

0099028011

城西大学  
水田記念図書館

城西大学大学院薬学研究科  
博士学位論文

甲第5号

昭和61年度

城西大学水田記念図書館

甲第5号

小幡淳雄

ドーパミン  $\beta$ -モノオキシゲナーゼにおける活性部位の構造と反応機構：生体系における銅-薬物相互作用解明の一環として

昭和61年度  
城西大学

城西大学  
水田記念図書館

0099028011

ドーパミン  $\beta$ -モノオキシゲナーゼにおける  
活性部位の構造と反応機構

—— 生体系における

銅-薬物相互作用解明の一環として——

小 幡 淳 雄

ドーパミン $\beta$ -モノオキシゲナーゼにおける  
活性部位の構造と反応機構

——生体系における

銅—薬物相互作用解明の一環として——

甲第5号

小 幡 淳 雄

# 目 次

I 序 論	1
I-1 本研究の目的並びに意義	1
I-2 本研究に至る背景的研究について	2
II 酵素精製法並びに各種定量法	8
II-1 酵素精製法	8
II-2 酵素活性の測定および酵素反応	14
II-3 電気泳動	18
II-4 タンパク定量法	22
II-5 銅の定量法	24
II-6 シアンイオンの定量	26
II-7 試薬および材料	27
III DBM と無機アニオンとの結合平衡の磁気共鳴による解析	29
III-1 緒言	29
III-2 実験	29
1) 試料の調製	29
2) 磁気共鳴の測定	30
III-3 核磁気緩和速度の平衡論的解析	32
1) 核磁気緩和について	32
2) 相関時間( $\tau_c$ )について	33
3) 金属イオンと配位子との距離の算出	34
4) 緩和時間の平衡論的解析	35
III-4 結果ならびにその解釈	40
1) 常磁性 $^1\text{H}$ 核磁気縦緩和速度のアニオン濃度依存性	40
2) $^1\text{H}$ 核磁気縦緩和および横緩和速度の測定による $\text{Cu(II)}-\text{H}_2\text{O}$ 間距離の見積り	44
3) EPR スペクトル変化のアニオン濃度依存性	45

4) シアンイオン及びアジドイオンの DBM に対する競合結合の解析	51
III-5 DBM の活性部位の構造に関する考察	56
III-6 まとめ	58
IV DBM の無機アニオンによる阻害反応の平衡論的解析	59
IV-1 緒言	59
IV-2 酵素反応の平衡論的解析	59
IV-3 結果	61
1) 無機アニオンの阻害濃度	61
2) 無機アニオンによる DBM の阻害型の検討	62
IV-4 無機アニオンによる DBM の阻害機作についての検討	71
IV-5 まとめ	72
V DBM の活性部位構造と反応機構	73
V-1 緒言	73
V-2 DBM の酵素反応開始機構 — 2 電子 1 段階還元か 1 電子 2 段階還元か —	73
V-3 推定活性部位構造による阻害反応の解釈	75
1) 阻害型式	75
2) 活性部位構造モデル	76
3) 各阻害型の解釈	76
V-4 まとめ	77
VI まとめ	77
謝 辞	79
引用文献	81

# I 序 論

## I-1 本研究の目的並びに意義

生命活動に必要不可欠な元素を必須元素と呼び、その中で Fe, Zn, Cu, Mn, Co などの微量元素は生体内で、金属タンパク質や金属酵素として重要な役割を演じている<sup>1)</sup>。特に銅は、鉄、亜鉛などと共に、生体系が広く利用している金属の一つで、銅タンパク質として電子伝達、酸化還元、酸素添加、そして酸素の運搬などに寄与している。それらの銅タンパク質中の銅は、分光学的および磁氣的性質によって表 I-1 に示すように、タイプ 1, 2, 3, 4 に分類されている<sup>2)</sup>。

---

Table I-1. Classification of Cu(II) in copper proteins

---

Type 1 Cu(II) : epr-detectable, reoxidizable, and responsible  
for the blue color

Type 2 Cu(II) : epr-detectable, non blue, and not reoxidizable

Type 3 Cu(II) : epr-nondetectable, spin-coupled pair of Cu(II)

Type 4 Cu(II) : Cu ion which does not fit any of the other  
three types

---

タイプ 1 の銅は一般に“ブルー銅”と呼ばれ、可視部に強い吸収をもつのが特徴であり、電子常磁性共鳴 (EPR) で検出される。またタイプ 2 の銅は“非ブルー銅”と呼ばれ、可視部に強い吸収はないが EPR では検出される。それに対してタイプ 3 の銅は 2 原子の銅がペアーで存在することにより、その間の反強磁性的相互作用により EPR では検出されないものである。また銅タンパク質は主としてそれらに含まれている銅の種類によって、グループ I, II, III, IV に分類されている<sup>3)</sup>。表 I-2 にそれらの分類と機能を示した。

Table I-2. Classification of copper proteins

Classification	Protein	Mol.Wt.	Role	type 1	type 2	type 3
Group I	azurin	14,000	electron transfer	1		
	plastocyanine	10,500	electron transfer	1		
Group II	galactose oxidase	68,000	substrate oxidation with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> formation		1	
	benzylamine oxidase	80,000-100,000	substrate oxidation with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> formation		2	
	superoxide dismutase	32,000	superoxide dismutation		1/1Zn	
	<del>tyrosinase</del> <del>monooxygenase</del>	290,000	monooxygenation		4-8	
Group III	tyrosinase	61,000	monooxygenation			2
	hemocyanine	10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup>	oxygen transport			2
Group IV	ceruloplasmin	134,000	terminal oxidation	2	2(1)	4(3)
	laccase	64,000	terminal oxidation	1	1	2
	ascorbate oxidase	140,000	terminal oxidation	2(3)	2	4

Group I : Contains a single copper ion having 4 ligands in a distorted tetrahedral geometry. The ligands are coordinated to the copper via sulfur and nitrogen donor atoms, with two nitrogens and two sulfur atoms being the most common arrangement. Important physical properties such as the redox potential are modulated by the details of the coordination environment, particularly the number and nature of the sulfur ligands.

Group II : Contains a single copper ion at the catalytic center. The ligands are coordinated via nitrogen and oxygen donor atoms with the geometry dominated by a square-planar arrangement around the copper. There is at least one readily accessible coordination site, either in the plane or along the tetragonal axis, that binds substrate or other ligands. In these proteins, the Lewis acid properties of copper(II) are employed with, or without, concomitant redox activity.

Group III : Contains one or more binuclear copper centers with a coordination environment consisting mainly of nitrogen donor atoms. In the copper(I) form of the protein, two ligand atoms may dominate the coordination environment thereby allowing the protein to fulfill its function the coordination of dioxygen.

Group IV : Contains two or more of the centers that characterize groups I to III.



このように、生体系には様々な銅タンパク質が存在していることがわかる。その中で哺乳動物の中枢神経伝達物質ノルアドレナリンの生合成に関与し、神経化学的に極めて重要な酵素でありながら、未だその構造と反応機構が明確でないドーパミンβ-モノオキシゲナーゼを取り上げ、その酵素の銅部位の構造や反応機構をより明白にすることを目的として本研究に着手した。

ドーパミンβ-モノオキシゲナーゼ [dopamine β-monooxygenase; DBM (E. C. 1. 14.

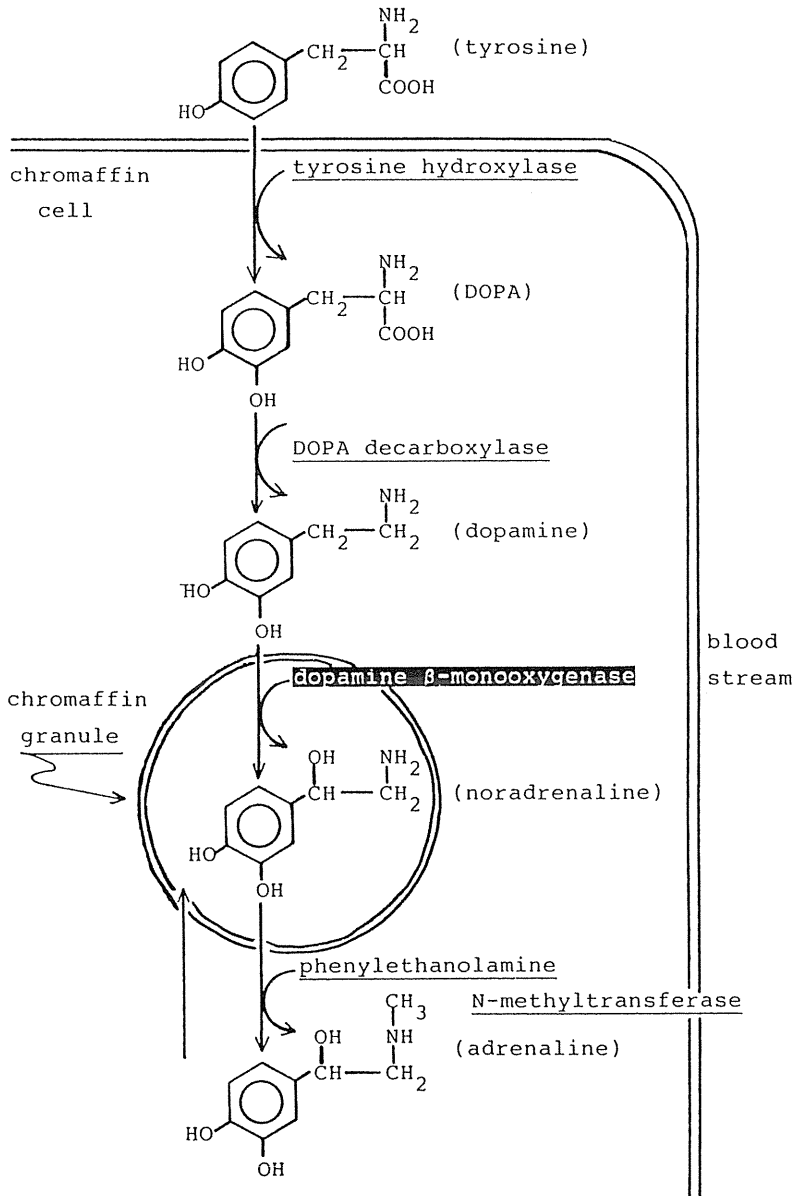


Fig. I-1. Biosynthetic pathway from tyrosine to adrenaline

2. 1) 3, 4-dihydroxyphenylethylamine, ascorbate : oxygen oxidoreductase (hydroxylating)] は, 哺乳動物のノルアドレナリン作動性神経細胞やノルアドレナリン貯蔵顆粒(クロム親和性小胞: クロマフィン顆粒)に局在する銅含有1原子酸素添加酵素<sup>4)</sup>であり, 可溶型と膜結合型の2種類の状態で存在している<sup>5)</sup>. DBM はチロジンからアドレナリンに至る一連の神経伝達物質の生合成にかかわる酵素群の中の1つであり, ドーパミンをノルアドレナリンに変換する. (図 I-1) DBM の触媒反応はドーパミン(一般にフェニルエチルアミン誘導体)のエチルアミン側鎖のβ-炭素を水酸化するものであり, 分子状酸素<sup>6)</sup>と電子供与体としてアスコルビン酸<sup>7)</sup>を必要とする. (図 I-2)

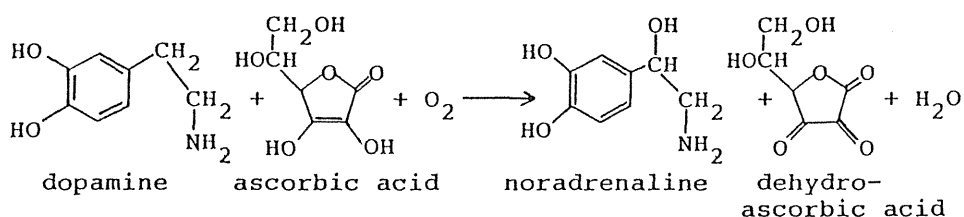


Fig. I-2. Catalytic reaction of DBM

DBM は, 1960年に Levin, Levenberg, Kaufman<sup>6)</sup>によって最初に牛副腎髄質から部分精製され, ついで, 1965年 Friedman と Kaufman<sup>8)</sup>により均一に精製された.

DBM は分子量 75,000 の等しい4個のサブユニットからなり, 分子量 290,000<sup>9)</sup>, そのタンパク部分は糖鎖を含んでいる<sup>10)</sup>. 牛副腎のDBM は4%の糖組成をもっており, 4個のサブユニットのうち, 2個がジスルフィド結合で結ばれ分子量約 150,000 の2量体を構成し, その2量体がさらに非共有結合(水素結合)により2つが集って4量体を構成している<sup>11)</sup>. (図 I-3)

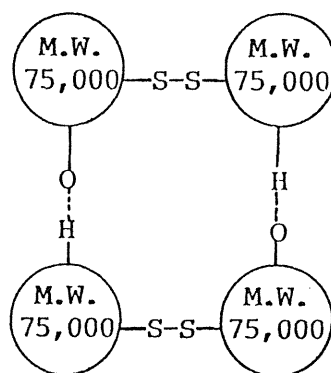


Fig I-3. Structure of DBM

最近、この2量体と4量体との間には可逆的平衡があり、溶液のpHによりこの平衡が変化することが報告されている<sup>12)</sup>。

DBMの銅の含有量は精製操作の条件によって異なり、FriedmanとKaufmanの方法<sup>8)</sup>で精製したDBMは3～7原子/mol(Mr=290,000のテトラマー)の銅を含むこと、他の精製法でも銅含量は必ずしも一定しないことが報告されている<sup>13, 24)</sup>。一方、Skotlandらは<sup>64</sup>Cuを用いた実験<sup>15)</sup>と、銅を添加することによる酸化還元電位の変化<sup>16)</sup>からDBM 1モル当りに必須の銅原子は4個であるとしている。それに対してVillafrancaは、核磁気縦緩和速度( $1/T_1$ )の常磁性変化を測定した結果、8個までその $1/T_1$ が直線的に増加することにより、8個説を主張している<sup>17)</sup>。

次に、これらの銅が活性中心に2原子がペアーで存在しているのか、または1原子のみが存在しているのかについても反応機構をからめた見解の対立がある。FriedmanとKaufmanはDBMの反応の速度論的解析より得た、uni-uni-random-bi-uniピンポン機構<sup>18, 19)</sup>及び触媒反応の定量的解析<sup>8)</sup>にもとづき2原子関与説を提唱し、Blackburnも銅添加による反応速度の増加の解析<sup>20)</sup>から、活性中心、銅2原子説に傾いている。これに対し、Skotland<sup>21)</sup>やDiliberto<sup>22)</sup>らは還元段階でアスコルビン酸のラジカルの生成が確認されること<sup>23)</sup>から、アスコルビン酸還元による直接の生成物はセミデヒドロアスコルビン酸であるとの結論や、DBMのEPRスペクトルが強固に結合した2個の2価銅と一致しないこと<sup>14)</sup>などから、活性中心、銅1原子説をとっている。

活性中心の銅まわりの構造については、EPRの測定によって得られる軸対称のスペクトル<sup>25, 26)</sup>から、銅まわりの配位子の配置が軸対称をもつことが認められるにとどまっていた。最近、DBMのEXAFS(Extended X-ray Absorption Fine Structure)がしらべられ、銅中心に4つのヒスチジン残基が配位しているとの報告がなされている<sup>27)</sup>が、この報告においても第5および第6の配位子としてO原子の可能性を示唆しているにとどまり、未だその構造についての最終的結論は得られていない。

一方、DBMの反応機構については先程のべたFriedmanらのピンポン機構(基質が反応する毎に生成物が生ずる機構)が永らく支配的であったが、最近ではこの機構に疑問が持たれ、むしろシーケンシャル機構(基質がすべて反応した後に生成物が生ずる機構)を考える方が妥当であることが指摘<sup>28, 29)</sup>されている。酵素反応の全過程が果してどちらの機構で進行しているかはしばらくおくとしても、反応の開始過程についても議論が分かれている。この酵素反応がまず、アスコルビン酸によるCu(II)の還元によって始まる<sup>30)</sup>ことはすべての研究者の等しく認める所であるが、その還元過程に関して2電子1段階還元説と1電子2段階還元説が対立している。前者はFriedmanらによって代表されるスキームで、2つの銅が

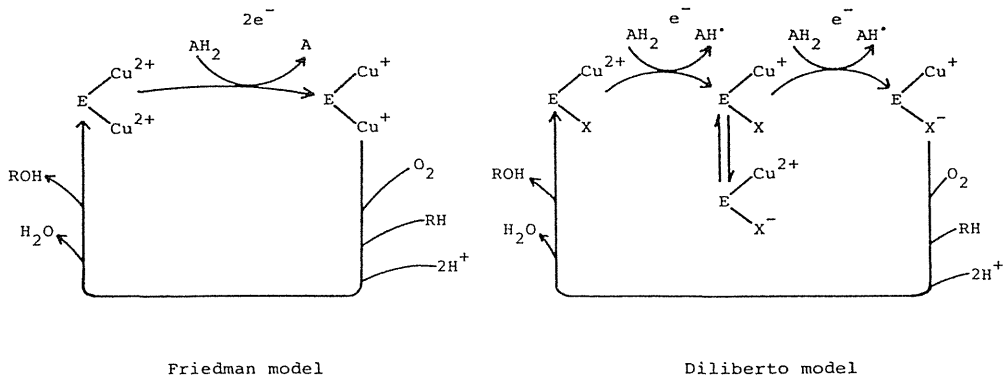


Fig. I-4. Previous studies on reaction mechanisms of DBM

活性中心を形成し、1分子のアスコルビン酸により2電子が一度にDBM中のCu(II)をCu(I)に還元し、デヒドロアスコルビン酸を遊離した後、この還元型DBMに分子状酸素および基質が反応して、 $\beta$ -水酸化をうけた生成物と水が遊離してDBMは再び酸化型へ戻るとい説<sup>9)</sup>であり、後者はDilibertoらによって提唱されているもので、DBMの反応過程でのアスコルビン酸よりの直接の生成物は先にのべた様に、遊離基のセミデヒドロアスコルビン酸であることから<sup>22)</sup>活性中心には銅が1つだけ存在し、2電子が別々に移動することによって酵素反応サイクル中2段階の還元を行うという説である。(図I-4)

以上のべたところからも明らかなように、DBMの活性中心の構造や反応機構についての統一的な結論は今のところ得られていない。本研究はまず、酵素の反応座として重要と考えられる活性中心まわりの配位水に注目し、それらの挙動を知ることによって活性中心の構造を推定するべく、DBMの阻害剤であるシアンイオン(CN<sup>-</sup>)とアジドイオン(N<sub>3</sub><sup>-</sup>)を用い、それらと配位水との相互作用を磁気共鳴(NMRおよびEPR)法により検討した(第三章)、ついで上記磁気共鳴法による検討の有効なプローブとなり得た2種の無機アニオンによるDBMの阻害反応の平衡論的解析を行い、その結果を磁気共鳴の研究から得られたDBM-阻害剤(アニオン)複合体の結合パラメーターと比較検討することにより、DBMの反応機構、特に先にのべたDBM中の銅(II)の還元反応についての相対立する二説を評価すると共に、DBMの活性部位構造と反応機構の関連について考察をめぐらせた(第四章及び第五章)ものである。

## I-2 本研究に至る背景的研究について

本研究は上記の如く銅酵素である DBM の構造と反応についての構造化学的手段、すなわち特に磁気共鳴法を用いた研究であるが、本研究を開始した基本的動機は本論文の副題にも記述した如く、生体系における銅元素の諸種の薬物との間に起こりうる各種の相互作用の究明である。この基本的命題のもとに著者らはすでに無機銅塩と薬物の間、特に塩化第二銅と諸種の中樞神経作用薬との間の錯体形成について検討し、一連の中樞神経作用薬が塩化第二銅との間に錯結晶を生成することを見出して、それらの構造化学的手段、すなわち主として X 線構造解析法による構造究明を行ってきた。その結果、これらの錯結晶には Cu(II) と薬物間の共有結合を含むもの<sup>31)</sup> から Cu(II) Cl<sub>4</sub><sup>2-</sup> と薬物間の静電的結合を含むもの<sup>32, 33)</sup> に至る多様な結合様式を示すものが存在しうることが明らかになり、生体系における銅-薬物相互作用の複雑さをうかがい知らせるものであった。又、反面これらの研究成果は従来ほとんど顧慮されていなかった中樞神経作用薬と生体内銅元素との間の相互作用に関し充分考慮すべき相互作用のありうることを示唆するものでもあった。この観点から脳内にあって中樞神経伝達物質の産生及び代謝に関与している諸種の銅酵素と中樞神経作用薬との間の何らかの相互作用は当然予想されるものであり、著者らはこの線に沿って、ノルアドレナリンの産生に関与している DBM と諸種の中樞神経作用薬との相互作用を動力学的手法によって検討し、一連の中樞神経作用薬が DBM に対し拮抗的阻害作用を示すことを明らかにした<sup>34)</sup>。この事実は中樞神経作用薬の作用機序の観点から興味ある所であるが、果してこれらの作用薬が DBM の銅部位に対し、果してどのような結合又は配位形態を示すのかについては、この相互作用系に対する各種の分光学的検討にも拘らず、殆んど未解明に終わっていた。この原因はすでに I-1 でも述べた如く、DBM 自身の銅部位の構造が未解明である点に由来する所が多く、DBM の銅部位構造の究明が必然的に要請されるに至ったのである。以上本研究の主題である DBM の構造と反応の研究に至る経過を記述したが、その経過において中樞神経作用薬銅錯体の存在の発見とその構造解析の成功が本研究開始のプロモーターであると共に、本研究を進める上で多くの有用な情報を提供してくれたことを強調しておきたい。

## II 酵素精製法並びに各種定量法

### II-1 酵素精製法

ドーパミンβ-モノオキシゲナーゼ(DBM)は、Foldesらの方法<sup>35)</sup>に準じウシ副腎より次の手順で精製した。ただしクロマフィン顆粒からDBMを可溶化する際に、可溶性のDBMだけを遊離させるため、可溶化剤であるTriton X-100を用いなかった<sup>36)</sup>DBMの純度をあげるため最終精製段階で、Agarose A-1.5Mカラムによる処理を行った。

#### 1) クロマフィン顆粒の単離

ウシ副腎を出発原料として用い、最初に副腎の回りについた脂肪をハサミで切り落とし、次にその副腎をメスで2枚に切り開き、内側にある肌色の部分(副腎髄質)をメスまたはハサミで取り出し副腎髄質のみを回収した。さらにこの副腎髄質にその重さの約5倍量の0.32Mショ糖溶液を入れ、polytronホモジナイザーで懸濁し、さらにteflonホモジナイザーで均一に懸濁した。次にこの懸濁液を、1,100gで15分間遠心分離し、その上清を10,000gでさらに30分間遠心分離し、沈殿を0.32Mショ糖溶液で再懸濁した。次にこの懸濁液を3倍量の1.6Mショ糖溶液の上のせ、密度勾配を利用して100,000gで1.5時間遠心分離し、遠沈管の底に沈殿したピンク色の分画を再度0.32Mショ糖溶液で懸濁し、20,000gで20分間遠心分離して沈殿を分取し、クロマフィン顆粒を得た。また、ここで得られたクロマフィン顆粒は-20℃で保存し、必要量だけ解凍し次の操作に用いた。(Scheme II-1)

#### 2) クロマフィン顆粒からDBMの抽出

上記の操作で得たクロマフィン顆粒からDBMを溶出させるために、まず1.5倍量の10mMリン酸カリウム緩衝液、pH7.2に懸濁し、顆粒中に溶存しているDBMのみを溶出させた。次にこの懸濁液を超音波処理し、45分間マグネチックスターラーにて攪拌した後、1,100gで10分間遠心分離を行い上清を回収した。この時沈殿が残った場合は同じ操作をくり返し行い、最初の上清と合わせて100,000gで60分間遠心分離を行い上清を50倍量の10μM硫酸銅を含むリン酸カリウム緩衝液、pH7.2で4回透析を行った。(Scheme II-2)

#### 3) DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

透析の終わった試料を、あらかじめ10mMリン酸カリウム緩衝液、pH7.2で平衡化したDEAE-セルロースカラム(Whatman DE 52)に吸着させ、非吸着タンパクの吸光度(280nm)

がその最大吸光度の約 1/10 以下になったところで、0.5M の NaCl を含んだ 10mM のリン酸カリウム緩衝液で NaCl の直線濃度勾配により DBM を溶出させた。溶出各フラクションごとにタンパク定量 (II-4 参照) と酵素活性の測定 (II-2 参照) を行い、活性の高いフラクションを回収した。尚、DBM 分画は NaCl の濃度が約 1.2~1.8M の間で流出する。次に、この溶出液を集めて 80% 飽和硫酸アンモニウムで塩析し、15,000g で 15 分間遠心分離した後沈殿を、0.1M NaCl を含んだ 10mM リン酸カリウム緩衝液、pH 7.2 に懸濁させた。

#### 4) アガロース A-1.5M カラムクロマトグラフィー

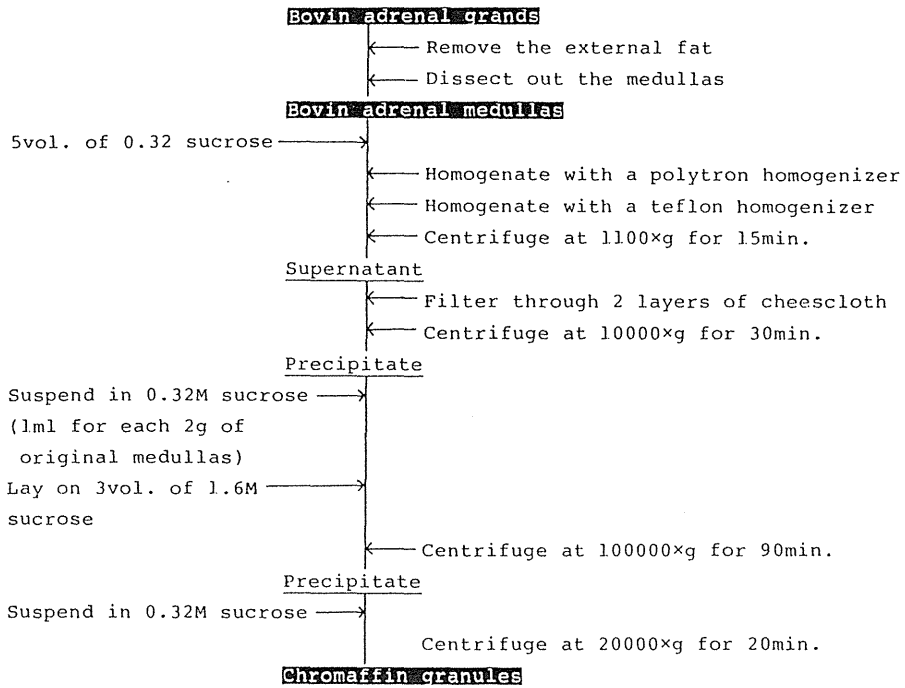
上記の操作で得た懸濁液を、0.1M NaCl を含む 10mM リン酸カリウム緩衝液で平衡化したアガロース A-1.5M カラムにのせ、溶出した各フラクションのタンパク定量と酵素活性の測定を行い、比活性の高い分画を採取した。(Scheme II-4)

採取した elute はポリアクリルアミド電気泳動 (II-3 参照) で単一バンドを示すことが確認され、この方法によって精製した DBM の比活性値は、現在までに報告されている最高の比活性値<sup>20)</sup> とほぼ同等である。

