シトクロム P450 による フェノール類新規代謝反応の 検索と機構解析

増野 匡彦*

*Novel Metabolic Pathway of Phenols Catalyzed by Cytochrome P450
and Its Mechanism*

Tadahiko Mashino*

We have found a novel metabolic pathway of phenols catalyzed by cytochrome P450 and its chemical models. When various *p*-substituted phenols (substituent = OPh, NO₂, CN, CH₂OH, COCH₃, COPh, COOH, F, Cl, and Br) were reacted with rat liver microsomes system or *meso*-tetraphenylporphyrinatoiron(III) chloride model system, the substituent was eliminated to produce hydroquinone. In the case of *p*-cresol, *p*-toluquinol was formed instead of hydroquinone. To elucidate how the substituent is eliminated, we attempted to detect the product derived from the eliminated group. Results indicated that the mechanism of this reaction can be divided into two types: the substituent is eliminated as an anion and as a cation. P450 also catalyzed phenol coupling reaction to give biphenyl derivatives, diphenyl ether derivatives, and dibenzodioxin.

Key words: cytochrome P450, cytochrome P450 model, phenol metabolism, drug metabolism, dibenzodioxin, estrogen, phenol coupling

1. 序

基質と酵素は鍵と鍵穴にたとえられるように、酵素反応では基質選択性が高く、ただ1種類の反応を触媒し生成物は1つと思われている方が多いと思う。しかし、薬物などの外来異物の代謝で中心的役割を果たしているシトクロム P450 (以下 P450) は様々な異物に対応するため、基質選択性は低く、触媒する反応も多様である。この酵素の目的は、不特定多数の外来異物の水溶性を高くし、排泄しやすい形に変換することである。P450 はヘム酵素であり、酸素分子を還元的に活性化し、一般の有機化学試薬では難しい酸化反応、例えば炭化水素の水酸化、芳香環の水酸化等を進行させるため、我々有機化学者から見ても魅力ある触媒である。そして、高い触媒機能の解析と再現を目的として様々なモデル研究がなされてきた¹⁾。

酵素反応については本誌ではあまり取り上げられていないが、本論文では化学モデルを用いて見いだした P450 の新規反応と、その機構解析・応用をフェノール類の代謝を例に紹介させていただく²⁻⁶⁾。本論文を読んでいただき、酵素も有機化学で使用する触媒と基本的には同じで、有機化学を専攻する研究者がもっと酵素反応の解析に携わるべきだと感じていただければ幸いであ

る。あるいは、読者諸氏はもうすでにそのようなことは当然と考えているかもしれないが。

また、今回フェノールの代謝を取り上げるが、フェノール骨格は医薬品以外にも天然由来の化合物に含まれており、さらに、芳香環を有する化合物は P450 により水酸化されフェノール骨格に変換されるので、フェノール骨格の代謝研究は重要である。

1.1 異物(薬物)代謝研究と P450 モデル

まずはじめに読者諸氏にはなじみが薄いと思われる異物(薬物)代謝について概説する。

P450 の多様な反応性と低い基質選択性により、単一の外来異物から複数の代謝物が生成する。それらの中には本来の目的とは異なる代謝物、すなわち、薬理作用の本体や、副作用や毒性の本体である例が数多く報告されている⁷⁾。このような代謝活性化が存在するため、化学物質がどのような代謝物に変換されるかを検索することは重要である⁷⁾。

一般に薬物などの代謝物検索は、動物に化合物を投与し尿や胆汁中から検出するか、酵素を調製して反応を行い生成物を検出するかである。しかし、これらの方法では複数の不安定で微量な代謝物を単離同定するのは困難であり、多大な労力を要する。一方、有機化学的興味から P450 モデル研究が活発に行われ、数多くの金属ポルフィリンが合成されるとともに P450 の反応を模倣した系が構築されている¹⁾。我々は、この P450 化学モデル

* 共立薬科大学 ()

* Kyoritsu College of Pharmacy

()

系を用い実際の薬物代謝研究に応用してきた²⁻⁶⁾。

1.2 P450 反応機構とペルオキシダーゼ

つぎに P450 について、同じヘム含有酸化酵素であるペルオキシダーゼと比較して概説する。

P450 は NADPH-P450 還元酵素から電子を受け取り分

Fig. 1 Catalytic cycle of P450.

