総 合 論 文

触媒抗体の基質特異性に関する研究

小 野 光 則*・和 田 裕美子*

Study on Substrate Specificity of Hydrolytic Catalytic Antibody

Mitsunori Ono* and Yumiko WADA*

Interestingly, 4A1, an antibody against *p*-nitrophenyl phosphonate, showed a significant rate acceleration against substrates that differ from the given haptenic structure in the carrier-proximal region. The rate acceleration ($k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$) for one of the specific substrates is 6.4×10^4 , 20-fold higher than that of a substrate congruent with the hapten. Kinetic analysis of K_m and k_{cat} values, as well as the affinity constant (K_d) values of the corresponding transition-state analogs, indicated that the rate enhancement is associated with a decrease in the activation energy due to stabilization of the transition-state in the cleavage reaction. In addition, the inactivation of 4A1 upon hydrolysis of a particular substrate was observed. The 600 MHz ^{13}C NMR measurement clearly showed that the ^{13}C -labeled fragment attached covalently to the 4A1 antibody, proving formation of an acyl-antibody. Further kinetic analysis study demonstrated that the 4A1 catalytic antibody uses a multistep kinetic sequence for the hydrolytic reaction.

Key words: Catalytic antibody, 4A1, Transition-state analog, Acyl-antibody, Specificity constant, Substrate specificity

1. 背 景

触媒抗体の概念が2つのグループによって実験的に証明されてから10年が経過した^{1,2)}。この間、有機反応への応用例が多数報告され^{3,4)}、この分野は長足の進歩をとげてきたが、同時に触媒抗体の汎用性についての議論も活発になされてきた⁵⁻⁷⁾。天然酵素のもつ重要な要素は『基質特異性』と『触媒効率』であるが、例えば加水分解触媒抗体の基質特異性はリパーゼやプロテアーゼと比べて一段と狭い。抗原抗体反応では一般に親和性の最も高いクローンが選択されるように構造の最適化が起これと言われている。この『Affinity Maturation』の過程を経て、結合活性の高い特異的な抗体が生成し、結果的に、免疫に用いたハプテンと基質間には酵素以上に厳密な構造類似性が要求される⁷⁻⁹⁾。これは触媒抗体が当初、テーラードの触媒とやや大仰に喧伝された理由でもあった。しかし、このクローン選択過程は『汎用触媒』が備えるべき『基質への寛容性』とは相反している。すなわち、触媒

抗体は『触媒効率を損なわずして基質に寛容』という二律背反の命題を両立せねばならず、その意味で『practical reagent』としての実用化にはやや悲観的な意見も多かったのである¹⁰⁾。

そのような中、1997年にアルドール縮合触媒抗体 38C2がAldrich社から発売された。この抗体は、Lernerら¹¹⁾が免疫初期に活性エナミン中間体を生成させる『Reactive Immunization』というユニークな方法で作成したものであり、免疫反応初期に化学結合が生じるために、通常の免疫反応でみられるような構造の最適化が起これず、幅広い基質選択性が付与されるのが特長であった。さらに昨年、38C2抗体がTaxolにまさる抗癌剤と言われる、Epothiloneの実用的な全合成経路のあるステップにおいて、速度論的光学分割に応用されたことによりその汎用性が証明された¹²⁾。これは、触媒抗体の合成化学への応用という側面から見ると、『基質寛容性』と『触媒効率』の両立にひとつのヒントを与える画期的な報告であった。

これに先立ち、筆者らは7年前、従来の遷移状態アナログによる免疫法でも、抗体の多様性を反映した選択法を用いることにより、基質に寛容かつ高活性の触媒抗体

* シオノギバイオリサーチ社

* Shionogi BioResearch Corp. ()

4A1を見いだしている¹³⁾。筆者らの知る限り、ハプテンのキャリアタンパク連結部位が触媒抗体活性に及ぼす影響を系統的に検討した最初の例と思われる。

本稿ではこのキャリア連結部位と触媒効率に関する筆者らの今までの知見を他者の研究結果と比較しながら述べる。さらに、基質特異性の検討過程に単離できた安定アシル化抗体に端を発した4A1の反応機序に関する研究の概要も併せて紹介する。

