



X線吸収スペクトル法による タンパク質反応中間体の構造解析

西郷 敏, 橋本 秀樹*

自治医科大学

*東レリサーチセンター

Structural Characterization of Reaction Intermediates of Metalloproteins by X-Ray Absorption Spectroscopy

Satoshi SAIGO and Hideki HASHIMOTO*

Jichi Medical School

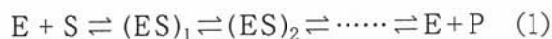
*Toray Research Center

X-ray absorption fine structure spectroscopy is a well-suited technique for probing the active site structures of metalloproteins. Several different approaches are possible for measuring the X-ray absorption spectra of short-lived reaction intermediates of metalloproteins. Rapid freezing is one of such approaches. Recent X-ray absorption spectroscopic studies of reaction intermediates of metalloproteins by using rapid freezing are briefly reviewed. The topics include intermediates of myoglobin and carboxypeptidase A.

1. はじめに

酵素は自然が設計したタンパク質触媒であり、その目的のための最適の構造に進化していると考えられている。酵素がさまざまな反応を触媒するとき、いくつかの反応中間体を生じることが多い。一般に、酵素反応の過程はつぎの式で表され

る。



ここで、Eは酵素、Sは基質、(ES)₁、(ES)₂などは酵素基質複合体、Pは生成物を表す。酵素基質

複合体の状態、基質は酵素により時間的、空間的に多重の制御を受けて、最終的な生成物へ高エネルギーで変化する。

酵素反応の機構を明らかにするためには、このような反応中間体の構造を知ることが大切である。タンパク質の構造を原子レベルで直接的に調べる手段としては、X線結晶解析が代表的なものである。この方法により数多くのタンパク質の立体構造が明らかにされている。活性部位に結合はするが、反応が起こらない阻害剤と酵素の複合体の結晶解析の結果をもとにして、反応の機構が推定されている場合が多い。しかしながら、このような反応の進まない阻害剤では、酵素との結合様式が基質の場合と重要な点で異なっている可能性があるし、反応の各段階を追うことも難しい。したがって、反応機構の分子の詳細を明らかにするためには、本来の基質と酵素の組み合わせで反応を進め、その途中に現れる中間体の構造を知る必要がある。

X線吸収スペクトルに現れる構造には、X線の吸収端から40eVまでのエネルギー領域に現れる構造 XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) と、これより高いエネルギー領域に現れる波打ち状の微細構造 EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) がある¹⁾。EXAFSは、X線により励起された光電子の波が、周囲の原子により主として一回散乱されて生じる干渉を反映している。この微細構造を解析することにより、X線を吸収した原子のまわりに分布する原子の結合

距離、数、種類などを知ることが出来る。一方、XANESは、内核電子が束縛状態へ励起される過程や光電子が周囲の複数の原子により多重散乱されて生じる干渉効果により生じる。XANESからは、X線を吸収した原子のまわりに分布する原子の幾何学的配置、対称性など、EXAFSから得られるものとは相補的な情報が得られる。この方法を金属タンパク質に応用すると、金属原子のまわりの局所構造を溶液状態で調べることが出来る。多くの金属タンパク質は、金属原子が活性に直接関与しているので、反応の中間状態でこのような測定ができると、反応機構を明らかにするための重要な手がかりとなるであろう。それでは、このような測定はどのようにすれば可能になるのだろうか。

2. 急速凍結法

シンクロトロン放射光を用いたとしても、通常のX線モノクロメーターを走査してX線吸収スペクトルを測定するには、最低でも数十分の時間がかかる。したがって、速い反応に伴うスペクトル変化の測定をするためには、特別の工夫が必要になる。表1にこのような方法とその特徴をまとめた。タンパク質などの生体物質を測定する場合、X線を吸収する金属原子は数ミリモル以下の濃度であることが多く、良好な質のスペクトルを得るには、試料から出て来る蛍光X線を検出する方式を採用しなければならない。また、多くのタンパク質では試料の量に制限があるために、反応を

Table 1 Methods for time-resolved X-ray absorption spectroscopy.

方式	検出法	応用	文献
分散型配置	透過	単発/繰り返し現象	2
繰り返し励起	透過/蛍光	繰り返し現象	3
急速凍結	透過/蛍光	単発/繰り返し現象	4-6
QEXAFS	透過/蛍光	単発/繰り返し現象	7

多数繰り返すことが難しい。このような点を考慮すると、生体物質の反応を追跡するには、QEXAFS法と急速凍結法の適用性が大きいと思われる。QEXAFS法は、モノクロメーターの送り方を工夫して高速の走査を可能にしたもので、現状では1秒程度の走査時間を実現している。しかし、生体物質などの希薄試料で良好なデータを得るためには、時間をかけて信号を測定する必要があるため、その応用はかなり遅い反応に限られるであろう。急速凍結法では、反応開始後の種々の時点で反応を凍結停止し、スペクトルを通常の方法で測定する。筆者らは、この方法の有用性に注目して装置開発を行い⁵⁾、最近、タンパク質の反応中間体について、いくらかの結果を得た⁶⁾。

急速凍結法は、最初、Bray⁸⁾により、酵素反応中間体のESR測定をするために開発された。この方法により、反応中間体のX線吸収スペクトルを測定するために図1(a), (b)のような装置を開発した⁶⁾。(a)は急速混合と急速凍結をするための装置である。シリンジ内の反応液は、ピストンにより一定の速度で、ミキサーに送られて混合される。その後、一定の長さの反応管を通過してから、微小な出口を持つノズルより、 -140°C に冷却されたイソペンタン中に噴出される。急速凍結を実現するためには、この冷却剤が水と混合しない性質を持つこととその温度が沸点より十分低いことが大切である。イソペンタン中に高速で吹き込まれた混合液は、微細な水滴となって急速に凍結する。混合開始から反応停止までの最短時間は約5msであることが、標準反応を用いて見積もられている⁵⁾。液体窒素を冷却剤として用いることは出来ない。吹き込まれた反応液の周囲を気化した窒素ガスが取りまいて、急速な冷却を妨げるからである。試料混合から急速凍結までの時間は、反応管の長さを変えることにより調節する。