子状酸素を還元的に活性化して酸化活性種(iron oxenoid)を生成する。そして、基質に酸素分子由来の酸素原子を1つ、すなわち活性種上の酸素原子を導入する一原子酸素添加酵素である(図1)。また、これとは別に酸素分子の還元的な活性化過程を経ずに種々の酸化剤を用いて直接に酸化活性種を生成する経路(シャント系)も存在し、酸化剤としてヨードソベンゼン、過酸類などが使用される。P450 反応サイクル、反応機構に関しては酵素、モデル双方を用いた研究が多くなされてきた^{8,9)}。その結果、様々な酸化反応において、基本的には基質からのヒドロキシラジカル引き抜き(あるいは一電子とプロトン引き抜き)とそれに続く非常に速い活性種上のヒドロキシラジカル相当のリバンドであることが明らかにされている¹⁰⁾。O-脱アルキル化反応の例を図2に示す。

ペルオキシダーゼは、主に過酸化水素を酸化剤として

Fig. 2 O-Dealkylation mechanism catalyzed by P450.

用い、P450 のシャント系と類似した機構で活性種を生成する。しかし、ペルオキシダーゼは P450 とは異なり活性種上の酸素原子を基質に導入する反応はほとんど触媒せず、電子の引き抜きのみ行う。このような違いはヘムの環境、第5配位子(P450 ではチオレート、ペルオキ

シダーゼはイミダゾール)や基質結合部位の違いに由来している⁸⁾。しかし、特殊な例として、P450 も酸素添加ではなく一電子酸化と考えられる反応を触媒することを我々は見いだしており、最後の節で紹介する⁶⁾。

2. P450 によるイプソ置換反応

2.1 イプソ置換反応

2価銅-アスコルビン酸-酸素系は効率的に *o*-メトキシフェノール類をカテコール類に変換させる(図3)¹¹⁾。本反応系は P450 系と同様に金属イオン、還元剤、分子状酸素を反応に必要とする生体類似型反応系である。しかし、この反応は P450 とは異なり、 α 位水素引き抜きを初発とする O-脱アルキル化ではなく、アルコキシル基が分子状酸素由来の酸素原子(本系では活性種の酸素原子と見なせる)により置換されるイプソ置換反応(置換基の根元を一般にイプソ位と呼ぶ)であることが明らかにされた¹¹⁾。見かけ上類似した反応が西洋わさびペルオキシダーゼ¹²⁾、リグニンペルオキシダーゼ¹³⁾においても報告されている。しかし、これらは2価銅-アスコルビン酸-酸素系とは機構的に異なり、アルコキシル基が水由来の酸素原子により置換される(図3)。すなわち、活性種上の酸素原子は基質に導入されない。

Fig. 3 ipso-Substitution.

P450 に類似する様々な酸化系においてイプソ置換型反応が進行していることから、P450 においても同様な反応が進行すると考え本研究に着手した。イプソ位における代謝反応は、P450 反応としては特異なものであった。

2.2 P450 による芳香族エーテル類のイプソ置換反応²⁾

従来アニソールなどの芳香族エーテル類は、P450 活性種による α 位水素ラジカル引き抜きを初発とする機構で脱アルキル化されるとされていた(図2)。今回、このイプソ置換反応を検討するに当たり、 α 位水素を持たない基質、*p*-(*p*-ニトロフェノキシ)フェノールを用いた。

ジフェニルエーテル骨格は殺虫剤などとして環境中に広く存在するが、そのエーテル結合は安定であり代謝分解されにくいとされていた。また、これらは細菌によっ

Fig. 4 P450 Chemical models.

