

Tranlycypromine 광학이성질체에 의한 MAO 자살억제의 반응속도론

강건일·최명희

숙명여자대학교 약학대학

(Received January 23, 1989)

Suicidal Inhibition Kinetics of MAO by Tranlycypromine Enantiomers

Gun Il Kang and Myung Hee Choi

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract—Since time-dependent inactivation of MAO was found to be complete in a few minutes when high concentration ratios of tranlycypromine to MAO were used, a method to obtain kinetic parameters was sought suitable to the conditions in which concentrations of tranlycypromine analogs did not exceed that of MAO. For the purpose, kinetic equations were derived and the method applied to the kinetic studies of tranlycypromine enantiomers. It was found that (*E*)-(+)-2-phenylcyclopropylamine inhibited MAO by the mechanism following bimolecular reaction scheme with \bar{K}_i of $2.0 \times 10^6 \text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$. Whereas, MAO-inhibitory pattern of the (-)-enantiomer was to be interpreted by suicide inhibition scheme and measured k_{im} and \bar{K}' were 0.457min^{-1} and $5.4 \mu\text{M}$, respectively.

모노아민산화효소(MAO, EC 1.4.3.4)는 신경 전달물질을 비롯한 biogenic amine을 산화 분해하는 효소로서 MAO-A 및 B의 두 형태로 존재하며 그 형태에 따라 기질에 대한 특이성 및 억제제와의 상호작용이 다르다.^{1,2)} 임상적으로 항우울제로 사용되는 tranlycypromine(*trans*-*dl*-2-phenylcyclopropylamine)은 MAO에 비선택적으로 작용하는 억제제로 그 작용기전면에서 비가역적 자살억제제인 것이 보고되었다.^{3,4)} Silverman⁴⁾이 제시한 억제기전에 의하면 tranlycypromine은 MAO에 의하여 amine 질소가 한 개 전자의 산화를 받고 그 뒤에 cyclopropyl ring이 개환되어 형성된 라디칼이 효소활성 자리와 공유결합을 형성하여 MAO를 억제하며, aldol 산물의 탈수과정과 유사한 반응에 의하여 효소의 활성이 회복된다고 보고되었다.

Tranlycypromine 유도체에 의한 MAO 억제활성 및 선택성을 평가하기 위하여 MAO-A 및 B에 대한 IC_{50} 를 비교하는 방법을 이용하였으나^{5,6)} 이들 화합물과 MAO와의 상호작용을 세밀히 파악하기 위하여는 자살억제의 가역적 복합체 형성 단계와 비

가역적 불활성화 단계에서의 구조적 역할을 분리하여 검토하는 것이 필요하리라 생각되었다. 이러한 자살억제의 반응속도론적 파라메타는 일반 비가역적 억제제에 적용하는 Kitz와 Wilson⁷⁾의 시간의존성 불활성화 실험으로 구하며 자살억제의 반응속도론적 scheme에 대한 관계 방정식은 Waley^{8,9)} 및 Tatsunami 등¹⁰⁾에 의하여 유도된 바 있다.

본 연구에서는 tranlycypromine 구조화합물에 의한 MAO 자살억제의 반응속도론적 특징을 파악하고, 이들 화합물에 부합된 반응속도론적 모델을 선정하고, 실험조건에서 반응속도론적 파라메타를 구할 수 있는지 검토하고자 하였으며 이러한 목적으로 tranlycypromine의 광학이성질체를 분할하여 beef liver 미토콘드리아를 효소원으로 하여 실험하였다.

실험방법

시약 및 재료—Tyancypromine은 미국 Smith Kline & French Laboratories에서 기증받아

사용하였으며 무수염화수소에테르 용액(1.0 M) 및 D(-)-tartaric acid는 미국 Aldrich Chemical Co.로부터 구입하였다. benzylamine 염산염 및 bovine albumin은 미국 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다. 기타 용매 및 시약은 특급품을 국내에서 구입하여 사용하였다. beef liver는 독산동 협진식품 주식회사에서 도살 직후 약 600g을 구하고 냉동 보관하여 사용하였다.

기기-용점은 일본 Olympus 제품인 sybron thermolyne으로 측정하였으며 보정하지 않았다. 선광도는 Jasco사의 DIP-181 선광계로 측정하였으며 UV-VIS 흡광도는 Hitachi사의 모델 200-20 스펙트로포토메타로 측정하였다. 냉동 원심분리기는 미국 Sorvall제 RC2-B 이었으며 모타작동식 Potter Elvehjem type의 유리 homogenizer를 사용하여 효소원을 제조하였다. 이 때 Teflon 수지봉을 사용하였다.

