講座

ライフサイエンスのための安定同位体利用技術(XII)

同位体効果利用による物質代謝研究法†

栗原紀夫

京都大学放射性同位元素総合センター

606 京都市左京区吉田近衛町

Key Words: isotope effects, deuterium isotope effects, kinetic isotope effects, xenobiotic metabolism, isotope effects on biological activity

1. はじめに

ライフサイエンス分野で、われわれがアイソトープ(以下、同位体)を用いてトレーサ実験を行うとき、トレーサとして用いる同位体標識化合物(以下、標識化合物とのみ記す)は、元の化合物と同一挙動をとる、ということが大前提となっている。

しかし、厳密には標識化合物は元の化合物とは違った挙動をとる。これが同位体効果である。ことに ^3H (T) や ^2H (D) を持つ化合物において、これらを含む共有結合が反応中心付近にある場合、大きい同位体効果を示すことがある。

同位体効果が簡単に見出され、またその大きさが測定できるという場合は必ずしも多くないが、種々の実験条件の工夫により、この値を求め、他の方法では得難い情報を得ることも可能である。原理等は成書や総説に説明がある^{1)~9)}ので、ここでは簡単に触れるにとどめ、どのような実験目的に適しているか、実験計画時にどのような注意が必要か、などについて述べていく。なお同位体効果の値は、たとえば反応速度における重水素同位体効果であれば、速度定数の比 $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ 等で表す。これが1の場合、「同位体効果がない」という。「大きさが測定できる」というのは1以外のある決まった値を求められることを指す。「同位体効果が小さい」とは値が「1に非常に近い」ことを指す。

2. 同位体効果はなぜ現れるか

ここでは反応速度同位体効果のみを考えるが、平衡におけるそれと考え方は同様である。出発物と遷移状態とのエネルギー差が反応速度を決めるわけであるが、それぞれの状態において、結合の零点エネルギーの寄与がある。同位体置換をすると、この零点エネルギーが変わる。零点エネルギーは結合の振動エネルギーによっていると考えてよいから、その差は、 $h \cdot \Delta\nu/2$ である。 $\Delta\nu$ は標識および非標識の結合の振動数の差である。反応の遷移状態において、この結合が完全に切れ、零点エネルギーの差がそこではなくなる場合には、反応速度を決める活性化エネルギーの差は、出発物における零点エネルギーの差のみによることになる。これは同位体を含む結合が切れるという点で、一次の同位体効果であり、しかも遷移状態での零点エネルギーの差が0になるのはさらにその特別な場合にあたる。同位体を含む結合は切れないで、近傍の結合の組み換えが起こる場合には二次の同位体効果が観察される。この値は一般に小さく、炭素-重水素についても高々1.4程度にしかない。

振動数 ν は $(1/2\pi)\sqrt{f/\mu}$ で表される(2原子分子モデルで、力の定数を f 、換算質量を μ とする)。したがって換算質量の差の大きいもので比べるほど、同位体効果が大きく現れてくることになる。

ただし上の説明は随分単純化したものであり、反応メカニズムにより同位体効果を小さくする因子や大きくする因子がある。実際、C-H結合の切断生成が関係する反応の重水素反応速度同位体効果(一次)は通常1から7の間に分布する。10を超える場合も観察されている。

† Use of the Stable Isotopes in Life Science (XII) Application of Isotope Effects in Xenobiotic Metabolism Studies. Norio KURIHARA: Radioisotope Research Center, Kyoto University, Yoshida Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi 606.

3. どのような目的に使えるか

各種の目的が複合する場合があるが、一応つぎのように分類できる。

(1) 薬効の増強、持続時間の延長、あるいは毒性の減少等、化合物の生理活性の強さを変化させる。

バルビツール酸系薬剤ブテアル分子中にあるブチル基の3位水素をすべてDで置換すると、マウスを使った実験で、睡眠時間を2倍以上に延長することができる⁷⁾。この化合物のおもな代謝物として、ブチル基の3位の水酸化されたものが同定されており、上記睡眠時間延長という活性は代謝分解速度の低下で説明されることも報告された⁷⁾。

