

Title	アミノ酸加熱変異原, Trp-P-2の代謝的活性化機構の研究
Author(s)	山添, 康
Citation	大阪大学, 1981, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33006
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	山 添 康
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 5 4 5 2 号
学位授与の日付	昭 和 56 年 10 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	アミノ酸加熱変異原, Trp-P-2 の代謝的活性化機構の研究
論文審査委員	(主査) 教 授 岩田平太郎
	(副査) 教 授 近藤 雅臣 教 授 青沼 繁 教 授 北川 勲

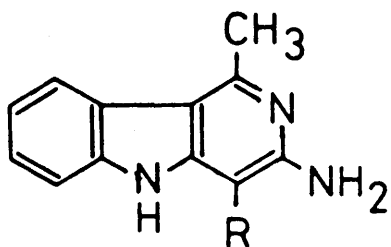
論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

ヒト癌の原因のうち少なくともその50%以上は、我々が経口、その他の経路で体内に取り込む化学物質に由来するとされている。現在、発癌にはイニシエーションとプロモーションの2段階が必要とされており、環境中にはいずれかの段階あるいは両段階に関与する物質が多数存在していると考えられている¹⁾。癌原性物質および変異原性物質の中にはそのままの形で活性なものもあるが、多くは化学的、生物学的にも不活性な形で存在し、生体内で酵素的に代謝活性化されたのち、生成した活性代謝物が有害な作用を示すとされている^{2,3,4)}。

Sugimura⁵⁾ およびKosuge⁶⁾ らはサルモネラ変異原性試験において、肝9,000g上清の共存下、ベンゾ (a) ピレンの数百倍 (等モル比) という強い変異原性を示す物質をトリプトファン加熱生成物より単離し、その構造が3-アミノ-1-メチル-5H-ピリド [4,3-b] インドール (Trp-P-2) および3-アミノ-1,4-ジメチル-5H-ピリド [4,3-b] インドール (Trp-P-1) であることを明らかにした。現在、これら物質は魚の焦げからも単離されており⁷⁾ 最近、ハムスターやマウスに肝腫瘍を形成することも明らかにされている^{8,9)}。

Trp-P-2のような、日常我々が摂取する食品に含まれる加熱変異原性物質がどのようにヒトの発癌に寄与しているかを明らかにすることは非常に重要であり、これらの解明にはTrp-P-2のような物質が生体内でどのような機構によって、どのような代謝を受けるかを知ることが必要である。そこで癌原性が明らかにされたTrp-P-2の代謝的活性化機構の解明を目的として以下の研究を行なった。さらにTrp-P-2の毒性学的意義についても検討を加えた。



Trp-P-1 R: CH₃

Trp-P-2 R: H

Structures of Trp-P-1 and Trp-P-2.

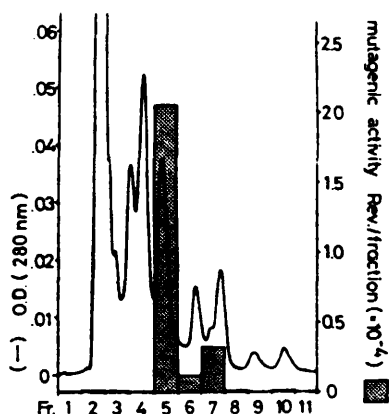
本 論

第1章 Trp-P-2の活性化酵素系および代謝生成物に関する基礎的検討

Trp-P-2の変異原性を発現させるラット肝9000g 上清の活性化酵素および代謝物に関する基礎的検討を行なった。その結果、Trp-P-2から変異原への活性化は用いる肝9000g 上清の量によって大きく影響されるが、Trp-P-2を活性化する酵素の大部分はマイクロゾーム画分に存在することが明らかとなった。一方、Trp-P-2はマイクロゾーム酵素系によって少なくとも4種の代謝物に変換されることがTLCおよびHPLCによって明らかとなった。

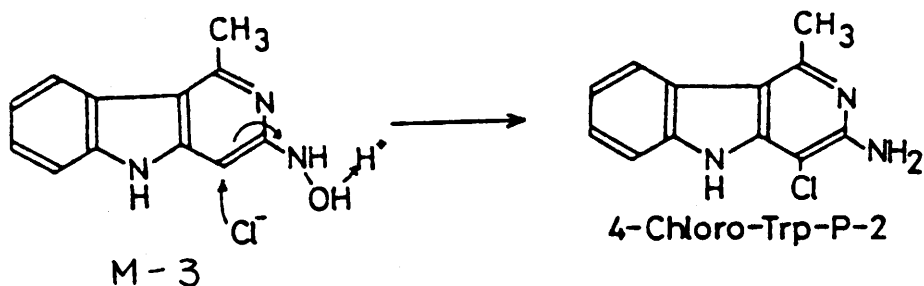
第2章 Trp-P-2の活性代謝物の単離と構造

Trp-P-2は肝マイクロゾームの共存下で初めてその変異原性を示すことから、肝マイクロゾームによって生成する4種の代謝物のいずれかがTrp-P-2の変異原性に関与するものと考えられた。そこで代謝物の生成と復帰変異コロニー数の増加の関係を調べたところ、M-3が活性代謝物である可能性が示唆された。実際、HPLCによって分離したM-3を含む画分は、肝マイクロゾームの非存在下で変異原性を示し、その活性はTrp-P-2の変異原性をほぼ説明した。また芳香族N-ヒドロキシルアミンをニトロソ体で酸化するのに用いられるフェリシアン化カリやr-二酸化マンガンによってM-3はM-4に酸化され、M-3やM-4は共に三塩化チタンによってTrp-P-2に還元された。



