

## 液体アンモニア非水溶媒系におけるリゾチームカルボキシル基の化学修飾

王, 仁澤  
九州大学農学部農芸化学教室

尾崎, 孝幸  
九州大学農学部農芸化学教室

林, 勝哉  
九州大学農学部農芸化学教室

船津, 勝  
九州大学農学部農芸化学教室

<https://doi.org/10.15017/23121>

---

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 27 (1/2), pp.1-25, 1972-09. 九州大学農学部  
バージョン：  
権利関係：

## 液体アンモニア非水溶媒系における リゾチームカルボキシル基の化学修飾

王 仁 澤\*・尾 崎 孝 幸  
林 勝 哉・船 津 勝

### Chemical Modification of Carboxyl Groups of Lysozyme in Non-Aqueous Liquid Ammonia Phase

RENTSE WANG, TAKAYUKI OZAKI, KATSUYA HAYASHI  
and MASARU FUNATSU

#### I. 緒 言

タンパク質の化学修飾は、とくに生理的活性タンパク質の機能と構造との関連を追究する手段として重要である。すでにこの方法によつて酵素の活性基の解明が行なわれ、活性中心の構造が明らかにされている。

今日タンパク質の官能基に対してそれぞれ特異的な修飾試薬が開発されているが、これらの試薬による化学修飾はすべて水溶液中の反応として行なわれ、非水溶媒系中で行なわれたものはほとんどない。わずかに最近 Meienhofer ら (1971) によつて液体アンモニア中におけるペプチドおよびタンパク質のジスルフィド結合 (-S-S-) の環元と S-アルキル化が報告されているに過ぎない。

しかしながら、非水溶媒中の反応に関する最近の著しい進歩にかんがみ、これをなんらかの形でタンパク質の化学修飾に応用し、化学修飾に新分野を開発しようと考え、本研究を企画した。

非水溶媒としては液体フッ化水素、液体アンモニアなどがあるが、本研究では反応性、タンパク質の溶解性などを考慮して液体アンモニア (液安と略記) を選び、一方タンパク質としては、構造および酵素反応機構がよく究明され、しかも安定なタンパク質であるリゾチームを選んだ。

リゾチームの水溶液中における化学修飾に関しては、トリプトファン残基、チロシン残基、リシン残基の  $\epsilon$ -アミノ基、アルギニン残基およびカルボキシル

基の修飾が報告されている (船津, 1967)。このうちトリプトファン残基については、化学修飾、差スペクトルによる研究、X線解析によつて活性基として基質との結合に関与していることが明らかにされた (Hayashi *et al.*, 1963, 1964, 1965; Phillips, 1966)。カルボキシル基についてもX線解析 (Phillips, 1966) により 35-Glu と 52-Asp の2つのカルボキシル基が活性基として触媒反応に関与していることが推定され、さらに 52-Asp のカルボキシル基については、化学修飾によつて活性基であることが証明された (Parsons ら, 1969; Parsons and Raftery, 1969)。もつともこの研究は 52-Asp のカルボキシル基をエチルエステル化したときリゾチームの活性がほとんど消失することを明らかにしたものであるが、結合したエチル基による立体障害も考えられ、なお問題があるようにみえる。

リゾチームのカルボキシル基の修飾に関しては、古く塩酸-アルコールによるエステル化 (Fraenkel-Conrat, 1949) があり、エステル化によつてリゾチームが完全に失活することが報告されている。さらに最近 Hoare および Koshland (1966, 1967) はカルボジイミドと親核性試薬を用いた化学修飾を報告している。林ら (1998) もまた異なるカルボジイミド化合物による化学修飾について検討を行なつた。他方ワードワード試薬 (N-ethyl-5-phenyl-isoxazolium-3-sulfonate) による化学修飾も試みられている (Hains and Zamecnik, 1967)。

\* 1971-1972年九州大学農学部訪問研究員、現在、中華民国台湾高雄市高雄医学院。

以上の反応のうち塩酸-アルコールによるエステル化は反応に選択性がなく、失活の原因もエステル化にあるのか、変性にあるのか区別することが困難である。また、カルボジイミドおよびウッドワード試薬との水溶液中における反応には、これらの試薬が水溶液中で不安定であるため、大量の試薬が必要である。

このように、リゾチームのカルボキシル基の化学修飾には問題点が多いので、本研究においては、まずカルボキシル基の液体アンモニア中における修飾を検討することにした。すなわち、水溶液中または液体アンモニア中でカルボキシル基をエステル化し、ついで液体アンモニアにより加アンモニア分解することによってアシドアミドに変えることを試みた。

そのため、まずリゾチームの液体アンモニアに対する溶解性、液体アンモニア中での安定性などを詳細に検討した。その結果、リゾチームは液体アンモニアによく溶解し、 $-45^{\circ}\text{C}$  以下の低温では安定で、失活しないことを確めた。

そこで、塩酸-アルコール、カルボジイミドおよびウッドワード試薬により水溶液中でエステル化したリゾチームを液安の低温処理によって加アンモニア分解しアミド化する手法、さらにカルボジイミドとウッドワード試薬については液体アンモニア中でエステル化とアミド化を同時に行なう方法を研究した。

以上の反応によって、リゾチームの遊離のカルボキシル基をアミド化した、いわゆるアミド化リゾチームをうることができたので、生成物について物理化学的ならびに酵素化学的性質を調べた。

## II. 液体アンモニア処理がリゾチームの性状に及ぼす影響

液体アンモニアはその性質が水に類似し、有機化合物に対して優れた溶解性をもっているため、種々の有機合成の溶媒として用いられている。さらに合成試薬としても有機化合物の合成反応に利用されている。すなわち液体アンモニアは一方では単なる溶媒、また他方では反応の試薬となる。したがってタンパク質の修飾を液体アンモニア中で行なう場合には、溶媒と反応試薬の両面を利用することができる。

いずれにしてもタンパク質の修飾を液体アンモニア中で行なう場合には、まず試料タンパク質の溶解性、液体アンモニア処理がタンパク質の物理化学的ならびに生理的性質に及ぼす影響をあらかじめ調べる必要がある。そこでリゾチームを種々の条件下で液体アンモニアに溶解し、一定時間所定の処理を行な

つたのち、液体アンモニアを蒸発除去し、リゾチームを回収してその性状の変動を調べた。

### 1. 実験材料と方法

#### (1) 実験材料

リゾチーム：鶏卵白より調製し6回再結したものをを用いた。

グリコールキチン：エビ殻より調製したチキンを千手らの方法（千手および沖増，1950）の改良法（船津・山崎，1966）によりエチレンオキシドを用いグリコール化したものをを用いた。

液体アンモニア：ポンベより気化したアンモニアを固体苛性ソーダ塔を通したのち、アセトン・ドライアイスで冷却した液安反応容器中に導入して液化した。

#### (2) 反応装置

液安反応容器から水分を完全に遮断するため十分注意し、Fig. 1 に示すような反応装置を本研究を通じて用いた。

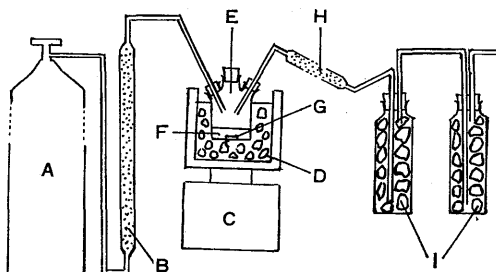


Fig. 1. Apparatus employed for the reaction of liquid ammonia with lysozyme.

- A. Bomb of liquid ammonia
- B. NaOH
- C. Magnetic stirrer
- D. Acetone-dry ice bath
- E. Three-mouth round bottle
- F. Liquid ammonia
- G. Magnetic bar
- H. Silica gel
- I. CaO

液安反応容器としては小型の三口平底フラスコまたは大型耐圧試験管（密栓）を用いた。

#### (3) 実験方法

##### A. 液体アンモニア処理および液体アンモニア中の反応

アセトン・ドライアイス浴中で冷却した反応容器に一定量の液体アンモニアを入れ、マグネチックスターラーで十分攪拌しながら一定量のリゾチームを加えて溶解し、実験の目的に応じ、必要な場合には所定の試薬を加え、所定の条件にしたがい、アセトン・ドライ

アイス浴中に保持した。処理後速やかにアンモニアを蒸発させ、残査を 0.2 N 酢酸に溶解し、溶液を無イオン水に対して 3~4 日間透析したのち凍結乾燥したものを液安処理リゾチームとした。

液体アンモニア処理または液体アンモニア中の反応を沸点 (-33°C) 以上の温度で行なう場合には、反応容器として耐圧試験管を用い、アセトン・ドライアイス中で冷却した液体アンモニアにリゾチームを溶解したのち、密栓して所定の温度に保つた。処理後反応容器を一旦アセトン・ドライアイス浴につけて冷却したのち栓を開いてアンモニアを蒸発させた。以後の操作は上記低温処理の場合と同じである。

#### B. リゾチーム活性測定法

グリコールキチンを基質とし粘度法 (Hamaguchi and Funatsu, 1959; Hamaguchi et al., 1960) および環元力法 (Imoto and Yagishita, 1971) によってリゾチーム活性を測定した。

#### C. 紫外吸収スペクトルおよびリゾチーム・グリコールキチン複合体の差スペクトル測定法

キャリー 14 型自記分光光度計を用い林らの方法 (Hayashi et al., 1963) にならって測定した。

#### D. 赤外吸収スペクトル測定法

日本分光 IR-X-1A 型を用い臭化カリ錠剤法で測定した。

#### E. 旋光分散測定法

日本分光 ORD/UV 5 型を用い測定した。

#### F. アミノ酸分析

リゾチームあるいは液体アンモニア処理リゾチームを脱気封管中で 6 N 塩酸により 105°C で 24 時間加水分解したのち、日立アミノ酸分析機 KLA 3 B 型によって全アミノ酸の分析を行なった。

トリプトファンについては別に p-アミノジメチルベンザルデヒドを用い比色定量した。

### 2. 液体アンモニア処理条件とリゾチームの回収率および残存活性

リゾチームを液体アンモニアに溶解したとき、攪拌、処理時間、液体アンモニアとリゾチームの量比、液体アンモニアの水分含量などの処理条件がリゾチームの回収率および残存活性に及ぼす影響を調べた。

#### (1) 液安処理時の攪拌の影響

100 mg のリゾチームを液体アンモニア 20 ml に溶解したのち、反応容器を -55~-60°C のアセトン・ドライアイス浴につけ、まったく振盪または攪拌する

Table 1. Effect of mixing on the treatment of lysozyme in liquid ammonia.

Treatment	Time of treatment (hr)	Activity (%)	Recovery (%)
None	1	—	trace
	2	—	trace
Shaking by hand	1	91	33.5
	2	84	28.6
Stirring by magnetic stirrer	1	104	82.2
	2	100	81.4

ことなく静置した場合、マグネチックスターラーで攪拌 (120~240 rpm) した場合について、1 時間および 2 時間処理後回収したリゾチームの活性と収量を測定した。

Table 1 に示すように、攪拌をまったく行なわない場合には、リゾチームは容器壁に附着して 0.2 N 酢酸に溶けなくなり、ほとんど回収されない。これに対し振盪さらに攪拌を行なう場合には不溶化が抑えられ、マグネチックスターラーで十分攪拌すると、不溶化はまったく起らず完全に回収され、活性もまったく消失しなかつた。したがって以下の実験における液安処理および液安中の反応は、すべて十分攪拌しながら行なった。

#### (2) 液安処理時間の影響

上記と同じ条件でリゾチームを液体アンモニアに溶解し、-55~-60°C で攪拌しながら、最長 9 日間放置し、回収率と残存活性の経時的変化を調べた。Fig. 2 から明らかなように、液安処理によつて時間とともにわずかながら活性、回収率ともに低下したが、実験誤差範囲を越えず、リゾチームは十分攪拌しながら溶解すれば、液体アンモニア中で長時間安定であること

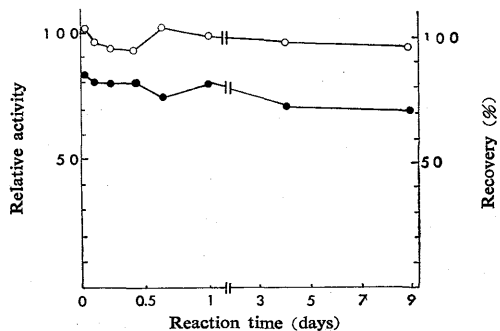


Fig. 2. Stability of lysozyme in liquid ammonia at -60°C to -65°C.

—○— Relative activity  
—●— Recovery

がわかった。

### (3) 液安処理温度の影響

耐圧試験管中でリゾチーム 50 mg を  $-55\sim-65^{\circ}\text{C}$  に保つた 5 ml の液体アンモニアに溶解し、 $-65^{\circ}$ 、 $-55^{\circ}$ 、 $-45^{\circ}$ 、 $-20^{\circ}$ 、 $0^{\circ}$  および  $20^{\circ}\text{C}$  にそれぞれ 24 時間保つたのち、上記の方法でリゾチームを凍結乾燥標品として回収し、残存活性と回収率を測定した。その結果を Fig. 3 に示すが、処理温度の顕著な影響がみられ、活性は  $-45^{\circ}\text{C}$  附近までの低温では約 20% 低下するに過ぎないが、それより高い温度では急激に低下し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で約 90% の活性が消失した。回収率についても同じ傾向がみられ、 $-65\sim-55^{\circ}\text{C}$  では 70~80% の収量で回収されたが、 $-45^{\circ}\text{C}$  では回収率が急激に低下し約 20% になった。それより高い温度ではリゾチームが不溶化し、回収率は 10% 以下になった。

以上のことからリゾチームの液安処理は  $-45^{\circ}\text{C}$  以下の低温で行なう必要が認められた。

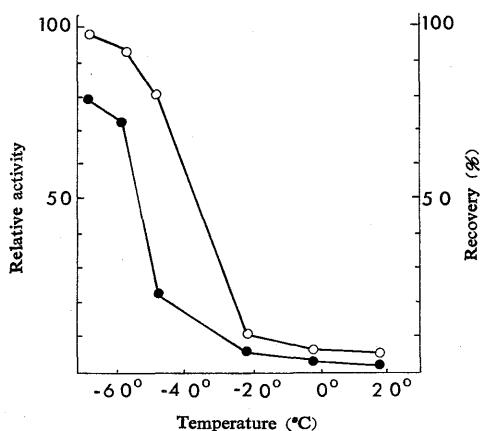


Fig. 3. Effect of temperature on the stability of lysozyme in liquid ammonia.

