

フラビンモノヌクレオチド (FMN) と ϵ -[H₂Mo^V₁₂O₂₈(OH)₁₂(Mo^{VI}O₃)₄]⁶⁻ の相互作用に関 する電気化学的および熱力学的検討

石川 英里

Electrochemistry and Calorimetry of Interaction Between Flavin Mononucleotide (FMN) and ϵ -[H₂Mo^V₁₂O₂₈(OH)₁₂(Mo^{VI}O₃)₄]⁶⁻

Eri Ishikawa

The interaction of ϵ -[H₂Mo^V₁₂O₂₈(OH)₁₂(Mo^{VI}O₃)₄]⁶⁻ (ϵ -Mo₁₆) with flavin mononucleotide (FMN) has been investigated by direct current (d.c.) and differential pulse (d.p.) polarographic analyses and isothermal titration calorimetry (ITC) technique at the pH 7.5. The half-wave potential (-0.5 V vs. Ag/AgCl) of the d.c. polarogram for the quasi-reversible one-electron reduction of FMN was shifted by ϵ -Mo₁₆ toward a more positive potential with a resultant deviation from one-electron reduction to formally more than one-electron reduction waves. The ϵ -Mo₁₆ effect on the d.c.polarogram could be explained by a variety of FMN···(ϵ -Mo₁₆)_n (n>0) aggregates with multiple conformations which was supported by the thermodynamic parameters ($\Delta H = -29.7$ kJ·mol⁻¹, $\Delta S = -28.2$ kJ·mol⁻¹·K⁻¹, $\Delta G = -21.5$ kJ·mol⁻¹ and number of FMN in the binding with ϵ -Mo₁₆ (N) = 0.053 at 20 °C) estimated by the ITC measurement.

Keywords : Polyoxomolybdates, ϵ -Keggin structure, Flavin mononucleotide, Polarogram, Isothermal titration calorimetry, Antitumor agents

1. はじめに

イソポリモリブデン酸イオンの抗腫瘍活性は、山瀬らが [ⁱPrNH₃]₆[Mo^{VI}₇O₂₄]·3H₂O が乳癌に対して強い増殖抑制効果を示すことを見出したことをはじめとして研究が進められてきた¹⁾。その後、[ⁱPrNH₃]₆[Mo^{VI}₇O₂₄]·3H₂O とさらに[Me₃NH]₆[H₂Mo^V₁₂O₂₈(OH)₁₂(Mo^{VI}O₃)₄]·2H₂O がいずれも胃癌や膵臓癌に対して抗腫瘍活性を示すことが報告された²⁻⁴⁾。 ϵ -[H₂Mo^V₁₂O₂₈(OH)₁₂(Mo^{VI}O₃)₄]⁶⁻ (ϵ -Mo₁₆) は [Mo^{VI}₇O₂₄]⁶⁻ (Mo₇) の多電子還元種であり、Mo₇ を光化学的に還元することによって ϵ -Mo₁₆ の単離に成功し、その構造の詳細は単結晶 X 線構造解析によって明らかにされている⁵⁾。 ϵ -Mo₁₆ は 12 個の 5 価の Mo を含む Mo^VO₆ 八面体で構成される ϵ -Keggin 骨格に 4 個の Mo^{VI}O₃ が分子全体が T_d 対称を形成するように配位した構造を持つ⁵⁻⁶⁾。水溶液中において Mo₇ は pH 3~7, ϵ -Mo₁₆ は pH 5~9 の範囲で安定に存在する。Mo₇ の抗腫瘍活性のメカニズムを検討していく中で、山瀬らによって Mo₇ はフラビンモノヌク

レオチド (FMN) と 1 : 1 の会合体を形成することが電気化学的に確認された⁷⁾。FMN は細胞のミトコンドリア内の電子伝達系においてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド NADH からユビキノンの電子伝達体として機能し、このサイクルが回ることによって最終的に生命活動のエネルギー源である ATP の合成が進行する⁸⁻⁹⁾。図 1 に Mo₇ と ϵ -Mo₁₆, FMN の構造を示す。

