総 説

タンパク質分解酵素による
ペプチドの合成

小 山 清 孝

東洋曹達工業(株) 開発生産部
(山口県新南陽市大字富田 4,560)

Syntheses of Peptides by Proteolytic Enzymes

Kiyotaka OYAMA

Product Development Division, Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd.
(Tonda, Shin-nanyo, Yamaguchi)

1 はじめに

過去数年の間に、タンパク質分解酵素によるペプチド結合の加水分解反応を利用した、いわゆる酵素法ペプチド合成に関する研究が非常に活発になってきた。研究の対象も基礎的なものから固定化酵素法等の工業的製造法の開発まで、広がりとお興味の深まりを見せている。近年、酵素の高選択性、常温常圧での高効率性に注目して、有用物質を酵素法で合成しようとする動きがますます活発になってきている。酵素法によるペプチド合成もその考え方は古くからあったが、近年の酵素法全般に対する関心の高まりと相まって、注目を集めているものである。そして、工業的にもヒトインシュリンの半合成やアスパルテームの合成等に応用され、ペプチド合成の基本的な一手段として市民権を得たように思われる。そこで本稿では研究の歴史、原理、そして実際の応用等について筆者等の研究を交えながら述べてみたい。

2 研究の歴史

酵素法ペプチド合成に関する最初の報告は、おそらく Mohr らによるものであろう。すなわち、彼らは 1909 年に次のような反応が、パパインの存在下起こることを見だしている¹⁾。

ところで、タンパク質は核酸とならんで生体内で最も重要な構成物質であり、これの生成機構を知ることは極めて重要である。Bergmann らは彼らが見いだした知

見を基に、タンパク質の生体内合成が、タンパク質分解酵素の作用によりなされるのではないかとこの想定のもとに、1930 年代後半から 1940 年代にかけて精力的に研究を行った²⁾。ところが、1950 年代に入って、分子生物学の著しい進歩によってタンパク質の生合成機構が明らかになり、その結果酵素法ペプチド合成への興味は急速にうすれていってしまった。

一方酵素法ペプチド合成は、ペプチドの合成手段としても極めて興味深いものである。しかしながら、本方法は混合酸無水物法や活性エステル法のような多くの化学的合成法のように、ペプチド合成の有用な汎用的手段として発展するようなことはなかった。酵素法における当時の大きな障害は保護基と酵素の問題であった³⁾。Bergmann らの時代には、アミノ基の保護には専らベンゾイル基が、カルボキシル基の保護にはアミド基が主に用いられていた。これらの脱離には過酷な条件を必要とすることから、脱離に際してはペプチド結合のある程度の開裂を避けることができない。また酵素についても、動植物起源の限られたものであり、酵素の基質特異性から、ある限られたアミノ酸同士の結合にしか適用することができない。

その後、ペプチド合成の有機化学、酵素化学、応用微生物学等の進歩により、徐々にこれら障害が除かれてきた。すなわち、容易に導入及び脱離のできる保護基の開発が進み、また酵素の研究についても、微生物起源の多くの酵素が自然界より見いだされ、それらの基質特異性や酵素化学的性質も明らかにされてきた。このような科学上の進歩と、近年の酵素法全般に関する意識の高まりの結果、酵素法ペプチド合成が改めてペプチド合成の一手段として見直されるようになってきたものである。

* 本稿において使用した略号の意味は、次の通りである。

Bz, ベンゾイル; Z, ベンジルオキシカルボニル; Ac, アセチル; Boc, t-ブチルオキシカルボニル; ODPM, ジフェニルメチルエステル; OMe, メチルエステル; OBzl, ベンジルエステル; TPL, トヨパール。なお、とくに断らない場合、アミノ酸はすべて L-体である。

