でもとびきりとんでもないテーマを選んでしまった。またも江上魔術にかけられて、卒業研究での痛い経験などけりりと忘れて、今度こそ世界をアツと言わせてやるぞと、身の程知らずの夢にとりつかれてしまったのだ。

それは Pauling の仮説を検証しようというだけそれた挑戦だった。つまり抗体の特異性がどのようにして決まるのかを解明する企てである。今日では既に歴史の1ページになってしまっているが、かつて Pauling は指令説を唱えた。免疫系があらゆる

immune system to produce specific antibodies against every foreign substance. He proposed that the polypeptide chain of antibody would be flexible enough to construct the conformation of the binding site that can accommodate any possible antigen molecule; that is, the antigen would serve as a template for an antibody during the process of folding of a random polypeptide chain.

This hypothesis was widely accepted because it was proposed by Pauling who was the highest authority on molecular structure and the prophet of α -helix. On the other hand, Burnet proposed the selection theory on the basis of biological phenomena such as immune tolerance, and the number of people who approved this theory was increasing. However, in those days, knowledge of both primary and tertiary structures of antibodies were still very poor, the difference between T and B cells was not yet recognized, and nothing was known about the gene structure for antibodies. Therefore, it was too early to explain a rational mechanism for the formation of specific antibodies, and it was not possible to conclude which theory was correct.

Since Prof. Egami was very interested in immune phenomena, he decided to solve this problem from the molecular points of view. It occurred to him to use the technique of reviving dead proteins. About three years before, Anfinsen's group had made a great discovery. They completely denatured bovine pancreatic ribonuclease with urea and a reducing agent, which splits disulfide bonds. This resulted in complete loss of the catalytic activity. However, if the denatured protein was allowed to be oxidized slowly after removal of urea and the reducing agent, its activity was found to be restored completely. Until this discovery, proteins had been believed to be extremely unstable and denaturation was irreversible; that is, once a protein was dead, it would be absolutely impossible to revive it. This finding was really a big event because it reversed the popular concept, and resulted in the establishment of today's common concept that the information necessary for the proper folding of polypeptides resides in the amino acid sequence.

"This means that we can produce a protein with a fully ordered conformation from a random polypeptide *in vitro*. It is very interesting to apply this technique to antibodies. Firstly, we destroy completely the conformation of an antibody molecule by urea and a reducing agent, and make it return to its starting state immediately after birth, that is, a state of random coil. Then, we remove urea and the reducing agent, and let it fold again in order to attain a certain conformation. If we don't interfere with, the protein will reach its original conformation. But, if we add some substance to the solution, what will happen? If Pauling's hypothesis is correct, the protein will fold by using the added molecule as a template. Then, we might be able to obtain an antibody molecule which has a specific binding site for the added molecule."

As usual, he uttered these words energetically like a ma-

異物に対して特異的抗体を作ることができるのは、抗体タンパク質に柔軟性があり、抗原分子の形に合わせて結合部位の立体構造を作れるからだ、つまり無秩序なポリペプチドから立体構造を作り上げるときに、抗原が鋳型になるからだという説である。

分子構造の最高権威、 α -ヘリックスの予言者として高名な Pauling の唱えたものであり、当時の知識レベルでは分かりやすい考え方だったので、納得していた人が多かった。しかし一方で、Burnet は免疫寛容現象のような生物学的な観点から選択説を唱え、じわじわと支持者を獲得しつつあった。しかし抗体についてのタンパク質レベルでの知識はきわめて乏しく、T 細胞や B 細胞もまだ区別されておらず、まして遺伝子のことなど皆目分かっていなかったため、具体的な機構を合理的に説明できる段階ではなかった。だから指令説と選択説のどちらが正しいかは未解決だった。

江上先生は免疫現象に大きな関心を寄せていたので、分子論の立場からこれに決着をつけることをもくろんだ。その手段として利用しようと考えたのが、死んだタンパク質を生き返らせる技術である。3 年ほど前に Anfinsen のグループが画期的な発見をしていた。ウシ膵臓リボヌクレアーゼを尿素で変性させてから、ジスルフィド結合を還元剤で切ってしまうと、酵素は完全に活性を失う。ところが、尿素と還元剤を除いてから、酸化的な条件でゆっくりと養生させると、酵素活性が完全に戻る。それまでの数十年間、タンパク質はきわめて不安定な構造をしており、変性したら不可逆、つまり死んだら生き返らない、と誰もが信じて疑わなかった。その常識をくつがえしたのだから大事件だった。タンパク質の立体構造の情報がアミノ酸配列の中に宿るといふ、今日の常識の原点になった発見である。

「つまり試験管の中で、まったく無秩序な構造のポリペプチドから、秩序ある立体構造をもったタンパク質を作れるようになったということなんだよ。そこで同じことを抗体タンパク質に適用したらとても面白いことができるじゃないか。抗体の立体構造を尿素と還元剤で完全に壊し、生まれた直後のかたち、つまり無秩序なコイル状態にまで戻してやる。そして尿素と還元剤を除去して、もう一度立体構造を作らせてやる。このときに何もしなければ元の形に戻ってしまって、元と同じ特異性になるかも知れないが、何か適当な分子を入れておいたらどうなるだろう。もしも Pauling の仮説が正しければ、その分子を鋳型にしてポリペプチドが巻き戻るだろうから、その分子に特異的な抗原結合部位ができるはずだ」

いつものように神に憑りつかれ、両手をビュンビュン振り

chine gun in a shrill voice, spitting, and shaking both hands vigorously. The flood of words from the divinely inspired brain stuck into my brain cells. He ignored completely the possibility of failure. He was not anxious at all about the possibility that it might be too hard for an inexperienced graduate student on a master course to complete such a bold project or to produce any positive results. His power was overwhelming and I was totally enchanted by the freshness, boldness, and fun of the idea. Since I lacked vision, I dreamed only of success, and chose this project without hesitation. Though there were three new graduate students including me, no one was trapped by such a dangerous project except me.

