



置換フェニル N-メチルカーバメイト類の
アセチルコリンエステラーゼ阻害反応機構
に関する研究。

1976

西岡孝明

置換フェニル N-メチルカーバメイト類の
アセチルコリンエステラーゼ阻害反応機構
に関する研究。

1976

西岡孝明

目 次

| | |
|------------------------------------------------|----|
| 第1章 序 論 | 1 |
| 第2章 フェニルカーバメイトによる AChE 阻害反応定数の測定 | 5 |
| 第1節 実 験 | |
| 2.1.1. 阻害剤, 基質および酵素 | 7 |
| 2.1.2. 反応速度式と反応定数 K_d , k_2 の測定 | 8 |
| 2.1.3. 実験操作 | 12 |
| 第2節 実 験 結 果 | |
| 2.2.1. 脱カルバミル化速度定数 k_3 | 13 |
| 2.2.2. 解離平衡定数 K_d とカルバミル化速度定数 k_2 | 14 |
| 第3節 考 察 | 22 |
| 第3章 フェニルエステル類のアルカリ加水分解反応におけるオルト置換基効果の解析 | 29 |
| 第1節 実 験 | |
| 3.1.1. 化合物の合成 | 33 |
| 3.1.2. アルカリ加水分解反応速度定数の測定 | 33 |
| 3.1.3. 置換基定数 | 34 |
| 3.1.4. 計算と検定 | 36 |
| 第2節 実 験 結 果 | 36 |
| 第3節 考 察 | 38 |
| 第4章 フェニルメチルカーバメイトの AChE 阻害反応における置換基効果の解析 | 43 |
| 第1節 実 験 | |
| 4.1.1. 化合物 | 48 |
| 4.1.2. 阻害反応定数 K_d , k_2 の測定 | 48 |
| 4.1.3. 反応定数の LFER 置換基定数による解析 | 48 |
| 第2節 実 験 結 果 | 50 |
| 第3節 考 察 | |
| 4.3.1. 疎水性相互作用 | 58 |
| 4.3.2. 置換基の電子的効果 | 60 |
| 4.3.3. オルト置換基による近接効果 | 63 |
| 4.3.4. 水素結合 | 64 |
| 4.3.5. カルバミル化速度定数 k_2 | 67 |
| 第5章 ま と め | 69 |
| 参 考 文 献 | 70 |

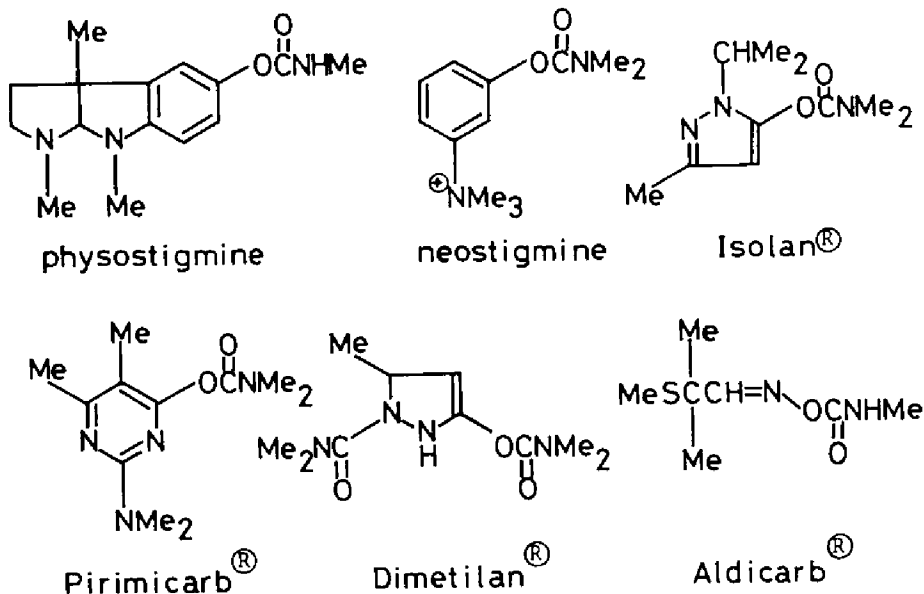
第1章 序 論

アセチルコリンエステラーゼ (Acetylcholinesterase, AChE) EC 3.1.1.7 は動物や昆虫の神経系に存在するコリン作動性シナプスの化学伝達物質アセチルコリン (Acetylcholine, ACh) を速やかに加水分解することにより、シナプスでの神経刺激伝達機能を正常に保つ働きをしている酵素である。AChEはこの特異的な機能のためにシナプス前後膜、あるいはその近傍に膜構造の一部として存在していることが動物や昆虫の神経組織標本を用いた電子顕微鏡観察から明らかにされている。^{1~3)} それ故にAChEを溶出 (solubilize) し精製することが極めて困難であり、昆虫のAChEについてはこれまでに部分的な精製が試みられているにすぎない。⁴⁾ AChEは神経組織のみならず哺乳動物の赤血球膜や電気ウナギの電気器官などにも分布しており、これらの酵素標品は高い比活性を示し、均一であることなどの理由から、酵素化学的研究にはもっぱらこれらの市販品が使われている。最近 Berman は市販酵素標品を affinity chromatography によって100倍以上精製し、ゲル電気泳動における挙動から電気ウナギ電気器官のAChEは分子量260,000 (60,000 × 2 と 75,000 × 2 の4個のサブユニットより構成されている)、仔牛赤血球のAChEは分子量200,000 (126,000 と 75,000 の2個のサブユニットより構成されている) と報告している。⁵⁾

AChEは α -chymotrypsin などによく似たセリンエステラーゼであり、アシル化酵素中間体を経て基質AChを加水分解することが、動物や昆虫の酵素標品について明らかにされている。^{6~8)} 基質AChは4級アミノ基を持つ化合物であり、他の中性アセテート類に比べて極めて速やかにAChEによって加水分解をうけること、⁸⁾ 種々の4級アミノ基を持つ化合物によってAChEは強い阻害をうけること、⁸⁾ methansulfonyl fluoride や dimethylcarbamyl fluoride とAChEとの反応が4級アンモニウム塩の存在によって促進されること⁹⁾ などの現象から、AChEの基質結合部位にはアシル化反応に直接関与するエステル部位 (esteratic site) と正電荷を持つグループが結合する陰性部位 (anionic site) の2箇所の結合部位が存在するものと考えられており、他のセリンエステラーゼとは異なるAChEの特徴とされている。

カーバメイト系化合物のもつ生理作用の応用は、旧くは西アフリカの折とう師がカラバル豆、*Physostigma venenosum* (Balf.) のアルカロイド Physostigmine を試罪毒 (ordeal poison) として利用していた例にまで遡ることができる。¹⁰⁾ Methylcarbamoyl 基 (-CONHMe)* を持つ唯一の天然物である physostigmine が強い抗アセチルコリンエステラーゼ活性を示すことが見つけられ、その生理作用に着目して多くのカーバメイト系化合物が医薬として合成された。^{11,12)} これら医薬用カーバメイト化合物はいずれも4級アンモニウム基を持つ neostigmine 関連化合物であり、高いAChE阻害活性を示すにもかかわらず殺虫活性を示す化合物はなかった。第2次世界大戦後、殺虫活性を示すカーバメイト系化合物の検索、合成が行なわれた結果、

(*) 本論文ではN-methylcarbamate を methylcarbamate と、N,N-dimethylcarbamate を dimethylcarbamate と略す。

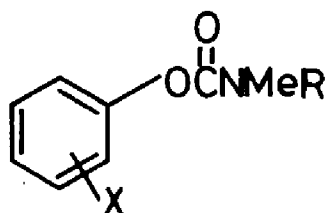


pyrazole, pyrimidine, pyrazoline など複素環水酸化物の dimethylcarbamate 類が強い殺虫作用を示すことが見つけられ実用に供された。Dimethylcarbamate よりも対応する methylcarbamate の方が 5~10 倍強い殺虫剤であり AChE 阻害剤でもあるが、合成法の制約から初期の殺虫剤は dimethylcarbamate であった。現在では少数の oxime carbamate を除いて中性置換 phenyl methylcarbamate 類がその大部分を占めている。

ベンゼン環上の置換基の種類、置換位置を変えた置換 phenyl methylcarbamate を系統的に合成することが容易なこともあって、これら豊富な置換誘導体を用いて AChE 阻害、殺虫機構に関する広範囲な研究が行なわれている。¹³⁾ 次のような実験事実から現在では、カーバメイト系殺虫剤が昆虫神経系に存在する AChE を阻害することによりその殺虫活性を発揮することは疑いないこととされている。①種々のカーバメイトについて殺虫活性と酵素液を用いた AChE 阻害活性との間に良い相関性がみとめられる。¹³⁾ Neostigmine 誘導体が強い AChE 阻害剤でありながら殺虫活性を示さないのは脂質に富む昆虫表皮や神経鞘 (sheath) を透過しえず、その作用点である AChE に到達しえないためであると推定されている。¹⁰⁾ その他にこの相関からはずれる化合物については昆虫体内におけるカーバメイトの代謝 (解毒) の影響を挙げることができる。¹⁴⁾ ②外部より点滴投与されたカーバメイトが AChE を阻害していることは、昆虫の中樞神経節 (ganglion) の組織をとり出して組織化学的に証明された。^{1,2)} ③カーバメイト溶液を昆虫の中樞神経節に直接投与して電気生理学的に観察すると AChE 阻害による後発性興奮 (after-discharge) の延長増大があらわれる。^{15,16)} ④致死量のカーバメイトを投与された昆虫は最初はげしく動きまわり、次いでけいれん、不等位運動、マヒに致り死ぬことが観察されている。¹⁷⁾ これら

一連の中毒症状は AChE 阻害によってひきおこされていることを示唆している。

したがって AChE 阻害反応を酵素化学的側面から研究を進めてゆくことは、新しいカーバメイト系殺虫剤の design においても、AChE 触媒反応機構や特異性を明らかにするうえで重要な手掛りを与えてくれるものと思われる。カーバメイトによる AChE 阻害反応過程は比較的以前から提唱されていたにもかかわらず、¹⁸⁾ 比活性の高い均質な酵素標品が得られなかったこと、阻害が活性測定中に更に進行したり回復したりすることや、基質 ACh の AChE による加水分解反応速度の測定が困難であったことなどの理由からその反応過程における素反応の反応定数がそれぞれ分離して実際に測定されることによって、その反応過程の正しさが証明されたのは比較的最近である。¹⁹⁾ カーバメイトの阻害の強さは、カーバメイトと AChE との結合の強さと、その次の反応段階である酵素活性部位のカルバミル化反応の速さの積でまらることから、これらに関係した反応定数の測定は阻害反応機構の研究に欠くことはできない。しかし後に詳しく論ずるような反応定数の測定法に関していくつかの疑問点がこれまでに指摘されており、^{13,20)} AChE 阻害反応機構を明らかにするうえでの隘路となっている。第 2 章においていくつかの測定方法によって、これらの反応定数を測定し、比較することによりこれら反応定数の正しい評価のための実験条件、方法について検討した結果について述べる。第 3 章においては、これまで強い阻害剤、殺虫剤で



Substituted phenyl
{ methylcarbamate (R=H)
 dimethylcarbamate
 (R=Me)

ありながら全く物理化学的な反応機構の検討が試みられなかったオルト置換誘導体についても検討を加える準備として、酵素加水分解反応や阻害反応のモデル有機化学反応として、AChE の基質や阻害剤である置換 phenyl ester 類の加水分解反応をとりあげ、オルト置換基効果の解析を行なった結果について論ずる。第 4 章では阻害の強さがカーバメイト分子のどのような物理化学的性質と関係があるのかを解析し、これまでに知られている種々の有機化学反応における関係と比較することによりカーバメイトの AChE 阻害反応機構について得られた知見について述べる。

本研究に用いた置換 phenyl methylcarbamate, dimethylcarbamate 類は次の点でこの研究目的にふさわしい化合物であると思われる。① AChE 阻害作用が強く、この反応定数をそれぞれ分離して測定することが可能である。②物理化学的な諸性質において十分に変化に富む種々の置換誘導体の合成が可能である。

本研究の目的は置換 phenyl methylcarbamate, dimethylcarbamate 類を用いて AChE 阻害活性の変化を酵素反応速度定数の変化として測定し、カーバメイトの物理有機化学的諸性質と関連づけて定量的な解析を行なってその阻害反応機構について詳細な検討を加えることにある。

この研究は中島稔先生の御指導のもとに行なわれたものであり、深く感謝いたします。また実験を行なうにあたり御助言、激励をいただいた藤田稔夫先生、精力的に実験に御助力いただいた北村公二氏、能田政秀氏、汲田泉氏をはじめ御協力いただいた農業化学研究室の方々に厚く感謝

いたします。置換 phenyl methylcarbamate を提供していただいた住友化学工業（株）生物科学研究所・鴨下克三氏，酵素化学実験に御便宜いただいた京都大学食糧科学研究所・秦忠夫先生，林力丸博士，統計用プログラム作製に際して御助言いただいた農業工学科・青山成康博士，京都大学大型計算機センタープログラム相談室の方々に御礼申し上げます。

が可能である。第1番目の方法はカーバメイトと AChE との反応過程を直接追跡しようとするものである。それには、まず、フェノール部分を³H 標識したカーバメイトを用いて生成するフェノール (X) を液体シンチレーションカウンタにより測定する方法、²²⁾ 2-cyano-あるいは2-nitrophenyl dimethylcarbamate のように生成するフェノールが大きな紫外吸収係数を持っていることを利用して経時変化を追跡する方法²⁴⁾ がある。いずれの観察においても反応の初期に burst が見られ定常状態におけるフェノールの生成速度が上述の k_3 値から推定される速度とよく一致している。この結果はこの反応が脱カルバミル化律速 ($k_2 \gg k_3$) であることや、反応中に脱離基 (X, フェノール) が放出されていることを示している。しかしこれらの方法ではカーバメイトはもっぱら AChE 活性部位の滴定に用いられ、反応定数 K_d, k_2 は測定されていない。また Rosenberry and Bernhard は hydroquinolinium の zwitter ion が蛍光を発することに着目して N-methyl (7-dimethylcarbamoyl) quinolinium iodide (M7C) と電気ウナギ AChE との反応定数を詳細に測定している。²⁵⁾ その結果① AChE 1分子 (4 subunit から構成されている) あたり 3.9 個のカルバミル化部位が存在する。すなわち subunit あたり 1 個のカルバミル化部位が存在する。② k_2 および k_3 は反応中変化しない。このことは subunit 間に相互作用がないことを意味している。③ 基質 ACh の拮抗阻害剤は M7C に対しても拮抗阻害を示しその阻害定数は等しい。④ 拮抗阻害剤や M7C は遊離の酵素 (E) のみならずカルバミル化酵素 (EC) にも結合することなどが明らかにされた。これらの方法はいずれも比活性の極めて高い酵素標品と、特殊な脱離基を持ったカーバメイトに限られており、他の化合物には適用できない。

反応定数 K_d, k_2 を測定する第2の方法は基質の AChE 加水分解反応を indicator としてカ

Table 1. Comparison of Kinetic Parameters with Bovine Erythrocyte AChE

| | K_d (mM) | k_2 (min ⁻¹) | k_1 (M ⁻¹ min ⁻¹) | Range ^{c)} (mM) | Ref. |
|--------------------------------|---------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------|------|
| N-Me-carbamate | | | | | |
| Phenyl | 2.90 | 1.56 | 5.4×10^2 | 0.25 - 5 | a |
| | 23.7 | 6.82 | 2.88×10^2 | 0.1 - 20 | b |
| 1-Naphthyl | 0.0106 | 1.33 | 1.25×10^5 | 0.5 - 5 ^{d)} | a |
| | >0.5 | >20 | 2.18×10^4 | 0.1 - 0.4 | b |
| N,N-Me ₂ -carbamate | | | | | |
| Phenyl | 1.49 | 0.22 | 1.5×10^2 | <4.5 | a |
| | 10.3 | 0.24 | 2.33×10^2 | 1.0 - 20 | b |
| 4-NO ₂ -phenyl | 0.328 | 0.25 | 7.5×10^2 | <1.0 | a |
| | 3.2 | 0.14 | 4.50×10^2 | 0.5 - 2.7 | b |

a) From ref. 22. At 38°, pH 7.0. b) From ref. 23. At 25°, pH 7.6. c) Concentration range of the inhibitor used for determining parameters. d) μ M.

ーバメイト阻害反応過程を観察する方法である。Main and Hastings は阻害反応開始後しばらくの間脱カルバミル化反応を無視することができ、酵素活性はカーバメイト過剰の条件で一次反応的に減少してゆくことに着目して一次反応速度定数とカーバメイト濃度 $[CX]$ それぞれの逆数値を両軸にプロットすることにより反応定数 K_d , k_2 値を測定した (Main plot)¹⁹⁾。これが酵素・カーバメイト活性複合体 (ECX) の存在を証明した最初の実験である。その後いくつかのカーバメイトについて Main and Hastings の方法に従って反応定数 K_d , k_2 値が測定されたが Table 1 に示すごとく研究者によって非常にバラツキのある値が同一のカーバメイト、酵素標品について報告されている。このように反応定数 K_d , k_2 はカーバメイトの阻害の強さと直接関係し、AChE 阻害反応機構を検討するために極めて重要な反応定数であるにもかかわらず一般的なカーバメイトについて K_d , k_2 値を測定する方法や実験条件が未だ確立されていないと言える。

本章においては Main プロット以外にこれらの反応定数を測定する方法について検討し、Hart and O'Brien が有機リン酸エステルの AChE 阻害反応の測定に用いた方法^{26,27)} を適用し、基質共存下で阻害反応の前定常状態からの測定方法によっても可能であることを明らかにする。この方法を用いて置換 phenyl methyl- および dimethylcarbamate の牛仔赤血球 AChE 阻害反応における反応定数を測定し、得られた値を Main プロットを用いて測定した値と比較した結果、阻害反応に用いたカーバメイト濃度によって "見かけの" K_d と k_2 値とは変化するが用いたカーバメイト濃度範囲がほぼ等しい場合には両方の方法で測定した値が互いによく一致し、またこれまでに他の研究者によって報告されている値ともよく対応し、再現性ある結果が得られた。また目的とする反応定数を得るためには、反応条件を満足しながら、できるだけ低いカーバメイト濃度範囲を用いて測定しなければならないことにも言及する。

第1節 実 験

2. 1. 1. 阻害剤、基質および酵素

5種類の置換 phenyl dimethylcarbamate は Metcalf らの方法に従い次のように合成した。²⁸⁾ 0.12 - 0.15 mole の COCl_2 を含む無水トルエン 150ml に 0.1 mole 置換フェノールのトルエン溶液 150ml を 5℃ 以下に保ちながら徐々に添加する。次に無水ピリジン 0.11 mole を 5℃ に保ちながら加え、生成するピリジン塩酸塩のトルエン溶液に 40% ジメチルアミン水溶液 (20.5 g, 0.2 mole) を加え、反応終了後トルエン相を飽和食塩水にて 3 回洗浄する。無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、減圧下でトルエンを除き得られたカーバメイトを減圧蒸溜またはベンゼン、ヘキサンにて再結晶精製する。いずれも元素分析、赤外、NMR にて確認した。2-cyano-: b. p. 209 - 210° (23.5 mmHg); 2-nitro-: m. p. 58°; 3-isopropyl-: b. p. 163 - 6° (23 mmHg); 3-sec-butyl-: b. p. 186 - 9° (29 mmHg); 3-tert-butylphenyl dimethylcarbamate: b. p. 140 - 4° (4 mmHg)。

Neostigmine (iodide) は市販品 (東京化成) をエタノールにて再結晶精製後使用した。5種類の置換 phenyl methylcarbamate は住友化学工業製である。Neostigmine を除いてこれらの

カーバメイトは水に難溶性のため、20~30% (v/v) エタノール水溶液でカーバメイト原液を調製し、酵素阻害反応液中のエタノール濃度が0.9%を超えないように目的とする濃度まで希釈し、速やかに阻害実験に用いた。

基質 ACh (塩酸塩) とフェニルアセテートは市販品を用いた。フェニルアセテートは蒸留精製後50%エタノール水溶液に溶かしたものを原液とし、カーバメイトを含む酵素反応液中でエタノール濃度が1.7%を超えないように実験を行なった。Lineweaver-Burk プロットより求めた K_m (app) はそれぞれ0.156, 1.75 mMであった。

酵素標品は Sigma 社製仔牛赤血球 AChE (EC 3.1.1.7) 3.2~3.6 unit/mg solid を使用した。pH7.6 リン酸緩衝液 (10 mM phosphate, 0.1 M NaCl を含む) に溶かし酵素液とした。

2. 1. 2. 反応速度式と反応定数 K_d , k_2 の測定

2. 1. 2 a. 前定常状態の反応式による測定 (Main プロットによる測定)

ここで定常状態とはカルバミル化酵素濃度 $[EC]$ に関して定常状態という意味に用いる。カーバメイトと酵素を一定時間(t)反応させた後に、十分に高濃度の基質を加えると酵素による基質の加水分解速度 v は、カルバミル化されていない酵素濃度 $[E]_0 - [EC]$ に比例する。ここに $[E]_0$ は全酵素濃度であり、十分に高濃度の基質とはカーバメイト酵素活性複合体濃度 $[ECX]$ を $[E]_0 - [EC]$ に比べて無視しうるような基質濃度である。この時阻害は $[EC]$ に比例する。 $[CX] \gg [E]_0$ ではカルバミル化酵素濃度 $[EC]$ は(1)式で表わされる。²⁹⁾ ここに $a = k_2 / \{ 1$

$$[EC] = \frac{a}{b} [E]_0 \{ 1 - \exp(-bt) \} \quad \dots\dots\dots (1)$$

+ $K_d / [CX]$ }, $b = k_3 + a$ である。Scheme 1 から(1)式を導く際に「最初の段階 $E + CX = ECX$ の平衡状態が迅速に達成される (迅速平衡)」が仮定されている。カルバミル化されていない酵素の濃度 $[E]_0 - [EC]$ は次のようになる。

$$[E]_0 - [EC] = [E]_0 \{ 1 - a \{ 1 - \exp(-bt) \} / b \} = [E]_0 \{ k_3 + a \exp(-bt) \} / b \quad \dots\dots (2)$$

反応時間 t と $[CX]$ を条件 $k_3 \ll a \exp(-bt) \lesssim a$ を満すように選べば(2)式は(3)式のように一次反応速度式で表わされる。すなわちカーバメイトと酵素との反応開始後しばらくは、脱カルバミル化反応を無視することができ $[E]_0 - [EC]$ は一次反応的に減少することを意味している。

$$([E]_0 - [EC]) / [E]_0 = v_t / v_0 = \exp(-at) \quad \dots\dots\dots (3)$$

(3)式で v_0 , v_t はそれぞれ時間 $t = 0$, t における基質加水分解速度である。(1)式での a の定義から(5)式が得られる。 $1/a$ と $1/[CX]$ を両軸にとってプロットすれば、切片と傾きより K_d

$$a = \ln(v_0 / v_t) / t \quad \dots\dots\dots (4)$$

ここに $A = 1 + \frac{K_d}{[CX]} + \frac{K_d[S]_0}{K_m[CX]}$, $B = \frac{k_2}{A}$, $C = B + k_3$ である。(8)式右辺の

$B \{ 1 - \exp(-Ct) \} / C$ 項は(1)式に対応しており ECの割合を示し, [] の中は(2)式に対応している。 $D = \frac{k_{cat} K_d [S]_0 [E]_0}{A K_m [CX]}$ とおくと, Dは基質加水分解反応のカーブメイトによ

る拮抗阻害の成分を表わしており, (8)式はDを用いて(9)式になる。(9)式を時間 $t = 0 \rightarrow t$ (初期条件 $t = 0$ の時 $[P] = 0$) で積分すれば(10)式が導かれる。十分に時間が経てば ($t \rightarrow \infty$),

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{D(C-B)}{C} + \frac{BD}{C} \exp(-Ct) \quad \dots\dots\dots (9)$$

$$[P] = \frac{Dk_3}{C} t + \frac{BD}{C^2} \{ 1 - \exp(-Ct) \} \quad \dots\dots\dots (10)$$

$$[P]_{\infty} = \frac{Dk_3}{C} t + \frac{BD}{C^2} \quad \dots\dots\dots (11)$$

基質加水分解反応は(11)式で表わされ, カーブメイトによる阻害反応系も定常状態になる。ここで変数を分離するために(11)式と(10)式との差 (ΔP) をとれば指数函数部分だけが残る, (12)式。(8)~(12)式の関係を図示したのが Fig 1 である。 ΔP 減少の一次速度定数から, すなわち $\ln \Delta P$ と時

$$\Delta P = \frac{BD}{C^2} \exp(-Ct) \quad \dots\dots\dots (12)$$

$$\ln \Delta P = -Ct + \ln (BD/C^2) \quad \dots\dots\dots (13)$$

間 t とを両軸にとってプロットをすれば, 傾きから C が得られる, (13)式。 k_3 値が既知であれば $C - k_3$ から B 値が決定される。ところで(8)式の定義から B , $1/B$ は反応定数 K_d , k_2 と(14), (15)式で関係づけられている。ここで $[I]$ は基質共存下におけるカーブメイトの実効濃度であり,

$$B = k_2 [CX] / \{ [CX] + K_d (1 + [S]_0 / K_m) \} = k_2 [I] / (K_d + [I]) \quad \dots\dots (14)$$

$$\frac{1}{B} = \frac{K_d}{k_2} \frac{1}{[I]} + \frac{1}{k_2} \quad \dots\dots\dots (15)$$

$[I] = [CX] / (1 + [S]_0 / K_m)$ 。いくつかの $[I]$ について B 値を求めそれらの逆数値, $1/B$ と $1/[I]$, をプロットすれば傾きと切片から K_d , k_2 値が得られる。ただし k_3 , 基質濃度 $[S]_0$,

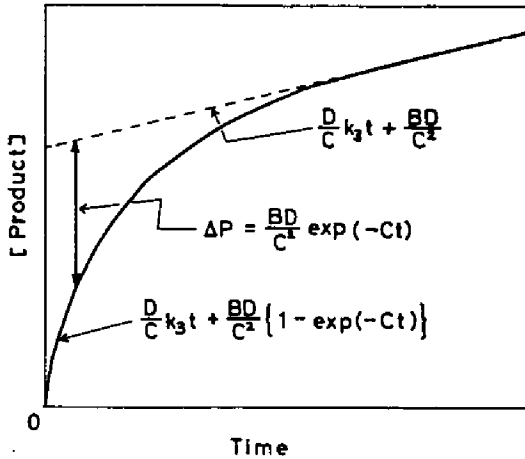


Fig. 1. Time course of substrate hydrolysis in the presence of carbamate.

