ポリビニルアルコール膜に固定化した α -キモトリプシンによるアミノ酸のエステル化とペプチド合成*

渡辺 朗*¹・乗富 秀富*¹・永嶋 徹*¹・木瀬秀夫*¹

(受付 1990 年 11 月 5 日・審査終了 1990 年 12 月 10 日)

要 旨 高濃度親水性有機溶媒中で、非固定化及び PVA 膜に固定化した α -キモトリプシンを触媒として用い、*N*-アセチル-L-チロシンのエステル合成、及び *N*-アセチル-L-チロシンエチルエステルとグリシンアミドからのジペプチドの合成について研究した。いずれの場合も系中に全く水の無い状態では、酵素は活性を示さないが、数 % の含水濃度で活性を発現し、合成速度とエステル及びペプチドの収率は水濃度に強い依存性を示した。エステル合成においては、酵素を PVA 膜中に包括固定化することで、 K_m 値は増加したが二次反応速度に変化はなかった。また固定化により、アセトニトリル中でのペプチド合成に対して長期間安定な活性を示す酵素膜が得られた。

1 緒 言

近年非水溶媒系中で、酵素を用いる研究が多くなされている^{1)~6)}。例えば、高濃度の有機溶媒を用いて系中の水の濃度を制御することにより、プロテアーゼによるエステルあるいはペプチドの合成が可能となる。しかし一般に酵素は有機溶媒と接触することにより失活しやすい。そこでこれまで、水相に溶けた酵素が有機相と接することの少ない、疎水性有機溶媒を用いた 2 相系での反応が試みられた。しかしこのような系では、アミノ酸またはその誘導体が酵素を含む水相に濃縮されて酵素の失活を起こしやすく、また界面との接触によっても失活しやすい^{7), 8)}。

一方、水と混和性の親水性有機溶媒中でも数 % の水が存在すれば酵素活性が保たれることがわかってきた⁹⁾。しかしこのような反応系で、酵素を安定化するため、または酵素を回収し、再利用する目的での酵素の固定化についてはあまり研究されていない。我々は以前、エタノールやアセトニトリルなどの親水性有機溶媒中において PVA ゲル中に吸着固定化した α -キモトリプシンを用いて、芳香族アミノ酸のエステル化、ペプチド合成を行ってきた^{9), 10)}。本報ではキャスト法により PVA 膜中に酵素を包括固定化し、親水性有機溶媒中でのアミノ酸のエステル化及びペプチド合成を行い、固定化による酵素活性の変化と繰り返し使用における安定性について検討した結果を報告する。

2 実 験

2.1 試薬

すべての薬品は、特に記していない限り市販のものを精製せずに使用した。

α -キモトリプシン (CT) (EC 3.4.21.1, 50 U/mg⁻¹), *N*-アセチル-L-チロシン (Ac-Tyr-OH), *N*-アセチル-L-チロシンエチルエステル (Ac-Tyr-OEt), グリシンアミド塩酸塩 (Gly-NH₂·HCl) は、Sigma Chemical 社から購入した。ポリビニルアルコール (PVA) (重合度 1500) は、和光純薬工業(株)から購入した。トリエチルアミンとアセトアニリド及び反応溶媒であるエタノール、アセトニトリルなどはナカライテスク(株)から購入した。薬品はすべて特級を使用し、溶媒はモレキュラーシーブスを用いて脱水処理をした。

2.2 固定化酵素の調製

酵素 50 mg を 30 ml の純水に溶かし、マグネチックスターラーで攪拌しながら、PVA 2.5 g を徐々に加えて溶解させる。この溶液を直径 15 cm のシャーレーに移し、五酸化二リン存在下で徐々に減圧乾燥後、シャーレーからフィルムをはがし、約 1 cm 角に切断し冷凍庫に保管した。膜厚はおおよそ 0.1 mm であった。

2.3 反応

2.3.1 非固定化酵素を用いたエステル合成反応 酵素 5 mg (0.2 μ mol) をスクリーバイアル中に秤量し、所定量の純水に溶かす。エタノール 10 ml に Ac-Tyr-OH 22.3 mg (0.1 mmol) と、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の標準試薬であるアセトアニリド 25 mg を溶かしたものに、酵素水溶液を加えて反応を開始する。30°C に保った恒温槽中で、1 分間に 150 回で振とうしな

* 本報を「有機溶媒中の酵素反応 第 10 報」とする。第 9 報: H. Kise, *Bioorg. Chem.*, 18, 107 (1990)。

*¹ 筑波大学物質工学系 (〒305 茨城県つくば市天王台 1-1-1)

Fig. 1. Effect of water content on ester synthesis by CT in ethanol. (CT 5 mg, AcTyrOH 0.1 mmol, EtOH 10 ml, 30°C, 24 h). ○, ester yield by free CT; ●, ester yield by immobilized CT (PVA 0.25 g).