2. 触媒抗体の作成

我々が基質特異性検討用に設定した遷移状態アナログ(ハプテン)はSchultzら¹⁴⁾と同じ

-ニトロフェニルホスホニル基を有し、これに約8 Åの直鎖メチレン基を導入したカルボン酸である。一般に抗原をデザインする場合、このようにハプテンとキャリアタンパクの間を3から4個の免疫原性の弱い直鎖メチレン基で連結することが多い。これは免疫時のキャリアタンパクの立体的な影響を防ぐために経験的に用いられてきた手法である。この2aをEDCメチオダイドを用いてかさ高いヘモシアニン(KLH, MW 10⁶)に連結し免疫抗原(Immunogen)を作成した。得られた抗原には13.2分子のハプテンが導入されていた。単一の遷移状態アナログの免疫によって誘導される一連の触媒抗体の触媒活性とハプテンおよび基質に対する結合活性には相関があるという報告があるが、ハプテンに対する結合活性が高い抗体が必ずしも触媒活性が高いとは限らない¹⁵⁻¹⁷⁾。また、抗体の触媒活性の測定には来雑物によるノイズが懸念される。特に加水分解反応の場合は混入酵素を注意深く除く必要があり、3,000近いクローンの培養上清からすべての抗体を精製しその加水分解能を調べるにはかなりの時間を要する。従って、抗体の選択方法が重要となる。我々は認識部位の差異によって抗体をあらかじめいくつかのグループに

Fig.1 Structures of substrate 1a, phosphonate (hapten) 2a, and phosphate (transition-state analog) 2b.

分類する方法をとった¹⁸⁾。

3. 抗体スクリーニング

テトラヘドラル中間体の構造をもつハプテン2aをベンゼン部とリン酸部の2つの部分構造にわけ(表1), それぞれの部分構造を有する化合物(A)(B)をプレートに固定化してELISA法で産生抗体の親和性を調べた。そしてハプテンに対して強い結合力を有する抗体を上記2つの部分構造に対する親和性によって3つのタイプ(I)(II)(III)に分類した。この3グループから親和性の強い抗体産生細胞を選びクローニングを繰り返し、35種の抗体を精製した。

4. 4A1抗体の発見

35種の精製抗体のうち、触媒活性を有するのは3種だけ(5H2, 1G2, 4A1)であった。その中でもっとも高活性であったのが4A1である。この4A1抗体が(A)(B)の2

Table 1 Classification by the binding affinity of clones against the partial structure of hapten.

Class	 hapten-BSA	 A; DNP-BSA	 B; PEA-BSA
I	bound	not bound	bound
II	bound	bound	not bound
III	bound	not bound	not bound

つの部分構造に全く親和性がないグループ(Ⅲ)に属していたことは予想外のことであった(図2)。3種の抗体はアミドに対しては開裂活性をもたないが、エステル、ウレタン、カーボネート類の加水分解を加速した。4A1, 5H2, 1G2の基質1aに対する加速倍率($k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$)は無触媒に比べて、pH 8.5でそれぞれ3,000, 450, 440倍であり、飽和速度論に従い、pH 7.5から9.5の範囲で水酸イオン濃度に擬1次的に依存し、その触媒反応はハプテン2aあるいは遷移状態アナログ2bの添加によって完全に阻害された。これら速度論データを見る限り、すべての挙動が文献で得られている典型的な加水分解抗体と類似していた¹⁹⁾。しかし、基質開裂基近傍の置換基効果を調べていくと4A1の予想外の基質特異性が明らかとなった。

Fig.2 Binding specificity of purified monoclonal antibodies against DNP-BSA A and PEA-BSA B. ■; clones derived from mouse 1, ◆; clones derived from mouse 2.

Fig.3 Structures of substrates 1b–1f.

5. 4A1の基質選択性²⁰⁾

免疫したハプテン構造に最も類似している基質1bに対する開裂反応に対して、4A1抗体の加速倍率($k_{\text{cat}}/$

Table 2 Summary of the kinetic parameters for 4A1 antibody catalyzed reactions. The kinetic parameters were determined at 30 °C in 98% Tris/HCl pH 8.5 and 2% THF in the presence or absence of antibody (4.4 μM).