K_m 値が既知でなければならない。⑨式は⑤式と対応しており逆数プロットを行なった時の傾きと切片はいずれも、 $K_d/k_2 (= 1/k_3)$, $1/k_2$ であり全く同じ速度論的意味を持っている。

Scheme 2 の反応系を使って他にも K_d を測定する方法がある。例えば⑩式で $t=0$ とおけば初速度 v_0 が D に等しくなる。カーバメイトが存在しない場合の基質加水分解反応の初速度を v_s とすれば、 v_s/v_0 と $[I]$ をプロットすることにより K_d を決定することができる。⑩～⑬式。また別の方法として⑨式の切片値 $\ln(BD/C^2)$ を用いることにより K_d を測定することができる。すなわちこの切片の値と④式よ

$$v_0 = \left(\frac{d[P]}{dt} \right)_0 = D = \frac{V_{\max}[S]_0}{[S]_0 + K_m(1 + [CX]/K_d)}$$

$$= \frac{V_{\max}[S]_0 / ([S]_0 + K_m)}{1 + [I]/K_d} \quad \dots\dots\dots (10)$$

り得られた B と C の値を用いて D を計算し、⑩式に従うプロットを行なえば K_d 値を得ることができる。

$$v_s = \frac{V_{\max}[S]_0}{[S]_0 + K_m} \quad \dots\dots\dots (17)$$

$$\frac{v_s}{v_0} = 1 + \frac{[I]}{K_d} \quad \dots\dots\dots (18)$$

$$\frac{v_s}{D} = 1 + \frac{[I]}{K_d} \quad \dots\dots\dots (19)$$

2. 1. 2 d. 脱カルバミル化反応速度定数 k_3 の測定

カルバミル化酵素 EC は一次反応速度式に従って脱カルバミル化し、酵素 E にもどる。反応系

のカーバメイト濃度 $[CX]$ を急激に薄くするか、あるいは EC を反応系より取り出せば $[EC]$ は20式に従って減少する。ここで v_0 , v_t , v_∞ は脱カルバミル化反応を開始してから $t = 0$, t , ∞ 後における基質加水分解速度である。

$$\ln[EC]_0 - \ln[EC]_t = \ln(v_\infty - v_0) - \ln(v_\infty - v_t) = k_3 t \quad \dots\dots\dots 20$$

2. 1. 3 実験操作

2. 1. 3 a. 前定常状態での実験

内容積 4ml の二重ビーカを反応槽とし、外側に恒温水を循環し、反応槽内を $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に保った。種々の濃度のカーバメイトを溶かした 0.1M 食塩水 2ml を反応槽に入れ pH 7.6 にあわす。ついで 50 μl AChE 酵素液 (7.5 unit/ml) を加えて反応を開始する。反応液はよく攪拌し、5 分以内の一定時間 (t) 反応したのち、基質 ACh 0.5ml (反応槽中で $[ACh] = 2 \sim 4 \text{ mM}$ になるように 0.1 M 食塩水で調製) を加え残存する酵素活性を ACh 加水分解速度 v_t として測定する。測定は炭酸ガスを除去した N_2 ガス気流中で ACh の加水分解により生成する酢酸を炭酸塩を含まない 1mM NaOH にて Radiometer 社製 pH-stat 装置 (PHM 型 pH メータ, Titrator TTT1c, 自動ビュレット ABU12) を使って pH 7.6 で滴定し、NaOH 流入速度から v_t を求めた。

2. 1. 3 b. 定常状態での実験

1.5ml 試験管に種々の濃度のカーバメイト $[CX]$ を含む pH 7.6 リン酸緩衝液 0.2ml をとり、AChE 3 unit を加えて 25°C にてカルバミル化反応が定常状態に達するまで (約 1.5 時間) 反応を行ない、これを酵素液とする。この酵素液と同じ濃度のカーバメイトと 4mM ACh を含む 0.1M 食塩水溶液 2.5ml を反応槽にとり、pH 7.6 に調製後、酵素液 100 μl を加えて残存する酵素活性 v_t を (2.1.3 a) と同じ方法で測定した。

2. 1. 3 c. 基質共存下での実験

カーバメイトと一定濃度の基質 phenyl acetate $[S]_0$ を含むリン酸緩衝液 2.5ml を UV 測定用セル (栓つき, 4ml 容) にとり、これに AChE 酵素液 (6 - 12 unit/ml リン酸緩衝液) 30 μl をマイクロピペットにて吹きこみ、速やかに攪拌する。攪拌後直ちに恒温水の循環により $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に保たれたホルダーにセルを固定し、基質の AChE 加水分解により生成するフェノールを、AChE 酵素液のかわりにリン酸緩衝液 30 μl を加えた反応液を対照 (reference solution) として島津 UV-200 分光光度計を用いて、波長 269.5 nm における吸収増加として経時的にレコーダで記録した。記録は吸収の増加が一定 (阻害反応が定常状態) になるまで 15 ~ 40 分間行なった。あらかじめ AChE 酵素液による 269.5 nm で吸収を測定しておき、 $t = 0$ における吸収の補正をした。pH 7.6, 269.5 nm における基質の吸収はフェノールの吸収の約 2% あり、その補正を行なった。基質の AChE 加水分解による基質濃度減少の影響を少なくするためには、

$[S]_0 \gg K_m (= 1.75 \text{ mM})$ でなければならないが、溶解度の制約のために $[S]_0 = 1.5 \sim 3.5 \text{ mM}$ で実験を行なわざるを得なかった。

2. 1. 3 d. 脱カルバミル化速度の測定実験

3-Isopropylphenyl methylcarbamate と 2-cyanophenyl dimethylcarbamate の脱カルバミル化速度定数 k_3 を測定した。カーバメイトの 10 (v/v) % エタノール水溶液 (それぞれ, $[CX] = 25.3 \mu\text{M}, 1.00 \text{ mM}$) を 20 μl とり, AChE 酵素液 (AChE 3 unit を 0.30 ml リン酸緩衝液に溶かしたもの) に加え, $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ で反応させる。1.5 時間後に反応液を Sephadex G-25 カラム, $0.8 \times 45 \text{ cm}$, を用いてリン酸緩衝液を溶出液としてゲルろ過し, カーバメイトと酵素とを分離した。1.0 ml 毎のフラクションを集め紫外吸収 (280 nm) を指標として酵素フラクション 2 ml を集めた。この条件においてカーバメイト, フェノール類は酵素フラクションから完全に除かれている。酵素フラクションを $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に保ち, 溶出直後から 10 分毎に 50 μl を抜き取り, 4 mM ACh を含む 0.1 M 食塩水 2.5 ml に加え, pH-stat 法にて酵素活性 v_t を測定した。

3-Isopropylphenyl methylcarbamate においては溶出後 150 分, 2-cyanophenyl dimethylcarbamate では溶出後 300 分における酵素活性を v_∞ とした。

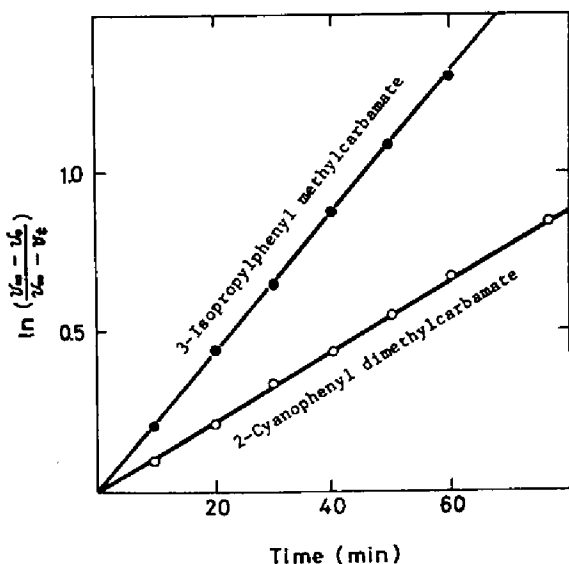


Fig. 2. Plots for the determination of decarbamylation rate constants.

第2節 実験結果

2. 2. 1. 脱カルバミル化速度定数 k_3

0式によるプロットは Fig 2 に示すように 60 分まで直線であり, 実験条件を満している。直線の傾きから 3-isopropylphenyl methylcarbamate $k_3 = 0.0219 \pm 0.0001 \text{ min}^{-1}$, 2-cyanophenyl dimethylcarbamate の $k_3 = 0.0112 \pm 0.0001 \text{ min}^{-1}$ が得られる。これらの値はこれまでに報告されている値とよく一致している。^{20,30)} 得られた k_3 値を水濃度 ($[\text{H}_2\text{O}] = 55.5 \text{ M}$) で割ればカルバミル化酵素の水との 2 次反応速度定数はそれぞれ 3.96×10^{-4} , $2.03 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ となる。これらの値は ethyl methyl-

carbamate, dimethylcarbamate の 25℃におけるアルカリ加水分解反応速度定数, それぞれ 3.4×10^{-4} ; $2.7 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ と全くよい一致を示している。³¹⁾ このことは脱カルバミル化反応において水分子が HO^\ominus イオンと同程度まで求核反応性を高められていることを示唆している。

2. 2. 2. 解離平衡定数 K_d とカルバミル化速度定数 k_2

2. 2. 2 a. 前定常状態法による測定結果

(5)式によるプロットから K_d と k_2 を測定した一例を Fig 3 に示す。このプロットが有効かどうかは、次の2つの実験条件を満しているかどうかによる。³²⁾

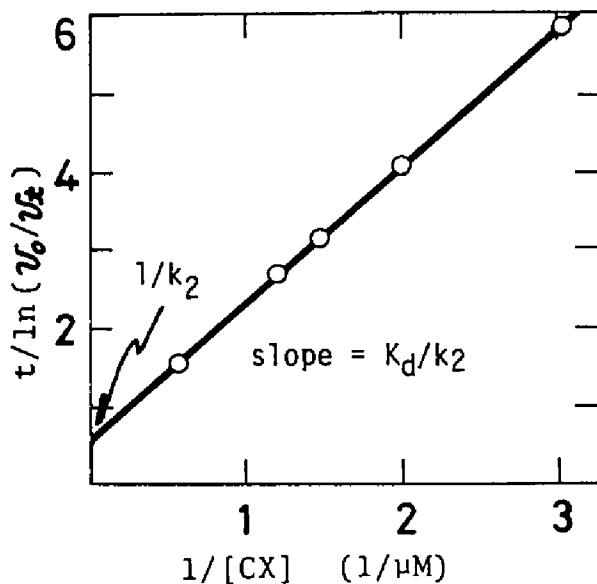


Fig. 3. Double reciprocal plot from the pre-steady state method (Main plot) for 3-isopropylphenyl methylcarbamate.

実験条件1: 最初の t 時間内は阻害反応が一次反応的に進行しなければならない。

Fig 4 に示すように 3-isopropylphenyl methylcarbamate の各濃度において半対数プロットは、高濃度 1.66 μM の場合を除いて少なくとも反応開始後3分間は直線になっている。この半対数プロットが直線になるかどうか、とりもなおさず(5)式を導くための条件 $k_3 \ll a \exp(-bt)$ を満しているかどうかの検定になっている。Fig 3 のプロットから得られた K_d, k_2 値を用いて $k_3 \ll a \exp(-bt)$ が成立しているかどうかを計算によって確かめると、 $[\text{CX}]$

= 0.33 μM の場合 $t = 1, 2, 3 \text{ min}$ において $a \exp(-bt) = 0.145, 0.119, 0.097 \text{ min}^{-1}$, $[\text{CX}] = 1.66 \mu\text{M}$ の場合 $a \exp(-bt) = 0.343, 0.164, 0.078 \text{ min}^{-1}$ であり高濃度の場合には $t = 3 \text{ min}$ において $k_3 (= 0.022 \text{ min}^{-1}) \ll a \exp(-bt)$ がもはや成立しなくなることがわかる。従って $[\text{CX}] = 1.66 \mu\text{M}$ の場合には Fig 4 で示されている最初の4点から a 値を求め、Fig 3 のプロットに用いた。Dimethylcarbamate の場合には k_3 値が小さいので ($k_3 = 0.011 \text{ min}^{-1}$) 高濃度でもこの条件を満していた。一般に逆数プロットは“重みつき最小二乗法”により処理されるが、このような事情を考慮し(5)式のプロットより K_d, k_2 値を求める際には通常の最小二乗法によった。

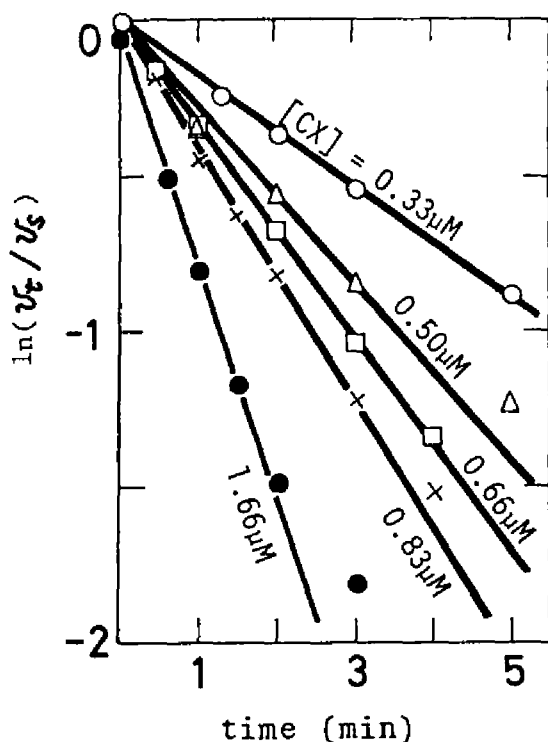


Fig. 4. First order inhibition of AChE with 3-isopropylphenyl methylcarbamate

していることを示している。11個の methyl および dimethylcarbamate についてこのようにして得られた K_d , k_2 値を Table 2 に示す。

2. 2. 2 b. 定常状態法による測定結果

2-Cyanophenyl dimethylcarbamate の反応定数 K_d , k_2 , $k_i (= k_2/K_d)$ 値をこの方法で測定した。 $v_t/(v_0 - v_t)$ と $1/[CX]$ のプロット, Fig 5, は直線となり, (7)式の関係から傾きと切片値を使って $K_d = 1.43 \pm 0.07 \times 10^{-4} M$, $k_2 = 2.07 \pm 0.10 \text{ min}^{-1}$, $k_i = 1.73 \pm 0.10 \times 10^4 M^{-1} \text{ min}^{-1}$ が得られた。この測定に用いた $[CX]$, $[S]_0$ は (2.2.2 a) の実験条件 2 を満たしている。この方法で得られた反応定数値は Table 2 に掲げられている他の測定法で得られた値とよく対応しているが, この方法はあまり薦められない。何故ならばこの実験条件下で反応系に存在する全酵素の 96~99% がカルバミル化酵素 EC であり, v_t 測定に際して加える ACh によって定常状態がくずれ脱カルバミル化反応 (阻害の回復) が極めて顕著にあらわれて無視することができなくなり, 正確に v_t を測定することが困難になるからである。とりわけ k_3 値の大きな methylcarbamate においてこの傾向が顕著であった。また脱カルバミル化反応の影

実験条件 2: $\ln v_t/v_0$ と t を両軸とする半対数プロット (Fig 4) が $t=0$ において 0 を通らなければならない。すなわち $v_{t=0} = v_0$ が成立しなければならない。

$v_{t=0} (= v_0)$, v_0 はそれぞれ (6), (7) 式で表わされるからこの条件は $K_m [CX]/K_d \ll K_m + [S]$ が成立する条件と同じである。この時 $[ECX]$ を $[ES]$ に比べて無視することができ, 酵素活性 v_t 測定中にもはやそれ以上カルバミル化反応が進行しないことを意味している。本実験において用いた $[CX]$ が K_d 値の 0.1~0.5 倍の範囲内であること, 基質濃度 $[S]_0 = 2 \sim 4 \text{ mM}$ が $K_m (= 0.156 \text{ mM})$ より大きく, $K_m + [S] \gg [CX] K_m/K_d$ が成立する。実際半対数プロット, Fig 4, は 0 を通っている。

以上のように Fig 4 や計算による検定はいずれも実験条件 1, 2 を満足

Table 2. Kinetic Parameters for Bovine Erythrocyte AChE Inhibition^a

| | Pre-steady State Procedure | | | | Procedure in the Presence of substrate ^b | | | | Initial Rate Procedure ^c | | | |
|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------|
| | K_d (M) | k_2 (min ⁻¹) | k_i (M ⁻¹ min ⁻¹) | n ^e | K_d (M) | k_2 (min ⁻¹) | k_i (M ⁻¹ min ⁻¹) | n ^e | K_d (M) | k_2 (min ⁻¹) | k_i (M ⁻¹ min ⁻¹) | n ^e |
| N-Methylcarbamate | | | | | | | | | | | | |
| Phenyl | 3.02x10 ⁻³ (0.15) | 0.86 (0.05) | 2.84x10 ² (0.03) | 0.37 - 1.47 x10 ⁻³ | 6 | 8.57x10 ⁻³ (1.63) | 2.07 (0.50) | 3.15x10 ² (0.14) | 0.80 - 2.38 x10 ⁻³ | 5 ^f | 2.68x10 ⁻³ (0.15) | 0.80 - 2.38 x10 ⁻³ |
| 2-i-Pr-phenyl | 1.24x10 ⁻⁴ (0.21) | 3.14 (0.53) | 2.54x10 ⁴ (0.08) | 0.84 - 3.33 x10 ⁻⁵ | 6 | 1.27x10 ⁻⁴ (0.60) | 3.29 (1.54) | 2.58x10 ⁴ (0.12) | 0.77 - 2.58 x10 ⁻⁵ | 5 | 1.00x10 ⁻⁴ (0.06) | 0.77 - 3.86 x10 ⁻⁵ |
| 3-i-Pr-phenyl | 5.55x10 ⁻⁶ (0.54) | 3.13 (0.31) | 5.64x10 ⁵ (0.05) | 0.33 - 1.66 x10 ⁻⁶ | 5 | 4.58x10 ⁻⁶ (1.31) | 2.45 (0.70) | 3.35x10 ⁵ (0.41) | 0.43 - 1.14 x10 ⁻⁶ | 5 | 4.84x10 ⁻⁶ (0.14) | 0.43 - 1.75 x10 ⁻⁶ |
| 3-t-Bu-phenyl | 3.20x10 ⁻⁶ (0.26) | 1.42 (0.10) | 4.43x10 ⁵ (0.03) | 0.45 - 1.42 x10 ⁻⁶ | 6 | 6.15x10 ⁻⁶ (1.68) | 2.42 (0.64) | 3.93x10 ⁵ (0.24) | 1.05 - 1.93 x10 ⁻⁶ | 6 | 6.71x10 ⁻⁶ (0.36) | 0.58 - 2.31 x10 ⁻⁶ |
| 1-Naphthyl | 2.65x10 ⁻⁴ (0.83) | 6.78 (2.11) | 2.56x10 ⁴ (0.04) | 0.56 - 3.37 x10 ⁻⁵ | 7 | 1.89x10 ⁻⁴ (0.47) | 4.46 (1.12) | 2.36x10 ⁴ (0.05) | 0.94 - 2.82 x10 ⁻⁵ | 6 | 9.52x10 ⁻⁵ (3.69) | 0.41 - 1.53 x10 ⁻⁵ |
| NN-Dimethylcarbamate | | | | | | | | | | | | |
| 2-CN-phenyl | 1.70x10 ⁻⁴ (0.40) | 2.67 (0.61) | 1.57x10 ⁴ (0.09) | 0.23 - 1.36 x10 ⁻⁴ | 6 | 3.14x10 ⁻⁴ (0.68) | 4.87 (1.04) | 1.55x10 ⁴ (0.02) | 0.14 - 0.72 x10 ⁻⁴ | 5 | 1.47x10 ⁻⁴ (0.05) | 0.14 - 0.72 x10 ⁻⁴ |
| 2-NO ₂ -phenyl | 1.10x10 ⁻⁴ (0.19) | 0.92 (0.16) | 8.35x10 ³ (0.31) | 4.00 - 12.1 x10 ⁻⁵ | 6 | 2.40x10 ⁻⁴ (0.31) | 2.01 (0.26) | 8.39x10 ³ (0.15) | 2.16 - 5.75 x10 ⁻⁵ | 5 | 1.85x10 ⁻⁴ (0.11) | 2.20 - 12.0 x10 ⁻⁵ |
| 3-1-Pr-phenyl | 2.84x10 ⁻⁴ (0.59) | 0.68 (0.13) | 2.38x10 ³ (0.17) | 0.57 - 1.72 x10 ⁻⁴ | 6 | 5.80x10 ⁻⁴ (0.47) | 1.71 (0.40) | 2.95x10 ³ (0.12) | 0.64 - 1.66 x10 ⁻⁴ | 7 | 2.69x10 ⁻⁴ (0.17) | 0.55 - 1.66 x10 ⁻⁴ |
| 3-sec-Bu-phenyl | 7.29x10 ⁻⁵ (3.32) | 3.81 (1.72) | 5.22x10 ⁴ (0.25) | 0.50 - 1.50 x10 ⁻³ | 6 | 4.36x10 ⁻⁵ (1.28) | 1.94 (0.56) | 4.44x10 ⁴ (0.18) | 0.44 - 1.10 x10 ⁻⁵ | 5 | 3.51x10 ⁻⁵ (0.20) | 0.44 - 2.82 x10 ⁻⁵ |
| 3-t-Bu-phenyl | 1.95x10 ⁻⁴ (0.30) | 0.46 (0.03) | 2.37x10 ³ (0.14) | 0.53 - 1.58 x10 ⁻⁴ | 6 | 2.99x10 ⁻⁴ (0.12) | 0.66 (0.25) | 2.22x10 ³ (0.03) | 0.69 - 1.72 x10 ⁻⁴ | 5 | 3.84x10 ⁻⁴ (0.21) | 0.69 - 1.97 x10 ⁻⁴ |
| Neostigmine | 3.29x10 ⁻⁶ (0.43) | 6.10 (0.13) | 1.85x10 ⁶ (0.02) | 1.94 - 6.80 x10 ⁻⁶ | 6 | 1.78x10 ⁻⁶ (0.60) | 2.79 (0.93) | 1.57x10 ⁶ (0.06) | 1.43 - 3.79 x10 ⁻⁶ | 5 | 1.35x10 ⁻⁶ (0.11) | 0.91 - 5.67 x10 ⁻⁶ |

^a Figures in parentheses are the standard errors. ^b Determined according to eq.15. ^c Determined according to eq.18.

^d Range of [C] or [I]. ^e Number of concentration points. ^f Final concentration of EtOH in the reaction medium; 3.97 %.

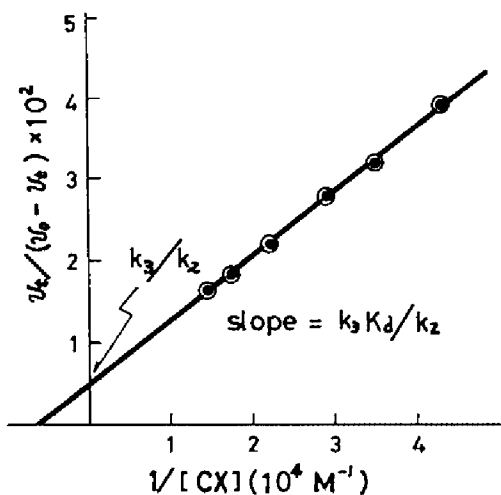


Fig. 5. Plot from the steady state method for 2-cyanophenyl dimethylcarbamate

取った時間 t に対してプロットすれば傾き C の直線が得られる。カーバメイト各濃度でこのプロットは直線であった。(Fig 7)。

次に $C - k_3 (= B)$ 値とカーバメイト実効濃度 $[I]$ ，それぞれの逆数プロットを行なう。3-Isopropylphenyl methylcarbamate と neostigmine について $1/B$ と $1/[I]$ プロットを行なったものが Fig 8 a, b に示されており，いずれの場合も 9 式に従う直線にはならないで曲線が得られた。図中，直線部分と破線は前定常状態の方法 (2.2.2 a) の実験に用いた $[CX]$ 範囲と同じ $[I]$ 範囲で測定した観測点を使ってひいた直線である。 $[I]$ がもっと高い観測点を用いてひいた直線は点線で示されているように，得られる傾き $k_i (= k_2/K_d)$ は大きく，逆に切片 ($1/k_2$) は小さくなっている。いくつかのカーバメイトで広い $[I]$ 範囲を選んでプロットを行なったところ，プロットはいずれも直線にはならず Fig 8 同様の曲線が得られた。低い $[I]$ 範囲と高い $[I]$ 範囲でそれぞれ観測点を選んでひいた直線から得られた K_d , k_2 値を Table 2, 3 に掲げる。Table 2 には基質共存下の方法で低い $[I]$ 範囲で実験した観測点を使ってひいた直線から得られた定数だけを，他の方法で得られた結果とともに示してある。

$1/B$, $1/[I]$ プロットが直線にならない原因として反応系が定常状態に至るまでに (15 ~ 40 分)，基質の AChE による加水分解反応によって反応系の基質濃度が徐々に減少してゆき (8) ~ (9) 式的前提条件「 $[S]$ は反応中一定であり $[S]_0$ に等しい」が成立しなくなることによる可能性を先ず挙げるができる。低い $[I]$ 範囲では反応系が定常状態に達するまでに長い時間がかかることにより，高い $[I]$ 範囲を用いた場合に比べて基質濃度減少の程度が大きくなる。

響を除くために低濃度で反応を行なった場合には， $1/[CX]$ 値が大きくなり (7) 式のプロットは原点付近を通り，正確な切片値を求めることができなかつた。従って他のカーバメイトについてこの方法で反応定数を測定することを断念した。

2. 2. 2 c. 基質共存下の方法による測定結果

2-Cyanophenyl dimethylcarbamate 存在下での基質 phenyl acetate の AChE による加水分解反応による紫外吸収変化 (生成する phenol による吸収増加) の典型的な trace を Fig 6 に示す。この trace の直線部分を延長して反応開始後数分間に観察される曲線部分の，trace との差 ΔP を 20 ~ 40 秒間隔で読み取った。この対数值 $\ln \Delta P$ を読み

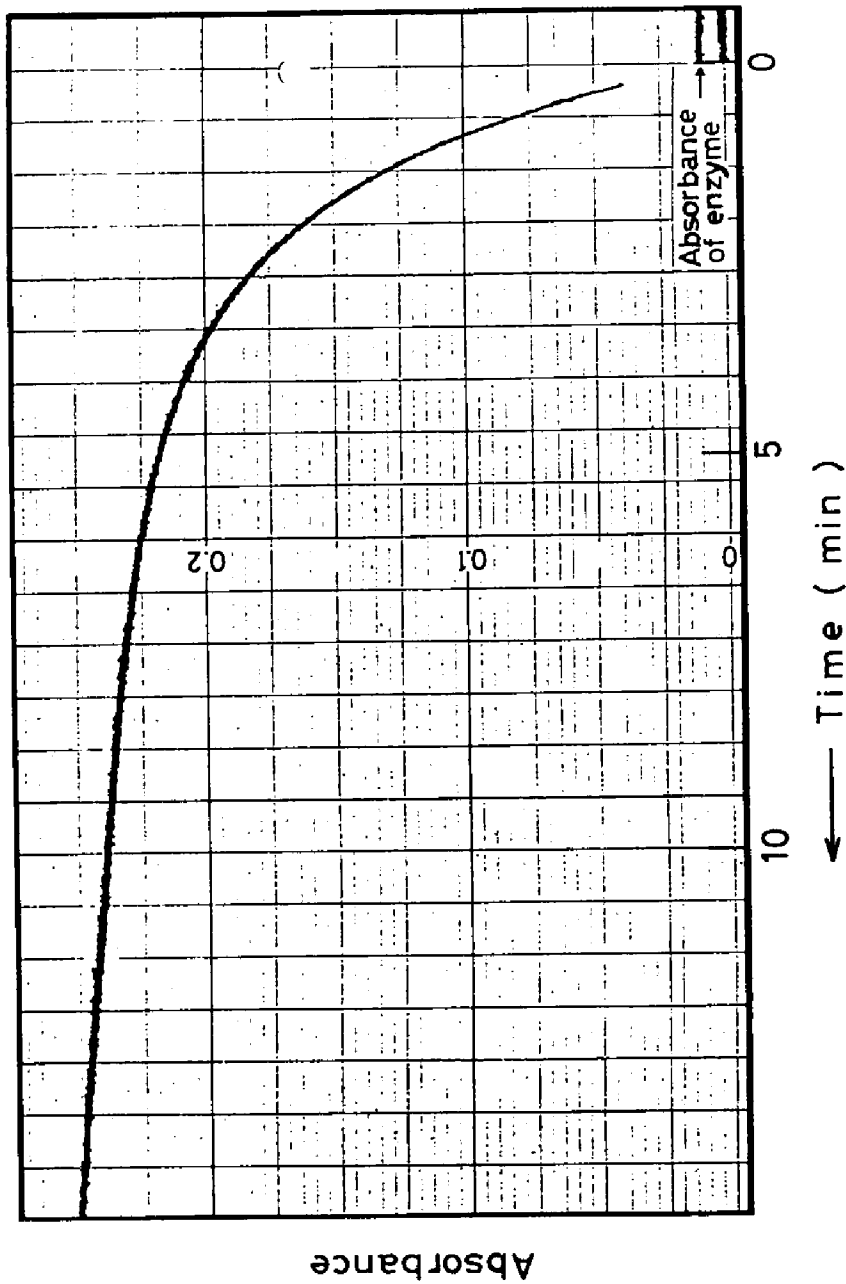


Fig. 6. Spectrometric trace of substrate hydrolysis in the presence of carbamate. Substrate, phenyl acetate (3.45 mM); Inhibitor, 2-CN-phenyl dimethylcarbamate (0.129 mM).

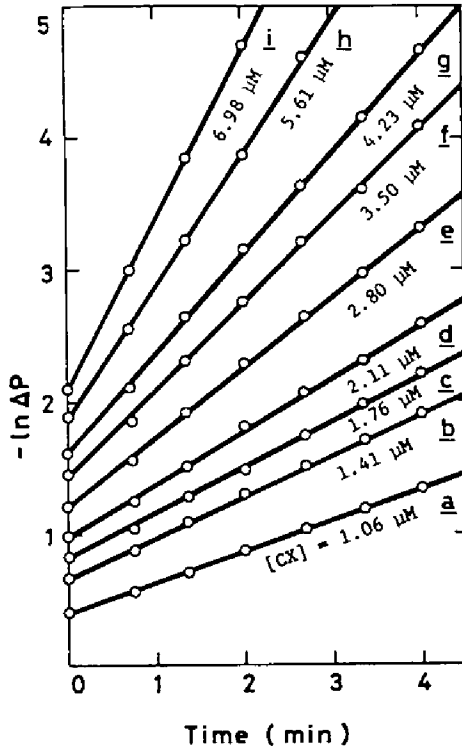


Fig. 7. First order decrease of ΔP . Substrate: Phenyl acetate 2.56mM; 3-Isopropylphenyl methyl carbamate

本実験に用いた基質濃度の範囲では、反応が進行して基質濃度が20%だけ減少すれば加水分解速度は—カーバメイトが存在しなくても—初速度の92%になることが実験的にも、計算でも確かめられた。最も低濃度の[1]で反応を行なった例では、定常状態に達した時には基質濃度[S]が[S]₀の81~85%にまで減少しており(1)式で表わされる直線[P]_∞の傾きが7~8%(計算値)だけ小さくなる。すなわちプロットに用いるB値をやや大きく評価することになる。またこの時生成するフェノールによる酵素阻害の影響は無視することができた。

次に基質濃度変化することを考慮してScheme 2の反応系においてK_d, k₂値を測定する方法について検討した。基質濃度は[S]=[S]₀-[P]とあらわされて(8)式に対応するのは一組の微分方程式(21), (22)である。AChEの分子量が不明であるため[E]/[E]₀で表わしている。この反応系の時間経過を知るためには両式を、[P]について解かねばならないが、この式を解析的に解くことができないのでRunge-Kutta-Gill法を使って数値積分し、生成するphenol濃度[P]を各時間につ

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[E]([S]_0 - [P])/K_m = v_{max}[E]([S]_0 - [P])/[E]_0 K_m \dots (21)$$

$$\frac{d([E]/[E]_0)}{dt} = \frac{K_d}{AK_m[CX] - K_d[P]} \left\{ \frac{v_{max}}{K_m} \left(\frac{[E]}{[E]_0} \right)^2 ([S]_0 - [P]) - \frac{k_2 K_m [E][CX]}{K_d [E]_0} + k_3 K_m \right\} - \frac{[E]}{[E]_0} k_3 \dots (22)$$

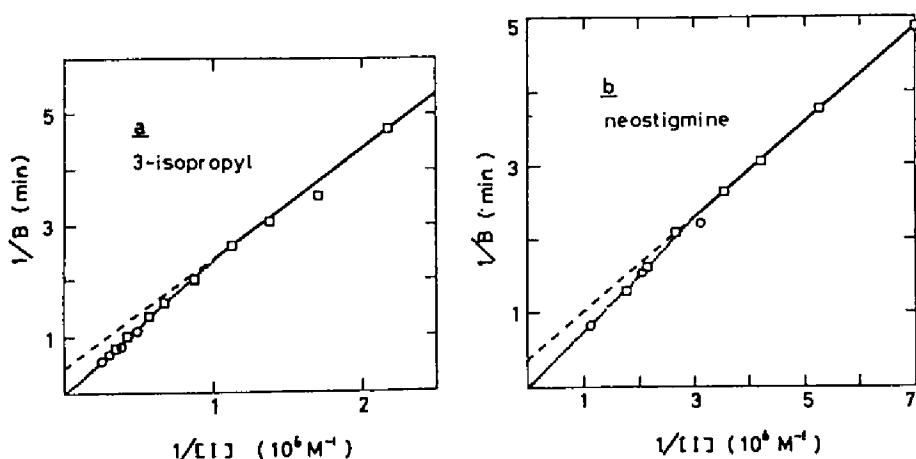


Fig. 8. Double reciprocal plot from the method in the presence of substrate. a: 3-Isopropylphenyl methylcarbamate with phenyl acetate (\square , 2.56mM; \circ , 0.79mM) b: Neostigmine with phenyl acetate (\square , 3.50mM; \circ , 1.88mM).

