The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	酵素的フェノール酸化反応を利用した有用物質合成と各種酵素活性測定法の開発
Author(s)	上松, 仁
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3108036
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

酵素的フェノール酸化反応を利用した有用物質合成と各種酵素活性測定法の開発

1995

上松　仁

①

酵素的フェノール酸化反応を利用した有用物質合成と各種酵素活性測定法の開発

1995

上松 仁

目　　次

緒　論　・・・

第II章　ラッカーゼによるβ-ラクタム抗生物質の酵素変換 ・・・・・・・・・・・・・ 32
序 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
第1節　ラッカーゼによるセファロスポリンXの酵素変換 ・・・・・・・・・・ 33
1．実験材料と実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33
2．酵素反応条件の検討 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33
3．CXL-1とCXL-2の単離精製 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33
4．CXL-1とCXL-2の構造決定 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35
5．CXL-1とCXL-2の抗菌活性 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41
6．要　約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41
第2節　ラッカーゼによるラタモキセフの酵素変換 ・・・・・・・・・・・・・ 42
1．実験材料と実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 42
2．酵素反応条件の検討 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 42
3．反応生成物LL-1.1とLL-1.2の単離精製 ・・・・・・・・・・・・・・・ 43
4．LL-1.1とLL-1.2の構造決定 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 43
5．LL-1.1とLL-1.2の抗菌活性 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47
6．要　約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 48
第3節　考　察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 48

第III章　ラッカーゼ及びビリルビンオキシダーゼによる新規な酸化的脱炭酸反応の発見 49
序 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 49
第1節　実験材料と実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 49
1．実験材料 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 49
2．実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 50
第2節　ラッカーゼによる新規な酸化的脱炭酸反応の発見 ・・・・・・・・・・ 51
1．単一の生成物が生じる基質の探索 ・・・・・・・・・・・・・・・・・ 51
2．HPGとHMAの酸化反応生成物の同定 ・・・・・・・・・・・・・・・・ 53
3．HPGとHMAの酸化反応の化学当量実験 ・・・・・・・・・・・・・・・ 55
4．HPGとHMAの酸化反応の化学反応式の検討 ・・・・・・・・・・・・・ 56

5．要　約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 58
第3節　他の酸化酵素による脱炭酸反応の検討 ・・・・・・・・・・・・・・・・・ 58
1．他の酸化酵素によるHMAの酸化 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 58
2．ビリルビンオキシダーゼによる脱炭酸反応 ・・・・・・・・・・・・・ 60
3．セルロプラスミンによる脱炭酸反応 ・・・・・・・・・・・・・・・・ 60
4．ペルオキシダーゼによる脱炭酸反応 ・・・・・・・・・・・・・・・・ 61
5．要　約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 62
第4節　酸化酵素によるHPGおよびHMAの脱炭酸反応の反応経路 ・・・・・・ 62
1．ラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの脱炭酸反応の至適pH ・・ 62
2．ラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの脱炭酸反応の*Km*値・・・ 64
3．脱炭酸反応の反応経路の考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 64
第5節　酸化的脱炭酸反応を用いた酸化酵素の活性測定法の開発 ・・・・・・・ 66
1．HBAの発色定量法の確立 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 67
2．HMAの酸化的脱炭酸反応を用いたラッカーゼの活性測定法の設定 ・・ 69
3．本測定法を用いた漆由来ラッカーゼの活性測定 ・・・・・・・・・・・ 71
4．要　約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 72
第6節　考　察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 73

第IV章　酸化酵素を用いたアミノペプチダーゼ及び
アンジオテンシンI変換酵素の活性測定法の開発 ・・・・・・・・・・・・・ 75
序 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 75
第1節　アミノペプチダーゼの活性測定法の開発 ・・・・・・・・・・・・・・・ 75
1．アミノペプチダーゼの活性測定法の現状 ・・・・・・・・・・・・・・ 75
2．実験材料と実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 78
3．アミノペプチダーゼの基質の検討と反応条件の至適化 ・・・・・・・ 79
4．アミノペプチダーゼとラッカーゼを共役させた
アミノペプチダーゼ測定法の組み立て ・・・・・・・・・・・・・・・ 82
5．アミノペプチダーゼ活性測定法の実際 ・・・・・・・・・・・・・・・ 85
6．要　約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 87

第２節　アンジオテンシンＩ変換酵素の活性測定法の開発 ・・・・・・・・・・・ ８８
１．アンジオテンシンＩ変換酵素の活性測定法の現状 ・・・・・・・・・・ ８８
２．実験材料と実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ８９
３．ACEの基質の検討 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ９０
４．作用反応条件の最適化 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ９１
５．ビリルビンオキシダーゼによるN-Bz-HPGの脱炭酸反応 ・・・・・・・ ９３
６．アンジオテンシンＩ変換酵素とビリルビンオキシダーゼの共役反応 ・・ ９４
７．ACE活性測定法の実際 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ９６
８．要　約 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ９８
第３節　考　察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ ９８

合成法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ １００

総括と展望 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ １０７

参考文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ １１１

本論文に関連する文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ １１８

謝　辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ １１９

略記一覧 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ １２０

緒　　論

これまでに、多くの天然有機化合物が主として微生物界、植物界より単離、精製され構造決定されてきた。これらの中には抗生物質をはじめとする様々な生理活性物質も含まれており、人類に多大な恩恵を与えている。これらの天然物の生合成を考える時、フェノール酸化反応がkey reactionをなしている場合が多い。すなわち、天然物の生合成ではフェノール性前駆物質のフェノール酸化反応によって生じるフェノオキシラジカルの分子内あるいは分子間カップリングが重要な役割を果たしている。そのような例として、イソキノリンアルカロイド、テルペン、地衣フェノール性成分、クマリン、チロキシン、タンニン、リグニン、リグナン等が挙げられる。

フェノール類は赤血塩（フェリシアン化カリウム）や塩化第二鉄などの温和な酸化剤で容易に酸化を受け、炭素・炭素結合により２分子から数分子が重合した化合物の混合物が得られることが、今世紀の初頭より知られていたが、これら混合物からの生成物の単離が困難であったり、生成物の収率が低くその構造決定が困難であった為にあまり顧みられず進歩しなかった。しかし、ここ数十年における高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を初めとする分離精製技術の進歩、さらに核磁気共鳴スペクトル（NMR）による構造解析法の発展とあいまって、フェノール酸化反応によって天然物を合成する試みが多くなされている。これは、また、天然物の合成においてWoodwardらによって示された着実なstep by step的な合成方法では多くの行程を要し高収率を上げることができないので、生合成機構に従った合成法（biomimetic synthesis）の開発を必要としていることの現われでもある。

フェノール酸化反応における酸化試薬および酸化方法は、（１）赤血塩、塩化第二鉄などの無機試薬による酸化、（２）四酢酸鉛などの有機化合物による酸化、（３）電解酸化、（４）紫外線照射による光酸化、（５）酵素による酸化、に大別される[1]。フェノール酸化反応の反応様式は反応条件、特に酸化試薬の種類によって大きく左右される[1]。酵素による酸化ではこれまで主にペルオキシダーゼが過酸化水素存在下で用いられたのみで、フェノール酸化反応の研究は非酵素的方法が主流であった。

一方、酵素反応という観点から考えると、酵素反応は温和な反応条件下で反応が進行する、基質特異性が高い、反応が立体選択的である、と言った特長を有している。それゆえに、これまでに多くの酵素反応が化合物の合成や変換に用いられてきた。反応の種類としては、酸化、還元、加水分解（およびその逆反応）、C-C及びC-N結合の生成など多種にわたるが、その報告のほとんどが還元および加水分解反応である。炭素・炭素結合反応を触媒する酵素を実際に酵素合成的見地から研究した例はまだ少ない[2]。

従って、フェノール酸化反応の重要性と炭素・炭素結合が生じる酵素反応であるという点から、酸化酵

素によるフェノール酸化反応の応用に関する研究は非常に興味深い分野である。

本研究は以上の知見を出発点として、酸化酵素によるフェノール酸化反応のフェノール系化合物の酵素合成および酵素変換への応用を目的とし、更にその過程で見いだした酸化酵素による新規な脱炭酸反応を各種酵素活性測定法の開発へ展開したものである。

本研究では酸化酵素として真菌である*Coriolus versicolor*（カワラタケ）由来のラッカーゼ（EC 1.10.3.2）を主に用いた。ラッカーゼは1883年に吉田により*Rhus vernicifera*（ウルシノキ）の樹液中に発見された[3)]。別名ウルシオールオキシダーゼあるいはフェノールオキシダーゼとも呼ばれ、広く植物中に存在し[4,5)]真菌からも同種の酵素が見いだされている[6-18)]。その活性中心は、1分子当たりタイプI銅（blue Cu(II)）が1つ、タイプII銅（non-blue Cu(II)）が1つ、タイプIII銅（Cu(II)-Cu(II)）が2つの計4つの銅からなり、ラッカーゼはマルチ銅酸化酵素に属している[19,20)]。このグループに属する酵素には他に植物のアスコルビン酸酸化酵素（EC 1.10.3.3）と哺乳動物の血漿蛋白であるセルロプラスミン（EC 1.16.3.1）がある。その酵素作用は、一般にフェノール系化合物の水酸基から酸素を電子受容体として水素を引き抜く1電子酸化反応を触媒する[21)]。その結果、フェノオキシラジカルが生じ、次いで生じたフェノオキシラジカルが付加反応をはじめとするラジカルに特異的な反応を引き起こし様々な生成物が生じる。このようにラッカーゼによって引き起こされる反応はフェノール酸化反応である。これまでのラッカーゼの酵素反応に関する研究は、銅酵素としての酸化機構に関する研究とリグニン分解酵素としてのリグニン関連化合物の酸化反応に関する研究が主であり、酵素合成的見地からの研究はあまりなされていない。

まず、著者はフェノール系化合物の2量体をラッカーゼを用いて酵素合成することを計画した。そのためのモデル化合物として、フェノール性の側鎖を有するβ-ラクタム系の抗生物質であるペニシリンX（PcX）を選んだ。初め、PcXナトリウム塩を基質としたが、産物が不安定なために構造決定には至らなっかた。そこで、PcXのメチルエステル体（PcXOMe）を基質とし、クロロホルムと酵素液の2相系で反応させることにより4つのカップリング生成体XML-1、2、3、4を得て、それらの構造を明らかにした。次に、抗菌活性を有するPcXの2量体を得るために、エステラーゼによって加水分解されるエステルであるピバロイルオキシメチルエステル体を固形物の状態（懸濁系）で反応させXML-1に相当するXPL-1を得た。

更に、他のフェノール性の側鎖を有するβ-ラクタム系抗生物質を水溶液中でラッカーゼで酵素変換する実験を行ない、7-(4-ヒドロキシフェニルアセトアミド)セファロスポラン酸（CepX）がスピロ-エポキシド化合物CXL-1、2に変換されること、ラタモキセフナトリウムが側鎖のカルボキシル基が脱炭酸された物質LL-1.1、1.2に変換されることを明らかにした。

これまでのラッカーゼによる酸化反応では、単一の生成物が生じる反応は見いだされていなかった。も

し、そのような反応が発見できたならば、ラッカーゼの反応速度論的解析が可能になり、また、酵素分析法への応用が期待できることから、著者は先の重合産物が比較的生じなかった脱炭酸反応に注目し、カルボキシル基を有する種々のフェノール化合物を基質にして単一の生成物が生じる反応の探索を行った。その結果、2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン（HPG）と4-ヒドロキシマンデル酸（HMA）が、それぞれ唯一の生成物として4-ヒドロキシベンズアルデヒド（HBA）に変換される新規な酸化的脱炭酸反応を発見した。化学当量的実験および反応液中のアンモニウムイオンと炭酸水素イオンの検出から、これらの酸化反応は、$HPG + 1/2\,O_2 \rightarrow HBA + NH_3 + CO_2$、$HMA + 1/2\,O_2 \rightarrow HBA + H_2O + CO_2$という化学反応式で表わされることを明らかにした。更に、ビリルビンオキシダーゼ（EC 1.3.3.5）とセルロプラスミンでも同様の脱炭酸反応を確認した。

従来のラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの活性測定法では、活性を生成物の生成速度で表わすことができず、酸化反応に伴って生じる発色性物質による吸光度の増加速度によって表されていた。しかし、上記のHMAの脱炭酸反応では唯一の生成物としてHBAが生じるので、生じたHBAを2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いて発色定量することによって、これらの酵素活性を生成物の生成速度で表わすことが初めて可能になった。

血清中には多種類の酵素が含まれており、その増加や減少が様々な病態と対応することから臨床診断に利用されている。血清中の酵素の量を求める方法にはイムノアッセイ法と活性測定法があるが、安価、迅速、高精度で測定できる点から活性測定法が主流である。中でも操作が簡便で特殊な測定器を必要とせず、微量成分の定量が可能であり、目的生成物を分離する必要がない比色分析法が好まれている。そのため、本来無色の目的生成物を有色物質に変換するため発色性の人工基質が数多く開発されて来た。しかし、天然基質と部分的に共通な化学構造を持つ人工基質は、必ずしも目的酵素に対して天然基質と同様の反応速度および基質特異性を示さないことがあり、更に適した人工基質の開発が望まれている。特に、ペプチダーゼの活性測定法では加水分解されて生じたα-アミノ酸を特異的に発色させる適当な方法がない。そこで、著者はα-アミノ酸であるHPGの脱炭酸反応をアミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼの活性測定法へ応用することを考えた。

アミノペプチダーゼの中でも細胞質由来アミノペプチダーゼ（ロイシンアミノペプチダーゼ、略してLAP、EC 3.4.11.1）とミクロソーム由来アミノペプチダーゼ（アリルアミダーゼ，EC 3.4.11.2）が臨床上重要である。通常の臨床化学検査においてこれらの酵素の区別は明確ではないが、活性上昇が見られる病態の違いが指摘されている。従来の「LAP活性測定法」では人工基質に対する基質特異性の違いから一つの基質で両酵素活性を測定することが出来なっかた。そこで、血清中の両酵素の総活性を測定すること

を目指してアミノペプチダーゼの活性測定法の開発を行った。基質としてL-Leu-L-HPGを用い、第一ステップ：アミノペプチダーゼによる基質の加水分解（L-Leu-L-HPG → L-Leu + L-HPG）、第二ステップ：ラッカーゼによるHPGの脱炭酸反応（$HPG + 1/2\,O_2 \rightarrow HBA + NH_3 + CO_2$），第三ステップ：2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いたHBAの発色定量、によって両酵素活性を測定することができた。

カルボキシペプチダーゼではアンジオテンシンＩ変換酵素（EC 3. 4. 15. 1）が臨床上重要である。アンジオテンシンＩ変換酵素の活性測定法としてはカッシュマン法及びその変法が用いられている。基質としてBz-Gly-L-His-L-Leuを用い、いずれも基質の加水分解によって生じたBz-Glyを反応液中から有機溶媒で抽出し紫外吸収で定量しなければならず、操作が煩雑であることと測定値のバラツキが問題であった。著者はN-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuを基質とし、共役酵素としては*Myrothecium verrucaria*由来ビリルビンオキシダーゼを用いて、先のアミノペプチダーゼの活性測定法と同様のステップからなる連続酵素反応系により、簡便なアンジオテンシンＩ変換酵素の活性測定を開発した。この測定法では生成物（HBA）をそれに特異的な発色試薬により発色定量するので生成物の反応液からの抽出を必要としない。

本論文は次の四章より構成されている。以下にその概略を示す。

第Ｉ章では、ラッカーゼを用いてPcXの２量体の酵素合成を試み、PcXのメチルエステル体を有機溶媒と酵素液の２相系で反応させることによって種々のカップリング生成体が生じることを明らかにすると共に、これらの化合物の構造を明らかにして生成機構の考察を行なう。更に、PcXのピバロイルオキシメチルエステル体を基質にすることによって、抗菌活性を有するPcXの２量体を得ることがでた。

第II章では、ラッカーゼを用いて側鎖にフェノール基を有するβ-ラクタム抗生物質であるCepXおよびラタモキセフナトリウムの酵素変換を試み、それぞれスピロ-エポキシド構造体、脱炭酸反応物に変換されることを明らかにする。

第III章では、ラッカーゼによりHPGとHMAが唯一の生成物としてHBAに変換される新規な酸化的脱炭酸反応を発見した経緯について述べる。更に、ビリルビンオキシダーゼとセルロプラスミンにおいても同様の脱炭酸反応が見られることを明らかにする。これらの酸化酵素の脱炭酸反応について反応最適条件の検討、速度論的解析を行ない、脱炭酸反応の反応経路を考察する。また、この脱炭酸反応を用いた酸化酵素の活性測定法について述べる。

第IV章では、ラッカーゼを共役酵素とするアミノペプチダーゼの活性測定法、およびビリルビンオキシダーゼを共役酵素とするアンジオテンシンＩ変換酵素の活性測定法の開発について論述する。

最後に、これらの総括を行うと共に将来の展望を述べたい。

第Ⅰ章　ラッカーゼを用いたペニシリンX２量体の酵素合成

序

酵素は有機合成においても生体触媒として広く利用されている。その理由は酵素反応が、反応条件が穏和なため不安定な物質の合成に利用できる、位置選択性、官能基選択性がある、立体選択性がある、といった特長を有しているからである。これまでに利用されてきた酵素反応は、酸化反応、還元反応、アルキル化反応、脱アルキル化反応、アシル化反応[22]、脱アシル化反応[23]、加水分解反応、リン酸化反応[24]、グルコシル化反応[25]、と多岐にわたるが、C-C結合反応に関与する酵素の合成的展開に関する報告は少ない。なかでも、C-C結合を形成する反応であるフェノール酸化反応の酵素合成への応用に関する報告はあまりない。

著者は、フェノール酸化反応によって一部にフェノール性の部分を有する２つの化合物をカップリングさせ２量体を合成することを計画した。そのためのモデル化合物として抗生物質の中から、側鎖のカップリングによっても抗菌活性を保持していると考えられるβ-ラクタム系抗生物質のペニシリンX（Fig. I-1）を選んだ。また、酸化酵素としてはラッカーゼを用いることにした。ラッカーゼは銅酵素で、基質特異性が広く、一般にフェノール系化合物の水酸基から酸素を電子受容体として水素を引き抜く反応を触媒する。その結果、Fig.I-2に示すようなフェノオキシラジカルが生じ、次いで、ラジカル付加反応を初めとするラジカルに特異的な反応を引き起こす[26-30]。

本章では、ペニシリンXの２量体を合成する為に、はじめにペニシリンXナトリウム塩を基質としたが生成物の生成比が低く、且つ生成物が化学的に不安定なために構造決定に至らなかった経緯を述べ、次にペニシリンXのエステル体を基質にすることによって、これらの問題点を克服し４種類の２量体が得られたことを述べる。更に、２量体の化学構造を明らかにし、その生成機構についての考察を行なった。

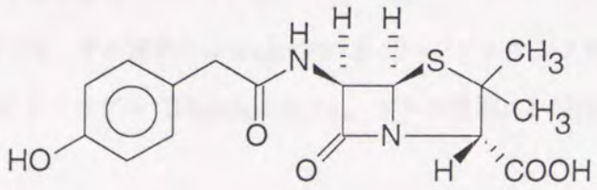


Fig. I-1　Structure of penicillin X

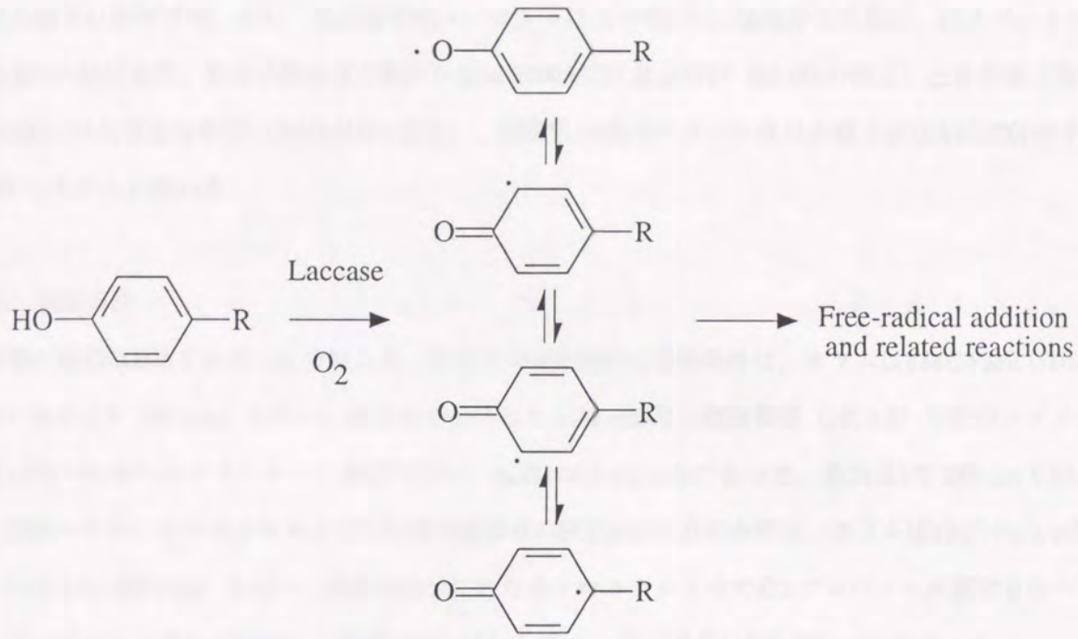


Fig. I-2　Formation of phenoxy radicals by laccase

第１節　実験材料と実験方法

１．実験材料

ラッカーゼは、*Coriolus versicolor* IFO 9791の培養液よりFåraeusらの方法[31]で電気泳動的に単一に精製した酵素を用いた。蛋白質濃度は、Bio-Rad社製のプロテインアッセイキットを用いて、牛血清アルブミンを標準としてBradfordの方法[32]により求めた。使用したラッカーゼ酵素液の蛋白質濃度は、1.3 mg/mlであった。

ペニシリンXは本来、天然物であるが、本章では化学合成して用いた。ペニシリンX（PcX）、ペニシリンXのメチルエステル（PcXOMe）、ペニシリンXのピバロイルオキシメチルエステル（PcXPOM）の合成については、後述する合成法（１、２、３）で述べる。

反応産物の単離精製では、ゲル濾過にはSephadex LH-20（ファルマシア社製）を用い、薄層クロマトグラフィー（TLC）にはシリカゲル（Kieselgel 60 F_{254}、メルク社製）を使用した。

２．実験機器

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、分析には島津社製LC-6Aシステムを、分取には同じくLC-8Aシステムを用いた。

化合構造の解析では、紫外・可視部吸収スペクトルは島津製UV-2100型分光光度計、IRスペクトルは日立製260-10分光器、質量分析は日立製作所製M-2000A型質量分析計（SI-MSの測定）と日本電子製JMS-SX102A型質量分析計（FAB-MSの測定）、核磁気共鳴スペクトルは日本電子製JNM-GSX400 FT NMRシステムを用いた。

3．実験方法

酵素反応液はHPLCを用いて分析した。水溶液の逆相HPLC分析条件は、カラムはYMC-Pack ODS A-312（4.6 ϕ × 150 mm）を用い、溶出は60分にわたる20 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）中でのメタノール濃度10%～60%へのグラジエント溶出で行い、流速は0.5 ml/minであった。検出はUV 280 nmで行なった。酢酸エチル、クロロホルムなどの有機溶媒溶液の順相HPLC分析条件は、カラムはYMC-Pack s-5 60A SIL（4.6 ϕ × 250 mm）を用い、溶出は60分にわたるクロロホルム中での2-プロパノール濃度 0 %～10%へのグラジエント溶出で行ない、流速は1.0 ml/minであった。検出はUV 280 nmで行なった。

通常の分析、精製過程における基質および反応生成物の抗菌活性の検定は、検定板を用い検定菌としてβ-ラクタム抗生物質に対する高感受性グラム陰性菌である*Comamonas terrigena* B-996を用いたペーパーディスク-寒天拡散法によって行なった。

抗菌物質の最小発育阻止濃度（MIC）の測定は、Mueller Hinton Broth（Difco社製）を培地に用い、保存菌より培地に植菌し37℃で18～20時間、静置培養を行ないこれを10^8 cfu/mlとして生理食塩水で希釈して10^5 cfu/mlを調製して菌液とした。96穴のマイクロタイターにMueller Hinton Brothで調製した抗菌物質の希釈列0.1 mlと菌液0.1 mlを注入し、37℃で18～20時間培養後、生育の有無によりMICを判定した。

第2節　ラッカーゼによるペニシリンXの酵素変換

本節では、ペニシリンXナトリウム塩をラッカーゼで反応させると、いくつかの抗菌活性を有する反応生成物が生じることを見いだしたことをまず述べ、更に、反応生成物の単離精製を行ない、化学構造の決定を試みたが、生成率が低くまた化学的に不安定であった為に構造決定に至らなかった経緯について述べる。

1．ラッカーゼによるペニシリンXの酵素変換

ラッカーゼのフェノール化合物に対する至適pHは一般に5.5～6.0であるので、反応液の緩衝液はリン酸緩衝液（pH 6.0）を用いることにした。ペニシリンXナトリウム塩を50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）に溶

かし、ラッカーゼを添加して撹拌しながら30℃に保温し、反応液をHPLCで分析して新たな生成物のピークが生じる反応条件について検討した。

その結果、ペニシリンXの濃度を1～2 mg/ml（2.7～5.4 mM）と低くすることによって、Fig. I-3のHPLC分析チャートが示すように新たなピークが生じることを見いだした。それぞれのピークを分取して抗菌活性があることを確認し、これらの物質をA1、A2、C、D、E、Fとした。しかし、ペニシリンXの濃度を高くしていくと、HPLC分析でピークとして分離しない物質（おそらく重合度が進んだオリゴマーと考えられる）が増加し、これらの新たな生成物のピークが生じなくなった。

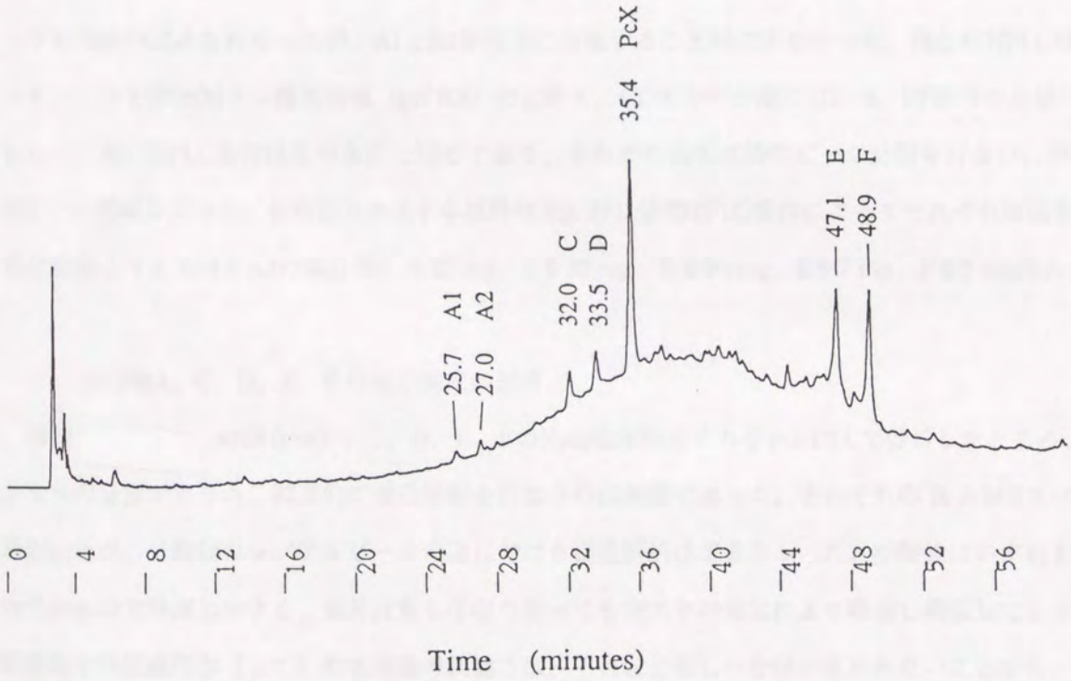


Fig. I-3. HPLC analysis of the reaction mixture of PcX.

The analytical conditions: column, YMC-Pack ODS A312 (4.6ϕ × 150 mm); elution, methanol concentration gradient in 20 mM phosphate buffer (pH 6.8) from 10% to 60% for 60 minutes; flow rate, 0.5 ml/min; detection, UV 280 nm.

2．反応生成物の単離精製

ペニシリンXナトリウム塩 500 mg（1.34 mmol）を50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）300 mlに溶かし、それにラッカーゼ 3.9 mg（酵素液 3 ml）を添加して、1リッター容のビーカ中でスターラで攪拌しながら30℃で6時間反応させた。その後、反応液をそのまま凍結乾燥した。得られた凍結乾燥物をメタノールで充填したSephadex LH-20カラム（3 ϕ ×47 cm）の上に乗せそのままメタノールで溶出した。溶出フラクションの抗菌活性をアッセイしたところ、活性物質はいっしょに溶出してきた。活性フラクションを集め、減圧下に濃縮して容量を小さくしてから、更に分取HPLCにより精製した。分取HPLC条件は、カラムはYMC-Pack ODS S-343-15（2 ϕ ×25 cm）、移動相はメタノール／20 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）（2 : 8）、流速は7.0 ml/min、検出はUV 280 nmで行なった。そして大まかにA1とA2を含むA画分、CとDを含むCD画分、EとFを含むEF画分に分けた。以上の操作を3回繰り返して計1.5 gのペニシリンXナトリウム塩を反応させた。

CD画分とEF画分については、C、D、E、Fを分離するために再び分取HPLCを行なった。A画分についても同様の試みを行なったが、A1とA2を完全に分離することができなかった。再分取HPLCの移動相はメタノールと20 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）の比率を、CD画分の分離には2 : 8、EF画分の分離には35 : 65とした。他のHPLC条件は先の条件と同じである。それぞれ各生成物のピーク分取を行ない、分取画分を減圧下に濃縮してから、移動相を水とする以外は先と同じ分取HPLC条件によってそれぞれ脱塩を行ない、凍結乾燥してA（A1とA2の混合物）を12 mg、Cを22 mg、Dを25 mg、Eを7 mg、Fを9 mg得た。

3．生成物A、C、D、E、Fの構造決定の試み

精製したA（A1、A2混合物）、C、D、E、Fの凍結乾燥物をそれぞれHPLCで分析したところ、すでにかなりの分解が見られ、純度的に構造解析を行なうのは無理であった。それぞれの^{1}H-NMRスペクトルを測定したが、分解物のシグナルピークの為にやはり構造解析はできなかった。精製物はいずれも凍結乾燥物であるので吸湿しやすく、充分注意して取り扱っても空気中の湿気により吸湿し褐変してしまった。精製過程での低温保存（5℃）の水溶液の状態では、それほど著しい分解が見られないことから、これらの物質は吸湿した状態すなわち高濃度水溶液の状態でかなり不安定であり、また空気酸化しやすいと考えられた。

4．生成物A、C、D、Fの抗菌活性評価

反応生成物の内、A（A1とA2の混合物）、C、D、Fについて抗菌活性の評価を行なった。Eはサンプル

量が少ない為にできなかった。先に述べたようにこれらの物質は空気中（吸湿と酸化）で不安定なため、凍結乾燥の真空を解除後すぐに検定用の培地を加えて溶かした。最小発育阻止濃度（MIC）の検定方法は、いずれも試料が量的に少ないため96穴のマイクロタイターを使用したブロス希釈法により行なった。Table I-1 に示すように、反応生成物のMICはいずれもparent compoundであるペニシリンXと比較して16～250倍と高かった。4物質の中ではCが最も活性が高く、Aが最も活性が低かった。

Table I-1. Antibacterial activity of A, C, D, F, PcX, and PcG

Test organism	MIC (μg/ml)					
	PcX	A	C	D	F	PcG
Bacillus subtilis ATCC 6633	< 0.006	1.56	0.39	3.13	1.56	0.012
Staphylococcus aureus 209P	0.012	3.13	0.20	0.39	0.39	< 0.006
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	3.13	> 100	12.5	25	50	25
Micrococcus luteus ATCC 9341	< 0.006	1.56	0.024	0.10	0.10	< 0.006
Escherichia coli K-12	6.25	> 100	50	> 100	> 100	12.5

PcX: penicillin X; PcG: penicillin G

5．要 約

（1）ペニシリンXナトリウム塩を1～2 mg/ml（2.7～5.4 mM）と低濃度でラッカーゼで反応させることによって抗菌活性を有する6つの反応生成物A1、A2、C、D、E、Fが生じた。

（2）これらの抗菌物質は、ペニシリンXナトリウム塩を高濃度でラッカーゼで反応させた場合には生じなかった。

（3）これらの生成物を単離精製したが化学的に不安定なために構造決定ができなかった。

（4）これらの生成物の抗菌活性（MIC）は基質に用いたペニシリンXよりいずれも低かった。

第3節　ラッカーゼによるペニシリンXメチルエステルの2量体の酵素合成

前節で述べたように、ペニシリンXの反応生成物は不安定であった。ペニシリン系抗生物質のβ-ラクタム環は、不安定で水溶液中で加水分解され易い。有機合成ではエステル体にして有機溶媒中で反応させるのが一般的である。そこで、著者は、安定な生成物を得るためにラッカーゼの基質としてペニシリンXのメチルエステル体（PcXOMe）を用いることにした。脂溶性の基質の酵素反応では、これまでに有機溶媒

と酵素水溶液との２相系で激しく攪拌しながら反応させたり（２相系）、酵素水溶液中で固形物で反応させる（固液系）試みがなされて来た。PcXOMeでも同様の反応方法を試みた。

本節ではPcXOMeをラッカーゼで反応させると４種類のPcXOMeの２量体が生成し、単離精製、構造決定を行なったことを述べる。

１．PcXOMeのラッカーゼによる酵素反応

１）有機溶媒との２相系による酵素反応

PcXOMeのクロロホルム溶液１mlをスクリューキャップ付き試験管にとり、そこにラッカーゼを添加した0.1Mリン酸緩衝液（pH 6.0）１mlを加え、キャップをしてロータリーシェーカー上で攪拌しながら28℃で６時間反応させた。その後、クロロホルム層と水層をTLCおよびHPLCで分析することによって反応条件の検討を行なった。

クロロホルムと酵素液の２相系における水層のラッカーゼ活性は、有機溶媒の水層への溶け込みにより通常の水溶液中の活性の約10分の１であった。そこで、ラッカーゼの濃度を高くすることによって反応の進行を確認した。Fig. I-4 のクロロホルム層のHPLC分析チャートが示すように４つの新たなピークが見られ、これらの生成物をそれぞれXML-1、XML-2、XML-3、XML-4と名付けた。これらの物質のピークを分取し抗菌活性を検定したところ、いずれも抗菌活性を有していた。PcXOMeのクロロホルム溶液中での濃度は反応に影響しなかった。また、有機溶媒として酢酸エチルを用いた場合も同様の結果を得た。

２）固液系での酵素反応

PcXOMeのクロロホルム溶液１mlを試験管にとり、ロータリーエバポレータで減圧下にクロロホルムを留去して試験管のガラス壁にPcXOMeを薄く乾固した。これはPcXOMeと酵素液の接触面積をできるだけ大きくする為である。そこにラッカーゼを添加した0.1Mリン酸緩衝液（pH 6.0）１mlを加え、ロータリーシェーカー上で攪拌しながら28℃で６時間反応させた。その後、反応液をクロロホルム１mlで抽出しTLCおよびHPLCで分析することによって反応条件の検討を行なった。

反応開始後、酵素液が次第に白濁していった。対照として行なった酵素無添加の緩衝液を用いた場合にはこの白濁は起こらなかった。反応液のクロロホルム抽出液のHPLC分析の結果、先の２相系の酵素反応のときと同様の生成物のピークを確認した。

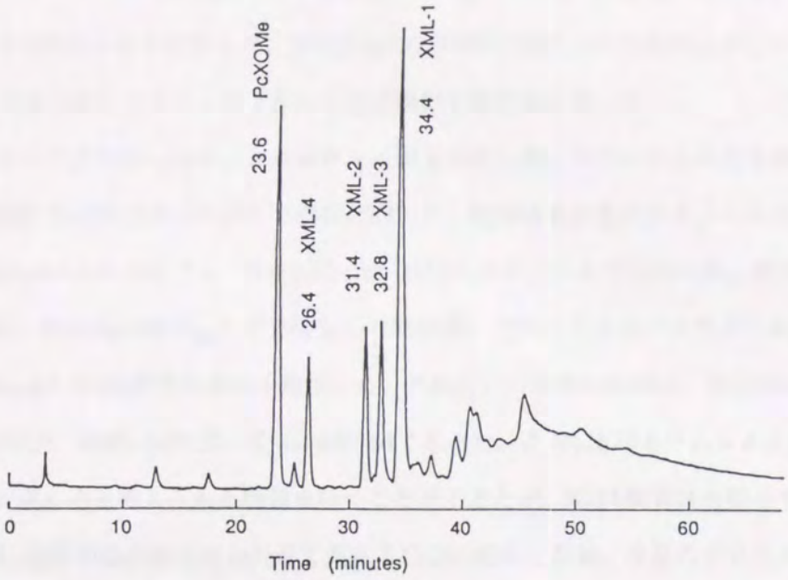


Fig. I-4. HPLC analysis of the reaction mixture of PcXOMe.

Two hundred and thirty mg of PcXOMe was dissolved in 23 ml of chloroform in a 500-ml Erlenmeyer flask, and then 21 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1.3 mg of laccase was added into the flask. The flask was capped and incubated at 28°C for 18 hours on a rotary shaker. The chloroform layer was used for HPLC analysis. HPLC conditions: column, YMC-Pack s-5 60A SIL (4.6 × 250 mm) ; elution, a 2-propanol concentration gradient in chloroform from 0 % to 10 % over 60 minutes; flow rate, 1.0 ml/min; detection, UV 280 nm.

