チトクロム P-450 および含 FAD モノオキシゲナーゼによる含硫化合物の酸化の機構と立体化学

大 饗 茂**・藤 森 憲*

Mechanisms and Stereochemistry in the Oxygenations of Organosulfur Compounds with Cytochrome P-450 and FAD-Containing Monooxygenase.

Shigeru OAE** and Ken FUJIMORI*

This review deals with the mechanisms and stereochemistry of the enzymatic oxygenations of foreign organic sulfides promoted by two hepatic microsomal monooxygenases, i.e., cytochrome P-450 isolated from phenobarbital pretreated rabbit liver and pig liver microsomal FAD-containing monooxygenase (E.C. 1.14.13.8). Oxygenation of sulfides with cytochrome P-450 proceeds via a single electron transfer process from the substrate to the enzyme active site eventually affording both S-oxidation and S-dealkylation products, while FAD-containing monooxygenase catalyzes only the S-oxidation through electrophilic oxidation of divalent sulfur of the substrate by the peroxidic oxygen of the flavin-hydroperoxide intermediate. Stereochemistry of the sulfoxide formation is not highly controlled in the oxygenation of sulfides with cytochrome P-450, however, quite specific in the oxygenation of sulfides with FAD-monoxygenase.

はじめに

随分以前にチアミナルキルジスルフィド (1) のマウス体内での代謝の仕事をお手伝いした時、S-S 結合が代謝過程で開裂し、さらにメチル化され次いで酸化を受けて生じたスルホキシド 2 やスルホン 3 が得られてくること¹⁻⁸⁾, ¹⁸O トレーサー実験からその酸化が肝ミクロソーム中のモノオキシゲナーゼによって起っていることが解った。中間に存在するらしいチオールやメチルスルフィドも単離されるという報告もある⁹⁾。

一方私共は有機硫黄化合物の酸化の一連の研究で¹⁰⁾,

酸化には酸化剤の種類によって過酸化物や ¹O₂ のような試剤による親電子酸化と、RCO₃⁻ とか O₂⁺, IO₄⁻ のような試剤による求核的酸化と、もう一つ・OH とか鉄ポルフィリン/H₂O₂ や Co 錯体/O₂ による酸化のような電子移動が律速で、一たんスルフェニウムカチオンラジカル-S⁺を中間体に生成して進む 3 つの型の機構の反応があることをあきらかにしてきた¹⁰⁻¹²⁾。

さて、哺乳動物の肝ミクロソームに豊富に存在するモノオキシゲナーゼで私共でも単離できそうなものにチトクロム P-450 と含 FAD モノオキシゲナーゼ (EC 1.14.13.8) がある。これらの酸素添加酵素による硫黄化合物の酸化機構が私達が解明してきた化学的酸化機構に対比してどの型の機構の酸化反応であるか、そして、非対称のスルフィドの酸化が酵素反応に特有などのような立体特性および立体選択性を持っているかに興味を持ったので、酸化中間体のスルホキシドやチオールスルフィナートが単離できるような化合物を選んで、これら 2 つの酵素酸化を調べて見ることにした。以下用いたチトク

* 筑波大学化学系 ()

* Department of Chemistry, The University of Tsukuba ()

**現在, 岡山理科大学 ()

**Okayama University of Science ()

ロム P-450 はフェノバルビタールを 5 日間投与した兎の肝臓から¹³⁾, 含 FAD モノオキシゲナーゼは豚肝臓から単離精製したものである¹⁴⁾。得られた成果をここでまとめてみよう。

1. 酸化の機構

1.1. チトクロム P-450 チトクロム P-450 については優れた成書や総説があるので¹⁵⁾, ここでは活性中心に含まれているヘムの構造 (図 1) とターンオーバーサイクル (スキーム 1) のみを示す^{15(f-h)}。精製チトクロ

Fig. 1 Iron protoporphyrin IX.

Scheme 1 Turnover cycle assumed for the hydroxylation of RH with cytochrome P-450^{15(f-h)}.

ム P-450 再構成系とミクロソーム両方を用いて 1,2-ジチアン 4 および 3-メチル-1,2-ジチアンを酸化したところ, それぞれ対応するモノオキシド, つまり 5 のようなチオールスルフィナートが得られることがわかった¹⁶⁾。

また, チオールスルフィナート 5 はさらに酸化されてチオールスルホナート 6 を与えるが, この 5 → 6 への酸化は 4 → 5 への酸化に比べて数倍遅い。もしや, 酵素系の反応で発生するかも知れない H₂O₂ とか一重項酸素で 4 や 5 が酸化されていないことを確かめるために, H₂O₂ を分解するカタラーゼや ¹O₂ をクエンチする DABCO を添加してみたが, この酵素酸化には何の影響も無かったし, 基質を変えて荒っぽい反応速度 (V_{max}/K_m) と酸化生成物の収率などを調べると反応性は次の順で減少する^{16,17)}。

明かに基質の分子構造と疎水性が効いている。このようなデータからチトクロム P-450 によるジスルフィドの酸化は一種の親電子的酸化ということになった。

反応の機構を詳細に調べるために α 置換のメチルフェニルスルフィド 7 を酸化したところ, X が CN とか -COPh や -Ph-NO₂-p のような電子吸引基であると, S 原子上の酸化と Co^{II}(b₂acen)/O₂ を用いる反応でみられるような¹⁸⁾ C-S 結合の開裂が同時に起こることが解った¹⁹⁾ (スキーム 2)。C-S 開裂が起こるということ

Scheme 2 Dual modes of oxygenation of sulfides with cytochrome P-450.

は恐らく Co^{II}(b₂acen)/O₂ 系を用いての酸化と同様に²⁰⁾, 2 価の S からチトクロム P-450 に一電子移動が起って, いったんスルフェニウムカチオンラジカル (8) を中間に生成して反応が進んでいるのではなかろうか, そしてもしその段階が律速であれば, S-酸化しか起こらない p-置換のチオアニソール類 (9) をチトクロム P-450 再構成系を用いて酵素添加反応してやるとその V_{max} つまり酸化速度はチオアニソール類の一電子酸化電位により相関関係を示すだろうし, また Brown-Oka-moto の σ⁺ 値ともよい直線関係が成立することが期待される。事実, その通りの実験結果が得られ σ⁺ に対してプロットすると -0.16 という小さいながらも負の ρ⁺ 値が得られた^{21,22)}。R-S-R' を Fenton 試薬を用いて

Fig. 2 Plots of $V_{\max}$'s of the following reactions vs σ^+ .