Substrate	K_m μM	k_{cat} min ⁻¹	k_{uncat} min ⁻¹	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$	k_{cat}/K_m min ⁻¹ μM ⁻¹
1a	641	13	0.0044	3000	0.02
1b	238	13	0.0035	3700	0.05
1c	547	30	0.0038	8000	0.05
1d	528	122	0.0035	30000	0.23
1e	470	21	0.0040	5200	0.03
(S)-1d	586	224	0.0035	64000	0.38
(R)-1d	363	50	0.0035	14000	0.14
(S)-1f	812	23	0.0038	6000	0.03
(R)-1f	607	9	0.0035	2400	0.01

k_{uncat})は約3,700倍であったが、ハプテンには存在しないかさ高い置換基をキャリア連結部位に有する基質1c, 1d(ともにラセミ体), 1eの開裂反応では8,000倍, 30,000倍, 5,200倍という予想しない高い加速倍率を示した(表2)。しかも、これは4A1にのみ特徴的な性質であり、残り2種の抗体にはこのような反応加速は全く観測されなかった。次に1dの光学活性体をそれぞれ合成し、開裂速度を比較してみると、(S)-1dの64,000倍の加速倍率に対し、(R)-1dは14,000倍という結果となり、S体とR体で反応の加速に明確な差が見られた。同様の結果は1fのS体とR体でも得られた。このデータは4A1抗体の基質認識部位がエナンチオセレクトブに2つの構造を見分けていることを示唆している。キラル要素をもたない免疫ハプテンから低いながらもエナンチオセレクトブな抗体が生成したという興味深い例の1つである^{21,22)}。

6. 反応加速の理由

$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ で表される触媒効率の増大は活性化自由エネルギー($\Delta G^\ddagger$)の減少にほかならない。これを自由エネルギー変化のグラフで眺めると(図4)、活性化エネルギーを減少させる方法は、このグラフ上から2つ考えられる。1つは遷移状態[ES][‡]の安定化(↓)、もう1つは基質/抗体との結合状態[ES]を不安定化(↑)することにより $\Delta G^\ddagger$ を減少させるのである。酵素は基質自身よりも基質の遷移状態と強く結合するように進化してきたため、前者の方法にて触媒効率を増大させる。この場合、

Fig. 4 Reaction ΔG profile. The activation energy $\Delta G^\ddagger$ is lowered by the stabilization of the transition-state $[ES]^\ddagger$ (a) or the destabilization of the ground-state $[ES]$ (b).

$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ という値はあまり意味がなく、その触媒効率はむしろ特異性定数 (k_{cat}/K_m) で表され、特異性定数が高くなればなるほど高い遷移状態への相補性を持つことを意味する²³⁾。この観点で、高い加速倍率を示したかさ高い置換基を有する化合物 **1c**, **1d**, **1e** をハプテンと同じ連結基を有する基質 **1b** と比較してみると、 K_m 値には差が見られず、**1c**, **1d**, **1e** の特異性定数はかなり増大している。さらに、遷移状態アナログ(ホスフェート体)を用いて、見かけの解離定数 (K_d) から抗体の遷移状態への親和性を調べた結果、基質 **1c**, **1d** の遷移状態アナログに相当するホスフェート体 **2c**, **2d** の K_d 値はそれぞれハ

Table 3 Apparent binding constant (K_d) of antibody 4A1 with phosphonate and phosphates^a.

Phosphonate/phosphates	$K_d(\text{M})$
2a:	2.5×10^{-5}
2b:	8.9×10^{-5}
2c:	2.0×10^{-5}
2d:	6.2×10^{-7}

The apparent binding constants (K_d) for the antibody 4A1 and various transition-state analogs were determined by competitive ELISA procedure using hapten-BSA conjugates.

^a Binding determined at 30 °C in 10 mM Tris/HCl buffer, pH 8.5.

プテン **2a** よりも低く、4A1 が遷移状態に強く結合していることが分かった(表 3)。これらの結果より、基質 **1c**, **1d** に見られる高い触媒活性は酵素と同様に反応の遷移状態を安定化することによってもたらされていることが分かる。

ここで少し横道にそれるが、活性化エネルギー ($\Delta G^\ddagger$) を低くするもう 1 つの方法、基底状態の不安定化の例を紹介する。これは Janda らにより『abzyme substrate destabilization principle』として提唱された^{24,25)}。彼ら

Table 4 Kinetic parameters for antibody 37G2 with various substrates.

