金属キレート触媒によるペプチドおよび 関連化合物の加水分解反応

木 村 栄 一*

Hydrolysis of Peptides and the Related Compounds with Metal
Chelate Catalysis.

Eiichi KIMURA*

I. はじめに

生物が不可欠とする金属イオンに Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe, Co, Cu および Zn がある。これらの金属イオンは配位能の違いから、生体内の周囲の分子に化学的に固定した遷移金属類と、周囲とは弱く結合し場合によってはイオンとして動きやすいアルカリ金属および土類とに大別できる¹⁾。もう少し詳しく分類すると表 1 のようになる²⁾。

表 1 生体内における金属イオン²⁾

	Na ⁺ , K ⁺	Mg ²⁺ , Ca ²⁺	Zn ²⁺	Fe, Co
役割	電荷キャリアー	構造形成	酸触媒	酸化還元触媒
動き易さ	動き易い	やや動き易い	静止	静止
結合配位子	酸素アニオン	酸素アニオン	N, S 原子	N, S 原子
錯体安定性	弱い	やや安定	安定	安定
配位子交換	非常に速い	かなり速い	非常に遅い	非常に遅い

遷移金属イオンの存在意義について現在十分に認識されているが、それは多くの酵素の働きが主として重金属イオンを活性の co-factor として必要としているからである。金属酵素 (Metalloenzyme)³⁾ はその酵素蛋白の活性中心部に当量比をもって特殊な形で強く結合した金属イオンを含んでいる。また他方には、金属イオンとの結びつきはさほど強くなくても活性をより高めるためにそれを必要とする酵素もある。この場合金属イオンとタンパク分子との構成は明確な当量比にはない。金属酵素および金属イオン活性酵素の例をいくつか表 2 に

かかげる。

表 2 金属酵素および金属イオン活性酵素

	触媒反応	金属
金属酵素		
カルボキシペプチダーゼ	ペプチド加水分解	Zn
アルカリフォスファターゼ	リン酸エステル加水分解	Zn
炭酸脱水酵素	カルボニル, CO ₂ の水和, 脱水	Zn
ロイシンアミノペプチダーゼ	ペプチド加水分解	Mn, Mg
カルボキシトランスフォスフォリラーゼ	リン酸エステル転移	Co
グリシルグリシンペプチダーゼ	ペプチド加水分解	Co
チトクロムオキシダーゼ	酸化	Cu, Fe
チトクロムC	電子伝達	Fe
金属イオン活性酵素		
ATP-アーゼ	リン酸エステル転移	Mg, Ca
エノラーゼ	脱水	Mg
オキザルアセテートデカルボキシラーゼ	脱炭酸	Mg

このようにアルカリ金属をのぞいた金属イオンは酵素の co-factor となり、ルイス酸としての機能、酸化還元触媒、或いは活性構造の保持に役立っているが、ここではルイス酸としての触媒作用に話をしばって考えてみたい。

II. 酵素内の金属イオン

ある金属を含む酵素は、一たん単離された後で他の金属がその本来の金属と代り得る。その場合の酵素活性はそれぞれの金属イオンによって異なってくる。たとえばカルボキシペプチダーゼは Co²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, 等で本来の Zn²⁺ を置換したとき活性を保持するが Cu²⁺, Hg²⁺, Cd²⁺ のような金属イオンをもってくと活性を失う。

リン酸エステル転移に関係するほとんど全ての酵素が

* 広島大学医学部薬学科 ()

* Department of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University, School of Medicine, ()

Mg²⁺ か Mn²⁺ を必要とするがこのことは触媒作用中リン酸エステルのマイナス電荷が二価カチオンで中和されねばならないということを示唆する。このうちいくつかの酵素は ATP → ADP を触媒する。金属イオンだけでも同様の作用があるがその場合は金属が ATP の β-PO₃⁻ 部に結合し加水分解を促進させると考えられる⁵⁾。その complex 生成定数は金属を変えてもあまり変らず⁶⁾、加水分解速度も差はほとんどない⁵⁾。ところがこれに酵素が加わると機構が変わり、その結果 Mn²⁺, Mg²⁺ は反応を促進する一方 Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ は逆に強い阻害剤となる。この理由は、酵素タンパク中の塩基性部分(イミダゾール基等)も活性中心に必要であるが、これが錯体をつくり易い金属イオン (Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺) によってブロックされたがって酵素は失活するのに対し、Mn²⁺, Mg²⁺ は後述の如く窒素塩基とそれほど強い親和性がないのでブロックされるにいたらないと説明されている⁴⁾。

金属のルイス酸としての触媒作用の強さと酵素系における金属イオンの活性との関連性は 図 1 に示されているように必ずしも一致しない。モデル系では強力な効果のある超酸 (super-acid), Hg²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ 等は、酵素中にある活性を示さない。対照的なのが Co²⁺ と Zn²⁺ でペプチド加水分解や炭酸水和等に際して非常にすぐれた co-factor となる。

図 1 金属酵素反応速度⁴⁾

(a) カルボキシペプチダーゼ; (b) 炭酸脱水酵素, およびモデル錯体触媒反応速度(c)⁴⁾

なお金属イオンの錯体生成定数は配位子に関係なく、Mn<Fe<Co<Ni<Cu>Zn の順で⁶⁾、触媒速度の順と合わせると Brønsted の関係がなりたつ。すなわち、 $\log(\text{金属イオン触媒速度}) = k \cdot \log(\text{金属イオン錯体安定定数})$ 。

以上の例からも明らかな如く金属イオンの酵素における効果には選択性が存在する。なぜそうなのかは問題が複雑すぎて答はまだ speculation の域をでていないが、一つの要素としてあげられるのは金属イオンの配位子の選択性である⁶⁾。生体内においては酸素、窒素およびイオウ原子が最も重要な配位子であるがこれらと金属イオン間の錯体安定度定数は先にも触れたように一様に Mn<Fe<Co<Ni<Cu>Zn の順である。しかしある金属がいずれの配位子を特に好むかは Irving-Williams の序列⁷⁾に示されるように Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ は窒素原子を, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ は酸素原子とより強い complex をつくる (図 2 参照)。

図 2 1:1 錯体の安定度定数⁶⁾

配位子: 1, ATP; 2, (CO₃)₂; 3, Gly; 4, en; 5, イミダゾール; 6, CH₃CO₂

Pearson の “soft, hard acid and base rule” がこの説明に使われた⁶⁾。つまり比較的 soft な窒素ドナーは比較的 soft な Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺ 等とより安定な complex をつくるというわけである。リン酸エステルドナーは酸素原子同様 hard base で Ca²⁺, Mg²⁺ 等の hard acid を好む。イオウ原子は soft で 3d 金属に対して強い配位子でありイミダゾール基も同様 soft である。Williams は金属イオンの酵素選択性は金属がこのように特定の配位子と complex をつくることから生じると考えた⁸⁾。たとえばイオウ原子は右側の金属イオン (Cu²⁺, Pd²⁺ 等) と強い結合をするが Mg²⁺, Mn²⁺ に対しては親和性が低い。したがってイオウが存在してもリン酸エステルと結合しその酵素を活性化するという Mg²⁺, Mn²⁺ の働きは妨げられないという風に説明される。