でも極めて分解されにくい構造のため、体内にも環境中にも蓄積され問題とされている。

P450 モデルとしては *meso*-tetraphenylporphinatoiron(III) chloride (Fe(III)TPPCL) および *meso*-tetrakis(2,6-difluorophenyl)porphinatoiron(III) chloride (Fe(III)TDFPPCl) (図 4) を用いた。これらの触媒と、NADPH の代わりに NaBH₄ を、シャント系のモデルには *m*-クロロ過安息香酸(*m*CPBA)を用い反応を行った。反応終了後(*m*CPBA 系ではさらに還元し)生成物をトリメチルシリル化し、GC-MS により検索・定量した。その結果、基質が開裂して生成したと考えられる *p*-ニトロフェノールおよびヒドロキノンが検出された(表 1)。

以上の化学モデル系の結果をもとに、酵素系としてラット肝ミクロソームを用いて検討した。ラット肝ミクロソームは、P450 の誘導剤フェノバルビタールを 3 日間ラットに投与後、肝を摘出し、常法により調製した。生成物は反応終了後、酢酸エチルで抽出し、同様にトリメチルシリル化してから GC-MS により検索した。表 1 に示すように、モデル系と同様開裂生成物が得られた。

還元剤が反応系に存在しないシャント系モデルにおいては、反応後還元剤を添加しないとヒドロキノンは検出されないこと、およびもう一方の生成物がフェノールで

Table 1 Diphenyl ether cleavage catalyzed by P450 models and P450.

System	Product Formation (nmol/nmol cat.)	
	Hydroquinone	<i>p</i> -Nitrophenol
Fe(III)TDFPPCl- <i>m</i> CPBA	5.21	4.98
Fe(III)TPPCL-NaBH ₄ /O ₂	5.55	6.82
Microsomes-NADPH/O ₂	0.53 ± 0.08	3.00 ± 0.16

あることより、ヒドロキノンが直接生成するのではなく *p*-ベンゾキノンが生成し、その後還元されていると考えられる。なお、酵素系では *p*-ニトロフェノール生成量に比べヒドロキノン生成量が少ないが、これはベンゾキノンが一部タンパクと結合してしまうためである。

次に、機構を調べる目的で [¹⁸O]*m*CPBA 系を用い反応を行った。*p*-ニトロフェノールには ¹⁸O が全く導入されなかったのに対し、*p*-ヒドロキノンにおける ¹⁸O 導入率はほぼ 100% だった。さらに、肝ミクロソーム-NADPH 系の反応を ¹⁸O₂ 下行うと、ほぼ同様の結果が得られた。これは、本開裂様式がポルフィリン活性種の酸素原子によるイプソ置換反応であり、ペルオキシダーゼとは異なることを示している。

さらに、 α 位水素が存在する *p*-メトキシフェノールにおいても、従来の *O*-脱アルキル化よりもイプソ置換が優先することが ¹⁸O₂ を用いた酵素系の実験より明らかとなった²⁾。

2.3 様々な置換フェノールにおけるイプソ置換反応

次に、イプソ置換される基はアルコキシル基やフェノキシル基に限るものではないと考え、本反応を一般の置換フェノール類に展開させた^{3,4)}。置換フェノールにお

Fig. 5 *ipso*-Substitution catalyzed by P450 model and P450.

いて一般に知られている代謝経路は芳香環水酸化であり、イプソ位における代謝反応はこれまでほとんど知られていない¹⁴⁾。

様々なパラ置換フェノール類を基質とし、モデル系およびP450を用いた反応を行ったところ、メチル基以外すべての置換基が置換された(図5)。芳香環に結合したニトロ、シアノ、ヒドロキシメチル、アセチル、ベンゾイル、カルボン酸については、従来代謝的に安定と考えられていた結合である。P450による炭素-炭素結合開裂反応は、ステロイドホルモンの生合成に関わるP450が触媒することが知られているが⁸⁾、本置換基脱離反応とは全く異なる機構である(図6)。

Fig. 6 C-C Bond cleavage catalyzed by P450 in steroid biosynthesis.