・OHで酸化する時にも R-S-R' を生成することが知られているので²³⁻²⁵，それを用いて PhCH_2X ($\text{X}=\text{CN}$, COPh , $-\text{Ph-NO}_2-p$) を酸化してやるとチトクロム P-450 を用いる反応と同じようにスルホキシドも得られるし C-S 開裂の S-脱アルキル化も起こってくる²⁶，チトクロム P-450 による酸化でも ・OH による酸化で得られるスルホキシドにも溶媒中の H_2^{18}O からの ^{18}O のとりこみは見られず，また $\text{Ph-S-CD}_2\text{COPh}$ を用いての脱アル

Scheme 3 Mechanism for oxygenation of sulfides with cytochrome P-450.

キル化反応で観測される k_H/k_D の値も 1.2 と非常に小さい。これらのデータからスキーム 3 に示すような反応機構が考えられてくる^{22, 26}。a のルートが最も考え易いが b の可能性も完全に否定することは難しい。このようなイオンラジカル中間体を直接 esr で検出しようという努力が随分なされているが²⁷，特殊なジヒドロピリジンの酸化では確かに中間ラジカル種の esr スペクトルが得られて²⁸，この一電子移動機構が一般的であることが示されている。一方，*p*-置換フェニルメチルスルフィドをチトクロム P-450 再構成系を用いて酸化する反応でも， $V_{\max}$ の対数をスルホキシド類の一電子酸化電位に対してプロットすると図 3 に示したようにスルフィド類と同一線上にのってくる³¹。従ってこの場合も (式 4) のような機構で進む。面白いことに，チトクロム P-450 の酵素モデルとして [塩化メゾテトラフェニルポルフィン鉄(III)] (略して TPPFe(III)Cl)/H₂O₂/イミダゾール系を用いて酸化しても $\text{Ar-S-CH}_2\text{X}$ ($\text{X}=\text{CN}$, COPh) で

Fig. 3 Linear dependence of $\log(V_{\max})$ of oxygenation of organosulfur compounds with cytochrome P-450 on oxidation potentials of substrates³¹.

は S が酸化されて生成するスルホキシドと C-S が酸化開裂して生成する XCHO を生成する (表 2)。また *p*-置換チオアニソールの酸化速度は一電子酸化速度と良い直線関係にあり, σ^+ に対して直線関係が成立し $\rho^+ = -0.26$ という値が得られてくる³⁰⁾。しかも後述するように含硫ヘテロ環の酸化で生成するスルホキシドの *trans/cis* 生成比も良く似てくる³⁰⁾。

さて, 酸素同族体のアニソールの酸化では脱メチル化のみ見られるが, この場合は $V_{\max}$ と一電子酸化電位とは何の相関もなく, CH_3 を CD_3 に変えると $k_H/k_D = 3.4$ 分子間の競争反応で出ると $k_H/k_D = 5.1$ という大きな値が得られてくる。明らかにチトクロム P-450 による α -水素の引き抜きが律速のスキーム 4 に示すような機構で進む。

Scheme 4 Mechanism for oxidative dealkylation of anisole with cytochrome P-450

1.2 含 FAD モノオキシゲナーゼ (EC 1.14.13.8)

この酵素は Ziegler によって発見され, 初期にはアミノオキシダーゼと呼ばれていた^{14a)}。この酵素は哺乳類動物の各組織に広く分布しているが特に肝臓に多量に含まれる。チトクロム P-450 同様脂質膜に存在し, NADPH と分子状酸素を要求する活性中心に FAD (図 4) を含むモノオキシゲナーゼで^{14, 32)}チトクロム P-450 に基質特異性も類似しているが, 表 1 に示したようにチトクロ

Fig. 4 Flavin adenine dinucleotide (FAD)

Table 1 Oxygenation promoted by FAD-monoxygenase.

Nitrogen	Sulfur
$\text{R-N}^{\text{R}'}_{\text{R}''} \rightarrow \text{R-N}^{\text{R}'}_{\text{R}''} \text{O}^-$	$\text{R-C}^{\text{S}}_{\text{NH}} \rightarrow \text{R-C}^{\text{S}=\text{O}}_{\text{NH}_2}$
$\text{R-NHR}' \rightarrow \text{R-N}^{\text{OH}}_{\text{R}'}$	$\text{R-NH}_{\text{R}'\text{N}}\text{C-SH} \rightarrow \text{R-NH}_{\text{R}'\text{N}}\text{C-SO}_2\text{H}$
$\text{R-N}^{\text{OH}}_{\text{R}} \rightarrow \text{R-N}^{\text{O}^-}_{\text{R}} \text{R}'$	$2 \text{ R-SH} \rightarrow \text{R-S-S-R}$
$\text{R-N}^{\text{OH}}_{\text{R}} \rightarrow \text{R-N}^{\text{O}^-}_{\text{R}} \text{R}'$	$\text{R-S-S-R} \rightarrow 2 \text{ R-SO}_2\text{H}$
$\text{R-NH} \rightarrow \text{R-NHOH}$	$\text{R-S-R}' \rightarrow \text{R-S}^{\text{O}}_{\text{R}'}$
$\text{R-N}^{\text{NH}_2}_{\text{R}'} \rightarrow \text{R-N}^{\text{O}}_{\text{R}'} \text{NH}_2$	$\text{R-S-R}' \rightarrow \text{R-S}^{\text{O}}_{\text{R}'}$

ム P-450 よりも範囲が狭く, 2価硫黄化合物³³⁾, 2級および3級アミン^{14a)}, ヒドロキシルアミン³⁴⁾, ヒドラジン誘導体³⁵⁾や I⁻³⁶⁾のように中心ヘテロ原子がソフトでかつ強い求核性を有する化合物に限られる。このような基質の酸素添加では *in vitro* の実験によるとこの酵素の方がチトクロム P-450 より基質の濃度の低い場合, Ph-S-CH_3 を例にとると $\text{pH}=7.4$ で約 60 倍効率が良い。

