

モノイミダゾール配位ヘム酵素モデル
による基質酸化反応機構の検討

中 村 成 夫

①

モノイミダゾール配位ヘム酵素モデル による基質酸化反応機構の検討

中村 成夫

目次

序論	1
第1章 Microperoxidase-11 (MP-11) と Hemin-bis- <i>N</i> -methylimidazole 錯体 (Hemin- <i>N</i> -Melm ₂) の調製	10
第1節 MP-11 の調製	10
第2節 Hemin- <i>N</i> -Melm ₂ の調製	10
第1章の実験	12
第2章 各種酸化剤を用いたMP-11、Hemin- <i>N</i> -Melm ₂ 、Hemin-Cl の酸化反応性の比較	14
はじめに	14
第1節 H ₂ O ₂ を酸化剤とした反応	14
2.1.1. スルフィドの酸化反応	14
2.1.2. <i>N</i> -脱メチル化反応	16
2.1.3. オレフィンの酸化反応	19
第2節 ヨードソベンゼン (PhIO) を酸化剤とした反応	23
2.2.1. スルフィドの酸化反応	23
2.2.2. <i>N</i> -脱メチル化反応	23
2.2.3. オレフィンの酸化反応	25
第3節 クメンヒドロペルオキシド (CumOOH) を酸化剤とした反応	27
2.3.1. スルフィドの酸化反応	27
2.3.2. <i>N</i> -脱メチル化反応	27
2.3.3. オレフィンの酸化反応	29
第4節 Potassium Peroxymonosulfate (KHSO ₅) を酸化剤とした反応	29
2.4.1. スルフィドの酸化反応	29
2.4.2. <i>N</i> -脱メチル化反応	30
2.4.3. オレフィンの酸化反応	30
第2章の実験	32
第3章 O-O 結合開裂機構の検討	34
第1節 H ₂ O ₂ による触媒分解と O-O 結合開裂機構の検討	34

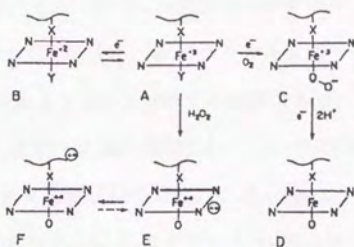
3.1.1.	H ₂ O ₂ による触媒分解速度	34
3.1.2.	触媒分解速度に及ぼす基質添加効果	37
3.1.3.	MP-11へのイミダゾール添加効果	37
3.1.4.	MP-11によるH ₂ O ₂ のO-O結合開裂機構に関する考察	38
第2節	CumOOHによる反応におけるO-O結合開裂機構の検討	39
3.2.1.	H ₂ O ₂ を用いたチオアニソール酸化におけるCumOOHの阻害効果	39
3.2.2.	CumOO・生成証拠の検索	41
3.2.3.	MP-11によるCumOOHのO-O結合開裂機構に関する考察	43
3.2.4.	CumO・の反応性	45
第3章の実験		47
第4章	MP-11による酸化反応機構の検討	49
はじめに		49
第1節	スルフィド酸化反応機構	49
4.1.1.	チオアニソールの酸化反応における <i>p</i> -位置換基効果	49
4.1.2.	フェナシルフェニルスルフィド (PhSCH ₂ COPh) の酸化反応	51
4.1.3.	MP-11によるスルフィドへのO原子の導入	54
4.1.4.	スルフィド酸化反応機構に関する考察	56
第2節	<i>N</i> -脱メチル化反応機構	58
4.2.1.	MP-11による <i>N</i> -メチルカルバゾールへのO原子の導入	58
4.2.2.	MP-11による <i>N</i> -脱メチル化反応機構に関する考察	61
4.2.3.	<i>N,N</i> -ジメチルアニリンの <i>N</i> -脱メチル化反応における分子内重水素同位体効果	63
4.2.4.	<i>N,N</i> -ジメチルアニリンの <i>N</i> -脱メチル化反応における <i>p</i> -位置換基効果	63
4.2.5.	<i>N,N</i> -ジメチルアニリンオキシドからの <i>N</i> -メチルアニリンの生成	66
4.2.6.	<i>N,N</i> -ジメチルアニリンとチオアニソールの競争反応	66
第3節	オレフィン酸化反応機構	68
4.3.1.	MP-11によるオレフィンへのO原子の導入	68
4.3.2.	転位反応機構に関する考察	71
第4節	反応性に及ぼす活性部位環境の影響に関する考察	75
第4章の実験		78
第5章	MP-11の化学修飾	86
はじめに		86
第1節	MP-11-Me-ester、MP-9の調製	91
5.1.1.	MP-11のメチルエステル化	91
5.1.2.	MP-9の調製	91

第2節 MP-11、MP-11-Me-ester、MP-9の比較	93
5.2.1. MP-11、MP-11-Me-ester、MP-9のNMRスペクトル	93
5.2.2. MP-11、MP-11-Me-ester、MP-9の酸化反応性の比較	93
第5章の実験	99
総括	100
補足	103
参考文献	106

序論

生体内のヘムタンパク質は大きく分けて次の3つの機能を担っている (Scheme 0-1)¹⁾。
①電子伝達を行うもの、②酸素を運搬するもの、③酸化還元反応を触媒するもの、である。その機能の差に関わらず、これらヘムタンパク質はすべて補欠分子族としてプロトヘムIX (Fig. 0-1) を持っている。この中で①のcytochrome類はヘム鉄に2つの軸配位子を持つため (例えばcytochrome cはHisのイミダゾールとMetのS)²⁾、ペルオキシドなどと反応することができない構造になっており、酸化型 (Fe^{3+}) と還元型 (Fe^{2+}) の2つの状態の変換に伴う電子移動を行うのみである。しかし②、③のヘムタンパク質はペルオキシドと反応しO-O結合を開裂することによって活性種を生成し酸化反応を行うことができる (ただしhemoglobinやmyoglobinのペルオキシダーゼ活性は非常に弱い)。また、cytochrome P450 (P450) やsecondary amine monooxygenaseは還元剤存在下、分子状酸素を効率よく活性化する機能を有している³⁾。

これらヘムタンパク質は、多くの場合ヘム鉄第5配位子としてHisのイミダゾールを持っている。その例は、酸素運搬体であるhemoglobin、myoglobinの他に、植物 (西洋ワサビ) 由来のhorseradish peroxidase (HRP)、酵母由来のcytochrome c peroxidase (CcP)、*Pseudomonas aminovorans*より発見されたsecondary amine monooxygenase、牛乳に含まれるlactoperoxidase (LPO)、白血球に存在するmyeloperoxidase、甲状腺に存在するthyroid peroxidase、プロスタグランジン生合成に働くprostaglandin H_2 synthase (cyclooxygenase)、リグニンを分解する*Phanerochaete chrysosporium*由来のlignin peroxidase (LiP)、トリプトファンを代謝するtryptophan 2,3-dioxygenaseなど枚挙にいとまがない。一方、Hisイミダゾール以外の軸配位子を持つものは、Cysのチオレート (S^-) が配位しているP450⁴⁾とchloroperoxidase (CPO)⁵⁾、Tyrのフェノレート (PhO^-) が配位しているcatalase⁶⁾の3つしか見つかっていない。P450は薬物代謝において中心的役割を果たしている酵素である。CPOは*Caldariomyces fumago*から精製され、基質のハロゲン化をも触媒するという点で特



Scheme 0-1. Interrelation of hemoprotein states: (A) resting ferric hemoprotein with ligands X and Y; (B) electron transport, X = histidine, Y not readily exchanged; (C) oxygen transport, X = histidine, Y exchanged for O_2 in Fe^{3+} state; (D) cytochrome P450, X = cysteine thiolate, Y readily exchanged; (E) peroxidase, X = histidine, Y readily exchanged. The radical may move from the porphyrin (as in E) to the protein (as in F). The distribution of electrons in D, which is at the same oxidation state as E and F, is not known.

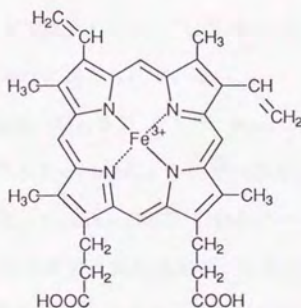


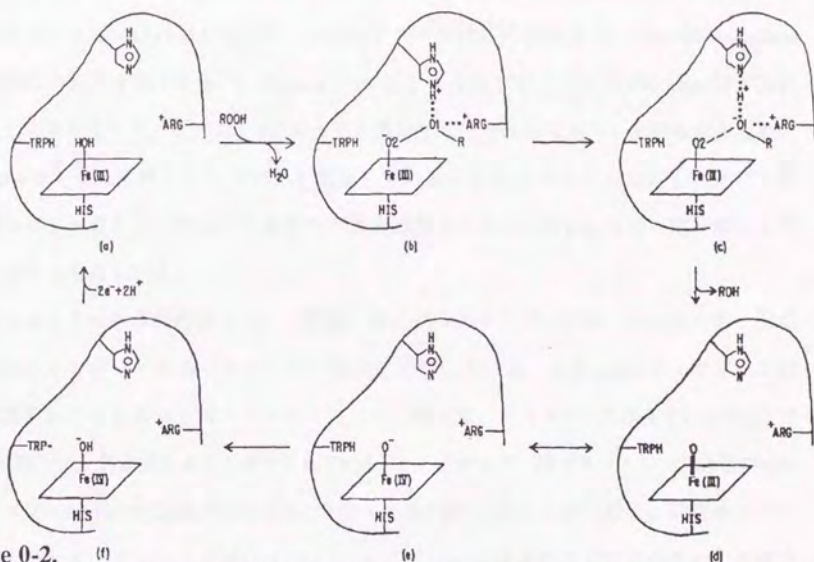
Fig. 1-1. Structure of iron(II)protoporphyrin IX

異なるヘム酵素である。また、catalaseは H_2O_2 を O_2 と H_2O にする不均化反応を行う酵素である。

ペルオキシダーゼの生体内での機能には不明な点が多いが、その触媒する反応に関してはいくつかの知見が得られている。一般にペルオキシダーゼは過酸化水素を用いて、 $2\text{A} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{A}^\bullet + 2\text{H}_2\text{O}$ のような反応を触媒する酵素であり、その触媒サイクルはFig. 0-2のようになっている⁷⁾。まずヘム鉄に配位した H_2O_2 のO-O結合がヘテロリティックに開裂しcompound Iと呼ばれる活性種が生じる。このcompound Iは、MössbauerスペクトルなどからHRPでは鉄4価オキセノイド-ポルフィリン π カチオンラジカルであることが分かっている⁸⁾。最もよく知られているペルオキシダーゼであるHRPではcompound Iは緑色をしている。Compound Iが基質を一電子酸化するとcompound IIになるが、これは鉄4価オキセノイド⁹⁾であり、HRPでは赤色をしている。さらにcompound IIが基質を一電子酸化すると触媒サイクルが一回転する。X線結晶解析のなされているCcPでは、compound ESとよばれる赤色の活性種がcompound Iに相当するが、これはHRPのようにポルフィリン環が一電子酸化されて π カチオンラジカルになった状態ではなく、ヘム鉄に近接するTrp-191から一電子が引き抜かれた Trp^+ の状態であると考えられている¹⁰⁾。チオレート軸配位子を持つという点で非常にユニークなCPOにおいてもcompound I、compound IIのスペクトルが確認されている¹¹⁾。しかし同じくチオレート配位のP450においてはこれらの活性種は未だに捉えられていない。

CcPのX線結晶解析の結果 (Fig. 0-3) から¹²⁾、PoulosらはO-O結合開裂機構について考察している¹³⁾。すなわちScheme 0-2のように活性部位近傍のArg-48、His-52、Asp-235による水素結合を通した電子のpush-pullがO-O結合のヘテロリティック開裂を促進しているというものである。つい最近X線結晶解析が行われたLiPにおいても同様の水素結合が見いだされた¹⁴⁾。他の多くのペルオキシダーゼにおいても活性サイトには極性アミノ酸、特にHisが存在することが明らかになりつつある。

これらのペルオキシダーゼが触媒する酸化反応は、フェノール類の酸化的二量化、ア



Scheme 0-2.

(f) Schematic representation of the cytochrome c peroxidase-catalyzed heterolytic cleavage of the RO1-O2H bond. *a*, the resting enzyme with a water molecule bound at the sixth coordination position; *b*, a hypothetical enzyme-substrate complex with the substrate bound as a hydroperoxyl anion, the O2 proton having transferred to the distal histidine; *c*, the transition state. The hydroperoxide O-O bond is undergoing heterolytic cleavage and a

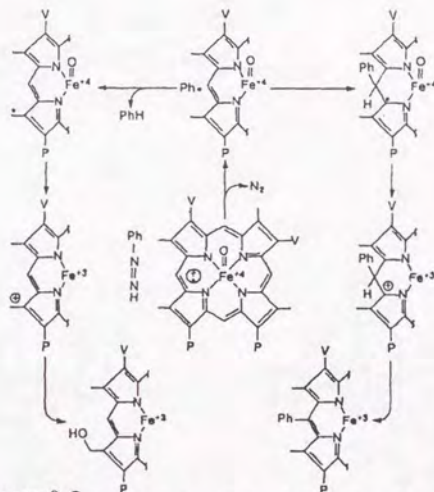
negative charge developing on the leaving group, RO1⁻, is stabilized by hydrogen bonding with Arg-48 and by the transfer of a proton from the distal histidine. *d* to *f*, possible structures of compound I, *d* and *e*, two resonance forms of the "oxene" intermediate; *f*, the structure of compound I after the "oxene" oxygen atom has abstracted a hydrogen atom from the indole ring of Trp-51.

ルキルアミンの*N*-脱アルキル化¹⁵⁾、スルフィドからスルフォキシドへの酸化¹⁶⁾などが挙げられる。またフェノールなどの存在下でのみオレフィンのエポキシ化¹⁷⁾も行い、これに関しては第3章で詳しく説明するが、HRP活性種による直接の酸化ではない。これらの反応の中でH₂O₂由来のO原子が基質に導入されることが知られているのは、スルフィドの酸化のみである¹⁶⁾。

ペルオキシダーゼが基質への酸素添加を苦手としていることに関しては、フェニルヒドラジンによるHRPの不活化反応（ヘムのアルキル化）の検討から、Ortiz de Montellanoらが面白い知見を得ている¹⁸⁾。Scheme 0-3に示すようにプロトヘムIXのδ-*meso*位が選択的にアルキル化されたものと、8位のメチル基が水酸化されたもののみが得られるため、Fig. 0-4のような活性サイトモデルを想定している。このようにヘムは広くタンパク質に覆われているため、HRPでは基質への酸素添加よりもヘムのedgeでの一電子酸化を得意すると考えられる。

以上のように生体内の多くのヘム酵素、特にペルオキシダーゼは、ヘム鉄の第5配位子にのみイミダゾール基を有してその機能を果たしている。またmono-イミダゾール錯体を容易にとりえるマンガンポルフィリン化合物では、イミダゾール存在下と非存在下では基質酸化反応性が異なることが示されている¹⁹⁾。したがって、鉄ポルフィリン化合物のmono-イミダゾール錯体の反応性を検討することは大変興味深い。ところが一般に、鉄ポルフィリン化合物とイミダゾールを混合するとbis-イミダゾール錯体の方が安定なため、溶液中mono-イミダゾール錯体はほとんど存在しない。したがって、鉄ポルフィリン化合物のmono-イミダゾール錯体の反応性などを検討することは容易でなく、それらに関する報告は大変少ない。TraylorらはFig. 0-5aのような化合物を合成しO-O結合開裂の促進を検討しているが^{20a,b)}、この化合物の合成はそれほど容易ではなく、イミダゾール基もヘム鉄からはずれやすい状態にある。Mansuy^{20c)}、Quici^{20d)}らもmono-イミダゾール配位マンガンポルフィリン (Fig. 0-5b,c) を合成しているが、同様に合成は困難である。

一方、cyt. *c*をpepsinで加水分解する際にプロトヘムIXが共有結合したペプチドフラグ



Scheme 0-3. Hypothetical mechanism for formation of the 6-meso-phenyl and 8-hydroxymethyl derivatives of heme during catalytic turnover of phenylhydrazine by horseradish peroxidase.

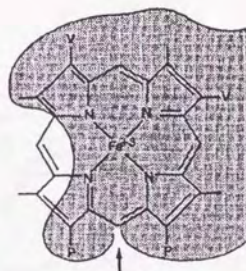
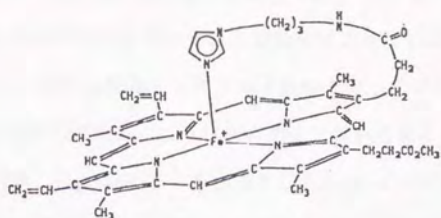
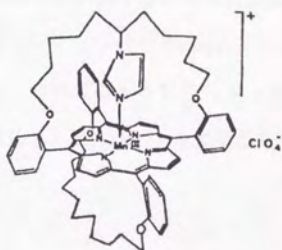


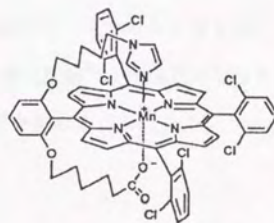
Fig. 0-4. Model of the active site proposed for horseradish peroxidase showing the exposed sector of the prosthetic heme to which electrons are transferred from the substrate.



(a)



(b)



(c)

Fig. 0-5

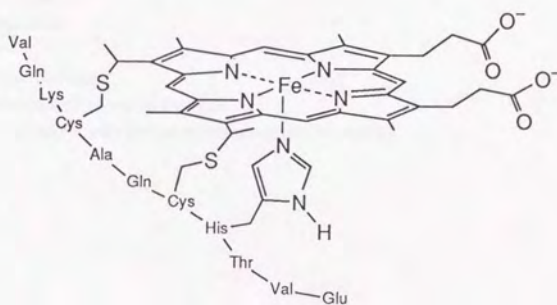


Fig. 0-6. Structure of microperoxidase-11 (MP-11)

メントが得られることは比較的早くから知られていた²¹⁾。一般に補欠分子族であるプロトヘムIXは、ヘムタンパク質中では水素結合によってのみ固定化されているが、cyt. *c*では例外的に2つのCys残基とスルフィド結合を介してプロトヘムIXがタンパク質と共有結合しているからである。この11個のアミノ酸からなるペプチドはmicroperoxidase-11 (MP-11)と呼ばれ、Fig. 0-6のような構造をしたmono-イミダゾール錯体である。MP-11の第5配位子であるHisのイミダゾールがヘム鉄に比較的強固に配位していることはBaldwinらにより示されている²²⁾。

Cyt. *c*からMP-11を調製する作業は比較的簡便であるので、MP-11は最も容易に手に入られる鉄ポルフィリン化合物mono-イミダゾール錯体の一つであると言える。ところが、その酸化反応性に関する報告はフェノール類の酸化反応²³⁾以外ほとんどなされていないことに着目し、MP-11による基質酸化反応の検討を試みることにした。

abbreviation

MP-11: microperoxidase-11

P450: cytochrome P450

cyt. *c*: cytochrome *c*

HRP: horseradish peroxidase

CcP: cytochrome *c* peroxidase

CPO: chloroperoxidase

LPO: lactoperoxidase

LiP: lignin peroxidase

Im: imidazole

N-MeIm: *N*-methylimidazole

Hemin-Cl: chloroproporphyrin IX iron(III)

Hemin-*N*-MeIm₂: bis(*N*-methylimidazole)protoporphyrin IX iron(III)

第1章 Microperoxidase-11 (MP-11)とHemin-bis-*N*-methylimidazole錯体 (Hemin-*N*-MeIm₂)の調製

第1節 MP-11の調製

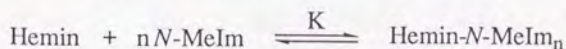
MP-11はSigma社から購入できるが、cyt. *c*から比較的容易に調製できる。またその方が安価で、大量に純度の高いものが得られるため、Baldwinらの方法²⁾に従ってMP-11を調製した。凍結乾燥して得られた粉体のまま、あるいは1mM MP-11の100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)溶液をエッペンドルフチューブに分注し凍結させ、-20℃で保存した。

第2節 Hemin-*N*-MeIm₂の調製

序論で述べたように、鉄ポルフィリン化合物は溶液中ではbis-イミダゾール錯体を形成する。Hemin-Clにどの程度の量のイミダゾールを加えると、全てbis-イミダゾール錯体になるかを調べた。

Fig. 1-1に示すように、20μMのHemin-Clに対し10mM（すなわち500当量）の*N*-methylimidazole (*N*-MeIm)を加えると、それ以上スペクトルが変化しなくなり、すべてのHeminがbis-イミダゾール錯体となった。これ以後の実験ではHemin-bis-*N*-methylimidazole錯体 (Hemin-*N*-MeIm₂)は、すべてHemin-Clに500当量の*N*-MeImを加えたものを用いた。

またHeminに対し*n*個の*N*-MeImが配位するとすれば、



となり、

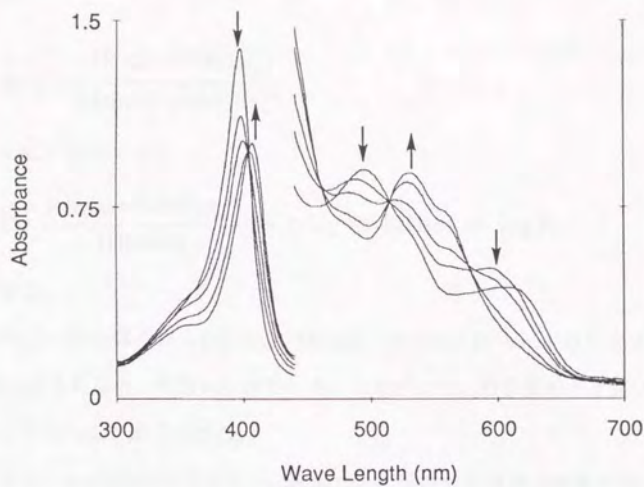


Fig. 1-1. Spectral changes of Hemin-Cl by addition of *N*-methylimidazole.

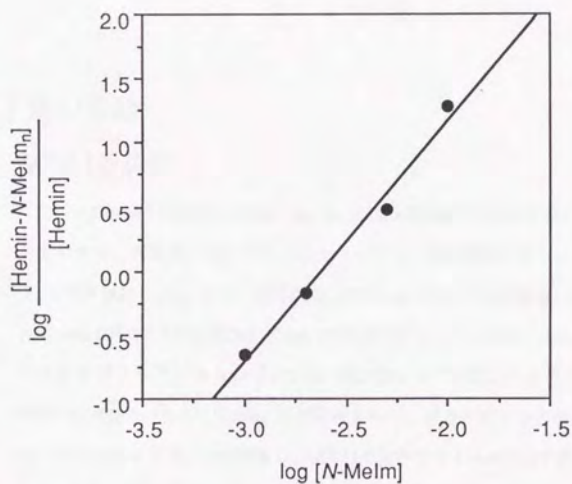


Fig. 1-2. Plots of $\log [N\text{-MeIm}]$ vs $\log ([Hemin-N-MeIm_n]/[Hemin])$.

$$K = \frac{[\text{Hemin-N-MeIm}_n]}{[\text{Hemin}] [\text{N-MeIm}]^n}$$

この式を変形すると、

$$\log \frac{[\text{Hemin-N-MeIm}_n]}{[\text{Hemin}]} = n \log [\text{N-MeIm}] + \log K$$

となる。

Fig. 1-1から得られる $[\text{Hemin-N-MeIm}_n]/[\text{Hemin}]$ と $[\text{N-MeIm}]$ の値をプロットするとFig. 1-2のようになり、傾き $n=1.89$ となる。したがって、約2個のイミダゾールがHeminに配位していることが示された。

なお、N-MeImのかわりにimidazole (Im)を用いても同様な結果が得られたが、Im錯体の場合しばらく保存しておくとpolymerになってしまうので使用に適しない。Hemin-Im₂とHemin-N-MeIm₂の反応性には全く差がないことが分かったので (data not shown)、長期保存のきくHemin-N-MeIm₂を以後用いることにした。

第1章の実験

MP-11の調製

Cyt. c (Sigma Type II-S) 400mgとpepsin 10mgを約2mlの蒸留水に溶かし、2N HClでpHを2.5に合わせた。反応液を25℃でインキュベートし、24時間後にさらに10mgのpepsinを加えpHを2.5に再調整した。さらに24時間後、Silica gel TLC (展開溶媒: 22ml H₂O, 22ml *i*-PrOH, 50μl conc. NH₄OH, 28mg KCN) でcyt. cの消失をチェックした後、conc. NH₄OHでpHを8.5にして反応を停止した。あらかじめ0.1M NH₄HCO₃で平衡化しておいたBio Gel P-6 (Fine 200-400mesh) カラム (4cm×100cm) に反応液をのせ、ゲルクロマトグラフィーを行った。流速は10~15ml/hrになるように調整し、MP-11を含むフラクションはフラクションコレクターで約2mlずつ分取した。各フラクションの423nmの吸光度を測定し (Fig. 1-3)、必要なフラクションを集め (total約30ml)、DIAFLO YM2 membraneを用い限外濾過によって濃縮した。

約5mlまで濃縮した後、3lの蒸留水に対して透析した。最後に凍結乾燥を行い、35mg (yield 58%)のMP-11赤色粉末を得た。TLCで1スポット、HPLCで1ピークであることにより精製を確認した。

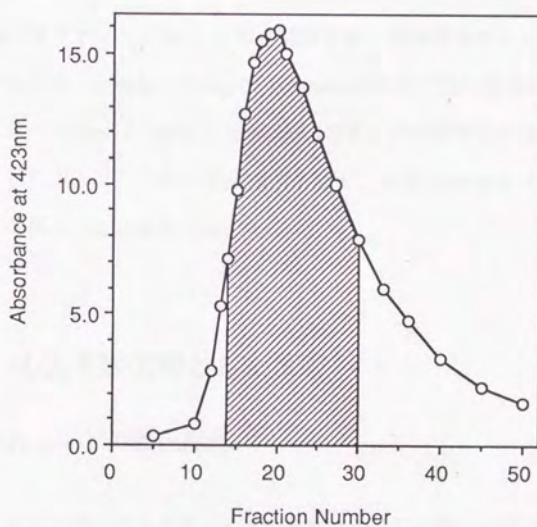


Fig. 1-3. Preparation of MP-11 (gel chromatography elution profile).