—○— Relative activity, —●— Recovery

### (4) 液体アンモニアとリゾチームの量比の影響

リゾチーム 100 mg をそれぞれ 1, 3, 7.5, 15, 30 および 60 ml の液体アンモニアに溶解し、 $-55\sim-65^{\circ}\text{C}$  のアセトン・ドライアイス浴中に 1 時間保ち、リゾチームを回収して残存活性と収量を測定した。

Fig. 4 に示すように、量比の影響はほとんど認められなかったが、リゾチームに対して液体アンモニアが極度に少ない場合、すなわち量比 (液体アンモニア量 [ml]/リゾチーム量 [g]) 25 以下では不溶化が起り回収率が低下した。また量比 75~150 で回収率は最高になり、それ以上液体アンモニア量を増しても収量は

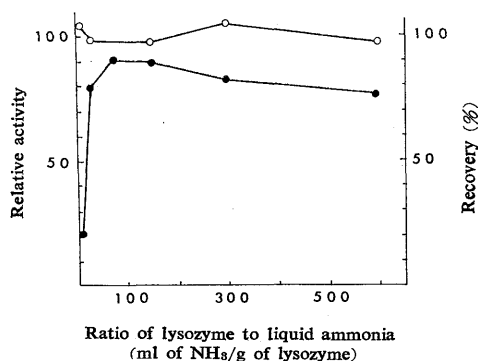


Fig. 4. Effect of ratio of lysozyme to liquid ammonia on the stability of lysozyme in liquid ammonia at  $-55^{\circ}$  to  $-60^{\circ}\text{C}$ .

—○— Relative activity, —●— Recovery

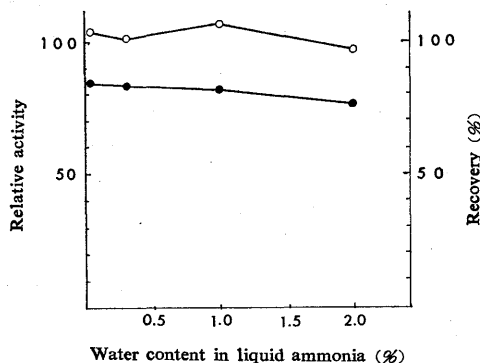


Fig. 5. Effect of water content in liquid ammonia on the stability of lysozyme in liquid ammonia at  $-55^{\circ}$  to  $-60^{\circ}\text{C}$ .

—○— Relative activity, —●— Recovery

増加せず、むしろわずかながら低下する傾向がみられた。

### (5) 液体アンモニアの水分含量の影響

リゾチーム 50 mg を 0.26, 1.0, 2.0% の水分を添加した液安 5 ml にそれぞれ溶解し、 $-55\sim-65^{\circ}\text{C}$  に 2 時間保つたのち回収した。えられた液安処理リゾチームの活性と収量を測定した結果を Fig. 5 に示す。水分含量 2% までの範囲内ではなんらの影響も認められなかった。

以上液安処理に影響を及ぼすと考えられる諸種の因子について検討した結果、リゾチームは  $-45^{\circ}\text{C}$  以下の低温において十分攪拌しながら処理すれば、リゾチーム濃度 0.3% 以上で 9 日間処理してもほとんど活性を失わないことが明らかになった。したがってこの条件で化学修飾を行えば、リゾチームの構造と活性に関する研究に液体アンモニアを利用することができ

る。

### 3. 室温液安処理によるリゾチームの不溶化について

すでに述べたように、リゾチームを  $-45^{\circ}\text{C}$  以上の温度で処理すると不溶化が起つた。そこで不溶化の原因を追求し、さらにこれを阻止することができれば、室温における反応が可能になると考え下記の実験を行なった。

#### (1) 不溶化リゾチームの性状と不溶化の原因の推定

##### A. 不溶化リゾチームのアミノ酸組成

Table 2 に室温における液安処理によつて不溶化したリゾチームのアミノ酸組成を示す。表から明らかなように、リゾチームのアミノ酸組成に較べて誤差範囲以上の差違は認められなかつた。したがつて不溶化は液安処理によるアミノ酸残基側鎖の構造変化によるものではないと考えた。

Table 2. Amino acid composition of lysozyme being insolubilized with liquid ammonia.

Amino Acid	Theoretical	Found	
		Native lysozyme	Insoluble lysozyme
Asp	21	21.7	21.2
Thr	7	7.1	7.2
Ser	10	9.0	10.2
Glu	5	4.8	5.6
Pro	2	3.1	2.8
Gly	12	12.3	12.5
Ala	12	12.0	12.0
1/2 Cys	4	4.5	4.2
Val	6	5.6	6.1
Met	2	2.0	1.9
Ileu	6	5.6	5.9
Leu	8	8.2	8.5
Tyr	3	3.1	3.2
Phe	3	3.1	3.3
Lys	6	6.0	6.0
His	1	1.2	1.0
Arg	11	11.6	10.6
Trp	6	6.3	6.1

Amino acid compositions were calculated assuming alanine to be 12.0.

##### B. 不溶化リゾチームの赤外分析

不溶化リゾチームと無処理リゾチームそれぞれ 1.5 mg を 150 mg の臭化カリと混合し、臭化カリ錠剤法によつて赤外吸収を測定した。

Fig. 6 に示すように、不溶化リゾチームは無処理リゾチームに比し、波長全域にわたつて吸収が弱かつた。その原因として研磨と混合不十分も考えられる

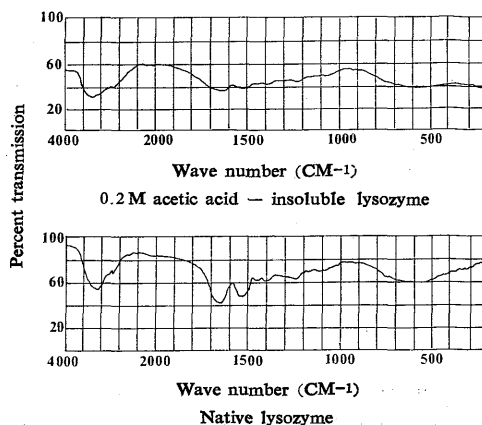


Fig. 6. Infra-red spectra of lysozyme being insolubilized with liquid ammonia and native lysozyme.

が、本実験ではその点とくに注意したのでその可能性は否定することができる。そこで他の原因としてリゾチームの会合とそれに伴う凝集が考えられる。凝集によつて不溶化が起ることは当然考えられるので、単に会合を阻止するだけで不溶化を抑制しうるか否かを検討した。

#### (2) 室温液安処理による不溶化の阻止

上述のように液安処理の温度が高い場合リゾチームが会合を起すことが推察されたので、タンパク質の会合に関係すると考えられる諸種因子が不溶化に及ぼす影響について検討し、不溶化の阻止を試みた。

##### A. リゾチーム濃度

リゾチーム 50 mg を 1.5, 7.5, 12.5 および 20 ml の液体のアンモニアに溶解し、室温 ( $15\sim 20^{\circ}\text{C}$ )

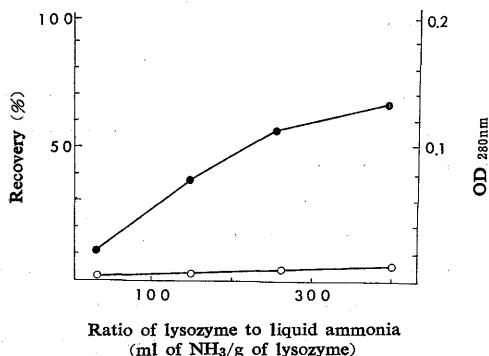


Fig. 7. Effect of ratio of lysozyme to ammonia on the stability of lysozyme in liquid ammonia at room temperature.

●— OD<sub>280nm</sub>  
○— recovery calculated by OD<sub>280nm</sub>

Table 3. Effect of solvent added to liquid ammonia on the recovery of lysozyme.

Additive	Ratio of liquid ammonia to solvent (V/V)	Recovery (%)
None	5:0	trace
Anhyd. methanol	4:1	12
"	3:2	10
"	2:3	trace (gel formation)
Anhyd. ethanol	4:1	15
Propanol	4:1	7.5
Butanol	4:1	8.0
Acetone	4:1	18

に1日放置したのち液体アンモニアを蒸発させ、残渣に0.2N酢酸を加えて溶解するリゾチームの量を測定し不溶化度を求めた。リゾチームの量は溶液の $OD_{280nm}$ を測定し、 $E_{1\%}^{1cm} = 25$ として算出した。

その結果 Fig. 7 に示すように液体アンモニアの量を増して会合を阻止すれば、不溶化が抑制され回収率も増大することがわかったが、いずれの濃度においても活性はほとんど完全に消失した。これは変性による失活と考えられる。

#### B. 有機溶媒の添加

Table 3 に示すような種々の有機溶媒を液体アンモニアに添加し、不溶化阻止効果を調べた。リゾチームと液体アンモニアの量比は100で、室温で1日処理した。

その結果、有機溶媒の添加によつてわずかながら回収率を増大することができたが、いずれの場合も活性は完全に消失した。

#### C. 塩類の添加

塩化アンモニウム、塩化ナトリウム、塩化カリ、塩化カルシウム、塩化マグネシウムそれぞれ500mgを5mlの液体アンモニアに加え、これにリゾチーム50mgを溶解して室温に1日放置した。処理後0.2N酢酸可溶性リゾチームの収量を求めた結果、Table 4 に示すように塩化アンモニウムと塩化ナトリウムが収量を大巾に増大させることがわかった。しかし他の塩類にはまったく効果が認められなかった。この原因を究明するためこれら塩類の液安中における溶解度を調べたところ、塩類の効果は塩類の液体アンモニアに対する溶解度に関係があることがわかった。塩化アンモニウムは最もよく液体アンモニアに溶解し、回収率は53%に向上したが、いぜんとして残存活性は認められなかった。

塩化アンモニウム添加の効果をさらに検討し、処理リゾチームの回収率と残存活性を増大させる条件を求

Table 4. Effect of salt added to liquid ammonia on the recovery of lysozyme.

Salt	Recovery (%)	Solubility of salt in liquid ammonia at 25°C (%)
NH <sub>4</sub> Cl	53	102.5
NaCl	40	3.02
KCl	trace	0.04
CaCl <sub>2</sub>	trace	0.01
MgCl <sub>2</sub>	trace	—

めたが、室温で処理する限りリゾチームは完全に失活した。また0.2N酢酸可溶性リゾチームの収量は塩化アンモニウムの添加量10%までは増大したが、それ以上添加量を増すと逆に低下した。

#### 4. 低温液安処理リゾチームの物理化学的ならびに酵素化学的性質

上述のようにリゾチームは-45°C以下の液体アンモニアで長時間処理しても活性を保持し、しかも好収量で回収されることが明らかになり、液体アンモニアをリゾチームの化学修飾に利用しうることになったが、修飾に先立ち、液安処理がリゾチームの物理化学的ならびに酵素化学的性質になんらかの影響を与えるか否かを詳細に確かめておく必要があつた。

そこで、アセトン・ドライアイス中で-45°C以下の液体アンモニア中に8日間放置したのち、液体アンモニアを蒸発除去し、0.2N酢酸に溶解して水に対して透析後凍結乾燥した処理リゾチームの性質を比較検討した。

##### (1) アミノ酸組成

Table 5 に示すように低温液安処理はリゾチームのアミノ酸組成になんらの影響も及ぼさなかった。

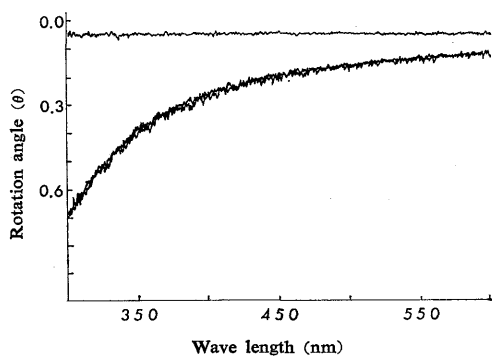
##### (2) 旋光分散

pH 4.5の0.5M酢酸緩衝液中で濃度1%溶液について1cmセルを用い測定した結果、Fig. 8 に示

**Table 5.** Amino acid composition of lysozyme treated with liquid ammonia at  $-60^{\circ}$  to  $-65^{\circ}\text{C}$ .

Amino Acid	Theoretical	Found	
		Native lysozyme	Lysozyme treated at low temperature
Asp	21	21.7	20.6
Thr	7	7.1	7.5
Ser	10	9.4	9.6
Glu	5	4.8	5.5
Pro	2	3.1	2.9
Gly	12	12.3	12.4
Ala	12	12.0	12.0
1/2 Cys	4	4.5	4.8
Val	6	5.6	6.4
Met	2	2.0	1.7
Ileu	6	5.6	5.0
Leu	8	8.2	8.3
Tyr	3	3.1	3.5
Phe	3	3.1	2.8
Lys	1	1.1	1.3
Arg	11	11.1	10.6
Trp	6	6.4	6.2

Amino acid compositions were calculated assuming alanine to be 12.0.