このようにして生成した微細な氷粒を容器の下部に設置した柄の付いたセルに詰め込んでから、セルごと(b)のクライオスタットにすばやく移す。

クライオスタットは液体窒素により冷却され、試料の温度は -190°C に保たれる。クライオスタットの下部には、入射X線や蛍光X線用の窓があり、試料のX線吸収スペクトルを蛍光法で測定できる。さらに、オプティカルファイバーを用いて、試料の可視部領域の反射スペクトルが測定できる。これにより、急速凍結した試料の状態をモニターし、中間体の生成量、低温での試料の安定度、X線測定中の放射線損傷の有無などを評価する。

3. ミオグロビンの反応中間体

ミオグロビン(Mb)は、動物の筋組織中にあるヘムタンパク質で、可逆的に酸素を脱着し、その貯蔵体として機能している。その立体構造は、図2に示すように、一本のポリペプチド鎖が、折れ曲がりながら α らせんを形成し、1個のヘムを疎水的なポケット内に包み込んでいる。ヘム鉄の第5配位座には、ヒスチジン残基が配位している。ヘム鉄が2価のとき、 O_2 が第6配位座に結合する。Mbはヘムタンパク質としては最も単純なものの一つであり、 O_2 あるいは非生理的なりガンドとの結合過程が、幅広く研究されている⁹⁾。特に最近では、第6配位座近傍のいくつかのアミノ酸側鎖が、どのようにリガンドとの結合や解離の過程を制御しているかという問題に研究の焦点が当てられている。

3価のヘム鉄のMb(メトMb, Mb⁺)の第6配位座には、 H_2O をはじめ種々のリガンドが結合する。シアン(CN⁻)が結合したMb⁺をジチオナイトで急速に還元すると、一つの間体が現れる^{10, 11)}。中間体の可視部のスペクトルは、ヘモクロモゲン型の2本の吸収帯を示すので、この状態はCN⁻の結合した2価鉄Mbであると推定されている。この状態の可視部吸収スペクトルやCN⁻解離速度は、第6配位座近傍のアミノ酸置換によって影響を受け易いことが知られている¹²⁾。このことは、ヘム鉄に結合したCN⁻と周辺のアミノ酸残

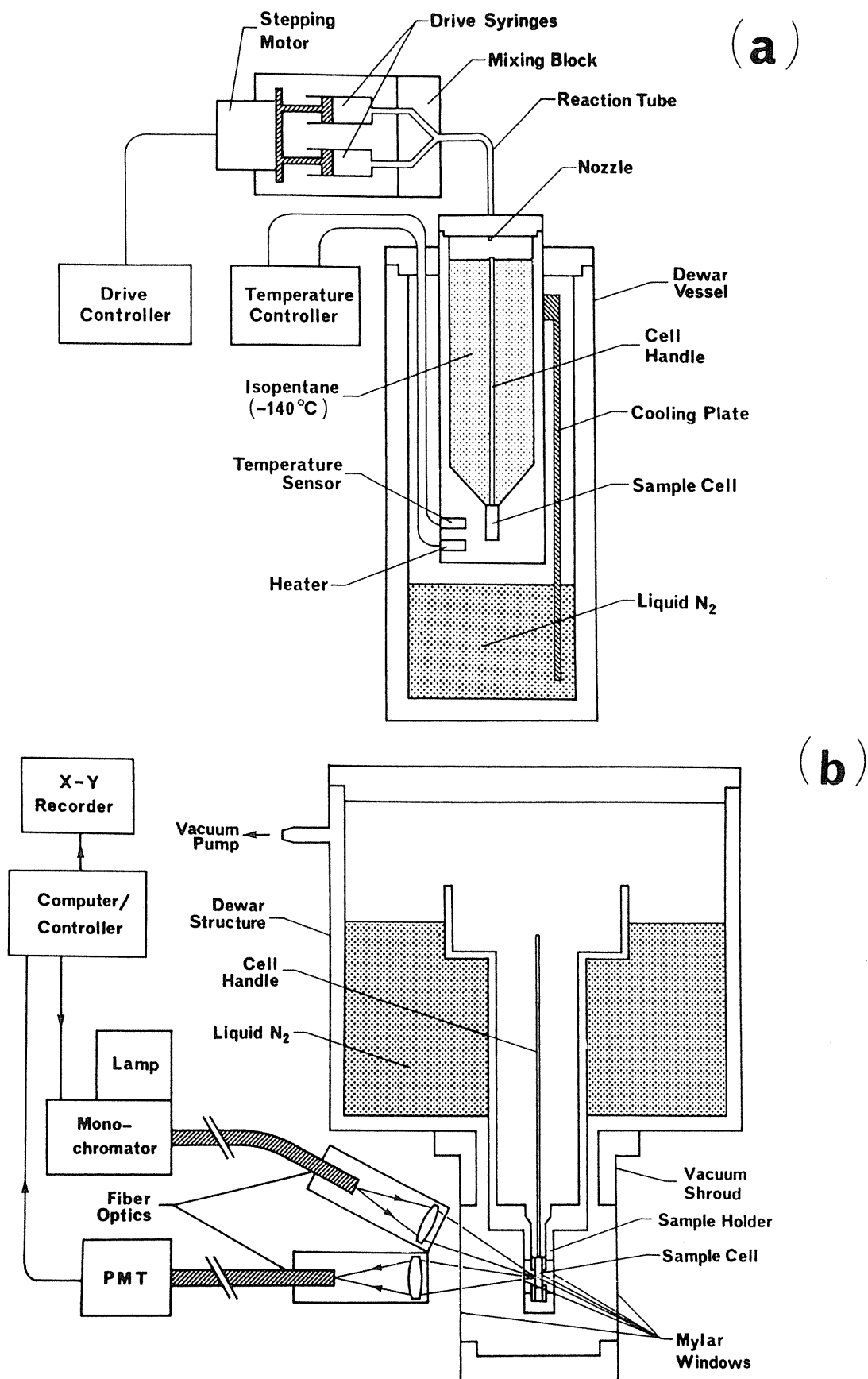


Fig.1 Schematic diagram of the rapid-freeze apparatus for X-ray absorption spectroscopy. The apparatus consists of (a) mixing and freezing units and (b) a cryostat for X-ray and optical measurements.