第2章 各種酸化剤を用いたMP-11、Hemin-*N*-Melm₂、Hemin-Clの酸化反応性の比較

はじめに

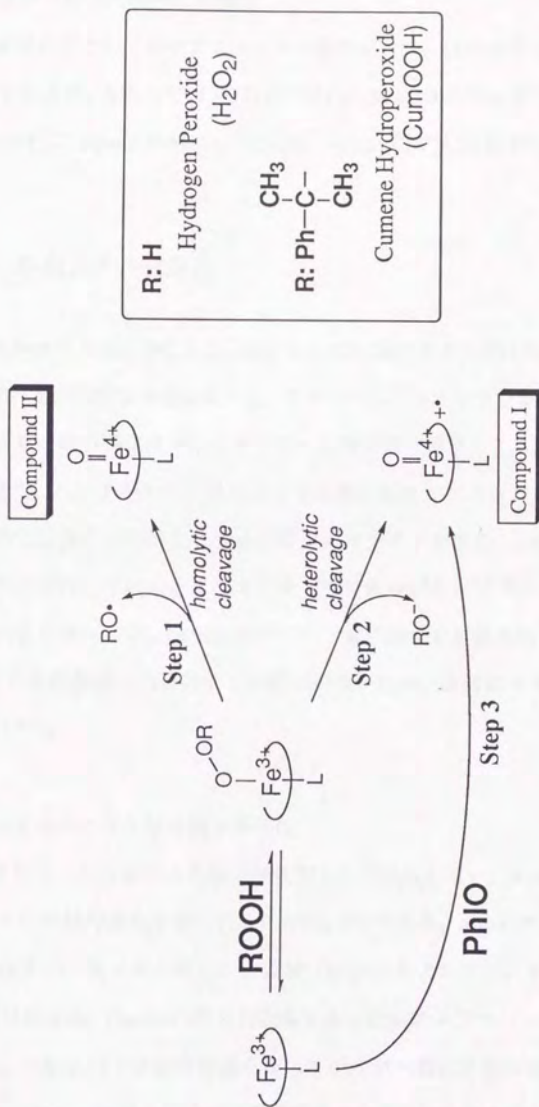
酸化剤としてH₂O₂、ヨードソベンゼン (PhIO)、クメンヒドロペルオキシド (CumOOH) を比較し、その特徴と反応様式の違いについて検討を加えた。対照としてはHemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clを用い、MP-11におけるイミダゾール配位子の効果を見ることとした。

H₂O₂やアルキルヒドロペルオキシド (ROOH) を酸化剤とした場合には、ヘテロリティックあるいはホモリティックなO-O結合開裂を経て活性種が生じる。ヘテロリティック開裂が起きた場合 (Scheme 2-1 Step 2) compound Iタイプの活性種が、ホモリティック開裂の場合には (Scheme 2-1 Step 1) compound IIタイプの活性種が生成する。一方、PhIOを酸化剤とした場合はO-O結合開裂過程を経ず、直接compound Iタイプの活性種が生成すると考えられる (Scheme 2-1 Step 3)。

第1節 H₂O₂を酸化剤とした反応

2.1.1. スルフィドの酸化反応

ペルオキシダーゼによるスルフィドの酸化はいくつか報告されている¹⁶⁾。一般にペルオキシダーゼの活性部位はタンパク質に覆われており、主としてヘムのedgeで電子を移動し、基質の一電子酸化を行う¹⁸⁾。そのためH₂O₂由来のO原子が基質に導入される例はほとんどないが、唯一、HRPやCPOによるスルフィドの酸化において、H₂¹⁸O₂を用いると¹⁸Oの入ったスルフォキシドが生成することが知られている^{16c)}。



Scheme 2-1. Formation of active intermediates.

チオアニソール (PhSMe) の酸化

H_2O_2 を酸化剤としてチオアニソールの酸化を行い、経時変化を測定した。Fig. 2-1はその結果であるが、MP-11では3分以内で H_2O_2 に対し100%の収率でスルフォキシドが得られるのに対し、Hemin-*N*-MeIm₂では20%、Hemin-Clでは5%以下であった。

2.1.2. *N*-脱メチル化反応

鉄ポルフィリン化合物による三級アミンの*N*-脱アルキル化はScheme 2-2に示すように、N原子の一電子酸化を初発反応とし、アミニウムカチオンラジカルを経由して進行する。このような一電子酸化はペルオキシダーゼ類が最も得意とする反応であり、数多くの報告がある¹⁵⁾。ペルオキシダーゼによって生成するアミニウムカチオンラジカルは系外で非酵素的に二分子が不均化してイミニウムカチオンを生じ (path C)、これが非酵素的に脱アルキル化していく。またカチオンラジカルがカップリングした生成物 (path D) も比較的多く得られる。P450においても一電子酸化を初発反応とするが、path AまたはBのように活性種鉄上のO原子との結合が速いため、系外にカチオンラジカルが放出されにくい^{24,25)}。

N,N-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化

チオアニソールの場合と同様に酸化剤として H_2O_2 を用い、*N,N*-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化の経時変化を表したものがFig. 2-2である。MP-11では5分間で H_2O_2 に対して100%の収率で*N*-脱メチル化した生成物 (*N*-メチルアニリン) が得られるが、Hemin-*N*-MeIm₂では約60%、Hemin-Clでは約20%であった。チオアニソールの酸化よりもHemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clでの収率が上がっているが一般にN原子の方がS原子よりも酸化還元電位が低く、N原子の方が一電子酸化されやすいからと考えられる。またカップリ

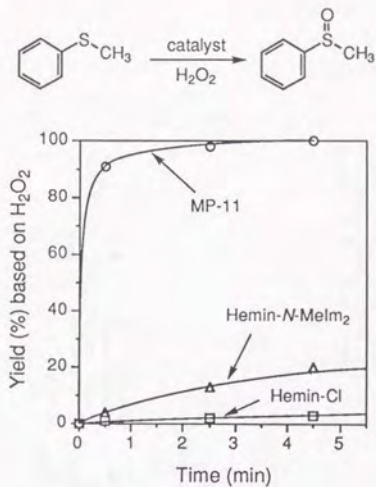


Fig. 2-1. Oxidation of thioanisole by H_2O_2 catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 1.0 mM H_2O_2 , 5.0 mM thioanisole, 50% methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μM catalyst. Yields were based on H_2O_2 .

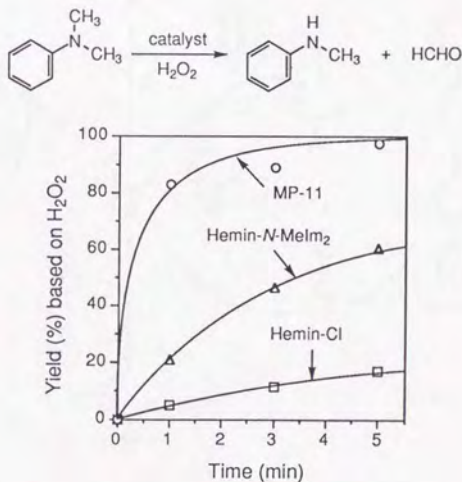


Fig. 2-2. *N*-Demethylation of *N,N*-dimethylaniline by H_2O_2 catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 1.0 mM H_2O_2 , 10 mM *N,N*-dimethylaniline, 50% methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μM catalyst. Yields were based on H_2O_2 .

ング体である N,N,N',N' -テトラメチルベンチジンは検出されず、MP-11においてはP450と同様にpath AまたはBが主経路であることが示唆された。

2.1.3. オレフィンの酸化反応

P450はオレフィンを基質としてエポキシドを生成する^{17b,26}。しかしながら、ペルオキシダーゼによるオレフィンのエポキシ化の報告はほとんどない。CPOはチオレート基 (S^-) を軸配位子に持つユニークなペルオキシダーゼであるが、この酵素がスチレンのエポキシ化を行うことが報告された^{17b,27}。この反応においてスチレンの立体化学は保持されることから、CPOによるオレフィンの酸化はP450と同様にオキシセントランスファー型であると考えられている。また、HRPはフェノール存在下でのみオレフィンをエポキシ化することが知られている¹⁷。この反応において、 H_2O_2 由来ではなく O_2 由来のO原子が基質に導入されること、立体化学が保持されないことから、反応機構はScheme 2-3のようなcooxidationであると推定されており、いわゆるオキシセントランスファー型の機構によるオレフィンのエポキシ化とは異なる。同様にhemoglobin、myoglobinでもオレフィンのエポキシ化が進行するが、これもヘム近傍のTyrのフェノール残基の酸化が初発であるcooxidationである (Scheme 2-4、Fig. 2-3)²⁸。

以上の知見からは S^- 配位ボルフィリンのみが、オレフィンのエポキシ化活性を有すると推定される。しかし、モデル系においては第5配位子が Cl^- などのボルフィリンでも効率は低いものの、オレフィンのエポキシ化は進行している^{20b,26,29}。一般にペルオキシダーゼはオレフィンのエポキシ化を触媒しないが、これは序論でも述べたように、活性部位のヘムがタンパク質で覆われているため、一電子酸化はヘムのedgeを通じて行えるもののオキシセントランスファー型の反応はできないためと考えられる。そこで、第6配位子側がタンパク質で覆われていないMP-11を用いたオキシセントランスファー型の反応

Scheme 2-3. Mechanism Proposed for the 4-Methylphenol-Mediated Cooxidation of Styrene

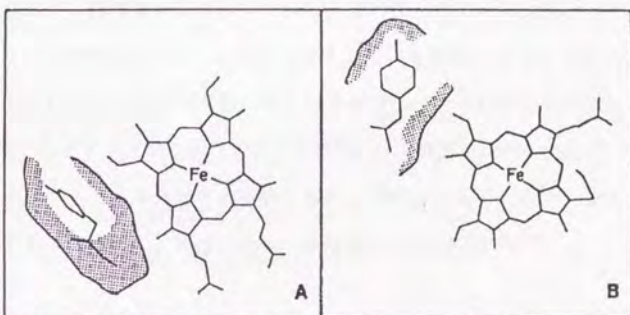
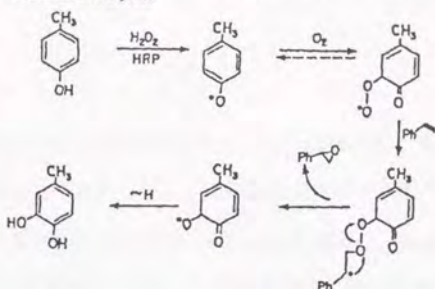
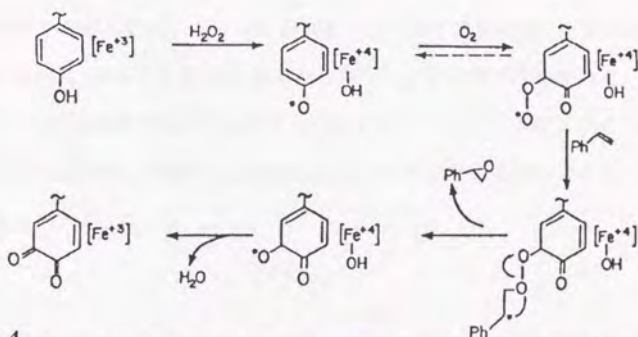


Fig. 2-3. Relationship of (A) tyrosine 42 in the crystal structure of equine methemoglobin and (B) tyrosine 103 in the crystal structure of sperm whale metmyoglobin to the prosthetic heme and the protein exterior. The relationship in bovine and equine methemoglobin is expected to be similar because of sequence homology. The inner and outer surfaces of the tyrosine, indicated by the dotted regions, form part of the heme pocket and the outer surface of the protein, respectively.



Scheme 2-4. Proposed mechanism for the incorporation of molecular oxygen into styrene oxide in the H_2O_2 -dependent oxidation of styrene by methemoglobin. The prosthetic heme, represented by the brackets around the iron, and the active site tyrosine, are shown. Alternative fates for the hydroxylated tyrosine radical at the end of the sequence can be envisioned.

を検討した。

スチレンの酸化

SやNの酸化と同じ条件では、スチレンのエポキシ化はほとんど進行しないため、基質、触媒、酸化剤の濃度を上げるとともに、反応温度を下げて収率を上昇させた。Fig. 2-4に示すように、 H_2O_2 を酸化剤とした場合にはHemin-N-MeIm₂、Hemin-Clでは反応は進行せず、MP-11でのみ酸化活性が見られた。しかしながら、触媒回転数は約14回でありSやNの場合に比べ、収率はかなり低くなった。この反応における特徴はスチレンオキシドとともに、その約2.5倍のフェニルアセトアルデヒドが得られることである。モデル系ではこのような転位生成物が大量に得られる例はなく、せいぜいエポキシドに対して数%の収率でアルデヒドが得られるだけである²⁹⁾。ヘム酵素では唯一CPOでのみ約1:1の割合でエポキシドとアルデヒドが生成することが報告されている^{17b)}。また、P450においてはアルデヒドはほとんど生成しない(エポキシドの約3%)^{17b,26)}。

cis-スチルベンの酸化

オキシセントランスファー型の反応においては生成するエポキシドの立体化学は保持される。そこでcis-スチルベンを用いて反応機構の検討を行った。

H_2O_2 を酸化剤とした場合には、スチレンを基質とした時と同様にMP-11でのみ活性が見られた(Fig. 2-5)。エポキシドはcis-体のみ得られ立体化学は保持された。また、転位生成物としてはPh基が転位したジフェニルアセトアルデヒドがエポキシドの約0.5倍得られた。trans-位のHが転位した場合に生成するはずであるベンジルフェニルケトンは生成しなかった。

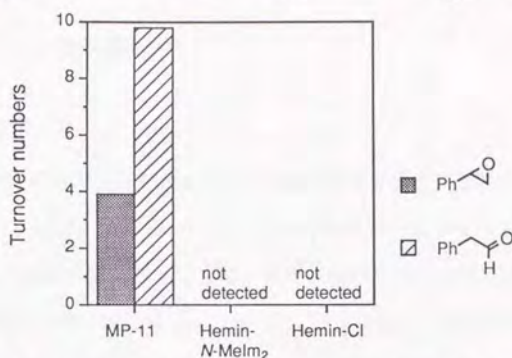
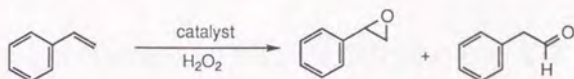


Fig. 2-4. Oxidation of styrene by H_2O_2 catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 5.0 mM H_2O_2 , 100 mM styrene, 60 % methanol, 40 mM potassium phosphate pH 7.4, and 20 μM catalyst. The reactions were carried out for 10 minutes at 0 °C. Yields are based on H_2O_2 .

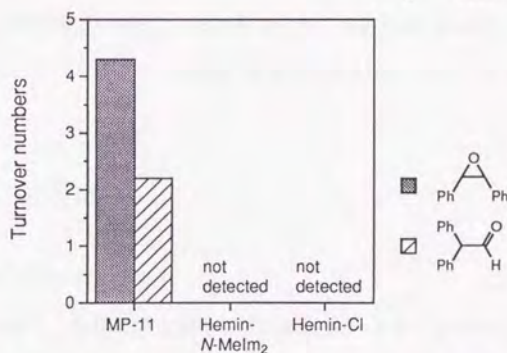
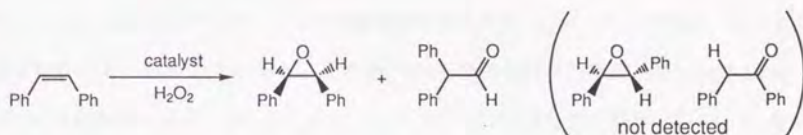


Fig. 2-5. Oxidation of *cis*-stilbene by H_2O_2 catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 5.0 mM H_2O_2 , 100 mM *cis*-stilbene, 80 % methanol, 20 mM potassium phosphate pH 7.4, and 20 μM catalyst. The reactions were carried out for 10 minutes at 0 °C. Yields are based on H_2O_2 .

第2節 ヨードソベンゼン (PhIO) を酸化剤とした反応

2.2.1. スルフィドの酸化反応

チオアニソールの酸化

Scheme 2-1 (P. 15) に示すようにPhIOはO-O結合開裂を経ることなしに、いずれの触媒においてもダイレクトにcompound Iタイプの活性種を生成させると考えられる (Scheme 2-1 Step 3)。PhIOを酸化剤として用いると、極めて速く30秒以内に反応が終了してしまうため、反応の経時変化は追えなかった。Fig. 2-6は、反応終了後のスルフォキシドの収率をPhIOに対して求めたものであるが、このようにMP-11、Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clで反応はほぼ100%の収率で進行し、収率の差はほとんどなくなる。また、PhIOを用いた場合触媒なしでも16%の収率でスルフォキシドが得られた。

PhIOを用いた場合、どの触媒でも同様にcompound Iタイプの活性ができていると仮定すると、それら活性種のチオアニソール酸化力には差がないということになる。ここで、H₂O₂とPhIOの系を比較してみると、その違いはO-O結合開裂の段階 (Scheme 2-1 Step 2 or 3) があるかないかである。したがって、H₂O₂を用いた場合での収率の差は、O-O結合開裂速度さらには開裂様式に起因すると考えられ、MP-11はHemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clに比べO-O結合のヘテロリティック開裂が促進されているということが示唆された。

2.2.2. *N*-脱メチル化反応

N,N-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化

チオアニソールの場合と同様に酸化剤としてPhIOを用いると、*N*-脱メチル化も30秒以内に反応が終了してしまうため、反応の経時変化を追うことはできなかった。Fig. 2-7は反応終了後の*N*-メチルアニリンの収率をPhIOに対して求めたものであるが、MP-11、

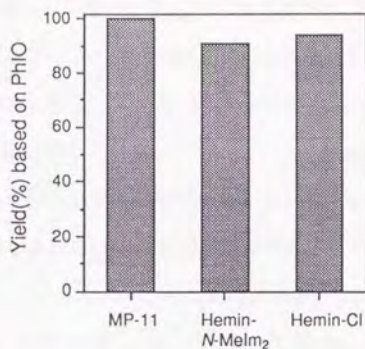
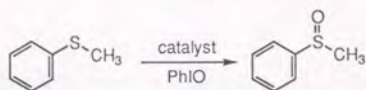


Fig. 2-6. Oxidation of thioanisole by PhIO catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 1.0 mM PhIO, 5.0 mM thioanisole, 50% methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μ M catalyst. Yields were based on PhIO.

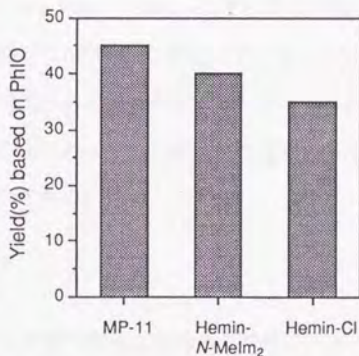
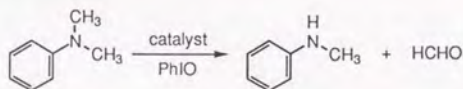


Fig. 2-7. *N*-Demethylation of *N,N*-dimethylaniline by PhIO catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 1.0 mM PhIO, 10 mM *N,N*-dimethylaniline, 50% methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μ M catalyst. Yields were based on PhIO.

Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clで収率の差はほとんどなくなる。しかしチオアニソールの場合と異なり、収率は100%に達していない。H₂O₂の場合と異なり、PhIOを用いると反応液が赤紫色を呈するので、カップリング体が生成しているために*N*-メチルアニリンの収率が低下しているのではないかと考え、*N,N,N',N'*-テトラメチルベンチジン定量したがいずれの場合でも2~3%しか生成していなかった。よって、PhIOを用いた場合になぜ収率が下がるかについては未だ明らかとなっていない。しかしながら、PhIOを用いた場合には各触媒で収率の差がなくなっていることは確かであり、この場合もチオアニソールの時と同様な解釈が可能である。すなわち、H₂O₂を用いた場合に見られた活性の差は、O-O結合開裂の差に由来すると考えられ、MP-11において最もO-O結合開裂速度が速くなっていることである。

2.2.3. オレフィンの酸化反応

スチレンの酸化

PhIOを酸化剤とすると、Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clでも反応は進行するが (Fig. 2-8)、収率の差は縮まるものの生成物の比はMP-11と異なっている。この場合はO-O結合開裂の差のみでなく活性種自体の性質の差が現われていると考えられる。また、アルデヒドが主生成物となるのはMP-11のみであって、この転位生成物の多さはMP-11によるオレフィンの酸化反応の特徴の一つである。

cis-スチルベン の酸化

PhIOを酸化剤とすると、H₂O₂を酸化剤とした場合と同様にエポキシドは*cis*-体のみが得られ立体化学は保持された。スチレンの場合と同様にHemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clでも反応が進行するが、活性はMP-11のそれぞれ約7分の1、13分の1しかなかった (Fig. 2-9)。

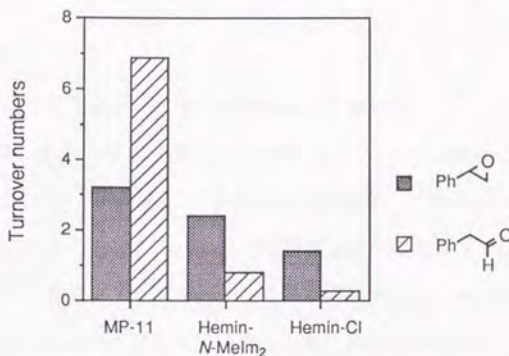
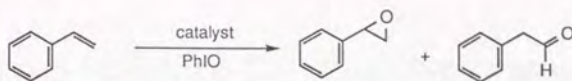


Fig. 2-8. Oxidation of styrene by PhIO catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 5.0 mM PhIO, 100 mM styrene, 60 % methanol, 40 mM potassium phosphate pH 7.4, and 20 μ M catalyst. The reactions were carried out for 10 minutes at 0 °C. Yields are based on PhIO.

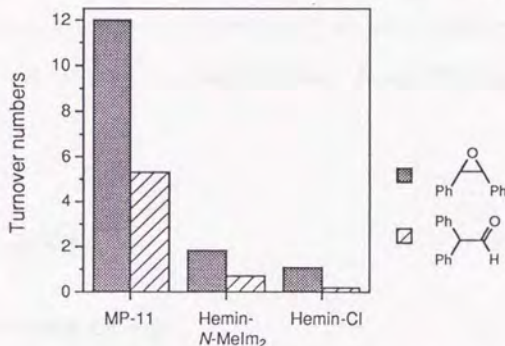
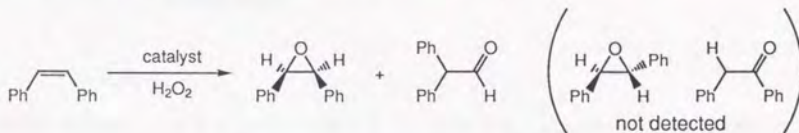


Fig. 2-9. Oxidation of *cis*-stilbene by PhIO catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 5.0 mM PhIO, 100 mM *cis*-stilbene, 80 % methanol, 20 mM potassium phosphate pH 7.4, and 20 μ M catalyst. The reactions were carried out for 10 minutes at 0 °C. Yields are based on PhIO.

第3節 クメンヒドロペルオキシド (CumOOH) を酸化剤とした反応

ヘム酵素およびそのモデルを用いた酸化反応において酸化剤としてよく用いられるものには、分子状酸素、 H_2O_2 、アルキルヒドロペルオキシド (ROOH)、有機過酸 (RCOOOH)、PhIO、 OCl^- などがある。このうち分子状酸素、アルキルヒドロペルオキシドは比較的穏やかに反応が進行するが、分子状酸素は還元剤存在下で活性化しなければならず、P450のように効率よくこれを行なうことは困難である。アルキルヒドロペルオキシドのうちクメンヒドロペルオキシド (CumOOH) は手に入れやすく、比較的安定に保存できるのでよく反応に用いられる³⁰⁾。

2.3.1. スルフィドの酸化反応

チオアニソールの酸化

CumOOHを用いてチオアニソールの酸化を行ったところ、 H_2O_2 を用いた場合100%の収率で反応を触媒したMP-11においても、酸化剤に対して5%以下の収率でしかスルフォキシドが生成しなかった (Fig. 2-10)。Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clでも反応は進行しなかった。

2.3.2. *N*-脱メチル化反応

N,N-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化

N,N-ジメチルアニリンを基質として用いたところ、MP-11を触媒とすると約50%の収率で*N*-脱メチル化が進行した (Fig. 2-11)。また同時にCumOOHに対して約10%の収率

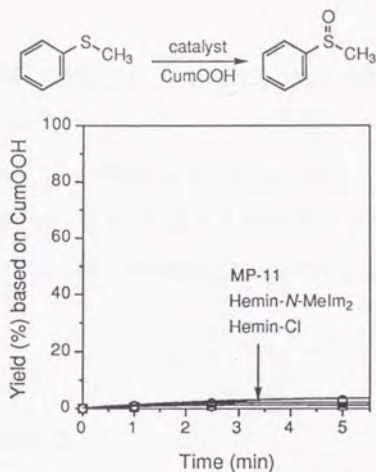


Fig. 2-10. Oxidation of thioanisole by CumOOH catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 1.0 mM CumOOH, 5.0 mM thioanisole, 50% methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μ M catalyst. Yields were based on CumOOH.