表-1 ペプチド結合生成反応の平衡定数

タイプ	平 衡 式	平 衡 定 数
1. 非 解 離 型	$\text{RCO}_2\text{H} + \text{H}_2\text{NR}' \rightleftharpoons \text{RCONHR}' + \text{H}_2\text{O}$	$K_I = \frac{[\text{RCONHR}']}{[\text{RCO}_2\text{H}][\text{H}_2\text{NR}']}$
2. 解 離 型	$\text{RCO}_2^- + \text{H}_3\text{N}^+\text{R}' \rightleftharpoons \text{RCONHR}' + \text{H}_2\text{O}$	$K_{II} = \frac{[\text{RCONHR}']}{[\text{RCO}_2^-][\text{H}_3\text{N}^+\text{R}]}$
3. 混合型 (見かけの平衡定数)	$[\text{RCO}_2\text{H}]_{\text{tot}} + [\text{H}_2\text{NR}']_{\text{tot}} \rightleftharpoons \text{RCONHR}' + \text{H}_2\text{O}$	$K_{\text{pH}} = \frac{[\text{RCONHR}']}{[\text{RCO}_2\text{H}]_{\text{tot}}[\text{H}_2\text{NR}']_{\text{tot}}}$

$[\text{RCO}_2\text{H}]_{\text{tot}}$ は解離型及び非解離型のカルボキシル側基質の総濃度を示す。

$[\text{H}_2\text{NR}']_{\text{tot}}$ は同様にアミノ側基質の総濃度である。

3 原 理

ペプチド結合の生成及び分解は、典型的な(有機)平衡反応である。通常の酵素的反応条件下では、基質のカルボキシル基、アミノ基及び生成物は解離型、非解離型の複雑な系を形成している。従ってどのような平衡系を考えるかによって、その平衡定数は異なる。表-1の K_I は、非解離型の基質からペプチド結合を生成するとした場合の平衡定数である。この場合平衡定数は pH の影響を受けないので、ペプチド結合の平衡の理論的考察をする場合に便利である⁴⁾。しかしながら、実際の系においては、原系側の両基質ともに非解離型である確率は極めて低い。 K_{II} はそれぞれの解離型に基づく平衡定数で、pH の影響は受けない。ところで、実験的に実際に求められるのは、解離型、非解離型の混合であり、この場合の平衡定数 K_{pH} は式(1)のようにも表され⁵⁾、系の pH の影響を受ける(式中 K_I , K_2 は基質のカルボキシル

$$K_{\text{pH}} = \frac{K_{II}}{1 + [\text{H}^+]/K_1 + K_2/[\text{H}^+]} \quad (1)$$

基とアミノ基のそれぞれの酸解離定数である)。従って平衡定数を測定した系の pH を併記することが必要である。ここで重要なことは、非解離型に基づく平衡系においては、平衡はむしろ合成側にあるが、実際の系である混合型においては、平衡は大きく分解側に片寄っているということである⁶⁾。

生成物の収率を増す方法はいろいろと考えられるが、まず第一に、質量作用の法則から原料濃度を増すことが示唆される。しかしながら、通常の酵素的反応条件下では、平衡が分解側にあるために、生成物の収率は非常に低い。このことは、平衡定数が最も大きい部類に入る $\text{Bz-Tyr-OH} + \text{H-Gly-NH}_2 \rightleftharpoons \text{Bz-Tyr-Gly-NH}_2$ ($K_{\text{pH}} = 0.43 \text{ M}^{-1}$)⁷⁾において、式(2)に従って平衡転化率 α を計

$$K_{\text{pH}} = \frac{a\alpha}{a(1-\alpha)(b-a\alpha)} \quad (2)$$

算によって求めることで理解することができる(式中 a 及び b は、両基質の初期濃度であり、 $a \leq b$ とする)。

表-2 基質濃度、平衡定数、及び生成物の溶解度 (S)^{a)} が収率に及ぼす影響

基質濃度	$K = 0.43 \text{ M}^{-1}$ ^{b)}				$K = 38 \text{ M}^{-1}$ ^{c)}
	$S = \infty$	$S = 10^{-3} \text{ M}$	$S = 10^{-4} \text{ M}$	$S = 10^{-5} \text{ M}$	
0.01 M	0.5%	(0.5%) ^{d)}	(0.5%) ^{d)}	51.7%	22.8%
0.1	3.5	50.8	84.5	95.2	60.2
1.0	24.4	95.1	98.5	99.5	85.0

a) 生成物の仮定の溶解度

b) $\text{Bz-Tyr-OH} + \text{H-Gly-NH}_2 \rightleftharpoons \text{Bz-Tyr-Gly-NH}_2$ の平衡定数

c) 85% (vol/vol) 1,4-ブタンジオール中における $\text{Z-Trp-OH} + \text{H-Gly-NH}_2 \rightleftharpoons \text{Z-Trp-Gly-NH}_2$ の平衡定数。

d) 平衡における生成物の収率が仮定の溶解度よりも低い場合、収率は均一系のそれと同じである。

ここで $a=b$ とし、 a をいろいろと変化させた場合の生成物の収率を式(2)に従って求めると、表-2 のようになる。表-2 から明らかなように、基質濃度が 1 M と相当高い場合でさえも、生成物の収率は高々 25% であり、単なる平衡からは充分な収率を期待することはできない。