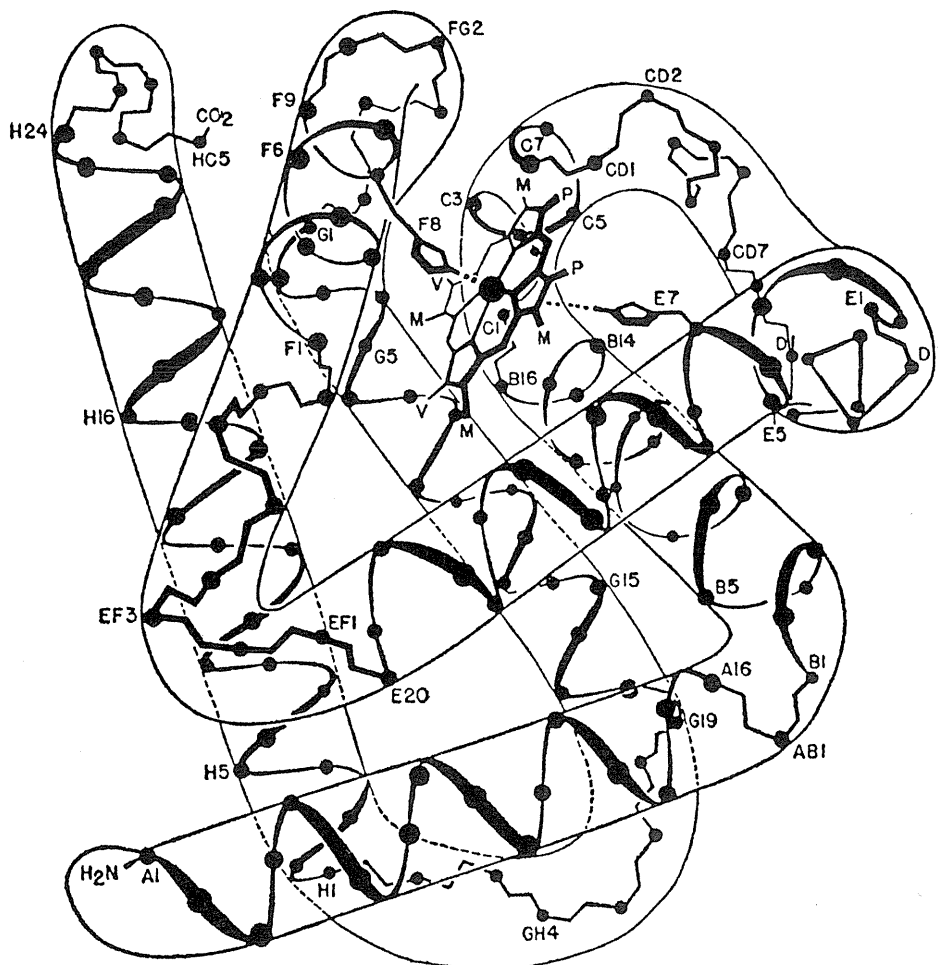
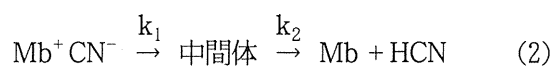


Fig.2 Diagrammatic sketch showing the course of the polypeptide chain of sperm whale myoglobin. [From R. E. Dickerson, *The Proteins*, (ed. H. Neurath, Academic Press, 1964), Vol.2, p.634]

基が相互作用をしていることを示している。さらに、ヘモグロビン (Hb) のこのような中間体から、 CN^- が協同的に解離することが見いだされ、Hbの4次構造が解離過程に影響を与えることが分かった¹³⁾。この中間体の構造を明らかにすることは、MbやHbのリガンド結合や解離を制御する因子を解き明かすことにもつながるであろう。

図3は、この反応過程における可視部領域のラピッドスキャン・スペクトルである。速い相の反応で、 CN^- が結合したメト Mb ($\text{Mb}^+ \text{CN}^-$) のスペクトルから中間体に特徴的な二本の吸収帯を持つスペクトルに変化している。遅い相の反応では、中間体のスペクトルから2価の Mb (デオキシ Mb)

のスペクトルに変化している。二つの相でスペクトルは等吸収点を結びながら変化しているので、反応の途中で一つの間体が過渡的に現れていることが分かる。この吸収の変化は固定波長で測定すると、二つの指数関数の和で表される。このようなことから、全体の過程はつぎの2段階反応で記述できる¹⁰⁻¹²⁾。



最初の過程で $\text{Mb}^+ \text{CN}^-$ はジチオナイトにより還元されて中間体になり、続く過程で中間体がデオキシ Mb と HCN に解離する。(2)式より、中間体の

