アデニン-銅触媒によるノルアドレナリンの酸化反応機構*

村上浩紀, 白畑実隆, 山田耕路, 大村浩久

(九州大学農学部食糧化学教室)

昭和 50 年 4 月 18 日 受 理

Oxidation Mechanism of Noradrenaline Catalyzed with Adenine-Cu²⁺ (Studies on the Physiological Function of Reductones Part XVIII)

By Hiroki MURAKAMI, Sanetaka SHIRAHATA, Koji YAMADA and Hirohisa OMURA

Food Chemistry Institute, Faculty of Agriculture,

Kyushu University, Fukuoka

In order to elucidate the catalytic activity of nucleic acid components on the oxidation of aromatic reductones with Cu²⁺, we attempted kinetic analyses of the adenine-Cu²⁺-catalyzed oxidation of noradrenaline, for adenine had the most remarkable stimulative potentiality among the nucleic acid components examined.

1. For the stimulative effect of adenine on the oxidation of noradrenaline with Cu²⁺, the removal of dissolved oxygen by N₂ gas was initially ineffective, and then suppressed the oxidation by the prolonged reaction.

2. The oxidative reaction at initial stage through N₂ gas represented a typical Michaelis-Menten type behavior. It was clear that noradrenaline was oxidized by the sequential type mechanism of the random ordered system in which adenine and noradrenaline could bind to Cu²⁺ both independently and in any other order, resulting in the formation of a mixed ligand complex. Two pathways were possible to conform the mixed complex, as shown in the text. The predominant one could be deduced from the equilibrium constants experimentally determined. In that pathway, noradrenaline first combined with Cu²⁺, then followed by adenine. 2,2'-Bipyridine, which is known to form a similar complex with *o*-diphenol and Cu²⁺, never accelerating but suppressing the oxidation of noradrenaline indicates that the catalytic activity of nucleic acid components depend on their different properties from 2,2'-bipyridine.

(Received April 18, 1975)

カテコールアミンをはじめとした芳香族レダクトンの Cu²⁺ による酸化が、核酸成分によって著しく促進あるいは抑制されることを見出し、前報⁽¹⁾で報告した。そこで、この核酸成分による酸化促進機構を解明するために、最も促進効果の著しいアデニンをを用いたアデニン-Cu²⁺-ノルアドレナリン系の酸化反応機構を反応速度論的に解析した。

実験材料および実験方法

1) 試薬 アデニン、2,2'-ビピリジンおよび硫酸銅は、和光試薬特級を用いた。ノルアドレナリンは、半井化学(株)より購入した。2種類の展開溶媒(イソプロ

* レダクトン類の生理的機能に関する研究(第18報)。

パノール:HCl:水=17:4:4, *n*-ブタノール:水=86:14)およびろ紙電気泳動(0.1 M 酢酸緩衝液, pH 4.5)により、これらの試薬中には紫外吸収性の夾雑物が混在しないことを確かめた。

2) 酸化反応の測定 前報にしたがって、ノルアドレナリン、Cu²⁺ およびアデニンあるいは2,2'-ビピリジンの混液を 37°C で保温しながら、経時的にノルアドレナリンの酸化にともなう 470 nm での吸光度の増加を比色計(東京光電製 ANA-1 型)で測定した。ノルアドレナリン、Cu²⁺ のみの混液を対照とした。

結果および考察

前報で明らかにしたように、核酸成分の Cu²⁺ 共存下

での芳香族レダクトンの酸化促進効果は、核酸成分の種類によって必ずしも一様でなく、また促進を受けるレダクトンの種類も異なった。このような核酸成分の効果は、 Cu^{2+} の存在なしには発現されないで、核酸成分が Cu^{2+} に配位することにより Cu^{2+} の酸化触媒能を強めるとともに、基質選択性をも賦与していることが考えられた。そこで、核酸成分のうちでもっとも酸化促進効果の著しいアデニンの作用を、アデニン- Cu^{2+} -ノルアドレナリン系で反応速度論的に検討した。