Table 3. Kinetic Parameters Estimated from High Inhibitor Concentrations in the Presence of Substrate^a)

| | K_d (M) | k_2 (min^{-1}) | k_1 ($\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$) | Range ^b) (M) | n^c |
|------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------|-------|
| N-Methylcarbamate | | | | | |
| 2-1-Pr-phenyl | 2.59×10^{-4} (2.62) | 6.31 (6.38) | 2.43×10^4 (0.21) | $1.55 - 3.86 \times 10^{-5}$ | 5 |
| 3-1-Pr-phenyl | 1.57×10^{-4} (1.67) | 69.3 (73.5) | 4.40×10^5 (0.04) | $0.87 - 2.88 \times 10^{-6}$ | 6 |
| N,N-Dimethylcarbamate | | | | | |
| 2-CN-phenyl | 5.22×10^{-4} (1.50) | 8.02 (2.24) | 1.54×10^4 (0.10) | $0.87 - 2.07 \times 10^{-4}$ | 7 |
| 2-NO ₂ -phenyl | 1.38×10^{-3} (1.33) | 9.90 (8.33) | 7.18×10^3 (3.42) | $0.57 - 1.20 \times 10^{-4}$ | 5 |
| 3-sec-Bu-phenyl | 7.73×10^{-5} (1.55) | 3.43 (0.67) | 4.43×10^4 (0.20) | $1.45 - 2.82 \times 10^{-5}$ | 6 |
| Neostigmine | 7.55×10^{-6} (3.75) | 10.8 (5.35) | 1.43×10^6 (0.03) | $1.90 - 9.10 \times 10^{-7d}$ | 7 |

a) Figures in parentheses are standard errors. b) Range of effective inhibitor concentration, [I]. c) Number of points used for the plot. d) The range used covered both the high and low inhibitor concentration ranges. Using only high inhibitor concentrations, kinetic parameters were estimated as negative.

いて算出し、実験で得られた紫外吸収の trace と最もよく一致するように K_d と k_2 値を決定する最適化 (optimization) の問題として、 K_d と k_2 値を求めようと試みた。³³⁾ 3-Isopropylphenyl methylcarbamate について行なった結果は次のとおりである。初期値は $[E]/[E]_0 = 1$ 、 $[P] = 0$ であり $V_{max} = 1.98 \times 10^{-4} \text{ Mmin}^{-1}$ 、 $K_m = 1.75 \text{ mM}$ 、積分のさざみ巾 (step size) $\Delta t = 0.6$ 秒で

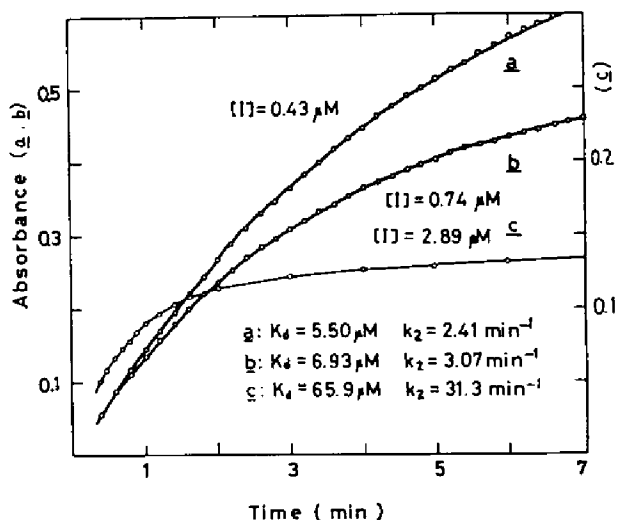


Fig. 9. The fit of the spectrometric trace of substrate hydrolysis with the calculated values using the numerical integration method for 3-isopropylphenyl methylcarbamate. Solid lines represent spectrometric traces. Open circles are the calculated values.

Table 4. Kinetic Parameters for 3-Isopropylphenyl N-methylcarbamate Determined by Curve-Fitting Method

| K_d (μM) | k_2 (min^{-1}) | $[I]$ (μM) |
|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| 5.50 | 2.41 | 0.43 |
| 5.74 | 2.69 | 0.58 |
| 6.93 | 3.07 | 0.72 |
| 9.56 | 4.35 | 0.87 |

$[P]$ を計算した。pH 7.6での phenol の吸光係数を使って得られた $[P]$ を吸光度に変換し、時間毎にプロットをして実験で得られた反応 trace と最もよく一致するように K_d , k_2 値を同時に、あるいは独立に変化させながら最適値へ収束させた。このようにして決定された K_d , k_2 値は $1/B$, $1/[I]$ プロットの低濃度範囲の観測点を使って得られた値とよい対応を示し、濃度が高くなるにつれて K_d , k_2 が共に大きくなってゆく傾向を表わしている、Fig 9, Table

4。Neostigmine の場合についても同様よい対応が得られた。結局、基質濃度が反応中に減少しても、この程度であれば逆数プロットより得られる反応定数 K_d , k_2 値にはあまり影響しないものと考えられる。

阻害反応液中のカーバメイト濃度が低い時、反応式を導く場合の前提条件である $[CX] \gg [E]_0$ が満たされない危険性がある。こ

Table 5. Effect of BSA on the Determination of Kinetic Parameters for Substituted Phenyl N-methylcarbamates

| Substituent | [BSA] (mg/ml) | K_d (M) | k_2 (min ⁻¹) |
|-------------|------------------|-----------------------|-------------------------------|
| H | 1.16 | 4.29x10 ⁻³ | 1.07 |
| | 0 | 3.02x10 ⁻³ | 0.86 |
| 3-Me | 1.16 | 5.25x10 ⁻⁴ | 2.00 |
| | 0 | 3.76x10 ⁻⁴ | 1.40 |
| 3-Et | 1.02 | 6.25x10 ⁻⁵ | 1.35 |
| | 0 | 6.45x10 ⁻⁵ | 2.22 |
| 3-iso Pr | 1.16 | 8.04x10 ⁻⁶ | 1.60 |
| | 0 | 5.55x10 ⁻⁶ | 3.13 |
| 3-tert Bu | 1.02 | 1.01x10 ⁻⁵ | 2.92 |
| | 0 | 3.20x10 ⁻⁶ | 1.42 |

の点を確かめるために低い [CX] を用いて反応液中の蛋白質濃度を約 1 mg/ml までに高くした時、前定常状態の方法で得られる反応定数にどのような影響を与えるのかを調べた結果が Table 5 である。蛋白質としては Bovine serum albumine (BSA) を加えた。蛋白質濃度が高い

と、反応定数は全体に 2 倍程度小さくなっているが、通常用いる酵素濃度 (0.1 ~ 0.01 mg/ml) では $[CX] \gg [E]_0$ が成立しているとみなせるであろう。

以上のように前定常状態の方法、基質共存下の方法いずれにおいても測定された反応定数は実験に用いたカーバメイト濃度に依存して変化することがわかる。しかしカーバメイト濃度が等しい場合には得られる反応定数の値が互いに良く一致している。

基質共存下の方法は、(8)~(9)式で $k_3 = 0$ とおけば Hart and O'Brien が phenyl phosphate の場合に用いた速度式と全く一致する。²⁷⁾ 第 3 節で考察するように Hart and O'Brien が報告している逆数プロットも Fig 8 のような曲がりを生じている。(13)式の $\ln \Delta P, t$ プロット (Fig 7) がいずれのカーバメイトについても直線になったことは、本酵素標品には isozyme や E と EC による subunit 間相互作用が存在しないことを示している。

第 3 節 考 察

Table 3 にまとめられた測定結果から逆数プロットに用いた [CX], [I] 濃度範囲が等しければ、異なる基質 (ACh, phenyl acetate) を用いて異なった方法で測定しているにもかかわらず反応定数の値は 2 ~ 3 倍の範囲内で一致し、再現性ある測定値であることを示している。Table 6 には反応定数のカーバメイト濃度範囲に対する依存性が 3-isopropylphenyl methylcarbamate と neostigmine の場合について前定常状態の方法 (Main プロット) と基質共存下の方法で得られた値が比較してある。この比較から Table 1 に示して指摘した矛盾点 — これまでに Main プロットを用いて同一化合物について測定し報告された反応定数値が報告者によって 10 ~ 25 倍程度異なっていること — の原因のほとんどは測定 (逆数プロット) に用いられてい

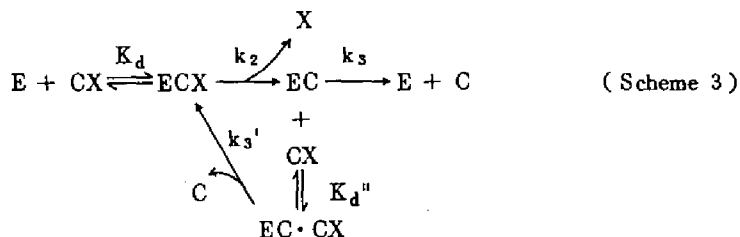
Table 6. Dependence of Apparent Kinetic Parameters on Inhibitor Concentration Ranges

| | 3-i-Pr-phenyl methylcarbamate | | Neostigmine | | Method |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|--------|
| | Lower | Higher | Lower | Higher | |
| K _d (μM) | 5.55 | 177 ^{a)} | 3.29 | 10.2 ^{a)} | } (b) |
| k ₂ (min ⁻¹) | 3.13 | 80.7 ^{a)} | 6.10 | 44.0 ^{a)} | |
| k ₁ (M ⁻¹ min ⁻¹) | 5.64x10 ⁵ | 4.56x10 ^{5a)} | 1.85x10 ⁶ | 4.30x10 ^{6a)} | |
| Range (μM) | 0.33~1.66 | 2~100 ^{a)} | 0.19~0.68 | 0.1~12 ^{a)} | |
| K _d (μM) | 4.58 | 157 | 1.78 | 7.55 | } (c) |
| k ₂ (min ⁻¹) | 2.45 | 69.3 | 2.79 | 10.8 | |
| k ₁ (M ⁻¹ min ⁻¹) | 5.35x10 ⁵ | 4.40x10 ⁵ | 1.57x10 ⁶ | 1.43x10 ⁶ | |
| Range (μM) | 0.43~1.14 | 0.87~2.88 | 0.14~0.38 | 0.19~0.91 | |

a) From ref. 23. b) Pre-steady state procedure. c) Procedure in the presence of substrate.

るカーバメイト濃度範囲が互いに異なっていることによるものと考えられる。Table 6 においてカーバメイト濃度範囲の数倍の変化に伴う K_d, k₂ 値の変化が極端に大きすぎるように思えるかもしれないが、これは高濃度範囲の場合に切片が逆数プロットの原点近くにあることによるものであって K_d, k₂ 値の標準偏差も大きくなっている。酵素標品、反応液のイオン強度、メタノールやエタノール濃度、測定 pH などの実験条件の違いはそれほど大きく反応定数値には影響していないようである。

このような反応定数のカーバメイト濃度範囲に対する依存性を説明するためには、(5)式を導くもととなった Scheme 1, 2 を改めなくてはならない。Scheme 修正の一つの可能性として最初に検討してみるのは、Scheme 3 で示されるようにカルバミル化酵素 EC にカーバメイト CX がもう一分子結合し EC·CX 複合体を形成することによる効果を考慮する場合である。ここに K_d^{''} は EC·CX の解離定数である。この Scheme では EC·CX からの脱カルバミル化過程 (速



度定数 k_3) を考慮している。カーバメイトのカルバミル化酵素 EC への結合は、遊離の酵素 E への結合に比べてはるかに弱いと推定される、 $K_d'' \gg K_d$ 。Rosenberry and Bernhard はカーバメイト M7C による電気ウナギ AChE 阻害反応において K_d , K_d'' をそれぞれ測定し、 K_d'' は K_d の約 8 倍であるという結果を得ている。²⁵⁾ M7C 以外に、カルバミル化酵素に結合することが確かめられている化合物は choline,²⁷⁾ 4 級アンモニウム塩³⁴⁾ などであるが、いずれも正電荷を持つ化合物であり、中性カーバメイトでは EC·CX 形成は極めて弱いものと考えられる。

$K_d'' = [EC][CX]/[EC \cdot CX]$ とおけば、カルバミル化酵素濃度 $[EC]$ は (2) 式であらわされる。ここに $a' = a / (1 + [CX]/K_d'')$,

$b' = a + (k_3 + k_3'[CX]/K_d'') / (1 + [CX]/K_d'')$ である。従って (2) 式に対応する (24) 式が次のように導かれる。 ($[E]_0 - [EC]$) / $[E]_0$ が一次反応速度式に従う

$$[EC] = \frac{a'}{b'} [E]_0 \{ 1 - \exp(-b't) \} \quad \dots\dots\dots (23)$$

$$\frac{[E]_0 - [EC]}{[E]_0} = \frac{b' - a' + a' \exp(-b't)}{b'} = \frac{a [CX]/K_d'' + k_3 + k_3' [CX]/K_d'' + a \exp(-b't)}{a [CX]/K_d'' + k_3 + k_3' [CX]/K_d'' + a} \quad \dots\dots\dots (24)$$

ためには条件 $a [CX]/K_d'' + k_3 + k_3' [CX]/K_d'' \ll a \exp(-b't) < a$ が満足されねばならない。カーバメイト濃度が K_d に比べて十分高い場合 ($[CX] \gg K_d$), $a (= k_2 [CX]/[CX] + K_d)$ は $k_2 (> k_3)$ にほぼ等しくなる。低いカーバメイト濃度の場合 a は $k_i [CX]$ に近づくが、本実験条件は $k_i [CX] = 0.2 - 1.0 \text{ min}^{-1} (> k_3)$ であるから、 $[CX]$ の全濃度範囲において $a > k_3$ が成立する。高いカーバメイト濃度範囲においても $[CX] \ll K_d''$ であれば a' , b' , はいずれも a に等しくなり、(24) 式は (3) 式になる。

基質共存の方法における実験においても Scheme 2 を Scheme 3 のように EC·CX 形成を考慮するよう変えることにより、(9) 式は (25) 式のようにあらわされる。

ここで $C' = B + (k_3 + k_3' [CX]/K_d'') / (1 + [CX]/K_d'')$ である。

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{D \{ k_3 + k_3' [CX]/K_d'' \}}{C' \{ 1 + [CX]/K_d'' \}} + \frac{BD}{C'} \exp(-C't) \quad \dots\dots\dots (25)$$

この時 $\ln \Delta P$ と t を両軸にとったプロット (Fig 7) の傾きから得られる C' と k_3 の差、 $C' - k_3$, は B ではなくて見かけの値、 B_{app} である。このようにして (25) 式は (26) 式へと変わる。本実験条件では高濃度の $[CX]$ において $K_d'' \gg [CX] \gg K_d$ と思われる。従って $\{ [CX] + K_d \} / \{ [CX] + K_d'' \}$ は $[CX]/K_d'' (< 1)$ にほぼ等しくなる。Rosenberry and Bernhard によれば M7C と電気ウナギ AChE の反応において k_3' は $k_3 (= 1/200 k_2)$ の約 3 倍にすぎない。²⁵⁾ こ

$$\frac{1}{B_{app}} = \frac{1}{C'' - k_3} = \left\{ \frac{K_d}{k_2} \frac{1}{[I]} + \frac{1}{k_2} \right\} \frac{K_d' (eff.)}{K_d' (eff.) + k_2' [I] / k_2} + \frac{[I]}{k_2 K_d' (eff.) + k_2' [I]} \quad \dots\dots\dots (29)$$

1/[CX], 1/[I] の函数であるが、(29)式の右辺は2つの項よりできている。第1項は原点を通る双曲線(I)の一部をあらわし、第2項もまた切片を1/k₂'とする双曲線(II)の一部をあらわすことから両式は Fig 10 に示すような形の曲線になる。図中破線は双曲線(I)、(28)、(29)式の曲線共通の漸近線であり、その傾き = (“真の”) K_d/k₂、切片 = (1/k₂) (1 - K_d k₂' / K_d' k₂) である。2つの条件、① K_d ≪ K_d'、② k₂ と k₂' はほぼ同程度の大きさである、が満たされるならばこの漸近線の切片は 1/k₂ になる。しかしもしも k₂ ≧ k₂' と仮定すれば Scheme 4 において k₂' を無視することになり、(28)、(29)式は(30)式及びその対応する式になる。また k₂' ≧ k₂ と仮定すれば、(31)式と基質共存下の方法ではそれに対応する式が得られる。(30)式が [CX]/k₂ K_d' 項を

$$\frac{1}{a''} = \frac{K_d}{k_2} \frac{1}{[CX]} + \frac{1}{k_2} + \frac{[CX]}{k_2 K_d'} \quad \dots\dots\dots (30)$$

$$\frac{1}{a''} = \frac{K_d'}{k_2'} \frac{1}{[CX]} + \frac{1}{k_2'} + \frac{K_d K_d'}{k_2' [CX]^2} \quad \dots\dots\dots (31)$$

含んでいることにより、逆数プロットはカーバメイトの高濃度範囲において上方に曲るものと予想される。一方(31)式であらわされる場合には、逆数プロットはカーバメイトの低濃度範囲で上方に曲るものと予想される。k₂ ≧ k₂'、k₂' ≧ k₂ という仮定から予想される逆数プロットの様相が実験で得られたカーバメイトの高濃度範囲において下方に曲がるということと一致しないことから、k₂ と k₂' とが互いに同程度の大きさであるという仮定だけが実験事実と対応する。(28)(29)式の切片が 1/k₂' であり、しかも高濃度範囲で下方に曲がっていることから k₂' は k₂ よりも大きいことを意味している。有機リン酸エステルである amiton による horse serum cholinesterase 阻害の場合も、リン酸化反応の促進が観察され、この時阻害反応は k₂' ≧ k₂ を仮定した(31)式で最もよく説明されている。³⁵⁾

以上の考察から逆数プロットがカーバメイトの高い濃度範囲で下方に曲がることは ECX・CX 複合体が形成されることによる影響と考えられる。この時低濃度のカーバメイトを用いたプロットより得られた反応定数が目的とする K_d、k₂ 値である。このことは基質共存下の方法において、基質加水分解の初速度から(30)式に従うプロットから得られる K_d 値によっても支持される。ECX・CX 複合体形成の影響を考慮した時(30)式は(32)式に変換される。3-Isopropylphenyl methylcarbamate の場合、Fig 11 に示されているように v_g/v₀ 対 [I] プロットは切片 1 の直線になっている。もっと高濃度のカーバメイトを用いた場合には UV 吸収 trace が急激に変化し速や

$$\frac{v_s}{v_0} = 1 + \frac{[I]}{K_d} \left\{ 1 + \frac{[I]}{K_d'(\text{eff.})} \right\} \quad \dots\dots\dots 32$$

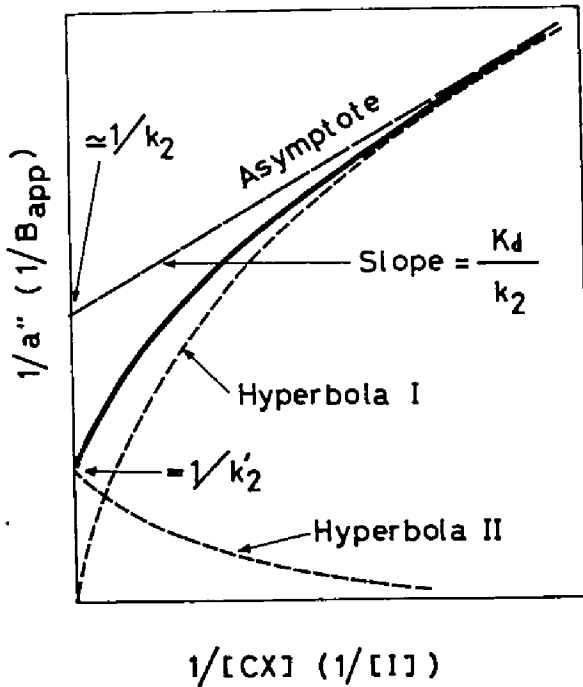


Fig. 10. Non-linearity of the double reciprocal plot under conditions of the ECX·CX and EC·CX formation.

かに定常状態に達するために、traceに正しく接線をひいて初速度 v_0 を測定するのが困難であった。故に高濃度範囲の測定値を含んではいないが、比較的高い濃度範囲でも Fig 11 のプロットが直線であることから、 $K_d'(\text{eff.})$ はこのプロットに用いられた $[CX]$ よりも大きいものと推定される。本実験では $[CX] \leq K_d$ であるから、前に行なった仮定 $K_d' > K_d$ が確かめられたことになる。このようにして得られた K_d 値は 15 式によるプロットの低濃度範囲から得られた K_d 値とよく対応している。この比較が Table 2 に示されている。初速度から K_d を求める方法では EC·CX 複合体形成や基質濃度減少などの影響を考慮する必要

がない。また 14 式の関係から K_d を決定する方法についても試みたが、13 式の傾きと切片から得られる D 値の誤差が大きく、 K_d を得ることができなかった。

15 式で $[I] \rightarrow \infty$ になればこのプロットの傾きは $\{ K_d'(\text{eff.}) / k_2 \} (1 - k_2 / k_2')$ に近づくが、このような条件では K_d' を無視することができないし、またカーバメイトの反応液への溶解度による制約もあって $[I] \rightarrow \infty$ は実現不可能であったので、極端な高濃度においてプロットの傾きを実際に求めることができなかった。 $[I]$ が極端に高濃度ではないが、 $[I] > K_d'(\text{eff.})$ k_2 / k_2' を満足するような濃度範囲では、傾きが $K_d'(\text{eff.}) / k_2'$ に近い値をとるであろう。Fig 8 a, b において低濃度と高濃度範囲において傾きがそんなに変わらないことから、また k_2 と

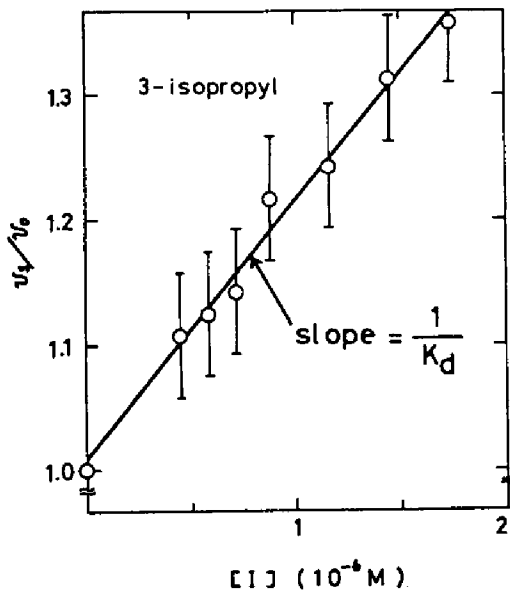


Fig. 11. Plot for the determination of K_d from the initial rate of substrate hydrolysis in the presence of 3-isopropylphenyl methylcarbamate. Substrate: Phenyl acetate 2.56 mM.

k_2' とが同じ程度の大きさであることも併せて考えれば K_d と K_d' (eff.) も互いに等しいと期待できる。しかしこれは事実とは異なっていて、条件 $[I] \gg K_d'$ (eff.) k_2/k_2' が本実験条件では満たされていないと考えるのが妥当である。

前定常状態の方法では条件「一次反応的に阻害が進行する」がこの実験方法を限定している。高濃度のカーバメイトを使って反応を観測する場合には極めて短時間で阻害反応を追跡するための特別な反応容器が工夫されている。³²⁾ また数分間一次反応状態を継続させて通常反応容器で測定するためには、カーバメイト濃度を低くしなければならない。これまで異なった研究者によってそれぞれ都合の良い実験方法とそれによって規制されるカーバメイト濃度を用いて $1/v$ 対 $1/[CX]$ プロットが行なわれ反応定数の決定がなされてきた。また反応定数のカーバメイト濃度依存性についてこれまで同一基準で論じられてこなかった。基質

共存下の方法ではこのような制約をうけないし、広範囲の $[I]$ を用いて見かけの反応定数を同一基準で測定し比較することが可能である。

Fig 8 で示されたような $1/B$ 対 $1/[I]$ プロットの直線からの曲がり方が、リン酸エステルによる阻害反応においても観察されている。²⁷⁾ 報告者は高い濃度範囲のプロットから得られる反応定数がむしろ目的とする K_d, k_2 であり、低濃度範囲での直線からの方へへの曲がり方は、条件 $[CX] \gg [E]$ が成り立たないことによると推察している。しかし条件 $[CX] \gg [E]$ が満たされず反応液中の $[CX]$ が減少していると仮定するならば $1/B$ 対 $1/[I]$ プロットはむしろ「上方」に曲がらなければならない。(15) 図式は $k_3 \approx 0$ であるリン酸エステルの場合にも有効であり、C および C' がそれぞれ B および B' におきかわる。それ故、リン酸エステルによる阻害においても、 $ECX \cdot CX$ に対応する複合対が形成しているものと考えられる。見かけの反応定数 K_d はカーバメイト濃度とともに変化するためにこれまでしばしば行なわれてきたように見かけの K_d 値と比較するだけでは、目的とする K_d 値を得るための濃度範囲を決定することはできない。適切なカーバメイト濃度範囲は $[CX]$ にあまり依存しない k_i 値を基準にして選ばれるべきである。カーバメイトの場合積 $k_i \times [CX]$ 又は $k_i \times [I]$ が $0.1 \sim 1.0 \text{ min}^{-1}$ なら適切と思われる。

第3章 フェニルエステル類のアルカリ加水分解 反応におけるオルト置換基効果の解析

オルト置換 phenyl methylcarbamate は強い AChE 阻害活性を示すにもかかわらずこれまで構造活性相関による阻害機構の検討は、もっぱらメタやパラ置換体についてのみおこなわれ、オルト置換体については全く検討がなされていない。^{13,36)} これはオルト置換基の異常な効果 — “オルト効果” — をオルト置換基の物理化学的性質によって定量的に解析することが困難な問題であり、単純な有機化学反応系においてすら“オルト効果”の性質を統一的に説明する方法論がこれまでに確立されていなかったことによる。本章ではカーバメイトによる AChE 阻害反応における置換基の効果を解析する(第4章)準備として、阻害反応の最も単純なモデル有機反応と思われるアルカリ加水分解反応における置換基の効果を“オルト効果”をも含めて解析する。

ここで一般的な置換基効果の解析法について簡単にふれ、次いで最近行なわれた“オルト効果”の定量的な解析の試みについて述べておこう。これまでにメタ・パラ置換化合物の反応速度、平衡定数(k)について Hammett 型(33式)の自由エネルギー関係(linear free energy relationships, LFER)が成立することが多くの例によって示されている。³⁷⁾ これら化合物の反応

$$\log k = \rho\sigma_{m, p} + c \quad \dots\dots\dots (33)$$

性の変化は、置換基が反応基に及ぼす極性あるいは電子的効果(polar or electronic)の変化のみによって支配されている。この効果を表わす LFER 定数として Hammett σ 以外にも σ^- , σ^+ , σ^0 , σ^* , σ_I , σ_R , F, R 等の置換定数が反応タイプ、化合物の種類によって、あるいは電子的効果を2箇の成分に分離して定義されている。Hammett σ は置換安息香酸の酸解離平衡定数から Fig 12 のように定義されており、ハロゲン、アシル、CN, NO₂ 基など電子吸引基ほど σ

$$\text{ArCOOH} \xrightleftharpoons{K_A} \text{ArCOO}^\ominus + \text{H}^\oplus$$

(25°C in H₂O)

$$\log (K_A/K_A^H) \equiv \sigma$$

| | Me | OMe | Cl | NO ₂ |
|------------|-------|-------|------|-----------------|
| σ_m | -0.07 | 0.12 | 0.37 | 0.71 |
| σ_p | -0.17 | -0.27 | 0.23 | 0.78 |

Fig. 12. Electronic parameter
The Hammett σ

値が大きくなる。³⁸⁾ 置換基と反応基との間に芳香環を通しての強い共鳴効果が関与する場合には σ^- や σ^+ が用いられ、^{39,40)} 逆にこれらグループ間の共鳴効果が重要でない場合には σ^0 が適応される。^{39,41)} $\sigma^0 \approx \sigma \ll \sigma^-, \sigma^+$ の順に共鳴効果の寄与が増加している。脂肪族化合物の反応には σ^* , σ_I が定義されているが、共鳴効果をふくまないで誘起効果(inductive effect)の指標として

芳香族化合物の反応にも適応されることがある。⁴²⁾

③3式の係数 ρ は、置換基の電子的効果の変化に対する反応基の感受性を表わしており、ベンゼン環から反応に直接関与している結合までの距離の函数である。⁴³⁾ 従ってある反応について③3式の関係が成立すれば、用いられた σ 定数の種類や係数 ρ の符号や大きさからその反応過程において決定的役割をはたしている反応中間体の構造について手がかりを得ることができる。

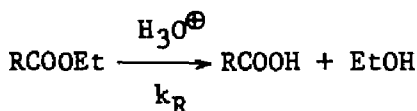
このように反応タイプ、化合物種によって適切な σ 定数を定義しながら解析する方法の他に、電子的効果を普遍的な直交した成分 — 誘起効果 (field or inductive effect) と共鳴効果 (resonance effect) — に分離し、これらの効果をあらわす2つの LFER 定数を定義し、どの反応、化合物タイプについてもこの2定数の一次結合として解析する方法がある。誘起効果と共鳴効果をあらわす定数としてそれぞれ σ° と $\Delta\sigma (= \sigma^+, \sigma^- - \sigma^\circ)$ を使う湯川-都野式や、⁴⁴⁾ σ_1 と σ_R ,⁴⁵⁾ F と R,^{46,47)} などを使う方法がある。しかし σ_1 と σ_R , F と R は同じ反応であっても置換基の置換位置によっても異なった感受性を示すために、置換位置の異なる化合物をひくくめて解析する場合には、項の数が極めて多くなりこれらの相関式だけで反応機構について明確に論ずることが困難な場合が多い。