ところで, 含 FAD モノオキシゲナーゼは脂質膜に埋った疎水性の大きな酵素であるから, 解離基を 2 ケ以上持つような基質や親水性の基質は酸化されない。たとえば, *o*-チオサリチル酸は酸化されるが *m*, および *p*-メルカプト安息香酸は酸化されないし, システアミンは効率良く酸化されるがシスタミン, システイン, システインには不活性で, ジチオカルバメートもチオグリコール酸も酸化されない。また硫黄の非共有電子対が非極在化して求核性の低下したチオフェンなどは酸化されない³⁶⁾。現在知られている限りこの酵素の生理的基質はシステアミン ($\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$) のみである。システアミンがこの酵素で酸化されるとシスタミン ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{S}$) を生成するが, このシスタミンが生体内でシステイン残基に由来するペプチドに含まれる SH 基を酸化し, 生体内の SH 基レベルを制御していると考えられている³⁷⁾。

この酵素の触媒作用について Ziegler³⁸⁾ および Ballou³⁹⁾ の研究グループによってスキーム 5 のような機構が提案されている。この酵素の活性は $\text{pH}=9$ で最大になるが (図 5)⁴⁰⁾, $\text{pH}=7.2$, 40°C で Ballou によって求められた各ステップの $V_{\max}$ をスキーム 5 に合せてあげておく。この酵素の面白い特性の一つは基質の取り込みの順序で

Scheme 5 Turnover cycle for FAD-containing monooxygenase.

Fig. 5 pH- $V_{\max}$ (NADPH/min/FI) profiles for NADPH consumption in H_2O_2 production and oxygenation of *N,N*-dimethylaniline with FAD-containing monooxygenase at 20 °C (○: without *n*-octylamine, △: with 3 mM *n*-octylamine)⁵⁰⁾.

ある。通常のモノオキシゲナーゼではまず基質の取り込みから始まるが、スキーム 5 に示したように、この酵素は最初に NADPH を取り込み、 $E(FI_{ox})$ は還元型 $E(FIH_2)$ に変化する。そこに O_2 が入ってきて酸化活性種である $E(FIOOH)$ を生成する。その後基質が取り込まれて酸化を受けるわけである。この活性種 $E(FIOOH)$ の同定は *p*-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素⁴²⁾ やルシフェラーゼの活性種と考えられている FAD のフラビンの 4_a 位にヒドロペルオキシ基のついた中間体や⁴³⁾、Bruice らによっ

て合成された強い酸化力を持つ **4a-FIEt-OOH** (式 5) と極めて類似した 375 nm に吸収極大を示すことに基づいている⁴⁵⁾。この酸化活性種は中性付近で安定であるが酸化される基質が存在しないと、徐々に H_2O_2 を放出してもとの $E(FI_{ox})$ にもどる。もしこの step 1 に NADPH の代りにジチオナイトを用いて生成する $E(FIH_2)$ に O_2 を作用させると、いったん生成すると考えられる $E(FIOOH)$ は全く検出されず瞬時に H_2O_2 と $E(FI_{ox})$ に分解してしまう³⁹⁾。恐らく実際の酵素反応では step 1 で生じた $NADP^+$ が最後までフラビンのそばに存在していて $E(FIOOH)$ の安定化に大きく寄与し、NADPH の浪費を妨げているのであろう^{38, 39)}。

$E(FIOOH)$ で基質が酸化される場合、i) チトクロム P-450 のようにまず基質から酸化剤への一電子移動をおこすか、ii) 通常の過酸による酸化のように単純な親電子酸化 (末端過酸化酸素上の基質による求核置換反応) を経由するのかの 2 つの可能性がある。事実、フラビンを活性中心にもつミトコンドリアモノアミンオキシダーゼの反応では基質アミンから酸化型フラビンへの一電子移動で酸化が始まるスキーム 3 a b に類似した機構で *N*-脱アルキル化が起こると考えられているし⁴⁶⁾、*p*-ヒドロキシ安息香酸水酸化酵素の触媒作用について基質から酸化活性種への一電子移動が重要なステップであるという主張もある⁴⁷⁾。またやはり、**4a-FIOOH** が酸化活性種と考えられているシクロヘキサノンモノオキシゲナーゼは求核的、親電子的いずれの酸化モードをも取り得る両刀使いである⁴¹⁾。

これら可能な酸化反応機構のどれが働いているのか区別するにはスルフィド **7** ($X = C(Ph)$) の酸化生成物と置換アニソールの酸素添加速度を測定すれば良い。さて、酸化生成物は、表 2 に示したようにモデル系 (**4a-FIEtOOH**)、酵素いずれの系においてもスルホキシドのみが得られ、C-S 開裂は生じない。また次の反応 (式 5) のハメットプロットは同化合物の H_2O_2 酸化の $\rho = -1.13$ に近い $\rho = -1.47$ が観測され、この酸化は親電子酸化で

Table 2 Ratios of S-oxidation (B) to S-dealkylation (C) in the oxidation of phenacyl phenyl sulfide (A) with various oxidants at room temperature⁴⁹⁾.
$$\text{Ph-S-CH}_2\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{Ph} \longrightarrow \text{Ph-S}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{Ph} + \frac{1}{2} \text{PhSSPh} + \text{Ph}\overset{\text{O}}{\text{C}}\text{CHO}$$

(A) (B) (C)

Oxidants	Solvent	Ratio B : C
Cytochrome P-450/O ₂ /NADPH	pH=7.4 aq. buffer	48 : 52
TPPFe (III) Cl/Imidazole/H ₂ O ₂	CH ₃ CN	86 : 14
Fe ³⁺ /Ascorbic acid/H ₂ O ₂	acetone/7 % HClO ₄	49 : 51
FAD-monooxygenase/O ₂ /NADPH	pH=7.4 aq. buffer	100 : 0
4a-FlEt-OOH	Dioxane	100 : 0
m CPBA	CH ₂ Cl ₂	100 : 0
H ₂ O ₂	Acetic acid	100 : 0

Fig. 6 Hammett plots for the reactions of:

あることが判明した⁵⁰⁾。ところが、含 FAD モノオキシゲナーゼによる置換チオアニソールの酸化は置換基によって全く影響を受けず⁵¹⁾、Ballou らが主張するように³⁹⁾ step 4 がターンオーバーサイクルの律速段階であることが明白となった(スキーム 5. 図 6)。ところで、なぜ E (FIOOH) が非常に強い酸化力を持つのか興味深い。種々の親電子酸化剤とチオキシンの 2 次反応の相対速度を図 7 にあげておく^{39, 52)}。このような酵素の作用の巧妙さに驚かされる。

Fig. 7 Relative rates for oxidation of thioxane^{39, 52)}.

