薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
106 (8) 619-637 (1986)

チトクロム P-450 を中心とした金属酵素モデル及び生体関連金属イオンに関する 生物無機化学的研究

桜井 弘

徳島大学薬学部, 〒770, 徳島市庄町 1-78

Studies on Bioinorganic Chemistry of Cytochrome P-450 Models and Biometal Ions

HIROMU SAKURAI

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokushima,
Sho-machi 1, Tokushima, 770, Japan*

Redox reactions are involved in some fundamental biological processes such as molecular oxygen activation and oxidation of organic compounds by mono- and di-oxygenases, electron transfer and enzyme reactions by metalloproteins and biometal ions. To clarify the active site structure and functions of cytochrome P-450, several hydrophilic and lipophilic model compounds were constructed by using metalloporphyrins (Fe- and Co-protoheme or tetraphenylporphyrin) and various types of thiol-containing ligands. The active site structure of P-450 in the ferric low-spin state was proposed to have a cysteinate thiolate in the 5th position and an oxygen of H₂O in the 6th position. Aromatic, aliphatic and olefin oxidation activities were found in the metalloporphyrin-thiol ligand systems under oxygen and the active oxygen species was proposed.

Behaviors of biometal ions such as Mn and V in the living systems were studied on the conversion of the valence states by electron spin resonance spectrometry. Functional and active site models for Mn-enzymes such as Mn-dioxygenase and superoxide dismutase or catalase, respectively, were proposed. In addition, redox and complex reactions of vanadate ion with biomolecules such as cysteine, glutathione, ascorbate, adenosine triphosphate, heme proteins as well as some drugs studied.

This review has been discussed on structure and functions of metalloenzymes and significance of biometal ions.

Keywords—biometal ion; redox reaction; metalloenzyme; cytochrome P-450 model; active site structure; oxidation activity; ESR; Mn-distribution; vanadium complex

1. はじめに

生命と遷移金属, 一見無縁とも思えるこの組み合わせに関する問題は, 19 世紀中頃からの分子生物学の新生に伴い関連諸領域の科学者の関心を集めて, 生物無機化学あるいは無機生化学とよばれる新しい学問に成長した. Fe, Cu, Zn, Mn, Co, Cr, V などの遷移金属は, アミノ酸, タンパク質, 核酸などの生体分子と結合し, 種々の生理機能にきわめて本質的な役割を果たしていることが明らかにされた. このような状況の中で, 生体が金属イオンの酸化還元性をいかに巧妙に利用しているかを理解しようとした. そして, 薬学領域の生物無機化学であることを意識し, 薬物代謝に関与する鉄含有酸化還元酵素であるチトクロム P-450 とその化学モデルに関する研究が行われた. 一方, 重要性が認識されているにもかかわらず, Fe や Cu と比べて生物現象との関連がよく理解されていない Mn と V について, これら金属イオンの酸化還元と生理機能との関連性について基礎的研究が行われた. ここでは, これらの問題について考察する.

2. チトクロム P-450 の構造と機能のモデル

哺乳動物の肝細胞小胞体中存在する一原子酸素添加酵素チトクロム P-450 は、薬物、異物や生体物質などの代謝反応を触媒する。^{1,2)} 本酵素の活性中心は、アポ P-450 (タンパク) のシステイン残基のチオレートアニオン (第 5 配位子) が平面をなすプロトヘム錯体に配位した構造をもち、このヘム鉄-硫黄結合が分子状酸素の活性化とそれに続く基質酸化 (Fig. 1), 更に P-450 のもつユニークなスペクトル特性の発現に本質的な役割を果たしていると考えられる。³⁻⁷⁾ 我々は、このヘム鉄-硫黄結合を意識的に適用した P-450 モデルを作成し、構造と機能の両面から P-450 の意義を理解しようとした。

2-1. チトクロム P-450 の構造モデルとスペクトル特性 生理的 pH 7.4 の緩衝溶液中でヘミン (protoheme IX)-チオール配位子 (cysteine (Cys), α -mercaptopropionylglycine (α -MPG), glutathione (GSH)) 錯体は、368, *ca.* 520 と *ca.* 650 nm に吸収極大を示す。これを pyridine (Py) で滴定するとスペクトルは次第に変化し、最終的には 417—418, 537—538 と 560—570⁸⁾ nm に吸収極大が移行する。これらに対応する電子スピン共鳴 (ESR 又は EPR) スペクトルは、77K で $g = ca. 6.5$ と 2.0 にシグナルを与え、酸化型高スピン状態にある錯体。また Py 共存下では $g = 1.93, 2.26, ca. 2.4$ にシグナルを与え、典型的な酸化型低スピン状態にある錯体がそれぞれ生成されていることを示した。Fig. 2 には、hemin-GSH 錯体の電子及び ESR スペクトルを示す。Table I と II には、モデル錯体における結果をそれぞれ高及び低スピン型錯体についてまとめ、チトクロム P-450 系や種々の

Fig. 1. Proposed Oxidation Mechanism by Cytochrome P-450¹⁻⁷⁾

E°, oxidized P-450; E^r, reduced P-450; S, substrate.

Fig. 2. Optical and ESR Spectra of Hemin-Glutathione Complex at pH 7.4¹²⁾

Optical spectra: $T = 293\text{K}$, hemin 0.025 mM, GSH 12.5 mM, Py 0, 23.6, 47.2, 94.4, 118, 236 and 354 mM.
ESR spectra: $T = 77\text{K}$, hemin 5 mM, GSH 200 mM, Py (A) 0, (B) 50 mM, (C) 500 mM.

TABLE I. Optical and ESR Data for High-Spin Species

System	$\lambda_{\max}$ (293°K, pH 7.4)			g -Value	
Hemin	370			5.8	
Hemin-Cys	368	518	653	6.5	2.1
Hemin- α -MPG	368	521	649	6.64	2.25
Hemin-GSH	368	521	652	6.32	
Hemin-Cys-aniline	394	500	636	7.19	2.0
Hemin-GSH-aniline	365	395	520	7.49	2.06
Hemin-GSH-aminopyrin	365	500	650	8.21	2.25
Cytochrome P-450 _{RLM} -S	391	520	646	8.1	3.7
Cytochrome P-450 _{CAM} -S	394	517	647	8.08	3.68

TABLE II. Optical and ESR Properties of Model Compounds

System	(293°K, pH 7.4)			g -Value (77°K)			μ	R	μ/R
	$\lambda_{\max}$			g_x	g_y	g_z			
Hemin-Cys-Py	417.5	537.0	560 ^{sh}	1.926	2.244	2.414	5.49	5.03	1.09
Hemin- α -MPG-Py	418.8	538.8	570 ^{sh}	1.928	2.267	2.447	5.21	4.80	1.09
Hemin-GSH-Py	418.0	538.0	570 ^{sh}	1.931	2.257	2.378	4.97	5.40	0.92
Cytochrome P-450 _{RLM}	415	534	568	1.914	2.244	2.412	5.28	4.91	1.08
Cytochrome P-450 _{CAM}	417	535	578	1.91	2.26	2.45	5.11	4.59	1.11
-S ⁻ -Hm-N<	424	543	571 ^{sh}	1.91—1.95	2.23—2.27	2.34—2.43			0.9—1.1
-S ⁻ -Hm-S-	380	470	565	1.92—1.96	2.23—2.27	2.31—2.41			0.8—0.9
-S ⁻ -Hm-S<	404	431		1.91—1.94	2.23—2.24	2.31—2.35			0.8—0.9
-S ⁻ -Hm-O<	420	535	566	1.95—1.97	2.22—2.24	2.29—2.37			0.8—0.99
>S-Hm-N<				1.24	2.24	3.06			0.17