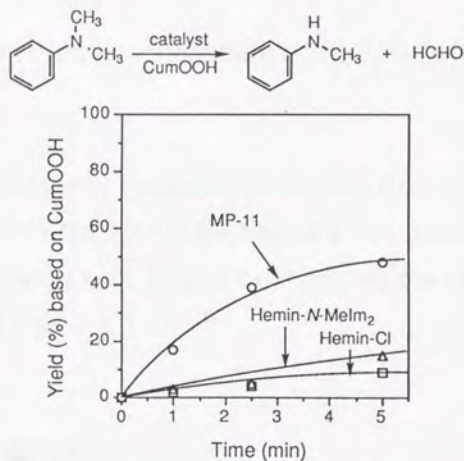


Fig. 2-11. *N*-Demethylation of *N,N*-dimethylaniline by CumOOH catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 1.0 mM CumOOH, 10 mM *N,N*-dimethylaniline, 50% methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μ M catalyst. Yields were based on CumOOH.

でアセトフェノン (PhCOMe) も生成した。これはCumOOH由来と考えられるが、これに関しては次章で詳しく述べる。

ここでMP-11は H_2O_2 を酸化剤とした場合にはSの酸化もN-脱メチル化も100%の収率で行うのに対し、CumOOHを酸化剤とするとN-脱メチル化は行うのにSの酸化は行わないという興味深い知見が得られた。Hemin-N-MeIm₂、Hemin-Clでも収率は低いものの反応は進行した。

2.3.3. オレフィンの酸化反応

オレフィンの酸化もほとんど進行しなかった。詳細については機構に関する考察とともに第4章で述べる。

第4節 Potassium Peroxymonosulfate (KHSO₅)を酸化剤とした反応

KHSO₅はOXONE®, monopersulfate compound (2KHSO₅·KHSO₄·K₂SO₄)という商品名で市販されている。KHSO₅をヘム酵素モデルに用いた例は少ないが、Meunierらのグループは積極的にこの酸化剤を使っている。基本的にはO-O結合開裂を経て活性種を生成するタイプの酸化剤であると思われる³⁰。

2.4.1. スルフィドの酸化反応

ここで用いている反応条件では、触媒なしでKHSO₅のみでスルフィドは100%スルフォ

キシドに酸化されたため、触媒活性の比較検討を行うことはできなかった。

2.4.2. *N*-脱メチル化反応

N,N-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化

スルフィドと異なり、*N*-脱メチル化は KHSO_3 のみでは全く進行しなかった。MP-11を触媒とした時はこの反応は100%に近い収率で進行したが、Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clでは10%程度と低い収率であった (Fig. 2-12)。このように、 KHSO_3 は H_2O_2 を酸化剤とした場合に近い反応性を示した。

2.4.3. オレフィンの酸化反応

スチレンの酸化

KHSO_3 のみのコントロールでも少量のエポキシドが生成したが、触媒存在下では、それ以上に反応が進行した。MP-11を触媒とした場合、 H_2O_2 、PhIOの時と同じように転位生成物 (フェニルアセトアルデヒド) が生成した (Fig. 2-13)。Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clでも反応は進行したが、PhIOの場合と同様低い収率であり、フェニルアセトアルデヒドの生成量も少なかった。MP-11においては、 KHSO_3 は H_2O_2 と同様なO-O結合開裂を経て、同じタイプの活性種を生成しているものと思われる。

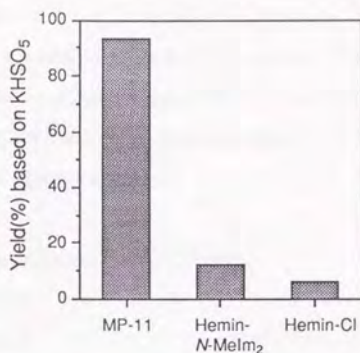
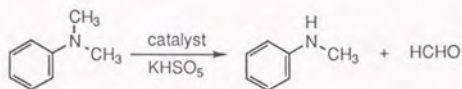


Fig. 2-12. *N*-Demethylation of *N,N*-dimethylaniline by KHSO₅ catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 1.0 mM KHSO₅, 10 mM *N,N*-dimethylaniline, 50% methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μ M catalyst. Yields were based on KHSO₅.

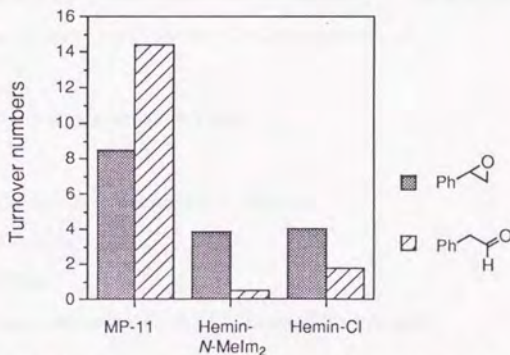
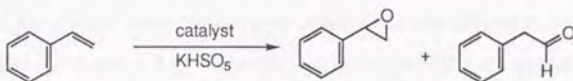


Fig. 2-13. Oxidation of styrene by KHSO₅ catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 5.0 mM KHSO₅, 100 mM styrene, 60 % methanol, 40 mM potassium phosphate pH 7.4, and 20 μ M catalyst. The reactions were carried out for 10 minutes at 0 $^{\circ}$ C. Yields are based on KHSO₅.

第2章の実験

チオアニソールの酸化

触媒10 μ M、チオアニソール5.0mMを含むメタノール/100mMリン酸カリウムバッファー (pH7.4)=1/1の混合溶媒中、酸化剤 (H_2O_2 またはPhIOまたはCumOOH) が1.0mMになるように加えることにより反応を開始した。反応液は室温で攪拌しながら、各時間に一部をとりHPLCにインジェクトし、生成物を定量した。

Methyl Phenyl Sulfoxide (PhS(O)Me)のHPLC検出条件

column: C₁₈
eluent: MeCN:H₂O=10:90
flow rate: 1.0ml/min
detect: UV 254nm

N,N-ジメチルアニリンのN-脱メチル化

触媒10 μ M、N,N-ジメチルアニリン10mMを含むメタノール/100mMリン酸カリウムバッファー (pH7.4)=1/1の混合溶媒中、酸化剤 (H_2O_2 またはPhIOまたはCumOOHまたはKHSO₅) が1.0mMになるように加えることにより反応を開始した。反応液は室温で攪拌し、各時間に一部をとりHPLCにインジェクトし、生成物の定量を行った。

N-Methylaniline (PhNHMe)のHPLC検出条件

column: C₁₈
eluent: MeCN:H₂O=25:75 (containing 0.1% NH₄OH)
flow rate: 1.0ml/min
detect: UV 254nm

N,N,N',N'-Tetramethylbenzidine (Me₂NC₆H₄C₆H₄NMe₂)のHPLC検出条件

column: C₁₈
eluent: MeCN:H₂O=60:40 (containing 0.1% NH₄OH)
flow rate: 2.0ml/min
detect: UV 305nm

スチレンおよび*cis*-スチルベンの酸化

触媒20 μ M、基質（スチレン100mMまたは*cis*-スチルベン50mM）を含むメタノール／100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)混合溶媒中（スチレンの場合は6／4、*cis*-スチルベンの場合は8／2）、酸化剤（H₂O₂またはPhIOまたはCumOOHまたはKHSO₅）が5.0mMになるように加えることにより反応を開始した。反応液は氷冷下攪拌し、15分後に一部をとりGCにインジェクトし、生成物の定量を行った。

Styrene Oxide、PhenylacetaldehydeのGC検出条件

column: PEG-20M (0.53mm×25m)

column temperature: 85℃

detect: FID

cis-Stilbene Oxide、DiphenylacetaldehydeのGC検出条件

column: HR-1 (0.53mm×25m)

column temperature: 170℃

detect: FID

第3章 O-O結合開裂機構の検討

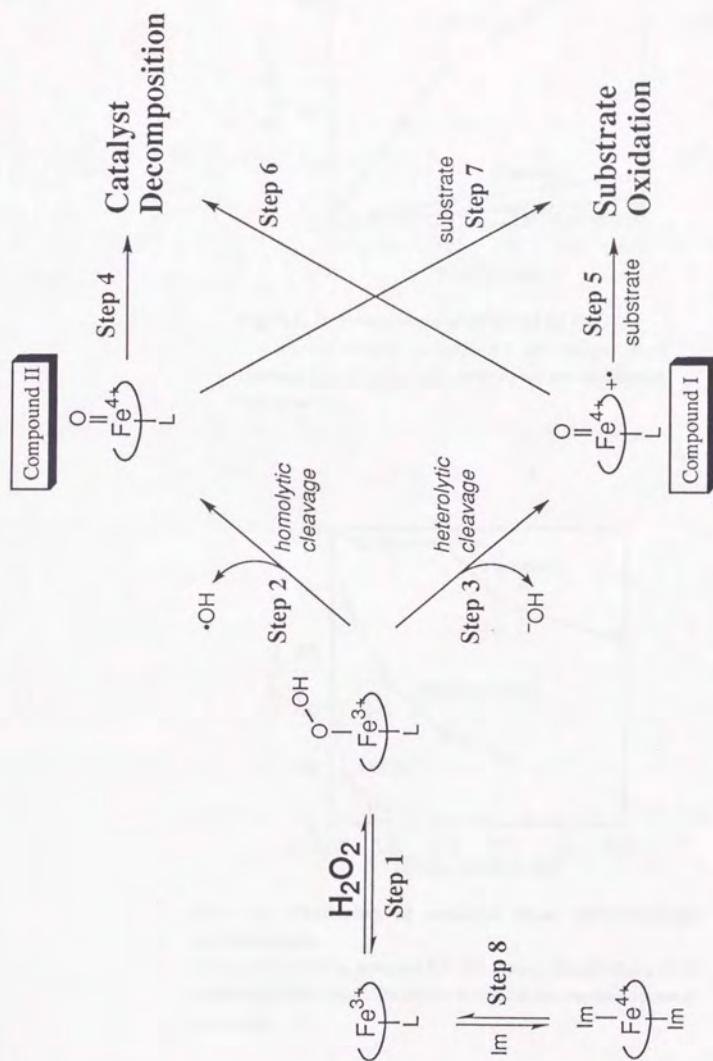
第1節 H_2O_2 による触媒分解とO-O結合開裂機構の検討

H_2O_2 を酸化剤として用いる反応はScheme 3-1のような機構で進行すると考えられる。すなわち、 H_2O_2 のヘム鉄への配位によるperoxo錯体の形成 (Step 1)、次にホモリティック (Step 2) あるいはヘテロリティック (Step 3) な開裂を経て、compound Iまたはcompound IIタイプの活性種が生じる。基質存在下では、活性種は基質酸化 (Step 5 or 7) または触媒分解 (Step 4 or 6) へと進行し、この2つの反応は競争反応である。

3.1.1. H_2O_2 による触媒分解速度

まず、基質非存在下での触媒分解速度をMP-11、Hemin-N-MeIm₂、Hemin-Clと比較してみた。 H_2O_2 を過剰量用い、Soret帯の減少より見かけの触媒分解定数 (k_{obs}) を求めた。 k_{obs} は触媒濃度に対して一次であったため (data not shown)、この分解は自己分解であると思われる。また k_{obs} は H_2O_2 低濃度では H_2O_2 に対しても一次であった (Fig. 3-1) ことから、律速段階に H_2O_2 濃度が効いていることが分かる。 H_2O_2 高濃度では飽和現象が見られた。

このように分解速度が H_2O_2 濃度に依存していること、また H_2O_2 のヘム鉄への配位 (Step 1) は速い平衡であると考えられていることより、O-O結合開裂 (Step 2 or 3) が律速段階であると考えられる。その開裂速度はFig. 3-1から、MP-11 > Hemin-Cl > Hemin-N-MeIm₂の順であり、MP-11ではHemin-Clの約8.3倍、Hemin-N-MeIm₂の約17倍であった。Hemin-N-MeIm₂では過剰のN-MeImにより H_2O_2 の配位が阻害される (Step 8) ため、見かけ上のO-O結合開裂はHemin-Clより遅くなっている。しかしMP-11による結果から、第



Scheme 3-1.

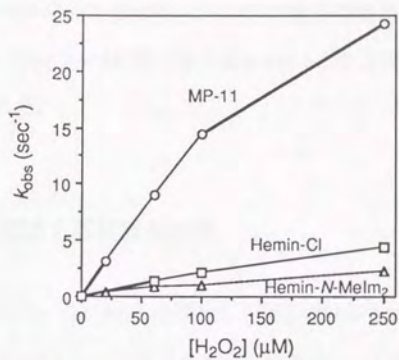


Fig. 3-1. Decomposition of catalysts by H_2O_2 .

The reaction mixtures contained 8.3 μM catalyst, 50 % methanol, 50 mM sodium phosphate pH 6.0, and the indicated amount of H_2O_2 .

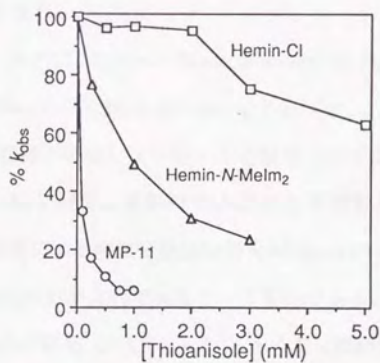


Fig. 3-2. Protection of catalysts from decomposition by thioanisole.

The reaction mixtures contained 8.3 μM catalyst, 100 μM H_2O_2 , 50 % methanol, 50 mM sodium phosphate pH 6.0, and the indicated amount of thioanisole.

5 配位子にのみイミダゾールを持つ場合は明らかに O-O 結合開裂が促進されている。また H_2O_2 高濃度においては、Step 2 or 3 が速くなり Step 4 or 6 に律速段階が移るために、飽和現象が見られると思われる。

3.1.2. 触媒分解速度に及ぼす基質添加効果

次に基質としてチオアニソール (PhSMe) を添加した場合の触媒分解速度を検討した。基質非存在下での分解速度を 100 として % 表示すると、結果は Fig. 3-2 のようになった。基質添加による触媒分解の抑制は MP-11 において最も顕著であり、次いで Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Cl の順であった。基質による触媒分解抑制効果が大きいほど、Step 5 と Step 8 あるいは Step 6 と Step 7 の競争反応において、触媒分解よりも基質酸化が有利となっていることを意味する。このことは、MP-11 から生じる活性種が、基質存在下では効率よく基質酸化に働くことを示唆する。

この場合の抑制効果の順 (MP-11 > Hemin-*N*-MeIm₂ > Hemin-Cl, Fig. 3-2) は、O-O 結合開裂速度の順 (MP-11 > Hemin-Cl > Hemin-*N*-MeIm₂, Fig. 3-1) とは異なっており、Hemin-Cl と Hemin-*N*-MeIm₂ の順番が逆転している。この結果に対する解釈は次のようになる。Hemin-*N*-MeIm₂ は O-O 結合開裂は過剰の *N*-MeIm により阻害を受け、Hemin-Cl より遅くなっているものの、基質による触媒分解抑制効果が Hemin-Cl よりも大きいことから基質酸化には Hemin-*N*-MeIm₂ の方が有利であるというものである。この解釈は、第 2 章で示した基質酸化活性の検討の結果 (P. 17, Fig. 2-1) もうまく説明することができる。

3.1.3. MP-11 へのイミダゾール添加効果

3.1.1. で、Scheme 3-1 におけるイミダゾールの配位 (Step 8) が H_2O_2 の配位 (Step 1) を

阻害しているため、Hemin-*N*-MeIm₂では見かけのO-O結合開裂が遅くなっていると説明したが、MP-11でも過剰のイミダゾールを添加すると同様の傾向が見られるはずである。そこでMP-11へのイミダゾール添加による基質酸化活性への影響を検討したところ、添加したイミダゾールの濃度依存的にMP-11のチオアニソール酸化活性は低下した (data not shown)。またMP-11の500当量のイミダゾールを加えた時、収率はもっとも低くなり、さらに過剰のイミダゾール (2000当量) を加えても変化はなかった。このことは過剰のイミダゾールは反応を阻害するため、本来のイミダゾール配位鉄ポルフィリンの特徴を生かせないということを意味する。したがって、mono-イミダゾール錯体であるMP-11は第5配位子イミダゾールの効果を検討する上で、極めて有用であることが分かった。

3.1.4. MP-11によるH₂O₂のO-O結合開裂機構に関する考察

ここで前章のMP-11によるH₂O₂とPhIOの反応性を比較することにより、H₂O₂のO-O結合開裂機構に関して考察してみる。PhIOではO-O結合開裂を経ることなく、いずれの触媒においてもダイレクトにcompound Iタイプの活性種を生成させると考えられる。MP-11において、H₂O₂を用いた場合とPhIOを用いた場合を比較するとはほぼ等しい反応性が見られたことから (P. 17, Fig. 2-1, 2-2; P. 24, Fig. 2-6, 2-7)、どちらの酸化剤を用いても共通の活性種compound Iが生成していると考えられる。したがってH₂O₂の場合、MP-11ではO-O結合はヘテロリティックに開裂していることが示唆された。

また、PhIOを酸化剤として用いた時、スルフィドの酸化、*N*-脱メチル化において、MP-11とHemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clの収率の差はほとんどなくなり、H₂O₂を用いた場合と対照的であった (P. 24, Fig. 2-6, 2-7)。これらの基質のH₂O₂を用いた場合での収率の差は、O-O結合開裂速度さらには開裂様式の差に起因すると考えられる。しかしPhIO

を酸化剤とした時、Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clでもオレフィンの酸化が進行するようになるが、依然MP-11との差は残ったままであった (P. 26, Fig. 2-8, 2-9)。よって、ここでは活性種自体の性質の差が現われたものと思われる。すなわち、第5配位子としてイミダゾールを持つMP-11は、同じcompound Iタイプの活性種においてもHemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clとその性質および酸化力が異なることが示唆される。

第2節 CumOOHによる反応におけるO-O結合開裂機構の検討

3.2.1. H₂O₂を用いたチオアニソール酸化におけるCumOOHの阻害効果

前章の結果 (P. 28, Fig. 2-10) は、チオアニソールの酸化においてCumOOHが何らかの阻害をしているためではないかと考え、H₂O₂を用いた系にCumOOHを添加してその効果を調べた。Fig. 3-3に示すように、添加したCumOOHの濃度依存的に、H₂O₂に対するスルフォキシドの収率が減少した。ここでCumOOHは明らかに阻害効果を示している。

Traylorらはアルキルヒドロペルオキシドを酸化剤とした場合、基質に対する酸化剤の量が少なくなるほど、酸化剤に対する収率が上がることから (Fig. 3-4)、compound Iが基質より速くアルキルヒドロペルオキシドと反応し、ROO[•]を生じると報告している^{32a)}。そこで前章の結果は、CumOO[•]が生じる反応がSの酸化より速いためCumOOHがSの酸化を阻害しているように見えるのではないかと考え (Scheme 3-2)、CumOO[•]が生成していることを確認しようと試みた。

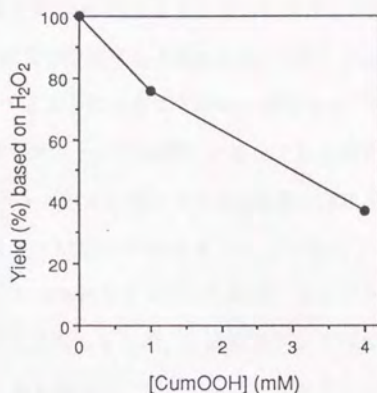
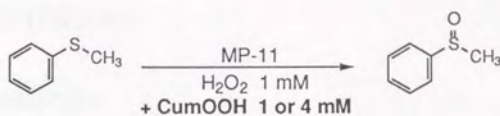


Fig. 3-3. Inhibition of thioanisole oxidation by CumOOH.
The reaction mixtures contained 1.0 mM H₂O₂, 5.0 mM thioanisole, 50% methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μ M MP-11, and indicated amount of CumOOH. Yields were based on H₂O₂.

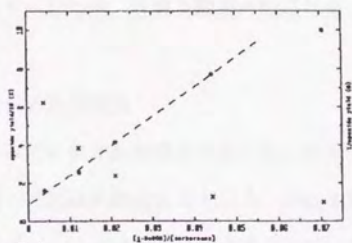


Fig. 3-4. Plots of % yield (X) and 100/yield (O) vs. ratio of concentrations of *t*-BuOOH and norbornene for reactions in solutions containing 5 M norbornene, 10⁻³ M FeClTMP, and varying concentrations of *t*-BuOOH in methylene chloride after complete reaction. The reciprocal plot only approximates the kinetic descriptions but becomes more exact at low *t*-BuOOH concentrations.

3.2.2. CumOO•生成証拠の検索

ジクメンペルオキシド検出の試み

CumOO•が生成したとするとScheme 3-2のような反応が進行し、CumO•またはジクメンヒドロペルオキシドおよび酸素が生成すると言われている³²⁾。CumO•は速やかにメチルラジカルを放出してアセトフェノンになることが知られている^{32,33a)}。CumO•は活性種ができる際にO-O結合がホモリテックに開裂した場合でも生成するので、アセトフェノン以外の生成物であるジクメンペルオキシドおよび酸素の検出を試みた。

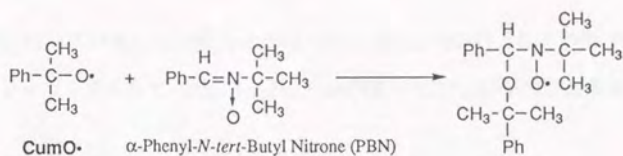
基質（チオアニソールまたは*N,N*-ジメチルアニリン）存在下あるいは非存在下でHPLCにてジクメンペルオキシドを検出しようとしたが、ジクメンペルオキシドの保持時間付近にbroadなピークが見られたものの、これがジクメンペルオキシドだとしてもせいぜい3%程度の収率でしかなかった。したがって、ジクメンペルオキシドはほとんど生成していないと考えてよい。

O₂生成の検討

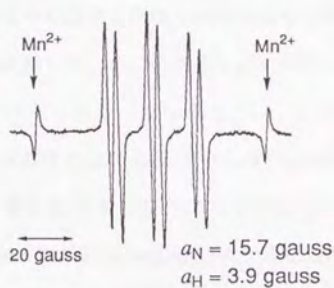
次に、酸素電極を用いて酸素の生成を検討した。上と同様な条件で窒素気流下にて反応を行いながら酸素濃度をモニターしたが、有意な酸素の生成は見られなかった。

ESRスピントラップ法によるラジカルを検出

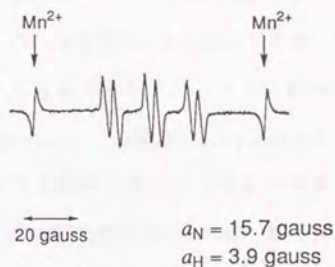
最後にスピントラップ剤を用いてラジカルを検出を試みた。スピントラップ剤としてPNB(α -phenyl *t*-butyl nitron)を用いてESRを測定したところ、Fig. 3-5aのようなシグナルを得た。このシグナルは $a_N=15.7\text{gauss}$ 、 $a_H=3.9\text{gauss}$ であり、ベンゼン中での文献値（CumOO•: $a_N=13.55\text{gauss}$ 、 $a_H=1.82\text{gauss}$; CumO•: $a_N=14.6\text{gauss}$ 、 $a_H=3.7\text{gauss}$ ）から、CumO•のシグナルであると思われた^{33b)}。またこのシグナルを同定するために、Fe²⁺とCumOOHからCumO•を生成させたところ^{33c, d)}、このシグナルと一致し（Fig. 3-5b）、この反応系にお



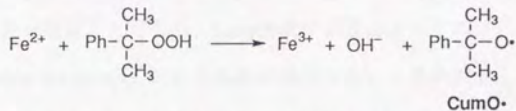
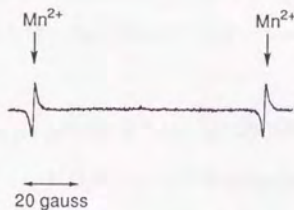
a. MP-11 + CumOOH



b. Fe²⁺ + CumOOH



c. MP-11 + H₂O₂



Schaich, K. M.; Borg, D. C. *Autoxidation in Food and Biological Systems* (M. G. Simic and M. Karel, eds.), pp. 45-70, Plenum Press, New York (1980)

Fig. 3-5. ESR spectra of CumO \cdot by using PBN as a spin-trapping agent.

