

Sodium Fluoride による Dopamine β -Hydroxylase 阻害作用

小山 英子 村井 繁夫 伊藤 忠信

岩手医科大学歯学部薬理学講座* (主任: 伊藤忠信教授)

[受付: 1981年1月22日]

抄録: フッ化物の生体におよぼす影響の一端を明らかにするため dopamine β -hydroxylase (D β H) に対する NaF の阻害作用を検討した。酵素標本は Friedman and Kaufman の方法を一部改良してウシ副腎髄質より調製し、また D β H 活性は Van der Schoot et al. の方法に従って測定した。NaF は 10mM 濃度で D β H 活性を40%阻害した。基質 tyramine から octopamine の形成は、NaF のあるなしにかかわらず、incubation 時間 (20分まで) とともにほぼ直線的に増大し、酵素量 (60, μ g 蛋白質質量まで) と正の相関を示した。preincubation 時間の延長とともに NaF による阻害の程度は増加した。NaF による阻害様式は Lineweaver-Burk plot より、基質 tyramine, cofactor の ascorbic acid に対して、ともに非拮抗的阻害を示した。Cu⁺⁺ の添加により阻害の回復がみられなかったが、12時間透析により阻害の回復がみられた。以上の結果より、NaF は明らかに D β H 阻害作用を有し、その阻害は可逆的なものであることが明らかにされた。

緒 言

近年にはいって、予防歯科学が急速にクローズアップされ、ウ蝕の予防手段が種々検討されてきた。なかでもフッ化物の応用は、現在、ウ蝕予防の分野で主要な地位を占めるにいたっている。それにともない、ウ蝕予防作用を含めたフッ化物の生体作用に関して、より詳細な検討がなされてきた¹⁻²⁾。その結果、フッ化物は、ウ蝕原性細菌の酸産生過程に関与する酵素群³⁻⁶⁾ やエネルギー代謝⁷⁻⁹⁾ に対して、また血清中の lactic dehydrogenase, acid phosphatase, glutamic transaminase, alkaline phosphatase のなど酵素¹⁰⁻¹²⁾ に対して阻害作用を示すことが明らかにされた。これらの知見は、フッ化物が生体の様々な酵素系に対して影響を持つ可能性を示唆するものである。

最近、唾液腺細胞の増殖がカテコールアミン

(CA) の β 効果により惹起されること¹³⁻¹⁶⁾、また唾液分泌特にアミラーゼの分泌も CA の β 効果により著明な促進を受けること¹⁷⁾ など、口腔領域における CA の役割が注目されてきている。そこで著者らは、NaF の生体への影響に関する研究の一環として¹⁸⁻¹⁹⁾、CA 生合成系の重要な酵素である dopamine β -hydroxylase (D β H) に対する NaF の影響を検討した。

実験材料および方法

1. 酵素標本の調製

D β H の調製は Friedman and Kaufman の方法²⁰⁾ を一部改良して行なった。まず、ウシ副腎髄質を homogenize し 700 \times g, 10分間遠心分離して核分画を除去し上清を得た。その上清を 1,000 \times g, 1時間遠心分離して得られた沈殿物を 0.02M リン酸緩衝液 (pH6.5) に懸濁した。この懸濁液に界面活性剤 Nikol O P-

Inhibition of dopamine β -hydroxylase by sodium fluoride

Hideko OYAMA, Shigeo MURAI and Tadanobu ITOH

(Department of Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

*岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 6: 48-55, 1981

10を加えて蛋白を可溶化した後、44,000×g、90分間遠心分離して上清を得た。その上清を80%飽和硫酸処理して沈殿物を得た。この沈殿物を0.02Mリン酸緩衝液に懸濁した後、活性炭処理と透析を行った。その後再び40%飽和硫酸処理をくりかえし、得られた懸濁液を、0.02Mリン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化した DEAE-cellulose column に吸着させ、0.04 M—0.5 Mまで gradient にリン酸緩衝液 (pH 6.5) の濃度をあげ、DβH を溶出させた。本実験では0.08M—0.15Mリン酸緩衝液濃度の部分に溶出された DβH を凍結乾燥した後、部分精製標本として用いた。