Tranlycypromine 광학이성질체의 분할-Kaiser 등¹¹⁾이 기술한 방법으로 분할하였다. tranlycypromine(1.73g)으로부터 (E)-(-)-2-phenylcyclopropylamine·(+)-tartrate 0.56g을 얻었다. mp 188~190°C. $[\alpha]_D^{25} -29.6^\circ$ (c 0.25, H₂O). 위의 (+)-tartrate(0.52g)를 염산염으로 바꾼 후 isopropanol-ether로 2회 재결정하여 (E)-(-)-2-phenylcyclopropylamine·HCl 0.18g을 얻었다. mp 178~180°C. $[\alpha]_D^{25} -75.0^\circ$ (c 0.25, H₂O). 문헌¹¹⁾에 의하면 (-)-거울상이성질체는 mp 180~181°C, $[\alpha]_D^{25} -75.5^\circ$ (c 1, H₂O)로 보고되어 있다.

(+)-Tartrate를 제거한 모액을 유리염기로 한 후 D(-)-tartaric acid로 처리하여 (E)-(+)-2-phenylcyclopropylamine·(-)-tartrate 0.43g을 얻었다. mp 187~190°C. $[\alpha]_D^{25} +30^\circ$ (c 0.25, H₂O). (-)-tartrate를 염산염으로 바꾼 후 isopropanol-ether로 2회 재결정하여 (E)-(+)-2-phenylcyclopropylamine·HCl 0.125g을 얻었다. mp 179~181°C. $[\alpha]_D^{25} +76.5^\circ$ (c 0.24, H₂O). (+)-거울상이성질체는 문헌¹¹⁾에 mp 181~182°C, $[\alpha]_D^{25} +75.7^\circ$ (c 1, H₂O)로 보고되어 있다.

효소원 제조-도살 직후 냉동 보관한 beef liver 일정량을 취하여 그 무게의 10배에 해당하는 냉각한 0.32 M sucrose 용액을 가하여 잘게 나눈 후 균질

화 하였다. 균질액을 2,000g에서 20분간 원심분리하여 침전은 버리고 상층액을 취하고 이것을 다시 14,000g에서 20분간 원심분리하여 미토콘드리아 침전을 얻었다. 이 침전에 beef liver 1g당 1.2 ml의 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.2)를 가하여 현탁시켜 효소원으로 사용하였다. 모든 조작은 0~5°C에서 실시하였다. 이렇게 얻은 효소원중 단백질 함량은 Lowry 등¹²⁾의 방법으로 bovine albumin을 표준물질로 하여 측정하였다.

시간의존성 불활성화 실험-효소원 약 0.74 ml (10 mg protein)에 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.2)를 가하여 3.6 ml로 한 전배양 혼합액에 각 농도가 되도록 억제제 0.4 ml를 가하였다. 37°C에서 배양하면서 일정시간 간격으로 0.1 ml를 취하여 40 mM benzylamine 0.2 ml (최종농도 2 mM)와 동일한 완충액 3.7 ml의 배양 혼합액에 가하여 희석하고 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양 후 3% ZnSO₄ 1 ml를 가하여 반응을 종결시키고 문헌의 방법⁵⁾에 따라 처리하여, 생성된 benzaldehyde의 흡광도를 250 nm에서 측정하였다. 이때 blank는 완충액 3.7 ml에 전배양 혼합액 0.1 ml를 가한 후 10분간 비등수욕내에서 끓여 효소를 죽이고 냉각하여 40 mM benzylamine 0.2 ml를 가한 후 3% ZnSO₄ 1 ml를 가하여 검체와 동일하게 처리하여 사용하였다.

위의 효소원 약 0.74 ml에 완충액을 가하여 4 ml로 제조한 억제제가 없는 전배양 혼합액 0.1 ml를 배양 혼합액에 가하여 30분 배양 후 검체와 동일하게 처리하여 얻은 흡광도를 잔존활성 100%의 0시간 흡광도로 사용하였다. 이 흡광도는 완충액 3.6 ml에 40 mM benzylamine 0.2 ml, 그리고 전배양 혼합액내의 억제제 농도로 한 억제제 0.1 ml를 가하고 37°C로 평형시킨 후 전배양 혼합액과 동일하게 희석한 효소 0.1 ml를 가하여 30분간 배양 후 검체와 같은 방법으로 처리하여 얻은 흡광도와 일치하였다.

