

人工高分子化合物の分子設計に関する研究

北國英一

昭和電工株式会社 化学品事業部 神奈川県川崎市川崎区扇町 5 - 1

Study on *de novo* design of artificial polymers and their characterization

Eiichi Kitakuni

Organic polymers are very useful and necessary to our modern life, and the chemical structure is essential to the function, e.g. proteins, and the biodegradability, e.g. polyesters. *De novo* design of artificial polymers is a key technology and made to obtain the useful polymer structures and functions, and we examined the small peptide of good structural stability comparable to natural proteins, and the polyester of good biodegradability friendly to an environment, and those polymers have a simple and repeated sequence in the structure. The 30-residue peptide (PERI COIL-1) was artificially designed with combining the motif of “leucine zipper” observed in the two-stranded coiled coil protein, e.g. GCN-4, and the periodic proline in α -helical structure, and investigated the structural uniqueness and stability. The peptide was obtained by solid-phase peptide synthesis, and characterized by CD spectroscopy, sedimentation equilibrium experiment and NMR, and shows the formation of a pentameric α -helical structure in aqueous solution. The thermal denaturation curves of the CD at 222nm (pH 7.5) show an unusual cold denaturation occurring well above 0°C and no thermal denaturation is observable under 90°C. The thermodynamic analysis of the curves shows that the helical structure would be stabilized by entropic effect rather than enthalpic effect, which is derived from hydrophobic interaction among leucine residues. The structure might be available as a platform of future enzyme.

The aliphatic polyester, poly(tetramethylene succinate-co-tetramethylene adipate); PBSA, poly(tetramethylene succinate); PBS, has the structure of good biodegradability and investigated of the degradation manner and the environmental impact. PBSA or PBS was experimentally hydrolyzed into some oligomers and monomer by bacterial esterase, and the obtained oligomers were identified by high performance liquid

chromatography / mass spectroscopy (HPLC/MS) and NMR. It revealed that the oligomers of ester-bonds is easily decomposed and immediately mineralized by micro-bacteria, but the ones of di-urethane group, which is come from a coupling agent, is hardly utilized. However, the di-urethane oligomers could be promoted in biodegradation by an addition of the ester oligomers because of an enhancement in microbial activity, so that PBSA or PBS gets a promising character of good biodegradability.

The outcome of this study should help and adapt to develop the new generation of polymers which requires a good stability and an environmental friendliness.

Key Word: artificial polymer, design, α -helical structure, leucine zipper, proline, circular dichroism, sedimentation equilibrium, thermodynamic analysis, poly(tetramethylene succinate-co-tetramethylene adipate), enzymatic hydrolysis, oligomers, biodegradability

緒言

人為的に蛋白質分子の立体構造を創造し、それに適合するアミノ酸配列を決定する分子設計技術は、蛋白質工学が目指す主要目標の一つである。人工酵素などの有用な機能を有する蛋白質を人為的に設計開発することは、医薬品、医療材料、化学工業、食品、農業分野などの幅広い産業分野において活用が期待されている。天然蛋白質の立体構造解析は、近年の解析技術や情報処理技術の飛躍的な向上に伴い、データ数、精度、内容ともに高まってきている。同時に構造構築原理の追求も進んできているものの、その目標への到達までにはまだ相当な努力が求められている。従来、人為的な蛋白質の構造設計は冒険的な色彩が強く、成功事例も数少ないため、多くの研究者はむしろ天然蛋白質をベースにその改変・修飾を通じて構造原理解明にアプローチするストラテジーを選ぶ傾向が強い。しかし、人工蛋白質の設計の目的は、構造原理について新しい知見を得ることだけではなく、むしろ既知の理論を検証するという意味があることを再認識する必要がある。

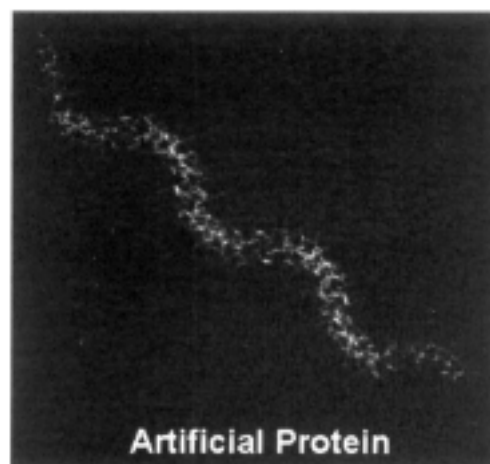
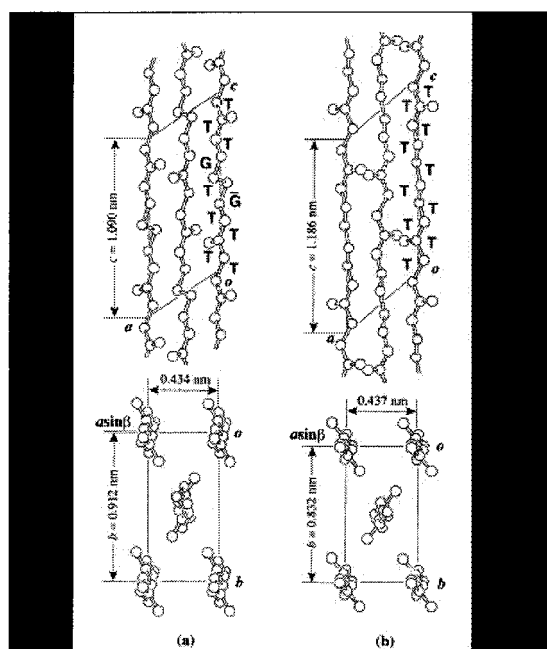