脂肪族エステルの加水分解反応における置換基の効果には、電子的効果の他に置換基の“かさばり”による反応の阻害効果がある。この立体効果 (steric effect) に関する LFER 定数として E_s が定義されている。⁴⁸⁾ E_s 値は Fig 13 に示すように定義されており置換基の“かさばり”が大きくなるほど値は小さくなる。その後 E_s 値と置換基の平均 van der Waals 半径 ($\overline{r_v}$) との間には④4式で示される関係があることが明らかにされた。⁴⁹⁾ ハロゲン、アルコキシ、アミノ、

$$E_s = 3.484 - 1.839 \overline{r_v} \quad \dots\dots\dots ④4$$

CN, NO₂ 基などの置換基についても④4式から、それぞれの $\overline{r_v}$ 値を使って E_s 値が計算され、芳香族化合物の反応にまで適応されている。⁵⁰⁾ また E_s 定数は分子内における置換基の立体的効果として定義されていたが、その後分子間における立体効果にも E_s 定数が適用されている。

Fig. 13. Steric parameter E_s



$$\log (k_R/k_{\text{Me}}) \equiv E_s$$

| | Me | Et | n-Pr | i-Pr |
|-------|-----|-------|-------|-------|
| E_s | 0.0 | -0.07 | -0.36 | -0.47 |

オルト置換化合物には③3式があてはまらず、オルト置換体の反応機構についてメタ・パラ置換体と同一基準で論ずることができなかつた。これは反応基の隣りに置換基が存在することにより、反応中間体の安定性や攻撃試薬の接近に対する立体的な阻害、および近距離の誘起効果あるいは分子内水素結合などの近接効果が余分に寄与しているためと考えられる。これらの効果は化合物、反応

種によって変化するであろうから、オルト置換体の反応性を単一の LFER 定数で関係づけることはできない。Taft はオルト置換基の効果を極性効果と立体効果との 2 成分に分離できるものと仮定し、オルト置換安息香酸エステルの加水分解反応速度定数から Fig 13 で示された σ^* , E_s の定義と同様に σ^* (ortho) と E_s (ortho) を定義している。⁴⁸⁾ Charton はオルト効果を誘起、共鳴および立体効果に分離できるものと仮定し、それらの LFER 定数 σ_1 , σ_R , \overline{r}_V の一次結合として多くの反応データを解析している。⁵¹⁾ 彼の解析結果によれば \overline{r}_V 項で示される立体効果は重要でなくて、 σ_1 と σ_R 項の係数の比が反応タイプによって異なっていることが明らかにされた。また Farthing and Nam はオルト置換体の電子的効果に対応するパラ置換体の電子的効果と等しいものと仮定し、オルト置換体とパラ置換体との反応性の差を立体効果によるものとみなしている。⁵²⁾ そしてオルトおよびパラ置換安息香酸の酸解離定数より、電子的および立体的効果に関する LFER 定数 σ_E , σ_S を定義し、これらの定数によっていくつかの反応例を解析している。

以上の試みはいずれも適応可能な反応タイプや化合物種が限られていたり、H, NO₂, phenyl, iodo, tert-butyl 基など特別な置換基にはあてはまらないなどの解決されねばならない問題点が多く残されている。⁵³⁾ このことはオルト効果が完全に直交した成分に未だ分離されていないことを意味している。またこれらの方法はオルト置換体だけを別個に解析する方法であって、メタ・パラ置換体に関する相関式、(33)式、とは直接対応のつかない全く別の相関式が得られる。従って(33)式から得られた反応機構についての知識を、オルト置換体の相関式の解釈にまでそのまま拡張することができない。

藤田と西岡はオルト置換基の効果を(35)式のように 3 つの LFER 項であらわせればこれらの問題点がほとんど解決されることを 44 種類の反応例について示した。⁵⁴⁾ (35)式では次のことが仮定されている。

$$\log k = \rho\sigma_{ortho} + \delta E_s + fF + c \quad \dots\dots\dots 35$$

①オルト置換基の効果は通常の電子的効果 (ordinary polar effect), 立体効果 (steric effect), 近接電子的効果 (proximity polar effect) の 3 成分に分離できる。②通常の電子的効果とは対応するパラ置換基の電子的効果と等しい成分を意味している。 $\sigma_{ortho} = \sigma_{para}$ 。③立体効果は δE_s 項で表わされる成分である。④近接電子的効果は fF 項で表わされる成分である。上述の σ_1 値が対応する F 値とほとんど変わらないことから、 fF 項のかわりに $\rho_1\sigma_1$ 項を用いても解析結果や物理化学的意味は異ならない。

これらの仮定により(33)と(35)式からオルト, メタ, パラ置換体全てをひっくるめた相関式(36)が得られる。オルト置換基の特別な効果は $\delta E_s + fF$ 項に分離されるはずである。

$$\log k = \rho\sigma_{o,m,p} + \delta E_s^{ortho} + fF_{ortho} + c \quad \dots\dots\dots 36$$

本章では置換 phenyl methylcarbamate の AChE 阻害剤である置換 phenyl diethyl phos-

Table 7. Phenyl Esters of Acetic Acids and Dimethylcarbamic Acids^a

| Phenol substituents | Acetates mp or bp (mm), °C | Carbamates mp or bp (mm), °C | Phenol substituents | Acetates mp or bp (mm), °C | Carbamates mp or bp (mm), °C |
|---------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------|
| H | 81-82 (12) ^b 79-80 (13) | 44-45 ^f 113-114 (7) | <i>m</i> -Me | 92-93 (13) ^f 110-112 (19) ^f | 129 (7) |
| <i>o</i> -F | 100 (9) ^c | 130-131 (6) | <i>m</i> -OMe | 55 ^f 58 ^m | 62 63-64 |
| <i>o</i> -Cl | 110-111 (13) ^c 126-127 (13) ^d | 148-149 (8) 163-164 (7) | <i>m</i> -NO ₂ <i>m</i> -CN | | 169-171 (7) |
| <i>o</i> -Br | 87-88 (13) ^e | 123-124 (7) | <i>m</i> -COMe | | |
| <i>o</i> -Me | 105-106 (13) | | <i>p</i> -F | 81-82 (13) ⁿ | 115 (0.3) ^t |
| <i>o</i> -Et | 103 (9) | | <i>p</i> -Cl | 109 (13) ^p | |
| <i>o</i> - <i>i</i> -Pr | | | <i>p</i> -Br | 120 (13) ^p | |
| <i>o</i> - <i>sec</i> -Bu | | 131-132 (8) | <i>p</i> -Me | 94 (14) ^e | 52 ^t |
| <i>o</i> - <i>t</i> -Bu | 112 (13) | 107 | <i>p</i> -Et | 105-106 (13) ^r | |
| <i>o</i> -CF ₃ | | 46-47 | <i>p</i> - <i>t</i> -Bu | 119 (9) ^f | 93-94 |
| <i>o</i> -OMe | 115 (13) ^f | 142 (2) | <i>p</i> -OMe | 122 (14) ^f | 66 ^t |
| <i>o</i> -NO ₂ | 41 ^f | 58 | <i>p</i> -NO ₂ | 79 ^f | 107-108 ^t |
| <i>o</i> -CN | 143-144 (22) ^h | | <i>p</i> -CN | 56 ^f | 67 ^t |
| <i>m</i> -F | 77-78 (13) | | <i>p</i> -COMe | 53 ^s | 123 |
| <i>m</i> -Cl | | 125-127 (4) | | | |
| <i>m</i> -Br | 142 (34) ^f | | | | |

^a All new compounds provided acceptable elemental analyses. ^b "Handbook of Table for Organic Compound Identification", 3rd ed., Chemical Rubber Publishing Co., Cleveland, Ohio, 1967, p 258. ^c W. J. Wohleben, *Ber.*, 42, 4369 (1909). ^d S. Buchan and H. McCombie, *J. Chem. Soc.*, 137 (1931). ^e K. Matsumoto and K. Han, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 8, 333 (1933). ^f F. Misani and M. T. Bogert, *J. Org. Chem.*, 10, 347 (1945). ^g F. D. Chattaway, *J. Chem. Soc.*, 2495 (1931). ^h B. Lach, *Chem. Ber.*, 17, 1501 (1884). ⁱ K. Ono and M. Imoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 11, 127 (1936). ^j R. L. Van Etten, J. F. Sebastian, G. A. Clowes, and M. L. Bender, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 3242 (1967). ^k F. Mauthner, *J. Prakt. Chem.*, 136, 205 (1933). ^l T. C. Bruice and G. L. Schmir, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1663 (1957). ^m A. Clemm, *Ber.*, 24, 826 (1891). ⁿ C. M. Suter, E. J. Lawson, and P. G. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, 61, 161 (1939). ^o E. Klarmann, V. A. Shternov, and L. W. Gates, *ibid.*, 55, 2576 (1933). ^p W. Autenrieth and P. Muhlinghaus, *Ber.*, 40, 744 (1909). ^q J. Meisenheimer and L.-H. Chen, *Justus Liebig's Ann. Chem.*, 539, 78 (1936). ^r W. S. Emerson, J. W. Heyd, V. E. Lucas, W. B. Cook, G. R. Owens, and R. W. Shotridge, *J. Am. Chem. Soc.*, 68, 1665 (1946). ^s J. A. King and F. H. McMillan, *ibid.*, 68, 2335 (1946). ^t R. D. O'Brien, B. D. Hilton, and L. Gilmour, *Mol. Pharmacol.*, 2, 593 (1966).

phate, phenyl dimethylcarbamate や酵素反応の基質としてしばしば用いられる置換 phenyl acetate のアルカリ加水分解反応における置換基効果の解析をオルト置換体を中心として検討を加えた結果について述べる。これらの化合物のメタ、パラ置換体についてはアルカリ加水分解反応機構がほぼ明らかにされている。

第1節 実 験

3. 1. 1. 化合物の合成

実験に用いた置換 phenyl acetate は Table 7 のとおりである。置換フェノール 0.1mole にアセチルクロリド 0.2mole を加えて2時間室温にて攪はん後、100℃で1時間反応を行なう。反応終了後、反応液を氷に注ぎ分離する油状物質をエーテルにて抽出、薄いアルカリ、飽和食塩水で洗滌し無水硫酸ナトリウムにて乾燥する。減圧蒸留またはエタノールから再結することにより精製した。Table 7 に示した置換 phenyl dimethylcarbamate は (2.1.1.) で述べた方法に従って合成した。オルト置換基はできるだけ独立変数 σ , E_s , F 値の間に collinearity のないよう十分に變化に富む化合物を選んで合成した。

3. 1. 2. アルカリ加水分解反応速度定数の測定

島津 UV-200 分光光度計を用いて 25.0 ± 0.2℃ に保った測定セル中で反応を行ない生成するフェノールを経時的に記録することによって加水分解反応速度を測定した。Acetate は pH 9.14

Table 8 Second-Order Rate Constant for the Alkaline Hydrolysis of Substituted Phenyl Acetates and *N,N*-Dimethylcarbamates

| | Acetates $10^{-2}k, a)$ $M^{-1}min^{-1}$ | Carbamates $10^3k, b)$ $M^{-1}min^{-1}$ | | Acetates $10^{-2}k, a)$ $M^{-1}min^{-1}$ | Carbamates $10^3k, b)$ $M^{-1}min^{-1}$ |
|---------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| H | 1.65 | 2.30 | <i>m</i> -Me | 1.45 | 2.00 |
| <i>o</i> -F | 4.63 | 3.18 | <i>m</i> -Et | 1.50 | |
| <i>o</i> -Cl | 3.35 | 2.08 | <i>m</i> -OMe | 2.22 | 2.57 |
| <i>o</i> -Br | 3.69 | 1.78 | <i>m</i> -NO ₂ | 12.2 | 14.7 |
| <i>o</i> -I | 3.30 | 1.30 | <i>m</i> -CN | 9.73 | 11.9 |
| <i>o</i> -Me | 0.74 | 0.64 | <i>m</i> -COMe | | 5.62 |
| <i>o</i> -Et | 0.67 | | <i>p</i> -F | 2.52 | |
| <i>o</i> - <i>i</i> -Pr | 0.61 | | <i>p</i> -Cl | 3.64 | 5.88 |
| <i>o</i> - <i>sec</i> -Bu | | 0.38 | <i>p</i> -Br | 3.33 | |
| <i>o</i> - <i>t</i> -Bu | 0.32 | 0.33 | <i>p</i> -Me | 1.45 | 1.89 |
| <i>o</i> -CF ₃ | | 3.25 | <i>p</i> -Et | 1.21 | |
| <i>o</i> -OMe | 1.20 | 1.15 | <i>p</i> - <i>t</i> -Bu | 1.14 | 1.64 |
| <i>o</i> -NO ₂ | 13.1 | 4.51 | <i>p</i> -OMe | 1.43 | 2.11 |
| <i>o</i> -CN | 20.2 | | <i>p</i> -NO ₂ | 18.6 | 25.0 |
| <i>m</i> -F | 4.66 | | <i>p</i> -CN | 11.9 | 15.3 |
| <i>m</i> -Cl | | 6.76 | <i>p</i> -COMe | 5.99 | 10.7 |
| <i>m</i> -Br | 4.70 | | | | |

^a 0.1 M Atkins-Pantin (Na₂CO₃-H₃BO₃) buffer, 3% ethanol, 25°. ^b 0.9 N NaOH, 10% ethanol, 25°.

± 0.20, 0.1 M-Atkins-Pantin 緩衝液 (0.1M Na₂CO₃ と 0.1M H₃BO₃ -KCl の 3.7/6.3 (v/v) 混合液) 中で, dimethylcarbamate は 0.9N NaOH (pH 13.95 ± 0.20) 中で反応を行なった。化合物の水への溶解度が低いために acetate では 3 vol %, dimethylcarbamate では 10 vol % エタノールを

Table 9
Log *k* Values Used in Correlations of Phenyl Diethyl Phosphates and Phenyl *N*-Methylcarbamates

| Substituent and log <i>k</i> , M ⁻¹ min ⁻¹ | |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Phosphates ^a | H: -1.56, <i>o</i> -Cl: -0.81, <i>o</i> -Br: -0.85, <i>o</i> -I: -0.94, <i>o</i> -C ₂ H ₅ : -1.94, <i>o</i> - <i>i</i> -C ₃ H ₇ : -1.99, <i>o</i> -OCH ₃ : -1.66, <i>o</i> -NO ₂ : 0.12, <i>m</i> -Cl: -1.03, <i>m</i> -Br: -1.00, <i>m</i> -CH ₃ : -1.67, <i>m</i> -OCH ₃ : -1.43, <i>m</i> -NO ₂ : -0.42, <i>p</i> -Cl: -1.16, <i>p</i> -Br: -1.12, <i>p</i> -I: -1.11, <i>p</i> -C ₂ H ₅ : -1.71, <i>p</i> - <i>i</i> -C ₃ H ₇ : -1.70, <i>p</i> -OCH ₃ : -1.78, <i>p</i> -SCH ₃ : -1.35, <i>p</i> -NH ₂ : -1.84, <i>p</i> -COCH ₃ : -0.71, <i>p</i> -CN: -0.42, <i>p</i> -NO ₂ : -0.18 |
| <i>N</i> -Methylcarbamates ^b | H: 2.38, <i>o</i> -F: 3.89, <i>o</i> -Cl: 3.92, <i>o</i> -Br: 4.10, <i>o</i> -I: 4.01, <i>o</i> -CH ₃ : 1.67, <i>o</i> -C ₂ H ₅ : 1.67, <i>o</i> - <i>i</i> -C ₃ H ₇ : 1.69, <i>o</i> -C ₃ H ₇ : 1.66, <i>o</i> - <i>sec</i> -C ₄ H ₉ : 0.83, <i>o</i> - <i>t</i> -C ₄ H ₉ : 0.83, <i>o</i> -OCH ₃ : 2.53, <i>o</i> -OC ₂ H ₅ : 2.48, <i>o</i> - <i>i</i> -C ₃ H ₇ : 2.36, <i>o</i> -CN: 5.44, <i>o</i> -NO ₂ : 5.79, <i>m</i> -F: 3.30, <i>m</i> -Cl: 3.26, <i>m</i> -Br: 3.54, <i>m</i> -CH ₃ : 2.28, <i>m</i> -OCH ₃ : 2.55, <i>m</i> -CN: 4.10, <i>m</i> -NO ₂ : 4.44, <i>m</i> -N(CH ₃) ₂ : 2.15, <i>p</i> -F: 2.40, <i>p</i> -Cl: 3.00, <i>p</i> -Br: 3.10, <i>p</i> -CH ₃ : 1.98, <i>p</i> -OCH ₃ : 1.79, <i>p</i> -CN: 5.00, <i>p</i> -NO ₂ : 5.66, 3,4-(CH ₃) ₂ : 1.80 |

^a From C. van Hooijdonk and L. Ginjaar, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 86, 449 (1967). ^b From T. Fujita, K. Kamoshita, T. Nishioka, and M. Nakajima, *Agric. Biol. Chem.*, 38, 1521 (1974).

は 10 vol % エタノールを反応液中に含んでいる。2 次反応速度定数, *k*_{OH}, は UV 吸収増加の時間変化と pH 値より算出した。測定は異なった濃度において 3 回測定し, 平均値を *k*_{OH} とした。*k*_{OH} の標準偏差は 4 % 以下であった。

Acetate と dimethylcarbamate の *k*_{OH} 値を Table 8 に示す。置換 phenyl diethyl phosphate の *k*_{OH} は van Hooijdonk and Ginjaar の報告値を,⁵⁵⁾ 置換 phenyl methylcarbamate の *k*_{OH} は藤田らの報告値⁵⁶⁾ を解析に用いた (Table 9)。

3. 1. 3. 置換基定数

脂肪族置換基の *E*_s 値は Taft によって最初に定義された値を,⁴⁸⁾ 他の置換基の *E*_s 値は Kutter and Hansch が 34 式から計算した値を用いた。⁵⁰⁾ 置換基 OR, SR, NRR' の *E*_s 値はそれぞれ酸素, 硫黄, 窒素原子の \overline{r}_v だけを使って計算した値である。NO₂ 基に関してはベンゼン環と同一平面にある場合と垂直になっている場合とに対応して 2 つの *E*_s 値が計算されている。本章でとりあげた phenyl ester ではいずれもベンゼン環と同一平面に NO₂ 基があると仮定した *E*_s 値を使った場合に良い結果が得られた。また, もともと *E*_s 値は Me 基を基準にして定義されてい

Table 10. Substituent Parameters Used for Correlations^a

| Substituent | σ_m^b | σ_p^b | $\sigma_m^{c,c}$ | $\sigma_p^{c,c}$ | σ_p^{-c} | E_{sd}^d | Fe) |
|------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| H | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | 0.0 | 0.0 |
| Me | -0.07 | -0.17 | -0.07 | -0.12 | | -1.24 | -0.04 |
| Et | -0.07 | -0.15 | -0.07 | -0.13 | | -1.31 | -0.05 |
| <i>i</i> -Pr | -0.07 ^f | -0.15 | -0.07 | -0.16 | | -1.71 | -0.05 |
| <i>n</i> -Pr | | -0.15 ^e | -0.07 ^e | -0.13 ^e | | -1.60 | -0.06 |
| <i>sec</i> -Bu | | -0.15 ^e | | -0.16 | | -2.37 | -0.05 ^e |
| <i>t</i> -Bu | -0.10 | -0.20 | -0.07 | -0.17 | | -2.78 | -0.07 |
| OMe | 0.12 | -0.27 | 0.06 | -0.16 | -0.20 ^f | -0.55 | 0.26 |
| OEt | 0.07 ^f | -0.24 | 0.04 ^e | -0.14 ^e | | -0.55 | 0.22 |
| O- <i>i</i> -Pr | | -0.45 | 0.04 ^e | -0.17 ^e | | -0.55 | 0.30 |
| F | 0.34 | 0.06 | 0.35 | 0.17 | -0.02 ^f | -0.49 | 0.43 |
| Cl | 0.37 | 0.23 | 0.37 | 0.27 | | -0.87 | 0.41 |
| Br | 0.39 | 0.23 | 0.38 | 0.26 | | -1.16 | 0.44 |
| I | 0.35 | 0.18 | 0.35 | 0.27 | | -1.40 | 0.40 |
| CF ₃ | 0.43 | 0.54 | 0.47 | 0.27 | 0.65 | -2.40 | 0.38 |
| COMe | 0.38 | 0.50 | 0.34 | 0.46 | 0.87 ^f | | |
| CN | 0.56 | 0.66 | 0.62 | 0.69 | 0.90 | -0.51 | 0.51 |
| NO ₂ | 0.71 | 0.78 | 0.70 | 0.82 | 1.24 ^f | -1.01 ^h | 0.67 |
| NH ₂ | -0.16 | -0.66 | -0.14 | -0.38 | -0.15 | -2.52 ⁱ | |
| NMe ₂ | -0.21 ^f | | -0.15 | -0.44 | | -0.61 | 0.10 |
| SMe | 0.15 | 0.0 | | 0.08 | | | |

^a Values used in this work are listed. When σ_p^- value is taken as σ_p^+ for substituents which do not undergo electron-withdrawing through resonance, it is not shown. Likewise, if σ_m^+ value is equal to σ_m^- , it is not necessarily listed. ^b From the compilation of D. H. McDaniel and H. C. Brown, *J. Org. Chem.*, 23, 420 (1958), unless otherwise noted. ^c From ref 39 unless otherwise noted. ^d From ref 48 and 50; the point of reference is shifted to E_s of H; see text. ^e From ref 47. ^f From the compilation of M. S. Tuttle, *Adv. Drug Res.*, 6, 68 (1971). ^g Estimated from values of closely related substituents. ^h For the minimum steric effect of the perpendicular dimension. ⁱ For the maximum steric effect of the coplanar dimension.

るが ($E_s(\text{Me}) = 0$) この論文では他の LFER 定数と同様に H 基を基準とした E_s 値, $E_s(\text{H}) = 0$, を用いる。

F 値は Hansch らによって訂正された値を用いた。⁴⁷⁾ その他の LFER 定数は Table 10 に掲げるとおりである。

3. 1. 4. 計算と検定

相関式, (33), (35), (36) 式, の係数は最小二乗法によって決定した。相関式, 各項の有意性, 項の追加に関する有意性は多変量解析に従って F 検定, t 検定を行なって判定した。

第 2 節 実験結果

(35), (33), (36) 式に対応する 3 種類の相関式 (cor 1, 2, 3) がそれぞれのエステルについて Table 11 に示されている。いずれの相関式も置換基 = H の化合物をふくんでいる。これらの相関式は F 検定で 99.5% 以上, 各項は t 検定で 99% 以上の信頼性をもって有意である。さらにある項を追加することによる相関性の向上を検定する方法によって各項の有意性を確かめた場合にも 99% 以上の信頼性が認められた。例外は Set 3 cor 1 の E_s 項であり, t 検定 97.5%, F 検定 98.5% の信頼性で有意であった。

Acetate (Set 1), dimethylcarbamate (Set 2) ではベンゼン環と反応基間の共鳴効果を含まない置換基定数 σ° を用いた相関式の方が σ^- や σ を用いた場合よりも良い結果が得られた。メタ, パラ置換 phenyl diethyl phosphate の場合には若干の置換基 — 反応基間の共鳴効果を

$$\log k = \rho\sigma^\circ + b\Delta\sigma + c; \quad \Delta\sigma = \sigma^- - \sigma^\circ \quad \dots\dots\dots (37)$$

考慮した湯川—都野式, (37) 式, を適用した場合に良い結果が得られた。(Set 3 cor 2)。オルト置換体を含めたとき $b\Delta\sigma$ 項は統計的に有意であった。従って phosphate においてオルト置換基による通常の電子的効果は $\sigma^\circ + b(\sigma^- - \sigma^\circ) / \rho$ とあらわされる。しかし $o\text{-NO}_2$, $o\text{-O Me}$ を除いた他のオルト置換基は $\Delta\sigma = 0$ であるため, オルト置換体だけの相関式 (Set 3 cor 1) では $b\Delta\sigma$ 項は統計的に有意でない。

メタ, パラ置換 phenyl methylcarbamate の $\log k_{\text{OH}}$ は σ^- で関係づけられる (Set 4 cor 2)。オルト置換体について $\sigma_{\text{ortho}} = \sigma_{\text{p}}^-$ と仮定すれば相関はよくなかったが, $\sigma_{\text{ortho}} = \sigma_{\text{p}}$ とおいた場合に極めて良い相関関係が得られた (Set 4 cor 1, 3)。ここで $\sigma^\#$ は $\rho\sigma$ 項がオルト, メタ, パラ置換体それぞれについて $\sigma_{\text{ortho}} (= \sigma_{\text{p}})$, σ_{m} , σ_{p}^- の組み合わせで解析されていることを表わしている。

Table 11 のいずれの Set においてもメタ, パラ置換体についての Hammett 式 (cor 2) の ρ 値はオルト置換体だけの相関式 (cor 1) における ρ 値と等しいし, またいずれも総合式 (cor 3) の ρ 値とも等しくなっていることがわかる。また cor 1 における σ_{Es} と fF 項は cor 3 のそれらの項とよい対応を示している。従って methylcarbamate (Set 4) の場合に $\sigma_{\text{ortho}} = \sigma_{\text{p}}$ とおいた点を除いて, 本章のはじめに述べた (35) 式の前提条件がアルカリ加水分解反応においても

Table 11. Correlation of Hydrolysis Data with Eq 33, 35, and 36a
 $\log k = \rho\sigma + \delta E_n + fF + b\Delta\sigma + c$

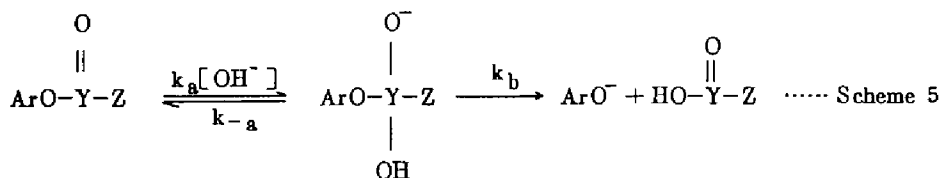
| Set no. | Esters & cond. | ρ | δ | f | b | c | n | c | n | d | se | r | f | rg |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----|-----|-------|-------|--------|-------|-----|------|
| 1 | Acetates 3% EtOH-H ₂ O, 25° (log k_H = 2.22) | 1 | 1.234 σ (±0.234) | 0.185 (±0.045) | 0.482 ^a (±0.295) | 2.263 (±0.085) | 12 | 12 | 0 | 0.052 | 0.997 | 414.2 | | |
| | | 2 | 1.174 σ (±0.057) | | | 2.258 (±0.022) | 18 | 0 | 0.037 | 0.996 | 1921.5 | | | |
| | | 3 | 1.180 σ (±0.054) | 0.185 (±0.023) | 0.538 (±0.094) | 2.258 (±0.021) | 29 | 12 | 0.041 | 0.997 | 1203.3 | | | |
| 2 | Dimethylcarbamates 10% EtOH-H ₂ O, 25° (log k_H = -2.64) | 1 | 1.144 σ (±0.305) | 0.232 (±0.102) | | -2.684 (±0.168) | 11 | 11 | 0.128 | 0.956 | 42.2 | | | |
| | | 2 | 1.145 σ (±0.096) | | | -2.591 (±0.041) | 14 | 0 | 0.056 | 0.991 | 681.2 | | | |
| | | 3 | 1.164 σ (±0.121) | 0.271 (±0.043) | | -2.610 (±0.057) | 24 | 11 | 0.095 | 0.983 | 302.0 | | | |
| 3 | Diethyl phosphates 2% <i>i</i> -PrOH-H ₂ O, 25° (log k_H = -1.56) | 1 | 1.639 σ (±0.252) | 0.090 ^c (±0.060) | 0.840 (±0.281) | -1.553 (±0.089) | 8 | 8 | 0.034 | 0.999 | 1063.6 | | | |
| | | 2 | 1.405 σ (±0.090) | | | 0.472 ^d (±0.207) | 17 | 0 | 0.052 | 0.996 | 785.3 | | | |
| | | 3 | 1.420 σ (±0.083) | 0.134 (±0.047) | 0.950 (±0.178) | 0.445 ^e (±0.181) | 24 | 8 | 0.051 | 0.997 | 732.0 | | | |
| 4 | Methylcarbamates 10% EtOH-H ₂ O, 38° (log k_H = 2.38) | 1 | 2.216 σ (±0.349) | 0.244 (±0.103) | 3.233 (±0.471) | 2.477 (±0.200) | 16 | 16 | 0.133 | 0.997 | 605.9 | | | |
| | | 2 | 2.690 σ (±0.161) | | | 2.440 (±0.077) | 17 | 0 | 0.128 | 0.994 | 1262.8 | | | |
| | | 3 | 2.541 σ [#] (±0.144) | 0.241 (±0.069) | 2.989 (±0.285) | 2.501 (±0.073) | 32 | 16 | 0.148 | 0.994 | 802.1 | | | |

^a Unless otherwise noted, the value of ρ , δ , f , and b are justified by t test at better than the 99.5% level of significance. The figures in parentheses are the 95% confidence intervals. ^b Correlation number; see text. ^c The number of data used in the correlation. ^d The number of data of ortho-substituted derivatives including the unsubstituted ester. ^e Standard deviation. ^f Multiple correlation coefficient. ^g F value of the correlation. ^h Justified at a level between 99.5 and 99%. ⁱ Justified at a level between 99 and 97.5%. ^j $\Delta\sigma = \sigma^+ - \sigma^-$.