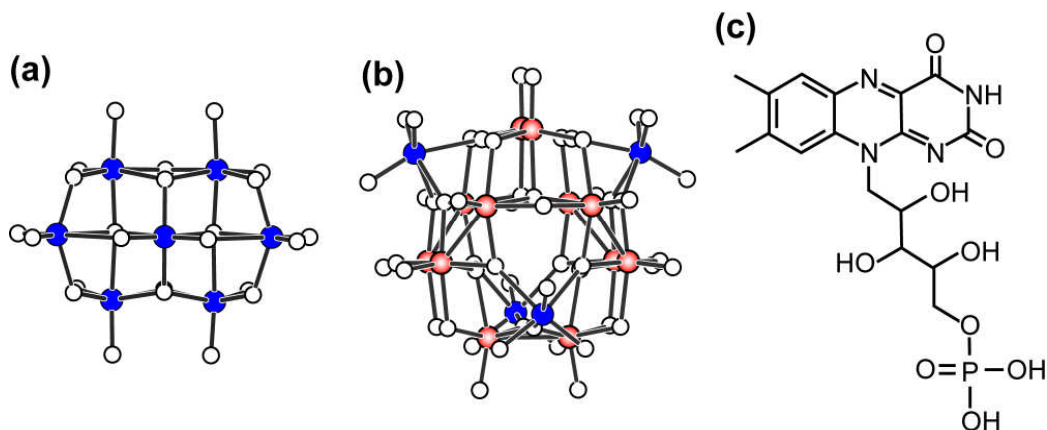


図 1. 各イオンや分子の構造 (a) [Mo₇O₂₄]⁶⁻ (b) ϵ -[H₂Mo^V₁₂O₂₈(OH)₁₂(Mo^{VI}O₃)₄]⁶⁻ (c) FMN
赤丸—Mo^V原子, 青丸—Mo^{VI}原子, 白丸—O 原子を示す。

pH 4.6 の水溶液中, Mo₇ が共存することによって FMN のポーラログラムは半波電位 $E_{1/2}$ を -0.3 V (vs. Ag/AgCl 電極) に示した。これは Mo₇ が共存しない FMN 水溶液で観測される -0.43 V よりも正電位側にシフトしていた。ポーラログラムを解析することによって FMN/ Mo₇ (pH 4.6) 反応系では 1:1 FMN-Mo₇ 会合体が形成されることや、さらに 1:1 FMN-Mo₇ 会合体の FMN サイトが還元されると FMN のセミキノラジカルである FMN[•] (FMNH[•]) が形成し、続いて FMN サイトから Mo₇ サイトに電子移動が起ることによって Mo₇ が触媒的に還元されることが明らかとなった。実際に ESR スペクトルの測定により 1:1 FMN-Mo₇ 会合体の可逆的な 1 電子還元を裏付ける事実として FMN[•] (FMNH[•]) に帰属されるシグナル ($g = 2.00$) と [Mo^VO₅(OH)] に帰属されるシグナル ($g = 1.92$) が確認されている^{7,10)}。

その後研究が進むにつれて Mo₇ の多電子還元体である ϵ -Mo₁₆ は Mo₇ よりも優れた抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった²⁻⁴⁾。本研究ではそのメカニズムを解明するために生理溶液と同じ pH7.5 水溶液中での ϵ -Mo₁₆ と FMN の相互作用をポーラログラフィーや等温滴下型マイクロカロリーメトリー (ITC) を測定することによって検討した。その結果, FMN/ ϵ -Mo₁₆ (pH 7.5) 反応系では様々な会合状態にある FMN $\cdots(\epsilon$ -Mo₁₆)_n ($n > 0$) 会合体が形成されており, ϵ -Mo₁₆ が FMN を囲い込んで FMN から NADH への電子伝達を阻害し、腫瘍細胞を死滅させることが推測された。

2. 実験

2.1. 試薬

[ⁱPrNH₃]₆[Mo^{VI}₇O₂₄] $\cdot$ 3H₂O¹¹⁾ と [Me₃NH]₆[H₂Mo^V₁₂O₂₈(OH)₁₂(MoO₃)₄] $\cdot$ 2H₂O⁵⁾ は既報の方法によって合成し、IR スペクトル測定によって定性した。FMN はナトリウム塩で和光純薬製の市販のものを使用した。各水溶液の pH 調整は HCl や NaOH を用いて行なった。

2.2. 装置と測定条件

IR スペクトルは日本分光製の Jasco FT-IR 5000 を用いて KBr ペレット法で測定した。³¹P NMR スペク

トルは日本電子製の JEOL JNM ECS-400 を用いて測定した。85%リン酸を外部標準とした。直流ポーラログラムや微分パルスポーラログラムは PerkinElmer 製の Model 303A Static Mercury Drop Electrode を用いて銀-塩化銀電極を参照電極として測定した。等温滴下型マイクロカロリメトリー (ITC) は MicroCal 製の VP-ITC を用いて測定した。セルにポリ酸水溶液を、シリンジに FMN 水溶液を充填してポリ酸水溶液に FMN 水溶液を滴下して測定した。得られた熱量変化のデータを装置付属のプログラム (Origin) で解析することによって結合定数 K , 1 分子の $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ に配位する FMN の分子数 N , 1 mol の FMN に対するエンタルピー変化量 ΔH を求めた。