1. アデニンの酸化促進作用におよぼす溶存酸素の影響

アコ Cu^{2+} あるいは銅酵素によって触媒される芳香族レダクトンの酸化は、 Cu^{2+} による 1 電子酸化反応で進行し、生成した Cu^+ は溶存酸素により Cu^{2+} に再酸化され、再び使用されるという Cu^{2+} の回転が考えられている⁽¹⁻⁴⁾。最近では、 Cu^{2+} が Cu^+ に還元されることは必ずしも必要でなく、溶存酸素が直接電子受容体になりうることも報告されている^(5,6)。しかし、本反応を高濃度のレダクトン、 Cu^{2+} 共存下におこなうと Cu_2O の生成を確認しうることもから、レダクトンの酸化反応が、 Cu^{2+} の還元をともなうと考えるのが妥当であろう。アデニンによる芳香族レダクトンの酸化促進反応が、このような Cu^{2+} の 1 電子酸化反応を経由して進行しているとすると、最終的な電子受容体である溶存酸素を除去することによって、酸化は抑えられるはずである。そこで、ノルアドレナリン濃度を 3 mM、 Cu^{2+} 濃度を 0.2 mM とし、 Cu^{2+} 濃度に対するアデニン濃度比を 1/2, 1, 2, 4, 6, 10 と変化させたときの吸光度の増加を再蒸留水中、pH 4.3 で測定した。なお、pH は希塩酸または希カリ性ソーダであらかじめ調整した。反応は、空気中および N_2 ガス通気中のそれぞれの場合についておこない比較した。 N_2 ガス中での反応は、あらかじめ各試薬溶液に 10 分間 N_2 ガスを通気して溶存酸素を除去した後、混合してさらに 5 分間 N_2 ガスを吹き込んだ後すばやく密栓し、吸光度の増加を追跡した。その結果は Fig. 1 に示すように、反応開始 6 分目までは空気中および N_2 ガス中のいずれも、ほとんど同程度の着色度を示したが、40 分経過すると明らかに空気中での反応が N_2 ガス中の反応よりも高い値を示した。このことから、この酸化反応が Cu^{2+} の 1 電子酸化反応で進行することが支持される。なぜなら、 Cu^{2+} の還元をともなわないで酸素が直接電子受容体となるなら、酸素の除去によって酸化は

Fig. 1. Oxidation of Noradrenaline Catalyzed with Adenine- Cu^{2+} in the N_2 Gas Saturated Solution.

Noradrenaline (3 mM), Cu^{2+} (0.2 mM) and various molar ratio of adenine to Cu^{2+} (0.5 ~ 10) were mixed in re-distilled water. The mixture was previously adjusted to pH 4.3 by dil. HCl or dil. NaOH. Oxidation of noradrenaline was estimated at 470 nm. The mixture was saturated with N_2 gas to investigate the effect of dissolved oxygen on the oxidation of noradrenaline. Results were compared at 6 and 40 min. $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ test in the N_2 gas saturated solution, $\bullet$ — $\bullet$ control.

反応初期から抑制されると考えられるからである。アデニンによる酸化促進反応の最初の 8 分間くらいの反応では、 Cu^{2+} が十分量存在して溶存酸素の関与は無視しうるが、その後の反応では溶存酸素が関与して、 Cu^+ を Cu^{2+} へ再酸化する反応の寄与が大きくなるものと思われる。そこで、解析を簡単にするために、 N_2 ガス中で反応開始 6 分間の初期反応について、反応速度論的解析を試みることにした。

