

学位論文題名

哺乳動物精子及び酸触媒による非酸化的  
N-アリルアセトヒドロキサム酸生成機構

学位論文内容の要旨

[目的]

芳香族含窒素化合物を始めとする生体異物の毒性発現には、殆どの場合生体内での代謝活性化が必要とされており、体細胞を対象とした異物代謝研究が行われている。また、異物の中には種々の遺伝毒性を有するものが知られており、それら異物の代謝活性化に関する研究が生殖器官においても展開されている。しかし、生殖細胞そのものの異物代謝能についての報告は皆無に等しい。これらのことから著者はヒトを含めた哺乳動物精子における芳香族含窒素化合物の代謝研究を企画し、芳香族ニトロソ化合物から近接発ガン体脂質含量の一分子種であるN-アリルアセトヒドロキサム酸の生物学的及び非生物学的の二つの新生成経路を見出した。本研究は生物学的活性がミトコンドリア局在のピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC) によることの証明と酵素的及び非生物学的反応機構の解明を目的とし、さらに広範に使用されている芳香族ニトロ系除草剤の環境中における代謝物のニトロソ体からのN-アセトヒドロキサム酸体に二経路による生成能とその意義についても検討を行った。

[結果及び考察]

1. 哺乳動物精子によるN-アリルアセトヒドロキサム酸生成

豚精子にグルコースを始めとする解糖経路中の化合物を添加した生理的条件下で、ニトロソベンゼン (NOB) からN-フェニルアセトヒドロキサム酸 (N-OH-AA) の生成を見出した。同条件下、アニリン及びアセトアニリドに対するN-水酸化活性は認められないことから、このN-OH-AA生成がP-450介在の酸化的反応によることは否定された。NOBからのN-OH-AA生成においてピルビン酸は最も有効な基質であり、[3-<sup>13</sup>C] 標識ピルビン酸を用いた<sup>13</sup>C取り込み実験並びにピンポン BiBi 機構を支持する反応速度論的実験結果から、NOBとピルビン酸がN-OH-AA生成反応の直接反応物質であることが証明された。NOB以外に発ガ

ン性が知られている2-ニトロソフルオレン及び4-ニトロソビフェニルからも対応するN-アセトヒドロキサム酸体生成が認められた。また、豚以外にラット及びヒトの精子もN-OH-AA 生成活性を示したことから、芳香族ニトロソ化合物からのN-アセトヒドロキサム酸体生成反応は哺乳動物精子に普遍的であることが示唆された。豚精子のN-OH-AA 生成活性はミトコンドリアで構築されている精子中片部に局在しており、チアミンピロリン酸 (TPP) 添加による活性増強及びチアミンチアゾロンピロリン酸添加による活性阻害が認められた。以上の結果から、N-OH-AA 生成活性はミトコンドリア局在酵素 PDHC によると推察された。尚、<sup>31</sup>P-NMR により TPP は豚精子の細胞膜を通過することが確認され、この結果は精子の保存目的で添加される薬剤としての有効性を示すものである。

## 2. N-アリルアセトヒドロキサム酸生成機構

精子のN-アリルアセトヒドロキサム酸生成活性が、ミトコンドリア局在酵素 PDHC によることの証明実験を行った。精子のミトコンドリアは体細胞のミトコンドリアと本質的には同一の特性を有することが知られているので、分離法が確立されている心筋ミトコンドリアと単離豚心筋 PDHC を用いてN-アリルアセトヒドロキサム酸生成活性の有無を調べた。豚、ウシ及びヒト心筋ミトコンドリアは何れも精子と同様にピルビン酸依存性のN-アリルアセトヒドロキサム酸生成活性を示した。単離豚心筋 PDHC もN-OH-AA 生成活性を示し、その至適 pH 及び活性化エネルギーは豚心筋ミトコンドリアで得られた値と一致した。以上のことから哺乳動物精子で認められたN-アリルアセトヒドロキサム酸生成はミトコンドリア局在酵素 PDHC によることが強く示唆された。単離豚心筋 PDHC によるN-アリルアシルヒドロキサム酸生成では、他に以下の知見が得られた。(1) N-OH-AA 生成反応はピンポン BiBi 機構に従い、ピルビン酸に対するkm値はPDHCの正常反応での値と一致した。(2) N-OH-AA 生成活性はN-エチルマレイミドにより阻害されないが、ATPにより制御を受けた。(3) N-OH-AA 生成活性はPDHCの構成酵素(E1, E2及びE3)のうちピルビン酸の酸化的脱炭酸反応を触媒するE1酵素の単独作用であり、E1酵素活性発現に必須なヒスチジン残基が本反応に関与していることが示唆された。(4)  $\alpha$ -オキソ酸に対する基質特異性では、 $\alpha$ -オキソ酸のアルキル基の立体的効果による著しい影響が認められた。(5) 芳香族ニトロソ化合物に対する基質特異性では電子吸引性の芳香環置換基による反応性の増大及びp-置換基の立体的効果による反応性の低減が認められた。以上の結果から、PDHCのE1酵素によるN-アリルアセトヒドロキサム酸生成機構は、 $\alpha$ -オキソ酸の脱炭酸反応で生成する活性アルデヒド中間体の芳香族ニトロソ化合物へ求核反応であるという結論に至った。