3）酵素反応条件の考察

酵素水溶液と有機溶媒との２相系、酵素水溶液中で固形物で反応させる固液系のいずれでも同様にPcXOMeがラッカーゼによって反応し生成物が生じた。２相系の場合には固液系に比べ酵素量が約10倍必要であるが、反応終了後、水層から溶媒を減圧下に留去することによって約80%の残存活性で酵素が回収できた。固液系の反応液のHPLC分析で、２相系での反応生成物以外の物質の生成が見られた。これらの物質は、２相系での反応生成物を水に懸濁して保温した際にも生じることから、反応生成物と水との反応によって生じた物質と考えられる。生成物と水との反応をできるだけ避けるために、PcXOMeのラッカーゼによる反応条件は、クロロホルムとの２相系が適当であると判断した。

2．反応生成物XML-1、2、3、4の分離精製

230 mgのPcXOMeを溶かした23 mlのクロロホルムとラッカーゼ1.3 mg（酵素液1 ml）を添加した21 mlの0.1 Mリン酸緩衝液（pH 6.0）を、500 ml容のエルレンマイヤーフラスコに入れゴム栓をして28℃でロータリーシェーカー上で激しく撹拌しながら反応させた。経時的に反応混合液をサンプリングしてそのクロロホルム層をHPLCにより分析した。反応開始後18時間でXML-1の生成がほぼピークに達したので、ロータリーシェーカーからフラスコを下ろして生成物の分離精製に移った。

反応液を分液ロートで2層に分け、クロロホルム層を回収した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下にエバポレーターで濃縮乾固した。乾固物を少量のメタノールに溶かし、メタノールで充填したSephadex LH-20カラム（3 ϕ×47 cm）に付しメタノールで溶出した。溶出フラクションをTLC（シリカゲル、Kieselgel 60 F_{254}）で分析して（展開液、クロロホルム／メタノール混液(100:7)；検出、UV吸収254 nm）XML物質の溶出を検出した。それぞれの物質のRf値は、PcXOMeが0.44、XML-1が0.41、XML-2が0.58、XML-3が0.57、XML-4が0.54であった。このLH-20カラムによるゲル濾過ではPcXOMeの重合が進んだと考えられる物質を除くことができたが、XML物質は分離せずにいっしょに溶出してきた。XML物質の溶出画分を合わせて減圧下に濃縮乾固した後、少量のクロロホルムに溶かして分取HPLCによりXML-1、2、3、4の分離を行なった。分取HPLCの条件は、カラムはYMC-Pack s-10 120A SIL（2 ϕ×25 cm）を用い、移動相はクロロホルムと2-プロパノールの混合溶媒（50:1）を用い、流速は7.0 ml/minであった。検出はUV 280 nmで行なった。XML-1、2、3、4のピークを別々に分取し、減圧下に濃縮乾固してXML-1を18 mg、XML-2を8 mg、XML-3を12 mg、XML-4を8 mg得た。

3．XML-1、2、3、4の構造決定

XML-1、2、3、4の構造決定は、赤外吸収スペクトル、質量スペクトル、NMRスペクトルの解析によって行なった。これらの化合物全ての赤外吸収スペクトルにおいて、β-ラクタム環のカルボニル基に帰属できる1775から1780 cm^{-1}の範囲に一本のバンドが見られた。これら化合物の分子量は、二次イオンマススペクトル（Secondary Ion Mass Spectrum、SI-MS）においてm/z 727 $(M+H)^+$の分子プロトン化イオンピークが認められたことより726と決定された。この結果は、PcXOMeの分子量が364であることから、XML-1、2、3、4はPcXOMeの2量体であることを示唆している。XML-1、2、3、4の^{1}H-NMRスペクトル及び^{13}C-NMRスペクトルをFig. I-5～I-12に示す。PcXOMeの^{1}H-NMRスペクトル（Fig. I-13）及び^{13}C-NMRスペクトル（Fig. I-14）と比較することによって構造決定を行なった。XML-1、2、3、4とPcXOMeのペナム骨格上のプロトンの化学シフトおよびカップリング定数は実質的に同じであることから、

XML-1、2、3、4のペナム骨格は酵素反応においても変化していないことを示している。この結果は^{13}C-NMRスペクトルからも示唆された。

最終的に、XML-1、2、3、4の化学構造はFig. I-15 に示すように決定した。各プロトンとカーボンはTable I-2 とTable I-3 に示すように帰属した。このように化学構造を決定するに至った根拠を次に述べる。

1）XML-1の構造決定

XML-1はPcXOMeの２量体であるにもかかわらず、その^{13}C-NMRスペクトル（Fig. I-6）のシグナルの数は17であり、PcXOMeの^{13}C-NMRスペクトル（Fig. I-14）のシグナルの数15よりも２つ多いだけだった。このことは多くのシグナルが重なっていることを示しており、XML-1は分子内対称化合物であると考えた。PcXOMeの^{1}H-NMRスペクトル（Fig. I-13）でδ_H6.81およびδ_H7.12の二つのダブレット（共に2H, J = 8.5 Hz）は、XML-1の^{1}H-NMRスペクトル（Fig. I-5）ではδ_H6.87のダブレット（1H、J = 8.2 Hz）、δ_H 7.11のダブルダブレット（1H、J = 2.2 HzとJ = 8.2 Hz）、δ_H7.15のダブレット（1H、J = 2.2 Hz）に変化していた。8.2 Hzと2.2 Hzのカップリング定数はそれぞれオルト、メタ配位を示していることから、XML-1が典型的な1', 2', 4'位置換環状構造を有していることを示している。

2）XML-2、3の構造決定

XML-2の^{1}H-NMRスペクトル（Fig. I-7）および^{13}C-NMRスペクトル（Fig. I-8）は、XML-3のそれぞれのスペクトル（Fig. I-9、I-10）と実質的に同じであった。このことはXML-2とXML-3が立体異性体であることを示している。XML-2とXML-3の^{1}H-NMRスペクトルにおいて、5'-Hと6'-Hのシグナルが XML-1と比較して0.5～0.9 ppm高磁場側にシフトしている。これはこれら２つのプロトンがオレフィンプロトンにかわったことを示している。5'-Hと6'-H間のカップリング定数（J = 10.2 HzまたはJ = 10.4 Hz）は、5'-Hと6'-Hがシス配位であることを示している。更に、^{13}C-NMRスペクトルでケトンのカルボニル基に帰属できるδ_C195のシグナルとオレフィンカーボンと考えられるδ_C124（C-6'）とδ_C146（C-5'）のシグナルが観察された。XML-2、3の両方ともメタノール中で221 nmに特徴的な紫外部吸収スペクトルが観察された。これらの知見からシス-α,β-不飽和ケトン部分の存在が示唆される。XML-2、3のそれぞれの^{1}H-^{1}HCOSY実験よりメチレンプロトン2'-H_2がメチンプロトン3'-Hとカップリングしていることがわかった。他の芳香環プロトン9'-H、11'-H、12'-Hのカップリングパターンは、XML-1の場合と同様に7',8',10'-置換環状構造の存在を示している。また、NOE実験で、9'-Hと10'-CH_2間、3'-Hと2'-H_2および4'-CH_2間にNOEが観察された。

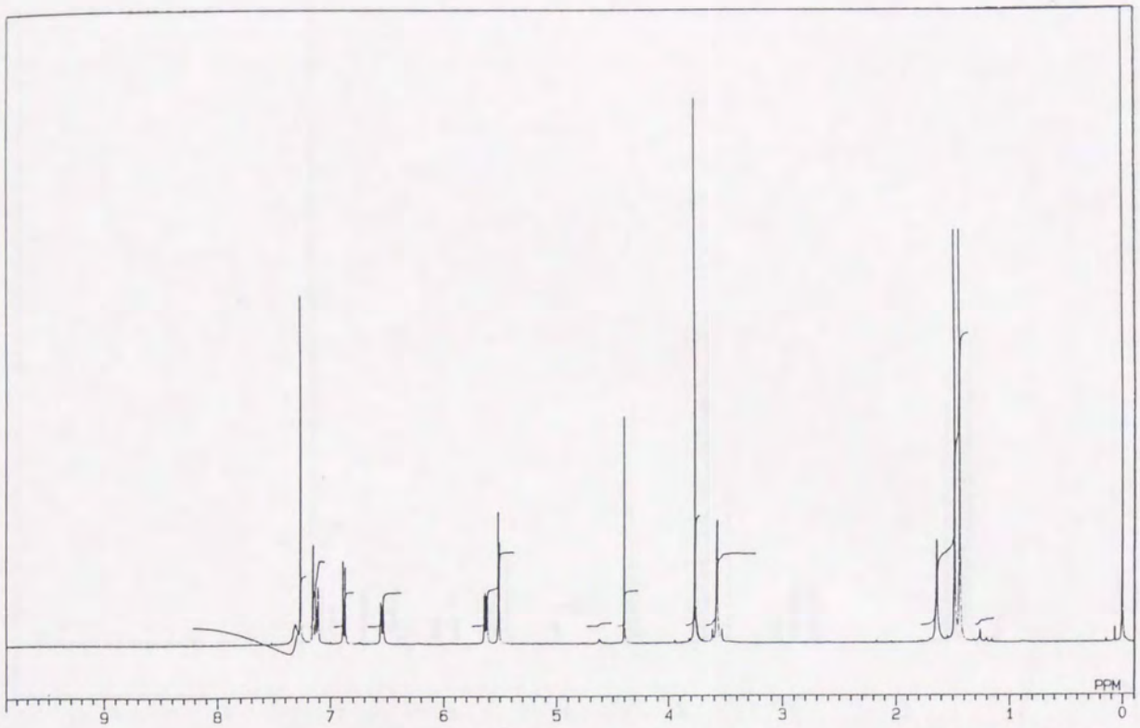


Fig. I-5. ^{1}H-NMR spectrum of XML-1. (400 MHz, $CDCl_3$)

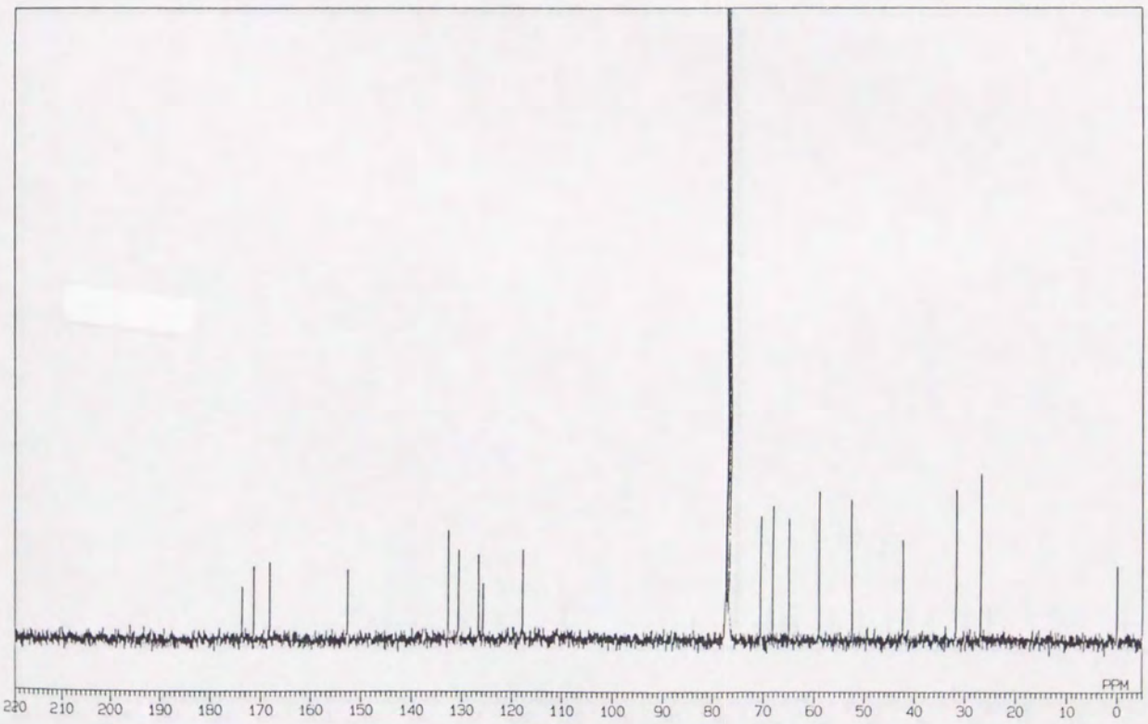


Fig. I-6. ^{13}C-NMR spectrum of XML-1. (100 MHz, $CDCl_3$)

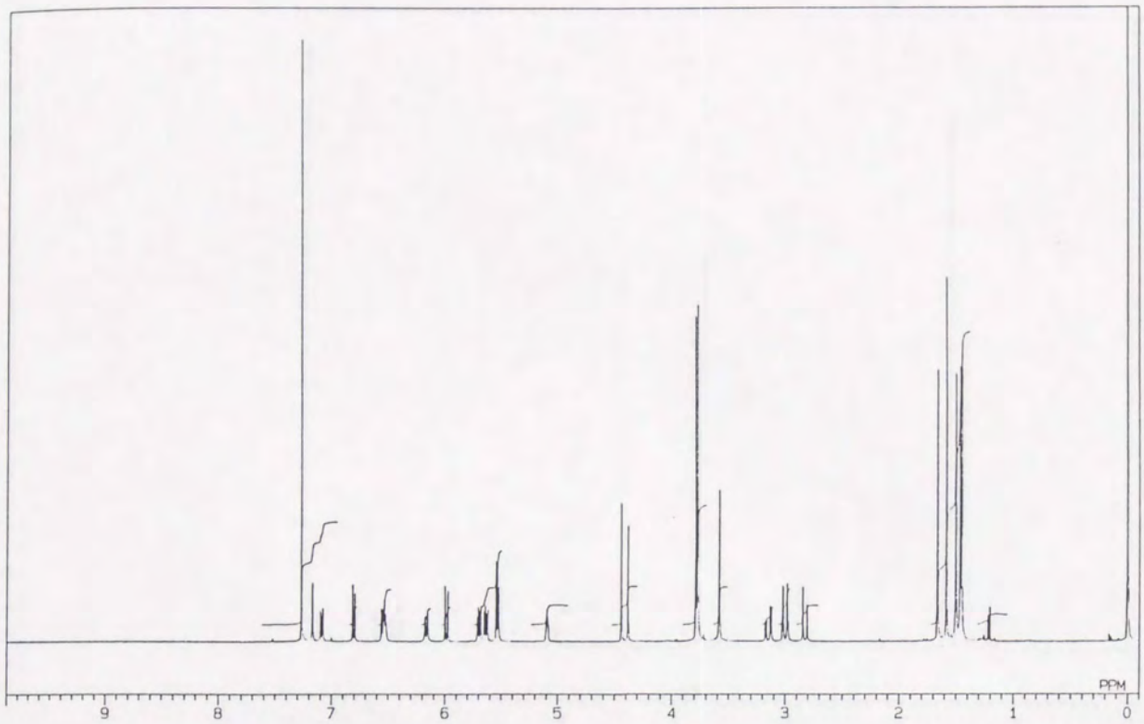


Fig. I-7. ^{1}H-NMR spectrum of XML-2. (400 MHz, $CDCl_3$)

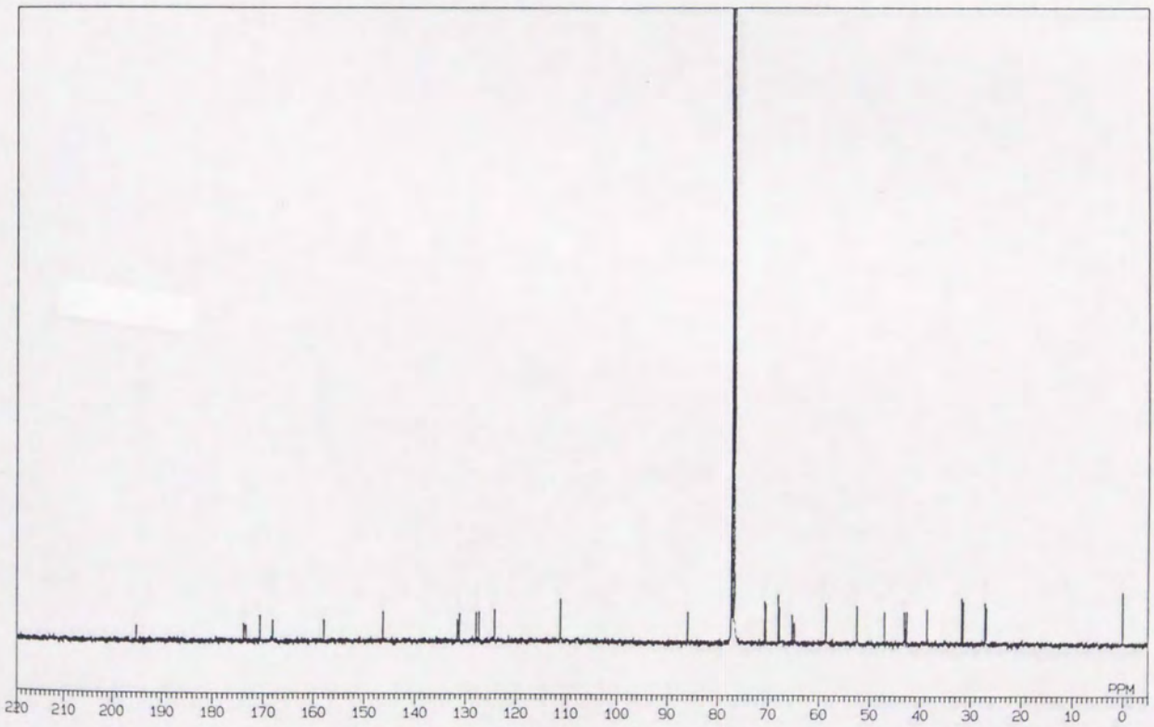


Fig. I-8. ^{13}C-NMR spectrum of XML-2. (100 MHz, $CDCl_3$)

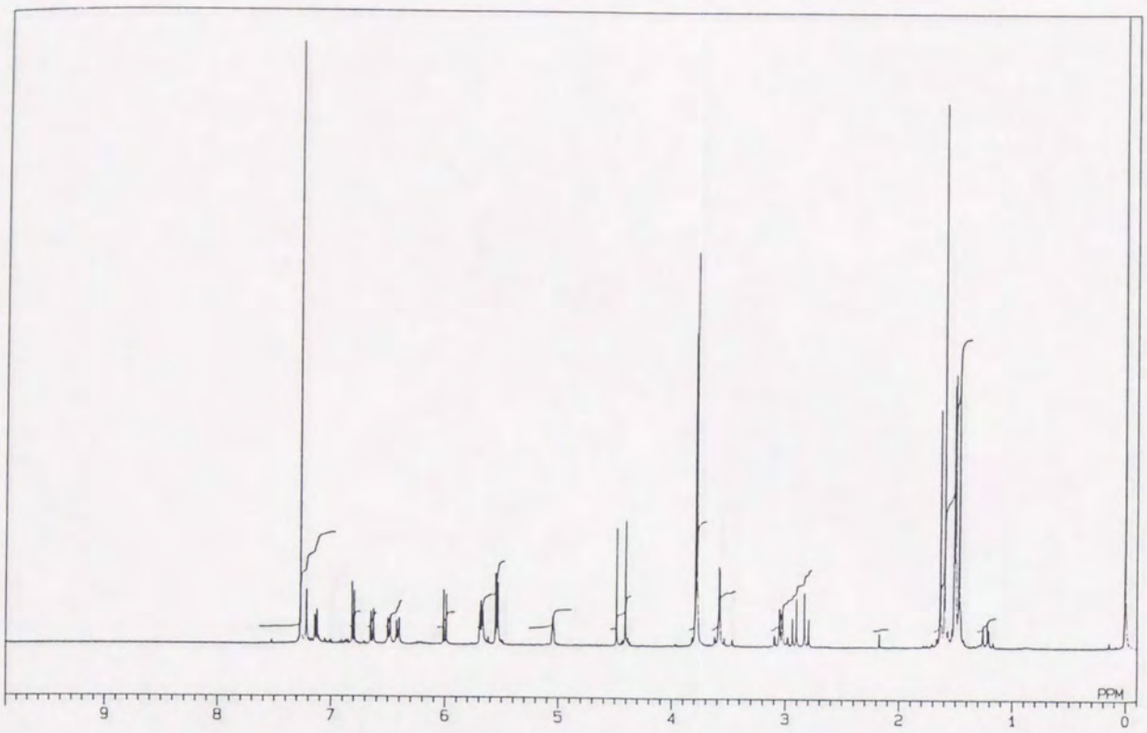


Fig. I-9. ^{1}H-NMR spectrum of XML-3. (400 MHz, $CDCl_3$)

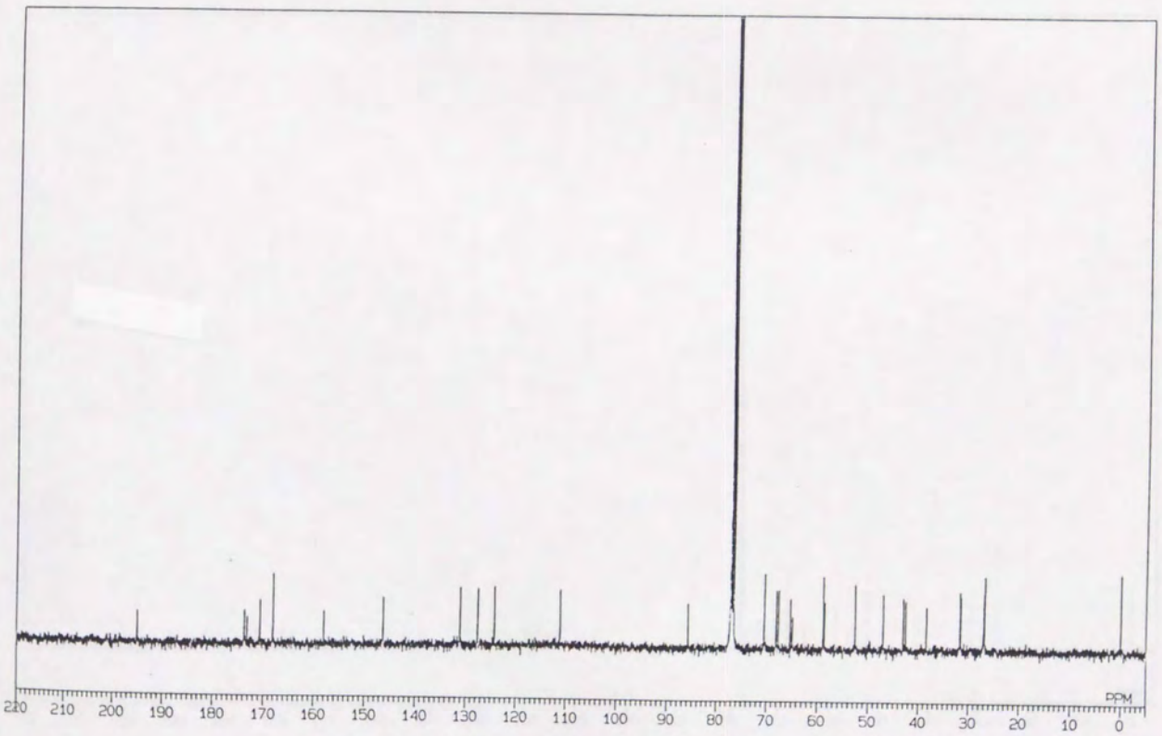


Fig. I-10. ^{13}C-NMR spectrum of XML-3. (100 MHz, $CDCl_3$)

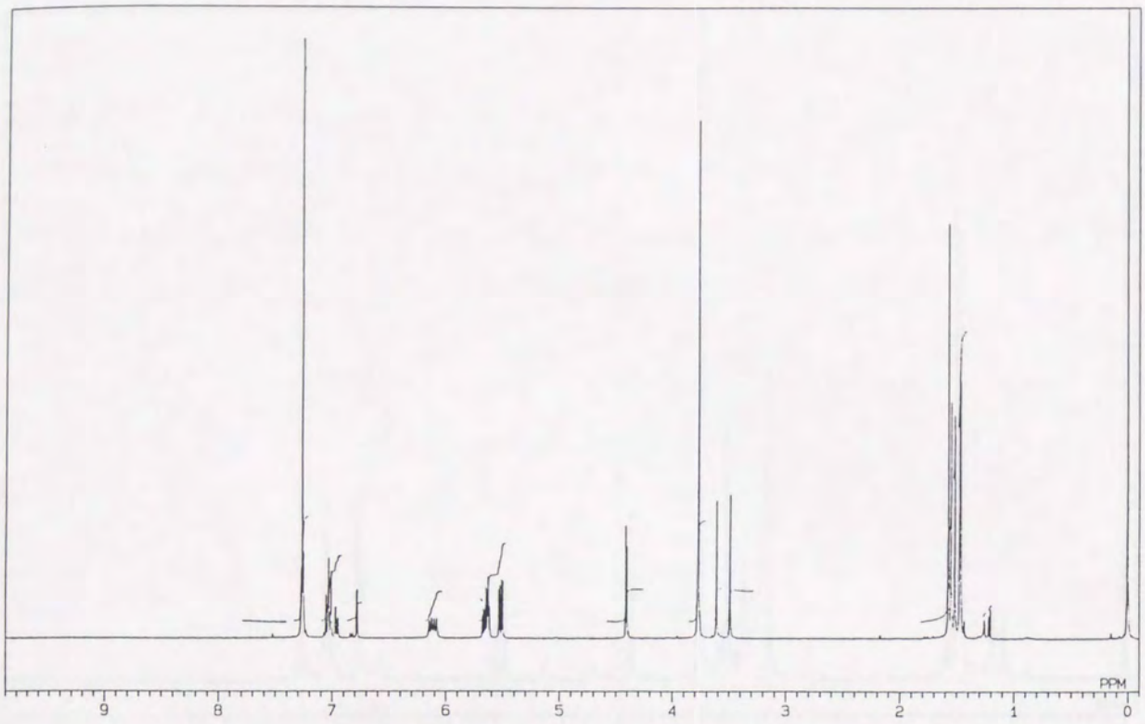


Fig. I-11. ^{1}H-NMR spectrum of XML-4. (400 MHz, $CDCl_3$)

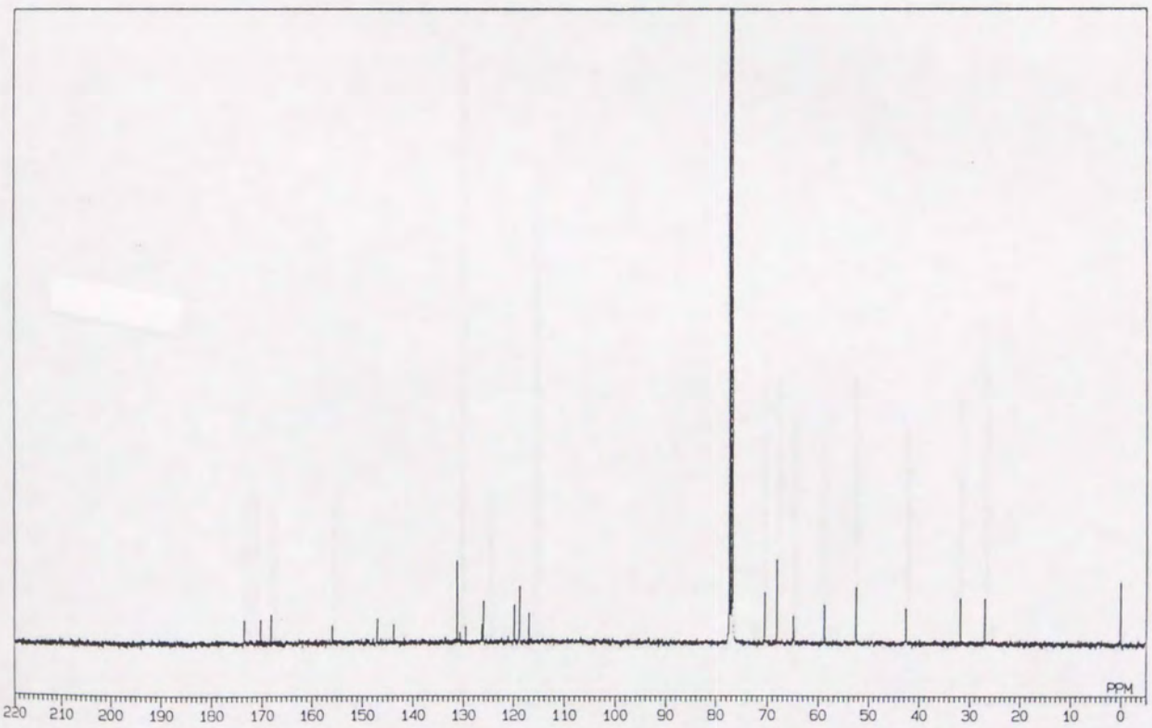


Fig. I-12. ^{13}C-NMR spectrum of XML-4. (100 MHz, $CDCl_3$)

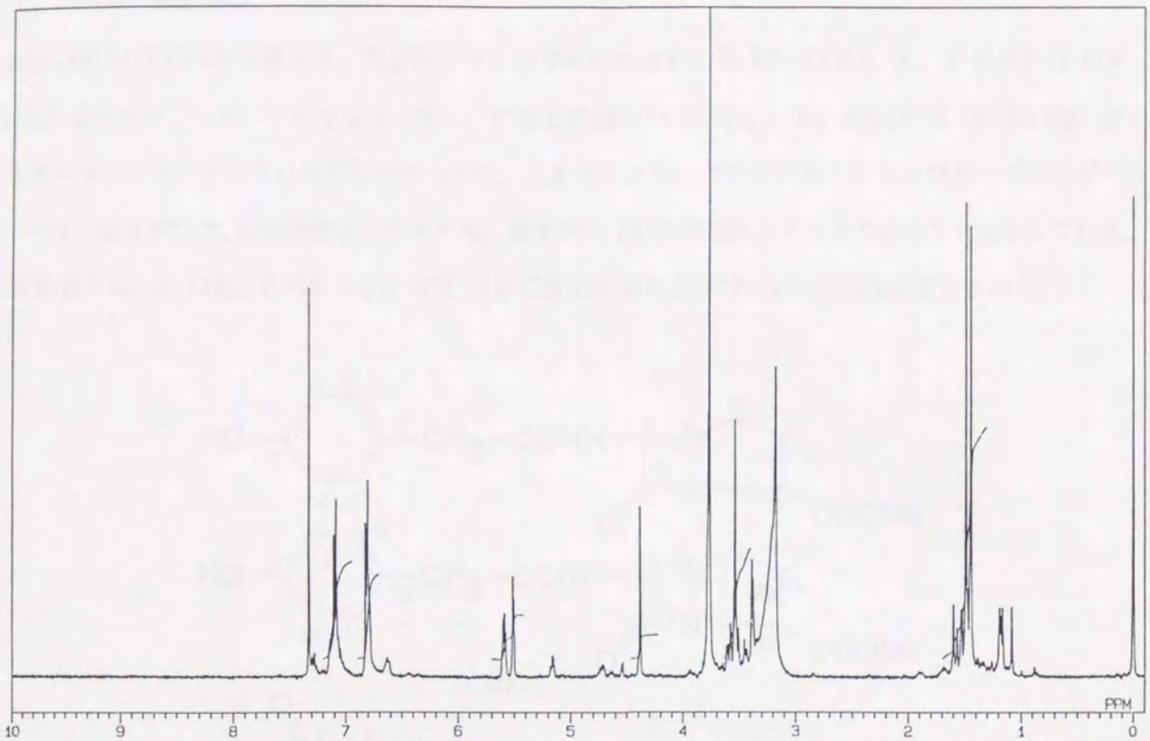


Fig. I-13. ^{1}H-NMR spectrum of PcXOMe. (400 MHz, $CDCl_3$)

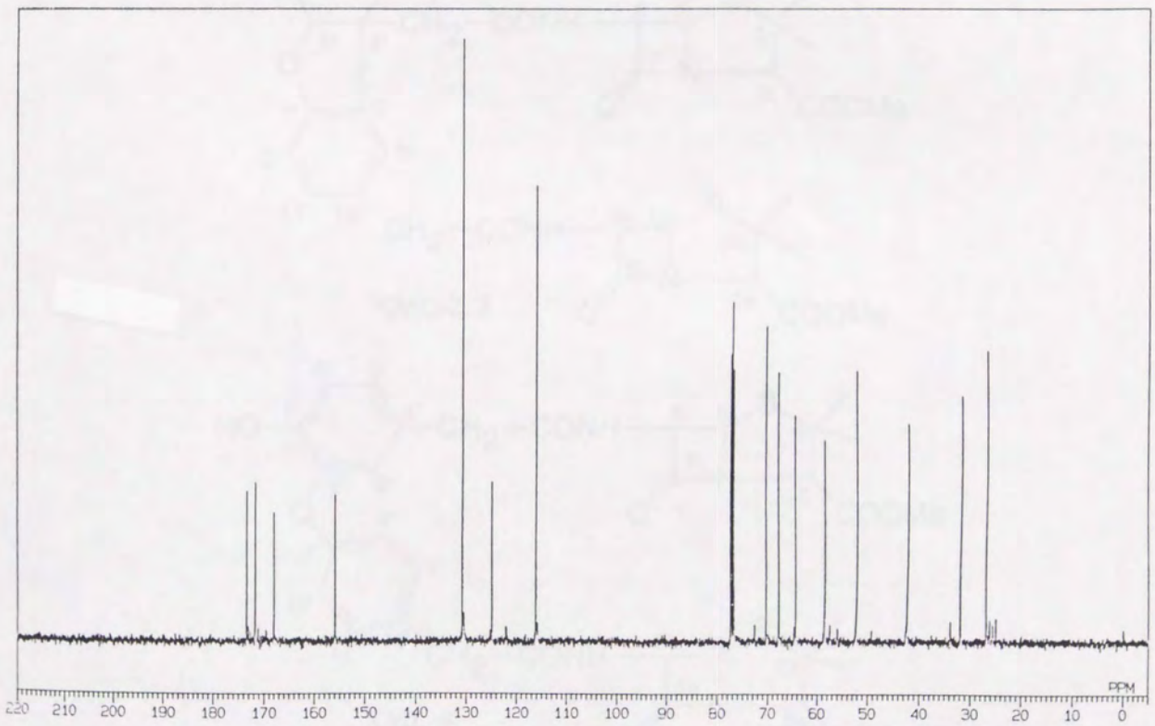


Fig. I-14. ^{13}C-NMR spectrum of PcXOMe. (100 MHz, $CDCl_3$)

3）XML-4の構造決定

XML-4の^{1}H-^{1}HCOSY実験より、芳香族プロトンである3'-Hが5'-H（J = 2.2 Hz）と、5'-Hが6'-H（J = 8.1 Hz）とカップリングしていること、更に、8'-Hと9'-H（J = 8.1 Hz）、12'-Hと11'-H（J = 8.1 Hz）がそれぞれカップリングしていることがわっかた。これら2グループの芳香族プロトンのカップリングパッターンは、前者が1', 2', 4'-置換環状システムを、後者が7', 10'-置換環状システムであることを示している。NOE実験では、4'-CH_2と3'-Hおよび5'-H間、10'-CH_2と9'-Hおよび11'-H間にNOEが観察された。

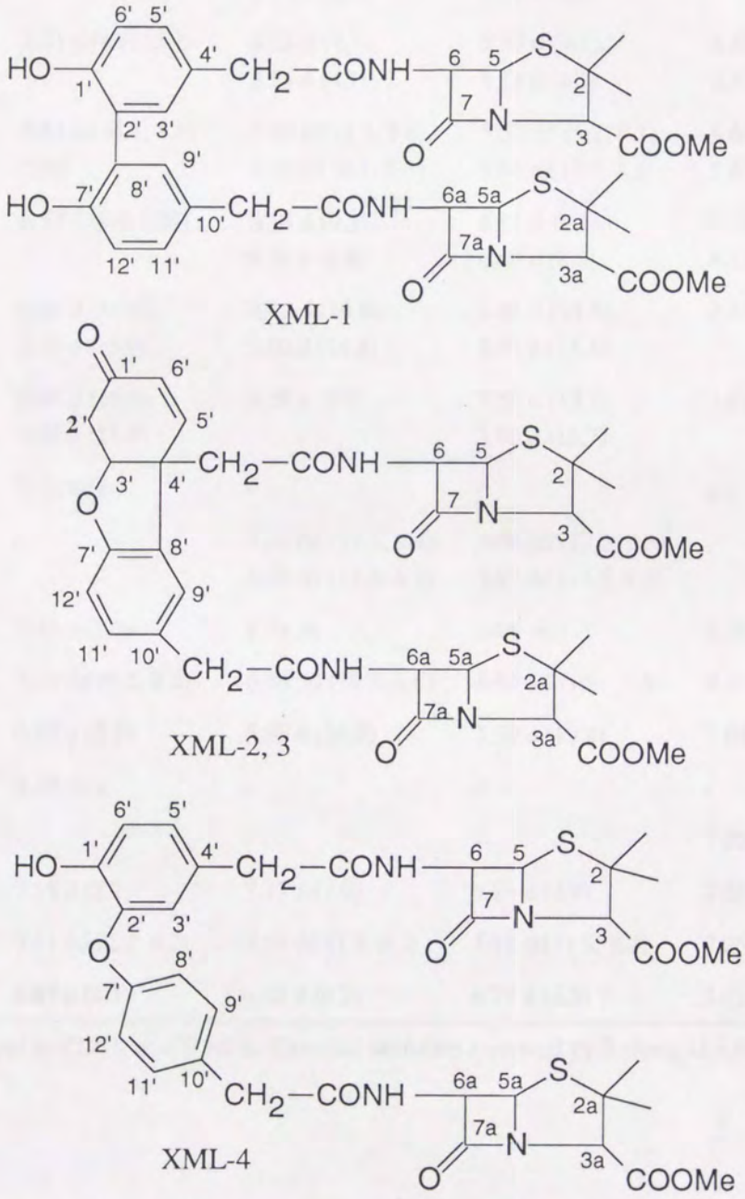


Fig. I-15. Structures of XML-1, 2, 3, and 4.

Table I-2. ^{1}H NMR data of XML-1, 2, 3, and 4

proton	XML-1	XML-2	XML-3	XML-4
2, 2a -$(CH_3)_2$	1.43 s (6H), 1.48 s (6H)	1.45 s (3H), 1.46 s (3H), 1.50 s (3H), 1.58 s (3H)	1.46 s (3H), 1.49 s (3H), 1.50 s (3H), 1.62 s (3H)	1.46 s (3H), 1.47 s (3H), 1.51 s (3H), 1.54 s (3H)
3, 3a-H	4.40 s (2H)	4.37 s, 4.43 s	4.39 s, 4.48 s	4.40 s, 4.41 s
$COOCH_3$	3.76 s (6H)	3.77 s (3H), 3.79 s (3H)	3.77 s (3H), 3.79 s (3H)	3.77 s (6H)
5, 5a-H	5.51 d (4.1) (2H)	5.53 d (4.1), 5.54 d (4.1)	5.53 d (4.1), 5.54 d (4.1)	5.50 d (4.4), 5.53 d (4.4)
6, 6a-H	5.62 dd (4.1, 8.8) (2H)	5.63 dd (4.1, 8.8), 5.69 dd (4.1, 9.3)	5.67 dd (4.1, 9.1), 5.68 dd (4.1, 8.8)	5.64 dd (4.4, 8.8), 5.65 dd (4.4, 8.8)
6, 6a -NH	6.57 d (8.8) (2H)	6.15 d (9.3), 6.52 d (8.8)	6.41 d (9.1), 6.49 d (8.8)	6.09 d (8.8), 6.13 d (8.8)
4'-CH_2	3.54 d (15.9), 3.59 d (15.9)	2.82 d (14.8), 3.00 d (14.8)	2.81 d (14.3), 2.91 d (14.3)	3.49 s (2H)
10'-CH_2	3.54 d (15.9), 3.59 d (15.9)	3.58 s (2H)	3.56 d (15.7), 3.60 d (15.7)	3.61 s (2H)
1'-OH	7.52 br s	-	-	n.i.
2'-H_2	-	3.00 dd (17.3, 2.4), 3.14 dd (17.3, 4.1)	3.00 dd (17.5, 3.3), 3.07 dd (17.5, 4.1)	-
3'-H	7.15 d (2.2)	5.09 m	5.04 m	6.78 d (2.2)
5'-H	7.11 dd (2.2, 8.2)	6.54 dd (10.2, 1.6)	6.63 dd (10.4, 1.9)	6.95 dd (2.2, 8.1)
6'-H	6.87 d (8.2)	5.98 d (10.2)	5.99 d (10.4)	7.04 d (8.1)
7'-OH	7.52 br s	-	-	-
8'-H	-	-	-	7.02 d (8.1)
9'-H	7.15 d (2.2)	7.17 d (1.9)	7.21 d (1.9)	7.26 d (8.1)
11'-H	7.11 dd (2.2, 8.2)	7.08 dd (1.9, 8.2)	7.12 dd (1.9, 8.2)	7.26 d (8.1)
12'-H	6.87 d (8.2)	6.80 d (8.2)	6.79 d (8.2)	7.02 d (8.1)

Spectra were measured in $CDCl_3$ at 400 MHz. Chemical shifts are expressed by δ (ppm) (J = Hz) from internal TMS.

n.i. : Not identified

Table I-3. ^{13}C NMR data of XML-1, 2, 3, and 4

Carbon	XML-1	XML-2	XML-3	XML-4
2, 2a	64.8	64.7, 65.2	64.8, 65.2	64.7
2, 2a -(C H_3)$_2$	26.8, 31.7	26.9, 27.1, 31.3, 31.7	26.9, 27.1, 31.6, 31.8	26.9, 27.0, 31.7, 31.8
3, 3a	70.4	70.3, 70.6	70.4, 70.5	70.4
5, 5a	68.0	67.7, 68.0	67.6, 68.0	68.0
6, 6a	58.8	58.5, 58.6	58.5, 58.8	58.7
7, 7a	171.2	167.9, 170.5	168.0, 170.6	170.1, 170.2
3, 3a -C O	173.6	173.2, 173.7	173.2, 173.7	173.5
COOC H_3	52.4	52.3, 52.5	52.5	52.5
C ONH	168.1	168.0	167.9	168.1
1'	152.6	195.0	195.0	155.9
2'	126.6	38.6	38.4	146.9 [c]
3'	132.6	85.9	85.8	125.9
4'	125.6	47.0	47.0	129.5 [d]
4'-C H_2	42.3	42.6 [a]	42.6 [b]	42.6 [e]
5'	130.5	146.1	146.2	130.6
6'	117.7	124.1	124.2	116.9
7'	152.6	157.9	157.9	143.7 [c]
8'	126.6	131.5	131.0	118.7 [f]
9'	132.6	131.1	131.0	131.2
10'	125.6	127.2	127.5	126.3 [d]
10'-C H_2	42.3	43.1 [a]	43.1 [b]	42.5 [e]
11'	130.5	127.8	127.5	131.2
12'	117.7	111.1	111.1	119.8 [f]

Spectra were measured in $CDCl_3$ at 100 MHz. Chemical shifts are expressed by δ (ppm) from internal TMS.

[a-f]: Assignments could be interchanged.

4．要　約

（1）PcXOMeをラッカーゼの基質とすることによって、有機溶媒と酵素液の２相系および酵素液中で固形物で反応させる固液系のいずれの反応方法によっても４種類のPcXOMeの２量体XML-1, 2, 3, 4を合成することができた。

（2）２相系の酵素反応では、有機溶媒の影響によってラッカーゼ活性が減少するため固液系に比べ10倍量のラッカーゼを必要とした。しかし、反応終了後、残存活性80%で回収できた。

（3）固液系の酵素反応では、生成物と水との反応によって生じたと考えられる生成物が生じた。

（4）２量体の構造をNMRスペクトルによる構造解析によりFig. I-15に示すように明らかにした。

第４節　ラッカーゼによるペニシリンXピバロイルオキシメチルエステルの２量体の酵素合成

前節で述べたように、ラッカーゼによってPcXPOMの種々の２量体、XML物質を合成することができた。しかし、XML物質はメチルエステル体である為に抗菌活性がかなり低かった。また、エステラーゼによってもエステルを水解することができなかった。著者の本来の目的は、抗菌活性を有するペニシリンXの２量体を得ることにあるので、次にペニシリンXのピバロイルオキシメチルエステル体（PcXPOM）をラッカーゼの基質とすることにした。ピバロイルオキシメチルエステルは、エステラーゼによって容易に加水分解されるエステルで、血中のエステラーゼによって加水分解されることから抗生物質のプロドラッグに用いられている[33]。

本節では、PcXPOMもPcXOMeと同様にラッカーゼによって２量体に変換されることを示すと共に、その抗菌活性について検討を行なった。

1．PcXPOMの酵素反応条件の検討

1）有機溶媒と酵素液の２相系による酵素反応の試み

第３節に述べたPcXOMeの２量体の酵素合成と同様に、PcXPOMをクロロホルムに溶かしラッカーゼを添加したリン酸緩衝液（pH 6.0）と共に28℃でロータリーシェーカー上で激しく攪拌した。しかし、HPLC分析の結果、クロロホルム層、水層共にほとんど反応産物が見られず反応が進行していないことがわかった。有機溶媒をトルエン、ジエチルエーテル、酢酸エチルに代えても同様であった。

2）固液系による酵素反応

次に固液系での検討を行なった。第３節の１の２）で述べたようにPcXPOMをクロロホルムに溶かし、

ロータリーエバポレータを用いて回転しながら試験管内で減圧下に乾固しガラス壁面に膜状にコーティングしてから酵素液を加えて反応させると反応生成物が生じた。しかし、この方法ではPcXPOMを少量しか反応させることができないので、更に条件検討を行なった。その結果、PcXPOMと酵素液との接触面積をできるだけ大きくするために、表面積の大きなガラス容器（2リッター容のエルレンマイヤーフラスコ）を反応容器として、その底面にPcXPOMを膜状に薄くコーティングすることにした。具体的な方法は、2.単離精製に述べる。このようにして反応させた結果、Fig. I-16にHPLC分析チャートを示すように反応生成物の生成を確認した。保持時間33.3分の主生成物をXPL-1と名付けた。コーティングするための溶媒としてはメタノール、酢酸エチルについても検討したが、クロロホルムを用いることによって反応中にはがれにくいコーティングを作ることができた。

50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）における溶解度は、PcXOMeが0.069 mg/ml、PcXPOMが0.04 mg/mlであるが、等量の酢酸エチルと50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）での2相系では、それぞれの化合物の有機溶媒層から水層へ移行はPcXOMeが1.4 %であるのに対して、PcXPOMでは0.031 %と低かった。従って、PcXPOMが2相系で反応しない原因は、PcXPOMの疎水性が高い為に水層のPcXPOM濃度が低く酵素反応が起こりにくい為と考えられる。

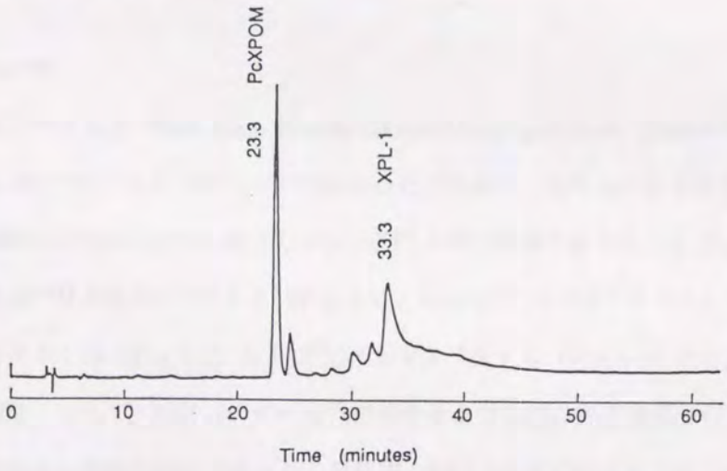


Fig. I-16. HPLC analysis of the reaction mixture of PcXPOM.

One hundred mg of PcXPOM was dissolved in 10 ml of chloroform. The solution was poured into a 2-liter Erlenmeyer flask, and then the solvent was removed under reduced pressure to coat the bottom of the flask with PcXPOM. One hundred ml of 10 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) containing 1.3 mg of laccase was added into the flask. The flask was slowly shaken on a reciprocal shaker at 30°C for 20 hours. The reaction mixture was extracted with an equal volume of EtOAc, and the extract was used for HPLC analysis. HPLC conditions: column, YMC-Pack s-5 60A SIL (4.6 × 250 mm); elution, a 2-propanol concentration gradient in chloroform from 0% to 10% over 60 minutes; flow rate, 1.0 ml/minute; detection, UV 280 nm.