(2) 化合物の代謝経路解明の一助とする。

① 生理活性物質の解毒代謝反応や活性化反応の連鎖のうち、律速部分を推定する。

クロロホルムを重水素化すると麻酔作用は変わらないが、肝毒性が著しく減少する⁸⁾。肝毒性を示す代謝物がホスゲンであり、これを生成する反応において酸素添加反応のステップが律速であることが示されている⁸⁾。また、殺虫剤リンデンを完全重水素化すると殺虫力が著しく増強される⁹⁾。リンデンはすべての代謝変換で解毒の方向に向かうことが分かっており、このため第一ステップの代謝反応の主要なものはすべてC-H結合切断を含む反応であり、かつ、これら最初の反応が律速的であると考えられる¹⁰⁾。

② 複数の代謝経路が考えられる場合、そのどれが問題にしている代謝生成物を与える経路なのかを決める。

これには同位体標識による最終代謝生成物の生成速度に現れる同位体効果などを利用する。ラットでのリンデン代謝物中4-クロロフェニルメルカプツール酸生成の経路をその生成速度同位体効果で調べている¹¹⁾。

③ 目立たない代謝経路を増強・発見する。

アンチピリンの代謝には通常C-メチル基が酸化されてメチロール体になるが、この位置を重水素化すると、N-メチルの方が酸化され脱メチル化物を与え、代謝パターンがまったく変わってしまう。いわゆるメタボリックスイッチング現象である¹²⁾。

(3) 酵素系による代謝反応における各段階の動力学的関係を解明する一助とする。

酵素反応はライフサイエンス分野では比較的解析しやすい系であるが、そこにおいてもE(酵素)+S(基質) $\rightleftharpoons$ ES(酵素基質複合体)や、EP(酵素生成物複合

体) $\rightarrow$ E+P(生成物)のような部分が動力学的に重要になり、解析を複雑にすることがある。同位体効果を利用して、これら各ステップの速度の相対的な大きさの比較などを行うことができる¹³⁾。

N,N-ジメチルフェンテルミンのN-メチル基の酸化的脱離反応が重水素置換N-メチル基を持つ化合物を使って調べられている¹³⁾。分子間、分子内同位体効果の大きさから考えて、通常は速いと考えられているE+S $\rightleftharpoons$ ESやEP $\rightarrow$ E+P等のステップがC-H $\rightarrow$ C-OHという反応ステップと比べられるほど遅くなっていることが分かる(後述実験例の項でふたたび記す)。

(4) 代謝反応メカニズムを解明する。

これは「真の」*同位体効果またはそれに近いと考えられる値を得て、これを根拠に反応の詳細なメカニズムを論ずるものである。

真の同位体効果を測定することはなかなか困難であるが、分子内同位体効果を求めると非常に高い値を得ることは多く、また、Dによる同位体効果とTによる同位体効果をともに求めることができれば、真の同位体効果を算出できる。このような信頼できる値を用いれば、詳細な反応メカニズムを論ずることが可能となる。

たとえば[1,1-D₂]-1,3-ジフェニルプロパンの、ラット肝ミクロゾームによる水酸化反応の分子内同位体効果は11という大きい値であり¹⁴⁾、ノルボルナンの水酸化反応についても巧妙に分子内同位体効果を求め、11.5という値を得ている¹⁵⁾。またエトキシマリンの脱エチル化に関しては、分子間同位体効果をDとTの両標識体について求め、これから真の同位体効果を2種の酵素P-450とP-448について求めている¹⁶⁾(いずれも後述参照)。

以上、いろいろな目的の実験について例を示した。目的が何であれ、同位体効果を測定することが何らかの新しい情報を与えてくれると予想されるなら、積極的に同位体効果測定実験を行ってみたい。

4. 標識化合物、競争法と非競争法、分析法

4.1 標識化合物

解析が簡単で測定に関して小さな誤差があまり問題にならないという点で、なるべく真の同位体効果が大きくなる材料を選びたい。この点DやTの標識を選べれば最もよい。なかでも高純度高濃度標識のD標識化合物は比較的容易に入手でき、現時点で、ライフサイ

* 本稿では“intrinsic”を一応このように記す。

エンス分野の同位体効果測定にはほとんどこれが用いられている。

炭素-水素の結合が切断生成されることが分かっている場合、その位置がD標識されている化合物を選ぶことが多い。一次同位体効果を狙うのである。

同位体含量がなるべく高いもの(99%以上)を選ぶことも重要である。そうでないと必然的に競争法(後述)による実験しかできない。仮に非競争法的な解析を試みても結果の解釈が不明確になることが多い。

1つの分子内で標識部分と非標識部分が等価な位置にあり、そのどちらもが反応中心になり得る化合物も便利である。すでに3節(3)や(4)で挙げた例の中に、そのような化合物を使った実験があり、多くの場合、真の同位体効果に近い値が得られる。