(E)-(+)-2-phenylcyclopropylamine은 $6 \times 10^{-8} \sim 6 \times 10^{-7}$ M 범위의 7개 농도를 사용하여 3분까지는 30초 간격으로, 그 이후는 적당한 간격으로 하여 60~70분까지 전배양 검체를 취하여 효소활성을 측정, constant level 잔존활성을 구하였다. 또한 $5.5 \times 10^{-7} \sim 8 \times 10^{-7}$ M 범위의 4개 농도를 사

용하여 30초 간격으로 4분까지 측정하여 활성이 50%로 되는 시간($t_{1/2}$)을 구하였다. (E)-(-)-2-phenylcyclopropylamine은 $10^{-7} \sim 4 \times 10^{-6}$ M 범위의 7개 농도를 사용하여 20분까지는 3분 간격으로, 그 이후는 적당한 간격으로 120분까지 전배양 후 효소활성을 측정, constant level 잔존활성을 구하였으며, $t_{1/2}$ 는 이중 $8 \times 10^{-7} \sim 4 \times 10^{-6}$ M 범위의 4개 농도의 값을 사용하여 구하였다.

실험결과 분석—전배양 시간에 대한 잔존활성 %의 plot으로부터 $t_{1/2}$ 및 불완전 억제제의 constant level 잔존활성 %를 구하였다. 각 억제제 농도(s_0)에 대한 constant level 잔존활성 %를 plot 하여 완전억제(0% 잔존활성)에 해당되는 억제제의 농도(Z)를 구하였다. 이때 얻어지는 Z값 및 s_0 로부터 $[\ln(2-Z/s_0)]/(s_0-Z)$ 에 대한 $t_{1/2}$ 를 plot 하여 Table I의 방정식으로부터 반응속도론적 파라메타를 구하였다.

실험결과 및 고찰

자살억제의 반응속도론적 연구는 효소의 불활성화가 시간의존성이므로 효소를 억제제와 배양하면서

일정한 양을 일정시간 간격으로 취하여 효소활성을 분석할 성분을 함유한 혼합액에 가하여 희석하고 일정시간 배양하여 분석하는 방법을 사용한다.¹³⁾ 이러한 시간의존성 불활성화 실험에서 전배양 후 높은 희석이 필요한 것은 비가역적 효소의 변형과 가역적 억제를 구분하기 위한 것이며 이때 희석조건에서 효소의 잔존활성을 측정하기 위하여 높은 활성을 가진 정제된 효소를 사용하는 것이 일반적인 방법이다. 본 실험에서는 실험조건상 효소의 정제가 가능하지 않았으므로 MAO-B의 활성이 높은 beef liver 미토콘드리아를 효소원으로 사용하였다. 이 효소원은 benzylamine을 기질로 사용하였을 때 흰쥐 뇌중의 MAO-B에 비하여 16배 정도 높은 활성을 나타내었으며, 본 실험에서 전배양 후 40배 희석한 조건에서 100% 잔존활성을 나타내는 흡광도는 ~ 0.5 이었다.

일반적으로 시간의존성 불활성화 실험은 자살억제를 포함한 비가역적 억제 반응속도론적 연구에 적용하는 것으로 비가역적 억제의 반응속도론적 주요 scheme은 부록에 나타난 Scheme 1, 2 그리고 3과 근본적으로 동일하며 $1/s_0$ 에 대한 $t_{1/2}$ plot에서 y 절편이 존재하는지 여부로부터 Scheme 3에 해당되

Table I—Summary of suicidal kinetic parameters and equations for three inhibition schemes.

	Kinetic parameters	Kinetic equations
Scheme 1 ($r \neq 0, Z/e_0 = 1+r$)	$K' = \left(\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} \right) \left(\frac{k_{+3} + k_{+4}}{k_{+2} + k_{+3} + k_{+4}} \right)$	$t_{1/2} = \frac{K'}{k_{in}} \frac{\ln(2-Z/s_0)}{s_0-Z} + \ln 2/k_{in}$ if $s_0 \gg e_0$
	$k_{in} = \frac{k_{+2}k_{+4}}{k_{+2} + k_{+3} + k_{+4}}$	$t_{1/2} = \frac{K'}{k_{in}} \frac{\ln 2}{s_0} + \ln 2/k_{in}$
Scheme 2 ($r=0$)	$K' = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}$	$t_{1/2} = \frac{K'}{k_{in}} \frac{\ln(2-Z/s_0)}{s_0-Z} + \ln 2/k_{in}$ if $s_0 \gg e_0$
	$k_{in} = k_{+2}$	$t_{1/2} = \frac{K'}{k_{in}} \frac{\ln 2}{s_0} + \ln 2/k_{in}$
Scheme 3 ($r=0, K' \gg s$)	K_i	$t_{1/2} = \frac{1}{K_i} \frac{\ln(2-Z/s_0)}{s_0-Z}$ if $s_0 \gg e_0$
		$t_{1/2} = \frac{1}{K_i} \frac{\ln 2}{s_0}$

See the Appendix for Schemes, Symbols, and Derivations.