Fig.1 helical polymer

本研究は、蛋白質分子の基本構造である α -ヘリックス構造のデザインを通じて、我々が既に理解している構造原理の実用性を再確認するとともに、加えて挑戦的な新しい概念を創造するため、プロリンを配列に導入した。単純な単位配列の繰り返し構造である α -ヘリックス構造 (Fig.1) は、構造構築原理を理解する上で最適な研究テーマであり、さらにプロリンの導入によって変化を加えるデザインにより、その多様性を広げることが可能となる¹⁾。このデザインの有効性は今後、人工蛋白質設計の確実性を高め、さらには人工酵素など機能構造を有する蛋白質の創製に重要な知見を提供するものと期待できる。また、人工蛋白質の構造安定性について熱力学的な解析を通じて、疎水性相互作用に焦点を当て、天然蛋白質と比較検討しながら、構造安定化のための設計方針について考察を加えた²⁾。

一方、単純な繰り返し構造を有し、我々の日常生活に必需となっている汎用樹脂の分野で、近年最も注目されている高分子が脂肪族ポリエステルである。ポリブチレンサクシネート・アジペート (PBSA)、ポリブチレンサクシネート (PBS) は代表的な脂肪族ポリエステルであり (Fig.2)、本質的な生分解性を有している。脂肪族ポリエステルの生分解に関しては、未だその詳しいメカニズムは解明されておらず、生分解による地球環境への負荷に関する知見も少ない。そこで、本研究は天然にある微生物が産生するエステル加水分解酵素を利用して、脂肪族ポリエステルを実験的に加水分解し、得られた水溶性オリゴマー成分及びその微生物による再資源化過程を明らかにすることにより、生分解メカニズムの全体像を捉えるとともに、将来の資源循環サイクルの見据えて、酵素分解の有効性と再資源化の制御について知見を得ることを目指した³⁾。



Artificial Biodegradable Polymer
Fig.2 Aliphatic polyester structure

1. 天然に存在しないアミノ酸配列を有する人工的 α -ヘリカルペプチドの分子設計と構造学的検証

人工的な α -ヘリックス構造のアミノ酸配列は、天然蛋白質から抽出した次の3つの構造構築情報に基づき、分子設計手法を用いてデザインした。設計した α -ヘリックスは、化学合成により容易に得られる30個のアミノ酸配列からなり、実際に合成して、その構造を検証した。

【構造構築情報】

① ヘリカルコイルドコイル

核酸の二重らせん構造に類似する蛋白質の2本鎖コイルドコイル構造を有する筋肉蛋白質トロポミオシンに観られる7残基アミノ酸配列を繰り返したヘリカルコイルドコイル構造をデザインに取り入れることにした。

② プロリンの導入

人工酵素を念頭に、基質結合に必要なサイト(クレフト)形成の設計方針は、次のような理由からプロリンを繰り返し配置する設計とした。プロリンは自由度の少ないアミノ酸であるため、通常はヘリックスブレイカーである⁴⁾。しかし、クエン酸合成酵素やアルコール脱水素酵素、チトクローム過酸化酵素などに観られるプロリンを含んだヘリックス構造ではプロリンが中央部に位置することでヘリックスが折れ曲がっており、このジオメトリーをらせん構造に適用しプロリンを周期的に配置することでらせん長が短縮できると考えられ、更に二本鎖にすることで核酸の二重らせん様の安定したコイルドコイル構造が新たに創製できると考えられる。また、らせん間に生じる溝は酵素蛋白質が基質と結合するために必要なサイト(クレフト)を形成することになり、将来低分子酵素触媒への利用が期待できる。さらに、プロリンは構造自由度が低いことから蛋白質の構造安定化の役割を担うことが考えられる。

③ ロイシンジッパー

安定したコイルドコイル構造を蛋白質で獲得する設計方針としては、核酸の二重らせんの相補的な水素結合に匹敵する、蛋白質の安定化構造は疎水性アミノ酸同士の疎水性相互作用がある。天然蛋白質のコイルドコイル構造では疎水性アミノ酸であるロイシンがヘリックス-ヘリックスのインターフェースで入れ子となって疎水性相互作用により蛋白質をパッキングする構造、すなわちロイシンジッパーモチーフが観られる^{5,6)}。そこで、構造安定化を意図し人工蛋白質設計にロイシンジッパーモチーフを初めて取り入れた。

これらの設計基本方針を以下のように具体化した。

- 1) 7残基のアミノ酸配列を繰り返す。
- 2) プロリンを6～8残基アミノ酸配列毎に配置する。
- 3) ロイシンジッパーにより構造安定化を図る。

コイルドコイル構造のデザインは、蛋白質構造データ (Protein Data Bank) 検索により、主鎖構造をコンピューター上で精密に再現し、その上にアミノ酸の側鎖を構築した^{7), 8)}。そのうえで分子動力学的手法により構造エネルギーを極小化することにより、立体障害を取り除く作業を繰り返して最適なアミノ酸配列を模索した。得られたアミノ酸配列を PERI COIL-1 と命名した (Fig.3)。

