



Title	哺乳動物精子及び酸触媒による非酸化的N-アリルアシルヒドロキサム酸生成機構
Author(s)	吉岡, 忠夫
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬学)
Dissertation Number	乙第4140号
Issue Date	1992-09-30
DOI	https://doi.org/10.11501/3090810
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/49823
Type	doctoral thesis
File Information	000000255481.pdf



哺乳動物精子及び酸触媒による
非酸化的N-アシルアシルヒドロ
キサム酸生成機構

北大印刷 内 2084

吉岡 忠夫

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

吉岡忠夫

目次

略語表	1
カタカナ名 - 英名対比表	2
序論	5
第1章 哺乳動物精子における芳香族ニトロソ化合物からの N-アリルアセトヒドロキサム酸生成	
1.1 緒論	11
1.2 結果	
1.2.1 種々の窒素官能基を有するベンゼン誘導体の 豚精子による代謝	12
1.2.2 N-OH-AA生成活性に対する添加基質の効果	13
1.2.3 NOBとピルビン酸からのN-OH-AA生成	14
1.2.4 Mg ²⁺ 、チアミン、TPP、及びTTPP添加の影響	15
1.2.5 ³¹ P-NMRによるTPPの豚精子膜透過立証実験	15
1.2.6 [3- ¹³ C]標識ピルビン酸の取り込み実験	17
1.2.7 酵素反応動力学定数の測定	19
1.2.8 豚精子頭部、中片部及び尾部のN-OH-AA生成活性	21
1.2.9 哺乳類動物精子のN-OH-AA生成活性における種差	21
1.3 考察	22
1.4 要約	25
第2章 哺乳動物心筋ミトコンドリア及び単離豚心筋PDHCによる N-アリルアセトヒドロキサム酸生成	
2.1 緒論	26
2.2 結果	
2.2.1 哺乳動物心筋ミトコンドリアによる N-アリルアセトヒドロキサム酸生成	27
2.2.2 単離豚心筋PDHCによるN-OH-AA生成	29
2.2.3 N-OH-AA生成に関与するPDHC構成酵素の同定	31
2.2.4 E1酵素によるN-OH-AA生成	34
2.2.5 PDHCによるNOBと α -オキソ酸からの N-フェニルアシルヒドロキサム酸生成	35
2.2.6 芳香環置換基の影響	38
2.3 考察	40
2.4 要約	46

第3章 酸触媒による芳香族ニトロソ化合物と α -オキソ酸からの
N-アリルアシルヒドロキサム酸生成

3.1 緒論	47
3.2 結果	
3.2.1 反応条件の検討	48
3.2.1(1) 反応速度定数に対するpHの影響	48
3.2.1(2) 活性化エネルギー	49
3.2.1(3) 反応溶媒の検討(合成法としての展開)	50
3.2.2 N-アリルアシルヒドロキサム酸生成に対する置換基効果	50
3.2.2(1) 芳香族ニトロソ化合物の環置換基の影響	50
3.2.2(2) α -オキソ酸のR基の影響	53
3.2.2(3) N-フェニルアシルヒドロキサム酸の加水分解に基づく アゾキシ体の副成	54
3.2.2(4) NOBとアセトアルデヒドからのN-OH-AA生成	55
3.3 考察	56
3.4 要約	58

第4章 ニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体からの豚精子
並びに酸触媒によるN-アセトヒドロキサム酸体生成

4.1 緒論	59
4.2 結果	
4.2.1 豚精子による酵素的N-アセトヒドロキサム酸体生成	60
4.2.2 酸触媒による非酵素的N-アセトヒドロキサム酸体生成	62
4.3 考察	64
4.4 要約	70

結語	71
----	----

実験の部

各章共通の実験	73
第1章に関する実験	74
第2章に関する実験	79
第3章に関する実験	86
第4章に関する実験	90

謝辞	93
----	----

文献	94
----	----

略語表

DCPIP	sodium 2,6-dichlorophenolindophenolate
E.coli	Escherichia coli
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol bis(β -aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid
GSH	reduced glutathione
HPLC	high performance liquid chromatography
MO	4-(2,4,6-trichlorophenoxy)nitrobenzene
MO-NO	4-(2,4,6-trichlorophenoxy)nitrosobenzene
MS	mass spectrometry or spectrum
N-OH-AA	N-hydroxyacetanilide, N-phenylacetohydroxamic acid
N-OH-BAA	N-hydroxy-N-4-biphenylacetamide, N-(4-biphenyl)acetohydroxamic acid
N-OH-FAA	N-hydroxy-N-2-fluorenylacetamide, N-(2-fluorenyl)acetohydroxamic acid
NEM	N-ethylmaleimide
NIP	4-(2,4-dichlorophenoxy)nitrobenzene, nitroph(en)
NIP-NO	4-(2,4-dichlorophenoxy)nitrosobenzene
NMR	nuclear magnetic resonance
NOB	nitrosobenzene
NOBP	4-nitrosobiphenyl
NOF	2-nitrosofluorene
P-NO	4-(phenoxy)nitrosobenzene
PDHC	pyruvate dehydrogenase complex
TPP	thiamine pyrophosphate
TTPP	thiamine thiazolone pyrophosphate
X52	2-methoxy-4-(2,4-dichlorophenoxy)nitrobenzene
X52-NO	2-methoxy-4-(2,4-dichlorophenoxy)nitrosobenzene

カタカナ名-英名対比表

アジ化ナトリウム	sodium azide
2-アシルチアゾリウム	2-acylthiazolium
N-アシルヒドロキサム酸	N-acylhydroxamic acid
アセチルジヒドロリポイル残基	acetyl dihydrolipoyl residue
アセチルジヒドロリポアミド	acetyl dihydrolipoamide
N-アセチル- <i>p</i> -ベンゾキノイミン	N-acetyl- <i>p</i> -benzoquinonimine
アセチルCoA	acetyl CoA
2-アセチル-TPP	2-acetyl TPP
アセトアニリド	acetanilide
アセトアミノフェン	acetaminophen
アセトアルデヒド	acetaldehyde
N-アセトキシ-2-クロロアニリン	N-acetoxy-2-chloroaniline
アセトヒドロキサム酸体	acetohydroxamic acid derivative
アゾキシベンゼン	azoxybenzene
アニリン	aniline
N-アリルヒドロキサム酸体	N-arylhydroxamic acid derivative
N-アリルヒドロキシルアミン	N-arylhydroxylamine
アリルピルビン酸	arylpyruvic acid
イソプロピルエーテル	iso-propyl ether
イミダゾール	imidazole
N-エチルマレイミド	N-ethylmaleimide
エーテル	diethyl ether
4-エトキシニトロソベンゼン	4-ethoxynitrosobenzene
オキサジリジン	oxaziridine
α -オキシソイソカプロン酸	α -oxo-iso-caproic acid
α -オキシソイソペンタン酸	α -oxo-iso-pentanoic acid
キナーゼ	kinase
グリオキシル酸	glyoxylic acid
グリセリン	glycerol
グリセルアルデヒド	D-glyceraldehyde
グリセルフォスフォコリン	D-glycero-3-phosphocholine
グルコース	D-glucose
3-クロロ-4-アミノフェノール	3-chloro-4-aminophenol
(2-, 3- 及び 4-)クロロニトロベンゼン	(2-, 3- or 4-)nitrobenzene
N-(2-クロロフェニル)ヒドロキサム酸体	N-(2-chlorophenyl)hydroxamic acid derivative
N-(2-クロロフェニル)ヒドロキシルアミン	N-(2-chlorophenyl)hydroxylamine
2-クロロ-4-アセトキシアセトアニリド	2-chloro-4-acetoxyacetanilide

2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム	2,6-dichlorophenolindophenol sodium
2-クロロニトロソベンゼン	2-chloronitrosobenzene
α -ケトグルタール酸脱水素酵素	α -keto glutarate dehydrogenase
ジヒドロキシアセトン	dihydroxyacetone
(±)ジヒドロリポアミド	(±)dihydrolipoamide
ジヒドロリポイルアセチル転移酵素	dihydrolipoylacetyl transferase
ジヒドロリポイル脱水素酵素	dihydrolipoyldehydrogenase
4-ジメチルアミノニトロソベンゼン	4-dimethylaminonitrosobenzene
チアミン	thiamine
チアミンチアゾロンピロリン酸	thiamine thiazolone pyrophosphate
チアミンピロリン酸	thiamine pyrophosphate
ツバサイジン-5'-モノリン酸	Tubercidin-5'-monophosphate
デスフェラルメシレート	desferal mesylate
テトラメチルシラン	tetramethylsilane
4-ニトロソビフェニル	4-nitrosobiphenyl
2-ニトロソフルオレン	2-nitrosofluorene
ニトロジフェニルエーテル	nitrodiphenyl ether
ニトロベンゼン	nitrobenzene
ヒスチジン	histidine
ビス(2-メトキシエチル)エーテル	bis(2-methoxyethyl)ether
N-ヒドロキシルアミノ体	N-hydroxylamino derivative
ビフェニル	biphenyl
4,4'-ビフェニルアゾキシベンゼン	4,4'-biphenylazoxybenzene
N-(4-ビフェニルイル)アセトヒドロキサム酸	N-(4-biphenyl)acetohydroxamic acid
ピリドキサール-5'-モノリン酸	pyridoxal-5'-monophosphate
ピルビン酸	pyruvic acid
ピルビン酸エチル	ethyl pyruvate
ピルビン酸エチルエステル	pyruvate ethyl ester
ピルビン酸脱水素酵素	pyruvate dehydrogenase
2-(1-ヒドロキシアルキリデン)-TTP	2-(1-hydroxyalkylidene)-TTP
2-(1-ヒドロキシエチリデン)-TTP	2-(1-hydroxyethylidene)-TTP
2-(1-ヒドロキシエチル)-TTP	2-(1-hydroxyethyl)-TTP
[3- ¹³ C]標識ピルビン酸ナトリウム	[3- ¹³ C] labeled sodium pyruvate
N-フェニルアシルヒドロキサム酸	N-phenylacylhydroxamic acid
N-フェニルアセトヒドロキサム酸	N-phenylacetohydroxamic acid
N-フェニルヒドロキサム酸体	N-phenylhydroxamic acid derivative
N-フェニルベンゾイルヒドロキサム酸	N-phenylbenzohydroxamic acid
N-フェニルヒドロキシルアミン	N-phenylhydroxylamine

N-フェニルホルミルヒドロキサム酸	N-phenylformylhydroxamic acid
フォスフォアセチル転移酵素	phosphoacetyltransferase
フォスファターゼ	phosphatase
フォスフォエノールピルビン酸	phosphoenolpyruvate
フェリシアン化カリウム	potassium ferricyanide
フルクトース	D-fructose
フルオレン	fluorene
プロテック溶媒	protic solvent
フロリジルカラム	florisil column
ヘキサメチルフォスフォラミド	hexamethylphosphoramide
ベンゾイルギ酸	benzoyl formic acid, phenylglyoxylic acid
ポリ塩素化ビフェニル	polychlorobiphenyl
N-ホルミルヒドロキサム酸体	N-formylhydroxamic acid derivative
(±)-β-メチル-α-オキソペンタン酸ナトリウム	(±)-β-methyl-α-oxopentanoic acid
4-メチルニトロソベンゼン	4-methylnitrosobenzene
メルカプトエタノール	2-mercaptoethanol
(±)-モノ-S-アセチルジヒドロリポアミド	mono-S-acetyldihydrolipoamide
モノオキシゲナーゼ	monooxygenase
モノリン酸エステル	monophosphate ester
モリブデンオキシド化合物	molybdenum oxide compound
2-(N-モルフォリノ)プロパンスルホン酸	2-(N-morpholino)propanesulfonic acid
2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
リポアミド	lipoamide