から反応させた。30分、60分、及び24時間後に溶液の一部を取り出し、必要に応じてメンブレンフィルターにてろ過後、HPLC (島津 LC-6A) にて Ac-Tyr-OH と Ac-Tyr-OEt を定量した。カラムに (株) 島津製作所製の Shim-pack CLC-ODS (0.15 m × 6.0 mmφ) を用い、流動相として純水とアセトニトリルの混合溶液 (体積比で 1:1) を流速 1 ml/min⁻¹ で流した。紫外吸光検出器 (波長 270 nm) を用いた。

2.3.2 固定化酵素を用いたエステル合成反応 固定化酵素膜 255 mg (酵素 5 mg を含む) をスクリーバイアルに秤量し、エタノール 10 ml と所定量の純水との混合溶液を加え 24 時間放置する。これは PVA 膜中に水やエタノールを十分拡散させるためである。その後膨潤した PVA 膜を取り出し、Ac-Tyr-OH 22.3 mg (0.1 mmol) とアセトアニリド 25 mg を溶解した水-エタノール混合溶液に加えて 30°C にて反応を開始する。反応後上記と同様に HPLC で定量分析した。固定化酵素の繰り返し使用実験では、24 時間ごとに基質溶液を交換した。

2.3.3 非固定化酵素を用いたペプチド合成反応 酵素 5 mg をスクリーバイアル中に秤量し、所定量の純水に溶かす。アセトニトリル 10 ml に Ac-Tyr-OEt 25.1 mg (0.1 mmol) と、アセトアニリド 25 mg を溶かした溶液 (C 側基質溶液) と、純水に Gly-NH₂·HCl 13.3 mg (0.12 mmol) と、この基質の脱塩酸のためのトリエチルアミン 16.6 μl (0.12 mmol) を溶かしたもの (N 側基質溶液) を準備する。C 側基質溶液と N 側基質溶液を混ぜ、これに酵素水溶液を加えて 30°C にて反応を開始する。エステル合成反応と同一条件で実験し、30分、60分、及び 24 時間後に HPLC にて定量分析した。合成したペプチドの収率は、加えた Ac-Tyr-OEt から反応後系中に残っている基質 (Ac-Tyr-OEt) と加水分解物 (Ac-Tyr-OEt) を引算して求めるか、別途合成したペプチドを用いて作成した検量線から求めた。

Fig. 2. CT-catalyzed ester synthesis from AcTyrOH in 95% ethanol (CT 5 mg, EtOH 10 ml, H₂O 0.5 ml, 30°C).

Table 1. Kinetic constants for esterification of Ac-Tyr-OH by CT in ethanol^{b)}

	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (M)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ M ⁻¹)
Free CT	0.030	0.010	3.0
PVA/CT ^{b)}	0.075	0.025	3.0

^{a)} CT 5 mg, EtOH 10 ml, H₂O 0.5 ml, 30°C.

^{b)} PVA 0.25 g.

2.3.4 固定化酵素を用いたペプチド合成反応 固定化酵素膜 255 mg (酵素 5 mg を含む) をスクリーバイアルに秤量し、アセトニトリル 10 ml と所定量の純水との混合溶液を加え 24 時間放置する。その後、アセトニトリル 10 ml に Ac-Tyr-OEt 25.1 mg (0.1 mmol) とアセトアニリド 25 mg を溶解させた C 側基質溶液と、所定量の純水に Gly-NH₂·HCl 13.3 mg (0.12 mmol) とトリエチルアミン 16.6 μl (0.12 mmol) を溶解させた N 側基質水溶液の混合物に、膨潤した PVA 膜を添加し、30°C にて反応を開始する。反応後上記と同様に HPLC で定量分析した。酵素膜の繰り返し使用実験では、24 時間ごとに基質溶液を交換して反応させた。

3. 結果と考察

3.1 エステル合成反応

Fig. 1 に非固定化及び固定化 CT を用いた Ac-Tyr-OH のエチルエステル合成反応における水濃度依存性を示す。いずれの場合も無水条件下では酵素活性は全く認められないが、水濃度とともにエステル合成収率は上昇し、水濃度 7~10% 程度で最大となる。これは水和により活性化された酵素量の増加を反映するものと考えられる。それ以上の水濃度では、エステル収率は平衡論支配

