Mitomycin と血清 Albumin の結合 (第 2 報¹⁾) Mitomycin の Cellophane 膜透過速度および Bovine Serum Albumin との相互作用について

中垣正幸,^{2a)} 近藤 明, 上条祐蔵, 鈴木正美^{2b)}
京都大学薬学部,^{2a)} 協和醸酵工業富士工場研究室^{2b)}

Binding of Mitomycin Derivatives to Serum Albumin. II.¹⁾ Permeability Behavior of Mitomycin through Cellophane Membrane and Interaction between Mitomycin and Bovin Serum Albumin

MASAYUKI NAKAGAKI,^{2a)} AKIRA KONDO, YUZO KAMIJO, and MASAMU SUZUKI^{2b)}
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University^{2a)} and Pharmaceutical Research
Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.^{2b)}

(Received September 20, 1973)

pH dependence of binding properties of mitomycin derivatives to bovine serum albumin and some transport behaviors of mitomycin derivatives aqueous solution through cellophane tube, were investigated in order to clarify the relationship between the chemical structure of mitomycin derivatives and their binding sites.

As previous paper, investigated mitomycin derivatives were demethoxymitomycin-A, 7-amino-N-methylisomitomycin-B, mitomycin-C, decarbamoylmitomycin-C, and 10-acetoxydecarbamoylmitomycin-C.

1) Mitomycin derivatives are more labilized in acidic condition than in alkaline, and are relatively stable in the pH region of 6.0 to 10.0. Among these compounds, mitomycin-C is the most stable in the above pH range.

2) Diffusion coefficients of mitomycin derivatives at 25° in 0.05 M aqueous phosphate and borate buffer range from 0.3×10^{-5} to 0.4×10^{-5} (cm²/sec), and it is found that transport processes of mitomycin derivatives through a cellophane tube are rate-determined by diffusion processes.

3) The Scatchard plot showed that mitomycin derivatives bind to bovine serum albumin at homogenous binding sites with 9 saturated binding sites at pH 8.0 as well as at pH 7.0.

Association constants at pH 8.0 decrease to 1/1.6 to 1/3.3 times compared with these at pH 7.0, and especially marked decrease in association constants was observed for decarbamoylmitomycin-C and 10-acetoxydecarbamoylmitomycin-C.

前報¹⁾で mitomycin 誘導体 (MMD) のウサギ血清中での抗菌活性と, ウン血清 albumin (BSA) に対する結合の関係について検討した. その結果これらふたつの性質の間に明らかな相関関係が認められ, MMD の化学構造中 urethane group の carbamoyl 基が除かれた decarbamoylmitomycin C (DCMC), および carbamoyl 基が acyl 化された 10-acethoxymitomycin C (ADCMC) が他の化合物に比べてウサギ血清中で著しく抗菌活性を減じると同時に BSA に対しても強く結合することを報告した.

今回著者らは MMD, BSA のおのおのの結合部位および MMD 水溶液若干の性質を検討する目的で結合の pH による影響を調べた. 用いた MMD は前報¹⁾と同様に, demethoxymitomycin A (DMMA), 7-amino-N-methylisomitomycin B (NMMB), mitomycin C (MMC), 10-acetoxy decarbamoylmitomycin C (ADCMC), および decarbamoylmitomycin C (DCMC) の 5 種類である.

1) 第 1 報: 中垣正幸, 近藤 明, 上条祐蔵, 小田倉義明, 鈴木正美, 薬誌, 92, 1218 (1972).

2) Location: a) Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto; b) Shimotogari, Nagaizumi-cho, Suntou-gun, Shizuoka.