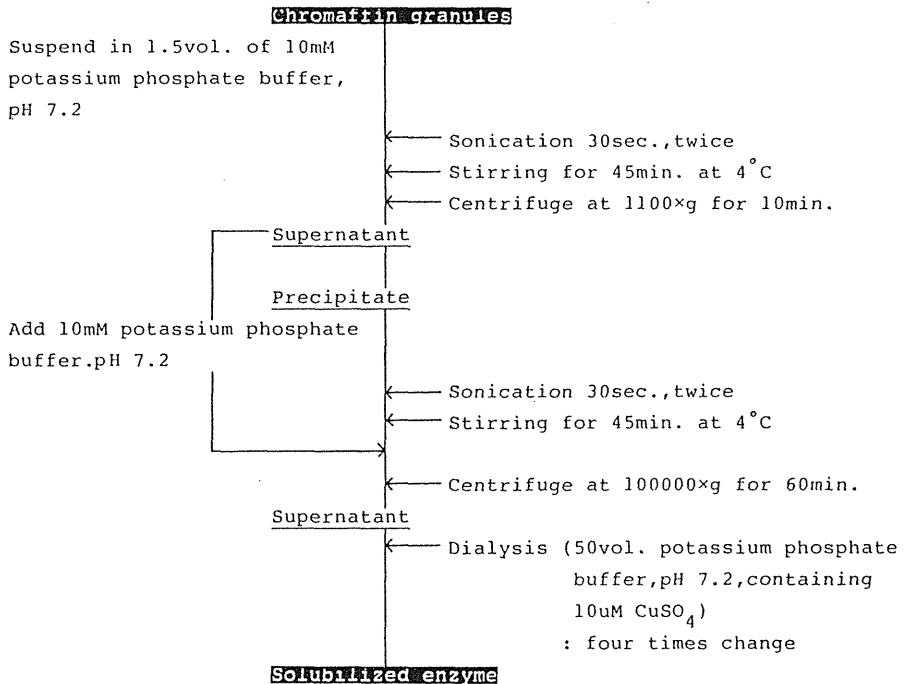
酵素反応速度の実験には精製 DBM (~0.3mg of protein / mol) を、少量ずつエッペンドルフチューブに分配し、-20℃で凍結保存し用時解凍して用いた。この保存状態で少なくとも 3 ヶ月は精製時の活性を失なわなかった。また、磁気共鳴に用いるためにはこの溶出液をコロジオンバッグにて濃縮し (III-2 参照)、同様に -20℃で保存した。

精製の各ステップの流れを Scheme II-1 ~ II-4 に、各ステップに対応したタンパク量とその比活性値の変化を表 II-1 に、DEAE-セルロースカラムの流出パターンを図 II-1 に、アガロース A-1.5M カラムの流出パターンを図 II-2 に示す。

Scheme II-1. Isolation procedure of chromaffin granules

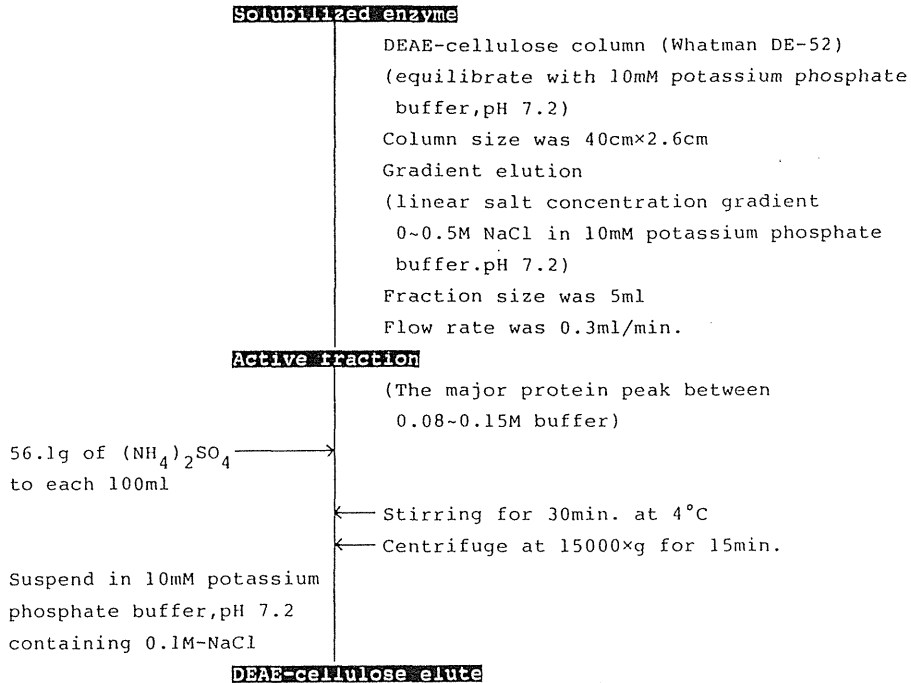


Scheme II-2. Extraction procedure of DBM from chromaffin granules

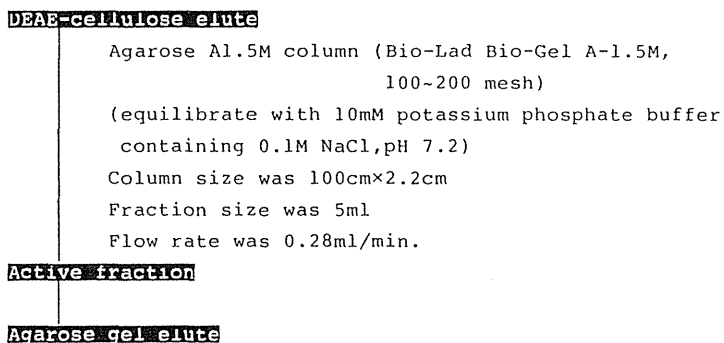




Scheme II-3. DEAE-cellulose column chromatography



Scheme II-4. Agarose A-1.5M column chromatography



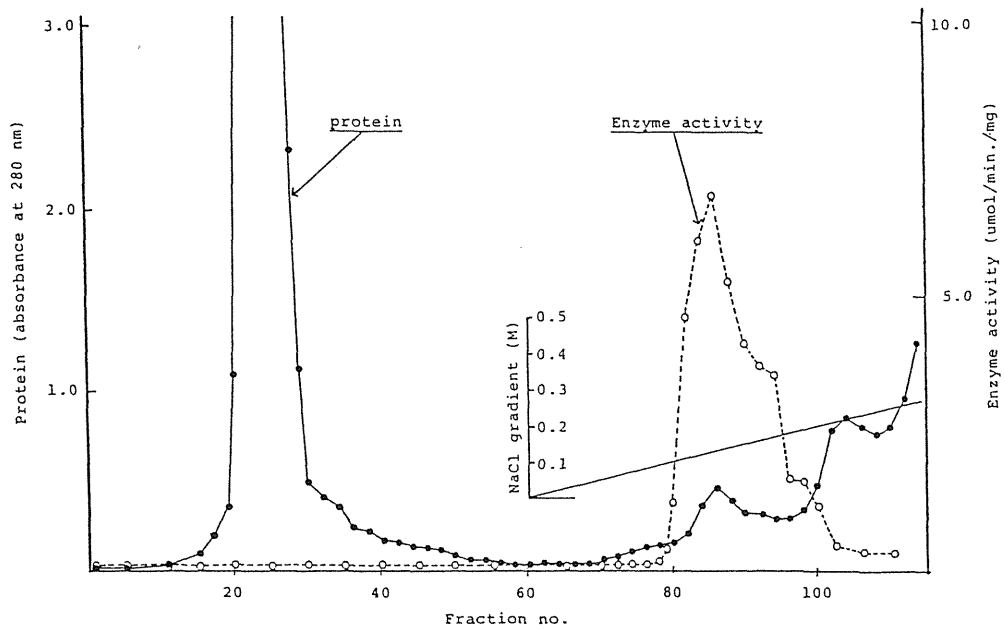


Fig. II-1. DEAE-cellulose elution pattern. Column size was 45cm×2.6cm, flow rate was 0.43ml/min and fraction size was 5.0ml. A linear salt gradient from 0 to 0.5M-NaCl in 10mM potassium phosphate buffer, pH 7.2 was applied at fraction 60. Enzyme activity (○) was assayed as described in the Experimental section. Protein (●) was determined by absorption at 280nm.

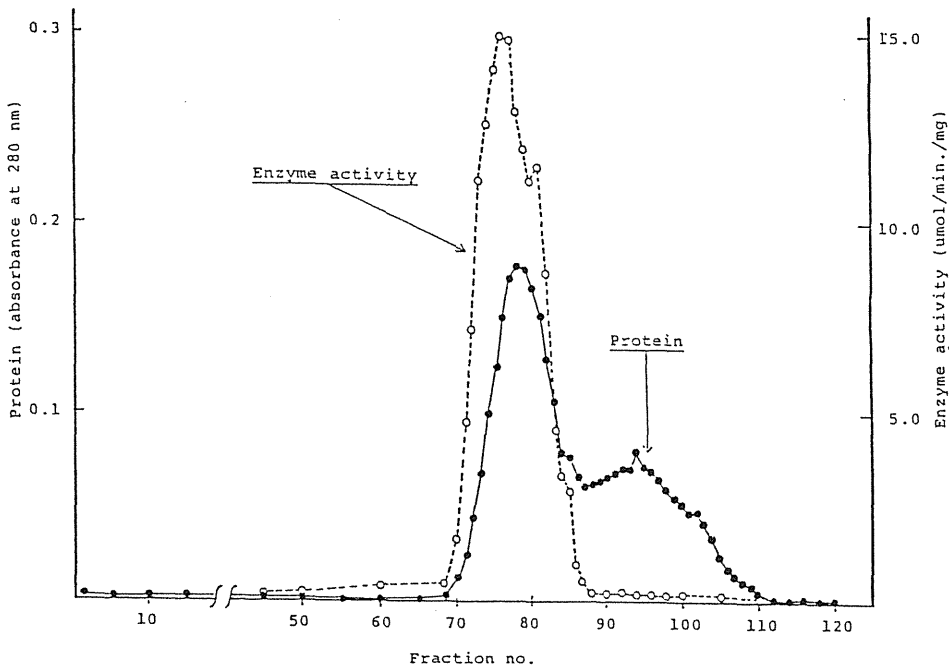


Fig. II-2. Agarose A-1.5M column elution pattern. Column size was 100cm×2.2cm, flow rate was 0.33ml/min and fraction size was 5.0ml. The elution buffer was 10mM potassium phosphate, pH 7.2, containing 0.1M-NaCl. Enzyme activity (o) was assayed as described in the Experimental section. Protein (•) was determined by absorption at 280nm.

Table II-1. Purification<sup>a</sup> of dopamine β-mono-oxygenase

Purification step	Protein volume (ml)	Total protein (mg)	Specific activity (umol/min/mg of protein)
Homogenate	1650.0	38923.7	0.414
1100g supernatant	1160.0	21365.9	0.522
10000g precipitate	135.0	8124.0	0.824
Lysed granules	110.0	3456.2	1.82
100000g supernatant	98.0	2270.7	2.02
Dialysis	105.0	2180.5	2.68
DEAE-cellulose	70.0	16.9	10.1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> precipitate	2.2	14.1	12.6
Agarose A-1.5M	19.0	3.2	21.2
Dialysis	22.2	3.2	30-40

<sup>a</sup>Method used in present paper. A 292.0g (wet wt.) sample of bovine adrenal medulla was processed and obtained 16.8g (wet wt.) of chromaffin granules. Enzyme activity was assayed as described in the Experimental Procedure.



10分間遠心分離した後上清を、Dowex 50W-X4 (H<sup>+</sup> form) (200~400 mesh) カラム (図II-4, 反応溶液分準備する) に吸着させ、2倍量の水で2度カラムの非吸着成分を洗い流した後、3Mのアンモニア水を加え吸着したアミンを溶出させ、2%過ヨウ素酸ナトリウム

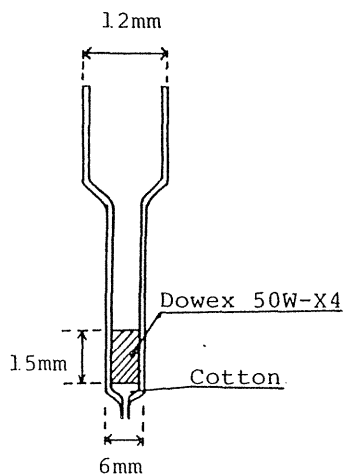


Fig. II-4. Dowex 50W-X4 column

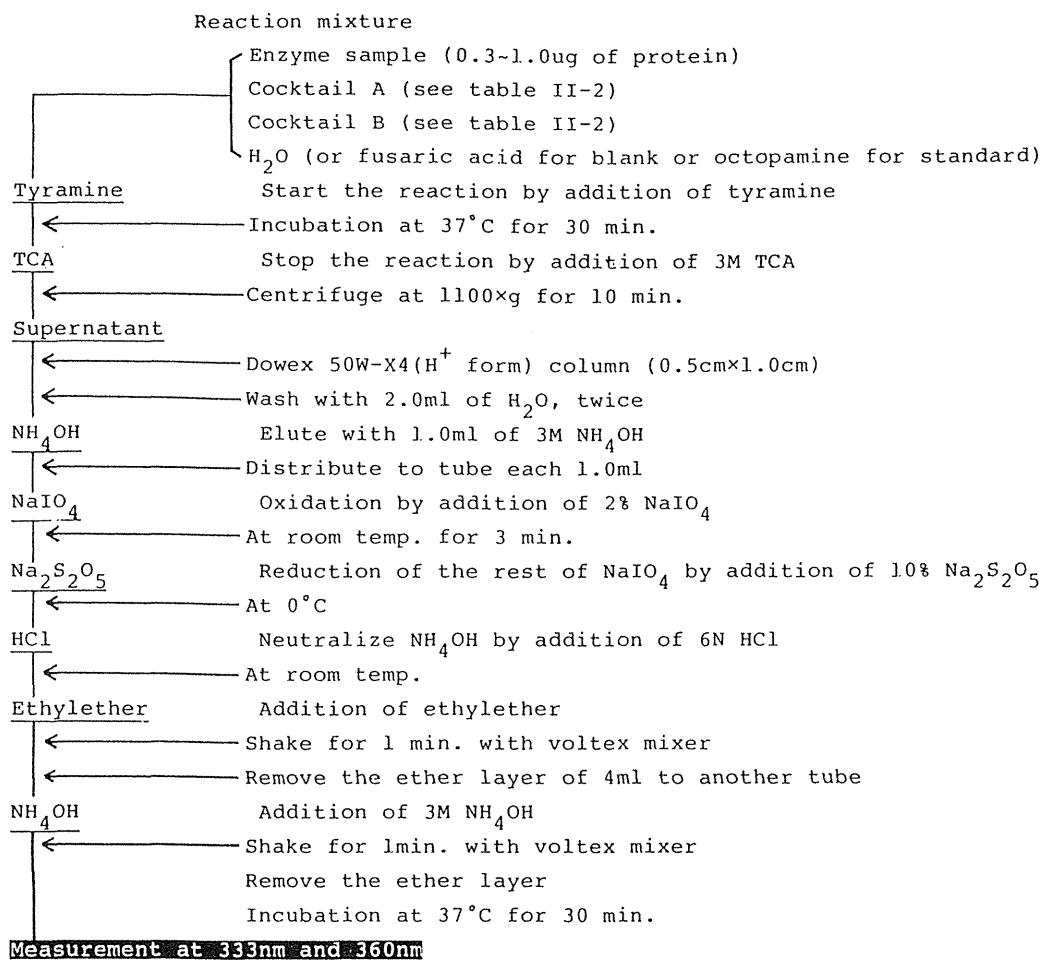
(NaIO<sub>4</sub>)により、生成したオクトパミンを pHBA に酸化し、過量の NaIO<sub>4</sub>を10%亜硫酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) で中和する。次に、反応管を 0°C に冷却し 6N HCl で溶液を中和した後室温に戻し、エーテルを加えて Voltex mixer で1分間振とうし、pHBA を抽出する。そのエーテル層を別々の反応管に移し、再び3Mのアンモニア水を加え再度振とうした後、上層のエーテル層を取り除き、エーテルを完全に追出したアンモニア水溶液を、

Table II-2. Standard reaction mixture of dual-wavelength spectrophotometric assay for DBM activity

Component	Concentration
1) Cocktail A	
Buffer	200 mM
(Sodium acetate, pH 5.0)	
(Potassium phosphate, pH 7.0)	
(MES <sup>*</sup> , pH 5.5, pH 7.0)	
N-ethylmaleimide	30 mM
CuSO <sub>4</sub>	10 μM
2) Cocktail B	
Ascorbic acid	10 mM
Sodium fumarate	10 mM
Pargyline	1 mM
Catalase	500 μg

\* 2(N-Morpholino)ethanesulfonic acid

Scheme II-5. Dual-wavelength spectrophotometric assay



333nm と 360nm の 2 波長で吸光度測定して pHBA を定量し、生成したオクトパミン量に換算する。Blank 及びオクトパミン標準は、あらかじめ TCA で反応を停止させた別の反応管に、それぞれ水及び所定量のオクトパミンを入れ、同様に操作しその吸光度の値を基準として、個々の反応溶液中の生成オクトパミン量を決定する。

酵素比活性値はこのオクトパミン量にもとづき次式に従って算出した。

$$\text{生成したオクトパミン量} (\mu\text{mol}) = \frac{(\text{試料吸光度}^* - \text{対照吸光度}^*) \times \text{オクトパミン標準液濃度}}{(\text{オクトパミン標準液溶液吸光度}^* - \text{対照吸光度}^*) \times 1000}$$

$$\text{比 活 性} (\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min.}) = \frac{\text{生成したオクトパミン量} (\mu\text{mol})}{\text{反応に使用した酵素量} (\text{mg}) \times \text{反応時間} (\text{min})}$$

\* 吸光度の値はすべて 333nm の吸光度の値から 360nm での吸光度の値を差し引いたものである。

## 2) 開放系での酵素反応および反応速度の測定

酵素反応の阻害実験などを行う場合は、添加する基質が気体でない場合は通常開放系で行った。1) 項の活性測定と同じ反応管を用い、基質濃度、阻害剤濃度を実験条件に応じて変化させた以外、反応液組成は 1) 項で述べた所と全く同様である。又、緩衝液として 2(N-モルホリン)エタンスルホン酸(MES)を用いた。反応も特に断らない限り、1) 項の条件(30分, 37°C)で行い、反応速度の決定も 1) 項の活性測定法によって反応停止後の反応混合液の残存活性を求めることによって行った。

## 3) 密閉系での酵素反応及び反応速度の測定

基質である酸素濃度の変化を必要とする条件下の酵素反応には、図 II-5 に示すような酸素を含む混合気体導入装置を用いた。

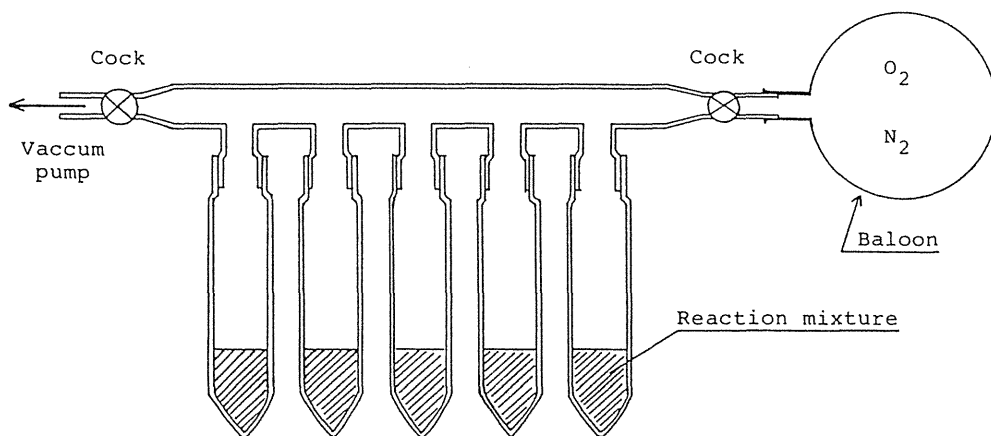


Fig. II-5. Schematic figure of reaction tube of close cover system

すなわち、まずあらかじめ 1) 項の方法で調製した反応混合液と所定量の酵素溶液を反応管にとり、氷浴で冷しながら真空ポンプにより溶液中の溶存気体を除去し、ついで混合気体が入っている風船側のコックを開いて所定量の混合気体を反応管内に送り込み、密閉状態を保ったまま、37°Cで反応を進行させた。尚、DBM は凍結解凍の作業で極端に活性が低下するため、凍結しての脱気は行なわなかった。反応終了後、コックを開け直ちに TCA で反応を止め、其の後の定量操作は開放系における場合と同様に行った。

### II-3 電気泳動

精製した DBM の純度を確認するために、ポリアクリルアミド-ディスク電気泳動を、サブユニット構造及びその分子量を確認するために、SDS (Sodium dodecyl sulfate)-ポリアクリルアミド-スラブ電気泳動を行った。

#### 1) ポリアクリルアミド-ディスク電気泳動

ポリアクリルアミド-ディスク電気泳動は Ornstein-Davis<sup>46)</sup> らの方法に従った。表II-4 に泳動に用いたゲルの組成を示す。

操作はまず内径 5mm 長さ 12cm のガラス管を用意し、その底を薄いセロファンで被った後、細孔ゲル (Small-pore gel) として 5% アクリルアミド溶液、pH 8.9 を約 10cm の高さになるように入れ、室温で静置しゲル化させた。(20°C, 約50分)ゲル化後、粗孔ゲル (Spacer gel) として 2.5% アクリルアミド溶液、pH 6.7 を約 1.5cm 重ね、光重合させた。(約15分)さらに、2.5% アクリルアミド溶液に試料を入れ、(約100 $\mu$ g/tube) 調製した試料ゲル (Sample gel) を粗孔ゲル上に重ね同様に光重合させた。ゲル化が完了した後、ガラス管の底のセロファンをはずし、試料ゲルを上にして緩衝液槽に取り付け、上部下部両液槽にトリス-グリシン緩衝液、pH 6.7 をみだし、上部液槽に 0.001% ブロムフェノールブルー (BPB) 水溶液を 1 mol 入れ泳動を開始した。BPB の青色バンドが粗孔ゲルを通過するまで 2mA/tube (150~200V) で電流を流し、そのバンドが細孔ゲルに入った時から 5mA/tube (200~500V) に電流を変えて BPB の青色バンドがガラス管の底から約 1cm に達したところで電流を止めて泳動を終了し、ガラス管からゲルをはずしてクマシーブリリアントブルー (CBB) で一夜染色した後 7% 酢酸で脱色し、脱色終了後ゲルを 7% 酢酸中に貯えた。

用いた試料は泳動の結果、図 II-6 に示すように単一バンドを示したので、精製酵素は電気泳動的に単一組成であることを確認した。



Table II-4. Compositions of polyacrylamide gel

Component	Mixing ratio
1) Small-pore gel (5% acrylamide solution, pH 8.9)	
3.0M Tris-HCl, pH 8.9	1.000
Acrylamide-Bis (30:0.8)	1.000
TEMED	0.002
H <sub>2</sub> O	3.950
10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> fresh	0.050
-----	
2) Spacer gel (2.5% acrylamide solution, pH 6.7)	
0.5M Tris-HCl, pH 6.7	1.000
Acrylamide-Bis (10:2.5)	2.000
TEMED	0.005
0.04% Ribohurabin	1.000
H <sub>2</sub> O	4.000

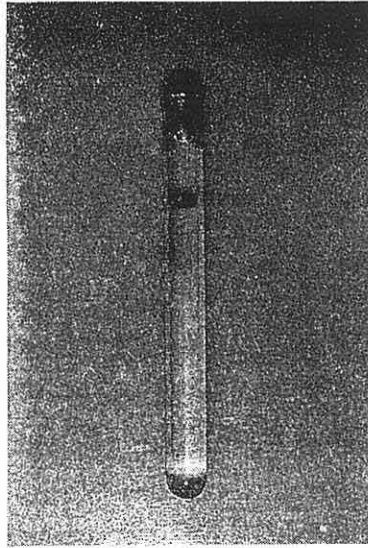


Fig. II-6. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase. Sample contained 50 ug of protein and the bands were stained with Coomassie blue. Migration was from top to bottom.

## 2) SDS-ポリアクリルアミドスラブ電気泳動

SDS (Sodium dodecyl sulfate)は溶液中でタンパク質と1.4:1の割合で結合する。負の電荷をもつSDSがタンパク質より過剰に結合するため、タンパク質が本来持っている荷電

より多くの負の電荷を持った複合体に変化する。しかもタンパク質はその種類によらず SDS と結合し、形状、荷電密度などが一定なタンパク質-SDS 複合体となるので、SDS を含むゲル中でのタンパク質の易動度はタンパク質の大きさのみに依存することになる。それゆえに、SDS 含有ゲルにおけるタンパク質-SDS 複合体の移動距離を測定し、標準ペプチド鎖の移動距離と比較することによって相対易動度を求め分子量を測定することができる。

そこで今回精製した DBM のサブユニット構造を確認するために Laemmli の方法<sup>47)</sup>に準じて、あらかじめ $\beta$ -メルカプトエタノールによってサブユニットに解離した DBM を、0.1% SDS 濃度で、泳動ゲルとして 4%~15% アクリルアミドを用い、濃度勾配を適用してスラブ電気泳動を行った。

操作は、スラブ用の泳動キットを用いてまず細孔ゲルを直線グラジェント法によりガラス板内につめて、室温でゲル化させた後、粗孔ゲルをその上に重ね静置しゲル化させた。次に、3% SDS-アクリルアミド溶液に試料および標準試料(分子量マーカー)を溶かし、 $\beta$ -メルカプトエタノールを 12.5% になるように加え、60°C で 10 分間加熱しサブユニット-SDS 複合体を形成させた後、粗孔ゲル上に重ねて静置しゲル化させた。次に泳動緩衝液(0.1% SDS 含有トリス-グリシン緩衝液)を上下の液槽に入れ、上槽に 0.001% ブロムフェノールブルーを数 ml 加え、7mA, 50V で 1 時間、次に 12mA, 100V で 1 時間、最後に 11.5mA, 150V で 1 時間泳動させた後、泳動ゲルをゲル板よりはずし、Silver staining キット(Bio-Rad 社)を用いて染色し、15% 酢酸で脱色した後、脱色に用いた同じ濃度の酢酸中に貯えた。

表 II-5 に各ゲルの成分表を、図 II-7 にその泳動結果を示す。また図 II-8 に染色した各分子量マーカータンパクと DBM の泳動距離を、BPB の泳動距離で割り、それぞれの BPB に対する相対易動度を横軸に、縦軸に  $\log$ (分子量)をとって片対数グラフにプロットしたものを示す。分子量マーカーとしては、lysozyme (14,400), soybean trypsin inhibitor (21,500), carbonic anhydrase (31,000), ovalbumin (45,000), bovine serum albumin (66,200), phosphorylase B (92,000) を用いた。

その結果、分子量マーカーからの検量線より、DBM のサブユニットの分子量を求めると、約 75,000 となり本精製法によって精製された DBM 活性をもつタンパクは DBM そのものであることを確認した。

Table II-5. Compositions of SDS-polyacrylamide gel

Component	Mixing ratio	
	(4% acrylamide sol.)	(15% acrylamide sol.)
1) Small-pore gel		
1.5M Tris-HCl, pH 8.9	1.875	1.875
10% SDS	0.075	0.075
Acrylamide-Bis (30:0.8)	1.000	1.000
TEMED	0.005	0.005
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> (OH)	-----	0.300
10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> fresh	0.050	0.050
H <sub>2</sub> O	4.495	1.445
-----		
3) Spacer gel	(3% acrylamide sol.)	
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	0.625	
10% SDS	0.025	
Acrylamide-Bis (10:2.5)	0.250	
TEMED	0.002	
10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	0.025	
H <sub>2</sub> O	1.575	

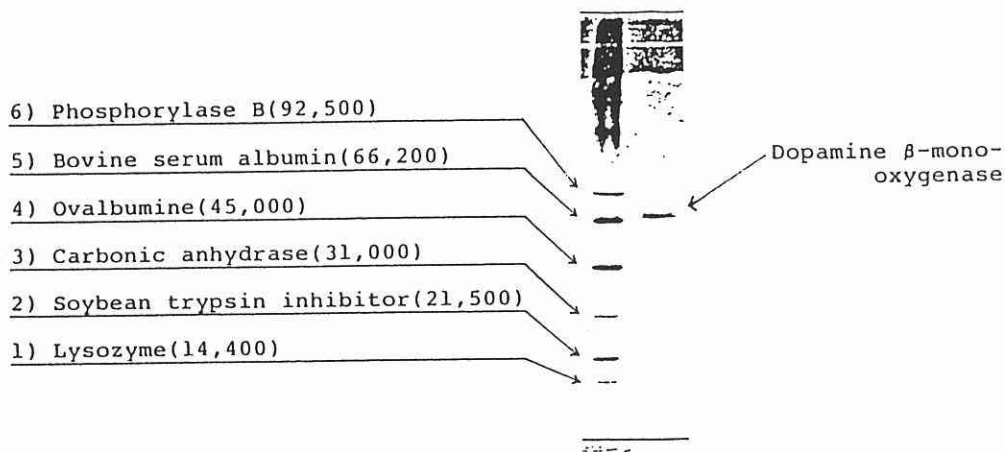


Fig. II-7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase. Sample contained 0.5  $\mu$ g of protein and the bands were stained with Bio-Rad silver stain. Migration was from top to bottom.