Elution profiles of the metabolites and mutagenicities of the eluate

主代謝物であるM-3のジメチルイソプロピルシリル (DMiPS) 体のマススペクトルでは、Trp-P-2-DMiPS 体よりも16amu多いm/e313に分子イオンピークが認められた。さらにこのマススペクトルでは、m/e298およびm/e270の脱メチル (M-15) および脱イソプロピル (M-43) に基づくフラグメントイオン以外に、m/e297 およびm/e254に分子イオンおよびm/e270から16amuが脱離したと考えられるイオンが認められた。このフラグメントイオンはトリメチル化 (TMS化) したフェニルヒドロキシルアミンのマススペクトルにも認められ、D₀-TMS-BSAを用いた実験から、この16amuの脱離は脱酸素原子ではなく、メチルラジカルと水素ラジカルから生成したメタンの脱離によるものであることが明らか



A possible formation mechanism of
4-chloro-Trp-P-2.

となった。さらにこのフラグメントの生成機構より、M-3はその窒素原子上に水素原子を有するN-モノ置換ヒドロキシルアミンであること、つまりM-3は3-ヒドロキシアミノ-1-メチル-5H-ピリド [4,3-b] インドールであることが明らかとなった。またM-3を塩酸処理するとクロル化物を与え、この物質はマススペクトルにおいてm/e233と231に分子イオンクラスターを与え、FT-NMRの結果から、その構造が4-クロロ-Trp-P-2であることが明らかとなった。4-クロロ-Trp-P-2はN-ヒドロキシ体から分子内転位を伴って生成するものと考えられ、この結果からも活性化代謝物、M-3が3-ヒドロキシアミノ体であることが支持された。

第3章 Trp-P-2活性化酵素の同定

肝の小胞体つまり肝ミクロゾームにあって内因性物質のみならず種々の体外異物の代謝に関与する酵素としてはチトクロームP-450, NADPH依存性アミン酸化酵素, エポキシド水解酵素やDT-ジアホラーゼなどが知られている。これら酵素は、動物に薬物を投与することによって、酵素量や活性が増加するものとしめないものがあり、投与薬物の種類によって増加する酵素の量や性質に違いを生ずることも知られている。そこでラットにフェノバルビタール, 3-メチルコラントレンおよびPCBを前処理して得られる肝ミクロゾームのTrp-P-2活性化能を比較した。その結果, Trp-P-2から変異原への活性化(変異原活性化)およびN-水酸化活性は共にPCBあるいは3-メチルコラントレンの前処理によって著しく増加した。しかしながらフェノバルビタールの前処理は両活性にほとんど影響を与えなかった。これらの結果は肝ミクロゾームのチトクロームP-450 (P-448)のTrp-P-2代謝活性化への関与を示唆したが、チトクロームP-450依存性の反応は幾つかの試薬の添加によって阻害されることが知られている。そこで数種の阻害剤による効果を比較したところ, Trp-P-2のN-水酸化は一酸化炭素やP-448型チトクロームP-450の選択的阻害剤として知られている7,8-ベンゾフラボン(α -ナフトフラボン)の添加によって強く阻害された。一方P-450型チトクロームP-450の選択的阻害剤であるメチラポンやSKF525-Aの添加によっては微かしか影響されなかった。

Nebert¹⁰⁾ はマウス肝およびその他組織に含まれるP-448型チトクロームP-450 (P₁-450) とそれに伴う芳香族炭化水素水酸化酵素 (Aryl hydrocarbon hydroxylase) 活性の芳香族炭化水素 (PAH) による誘導に遺伝的差異のあることを明らかにしている。そこでPAHに応答性のC57BL/6N

(B6) および非応答性のDBA/2N (D2) マウスを用いて Trp-P-2の活性化を検討した。その結果、コントロールとしてコーン油のみを投与した B 6 および D 2 マウスの肝から調整したマイクロゾームによる Trp-P-2の変異原活性化およびN-水酸化には両系統間で差は認められなかったが、3-メチルコラントレン前処置によって、B 6 マウス肝マイクロゾームのTrp-P-2の活性化能は著しく増加し、N-水酸化活性は対照群の約14倍を示したのに対し、D 2 マウス肝マイクロゾームの活性化能は同処置によってほとんど変化しなかった。又このTrp-P-2の活性化に見られるマウス系統間の差はベンゾピレン水酸化 (AHH) 活性の系統差とよく一致した。