2. DβH 活性測定法

酵素活性は Van der Schoot et al.²¹⁾の方法に従って測定した。反応液 (1.0 ml) としては、potassium phosphate buffer (pH 5.5) 200 μmoles ; fumaric acid, 10 μmoles ; ascorbic acid, 10 μmoles ; catalase (最大速度を与える量) ; 酵素標本, 20—50 μg 蛋白質質量 ; tyramine-HCl, 10 μmoles を用いた。5分間 preincubation した後、基質 tyramine 添加により反応を開始し、37°C, 15分間 incubation を行った。Control としては5分間 preincubation 後、直ちに反応を停止したものを用いた。生じた octopamine は 2% NaIO₄, 0.3 ml の添加により過ヨウ素酸分解して p-hydroxybenzaldehyde を生成させ、10% Na₂S₂O₅, 0.3 ml 添加により反応停止後、再蒸留水を加えて全量を 5 ml とした。p-hydroxybenzaldehyde の濃度は日立EPU-2Aを用いて 330 mμ における UV 吸収により測定した。

3. 蛋白量の測定

蛋白量の定量には、牛血清 albumin (fraction V, Sigma) を標準物質として、Biuret および Lowry 法²²⁾を用いた。

4. 試薬

tyramine-HCl は第一化学薬品, crystalline catalase は Sigma 社, Nikol OP-10 は日光ケミカルズ, その他の試薬は市販のものを用いた。

実験結果

1. NaF による DβH 阻害作用

NaF の DβH に対する効果を検討した。DβH 活性は NaF の濃度が増加するにつれて非直線的に低下した。NaF は10mM の濃度で DβH 活性を40%阻害した (Fig. 1)。

2. DβH 活性の経時変化と酵素量との関連 Fig. 2 に示したように、基質 tyramine か

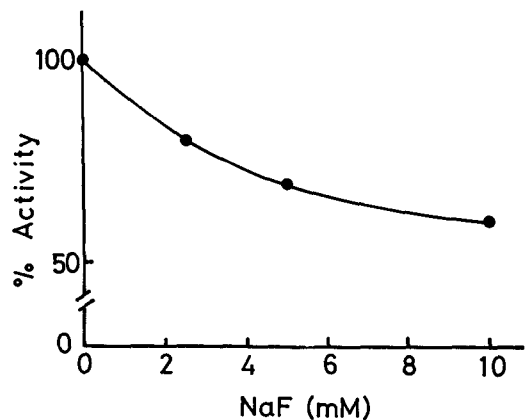


Fig. 1 Effect of concentration of NaF on the activity of dopamine β-hydroxylase. NaF was preincubated for 5 min with enzyme before substrate was added. See Materials and Methods for other conditions of assay.

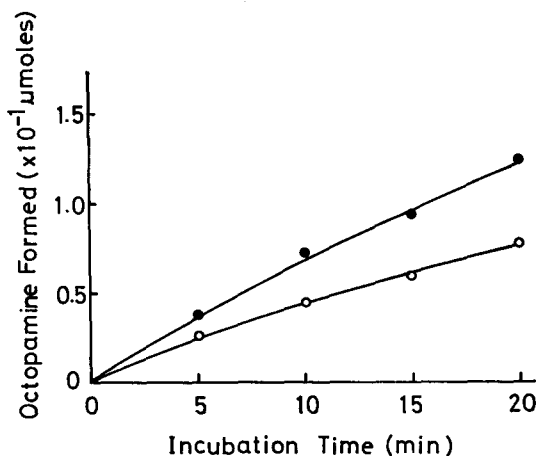


Fig. 2 Octopamine formation as a function of incubation time in the absence (—●—) and presence (—○—) of NaF (10mM).