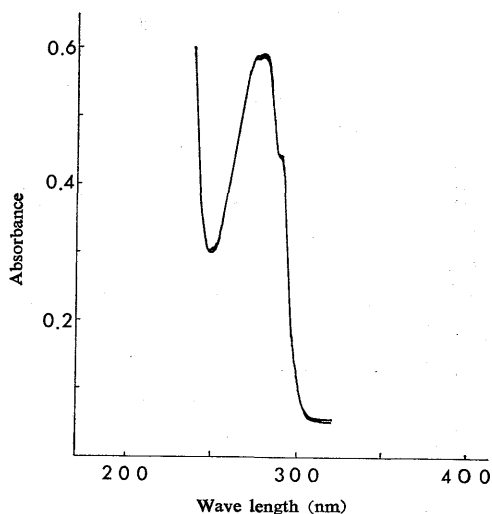
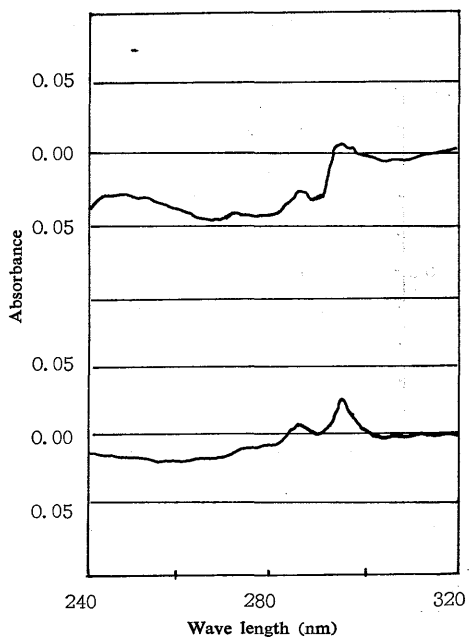

**Fig. 8.** ORD curves of native lysozyme and lysozyme treated with liquid ammonia at  $-60^{\circ}$  to  $-65^{\circ}\text{C}$ .

すように処理リゾチームについて無処理リゾチームとまったく一致する旋光分散曲線がえられた。したがって低温液安処理はリゾチームの主鎖の立体構造になんらの変化も与えないことが推察された。

### (3) 紫外吸収スペクトル

pH 4.5 の 0.5 M 酢酸緩衝液中濃度 0.02% で 1 cm セルを用い処理および無処理リゾチームの紫外外部吸収スペクトルを測定した結果を Fig. 9 に示す。両者の吸収スペクトルはよく一致した。したがって低温液安処理はリゾチームの紫外外部吸収に関する組成および構造に変化を与えないことが推察された。

### (4) 差スペクトル


**Fig. 9.** UV spectra of native lysozyme and lysozyme treated with liquid ammonia at  $-60^{\circ}$  to  $-65^{\circ}\text{C}$ .

**Fig. 10.** Difference spectra of ES-complex of native lysozyme and lysozyme treated with liquid ammonia at  $-60^{\circ}$  to  $-65^{\circ}\text{C}$  employing glycolchitin as substrate.

Upper curve: lysozyme treated with liquid ammonia

Lower curve: native lysozyme

グリコールキチンを基質とし、pH 4.5 の酵素反応溶液中における処理リゾチームの紫外吸収スペクトルの変動を差スペクトル法によつて測定した。



Fig. 10 に示すように、低温液安処理リゾチームは無処理リゾチームに比し、差スペクトルの形を多少変化するが、この程度の変化は活性の消失に結びつくような本質的なものではなく、62-Trp の状態がわずかに変化しているものと推察される。しかし赤色移動が観察されるのでリゾチームと同じような酵素基質複合体を形成していることは明らかである。

#### (5) pH 依存性

pH 3.5, 4.0, 4.6, 5.0 の 0.15 M 酢酸緩衝液および pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 の 0.15 M リン酸緩衝液にグリコールキチンを 0.05% になるように溶解して基質溶液を調製した。その 1 ml に低温液安処理および無処理リゾチームの 0.02% 水溶液をそれぞれ 0.5 ml ずつ加え、40°C で 30 分間反応させたのち糖還元力法によって生成する還元力を測定し、リゾチーム活性と反応液の pH との関係求めた。

Fig. 11 に pH-活性曲線を示すように、最適 pH はいずれも 4.6 にあり、低温液安処理はリゾチームの pH 依存性を変えないことが明らかになった。

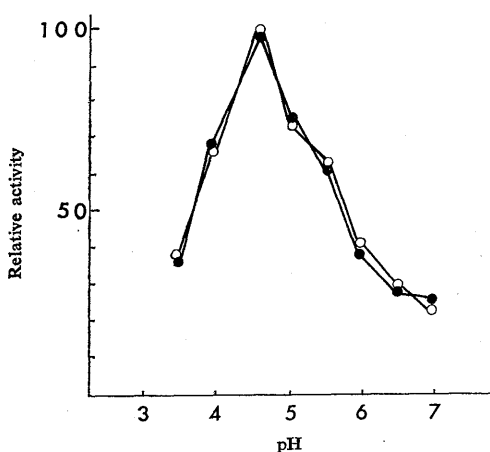


Fig. 11. The pH dependence of activity of lysozyme treated with liquid ammonia at  $-60^{\circ}$  to  $-65^{\circ}\text{C}$ .

—●— Lysozyme treated with liquid ammonia  
—○— Native lysozyme

#### (6) 耐熱性

低温液安処理リゾチームを pH 4.5 の 0.1 M 酢酸緩衝液に溶解し、その 1 ml に 0.05% グリコールキチン溶液 (pH 4.5 の 0.1 M 酢酸緩衝液) 2 ml を加え、所定時間 100°C に保つたのち、残存活性を糖還元力法で測定した。

Fig. 12 に示すように、低温液安処理リゾチームは

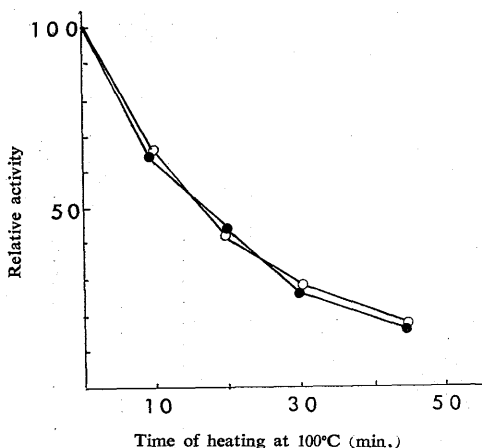


Fig. 12. Thermal stability of lysozyme and lysozyme treated with liquid ammonia at  $-65^{\circ}$  to  $-65^{\circ}\text{C}$ .

—●— Lysozyme treated with liquid ammonia  
—○— Native lysozyme

リゾチームと同じ耐熱性を示し、50% 失活する時間はいずれも 15 分であった。

以上の実験により、 $-45^{\circ}\text{C}$  以下の低温においてリゾチームを液体アンモニア中に長時間保つても、リゾチームの物理化学的ならびに酵素化学的性質はほとんど変化しないことが明らかになった。したがって、低温における液体アンモニア中での化学修飾によって、リゾチームの活性が変動した場合には、変動の原因を化学修飾に帰しうることが確認された。その結果以下述べるようなリゾチームのカルボキシル基のアミド化を液体アンモニア中で試みた。

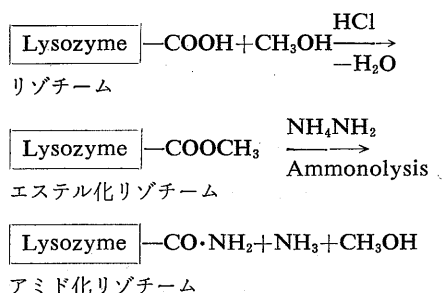
### III. リゾチームのカルボキシル基のアミド化

リゾチーム 1 分子中には 8 個のアスパラギン酸残基と 2 個のグルタミン酸残基が含まれている。したがってこれらの残基側鎖中に存在する 10 個のカルボキシル基と C 末端のカルボキシル基を合せ 11 個の遊離のカルボキシル基が 1 分子のリゾチーム中に存在することになる。

本実験の目的はカルボキシル基をアミドに変えることにあるが、アンモニアとの反応によって直接アミド化することは困難であるので、まずなんらかの方法でカルボキシル基を活性エステル形に変え、しかるのちアンモニアによって加アンモニア分解を行ないアミドに変える方法を検討した。

1. 塩酸-メチルアルコールによりメチルエステル化したリゾチームの液体アンモニア中における加アンモニア分解によるアミド化

リゾチームのカルボキシル基を一般に用いられている塩酸-メチルアルコールによつてメチルエステルに変えメチル化リゾチームを調製し、ついでこれを液体アンモニアに溶解することによつて加アンモニア分解を行ない、アミド化することを試みた。この反応は下記のようになる。



すなわちエステル化されたカルボキシル基がアミド化されることになるので、エステル化がアミド化を支配することになる。そこで、まずエステル化の条件を検討した。

(1) 実験材料と方法

実験材料および液安反応装置はすべて上記 I-1 に記載したものをを用いた。

A. リゾチームのメチルエステル化

Fraenkel-Conrat (1949) の方法にならい、塩酸-無水メタノール法によつて行なつた。

B. エステル化度の測定

Donovan らの方法 (1960) によつて行なつた。

C. 加アンモニア分解によるアミド化リゾチームの調製

メチルエステル化したリゾチームを上記 I-1-(3)-A に記載した方法によつて液体アンモニアと反応させアミド化を行なつたのち、液体アンモニアを蒸発させ、十分透析して凍結乾燥した。

D. アミドの定量

アミド化リゾチームを 6N 塩酸を用い 105°C で 24 時間加水分解し、日立アミノ酸分析機 KLA 3 B 型によつてアンモニアとしてアミドを定量した。

E. アミド化リゾチームのカラムクロマトグラフィー

Bio-Rex 70 に吸着させたアミド化リゾチームを 0.2 M 食塩を含有する 0.2 M リン酸緩衝液 (pH

6.5) と同量の 0.8 M 食塩を含有する同じ緩衝液による gradient elution によつて溶出した。

F. その他

リゾチーム活性の測定、紫外吸収スペクトルおよび旋光分散の測定、またグリコールキチンとの複合体についての差スペクトルの測定はすべて上記 I-1-(3) 記載の方法によつた。

(2) リゾチームのメチルエステル化

A. 反応時間とエステル化度および残存活性

リゾチーム 300 mg を 0.3 ml の塩酸を含有する無水メタノール 30 ml に溶解し、室温 (25°C) で反応させて経時的にエステル化度を測定した。

Fig. 13 に示すように、エステル化は最初の 4 時間に急激に進行し、リゾチーム 1 分子あたり 3.5 個のカルボキシル基がエステル化された。これと同時に活性も急激に低下し、残存活性は約 40% になつた。このようにエステル化度に比し活性の低下が著しいことは変性が急激に起つたか活性カルボキシル基、恐らく結合部位を構成するカルボキシル基の修飾が起りやすいことを示唆しているようにみえる。

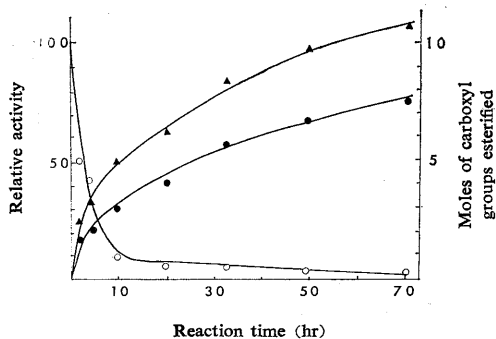


Fig. 13. Time course of esterification and change in activity of lysozyme.

- ▲— Titration in the presence of 6.5 M guanidine hydrochloride
- Titration in KCl solution
- Relative activity

反応 4 時間後エステル化は緩慢になり、3 日間の反応で約 11 個のすべてのカルボキシル基が修飾された。同時に活性もほとんど完全に失なわれた。

B. 塩酸濃度とエステル化度および残存活性

リゾチーム 100 mg を塩酸含量を異にするメチルアルコール 10 ml に溶解し、室温 (25°C) で 24 時間エステル化を行なつた。

Fig. 14 に示すように、塩酸濃度の増大につれてエステル化も増したが、同時に活性も急激に低下した。

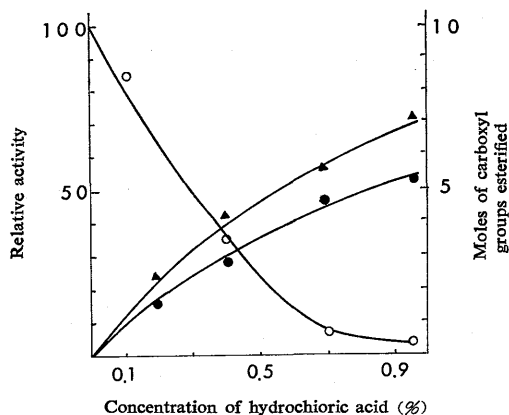


Fig. 14. Effect of concentration of hydrochloric acid on the esterification and activity of lysozyme.

- ▲— Titration in the presence of 0.5 M guanidine hydrochloride
- Titration in KCl solution
- Relative activity

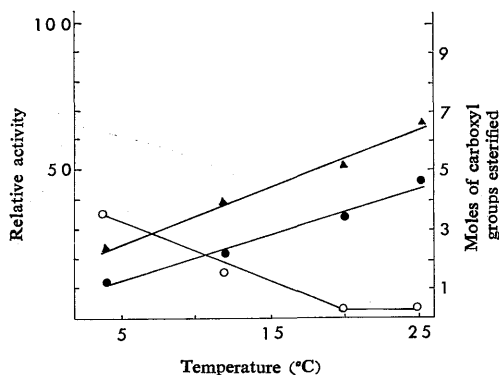


Fig. 15. Effect of temperature on the esterification and activity of lysozyme.