2. 酸化反応速度式および酸化反応機構

a. 酸化反応速度式：アデニン- Cu^{2+} -ノルアドレナリン系の酸化反応を反応速度論的に取り扱う際、生成物であるノルアドレナリン酸化体の濃度を知る必要がある。そこで、ノルアドレナリン酸化体は酸性溶液中では比較的安定に存在することから、pH 5.0 の酢酸緩衝液中で Ag_2O により急速に酸化して、470 nm での分子吸光係数 4.5×10^4 という値を得、これからノルアドレナリン酸化体の生成濃度を推定した。

Cu^{2+} 濃度を 0.3 mM と一定にし、パラメーターとしてアデニン濃度を 0.3 mM, 0.6 mM, 0.9 mM と変化さ

せたときの反応速度のノルアドレナリン濃度依存性を N_2 ガスを飽和した 37°C , $\text{pH} 5.0$ の 10 mM 酢酸緩衝液中でしらべた. 反応開始 6 分後の生成物の濃度を V mM とし, $1/V$ を $1/[\text{NA}]$ に対しプロットしたのが Fig. 2 である. いずれのプロットも直線上にのり, しかもアデニン濃度が 0.3 mM , 0.6 mM , 0.9 mM と増加するにつれて直線の傾きは低下し, これらの直線は 1 点で交わることがわかった. 次に, Cu^{2+} 濃度をやはり 0.3 mM と一定にして, パラメーターとしてノルアドレナリン濃度を 0.1 mM , 0.3 mM , 0.6 mM と変えたときの酸化反応速度のアデニン濃度依存性をしらべ, $1/V$ を $1/[\text{Ade}]$ に対してプロットしたのが Fig. 3 である. これも Fig. 2 とまったく同様の傾向を示し, ノルアドレナリン濃度が 0.1 mM , 0.3 mM , 0.6 mM と増加すると直線の傾きは低下し, しかも, これらの直線は 1 点でまじわった. このことは, アデニン- Cu^{2+} -ノルアドレナリンの系における酸化反応は, (1) 式に示すような酸化反応の速度式に従っていることを意味しており, Cu^{2+} を中心にアデニンおよびノルアドレナリンが配位した 3 者の混合錯体が形成され, しかもこの錯体が比較的安定で, その解離が律速段階となっているため反応物との間に平衡が成立し, ノルアドレナリン酸化体の生成速度 (v) は, この形成される混合錯体の濃度に依存していることがわかる. なお, (1) 式の数値定数 k および各平衡定数の内容については, Table I および Fig. 4 に記載した.

$$v = \frac{k[\text{Cu}^{2+}]}{1 + \frac{K_a'}{[\text{NA}]} + \frac{K_b'}{[\text{Ade}]} + \frac{K_a K_b' (= K_a' K_b)}{[\text{NA}][\text{Ade}]}} \quad (1)$$

Table I. Velocity Constant (k) and Equilibrium Constants (K_a , K_b , K_a' , K_b' , $K_a K_b' (= K_a' K_b)$) Concerned with the Adenine- Cu^{2+} Catalyzed Oxidation of Noradrenaline

Reactions		Constants
$\text{Ade}-\text{Cu}^{2+}-\text{NA} \xrightarrow{k} \text{Ade}, \text{Cu}^+, \text{NAox}$		$5.82 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$
$\text{Cu}^{2+}, \text{NA} \xrightleftharpoons{K_a} \text{Cu}^{2+}-\text{NA}$		$3.34 \times 10^{-4} \text{ M}$
$\text{Cu}^{2+}, \text{Ade} \xrightleftharpoons{K_b} \text{Ade}-\text{Cu}^{2+}$		$6.39 \times 10^{-3} \text{ M}$
$\text{Ade}-\text{Cu}^{2+}, \text{NA} \xrightleftharpoons{K_a'} \text{Ade}-\text{Cu}^{2+}-\text{NA}$		$2.49 \times 10^{-5} \text{ M}$
$\text{Cu}^{2+}-\text{NA}, \text{Ade} \xrightleftharpoons{K_b'} \text{Ade}-\text{Cu}^{2+}-\text{NA}$		$4.76 \times 10^{-4} \text{ M}$
$\text{Ade}, \text{Cu}^{2+}, \text{NA} \xrightleftharpoons{K_a K_b' (= K_a' K_b)} \text{Ade}-\text{Cu}^{2+}-\text{NA}$		$1.59 \times 10^{-7} \text{ M}^2$

NA=noradrenaline.