2．反応産物XPL-1の単離精製

2リッター容のエルレンマイヤーフラスコにPcXPOM 150 mg（0.32 mmol）を溶かした10 mlのクロロホルム溶液を入れ、減圧下にクロロホルムを完全に留去してフラスコの底面にPcXPOMを膜状に薄くコーティングした。そこに1.3 mgのラッカーゼを添加した100 mlの0.1 Mリン酸緩衝液（pH 6.0）を加え、レシプロシェーカー上でゆっくり振盪しながら30℃で20時間反応させた。反応の進行と共に酵素液は次第に白濁していった。

反応終了後、反応液を100 mlの酢酸エチルで2度抽出を行なった。酢酸エチル層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下に濃縮乾固した。乾固物を少量のメタノールに溶かし、メタノールで充填したSephadex LH-20カラム（3 ϕ ×47 cm）に付しメタノールで溶出した。各溶出フラクションをTLCで分析して（展開液、クロロホルム／メタノール混液（20：1））XPL-1の溶出を検出した。Rf値はPcXPOMが0.27、XPL-1が0.20であった。XPL-1の溶出フラクションを合わせて減圧下に濃縮乾固した。この乾固物を少量のクロロホルムに溶かして分取HPLCによって更に精製を行なった。分取HPLCの条件は、先のXML物質の精製の条件と同様であるが、移動相はクロロホルムと2-プロパノールの混合液（200:3）を用いた。XPL-1の溶出ピークを分取して減圧下に濃縮乾固して、XPL-1を21 mg得た。

3．XPL-1の構造決定

高速原子衝撃マススペクトル（Fast Atom Bombardment Mass Spectrum、FAB-MS）よりm/z 927 $(M+H)^+$とm/z 925 $(M-H)^-$の分子イオンピークが観察されたことから、XPL-1の分子量を926と決定した。この結果は、PcXPOMの分子量が464であることから、XPL-1が2量体であることを示している。

構造決定は、XPL-1の^{1}H-NMRスペクトル（Fig. I-17）および^{13}C-NMRスペクトル（Fig. I-18）とXML-1の^{1}H-NMRスペクトル（Fig. I-5）および^{13}C-NMRスペクトル（Fig. I-6）とを比較することによって行なった。その結果、XPL-1とXML-1のペナム骨格部分および側鎖の芳香環部分のプロトンの化学シフトとカップリング定数は本質的に同じであった。最終的にXPL-1の全てのプロトンとカーボンの帰属は、Fig. I-19, I-20に示すようにHMBC（^{1}H-Detected Multiple-bond Heteronuclear Multiple Quantum Coherrence Spectroscopy）、HMQC（^{1}H-Detected Multiple Quantum Coherrence Spectroscopy）を含む2次元NMR実験により行ない、Fig. I-21に示すような結果を得、Table I-4に示すように帰属した。XPL-1の構造をFig. I-22に示すように決定した。

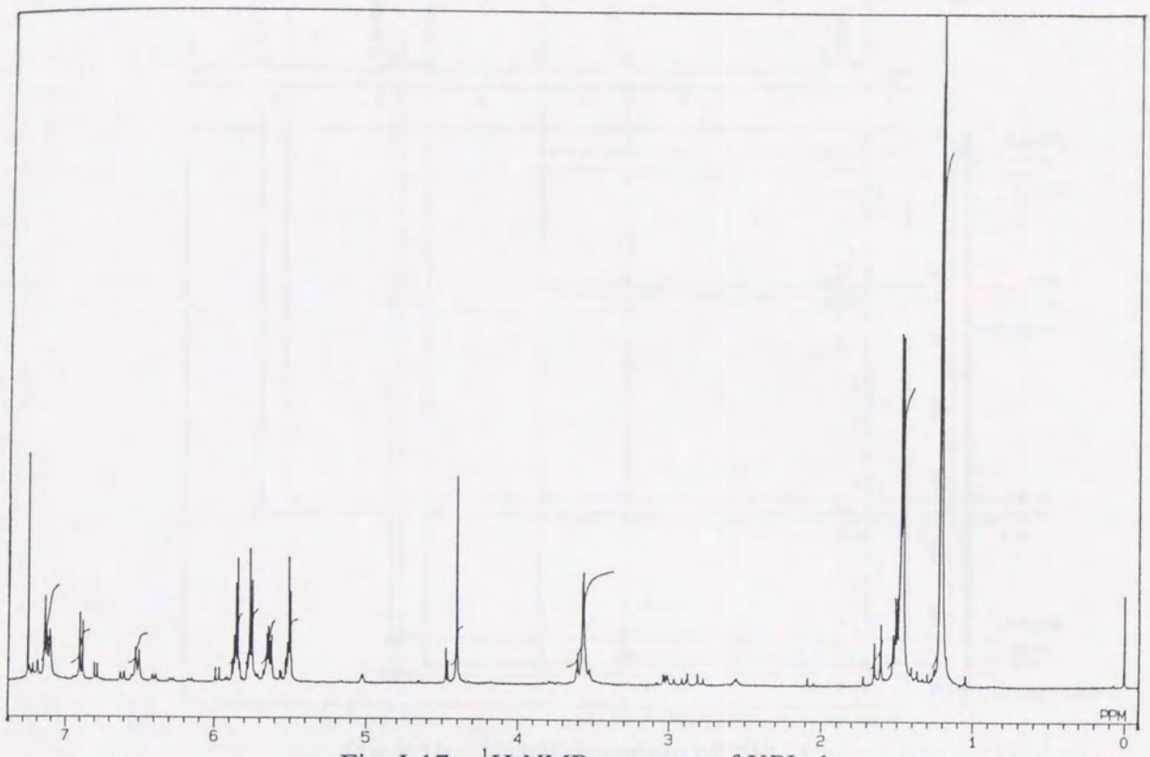


Fig. I-17. ^{1}H-NMR spectrum of XPL-1. (400 MHz, $CDCl_3$)

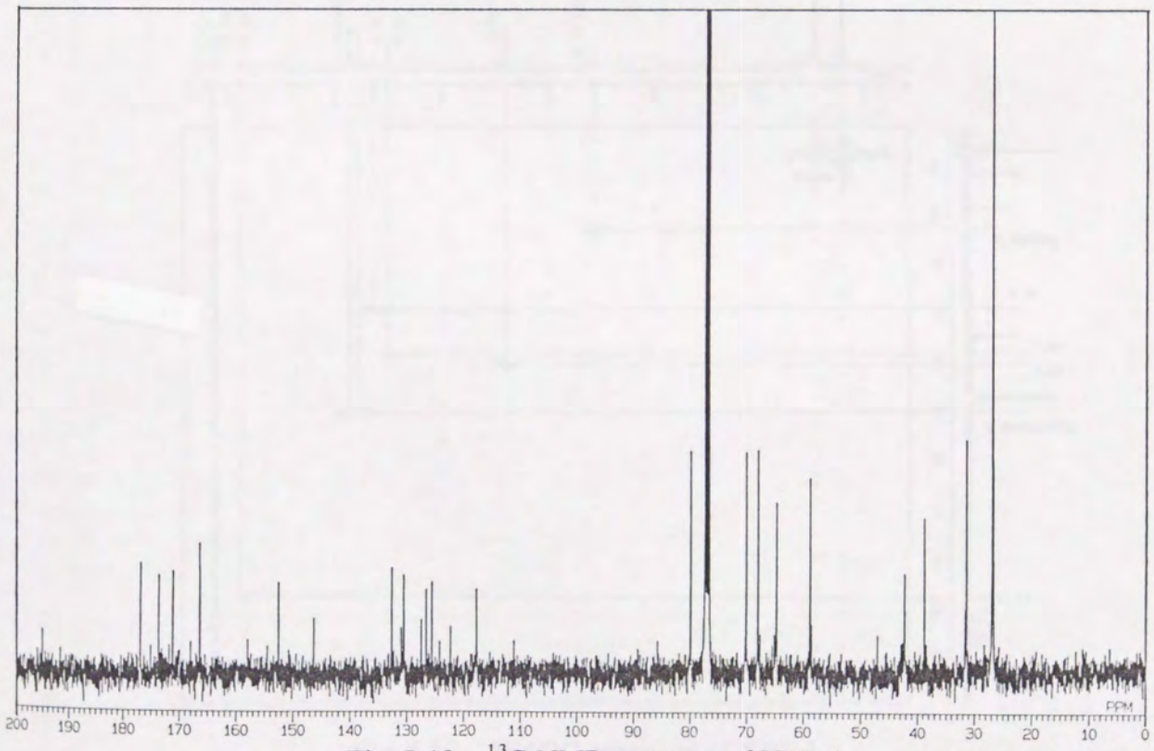


Fig. I-18. ^{13}C-NMR spectrum of XPL-1. (100 MHz, $CDCl_3$)

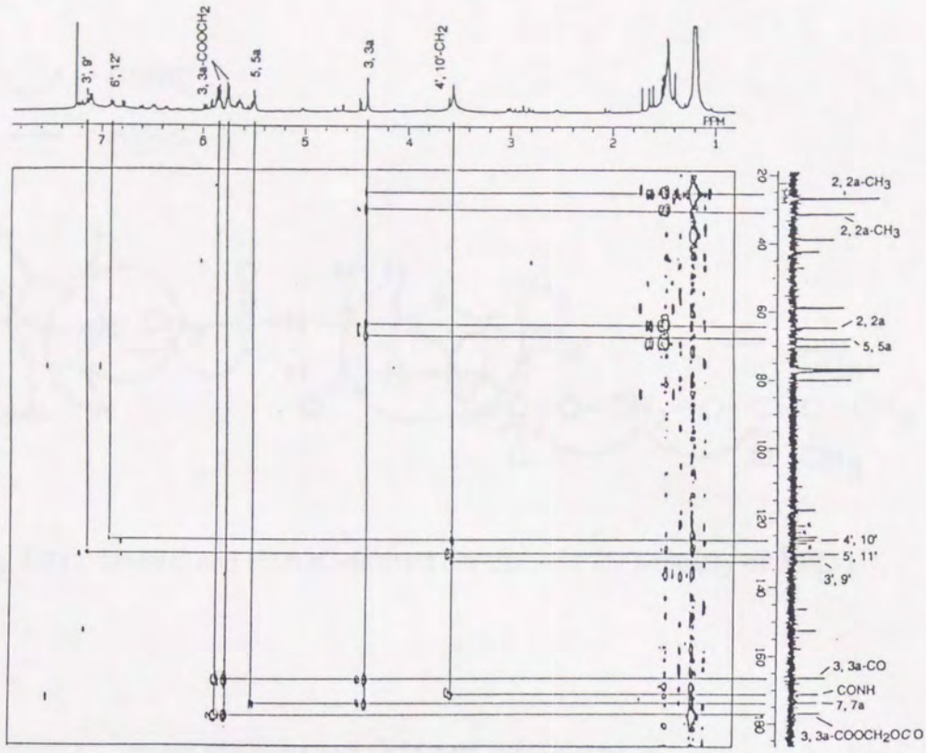


Fig. I-19. HMBC spectrum of XPL-1.

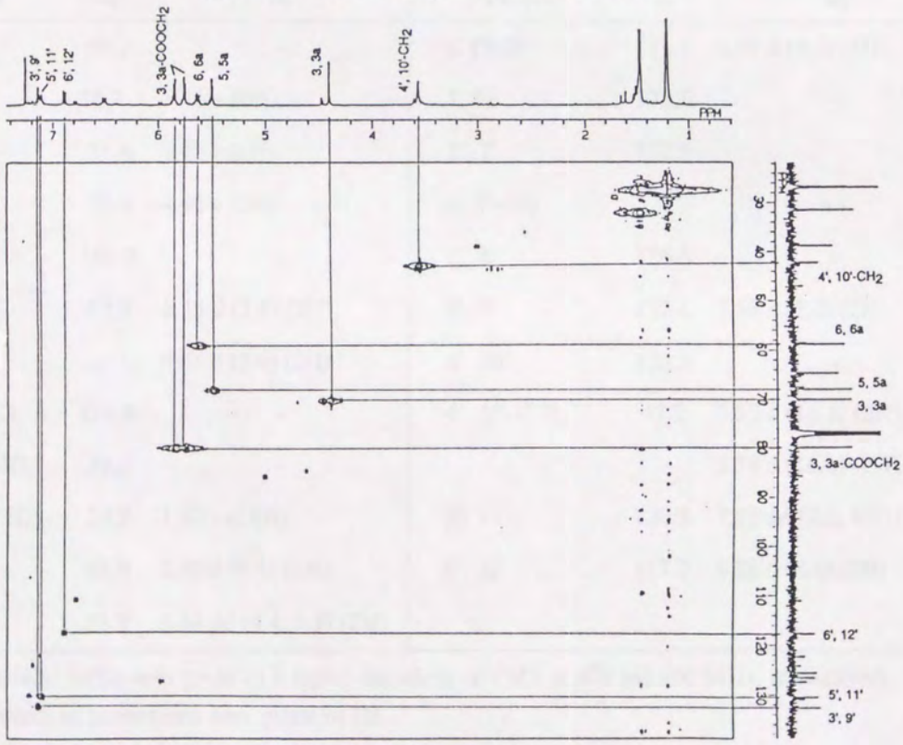


Fig. I-20. HMQC spectrum of XPL-1.

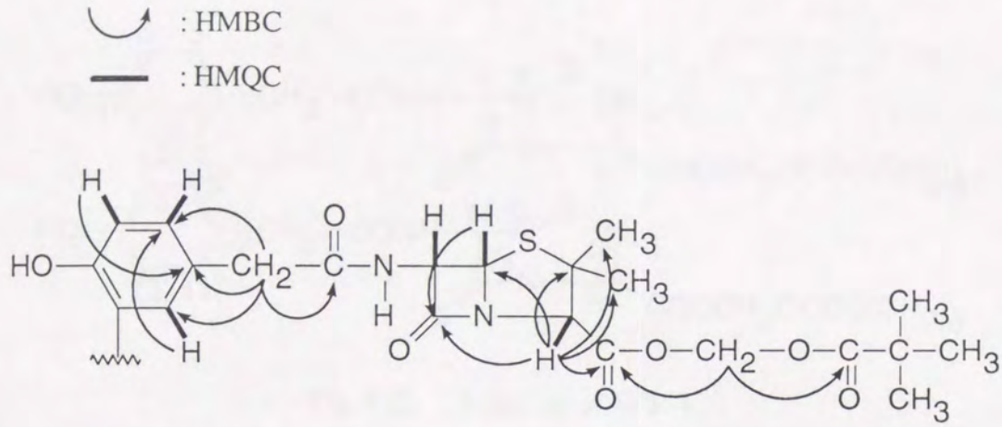


Fig. I-21. HMBC and HMQC-derived correlations for a moiety of XPL-1.

Table I-4. ^{1}H and ^{13}C NMR data of XPL-1

Position	δ_C	δ_H	Position	δ_C	δ_H
2, 2a	64.7	-	*C* ONH	171.1	6.51 d (8.8) (2H)
2, 2a-(*C* H_3)$_2$	26.7,	1.46 s (6H),	7, 7a	173.6	-
	31.4	1.48 s (6H)	1', 7'	152.5	-
3, 3a	70.0	4.40 s (2H)	1', 7'-OH	-	n.i.
3, 3a-C O	166.3	-	2', 8'	125.5	-
COO*C* H_2	79.9	5.75 d (5.9) (2H),	3', 9'	132.6	7.15 d (2.2) (2H)
		5.85 d (5.9) (2H)	4', 10'	126.5	-
COOCH$_2$O*C* O	176.8	-	4', 10'-*C* H_2	42.2	3.55 d (16.1) (2H),
COOCH$_2$OCO*C*	38.8	-			3.59 d (16.1) (2H)
CH$_2$OCOC(*C* H_3)$_3$	26.9	1.22 s (18H)	5', 11'	130.5	7.12 dd (2.2, 8.2) (2H)
5, 5a	68.0	5.50 d (4.1) (2H)	6', 12'	117.7	6.88 d (8.8) (2H)
6, 6a	58.8	5.64 dd (4.4, 8.8) (2H)			

^{1}H and ^{13}C chemical shifts were given in δ (ppm) downfield of TMS at 400 and 100 MHz, respectively.
Coupling constants in parentheses were given in Hz.
n.i. : Not identified

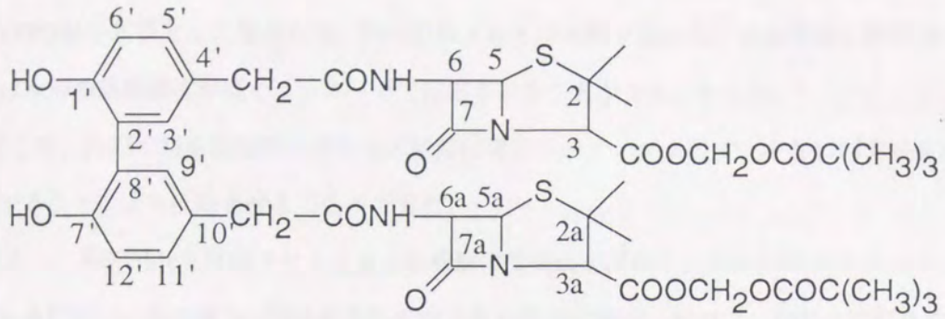


Fig. I-22. Structure of XPL-1

4．XPL-1の抗菌活性

XPL-1の最小発育阻止濃度（MIC）を調べた。抗菌活性の検定は、エステルを水解する為に豚肝臓由来のエステラーゼ（シグマ社製）を添加したMueller Hinton Broth（pH 7.0）での連続希釈法によって行なった。結果をTable I-5 に示す。2 量体であるXPL-1の抗菌活性は、検定菌の全てにおいて単量体であるペニシリンXよりも劣っていた。

Table I-5. Antibacterial activity of XPL-1, the assay carried out after the preincubation with hog liver esterase

Test organism	MIC (μg/ml)	
	PcX (Na)	XPL-1
Bacillus subtilis ATCC 6633	< 0.006	1.56
Staphylococcus aureus 209P	0.012	0.39
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228	3.13	50
Micrococcus luteus ATCC 9341	< 0.006	0.10
Escherichia coli K-12	6.25	> 100

5．要　約

（1）PcXPOMを基質とした場合には、PcXOMeよりも疎水性が高い為に有機溶媒と酵素液の２相系では水層の基質濃度が低くラッカーゼで反応させることができなかった。

（2）そこで、PcXPOMを反応器のガラスの壁面に薄くコーティングして、そこに酵素液を加えて振盪することにより反応させることができた。

（3）しかし、PcXOMeを反応させたときと生成物の生成比が異なり、オルト-オルトカップリング体であるXML-1に相当するXPL-1が主生成物であり他のXML-2、XML-3、XML-4に相当する産物の生成比は低かった。

（4）XPL-1はエステラーゼによってそのエステルが加水分解されペニシリンXの２量体に変換されて抗菌活性を示した。しかし、活性はペニシリンXよりも劣っていた。

第5節　考　察

PcXの２量体を酵素合成するために、はじめ基質としてPcXのナトリウム塩を用いた。PcXナトリウム塩はラッカーゼによって種々の抗菌物質に変換されたが、PcXのほとんどは抗菌活性のない重合産物まで重合が進んでしまった。また、生じた抗菌物質も不安定であった。この反応効率の悪さと生成物の不安定性をエステル体で反応させることによって解決することができた。PcXのラッカーゼによる酵素反応においてエステル体で反応させることの有利な点として、1）生じた２量体が疎水的であるために有機溶媒層または固形物として反応系外に除かれるので更に酵素による酸化を受けにくい。2）フェノール性化合物は反応性に富むので水との反応が予想されるが、先と同じ理由から生成物の水との副反応をできるだけ防げる。3）非水系で精製ができるので精製が容易である。4）保存において生成物が安定である。が挙げられる。ついでエステルをエステラーゼで加水分解することによって、目的とするPcX２量体が得られた。

Kazandjianらはクロロホルム中でラッカーゼ（アセトンパウダーあるいはガラスビーズに固定化した状態）によるフェノールの酸化反応を行うことにより、水溶液中で反応させるよりもフェノールの重合化が抑さえられ定量的なレギオ特異的水酸化反応が可能であることを報告している[34]。今回の実験からも重合化が抑さえられるという点で同様の結果を得た。水溶液と有機溶媒の２相系で酵素反応を行うことにより、重合反応が水溶液中で反応を行うよりも抑さえられ２量体の蓄積が見られた。２量体を酵素合成するにはこのように水溶液と有機溶媒の２相系で反応させるのが有効であることがわっかた。

PcXのようにフェノールのパラ位がアルキル基（ペナム骨格）によって置換されたフェノール化合物をラッカーゼの基質にした場合、Fig. I-2に示したように、ラッカーゼによるフェノール性水酸基からの水

素の引き抜きによって生じた不対電子は、酸素原子上のみならず芳香環上に広く非局在化し、特にオルト位とパラ位で電子密度が高いことが知られている[1)]。PcXOMeの２量体であるXML-1、2、3、4は、こうして生じたフェノオキシラジカル間のラジカル付加反応によって説明できる構造であった。XML-1は側鎖のフェノール基のオルト位（2'位）に不対電子を持つ２つのフェノオキシラジカルがラジカル付加して生じたと考えられる。よってXML-1はオルト-オルトカップリング生成体である。XML-2とXML-3はオルト位（8'位）とパラ位（4'位）にそれぞれ不対電子を持つフェノオキシラジカルがラジカル付加し、ついで7'位の水酸基がジエノン系の3'位に付加することによって生じたと考えられる。従って、XML-2とXML-3は3'炭素と4'炭素をキラル中心とするジアステレオマーである。XML-2とXML-3はオルト-パラカップリング生成体であると言える。XML-4は、フェノール基の酸素原子上とオルト位（2'位）のそれぞれに不対電子を持つフェノオキシラジカルがC-Oカップリングして生じたと考えられる。

ラッカーゼを用いた２量体の酵素合成のモデル化合物としてPcXを用いたが、この酸化酵素による２量体の合成は他のフェノール性化合物にも一般化できる酵素合成法である。PcXの酵素反応においてペナム骨格は酵素反応に関与しておらず、これを他のアルキル基に置き換えても同じカップリング様式の２量体の生成が期待できる。

PcXの２量体はいずれもPcXより抗菌活性が劣っていたが、PcXをモデル化合物に選んだ意義としては、化学的に不安定なペニシリンでも反応させうるほどこの酵素合成法の反応条件が温和であることを示すことができたこと、反応産物をその抗菌活性で追うことによって重合産物には抗菌活性がないことから種々の産物の中から２量体を効率的に見つけることができたこと、が挙げられる。

今後の課題として反応収率の改善がある。PcXの場合には２量体の生成がピークに達したところで反応を終了したが、未反応の基質が残っていた。収率はおよそ十数%であった。収率を上げるためには、実際に反応させる各々の基質について反応条件の最適化を検討する必要がある。

第II章　ラッカーゼによるβ-ラクタム抗生物質の酵素変換

序

第I章で述べたように、ペニシリンXをラッカーゼで反応させると抗菌活性を有する種々の反応生成物が生じた。しかし、生成物が不安定である為に構造決定には至らなかった。生成物が不安定である原因の1つは、基質のペニシリンX自体の不安定性にあるので、次にペニシリンより安定なセファロスポリンを基質にすることにした。そこで、ペニシリンX（6-(4-ヒドロキシフェニルアセトアミド)ペニシラン酸）と同じフェノール性側鎖（4-ヒドロキシフェニルアセトアミド）を有する7-(4-ヒドロキシフェニルアセトアミド)セファロスポラン酸（Fig. II-1）を基質にした。以後このセファロスポリンをセファロスポリンX（CepX）と呼ぶことにする。また別の試みとして、実際に臨床で使われているβ-ラクタム抗生物質の中から、フェノール性側鎖を有するラタモキセフ（Latamoxef）[35, 36]（Fig. II-1）を選びラッカーゼの基質とした。

本章では、第1節にセファロスポリンXを基質とした反応条件の検討の結果、変換率の高い反応条件を見いだし、生成物の単離精製、構造決定を行ない生成物がスピロ-エポキシド構造体であることを明らかにする。第2節では、ラタモキセフを基質にして反応させた結果、脱炭酸反応産物が得られたことについて述べる。

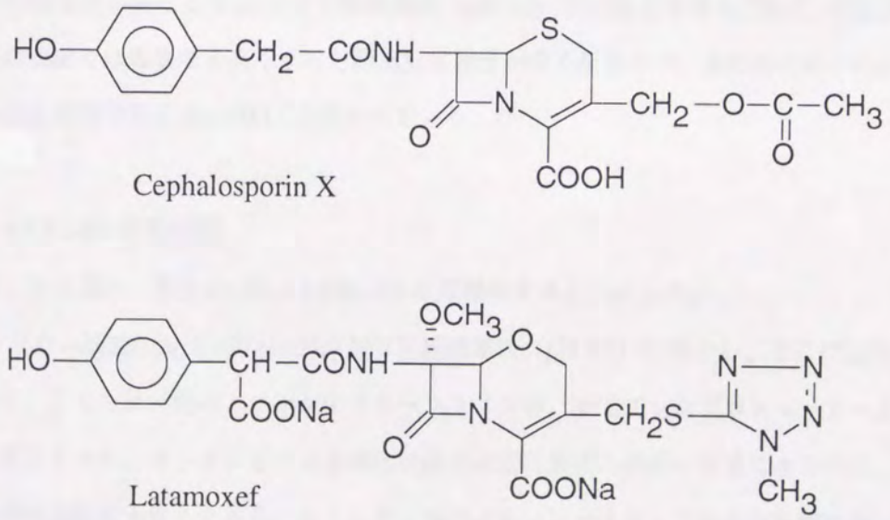


Fig. II-1.　Structures of Cephalosporin X and Latamoxef.

第1節　ラッカーゼによるセファロスポリンXの酵素変換

1．実験材料と実験方法

ラッカーゼは、第Ⅰ章と同様に*Coriolus versicolor* IFO 9791の培養液より精製した酵素を用いた。ラッカーゼ酵素液の蛋白質濃度は1.3 mg/mlであった。基質の7-(4-ヒドロキシフェニルアセトアミド)セファロスポラン酸（CepX）の合成法は、後述する合成法（4）に述べる。

実験方法は第Ⅰ章と同じである。

2．酵素反応条件の検討

第Ⅰ章で述べたPcXの場合と同様に、CepXをリン酸緩衝液（pH 6.0）に低濃度（1～2 mg/ml）で溶かし、ラッカーゼを添加して30℃で反応させるとPcXのときと同様な反応生成物が生じることがHPLC分析よりわかった。

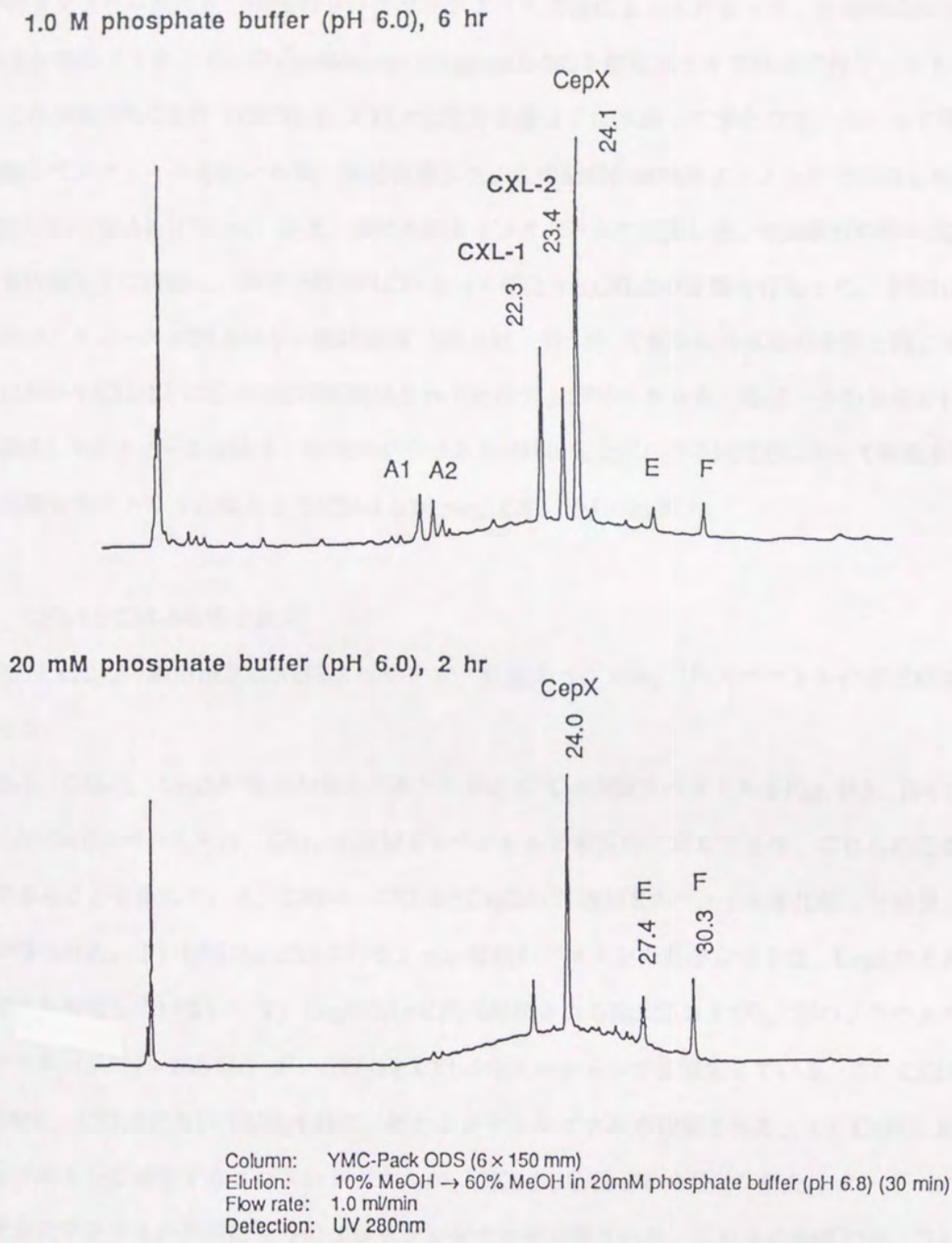
しかし、第Ⅰ章で述べたようにPcXのラッカーゼによる変換の問題点の1つは、反応産物の生成率が低いことにあるので、CepXの酵素変換においてもこの点を解決しなければならない。そこで、反応時間、基質濃度、酵素濃度、緩衝液のpH、緩衝液の塩濃度等についての検討を行なった。その結果、緩衝液の塩濃度を高くすることによって、第Ⅰ章の第2節で述べたPcXの反応産物C、Dに相当する生成物が蓄積しやすいことがわかった。これらの生成物をそれぞれCXL-1、CXL-2と名付けた。

Fig. II-2に示すように20 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）で反応させるとCXL-1、CXL-2はほとんど生じないが、緩衝液の塩濃度を高くして1.0 Mリン酸緩衝液（pH 6.0）で反応させるとCXL-1、CXL-2が生じるのがわかる。この実験では塩濃度を高くすると酵素反応速度が遅くなるので、比較のためにCepXの残存量がほぼ等しい反応時間で反応液のHPLC分析を行なった。

3．CXL-1とCXL-2の単離精製

生成物の内、生成量の一番多いCXL-1とCXL-2を単離精製することにした。

CepXのナトリウム塩320 mgを250 mlの1.0 Mリン酸緩衝液（pH 6.0）に溶かし、そこに3.25 mgのラッカーゼを加えて、2リッター容のエルレンマイヤーフラスコ中、30℃でレシプロシェーカー上でゆっくり振盪しながら反応させた。ラッカーゼによる酸化反応では溶存酸素の供給が律速になるので、なるべく空気と反応液の接触面積を大きくする為に2リッター容のエルレンマイヤーフラスコを用いた。反応開始後7時間で、CXL-1とCXL-2の生成量がほぼ最大に達し反応を終えた。



Column: YMC-Pack ODS (6 × 150 mm)
Elution: 10% MeOH → 60% MeOH in 20mM phosphate buffer (pH 6.8) (30 min)
Flow rate: 1.0 ml/min
Detection: UV 280nm

Fig. II-2. HPLC analysis of the reaction mixture of CepX.

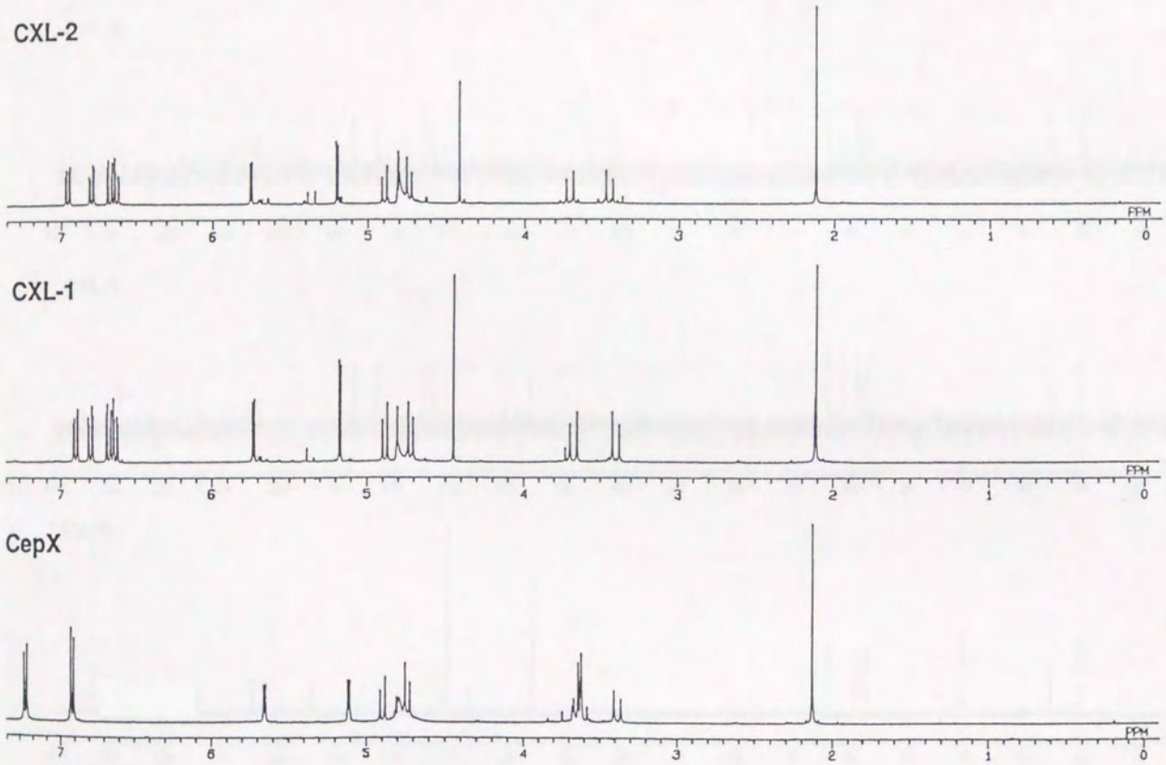
反応液を0.45 μm径のフィルターで濾過した後、50 mlづつ5回に分けてそのままポンプ側から分取HPLCカラムに通塔し、反応生成物をカラムに吸着させた。分取HPLC条件は、カラムはYMC-Pack ODS

S-343-15（2 ϕ×25 cm）を用い、溶出は流速7.0 ml/minで1時間にわたる20 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）中でのメタノール濃度0～60%のリニアグラジエント溶出によって行なった。生成物の検出はUV280 nmの吸収と溶出フラクションの*Comamonas terrigena* B-996を検定菌とする抗菌活性アッセイにより行なった。この分取HPLC条件ではCXL-1、CXL-2は充分分離せずに溶出して来たので、合わせて分取し減圧下に濃縮してメタノールを除いた後、凍結乾燥した。この凍結乾燥物をメタノールで充填したSephadex LH-20カラム（2.5 ϕ×70 cm）の上に乗せそのままメタノールで溶出した。抗菌活性物質の溶出フラクションを集め減圧下に濃縮し、再び分取HPLCによってCXL-1とCXL-2の分離を行なった。分取HPLC条件は、移動相がメタノール／20 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）（2 : 8）である以外は先の条件と同じである。この条件においてCXL-1とCXL-2の保持時間はそれぞれ60分、77分であった。各ピークの分取を行ない、減圧下に濃縮してメタノールを除き、移動相が水である以外は先と同じ分取HPLCによって脱塩を行なった後、凍結乾燥してナトリウム塩としてCXL-1を16 mg、CXL-2を18 mg得た。

4．CXL-1とCXL-2の構造決定

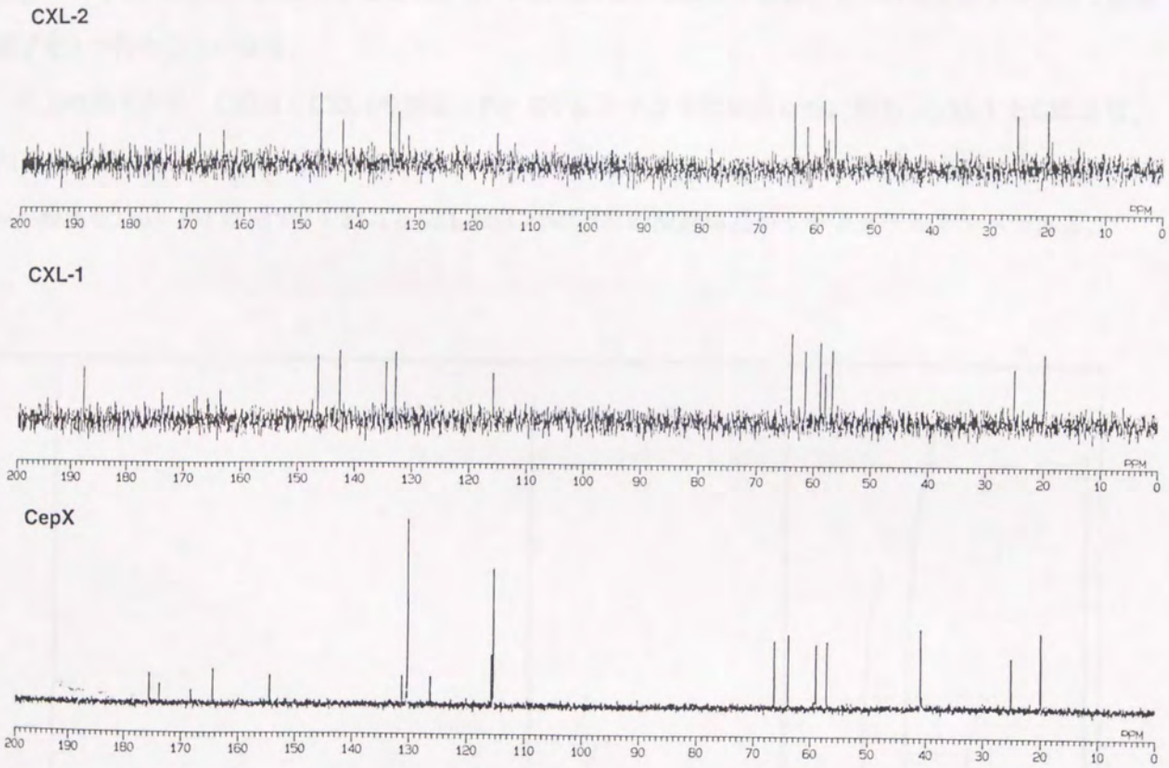
CXL-1とCXL-2の構造決定はNMRスペクトル、質量スペクトル、UVスペクトルの測定結果に基づいて行なった。

CXL-1, CXL-2, CepXの^{1}H-NMRスペクトルおよび^{13}C-NMRスペクトルをFig. II-3、II-4に示す。CXL-1のNMRスペクトルは、CXL-2のNMRスペクトルと本質的に同じであり、これらの化合物が立体異性体であることを示している。CXL-1、CXL-2とCepXの^{1}H-NMRスペクトルを比較した結果、次のような知見が得られた。1）CXL-1とCXL-2のセフェム骨格のプロトンの化学シフトは、CepXのそれと本質的に同じであり変化していない、2）CepXのAr-CH_2に帰属されるδ_H 3.55およびδ_H3.59の2つのメチレンプロトンシグナル（共にJ = 16.3 Hz）が、CXL-1とCXL-2のスペクトルでは消失している、3）CXL-1においてはδ_H 4.44に、CXL-2においてはδ_H 4.41に、新たにメチンシグナルが観察される、4）CepXにおける4つの芳香族プロトンに対応するプロトンシグナルが、CXL-1とCXL-2では消失し新たにオレフィンプロトンに相当する化学シフトの位置に4つのプロトンシグナルが観察される。これらの知見の内、2）と3）よりCepXの側鎖のメチレンプロトンAr-CH_2の内1つがなくなり、4）よりそれに伴いフェノールからキノン様の構造に変化したことがわかる。更に、UVスペクトルにおいて、CepXは水溶液中で224 nmと263 nmに極大吸収が、280 nmに肩吸収が見られるが、CXL-1、CXL-2においては253 nmの吸収のみであった。この結果からも、CepXにおけるフェノール部分がCXL-1、CXL-2ではなくなっていることを示唆している。



(400 MHz, D_2O)

Fig. II-3. ^{1}H-NMR spectra of CXL-1, CXL-2, and CepX.



(100 MHz, D_2O)

Fig. II-4. ^{13}C-NMR spectra of CXL-1, CXL-2, and CepX.

高速原子衝撃マススペクトル（Fast Atom Bombardment Mass Spectrum、FAB-MS）の測定によってCXL-1とCXL-2の分子量を求めようとしたが、分子イオンピークが観察されなかった。そこで、CXL-1とCXL-2をそれぞれ酢酸エチル中でジアゾメタンと反応させメチルエステルに変換した。CXL-1のメチルエステル体の^{1}H-NMRスペクトルをFig. II-5に示す。CXL-1とCXL-2のメチルエステル体は、FAB-MSの測定でm/z 435 $(M+H)^+$と433 $(M-H)^-$に分子イオンピークが観察されたことより分子量が434であることがわっかた。CXL-1のメチルエステル体のFAB-MSをFig. II-6に示す。更に、高分解能FAB-MSの測定よりCXL-1の分子式を$C_{19}H_{18}N_2O_8S$と決定した（測定値、m/z 435.0848 $(M+H)^+$；計算値、m/z 435.0862）。CepXの分子式が$C_{19}H_{20}N_2O_7S$であることから、CXL-1のメチルエステルは、2つの水素原子を失って酸素原子を1つ得たことになる。

以上の結果から、CXL-1とCXL-2の構造をFig. II-7に示すように決定した。即ち、CXL-1とCXL-2は、7-[1-oxaspiro (2.5) octa-6-oxo-4, 7-diene-2-carboxamido]cephalosporanic acidである。各プロトンとカーボンの帰属をTable II-1に示す。CXL-1とCXL-2はC-2'の周りの配置に基づくジアステレオマーである。

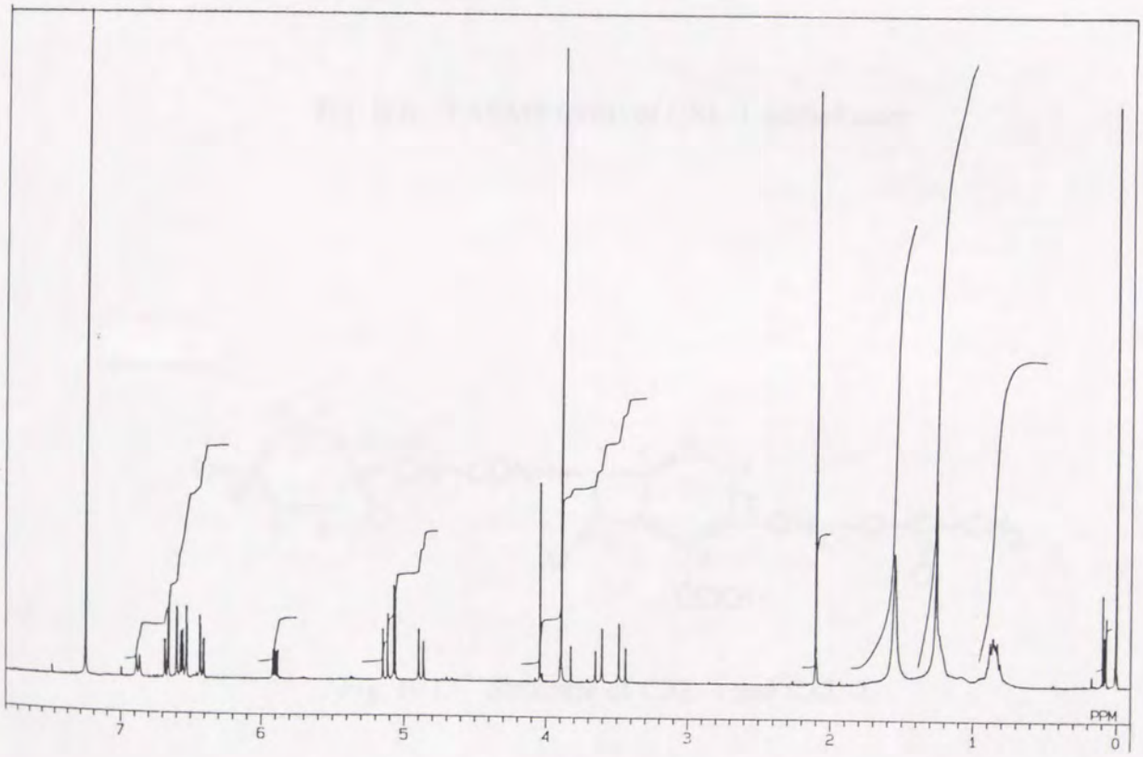


Fig. II-5. ^{1}H-NMR spectrum of CXL-1 methyl ester. (400 MHz, $CDCl_3$)

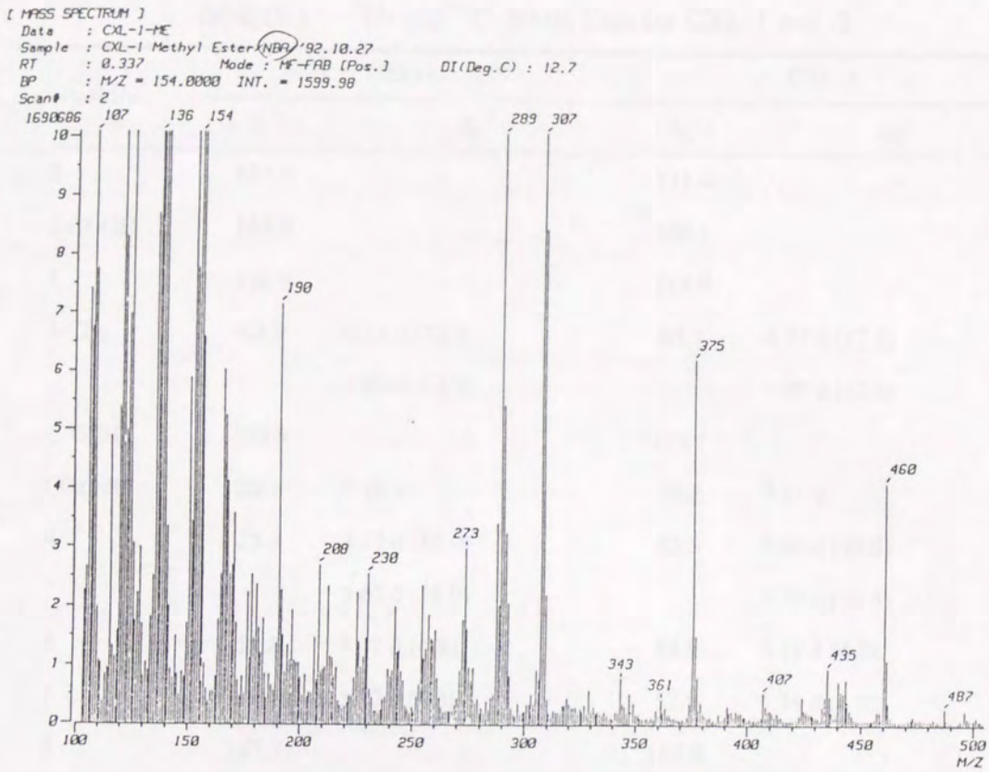


Fig. II-6. FABMS (posi) of CXL-1 methyl ester.