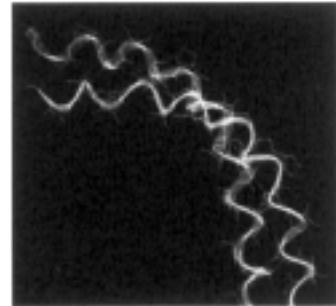


Fig.3 PERI COIL-1

設計した PERI COIL-1 のアミノ酸配列は、7つのアミノ酸残基配列を繰り返して、プロリン (P) をその配列に配置することにより、ヘリックス構造が周期的に折り曲がるスーパーコイルが設けられた。このスーパーコイルのピッチはプロリン間の距離に依存し、6残基周期だと伸長し、8残基周期になると幅が広がることから、7残基周期の配列がコイルドコイル構造には理想型であることが明らかになった。

ヘリックス構造に適するアミノ酸配列は、立体構造データベース解析により2次構造によく出現しているアミノ酸組成を検索し、出現頻度の高いアミノ酸の中から、非極性の疎水性アミノ酸としてロイシン (L)、極性の親水性アミノ酸としてグルタミン酸 (E) とリジン (K)、そしてデフォルトのアミノ酸としてアラニン (A) を選択した。これらのアミノ酸を先に設計したコイルドコイル

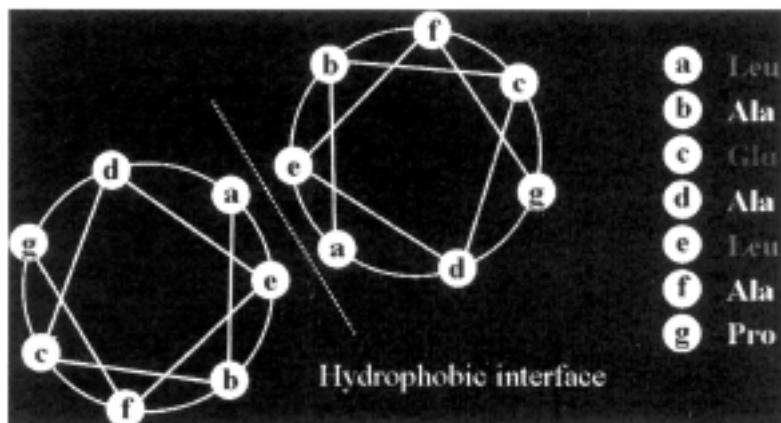


Fig.4 Repeated structure (helical wheel)

ヘリックス構造の主鎖骨格上に親水性面と、その反対面が疎水性面を形成する両親媒性構造を構築できる様に配置した。プロリンを含むヘリックス構造を精査すると、ロイシンやイ

ソロイシンはプロリン位置を0とした場合、-2と+1に出現する頻度が高く、この位置はヘリックスのパッキングに適したポジションであることを示唆している (Fig.4)。コイルドコイルヘリックス構造から見ると、ロイシンやイソロイシンはヘリックス-ヘリックス間の疎水性面となり、構造安定性に重要となる。グルタミン酸はロイシンの対極に位置することで、水溶性を提供することになる。そこで、基本配列を **Leu-Ala-Glu-Ala-Leu-Ala-Pro** に決定した。

本研究では、この基本配列を3回繰り返すデザインとした。デザイン上の欠点は、プロリンがヘリックス構造中に配置されることにより、ヘリックス軸が約 30° 曲げられるため、これによる弊害として α -ヘリックス構造を保持している水素結合ネットワークが一部寸断されてしまい、構造安定性が失われる可能性が高いことである。そこで、3回繰り返し配列の中央となる2番目の配列では、疎水性相互作用を強化するためにアラニンをロイシンに置換することでパッキングを改善した。さらに、ヘリックスのN端とC端にもヘリックス雰囲気を広げる目的でそれぞれ2残基のロイシンを配置した。さらにデザインしたアミノ酸配列はその配列中心を境に対称性を有するが、これを利用して、C端に2残基のリジン、N端に2残基のグルタミン酸を配置することで、N-C端の間に水素結合を設けて、両端がうまく相補するように設計を加えた。この設計は、ヘリックス分極を打ち消すことになり、構造安定化に寄与することになる⁹⁾。結果として、デザインしたコイルドコイルヘリックス構造はアンチパラレル型となった (Fig.5)。

(設計したアミノ酸配列； **EELLPLAEALAPLLEALLPLAEALAPLLKK**)