2. 酸素添加の立体化学⁵³⁾

チトクロム P-450 群の中でステロイドホルモンの水酸化や、高級脂肪酸の ω-水酸化など生理学的に重要な物質の合成に働いているチトクロム P-450 はその要請に応じて立体選択的あるいは位置選択的に酸素添加がかなり厳密に制御されている^{15b, 57)}。ところが、フェノバルビタールで誘導される肝ミクロソームチトクロム P-450 は体外から過って摂取した求核の硫黄や窒素を含む異物を酸化代謝するために肝臓内に急激生産されるモノオキシゲナーゼである。従ってこの場合、特に酸化を立体選択的または特異的に行う必要は無く、むしろ好き嫌いをせずにどんな立体構造の異物をも遍く酸化して水溶性を増加して排泄しやすくするという使命を帯びている。他方、含 FAD モノオキシゲナーゼの唯一知られている生理的基質であるシステアミンは反応点を一つしか持たないし、プロキラルでもないから、この化合物の酸化においては位置選択性も立体選択性も発現することは本来要請

されていない。また、すでに前述した通り、この酵素もチトクロム P-450 同様に異物代謝を行うのであるから、ここでも立体選択的および立体特異的に酸素添加を行う必要は全く無いのである。ところが、酵素であるからにはキラルな反応場を形成しているのであろうし、基質を取り込む立体空間も限られているのであろう。従って、これらの 2 つのモノオキシゲナーゼによる基質への酸素添加反応がかなり立体的に制御されているとしても不思議は無い。事実、牛血清アルブミン(BSA) 存在下 H_2O_2 や $NaIO_4$ 等アキラルな酸化剤によるプロキラルスルフィドの酸化反応にかなり立体特異性および選択性が観測されている⁵⁵⁾。そこでこれら 2 つのモノオキシゲナーゼによるスルフィド酸化の立体化学を調べることは、これら酵素の活性中心付近の立体空間の大きさや形状を推察する手だてになるであろうし、近い将来にこれら酵素が結晶化されてその立体構造が明らかになると、その反応機構を考える上で酸化の立体化学データが生きてくるであろう。そのようなことで以下述べる立体化学が調べられた。

この実験はいずれも酵素反応の K_m を遙かに凌駕する基質高濃度条件下で行われたもので、スルホキシド生成の立体特異性および立体選択性は基質の反応場への取り込みの難易 (thermodynamic control) に由来するもの

では無く、基質と酸化活性中心の空間的配列が酵素酸素添加速度を規定する結果生じたものである (kinetic control)。つまり、チトクロム P-450 による酸素添加ではチオスルフェニウムカチオンラジカル **8** の生成する電子移動の段階か、または **8** と鉄オキセノイドのカップルする反応速度におよぼす立体効果が、含 FAD モノオキシゲナーゼによる酸化では step 3 の速度におよぼす立体効果が、生成してくるスルホキシドの立体化学に反映されている。

2.1. チトクロム P-450

2.1.2. エナンチオ場区別酸素添加反応 異なった置換基 R_L と R_S を有するスルフィドのプロキラル硫黄原子の 2 つの非共有電子対は図 8 に示されるように互にエ

Fig. 8 Enantiotopic differentiating oxygenation.

ナンチオトピックな関係にある。従って酵素のキラルな反応場ではこのエナンチオ場区別が起こって、スルフィドの不斉合成がなされるはずである。いくつかのスル

Table 3 Enantiotopic differentiation in oxygenation of unsymmetrical sulfides to sulfoxides with two hepatic microsomal monooxygenases, aspergillus niger, and nonenzymic oxidation with usual chemical oxidants in chiral environment.

Oxidation system	Ratio of oxygenation course (A : B) and absolute configuration of excess enantiomer							
Cytochrome P-450/ O_2 /NADPH ^{a) b)}	44: 55(R)	49: 51(R) (47: 53, R) ^{f)}	23: 77(R)	40: 60(R)	27: 73(S)	39: 61(S)	43: 57(R)	55: 45(S)
FAD-Monooxygenase/ O_2 /NADPH ^{b) c)}	15: 85(R)	12: 88(R)	17: 83(R)	44: 56(R)	25: 75(S)	34: 66(S)	2: 98(R)	18: 82(R)
Aspergillus Niger ^{d)}			85: 15(S) 89: 11(S)		5: 95(R) 3: 97(R)	85: 15(R) 91: 9(R)	34: 66(R) 7: 93(R)	
BSA/ H_2O_2 ^{e)}					49: 61(R)	87: 13(R)		
BSA/ $NaIO_4$ ^{e)}			48: 53(R)		23: 67(R)	70: 30(R)		

a) Oxygenation was carried out using microsomes obtained from phenobarbital pretreated rabbit liver⁵⁶⁾.

b) Oxygenation was carried out in phosphate buffer of pH 7.4 at 37°C.

c) Isolated from pig liver⁵⁴⁾

d) Oxygenation was carried out in growing fungi and the ratio of attacking courses A:B was calculated from e. e. value of sulfoxide obtained after recrystallization⁵⁸⁾.

e) Oxidation was carried out in the presence of bovin serum albumin in borate buffer of pH=9.2 at 25°C^{55 b)}.

f) Oxygenation was carried using a reconstituted system with purified cytochrome P-450 isolated from phenobarbital pretreated rabbit liver⁵⁶⁾

イドのフェノバルビタールでチトクロム P-450 を誘導した兎肝ミクロソームを用いた酸素添加について得られた結果⁵⁶⁾を他の例と比較掲載しておく(表 3)。ここで用いられた肝ミクロソームは含 FAD モノオキシゲナーゼをも含むことが考えられるが、このミクロソームによるスルフィド酸化はチトクロム P-450 によるものであることが確かめられている⁵⁶⁾。表 3 では、図 8 と同様に硫黄原子に近い部分で 3 次的によりかさ高い置換基 R_L が紙面の左後方に、嵩の小さい置換基 R_S が右方手前にくるように描かれている。ここで、嵩高さは次の順に小さくなるものと仮定されている： $t\text{-Bu} > p\text{-TolCH}_3 > p\text{-Tol} > \text{Ph} > \text{Me}$ 。当初、この酵素の基質特異性が乏しいことから予測した通り、チトクロム P-450 はそれほど厳密にエナンチオ場区別を行っていないことが明らかになったが、B 方向からの酸素添加がいずれの場合も優先するという規則性が見られる。この酸素添加反応は大きなヘム平面で起るために蛋白質部分にキラルな場があったとしてもそれによる規制はさほど大きくは無いであろう。ヘムと同程度またはそれ以上の大きな平面を持つステロイドのような大きな分子への酸素添加では立体制御がうまく行われていることも一応うなづけよう。ここで特筆すべきことは、後述する含 FAD モノオキシゲナーゼの酸素添加の立体選択性と傾向が一致することである。ところが、BSA 存在下の非酵素的酸素酸化⁵⁵⁾や *aspergillus niger*⁵⁸⁾の立体選択性とは全く異なっている。