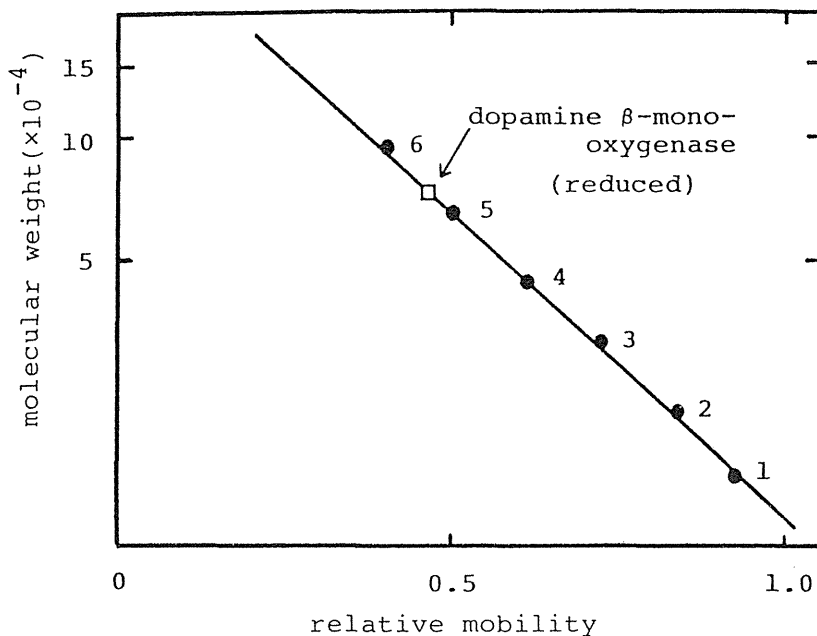


Fig. II-8. Calibration diagram of molecular weight versus relative mobility

#### II-4 タンパク定量法

##### 1) 吸光度法<sup>48)</sup>

DBM の 280nm での比吸光度値  $E_{280}^{1\%}$  = 1.24 を用い、試料溶液の吸光度を比較してタンパク量を決定した。

##### 2) 比色定量法 (バイオラッドプロテインアッセイ法<sup>49)</sup>)

バイオラッドプロテインアッセイ法は染料であるクマシーブリリアントブルー (CBB)-G 250 がタンパクと結合することによって、それ自身の最大吸収波長 ( $\lambda_{max}$ ) が 485nm から 595nm に移動することを利用したものである。(図 II-9)

バイオラッドプロテインアッセイ法は他のタンパク定量法 (Lowry 法<sup>50)</sup>, Kieldahl 法) と比べて、感度は 1 $\mu$ g と同じであるが、共存塩の影響が少ないこと、呈色反応が一段階ですみ

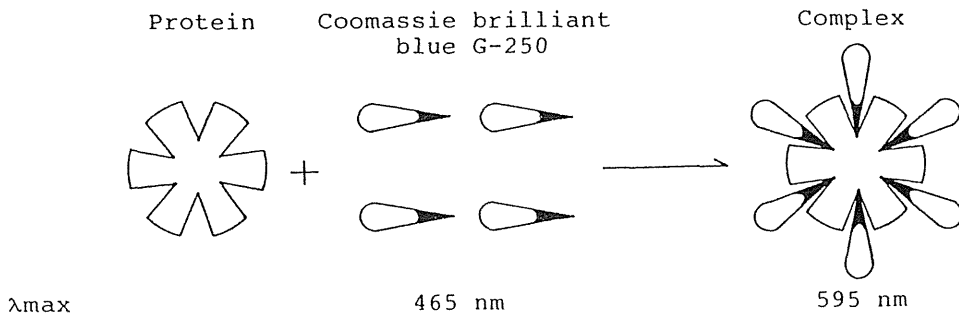


Fig. II-9. Principle of Bio-Rad protein assay

Table II-6. Comparison of the Bio-Rad protein assay with four commonly used methods

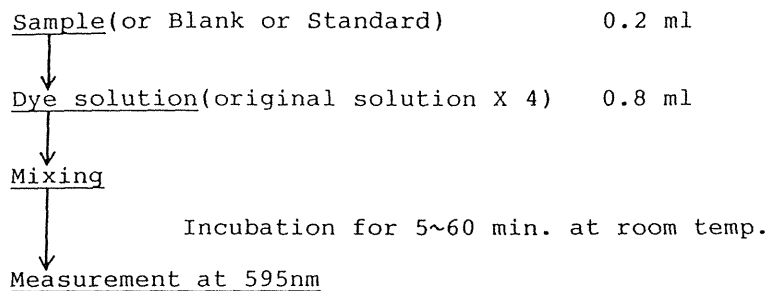
Method and Sensitivity	Chemical Interference	Protein/Protein Variation	Technique: Speed Complexity
Bio-Rad (Bradford) 1ug	Silight	Significant	Rapid Simple (one reagent)
Lowry 1ug	Great	Significant	Moderate Moderate
Biuret 100ug	Moderate	Low	Moderate Simple
Kjeldahl 1ug	Moderate	Low	Slow Complex
Absorbance <sup>a</sup> 10ug	Moderate	Significant	Rapid Simple

a. At 280nm.

定量操作が簡易迅速であることからこの方法を採用した。他のタンパク定量法との比較を表 II-6 に示す。

タンパク定量は Scheme II-6 に示す手順で行った。CBB-G-250 による呈色は 5~60 分の間で一定であるため、この時間内で比色定量すればよい。被検試料のタンパク量は、ウシ血清アルブミンを標準試料として作製された検量線を用いて決定した。

Scheme II-6. Bio-Rad protein assay procedure



II-5 銅の定量

銅の含量は原子吸光法とバソクプロインスルホン酸による比色定量法<sup>51)</sup>により求めた。

1) 原子吸光法

原子吸光法による銅の定量は、Japan Jarell-Ash atomic absorption spectrometerを用いて、吸収波長  $\lambda_{\max} = 324.7\text{nm}$  の光を用いてフレイムレス法で行った。

酵素溶液をそのまま試料溶液とし、標準液として塩化第2銅水溶液 (1,000ppm  $\text{Cu}^{2+}$ ) を

Table II-10. Measurement conditions	
Copper lamp.	324.7 nm
Flow gas (argon) rate	3kg/cm <sup>2</sup>
Dry temp.	200°C
time	20 sec.
Ash temp.	1000°C
time	15 sec.
Atomize temp.	3000°C
time	10 sec.

用いて、標準液の濃度が0.1~2.0ppmになるように希釈し、このものの銅濃度を定量して検量線を作り、試料溶液中の銅濃度はこの検量線を用いて決定した。表II-7に測定条件を示す。

## 2) 比色定量法(バソクプロインスルホン酸による1価銅の定量)

バソクプロインスルホン酸(図II-10)は1価の銅と定量的に反応し、キレート化合物を作って橙黄色に発色する。 $(\lambda_{\max}=483\sim485\text{nm}, \epsilon=1.2\times 10^4 \mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$

定量法はScotlandらの方法<sup>47)</sup>に準じて行い、アスコルビン酸によってDBM中のすべての銅を還元した後、バソクプロインスルホン酸を加え、483nmで比色定量した。表II-7に反応溶液の組成を示し、定量操作の手順をSchemeII-7に示した。

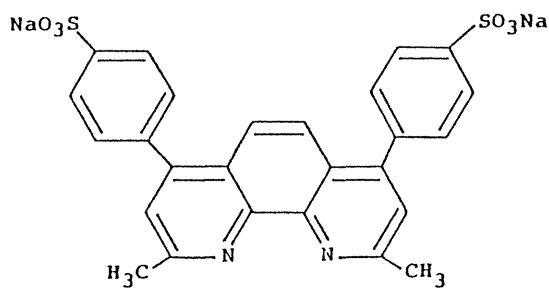
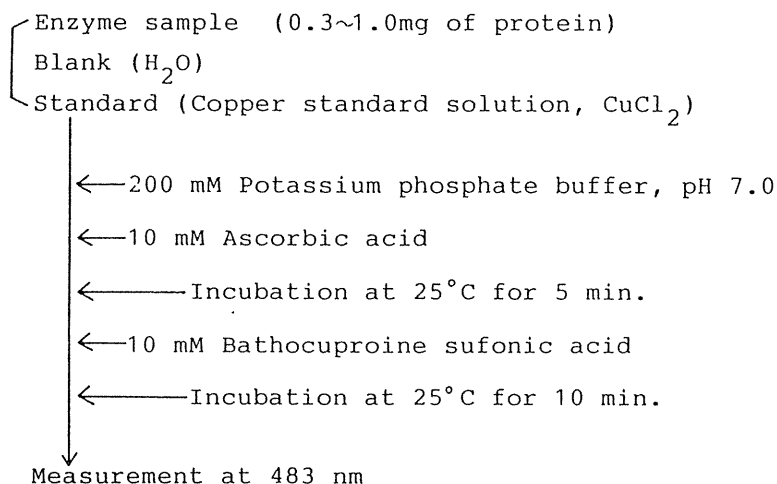


Fig. II-10. Bathocuproine disulfonic acid, 2 Na salt

Table II-7. Incubation mixture

Component	Concentration
Potassium phosphate buffer, pH 7.0	140 mM
Ascorbic acid	1.0 mM
Bathocuproine sulfonic acid	1.0 mM

Scheme II-7. Assay procedure



## II-6 シアンイオンの定量

シアンイオンの定量はピリジン・ピラゾロン法<sup>52)</sup>を用いて行った。この方法はシアンイオンがクロラミンTの作用で塩化シアンとなり、つぎに塩化シアンとピリジンが反応することによって生成するグルタコンアルデヒドに1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンを縮合させ、生成する青色化合物を620nmで比色定量する方法である。この方法を用いて、調製したNaCN溶液(希釈原液)中のシアンイオンの量を定量した。

又、それぞれのpHでの反応溶液中の真のシアンイオンの量を求めるために必要となってくる、HCNのpKa値を求めるために、酵素溶液の濃度(10mg/ml)にウシ血清アルブミンを調製し、これに<sup>13</sup>CでエンリッチしたNa<sup>13</sup>CNを添加して(1.4mg/ml)<sup>13</sup>Cのケミカルシ



フトを、pH4～13の間で測定した。その結果、<sup>13</sup>CのpH滴定曲線よりHCNのpKa値9.12を得た。

## II-7 試薬及び材料

ウシ副腎は大宮食肉センター内、工藤畜産より新鮮なものを譲り受け直ちに用いた。

酵素精製用試薬：Triton X-100、硫酸アンモニウム（酵素精製用）、ショ糖は和光純薬株式会社から、DEAE-セルロース（DE-52）はWhatman社から、アガロースA-1.5MはBio-Rad Laboratories社から購入した。

酵素活性測定用試薬：N-エチルマレイミド（NEM）、パージリン、塩酸チラミン、塩酸オクトパミン、アスコルビン酸、フマル酸ナトリウムはSigma社から、カタラーゼ（250mg/12.5ml、サスペンション）はBeringer社から、Dowex 50W-X4イオン交換樹脂はBio-Rad Laboratories社からそれぞれ購入した。

電気泳動用試薬：トリスヒドロキシメチルアミノメタン、グリシン、ブROMフェノールブルー、テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）、N,N'-メチレン-ビス（アクリルアミド）（BIS）、過硫酸アンモニウム、β-メルカプトエタノール（電気泳動用）、クマシーブリリアントブルー（CBB）は和光純薬株式会社から、リボフラビン（東京化成から）、電気泳動用マーカータンパク質キット、シルバーステイニングキットはBio-Rad Laboratories社からそれぞれ購入した。

タンパク定量用試薬：Bio-Rad プロテインアッセイ用試薬（クマシーブリリアントブルーG250）はBio-Rad Laboratories社から購入した。

銅定量用試薬：バクプロインスルホン酸ナトリウム、塩化銅標準試薬（1,000ppm Cu<sup>2+</sup>）は和光純薬株式会社から購入した。

シアンイオン定量用試薬：クロラミンT、1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンは和光純薬株式会社から購入した。

緩衝液：酢酸、酢酸ナトリウム、リン酸1水素カリウム、リン酸2水素カリウム、2(N-モルホリン)エタンスルホン酸（MES）は和光純薬株式会社から購入した。

シアン化ナトリウム、アジ化ナトリウムは東京化成から、キレックス100はBio-Rad Laboratories社から、コロジオンバッグはSartorius社から、<sup>63</sup>CuOは第1化学薬品株式会社から、Na<sup>13</sup>CNはMerck社から購入した。

実験に用いた試薬はすべて特級以上のものを用い、使用した水はイオン交換し蒸留したものをを用いてその電気抵抗が10<sup>8</sup>Ω/cm以上のものを用いた。又、磁気共鳴の実験に用いるた

めに調製した試薬及び緩衝液は、キレックス100カラムを通してその中に含まれる重金属を取り除いて調製した。

### Ⅲ DBM と無機アニオンとの結合平衡 の磁気共鳴による解析<sup>87)</sup>

#### Ⅲ-1 緒言

序論において述べた如く、DBM の全過程にわたる反応機構についての統一的な見解は未だ得られていない。その原因の最大の理由は、DBM のタンパク部分の一次構造が未解明であることに加えて、その活性中心の構造に関する情報が不足していることにあると思われる。

そこで本章では活性中心の直接的な構造の知見を得るべく、酵素の反応座として重要と考えられる活性中心まわりの水分子の配置と数に注目し、それらを決定することを第一の目的とした。すなわち DBM 中の銅部位が属すると考えられるタイプⅡ銅に特異的に作用し、銅(Ⅱ)まわりの配位水置換をひきおこす<sup>53-56)</sup>シアニオン(CN<sup>-</sup>)およびアジドイオン(N<sub>3</sub><sup>-</sup>)をプローブとして DBM に添加し、活性中心である銅(Ⅱ)まわりの配位水交換による水プロトンの常磁性核磁気緩和速度変化と電子常磁性共鳴(EPR)スペクトル変化を追跡することによって配位水の挙動を詳細に検討した。その結果、以下本文に述べる様に第一の目的とした活性中心である銅(Ⅱ)まわりの配位水の配置数のみならず、活性中心に対する無機アニオンの結合平衡パラメーターの決定も可能となり、活性中心の構造を推定する上での興味ある情報が集積されるに至った。

#### Ⅲ-2 実験

##### 1) 試料の調製

磁気共鳴の測定に DBM を用いるためには、酵素濃度として  $10^{-4} \sim 10^{-5} \text{ M}$  (銅(Ⅱ)濃度  $10^{-3} \sim 10^{-4} \text{ M}$ ) の濃度を必要とするために、Scheme 1 の方法に従い磁気共鳴用試料を調製した。また銅は自然界に 2 種の同位体 (<sup>63</sup>Cu と <sup>65</sup>Cu) とがその比 2 対 1 の割合で存在し、それぞれ異った磁気回転比を持ち、超微細結合定数 (hyperfine coupling constant, A) が異なるため、電子常磁性共鳴 (EPR) スペクトルはその重りとして観測される。そこで本実験では超微細構造の S/N (シグナルとノイズの比) の向上のため、また無機アニオンを添加した後の ERR スペクトルの解釈を容易にするため、DBM 中の銅をすべて <sup>63</sup>Cu に置換した。

精製の最終段階での溶出液が希薄 (約 0.1 mg of protein/ml) であるため、まず精製酵素をコロジオンバッグ (図Ⅲ-1) にて酵素濃度が約 1 mg of protein/ml となるように濃縮した後、過量の <sup>63</sup>CuCl<sub>2</sub> (あらかじめ <sup>63</sup>CuO を 1 N HCl に溶かして調製した。) 溶液を加え、20 mM リン酸カリウム緩衝液、pH 7.0 中 25°C で 5 分間インキュベーションし、DBM の銅をすべて

Scheme III-1. Sample preparation of DBM

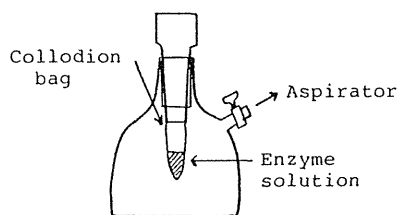
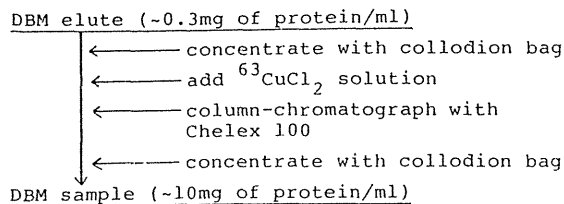


Fig. III-1. Collodion bag

$^{63}\text{Cu}$  で置換した<sup>57)</sup>  $^{63}\text{Cu}$  で置換された DBM は遊離の銅イオンを取り除くために、キレックス 100 カラムに通し<sup>58)</sup>、溶出液を再度コロジオンバッグにて酵素濃度が約 10mg of protein /ml になるように濃縮し、磁気共鳴用試料とした。尚、この方法によって調製した DBM の酵素活性は、精製時の酵素活性とほとんどかわりなく、バンクプロイン定量法による 1 価銅の定量から求めた 2 価銅の割合が 90% 以上の試料を調製することができた。

2) 磁気共鳴の測定

核磁気緩和時間の測定は 100MHz 帯、270MHz 帯に対しそれぞれ日本電子製 PS-PFT100, JNM-GX 270 を用い、縦緩和時間 ( $T_1$ ) は Inversion-Recovery 法<sup>59)</sup>、横緩和時間 ( $T_2$ ) は Carr-Purcell-Meiboom-Gill 法<sup>60)</sup> で測定した。

電子常磁性共鳴 (EPR) スペクトルは日本電子製 JES-FX-3XG 分光器を用いて、X-バンド (約 9GHz) でフィールドモジュレーション 100KHz、測定温度 -150°C で測定した。また測定は通常モジュレーション 0.5mT、マイクロ波パワー 10mW で行いこの条件の下ではスペクトルのラインブロードニングは観測されなかった。

測定試料は、図 III-2 に示すように、3φ の石英製のチューブに酵素溶液 (10mg of protein/ml) を 100μl 入れて、それに NaCN または  $\text{NaN}_3$  溶液をドルーマントのマイクロピペットを用いて、1μl ずつ添加することによって調製し、NMR 緩和時間はこの 3φ チューブを 5φ チューブに入れ、その間をロ

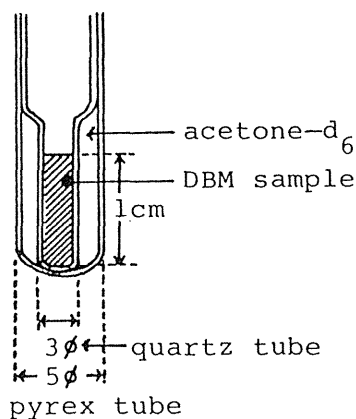


Fig. III-2. Sample tube

ック溶媒としてアセトン- $d_6$  をみたくことによって測定した。また、EPRの測定にはこの3φチューブのみを取り出して行った。

(a)  $T_1$  (スピン格子緩和時間, 縦緩和時間) の測定

$T_1$  は Inversion-Recovery 法 (IR 法,  $180^\circ - \tau - 90^\circ$  パルス系列) を用いて測定した。IR 法とは磁化の x 軸方向からの  $180^\circ$  パルスによって反転した磁化がもとの方向へ戻るまでの時間を測定するもので、 $180^\circ$  パルスから  $\tau$  時間後に x 軸からの  $90^\circ$  パルスによって y 軸上に転回させた磁化の大きさを、時間  $\tau$  をそれぞれ変化させてサンプリングし  $T_1$  を求める方法である。

(b)  $T_2$  (スピンスピン緩和時間, 横緩和時間) の測定

$T_2$  は Carr-Purcell-Meiboom-Gill 法 (CPMG 法,  $90^\circ(x) - \tau - 180^\circ(y)$ ) のパルス系列を用いて測定した。CPMG 法とは磁化を x 軸方向からの  $90^\circ$  パルスによって y 軸上に倒し、2 番目の  $180^\circ$  パルスを y 軸上から与えることによって、y 軸上に収束した核スピンのエコーを観測するものであり、 $180^\circ$  パルス後の時間を変えて発生するエコーをそれぞれサンプリングして、スペクトルの強度と拡散時間をプロットし、その傾きから  $T_2$  の値を求めるものである。

### III-3 核磁気緩和と緩和速度の平衡論的解析

#### 1) 核磁気緩和について

分子振動などによる磁気双極子の振動の周波数は NMR の測定周波数 ( $1.5 \sim 10.0 \times 10^7 \text{ Hz}$ ) に比べて極めて速い ( $10^{12} \sim 10^{14} \text{ Hz}$ ) のでスピンのエネルギーの緩和には大きく寄与することはないが、分子全体の回転によって生じる核磁気双極子-双極子相互作用による局所磁場のゆらぎや分子間相互作用はその緩和に大きく寄与してくる。分子が見かけ上 1 ラジアン回転する時間を回転相関時間 ( $\tau_r$ , correlation time) と呼ぶが、NMR 測定周波数が  $\tau_r$  の逆数に近いとき分子は最も速くスピンエネルギーをこの回転のために消費してしまうからである。通常小さい分子では  $\tau_r = 10^{-13} \sim 10^{-11} \text{ sec.}$  であるが、酵素のような大きな分子では  $\tau_r = 10^{-9} \text{ sec.}$  ほどであり、その回転速度は NMR 周波数に近づきこのことから生体高分子の  $T_1$  は極めて短くなる<sup>57)</sup>

このような系に常磁性金属イオンが入ってくるとこのイオンがもつ不対電子の磁気双極子能率は核のもつそれに比べると  $10^3$  倍ぐらい大きいので、核スピンエネルギーはほとんど常磁性イオンの電子の作る局所磁場のゆらぎを通して緩和される。

固体中あるいは液体中にある核スピンの運動できない場合や、不対電子の影響をうけない程遠くにある場合には、常磁性中心は核スピンのほとんど効果を及ぼさないが、近くにあるごくわずかな核は強い緩和効果をうけ、その NMR 線は完全にブロードアウトしてしまう。しかしながらその常磁性イオンに対し速やかに交換している核については、不対電子とひんばんにぶつかりあうことにより、その局所的な環境についての荷重平均として NMR が観測され、緩和速度を測定することができる。

一般に縦緩和速度  $1/T_1$  および横緩和速度  $1/T_2$  は常磁性種の濃度  $N$  に正比例する。ここで常磁性イオンの配位圏にあるプロトンは不対電子によって強い緩和効果を受けるが、溶液中の他のすべてのプロトンは純水中のプロトンと同じ通常の緩和現象を示す。したがって  $T_{1M}$ 、 $T_{2M}$  を配位したプロトンの緩和時間とし、 $T_{1w}$ 、 $T_{2w}$  を水のプロトンの緩和時間とすると、観測される緩和速度  $1/T_1$ 、 $1/T_2$  は次のようになる。

$$\left. \begin{aligned} 1/T_1 &= (1-f)/T_{1w} + f/T_{1M} \\ 1/T_2 &= (1-f)/T_{2w} + f/T_{2M} \end{aligned} \right\} \text{----- (1)}$$

$f$ : 各々のプロトンが配位圏内で費やす時間の割合

ここで  $n$  を配位している水プロトンの数、 $N_H$  を水プロトンのモル濃度とすると、 $f = (nN/N_H)$  となる。線幅の広がりには大部分常磁性イオンによるものと考えられるから、(1) 式の第 1 項は無視することができ、次のように書くことができる。

$$\left. \begin{aligned} 1/T_1 &= (N/N_H)n/T_{1M} \\ 1/T_2 &= (N/N_H)n/T_{2M} \end{aligned} \right\} \text{-----} \quad (2)$$

したがって緩和時間の解釈から溶液中の常磁性イオンの水和殻中にあるプロトンの緩和に関して考察することができる。

## 2) 相関時間 ( $\tau_c$ ) について

緩和速度を支配するものに次の2つの重要な磁氣的相互作用がある。1つは電子スピンの核スピンの直接的な双極子-双極子相互作用と、もう1つは核の中心における電子スピン密度に依存するスカラー相互作用（コンタクト超微細相互作用）であり、これらの相互作用は固有の相関時間をもつ次のようないくつかの異った時間依存過程による変動を受ける。

まず、双極子-双極子相互作用に対する有効相関時間  $\tau_c$  は次の式のように表わされる。<sup>62)</sup>

$$1/\tau_c = 1/\tau_r + 1/\tau_s + 1/\tau_M \text{-----} \quad (3)$$

$\tau_r$  : イオンと核を結ぶベクトルの回転運動の相関時間

$\tau_s$  : 電子の緩和速度

$\tau_M$  : イオンの作る第1配位圏に核が滞在する時間

通常遷移金属元素の常磁性アコ錯体では  $\tau_r$  と  $\tau_s$  は  $10^{-11}$  sec. 程であるが、 $\tau_M$  は  $10^{-7}$  sec. ぐらいのオーダーにある。<sup>63)</sup>

次にスカラー相互作用に対する相関時間  $\tau_e$  は、等方的相互作用なので回転運動によって変化せず、従って  $\tau_r$  項は寄与しないので次の式のように表わされる。<sup>62)</sup>

$$1/\tau_e = 1/\tau_s + 1/\tau_M \text{-----} \quad (4)$$

この時間はそれぞれ温度に依存し、金属イオンによって異なる。しかし一般に  $\tau_c$  および  $\tau_e$  の挙動はそれに影響を与える最も速い分子過程によって、おもに決められてしまう。

一般に電子スピン量子数  $S$  をもつ常磁性イオンの第1配位圏にある核の緩和速度は、量子論的に2スピン系間の遷移確率を計算した、以下に示す Solomon-Bloembergen<sup>64, 65)</sup> の式によって与えられている。

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_{1M}} &= \frac{2}{15} \cdot \frac{S(S+1)\gamma_I^2 g^2 \beta^2}{r^6} \left( \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{7\tau_c}{1 + \omega_s^2 \tau_c^2} \right) \\ &+ \frac{2}{3} \cdot \frac{S(S+1)A^2}{\hbar^2} \left( \frac{\tau_e}{1 + \omega_s^2 \tau_e^2} \right) \text{-----} \quad (5) \end{aligned}$$

$$\frac{1}{T_{2M}} = \frac{1}{15} \cdot \frac{S(S+1)r_I^2 g^2 \beta^2}{r^6} \left( 4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1+\omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{13\tau_c}{1+\omega_s^2 \tau_c^2} \right) + \frac{1}{3} \cdot \frac{S(S+1)A^2}{\hbar^2} \left( \tau_e + \frac{\tau_e}{1+\omega_s^2 \tau_e^2} \right) \quad (6)$$

$r_I$  : 磁気回転比,  $r$  : イオンと核間の距離,  $g$  : 電子の  $g$  因子,  
 $\beta$  : ボーア磁子,  $\omega_I, \omega_s$  : 核と電子のラーモア周波数,  
 $A$  : 等方的超微細結合定数

(5), (6)式の第1項は双極子相互作用の項で第2項はスカラー相互作用の項である. 一般に  $\tau_e > \tau_c$  から  $\omega_s^2 \tau_e^2 \gg 1$  となるために,  $1/T_{1M}$  においてはその第2項は無視できるくらいに小さいが,  $1/T_{2M}$  においてはその効果は無視することはできない.