Readers should be surprised at this story. "Alchemy again! You were too naive if you expected you could succeed." "Such a project was too rough because it was based only on instinct." "You were too simple to be trapped by such a ridiculous idea." "Since Pauling's hypothesis proved to be incorrect, such a project could never be successful." I totally agree with these criticisms. From the contemporary viewpoints, there should have been no chance of success. But I was a real greenhorn who had been caught by such a fantastic dream.

However, I became somewhat prudent when I was going to start the experiments. Though Prof. Egami had given me a splendid idea, he did not consider a realistic protocol for the conduct of the experiments; e.g., which antibody of which animal, which antigen, and which experimental procedure, etc., should be used. It was not his responsibility, but was the responsibility of the student who chose the project to put the idea into practice. Therefore, I thought I had to think them through.

You can hardly imagine how poor the knowledge on the structure of antibodies was at that time. We had only the ultracentrifugation method to determine molecular weight of proteins. None of the gel filtration chromatography and SDS-PAGE had been invented. We only knew that antibodies are macromolecules having a molecular weight of more than 100 thousands. No one knew that they are composed of H and L chains. Since efficient techniques such as affinity chromatography and monoclonal antibody production were not yet available, it was impossible to obtain a homogeneous antibody. Therefore, the primary structure of antibodies were totally unknown. If one mentioned a specific antibody, it meant only a fraction of antiserum treated by primitive purification procedures such as ammonium sulfate precipitation. Someone began to use DEAE cellulose which had been available shortly before, and they reported its usefulness to obtain a more purified antibody.

As to the circumstances in Egami's lab, it was rather advantageous because Dr. Jiro Koyama and Dr. Tsuneko Uchida, both of them experienced in immunochemistry, were working as staff. However, their own research projects were different from those which were targeted at antibodies at protein level, so

回し、唾を盛大に飛ばしながら、頭のてっぺんから噴出させる言葉の洪水。ものすごいスピードでこちらの脳細胞にキンキンと突き刺さってくる。いつものように失敗の可能性など眼中になし。こんなだいたいそれテーマでは駆け出しの修士課程の院生が2年間でできっこないとか、結果を何も出せずに終わるのじゃないか、といった心配は一切していなかった。先生のパワー、発想の斬新さ、大胆さ、面白さに圧倒されるばかりだった。先見の明に欠けている私には、成功することしか想像できず、すぐにこのテーマを選んでしまった。私と一緒に修士課程を始めた者は3人いたが、こんな危険なテーマに誘惑された者はまたも私だけだった。

読者の皆さんがあきれはてている様子が目に浮かぶ。「またしても錬金術だ。そんなことができるなんてナイーブすぎる」「直感だけでもとづいた仮説、荒っぽすぎる」「こんな無茶なテーマにたぶらかされるなんてお前はおめでたすぎる」「Paulingの仮説は大間違いだったんだから、もともとこんな実験が成功するはずがない」すべてごもっともで、今日の目から見れば、こんな実験が成功する可能性は万に一つもなかったはずだ。しかし私は大成功の夢だけをひたすらふくらませる青二才だった。

しかし実際に実験を始める段になって、さすがに私も今度は少し慎重になった。江上先生はとてつもないアイデアは出すが、それをどういうふうに行うかについての実際的なプロトコルはまるで考えていない。どんな動物のどんな抗体を使うのか、抗原は何にするのか、どんな実験技術を利用し、どのような操作をするのか、具体的なことなどまったく詰めていない。そんなことを考えるのは、テーマを生み出す者の役目ではない。アイデアを具体的な実験として実体化するのは、テーマを選んだ弟子の責任なのだから。まずは慎重に考えなければならぬ。

ところで当時の抗体についての知識レベルは、今日では想像もつかないほど低かった。タンパク質の分子量を測定するのに超遠心機を使うしかなかった時代である。分子ふるいクロマトグラフィーやSDS-PAGEも実用化されていなかった。抗体は10万以上の巨大分子だということがわかっていくくらいで、H鎖とL鎖からなることすらわかっていなかった。アフィニティークロマトグラフィー法も、モノクローン抗体技術ももちろんなかったから、均一な抗体など得られるはずがなく、一次構造などまったくわかっていなかった。特異的抗体を使って研究している人がいるといったって、抗原で免疫した動物の抗血清を硫酸沈殿で精製した程度のもので、最近できたDEAEセルロースを使うともっときれいになるよ、と言われ始めた程度の状況だった。

研究室の環境はというと、スタッフとして免疫化学に明るい小山次郎博士と内田庸子博士がいたという点で有利な状況にあったといえるが、抗体を分子レベルでの研究対象にしていた

there was essentially no base for my project. It was almost the same everywhere in the world at that time. Prof. Egami's idea was too advanced.