いてCumO \cdot が生成していることが明らかとなった。また、MP-11とH₂O₂の系では、ラジカルの生成はまったく見られず (Fig. 3-5c)、CumOOHの場合と対照的な結果を示した。

3.2.3. MP-11によるCumOOHのO-O結合開裂機構に関する考察

ここまでの結果をH₂O₂とCumOOHで比較してみると、ラジカル種の生成とスルフィドの酸化に関して、2つの大きな違いが見られる。これらを説明する仮説としては、次の2つが考えられる (Scheme 3-2)。1つは、O-O結合がホモリティックに開裂し、CumO \cdot が直接生成する経路である (Scheme 3-2 path 1)。この場合、compound IIはN原子を一電子酸化する能力はあるがS原子を酸化する能力はないというものである。Compound IIは当然compound Iより酸化力は低く、かつ酸化還元電位的には一般にN原子の方がS原子よりも酸化されやすいのでこの説明は説得力をもっている。もう1つは、compound IがCumOOHを酸化し、CumOO \cdot が生成し、最終的にCumO \cdot になる過程である (Scheme 3-2 path 2)。この場合は、もしCumOO \cdot が生成する速度がスルフィドの酸化より速いならば、CumOOHでチオアニソールの酸化が進行しなかったことの説明がつけられる。

Scheme 3-2 path 2のように、CumOO \cdot が生成する速度がチオアニソールの酸化よりも速いとすると、H₂O₂を用いた場合compound Iによってチオアニソールの酸化が効率よく進んだのと同じように、CumOOHも効率よく減少するはずである。しかしながら、反応系中のCumOOHの濃度を定量したところ、CumOOHの消費はチオアニソールのあるなしにかかわらず遅く (data not shown)、この仮説は適当でないと思われる。さらに酸素生成は認められないのに、CumO \cdot がESRで検出されていることもホモリティック開裂を示唆しており、Scheme 3-2 path 2を否定するものである。以上の結果を考え合わせると、MP-11においてはTraylorらの主張するScheme 3-2のような反応は起こっていないと思われる。

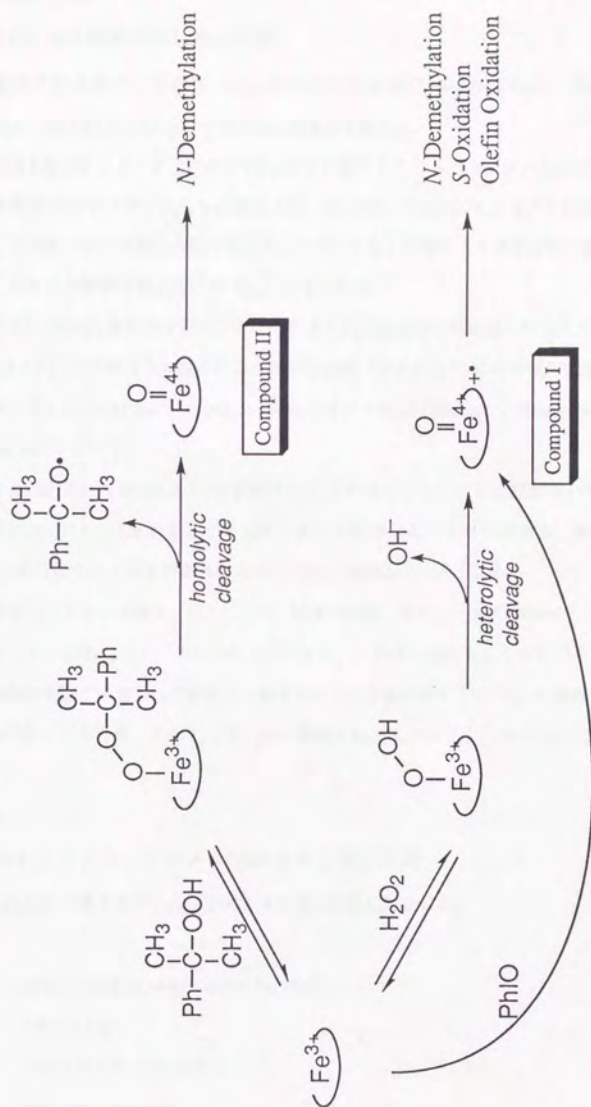
したがって、CumO \cdot の生成は、ホモリティックな開裂が起こっていることに由来しており、このとき生成するcompound IIがN-脱メチル化を行っていると考えられる。以上のように、MP-11においてH $_2$ O $_2$ とCumOOHは異なる様式でO-O結合が開裂し、そのために反応性が異なることが示唆された (Scheme 3-3)。

CumOOHがホモリティックに開裂すればCumO \cdot が生成しアセトフェノンになるはずである。しかしながらアセトフェノンの生成量は基質のあるなしに関わらず常に10%前後であり、このことをどのように評価してよいのかが次に問題となる。

3.2.4. CumO \cdot の反応性

CumO \cdot は比較的速やかにメチルラジカルを放出して、アセトフェノンになることが知られている。そこで、MP-11とCumOOHの系において、アセトフェノンを定量したところ、CumOOHに対して11%の収率でアセトフェノンが得られた。また、CumO \cdot のシグナルは、N,N-ジメチルアニリン存在下ではほとんど消失するが、これと対照的に、チオアニソールを加えた場合にはシグナルの消失は見られないという興味深い知見が得られた。このことから、CumO \cdot がN-脱メチル化反応に関与している可能性が考えられた。そこでFe $^{2+}$ を用いてCumO \cdot を発生させる系に、N,N-ジメチルアニリンを加えたところ、収率は低いもののCumOOHに対して14%の収率でアセトフェノンが生成し、16%の収率でN-脱メチル化が進行した。なお、この場合Fe $^{2+}$ は触媒量ではなく、過剰量加えてある。

よって、CumO \cdot がN原子酸化能を持っていることが明らかとなった。したがって、CumO \cdot は、メチルラジカルを放出してアセトフェノンになる過程と、N原子を一電子酸化する過程の2種類の経路をたどると考えられる。また、CumO \cdot のみによるN-脱メチル化と、MP-11が存在する時のN-脱メチル化の生成物の比率の違いから、MP-11による反応では、CumO \cdot による酸化とcompound IIによる酸化が両方起こっていると思われる。



Scheme 3-3.

第3章の実験

H₂O₂による触媒分解速度の測定

触媒分解速度は、各触媒のSoret帯最大吸収波長（MP-11は398nm、Hemin-N-MeIm₂は403nm、Hemin-Clは398nm）の吸光度の減少から求めた。

触媒8.3μMを含むメタノール/100mMリン酸ナトリウムバッファー(pH6.0)=1/1混合溶液をUVセルに入れ、H₂O₂を各濃度（20、60、100、250μM）になるように加え反応を開始し、各波長の吸光度減少の経時変化をモニターした。本条件下で触媒分解は擬一次反応であり、見かけの触媒分解速度定数（ k_{obs} ）が得られた。

この k_{obs} をH₂O₂濃度に対してプロットするとH₂O₂低濃度ではH₂O₂に対して一次であった（Fig. 3-1）。この傾きから得られる二次分解速度（すなわちO-O結合開裂速度）は、MP-11において $1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、Hemin-N-MeIm₂において $9.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、Hemin-Clにおいて $1.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ であった。

なお反応溶液のpHを6.0（この実験以外はpH7.4を用いた）にした理由は、分解速度を追うためにはpH7.4では速すぎるため速度を落とす必要があったからである。pHを低くするとStep 1の平衡が左に傾くため見かけのO-O結合開裂速度は遅くなる。

基質存在下での実験は、触媒8.3μM、H₂O₂100μM、メタノール/100mMリン酸ナトリウムバッファー(pH6.0)=1/1の条件下で行った。この系に基質としてチオアニソールを0.1~5.0mMの範囲で添加し、分解速度定数を求めた。基質非存在下での k_{obs} を100%とした時の k_{obs} を%で表したものを、チオアニソールの濃度に対してプロットするとFig. 3-2のようになった。

アセトフェノン、ジクメンペルオキシドの測定

反応条件は第2章のCumOOHによる反応と同様に設定した。

Acetophenone (PhCOMe)のHPLC検出条件

column: C₁₈

eluent: MeCN:H₂O=10:90

flow rate: 1.0ml/min

detect: UV 254nm

Dicumene Peroxide ($\text{PhCMe}_2\text{OOCMe}_2\text{Ph}$)のHPLC検出条件

column: C_{18}

eluent: $\text{MeCN}:\text{H}_2\text{O}=60:40$

flow rate: 1.0ml/min

detect: UV 215nm

Cumyl Alcohol (PhCMe_2OH)はUV吸収が非常に小さく、HPLCでの定量に適しなかった。またGCでは、サンプル中に残存するCumOOHがカラム中で熱により分解しCumOHまたはアセトフェノンになるためこれも不適であった。

酸素濃度の測定

酸素濃度の定量はクラーク型酸素電極を用いた。MP-11の濃度は10、33、67 μM とし、それぞれ1、3、4mMになるようにCumOOHを加えて反応を行った。溶媒は100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)を用いた。

ESRスペクトルの測定

ESRスペクトルは、MP-11 100 μM 、PBN 100mMを含むメタノール/100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)=1/1混合溶媒中、CumOOHが10mMになるように加えることにより反応を開始し、1分後に一部をとり室温で測定した。また Fe^{2+} の場合はMP-11のかわりに FeSO_4 100 μM を用いた。 N,N -ジメチルアニリン存在下での反応は上記条件に N,N -ジメチルアニリン10mMをあらかじめ加えておいた。

Fe^{2+} による N,N -ジメチルアニリンの N -脱メチル化

FeSO_4 10mM、 N,N -ジメチルアニリン10mMを含むメタノール/水=1/1混合溶媒中、CumOOHが1.0mMになるように加えることにより反応を開始し、5分後に一部を取り、HPLCにインジェクトし N -メチルアニリン、アセトフェノンを定量した。

第4章 MP-11による酸化反応機構の検討

はじめに

ヘム酵素は数多くの酸化反応を行うが、ここまで示してきたようなスルフィドの酸化、*N*-脱アルキル化、オレフィンのエポキシ化をP450はすべて触媒することができる。これに対し、HRPでは、スルフィドの酸化は遅く、またオレフィンのエポキシ化は触媒しない。ここでMP-11の反応性について考えると、MP-11はHRPと同じイミダゾール配位でありながら、チオレート配位であるP450に近い反応性を示していると言える。そこで、MP-11による酸化反応機構を明らかにするために、さらに詳細な検討を加えた。

第1節 スルフィド酸化反応機構

4.1.1. チオアニソールの酸化反応における*p*-位置換基効果

スルフィドの酸化反応機構を明らかにするために、*p*-位置換チオアニソールを用いて競争反応を行った。競争反応の結果からそれらの相対反応性を求め、その対数とHammettの σ_p^* 値をプロットしたところ、Fig. 4-1のような結果が得られた。MP-11、Hemin-*N*-MeIm₂では σ_p^* 値とよい相関が見られ、S原子の一電子酸化を含む反応経路でスルフォキシドが生成すると考えられる。LPO、P450によるスルフィドの酸化も一電子酸化機構で進行することが報告されており^{16a,b)}、本結果はそれらとも一致する。また、この傾きはMP-11、Hemin-*N*-MeIm₂でほぼ等しく、生成する活性種自体はMP-11とHemin-*N*-MeIm₂とでよく似ていると考えられる。Hemin-Clは反応収率が低すぎて、相対反応性は求められなかった。

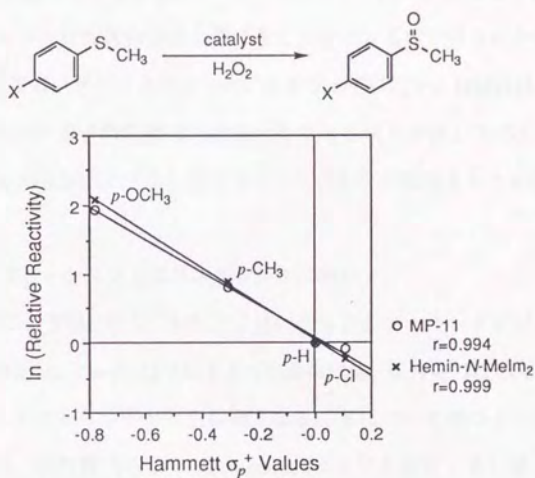


Fig. 4-1. Relative reactivity of *p*-substituted thioanisole.

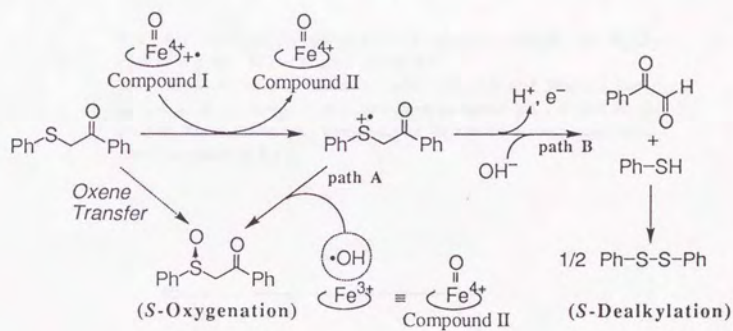
The reaction mixtures contained 10 mM each of two kinds of *p*-substituted thioanisole, 1.0 mM H_2O_2 , 50 % methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μM catalyst. The relative reactivities were approximated by the ratios of product yields.

4.1.2. フェナシルフェニルスルフィド ($\text{PhSCH}_2\text{COPh}$) の酸化反応

フェナシルフェニルスルフィドからは、Scheme 4-1に示すようにスルフォキシドとともにジフェニルジスルフィドが生成する。この化合物はS原子のとなりに脱離しやすいカルボニル α 位プロトンを持つため、S-脱アルキル化が進行し (path B)、最終的にジフェニルジスルフィドが生成することがOaeらにより示されている³⁴⁾。そこでこれらの生成比を比較することにより、活性種の性質を論ずることができるのではないかと考えた。LPOやP450による反応では、スルフォキシドのジスルフィドに対する比はほぼ1である。MP-11によるSの酸化は一電子酸化機構で進行することを明らかにしたので、MP-11においても一電子酸化を初発反応とするS-脱アルキル化がかなり進行すると予想された。

H_2O_2 を酸化剤とするフェナシルフェニルスルフィドの酸化

Fig. 4-2に示すように、予想に反してMP-11においてはスルフォキシドがジスルフィドの約3.1倍、Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clではそれぞれ約0.15倍、0.09倍の収率で得られた。MP-11でこのようにスルフォキシドが主生成物となることについて次のように考えられる。MP-11においては、活性種（ここではcompound Iタイプと仮定する）が、S原子より電子を1つ奪い、Sカチオンラジカルとcompound IIを生成する。Compound II（鉄4価オキセノイド）は鉄3価ポルフィリンと $\cdot\text{OH}$ に等価であり、この $\cdot\text{OH}$ に相当する活性種上のO原子がSカチオンラジカルとカップリングしスルフォキシドが生成する (path A)。MP-11においてはpath Aの方がpath B (α 位プロトンの脱離) よりもかなり速いと考え、この結果はうまく説明することができる。これは*N,N*-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化においてカップリング体ができなかったことに対する考察とも一致する。本結果は、mono-イミダゾール錯体であるMP-11の特徴の一つを明らかにした。



Scheme 4-1. Oxidation of phenacyl phenyl sulfide.

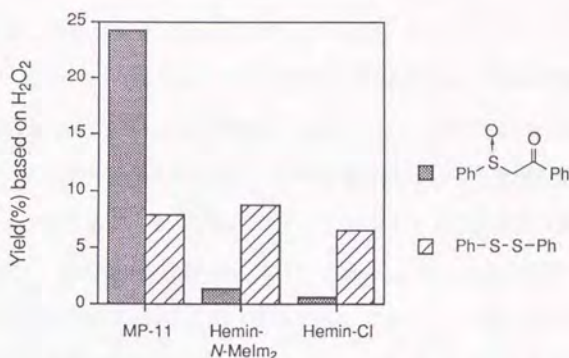


Fig. 4-2. Oxidation of phenacyl phenyl sulfide by H_2O_2 catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 1.0 mM H_2O_2 , 5.0 mM phenacyl phenyl sulfide, 50 % methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μM catalyst. The reactions were carried out for 10 minutes at room temperature. Yields are based on H_2O_2 .

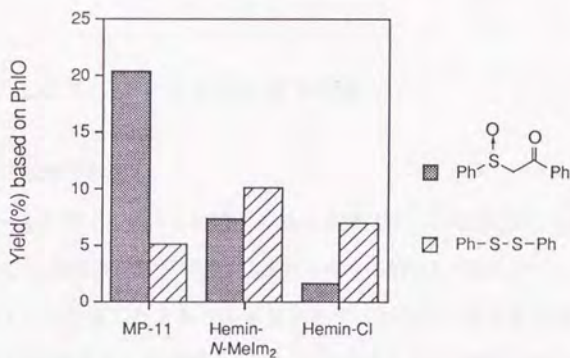


Fig. 4-3. Oxidation of phenacyl phenyl sulfide by PhIO catalyzed by MP-11 and Hemins.

The reaction mixtures contained 1.0 mM PhIO, 5.0 mM phenacyl phenyl sulfide, 50 % methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μM catalyst. The reactions were carried out for 10 minutes at room temperature. Yields are based on PhIO.

PhIOを酸化剤とするフェナシルフェニルスルフィドの酸化

チオアニソール、*N,N*-ジメチルアニリンを基質とした場合には、PhIOを酸化剤とすると、MP-11、Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clで収率に差がなくなった (P. 24, Fig. 2-6, 2-7)。しかしフェナシルフェニルスルフィドの場合、PhIOを酸化剤としても収率の差は多少縮まるが依然差は残っている上に、スルフォキシドとジスルフィドの生成比も異なったままである (Fig. 4-3)。PhIOからはMP-11、Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clにおいて同様に compound Iタイプの活性種が得られるという仮定のもとでは、ここで見られる収率の差は活性種自体の性質の差が現われているに他ならない。チオアニソール、*N,N*-ジメチルアニリンを基質とした場合には、活性種自体の性質の差は現われなかったので、O-O結合開裂の差のみで説明することができたが、フェナシルフェニルスルフィドを基質とした場合には、収率の差が縮まった分に関してしかO-O結合開裂の差で説明できない。したがって、用いる基質によってO-O結合開裂の差のみが現われるものと、活性種自体の性質の差も現われてくるものとがあることが分かった。

4.1.3. MP-11によるスルフィドへのO原子の導入

チオアニソールへのO原子の導入

まずチオアニソールの酸化におけるO原子の導入を調べた。この反応は、HRPが触媒する反応の中で、 $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ 由来のO原子が取り込まれる唯一の例として知られている^{16cch}。Fig. 4-4はMP-11によって生成したスルフォキシドのマススペクトルであるが、用いた $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ の¹⁸O含量が78%であることを考慮すると、このO原子はほぼ100%が $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ 由来であると算出される。またCum¹⁸O¹⁸OHを用いて反応を行ったところ、5%以下という低い収率 (P. 28, Fig. 2-10) でしかスルフォキシドは生成しないが (H_2O_2 では100%)、生成してくる少量のスルフォキシドのO原子は72%がCum¹⁸O¹⁸OH由来であった。このことか

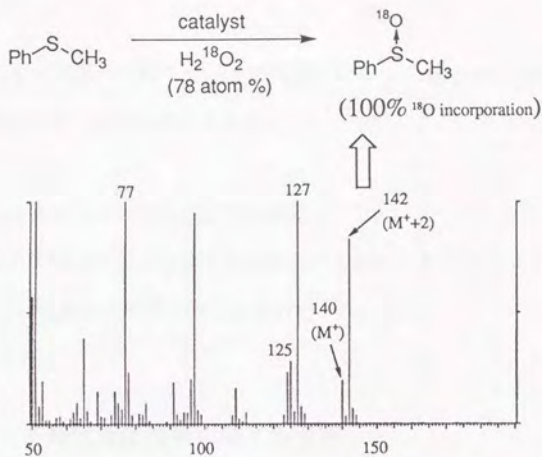


Fig. 4-4. ^{18}O Incorporation from $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ in the oxidation of thioanisole.

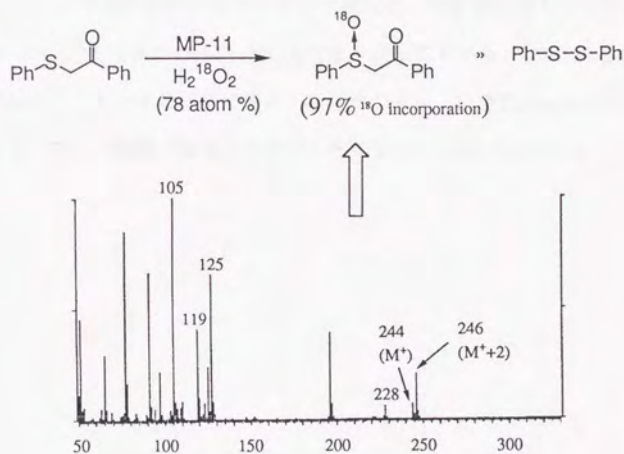


Fig. 4-5. ^{18}O Incorporation from $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ in the oxidation of phenacyl phenyl sulfide.

らCumOOHでもごく一部はヘテロリティック開裂を起こしてcompound Iを生成し、それがスルフィドの酸化を行うものと考えられる。

フェナシルフェニルスルフィドへのO原子の導入

フェナシルフェニルスルフィドの場合も同様に、生成物であるスルフォキシドに97%という高い割合で $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ 由来のO原子が導入された (Fig. 4-5)。

4.1.4. スルフィド酸化反応機構に関する考察

前章でも述べたようにMP-11と H_2O_2 から生成する活性種はcompound Iと考えられる。また、最近Wangらが*N*-acetyl-MP-8と H_2O_2 からcompound Iのスペクトルをとったと報告しており³⁹⁾、MP-11においてO-O結合はヘテロリティックに開裂していると思われる。

4.1.1.で示したようにMP-11によるスルフィド酸化は一電子酸化過程を含む。また、4.1.3.で示したように生成物のO原子は H_2O_2 由来であることから、MP-11もP450またはHRPなどのペルオキシダーゼと同様にSカチオンラジカルと活性種compound II上のO原子が結合するリバウンド機構であることが明らかとなった (Scheme 4-2)。

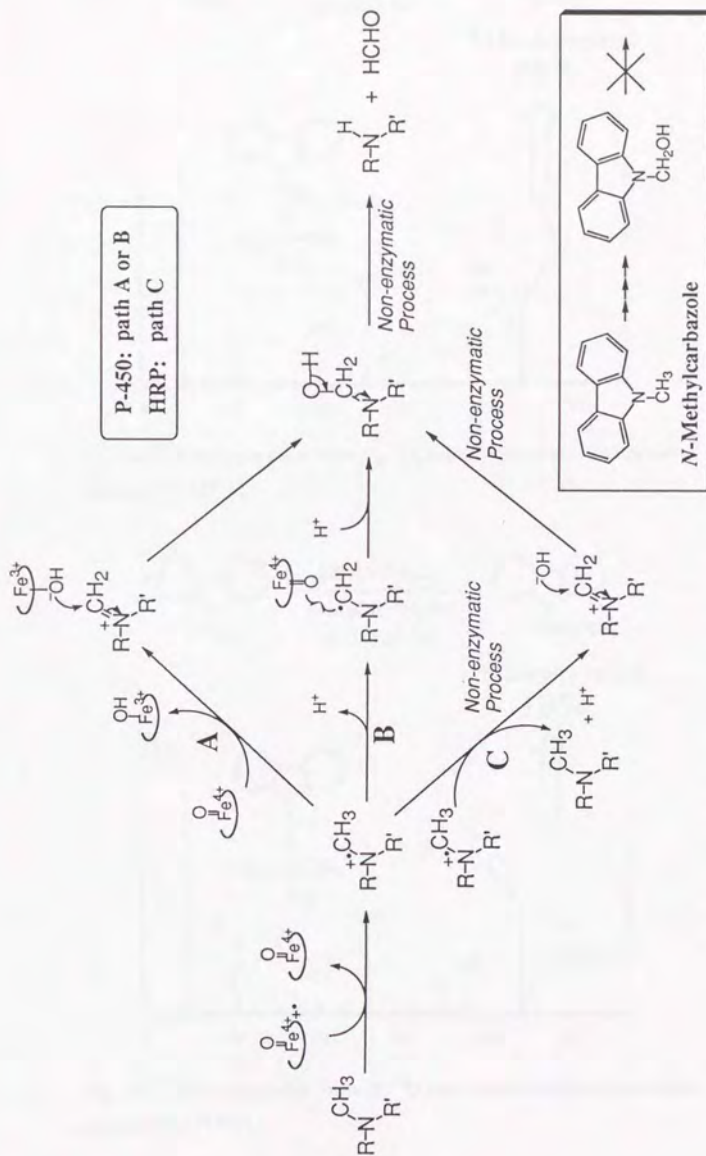
第2節 N-脱メチル化反応機構

次にN-脱アルキル化反応機構について検討した。スルフィドの酸化とは異なり、N-脱メチル化機構はHRPとP450とで違うと言われている^{24,25)}。すなわち、HRPではアミニウムカチオンラジカル2分子が不均化してイミニウムカチオンが生じ (Scheme 4-3 path C)、これに溶媒中のOH⁻が非酵素的に付加してカルビノールアミンになり反応が進行する。ところが、P450では一電子酸化に続いてヘム鉄上のO原子が結合し (Scheme 4-3 path A or B)、カルビノールアミンを生じ、その後は非酵素的にN-脱メチル化が進行する。

MP-11ではHRPで進行しないオレフィンのエポキシ化が進行すること、また、スルフィド酸化においてカチオンラジカル中間体とヘム鉄上のO原子のリバウンドが速かったことから、P450タイプの機構ではないかと予想される。どちらのタイプの機構であるかは、生成するアルデヒドのO原子の由来を調べればよいのであるが、アルデヒドのO原子は容易に水のO原子と交換してしまう。しかしながら、N-メチルカルバゾールを基質とすると、中間体であるカルビノールアミンが安定に単離できるので、この基質を用いて検討することにした。

4.2.1. MP-11によるN-メチルカルバゾールへのO原子の導入

Fig. 4-6はH₂¹⁸O₂を用いて生成したN-ヒドロキシメチルカルバゾールのTMS化体のマススペクトルであるが、MP-11によってH₂¹⁸O₂由来のO原子が80%の割合で導入された。さらにH₂¹⁸Oを50%にエンリッチした溶媒系で、ラベルしていないH₂O₂を用いて反応を行ったところ、生成したN-ヒドロキシメチルカルバゾールのTMS化体はFig. 4-7のようなマススペクトルになった。これからH₂¹⁸O由来のO原子が生成物に導入された割合は18%と算出される。またCum¹⁸O¹⁸OHを酸化剤とした場合、N-ヒドロキシメチルカルバゾール



Scheme 4-3. *N*-Demethylation mechanisms of P-450 and HRP.