### 3) 金属イオンと配位子との距離の算出

ここで(5)式を簡単化するために  $\tau_c$  の入っている関数を  $f(\tau_c)$  とし,  $S(S+1)g^2\beta^2 = \mu_s^2$  を使えば次のようになる.

$$1/T_{1M} = 2/15 (\mu_s r_I / r^3)^2 \cdot f(\tau_c) \quad (7)$$

$$f(\tau_c) = 3\tau_c / (1 + \omega_I^2 \tau_c^2) + 7\tau_c / (1 + \omega_s^2 \tau_c^2) \quad (8)$$

次に(7)式を変形して金属イオンと配位子との距離  $r$  について解くと次式が得られる.

$$r \text{ (in } \text{\AA}) = C [T_{1M} f(\tau_c)]^{1/6} \quad (9)$$

ここで  $C$  は種々の金属イオンと核の相互作用によってきまる定数<sup>66)</sup>で,  $\text{Cu}^{2+} \dots \dots \text{}^1\text{H}$  の場合は 540 という値をとる. (9)式から明らかなように金属イオンと配位子との間の正確な距離を出すためには  $\tau_c$  の決定が重要になってくるのはいうまでもない.  $\tau_c$  の決定にはいくつかの方法が述べられている<sup>67-70)</sup>が今回の実験においては, 先程の Bloembergen の (5), (6)式から  $1/T_{1M}$  と  $1/T_{2M}$  との比をとり導いた  $\tau_c$  についての式 (10) を用いて決定した<sup>67)</sup>

$$\tau_c = (6F - 7/4 \omega_I^2)^{1/2} \quad (10)$$

$$\text{但し, } F = T_{1M}/T_{2M} = \{4\tau_c + 3\tau_c/(1 + \omega_I^2 \tau_c^2)\} / \{6\tau_c/(1 + \omega_I^2 \tau_c^2)\}$$

この方法では同じ周波数帯で測定した  $1/T_{1P}$ ,  $1/T_{2P}$  の値から (2) 式により求めた  $1/T_{1M}$ ,  $1/T_{2M}$  の値を用いて  $\tau_c$  を算出することができる. 尚ここで測定周波数を 270 MHz とし,  $\tau_c$



を  $10^{-9}$ s 程とすると  $\omega_1 = 1.67 \times 10^9 \text{sec}^{-1}$ ,  $\omega_s = 1.08 \times 10^{12} \text{sec}^{-1}$  から  $\omega_1^2 \tau_c^2 \ll \omega_s^2 \tau_c^2$  となるため先程の Bloembergen の (5), (6) 式中の  $\omega_s$  項は無視するほど小さくなる。又, (5), (6) 式中の第 2 項 (コンタクト項) は A (等方的超微細結合定数) 値がたかだか 1Mc であるとして, 第 1 項 (双極子-双極子相互作用項) 及び第 2 項の係数項を算出すると, 第 1 項  $\gg$  第 2 項となるため, 第 2 項の影響も無視するほど小さくなり, これらの近似を用いて (10) 式は  $\omega_1$  項だけを含むものとなる。よって (10) 式から求た  $\tau_c$  値と  $T_{1M}$  値を (9) 式に代入し, 金属-水プロトン間の距離を算出することができる。

今回の実験では, 銅に配位している水プロトンの常磁性核磁気緩和速度の変化を追跡し, その結果から銅に配位した水分子の数やその距離を見積ったわけであるが, ではなぜ, 銅イオンに比べて大過剰に水分子が存在しているにもかかわらず, 銅イオンに配位した水分子についての情報が得られるのであろうか。それは先ほど示した, Solomon, Blombergen の式 [(5), (6) 式] で示されているように,  $T_1$  も  $T_2$  も常磁性イオンと水分子との距離 ( $r$ ) の間に,  $T_1 \propto 1/r^6$  という関係があり, 常磁性金属の第 1 水和圏に存在し, その金属と配位して速やかにまわりの水分子と交換しているものだけが緩和時間に影響を及ぼすからである。そこで 2 価銅に配位する水分子の圏内を第 1 水和圏とし, その場合銅-水プロトン間の距離は一般的な銅-アコ錯体の値を用いて, 約  $2.6 \text{Å}$  と仮定することができる。又, 銅に直接配位していない第 2 水和圏以後の水プロトンとの距離は, 第 2 水和圏の水分子が第 1 水和圏の水分子と水素結合によって結びついているとした場合,  $4.5 \text{Å}$  以上離れていることになる。これらの値を用いてその距離の違いが  $1/T_{1M}$ ,  $1/T_{2M}$  に与える効果を検討すると,  $r = 2.6 \text{Å}$  の場合に比べて  $r = 4.5 \text{Å}$  の場合には約 1.6% となり, その効果はほぼ無視することができる。すなわち, 配位していない第 2 水和圏以後の水分子については, 測定の誤差範囲にはいる。したがって常磁性イオン中の水分子のプロトンの緩和を測定することは, そのイオンに配位した水プロトンのみを観測していることにほかならない。実際に, アニオンを添加することによってみられる  $1/T_1$  の減少は, 2 価の銅イオンが還元などによって, その常磁性効果を失なわない限り, 配位した水分子にそれら無機アニオンが置換したことに対応している。

#### 4) 緩和時間の平衡論的解析

常磁性中心に配位した水分子は回りの溶媒水分子と速やかに交換することによって水プロトンの核磁気縦緩和速度  $1/T_1$  に常磁性効果  $1/T_{1P}$  をもたすが, この効果は配位水と交換し得る他の分子が配位するとき減少する。アニオン非存在下での常磁性縦緩和速度を  $1/T_{1P}$ , アニオン存在下での常磁性縦緩和速度を  $1/T_{1P}$  とすると, 常磁性縦緩和速度の減少分  $R_p$  は次のように定義することができる。

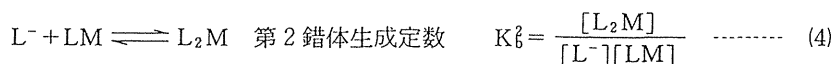
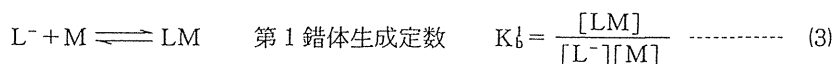
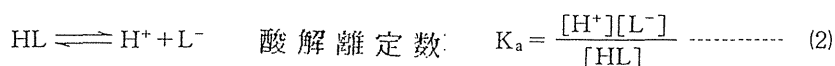
$$R_P(\%) = \frac{1/T_{1P}^f - 1/T_{1P}}{1/T_{1P}^f} \times 100 \quad \text{-----} \quad (1)$$

ここで常磁性縦緩和速度  $1/T_{1P}^f$ ,  $1/T_{1P}$  は実際に測定して求められる縦緩和速度  $1/T_1^f$ ,  $1/T_1$  から, アスコルビン酸で還元して得られる反磁性の縦緩和速度  $1/T_{1d}$  を引いたものである。

$$1/T_{1P}^f = 1/T_1^f - 1/T_{1d}$$

$$1/T_{1P} = 1/T_1 - 1/T_{1d}$$

この効果を利用して DBM と無機アニオンとの相互作用を以下のような平衡式を用いて解析した。



⋮

ある pH において DBM と相互作用する物質として弱酸, 強塩基物質を用いる場合には, その物質の酸解離平衡を考慮する必要がある。今(2)式の平衡にあるアニオン種の全濃度を  $[L]_0$  ( $[L]_0 = [HL] + [L^-]$ ), 酸 HL の解離度を  $\alpha$  とすると, 酸解離定数  $K_a$  および  $\alpha$  はそれぞれ(5)および(6)式で与えられる。

$$K_a = \frac{[H^+] \cdot ([L]/[L]_0)}{[HL]/[L]_0} = \frac{[H^+] \cdot \alpha}{1 - \alpha} \quad \text{-----} \quad (5)$$

$$\alpha = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} = \frac{10^{-pK_a}}{10^{-pK_a} + 10^{-pH}} = \frac{10^{pH - pK_a}}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad \text{-----} \quad (6)$$

従って(5), (6)式よりそれぞれの pH における無機アニオン濃度を算出して解析に用いた。

(a) DBM とアニオン ( $L^-$ ) の 1 : 1 平衡

DBM と無機アニオンとの 1 : 1 平衡を考えると, 観測される常磁性効果の減少分  $R_P$  は 1 : 1 錯体の固有の常磁性効果の減少分  $R_P^1$  と 1 : 1 錯体濃度  $[LM]$  の全金属濃度  $[M]_0$  に

対するモル分率を用いて次の式で表わされる.

$$R_p = R_p^{\ddagger} \times \left( \frac{[LM]}{[M]_0} \right) \quad \text{-----} \quad (7)$$

ここで [LM] は (2) 式並びに (3) 式と全アニオン濃度 [L]<sub>0</sub> ([L]<sub>0</sub> = [HL] + [L]<sub>f</sub> + [LM]) と全金属濃度 [M]<sub>0</sub> ([M]<sub>0</sub> = [M]<sub>f</sub> + [LM]) とから

$$[LM] = \frac{1}{2} \left( [L]_0 + [M]_0 + (1/\alpha K_b) - \sqrt{\{[L]_0 + [M]_0 + (1/\alpha K_b)\}^2 - 4 \cdot [L]_0 \cdot [M]_0} \right) \quad \text{-----} \quad (8)$$

となり, R<sub>p</sub> は

$$R_p = \frac{R_p^{\ddagger}}{2[M]_0} \left[ [L]_0 + [M]_0 + (1/\alpha \cdot K_b) - \sqrt{\{[L]_0 + [M]_0 + (1/\alpha \cdot K_b)\}^2 - 4 \cdot [L]_0 [M]_0} \right] \quad \text{-----} \quad (9)$$

で表わされる.

又, この(9)式はアニオン濃度 ([L]<sub>0</sub>) が金属濃度 ([M]<sub>0</sub>) に比べて大過剰の条件 ([L]<sub>0</sub> ≫ [M]<sub>0</sub>) の下では次のように簡単化できる.

$$\frac{1}{R_p} = \frac{1}{\alpha K_b \cdot R_p^{\ddagger}} \cdot \frac{1}{[L]_0} + \frac{1}{R_p^{\ddagger}} \quad \text{-----} \quad (10)$$

この式は 1/R<sub>p</sub> に対して 1/[L]<sub>0</sub> をプロットすると直線となり, 切片から 1:1 錯体固有の常磁性緩和速度の減少分 R<sub>p</sub><sup>‡</sup> と, 傾きから 1:1 錯体生成定数 K<sub>b</sub> とを算出することができることを示している.

#### (b) DBM とアニオン (L<sup>-</sup>) との 1:1 及び 1:2 平衡

さらに反応が進んで (4) 式の錯体の生成をも含めると, その錯体固有の常磁性効果の減少分を R<sub>p</sub><sup>‡</sup> とし R<sub>p</sub> は次の式で表わされる.

$$R_p = R_p^{\ddagger} \times \left( \frac{[LM]}{[M]_0} \right) + R_p^{\ddagger 2} \times \left( \frac{[L_2M]}{[M]_0} \right) \quad \text{-----} \quad (11)$$

ここで [L]<sub>0</sub> が [M]<sub>0</sub> に比べて大過剰の条件の下では,

$$[L]_0 = [HL] + [L]_f + [LM] + [L_2M]$$

$$[M]_0 = [M]_f + [LM] + [L_2M]$$

の関係と(2)式~(4)式とを用いて次のように表わされる。

$$[LM] = \frac{\alpha K_b^1 [L]_0 [M]_0}{1 + \alpha K_b^1 [L]_0 + \alpha K_b^1 \cdot \alpha K_b^2 ([L]_0)^2} \quad (12)$$

$$[L_2M] = \frac{\alpha K_b^1 [L]_0 \cdot \alpha K_b^2 [L]_0 [M]_0}{1 + \alpha K_b^1 [L]_0 + \alpha K_b^1 \cdot \alpha K_b^2 ([L]_0)^2} \quad (13)$$

ここでこの(12), (13)を(11)に代入すると次式が得られる。

$$\frac{1}{R_p} = \frac{1}{\alpha K_b^1 (R_p^1 + R_p^2 \cdot \alpha K_b^2 [L]_0)} \cdot \frac{1}{[L]_0} + \frac{1 + \alpha K_b^2 [L]_0}{R_p^1 + R_p^2 \cdot \alpha K_b^2 [L]_0} \quad (14)$$

よって  $1/R_p$  に対して  $1/[L]_0$  の値をプロットするならば、この式にもとづいて  $R_p^1$ ,  $R_p^2$  そして  $K_b^1$ ,  $K_b^2$  の4つのパラメーターを決定することができる。

### (c) 競合系における解析

2種のアニオン ( $L^A$  と  $L^B$ ) が M と競合的に結合する系を考える。今  $L^A M$  が M に比して低い濃度で存在している所へ過剰の  $L^B$  が添加される場合を考える。この場合  $L^A M$  は殆んど生成しないし、 $L^A L^B M$  の濃度も  $L^A M$ ,  $L^B M$  および  $L^B M$  の濃度に比べれば無視しうる程度になる。したがって観測される常磁性緩和速度の減少分  $R_p$  は次式であらわされる。

$$R_p = R_p^{1A} \left( \frac{[L^A M]}{[M]_0} \right) + R_p^{1B} \left( \frac{[L^B M]}{[M]_0} \right) + R_p^{2B} \left( \frac{[L^B M]}{[M]_0} \right) \quad (15)$$

ここで  $R_p^{1A}$ ,  $R_p^{1B}$  および  $R_p^{2B}$  はそれぞれ  $L^A M$ ,  $L^B M$  および  $L^B M$  に対する固有の常磁性緩和速度減少分である。酸  $HL^A$  および  $HL^B$  の解離度をそれぞれ  $\alpha^A$  および  $\alpha^B$  とし、 $[L^B]_0 \gg [M]_0$  の条件の下に(b)項におけると同様に処理すると、おのおのの錯体の濃度は次のように表わされる。

$$[L^A M] = \alpha^A K_b^A [L^A]_0 [M] / (1 + \alpha^A K_b^A [M]) \quad (16)$$

$$[L^B M] = \alpha^B K_b^B [L^B]_0 [M] \quad (17)$$

$$[L^B M] = \alpha^B K_b^B \alpha^B K_b^{2B} ([L^B]_0)^2 [M] \quad (18)$$

ここで、 $K_b^A$ ,  $K_b^B$  および  $K_b^{2B}$  は  $L^A M$ ,  $L^B M$  および  $L^B M$  錯体それぞれの錯体生成定数で

ある。尚、 $[L^B M]$  を求めるに当っては  $L^A M + L^B = L^B M + L^A$  の交換反応によって生成する  $L^B M$  の濃度は  $L^A L^B M$  の濃度が無視するという理由と同じ理由によって無視されている。(16)~(17)式は未知濃度  $[M]$  を含み、このままでは  $R_p$  の数値的な評価には利用できない。それをするためには(16)~(17)式を、金属の全濃度  $[M]_0$  を定義する式に代入して  $[M]$  に関する次の二次方程式を解いてやらねばならない。

$$a[M]^2 + b[M] + c = 0 \quad \text{-----} \quad (19)$$

$$\begin{cases} a = \alpha^A K_b^{LA} + \alpha^A K_b^{LA} \cdot \alpha^B K_b^{LB} [L^B]_0 + \alpha^A K_b^{LA} \cdot \alpha^B K_b^{LB} \cdot \alpha^B K_b^{LB} ([L^B]_0)^2 \\ b = 1 + \alpha^A K_b^{LA} [L^A]_0 + \alpha^B K_b^{LB} [L^B]_0 + \alpha^B K_b^{LB} \cdot \alpha^B K_b^{LB} ([L^B]_0)^2 - \alpha^A K_b^{LA} [M]_0 \\ c = -[M]_0 \end{cases}$$

すなわち(18)式よりそれぞれの  $[L^B]_0$  において遊離の金属濃度  $[M]$  を求め、(16)~(18)式より各錯体の濃度  $[L^A M]$ ,  $[L^B M]$  および  $[L^B M]$  を算出して、(15)式に代入することにより、それぞれの  $[L^B]_0$  に対する常磁性緩和速度の減少分  $R_p$  を求めることができる。

尚、本項の解析法全体を通じて  $M$  は DBM の  $Cu(II)$  に、 $L^-$  は  $CN^-$  又は  $N_3^-$  に、 $L^A$  および  $L^B$  はそれぞれ  $CN^-$  および  $N_3^-$  に対応させることによって次項以下の解析に利用される。

### Ⅲ-4 結果ならびにその解釈

#### 1) 常磁性 $^1\text{H}$ 核磁気縦緩和速度のアニオン濃度依存性

前節(Ⅲ-3)において銅(Ⅱ)まわりの配位水交換による水プロトンの常磁性緩和速度変化の平衡論的解析が、無機アニオン-DBM 錯体の生成定数 ( $K_1^b$ ,  $K_2^b$ )ならびにその錯体固有の常磁性効果の減少分 ( $R_p^1$ ,  $R_p^2$ )をパラメーターとして含むことを明らかにした。したがって、シアニオン ( $\text{CN}^-$ ) やアジドイオン ( $\text{N}_3^-$ ) の濃度変化に対する水プロトンの常磁性縦緩和速度変化を追跡するならば、これらのパラメーターを決定することが可能である。実際、DBM にシアン化ナトリウム ( $\text{NaCN}$ ) 及びアジ化ナトリウム ( $\text{NaN}_3$ ) を添加すると、常磁性縦緩和速度 ( $1/T_{1p}$ ) の減少 ( $R_p$ ) が観測された。この減少は常磁性金属に配位している水分子にこれら無機アニオンが置換することによって生じることはすでに述べたが、この効果の他に、これら無機アニオンによる DBM の 2 価銅の 1 価銅への還元効果によっても起こりうる。事実、DBM の 2 価銅はシアニオンによって還元されることが Blackburn<sup>72)</sup> によって報告されている。従って無機アニオンの置換効果のみにもとづく  $R_p$  値を得るためには、この還元効果が  $R_p$  値に及ぼす影響を定量化するか、あるいはこの還元効果が殆んど  $R_p$  値に影響を及ぼさないような無機アニオンの濃度域を選ばねばならない。 $\text{CN}^-$  および  $\text{N}_3^-$  に対する DBM の 2 価銅の 1 価銅への還元効果を、バソクプロイン定量法によって幾つかのアニオン濃度 ( $[\text{L}]_0$ ) において検討した。 $\text{CN}^-$  では 1 価銅の割合が添加した  $\text{NaCN}$  濃度 ( $[\text{NaCN}]_0$ ) に対する全常磁性銅濃度 ( $[\text{Cu}]_0$ ) との比 ( $[\text{NaCN}]_0/[\text{Cu}]_0 = 2$  では 5% 以下であったが、比が増大するにつれて 1 価銅の割合が増加し、17.5 では 87% と；シアン高濃度域で顕著に還元が進行した。しかし  $\text{N}_3^-$  については  $[\text{NaN}_3]/[\text{Cu}]_0 = 750$  に至る高濃度域まで  $\text{N}_3^-$  による  $\text{Cu(II)}$  の還元は認められなかった。そこで  $\text{CN}^-$  に対しては、その還元効果は無視し得る  $[\text{NaCN}]/[\text{Cu}]_0 \leq 2$  の領域について、その観測値  $R_p$  を無機アニオンの低濃度域における 1 : 1 錯体平衡のみを考えた(9)式により、カーブフィティング法で解析した。(Ⅲ-3-4 参照) pH 5.5 における  $R_p$  値の解析結果を図Ⅲ-3 に示す。図中黒まるが観測値であり、実線が(9)式にもとづく理論曲線である。図中枠内はシアン高濃度にわたる  $R_p$  の観測値(黒まる及び点線)と理論曲線(実線)であり、 $[\text{NaCN}]/[\text{Cu}]_0 = 2$  以上では 2 価銅の 1 価銅への還元による常磁性緩和速度の減少が大きいことを示しているが、2 以下では理論曲線と観測値の一致は良好である。決定されたシアン-DBM 1 : 1 錯体生成定数 ( $K_1^b$ ) と錯体固有の常磁性緩和速度の減少分 ( $R_p^1$ ) を表Ⅲ-1 に示す。又、pH 7.0 でも同様な結果が得られ、同様に解析し各パラメーターを決定して表Ⅲ-1 に収載した。

一方、 $\text{N}_3^-$  では先に述べた様に高濃度域まで 2 価銅の還元はおこらなかったので  $10 \leq [\text{NaN}_3]_0/[\text{Cu}]_0 \leq 750$  の濃度域での観測値を解析に用いた。図Ⅲ-4 に pH 5.5 (白ま

る)と pH 7.0 (黒まる)における結果を、縦軸に  $1/R_p$ , 横軸に  $1/[NaN_3]_0$  をとってプロットしたものを示した。このプロットにみられるようにアジド高濃域 ( $[NaN_3]_0/[Cu]_0 \geq 100$ ) で直線からはずれだし、DBM-無機アニオン 1 : 1 錯体 ( $[L]_0 \gg [M]_0$ ) の生成のみを考えた (10) 式 (III-3-4 参照) で予想される傾向とは異っている。これはアジド高濃度域では DBM-無機アニオン 1 : 2 錯体の生成も考慮にいれねばならないことを意味していると考え、(14) 式を用いてカーブフィティング法により観測値を解析した。(III-3-4 参照) 図中の実線が (14) 式にもとづいた理論曲線であり、DBM-アジド 1 : 1 および 1 : 2 錯体生成定数 ( $K_b^1, K_b^2$ ) とそれぞれの錯体の固有常磁性緩和速度減少分 ( $R_p^1, R_p^2$ ) が表 III-I に示すごとく決定された。ここで錯体生成定数  $K_b^1, K_b^2$  について一言しておく、これらは pH に依存しない真の生成定数であり、生成定数の真の pH 効果を見積もる上で欠かせないものである。各 pH 領域での実験結果から一次的に求め得るものは、第三章の解析式からも明らかな如く常に pH に依存する見掛けの生成定数、すなわち  $\alpha K_b^1, \alpha K_b^2$  等であり、真の生成定数はこれらを酸解離度  $\alpha$  で除して得られる。 $CN^-$  および  $N_3^-$  錯体についてそれぞれ  $pK_a(HCN) = 9.12$  および  $pK_a(HN_3) = 4.65^{69)}$  がそれぞれの pH での  $\alpha$  の算出に利用された。

1 : 1 錯体固有の常磁性緩和速度の減少分 ( $R_p^1$ ) の値は、シアン錯体の場合、pH 5.5 で 53%, pH 7.0 で 52% とほぼ同じ値を示し、全常磁性効果 ( $1/T_{1p}^1$ ) の約半分が消失した。一方アジド錯体では、pH 5.5 で 37%, pH 7.0 で 31% とこの場合も両 pH ではほぼ同じ値を示し、全常磁性効果の約 1/3 が消失した。さらにアジド錯体において残りの常磁性効果は、1 : 2 錯体固有の常磁性緩和速度の減少分 ( $R_p^2$ , pH 5.5 で 98%, pH 7.0 で 96%) が示すように、1 : 2 錯体の生成によってほぼ消失することが示された。このことは DBM の 2 価銅には無機アニオンと交換可能な 2 分子の水が配位していることを示すものである。

次に 1 : 1 錯体生成定数 ( $K_b^1$ ) の値を両アニオン錯体で比較すると、シアン錯体の方がアジド錯体に比べて、 $10^3 \sim 10^4$  倍大きくなっており  $CN^-$  の方が  $N_3^-$  よりも DBM の銅 (II) に対する親和性が高いことを示している。

さらに 1 : 1 錯体生成定数 ( $K_b^1$ ) の値を両 pH で比較すると、シアン錯体もアジド錯体も pH 5.5 の値が pH 7.0 の値よりもシアン錯体で約 11 倍、アジド錯体で約 3 倍大きくなっており pH 5.5 の方が両アニオンとも DBM に対する親和性が高くなっていることを示している。1 : 2 錯体を作るアジドの場合、 $K_b^2$  についても同じ傾向があり、しかもその比が 1 : 1 錯体の場合と同じ 3 倍を示すことは興味のある所である。

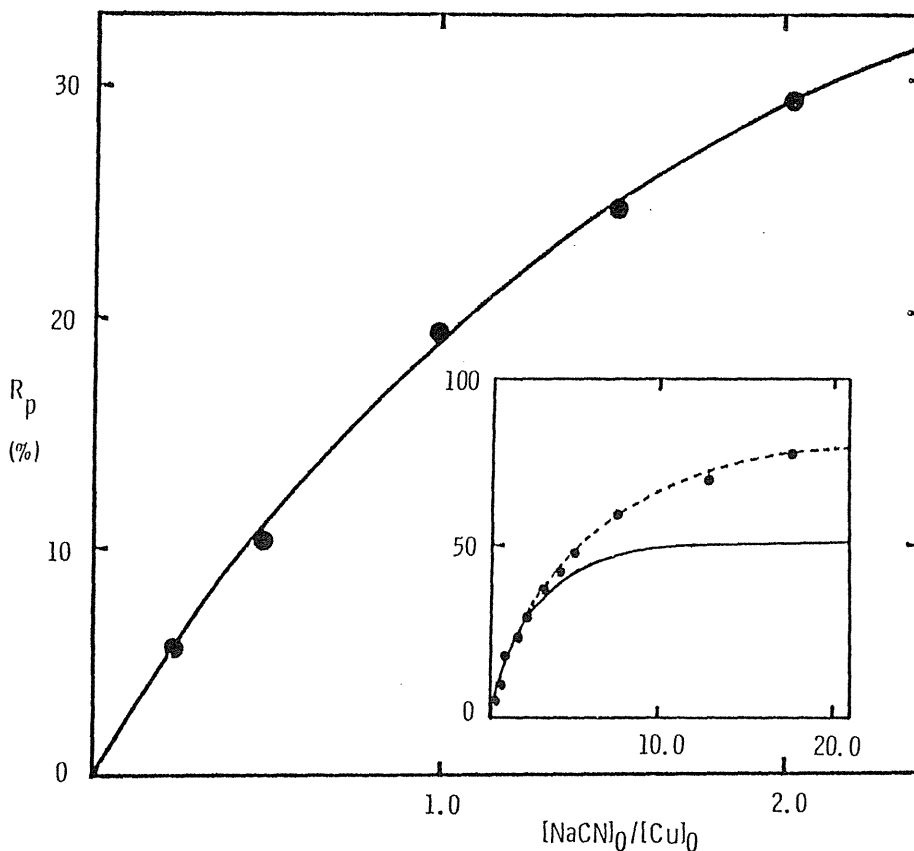


Fig. III-3. Correlation between the paramagnetic reduction  $R_p$  and the ratio  $[\text{NaCN}]_0/[\text{Cu}]_0$  in the  $^1\text{H}$  nuclear spin-lattice relaxation of the enzyme solution containing NaCN.