軸配位形をもつ錯体のデータと比較した。これらの結果から、生理的 pH において、ヘム鉄-チオレート結合をもつ高スピン状態の 5 配位錯体 RS⁻-heme (Fe³⁺), また Py 存在下では低スピン状態の 6 配位錯体 RS⁻-heme (Fe³⁺)-N(Py) が形成されることが見い出された。⁸⁻¹²⁾ GSH は哺乳動物の細胞中に 0.5—20 mM 存在するチオール含有トリペプチドであり、ヘミンへの強い配位子となり得た。

5 配位 hemin-GSH 錯体に 2, 3 の基質を加え差スペクトルを測定すると、酵素で典型的に見い出される type I 及び II の基質差スペクトルが観察された (Fig. 3)。得られた spectral dissociation constant K_s は、P-450 のそれらよりも大きく、したがって錯体-基質結合は、P-450 のそれらよりも弱いことが示唆された。錯体-基質複合体の形成は、ESR g 値からも支持された (Table I).¹²⁾

Chevion らは、休止形で酸化型低スピン状態にある P-450 は、Cys(S⁻)-heme-(N)imidazol から成る軸構造を有すると提案した。¹³⁾ したがって、この可能性を探るため、種々のチオール含有ペプチドを用いたモデル研究が行われた。^{11,14,15)}

MAH, mercaptoacetyl-His; MPH, β -mercaptopropionyl-His; MAGH, mercaptoacetyl-Gly-His; MAAH, mercaptoacetyl-Ala-His; S, H-Cys-Ala-Gly-Ser-OH; T, H-Cys-Ala-Gly-Thr-OH; H, H-Cys-Ala-Gly-His-OH; AS, H-Cys-Ala-Gly-Ala-Ser-OH; AT, H-Cys-Ala-Gly-Ala-Thr-OH; AH, H-Cys-Ala-Gly-Ala-His-OH; Y, H-Cys-Ala-Gly-Tyr-OH; AY, H-Cys-Ala-Gly-Ala-Tyr-OH; AC, H-Cys-Ala-Gly-Ala-Cys-OH; P5, Leu-Ala-Cys-Ser-Leu; P9, Leu-Ala-Cys-Ser-Leu-Ile-Glu-Ser-Leu.

これら水溶性 hemin-thiolatepeptide モデル錯体における結果は、次のように要約された。①Hemin-peptide 錯体の電子及び ESR スペクトルは P-450 のそれらに基本的によく類似するが、hemin-peptide-Py 錯体の電子スペクトルは、休止形 P-450 に特徴的な明瞭な α 吸収帯を示さなかった。②いくつかのペプチドでは、分子内チオレートとイミダゾール窒素が同時にヘミンに結合した環状錯体の形成が観察されたが (Fig. 4), チオレートと

Fig. 3. Difference Spectra of the Model Complex with Substrate [I] and a Double-Reciprocal Plot of Absorbance against Concentration of Type II and I Substrate [II] at pH 7.4¹²⁾

[I] hemin 0.043 mM, GSH 5.5 mM; (A) aniline: a 5.72 mM, b 11.4 mM, c 17.1 mM, d 22.9 mM, e 28.6 mM;
 (B) phenobarbital: a 2.86 mM, b 5.71 mM, c 8.57 mM, d 11.4 mM, e 14.3 mM.
 [II] (A) aniline $\circ$ —, quinoline $\bullet$ —; (B) phenobarbital $\circ$ —, aminopyrine $\bullet$ —.

Fig. 4. Reaction Sequence and the Structures of the Complexes in the Reaction of Hemin and Peptides at pH 7.2^{11,14,15)}

オキシアミノ酸酸素を軸位にもつ環状錯体は形成されなかった. P-450 とその水溶性化学モデル錯体のスペクトル特性の以上のような相異は, 両系の三次元構造, 疎水的環境やヘム鉄周辺の電子状態などの相異に基づくものと考えられた. そこで, 脂溶性環境にある P-450 モデル錯体の開発が試みられた.

精製された緑膿菌 P-450_{cam} や肝ミクロゾームの P-450 の電子スペクトルは, 酸化型低スピン状態において 417 nm に Soret 吸収帯を, *ca.* 570 及び *ca.* 540 nm にそれぞれ明瞭な α と β 吸収帯を示し, α/β 吸収帯の強度比 (α/β ratio) は 1 又はそれ以上の値を与えることは大きな特徴である.

ジクロルメタン中, 5 配位錯体 (4-NO₂C₆H₄S⁻)-Hm(protohemedimethylester) に, 第 6 配位子として種々の化合物を結合させ, 電子及び ESR スペクトルを測定した. Fig. 5 はメタノール錯体のそれらであり, 明らかに P-450 に特徴的な 417 nm の Soret 吸収帯と明瞭な α 吸収帯 (566 nm) が観察された. α/β ratio は 1.0 であり, P-450 のそれとよく一致した. メタノールの代りに長鎖アルコール, イミダゾールやチオール化合物類を結合させても明瞭な α 吸収帯は得られなかった. これらの結果から, P-450 の活性中心の構造として, ヘム鉄の両軸にはシステイン残基のチオレートとオキシアミノ酸残基もしくは水分子の酸素が配位していると提案された.¹⁶⁾ しかし, このモデル錯体は室温大気下ではきわめて不安定であるので, 安定なモデル錯体の開発が試みられた.

アセトン中 hemin もしくは Hm に thioglycolate ethylester (TGE) と tetramethylammonium hydroxide (Me₄NOH) を加えると Soret 吸収帯が 2 本に分裂した hyperporphyrin spectrum (HPS) が観測される. この HPS は bithiolate-hemin (Hm) 軸配位の形成によるものであり, 硫黄 $p' \rightarrow$ ポルフィリン π^* と ポルフィリン $\pi \rightarrow \pi^*$ (p^* は不對硫黄軌道電子) の電子遷移が混合して生ずると考えられている.¹⁷⁾ P-450 にチオール配位子を作用させると同様の HPS が観測され, 本 HPS の出現により P-450 の内因性チオレート配位に大きな根拠が与えられた. Bithiolate-hemin 錯体の ESR スペクトルは, P-450 のそれよりも幾分異方性が低下していることを示す. 本 bithiolate-hemin 錯体をメタノールで滴定するか, 又はメタノールに溶解した hemin をチオレート形

の TGE で滴定すると, TGE(S⁻)-hemin-O-CH₃ 錯体が, 室温大気下で安定的に形成されることが見い出された. 本錯体は, 明瞭な α 吸収帯を示し, α/β ratio は 1.0 であり, P-450 にきわめてよく類似したスペクトル形を示す.¹⁸⁾ しかし, 長鎖アルコールやイミダゾール類が第 6 位に配位しても α/β ratio が 1 に近い錯体は得られなかった. メタノールを H₂O に置換した ESR スペクトルは, g 値の異方性が増大する傾向を示し, したがって P-450 のスペクトルに近接してゆくことが見い出された. これら P-450 モデル錯体と関連錯体及び P-450 系について, ESR の 3 つの g 値から得られる結晶場パラメーター (rhombicity と tetragonality) 相関図を作成するときわめて興味深い結果が得られた (Fig. 6).¹⁹⁾