金属酵素中の金属の物理的性質を詳しく分析してみる

と、同じ金属のモデル錯体に比べ結合 site の構造が極めて異常であることがわかる⁹⁾。そのデータは基底状態の金属の性質からは十分に説明され得ないが、このことは酵素の金属を含む活性中心が反応の遷移状態に近い構造をとっているよを示唆する。図1の例の如く Zn^{2+} と Co^{2+} は酵素を最も活性化する金属であるが、これらは他のイオンと違って触媒反応ポテンシャルである low symmetry を容易にとることができるからであろう⁹⁾。また Zn^{2+} と Co^{2+} の ternary complex の形成傾向は非常に似ているが Ni^{2+} は異なっている⁹⁾。この事実も Zn^{2+} と Co^{2+} の特別共通な性質を物語るものであろう。

次に金属酵素における金属イオンの機能についてであるがこれは次のように要約される¹⁰⁾。(i) 金属イオンが酵素または基質のドナー原子と complex をつくりおのおの反応性を増大させる。(ii) 基質と酵素両方に配位して互いに近づくブリッジの役をする。(iii) (ii) の役目と同時に化学反応性を高める。(iv) 酵素が基質どちらかに配位し反応に適切な構造とする。これらの例および金属が酵素中どのように働いているのか、またもっとさかのぼって金属イオンは如何に基質に働いて触媒作用を示すのか等に関して次章でペプチドおよび関連化合物の加水分解を例に説明してみよう。

III. 金属イオン触媒によるペプチドおよび関連化合物の加水分解反応

1951年 Kroll は2価金属イオン (M^{2+}) が pH 7~8 でアミノ酸エステル (NH_2CHCO_2R') の加水分解に効果的な触媒として働くことを見出した¹¹⁾。 $[M^{2+}]$ を増すと反応速度は増加するが $[M^{2+}]/[NH_2CHCO_2R'] = 1$ のとき最大となることから律速段階では金属とエステル, 1:1 の complex が関与していることが考えられる。反応速度は pH に比例して増加する (pH 7.5→8.5, 4倍増加)。したがって反応は $M^{2+}-NH_2CHCO_2R'$ complex と OH^- おのおの一次よりなると想定された。また、金属のキレート安定性が増すにつれて速度は増大することがわかった (pH 7.9 におけるグリシンエステル加水分解速度比は Cu^{2+} , 60; Co^{2+} , 22; Mn^{2+} , 5; Ca^{2+} , 1; Mg^{2+} , 1), 安定な錯体をつくらぬ Ca^{2+} や Mg^{2+} は触媒効果があらわれなかった。以上の事実から金属イオン触媒反応に次の機構が提出された。

反応の駆逐力は金属イオンのカチオニックな効果および安定な五員環キレート, (1) および (2) の形成によ

て得られたと考えられる。しかし Kroll の実験事実はエステルが配位した中間体(1)の想定を必ずしも要求しない。反応生成物のアミノ酸が非常に安定な錯体(2)をつくるため活性化エネルギーがさがり触媒効果ができたと考えてもあるいは、一座配位子としての NH_2CHCO_2R' の錯体安定性が反応速度を決めると考えることもできよう。たとえば、Li⁺らは次の機構を出した¹²⁾。

Bender らは、機構をより明らかにするため追試をかねた実験をしたが、 Cu^{2+} イオン触媒によるフェニアラニンエステル加水分解は pH 7.3 で単なるアルカリ触媒より 10^6 倍も効果があることがわかった¹³⁾。この速度増加は、先に Li⁺らが指摘したように単に金属カチオンの間接的な影響によるものではないことは明らかである。なぜなら α -アミノ基がプラスを帯びてもエステルのアルカリ加水分解は 10^3 倍しか増えないからである (表3参照)。

表3 酸、アルカリおよび Cu^{2+} -触媒によるエステル加水分解速度¹³⁾

エステル	触媒	温度 (°C)	k_2 (l/mol·sec)	k_1 (sec ⁻¹)
$(CH_3)_2NCH_2CO_2t-Bu$	OH^-	10.02	3.72×10^{-4}	
$Cl^-(CH_3)_3N^+CH_2CO_2t-Bu$	OH^-	10.02	3.70×10^{-4}	
DL-フェニアラニンエチルエステル	H^+	25.04		1.46×10^{-14}
	OH^-	25.04	2.97×10^{-8}	5.8×10^{-9}
	Cu^{2+}	25.04		2.67×10^{-8}

したがって 10^6 倍の効果を説明するために、 Cu^{2+} がアミノ基に配位しているだけでなくエステルとも何らかの

interaction をもちそれを活性化していると考えたのである。またこの反応でエステルカルボニルの O^{18} 交換の起ることが観察された。このことは反応中に tetrahedral 中間体 (3) が可逆的に形成されることを示唆する。以上の結果より次の機構が与えられた¹³⁾。

しかし次の機構も Bender らの結果をうまく説明する。

この機構では、金属イオンは基質と求核試薬両方に配位し双方を互いに近づく役目をしている。反応を二次 (基質と OH^-) から一次 (complex の分子内反応) にかへ活性化エントロピー ($\Delta S^\ddagger$) をより有利に導くことにより触媒作用がでてくる訳である。もう一つ注目すべきは緩衝液として使われたグリシン (Gly) が Cu^{2+} と錯体を形成しそれが遷移状態に関与していることである。グリシン存在下における加水分解反応は次の段階を踏む。

主な反応は第2および3式で反応速度 $= k_3 [Gly Cu(Ester)] = k_3 \frac{k_2}{k_1} [Gly Cu][Ester] = k_{obs}[Ester]$ とあらわされた。したがってもし緩衝液のグリシンの代りに bulky な基をもつ光学活性のアミノ酸を用いれば D, L 間の k_2/k_1 や k_3 の相違により D, L 立体特異的なアミノ酸エステル加水分解が期待されよう。最近このような例が報告された⁵³⁾がこれについては後に述べる。

Jones らは pH stat 法を用いて Cu^{2+} ¹⁴⁾, Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} ¹⁵⁾ 触媒によるグリシンエステルの加水分解機構をより明らかにした。反応速度 ($pH\ 6\sim7$) $= k_{OH}[M-Ester\ complex][OH^-] + k_{H_2O}[M-Ester\ complex][H_2O]$ とあ