Substrate	K_m μM	k_{cat} min^{-1}	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$	k_{cat}/K_m $\text{min}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$
(ii)	No catalysis			
(iii)	33	0.0324	71	0.00098
(iv)	143	0.0552	153	0.00039
(v)	768	0.198	1976	0.00026

はリン酸アミド **i** (表 4) をハプテンとして得られた抗体が、ハプテンとは異なる基質 **iii**, **iv**, **v** のアシル化反応を基質 **ii** に比べてより加速することを見だし、基質と抗体の結合が緩くなることにより K_m 値が増大し、活性化エネルギーが低下するために見かけの反応速度が向上したと結論している。しかしこの場合、特異性定数は大きく減少し、このアプローチが真の触媒抗体の進化する方向かどうかは疑問が残るところである。

7. 4A1 の基質特異性

上記の速度論的、熱力学的解析により 4A1 が **1c**, (S)-**1d** などの基質に予期せぬ高い触媒活性をもつのは、かさ高い置換基を有する基質の反応遷移状態に強い相補性をもつことが原因であることが明らかになった。どうやらこの抗体はキャリアタンパクから離れた免疫原性の強い部位にのみ強い親和性を示す通常の触媒抗体とは異なり、スパーサー部分を認識するサブサイトを有していると考えられる。このサブサイトが許容しうる基質の構造

Fig. 5 Inactivation of 4A1 catalytic antibody upon hydrolysis of substrate **1g**. All reactions were carried out by use of 4A1 antibody (4.4 μ M) and substrates (200 μ M), $\blacksquare$; **1g**, $\bullet$; (S)-**1d**, $\blacktriangle$; **1a**. Substrate, in THF stock solution, was diluted with 10 mM Tris/HCl, and added to the antibody.

を知るために様々な基質の開裂反応を試みたところ、4A1 は開裂基近傍から直鎖アルキルまたは枝分かれ構造を介して、ベンゼンのような疎水的な環を持つ基質から酸素を含有するヘテロ環を持つ基質まで極めて広範囲の基質を数 100 倍から数万倍の加速倍率で加水分解することが分かった²⁶⁾。これは換言すると、4A1 抗体がさまざまなキャリア連結部位構造を有する化合物を『基質』として受け入れる『寛容性』を持つことを意味している。

8. アシル中間体の単離²⁷⁾

4A1 の基質特異性を検討中、興味深い現象が見られた。すなわち、基質 **1g** を反応させたところ、図 5 に示すように、初期のバーストにより抗体の活性部位とほぼ等モルの *p*-ニトロフェノールを遊離した時点で急激に活性が落ち反応が停止したのである。この現象は他の基質では観察されず、開裂反応で必ず生成する片割れの *N*-アセチルフェニルアラニノール **1h** が反応溶液から全く検出されないことから、当初は *N*-アセチルフェニルアラニノールによる生成物阻害であると推測した。しかし 1) *N*-アセチルフェニルアラニノールを直接 4A1 抗体に加えても反応阻害が全く起きないこと、2) 反応後の 4A1 抗体を pH 3.0 の酒石酸緩衝液で透析を行っても、*N*-アセチルフェニルアラニノールは検出されず、触媒活性も戻らないこと、3) pH 10.5 のアルカリ溶液の処理で初めて *N*-アセチルフェニルアラニノールが定量的 (1.8 等量) に回収され、抗体の活性も回復することなどの実験

Fig. 6 600 MHz ^{13}C NMR spectra of ^{13}C labeled *N*-acetylphenylalaninol incorporated 4A1 (a) and intact 4A1 (b).

事実から、この現象を単なる生成物阻害とは結論できないことが分かった。さらに、カルボニル炭素を ^{13}C 標識した基質 **1g** を同様に 1 時間反応させ、その後重水中で 24 時間透析をして *p*-ニトロフェノールを除去した抗体を重水中にて 600 MHz ^{13}C NMR 測定したところ(図 6)、176.2 ppm に (S)-(-)-*N*-アセチルカルボニル炭素に帰属されるピークが観察され、これは同条件で測定した標品のケミカルシフトと完全に一致した。これらのことから、抗体の結合部位に存在するアミノ酸残基がカーボネートと反応してできるアシル化中間体の加水分解が極めて遅く、中間体が検出可能になったと考えられる。4A1 抗体がアシル化中間体を経て基質を加水分解すると考えれば、4A1 抗体による触媒反応が水酸イオン濃度 (pH 7.5–9.5) に擬一次的に依存することや、不活化を受けた抗体がアルカリ処理によって容易に活性を回復していく現象も無理なく説明される。

9. 化学修飾による基質結合部位の解析

触媒作用の発現機序を理解するために、基質結合部位

Fig. 7 Hydrolytic activity of arginine-modified 4A1 antibody against substrates **1a** and (S)-**1d**. All reactions were carried out by use of antibody (4.4 μM) and substrates (200 μM) in 10 mM Tris/HCl at pH 8.5.

