

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590152

研究課題名(和文) 環境内発がん性N-ニトロソ化合物の新規活性化経路の解明

研究課題名(英文) Activation Mechanism of N-Nitrosodialkylamine by Reactive Oxygen Species

研究代表者

望月 正隆 (Mochizuki, Masataka)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：10072414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：N-ニトロソ化合物はヒト体内でも生成する強力な発がん物質であり、ヒトがんの原因として重要な位置を占める。活性酸素発生系を用いてN-ニトロソ-N-メチルペンチルアミンを処理して生成する変異原を単離し、構造決定を試みたところ、環状構造をもつ変異原を単離したことから、N-ニトロソジアルキルアミンの新規活性化経路を明らかにした。

一方、N-ニトロソ-N-メチルブチルアミンから生成した変異原Xの活性発現に至る経路の解明を目的とし、変異原Xの基本構造をもつピラゾリン類を合成し、変異原性発現に及ぼす構造の影響を検討したところ、1位窒素原子の酸化が変異原性発現機構に重要であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Carcinogenic and mutagenic N-nitroso compounds exist in our environment and can be formed in human body. To elucidate the new activation mechanism of N-nitrosodialkylamines by reactive oxygen species, the reaction mixture with N-nitroso-N-methylpropylamine and Fe²⁺-Cu²⁺-H₂O₂-NO was fractionated, and a direct-acting mutagen which has a ring structure was isolated. It is indicated that N-nitrosodialkylamines was activated by reactive oxygen species via new mechanisms.

Moreover, to clarify the structure-activity relationship for the mutagenesis of the mutagen X derived from N-nitroso-N-methylbutylamine with Fe²⁺-Cu²⁺-H₂O₂-NO, pyrazoline analogues were synthesized and assayed for their mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA1535. The data showed that the position of N-oxidation in the pyrazoline also affected on the mutagenic activity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学 環境系薬学

キーワード：ニトロソジアルキルアミン 活性酸素 代謝活性化 フェントン試薬 酸化 発がん

1. 研究開始当初の背景

環境内に存在する *N*-ニトロソ化合物は、ヒト体内でも生成する強力な発がん物質であり、ヒトがんの原因として重要な位置を占める。*N*-ニトロソ化合物のうち、*N*-ニトロソジアルキルアミンはシトクロム P450 により -水酸化体が生成し、DNA をアルキル化して生物活性を示す。本研究は、酸化代謝モデル系を用いて *N*-ニトロソジアルキルアミンの酸化生成物および酸化中間体を同定し、-水酸化体以外の活性体の存在を明らかにすることで、環境内発がん物質である *N*-ニトロソジアルキルアミンについて、詳細な活性化機構の解明を目指す。

本研究で得られた結果に基づき、環境内に存在する *N*-ニトロソ化合物の発現に至る活性化経路の抑制からがん予防の方策を検討する。

2. 研究の目的

これまでの研究から、シトクロム P450 の酸化代謝モデルとして修飾フェントン試薬を用いて *N*-ニトロソ-*N*-メチルブチルアミン (NMB) の酸化生成物および酸化中間体を同定した。直接変異原として 5-メチル-5-ニトロ-1-ピラゾリン 1-オキド (変異原 X; **1a**) を同定した。ブチル側鎖をペンチル基に変えた *N*-ニトロソ-*N*-メチルペンチルアミン (NMPe) からも、同様に 5-エチル-5-ニトロ-1-ピラゾリン 1-オキド (変異原 Z; **1b**) を変異原として同定した。(図 1) つまり、*N*-ニトロソジアルキルアミンの活性化について、-水酸化体以外の活性体の存在を明らかにした。