標識位置と非標識位置とがまったく等価ではなくとも、似た反応性を持ち同じ反応の中心になるような部分を持つ化合物でも、分子内同位体効果を測定できる場合がある。3節(4)のノルボルナン(後述)の例はこれにあたる。

4.2 競争法と非競争法

同位体効果は何らかの形で標識・非標識化合物の反応性などを比較して求めるのだが、これを同一生物、同一容器等の中で両者混合で行うのが競争法であり、別々に実験して結果を得てから値を比較するのが非競争法である。分子内同位体効果は競争法の特殊な例とみることもできる。

競争法においては、標識・非標識の両化合物を一定の割合で混合し、これを反応させ基質減少量の「比」や、生成物量の「比」を一挙に求めるものである。この方法は *in vivo* 実験のように代謝系が複雑で個体差等も無視し難く、かといって多数の個体を使って統計的処理を行うなどが困難な場合や、化合物が強力な生理活性を持つなどして代謝反応系を化合物自身が攪乱する恐れがあり、したがって、その攪乱作用に同位体効果の生ずる恐れが考えられる場合などに便利な方法である。

反応後、残存基質や生成物を抽出し定量しようとするとき、回収率等に同位体効果がないと仮定すれば(この仮定は通常許容できる)、同一操作での回収・定量ができ、しかも必要な量は同位体「比」であるから、実験操作に起因する誤差は非常に小さく保つことができる。

しかし、たとえば *in vitro* 競争実験において $V_{\max}$ や K_m における同位体効果を求めることは不可能で

あり、($V_{\max}/K_m$)における同位体効果しか求まらない。これは反応初速度を v_H , v_D (それぞれ 1H と D に対応する)とし、基質濃度を $[S_H]$, $[S_D]$ (上と同様)とすると、

$$\frac{v_H}{v_D} = \frac{\{(V_{\max}/K_m)_H \cdot [S_H]\}}{\{(V_{\max}/K_m)_D \cdot [S_D]\}}$$

となり、実験では(v_H/v_D)の値と、 $[S_H]$, $[S_D]$ の値を決めることになるからである。

化合物の分析に、たとえばマスフラグメントグラフ法(MF)も含め、少なくともマスペクトロメトリ(MS)の一方法を用いる必要があることも、これら機器を持たない場合、この方法の短所に数えてよいかもしれないが、機器保有グループとの共同研究等の手段はある。

非競争法による同位体効果の求め方は明快である。100% 同位体で標識した化合物を基質とした実験と、非標識の基質を用いた実験を別々に行い、結果を比較すればよい。 $V_{\max}$, K_m , ($V_{\max}/K_m$)等の同位体効果を求めることができる。

非競争法には、しかしつぎのような欠点がある。たとえば速度の「比」や物質量の「比」が直接求まらないため、速度のそれぞれの大きさやそれぞれの量を別々に定量する必要がある。これにより($V_{\max}/K_m$)の同位体比などに誤差が生じやすい。また基質については標識・非標識両者において、不純物の存在その他の反応に及ぼす因子をあらかじめ知っておく必要がある。

分子内同位体効果は同一分子内で等価の位置にある反応中心を持つ場合に測定可能だが、両者が互いに競争するという意味で競争法の極端な場合といえる。しかし大いに違った特徴がある。分子間競争法で得られる値よりも真の値に近い大きい値が得られやすいのである。

酸化代謝を考えたとき、分子間競争法では酸化反応段階自体、つまりC-H結合切断段階等に同位体効果が大きかったとしても、たとえば酵素-基質錯体の電子授受等が律速であるなら、観測される同位体効果は小さいものとなる。分子内の競争ならそのような場合にも同位体効果が大きいままで観測され得る。ただこれには問題の基質分子の等価の位置にある反応中心部分が、互いに速く酵素表面で交換していることが前提となる。

4.3 分析法

非競争法では適当な分析法を選ぶことは容易である。標識、非標識体を独立に定量すればよいのだから。

競争法では標識・非標識の混合物について各成分を分別定量する必要がある。T化合物では化合物の放射能と総量とを別々に測定すればよいが、Tは本稿では範囲外なので詳述しない。D化合物では通常MSまたはMFを利用する。GC-MSを、GC(ガスクロマトグラフ)ピークの数点において測定し、該当するマスピークの高さを平均してそれらを比較するという方法もとられる^{14),17)}が、今ではMFを用いることが多い。