序 論

異物の毒性発現には殆どの場合、生体内因子(酵素及び低分子量有機化合物等)が関与する代謝活性化が必要とされている。この代謝活性化系に関する多くの知見^{1, 2)}が異物代謝の主要臓器である肝臓において得られている。一方で、このような異物の代謝活性化及び毒性発現部位は必ずしも肝臓等の異物代謝の主要部位に限定されていないことも知られている。従って、生体を構成する全細胞は多少とも異物代謝能を有し、その代謝物による障害を受ける潜在的な危険性を伴っている。現在までの異物代謝研究は体細胞(2n体)を中心に行われており、生殖細胞(n体)においては殆どなされていない。異物の標的部位が生殖細胞である場合には、異物の毒性は遺伝毒性にも関連することになる。生殖細胞の形成から受精、出生、生育そして次世代への継承(Fig. 1)及び個体死というヒトを含む動物の一生の様々な段階に対する異物の影響において、これら細胞が担う遺伝的役割を考慮すれば、その異物代謝研究の重要性は明かである。

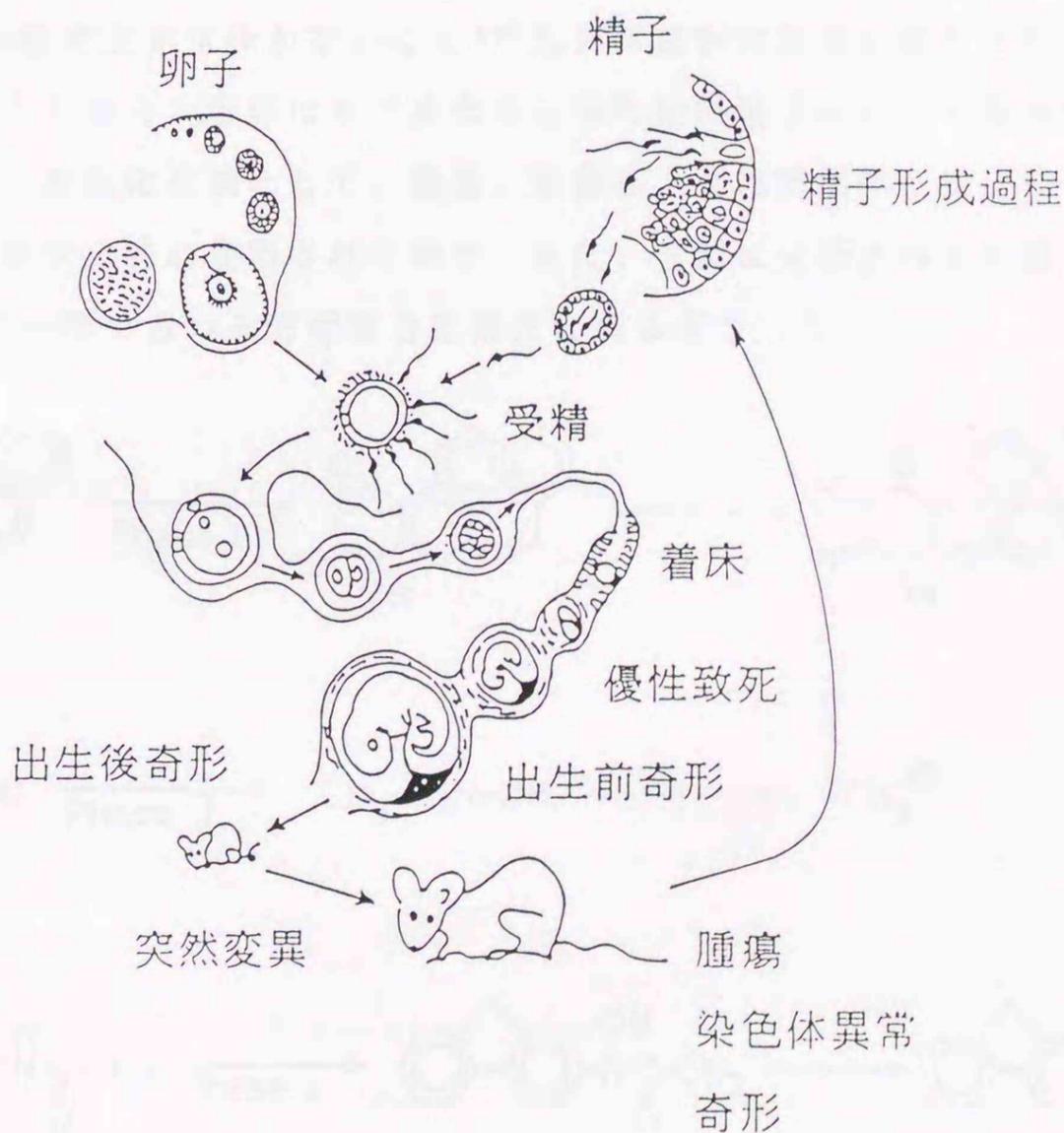
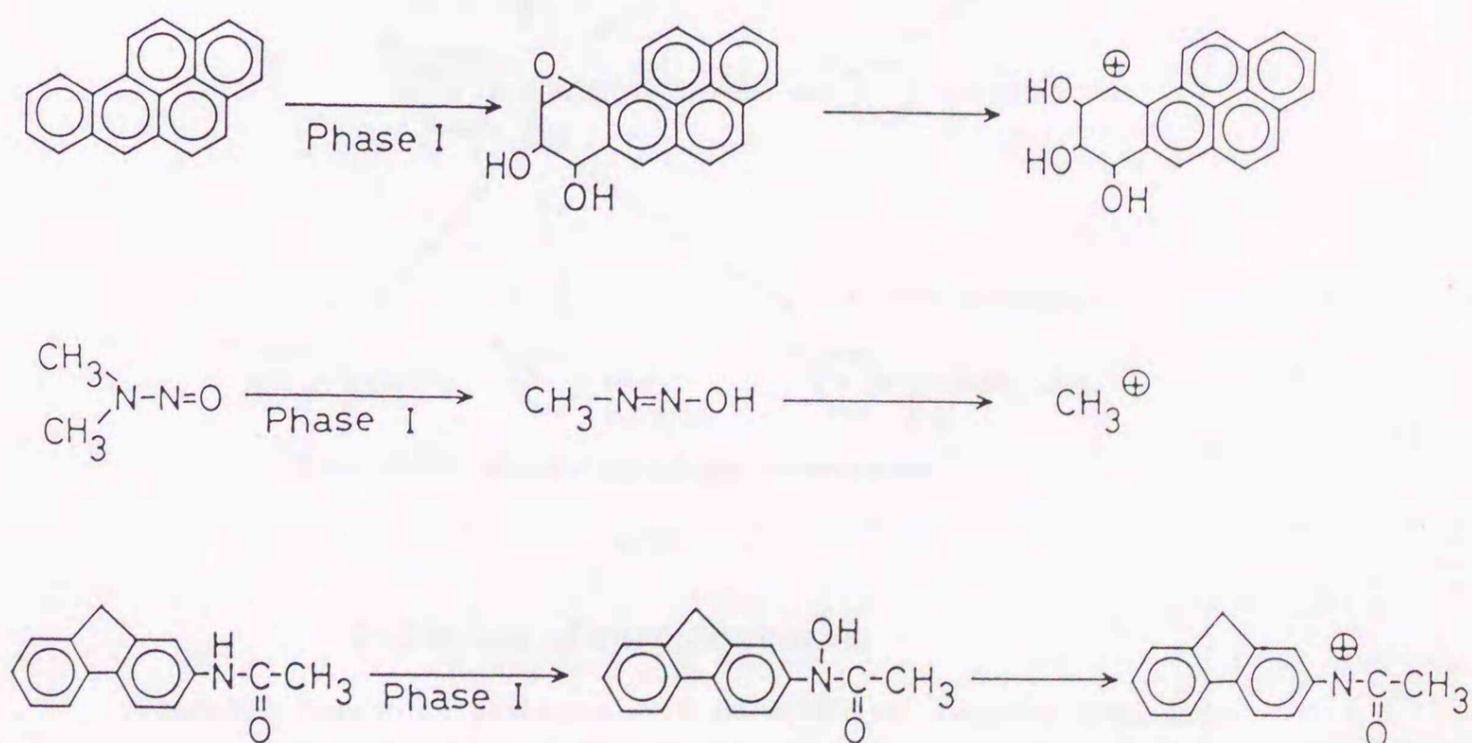


FIG. 1.³⁾ Life cycle and gene aberration.

両生殖細胞のうち著者が本研究の対象とした精子は、通常の体細胞とは異なり、形態的・機能的に高度に分化した細胞である。その代謝研究は生殖細胞としての機能発現、特に遊走能と内在性基質との関係について、行われている⁴⁻⁷⁾。一方、異物の遺伝毒性に関する研究から、脂溶性の高い異物が血液-精巣関門を通過し得ること⁸⁾及び医薬品を始めとする種々の異物が精子形成過程に作用して、精子の形態異常並びに遊走能低下を引き起こすこと⁹⁻¹¹⁾が明らかにされている。

形態異常精子誘発能試験では、芳香族含窒素化合物を含む多くの突然変異原物質及び発ガン物質に、形態異常精子の誘発率を増大させる作用^{12, 13, 14)}が認められている。それ故、雄性生殖器に対する造精細胞系障害作用及び染色体異常誘発能に関する試験等が、化学物質の遺伝毒性評価の一環として行われている。これら化学物質によるDNAあるいは染色体障害が、次世代以降に対して遺伝的奇形、先天的機能欠損及び腫瘍発生等を引き起こすこと¹⁵⁻¹⁸⁾が報告されている。しかし、上述した精子に対する化学物質の潜在的遺伝毒性の重大さにも関わらず、精子そのものの異物代謝能については殆ど注意が向けられていないのが現状である。著者の知る限り、多環芳香族炭化水素化合物に対するC-水酸化活性が見出されないこと及びGSH S-転移酵素活性が高いこと¹⁹⁾以外に異物代謝能に関する報告はない。

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異物代謝研究を企画した。対象化合物として、農薬、医薬品、食品添加物、及び化学工業原料等として環境中で広範に使用されており、また、三群に分類される有機発ガン物質(Scheme I)の一群を占める芳香族含窒素化合物を選定した。