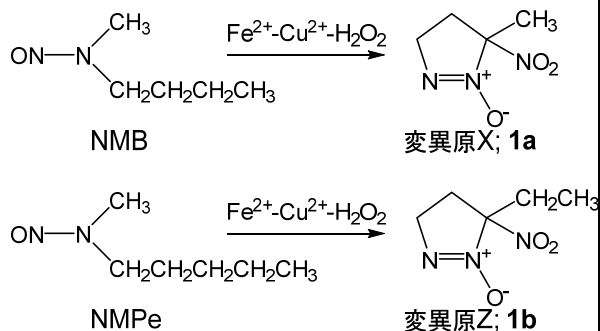


図 1 NMB および NMPe から変異原 X と変異原 Z の生成

これらの変異原の生成機構についても検討した。金属イオンと過酸化水素から生成したヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$) が、NMB と反応すると一酸化窒素 (NO) ができ、その NO が金属イオンの存在下でもう一分子の NMB と反応することで直接変異原が生成することを明らかにした。(図 2)

修飾フェントン処理による NMB の変異原性発現における変異原 X の活性への寄与を明らかにするために、抽出物中に存在する変異原 X を定量し、合成した変異原 X と活性を比

較したところ、反応抽出物のサルモネラ TA1535 に対する変異原活性は別途で合成した変異原 X よりも高く、変異原 X 以外のさらに強い直接変異原の存在が明らかになった。(図 3)

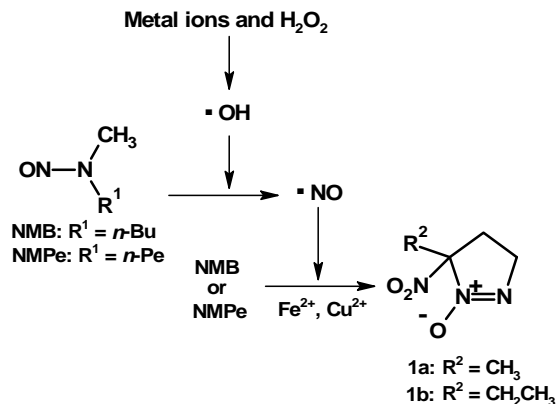


図 2 NMB および NMPe のフェントン試薬による活性化機構

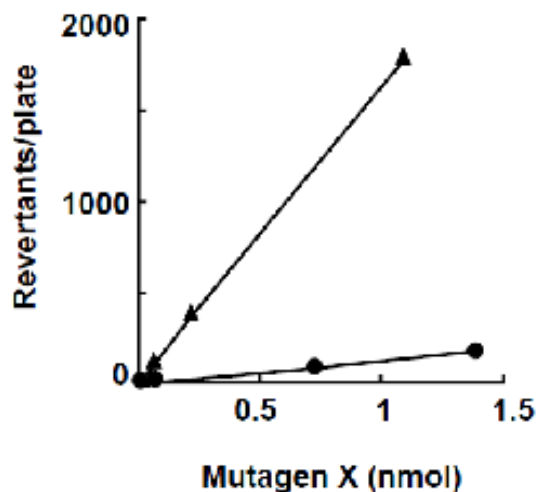


図 3 ジクロロメタン抽出物の変異原活性 : 反応抽出物の変異原 X を横軸にプロットしたときの CH_2Cl_2 抽出物の活性 : 合成した変異原 X

本研究では、活性酸素と *N*-ニトロソジアルキルアミンとの反応液中から変異原 X 以外の直接変異原を単離・同定する他に、推定酸化中間体からの活性化体の生成を検討することで、*N*-ニトロソ化合物の -水酸化以外の新たな活性化経路を証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 一酸化窒素の共存下、NMB および *N*-ニトロソ-*N*-メチルプロピルアミン (NMP) を $Fe^{2+}-Cu^{2+}-H_2O_2$ で処理し、有機溶媒で抽出した後、変異原性を試験した。抽出物を分画し、得られた分画について変異原性を試験することを繰り返し、最も活性の高い分画について、変異原を単離し構造決定を試みた。

(2) 推定される活性中間体は、2-ニトロプロペンとニトロイミン類との付加環化によって合成を試みた。(図4) 合成した化合物の変異原性を試験することで、変異原 X の生成および新規変異原の生成機構を検討した。