The inset shows the correlation extended to higher range of  $[\text{NaCN}]_0/[\text{Cu}]_0$  (abscissa). Closed circles: experimental points. Solid line: theoretical curve based on Eq.(9). Enzyme solution: protein concentration  $4.55 \times 10^{-2}$  mM,  $[\text{Cu}]_0$   $2.07 \times 10^{-1}$  mM, MES buffer 200mM, pH 5.5. Titrations with NaCN were performed as described under Experimental Procedure.



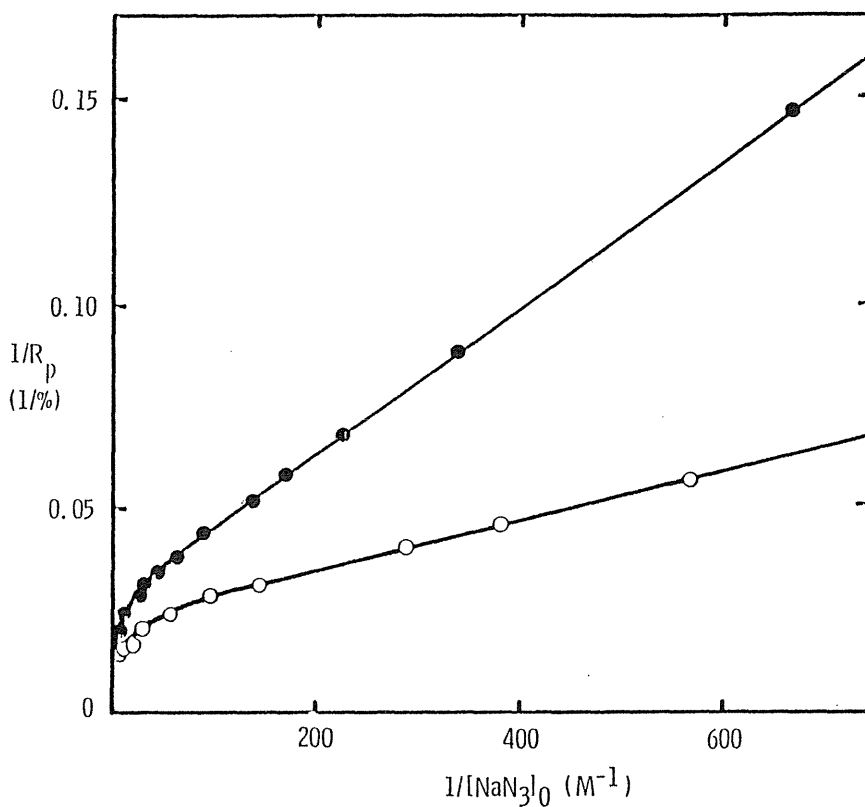


Fig. III-4. Correlation between the reciprocal of paramagnetic reduction  $1/R_p$  and the reciprocal of  $[\text{NaN}_3]_0$  in the  $^1\text{H}$  nuclear spin-lattice relaxation of the enzyme solution containing  $\text{NaN}_3$ . Closed circles: experimental points at pH 7.0 (200mM potassium phosphate buffer). Open circles: experimental points at pH 5.5 (200 mM MES buffer). Solid lines: simulated curves based on Eq. (14). Enzyme solution: protein concentration  $4.14 \times 10^{-2}$  mM,  $[\text{Cu}]_0$   $1.64 \times 10^{-1}$  mM. Titrations with  $\text{NaN}_3$  were performed as described under Experimental Procedure.

Table III-1. The binding constants ( $K_D^1$  and  $K_D^2$ ) and the intrinsic reduction of the paramagnetic relaxation rates ( $R_P^1$  and  $R_P^2$ ) in the binding of  $CN^-$  or  $N_3^-$  to the Cu(II) site of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase

		pH 5.5	pH 7.0
$CN^-$ -Cu(II)	$K_D^1 / M^{-1}$	$8.67 \times 10^6$	$7.49 \times 10^5$
	$R_P^1 / \%$	53	52
$N_3^-$ -Cu(II)	$K_D^1 / M^{-1}$	$5.55 \times 10^2$	$1.78 \times 10^2$
	$K_D^2 / M^{-1}$	8.1	3.1
	$R_P^1 / \%$	38	32
	$R_P^2 / \%$	98	96

一方アジド錯体において、 $K_D^1$ と $K_D^2$ との値を比較すると、 $K_D^2$ の値が $K_D^1$ の値に比べて約100倍小さくなっていることより、2番目の配位水の置換は極めて困難な過程であると考えられる。

## 2) $^1H$ 核磁気縦緩和および横緩和速度の測定によるCu(II)- $H_2O$ 間距離の見積もり

前節において $CN^-$ 及び $N_3^-$ とDBMとの相互作用を、pH 5.5とpH 7.0で水プロトンの常磁性縦緩和速度の変化からみつもったが、それらのpH効果を考えるうえで、両pHにおけるDBMの2価銅と配位した水分子間の距離がどうなっているかを調べることは重要である。

そこで、同じ緩衝液(200mM 2-(N-モルホリン)エタンスルホン酸(MES))を用いて、pH 5.5とpH 7.0に調整したDBM溶液を調製し、同じ周波数帯(270MHz)でそれぞれの縦緩和時間( $T_1$ )と横緩和時間( $T_2$ )を測定した。銅(II)に配位した水プロトンの距離は、III-3-3で説明したようにSolomon, Bloembergen<sup>64, 65</sup>らの式を用い、 $1/T_{1M}$ と $1/T_{2M}$ との比から相関時間( $\tau_c$ )を求めた。表III-2に両pHで得られた各種パラメーターを示した。ここで $R_{Cu-H}^{av}$ は配位していると考えられる2分子の水プロトンと銅との平均距離を表わしている。又、 $R_{Cu-O}^{av}$ は $R_{Cu-H}^{av}$ の値を用いて銅(II)に配位している水分子はそのO原子をCu(II)に可能な限り最近接させているとし、その原子価角(H-O-H)を $106^\circ$ 、酸素-水素間の距離(O-H)を $1.09 \text{ \AA}$ として算出したものである。

表よりわかる通り、相関時間( $\tau_c$ )の値は両pHでほとんど変わらず、算出した銅(II)と水分子との距離もほとんど同じである。このことは、シアニオンやアジドイオンのDBMの

Table III-2.<sup>a</sup> Estimation of Cu(II)-H and Cu(II)-O distances in the H<sub>2</sub>O co-ordination to the Cu(II) site of dopamine β-mono-oxygenase

	pH 5.5	pH 7.0
$1/T_{1M}(s^{-1})$	$3.82 \times 10^4$	$4.36 \times 10^4$
$1/T_{2M}(s^{-1})$	$2.24 \times 10^5$	$2.03 \times 10^5$
$\tau_c(sec.)$	$1.55 \times 10^{-9}$	$1.35 \times 10^{-9}$
$R_{Cu-H}^{av.}(\text{Å})$	2.69	2.68
$R_{Cu-O}^{av.}(\text{Å})$	2.00	1.98

<sup>a</sup>The terms  $1/T_{1M}$ ,  $1/T_{2M}$ ,  $\tau_c$ ,  $R_{Cu-H}^{av.}$  and  $R_{Cu-O}^{av.}$  are defined under Theory in the text

銅(II)への付加による  $R_p^1$  値や  $R_p^2$  値が pH によって殆んど変わらないことも考え合わせて、DBM の銅(II)の基本構造は両 pH において変化していないことを示すものと考えられる。したがって  $K_b^1$  や  $K_b^2$  が pH によって変化する原因は少くとも銅(II)-H<sub>2</sub>O 間距離の変化とは無関係であるといえよう。

### 3) EPR スペクトル変化のアニオン濃度依存性

水プロトンの常磁性核磁気緩和速度の変化から DBM に対する無機アニオンの結合平衡パラメーターや銅(II)まわりの水分子の配置数を知ることができたが、この事実を EPR を用いて確めるために無機アニオンの濃度変化に対する DBM の 2 価銅の EPR スペクトルの変化を観測した。

シアン添加濃度の変化に対する EPR スペクトル変化を pH 7.0 の場合につき、図 III-5 に示す。EPR スペクトルは、シアン化ナトリウム添加量 ( $[NaCN]_0$ ) と銅(II)濃度 ( $[Cu]_0$ ) との比 ( $[NaCN]_0/[Cu]_0 = 0.5$  付近から  $g_{\perp}$  ( $g_{xx}, g_{yy}$  成分)領域の高磁場側に新しいシグナルがみえはじめ、それと同時に  $g_{\parallel}$  ( $g_{zz}$  成分)領域の山が 2 つに分かれ始める。特に  $g_{\perp}$  の新シグナルは CN<sup>-</sup> 濃度の増加と共に強くなり、Blackburn ら<sup>72)</sup> が pH 5.5 で観測した結果とよく一致する。したがってこの新シグナルをもとのシグナルすなわち Native-DBM (Component I) に対し、Blackburn らと同じくシアン錯体 (Component II) と帰属することができる。両者は共に軸対称のスペクトルとして表 III-3 に示したような異方性  $g$  および A テンソルによってシミュレートできる。 $[NaCN]_0/[Cu]_0$  が 1.25 において観測された EPR スペクトルは Component I : Component II = 1 : 1 を仮定したシミュレーションスペクトル

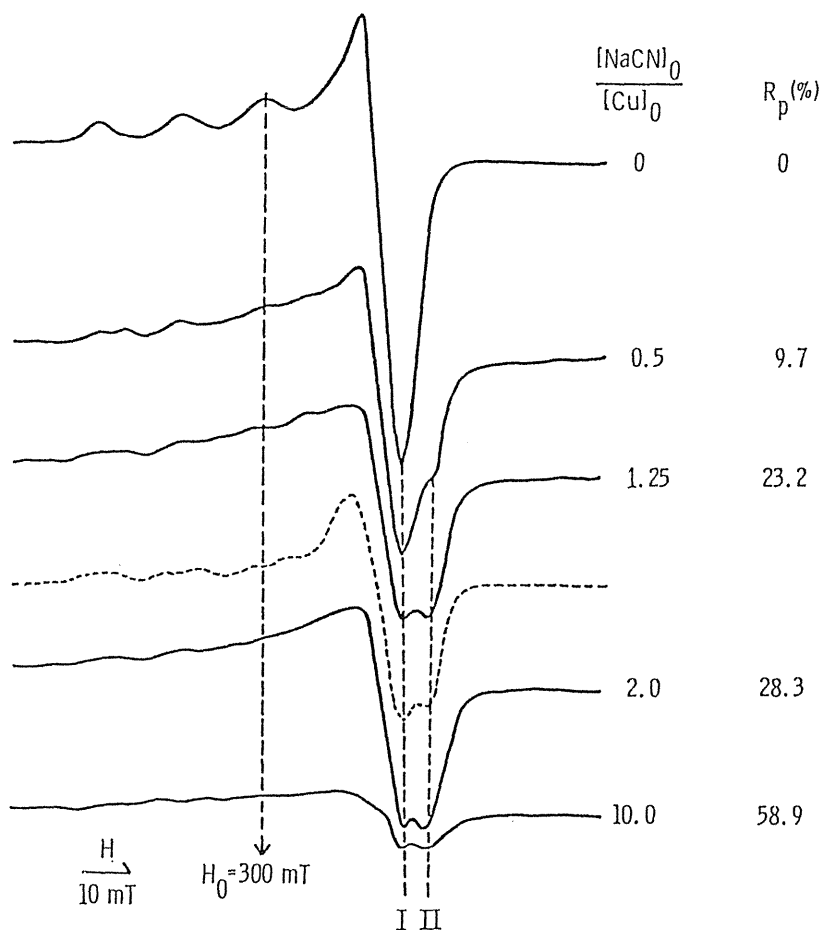


Fig. III-5. Change of EPR spectra of  $^{63}\text{Cu}$ -dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase solution with increase of the  $[\text{NaCN}]_0/[\text{Cu}]_0$  ratio.

Enzyme solution: protein concentration  $2.86 \times 10^{-2}$  mM,  $[\text{Cu}]_0$   $1.54 \times 10^{-1}$  mM, potassium phosphate buffer 200 mM, pH 7.0. Titrations with NaCN were performed as described under Experimental Procedure. The dashed line is the spectrum simulated on the basis that the solution consisted of equal proportions of component I and component II by using the parameters in Table III-3. EPR spectra were recorded at  $-150^\circ\text{C}$  as described under Experimental Procedure and the parallel nuclear relaxation rate measurements were also carried out according to the same procedure as in Fig. III-3 to give the  $R_p$  values shown in the figure, along with the  $[\text{NaCN}]_0/[\text{Cu}]_0$  ratio.

(図中点線)とよく一致し、このとき Native-銅サイトとシアン錯体とが等量ずつ混合していることを表わしている。さらに  $\text{CN}^-$  濃度を高めていくと、 $[\text{NaCN}]_0/[\text{Cu}]_0 = 1.25$  における両シグナル強度比はほぼ保れたまま、シグナル強度が減少する。この減少は、先の核磁気緩和速度の測定で見られた  $\text{CN}^-$  による DBM の 2 価銅の還元に対応しており、この傾向も先の Blackburn らの結果とほぼ一致した。

EPR 滴定の各ステップにおいて測定された核磁気緩和速度の減少分 ( $R_p$ ) が図 III-5 の右欄に記載されている。ほぼ 1 : 1 の強度比を与える  $[\text{NaCN}]_0/[\text{Cu}]_0 = 1.25$  における  $R_p$  値は 23.2% であり、この状態ははじめ DBM の銅に 2 分子の水が配位しているとする全体で 4 個の水のうち 1 個の水が  $\text{CN}^-$  に置き換った、図 III-6(a) の模式図のように考えることができる。ところで 2 分子の水のうち 1 分子の水が完全に  $\text{CN}^-$  に置き換ったとき (図 III-6(b)) にその  $R_p$  値は約 50% (1 : 1 シアン錯体固有の常磁性緩和速度の減少分、すなわち  $R_p^1$  より) になる筈であり EPR 滴定の結果もまた DBM の 2 価銅には 2 分子の水が配位していることを支持している。

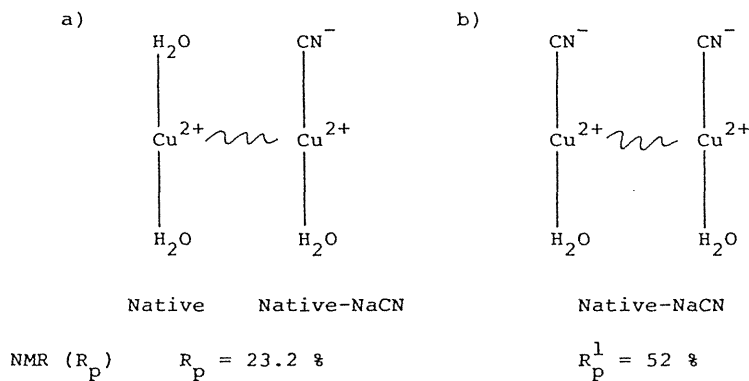


Fig. III-6

次に、アジドを添加したときの EPR スペクトル変化を、pH 7.0 の場合につき図 III-7 に示す。アジド濃度変化にともなう EPR スペクトル変化は、シアン添加によって観測されたシグナル分離は認められなかった。このことはアジド錯体の EPR パラメーターがシアン錯体のそのパラメーターとは異り、Native-DBM のパラメーターとあまり大きな違いをもっていないためと考えられる。尚、このアジド錯体の EPR スペクトルは、pH 5.0 (酢酸ナトリウム緩衝液中) で Blackburn らも観測しており、同様にシグナル分離は観測されていない。しかし、アジドの添加によって DBM の  $\text{Cu(II)}$  は還元されないため、高濃度までそのスペクトル変化を観測することができる。それらの軸対称スペクトルにおける各パラメーター

( $g_{\perp}$ ,  $g_{\parallel}$ ,  $A_{\parallel}$  (超微細結合定数の Z 軸成分)) を, アジ化ナトリウム添加量に対してプロットすると, 図Ⅲ-8 のようになる.  $[\text{NaN}_3]_0/[\text{Cu}]_0$  が 100 以下の領域では各パラメーターは比較的大きく変化しているのに対し, それ以上ではその変化がゆるやかになっている. ところで, 先に行った緩和速度の実験で求めたアジド錯体の各パラメーター ( $K_b^1$ ,  $K_b^2$ ,  $R_p^1$ ,  $R_p^2$ ) を用いて, それぞれのアジド濃度における各成分 (Native-DBM ( $\text{Free-Cu}^{2+}$ ), 1:1 アジド錯体, 1:2 アジド錯体) のモル分率を計算すると, 図Ⅲ-9 になる. この図からアジド添加にともない, Native-DBM のモル分率が減少すると共に, 1:1 アジド錯体の生成が速やかに起こった後,  $[\text{NaN}_3]_0/[\text{Cu}]_0$  が 100~200 付近で 1:1 アジド錯体濃度が最大 (約 75%) となり, その後ゆるやかに減少していくことがわかる. この傾向は図Ⅲ-8 にみられるような EPR パラメーターの変化とはほぼ対応しており, 1:1 アジド錯体並びに 1:2 アジド錯体の固有の EPR パラメーターを推定することができる. つまり 1:1 アジド錯体固有の EPR パラメーターは,  $[\text{NaN}_3]_0/[\text{Cu}]_0 = 100\sim 200$  の領域で得られたパラメーターに近いものと推定される. 又, 1:2 アジド錯体については, その濃度が約 30% 占める点 ( $[\text{NaN}_3]_0/[\text{Cu}]_0 = 750$ ) までのデータしかなくさらに不確定性は残るが, アジド高濃度域における各パラメーターの変化が 1:2 アジド錯体の生成と対応して変化する傾向はなく, ほぼ一定値を示したことから 1:2 アジド錯体固有の EPR パラメーターは, 1:1 アジド錯体のそのパラメーターとそれほど大きく違うものではないと考えられる. 表Ⅲ-3 にはアジド錯体として 3 種のアジド濃度における EPR パラメーターを収載した.

表Ⅲ-3 よりシアン錯体とアジド錯体の EPR パラメーターを比較すると, 両アニオンとも DBM の 2 価銅と配位することによって, それぞれの  $g_{\parallel}$ ,  $g_{\perp}$  の値を減少させる傾向にある. しかしながら,  $A_{\parallel}$  の値はシアン錯体では増加する傾向にある. 表Ⅲ-3 は pH 7.0 での結果であるが, 両アニオンとも pH 5.5 においても同様な傾向がみられた. したがってシアン錯体とアジド錯体の間には何らかの構造上の違いがあるものと考えられる.

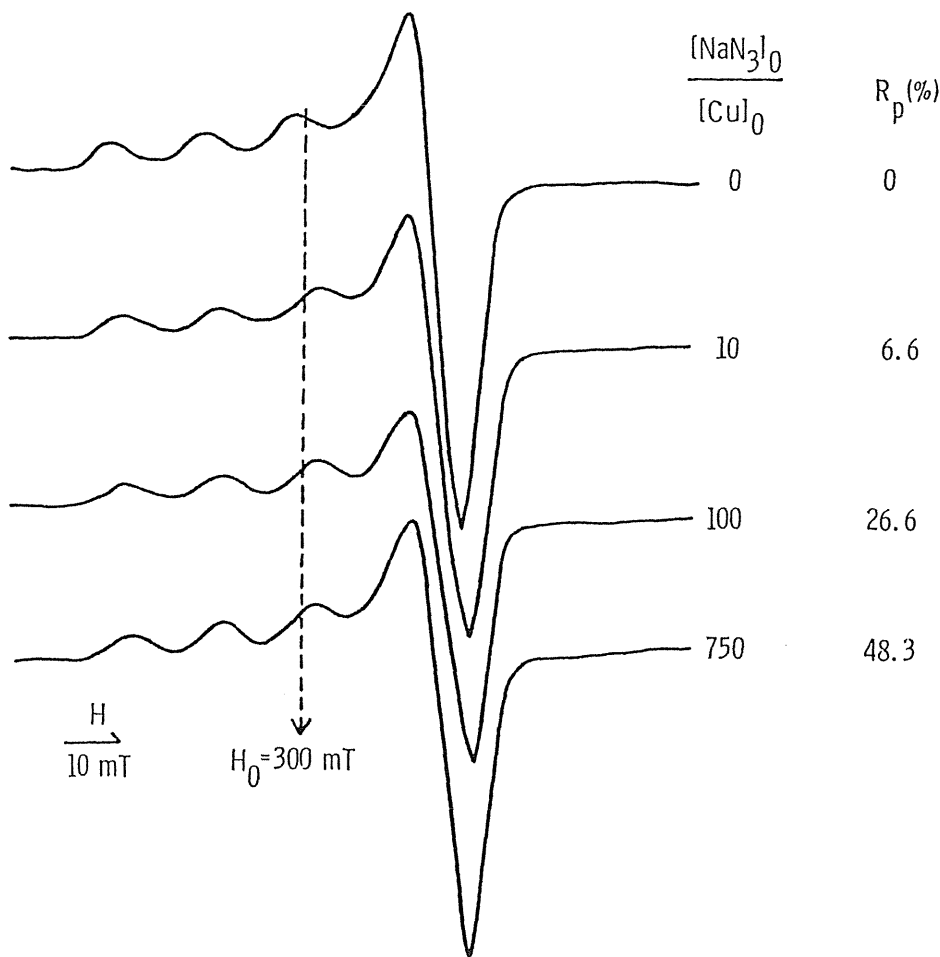


Fig. III-7. Change of EPR spectra of  $^{63}\text{Cu}$ -dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase solution with increase of the  $[\text{NaN}_3]_0/[\text{Cu}]_0$  ratio.

Enzyme solution: protein concentration  $2.86 \times 10^{-2}$  mM,  $[\text{Cu}]_0$   $1.54 \times 10^{-1}$  mM, potassium phosphate buffer 200 mM. pH 7.0. Titration with  $\text{NaN}_3$  were performed as described under Experimental Procedure. EPR spectra were recorded at  $-150^\circ\text{C}$  as described under Experimental Procedure and the parallel nuclear relaxation rate measurements were also carried out according to the same procedure as in Fig. III-4 to give the  $R_p$  values shown in the figure, along with the  $[\text{NaN}_3]_0/[\text{Cu}]_0$  ratio.

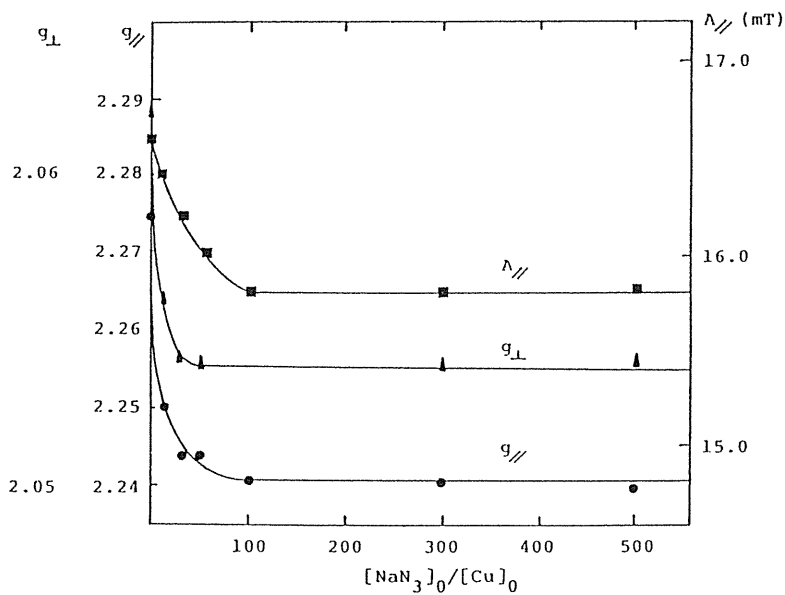


Fig. III-8. Change of EPR parameters of  $^{63}\text{Cu}$ -dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase solution with increase of the  $[\text{NaN}_3]_0/[\text{Cu}]_0$  ratio.

( $-150^\circ\text{C}$ , 200mM Phosphate buffer, pH 7.0)

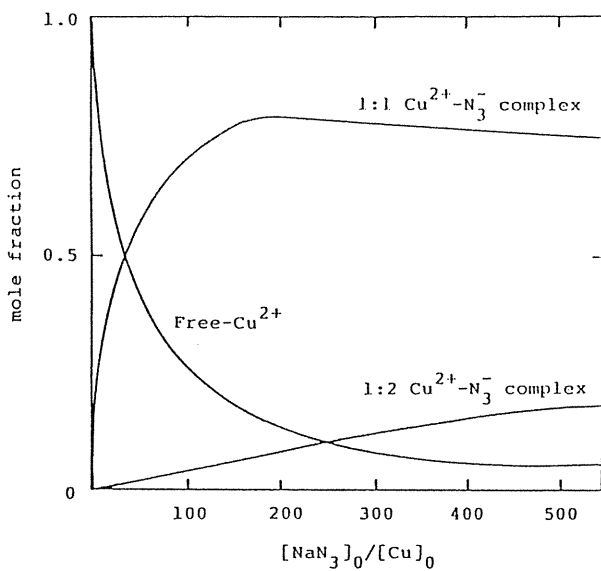


Fig. III-9. Calculated mole fractions of native-DBM and its anation complexes in  $\text{DBM}-\text{N}_3^-$  system.



Table III-3. EPR parameters<sup>a</sup> of <sup>63</sup>Cu-dopamine β-mono-oxygenase solution alone (Native) and containing NaCN (Native-NaCN) or NaN<sub>3</sub> (Native-NaN<sub>3</sub>)

	$g_{//}$	$g_{\perp}$	$A_{//}/mT$
Native	2.273	2.062	16.6
Native-NaCN ( $[L]_0/[Cu]_0=1.25$ )			
Component I	2.273	2.060	16.1
Component II	2.218	2.025	17.0
Native-NaN <sub>3</sub> ( $[L]_0/[Cu]_0=10$ )	2.249	2.056	16.4
(     "     =100)	2.242	2.056	15.8
(     "     =750)	2.241	2.053	15.2

<sup>a</sup>The parameters were determined based on the spectra shown in Fig. III-5 and III-7.