本研究で用いた水溶液には測定に必要であれば電解質として 0.1M KCl を共存させた。

3. 結果と考察

3.1. $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ 存在下における FMN の電気化学的還元

FMN は生体内で 2 電子もしくは 1 電子伝達体として機能することが可能である⁸⁻⁹⁾。図 2 に 0.5 mM FMN 水溶液 (pH 7.5) の直流ポーラログラム (図 2 (a)) と微分パルスポーラログラム (図 2 (b)) を示す。いずれにおいても -0.5 V (vs. Ag/AgCl 電極) に半波電位 $E_{1/2}$ を持つ可逆なポーラログラムが観測された。この直流ポーラログラムで得られた電解電流値 i と拡散電流値 i_d より $\ln[(i_d-i)/i]$ を求め、この値に対して電位 E をプロットすると傾きが 29.2 mV となる直線が得られた。可逆的な還元反応では直線の傾きは 25.7 mV/ n (n は観測された反応に関与する電子数を示す) に従うことから n 値は 0.88 と求められ、図 2(a) の直流ポーラログラムは (1) 式に示した FMN の準可逆 1 電子還元反応に相当すると推定した¹²⁻¹⁵⁾。

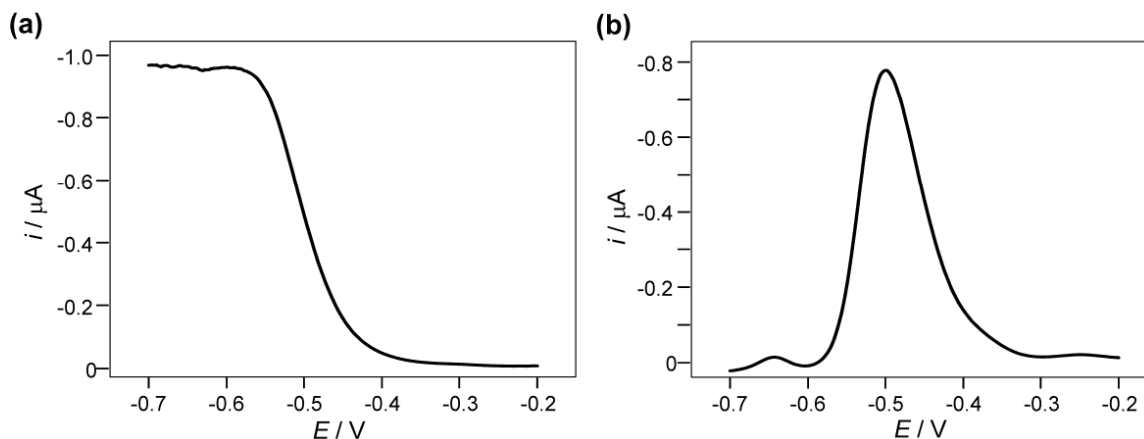


図 2. 0.5 mM FMN 水溶液 (pH 7.5, 0.1 M KCl 含む) の (a) 直流ポーラログラム (b) 微分パルスポーラログラム

0.5 mM FMN 水溶液に 0.2 mM となるように $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ を共存させた場合、直流ポーラログラムにおいて i_d 値には大きな変化は見られなかったが (FMN のみの系では 0.98 μA であるのに対して $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ を共存させた系では 0.91 μA)、半波電位 $E_{1/2}$ は -0.46 V と FMN のみの場合よりも正電位側へ移動した (図 3 (a))。 $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ のみを含んだ水溶液 (pH 7.5) のポーラログラムではおよそ -1.2 V に不可逆な還元波が観測されるが、-0.50 から -0.35 V の範囲ではピークは観測されないことから⁵⁾、 $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ が共存した FMN 水溶液のポーラログラムにおいて $E_{1/2}$ が正電位側へ移動したのは FMN と $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ が分子間相互作用によって弱

く結合した FMN $\cdots(\epsilon$ -Mo₁₆)_n (n>0) 会合体の形成によるものとされる。

0.5 mM FMN と 0.2 mM ϵ -Mo₁₆ が共存した水溶液 (pH 7.5) の直流ポーラログラムにおける $\ln[(i_d-i)/i]$ 値に対する E のプロットから得られる直線の傾きは 28.0 mV であった。この傾きの大きさは共存する ϵ -Mo₁₆ の濃度が大きくなるにつれて、小さくなる傾向が確認された。0.5 mM FMN に 5 mM もしくは 9.5 mM ϵ -Mo₁₆ が共存する水溶液のポーラログラムにおいて $E_{1/2}$ は -0.44 V (5 mM ϵ -Mo₁₆) と -0.43 V (9.5 mM ϵ -Mo₁₆)、傾きは 21.9 mV (5 mM ϵ -Mo₁₆) と 19.8 mV (9.5 mM ϵ -Mo₁₆) と求められ、これらはそれぞれ 1.2 電子還元 (5 mM ϵ -Mo₁₆) と 1.3 電子還元 (9.5 mM ϵ -Mo₁₆) に相当する。図 3(c) に 9.5 mM ϵ -Mo₁₆ が共存する水溶液の直流ポーラログラムを示す。もし (2) 式のような FMN の 2 電子還元反応が進行したとすれば ϵ -Mo₁₆ 濃度の増加に伴って i_d 値は増加するはずだが、共存する ϵ -Mo₁₆ 濃度を変化させても i_d 値は大きく変化しなかった。