となり、加水分解反応の増加とともにエステル合成収率は低下している。

Fig. 2 は水濃度 5% で行ったエステル合成反応における、Lineweaver-Burk プロットである。このグラフの直線性から高濃度有機溶媒中でもミカエリス型の動力学で反応が進行することがわかる。このグラフから算出した酵素定数を Table 1 に示した。固定化によって K_m 値が 2 倍以上に増加している。これは基質の拡散が固定化担体によって阻害されるためと考えられる。水溶液中での酵素反応でも、固定化担体に PVA の繊維、または膜を用いた場合に、 K_m 値が数倍に増加することが報告されている^{(11)~(13)}。Table 1 に示すように、 k_{cat} は固定化により増加した。これは PVA が吸水性であるため酵素周囲の水濃度が増加し、活性酵素量が増加するためと考えられる。この結果二次反応速度 k_{cat}/K_m 値は固定化により減少していない。

Fig. 3 は、固定化 CT を回分式反応において繰り返し使用した結果である。比較的速く収率が落ちているが、これは酵素の脱落が原因と考えられる。このことは固定化酵素膜から含水エタノールへの酵素の抽出実験により

Fig. 3. Batch reusability of immobilized CT for ester synthesis in ethanol (CT 5 mg, PVA 0.25 g, AcTyrOH 0.1 mmol, EtOH 10 ml, H₂O 0.5 ml, 30°C).

確認された。

3.2 ペプチド合成

Ac-Tyr-OEt と Gly-NH₂ からジペプチド Ac-Tyr-Gly-NH₂ の合成における溶媒の影響を調べたのが Table 2 である。アルコール類を溶媒として用いた場合には、エステル交換反応が起こり、目的とするジペプチドの収率が低下する傾向がある。また、メタノールを溶媒に用いた場合には、ペプチドの合成も基質の加水分解反応も起こらなかった。用いた溶媒の中ではアセトニトリルが最も有効であり、以後は溶媒にアセトニトリルを用いて検討した。

Fig. 4 は、非固定化 CT によるペプチド合成反応における広範囲の水濃度の効果を 24 時間後の収率でみたものである。エステル合成の場合と同様に、無水条件下では生成物は得られなかった。しかし数 % の水濃度でペプチド合成収率は非常に大きくなり、それ以上では水濃度の上昇に伴って合成収率は減少した。この反応系は、アシル化酵素中間体 Ac-Tyr-CT に水とグリシンアミド

Fig. 4. Effect of water content on peptide synthesis by free CT (CT 5 mg, AcTyrOEt 0.1 mmol, GlyNH₂HCl 0.12 mmol, Et₃N 0.12 mmol, MeCN 10 ml, 30°C, 24 h). ○, peptide yield (%); ●, hydrolysate yield (%).

Table 2. Effect of solvents on peptide synthesis by CT^{a)}

Solvent	Free CT			PVA-immobilized CT ^{b)}		
	Peptide	Hydr. (%)	Trans.	Peptide	Hydr. (%)	Trans.
Acetonitrile	93	7.0	—	67	4.5	—
THF	78	20	—	81	14	—
Methanol	0	0	—	0	0	0
Ethanol	75	9.8	—	53	12	—
<i>n</i> -Propanol	70	9.3	20	41	12	37
<i>n</i> -Butanol	24	8.0	20	41	15	26
DMF	0	0	—	0	0	—

^{a)} CT 5 mg, AcTyrOEt 10 mM, GlyNH₂HCl 12 mM, solvent 10 ml, H₂O 0.5 ml, Et₃N 12 mM, 30°C, 24 h.

^{b)} PVA 250 mg.

Scheme 1.

Fig. 5. Effect of water content on peptide synthesis by immobilized CT (CT 5 mg, PVA 0.25 g, AcTyrOEt 0.1 mmol, GlyNH₂HCl 0.12 mmol, Et₃N 0.12 mmol, MeCN 10 ml, 30°C, 24 h). ○, peptide yield (%); ●, hydrolysate yield (%); Δ, peptide synthesis rate (μmol·min⁻¹·CTmg⁻¹); □, peptide yield by free CT (%).

が競争的に求核攻撃をする反応であるので (Scheme 1), 水濃度の上昇に伴って加水分解反応が有利になったためである。数 % の水濃度でもグリシンアミドに対して大過剰の水が存在することになるが, それにもかかわらずペプチドが高収率で得られるのは, この反応系でグリシンアミドの求核反応性が水に対して非常に大きいためと考えられる。水溶液中 (pH 9.3) で, Ac-Ty-CT の脱アシル化反応をストップフロー法で測定し, アミノ酸アミドと水分子の求核反応性を比較した結果, Gly-NH₂/H₂O = 11.5, Ala-NH₂/H₂O = 44 であったと報告されている¹⁴⁾。なお, Fig. 4 で水濃度 65% 付近で酵素活性が急激に低下することが認められた。この領域ではほとんどの Ac-Tyr-OEt が未反応で残存していた。この原因は明らかでないが, この溶媒組成で酵素が膨潤するか, ペプチド鎖の unfolding が起こるものと考えられる。