また、モデル系と酵素系での各基質における生成量の傾向は類似していた。モデル系は酵素と違い基質結合部位がないので、イプソ置換が進行するかはポルフィリン活性種の反応性により決まる。よって酵素の反応性もかなりポルフィリンに依存していると考えられる。

2.4 反応機構の検討^{3,4)}

次に、置換基脱離反応の機構を検討するために、モデル系では酸化剤として $[^{18}\text{O}]m\text{CPBA}$ を用い、酵素系では $^{18}\text{O}_2$ を用いて反応を行った。反応後、生成するヒドロキノンにおける ^{18}O 導入率をGC-MSで調べた結果、 ^{18}O 導入率はいずれの系においても、すべての基質で80%以上だった。この結果より、本反応はポルフィリン活性種の酸素原子によるイプソ置換反応であることが明らかになった。

フェノール性水酸基をメチル基に変えた、パラ置換トルエンを基質とした際には本置換反応は進行せず、フェノール性水酸基が必須であることが示された。一電子酸化され生じるフェノキシラジカル、あるいは二電子酸化されたカチオンを経由する機構が考えられるが、水からの酸素原子導入がほとんど見られないことからフェノキシラジカル経由の可能性が高い。

基質が

-クレゾールの場合にはイプソ置換が進行しなかったが、その代わりに

-トルキノールが得られた(図7)。すなわち、メチル基は脱離しにくく反応がその手前で止まった。本知見は新たな代謝様式の可能性を示して

いると同時に、他のパラ置換フェノールにおいても反応中間体としてキノール体が生成していることを示唆している。

以上の結果をまとめ、新規代謝様式イプソ置換反応の反応機構を図7に示した。

Fig. 7 Proposed mechanisms for *ipso*-substitution of *p*-substituted phenols.

2.5 脱離機構の解析⁴⁾

キノール中間体から置換基が脱離する様式には2種類考えられる。1つは、電子が置換基の方へ移動してアニオンとして脱離して、*p*-ベンゾキノンが生成するType I脱離。もう1つは、その逆に置換基がカチオンとして脱離してヒドロキノンが生成するType II脱離である(図7)。置換基がアルコキシルやフェノキシルの場合は、アルコールやフェノールが検出されたのでType I脱離で進行していた。

また、置換基がハロゲンの場合は、ハロゲノフェノールやハロゲノアニリンからのP450による脱ハロゲン化の報告があり^{15,16)}、Rietjensらはハロゲンアニオンが脱離する機構を提唱している。その他の置換基がどちらの様式で脱離するのかを調べるために脱離基が何に変換されているか検討した。

置換基がヒドロキシメチルの場合、ホルムアルデヒドが生成物として検出され、生成量はヒドロキノン量にほぼ一致していた。

本系においてはメタノール(Type I脱離での生成物)はホルムアルデヒドに酸化されないことから、直接ホルムアルデヒドが生成したものと考えられ、Type II脱離機構であることがわかった(図8)。

Fig. 8 Type II Elimination.

置換基がベンゾイルの場合、ベンズアルデヒドおよびベンジルアルコールは検出されなかったが、安息香酸が検出された。安息香酸の生成量はヒドロキノンの生成量にはほぼ一致していた。従って、中間体のキノール体は水の付加を伴いながら、Type II 脱離を経てイプソ置換されたと考えられる(図 8)。この場合、Type I 機構によりベンズアルデヒドとして脱離し、その後、安息香酸に酸化される可能性も考えられる。そこで、酵素系におけるベンズアルデヒドの添加回収を行ったところ、一部は安息香酸に酸化されるが、還元されたベンジルアルコールも生成することが確認された。ベンズアルデヒド、ベンジルアルコールともに生成しなかったことを考えると、Type I 機構により脱離した可能性は低い。また、水の付加が脱離に関与していることは、有機溶媒中の反応であるモデル系においてベンゾイルはイプソ置換されにくかったことと対応している(図 5)。

他の置換基に関しては省略するが、脱離機構をまとめると、置換基がアルコキシやフェノキシ、ハロゲン、ニトロ、シアノの場合は Type I 脱離、ヒドロキシメチルやベンゾイルのような炭素-炭素結合を介する置換基の場合は Type II 脱離となる。アニオンとなりやすい置換基では Type I 脱離が進行し、一方、炭素-炭素結合を介する置換基の場合はアニオンとしての脱離能が低いため Type II 脱離が進行すると考えられる。