これより直流ポーラログラムにおいて 1 電子以上の還元が観測されたのは、高濃度の ϵ -Mo₁₆ が共存する場合、少しずつ異なる $E_{1/2}$ 値を持つ様々な会合比の FMN $\cdots(\epsilon$ -Mo₁₆)_n 会合体が同時に形成して、それぞれの 1 電子還元のパークが重なったためと考えた。

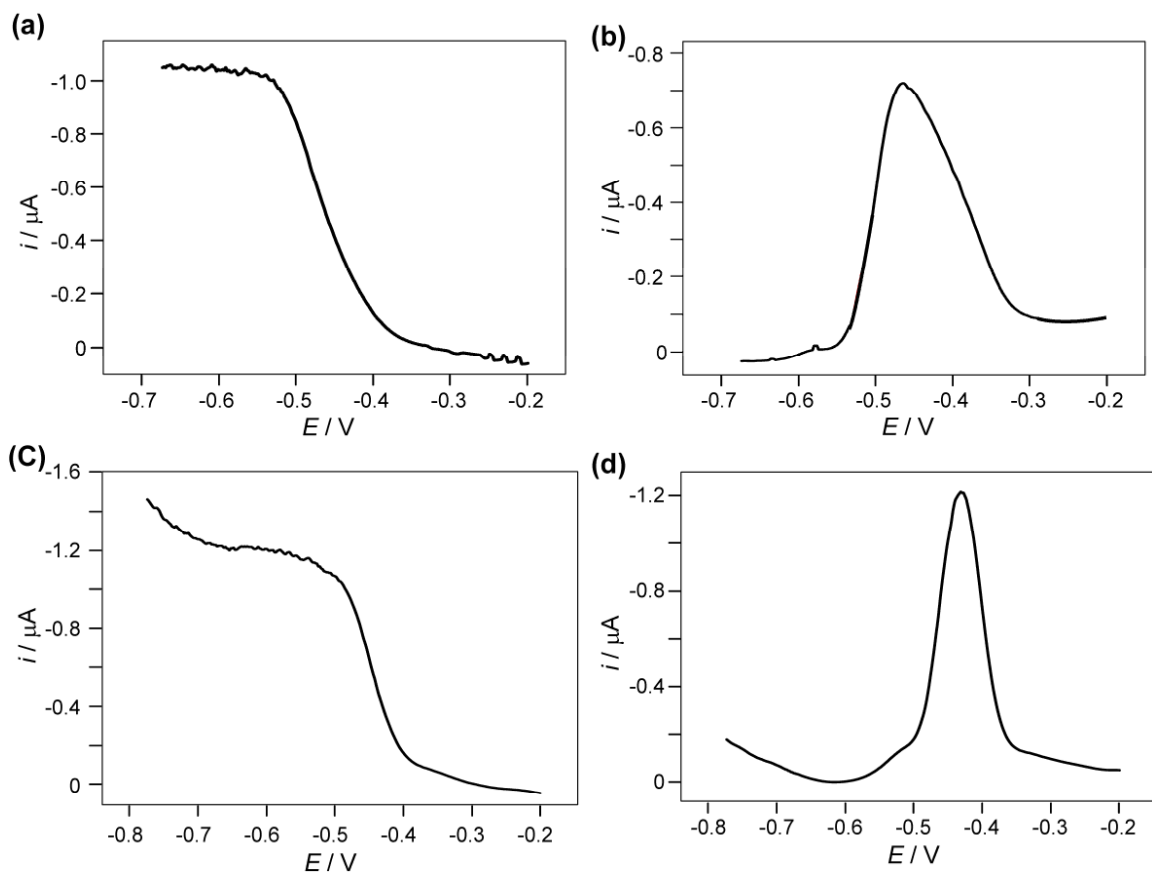


図 3. ϵ -Mo₁₆ を共存させた 0.5mM FMN 水溶液 (pH 7.5, 0.1 M KCl 含む) のポーラログラム (a) 0.2 mM ϵ -Mo₁₆ 共存, 直流ポーラログラム (b) 0.2 mM ϵ -Mo₁₆ 共存, 微分パルスポーラログラム (c) 9.5 mM ϵ -Mo₁₆ 共存, 直流ポーラログラム (d) 9.5 mM ϵ -Mo₁₆ 共存, 微分パルスポーラログラム