結 果

[1] MMD 水溶液の安定性と pH の関係

膜平衡法によって MMD と BSA の相互作用を調べる際 MMD の膜透過速度と、平衡に達するまでの間 MMD が化学的に安定であることを確認する必要がある。したがって本実験に先立って MMD の安定性におよぼす影響として考えられる pH, 温度について安定性との関係を調べた。

MMD の分解機構については未だ明確な報告はない。25°, および 5° における 48 時間までの MMD の経時変化の pH 依存性を Table I に示す。

TABLE I. pH Dependence of MMD Stabilities in Aqueous Solution

MMD	pH	25°				5°			
		Time (hours after)			48	Time (hours after)			48
		8	16	24		8	16	24	
DMMA	5.0	72.5%	69.5%	52.1%	51.0%	78.9%	72.1%	62.3%	58.8%
	6.0	95.5	99.2	98.6	95.3	100.0	99.8	99.5	98.0
	7.0	99.8	99.2	100.1	98.5	100.2	99.8	99.7	98.7
	10.0	99.7	98.7	97.3	95.3	99.9	99.0	98.7	96.7
	11.0	87.2	75.3	63.2	60.8	89.3	88.3	71.5	63.5
NMMB	5.0	95.2	81.5	86.2	75.3	99.9	95.3	90.5	82.3
	6.0	99.8	92.5	87.7	72.3	100.0	95.3	90.5	85.2
	7.0	99.8	99.5	99.7	98.5	100.2	99.8	99.5	98.8
	10.0	99.7	98.0	92.3	87.7	99.7	89.9	95.3	90.3
	11.0	72.5	63.2	50.2	50.5	88.9	70.5	62.5	55.8
MMC	5.0	78.5	75.2	68.2	60.5	77.3	75.3	70.3	70.0
	6.0	100.0	100.1	99.2	98.1	99.8	100.2	99.5	99.2
	7.0	99.8	100.1	100.2	99.5	100.2	99.8	100.2	99.5
	10.0	99.7	99.9	99.5	98.5	99.9	98.9	99.2	98.9
	11.0	75.3	70.5	65.3	61.5	78.9	75.6	70.3	68.0
DCMC	5.0	82.5	71.5	62.3	55.3	80.5	75.3	69.9	59.9
	6.0	99.3	98.2	95.5	90.3	99.5	99.1	97.9	95.2
	7.0	99.8	99.0	99.0	97.3	100.2	100.3	99.2	98.5
	10.0	99.8	99.7	99.3	99.0	99.5	99.9	99.5	99.2
	11.0	98.8	97.7	97.0	96.0	98.8	98.0	97.5	97.0
ADCMC	5.0	88.5	75.5	72.3	60.3	89.5	80.0	75.5	70.2
	6.0	99.9	99.8	99.8	99.5	99.7	99.8	99.0	98.7
	7.0	100.0	99.9	99.6	98.0	99.7	99.7	99.9	98.6
	10.0	99.7	99.5	98.5	95.5	100.0	99.8	99.0	95.0
	11.0	88.8	85.2	73.2	63.5	90.3	88.7	78.8	65.5

MMD concentration: 30 μ g/liter
 pH 5.0, pH 7.0: 0.05M phosphate buffer
 pH 10.0, pH 11.0: 0.05M borate buffer

いずれの MMD も 30 μ g/liter の濃度を用い、初濃度に対する各時間後の残存率を % で示した。定量は前報で報告したとおり紫外線 (UV) 吸収法で行なった。なお分解についての反応速度論的な検討は行なわず残存率の表示のみにとどめた。MMD は pH 5.0 以下, pH 11.0 以上の水溶液で不安定である。とりわけ酸性領域では NMMB を除いて著しい分解を示す。分解の温度依存性はアルカリ領域に比べて酸性領域における方が大きい。MMD が比較的安定な領域、すなわち pH 6.0—10.0 では MMC, DMMA > NMMB > ADCMC, DCMC の順に安定である。

[2] MMD セロファン膜透過速度

膜平衡法によって MMD と BSA の相互作用を検討する際 MMD の水溶液での安定性と関連して MMD がセ

ロファン膜を通過して膜の内外の濃度が平衡に達するまでの時間が重要な問題になる。そこで MMD の最も安定な pH 7.0 でセロファン膜の外側に透過する MMD を経時的に 12 時間まで定量して膜透過速度を調べた。

中垣ら³⁾によると膜を通過する拡散が Fick の法則に従っておこなわれるとすると、式 (1) のように示される。

$$K = \frac{1}{t} \ln \left\{ \frac{1 + (V_2/V_1)(C_1/C_2)}{1 - (C_2/C_1)} \right\} \quad (1)$$