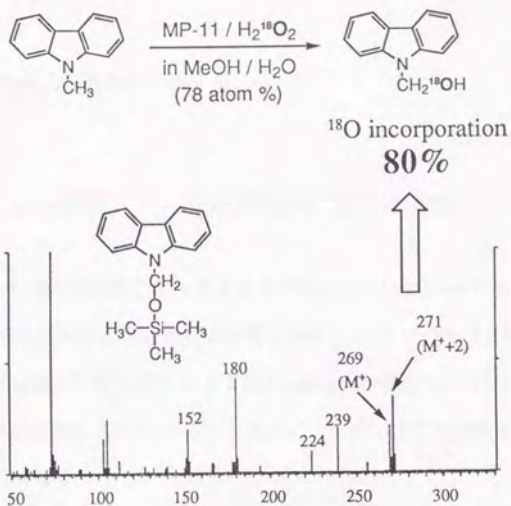


Fig. 4-6. ^{18}O Incorporation from $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ into *N*-hydroxymethylcarbazole catalyzed by MP-11.

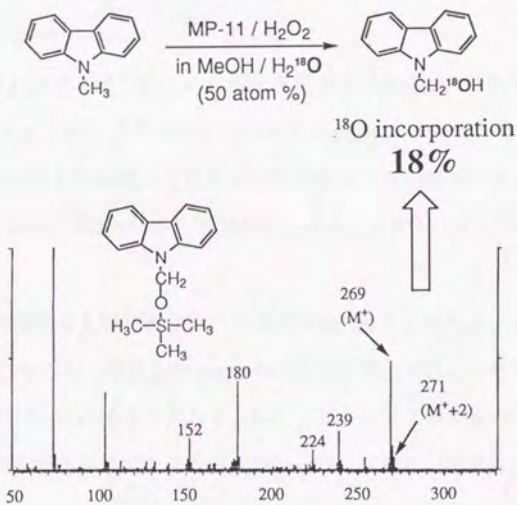


Fig. 4-7. ^{18}O Incorporation from H_2^{18}O into *N*-hydroxymethylcarbazole catalyzed by MP-11.

のO原子は60%が $\text{Cum}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ 由来であった。

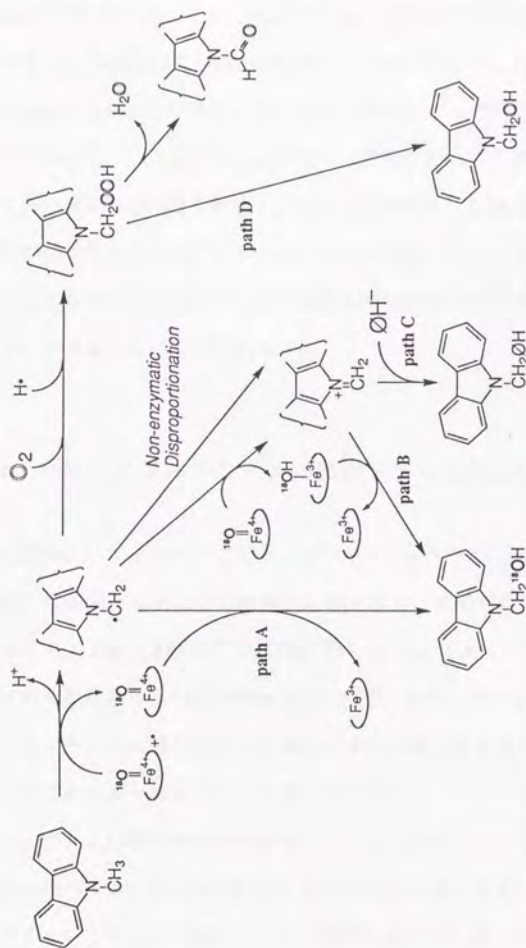
4.2.2. MP-11による*N*-脱メチル化反応機構に関する考察

上の結果と、HRP、P450に関する知見をまとめたのがScheme 4-4である。まずHRPでは約20%が溶媒中の H_2O 由来、約65%が O_2 由来であり、ヒドロペルオキシド中間体を通るのが (Scheme 4-4 path D) 主経路であるとHollenbergらが報告している^{24d)}。このヒドロペルオキシド中間体から生じる*N*-ホルミルカルバゾールがHRPでは比較的大量に得られ、そのO原子も O_2 由来である。

P450でも*N*-ヒドロキシメチルカルバゾールのO原子はほぼ100%が O_2 由来であるが、P450の場合、これは鉄オキセノイドのO原子である^{24d)}。P450では*N*-ホルミルカルバゾールは生成しないことから、ヒドロペルオキシド中間体は生成しておらず、Scheme 4-4 path Dは通らないと思われる。

MP-11の場合、 H_2O_2 由来の活性種上のO原子が生成物に80%導入された。これは基質の一電子酸化体と鉄オキセノイドとのリバウンド (Scheme 4-4 path A or B) が速いことを示しており、MP-11による*N*-脱メチル化反応はP450タイプの機構で進行していることが示唆された。またP450と同様にMP-11の場合も*N*-ホルミルカルバゾールは生成しなかった。

CumOOH を用いた場合にも酸化剤由来のO原子が60%導入されたが、チオアニソールの場合と同様にこれもごく一部生じたcompound Iによる酸化が起こったことが考えられる。しかしチオアニソールの場合と異なり、*N*-ヒドロキシメチルカルバゾールの化学収率は H_2O_2 と CumOOH とでそれほど大きな差はなかったことから (正確な定量は行っておらず定性的なもの)、compound II 2分子による*N*-メチルカルバゾールの2電子酸化が起こり、活性種上のO原子が導入されたとも考えられる。



MP-11	80%	18%	—
P-450 ^a	>95%	—	—
HRP ^b	—	20%	65%

a) Shea, J. P.; Valenine, G. L.; Nelson, S. D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982, 109, 231-235.
b) Keddaris, G. L.; Rickert, D. E.; Pandey, R. N.; Hollenberg, P. F. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 15910-15914.

Scheme 4-4. Proposed mechanisms of the N-hydroxymethylcarbazole formation.

4.2.3. *N,N*-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化反応における分子内重水素同位体効果

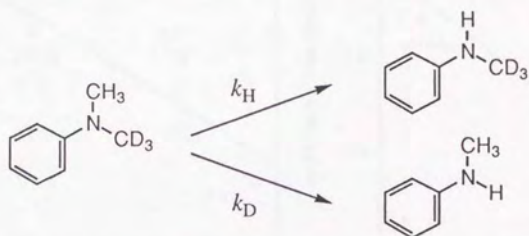
d_5 -*N,N*-ジメチルアニリン ($\text{PhNCH}_3\text{CD}_3$) を用いて分子内重水素同位体効果 (k_H/k_D) を求めると、P450では1.5~3、HRPでは8~10になることが知られている²⁹。これはHRPではScheme 4-3 path Cにおける脱プロトン化のところで同位体効果が現われるためと説明されている²⁹。したがって k_H/k_D の値から機構をある程度推測することが可能である。

ところが結果はMP-11を触媒とし H_2O_2 を酸化剤とした場合、 k_H/k_D は5.3となり、P450とHRPの中間の値を示した (Table 4-1)。また H_2O_2 、PhIO、CumOOHの3種類の酸化剤によって k_H/k_D が大きく異なれば、O-O結合開裂機構や活性種の違いを議論できると思われたが、そのような差は見られなかった。

4.2.4 *N,N*-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化反応における*p*-位置置換基効果

p-位置置換*N,N*-ジメチルアニリン (*p*-ブロム、*p*-メチル) を用いて競争反応を行った。競争反応の結果からそれらの相対反応性を求め、その対数とHammettの σ_p^* 値をプロットしたところ、Fig. 4-8のような結果が得られた。スルフィドの場合と異なり、 H_2O_2 、CumOOHを酸化剤とした場合Hammettの σ_p^* 値、 σ_p 値ともに全く相関が見られなかった。しかしながらPhIOを酸化剤とした場合はよい相関が見られた²⁹。*p*-ニトロ体が溶媒に難溶なため3点しかとれなかったためにはっきりしたことは言えないが、 H_2O_2 、CumOOHの場合、ブロムに特異的な反応が起こってしまったことも考えられる (H_2O_2 、CumOOHはPhIOに比べて*p*-ブロム体の*N*-脱メチル化収率が低すぎる)。どちらにしろプロット数を増やさないことには議論ができない結果となってしまった。

Table 4-1. Kinetic hydrogen isotope effects for *N*-demethylation of *N,N*-dimethylaniline.



catalyst	k_H / k_D
P450	2.0
P420	3.8
HRP	>8.7
MP-11 / H_2O_2	5.3
MP-11 / PhIO	4.8
MP-11 / cumeneOOH	3.2

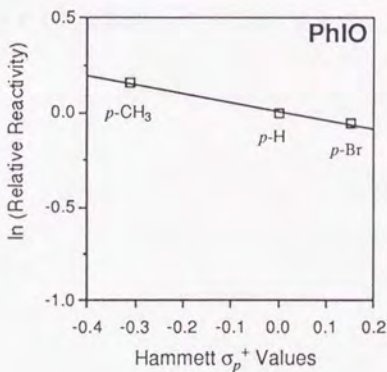
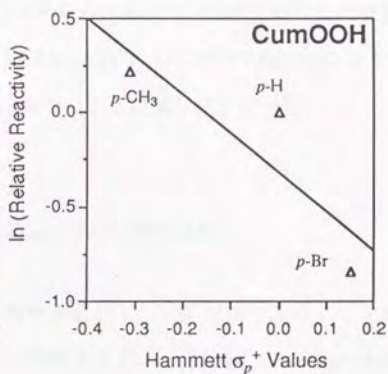
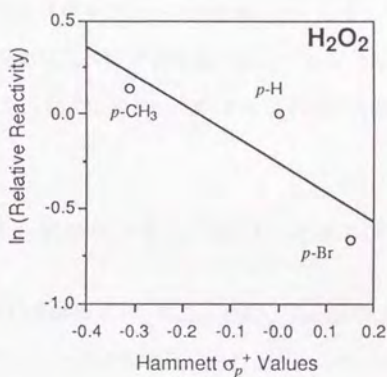
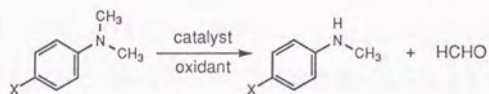


Fig. 4-8. Relative reactivity of *p*-substituted *N,N*-dimethylaniline.

The reaction mixtures contained 10 mM each of two kinds of *p*-substituted *N,N*-dimethylaniline, 1.0 mM oxidant, 50 % methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μ M MP-11. The relative reactivities were approximated by the ratios of product yields.

4.2.5. *N,N*-ジメチルアニリンオキシドからの*N*-メチルアニリンの生成

3級アミン*N*-オキシドとヘムを反応させると、*N*-オキシドのO原子から活性種鉄オキセノイドが生成し、脱オキシ化した3級アミンがさらに*N*-脱メチル化される反応が知られている³⁶⁾。P450の反応などでこの*N*-オキシドが反応中間体であるとするグループもある。MP-11と*N,N*-ジメチルアニリンオキシドを反応させたところ、Fig. 4-9のような経時変化で*N*-メチルアニリンが生成した。しかしながらこの反応は H_2O_2 を酸化剤とした*N*-脱メチル化に比べてかなり遅い反応である (P. 17, Fig. 2-2)。したがってMP-11による*N*-脱メチル化反応において*N*-オキシドが中間体ではないことが明らかとなった。

4.2.6. *N,N*-ジメチルアニリンとチオアニソールの競争反応

MP-11を触媒とし、 H_2O_2 、PhIO、CumOOHを酸化剤として、*N,N*-ジメチルアニリンとチオアニソールの競争反応を行ったところ、どの酸化剤を用いても*N*-脱メチル化が優先した (Table 4-2)。N原子の方がS原子より酸化されやすいことが示されたが、PhIOで*N*-脱メチル化収率が低いことに関する考察はできなかった。

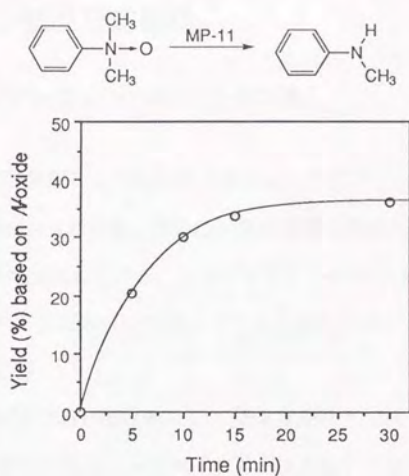


Fig. 4-9. Formation of *N,N*-dimethylaniline from *N,N*-dimethylaniline oxide catalyzed by MP-11.

The reaction mixtures contained 1.0 mM of *N,N*-dimethylaniline oxide, 50 % methanol, 50 mM potassium phosphate pH 7.4, and 10 μ M MP-11. Yields were based on *N,N*-dimethylaniline oxide.

Table 4-2. Competition of *N*-demethylation and *S*-oxidation catalyzed by MP-11.

$\text{Ph}-\text{N}(\text{Me})_2 + \text{Ph}-\text{S}-\text{Me} \xrightarrow[\text{COMPETITION}]{\text{MP-11 / oxidant}} \text{Ph}-\text{N}(\text{H})-\text{Me} + \text{Ph}-\text{S}(=\text{O})-\text{Me}$		
	<i>N</i> -Demethylation	<i>S</i> -Oxidation
MP-11 / H ₂ O ₂	100%	0%
MP-11 / PhIO	46%	0%
MP-11 / CumOOH	50%	0%

第3節 オレフィン酸化反応機構

4.3.1. MP-11によるオレフィンへのO原子の導入

まず H_2O_2 、CumOOHを酸化剤として O_2 気流下またはAr気流下でMP-11によるスチレンの酸化を行った結果がTable 4-3である。特にCumOOHを酸化剤とした時、二重結合が開裂してベンズアルデヒドが生成している。またベンズアルデヒドは O_2 気流下ではAr気流下の約3倍量生成しており、反応に O_2 が関与していると思われる。これは次の ^{18}O 導入実験からも示唆される。

Table 4-4は $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ 、Cum $^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ を酸化剤として様々な条件下でスチレンの酸化を行ったものである。 $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ を用いた場合、Ar気流下では84%と高い効率でスチレンオキシドに ^{18}O が導入された (Fig. 4-10)。これはP450、CPOと同様な結果となった。序章で述べたように、CPOは唯一チオレート配位のペルオキシダーゼであり、他のイミダゾール配位ペルオキシダーゼにはないオレフィンの酸化活性を持っている¹⁷⁾。これは配位子の違いによるものではなく、活性部位近傍の環境によるとOrtiz de Montellanoらは主張している^{17b)}。ベンズアルデヒド、フェニルアセトアルデヒドの ^{18}O 導入率は低かったが、これは溶媒中の水と交換していることが考えられる。 H_2^{18}O を含む溶媒中で反応を行ったときのアルデヒドの ^{18}O も同様な交換であると思われる。Cum $^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ の場合、スチレンオキシドへのO原子の導入はチオアニソールやN-メチルカルバゾールと同様に一部生じたcompound Iによるものと考えられる。また O_2 気流下ではベンズアルデヒドへのO原子導入率が下がること、 $^{18}\text{O}_2$ 気流下でベンズアルデヒドにO原子が導入されることもベンズアルデヒドの生成に O_2 が関与していることを示している。

CumOOHを用いた反応では比較的多くベンズアルデヒドが生成した。そこで Fe^{2+} を過剰量用いて、CumOOHからCumO \cdot を生成させる系でスチレンの酸化を行ったところ、CumOOHに対して59%の収率でベンズアルデヒドが生成した。これはいわゆるジオキシ

Table 4-3. Oxidation of styrene catalyzed by MP-11.







catalyst	oxidant	condition	product		
					
MP-11	H ₂ O ₂	under Ar	20 μM	51 μM	150 μM
MP-11	H ₂ O ₂	under O ₂	24 μM	60 μM	170 μM
Fe ³⁺	H ₂ O ₂	under Ar	trace(>5 μM)	—	—
Fe ³⁺	H ₂ O ₂	under O ₂	trace(>5 μM)	—	—
MP-11	CumOOH	under Ar	104 μM	26 μM	not determined
MP-11	CumOOH	under O ₂	312 μM	17 μM	not determined
Fe ³⁺	CumOOH	under Ar	15 μM	—	not determined
Fe ³⁺	CumOOH	under O ₂	18 μM	—	not determined

Table 4-4. ¹⁸O Incorporation into benzaldehyde, styrene oxide, and phenylacetaldehyde catalyzed by MP-11.

oxidant	condition	¹⁸ O incorporation		
				
H ₂ ¹⁸ O ₂ (78atom%)	under Ar	37 %	84 %	4 %
H ₂ ¹⁸ O ₂ (78atom%)	under O ₂	4 %	66 %	5 %
H ₂ O ₂	under ¹⁸ O ₂ (96atom%)	21 %	0 %	0 %
H ₂ O ₂	under air in H ₂ ¹⁸ O (50atom%)	9 %	0 %	14 %
Cum ¹⁸ O ¹⁸ OH (37atom%)	under Ar	61 %	55 %	not determined
Cum ¹⁸ O ¹⁸ OH (37atom%)	under O ₂	18 %	75 %	not determined

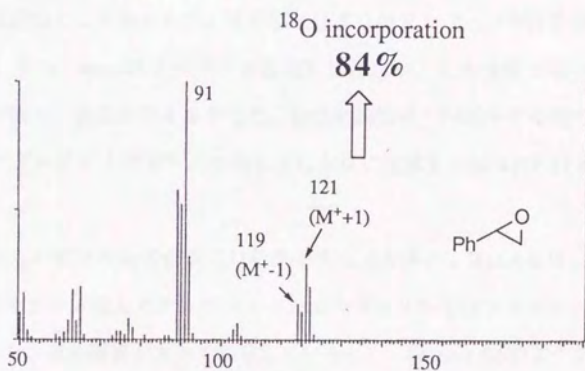
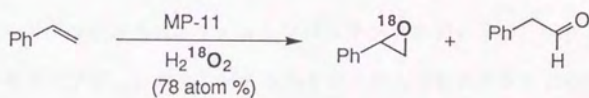


Fig. 4-10. ^{18}O Incorporation from $\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ into styrene oxide catalyzed by MP-11.























ゲナーゼ反応であるが、この反応においてCumO \cdot が関与している可能性も残された。

4.3.2. 転位反応機構に関する考察

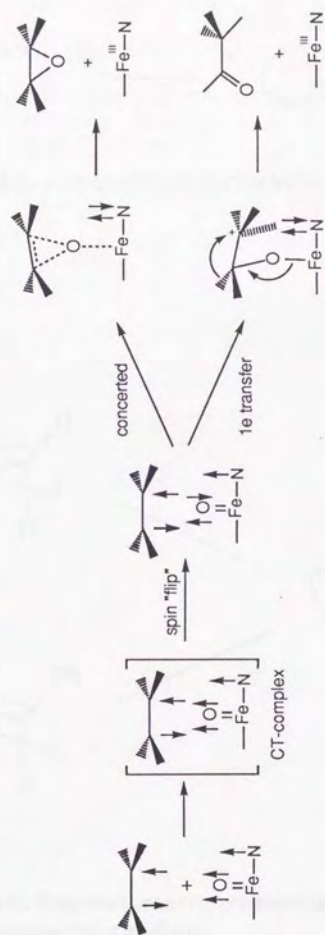
MP-11で特徴的な転位反応を検討するため、他のオレフィンの酸化も行った。Table 4-5にそれらの結果をまとめたが、1,1-ジフェニルエチレンからはジフェニルアセトアルデヒドが、 α -メチルスチレンからは2-フェニルプロピオンアルデヒドが、シクロヘキセンからはシクロヘキサノンが、1-メチルシクロヘキセンからは2-メチルシクロヘキサノンがそれぞれ転位生成物として得られた。芳香環を含まないオレフィンでは転位反応の比率は小さかった。また、*trans*-スチルベンの酸化も試みたが、この実験で用いた溶媒系に対する溶解度が低く、反応が行えなかった。転位生成物は、P450やその他の化学モデル系ではマイナープロダクトであり、このように大量に生成する例はMP-11とCPO以外に知られていない。

結果としてこれらの転位反応の機構には依然不明な点が多い。Bruceらは、*meso*位のフェニル基の*o*-位をブロム化したテトラフェニルポルフィリンではアルデヒド体が生成してこないことから、立体障害が大きく影響しているとし、Scheme 4-5のようなポルフィリン環上の窒素との相互作用を想定している^{29c)}。またCollmanらは、*trans*-位あるいは*cis*-位を重水素でラベルしたスチレンを用いるとScheme 4-6のように*cis*-位のHのみが転位することから、Bruceらの考えているピナコール転位タイプではこの選択性が説明できないとして、メタロオキセタン中間体を経由すると主張している^{29b)}。メタロオキセタンもScheme 4-7のようにA、Bの2種類が考えられ、Aでは*cis*-位のHが、BではPh基が転位する。MP-11による結果 (Table 4-5) で*cis*-スチルベンでPh基が転位することからBの中間体も考えられるが、1,1-ジフェニルエチレン、 α -メチルスチレンでPh基が転位した生成物が得られないことによりこの中間体は否定される。したがって、Aタイプのメタ

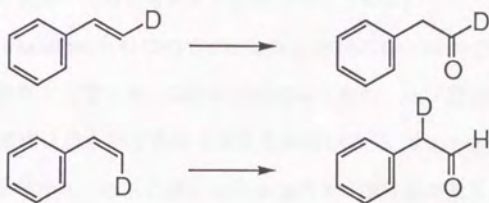
Table 4-5. Oxidation of various olefins by H₂O₂ catalyzed by MP-11.

substrate	epoxide	rearrangement product	
	 5.0%	 12.0%	 n.d.
	 5.6%	 2.8%	 n.d.
	 4.0%	 1.2%	 n.d.
	 2.8%	 1.2%	 n.d.
	 3.0%	 0.6%	
	 5.6%	 0.6%	

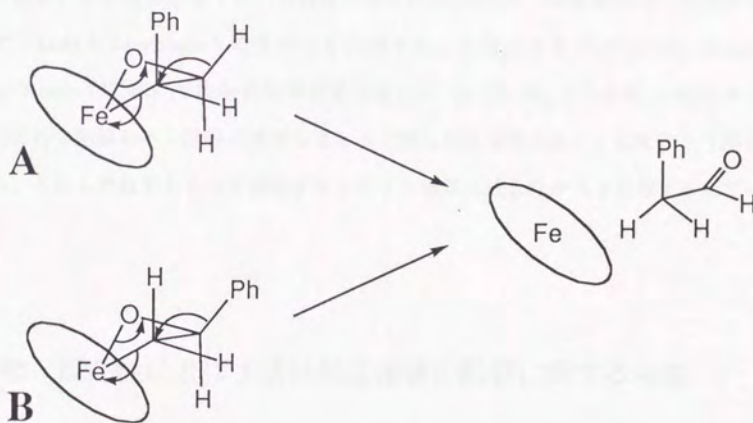
n.d. = not detected



Scheme 4-5. Proposed mechanism of olefin epoxidation and rearrangement.



Scheme 4-6. *cis*-Selective rearrangement of styrene.



Scheme 4-7. Proposed rearrangement mechanism *via* metallaoxetane intermediate.