P-450_{cam}-イミダゾール (Im) 複合体, P-450_{cam} 及び P-450_{cam}-チオレート配位子複合体のそれぞれの 2 つの結晶場パラメーターが作る点群は, 図上で (11 $\rightarrow$ 53 $\rightarrow$ 42) のように移動する. 一方, TGE(S⁻)-hemin-Im, TGE(S⁻)-Hemin-H₂O 及び bisTGE(S⁻)-hemin 錯体の点群は (1 $\rightarrow$ 14 $\rightarrow$ 32), また TGE(S⁻)-Hm-Im, TGE(S⁻)-Hm-MeOH 及び bisTGE(S⁻)-Hm 錯体のそれらは (2 $\rightarrow$ 16 $\rightarrow$ 36) のように移行し, これらはいずれも P-450 系の作る図形と互いに並行関係にある. これは, おそらく両系の三次元構造や疎水的環境の相異から生ずるものと推定されるが, 興味ある点は, native P-450_{cam} に対応する点 (53) は, モデル錯体の第 6 H₂O 又はメタノール配位

Fig. 5. Electronic (77K) and ESR Spectra (100K) of Fe(PPIXDME)(SC₆H₄NO₂)-Methanol Complex¹⁸⁾

— Fe(PPIXDME)(SC₆H₄NO₂)+MeOH; ---- Fe(PPIXDME)Cl+MeOH.
PIXDME=protohemedimethylester.

Fig. 6. Crystal Field Diagram for the Low-Spin Ferric Porphyrin Complexes and Cytochrome P-450¹⁹⁾

Numbers refer to the systems cited from reference.

Fig. 7. Possible Active Site Structure of Cytochrome P-450 in the Ferric Low-Spin State

に対応していることである。つまり、P-450 の第 6 配位子は、 H_2O 分子の酸素であることを示唆していると言える。以上の結果から、P-450 の活性中心を成すヘム鉄の軸方向は、非置換性 soft 塩基としての第 5 シスチンチオレートと触媒サイトの第 6 位には、hard 塩基としての H_2O 分子酸素とで占められると考えられた。かくして P-450 の活性中心の構造は Fig. 7 として描かれる。

この結論を裏づけるチトクロム P-450_{cam} (基質結合型) の結晶構造が、1985 年 12 月 Gunsalus らのグループにより発表された (Fig. 8).²⁰⁾ P-450_{cam} は 414 個のアミノ酸残基をもち、ヘムへのチオレート配位子は helix L の N 末端近くの Cys-357 であり、これは Phe-350, Leu-358 と Gln-360 のつくる pocket 中に入りこみ疎水的環境にある。基質 camphor 結合型 P-450_{cam} のヘム近傍はチオレート配位に基づく 5 配位構造をしており、第 6 位周辺には camphor が水素結合を介して配置され、かつ O_2 分子が結合できる十分な空間が見出される。しか

Fig. 8. Crystal Structure and Heme Binding Site of Cytochrome P-450_{cam}²⁰⁾

A 37–45, B 67–79, C 108–121, D 123–143, E 149–156, F 176–185, G 192–205, H 218–225, I 234–267, J 268–276, K 282–292, L 359–378. $\beta 1$ 56–62, $\beta 2$ 226–233, $\beta 3$ 297–301, 315–320, $\beta 4$ 305–312, $\beta 5$ 390–400.

し、酸素や窒素を含むアミノ酸残基は、第6位近傍には見い出されないので、酸化型低スピン状態の第6配位子としては、 H_2O もしくは ^-OH が結合するのではないかと推定されている。

ヘムタンパクのコバルト置換は、native タンパクでは解明できない物性を明らかにするためによく用いられる方法である。Wagner らにより再構成されたコバルト置換 P-450_{cam} (Co-P-450_{cam})²¹⁾ の活性中心の構造が、先の HPS の配位子置換反応法を組み合わせることで検討された。²²⁾ TGE(S⁻)-CoPPIX (Co-protoheme IX)-OCH₃ 錯体のスペクトルは Co-P-450_{cam} のそれに本質的に類似するが、詳細なスペクトルの比較から、第6配位子がエチルアルコールの時、Soret 吸収帯及び α/β ratio は最もよく Co-P-450_{cam} のそれらに一致した。したがって、Co-P-450_{cam} の活性中心は、-Cys(S⁻)-CoPPIX-OR (オキシアミノ酸残基) と推定され、native P-450_{cam} における第6 H_2O 配位は示唆されなかった。Co-P-450_{cam} の基質酸化活性は、native P-450_{cam} と比べてかなり低いと報告されている。コバルト置換により、タンパク三次元構造が変化し、native P-450_{cam} の軸配位は水からオキシアミノ酸残基の酸素に変化したかもしれないと予想された。

チトクロム P-450 の活性中心の構造を考察する経過の中で、安定な HPS を示すビスチオレート-金属ポルフィリン錯体が形成されることが見い出された。本錯体は錯体化学的にも特異な構造を有しているため、興味もた

Fig. 9. Electronic Spectrum of Bisthiolate-Co(III)TPP Complex at Room Temperature and ESR Spectrum of Superoxide Anion at 77K²³⁾

These spectra were obtained with the mixture consisting of Co(II)TPP, TGE and Me_4NOH under air at room temperature.

れている。Co(II)TPP(TPP=tetraphenylporphyrin)に TGE とアルカリ (Me_4NOH) を加えると、室温大気下で Soret 吸収帯が 2 本に分裂した特徴的な電子スペクトル HPS が観測される (Fig. 9)。HPS は一定の半減期を有し分解してゆくが、TGE を更に加えるかあるいは空気又は O_2 を導通すると元の HPS を回復する。HPS を生成する条件で ESR スペクトルを測定すると、 g 値 ($g_{\parallel}=2.084$, $g_{\perp}=2.006$) とその線型から遊離形の superoxide anion O_2^- が產生されている (Fig. 9) ことが見い出された。²³⁾ 真空下や微量 O_2 共存下の ESR をスペクトルを測定して、反応中間体を検出し、 O_2^- 生成機構が明らかにされた (Fig. 10)。^{23,24)} 同様に、Fe(III)TPP-²⁵⁾ や Rh(III)OEP(OEP=octaethylporphyrin)²⁶⁾-thiolate 錯体においても、HPS と O_2^- の同時生成が見い出され、それぞれにおいて反応機構が提案された。これら金属ポルフィリン錯体による O_2^- 産生は、チトクロム P-450 による酸素分子の活性化機構あるいは生体の活性酸素の反応性を考察する²⁷⁾上に重要な知見を与えるであろうと考えられる。なお Cr(III)TPP²⁸⁾ や Mn(III)TPP²⁹⁾ においても安定なビスチオレート-金属ポルフィリン錯体の形成が見い出されている。このようなビスチオレート-金属ポルフィリン錯体の形成は、これまでポルフィリンの中心金属が Mn, Fe, Co, Cr と Rh について検出され、一般性が見い出されるに至っており、錯体の構造と触媒機能の両面から、今後の研究の展開が期待される。

Fig. 10. Possible Reaction Mechanism for Superoxide Generation by CoTTP-Thiolate Model Complex^{23,24)}