ここで K は装置定数を含めた MMD の膜透過係数とする。 V_1, V_2, C_1, C_2 は時間 t における第 1 室、第 2 室の溶液量およびその中の MMD 濃度とする。MMD は第 1 室より第 2 室にセロファン膜を通過して移行するものとする。本実験においては第 1 室、すなわちセロファン膜 tube 内の MMD 水溶液の量をセロファン膜 tube の外液と同じく 10 ml とした。セロファン膜 tube の浸透圧の差による膨張を防ぐために初めの MMD 濃度を 1×10^{-4} mole/liter とした。25° および 5° に調節した恒温振盪機で 1 分間 60 往復、5 cm 振幅の振動を与えながら経時的にセロファン tube の外側の MMD 濃度を測定した。

いま、 $V_1 = V_2$ とすれば式 (1) は、

$$\log \frac{1+x}{1-x} = 0.4343 Kt \quad (2)$$

と書き直される。ここで $x = C_2/C_1$ で C_1 はセロファン tube 内の MMD 濃度、 C_2 は外側の濃度である。典型的な例をとりあげて $\log\{(1+x)/(1-x)\}$ を縦軸に、時間 t を横軸に plot したのが Fig. 1 である。なおセロファン tube に吸着した MMD 量を調べた結果、吸着量は無視し得ることが確かめられた。

Fig. 1 より膜透過係数 K を求めると、25° では DMMA については、 $K = 1.1 \times 10^{-4} [\text{sec}^{-1}]$ 、その他の MMD については $K = 1.4 - 1.6 \times 10^{-4} [\text{sec}^{-1}]$ となり DMMA は若干膜透過速度が小さい。また 5° では DMMA、DCMC はともに $K = 1.1 \times 10^{-4} [\text{sec}^{-1}]$ なる小さい膜透過係数を有し、その他の MMD は $K = 1.2 \times 10^{-4} [\text{sec}^{-1}]$ の膜透過係数を有する。

実験の定量精度を考えて理論平衡状態の 99.9% に達するまでの時間 τ の値を、求めた K より計算し Table II に示す。これによれば、たとへば pH 7.0, 25° で DMMA は理論平衡状態の 99.9% に達するのに約 19 時間、他の MMD は 14—15 時間を要し、5°

Fig. 1. Membrane Permeability of MMD at pH 7.0, 0.05M Phosphate Buffer

membrane: visking tube, size 30/32, pore size 24 Å

●—●: DMMA 5° ○—○: NMMB 5°
×—×: DMMA 25° ▲—▲: NMMB 25°
□—□: MMC 25°

TABLE II. Apparent Permeability Constants (K), Diffusion Coefficients (D) and τ for Cellophane Tube in 0.05M Phosphate Buffer at pH 7.0

Temp. °C	Samples	$K \times 10^4$ (sec ⁻¹)	$D \times 10^5$ (cm ² /sec)	K/D (cm ⁻²)	τ (hour)
25	DMMA	1.11	0.308	36.0	19.0
	NMMB	1.41	0.341	41.3	14.9
	MMC	1.47	0.352	41.7	14.3
	DCMC	1.44	0.379	38.0	14.6
	ADCMC	1.58	0.393	40.2	13.54
5	DMMA	1.10	0.210	52.5	21.5
	NMMB	1.19	0.281	42.3	17.7
	MMC	1.25	0.299	41.8	16.9
	DCMC	1.11	0.265	41.9	19.9
	ADCMC	1.22	0.306	39.8	17.3

τ : Time require to reach 99.9% theoretical equilibrium concentration of MMD outside the cellophane membrane.

3) 中垣正幸, 古賀直文, 岩田修造, 薬誌, 82, 1134, 1138 (1962).