2.1.2. ジアステレオ場区別酸素添加反応 置換基の α -炭素上に不斉中心を持つスルフィド 9 および 10 の酸化ではスキーム 6 に示すようにジアステレオ場の区別が期待される。9 と 10 は各々 1 対のジアステレオマーを生成する。実験はラセミ体スルフィドを用いて行ったが、フェノバルビタール誘導肝ミクロソームおよび精製チトクロム P-450 再構成系で得られた結果を他の酸素添加反応の結果と合せて表 4 に比較しておいた。当然のことであるが、エナンチオマー区別が同時に起って鏡像体 9 と

10 は異なる速度で酸素添加されるであろう。しかしながらこの実験では生成したスルホキシドのジアステレオマー比のみを決定しており各ジアステレオマーの光学純度は求められてはいない。従って 11+13 と 12+14 の比が表 4 に記されている。唯一 2 メチル-1,2-ジヒドロベンゾチオフェン 15 から得られるスルホキシド 16 についてのみジアステレオマーを分離し、各ジアステレオマーの光学純度と絶対配置を決めることができた。これについては次節で述べる。表 4 のはじめの 5 つの環状スルフィドの酸化では酵素を用いない通常の化学的酸化剤を用いるとほとんどジアステレオ面の区別は行われぬ。とこ

Table 4 Diastereotopic differentiation in the oxidation of racemic cyclic sulfides⁵⁶⁾.

Substrate	<i>cis</i> : <i>trans</i> Ratio		
	Microsomal oxygenation ^{a)} (Cytochrome P-450)	Nonenzymatic oxidation <i>m</i> CPBA	NaIO ₄
18 : 82	56 : 44	55 : 45
18 : 82	43 : 57
16 : 84	44 : 56
51 : 49	49 : 51
25 : 75 ^{b)} 19 : 81	47 : 53	48 : 52
37 : 63	30 : 70
29 : 71	30 : 70	

a) Microsomes were obtained from phenobarbital pretreated rabbit liver.

b) Oxygenation with purified cytochrome P-450 reconstituted system.

Scheme 6 Diastereotopic differentiation in the oxygenation of racemic sulfide.

Table 5 Diastereotopic differentiation in oxidation of racemic sulfides (**15**, **17**) to sulfoxides (**16**, **18**) by the two monooxygenases, enzyme models and usual chemical oxidants.

Oxidants	Solvent	Temp. (°C)	16		18	
			<i>cis</i> :	<i>trans</i>	<i>cis</i> :	<i>trans</i>
Cytochrome P-450/O ₂ /NADPH	pH=7.4 aq. buffer	37	19 :	81	34 :	66
Cytochrome P-450/H ₂ O ₂	"	37	22 :	78		
TPPFe (Ⅲ) Cl/H ₂ O ₂ /Imidazole	CHCl ₃	25	24 :	76		
FAD-Monooxygenase/O ₂ /NADPH	pH=7.4 aq. buffer	37	92 :	8	6 :	94
4 a-FlEt-OOH	dioxane	30	18 :	82	33 :	67
Fe ²⁺ /Ascorbic acid/H ₂ O ₂	aq. acetone	25			33 :	67
TiCl ₃ /H ₂ O ₂	75 % aq. acetone	r. t.			20 :	80
H ₂ O ₂	acetone	25			30 :	70
<i>m</i> CPBA	CH ₂ Cl ₂	0	47 :	53	33 :	67
<i>t</i> -Bu-OOH	benzene	50			35 :	65
NaIO ₄	H ₂ O	0	48 :	52	76 :	24
<i>t</i> -Bu-OCI	Methanol	-70			98 :	2
Br ₂ /H ₂ O/DABCO	aq. acetic acid	20			14 :	86
N ₂ O ₄	neat	0			81 :	19
PhIO	aq. pyridine	20			17 :	83
PhIO	benzene	80			51 :	49

Ref. 26, 30, 50, 51, 59)

ろが、チトクロム P-450 による酵素的酸素添加は優先的に 2 位の置換基と反対の立体的反発の小さな側から酸化が行われている。2 つのチオデカリンの酸化はチトクロム P-450, *m*CPBA いずれを用いてもより立体的に空いているエクアトリアル方向から優先的に酸素添加が起っている。

環状スルフィド **15** と **17** のアキラルな酸化剤によるジアステレオ場区別に関しては詳しい研究がなされており、表 5 に要約しておく。まずスルフィド **15** の酸化を見ると、前述したようにチトクロム P-450 を用いた方が通常の酸化剤を用いた場合よりも立体選択性が大きく現れるが、NADPH/O₂/チトクロム P-450/チトクロム P-450 レダクターゼを用いた再構成系と、酸化型チトクロム P-450/H₂O₂ 系はほとんど同じ *cis/trans* 比になっており、後者の反応種は水酸ラジカルであろうと推定されていること¹⁵⁾を考えあわせて興味深い。また TPPFe (Ⅲ) Cl/H₂O₂/イミダゾールを用いたモデル系でも酵素と同じ立体化学が見られる³⁰⁾。

スルフィド **17** の酸化で得られるスルホキシド **18** はシス体の方がトランス体よりも熱的に安定で、ジオキサ

Fig. 9 Model structural arrangement for active site cavity of cytochrome P-450.

ン中 25 °C で HCl 触媒による異性化はシス体 80 % で平衡に達する⁵⁹⁾。通常の親電子酸化剤は立体的により空いているエクアトリアル側から攻撃してトランス体を優先的に与える⁵⁹⁾。チトクロム P-450 による酸素添加も同様の立体選択性を示す。このことは図 9 を見れば良く理解できよう。N₂O₄ による酸化ではシス体を多く与えているが、これは N₂O₄ が **18** のシス-トランス異性化を触媒することから理解される。*t*-BuOCl もほとんどシス体のみを与えるが、これはまずエクアトリアル位に Cl⁺ が結合したクロロスルホニウム塩が生成し、その S⁺ 上にアキシアル方向から溶媒由来のメトキシアニオンが攻撃してシス-スルホキシド **18** を与えるのでありよく理解で

Scheme 7 Yields of four stereoisomers in the oxygenation of racemic **15** with rabbit liver microsomal cytochrome P-450 and pig liver microsomal FAD-containing monooxygenase which is shown in parenthesis (pH=7.4, 37 °C)^{48, 54, 56}.