ら octopamine の形成は, NaF のあるなしにかかわらず, 37°C の incubation 温度において, 少なくとも20分まで, 反応はほぼ直線的に進行した。

また Fig. 3 に示したように, DβH 活性は NaF のあるなしにかかわらず反応系に添加される酵素量の増加とともに増大した。

3. NaF による DβH 阻害作用に対する preincubation 時間の影響

NaF による DβH 阻害に対する preincubation 時間の影響を検討したところ, NaF による DβH 阻害の程度は preincubation の時間とともに増加した (Fig. 4)。

4. NaF による DβH 阻害作用に対する incubation 温度の影響

次に30°Cと37°Cの2つの異なる incubation 温度において, DβH に対する NaF の効果を検討した。NaF による DβH 活性阻害の程度は 30°C よりも 37°C 測定時により強くみられた。NaF 非存在下, incubation 温度を 37°C から 30°C に低下すると, 30°C 測定時の DβH 活性は 37°C 測定時の約50%に低下した (Fig. 5)。

5. DβH 活性に及ぼす KF および NaCl の影響

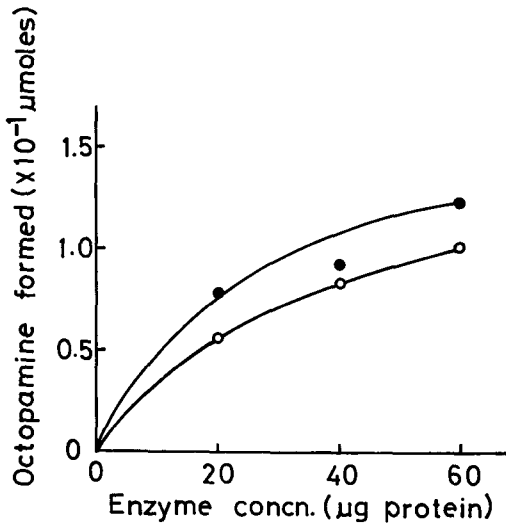


Fig. 3 Octopamine formation as a function of enzyme concentration in the absence (—●—) and presence (—○—) of NaF (5 mM)

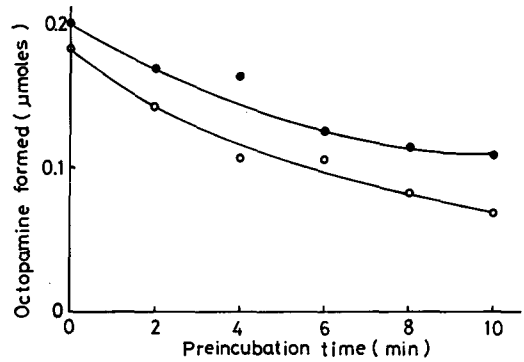


Fig. 4 Effect of preincubation time at 37°C on dopamine β-hydroxylase in the absence (—●—) and presence (—○—) of NaF (5 mM).

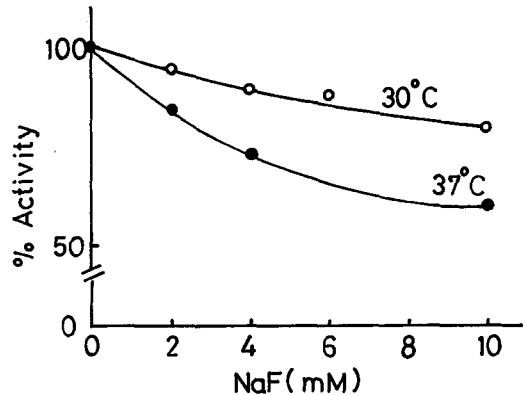


Fig. 5 Dopamine β-hydroxylase activity at 30°C (—○—) and 37°C (—●—) in the presence of various concentrations of NaF.

Activity was measured in a 15-min assay under standard conditions. NaF was included in the assay mixture at the concentrations indicated.

NaF による DβH 阻害が Na⁺ によるものか F⁻ によるものかを知る目的で, NaCl および KF による DβH 活性に対する影響を検討した。KF による DβH 阻害作用は NaF による阻害作用より幾分弱く, 10mM の濃度で約32%の阻害を示した。一方, NaCl は10mM の濃度でも約15%の阻害を示したにすぎなかった (Fig. 6)。

6. Lineweaver-Burk plot による DβH 阻害様式の検討

Lineweaver-Burk plot により NaF の阻害様式を検討したところ, NaF は基質 tyramine に対して非拮抗的阻害を示し, また co-factor の一つである ascorbic acid に対しても同様に非拮抗的阻害を示した (Figs. 7, 8)。