一方、生成物が溶媒に難溶性で系外に析出する場合には事情が異なる。この場合には転化率は基質の初期濃度 a 及び b (ただし $a \leq b$ とする)、生成物の溶解度 S と式(3)により関係づけることができる⁸⁾。式(3)にお

$$K_{\text{pH}} = \frac{S}{\{a(1-\alpha) - S\} \{b - a\alpha - S\}} \quad (3)$$

いて $a=b$ とし、 a 及び S をいろいろと仮定し、それぞれの収率を計算により求めた。この場合には生成物の溶解度が 10^{-5} M であれば、基質濃度が 10^{-1} M 程度でもほぼ定量的に生成物を得ることができる(表-2)。

収率を増やす別のアプローチは、平衡定数をできるだけ大きくすることである。先にも述べたように、見掛けの平衡定数 K_{pH} は式(1)のように表されることから、最大平衡定数を与える pH は $d(K_{\text{pH}})/d(\text{H}^+) = 0$ の条件を用いて $[\text{H}^+] = \sqrt{K_1 \cdot K_2}$ から求めることができる。一方 Loskowski らは、水と相溶性の有機溶媒を系に加えることにより、 $\text{Z-Trp-OH} + \text{H-Gly-NH}_2 \rightleftharpoons \text{Z-Trp-Gly-NH}_2$ の平衡において、見掛けの平衡定数が純水中の 0.45 M^{-1} から 85% (vol/vol) 1,4-ブタンジオール-水系では 38 M^{-1} となり、84 倍も増大することを見いだしてい

表-3 水-有機溶媒 2 相系における酵素法ペプチド合成

反 応	酵 素	溶 媒	収 率
Z-Glu-OH+H-Ala-ODPM→Z-Glu-Ala-ODPM	ババイン	H ₂ O-AcOEt	76 ⁹⁾
Ac-Leu-Phe-OMe+H-Leu-NH ₂ →Ac-Leu-Phe-Leu-NH ₂	α-キモトリプシン	H ₂ O-(ClCH ₂) ₂	82 ¹⁰⁾
Boc-Phe-Leu-OH+H-Leu-NH ₂ →Boc-Phe-Leu-Leu-NH ₂	ババイン	H ₂ O-CCl ₄	71 ¹⁰⁾

る⁹⁾。この場合には表-2に示すように、基質濃度が 1 M の場合でも 85% の収率で生成物を得ることができる。これは有機溶媒の添加により K_1 が小さくなり、平衡が合成側にあるところの非解離型に基づく平衡に系が近くなった結果、平衡定数が増大したものと考えられる⁹⁾。

収率を増大させるさらに別の方法は、反応系中に水と相溶性でない有機溶媒を加え、水との二相系で反応を行う方法である。もしも原料が水相に、生成物が有機相によく分配する適当な系を選ぶことができれば、生成物は水相から除かれて、不利な平衡にもかかわらず生成物を高収率で得ることができる(表-3)^{9),10)}。

工業的な見地から、酵素法ペプチド合成においても固定化酵素の利用は魅力的なものである。しかしながら水溶液中の反応では生成物を沈殿物として析出させることにより高収率を得ていることから、この場合には生成物と固定化酵素の分離が困難となり、実用上問題がある。ところが生成物を溶解しさらに平衡的にも有利に導くような有機溶媒を使用すれば、固定化酵素による反応も現実的になってくる。筆者らは後述するように、このような観点から固定化酵素を用いたアスパルテームの合成法について研究を行った。また、固定化酵素の細孔中が水分で満たされたものを用いることにより、水と相溶性でない有機溶媒の見掛け上単一相中で、ペプチド合成反応が効率よく行われることを見いだしている(図-1)¹¹⁾。この方法によれば、酵素は水溶液として担体の細孔中に保持されるので、ガラスビーズ等のような酵素と相互作用のない担体を用いても酵素の“固定化”が可能になる。さらに、逆相ミセル中に酵素を水溶液として保持し、オイル中で反応させる方法や¹²⁾、水と相溶性でない有機溶媒中に hollow-fiber を浸し、内側を酵素及び基質を含んだ水溶液を流し、生成物は hollow-fiber を透過させ、外側の有機溶媒中に溶出させながら反応を行う