きる。このようにコンホメーションの固定されたスルフィド酸化の立体化学はその反応機構を考える上で大変役に立つ。

2.1.3. 同時にエナンチオマー区別酸素添加とジアステレオ場区別酸素添加が起る場合 先に述べたように、置換基に不斉炭素原子を持つスルフィドのラセミ体を酵素酸化するとジアステレオ場区別の他にエナンチオマー区別、つまりラセミ体スルフィドの動力学的分割が行われるはずである。スルフィド **15** の酸化が定量的にこれらのことを検討された唯一の例である⁵⁶⁾。ラセミ体 **15** をチトクロム P-450 を用いて酸化した際生じる各異性体の収率をスキーム 7 に示しておく。()内は含 FAD モノオキシゲナーゼによる実験結果である。

まずエナンチオマー区別から検討すると、**15_S** に由来するもの 41.3 %, **15_R** から生成するスルホキシドは残り 58.7 % であり、わずかではあるが **15_R** の方が **15_S** よりも 1.4 倍早く酸化されている。

次にジアステレオ場区別について見ると、トランス体がシス体の 4.3 倍も生成速度が大きく、立体的に空いている方向から酸素が入ってきている。この傾向は **15_S** の方が **15_R** よりも約 2 倍生成速度が大きく顕れている。つまり、**15** のチトクロム P-450 による酸化はエナンチオマー区別よりもジアステレオ場区別の方が支配的である。

2.2 含 FAD モノオキシゲナーゼ

2.2.1. エナンチオ場区別酸素添加 この酵素もまた幅広く異物代謝を行う基質特異性に乏しい酵素であるにもかかわらず、表 3 に示したようにかなり立体選択的に

スルフィドを酸化する。*p*-トリルメチルスルフィドでは約 98 % の光学収率で *R* 配置スルホキシドを生成する。2-メトキシジフェニルスルフィドを除けばチトクロム P-450 と同様、B 方向から優先的に酸素添加が起るが、立体選択性は含 FAD モノオキシゲナーゼの方が遙かに大きい。チトクロム P-450 の酸化活性種が大きな平面を持つヘム鉄オキセノイド (図 9) であるのに対して、この酵素の活性種はスキーム 5 に示した通り E (FIOOH) で、蛋白質部分を除いた FAD ヒドロペルオキシド自身 8 個の不斉炭素原子を有するキラルな化合物である。特に OOH のつけ根のフラビン 4a 炭素はキラルであり、しかも酸素添加反応は 1 段階で進む。また酸素添加に用いられる過酸化物の末端酸素はフラビン面からある程度離れており、基質は不斉な場をつくる蛋白質部分に十分包まれた状態で酸素添加が行われ得る (図 10)。恐らくこれらの理由で含 FAD モノオキシゲナーゼの方がチトクロム P-450 よりも大きな立体選択性を発揮するのであろう。

含 FAD モノオキシゲナーゼによる酸素添加速度は *n*-オクチルアミンによって加速されるが、もし *n*-オクチ

Fig. 10 Model structural arrangement for active site cavity of FAD-containing monooxygenase.

ルアミンが反応活性中心付近で作用しているのであれば、*n*-オクチルアミンを系内に加えることによって生成するスルホキシドの立体化学に変化をもたらすであろう。また pH を 7.4 から 9.0 にすると約 2.5 倍 $V_{\max}$ は増大するが、もしこれが反応活性中心付近の蛋白質のコンホメーション変化に由来するものならば、やはりスルホキシド生成の立体化学に pH 依存性が観測されるであろう。ところが、表 3 に示したスルフィドの酸化で生じるスルホキシドの e. e. は *n*-オクチルアミンの有無および pH 変化には全く無関係にほぼ同じである。つまり、この酸素添加反応の律速段階は前述したように E(FIOH) が脱水して E(FI_{ox}) にもどる step 4 であり(スキーム 5) pH や *n*-オクチルアミンの影響は基質の酸化の起った後の E(FIOH) の脱水過程で発現するのであるから、スルフィド酸化の立体化学にこれらの要素が影響をおよぼさないのは当然な結果と言えよう。反応機構の項で述べたように E(FIOOH) は背面に NADP⁺ が存在していないと直ちに H₂O₂ を脱離してしまうが、E(FIOH) からの脱水過程(step 4)も E(FIOOH) からの H₂O₂ 脱離と同じ機構と考えられるから、step 4 も NADP⁺ の存在で抑えられているものと考えられる。従って、酸化反応(step 3)が終った後で NADP⁺ を取り除いてやれば E(FIOH) の脱水も容易に起るであろうから、この酵素反応のターンオーバー速度におよぼす *n*-オクチルアミンや pH の効果はこの NADP⁺ を活性中心から放出させる方向に、しかもフラビンを挟んで酸化の起こる側と反対側に働いているものと推察される。

2.2.2 同時にエナンチオマー区別酸素添加とジアステレオ場区別酸素添加が起る場合 ラセミ体スルフィド 15 を含 FAD モノオキシゲナーゼで酸化すると、スキーム 7 の () 内に示したような収率でスルホキシド 16 の各異性体が得られてくる。表 3 に掲げたエナンチオ場区別酸化ではチトクロム P-450 と含 FAD モノオキシゲナーゼは程度の差はあるが同じ傾向の立体選択性を示していたけれども、スルフィド 15 の酸化では両モノオキシゲナーゼの立体選択性および立体特異性は全く異なっていることがわかった。これはエナンチオマー区別酸化に顕著にあらわれ、15_R が 15_S よりも少くとも 13 倍以上も早く酸素添加を受け、効率良くラセミ体 15 の動力学的分割が行われる。しかも、15_R のジアステレオ場区別酸素添加も厳密に行われていて、シス体 16(C_RS_R) のみを選択的に生成している。酸素添加速度の遅い 15_S は 15_R と逆のジアステレオ場選択を行ってトランス体 16(C_SS_R) のみを生成する。つまり、ラセミ体 15 の含 FAD モノオキシゲナーゼによる酸素添加はスキーム 7 に描いたスルフィド