7. NaF による DβH 阻害作用に対する Cu⁺ の影響

DβH は活性中心に Cu⁺ を含む金属酵素なので, NaF による DβH 阻害作用と Cu⁺ との関係を検討した。NaF による DβH 阻害作用は Cu⁺ 添加により回復を示さなかった。NaF 非

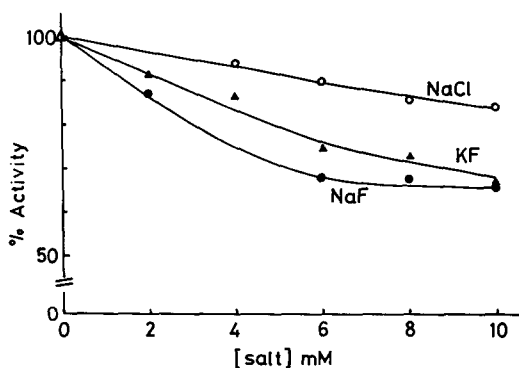


Fig. 6 Effects of NaF, NaCl and KF on dopamine β-hydroxylase.

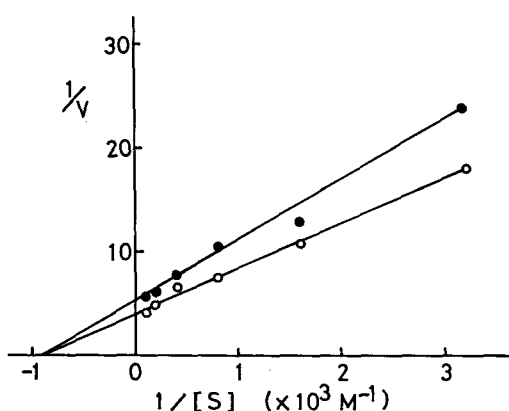


Fig. 7 Lineweaver-Burk plots of tyramine concentration against the rate of octopamine formation with and without NaF.

—○— without inhibitor
—●— with NaF (10mM)

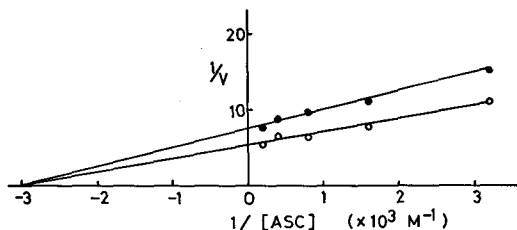


Fig. 8 Lineweaver-Burk plots of ascorbic acid concentration against the rate of hydroxylation with and without NaF.
—○— without inhibitor
—●— with NaF (10mM)

存在時における DβH 活性は高濃度 (1 × 10⁻⁶ M, 5 × 10⁻⁶ M) の Cu⁺ 添加により低下した (Table I)。

8. NaF による DβH 阻害作用に対する透析の影響

NaF による DβH 阻害が可逆的か否かを知る目的で, 透析による阻害の回復の有無を検討した。DβH 酵素を NaF (最終濃度: 5 mM) とあらかじめ, 37°C, 10分間 incubate した後, 一部は活性を測定するためとり除き, 残りを1,000倍量の10mMリン酸緩衝液(pH 7.2) に対して, 4°C, 12時間透析した。その結果, Table IIに示すように, NaF による DβH 阻害は透析により完全に回復した。

考 察

Norepinephrine 生合成の最終段階の合成酵

Table I Effect of Cu⁺⁺ on the inhibition of dopamine β-hydroxylase by NaF

Cu ⁺⁺ concn (M)	Dopamine β-hydroxylase* (% of control activity)	
	Enzyme alone	Enzyme plus 10 mM NaF
0	100	64.3
5 × 10 ⁻⁶	8.2	8.1
1 × 10 ⁻⁶	15.1	7.6
1 × 10 ⁻⁷	92.9	63.0

*The enzyme was preincubated with NaF and Cu⁺⁺ at 37°C for 5 min. The reaction was started by the addition of the substrate; the reaction mixture was incubated for 15 min at 37°C.