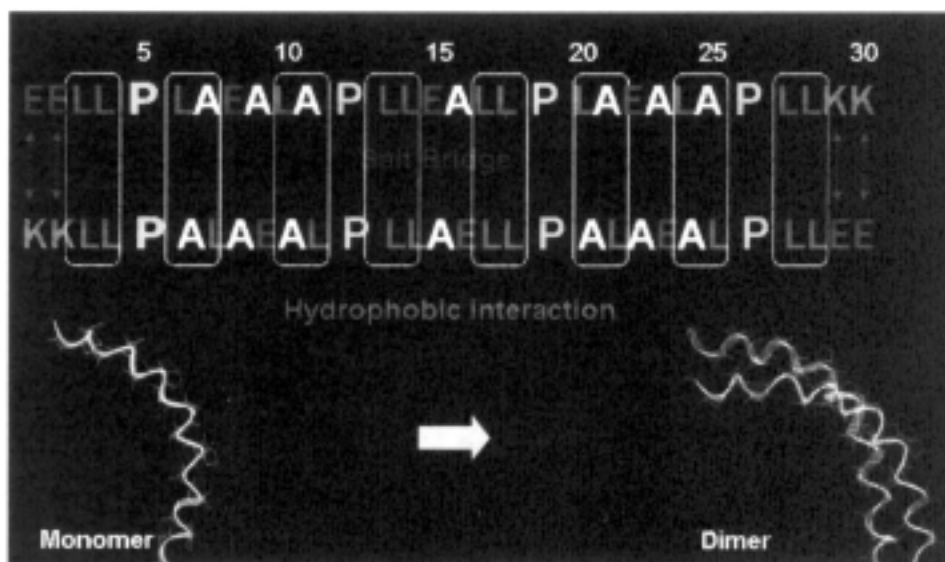


Fig. 5 Designed sequence

2. 設計に基づく人工ペプチドの合成と構造検証

実際に合成した PERI COIL-1 は配列の約 70%を疎水性残基が占めるにも関わらず、高い水溶性を示した (約 2mM, pH7.0)。このことは、疎水性のパッキングがうまく機能していることを示唆している。CD スペクトル測定では、ヘリックス構造特有の 208nm と 222nm の負のピークが観察された

(Fig.6)。222nm (ペプチド濃度: 30 μ M、20 $^{\circ}$ C)で観測された分子楕円率は pH3.5 で 21,000、pH7.0 で 12,000 であり、これらをヘリックス含量で示すと各々 50%、30%であった^{10),11),12)}。一方、ヘリックスサポーターであるトリフルオロエタノール (TFE) を 50% (V/V) 加えた場合のヘリックス含量は 30%が 60%に増加した (pH7.0)。

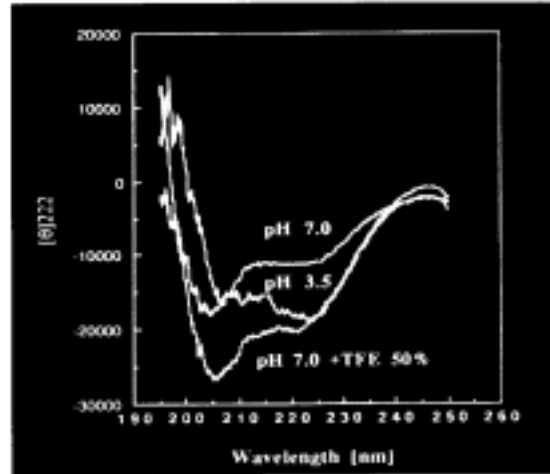


Fig.6 CD spectra

ヘリックス含量はペプチド濃度に依存して高くなり、70 μ M で定常状態になった (Fig.7)。これから、ペプチドは、極性アミノ酸のプロトネーションと、疎水性アミノ酸間の相互作用とによりヘリカルな会合体を形成していることを示しており、設計の妥当性が指示された。しかし、設計したリジンとグルタミン酸間の塩結合や、アンチパラレルの配向について情報は得られなかった。

沈降平衡法により求めた分子量は $M_w=16,000$ (pH7.0, 20 $^{\circ}$ C), $M_w=14,000$ (pH

7.0, 37.5 $^{\circ}$ C) であり、サイズ排除クロマトにより求めた分子量は $M_w=12,000$ (pH7.0, 20 $^{\circ}$ C) であった。これらの測定結果がよく一致したことから合成したペプチドは、会合数 $n=5$ の安定な構造体をつくることが判明した。また合成品の見かけの分子量がデザインした値に比べて大きくなっていることから、中心に配置した 4 残基のロイシンの側鎖が別鎖と疎水性相互作用を設けている

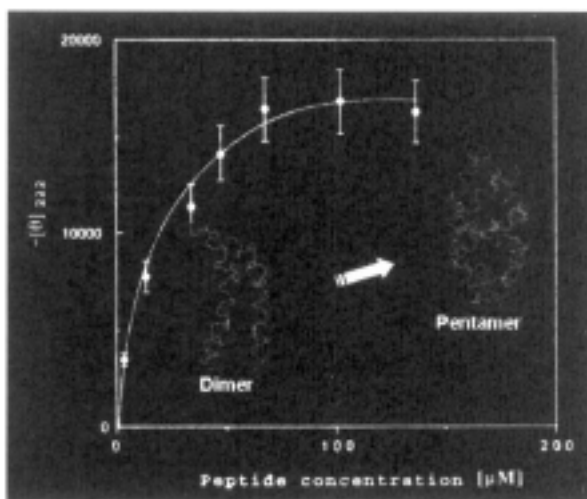


Fig.7 Dependence on peptide conc.