TABLE III. pH Effects on Apparent Permeability Constants (K), Diffusion Coefficients (D) and τ of MMC for the Cellophane Tube at 25°

pH	$K \times 10^4$ (sec ⁻¹)	$D \times 10^5$ (cm ² /sec)	K/D (cm ⁻²)	τ (hour)
6.0	1.41	0.436	32.3	14.9
7.0	1.47	0.352	41.8	14.3
8.0	1.38	0.340	40.6	15.2
10.0	1.27	0.325	39.1	16.5

pH 6.0, pH 7.0: 0.05M phosphate buffer
pH 8.0, pH 10.0: 0.05M borate buffer

では DMMA は 22 時間, 他の MMD は 17—19 時間を要することになる。

さらに膜透過係数の pH 依存性を調べる目的で比較的広い pH 領域で安定な MMC について pH 6.0—10.0 で経時的には 12 時間膜透過量を測定しその結果を Table III に示す。MMC は pH 7.0 以上では pH の上昇に従って K は小さくなる。

K の内容をさらに詳しく検討する目的で拡散係数を膜透過係数を求めた場合と同一条件でポーログラフイーによって求めた。

Ilkovic⁴⁾ によると拡散係数とポーログラフイーで得られる拡散電流の関係は式 (3) で示される。

$$i_d = 607n \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} \cdot c \quad (3)$$

ここで i_d は μA で示される拡散電流, n は 1 分子の電極反応に関与する電子の数, D は拡散係数, m, t はそれぞれ 1 秒間に毛管から流出する水銀の質量および 1 滴の水銀が毛管の先端で成長し滴下するに要する時間をあらわし, C は電極反応にあずかる物質の濃度である。式 (3) より n, c, t, m が既知であれば i_d を知ることによって拡散係数 D を知ることができる。

Fig. 2. Relationship between the Square Root of the Height of Mercury Column above the Tip of the Capillary $\sqrt{h}$ and Diffusion Currents μA at 25° in 0.05M Phosphate Buffer pH 7.0

●—●:DMMA ▲—▲:MMC
MMD conc.: 1×10^{-4} mole/liter

ところでポーログラフの波高が拡散律速の電流をあらわすとは限らない。一般に i_d が拡散電流であることを知るためには水銀高 h を変化させて, $\sqrt{h}$ に対して i_d を plot して直線関係になれば拡散電流であるとしている。⁵⁾ すなわち, m は h に比例し, t は h に反比例するので k_1, k_2, k_3 を比例定数とすると, 式 (4) の関係が成り立つ。

$$\begin{aligned} m &= k_1 \cdot h \\ t &= k_2 / h \end{aligned} \quad (4)$$

式 (4) を式 (3) に代入して,

$$i_d = 607n \cdot D^{1/2} \cdot c \cdot k_3 \sqrt{h} \quad (5)$$

となり, i_d は C が一定ならば $\sqrt{h}$ に比例する。

行なった実験のうち, MMC と DMMA についての結果を Fig. 2 に示す。Fig. 2 から明らかなように $\sqrt{h}$ と i_d は直線関係を示し i_d は拡散電流であることがわかる。

なお Ilkovic の式をそのまま使って拡散係数を求めることについては多くの人々⁶⁾ によって議論され, 式 (6) のように修正され, A については, 17,⁷⁾ 24,^{6b)} 39^{6c)} などの値が提唱されている。

$$i_d = 607n \cdot D^{1/2} \cdot c \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} (1 + AD^{1/2} m^{-1/3} t^{1/6}) \quad (6)$$

4) D. Ilkovic, *Collection Czechoslov. Commun.*, **6**, 489 (1934); D. Ilkovic, *J. Chim. Phys.*, **35**, 129 (1938).

5) 武者宗一郎, “ポーログラフイー(現代化学シリーズ 7),” 東京化学同人, 東京, 1961, p. 39.

6) a) H. Strehlow, M.V. Stackelberg, *Z. Electrochem.*, **54**, 51 (1950), **55**, 244 (1951); b) H. Matsuda, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **36**, 342 (1953); c) J.J. Lingane, B.A. Loveridge, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 438 (1950).

7) N.K. Roberts, H.L. Northey, *J. Chem. Soc. Faraday, Trans.*, **68**, 1528 (1972).