Table II Effect of dialysis on NaF-pretreated dopamine β -hydroxylase

	Dopamine β -hydroxylase* (% of control activity)	
	Before dialysis	After dialysis
Control	100	100
NaF-pretreated enzyme	74	98

*The enzyme was pretreated with NaF for 10 min at 37°C. One portion was then removed for the assay of enzyme activity (final NaF concentration, 5 mM), and the other portions were dialyzed against 1000 vol. of 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) at 4°C for 12 hrs.

素として存在する D β H²³⁾ は銅を含み²⁴⁾, cofactor として ascorbic acid²⁵⁾を必要とする酵素である。生体内において D β H は副腎²⁵⁾, 脳²⁶⁾および心臓²⁷⁻²⁸⁾などの交感神経支配臓器に豊富に認められ, 細胞内では CA 含有顆粒²⁹⁾に認められる。また D β H は種々の哺乳動物の血清中にも存在し³⁰⁻³¹⁾, 血清中の D β H は神経末端から CA と同時に分泌されることが判明しており³¹⁻³²⁾, 神経芽細胞腫³³⁾や褐色細胞腫³⁴⁾の診断などの臨床的応用が検討されている。口腔組織における D β H に関する報告はいまだほとんどみられないが, 緒言でも述べたように唾液腺の機能に関して CA が重要な役割を果たしていることからみて¹³⁻¹⁷⁾, 唾液腺の機能維持に D β H の動態が何らかの影響を持つものと考えられる。

D β H は phenylethylamine 関連構造物質²¹⁾³⁵⁻³⁷⁾, disulfiram などの銅のキレート剤³⁸⁻⁴²⁾, cysteine などの SH 化合物⁴³⁾, fusaric acid とその誘導体⁴⁴⁻⁴⁶⁾, 各種の alkyl および aromatic thiourea⁴⁷⁻⁵⁰⁾ など多くの化合物に阻害されることが知られている。しかしながら, D β H と NaF との関係についてはまだ報告はない。

今回の実験により, NaF は D β H 活性を阻害することが明らかになった。ただし, その阻害作用は 10mM の濃度で 40% で, 従来報告されている D β H 阻害剤^{38), 40), 43), 47), 49-50)} の効力と比較すると強いものではなかった。

alkyl thiourea による D β H 阻害作用において, その D β H 阻害機構に preincubation 時間の長短が影響する⁴⁷⁾ことが報告されている。そこで D β H に対する NaF の効果に対する preincubation 時間の影響を検討したところ, NaF による D β H 阻害の程度は preincubation 時間が長くなるとともに増加を示した。また NaF の D β H に対する効果を 30°C と 37°C の 2 つの異なる incubation 温度において検討したところ, D β H 阻害の程度は 37°C の時により強く発現した。これらの結果は, NaF が D β H 酵素に直接作用して阻害を起すことを示唆するものである。

次に Lineweaver-Burk plot により NaF の阻害様式を検討したところ, 基質 tyramine, cofactor の ascorbic acid に対して非拮抗的阻害を示した。この結果は D β H と基質との結合, D β H と cofactor の ascorbic acid との結合に関して, NaF による干渉がないことを示しており, NaF は D β H に直接作用するという上述の推定を裏付けるものである。

D β H は活性中心に Cu⁺を含む金属酵素²⁴⁾のため, Cu⁺とキレートを作る disulfiram などのキレート化合物により阻害を受ける³⁸⁻⁴²⁾。一方, NaF は活性化因子として Mg⁺を必要とする enolase などの酵素において, Mg⁺と結合して magnesium fluorophosphate を作るため, 阻害作用を発現することが知られている²¹⁾。そこで NaF の D β H 阻害作用と Cu⁺との関係を検討したが, NaF による D β H 阻害は Cu⁺添加により回復を示さなかった。したがって, NaF は D β H の活性中心には何ら作用を示さないものと考えられる。また NaF による D β H 阻害は, cysteine による D β H 阻害作用⁴³⁾と同様に, 12時間透析により完全に回復し, 可逆的なものと考えられる。

フッ化物による酵素の阻害機構として, 現在イオンによる一般的な三種類の酵素阻害の機構²⁾が考えられている。すなわち, 第一の阻害機構は, フッ化物による succinic dehydrogenase 阻害の場合にみられような酵素の活