2-2. チトクロム P-450 の機能モデル P-450 による一原子酸素添加反応には、位置選択的及び立体特異的反応が見られる他に、NIH shift として知られるユニークな転位反応が見い出されている。NIH shift は、基質上の水酸化される位置にある芳香環上の置換基が隣接する位置へ転移 (shift) する反応であり、NIH (National Institute of Health, U.S.A.) の研究者らにより見い出された。³⁰⁾ これらの諸反応は、P-450 機能モデルの評価のために、しばしば用いられている。したがって、ヘム鉄-チオール配位子モデル錯体が、P-450 反応のこれらの特性を有しているかどうかを評価するため、すでに知られている著名な Fenton 系 ($\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$)、Hamilton 系 ($\text{Fe}^{3+}/\text{catechol}/\text{H}_2\text{O}_2$) や Udenfriend 系 ($\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}/\text{ascorbic acid}(\text{Asc})/\text{O}_2$) などによる反応と比較しつつ検討された。

ヘミン-チオール配位子錯体による aniline の酸化反応において、ヘミン/チオール配位子/ O_2 の 3 成分のうちどれを欠いても、またチオール配位子の代りにメチル化チオール配位子を用いても、アニリン酸化は見られなかった。この事実は、ヘミン-チオール配位子錯体中のチオレート-鉄結合が分子状酸素を活性化し、続いてアニリンをアミノフェノール類へ酸化していると考えられた。水酸化の方向 (位置選択性) は、チオール配位子の構造、反応 pH や時間に関係している。脂肪族チオール配位子は、 p/o 比 (p -aminophenol と o -aminophenol の生成比) が 1 以上の値を示すのに対し、芳香族チオール配位子は 1 以下の値を示した。これらの結果は、アニリン投与動物の尿中に見い出される p/o 比の結果と比較するときわめて興味深い (Fig. 11)。³¹⁾ 同様の錯体によるアセトアニリドの酸化反応においては、Table III に見られるように、モデル錯体は、ミクロゾーム系に類似の酸化活性を示した。しかし、Cu(II)-Asc 系は、 $o->p->m$ -acetoaminophenol (AAP) の順で水酸化を促進し、ヘミン-チオール配位子モデル錯体やミクロゾーム系とは逆の位置選択性を示し、したがって反応機構における相異が推察された。Hemin-thioglycolate ethylhexylester (TGEH) 錯体に、TGEH と異なる酸化還元電位をもつ Cys や Asc のような還元剤を加えると acetanilide の酸化収率は増大し、P-450 反応における 2 電子要求反応との類似性が観測されている。³²⁾

ヘミン-チオール配位子錯体による NIH shift 発現の可能性は、次の 3 種類の基質を用いて、メチル基 NIH

Fig. 11. Ratio of *p*- to *o*-Aminophenol Formed in the Hemin-Thiol (I) and Ferrous Ion-Thiol (II) Model Systems³¹⁾

Thiol compound: ferrous ion or hemin: aniline 10^{-1} M: 10^{-3} M: 10^{-1} M.

Thiol compound:

(A) cysteine	○	pH 4,	●	pH 6
(B) cysteine methyl ester	○	pH 4,	●	pH 6
cysteamine	△	pH 4,	▲	pH 6
<i>o</i> -aminobenzenethiol	◇			
(C) <i>N</i> -acetyl-cysteine	○	pH 4,	■	pH 6
β-mercaptopropionic acid	□		◆	pH 6
thiosalicylic acid	◇			

shift が検討された (Chart 1).³³⁻³⁵⁾ P-450 モデル錯体ではマイクロゾーム系による反応と比較して約 1/10 の活性を示し、明らかにメチル基が *p* 位から *m* 位へ転位することが観察された。特にチオール基とカルボン酸エステルを含む配位子を含む系で高いシフト率が見いだされた。同一条件下の Fenton 系や Udenfriend 系では、メチル基 NIH shift は見いだされなかったが、最近、非プロトン性溶媒中の Fenton 系による NIH shift が観測され、その反応機構に興味を持たれている。³⁶⁾

ヘミン-チオール配位子錯体による基質酸化における環境場がアセトン溶媒中で検討され、Cys や CysEt など生物学的に重要なチオール配位子を含む系で、誘電率が 30—40 (一般のタンパクの極性値に対応) の時、反応が最大となることが見いだされている。³⁷⁾

ヘミン-チオール配位子錯体による基質酸化の機構が阻害実験法により検討された。・OH radical scavengers,

TABLE III. Hydroxylation of Acetanilide by Model Systems and Rat Liver Microsomal Fractions³²⁾

System	pH	Acetone (%)	Total yield (μmol)	Conversion (%/2 h)	Product ratio		
					<i>p</i> -AAP: <i>m</i> -AAP: <i>o</i> -AAP		
Hm-Cys	4.0	50	24.09±0.94	2.41	53.3	5.8	40.9
Hm-CysE	4.0	50	31.89±0.44	3.10	55.8	4.4	39.9
Hm-TGE	4.0	50	11.74±0.54	1.17	57.8	3.7	38.5
Hm-TGB	4.0	50	10.80±0.22	1.08	54.9	4.5	40.6
Hm-TGO	4.0	50	10.09±0.31	1.01	55.2	4.2	40.7
Hm-TGEH	4.0	50	20.43±0.04	2.04	46.7	7.3	46.0
Hm-TGOD	4.0	50	12.49±0.49	1.25	56.0	4.1	39.9
Hm-TGEH-Cys	4.5	50	33.16±0.43	3.32	57.9	5.5	36.7
Hm-TGEH-Asc	4.0	50	41.44±2.40	4.14	46.4	12.1	41.6
Fe(II)-Cys	5.0	50	22.63±1.09	2.26	57.6	5.4	37.0
Cu(II)	4.5	50	—	—			
Asc	4.5	50	1.38	0.17	44.9	16.7	38.4
H ₂ O ₂	4.5	50	0.18	0.22	100	0	0
Cu(II)-Asc	4.5	50	14.53	1.83	37.9	22.9	39.2
Cu(II)-H ₂ O ₂	4.5	50	1.68	0.21	48.8	13.1	38.1
Cu(II)-Asc-H ₂ O ₂	4.5	50	3.76	0.47	45.5	7.7	46.8
Asc-H ₂ O ₂	4.5	50	4.86	0.61	42.0	6.2	51.8
Cu(II)-Asc	3.0	50	2.12±0.09	0.27	34.4	34.4	31.1
	3.5	50	2.03±0.08	0.25	35.5	33.5	31.0
	4.0	50	20.09±0.20	2.51	33.8	23.2	43.1
	4.5	50	10.75±0.50	1.34	39.0	19.4	41.6
	5.0	50	10.25±0.22	1.28	41.4	16.3	42.3
		Microsomes (mg protein/ml incub. mix.)	P-450 content (nmol/ml incub. mix.)	Rate of AAP formation (nmol/mg prot./30 min)	Product ratio		
					<i>p</i> -AAP: <i>m</i> -AAP: <i>o</i> -AAP		
105 000× <i>g</i> microsomes							
System (A)		2	1.95	38.1	50.0	2.6	47.4
System (B)		2	1.95	40.5	69.6	13.0	17.4
System (C)		5	4.86	22.6	64.6	8.0	27.4

TGO=thioglycolate octyl ester; TGOD=thioglycolate octadecyl ester.