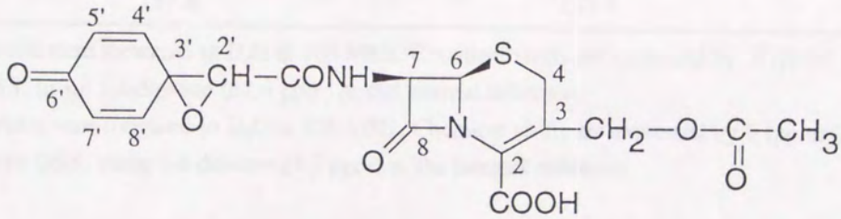


Fig. II-7. Structure of CXL-1 and CXL-2.

Table II-1. ^{1}H- and ^{13}C- NMR Data for CXL-1 and -2

Position	CXL-1		CXL-2	
	δ_C [a]	δ_H [b]	δ_C [a]	δ_H [b]
2	131.2	-	131.4	-
2-COOH	165.9	-	166.1	-
3	116.0	-	115.9	-
3-CH_2	63.9	4.71 d (12.5)	64.1	4.73 d (12.5)
		4.88 d (12.5)		4.89 d (12.5)
C OCH_3	173.9	-	174.1	-
CO*C* H_3	20.1	2.10 s	20.2	2.11 s
4	25.3	3.39 d (18.0)	25.5	3.44 d (18.0)
		3.67 d (18.0)		3.70 d (18.0)
6	58.8	5.17 d (4.8)	58.9	5.19 d (4.8)
7	56.7	5.72 d (4.8)	57.0	5.74 d (4.8)
8	163.7	-	163.8	-
CONH	167.8	-	168.0	-
2'	61.5	4.44 s	61.8	4.41 s
3'	58.0	-	58.1	-
4', 8'	142.8	6.79 dd (10.3, 2.9)	143.0	6.79 dd (10.3, 2.9)
	146.6	6.89 dd (10.3, 2.9)	146.8	6.95 dd (10.3, 2.9)
5', 7'	133.0	6.62 dd (10.3, 2.2)	133.1	6.64 dd (10.3, 2.2)
	134.7	6.67 dd (10.3, 2.2)	134.7	6.67 dd (10.3, 2.2)
6'	187.8	-	187.9	-

a Spectra were measured in D_2O at 100 MHz. Chemical shifts are expressed by δ (ppm) from DSS, using 1,4-dioxane (67.4 ppm) as the internal reference.

b Spectra were measured in D_2O at 400 MHz. Chemical shifts are expressed by δ (ppm) (J = Hz) from DSS, using 1,4-dioxane (3.7 ppm) as the internal reference.

5．CXL-1とCXL-2の抗菌活性

CXL-1とCXL-2の最小発育阻止濃度（MIC）の検定は、Mueller Hinton Broth（pH 7.0）を用いた連続希釈法によって行なった。結果をTable II-2 に示す。興味深いことにCXL-2はCXL-1よりもグラム陽性細菌および*E. coli* NIHJ株に対して10～30倍抗菌活性が高かった。しかしながら、CXL-2の抗菌活性は、parent compoundであるCepXの抗菌活性よりも全ての検定菌において低かった。

Table II-2. Antibacterial Activity of CXL-1, CXL -2, and CepX

Test organism	MIC (μg/ml)[a]		
	CepX	CXL-1	CXL-2
Micrococcus luteus ATCC 9341	0.024	6.25	0.39
Staphylococcus aureus 209P	0.20	6.25	0.78
Bacillus subtilis ATCC 6633	0.024	6.25	0.20
Escherichia coli NIHJ	1.56	100	3.13
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	12.5	>100	50
Pseudomonas aeruginosa IFO 3445	>100	>100	>100
Serratia marcescens IFO 3736	>100	>100	>100
Proteus vulgaris GN 76	>100	>100	>100

[a] Mueller-Hinton broth dilution method; 10^5 cfu/ml.

6．要　約

第I章において述べたように、ペニシリンXナトリウム塩をラッカーゼで反応させた時の問題点は、1）反応生成物が不安定である、2）反応生成物の生成比が低い、ということであった。そこでその対策として、1）に対しては、基質としてペニシリンより安定なセファロスポリンであるCepXを用いる、2）に対しては、生成比の高い反応条件（反応液の塩濃度を高くする）で酵素反応を行なう、ということで問題点の解決をはかった。その結果、2つの反応生成物CXL-1とCXL-2を得た。これらの物質は、HPLCの分析パターンより先のペニシリンXの反応産物CとDに相当する物質であると予想される。構造解析の結果、これらの物質は2量体ではなくスピロ-エポキシド構造体であった。CXL-1 とCXL-2 はジアステレオマーの関係にあり、CXL-1 の方が抗菌活性が高かった。

第2節　ラッカーゼによるラタモキセフの酵素変換

ラタモキセフは、最初に臨床で使用された合成法による非天然型β-ラクタム抗生物質で第3世代セファロスポリンに属し、現在も広く臨床で使用されている。その側鎖にフェノール部分を有することから、これまでのペニシリンXやセファロスポリンXと同様にラッカーゼによる酵素変換が期待された。

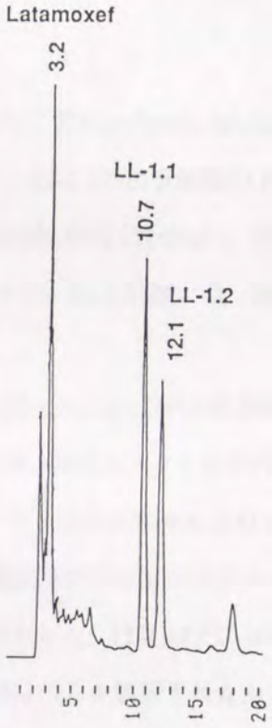
1．実験材料と実験方法

ラッカーゼは、第I章と同様に*Coriolus versicolor* IFO 9791の培養液より精製した酵素（蛋白質濃度、1.3 mg/ml）を用いた。ラタモキセフは、塩野義製薬（株）製のシオマリン®静注用（シオマリンはラタモキセフの商品名）を用いた。使用したラタモキセフは、7β位の側鎖の立体の違いによる2つのジアステレオマーの混合物である。

実験方法は、第I章と同じである。

2．酵素反応条件の検討

先のセファロスポリンXの酵素変換と同様に、50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）にラタモキセフを溶かし、そこにラッカーゼを添加して30℃で反応を行なった。先の酵素反応では、基質濃度が高いと重合産物が生じHPLC分析でピークとして検出できる生成物が生じなっかたが、ラタモキセフの酵素反応では基質濃度にかかわらずピークとして検出できる反応生成物が生じた。Fig. II-8に反応液のHPLC分析チャートを示す。酵素反応の進行とともに保持時間3.2分のラタモキセフのピークが減少していき、それに連れて保持時間10.7分、12.1分、17.8分に新たなピークが生じた。これらのピークを分取して抗菌活性をアッセイした結果、前の2ピークが抗菌活性を有していた。そこで、保持時間10.7分の生成物をLL-1.1、保持時間12.1分の生成物をLL-1.2と名付けた。



Column: YMC-Pack ODS (6×150mm)
Elution: 15%MeOH in 50mM phosphate buffer (pH 6.8)
Flow rate: 1.0 ml/min
Detection: UV 270 nm

Fig. II-8. HPLC analysis of the reaction mixture of latamoxef.

3．反応生成物LL-1.1、LL-1.2の単離精製

500 mgのラタモキセフナトリウムを100 mlの20 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）に溶かし、そこに1.3 mgのラッカーゼを添加して500 ml容のビーカ中で攪拌しながら28℃で16時間反応させた。生成物の生成量が最大に達したところで反応を終了し、反応液をそのまま凍結乾燥した。

得られた凍結乾燥物を少量の水に溶かしてから分取HPLCによってLL-1.1とLL-1.2の単離精製を行なった。分取HPLC条件は、カラムはYMC-Pack ODS S-343-15（2 ϕ×25 cm）、移動相はメタノール／20 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）（16 : 84）、流速は7.0 ml/min、検出はUV 280 nmで行なった。LL-1.1とLL-1.2のピークをそれぞれ分取して減圧下に濃縮してメタノールを除き、移動相が水である以外は先の分取HPLCと同じ条件でそれぞれの濃縮画分の脱塩を行なった後、凍結乾燥を行ない、ナトリウム塩としてLL-1.1を42 mg、LL-1.2を62mg得た。

4．LL-1.1とLL-1.2の構造決定

構造決定はMSスペクトルとNMRスペクトルによって行なった。

LL-1.1とLL-1.2の高速原子衝撃マススペクトル（FAB-MS）の測定より、共にm/z493 $(M+H)^+$と491 $(M-H)^-$の分子イオンピークが観察され、分子量を492と決定した。更に、LL-1.1の高分解能FAB-MSの測定より、分子式が$C_{19}H_{19}O_8N_6SNa$であることがわかった（測定値：m/z515.0951 (M+Na)+、計算値：m/z515.0961）。ラタモキセフの分子式が$C_{20}H_{18}O_9N_6SNa_2$であることから、LL-1.1はC、O、Naをそれぞれ1つずつ失い、Hを1つ得た物質であることがわかった。

LL-1.1の^{1}H-NMRスペクトルはLL-1.2のそれと本質的に同じであり、LL-1.1とLL-1.2が立体異性体であることを示している。以後LL-1.1について構造解析を行なった。LL-1.1の^{1}H-NMRスペクトルをFig. II-9に示す。LL-1.1のオキサセフェム骨格におけるプロトンシグナルの化学シフトはラタモキセフの文献値と一致し、オキサセフェム骨格における変化は見られなかった。また、側鎖部分のプロトンシグナルの変化ではメチンプロトンAr-C*H*のδ_H 4.45からδ_H 5.14への低磁場シフトのみが見られた。LL-1.1の^{13}C-NMRスペクトルをFig. II-10に示す。LL-1.1では、カルボニルカーボンのシグナルが3つしか観察されなかった。ラタモキセフのカルボニルカーボンは4つあることから、LL-1.1ではカルボニルカーボンが1つなくなっていることを示している。LL-1.1では脱炭酸反応が起きていると考えられる。

最終的に、LL-1.1の全てのプロトンとカーボンは、Fig. II-11、Fig. II-12に示すようにHMBC（^{1}H-detected multiple-bond heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy）とHMQC（^{1}H-detected multiple quantum coherence spectroscopy）を含む2次元NMRスペクトルからFig. II-13に示

すようなカーボンとプロトン間の関係が見られ、Table II-3に示すように帰属された。LL-1.1とLL-1.2の化学構造をFig. II-14 に示すように決定した。

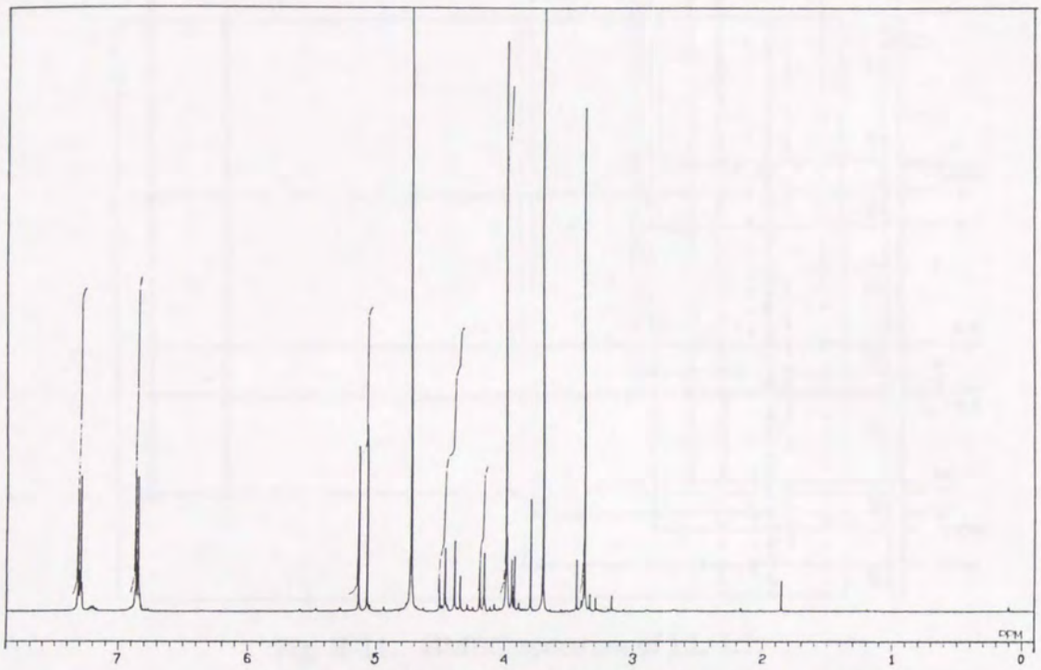


Fig. II-9. ^{1}H-NMR spectrum of LL-1.1. (400 MHz, D_2O)

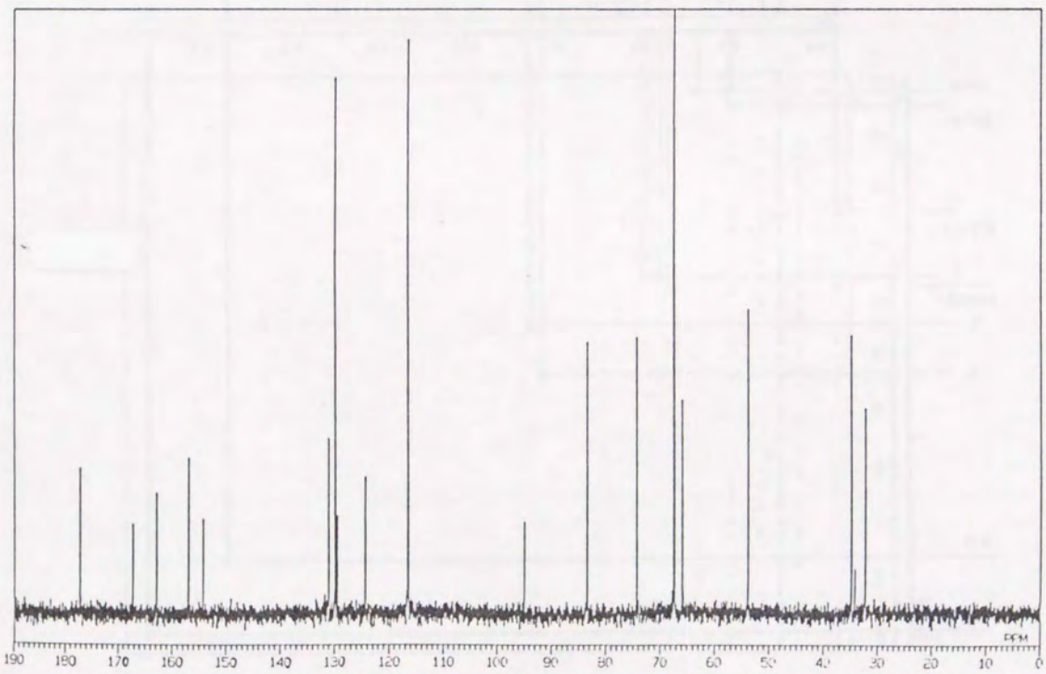


Fig. II-10. ^{13}C-NMR spectrum of LL-1.1. (100 MHz, D_2O)

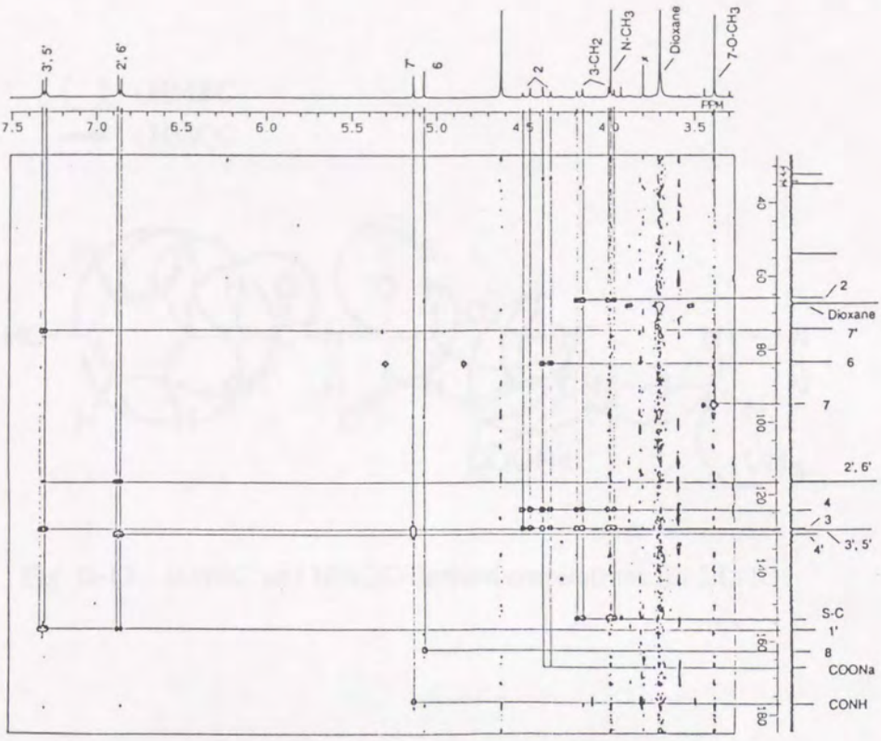


Fig. II-11. HMBC spectrum of LL-1.1.

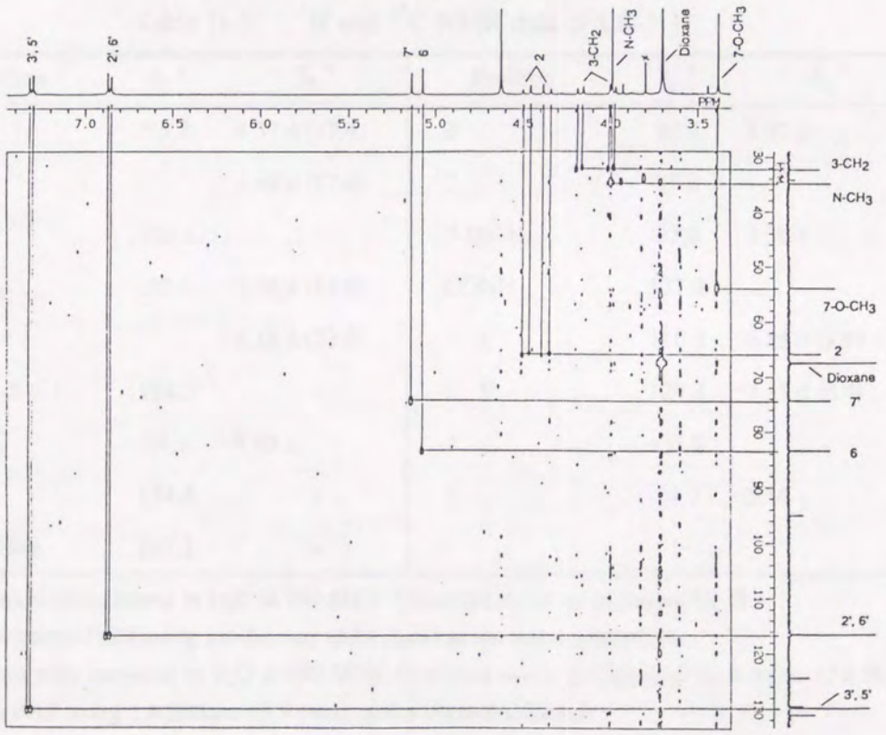


Fig. II-12. HMQC spectrum of LL-1.1.

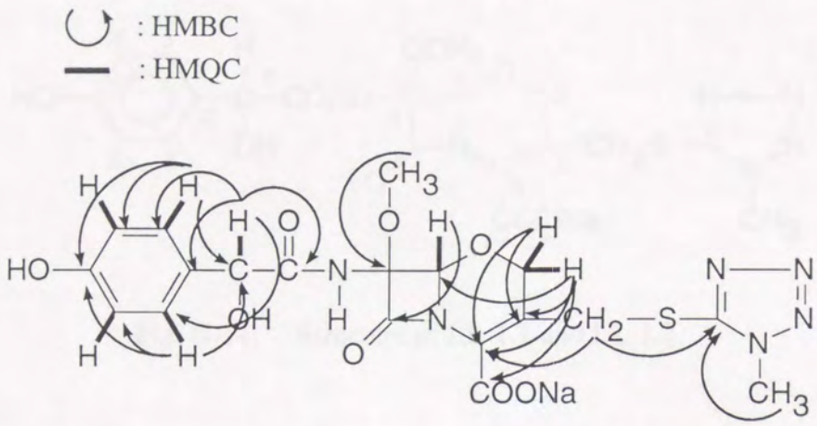


Fig. II-13. HMBC and HMQC-derived correlations for LL-1.1.

Table II-3. ^{1}H and ^{13}C NMR data of LL-1.1

Position	δ_C [a]	δ_H [b]	Position	δ_C [a]	δ_H [b]
2	65.8	4.37 d (17.4)	6	83.4	5.07 s
		4.48 d (17.4)	7	95.0	-
3	129.5	-	7-O*C* H_3	53.8	3.38 s
3-*C* H_2	32.3	3.96 d (13.6)	CONH	177.2	-
		4.18 d (13.6)	2', 6'	116.5	6.85 d (8.4)
3-CH_2-S-*C*	154.2	-	3', 5'	129.8	7.31 d (8.4)
N-CH_3	34.9	3.99 s	4'	131.0	-
4	124.4	-	7'	74.3	5.14 s
4-*C* OONa	167.2	-			

a Spectra were measured in D_2O at 100 MHz. Chemical shifts are expressed by δ (ppm) from DSS using 1,4-dioxane (67.4 ppm) as the internal reference.

b Spectra were measured in D_2O at 400 MHz. Chemical shifts are expressed by δ (ppm) (J = Hz) from DSS using 1,4-dioxane (3.7 ppm) as the internal reference.

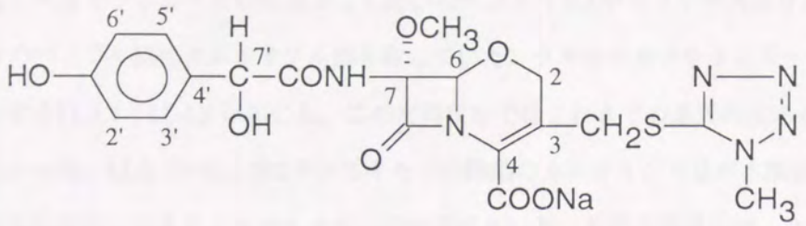


Fig. II-14. Structure of LL-1.1 and LL-1.2.

5．LL-1.1とLL-1.2の抗菌活性

LL-1.1、LL-1.2、ラタモキセフの抗菌活性をTable II-4 に示す。ラタモキセフは、グラム陽性菌のみならずグラム陰性菌に対しても幅広い抗菌スペクトルを示すが、LL-1.1、LL-1.2ではラタモキセフと比較してグラム陽性菌に対しては活性が高くなったもののグラム陰性菌に対しては活性が低くなった。特に、*Pseudomonas* では抗菌活性をほとんど示さなかった。

Table II-4. Antibacterial activity of LL-1.1, LL-1.2, and latamoxef

Test organism	MIC (μg/ml)[a]		
	Latamoxef	LL-1.1	LL-1.2
Micrococcus luteus ATCC 9341	0.39	0.05	0.39
Staphylococcus aureus 209P	3.13	0.39	1.56
Bacillus subtilis ATCC 6633	3.13	0.78	1.56
Escherichia coli NIHJ	0.39	1.56	0.39
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031	1.56	3.13	3.13
Pseudomonas aeruginosa IFO 3445	6.25	>100	>100
Serratia marcescens IFO 3736	3.13	100	50
Proteus vulgaris GN 76	6.25	6.25	12.5

[a] Muller-Hinton broth dilution method; 105 cfu/ml.

6．要　約

ラタモキセフはこれまでラッカーゼの基質として用いたペニシリンXやセファロスポリンXと異なり、側鎖のフェノールのベンジル位にカルボキシル基を有していた。ラタモキセフをラッカーゼで反応させると、抗菌活性を有するLL-1.1とLL-1.2が生じた。この変換反応ではこれまでの基質の反応と異なり重合産物があまり生じなかった。LL-1.1とLL-1.2はラタモキセフの側鎖のカルボキシル基が水酸基に置換わった物質で、7'位をキラル中心とするジアステレオマーの関係にあった。その抗菌活性は、ラタモキセフと比較してグラム陽性菌に対しては活性が高くなったが、グラム陰性菌に対しては活性が低くなった。

第3節　考　察

CepXをラッカーゼで反応させるとPcXのときと同様の反応産物が生じた。各生成物の生成率は、反応時間や反応条件により変わり、緩衝液の塩濃度を上げることによってCXL-1とCXL-2の生成率を上げることができた。CXL-1とCXL-2はそれぞれPcXのラッカーゼによる反応産物CとDに相当する物質であると予想される。セファロスポリンはペニシリンよりも化学的に安定であるので、今回、産物を精製し構造を決定することができた。CXL物質は2量体ではなく7-[1-oxaspiro(2.5)octa-6-oxo-4,7-diene-2-carboxamide] cephalosporanic acidで表わされるスピロ-エポキシド構造体であった。水酸基に対してパラ位に不対電子を持つフェノオキシラジカルが非酵素的な反応ステップを経て生成したと考えられる。エポキシド環の酸素原子は水分子に由来すると考えられることから、水の付加反応が起きたと予想される。

LL-1.1とLL-1.2は、ベンジル位のカルボキシル基が水酸基に置き換わった脱炭酸反応産物であった。一般的にカルボニル基のα結合は不対電子によって解裂を受けやすいことから、ラッカーゼによるフェノール性水酸基からの水素原子の引き抜きにより生じた不対電子がパラ位に移動し、カルボキシル基のα結合を解裂させ生じた2重結合に水が付加してLL-1.1とLL-1.2が生じたと考えられる。

これまでのPcXやCepXのラッカーゼによる酸化反応では、ラジカル付加反応の進行により重合産物が生じたが、ラタモキセフの反応ではそういった重合産物の生成がほとんど見られなっかた。これはラッカーゼによる酸化反応で生じた不対電子が脱炭酸反応によって化合物から消失していく場合には、ラジカル付加反応が起きにくいいことを意味している。

CXL物質およびLL物質ともに、その生成に水の付加反応が関与していると考えられる。そのため、これらの酵素反応では当初目的とした2量体の生成は確認できなかった。生成していたとしても、おそらく生成率がかなり低いと予想される。やはり、2量体を得るためには第I章で述べたように水との反応を防ぐために、エステル体にして有機溶媒との2相系で反応させた方が効率的である。

第III章　ラッカーゼ及びビリルビンオキシダーゼによる新規な酸化的脱炭酸反応の発見

序

ラッカーゼによるフェノール化合物の酸化反応では、ラッカーゼはフェノール性水酸基からの水素の引き抜きによりフェノオキシラジカルが生じる酸化反応を触媒する。次いで非酵素的にフェノオキシラジカル間でラジカル反応が起こり、最終的に様々な反応生成物が生じる。それ故、これまでラッカーゼによる酸化反応では単一の生成物が生じる反応は見いだされていない。

著者はラタモキセフのようにフェノールのベンジル位にカルボキシル基を有している化合物をラッカーゼで反応させると、生じた不対電子によってカルボキシル基のα-結合が解裂されラジカルが化合物から遊離していくために、通常起こるフェノオキシラジカル間のラジカル付加反応が起こらないのではないかという考えを第II章で述べた。著者はこの脱炭酸反応に注目し、単一の生成物が生じるラッカーゼによる酸化反応の探索を行なった。

この章では、まず、カルボキシル基を有する種々のフェノール化合物についてラッカーゼによる酸化反応を検討した結果、2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシンと4-ヒドロキシマンデル酸が、単一の反応産物として4-ヒドロキシベンズアルデヒドに変換される新規な脱炭酸反応を発見したことを述べ、次に、他の酸化酵素についても検討した結果、ビリルビンオキシダーゼとセルロプラスミンにおいても同様の脱炭酸反応を見いだしたことについて述べる。更に、この酸化的脱炭酸反応を用いたこれらの酸化酵素の活性測定法の開発を行なった。

第1節　実験材料と実験方法

1．実験材料

ラッカーゼは*Coriolus versicolor* IFO 9791の培養液よりFåhraeusらの方法[31]によって精製した酵素を用いた。ラッカーゼの蛋白質濃度は、Bio-Rad社製のプロテインアッセイキットを用いて牛血清アルブミンを標準としてBradfordの方法[32]により求めた。使用したラッカーゼの蛋白質濃度は1.3 mg/mlであった。マッシュルーム起源のチロシナーゼ（EC 1.14.18.1）、西洋ワサビ起源のペルオキシダーゼ（EC 1.11.1.7）、キュウリ起源のアスコルビン酸オキシダーゼ（EC 1.10.3.3）、ヒト起源のセルロプラスミン（EC 1.16.3.1）はシグマ社製の酵素を用いた。ビリルビンオキシダーゼ（EC 1.3.3.5）は、*Trachyderma*

*tsunodae*由来[37] は宝酒造（株）製の酵素を、*Myrothecium verrucaria*由来[38-42] は天野製薬（株）製の酵素を用いた。

D-2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン（以後、HPGと略記する）、4-ヒドロキシベンズアルデヒド（以後、HBAと略記する）は、東京化成（株）製の特級試薬を用いた。なお、HPGはD体しか市販されていない。DL-4-ヒドロキシマンデル酸（以後、HMAと略記する）は、シグマ社製の特級試薬を用いた。他の試薬はいずれも特級を用いた。

2．実験方法

1）ラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼの活性測定

ラッカーゼ及びビリルビンオキシダーゼの活性測定は、本章において開発された以下の方法で行なった。測定原理については後述する。

50 mMの緩衝液に溶かした50 mMのHMAを基質溶液とし、基質溶液1 mlに酵素液を10 μl添加して30 ℃に保温した。緩衝液としては、ラッカーゼの活性測定には酢酸緩衝液（pH 4.5）を、*Trachyderma tsunodae*由来ビリルビンオキシダーゼの活性測定には酢酸緩衝液（pH 5.0）を、*Myrothecium verrucaria*由来のビリルビンオキシダーゼの活性測定にはホウ酸緩衝液（pH 8.5）を用いた。反応開始後、経時的に（例えば20、30、60秒など）反応液から100 μlをサンプリングして、それを2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン水溶液（2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンを1 N塩酸に飽和させ、それを水で20倍に希釈して調製する）2.8 mlに加え、室温で10分放置後、更に100 μlの5 NNaOHを添加して発色させた。その後、分光光度計で475 nmの吸光度を測定し、HBAの検量線からHBAの生成量の定量を行なった。酵素活性はHBAの生成速度（mM/min）で表わした。酵素単位（U）は、上記の反応条件で1分間に1 μmolのHBAを生成する酵素量を1単位とした。

2）HPLC分析

酵素反応の生成物はHPLCによって分析した。分析条件は、カラムはYMC-Pack ODS A-312（4.6 ϕ × 150 mm）を用い、溶出は30分にわたる20 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）中におけるメタノール濃度の10%～60%へのリニアグラジエント溶出で行ない、流速は0.5 ml/minであった。生成物の検出は、フォトダイオードアレイ検出器（ウォーターズ製991J型）を用いて190 nmから400 nmにわたる波長スキャンによって行なった。

反応液中のHMA、HPG、HBAの定量分析の条件は、移動相にメタノール／20 mMリン酸緩衝液（pH

6.8）（4：6）を用い検出はUV280 nmで行なう以外は、先の条件と同じであった。

反応液中の炭酸水素イオン、アンモニウムイオンのHPLCによる定量分析は次のように行なった。炭酸水素イオンは、カラムはShim-pack PA-QA（8 ϕ×100 mm）を用い、カラム温度は40℃、移動相は2 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.8）、流速は1.0 ml/minで行なった。アンモニウムイオンは、カラムはShim-pack PA-SP（8 ϕ×100 mm）を用い、移動相は5mM硝酸を用い、他は先と同じ条件で行なった。検出はいずれも島津製CDD-6A型電気伝導度検出器を用いた。

第2節　ラッカーゼによる新規な酸化的脱炭酸反応の発見

本節では、ラッカーゼによって単一の生成物が生じる酸化的脱炭酸反応の発見の経緯について述べる。

1．単一の生成物が生じる基質の探索

カルボキシル基を有する種々のフェノール性化合物をラッカーゼの基質とし、酵素反応液をHPLCで分析して単一の生成物が生じる基質の探索を行なった。

Fig. III-1に示すように、カルボキシル基がフェノールの芳香族環から7位（ベンジル位）の炭素に結合した化合物（HO-Ar-CH-COOH）の他にも、芳香族環から8位の炭素に結合した化合物（HO-Ar-CH_2-CH-COOH）、芳香族環に直接結合した化合物（HO-Ar-COOH）についても検討した。これらの化合物を50ｍＭリン酸緩衝液（pH6.0）に10ｍＭになるように溶かし、そこにラッカーゼを添加して30℃に保温した。反応液をフォトダイオードアレイ検出器を付けたHPLCで分析して、基質のピークの減少と新たなピークの生成について検討した。

Table III-1に結果を示すように、HPGとHMAのみが単一の生成物に変換され、他の化合物では複数の生成物が生じた。HPGとHMAの反応生成物のピークの保持時間が同じことから、HPGとHMAは同じ物質に変換されたと考えられた。複数の生成物が生じる酸化反応においては、ラジカル付加反応によって基質の様々な重合体が生じたと考えられる。なお、4-ヒドロキシ安息香酸は、ほとんど反応しなかった。これらの結果より、単一の生成物が生じる基質の条件としては少なくとも、1）7位にカルボキシル基が存在する（8位にカルボキシル基が存在するチロシンでは複数の生成物が生じる）、2）7位に水酸基もしくはアミノ基が存在する（どちらの基も存在しない4-ヒドロキシフェニル酢酸では複数の生成物が生じる）、3）フェノールの水酸基に対してパラ位に置換基が存在する（3-ヒドロキシマンデル酸では複数の生成物が生じる）、の条件を全て満たす必要があると言える。

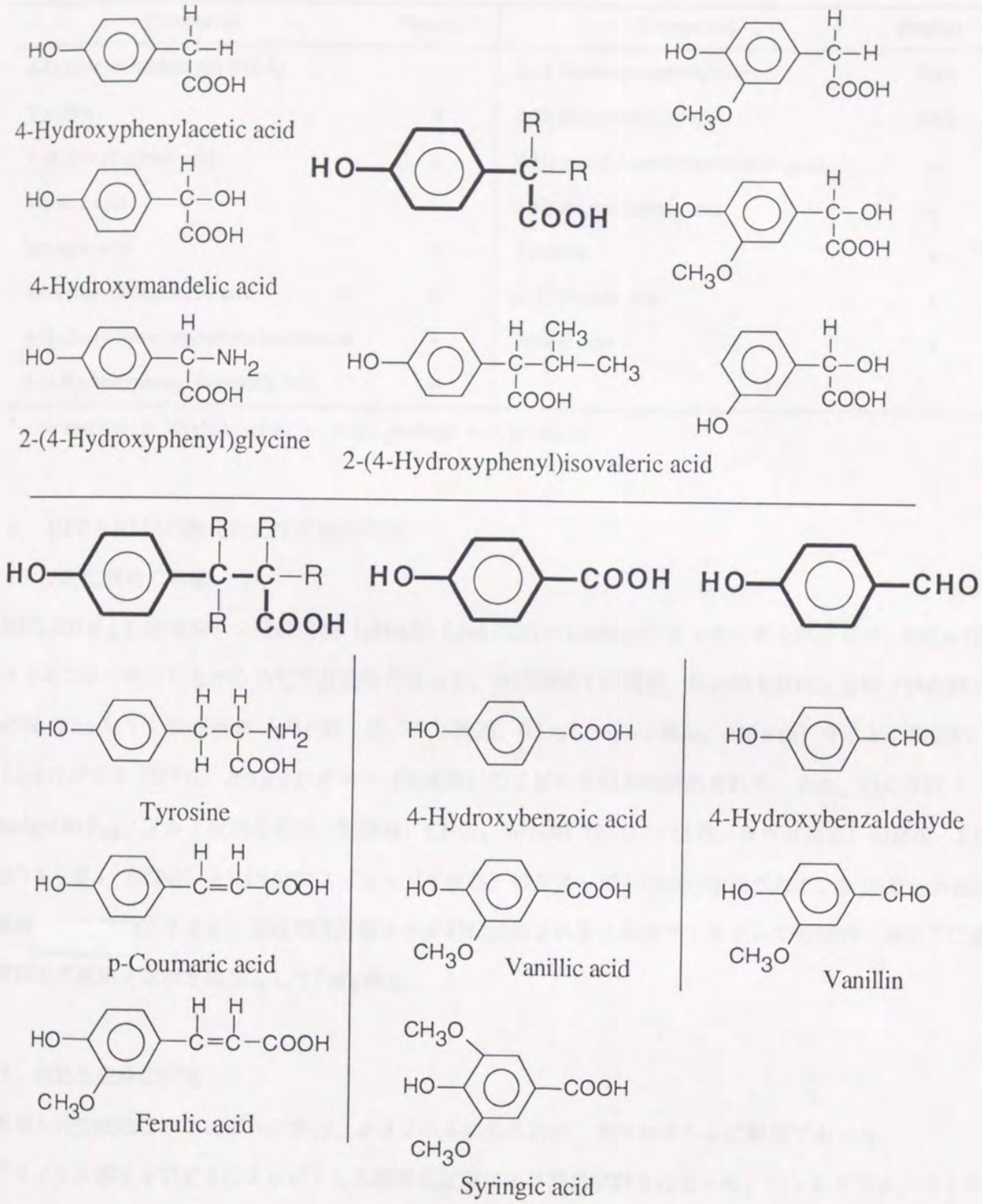


Fig. III-1. Structures of phenolic compounds used as a substrate of laccase.

Table III-1. Oxidations of phenolic compounds by laccase

Compound	Product [a]	Compound	Product [a]
4-Hydroxybenzaldehyde (HBA)	-	2-(4-Hydroxyphenyl)glycine	HBA
Vanillin	+	4-Hydroxymandelic acid	HBA
4-Hydroxybenzoic acid	±	4-Hydroxy-3-methoxymandelic acid	+
Vanillic acid	+	3-Hydroxymandelic acid	+
Syringic acid	+	Tyrosine	+
4-Hydroxyphenylacetic acid	+	*p*-Coumaric acid	+
4-Hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid	+	Ferulic acid	+
2-(4-Hydroxyphenyl)isovaleric acid	+		

[a] -, no reaction; ±, slight reaction; +, many products were produced.