는지를 결정하고 Scheme 1과 2는 분배비율의 값을 구하여 구분이 가능하다. 본 실험에서는 일반적으로 cyclopropylamine 화합물이 MAO의 자살억제제로 증명된 것과 같이¹⁴⁻¹⁶⁾ tranlycypromine에 의한 MAO의 억제가 자살억제이기 때문에⁴⁾ tranlycypromine의 광학이성질체들도 자살억제 기전에 의하여 작용하리라 생각하였다. 이들 화합물을 사용한 시간의존성 불활성화 실험자료를 해석하기 위하여 Scheme 1을 선정하였고 부록에 유도한대로 분배비율(r)이 0에 가까운 경우에 실제 반응속도론적 scheme은 Scheme 2와 동일한 것을 발견하였고 $r=0$, $K' \gg s$ 의 경우는 Scheme 3과 동일하였다.

시간의존성 불활성화 실험은 억제제의 농도가 과량의 조건에서 행하는 것이 일반적인 방법이며 이 경우 Table I에 요약한 $s_0 \gg e_0$ 에 해당되는 반응속도론적 방정식으로부터 반응속도론적 파라메타를 구할 수 있다. 본 실험에서 tranlycypromine은 억제제의 농도가 높을 경우 수분내에 완전 불활성화되는 것을 발견하였으며 이러한 점은 Paech 등³⁾에 의하여도 보고된 바 있다. 따라서 억제제를 과량 사용하지 않는 조건에서 반응속도론적 파라메타를 구하고자 하였으며 부록에 보인대로 억제제의 농도가 과량이 아닌 경우에 가능한 방정식을 유도할 수 있었으며 Table I에 요약하였다. 이때 실제의 e_0 값은 본 실험에서 구할 수 없었으므로 constant level 잔존활성이 0일 때의 s_0 값을 Z 로 하여 Scheme 1에서는 $Z=e_0(1+r)$, Scheme 2 및 3에서는 $Z=e_0$ 로 하여 방정식에 Z 값을 사용하였다.

Tranlycypromine의 경우에는 반응속도론적 방정식의 유도가 가능하지 않았다. 순수히 분리한 (*E*)-(+)-2-phenylcyclopropylamine을 사용한 실험에서 전배양 시간에 대한 각 농도에서의 잔존활성 %를 Fig. 1A에 나타내었다. 이때 각 농도에서의 constant level 잔존활성 %를 구할 수 있었다. Fig. 1B는 constant level 잔존활성 %를 y축으로 하고 e_0 를 고정한 상태에서 s_0/e_0 를 x축으로 하여 plot한 것으로 이때 x축 절편은 $4.8 \times 10^{-7} M/e_0$ 이었다. 이 $4.8 \times 10^{-7} M$ 을 Z 값으로하여 $[\ln(2-Z/s_0)]/(s_0-Z)$ 에 대한 $t_{1/2}$ 를 plot 하였을 때 (Fig. 1C) 원점을 통과하는 직선관계($r=0.979$)가 성립됨을 발견하였다. 원점을 통과하는 것은 Scheme 3에 해당되므로 $e_0=Z$ 에서 e_0 는 $4.8 \times 10^{-7} M$ 임을 알 수