性中心でフッ化物と陰イオンが競合することによるもの；第二はフッ化物が活性中心以外の箇所酵素分子に直接結合することによるもの、これにはATP非存在下における5-adenylic acid deaminase阻害が例としてあげられる；第三はcholinesteraseやurease阻害の場合で、フッ化物が酵素に結合すると酵素はconformationalな変化をおこしその結果活性の低

下がみられるというものである。本実験の結果からみるとNaFによるDβH阻害作用は上に述べた第二の阻害機構、すなわち、ATP非存在下における5-adenylic acid deaminaseのF⁻による阻害機構^{2),51)}と同様、F⁻が活性中心以外の箇所、DβH分子自体に直接結合することによって発現されるものと考えられる。

Abstract : The inhibitory effect of NaF on dopamine β-hydroxylase (DβH) activity was examined to clarify influence of fluorides on the function of a living body. DβH was prepared from bovine adrenal glands by modifying the method of Friedman and Kaufman, and DβH activity was assayed according to the method of Van der Schoot et al., NaF at 10 mM concentration inhibited 40% of DβH activity. This inhibition by NaF was recovered by dialysis for 12 hrs, but not by the addition of Cu⁺⁺ to the reaction mixture. Regardless of the presence of NaF, the increase of the enzymatic formation of octopamine from tyramine was almost linear with respect to the incubation time (up to 20 min) and there was positive correlation between the increase of the enzymatic formation of octopamine from tyramine and enzyme concentration (up to 60 μg protein). Furthermore, the inhibitory effect of NaF on DβH activity increased with the prolongation of preincubation time. Kinetic studies using the Lineweaver-Burk plot revealed that this inhibitory effect of NaF was of a noncompetitive type with the substrate, tyramine and ascorbic acid, one of the cofactors in this reaction. These results indicate that NaF produces reversible inhibition of DβH activity probably by combining directly with DβH molecules.

文 献

- 1) Hodge, H. C. and Smith, F. A. : Effects of fluorides on enzyme systems. Fluorine Chemistry IV, Edited by Simons, J. H., Academic Press, New York and London, pp. 176-189, 1965.
- 2) Cimasoni, G. : Fluoride and enzymes. Fluoride in Medicine, Edited by Vischer, T. L., Hans Huber Publisher, Bern Stuttgart Vienna, pp. 14-26, 1970.
- 3) Jenkins, G. N. : The mechanism of action of fluoride in reducing caries incidence. *Int. Dent. J.* 17 : 552-563, 1967.
- 4) Jenkins, G. N., Edgar, W. M. and Ferguson, D. : The distribution and metabolic effects of human plaque fluoride. *Arch. oral. Biol.* 14 : 105-119, 1969.
- 5) Cimasoni, G. : The inhibition of enolase by fluorism in vitro. *Caries Res.* 6 : 93-102, 1972.
- 6) Hamilton, I. R. : Effects of fluoride on enzymatic regulation of bacterial carbohydrate metabolism. *Caries Res.* 11 (Suppl.) : 1-327, 1977.
- 7) Pranker, T. A. J. and Altman, K. I. : A study of the metabolism of phosphorus in mammalian red cells. *Biochem. J.* 58 : 622-633, 1954.
- 8) Feig, S. A., Shohet, S. B. and Nathan, D. G. : Energy metabolism in human erythrocytes. I. Effects of sodium fluoride. *J. clin. Invest.* 50 : 1731-1737, 1971.
- 9) Marquis, R. E. : Inhibition of streptococcal adenosine triphosphatase by fluoride. *J. dent. Res.* 56 : 704, 1977.
- 10) Frajola, W. J. : Fluoride and enzyme inhibition. Fluorine and Dental Health, Edited by Muhler, J. C. and Hine, M. K., Indiana Univ. Press, Bloomington, pp. 60-69, 1959.
- 11) Ferguson, D. B. : Effects of low doses of fluoride on serum proteins and a serum enzyme in man. *Nature new Biol.* 231 : 159-160, 1971.
- 12) Ferguson, D. B. and Stephen, K. W. : Plasma alkaline phosphatase levels in subjects taking fluoride tablets. *Caries Res.* 14 : 233-234, 1980.
- 13) Brown-Grant, K. : Enlargement of salivary gland in mice treated with isopropylnoradrenaline. *Nature (Lond.)* 191 : 1076-1078, 1961.