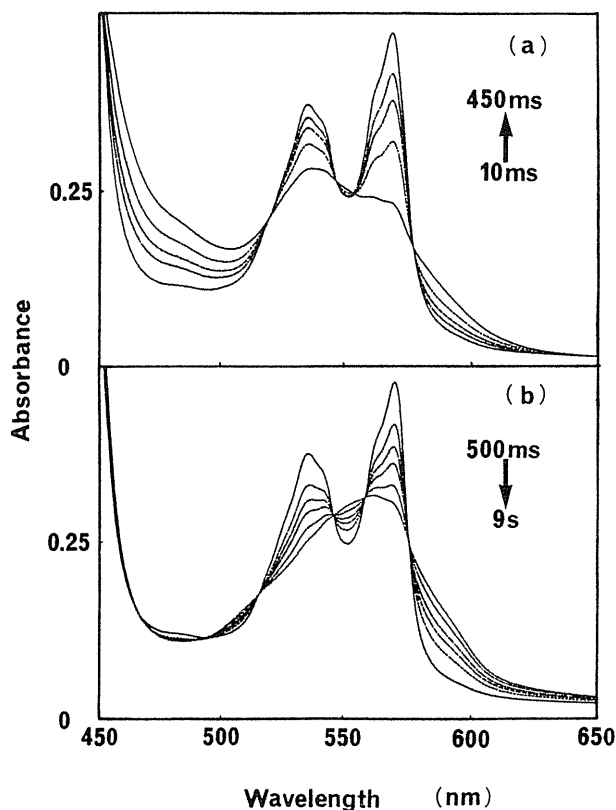


Fig.3 Visible spectral changes after stopped-flow mixing of Mb^+CN^- and dithionite. The spectra at (a) 10 ms, 60 ms, 100 ms, 150 ms and 450 ms, (b) 500 ms, 2 s, 3 s, 4 s, 6 s and 9 s after mixing were measured by the rapid-scanning method.

濃度 C_1 は, C_0 をタンパク質の全濃度として,

$$C_1 = \frac{k_1 C_0}{k_1 - k_2} (e^{-k_2 t} - e^{-k_1 t}) \quad (3)$$

と表される。実験から求めた k_1 と k_2 の値を使って, (3)式より見積もると, 中間体は反応開始後ほぼ 0.6s で最大の濃度になることが分かる。

Mb^+CN^- とジチオナイトを混合後 0.6s に急速凍結をして, X線測定用の試料を調製した。図4はこのように調製した試料の可視部の反射スペクトルである。中間体に特徴的な二本の吸収帯が見られる。各吸収ピークの肩は, スペクトルが低温で先鋭化しているために顕著になっている。(3)式を用いて見積もると, 急速凍結した試料中の中間体の割合は 90% である。中間体は液体窒素温度では

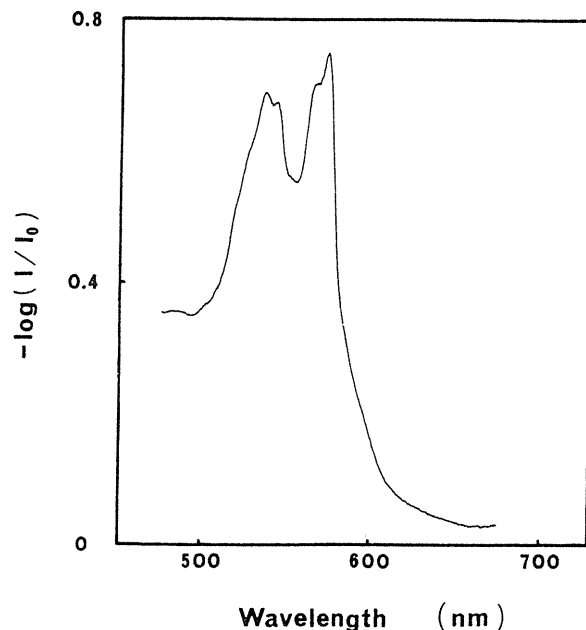


Fig.4 Visible reflectance spectra of Mb rapidly frozen at the time of the maximum population of the intermediate.

1週間以上安定であることが反射スペクトルの測定により確認されている。

図5は Mb^+CN^- , 中間体, デオキシMbの Fe-K 吸収端の XANES スペクトルを示している。スペクトルの構造には, Bianconiら¹⁴⁾ に倣って記号が付されている。COが結合したMbの単結晶の偏光X線吸収の測定結果とMb誘導体についての多重散乱の計算結果を総合して, Bianconiらはピーク C_1 と C_2 はヘム面の法線方向の光電子の散乱, ピーク D はヘム面内の散乱によるものであることを示した。さらに, ピーク C_1 のピーク D に対する比は, Fe-X-Yの結合角が大きくなると顕著に増大することも示された。図にみられるように, Fe-C-Nが直線的に結合している Mb^+CN^- では, ピーク C_1 の高さはピーク D より大きい。また, 第6配位座が空いているデオキシMbでは, ピーク D の高さはピーク C_1 より大きい。吸収端の前にある小さなピーク P_1, P_2 を除くと, 中間体と Mb^+CN^- の XANES スペクトルの形は非常によく似ている。 Mb^+CN^- と同じように, 中間体では, CN^- はヘム鉄に直線的に結合していることが結論できる。