- ▲— Titration in the presence of 0.5 M guanidine hydrochloride
- Titration in KCl solution
- Relative activity

#### C. 反応温度とエステル化度および残存活性

リゾチーム 100 mg を塩酸 1% を含有するメチルアルコール 10 ml に溶解し、種々の温度で 24 時間エステル化した。

Fig. 15 から明らかなように、エステル化度は温度の上昇とともにほぼ直線的に増大したが、これにともなう活性もほぼ直線的に低下した。

#### D. リゾチーム試料の水分含量とエステル化度および残存活性

水分含量を異にするリゾチーム試料 100 mg を、それぞれ塩酸 0.33% を含むメチルアルコール 10 ml に

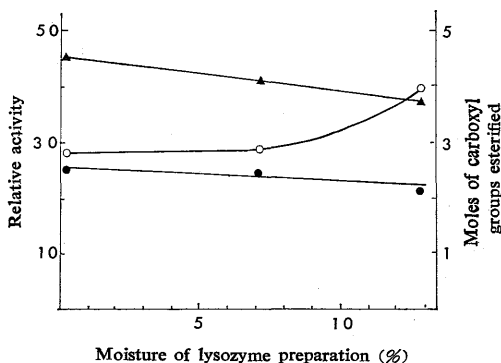


Fig. 16. Effect of moisture of lysozyme preparation on the esterification and activity of lysozyme.

- ▲— Titration in the presence of 0.5 M guanidine hydrochloride
- Titration in KCl solution
- Relative activity

溶解し、4°C で 3 日間エステル化した。Fig. 16 に示すように水分含量の増大はエステル化度と残存活性を低下させる傾向があつた。

#### (3) エステル化リゾチームの物理化学的ならびに酵素化学的性質

塩酸 1% を含有するメチルアルコールにより、室温 (25°C) で 1 時間エステル化し、エステル化リゾチームを調整した。このエステル化リゾチームのエステル化度は 1 分子あたり 2.5 個で、残存活性は約 50% であつた。

物理化学的性質に関しては、エステル化リゾチームを 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解した溶液について、紫外吸収スペクトル、旋光分散を測定したが、リゾチームの紫外吸収スペクトルおよび旋光分散曲線とよく一致した。したがって、リゾチームは上記のエステル化によつて主鎖の配位、紫外吸収に関係する構造をほとんど変化しないことが推察された。

ついで、酵素化学的性質に関しエステル化リゾチームとグリコールキチンとの複合体についての差スペクトルを測定した。反応溶液中のエステル化リゾチームおよびグリコールキチンの濃度はそれぞれ 0.05%, 0.1% で緩衝液は pH 4.5 の 0.5 M 酢酸緩衝液を用いた。

Fig. 17 に示すように赤色移動の差スペクトルが観察された。リゾチームの場合と多少形が異なるが、リゾチーム・グリコールキチン複合体が形成されていることは明らかである。

エステル化リゾチームの活性の pH 依存性はリゾ

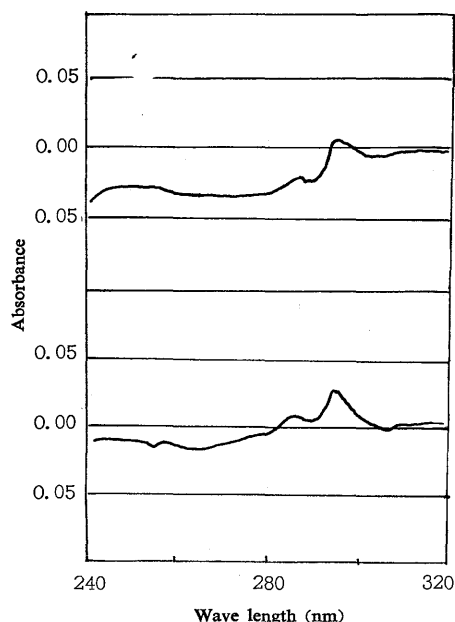


Fig. 17. Difference spectra of ES-complex of esterified lysozyme and native lysozyme employing glycolchitin as substrate.

Upper curve: esterified lysozyme  
Lower curve: native lysozyme

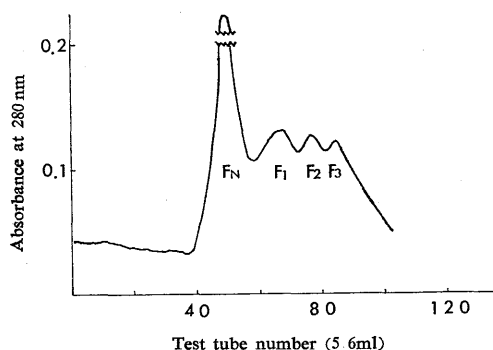


Fig. 18. Chromatogram of lysozyme esterified with methanol for one hour.

チームとまったく同じで、最適 pH は 4.6 にあつた。

また、100°C の加熱による活性の変動もリゾチームの場合とまったく同じであつた。

(4) エステル化リゾチームのカラムクロマトグラフィー

上記と同じエステル化リゾチーム 8 mg と無処理リゾチーム 2 mg を混合し pH 6.5 の 0.2 M リン酸緩衝液に溶解し溶液を Bio-Rex 70 のカラムにかけ、食塩濃度の傾斜 (0.2→0.8 M) によつて gradient

elution を行なつた。その結果 Fig. 18 に見られるように、リゾチームの溶出位置 (F<sub>N</sub>) とは異なる位置に F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> の 3 つの画分が溶出された。この 3 つの画分に含まれるエステル化リゾチームは、エステル化度、エステル化されたカルボキシル基の位置を異にするものと考えられ、エステル化は不規則に進行したものと推察される。したがつて、室温、高濃度塩酸によつてエステルを行なうとエステル化に関し不均一なエステル化リゾチームがえられる。

(5) メチルエステル化リゾチームの液体アンモニアによる加アンモニア分解

有機酸エステルを液体アンモニアによつて加アンモニア分解し有機酸アミドを生成する方法は、有機合成法として、低分子化合物、合成繊維などの合成に広く用いられている。この反応を高分子タンパク質のカルボキシル基をエステル化したものに応用し、これをアミド化することを試みた。

A. エステル化リゾチームの加アンモニア分解の条件

(a) 反応時間

塩酸 1% を含むメチルアルコールを用い、室温で 3 日間エステル化したリゾチーム 50 mg を液体アンモニアまたは塩化アンモニウムを添加した液体アンモニア 5 ml に溶解し、それぞれ所定の温度に保つて経時的にアミド化度を測定した。

その結果 Fig. 19 に示すように、-45°C 以下では

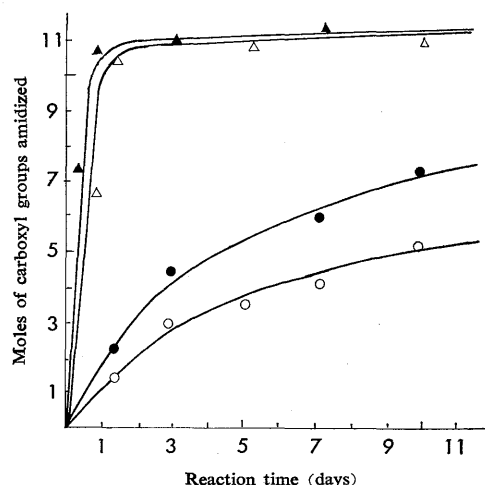


Fig. 19. Time course of the ammonolysis and change in activity.

- △— Reaction at 20°C
- ▲— Reaction at 20°C (with NH<sub>4</sub>Cl)
- Reaction at -45°C
- Reaction at -65°C

加アンモニア分解は徐々に進行し、10日間の処理で $-45^{\circ}\text{C}$ では7個、 $-65^{\circ}\text{C}$ では5個のカルボキシル基がリゾチーム1分子あたりアミド化された。

室温( $20^{\circ}\text{C}$ )処理では加アンモニア分解はきわめて迅速に進行し、一日の処理でリゾチーム1分子あたり約11個のすべてのカルボキシル基がアミド化された。

なお、この実験で塩化アンモニウムを添加した液体アンモニアによる加アンモニア分解は無添加の場合よりわずかながら加アンモニア分解の速度が速かった。

#### (b) 反応温度

上記と同じエステル化リゾチーム50mgを液体アンモニアまたは塩化アンモニウムを添加した液体アンモニア5mlに溶解し、それぞれ所定の温度に1日保ち、アミド化度を測定した。

その結果をFig. 20に示す。すなわちアミド化は温度の上昇とともにほとんど直線的に上昇したが、0.2N酢酸可溶性リゾチームの収量は逆に急激に低下した。この低下はすでに述べたように塩化アンモニウムの添加によつてかなり阻止することができた。

なお、この場合にも塩化アンモニウムの添加によつてある程度アンモニア分解の速度を促進することができた。

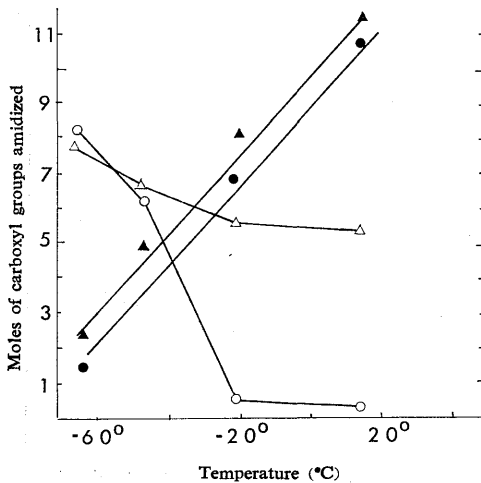


Fig. 20. Effect of temperature on the amidolysis of esterified lysozyme.

- ▲— Amidation in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- Amidation in the absence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- △— Yield in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- Yield in the absence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$

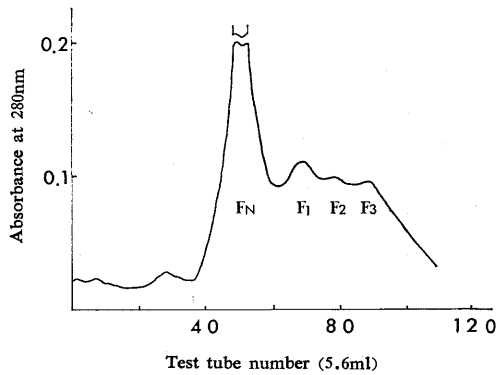


Fig. 21. Chromatogram of amidized lysozyme.

#### B. アミド化リゾチームのカラムクロマトグラフィー

塩酸1%を含有するメチルアルコールを用い、室温で1時間エステル化し、ついで $-65^{\circ}\text{C}$ の液体アンモニア中で16日間加アンモニア分解を行なつて調製した、残存活性56%、アミド化されたカルボキシル基の数2.7個/分子のアミド化リゾチームについてBio Rex 70によるクロマトグラフィーを上記の方法で行なつた。

溶出像をFig. 21に示すが、エステル化リゾチームの溶出像に類似し、リゾチームの溶出位置と異なる位置にアミド化リゾチームの3つの画分が溶出された。

#### C. アミド化リゾチームの物理学的ならびに酵素化学的性質

上記Bに記載したものと同一アミド化リゾチームについて、旋光分散、紫外吸収スペクトル、基質グリコールキチンとの複合体の差スペクトル、活性のpH依存性および耐熱性をそれぞれ測定した。

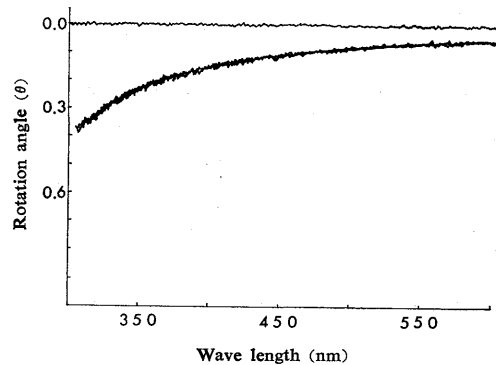


Fig. 22. ORD curves of amidized lysozyme and native lysozyme.

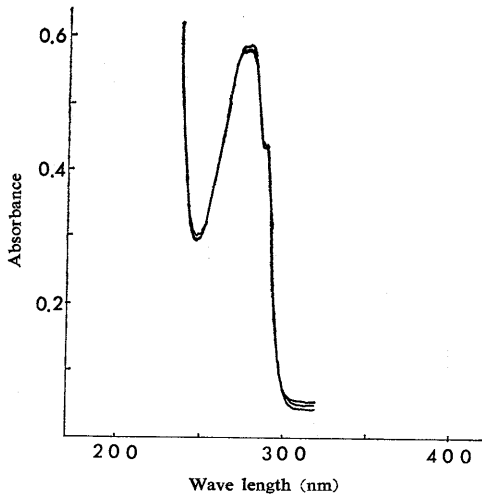


Fig. 23. UV spectra of amidized lysozyme and native lysozyme.

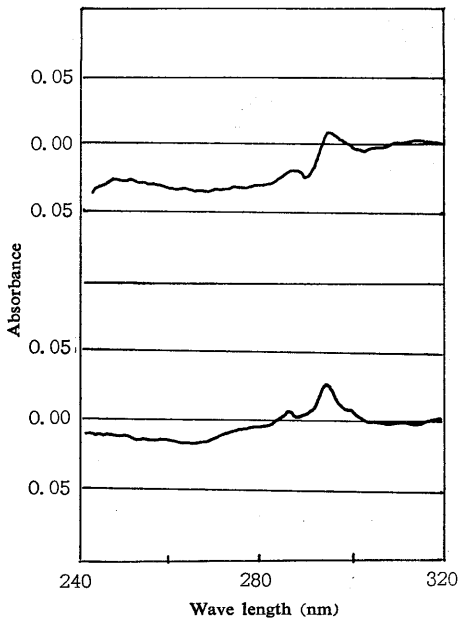


Fig. 24. Difference spectra of ES-complex of amidized lysozyme and native lysozyme employing glycolchitin as substrate.