MFの場合、まず標準物質(基質や想定代謝物の純粋なもの)のMSを測定し、どのピークを選んでMFを行うかを決定する。この場合、なるべく強度の大きなピークを選ぶのがよいが、標識体の該当ピークとの関係で、他のピークからの妨害のないものを選ぶのが得策である。たとえば図1の化合物のD₃体とD₀体をMFで定量するとき、(M-CF₃CONH₂)⁺のm/z 304と307のピーク対を選んでよいが、図で分かるように、非標識体にも307に無視できないピークがあり、これがD₃体の307ピーク定量を複雑にする(補正は可能であるが)。そこで、少々強度は落ちるが、m/z 306と309の対を選ぶ方が定量が明快に行えることになる¹¹⁾。

図1 ジクロルフェニルシステイン誘導体D₀体、D₃体のマスペクトル(文献¹¹⁾より改変引用)(Shimadzu-LKB-9000; EI, 20 eV)

図2に示したのがMFの1例であり、2,4-isomerとあるのは図1の化合物、3,4-はClの位置が異なる異性体である。保持時間5分以下の所にあるピーク群は混合不純物である。この図はm/z 309のフラグメントグラムを塗りつぶして見やすく示したが、2つのピークともにm/z 309の方がm/z 306のクロマトグラムよりわずかに早く出現している。これはGCにおける同位体効果と呼んでよく、一般にD体(とくに多重標識のもの)はD₀体より保持時間が小さい。このこ

図2 ジクロルフェニルシステイン誘導体(2,4-および3,4-異性体)のD₀体(m/z 306)とD₃体(m/z 309)のマスフラグメントグラム(Shimadzu-LKB-9000 GC-MS, MID-PM 9060 S)(カラム SE-52, 2m, 200~250°, 5°/min)

とからも、同位体効果測定のためには、GC-MSでピークの各点でスペクトルをとるより、MFを行う方が便利で確実であることが分かる。

塩素化合物の場合、³⁵Clと³⁷Clによる特長あるイオンクラスタをスペクトル上に示すので、できれば2ないし4マスユニットだけ異なるイオン群を選んで、少なくとも4つのイオンを同時定量できるMFを走らせることにより、ピーク比の定量、したがって同位体比の定量を、信頼性の高いものになりたい。たとえばBHCとD₆-BHCを定量するとき[C₆H₅Cl₄]⁺(m/z 219および221)と[C₆D₅Cl₄]⁺(m/z 224および226)を選び、ピーク高(面積)比として(219)対(224)、ならびに(221)対(226)をそれぞれ算出し、両者が合致すれば同位体比の値は信頼性が高いものとなる¹⁸⁾。

第2に標識、非標識標準物質の一定比の混合物を用意し、それらについてMFを測定し、ピーク高の比と化合物の量比との関係を調べておく必要がある。両者をプロットすると通常、原点を通る直線となる。

なおMS、MF測定を依頼する場合とくに注意すべき点を二、三記す。

まずサンプル精製を努めて行う。少なくとも薄層クロマトグラフィ(TLC)を行うか小カラムを通す。つぎにサンプルについて通常のGCを行い、標準物質のGCと比べ、妨害ピークのないことを確かめる。このGCには、なるべく多くの有機化合物に平均した感度

を示す検出器（水素炎イオン化検出器(FID)など）を用いる。その他、MS や MF を測定してくれる人との連絡を密にする。これができているれば、手元に測定機がなくとも信頼性の高いデータが得られるはずである。

5. 実験例

5・1 クロロホルム代謝産物の肝毒性とリンデンの解毒代謝——酸素添加, 脱水素等

① クロロホルムは麻酔作用だけでなく肝毒性を示す。ラットで肝がんの原因にもなる。この原因については種々の研究の結果、代謝物によることが判明した。なかでもホスゲン生成や代謝物のタンパクとの共有結合形成が主因であるとされた。実際システインによりホスゲンをトラップし、2-オキシチアゾリジン4-カルボン酸の生成が見られることを、MSで証明している。しかもホスゲンのカルボニル酸素は酸素分子から生じていることが、 ^{18}O を用いたトレーサ実験で明らかにされた。