ことが示唆された。

$^1\text{H-NMR}$ 解析からは溶液中で α -ヘリックス構造が形成されていることを確認することができた¹³⁾。実際のアミノ酸配列の作成に関しては、二次構造予測法で採用される各アミノ酸と立体構造との相関を利用することが有効であった。また立体構造の作成には立体構造既知のコイルドコイル構造から主鎖構造を抽出し、これを利用してデザインが求める構造フレームをまず作成した。この上に必要なアミノ酸を一つ一つ適用しながら最適なモデリングを進めた。蛋白質の高次構造設計に関しては、これまで様々なアプローチが試みられているが、本研究の手法が設計成功への一助となれば幸いである。PERI COIL-1のスーパーコイルドコイル構造はユニークであり、疎水性相互作用を効果的に導入した初めてのケースとなった。

3. デザインした人工 α -ヘリカルペプチドの熱動学的性質

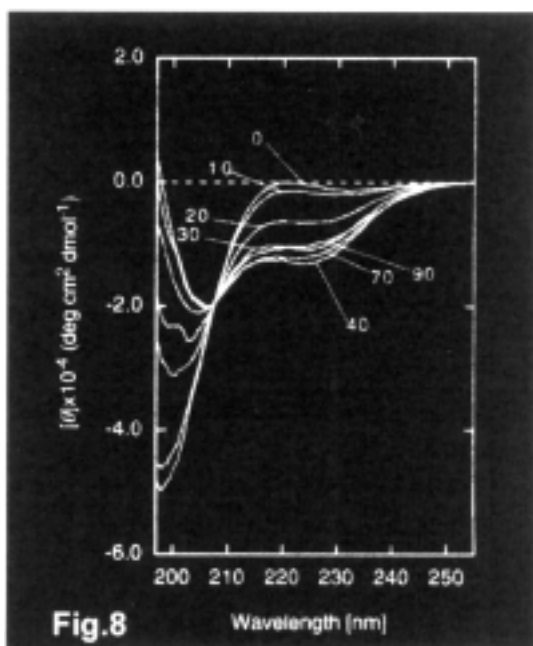


Fig.8 CD spectra at different temp.

期待された。実際に CD を用いて PERI COIL-1 の熱変性曲線を求めると、予想以上に熱安定性が高く、90°C においてもヘリックス構造を維持していた (Fig.8)。

反面、低温で変性状態を示した。本研究はその要因について、エントロピー変化、エンタルピー変化、熱容量変化に注目し、2状態モデルを用いて解析した。

設計したデザインの有効性、特に構造の熱安定性について解析を進めた。天然蛋白質の場合、構造安定性に最も寄与していると考えられているのが構造内部の疎水性相互作用であるが、PERI COIL-1にはそれに相当するロイシン残基間のパッキングと、耐熱性蛋白質で多く観られるプロリンがあり、構造安定化への手掛りが得られるのではないかと期待された。特に疎水性相互作用は天然蛋白質の構造維持に重要な役割があるものと考えられており、うまく低分子蛋白質に反映できれば、安定構造を有する人工蛋白質の創製に重要な手掛かりを与えるものと

その結果、PERICOIL-1 のエンタルピー、エントロピー変化は十分に小さいが、熱容量変化は球状蛋白質のそれに匹敵するというために、非常に高い熱安定性を示すと同時に、低温変性温度の上昇を招いていることが判明した^{14),15),2)}。この結果、設計する蛋白質内部に疎水性相互作用を積極的に導入することにより、構造的な安定性が図られるというストラテジーが有効であることを本研究で初めて証明することができた。天然蛋白質のような精密なパッキング構造を目標とすれば、PERI COIL-1 のそれは複数の構造体の集合であるモルテングロビュール状態にあるといえるが、今後の特異的な相互作用の導入を研究することにより、安定な低分子人工蛋白質の途が開けるものと期待される。

4. 脂肪族ポリエステルの酵素学的分解挙動と生分解性に関する研究

蛋白質の安定構造の次には機能構造が考えられる。酵素蛋白質は複雑な化学反応の触媒として産業上有用であるが、その機能構造は安定な構造体の上に形成されている。本研究で行った分子設計は、安定構造の実現を追究する意味において、人工酵素の実現に寄与するものとする。一方、単位構造を繰り返す人工高分子もまた酵素と異なる機能的な役割を果たしている。その中で、近年、地球環境にやさしい素材として注目される脂肪族ポリエステルは、本質的な生分解性を有しており、将来的に資源循環に果たす役割は重要である。しかしながら、今日まで、その生分解のメカニズムに関して詳細な報告はなく、その環境への負荷については未知数のままであった。

そこで、本研究では、代表的な脂肪族ポリエステルであるポリブチレンサクシネート・アジペート (PBSA)、ポリブチレンサクシネート (PBS) を、微生物酵素を用いて加水分解してその分解生成物の化学構造の詳しく調べることで¹⁶⁾、高分子の生分解挙動を明らかにし、生分解の全体像を捉えることを目指した。

5. 酵素分解生成物の同定

PBSA と PBS を微生物由来のグリセロールエステラーゼで処理し、生成した水溶性組成物組成を分子量別に Fig.9 に示した。水溶性分解産物は、原料であるモノマー (S,B,A) と、それらのオリゴマーであった。ここで、同じ分子量のものについては結合情報がないため、例えば、tetramer である ABSB と SBAB は同一物として取り扱った。