#### 4) シアンイオン及びアジドイオンの DBM に対する競合結合の解析

EPR スペクトルの測定から、シアン錯体とアジド錯体の間に何らかの構造上の差異が予想された。この差異が両アニオンの DBM の 2 価銅との作用部位の差異に起因するものか否かを検討するために、まず 1 : 1 シアン錯体 50% を含む DBM 溶液 ( $[NaCN]_0/[Cu]_0 = 1.25$ ) を調製し、これにアジドイオンを添加した場合の EPR スペクトルの変化を追跡した。結果を図 III-9 に示す。図より  $N_3^-$  濃度の増加に伴い Native-DBM (成分 I) およびシアン錯体 (成分 II) のシグナル強度が減少し、アジド錯体 (成分 III) のシグナル強度が増加していくことがわかる。このことは DBM の 2 価銅との配位部位を占有していた  $CN^-$  を、 $N_3^-$  が追い出して配位することを示唆しており、両アニオンとも DBM の 2 価銅の同じ部位の水分子と置換しているものと考えられる。

この  $CN^-$  と  $N_3^-$  の同一部位への競合的付加の過程をより定量的に解釈するために EPR 滴定を行った各ステップにおいて水プロトンの常磁性緩和速度の減少分  $R_p$  を前節の方法にならって求めた。その結果をアジ化ナトリウム添加量の逆数 ( $1/[NaN_3]_0$ ) に対して、常磁性縦緩和速度の減少分の逆数 ( $1/R_p$ ) でプロットして図 III-10 に示す。図からみられるように、競合系においてもアジド単独で加えたときのプロットと同じように、アジド高濃度域で  $1/R_p$  の変化が激しい。前節 (III-3-4) で導いた緩和速度の平衡論的解析の競合系での (15) 式にもとづき、式中の各パラメーターの値には先におのおのの系で解析して得られた値 ( $K_p^A$  および  $R_p^A$  には 1 : 1 シアン錯体の生成定数およびその固有の常磁性緩和速度の減少分、 $K_p^B$ ,  $K_p^{2B}$  および  $R_p^B$ ,  $R_p^{2B}$  には 1 : 1 および 1 : 2 アジド錯体のそれぞれの生成定数とその固有の

常磁性緩和速度の減少分)を代入して  $1/R_p$  を求めると、その曲線は図中実線のようになり、実測値(黒まる)とよい一致を示した。このことは同じサイトを取り合う2つのアニオンを仮定した解析式を基礎とし、しかも個々の錯体の各パラメーターを用いて発生させた理論曲線が、競合系での実験をうまく説明することを示している。又、この計算式を用いて Native-DBM (Free-Cu<sup>2+</sup>)、1 : 1 シアン錯体、1 : 1 及び 1 : 2 アジド錯体のモル分率をおおの算出し、 $[\text{NaN}_3]_0/[\text{Cu}]_0$  に対してプロットすると、図Ⅲ-12に示すような各成分のモル分率曲線を描くことができる。この図からもわかる通り、アジド添加にともない Native-DBM 及び 1 : 1 シアン錯体のモル分率が減少し、それに対して 1 : 1 並びに 1 : 2 アジド錯体のモル分率が上昇していくことがわかる。この傾向は図Ⅲ-10で示した EPR スペクトルの変化ともよく対応している。例えば  $[\text{NaN}_3]_0/[\text{Cu}]_0 = 50$  の点で各成分のモル分率を算出すると、Native-DBM 及び 1 : 1 シアン錯体がそれぞれ約25%、1 : 1 アジド錯体が約40%となり、この系での EPR スペクトル(図Ⅲ-10)をみると、その3成分が混合したピークを示している。さらにその比 300~750 では Native-DBM と 1 : 1 シアン錯体はほとんど消失し、1 : 1 及び 1 : 2 アジド錯体が大部分を占めるが、その比での EPR スペクトルもそのことを示し、先のアジド単独で添加した系で観測したアジド錯体の EPR スペクトル(図7)に一致した。

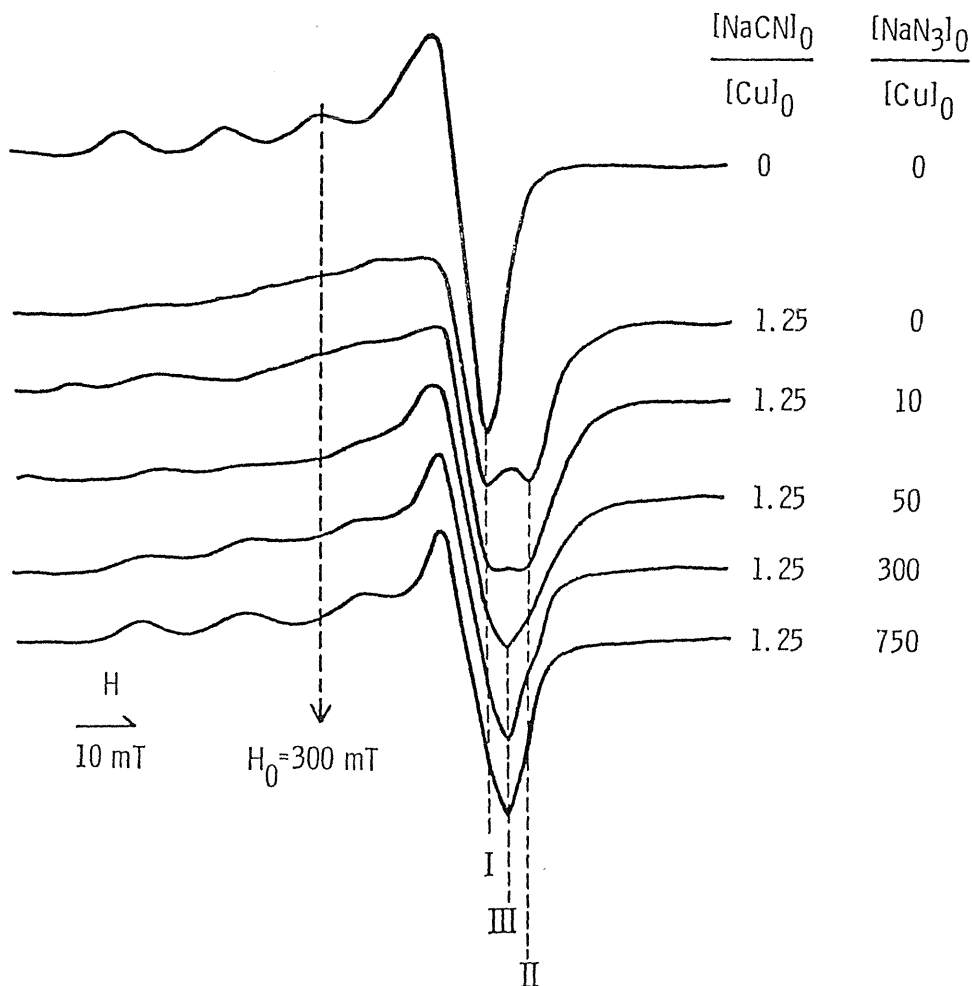


Fig. III-10. EPR titration of  $^{63}\text{Cu}$ -dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase- $\text{CN}^-$  (1:1) complex with  $\text{NaN}_3$ .

Enzyme solution: protein concentration  $4.17 \times 10^{-2}$  mM,  $[\text{Cu}]_0$   $1.83 \times 10^{-1}$  mM, potassium phosphate buffer 200 mM, pH 7.0. Titration with  $\text{NaN}_3$  was performed as described under Experimental Procedure except for the use of enzyme solution containing NaCN in the ratio of 1.25 for  $[\text{NaCN}]_0/[\text{Cu}]_0$ . EPR spectra were recorded at  $-150^\circ\text{C}$  as described under Experimental Procedure.

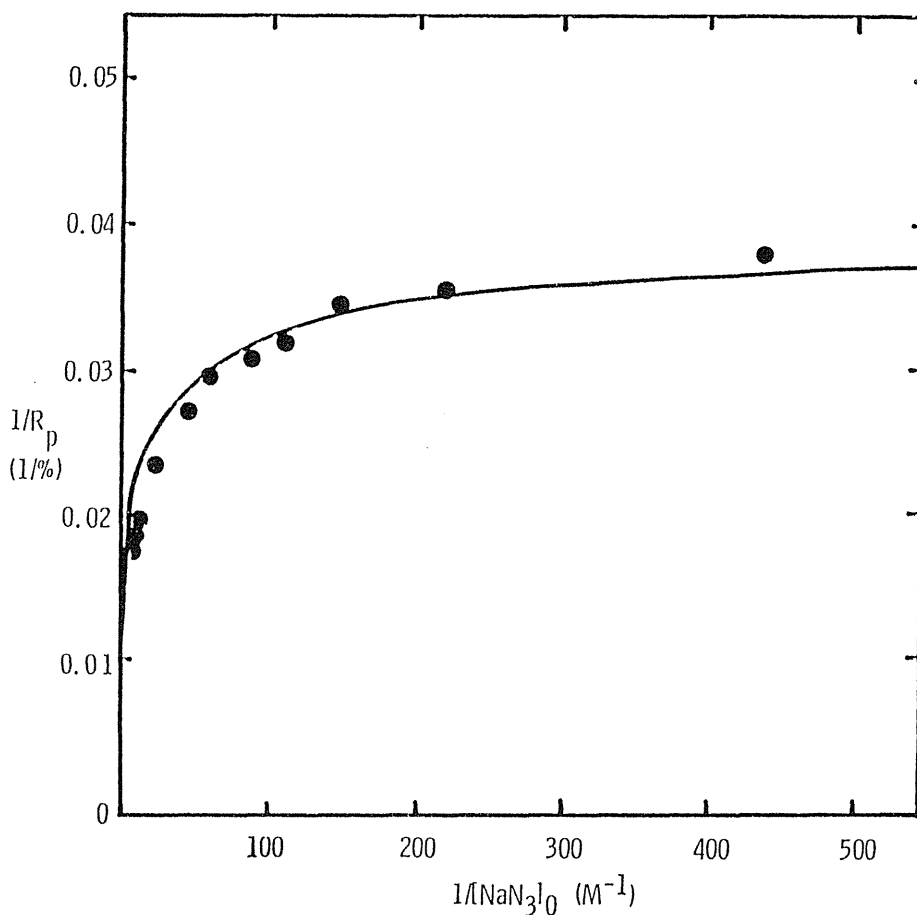


Fig. III-11. Correlation between the reciprocal of paramagnetic reduction  $1/R_p$  and the reciprocal of  $[\text{NaN}_3]_0$  in the titration of  $^{63}\text{Cu}$ -dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase solution containing NaCN with  $\text{NaN}_3$

Closed circles: experimental points. Solid line: theoretical curve based on Eq. (15). Enzyme solution: protein concentration  $4.86 \times 10^{-2}$  mM,  $[\text{}^{63}\text{Cu}]_0$   $2.29 \times 10^{-1}$  mM,  $[\text{NaCN}]_0/[\text{Cu}]_0$  1.0, potassium phosphate buffer 200 mM, pH 7.0. Titration with  $\text{NaN}_3$  were performed as described under Experimental Procedure except for the use of enzyme solution containing NaCN in the above ratio to  $[\text{}^{63}\text{Cu}]_0$ .

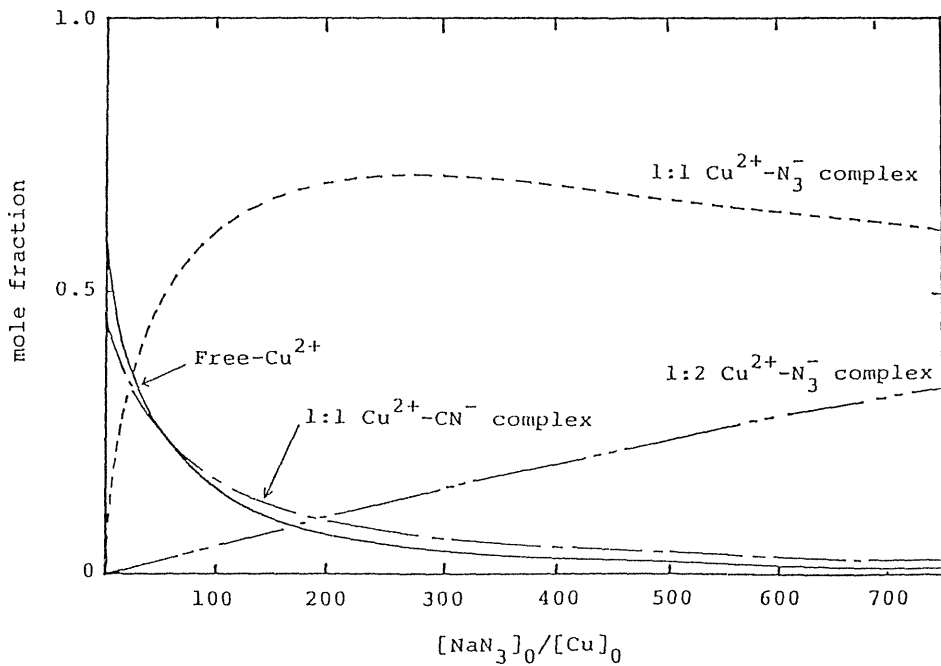


Fig. III-12. Mole fractions of DBM and its complexes with anions:  
 $[\text{NaN}_3]_0/[\text{Cu}]_0$  is changed while  $[\text{NaCN}]_0/[\text{Cu}]_0$  fixed at 1.25.

このように、 $\text{CN}^-$  も  $\text{N}_3^-$  も DBM の 2 価銅の同じ部位の水分子と置き換るとした EPR の結果を支持するものであると共に、前 2 節で得られた緩和速度から求められた各種パラメーターが信頼しうるものであることも示していると考えられる。

### III-5 DBM の活性部位の構造に関する考察

今回、シアニオンとアジドイオンを添加することによる NMR 及び EPR の実験から、DBM の 2 価銅部位にはこれら無機アニオンと交換可能な 2 分子の水の存在が明らかとなった。この結果を最近報告された EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) の研究<sup>27)</sup> から出された DBM の 2 価銅部位に、4 個のヒスチジン残基の窒素原子が平面上に配位しているとされる構造と結びつけると、この 2 分子の水はアクシャル位に配位していることになる。しかしながら、我々の知るかぎりにおいて現在までにこのような 6 配位構造をもつ銅酵素は報告されていない。その EPR スペクトルが DBM と同様なアクシャル対称をもっている銅酵素では、むしろ 5 配位構造をしているものが多く報告されているのである。例えばガラクトースオキシダーゼの銅部位は、テトラゴナルピラミダル構造をしており 2 分子の水は、アピカル位と面内にそれぞれ配位しているとされている。<sup>70)</sup> 又、ブタ血清アミノキシダーゼも 2 分子の水を含む 5 配位構造をしているという報告がある。<sup>71)</sup> さらに、スーパーオキシドディスムターゼにおいても銅部位の周りには 4 つのヒスチジン残基があり、1 分子の水を含む 5 配位構造が報告されている<sup>72)</sup>。それでは DBM の活性中心は本当に EXAFS のデータと 2 分子の水の存在から導かれる様な 6 配位構造をとっているのだろうか。この点について今回 DBM について得られた緩和速度実験及び EPR データの結果をもとに考察を加えてみたい。

まず EPR パラメーターである  $g_{\parallel}$  の値は、無機アニオンがアクシャル位に配位する場合と、面内に配位する場合とでどのように変化するかを考えると、もしアクシャル位にその置換が起こるとすれば  $g_{\parallel}$  の値は増加し、面内にその置換が起こるとすれば逆に  $g_{\parallel}$  の値は減少するとされている。<sup>73, 78)</sup> 又、四面体型錯体においてはその面の歪みが減少し、より面内が安定化されることによっても  $g_{\parallel}$  の値が減少するということが報告されている。<sup>75)</sup> よって今回の実験でみられたシアン錯体及びアジド錯体での  $g_{\parallel}$  の減少は、アクシャル位の水とそれら無機アニオンが置き換ったことによって生じたものではなく、むしろ面内の水と置換が起こることにより、よりその面内が安定化されることによって生じたものと考えた方が妥当であると思われる。実際に、ブタ血清アミノキシダーゼにおいては 2 価銅部位の面内の水と、シアニオンやアジドイオンが置き換ることによる  $g_{\parallel}$  の減少が観測されており、<sup>80, 82)</sup> そしてそれは、面内に配位した水分子とそれら無機アニオンが置き換ることによって面内配位の強さが増し、アクシャル位の配位能が低下するために生じると説明されている。表 III-4 には、他の 5 配位構造をとる銅酵素のシアン及びアジドイオンを添加することによって生じる EPR パラメーターの変化を、今回の DBM のデータと対比させて掲載した。

Table III-4. Comparison of EPR parameters for  $\text{CN}^-$  and  $\text{N}_3^-$  complexes of copper proteins

	$g_{//}$			$A_{//}$ (mT)		
	Native	$\text{CN}^-$	$\text{N}_3^-$	Native	$\text{CN}^-$	$\text{N}_3^-$
Superoxide dismutase	2.265	2.210	----	13.0	18.6	----
Benzylamine oxidase	2.286	2.218	2.250	15.5	15.8	16.7
Galactose oxidase	2.276	2.229	2.253	17.7	15.8	17.6
Dopamine $\beta$ -mono-oxygenase	2.273	2.218	2.242	16.6	17.0	15.8

以上今回の実験データからは DBM の活性部位の構造として、水 2 分子がアクシャル位に配位した構造よりもむしろ、水分子の一方がアクシャル位にもう一方が面内に配位した構造をとるとした方が考えやすく、無機アニオンは面内の水分子と優先的に置き換えることによって個々のパラメーターの変化を生じたものと思われる。しかしながら、この結論は無機アニオンが配位してできた錯体の構造から考えられるものであり、スーパーオキシドディスムターゼにおいていわれている *trans* rearrangement のような、無機アニオンが一度アクシャル位に配位した後、面内に移るという可能性は残されている。<sup>79)</sup>

無機アニオンの配位した銅錯体の固有の常磁性緩和速度の減少分  $R_p^1$ ,  $R_p^2$  の値は、pH 5.5 と 7.0 でほとんど変化しないことから、その pH 間では DBM の銅(II)部位の基本的な構造は変化しないと考えられる。このことは両 pH で、銅(II)-配位水間の距離がほとんど変化しないことから支持される。しかしながら、錯体生成定数  $K_b$  値が常に pH 7.0 より pH 5.5 において大きい事実はどのように説明されるであろうか。従来から DBM のコンホメーション変化の引き金として考えられているヒスチジン残基の pKa 値は 6.2 であり、今回の実験の pH 5.5 と pH 7.0 の中間にあることからこの両 pH 間で生じる  $K_b$  値の変化は、活性部位の基本構造を変えることなしに、その回りのタンパク部分の構造変化によって誘発されたものと考えざるを得ないが、この点については尚検討を重ねるべきものと思われる。

### III-6 まとめ

DBMの阻害剤であるシアニオン( $\text{CN}^-$ )とアジドイオン( $\text{N}_3^-$ )を用い、それらと配位水との相互作用を磁気共鳴法により検討した結果、核磁気緩和の観測からはアニオンの添加にともない活性中心であるCu(II)のまわりの配位子交換による溶媒水プロトンの常磁性核磁気緩和速度が変化しその効果を平衡論的に解析することによって、アニオン-DBM 1:1及び2:1錯体の固有の常磁性緩和速度の減少分 $R_p^1$ ,  $R_p^2$ とそれらの錯体生成定数 $K_b^1$ ,  $K_b^2$ を決定することができた。 $R_p^1$ 値は $\text{CN}^-$ で53(pH 5.5), 52(pH 7.0),  $\text{N}_3^-$ で38(pH 5.5), 32(pH 7.0)を示し、 $R_p^2$ 値は $\text{N}_3^-$ において98(pH 5.5), 96(pH 7.0)を示した。この $R_p^1$ と $R_p^2$ との値を検討することによって、DBMのCu(II)部位にはこれら無機アニオンと交換可能な2分子の水の存在が明らかとなった。一方、EPRスペクトルのアニオン添加による変化の追跡から $\text{CN}^-$ -DBM(1:1)錯体とNative-DBMとが等量ずつ存在する系が同定され、その $R_p$ 値が23%を示したことから $\text{CN}^-$ -DBM(1:1)錯体の $R_p^1$ 値を考慮して、やはり2分子の配位水の存在が妥当化されることを確認した。

次に $K_b^1$ ,  $K_b^2$ の値はpH 5.5において常にpH 7.0よりも小さな値を示し、 $\text{CN}^-$ ,  $\text{N}_3^-$ ともDBMに対する親和性がpH 5.5の方が高くなっていることがわかった。一方、 $\text{N}_3^-$ において決定した $K_b^1$ 値は $K_b^2$ 値に比べて約100倍小さくなっており、2番目の配位水の置換は極めて困難な過程であることが明らかとなった。

さらに、 $\text{CN}^-$ と $\text{N}_3^-$ による競合実験のEPRスペクトル変化の解析と水プロトンの常磁性核磁気緩和速度変化の競合系での平衡論的解析より、 $\text{CN}^-$ も $\text{N}_3^-$ もDBMの同じCu(II)サイトの配位水と置換していることも確認された。

以上の錯体結合定数の値、アニオン結合サイトの情報と共に、EPR測定によって得られる錯体構造に関する各種パラメーターの値をもとにDBMのCu(II)まわりの可能な構造について推定を加えた。



## IV DBM の無機アニオンによる阻害反応 の平衡論的解析

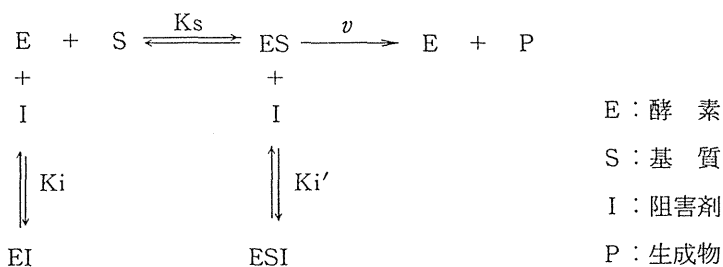
### IV-1 緒 言

第Ⅲ章においてシアニオン及びアジドイオンをプローブとする核磁気緩和及び EPR の測定を通じて、DBM に対する無機アニオンの結合平衡パラメーターが決定されるばかりでなく、DBM の活性部位の構造についても興味あるいくつかの知見が得られることを明らかにした。これらの結合パラメーターや推定された活性部位構造が、実際に DBM の効果的な阻害剤であるシアニオン及びアジドイオンの阻害反応とどのように関連しているかをしらべることは酵素活性部位の構造と反応機構の関係をj知る上に於いて極めて重要である。

本章では上述の観点からシアニオン及びアジドイオンによる DBM の阻害反応を Lineweaver-Burk プロット (L. Bプロット) を用いて解析し、阻害反応型、阻害反応パラメーターを決定し、これらの結果を第Ⅲ章で得られた知見と比較考察した。

### IV-2 酵素阻害反応の平衡論的解析

一般に阻害剤共存下での酵素反応は、1 基質 1 阻害剤の場合次のように簡単に表わすことができる。<sup>84, 85</sup>



$$K_s = [E][S]/[ES] \quad \text{酵素-基質解離定数}$$

$$K_i = [E][I]/[EI] \quad \text{酵素-阻害剤解離定数}$$

$$K_i' = [ES][I]/[ESI] \quad \text{酵素・基質-阻害剤解離定数}$$

上のスキームにおける平衡系とすべてに迅速平衡を仮定すると、生成物 P の生成速度すなわち酵素反応の反応速度  $v$  は  $V_{\max}$  を最大反応速度として次式で表わされる。

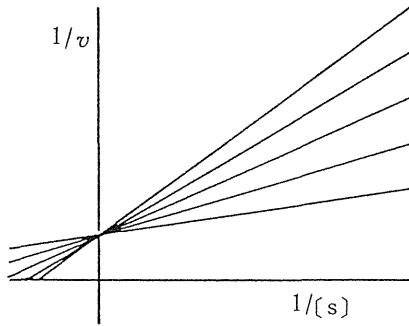
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i'} \right) + \frac{K_s}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} \quad \text{----- (1)}$$

1) 拮抗型阻害 ( $K_i \ll K_i'$ )

$K_i' = \infty$  の場合で(1)式は(2)式のように簡単化される.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_s}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} \quad \text{-----} \quad (2)$$

この場合, IはEとのみ結合し ES 錯体とは結合できない. L. Bプロットは, 種々の [I] に対応する直線群が  $1/v$  軸上の一点で交わる.

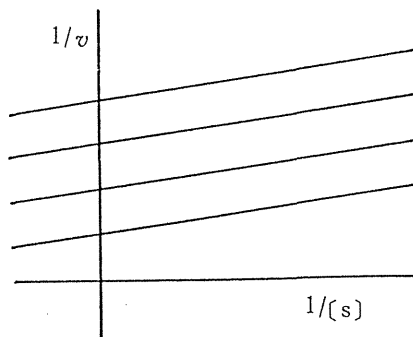


2) 反拮抗型阻害反応 ( $K_i \gg K_i'$ )

$K_i = \infty$  の場合で(1)式は(3)式に簡単化される.

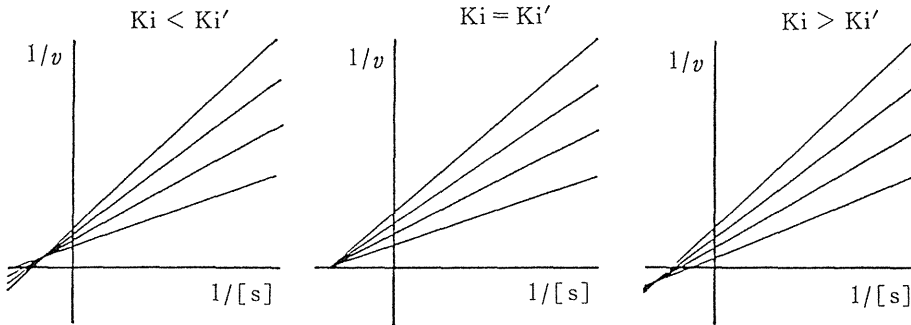
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i'} \right) + \frac{K_s}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} \quad \text{-----} \quad (3)$$

この場合, IはESとのみ結合し E そのものには結合できない. L. Bプロットは種々の I に対応する直線群がすべて平行になる.



3) 混合型阻害反応 ( $K_i > K_i'$ ,  $K_i = K_i'$ ,  $K_i < K_i'$ )

拮抗型阻害 ( $K_i \ll K_i'$ ) と反拮抗型阻害 ( $K_i \gg K_i'$ ) の中間を示す阻害はすべて混合型阻害と呼ぶことができる。  $K_i = K_i'$  となるときは特に、非拮抗型阻害とよばれている。この場合の反応速度  $v$  は(1)式そのもので表わされ、  $K_i$  と  $K_i'$  の大小関係に従い L. Bプロットは次の3つのパターンをとる。



以上いずれの阻害型反応についても阻害定数  $K_i$  および  $K_i'$  は次の手順で容易に求めることができる。すなわち(1)式より明らかな如く、阻害剤濃度  $[I]$  に対して L. Bプロットの傾き  $[\{(1 + [I])/K_i\} K_s/V_{max}]$  をプロットして得られる直線の横軸切片より  $-K_i$  が、また同様に L. Bプロットの縦軸切片  $[\{(1 + [I])/K_i'\}/V_{max}]$  をプロットして得られる直線の横軸切片より  $-K_i'$  が求められる。この方法は L. Bプロットの2次プロット法と呼ばれている。

IV-3 結果

1) 無機アニオンの阻害濃度 ( $\text{NaCN}$  と  $\text{NaN}_3$  の DBM に対する  $IC_{50}$  値の検討)

磁気共鳴による研究に用いた2種のアニオン(シアンイオン( $\text{CN}^-$ )とアジドイオン( $\text{N}_3^-$ ))のアスコルビン酸、チラミン、および酸素の3基質に対する DBM 阻害反応の平衡論的解析を行うために、まず pH 5.5 と pH 7.0 の両点でそれぞれの阻害剤の阻害濃度域 ( $IC_{50}$ ) をみつかった。阻害反応は II-2 項に記載した反応条件に従い、阻害剤濃度すなわち  $[\text{NaCN}]_0$  および  $[\text{NaN}_3]_0$  を種々かえて行い、反応停止後 II-2 項記載の方法で残存活性の測定を行った。結果は図 IV-1 に示す通りである。

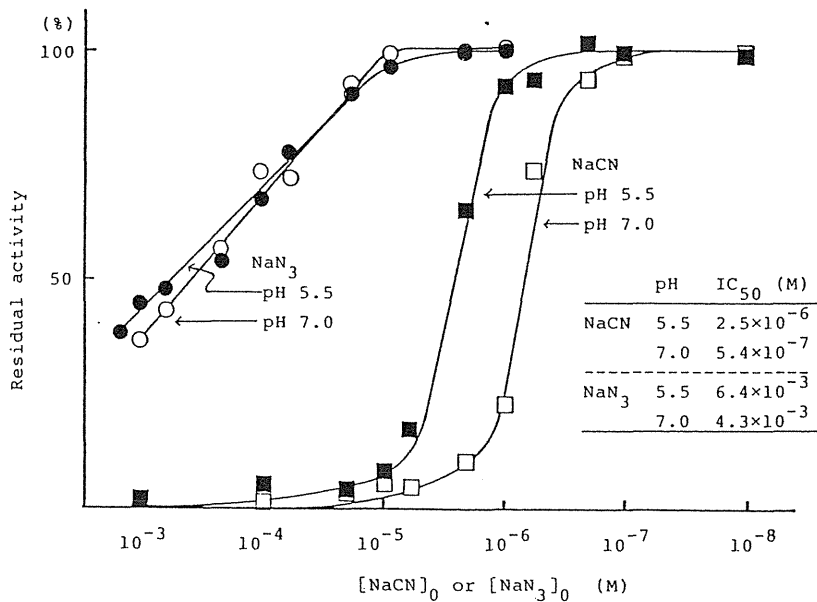


Fig. IV-1. Residual DBM activity as function of inhibitor-anions concentration at pH 5.5 and pH 7.0.