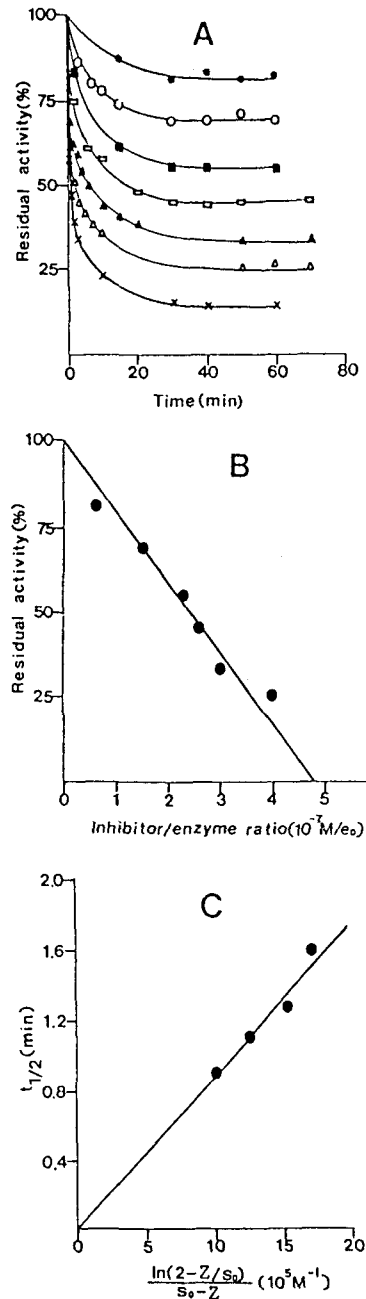


Fig. 1. Plots to derive kinetic parameters of the suicidal inhibition of MAO by (*E*)-(+)-2-phenylcyclopropylamine. A. Time course for the inhibition of MAO by various concentrations of (+)-enantiomer. $6 \times 10^{-8} M$ (●-), $1.5 \times 10^{-7} M$ (○-), $2.3 \times 10^{-7} M$ (■-), $2.6 \times 10^{-7} M$ (□-), $3 \times 10^{-7} M$ (▲-), $4 \times 10^{-7} M$ (△-), $6 \times 10^{-7} M$ (×-). B. Relation of constant level residual activities to inhibitor/enzyme ratios. C. Inactivation half-times as a function of concentrations of (+)-enantiomer.

있었고 그 기울기로부터 구한 K_i 값은 $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이었다.

(E)-(-)-2-phenylcyclopropylamine의 전배양 시간에 대한 각 농도에서의 잔존활성 %를 Fig. 2A에 나타내었다. (-)-이성질체는 (+)-이성질체에 비하여 MAO 억제활성이 낮으며 억제속도가 느린 것이 확인되었다. Fig. 2B는 e_0 를 고정한 s_0/e_0 에 대한 constant level 잔존활성 %를 plot한 것으로 직선관계를 나타내었으며 잔존활성이 0%일 때 s_0 (Z)가 $11 \times 10^{-7} \text{ M}$ 이었다. (+)-이성질체의 실험에서 $Z = 4.8 \times 10^{-7} \text{ M}$ 임을 감안할 때 (-)-이성질체의 Z값이 2.29배이므로 반응속도론적 scheme은 Scheme 1에 적합함을 알 수 있었고 $1+r = Z/e_0$ 로부터 분배비율은 1.29인 것을 알 수 있었다. Fig. 2C는 $[\ln(2-Z/s_0)]/(s_0-Z)$ 에 대한 $t_{1/2}$ 를 plot한 것으로 y절편이 1.52 min 으로 계산되었으며 ($r = 0.998$) 이로부터 얻은 k_{in} 값은 0.457 min^{-1} 이었다. 또한 기울기로부터 구한 K' 은 $10.8 \mu\text{M}$ 이었다.

McEwen 등¹⁷⁾은 2-phenylcyclopropylamine 관련 화합물의 human liver에 대한 기질과의 경쟁적 억제 실험에서 Lineweaver-Burk plot으로부터 억제상수(K')를 구하였으며 (E)-(+)-2-phenylcyclopropylamine은 benzylamine을 기질로 하였을 때 비양성자 첨가형으로 계산한 \bar{K}' 은 $0.070 \mu\text{M}$ 이었으며 veratrylamine을 기질로 사용한 (-)-이성질체의 \bar{K}' 을 $3.6 \mu\text{M}$ 로 보고하였다. Paech 등³⁾은 정제한 beef liver MAO를 사용하고 benzylamine을 기질로 사용한 실험에서 (+)-이성질체의 \bar{K}' 을 $0.36 \mu\text{M}$ 로 보고하였으며 (-)-이성질체의 \bar{K}' 은 $30 \mu\text{M}$ 이었다. 본 실험에서 구한 \bar{K}' 은 (-)-이성질체의 경우 $5.4 \mu\text{M}$ 이었다.

McEwen 등¹⁷⁾은 전배양 후 회석하지 않고 기질을 가하여 잔존효소의 활성을 측정하는 방법으로 시간의존성 실험을 하였으며 2-phenylcyclopropylamine이 Scheme 3과 같은 양식으로 MAO를 억제한다고 보고하였다. 이때 구한 \bar{K}_i 는 benzylamine을 사용한 (+)-이성질체의 경우 $5.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이었으며 veratrylamine을 사용한 (-)-이성질체는 $0.09 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이었다. 또한 Paech 등³⁾의 실험에서는 (+)-이성질체의 \bar{K}_i 는 $5.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이었으며 (-)-이성질체는 $7.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이었다. 본 실험에서 구한 (+)-이성