PBSA の水溶性生成物の分子量は 90 (コハク酸(S)) から 834 (ABSBSBSBS) まだが

検出された。反応5時間での主な生成物は、SBSBSB (M_w ;534)、SBSBS (M_w ;462)、ABSBS (M_w ;390)、SBSB (M_w ;362)であり、20時間では、分子量の低いABSBS (M_w ;390)、SBSB (M_w ;362)、SBS (M_w ;290)、SB (M_w ;190)が主要な生成物となった。エステル結合数が3より大きいオリゴマーについては、反応時間20時間では、著しくその分布量が減少したことから、酵素加水分解による主要な分解産物は1~3個のエステル結合を有するオリゴマーであることが明らかになった。エステル結合数の少ない低分子オリゴマーは、酵素への基質結合性が低いために、それ以上酵素分解を受けずに、酵素から遊離したものと考えられる。また分解産物の中でSBHBSBSB (M_w ;792)、SBHBSB (M_w ;620)、ABHBS (M_w ;576)、SBHBS (M_w ;548)、ABHB (M_w ;476)、SBHB (M_w ;448)、BHB (M_w ;348)はジウレタンセグメント(H)を有しており、他のエステル結合型のオリゴマー成分と異なっている。

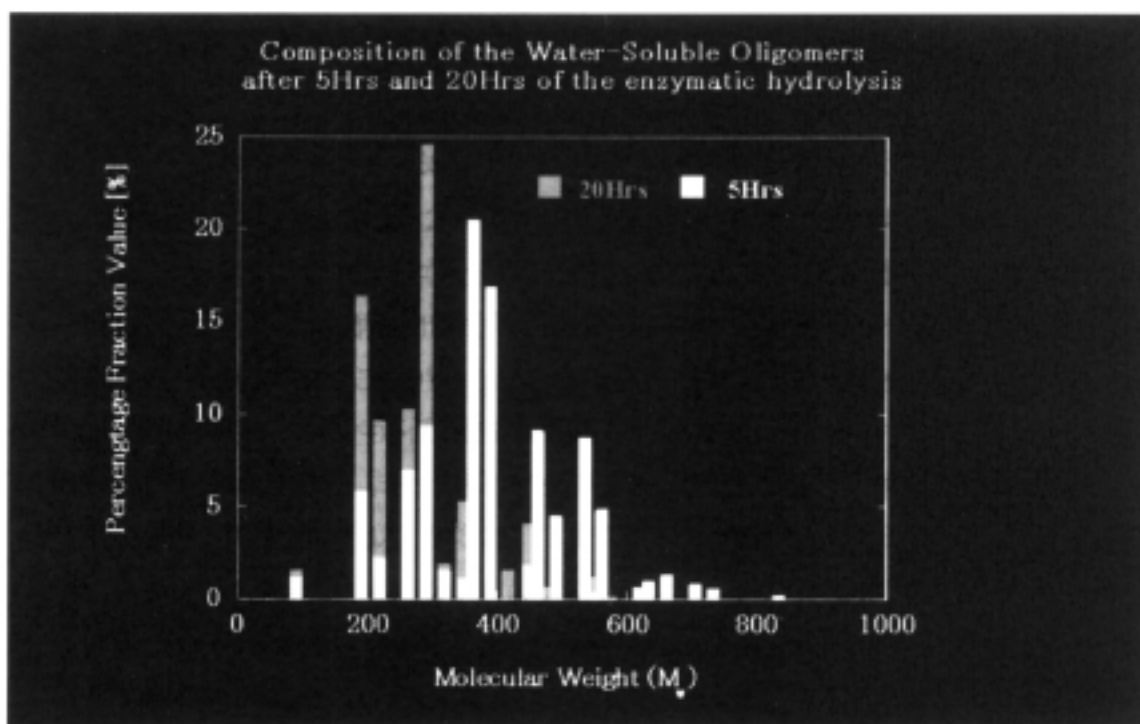


Fig.9 Composition of the oligomers after 5h and 20h of enzymatic degradation of PBSA

6. 分子内結合タイプによる生分解性の違い

PBSAの分解生成物(水溶性オリゴマー)はエステル結合型オリゴマーとジウレタン型オリゴマーの2種類に分類される。そこで、エステル結合型オリゴマーのBSBとジウレ

タン型の BHB をとりあげ、それぞれの生分解性の違いを検討した。Fig.10 に生分解性試験の結果を示した。生分解の半減期は、BSB で約 3 日、BHB で 50 日以上となり、BHB は生分解性が低いことが明らかになった。この結果、ジウレタンオリゴマーの生分解速度がエステルオリゴマーに比して遅いことが明らかになった。また、Owen らは¹⁷⁾、ジウレタン化合物 *toluene-2,4-dicarbamic acid diethylester* は、(3-amino-4-methyl-phenyl)-ethyl ester と carbamic acid (5-imino-2-methylphenyl)-ethyl ester のような芳香族アミンのカルバミン酸を経て *toluene-2,4-diamine* に生分解されることを報告している。これらの結果から、ウレタン基を有するオリゴマーは微生物による代謝中間体が培養液中に蓄積する可能性が考えられた。