成立しているように思われる。

第3節 考 察

フェニルエステルのアルカリ加水分解反応では、一般に Scheme 5 で示されるように四面体中間体 (tetrahedral intermediate) のような付加中間体を経て反応が進行することが知られている。⁵⁷⁾ この中間体に関して定常状態が成立する時、2次反応速度定数 k_{OH} は各素反応段階の速度定数を使って式であらわされる。加水分解反応の律速段階が Scheme 5 であらわされる素



$$k_{OH} = k_a k_b / (k_{-a} + k_b) \quad \dots\dots\dots \text{式}$$

反応のいずれにあるかによって2つの極端な場合を考えることができる。

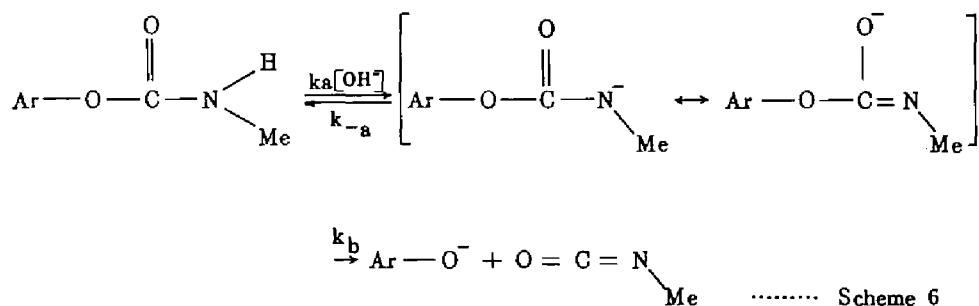
今、 OH^- のカルボニル炭素への求核攻撃が律速段階であり脱離基 phenoxide, ArO^- の脱離が速やかに進むものと仮定すれば、式において $k_b \gg k_{-a}$ になる。律速段階において反応中心——カルボニル炭素——はベンゼン環から2番目の原子であるから、速度定数 k_{OH} は置換安息香酸の酸解離 (Fig 12, $\rho = 1.0$) と同程度の置換基効果の影響をうけるものと推定される。^{39,43)} Table 11において acetate と dimethylcarbamate はそれぞれ $\rho = 1.18, 1.16$ と 1.0 に近い値を示している。従ってこの2つのエステルでは OH^- の求核攻撃が律速段階である。また σ^0 で関係づけられていることは、反応原系と反応中間体のいずれにおいても acyl 基とベンゼン環との共役が存在していないことを意味している。最近 Cohen and Takahashi はフェニルエステルの加水分解反応において phenoxy 酸素原子の孤立電子対 (lone pair electrons) と $p\text{-NO}_2$, CN, や COMe 基などの電子吸引性パラ置換基との間にグループ間の共鳴効果が寄与していないと報告している。⁴¹⁾ このことからオルト置換基が acyl 基 (反応基) とベンゼン環との共役を“かさばり”によって阻害する効果を考慮する必要がないことになる。

もう一方の極端な場合は中間体形成段階が速やかに平衡に達し、phenoxide の脱離段階が律速となる場合である。式において $k_b \ll k_{-a}$ となるから $k_{OH} = k_a k_b / k_{-a}$ である。この時係数 ρ は k_a / k_{-a} 平衡段階と k_b 脱離段階とにおけるそれぞれの ρ 値の和としてあらわされる。 k_a / k_{-a} における ρ 値はほぼ1であると期待できる。 k_b における ρ 値はフェノールの酸解離平衡における ρ 値 (≈ 2.0) に近い値になるものと思われる。^{39,43)} Phenoxide の脱離段階は電子吸引性の共鳴効果によって促進され、中間体形成の平衡段階よりも置換基効果に対する感受性が高いために $\log k_{OH}$ は σ^0 よりもむしろ σ^- によって関係づけられるものと推定される。

Phosphate はこれら2つの極端な例の中間に位置している。Set 3 cor 3 は電子的効果が湯

川-都野式で関係づけられることを示している： $1.42\sigma^{\circ} + 0.45\Delta\sigma = 1.42(0.68\sigma^{\circ} + 0.32\sigma^{-})$ 。
この項が70%の σ° 性を帯びていることや $\rho (= 1.42)$ 値の大きさは phosphate のアルカリ加水分解反応がどちらかといえば OH^{-} 攻撃の段階によって支配されていることを意味している。

Methylcarbamate の ρ 値はパラ置換基の共鳴効果 (through-resonance) を考慮した定数 σ^{-} で最もよく関係づけられることから、phenoxide 脱離が律速段階となる反応機構を経るものと期待される。しかしこの反応は四面体中間体を形成するのではなく Scheme 6 に示すごとく、先ず速やかなプロトン脱離を経て律速段階である phenoxide 脱離が進行する。^{56,58,59)} すなわち $\log k_{\text{OH}}$ の $\rho = 2.5$ は Scheme 6 で示された2つの素反応段階におけるそれぞれの ρ 値の和としてあらわされるはずである。脱プロトン平衡における ρ 値はベンゼン環からの距離を考慮して置換



phenylacetic acid 類の酸解離平衡における ρ 値 ($= 0.5$)^{39,43)} に近い値となるであろうし、phenoxide 脱離反応においては $\rho = 2.0$ と考えると解析結果 $\rho = 2.5$ は矛盾なく説明される。オルト置換体を含む相関式 (cor 1 と 3) が $\sigma_{\text{ortho}} = \sigma_{\text{p}}^{-}$ ではなくてむしろ $\sigma_{\text{ortho}} = \sigma_{\text{p}}$ と仮定した時に良い相関関係が得られていることは、phenoxy 酸系の孤立電子対とベンゼン環との共鳴効果がオルト置換基によって禁止されていることや、律速段階である phenoxide 脱離においてオルト置換基と phenoxide 酸素との共鳴も禁止されていることなどを示唆している。

Set 4 の相関式を置換フェノールの酸解離平衡定数 $\log K_{\text{A}}$ における置換基効果の解析結果⁵⁴⁾ (39~(41)式、と比較すればこれらの点がより明確になる。オルト置換フェノールは σ 定数で関係づけられ、全置換体に関して、

オルト置換体：

$$\log K_{\text{A}} = 2.196 (\pm 0.749) \sigma + 0.199 (\pm 0.148) E_{\text{s}} + 2.173 (\pm 0.930) F - 9.727 (\pm 0.308) \\ n = 14 \quad s = 0.203 \quad r = 0.990 \quad \text{..... (39)}$$

メタ、パラ置換体：

$$\log K_{\text{A}} = 2.061 (\pm 0.099) \sigma^{-} - 9.836 (\pm 0.055) \\ n = 27 \quad s = 0.097 \quad r = 0.993 \quad \text{..... (40)}$$

オルト、メタ、パラ置換体：

$$\log K_{\text{A}} = 2.036 (\pm 0.118) \sigma^{\#} + 0.167 (\pm 0.060) E_{\text{s}} + 2.395 (\pm 0.260) F - 9.814 (\pm 0.065) \\ n = 40 \quad s = 0.134 \quad r = 0.992 \quad \text{..... (41)}$$

通常の電子的効果は $\sigma^{\#}$ であらわされている。(39)~(41)式は methylcarbamate の $\log k_{OH}$ の解析結果 (Set 4) と全くよく対応している。フェノールの $\log K_A$ 値と methylcarbamate の $\log k_{OH}$ との間によい相関性が見つけられていることも、⁵⁶⁾ これら LFER 定数を用いた解析結果の比較からよく理解できる。

Set 1 および 2 における δE_s 項の係数 δ が正で互いに似た値をとることは、acetate と dimethylcarbamate のアルカリ加水分解反応においてオルト置換基の“かさばり”効果が阻害的に作用しており、この効果にとって重要な律速段階はベンゼン環に関してほぼ等しい位置関係にあることを意味している。共鳴効果に対する立体的な阻害を考慮する必要がないことから、 δE_s 項はオルト置換基が OH^- の反応基への接近を阻害したり、空間的に“こみあった”四面体中間体形成を阻害する効果をあらわしている。種々のタイプの反応系におけるオルト効果を解析した結果、 δ 値の大きさはほぼオルト置換基と反応基との距離に関係しているものと考えられている。⁵⁴⁾ 例えば四面体中間体を形成する反応では benzoyl transfer 反応 8 例において $\delta = 0.63 \pm 0.14$ 、phenylacetyl transfer 反応 3 例において $\delta = 0.39 \pm 0.01$ と化合物種によって一定の δ 値を示している。

phosphate において電子的効果が σ° と σ^- の一次結合として表わされる (湯川-都野式) ことから、この反応の遷移状態は acetate や dimethylcarbamate の場合に比べて反応座標系 (reaction coordinate) をより生成物の方向に進んだ位置にあるものと推定される。すなわち P-O (phenoxy 酸素) 結合が弱まり、長くのびているものと考えられる。しかしこのような結合の変化は δ 値にあまり影響を与えないようである (Set 2 cor 3)。

Methylcarbamate の $\log k_{OH}$ における δ 値は acetate, dimethylcarbamate の場合とよく類似している (Set 4 cor 3)。しかし反応機構 (Scheme 6) がこれらとは全く異なっていることや、フェノールの $\log K_A$ における δ 値(41)式、とよく対応していることから phenoxide 脱離がオルト置換基による立体効果にとっても重要な段階なのであろう。プロトン脱離平衡段階はベンゼン環より 3 番目の原子における反応であるので、この反応過程はオルト置換基による立体効果をうけない。実際オルト置換 phenoxyacetic acid の酸解離平衡定数に δE_s 項は寄与していない。⁵⁴⁾

いずれの相関式 (Set 1~4) においても $o-NO_2$ 基の立体効果は $o-NO_2$ 基がベンゼン環と同一平面内にあると仮定した $E_s(NO_2)$ 値を用いた場合に良い相関が得られていることから、反応中 $o-NO_2$ 基はベンゼン環と同一平面内にあるのであろう。 $o-NO_2$ 基とベンゼン環との共鳴は禁止されていないが、 σ° または σ_p 値によって電子的効果があらわされていることは、 $o-NO_2$ 基と反応基間の共鳴を考慮する必要のないことを意味している。

Acetate と dimethylcarbamate のアルカリ加水分解反応における置換基効果は通常の電子的効果 ($\rho\sigma$ 項) や立体効果 (δE_s 項) に関する限り互いに極めてよく似ている。しかし近接電子的効果 (fF 項) に関しては全く異なる。 fF 項は acetate において重要である (Set 1 cor 3) のに対し dimethylcarbamate においては有意でない (Set 2 cor 3)。他の化合物種の多くの反応を解析した結果からも、係数 f は反応原子からベンゼン環までの距離のみならず反応基の構造

にも依存していることが示唆されている⁵⁴⁾： phenol, $\log K_A$ $f = 2.4$; anilinium ion, $\log K_A$ $f = 1.8$; benzoyl transfer, $\log k$ $f = 1.1$; phenylacetyl transfer, $\log k$ $f = -0.30$ 。Acetate や dimethylcarbamate のアルカリ加水分解反応に反応経路や律速段階が類似している phenylacetyl transfer 反応の例において負の f 値が得られていることが特徴である。

Methylcarbamate の $\log k_{OH}$ における大きな f 値 ($f = 3.0$) は phenoxide 脱離反応過程におけるオルト置換基の強い電子吸引性近接効果を反映している。Phenol の $\log K_A$ における f 値, 例式, との差 $f = 0.6$ はプロトン脱離平衡における近接電子効果をあらわしている。

Phosphate の $\log k_{OH}$ においては, acetate に比べて f 値が大きくなっているのは, 中間体の違いや phenoxide 脱離段階における近接効果の寄与も含まれていることによるものと考えられる。

これらの解析結果はフェニルエステルのアルカリ加水分解反応において“オルト効果”として互いに重なりあっている立体的効果, 近接電子効果が LFER 定数項, δE_s および fF 項, によって定量的に通常の電子的効果から分離されたことを意味している。Acetate と dimethylcarbamate のように律速段階, ρ 項, δE_s 項などが互いに類似していても fF 項が異なるように, オルト置換基の効果は反応系によって寄与を異にしている。従ってオルト置換体を含むこれらの化

Table 12. Typical Values of δ and f in Ortho Effect

| Reactions & compounds | δ | f |
|---------------------------------------------|----------|-------|
| Ester formation & hydrolysis: ^{a)} | | |
| Benzoic acids | 0.63 | 1.1 |
| Phenylacetic acids | 0.39 | -0.30 |
| Log K_A : ^{a)} | | |
| Phenols | 0.17 | 2.40 |
| Phenoxyacetic acids | 0.0 | 0.0 |
| Benzoic acids | -0.39 | 1.47 |
| Anilinium ions | -0.53 | 1.77 |
| Alkaline hydrolysis: | | |
| Phenyl dimethylcarbamates | 0.27 | 0.0 |
| Phenyl methylcarbamate | 0.24 | 2.99 |
| Phenyl acetates | 0.19 | 0.54 |
| Phenyl diethyl phosphates | 0.13 | 0.95 |

a) From ref. 54.

化合物の酵素反応機構を論ずるためには、比較する反応系や反応条件をできる限り酵素反応に近いものを選んで慎重に論じなければならない。

最後に酸やエステルの方々の反応定数を解析してこれまでに得られている δE_s , fF 項の係数 δ , f 値を Table 12 に掲げておく。

第4章 フェニルメチルカーバメイトのAChE 阻害反応における置換基効果の解析

Metcalf and Fukuto らのグループはこれまでに数百種類にのぼる置換 phenyl methyl-carbamate を合成し、ベンゼン環上の置換基の種類と置換位置の変化が AChE 阻害活性 (ACh の加水分解速度を 50% 阻害するのに必要なカーバメイト濃度, I_{50} 値, による比較) におよぼす効果を構造活性相関の立場から調べている。¹³⁾ それらの結果を整理すれば①正電荷を持つ neostigmine 誘導体は高い AChE 阻害活性を示す。⁶⁰⁾ ②アルキルやハロゲンのように化合物の脂溶性 (lipid solubility) を増す置換基は AChE 阻害活性を高める。③アルキル置換体の AChE 阻害力はアルキル基の置換位置と密接に関係しており (メタニオルト ≫ パラ), アルキル基の炭素数がふえるにつれて阻害力は増す ($\text{CH}_3 < \text{C}_2\text{H}_5 < \text{iso-C}_3\text{H}_7 \leq \text{tert-C}_4\text{H}_9 < \text{sec-C}_4\text{H}_9$)。しかしこれ以上炭素数がふえると ($\text{C}_5 - \text{C}_{10}$), 阻害力は低下する。⁶¹⁾ Cyclopentyl や cyclohexyl 基の導入も阻害力が低下する。④アルコキシ (OR) 置換体も対応するアルキル置換体と同程度の阻害力を示し, 置換基の位置や炭素数と阻害力との関係もアルキル置換体の場合に似ている。⑤パラ位にハロゲンの入った置換体は阻害力が極めて弱い。一方, オルトやメタ位にハロゲンが入ると Me や Et 基と同程度の阻害力を示し, $\text{F} < \text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$ の順に阻害活性は高くなる。⑥多置換体ではいずれの種類も 2,5-置換体と 2,3-置換体とがほぼ等しい阻害活性を示し, 阻害活性に加成性が認められる。⁶⁰⁾ このことは AChE のカーバメイト結合部位において 2 位と 6 位の置換基, 3 位と 5 位の置換基とがそれぞれ等価な相互作用をしていることを示唆している。⑦ NO_2 置換体はアルカリ加水分解速度が最も大きいにもかかわらず, AChE 阻害力は弱い。⁶²⁾

Metcalf and Fukuto はこのような AChE 阻害活性の変化を置換基とカルバモイル基 (CONHMe 基) との距離で説明しようとしている。すなわち AChE のエステル部位と陰性部位 (非常に疎水性に富み, COO^- 基が存在していると推測されている⁸⁾) とに同時に相補的に結合しうる置換体は酵素への親和性が高く, 従って阻害活性も高くなるものと説明するものである。例えば *o*-isopropoxy や *o*-sec-butyl 置換体はアルコキシ置換体の中で最も強い AChE 阻害を示すが, いずれの置換体においても枝分れ炭素からカルバモイル基の $>\text{C}=\text{O}$ 基までの分子模型より計算した距離は約 0.53 nm であり, neostigmine 誘導体における $^+\text{NMe}_3$ 基から $>\text{C}=\text{O}$ 基までの距離 0.47 ~ 0.53 nm とよく対応している。¹³⁾

しかしこのような説明では置換位置や種類を変えた場合の阻害活性の連続的な変化や, カルバミル化酵素 (EC) 形成の際に予想される有機化学的な反応性の変化を説明することはできない。

AChE 阻害反応の構造活性相関を定量的に扱おうとする試みは, AChE 阻害活性とアルカリ加水分解速度の比較から始められた。すなわちいずれの反応においても求核試薬——AChE 阻害反応においてはセリン OH 基, アルカリ加水分解反応においては OH^- ——の攻撃をうけやすく,

脱離基の脱離が容易な置換体ほど有利であると予想されるからである。カーバメイトと同様に AChE の基質型阻害剤であるメタあるいはパラ置換 phenyl diethyl phosphate や ethyl p-nitrophenyl alkyl phosphate の AChE 阻害活性, $\log 1/I_{50}$, とアルカリ加水分解反応速度定数, $\log k_{OH}$, との間に良好な正の相関が認められている。^{36, 63)} また LFER 定数を用いた $\log 1/I_{50}$ 値の解析においてもベンゼン環上の置換基の変化は $\rho\sigma^-$ 項 ($\rho > 0$) によって, アルキル基の変化は $\rho\sigma^*$ と δE_s 項とによってそれぞれ関係づけられている。測定に使われた化合物の脂溶性の変化が少ないものに偏っていることや, Scheme 1 に示された阻害反応過程のどの段階で置換基効果が現われているかなど問題点が残されてはいるが, phosphate による阻害反応はアルカリ加水分解反応とはほぼ類似した機構で進行するものと推定される。

しかし置換 phenyl methylcarbamate ではこのようなアルカリ加水分解反応と阻害反応との対応が認められない。むしろ phosphate の場合とは逆にアルカリ加水分解反応を容易にうける置換体ほど AChE 阻害活性が低い傾向がみられる。^{64, 65)} その理由としてアルカリ加水分解反応を容易にうける NO_2 置換体では阻害反応液中 (pH 7~8) において不安定であり, 自然加水分解によりカーバメイト濃度 [CX] が減少することによりみかけの阻害活性が低下することを挙げる事ができるが,⁶²⁾ この理由だけでは NO_2 置換体以外のカーバメイトについて阻害活性の変化を定量的に説明することはできない。カーバメイトの場合には脱離基の脱離のしやすさだけでは説明のできない酵素反応に特異的な相互作用の寄与 — 例えば疎水性相互作用 — などをも含んでいるであろうし, それらの効果を定量的に分離して表現しなければ阻害反応機構を明らかにすることはできない。

一般にベンゼン環上の置換基の種類や置換位置の変化によって生ずる酵素活性の変化は, 酵素活性を支配している電子的, 疎水的, 立体的, その他の成分に分離可能な化合物自身の物理化学的性質の変化に依存しているものと考えることができる。酵素活性の変化を自由エネルギー単位の変化 ($\delta\Delta G$) で表わすことができるならば $\delta\Delta G$ は化合物のこれら物理化学的性質の変化を自由エネルギー単位で表わした項, $\delta\Delta G_{polar}$, $\delta\Delta G_{hydrophobic}$, $\delta\Delta G_{steric}$, $\delta\Delta G_{others}$ の一次結合として(42)式のように書くことができる。この仮定に基づいて Hansch and Fujita は

$$\delta\Delta G = \delta\Delta G_{polar} + \delta\Delta G_{hydrophobic} + \delta\Delta G_{steric} + \sum \delta\Delta G_{others} \quad \dots\dots (42)$$

これら置換基の物理化学的性質の変化に関連した LFER 定数を用いて種々の化学物質の酵素活性や蛋白質への結合, さらに広く生理活性一般を関係づけることが可能であることを多くの例について明らかにした。^{66, 67)} (42)式の各項に対応した LFER 定数として, 前章で述べたように $\delta\Delta G_{polar}$ をあらわす $\rho\sigma$ 項, $\delta\Delta G_{steric}$ をあらわす δE_s 項が有機化学反応において定義されており, 有機化学反応のみならず一部の酵素反応においてもそれら LFER 定数の有用性が認められている。⁶⁸⁻⁷⁰⁾ しかし化合物の変化に伴う脂溶性 (疎水性) の変化をあらわす $\delta\Delta G_{hydrophobic}$ 項の LFER 定数に関してはそれまで適切な定数が定義されていなかった。蛋白質と有機化合物の基本的な相互作用である疎水性相互作用を定量的に評価しようとする試みは, これまでにも種

々のアミノ酸の有機溶媒への溶解や、⁷¹⁾ エタノール/水間の分配、⁷²⁾ 脂肪族アルコールの水への移行、⁷³⁾ 中性型脂肪酸のn-ヘキサン/水間の分配⁷⁴⁾ における自由エネルギー差を測定することにより行なわれている。脂肪族側鎖に関する評価に限ればいずれの測定法によっても炭素数と自由エネルギー変化との間により相関性が得られている。炭素1個 (methylene) あたりの自由エネルギー差 (ΔF_{CH_2}) が炭素数 $C_1 - C_{22}$ までについて $\Delta F_{CH_2} = 0.7 - 0.8 \text{ kcal/mole}$ と一定であり、加成性が成立することなどが明らかにされている。⁷⁵⁾ このような性質は水の構造理論に基づく理論的研究からも証明されている。⁷⁶⁾ 蛋白質と有機化合物との結合や会合については、bovine serum albumin (BSA) と脂肪酸との結合のように比較的単純な系において炭素数と結合自由エネルギー差との間に相関性が見つけられているにすぎない。⁷⁷⁾ ハロゲン、アミノ、OR、 NO_2 、CN などの脂肪族側鎖以外の置換基に関して、あるいは芳香族環上の置換基に関してこのように疎水性相互作用を定量的に評価したり、他の LFER 定数との一次結合で使うような試みはなされていなかった。

Hansch and Fujita は 1-オクタノール/水系の分配係数より導かれた LFER 疎水性定数 π を芳香族置換基について定義した。⁷⁸⁾ ベンゼン環上の置換基 X の疎水性定数 π は Hammett σ の定義と同様次のように定義される。 $\pi_X = \log P_X - \log P_H$ ここに P_X は X 置換誘導体の 1-オクタノール/水系における分配係数であり、 P_H は母核分子 (X=H) の分配係数である。 $\log P_X$ は分子全体の性質に依存しているが、その差である π_X は置換基そのものの疎水的性質をあらわす。すなわち π_X を分子の特定の構成成分 X に assign することが可能であり、 π_X の加成性が成立する。 π_X の典型的な値を Table 13 に示す。置換基と母核の側鎖との間に特殊な立体的ある

Table 13
Hydrophobic Substituent Constant,
 π for Monosubstituted Benzenes^{a)}

| Group | π | Group | π |
|-------------------------------------------------|-------|-------------------|-------|
| H | 0.0 | Br | 0.86 |
| CH ₃ | 0.56 | I | 1.12 |
| CH ₂ CH ₃ | 1.02 | OCH ₃ | -0.02 |
| CH ₂ CH ₂ CH ₃ | 1.55 | OH | -0.67 |
| CH(CH ₃) ₂ | 1.53 | NH ₂ | -1.23 |
| CH ₂ CH=CH ₂ | 1.10 | NO ₂ | -0.28 |
| F | 0.14 | CN | -0.57 |
| Cl | 0.71 | COCH ₃ | -0.55 |

a) From ref. 47.

いは他の相互作用がない限り母核の異なった系でそれぞれ測定された

π_X 値はかわらない。例えば 15 種類のベンゼン系化合物より得られた

Me 基の π_{Me} は 0.5 ± 0.04 と一定である。⁷⁹⁾ しかしフェノール、アニ

リン系化合物より測定された電子吸引基の π_X は若干の σ の寄与を含ん

でいる。これは OH、NH₂ 基の lone pair 電子対 (非結合電子対) への

溶媒和に対する置換基の誘起効果によるものと考えられる。このように

π_X は、母核によっては置換基の疎水的性質のみならず電子的効果をも

ふくむ (composite な) 置換基定数

である。しかしこのような性質を持っているにもかかわらずフェノール、アニリンなどを含む種々のタイプの中性型有機化合物の蛋白質分子への結合は $\log P$ あるいは π だけで一義的に関係づ

けられる。例えば BAS と 1 対 1 結合を形成するモル濃度 (C) の逆数値と $\log P$ との間に $\log 1/C = 0.67 \log P + 2.48$ ($n=25, r=0.98, s=0.24$) という関係が認められる。⁶⁶⁾ このように特定の結合部位を持たない蛋白質分子への結合に関しては $\log P$ または π だけで関係づけられその係数はほぼ一定で 0.6 ± 0.1 である。このような関係は芳香族、脂肪族、アミン、アルコールなど有機化合物の種類にかかわらず成立することから、蛋白質分子との結合、会合に関与する一般的な相互作用 — 疎水性相互作用のみならずペプチド基やアミノ酸残基による水素結合などの相互作用も寄与しているであろう — が $\log P$ や π に考慮済みであるとみなすことができる。またこのようにして一般的な蛋白質への相互作用以外の特殊な相互作用を $\delta\Delta G_{\text{polar}}$, $\delta\Delta G_{\text{steric}}$, や $\delta\Delta G_{\text{others}}$ 項として分離評価することが可能であり、酵素蛋白質の特殊な作用を調べるために極めて好都合である。

このようにして 42 式の各項に対応した置換基の物理化学的性質をあらわす LFER 定数を使って、化合物の生理活性 (BR) — 酵素反応, モデル反応を含む — を 43 式のようにあらわすことが可能になる。^{66,67)} ここで e_i, E_i 項は水素結合やオルト効果などの効果に関する項である。これ

$$BR = a\pi + \rho\sigma + \delta E_s + \sum e_i E_i + c \quad \dots\dots\dots 43$$

までに酵素反応へ 43 式が適用された例は α -chymotrypsin⁸⁰⁾, monoamine oxidase⁸¹⁾, や以下に述べる AChE³⁶⁾ など数少ない。このことは変化に富む多くの置換誘導体を系統的に使って実験を行なわなければ十分に信頼性ある解析結果を得ることができないことを意味している。

メタあるいはパラ位が置換された phenyl methylcarbamate 53 個について Metcalf らが測定した AChE 阻害活性データの LFER 定数による解析が行なわれている。^{82,83)} (44 式において $a\pi$ 項の係数 a が正であることは置換基の疎水性が増加するにつれて阻害活性が高くなり、負の $\rho\sigma^-$

$$\log 1/I_{50} = 0.69\pi - 0.95\sigma^- + 1.19X + 3.50 \quad \dots\dots\dots 44$$

$$n = 53, r = 0.913, s = 0.415$$

項は、電子吸引基ほど阻害活性が低くなることを意味している。X は置換位置に関係した仮変数であり、メタ置換体では $X=1$, パラ置換体では $X=0$ の値をとる。本章の始めに紹介した Metcalf and Fukuto による定性的な解析結果 — 置換基の炭素数が増えるに従って ($a\pi$ 項) 阻害活性が高くなること、強い電子吸引基で置換された化合物ほど ($\rho\sigma$ 項) 阻害力が弱くなることや、パラ置換体よりも対応するメタ置換体の方が (XX 項) 強く阻害すること — が定量的に分離されている。

カーバメイトのアルカリ加水分解反応速度定数と AChE 阻害活性とを直接比較しても phosphate の場合に得られているような相関関係を認めることができなかったが、直接比較することが困難な場合でも次に述べるように置換基効果の解析を行えば容易に比較できる。カーバメイトのアルカリ加水分解反応速度定数, $\log k_{OH^-}$ における $\rho\sigma^-$ 項 (Table 11, Set 4 cor 2) と 44)

式における $\rho\sigma^-$ 項の比較から、置換基の電子的効果は全く逆方向に働いていることがわかる。また直接対応を示さない理由として AChE 阻害反応には $n\pi$, XX 項が加わっていることがわかる。これらの点でカーバメイトは phosphate と同一タイプの阻害剤でありながら、もっと複雑な様相で阻害反応を行なっているものと思われる。

これまでに行なわれた $\log 1/I_{50}$ 値の置換基効果による解析に関して次の点が解決されねばならない問題点として残されている。① I_{50} 値は反応定数 K_d , k_2 , k_3 (Scheme 1) が分離された値ではなくて、これらの複雑な関数であり各反応段階に及ぼす置換基効果の overall, 差し引きた効果だけが I_{50} 値にあらわれている。従って(4)式において LFER 項をある特定の反応過程にあてはめたり、係数の大きさや符号によって反応機構を検討することに任意性が生じてくる。② オルト置換 phenyl methylcarbamate が強い AChE 阻害剤であるにもかかわらず LFER 定数を用いた解析の試みがなされていない。③ これまでの AChE 阻害反応の解析に用いられてきた疎水性置換基定数 π は置換フェノキシ酢酸から測定されたものである。従ってカーバメイトの反応において電子的効果、立体的効果、その他の効果を完全に分離するためにはカーバメイトより実測された π 値を使わなければならない。とりわけオルト置換体による AChE 阻害反応の解析にはこのことが重要である。④ 仮変数 X の物理化学的意味づけが明確ではない。Hansch はカーバメイトのメタ置換体が AChE の陰性部位と特異的に相互作用を行なうために、より高い阻害活性を示す項であると説明している。⁸³⁾ しかしメタ置換体と同程度の強い阻害活性を示すオルト置換体の場合についても同様の仮変数項 XX が必要なのかどうかを検討しなければ、この項の物理化学的意味はわからない。

最近 Hetnarsky and O'Brien は種々の aryl methylcarbamate とモデル受容体, tetra-cyanoethylene, との電荷移動錯体 (charge transfer complex) 形成の平衡定数を測定し、この平衡定数からカーバメイトの電子供与性パラメータを定義している。⁸⁴⁻⁸⁶⁾ 20 種類のメタ, パラ置換 phenyl methylcarbamate について AChE 阻害反応における反応定数 K_d (Scheme 1) を測定し、疎水性置換基定数 π と彼らが定義した電子供与性パラメータの 2 変数を使って置換基の変化による K_d 値の変化を解析しようと試みている。彼等はカーバメイト・酵素活性複合体 (ECX) 形成においてカーバメイトのベンゼン環部分が疎水性相互作用のみならず電荷移動錯体形成のために電子供与体として関与しているものと仮定し、電子吸引性基 (σ 値の大きな置換基) で置換された誘導体ほど AChE 阻害活性が弱いことを証明しようとしている。しかし LFER 置換基定数を用いて解析を行なう場合には、解離平衡定数 K_d の対数値, $\log K_d$ 又は $\log 1/K_d$, を従属変数としなければならないのに K_d そのままを従属変数としている等、重大な誤りを犯していることもあって意味のある解析結果は得られていない。