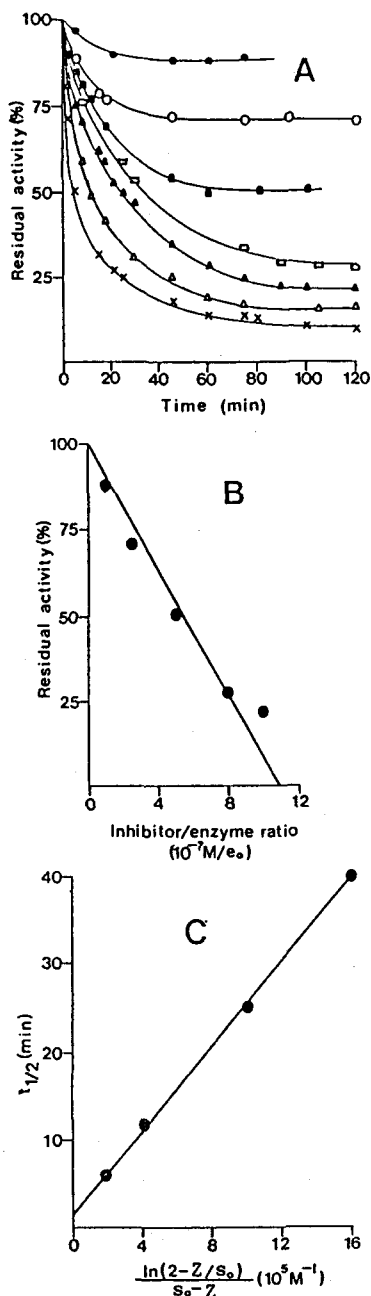


Fig. 2. Plots to derive kinetic parameters of the suicidal inhibition of MAO by (E)-(-)-2-phenylcyclopropylamine. A. Time course for the inhibition of MAO by various concentrations of (-)-enantiomer. 10^{-7} M (●-), $2.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ (○-), $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ (■-), $8 \times 10^{-7} \text{ M}$ (□-), 10^{-6} M (▲-), $2 \times 10^{-6} \text{ M}$ (△-), $4 \times 10^{-6} \text{ M}$ (×-). B. Relation of constant level residual activities to inhibitor/enzyme ratios. C. Inactivation half-times as a function of concentrations of (-)-enantiomer.

질체의 \bar{K}_i 는 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이었다.

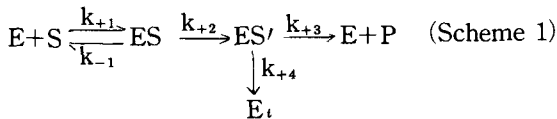
본 실험에서는 과량의 억제체가 존재할 때 뿐만 아니라 존재하지 않는 조건에서도 시간의존성 불활성화 실험을 행하여 MAO 억제도 측정의 오차 한계를 가지고 자살억제 반응속도론적 파라메타를 구하는 것이 가능함을 확인하였다. 앞으로 합성에 의하여 얻은 흥미있는 화합물, 예로 tranlylcypromine의 1-메틸 동족체⁹⁾를 분할하여 이 연구에서와 같이 반응속도론적 파라메타를 구할 수 있다면 2-phenylcyclopropylamine 유도체의 구조와 MAO 억제와의 상관관계에 대한 자세한 지식을 얻을 수 있으리라 생각된다.

결 론

2-phenylcyclopropylamine 유도체에 의한 MAO 억제의 시간의존성 불활성화 실험에서 과량의 억제체를 사용하였을 때 수분내에 완전 억제에 도달하므로 자살억제의 반응속도론적 파라메타 측정이 가능하지 않았다. 따라서 억제체의 농도가 과량이 아닌 경우에 적합한 자살억제 반응속도론적 방정식을 유도하였고 tranlylcypromine 광학이성질체를 분할하여 실험하였다. 그 결과 (E)-(+) -2-phenylcyclopropylamine은 2분자 반응 scheme에 적합하였고 측정된 \bar{K}_i 값은 $2.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ 이었다. (-)-이성질체는 자살억제 반응 scheme에 적합하였고 측정된 k_{in} 는 0.457 min^{-1} , \bar{K}' 은 $5.4 \mu\text{M}$ 이었다.

부 록

자살기질(억제제)의 반응속도론적 모델은 Scheme 1과 같다.



이때 E, S, P, ES, ES' 및 E_i 는 각각 효소, 기질, 대사산물, 제 1효소-기질 복합체, 제 2효소-기질 복합체 및 불활성 효소를 의미하며 관계 방정식에서는 각각의 농도를 소문자로 하여서 나타내었다.