2.6 ハロゲンフェノール類におけるイプソ置換反応

ハロゲンフェノールからの脱ハロゲン化反応において、F, Cl, Br の順でイプソ置換が進行していた(図 5)。この理由を検討するために、酵素系においてオルト水酸化体の生成量を同時測定した(表 2)。その結果、F から Cl, Br になるにつれオルト水酸化体生成量が増加したが、3つの基質で代謝物の総量は変わらなかった。また、基質結合部位の全くない化学モデル系においても同様な傾向が見られた(図 5)。従って、この反応位置の変化は、酵素基質結合部位への基質の取り込みの差によるのではなく、ポルフィリン活性種が基質のどの部分を攻撃しやすいかに起因しているのであろう。原因としては

Table 2 *ipso*-Substitution and *o*-hydroxylation of *p*-halogenophenols catalyzed by P450.

Substituent	<i>ipso</i> -Substitution (nmol/nmol P450)	<i>ortho</i> -Hydroxylation (nmol/nmol P450)	Total Amount (nmol/nmol P450)
F	5.08 ± 0.61	8.48 ± 0.24	13.56 ± 0.80
Cl	0.60 ± 0.02	15.17 ± 0.47	15.77 ± 0.49
Br	0.49 ± 0.02	17.23 ± 0.90	17.72 ± 0.88

立体障害が考えられる。

2.7 反応機構(まとめ)

P450 によるイプソ置換反応の進行過程を考えると、各基質において生成量の違いを生じる段階は大きく 4 つある。まず、基質結合部位への基質の取り込み。第 2 に一電子酸化、すなわちフェノキシラジカルの生成。第 3 にキノール中間体生成。最後にキノール骨格からの置換基脱離である(図 7)。

フェノールの一電子酸化を考えたとき、フェノール自体十分に酸化されやすく、ポルフィリン活性種の酸化力が強いことも考えると置換基が要因となって違いが生じるとは考えにくい。よって、生成量の違いを生じさせている段階は主に第 1, 第 3, 第 4 の段階と考えられる。

モデル系の場合、基質結合部位がないので当然第 1 の段階は無視される。Type I 脱離においては、アニオンとしての脱離は比較的容易なため、第 4 段階は反応性を決めるキーステップとならずに、主に第 3 段階のみで決定すると考えられる。例えば、脱ハロゲン化において生成量の違いを立体効果で説明できるのは、この段階が反応性を決める重要な段階であることを示している。Type II 脱離においては脱離しにくい置換基が多いため、第 4 段階も反応性を左右させると考えられる。その顕著な例がメチル基である。

酵素の場合、第 1 の段階の寄与は少なからず存在する。本論文では省略させていただいたが、P450 アイソザイム間で触媒する基質が違う結果を見いだしており、これは基質結合部位の違いが本反応に影響していることを示している。ただし、モデル系との類似性を考えると、基本的に第 3, 第 4 の段階により反応は支配されるのだろう。

このように、モデル系を使い、その結果を酵素系と比較検討することで、類似点、相違点が示され、そこから詳細な機構解析が可能となった。

3. ジベンゾダイオキシン骨格におけるイプソ置換反応

次にイプソ置換反応の応用として、従来代謝的に安定と考えられていたジベンゾダイオキシン骨格が本反応により開裂するか検討した。農薬などに使用されているジフェニルエーテル骨格が開裂することはすでに示したが、本節では強力な催奇形性や発癌性を有する環境汚染物質 TCDD 類の基本骨格であるジベンゾダイオキシン骨格を基質として用いた¹⁷⁾。ダイオキシン類は毒性が強いだけでなく、代謝に対して極めて安定であることから、生物濃縮や体内蓄積が問題となっている。しかしながら、極めてゆっくりとした代謝は起こることが報告されており、主経路は 2 位水酸化である¹⁸⁾。2 位水酸化体

は、イプソ置換型代謝反応によって環開裂される可能性があると考えた。そこで、モデル基質として塩素のない2-ヒドロキシジベンゾ-*p*-ダイオキシンを用い、モデル系および酵素系において検討を行った。