に化学修飾を施し、触媒活性の変化を見るのは良く用いられる方法である²³⁾。我々も幾つかの代表的な蛋白質の化学修飾試薬を用いて 4A1 抗体の修飾を試みた。その結果、アルギニン残基のグアニジノ基に特異的なフェニルグリオキザールで処理した場合、基質 **1a** と (S)-**1d** の開裂反応においてアルギニン修飾抗体は基質 (S)-**1d** に対しその触媒活性を半分以上失ったが、基質 **1a** に対しては活性をほぼ保持(14%の低下)した(図 7)。

さらに、アシル化中間体を用いて化学修飾実験を続けた。図 8 に示すように、まず 4A1 抗体に基質 **1g** を反応させ、安定なアシル-抗体反応中間体を作成した後、そのアシル化中間体と 4A1 抗体をそれぞれフェニルグリオキザールによって化学修飾した。化学修飾したアシル化中間体を次に pH 10.5 で脱アシル化し、*N*-アセチルフェニルアラニノールを遊離させる。保護なしで修飾した抗体のハプテン結合能は 30%まで低下していたのに比べ、フェニルアラニノールを結合させたまま化学修飾を施した 4A1 抗体では、そのハプテン結合能および基質 **1a** の加水分解反応の触媒能にはほとんど変化がみられなかった(93%以上)。これらの結果は基質のかさ高い置換基を受け入れる相補的な 4A1 の結合部分に少なくとも 1 つのアルギニン残基が存在することを示唆する。

また、このアルギニンの修飾が基質 (S)-**1d** 特異的に

Fig. 8 Percent binding affinity against hapten upon arginine modification. R: Arginine.

4A1の活性を低下させる事実は、かさ高い置換基を持つ基質に対する加速効果が、置換基に相補的な結合部位によって反応の遷移状態が安定化された結果であるという考え方を支持する。

10. アミノ酸配列の解析²⁸⁾

次に4A1抗体の可変(V)領域の3次元構造を推定するために、H鎖とL鎖V領域cDNAからDNA塩基配列を決定した。4A1の基質結合部位の3次元構造を推定するために、その相補性決定部位(CDR)のアミノ酸配列をデータベースに照合したところ、L鎖は一本鎖DNAに対する自己抗体²⁹⁾、H鎖は抗鶏卵リゾチーム抗体³⁰⁾との間に高い相同性が見られることが分かった。これらの抗体で得られているX線結晶解析結果をもとに、4A1のV領域の3次元モデルを構築した。これに、遷移状態アナログ(例えば2d)との結合エネルギー計算に基づく最安定な結合位置を加味すると、図9のようになる。それによると、2dの

-

ニトロフェノキシグループがCDR3のペプチドセグメントに深く沈みこみ、その結果、キャリア連結部位が抗体の表面に位置するように配置することが分かる。これは、近年報告されている他の触媒抗体のX線結晶解析結果とも一致している³¹⁻³³⁾。4A1抗体の基質結合部位近傍にあると推定されるアルギニン残基はL鎖のArg46とH鎖のArg28である。モデル上からは、いずれもかさ高い置換基に近接しているようには見えない。しかし、ハブテン/触媒抗体の結合によって抗体のV領域のコンフォメーションが顕著に変化することが多数報告されており³²⁻³⁵⁾、中でも抗原結合部位の外側に位置するH鎖のアミノ酸25から32は結合に伴ってハブテンにかなり接近することが確認されてい

Fig.9 The 3-D model of V region of 4A1. V_L and V_H regions were shown by ribbon (three and six lines, respectively). CDR regions were shown by thin lines. Arg residues were shown by black circles, except Arg-L46 and Arg-H28 which shown by stick. 2d was also shown by stick.