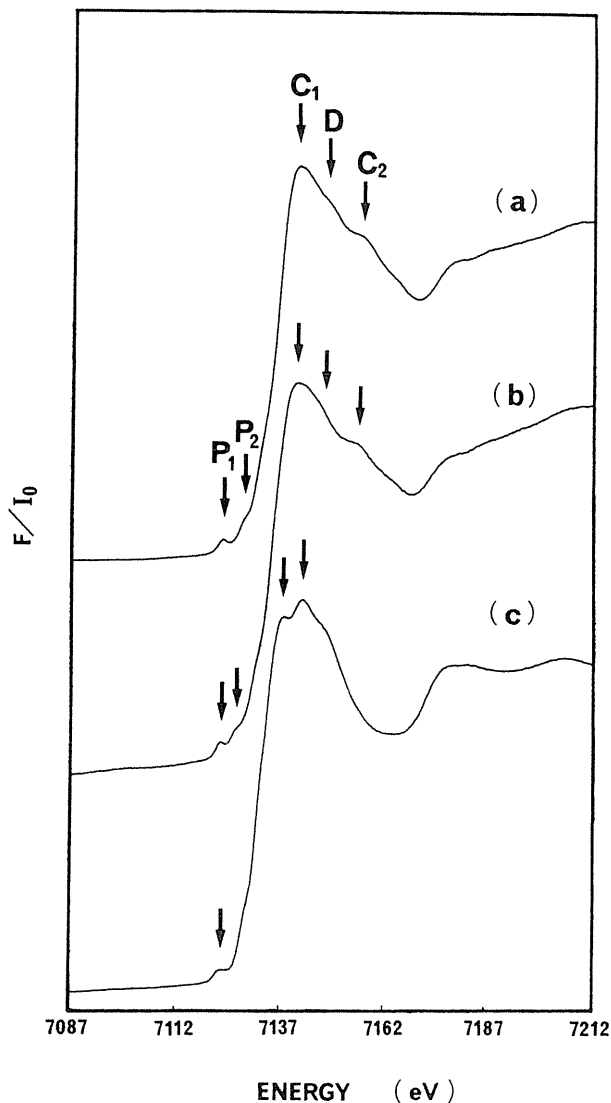


Fig.5 Fe K-edge XANES spectra of (a) Mb^+CN^- , (b) the intermediate and (c) deoxyMb.

デオキシMbの吸収端の位置は、 Mb^+CN^- よりも約4eVだけ低エネルギー側に寄っている。一方、中間体の吸収端位置は、 Mb^+CN^- よりも約1eV低エネルギー側に移動しているだけである。一般に、吸収端の位置はX線を吸収する原子の実効電荷を反映していると考えられているが、ヘムタンパク質についてのBianconiら¹⁵⁾の多重散乱の計算によると、鉄-ポルフィリン窒素原子間の結合距離の影響も大きい。中間体の生成に伴う吸収端の移動量が、全移動量に比べて小さいことは、還元剤から移行した電子が、中間体では鉄原子以

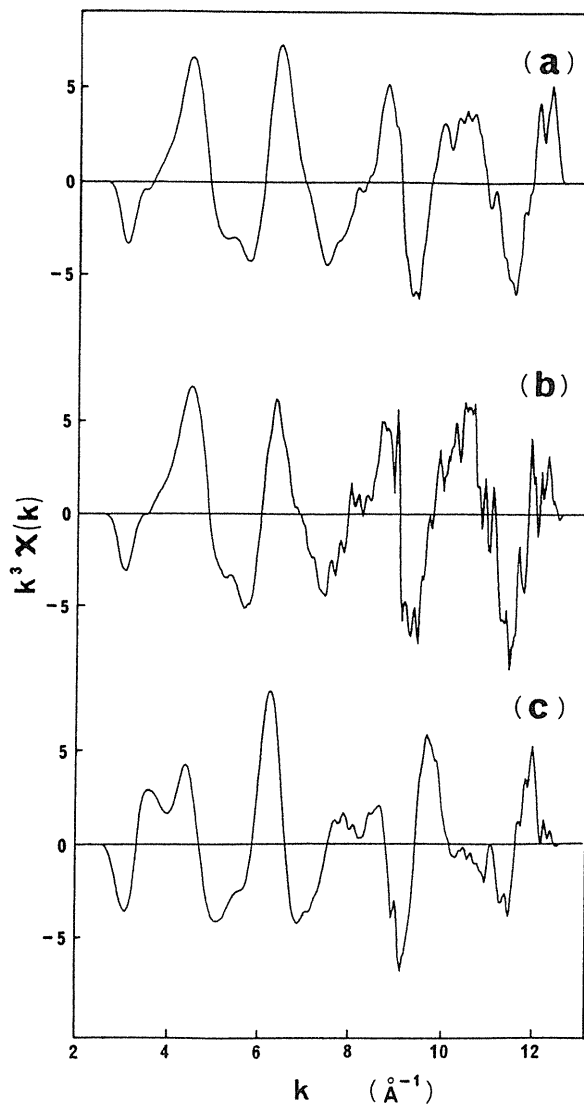


Fig.6 Fe K-edge EXAFS $k^3 \chi(k)$ of (a) Mb^+CN^- , (b) the intermediate and (c) deoxyMb.

外の部分に広がっている可能性を示唆するが、中間体の鉄原子のまわりの局所構造が、以下に述べるように、 Mb^+CN^- によく似ていることも関連しているであろう。

図6は、Mbの三つの状態のEXAFSスペクトルを光電子の波数kの関数として示したものである。 Mb^+CN^- と中間体のスペクトルは良く似ているが、これらとデオキシMbのスペクトルは、大きく異なっている。これらのEXAFSスペクトルを実空間にフーリエ変換した結果を、図7に示す。これらの曲線は、鉄原子のまわりの原子の動

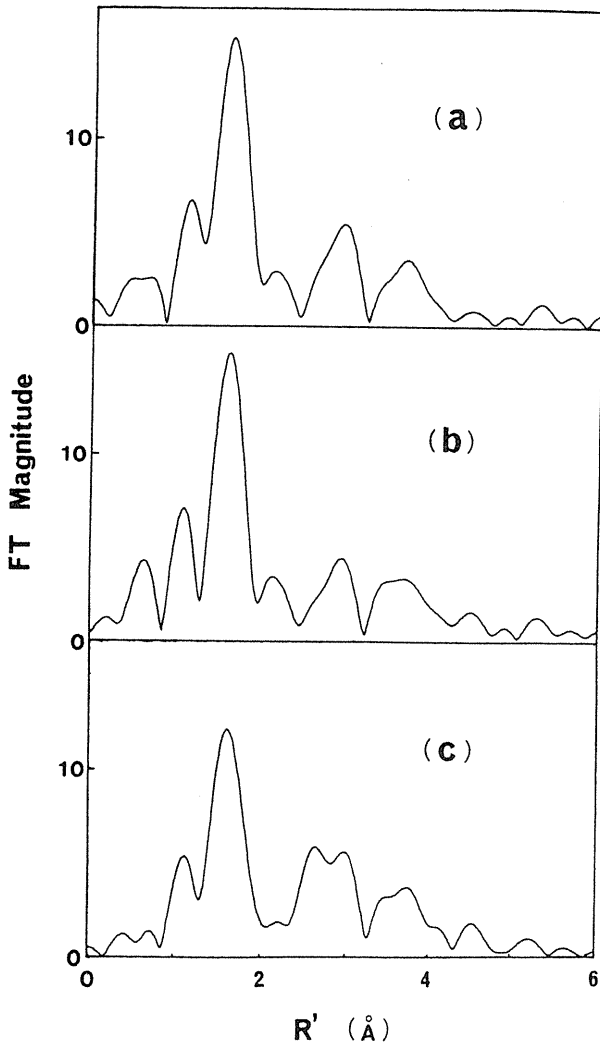


Fig.7 Fourier transforms of the EXAFS of (a) Mb⁺CN⁻, (b) the intermediate and (c) deoxyMb.