Upper curve: amidized lysozyme  
Lower curve: native lysozyme

その結果を Fig. 22—26 に示す。すなわちアミド化リゾチームの物理化学的ならびに酵素化学的性質は、差スペクトルの微細な変化を除いて、無処理リゾチームとよく一致した。

## 2. カルボジイミド法によるアミド化

上に述べたリゾチームのアミド化は、塩酸・メチル

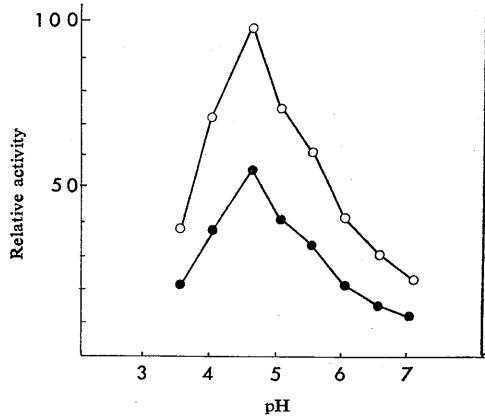


Fig. 25. The pH dependence of activity of amidized lysozyme and native lysozyme.

●— Amidized lysozyme  
○— Native lysozyme

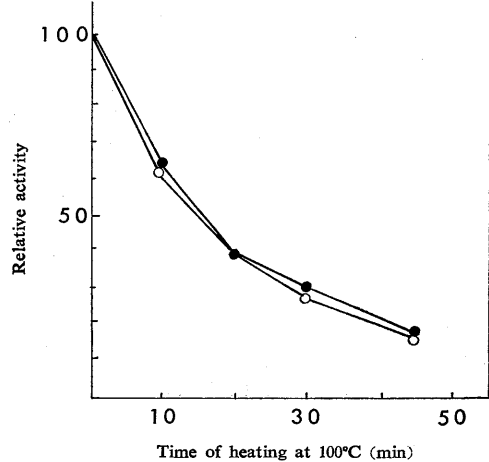


Fig. 26. Thermal stability of amidized lysozyme and native lysozyme.

●— Amidized lysozyme  
○— Native lysozyme

アルコールによるメチルエステル化に選択性がみられず、反応が不均一に進行することがわかったので、ゆらに他の方法でカルボキシル基を活性化し、活性化されたエステルを液体アンモニアによって加アンモニア分解してアミド化することを試みた。

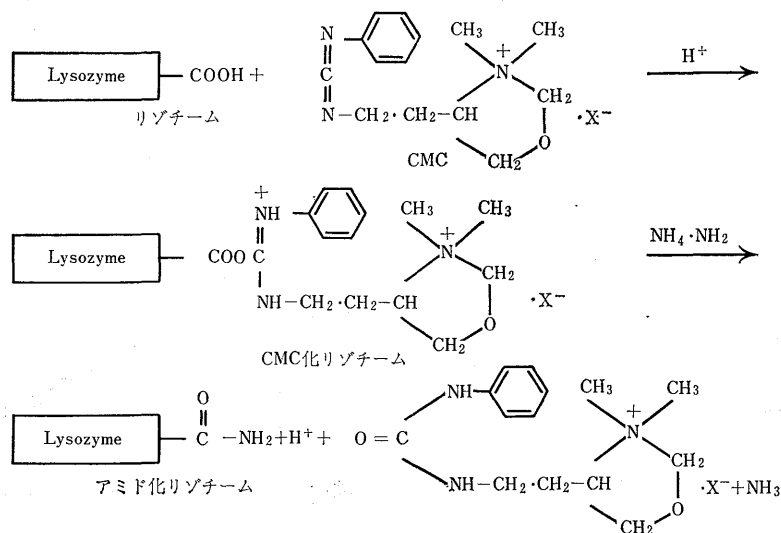
そこで、まずタンパク質のカルボキシル基修飾法として最近よく用いられているカルボジイミド法について検討を加えた。

この修飾法についてはすでに Hoare および Koshland (1966, 1967) の *N*-benzyl-*N'*-(dimethylaminopropyl) carbodiimide, 1-methyl-3-(dimethylaminopropyl) carbodiimide, 1-cyclohexyl-

3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide などを用いた報告がある。また林ら (1968) の 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide (以下 CMC と略称) を修飾試薬として用いたリゾチームの修飾も報告されている。これらの研究はいずれも水溶液中の反応として行なわれ、液体アンモニアを溶媒として使用した報告はまったくない。

そこで、ここでは CMC について液体アンモニア中での反応の可能性を検討し、従来水溶液中での反応と比較した。

CMC によるカルボキシル基の修飾および液体アンモニアによる加アンモニア分解は下に示した反応式にしたがって進行するものと考えられる。



#### (b) CMC 化リゾチームの加アンモニア分解

CMC 化リゾチームについて、エステル化リゾチームの場合と同じ方法で加アンモニア分解を行なった。

#### (c) 液体アンモニア中におけるリゾチームと CMC の反応 (直接アミド化法)

アセトン・ドライアイスで冷却した液体アンモニア 5 ml に 50 mg のリゾチームをマグネチックスターラーで攪拌しながら加えて溶解し、さらに CMC 所定量 (50~100 mg) を加えた。-45°C 以下の一定温度に一定時間反応させ、液体アンモニアを蒸発させたのち透析、凍結乾燥によつてアミド化リゾチームをえた。

上記の反応においてリゾチームは液体アンモニア中で CMC と反応し、カルボキシル基が CMC と結合する。生成した活性エステルは直ちに加アンモニア分解を受け、アミドになる。

#### (1) 実験材料と方法

##### A. 試薬

1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide (CMC): Mann Research Laboratories Inc. より購入。

##### B. 実験方法

##### (a) CMC 化リゾチームの調整

リゾチーム 100 mg を 0~4°C で pH 4.7 の酢酸緩衝液に溶解し、温度を 0~4°C に保ちながら 200 mg の CMC を数回にわけ、2 時間かけて添加した。この間反応液の pH は 1 N の塩酸を用いできるだけ 4.7 に保った。反応後溶液を pH 7.5 の 0.1 M リン酸緩衝液に対して 3 日間透析したのち凍結乾燥した。

#### (d) その他

旋光分散、紫外吸収スペクトル、差スペクトル、リゾチーム活性などの測定およびアミド化リゾチームのカラムクロマトグラフィーにはすべてすでにエステル化リゾチームについて記載した方法を用いた。

#### (2) 水溶液中で CMC と反応させたリゾチームの液体アンモニアによる加アンモニア分解 (間接的アミド化)

上記の方法で水溶液 (酢酸緩衝液) 中で CMC 化したリゾチームの残存活性は 76% であったが、その 100 mg を液体アンモニア 5 ml に溶解し、室温 (15°C) および -65°C で加アンモニア分解を行ないアミド化リゾチームをえた。

Table 6 に示すように、室温処理で 5 個、低温 (-65°C) 処理では 5.5 個のカルボキシル基がリゾチーム 1 分子あたりアミド化された。この方法によつて

Table 6. Ammonolysis of CMC-lysozyme produced in aqueous solution.

Conditions of ammonolysis	Moles of carboxyl groups amidized	Activity (%)	Recovery (%)
CMC-lysozyme	0.2	76	—
Treated at 15°C for 1 day	5.2	4	2.5
Treated at -60°C for 2 days	5.7	65	75

アミド化されたカルボキシル基の数は、林ら (1968) が水溶液中でリゾチームのカルボキシル基を CMC および親核性化合物グリシンメチルエステルあるいはグリシンアミドで修飾したときの修飾基の数より 3~4 個多かった。したがってこの化学修飾は水溶液中より、液体アンモニア中において、むしろ容易に進行するようみえる。

活性に関しては、低温処理の場合、CMC 化リゾチームの残存活性 76% であったものがアミド化の結果 65% になった。このように加アンモニア分解によっても顕著な活性の低下が起らないことは、この修飾がリゾチームの活性発現に直接関係していないカルボキシル基で起ったことを示唆している。

本法で修飾したリゾチームの活性は、上記の林ら (1968) の修飾に較べると約 10% 高く、しかもすでに述べたように修飾されたカルボキシル基の数は多かった。これは恐らく、アンモニアの親核性が高く、しかも反応を低温で行なったためと考えられる。

一方、液安処理を室温で行なった場合には活性は完全に消失し、回収率も著しく低かった。

### (3) CMC 化リゾチームの加アンモニア分解物接アミド化)のクロマトグラフィー

CMC 化リゾチームの加アンモニア分解物について行なったアミノ酸分析によつて、アンモニアの増加を認め、アミド化されたカルボキシル基の数を推定したが、この増加したアンモニアが真に増加したアミド態窒素に由来したものか否かを確かめるため、またこの修飾の均一性を調べるため Bio Rex 70 によるクロマトグラフィーを行なった。

その結果 Fig. 27 に示すように、普通リゾチームが溶出される位置 ( $F_N$ ) より遅れて、アミド化リゾチームに相当する 3 つのピーク ( $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$ ) が認められた。このことは Bio Rex の性質 (陽イオン交換樹脂) から考えて、修飾物はリゾチームより塩基性であることを示しており、カルボキシルがアミド化されたためと考えた。しかしアミド化は均一には起つておらず、少なくとも 3 種のアミド化リゾチームが生成していることが推定された。

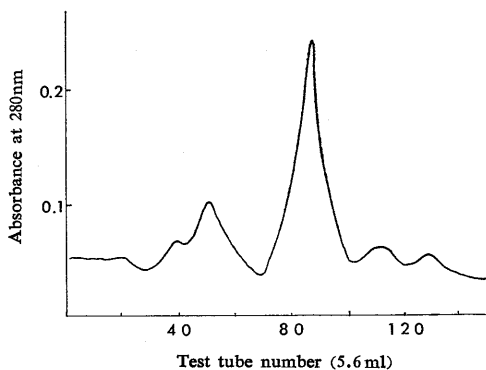


Fig. 27. Chromatogram of ammonolysis-products of CMC modified lysozyme.

### (4) 液体アンモニア中における CMC とリゾチームの反応によるアミド化 (直接アミド化法)

上に述べたカルボジイミドを用いるリゾチームのアミド化は、水溶液中におけるカルボジイミドとの反応と CMC 化リゾチームの液体アンモニアとの反応の二段階の反応によつて行なったものであるが、水溶液中では大量のカルボジイミドを必要とし、しかも反応速度が遅い。さらに二段階の反応を調節することによつて一定のアミド化リゾチームをうる事が困難である。また水溶液中で調製した CMC 化リゾチームを一度精製し、これを液体アンモニアと反応させるため操作が複雑である。

そこでリゾチームと CMC との反応を液体アンモニア中で行ない、生成するカルボキシル基の誘導体を同時に加アンモニア分解してアミドに変えることを試みた。

#### A. 反応条件の検討

##### (a) CMC 量

反応に用いる CMC の適量を知るため、リゾチーム 50 mg と種々の量の CMC を 5 ml の液体アンモニアに溶解し、一方は -65~-60°C に他は室温 (15°C) にそれぞれ 1 日保った。反応後生成物について残存活性とアミド態アンモニアの量を測定した。Fig. 28 にその結果を示す。すなわち CMC 量を増すにつれてアミド化されるカルボキシル基の数も増加する。



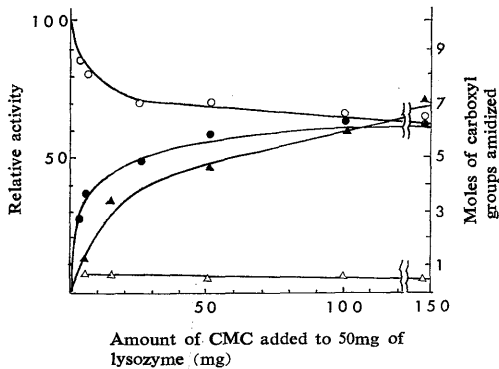


Fig. 28. Effect of amount of CMC on the modification of lysozyme in liquid ammonia.

- Activity at  $-60^{\circ}$  to  $-65^{\circ}\text{C}$
- △— Activity at  $15^{\circ}\text{C}$
- Amidation at  $-60^{\circ}$  to  $-65^{\circ}\text{C}$
- ▲— Amidation at  $15^{\circ}\text{C}$

とくに CMC 低濃度では CMC 量の増大につれてアミド化も急激に増大するが、その後は徐々に増大し、CMC 量 50 mg 以上では一定値を保った。この傾向は低温、室温いずれの反応でもみられたが、低温の方がむしろアミド化の速度が速く、すみやかに一定値に達して止る傾向がみられた。

アミド化が一定値に達するに必要な CMC の量は低温の場合リゾチームとほぼ等量で、上に述べた間接アミド化法の場合の約半分まで十分であった。しかし室温反応の場合には CMC が熱に不安定なため、低温の場合と同じ一定値に達するのにリゾチームの倍量が必要とした。

一方生成したアミド化リゾチームの活性は、低温の場合アミド化の進行に対応して低下するが、アミド化が一定値に止まるとも活性も一定値を保ち、残存活性は約 70% であった。このことは、本修飾法がかなり選択性をもっていることを示唆している。

室温での反応では活性は CMC 量に関係なく完全に消失した。

#### (b) 反応時間

リゾチームと CMC それぞれ 50 mg を液体アンモニア 5 ml に溶解し低温 ( $-65^{\circ}$ ~ $-60^{\circ}\text{C}$ ) および室温 ( $15^{\circ}\text{C}$ ) に所定の時間保つてアミド化を行なった。

その結果 Fig. 29 に示すように、加アンモニア分解は時間経過とともに進行し、はじめの 1 時間は迅速に、その後は徐々に進行して低温では 2 時間の反応で一定値に達し、リゾチーム 1 分子あたり 6 個のカルボキシル基がアミド化されて止まった。それ以後反応時間を延長してもアミド化は進まなかつた。一方室温で

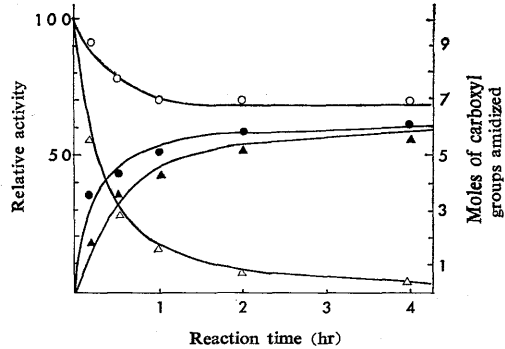


Fig. 29. Time course of direct ammonolysis of lysozyme with CMC in liquid ammonia.