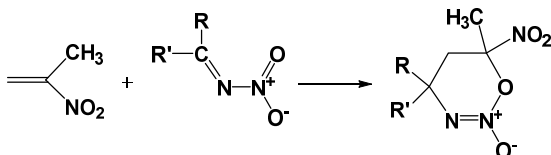


図4 推定される活性中間体の別途合成経路

(3) NMB から同定した変異原 X の変異原性発現に至る経路の解明を目的とし、ピラゾリン骨格をもつ類縁体を合成し、変異原性発現に及ぼす構造の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) NMBを Fe^{2+} - Cu^{2+} - H_2O_2 -NOで処理し、有機溶媒で抽出した後、シリカゲルカラムによる精製と変異原性試験を繰り返したが、分離操作を繰り返すことで変異原の収量および活性も低下し、最も活性の高い変異原を単離することができなかつた。

そこで、NMB類縁体のNMPについて、生成する変異原の単離を検討するために、フェントン試薬処理によるNMPの変異原活性を試験した。(図5)さらに、NO添加あるいは無添加の条件下でもNMPの活性を試験した。(図5)

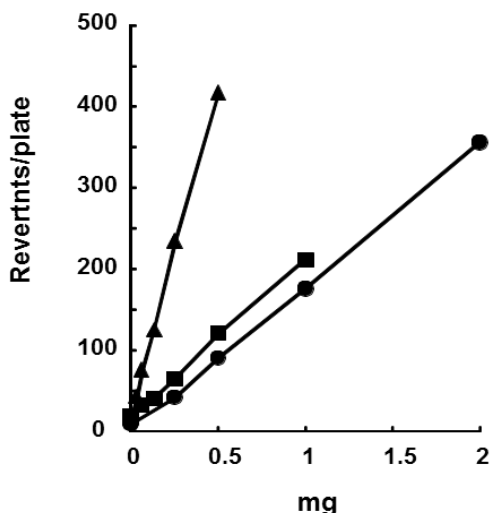


図5 様々な条件でNMPを処理した反応液から得られた抽出物のサルモネラTA1535 に対する変異原性発現

- : Fe^{2+} - Cu^{2+} - H_2O_2 -NO
- : Fe^{2+} - Cu^{2+} - H_2O_2
- : Fe^{2+} - Cu^{2+} -NO

いずれの条件においてもNMPは活性化し、サルモネラTA1535 に対して変異原性を発現した。その活性は、フェントン試薬にNOを添

加した修飾フェントン系で最も高く、さらに H_2O_2 が存在しなくてもNOが存在することで活性化することが分かった。NO添加あるいは無添加による変異原活性の変化の傾向は、NMBの場合と同じであった。

そこで、NMPを一酸化窒素の存在下において修飾フェントン試薬で処理し、有機溶媒で抽出して得られた粗抽出物について、カラムクロマトグラフィーで分画した後に変異原性試験を繰り返すことで、最も高い変異原活性をもつ分画を得ることができた。その分画の機器データを測定して構造決定を試みた。構造を同定するには至らなかったものの、生成した変異原が変異原 X と同様に環構造を有することが分かった。

(2) 推定活性体を2-ニトロプロペンとニトロイミン類による付加環化により、別途合成を試みたが目的物は得られなかつた。いずれも変異原が不安定であることが原因である。推定活性中間体の合成では、ニトロイミンに長鎖アルキル基や芳香環を導入することで、合成しやすい化合物とし検討する必要があることが分かった。

(3) 変異原 X の変異原性発現に至る経路の解明では、種々のピラゾリン骨格を有する化合物を合成して(図6)、変異原性を試験し、活性発現に必要な部分構造を明らかにした。

