

[J. Biochem., 93, 1343 (1983)]

**pH-Dependence of the Binding Constant of Ca^{2+} to β -Bungarotoxin
from *Bungarus multicinctus* Venom**

KIYOSHI IKEDA*, KYOZO HAYASHI

Bungarus multicinctus 毒中の β -ブンガロトキシンに対する
 Ca^{2+} の結合定数の pH 依存性

池田 潔*, 林 恭三

神経毒ホスホリパーゼ A_2 の一つである β -ブンガロトキシンは、ホスホリパーゼ活性を持つ A 鎖と B 鎖が S-S 結合により結ばれた 2 本鎖のタンパクである。酵素活性に必須の Ca^{2+} の結合定数の pH 依存性を、共存させた色素 ANS の蛍光変化、または唯一の Trp 残基の蛍光変化を用いて調べた。中性 pH での結合定数は Abe らにより報告されている値とよく一致した。 Ca^{2+} の結合に伴い、ある解離基の pK が 7.52 から 5.90 へ移行し、もう一つの解離基のプロトン化が Ca^{2+} の結合と拮抗することがわかった。前者は A 鎖の活性部位の His 48、後者は Ca^{2+} が直接配位する Asp 59 であると推定した。 α -アミノ基の関与はみられなかった。His 48 の pK 値 (7.25) は His と *p*-bromophenacyl bromide との反応の速度の pH 依存性から推定された値 6.9 に近い。 Ca^{2+} の結合に関与するすべての解離基が脱プロトン化した時の Ca^{2+} の結合定数は、他のいくつかのホスホリパーゼ A_2 の対応する値によく似ている。これは Ca^{2+} 結合部位の構造の共通性を示す。 Ca^{2+} と同じ部位へ結合し、酵素活性を阻害すると考えられる Ba^{2+} および Sr^{2+} の結合定数は、中性 pH において Ca^{2+} の値と同程度であることがわかった。

* 大阪大学理学部

[J. Biochem., 94, 223 (1983)]

**Bindings of Cobra Venom Phospholipase A_2 to Micelles of
n-Hexadecylphosphorylcholine**

KEIZO TESHIMA*, KIYOSHI IKEDA*, KOZO HAMAGUCHI*, KYOZO HAYASHI

コブラ毒ホスホリパーゼ A_2 の *n*-hexadecylphosphorylchoine ミセルへの結合

手島圭三*, 池田 潔*, 浜口浩三* 林 恭三

リゾレシチンのアナログである *n*-hexadecylphosphorylcholine のミセルに対するコブラ毒ホスホリパーゼ A_2 の結合を Trp 残基に由来する蛍光スペクトルの変化を用いて調べた。同じ互いに独立な酵素結合部位がミセル表面にいくつかあるものとして結果を解析した。酵素 1 分子当り 4~10 分子の基質が結合することがわかった。ミセルに対する酵素の結合定数は $0.18 \sim 3.1 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ であった。この結果は酵素分子には基質分子に対し強弱の親和性を持つ少なくとも 2 つの結合サブサイトがあると仮定することでよく説明される。酵素に Ca^{2+} が結合するとミセルに対する酵素の結合力が低下することがわかった。アポ酵素のミセルに対する結合定数の pH 依存性は 2 つの解離基の関与により説明できた。 Ca^{2+} 酵素複合体に対する pH 依存性には pH 5.4 の解離基の関与がなく、1 つの解離基の関与だけが見られた。本酵素の活性部位の解離基に関する研究結果に基づき、pH 5.4 の解離基は Ca^{2+} が直接配位する Asp 49 であり、pH 7.55 (アポ酵素) および 7.25 (Ca^{2+} 複合体) の解離基は近傍の His 48 と同定した。 α -アミノ基 (pH 8.55) はミセルとの結合に関与しないことがわかった。

* 大阪大学理学部