ロオキシタンが中間体であると考えるのが最も妥当である。

また、Ortiz de MontellanoらはCPOでは転位反応が起こり、P450では起こらないことから、次のような推測をしている。CPOの活性部位は極性アミノ酸残基が多く存在しており、ヘム近傍の環境は親水的であると考えられている³⁷⁾。またP450は、P450camのX線結晶解析の結果などから、ヘム近傍には非極性アミノ酸残基が集まって疎水的な環境を形成している³⁸⁾。これらの事実から、Bruceらの主張と同様な中間体を考え、CPOにおいてはヘム近傍が親水的であるためその中間体のカチオンが安定化され、転位反応が進行しやすくなっているとしている^{17b)}。しかし彼らは*cis*-位の選択的な転位を考慮に入っていない。

MP-11、Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clの結果に照らし合わせて考えると、MP-11では確かに活性部位に立体障害はなく、ヘム近傍の極性は水-メタノール系溶媒のため高いはずなので、Ortiz de Montellanoらの主張とも合致する。しかしこれではMP-11、Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clで転位生成物の比率が異なること (P. 26, Fig. 2-8, 2-9) の説明がつかない (これら触媒のヘム近傍の環境はほとんど等しいと思われる)。したがって現在のところ、これらの結果をすべて満足させるような機構は残念ながらまだ与えられていない。

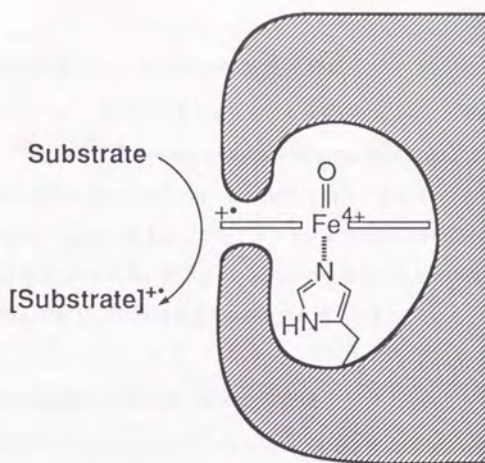
第4節 反応性に及ぼす活性部位環境の影響に関する考察

一般にペルオキシダーゼは一電子酸化を得意とするが、酸素原子移動反応はスルフィド酸化を除きほとんど触媒しない。Fig. 0-4 (P. 7)、Fig. 4-11はHRPの活性部位の模式図であるが、このようにヘムが広くタンパク質に覆われているため、ヘムのエッジで一電子酸化は行えるものの、オキシセントランスファー型反応は不得意であるため、スルフィド酸化は遅く、またオレフィン酸化活性は有していない。MP-11ではタンパク質に

よる影響がないため、イミダゾール配位でありながら、P450様の酸素原子移動反応を行えると考えられる。

そのような例として最近、secondary amine monooxygenaseがイミダゾール配位でありながら、ジメチルアミンの*N*-脱メチル化においてP450と同じような k_i/k_p 値を持つことがDawsonらによって報告された²⁸⁾。このように同じ軸配位子を持っていたり、活性部位の環境によって反応性が異なることがありえる。

また唯一チオレート配位のペルオキシダーゼであるCPOは、他のイミダゾール配位ペルオキシダーゼにはないオレフィンの酸化活性を持っている。これは配位子の違いによるものではなく、活性部位近傍の環境によると考えられている。Fig. 4-12はOrtiz de Montellanoらによって示されたCPOの活性部位モデルであるが³⁷⁾、HRP (Fig. 0-4) と比較すると、かなり基質が近づきやすくなっている。またMP-11においてスチレンから比較的少量に生成するフェニルアセトアルデヒドがCPOにおいても多く生成しており、第5配位子よりも活性部位の環境が反応に影響を与えていることを示唆している。転位生成物が大量に得られるヘム酵素あるいはモデル系はCPOとMP-11だけである。



Horseradish Peroxidase

Fig. 4-11. Proposed heme environment of HRP.

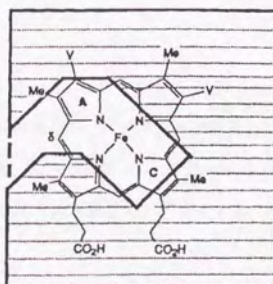


Fig. 4-12. Model of the CLP active site based on the regiochemistry of *in situ* *N*-phenyl and *meso*-azido adduct formation (abbreviations: V = vinyl, P = propionic acid).

第4章の実験

チオアニソールの酸化反応における*p*-位置換基効果

p-クロル、*p*-メチル、*p*-メトキシチオアニソールはそれぞれ対応する*p*-位置換フェニルメルカプタンとジメチル硫酸を反応させることにより合成した。触媒10μM、2種類の*p*-位置換チオアニソール各10mMを含むメタノール/100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)=1/1混合溶媒中、H₂O₂が1.0mMになるように加えることにより反応を開始した。相対反応性はスルフォキシドの収率の比から求めた。なお、反応中の生成物比はどの時間をとっても一定であることは確認してある。HPLC検出条件は第2章と同じである。

Phenacyl Phenyl Sulfide (PhSCH₂COPh)の合成

フェニルメルカプタン2.3g、α-ブロムアセトフェノン4.2g、ピリジン2.1gをメタノール20mlに溶かし、2時間還流する。溶媒を減圧留去した後、残渣にCH₂Cl₂ 100mlを加え水100mlで洗い、ピリジン臭化水素酸塩を除く。CH₂Cl₂層をNa₂SO₄で乾燥した後、CH₂Cl₂を減圧留去し、メタノールから再結晶する。融点51~52℃（文献値52~53℃）。

機器データ

¹H-NMR (60MHz, CDCl₃/TMS): δ 4.2(s, 2H, -CH₂-), δ 7.0-8.0(m, 10H)

各スルフォキシドの合成

スルフィド約1gをCH₂Cl₂ 100mlに溶かし、0℃で攪拌しながら*m*-クロル過安息香酸(*m*CPBA) 1.2当量を加える。0℃で1時間攪拌し、TLCで原料が消失していないようなら、さらに*m*CPBAを追加する。反応終了後、0.5N NaOH 100mlで洗い*m*-クロル安息香酸を除く。CH₂Cl₂層をNa₂SO₄で乾燥した後、CH₂Cl₂を減圧留去し、アルミナまたはシリカゲルカラムにて精製する。

フェナシルフェニルスルフィドの酸化

触媒10μM、フェナシルフェニルスルフィド5.0mMを含むメタノール/100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)=1/1混合溶媒中、酸化剤(H₂O₂またはPhIO)を1.0mMになるよ

うに加えることにより反応を開始した。反応液は室温下攪拌し、10分後に一部をとりHPLCにインジェクトし、生成物（フェナシルフェニルスルフォキシドまたはジフェニルスルフィド）の定量を行った。

Phenacyl Phenyl Sulfoxide (PhS(O)CH₂COPh)のHPLC検出条件

column: C₁₈

eluent: MeCN:H₂O=30:70

flow rate: 1.0ml/min

detect: UV 254nm

Diphenyl Disulfide (PhSSPh)のHPLC検出条件

column: C₁₈

eluent: MeCN:H₂O=70:30

flow rate: 1.0ml/min

detect: UV 254nm

H₂¹⁸O₂の調製

H₂¹⁸O₂はK¹⁸O₂を不均化させることにより調製した ($2K^{18}O_2 + 2H_2O \rightarrow H_2^{18}O_2 + ^{18}O_2 + 2KOH$)。K¹⁸O₂はベンツヒドロール、*t*-BuOK、¹⁸O₂から合成した³⁹⁾。K¹⁸O₂の¹⁸O含量はラムンスペクトルのピーク強度から78%と算出された。H₂O₂量はHildebrandtらの方法³⁹⁾により以下のように比色定量した。

K¹⁸O₂数mgをH₂O 1mlに溶かすと¹⁸O₂の泡を発生させながら瞬時にH₂¹⁸O₂が生成する。このH₂¹⁸O₂濃度はほぼ10~20mMである。10mM FeSO₄(NH₄)₂SO₄·6H₂O 0.5ml、2.5M KSCN 0.2ml、3% CCl₃COOH 2mlを試験管に入れ、そこに未知濃度のH₂¹⁸O₂をさらに10~20倍に希釈したものを0.2ml加え、25℃で10分間インキュベートする。H₂¹⁸O₂量に応じて赤色を呈するので、480nmの吸光度からH₂¹⁸O₂濃度を算出する。

Cum¹⁸O¹⁸OHの合成

¹⁸Oラベル-クメンヒドロペルオキシドはクメン (PhCHMe₂) の自動酸化により合成した。クメン5gとTriton B (10% benzyltrimethylammonium hydroxide水溶液) 0.25gをナスコルベンに

入れ、 $^{18}\text{O}_2$ 入りゴム風船のついた三方コックを付け、脱気した後容器内を $^{18}\text{O}_2$ で満たした。80~90℃で20時間激しく攪拌し、 $^{18}\text{O}_2$ が消費されゴム風船がしはんでいたら、Arガスを足す。この時、空気中の酸素の混入には極力注意する。さらに20時間攪拌した後、 CH_2Cl_2 100mlを加え、 H_2O 100mlで洗う。 CH_2Cl_2 層を Na_2SO_4 で乾燥した後、 CH_2Cl_2 を減圧留去し、シリカゲルカラムにて精製する（展開溶媒： $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-hexane}=2/1$ ）。TLC上で過マンガン酸カリウムによって強く発色するフラクションを集め、溶媒を減圧留去すると、無色オイル $\text{Cum}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ 237mgを得る。 $\text{Cum}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ 自体は M^+ が出ない化合物であるので、 SnCl_2 で Cum^{18}OH に還元してから ^{18}O 含量を測定したところ46%であった。

$\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ 、 $\text{Cum}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$ を用いたスルフィドの酸化

反応条件は第2章のチオアニソールの酸化、第4章のフェナシルフェニルスルフィドの酸化と全く同じ条件である。反応終了後、反応液に2倍量の H_2O を加えた後、 AcOEt で2回抽出し、 Na_2SO_4 で乾燥した後 AcOEt を濃縮し、GC-MS用のサンプルとした。 M^+ と M^++2 の強度比から ^{18}O 導入率を求めた。

Methyl Phenyl Sulfoxide (PhS(O)Me)のGC-MS検出条件

column: DB-1 (0.25mm×30m)

column temperature: 60℃(1min)→(10℃/min)→200℃

retention time: 10.4min

Phenacyl Phenyl Sulfoxide ($\text{PhS(O)CH}_2\text{COPh}$)のGC-MS検出条件

column: DB-5 (0.25mm×30m)

column temperature: 150℃(5min)→(10℃/min)→250℃

retention time: 13.2min

N-メチルカルバゾールの酸化

MP-11 10μM、N-メチルカルバゾール2mMを含むメタノール/100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)=1/1の混合溶媒中、酸化剤($\text{H}_2^{18}\text{O}_2$ または $\text{Cum}^{18}\text{O}^{18}\text{OH}$)が1.0mMになるように加えることにより反応を開始した。反応液は室温下10分間攪拌し、2倍量の H_2O を加えた後 AcOEt で2回抽出する。 Na_2SO_4 で乾燥した後 AcOEt を濃縮し、BSTFA (N,O-

bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) 100 μ lを加え80℃で30分間加熱することにより、TMS化を行った。サンプルを濃縮し、GC-MSに供した。M⁺とM⁺+2の強度比から¹⁸O導入率を求めた。

N-Hydroxymethylcarbazole (NHMC)、*N*-Formylcarbazole (NFC)のGC-MS検出条件

column: DB-5 (0.25mm \times 30m)

column temperature: 120℃(1min) \rightarrow (10℃/min) \rightarrow 250℃

retention time: NHMC 9.5min、NFC 10.0min

N-Hydroxymethylcarbazoleの合成

カルバゾール1.8g、バラホルムアルデヒド2.0g (過剰量)、K₂CO₃ 1.4gをメタノール100mlに溶かし、2時間還流する。メタノールを減圧留去した後、シリカゲルカラム (展開溶媒: CH₂Cl₂) にて精製し、さらにベンゼンから再結晶する。

機器データ

¹H-NMR (60MHz, d₆-DMSO/TMS): δ 6.1(d, 2H, -CH₂OH, *J*=6.6Hz), δ 6.7(t, 1H, -CH₂OH, *J*=6.6Hz), δ 7.4~8.0(m, 6H), δ 8.4(m, 2H)

MS: 197(M⁺), 167(M⁺-CH₂O)

N-Formylcarbazoleの合成

カルバゾール1.8gを90% HCOOH 50mlに溶かし、2時間還流する。溶媒を減圧留去した後、シリカゲルカラム (展開溶媒: CH₂Cl₂/n-hexane = 1/2) で精製し、さらにメタノールから再結晶する。

機器データ

¹H-NMR (60MHz, CDCl₃/TMS): δ 7.4(m, 4H), δ 7.8(m, 4H), δ 9.5(s, 1H, -CHO)

IR (KBr): 1700cm⁻¹(C=O)

MS: 195(M⁺), 167(M⁺-CO)

N,N-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化反応における分子内重水素同位体効果

基質は d_5 -*N,N*-ジメチルアニリン ($\text{PhNCH}_3\text{CD}_3$) を用い、反応条件は第2章と同じ。反応終了後、反応液の一部を取りGC-SIMに供し、 m/z 107と110のピーク面積比より、 k_1/k_0 を算出した。

N-Methylaniline (PhNHMe)のGC-SIM検出条件

column: DB-5 (0.25mm \times 30m)

column temperature: 60 $^\circ\text{C}$ (1min) \rightarrow (10 $^\circ\text{C}/\text{min}$) \rightarrow 250 $^\circ\text{C}$

retention time: PhNHCH_3 7.21min, PhNHCD_3 7.15min

N-Formyl-*N*-trideuteriomethylaniline (PhNCD_3CHO)の合成

PhNHCD_3 1.0gを99% HCOOH 20mlに溶かし、1時間還流する。 HCOOH を減圧留去した後、残渣を CH_2Cl_2 30mlに溶かし H_2O 30mlで洗う。 CH_2Cl_2 層を Na_2SO_4 で乾燥した後減圧留去し、シリカゲルカラムで精製する(展開溶媒: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-hexane} = 1/3 \rightarrow 2/1$ で原料が消失するのを確認した後、2% MeOH を含む CHCl_3 で生成物を溶出させる)。無色オイル1.1gを得る。

N-Methyl-*N*-trideuteriomethylaniline ($\text{PhNCH}_3\text{CD}_3$)の合成

PhNCD_3CHO 1.1gを無水 Et_2O 15mlに溶かし、0 $^\circ\text{C}$ で LiAlH_4 380mg(1.25当量)を反応が激しくならないように注意深く加える。ゆっくりと室温に戻した後、2時間還流する。反応液に0 $^\circ\text{C}$ で H_2O 0.5mlを滴下し、さらに2N NaOH 50mlを加えた後濾過する。濾液に Et_2O 50mlを加えて振り取りし、 Et_2O 層を Na_2SO_4 で乾燥した後減圧留去し、シリカゲルカラムで精製する(展開溶媒: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-hexane} = 1/9$)。無色オイル0.20gを得る。

機器データ

$^1\text{H-NMR}$ (60MHz, CDCl_3/TMS): δ 2.9(s, 3H, $-\text{CH}_3$), δ 6.5-7.3(m, 5H)

N,N-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化反応における*p*-位置換基効果

触媒10 μ M、2種類の*p*-位置換*N,N*-ジメチルアニリン各5mMを含むメタノール/100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)=1/1混合溶媒中、酸化剤(H₂O₂またはPhIOまたはCumOOH)が1.0mMになるように加えることにより反応を開始した。相対反応性は脱メチル体の収率の比から求めた。

N-methylaniline、*p*-Bromo-*N*-methylaniline、*N*-Methyl-*p*-toluidineのHPLC検出条件

column: C₁₈

eluent: MeCN:H₂O=20:80 (containing 0.1% NH₄OH)

flow rate: 1.0ml/min

detect: UV 254nm

p-Bromo-*N*-methylaniline、*N*-Methyl-*p*-toluidineの合成

p-Bromoaniline、*p*-toluidineのホルミル化は*N*-Formyl-*N*-trideuteriomethylanilineの合成と同様にして行った。シリカゲルカラムの展開溶媒は*p*-ブロムがCHCl₃、*p*-メチルがCH₂Cl₂であった。各ホルミル体の還元は*N*-Methyl-*N*-trideuteriomethylanilineの合成と同様にして行った。シリカゲルカラムの展開溶媒は*p*-ブロムがCH₂Cl₂/*n*-hexane=1/3、*p*-メチルがCH₂Cl₂/*n*-hexane=1/2であった。

機器データ

p-Bromo-*N*-methylaniline

¹H-NMR (60MHz, CDCl₃/TMS): δ 2.7(s, 3H, -CH₃), δ 3.6(bris, 1H, -NH-), δ 6.4(d,

2H, *J*=9.0Hz), δ 7.2(d, 2H, *J*=9.0Hz)

N-Methyl-*p*-toluidine

¹H-NMR (60MHz, CDCl₃/TMS): δ 2.2(s, 3H, -NCH₃), δ 2.8(s, 3H, *p*-CH₃), δ 3.4(s,

1H, -NH-), δ 6.4(d, 2H, *J*=8.4Hz), δ 6.9(d, 2H, *J*=8.4Hz)

N,N-ジメチルアニリンオキシドからの*N*-メチルアニリンの生成

MP-11 10 μ Mを含むメタノール/100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)=1/1混合溶媒中、*N,N*-ジメチルアニリンオキシドが1.0mMになるように加えることにより反応を開始した。

N,N-Dimethylaniline oxide (PhN(O)Me₂)の合成

CH₂Cl₂中で*N,N*-ジメチルアニリンと1.2当量の*m*-クロル過安息香酸を加え*N*-オキシドを生成させ、アルミナカラムで精製した(展開溶媒:最初にCHCl₃で溶出し原料が消失するのを確認した後、CHCl₃/MeOH=3/1で生成物を溶出させると、強吸湿性の無色オイルが得られる)。

機器データ

¹H-NMR (60MHz, CDCl₃/TMS): δ 3.6(s, 6H, -CH₃), δ 7.5(m, 3H), δ 8.0(m, 2H)

H₂¹⁸O₂、Cum¹⁸O¹⁸OHを用いたスチレンの酸化

反応条件は第2章と全く同じ条件である。反応終了後、反応液に2倍量のH₂Oを加えAcOEtで2回抽出し、Na₂SO₄で乾燥後AcOEtを濃縮し、GC-MS用のサンプルとした。M⁺とM⁺+2の強度比から¹⁸O導入率を求めた。

Styrene Oxide、Phenylacetaldehyde、BenzaldehydeのGC-MS検出条件

column: PEG-20M (0.25mm×25m)

column temperature: 80 $^{\circ}$ C \rightarrow (10 $^{\circ}$ C/min) \rightarrow 200 $^{\circ}$ C

retention time: Styrene Oxide 7.2min、Phenylacetaldehyde 7.6min、

Benzaldehyde 6.1min

Fe²⁺、CumOOHによるスチレンの酸化

スチレン100mM、FeSO₄ 10mMを含むメタノール/水=6/4混合溶媒中、CumOOHが1.0mMになるように加えることにより反応を開始した。

MP-11による H_2O_2 を酸化剤とするその他のオレフィンの酸化

MP-11 100 μM 、基質50または100mMを含むメタノール/100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.4)=8/2混合溶媒中、 H_2O_2 が5.0mMになるように加えることにより反応を開始した。反応液は氷冷下攪拌し、15分後に一部をとりGCにインジェクトし、生成物(各エボキシドと転位生成物)の定量を行った。

1,1-Diphenylethylene Oxide、DiphenylacetaldehydeのGC検出条件

column: HR-1 (0.53mm \times 25m)

column temperature: 170 $^\circ\text{C}$

detect: FID

α -Methyl Styrene Oxide、2-Phenyl PropionaldehydeのGC検出条件

column: PEG-20M (0.53mm \times 25m)

column temperature: 70 $^\circ\text{C}$

detect: FID

Cyclohexene Oxide、1-Methyl Cyclohexene Oxide、Cyclohexanone、2-Methyl

CyclohexanoneのGC検出条件

column: PEG-6000 (2.0mm \times 2m)

column temperature: 110 $^\circ\text{C}$

detect: FID

第5章 MP-11の化学修飾

はじめに

前章までに、MP-11は高い酸化活性をもち、その要因としてO-O結合のヘテロリティック開裂が促進されていること、活性種自体がHemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clに比べて高い酸化力を持っていることを明らかにしてきた。

序論でも述べたように、現在までにX線結晶解析のなされているペルオキシダーゼはCcPとLiPのみである^{12,14)}。Fig. 5-1はCcPとLiPの活性部位近傍の結晶構造であるが、PoulosらはCcPにおいて2つの水素結合の重要性を提唱している¹³⁾。1つは第6配位子側 (distal site) のHis-52とArg-48であり、この2つのアミノ酸残基がO原子を引っ張り、O-O結合のヘテロリティック開裂を促進していると考えている。もう1つは軸配位子側 (proximal site) のAsp-235であり、このカルボキシル基が軸配位子イミダゾール (His-175) と水素結合をしている。この水素結合によってイミダゾールがanionicになり (電子伝達系のcytochrome類の酸化還元電位は20~320mVであるのに対しCcPは-194mV)、下から電子を押し出しO-O結合開裂を促進するとともに、活性種の高酸化状態を安定化すると考えられる¹³⁾。LiPにおいてもHis-47、Arg-43、Asp-238などのアミノ酸残基が同様な水素結合を形成していることが確認されている (Fig. 5-1)。HRPやCPOはまだX線結晶解析がなされていないが、様々な実験からCcPのHis-52に相当するHisが活性サイトに存在するのは事実となっている^{37,40,41b)}。またHRPの軸配位子Hisのイミダゾールにも、CcPのHis-175とAsp-235に見られるような水素結合が存在することを示唆する結果がNMRスペクトルの解析から得られている (Fig. 5-2)⁴¹⁾。最近KrautらはCcPのsite-directed mutagenesisを積極的に行って、Asp-235をAsn-235に変えるとRamanスペクトルやNMRスペクトルが大きく変化することを報告しており⁴²⁾、この水素結合のペルオキシダーゼ活性に及ぼす重要性を述べている (Fig. 5-3, 5-4)。

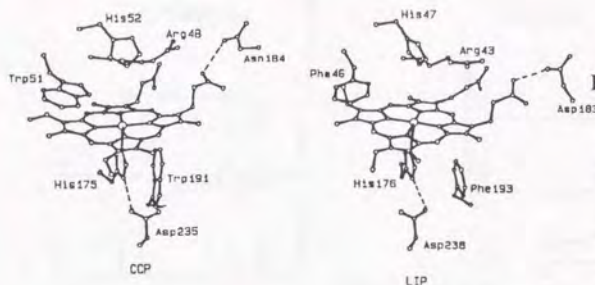


Fig. 5-1. Comparison of LIP and CCP active sites. Note that where LIP has phenylalanine residues contacting the heme and proximal histidine ligand, CCP has tryptophan. Note, too, that where CCP has Asn-184 hydrogen bonding with a heme propionate, Asp-183 serves this role in LIP. This may explain in part the low pH optimum of LIP since disruption of the aspartic acid-propionate hydrogen bond would be expected to destabilize the heme pocket.

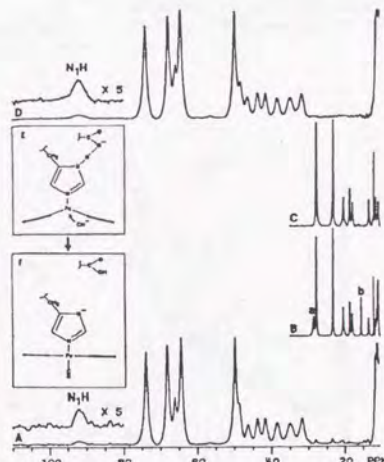


Fig. 5-2. Downfield portions of the 360-MHz ^1H hyperfine shifted spectra at pH 7.0, 55 $^\circ\text{C}$, of (A) resting-state HRP freshly dissolved in $^2\text{H}_2\text{O}$, (B) HRP in 90% $\text{H}_2\text{O}/10\%$ $^2\text{H}_2\text{O}$, (C) HRP formed by treatment of sample shown in trace (A) with 2 equiv of KCN, and (D) resting-state HRP reformed by treatment of sample shown in trace C with ten equivalents of hydroxocobalamin hydrochloride. Traces (A) and (D) show the proximal N_1H resonance; trace (B) shows exchangeable resonances a and b. Schematic representation of (E) five-coordinate high-spin heme in resting-state HRP and (F) six-coordinate low-spin heme in HRP. (E) shows the pentacoordinate iron in the expected domed configuration with significant out-of-plane displacement toward the proximal histidine. The postulated hydrogen-bonding interaction between the histidyl ring NH and an amino acid acceptor is shown severed in (F) as the cyanide ligation pulls the iron in plane with concomitant flattening of the porphyrin resulting in the breaking of the histidyl ring NH-carboxylate hydrogen bond, generating a proximal histidyl imidazolate in HRP. The tight clamping of the heme by the amino acids in the heme pocket prevents the porphyrin from changing position.

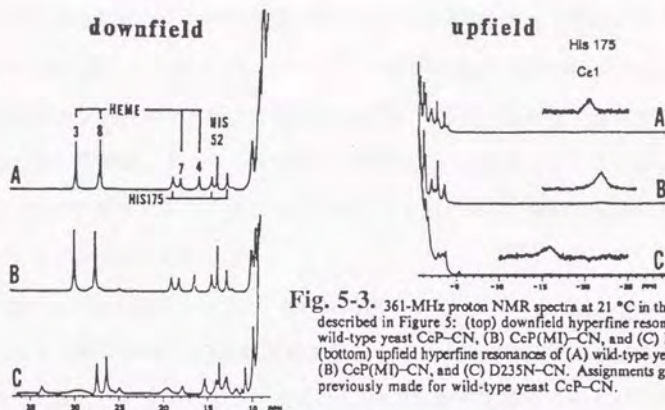


Fig. 5-3. 361-MHz proton NMR spectra at 21 °C in the D₂O buffer described in Figure 5: (top) downfield hyperfine resonances of (A) wild-type yeast CcP-CN, (B) CcP(M1)-CN, and (C) D235N-CN; (bottom) upfield hyperfine resonances of (A) wild-type yeast CcP-CN, (B) CcP(M1)-CN, and (C) D235N-CN. Assignments given are those previously made for wild-type yeast CcP-CN.