図より明らかな通り NaCN の IC<sub>50</sub> 値は溶液の pH によって大きく異なり、pH 5.5 で  $2.5 \times 10^{-6}$  M、pH 7.0 で  $5.4 \times 10^{-7}$  M と pH 7.0 でその阻害効果が大きくなっているように見える。一方 NaN<sub>3</sub> の IC<sub>50</sub> 値は、pH 5.5 で  $6.4 \times 10^{-3}$  M、pH 7.0 で  $4.3 \times 10^{-3}$  M とほぼ同じ値を示した。しかしながらこれら阻害剤のアニオン濃度は pH に依存して大きく変化する（第 III 章 3 節参照）ので、これら阻害剤と DBM との真の阻害定数を求める場合には、それぞれの pH における阻害剤の解離平衡を考慮する必要がある。

## 2) 無機アニオンによる阻害型の検討

NaCN 及び NaN<sub>3</sub> の両 pH での阻害効果の値を参考にして、CN<sup>-</sup> 及び N<sub>3</sub><sup>-</sup> の DBM に対する阻害型を検討するために、アスコルビン酸、チラミン、及び酸素の 3 基質のそれぞれに対する無機アニオンの阻害反応を、Lineweaver-Burk (L. B) プロットによって解析した。反応は pH 5.5 と pH 7.0 の MES 緩衝液中で行い、その際 [I] の選択には前節で求めた IC<sub>50</sub> 値を参考にした。阻害定数 (K<sub>i</sub>, K<sub>i</sub>') の決定には前述の 2 次プロットを利用したが、阻害剤濃度すなわち [NaCN]<sub>0</sub> 及び [NaN<sub>3</sub>]<sub>0</sub> に対して得られたこれらの値は、阻害剤の解離平衡を考慮して実効アニオン濃度に対する値に校正した。

(a) アスコルビン酸に対する無機アニオンの阻害反応

チラミン濃度(10mM)を一定に保ち、アスコルビン酸濃度を0.33~10mMまで変化させ、大気圧開放系に所定量のNaCNまたはNaN<sub>3</sub>を加えて阻害反応のL.Bプロットを求めた。その他の反応溶液組成及び反応条件はII-2項に記載した通りである。NaCNの場合を図IV-2 (pH 5.5)および図IV-3 (pH 7.0)に、NaN<sub>3</sub>の場合を図IV-4 (pH 5.5)および図IV-5 (pH 7.0)に示す。

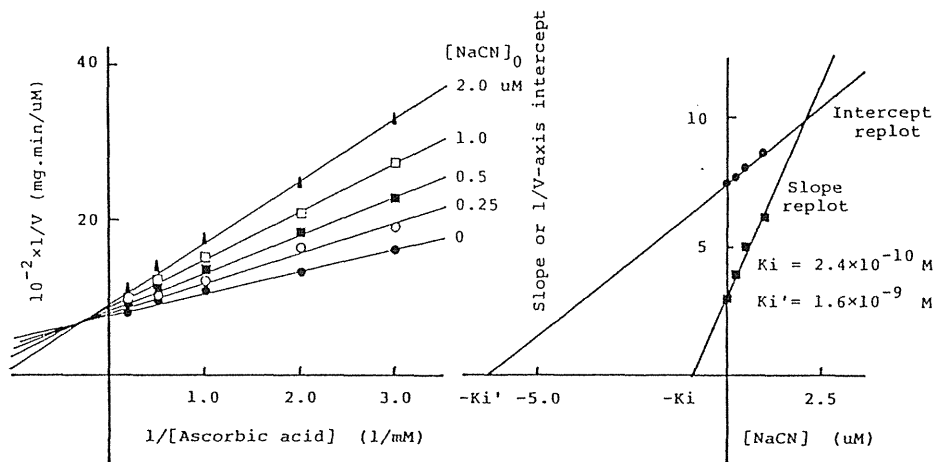


Fig. IV-2. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by NaCN with tyramine saturating (10 mM) and ascorbic acid as variable substrate and replots of slope and  $1/V$ -axis intercept of L-B plots versus NaCN concentration at pH 5.5.

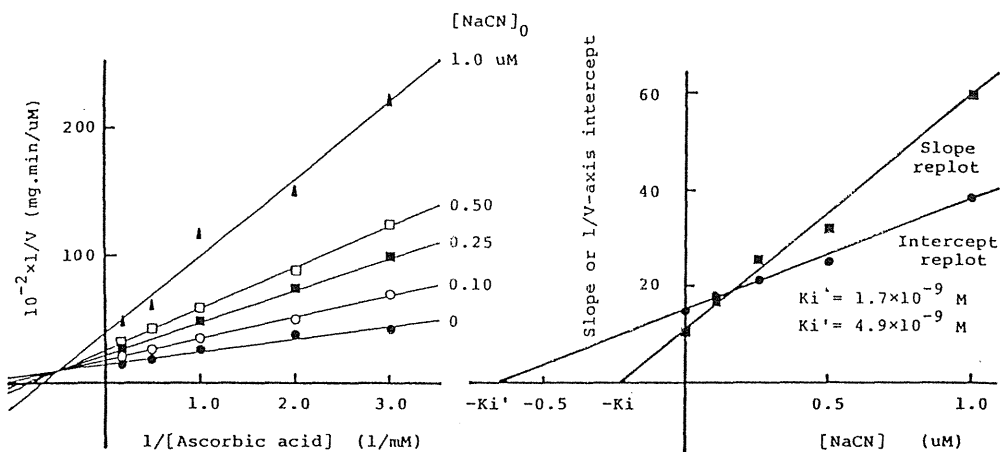


Fig. IV-3. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by NaCN with tyramine saturating (1.0 mM) and ascorbic acid as variable substrate and replots of slope and  $1/V$ -axis intercept of L-B plots versus NaCN concentration at pH 7.0.

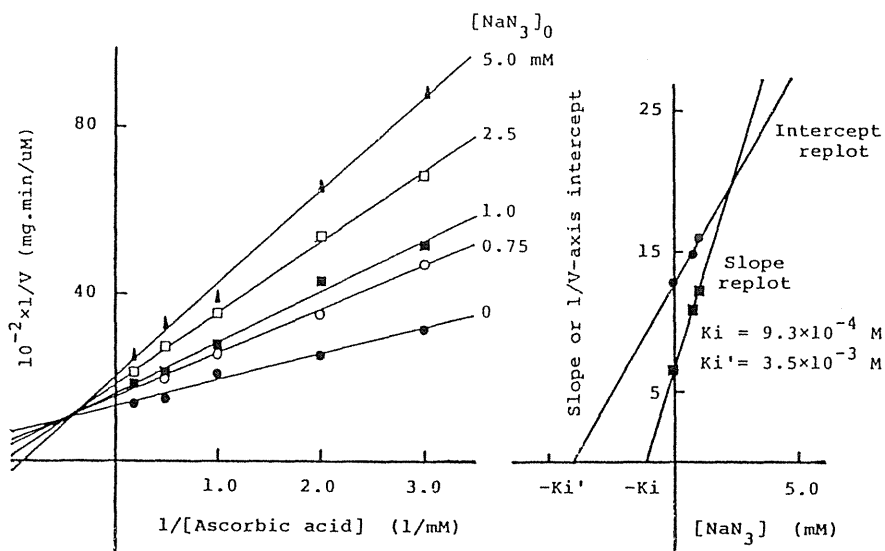


Fig. IV-4. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by  $\text{NaN}_3$  with tyramine saturating (1.0 mM) and ascorbic acid as variable substrate and replots of slope and  $1/v$ -axis intercept of L-B plots versus  $\text{NaN}_3$  concentration at pH 5.5.

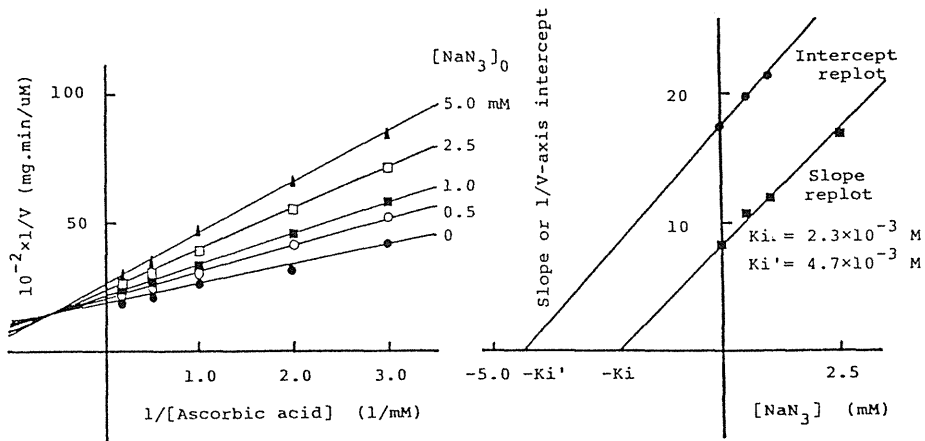


Fig. IV-5. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by  $\text{NaN}_3$  with tyramine saturating (10mM) and ascorbic acid as variable substrate and replots of slope and 1/V-axis intercept of L-B plots versus  $\text{NaN}_3$  concentration at pH 7.0.

これらの図より明らかな通り、アスコルビン酸基質に対しては  $\text{NaCN}$ ,  $\text{NaN}_3$  いずれの場合も両 pH において、L. B プロットの直線群が第 2 象限で交わる拮抗性の強い混合型を示した。2 次プロットから解離平衡補正をして求めた阻害定数  $K_i$  と  $K_i'$  を図中に示した。

(b) チラミンに対する無機アニオンの阻害作用

アスコルビン酸濃度 (10mM) を一定に保ち、大気圧開放系でチラミン濃度を 0.5~10mM まで変化させた系に、所定量の  $\text{NaCN}$  または  $\text{NaN}_3$  を加えて阻害反応の L. B プロットを求めた。その他の反応溶液組成及び反応条件は II-2 項に記載した通りである。  $\text{NaCN}$  の場合を図 IV-6 (pH 5.5) および図 IV-7 に、  $\text{NaN}_3$  の場合を図 IV-8 (pH 5.5) および図 IV-9 (pH 7.0) に示す。

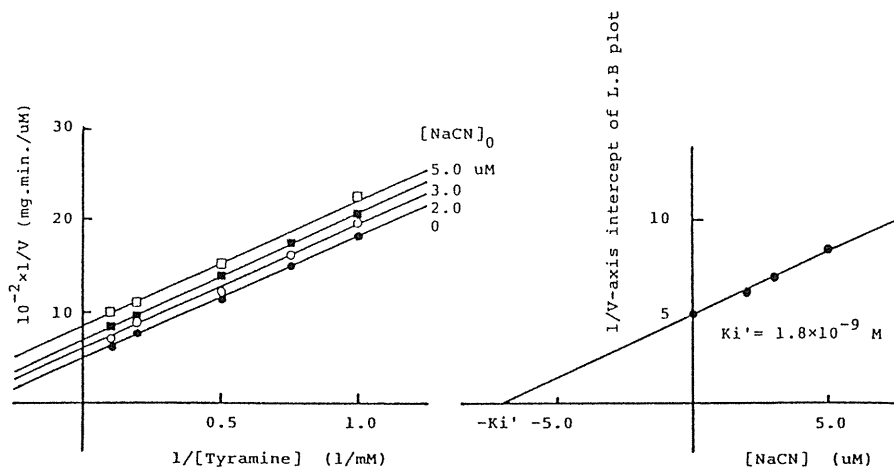


Fig. IV-6. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by NaCN with ascorbic acid saturating (10 mM) and tyramine as variable substrate and replots of  $1/V$ -axis intercept of L-B plots versus NaCN concentration at pH 5.5.

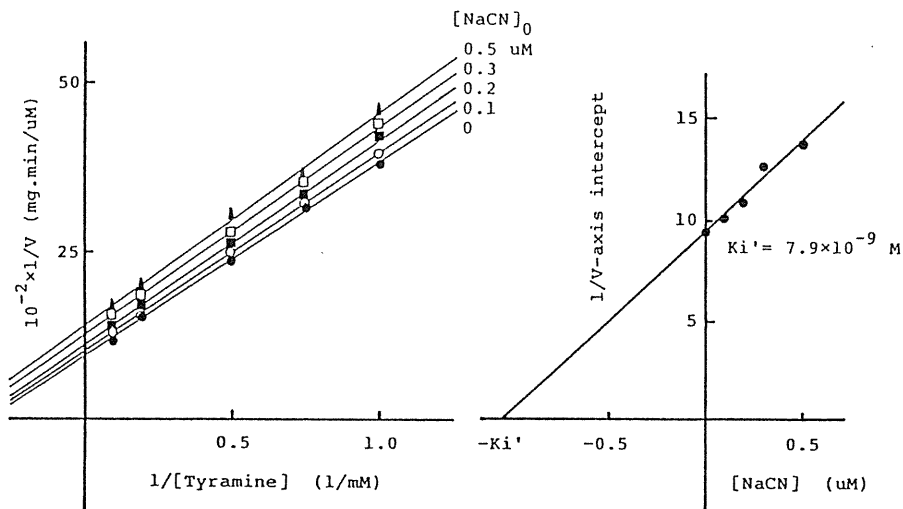


Fig. IV-7. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by NaCN with ascorbic acid saturating (10 mM) and tyramine as variable substrate and replots of  $1/V$ -axis intercept of L-B plots versus NaCN concentration at pH 7.0.



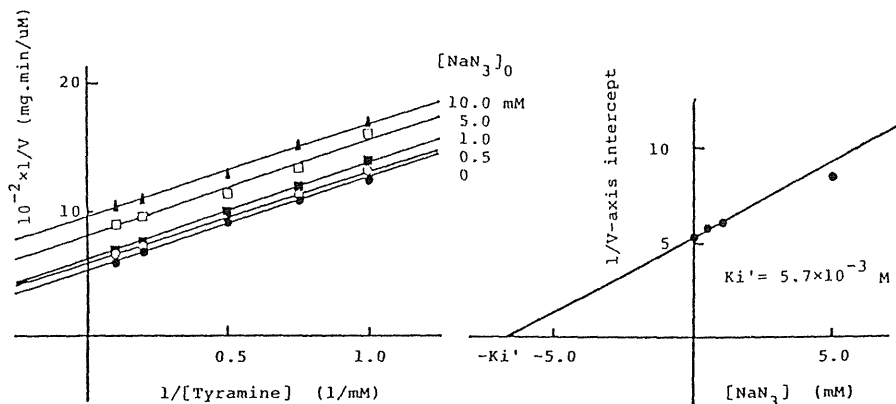


Fig. IV-8. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by  $\text{NaN}_3$  with ascorbic acid saturating (10 mM) and tyramine as variable substrate and replots of  $1/V$ -axis intercept of L-B plots versus  $\text{NaN}_3$  concentration at pH 5.5.

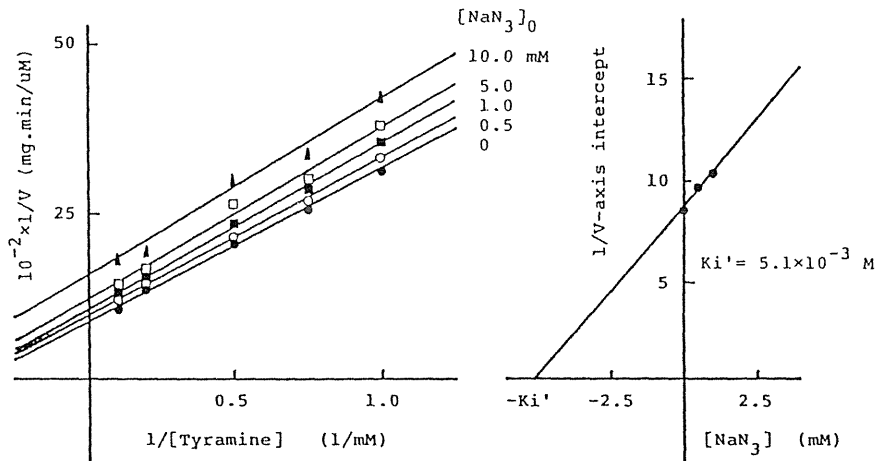


Fig. IV-9. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by  $\text{NaN}_3$  with ascorbic acid saturating (10 mM) and tyramine as variable substrate and replots of  $1/V$ -axis intercept of L-B plots versus  $\text{NaN}_3$  concentration at pH 7.0.

これらの図より明らかな通り、チラミン基質に対しては NaCN,  $\text{NaN}_3$  いずれの場合も典型的な反拮抗型阻害を示した。両 pH において阻害型が共通している点は、アスコルビン酸基質の場合と同様である。補正された反拮抗阻害定数  $K_i'$  はそれぞれ図中に示した通りである。

(c) 酸素に対する無機アニオンの阻害作用

アスコルビン酸濃度 (10mM) チラミン濃度 (10mM) を一定に保ち、密閉条件 (II-2 参照) で酸素濃度を 0.0422mM~0.3175mM まで変化させた系に所定量の NaCN または  $\text{NaN}_3$  を加えて阻害反応の L. B プロットを求めた。その他の反応溶液組成及び反応条件は II-2 項に記載した通りである。NaCN の場合を図 IV-10 (pH 5.5) および図 IV-11 (pH 7.0) に、 $\text{NaN}_3$  の場合を図 IV-12 (pH 5.5) および図 IV-13 (pH 7.0) に示す。

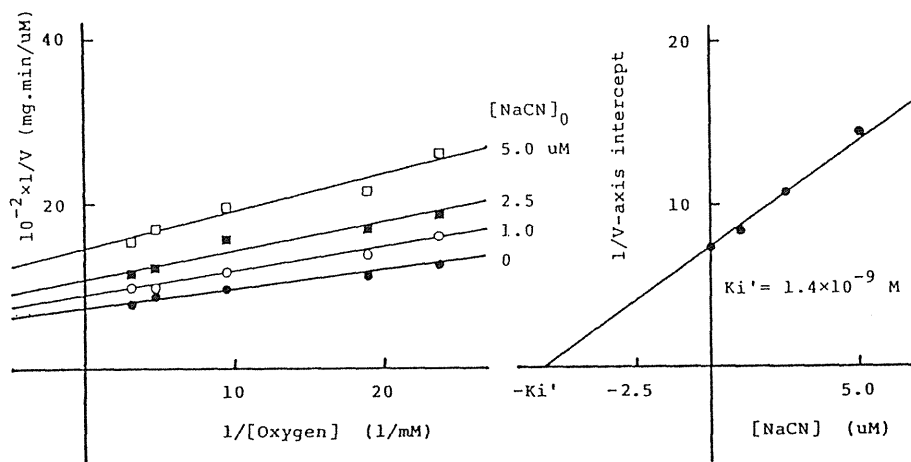


Fig. IV-10. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by NaCN with tyramine (10 mM) and ascorbic acid (10 mM) saturating and oxygen as variable substrate and replots of  $1/V$ -axis intercept of L-B plots versus NaCN concentration at pH 5.5.

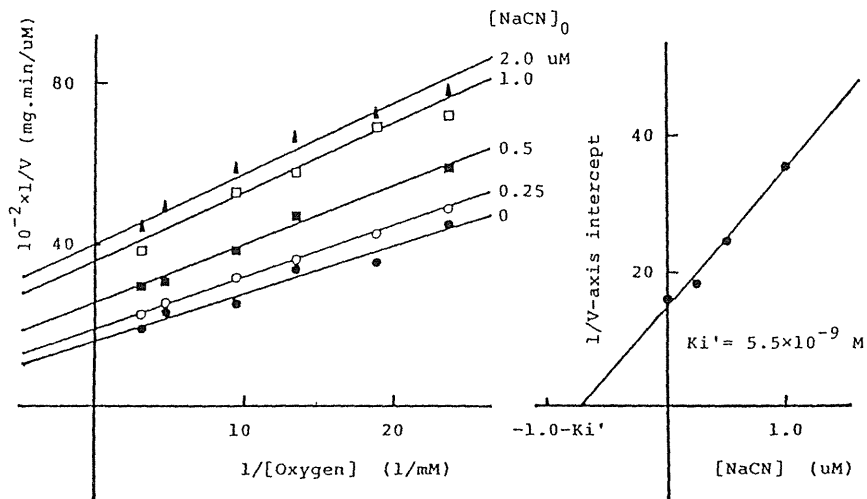


Fig. IV-11. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by NaCN with tyramine (10 mM) and ascorbic acid (10 mM) saturating and oxygen as variable substrate and replots of  $1/V$ -axis intercept of L-B plots versus NaCN concentration at pH 7.0.

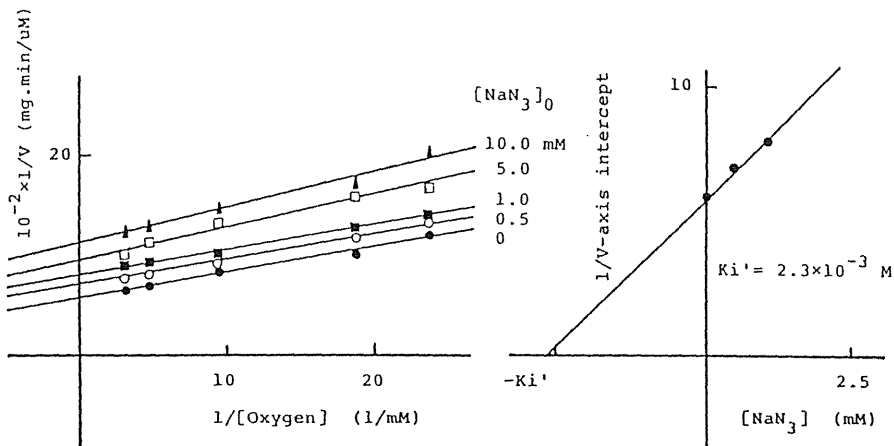


Fig. IV-12. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by  $\text{NaN}_3$  with tyramine (10 mM) and ascorbic acid (10 mM) saturating and oxygen as variable substrate and replots of  $1/V$ -axis intercept of L-B plots versus  $\text{NaN}_3$  concentration at pH 5.5.

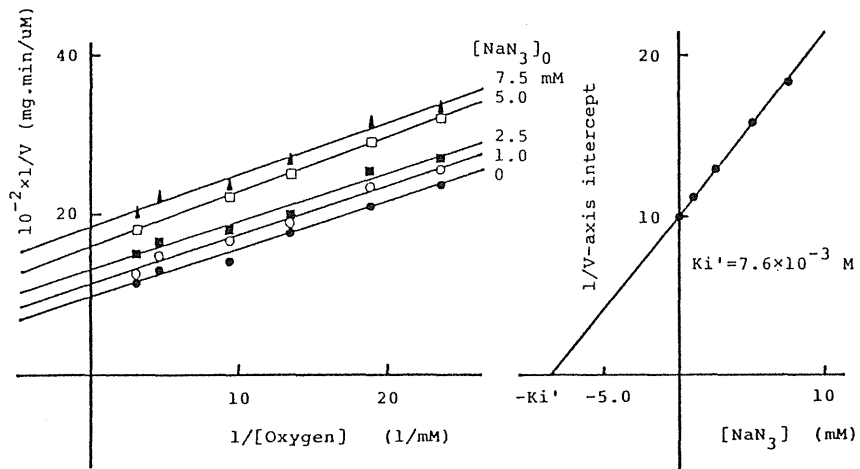


Fig. IV-13. L-B plots of inhibition of dopamine  $\beta$ -mono-oxygenase by  $\text{NaN}_3$  with tyramine (1.0 mM) and ascorbic acid (1.0 mM) saturating and oxygen as variable substrate and replots of 1/V-axis intercept of L-B plots versus  $\text{NaN}_3$  concentration at pH 7.0.