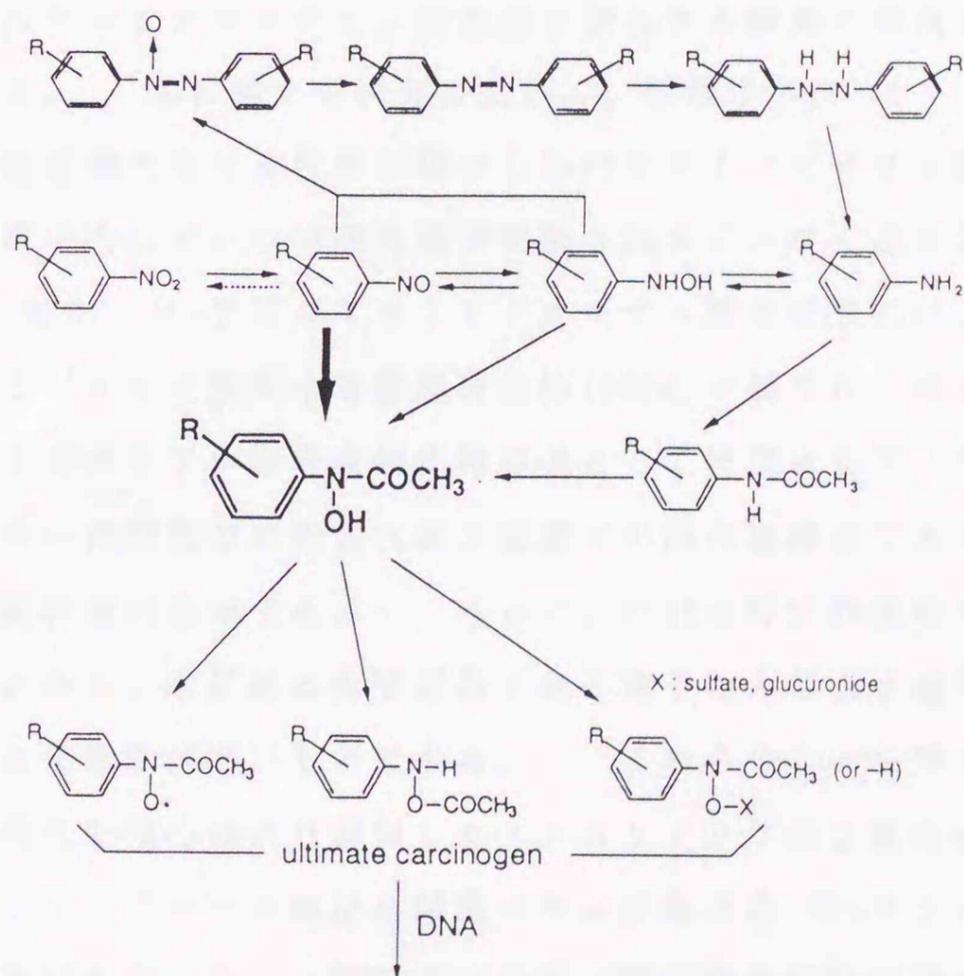


SCHEME I. Three types of metabolic pathways for the activation of carcinogens.

芳香族含窒素化合物の発ガン代謝において、N-アリルヒドロキシルアミン²⁰⁾及びN-アリルアセトヒドロキサム酸²¹⁾(N-arylaceto-hydroxamic acid)は、近接発ガン物質と考えられている。N-アリルアセトヒドロキサム酸の生成経路並びに親電子反応性の高い究極発ガン物質(ultimate carcinogen)へのさらなる代謝活性化経路²²⁻²⁶⁾に関する研究は、芳香族含窒素化合物による発ガン機構解明において重要なテーマの一つになっている(Scheme II)。また、N-アリルアシルヒドロキサム酸は抗生物質²⁷⁾及び金属キレーター^{28, 29)}等としても有用な化合物であり、それらの化学的合成法の開発や化学的性質の解明は、近接発ガン物質としての機能を理解する上でも必要になる。

現在までに報告されているN-アリルアセトヒドロキサム酸の酵素的な生成経路を整理すると(Scheme II参照)、

- ① アセチル転移酵素によるN-ヒドロキシルアミノ化合物のN-アセチル化³⁰⁾、
 - ② チトクロムP-450によるN-アセチルアミノ化合物のN-水酸化²¹⁾、
 - ③ ピルビン酸脱炭酸酵素³¹⁾によるニトロソ化合物の還元的アセチル化、
- の三経路に大別することができる。



Initiation of carcinogenesis

SCHEME II Metabolic pathways of N-substituted aromatic compounds leading to ultimate carcinogens.

芳香族含窒素化合物の重要な特徴の一つは、その窒素官能基の化学的安定性が

低いため、存在形態が多岐に亘っていることである (Scheme II 参照)。 例えば、ニトロ基を有する化合物は環境中及び生体内における条件に応じてニトロソ、N-ヒドロキシルアミノ、アミノ、アゾ、アゾキシ化合物等に変化し、また、それらは可逆的に相互変換し得る。 従って、哺乳動物精子における芳香族含窒素化合物の代謝経路を明らかにする際には、種々の窒素官能基を有する化合物を基質として調べる必要がある。 豚精子を用いて行った芳香族含窒素化合物の代謝研究中、著者は芳香族ニトロソ化合物から近接発ガン物質である N-アリルアセトヒドロキサム酸が生成することを見出した³²⁾。 精子は小胞体を欠損³³⁾しており、この反応が従来知られているミクロゾーム酵素P-450関与によるものとは考え難い。 この代謝反応が精子のみならず小胞体を有する他の細胞系においても起こり得るならば、芳香族含窒素化合物の代謝活性化及び発ガン機構に関して新たな展開をもたらすことにもなり、この近接発ガン物質の新規な生成機構を解明することが必要である。

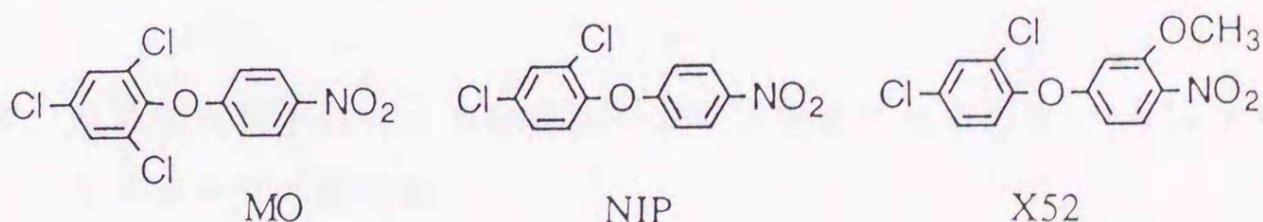
本研究において明らかにすべき点として、

- ① N-アリルアセトヒドロキサム酸生成活性の豚精子内局在部位、
 - ② 哺乳動物精子におけるN-アリルアセトヒドロキサム酸生成の普遍性、
 - ③ N-アリルアセトヒドロキサム酸生成に関与する酵素の帰属及び反応機構解明、
- 等があげられる。 ③に関する研究において、豚精子のN-アリルアセトヒドロキサム酸生成活性を増大させる作用が認められたチアミンピロリン酸は、³¹P-NMR 解析により、豚精子内にピロリン酸残基が切断されることなく取り込まれることが確認された。 また、N-アリルアセトヒドロキサム酸の生成には、ミトコンドリア局在酵素であるピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC) の関与が示唆された。 このことは、ミトコンドリアが従来異物代謝の場として軽視されていたという点、及びPDHCがエネルギー代謝並びに物質代謝上重要な中間代謝酵素であるという二点において、非常に興味深いものである。 さらに、PDHCは好氣的生物が普遍的に有する酵素であることから、本反応は生殖細胞である精子のみならず通常の体細胞においても起こり得る可能性が高いものである。 これらのことを明らかにするために、ヒトを含めた哺乳動物心筋より調製したミトコンドリア及び豚心筋由来のPDHCを用いて、ミトコンドリアレベル並びに酵素レベルにおける N-アリルアセトヒドロキサム酸生成の検討も行った。 PDHCはピルビン酸の酸化的脱炭酸によりNADH及びアセチルCoA生成を触媒する複合酵素である³⁴⁻³⁷⁾。 この酵素複合体は、TPP依存性のピルビン酸脱水素酵素 (E1)、ジヒドロリポイルアセチル転移酵素 (E2)、及びジヒドロリポイル脱水素酵素 (E3) の三種の主要な酵素から構成されている。 他に、E1

酵素活性の調節酵素であるピルビン酸脱水素酵素キナーゼ及びピルビン酸脱水素酵素フォスファターゼも構成酵素の一員として知られている。従って、N-アリルアセトヒドロキサム酸生成に関し、PDHCの各構成酵素の役割を明らかにすることは酵素反応機構を理解する上で重要になるので、本反応に関与する構成酵素の同定並びに活性に影響を及ぼす因子の解明も行った。

芳香族ニトロソ化合物とピルビン酸からの近接発ガン物質 N-アリルアセトヒドロキサム酸の生成は形式上、脱炭酸を伴う一種の混合ベンゾイン縮合反応と見なすことができ、反応機構的にも興味を持たれる。本反応は熱力学上、本質的には自発的に進行し得るものであるので、この近接発ガン物質の生成が自然界(生物圏)において非酵素的にも有意に起こり得るならば、この非酵素反応は環境毒性学的意義においても重要性を増すことになる。非酵素的なN-アリルアシルヒドロキサム酸の生成に関して、芳香族ニトロソ化合物とピルビン酸を含めた数種の α -オキソ酸との反応性を検討した結果、低pH側ではPDHC同様、対応するN-アリルアシルヒドロキサム酸を生成することを見出した³⁸⁾。この酸性条件下での非酵素的なN-アリルアシルヒドロキサム酸の生成と前述したPDHC関与による酵素的な生成の両反応系について、 α -オキソ酸及び芳香族ニトロソ化合物の置換基効果並びに反応機構を比較することにより、その同異を明らかにする必要がある。

芳香族含窒素化合物であるニトロジフェニルエーテル系除草剤(下記構造式参照)は環境中で広く使用されているが、突然変異原性、発ガン性、及び催奇形成性等の毒性³⁹⁻⁴³⁾が報告されている。



これら除草剤は環境拡散物質としての特徴(水難溶性、難分解性、及び $10^{-5} \sim 10^{-6}$ mmHgの蒸気圧)も有している。環境中での分解経路⁴⁴⁻⁴⁷⁾に関する研究から、これらはニトロ基の還元、クロル基の脱離、芳香環の水酸化及びエーテル結合の解裂等を起こすことが明らかにされている。農薬を始めとして人工有機物は、一般に原体とその主代謝産物の毒性が数種の動物を用いて調べられ、それのみに基づいて使用基準が設けられて使用が許可されているのが現状である。しかし、環境中に放出された人工有機物は、空気、光、土壌成分及び数百万種存在すると言われる生