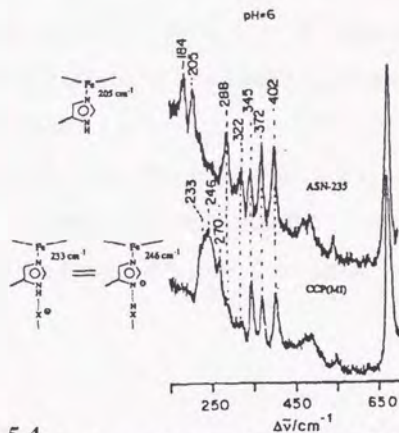


Fig. 5-4. Low-frequency RR spectra of Fe(II) forms of CCP(M1) and of the Asn-235 mutant, obtained with 441.6-nm excitation [experimental details in Smulevich et al. (1988a)]. The broad ~240-cm⁻¹ Fe-N(His) stretching band of CCP(M1) has 233- and 246-cm⁻¹ components, which are suggested to arise from a double-well potential in which the proton can reside on the proximal imidazole (233 cm⁻¹) or on the interacting carboxylate group of Asp-235 (246 cm⁻¹). Replacement of the carboxylate group by the carboxamide side chain of Asn eliminates the 240-cm⁻¹ band and replaces it with one at 205 cm⁻¹, indicating that the proximal H-bond is very weak.

また序論でも述べたように、TraylorらはプロトヘムIXを原料としてFig. 0-5a (P. 8) のような化合物を合成し、この化合物のプロピオン酸側鎖をアミドやエステルにするとO-O結合開裂が遅くなることから、このカルボキシル基がCcPのHis-52やArg-48のようにO原子を引っ張る役割を果たすと言っている²⁰⁾。一般にヘム酵素においてプロトヘムIXのプロピオン酸側鎖はタンパク質のアミノ酸残基と水素結合することによってヘムを固定化するために使われるが、プロトヘムIXだけを取り出した場合Traylorらの言うような働きをする可能性は十分ありうる。

ここでMP-11に目を向けてみると、MP-11に関しても同じことが言え、Scheme 5-1のようにプロピオン酸側鎖がO-O結合開裂を促進している可能性がある。また、MP-11のCPKモデルを組んでみたところ、C末端のGlu残基は第5配位子イミダゾールと水素結合しやすい位置にあることが分かった。もしこのようなことが実際に起こっているとすると、MP-11は非常に酵素に近いベルオキシダーゼモデルと言える。

MP-11においてもベルオキシダーゼと同じように、高い酸化活性にScheme 5-1のような水素結合が大きな影響を及ぼしているという仮説を証明するために、Fig. 5-5のような2種類のMP-11誘導体を調製することにした。1つはすべてのカルボキシル基をメチルエステル化することにより、これらの水素結合が起こらないようにするもの(MP-11-Me-ester)であり、もう1つは酵素による限定加水分解によってGluをなくし、軸配位子イミダゾールとの水素結合のみをなくするというもの(MP-9)である。

第1節 MP-11-Me-ester、MP-9の調製

5.1.1. MP-11のメチルエステル化

一般的なタンパク質のエステル化と同様に塩化水素ガスをバブルしたメタノール中でMP-11をメチルエステル化した⁴³⁾。MP-11-Me-esterはHPLCで精製した後、FABマススペクトルをとったところ、Fig. 5-6のように M^+ (1918)が強いピークとして現われ、MP-11が完全にメチルエステル化されたことが確認された。

5.1.2. MP-9の調製

MP-11の軸配位子Hisを残し、Gluがなくなるような加水分解を行なう酵素を検索したところ、thermolysin (EC 3.4.24.4)が有望であると思われた。この酵素はLeu、Ile、Val、Pheのようなかさ高い疎水性アミノ酸残基のN末端側を特異的に加水分解するプロテアーゼである⁴⁴⁾。これを用いるとMP-11のThr-Valの結合が切断され、Hisは残ったままGluはなくなった9個のアミノ酸残基からなるペプチドが生成するはずである。

予想通りthermolysinを用いると望みのペプチド(MP-9)が得られた。MP-9はゲルクロマトグラフィー、さらにHPLCで精製し、FABマススペクトルをとったところ、Fig. 5-7のように M^+ -1(1632)、 M^+K^+ -2(1670)のピークが現われ、MP-9の構造が確定した。

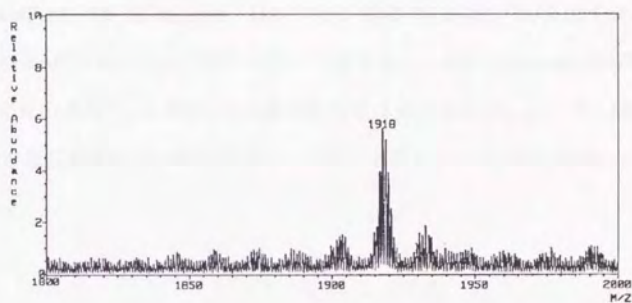
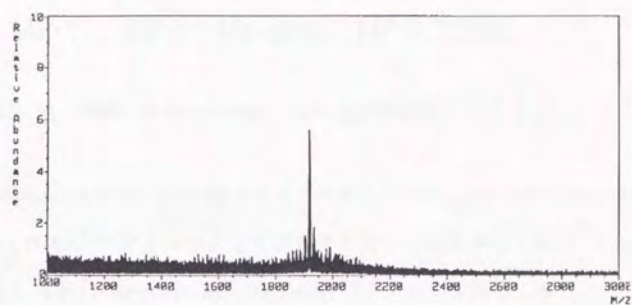


Fig. 5-6. FAB mass spectrum of MP-11-Me-ester.

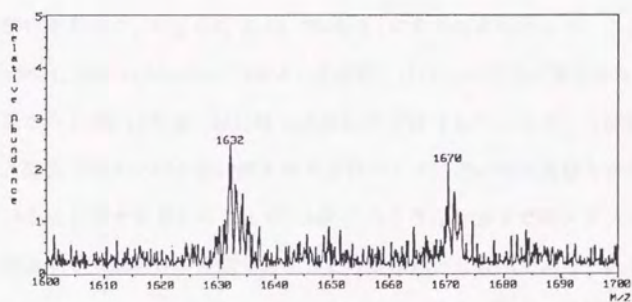


Fig. 5-7. FAB mass spectrum of MP-9.

第2節 MP-11、MP-11-Me-ester、MP-9の比較

5.2.1. MP-11、MP-11-Me-ester、MP-9のNMRスペクトル

最近CcPのAsp-235をAsn-235に変えたミュータントでは、Asp-235とHis-175の水素結合がなくなり、NMRスペクトルが大きく変化するという報告がなされた (Fig. 5-3) ⁴²⁾。

そこでMP-11、MP-11-Me-ester、MP-9のNMRスペクトルを比較してみた。

Fig. 5-8はMP-11、MP-11-Me-ester、MP-9のCN⁻錯体の400MHz ¹H-NMRスペクトルであるが、MP-11とMP-9はほとんど同じスペクトルであり、MP-11-Me-esterは若干異なるものの、CcPで見られたFig. 5-3のような劇的な変化は見られない。ここで、MP-11においてGluとHisの間に水素結合が存在するという仮説が間違っていたのではないかという疑いが生じた。

5.2.2. MP-11、MP-11-Me-ester、MP-9の酸化反応性の比較

NMRスペクトルで変化が見られなかったので、実際の酸化反応性を比較してみた。前章とはほぼ同じ条件でチオアニソールの酸化、*N,N*-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化、スチレンの酸化を行った。Fig. 5-9、5-10、Table 5-1にその結果を示すが、これらの反応においてもMP-11、MP-11-Me-ester、MP-9で反応性にはほとんど差が見られなかった。

以上の結果から、MP-11の高い反応性に水素結合が関与しているという仮説は証明されなかった。酵素ではタンパク質に埋もれた活性サイトにおいて水素結合が重要な役割を果たしていることは十分考えられるが、MP-11のような小分子ではメタノール/バッファー混合溶媒中で水素結合が可能であるかどうかは確かに疑問であった。しかしながらHemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clとの比較の上でその差を説明するために、どうしても水素結合のようなファクターを考えざるを得なかった。なぜなら、PhIOによる活性種はどの

[illegible]

-94-

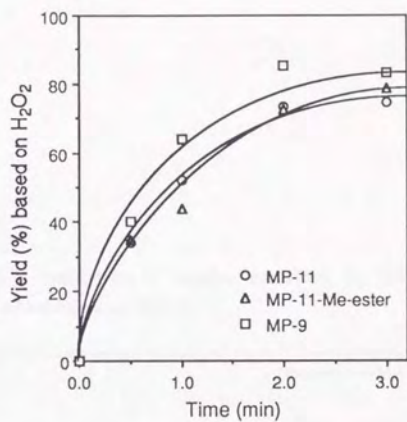


Fig. 5-9. Oxidation of thioanisole by H_2O_2 catalyzed by MP-11, MP-11-Me-ester and MP-9.

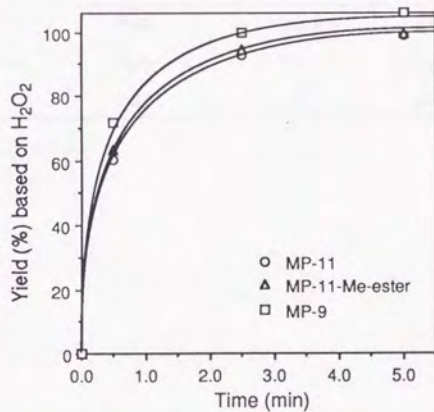




Fig. 5-10. *N*-Demethylation of *N,N*-dimethylaniline by H_2O_2 catalyzed by MP-11, MP-11-Me-ester and MP-9.

Table 5-1. Oxidation of styrene catalyzed by MP-11, MP-11-Me-ester and MP-9.

catalyst	oxidant	turnover numbers	
			
MP-11	H ₂ O ₂	3.9	9.8
MP-11-Me-ester	H ₂ O ₂	4.0	9.3
MP-9	H ₂ O ₂	3.7	8.5
MP-11	PhIO	3.2	6.9
MP-11-Me-ester	PhIO	3.7	7.0
MP-9	PhIO	2.6	6.4

触媒においても compound I タイプであるならば、MP-11 と Hemin-*N*-MeIm₂ の活性種は全く等しいはずだからである (Fig. 5-11)。ところが第 2、4 章で示したようにスチレンの酸化、フェナシルフェニルスルフィドの酸化においては PhIO を酸化剤として用いても MP-11 と Hemin-*N*-MeIm₂ の反応性に大きな差が残った (P. 26, Fig. 2-8; P. 53, Fig. 4-3)。そこで MP-11 において His と Glu の間の水素結合によって、活性種の高酸化状態が安定化されると考えるのは大変都合のよいことであった。

しかしこの仮説が証明されなかったことから、MP-11 と Hemin-*N*-MeIm₂ の活性種の違いとして考えられるのは、Hemin-*N*-MeIm₂ の場合活性種近傍に過剰のイミダゾールが存在することしか残っていない。そこで MP-11 に過剰量 (500 当量) の *N*-MeIm を加え H₂O₂ を酸化剤としてスチレンの酸化を行ったところ、反応は全く進行しなかった (Fig. 5-12)。また PhIO を酸化剤としたところ収率は 3 分の 1 以下になり、スチレンオキシドとフェニルアセトアルデヒドの生成比も変化した (Fig. 5-12)。 *N*-MeIm が酸化されないことは確認済みであるので、過剰量のイミダゾールがどのように反応を阻害するのかは今後の検討課題である。

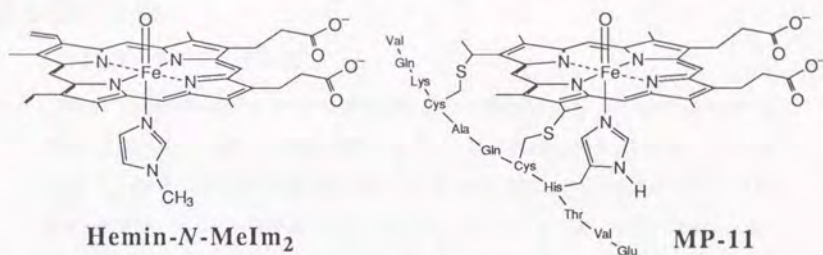


Fig. 5-11. Comparison of compound I of Hemin-*N*-MeIm₂ and MP-11.

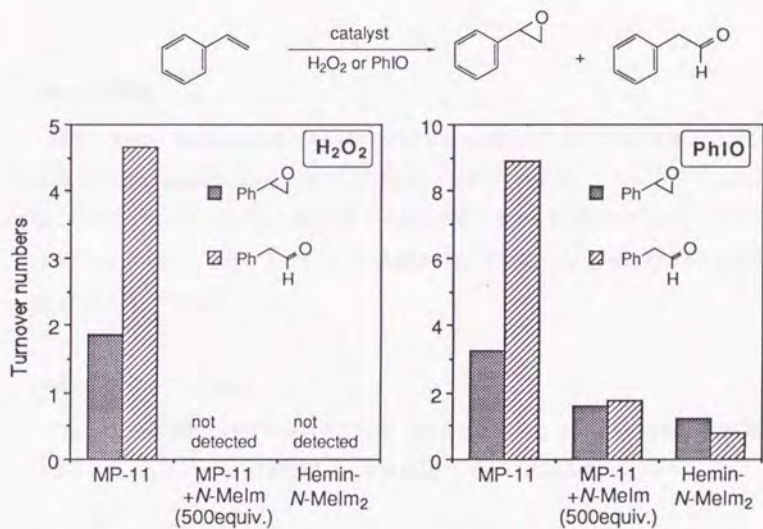


Fig. 5-12. Effect of *N*-MeIm on oxidation of styrene catalyzed by MP-11.

The reaction mixtures contained 5.0 mM H₂O₂ or PhIO, 100 mM styrene, 60 % methanol, 40 mM potassium phosphate pH 7.4, and 100 μM catalyst. The reactions were carried out for 10 minutes at 0 °C. Yields are based on oxidant.

第5章の実験

MP-11のメチルエステル化

MP-11 20mgを10mlのメタノールに懸濁させ、氷冷下攪拌した。そこに5N HCl-メタノール溶液0.2mlをゆっくり滴下し、攪拌を続けたまま、反応温度を約2時間かけてゆっくりと室温にした。MP-11は最初懸濁状態であるが、エステル化の進行とともに徐々にメタノールに溶解し最終的に均一な赤色溶液となる。反応液を減圧留去した後、HPLCにてMP-11-Me-esterを精製した。分取用C₁₈カラムを用い、50%アセトニトリル（0.1%トリクロル酢酸を含む）から20分間で100%アセトニトリル（0.1%トリクロル酢酸を含む）になるようにグラディエントをかけた。流速は5.0ml/minになるようにし、396nmの吸収でMP-11-Me-esterを検出した。MP-11-Me-esterを含むフラクションはアセトニトリルを減圧留去した後透析し、凍結乾燥した。

MP-9の調製

MP-11 20mg、thermolysin 20mgを5mM CaCl₂（thermolysinの活性にCa²⁺が必要）を含む0.1M *N*-ethylmorpholine-acetate(pH8.0) 2mlに溶かし、37℃で24時間インキュベートした。HPLCでMP-11の消失を確認した後、MP-11の精製と全く同じ条件でゲルクロマトグラフィーを行った。MP-9を含むフラクションを濃縮後HPLCで精製した。分取条件はMP-11-Me-esterと全く同じであった。

NMRスペクトルの測定

CD₃OD:D₂O=10:90の溶媒中に各触媒が2mM、NaCNが500mMになるように調製したCN⁻錯体をサンプルとした。測定は400MHz ¹H-NMRを用い、25℃で1024回積算を行った。

酸化反応性の比較

第3章の条件とはは同様に行った。異なる点は、チオアニソールの酸化において反応速度を遅くするために触媒濃度を2.0μM、H₂O₂濃度を200μMにしたことである。

総括

以上、第5配位子にのみイミダゾール基を有するという特徴を持つMP-11はHemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clなどに比べ基質酸化触媒活性が高いことを明らかにした。この高活性は、(1) MP-11ではO-O結合のヘテロリティック開裂が促進されること、(2) 生成した活性種は基質酸化と触媒の自己分解を引き起こすが、MP-11では基質酸化の触媒分解に対する比率が高いこと、(3) MP-11から生成する活性種は基質を一電子酸化した後、基質一電子酸化中間体にMP-11活性種上のO原子を導入する能力が高い、の3点によると考えられる。O-O結合開裂に関しては、第3章において触媒分解速度がO-O結合開裂速度を反映していることを示し、MP-11が最もその速度が速いことを明らかにした。また第2章において、O-O結合開裂過程を含まない酸化剤であるPhIOを用いた場合、基質によってはMP-11、Hemin-*N*-MeIm₂、Hemin-Clで収率に差がなくなるという結果が得られたが、このこともMP-11の特徴がO-O結合開裂促進にあるということの証明の一つとなった。しかしながら、活性種自体の寿命、不安定さや測定機器の機械的な問題から、O-O結合開裂様式の直接的な証明方法である活性種の検出に関しては失敗に終わった。

P. 102の表は、第2、4章で得られたMP-11の反応性および機構などをHRP、CPO、P450の3種のヘム酵素ですでに知られている知見と比較したものである。MP-11ではHRPのような第6配位子側のタンパク質による影響がないため、HRPと同じイミダゾール配位でありながら、スルフィドやオレフィンにすばやく酸素原子を導入するというP-450様の活性を有していた。また、*N*-脱アルキル化機構もHRPタイプでなく、P-450タイプであった。これはHRPにおいてマスクされていたイミダゾール配位ヘム錯体の反応性であり、MP-11を用いることによって純粋に軸配位子としてのイミダゾールの効果を検討することができると言える。しかしながら、P-450が触媒する他の反応、*O*-脱アルキル化、不飽和炭化水素や芳香環の水酸化などに関してはMP-11は活性を持っていなかった。

た。またP-450と同じチオレート配位であるCPOにおいてもこれらの反応は進行しない。よってこれらの反応はチオレート軸配位子とともに、活性部位の疎水性などによるP-450特異的なものと考えられる。

このようにモノイミダゾール配位ヘム酵素モデルであるMP-11を用いて、基質酸化反応および反応機構を検討することによって、それらに及ぼす軸配位子、活性部位環境の影響について明らかにした。第5章ではMP-11の高い活性の原因をその構造から明らかにしようと試みたが、残念ながらその解明には至らなかった。

	第5配位子	第6配位子側の環境 (基質結合部位)	触媒する反応 (生成物に導入される酸素原子)
MP-11	Hisイミダゾール	親水的 (第6配位子側には何も なく、基質は自由に鉄オキセノ イドに近づくことができる)	N-脱アルキル化 (活性種由来) スルフィドの酸化 (活性種由来) オレフィンのエポキシ化 (活性種由来)
HRP	Hisイミダゾール	親水的 (第6配位子側は蛋白質 に覆われており、基質は鉄オキ セノイドに近づきにくい)	N-脱アルキル化 (溶存酸素由来) スルフィドの酸化 (活性種由来)
CPO	Cysチオレート	親水的 (第6配位子側はHRPに 比べて広く、基質は鉄オキセノ イドに近づきやすい)	N-脱アルキル化 スルフィドの酸化 (活性種由来) オレフィンのエポキシ化 (活性種由来)
P450	Cysチオレート	疎水的 (基質結合部位があり、 比較的大きな基質も鉄オキセノ イドに近づきやすい)	N-脱アルキル化 (活性種由来) スルフィドの酸化 (活性種由来) オレフィンのエポキシ化 (活性種由来) O-脱アルキル化 (活性種由来) 飽和炭化水素の水酸化 (活性種由来) 芳香環の水酸化 (活性種由来)

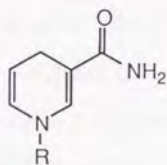
補足

本文中では述べなかったMP-11を用いたその他のいくつかの反応や試みについて簡単に記す。

NaBH₄/O₂/MP-11系による酸化反応

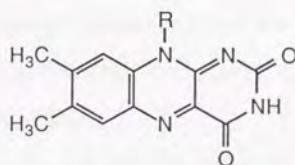
P450はNADPHやNADHを還元剤として分子状酸素を還元的に活性化し、基質を酸化することができる。P450以外のヘム酵素ではsecondary amine monooxygenaseが同様に分子状酸素を活性化することが知られている。当教室では還元剤としてNaBH₄を用いたP450化学モデルが開発されている。この系におけるオレフィンの酸化は、 α -アルキル錯体を経由し鉄-炭素結合に分子状酸素が挿入され反応が進行する点で機構的にはP450とは異なる。この系を用いてMP-11によるスチレンの酸化および*N,N*-ジメチルアニリンの*N*-脱メチル化を行ったところ、スチレンから α -フェネチルアルコールが生成する反応の触媒回転数は約200回、*N*-脱メチル化の触媒回転数は約10回であった。しかしながらHemin-Im₂でもMP-11の70%程度の活性を有していた。

NADHモデル/FMN/O₂/MP-11系による酸化反応



R = CH₃: MeNAH

R = CH₂CH₂CH₃: PrNAH

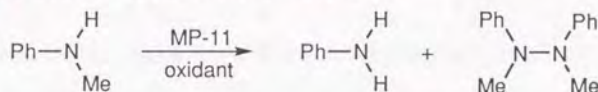


R = CH₂(CHOH)₃CH₂OPO₃²⁻: FMN

より生体に近いモデル反応として、NADHモデル (MeNAH、PrNAH) を還元剤として分子状酸素活性化を試みた。スチレンの酸化、チオアニソールの酸化ともに反応は進

行するものの、コントロールと同程度であった。光励起されたフラビンによる酸素活性化が起こったものと考えられる。

MP-11による二級アミンのN,N-カップリング反応



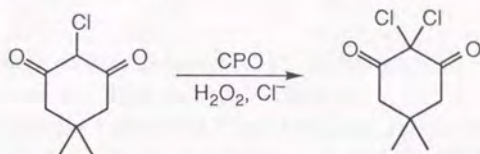
当教室ではP450化学モデルを用いて二級アミンのN,N-カップリング反応が進行することが見いだされ、さらにこの反応が生体内で起こっているP450新規代謝様式であることが明らかとなった。MP-11/H₂O₂系でN-メチルアニリンを基質としたところ、N-脱メチル体であるアニリンが13%の収率で、N,N-カップリング体であるN,N'-ジメチル-N,N'-ジフェニルヒドラジンが12%の収率で得られた。酸化剤がCumOOHではそれぞれ20%と7%、PhIOではそれぞれ14%と5%であった。このようなN,N-カップリング反応はヘム酵素ではかなり一般的に起こると考えられる。

MP-11を利用した不斉酸化の試み

当教室で開発されたP450化学モデル系の一つにPMG (poly-γ-methyl-L-glutamate) 固定化ボルフィリンがある。MP-11をPMGに固定化することにより、反応場が不斉環境に置かれるのではないかと期待した。しかし、PMG固定化MP-11を用いてチオアニソールの酸化、スチレンの酸化を行い、生成物をHPLC光学活性カラムで分析したところ、スルフォキシド、エポキシドともに不斉は生じていなかった。

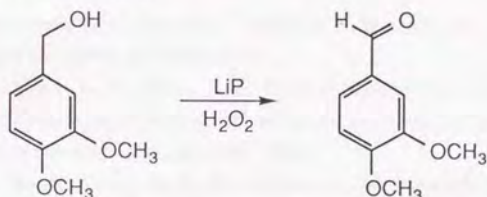
また、MP-11はBSAと相互作用し、そのスペクトルが変化することが知られている。そこでBSA存在下でMP-11による酸化を行ってみたが、生成物はラセミであり、不斉酸化は進行しなかった。

MP-11によるCPOモデル反応の試み



CPOはその名の通り、 H_2O_2 を用いて基質をクロル化する能力を持っている。MP-11はペルオキシダーゼの中でもとりわけCPOに近い反応性を示すことから、クロル化反応も触媒することができるのではないかと期待した。CPO活性のアッセイ法としてはモノクロルジメドン (MCD) のクロル化が指標とされる。MP-11/ H_2O_2 /KCl系でMCDのクロル化を試みたところ、MCDに特有の278nmの吸収の減少が見られた。しかしながら、さらに生成物を詳細に検討したところ、ジクロルジメドンは生成しておらず、他の酸化生成物（同定はできなかった）が見られるのみで、MP-11はクロル化反応を行うことができなかった。

MP-11によるLiPモデル反応の試み



LiPは他のペルオキシダーゼが有していない強力な酸化反応をも進行させることが知られている。その一つにベラトリルアルコールを酸化し、ベラトルムアルデヒドを生成する反応がある。この反応はLiPの強力な活性種による芳香環からの一電子引き抜きが初発とされている。MP-11/ H_2O_2 系でベラトリルアルコールの酸化を行ったところ、原料回収に終わった。