る³⁶⁾。このことを考慮すると、反応の遷移状態では4A1のH鎖Arg28近傍は基質のかさ高い置換基と相互作用できると推測される。反応の遷移状態におけるコンフォメーション変化によって初めて基質と抗体の安定な結合が可能になるという推測は、前述した4A1抗体の速度論、熱力学的解析の結果からも無理なく説明され、かさ高い置換基を有する基質への4A1抗体の予期せぬ反応加速が遷移状態特異的な安定化によるものであることを支持する。

Fig.10 Schemes of 4A1 antibody catalyzed hydrolysis. The reaction is most likely mediated by acyl-antibody intermediate resulting from nucleophilic attack by amino acid residue in or near the combining site. X: Amino acid residue.

11. 触媒反応機序

これらの実験から推定される 4A1 抗体の加水分解機構を図 10 に示す。最初に抗体結合部位に存在するアミノ酸残基がカーボネートのカルボニルに求核攻撃を行い、テトラヘドラル遷移状態を経て、*p*-ニトロフェノールが遊離し、アシル中間体が形成される。これに水酸イオンが攻撃し脱アシル化が進行する。基質 **1g** の場合、生成したアシル化中間体が加水分解を受けにくいコンフォーメーションをとり、脱アシル化の速度が極度に遅くなったために、単離が可能になったものと思われる。しかし、反応の初期の *p*-ニトロフェノールの遊離は置換基を持たない **1a** よりも顕著に早いので、**1g** もまた他のかさ高い置換基を持つ基質と同様、抗体のサブサイトとの相補性によって遷移状態の安定化を受けていると考えられる。

12. おわりに

本稿で紹介した 4A1 触媒抗体はハプテンとは異なる構造を有する基質群に高い触媒活性を示し、しかも *K_m* 値の上昇を示さず高い特異性定数を維持している。我々は本研究を通して、ハプテンのキャリアタンパクに近い領域(carrier-proximal region)を有効に利用すれば、基質寛容性と高い触媒活性を共存させる可能性があることを学んだ。免疫原性の高い(immunogenic)置換基が集中するキャリアタンパクから離れた領域(carrier-distal region)は、基質の認識に大きな影響を与える場合が多い。それに比べ、キャリアタンパクに近い領域は基質の改変が比較的許容される空間を提供できる可能性があると考えられる。例えば、ハプテンのキャリアタンパクに近い領域に電荷も極性もない大きな置換基を導入した場合、ハプテンとは異なるいくつかの基質を受入れることが報告されている³⁷⁾。これも、キャリアタンパクに近い領域を有効に利用して基質寛容性を誘導した一例といえる。4A1 抗体のユニークな特異性の発見により、最適基質の構造はハプテンの構造には必ずしも類似しない場合もあることが示された。触媒抗体から高い触媒活性や基質寛容性を引き出すためには、いままでの経験則に縛られないハプテン/基質の設計が重要と言えるようである。また、本稿で紹介した抗体選択法のように、抗体の多様性を最大限に引き出す努力も今後ますます必要になるであろう。

最後に、本研究の大部分の実験は筆者らが富士写真フイルム足柄研究所で行ったものであることを付記いたします。本発表を許可された富士写真フイルム林足柄研究

所長に感謝いたします。また、アミノ酸配列ならびに 3 次元モデルの構築は北里大学理学部、鈴木春男教授との共同で行ったものであります。ここに厚くお礼申し上げます。また、筆者らをいつも激励し、本稿をまとめる機会を与えて頂いた塩野義製薬有田斉創薬研究所長に深甚の謝意を表します。

(平成 11 年 5 月 25 日受理)