3.1 モデル系によるジベンゾダイオキシン環開裂

表3はポリフィリン-NaBH₄/O₂およびCHPの両モデル系において、ジベンゾダイオキシン骨格の環開裂反応が進行することを示している。しかし、2,5,2'-トリヒドロキシジフェニルエーテルとカテコールの生成比は両系で顕著に異なっていた。NaBH₄/O₂系の場合、最初の環開裂生成物であるキノン体は、過剰に存在するNaBH₄により2,5,2'-トリヒドロキシジフェニルエーテルに還元されている。この還元体にはフェノール性水酸基が3つあるため基質よりイプソ置換反応が進行しやすく、さらにエーテル結合が開裂して最終的にカテコール(初生成物は*o*-ベンゾキノン)が多量に生成する。一方、CHP系の場合、最初の環開裂体はキノン体のままである(生成物の検出は反応終了後、還元して行っている)。このキノン体にはフェノール性水酸基が1箇所しかなく、次の酸化反応は起こりにくいと予想される。従って、カテコールまで開裂が進行せず、最初の環開裂体が主に生成する。

Table 3 Degradation of dibenzodioxin structure catalyzed by P450 model and P450.

System	Product Formation (nmol/nmol cat.)	
	Trihydroxydiphenyl ether	Catechol
Fe(III)TPPCI-NaBH ₄ /O ₂	0.03	1.96
Fe(III)TDFPCCI-CHP	27.88	0.17
Microsomes-NADPH/O ₂	7.16 ± 0.26	3.30 ± 0.06

3.2 酵素系によるジベンゾダイオキシン環開裂

以上のモデル系の結果をもとに酵素系での検討を行った(表3)。その結果、モデル系と同様に開裂生成物である2,5,2'-トリヒドロキシジフェニルエーテルおよびカテコールが得られた。さらに、¹⁸O₂ 雰囲気下反応を行うと、2,5,2'-トリヒドロキシジフェニルエーテルにおける¹⁸O 導入率は81%、カテコールにおける¹⁸O 導入率は10%であった。従って、最初の開裂および2回目の開裂は、もともと水酸基の付いている芳香環上でイプソ置換反応が起きていることが示された。生成物比から、はじめの

開裂で生成するキノン体は一部2,5,2'-トリヒドロキシジフェニルエーテルに還元されていることがわかる。P450還元酵素がこのキノン体を還元していると考えられる。

4. イプソ付加反応

前著したように、基質が*p*-クレゾールの場合はイプソ置換が進行しなかったが、その代わりに*p*-トルキノールが得られた。本知見は、置換基がアルキル基の場合、新たな代謝様式イプソ付加反応(キノール生成反応)が進行することを示したものである。そこで、イプソ付加反応について、さらに検討した。

モデル系としてはFe(III)TDFPCCI-*m*CPBAを、酵素系としてはラット肝ミクロソーム-NADPH/O₂系を用いた。いずれの系でも*p*-トルキノールが得られた。また酵素標識体を用いた実験より、生成物中にポリフィリン活性種上の酸素原子が1つ導入されることが明らかになった。

Fig. 9 ipso-Addition reaction.

本新規代謝様式の応用として、内在性物質である*N*-アセチルチラミンを基質とした。*N*-アセチルチラミンを基質とし、酵素系を用い反応を行ったところイプソ付加して生じたキノール体が分子内 Michael 型付加反応により環化した2環性の代謝物が得られた(図9)。これは、イプソ付加型代謝物であるキノール体が非常に求核攻撃を受けやすいためであり、一般にキノール体が生体高分子と結合して毒性を発現する可能性を示している。

また、*p*-ヒドロキシフェニルアルコールを基質とし、酵素系で反応を行った場合も同様の環化生成物が得られた(図9)。

5. エストロゲン類におけるイプソ付加反応⁵⁾

エストロゲン型ステロイドホルモンは女性ホルモンとしては言うまでもなく、癌を引き起こす内在性物質としても注目されているが、これには代謝物が関与しているとされている¹⁹⁾。