I became somewhat wiser as a result of my bitter experience during my first research in the final year of my undergraduate course. Therefore, I thought it would be too reckless to challenge antibodies from the beginning because they were too big and heterogeneous, and it would be better to check several critical points in advance. Was denaturation-renaturation possible for every protein? The success of Anfinsen's group might have been attributed to some special ability of bovine ribonuclease. Though some papers had appeared reporting the success of similar experiments applied to other proteins such as lysozyme and trypsin, all of them were rather small. I thought it would be much safer to practice using a small protein which would be easier to handle and to verify whether it worked or not, before the challenge to antibody proteins which would be very difficult to handle.

Fortunately, my seniors Dr. Sadako Yamagata and Dr. Kenji Takahashi had already done a preliminary experiment on the denaturation-renaturation experiment of *Aspergillus oryzae* ribonuclease T_1 and got some results. However, this project was interrupted because Dr. Yamagata moved to another project and Dr. Takahashi was occupied with the work on the determination of the complete amino acid sequence of ribonuclease T_1 . Therefore, there remained some unsolved problems. For example, if the denaturation process was stopped at a point where some residual enzymatic activity remained, complete restoration of the enzymatic activity was possible. However, if the enzyme was treated until the activity was completely lost, it was not possible to restore full activity. If the denaturation was reversible only within a certain limit and became irreversible when this limit was exceeded, the process would be very complicated. Therefore, if I tried to examine ribonuclease T_1 and failed to obtain results essentially similar to those which Anfinsen's group obtained, the challenge to antibodies would become almost unrealistic.

Therefore, I dared to ask Prof. Egami permission to do some practice on ribonuclease T_1 and compare the results with Anfinsen's group. I was a little nervous because I was afraid he might say, "You should start immediately using antibodies!" However, he only said, "Do as you like." When he was in the lab, he used to come to our room two or three times a day and ask us, "Is your research going well?" Though these words of course put us under a certain pressure, he never forced us to go on with the research saying for example, "Why are you so slow?" or "Hurry up!"

Then I started experiments using ribonuclease T_1 as an object for practice. However, I made a great mistake in expecting that it would take a few months. As a matter of fact, almost all experiments I did failed contrary to my expectation. Finally,

わけではないので、私が仕事を始める土台は実質的にはほとんどなかった。もっとも当時の状況では、世界中のどこの研究室だって同じような状況だったはずで、私のテーマそのものがあまりにも時期尚早だった。

それでも卒業研究の経験でちょっとは利口になって、いきなり抗体などという、やたらに大きい不均一なタンパク質に挑戦するのは無謀だから、今度はあらかじめ大事なところをきちんと抑えておこうと考えた。変性・再生がどんなタンパク質でもうまくゆくとはいえない。Anfinsenのグループが成功したのは、ウシ・リボヌクレアーゼの特殊事情だったのかも知れない。この頃までにリゾチームやトリプシンなどでも成功したという報告が出ていたが、みんな小さいタンパク質ばかりだ。自分でも一度、小さくてやさしそうなタンパク質でうまくゆくことを確かめてから、難しそうな抗体に挑戦した方が安全だろう。

ちょうど都合のよいことに、先輩の山形貞子博士と高橋健治博士が、コウジカビのリボヌクレアーゼ T_1 について変性・再生の実験を既にやっていて、ある程度の結果を得ていた。ただし、変性・再生が可能だということを現象的に確認した段階でこの仕事は中断されていた。山形さんは別のテーマに移っており、高橋さんは一日も早くリボヌクレアーゼ T_1 の全一次構造を決定しようと超多忙だったからである。したがって解釈が難しい実験結果がいくつか残っていた。たとえば酵素活性がある程度残っているところで変性操作を止めれば、酵素活性は回復するが、完全に失活するまで変性させると、元に戻らないという観察などである。ある段階までは可逆的でも、それを過ぎると不可逆的になってしまうようなことがあるとすれば、抗体について実験した場合に、非常に難しいことになりかねない。だからリボヌクレアーゼ T_1 についても、Anfinsenらがウシ・リボヌクレアーゼで報告したのと同じレベルのデータが出せないようでは、とても抗体にまで手を出せそうにもないと思った。

そこで江上先生に、まずは練習としてリボヌクレアーゼ T_1 を使ってAnfinsenらの実験の追試をしたいのですがと、恐る恐る申し出た。「なんですぐに抗体にとりかからないのか」と言われはしないかと心配したのだが、江上先生はいたって気軽に「ああ、いいよ」と言ってくれた。江上先生は大学にいるときは、1日の間に何度でも「どう、研究はうまくいっている？」と聞きに来る。それはそれでプレッシャーにはなるが、「何をグズグズしている」とか「早くやれ」などとは絶対に言わないのだ。

そういうわけで練習台としてリボヌクレアーゼ T_1 を使って実験を始めた。せいぜい2カ月もあれば済むだろうをたかをくくっていたのだが、これが大間違いだった。あらゆることが誤算に次ぐ誤算。酵素活性を0%に落としてから、100%までに回

it took almost one year to succeed in the fundamental process, that is, complete restoration of enzymatic activity after complete destruction.

I would be grateful if the readers would be patient enough to hear my excuse. It took about two weeks to obtain pure ribonuclease T_1 from crude Takadiastase powder, which was the starting material. Because of the lack of effective purification methods such as affinity chromatography, we had to combine several complicated processes to obtain adequately pure protein. Several milligrams of the protein obtained after such a troublesome process disappeared after only a few experiments. I had been too optimistic to think that I had only to carry on a little from the point which Dr. Yamagata and Dr. Takahashi had reached. But I was completely wrong. The mimic of Anfinsen's group did not work everywhere.