Chart 1

Fig. 12. Possible Hydroxylation Mechanism by Hemin-Thiol Ligand Model Complex for Cytochrome P-450³⁸⁾

superoxide dismutase (SOD), catalase や一重項酸素消去剤が添加された系は、酸化反応にはほとんど影響が見られず、ミクロゾーム P-450 による反応とよく類似した傾向が見出された。スペクトル特性などの結果を総合して、酸化活性を示す活性酸素種として Fig. 12 に示される平衡混合物 (A) から成るフェリルイオン種が提案された。³⁸⁾ チオレートを含むフェリルイオン種においては、チオレート基がヘム鉄を介して酸素原子に電子を押し出すことが可能であり、基質に酸素原子を添加することが出来ると考えられる。

以上の諸結果に基づいて、水溶性ヘム鉄-チオール配位子錯体は、P-450 にきわめてよく類似した基質酸化活性を示し、したがって P-450 の水溶性機能モデルとして提案されている。

肝ミクロゾームの P-450 は、脂溶性酵素であることを考慮し、新しい脂溶性機能モデルの開発が試みられている。同時に、ヒトにおける真の薬物代謝反応を知ることを目的として、肝細胞による薬物代謝反応が検討され、脂溶性機能モデルの結果が、ミクロゾーム P-450 及び肝細胞による基質酸化反応と比較されている。脂溶性機能モデルの開発にあたり、次に示されるような生体成分系のモデル系への置き換えを行い、肝細胞のモデル化を目指し、気-液-固相の複合相からなる反応系での検討が行われた。

金属ポルフィリン/ NaBH_4 系は、ベンゼン溶媒中でキャリアーとして crown ether (dibenzo-18-crown-6) を用いる時、cyclohexene に対し高い酸化活性を示し、現在知られている関連の化学モデル系の中で最も効率のよい系であることが見出された (Table IV).³⁹⁾ 更に、金属ポルフィリンに対して軸配位子となり、かつベンゼン溶

TABLE IV. Oxidation of Cyclohexene by Various Model Systems³⁹⁾

System	Reaction time (h)	Yield (based on metalloporphyrin) (%)				
Mn(TPP)Cl- NaBH_4 - O_2	3	—	1.5	—	—	5.9
Mn(TPP)Cl- O_2	3	0.12	1.1	4.8	—	—
Mn(TPP)Cl-ascorbate- O_2	10	230	—	—	—	—
Cr(TPP)Cl-iodosylbenzene		2.6	49.5	13.9	—	—
Fe(TPP)Cl-iodosylbenzene	1	42	11	—	—	—
Mn(TPP)Cl-Pt- H_2 - O_2 -imidazole	14	6470	Trace	440	—	—
Ru(OEP)(PPh ₃)Br-iodosylbenzene	6	227	386	772	114	—
Mn(TPP)Cl- NaBH_4 -crown ether- O_2 ^{a)}	5	1095	3852	643	1440	11600
Mn(TPP)- BaBH_4 -avicol- O_2 ^{a)}	24	221	12014	814	339	15578
Rat liver 9 000 g supernatant (μmol (ml incubating mixture) ⁻¹) ^{a)}						
Control	0.17	0.06	0.93	—	—	—
PB-treated ^{b)}	0.17	4.47	5.14	0.03	—	—
Isolated rat hepatocytes (conversion %/substrate)						
Control	0.17	0.92	1.05	1.75	0.32	0.17
PB-treated	0.17	0.13	0.95	0.47	0	0.18

a) Present work (average of two or three experiments). b) PB=phenobarbital.
PPh₃=triphenylphosphine.

TABLE V. Cyclohexene Oxidations by Biological Systems and Model Systems⁴⁰⁾

System	Reaction time (h)	Relative yield (%)					Total yield/ (%)

Isolated rat hepatocytes	1/6	21.9	4.0	24.9	7.5	41.6	4.12
Microsomes (P-450)	1/6	46.4	0	53.5	0	0.3	
System	Reaction time (h)	Relative yield (%)					Total yield ^{a)} (%)

MnTPP/Cys	1	21.4	6.0	25.5	6.8	40.3	4193
	6	14.6	4.5	22.4	0	58.5	6189
	24	9.9	3.5	24.0	0	62.6	9080
MnTPP/Pen	1	18.7	2.7	26.9	4.3	46.0	4864
	6	15.6	2.5	26.3	3.5	52.1	5889
	24	9.0	1.6	34.9	2.0	52.3	10483
MnTPP/NaBH ₄	1	14.3	8.5	14.4	12.8	49.8	5125
	6	9.0	11.9	18.0	9.4	51.7	8990
	24	7.1	15.6	18.3	7.5	51.5	11937
MnTPP/Cys/OH ⁻	1	39.4	0	15.6	0	45.0	1823
	6	43.0	7.1	49.9	0	0	1879
MnTPP/Pen/OH ⁻	1	20.8	2.9	76.2	0	0	4166
	6	24.8	3.1	72.1	0	0	4025
	24	20.8	2.9	78.3	0	0	4108
MnTPP/OH ⁻	1	20.4	2.3	43.6	1.9	31.9	4786
	6	22.1	2.9	55.0	1.7	23.3	4497
	24	24.3	2.7	55.9	1.9	15.2	4185

a) Based on MnTPP.

媒中で固体相をも形成しうる両機能性チオール化合物 Cys や penicillamine (Pen) と金属ポルフィリン系によるシクロヘキセンの酸化反応が検討された。Table V に見られるように、MnTPP-チオール配位子系は、遊離肝細胞での反応を、一方、MnTPP-チオレート配位子系 (MnTPP/Cys or Pen/OH⁻ 系) はミクロゾーム P-450 での反応をほぼ完全にシミュレートしていることが見出された。⁴⁰⁾ 水溶性機能モデルにおける観察と同様に、脂溶性機能モデルにおいても、基質酸化におけるチオレート配位子つまり硫黄-金属結合の重要性が認識された。脂溶性金属ポルフィリン-チオレート錯体による機能性 P-450 モデルもしくは薬物代謝機能をもつ人工肝細胞の開発が展開されている。

3. マンガンイオンに関する生物無機化学

マンガンイオン (Mn) は、ヒト、動物及び植物にとって必須微量元素であることが 1931 年に証明されている。現象的には、Mn 欠乏は骨の発育異常、不妊や運動失調などが、一方 Mn 過剰は、成長不良、Ca や P の取り込みへの干渉、ヘモグロビン形成の減少、錐体外路系の神経障害や甲状腺の肥大化などが知られている。分子レベルでは、Mg イオンと競合し Mn により活性化される酵素と Mn を強く結合しているマンガン酵素の存在が知られている。前者には、一群の peptidases, phosphatases, polymerases や arginase などが、また後者には pyruvate carboxylase, glutamine synthetase, superoxide dismutase, dioxygenase や catalase などが分類される。

ヒトにおいて約0.1 gが全身に分布する Mn は、Fe, Zn, Cu などと並んで必須微量元素の中ではとりわけ重要な元素であり、多くの研究が蓄積されているにもかかわらず、Mn のもつ真の生物学的役割はなお未解決であると考えられている。そこで Mn に関する生理機能-細胞レベル-分子レベルにおける総合的な研究を行うことが、Mn のもつ本質的な役割を理解するカギを握っているのではないかと考え、基礎的研究が行われている。

Mn は自然界には +7—3 の 11 種類の原子価状態を取りうるが、この中で 5 個の 3d 電子と比較的長いスピン緩和時間をもつ 2 価 Mn (Mn(II)) は、室温及び液体窒素温度 77K で、ESR 法により容易に観測される。⁴¹⁾ また、生体試料中の全 Mn 量は、中性子放射化分析法により高感度に定量されうる。⁴²⁾