エストロゲン類の代謝物としては2位、16 α 位、その他4位、6 α 位、6 β 位、7 α 位、15 α 位、16 β 位の水

酸化体が報告されている²⁰⁾。

エストロン、エストラジオールを基質とし、ヒト P450 発現細胞ミクロソームを用い反応を行った。反応終了後、酢酸エチルで抽出し、HPLC で部分精製後 GC-SIM 法により生成物を検出した。その結果、それぞれの基質より 10 β -OH 体が得られた(図 10)が、ステロイド平面の逆側から攻撃されて生成する 10 α -OH 体は検出されなかった。10 β 体は母化合物同様ほぼ平面であるが、10 α 体はかなり屈曲するため、生成反応の遷移状態が高く反応が進行しにくいと考えられる。

Fig. 10 Metabolism of estradiol and estrone catalyzed by P450.

10 β -OH エストロンおよび 10 β -OH エストラジオールは、エストロゲン類の新規代謝物であり、その内在性および生理活性に興味を持たれる。特にエストロゲンの発癌との関わりについては、今後検討の価値がある。

今回見いだしたフェノール類の新規代謝反応で生成する化合物は生体に障害を与える可能性が高い。例えばキノン類は DNA 等の生体高分子と共有結合し²¹⁾、また、レドックスサイクルを介して活性酸素を産生²²⁾することにより、生体機能に重要な要素を直接破壊して毒性を発現する。キノール体も生体高分子との反応性が高く、こ

れらの知見は代謝化学的に重要である。

6. フェノール類のカップリング反応とジベンゾダイオキシン骨格の生成

従来 *N*-アルキルアニリンの P450 による代謝は脱アルキル化反応のみ報告されていたが、我々はポルフィリンモデルの研究からカップリング代謝物が得られることを明らかにした(図 11)⁶⁾。これよりフェノール類でもカップリング代謝が進行すると考え検討した。また、アルカロイド類の生合成過程でも P450 によるカップリング反応が報告されている²³⁾。

Fig. 11 P450-mediated *N*-methylaniline coupling reaction.

フェノールを基質として P450 で反応を行い様々なカップリング代謝物を検索した(図 12)。図中、代謝物の下に生成量(nmol/nmol P450)を示したが、従来より知られていた水酸化体に比べかなり少量ではあるがカップリング体の生成が認められた。この中で注目されるのはカップリング反応が 2 回進行して生成するジベンゾダイオキシンである。生成量は非常に少ないが、本結果は塩素化フェノール類から毒性の高い塩素化ジベンゾダイオキシンが生成することを示唆している。

反応機構が一電子酸化体のカップリングかどうか明らかにするためラジカルトラップ剤(α -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitrone, POBN)を反応系に添加したところ、水酸化反応は影響を受けなかったが、カップリング反応は抑制された。POBN は水溶性のため P450 活性部

Fig. 12 Phenol coupling reaction catalyzed by P450.

位には入りにくく水酸化反応には効果がないと考えられる。さらに、本結果は反応部位からフェノキシラジカルが遊離している可能性も示唆している。この遊離したラジカルがカップリングし、POBNはそのラジカルをトラップしたと考えると実験結果を説明できる。

また、炭素-炭素結合で結合した二量体は他の二量体に比べフェノールでは多いが、*N*-メチルアニリンでは少なかった⁶⁾。これはフェノールとアニリンではラジカル分布が異なることに由来している。フェノールではオルト、パラ位の炭素に、アニリンでは窒素に主にラジカルが分布することがMOPACの計算により示され、実験結果と一致した。

一般に、これらカップリング反応はP450よりもベルオキシダーゼの反応と考えられていた。今回P450もカップリング反応を触媒することが明らかとなったが、ジベンゾダイオキシンはベルオキシダーゼでは生成せず、また、カップリング体の生成物比も異なっていた。

本論文では誌面の関係もあり、P450酵素反応を有機化学的に解析した結果が中心となったが、興味を持って読んでいただけたのであれば幸いである。しかし、モデル系の結果をかなり省略したため新規代謝反応検索におけるモデル系の有用性はあまりご理解いただけなかったかもしれない。我々のグループはこの手法を用いフェノール代謝以外にも多くの新規代謝反応を見いだしている。