径分布関数を表している。ただし、光電子の波の位相シフトが補正されていないので、横軸は正確には原子間距離には対応していない。主ピークおよび2.5から3.5 Åに広がる副ピークは、それぞれ第1配位殻と第2配位殻の原子に対応している。この図から明らかなように、鉄原子のまわりの原子分布は、Mb⁺CN⁻と中間体ではよく似ているが、デオキシMbではこれらと異なっていることが分かる。

図7の主ピークに窓関数をかけて取り出し、これを逆フーリエ変換した結果を図8に実線で示す。一回散乱の理論式を、これらの曲線に当てはめていくつかのパラメーターを決めた。この際、

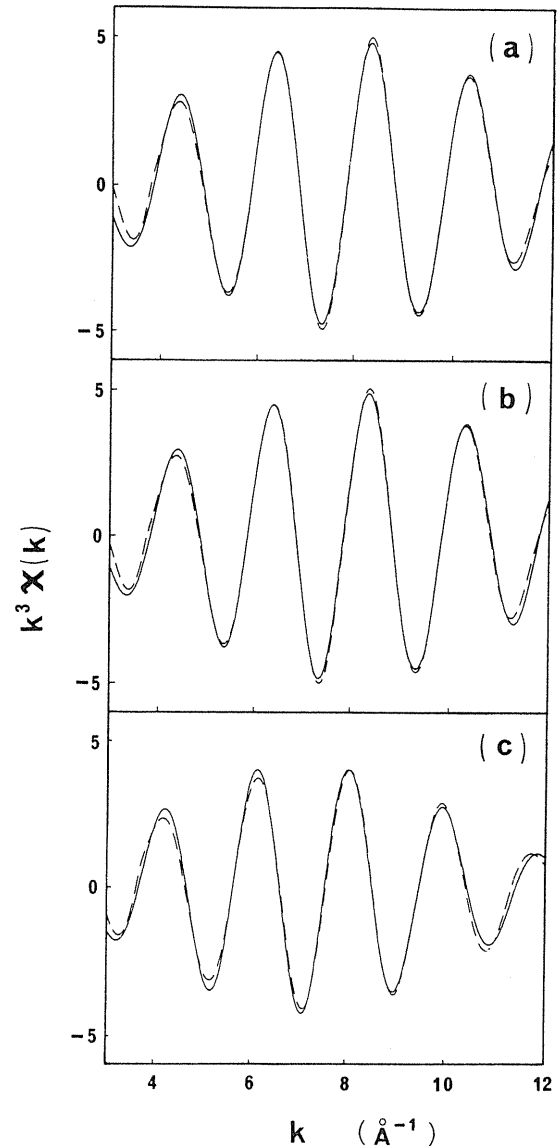


Fig.8 Fourier filtered first-shell EXAFS (solid lines) and the fits (dashed lines) of (a) Mb⁺CN⁻, (b) the intermediate and (c) deoxyMb.

位相シフト、後方散乱振幅はモデル物質から求めたものを用いた。その結果、Mb⁺CN⁻と中間体では、最近接原子の結合距離の平均値が 1.99 ± 0.01 Å、デオキシMbでは、 2.05 ± 0.01 Åであることが分かった。鉄ポルフィリンやヘムタンパク質では、鉄原子が低スピンから高スピン状態に変わると、鉄原子の位置がポルフィリン面内から面外に変位し、鉄-ポルフィリン窒素原子間の距離も変化することが知られている¹⁶⁾。中間体が低スピン状態であることを仮定すると、デオキシMbと他

の状態との結合距離の違いは、主としてスピン状態の違いにもとづく構造変化に由来することになる。Mb⁺CN⁻が還元を受けると、ヘム鉄は3価から2価になるが、CN⁻が解離するまで、鉄原子周辺の構造は変わらないという結論が得られる。

1M程度の高い濃度のKCNを共存させ、アルカリpH条件で、Mb⁺CN⁻をジチオナイトで還元すると、CN⁻の結合した2価鉄Mbを平衡状態で作り出すことが出来る¹⁷⁾。この状態の光吸収スペクトルは、中間体と同じく可視部に2本の吸収帯を持っているが、そのピークは肩のない滑らかな形をしている。中間体のスペクトルは、第6配位座近傍

のアミノ酸残基の置換により影響を受け易いことが知られているので、これらの状態のスペクトルの違いは、ヘム鉄に結合したCN⁻と周辺のアミノ酸残基との相互作用の違いを反映しているのかも知れない。

4. カルボキシペプチダーゼAの反応中間体

カルボキシペプチダーゼA(CPA)は、亜鉛イオンを1個含む、膵臓から分泌される消化酵素である。307個のアミノ酸からなる1本のポリペプチドが折りたたまれて、図9のような立体構造を形作っている¹⁸⁾。いくつかの酵素反応の一般的概念



Fig.9 Perspective drawing illustrating the back bone conformation of bovine pancreas carboxypeptidase A. The zinc atom is drawn as a stippled circle and the positions of the three protein ligands are shown by arrows. [From F. A. Quiocho and W. N. Lipscomb: Adv. Protein Chem. 25, 1 (1971)]