3.2. 等温滴下型カロリメトリー (ITC) を用いた FMN···(ϵ -Mo₁₆)_n 会合体形成に関する熱力学検討

pH 7.5 における FMN···(ϵ -Mo₁₆)_n 会合体形成の熱力学的パラメーターと化学量論比を ITC 測定によって求めた. ITC 測定では ϵ -Mo₁₆ 水溶液に FMN 水溶液を徐々に滴下した. この時のわずかな熱量変化を ϵ -Mo₁₆ に対する FMN のモル比 (FMN/ ϵ -Mo₁₆) に対してプロットし, 得られた曲線を装置付属のプログラムを使って解析することによって実験データから結合定数 K , 1 分子の ϵ -Mo₁₆ に配位する FMN の分子数 N , 1 mol の FMN に対するエンタルピー変化量 ΔH を求め, 1 mol の FMN に対するエントロピー変化量 ΔS は K 値と ΔH 値から計算した ($\Delta H = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S$). 図 4 に ϵ -Mo₁₆ 水溶液に FMN 水溶液を滴下して測定した ITC のデータを, 表 1 に種々の条件で ITC 測定し, 得られた熱力学的パラメーターを示した. ϵ -Mo₁₆ 水溶液に FMN 水溶液を滴下したところ, 電解質である KCl の有無や温度 (10 °C, 20 °C, 30 °C) にかかわらず発熱反応が進行した. 興味深い結果としていずれの条件でも N 値は 0.034 から 0.053 と小さな値を, ΔS は -93.8 から -18.2 J·mol⁻¹·K⁻¹ と負の値を示した. N 値が 0.034 から 0.053 ということは 1 分子の ϵ -Mo₁₆ に 0.034 から 0.053 個の FMN 分子が配位すること, 言い換えれば 1 分子の FMN に 19 から 28 個の ϵ -Mo₁₆ が配位することを表している. また ΔS 値が負の値を示し, エントロピーとしては不利な反応が進行していることから, FMN に多くの ϵ -Mo₁₆ が会合した会合体が形成していることが推定される. 同様の挙動が pH 7.5 の条件下, ϵ -Mo₁₆ 水溶液に ATP を滴下した場合にも確認されており ($N = 0.036$, $\Delta S = -18.2$ J·mol⁻¹·K⁻¹), これは ATP のリン酸基部分に多くの ϵ -Mo₁₆ が会合して ATP の構造を固定化したためと考察されている¹⁶⁾.