最近, Roberts ら⁷⁾ は式 (6) を用いて, H_3O^+ , C_2^{2+} の拡散係数を求めた結果, $A=17$ とした場合最も理論値に近い値を得たことを報告しているので著者らは式 (6) において, $A=17$ を用いた. 得られた D , K/D を先に膜透過実験で求めた K , τ とともに Table II, III に示した. ここで K/D は膜の厚さ, 膜の表面積および第 1 室, 第 2 室の容積で決る膜定数である.

pH 7.0, 25° における MMD の拡散係数は $0.3\text{--}0.4 \times 10^{-5} [\text{cm}^2/\text{sec}]$ でありこの大きさの順序は膜透過係数 K のそれに大体対応している. 膜定数 K/D は大略 40—41 $[\text{cm}^{-2}]$ となり DMMA を除いては 25°, 5° いずれにおいても一定である.

25° における MMC の K および D は pH に依存し, pH 6.0 における D の値は比較的大きく, $0.436 \times 10^{-5} [\text{cm}^2/\text{sec}]$ となりこの時の K/D は異状に低い値 32.3 を示す. pH が上昇するに従って D および K の値は若干減少する. K および D の温度による変化を見ると, K は 25° と 5° で 10—20% の差が認められるがとりわけ DCMC, ADCMC は共に 22% と大きな差が認められ他の MMD に比べて大きな温度依存性を示す. 一方 DMMA は温度依存性がほとんど認められない. また D は 5° と 25° で 20—30% の差があり特に DMMA と DCMC はその差が大きくそれぞれ, 32%, 31% の差がある.

[3] BSA と MMD の相互作用

MMD の水溶液での分解の pH 依存性と膜透過速度の大略がわかったので, これが比較的安定な領域である pH 7.0 と pH 8.0 で膜透過時間 24 時間の条件で 25°, 5° において膜平衡法によって BSA と MMD の相互作用を調べた. 結果を Fig. 3 に示す.

前報と同様に BSA 1 分子に結合した MMD 分子の数を r , 平衡に達した時に BSA に結合していない MMD 濃度を C mole/liter であらわしそれらの間の関係が式 (7) であらわされるものと考え, r/C に対して r を plot した.

$$r/c = k(n-r) \quad (7)$$

ただし n は飽和結合量を, k は結合の際の平衡定数をあらわす.

Fig. 3a. Scatchard Plot of Data for Binding of MMD to BSA at 25° in 0.05M Phosphate Buffer obtained by Membrane Equilibrium Method at pH 7.0

●—●:DMMA
○—○:NMMB
▲—▲:MMC
■—■:DCMC
□—□:ADCMC

Fig. 3b. Scatchard Plot of Data for Binding of MMD to BSA at 25° in 0.05M Borate Buffer obtained by Membrane Equilibrium Method at pH 8.0

●—●:DMMA
○—○:NMMB
▲—▲:MMC
■—■:DCMC
□—□:ADCMC

TABLE IV. Association Constants and Thermodynamic Parameters of MMD-BSA
Interaction obtained by Membrane Equilibrium Method at pH7.0 and pH 8.0

pH	Samples	Temp. °C	Binding constants k 1/mole	Free energy change (ΔF) kcal/mole	Enthalpy change (ΔH) kcal/mole	Entropy change (ΔS) e.u.	No of sites n
7.0	DMMA	25	1.98×10^3	-4.5	-3.2	4.4	9
		5	2.59×10^3	-4.3			9
	NMMB	25	1.08×10^3	-4.1	-3.1	3.4	9
		5	1.57×10^3	-4.1			9
	MMC	25	1.41×10^3	-4.3	-3.5	2.6	9
		5	2.16×10^3	-4.2			9
	DCMC	25	9.03×10^3	-5.4	-2.7	9.6	9
		5	1.26×10^4	-5.2			9
	ADCMC	25	1.27×10^4	-5.6	-1.0	15.4	9
		5	4.49×10^4	-5.9			9
8.0	DMMA	25	6.23×10^2	-3.8	-3.1	2.3	9
		5	9.08×10^2	-3.8			9
	NMMB	25	6.52×10^2	-3.8	-3.2	2.0	9
		5	9.62×10^2	-3.8			9
	MMC	25	6.03×10^2	-3.8	-3.1	2.3	9
		5	8.79×10^2	-3.7			9
	DCMC	25	2.73×10^3	-4.7	-3.5	4.0	9
		5	3.63×10^3	-4.5			9
	ADCMC	25	3.81×10^3	-4.9	-3.0	6.4	9
		5	5.48×10^3	-4.8			9

pH 7.0: 0.05M phosphate buffer
pH 8.0: 0.05M borate buffer

Fig. 3 からわかるように膜平衡法による BSA と MMD の結合は pH 7.0, pH 8.0 において $r/C-r_i$ がともに直線関係であることから均一な結合点に対する均一な結合であると考えられる. また結合点の数は BSA 1 分子に対して 9 個存在する.