- 14) Selye, H., Veilleux, R. and Cantin, M. : Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol. *Science* 133 : 44-45, 1961.
- 15) Pohto, P. : Catecholamine-induced salivary gland enlargement in rats. *Acta odont. scand.* 24 (Suppl. 45) : 10-18, 1966.
- 16) 佐々木武仁 : Isooproterenolによるマウス唾液腺の増殖誘導機構, 医学のあゆみ, 80 : 285-292, 1971.
- 17) Yamamoto, I., Inoki, R. and Kojima, S. : Adrenergic receptors in amylase secretion from rabbit parotid gland. *Eur. J. Pharmacol.* 3 : 123-130, 1968.
- 18) Izumi, H., Oyama, H. and Ozawa, H. : The stimulatory effect of the boiled supernatant on cyclic AMP formation in synaptosomes from rat cerebral cortex. *Jap. J. Pharmacol.* 25 : 375-381, 1975.
- 19) Izumi, H., Oyama, H. and Ozawa, H. : Activation of adenyl cyclase and adenosine 3', 5'-monophosphate phosphodiesterase in rat brain synaptosomes. *Chem. pharm. Bull., Tokyo* 24 : 1064-1067, 1976.
- 20) Friedman, S. and Kaufman, S. : 3, 4-Dihydroxyphenylethylamine β -hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 240 : 4763-4773, 1965.
- 21) Van der Schoot, J. B., Creveling, C. R. and Udenfriend, S. : On the mechanism of inhibition of dopamine- β -oxidase by benzyl-oxyamines. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 141 : 74-78, 1963.
- 22) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
- 23) Blaschko, H. : The specific action of l -dopa decarboxylase. *J. Physiol.* 96 : 50-56, 1939.
- 24) Friedman, S. and Kaufman, S. : 3, 4-Dihydroxyphenylethylamine β -hydroxylase : a copper protein. *J. Biol. Chem.* 240 : 552-554, 1965.
- 25) Levin, E. Y., Levenberg, B. and Kaufman, S. : The enzymatic conversion of 3, 4-dihydroxyphenylethylamine to norepinephrine. *J. Biol. Chem.* 235 : 2080-2086, 1960.
- 26) Udenfriend, S. and Creveling, C. R. : Localization of dopamine- β -oxidase in brain. *J. Neurochem.* 4 : 350-352, 1959.
- 27) Potter, L. T. and Axelrod, J. : Subcellular localization of catecholamines in tissues of the rat. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 142 : 291-298, 1963.
- 28) Nagatsu, T., Van der Schoot, J. B., Levitt, M. and Udenfriend, S. : Factors influencing dopamine β -hydroxylase activity and epinephrine levels in guinea pig adrenal gland. *J. Biochem. (Tokyo)* 64 : 39-43, 1968.
- 29) Kirshner, N. : Pathway of noradrenaline formation from dopa. *J. Biol. Chem.* 226 : 821-825, 1957.
- 30) Weinshilboum, R. and Axelrod, J. : Serum dopamine β -hydroxylase activity. *Circulat. Res.* 28 : 307-315, 1971.
- 31) Weinshilboum, R. and Axelrod, J. : Serum dopamine β -hydroxylase : Decrease after chemical sympathectomy. *Science* 173 : 931-934, 1971.
- 32) Axelrod, J. : Dopamine- β -hydroxylase : Regulation of its synthesis and release from nerve terminals. *Pharmacol. Rev.* 24 : 233-243, 1972.
- 33) Goldstein, M., Freedman, L. S., Bohuon, A. C. and Geurinot, F. : Serum dopamine- β -hydroxylase activity in neuroblastoma. *New Eng. J. Med.* 286 : 1123-1125, 1972.
- 34) Horwitz, D., Alexandar, R. W., Lovenberg, W. and Keiser, H. R. : Human serum dopamine- β -hydroxylase relationship to hypertension and sympathetic activity. *Circulat. Res.* 32 : 594-599, 1973.
- 35) Creveling, C. R., Daly, J. W., Witkop, B. and Udenfriend, S. : Substrates and inhibitors of dopamine- β -oxidase. *Biochim. biophys. Acta* 64 : 125-134, 1962.
- 36) Creveling, C. R., Van der Schoot, J. B. and Udenfriend, S. : Phenylethylamine isosteres as inhibitors of dopamine- β -oxidase. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 8 : 215-219, 1962.
- 37) Nikodijevic, B., Creveling, C. R. and Udenfriend, S. : Inhibition of dopamine β -oxidase in vivo by benzyloxyamine and benzylhydrazine analogs. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 140 : 224-228, 1963.
- 38) Green, A. L. : The inhibition of dopamine- β -oxidase by chelating agents. *Biochim. biophys. Acta* 81 : 394-397, 1964.
- 39) Goldstein, M., Anagnoste, B., Lauber, E. and Mekereghan, M. R. : Inhibition of dopamine-beta-hydroxylase by disulfiram. *Life Sci.* 3 : 763-767, 1964.
- 40) Goldstein, M., Lauber, E. and Mckereghan, M. R. : The inhibition of dopamine- β -hydroxylase by tropolone and other chelating agents. *Biochem. Pharmacol.* 13 : 1103-1106, 1964.
- 41) Musacchio, J., Goldstein, M., Anagnoste, B., Poch, G. and Kopin, J. : Inhibition of dopamine- β -hydroxylase by disulfiram in vivo. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 152 : 56-61, 1966.
- 42) Collins, G. S. : Inhibition of dopamine-