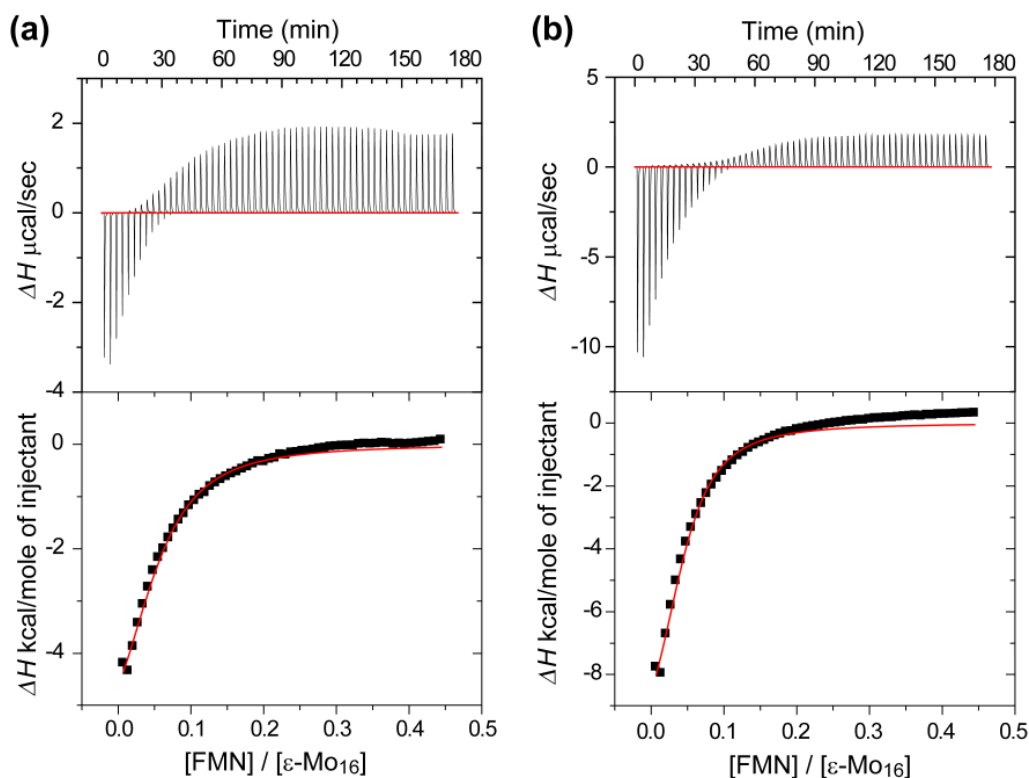


図 4. 5 mM ϵ -Mo₁₆ 水溶液に 10 mM FMN 水溶液を滴下した ITC データ (pH 7.5, 20 °C) (a) KCl を含まない (b) 0.1 M KCl 共存. (a) (b) とともに上段のグラフは一定時間ごとに 5 μ l ずつ FMN 水溶液を滴下した際の熱量変化を表したものの, 下段のグラフは滴下ごとの熱量変化を FMN と ϵ -Mo₁₆ のモル比に対して表したものの. 赤線は装置付属のプログラムを用いて変化の様子を最適化して得られた曲線.

表 1. FMN と ϵ -Mo₁₆ (pH 7.5) もしくは Mo₇ (pH 4.6) の相互作用に対する熱力学的パラメーター

	K (M ⁻¹)	ΔH (kJ·mol ⁻¹)	ΔS (J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹)	ΔG (kJ·mol ⁻¹)	N
ϵ -Mo ₁₆ , 20℃	1.04×10^4	-50.0	-93.8	-22.5	0.044
ϵ -Mo ₁₆ , 0.1 M KCl 含む 10℃	5.09×10^3	-25.3	-18.2	-20.1	0.037
ϵ -Mo ₁₆ , 0.1 M KCl 含む 20℃	6.65×10^3	-29.7	-28.2	-21.5	0.053
ϵ -Mo ₁₆ , 0.1 M KCl 含む 30℃	3.52×10^3	-36.7	-53.0	-20.6	0.034
Mo ₇ , 20℃	2.57×10^3	-30.8	-39.8	-19.1	1.39

ϵ -Mo₁₆ と同様に抗腫瘍活性を持つ Mo₇ を FMN 水溶液 (pH 4.6) に共存させた系の直流ポーラログラムの $E_{1/2}$ は -0.3 V を示し, FMN のみ系の -0.43 V よりも正電位側にシフトする⁷⁾. しかし 1 電子以上の還元量を示した ϵ -Mo₁₆ の場合と異なり Mo₇ でははっきりと 1 電子還元であることが示され, 直流ポーラログラムをさらに解析することによって FMN と Mo₇ が 1:1 で配位した会合体が形成していることが確認されている. 1:1 FMN-Mo₇ 会合体の形成を ITC 測定 (図 5) によっても確認したところ N 値は 1.39 と求められた (表 1). この結果は電気化学的に確認されていた 1:1 FMN-Mo₇ 会合体の形成を裏付けるものであり, N 値が 0.034 から 0.053 と小さく, 多くの ϵ -Mo₁₆ が会合した会合体が形成する FMN/ ϵ -Mo₁₆ の系とは大きく異なっていた.

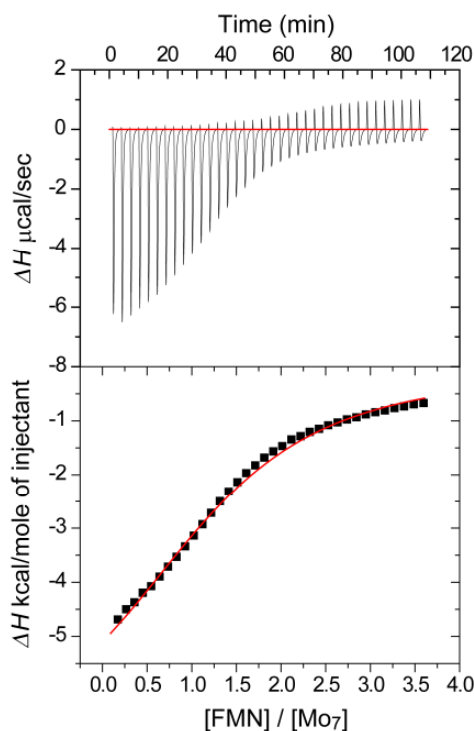


図 5. 0.6 mM Mo₇ 水溶液に 10 mM FMN 水溶液を滴下した ITC データ (pH 4.6, 20 ℃). 上段のグラフは一定時間ごとに 8 μl ずつ FMN 水溶液を滴下した際の熱量変化を表したもので, 下段のグラフは滴下ごとの熱量変化を FMN と Mo₇ のモル比に対して表したもので, 赤線は装置付属のプログラムを用いて変化の様子を最適化して得られた曲線.