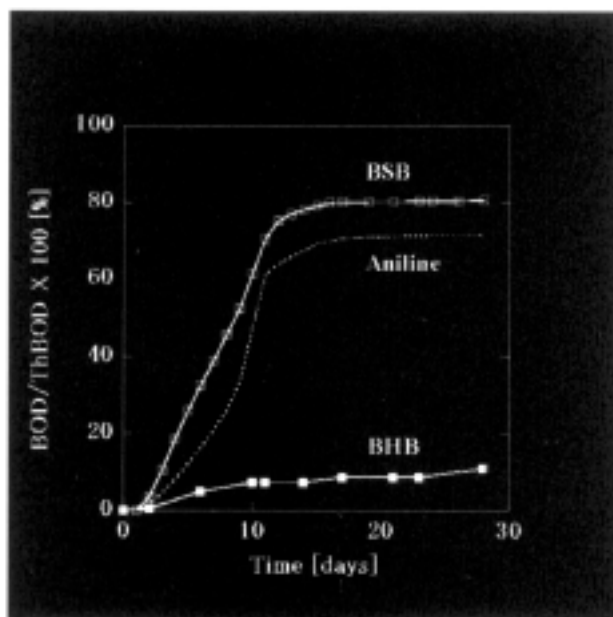


Fig.10 Biodegradation curves of BSB and BHB

そこで、ジウレタンオリゴマーの微生物による代謝中間体の蓄積性を明らかにする目的で、BSB、BHB の生分解における全炭素収支を次のように追跡した。全試料中の炭素 (C_{MAT} ; mg/l) のうち、生分解度から生化学的に酸化された炭素量 (C_{BOD} ; mg/l) を、濾過ケーキの元素分析からバイオマスとして蓄積された炭素量 (C_{BIO} ; mg/l)、溶存炭素 (DOC) 分析から DOC 炭素量 (C_{DOC} ; mg/l)、SEC-MS 分析から残存試料中の炭素量 (C_{RES} ; mg/l) を各々決定した。この結果、約 70 mol% の BHB が微生物による生化学的修飾を受け、水溶性の中間代謝物が培養液中に蓄積していることが判明した。

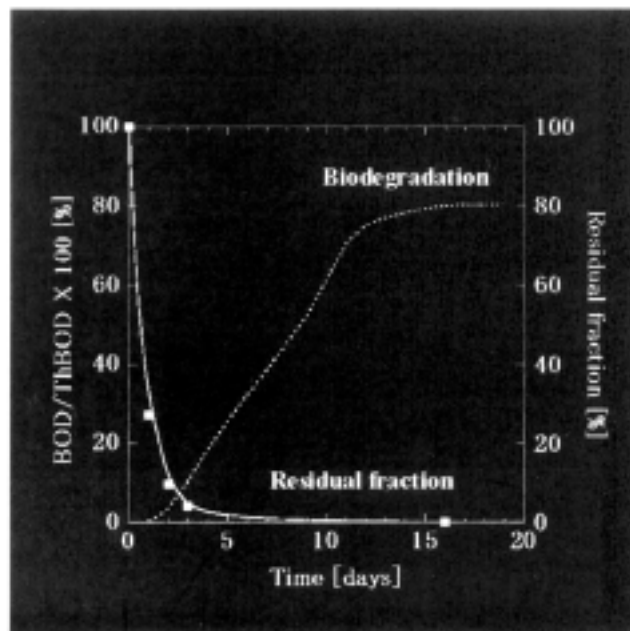


Fig.11 Material balance in the biodegradation of all oligomers

7. 生分解性のシナジー効果

実用化されているポリエステル PBSA の酵素加水分解産物（反応時間 20Hrs）の生分解性を活性汚泥法により測定した。生分解率は各分解産物の理論的 BOD を基に算出した。BOD は経時的に測定し、同時に各産物の残存率を 1, 2, 3, 16 日後に HPLC-MS で測定した (Fig.11)。すべての加水分解産物は活性汚泥中で生分解し、16 日後にはすべてが消失した。全体的な生分解率は 80% となった。また全体としての半減期は 3 日であり、BSB の半減期と同じ値となった。ジウレタン化合物である BHB と SBHB には、他のエステル型分解産物と同様に生分解した。

単独では生分解性が低い BHB の生分解が PBSA の酵素加水分解産物において進行したことは、他の BSB のような易分解性物質の存在が影響していることが予想された。すなわち、BSB が非常に速く生分解することで培養液中の微生物的活性を高めた結果、BHB の生分解が加速されたのではないかと考えられた。そこで、BSB (6mg) / BHB (24mg) の混合物（モル比で 1 : 3）を活性汚泥に加え、その生分解性を測定した (Fig.12)。BHB、BSB が単独で生分解した場合の生分解率は各々 10%、80% であることが既に判明している。もしそれらが相互依存性なく生分解するなら、存在モル比から分解時間 20 日での生分解率への BHB の寄与は 8%、BSB の寄与は 16% となり、全体の生分解率は 24% と予想される。しかし、実際に測定した生分解度は 31% に達した。BSB の生分解速度は BHB 比較して十分に速いことから、BHB の分解速度が律速となるので、生分解率の増加はすべて BHB の生分解の増加に起因すると考えられる。BSB を添加した場合の BHB の生分解率を推測すると 15% (31% - 16%) となり、BHB 単独の生分解率に比して約 2 倍値となった。BSB の存在によって明らかに BHB の生分解速度が加速されることが明らかになった。