未処置及び MnCl₂ 投与ラットの臓器中の総 Mn, Mn(II) 及び Mn(II)/総 Mn 比を Table VI に示す。肝臓中の総 Mn 量を 1 とすると、未処置ラットでは、甲状腺には肝臓 Mn の約 1.2 倍の Mn が存在し、他の臓器では肝臓 Mn を越えるものがなかった。MnCl₂ を 2 週間投与すると全臓器中の Mn 量は増大し、脾臓 (6.2) > 下垂体 (2.9) > 副腎 (2.4) > 腎臓 (2.1) > 甲状腺 (1.7) > 睾丸 (1.1) の順となり、Mn 分布は未処置の場合と異なり変動している。また、ホルモン産生に関連する臓器において Mn が選択的に蓄積される特徴的な現象が思い出された。更に、未処置及び MnCl₂ 投与ラットの各臓器中の総 Mn に対する Mn(II) の割合は、きわめて低く、Mn (II) は内因性物質により酸化還元反応を受け、他の原子価状態おそらく Mn(III) として、各臓器に取り込まれていることが明らかにされた。そこで金属代謝反応において重要な役割を果たしていると考えられる肝、腎及び脾臓の細胞下画分における Mn 分布が調べられた (Table VII)。肝及び腎臓では、未処置及び MnCl₂ 投与群共に、総 Mn 量はミトコンドリア > 核 > ミクロソーム > 上清の順に減少し、Mn の大部分はミトコンドリアと核画分に集中している。臓器間分布で見い出された傾向と同様に、肝及び腎臓内においても Mn(II) 量は少なく、Mn の原子価を変動させる代謝機構の存在が予想された。脾臓では、上記臓器における傾向とは逆に、ミクロソーム > 上清 > ミトコンドリア > 核の順の Mn 分布を示した。MnCl₂ 投与核画分は、約 60% の Mn(II) が存在していることは、他の臓器に見られない大きな特徴である。

Mn が真に核やミトコンドリア画分に蓄積されているかどうかを明らかにするため、粗及び精製画分中の Mn 量が検討され、両画分共に、精製により Mn の存在比が未精製画分に比べて増大し、Mn がこれら画分中に強く結合していることが見い出されている (Table VIII)。⁴²⁾

これら精製画分中の Mn は、可溶化、ゲル濾過及び高速液体クロマトグラフィー法により更に分離されたところ

TABLE VI. Distribution of Total and Divalent Manganese in Various Rat Tissues⁴²⁾

Organ	Control			MnCl ₂ -treated			Percent change of total Mn
	Mn level (nmol/g protein)		Ratio (%) Mn ²⁺ /total Mn	Mn level (nmol/g protein)		Ratio (%) Mn ²⁺ /total Mn	
	Total Mn	Mn ²⁺		Total Mn	Mn ²⁺		
Cerebrum	10.5 (0.22)	n.d.	—	70.7 (0.77)	1.6	2.3	573
Cerebellum	13.1 (0.27)	n.d.	—	38.3 (0.42)	2.3	6.0	192
Hypophysis	35.4 (0.73)	n.d.	—	265.4 (2.89)	1.4	5.3	650
Thyroid	58.6 (1.21)	n.d.	—	152.6 (1.66)	4.0	2.6	160
Thymus	4.0 (0.08)	n.d.	—	27.1 (0.30)	0.3	1.1	578
Heart	6.6 (0.14)	n.d.	—	32.5 (0.35)	2.8	8.6	392
Lung	5.5 (0.11)	n.d.	—	13.6 (0.15)	n.d.	—	147
Liver	48.3 (1.00)	0.6	1.2	91.7 (1.00)	3.5	3.8	90
Spleen	4.9 (0.10)	n.d.	—	15.8 (0.17)	0.7	4.4	222
Pancreas	19.5 (0.41)	1.2	6.2	571.9 (6.24)	14.6	2.6	2833
Kidney	19.8 (0.40)	3.1	15.6	191.8 (2.09)	5.3	2.8	869
Adrenal	32.2 (0.67)	0.4	1.2	217.4 (2.37)	4.4	2.0	575
Testis	6.8 (0.14)	0.1	1.5	96.7 (1.05)	1.3	1.3	1322

Data are means of two replicate experiments on pooled samples from 5 rats. Values in parentheses are ratios of the total Mn level in the tissue to that in the liver. n.d., not detected. Percent change in total Mn was calculated by the following equation: [(total Mn in MnCl₂-treated rats) - (total Mn in control rats)] / (total Mn in control rats) × 100.

TABLE VII. Distributions of Total and Divalent Manganese in Subcellular Fractions of Rat Liver, Kidney and Pancreas⁴²⁾

Subcellular fraction	Liver			Kidney			Pancreas		
	Mn level (nmol/g prot.)		Ratio (%)	Mn level (nmol/g prot.)		Ratio (%)	Mn level (nmol/g prot.)		Ratio (%)
	Total Mn	Mn ²⁺		Total Mn	Mn ²⁺		Total Mn	Mn ²⁺	
Control									
Nuclei	109.3	1.8	1.6	36.3	0.9	2.5	36.7	2.8	7.6
Mitochondria	144.6	2.9	2.0	64.0	1.5	2.3	55.6	6.8	12.2
Microsomes	12.6	3.5	20.7	5.1	0.7	13.7	82.5	12.8	15.5
Supernatant	23.2	0.8	3.4	0.0	n.d.	—	63.5	5.2	8.2
MnCl ₂ -treated									
Nuclei	173.2	4.4	2.5	296.1	8.0	2.7	86.0	49.8	57.9
Mitochondria	176.7	5.3	3.0	577.0	13.7	2.4	845.6	57.9	6.8
Microsomes	26.0	2.8	10.8	178.0	8.4	4.7	1918.0	93.7	4.9
Supernatant	55.8	1.0	1.8	120.2	1.7	1.4	1144.2	59.6	5.2

Values are means of two replicate experiments on pooled samples from 5 rats. Ratio (%) means (Mn²⁺/total Mn) × 100.

TABLE VIII. Total Manganese Contents of Crude and Purified Nuclear and Mitochondrial Fractions of Rat Liver⁴²⁾

Fraction		Total Mn content (nmol/g protein)		Percent change of Mn content on purification ^{a)}
		Crude fraction (A)	Partially purified fraction (B)	
Nuclei	Control	36.7	429.8	1071
	MnCl ₂ -treated	86.0	880.5	924
Mitochondria	Control	44.3	92.5	109
	MnCl ₂ -treated	68.4	170.7	150

Values are means for two replicate experiments on pooled samples from 4 rats.

a) Calculated by the following formula: [(B) - (A)] / (A) × 100.

ろ、ミトコンドリア中の Mn は、分子量 *ca.* 10⁶ と 1.3—1.4 × 10⁵ に相当するタンパクに結合していること、また核では、主に deoxyribonucleic acid 中に Mn が取り込まれていることが明らかにされている。⁴³⁾ ミトコンドリア中に見出される Mn を含むタンパク画分は、従来からよく知られている pyruvate carboxylase を含む画分に対応しており、今後の研究の展開に興味が持たれている。

一方、Mn 酵素の機能的化学モデル化が、錯体化学的手法を用いて検討されている。O₂ 共存下で生成する緑色 Pen-Mn(II) 錯体は、配位子: Mn(II) が 1:1 で結合し、Pen のチオレートとアミノ基から Mn(II) に配位している。本錯体は、室温で可逆的に O₂ を脱着し、pH 7.0—7.5 では、O₂ 付加錯体は catechol 分子に対して酸化的 extradiol 切断反応つまり二原子酸素添加反応を触媒することが見い出されている。したがって、Pen-Mn(II) 錯

体は, *Bacillus brevis* に見い出される Mn 含有 extradiol 切断酵素, dihydroxyphenylacetate 2,3-dioxygenase の機能性化学モデルとなりうることが提案されている。⁴⁴⁾

先に述べたように, 生体内の Mn は 2 価以外の原子価状態で存在することが明らかにされている. Phosphatases, SOD や catalase などの Mn 酵素は, 3 価状態の Mn(III) を有していることが明らかにされており, Mn(III) の生理機能が注目されている.