2．HPGとHMAの酸化反応生成物の同定

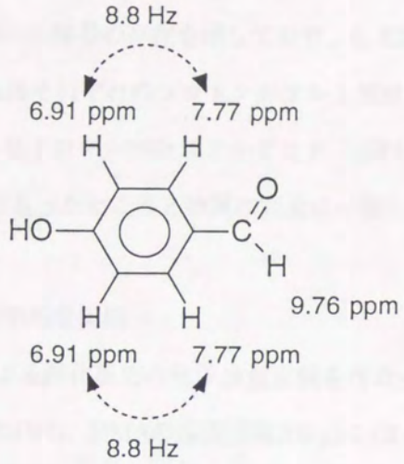
1）反応生成物の単離

HPG 200 mgを50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）50 mlに溶かし250 μlのラッカーゼを添加して、500 ml容のフラスコ中で撹拌しながら25℃で反応を行なった。反応開始7時間後、反応液をHPLC分析（移動相、MeOH／20mMリン酸緩衝液（pH 6.8）（3:7）；流速、0.5 ml/min；検出、280 nm）すると、保持時間2.8分のピーク（HPG）と9.8分のピーク（生成物）の2ピークのみが検出された。また、TLC分析（Kieselgel 60 F_{254}、メルク社製を使用；展開液、$CHCl_3$／MeOH（2:1）；発色、ヨウ素蒸気）の結果、Rf 0.03のスッポト（HPG）とRf 0.87のスポット（生成物）の2スッポトのみが検出された。反応液を50 mlの酢酸エチルで抽出すると、生成物は酢酸エチル層に抽出され無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下に濃縮乾固して反応生成物を純品として7 mg得た。

2）反応生成物の同定

単離した生成物は水にわずかに溶け、メタノールに良く溶け、クロロホルムに難溶であった。

メタノール溶液をTLC上にスッポトし各種発色試薬により発色試験を行なった。ニンヒドリン、ライドンスミスでは発色しないことから、生成物にはアミノ基、アミド結合が存在しないことがわかった。また、2,4-ジニトロフェニルヒドラジンで発色することから、生成物はアルデヒドもしくはケトンであることが示唆された。UVスペクトルは、280 nmに極大吸収が見られることから生成物がフェノール環を有していると推測された。



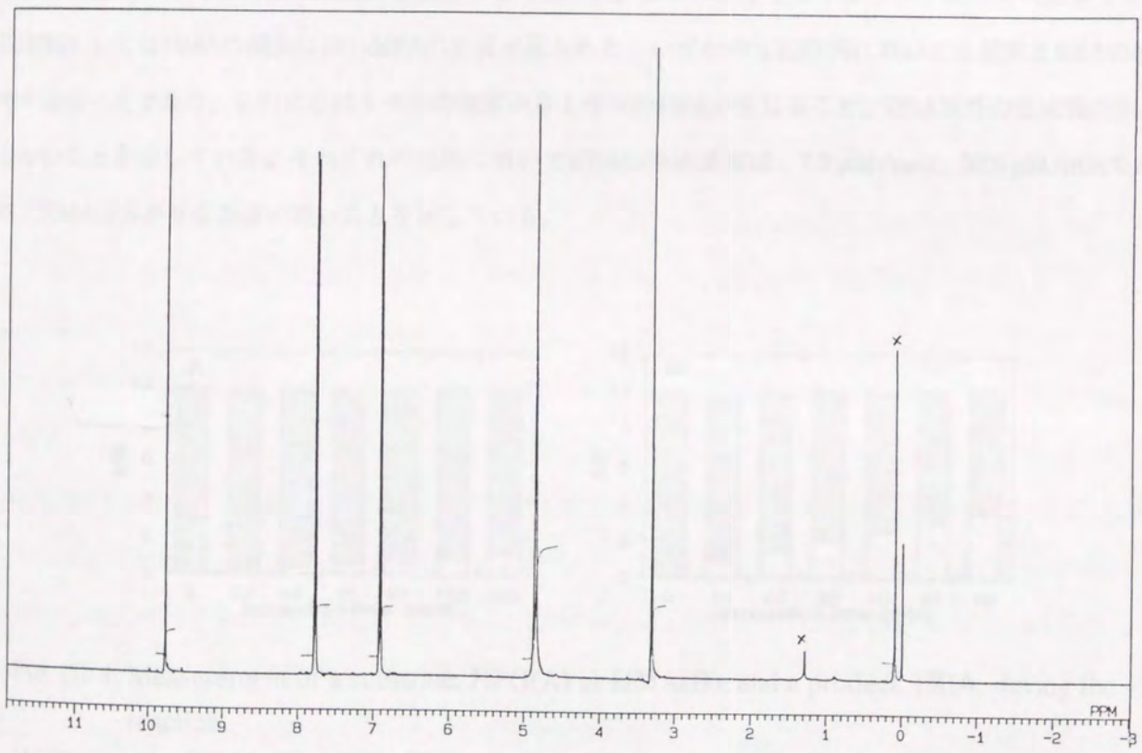


Fig. III-2. ^{1}H-NMR spectrum of HBA. (400 MHz, CD_3OD)

^{1}H-NMRスペクトル（CD_3OD、内部標準TMS）は、Fig. III-2に示すようにδ_H 6.91 (2H, d, J = 8.8 Hz), δ_H 7.77 (2H, d, J = 8.8 Hz), δ_H 9.76 (1H, s)の試料に由来する3つのプロトンシグナルのみが観察された。低磁場側にあるδ_H 9.76のシングレットはアルデヒドのプロトンに特徴的なシグナルであり、高磁場側にあるδ_H 6.91の芳香族プロトンシグナルは隣に水酸基の存在を示しており、δ_H 6.91とδ_H 7.77の2つずつの芳香族プロトン間のカップリング定数8.8 Hzはそれぞれのプロトンがオルト配位であることを示している。

以上の結果に基づき、生成物を4-ヒドロキシベンズアルデヒド（HBA）と同定した。HPLC分析により生成物とHBAの保持時間の比較を行なったところ2物質は完全に一致した。

3．HPGとHMAの酸化反応の化学当量実験

HPGおよびHMAのラッカーゼによる酸化反応の化学当量実験を行なった。50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）に10 mMになるように溶かしたHPG、HMAの基質溶液200 μlに1.3 μgのラッカーゼ（1 μl）を添加して、30℃で反応を行なった。反応開始後、経時的に10 μlずつサンプリングしてそのままHPLCを用いて反応液中の基質と生成物であるHBAの定量を行なった。Fig. III-4に結果を示すように、経時的に基質であるHPGもしくはHMAの減少に伴いHBAの生成が見られた。いずれの反応時間においても基質とHBAの総モル数は一定であり、このことは1モルの基質から1モルのHBAが生じること、HBA以外の生成物が生じないことを示している。それぞれの反応においてHBAの生成速度は、7.2 μM/min、50.6 μM/minであり、HMAの方が反応速度が速いことを示している。

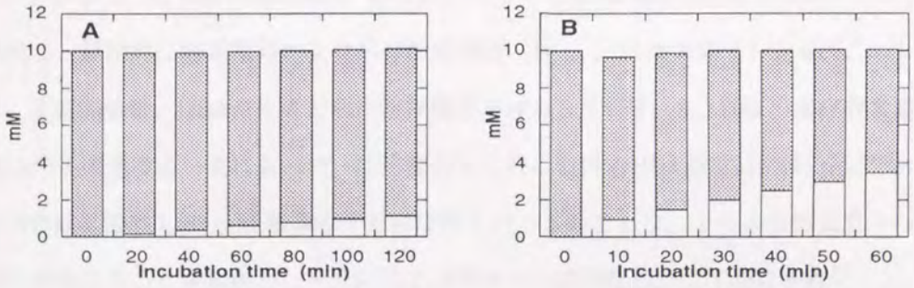


Fig. III-4. Measurement of a substrate, HPG(A) or HMA(B), and a product, HBA, during the reaction.

(A) The reaction of HPG. ▩, HPG; □, HBA. (B) The reaction of HMA. ▩, HMA; □, HBA. The reactions were done in reaction mixtures containing 10 mM substrate, HPG or HMA, and laccase solution at 30 °C. HPLC conditions were as follows: column, YMC-Pack A-312 ODS (4.6 × 150 mm); mobile phase, 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) / methanol = 6/4; flow rate, 0.5 ml/min; detection, UV 280 nm.

4．HPGとHMAの酸化反応の化学反応式の検討

先の結果およびラッカーゼの反応が酸化反応である点を踏まえると、次のような化学反応式が考えられる。すなわち、HPGの酸化反応においては、

$$HPG + 1/2\,O_2 \rightarrow HBA + NH_3 + CO_2$$

HMAの酸化反応においては、

$$HMA + 1/2\,O_2 \rightarrow HBA + H_2O + CO_2$$

である。そこで、これらの化学反応式を確認するために、それぞれの反応で生成されると考えられるアンモニアと二酸化炭素をそれぞれアンモニウムイオン、炭酸水素イオンとして検出することを試みた。炭酸のpKaが6.35であることからpH6.0では炭酸水素イオンが二酸化炭素と水に分解してしまうので、酵素反応はいずれも2 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）中で行なった。

HPGおよびHMAを10mMになるように2 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）に溶かし、1N NaOHでpHを6.8に調節した。そこにラッカーゼを添加して28℃で反応を行ない、経時的にサンプリングして炭酸水素イオンとアンモニウムイオンを電気伝導度検出器を装備したイオン交換HPLC分析によって、また、HPGとHMAは通常の逆相HPLC分析によって定量を行なった。Fig. III-4 に示すように、経時的に基質が減少して行きそれに伴って、HPGの反応では炭酸水素イオンとアンモニウムイオンが検出され、HMAの反応ではアンモニウムイオンが検出された。一方、pH 6.0で同様の実験を行なったところ、先の炭酸水素イオンに相当するピークが検出されなかった。このことからも反応における二酸化炭素の生成を確認した。

次に、これらの反応が酸化反応であることを確認するために、反応液中の溶存酸素の測定を行なった。Fig. III-5に示すように、50 mM酢酸緩衝液（pH 4.5）に溶かした50 mM HMA 3 mlにラッカーゼを添加して反応を開始し、経時的に酸素電極により溶存酸素濃度（DO、mM 酸素原子）とHPLCによりHBA濃度を測定した。反応開始後、HBAの生成と共に溶存酸素が減少して行き、6分以後、溶存酸素濃度はほぼ一定になりHBAの生成速度も一定になった。反応開始 6 分時におけるHBA濃度は0.445 mMでありこれは反応開始時の溶存酸素濃度0.463 mM 酸素原子とほぼ等しい。このことは、1 モルの酸素原子の消費により1 モルのHBAが生じることを意味し、6 分以後では溶液中の溶存酸素がほぼ消費され尽くし、反応液と空気との境界面における空気中の酸素の反応液への溶け込みが律速になっていることを示してている。なお、あらかじめ反応液に窒素ガスを吹き込んで溶存酸素を窒素で置換した場合には、反応の進行は見られなかった。

以上の結果より、先の化学反応式が正しいことを確認した。すなわち、HPGおよびHMAのHBAへの変換反応は酸化的脱炭酸反応である。

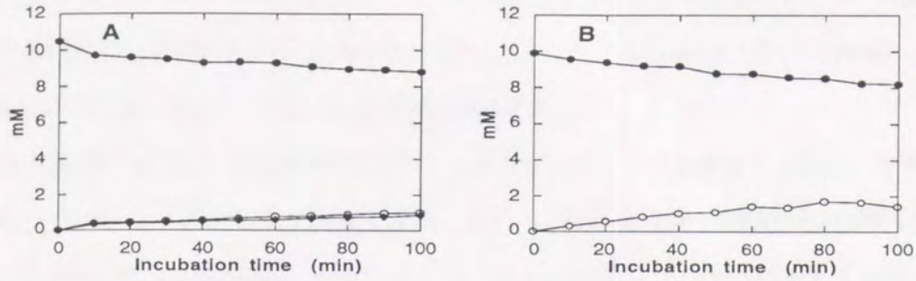


Fig. III-4. Measurement of hydrogen carbonate ion (—○—) and ammonium ion (—●—) during the reactions of HPG(A) and HMA(B).

(A) The reaction of HPG. —●—, HPG. (B) The reaction of HMA. —●—, HMA. For hydrogen carbonate ion analysis, HPLC conditions were as follows: column; Shim-pack PA-QA (8 × 100 mm); column temperature, 40 °C; mobile phase, 2 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8); flow rate, 1.0 ml/min; detection, Shimazu CDD-6A conductivity detector. For ammonium ion analysis, HPLC conditions were the same as above except that a column was a Shim-pack PA-SP (8 × 100 mm) and mobile phase was 5 mM nitric acid. HPG and HMA were measured by reverse-phase HPLC analysis.

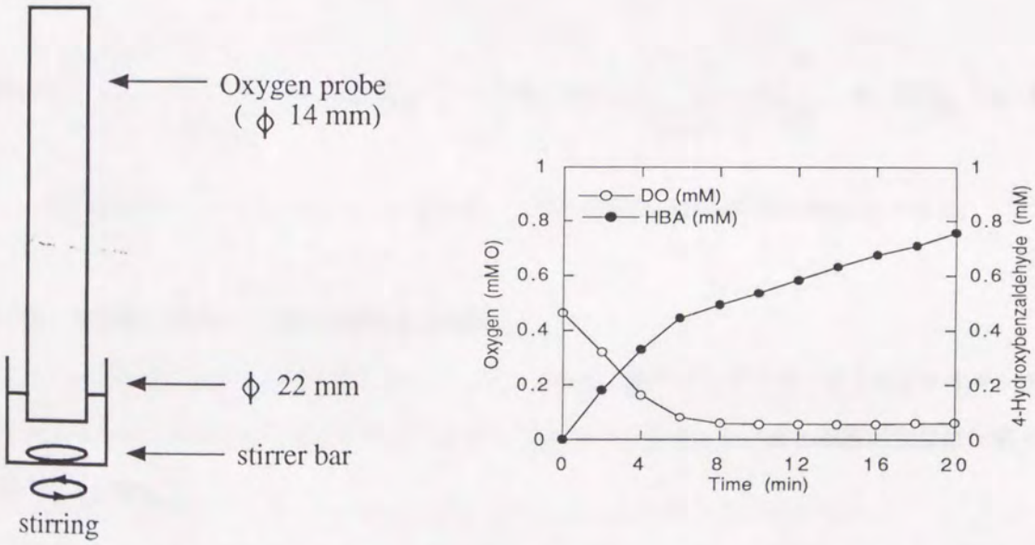


Fig. III-5. Time courses of the oxygen consumption and the formation of HBA.

The reaction mixture contained 0.15 mmol of HMA, 0.15 mmol of acetic acid buffer (pH 4.5), and 26 μl of laccase in a final volume of 3 ml. The reaction was carried out at room temperature.

5．要　約

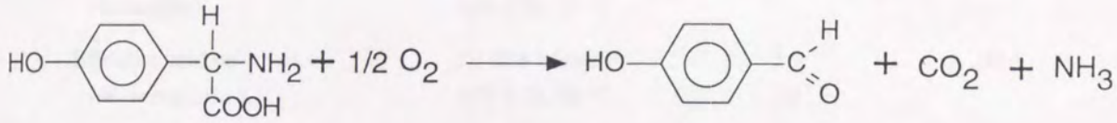
（1）カルボキシル基を有する種々のフェノール化合物をラッカーゼの基質とし、単一の反応生成物が生じる酸化反応の探索を行なった結果、2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン（HPG）と4-ヒドロキシマンデル酸（HMA）が単一の生成物に変換された。

（2）その反応産物は単離、構造決定の結果、4-ヒドロキシベンズアルデヒド（HBA）であった。

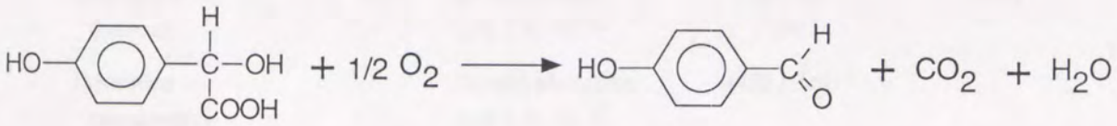
（3）ラッカーゼによるHPGとHMAの酸化反応において基質と生成物（HBA）を経時的に定量した結果、それらの総モル数が変化しないことから1モルのHPGもしくはHMAから1モルのHBAが生じること、副反応が生じないことがわかった。

（4）HPGの酸化反応ではアンモニウムイオンと炭酸水素イオンが検出され、HMAの酸化反応では炭酸水素イオンが検出されること、また、いずれの反応も酸素を必要とすることから、

HPGの酸化反応は、



HMAの酸化反応は、



で表わされることがわかった。すなわち、これらの反応は酸化的脱炭酸反応である。

第3節　他の酸化酵素による脱炭酸反応の検討

フェノール化合物を酸化する他の酵素として、アスコルビン酸オキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、セルロプラスミン、チロシナーゼ、ペルオキシダーゼについてもラッカーゼと同様の脱炭酸反応が見られるか検討した結果を述べる。

1．他の酸化酵素によるHMAの酸化

キウリ起源のアスコルビン酸オキシダーゼ、*Trachyderma tsunodae*由来と*Myrothecium verrucaria*由来のビリルビンオキシダーゼ、ヒト起源のセルロプラスミン、マッシュルーム起源のチロシナーゼ、西

洋ワサビ起源のペルオキシダーゼについて、Table III-2 に示すように各酵素の最適反応条件でHMAと反応させ、その反応液をHPLCで分析して反応の進行を検討した。

結果をTable III-2 に示す。ラッカーゼの他にもビリルビンオキシダーゼとセルロプラスミンにおいて、HMAがHBAに変換されHBA以外の生成物が生じない反応が確認された。ペルオキシダーゼではHBAと他の生成物が生じた。一方、アスコルビン酸オキシダーゼとチロシナーゼでは反応が起きなかった。

Table III-2. Oxidation of HMA by Copper-containing Enzymes and Peroxidase

Enzyme (Origin)	Reaction conditions [a]		Specific activity (U/mg)	Product [b]
	Protein (mg/ml)	Buffer ,Temp.		
Laccase (*C.versicolor*)	13	50 mM acetate (pH 4.5), 30 °C	42 [c]	HBA
Ascorbate oxidase (cucumber)	11.4	25 mM acetate (pH 5.5), 25 °C	1750 [d]	-
Bilirubin oxidase (*M. verrucaria*)	20	50 mM borate (pH 8.5), 30 °C	3.9 [c] 60 [e]	HBA
Bilirubin oxidase (*T. tsunodae*)	22.3	50 mM acetate (pH 5.0), 30 °C	16.1 [c]	HBA
Ceruloplasmin (human)	784	25 mM acetate (pH 5.5), 37 °C	1.3×10^{-4} [c] 110 [f]	HBA
Tyrosinase (mushroom)	-	50 mM phosphate (pH 6.5), 25 °C	(430 U/ml) [g]	-
Peroxidase (horseradish)	-	50 mM acetate (pH 4.0), 30 °C	(9.2 mU/ml) [h]	HBA and other products

[a] The described buffers containing 50 mM HMA and each enzyme were incubated. The buffer for peroxidase contained 94 mM hydrogen peroxide.

[b] -, no reaction.

[c] One unit of protein will produce 1.0 μmol of HBA per minute under the described conditions.

[d] One unit of protein will oxidize 1.0 μmol of L-ascorbate to dehydroascorbate per minute at pH 5.6 at 25 °C.

[e] One unit of protein will oxidize 1.0 μmol of bilirubin per minute at pH 8.4 at 37 °C.

[f] One unit of protein will cause an increase in A_{550} of 0.01 per minute at pH 5.5 at 37 °C, using *N,N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine as a substrate.

[g] One unit of protein will cause an increase in A_{280} of 0.001 per minute at pH 6.5 at 25 °C, using L-tyrosine as a substrate.

[h] One unit of protein will produce 1.0 mg of purpurogallin from pyrogallol in 20 seconds at pH 6.0 at 20 °C.

2．ビリルビンオキシダーゼによる脱炭酸反応

ビリルビンオキシダーゼのHMAの酸化反応について化学当量実験を行なった。*Trachyderma tsunodae*由来のビリルビンオキシダーゼは50 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）を、*Myrothecium verrucaria*由来のビリルビンオキシダーゼは50 mMホウ酸緩衝液（pH 8.5）を用い、10 mMのHMAを基質として30℃で反応を行ない、経時的にHMAとHBAの定量を行なった。Fig. III-6 に示すように、*T. tsunodae*由来と*M. verrucaria*由来のいずれのビリルビンオキシダーゼの酵素反応においてもHMAとHBAの総モル数は変化せず、ラッカーゼによる脱炭酸反応と同様に、HBAが唯一の生成物であることを示している。

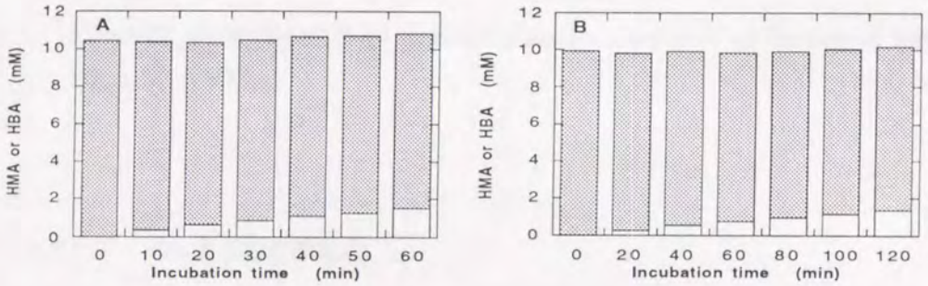


Fig. III-6. Measurement of HMA and HBA during the reactions by two bilirubin oxidases from *T. tsunodae* (A) and *M. verrucaria* (B).

The reaction mixture contained 4 µl of enzyme solution and 400 µl of 10 mM HMA in the following buffers: 50 mM acetate buffer (pH 5.0) (A), 50 mM borate buffer (pH 8.5) (B). Incubation was at 25 °C. At regular times, HMA and HBA in the reaction mixture were measured by HPLC analysis. ▩, HMA; □, HBA.

3．セルロプラスミンによる脱炭酸反応

セルロプラスミンによるHMAの脱炭酸反応の至適pHの検討を行なった。pH 4.0から5.5は25 m M酢酸緩衝液を、pH 6.0と6.8は25 m Mリン酸緩衝液を用いた。50 mMHMA 100 µlにセルロプラスミンを添加して37℃で反応を行なった。結果をFig. III-8 に示す。pH 4～5に至適pHがあることがわかったが反応速度が遅く、1分間に1 µmolのHBAを生成する酵素量を1単位とするとき、得られた測定値よりpH 5.5における比活性は1.3×10^{-4} U/mgであった。この値はTable III-2 に示したラッカーゼやビリルビンオキシダーゼの比活性と比較してかなり低くいことがわかる。また、セルロプラスミンについても化学当量実験を試みたが、反応速度が遅い為にはっきりした結果が得られなかった。

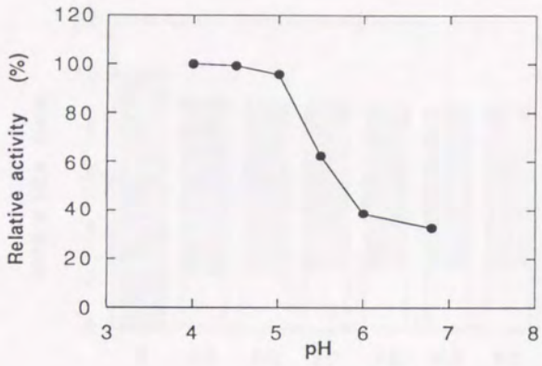


Fig. III-7. Effect of pH on the activity of ceruloplasmin, measured as the rate of formation of HBA from HMA.

4．ペルオキシダーゼによる脱炭酸反応

ペルオキシダーゼについてラッカーゼと同様の化学当量実験を行なった。10 mMのHMAを溶かした50 mM酢酸緩衝液（pH 4.0）400 μlに過酸化水素100 μmolを添加しペルオキシダーゼ4 μlを添加して25℃で反応を行なった。反応開始後、経時的に反応液をHPLCで分析してHMAとHBAの定量を行なった。Fig. III-8に結果を示すように、経時的にHMAの減少とHBAの生成が見られたがHMAとHBAの総モル数は減少しており、HBA以外の生成物が生じたことを示している。また、別の実験でHBAがペルオキシダーゼによって酸化されるのが分かった。すなわち、ペルオキシダーゼによるHMAの酸化反応では、HBAが生じる脱炭酸反応が起こるが、HBAが更にペルオキシダーゼによって酸化される。

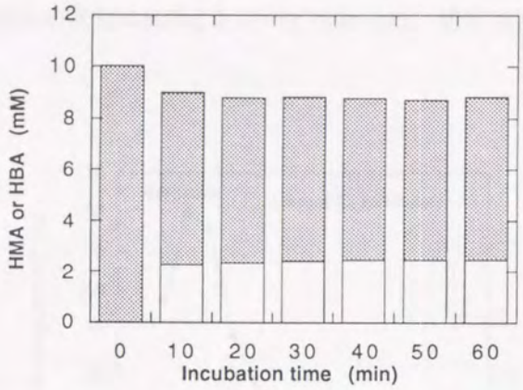


Fig. III-8. Measurement of HMA and HBA during the reactions by peroxidase.

The reaction mixture contained 4 μl of enzyme solution and 400 μl of 10 mM HMA in 50 mM acetate buffer (pH 4.0) containing hydrogen peroxide (100 μmol). Incubation was at 25 °C. At regular times, HMA and HBA in the reaction mixture were measured by HPLC analysi . ▩, HMA; □, HBA.

5．要 約

（1）*T. tsunodae*由来と*M. verrucaria*由来のビリルビンオキシダーゼにおいて、ラッカーゼと同様のHMAの脱炭酸反応が見られ唯一の生成物としてHBAが生じた。

（2）ヒト起源のセルロプラスミンでもHMAの脱炭酸反応が見られたが反応速度が非常に遅かった。

（3）西洋ワサビ起源のペルオキシダーゼでは、HMAの脱炭酸反応によってHBAが生じたが、更にHBAがペルオキシダーゼにより酸化された。

（4）アスコルビン酸オキシダーゼとチロシナーゼではHMAの酸化反応は見られなかった。

第4節 酸化酵素によるHPGおよびHMAの脱炭酸反応の反応経路

ラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼのHPGおよびHMAの脱炭酸反応の至適pH、*Km*値の測定を行なった。更に、得られた結果より脱炭酸反応の反応経路について考察を行なった。

1．ラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの脱炭酸反応の至適pH

*Coriolus versicolor*由来のラッカーゼ、*Trachyderma tsunodae*由来と*Myrothecium verrucaria*由来のビリルビンオキシダーゼ（BOD）について、基質をHPGおよびHMAにしたときのHBAの生成速度（

mM/min）に与えるpHの影響について検討した。基質濃度はそれぞれ50 mMとし、緩衝液はpH4.0～5.5までは25mM酢酸緩衝液、pH6.0～7.5は25mMリン酸緩衝液、pH7.5～10.0は25mMホウ酸緩衝液を用いた。酵素反応は30℃で行ない、HBAの定量はHPLCを用いて行なった。結果をFig. III-9 に示す。

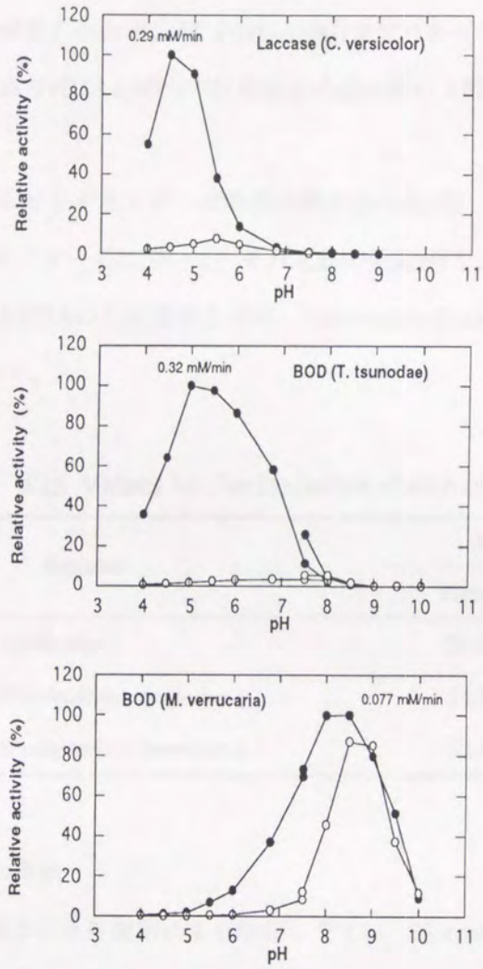


Fig. III-9. Effects of pH on the activities of laccase and bilirubin oxidases from *T. tsunodae* and *M. verrucaria* .

The reaction mixtures contained 250 µl of 100 mM HMA in water or 100 mM HPG in water, 250 µl of 50 mM acetate buffer (pH 4.0 - 5.5), 50 mM phosphate buffer (pH 6.0 - 7.5), or 50 mM borate buffer (pH 7.5 - 10.0), and 5 µl of enzyme solution. Incubation was at 30 °C. The activities of the enzyme at various pHs are shown as percentages of that, which is shown at each graph, at the optimum pH for the reaction with HMA as a substrate. —●—, the reaction with HMA as a substrate; —○—, the reaction with HPG as a substrate.

HMAの脱炭酸反応（黒マル）では、ラッカーゼ、*T. tsunodae*由来ビリルビンオキシダーゼ、*M. verrucaria*由来ビリルビンオキシダーゼの至適pHは、それぞれ4.5、5.0、8.0～8.5であった。一方、HPGの脱炭酸反応（白マル）の至適pHは、それぞれ5.5、7.5、8.5～9.0であった。このようにHPGの脱炭酸反応の至適pHは、いずれもHMAの脱炭酸反応の至適pHよりもわずかにアルカリ側にずれていた。また、ラッカーゼおよび*T. tsunodae*由来ビリルビンオキシダーゼによる脱炭酸反応は、至適pHが酸性側にありHMAとHPGの反応速度に大きな差が見られたが、*M. verrucaria*由来ビリルビンオキシダーゼによる脱炭酸反応は、至適pHがアルカリ側にありHMAとHPGの反応速度の差は先の２酵素ほど大きくなかった。

２．ラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの脱炭酸反応の*K*m値

ラッカーゼ、ビリルビンオキシダーゼについて、それぞれの至適pHでいろいろな濃度のHPG、HMAを基質にしたときの30℃におけるHBAの生成速度を求め、Lineweaver-Burkの逆数プロットにより*K*m値を求めた。結果をTable III-3 に示す。

Table III-3. *K*m Values for the Decarboxylation of HMA and HPG

Enzyme	*K*m value (mM)	
	HMA	HPG
Laccase (*Coriolus versicolor*)	31.3	68.0
Bilirubin oxidase (*Trachyderma tsunodae*)	34.5	60.8
Bilirubin oxidase (*Myrothecium verrucaria*)	22.3	90.2

３．脱炭酸反応の反応経路の考察

カルボニル化合物のα結合はラジカル機構により解裂しやすい（Norrish Type I 反応）ことが知られている。それとFig. III-9 に示したラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの酵素活性におけるpHの影響より、これらの酵素によるHMAおよびHPGの脱炭酸反応の反応経路をFig. III-10 に示すように考えた。すなわち、いずれの脱炭酸反応も、通常の酸化酵素の触媒作用であるフェノール性水酸基からの水素の引き抜きにより引き起こされる。その結果生じた不対電子が水酸基に対してパラ位に移動し、次いで、カルボキシル基のα結合を解裂させ二酸化炭素が生じ、HMAの場合にはそのままHBAに変換されるが、HPGの場合には中間体としてイミンを経てHBAに変換される。イミンはアルカリ条件下の方が生じやすいので、HPGの脱炭酸反応は酸性条件下よりもアルカリ条件下で進行しやすいと考えられる。故に、HPGの

脱炭酸反応の反応速度は、酸性条件下ではHMAのそれよりも小さく、アルカリ条件下ではHMAとほぼ等しくなると考えられる。

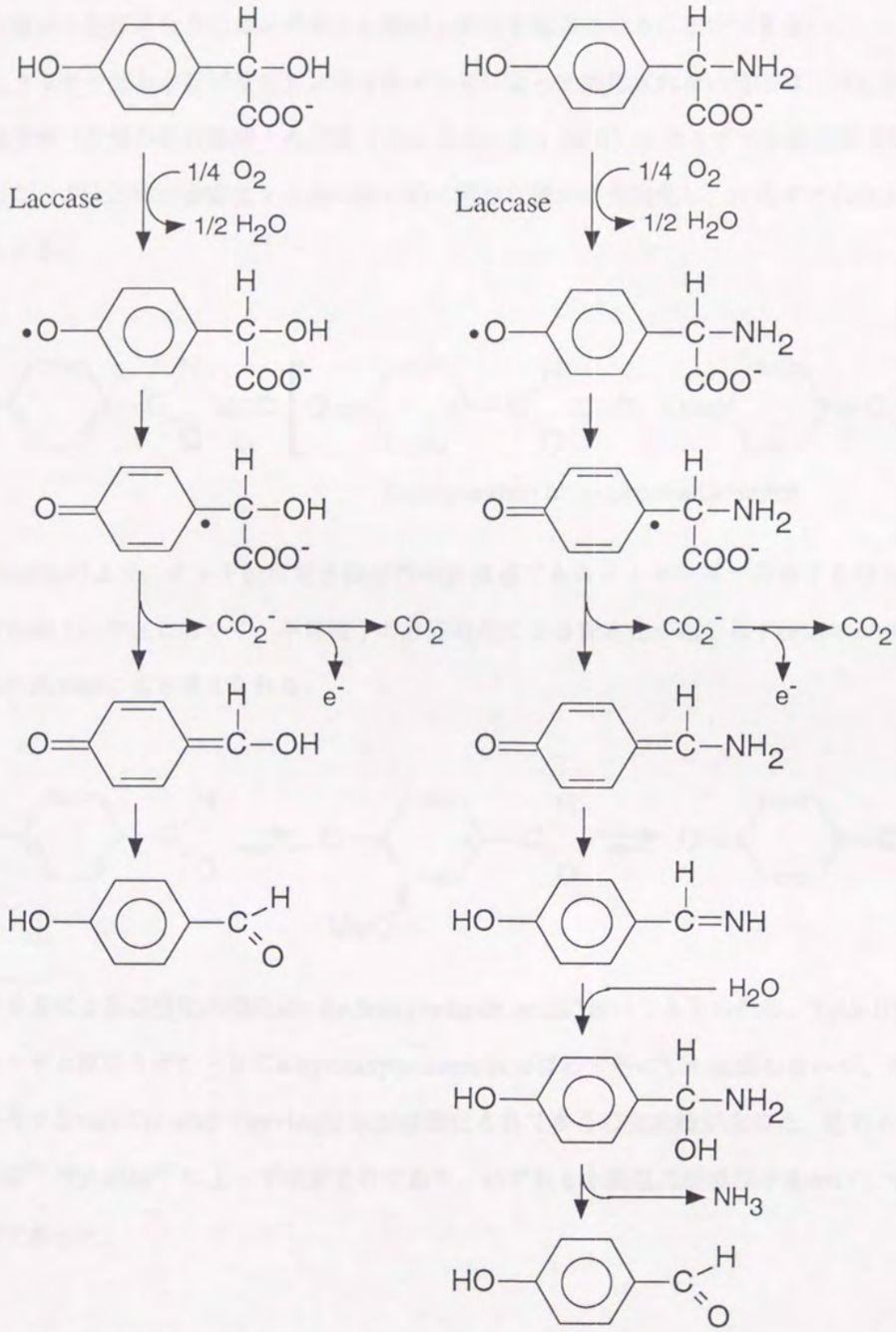


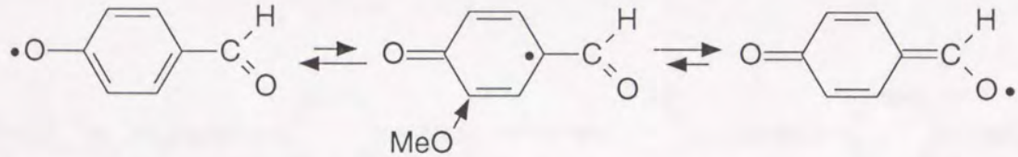
Fig. III-10. Proposed reaction pathways for the decarboxylations of HMA and HPG by laccase.

また、Table III-1 に示したように3-Hydroxymandelic acidを基質にしたとき複数の生成物が生じる点からも上記の反応経路が支持される。すなわち、生じた不対電子の電子密度は水酸基に対してオルト位とパラ位で高い。しかし、3-Hydroxymandelic acidの場合にはそれらの位置は置換基に対していずれもオルト位もしくはパラ位にあたり、カルボキシル基のα結合を解裂させることはできない。

HBAが更にラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼによって酸化されない理由は、下に示すように、生じた不対電子がパラ位の芳香族環上の炭素（カルボニルのα-炭素）とカルボニル酸素原子間で非局在化することによって反応体が安定化する為に相対的に遷移状態が不安定化し、反応がそれ以上進行しないからと考えられる。

Delocalization of an unpaired electron

しかし、Vanillinのようにオルト位に電子放出性の置換基であるメトキシ基が存在する場合には、不対電子が芳香族環上に存在しにくく、不対電子の非局在化による安定化が起こらず反応体が活性化されてラジカル付加反応が起こると考えられる。



このメトキシ基による活性化の傾向は4-hydroxybenzoic acidにおいても見られる。Table III-1 に示すようにラッカーゼと反応させたときに4-hydroxybenzoic acidはわずかにしか反応しないが、オルト位にメトキシ基を有するvanillic acid やsyringic acidは酸化されて多くの生成物が生じた。それらの反応生成物の構造は石原[43] やBollag[44] によって決定されており、いずれも水酸基の酸素原子をかいしてのラジカル付加生成物であった。

第5節　酸化的脱炭酸反応を用いた酸化酵素の活性測定法の開発

第2、3節において、ラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼによる単一の生成物が生じる脱炭酸反

応について述べ、第4節においては、この脱炭酸反応がそれぞれの酵素の通常のフェノール酸化反応によって引き起こされる反応であることを述べた。これまでこれらの酸化酵素において、単一の生成物が生じる反応が見い出されていなかった為に、酵素活性を生成物の生成速度で表わすことができなかった。そこで著者は、この脱炭酸反応をこれら酸化酵素の活性測定法に利用することを考えた。本節では、HBAの発色定量条件の最適化を行ない比色活性測定法を確立するに至った実験経過および結果について述べる。

1．HBAの発色定量法の確立

ラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの酵素活性はHBAの生成速度によって表わされる。そのためHBAを経時的に定量する必要がある。HBAはUV 284 nmに極大吸収（pH 4.5 で ε 15,200、pH 6.8 で ε 12,700）を持つことから、HPLC分析によって高感度にHBAを定量することができる。しかし、簡便さから測定法としては発色定量法が望ましい。発色定量法としては、HBAに特異的な発色であること、検出感度からモル分子吸光係数（ε値）が1万以上であることを満たさなければならない。

HBAがアルデヒドであることからアルデヒドに特異的な発色定量法について検討した。2,4-ジニトロフェニルヒドラジンは、ケトンおよびアルデヒドに特異的な発色試薬で、臨床分析においても使われている。その発色原理はFig. III-11 に示すように、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（1）とアルデヒドを酸性条件下で縮合させ2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン（2）を生成させ、これをアルカリ条件下にすることによって赤色を呈するキノイド構造体（3a、3b）に変換して発色（褐色）させることにある。

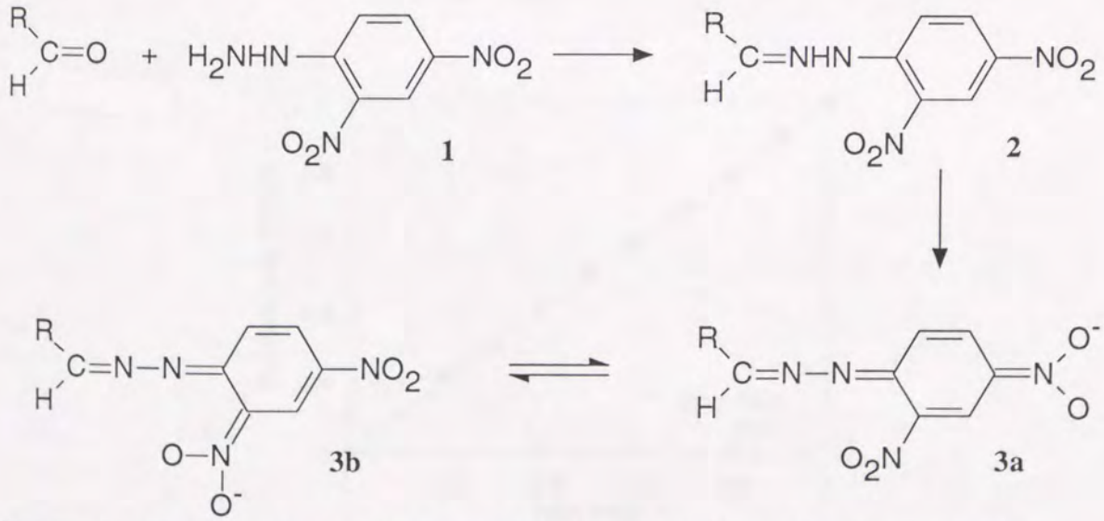


Fig. III-11. Color development between aldehyde and 2,4-dinitrophenylhydrazine (1).

HBAについても発色条件の最適化を行なった結果、Fig. III-12 に示す方法によってHBAが発色定量できることがわかった。すなわち、1 N HClの2,4-ジニトロフェニルヒドラジン飽和液を水で20倍希釈した2,4-ジニトロフェニルヒドラジン水溶液 2.8 mlに測定試料（HBA水溶液）100 μlを加え、室温で10分間放置した後、5 N NaOH 100 μlを添加して発色させた。この方法によって生じるキノイド構造体の極大吸収は475 nmにあり、HBAに換算したモル分子吸光係数は33,400であった。また、500 nmでは30,800であった。Fig. III-13 にこの方法によって求めたHBAの検量線を示す。このように、この発色定量法によってHBAが高感度に定量できることがわかる。

2.8 ml of 2,4-DNP solution

↓ ← 100 μl of sample

standing for 10 min at room temp.

↓ ← 100 μl of 5N NaOH

measurement of absorbance at 475 nm

(ε = 33,400)

Fig. III-12. Colorimetric measurement of HBA concentration by treatment with 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNP).

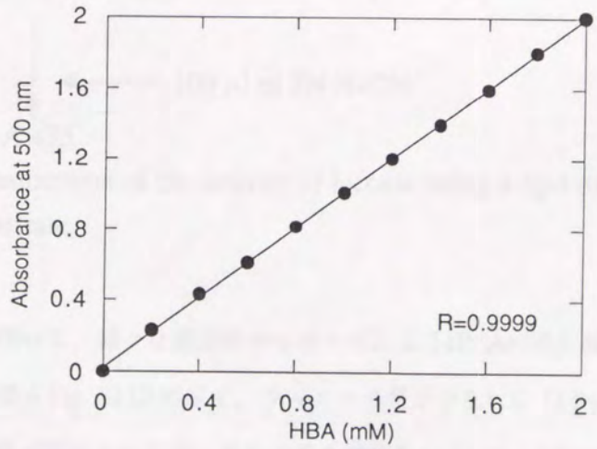


Fig. III-13. Standard curve for measurement of HBA concentration.

2．HMAの酸化的脱炭酸反応を用いたラッカーゼの活性測定法の設定

ラッカーゼの活性測定は、第4節で述べたようにHMAの方がHPGよりも反応速度が速いことからHMAを基質とし、至適pH 4.5で反応を行うことにした。2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いたHBAの発色定量法と組み合わせたラッカーゼの活性測定法をFig. III-14に示すように設定した。50 mM酢酸緩衝液（pH 4.5）に溶かした50 mMのHMAにラッカーゼを添加して30℃で反応を行ない、経時的に100 μlずつサンプリングして2,4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いた発色定量法によってHBAを定量し、HBAの生成速度（mM/min）を求めてラッカーゼの酵素活性とする方法である。また、ビリルビンオキシダーゼの活性測定法では、それぞれの至適pHで反応を行う為に、*Trachyderma tsunodae*由来の酵素は50 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）を、*Myrothecium verrucaria*由来の酵素は50 mMホウ酸緩衝液（pH 8.5）を用いることにした。他はラッカーゼの活性測定法と同じである。

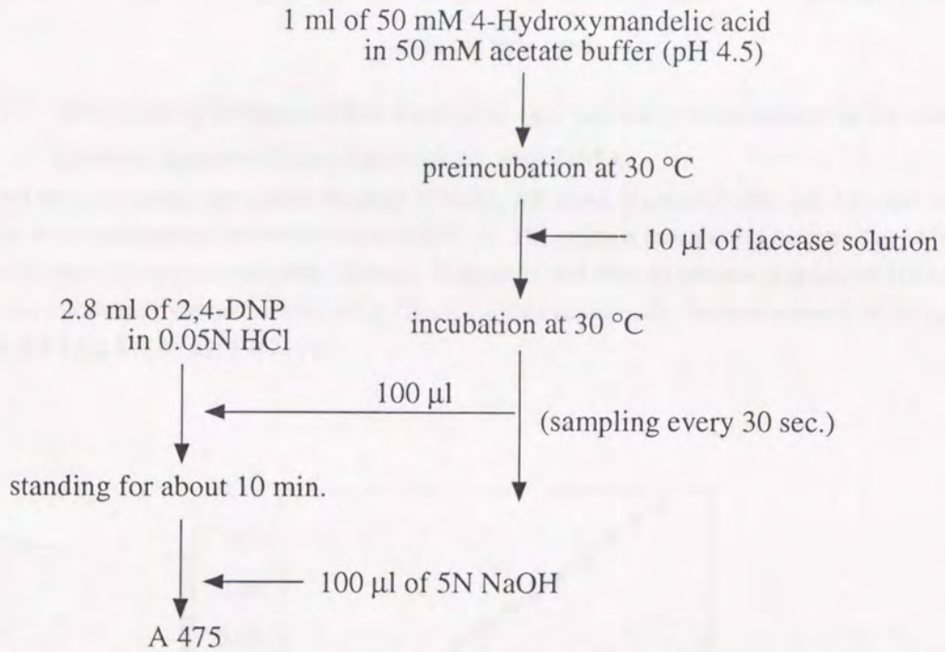


Fig. III-14. Measurement of the activity of laccase using 4-hydroxymandelic acid as a substrate.