らわされ、金属イオンエステル (1:1) complex が active な species であることが確認された。 k_{OH} は $Cu^{2+} \gg Zn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+}$ の順に低くなる。また k_{OH} は k_{H_2O} よりも 10^9 倍も大きい。つまり OH^- が求核試薬として圧倒的に強いこともわかった。

Conley らは protonate したグリシンエステルへの OH^- の攻撃は中性のエステルへの攻撃より 40 倍早い ($k_{OH} = 24\ vs\ 0.58\ M^{-1}\ sec^{-1}$, at $25^\circ C$) が⁵, Cu^{2+} -エステル complex と OH^- の反応はさらに 3200 倍も早い ($k_{OH} = 0.76 \times 10^5\ M^{-1}\ sec^{-1}$)¹⁶⁾ ことを報告した。反応中心が関与した金属キレートによる触媒効果が定量的に確認された訳である。末端アミノ基が金属と配位してもエステル基とキレートが起り得ないとき金属イオン効果は protonation 効果とほぼ同じである¹⁷⁾。(例えば $(NH_3)_3Co^{3+}-NH_2CH_2CO_2Et$ の加水分解速度, $k_{OH} \approx 30\ M^{-1}\ sec^{-1}$)¹⁸⁾。もしアミノ酸エステルが反応中心以外に強い配位子をもっていれば (たとえばヒスチジン, システイン等のエステル) 金属イオン触媒効果は、金属にかかわらず protonation 効果と大差はない¹⁹⁾。以上のデータから金属イオンがエステル加水分解の効果的な触媒となるためには、(i) エステルが α -アミノ基を有すること、たとえば酢酸エステルは Cu^{2+} によって加水分解は促進されない²⁰⁾。(ii) 金属イオンの配位座に vacancy のあること。(iii) α -アミノ基以外にエステルよりも強い配位子をもたないこと。と要約されよう。

今までの実験事実は最初に Kroll の唱えた機構 (A) を支持するが、もう一つの機構 (B) も除外はできない。

Cu^{2+} , Ni^{2+} のような反応性の高い金属²¹⁾を用いていたのでは反応を追いかけるのが困難で詳細な反応機構を検討できにくい。そこで Busch らは比較的不活性な Co^{3+} 錯体を代りに選んだ²²⁾。一座配位子としてのグリシンエステル ($GlyOR$) を含んだ $cis-[Co\ en_2(Gly\ OR)X]^{2+}$ (4) (en =エチレンジアミン) は、 X (=ハロゲン) が比較的 labile でのぞかれやすく、先にあげた金属触媒となるための3つの条件を満足する。実際、錯体 (4) 内のエステルは水溶液中 Hg^{2+} が存在すると直ちに分解し、 $[Co\ en_2(Gly)]^{2+}$ (7) が生成する。その機構は、 Hg^{2+} により X^- がのぞかれ不安定な五配位の中間体 (5) ができ、次に X のあいた位置にエステルカルボニルがきて比較的安定な中間体 (6) になり、かくて極性化されたカ

ルボニルが外部より H_2O または OH^- の攻撃をうけ反応が起ると説明された。

中間体 (6) は水溶液中可視および赤外スペクトルで観察された。(4) の $\nu_{\text{C=O}} 1740 \text{ cm}^{-1}$ に代わって 1610 cm^{-1} の吸収があらわれ、次にこれがグリシナ錯体 (7) の $\nu_{\text{C=O}} 1640 \text{ cm}^{-1}$ によって置き換えられた。 1610 cm^{-1} の吸収は配位したカルボニルによるものと帰属がきめられた。Busch らの結論は (A) 機構を支持する。なお中間体 (6) は後に Buckingham らによって単離され、Busch らの結論は確認された²³⁾。イソプロピルエステル中間体 (6) の加水分解速度定数 $k = k_{\text{H}_2\text{O}}[\text{H}_2\text{O}] + k_{\text{OH}}[\text{OH}^-]$ で、 $k_{\text{H}_2\text{O}} = 1.9 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, $k_{\text{OH}} = 1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ であった¹⁸⁾。この値および活性化パラメーターを free のエステル反応の場合と比較すると (表 4 参照), 速度は 10^6 倍以上も速く, Cu^{2+} 触媒の反応速度以上であることがわかる。

表 4 アルカリ加水分解速度定数および活性化パラメーター

グリシンエステル	$k_{\text{OH}} (\text{M}^{-1} \text{ sec}^{-1})$ 25°C	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$\Delta S^\ddagger$ (e.u.)
$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$	0.6	8.8	-32 ¹⁸⁾
$^\oplus\text{NH}_3\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$	24	11.8	-6 ¹⁸⁾
$[\text{Co en}_3(\text{Gly O}^- \text{-Pr})^{3+}]$ (6)	1.5×10^6	14.3	+15 ¹⁸⁾
$\text{Cu}^{2+} \cdot \text{NH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$	0.76×10^5	—	- ¹⁸⁾
$(\text{NH}_3)_5\text{CoNH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$	30	—	- ¹⁸⁾

さらに興味あるのは金属イオン錯体は, エンタルピー項 ($\Delta H^\ddagger$) を不利にしているのにエントロピー項 ($\Delta S^\ddagger$) を非常に反応に有利にしていることである。(B) 機構ならば簡単に説明つくが, (A) 機構だとすると解釈は難しい。なお錯体 (4) の $\text{R} = t\text{-Butyl}$ のときは結合切断がア

ルキル酸素 ($\text{R}'-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-t\text{-Bu}$) に起ることもわかった²⁴⁾。

エステル同様アミドも金属イオンによって加水分解される。アミノ酸アミド, ペプチド等がこれに入る。基質の構造上の条件はエステルの場合と同様であろう。 Cu^{2+} , Co^{3+} および Ni^{2+} はその順序の速さでグリシンアミド

やフェニルアラニルグリシンアミドを弱アルカリ性で無選択的に加水分解する。 Cu^{2+} は pH 5 で触媒的に働き約 100 倍の速度増加がみられた。しかしこの効果は金属ペプチダーゼの作用に比べればごくわずかである²⁵⁾。Fernando は金属触媒によるアミド加水分解反応を次のように考えた²⁶⁾。

しかしこれだけでは後述のようになぜエステルの場合に比べ反応が遅いのか説明しない。

Conley らはグリシンアミド加水分解の kinetics を調べた結果, Cu^{2+} は中性 pH 領域で反応を早めるがアルカリ側では逆に遅くすることがわかった。pH 12 ではアミド水素が解離し非常に安定なアミド- Cu^{2+} 錯体を作るので反応はその先へ進まないと言明された¹⁶⁾。また金属触媒効果はエステルの場合よりも弱いこともわかったがその理由について Conley らは次のように考えた。