Mn(III) を含む SOD や catalase の活性中心の構造が錯体化学的に検討されている. 数十種の配位子と Mn(III) との錯体が調べられた結果, pyridine 2,6-dicarboxylic acid-Mn(III) 錯体が, これら両酵素の金属結合部位の構造によく類似することが見い出されている. この結果は, これら酵素中の Mn(III) 結合部位には少なくとも 2 個以上のアミノ酸残基の窒素 (イミダゾール性) と酸素が存在していることを示している。⁴⁵⁾

4. バナジウムイオンに関する生物無機化学

バナジウムイオン (V) は, ヒト体内には約 15 mg 存在し, 1971 年必須微量元素であることが明らかにされている. 現象的には, V 欠乏は, 成長の阻害や生殖機能の低下を生じ, 一方 V 過剰は, コレステロールの合成が抑制され, 血液中のコレステロール量が低下することなどを引き起こすことが知られている. 1977 年, Cantley らにより, 5 価形 vanadate (VO_5^- 又は VO_5^{3-}) が Na^+ , K^+ -ATPase の強い阻害剤であることが見い出され,⁴⁶⁾ その後 V と高血圧症との関係などが研究され, 微量元素としての V の生理作用や生物無機化学に関心が集められるようになった.

Fig. 13. ESR Spectra at 77K of the Mitochondrial Fraction of Rat Liver treated with NaVO_3 (a) and Plot of g_0 -Values vs. A_0 -Values for Various Types of Square Pyramidal Oxovanadium (IV) Complexes (b)⁴⁷⁾

Points, 1 and 2, are the values for microsomal supernatant and mitochondrial fractions containing oxovanadium (IV), respectively.

V の生理作用を、その化学形や原子価状態から理解しようとして、V の安定形である **vanadate** が動物に投与されたところ、還元された 4 価 V **vanadyl ion** (VO^{2+}) として、肝細胞下画分、ミトコンドリアとミクロソーム上清に取り込まれていることが ESR 法により見いだされている (Fig. 13-a). その ESR パラメーターを、種々の配位形をもつ **vanadyl** 錯体と比較解析すると (Fig. 13-b), 生体 **vanadyl ion** は、タンパク結合し、その金属部位は、右図のようなオキシアミノ酸残基の酸素を平面配位子とした **square pyramidal** 構造をとっていることが明らかにされている。⁴⁷⁾

したがって、**vanadate** を還元しうる可能性のある内因性物質としての **GSH**, **Cys**, **nicotinamide adenine dinucleotide phosphate**, **nicotinamide adenine dinucleotide**, **Asc** や **catechol** など **vanadate** の反応が検討されている。例えば、**Cys** と **vanadyl** 及び **vanadate ion** とは、次のように、酸化還元的に錯形成反応をすることが明らかにされた。⁴⁸⁾

(A)

(B)

これらの反応において形成される **Cys-VO**²⁺ 錯体は、**CysMe** を用いると紫色錯体として単離され、⁴⁹⁾ その結晶構造が明らかにされている (Fig. 14).⁵⁰⁾ 錯体は、**square pyramidal** 構造をしており、2 分子の **CysMe** は互いに V に対して **trans** 配位している。O₁-V-N 及び O₁-V-S のつくる結合角はそれぞれ 98.06° と 114.13° であり、V 原子は S_N のつくる平面から少し浮き上っている。

生体内で還元的に生成された **vanadyl ion** は、種々の生体物質と反応し、錯体形成や生理作用に関連

Fig. 14. Crystal Structure of Cysteine-methyl-ester-Vanadyl Complex⁵⁰⁾

Fig. 15. Possible Structures of Three Types of ATP-Vanadyl Complex^{51,52)}

[A], blue 1:1 ATP-vanadyl complex in acidic pH region; [B], blue 1:1 ATP-vanadyl complex in neutral pH region; [C], green 2:1 ATP-vanadyl complex in alkaline pH region.

すると期待される。

例えば、V が Na^+ 、 K^+ -ATPase の阻害剤として機能することから、この酵素の基質である ATP やその関連化合物と VO^{2+} との反応は十分に考えられる。詳細に検討された結果、反応 pH に依存して、青色と緑色の 3 種類の錯体の構造が明らかにされている (Fig. 15).^{51,52)}

V は血液を介して全身に運搬されると考えられ、したがって、vanadyl ion と血液タンパクの酸化形ヘモグロビン (Hb) やミオグロビン (Mb) との反応が検討されている。Vanadyl ion は Fe^{3+} -Hb を還元し Fe^{2+} -Hb が生成され、したがってヘムタンパクの O_2 親和性を増大させることが見い出され、反応機構は次のように考えられている。⁵³⁾ Vanadyl ion と Hb や Mb との酸化還元反応は V の生理的役割を考える上に重要な知見となるかもしれない。

一方、臨床レベルでは、躁うつ病の病因に V が関係しているかもしれないことが報告されている。この疾病は、 Na^+ の膜輸送を変化させる imipramine (IP) や chlorpromazine (CPZ) などにより治療されるので、疾病、

Na^+ 、 K^+ -ATPase、治療薬及び V は相互に密接な関連性を有していることが予想される。そこで基礎的に、これら治療薬と vanadate ion との反応が検討されている。薬物は vanadate ion により酸化され、比較的安定な free

Fig. 16. ESR Spectra of Vanadyl Ion (a) and Chlorpromazine Free Radical (b) Measured at Room Temperature⁵⁵⁾

The reaction mixture contained CPZ and NaVO_3 .

radical ion を生じ、一方この反応に共役して vanadate ion は vanadyl ion に還元されることが明らかにされ (Fig. 16)、次のような反応機構が考えられている。^{54,55)}

5. おわりに

生体酸化還元を基本にして、チトクロム P-450 とそのモデル、マンガン及びバナジウムなどの生体関連金属の生理機能と化学形に関する生物無機化学的研究の一端を紹介した。生体金属や生体錯体は、その特有の配位構造や物理化学的特性をたくみに利用して酸化還元に基づく種々の生理機能（気体分子の活性化と取り込み、有機物質の化学的変換と代謝、電子移動、酵素反応の制御など）を効率よく営んでいる。生体金属や金属酵素のこれらの役割を十分に理解し得たならば、我々はこれらを積極的に用い、人工酵素 P-450 や人工肝臓の開発そして、健康、医療や環境問題の改善など実用的応用への道を開くことが出来るであろう。

謝辞 本研究を行うにあたり、ご指導、ご教示、ご協力そしてご支援を下さいました徳島大学薬学部 下村滋教授、久保田晴寿教授、川田 純教授、松浦 博教授、西田幹夫助教授、五郎丸 毅助教授、渋谷雅之助教授、愛媛大学理学部 石津和彦教授、神戸学院大学薬学部 川崎紘一教授、兵庫県公害研究所 吉村哲彦博士、京都薬科大学 富士谷憲徳助教授、慶応義塾大学医学部 加藤隆一教授、京都大学原子炉実験所 小山睦夫助教授、高田実弥博士、徳島文理大学薬学部 佐藤利夫教授、イリノイ大学 I. C. Gunsalus 教授、コンスタンツ大学 V. Ullrich 教授そして京都大学薬学部 田中 久教授に心から厚く感謝申し上げます。更に本研究は、徳島大学薬学部薬品分析学講座、中央機器室、愛媛大学理学部化学科講造化学教室の多数の方々のご協力とご努力によって遂行されたものであり深く感謝申し上げます。