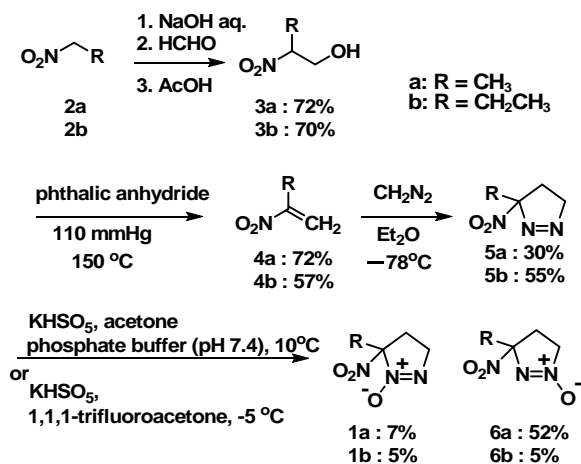


図6 ピラゾリン類の合成

出発原料に1-ニトロプロパン(2b)を用いて、塩基性条件下でホルムアルデヒドと反応させて2-ニトロ-1-ブタノール(3b)を合成した。次いで、無水フタル酸を用いた脱水反応により2-ニトロ-1-ブテン(4b)を得た。ジアゾメタンを発生させ、4bとの環化反応により3-エチル-3-ニトロ-1-ピラゾリン(5b)を合成した。続いて選択的な位置にN-オキシド化する方法を検討した。ペルオキシ硫酸-カリウム(KHSO_5 ; オキシソ)を用いて、アセトンを加えてN-オキシド化すると変異原 Z(1b)とN-オキシド化された位置が異なるZ異性体(6b)が99:1で生成し、1,1,1-トリフ

ルオロアセトンを加えて -5 で *N*-オキシド化すると **1b** と **6b** が 15 : 85 の割合で得られた。出発原料に 1-ニトロエタンを用いて同様の方法で合成し、**1a** および **6a** を得た。

ピラゾリン 1-オキシド **1a** と **1b** は、構造をすでに明らかにしているが、ピラゾリン **5a**, **5b** およびピラゾリン 2-オキシド **6a**, **6b** は、本研究において新規化合物として合成した。これら新規化合物の構造は ¹H NMR, ¹³C NMR および高分解能質量分析などの機器データから確認した。特に変異原 X (**1a**) の位置異性体である **6a** については、X 線結晶構造解析により構造を決定した。

(4) 上記 (3) で合成したピラゾリン類について、サルモネラ TA1535 に対する変異原性を試験した。(表 1)

表 1 合成したピラゾリン類の変異原性発現

Compounds	Revertants/μmol
1a	110000
1b	4300
6b	1900
6a	370
5b	19

5 つのピラゾリン化合物のうち、*N*-オキシド化されていない **5b** は最も活性が低かったことから、ピラゾリン骨格自身は変異原性発現に関与せず、環内窒素がオキシド化されていることが重要であることが分かった。また、変異原 (**1a**, **1b**) の変異原性は、*N*-オキシドの位置が異なる異性体よりも高かったことから、ピラゾリン環の二つの窒素原子のうちニトロ基近傍の窒素原子の酸化が変異原性発現機構に重要であることがわかった。

生体内でフェントン反応は常に起こっており、さらに炎症部位のマクロファージからは一酸化窒素が生成している。つまり、修飾フェントン試薬による酸化条件は生体内で十分に起こりうる反応である。この条件に、*N*-ニトロソジアルキルアミンが加わることで、非常に強い変異原を生成する可能性を示した。その変異原は、これまでに知られていた -水酸化体ではなく、環構造をもつ新たな活性化体であることを明らかにした。

本研究で単離した変異原 X と変異原 Z がどのように DNA を攻撃して、変異原性を発現するかは興味深く、化学的反応性の研究も今後の重要な課題である。

本研究において、*N*-ニトロソ化合物の活性化にはシトクロム P450 だけではなく、活性酸素種も関与することを明らかにした。以上より、抗酸化性化合物が *N*-ニトロソ化合物の変異原性を抑制する可能性もあり、抗酸化性化合物ががん予防に導く可能性を示した。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 9 件)

J. Tatsuzaki, Y. Jinwei, Y. Kojo, Y. Mine, S. Ishikawa, M. Mochizuki, K. Inami, Antimutagenicity screening of extracts from medicinal and edible plants against *N*-methyl-*N*-nitroso-urea by the Ames assay, *Genes and Environ.*, 査読有, Accepted. (2014).