### 3. 酸触媒によるN-アリルアシルヒドロキサム酸生成

上記した酵素反応機構解明に関連して行った芳香族ニトロソ化合物と $\alpha$ -オキソ酸からの非酵素的なN-アリルアシルヒドロキサム酸生成における構造活性相関性に関する実験から、非酵素的反応における芳香環置換基効果は前述したE1酵素による反応の場合と正反対（芳香族ニトロソ化合物は酵素的反応では親電子剤、非酵素的反応では求核剤）であるという顕著な相違点が得られた。尚、本反応は、簡便さと高収率の点で種々のN-アリルアシルヒドロキサム酸合成法としても有用である。

### 4. ニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ体からのN-アリルアセトヒドロキサム酸体生成

上記除草剤には発ガン性が知られているものがあり、また、上記除草剤は環境中でニトロ基の還元及び脱クロル化反応等が認められている。還元生成物としてアミノ体が確認されていることは、これら除草剤のニトロソ体が環境中で生成している可能性を示している。これら除草剤及び脱クロル化体のニトロソ体を用いて豚精子及び酸触媒によるN-アセトヒドロキサム酸体生成の有無を検討した結果、両反応系ともにN-アセトヒドロキサム酸体生成率はクロル置換基数の減少に伴って増大した。

#### [まとめ]

- (1) 精子に認められた芳香族ニトロソ化合物からのN-アリルアシルヒドロキサム酸生成が、ミトコンドリアに局在するPDHCの構成酵素E1酵素によることを明らかにした。
- (2) 酵素的及び非酵素的なN-アリルアシルヒドロキサム酸の生成機構を明らかにした。
- (3) ニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ体からのN-アリルアヒドロキサム酸体生成が中性-酸性の液性領域にわたって環境中で起こる可能性が示唆され、また脱クロル化に伴って反応性が増大することは本除草剤の安全性に対する警鐘となることを示した。
- (4) 本反応は生殖細胞及び体細胞のみならず全ての好氣的生物における近接発ガン体生成とエネルギー代謝・物質代謝の攪乱という両面において重要な代謝経路と考えられる。

## 学位論文審査の要旨

主査	教授	米光	宰
副査	教授	鎌滝	哲也
副査	助教授	浜田	辰夫
副査	助教授	横井	毅

芳香族含窒素化合物などの生体異物の毒性作用発現には、生体内で代謝を受けて生成する活性代謝物によるものが多いことが知られており、体細胞による代謝研究がよく行われている。これら毒性物質の中には、遺伝毒性を有するものも種々知られており、これらの生殖器官における代謝活性化に関する研究も行われている。しかし、生殖細胞そのものにおける異物代謝についての報告は皆無に等しい。本研究は豚をはじめラット、ヒトなど哺乳動物精子における芳香族含窒素化合物の代謝研究に取り組み、芳香族ニトロソ化合物から近接発がん体の一分子種であるN-アリアルアセトヒドロキサム酸 (N-OH-AA) の生成を初めて発見し、詳細な反応機構の検討を行い、さらに同じ反応が非酵素的触媒反応でも進行することも明らかにしたものである。

ブタ精子にグルコースを添加した生理的条件下で、ニトロソベンゼン (NOB) からN-OH-AAの生成が認められた。この反応は従来から知られているP-450介在の酸化的代謝経路によるものではない。[3-<sup>13</sup>C] 標識ピルビン酸を用いてN-OH-AAへの<sup>13</sup>C取り込みを調べ、ピルビン酸のBiBi機構で反応が進行することから、ピルビン酸が直接の基質であることが証明された。N-OH-AA生成はブタ以外にラット及びヒトの精子においても認められたことから、このNOBからN-OH-AA生成反応は、哺乳動物精子に共通したものと思われる。

ブタ精子のN-OH-AA生成活性はミトコンドリアで構築されている精子中片部に局在しており、この活性はミトコンドリアに局在するTPP依存酵素であるPDHCによるものと推察された。このことを分離法が確立されている心筋ミトコンドリアを用いて証明することができた。即ち、ブタ、ウシ、及びヒトの心筋ミトコンドリアは何れも精子と同様にピルビン酸を基質とするN-OH-AA生成活性を示した。さらに単離したブタ心筋PDHCでも全く同じ結果をえた。N-OH-AA生成機構を明らかにするため、PDHCによるN-OH-AA生成の反応動力学定数のpH依存性など反応論的検討を詳細に行い、PDHC構成酵素の一つであるE1酵素によるピルビン酸の脱炭酸反応を第一段階とし、生成する2-(1-ヒドロキシアリキリデン)TPPのNOBへの求核反応を第二段階とするN-OH-AA生成機構を明らかにした。

N-OH-AA の生成は pH 5 以下の酸性側では非酵素的酸触媒反応によっても進行する。NOB とピルビン酸からの酸触媒による N-OH-AA 生成の二次反応速度定数と pH との関係などにより、この非酵素的 N-OH-AA 生成の機構も解明している。最後に、除草剤の環境中での変化にも言及している。即ち、塩基化ニトロジフェニルエーテル系除草剤の中には発がん性のももある。こられの還元が知られているが、環境中ニトロソ体を経て N-OH-AA 誘導体への変化の可能性があることを警告している。以上、本研究は芳香族含窒素化合物が精子及び酸触媒によって N-OH-AA に変換されることを詳細なメカニズムの検討と共にはじめて明らかにしたもので、この研究を行った申請者は博士(薬学)の学位を受けるに充分価すると認定した。