Even the first step did not go well. I failed to destroy completely the enzymatic activity with urea and a reducing agent. Several percent of the original activity always remained even after prolonged treatment. Since I had to show complete restoration of the activity after its complete loss, this situation was undesirable. This was finally explained by the fact that ribonuclease T_1 was a protein which is very easily regenerated. When I measured enzymatic activity, the enzyme was incubated with the substrate at 37 °C for 15 minutes. During this incubation period, a part of the molecules which had been completely denatured refolded and restored the activity.

Another problem was that removal of urea and the reducing agent by gel filtration, which had been adopted by Anfinsen's group, did not work at all. No protein was eluted from the gel filtration column. This turned out to be due to the acidic nature of ribonuclease T_1 . Gel filtration had to be carried out at an acidic pH in order to prevent reoxidation of the protein during the gel filtration process. Under such conditions, the enzyme became insoluble in the column.

It was also difficult to restore 100% activity after complete denaturation. This was due to undesired side reactions by impurities contained in both urea and the reducing agent. Consequently, almost all processes did not proceed as expected. It took one or two months to identify the reason for each problem, consider appropriate measures, and make it go well.

Therefore, my foolish expectation that I would be able to easily mimic the work of Anfinsen's group resulted in disappointment. Bovine pancreatic ribonuclease and ribonuclease T_1 were extremely different though both of them are called ribonuclease. Even with almost the same experiment, the same result could not be obtained.

I conducted the research with the worst efficiency, because I consumed purified ribonuclease T_1 in one or two experiments, and needed to prepare again and again the purified enzyme from Takadiastase in order to continue the experiments. Several tens of mg of the purified enzyme were immediately

復させる。このもっとも基本的なことができるようになるまでに、アツという間に1年くらいかかってしまったのだ。

一応言い訳をしておくと、材料のリボヌクレアーゼ T_1 を原料である粗タカジアスターゼ粉末から純粋なタンパク質として得るために2週間はかかる。アフィニティークロマトグラフィーなどという効率的な手段がなかった頃だから、いくつものステップを組合わせてようやく精製できるのである。そうして得た数10 mgのタンパク質は、1回か2回実験すると無くなってしまふ。ウシ・リボヌクレアーゼの手本があるし、山形さん達がある程度のところまで進めていたのだから、後はほんの少しつけ加えれば良いだけだ、2回くらい実験すれば片がつくだろう、などと楽観していたら、とんでもないことだった。いたるところでAnfinsenらの真似が通用しないのだ。

たとえば出だしのところからうまくゆかない。尿素と還元剤で処理しても、酵素活性を完全に無くすことができない。いくら時間を延ばしても、数%の活性が残っている。完全に死んだタンパク質が生き返ることを示す必要があるのだから、これではまずい。この問題の答えは、リボヌクレアーゼ T_1 が非常に生き返りやすいタンパク質だったからだった。酵素活性を測るときには、基質を含む緩衝液に酵素試料を加えて、37 °Cで15分間反応させるが、その間に完全に死んでいたはずの酵素の一部が生き返っていたのだった。

また失活させてから尿素と還元剤を除去する方法として、Anfinsenらはゲル濾過を行っていたが、それを真似すると全然うまくゆかない。ゲル濾過カラムからタンパク質が出てこなくなる。この問題は、リボヌクレアーゼ T_1 が強い酸性タンパク質だったことにあった。SS結合の再酸化を防ぐためにゲル濾過を酸性の条件下で行う必要があるが、そうすると尿素が除かれたとき、リボヌクレアーゼ T_1 がカラムの中で不溶性になってしまうのである。

また完全に失活した酵素を生き返らせようとしても、なかなか100%にまでは戻せなかった。これは使った尿素や還元剤に含まれる不純物のために副反応が起こったからだった。こんな調子で、やることなすことに問題が起こった。ひとつひとつについて原因を突き止め、対策を立て、それが効を奏するまでに、アツという間に1、2カ月ずつ経ってしまったのだ。

そういうわけで、Anfinsenらの真似をすればすぐにできるさ、という甘い見通しがことごとくはずれた。名前は同じリボヌクレアーゼでも、タンパク質としての性質はまるで違って、同じ実験をやったからといって、同じことは起こらないのだった。

更なる不手際は、精製した酵素をすぐに使い果たすので、次の実験をするために、またタカジアスターゼ粉末から精製しなければならぬ。数10 mg精製しては、ろくな結果も出ないうちに全部使い果たし、また酵素を精製するところから始め

lost without giving any positive result, and I had to prepare the enzyme again. Bad insight and wrong expectation made my research extremely inefficient. From this lesson, I always advise my colleagues and students to be patient and stock the materials needed for a project as much as possible before the start.

My senior Dr. Takahashi was an excellent model. When he decided to determine the complete amino acid sequence of ribonuclease T_1 during the doctor course, he spent almost half a year preparing ribonuclease T_1 and stocked a huge amount enough for several years of research. I still remember the scene when he talked for the first time about the complete primary structure of ribonuclease T_1 , the fruit of his superhuman effort, in a scientific meeting. After his lecture, one of the audience asked him. "How much ribonuclease T_1 did you use until you completed your work? Was it several tens of mg?" His answer was cool and sophisticated as he was at all times. "About several grams." The meeting room was filled with sighs.