以上の実験結果から、Trp-P-2は肝マイクロゾームのチトクロームP-450によって活性化されることが強く示唆されたので、次に肝マイクロゾームより可溶化、精製したチトクロームP-450、NADPH-チトクロームP-450還元酵素およびリン脂質を用いてTrp-P-2の活性化反応を再構成し、直接的にチトクロームP-450の関与の証明を試みた。その結果、Trp-P-2の変異原活性化にはチトクロームP-450およびNADPH-チトクロームP-450還元酵素が必須であった。また使用するチトクロームP-450標品の種類によって、Trp-P-2の変異原活性化およびN-水酸化に大きな違いが認められ、PCBや3-メチルコラントレン処置ラットの肝マイクロゾームより精製されたMCP-448およびPCB P-448各標品の活性化能は高かったが、PCBおよびフェノバルビタール処置ラットより精製されたPCB P-450およびPC-P-450の活性はいずれもMCP-448の5%以下であった。

**Mutagenic Activation and N-Hydroxylation of
Trp-P-2 by Various Forms of Purified
Cytochrome P-450**

Preparation	Mutagenicity	N-Hydroxy-Trp-P-2 formation
	Rev./pmol P-450/10 min	pmol/pmol P-450/10 min
PB P-450	10	< 0.18
MC P-448	1172	9.60
PCB P-450	60	0.57
PCB P-448	1029	7.94

PB P-450: P-450 form purified from liver microsomes of phenobarbital-treated rats
 MC P-448: P-448 form purified from liver microsomes of 3-methylcholanthrene treated rats
 PCB P-450: P-450 form purified from liver microsomes of PCB-treated rats
 PCB P-448: P-448 form purified from liver microsomes of PCB-treated rats

第4章 Trp-P-2の毒性学的研究

前章までの実験結果から、Trp-P-2が食品の焦げの一部として生体に取り込まれた場合、ラットと

同様にヒト体内でも活性化されDNAやその他の生体高分子との反応が起こることが予想される。しかしながら癌原性物質の種類によってはその活性化に著しい動物種差のあることが知られている。そこで5種の実験動物を用いて Trp-P-2の活性化を比較した。その結果、マウス、ラット、ハムスター、モルモットおよびウサギから得た肝マイクロゾームはいずれも Trp-P-2を変異原へと活性化したが、その活性には動物間で大きな差が認められ、N-水酸化活性はハムスターが最も高く、モルモット、マウス、ウサギ、ラットの順に減少した。これら肝マイクロゾームの活性は動物をPCBで処置することによっていずれも誘導されたが、なかでもラット肝マイクロゾームの Trp-P-2 N-水酸化活性は無処置時の257倍にまで増加した。これら実験動物肝マイクロゾームのN-水酸化活性は変異原活性化能と良い対応を示し、これら実験動物体内における Trp-P-2活性化がいずれもN-水酸化反応を経由して起こることが示唆された。

またウサギ肝マイクロゾームの Trp-P-2 N-水酸化活性はAHH活性と異なりPCB処置によって強く誘導された。この結果から従来から知られている高いAHH活性を示す低スピン型チトクロームP-450 (P-448)とは異なる、高スピン型チトクロームP-448によっても Trp-P-2が活性化されることが示唆され、実際精製チトクロームP-450 (P-448)系を用いて高スピン型チトクロームP-450 (P-448)の関与を証明した。

臓器特異性に関しては、ラットの肝、腎、肺、小腸および胃から調整したマイクロゾームはいずれも Trp-P-2から変異原 (N-水酸化体) への反応を触媒したが、肝以外の活性は低く、殊に胃の活性は肝の1/30程度であった。しかしながらPCBや3-メチルコラントレンのみならず、キャベツ等の野菜に含まれていることが知られているインドール3-カルビノールや脂溶性色素であるスダンⅢによっても肝、腎の活性は誘導され、食品と共に体内に取り込まれる物質の種類によっては肝、その他の臓器で Trp-P-2の活性化を触媒する酵素が誘導される可能性が示された。さらにAmes試験においてヒトの肝マイクロゾームは Trp-P-2を変異原へ活性化しうることが明らかとなった。

総括

トリプトファンの焦げが示す変異原性の本体として単離された、Trp-P-2は肝マイクロゾームのチトクロームP-450、殊にP-448型のチトクロームP-450によってアミノ基が水酸化され、N-ヒドロキシ-Trp-P-2に変換されたのち、その変異原性を発揮することが明らかとなった。またこのような代謝的活性化の反応は実験動物のみならずヒトにおいても起こることが示唆された。

論文の審査結果の要旨

本論文はトリプトファンの焦げが示す変異原性の本体である Trp-P-2は肝マイクロゾームのP-448型チトクロームP-450によりアミノ基が水酸化されN-ヒドロキシ-Trp-P-2に変化したのち変異原性を発揮することを明らかにしたもので薬学博士の称号を与えるにふさわしいものである。