Tatsunami 등¹⁰⁾은 ds/dt 는 방정식 (1)로, 그리고 방정식 (2)의 관계식을 이용하여 시간에 따른 잔

존활성 효소의 양 (a)를 방정식 (3)과 같이 유도하였다.

$$\frac{ds}{dt} = -C \left(1 + \frac{1}{r}\right) \frac{as}{B+s} \quad (1)$$

여기에서

$$B = \left(\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}\right) \left(\frac{k_{+3} + k_{+4}}{k_{+2} + k_{+3} + k_{+4}}\right)$$

$$C = \frac{k_{+2}k_{+3}}{k_{+2} + k_{+3} + k_{+4}}$$

$$r = \frac{k_{+3}}{k_{+4}} \quad a = e_0 - e_i$$

$$a = e_0 - \frac{s_0 - s}{1+r} \quad (2)$$

$$t = \frac{1}{C} \left\{ \left[\frac{rB}{1 - (1+r)\frac{e_0}{s_0}} \ln \left(\frac{1 - \frac{e_0}{s_0}(1+r)(1 - \frac{a}{e_0})}{\frac{a}{e_0}} \right) - r \ln \frac{a}{e_0} \right] \right\} \quad (3)$$

방정식 (1)에서 $\frac{ds}{dt}$ 대신 $(1+r) \cdot \frac{da}{dt}$ 를, s대신 $s_0 - (e_0 - a)(1+r)$ 을 대입하여 정리하면 방정식 (4)가 된다.

$$\frac{da}{dt} = -\frac{C}{r} \cdot \frac{a[s_0 - (e_0 - a)(1+r)]}{B + [s_0 - (e_0 - a)(1+r)]} \quad (4)$$

잔존활성이 constant level일 경우에 $\frac{da}{dt} = 0$ 이고, 따라서 $s_0 - (e_0 - a)(1+r) = 0$ 의 관계로부터 방정식 (5)를 얻는다.

$$\frac{a}{e_0} = 1 - \frac{1}{1+r} \cdot \frac{s_0}{e_0} \quad (5)$$

이때 $\frac{s_0}{e_0}$ 에 대한 $\frac{a}{e_0}$ 의 plot에서 $\frac{a}{e_0} = 0$ 일 때 $\frac{s_0}{e_0} = 1+r$ 이며 이때의 s_0 의 값을 Z이라고 하면 $\frac{Z}{e_0} = 1+r$ 이 된다.

방정식 (3)에서 $t = t_{1/2}$ 일 때 $\frac{a}{e_0} = \frac{1}{2}$ 이고 $Z = e_0(1+r)$ 을 대입하면 식 (6)을 유도할 수 있다.

$$t_{1/2} = \frac{rB}{C} \left\{ \frac{\ln(2 - Z/s_0)}{s_0 - Z} \right\} + \frac{r}{C} \ln 2 \quad (6)$$

방정식 (6)은 방정식 (7)의 형태로 나타낼 수 있고 $s_0 \gg e_0$ 의 경우에 방정식 (8)이 된다.

$$t_{1/2} = \frac{K'}{k_{in}} \left\{ \frac{\ln(2 - Z/s_0)}{s_0 - Z} \right\} + \frac{1}{k_{in}} \ln 2 \quad (7)$$

$$t_{1/2} = \frac{K'}{k_{in}} \cdot \frac{1}{s_0} \ln 2 + \frac{1}{k_{in}} \ln 2 \quad (8)$$

이때 $K' = \left(\frac{k_{-1}+k_{+2}}{k_{+1}}\right) \left(\frac{k_{+3}+k_{+4}}{k_{+2}+k_{+3}+k_{+4}}\right)$ 로서 Michaelis 상수에 대응하는 값이며 $k_{in} = \frac{k_{+2}k_{+4}}{k_{+2}+k_{+3}+k_{+4}}$ 로서 불활성화 속도상수를 나타낸다.

Scheme 1로 나타낸 자살억제 반응속도론적 모델에서 분배비율 $r=0$ 의 경우에 방정식 (5)에서 $1+r=1$ 이므로 여기로부터 유도된 $\frac{Z}{e_0} = 1$ 이 된다. 또한 방정식 (7) 및 (8)은 같은 형태를 가지나 이 경우 $k_{in}=k_{+2}$, $K' = \frac{k_{-1}+k_{+2}}{k_{+1}}$ 로 간단히 나타낼 수 있다. 이때 Scheme 1은 실제 Scheme 2와 같은 것이 된다.



Scheme 1에서 방정식 (1)은 $r=0$ 의 경우에 방정식 (9)로 나타낼 수 있고 이것은 Scheme 2에 적용되는 방정식이다.

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{k_{+2}as}{\frac{k_{-1}+k_{+2}}{k_{+1}}+s} = -\frac{k_{in}}{K'+s}as \quad (9)$$

$r=0$ 이며 동시에 $K' \gg s$ 의 경우에 방정식 (9)는 (10)으로 간단히 된다.