Fig. 2. Lineweaver-Burk Plot of the Adenine- Cu^{2+} -catalyzed Oxidation of Noradrenaline.

Oxidation rate of noradrenaline for 6 min was measured against various concentration of noradrenaline using acetate buffer ($\text{pH} 5.0$, 10 mM) saturated with N_2 gas. Adenine concentration was altered from 0.3 mM to 0.9 mM as parameter.

Fig. 3. Lineweaver-Burk Plot of the Adenine- Cu^{2+} -catalyzed Oxidation of Noradrenaline.

Noradrenaline concentration was altered from 0.1 mM to 0.6 mM as parameter. The test was performed against various concentration of adenine in the same conditions as shown in Fig. 2.

Fig. 4. Oxidative Process of Noradrenaline Catalyzed with Adenine-Cu²⁺.

Fig. 2 および Fig. 3 における Lineweaver-Burk の直線が、この反応が(1)式に示す速度式に従うことを意味するという事は、この式の逆数をとることにより容易に理解できる。

すなわち、

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k[\text{Cu}^{2+}]} \left\{ 1 + \frac{K_a'}{[\text{NA}]} + \left(K_b' + \frac{K_a K_b'}{[\text{NA}]} \right) \frac{1}{[\text{Ade}]} \right\}$$

となり、[Cu²⁺] を一定にすると 1/v は 1/[Ade] (あるいは 1/[NA]) に関する 1 次関数である。ここで、パラメーターとして 1/[NA] (あるいは 1/[Ade]) をきめると 1 つの直線がきまり、しかも [NA] (あるいは [Ade]) が増加すると、直線の傾きは低下する。そこで、[NA] および [Ade] を変化させて実験的に決定したいくつかの直線の 1/v 切片および交点より、各平衡定数 $K_a, K_b, K_a', K_b', K_a K_b' (= K_a' / K_b)$ および速度定数 k が決定できる。Fig. 2 および Fig. 3 から決定された各平衡定数および速度定数を Table I に示した。これらの定数から、アデニン-Cu²⁺-ノルアドレナリン系におけるノルアドレナリンの酸化速度は、Cu²⁺ 濃度に最も大きく依存し、ついでアデニン濃度、ノルアドレナリン濃度の順であることがわかる。

b. 酸化反応機構：前項において決定された速度式(1)は、Fig. 4 に示したような無順序系の逐次型反応機構から導かれたものである。すなわち、Cu²⁺ にノルアドレナリンが結合し、次にアデニンが結合するか、あるいは、はじめにアデニンが結合し、次にノルアドレナリンが結合するかのいずれかの経路を通してアデニン-Cu²⁺-ノルアドレナリンの混合錯体が形成され、この形成された錯体は比較的安定で解離が遅いので、混合錯体と反応