エステルの場合 $k_2/k_3 < 1$, 故に律速段階は k_1 となる。金属イオンが関与したときも $k_2/k_3 < 1$ 。したがって触媒効果は tetrahedral 中間体が錯体をつくることにより k_1 を増加させるところにある。一方アミドの反応では $k_2/k_3 > 1$, 最初の段階で平衡が起り律速段階は k_3 となる。グリシンアミドの方がエステルよりも安定な錯体を形成するので, もし k_1 が律速ならば金属イオン効果はアミドに強く効くはずである。故に Cu^{2+} がエステルのときほど効果的でないのは k_2/k_3 がさらに増大するからだと考えた。それはアミドキレートするとき切断されるべき結合は環の中にあり切りにくいのがエステルの場合は外にあり加水分解が容易であるからであると結論した。

反応中心の配位ということに関して、先に見た如くエステルは Co^{3+} と配位することにより $\nu_{\text{C=O}}$ 1740 から 1610 cm^{-1} までさがった ($\Delta \sim 130\text{ cm}^{-1}$)。一方アミドの場合後述の如く free の $\nu_{\text{C=O}}$ 1675 から 1625 cm^{-1} ($\Delta \sim 50\text{ cm}^{-1}$) にさがる。これからも明らかなように金属のカルボニルへの影響はエステルの場合の方がより顕著で、 OH^- や他の求核試薬の攻撃をアミドよりも受け易くなったと云えよう。ここで興味あるのはカルボニルを活性化するには通常 X^- , OAc^- といった基をとりにもってくるが、いずれの場合もエステルの $\nu_{\text{C=O}}$ よりも高波数にある。これに対し金属イオンがエステルを活性化する場合とは逆に異常に低くなるのが特徴である。

先の Conley らの実験に関連して、グリシルグリシンのアルカリ加水分解は Cu^{2+} があると阻止される²⁷⁾。この原理を応用して選択的にペプチドの C 末端分解を行なうことができる²⁸⁾。

アミノ酸エステルの場合と同様に 8-アセトキシキノリンも Cu^{2+} によって加水分解を受ける。反応速度 $= k[8\text{-アセトキシキノリン}]$, $k = \{k_1[\text{H}^+]^2 + K_a(k_2[\text{H}^+] + k_3 + k_4[\text{OH}^-] + k_5[\text{OH}^-][\text{Cu}^{2+}])\} / [\text{H}^+] + K_a$ とあらわされ Cu^{2+} -基質 (1:1) 錯体に働く OH^- の反応項がある。これに関連して興味深いのは、カルボ(8-キノルオキシ)基 (8) がアミノ基の保護に使われている例である²⁹⁾。この保護基は最後に金属触媒によって緩和な条件でのぞかれる。

1963 年, Collman らは $\text{cis-}[\text{Co}(\text{trien})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (9) (trien=トリエチレンテトラミン) を金属酵素モデルとしてペプチドの加水分解反応を報告した³⁰⁾。この錯体と Mn^{2+} , Mg^{2+} を含むロイシニアミノペプチダーゼ

との類似点は、両方共加水分解の駆逐力としてキレート化が必要なこと³¹⁾, また N-末端のペプチド結合を選択的に切断することである。しかし Collman のモデル錯体はペプチドと化学量論的に反応し切断されたアミノ酸残基と安定なキレートを不可逆的に生成する点が酵素と異なる。(9) に類似した $\text{cis-}[\text{Co en}_2(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ ³²⁾ や $[\text{Co}(\text{tren})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (tren=トリアミノトリエチルアミン)³³⁾ もペプチドの段階的分解に用いられた。ジペプチドは (9) により緩和な条件 (pH 7.5 水溶液中, 65°C) で定量的に分解される。たとえば Gly-Phe が当モルの (9) と反応すると生成物は $[\text{Co}(\text{trien})(\text{Gly})]^{2+}$ (10), Phe および微量の $[\text{Co}(\text{trien})(\text{Phe})]^{2+}$ である。

別途に (9) と free のアミノ酸から容易に合成される錯体 (10) は各アミノ酸固有の R_f 値をもちペーパークロマト分析が可能である。したがってこの方法で簡単にペプチドの N-末端を決定できる^{33,34)}。Free の N-末端が必要なことは、Nを保護したペプチドあるいはジケトヒペラジンが (9) とは反応しないことから明白であろう。ヒドロキソアコ錯体 (9) はジアコおよびジヒドロキソ型と平衡にある。

H_2O 分子が Co^{3+} に配位することにより acidity が増し中性 pH 付近で H^+ が解離し、潜在的求核試薬となる OH^- が金属イオンの周囲に当モル以上いるわけである。(後述するようにこの OH^- がアミド加水分解の際きわめて重要な役割をすることが最近わかった。)³⁵⁾ ペプチド加水分解機構として次の A, B どちらかが考えられる。

モデル酵素, $cis\text{-}[\text{CoN}_4(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ はアミノ酸エステル加水分解も促進する。この場合は先にあげた Buschらの機構²²⁾がそのままあてはめられるという²³⁾。なお(11)→(12)反応はエステルのキレート環が解離することなく起り, B機構は否定された。

Cu^{2+} 触媒のときと同様に, もしこの ternary complexの酵素に相当する部分(つまり4つの窒素配位子)に光学活性の基を導入したならば基質に対し立体特異的な反応がいくのではないかと予想される。事実, 村上らはエチレンジアミンの代りにプロピレンジアミン $\text{CH}_3(\text{NH}_2\text{-CHCH}_2\text{-NH}_2)$ のD体を用いたとき, L-フェニルアラニンエステルの加水分解速度が, L体を用いたときよりも速いことを見出した³⁶⁾。

金属イオンによる触媒効果の他の例として Breslowらは2-シアノ-1,10-フェナンスロリンの水和反応の機構を研究した³⁷⁾。この基質の特徴は2つのピリジン窒素によって金属にキレートするが, 反応中心のCN基は基底状態では金属の近くにあるが配位はできないことである。

Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} いずれも反応を著しく早めた。反応は金属-基質 complex, および OH^- おののおのに関して一次であった。 Ni^{2+} は速度を 10^7 倍も増大させ, Cu^{2+} は 10^9 倍以上にもする。これら触媒作用はアミノ酸エステル, ペプチドのときと同様 A, B いずれかの機構で説明される。Breslow らは OH^- 以外の求核試薬の攻撃の