このように、ホスゲン生成には酸化反応が関与していることから、ミクロゾーム NADPH による COCl_2 生成速度をD体とD₀体とで比べると、前者が1/2以下であった⁹⁾。そこでクロロホルム分子のC-H結合が切断して酸素が導入されるステップが、この代謝の律速部分であることが分かる。また、肝毒性については、 CDCl_3 は CHCl_3 より低い(表1)⁹⁾。これらの実験が、クロロホルムの肝毒性はおもに COCl_2 等の生成によるものとする考えを支持した。

表1 CHCl_3 と CDCl_3 の肝毒性*

(フェノバルビタール処理ラット; 24時間後の結果)

薬 剤	死亡率	生存ラットの肝障害 (%)		
		な し	軽 度	重 度
CHCl_3	85%	0	27	73
CDCl_3	0%	0	85	15

(薬量: とともに4.98 mmol/kg; ラット数各27頭)

*文献⁹⁾より改変して引用

② リンデンではD₆体(図3)は強力な殺虫効果を示し(表2)、種あるいは系統によってはその同位体効果は非常に大きい^{9), 18)}。ところが、その本質的な活性である神経興奮作用についてはD₆, D₀間に差はない⁹⁾。薬剤の虫体への侵入速度や代謝分解速度などが、殺虫力に同位体効果を示す原因の候補と考えたが、結局は代謝分解速度における同位体効果が大きく、これ

図3 $[\text{D}_6]$ -リンデンの構造

表2 リンデンのD₀体とD₆体の殺虫活性*
(LD₅₀ (10⁻¹⁰mol/頭)にて表す)

	ア カ イ エ カ	イ エ バ エ			チャバネ ゴキブリ	ワ モ ン ゴ キ ブ リ
		系統1	系統2	系統3		
D ₀ 体	1.3	6.53	816	>2200	16.0	200
D ₆ 体	0.32	2.06	68	86.2	1.95	24.5
比	4.06	3.17	11.8	>25	8.21	8.16

*文献^{9), 18)}より

**ワモンゴキブリのみ注射, 他は点滴投与

が最も重要であると考えた。イエバエについて競争法で求めた代謝分解の速さの比較を表3に示す¹⁸⁾。非競争法でこれを実験したとき、D₆体を与えた昆虫群のみが、その殺虫力により途中で死に至った場合がある。たとえ生き残った場合にも、D₆体を与えた昆虫群の解毒代謝力はD₀投与群より弱っていることがあり得る。つまり、代謝分解速度における見かけの同位体効果は、代謝反応そのものの同位体効果が原因でなく、別の原因の生理活性同位体効果の「結果」なのかもしれないことになる。競争法を用いれば少なくともこの反論は封じられる。

表3 リンデンのD₀体、D₆体の抵抗性イエバエ中での代謝消失* (点滴投与: 計 5×10⁻⁹ mol/頭)

経過時間 (時)	総回収率 (%)	回収物中の成分 (%)	
		リンデン	$[\text{D}_6]$ -リンデン
0	100	50	50
2	66.8	22.2	44.6
4	44.5	11.7	32.8
6	29.2	5.55	23.7
8	28.1	4.44	23.7
24	22.8	1.71	21.1

*文献¹⁸⁾より。定量はMFによる

このような結果を根拠として種々の解毒代謝反応を検索し、酸素添加, 脱水素, 脱塩化水素等、リンデンのほとんどすべての代謝経路の第一段階が、C-H結合

切断を含む反応であることを見出した。これらによって生ずる生成物はすべて事実上殺虫力がなく、またこれらの反応が比較的遅く、それぞれの代謝経路において律速的なステップであった。

これらの反応のうち酸素添加 ($C-H \rightarrow C-OH$) は、*gem*-クロロヒドリンを生じ、ただちに脱 HCl してケトンを与える。この点、クロロホルム代謝の第一段階と同様の反応である。クロロホルムの場合、活性化に結びついた反応がリンデンでは解毒に結びついた。したがって、生理活性同位体効果は両者において、一見逆の方向に現れるのである。

5.2 ジフェニルプロパンの酸化的代謝¹⁴⁾ (分子内同位体効果の例——その1)

代謝速度において重水素同位体効果を求め、その値がたとえば 1.5 前後以上あり一次同位体効果の存在が知れる、ということによって目的に適う場合がある。しかしさらに進んで真の同位体効果を知りたい場合がある。反応の化学的なメカニズムを知りたい場合などである。真の同位体効果に少しでも近い値を求めるため考え出されたのが、分子内同位体効果である。