この酵素活性測定法を用いて、様々な濃度のラッカーゼによるHMAの脱炭酸反応によって生じたHBAを経時的に測定した。結果をFig. III-15に示す。ラッカーゼ量が少ないC（1.8 μg）までは、5分までの測定時間で測定値の直線性が認められるが、それよりも酵素量の多いA（7.2 μg）とB（3.6 μg）ではHBAの生成量は約0.38 mM以上に増加しなかった。条件Aの反応液の溶存酸素濃度を経時的に酸素電極を用い

て測定したところ、反応開始前の溶存酸素濃度は約0.4 mM酸素原子であったが、反応開始5分後においては0 mM酸素原子であった。このことは、AとBの現象が反応液中の溶存酸素を消費尽くし反応が進まなくなった為に起きたことを示している。

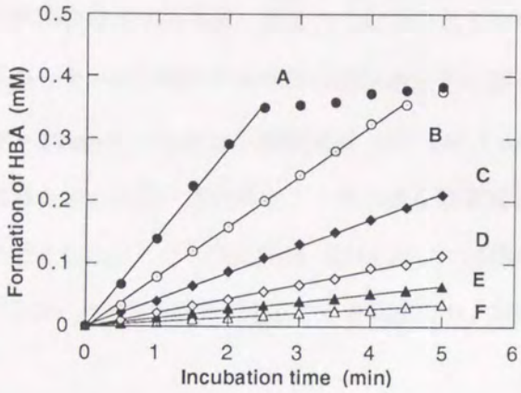


Fig. III-15. Relationship between HBA formation and laccase concentration in the standard reaction mixture during the reaction with HMA.

The standard reaction mixture contained 100 μmol of HMA, 100 μmol of acetate buffer (pH 4.5), and various concentrations of laccase solution in a final volume of 2.02 ml. The reaction mixture was incubated at 30 °C. One hundred μl of the reaction mixture was collected every 30 seconds, and then the amount of produced HBA was measured by the colorimetric method shown in Fig. III-15. Laccase added to the reaction mixture: A, 7.2 μg; B 3.6 μg; C 1.8 μg; D 0.9 μg; E 0.45 μg; F 0.23 μg.

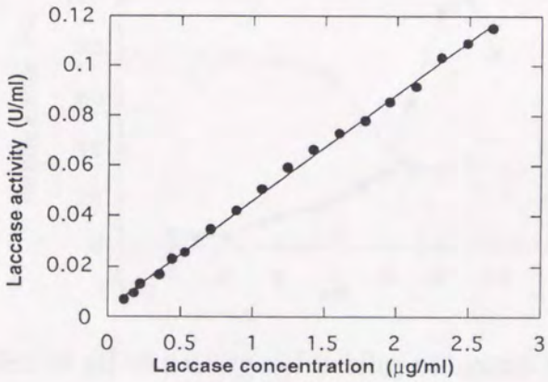


Fig. III-16. Relationship between laccase activity and laccase concentration in the standard reaction mixture.

One unit (U) was defined as the amount which catalyzed the formation of 1 μmol of HBA per minute.

こうして得られた結果から、HBAの生成速度（ラッカーゼ活性）を求め、Fig. III-16 にラッカーゼ濃度（μg/ml）とラッカーゼ活性（U/ml）でプロットすると両者の間に良好な直線関係が見られ、本活性測定法によってラッカーゼの活性測定ができることを示している。

3．本測定法を用いた漆由来ラッカーゼの活性測定

本ラッカーゼ活性測定法の汎用性を示すために、最も良く研究されているラッカーゼの１つである漆の木（*Rhus vernicifera*）由来ラッカーゼの種々の条件での活性測定を行なった。

漆の樹液のアセトンパウダー70 mgを50 mMリン酸緩衝液（pH 6.0）1 mlに分散し5℃で一晩攪拌して酵素の抽出を行なった。不溶物を遠心分離により除き、上澄み液を酵素液とした。得られた酵素液中にはペルオキシダーゼの混在が予想されたが、リン酸緩衝液（pH 6.8）中でHBAが分解されないことから、過酸化水素が存在しない条件下ではその活性が無視できることを確認した。以後、この酵素液を粗漆由来ラッカーゼとして使用した。

50 mM HMAを基質として種々のpHにおけるラッカーゼ活性（HBAの生成速度）の測定とpH安定性試験（25℃、15時間）を行なった。結果をFig. III-17 に示す。漆由来ラッカーゼの至適pHは9.5 付近にあり、*M. verrucaria* 由来ビリルビンオキシダーゼの至適pH 8.0～8.5よりも更にアルカリ側にあることがわかった。しかし、アルカリ側では不安定であった。

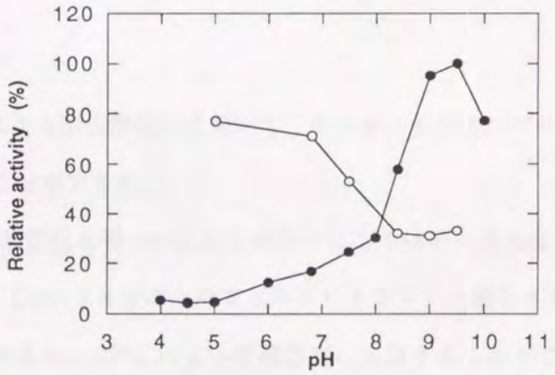


Fig. III-17. Effect of pH on activity and stability of laccase from *Rhus vernicifera*.
—●—, Optimum pH; The activity of the laccase was measured at each pH by the procedure shown in Fig. III-15. —○—, pH stability; Enzyme solution were incubated at each pH for 15 hr at 25 °C and the remaining activities were assayed.

次に、アセトンの酵素活性に与える影響について検討した。Fig. III-18に示すように、*C. versicolor*由来ラッカーゼにおいてはアセトン添加と共に活性が減少していくが、漆由来ラッカーゼの場合にはアセトン添加5％で活性が114％まで上昇し、その後、13%添加まで活性が100％以上にあった。漆由来ラッカーゼは、糖含量が45％と多く、ウルシオール（60～70％）、水（20～35％）、水溶性多糖類（5～10％）、糖蛋白（1～5％）からなるW／O型のエマルジョン状態の樹液中に存在している[45]。よって、酵素に結合している糖鎖によってアセトンの影響を受けにくく、さらには、漆樹液中での存在環境に近いと考えられるある程度の濃度のアセトンの存在は、むしろラッカーゼを活性化させるものと考えられる。

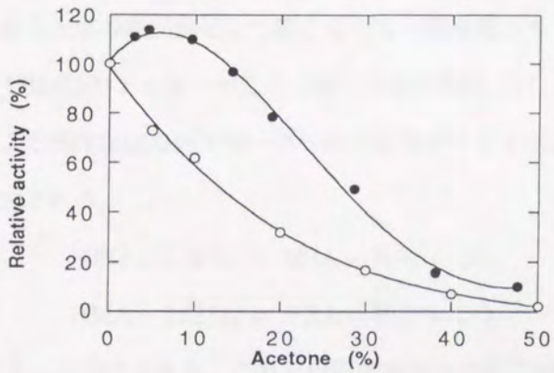


Fig. III-18. Effect of acetone on activities of laccase from *Rhus vernicifera*(—●—) and *C. versicolor* (—○—).

4．要　約

（1）HMAの酸化酵素による脱炭酸反応を用いて、ラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの活性測定法を開発することができた。

（2）本測定法では、酵素活性を唯一の反応生成物であるHBAの生成速度で表わすことができる。

（3）HBAの定量法としては、2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンと縮合させて簡便に発色定量（475 nm、ε = 33,400）するか、HPLCによって高感度に定量することができる。

（4）本測定法を用いて漆由来ラッカーゼの諸性質を明らかにすることができた。

第6節　考　察

これまでのラッカーゼの酵素反応に関する研究は、リグニンの分解反応が注目されていたためにリグニンまたはそのモデル化合物を基質にした研究が主であった。また、その酵素反応がラジカル反応であるために解析が困難であり、酵素反応を合成反応、変換反応として捕えた研究はあまりなされていなかった。報告されているラッカーゼによる反応としては、リグニン関連ではラジカル付加反応、脱炭酸反応、脱メチル化反応、Cα-Cβ結合の解裂[46]がある。リグニン関連以外では、Bollagらによるヒューマスの生成モデルとしての*Rhizoctonia praticola*由来ラッカーゼによるフェノールおよび芳香族アミン間での酸化的カップリング反応の報告がある[26-29, 47]。ラッカーゼによる脱炭酸反応としては、バニリン酸[29, 48]、シリンジ酸[44]、フェルリ酸[49]と言ったリグニン関連芳香族化合物についての報告があが、いずれの脱炭酸反応もラッカーゼによるラジカル重合反応の副反応として起こるので、最終的に多くの反応産物が生じる。

著者が発見したHPGおよびHMAのラッカーゼによる酸化的脱炭酸反応は、副反応がなくこれまでに報告されているラッカーゼによる酸化反応の内で唯一単一の生成物が生じる反応である。

それぞれ以下の反応式で表される。

$$\mathrm{HPG} + 1/2\,\mathrm{O_2} \rightarrow \mathrm{HBA} + \mathrm{NH_3} + \mathrm{CO_2}$$

$$\mathrm{HMA} + 1/2\,\mathrm{O_2} \rightarrow \mathrm{HBA} + \mathrm{H_2O} + \mathrm{CO_2}$$

HPGの酸化反応は、脱アミノ反応でもある。これらの脱炭酸反応の反応経路は、Fig. III-10に示したように、ラッカーゼの本来の触媒反応であるフェノール性水酸基からの水素の引き抜きによって引き起こされると考えられる。

同様の脱炭酸反応がビリルビンオキシダーゼにおいても見い出された。ビリルビンオキシダーゼは、ヘムの生理的代謝産物であるビリルビンを分解する酵素の探索の結果、村尾らによって1981年に発見された酸化酵素である（1984年に新規酵素Bilirubin oxidase（EC 1.3.3.5）として登録）。生産菌は*Myrothecium verrucaria*であったが、*Myrothecium*属の真菌に広く分布していることがわかっている。その後、他の菌株について同様の探索が行なわれた結果、*Trachyderma tsunodae*からもビリルビンオキシダーゼが見い出された。現在のところ、この2つのビリルビンオキシダーゼが分離され、研究されている。それぞれの酵素の活性中心に関する研究から、*M. verrucaria*由来ビリルビンオキシダーゼの活性中心は、2つのタイプI銅からなることがわかっている[50]が、*T. tsunodae*由来ビリルビンオキシダーゼの活性中心は、ラッカーゼと同様に1つのタイプI銅、1つのタイプII銅、2つのタイプIII銅からなることがわかっている[51]。これらの酵素のHPGおよびHMAの脱炭酸反応の至適pHは、Fig. III-9に示したように*M. verrucaria*由来ビリルビンオキシダーゼはアルカリ側（pH 8.5）にあり、*T. tsunodae*由来ビリル

ビンオキシダーゼではpH 5.0であるが、*C. versicolor*由来ラッカーゼと比較して中性域からアルカリ側（pH 7.0-8.0）でも活性がある。これは、ビリルビンはアルカリ側（pH 8以上）でしか水に溶けないためにビリルビンを酸化する酵素の探索をアルカリ側で行った結果、アルカリ側でも酸化活性のある酵素が選択された為と考えられる。

これまでラッカーゼの活性測定の為に、様々な発色試薬が開発されてきた。これらの発色試薬を用いた活性測定法の原理は、ラッカーゼによる発色試薬の酸化により生じた発色物質による吸光度の増加速度の測定にある。しかし、これらの測定法には幾つかの問題点があった。例えば、通常良く用いられているN, N-ジメチル-1, 4-フェニレンジアミンは、毒性のある揮発性物質であり、その水溶液はすぐに自然酸化して発色する。シリンガルダジン（Syringaldazine）[52]は、水溶性が低く、その水溶液および発色生成物は化学的に不安定である。更に、従来の酵素活性測定法では、酵素活性を生成物の生成速度で表わすことができなかった。それは、その酵素反応が単一の反応に基づいていないからである。それに対して著者が開発したラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼの活性測定法は、次のような特長がある。1）基質のHMAは水に良く溶け安定である。2）生成物のHBAは、更に酸化されることなく安定である。そして、HPLC法により正確に、2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンを用いた発色定量法により簡便に定量できる。3）本測定法で用いる脱炭酸反応は、副反応がなく単一の生成物が生じる反応であるから酵素活性を反応産物の生成速度で表せる。4）生成物が安定であることから、反応時間を長くすることによって酵素活性の検出感度を上げられる。5）本測定法は、キノン発色に依存していないのでキノン還元酵素の影響を受けない。故に、キノン還元酵素が存在する真菌などの培養液[53]や粗抽出液中のラッカーゼ活性を測定するのに適している。しかし、HMAさらにHBAがペルオキシダーゼにより酸化されるので、ペルオキシダーゼが混在している場合には影響を受けると考えられるが、カタラーゼを添加して過酸化水素を消去することによってペルオキシダーゼ活性を除くことができる。

第IV章　酸化酵素を用いたアミノペプチダーゼ及びアンジオテンシンI変換酵素の活性測定法の開発

序

2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン（HPG）が酸化酵素によって4-ヒドロキシベンズアルデヒド（HBA）に変換される脱炭酸反応を発見し、更に、生じたHBAが2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンと縮合させることによって発色定量できることを第III章で述べた。著者は、HPGがα-アミノ酸であることから、この一連の反応を応用して血清中のペプチダーゼの酵素活性測定法の開発を計画した。すなわち、HPGをペプチドのN末端もしくはC末端にアミド結合で結合させたペプチドを基質とし、アミノペプチダーゼあるいはカルボキシペプチダーゼによるペプチド末端の加水分解により遊離して来るHPGを酸化酵素によりHBAに変換して発色定量することによって、これらのペプチダーゼの活性測定ができると考えた。

本章では、第1節にアミノペプチダーゼであるアリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの活性測定法の開発について、第2節にカルボキシペプチダーゼであるアンジオテンシンI変換酵素の活性測定法の開発について、各々反応条件の至適化を行ない測定法を確立するに至った実験経過および結果について述べる。

第1節　アミノペプチダーゼの活性測定法の開発

本節では、ラッカーゼを共役酵素として用い、アリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの両酵素の活性を測定するための反応条件の至適化、測定法の設定、本測定法を用いた測定結果について述べる。

1．アミノペプチダーゼの活性測定法の現状

これまでに、様々なアミノペプチダーゼが人間のほとんどの組織中に見いだされている[54-60]。これらのアミノペプチダーゼは、腸管におけるアミノ酸の輸送や種々のペプチドホルモンの分泌、代謝に関連していると言われている。なかでも臨床分析において重要なアミノペプチダーゼは、細胞の可溶性画分に存在する細胞質由来アミノペプチダーゼ（別名、ロイシンアミノペプチダーゼ（LAP）、EC 3. 4. 11. 1）とミクロソーム画分に存在する膜酵素であるミクロソーム由来アミノペプチダーゼ（別名、アリルアミダーゼ、アミノペプチダーゼM、EC 3. 4. 11. 2）である。本節では、前者をロイシンアミノペプチダーゼ、後者をアリルアミダーゼと呼ぶことにする。従来の臨床化学において、ロイシンアミノペプチダーゼはtrue LAP、

アリルアミダーゼはclinical LAPと呼ばれ、日常検査では種々の基質を用いてこれらのアミノペプチダーゼをまとめてLAPと通称して、その総量を測定している。

しかし、両酵素は蛋白化学的に性質が異なると共に基質特異性にも差が見られることが指摘されている[57, 61]。すなわち、ロイシンアミノペプチダーゼは、オリゴペプチドやアミノ酸アミドに対して幅広い基質特異性を示し、特にロイシンや他の疎水性アミノ酸に高い特異性を示すが、アミノ酸-β-ナフチルアミドやアミノ酸-*p*-ニトロアミリド（amino acid-pNA）といった発色性基質に対してはほとんど活性を示さない。これと対照的にアリルアミダーゼは、これらの発色性基質をアミノ酸の種類にあまり影響されず加水分解するが、アミノ酸アミドに対してはほとんど活性を示さない。両酵素の基質特異性の違いを示す測定結果としてTable IV-1にLeu-NH_2、Leu-pNAおよびGly-pNAを基質としたときのアリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの*V*max値を「Proteinases in Mammalian Cells and Tissues」から引用して示す。

Table IV-1. Comparison of hydrolysis rate of substrates by arylamidase and leucine aminopeptidase

Substrate	*V*max (μmol / min / mg protein)	
	Arylamidase	Leucine aminopeptidase
Leu-NH_2	0.21	100
Leu-pNA	37	2
Gly-pNA	11.4	0.002

Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, ed. Barrett, A. J., P. 393, North-Holland (1977)

更に、病態の違いによってもこれらのアミノペプチダーゼの酵素活性に差が見られることが指摘されている[59-63]。例えば、悪性のリンパ腫や白血病の初期段階において、L-ロイシンアミドを基質として測定した血清中のロイシンアミノペプチダーゼの活性が著しく上昇しているにもかかわらず、L-ロイシル-*p*-ニトロアミリドを基質として測定したアリルアミダーゼの活性はほとんど正常値であった[63]。一般的に活性上昇が見られる病態としては、ロイシンアミノペプチダーゼは急性肝炎、悪性リンパ腫、白血病（急性、慢性）、非定型性肺炎が、アリルアミダーゼは閉塞性黄疸、胆道癌、胆管結石、肝癌（原発性、転移性）、膵癌が挙げられる[64]。

従来の臨床における血清中のアミノペプチダーゼの活性測定法には、大きく分けて基質にL-ロイシンアミドを用いる方法とL-ロイシル-*p*-ニトロアミリドなどの発色性基質を用いる方法の２つがある。L-ロイシンアミドを基質とする測定法では、アミノペプチダーゼ（主としてロイシンアミノペプチダーゼ）による

加水分解でアンモニアとロイシンが遊離して来る。アンモニアの定量法としては、インドフェノール反応で発色定量するか、生じたアンモニアにNAD(P)H_2とα-ケトグルタル酸を加えてグルタミン酸デヒドロゲナーゼを作用させ、NAD(P)H_2の減少を340 nmでの吸光度の減少で定量する方法がある。一方、ロイシンの定量法としては、ロイシン脱水素酵素を共役酵素として用いNADHの生成による340 nmの吸光度の増加を測定する方法[65]がある。しかしながら、これらの方法は血清中に内在するアンモニアの影響をうけたり、紫外部での吸光度の測定は夾雑物の影響を受けやすいと言った問題点がある。発色性基質を用いる測定法では、簡便に主としてアリルアミダーゼの活性測定ができるが、先に述べたようにロイシンアミノペプチダーゼの活性測定はできない。

著者はロイシンアミノペプチダーゼとアリルアミダーゼの両酵素活性を一緒に同程度の比活性で比色定量する方法が開発されたならば、1回の測定で両酵素の異常を検出できると考えた。そのために、Fig. IV-1に示すようなストラテジーを考えた。すなわち、HPGをC末とするジペプチドを基質とし、アミノペプチダーゼによる加水分解で遊離するHPGを酸化酵素によってHBAに変換し、HBAを発色定量することによってアミノペプチダーゼの活性を測定する方法である。

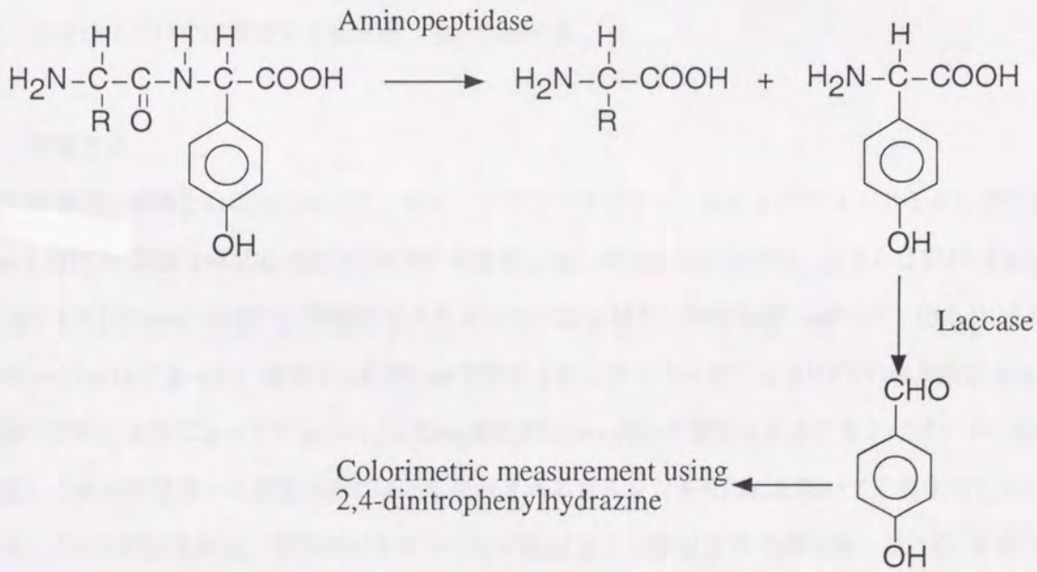


Fig. IV-1. Strategy of the determination of aminopeptidase activity.

2．実験材料と実験方法

1）　実験材料

ラッカーゼは*Coriolus versicolor* IFO 9791株の培養液から精製した酵素（蛋白質濃度、1.3 mg/ml）を用いた。ラッカーゼの酵素単位は、HMAを基質とし50 mM酢酸緩衝液（pH 4.5）中、30℃で1分間に1 μmolのHBAを生成する酵素量を1単位とした。ロイシンアミノペプチダーゼおよびアリルアミダーゼはシグマ社製の豚肝臓由来の酵素を用いた。ロイシンアミノペプチダーゼの酵素単位は、50 mMホウ緩衝液（pH 8.5）中、37℃で1分間に1 μmolのL-ロイシンアミド（L-Leu-NH_2）を加水分解する酵素量を1単位とした。アリルアミダーゼの酵素単位は、50 mMリン緩衝液（pH 7.5）中、37℃で1分間に1 μmolのL-ロイシンル-*p*-ニトロアニリド（L-Leu-pNA）を加水分解する酵素量を1単位とした。血清としてはシグマ社製の標準血清Control-2Nおよび正常なヒト起源の血清を用いた。標準血清のアミノペプチダーゼ活性は慣用単位であるG-R単位で表わした。1 G-R単位は、L-ロイシル-β-ナフチルアミドを基質として用い、血清0.02 mlが37℃で2時間基質に作用して1/12 mgのβ-ナフチルアミンを遊離する酵素量を示す[66]。

L-Leu-NH_2とL-Leu-pNAはシグマ社製の試薬を用いた。D-2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン（D-HPG）は東京化成（株）製の試薬を用いた。基質の合成に用いたN-Boc-L-Leuはペプチド研究所（株）製の試薬を用いた。

基質として用いたL-ロイシル-L-2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン（L-Leu-L-HPG）はDCC法により合成した。合成法については後述する合成法（5）に述べる。

2）　実験方法

酵素反応条件の最適化の過程において、ロイシンアミノペプチダーゼおよびアリルアミダーゼによる基質L-Leu-L-HPGの加水分解反応はHPLCを用いて分析した。HPLC分析条件は、カラムはYMC-Pack ODS A-312（4.6 φ×150 mm）を用い、移動相はメタノール／20 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）（6：4）を用い、流速は0.5 ml/minであった。検出はUV 280 nmで行なった。ラッカーゼによるHPGの脱炭酸反応もまた先と同様のHPLC条件によって行なった。L-Leu-NH_2やL-Leu-pNAを基質とするアミノペプチダーゼの酵素活性は、これらの基質から加水分解によって生成されるロイシンをHPLCを用いて定量することによって求めた。そのHPLC条件は、移動相にメタノール／20 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）（2：8）を用い、検出がUV 210 nmであることを除いて先のHPLC条件と同じである。

3．アミノペプチダーゼの基質の検討と反応条件の至適化

ロイシンアミノペプチダーゼはN末のアミノ酸がロイシンまたは疎水性アミノ酸の場合に良く作用するが、アリルアミダーゼの場合にはN末のアミノ酸の種類による分解速度の差が少ない。そこで、両酵素活性を測定する為にN末のアミノ酸をロイシンとするLeu-HPGを基質にすることにして、反応条件の至適化について検討を行なった。

1) L-Leu-L-HPGとL-Leu-D-HPGのアミノペプチダーゼによる加水分解の検討

HPGはヒダントイナーゼを用いて製造され、半合成β-ラクタム系抗生物質の側鎖成分としての有用性からそのD体のみが市販されている。よって、L-Leu-L-HPGを合成するためには、まず、D-HPGを化学的にラセミ化してDL-HPGとしてからL-Leu をアミノ基に縮合させてL-Leu-DL-HPGを合成し、次にこのジアステレオマーをL-Leu-L-HPGとL-Leu-D-HPGに分ける必要がある。従って、基質の合成のしやすさからL-Leu-D-HPGの方がL-Leu-L-HPGよりも有利であると言える。

これまでアミノペプチダーゼの活性測定法に用いられてきた基質は、ジペプチドではなくL-Leuのカルボキシル基にアミノ基（L-Leu-NH_2の場合）や発色性の化合物をアミド結合で結合させた合成基質（L-Leu-*p*-nitroanilide、L-Leu-β-naphthylamideなどの場合）であったので、L-Leu-HPGのHPGの立体はアミノペプチダーゼによる加水分解に影響しないのではないかと考えられた。

そこで、L-Leu-L-HPGとL-Leu-D-HPGの２つのジペプチドについて、ロイシンアミノペプチダーゼおよびアリルアミダーゼにより加水分解されるかどうかを検討した。L-Leu-D-HPGおよびL-Leu-L-HPGをそれぞれの酵素の最適条件、すなわち、ロイシンアミノペプチダーゼは50 mMホウ緩衝液（pH 8.5）中で、アリルアミダーゼは50 mMリン緩衝液（pH 7.5）中で37℃で酵素と保温して、HPLC分析によって各ジペプチドの分解を見た。その結果、L-Leu-L-HPGは両酵素によって加水分解されLeuとHPGが生じたが、L-Leu-D-HPGはいずれの酵素によってもほとんど分解されなかった。よって、L-Leu-L-HPGをロイシンアミノペプチダーゼおよびアリルアミダーゼの基質にすることにした。

2) 作用最適pHの検討

基質をL-Leu-L-HPGとするときのアリルアミダーゼおよびロイシンアミノペプチダーゼの作用最適pHを調べた。pH 6.0～7.5はリン酸緩衝液を、pH 8.0～10.0はホウ酸緩衝液を用い37℃で反応を行なった。それぞれの酵素活性はHPGの生成速度から求めた。Fig. IV-2 に示すように、アリルアミダーゼの至適pHは7.5、ロイシンアミノペプチダーゼの至適pHは8.5であることがわっかた。

次に、ヒトの血清を用いて同様の実験を行った。結果をFig. IV-3に示す。血清中にはアリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼが存在するので、各pHにおけるL-Leu-L-HPGの加水分解速度（黒マル）は両酵素の総活性を表わしていると考えられる。これに対し、L-Leu-pNAおよびL-Leu-NH_2を基質にした場合には（それぞれ白マル、白三角）、そのpH曲線のパターンがFig. IV-2のA、Bに似ていることから、それぞれアリルアミダーゼ、ロイシンアミノペプチダーゼに片寄った活性を示していると考えられる。

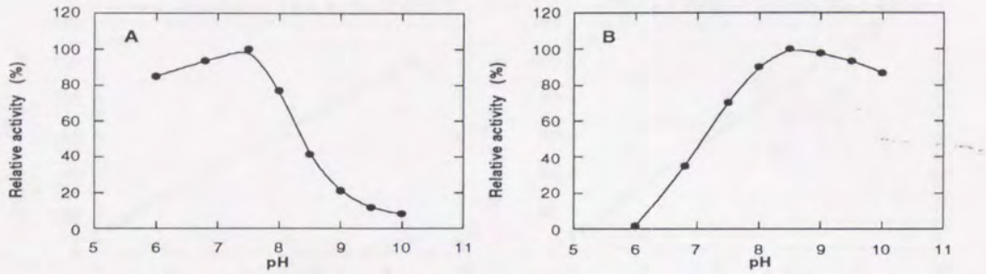


Fig. IV-2. Effects of pH on the activities of arylamidase (A) and leucine aminopeptidase (B), measured as the hydrolysis rate of L-Leu-L-HPG.

The reaction mixture contained 12×10^{-3} units of arylamidase(A) or 15×10^{-3} units of leucine aminopeptidase(B), 1.65 μmol of L-Leu-L-HPG, and 5 μmol of phosphate buffer (pH 6.0 - 7.5) or borate buffer (pH 8.0 - 10) in a final volume of 101 μl. Incubation was at 37 °C. The hydrolysis rate of L-Leu-L-HPG was measuredby HPLC.

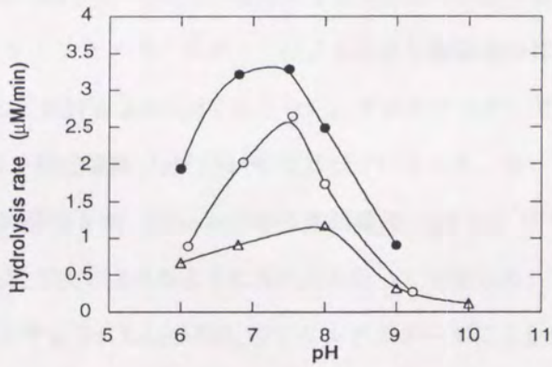


Fig. IV-3. Hydrolysis of L-Leu-L-HPG, L-Leu-pNA, and L-Leu-NH_2 by human serum aminopeptidasesat various pHs.

Five hundred μl of substrate solution containing 0.5 μmol of substrate, and 25 μmol of phosphate buffer (pH 6.0 - 7.5) or borate buffer (pH 8.0 - 10) was incubated with 50 μl of human serum at 37 °C. The hydrolysis rate of each substrate was measured by HPLC. Symbols: ●, L-Leu-L-HPG; ○, L-Leu-pNA; △, L-Leu-NH2.

3) L-Leu-L-HPGに対する*Km*値の測定

ロイシンアミノペプチダーゼおよびアリルアミダーゼのL-Leu-L-HPGに対する*Km*値の測定を行なった。それぞれの酵素の至適pHにおいて様々な濃度のL-Leu-L-HPGの加水分解速度を37℃で測定し、Lineweaver-Burkの逆数プロットにより*Km*値を求めた。Fig. IV-4 に示すようにロイシンアミノペプチダーゼは1.72 mM、アリルアミダーゼは1.29 mMであった。

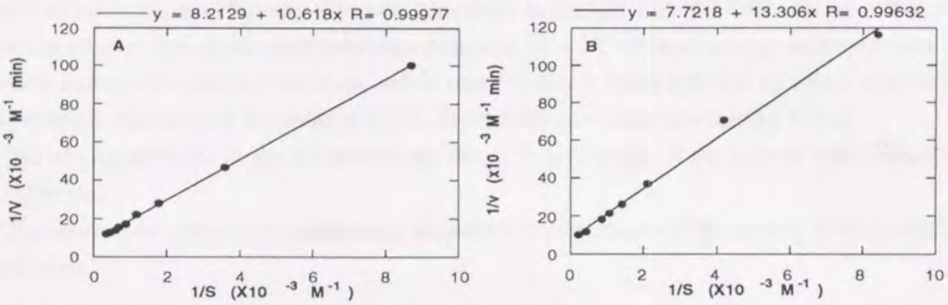


Fig. IV-4. Effect of substrate concentration on the activities of arylamidase (A) and leucine aminopeptidase (B), measured as the rate of hydrolysis of L-Leu-L-HPG (Lineweaver-Burk plots).

4) L-Leu-L-HPGとL-Leu-NH_2、L-Leu-pNAとの比較

L-Leu-L-HPGと従来の測定法に用いられている基質であるL-Leu-NH_2およびL-Leu-pNAの、豚の肝臓由来アリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼによる加水分解速度の比較を行なった。

各基質濃度は2.0 m Mとし、最終容量401 μlで行なった。アリルアミダーゼによる加水分解は58 × 10^3単位の酵素を用い50 m Mのリン酸緩衝液（pH 7.5）中で37℃で行なった。ロイシンアミノペプチダーゼによる加水分解は74 × 10^3単位の酵素を用い50 m Mのホウ酸緩衝液（pH 8.5）中で37℃で行なった。それぞれの基質の加水分解速度は実験方法で述べたようにHPLCを用いて測定した。

その結果、Table IV-2 に示すようにL-Leu-NH_2のアリルアミダーゼによる加水分解速度は低く、L-Leu-NH_2がアリルアミダーゼの基質として適さないことを示している。また、L-Leu-pNAはロイシンアミノペプチダーゼによってほとんど加水分解されなかった。これに対し、L-Leu-L-HPGはアリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの両方によりバランス良く加水分解され、L-Leu-NH_2やL-Leu-pNAよりも両酵素の基質として適していることを示している。

Table IV-2. Rates of substrate hydrolysis by arylamidase and leucine aminopeptidase

Substrate	Hydrolysis rate (mM/min)	
	Arylamidase	Leucine aminopeptidase
Leu-pNA	70 (100) [a]	0.9 (0.7) [b]
Leu-NH_2	15 (21) [a]	134 (100) [b]
Leu-HPG	94 (134) [a]	116 (87) [b]

The reaction mixture for arylamidase contained 58×10^{-3} units of arylamidase from porcine kidney, 0.8 μmol of substrate, and 20 μmol of sodium phosphate buffer (pH 7.5) in a final volume of 401 μl. The reaction mixture for leucine aminopeptidase contained 74×10^{-3} units of leucine aminopeptidase from porcine kidney, 0.8 μmol of substrate, and 20 μmol of borate buffer (pH 8.5) in a final volume of 401 μl. The reaction mixture was incubated at 37 °C. Hydrolysis rates were measured by HPLC.

[a] The relative activities in the parentheses are shown as percentages of the activity with Leu-pNA as a substrate.

[b] The relative activities in the parentheses are shown as percentages of the activity with Leu-NH_2 as a substrate.

4．アミノペプチダーゼとラッカーゼを共役させたアミノペプチダーゼ測定法の組み立て

ラッカーゼを共役酵素として血清中のロイシンアミノペプチダーゼおよびアリルアミダーゼの総活性を測定する為に、次のような連続酵素反応系を考えた。

第1反応：　$\text{L-Leu-L-HPG} + H_2O \xrightarrow{\text{aminopeptidases}} \text{L-Leu} + \text{L-HPG}$

第2反応：　$\text{L-HPG} + 1/2\,O_2 \xrightarrow{\text{laccase}} \text{HBA} + CO_2 + NH_2$

第3反応：　HBA + 2,4-dinitrophenylhydrazine → quinoide dye

まず血清中のロイシンアミノペプチダーゼおよびアリルアミダーゼが、ジペプチド基質であるL-Leu-L-HPGを加水分解してHPGが遊離する（第1反応）。次に、このHPGがラッカーゼによる脱炭酸反応によってHBAに変換される（第2反応）。このHBAをアルデヒドに特異的な発色試薬である2,4-ジニトロフェニルヒドラジンによって発色定量する（第3反応）方法である。ここでは、ロイシンアミノペプチダーゼとアリルアミダーゼの酵素活性を一緒に測定することを前提として、アミノペプチダーゼ測定法の組み立てを行なった。

1）ラッカーゼによるL-Leu-L-HPGの酸化反応について

ラッカーゼは一般的にフェノール系化合物を酸化するので、L-Leu-L-HPGがラッカーゼによって酸化されるか調べた。L-Leu-L-HPGをリン酸緩衝液（pH 6.8）中でラッカーゼと共に37℃に保温して、HPLCでL-Leu-L-HPGとHBAの定量を経時的に120分まで行なった。その結果、Fig. IV-5 に示すようにL-Leu-L-HPGの減少とHBAの生成が見られた。しかし、L-Leu-L-HPGとHBAの総モル数が減少していくことから、HBA以外の生成物、おそらくL-Leu-L-HPGの重合産物が生じたことを示している。実際にHPLC分析でもL-Leu-L-HPGとHBA以外のピークが検出された。従って、ラッカーゼによるL-Leu-L-HPGの酸化反応はL-Leu-L-HPGの重合反応とHBAを生成する脱炭酸反応からなると考えられる。

これらの反応の内でHBAの生成が、計画しているアミノペプチダーゼの測定法にとって問題になるが、想定している酵素反応時間は30分なので30分におけるHBAの生成量はL-Leu-L-HPGの初期モル数の約0.3%と少ないことから、血清を添加しないでブランク値を求め実際の測定値から差し引くことによってラッカーゼによるL-Leu-L-HPGからのHBAの生成を無視できると判断した。

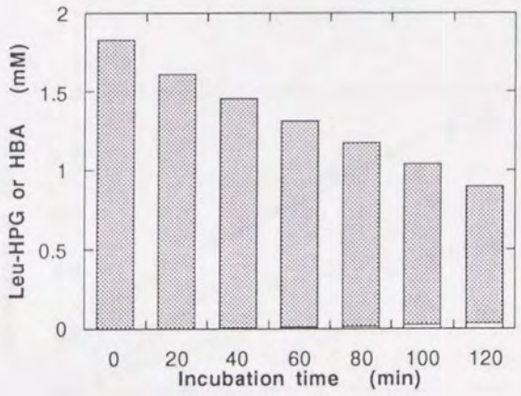


Fig. IV-5. Measurement of Leu-HPG(▩) and HBA(□) during the oxidation of Leu-HPG by laccase.

The reaction mixture containing 4 μl of laccase solution and 200 μl of 2 mM L-Leu-L-HPG in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) was incubated at 37 °C. At regular times, L-Leu-L-HPG and HBA were measured by HPLC analysis.

2）アミノペプチダーゼとラッカーゼの共役反応系の検討

先に述べたように、アリルアミダーゼの至適pHは7.5であり、ロイシンアミノペプチダーゼの至適pHは8.5であった。また、ラッカーゼによるHPGの脱炭酸反応の至適pHは第III 章に示したように5.5であった。

アリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの総活性を測定することを目的とし、かつ、ラッカーゼの脱炭酸反応を先の2酵素による加水分解反応と共役させるために、これら3種の酵素の共役反応をpH6.8のリン酸緩衝液中で行なうことにした。

HBAの生成速度を測定することによってアミノペプチダーゼの酵素活性を測定する為には、アミノペプチダーゼによるHPGの生成が律速にならなければならない。そこで、共役反応が成り立つ為のアミノペプチダーゼ（血清）とラッカーゼの添加量の検討を行なった。Fig. IV-6 に示すように、色々なアミノペプチダーゼ活性の標準血清を用いてその添加量とラッカーゼ（蛋白質濃度、1.3 mg/ml）の添加量から3つの条件A、B、Cについて標準曲線を求めた。条件A（血清 180 µl、ラッカーゼ 25 µl）と条件B（血清 90 µl、ラッカーゼ 25 µl）では、ラッカーゼ活性が低すぎてHPGの脱炭酸反応が律速段階になっている。これに対し、条件C（血清 90 µl、ラッカーゼ 50 µl）ではアミノペプチダーゼによるL-Leu-L-HPGの加水分解が律速になっており、475 nmの吸光度とアミノペプチダーゼ活性との間に400 G-R単位まで直線関係が見られた。正常人の血清中のアミノペプチダーゼ活性の範囲が100～170 G-R単位であることから、Cの条件で血清中のアミノペプチダーゼ活性の上昇を検出できることがわかる。よって、測定法において基質溶液を2.5 mlとし、血清の添加量を90 µl、ラッカーゼの添加量を50 µl（2.7単位）とすることにした。

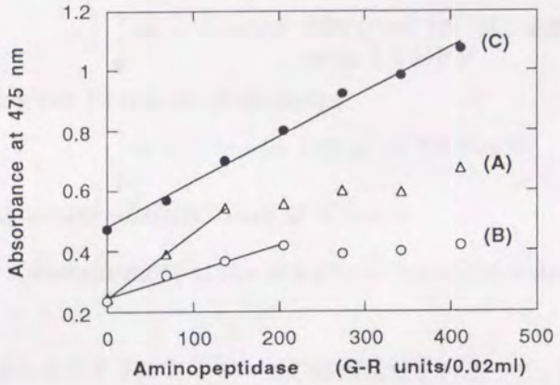


Fig. IV-6. Standard curve for assaying aminopeptidase activity in serum.

Aminopeptidase activities in the presence of control sera containing various known amounts of aminopeptidase activity were measured under the following three conditions: A, 180 µl of serum and 25 µl of laccase; B, 90 µl of serum and 25 µl of laccase; C, 90 µl of serum and 50 µl of laccase.

5．アミノペプチダーゼ活性測定法の実際

これまでの酵素反応条件の検討結果より、ラッカーゼを共役酵素とする血清中のアミノペプチダーゼの活性測定法をFig. IV-7 に示すように設定した。50 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）に溶かした1 mM L-Leu-L-HPGを基質溶液とし、基質溶液2.5 mlを37℃で予備加温しておき、そこに試料（血清）90 μlとラッカーゼ50 μl（2.7単位）を添加してそのまま37℃で30分間保温する。酵素反応の停止は2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンで飽和した1 N HCl 100 μlの添加により行ない生成したHBAの定量を行なう。HBAの発色定量法については第 III 章で述べた通りである。本測定法におけるアミノペプチダーゼの酵素単位は、1分間に1 μmolのHBAを生じる酵素量を 1 単位とすることにした。

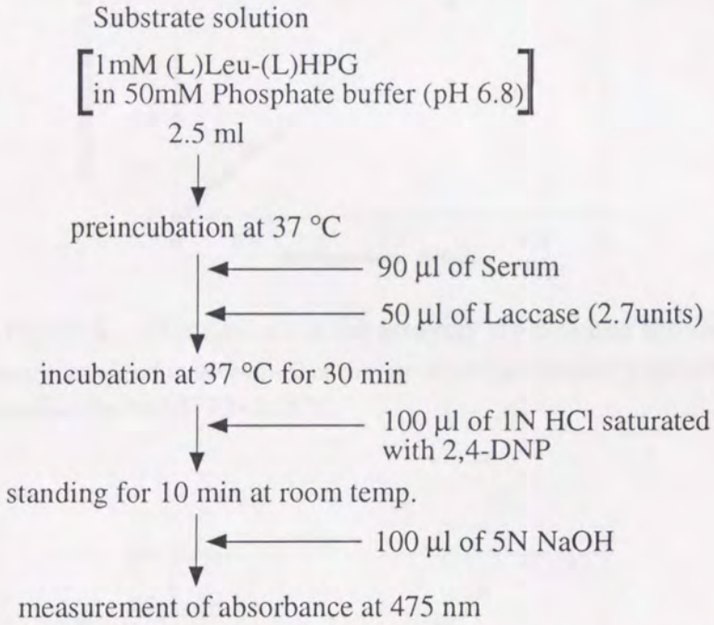


Fig. IV-7.　Measurement of the activity of aminopeptidases in serum.