- beta-oxidase by diethyldithiocarbamate. *J. Pharm. Pharmacol.* 17 : 526-527, 1965.
- 43) Nagatsu, T., Kuzuya, H. and Hidaka, H. : Inhibition of dopamine β -hydroxylase by sulfhydryl compounds and the nature of the natural inhibitors. *Biochim. biophys. Acta* 139 : 319-327, 1967.
- 44) Hidaka, H., Nagatsu, T., Takeuchi, T., Suda, H., Kojiri, K., Matsuzaki, M. and Umezawa, H. : Fusaric acid, a hypotensive agent produced by fungi. *J. Antibiot. (Tokyo)* 22 : 228-230, 1969.
- 45) Suda, H., Takeuchi, T., Nagatsu, T., Matsuzaki, M., Matsumoto, I. and Umezawa, H. : Inhibition of dopamine β -hydroxylase by 5-alkylpicolinic acids and their hypotensive effects. *Chem. Pharm. Bull., Tokyo* 17 : 2377-2379, 1969.
- 46) Hidaka, H. : Fusaric (5-buthypicolinic) acid, an inhibitor of dopamine β -hydroxylase, affects serotonin and noradrenaline. *Nature* 231 : 54-55, 1971.
- 47) Johnson, G. A., Boukma, S. J. and Kim, E. G. : Inhibition of dopamine β -hydroxylase by aromatic and alkyl thioureas. *J. Pharmacol. exp. Therap.* 168 : 229-234, 1969.
- 48) Johnson, G. A., Boukma, S. J. and Kim, E. G. : In vivo inhibition of dopamine β -hydroxylase by 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourea (U-14,624). *J. Pharmacol. exp. Therap.* 171 : 80-87, 1970.
- 49) 小澤 光, 小山英子 : Catecholamine 生合成に関する研究 (第4報) Thiourea 系化合物による Dopamine β -Hydroxylase 阻害作用, 薬誌, 95 : 373-377, 1975.
- 50) Oyama, H., Izumi, H. and Ozawa, H. : Inhibition of dopamine β -hydroxylase by some new thiourea derivatives. *Biochem. Pharmacol.* 25 : 277-280, 1976.
- 51) Lee, Y. P. and Wang, M. H. : Studies of the nature of the inhibitory action of inorganic phosphate, fluoride, and detergents on 5'-adenylic acid deaminase activity and on the activation by adenosine triphosphate. *J. biol. Chem.* 243 : 2260-2265, 1968.