1,3-ジフェニルプロパンの酸化代謝¹⁴⁾にその例が見られる。通常、脂肪族炭化水素の水酸化反応の同位体効果の値は 2 以下であるとされていた。そこで真の同位体効果が本当にそうなのか、という疑問を出発点として実験が行われた。基質として $[1,1-D_2]$ - β -フェニルプロパンを使う。この基質は β -ベンゾイルエチルベンゼンから調製され、ラット肝ミクロゾームで代謝する。代謝物は GC-MS で定量する。

酸化代謝物では図 4 のアルコールが大部分を占めており、 D_1 体と D_0 体の比を GC-MS ピーク高の比から求め得る。この場合、生成物の m/z 214 のピーク高と 213 のピーク高とを互いにプロットすると直線には乗るが、原点を通らない。これは両化合物が存在しな

図 4 $[1,1-D_2]$ -1,3-ジフェニルプロパンの代謝 (文献¹⁴⁾の実験)

いときも MS に m/z 213 ピークが存在したからである。常識だがバックグラウンド MS を取っておくことの重要性が分かる。また先に「ピーク高をプロット」と記したが実は補正したピーク高である。 D_2 体は m/z 214 の M^+ イオンに並び 213 の $(M-1)^+$ イオンピークを示す。この比率は 0.07 であった。これらの結果から、この基質の酸化における反応速度同位体効果 k_H/k_D は 11 と計算された。

以上の実験では他にも問題がある。代謝物として、アルコールの他に 1-ケトンが生じた。この還元も同時に起こるとすれば、アルコール生成の同位体効果の値を歪ませる可能性が考えられた。しかし別の実験でその可能性はないことが確かめられた。

5.3 ノルボルナンの酸化的代謝¹⁵⁾ (分子内同位体効果の例——その2)

分子内同位体効果を求める場合、標識・非標識の対応位置が必ずしも等価の位置になくてもよく、この例にノルボルナンの水酸化の実験がある。ノルボルナンは P-450 によって酸化されて、*exo*- および *endo*- の 2-ノルボルネオールを与える。*exo* 位と *endo* 位は等価ではないが、同一反応のサイトとして分子内同位体効果を測定する材料となり得る (図 5)。

図 5 $[2,3,5,6\text{-exo,exo,exo,exo-D}_4]$ -ノルボルナンの代謝 (文献¹⁵⁾の実験)

生成する OH 基の向き (*exo* か *endo* か) を決めるのは反応の立体選択性であり、 $2,3,5,6-D_4$ 体では、これに加えて同位体効果が関与する。 $[2,3,5,6\text{-exo,exo,exo,exo-D}_4]$ 体 (以下、単に D_4 基質) は反応の立体選択性の度合 ($k_{\text{exo}}/k_{\text{endo}}$) と、反応後の生成物の比 (D_4/D_3) や (*exo/endo*) を実験的に求めて、その反応速度同位体効果を計算することができる。

ノルボルナンを、ウサギ肝 P-450 を含む再構成系で酸化すると、*exo*- と *endo*-2-ノルボルネオールは 3.4:1 の比である。 D_4 基質ではこの比は 0.76:1 であった。

ここでもし、水素引き抜きと水酸基導入とが立体保持反応であるなら、*exo* 体分子はすべて D_3 体となり、*endo* 体は 100% D_4 体となるはずである。しかし実際は生成物を MS で調べると *exo* 体の 25% は D_4 体、

endo 体の9%はD₃体となっていた。この関係を表4に示す。したがってD₄基質から生ずる生成物4種(exo-OHのD₃, D₄体とendo-OHのD₃, D₄体)の相対比は表5のようになる。

表4 ノルボルナンのD₀体, D₄体から生ずる2-ノルボルネオールのexo体, endo体の比率等*

生成物 出発物	exo-OH	endo-OH
D ₀ 体	3.4x	x
D ₄ 体	0.76y {D ₃ 75% D ₄ 25%}	y {D ₄ 91% D ₃ 9%}

*文献¹⁵⁾のデータより

表5 D₄-ノルボルナンから生ずる各2-ノルボルネオールの相対比* (endo体総計=1.00)