方法等も報告されている¹³⁾。

4 アスパルテームの合成

酵素法ペプチド合成を応用して、今までに数多くの生理活性ペプチド類が合成されてきた。すでに、アンジオテンシン¹⁴⁾、サブスタンス P¹⁵⁾、エレディシン¹⁵⁾、セルレイン¹⁶⁾、エンケファリン類¹⁷⁾、アスパルテーム¹⁸⁾等が合成され、さらにはブタインシュリンからヒトインシュリンの半合成¹⁹⁾、ウシリボスクレアゼの半合成²⁰⁾等も報告されている。これらのうち、ヒトインシュリン及びアスパルテームは工業的規模で実際に酵素法で製造されている。ここでは筆者らのアスパルテームの合成について述べる。

アスパルテーム (H-Asp-Phe-OMe, APM と略称) は消化ホルモンであるガストリンの C 末端ジペプチドのメチルエステルである²¹⁾。砂糖の約 200 倍の甘さを持ち、低カロリー甘味料として近年注目されている。我々は APM の合成が酵素法ペプチド合成の格好のターゲットになるのではないかと考え、その合成法について検討した。ほとんどすべての市販のプロティナーゼ類についてスクリーニングを行ったが、ペプチド結合のアミノ側基質としてフェニルアラニンやロイシンのような疎水性アミノ酸に特異性を有する酵素について、特に慎重に検討を行った。その結果、金属プロティナーゼに属する一群の酵素の存在下に、フェニルアラニンメチルエステル (H-Phe-OMe) が *N*-ベンジルオキシカルボニルアスパラギン酸の β-ベンジルエステル (Z-Asp(OBzl)-OH) や *N*-ベンジルオキシカルボニルアスパラギン酸 (Z-Asp-OH) と反応することを見いだした^{18),22)}。こ

で得られる生成物中の Z や Bzl 基は通常の接触水素化分解反応により容易に脱離し、APM を与える。特に第 2 番目の反応においては、側鎖カルボキシル基が無保護のままでも主鎖のカルボキシル基のみが反応し、さらに生成したジペプチドの側鎖カルボキシル基は未反応の PM と水に難溶性の塩を形成し、その結果高収率で生成物を与える。ラセミ体原料を使用すると L 体のみが反応する。

図-1 有機溶媒の見掛け上単一相中で固定化酵素によるペプチド合成(細孔の外側は有機溶媒で、内側は酵素水溶液で満たされている)。

一方化学的合成法では高価な L 体のみしか原料として使用することができない。また工業的な製造法としては側鎖カルボキシル基の保護は複雑なことから、無保護のまま縮合反応に供されるが、その場合側鎖カルボキシル基が結合した異性体 APM が 20~40% 生成する²⁸⁾。従って酵素法は化学的合成法よりも工業的製造法として有利なことが期待できる。ここでは、筆者らが行った研究のうち、反応機構の解析と固定化酵素による合成法について述べる。

4.1 反応機構

キモトリプシンに代表されるセリンプロテナーゼ類による加水分解反応機構は、よく研究されており、アシル-酵素中間体を経ることが明らかにされている²⁴⁾。一方カルボキシルペプチダーゼ A (CPA) やサーモライシンをはじめとする金属プロテナーゼ類の反応機構は未解決である^{25), 26)}。ここでは、水分子の関与する一般塩基触媒反応を経由するのか、活性中心の求核基が直接結合するアシル-酵素中間体を経由するのかが最大の争点である。サーモライシンについては、X線解析の結果から Zn^{2+} イオン、Glu-143、His-231 が活性中心に関与することがわかっている²⁷⁾。Matthew らはこの結果を基に、Glu-143 のカルボキシル基と基質の切断部位との距離が離れすぎていることから、アシル-酵素中間体の生成は困難であり、水分子が関与した一般塩基触媒反応であろうと推定している²⁷⁾。また、CPA とサーモライシンの活性中心の構造類似性から、両者は同一の反応機構を経るのではないかと推定される²⁸⁾。森原らは、トランスペプチレーション反応の生成物から、サーモライシンはアルシ-酵素及びアミノ-酵素両中間体を経る機構を経由すると提案している²⁹⁾。