謝 辞 最後に、本研究を行うに当たり適切なご指導をいただきました東京大学大学院薬学系研究科名誉教授・静岡県立大学学長 廣部雅昭先生、共立薬科大学学長 望月正隆先生、ならびに本研究に携わった大江知之博士（現萬有製薬）らに深く感謝いたします。

（2000年7月31日受理）

文 献

- 1) B. Meunier, *Chem. Rev.*, 92, 1411 (1992)
- 2) T. Ohe, T. Mashino, M. Hirobe, *Arch. Biochem. Biophys.*, 310, 402 (1994)
- 3) T. Ohe, T. Mashino, M. Hirobe, *Tetrahedron Lett.*, 42, 7681 (1995)

- 4) T. Ohe, T. Mashino, M. Hirobe, *Drug Metab. Dispos.*, 25, 116 (1997)
- 5) T. Ohe, T. Mashino, M. Hirobe, *Drug Metab. Dispos.*, 28, 110 (2000)
- 6) T. Doi, T. Mori, T. Mashino, M. Hirobe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191, 737 (1993)
- 7) 加藤隆一, 鎌滝哲也 編, 薬物代謝学, 東京化学同人 (1995)
- 8) P. R. Ortiz de Montellano, "*Cytochrome P-450, Structure, Mechanism, and Biochemistry*", Plenum Press, New York (1986)
- 9) I. Schlichting, J. Berendzen, K. Chu, A. M. Stock, S. A. Maves, D. E. Benson, R. M. Sweet, D. Ringe, G. A. Petsko, S. G. Sligar, *Science*, 287, 1615 (2000)
- 10) J. K. Atkinson, P. F. Hollenberg, K. U. Ingold, C. C. Johnson, C. Cathy, M. H. Le Tadic, M. Newcomb, D. A. Putt, *Biochemistry*, 33, 10630 (1994)
- 11) 粟飯原一弘, 浦野泰照, 樋口恒彦, 廣部雅昭, 有合化, 55, 196 (1997)
- 12) G. Meunier, B. Meunier, *J. Biol. Chem.*, 260, 10576 (1985)
- 13) P. J. Kersten, B. Kalyanaraman, K. E. Hammel, B. Reinhammar, T. K. Kirk, *Biochem. J.*, 268, 475 (1990)
- 14) B. K. Park, N. R. Kitteringham, *Drug. Metab. Rev.*, 26, 605 (1994)
- 15) C. Den Besten, P. J. Van Bladeren, E. Duizer, J. Vervoort, I. M. C. M. Rietjens, *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 674 (1993)
- 16) N. H. P. Cnubben, S. Peelen, J.-W. Borst, J. Vervoort, C. Veeger, I. M. C. M. Rietjens, *Chem. Res. Toxicol.*, 7, 590 (1994)
- 17) M. P. Holsapple, D. L. Morris, S. C. Wood, N. K. Snyder, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 31, 730 (1991)
- 18) H. Poiger, H. R. Buser, H. Weber, U. Zweifel, C. Schlatter, *Experientia*, 38, 484, (1982)
- 19) A. R. Kennedy, R. R. Weichselbaum, *Carcinogenesis*, 2, 67 (1981)
- 20) C. P. Martucci, J. Fishman, *Pharmac. Ther.*, 57, 237 (1993)
- 21) T. J. Monks, R. P. Hanzlik, G. M. Cohen, D. Ross, D. G. Graham, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 112, 2 (1992)
- 22) H. Kappus, *Biochem. Pharmacol.*, 35, 1 (1986)
- 23) R. Stadler, M. H. Zenk, *J. Biol. Chem.*, 268, 823 (1993)

PROFILE

増野匡彦 共立薬科大学薬学部助教授

〔経歴〕 1981年東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了, 1983年同薬学部助手, 1985年薬学博士, 1985～87年米国デューク大学博士研究員, 1997年共立薬科大学助教授。

〔専門〕 有機薬化学, 生物有機化学