pH 8.0 と pH 7.0 とでは結合力に大きな差があり Table IV に示したように, 結合定数 k は pH 7.0 の場合に比べて pH 8.0 では 25° DMMA, DCMC, ADCMC で約 1/3.3 に, MMC が 1/2.3 に, NMMB が 1/1.6 に減少している. 5° においては特に ADCMC の pH 8.0 における k の減少が大きく 1/8.2 となっているほかは 25° におけるそれと大略同様である. ADCMC と DCMC は pH 7.0 におけると同じく pH 8.0 においても他の MMD に比べて BSA に強く結合する.

考 察

MMD のセロファン膜透過速度

セロファン tube 内の接液部の面積を調べるために, 透過実験を終えた直後のセロファン tube の結び目を切断しノギスで tube の長さを測定したところ Table V に示すように, 接液部の面積は平均 39.0 cm^2 でそのふれは $\pm 4\%$ 以内であった. また同様の状態の膜の厚みは東洋精機 KK 製, 精密塗膜測厚器で測定した結果, $51-53 \mu$ であった.

したがって $A=39.0 [\text{cm}^2]$, $\Delta x=5.2 \times 10^{-3} [\text{cm}]$, $V_1=V_2=10 [\text{cm}^3]$ を用いて中垣ら³⁾ の提唱した式 (8), (9), (10) により見かけの膜透過係数 P^* , 膜透過係数 P , および MMD の膜内における拡散係数 D^* を求めると Table VI, VII のようになる. なお式 (10) 中の f は膜内細孔の形状および大きさに関する因子で中垣ら³⁾ の求めた $f=0.0473$ を用いた.

TABLE V. The Variety of Transport Area of Cellophane Tube after Dialysis MMC for 20 hours at 25° in 0.05M Phosphate Buffer pH 7.0

Width (cm)	Length (cm)	Area (cm ²)
5.92	6.81	40.3
5.95	6.52	38.8
5.92	6.63	39.2
5.95	6.35	37.8
5.95	6.71	39.9
5.92	6.72	39.8
5.93	6.48	38.4
5.93	6.53	38.7
5.95	6.28	37.4
5.95	6.66	39.6
		M=39.0

$$P^* = \frac{KV_2}{A(V_2/V_1+1)} = \frac{2.303}{(1/V_1+1/V_2)t} \times \log \left(\frac{1+x}{1-x} \right) \quad (8)$$

$$P = P^* \cdot A \quad (9)$$

$$P = f \cdot D^* \quad (10)$$

Table VI, VII からわかるように MMD の buffer 中の拡散係数 D とセロファン膜中の拡散係数 D^* の比 D/D^* は約 1.7—2.0 であり NMMB, MMC および ADCMC はこの値が温度によって変らず前 2 者が 1.7, 後

TABLE VI. Permeability Constants (P) and Diffusion Constants (D^*) of MMC through Cellophane Tube at 25°, 5° in 0.05M Phosphate Buffer pH 7.0

Temp. °C	Samples	$P^* \times 10^5$ (cm ² /sec)	$P \times 10^5$ (cm ² /sec)	$D^* \times 10^5$ (cm ² /sec)	D/D^*
25	DMMA	55.5	0.0074	0.156	2.0
	NMMB	70.5	0.0094	0.199	1.7
	MMC	73.5	0.0098	0.207	1.7
	DCMC	72.0	0.0096	0.203	1.9
	ADCMC	79.0	0.0105	0.222	1.8
5	DMMA	55.0	0.0073	0.154	1.3
	NMMB	59.5	0.0079	0.167	1.7
	MMC	62.5	0.0083	0.175	1.7
	DCMC	55.5	0.0074	0.156	1.7
	ADCMC	61.0	0.0081	0.171	1.8