カーバメイトの AChE 阻害反応における反応定数 K_d , k_2 の測定に関する問題点は第 2 章において既に考察を加え、再現性ある目的とする反応定数の測定法、条件を決定することにより解決した。本章では 55 種類のオルト, メタ, パラ置換 phenyl methylcarbamate による仔牛赤血球 AChE 阻害反応の反応定数を測定し、物理化学的に意味づけされた LFER 定数を使ってこれら反応定数の解析を行ない、置換基がこれら反応定数に及ぼす効果を電子的効果、疎水性効果や

その他の効果に分離して評価し、物理有機化学的立場から阻害反応機構について検討を加えた結果について記述する。

第1節 実 験

4. 1. 1. 化合物

実験に用いた置換 phenyl methylcarbamate は住友化学工業¹⁾製であり、55種類の置換誘導体について AChE 阻害反応定数 K_d , k_2 の測定を行なった。その他の試薬、AChE 酵素標品は (2.1.1) の場合と同じである。

4. 1. 2. 阻害反応定数 K_d , k_2 の測定

第2章第3節で既に論じたように、 $k_2 \times [CX] < 1.0 \text{ min}^{-1}$ を満たす濃度範囲のカーバメイトを用いて観察するならば、(2.1.2 a) 前定常状態の反応式による方法、(2.1.2 c) 基質・カーバメイト共存下での反応式による方法いずれの方法によっても阻害反応定数 K_d , k_2 を測定することが可能である。しかし一回の測定に用いる酵素量が少量であることや測定時間が短くてよい (1~4分)、基質 ACh を溶かすためにエタノールが必要でなく、それだけ反応系のエタノール濃度が低くなるなどの点で前者の方法を選んで、(5式)による逆数プロットから反応定数を決定した。反応液組成、測定 pH = 7.6、温度 25℃、pH-stat 法による酵素活性の測定など (2.1.3 a) 実験操作と同じである。阻害反応時間は3分間としたが NO_2 、CN基を持つ6個のカーバメイトについては、カーバメイトの自然加水分解による $[CX]$ 減少の影響を考慮して反応時間を1.5分に短縮した。この時間内であれば AChE 阻害反応は一次反応的に進行し、自然加水分解の影響をうけない。これら強い電子吸引基によって置換されたカーバメイトの反応定数を正確に測定することは、第3節で考察するように反応機構解析のうえで極めて重要であったので少なくとも3回測定を繰り返して再現性、信頼性を確かめた。測定に用いたカーバメイト濃度は積 $k_2 \times [CX] < 1.0 \text{ min}^{-1}$ の範囲になるように選んだ。反応液中のエタノール濃度が 2.5 (v/v) % を越えないようにカーバメイト原液を調製した。この濃度でエタノールは ACh 加水分解速度を 1.4% 阻害するが、芳香族エステルである phenyl acetate の AChE による加水分解速度も同程度阻害される。エタノール濃度が 0~4 (v/v) % 範囲ではエタノールによる AChE 阻害はエタノール濃度に比例している。カーバメイトによる AChE 阻害反応もエタノールによって同程度影響をうけるが、この効果は AChE 残存活性 v_i 測定の際にいくらか相殺されるものと思われる。従って反応液中のエタノール濃度は 2.5 (v/v) % を越えない濃度範囲内でカーバメイト毎に異なっているが、測定された反応定数に対するその影響は置換基の変化に伴う反応定数の変化に比べて無視しうるものと思われる。

4. 1. 3. 反応定数の LFER 置換基定数による解析

置換 phenyl methylcarbamate の各置換誘導体による AChE 阻害反応定数 K_d , k_2 の変化は置換基の疎水的、電子的及び他の特異的な効果の変化によるものであり、これら置換基の物理化

学的性質をそれぞれ定量的にあらわす LFER 定数によって(43)式の形で表現される。(43)式における従属変数 BR は、今の場合 $\Delta \log 1/K_d$ あるいは $\Delta \log k_2$ である。ここに K_d はカーバメイト・AChE 活性複合体 ECX の解離平衡定数であり、AChE と安定な ECX を形成するカーバメイトは小さな K_d 値を示す。カーバメイトと AChE との親和性 (affinity) をあらわすために逆数値 $1/K_d$ について解析を行なった。 $\Delta \log 1/K_d$, $\Delta \log k_2$ はそれぞれ置換基が H ($X=H$) である phenyl methylcarbamate の $\log(1/K_d)_H$, $\log(k_2)_H$ を基準とした X 置換誘導体の値との差, $\Delta \log 1/K_d = \log(1/K_d)_X - \log(1/K_d)_H$, $\Delta \log k_2 = \log(k_2)_X - \log(k_2)_H$ をあらわしている。

本章の始めに紹介したようにカーバメイトの AChE 阻害反応においては、オルト、メタ置換体とパラ置換体とで著しくその阻害活性が異なり、ベンゼン環上の置換位置に特異的であることが知られている。¹³ 従って置換基効果の解析を、最初はオルト・メタ・パラの各置換位置毎に行なった。

置換基の疎水的性質をあらわす LFER 定数 π は、1-オクタノール/水系で分配係数 P_X をそれぞれの化合物について実測し、 $\pi = \log P_X - \log P_H$ として得られた値である。⁵⁶⁾ 報告されている o-CN 基の π 値は、その後測定しなおされ -0.30 に改められた。また報告されていない o-sec Bu 基の π 値は 1.62 (実測値) である。

フェニルエステル類のアルカリ加水分解反応においては反応中間体の種類や律速段階の reaction coordinate における位置によって、置換基の電子的効果は LFER 定数 σ° , σ^{-} あるいは $\sigma^{\circ} + b\Delta\sigma$ のいずれかであらわされることを第 3 章で明らかにした。律速段階が四面体中間体形成 (tetrahedral intermediate) であるならば σ° で関係づけられる。AChE 阻害反応定数の解析においては σ° 定数を使うことを基本的とし、これに $b\Delta\sigma = b(\sigma^{-} - \sigma^{\circ})$ 項を加えることによって through-resonance 効果の有意性を調べた。一次結合 $\sigma^{\circ} + b\Delta\sigma$ の両極限值 —— through-resonance 効果が最大の場合と全く存在しない場合 —— がそれぞれ σ^{-} と σ° であることから、 $\sigma^{\circ} + b\Delta\sigma$ の形によって律速段階のほとんどの場合について解析することが可能である。

オルト置換基の効果をメタ、パラ置換基の効果と同じ基準で比較するために、アルカリ加水分解反応の解析で使った(43)式を(43)式において考慮する。すなわち分子内水素結合を形成する場合を除いてオルト置換基の効果は立体効果と電子的効果に分けることができ、後者はさらに ρ^{σ}_{ortho} ($=\rho^{\sigma}_{para}$) 項であらわされる ordinary polar effect 成分と fF 項であらわされる proximity polar effect 成分とに分離される。立体効果をあらわす項はアルカリ加水分解反応の場合と同様 δE_s 項である。AChE 阻害反応定数に及ぼすオルト置換基効果のうち、これらオルト置換基だけが示す特殊な効果、fF と δE_s 項、を分離、評価することはオルト置換基が反応基 (カルバミル基) に近いこともあって反応機構に関する重要な手懸りを与えるものと思われる。オルト置換基による through-resonance 効果の寄与についてもパラ置換体と共通の $r\Delta\sigma$ 項を加えることによって調べた。

第 4 章で使った LFER 定数を Table 10, 14 に示す。Table 10 に掲げられていない置換基の

Table 14. π Value for Substituted Phenyl N-Methylcarbamate^{a)}

| Substituent | π_2 | π_3 | π_4 | Substituent | π_2 | π_3 | π_4 |
|-----------------|--------------------|---------|---------|--------------------|---------------------|---------|---------|
| H | 0.0 | 0.0 | 0.0 | OMe | -0.35 | 0.14 | 0.04 |
| F | 0.10 | 0.33 | 0.12 | OEt | 0.08 | 0.60 | 0.48 |
| Cl | 0.49 | 0.87 | 0.85 | O- <i>i</i> -Pr | 0.36 | 0.80 | |
| Br | 0.62 | 1.09 | 1.01 | O- <i>n</i> -Bu | | 1.80 | 1.66 |
| I | 0.80 | 1.36 | 1.30 | SMe | | | 0.77 |
| Me | 0.31 | 0.54 | 0.50 | NMe ₂ | | 0.27 | |
| Et | 0.77 | 1.04 | 1.08 | CHO | | -0.24 | -0.17 |
| <i>n</i> -Pr | 1.25 | 1.48 | 1.56 | Ac | | -0.26 | -0.15 |
| <i>i</i> -Pr | 1.15 | 1.47 | 1.64 | COEt | | 0.33 | 0.39 |
| <i>sec</i> -Bu | 1.62 ^{b)} | | | SO ₂ Me | | | -0.13 |
| <i>tert</i> -Bu | 1.49 | 1.77 | 1.90 | CN | -0.13 ^{b)} | -0.18 | -0.21 |
| CF ₃ | | 1.21 | | NO ₂ | -0.14 | 0.23 | 0.30 |

a) From ref. 56. The log P value for the unsubstituted compound is 1.16. b) Newly determined.

σ_m° , σ_p° 値は Exner がまとめた値³⁹⁾ を使った。CHO: $\sigma_p^\circ = 0.49$; SO₂Me: $\sigma_p^\circ = 0.69$ 。報告されていない置換基については次の推定値を用いた。CHO: $\sigma_m^\circ = 0.30$; COEt: $\sigma_m^\circ = 0.34$, $\sigma_p^\circ = 0.46$; OBu: $\sigma_m^\circ = 0.04$, $\sigma_p^\circ = -0.14$ 。(43)式の係数 a , ρ , δ , e_i 等は最小二乗法によって決定し、各式の有意性を多変量回帰分析法によって検定した。⁸⁷⁾ すなわち各係数の t -検定、回帰式の F -検定のみならず、ある特定の項を加えることによる相関性向上の有意性について F -検定することによって各項の有意性の検定とした。またある一組の独立変数間に collinearity が存在すれば — 単相関係 $r^2 > 0.4$ の場合 — 係数が異常値を示したり係数決定が不能になることがあるので各相関式に用いられている変数間の全ての組み合わせについて collinearity の存在を調べた。また相関式に用いる標本数 (sample number) — すなわち置換誘導体の種類 — に比べて独立変数の項が多ければ、本来相関性がないにもかかわらず偶然にみかけ上の相関が得られる危険性がある (chance correlation)。この危険を避けるために 1 独立変数あたり 6 種類以上の置換誘導体が含まれるように解析を行なった。⁸⁸⁾ これら統計学的側面にも留意しながら置換基の疎水性、電子吸引力、立体的大きさ、水素結合受容性など十分な物理化学的性質の変化に富み、互いに collinearity を示さないように置換性を選択した誘導体について AChE 阻害反応定数を測定した。

第2節 実験結果

53 種類の置換 phenyl methylcarbamate について測定した仔牛赤血球 AChE 阻害反応定数 K_d , k_2 値を Table 15 に示す。o-*tert* Bu および p-F 誘導体では溶解による制約のため、反応液中のカーバメイト濃度 [CX] を (5) 式に従う逆数プロットを行なうに十分な阻害を示すまで

Table 15. Kinetic Constants for Bovine Erythrocyte Acetylcholinesterase Inhibition by Substituted Phenyl N-Methylcarbamates

| Substituent | k_1 ($M^{-1}min^{-1}$) | Kd (M) | k_2 (min^{-1}) | Range (M) | No. of points | $\Delta \log 1/K_d$ (obsd) (calcd) |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------------|---------------|------------------------------------|
| H | $2.84 \pm 0.03 \times 10^2$ | $3.02 \pm 0.15 \times 10^{-3}$ | 0.86 ± 0.04 | $0.37 - 1.47 \times 10^{-3}$ | 6 | 0.0 |
| 2-F | $1.19 \pm 0.04 \times 10^3$ | $9.26 \pm 1.12 \times 10^{-4}$ | 1.10 ± 0.13 | $0.25 - 1.0 \times 10^{-3}$ | 6 | 0.51 |
| 2-Cl | $9.05 \pm 0.24 \times 10^3$ | $2.53 \pm 0.43 \times 10^{-4}$ | 2.29 ± 0.22 | $0.33 - 1.0 \times 10^{-4}$ | 6 | 1.08 |
| 2-Br | $2.03 \pm 0.05 \times 10^4$ | $6.81 \pm 0.71 \times 10^{-5}$ | 1.38 ± 0.15 | $0.06 - 1.25 \times 10^{-4}$ | 6 | 1.65 |
| 2-I | $3.22 \pm 0.14 \times 10^4$ | $5.58 \pm 0.38 \times 10^{-5}$ | 1.82 ± 0.27 | $0.71 - 2.0 \times 10^{-5}$ | 6 | 1.73 |
| 2-Me | $8.58 \pm 0.09 \times 10^2$ | $2.46 \pm 0.38 \times 10^{-3}$ | 2.11 ± 0.32 | $0.20 - 1.0 \times 10^{-3}$ | 6 | 0.09 |
| 2-Et | $3.39 \pm 0.10 \times 10^3$ | $9.36 \pm 0.98 \times 10^{-4}$ | 3.18 ± 0.33 | $0.67 - 1.25 \times 10^{-4}$ | 6 | 0.51 |
| 2-n-Pr | $3.98 \pm 0.13 \times 10^3$ | $3.95 \pm 0.39 \times 10^{-4}$ | 1.57 ± 0.14 | $0.50 - 2.0 \times 10^{-4}$ | 6 | 0.88 |
| 2-1-Pr | $2.54 \pm 0.08 \times 10^4$ | $1.24 \pm 0.21 \times 10^{-4}$ | 3.14 ± 0.53 | $0.84 - 3.33 \times 10^{-5}$ | 6 | 1.39 |
| 2-sec-Bu | $4.54 \pm 0.09 \times 10^4$ | $5.15 \pm 0.82 \times 10^{-5}$ | 2.34 ± 0.37 | $0.68 - 4.13 \times 10^{-4}$ | 6 | 1.77 |
| 2-OMe | $1.68 \pm 0.01 \times 10^3$ | $4.12 \pm 0.19 \times 10^{-4}$ | 0.69 ± 0.32 | $1.0 - 3.0 \times 10^{-4}$ | 6 | 0.87 |
| 2-OEt | $3.27 \pm 0.10 \times 10^3$ | $1.62 \pm 0.02 \times 10^{-4}$ | 0.53 ± 0.05 | $0.33 - 1.50 \times 10^{-3}$ | 6 | 1.27 |
| 2-O-1-Pr | $4.98 \pm 0.04 \times 10^4$ | $3.97 \pm 0.35 \times 10^{-5}$ | 1.98 ± 0.18 | $0.5 - 2.5 \times 10^{-5}$ | 6 | 1.88 |
| 2-CN | $3.01 \pm 0.08 \times 10^4$ | $1.58 \pm 0.12 \times 10^{-4}$ | 4.75 ± 0.36 | $0.67 - 2.5 \times 10^{-5}$ | 6 | 1.28 |
| 2-NO ₂ | $2.30 \pm 0.15 \times 10^4$ | $1.28 \pm 0.15 \times 10^{-4}$ | 2.94 ± 0.35 | $0.59 - 2.4 \times 10^{-5}$ | 7 | 1.37 |
| 3-F | $4.45 \pm 0.13 \times 10^2$ | $4.17 \pm 0.43 \times 10^{-3}$ | 1.86 ± 0.10 | $0.55 - 2.20 \times 10^{-3}$ | 7 | -0.14 |
| 3-Cl | $1.91 \pm 0.02 \times 10^3$ | $1.02 \pm 0.04 \times 10^{-3}$ | 1.95 ± 0.07 | $0.20 - 0.72 \times 10^{-3}$ | 6 | 0.47 |
| 3-Br | $1.10 \pm 0.04 \times 10^3$ | $1.22 \pm 0.23 \times 10^{-4}$ | 1.34 ± 0.24 | $0.22 - 5.55 \times 10^{-4}$ | 6 | 1.39 |

Table 15. (Continued)

| Substituent | k_1 ($M^{-1}min^{-1}$) | Kd (M) | k_2 (min^{-1}) | Range (M) | No. of Points | $\Delta \log 1/Kd$ (obsd) | $\Delta \log 1/Kd$ (calcd) |
|--------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------------|---------------|---------------------------|----------------------------|
| 3-I | $1.10 \pm 0.04 \times 10^4$ | $1.22 \pm 0.23 \times 10^{-4}$ | 1.34 ± 0.24 | $0.22 - 5.55 \times 10^{-4}$ | 6 | 1.39 | 1.35 |
| 3-Me | $3.72 \pm 0.10 \times 10^3$ | $3.76 \pm 0.63 \times 10^{-4}$ | 1.40 ± 0.37 | $0.67 - 1.43 \times 10^{-4}$ | 6 | 0.90 | 0.95 |
| 3-Et | $3.43 \pm 0.09 \times 10^4$ | $6.45 \pm 0.83 \times 10^{-5}$ | 2.22 ± 0.28 | $0.50 - 2.0 \times 10^{-5}$ | 6 | 1.67 | 1.65 |
| 3-n-Pr | $1.65 \pm 0.05 \times 10^5$ | $1.23 \pm 0.30 \times 10^{-5}$ | 2.03 ± 0.48 | $0.11 - 0.33 \times 10^{-5}$ | 6 | 2.39 | 2.26 |
| 3- <i>i</i> -Pr | $5.64 \pm 0.05 \times 10^5$ | $5.55 \pm 0.54 \times 10^{-6}$ | 3.13 ± 0.31 | $0.33 - 1.66 \times 10^{-6}$ | 5 | 2.74 | 2.25 |
| 3-tert-Bu | $4.43 \pm 0.03 \times 10^5$ | $3.20 \pm 0.26 \times 10^{-6}$ | 1.42 ± 0.10 | $0.45 - 1.42 \times 10^{-6}$ | 6 | 2.97 | 2.67 |
| 3-CF ₃ | $1.82 \pm 0.08 \times 10^3$ | $6.31 \pm 0.39 \times 10^{-4}$ | 1.15 ± 0.07 | $1.0 - 5.0 \times 10^{-4}$ | 6 | 0.68 | 0.93 |
| 3-OMe | $1.41 \pm 0.01 \times 10^3$ | $2.02 \pm 0.25 \times 10^{-3}$ | 2.86 ± 0.32 | $0.10 - 2.0 \times 10^{-3}$ | 7 | 0.17 | 0.16 |
| 3-OEt | $3.31 \pm 0.04 \times 10^3$ | $6.22 \pm 0.15 \times 10^{-4}$ | 2.06 ± 0.05 | $0.50 - 11.4 \times 10^{-4}$ | 7 | 0.69 | 0.84 |
| 3-O- <i>i</i> -Pr | $2.23 \pm 0.01 \times 10^3$ | $3.45 \pm 0.02 \times 10^{-4}$ | 0.77 ± 0.04 | $0.91 - 2.5 \times 10^{-4}$ | 6 | 0.94 | 1.12 |
| 3-O-n-Bu | $1.10 \pm 0.01 \times 10^4$ | $1.00 \pm 0.09 \times 10^{-4}$ | 1.10 ± 0.10 | $0.22 - 0.5 \times 10^{-4}$ | 5 | 1.48 | 1.75 |
| 3-CN | $1.17 \pm 0.02 \times 10^3$ | $8.56 \pm 1.41 \times 10^{-4}$ | 1.01 ± 0.16 | $0.63 - 4.40 \times 10^{-4}$ | 7 | 0.55 | 0.07 |
| 3-NO ₂ | $1.37 \pm 0.01 \times 10^3$ | $6.03 \pm 0.55 \times 10^{-4}$ | 0.86 ± 0.08 | $1.0 - 5.0 \times 10^{-4}$ | 6 | 0.70 | 0.50 |
| 3-CHO | $1.15 \pm 0.03 \times 10^3$ | $1.85 \pm 0.21 \times 10^{-3}$ | 2.12 ± 0.23 | $0.85 - 4.0 \times 10^{-4}$ | 5 | 0.21 | 0.55 |
| 3-Ac | $1.21 \pm 0.01 \times 10^3$ | $1.34 \pm 0.12 \times 10^{-3}$ | 1.62 ± 0.15 | $0.63 - 3.33 \times 10^{-4}$ | 6 | 0.35 | 0.45 |
| 3-COEt | $1.90 \pm 0.02 \times 10^3$ | $4.28 \pm 0.56 \times 10^{-4}$ | 0.81 ± 0.10 | $1.10 - 3.33 \times 10^{-4}$ | 6 | 0.85 | 1.28 |
| 3-NMe ₂ | $2.65 \pm 0.13 \times 10^4$ | $1.77 \pm 0.07 \times 10^{-5}$ | 1.49 ± 0.03 | $1.0 - 12.5 \times 10^{-5}$ | 6 | 2.23 | 2.06 |
| 4-Cl | $2.36 \pm 0.09 \times 10^2$ | $3.16 \pm 0.24 \times 10^{-3}$ | 0.74 ± 0.08 | $0.20 - 2.0 \times 10^{-3}$ | 6 | -0.02 | -0.15 |

Table 15. (Continued)

| Substituent | k_1 ($M^{-1}min^{-1}$) | Kd (M) | k_2 (min^{-1}) | Range (M) | No. of Points (obsd) | $\Delta \log 1/kd$ (calcd) |
|----------------------|-----------------------------|--------------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------------|
| 4-Br | $3.17 \pm 0.03 \times 10^2$ | $2.03 \pm 0.27 \times 10^{-3}$ | 0.64 ± 0.09 | 0.25 - 1.0×10^{-3} | 6 | 0.17 -0.08 |
| 4-I | $6.63 \pm 0.25 \times 10^2$ | $1.73 \pm 0.24 \times 10^{-3}$ | 1.14 ± 0.17 | 0.85 - 5.0×10^{-3} | 5 | 0.24 -0.01 |
| 4-Me | $6.12 \pm 0.33 \times 10^2$ | $1.61 \pm 0.20 \times 10^{-3}$ | 0.98 ± 0.05 | 0.20 - 0.71×10^{-3} | 5 | 0.27 0.44 |
| 4-Et | $1.15 \pm 0.01 \times 10^3$ | $9.43 \pm 1.60 \times 10^{-4}$ | 1.08 ± 0.18 | 0.67 - 6.7×10^{-4} | 8 | 0.51 0.63 |
| 4-n-Pr | $1.21 \pm 0.01 \times 10^3$ | $9.11 \pm 0.80 \times 10^{-4}$ | 1.10 ± 0.09 | 1.10 - 3.33×10^{-4} | 6 | 0.52 0.77 |
| 4-1-Pr | $1.36 \pm 0.01 \times 10^3$ | $3.80 \pm 0.51 \times 10^{-4}$ | 0.52 ± 0.07 | 1.70 - 8.40×10^{-4} | 6 | 0.90 0.85 |
| 4-tert-Bu | $1.60 \pm 0.02 \times 10^3$ | $7.00 \pm 0.85 \times 10^{-4}$ | 1.12 ± 0.13 | 1.45 - 11.0×10^{-4} | 6 | 0.63 0.95 |
| 4-OMe | $7.83 \pm 0.15 \times 10^2$ | $8.56 \pm 1.34 \times 10^{-4}$ | 0.67 ± 0.10 | 1.85 - 10.0×10^{-4} | 6 | 0.55 0.37 |
| 4-OEt | $5.60 \pm 0.03 \times 10^2$ | $6.07 \pm 1.03 \times 10^{-4}$ | 0.34 ± 0.06 | 1.50 - 5.0×10^{-4} | 4 | 0.70 0.47 |
| 4-O-n-Bu | $2.60 \pm 0.01 \times 10^3$ | $2.70 \pm 0.20 \times 10^{-4}$ | 0.70 ± 0.05 | 1.25 - 3.33×10^{-4} | 5 | 1.05 0.82 |
| 4-SMe | $6.51 \pm 0.18 \times 10^2$ | $9.28 \pm 1.36 \times 10^{-4}$ | 0.60 ± 0.08 | 1.15 - 7.75×10^{-4} | 5 | 0.51 0.16 |
| 4-CHO | $3.95 \pm 0.27 \times 10^3$ | $2.29 \pm 0.32 \times 10^{-4}$ | 0.91 ± 0.06 | 1.0 - 3.33×10^{-4} | 5 | 1.12 0.81 |
| 4-Ac | $1.77 \pm 0.07 \times 10^3$ | $4.18 \pm 1.32 \times 10^{-4}$ | 0.74 ± 0.23 | 1.11 - 3.33×10^{-4} | 6 | 0.86 0.77 |
| 4-COEt | $1.32 \pm 0.06 \times 10^3$ | $6.21 \pm 2.31 \times 10^{-4}$ | 0.82 ± 0.17 | 1.0 - 5.0×10^{-4} | 6 | 0.69 0.93 |
| 4-SO ₂ Me | $3.90 \pm 0.04 \times 10^3$ | $4.37 \pm 0.96 \times 10^{-4}$ | 1.70 ± 0.37 | 0.50 - 3.33×10^{-4} | 7 | 0.84 1.14 |
| 4-CN | $3.29 \pm 0.04 \times 10^3$ | $2.02 \pm 0.34 \times 10^{-4}$ | 0.66 ± 0.11 | 2.0 - 8.35×10^{-5} | 6 | 1.17 1.12 |
| 4-NO ₂ | $7.86 \pm 0.12 \times 10^3$ | $1.03 \pm 0.42 \times 10^{-4}$ | 0.81 ± 0.25 | 4.0 - 5.65×10^{-5} | 8 | 1.47 1.48 |

a) Calculated $\Delta \log 1/kd$ value from eq. 50.

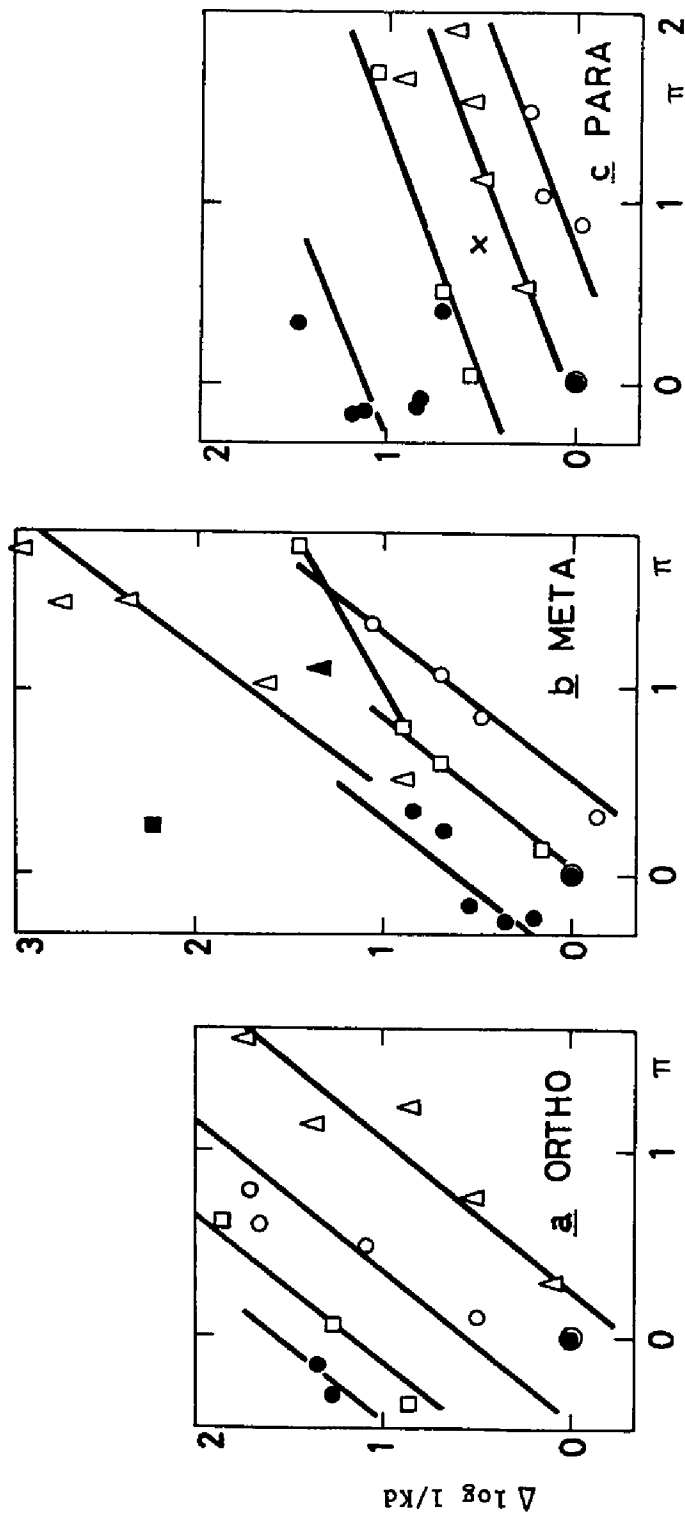


Fig. 14. Plots of $\Delta \log 1/K_d$ against π Value. \bullet , H; \circ , halogen; \blacktriangle , m-CF₃; \square , alkoxy; \blacksquare , NMe₂; \times , p-SMe; \bullet , NO₂, CN, COR, SO₂Me; \triangle , alkyl.