物の連繋関与により無数の物質に変換されながら終局の無機化へと向かう。その際、幾つかの律速段階があり、それらに対応して中間物質が滞ることになる。従って、人工有機物の毒性は原体そのもののみでなく環境中で生成する全ての代謝物について考慮することが必要である。事実、ニトロジフェニルエーテル系除草剤の変異原性に関しては、既にN-ヒドロキシルアミノ体及びN-アセトヒドロキサム酸体が強い変異原物質であり、それらの変異原性はフェノキシ基上のクロル置換基数の減少に伴って増大すること^{39, 40, 48)}が報告されている。この結果は、これら除草剤の毒性はニトロ原体よりもニトロ基に由来する還元代謝物の方が高く、さらに無機化方向への脱クロル化によって強化されることを示唆している。これら除草剤からのニトロソ誘導体の生成は生物圏において充分起こり得るものであり、さらにこれらニトロソ誘導体からのN-アセトヒドロキサム酸体生成は毒性学的に重要な意義を有しているものと考えられる。以上のことから、除草剤原体のみならず環境中で生成し得る脱クロル化体も含めたニトロジフェニルエーテル系化合物のニトロソ誘導体について、豚精子による酵素的及び酸触媒による非酵素的なN-アセトヒドロキサム酸体生成の検討も行った。

本研究は、哺乳動物精子に見出された芳香族ニトロソ化合物と α -オキソ酸、主としてピルビン酸からの近接発ガン物質N-アリルアセトヒドロキサム酸生成について、その毒性学的意義を明らかにすることを目的として、酵素的及び非酵素的な側面から検討したものである。

本論文は4章から構成されており、以下、著者が得た知見を

- 第1章 哺乳動物精子における芳香族ニトロソ化合物からのN-アリルアセトヒドロキサム酸生成
- 第2章 哺乳動物心筋ミトコンドリア及び単離豚心筋PDHCによるN-アリルアセトヒドロキサム酸生成
- 第3章 酸触媒による芳香族ニトロソ化合物と α -オキソ酸からのN-アリルアシルヒドロキサム酸生成
- 第4章 ニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体からの豚精子並びに酸触媒によるN-アセトヒドロキサム酸体生成

に分けて論述する。

第1章 哺乳動物精子による芳香族ニトロソ化合物からのN-アシルアセト
ヒドロキサム酸生成

1. 1 緒論

近年、異物代謝の主要臓器である肝臓以外に、胃、肺、皮膚、胎盤、及び精巣等における異物代謝研究が行われている⁴⁹⁻⁵¹⁾。 精巣における異物代謝研究は、異物の造精細胞系障害作用及び染色体異常誘発能等の遺伝毒性評価において非常に重要なものと考えられる。 何故ならば、精巣の精上皮細胞が分化成熟して精子を形成するまでの間（精子形成過程）、精子及びその前駆細胞は常に異物による障害を受ける危険性を有しているからである。 しかし、このような精子に対する異物の潜在的遺伝毒性の重大さにも関わらず、精子そのものの異物代謝能については殆ど注意が向けられていないのが現状である。 精子は通常の体細胞と機能的・形態的に異なっており (Fig. 2)、その主な特徴は、精子形成過程において異物代謝の主要な場である小胞体が欠落³³⁾ していること、及びミトコンドリアが精子中片部に局在していること⁵²⁾ である。

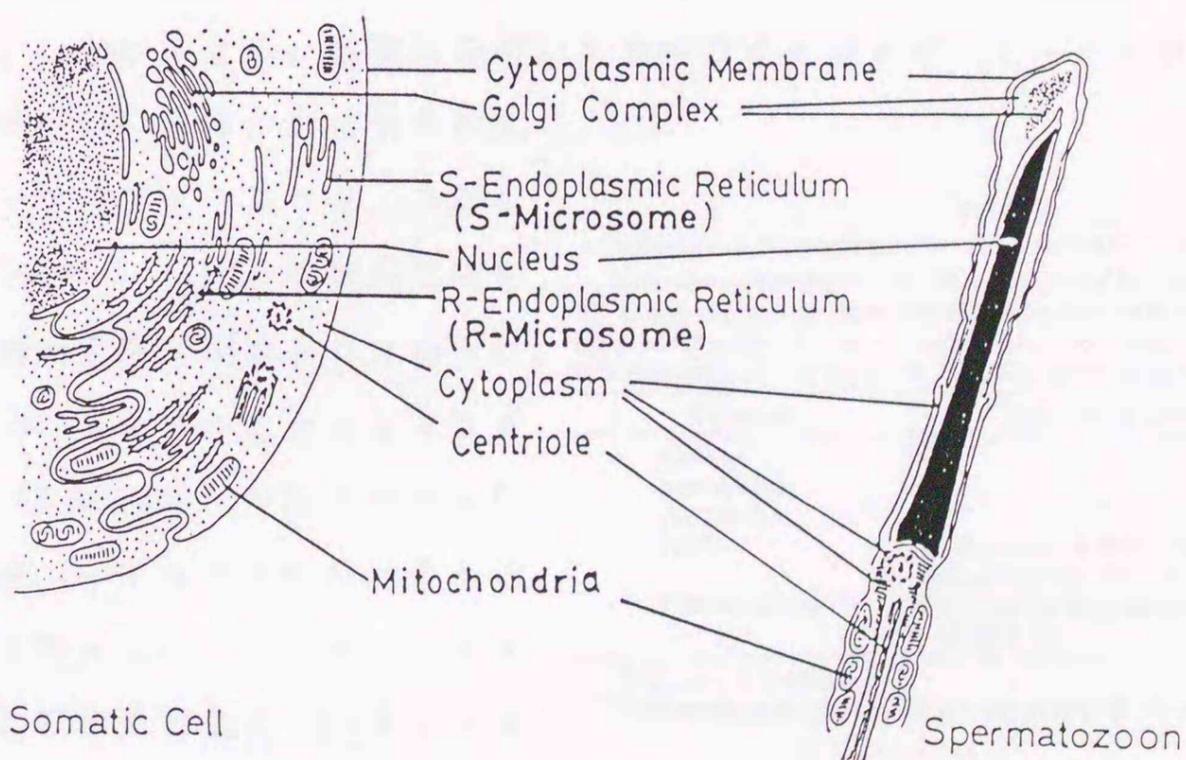


FIG. 2. Comparative essential features of typical somatic cell and spermatozoon.

上述した精子の特徴から、精子はその異物代謝能においても通常の体細胞とは異なる側面を有していることが推測される。 精子が担う遺伝的役割をも考慮すれば、精子における異物代謝研究は、異物の代謝活性化に伴う遺伝毒性発現との関係

を明らかにするために重要な意義を有しているものと考えられる。本研究は、哺乳動物精子における芳香族含窒素化合物の代謝経路を明らかにするために種々の窒素官能基を有するベンゼン誘導体をモデル基質として行ったものである。特に、本研究中に見出したニトロソ化合物からの近接発ガン物質 N-アリルアセトヒドロキサム酸生成経路について詳述する。また、この実験中にチアミンピロリン酸 (TPP) が精子の細胞膜を通過する知見が得られたので、併せて報告する。

1. 2 結果

1. 2. 1 種々の窒素官能基を有するベンゼン誘導体の豚精子による代謝

哺乳動物精子の実験材料としては、大量に入手し得る豚精子 (200~300 ml 精液/回) を用いて行った。内在性基質の一つであるグルコース存在下、種々の窒素官能基を有するベンゼン誘導体について、豚精液の生理的 pH 6.8 における代謝反応を調べた。Table I に、各基質を用いた場合のイソプロピルエーテル層転溶性代謝生成物の HPLC による分析結果を示す。

アニリン及びアセトアニリドに対しては、N-あるいはC-水酸化活性を含め代謝的変換は認められなかった。また、N-フェニルアセトヒドロキサム酸 (N-OH-AA) の脱アセチル化並びにN,O-アセチル転位活性も認められなかった。ニトロベンゼンでは還元成積体である N-フェニルヒドロキシルアミンが微量検出されたが、ニトロソベンゼン (NOB) に対しては、より高い還元活性が認められた。Fig. 3 に、NOB の代謝生成物アゾキシベンゼン及び N-OH-AA の典型的なクロマトグラムを示す。

代謝物 N-OH-AA は、¹H-NMR スペクトル及び HPLC での保持時間が標準品と一致し

TABLE I

Metabolites of N-substituted benzene derivatives in boar spermatozoa
Boar spermatozoa (5×10^7 cells) were incubated for 60 min at 30 °C with 15 mM glucose. Substrate concentrations used: aniline, 5 mM; acetanilide, 5 mM; N-OH-AA, 0.6 mM; NOB, 5 mM. In nitrobenzene (5 mM), 5×10^8 cells were incubated for 2 h.

Substrate	Metabolites detected
Aniline	ND ^a
Acetanilide	ND
N-OH-AA	ND
NOB	N-OH-AA (5.5 ± 0.4 nmol/h) ^b Azoxybenzene (61.5 ± 6.9 nmol/h)
Nitrobenzene	N-Phenylhydroxylamine (<2.0 nmol/2 h)

^a ND, not detectable.

^b Values in parentheses are the amounts of the metabolites formed.

ており、またMS スペクトルにおいて m/z 151(M^+)の他に m/z 135(M^+-O)、109(M^+-CH_2CO)、及び93(M^+-CH_2CO-O)というN-アリルアセトヒドロキサム酸に特有の解裂パターン⁵³⁾が認められたことから、その構造を確認した。もう一つの代謝生成物 アゾキシベンゼンについても、紫外部の吸光度比及び HPLCでの保持時間が標準品と一致したことから、その構造を確認した。

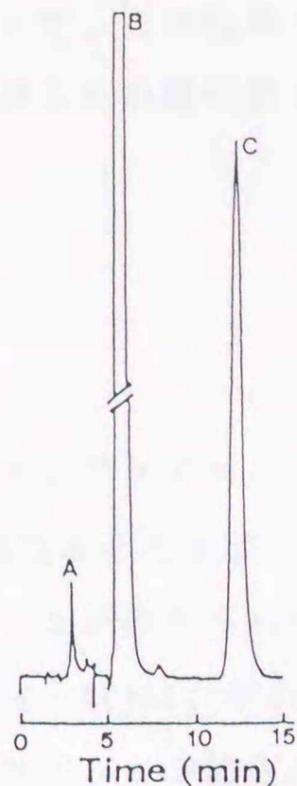


FIG. 3. Typical HPLC pattern. The chromatogram shows the result of analysis of metabolites formed on incubation of NOB with glucose. A, N-OH-AA; B, NOB; and C, azoxybenzene.