TABLE VII. Permeability Constants (P) and Diffusion Constants (D^*) of MMC through Cellophane Tube at 25°

pH	$P^* \times 10^5$ (cm ² /sec)	$P \times 10^5$ (cm ² /sec)	$D^* \times 10^5$ (cm ² /l)	D/D^*
6.0	70.5	0.0094	0.199	2.2
7.0	73.5	0.0098	0.207	1.7
8.0	69.0	0.0092	0.195	1.7
10.0	63.5	0.0085	0.180	1.8

pH 6.0, pH 7.0: 0.05M phosphate buffer
pH 8.0, pH 10.0: 0.05M borate buffer

者が 1.8 である。DCMC は 25° で 1.9, 5° で 1.7 を示す。一方 DMMA も同様の温度依存性を示し 25° では 2.0, 5° では 1.3 となる。このことから DMMA, DCMC はセロファン tube と何らかの相互作用があると考えられる。また拡散係数 D の温度依存性を調べて見ると、他の MMD が 5° における D は 25° における D の 80—85% であるのに対して DMMA と DCMC のそれは、それぞれ 68%, 69% と互いに近い温度依存性を示している。化学構造的には DMMA は 7 位の amino 基が methoxy 基で置換され、DCMC は 10 位の炭素に付いた carbamoyl 基が除かれた構造を持っていることからこの両者はともに他の MMD に比べて疎水性が強いこともこのことと関連している。

さらに D^* について温度依存性を調べて見ると、25° における D^* を D^*_{25} , 5° における D^* を D^*_5 とあらわしこれらの比 D^*_{25}/D^*_5 は DMMA, NMMD, MMC, DCMC, ADCMC についてそれぞれ、1.09, 1.19, 1.18, 1.30, 1.30, となる。これらの値と MMD の化学構造の類似性、就中 amino 基とを関連付けて見ると、DMMA は 7 位の amino 基が methoxy 基で置換された構造を、NMMD, MMC はともに 7 位、10 位に amino 基を有しているが DCMC, ADCMC はともに 10 位の amino 基が外れた構造をしている。

BSA と MMD の相互作用

前報で報告したように膜平衡法によれば、pH 7.0 で BSA に対する MMD の結合点は 9 個存在しかつ、均一な結合である。特に DCMC, ADCMC が強い結合を示すが、pH 8.0 においても同様な傾向が認められた。ただ結合力は pH 7.0 の場合よりも減少し結合定数 k は 25° で DMMA, NMMD, MMC, DCMC, ADCMC はそれぞれ pH 7.0 におけるその 1/3.1, 1/1.6, 1/2.3, 1/3.3, 1/3.3 となり 5° では 1/2.9, 1/1.6, 1/2.4, 1/3.4, 1/8.2 に減少する。pH 7.0 と pH 8.0 における結合定数の差は 25°, 5° いずれの場合も NMMD が特に小さくその比はいずれの場合も 1/1.6 である。NMMD は MMD 中ただ一つの aziridine 基の水素を methyl 基で置き換えたものであること、また Table I に示すように他の MMD に比べて pH 5.0 で著しく化学的に安定であったことと関連して考察すると、静電的な力に関与する形で aziridine 基が BSA への結合に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。

結合の強さの順序は pH 8.0 においても、pH 7.0 におけると同じく ADCMC > DCMC > NMMD > DMMA > MMC の順になる。

結合力の pH 8.0 における低下は熱力学的に調べてみると Table IV からわかるようにエントロピーの低下に起因する。このことは DCMC, ADCMC について顕著である。

ところでこのような MMD の BSA に対する相互作用の pH 依存性について、その原因を調べる目的で MMD 水溶液の性質の pH による変化を紫外、可視部の吸収スペクトル、MMD の quinone の還元電位、有機溶媒に対する分配係数⁸⁾などで調べたが pH 7.0 から pH 8.0 の間でこれらの性質の大きな変化は認められなかった。なお pH の還元電位におよぼす影響を Fig. 4 に示す。