- Activity at  $-55^{\circ}$  to  $-60^{\circ}\text{C}$
- △— Activity at  $15^{\circ}\text{C}$
- Amidation at  $-55^{\circ}$  to  $-60^{\circ}\text{C}$
- ▲— Amidation at  $15^{\circ}\text{C}$

は、逆に低温の場合より反応速度が遅く、30 分間の反応でリゾチーム 1 分子あたり 3.5 個のカルボキシル基 (低温では約 5 個) が、また 2 時間の反応では約 5 個 (低温では約 6 個) のカルボキシル基がアミド化された。さらにその後も反応は徐々に進行し 3 時間の反応で約 5.5 個に増加した。

残存活性については、低温の場合のはじめの 1 時間で約 70% に低下したが、それ以後反応時間を延長しても活性は低下せず一定値に止まった。しかし室温の場合にははじめの 1 時間で活性は急激に低下し、残存活性は約 20% になり、その後反応時間につれて活性はほとんど消失した。

#### (c) 反応温度

リゾチームと CMC 各 50 mg を塩化アンモニア 10% を含有する液体アンモニア 5 ml に溶解し、所定の温度に 1 日保つてアミド化を行なった。

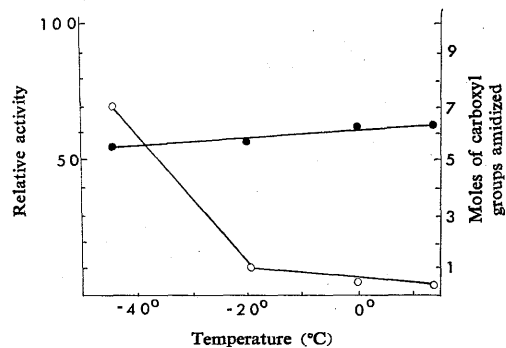


Fig. 30. Effect of temperature on the direct ammonolysis of lysozyme with CMC in liquid ammonia.

- Amidation, —○— Activity

Fig. 30 から明らかなように、温度の上昇にもかかわらずアミド化されるカルボキシル基の数はほとんど増加しなかつた。これは恐らく CMC の熱に対する不安定性に起因するものと考えられる。

一方残存活性は温度の上昇につれて急激に低下し、 $-20^{\circ}\text{C}$  ではほとんど消失した。

**B. アミド化リゾチーム (直接アミド化) のクロマトグラフィー**

液体アンモニア 中低温 ( $-65\sim-60^{\circ}\text{C}$ ) で等量の CMC とリゾチームを 3 時間反応させ、加アンモニア分解を行なつて調製したアミド化リゾチーム 40 mg と無処理リゾチーム 2 mg を pH 6.5 の 0.2 M リン酸緩衝液に溶解し、Bio Rex 70 によるクロマトグラフィーにかけた。溶出は上記の方法により、食塩の濃度勾配による gradient elution によつて行なつた。溶出像を Fig. 31 に示す。

アミド化リゾチーム ( $F_1, F_2$ ) はリゾチーム ( $F_N$ ) より遅れて溶出した。このことはカルボキシル基がアミド化されていることを示している。さらにアミド化

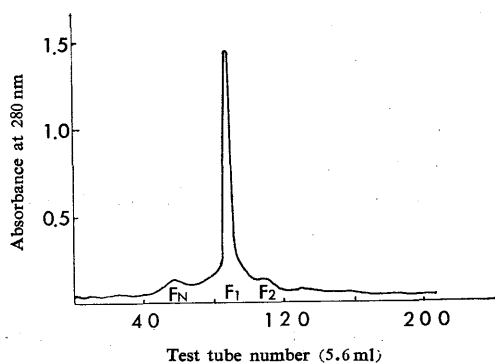


Fig. 31. Chromatogram of amidized lysozyme.

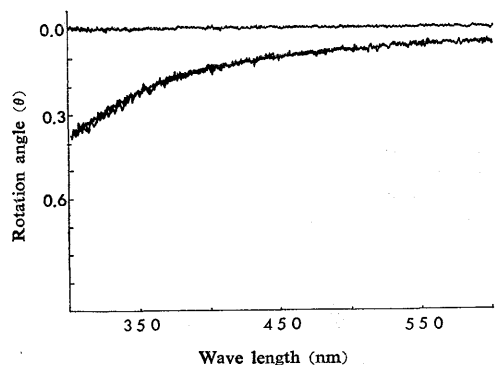


Fig. 32. ORD curves of amidized lysozyme and native lysozyme.

リゾチームの大部分は 1 つのピーク ( $F_1$ ) となつて溶出された。しかもこのピークは対称的でシャープであつた。したがつて、アミド化は選択的に進行し、特定のカルボキシル基に限定されているものと推察される。

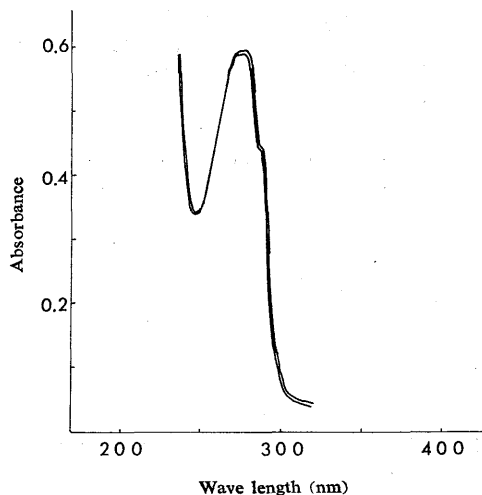


Fig. 33. UV spectra of amidized lysozyme and native lysozyme.

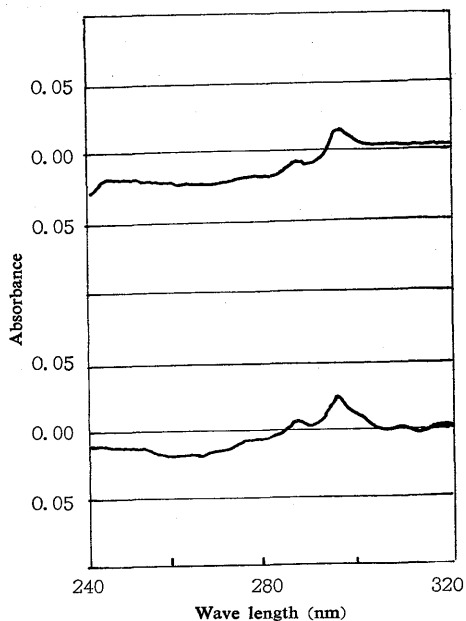


Fig. 34. Difference spectra of ES-complex of amidized lysozyme and native lysozyme employing glycolchitin as substrate.

Upper curve: amidized lysozyme  
Lower curve: native lysozyme

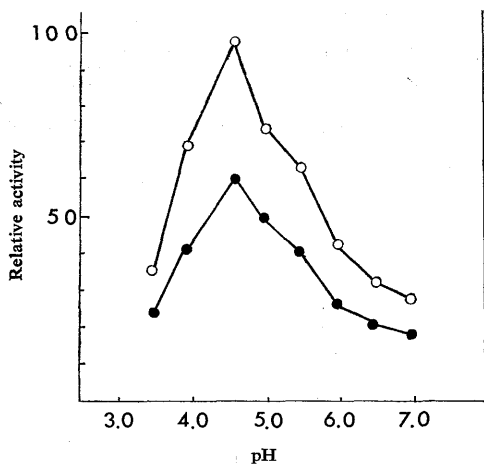


Fig. 35. The pH dependence of activity of amidized lysozyme and native lysozyme.

- Amidized lysozyme
- Native lysozyme

### C. アミド化リゾチームの物理化学的ならびに酵素化学的性質

すでに述べた方法によつて、本法でアミド化したリゾチームの旋光分散、紫外部吸収スペクトル、基質グリコールキチンとの複合体形成に由来する差スペクトル、活性のpH依存性、耐熱性を測定し、リゾチームと比較検討した。それらの結果を Fig. 32—36 に示すが、本修飾は、リゾチームの主鎖の配位、活性基の配位をほとんど変化せず、わずかに 62-Trp の状態を変化して基質との結合に微細な差違を生ずるに過ぎないことが明らかになった。

### 3. ウードワード試薬によるカルボキシル基のアミド化

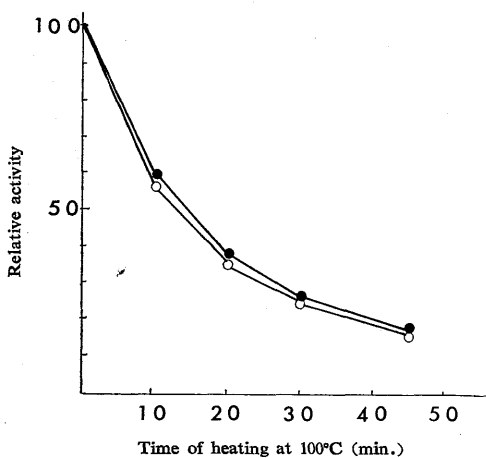
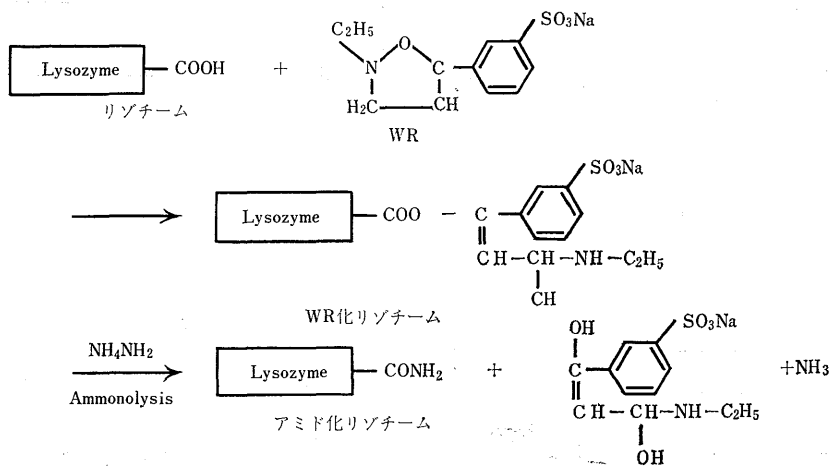


Fig. 36. Thermal stability of amidized lysozyme and native lysozyme.

- Amidized lysozyme
- Native lysozyme

ウードワード試薬 (N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3-sulfonate, 以下 WR と略称) をタンパク質に応用したものとしては、Hains および Zamecnik (1967), 林ら (1968) の報告があるが、すべて水溶液中の反応である。

そこでこの反応を液体アンモニア中で行なうことを試みた。

ウードワード試薬とリゾチームとの反応および生成物の加アンモニア分解は下記の反応式にしたがつて進行すると考えられる。

#### (1) 実験材料と方法

##### A. 試薬

ウードワード試薬: N-ethyl-5-phenylisoxazolium-3-sulfonate は Mann Research Laboratories

Inc. より購入した。

**B. 実験方法**

**(a) 水溶液中における WR とリゾチームの反応**

リゾチーム 300 mg を氷水で冷却した 25 ml の pH 4.0, 5.0 および 6.0 の 0.2 M リン酸緩衝液に溶解し、冷却しながら攪拌を続け、150 mg の WR を数回に分け、3時間かけて添加した。反応後蒸留水に対して3日間透析し、凍結乾燥によつて反応生成物すなわち WR 化リゾチームをえた。収量は 75~85% であった。

**(b) WR 化リゾチームの加アンモニア分解**

WR 化リゾチームを液体アンモニアに溶解して一定条件に保ち、加アンモニア分解を行なつてアミド化リゾチームを調製した。

**(c) 液体アンモニア中におけるリゾチームと WR との反応によるアミド化リゾチームの調製 (直接アミド化)**

液体アンモニアにリゾチームと WR を同時に溶解し、リゾチームカルボキシル基の WR による修飾とそれを加アンモニア分解することによつてアミドに変える反応を試みた。

**(d) その他**

アミド態アンモニア、リゾチーム活性、旋光分散、紫外吸収スペクトル、差スペクトルなどの測定およびアミド化リゾチームのクロマトグラフィーは上述の方法によつて行なつた。

**(2) WR 化リゾチームの生成とその性状**

リゾチームの WR との反応を上述の方法により pH 4, 5 および 6 のリン酸緩衝液中で行ない、生成した WR 化リゾチームの性状を調べた。Table 7 に示すように、反応液の pH によつて WR 化リゾチームの活性は異なり、pH が高くなるほど活性は低下した。その原因は下記の WR 化リゾチームの加アンモニア分解の実験結果から推定されるように、pH が高くなるほど WR との反応が促進されるためと考えられる。なお収量は反応液の pH には左右されなかつた。