引 用 文 献

- 1) 佐藤 了編, “薬物代謝—肝小胞体を中心として,” 講談社, 東京, 1973.
- 2) R. Sato, T. Omura, “Cytochrome P-450,” Kodansha, Tokyo, Academic Press, New York, 1978.
- 3) V. Ullrich, *Top. Curr. Chem.*, **83**, 68 (1979).
- 4) R. E. White, M. J. Coon, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 315 (1980).
- 5) M. J. Coon, R. E. White, “Metal Ion Activation of Dioxygen,” ed. by T. G. Spiro, Wiley-Interscience Publ., New York, 1983, p. 73.
- 6) F. P. Guengerich, T. L. Macdonald, *Acc. Chem. Res.*, **17**, 9 (1984).
- 7) 桜井 弘, “金属イオンの生物活性—生物無機化学の新しい流れ,” 化学増刊 95, 喜谷喜徳, 田中 久, 中原昭次共編, 化学同人, 1982, p. 21.
- 8) H. Sakurai, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 1686 (1976).
- 9) H. Sakurai, S. Shimomura, K. Ishizu, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 199 (1977).
- 10) H. Sakurai, S. Shimomura, K. Fukuzawa, K. Ishizu, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1348 (1978).
- 11) H. Sakurai, S. Shimomura, Y. Sugiura, K. Ishizu, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 3022 (1979).
- 12) H. Sakurai, S. Shimomura, K. Ishizu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 1102 (1981).
- 13) M. Chevion, J. Peisach, W. E. Blumberg, *J. Biol. Chem.*, **252**, 3737 (1977).
- 14) H. Sakurai, E. Hatayama, T. Yoshimura, M. Maeda, H. Tamura, K. Kawasaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 590 (1983).
- 15) H. Sakurai, H. Uchikubo, T. Toshimura, M. Maeda, K. Kawasaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 1254 (1985).
- 16) V. Ullrich, H. Sakurai, H. H. Ruf, *Acta Biol. Med. Germ.*, **38**, 287 (1979).
- 17) H. Sakurai, T. Yoshimura, *Inorg. Chim. Acta*, **56**, L49 (1981).
- 18) H. Sakurai, T. Yoshimura, *Inorg. Chim. Acta*, **66**, L25 (1982).
- 19) H. Sakurai, T. Yoshimura, *J. Inorg. Biochem.*, **24**, 75 (1985).
- 20) T. L. Poulos, B. C. Finzel, I. C. Gunsalus, G. C. Wagner, J. Kraut, *J. Biol. Chem.*, **260**, 16122 (1985).
- 21) G. C. Wagner, I. C. Gunsalus, M. Y. R. Wang, B. M. Hoffman, *J. Biol. Chem.*, **256**, 6211 (1981).
- 22) H. Sakurai, K. Ishizu, H. Sugimoto, I. C. Gunsalus, *J. Inorg. Biochem.*, **26**, 55 (1986).
- 23) H. Sakurai, K. Ishizu, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4960 (1982).
- 24) H. Sakurai, M. Khono, M. Sakamoto, K. Okada, K. Tajima, K. Ishizu, *Inorg. Chim. Acta*, **93**, L23 (1984).
- 25) H. Sakurai, K. Ishizu, K. Okada, *Inorg. Chim. Acta*, **91**, L9 (1984).
- 26) H. Sakurai, H. Ogoshi, Y. Aoyama, manuscript in preparation.

- 27) K. Tajima, M. Sakamoto, K. Okada, K. Mukai, K. Ishizu, H. Sakurai, H. Mori, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 1002 (1983).
- 28) H. Sakurai, J. Tamura, T. Yoshimura, *Inorg. Chem.*, **24**, 4227 (1985).
- 29) H. Sakurai, manuscript in preparation.
- 30) G. Guroff, J. W. Daly, D. Jerina, J. Renson, S. Udenfriend, B. Witkop, *Science*, **157**, 1524 (1967).
- 31) H. Sakurai, S. Ogawa, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1257 (1975); *idem*, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2171 (1979).
- 32) H. Sakurai, B. Hatayama, M. Nishida, *Inorg. Chim. Acta*, **80**, 7 (1983).
- 33) H. Sakurai, M. Kito, *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1647 (1975); *idem*, *Chem. Pharm. Bull.*, **25**, 233 (1977).
- 34) H. Sakurai, E. Hatayama, K. Fujitani, H. Kato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 1749 (1982).
- 35) H. Sakurai, E. Hatayama, K. Fujitani, *Inorg. Chim. Acta*, **91**, 233 (1984).
- 36) L. Castle, J. R. L. Smith, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1978**, 704; L. Castle, J. R. L. Smith, G. V. Buxton, *J. Mol. Catalys.*, **7**, 235 (1980).
- 37) H. Sakurai, M. Kito, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2113 (1976).
- 38) H. Sakurai, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3437 (1980).
- 39) H. Sakurai, Y. Hataya, T. Goromaru, H. Matsuura, *J. Mol. Cataly.*, **29**, 153 (1985) and progress after the publication.
- 40) H. Sakurai, manuscript in preparation; 第2回生体関連化学シンポジウム, 東京, 1985年6月, 要旨集 p. 97.
- 41) H. Sakurai, M. Nishida, T. Yoshimura, *Inorg. Chim. Acta*, **66**, L17 (1982).
- 42) H. Sakurai, M. Nishida, T. Yoshimura, J. Takada, M. Koyama, *Biochim. Biophys. Acta*, **841**, 208 (1985).
- 43) H. Sakurai, M. Nishida, S. Shimomura, J. Kawada, manuscript in preparation; 第3回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 名古屋, 1986年6月.
- 44) H. Sakurai, S. Shimomura, T. Yoshimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **115**, 618 (1983).
- 45) H. Sakurai, manuscript in preparation.
- 46) L. C. Cantley, Jr., L. Josephson, W. Waner, M. Y. Yanagisawa, C. Lechene, G. Guidotti, *J. Biol. Chem.*, **252**, 7421 (1977).
- 47) H. Sakurai, S. Shimomura, K. Fukuzawa, K. Ishizu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 293 (1980).
- 48) H. Sakurai, S. Shimomura, K. Ishizu, *Inorg. Chim. Acta*, **55**, L67 (1981).
- 49) H. Sakurai, Y. Yamada, S. Shimomura, S. Yamashita, K. Ishizu, *Inorg. Chim. Acta*, **46**, L119 (1980).
- 50) H. Sakurai, Z. Taira, manuscript in preparation.
- 51) H. Sakurai, T. Goda, S. Shimomura, T. Yoshimura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 1421 (1982).
- 52) H. Sakurai, T. Goda, S. Shimomura, *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, **108**, 474 (1982).
- 53) H. Sakurai, T. Goda, S. Shimomura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 1349 (1982).
- 54) H. Sakurai, T. Goda, K. Ishizu, *Inorg. Chim. Acta*, **78**, L33 (1983).
- 55) H. Sakurai, T. Goto, S. Shimomura, K. Ishizu, *Inorg. Chim. Acta*, **91**, 39 (1984).