したがって結合の pH 依存性と MMD の解離状態とは対応しない。このことから pH 8.0 における MMD の BSA に対する結合力の低下は MMD 自身の pH 変化に対する変化によるものではなく、BSA の pH 変化による解離基の状態の変化、およびこの変化による BSA の conformation の変化によるものと考えられ

Fig. 4. Reduction Potential of MMD in 0.1M KCl aq. sol obtained by Polarography, pH Adjusted by Addition of 0.1M KOH and 0.1M HCl at 25°

●—●:DMMA ■—■:DCMC
○—○:NMMD □—□:ADCMC
▲—▲:MMC

8) 中垣正幸, 近藤 明, 薬誌, 「投稿中」.

る.⁹⁾ なお buffer として用いたイオン種が結合に影響をおよぼしていること⁹⁾ も考えられるので phosphate buffer, borate buffer について 0.01M, 0.1M の濃度で結合実験を行なったが buffer 濃度による影響は認められなかった。

実 験 の 部

MMD いづれも協和醸酵工業株式会社東京研究所より提供されたものを用いた。¹⁰⁾

各試料は前報¹⁾と同様の方法で確認および純度試験を行なった。

BSA 前報¹⁾で報告したものと同一試料で, Aromor Pharmaceutical Co. 製, Bovine Serum Albumin Powder Fraction V を用いた。

MMD 水溶液の安定性と pH の関係 pH 7.0 以下は 0.05M phosphate buffer を用い pH 8.0 以上は 0.05M borate buffer を用いて pH を調整した。各 MMD 濃度を 30 $\mu\text{g/liter}$ とし $25^{\circ}\pm 1^{\circ}$ 室温で遮光ビンに保し経時的に MMD の λ_{max} の OD 変化を Hitachi Spectrophotometer type 139 で調べた。

MMD のセロファン膜透過速度 100° 2 時間蒸留水中で煮沸したのち 48 時間流水中で洗浄した Visking Tube (size 24/32 pore size 24Å) の一端を針金で結んだのち, 1.0×10^{-4} mole/liter の濃度の MMD buffer 溶液 10.0 ml を入れ, さらにガラスビーズを入れて他端を結んだのち, あらかじめ 10.0 ml の buffer を入れた半径 2.0 cm, 高さ 4 cm の広口蓋付ガラスビンに入れて $25^{\circ}, 5^{\circ}$ に調節した恒温振盪機, Taiyo Incuvator type M-1 で 1 分間 60 往復, 5 cm 振幅の振動を与え経時的に Visking Tube の外側に滲出した MMD 量を測定した。

膜平衡法による BSA と MMD の結合 上記の方法にしたがって処理した Visking Tube に 0.4% BSA buffer 溶液を 10.0 ml 入れ, MMD は濃度 1×10^{-3} — 5×10^{-5} mole/liter の範囲で Klotz¹¹⁾ らの方法にしたがって結合量を求めた。

MMD の還元電位および拡散電流の測定 0.1N KCl 水溶液を 0.01N NaOH, 0.01N HCl にて pH を調整し, $25\pm 0.05^{\circ}$ で水銀高 75 cm で半波電位を測定した。また拡散電流は 0.05M phosphate buffer および borate buffer を用いて, $25^{\circ}\pm 0.05^{\circ}, 5^{\circ}\pm 0.05^{\circ}$ で同じく水銀高 75 cm の条件で測定したポーログラムの波高より求めた。MMD 濃度はすべて 1×10^{-4} mole/liter とし, 使用機器は島津製作所製 Polarograph Type RP-2 である。

9) a) G. Scatchard, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 535, 546 (1950); b) D.S. Goodman, *ibid.*, **80**, 3892 (1958); c) B.J.M. Harmsen, S.H.De Bruin, L.H.M. Janssen, J.F. Rodrgaes, G.A.J. VanOs, *Biochem.*, **10**, 3217 (1971).

10) S. Kinoshita, K. Uzu, K. Nakano, M. Shimizu, T.Takahashi, *J. Med. Chem.*, **14**, 103, 109 (1971).

11) I.M. Klotz, *Arch. Biochem.*, **9**, 109 (1946).