Fig. 5 は PVA 膜中に包括固定化した CT を用いたペプチド合成反応における水濃度依存性のグラフである。測定した範囲内で, 水濃度の上昇に伴い反応速度は上昇するが, エステル合成の場合と同様に過剰の水により加水分解反応側に平衡がシフトするため, 24 時間後のペプチド合成収率は減少した。また, 固定化により最適水濃度が上昇するのは PVA の吸水性に起因すると思われる。

Fig. 6. Batch reusability of immobilized CT for peptide synthesis in acetonitrile (CT 5 mg, PVA 0.25 g, AcTyrOEt 0.1 mmol, GlyNH₂HCl 0.12 mmol, Et₃N 0.12 mmol, H₂O 0.5 ml, MeCN 10 ml, 30°C, 24 h). ○, ester yield; ●, hydrolysate yield; Δ, esterification rate.

る。

最後にペプチド合成における固定化 CT の繰り返し使用の結果を Fig. 6 に示す。上に述べたエステル合成の場合と比較して合成速度と収率が共に安定しているのがわかる。アセトニトリルはエタノールと比較して酵素に対する親和性が低く, そのため PVA からの酵素の脱離が少ないためと思われる。一般に水溶液中での固定化では, 酵素の脱離を防ぐために高分子の橋かけや酵素と担体との共有結合が必要である。これに対して, 上に述べたように適切な有機溶媒を選択すれば, 単純な包括固定化により安定に作用する酵素膜が得られ, この方法は他の有機溶媒中での酵素反応にも応用できると考えられる。

付 記 本研究の一部は, 文部省科学研究費補助金 (重点領域研究 No. 01604516) により行われた。

文 献

- 1) A. M. Klibanov, *Chemtech*, **16**, 354 (1986).
- 2) 山根恒夫, 油化学, **36**, 761 (1987).
- 3) Yu. L. Khmel'nitsky, A. V. Levashov, N. L. Klyachko, and K. Martinek, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 710 (1988).
- 4) A. Zaks and A. J. Russell, *J. Biotechnol.*, **8**, 259 (1988).
- 5) J. S. Dordick, *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 194 (1989).
- 6) H. Kise, A. Hayakawa, and H. Noritomi, *J. Biotechnol.*, **14**, 239 (1990).
- 7) J. M. Cassells and P. J. Halling, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1489 (1989).
- 8) J. M. Cassells and P. J. Halling, *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 755 (1990).
- 9) H. Noritomi and H. Kise, *Biotechnol. Lett.*, **9**, 383 (1987).
- 10) H. Noritomi, A. Watanabe, and H. Kise, *Polym. J.*, **21**, 147 (1989).
- 11) H. Ichijo, T. Suehiro, A. Yamauchi, S. Ogawa, M. Sakurai,

- and N. Fujii, *J. Appl. Polym. Sci.*, **27**, 1665 (1982).
- 12) K. Imai, T. Shiomi, K. Sato, and A. Fujishima, *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 613 (1983).
- 13) K. Imai, T. Shiomi, K. Uchida, and M. Miya, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1721 (1986).
- 14) J. Fastrez and A. R. Fersht, *Biochemistry*, **12**, 2025 (1973).

Amino Acid Esterification and Peptide Synthesis by α -Chymotrypsin Entrapped in Poly(vinyl alcohol) Films*

Akira WATANABE^{*1}, Hidetaka NORITOMI^{*1}, Toru NAGASHIMA^{*1}, and Hideo KISE^{*1}

^{*}Enzymatic Reactions in Aqueous-Organic Media X.

^{*1}*Institute of Materials Science, University of Tsukuba (1-1-1 Tennoudai, Tsukuba, Ibaraki, 305 Japan)*

Esterification of *N*-acetyl-L-tyrosine and peptide synthesis from *N*-acetyl-L-tyrosine ethyl ester and glycnamide in hydrophilic organic solvents were studied by using free α -chymotrypsin and chymotrypsin entrapped in PVA films as catalysts. The reaction rates and the product yields were strongly dependent on the water concentration in the reaction systems; at water concentrations below 10%, both the free and immobilized enzymes were highly active for the synthetic reactions, while under anhydrous conditions, the enzymes were totally inactive. By immobilization to PVA films, the value of K_m increased, but the second order reaction rate (k_{cat}/K_m) was the same as that of the free enzyme. The PVA-immobilized chymotrypsin exhibited stable catalytic activity for the peptide synthesis in acetonitrile for more than 7 days.

KEY WORDS Immobilized α -Chymotrypsin / Poly(vinyl alcohol) Film / Amino Acid Ester Synthesis / Peptide Synthesis / Organic Solvent / Enzyme Stability /

(Received November 5, 1990; Accepted December 10, 1990)

[*Kobunshi Ronbunshu*, **48**(4), 247—251 (1991)]

* Part IX: H. Kise, *Bioorg Chem.*, **18**, 107 (1990).