**Table 7. Effect of pH on the reaction of WR with lysozyme in aqueous solution.**

pH of reaction mixture	Activity (%)	Recovery (%)
4.0	60	77
5.0	48	86
6.0	38	80

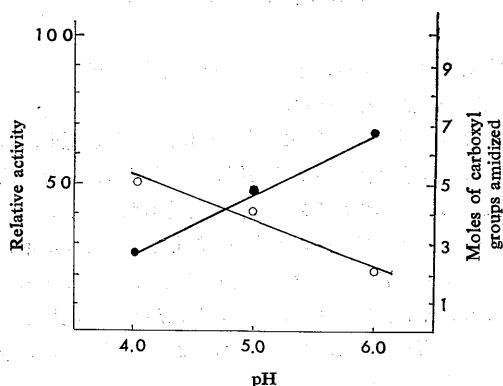
つた。

**(3) WR 化リゾチームの加アンモニア分解**

WR 化リゾチーム 50 mg を液体アンモニア 5 ml に溶解し、-45°C に1日保ち、加アンモニア分解を行なつた。えられたアミド化リゾチームのアミド化度と活性を調べた。

Fig. 37 に示すように、WR 化リゾチームの加アンモニア分解によつてアミド化されるカルボキシル基の数は WR とリゾチームの水溶液中における反応時の pH に影響され、pH 6.0 のときリゾチーム 1 分子あたり 6.5 個、pH 5 のとき 4.5 個、pH 4 のとき 2.5 個であった。すなわち反応溶液の pH とアミド化度とは直線関係にあつた。

一方残存活性はアミド化に逆比例し、pH が高いほど活性が低下した。



**Fig. 37. Ammonolysis of lysozyme modified with WR at different pH.**

—○— Activity, —●— Amidation

**(4) 直接アミド化**

上に述べた間接アミド化、すなわち水溶液中における WR との反応、および生成された WR 化リゾチームと液体アンモニアとの反応によるアミド化リゾチームの生成という2段階の反応は、カルボジイミドを用いた2段階の反応と同じように、アミド化度の調節、操作の複雑さなど種々の問題点がある。そこで、WR の場合にも液体アンモニア中でリゾチームと WR とを反応させ、直ちに加アンモニア分解を行なつてアミドに変える、いわゆる直接アミド化法を検討した。

**A. 反応条件の検討**

**(a) WR 量**

リゾチーム 50 mg と種々の量の WR を液体アンモニア 5 ml に溶解し、低温 (-65~-60°C) および

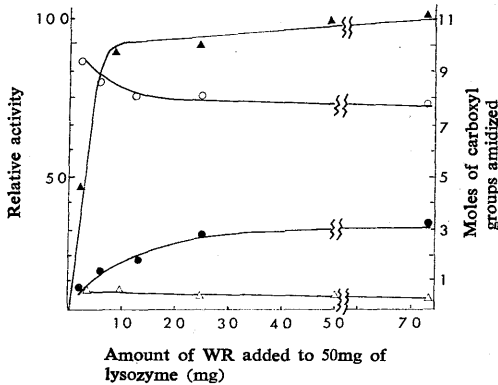


Fig. 38. Effect of amount of WR on the modification of lysozyme in liquid ammonia.

- Amidation at 15°C
- Amidation at -60° to -65°C
- △— Activity at 15°C
- Activity at -60° to -65°C

室温 (15°C) にそれぞれ 1 日保つて反応させたのち、生成物の性質を調べた。

その結果 Fig. 38 に示すように、反応を低温において行なう場合、WR 量が 25 mg までの範囲では試薬量の増加につれてアミド化も促進されるが、25 mg で一定値 (リゾチーム 1 分子あたり 3 個のカルボキシル基がアミド化) に達し、それ以上 WR の量を増してもアミド化は進まなかつた。したがって低温反応時必要な WR の量は 25 mg、すなわちリゾチームの半量で十分であつた。

低温反応における活性の変効についても同じような傾向がみられ、試薬量 15 mg までに残存活性は 85% に低下したが、それ以上試薬量を増しても一定値を保つた。

以上のことから WR を使用するアミド化も CMC によるアミド化同様かなり高い選択性をもつことが推察される。

一方室温反応においては、WR 量 10 mg までの範囲では試薬量の増加につれて反応は著しく促進され、リゾチーム 1 分子あたり約 10 個のカルボキシル基がアミド化される。それ以上の WR 量ではアミド化は進まず、50 mg で 11 個すべての遊離カルボキシル基がアミド化された。しかし室温反応では WR 量に関係なく活性は完全に消失した。

#### (b) 反応時間

リゾチームと WR それぞれ 50 mg を液体アンモニア 5 ml に溶解し、低温 (-65~-60°C) と室温 (15°C) に所定の時間保つて反応させた。

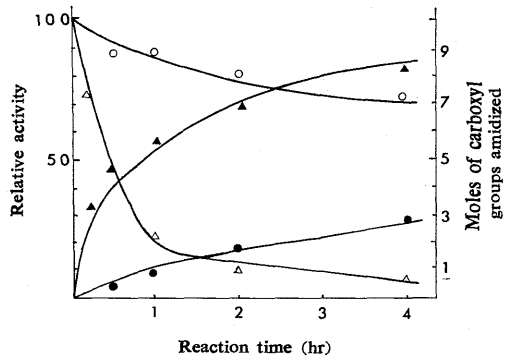


Fig. 39. Time course of direct ammonolysis of lysozyme with WR in liquid ammonia.

- Activity at -60° to -65°
- △— Activity at 15°C
- Amidation at -60° to -65°
- ▲— Amidation at 15°C

その結果を Fig. 39 に示すが、低温反応の場合にはアミド化は時間とともにほぼ直線的に増大し、4 時間の反応でリゾチーム 1 分子あたり 3 個のカルボキシル基がアミド化された。このアミド化にともなつて活性もほぼ直線的に低下し、4 時間反応時の残存活性は約 75% であつた。

一方室温反応では、はじめの 1 時間でアミド化は急激に進行し、リゾチーム 1 分子あたり約 6 個のカルボキシル基がアミド化されるが、それ以後アミド化はややゆるやかに進行し、2 時間で 7 個、4 時間で 8.5 個がアミド化された。しかし活性は急激に低下し、1 時間で残存活性約 20% となり、それ以上反応を続けるとほとんど消失した。

#### (c) 反応温度

リゾチーム 50 mg と WR 50 mg を塩化アンモニ

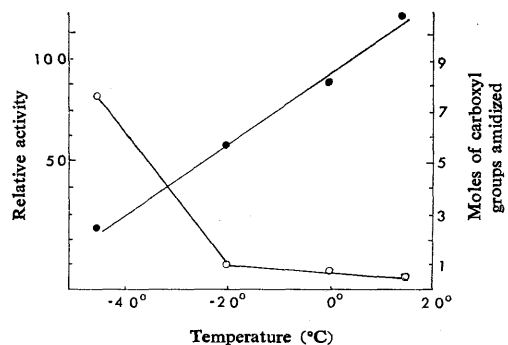


Fig. 40. Effect of temperature on the direct ammonolysis of lysozyme with WR in liquid ammonia.

- Amidation, —○— Activity

ウムを 10% 含有する液体アンモニア 5 ml に溶解し、 $-45^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $0^{\circ}\text{C}$  および  $15^{\circ}\text{C}$  に 1 日放置した。

Fig. 40 から明らかなように、アミド化は温度の上昇とともにほぼ直線的に、急激に増大し、リゾチーム 1 分子あたり、 $-45^{\circ}\text{C}$  では 2.5 個、 $-20^{\circ}\text{C}$  では 5.5 個、 $0^{\circ}\text{C}$  では 8.5 個、 $15^{\circ}\text{C}$  では約 11 個のカルボキシル基がアミド化された。一方活性は、リゾチームの液安処理の場合と同じように  $-45^{\circ}\text{C}$  から  $-20^{\circ}\text{C}$  にかけて急激に低下し、 $-20^{\circ}\text{C}$  以上ではほとんど完全に失活した。

**B. アミド化リゾチームのカラムクロマトグラフィー**

上記  $-65^{\circ}\text{C}$  の液体アンモニア中で直接アミド化法によって調製したアミド化リゾチーム 40 mg と無処理のリゾチーム 2 mg を pH 6.0 の 0.2 M リン酸緩衝液に溶解し、Bio Rex 70 を用いたクロマトグラフィーにかけた。

Fig. 41 にみられるように、アミド化リゾチーム ( $F_1$ ,  $F_2$ ) はリゾチーム ( $F_N$ ) より遅れて溶出され、

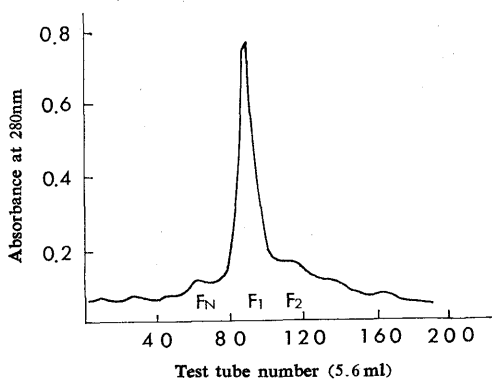


Fig. 41. Chromatogram of amidized lysozyme.

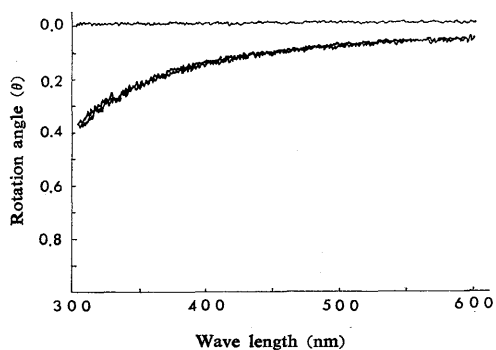


Fig. 42. ORD curves of amidized lysozyme and native lysozyme.

しかもその大部分は 1 つのシャープで対称的なピークとして分画  $F_1$  に溶出された。したがって、この修飾も CMC を用いてアミド化した場合と同じように、かなり選択的に起っているものと推察される。

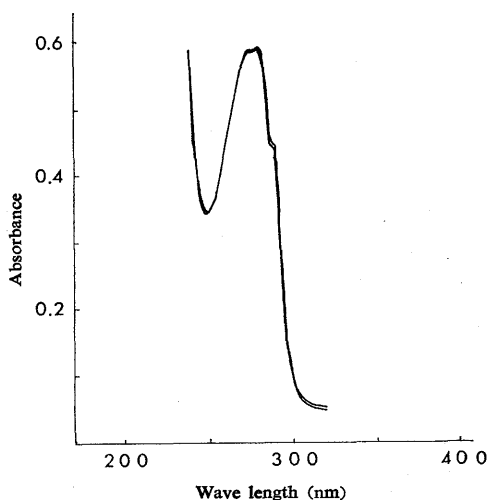


Fig. 43. UV spectra of amidized lysozyme and native lysozyme.

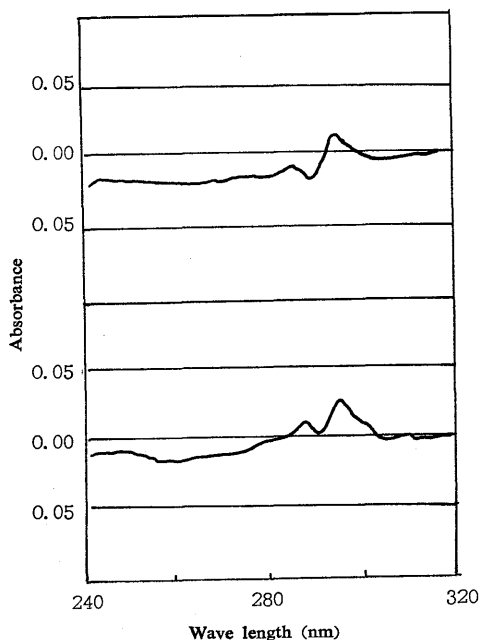


Fig. 44. Difference spectra of ES-complex of amidized lysozyme and native lysozyme employing glycolchitin as substrate.  
Upper curve: amidized lysozyme  
Lower curve: native lysozyme

### C. アミド化リゾチームの物理化学的ならびに酵素化学的性質

直接アミド化法により、 $-65^{\circ}\text{C}$  の液体アンモニア中で1日反応させて調製したアミド化リゾチームを、上記のクロマトグラフィーによつて分画し、 $F_1$  画分を分離して、その性質を調べた。

その結果を Fig. 42—46 に示す。すなわち旋光分散曲線、紫外吸収スペクトルは、リゾチームとよく一致した。基質グリコールキチンとの複合体に由来する差スペクトルはわずかながらリゾチームと異なるが、類似の赤色移動が認められ、アミド化リゾチームもリゾチームと同じような複合体をグリコールキチンとの

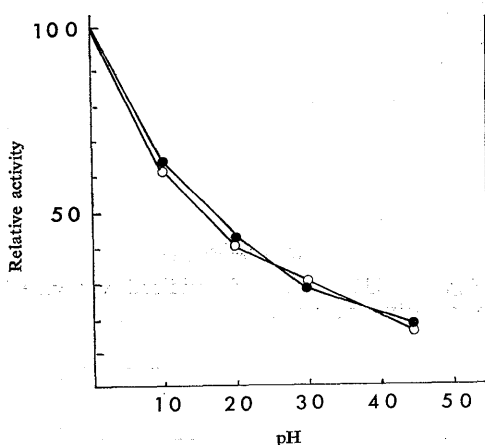


Fig. 45. The pH dependence of activity of amidized lysozyme and native lysozyme.

●—● Amidized lysozyme  
○—○ Native lysozyme

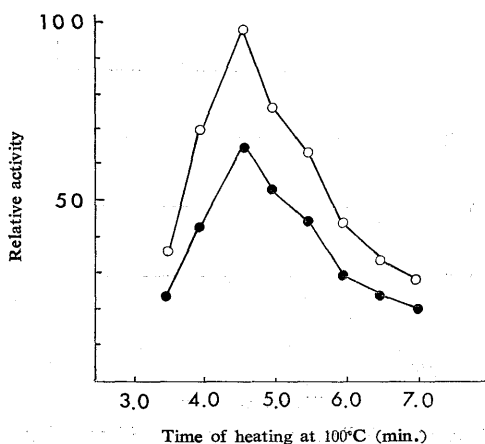


Fig. 46. Thermal stability of amidized lysozyme and native lysozyme.