仕方を比較することにより, OH^- は CN 基に対し外から攻撃する(つまり A 機構)と結論した。金属触媒による速度増加

はほとんど $\Delta S^\ddagger$ の効果によることが明らかになった(表 5 参照)。A 機構でこの事実を説明するためには, 金属

表 5 反応速度定数および活性化パラメーター

反 応	触 媒	$k_2(\text{M}^{-1} \text{min}^{-1})$	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$\Delta S^\ddagger$ (e.u.)
(13)→(14)	金属イオンなし	0.154(at 25°)	15.1±1.2	-(20±4)
	Ni^{2+} -触媒	$(1.6 \pm 0.8) \times 10^6$ (at 30°)	15.7±0.2	+(14±1)
(14)→(15)	金属イオンなし	0.054(at 45°)	—	—
	Ni^{2+} -触媒	3.3×10 (at 50°)	—	—

上に配位していた H_2O が遷移状態でイミノアニオンで置換され, その結果溶媒分子 (H_2O) の自由度が増したと考えたのである。もう 1 つ興味ある事実は, (14)→(15) 反応の場合金属イオンがあまり効果のないことである(表 5 参照)。基底状態における錯体 (13) の反応中心は

配位していないが, 遷移状態において初めて金属と直接結合する。一方 (14)→(15) 反応では反応中心が基底, 遷移状態いずれも配位している。つまり最初のような場合金属触媒効果が非常に大きくなることをこの例はよく

示している。反応のエネルギープロファイルは定性的に図 3 のように書けよう。

図 3 反応 (13)→(14)→(15) のエネルギープロファイル

酵素モデルの他の例をあげてみよう。先にもでてきた炭酸脱水酵素はアルデヒドや他のカルボニルまたは CO_2 の可逆的水和反応を触媒するが酵素活性化には Zn^{2+} を必要とする。このモデルとしてピリジン-2-アルデヒドの Zn^{2+} 触媒反応が報告されている³⁸⁾。反応速度 (pH 7.2) は、基質、 Zn^{2+} に関して各一次で速度定数は単なる水触媒反応より 6.5×10^8 倍も大きい。この大きな効果は Zn^{2+} がピリジン窒素に配位すると同時にアルデヒドの近くに位置することによって生じたと考えられる。したがって基質がピリジン-4-アルデヒドのとき速度が 1/280 に落ちることもうなずける。一方 Bovin 炭酸脱

水酵素はピリジン-2 および 4-アルデヒド両方にほぼ等しい作用をもち速度は水触媒反応に比べ約 10^8 倍である。反応速度に関しては Zn^{2+} は酵素に近い（わずかに 1/10 の違い）働きをするが前者は 2-アルデヒドにのみ特に効果があるという点が後者との大きな違いである。この実験結果は金属触媒と酵素との作用は必ずしもパラレルでないこと、したがって金属触媒の機構がそのまま酵素にあてはめられるものではないことを示唆する。同じように酵素中の金属イオンは基質と配位していないという報告がある³⁹⁾。Bovin 炭酸脱水酵素-基質（たとえば CO_2 ）complex 中、基質は特別な strain を受けていないということから基質は Zn^{2+} に配位しているのではなくタンパク中の hydrophobic な力で引きつけられていると推察された。しかし Zn^{2+} は近隣にありこの上に配位した OH^- が求核的に CO_2 を攻撃して水和反応を行なうという機構が出された。

このように炭酸脱水酵素中の Zn^{2+} は CO_2 やアルデヒドに binding site を提供するというよりはむしろ水和反応だけに関与するらしいことは以前から推察されていた⁴⁰⁾。これに対し後述のカルボキシペプチダーゼにおける Zn^{2+} は、基質-酵素 complex の形成に参加すると共に加水分解反応にも関与する⁴¹⁾。これに類似して金属が基質と酵素の活性中心に結合して反応をいきやすくするというモデル例が Breslow らによって報告されている⁴²⁾。次のアシル転移反応である。

Co^{3+} キレートによるペプチド加水分解の機構とその応用を検討中、木村らは Co^{3+} 錯体の配位圏内で逆反応のペプチド結合が起ることを見出した^{43,44)}。すなわち、*cis*- β -[Co(trien) X_2]⁺ (16) を当モルのグリシンエステル (GlyOR) で処理したところ（少量の水の存在、室温；または、DMF, DMSO 中 50°C, 30 分以内）、目的の *cis*- β -[Co(trien)(GlyOR) X]²⁺ (17) の他にジペプチドを含んだ錯体 (18) をも単離した。

面白いことに同じことを他の *cis*-[CoN₄X₂]⁺ に適用したところ生成物は *cis*-[CoN₄(GlyOR)X]²⁺ のみで (18) 類似の化合物はみとめられなかった⁴⁵⁾。 Co^{3+} に配位したハロゲンの反応性が窒素配位子によって間接的にいろいろ変わっていくことは無機化学的に非常に興味ある問

題である。錯体 (18) においてジペプチドエステルは二座配位子として N-末端アミノ基とペプチドカルボニル酸素とがキレートしている。以前からアミド基のドナーは窒素か酸素か問題になってなかなか決め手がなかったが, free のアミド $\nu_{C=O}$ が 1675 cm^{-1} であるのに (18) では 1625 cm^{-1} にさがったこと, 可視吸収スペクトルが $[\text{Co}(\text{trien})(\text{Gly})]^{2+}$ (10) のそれと完全に一致することから (18) の 6 つのドナーは N_3O であると結論して (18) 構造が提出された。後に X 線回析によりこの構造が確認された⁴⁶⁾。ジペプチド生成の機構については, 単離した (17) に GlyOR' , GlyNH_2 , GlyGlyOR あるいは AlaOR を反応させるとそれぞれ $[\text{Co}(\text{trien})(\text{GlyGlyOR}')]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{trien})(\text{GlyGlyNH}_2)]^{3+}$, $[\text{Co}(\text{trien})(\text{GlyGlyGlyOR})]^{3+}$ あるいは $[\text{Co}(\text{trien})(\text{GlyAlaOR})]^{3+}$ が収率よくできることから, (17) が中間体であることがわかる。その後 Buckingham らは不安定な $[\text{Co}(\text{trien})(\text{GlyOR})]^{3+}$ (19) の単離に成功し, これに GlyOR を反応させると (18) ができることを報告した⁴⁷⁾。したがって反応は

と進行するのであろうと推察されるがこの他の可能性,

も否定はできない。無機化学的に興味あるのは, $\text{cis-}\alpha$ - $[\text{Co}(\text{trien})\text{X}_2]^{2+}$ (20) から出発しても前と同じ β - $[\text{Co}(\text{trien})(\text{GlyGlyOR})]^{3+}$ (18) がとれることである。もし