物の間には平衡が成立する。次に、この錯体上で電子の移動が起って、Cu²⁺ は Cu⁺ に還元され、ノルアドレナリンは酸化型ノルアドレナリンになり解離するものと思われる。こうして生成した Cu⁺ は前節で述べたように、その後、溶存酸素によって Cu²⁺ へ再酸化されると考えられる。この Cu⁺ から Cu²⁺ への再酸化は、反応の律速段階である混合錯体の解離速度よりも、ほとんど例外なく非常に速いことが知られている⁽⁷⁻⁹⁾。速度式(1)は、この反応機構から Michaelis-Menten の平衡理論を用いて容易に導くことができる。その際、ここで用いた平衡定数は、Michaelis らの使用した解離平衡定数で、通常の化学平衡定数の逆数であることに注意を要する。実験的に決定された値では、 K_a は K_b よりもおおよそ 1/20 ほど小さく、このことは Cu²⁺ に先にノルアドレナリンが配位し、次にアデニンが配位する経路の方に平衡がかなり傾いていることを示している。このように、アデニン-Cu²⁺-ノルアドレナリン系においては、三者の混合錯体の形成を経由して、急速な酸化が起ることが推定された。前報において明らかにしたような核酸成分により、Cu²⁺ 共存下での芳香族レダクトンの酸化促進作用が異なり、また、それぞれが促進する芳香族レダクトンの種類も異なるなどの現象は、これらの形成される混合錯体の性質の相違にもとづくものと思われる。混合錯体は、金属酵素の作用機構を理解するうえで重要な概念となっている⁽¹⁰⁾。酵素-金属イオン-基質の混合錯体において、酵素は金属イオンに配位することにより、その触媒活性を高めるとともに、基質選択性をも賦与すると考えられる⁽¹¹⁾。アデニン-Cu²⁺-ノルアドレナリンの混合錯体は、ノルアドレナリンの酸化をとまなうことから、電荷移動錯体の触媒作用と関連している。Pecht は⁽¹²⁾ Cu²⁺-ポリ-L-ヒスチジン錯体が、酸性領域でアスコルビン酸の酸化をアコ Cu²⁺ よりも強く促進することを見出し、この反応が三者の混合錯体を経由して進行することを反応速度論的に明らかにした。アスコルビン酸の Cu²⁺ による酸化は、ポリ-L-ヒスチジンが配位することにより、典型的な Michaelis-Menten 型の反応機構に変化した。また、篠野ら⁽¹³⁾も Cu²⁺-ポリ-L-リシン錯体が、ドーパの酸化を促進するとともに不整選択性を有することと、ポリ-L-リシンのヘリックス構造との関連を明らかにし、配位子の立体構造が酵素の特異性をきめるのに重要な役割を果していることを示唆した。Wagner-Jauregg らは⁽¹⁴⁾ diisopropyl fluorophosphate の加水分解が、Cu²⁺-

ビピリジン錯体によって著しく促進されることを三者の混合錯体の形成によって説明した。この反応は、イミダゾール基を含む Cu^{2+} -L- ヒスチジン錯体によっても強く触媒された。Siegel ら⁽¹⁵⁾は、 Cu^{2+} にピリジン環やイミダゾール環の窒素が配位した場合は、陰イオン性酸素原子をもつ配位子との混合錯体が形成されやすいと主張した。 Cu^{2+} による芳香族レダクトンの酸化におよぼす核酸成分の促進作用においても、アデニン、グアニンおよびシトシンの効果が強いのに対し、チミンの効果は弱いことから、銅錯体形成の容易さおよび Siegel らの説との関連を前報で推定した。 Cu^{2+} -ビピリジンは *o*-ジフェノールと混合錯体を形成することが知られている⁽¹⁶⁾ので、2 mM のビピリジンが 0.2 mM の Cu^{2+} 共存下で、3 mM のノルアドレナリンの酸化におよぼす効果を酢酸緩衝液 (pH 5.0, 10 mM) 中でしらべたところ、ビピリジンはノルアドレナリンの酸化をまったく促進せず、むしろ Cu^{2+} による自然酸化を抑制した。これは、形成されるビピリジン- Cu^{2+} -ノルアドレナリンの混合錯体は安定で、ノルアドレナリンの酸化を触媒せず、かえって Cu^{2+} を消費したために、 Cu^{2+} によるノルアドレナリンの酸化は抑制されたものと思われる。また、反応溶液の可視部吸収スペクトルは、 Cu^{2+} -ノルアドレナリン溶液の吸収スペクトルとよく一致したことから、ビピリジン- Cu^{2+} -ノルアドレナリン混合錯体は、470 nm 付近に強い電荷移動 (CT) スペクトルを示さないことも推定された。