これらの図より明らかな通り、酸素基質に対しても両阻害剤は反拮抗型阻害を示し、しかも阻害型は両 pH において変化していない。2次プロットによる補正  $K_i'$  値がそれぞれ図中に示されている。

#### IV-4 無機アニオンによる DBM の阻害機作についての考察

以上、無機アニオンによる DBM の阻害反応の解析より得られた結果を表IV-1 にまとめて示す。

まず阻害型式についてみると、pH の変化にかかわらず  $\text{CN}^-$ 、 $\text{N}_3^-$  とともにアスコルビン酸に対しては拮抗性の強い混合型阻害を、チラミンに対しては反拮抗阻害を、そして酸素に対しても反拮抗阻害を示した。この両アニオンによる DBM の阻害反応については Blackburn<sup>72)</sup> が酢酸緩衝液、pH5.0 でのアスコルビン酸およびチラミンに対する結果を報告しているが、その結果ともよく一致している。この pH による阻害形式の不変性は、磁気緩和速度の研究から結論されたように、pH の変化によって DBM の活性中心銅の基本構造が変化しないという事実に対応していると考えられる。さらに両アニオンの阻害形式が同じであったことは、NMR や EPR による両アニオンの競合実験から確かめられた様に、 $\text{CN}^-$  と  $\text{N}_3^-$  が DBM の同じ銅サイトに配位した水分子と置き換えるという結論によく対応しており、Cu(II) に対するアニオンの置換反応が DBM の阻害反応に大きな役割をもつことをうかがわせるものである。

次に両 pH における  $K_s$  値及び阻害定数 ( $K_i$ ,  $K_i'$ ) 値を比較すると、まず  $K_s$  値はいずれの

Table IV-1. Inhibition types and constants (M) from L-B plots

		Ascorbic acid	Tyramine	Oxygen	
$\text{CN}^-$	5.5	Mixed	Un	Un	
		$K_i$	$2.4 \times 10^{-10}$	—	—
	7.0	$K_i'$	$1.6 \times 10^{-9}$	$1.8 \times 10^{-9}$	$1.4 \times 10^{-9}$
		Mixed	Un	Un	
		$K_i$	$1.7 \times 10^{-9}$	—	—
		$K_i'$	$4.9 \times 10^{-9}$	$7.9 \times 10^{-9}$	$5.5 \times 10^{-9}$
$\text{N}_3^-$	5.5	Mixed	Un	Un	
		$K_i$	$9.3 \times 10^{-4}$	—	—
	7.0	$K_i'$	$3.5 \times 10^{-3}$	$5.7 \times 10^{-3}$	$2.3 \times 10^{-3}$
		Mixed	Un	Un	
		$K_i$	$2.3 \times 10^{-3}$	—	—
		$K_i'$	$4.7 \times 10^{-3}$	$5.1 \times 10^{-3}$	$7.6 \times 10^{-3}$
5.5	$K_s$	$4.5 \times 10^{-4}$	$2.0 \times 10^{-3}$	$3.7 \times 10^{-5}$	
7.0	$K_s$	$5.4 \times 10^{-4}$	$2.9 \times 10^{-3}$	$6.7 \times 10^{-5}$	
Mixed: Mixed-type inhibition					
Un: Un-competitive inhibition					

基質についても pH 7.0 より pH 5.5 において小さくなっており、pH 5.5 で基質と DBM との親和性が増加していることを示している。さらに両アニオンの阻害定数 ( $K_i$ ,  $K_i'$ ) 値も同様な傾向を示し、阻害剤アニオンの DBM に対する親和性も pH 5.5 において高くなっていることを示している。この傾向は先の水プロトンの常磁性緩和速度の平衡論的解析から得られた各無機アニオン-DBM 錯体の生成定数 ( $K_b$ ) 値が、pH 5.5 における方が pH 7.0 よりも大であることに対応しており、これら両アニオンの DBM 2 価銅に対する親和性の pH による差異が、over all の反応においても認められることを示したもので興味深い結果と考えられる。

尚、 $CN^-$  と  $N_3^-$  の阻害能の強さにはそれらの  $K_i$ ,  $K_i'$  値からも容易に認められるように大きな差異があり、この点に関しては阻害反応機構との関連において次章で検討する。

#### IV-5 ま と め

DBM の  $CN^-$  および  $N_3^-$  による pH 5.5 および 7.0 における阻害反応の平衡論的解析を行った結果、 $CN^-$ ,  $N_3^-$  共アスコルビン酸基質に対しては拮抗性の強い混合型阻害を、酸素およびチラミン基質に対してはいずれも反拮抗阻害を示し、しかも阻害型式は両 pH を通じて同じであった。これらの事実は DBM の Cu(II) 部位における  $CN^-$  および  $N_3^-$  の付加サイトが同一であり、pH の変化によって Cu(II) 部位の基本構造は変わらないという先の磁気共鳴からの結論とよく一致した。磁気共鳴からは酸性 pH 域において無機アニオンの DBM への結合定数が増大することを認めたが、阻害反応における  $K_i$ ,  $K_i'$  の値はやはり同様の傾向を示し、Cu(II) 部位の構造が阻害反応全過程を大きく支配することが明らかになった。

## V DBM の活性部位構造と反応機構

### V-1 緒言

第Ⅲ章においては主として核磁気緩和法を用いて DBM の活性部位構造の推定を行い、第Ⅳ章においてはその活性部位構造推定のために利用したシアンイオン及びアジドイオンの DBM 阻害反応の解析を行った。その結果推定した活性部位構造と阻害反応の間には密接な関連のあることが明らかになった。このことは推定活性部位構造により実在性を与えるものであると共に、第Ⅲ章の方法によって得られた各種の結合パラメーターが DBM の反応機構の解釈に充分利用しうるものであることを示唆しているものと考えられる。

本章ではこの観点から、未だ統一の見解の与えられていない DBM の反応機構に関し、第Ⅲ章で得られた結合パラメーターや推定構造を軸としてまず、DBM の酵素反応開始の最初のステップであるとされているアスコルビン酸による DBM 中の 2 価銅の還元反応についての相対立する 2 説、すなわち 2 電子 1 段階還元説と、1 電子 2 段階還元説についてそのいずれが妥当であるかを考察する。一方、本研究で得られた推定活性部位構造が DBM の阻害反応型式に対しどの様な解釈を与えるかについても言及し、阻害反応機構、ひいては DBM の反応機構についての統一的理解への道を探りたい。

### V-2 DBM の酵素反応開始機構

#### —— 2 電子 1 段階還元か 1 電子 2 段階還元か ——

IV-2 に示した酵素反応スキームから明らかな様に、阻害定数  $K_i$  は酵素阻害剤複合体の解離定数である。これは迅速平衡を仮定した酵素の反応速度解析 (Rate Analysis, RA) から導かれたものであり、これを今、 $K_D(RA)$  としよう。一方、この酵素阻害剤複合体の解離定数はすでにⅢ章で示した如く、核磁気緩和 (Nuclear Magnetic Relaxation, NMR) の測定からその逆数である  $K_D$  として求められており、今これを  $K_D(NMR)$  と表わし、pH 5.5 と pH 7.0 における  $K_D(NMR)$  と  $K_D(RA)$  の値を  $CN^-$  および  $N_3^-$  につき対比して示すと表 V-1 のようになる。

まず  $N_3^-$  についてみると、いずれの pH においても  $K_D(NMR)$  と  $K_D(RA)$  はよく一致しており、両者の測定法が間違いなく酵素-阻害剤の解離平衡過程をみていることを示している。ところが、 $CN^-$  の場合は  $K_D(RA)$  は  $K_D(NMR)$  よりいずれの pH においても約 3 桁も小さくなっている。これは  $N_3^-$  における一致のよさから判断しても決して両方法の実験誤

Table V-1. Comparison of values of the dissociation constant for inhibitor-enzyme complexes

Inhibitor	pH	$K_D$ (NMR) (M)	$K_D$ (RA) (M)
$CN^-$	5.5	$1.15 \times 10^{-7}$	$2.4 \times 10^{-10}$
	7.0	$1.34 \times 10^{-6}$	$1.7 \times 10^{-9}$
$N_3^-$	5.5	$1.75 \times 10^{-3}$	$9.3 \times 10^{-4}$
	7.0	$5.41 \times 10^{-3}$	$2.3 \times 10^{-3}$

差によるものとは考え難く、むしろ両方法の測定対象に起因する本質的なものを含んでいると考えざるを得ない。すなわち NMR でみている測定対象はあくまで 2 価銅との配位平衡にあるアニオンであるのに対し、RA でみているものはその価数に依存しない銅部位でのアニオンの配位平衡であるということを考慮すると、この小さな  $K_D$ (RA) 値は  $CN^-$  が 2 価銅への配位によってひきおこす阻害過程とは別に、この過程以上に効率的な第 2 の阻害過程の存在を意味するものと考えてよい。この第 2 の阻害過程とは何か、以下この事実を DBM の酵素反応開始過程に関する 2 つの相対立する機構に照らし合わせて考察しよう。

図 V-1 に示したのはこの相対立する 2 説すなわち、Friedman らによって代表される銅活性部位のアスコルビン酸 ( $AH_2$ ) による 2 電子 1 段階還元機構と、Diliberto らによって提唱されているセミデヒドロアスコルビン酸 ( $AH^{\cdot}$ ) の生成をとまなう 1 電子 2 段階還元機構である。  $Cu^{2+}$  の  $Cu^{1+}$  への還元が 1 段階で終るとする Friedman モデルは全く第 2 の阻害過程を必要としない所から先の実事を説明し得ないのに反し、2 段階の還元過程の存在を要求

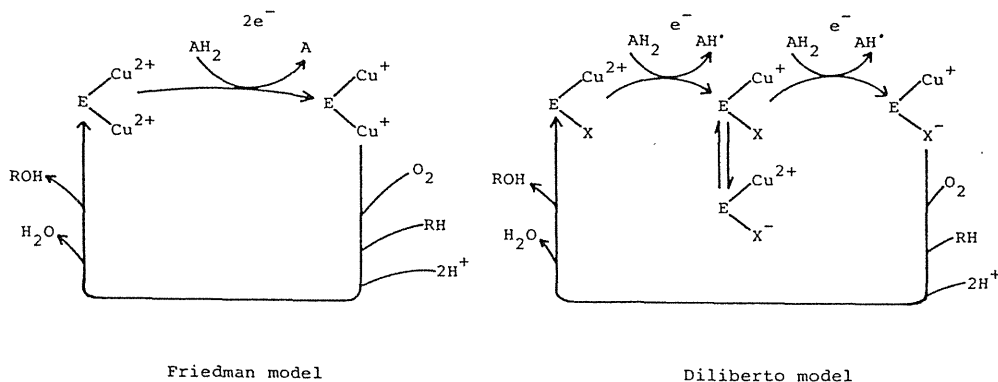


Fig. V-1. Previous studies on reaction mechanisms of DBM



する Diliberto モデルは先の事実とよく符合する。すなわち NMR でみられる  $\text{CN}^-$  の  $\text{Cu}^{2+}$  への配位過程は Diliberto モデルの最初の還元過程でおこりうるものであり、RA でみられた効率の高い第2の阻害過程は Diliberto モデルの2段階目の還元過程に対応するものと考えることができる。 $\text{CN}^-$  が2価銅よりは1価銅と極めて安定な錯体を形成する<sup>82)</sup> という一般の傾向を考慮すれば、Diliberto モデルにおける第2の還元過程が効率の高い阻害過程を形成することもよく説明できるのである。

以上の考察から明らかな通り、 $\text{CN}^-$ -DBM 複合体について得られた2種の解離定数  $K_D$  (NMR) と  $K_D$ (RA) の差異は、DBM の酵素反応開始過程の2段階還元説を妥当とするものであることが明らかになった。 $\text{N}_3^-$ -DBM 錯体については2種の解離定数は同一であり、これは2段階還元過程における生成錯体の安定性が同程度あるいは第1段階の方が高いことによるものと思われる。

### V-3 推定活性部位構造による阻害反応の解釈

前節において緩和時間の測定より得た DBM- $\text{CN}^-$  複合体の解離定数  $K_D$ (NMR) と阻害反応の平衡論的解析より得た同じ複合体の  $K_D$ (RA) とを比較することによって、DBM 中の2価銅のアスコルビン酸による還元過程は1電子による2段階反応で進行していることを明らかにした。

一方前章において  $\text{CN}^-$  および  $\text{N}_3^-$  の阻害反応型式がやはり磁気共鳴の研究(第III章)より推定される活性部位の基本的構造と矛盾しないことを指摘した。本節ではより具体的に2分子の配位水をもつ銅(II)中心構造を考え、このモデルが阻害反応の平衡論的解析より得た阻害反応型式をどのように説明しうるかを考察し、DBM の活性部位構造と反応機構の関連をより明らかにすることをこころみたい。

#### 1) 阻害型式

以上の考察を行うに当たり、まず各種阻害剤による阻害型式を次表に再録した。

Table V-2. Inhibition types

Inhibitor	Substrate	Inhibition type
$\text{CN}^-$ ( $\text{N}_3^-$ )	Ascorbic acid (AH)	Mixed ( $K_i < K_i'$ )
	Tyramine (Ty)	Un-competitive
	Oxygen ( $\text{O}_2$ )	Un-competitive

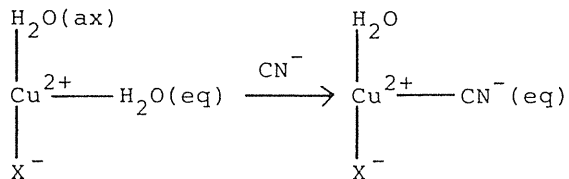
## 2) 活性部位構造モデル

活性部位の Cu(II) まわりは軸対称をもち阻害剤と交換しうる配位水 2 分子のうち一方はエカトリアル (eq) 位に他方はアキシャル (ax) 位にあり, 阻害剤分子又はアニオンは優勢に eq 位に水分子と交換するものとする (第 III 章考察参照).

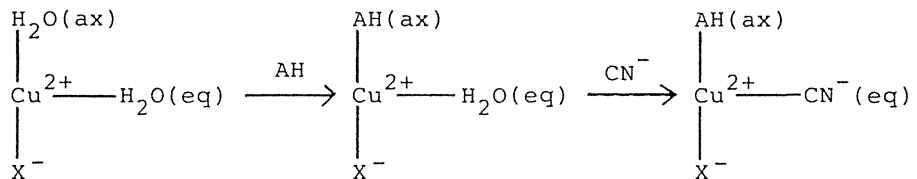
## 3) 各阻害型の解釈

同一阻害型を示すので  $\text{CN}^-$  で代表させて考える.  $\text{CN}^-$  が AH に対し  $K_i < K_i'$  の混合型を示すということは, 拮抗阻害過程 ( $K_i$ ) と反拮抗阻害過程 ( $K_i'$ ) を持つことであり, それぞれについて次のスキームを対応させることができる.

### Competitive inhibition process

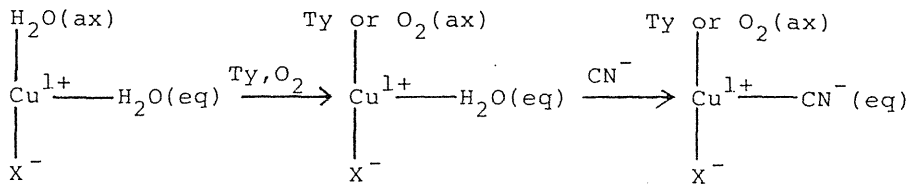


### Un-competitive inhibition process



すなわち拮抗阻害過程では  $\text{CN}^-$  がまず eq 位に入った結果, ax 位の変化がおり AH が入れなくなるものと解釈できる. 勿論 AH が  $\text{CN}^-$  と同じ eq 位を取り合う可能性もないわけではないが, AH は ax 位指向性をもつとした方が後に述べるすべての阻害型を統一的に理解できる. 反拮抗阻害過程では, ES 錯体に I が結合する故, スキームに示した通り, AH がまずその ax 位指向性によって ax 位に入り, この場合 eq 位の構造変化は顕著でなく,  $\text{CN}^-$  が eq 位に入り得て三元錯体が完成する.

次に  $\text{CN}^-$  は Ty 及び  $\text{O}_2$  に対し共に反拮抗であるが, これは次のスキームによって説明可能である.



すなわち Ty 又は O<sub>2</sub> が ax 位指向性をもって ax 位に入るならば、AH における反拮抗阻害過程と同様 CN<sup>-</sup> は eq 位に入り得て三元錯体が生成して反拮抗阻害が成立する。

以上述べたごとく、今後検討すべきいささか仮定的な部分もあるが、推定活性部位構造は CN<sup>-</sup> や N<sub>3</sub><sup>-</sup> の阻害形式を一応合理的に説明してくれることがわかる。このことは活性部位における 2 分子の配位水の存在が、今後 DBM の反応機構をより詳細に統一的に理解する上で極めて重要なカギになるものと思われる。

#### V-4 ま と め

DBM-阻害剤アニオン複合体における核磁気緩和より求めた解離定数 K<sub>d</sub>(NMR) と阻害反応の速度論的解析より求めた解離定数 K<sub>d</sub>(RA) を比較することによって、DBM の酵素反応のアスコルビン酸による還元過程が 1 電子の移動による 2 段階反応であることを明らかにした。更に磁気共鳴より推定された DBM の Cu(II) まわりの構造が無機アニオンによる阻害反応の阻害形式を無理なく説明できることを示した。

## VI 要 旨

DBM に無機アニオンを添加した系における水プロトンの常磁性核磁気緩和速度の平衡論的解析と EPR スペクトルの解析から、DBM の活性中心の銅 (II) のまわりには外から来る配位子と置換しうる 2 分子の配位水が存在し、この配位水の配置は銅 (II) 中心の軸対称場において、一方はエクソリアル位に他方はアキシアル位に存在すると考えることが妥当であることを明らかにした。

一方同じ無機アニオンを添加した系における DBM の阻害反応の平衡論的解析から、これらアニオンによる阻害反応型と阻害定数が決定され、これらを磁気緩和速度から決定された DBM-阻害剤複合体の解離定数と比較検討することによって、DBM の酵素反応における最初のステップである銅 (II) の還元反応が、従来多くの研究者によって支持されていた 2 電子の 1 段階の移動によってではなく、最近 2, 3 の研究者によって提出されているような 1 電子の 2 段階移動によって行なわれていることを明らかにした。

さらに 2 分子の配位水をもつとする活性中心の推定構造は、上記無機アニオンによる阻害反応の全過程を無理なく説明しうることなどから、酵素反応機構と活性部位構造との密接な関連を明らかにした。

## 謝 辞

本研究に際し、御指導御鞭撻を賜りました川面博司教授に感謝致します。

また、磁気共鳴の理論及び実験に御指導御助言を頂きました田中寿夫講師に感謝致します。

また、御指導御助言を頂きました山田紘一助教授、中川弘子博士に感謝致します。

さらに、DBMの精製単離方法に関して種々の御教示を頂きました名古屋大学永津俊治教授に厚く感謝申し上げます。

## References

- 1) G.D.Fasman(ed.), Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd.ed., Protein vol.II, p.276, CRC Press(1976)
- 2) E.Frieden, Metal ions in Biological system vol.13 Marcel Dekker, (1981)
- 3) A.E.G.Cass and H.A.O.Hill, in Copper proteins and copper enzymes, vol.1, CRC Press(1984)
- 4) R.C.Rosenberg, W.Lovenberg, Essays Neurochem., Neuropharmacol., 4, 163(1980)
- 5) E.P.Clater, S.Zaremba, Hogue-Angeletti, R.A., Arch.Biochem.Biophys., 211, 288(1981)
- 6) E.Y.Levin, B.Levenberg, S.Kaufman. J.Biol.Chem., 235, 2080(1960)
- 7) S.Friedman, S.Kaufman, J.Biol.Chem., 240, 4763(1965)
- 8) S.Kaufman, W.F.Bridgers, F.Eisenberg, S.Friedman, Biochem.Biophys. Res. Commun., 9, 497(1962)
- 9) J.E.Carine, G.H.Daniels, S.Kaufman, J.Biol.Chem., 248, 7838(1973)
- 10) D.Geissler, A.Martinek, R.U.Margolis, R.K.Margolis, J.A.Skrivanek, R.Ledeen, P.Konig, H.Winkler, Neuroscience, 2, 685(1977)
- 11) E.F.Wallace, M.J.Krantz. W.Lovenberg, Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 70, 2253(1973)
- 12) A.Saxena, R.Hensley, J.C.Osborne, Jr and P.J.Fleming, J.Biol.Chem., 260, 3386(1985)
- 13) T.Ljones, T.Skotland, T.Flatmark, Eur.J.Biochem., 61, 525(1977)
- 14) G.A.Walker, H.Kon, W.Lovenberg, Biochim.Biophys.Acta, 482, 309(1977)
- 15) T.Skotland, T.Flatmark. Eur.J.Biochem., 132, 171(1983)
- 16) C.S.R.Gaustad, K.Schroder, T.Ljones, J.Inorg.Chem., 26, 63(1986)
- 17) D.E.Ash, N.J.Papadopoulos, G.Colombo, J.J.Villafranca, J.Biol.Chem. 259.3395(1984)
- 18) D.Aunis, M.T.Miras-Portugal, P.Mandel, Biochem.Biophys.Res.Comm., 57, 1192(1974)
- 19) M.Goldstein, T.H.Joh, T.O.Garvey, Biochemistry, 7, 2724(1968)
- 20) N.J.Blackburn, H.S.Mason, P.F.Knowles, Biochem.Biophys.Res.Comm., 95, 1275(1980)
- 21) T.Skotland, T.Ljones, Biochim.Biophys.Acta, 630, 30(1980)
- 22) E.J.Diliberto Jr., D.L.Allen, J.Biol.Chem., 256, 3385(1981)
- 23) W.E.Blumberg, M.Goldstein, E.Lauber, J.Peisach, Biochim, Biophys. Acta, 99, 187(1965)

- 24) M. Goldstein, E. Lauber, M. R. McKereghan, *J. Biol. Chem.*, 240, 2066 (1965)
- 25) S. Friedman, S. Kaufman, *J. Biol. Chem.*, 241, 2256 (1966)
- 26) T. Ljones, T. Flatmark, T. Scotland, *FBSS Lett.*, 92, 81 (1978)
- 27) S. S. Hasnain, G. P. Diakun, P. F. Knoeles, N. Binsted, C. D. Garner, N. J. Blackburn, *Biochem. J.*, 221, 545 (1984)
- 28) P. Palatini, F. Dabbeni-Sala, P. Fintti, *Biochem. International*, 9, 675 (1984)
- 29) P. Palatini, *Biochem. International*, 11, 565 (1985)
- 30) T. Skotland, L. Petersson, D. Bäckström, T. Ljones, T. Flatmark, A. Ehrenberg, *Eur. J. Biochem.*, 103, 5 (1980)
- 31) H. Miyamae, A. Obata, H. Kawazura, *Acta Cryst.*, B38, 292 (1982)
- 32) A. Obata, H. Kawazura, H. Miyamae, *Acta Cryst.*, C40, 45 (1984)
- 33) A. Obata, M. Yoshimori, K. Yamada, H. Kawazura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 58, 437 (1985)
- 34) 島崎健一, 小幡淳雄, 山田紘一, 川面博司, 神経化学 (第27回日本神経化学会大会論文集) 23, p123 (1984)
- 35) A. Foldes, P. L. Jeffrey, B. N. Preston, L. Austin, *Biochem. J.*, 126, 1209 (1972)
- 36) D. Aunis, M. Bounclier, M. Pescheloche, P. Mandel, *J. Neurochem.*, 29, 439 (1977)
- 37) T. Nagatsu, S. Udenfriend, *Clin. Chem.*, 18, 980 (1972)
- 38) T. Nagatsu, P. Thomas, R. Rush, S. Udenfriend, *Anal. Biochem.*, 55, 615 (1973)
- 39) H. Nohta, K. Ohtsubo, K. Zaitzu, Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, 227, 415 (1982)
- 40) K. Fujita, T. Nagatsu, K. Maruta, R. Teradaira, H. Beppu, Y. Tsuji, T. Kato, *Anal. Biochem.*, 82, 130 (1977)
- 41) H. Matsui, T. Kato, C. Yamamoto, K. Fujita, T. Nagatsu, *J. Neurochem.*, 37, 289 (1981)
- 42) Y. Hashimoto, H. Miyazaki, *J. Chromatogr.*, 168, 59 (1979)
- 43) R. A. Rush, P. E. Thomas, S. Udenfriend, *Proc. Natl. Acad. Scie., USA*, 72, 750 (1975)
- 44) T. Kato, H. Kuzuya, T. Nagatsu, *Biochem. Med. Res.*, 10, 320 (1974)
- 45) T. Kato, Y. Wakui, T. Nagatsu, T. Ohnishi, *Biochem. Pharmacol.*, 27, 829 (1978)
- 46) L. Ornstein, B. J. Davis, Disc-electrophoresis, Unpublished work, (Preprinted by Distillation Products Ind. (1962))
- 47) U. K. Laemmli, *Nature*, 227, 680 (1970)
- 48) T. Skotland, T. Ljones, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 10, 311 (1979)
- 49) M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976)
- 50) O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951)

- 51) T. Skotland, T. Ljones, *Eur. J. Biochem.*, 94, 145 (1979)
- 52) American Public Health Assoc., 13th Ed., Washington, D.C., p. 397 (1971)
- 53) R. D. Berman, D. J. Kosman, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 7322 (1977)
- 54) B. J. Marwedel, D. J. Kosman, R. D. Bereman, R. J. Kurland, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 2842 (1981)
- 55) R. J. Kurland, B. J. Marwedel, *J. Phys. Chem.*, 83, 1422 (1979)
- 56) A. Nagai, S. D. Varfolomeev, *FEBS Lett.*, 113, 157 (1980)
- 57) T. Skotland, T. Flatmark, *Eur. J. Biochem.*, 132, 171 (1983)
- 58) E. T. O'Keefe, R. L. Hill, J. E. Bell, *Biochemistry*, 19, 4954 (1980)
- 59) T. C. Farrar, E. D. Becker, *Pulse and Fourier Transform NMR*, Academic Press (1971)
- 60) S. Neiboom, D. Gill, *Rev. Sci. Instr.*, 29, 688 (1958)
- 61) R. Freeman, H. D. Hill, *J. Chem. Phys.*, 54, 3367 (1971)
- 62) A. S. Mildvan, M. Cohn, *Advan. Enzymol.*, 33, p. 1 (1970)
- 63) J. Eisinger, R. G. Shulman, B. M. Szymanski, *J. Chem. Phys.*, 36, 1721 (1962)
- 64) I. Solomon, *Phys. Rev.*, 99, 559 (1955)
- 65) N. Blembergen, *J. Chem. Phys.*, 27, 572 (1957)
- 66) A. S. Mildvan, T. Nowak, C. H. Fung, *Annals. N. Y. Acad. Sci.*, 222, 192 (1973)
- 67) A. S. Midvan, M. C. Scrutton, *Arch. Biochem. Biophys.*, 149, 307 (1972)
- 68) J. R. Lyerla, G. C. Levy, *Topics in C-13 NMR Spectroscopy*, G. C. Levy, Ed., Wiley-Interscience, vol. 1, p. 80 (1974)
- 69) D. Doddle, V. Glushko, A. Allerhand, *J. Chem. Phys.*, 34, 842 (1971)
- 70) J. Reuben, M. Cohn, *J. Biol. Chem.*, 245, 6539 (1970)
- 71) W. J. Ray, A. S. Mildvan, *Biochemistry*, 9, 3886 (1970)
- 72) N. J. Blackburn, D. Collison, J. Sutton, F. E. Mobbs, *Biochem. J.*, 220, 447 (1984)
- 73) 化学便覧, 基礎編II, p. II-338
- 74) D. J. Kosman, in *Copper proteins and Copper Enzymes vol. 2* (Lontie, R., Ed.) p. 1, CRC Press, Boca Raton (1984)
- 75) P. F. Knowles, K. D. S. Yadav, in *copper Proteins and Copper Enzymes vol. 2* (Lontie, R., Ed.) p. 104, CRC Press, Boca Raton (1984)
- 76) E. M. Fielden, G. Rotilio, in *Copper Proteins and Copper Enzymes vol. 2* (Lontie, R., Ed.) p. 27, CRC Press, Boca Raton (1984)
- 77) B. B. Wayland, U. K. Kapur, *Inorg. Chem.*, 13, 2517 (1974)
- 78) J. Pradilla-Sorzano, J. P. Fackler, Jr, *Inorg. Chem.*, 13, 38 (1974)
- 79) H. Yokoi, A. W. Addison, *Inorg. Chem.*, 16, 1341 (1977)
- 80) R. S. Giordano, R. D. Bereman, D. J. Kosman, M. J. Effinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 96, 1023 (1974)
- 81) R. Barker, N. Boden, G. Cayley, S. C. Charlton, R. Henson, M. C. Holmes, I. D. Kelly, P. F. Knowles, *Biochem. J.*, 177, 289 (1979)



- 82) B.J.Marwedel, D.J.Kosman, R.D.Bereman, R.J.Kurland, J. Am. Chem. Soc., 103, 2842 (1981)
- 83) I.Bertini, C.Luchinat, A.Scozzafava, in The Coordination Chemistry of Metalloenzymes (I.Bertini, et al., Ed) p.155, D.Reidel Dordecht (1983)
- 84) M.Dixon, E.C.Webb, Enzyme, p.332, Longman Group Limited, London (1979)
- 85) H.S.Trwin, Enzyme Kinetics, Department of Biochemistry and Biophysics, John Wiley and Sons, Inc. (1975)
- 86) R.A.Penneman, L.H.Jones. J.Chem.Phys, 24, 293 (1956)
- 87) A.Obata, H.Tanaka, H.Kawazura, Biochemistry, in press.