が、この酵素の研究から生まれ、発展してきた。その機能は、ポリペプチドのC末端のアミノ酸を加水分解することであり、フェニルアラニンのような疎水性の大きいC末端アミノ酸側鎖を持つ基質に対して選択的に作用する。活性部位には、2価の亜鉛イオンがあり、これには、His69のN、Glu72のO、His196のNと1個の水分子がほぼ正四面体型に配位している。この酵素と基質の反応の過程は、 Zn^{2+} を CO^{2+} に置換した酵素、蛍光性の基質などを利用して、さまざまな分光学的方法による研究が進んでいる¹⁹⁾。

図10は、CPAと蛍光性基質ダンシル-L-アラニル-L-アラニル-L-フェニルアラニンの反応の過程における蛍光強度の変化をストップフロー法により追跡したものである。この基質は、CPAと結合すると、室温で約1/100sで分解される。ここ

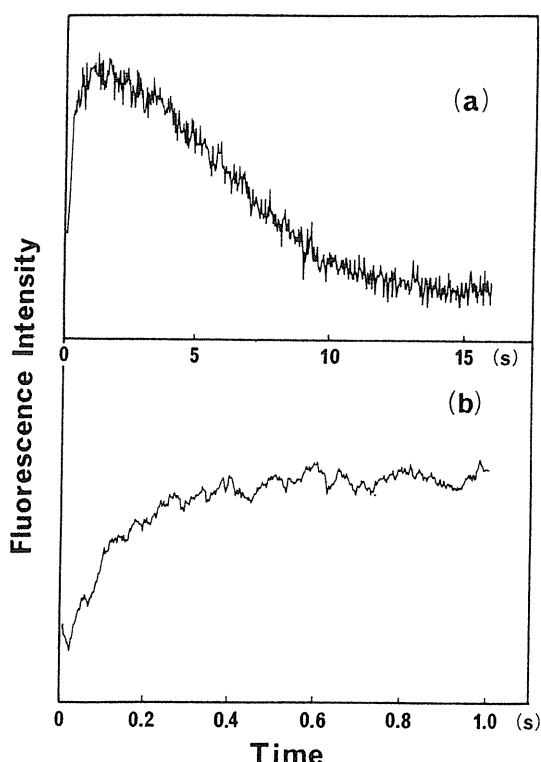
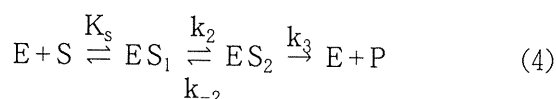


Fig.10 Fluorescence intensity change after low-temperature stopped-flow mixing of CPA and dansyl-alanyl-alanyl-phenylalanine. The fluorescence was excited at 340 nm and its intensity change was monitored in the visible region.

では、反応を遅くし、途中に現れる中間体を十分蓄積するために、5M $NaNO_3$ などの凍結防止剤の共存下で、 $-15^\circ C$ の低温で反応を観測している。図より、不感時間以内に終わる非常に速い過程、(b)に示される速い過程、(a)に見られるそれに続く遅い過程があることが分かる。Auldらのグループにより、反応の過程は次の図式で表されることが明らかにされている。



各過程の定数としては、 $K_s = 100 \mu M$, $k_2 = 40 s^{-1}$, $k_{-2} = 3 s^{-1}$, $k_3 = 1 s^{-1}$ ($-20^\circ C$, 4.5M $NaCl$ 共存下) が報告されている²⁰⁾。図10の不感時間内の蛍光の変化は、第1の中間体 ES_1 が形成される過程、速い変化は第2の中間体 ES_2 が生じる過程、遅い変化は基質が分解されて生成物を生じる過程を表している。

CPAと基質を低温で混合した後、7ms (b)と0.6s (c)の時点で急速凍結を行い、得られた試料のZn-K吸収端のX線吸収スペクトルの測定をした。これらのXANESスペクトルを、単独の酵素のスペクトル(a)と比較して、図11に示す。(b)と(c)の状態では、酵素はそれぞれ主として ES_1 と ES_2 の状態にあると思われる。(a)と(b)のスペクトルは形がよく似ている。このことは、 ES_1 がいわゆるミカエリス複合体であって、基質と亜鉛原子は直接の相互作用をしていないことを示唆している。これに対して(c)では、(a)、(b)に比べて主ピークが鋭く、幅が狭い。種々の低分子Zn錯体²¹⁾、ZnをCoに置換したカルボニックアンヒドラーゼ²²⁾、Znを含むコンカナバリンA²³⁾などの結果が示すように、金属の配位数が4配位から5配位あるいは6配位になると、K-吸収端の主ピークが鋭くなるとともに高さも増大する。このことは、現在のところ理論的な裏付けがなされていないが、金属原子のまわりの対称性の増加と関連づけて説明されるであろう。EXAFSの測定が完了

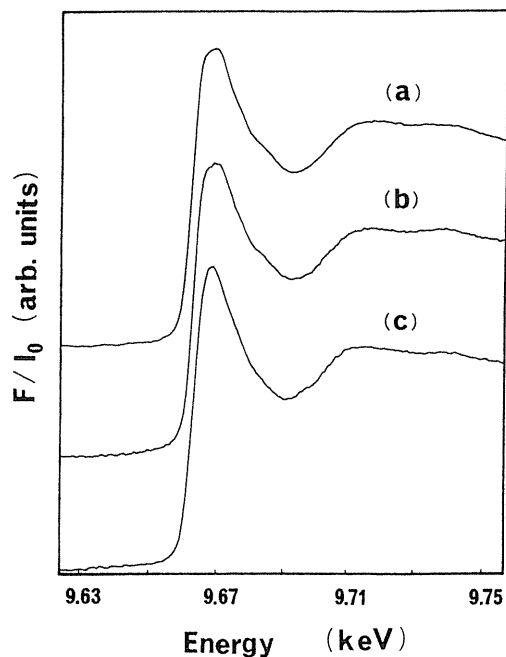


Fig. 11 Zn K-edge XANES spectra of (a) free CPA, (b) CPA rapidly frozen at 7 ms and (c) 0.6 s after mixing with dansyl-alanyl-alanyl-phenylalanine by using a low-temperature mixing device.