1. 2. 2 N-OH-AA 生成活性に対する添加基質の効果

NOBからのN-OH-AA生成は、形式上還元的アセチル化反応と見なすことができる。グルコースを添加しない条件ではNOBからのN-OH-AA生成活性は認められないので、グルコースが2電子還元当量及びアセチル供与体として作用しているものと思われるが、直接NOBと反応してN-OH-AAを生成することは考え難い。恐らく、グルコースの豚精子内での代謝生成物が本反応に関与しているものと推察される。N-OH-AA生成に直接関わる基質を明らかにするために、解糖系酵素等によりグルコースから代謝され得る物質を含め幾つかの豚精子内在性基質を用いて、N-OH-AA生成活性を測定した。Fig. 4に示すように、調べた基質の中ではピルビン酸が最も有効な基質であり、代謝経路上ピルビン酸に近い基質程その有効性が増大する傾向が認められた。酢酸は基質としての働きはなく、ピルビン酸と併用した場合でもN-OH-AA生成率に対し影響を与えず、ア

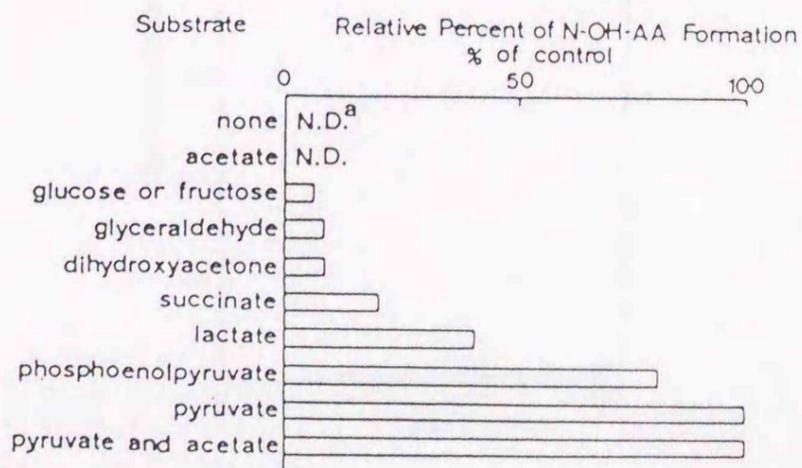


FIG. 4. Effects of substrates on N-OH-AA formation from NOB in boar spermatozoa. Boar spermatozoa (5×10^7 cells) were incubated for 30 min at 30 °C with 5 mM NOB and 10 mM substrate in the medium, as described under "Experimental Procedures." The activity is expressed as the percentage of the control value for the amount of N-OH-AA formed with pyruvate. N.D., not detectable.

セチル供与体としての作用も認められなかった。従って、この結果は、調べた基質の中ではピルビン酸が N-OH-AA生成において最も近接した前駆物質であることを示唆している。

1. 2. 3 NOBとピルビン酸からの N-OH-AA生成

Fig. 5に、豚精子による NOBとピルビン酸からのイソプロピルエーテル層転溶性代謝物であるN-OH-AA及びアゾキシベンゼン生成の経時変化を示す。N-OH-AA及びアゾキシベンゼンが殆ど遅滞時間なく生成していることが認められた。ピルビン酸を添加しない場合及び熱処理精子を用いた場合(Fig. 5B)は、何れもN-OH-AA生成は認められなかった。この結果は、N-OH-AA生成がピルビン酸依存性の酵素反応によるものであることを意味している。一方、アゾキシベンゼンの生成は、ピルビン酸を添加しない場合並びに熱処理精子を用いた場合の何れにおいてもFig. 5Aと同程度であることから、N-OH-AA生成とは関連しない非酵素反応によるものである。Fig. 5A及び 5Bに見られるように、本反応における物質収支は一致しておらず、NOBの減少量とN-OH-AA及びアゾキシベンゼンの生成量は対応しなかった。この結果はイソプロピルエーテル層転溶性代謝物の生成を意味しており、また、その反応も N-OH-AA生成とは関連しないピルビン酸非依存性の非酵素反応によるものである。

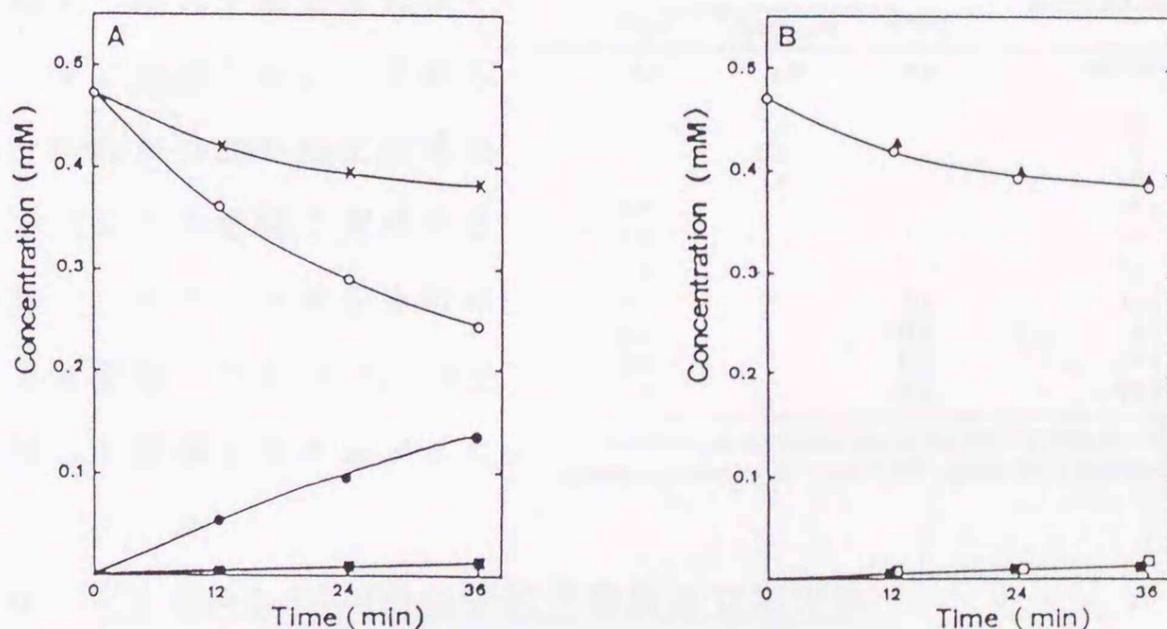


FIG. 5. Time course of the reaction of NOB with pyruvate in boar spermatozoa. A, boar spermatozoa (1.6×10^8 cells) were incubated at 30°C in the presence of 10 mM pyruvate in the medium, as described under "Experimental Procedures." ○, NOB; ●, N-OH-AA; ■, azoxybenzene; ×, total organic phase-extractable metabolites. B, time course of the reaction without pyruvate (▲, NOB; ■, azoxybenzene) or with boiled boar spermatozoa (○, NOB; □, azoxybenzene).

1. 2. 4 Mg²⁺、チアミン、TPP、及びTTPP添加の影響

上述したように、NOBからのN-OH-AA生成にはピルビン酸依存性の酵素が関与していることが示唆された。また、精子はその遊走能発現のために中片部(尾部の付け根に相当する; Fig. 2参照)に多くのミトコンドリア鞘を有すること⁵²⁾が知られている。これらのことから、NOBとピルビン酸からのN-OH-AA生成には、ミトコンドリア局在酵素であるピルビン酸脱水素酵素複合体(PDHC)が関与している可能性が考えられる。ピルビン酸の酸化的脱炭酸反応を触媒するPDHCの活性発現にはMg²⁺及びチアミンピロリン酸(TPP)が必要³⁵⁾である。豚精子のN-OH-AA生成活性に対するMg²⁺及びTPP添加の影響を調べたところ、何れも活性増強効果が認められた。20 mMのMg²⁺添加によって見かけ上最大活性の発現に達したので、本章の実験は、20 mMのMg²⁺濃度で行った。Mg²⁺及びTPPによる活性増強作用は、TPP依存酵素であるPDHCが本反応に関与している可能性を支持するものと考えられたので、TPP依存酵素の特異的阻害剤であるチアミンチアゾロンピロリン酸(TTPP)^{54, 55)}を用いた阻害実験も併せて行った。Table IIに示すように、0.5 mMのTPP添加によって最大活性の発現が認められた。

0.1 mM TPP存在下でのN-OH-AA生成活性は、0.1 mM TTPP添加により50%阻害され、またこの活性はTPP添加濃度を1 mMまで増大することにより元のレベルまで回復した。これらの結果は、PDHCがN-OH-AA生成活性に関与していることを強く支持するものである。チアミンそのものは、1 mM濃度まで添加してもN-OH-AA生成活性に対して影響を与えなかった。

TABLE II
Effects of TPP and TTPP on N-OH-AA formation activity in boar spermatozoa

The incubation mixture contained 10 mM NOB, 20 mM MgCl₂, 13 mM pyruvate, and thiamine and TPP and/or TTPP at the indicated concentrations. Each reaction was initiated by the addition of boar spermatozoa (3 × 10⁷ cells), and the incubation was carried out for 30 min at 30 °C.

Additives			N-OH-AA formation nmol/30 min
TPP	Thiamine	TTPP	
mM	mM	mM	
			18
	0.5		17
	1.0		18
0.1			21 (100) ^a
0.5			22
1.0			22
0.1		0.1	11 (50)
0.1		0.5	9 (40)
0.5		0.1	17 (80)
1.0		0.1	20 (95)

^a Values in parentheses are activities expressed relative to a control mixture containing 0.1 mM TPP, arbitrarily taken as 100.

1. 2. 5 ³¹P-NMRによるTPPの豚精子膜透過立証実験

TPPは原核細胞であるE. coliにおいて直接取り込まれる⁵⁶⁾という報告はあるが、著者の知る限り、真核細胞の細胞膜を通過するという報告はない。しかし、得られた上記の結果は、TPP並びにTTPPは豚精子の細胞膜も通過していることを意

味している。豚精子をTTPP(20 μ M)で処理すると、N-OH-AA生成活性は最大活性の約30%まで減少した。Fig. 6に示すように、このTTPP処理した精子を種々の濃度のTPP存在下でインキュベートすると、TPP濃度に依存したN-OH-AA生成活性の回復が認められた。この結果も、TPP及びTTPPが豚精子に取り込まれることを示唆している。

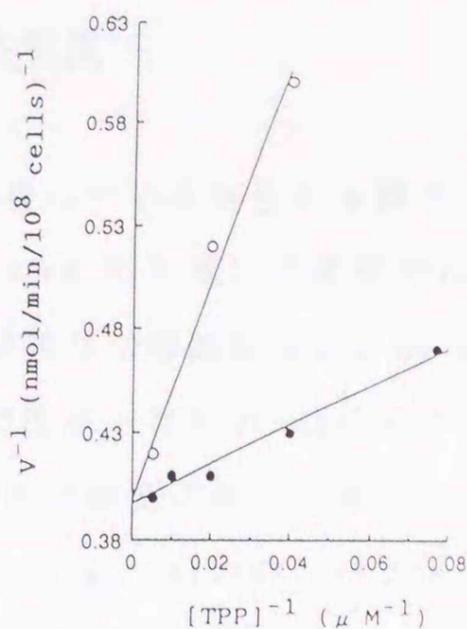


FIG. 6. Effect of TPP and TTPP on N-OH-AA formation.
○; TTPP-treated spermatozoa.
●; control cells.