Since I did not have the foresight that Dr. Takahashi had, I conducted my research with the worst efficiency; repetitions of preparation and consumption. During those days, I don't know how many times Prof. Egami came to our room and asked me: "Is your research going well?" My reply was always only, "Ah, uhh, not so bad." I still deeply regret that I was never able to answer with any other sincerer words.

The miserable consequence was, that almost one year had been spent for the practice before I could even attack the main project. Moreover, I could not conclude these preparatory experiments at this point, because Prof. Egami always told us.

"It is not polite to eat only the toppings of sushi. The same is true of research. You are not allowed to examine only the interesting portions. Whenever you start a research project, you should not throw out every minor part even if the major parts are finished. Even if you feel reluctant, you have a responsibility to clean up every detail so that people who may follow your research can avoid unnecessary experiments. You should not leave the room with a mess thinking nothing interesting is left."

Though my experiments were intended as practice, some new findings on ribonuclease T_1 were obtained. These findings should be published. To do so, some additional experiments were essential in order to make the work complete. Though the enzymatic activity was fully restored, some physicochemical data such as sedimentation coefficients and data on optical rotation should be collected in order to confirm that the conformation had been regenerated. It was also necessary to examine the effects of other molecules during the renaturation process from a random coil to a fully folded molecule.

When I finished all the necessary experiments, there was no time left to challenge antibodies. Since I had encountered too many problems even in the experiments on the simplest protein ribonuclease T_1 , if I had challenged antibodies, there would

る。これを何回も繰り返すはめになった。見通しの悪さ、誤算につく誤算で、じつに非効率なことをやってしまった。これを教訓として、今では研究室員や学生に、研究を始めるときには急がば廻れ、時間がかかっても最初に十分な量の材料を集めるようにと忠告している。

先輩の高橋健治さんは素晴らしいお手本だ。高橋さんはリボヌクレアーゼ T_1 の一次構造決定を博士課程のテーマとしたとき、まず半年くらいかけて、仕事が完成するまでもつように、大量の酵素を精製してストックしたそうである。数年間にわたるたった1人での超人的努力が実って、全構造を学会で発表したときの光景を思い出す。発表が終わったときある人が質問した。「その仕事を完成するまでにリボヌクレアーゼ T_1 を全部で何10 mgくらい使いましたか？」その時の高橋さんのカッコよさは最高だった。常のごとくクールに一言。「数gですね」ほう！という溜息の波が会場中を走った。

私には高橋さんのような先見の明などなかったから、精製しては使い果たし、の繰り返しで、最悪の効率で仕事を進めてしまった。その間、いったい何度、突然実験室に入ってきた江上先生に、「どう、研究はうまく進んでる？」と訊ねられたことだろう。そのたびにできる返事は、「ええ、まあ」の一言だけ。いつもこの一言であしらってしまい、先生、本当に申し訳ありませんでした。

結局、本番の実験に入る以前の予備実験にほぼ1年かけてしまうという情けない顛末になった。しかしこれで予備実験を終わりにするわけにはいかなかった。江上先生は常々言っていた。

「にぎり寿司のネタだけを食べたんじゃ失礼だよ。研究だって同じで、美味しいところだけつまみ食いするのは駄目だ。いったん研究を始めたなら、本筋の結果が出たからといって、後はどうでも良いと放り出してはいけない。面倒くさいと思っても、後からやる人が無駄な実験をすることにならないように、周辺の細々としたことまできちんと片づけることが、研究を始めた者の責任なんだから。どうせ面白いことは残っていないだろうと散らかしっぱなしにするべきではない」

予備実験のつもりで手がけたことだったが、一応いくつかの新知見も得られた。これは論文として残さなくてはならないが、そのためには更にいくつか実験して、完全な形にする必要がある。酵素活性は100%戻ったが、立体構造や形も完全に元に戻っていることを確認するため、超遠心機で沈降係数を比較したり、旋光性で二次構造を比較する必要がある。タンパク質をコイル状態から巻き戻すときに、他の分子の影響があるのかどうかも調べなければならない。

それやこれやのやらねばならないことをやっていたら、抗体に挑戦する時間なんて残っていなかった。タンパク質としてもっとも単純なりボヌクレアーゼで、これだけ手こずったのだから、抗体などとても手に負える相手ではなかったはずだが、

have been no chance to obtain something meaningful. Consequently, my research during the master course resulted in only the denaturation and renaturation of ribonuclease T_1 . I could only show that similar results to those of Anfinsen's group were obtained in the case of *Aspergillus* ribonuclease T_1 . It was only an imitation of the original work!

In this way, I destroyed the splendid dream of Prof. Egami. Since I was not brave enough to ask Prof. Egami directly about his opinion, I did not know his true evaluation. He never accused me at all of such a half-finished job. However, this was how he was. Even if the work of his students seemed very humble, he never blamed them saying things like, "What a stupid work this is!" or "What meaningless work!" On the contrary, he always encouraged them as much as he could saying, "Excellent!" or "Wonderful discovery!"

In addition, there was another reason why Prof. Egami could not accuse me: though I had not intended to do so, I obeyed faithfully his lesson which he repeated hundreds of times.