3.3. ^{31}P NMR スペクトル測定による FMN/ $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ 反応系と FMN/ Mo_7 反応系の検討

FMN/ $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ 反応系 (pH 7.5) と FMN/ Mo_7 反応系 (pH 4.6) を ^{31}P NMR スペクトル測定によって検討した. 図 6(a), (b) に FMN/ $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ 反応系の ^{31}P NMR スペクトルを示す. pH 7.5 の 10 mM FMN 水溶液では FMN のリン酸基由来のシグナルが 1 本, 5.03 ppm に観測された. これに対して 10 mM $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ を共存させるとわずかに高磁場シフトした 4.90 ppm にシグナルが観測され, これは FMN $\cdots(\epsilon\text{-Mo}_{16})_n$ 会合体によるものと考えた. 図 6(c)-(f) に FMN/ Mo_7 反応系の ^{31}P NMR スペクトルを示す. pH 4.6 の 10 mM FMN 水溶液では 2.09 ppm に 1 本のシグナルが観測された. 共存する Mo_7 を 2 mM, 10 mM, 20 mM と変化させたところ, それぞれ 2.00 から 2.11 ppm 附近に 1 本と 1.87 から 1.91 ppm 附近に 1 本, 合計で 2 本のシグナルが観測された. これら 2 本のシグナルの積分比は Mo_7 濃度によって変化し, Mo_7 濃度が増加するにしたがって高磁場側の 1.87 から 1.91 ppm 附近のシグナルの積分比も増加しており, このシグナルは 1:1 FMN- Mo_7 会合体によるものと考えられる. このように FMN/ $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ 反応系 (pH 7.5) ではわずかに高磁場シフトした 4.90 ppm に様々な凝集状態にある FMN $\cdots(\epsilon\text{-Mo}_{16})_n$ 会合体に帰属されるシグナルが観測されるのに対して, FMN/ Mo_7 反応系 (pH 5.6) では配位していない FMN と 1:1 FMN- Mo_7 会合体がそれぞれ 2.05 ppm 附近と 1.90 ppm 附近にはっきりと分離して観測された.

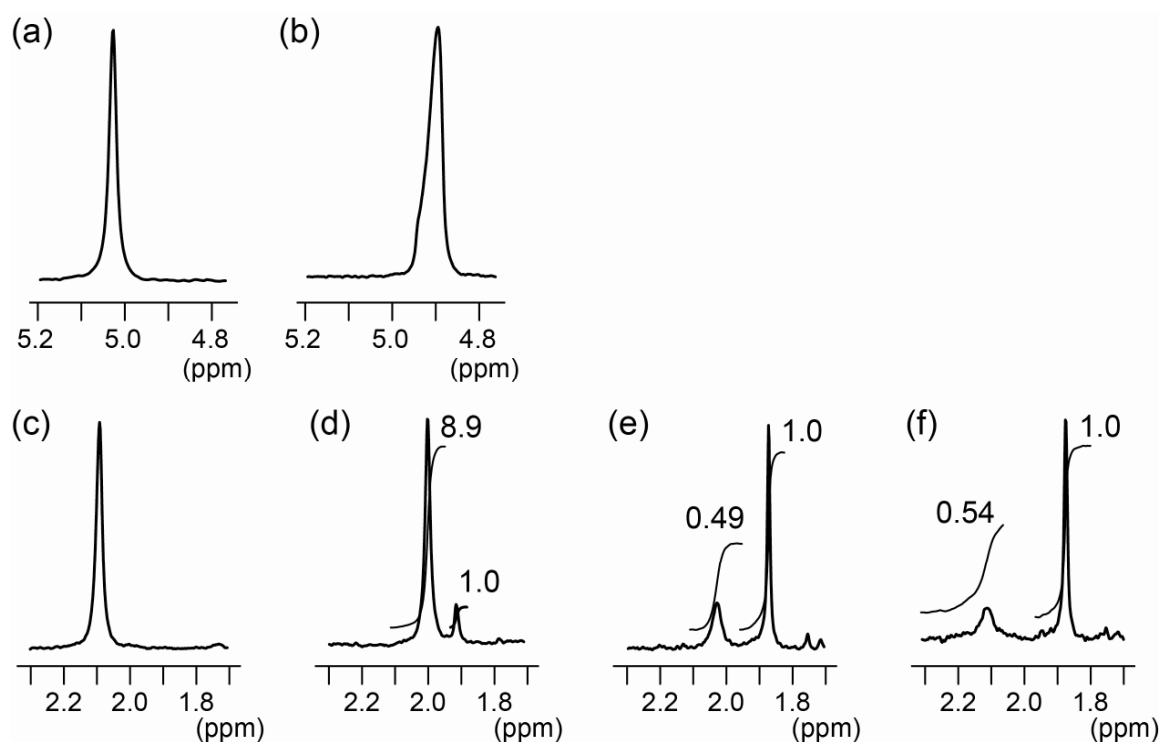
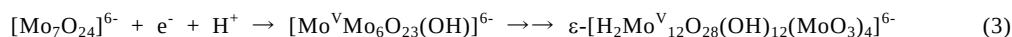


図 6. 10 mM FMN 水溶液の ^{31}P NMR スペクトル (a) pH 7.5, 0.1 M KCl 含む (b) pH 7.5, 10 mM $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ と 0.1 M KCl 含む (c) pH 4.6, FMN のみ (d) pH 4.6, 2 mM Mo_7 含む (e) pH 4.6, 10 mM Mo_7 含む (f) pH 4.6, 20 mM Mo_7 含む. (d)–(f) においてスペクトル内の数値は各シグナルの積分比を表す.