環平面の後方から起こる反応が最優先しており、チトクロム P-450 の立体選択性および立体特異性と趣を全く異にする。

以上述べたように含 FAD モノオキシゲナーゼはチトクロム P-450 よりも遙かに高い立体選択的かつ立体特異的にスルフィドの酸素添加を行っている。もちろんプロキラル 3 級アミンは光学活性なアミノキシドを与える。このような現象はいろんな所に、たとえば含硫黄薬物が生体内で酸化されて尿中に排泄される場合直接酵素阻害剤を使うわけに行かず、チトクロム P-450、含 FAD モノオキシゲナーゼいずれによって酸化代謝を受けたのか区別するのはむずかしいが、排泄された代謝産物の立体化学を調べるによりおおよその見当をつけることも可能である。含 FAD モノオキシゲナーゼを固定化して合成化学的に利用することも可能で⁶⁰⁾、この酵素の高いエナンチオマー区別特性はラセミ体スルフィドの動力学的分割に、高いエナンチオ場区別特性は光学活性スルホキシドの合成に利用できる。

おわりに

以上哺乳動物の肝臓で薬物代謝を行っている 2 つのモノオキシゲナーゼについて私達の研究を中心にまとめてみた。金教授をはじめ井柳、沼田、福島、高田、渡辺博士ら献身的努力と助成金を頂いた Toray に感謝する。医薬品などの生理活性物質を生体内に摂取する場合その化合物自身が治療効果とか発がん性などの毒性とかを示す以外に、むしろ酸化代謝産物によってもたらされる場合も多い^{15b, 33b, 61)}。従って、ドラッグデザインを行うに当って医薬の薬効や毒性を考える上で、問題の薬物が生体内でどのように酸化代謝が行われていくかを知ることが、今後ますます重要になってくることであろう。

読者諸賢のご教示・ご批判を頂戴できれば幸である。

(昭和 58 年 5 月 4 日受理)

文 献

- 1) T. Fujita, Z. Suzuoki, S. Kozuka, S. Oae, *J. Biochem.*, **94**, 723 (1973)
- 2) Z. Suzuoki, K. Nishikawa, M. Numata, *ibid.*, **58**, 279 (1965)
- 3) K. Nishikawa, Z. Suzuoki, M. Numata, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **157**, 589 (1967)
- 4) K. Nishikawa, S. Kikuchi, Z. Suzuoki, *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1221 (1969)
- 5) Z. Suzuoki, K. Murakami, S. Kikuchi, K. Nishikawa, M. Numata, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **158**, 353 (1967)
- 6) S. Kikuchi, K. Nishikawa, Z. Suzuoki, *Eur. J.*

- Pharmacol.*, **9**, 367 (1970)
- 7) K. Nishikawa, S. Kikuchi, Z. Suzuoki, *ibid.*, **9**, (1970)
 - 8) T. Fujita, Z. Suzuoki, *J. Biochem.*, **74**, 712 (1973)
 - 9) F. Challenger, A. A. Reallings, *J. Chem. Soc.*, **1937**, 868
 - 10) 大饗 茂 “有機硫黄化学” 反応機構編, 第 5 章酸化反応, 化学同人 (1982)
 - 11) 大饗 茂, 高田十志和 “有機硫黄化合物の酸化, I, II, III” 化学, **34**, 756, 891, 961 (1979) その中の文献
 - 12) 大饗 茂, “有機硫黄化合物の化学的酸化と生化学的酸化, I, II” 化学の領域, **34**, 2, 19 (1980) その中の文献
 - 13a) Y. Imai, R. Sato, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 8 (1974)
 - b) Y. Imai, R. Sato, *J. Biochem.*, **75**, 689 (1974)
 - 14a) D. M. Ziegler, C. H. Mitchell, *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 116 (1972)
 - b) D. M. Ziegler, L. L. Poulsen, *Methods in Enzymology*, **52**, 142 (1978)
 - 15a) R. Sato, T. Omura, “Cytochrome P-450” Kodansha Academic Press (1978)
 - b) 代謝 **13** (No. 12), チトクロム P-450 特集 (1976)
 - c) 代謝 **19** (No. 12), チトクロム P-450 特集 II (1982)
 - d) 今井嘉郎, 蛋白質・核酸・酵素, **22**, 374 (1973)
 - e) “Molecular Mechanisms of Oxygen Activation” (O. Hayaishi Ed.), Academic Press Inc. (1974)
 - f) R. E. White, M. J. Coon, *Ann. Rev. Biochem.*, **49**, 315 (1980)
 - g) J. T. Groves, S. Krishnan, G. E. Avaria, T. E. Nemo, “Biomimetic Chemistry” (D. Dolphin, C. McKenna, Y. Murakami, I. Tabushi Ed.), Chap. 15, *Adv. Chem. Series*, **191**, Am. Chem. Soc. (1980)
 - h) I. Tabushi, N. Koga, Ref. 15 g) Chap. 16.
 - 16) D. Fukushima, Y. H. Kim, T. Iyanagi, S. Oae, *J. Biochem.*, **83**, 1019 (1978)
 - 17) T. Takahashi, Y. H. Kim, D. Fukushima, K. Fujimori, S. Oae, T. Iyanagi, *Heterocycles*, **10**, 229 (1978)
 - 18) T. Numata, Y. Watanabe, S. Oae, *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 4933
 - 19) T. Numata, Y. Watanabe, S. Oae, *ibid.*, **1979**, 411
 - 20) Y. Watanabe, T. Numata, S. Oae, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55**, 1915 (1982)
 - 21) Y. Watanabe, T. Iyanagi, S. Oae, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 3685 (1980)
 - 22) Y. Watanabe, S. Oae, T. Iyanagi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **55**, 188 (1982)
 - 23) G. C. Gilbert, D. K. C. Hodgemann, R. O. C. Norman, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1973**, 1748
 - 24) M. Bonifacic, H. Mockel, D. Bahnemann, K. D. Asmus, *ibid.*, **1975**, 675
 - 25) W. Bose, E. Lengfelder, M. Saran, C. Fuchs, C. Mitchel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **70**, 81 (1976)
 - 26) Y. Watanabe, T. Numata, T. Iyanagi, S. Oae, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 1163 (1981)
 - 27a) B. W. Griffin, P. L. Ting, *Biochem.*, **17**, 2206 (1978)
 - b) B. W. Griffin, *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 850 (1978)
 - c) L. J. Marnett, G. A. Reed, *Biochem.*, **18**, 2923 (1979)
 - d) E. G. Rogan, P. A. Katomski, R. W. Roth, E. L. Cavalieri, *J. Biol. Chem.*, **254**, 7055 (1979)
 - e) B. W. Griffin, C. Marth, Y. Yasukochi, B. S. S. Masters, *Arch. Biochem. Biophys.*, **205**, 543 (1980)
 - f) B. W. Griffin, D. K. Davis, G. W. Bruno, *Bioorg. Chem.*, **10**, 177 (1981)
 - 28) O. Augusto, H. S. Beilan, P. R. O. de Montellano, *J. Biol. Chem.*, **257**, 11288 (1982)
 - 29) Y. Watanabe, T. Iyanagi, S. Oae, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 533 (1982)
 - 30) S. Oae, Y. Watanabe, K. Fujimori, *ibid.*, **23**, 1189 (1982)
 - 31) Y. Watanabe, Ph. D. Thesis, The University of Tsukuba (1982)
 - 32a) D. M. Ziegler “Enzymatic Basis of Detoxification” Vol. 1, Chap. 9, Academic Press Inc. (1980)
 - b) D. M. Ziegler, “Metabolic Basis of Detoxification” Chap. 9, Academic Press Inc. (1982)
 - 33a) L. L. Poulsen, R. M. Hyslop, D. M. Ziegler, *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 78 (1979)
 - b) J. R. Cashman, R. P. Hantzlik, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **98**, 147 (1981)
 - c) N. P. Hajjar, E. Hodgeson, *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 745 (1982)
 - 34a) R. A. Prough, *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 442 (1973)
 - b) L. L. Poulsen, F. F. Kadlubar, D. M. Ziegler, *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 774 (1974)
 - 35) R. A. Prough, P. C. Freeman, R. W. Hines, *J. Biol. Chem.*, **256**, 4178 (1981)
 - 36) D. M. Ziegler, 筑波大学での講演 (1982)
 - 37) D. M. Ziegler, M. W. Duffel, L. L. Poulsen, “Sulfur in Biology” Ciba Foundation Symposium 72, ISBN Elsevier North-Holland (1980)
 - 38) L. L. Poulsen, D. M. Ziegler, *J. Biol. Chem.*,