"Bovine-equine research is not so bad. Copper-iron research is not so bad"

A person does some research using bovine samples. Another person, who looked at this work, does almost the same experiments using equine samples. Such research which lacks any originality and is only the product of self satisfaction is called scornfully "bovine-equine research". "Copper-iron research" also means imitation work done on iron mimicking other people's work on copper. If you are told that your work is bovine-equine research, it is the most dishonorable abuse. No one will read such a report. However, Prof. Egami said that such work is not so bad.

"It is not so bad to imitate a study on bovine samples done by someone and do a similar study on equine samples. No one knows whether identical results to those obtained for bovine samples are obtained on equine samples or not. Since we cannot predict the result until we experimentally prove it, it is worth trying and should be done by someone. The worst is to have the preconception that nothing new will turn out on equine samples."

I did not intend to do bovine-equine research or copper-iron research. Prof. Egami's original idea could be compared to the big leap from ant to elephant. My inability replaced this brilliant challenge with "bovine-*Aspergillus* research". Though this was really a bargain, it could be considered that I realized faithfully the lesson of my teacher.

There was another point in that I was faithful to Egami's sayings: that is, I respected the tradition of the lab. "When you conduct your research, you should respect the tradition of the lab." This phrase was also often uttered by Prof. Egami. I added something new to the knowledge on ribonuclease T_1 that was one of the traditional objects of Egami's lab.

結局、私の修士課程での仕事は、リボヌクレアーゼ T_1 の変性と再生だけで終わってしまった。Anfinsenらがウシ臍臓リボヌクレアーゼでやったことを、コウジカビのリボヌクレアーゼ T_1 でもやったらうまくいきました、というだけ。まったくの二番煎じ!

こうして私は江上先生の壮大な夢をぶち壊してしまった。先生が本心でどう思っていたか、私は訊ねるだけの勇気がなかったからわからない。しかし先生はこのような腰ぐけについて、私を一言も叱らなかつた。当然なことで、江上先生は弟子がどんな仕事をして、「何だ、これは?」とか「こんな仕事じゃ駄目だ!」とは絶対に言わない。それとは逆に、「それは素晴らしい!」「大発見だ!」と最大限におだて上げるのが常だったから。

それに江上先生が私を叱れるわけがない。なぜか?私は意図したわけではないが、結果的には先生が何十回でも繰り返して止まなかった教えを忠実に守ったことになるのだから。

「牛馬的研究も悪くない。銅鉄的研究も悪くない」

ある人がウシを材料にして研究した。それを見た別の人が、ウマを材料にして同じことをやって発表する。このようなオリジナリティーの欠如した、自己満足だけの研究を軽蔑して牛馬的研究と言う。銅鉄的研究も同じで、人が銅でやったことを、鉄で真似することである。お前の研究は牛馬的だ、銅鉄的だと言われたら、研究者にとって最も不名誉な罵声と言ってよい。こういった研究の論文は誰も読まない。ところが江上先生は、こういう研究も悪くないと言うのだ。

「人がウシでやったことをウマでやってもいいのです。ウシでわかったことが全てウマでも同じかどうかなんて、誰にもわかりやしない。まったく違うことがわかるかも知れない。やって見なければわからないことなんだから、大いにやる価値があるし、誰かがやらねばならない。いちばんいけないのは、ウマでは何も新しいことを発見できるはずがない、というような先入観を持つことだ」

私は別に牛馬的、銅鉄的研究をやろうとたくらんだわけではない。江上先生の本来のテーマは、いわばアリから象への大飛躍だった。Paulingの仮説の実証が目標だった。その壮大な挑戦が、私の無能さのゆえに牛コウジカビの研究にすり代ってしまった。明らかな矮小化だが、一方では私は師の教えを忠実に実現したことになる。

実はもうひとつ江上語録に忠実だった点がある。それは研究室の伝統を尊重したことである。「研究を進めるにあたっては、自分の研究室の伝統を大事にせよ」これも江上先生がいつも言っていたことである。私は江上研究室の伝統であるリボヌクレアーゼ T_1 に少しは新しいことをつけ加えたのである。

もしも江上先生が私のぶざまな結末を大目に見てくれたのだとすると、江上語録を忠実に実行したこと、先生の錬金術の夢にひとときはお付き合いしたことに免じてのことだったのだろう。

If Prof. Egami permitted my awkward results, it may be due to my loyalty to Egami's saying and my tentative sympathy with his fantasy of alchemy.

I am always indebted to Prof. Egami for bargaining his magnificent project. However, for my part, I learned many things from this experience. For example, "it is impossible to achieve success by imitating other people's success," "an original work cannot be accomplished unless you establish your own experimental system," "nothing is known until you examine by yourself," "all proteins are different," etc. I also understood more deeply the phrase, "bovine-equine research and copper-iron research are not so bad." I have always been supported by this phrase in my career as a scientist after I left Egami's labo. Therefore, though it is of personal satisfaction, the bovine-*Aspergillus* research had significant meaning for me.

I am afraid that some people who did not hear directly from Prof. Egami might take it that he claimed, "It is enough to do bovine-equine research or copper-iron research." This is absolutely not the case. Many phrases in Egami's sayings are paradoxical. The content is almost opposite to the package. His idea was always magnificent and far from bovine-equine or copper-iron. He never said, "Be satisfied with bovine-equine research or copper-iron research". The true meaning is, "Don't conclude or underestimate something just from its appearance. Even if other people cannot find anything significant from bovine-equine or copper-iron research, you have to find out important things hidden in it. You should polish yourself in order to acquire such an ability, make a continuous effort, and retain this attitude."