この点を明らかにするため、TPPの豚精子内への透過を³¹P-NMRにより経時的に観察した。なお、この実験は精子内外のpH差を生じさせるために、pH7.4の緩衝液を用いて行った。Fig. 7のスペクトルAは、洗浄豚精子にTPPを添加後30分間で得られた³¹P-NMRスペクトルを示している。既に報告⁵⁷⁾されているように、スペクトルAには、豚精子由来のグリセリルフォスフォコリン、無機リン、及びモノリン酸エステルに対応する三つの信号(低磁場側)が確認された。また、添加された細胞外のTPPに由来する二つのリンの信号(α 、 β)も、 δ -10.62(α)及び -6.49(β)ppmに観測された。TPPの末端リン(β)の化学シフトはpHに依存すること⁵⁸⁾が知られており、また、豚精子の細胞内pHは 7.0 ± 0.2 であるという報告⁵⁷⁾があることから、TPPが取り込まれた場合、末端リン(β)の信号はより高磁場側に観測されることが予想される。Fig. 7のB~Fに示す差スペクトルは、経時的に増大する δ -6.76 ppmの信号(ピーク a)の出現を示しており、また、その化学シフトが豚精子内のpH 7におけるTPPの末端リン(β)に由来する予想値⁵⁸⁾と近い値を示していることは、豚精子により直接TPPが取り込まれていることを支持するものである。

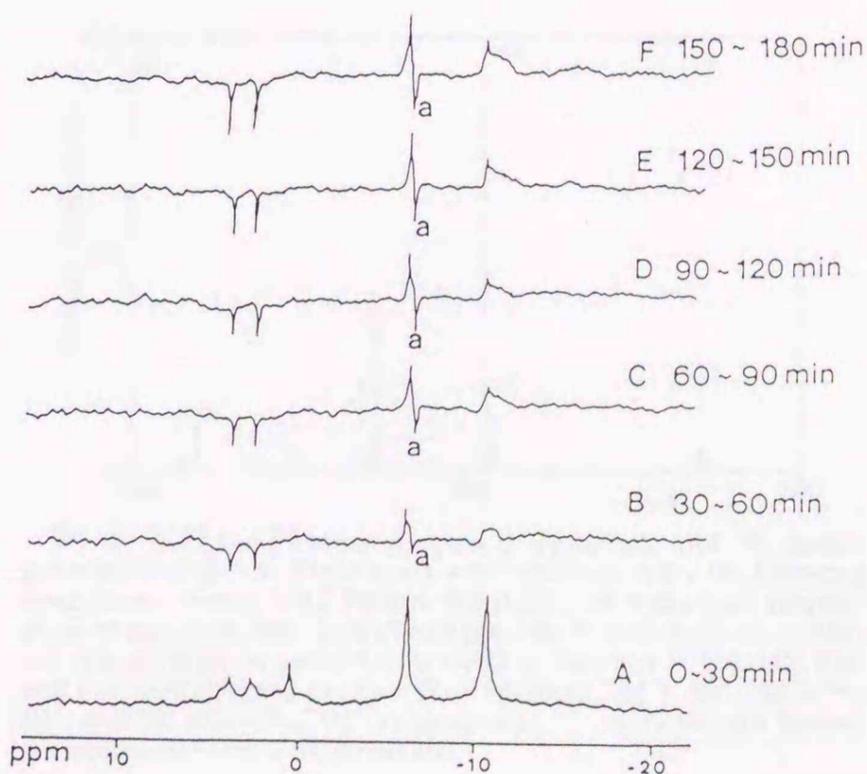


FIG. 7. Difference spectra of ³¹P NMR of boar spermatozoa in the presence of TPP.

1. 2. 6 [3-¹³C]標識ピルビン酸の取り込み実験

ピルビン酸が直接アセチル供与体として作用しているか否かを調べるために、NOB と [3-¹³C]標識ピルビン酸 (標識化率 99.5 atom %) を用いて豚精子による N-OH-AA 生成反応を行い、N-OH-AA への ¹³C 取り込み率並びに標識部位を、MS 及び ¹H-NMR により測定した。標識ピルビン酸との反応で生成した N-OH-AA のマスキロマトグラムでは、(M+H)⁺ に相当する m/z 153 及び総イオン濃度における両ピークの保持時間が一致した (Fig. 8)。また、N-OH-AA 標準品 (Fig. 9A) の MS スペクトルで観測された m/z 136、152 (M+H)⁺ 及び 184 の各イオンピークは、標識ピルビン酸との反応で生成した N-OH-AA (Fig. 9B) においては各々 1 マスユニットだけ大きな m/z 137、153 (M+H)⁺ 及び 185 に観測された。

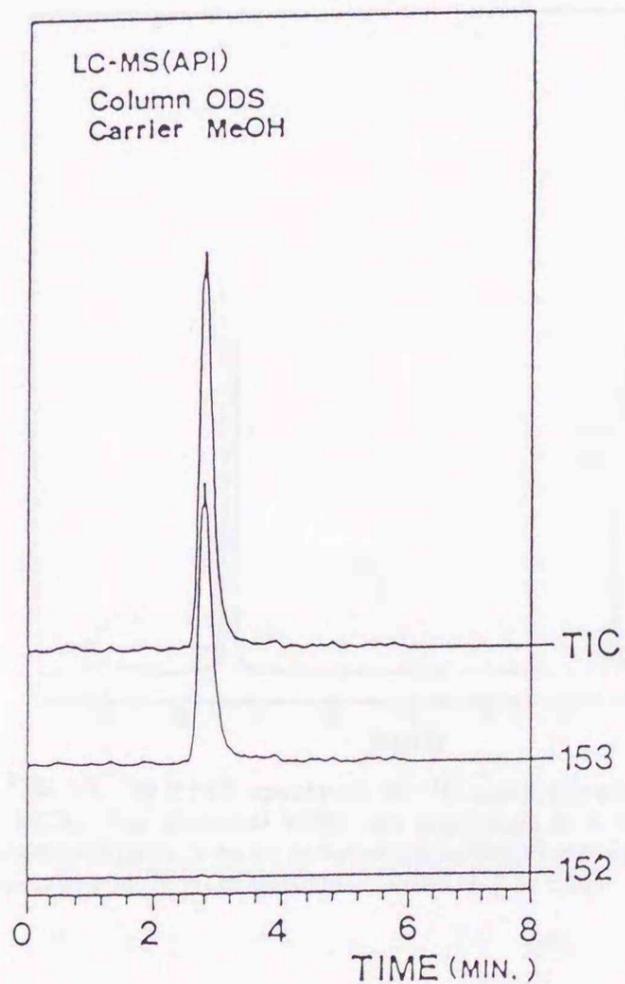


FIG. 8. HPLC/API-Mass chromatography of ¹³C-incorporated N-OH-AA. The chromatogram was obtained under the conditions as described in the legend of Fig. 9.

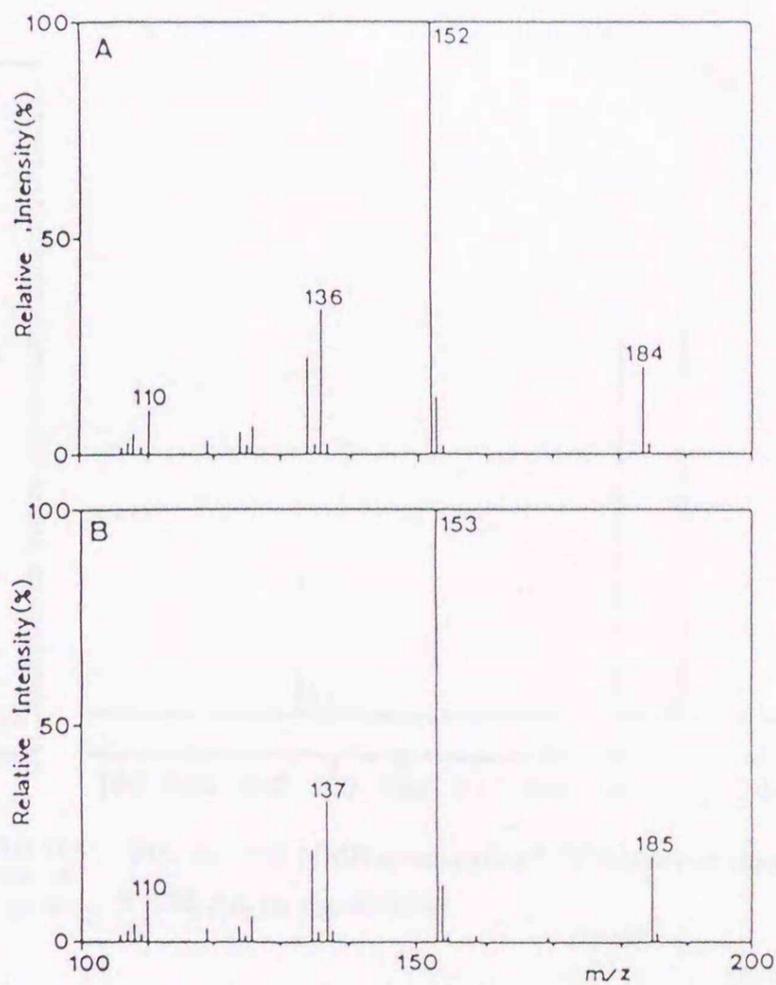


FIG. 9. HPLC/API mass spectra of authentic and ¹³C-incorporated N-OH-AA. The spectra were obtained under the following conditions: column, YMC Pack A-303 (ODS, 4.6 × 250 mm); temperature of nebulizer, 230 °C; drift voltage, 180 V; mobile phase, methanol (1.0 ml/min). A, authentic N-OH-AA: ions m/z = 184, 152, 136, and 110 were assigned to (M + H + MeOH)⁺, (M + H)⁺, (M + H - O)⁺, and (M + H - CH₂CO)⁺, respectively. B, N-OH-AA formed metabolically from [3-¹³C]pyruvate.