生成物	D ₃	D ₄	計
exo	0.57	0.19	0.76
endo	0.09	0.91	1.00
計	0.66	1.10	

*文献¹⁵⁾のデータより

exoの水素が引き抜かれたときにエビメリ化の起こる確率は $0.09/(0.57+0.09)=14\%$ であり、同様にendo水素が引き抜かれたときのエビメリ化は $0.19/(0.19+0.91)$ で18%である。これらおよび, exo, endoはD₀体では3.4:1の比で生ずることを考慮すればつぎの式が成り立つ。

$$3.4 = \text{exo体/endo体} = (0.86k_{\text{exo}} + 0.18k_{\text{endo}}) / (0.82k_{\text{endo}} + 0.14k_{\text{exo}})$$

$$\therefore k_{\text{exo}}/k_{\text{endo}} = 6.87$$

したがって, $(k_{\text{H}}/k_{\text{D}}) = (D_4/D_3) \times (k_{\text{exo}}/k_{\text{endo}}) = (1.1/0.66) \times 6.87$ で, この値は11.5となる。このようにノルボルナン酸化の分子内同位体効果の値は(真の値に近いと見られる)大きい値であり, エビメリ化が高率で起こることも考え合せると, この水酸化反応のラジカル機構を示唆する。

5・4 N,N-ジメチルフェンテルミンの代謝¹³⁾ (酵素反応における触媒作用比とコミットメント)

N,N-ジメチルフェンテルミンのNメチル基の, P-450再構成システム(ラットやウサギ)や, ラット肝ミ

クロゾームによる酸化的脱離の同位体効果を調べると, 表6のI, IIの対を用いた分子間同位体効果はV_{max}についても(V_{max}/K_m)についても0.94~1.2となり, 小さい。そこでIII(D₃体)について分子内同位体効果を調べると1.63~1.81となり, 一次同位体効果の存在が確かに示される(もちろん同一反応条件ではD₃体(III)からのD₃脱メチル体(V), D₀脱メチル体(IV)生成の合計速度はD₀(I)→D₀(IV)やD₃(II)→D₃(V)等の生成速度に合致する)。

表6 フェンテルミンの各種D体*

基 質	I	D ₀ 体	R ₁ =R ₂ =CH ₃
	II	D ₃ 体	R ₁ =R ₂ =CD ₃
	III	D ₃ 体	R ₁ =CD ₃ , R ₂ =CH ₃
生成物	IV	D ₀ 体	R ₁ =CH ₃ , R ₂ =H
	V	D ₃ 体	R ₁ =CD ₃ , R ₂ =H

*文献¹³⁾で用いられた化合物

分子内同位体効果が1.6であることの解釈には少なくとも2通りある。

- (1) 真の一次同位体効果がこの値に近く, 小さい
- (2) 真の同位体効果はずっと大きい(酵素反応における他のステップが真の同位体効果をマスクしている)

の2つである。反応がP-450依存であることから後者の考え方を検討している。

共有結合組換えの段階を, それ以外の段階がマスクすることについては, 触媒作用比 (ratio of catalysis) と, 触媒作用へのコミットメント (commitment to catalysis) という概念を軸として, Northropにより詳述されている⁵⁾。ここではあらましを述べるに止める。

酵素反応のステップをつぎの最も単純なモデルで考える:

作用比(R)は触媒作用の速度(k_{3H})と, 生成物-酵素複合体の解離速度(k_4)との比である。またコミットメント(C)とは基質-酵素複合体が生成物-酵素複合体へ変化する速度(=触媒作用速度)(k_{3H})と, 基質-酵素複合体が解離して出発物に戻る速度(k_2)との比である。

これらRやCが大きいとき, 通算の同位体効果は小

さくなる。「分子内」同位体効果を測定すれば「分子間」の場合ほどには、 R や C の入りこむ余地は多くない。それでも、分子内で競争する等価グループが酵素の触媒部位と結合したり、それから解離したりするさい、同位体間で差がなく、かつその速度が遅ければ、「分子内」同位体効果の値を減少させることになる。

N,N -ジメチルフェニルエチルミンの酸化において、互いに競争するグループは2つのメチル基であり、この反応において R や C が大きいの可能性が高い。

5.5 エトキシマリンの脱エチル¹⁰⁾ (真の同位体効果)

前節で述べた C を用いると

$$(V_{\max}/K_m)_H/(V_{\max}/K_m)_D = (k_H/k_D + C)/(1 + C)$$

と書ける⁵⁾ (k は $ES \rightarrow EP$ の速度定数)。トリチウム(T)についても同様の式を立て、両辺から1を引いてその比をとると

$$\frac{\{(V_{\max}/K_m)_H/(V_{\max}/K_m)_D\} - 1}{\{(V_{\max}/K_m)_H/(V_{\max}/K_m)_T\} - 1} = \frac{(k_H/k_D) - 1}{(k_H/k_T) - 1} \quad (1.44)$$