この測定法を用いて豚肝臓由来のアリルアミダーゼの活性測定を行なった。酵素活性がわかっているアリルアミダーゼ酵素液を適当に水で希釈して標準酵素液とした。Fig. IV-8 にアリルアミダーゼの検量線として横軸に酵素活性（L-Leu-pNAを基質とする酵素活性）を縦軸に本測定法によって求めた吸光度をプロットした。図からわかるように、本測定法はL-Leu-pNAを基質とする従来の測定法との間に2 U/mlまで良好な直線関係（相関係数、0.998）が見られた。

同様に豚肝臓由来のロイシンアミノペプチダーゼの活性測定を行なった。Fig. IV-9 にロイシンアミノペプチダーゼの検量線を示すように、本測定法はL-Leu-NH_2を基質とする従来の測定法との間に57 U/ml

まで良好な直線関係（相関係数、0.999）が見られた。このように、本測定法によってアリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの酵素活性が測定できることを証明した。

次に、実際に正常人の血清を試料として本測定法の精度について検討した。その結果、6.7 ± 0.36 U/L（n = 12、mean ± SD）の測定値が得られ、CV値は5.4%であった。

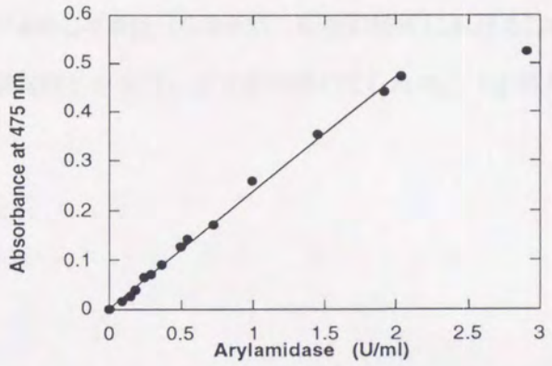


Fig.IV-8. Standard curve for assaying arylamidase activity.

One unit of arylamidase was defined as the amount of enzyme which hydrolyzed 1 μmol of L-leucyl-*p*-nitroanilide per minute in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5) at 37 °C.

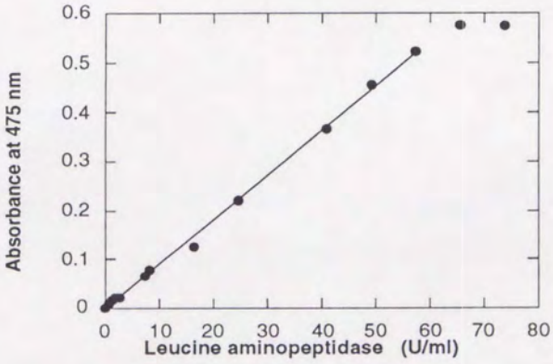


Fig. IV-9. Standard curve for assaying leucine aminopeptidase activity.

One unit of leucine aminopeptidase was defined as the amount of enzyme which hydrolyzed 1 μmol of L-leucinamide per minute in 50 mM borate buffer (pH 8.5) at 37 °C.

6. 要 約

ラッカーゼを共役酵素とするアミノペプチダーゼの活性測定法を検討し次の結果を得た。

（1）L-Leu-L-HPGは、従来のアミノペプチダーゼの基質であるLeu-NH_2やLeu-pNAと比較して、アリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの両酵素によりバランスよく加水分解された。

（2）L-Leu-L-HPGを基質にすることによって、アリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの両酵素活性を測定できる簡便な発色測定法を開発することができた。

（3）Fig. IV-6 からわかるように、設定した測定条件（Fig. IV-7）で発色（475 nm）とアミノペプチダーゼ活性との間に400 G-R単位（G-R単位：現在の臨床におけるLAP活性測定法に汎用されている酵素単位、「実験材料」を参照）まで直線性が見られた。（正常人の血清中の活性は100～170 G-R単位）

第2節　アンジオテンシンⅠ変換酵素の活性測定法の開発

本節では、ビリルビンオキシダーゼを共役酵素とするアンジオテンシンⅠ変換酵素の活性測定法の為の基質の検討、反応条件の至適化、測定法の設定、測定結果について述べる。

1．アンジオテンシンⅠ変換酵素の活性測定法の現状

アンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）は、レニン-アンジオテンシン系で昇圧活性の弱いアンジオテンシンⅠ（Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu）のC末端からのジペプチド（His-Leu）を遊離し昇圧活性の強いアンジオテンシンⅡに変換する作用と、カリクレイン-キニン系において降圧活性（血管拡張活性）のあるブラジキニンのC末端から次々にジペプチド（Phe-Arg, Ser-Pro, Gly-Phe）を水解してブラジキニンを不活性化する作用を持つジペプチジルカルボキシペプチダーゼであり、生体における血圧調節機構に重要な役割を果たしている。臨床において血清中のACE活性の上昇が見られる病態としては、活動性サルコイドーシスなどの肉芽腫性肺疾患、糖尿病、慢性腎不全、肝硬変などが挙げられ、臨床検査部門でもその測定法が注目されている。

血清中のACEの酵素活性測定法として多くの方法が報告されている。これらのほとんどがBz-Gly-His-Leu（hippuryl-L-histidyl-L-leucine）やその類縁体といった種々の合成基質の酵素的水解に基づいている。そして、Bz-Glyのような遊離産物の定量分析が、分光法[67]、蛍光法[68]、放射線同位体法[69]、比色法[70, 71]、HPLC法[72]などの方法によって行なわれてきた。これらのほとんどのアッセイ法では、生成した遊離産物を定量する為に産物を酸性条件下で有機溶媒に選択的に抽出する必要があった。一例として、一般に用いられている山本らによって報告されたLiebermanの方法の変法をTable IV-3に示す。表から分かるように、遊離産物の抽出には、反応液からの溶媒抽出、水層と溶媒層の遠心分離、溶媒層から加熱による溶媒の留去、残渣の再溶解、という操作を必要とする。このような煩雑な操作は時間がかかる上に再現性が乏しいことや測定値のバラツキの原因になり、さらにはACEの測定に習熟を要する要因になっている。また、紫外部による測定であるため夾雑物質（血清脂質や溶血物質など）の影響を受けやすいなどの問題点をかかえている。

そこで、著者は前節と同様にACE活性測定の為のストラテジーを考えた。アンジオテンシンⅠのC末がHis-LeuであることからHPG-His-Leuを基質とし、ACEによる加水分解によって遊離するHPGを酸化酵素によりHBAに変換し発色定量することによりACEの活性を測定する方法である。この方法ではアルデヒドに特異的な発色法を用いるので、HBAを反応液から抽出することなく簡便に定量できるのが特長である。

Table IV-3　Modified Lieberman's method

Procedure	Modified method
Substrate solution	Dissolve hippuryl-L-histidyl-L-leucine in borate buffer-NaCl solution. Substrate concentration is 12.5 mM. Adjust to pH 8.3.
Buffer-NaCl solution	Mix 4.5 volumes of M/20 $Na_2B_4O_7$ and 5.5 volumes of M/5 H_3BO_3. Dissolve NaCl to give 1.0 M concentration. Final concentration of NaCl in assay system is 0.4 M.
Assay system	0.1 ml of substrate solution 0.15 ml of serum Total volume is 0.25 ml.
Incubation	37 °C, 60 min.
Termination of reaction	Add 0.25 ml of 0.5N-HCl.
Extraction with ethyl acetate	After 5 min, add 1.5 ml of ethyl acetate gently along the wall of test-tube. Mix for 15 sec by Vortex Mixer. Centrifuge for 10 min at 2,500 rpm.
Evaporation of ethyl acetate	Take 0.5 ml of ethyl acetate layer. Heat at 140 °C for 20 min in electric oven. Stand for 5 min in room-temperature.
Extraction with NaCl	Add 3.0 ml of 1 M NaCl and mix for 15 sec by Vortex Mixer.
Spectrophotometry	Without waiting, extinction of NaCl solution is read at 228 nm against 1 M NaCl as a blank.
Calculation	$(E_{228:60\,min} - E_{228:\,zero\text{-}time})$ $\times 103 \times 3 / (10.44 \times 0.891 \times 0.33 \times 60 \times 0.15)$
Zero-time value	Add 0.25 ml of 0.5 N-HCl to 0.15 ml of serum, then add 0.1 ml of substrate solution. Treat as above without incubation.

山本節子ら、日胸疾会誌　18（5）、p. 298（1980）より

2．実験材料と実験方法

1）　実験材料

ビリルビンオキシダーゼは*Myrothecium verrucaria*由来の天野製薬（株）製の酵素を用いた。ビリルビンオキシダーゼの酵素単位は、4-ヒドロキシマンデル酸（HMA）を基質とし、50 mMホウ酸緩衝液（pH 8.5）中、30℃で1分間に1 μmolの4-ヒドロキシベンズアルデヒド（HBA）を生成する酵素量を1単

位とした。この酵素単位によって測定した天野製薬（株）製のビリルビンオキシダーゼ（凍結乾燥物）の比活性は、0.85単位／mg固形物であった。兎の肺起源のACEはシグマ社製の酵素を用いた。ACEの標準血清はシグマ社製のACE Control-Nを用いた。

基質の合成に用いたD-HPGは東京化成（株）製の試薬を、L-Boc-His(Tos)およびL-Leu-OEtはペプチド研究所（株）製の試薬をそれぞれ用いた。DL-HPG-L-His-L-Leuの合成は後述する合成法（6）に述べる。N-Bz-DL-HPG-L-His-L-Leuの合成は合成法（7）に述べる。N-Bz-D-HPGの合成は合成法（8）に述べる。

2） 実験方法

酵素反応はHPLC分析によって解析した。HPLC分析条件は、カラムはYMC-Pack ODS A-312（4.6 ϕ × 150 mm）を用い、移動相はメタノール／20 mMリン酸緩衝液（pH 6.8）（6：4）を用い、流速は0.5 ml / minであった。N-Bz-L-HPGの検出はUV 230 nmで行ない、HBAの検出はUV 280 nmで行なった。

HBAの比色定量では島津UV-2100型分光光度計を使用し、光路長10 mm、試料容量50 ～ 400 μlのマイクロ-ブラックセルを用いた。

3．ACEの基質の検討

ACEの基質特異性をまとめると次のようになる。

(1) カルボキシル基末端が遊離していればかなりの種類のペプチド結合を水解しC末端のジペプチドを遊離する。

(2) 基質として3つ以上のアミノ酸よりなるペプチドであることが必要であり、C末端より第3位のアミノ酸以降はブロックされていても長鎖のペプチドでもよい。

(3) C末端より第2位の位置にプロリンがあれば水解できない。

(4) アンジオテンシンＩを基質とする場合には塩素イオンの存在が必要である。

そこで、基質としてC末をアンジオテンシンＩのC末であるHis-LeuとしたHPG-L-His-L-Leuと、これまでのACEの合成基質の多くがN末がブロックされていることから、N末をBz基でブロックしたN-Bz-HPG-L-His-L-Leuについて検討することにした。

1）L-HPG-L-His-L-LeuとD-HPG-L-His-L-LeuのACEによる加水分解の検討

L-HPG-L-His-L-LeuとD-HPG-L-His-L-Leuを10 mMになるように0.1 MのNaClを含む50 mMホウ酸緩衝液（pH 8.3）にそれぞれ溶かし、兎の肺起源のACEを添加して37℃に保温して、これらトリペプチドが分解するかどうかを検討した。しかし、L-HPG-L-His-L-LeuおよびD-HPG-L-His-L-Leuのいずれも ACEによって加水分解されなかった。

2）N-Bz-L-HPG-L-His-L-LeuとN-Bz-D-HPG-L-His-L-LeuのACEによる加水分解の検討

先と同様にN-Bz-L-HPG-L-His-L-LeuとN-Bz-D-HPG-L-His-L-Leuを0.1 MのNaClの存在下に50 mMホウ酸緩衝液（pH 8.3）中でACEと37℃で保温した。その結果、N-Bz-L-HPG-L-His-L-LeuがACEによって加水分解されN-Bz-L-HPGが生じたが、N-Bz-D-HPG-L-His-L-Leuは加水分解されなかった。

以上の結果より、N-Bz-L-HPG-L-His-L-LeuをACEの基質にすることにした。N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuは、緩衝液中で非酵素的に分解することのない安定な基質であった。

4．作用反応条件の最適化

1）ACEによるN-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuの加水分解の作用至適条件の検討

ACEによるN-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuの加水分解の作用至適pHを調べた。兎の肺起源のACEを用い、37℃で反応を行ない、HPLCによりN-Bz-L-HPGの生成速度を求めた。Fig. IV-10 に示すように、pH 8.0 付近で最大の活性を示し、また、ホウ酸緩衝液の方がリン酸緩衝液よりも活性が高かいことが明かとなった。これはアンジオテンシンＩに対するACEの至適pHが8.3であるのと同じ結果である。

次に、ACEの活性の発現にはハロゲンイオンが必要なことから、N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuを基質としたときのACEの活性発現における最適な塩素イオン濃度について調べた。Fig. IV-11 に示すように、活性の発現には塩素イオンが必要であるが、0.1 MのNaClの添加で充分であることがわっかた。

よって、N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuを基質とするときのACEの作用至適条件は、0.1 MのNaClを含ぬpH 8.3のホウ酸緩衝液であることがわっかた。

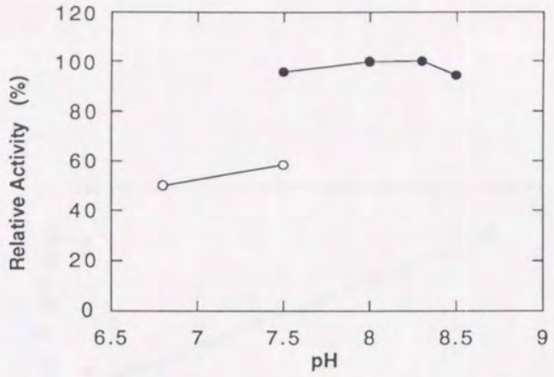


Fig. IV-10. Effect of pH on ACE activity, measured as the rate of hydrolysis of N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leu.

Rabbit lung ACE activity was measured at various pHs using the following buffers adjusted to the each pH in the presence of 0.3 M NaCl: sodium phosphate (—○—), sodium borate (—●—).

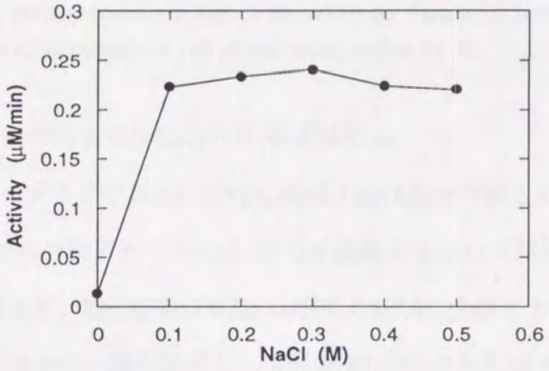


Fig. IV-11. Effect of NaCl on ACE activity, measured as the rate of hydrolysis of N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leu.

2）ACEのN-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuに対する*K*m値の測定

0.2 MのNaClを含む50 mMホウ酸緩衝液（pH 8.3）中、37℃で様々な濃度のN-Bz-L-HPG-L-His-L-LeuのACEによる加水分解速度を測定して、ACEのN-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuに対する速度パラメータを求めた。Fig. IV-12 に示すLineweaver-Burkの逆数プロットより*K*m値は0.072 mM、*V*maxは0.015 μmol/min/mg proteinと求められた。ACEのアンジオテンシンＩに対する*K*m値が0.07 mMであること

から、N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuは、ACEに対して天然基質（アンジオテンシンⅠ）に近い親和性を持った基質であると言える。また、測定法における基質濃度を*Km*値の約７倍である0.5 mMにすることにした。

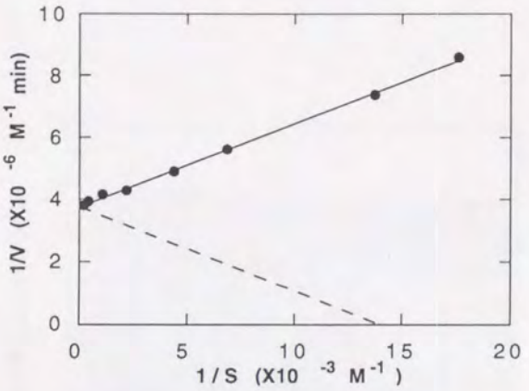


Fig. IV-12.　Effect of substrate concentration on rabbit lung ACE activity, measured as the rate of hydrolysis of N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leu (Lineweaver-Burk plot).

Reaction mixture containing various concentrations of the substrate, 5 μmol of borate buffer (pH 8.3), 20 μmol of NaCl, and rabbit lung ACE in a final volume of 110 μl was incubated at 37 °C.

５．ビリルビンオキシダーゼによるN-Bz-HPGの脱炭酸反応

先に、ACEによってトリペプチドであるL-HPG-L-His-L-Leuは加水分解されず、N末をブロックしたN-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuが加水分解されてN-Bz-L-HPGが遊離するという結果を得た。従って、ACEと酸化酵素の共役反応を考えるとき、酸化酵素がN-Bz-L-HPGをHBAに変換できなければならない。そこで、ACEの至適pHが8.3にあることから、酸化酵素として至適pHが8.5である*M. verrucaria*由来のビリルビンオキシダーゼを用いることにし、ビリルビンオキシダーゼがN-Bz-L-HPGをHBAに変換できるか検討を行った。

合成しやすいN-Bz-D-HPGを基質として用いた。N-Bz-D-HPGを50ｍＭホウ酸緩衝液（pH 8.3）に10ｍＭになるように溶かし、この基質溶液100μlにビリルビンオキシダーゼを8.5×10^3単位添加して37℃に保温した。反応開始後、経時的にサンプリングを行ないHPLCにより基質とHBAを定量した。Fig. IV-13に示すとおり、N-Bz-D-HPGはビリルビンオキシダーゼによってHBAに変換された。しかし、120分までの分析でN-Bz-D-HPGとHBAの総モル数が経時的に減少していくことがわかった。これはN-Bz-D-HPGがHBA以外の物質に変換されることを示している。おそらくビリルビンオキシダーゼによるラジカル付

加反応によって、N-Bz-D-HPGの重合産物が生じる為と考えられる。つまり、ビリルビンオキシダーゼによるN-Bz-D-HPGの酸化反応は、HBAが生じる酸化的脱炭酸反応が主であるが、副反応として重合産物が生じるラジカル付加反応が起きていると考えられる。しかし、重合産物のモル数は120分の反応で初期のN-Bz-D-HPGのモル数の２％以下と少なく、実際のACE活性測定法においては、血清（ACE）を添加しない測定値、つまりブランク値を求めて測定値から差し引いて実際の値を求めるので問題ないと判断した。

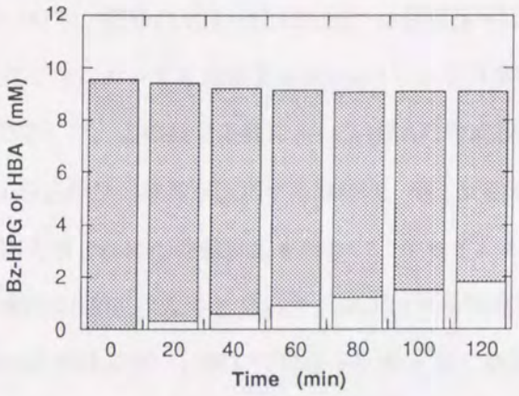


Fig. IV-13. Measurement of N-Bz-HPG and HBA during the oxidation of N-Bz-HPG by bilirubin oxidase.

The reaction mixture containing 1 μmol of N-Bz-HPG, 5 μmol of borate buffer (pH 8.3), and 8.5×10^{-3} units of bilirubin oxidase from *M. verrucaria* in a final volume of 105 μl was incubated at 37 °C. At regular times, N-Bz-HPG and HBA in the reaction mixture were measured by HPLC analysis.

6．アンジオテンシンＩ変換酵素とビリルビンオキシダーゼの共役反応

これまでの検討結果から、ビリルビンオキシダーゼを共役酵素として血清中のACEの酵素活性を測定する為に、以下のような連続酵素反応系を計画した。

第１反応：　N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leu + H_2O $\xrightarrow{\text{ACE}}$ N-Bz-L-HPG + L-His-L-Leu

第２反応：　N-Bz-L-HPG + 1/2 O_2 $\xrightarrow{\text{Bilirubin oxidase}}$ HBA + CO_2 + N-Bz-NH_2

第３反応：　HBA + 2,4-dinitrophenylhydrazine → quinoide dye

すなわち、N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuが血清中のACEによって加水分解されN-Bz-L-HPGが遊離する（第１反応）。遊離したN-Bz-L-HPGがビリルビンオキシダーゼによる酸化的脱炭酸反応によってHBAに変換される（第２反応）。生じたHBAを酸性条件下で2,4-ジニトロフェニルヒドラジンと縮合させてヒド

ラゾンに変換し、次いでアルカリ条件下でキノイド構造体にして発色定量する（第３反応）ことによってACEの酵素活性を測定する。

そこで、ACEとビリルビンオキシダーゼの共役系における反応条件の最適化を行なった。ACEの至適pHは8.3であり、また、ビリルビンオキシダーゼによるN-Bz-L-HPGの脱炭酸反応の至適pHは8.5であることから、共役反応はホウ酸緩衝液（pH 8.3）中で行なうことにした。N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuをホウ酸緩衝液（pH 8.3）中でビリルビンオキシダーゼと共に37℃に保温したが、N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuはビリルビンオキシダーゼによって酸化されなかった。

血清中のACE酵素活性は弱いので、従来のACE活性測定法では基質溶液に対して１～1.5倍量の血清が用いられてきた。そこで、本測定法においても血清量を100 μlとし、基質溶液を100 μl、ビリルビンオキシダーゼの添加容量を5 μlと設定した。この設定条件においてHBAの生成速度を測定することによってACEの酵素活性、すなわち第１反応の反応速度を測定する為には、第１反応が律速にならなければならず、その確認を行なった。第１反応と第２反応の連続反応を行ない、それぞれの反応の生成物であるN-Bz-HPGとHBAの定量を経時的にHPLCにより行なった。ACEは正常値を示す標準血清を用い、ビリルビンオキシダーゼは8.4 U/mlの酵素液を用い、37℃で反応を行なった。結果をFig. IV-14 に示す。約40分の応答時間の後にHBAが直線的に生成され、それに伴ってN-Bz-HPGの生成は横這いになっている。このことは、この連続酵素反応系において第１反応が律速になっていること、すなわちHBAの生成速度が第１反応速度（ACE活性）を表わしていることを示している。また、応答時間が約40分であることから、共役反応時間を120分にした。

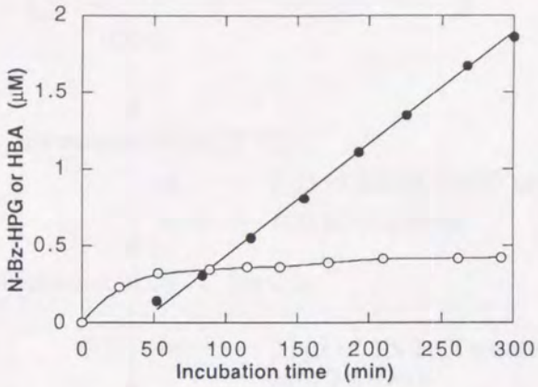


Fig. IV-14. Measurement of N-Bz-HPG and HBA in the standard reaction mixture.
A normal standard control serum was used as ACE. Symbols: ○ , N-Bz-HPG concentration; ● , HBA concentration.

7．ACE活性測定法の実際

これまでの測定条件の最適化の検討結果より、Fig. IV-15 に示すようにACEの活性測定法を決めた。1 mMのN-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuと0.15 MのNaClを含む0.2 Mホウ酸緩衝液（pH 8.3）を基質溶液とし、基質溶液100 μlを37℃で予備加温しておき、これにビリルビンオキシダーゼ5 μl（0.042 単位）と試料血清100 μlを添加し37℃で120分間保温する。反応の停止は1 N塩酸の2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン飽和溶液10 μlで行ない、室温で約10分放置後、5 N水酸化ナトリウム10 μlの添加で発色させ475 nmの吸光度を測定する。実際の測定では、試薬盲検として上記の測定で血清の替わりに水を用いた測定も同時に行ない、これを対照として検体の吸光度の測定を行なった。ACEの酵素活性は、1分間に1 nmolのHBAを生成する酵素量を 1 単位として表わすことにした。

様々な濃度（0 ～12 μg/ml）に希釈した兎の肺起源のACEを測定試料にして、本ACE活性測定法の定量性の確認を行なった。結果をFig. IV-16 に示すように、ACE濃度と測定値との間に高い相関関係（相関係数、0.997）が見られ、本測定法によってACEの活性測定ができることを示している。

次に、標準血清および正常なヒトの血清を検体にして数回測定を行ない、本測定法の正確さについて検討した。Tabl IV-3 に示すように、本測定法が正確であることを示している。

Substrate solution

[1 mM N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leu
0.15 M NaCl
in 0.2 M Borate Buffer (pH 8.3)]

100 µl

↓

preincubation at 37 °C

← 5 µl of BOD (0.042 units)
← 100 µl of Serum

↓

incubation at 37 °C for 2 h

← 10 µl of 1N HCl saturated with 2,4-DNP

↓

standing for 10 min at room temp.

← 10 µl of 5N NaOH

↓

measurement of absorbance at 475 nm

Fig. IV-15. Measurement of ACE activity in serum.

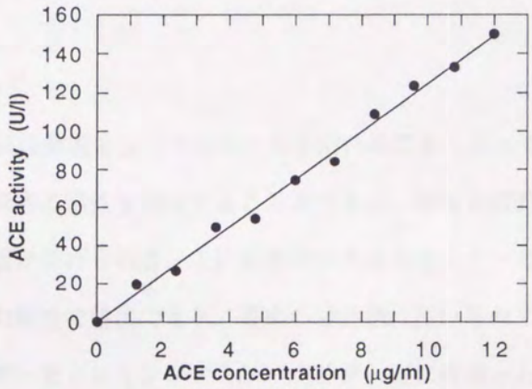


Fig. IV-16. Relationship between ACE activity and ACE concentration in the standard reaction mixture.

One unit (U) was defined as the amount that catalyzed the formation of 1 nmol of HBA per min. Various concentrations of rabbit lung ACE were used as ACE samples.

Table IV-4. Precision of this method

Sample	n	ACE activity (U/l)		CV (%)
		Mean	SD	
Control serum	8	35.8	4.60	12.8
Human serum	10	39.2	4.27	10.9

8．要　約

ビリルビンオキシダーゼを共役酵素とするアンジオテンシンⅠ変換酵素の活性測定法の開発を行い、次の結果をえた。

（1）アンジオテンシンⅠ変換酵素とビリルビンオキシダーゼの共役反応の為の基質の検討を行い、N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuを基質にすることにした。

（2）アンジオテンシンⅠ変換酵素によるN-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuの加水分解反応の*Km*値は0.072 mMであり、天然基質であるアンジオテンシンⅠの*Km*値0.07とほぼ同じ値であった。

（3）ビリルビンオキシダーゼによってN-Bz-L-HPGをHBAに変換することができた。

（4）設定した測定条件（Fig. IV-15）でアンジオテンシンⅠ変換酵素の酵素活性が測定できることを証明した。

第3節　考　察

L-Leu-L-HPGを基質とし共役酵素としてラッカーゼを用いることによって、アリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの両方の活性を測定することができた。著者が開発したアミノペプチダーゼの活性測定法の特長として次の点が挙げられる。1）血清中のアリルアミダーゼあるいはロイシンアミノペプチダーゼの活性上昇を1回の検査で検出できる。従来の測定法に用いられている基質Leu-pNA、Leu-NH_2では、それぞれアリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼに片寄った活性しか測れない。2）L-Leu-L-HPGは水溶液中で安定で非酵素的に加水分解されない。これに対しLeu-pNAとLeu-NH_2は共に水溶液の状態で不安定である。

また、本アミノペプチダーゼ活性測定法ではpH 6.8で酵素反応を行ったが、共役酵素に*M. verrucaria*由来のビリルビンオキシダーゼを用いることによって、その至適pHが8.0～8.5にあることからpH 7.5から9.0の範囲においてもアミノペプチダーゼの活性測定が可能である。酵素反応をどのpHで行うかは、病態によって血清中のアリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの存在比が異なるので、目的とする病

態に応じて実際の臨床に即した検討が更に必要である。

一方、N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuを基質としビリルビンオキシダーゼを共役酵素とすることによって、アンジオテンシンⅠ変換酵素（ACE）の活性を測定することができた。本ACE活性測定法は従来の測定法で行われていた溶媒抽出といった煩雑な操作を必要とせず、かつ可視部での測定が可能な測定法である。

N-Bz-L-HPG-L-His-L-LeuのACEによる加水分解の*K*m値は0.072ｍＭであり、天然基質であるアンジオテンシンⅠの0.07mMとほぼ等しかった。また、ACEの活性化に必要とするNaCl濃度は0.075 Mであった。これに対し、N-Bz-Gly-His-Leuの*K*m値は4.5～6.3 mMであり、活性化には0.4 MのNaClが必要である[73]。これらのことからN-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuは天然基質により近い基質であると言える。

臨床化学分析において酵素活性測定法は、可視領域の発色反応に結び付けて測定するのが一般的である。しかしながら、従来のアミノペプチダーゼ活性測定法、いわゆる「LAP活性測定法」に用いられるLeu-pNAやLeu-β-ナフチルアミドといった発色性基質は、発色性に優れているものの、測定酵素に対して本来の天然基質とは異なる加水分解特性を示している。すなわち、これらの発色性基質は「LAP活性測定法」の基質として用いられているにもかかわらず、アリルアミダーゼで分解されるもののロイシンアミノペプチダーゼ（LAP）ではあまり分解されないという点である。一方、ACE活性測定法（Cushumann法など）において用いられるN-Bz-Gly-His-Leuは、本来の基質であるアンジオテンシンⅠ以上にACEによって分解され易いが、発色反応に結びつけることができない為に測定法が煩雑になっている。このように、発色性に優れているが分解性に問題がある基質（前者）、および分解性は良いが発色でない基質（後者）と比較して、著者が開発したHPGをC末もしくはN末とするペプチド性の基質は天然基質に近く、かつ発色定量できるという点で優れた基質である。

本章では、酸化酵素による脱炭酸反応を用いたアリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの活性測定法とACE活性測定法の開発について述べたが、この測定原理は他のアミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼにも応用可能である。

合 成 法

シリカゲル薄層板（TLC）はKieselgel 60 F_{254}（メルク社製、Art 5715）を用いた。カラムクロマトグラフィーは以下の樹脂を用いた。シリカゲル樹脂、Kieselgel 60（メルク社製）；ゲル濾過樹脂、Sephadex LH-20（ファルマシア社製）；ポリスチレン吸着樹脂、ダイアイオンHP-20およびCHP-20P（三菱化学製）；イオン交換樹脂、ダウエックス50W（ダウケミカル社製）。

^{1}H-NMRスペクトルは、JNM-GSX400 FT NMRシステム（400 MHz）（日本電子製）で測定した。質量スペクトルは、JMS-SX102A型質量分析計（日本電子製）で測定した。IRスペクトルは、日立製260-10分光器で測定した。分取HPLCは、島津製LC-8Aシステムを用いた。

1．ペニシリンX（PcX）の合成

4-ヒドロキシフェニル酢酸 9.74 g（64 mmol）と4-ヒドロキシこはく酸イミド 7.37 g（64 mmol）をDMF 30 mlに溶かし、そこに20 mlのDMFに溶かしたジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）13.2 g（64 mmol）を氷冷下撹拌しながら滴下し、5℃で更に12時間撹拌した。反応液からDCUreaを濾去し、濾液を活性エステルとして用いた。6-アミノペニシラン酸 9.68 g（44.8 mmol）をジクロロメタン60 mlに懸濁し、更にトリエチルアミン 12.5 ml（89.6 mmol）を加え、氷冷下撹拌しながら先の活性エステルを滴下した。5℃で6時間、室温で2時間撹拌した。このカップリング反応液にジクロロメタン 250 mlを加え、5％炭酸水素ナトリウム水 200 mlで2回抽出を行ないPcXを水層側に転溶した。水層を減圧下に約100 mlまで濃縮した後、水で充填したCHP-20Pカラム（4 cm ϕ×31 cm）に通塔した。500 mlの水で水洗後、30%のメタノール水溶液でPcXの溶出を行なった。PcXの溶出画分を集めて濃縮しメタノールを除き、凍結乾燥を行ないPcXをナトリウム塩として 7.34 g（19.7 mmol）得た。（通算収率 44%）

IR（KBr）cm^{-1}: 1770, 1660, 1610; ^{1}H-NMR（D_2O、内部標準 TSP）δ: 1.50 (3H, s), 1.56 (3H, s), 3.58 (1H, d, J = 15.3 Hz), 3.64 (1H, d, J = 15.3 Hz), 4.23 (1H, s), 5.43 (1H, d, J = 3.7 Hz), 5.54 (1H, d, J = 3.7 Hz), 6.90 (2H, d, J = 8.2 Hz), 7.22 (2H, d, J = 8.3 Hz)

2．ペニシリンXのメチルエステル（PcXOMe）の合成

PcXナトリウム塩 1.2 g（3.2 mmol）をDMF 5 mlに溶かし、そこに氷冷下撹拌しながらトリエチルアミ

ン 530 μl（3.8 mmol）とヨウ化メチル 540 mg（3.8 mmol）を添加し更に室温で 4 時間攪拌した。反応液に氷冷した酢酸エチル 50 mlと20 %食塩水 50 mlの混合液を加え、生成したPcXOMeを有機溶媒層に抽出した。有機溶媒層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下に濃縮乾固した。残渣を 2 mlのクロロホルムに溶かし、クロロホルムで充填したシリカゲルカラム（1.5 ϕ×20 cm）に付し、クロロホルムとメタノールの混液（20 : 1）で展開した。溶出したPcXOMe画分を合わせ、減圧下に濃縮乾固してPcXOMeを765 mg（2.1 mmol）得た。（通算収率 66%）

IR（KBr）cm^{-1}: 1780, 1750, 1660; ^{1}H-NMR（$CDCl_3$、内部標準 TMS）δ: 1.44 (3H, s), 1.47 (3H, s), 3.56 (1H, d, J = 15.3 Hz), 3.76 (3H, s), 4.38 (1H, s), 5.51 (1H, d, J = 4.1 Hz), 5.65 (1H, dd, J = 4.1 Hz, J = 8.8 Hz), 6.11 (1H, d, J = 8.8 Hz), 6.81 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.12 (2H, d, J = 8.5 Hz)

3．ペニシリンXのピバロイルオキシメチルエステル（PcXPOM）の合成

PcXナトリウム塩 2.5 g（6.72 mmol）をDMF 40 mlに溶かし、ピバリン酸塩化メチルエステル 10.12 g（67.2 mol）を添加して室温で 3 時間攪拌した。その後、反応液に氷冷した酢酸エチル300 mlと20%食塩水 300 mlを加えて溶媒抽出を行なった。有機溶媒層を飽和食塩水 300 mlで洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下に濃縮乾固した。残渣を少量のクロロホルムに溶かし、クロロホルムで充填したシリカゲルカラム（3 ϕ×45 cm）に付し、クロロホルムとアセトンの混液（10：1）で展開した。PcXPOMの溶出フラクションを集め減圧下に濃縮乾固してPcXPOMを2.72 g（5.85 mmol）得た。（通算収率 87%）

IR（KBr）cm^{-1}: 1780, 1760, 1750, 1150; ^{1}H-NMR（$CDCl_3$、内部標準 TMS）δ: 1.21 (9H, s), 1.46 (9H, s), 3.56 (2H, s), 4.39 (1H, s), 5.50 (1H, d, J = 4.0 Hz), 5.65 (1H, dd, J = 4.4 Hz, J = 9.2 Hz), 5.76 (1H, d, J = 5.5 Hz), 5.84 (1H, d, J = 5.5 Hz), 6.15 (1H, d, J = 9.2 Hz), 6.80 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.11 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.27 (1H, br)

4．7-(4-ヒドロキシアセトアミド)セファロスポラン酸（CepX）の合成

CepXの合成は、ペニシリンXと同様にDCCを用いた活性エステル法で行なった。

4-ヒドロキシフェニル酢酸 952 mg（6.9 mmol）とN-ヒドロイシこはく酸イミド794 mg（6.9 mmol）をDMF 5 mlに溶かし、氷冷下攪拌しながらDMF 1 mlに溶かしたDCC 1.566 g（7.59 mmol）を滴下した。氷冷下で 1 時間、更に 5 ℃で 3 時間攪拌した。反応液からDCUreaを濾去し、更に精製せずに活性エステルとして用いた。7-アミノセファロスポラン酸 1 g（3.68 mmol）をジクロロメタン10 mlに懸濁し、更に

トリエチルアミン1.04 ml（7.36 mmol）を加え、氷冷下攪拌しながら先の活性エステルを滴下した。5℃で5時間、更に室温で5時間攪拌した。このカップリング反応液にジクロロメタン50 mlを加え、2.5%炭酸水素ナトリウム水溶液50 mlで2回抽出を行ないCepXを水槽に転溶した。水槽を減圧下に濃縮してジクロロメタンを除いた後、水で充填したCHP-20Pカラム（5.5 cm φ×10 cm）に通塔した。1リッターの水で水洗後、0%から40%のメタノール水溶液のグラジエント溶出（1リッター）によってCepXの溶出を行なった。CepXの溶出画分を集めて濃縮し、凍結乾燥を行ないCepXをナトリウム塩として410 mg（0.96 mmol）得た。（通算収率　26%）

^{1}H-NMR（D_2O、内部標準TSP）δ: 1.97 (3H, s), 3.23 (1H, d, J = 17.6 Hz), 3.49 (1H, d, J = 17.6 Hz), 3.44 (1H, d, J = 15.0 Hz), 3.50 (1H, d, J = 14.7 Hz), 4.58 (1H, d, J = 12.5 Hz), 4.74 (1H, d, J = 12.5 Hz), 4.95 (1H, d, J = 4.8 Hz), 5.50 (1H, d, J = 4.8 Hz), 6.76 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.10 (2H, d, J = 8.4 Hz)

5．L-Leu-L-HPGの合成

D-2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン（D-HPG）5 g（30 mmol）と無水酢酸300mlを混合し、80℃で5時間攪拌した。反応液を濾過後、減圧下に濃縮乾固し粗N-アセチル-D-HPGを8.55 g得た。このN-アセチル-D-HPGに1 N塩酸300 mlを加え、100℃で7時間攪拌してアセチルの加水分解を行なった。得られた反応混合物を、ダウエックス50Wで精製し（3Nアンモニア溶出）、更に水で結晶化を行ないDL-2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン（DL-HPG）の結晶を1.53 g（9.2 mmol）得た。（収率　31 %）

^{1}H-NMR (D_2O , 内部標準 TSP) δ: 4.74 (1H, s), 6.96 (2H, d, J = 8.0 Hz), 7.33 (2H, d, J = 8.8 Hz)

DL-HPG 1.53 g（9.2 mmol）を水-ジオキサン（1：1）40 mlに溶かし、トリエチルアミン2.2 ml（15.7 mmol）、ジ-t-ブチル-ジカルボナート 2.74 g（13.8 mmol）を加え、室温で3時間攪拌した。反応終了後、水と酢酸エチルを加え、冷却攪拌しながら1 N塩酸を添加して水層のpHを2に調整した。酢酸エチル層を水洗後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下に濃縮乾固しN-Boc-DL-HPGを2.10 g（7.9 mmol）得た。（収率　85 %）

N-Boc-DL-HPG 2.10 g（7.9 mmol）をDMF 25 mlに溶かし、トリエチルアミン3.3 ml（23.7 mmol）、臭化ベンジルを1.7 ml（14.3 mmol）加え14時間攪拌した。反応液に、水と酢酸エチルを加え溶媒抽出を行ない、酢酸エチル層を飽和炭酸水素ナトリウム水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下に濃縮乾固して、2.4 gの反応混合物を得た。この反応混合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行ない（トルエン：酢酸エチル / 10：1溶出）、N-Boc-DL-HPG-OBzlを1.80 g（5.0mmol）得た。

(収率　63 %)

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 内部標準 TMS) δ: 1.43 (9H, s), 5.15 (2H, s), 5.28 (1H, d, J = 6.6 Hz), 5.53 (1H, brs.), 6.73 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.17 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.19-7.21, 7.29-7.30 (5H, m)

得られたN-Boc-DL-HPG-OBzl 1.80 g（5.0 mmol）をジクロロメタン30 mlに溶かし、トリフルオロ酢酸を10ml加え、室温で２時間攪拌した。反応液を減圧下に濃縮乾固した後、飽和炭酸水素ナトリウム水100 mlと酢酸エチル200 mlを加え、溶媒抽出し、酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥してから、減圧下に濃縮乾固しDL-HPG-OBzlを1.20 g（4.7 mmol）得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, 内部標準 TMS) δ: 4.58 (1H, s), 5.10 (1H, d, J = 12.5 Hz), 5.17 (1H, d, J = 12.5 Hz), 6.70 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.17 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.20-7.24, 7.27-7.33 (5H, m)

得られたDL-HPG-OBzlを酢酸エチル100 mlに溶かし、N-Cbz-L-Leu を1.34 g（5.1 mmol）、DCCを1.17 g（5.7 mmol)加え、室温で１時間攪拌した。反応液を濾過後、濾液に水、酢酸エチルを加え、溶媒抽出を行ない、酢酸エチル層を0.1N塩酸、水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下に濃縮乾固して反応混合物を2.84 g得た。得られた反応混合物を、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行ないN-Cbz-L-Leu-DL-HPG-OBzlを2.34 g（4.5 mmol）得た。（収率　44%）

得られたN-Cbz-L-Leu-DL-HPG-OBzl 2.34 g（4.5 mmol）をメタノール80 mlに溶かし、10%パラジウム炭素を240 mg加え、室温で１時間攪拌して接触還元によりCbz基とベンジルエステル基を除去した。反応液を減圧下に濃縮乾固し、L-Leu-DL-HPGを1.22 g（4.12 mmol）得た。（収率　92%）

IR (KBr) cm^{-1} ：3333、2932、2853、1674、1628、1576、1514、1451、1385、1246、1175、1088、1005、893、837、754、708、640、521、476、415、^{1}H-NMR (D_2O + NaOH , 内部標準 TSP) δ: 7.05 (2H, d, J = 8.9 Hz), 6.55 (2H, d, J = 8.4 Hz), 5.02 (1H, s), 3.39 (1H, t, J = 7.0, 7.3 Hz), 1.49 (1H, m), 1.40 (2H, m), 0.82 (6H, q)

先に合成したジアステレオマーの混合物であるL-Leu-DL-HPGから、L-Leu-L-HPGを分離精製するために、L-Leu-DL-HPG 1.2gをメタノール／20mMリン酸緩衝液（pH 6.8）（2：8）50mlに溶かし、5 mlずつ10回に分けて連続して、分取HPLC（カラム：YMC-Pack ODS S-343-15 (2×25 cm)、移動相：MeOH／20mMリン酸緩衝液（pH6.8）（2／8）、流速：7.0ml/min、検出：UV280nm）にかけ、保持時間15.5分のピークを分取した。なお、L-Leu-D-HPGは保持時間26.3分に溶出してきた。分取したL-Leu-L-HPG画分の脱塩は、移動層を水とする他は上記の分取HPLCと同じ条件で行ない、脱塩されて溶出してきたL-Leu-L-HPGのピークを分取し、凍結乾燥してL-Leu-L-HPGをナトリウム塩として560 mg得た。

^{1}H-NMR (D_2O , 内部標準 TSP) δ: 7.31 (2H, d, J = 8.1 Hz), 6.95 (2H, d, J = 8.0 Hz), 5.24 (1H, s), 4.11 (1H, t,