濃くすることができなかつたので、反応定数を測定することができなかつた。 K_d 値がオルト、メタ、パラ置換体の中でそれぞれ約 75, 1000, 30 倍も変化しているのに比べて、 k_2 値の変化は極めて小さい。

最初にカーバメイトの AChE への結合過程における疎水性相互作用の寄与を調べるために $\Delta \log 1/K_d$ と疎水性置換基定数 π とをプロットした。Fig 14。電子的効果のほぼ等しい置換基を持つ化合物群（アルキル基、OR基、ハロゲン基のそれぞれ）では若干のバラツキが認められるものの、 π 値と $\Delta \log 1/K_d$ との間に直線関係が認められる。このことは置換基の種類や置換位置にかかわらず ECX 形成において疎水性相互作用が重要な役割をはたしていることを示している。Fig 14a と 14b のプロットの傾きがほぼ等しいことから、置換基の疎水の性質の変化に対する感受性がオルトとメタ置換体では互いによく似ているものと推定される。一方パラ置換体の疎水の性質に対する感受性は極めて小さいものと思われる。これらのプロットが σ^0 値のほぼ等しい置換基群毎に平行な直線群としてあらわされることは、置換基の電子的性質すなわち共有結合も ECX 形成過程に寄与していることを示唆している。またバラツキが認められるがこれは、実験的誤差のみならず電子的効果の違いや、他の効果の寄与（オルト置換体）によるものと思われる。

$\Delta \log 1/K_d$ と π プロットの平行な直線群の順序は置換基の電子的効果や他の相互作用の寄与を調べる手懸りとなる。この順序を整理すると Table 16 のようになる。o- NO_2 , CN, ハロゲンのような電子吸引性のオルト置換体はこの順序で、しかも o-アルキル置換体よりも高い $\Delta \log 1/K_d$ 値であることから、Table 16 で下線をほどこしたオルト置換体について $\rho\sigma$ 項の係

Table 16. Possible Overlapping Effects of Substituents

| | Sequence of Lines | Possible Overlapping Effects |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ortho | <u>NO_2, CN</u> > OR > <u>Hal</u> > <u>H, R</u> | hydrophobic, electronic, H-bonding, proximity effect |
| Meta | <u>NMe_2</u> > $\text{NO}_2, \text{CN, Ac}$ > <u>R, H</u> > OR > <u>Hal</u> | hydrophobic, electronic ($\rho < 0$), H-bonding or electronic ($\rho > 0$) for $\text{NO}_2, \text{CN, Ac}$ |
| Para | $\text{NO}_2, \text{CN, Ac}$ > OR > <u>R, H</u> > <u>Hal</u> | hydrophobic, electronic ($\rho < 0$), H-bonding or electronic ($\rho > 0$) for $\text{NO}_2, \text{CN, Ac}$ |

数 ρ は正の値 ($\rho > 0$) であると期待される。同様に下線をほどこしたメタ、パラ置換体については逆に、係数 ρ は負の値 ($\rho < 0$) と推定される。o-OR 誘導体やメタあるいはパラ位が NO_2 , CN, COR 基で置換された誘導体は例外的な挙動を示し、疎水性効果や電子的効果以外の

Table 17. Correlation of Relative Affinity Constants, $\Delta \log 1/K_d$, with Eq. 43a)

| | $a\pi_{23}$ | $a\pi_4$ | $\rho\sigma^{\circ}$ $\rho>0$ | $\rho\sigma^{\circ}$ $\rho<0$ | δE_s | fF | hHB | c | $n^b)$ | $r^c)$ | $s^d)$ | Eq. no. |
|--------------------------|------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------|----------------------------------|--------|--------|--------|------------|
| ortho | 1.297 (0.330) | | 2.236 (0.605) | | | | 1.682 (0.456) | -0.0318 ^{g)} (0.290) | 15 | 0.944 | 0.223 | (45) |
| meta | 1.550 (0.256) | | | -1.928 (0.515) | | | 1.531 (0.357) | -0.0648 ^{g)} (0.281) | 21 | 0.967 | 0.247 | (46) |
| | 1.514 (0.186) | | 0.827 (0.507) | -2.393 (0.441) | | | 1.344 (0.271) | 0.0258 ^{g)} (0.207) | 21 | 0.984 | 0.179 | (47) |
| para | | 0.208 ^{e)} (0.192) | 1.310 (0.449) | -1.192 (0.713) | | | | 0.235 ^{h)} (0.219) | 19 | 0.886 | 0.206 | (48) |
| meta & para | 1.380 (0.199) | 0.272 (0.188) | 1.501 (0.460) | -1.799 (0.429) | | | 1.312 (0.307) | 0.114 ⁱ⁾ (0.199) | 39 | 0.946 | 0.252 | (49) |
| ortho, meta & para | 1.395 (0.172) | 0.300 (0.167) | 1.600 (0.376) | -1.777 (0.379) | 0.162 ^{f)} (0.134) | 0.817 ^{f)} (0.545) | 1.345 (0.252) | 0.076 ⁱ⁾ (0.168) | 53 | 0.945 | 0.242 | (50) |

a) The figures in parentheses are the 95% confidence intervals. b) The number of data used in the correlations. c) Multiple correlation coefficient. d) Standard deviation. e) Justified at >95% by t-test and >97.5% by F-test. f) At 97.5% by t-test and 98.5% by F-test. g) At less than 50% by t-test. h) At a level between 95 and 97.5% by t-test. i) At less than 75% by t-test.

何か別の効果が寄与している可能性も考えられる。これら例外的な挙動を示す置換基は全て水素結合受容体であることから、酵素の基質結合部位に偏在する水素結合供与体 (H-donor) と特異的な水素結合を形成し、この水素結合の寄与分だけ $\Delta \log 1/K_d$ が高くなるのかもしれない。また別の可能性として、メタやパラ位にこれら強い電子吸引基が存在すれば ρ 値が正となる ($\rho > 0$) ような反応機構、すなわち $\rho < 0$ である他のメタやパラ置換体とは異なった反応機構で ECX 形成していることが考えられる。このように σ° (ρ) 値の大きさによって反応機構が変化する σ° (ρ) 値を横軸にとってプロットした時下に凸の折れ線になり、biphasic electronic effect と呼ばれる — 例は有機化学反応においてしばしば観察されている。³⁷⁾

o-OR 基, m,p-NO₂, COR 基についてはこの2つの可能性を考慮しながら $\Delta \log 1/K_d$ における置換基効果を分離した。水素結合の寄与について調べるため水素結合効果をあらゆる置換基定数 HB を新に定義して用いた。置換基定数 HB の値は、水素結合受容体となりうる置換基に対しては HB=1 であり、他の置換基に対しては HB=0 の2通りである。

このようにして解析した結果を Table 17 に示す。どの相関式も置換基 X=H である phenyl methylcarbamate の $\Delta \log 1/K_d (=0)$ を含む。表中に示された相関式は特に断わらない限り、F-検定によって 99.5%、誤差項 (定数項) を除いた各項は t-検定により 99.5% 以上、ある特定の項だけを除いた対応する相関式との分散比の F-検定により 99.9% 以上の有意性をいずれも示している。解析に用いられた独立変数間の単相関係数 r は π_3 と HB, $r=0.67$, (46) 式; π_3 と HB, $r=0.52$, (47) 式; π_4 と σ° ($\rho > 0$), $r=0.64$, (48) 式の3例を除いて $r < 0.5$ であり独立変数間には collinearity が存在しないとみなすことができる。

オルト置換体について最も統計的に有意な相関式は $a\pi_2$, $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$), および hHB 項であらわされる(45)式である。 δE_6 , fF 項で関係づけられる近接効果 (proximity effect) は統計的に有意でなかった。メタ置換体については異なる2つの相関式, (46)(47)式, が可能である。(46)式は m-NO₂, CN, COR, NMe₂ 置換体に水素結合の寄与 (HB=1) を考慮した相関式である。(47)式は $\sigma^\circ > 0.5$ であるメタ置換基 (m-NO₂, CN) で置換されている化合物では反応機構が他のメタ置換体と異なる ($\rho > 0$) ものとし, m-COR, NMe₂ 置換体に水素結合の寄与 (HB=1) を仮定した相関式である。(47)式が(46)式よりも統計的に若干優れているが, m-NO₂, CN にも水素結合の寄与を想定しない点で矛盾しているように思われる。何故ならば第3節で考察するように, 芳香環に置換した NO₂, CN, COR 基はほぼ等しい水素結合形成能力を持っていることが Tafel らによって確かめられており,⁸⁹⁾ NO₂, CN, COR 基の水素結合受容部位がベンゼン環に関して極めて似た位置にあるからである。これらのことからメタ置換体については $a\pi_3$, $\rho\sigma^\circ$ ($\rho < 0$), hHB 項で関係づけられた(46)式がより妥当と思われる。パラ置換体については疎水性相互作用と σ° 値の大きさによって ρ の符号が変わる biphasic electronic effect を仮定した(48)式が最も優れていた。p-NO₂, CN, COR, SO₂Me 基に正の ρ であらわされる $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$) 項をとる反応機構のかわりに, $\rho\sigma^\circ$ ($\rho < 0$) かつ水素結合の寄与 (HB=1) を仮定した場合には, 相関性が極めて悪くなった ($r=0.775$, $s=0.281$)。 (48)式に b $\Delta\sigma$ 項を加えても統計的に有意でなかった。

(45)(46)(48)式を比較すれば次のことがわかる。①オルトおよびメタ置換体の $a\pi$ 項の係数 a がほぼ等しい。②オルトおよびパラ置換体の $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$) 項の係数 ρ は 95% 信頼限界を考慮すれば同じとみなしうる。③同様にメタおよびパラ置換体の $\rho\sigma^\circ$ ($\rho < 0$) 項の係数がほぼ等しい。④ o -OR, m -NO₂, CN, COR, NMe₂ 基に関する水素結合の寄与, h HB 項の係数 h , はほぼ等しい。これらの比較から異なる置換位置の置換基に関して共通の独立変数として π_{23} , π_4 , σ° ($\rho > 0$), σ° ($\rho < 0$), HB を選べばメタとパラ置換体を一つにまとめる(49)式が得られ, さらに E_s , F を変数として加えることによって全ての置換体を含む相関式(50)が得られた。50式は δE_s , ΓF 項を含む以外は(49)式とよく対応している。53種類のオルト, メタ, パラ置換体が表示 1000 倍以上もの大きな K_d 値の変化を, 50式は化合物の物理化学的性質の変化だけで関係づけており, この種の構造活性相関式としては統計的にも優れた相関式であると思われる。

第3節 考 察

4. 3. 1. 疎水性相互作用

$a\pi_{23}$, $a\pi_4$ 項の係数の違いは, オルトやメタ位に対応した酵素のカーバメイト結合部位がパラ位に比べて 10 倍以上も疎水的性質を示すことを意味している。疎水的性質に乏しい o -OMe 基 ($\pi_{o\text{-OMe}} = -0.35$) から極めて疎水的性質に富む p -tert-Bu ($\pi_{p\text{-tert-Bu}} = 1.90$) まで, 置換基の疎水的性質が約 200 倍以上も変化した化合物群を50式は関係づけている。しかしこのように様々な疎水的性質を示す化合物を含んでいるにもかかわらず, 疎水性相互作用の感受性 — $a\pi$ 項の係数 a — が化合物の π 値の大きさによって決定されるのではなくて, ベンゼン環上の置換位置によってのみ決定されている。例えば疎水的性質に乏しい o -OMe 基が極めて強い疎水性相互作用を行なう結合部位 ($a\pi_{23}$) に結合し, 逆に最も疎水的性質に富む p -tert-Bu 基は疎水性相互作用の弱い結合部位 ($a\pi_4$) に結合している。このことは ECX 複合体形成においてカーバメイト分子の“正しい配向” (reactive orientation) が疎水性相互作用以外の他の相互作用 — 恐らくカルバミル基を認識する水素結合や共有結合 — によって決定されていることを示している。すなわちカーバメイト分子が全ての可能な配向の中から“正しい配向”を見い出して ECX 複合体を形成する際に, ミクロな疎水性相互作用に対する感受性の違いが,

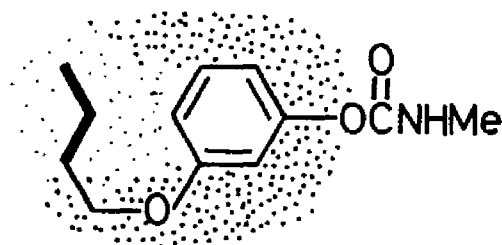


Fig. 15. Position specific hydrophobic interaction of substituents with AChE

決定的な役割をはたしているのではないように思われる。

Fig 14-bにおいて m -OBu 置換体が他の m -OR 置換体を結ぶ直線から期待されるよりも小さな $\Delta \log I/K_d$ 値を示している。このことは m -OBu 基の末端アルキル

鎖が疎水性相互作用の弱いパラ置換基の領域にまで延びていると仮定すればうまく説明される。

Fig 15。(49)式の相関においては、この置換基の π 値(=1.80)を π_3 と π_4 に分割し、 $\pi_3 = \pi_3(m-OEt) + \pi_3(CH_2) = 1.10$, $\pi_4 = 1.80 - \pi_3 = 0.70$ として計算し良好な解析結果が得られた。このことは「酵素結合部位にミクロな疎水性相互作用に対する感受性の異なる領域が存在している」や、「カーバメイト分子はいつも定められた正しい配向で結合している」という仮定を示している。

Hansch らは種々の1-オクタノール/水系における分配係数 P_{oct} を基準にとり、これら化合物の他の有機溶媒/水系における分配係数 P_g との垂熱力学的関係 (extrathermodynamic relationships (51)式) をいくつかの有機溶媒について調べている。⁷⁹⁾ (51)式の係数 a は、溶質分子の疎水性

$$\log P_g = a \log P_{oct} + c \quad \dots\dots\dots (51)$$

の変化に対する溶媒の感受性の尺度である。例えばアルコールを有機溶媒とすれば、アルコールの炭素数がふえるにつれて溶質の変化に対する感受性は高くなることが予想される。実際1級ブタノールから1-オクタノールまで炭素数がふえるに従って(51)式の係数 a は0.7から1.1まで大きくなる。Table 18。しかしそれ以上炭素数が増しても、もはや a 値は増加していない。Oleyl alcohol で $a = 1.0$ 。エーテル、芳香族、脂肪族溶媒/水系における P_g についても $a = 1.1$ とほぼ一定である。溶質分子の水相から有機溶媒 ($a \approx 1.0$) 中への移行においては、水溶液中で溶質の周囲に形成されていた水のクラスター (cluster) が壊れる段階が critical であると仮定すれば、係数 a がほぼ一定であるという現象がうまく説明される。⁷⁹⁾ 定数項 c は有機溶媒中において、溶質分子がどの程度、水分子から desolvation されているかを表わす尺度であり、有機溶媒への水の溶解度 (水飽和濃度) との間に相関が見い出されているが、⁷⁹⁾ 正確な物理化学

的意味はわからない。

Table 18
Extrathermodynamic Relationships
of Partition Coefficients^{a)}

$$\log P_{solvent} = a \log P_{oct} + c$$

| Solvent | a | Solvent | a |
|---------------|------|--------------|------|
| Butanone | 0.49 | Ether | 1.13 |
| Butanols | 0.70 | Nitrobenzene | 1.18 |
| Pentanol | 0.81 | Oils | 1.13 |
| Ethyl acetate | 0.93 | Chloroform | 1.13 |
| Oleyl alcohol | 1.00 | Benzene | 1.02 |

a) From ref. 79.

ECX 複合体形成の段階を溶質カーバメイトのAC hE/水系における分配過程とみなせば、(50)式において $a\pi_{23}$, $a\pi_4$ 項の係数 a は(51)式における係数 a と全く対応する。パラ置換基と酵素との疎水性相互作用の

感受性をあらわす $a\pi_4$ 項の係数 $a = 0.3$ は、1-オクタノール/水系における溶質の分配過程に比べて $1/3$ にすぎないことから、パラ置換体では ECX 複合体形成に際して部分的に水の cluster が壊されている — 部分的に desolvation されている — ことを意味しているものと考えられる。特定の結合部位を持たない蛋白質への有機化合物の非特異的な結合においては $a = 0.55 \pm 0.1$ であったが、この値と比較しても AChE のパラ置換基結合部位は疎水性相互作用に極めて乏しい領域であると推定される。

$a\pi_{23}$ 項の係数 $a = 1.40$ は 95% 信頼限界を考慮しても 1.0 よりもはるかに大きな値である。5) 式の関係でこれまでにこのような大きな a 値は、いかなる有機溶媒/水系の分配係数においても観察されていない。また化学的に不活性な有機化合物が蛋白質や膜の構造を変化させてひきおこす麻酔、微生物の発光現象や諸器官の O_2 消費の阻害作用なども化合物 $\log P$ だけで一義的に関係づけられ、 $\log P$ の係数はほぼ一定、 $a = 1.04 \pm 0.29$ (19 反応例の平均値)⁶⁶⁾ である。これらのことを考慮すれば ECX 複合体形成においてオルト、メタ置換カーバメイト分子は完全に周囲の水 cluster が壊されており、AChE 分子内にすっかりとり込まれている (engulfed) のみならず、オルトやメタ置換基の疎水性相互作用によって AChE 分子に何か特別な構造変化をおこし、ECX 複合体がより安定化しているものと推定される。

オルト、メタ、パラ置換 phenyl methylcarbamate の π 値 (π_{carb}) は置換ベンゼンの π 値 (π_{benz}) を用いて 52) 式のようにあらわされる。⁹⁰⁾ このように (45)~(50) 式の相関式に用いた π 値は

$$\begin{aligned} \pi_{carb} &= 0.957 (\pm 0.040) \pi_{benz} + 0.491 (\pm 0.095) \sigma + 0.188 (\pm 0.041) E_s \\ &\quad - 0.374 (\pm 0.158) F + 0.115 \\ n &= 55, \quad r = 0.992, \quad s = 0.086 \quad \dots\dots\dots 52) \end{aligned}$$

置換基そのものの "intrinsic" な疎水性置換基定数ではなくて、カルバミル基の solvation に関する置換基の電子的効果や近接効果などの諸効果を含む composite 置換基定数である。しかし脂肪族、芳香族、フェノール、アニリンのような種々の化合物の BSA との非特異的な結合においては、 $\log P_{octanol}$ が唯一の支配因子であることが見つけられている。すなわち結合の解離平衡定数、 $\log K$ は他の変数なしに $\log P_{octanol}$ だけで関係づけられている。⁶⁶⁾ このように化合物に水素結合型の溶媒和を受ける部位 (例えば OH, NH_2 基) があるのかどうかにかかわらず $\log P_{octanol}$ は蛋白質への結合過程をよく表わしている。それ故に実測された π 値は、カーバメイト分子全体の蛋白質への結合に関する一般的な相互作用を、他の AChE との結合に特有な相互作用から分離して評価できる定数である。ECX 複合体形成において、結合に関する特異的な相互作用は $\rho\sigma$ ($\rho > 0$), $\rho\sigma$ ($\rho < 0$), δE_s , fF , hHB 項としてそれぞれ分離し、定量的にあらわされている。

4. 3. 2. 置換基の電子的効果

(45)~(50) 式においていずれも $\rho\sigma$ 項の寄与が有意であることは、ECX 複合体形成段階において

すでに、共有結合の形成を伴った電子の移動を生ずるような反応段階が含まれていることを意味している。

Table 19. ρ -values for Hydrolyses of Phenyl Acetates

| Nucleophile | Catalyst | Conditions | ρ | Ref. |
|------------------|------------------|-------------------------|--------------------|------|
| HO ⁻ | | 25° in H ₂ O | 1.04 | 41 |
| HO ⁻ | | 25° in 60% aq. acetone | 1.47 | 41 |
| MeOH | | 27° in MeO ⁻ | 1.56 | 41 |
| H ₂ O | H ₂ O | 25°, pH 5.0 | 1.29 ^{a)} | c |
| H ₂ O | AcO ⁻ | 25°, pH 5.0 | 1.35 ^{b)} | c |

a) ρ was calculated from the k_0 values for 3,4-(NO₂)₂, p-NO₂, m-NO₂, p-Cl. and p-Me derivatives. b) ρ was calculated from the k_{AcO} values for m-NO₂, p-Cl, H, and p-Me derivatives. c) V. Gold, D.G.Oakenfull, and T. Riley, *J. Chem. Soc. (B)*, 515(1968).

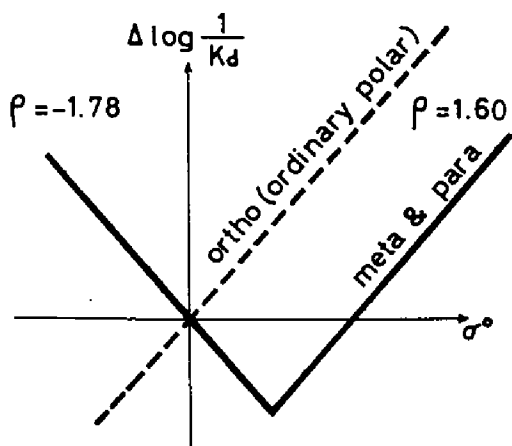
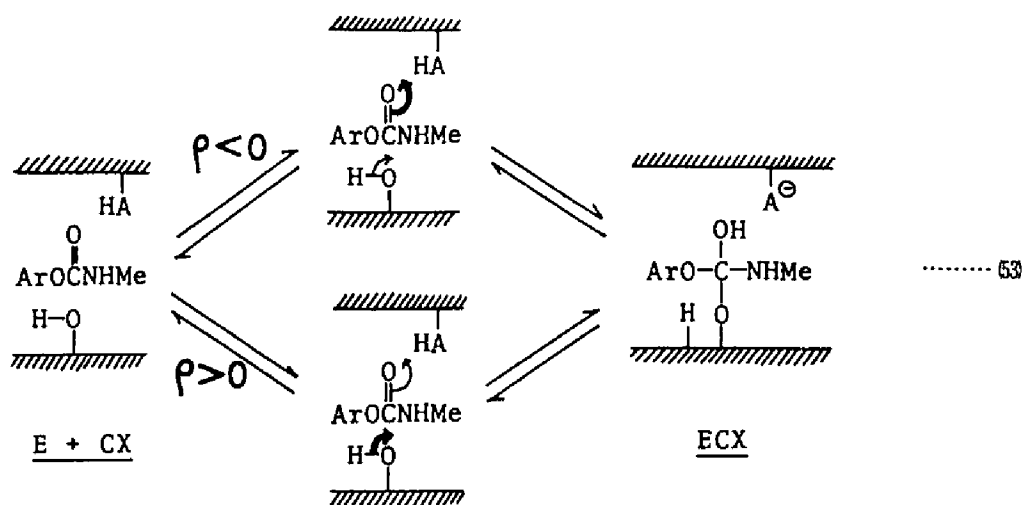


Fig. 16. Biphasic Electronic Effect in the Tetrahedral Intermediate Formation

$\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$)項の係数 $\rho = 1.60$ は置換 phenyl acetate 類の水-有機溶媒中における basic な加水分解反応や, general base 触媒加水分解反応において観察されている ρ 値とよく対応している (Table 19)。これらの反応の律速段階はいずれも tetrahedral 中間体形成の過程であることが知られている。
 $\rho\sigma^\circ$ ($\rho < 0$) 項の係数 $\rho = -1.78$ は $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$) 項の ρ 値と絶対

値がほぼ等しいことから、電子供与の置換基効果が $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$) 項の効果とベンゼン環に関してはほぼ同じ位置で作用するような反応機構で共有結合を形成するものと思われる。さらに $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$) 項に分類される置換体と $\rho\sigma^\circ$ ($\rho < 0$) 項に分類される置換体において k_2 値がほとんど等しいことも、いずれの置換体においても形成される反応中間体は互いに似ていることを示唆している。このような biphasic electronic effect であらわされる電子的效果を示し、共通の反応中間体を形成することを矛盾なく説明する反応機構は Fig 16 と図式であろう。すなわち $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$) であらわされる反応機構では酵素のセリン残基がカーバ



メイト分子のカルボニル炭素を求核攻撃する段階が律速であり、 $\rho\sigma^\circ$ ($\rho < 0$) であらわされる反応機構ではカルボニル酵素への protonation が推進力となっているものと考えられる。 $\rho > 0$ を示す反応の遷移状態では C (カルボニル) - O (セリン残基) の結合形成が O (カルボニル) - H (酵素) の protonation よりも先に生じているし、この逆が $\rho < 0$ の場合にあてはまる。オルト置換体は σ° 値の大きさによらず、すべて $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$) 項で表わされる反応機構を経る。酵素の酸触媒部位がオルト置換基による障害のために、カルボニル酸素に結合しえないのかもしれない。

メタ、パラ置換体のうち、 NO_2 , CN , SO_2Me 基のような強い電子吸引基で置換されたカーバメイトは $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$) であらわされる反応機構を経て ECX 複合体を形成するが、このような反応機構の変化は σ° 値の大きさのみで決定されているのではない。何故ならば p-COR 誘導体は置換基の σ° 値が 0.5 より小さくて $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$) グループに分類されているが、m- NO_2 , CN 基の σ° 値は 0.5 よりも大きいにもかかわらず $\rho\sigma^\circ$ ($\rho < 0$) グループに属している。このように σ° 値の大きさだけで判定すれば、より電子吸引基である m- NO_2 , CN 基で置換されたカーバメイトが $\rho\sigma^\circ$ ($\rho < 0$) グループに属している理由を説明できない。 $\rho\sigma^\circ$ ($\rho < 0$) グループに属するメタ、パラ置換体に共通している性質はこれら置換基の σ^- 値がいずれも 0.8 よりも小さいということである。それ故 ECX 複合体形成において、 $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$) グループのパラ置換基は through-resonance 効果によってカーバメイトの phenoxy 酸素にいくらかの正電荷を生じ、すぐ隣りのカルボニル炭素への求核攻撃を促進しているものと思われる。しかし(48), (50)式において $\rho\sigma^\circ$ ($\rho > 0$) 項と $b\Delta\sigma$ 項との間に、それぞれ $r = 0.88, 0.79$ という高い collinearity が存在するために、phenoxy 酸素の電荷に対する p- NO_2 , CN , COR , SO_2Me 基による through-resonance を分離、評価することは残念ながらできなかった。

このような biphasic な反応機構は酵素反応が置換基効果による反応性の変化をできるだけ小

さくする経路に従うものであるという事実によると考えられる。⁷⁰⁾ 芳香族置換基のこのような電子的効果が hippuric acid や N-methyl-L-phenylalanine の phenyl ester 類の chymotrypsin による加水分解反応において観察されることを Williams らが報告している。⁹¹⁾ 重なりあっている置換基効果をそれぞれ分離して評価するに必要なだけの置換誘導体について測定してはいないが $\log k_{cat}/K_m$ 値 — カーバメイトの AChE 阻害反応における $\log k_2/K_d$ 値 — の σ (σ^-) とのプロットは明らかに biphasic になっている。この場合には $\sigma > 0$ である置換基は $\rho > 0$ グループに属し、 $\sigma < 0$ である置換基は $\rho < 0$ グループに属す。置換基の電子的効果に対する全体としての感受性が低いために、また他の効果が完全に分離されていないこともあって、Williams は四面体中間体形成においてカルボニル酸素への親電子的な assistance を受けていることを指摘しているにすぎないが、十分多くの置換体について測定されるならば、カーバメイトの場合に得られたと同様の傾向が明らかになるものと思われる。

4. 3. 3. オルト置換基による近接効果

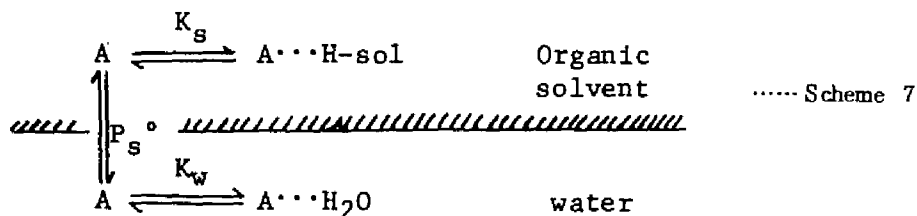
オルト置換体だけを関係づけた45式では δE_s , fF 項が共に統計的に有意でない。しかし全ての置換誘導体を含む50式では、これら2項が有意であった。このことは主として独立変数間の collinearity によるものである。すなわち45式において変数 σ^o と F ($r = 0.82$), π_2 と E_s ($r = 0.59$) にそれぞれ collinearity が認められるが、50式においてもはや collinearity が認められない。これはメタ、パラ置換体ではオルト位の置換基を $o-H$ とみなすことができ、全てのメタ、パラ置換体について $E_s(H) = 0$, $F(H) = 0$ であることによるものである。45式において48, 50式よりも若干高い ρ 値が得られているが、これは恐らく σ^o と F 間に collinearity が存在することにより fF 項であらわされる効果のいくらかが45式の $\rho\sigma^o$ 項にはいりこんできていることによるものと思われる。また50式の相関は化合物数の多いメタ、パラ置換体によってのみ決定され、 δE_s , fF 項は単なる補正項にすぎないと推定できるかもしれない。しかし第3章で考察したようにフェニルエステルのアルカリ加水分解反応や、他の多くの化学反応におけるオルト置換基効果の解析において δE_s , fF 項はそれら自身の物理化学的意味を持っており、単なる補正項ではない。全ての置換体を含む相関式、50, において δE_s , fF 項の係数 δ , f を Table 12 に掲げた典型的な反応における δ , f と比較すれば、カーバメイトの $\Delta \log 1/K_d$ における値 ($\delta = 0.17$, $f = 0.82$) は置換 phenyl acetate のアルカリ加水分解反応において観察されている値 ($\delta = 0.19$, $f = 0.54$) に近いことがわかる。それ故にオルト置換基が ECX 複合体形成においておよぼす近接効果は、四面体中間体形成における近接効果に類したものとみなすことができる。Table 17 の解析において、非対称的な $o-NO_2$ 基の立体効果は NO_2 基がベンゼン環と同一平面内にあると仮定した $E_s (= -2.52)$ 値で関係づけられていることも、置換 phenyl acetate のアルカリ加水分解反応の場合と同じである。

オルト置換基による近接効果の解析結果もまた、53式の反応機構を示持している。

4. 3. 4. 水素結合

$\Delta \log 1/K_d$ における置換基効果の解析, (45)~(50)式, では *o*-OR, *m*-NO₂, CN, COR, NMe₂ 基が AChE と選択的な水素結合を形成するものと仮定し, この効果をあらわすために水素結合置換基定数 H_B を導入した。ところで置換基定数 π (あるいは $\log P_{oct}$) の測定に用いた 1-オクタノールと水はいずれも水素結合受容体 (H-acceptor) と供与体 (H-donor) としての両方の性質を備えており, π ($\log P_{oct}$) にはすでに溶質 (カーバメイト) の溶媒との水素結合効果も考慮されている。にもかかわらずこれら解析において H_B 項を必要としたことは, ECX 複合体形成において AChE と 1-オクタノールそれぞれの水素結合形成能力の違いを無視することができないことを意味している。このことは「置換基の水素結合形成の効果が分配係数においてどのように評価されているのか?」ということと関係している。この問題を検討するためには水素結合能力の異なる種々の有機溶媒/水系で測定した分配係数を比較することが有効な方法と思われる。