していない現段階では、確定的な結論を出すことは出来ないが、実験結果は、(c)に対応するES₂の状態で亜鉛原子が5配位または6配位になっている可能性を示しているように思われる。CPAの反応機構については、阻害剤と酵素の複合体のX線結晶解析の結果に基づいて、Lipscombら²⁴⁾は図12のような反応中間体のモデルを提唱している。加水分解の最初の過程で、切断されるペプチドのカルボニル基は、Zn²⁺に配位している水分子の攻撃を受けて、正四面体型中間体を形成する。この反応は、Glu-270とZn²⁺により促進される。正四面体型中間体では、基質がZn²⁺に2座配位し、Arg-127と相互作用することによって安定化されている。(c)のXANESスペクトルの特徴は、このモデルに示されるような亜鉛原子の配位構造を反映したものであるのかもしれない。

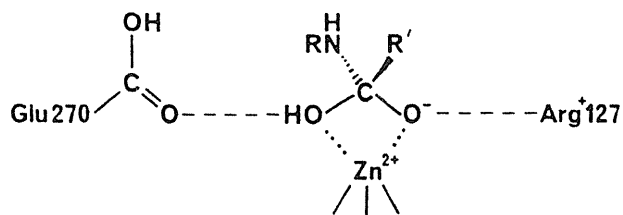


Fig. 12 Probable active site structure of the tetrahedral intermediate of CPA. [From D. W. Christianson and W. M. Lipscomb: *Acc. Chem. Res.* 22, 62 (1989)]

5. おわりに

急速凍結法とX線吸収スペクトル法を組み合わせ、反応中間体の構造解析をする方法の特徴と有用性について述べた。一般に、タンパク質の金属イオンの近傍には、CやNなどの軽い原子が多く、微妙な構造変化は、EXAFSよりもXANESの大きな変化となって現れることが多く、そこには機能的に重要な情報が含まれていると思われる。XANESの変化が、どのような構造変化に対応しているかを知るためには、構造既知のモデルと比較することも一つの方法であるが、理論的な計算の将来性が大きい。ここに述べた方法を用いて、生物物質の反応機構を明らかにするためにも、このような理論的計算方法がさらに発展することを望みたい。

ここに述べた研究は、自治医科大学・柴山修哉講師、千葉真純技師、放射光実験施設・野村昌治助教授、ユニソク・長村俊彦氏の御協力を得て行われた。これらの方々に、深く感謝致します。理化学研究所・飯塚哲太郎博士には、有益な御助言を頂きました。ここに厚く感謝の意を表します。

文献

- 1) D. C. Koningsberger and R. Prins, eds.: *X-ray Absorption: Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES* (John Wiley & Sons, 1988).

- 2) 松下 正, 大柳宏之, 西郷 敏: 日本結晶学会誌 **27**, 113 (1985).
- 3) D. M. Mills, A. Lewis, A. Harootunian, J. Huang and B. Smith: *Science* **223**, 811 (1984).
- 4) G. N. George, R. C. Bray and S. P. Cramer: *Biochem. Soc. Trans.* **14**, 651 (1986).
- 5) S. Saigo, N. Sone, T. Nagamura, H. Oyanagi, T. Iizuka, M. Kusunoki and T. Matsushita: *In Biophysics and Synchrotron Radiation* (A. Bianconi and A. Congiu-Castellano eds., Springer-Verlag, 1987), p.130.
- 6) S. Saigo, H. Hashimoto, N. Shibayama, M. Nomura and T. Nagamura: submitted to *Biochim. Biophys. Acta*.
- 7) R. Frahm: *Nucl. Instrum. Meth.* **A270**, 578 (1988).
- 8) R. C. Bray: *Biochem. J.* **81**, 189 (1961).
- 9) E. Antonini and M. Brunori: *Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands* (North-Holland, 1971).
- 10) E. Olivas, D. J. A. De Waal and R. G. Wilkins: *J. Biol. Chem.* **252**, 4038 (1977).
- 11) R. P. Cox and M. R. Hollaway: *Eur. J. Biochem.* **74**, 575 (1977).
- 12) A. Bellelli, G. Antonini, M. Brunori, B. A. Springer and S. G. Sligar: *J. Biol. Chem.* **265**, 18898 (1990).
- 13) M. Brunori, G. Antonini, G., M. Castagnola and A. Bellelli: *J. Biol. Chem.* **267**, 2258 (1992).
- 14) A. Bianconi, A. Congiu-Castellano, P. J. Durham, S. S. Hasnain and S. Phillips: *Nature* **318**, 685 (1985).
- 15) A. Bianconi, A. Congiu-Castellano, M. Dell'Aricecia, A. Giovannelli, E. Burattini and P. J. Durham: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**, 98 (1985).
- 16) W. R. Scheidt and C. A. Reed: *Chem. Rev.* **81**, 543 (1981).
- 17) D. Keilin and E. F. Hartree: *Biochem. J.* **61**, 153 (1955).
- 18) F. A. Quijcho and W. N. Lipscomb: *Adv. Protein Chem.* **25**, 1 (1971).
- 19) D. S. Auld, J. F. Riordan and B. L. Vallee: *Met. Ions Biol. Syst.* **25**, 359 (1989).
- 20) A. Galdes, D. S. Aulld and B. L. Vallee: *Biochemistry* **22**, 1888 (1983).
- 21) U. C. Srivastava and H. L. Nigam: *Coord. Chem. Rev.* **9**, 275(1972).
- 22) V. Yachandra, L. Powers and T. G. Spiro: *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 6596(1983).
- 23) S. L. Lin, E. A. Stern, A. J. Kalb and Y. Zhang: *Biochemistry* **30**, 2323(1991).
- 24) D. W. Christianson and W. N. Lipscomb: *Acc. Chem. Res.* **22**, 62(1989).