"I don't intend to say that everybody has to do bovine-equine research or copper-iron research. If you were a true genius, you would be able to foresee the most important thing and make a great discovery. However, it is impossible for ordinary researchers as myself. But, it will be still possible for us to have a chance to make an unexpected new finding, if we earnestly continue our own research step by step, which might seem to be an imitation of other people's work. Our finding that the specificity of ribonuclease T₁ was different from that of bovine ribonuclease came out of an experiment that had been neglected by other people. Therefore, bovine-equine research and copper-iron research are not so bad. I always wish to ascend slowly a hill which is not visible to other people, and find a pretty flower which is not visible to other people."

A horse is not identical to a cow. Iron is not identical to copper. Therefore, some treasure should be hidden there. You have to have the insight to find it and expose it. Therefore, the phrase, "bovine-equine research and copper-iron research are not so bad", does not mean, "you may be satisfied with bovine-equine research and copper-iron research." You have to make an important finding even from bovine-equine research or cop-

先生の壮大なテーマを矮小化してしまったという負い目は一生消えない。しかし私自身にとっては、このときの経験がたくさんの貴重な教訓を与えてくれた。たとえば、「他人が成功したことの真似なんかして成功するはずがない」「自分の実験系を確立しなければ独自の研究なんてできっこない」「どんなことでもやってみなければわからない」「タンパク質はみんな違う」などなどである。また「牛馬的研究、銅鉄的研究も悪くない」という言葉の理解が大いに深まった。江上研究室を離れて後も、この言葉が私の研究人生の支えのひとつになった。だから独りよがりではあるが、牛コウジカビの研究には大きな意味があった。

江上語録にじかに接していないと、江上先生が「牛馬的研究、銅鉄的研究さえやっていけば良い」と主張していたように受け取られるおそれがあるが、それは違う。江上語録の多くは逆説である。うわべと中身はまるで正反対だ。江上先生の研究上のアイデアは、いつでも牛馬的、銅鉄的発想からかけ離れて壮大だった。また「牛馬的、銅鉄的研究で満足してよい」とも断じて言っていない。「うわべだけ見て牛馬的、銅鉄的と判断したり、軽視するな。他人が牛馬的、銅鉄的としか見ることができないとしても、君はその中に潜む重要なものを見つけ出せ、そういう能力を磨け、そういう問題意識、姿勢を持って」と言っているのだ。

「私はみんなが牛馬的研究、銅鉄的研究をやれと言っているわけではないよ。真の天才なら、初めからいちばん大事なことを予見して、大発見をできるかもしれないが、私たち凡人にはそんなことはできっこない。でもそんな無理なことをしなくたって、人の模倣のように見えることであっても、コツコツと調べてゆくうちに、予想もしなかったところで新しい発見をするチャンスがあるはずだということなの。リボヌクレアーゼT₁の特異性が豚臓リボヌクレアーゼと違うという私たちの発見は、人が牛馬的研究、銅鉄的研究だと馬鹿にするようなところから生まれている。だから牛馬的研究、銅鉄的研究もけっして悪くない。人には見えない山をゆっくり登り、人には見えないきれいな花を見つけることが、私がいつもしたいと思っていることなのよ」

ウシとウマ、あるいは銅と鉄は決して同じではない。そこにきっと宝物が埋まっている。それを見抜く独自の眼力を持って、それを掘り出せ、ということだ。だから「牛馬的研究も悪くない」という言葉は、「牛馬的研究で良い」という意味では断じてない。「牛馬的研究から重要な発見をしなければならな

per-iron research. To realize it, you need to have the ability to see things differently from other people. If you have not yet had such an ability, you should polish yourself in order to acquire it. Prof. Egami said that he was only an ordinary person and not a genius, but an ordinary people cannot find a flower which is invisible for other people.

I still remember scenes often seen during the colloquium held weekly in Egami's lab. Several members of the lab were assigned to discuss progress in their research or introduce reports appearing in new journals. It used to be held in a small lecture room. All lab members sat facing the blackboard. Prof. Egami used to take a place in a front row. We, tails of the lab, used to take places in the back rows. Therefore, we could only see Prof. Egami's back. When sometime had passed after someone began to talk, his head would begin to nod back and forth, and this movement became larger and larger. Just as we were anxious about what would happen, his head would abruptly snap backward and his face turn to the ceiling. Once his head snapped, it returned towards the blackboard. However, after a short period, his head again would begin to nod and the same process was repeated. Since the presenter's talk was too boring, he could not have helped taking a nap, but we looked at each other and chuckled.

However, to our surprise, when the presentation was finished, Prof. Egami always asked some questions which were extremely unique. It had appeared he was not awake during that period because of the frequently repeated nodding and snapping. We felt bewildered because his question always got to the point, though it seemed to be almost impossible for him to listen to that part. He also made some comments which were so unique that I felt the scales had fallen from my eyes. Even from an ordinary presentation, he was able to find something quite unique as if seen from a different dimension.

Though we were awake, what did we hear and what did we consider? Even though he seemed to take a nap, he understood and considered more deeply than people who were awake. This ability to learn during a nap was one of the seven wonders of Prof. Egami.