となる。ただし、ここで $(k_H/k_T) = (k_H/k_D)^{1.44}$ (Swainによる¹⁰⁾)を用いている。

左辺は実験で測定できるから、真の同位体効果 k_H/k_D を求めることができる (Northrop⁵⁾)。

Luらは7-エトキシマリンを、ラット肝から得たP-450とP-448を主体とする再構成系で酸化し、その同位体効果を測定した (表7)¹⁰⁾。この値を用いて、再構成系P-450では11.8、P-448では13.5という値を真の同位体効果として提出した。このように両酵素系が類似の値を示すことから、両反応の遷移状態は類似の状態であることが明らかとなる。また、大きい値であるから、酸素が結合する前に、C-Hの遅い切断が起こると考えられ、すでに記した水素引き抜き——ラジカル結合メカニズムであるらしい。

表7 7-エトキシマリンの脱エチル化反応における同位体効果 (膜を含まない酵素再構成系による実験)*

酵素系	$^D(V/K)$	$^T(V/K)$	k_H/k_D
P-450系	3.85	10	11.8
P-448系	1.90	4	13.5

*文献¹⁰⁾のデータより。 $^D(V/K)$, $^T(V/K)$ はそれぞれ $(V_{\max}/K_m)$ のDおよびTの同位体効果

6. おわりに

分子内同位体効果や、トリチウム同位体効果を求め

て、真の同位体効果を求める実験を行うことは困難な場合が多い。しかし「分子間」重水素同位体効果の測定だけなら比較的容易であり、これだけでも貴重な情報を与えてくれる場合が多い。Northrop⁵⁾は、測定値を少しでも大きくし得る実験条件の改変について記しており、参考になろう。たとえば、第二基質の濃度を下げる (アルコールデヒドロゲナーゼによるNADH (またはD)の酸化におけるアセトアルデヒドの濃度); 類似基質に変えてみる (グルタミン酸デヒドロゲナーゼの基質をノルパリンに変えてみる); pHを変化させる; 温度を変える、等である。試みてみるべきであろう。

文 献

- 1) 安藤喬志:「理論有機化学 (反応編)」, 湯川泰秀編, pp. 99~138, 化学同人, 京都 (1974)
- 2) 安藤喬志: 現代化学, 43 (1981)
- 3) 栗原紀夫: 化学, 32, 206 (1977)
- 4) 田中啓司:「ライフサイエンスにおける同位体効果の応用に関する勉強会」要旨, p. 6, 日本アイソトープ協会 (1980)
- 5) Northrop, D.B.: "Isotope Effects on Enzyme-Catalyzed Reactions", eds. Cleland, W.W., et al., pp. 122~52, University Park Press, Baltimore (1977)
- 6) Melander, L. and Saunders, W.H., Jr.: "Reaction Rates of Isotopic Molecules", John Wiley & Sons, New York (1980)
- 7) Tanabe, M. et al.: *Life Sci.*, 8, (1), 1123 (1969)
- 8) Pohl, L.R.: "Reviews in Biochemical Toxicology", Vol. 1, eds. Hodgson, E. et al., pp. 79~107, Elsevier, New York (1979)
- 9) Tanaka, K. et al.: *Pestic. Biochem. Physiol.*, 6, 386 (1976)
- 10) Tanaka, K. et al.: *ibid.*, 6, 392 (1976)
- 11) Kurihara, N. et al.: *ibid.*, 14, 41 (1980)
- 12) Horning, M.G. et al.: "Proc. Int. Conf. Stable Isotopes", 2nd, eds. Klein, E.R. and Klein, P.D., pp. 41~54, Academic Press, New York (1976)
- 13) Miwa, G.T. et al.: *J. Biol. Chem.*, 255, 6049 (1980)
- 14) Hjelmeland, L.M. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 76, 541 (1977)

- 15) Groves, J.T. et al.: *ibid.*, **81**, 154 (1978) 2024 (1975)
- 16) Lu, A.Y.H. et al.: "Microsomes, Drug Oxidations, and Drug Toxicity", eds. Sato, R. and Kato, R., pp. 163~69, Japan Scientific Societies Press, Tokyo (1982)
- 18) Tanaka, K, et al.: *Pestic. Biochem. Physiol.*, **16**, 149 (1981)
- 19) Swain, C.G. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5885 (1958)
- 17) Tomaszewski, J.E. et al.: *Biochemistry*, **14**,
-