これらの結果は、[3-¹³C]標識ピルビン酸由来の CO¹³CH₃基が分子内に 1 個導入され

ていることを示唆している。 Fig. 9Bに示すMSスペクトルにおいて、分子イオン $(M+H)^+$ に相当する m/z 152及び153のイオン強度比から求めた ^{13}C 標識化率は99.4% となり、用いた $[3-^{13}\text{C}]$ 標識ピルビン酸の標識化率と一致している。 一方、 ^1H -NMRスペクトル(Fig. 10)による ^{13}C 標識N-OH-AAの解析では、 $^{13}\text{CH}_3$ 基のプロトンが予想されるように δ 2.11 ppm にカップリング定数(J)が130 Hzの二重線(^{13}C サテライトピークに相当する)として観測された。 このJ値は、 $\text{CO}^{13}\text{CH}_3$ 基に見られる ^{13}C - ^1H の典型的な値⁵⁹⁾と一致している。 $^{13}\text{CH}_3$ 基に由来するピークと $^{12}\text{CH}_3$ 基に由来するピーク(δ 2.11 ppmの一重線)の積分比からも、N-OH-AAの ^{13}C 標識化率は $99.2 \pm 0.2\%$ と算定され、用いた $[3-^{13}\text{C}]$ 標識ピルビン酸の標識化率と一致した。 また、標識N-OH-AAの ^{13}C -NMRスペクトル(Fig. 11)においても δ 22.4 ppm に $^{13}\text{CH}_3$ 基に由来する相対強度が著しく増大したピークが確認されている。

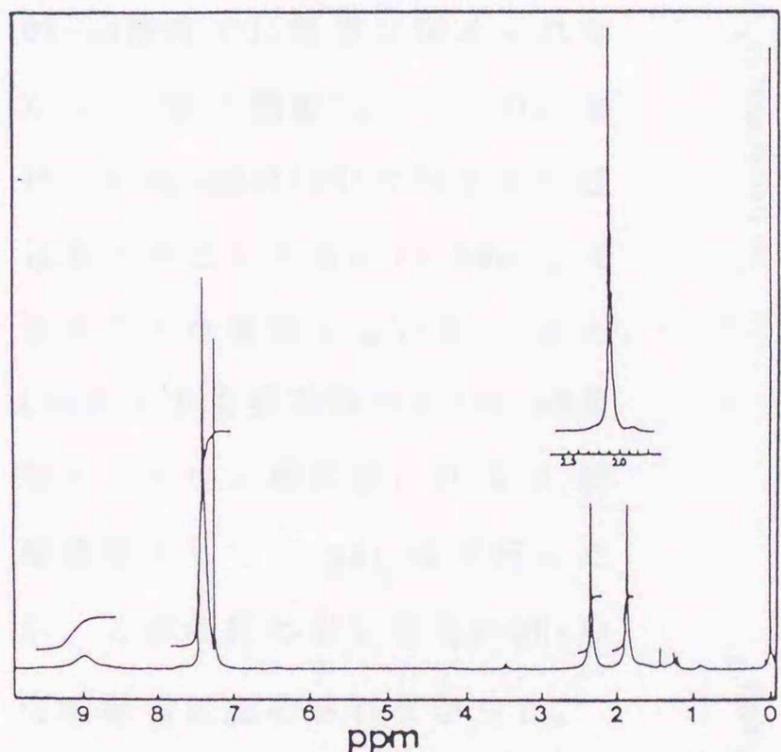


FIG. 10. ^1H NMR spectrum of ^{13}C -incorporated N-OH-AA in CDCl_3 . The chemical shifts are expressed in δ values relative to tetramethylsilane as an internal standard. Inset, singlet peak corresponding to $^{12}\text{CH}_3$ of authentic N-OH-AA (δ 2.11).

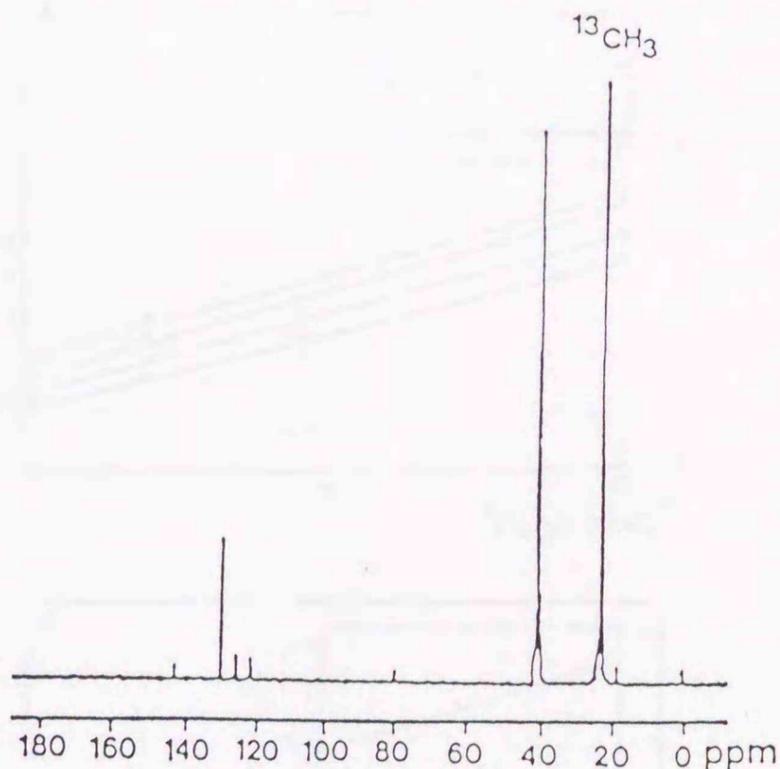


FIG. 11. ^{13}C NMR spectrum of ^{13}C -incorporated N-OH-AA in d_6 -DMSO.

これらスペクトルの解析結果から、NOBと $[3-^{13}\text{C}]$ 標識ピルビン酸との反応において、その ^{13}C が希釈あるいは乱雑化を受けることなくN-OH-AAに直接導入されることが証明された。 この事実は、ピルビン酸が近接型或いは究極型アセチル供与体であることを示唆している。

1. 2. 7 酵素反応動力学定数の測定

二基質反応の酵素反応速度論的解析法に従って、NOB及びピルビン酸の両基質濃度を可変にした条件で N-OH-AA生成初速度を求め、酵素反応動力学定数を算定した。その結果をFig. 12 に、また、得られたBiBi反応速度式を(式1-1)に示す。

$$\frac{V_{max}}{v} = 1 + \frac{0.07}{[\text{pyruvate}]} + \frac{0.27}{[\text{NOB}]} + \frac{0.00}{[\text{pyruvate}][\text{NOB}]} \quad (\text{式1-1})$$

上記反応速度式第4項の寄与が認められないことは、Fig. 12 において平行な直線群が得られたことと対応しており、本反応がピルビン酸とNOBを二基質、CO₂とN-OH-AAを二生成物とするピンポンBiBi機構に従って進行することを示唆している。

N-OH-AA生成反応における生成物

阻害実験では、0.20 mMまでのN-OH-AA濃度では阻害は認められなかった(表不掲載)。この結果は、N-OH-AAのPDHCに対するK_i値はあったとしても0.20 mM以上であることを意味している。また、CO₂による阻害実験では200 mM炭酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8;炭酸濃度として60 mM)中に行ったが、この条件においてもN-OH-AA生成阻害は認められなかった。

このピンポン BiBi機構において、第二の基質であるNOBは、ピルビン酸由来の2電子還元当量及びアセチル基の直接的な受容体として機能しているものと考えられる。NOB及びピルビン酸に対する見かけのK_m値は各々0.27 ± 0.01及び0.07 ± 0.01 mMであり、V_{max}値は2.5 ± 0.4 nmol/min/10⁸精子

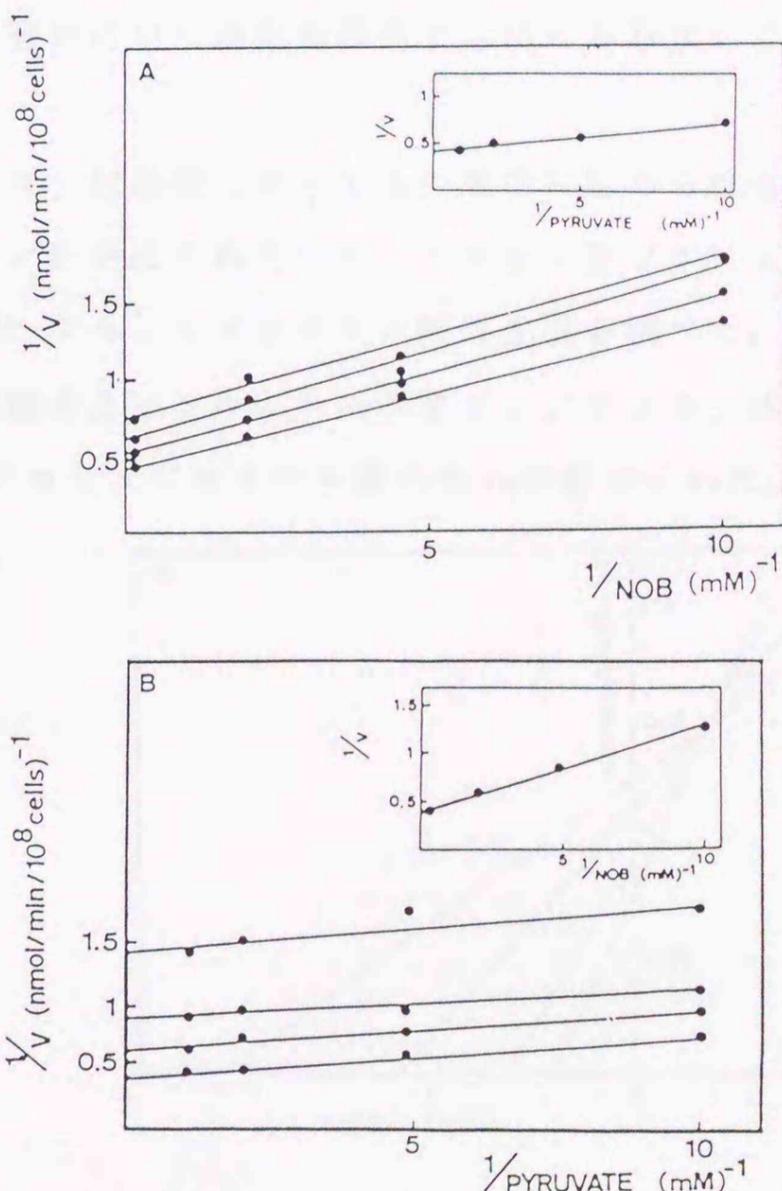
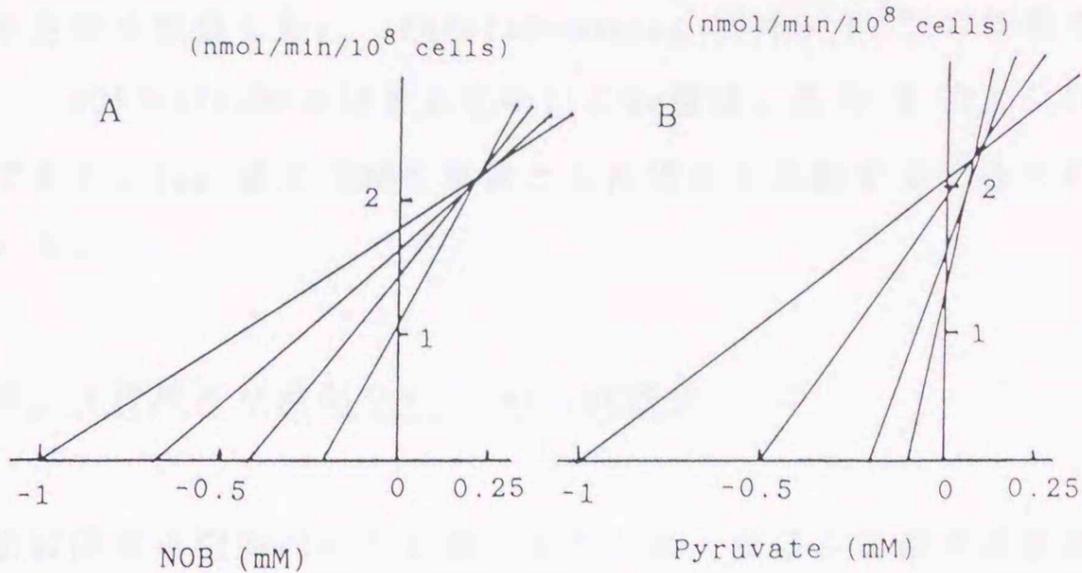


FIG. 12. Initial velocity pattern for the formation of N-OH-AA from NOB and pyruvate catalyzed by boar spermatozoa. Initial velocities are expressed in nanomoles of product formed per min/10⁸ cells. A, inset, replotting of the intercepts of the reciprocal plot. B, inset, replotting of the intercepts of the reciprocal plot.