文 献

- 1) S.J. Pollack, J.W. Jacobs, P.G. Schultz, *Science*, **234**, 1570 (1986)
- 2) A. Tramontano, K.D. Janda, R.A. Lerner, *Science*, **234**, 1566 (1986)
- 3) J.R. Jacobsen, P.G. Schultz, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 818 (1995)
- 4) P.G. Schultz, R.A. Lerner, *Science*, **269**, 1835 (1995)
- 5) B.L. Iverson, K.E. Cameron, G.K. Jahangiri, D.S. Pasternak, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5320 (1990)
- 6) Y. Iwabuchi, H. Miyashita, R. Tanimura, K. Kinoshita, M. Kikuchi, I. Fujii, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 771 (1994)
- 7) K.D. Janda, J.A. Ashley, T.M. Jones, D.A. McLeod, D.M. Schloeder, M.I. Weinhouse, R.A. Lerner, R.A. Gibbs, P.A. Benkovic, R. Hilhorst, S.J. Benkovic, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 291 (1991)
- 8) D.S. Tawfik, R.R. Zemel, R. Arad-Yellin, B. S. Green, Z. Eshhar, *Biochemistry*, **29**, 9916 (1990)
- 9) A. Tramontano, A.A. Ammann, R.A. Lerner, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2282 (1988)
- 10) A.J. Kirby, *Acta Chemica Scandinavica*, **50**, 203 (1996)
- 11) J. Wagner, R.A. Lerner, C.F. Barbas III, *Science*, **270**, 1797 (1995)
- 12) S.C. Sinha, C.F. Barbas III, R.A. Lerner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14603 (1998)
- 13) M. Ono, Y. Wada, M. Yamamoto, Y. Sudo, I. Ito, "Proceedings 34th Symposium on Chemistry of Natural Food Products", Tokyo, pp.55-62 (1992)
- 14) J. Jacobs, P.G. Schultz, R. Sugawara, M. Powell, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 2174 (1987)
- 15) F. Benedetti, F. Berti, M. Flego, M. Resmini, E. Bastiani, *Anal. Biochem.*, **256**, 67 (1998)
- 16) H.D. Ulrich, P.G. Schultz, *J. Mol. Biol.*, **275**, 95 (1998)
- 17) D.S. Tawfik, B.S. Green, R. Chap, M. Sela, Z. Eshhar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 373 (1993)

- 18) Y. Wada, M. Ono, *J. Protein Chem.*, **18**, 199 (1999)
- 19) D.S. Tawfik, Z. Eshhar, B.S. Green, *Mol. Biotechnology*, **1**, 87 (1994)
- 20) Y. Wada, M. Yamamoto, M. Ono, *Chem. Lett.*, **1997**, 1223
- 21) K.D. Janda, S.J. Benkovic, R.A. Lerner, *Science*, **244**, 437 (1989)
- 22) G.R. Nakayama, P.G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 780 (1992)
- 23) A. Fersht, "Enzyme Structure and Mechanism", 2nd ed., W. H. Freeman and Company, New York (1985)
- 24) I. Fujii, R.A. Lerner, K.D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8528 (1991)
- 25) K.D. Janda, S.J. Benkovic, D.A. McLeod, D. M. Schloeder, R.A. Lerner, *Tetrahedron*, **47**, 2503 (1991)
- 26) Y. Wada, M. Yamamoto, Y. Sudo, M. Ono, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **72**, 477 (1999)
- 27) Y. Wada, Y. Sudo, M. Ono, *Chem. Lett.*, **1997**, 1225
- 28) H. Suzuki, E.B. Mukoyama, C. Wada, Y. Kawamura-Konishi, Y. Wada, M. Ono, *J. Protein Chem.*, **17**, 273 (1998)
- 29) J.N. Herron, X.M. He, D.W. Ballard, P.R. Blier, P.E. Pace, A.L.M. Bothwell, E.W. Jr., Voss, A.B. Edmundson, *Proteins*, **11**, 159 (1991)
- 30) V. Chitarra, P.M. Alzari, G.A. Bentley, T.N. Bhat, J.L. Eisele, A. Houdusse, J. Lescar, H. Souchon, R.J. Poljak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7711 (1993)
- 31) B. Gigant, J-B. Charbonnier, Z. Eshhar, B.S. Green, M. Knossow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 7857 (1997)
- 32) J-B. Charbonnier, E. Carpenter, B. Gigant, B. Golinelli-Pimpaneau, Z. Eshhar, B.S. Green, M. Knossow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11721 (1995)
- 33) P.A. Patten, N.S. Gray, P.L. Yang, C.B. Marks, G.J. Wedemayer, J.J. Boniface, R.C. Stevens, P.G. Schultz, *Science*, **271**, 1086 (1996)
- 34) I.A. Wilson, R.L. Stanfield, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**, 857 (1994)
- 35) G.W. Zhou, J. Guo, W. Huang, R.J. Fletterick, T.S. Scanlan, *Science*, **265**, 1059 (1994)
- 36) G.J. Wedemayer, L.H. Wang, P.A. Patten, P.G. Schultz, R.C. Stevens, *J. Mol. Biol.*, **268**, 390 (1997)
- 37) T. Li, S. Hilton, K.D. Janda, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2123 (1995)