このように FMN の周囲に $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ が凝集した FMN $\cdots(\epsilon\text{-Mo}_{16})_n$ 会合体が形成することが確認され, この事実から $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ の抗腫瘍活性について次のように考察した. 細胞のミトコンドリア内の電子伝達系において FMN は NADH と結合して NADH 脱水素酵素を形成して存在している. しかし, $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ が共存することによって FMN を多数の $\epsilon\text{-Mo}_{16}$ が取り囲むこと (FMN $\cdots(\epsilon\text{-Mo}_{16})_n$ 会合体を形成) によって FMN が NADH 近傍に位置することができなくなり, NADH から FMN への電子移動 ($\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow$

FMNH₂ + NAD⁺) が阻害されてミトコンドリア内での電子伝達系のサイクルが断ち切れ、結果として生命活動のエネルギー源である ATP が生産できずに腫瘍細胞が死滅する. ϵ -Mo₁₆ は Mo₇ を還元することによって得られる還元体の 1 つであることから Mo₇ による抗腫瘍活性に関しても次のように ϵ -Mo₁₆ の関与が推測される. 1:1 FMN-Mo₇ 会合体において FMN サイトが電気的に還元されると FMN[•] (もしくは FMNH[•]) から Mo₇ サイトへ電荷移動が起こり, Mo₇ 部分が還元される. (3)式のように Mo₇ ([Mo₇O₂₄]⁶⁻) が多電子還元を受けて ϵ -Mo₁₆ (ϵ -[H₂Mo^V₁₂O₂₈(OH)₁₂(MoO₃)₄]⁶⁻) が形成すると, ϵ -Mo₁₆ が FMN に会合して腫瘍細胞の死滅を促進させていると考察した.



謝辞

本研究は中部大学総合工学研究所 平成 26 年度～27 年度の第 1 部門の援助を受け遂行されたものであり, ここに謝意を表します.

参考文献

- 1) T. Yamase, H. Fujita, and K. Fukushima (1988), *Inorg. Chim. Acta* **151**, L15-L18.
- 2) A. Ogata, S. Mitsui, H. Yanagie, H. Kasano, T. Hisa, T. Yamase, and M. Eriguchi (2005), *Biomedicine and Pharmacotherapy*, **59**, 240-244.
- 3) S. Mitsui, A. Ogata, H. Yanagie, H. Kasano, T. Hisa, T. Yamase, and M. Eriguchi (2006), *Biomedicine and Pharmacotherapy* **60**, 353-358.
- 4) A. Ogata, H. Yanagie, E. Ishikawa, Y. Morishita, S. Mitsui, A. Yamashita, K. Kasumi, S. Takamoto, T. Yamase, and M. Eriguchi (2008), *Br. J. Cancer* **98**, 399-409.
- 5) T. Yamase and E. Ishikawa (2008), *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **81**, 983-991.
- 6) M. I. Khan, A. Müller, s. Dillinger, H. Bögge, Q. Chen, and J. Zubieta (1993), *Angew. Chem. Int. Ed.* **32**, 1780-1782.
- 7) T. Yamase and K. Tomita (1990), *Inorg. Chim. Acta* **169**, 147-150.
- 8) P.W.Kuchel and G. B. Ralston, *Schaum's Outline of Theory and Problem of Biochemistry* McGraw-Hill Inc. (1988).
- 9) L. Stryer, *Biochemistry* (Freeman, San Francisco 1975).
- 10) T. Yamase (1982), *JCS Dalton Trans.* 344-350.
- 11) T. Yamase, T. Ikawa (1977), *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **50**, 746-749.
- 12) R. D. Draper, L. L. Ingraham (1968), *Arch. Biochem. Biophys.* **125**, 802-808.
- 13) E. J. Land and A. J. Swallow (1969), *Biochemistry* **8**, 217-2125.
- 14) P. Hemmerich, V. Massey, H. Fenner (1977), *FEBS Lett.* **84**, 5-21.
- 15) T. Yamase (1981), *Photochem. Photobiol.* **34**, 111-114.
- 16) E. Ishikawa and T. Yamase (2013), *J. Inorg. Biochem.* 1917-1925.