参考文献

- 1) Ortiz de Montellano, P. R. *Acc. Chem. Res.* **1987**, *20*, 289-294.
- 2) Salemme, F. R. *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, *46*, 299-329.
- 3) (a) Alberta, J. A.; Dawson, J. H. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11857-11863.
(b) Alberta, J. A.; Anderson, L. A.; Dawson, J. H. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 20467-20473.
- 4) *Cytochrome P-450*, Ortiz de Montellano, P. R., Ed.; Plenum Press; New York, 1986.
- 5) (a) Morris, D. R.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1763-1768.
(b) Hager, L. P.; Morris, D. R.; Brown, F. S.; Eberwein, H. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1769-1777.
(c) Dawson, J. H.; Sono, M. *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1255-1276.
- 6) (a) Murthy, M. R. N.; Reid III, Y. J.; Sicignano, A.; Tanaka, N.; Rossman, M. G. *J. Mol. Biol.* **1981**, *152*, 465-499.
(b) Fita, I.; Rossman, M. G. *J. Mol. Biol.* **1985**, *185*, 21-37.
- 7) Dawson, J. H. *Science* **1988**, *240*, 433-439.
- 8) Schulz, C. E.; Devaney, P. W.; Winkler, H.; Debrunner, P. G.; Doan, N.; Chiang, R.; Rutter, R.; Hager, L. P. *FEBS Lett.* **1979**, *103*, 102-105.
- 9) Moss, T. H.; Ehrenberg, A.; Bearden, A. J. *Biochemistry* **1969**, *8*, 4159-4162.
- 10) (a) Finzel, L. A.; Villafranca, J. E.; Mauro, J. M.; Kraut, J. *Biochemistry* **1987**, *26*, 351-360.
(b) Edwards, S. L.; Xuong, N. H.; Hamlin, R. C.; Kraut, J. *Biochemistry* **1987**, *26*, 1503-1511.
(c) Mauro, J. M.; Fishel, L. A.; Hazzard, J. T.; Meyer, T. E.; Tollin, G.; Cusanovich, M. A.; Kraut, J. *Biochemistry* **1988**, *27*, 6243-6256.
(d) Erman, J. E.; Vitello, L. B.; Mauro, J. M.; Kraut, J. *Biochemistry* **1989**, *28*, 7992-7995.
(e) Fishel, L. A.; Farnum, M. F.; Mauro, M.; Miller, M. A.; Kraut, J.; Liu, Y.; Tan, X.; Scholes, C. P. *Biochemistry* **1991**, *30*, 1986-1996.
(f) Savaraja, M.; Goodin, D. B.; Smith, M.; Hoffman, B. M. *Science* **1989**, *245*, 738-740.
(g) Goodin, D. B.; Mauk, A. G.; Smith, M. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 7719-7724.
- 11) (a) Frew, J. E.; Jones, P. *Adv. Inorg. Bioinorg. Mech.* **1984**, *3*, 175-212.
(b) Penner-Hahn, J. E.; Eble, K. S.; McMurry, T. J.; Renner, M.; Balch, A. L.; Groves, J. T.; Dawson, J. H.; Hodgson, K. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 7819-7825.
(c) Penner-Hahn, J. E.; McMurry, T. J.; Renner, M.; Balch, A. L.; Groves, J. T.; Dawson, J. H.; Hodgson, K. O. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 12761-12764.
- 12) (a) Poulos, T. L.; Freer, S. T.; Alden, R. A.; Xuong, N. H.; Edwards, S. L.; Hamlin, R. C.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 3730-3735.
(b) Poulos, T. L.; Freer, S. T.; Alden, R. A.; Edwards, S. L.; Skogland, U.; Takio, K.;

- Eriksson, B.; Xuong, N. -H.; Yonetani, T.; Kraut, J. J. *Biol. Chem.* **1980**, *255*, 575-580.
- (c) Edwards, S. L.; Poulos, T. L.; Kraut, J. J. *Biol. Chem.* **1984**, *259*, 12984-12988.
- (d) Finzel, B. C.; Poulos, T. L.; Kraut, J. J. *Biol. Chem.* **1984**, *259*, 13027-13036.
- (e) Edwards, S. L.; Poulos, T. L. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 2588-2595.
- (f) Edwards, S. L.; Kraut, J.; Poulos, T. L. *Biochemistry* **1988**, *27*, 8074-8081.
- (g) Bosshard, H. R.; Anni, H.; Yonetani, T. *Peroxidase in Chemistry and Biology*, Vol 2, pp. 51-84, Everse, J.; Everse, K. E.; Grisham, M. B., Ed.; CRC Press; Boca Raton, 1991.
- 13) (a) Poulos, T. L.; Kraut, J. J. *Biol. Chem.* **1980**, *255*, 8199-8205.
- (b) Poulos, T. L. *Adv. Inorg. Biochem.* **1987**, *7*, 1-36.
- (c) Goodin, D. B.; McRee, D. E. *Biochemistry* **1993**, *32*, 3313-3324.
- 14) (a) Edwards, S. L.; Raag, R.; Wariishi, H.; Gold, M. H.; Poulos, T. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 750-754.
- (b) Poulos, T. L.; Edwards, S. L.; Wariishi, H.; Gold, M. H. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4429-4440.
- 15) (a) Kedderis, G. L.; Koop, D. R.; Hollenberg, P. F. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 10174-10182.
- (b) Josephy, P. D.; Eling, T.; Mason, R. P. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 3669-3675.
- (c) Van der Zee, J.; Duling, D. R.; Mason, R. P.; Eling, T. E. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 19828-19836.
- 16) (a) Watanabe, Y.; Iyanagi, T.; Oae, S. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 3685-3688.
- (b) Doerge, D. R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, *244*, 678-685.
- (c) Kobayashi, S.; Nakano, M.; Goto, T.; Kimura, T.; Schaap, A. P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *165*, 166-171.
- (d) Kobayashi, S.; Nakano, M.; Kimura, T.; Schaap, A. P. *Biochemistry* **1987**, *26*, 5019-5022.
- (e) Pérez, U.; Dunford, H. B. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2757-2763.
- (f) Colonna, S.; Manfredi, A.; Casella, L.; Gullotti, M.; Carrea, G.; Pasta, P. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10465-10468.
- (g) Egan, R. W.; Gale, P. H.; Baptista, E. M.; Kennicott, K. L.; VandenHeuvel, W. J. A.; Walker, R. W.; Fagerness, P. E.; Kuehl, Jr., F. A. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 7352-7361.
- (h) Harris, R. Z.; Newmyer, S. L.; Ortiz de Montellano, P. R. *J. Biol. Chem.* **1993**, *1637*-1645.
- 17) (a) Ortiz de Montellano, P. R.; Grab, L. A. *Biochemistry* **1987**, *26*, 5310-5314.
- (b) Ortiz de Montellano, P. R.; Choe, Y. S.; DePillis, G.; Catalano, C. E. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 11641-11646.
- (c) Cassella, L.; Gullotti, M.; Ghezzi, R.; Poli, S.; Beringhelli, T.; Colonna, S.; Carres, G. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9451-9459.

- (d) Fu, H.; Kondo, H.; Ichikawa, Y.; Look, G. C.; Wong, C. -H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7265-7270.
- 18) (a) Ator, M. A.; Ortiz de Montellano, P. R. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 1542-1551.
 (b) Ator, M. A.; David, S. K.; Ortiz de Montellano, P. R. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 14954-14960.
 (c) Ortiz de Montellano, P. R.; David, S. K.; Ator, M. A.; Tew, D. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5470-5476.
 (d) Ator, M. A.; David, S. K.; Ortiz de Montellano, P. R. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 9250-9257.
- 19) (a) Meunier, B.; Carvalho, M. -E; Bortolini, O.; Momenteau, M. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 161-164.
 (b) Yuan, L. -C.; Bruce, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 1643-1650.
- 20) (a) Traylor, T. G.; Berzini, A. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 2844-2846.
 (b) Traylor, T. G.; Lee, W. A.; Styne, D. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 755-764.
 (c) Battioni, P.; Renaud, J. P.; Bartoli, J. F.; Reina-Artiles, M.; Fort, M.; Mansuy, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8462-8470.
 (d) Anelli, P. L.; Banfi, S.; Legramandi, F.; Montanari, F.; Pozzi, G.; Quici, S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 1345-1357.
- 21) (a) Harbury, H. A.; Loach, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1959**, *45*, 1344-1359.
 (b) Harbury, H. A.; Loach, P. A. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 3640-3645.
 (c) Harbury, H. A.; Loach, P. A. *J. Biol. Chem.* **1960**, *235*, 3646-3653.
- 22) (a) Adams, P. A. *Peroxidase in Chemistry and Biology*, Vol 2, pp. 171-200, Elsevier, J.; Everse, K. E.; Grisham, M. B., Ed.; CRC Press; Boca Raton, 1991.
 (b) Aron, J.; Baldwin, D. A.; Marques, H. M.; Pratt, J. M.; Adams, P. A. *J. Inorg. Biochem.* **1986**, *27*, 227-243.
- 23) (a) Baldwin, D. A.; Marques, H. M.; Pratt, J. M. *J. Inorg. Biochem.* **1986**, *27*, 245-254.
 (b) Marques, H. M.; Baldwin, D. A.; Pratt, J. M. *J. Inorg. Biochem.* **1987**, *29*, 77-91.
 (c) Baldwin, D. A.; Marques, H. M.; Pratt, J. M. *J. Inorg. Biochem.* **1987**, *30*, 203-217.
 (d) Cunningham, I. D.; Snare, G. R. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1992**, 2019-2023.
 (e) Adams, P. A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1990**, 1407-1414.
 (f) Adams, P. A.; Goold, R. D. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 97-98.
 (g) Cunningham, I. D.; Bachelor, J. L.; Pratt, J. M. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1991**, 1839-1843.
 (h) Baldwin, D. A.; Marques, H. M.; Pratt, J. M. *FEBS Lett.* **1985**, *183*, 309-312.
- 24) (a) Koop, D. R.; Hollenberg, P. F. *Mol. Pharmacol.* **1980**, *17*, 118-127.
 (b) Novak, R. F.; Koop, D. R.; Hollenberg, P. F. *Mol. Pharmacol.* **1980**, *17*, 128-136.
 (c) Kedderis, G. L.; Dwyer, L. A.; Rickert, D. E.; Hollenberg, P. F. *Mol. Pharmacol.* **1983**,

- 23, 758-760.
- (d) Shea, J. P.; Valentine, G. L.; Nelson, S. D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, 109, 231-235.
- (e) Kedderis, G. L.; Rickert, D. E.; Pandey, R. N.; Hollenberg, P. F. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 15910-15914.
- (f) Macdonald, T. L.; Gutheim, W. G.; Martin, R. B.; Guengerich, F. P. *Biochemistry* **1989**, 28, 2071-2077.
- 25) (a) Miwa, G. T.; Walsh, J. S.; Kedderis, G. L.; Hollenberg, P. F. *J. Biol. Chem.* **1983**, 258, 14445-14449.
- (b) Kedderis, G. L.; Hollenberg, P. F. *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 3663-3668.
- (c) Kedderis, G. L.; Hollenberg, P. F. *Biochemistry* **1985**, 24, 6158-6163.
- (d) Okazaki, O.; Guengerich, F. P. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 1546-1552.
- (e) Seto, Y.; Guengerich, F. P. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 9986-9997.
- (f) Dinnocenzo, J. P.; Karki, S. B.; Jones, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7111-7116.
- (g) Hawkins, B. K.; Dawson, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3547-3549.
- 26) Mansuy, D.; Leclaire, J. Fontecave, M.; Momenteau, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 119, 319-325.
- 27) (a) Geigert, J.; Lee, T. D.; Dalietos, D. J.; Hirano, D.; Neidleman, S. L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, 136, 778-782.
- (b) Allain, E. J.; Hager, L. P.; Deng, L.; Jacobson, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4415-4416.
- 28) (a) Ortiz de Montellano, P. R.; Catalano, C. E. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 9265-9271.
- (b) Tew, D.; Ortiz de Montellano, P. R. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 17880-17886.
- (c) Catalano, C. E.; Choe, Y. S.; Ortiz de Montellano, P. R. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 10534-10541.
- (d) Rao, S. I.; Wilks, A.; Ortiz de Montellano, P. R. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 803-809.
- 29) (a) Groves, J. T.; Myers, R. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 5791-5796.
- (b) Collman, J. P.; Kodadek, T.; Brauman, J. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2588-2594.
- (c) Castellino, A. J.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 158-162.
- (d) Castellino, A. J.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7512-7519.
- (e) Garrison, J. M.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 191-198.
- (f) Garrison, J. M.; Ostovic, D.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4960-4966.
- (g) Ostovic, D.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6511-6517.
- (h) He, G. -X.; Mei, H. -Y.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5644-5650.
- (i) He, G. -X.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 2747-2753.
- (j) Traylor, T. G.; Miksztal, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 7443-7448.
- (k) Traylor, T. G.; Tsuchiya, S.; Byun, Y. -S.; Kim, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115,

2775-2781.

- (l) Rocha Gonsalves, A. M. d'A.; Johnstone, R. A. W.; Pereira, M. M.; Shaw, J. J. *Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1991**, 645-649.
- 30) (a) Thompson, J. A.; Yumibe, N. P. *Drug. Metab. Rev.* **1989**, *20*, 365-378.
(b) Reed, C. J.; De Matteis, F. *Biochem. J.* **1989**, *261*, 793-800.
- 31) (a) Bernadou, J.; Bonnafous, M.; Labat, G.; Loiseau, L. P.; Meunier, B. *Drug. Metab. Dispos.* **1991**, *19*, 360-365.
(b) Meunier, B. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1411-1456.
- 32) (a) Traylor, T. G.; Xu, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6201-6202.
(b) Traylor, T. G.; Fann, W. P.; Bandyopadhyay, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8009-8010.
(c) Traylor, T. G.; Ciccone, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8413-8420.
(d) Traylor, T. G.; Xu, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 178-186.
(e) Bruice, T. C. *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 243-249.
(f) Lindsay Smith, J. R.; Balasubramanian, P. N.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7411-7418.
(g) Balasubramanian, P. N.; Lindsay Smith, J. R.; Davies, M. J.; Kaaret, T. W.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 1477-1483.
(h) Panicucci, R.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6063-6071.
(i) Murata, K.; Panicucci, R.; Gopinath, E.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6072-6083.
(j) Gopinath, E.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4657-4665.
(k) Gopinath, E.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6090-6094.
(l) Arasasingham, R. D.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6095-6103.
(m) Beck, M. J.; Gopinath, E.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 21-29.
(n) Lindsay Smith, J. R.; Lower, R. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1991**, 31-39.
- 33) (a) Mageli, O. L.; Sheppard, C. S. *Organic Peroxides*, Vol 1, pp. 1-104, Swern, D., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.; New York, 1970.
(b) Buettner, G. R. *Free Rad. Biol. Med.* **1987**, *3*, 259-303.
(c) Schaich, K. M.; Boeg, D. C. *Autoxidation in Food and Biological Systems*, pp. 45-70, Simic, M. G.; Karel, M., Ed.; Plenum Press; New York, 1980.
(d) Sosnovsky, G. *Organic Peroxides*, Vol 2, pp. 269-336, Swern, D., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.; New York, 1971.
- 34) (a) Watanabe, Y.; Numata, T.; Iyanagi, T.; Oae, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1981**, *54*, 1163-1170.
(b) Watanabe, Y.; Oae, S.; Iyanagi, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 188-195.
(c) Watanabe, Y.; Numata, T.; Oae, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1982**, *55*, 1915-1920.

- (d) Doerge, D. R.; Pitz, G. L.; Root, D. P. *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 972-974.
- 35) Wang, J. -S.; Baek, H. K.; Van Wart, H. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *179*, 1320-1324.
- 36) (a) Burka, L. T.; Guengerich, F. P.; Willard, R. J.; Macdonald, T. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2549-2551.
 (b) Woon, T. C.; Dicken, C. M.; Bruice, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 7990-7995.
- 37) (a) Sono, M.; Dawson, J. H.; Hall, K.; Hafer, L. P. *Biochemistry* **1986**, *25*, 347-356.
 (b) Blanke, S. R.; Hager, L. P. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 12454-12461.
 (c) Samokyszyn, V. M.; Ortiz de Montellano, P. R. *Biochemistry* **1991**, *30*, 11646-11653.
 (d) Hu, S.; Kincaid, J. R. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 6189-6193.
- 38) (a) Poulos, T. L.; Finzel, B. C.; Gunsalus, I. C.; Wagner, G. C.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 16122-16130.
 (b) Poulos, T. L.; Finzel, B. C.; Howard, A. J. *Biochemistry* **1986**, *25*, 5314-5322.
 (c) Poulos, T. L.; Howard, A. J. *Biochemistry* **1987**, *26*, 8165-8174.
 (d) Poulos, T. L.; Finzel, B. C.; Howard, A. J. *J. Mol. Biol.* **1987**, *195*, 687-700.
 (e) Poulos, T. L. *Pharm. Res.* **1988**, *5*, 67-75.
 (f) Raag, R.; Poulos, T. L. *Biochemistry* **1989**, *28*, 7586-7592.
- 39) (a) Yamamoto, H.; Mashino, T.; Nagano, T.; Hirobe, M. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4133-4136.
 (b) Hildebrandt, A. G.; Roots, I.; Tjoe, M.; Heinemeyer, G. *Methods in Enzymology*, Vol 52, pp. 342-350, Fleischer, S.; Packer, L., Ed.; Academic Press; New York, 1978.
- 40) Sakurada, J.; Takahashi, S.; Hosoya, T. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 9657-9662.
- 41) (a) De Ropp, J. S.; Thanabal, V.; La Mar, G. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 8268-8270.
 (b) Thanabal, V.; de Ropp, J. S.; La Mar, G. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 3027-3035.
- 42) (a) Smulevich, G.; Mauro, J. M.; Fishel, L. A.; English, A. M.; Kraut, J.; Spiro, T. G. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5477-5485.
 (b) Smulevich, G.; Mauro, J. M.; Fishel, L. A.; Kraut, J.; Spiro, T. G. *Biochemistry* **1988**, *27*, 5486-5492.
 (c) Miller, M. A.; Coletta, M.; Mauro, J. M.; Putnam, L. D.; Farnum, M. F.; Kraut, J.; Traylor, T. G. *Biochemistry* **1990**, *29*, 1777-1791.
 (d) Smulevich, G.; Wang, Y.; Edwards, S. L.; Poulos, T. L.; English, A. M.; Spiro, T. G. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2586-2592.
 (e) Spiro, T. G.; Smulevich, G.; Su, C. *Biochemistry* **1990**, *29*, 4497-4508.
 (f) Satterlee, J. D.; Erman, J. E.; Mauro, J. M.; Kraut, J. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8797-8804.
 (g) Smulevich, G.; Wang, Y.; Mauro, J. M.; Wang, J.; Fishel, L. A.; Kraut, J.; Spiro, T. G. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7174-7180.
 (h) Wang, J.; Mauro, J. M.; Edwards, S. L.; Oatley, S. J.; Fishel, L. A.; Ashford, V. A.;

Xuong, N. -H.; Kraut, J. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7160-7173.

43) 生化学実験講座第1巻タンパク質の化学IV, pp. 46-47, 日本生化学会編; 東京化学同人; 東京, 1977.

44) (a) Matsubara, H.; Singer, A.; Sasaki, R.; Jukes, T. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, *21*, 242-247.

(b) Matsubara, H.; Sasaki, R.; Singer, A.; Jukes, T. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1966**, *115*, 324-331.

謝辞

本研究を行うにあたって、懇切丁寧に御指導して下さった、東京大学薬学部薬品代謝化学教室、廣部雅昭教授に心より感謝致します。

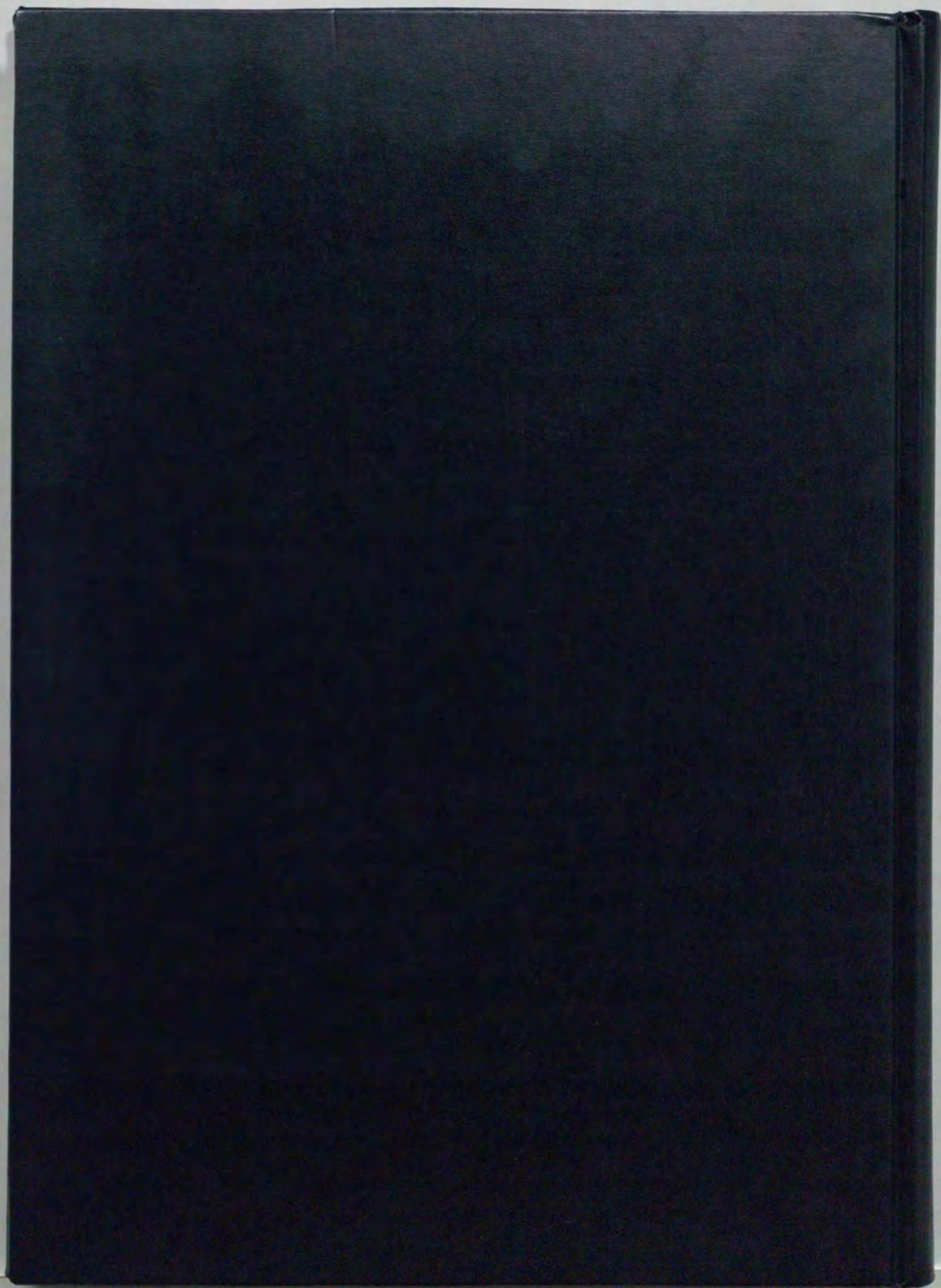
終始あたたかく見守って下さり、適切な御助言、討論をしていただいた、増野匡彦博士をはじめとする薬品代謝化学教室スタッフ、先輩、同級生、後輩の皆様に、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

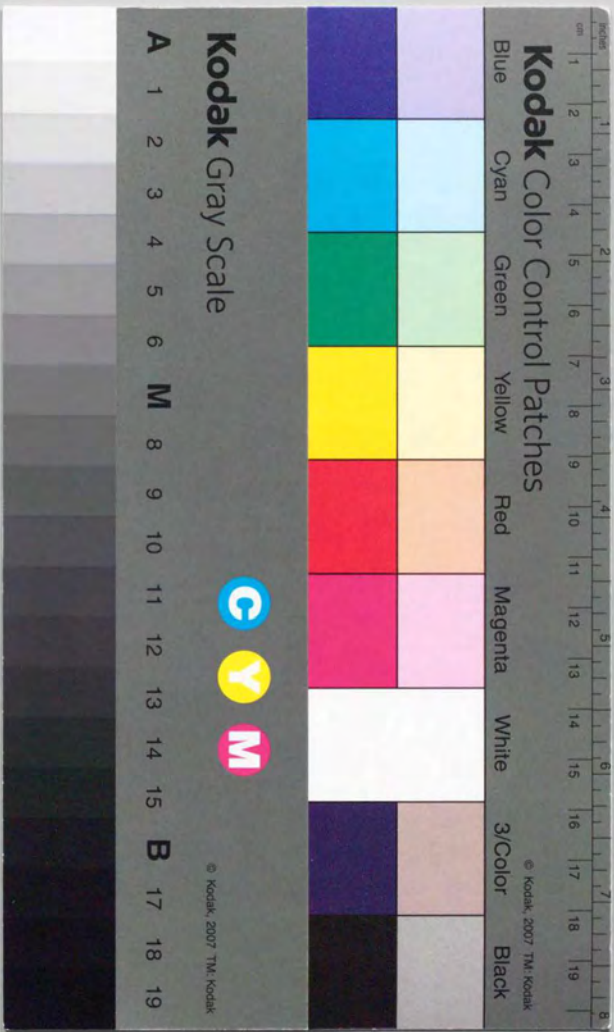
また、種々の機器分析にあたって、本学部中央分析室の皆様の御協力に深く感謝しております。

最後に、長い学生生活を陰で支えてくれた両親に感謝の気持ちを捧げます。

1994年1月

中村成夫





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

© Kodak, 2007 TM Kodak

Kodak Gray Scale



A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

© Kodak, 2007 TM Kodak