のように立体選択的にいくものなら光学活性の (20) から光学活性の (18) がとれるはずであるが実際には (18) は完全にラセミ化していることがわかった⁴⁵⁾。したがって反応は上のように単純ではないことがわかる。

錯体 (18) のペプチド結合はアルカリによって容易に切れ $[\text{Co}(\text{trien})(\text{Gly})]^{2+}$ (10) を与える^{43,44)}。また (18) は, 先に Collman らによって見出された $\text{cis-}[\text{Co}(\text{trien})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ (9) によるジペプチドエステル加水分解の一中間体であることもわかった。しかし直接 (9) によるペプチド分解速度はまだ測定に成功していないので

(18) が唯一の中間体かどうかは結論がでていない。Hay らは (18) $\rightarrow$ (10) 反応速度を定量的に測定することに成功した⁴⁸⁾。それによると $\text{pH } 10\sim 11$ における反応速度 $= k_1[\text{CoHA}][\text{OH}^-] + k_2[\text{CoA}^-][\text{OH}^-]$, (CoHA = ジペプチド錯体, CoA^- = アミド水素が解離したジペプチド錯体), $k_1 = 162\text{ M}^{-1}\text{ min}^{-1}$, $k_2 = 86\text{ M}^{-1}\text{ min}^{-1}$ (at 25°)。一方 free のグリシルグリシンのアルカリ加水分解速度定数は $2.4 \times 10^{-3}\text{ M}^{-1}\text{ min}^{-1}$ (at 26°) であるので Co^{3+} に配位し活性化されたペプチド結合は約 6.5×10^4 倍早く切断されることになる。この特別の速さが N-末端残

基の選択的な切断をよく説明する。後に Buckingham らは中性 pH 領域における類似のエチレンジアミン錯体 (21) 中のアミドおよびエステル加水分解速度を測定し次の結果をえた⁴⁹⁾。

この結果は、配位したアミドはエステルに比べ $10^5 \sim 10^6$ 倍も遅く切断されること、しかし free のアミドに比べれば 10^6 倍も早い (free のグリシルグリシンの $k = 2.8 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ in 0.5 M NaOH) ことを明白に示している。

似たような例であるがアミド形成に関して興味深い報告がある⁵⁰⁾。それは金属と interaction をもつ反応中心に対して求核試薬が外から攻撃するという今までの例とは逆に分子内より攻撃する (B) 機構の最初の定量的観察例である。

反応速度は、 $-\frac{d\{[\text{CoN}_3(\text{Gly OEt})]\}}{dt} = \{k_1[\text{OH}^-] + k_2[\text{OH}^-]^2\}[\text{CoN}_3(\text{Gly OEt})]$, k_1, k_2 はそれぞれ (22), (23) 生成の速度定数である。 $k_1 = 50 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$; $k_2 = 6.6 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ sec}^{-1}$ (at 25°C)

合成的に金属イオンを利用した例として山田らの報告がある⁵¹⁾。アミノ酸エステルを非水溶媒中 Cu^{2+} と混ぜると発熱反応が起りペプチド結合ができる。Gly OR を原料としたとき、GlyGly OR の他に GlyGlyGly OR および GlyGlyGlyGly OR も単離された。光学活性アミノ酸エステルを用いたときラセミ化は起らずきわめて有用な反応である。単離可能なグリシンエステル錯体, Cu

$\text{Cl}_2(\text{GlyOR})_2$ はエタノール中で GlyOR と反応して GlyGlyOR が得られるという山田らの観察から、木村らの Co^{3+} の場合と類似した機構が考えられる。

すでにでてきたように光学活性基を含んだキレート (たとえばプロピレンジアミン⁵²⁾, アミノ酸) 錯体は金属酵素モデルとして基質特異性が期待される。このモデルにアミノ酸をつけて ternary complex をつくろうとしたときその錯体定数には普通立体特異性がない。たとえば, AA = Ala, Phe, Val, Prol のとき K_1, K_2 は全く同じである⁵³⁾。

しかし立体的に比較的に bulky な基 (*i*-Pr) をもつバリンを modify して三座配位子にした L-ValMA (L-Valine-N-monoacetate) を Cu^{2+} に配位させたとこ、その錯体は DL-アミノ酸に対し選択性をもつことがわかった⁵³⁾。

たとえば,

このような選択性は明らかに L-ValMA の *i*-Pr 基と AA の R との間の立体的反発に生じたものであると考えられる。

この知見を発展させて Angelici らは, $\text{Cu}(\text{L-ValMA})$ をポリスチレンジ-ビニルベンゼンにくっつけて光学分割カラムをつくった。このカラムに DL-イソロイシンをのせエチレンジアミン水溶液で展開したところ部分的分割が達成された (80% D-体, 20% L-体)⁵⁴⁾。Angelici らはさらに $\text{Cu}(\text{L-ValMA})$ 触媒を使ってアミノ酸エステル(E)の加水分解 kinetics を研究した⁵³⁾。

酸性溶液中では最初の平衡が左にかたよるが、アルカリ側では加水分解速度 $= k[\text{Cu(L-ValMA)(E)}][\text{OH}^-]$ とあらわされる。速度定数は表6のようであった。

表6 光学活性エステル加水分解速度定数

エステル (E)	L-体	D-体
ロイシンメチルエステル	$1.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	$1.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$
フェニルアラニンメチルエステル	1.0×10^3	1.4×10^3
アラニンメチルエステル	2.5×10^3	2.5×10^3

一方金属イオンなしのロイシンメチルエステル加水分解速度定数は $0.455 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ なので Cu(L-ValMA) により 2200 倍の速度増加が生じたことになる。この効果は Kroll らの機構で説明された。

アラニンのように立体効果の少ないものは D, L で差がでてこないが bulky な基をもつ他のアミノ酸では速度に相違がでてくる。しかしこの違いは K, k_{OH} いずれによるものかはっきりした結論は得られなかった。また一般に L 体の方がエステル錯体、アミノ酸錯体いずれもより安定なのに、D 体の方が早く切断されるという結果もうまく説明されない。

これまでの実験は、配位子となるような基質だけをとりあげその基質におよぼす金属イオン効果だけをみてきた。だが実際の金属酵素においては、先にでてきた炭酸脱水酵素の例をみるまでもなく基質は必ずしもキレート剤ではない^{38,39)}。むしろ金属酵素では、基質は酵素タン

(24)