I stayed less than four years in Egami's lab. My lifelong regret is that I was unable to accomplish even a tiny work which could satisfy Prof. Egami during this period. However, the experience I gained during that period made an absolute contribution to my career as a scientist. My attitude as a scientist was almost totally determined in that period. Though it is impossible to imitate him, I have always wished to look at things differently from others and to generate ideas different from others. Thanks to this attitude, I have never got impatient when I saw many people were climbing hastily up the same hill. I have always felt happy when I could find a small flower which other

い」のである。そのためには、人とは違うものの見方ができなくてはならない、もしできないなら、できるようになるまで自分を磨き上げねばならないのである。江上先生は自分を天才ではない凡人だと言っていた。しかし人に見えない花を見つけるなんて凡人なんかにはできることではない。

江上研究室で毎週1回やっていたコロキウムの光景を今でも思い出す。研究室員の何人かが廻り持ちで実験報告や論文紹介をする。小さな講義室を使うので、みんなが黒板に向かって座り、発表者は黒板を背にしてこちらを向いてしゃべる。私たち下っ端は後ろの方に座るので、いちばん前に座っている先生の背中しか見えない。誰かが研究報告や文献紹介を始めてしばらくすると、たいてい江上先生の頭が次第にユラユラし始め、後ろのほうに傾いてくる。あれあれ、大丈夫かな、とはらはらしているうちに、頭がガクッとだけぞって天井を向いてしまう。一度のけぞると、また元に戻って正面を向くのだが、しばらくするとまたもユラユラ、やがてガクッとくる。発表者がつまらん話をだらだら続けるので、先生、つい眠気をさそわれてしまったんだな、と隣の奴と顔を見合わせてニヤニヤしてしまう。

ところが驚いたことに、発表が終わると先生は必ず質問をする。それが誰にでもできるようなありきたりの質問ではない。後ろから見ていた限り、あのくだりはいちばん頻りにユラユラ ガクツを繰り返していたから、とても聞こえていたとは思えないのに、あまりにも的をついた質問なので、狐につままれたような気分になる。あるいは何かコメントをするのだが、それがあまりにも独創的なので、あれ、そんな見方もあったのか、と何度も目からうろこが落ちた。私たちにはありきたりの発表としか思えないときでも、次元が違う質問やコメントが次々と出てくるのだった。

私たちは目覚めていながら、いったい何を聞いて、何を考えていたのだろう。居眠りしていたのに、目覚めていた者よりもずっと深く内容を理解し、深く考察している。江上先生には七不思議があったが、そのひとつがこの睡眠学習能力だ。

私が江上研究室にいた期間は通算で4年に満たない。その間に一度でも先生を満足させられるような仕事が出来たら良かったのにと、今でも慚愧に絶えないのだけれど、このときの経験が今日までの私の研究人生に決定的に貢献している。研究者の端くれとしての私の姿勢は、ほとんどここで決まってしまった。江上先生の真似など出来っこないが、少しでも人とは違う見方をしたい、人とは違う発想をしたい、といつも念じてきた。そのおかげで、みんなが同じ山に争って登っているのを見ても、あせる気持ちは起こらなかった。人が見つけていない花を見つけれれば幸せだと思っていた。人と同じことを言うの

people had missed. I have always felt uneasy if I said something that someone else had already said.

“Bovine-equine research and copper-iron research are not so bad.”

This phrase has always been a great comfort to me. Even if someone's work looked much more brilliant and advanced in comparison with my own, there has been no need for me to be impatient about it and to feel a sense of inferiority. “Wait for a while. Though you might estimate this area totally worthless, I know a big treasure box is buried here.” Whatever the consequence was, I have been able to hypnotize myself with this suggestion and stay calm. Thanks to this phrase, I have been able to avoid tough competition in certain areas crowded with people.

I am now in a position where I sometimes need to give my colleagues and students some advices. While I am speaking, I sometimes happen to notice that I am telling something which I heard from someone, and parroting someone's idea. Then I am deeply discouraged to continue. However, it is very strange that I don't feel such a sense of guilt at all when I repeat, like a tape recorder, the phrases that Prof. Egami told us, nor do I care about the lack of originality. On the contrary, I feel a sense of satisfaction in looking for an appropriate phrase for the given situation from the content of Egami's sayings in my brain. Why is this so?

は後ろめたく感じていた。

「牛馬的研究、銅鉄的研究も悪くない」

これこそ私にとっての安らぎの言葉。自分の研究にくらべて、他人の研究がはるかにまぶしく先進的に見えても、あせりや劣等感を持たずにすむ。「今に見ているよ。君にはつまらない場所にしか見えないだろうが、俺にはここに宝物が埋まっているの見えるのだ」と、結果はともかくとして、自己暗示にかけ、鷹揚に構えることができた。おかげで人口密度の高いところで競争に明け暮れるという経験をしないで済んだ。

私も今では時には研究室員や学生に対して、何か指導的なことを言わねばならない立場になっている。時々、自分がしゃべっている最中に、ふと「あれ？これは誰かが言っていたことじゃないか。誰かの受け売りだな」と気がつくことがある。するととたんに話を続ける意欲がなえてしまう。ところが不思議なことに、江上先生が言ったことだと、そのままテープレコーダーのようにしゃべっても、まったく気後れすることがないし、オリジナリティー皆無ということが全然気にならない。むしろ、「この場面ではこれが使えるな」と、もっともその場にふさわしい一句を、頭の中の江上語録の目次から選び出すことに喜びを感じてしまうのだ。どうしてだろう？