J = 8.1, 7.3 Hz), 1.74 (2H, m), 1.56 (1H, m), 0.93 (6H, q)

6． DL-HPG-L-His-L-Leuの合成

L-Leu-OEt・HCl 0.98 g（5.0 mmol）をジクロロメタン20mlに溶かし、これにトリエチルアミン0.77ml（5.5 mmol）を添加し、ジクロロメタン5mlに溶かしたL-Boc-His(Tos) 2.05g（5.0 mmol）を加えた。これに氷冷下撹拌しながらDCC 1.13g（5.5 mmol）のジクロロメタン溶液18 mlを滴下した。撹拌しながら氷冷下で5時間、更に室温で11時間撹拌した。反応終了後、不溶物を濾過で除き減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣を酢酸エチルに溶かし、0.1N HCl、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧下に濃縮乾固して反応混合物 2.98gを得た。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（トルエン、アセトン混液（2：1）で溶出）に付し、L-Boc-His(Tos)-L-Leu-OEtを2.36 g（4.3 mmol）得た。（収率、86%）

L-Boc-His(Tos)-L-Leu-OEt 2.0g（3.64 mmol）をジクロロメタン20 ml に溶かし、氷冷下撹拌しながらトリフルオロ酢酸10mlを加え、氷冷下 1 時間、更に室温で1.5時間撹拌した。反応終了後、減圧下に溶媒を留去し、得られた残渣を酢酸エチルに溶かし、氷冷した飽和炭酸カリウム水溶液、飽和食塩水で順次洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧下に濃縮乾固してL-His(Tos)-L-Leu-OEtを 1.31 g（2.9 mmol）得た。（収率、80%）

L-His(Tos)-L-Leu-OEt 0.93 g（2.06 mmol）をジクロロメタン9 mlに溶かし、これに先の 5（L-Leu-L-HPGの合成）と同じ方法で合成したN-Boc-DL-HPG 0.5 g（1.87 mmol）のジクロロメタン溶液6 mlを加え、氷冷下に撹拌しながらDCC 0.43 g（2.06 mmol）のジクロロメタン溶液 5 mlを滴下し、氷冷下13時間、更に室温で 2 時間撹拌した。反応終了後、不溶物を濾過で除き減圧下に溶媒を留去した。得られた残渣を酢酸エチルに溶かし、5 %クエン酸水溶液、水、飽和食塩水で順次洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧下に濃縮乾固してN-Boc-DL-HPG-L-His(Tos)-L-Leu-OEt を0.458 g（0.64 mmol）得た。（収率、34%）

N-Boc-DL-HPG-L-His(Tos)-L-Leu-OEt 0.458 g（0.64 mmol）にテトラヒドロフラン3 mlを加えて溶かし、氷冷下撹拌しながら水 0.5 ml、1N NaOH 2.5 mlを加え、氷冷下 2 時間、更に室温で 2 時間撹拌した。反応終了後、水を加えて希釈し、減圧下にテトラヒドロフランを留去した後、n-ブタノールを加え、氷冷下1N HCl で水層のpHを3.0にしてn-ブタノール抽出を行なった。n-ブタノール層は飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧下に濃縮乾固して反応混合物 0.67 gを得た。得られた反応混合物を

Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィーにより精製してN-Boc-DL-HPG-L-His-L-Leuを0.311 g（0.60 mmol）得た。（収率　94%）

N-Boc-DL-HPG-L-His-L-Leu 0.31 g（0.60 mmol）にジクロロメタン3 mlを加えて懸濁し、氷冷下攪拌しながら、TFA 1mlを加え、室温で2時間攪拌した。反応終了後、反応液を減圧下にTFAを留去した後、濃縮乾固してDL-HPG-L-His-L-Leuを0.227 g（0.55 mmol）得た。（収率　91%）

FAB-MS m/z : 418 $(M+H)^+$、^{1}H-NMR (CD_3OD, 内部標準 TMS) δ: 0.84 (3H, d, J = 6.2 Hz), 0.91 (3H, d, J = 6.2 Hz), 0.92 (3H, d, J = 6.2 Hz), 0.97 (3H, d, J = 6.2 Hz), 1.50-1.80 (3H×2, m), 3.02-3.28 (2H×2, m), 4.27 (1H, dd, J = 10.6,3.7 Hz), 4.33 (1H, dd, J = 10.6,3.7 Hz), 4.72 (1H, t, J = 5.9 Hz), 4.75 (1H, t, J = 5.9 Hz), 4.96 (1H×2, s), 6.58 (1H, br s), 7.23 (1H, br s), 6.81 (2H, d, J = 8.4 Hz), 6.86 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.29 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.30 (2H, d, J = 8.4 Hz), 8.30 (1H, br s), 8.37 (1H, br s)

7．N-Bz-DL-HPG-L-His-L-Leuの合成

DL-HPG-L-His-L-Leu 0.26g（0.62mmol）を水15mlに溶かし、氷冷下攪拌しながら塩化ベンゾイル86 μl（0.74mmol）と炭酸ナトリウム水（1mmol）をそれぞれ4回に分けて2時間かけて添加し、更に2時間攪拌した。反応終了後、エーテルで洗浄してから、水層を5 mlずつ3回に分けて連続して、分取HPLC（カラム：YMC-Pack ODS S-343-15 (2×25cm)、移動相：MeOH/20mMリン酸緩衝液（pH6.8）（45／55）、流速：7.0ml/min、検出：UV280nm）に付し、保持時間18.4分に溶出して来たBz-L-HPG-L-His-L-Leuのピークを分取した。なお、Bz-D-HPG-L-His-L-Leuは保持時間20.9分に溶出してきた。分取したBz-L-HPG-L-His-L-Leu画分の脱塩は、移動層を水とする他は上記の分取高速液体クロマトグラフィーと同じ条件で行ない、脱塩されて溶出してきたBz-L-HPG-L-His-L-Leuのピークを分取し、凍結乾燥してBz-L-HPG-L-His-L-Leuをナトリウム塩として103mg（0.19 mmol）得た。

FAB-MS m/z : 522 $(M+H)^+$, 544 $(M+Na)^+$, 520 $(M-H)^-$、^{1}H-NMR (CD_3OD, 内部標準 TMS) δ: 0.90 (3H, d, J = 4.0 Hz), 0.91 (3H, d, J = 4.0 Hz), 1.61-1.70 (3H, m), 3.08 (2H, d, J = 5.5 Hz), 4.32 (1H, dd, J = 9.9, 4.0 Hz), 4.70 (1H, t, J = 5.5 Hz), 5.60 (1H,s), 6.47 (1H, s), 6.78 (2H, dd, J = 6.6, 1.8 Hz), 7.25 (2H, dd, J = 6.6, 1.8 Hz), 7.43-7.55 (4H, m), 7.85 (2H, dd, J = 8.6, 1.3 Hz)

8．N-Bz-D-HPGの合成

4-ヒドロキシフェニルグリシン（HPG）0.84 g（5 mmol）を水6 mlに溶かし、氷冷下に攪拌しながら、塩化ベンゾイル0.69 ml（6 mmol）と炭酸ナトリウム水溶液（1.28 g、8 mmol）8.5 mlを各々5分の1量ずつ30分おきに加えた。更に室温で2時間反応させた後、過剰の塩化ベンゾイルを除くために反応液をエチルエーテルで洗浄した。水層を回収して水で約100 mlにメスアップした後、5N塩酸でpH2.0にし酢酸エチル100 mlで2回抽出を行なった。酢酸エチル層を合わせて減圧下に濃縮乾固した。この乾固物をクロロホルム、メタノール、酢酸の混合液（10 : 1 : 0.1）7 mlに溶かし、クロロホルムで充填したシリカゲルカラム（2.5 cm ϕ×47 cm）に付し、クロロホルム、メタノール、酢酸の混合液（10 : 2 : 0.1）で展開した。N-Bz-HPGの溶出フラクションを集め、減圧下に濃縮して溶媒を除いた後、少量の水を加えて凍結乾燥を行ないN-Bz-HPGを449 mg（1.66 mmol）得た。（収率　33%）

FAB-MS m/z : 272 $(M+H)^+$, 270 $(M-H)^-$、^{1}H-NMR (CD_3OD, 内部標準 TMS) δ: 1.98 (1H, s), 5.50 (1H, s), 6.77 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.32 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.44 (2H, m), 7.52 (1H, m), 7.84 (2H, m)

総 括 と 展 望

物質生産を考えるときその手段として酵素法、発酵法、化学合成法が挙げられる。これらの方法を化学反応という観点から考えると、発酵法および化学合成法による物質の生産では炭素-炭素結合反応が主たる反応である。それに対し、酵素法では様々な反応が行なわれている生体内の反応を取り出して単純化した方法であるにもかかわらず、酸化還元反応や加水分解反応が主で炭素-炭素結合反応はあまり用いられていない。その上、炭素-炭素結合酵素に関する研究、特に合成的展開を目的としたものはまだ少ない[74]。しかし、発酵法が天然物しか生産できないのに対して、酵素法は非天然物をも生産することができ、化学合成法が位置特異性、立体選択性に問題があるのに対して、酵素法ではこれらの選択性を有している。このように現状での酵素法は化学反応としての適用範囲に限界があるものの、発酵法、化学合成法にはない特徴を有している。

本研究の目的は天然物の生合成におけるkey reactionの１つであり、また、炭素-炭素結合反応を引き起こす反応でもあるフェノール酸化反応に着目し、酸化酵素によるフェノール酸化反応を酵素合成および酵素変換に利用すると共に、酸化酵素の潜在機能を明らかにし新たな酵素機能を開発することにある。その内容は、１）ラッカーゼによるフェノール化合物の２量体の酵素合成（第Ｉ章）、２）ラッカーゼによるフェノール化合物の酵素変換（第II章）、３）酸化酵素による酸化的脱炭酸反応の発見（第III章）、４）アミノペプチダーゼおよびアンジオテンシンＩ変換酵素の活性測定法の開発（第IV章）の４点についての実験結果である。その結果を要約すると次の通りである。

１）ラッカーゼによるフェノール化合物の２量体の酵素合成（第Ｉ章）

２量体の酵素合成のモデル化合物として側鎖にフェノール部分を有するβ-ラクタム系抗生物質のペニシリンXを選んだ。ペニシリンXをラッカーゼで反応させると様々な生成物が生じ、その中に種々の抗菌物質が存在したが２量体を得ることができなかった。そこで、メチルエステル体にして酵素水溶液と有機溶媒との２相系あるいは固形物で反応させる懸濁系によって、効率的に２量体を合成することができた。生成した２量体の構造は、いずれもラジカル付加反応によって説明できる構造であり、オルト-オルトカップリング生成体、オルト-メタカップリング生成体、C-Oカップリング生成体の３タイプに分類された。

２）ラッカーゼによるフェノール化合物の酵素変換（第II章）

側鎖にフェノール部分を有するβ-ラクタム系抗生物質であるセファロスポリンXおよびラタモキセフをラッカーゼの基質にして酵素変換を試みた。セファロスポリンXはスピロ-エポキシド構造体に、ラタモキ

セフは脱炭酸反応生成物に変換された。これらの酵素反応はいずれも水系で行われた為に変換反応に水の関与が示唆され、また、2量体は得られなかった。

3）酸化酵素による酸化的脱炭酸反応の発見（第III章）

先の変換反応のうち、重合産物があまり生じなかった脱炭酸反応に着目し、カルボキシル基を有する種々のフェノール化合物を基質にして単一の生成物が生じる反応の探索を行った。その結果、2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシンと4-ヒドロキシマンデル酸が、単一の生成物として4-ヒドロキシベンズアルデヒドに変換される酸化的脱炭酸反応を発見した。他の酸化酵素についても同様の検討を行った結果、ビリルビンオキシダーゼとセルロプラスミンについても同様の脱炭酸反応を見いだした。これらの脱炭酸反応は、これらの酵素の通常の触媒反応であるフェノール性の水酸基からの水素の引き抜きによって引き起こされると考えられ、酸化酵素の新たな潜在的機能を明らかにすることがでた。

ラッカーゼおよびビリルビンオキシダーゼのこれまでの活性測定法は、単一の生成物が生じる反応が見いだされていなかったために、酵素活性を生成物の生成速度で表わすことができなっかた。しかし、4-ヒドロキシマンデル酸の酸化酵素による脱炭酸反応を用いることによってそれが可能になった。生じた4-ヒドロキシベンズアルデヒドは2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンと縮合させることによって発色定量することができた。

4）アミノペプチダーゼおよびアンジオテンシンI変換酵素の活性測定法の開発（第IV章）

2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン（HPG）はα-アミノ酸であることから、酸化酵素の脱炭酸反応による4-ヒドロキシベンズアルデヒドへの変換とその発色定量を用いて血清中のペプチダーゼの活性測定法の開発を行った。

アミノペプチダーゼとしてはアリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの活性測定法を開発した。L-Leu-L-HPGを基質とし、アミノペプチダーゼによる加水分解によって生じた2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシンをラッカーゼによって4-ヒドロキシベンズアルデヒドに変換し、4-ヒドロキシベンズアルデヒドを2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンと縮合させて発色定量することによりアミノペプチダーゼの活性測定を行うことができた。本活性測定法では、従来の測定法ではできなっかたアリルアミダーゼとロイシンアミノペプチダーゼの総活性を測定することができた。

カルボキシペプチダーゼとしてはアンジオテンシンI変換酵素（ACE）の活性測定法を開発した。N-Bz-L-HPG-L-His-L-Leuを基質とし、ACEによる加水分解によって生じたN-Bz-L-HPGをビリルビンオキシダーゼによって4-ヒドロキシベンズアルデヒドに変換し、4-ヒドロキシベンズアルデヒドを先と同様に発色定量することによってACEの活性を測定することができた。従来のACEの活性測定法では、ACEに

よる基質の加水分解物質を溶媒抽出して定量したが、本活性測定法では生成物（4-ヒドロキシベンズアルデヒド）をそれに特異的な発色法によって発色定量するので抽出する必要がなくより簡便な測定法である。

酵素反応の特徴として、基質、立体、位置の３大特異性が広く知られている。後の２つは有機合成にとって魅力的であるが、基質特異性は一般性の欠如という点から欠点と見なされている。しかし、チトクロムP450系の酵素やesterase、phosphataseなどのなかには基質特異性の広い酵素も多く存在し、また、実際に酵素反応を試みてみると基質特異性が想像以上に柔軟である酵素もある。本研究に用いたラッカーゼについてもこのことが言える。ラッカーゼは、アルキル基で置換されたフェノール、言い換えれば、一部にフェノールを有する化合物を広く酸化する。この酸化反応はペルオキシダーゼが過酸化水素を電子受容体とするのに対し、酸素を電子受容体とする為より温和な条件で進行する。本研究において、PcXとCepX間およびPcXOMeとPcXPOM間において同じフェノール酸化反応が起きることを明らかにした。このように酸化酵素によるフェノール酸化反応は基質特異性が広く、一般性のある方法になりえる反応である。

酵素反応は、高分子である酵素の必ずしも構造のわかっていない活性部位（触媒部位および結合部位）における基質との相互作用によって反応が起こるため、その反応機構が必ずしも明らかになっていない。そのため、酵素反応は有機合成反応と比較して生成物の予測（特にその立体化学）が論理的でなく多分に経験的な側面を持っており、この反応の予測性に乏しいこともその利用を躊躇させる原因になっている。特にフェノール酸化酵素は、その触媒するラジカル反応によって多くの生成物が生じるために炭素-炭素結合が生じるにもかかわらず、ほとんど合成反応に利用されなかった。本研究によって明らかにしたように、水と有機溶媒の２相系で行ったラッカーゼによる２量体の合成反応はいずれもラジカル反応によって説明できる反応であった。その反面、CepXやラタモキセフの水溶液中での酵素反応では水と反応体の反応によって予期しない生成物が生じた。このことは、反応条件を選ぶことにより、酸化酵素によるフェノール酸化反応が生成物が予測可能な反応になりえることを示している。

フェノール酸化酵素により触媒される反応は、フェノール性水酸基からの水素の引き抜きによる不対電子の生成であるために、その後の非酵素的な反応の展開が多彩である。適当な基質を選ぶことによってラジカル付加反応のみならず、本研究において発見した脱炭酸反応というような新たな酵素機能を開発することができる。

最後に、将来の展望について言及したい。ラッカーゼは芳香族化合物の水酸基あるいはアミノ基から水素原子を引き抜く酸化反応を触媒すると考えられてきた。しかし、最近になって、ラッカーゼによる酸化反応の概念が変わりつつある。マンガンペルオキシダーゼがMn(II)を酸化してMn(III)を生成しMn(III)

が基質を酸化するように、ラッカーゼも酸化反応によって活性化されたABTS（2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)）のようなフェノール性の基質[75, 76]や活性化された酸素種[77]、Mn(III)キレート[78, 79]の存在によって、それ自身ラッカーゼの基質でない非フェノール性の化合物を間接的に酸化する可能性が示唆されている。さらに、ラッカーゼが1,2,4,5-tetramethoxybenzeneのような非フェノール性の化合物を酸化してカチオンラジカルが生じることがわっかている[80]。こういったことから、今後、ラッカーゼを含めたフェノール酸化酵素による酸化反応は、基質の多様性と化合物と接触しなくても酸化できるという点からますます幅広い応用が可能になっていくであろう。

そこで、ラッカーゼやビリルビンオキシダーゼの有機溶媒中での酵素反応の開発が望まれる[34, 81-84]。酸化反応においてその供給が律速になる酸素の溶解度は水よりも有機溶媒の方が高く（クロロホルムで約10倍、ベンゼンで約36倍）、また、有機溶媒中ならば脂溶性化合物も基質にできるし、反応系への水の影響を防げるといったメリットがある。さらに、非水系で反応を行なうことが多い有機合成化学と結び付くことによって、より広範囲な物質の生産が可能となるであろう。

ラッカーゼは19世紀の終わりから研究されている数少ない酵素の一つであるが、その生体における役割については今日に至ってもまだ良くわかっていない[85]。リグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼと共にリグニンの分解に重要な役割を果たしていることが指摘されてきたが[86]、最近、植物の木質組織におけるリグニンの生合成に関与しているのではないかという説も出されている[87]。

ラッカーゼの構造は活性中心に４つの銅があることがスペクトル的な解析からわかっているが、その配置については結晶化が成功していないのでまだ明らかになっていない。しかし、同じグループに属するアスコルビン酸酸化酵素は結晶化され、X線解析により高い分解能で解析されていることから[88, 89]、*Neurospora crassa*のラッカーゼの３次元構造が近いタンパク質にもとずく分子モデリングによって推測されている[90]。今後、X線結晶解析によって銅中心の立体配置が更に明らかになり、タンパク質工学的な手法により新たな機能を持った銅酸化酵素の創造が可能になり、酸化酵素によるフェノール酸化反応が物質の合成、変換において汎用される方法になっていくことを期待したい。

参 考 文 献

1) 亀谷哲治、福本圭一郎：「フェノールオキシデーション」p. 5-73、技報堂（1970）

2) 福井三郎、山田秀明：「酵素の新機能開発」p. 135-144、講談社サイエンティフィク（1989）

3) Yoshida, H.: Chemistry of Lacquer (Urushi) part 1. J. Chem. Soc., **43**, 472-486 (1883).

4) Takahashi, N., Hotta, T., Ishihara, H., Mori, M., Tejima, S., Bligny, R., Akazawa, T., Endo, S., and Arata, Y.: Xylose-containing common structural unit in N-linked origosaccharides of laccase from sycamore cells. Biochem., **25**, 388-395 (1986).

5) McDougall, G. J., Stewart, D., and Morrison, I. M.: Cell-wall-bound oxidases from tobacco (*Nicotiana tabacum*) xylem participate in lignin formation. Planta, **194**, 9-14 (1994).

6) Mosbach, R.: Purification and some properties of laccase from *Polyporus versicolor*. Biochim Biophys Acta, **73**, 204-212 (1963).

7) Durrens, P.: The phenol oxidases of the ascomycete *Podospora anserina*: the three forms of the major laccase activity. Arch Microbiol, **130**, 121-124 (1981).

8) Froehner, S. C. and Eriksson, K.-E.: Purification and properties of *Neurospora crassa* laccase. J. Bacteriol., **120**, 458-465 (1974).

9) Kurtz, M. B. and Champe, S.: Purification and characterization of the conidial laccase of *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol., **151**, 1338-1345 (1982).

10) Bollag, J.-M. and Leonowicz, A.: Comparative studies of extracellular fungal laccases. Appl. Environ. Microbiol., **48**, 849-854 (1984).

11) De Vries, O. M. H., Kooistra, W. H. C. F., and Wessels, G. H.: Formation of an extracellular laccase by *Schizophyllum commune* dikaryon. J. Gen. Microbiol., **132**, 2817-2826 (1986).

12) Zouari, N., Romette, J. L., and Thomas, D.: Purification and properties of two laccase isoenzymes produced by *Botrytis cinerea*. Appl. Biochem. Biotech., **15**, 213-225 (1987).

13) Niku-Paavola, M.-L., Karhunen, E., Salola, P., and Raunio, V.: Lignolytic enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*. Biochem. J., **254**, 877-884 (1988).

14) Oda, Y., Adachi, K., Aita, I., Ito, M., Aso, Y., and Igarashi, H.: Purificainon and properties of laccase excreted by *Pycnoporus coccineus*. Agric. Biol. Chem., **55**, 1393-1395 (1991).

15) Kofujita, H., Ohta, T., Asada, Y., and Kuwahara, M.: Purification and characterization of laccase from *Lentinus edodes*. Mokuzai Gakkaishi, **37**, 562-569 (1991).

16) Rehman, A. U. and Thurston, C. F.: Purification of laccase I from *Armillaria mellea*. J. Gen. Microbiol. **138**, 1251-1257 (1992).

17) Thakker, G. D., Evans, C. S., and Rao, K. K.: Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena. Appl. Microbiol. Biotechnol., **37**, 321-323 (1992).

18) Perry, C. R., Matcham, S. E., Wood, D. A., and Thurston, C. F.: The structure of laccase protein and its synthesis by the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. J. General Microbiology, **139**, 171-178 (1993).

19) Robert W. Hay,: Bio-inorganic chemistry, 142-147, Ellis Horwood Ltd. (1984)

20) 「金属蛋白質とそのモデル」蛋白質核酸酵素、別冊NO. 26、p. 200-213、p. 355-372、共立出版 (1983)

21) Andreasson, L-E. and Reinhammar, B.: The mechanism of electron transfer in laccase-catalysed reactions. Biochimica et Biophysica Acta, **568**, 145-156 (1979).

22) Sugiyama, M., Takeda, A., Paik, S.-Y., Nimi , O., and Nomi, R.: Acetylation of blasticidin S by its producing Actinomycetes. J. Antibiotics, **39**, 827-832 (1986).

23) Numata, K., Oka, M., Nakakita, Y., Murakami, T., Miyaki, T., Konishi, M., Oki, T., and Kawagutchi, H.: Enzymatic formation of glidobactamine: a peptide nucleus of glidobactins A, B and C, new lipopeptide antitumer antibiotics. J. Antibiotics, **41**, 1351-1357 (1988).

24) Endo, A. and Yamashita, H.: Microbial phosphorylation of compactin (ML-236B) and related compounds. J. Antibiotics, **38**, 328-332 (1985).

25) Furumoto, T., Yoshioka, T., Kamata, K., Kameda, Y., and Matsui, K.: Enzymic synthesis of valienamine glucosides and their antibiotic activity. J. Antibiotics, **44**, 371-373 (1991).

26) Sjoblad, R. D. and Bollag, J.-M.: Oxidative coupling of aromatic pesticide intermediates by a fungal phenol oxidase. Appl. Environ. Microbiol., **33**, 906-910 (1977).

27) Bollag, J.-M., Liu, S.-Y., and Minard, R. D.: Asymmetric diphenol formation by a fungal laccase. Appl. Environ. Microbiol., **38**, 90-92 (1979).

28) Liu, S.-Y., Minard, R. D., and Bollag, J.-M.: Coupling reactions of 2,4-dichlorophenol with various anilines. J. Agric. Food Chem., **29**, 253-257 (1981).

29) Bollag, J.-M., Liu, S.-Y., and Minard, R. D.: Enzymatic oligomerization of vanillic acid. Soil. Biol. Biochem., **14**, 157-163 (1982).

30) Matsumura, E., Yamamoto, E., Numata, A., Kawano, T., Shin, T., and Murao, S.: Structures of the laccase-catalyzed oxidation products of hydroxybenzoic acids in the presence of ABTS [2,2'-azino-di-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]. J.Agric.Biol.Chem., **50**, 1355-1357 (1986).

31) Fåraeus, G. and Reinhammar, B.: Large scale production and purification of laccase from cultures of the fungus Polyporus versicolor and some properties of laccase A. Acta.Chem.Scand., **21**, 2367-2378 (1967).

32) Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., **72**, 248-254 (1976).

33) Adam, S., Then, R., and Angehrn, P.: Potential prodrugs of 6-acetylmethylenepenicillanic acid (RO 15-1903). J. Antibiotics, **39**, 833-839 (1986).

34) Kazandjian, R. Z. and Klibanov, A. M.: Regioselective oxidation of phenols catalyzed by polyphenol oxidase in chloroform. J. Am. Chem. Soc., **107**, 5448-5450 (1985).

35) Narisada, M., Yoshida, T., Onoue, H., Ohtani, M., Okada, T., Tsuji, T., Kikkawa, I., Haga, N., Satoh, H., Itani, H., and Nagata, W.: Synthetic studies on β-lactam antibiotics. Part 10. Synthesis of 7β-[2-carboxy-2-(4-hydroxyphenyl)acetoamido]-7α-methoxy-3-[[(1-methyl-1*H*-tetrazol-5-yl)thio]-methyl]-1-oxa-1-dethia-3-cephem-4-carboxylic acid disodium salt (6059-S) and its related 1-oxacephems. J. Medicinal Chemistry, **22**, 757-759 (1979).

36) Narisada, M., Yoshida, T., Onoue, H., Ohtani, M., Okada, T., and Nagata, W.: Synthesis and antibacterial activity of 1-oxacephem derivatives. J. Antibiotics, **35**, 463-482 (1982).

37) Matsui, Y., Yoshihama, Y., and Taniguchi, T.: Japan Kokai Tokkyo Koho, 60-110290 (June 15, 1985).

38) Murao, S. and Tanaka, N.: A new enzyme "Bilirubin oxidase" produced by *Myrothecium verrucaria* MT-1. Agric. Biol. Chem., **45**, 2383-2384 (1981).

39) Murao, S. and Tanaka, N.: Isolation and identification of a microorganism producing bilirubin oxidase. Agric. Biol. Chem., **46**, 2031-2034 (1982).

40) Tanaka, N. and Murao, S.: Purification and some properties of bilirubin oxidase of *Myrothecium verrucaria* MT-1. Agric. Biol. Chem., **46**, 2499-2503 (1982).

41) Tanaka, N. and Murao, S.: Difference between various copper-containing enzymes (polyporus laccase, mushroom tyrosinase and cucumber ascorbate oxidase) and bilirubin oxidase. Agric. Biol. Chem., **47**, 1627-1628 (1983).

42) Tanaka, N. and Murao, S.: Reaction of bilirubin oxidase produced by *Myrothecium verrucaria* MT-1. Agric. Biol. Chem., **49**, 843-844 (1985).

43) Ishihara, T. and Miyazaki, M.: The structure of a new quinone derivative formed from vanillic acid by action of crude enzyme of *Polyporus versicolor*. Mokuzai Gakkaishi, **16**, 185-191 (1970).

44) Bollag, J.-M. and Liu, S.-Y.: Copolymerization of halogenated phenols and syringic acid. Pesticide Biochem. Physiol., **23**, 261-272 (1985).

45) Reinhammar, B.: Purification and properties of laccase and stellacyanin from *Rhus vernicifera*. Biochim. Biophys. Acta, **205**, 35-47 (1970).

46) Kawai, S., Umezawa, T., Shimada, M., Higuchi, T., Koide, K., Nishida, T., Morohoshi, N., and Haraguchi, T.: Cα-Cβ cleavage of phenolic b-1 lignin substructure model compound by laccase of *Coriolus versicolor*. Mokuzai Gakkaishi, **33**, 792-797 (1987).

47) Liu, S.-Y., Freyer, A.J., Minard, R.D., and Bollag, J.-M.: Enzyme-catalyzed complex-formation of amino acid esters and phenolic humus. Soil Sci. Soc. Am. J., **49**, 337-342 (1985).

48) Ander, P., Hatakka, A., and Eriksson, K.-E.: Vanillic acid metabolism by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. Arch. Microbiol. **125**, 189-202 (1980).

49) Rahouti, M., Seigle-Murandi, F., Steiman, R., and Eriksson, K.-E.: Metabolism of ferulic acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 2391-2398 (1989).

50) Gotoh, Y., Kondo, Y., Kaji, H., Takeda, A., and Samejima, T.: Characterization of copper atoms in bilirubin oxidase by spectroscopic analyses. J. Biochem., **106**, 621-626 (1989).

51) Hiromi, K., Yamaguchi, Y., Sugiura, Y., Iwamoto, H., and Hirose, J.: Bilirubin oxidase from *Trachyderma tsunodae* K-2593, a multi-copper enzyme. Biosci. Biotech. Biochem., **56**, 1349-1350 (1992).

52) Leonowicz, A. and Grzywnowicz, K.: Quantitative estimation of laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate. Enzyme Microb. Technol., **3**, 55-58 (1981).

53) Ander, P. and Eriksson, K.-E.: Determination of phenoloxidase activity using vanillic acid decarboxylation and syringaldazine oxidation. Biotechnol. Appl. Biochem., **9**, 160-169 (1987).

54) Hiwada, K., Terao, M., Nishimura, K., and Kokubu, T.: Comparison of human membrane bound neutral aryl amidases ec-3.4.11.2 from small intestine lung kidney liver and placenta. Clin. Chim. Acta., **76**, 267-276 (1977).

55) Andria, G., Cucchiara, S., De, V.B., De, R.G., Mazzacca, G., and Auricchio, S.: Brush border and cytosol peptidase activities of human small intestine in normal subjects and celiac patients. Pediatr Res., **14**, 812-818 (1980).

56) Ledeme, N., Vincent, F.O., Hennon, G., and Plaquet, R.: Human liver leucine aminopeptidase ec-3.4.11.1 evidence for 2 forms compared to pig liver enzyme. Biochimie. **65**, 397-404 (1983).

57) Niinobe, M. and Fujii, S.: Purification and properties of aminopeptidase and arylamidase from human liver. J. Biochem.,**87**, 195-203 (1980).

58) Kohno, H., Kanda, S., and Kanno, T.: Immunoaffinity purification and characterization of leucine aminopeptidase from humman liver. J. Biol. Chem., **261**, 10744-10748 (1986).

59) Tamura, Y., Niinobe, M., Arima, T., Okuda, H., and Fujii, S.: Aminopeptidases and arylamidases in normal and cancer tissues in humans. Cancer Research, **35**, 1030-1034 (1975).

60) Niinobe, M., Tamura, Y., Arima, T., and Fujii, S.: Immunological propertise of and neuraminidase action on aminopeptidases and arylamidases in human normal and cancer tissues. Cancer Research, **39**, 4212-4217 (1979).

61) Kanno, T., Maekawa, M., Kanda, S., Kohno, H., and Sudo, K.: Evaluation of cytosolic aminopeptidase ec-3.4.11.1 in human sera in hepatic disorders. Am. J. Pathol., **82**, 700-705 (1984).

62) Ito, S., Takaoka, T., Kishi, S., Okuda, H., and Fujii, S.: Studies on the clinical application of serum leucine aminopeptidase and mono amineoxidase estimation by the direct colorimetric determination of ammonia. Tokushima J. Exp. Med., **24**, 33-40 (1977).

63) Hirasawa, Y., Funato, T., Saito, M., Tokuhiro, H., Kuto, F., Nagaoka, T., Hayashi, M., and Miwa, E.: Dissociation of leucine aminopeptidase activities measured with 2 different substrates with special reference to the conditions chiefly affecting lymphoid tissue. Acta Haematol Jpn., **45**, 907-912 (1982).

64) 北村元仕、三輪史郎、三輪谷俊夫、狩野恭一、江部充、高橋正宜　編集：「臨床検査マニュアル」p. 192-193、文光堂（1988）

65) Takamiya, S., Ohshima, T., Tanizawa, K., and Soda, K.: A spectrophotometric method for the determinationof aminopeptidase activity with leucine dehydrogenase. Anal. Biochem., **130**, 266-270 (1983).

66) Goldbarg, J. A., Pinder, E. P., and Rutenberg, A. M.: Measurement of activity of leucine aminopeptidase in serum, urine, bile and tissues. Am. J. Clin. Pathol., **32**, 571-575 (1959).

67) Cushman, D. W. and Cheung, H. S.: Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol., **20**, 1637-1648 (1971).

68) Kapiloff, M. S., Strittmatter, S. M., Fricker, L. D., and Snyder, S. H.: A fluorometric assay for angiotensin-converting enzyme activity. Anal. Biochem. **140**, 293-302 (1984).

69) Rohrbach, M. S.: (Glycine-1-14C)hippuryl-L-histidyl-L-leucine: A substrate for the radiochemical assay of angiotensin converting enzyme. Anal. Biochem. **84**, 272-276 (1978).

70) Shin, T., Murao, S., and Matsumura E.: A chromogenic oxidative reaction of laccase: Applications for laccase and angiotensin I converting enzyme assay. Anal. Biochem., **166**, 380-388 (1987).

71) Kasahara, Y. and Ashihara Y.: Colorimetry of angiotensin-I converting enzyme activity in serum. Clin. Chem. **27**, 1922-1925 (1981)

72) Steven, G. C.: A liquid chromatography-assisted assay for angiotensin-converting enzyme (peptidyl dipeptidase) in serum. Clin. Chem., **25**, 1259-1262 (1979).

73) 山本節子、戸井田一郎、岩井和郎：血清アンギオテンシン変換酵素活性測定法の検討 日胸疾会誌 18、297-303 (1980)

74) 大野雅二：「酵素機能と精密有機合成」p. 160-199、シーエムシー (1984)

75) Bourbonnais, R. and Paice, M. G.: Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS LETTERS, **267**, 99-102 (1990).

76) Bourbonnais, R. and Paice, M. G.: Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). Appl. Microbiol. Biotechnol., **36**, 823-827 (1992).

77) Milstein, O., Hüttermann, A., Fründ, R., and Lüdemann, H.-D.: Enzymatic co-polymerization of lignin with low-molecular mass compounds. Appl. Microbiol. Biotechnol., **40**, 760-767 (1994).

78) Archibald, F. and Roy, B.: Production of manganic chelates by laccase from the lignin-degrading fungus *Trametes* (*Coriolus*) *versicolor*. Appl. Environ. Microbiol., **58**, 1496-1499 (1992).

79) Roy, B.P., Paice, M. G., Archibald, F. S., Misra, S. K., and Misiak, L. E.: Creation of metal-complexing agents, reduction of manganese dioxide, and promotion of manganese peroxidase-mediated Mn(III) production by cellobiose: Quinone oxidoreductase from *Trametes versicolor*. J. Biol. Chem., **269**, 19745-19750 (1994).

80) Kersten, P. J., Kalyanaraman, B., Hammel, K. E., and Reinhammar, B.: Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. Biochem ., **268**, 475-480 (1990).

81) Milstein, O., Nicklas, B., and Hüttermann, A.: Oxidation of aromatic compounds in organic solvents with laccase from *Trametes versicolor*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **31**, 70-74 (1989).

82) Oldfield, C. and Freedman, R. B.: Kinetics of bilirubin oxidation catalysed by bilirubin oxidase in a water-in-oil microemulsion system. Eur. J. Biochem., **183**, 347-355 (1989).

83) Skrika-Alexopoulos, E., Muir, J., and Freedman, R. B: Stability of bilirubin oxidase in organic solvent media: a comparative study on two low-water systems. Biotechnol. Bioeng., **41**, 894-899 (1993).

84) Skrika-Alexopoulos, E. and Freedman, R. B.: Factors affecting enzyme characteristics of bilirubin oxidase suspensions in organic solvents. Biotechnol. Bioeng., **41**, 887-893 (1993).

85) Christopher F. Thurston: The structure and function of fungal laccase. Microbiology **140**, 19-26 (1994).

86) Hatakka, A.: Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews, **13**, 125-135 (1994).

87) Bao, W., O'Malley, D.-M., Whetten, R., and Sederoff, R.-R.: A laccase associated with lignification in Loblolly Pine Xylem. Science, **260**, 672-674 (1993).

88) Messerschmidt, A., Rossi, A., Ladenstein, R., Huber, R., Bolognesi, M., Gatti, G., Marchesini, A., Petruzzelli, R., and Finazzi-Agró, A.: X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from zucchini. Analysis of the polypeptide fold and a model of the copper sites and ligands. J. Mol. Biol., **206**, 513-529 (1989).

89) Messerschmidt, A., Ladenstein, R., Huber, R., Bolognesi, M., Avigliano, L., Petruzzelli, R., Rossi, A., and Finazzi-Agró, A.: Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 A resolution. J. Mol. Biol., **224**, 179-205 (1992).

90) Messerschmidt, A. and Huber, R.: The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. Eur. J. Biochem., **187**, 341-352 (1990).

本論文に関連する文献

1) Hitosi Agematu, Norio Shibamoto, Hiroshi Nishida, Rokuro Okamoto, Takashi shin, and Sawao Murao:
Coriolus versicolor Laccase Catalyzes the Decarboxylation of 2-(4-Hydroxyphenyl)glycineand 4-Hydroxymandelic acid.
Biosci. Biotech. Biochem., **56** (7), 1176-1177 (1992).

2) Hitosi Agematu, Toshio Tsuchida, Norio Shibamoto, Takeo yoshioka, Hiroshi Nishida, Rokuro Okamoto, Takashi shin, and Sawao Murao:
Enzymatic Dimerization of Penicillin X.
J. Antibiotics, **46** (1), 141-148 (1993).

3) Hitosi Agematu, Kaichiro Kominato, Norio Shibamoto, Takeo Yoshioka Hiroshi Nishida, Rokuro Okamoto, Takashi shin, and Sawao Murao:
Transformation of 7-(4-Hydroxyphenylacetamido)cephalosporanic Acid into a New Cephalosporin Antibiotic, 7-[1-Oxaspiro(2.5)octa-6-oxo-4,7-diene-2-carboxamido]-cephalosporanic Acid, by Laccase.
Biosci. Biotech. Biochem., **57** (8), 1387-1388 (1993).

4) Hitosi Agematu, Norio Shibamoto, Hiroshi Nishida, Rokuro Okamoto, Takashi shin, and Sawao Murao:
Oxidative Decarboxylation of 4-Hydroxymandelic Acid and 2-(4-Hydroxyphenyl)glycineby Laccase from *Coriolus versicolor* and Bilirubin Oxidase from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*.
Biosci. Biotech. Biochem., **57** (11), 1877-1881 (1993).

5) Hitosi Agematu, Hiroyuki Chiba, Norio Shibamoto, Takeo Yoshioka, Takashi Shin, and Sawao Murao:
Colorimetric Measurement of Angiotensin I-Converting Enzyme Activity Using Bilirubin Oxidase-Catalyzed Oxidative Decarboxylation.
J. Ferment. Bioeng., **77** (1), 10-12 (1994).

6) Hitosi Agematu, Takashi Nakashima, Norio Shibamoto, Takeo Yoshioka, Takashi Shin, and Sawao Murao:
Colorimetric Measurement of Total Activity of Leucine Aminopeptidase and Arylamidase in Serum Using Laccase-Catalyzed Oxidative Decarboxylation.
J. Ferment. Bioeng., **77** (5), 479-482 (1994.)

謝　辞

本論文を取りまとめるに当たり、御指導と御高配を賜りました大阪大学工学部教授・今中忠行先生に深く感謝の意を表します。

また、本論文を作成する際に有益な御助言御教示を賜りました大阪大学工学部教授・大嶋泰治先生、山田靖宙先生、ならびに卜部格先生に深く感謝致します。

本研究を遂行するに当たり、終始御懇篤なるご指導と御鞭撻を賜りました大阪府立大学名誉教授、熊本工業大学教授・村尾澤夫先生ならびに同助教授・新隆志先生に深く感謝の意を表します。

最後に、本研究の機会を与えて下さいましたメルシャン株式会社社長・鈴木忠雄氏、同中央研究所前所長・石倉知之博士、同取締役・岡本六郎氏、同中央研究所所長・刀根弘博士、ならびに本研究において構造決定および基質の合成にあたり御援助御協力いただきました同生産技術センター長・吉岡武男博士、および小湊嘉一郎氏、千葉裕之氏、中島崇氏、ならびに本実験に種々御援助御協力いただいた柴本憲夫博士、坂本道子博士を始めとする中央研究所ならびに生産技術センターの皆様に感謝の意を表します。

略 記 一 覧

ACE	アンジオテンシンI変換酵素 (angiotensin I-converting enzyme)
Ar	芳香族環 (aromatic ring)
Boc	第三ブチルオキシカルボニル基 ($(CH_3)_3COCO$-)
BOD	ビリルビンオキシダーゼ (bilirubin oxidase)
Bz	ベンゾイル基 (C_6H_5CO-)
Cbz	カルボベンゾキシ基 ($C_6H_5CH_2OCO$-)
CepX	セファロスポリンX (cephalosporin X)
CV	変動係数 (coefficient of variation)
DCC	ジシクロヘキシルカルボジイミド (dicyclohexylcarbodiimide)
DCUrea	ジシクロヘキシル尿素 (dicyclohexylurea)
DMF	ジメチルホルムアミド (N,N-dimethylhormamide)
2, 4-DNP	2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-dinitrophenylhidrazine)
DO	溶存酸素 (dissolved oxygen)

DSS	4,4-ジメチル-4-シラペンタンスルホン酸ナトリウム ($(CH_3)_3Si(CH_2)_3SO_3Na$)
FAB-MS	高速原子衝撃質量分析法 (fast atom bombardment mass spectrometry)
HBA	4-ヒドロキシベンズアルデヒド (4-hydroxybenzaldehyde)
HMA	4-ヒドロキシマンデル酸 (4-hydroxymandelic acid)
HMBC	^{1}H-detected multiple-bond heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy
HMQC	^{1}H-detected multiple quantium coherence spectroscopy
HPG	2-(4-ヒドロキシフェニル)グリシン (2-(4-hydroxyphenyl)glycine)
HPLC	高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography)
IR	赤外分光法 (infrared spectroscopy)
LAP	ロイシンアミノペプチダーゼ (leucine aminopeptidase)
MIC	最小発育阻止濃度 (minimum growth-inhibitory concentration)
NMR	核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance)
NOE	核オーバーハウザー効果 (nuclear Overhauser effect)
OBzl	ベンジルエステル ($-OCH_2C_6H_5$)
ODS	オクタデシル基（オクタデシル基結合シリカゲル） (octadesil group)

OEt	エチルエステル ($-OC_2H_5$)
PcX	ペニシリンX (penicillin X)
PcXOMe	ペニシリンXのメチルエステル (methyl ester of penicillin X)
PcXPOM	ペニシリンXのピバロイルオキシメチルエステル (pivaloyloxymethyl ester of penicillin X)
pNA	パラ-ニトロアニリド (*p*-nitroanilide)
R	アルキル基 (alkyl group)
SD	標準偏差 (standard deviation)
SI-MS	二次イオン質量分析法 (secondary ion mass spectrometry)
TFA	トリフルオロ酢酸 (trifluoroacetic acid)
TLC	薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography)
TMS	テトラメチルシラン (tetramethylsilane)
Tos	トシル基 (tosyl group)
TSP	[2, 2, 3, 3-$^2H_4$]3-(トリメチルシリル)プロピオン酸ナトリウム ($(CH_3)_3Si(CD_2)_2COONa$)
U	酵素単位 (unit)