- 254, 6449 (1979)
- 39) N. B. Beaty, D. P. Ballou, *ibid.*, **256**, 4611, 4619 (1981)
- 40) S. Oae, K. Fujimori, A. Mikami, T. Iyanagi, in preparation for publication
- 41) D. P. Ballou, "Flavins and Flavoproteins" (V. Massey, C. H. Williams Ed.), Chap. **48**, Elsevier N. Holland Inc. (1982)
- 42a) T. Spector, V. Massey, *J. Biol. Chem.*, **247**, 5632 (1972)
- b) B. Entsch, D. P. Ballou, V. Massey, *ibid.*, **251**, 2550 (1976)
- 43a) J. W. Hastings, C. Balny, C. Pench, P. Douzou, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**, 3468 (1973)
- b) J. E. Becvar, S.-C. Tu, J. W. Hastings, *Biochem.*, **17**, 1807 (1978)
- c) S. Ghisla, J. W. Hastings, V. Favaudon, J.-M. Lhoste, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 5860 (1978)
- 44a) C. Kemal, T. C. Bruice, *ibid.*, **73**, 995 (1976)
- b) C. Kemal, T. W. Chan, T. C. Bruice, *ibid.*, **74**, 405 (1977)
- c) C. Kemal, T. W. Chan, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 7272 (1977)
- d) S. Ball, T. C. Bruice, *ibid.*, **102**, 6498 (1980)
- e) T. C. Bruice, Ref. 41, Chap. 44
- 45) フラビンによる分子状酸素の活性化に対して, Scheme 5 に示した E (FIOOH) 以外の活性種が提案されており, 最終的結論はまだなされていない。紙面の都合上その詳細な議論を省略した。興味ある読者は次の文献を参照されたい。
- a) G. A. Hamilton, Ref. 15 e) Chap. 10
- b) D. Dorphin, "Biomimetic Chemistry" (D. Dorphin, L. McKenna, Y. Murakami, I. Tabushi Ed.), Chap. 5, *Adv. Chem. Series* **191**, American Chemical Society (1980)
- c) T. C. Bruice, *ibid.*, Chap. 6
- d) T. C. Bruice, Ref. 44 e)
- e) F. Muller, "Radicals in Biochemistry", P. 71, Springer-Verlag (1983)
- 46) J. T. Simpson, A. Krantz, F. D. Lewis, B. Kokel, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 7155 (1982)
- 47) J. W. Frost, H. W. Rastetter, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5242 (1981)
- 48) S. Oae, K. Fujimori, Y. Watanabe, A. Mikami, T. Iyanagi, in preparation for publication
- 49) K. Asada, MS Thesis, The University of Tsukuba (1983)
- 50) S. Oae, K. Asada, T. Yoshimura, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 1256 (1983)
- 51) S. Oae, K. Fujimori, T. Matsuura, T. Iyanagi, in preparation for publication
- 52) T. C. Bruice, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1983**, 14
- 53) 立体化学に関する用語は次の文献に従った。中崎昌雄, "不斉反応の化学" 化学総説 No. 4, p. 1 (1974)
- 54) T. Matsuura, K. Fujimori, S. Oae, T. Iyanagi, 47th Ann. Meeting of Chem. Soc. Jpn., Abst. II, 1319 (1983)
- 55a) K. Ogura, M. Fujita, H. Iida, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 2233
- b) T. Sugimoto, T. Kokubo, J. Miyazaki, S. Tanimoto, M. Okano, *Bioorg. Chem.*, **10**, 311 (1981)
- 56) T. Takata, M. Yamazaki, K. Fujimori, Y. H. Kim, S. Oae, T. Iyanagi, *Chem. Lett.*, **1980** 1441; *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **56**, 2300 (1983)
- 57) 木村徳次, 生化学, **51**, 1109 (1979)
- 58) B. J. Aurret, D. R. Boyd, H. B. Henbest, S. Ross, *J. Chem. Soc., (C)*, **1968**, 2371
- 59a) C. R. Johnson, D. McCants, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 1109 (1965)
- b) G. Barbieri, M. Cinquini, S. Colonna, F. Montanari, *J. Chem. Soc., (C)*, **1968**, 659
- 60) S. S. Sofer, D. M. Ziegler, R. P. Popovich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **57**, 183 (1974)
- 61a) E. C. Miller, *Cancer Research*, **38**, 1479 (1978)
- b) 田所勇作, 川尻 要, 米川博道, 代謝 p. 18, 8月臨時増刊 (1981)