●—● Amidized lysozyme  
○—○ Native lysozyme

間に形成して、活性を発現するものと考えた。活性のpH依存性、 $100^{\circ}\text{C}$  の加熱における耐熱性もリゾチームとまったく同じで、アミド化にともなう最適pHの変動は認められなかった。

### IV. 総括ならびに考察

リゾチーム中の遊離カルボキシル基は活性発現に関係する基として注目されている。とくに101-Aspのカルボキシル基は結合部位として、基質の糖残基との間に2つの水素結合を形成することが推定されている(Phillips, 1966; 1967)。また35-Gluと52-Aspの2つのカルボキシル基は触媒反応に関係する反応部位と考えられている(Phillips, 1966; 1967)。

このようにリゾチームのカルボキシル基は活性との関連において重要であるので、活性基であることを化学的に証明するため、種々の化学修飾が試みられている。しかし52-Aspのメチルエステル化(Parsonsら, 1969; Parsons and Raftery, 1969)以外直接的な証明はなされていない。

これらの化学修飾はすべて水溶液中の反応として行なわれているので、著者らはこれを液体アンモニア中で行なうことを試みた。

修飾反応を行なうに先立ち、まず液体アンモニア中におけるリゾチームの安定性について調べた結果、 $-45^{\circ}\text{C}$  以上の温度ではリゾチームは変性を起して不溶化したが、 $-45^{\circ}\text{C}$  以下の低温ではかなり長期間安定で、その構造ならびに活性を変化しないことが認められた。

なお液安処理においてリゾチームの立体構造に影響を及ぼす最も大きな因子は温度であつたが、これは $-45^{\circ}\text{C}$  以下の低温で反応を行なえば問題がないことがわかつた。

したがって液体アンモニア中低温での反応で化学修飾を行ない、もし活性に変動があれば、その原因は化学修飾にあると考えることができる。また液体アンモニア中低温での化学修飾を利用してリゾチームの構造と活性との関係を追求することも可能になつた。

液体アンモニアは単なる溶媒として反応に関与しない場合と、反応試薬として反応に関与する場合がある。

カルボキシルの修飾においては、カルボキシル基をエステル化して活性化し、溶媒としての液体アンモニアに溶解すると同時に反応試薬として、エステルの加アンモニア分解を行なわせ、カルボキシルをアミドに変えることを試みた。水溶液中の化学修飾によつてカ

ルボキシル基を簡単にアミドに変える方法は報告されていない。

リゾチームのエステル化は3つの方法について適用性を検討した。

まず、カルボキシル基の修飾法として一般に用いられている塩酸-メチルアルコールによるエステル化を試みた。このエステル化は塩酸を含むメタノール中で行なうため、リゾチームはこの処理で完全に失活し、活性に関連する研究には適用できないが、活性を無視してカルボキシル基をエステル化しさらにそれを液体アンモニア中でアミドに変える反応としては利用できる。

この研究を通じ、エステル化されたカルボキシル基は液体アンモニア中で完全に加アンモニア分解を受けアミド基に変ることが確かめられた。

第2の方法はカルボジイミドをカルボキシル基に結合させたのち、親核性基と置換する反応によつてアミド化を行なつた。すなわちアンモニアは強い親核性をもっているため、カルボジイミドと結合したカルボキシル基を液体アンモニアに溶解することによつて溶媒のアンモニアと反応させアミドを生成させた。

この場合、はじめ水溶液中でカルボジイミドとリゾチームを反応させ、生成するカルボジイミド化リゾチームを液体アンモニアに溶解して加アンモニア分解を行なう方法を用いたが、その後、液体アンモニアにリゾチームとカルボジイミドを同時に溶解すれば、全反応が液体アンモニア中で進行し、遊離のカルボキシル基がアミド化されたリゾチームをうることができた。

このアミド化を $-45^{\circ}\text{C}$ 以下の低温で行なうと、選択的なアミド化が起り、一定の修飾リゾチームすなわちリゾチーム1分子あたり6個のカルボキシル基が修飾され、残存活性70%のアミド化リゾチームを生成した。しかもこのアミド化に必要なカルボジイミドの量は水溶液中の反応に必要な量の約半分であり、アミド化が一定値に達する時間は2時間であつた。したがつてこの方法はリゾチームの構造と活性との関連を追求する手段として使用しうるものと考えた。

なお、液体アンモニア中でカルボジイミドを用いリゾチームのアミド化を行なう場合、反応温度を上昇させても、一定量のカルボジイミドを用いる限り、アミド化は上昇せず、温度が高いほどむしろ低下した。これはカルボジイミドが液体アンモニア中で温度に対し不安定なためと考えられる。

第3の方法は上記のカルボジイミドのかわりにワード試薬(WR)を用いる方法である。この場合

にも液体アンモニアにリゾチームと同時にWRを溶解すると、WRはまずリゾチームの遊離カルボキシル基と反応しWR化リゾチームを生成するが、これは液体アンモニアと直ちに反応してアミド化リゾチームに変ることがわかつた。

この反応を $-45^{\circ}\text{C}$ 以上の液体アンモニア中で行なうと、リゾチームの活性は完全に消失するが、温度の上昇とともにアミド化されるカルボキシル基の数は増加し、 $15^{\circ}\text{C}$ で1日反応させると、リゾチーム中の11個すべての遊離カルボキシル基をアミド化することができた。したがつてこの方法は、活性とは関係なく、カルボキシル基を変える方法として有用である。

一方、 $-45^{\circ}\text{C}$ 以下の液体アンモニア中での反応では、非常に高い選択性が見られ、4時間の反応でリゾチーム1分子中3個のカルボキシル基のみがアミド化され、残存活性75%のアミド化リゾチームがえられた。したがつてこの低温反応はリゾチームカルボキシル基の活性発現との関係を追究する手段として有用であると考えられる。

以上の研究によつて液体アンモニアをリゾチームのカルボキシル基の化学修飾に用いうる事が明らかになつた。

## V. 要 旨

1. リゾチームの液体アンモニア中における安定性を調べた結果、処理温度が最も大きな影響を与えることが明らかになつた。しかし $-45^{\circ}\text{C}$ 以下の低温では安定で、構造および活性を変化せず、好収量で回収することができた。

2.  $-20^{\circ}\text{C}$ 以上の液体アンモニア処理ではリゾチームの変性とそれに伴う不溶化が顕著に現われた。この不溶化は塩化アンモニウムあるいは塩化ナトリウム、とくに前者を液体アンモニアに添加することによつて著しく阻止された。しかし $-45^{\circ}\text{C}$ 以上で起る活性の消失は阻止することができなかつた。

3. 塩酸-メタノールによつてリゾチームをエステル化し、ついで液体アンモニアに溶解することによつて加アンモニア分解を行ないアミド化リゾチームをうることができた。

この反応はリゾチームの失活をとめない、しかもアミド化は不規則に、非選択的に起つたが、カルボキシル基をエステル化し、これを液体アンモニアで処理すればアミド基に変換しうることを認めることができた。

4. カルボジイミドによつてまずリゾチームのカルボキシル基を修飾し、ついでこれを液体アンモニアで



処理することによつてアミド基に変換することができた。この場合リゾチームとカルボジイミドを同時に液体アンモニアに溶解しても、全反応が液体アンモニア中で進行し、簡単にアミド化リゾチームをうることができた。−45°C以上の反応ではリゾチームは完全に失活したが、−45°C以下の低温における反応によつて一定の性質をもつたアミド化リゾチームをうることができた。したがつてこの反応は低温では選択的に起ることがわかつた。

5. ウードワード試薬を用いカルボジイミドを用いた場合と同じ方法でアミド化リゾチームをえた。この場合、15°Cの液体アンモニア中で反応を行なうと1日でリゾチームのすべての遊離カルボキシル基をアミド基に変換することができた。−45°C以下の低温反応では、アミド化は選択的に起り、残存活性の高いアミド化リゾチームをうることができた。

## 文 献

- Donovan, J. W., M. Laskowski, Jr. and H. A. Scheraga 1960 Abnormal ionizable groups in lysozyme. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 2154.
- Fraenkel-Conrat, H. 1949 Essential groups for the interaction of ovomucoid (egg white trypsin inhibitor) and trypsin, and for tryptic activity. *J. Biol. Chem.*, **177**, 385.
- 船津勝, 山崎信行 1966 グリコールキチンを基質とするリゾチームの活性測定法. 栄養, 食糧, 発酵水質外国文献会誌, **17**, 787 A 107.
- 船津勝 1967 リゾチームの化学修飾と酵素活性. 蛋白質, 核酸, 酵素, **13**, 105.
- Hamaguchi, K. and M. Funatsu 1959 On the action of egg white lysozyme on glycol chitin. *J. Biochem.*, **46**, 1659.
- Hamaguchi, K., K. Rokkaku, M. Funatsu and K. Hayashi 1960 Studies on the structure and enzymatic function of lysozyme. I. Enzymatic action of lysozyme on glycol chitin. *J. Biochem.*, **48**, 351.
- Hayashi, K., T. Imoto and M. Funatsu 1963 The enzyme-substrate complex in a mura-midase catalyzed reaction. I. Difference spectrum of complex. *J. Biochem.*, **54**, 381.
- Hayashi K., T. Imoto and M. Furatsu 1964 The enzyme-substrate complex in a mura-midase catalyzed reaction. II. Evidence for the conformational change in the enzyme. *J. Biochem.*, **55**, 516.
- Hayashi K., T. Imoto, G. Funatsu and M. Funatsu 1965 The position of the active tryptophan residue in lysozyme. *J. Biochem.*, **58**, 227.
- Hoare, D. G. and D. E. Koshland, Jr. 1966 A procedure for the selective modification of carboxyl groups in proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **88**, 2057.
- Hoare, D. G. and D. E. Koshland, Jr. 1967 A method for the quantitative modification and estimation of carboxylic acid groups in proteins. *J. Biol. Chem.*, **242**, 2447.
- Hains, J. A. and P. C. Zamecnik 1967 Chemical modification of aminoacyl ligases and effect on formation of aminoacyl-tRNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 227.
- 林勝哉, 下田忠久, 船津勝 1968 リゾチームのカルボキシル基の修飾. 第19回タンパク質構造討論会予講集, p. 77 (東京).
- Imoto, T. and K. Yagishita 1971 A simple activity measurement of lysozyme. *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1154.
- Meienhofer, J., J. Czombos and H. Maeda 1971 Reduction of disulfide bond in peptides and proteins by dithiothreitol in liquid ammonia. *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 3080.
- Phillips, D. C. 1966 The three dimensional structure of an enzyme molecule. *Scientific American*, **215**, 78.
- Phillips, D. C. 1967 The hen egg-white lysozyme molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **57**, 484.
- Parsons, S. M., L. Jao, F. W. Dahlquist, C. L. Borders, T. Graff, J. Rass and M. A. Raftery 1969 The nature of amino acid side chains which are critical for the activity of lysozyme. *Biochemistry*, **8**, 700.
- Parsons, S. M. and M. A. Raftery 1969 The identification of aspartic acid residue 52 as being critical to lysozyme activity. *Biochemistry*, **8**, 4199.
- 千手諒一, 沖増哲 1950 キチンに関する研究 (第1報) キチンのグライコール化及びグライコールキチンの化学構造に就いて. 農化, **23**, 432.

## Summary

Attempts were made successfully to perform the amidation of carboxyl groups of lysozyme in liquid ammonia.

Prior to the chemical modification, stability of lysozyme in liquid ammonia was investigated under various experimental conditions. As the results, it was found that

there are no significant effects of liquid ammonia on the physical as well as chemical and enzymatical properties of lysozyme when lysozyme was dissolved in liquid ammonia below  $-45^{\circ}\text{C}$ .

Amidation of carboxyl groups of lysozyme was achieved by the ammonolysis of the active forms of ester. The esterification of carboxyl groups of lysozyme was carried out by three different methods employing the following reagents: (1) methanol with hydrochloric acid, (2) carbodiimide, (3) Woodward's reagent.

In the case of methanol-HCl, esterification was performed in aqueous solution and esterified lysozyme was ammonolyzed in liquid ammonia resulting in amidized lysozyme. In this method carboxyl group could be amidized without any denaturation when it was carried out at low temperature below  $-45^{\circ}\text{C}$ , though the reaction proceeded so slowly. Denaturation occurred accompanying insolubilization of lysozyme at room temperature.

In the case of carbodiimide, two methods were employed. Carboxyl groups of lysozyme were modified with 1-cyclohexyl-3-(2-morphinoethyl) carbodiimide (CMC) in aqueous solution followed by successive ammonolysis of CMC-lysozyme to amidized lysozyme in liquid ammonia.

On the other hand, lysozyme and CMC were simultaneously dissolved in liquid ammonia below  $-45^{\circ}\text{C}$ , and the reaction was completed producing amidized lysozyme. In this method the chemical modification occurred selectively in comparison with that in aqueous solution, and six carboxyl groups were amidized. The remaining activity of product was measured to be about 70 per cent.

In the case of Woodward's reagent, N-ethyl-5-phenylisoxazoline-3-sulfonate (WR), the reagent and lysozyme were reacted in liquid ammonia, and yielded specifically amidized lysozyme of which three carboxyl groups were modified and remaining activity was about 75 per cent.

Thus, a new method of the chemical modification of carboxyl groups of lysozyme was established by using liquid ammonia as solvent as well as chemical reagent. As the modification with CMC or WR in liquid ammonia are particularly selective, this method seems to be available for the study of the relationship between structure and function of lysozyme.