K. Inami, M. Takada, K. Itoh, S. Ishikawa, M. Mochizuki, Assessment of the antimutagenic effects of aqueous extracts from herbal medicines against *N*-nitroso-*N*-alkyl-ureas induced mutagenicity using the *umu* test, *Genes and Environ.*, Accepted. 査読有, 2014.

DOI: org/10.3123/jemsge.2014.003

K. Inami, S. Kondo, Y. Ono, C. Saso, M. Mochizuki, Transnitrosation of alicyclic *N*-nitrosamines containing a sulfur atom, 査読有, *Bioorg. Med. Chem.*, 21, 7853-7857 (2013).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.10.008

K. Inami, H. Yasui, H. Tsugumi, S. Ishikawa, M. Mochizuki, Oxidation of *N*-alkyl-*N*-(3-carboxypropyl)nitrosamines by iron porphyrin and oxidant forms alkylating mutagens, *Genes and Environ.*, 査読有, 35(4), 99-104, (2013).

DOI: org/10.3123/jemsge.2013.010

K. Inami, K. Yoshimitsu, H. Seino, M. Mochizuki, Ruthenium porphyrin and oxidant convert *N*-nitrosodialkylamines into direct-acting mutagen in the Ames assay, *Toxicol. Res.*, 査読有, 2 (6), 397-402 (2013).

DOI: 10.1039/C3TX50036E

K. Inami, I. Nakanishi, M. Morita, M. Furukawa, K. Ohkubo, S. Fukuzumi, M. Mochizuki, The high stability of intermediate radicals enhances the radical-scavenging activity of aminochromanols, *RSC Advances*, 査読有, 2 (33), 12714-12717 (2012).

DOI: 10.1039/C2RA21928J

K. Inami, Y. Iizuka, M. Furukawa, I. Nakanishi, K. Ohkubo, K. Fukuhara, S. Fukuzumi, M. Mochizuki, Chlorine atom substitution influences radical scavenging activity of 6-chromanol, *Bioorg. Med. Chem.* 査読有, 20, 4049-4055 (2012).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.008

K. Inami, M. Miura, N. Tsutsumi, E. Okochi, Y. Susaki, S. Ishikawa, S. Motohashi, J. Shiino, K. Takeda, M.

Mochizuki, Structure and mutagenicity of a direct-acting mutagen derived from the reaction of *N*-nitroso-*N*-methylbutylamine with hydroxyl radical, *Heterocycles*, 査読有, 84 (2), 1081-1088 (2012).

DOI: 10.3987/COM-11-S(P)90

M. Miura, K. Inami, M. Yoshida, K. Yamaguchi, T. Mashino, M. Mochizuki, Isolation and structural identification of a direct-acting mutagen derived from *N*-nitroso-*N*-methylpentylamine and Fenton's reagent with copper ion, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 19, 5693-5697 (2011).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.07.012>

〔学会発表〕(計 15 件)

中山 優, 稲見 圭子, 望月 正隆, 還元系シトクロム P450 化学モデルによる *N*-nitrosamine の代謝類似酸化分解機構, 日本環境変異原学会 第 42 回大会, 岡山, 11 月 29 日 ~ 11 月 30 日, 2013.

佐宗 千春, 稲見 圭子, 望月 正隆, チオール基あるいはチオアミド基をもつ新規含硫 *N*-ニトロソ化合物の合成と活性評価, 日本環境変異原学会 第 42 回大会, 岡山, 11 月 29 日 ~ 11 月 30 日, 2013.

稲見 圭子, 望月 正隆, 膀胱発がん性 *N*-butyl-*N*-(3-carboxypropyl)nitrosamine による DNA 損傷の検出, 第 72 回 日本癌学会総会, 横浜, 10 月 3 日 ~ 10 月 5 日, 2013.