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{k_{in}}{K'}as \quad (10)$$

방정식 (2)에서 $r=0$ 일 경우 $s=s_0-e_0+a$ 이므로 이것을 방정식 (10)에 대입하여 $\frac{da}{dt} = -\frac{k_{in}}{K'}a(s_0-e_0+a)$ 를 얻고 이것으로부터 방정식 (11)을 유도하였다.

$$t = -\frac{K'}{k_{in}} \cdot \frac{1}{s_0-e_0} \ln \frac{a}{s_0-e_0+a} \quad (11)$$

$t=t_{1/2}$ 일 때 $\frac{a}{e_0} = \frac{1}{2}$ 이며 $e_0=Z$ 이므로 방정식 (11)로부터 (12)를 얻는다.

$$t_{1/2} = \frac{K'}{k_{in}} \left[\frac{\ln(2-Z/s_0)}{s_0-Z} \right] \quad (12)$$

이 경우에 Scheme 1은 실제 Scheme 3과 같은 것이 되며 $\frac{K'}{k_{in}} = \frac{1}{K_i}$ 로 2분자 반응속도상수로 나타내진다.



따라서 $s_0 \gg e_0$ 의 경우에 방정식 (13)을 얻게 된다.

$$t_{1/2} = \frac{1}{K_i} \cdot \frac{1}{s_0} \ln 2 \quad (13)$$

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 일반 연구지원(1987~1989)의 일부에 의하여 수행되었으며 감사를 표합니다.

문헌

- 1) Neff, N.H. and Yang, H.-Y.T.: Another look at the monoamine oxidases and the monoamine oxidase inhibitor drugs. *Life Sci.* **14**, 2061 (1974).
- 2) Murphy, D.L.: Substrate-selective monoamine oxidases-inhibitor, tissue, species, and functional differences. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 1889 (1978).
- 3) Paech, C., Salach, J.I., and Singer, T.P.: Suicide inactivation of monoamine oxidase by *trans*-phenylcyclopropylamine. *J. Biol. Chem.* **255**, 2700 (1980).
- 4) Silverman, R.B.: Mechanism of inactivation of monoamine oxidase by *trans*-2-phenylcyclopropylamine and the structure of the enzyme-inactivator adduct. *J. Biol. Chem.* **258**, 14766 (1983).
- 5) Kang, G.I., Hong, S.K., and Choi, H.K.: 1-Methyl substituent and stereochemical effects of 2-phenylcyclopropylamines on the inhibition of rat brain mitochondrial monoamine oxidase A and B. *Arch. Pharm. Res.* **10**, 50 (1987).
- 6) Kang, G.I. and Hong, S.K.: Synthesis of two nitro analogs of tranlycypromine: Relations of aromatic substitution of nitro groups to MAO-inhibitory activity. *Arch. Pharm. Res.* **11**, 33 (1988).
- 7) Kitz, R. and Wilson, I.B.: Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* **237**, 3245 (1962).
- 8) Waley, S.G.: Kinetics of suicide substrates. *Biochem. J.* **185**, 771 (1980).
- 9) Waley, S.G.: Kinetics of suicide substrate. Practical procedures for determining parameters. *Biochem. J.* **227**, 843 (1985).
- 10) Tatsunami, S., Yago, K., and Hosoe, M.: Kinetics of suicide substrates. Steady-state treatments and computer-aided exact solutions. *Biochim. Biophys. Acta* **662**, 226 (1981).
- 11) Kaiser, C., Lester, B.M., and Zirkle, C.L.: 2-Substituted cyclopropylamines. I. Derivatives and

- analogs of 2-phenylcyclopropylamine. *J. Med. Pharm. Chem.* **5**, 1243 (1962).
- 12) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Forr, A.L., and Randall, R.T.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 13) Abeles, R.H.: Suicide enzyme. *Chemical & Engineering News* Sept. 19, p. 49 (1983).
- 14) Silverman, R.B. and Yamasaki, R.B.: Mechanism-based inactivation of mitochondrial monoamine oxidase by N-(1-methylcyclopropyl) benzylamine. *Biochemistry* **23**, 1322 (1984).
- 15) Vasquez, M.L. and Silverman, R.B.: Revised mechanism for inactivation of mitochondrial monoamine oxidase by N-cyclopropylamine. *Biochemistry* **24**, 6538 (1985).
- 16) Silverman, R.B. and Zieske, P.A.: Mechanism of inactivation of monoamine oxidase by 1-phenylcyclopropylamine. *Biochemistry* **24**, 2128 (1985).
- 17) McEwen, Jr., C.M., Sasaki, G., and Jones, D.C.: Human liver mitochondrial monoamine oxidase. III. Kinetic studies concerning time-dependent inhibitions. *Biochemistry* **8**, 3963 (1969).