今簡単な系として H-acceptor が 1 個存在する溶質 A の H-donor 有機溶媒 (例えばクロロホルム) /水系における分配平衡について考えてみよう (Scheme 7)。溶質 A は有機溶媒相, 水相いずれにおいても水素結合を形成し分配平衡が成立しているならば, 測定される分配係数 P_s は,



溶質 A の有機溶媒相中の濃度 $[A]_s$, 水相中の濃度 $[A]_w$, 有機溶媒相中で有機溶媒と水素結合している溶質 A の濃度 $[A \cdots H-sol]$, 水相中で水と水素結合している溶質 A の濃度 $[A \cdots H_2O]$ 水素結合していない溶質 A の分配係数 $P_s^\circ (= [A]_s / [A]_w)$ を用いて 54 式のようにあらわされる。ここに $[solvent]$, $[H_2O]$ それぞれ水飽和有機溶媒の濃度, 有機溶媒飽和水の濃度を, K_s ,

$$P_s = \frac{[A]_s + [A \cdots H-sol]}{[A]_w + [A \cdots H_2O]} = \frac{[A]_s (1 + [Solvent]K_s)}{[A]_w (1 + [H_2O]K_w)} = P_s^\circ \frac{(1 + [Solvent]K_s)}{(1 + [H_2O]K_w)} \quad \dots\dots 54$$

K_w は有機溶媒中, 水中での水素結合生成定数であり $K_s = [A \cdots H-sol] / [A]_s [solvent]$, $K_w = [A \cdots H_2O] / [A]_w [H_2O]$ をあらわしている。同様に 1-オクタノール/水系での分配係数 P_{oct} は 54 式のようにあらわされる。 P_s° と P_{oct}° とは 51 式, $\log P_s^\circ = a \log P_{oct}^\circ + c$ で関係づけられるから $\log P_s$ と $\log P_{oct}$ との関係は 56 式のようになる。 54 式を 56 式に代入すれば $\log P_{oct}$ との関係, 57 式, が得られる。 51 式の係数 a が 1 に近い有機溶媒/水系を選べば 57

$$P_{\text{oct}} = \frac{[A]_{\text{oct}} + [A \cdots \text{Oct}]}{[A]_{\text{w}} + [A \cdots \text{H}_2\text{O}]} = P_{\text{oct}}^{\circ} \frac{(1 + [\text{Octanol}]K_{\text{oct}})}{(1 + [\text{H}_2\text{O}]K_{\text{w}})} \quad \text{..... 55}$$

$$\log P_{\text{s}} = a \log P_{\text{oct}}^{\circ} + \log \frac{(1 + [\text{Solvent}]K_{\text{s}})}{(1 + [\text{H}_2\text{O}]K_{\text{w}})} + c \quad \text{..... 56}$$

$$\log P_{\text{s}} = a \left\{ \log P_{\text{oct}} - \log \frac{(1 + [\text{Octanol}]K_{\text{oct}})}{(1 + [\text{H}_2\text{O}]K_{\text{w}})} \right\} + \log \frac{(1 + [\text{Solvent}]K_{\text{s}})}{(1 + [\text{H}_2\text{O}]K_{\text{w}})} + c \quad \text{..... 57}$$

式は58式のように簡単な型になる。

$$\log P_{\text{s}} = \log P_{\text{oct}} + \log \frac{(1 + [\text{Solvent}]K_{\text{s}})}{(1 + [\text{Octanol}]K_{\text{oct}})} + c \quad \text{..... 58}$$

水素結合に関与しない溶質の分配係数の関係51式、に比べてH-acceptor基を1個持つ溶質の分配係数 P_{s} と P_{oct} の関係では $\log(1 + [\text{Solvent}]K_{\text{s}}) / (1 + [\text{Octanol}]K_{\text{oct}})$ 項が余分に加わることを58式は意味している。H-donor有機溶媒であるクロロホルムに着目し置換ベンゼン、phenyl methylcarbamateのクロロホルム/水系分配係数 P_{CL} を測定し、 $\log P_{\text{CL}}$ と \log

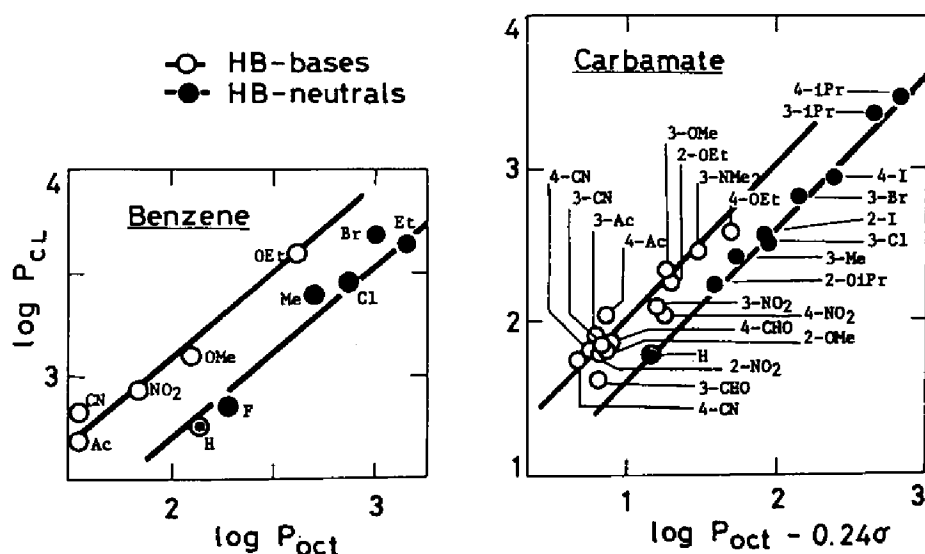


Fig. 17. Log $P(\text{CHCl}_3)$ vs. log $P(\text{octanol})$ of benzenes and phenyl methylcarbamate

P_{oct} との関係プロットしたのが Fig 17 である。OR, NMe_2 , CN のような H-acceptor 置換基では他の置換基に比べて約 0.3 ~ 0.4 だけ上にずれていることがわかる。とりわけ置換 benzene では H-acceptor の種類にかかわらず、一様にはば 0.3 ~ 0.4 だけ上にずれている。置換ベンゼンの $\log P_{\text{CL}}$ と $\log P_{\text{oct}}$ との関係は、5 種類の H-acceptor 置換基では $\text{HB} = 1$ を、6 種類の他の置換基では $\text{HB} = 0$ をとる置換基定数 HB を用いて 59 式で表わされる。しかしカーバマイ

$$\log P_{\text{CL}} = 0.91 (\pm 0.14) \log P_{\text{oct}} + 0.41 (\pm 0.14) \text{HB} + 0.86 (\pm 0.37) \\ n = 11, r = 0.99, s = 0.07 \quad \dots\dots\dots 59$$

トの場合には 1-オクタノールとクロロホルムによるカルバミル基の solvation の差に対する置換基効果（主として電子的効果）を含んでいるので、この効果を $\rho\sigma$ 項として分離することにより置換ベンゼンの場合と同様に水素結合の寄与を調べたのが 60 式である。60 式では *o*-OisoPr 基を除く 15 種類のオルト、メタ、パラ置換 H-acceptor 基が $\text{HB} = 1$ の値をとっている。59 式

$$\log P_{\text{CL}} = 0.95 (\pm 0.11) \log P_{\text{oct}} - 0.24 (\pm 0.12) \sigma + 0.31 (\pm 0.14) \text{HB} + 0.73 \\ (\pm 0.24) \quad n = 24, r = 0.98, s = 0.10 \quad \dots\dots\dots 60$$

と 60 式とにおいて $h\text{HB}$ 項の係数はほぼ等しい。このようにベンゼン環に置換した H-acceptor 基 (OR, NMe_2 , NO_2 , CN, COR 基) のクロロホルム/水系と 1-オクタノール/水系との分配係数を比較することにより、分配係数における水素結合の効果の差を $h\text{HB}$ 項として分離することができる。59/60 式と 58 式とを比較すれば $\log (1 + [\text{Chloroform}]K_{\text{CL}}) / (1 + [\text{Octanol}]K_{\text{oct}})$ 項は $h\text{HB}$ 項に対応していることがわかる。ここで $\text{HB} = 1$ の時 $h\text{HB} = 0.3 > 0$ であるから 61 式のように仮定することができる。水飽和クロロホルム、水飽和 1-オクタノールの濃度は

$$h\text{HB} = \log \frac{(1 + [\text{Chloroform}]K_{\text{CL}})}{(1 + [\text{Octanol}]K_{\text{oct}})} \approx \log \frac{[\text{Chloroform}]}{[\text{Octanol}]} + \log \frac{K_{\text{CL}}}{K_{\text{oct}}} \quad \dots\dots\dots 61$$

それぞれ 12.4M, 6.14M であるから,⁹²⁾ $\log [\text{Chloroform}]/[\text{Octanol}] = 0.31$ となり、 $h\text{HB}$ 項はほとんど有機溶媒の濃度比だけに依存している。従ってクロロホルムと 1-オクタノールの水素結合生成定数がほぼ等しい、 $K_{\text{CL}}/K_{\text{oct}} = 1$, ことを意味する。

クロロホルムや 1-オクタノールよりも強い H-donor である *p*-fluorophenol とベンゼン環に置換した種々の H-acceptor との水素結合生成定数 K_f を Taft らが測定している (Table 20)⁸⁹⁾。OMe 基を除いて NO_2 , CN, CH_2NMe_2 などほぼ同じ程度の水素結合を形成していることがわかる。また種々の脂肪族アミンの K_{CL} (クロロホルムとの水素結合定数)⁹³⁾ と K_f (*p*-fluorophenol との水素結合定数)⁸⁹⁾ との比較から K_{CL} は K_f の 1/200 - 1/50 程度と見積ることができる。従って本実験に用いた H-acceptor 置換基では、61 式において K_s 項が寄与する場合があっても、置換基によらずほぼ一定の値を示すものと思われる。エーテル/水、ベンゼン/水、へ

キサン/水系の分配係数 P_s と P_{oct} との間においても水素結合の効果が hHB 項であらわされ、 h HB 値は $\log ([\text{Solvent}]/[\text{Octanol}])$ にのみ依存 (ベンゼン、ヘキサンのように水素結合に関与しない有機溶媒では $\log (1/[\text{Octanol}])$ にのみ依存) することが明らかにされている。⁹⁴⁾

Table 20. H-Bond Formation of H-acceptor Substituted Benzenes with p-Fluorophenol^{a)}

$$p\text{-FC}_6\text{H}_4\text{OH} + \text{PhX} \xrightleftharpoons{K_f} p\text{-FC}_6\text{H}_4\text{OH} \cdots \text{XPh}$$

| X | $\log K_f$ | X | $\log K_f$ |
|-----------------|------------|----------------------------------|------------|
| OMe | 0.02 | CHO | 0.83 |
| NO ₂ | 0.73 | COMe | 1.13 |
| CN | 0.79 | CH ₂ NMe ₂ | 1.58 |

a) From ref. 89. CCl₄, 25°C

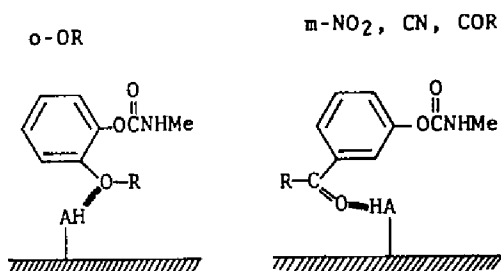
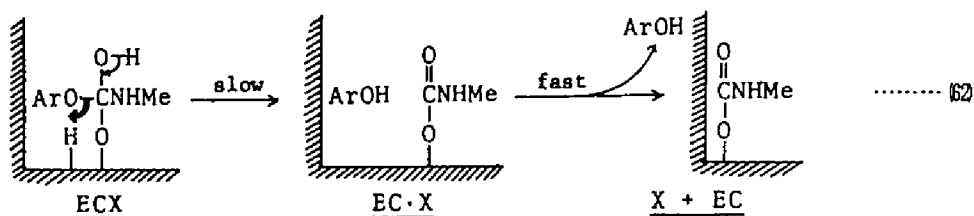


Fig. 18. Selective Hydrogen-bond Formation

4. 3. 5. カルバミル化速度定数 k_2

置換基が変わっても k_2 値はほとんど変化していない (Table 15)。これは四面体中間体 EC X からカルバミル化酵素 EC が生成する際に脱離基として中性フェノールが生成するためには、結合の開裂と生成が同時に進行しなければならない、それに対応した置換基効果は互いに相殺されてしまうことを意味している。フェノールが酵素から脱離する際に予想される置換基の疎水の相互作用や水素結合への効果も重要ではない。これを説明するためには、 k_2 段階に少なくとも次の

従って $\Delta \log 1/K_d$ の解析, (50式) において hHB 項はオルト, メタ置換基近傍の AChE 表面に局在している H-donor 基との水素結合の寄与をあらわす項であり, 係数 $h = 1.36$ は 1-オクタノール濃度の約 20 倍の濃度に対応する効果を持っていることを示している。AChE の H-donor 基は $o\text{-OR}$, $m\text{-NO}_2$, CN , COR だけと水素結合を形成しうるような極めて特異的な位置に存在しており (Fig 18), このような位置関係では $o\text{-NO}_2$, CN , $m\text{-OR}$ 基が有効な水素結合を形成しえないものと仮定できる。しかし Fig 18 に示した仮定に従えば $m\text{-NMe}_2$ 基は水素結合を形成しえないことになるが, これは実験事実と矛盾している。実際にはもっと複雑な選択機構によってこの特異的な水素結合が形成しているように思われる。



2つの反応過程が存在していると仮定すればよい、62式：第1段階は共有結合が同時に開裂，生成する段階であり，かつ律速過程である。第2段階は生成した中性フェノールが離脱する段階であり，極めて速やかな反応過程である。

結局置換 phenyl methylcarbamate の AChE 阻害反応過程は 53(62) 式で示されるように進行する。先ず速やかな平衡過程で四面体中間体 ECX を形成し，次いでゆっくりとカルバミル化反応が進行する。しかし置換基効果は，はじめの平衡過程でのみあらわれている。置換 phenyl methylcarbamate のアルカリ加水分解反応は Scheme 6 で示されているように，NH 水素の引き抜き反応が速やかに進行し，phenoxide の脱離が律速段階であった。このように反応機構は両者で全く異なっている。NH 水素が存在せず，四面体中間体を経てアルカリ加水分解反応が進行する置換 phenyl dimethylcarbamate の AChE 阻害反応定数 K_d ， k_2 値 (Table 2) が methylcarbamate の値 (Table 15) とよく対応していることも，四面体中間体を経て AChE 阻害反応が進行するという解析結果を支持している。置換基効果の立場から比較すれば，ECX は置換 phenyl acetate のアルカリ加水分解反応における反応中間体に類似している。

p-F 置換体が極めて弱い阻害活性しか示さなかったことは 50 式からも推定できる。p-F の置換基定数を用いて計算した $\Delta \log 1/K_d$ の推定値は -0.15 であり，phenyl methylcarbamate の K_d 値の 1.4 倍である。しかし o-tertBu 置換体の極めて弱い阻害活性を 50 式から推定することはできない。オルト置換基が酵素に正しく結合するためには，置換基の大きさに制限があるのかもしれない。secBu 基よりも大きくなると阻害活性は突然失なわれる。このように置換基効果による相関式があてはまらなくなる限界を調べることによって，酵素反応の特性をもっと詳細に知ることができるのであろう。

第5章 ま と め

最初に、置換 phenyl methyl-および dimethylcarbamate の AChE 阻害反応定数 K_d , k_2 を種々の実験方法によって測定した。Indicator である基質共存下で阻害反応を行なって反応定数を測定する方法について検討し、これまでの「Mainの方法」と比較した。いずれの方法においても得られる反応定数は、反応に用いたカーバメイト濃度に依存して変化することを明らかにした。高濃度のカーバメイトが反応系に存在する場合には、カーバメイト-AChE 複合体 ECX やカルバミル化酵素 EC にもう一分子のカーバメイトが結合することによる影響を考慮しなければならない。カーバメイト濃度と $k_i (= k_2/K_d)$ の積が $0.2 \sim 1.0 \text{ min}^{-1}$ 程度の低いカーバメイト濃度で測定を行えば、いずれの方法によっても目的とする反応定数 K_d , k_2 を得ることができる。

次に acetic acid, dimethylcarbamic acid, diethyl phosphoric acid, methylcarbamic acid の置換 phenyl エステルのアルカリ加水分解反応定数 k におけるオルト効果の解析を中心に、メタ、パラ置換体と同じ化学的基準で解析することを試みた。オルト効果は通常の電子的効果、立体的効果、近接誘起効果に分離され、反応定数 k は $\log k = \rho \sigma_{o,m,p} + \delta E_s + fF + c$ によってメタ、パラ置換体と同一の相関式で解析することができる。ここに E_s , F はそれぞれ Taft-Kutter-Hansch の立体的効果をあらわす定数, Swain-Lupton-Hansch の近接誘起効果をあらわす定数である。各項の係数 ρ , δ , f の物理化学的意味を明らかにし、反応機構と関連してオルト効果を論じた。

55 種類のオルト、メタ、パラ置換 phenyl methylcarbamate について仔牛 AChE 阻害反応定数 K_d , k_2 を測定した結果、置換基の種類や置換位置によって K_d 値は 1000 倍程度変化するのに比べて k_2 値はほとんど変化しなかった。 $\log 1/K_d$ の置換基による変化を LFER 置換基数を用いて多重回帰分析を行なった。その結果各置換位置における置換基の効果は疎水性効果、電子的効果、水素結合と近接効果（オルト置換基の立体的効果と誘起効果）とに分離された。モデル有機化学反応におけるこれらの効果との比較から、分離された各置換基効果の物理化学的意味を明らかにし、AChE 阻害反応機構を物理有機化学的に表わすことができた。

参 考 文 献

1. G.M.Booth and R.L.Metcalf, *Ann.Entmol.Soc.Amer.*, 63, 197 (1970).
2. G.M.Booth and A.H.Lee, *Bull.Wld.Hlth Org.*, 44, 91(1971).
3. R.M.Pitman, *Comp.gen.Pharmac.*, 2, 317(1971).
4. K.B.Augustinsson, *Bull.Wld.Hlth Org.*, 44, 81(1971).
5. J.D.Berman, *Biochemistry*, 12, 1710(1973).
6. T.L.Rosenberry, *Advan.Enzymol.*, 43, 103(1975).
I.B.Wilson and E.Cabib, *J.Amer.Chem.Soc.*, 78, 202(1956).
7. R.M.Krupka and K.J.Laidler, *ibid.*, 83, 1445, 1448(1961).
8. R.M.Krupka, *Biochemistry*, 3, 1749(1964), 5, 1988(1966),
6, 1183(1967), 9, 4665(1970).
9. B.Belleau and V.DiTullio, *J.Amer.Chem.Soc.*, 92, 6320 (1970).
10. R.D.O'Brien, "Insecticide. Action and Metabolism",
Academic Press, New York, 1967.
11. E.Stedman and G.Barger, *J.Chem.Soc.*, 127, 247(1925).
12. J.A.Aeschlimann and M.Reinert, *J.Pharmacol.exp.Ther.*, 43
413(1931).
13. R.L.Metcalf, *Bull.Wld.Hlth Org.*, 44, 43(1971).
14. T.R.Fukuto, *Drug Metab.Reviews*, 1, 117(1972).
15. R.L.Metcalf, W.B.Gruhn, and T.R.Fukuto, *Ann.Entomol.Soc. Amer.*, 61, 618(1968).

16. T.Narahashi, *Adv.Insect Physiol.*, 8, 1(1971).
17. M.H.J.Weiden, *Bull.Wld.Hlth Org.*, 44, 203(1971).
18. I.B.Wilson, M.A.Hatch, and S.Ginsburg, *J.Biol.Chem.*, 235
2312(1960).
19. A.R.Main and F.L.Hastings, *Science*, 154, 400(1966).
20. W.N.Aldridge and E.Reiner, "Enzyme Inhibitors as
Substrates", North-Holland, Amsterdam, 1972.
21. K.Hellenbrand, *J.Agr.Food Chem.*, 15, 825(1967).
22. R.D.O'Brien, B.D.Hilton, and L.Gilmour, *Mol.Pharmacol.*,
2, 593(1966).
23. F.L.Hastings, A.R.Main, and F.Iverson, *J.Agr.Food Chem.*,
18, 497(1970).
24. M.L.Bender and J.K.Stoops, *J.Amer.Chem.Soc.*, 87, 1622
(1965).
M.L.Bender, M.L.Bequé-Cantón, R.L.Blakeley, L.J.Brubacher,
J.Feder, C.R.Gunter, F.J.Kézdy, J.V.Killheffer, Jr., T.H.
Marshall, C.G.Miller, R.W.Roeske, and J.K.Stoops, *ibid.*,
88, 5890(1966).
25. T.L.Rosenberry and S.A.Bernhard, *Biochemistry*, 10, 4114
(1971).
26. G.J.Hart and R.D.O'Brien, *Biochemistry*, 12, 2940(1973).
27. G.J.Hart and R.D.O'Brien, *Pestic.Biochem.Physiol.*, 4, 239
(1974).
28. R.L.Metcalf, T.R.Fukuto, and M.Y.Winton, *J.Econ.Entomol.*,

- 55, 345(1962).
29. M.L.Bender, F.J.Kézdy, and F.C.Wedler, *J.Chem.Educ.*, 44, 84(1967).
30. W.D.Reed and T.R.Fukuto, *Pestic.Biochem.Physiol.*, 3, 120 (1973).
31. L.W.Dittert and T.Higuchi, *J.Pharm.Sci.*, 52, 852(1963).
32. A.R.Main and F.Iverson, *Biochem.J.*, 100, 525(1966).
33. FACOM 230/60 Scientific Subroutine Library Program User's Manual (290/50-301~309-001-7), 富士通, 東京, 1974, p146.
34. R.J.Kitz, L.M.Braswell, and S.Ginsburg, *Mol.Pharmacol.*, 6 108(1970).
35. A.R.Main, *J.Biol.Chem.*, 244, 829(1969).
36. C.Hansch and D.W.Deutsch, *Biochim.Biophys.Acta*, 126, 117 (1966).
37. J.E.Leffler and E.Grunwald, "Rates and Equilibria of Organic Reactions", John Wiley, New York, 1963.
38. L.P.Hammett, *Chem.Rev.*, 17, 125(1935).
L.P.Hammett, "Physical Organic Chemistry", 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1970.
39. H.H.Jaffé, *Chem.Rev.*, 53, 191(1953).
O.Exner, in "Advances in Linear Free Energy Relationships"
N.B.Chapman and J.Shorter, ed., Plenum Press, London,
1972, p27.
40. H.C.Brown and Y.Okamoto, *J.Amer.Chem.Soc.*, 79, 1913(1957).

41. L.A.Cohen and S.Takahashi, *ibid.*, 95, 443(1973)
42. R.W.Taft and I.C.Lewis, *J.Amer.Chem.Soc.*, 80, 2442(1958),
Tetrahedron, 5, 210(1959).
43. P.R.Wells, "Linear Free Energy Relationships", Academic
Press, New York, 1968.
44. Y.Yukawa and Y.Tsuno, *Bull.Chem.Soc.Japan*, 32, 965(1959).
45. S.Ehrenson, *Prog.Phys.Org.Chem.*, 10, 1(1973).
46. C.G.Swain and E.C.Lupton, *J.Amer.Chem.Soc.*, 90, 4328(1968).
47. C.Hansch, A.Leo, S.H.Unger, K.H.Kim, D.Nikaitani, and E.
Lien, *J.Med.Chem.*, 16, 1207(1973).
48. R.W.Taft, in "Steric Effects in Organic Chemistry", M.S.
Newman, ed., John Wiley, New York, 1956, Chap. 13.
49. M.Charton, *J.Amer.Chem.Soc.*, 91, 615(1969).
50. E.Kutter and C.Hansch, *J.Med.Chem.*, 12, 647(1969).
51. M.Charton, *Prog.Phys.Org.Chem.*, 8, 235(1971).
52. A.C.Farthing and B.Nam, in "Steric Effects in Conjugate
Systems", G.W.Gray, ed., Butterworth, London, 1958, p.131.
53. J.Shorter, in "Advances in Linear Free Energy Relation-
ships", N.B.Chapman and J.Shorter, ed., Plenum Press,
London, 1972, p.71.
54. T.Fujita and T.Nishioka, *Prog.Phys.Org. Chem.*, 12, in press
(1976).
55. C.van Vooïdonk and L.Ginjaar, *Rec.Trav.Chim.*, 86, 449
(1967).

56. T.Fujita, K.Kamoshita, T.Nishioka, and M.Nakajima, *Agr. Biol.Chem.*, 38, 1521(1974).
57. A.J.Kirby, in "Comprehensive Chemical Kinetics", Vol. 10, C.H.Bamford and C.F.H.Tipper, ed., Elsevier, Amsterdam, 1973, Chap. 2.
58. M.L.Bender and R.B.Homer, *J.Org.Chem.*, 30, 3975(1965).
59. T.Vontor and M.Vecera, *Collec.Czech.Chem.Commum.*, 38, 516 (1973).
60. R.L.Metcalf and T.R.Fukuto, *J.Agr.Food Chem.*, 15, 1022 (1967).
61. G.K.Kohn, J.N.Ospenson, and J.E.Moore, *ibid.*, 13, 232(1965).
A.M.M.Mahfouz, R.L.Metcalf, and T.R.Fukuto, *ibid.*, 17, 917(1969).
62. T.R.Fukuto, M.A.H.Fahmy, and R.L.Metcalf, *ibid.*, 15, 273 (1967).
63. T.R.Fukuto, *Bull.Wld.Hlth Org.*, 44, 31(1971).
64. M.J.Kolbezene, R.L.Metcalf, and T.R.Fukuto, *J.Agr.Food Chem.*, 2, 864(1954).
65. R.L.Metcalf, T.R.Fukuto, and M.Frederickson, *ibid.*, 12, 231(1964).
66. C.Hansch, in "Drug Design", Vol. 1, E.J.Ariens, ed., Academic Press, New York, 1971, p.271.
67. T.Fujita, in "Biological Correlations - The Hansch Approach", Advance in Chemistry Series, No. 114, Amer. Chem. Soc.,

- 1973, p. 1.
68. T.H.Fife and J.D.Milstein, *Biochemistry*, 6, 2901(1967).
J.D.Milstein and T.H.Fife, *ibid.*, 8, 623(1969).
69. W.P.Jencks, "Catalysis in Chemistry and Enzymology",
McGraw-Hill, New York, 1969.
70. W.P.Jencks, *Symp. Quant. Biol.*, 36, 1(1971).
71. E.J.Cohn and J.T.Edsall, in "Proteins, Amino Acids and
Peptides", Reinhold, New York, 1943. Chap. 9.
Y.Nozaki and C.Tanford, *J.Biol.Chem.*, 246, 2211(1971).
72. C.Tanford, *J.Amer.Chem.Soc.*, 84, 4240(1962).
73. K.Kinoshita, H.Ishikawa, and K.Shinoda, *Bull.Chem.Soc.
Japan*, 31, 1081(1958).
74. D.S.Goodman, *J.Amer.Chem.Soc.*, 80, 3887(1958).
R.Smith and C.Tanford, *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.*, 70, 289(1973).
75. C.Tanford, "The Hydrophobic Effect: Formation of Micells
and Biological Membranes", John Wiley and Sons, New York,
1973.
76. G.Némethy and H.A.Scheraga, *J.Chem.Phys.*, 36, 3382, 3401
(1962), *J.Phys.Chem.*, 66, 1773(1962).
D.Eisenberg and W.Kauzmann, "The Structure and Properties
of Water", Oxford Univ., 1969.
77. J.Steinhardt and J.A.Reynolds, "Multiple Equilibria in
Proteins", Academic Press, New York, 1969.
C.Tanford, *J.Mol.Biol.*, 67, 59(1972).

78. T.Fujita, J.Iwasa, and C.Hansch, *J.Amer.Chem.Soc.*, 86, 5175(1964).
79. A.Leo, C.Hansch, and D.Elkins, *Chem.Rev.*, 71, 525(1971).
80. C.Hansch and E.Coats, *J.Pharm.Sci.*, 19, 2193(1970).
J.Fostrez and A.R.Fersht, *Biochemistry*, 12, 1067(1973).
81. T.Fujita, *J.Med.Chem.*, 16, 923(1973).
82. R.L.Metcalf and T.R.Fukuto, *J.Agr.Food Chem.*, 13, 220(1965).
83. C.Hansch, in "Biochemical Toxicology of Insecticides", R.D. O'Brien and I.Yamamoto, eds., Academic Press, New York, 1970, p. 33.
84. B.Hetnarski and R.D.O'Brien, *Pestic.Biochem.Physiol.*, 2, 132(1972).
85. B.Hetnarski and R.D.O'Brien, *Biochemistry*, 12, 3883(1973).
86. B.Hetnarski and R.D.O'Brien, *J.Agr.Food Chem.*, 23, 709(1975).
87. C.A.Bennett and N.L.Franklin, "Statistical Analysis in Chemistry and Chemical Industry", John Wiley and Sons, New York, 1954.
W.J.Dixon, "BMD Biomedical Computer Programs", Univ. California Press, Los Angeles, 1970.
奥野忠一, 久米均, 芳賀敏郎, 吉沢正, "多変量解析法", 日科技連, 1971.
88. J.G.Toplis and R.J.Costello, *J.Med.Chem.*, 15, 1066(1972).
89. D.Gurka and R.W.Taft, *J.Amer.Chem.Soc.*, 91, 4794(1969).
R.W.Taft, D.Gurka, L.Joris, P.R.Schleyer, and J.W.Rakshys,

- ibid., 91, 4801(1969).
90. T.Fujita and C.Hansch, unpublished results.
91. A.Williams, *Biochemistry*, 9, 3383(1970).
92. R.N.Smith, C.Hansch, and M.M.Ames, *J.Pharm.Sci.*, 64, 599(1975).
93. 高山千代蔵, 修士論文(1971).
94. T.Fujita, T.Nishioka, and M.Nakajima, to be published.