そこに活性中心となるべき錯体 (PCA-Ni^{2+}) をおい

た (24)⁵⁵⁾。

基質として *p*-ニトロフェノールアセテートを用いその加水分解速度を調べた結果、このモデルは金属錯体 (PCA-Ni^{2+}) だけの系よりも 4 倍ほど反応を促進することがわかった。基質が 8-アセトキシ-5-キノリンスルホネートのように大きすぎてシクロヘキサアミロースの空間に入り切れないものは、このような差がでてこない。またシクロヘキサノール溶液中で反応をおこなわせると溶媒分子がその空間に入りこみ触媒作用は低下する。これらの事実から、触媒効果はほとんど PCA-Ni^{2+} による (10^3 倍) もので、hydrophobic な力で基質が固定されたことによる効果は、多少ある程度でこれはまだアセチル基の回転が完全に凍結されていないからであろうと結論された。

IV. カルボキシペプチダーゼ A (CPA)⁵⁶⁾

今までの人工的モデルを使って酵素のもつ特異性、触媒作用の機構を明らかにしていくという方向とは別に、天然の酵素そのものを対象に謎をときあかそうとするアプローチ例としてカルボキシペプチダーゼがある。カルボキシペプチダーゼは Zn^{2+} を含んだ金属酵素で C-末端を選択的に切る。ペプチダーゼ活性は Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} で示され、 Cu^{2+} -CPA と、 Zn^{2+} をのぞいたアポ CPA は不活性である。CPA は高分解構造およびアミノ酸順序が決定した最初の金属酵素である。

X線回析で CPA-ジペプチド (GlyTyr) complex の電子密度図が得られたがそれによると CPA-GlyTyr の結合は次の 4 つの interaction による。(i) 基質の C-末端 (この場合、Tyr) が CPA のタンパク部のポケットに入る。(ii) C-末端のカルボキシル基が Arg-145 のグアニジン基とイオンの結合をする。(iii) 基質のペプチド酸素が Zn^{2+} に第 4 の配位子として配位する。(iv) Glu-270 は H_2O を通じて GlyTyr の free アミノ基と結合する。このうちはじめの 3 つが触媒作用と直接関係

をもつ。

基質の切断されるペプチド部分と十分近い距離にあって CPA の触媒的働きに直接関与するタンパク部分は; Glu-270, Tyr-248 および Zn^{2+} だけである。したがって反応機構はきわめて限られてくる。現在のところ, Tyr-248 が切断ペプチド部にプロトンを供給し, Glu-270 の CO_2^- が求核試薬として直接(無水物中間体機構)あるいは間接(H_2O を介する general base 機構)的にペプチドカルボニルを攻撃すると考えられている。ルイス酸としての Zn^{2+} の働きは明らかであろう。Kaiser らは CPA によるエステル加水分解の kinetics を研究したが中間体は認められなかった³⁷⁾。ということは反応の遷移状態がきわめて不安定であるという Lipscomb らの仮説を支持する。しかしまだ次の機構のうちいずれかは明らかでない。

無水物中間体機構

General base 機構

V. おわりに

金属酵素の反応触媒効果はモデル錯体の触媒効果よりもさらに大きい。例えば CPA の benzoyl Gly-L-Phe のペプチド切断は基質の濃度が 10^{-2}M 以上のとき 0 次反応で速度定数は $7 \times 10^4 \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$ (at pH 7.5, 25°C) である⁵⁸⁾。またロイシニアミノペプチダーゼが L-Leu NH_2 および L-LeuGly を 50% 加水分解 (pH $\sim$ 9, 40°C) するにはそれぞれ 50 分および 30 分を必要とする⁵⁹⁾。一方, $[\text{Coen}_2(\text{GlyNH}_2)]^{3+}$ (21) の例より計算すると ($k = 25 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ at 25°), 配位したアミド切断の半減期は約 8 時間である (at pH 9)⁴⁹⁾。モデル錯体は反応を $\sim 10^6$ 倍促進させる効果を示したが、それでも金属酵素反応に比

べれば上の例のように ~ 10 倍も遅い。(一般的に他の例も含めていって $10 \sim 10^4$ 倍も遅い)⁴⁹⁾。 Co^{3+} 錯体ではペプチドのカルボニルを活性化させたことに触媒効果がでてきた(A機構)訳だがこれだけでは金属酵素の触媒反応速度には達し得ない。ところが最近の Buckingham らの実験により(B)機構が関与したとき、金属-カルボニル配位活性化によるよりもさらに $10^3 \sim 10^7$ 倍も速度を早めることがわかった³⁵⁾。つまり(B)機構経路は金属酵素触媒とほぼ等しい効果をもつ。(B)機構を積極的に支持するデータがモデル系にまだ多数ないので結論をだすのは危険であるが金属酵素(たとえば炭酸脱水酵素)の活性中心では(B)機構類似反応がしばしば起るのではないかと筆者は推察する。Buckingham らの結論は、分子内 (intramolecular) 反応の方が、仮に反応中心が活性化されていても分子間 (intermolecular) 反応よりもはるかに早いという今までの多数の例⁶⁰⁾に一致する。このような分子内反応の例は酵素に数多く見られる(例、キモトリプシンのアミド加水分解⁶¹⁾)。CPA の場合、(B)機構のように金属は求核試薬 (OH^-) を提供しないけれども分子内の他のグループ (Glu-270 の CO_2^-) がその役目を果たす。金属はカルボニルを活性化しているだけに同じ分子内反応でも非常に効果的であろう。

酵素の反応機構についてはまだ多くのデータがないので、モデル化合物の結果をそのままあてはめるのは早急であるかもしれないが、今後は進歩した kinetics の測定方法を使ってその機構が究明されることと思う。酵素反応が産業界でも注目を集めている現在この分野の発展が大いにのぞまれる。

一方酵素モデルの研究より、ペプチドの段階的切断³⁰⁾ ペプチド合成^{44,51)}、あるいはアミノ酸光学分割⁵⁴⁾といった応用面も見出された。Buckingham らの精力的な仕事からもわかるようにこの領域が無機化学、特に錯塩反応機構の研究を飛躍的に発展させたが、今後もこのような基礎的研究あるいは応用面もさらに深く追求されよう。

(昭和 46 年 7 月 30 日受理)

文 献

- 1) R.J.P. Williams, *Endeavour* **26** 96 (1967)
- 2) R.J.P. Williams, *Qurt. Rev.* **1970** 331
- 3) 詳しくは、瀬屑, 山中著 “酵素活性と金属”; 中原編集 “錯体化学と生化学の領域”, 化学の領域増刊 **79** (1968)
- 4) B.L. Vallee, R.J.P. Williams, *Chem. in Britain* **1968** 397 and refs. therein
- 5) P.W. Schneider, H. Brintzinger, *Helv. Chim. Acta* **47** 1717 (1964)
- 6) H. Sigel, D.B. McCormick, *Account of Chem. Res.* **3** 201 (1970)