プロテナーゼによる加水分解反応の逆反応の速度論的研究は、正反応からは得難い情報を得ることが期待できる。我々は APM 合成のプロセス開発のための速度論的研究から、サーモライシンの反応機構に関する新し

図-2 Z-L-Asp と DL-H-Phe-OMe との縮合反応速度と Z-L-Asp 濃度との Lineweaver-Burk プロット (A は Z-D-Asp 非存在下, B は Z-D-Asp 存在下)。

い知見を得ることができた³⁰⁾。

Z-L-Asp と L-PM の反応について、反応速度は酵素 (サーモライシン) 及び L-PM に関して一次である。一方 Z-L-Asp に関しては典型的な Michaelis-Menten 型の挙動を示す (図-2)。これらのことから、本反応はまず Z-L-Asp が酵素に取り込まれ、続いて L-PM が反応する次のような反応機構により進行しているものと考えられる (式中 E は酵素を表す)。

この機構に対する速度式は次式のように表され、これは実験事実とよく一致する (式中 E_0 は、酵素の初期濃度を示す)。

$$v = \frac{k_2[E_0][Z-L-Asp][L-PM]}{K + [Z-L-Asp]}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K}{k_2[E_0][L-PM]} \frac{1}{[Z-L-Asp]} + \frac{1}{k_2[E_0][L-PM]}$$

ここで D-PM が存在する場合、反応速度は全くその影響を受けない。一方 Z-D-Asp が存在する場合には反応速度の低下が見られる。さらに 図-2 において、Z-D-Asp が存在する場合としない場合の両直線が縦軸上で交叉することから、Z-D-Asp は競争的阻害剤として働いていることが示唆される。また 図-2 より、Z-L-Asp と Z-D-Asp の取り込み定数はそれぞれ $1.03 \times 10^{-2} M$ 及び $2.81 \times 10^{-2} M$ と求められる。ところで、アシル-酵素中間体を経る機構が確立されている α -キモトリプシンにおいては、アシル化の速度は L-体の方が D-体よりも早く、特にかさ高い側鎖基を有すアミノ酸の場合には、その差異は 100~20,000 倍である³¹⁾。一方、共有結合を伴わない酵素への単なる取り込みについては、取り込み定数は L-体、D-体ともにほとんど同じである³²⁾。これらのことから、本反応においては Z-L-Asp の取り込みはアシル-酵素の共有結合を伴う [図-3 (a)] ものではなく、取り込まれた Z-L-Asp に L-PM が反

図-3 サーモライシンによるペプチド合成の推定反応機構 [(a) はアシル-酵素中間体機構, (b) は一般塩基触媒反応機構]。

応するいわゆる一般塩基触媒反応による加水分解反応の逆反応 [図-3 (b)] により反応しているものと考えられる。このような速度論からの結果は、X線解析の結果ともよく一致する²⁷⁾。

原料アミノ酸としては、L-アスパラギン酸は安価であるが、フェニルアラニンに関してはラセミ体の方が、L-体よりもかなり安価である。ここで述べた速度論的研究結果より、Z-L-Asp と DL-PM を酵素反応の原料として使用することが有利であることが示唆される。

4.2 固定化酵素法によるアスパルテームの合成³³⁾

先にも述べたように、固定化酵素によるペプトチの合成においては、有機溶媒の使用が非常に有効である。溶媒の選択にあたっては次の点について考慮を払う必要がある。1) 有機溶媒による酵素の活性及び安定性に対する影響、2) 平衡への影響、3) 生成物の溶解度、4) 水と相溶性でない有機溶媒による水との二相系反応においては、原料及び生成物の有機相及び水相への分配。また固定化酵素については、1) 固定化の収率が高い、2) 固定化反応中酵素の失活が少ない、3) 固定化酵素単位重量当たりの触媒活性が高い、4) 酵素の脱離が少ない、等の条件を満たすことが要求される。我々は物理的吸着法、イオン結合法、共有結合法のいろいろな固定化法について検討した。これらのうち、前二者による方法は、有機溶媒及び高塩濃度のため、酵素の脱離が多いため不適当と判断した。そこで、担体としてゲル汙過クロマトグラフィーで多用されているトヨパールを選び、それへの共有結合法について主に検討を行った。トヨパールは親水性ポリマーゲルで、有機溶剤に対する膨潤性が小さい、機械的強度が大きい、熱に対する安定性が大きい等の特徴があり、さらに又、細孔内に多くの OH 基を有していることから、これを介して種々の方法で多量の酵