このように、核酸成分による芳香族レダクトンの酸化促進効果は、ビピリジンとは異なった核酸成分固有の性質にもとづくものと思われ、 Cu^{2+} の触媒活性を強めるとともに基質選択性をも賦与していることは、polyphenol oxidase 等のモデル系として役立つことも考えられるだけでなく、生体内において種々の核酸成分が遊離の Cu^{2+} 存在下で、芳香族レダクトンの活性の調節に関与している可能性も考えられる。

要 約

核酸成分による Cu^{2+} 共存下での芳香族レダクトンの酸化促進作用を解明するために、最も促進効果の著しいアデニンの作用をアデニン- Cu^{2+} -ノルアドレナリンの系で反応速度論的にしらべた。

1. Cu^{2+} 共存下でのアデニンによるノルアドレナリンの酸化促進効果において、窒素ガスの通気による溶存

酸素の除去の影響は反応初期にはあらわれなかったが、その後、反応が進むにつれてノルアドレナリンの酸化は抑制された。

2. 窒素ガス通気中での初期の酸化反応は、典型的な Michaelis-Menten 型の挙動を示した。すなわち、アデニンおよびノルアドレナリンがたがいに独立に、またどの順序でも Cu^{2+} に結合でき、アデニン- Cu^{2+} -ノルアドレナリン混合錯体の形成を経て、ノルアドレナリンが酸化される無順序系逐次型機構に従うことが反応速度論的に明らかとなった。また、2つの混合錯体の生成経路のうち、 Cu^{2+} にまずノルアドレナリンが配位し、次にアデニンが配位する経路に平衡が傾いていることが、実験的に決定された平衡定数から推定された。一方、 Cu^{2+} を介して *o*-ジフェノールと同様な混合錯体を形成する 2,2'-ビピリジンは、ノルアドレナリンの酸化を促進せず、むしろ抑制した。このことから、核酸成分の効果は 2,2'-ビピリジンとは異なった性質にもとづくことが考えられた。

- (1) 村上浩紀, 白畑実隆, 山田耕路, 大村浩久: 農化, **49**, 401 (1975).
- (2) H. S. Mason: *Advan. Enzymol.*, **16**, 105 (1955).
- (3) I. Yamazaki, H. S. Mason and L. H. Piette: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1**, 336 (1959).
- (4) F. Kubowitz: *Biochem. Z.*, **299**, 32 (1938).
- (5) P. Kertesz: *Nature*, **180**, 506 (1957).
- (6) L. L. Ingraham: *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 666 (1957).
- (7) A. Zuberbuhler: *Helv. Chim. Acta*, **53**, 669 (1970).
- (8) *idem*: *Chimia*, **23**, 416 (1969).
- (9) I. Pecht and M. Anbar: *J. Chem. Soc. A*, **1968**, 1902.
- (10) L. E. Orgel: "Metal and Enzyme Activity," ed. by E. M. Crook, Cambridge Univ. Press, London and New York, 1958, p. 8.
- (11) M. M. Johnes: "Ligand Reactivity and Catalysis," Academic Press, New York, London, 1968.
- (12) I. Pecht, A. Levitzki and A. Anbar: *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 1587 (1967).
- (13) 篠野昌弘, 野沢庸則: 日化, **92**(3), 1 (1971).
- (14) T. Wagner-Jauregg, B. E. Hackley, T. A. Lies, O. O. Owens and R. Proper: *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 922 (1955).
- (15) H. Siegel, R. G. Griesser and D. B. McCormick: *Inorg. Chim. Acta*, **6**, 559 (1972).
- (16) R. Grieser and H. Siegel: *Inorg. Chem.*, **9**, 1238 (1970); *ibid.*, **10**, 2229 (1971).