- 7) H. Irving, R.J.P. Williams, *Nature* **162** 746 (1948); *J. Chem. Soc.* **1953** 3192
- 8) R.J.P. Williams, *Biol. Revs.* **28** 381 (1953)
- 9) M.A. Cobb, D.N. Hagne, *Chem. Commun.* **1971** 20
- 10) F.D. Dwyer in "Chelating Agents and Metal Chelates" Academic Press, N.Y., 1964 p. 336
- 11) H. Kroll, *J. Am. Chem. Soc.* **74** 2036 (1952)
- 12) L.M. White, R.A. Manning, N.C. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **78** 2367 (1956)
- 13) M.L. Bender, B.W. Turnquest, *J. Am. Chem. Soc.* **79** 1889 (1957)
- 14) W.A. Connor, M.M. Jones, O.L. Tuleen, *Inorg. Chem.* **4** 1129 (1965)
- 15) J.E. Hix, M.M. Jones, *Inorg. Chem.* **5** 1863 (1966)
- 16) H.L. Conley, R.B. Martin, *J. Phys. Chem.* **69** 2914 (1965)
- 17) R.W. Hay, P.J. Morris, *Chem. Commun.* **1967** 23
- 18) D.A. Buckingham, D.M. Foster, A.M. Sargeson, *J. Am. Chem. Soc.* **92** 5701 (1970)
- 19) H.L. Conley, R.B. Martin, *J. Phys. Chem.* **69** 2923 (1965)
- 20) M.L. Bender, B.W. Turnquest, *J. Am. Chem. Soc.* **79** 1652 (1957)
- 21) H.B. Gray, H. Langford, *Chem. Eng. News.* p. 68, April 1 (1968)
- 22) M.D. Alexander, D.H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.* **88** 1130 (1966)
- 23) D.A. Buckingham, D.M. Foster, A.M. Sargeson, *J. Am. Chem. Soc.* **90** 6032 (1968)
- 24) Y. Wu, D.H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.* **92** 3326 (1970)
- 25) L. Meriwether, F.H. Westheimer, *J. Am. Chem. Soc.* **78** 5119 (1956)
- 26) Q. Fernando, in "Advances in Inorg. Chem. & Radiochem." Vol. 7, Academic Press, N.Y. 1965. p. 217
- 27) M.M. Jones, T.J. Cook, S. Brammer, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **28** 1265 (1966)
- 28) R.H. Andereatta, H.C. Freeman, A.U. Robertson, R.L. Sinclair, *Chem. Commun.* **1967** 203
- 29) E.J. Corey, R.L. Dawson, *J. Am. Chem. Soc.* **84** 4899 (1962)
- 30) J.P. Collman, D.A. Buckingham, *J. Am. Chem. Soc.* **85** 3039 (1963)
- 31) E.L. Smith, R.L. Hill, "The enzyme" P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbach, Eds, Vol. 4, Academic Press, N.Y. 1960, p. 37.
- 32) D.A. Buckingham, J.P. Collman, *Inorg. Chem.* **6** 1803 (1967)
- 33) E. Kimura, S.A. Young, J.P. Collman, *Inorg. Chem.* **9** 1183 (1970)
- 34) D.A. Buckingham, J.P. Collman, D.A.R. Happer, L.G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.* **89** 1082 (1967)
- 35) D.A. Buckingham, D.M. Foster, A.M. Sargeson, *J. Am. Chem. Soc.* **92** 6151 (1970)
- 36) M. Murakami, H. Itatani, K. Takahashi, J.W. Kang, K. Suzuki, *Mem. Inst. Sci. Ind. Res. Osaka Univ.* **20** 95 (1963)
- 37) R. Breslow, R. Fairweather, J. Keana, *J. Am. Chem. Soc.* **89** 2135 (1967)
- 38) Y. Pocker, J.E. Meany, *J. Am. Chem. Soc.* **89** 631 (1967)
- 39) M.E. Riepe, J.H. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **89** 4229 (1967)
- 40) Y. Pocker, J.E. Meany, *Biochem.* **4** 2535 (1965)
- 41) B.L. Vallee, J.F. Riordan, J.E. Coleman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **49** 109 (1963)
- 42) R. Breslow, D. Chipman, *J. Am. Chem. Soc.* **87** 4196 (1965)
- 43) E. Kimura, J.P. Collman, 153rd National Meeting of A.C.S., April, 1967, Abstract L 139
- 44) J.P. Collman, E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.* **89** 6096 (1967)
- 45) E. Kimura, Ph. D. Thesis, Univ. of North Carolina, Chapel Hill, N.C. (1967)
- 46) D.A. Buckingham, P.A. Marzilli, I.E. Maxwell, A.M. Sargeson, *Chem. Commun.* **1968** 488
- 47) D.A. Buckingham, L.G. Marzilli, A.M. Sargeson, *J. Am. Chem. Soc.* **89** 2772 (1967)
- 48) R.W. Hay, P.J. Morris, *Chem. Commun.* **1969** 1208
- 49) D.A. Buckingham, C.E. Davis, D.M. Foster, A.M. Sargeson, *J. Am. Chem. Soc.* **92** 5571 (1970)
- 50) D.A. Buckingham, D.M. Foster, A.M. Sargeson, *J. Am. Chem. Soc.* **91** 3451 (1969)
- 51) S. Yamada, S. Terashima, M. Wagatsuma, *Tetrahedron Letters* **1970** 1501
- 52) R.D. Gillard, H.M. Irving, L.D. Pettit, *J. Chem. Soc. A* **1968** 673
- 53) B.E. Leuch, R.J. Angelici, *J. Am. Chem. Soc.* **91** 6296 (1969)
- 54) *Chem. Eng. News.* p. 34, April 12 (1971)
- 55) R. Breslow, L.E. Overman, *J. Am. Chem. Soc.* **92** 1075 (1970)
- 56) W.N. Lipscomb, *Account of Chem. Res.* **3** 81 (1970) and references therein.
- 57) C. Tomalin, B.L. Kaiser, E.T. Kaiser, *J. Am. Chem. Soc.* **92** 6046 (1970)
- 58) R.C. Daves, J.F. Riordan, D.S. Auld, B.L. Vallee, *Biochem.* **7** 1096 (1968)
- 59) E.L. Smith, D.H. Spackman, *J. Biol. Chem.* **212** 271 (1955)
- 60) see "Catalysis in Chemistry and Enzymology" by W.P. Jencks, McGraw-Hill
- 61) "Bioorganic Mechanisms" by T.C. Bruice and S. Benkovic, Vol. 1, W.A. Benjamin, Inc. (1966)
- 62) *Chem. Eng. News.* p. 32, July 7 (1969)