素を固定化することができる。トヨパールへの固定化法について、検討した代表的なルートを図-4に示した。なおここで、酵素としてはサーモライシンの粗酵素で市販されているサーモアーゼ（図-4ではThAと略記）を使用した。これら固定化酵素のうち、グルタルアルデヒドを介して固定化したもの（TPL-EAGA-ThA）は固定化量も多く、また固定化酵素の活性も最も大である。一方ジアゾ化反応によるもの（TPL-DAZ-ThA）は、固定化量は多いが、固定化により活性が著しく損なわれる。これは、サーモライシンの安定性に重要な役割を果たしているチロシン残基³⁴⁾がジアゾ化反応に関与したためによるものと考えられる。

固定化酵素による連続反応は、固定化酵素を充てんしたカラムに、上部より Z-L-Asp と DL-PM を溶解した酢酸エチル-水の混合溶液を連続的にフィードすることにより行った。その代表的な例として、TPL-EAGA-

図-5 TPL-EAGA-ThA (エチレンジアミン-グルタルアルデヒドによりトヨパールへ固定化したサモアゼ)を用い、Z-L-Asp と DL-H-Phe-OMe を原料としたカラム反応器による Z-L-Asp-L-Phe-OMe の連続的合成 (溶媒 H_2O -AcOEt)。

図-4 代表的な共有結合法によるサーモアゼのトヨパール (TPL) への固定化法 (WSCD: 水溶性カルボジイミド)

による連続反応の結果を 図-5 に示した**。この場合の最大の問題点は有機溶媒による酵素の失活とカラム内でのチャンネリングである。

5 ま と め

以上酵素法ペプチド合成法について述べたが、アスパルテームの合成例でも明らかなように、アミノ酸の側鎖官能基を必ずしも保護する必要がなく、また安価なラセミ体原料を使用することができる等の化学合成法ではとても真似することができないすばらしい特徴を酵素法は有している。さらに、反応中ラセミ化が起こらない、反応を水溶液中常温で行える等の利点も有する。一方酵素法の欠点としては、酵素の基質特異性のために化学法の場合のようにどのような結合にも使用できるというものではない。また、トランスペプチドーションのような副反応も生じやすい。プロテイナーゼ類は、他の酵素類よりも一般的に安価とはいえ、触媒としてはやはり高価なものである。そこで、工業的な使用にあたっては、固定化酵素法等を採用し繰り返し再使用することが望ましい。その場合、有機溶媒に対する安定性の問題が生起する。従って、有機溶媒による失活のメカニズムの解明とその対策、より安定な固定化法の開発、さらには二相系反応のためのより効果的な反応方法の開発等の多くの課題がある。

ペプチドの合成手段としては、化学法、酵素法の外に近年遺伝子工学的的方法が脚光を浴びている。分子量の大きいペプチドの合成には遺伝子工学的的方法が多用されるであろうが、比較的低分子量のペプチドについては、目的に応じて、化学法と酵素法のそれぞれの特徴を考慮して使いわけすることが肝要であろう。

(昭和59年7月28日受理)