吉田 昌史, 稲見 圭子, 望月 正隆, *N*-ニトロソジアルキルアミンと活性酸素種から生成する直接変異原の構造, 日本薬学会第 133 年会 横浜, 3 月 27 日 ~ 3 月 30 日, 2013.

中山 優, 稲見 圭子, 望月 正隆, シトクロム P450 化学モデルによる *N*-ニトロソジアルキルアミンの脱ニトロソ化反応の検討, 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 3 月 27 日 ~ 3 月 30 日, 2013.

浅田 卓也, 稲見 圭子, 望月 正隆, 活性酸素種による *N*-ニトロソモルホリンの活性化, 日本薬学会第 133 年会 横浜, 3 月 27 日 ~ 3 月 30 日, 2013.

安居 洗貴, 稲見 圭子, 望月 正隆, 膀胱発がん性 3-carboxypropylnitrosamine 類の DNA 相互作用機構の解明, 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 3 月 27 日 ~ 3 月 30 日, 2013.

安居 洗貴, 稲見 圭子, 望月 正隆, 選択的膀胱発がん性 *N*-ニトロソ化合物の活性化機構, 日本環境変異原学会 第 41 回大会, 静岡, 11 月 29 日 ~ 11 月 30 日, 2012.

吉田 昌史, 稲見 圭子, 望月 正隆, 活性酸素種による *N*-ニトロソジアルキル

ミンの変異原性発現機構, 日本環境変異原学会 第 41 回大会, 静岡, 2012. 11 月 29 日 ~ 30 日, 2012.

浅田 卓也, 稲見 圭子, 望月 正隆, 活性酸素種による環状 *N*-ニトロソ化合物の活性化, 日本環境変異原学会 第 41 回大会, 静岡, 11 月 29 日 ~ 30 日, 2012.

中山 優, 稲見 圭子, 望月 正隆, 還元系シトクロム P450 化学モデル系による *N*-ニトロソジアルキルアミンの脱ニトロソ化, 日本環境変異原学会 第 41 回大会, 静岡, 11 月 29 日 ~ 11 月 30 日, 2012.

吉田 昌史, 稲見 圭子, 望月 正隆, 活性酸素種による *N*-ニトロソジアルキルアミンの新規活性化機構, 第 71 回 日本癌学会総会, 札幌, 9 月 19 日 ~ 9 月 21 日, 2012.

松居 久美子, 三浦 基文, 鳥山 正晴, 本橋 重康, 吉田 昌史, 稲見 圭子, 望月 正隆, 1-ピラゾリンに対する位置選択的 *N*-オキシド化の検討, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 3 月 28 日 ~ 3 月 31 日, 2012.

情野 秀晃, 稲見 圭子, 望月 正隆, ルテニウムポルフィリン・酸化剤のシトクロム P450 化学モデルによる *N*-ニトロソ化合物の変異原性発現機構, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 3 月 28 日 ~ 3 月 31 日, 2012.

小野 裕太, 稲見 圭子, 望月 正隆, アルキルチオアミド基を導入した五員環含硫 *N*-ニトロソ化合物の合成とニトロソ基移動能, 日本薬学会第 132 年会, 札幌, 3 月 28 日 ~ 3 月 31 日, 2012.

〔図書〕(計 2 件)

望月 正隆, 稲見 圭子, 「有機化学の基礎」, 東京化学同人, 東京, 2013.

稲見 圭子, 望月 正隆, 青木 伸 編「ベーシック薬学教科書シリーズ 無機化学」, 化学同人, 京都, 25-38 (2011).

〔その他〕

東京理科大学ホームページ
<http://www.tus.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

望月 正隆 (MOCHIZUKI Masataka)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号: 10072414

(2) 研究分担者

稲見 圭子 (INAMI Keiko)
東京理科大学・薬学部・講師
研究者番号: 00271247