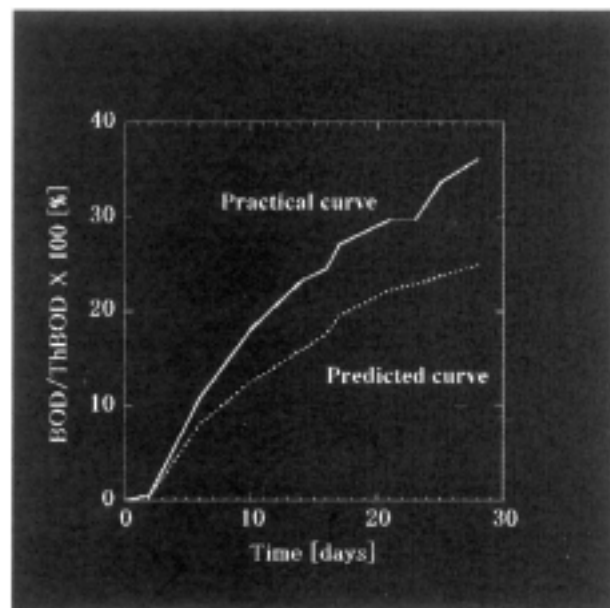


Fig.12 Biodegradation curve of the blend of BSB and BHB

総括

本研究では、残念ながら設計したペプチドを利用した人工酵素設計までは至らなかったが、そのデザインの有効性、その安定な素材を提供する要素としての疎水性相互作用の有用性について、熱安定性とそのメカニズムの解明に焦点を当てて論議をすることで、将来の有用な構造設計への指針・知見を初めて具体的に提供することができた。一方、その利用の面での酵素の触媒活性を利用することができる期待される産業として、生分解性の脂肪族ポリエステルを取り上げ、酵素を活用することにより再資源化が促進される機構について詳しく調べた。今後、一方でデザイン研究が進化し、もう一方で再資源化のために求められる酵素機能が解明されることにより、両者が結合して理想的な資源循環の道が開けていくことを切に希望するものである。

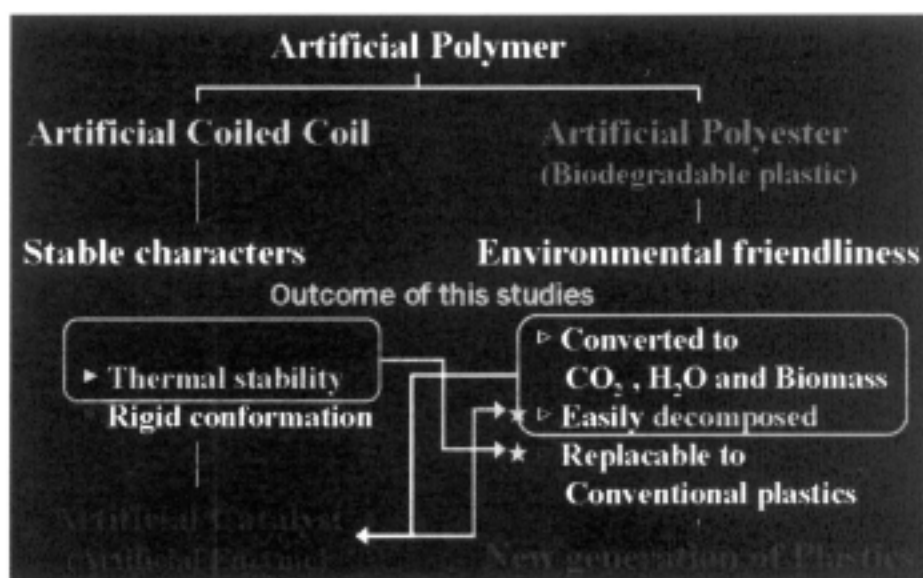


Fig.13 Outcome of this study and the future

以上

【参考文献】

1. E. Kitakuni, et.al, (1992), FEBS Letter, 298(2,3):233-236
2. E. Kitakuni, et.al, (1994), Protein Science, 3:831-837
3. E. Kitakuni, et.al., (2001), Environmental Toxicology and Chemistry, 20(5): 941-946
4. Barlow D.J., Thornton J.M. (1988), J.Mol.Biol, 201:601-619
5. O'Shea E.K., Rutkowski R., Kim P.S., (1989), Science, 243:538-542

6. O'Shea E.K., Rutkowski R., Stafford III W.F., Kim P.S., (1989), *Science*, 245:646-648
7. O'Neil K.T., DeGrade W.F., (1990), *Science*, 250:646-651
8. Lyu P.C., Life M.I., Marky L.A., Kallenbach N.R., (1990), 250:669-673
9. Fairman R., Shoemaker K.R., York E.J., Stewart J.M., Baldwin R.L., (1989), *Proteins*, 5(1):1-7
10. Holzwarth G., Doty P.J., (1965), *J. Am. Chem. Soc.*, 87:218-228
11. Greenfield N., Fasman G.D., (1969), *Biochemistry*, 8:4108-4116
12. Filippi B., Borin G., Moretto V., Marchiori F., (1978), *Biopolymers*, 17: 2545-2559
13. Wüthrich K., (1986), *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley-Interscience, New York.
14. Privalov P.L., (1982), *Adv. Protein Chem.*, 35:168-241
15. Thompson K.S., Vinson C.R., Freire E., (1993), *Biochemistry*, 32:5491-5496
16. Ando Y., Yoshikawa K., Nishioka M., Ishioka R., Yakabe Y., (1998), I. Enzymatic hydrolysis. *Polymer Degrad. Stabil.*, 61:129-137
17. Owen S., Otani T., Masaoka S., Ohe T., (1996), *Biotechnol. Biochem.*, 60:244-248