文 献

- 1) E. Mohr, F. Strohschein, *Ber.*, **42**, 2521 (1909)
- 2) M. Bergmann, H. Fraenkel-Conrat, *J. Biol. Chem.*, **124**, 321 (1937); M. Bergmann, J.S. Fruton, *Adv. Enzymol.*, **1**, 63 (1941)
- 3) J.S. Fruton, *Adv. Protein Chem.*, **5**, 1 (1949)
- 4) F.H. Carpenter, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1111 (1960)
- 5) A. Dobry, J.S. Fruton, J.M. Sturtevant, *J. Biol. Chem.*, **195**, 149 (1952)
- 6) W.J. Jencks, M. Caplow, M. Gilchrist, R.G. Kallen, *Biochemistry*, **2**, 1313 (1963)
- 7) 小山清孝, 木原啓一, 化学総説, **35**, 195 (1982)
- 8) G.A. Homandberg, J.A. Mattis, M. Laskowski, Jr., *Biochemistry*, **17**, 5220 (1978)
- 9) 磯和義員, 化学と生物, **18**, 536 (1978)
- 10) P. Kuhl, A. Könnicke, G. Döhning, H. Däumer, H.-D. Takubke, *Tetrahedron Lett.*, 893 (1980)
- 11) K. Oyama, S. Nishimura, Y. Nonaka, K. Kihara, T. Hashimoto, *J. Org. Chem.*, **46**, 5241 (1981)
- 12) P.L. Luisi, "Topics in Pharmaceutical Sciences", P. D. Breimer, P. Speiser, ed., Elsevier, 1983, p. 243.
- 13) P.L. Luisi, 私信
- 14) Y. Isowa, M. Ohmori, M. Sato, K. Mori, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **50**, 2766 (1977)
- 15) 磯和義員, 長沢 健, 黒岩勝昌, 成田浩一, 日化第35秋季年会, 札幌, 4 B 22 (1976)
- 16) H. Takai, K. Sakato, N. Nakamizo, Y. Isowa, "Peptide Chemistry 1980", K. Okawa, ed., Protein Research Foundation, Osaka, 1981, p. 213
- 17) W. Kullmann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **91**, 693 (1979); W. Kullmann, *J. Biol. Chem.*, **255**, 8234 (1980); C.-H. Wong, S.-T. Chen, K.-T. Wang, *Biochim. Biophys. Acta*, **576**, 247 (1979)
- 18) Y. Isowa, M. Ohmori, T. Ichikawa, K. Mori, Y. Nonaka, K. Kihara, K. Oyama, H. Satoh, S. Nishimura, *Tetrahedron Lett.*, **1979**, 2611
- 19) K. Inouye, K. Watanabe, K. Morihara, Y. Tochino, T. Kanaya, J. Emura, S. Sakakibara, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 751 (1979); K. Morihara, T. Oka, H. Tsuzuki, *Nature*, **280**, 412 (1979); K. Morihara, T. Oka, H. Tsuzuki, Y. Tochino, T. Kanaya, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 396 (1980)
- 20) G.A. Homandberg, M. Laskowski, Jr., *Biochemistry*, **18**, 586 (1979)
- 21) R.H. Mazur, J.M. Schlatter, A.H. Goldkamp, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2684 (1969)
- 22) 磯和義員, 小山清孝, 市川哲也, 日化第35秋季年会, 札幌, 4 B 23 (1976)
- 23) Y. Ariyoshi, T. Yamatani, N. Uchiyama, Y. Adachi, N. Sato, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 1893 (1973); *US Pat.*, 3,786,039 (1974), 3,933,781 (1976)
- 24) 例えば, E. Zeffren, P.P. Hall, "The Study of Enzyme Mechanism", John Wiley & Sons, New York (1973), p. 180
- 25) R. Breslow, D. Wernick, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 259 (1978)
- 26) J. Suh, E.T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 1940 (1976); T. Sugimoto, E.T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 7750 (1978); *J. Org. Chem.*, **43**, 3311 (1978)
- 27) W.R. Kester, B.W. Matthews, *Biochemistry*, **16**, 2506 (1977)
- 28) W.R. Kester, B.W. Matthews, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7704 (1977)
- 29) K. Morihara, H. Tsuzuki, T. Oka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **84**, 95 (1978)
- 30) K. Oyama, K. Kihara, Y. Nonaka, *J. Chem. Soc. Perkin II*, **1981**, 356
- 31) D.W. Ingles, J.R. Knowles, *Biochem. J.*, **104**, 396 (1967); **108**, 561 (1968)
- 32) M.L. Bender, L.J. Brubacher, "Catalysis and Enzyme Action," McGraw-Hill, New York, 1973, ch. 6-1
- 33) K. Oyama, S. Irino, N. Hagi, "Methods in Enzymology," K. Mosbach, ed., 投稿中
- 34) Y. Ohta, *J. Biol. Chem.*, **242**, 509 (1967)

** この場合、運転初期において酵素活性の急激な低下がみられるが、その後の活性低下は小さい。20 d 後に運転を停止し、残存活性を測定したところ、初期活性の 55% に低下していた。