であった。また、二
基質のうち片方の基質
濃度を酵素系に対する
飽和濃度に設定 (13 mM
ピルビン酸及び 15 mM
NOB濃度) した条件にお
いても、NOB及びピル
ビン酸に対する見かけ
の K_m 値を各々測定した。



Cornish-Bowdenプロッ
ト⁶⁰⁾の結果を、Fig.

FIG. 13. Cornish-Bowden plots of N-OH-AA formation catalyzed by boar spermatozoa. A, the apparent K_m value for NOB is 0.24 ± 0.02 mM and V_{max} value is 2.2 ± 0.4 nmol/min/ 10^8 cells. B, the apparent K_m value for pyruvate is 0.09 ± 0.02 mM and V_{max} value is 2.4 ± 0.3 nmol/min/ 10^8 cells.

13A及びBに示す。得られた K_m 値 (脚注参照) は上記した値と一致しており、この結果は NOB及びピルビン酸による基質阻害が用いた濃度範囲内では認められないことを意味している。

この反応が NOB以外の芳香族ニトロソ化合物においても一般的に認められる反応であるか否かを調べるために、発ガン性が知られているフルオレン及びビフェニルのニトロソ体 (NOF及びNOBP) からの N-アセトヒドロキサム酸体生成を調べた。ピルビン酸存在下 NOFおよびNOBPを豚精子とインキュベートすると、アゾキシ体及びアミノ体の他に対応する N-アリルアセトヒドロキサム酸の生成が認められた。

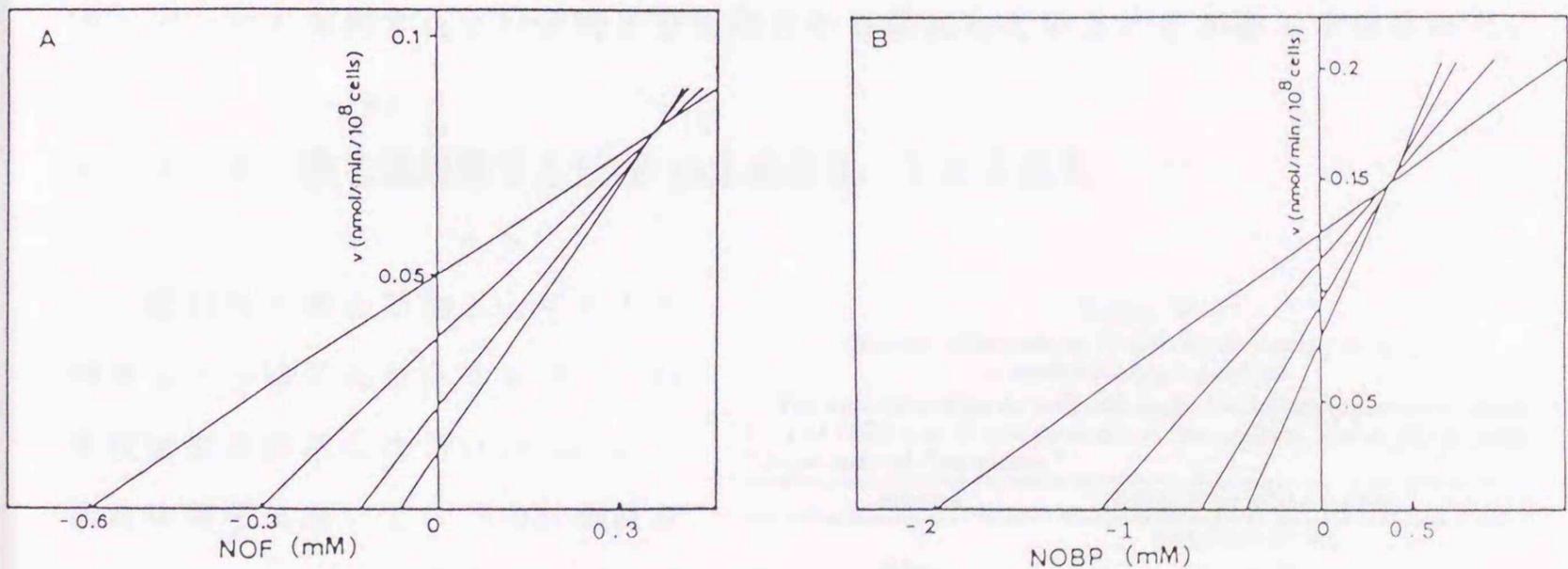


FIG. 14. Cornish-Bowden plots of N-hydroxy-N-arylacetamide formation catalyzed by boar spermatozoa. A, NOF; the apparent V_{max} is 0.08 ± 0.01 nmol/min/ 10^8 cells. B, NOBP; the apparent V_{max} is 0.15 ± 0.01 nmol/min/ 10^8 cells.

ピルビン酸に対する見かけの K_m 値は測定しなかったが、ピルビン酸濃度を酵素系に対する飽和濃度として 13 mM に設定して、対応する N-アリルアセトヒドロキサム酸

生成における反応動力学定数を測定した。Cornish-Bowden プロット⁶⁰⁾の結果を Fig. 14A及びBに示す。NOF及びNOBPに対する見かけのKm値は、各々 0.36 ± 0.03 mM及び 0.38 ± 0.06 mMであり、Vmax値はNOBを基質とした場合と比較すると各々約 1/30及び1/20の値であった。

1. 2. 8 豚精子頭部、中片部及び尾部のN-OH-AA生成活性

豚精子のN-OH-AA生成活性の細胞内分布を調べるために、豚精子を超音波処理後遠心分画して得た頭部、中片部及び尾部の各断片化画分について、NOBとピルビン酸からのN-OH-AA生成活性を測定した。

Table IIIに示すように、中片部の活性は頭部及び尾部に比較して遙かに高く、未断片化精子が有する総活性の80%が中片部に認められた。位相差顕微鏡による各画分の観察において、頭部及び尾部には各々未断片化精子及び

中片部を保持している尾部の夾雑が確認された。このことから両画分に認められた活性はそれらの夾雑成分によるものであり、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のみ局在していることが強く示唆された。

1. 2. 9 哺乳動物精子のN-OH-AA生成活性における種差

豚以外の哺乳動物としてヒト及びラットの精子についてもN-OH-AA生成活性を測定した(Table IV)。何れの精子においてもN-OH-AA及びアゾキシベンゼン以外のイソプロピルエーテル層転溶性代謝物の生成は認められなかった。10⁸精子当たり

で活性を比較するとラットが最も高く、次いでヒト、豚の順であった。この結果は本反応が哺乳動物精子において普遍的に起こり得ることを示唆している。

TABLE III
Subcellular distribution of N-OH-AA formation activity in boar spermatozoa

The activities of the fractions were determined under the general incubation conditions, as described under "Experimental Procedures."

Fraction	N-OH-AA formation activity nmol/45 min/10 ⁸ cells
Whole cell	94 (100) ^a
Head	9 (10)
Mid-piece	75 (80)
Tail	8 (10)

^a Values in parentheses are relative activities to that of whole spermatozoa.

TABLE IV
Species differences in N-OH-AA formation activity of mammalian spermatozoa

The activities were determined under the incubation conditions of 5 mM NOB and 10 mM pyruvate in the medium, as described under "Experimental Procedures."

Mammal	N-OH-AA formation activity nmol/min/10 ⁸ cells
Boar	2.2 (1.0) ^a
Human	6.9 (3.2)
Rat	51.7 (24)

^a Values in parentheses are relative activities to that of boar spermatozoa.

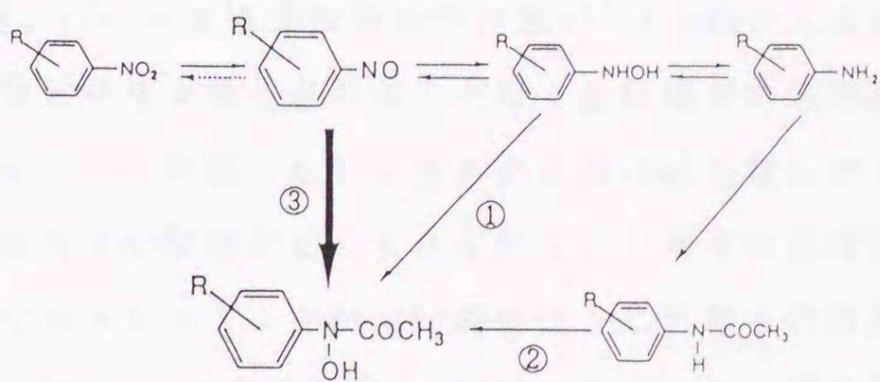
1. 3 考察

哺乳動物精子による芳香族含窒素化合物の代謝に関する実験から、肝臓等における異物代謝経路として良く知られているアセチル化、脱アセチル化及びモノオキシゲナーゼ活性は認められなかったが、還元的代謝経路が明かとなった。N-OH-AAはNOBを基質とした時の還元的代謝生成物の一つであり、豚精子以外にラット及びヒト精子においてもその生成が認められた。豚精子によるN-OH-AA生成において、ピルビン酸は2電子還元当量及びアセチル基供与体として最も有効な基質であった。より有効性が低かった乳酸、コハク酸、及び解糖系の基質(Fig. 4参照)は全て、精子の運動性のエネルギー源となることが知られている^{61, 62)}。酢酸も豚精子のエネルギー源の一つである⁶³⁾が、N-OH-AA生成反応においては基質とはなり得なかった。[3-¹³C]標識ピルビン酸を用いた同位体取り込み実験の結果、生成したN-OH-AAにはそのアセチル基のメチル基に¹³Cが希釈されることなく完全に保持されていることが確認された。これらの結果から、ピルビン酸が豚精子によるN-OH-AA生成の近接前駆物質または直接の反応物質であることが証明された。

現在までに報告されているN-アシルアセトヒドロキサム酸の代謝生成経路は、Scheme IIIに示すように次の三つに大別される。即ち、

- ① アセチル転移酵素による芳香族N-ヒドロキシルアミノ体のN-アセチル化²¹⁾、
- ② チトクロムP-450による芳香族N-アセトアミド体のN-水酸化³⁰⁾、
- ③ ピルビン酸脱炭酸酵素³¹⁾による芳香族ニトロソ化合物の還元的アセチル化。

豚精子によるNOBとピルビン酸からのN-OH-AA生成反応に上記した①及び②の代謝経路が関与している可能性は、アニリンに対するアセチル化活性及び調べた全ての基質に対するN-水酸化活性が豚精子に認められな



SCHEME III. Metabolic pathways of N-hydroxy-N-arylacetamide formation.

かったこと並びに¹³Cの取り込み実験から否定できる。N-水酸化活性が認められないことは、ラット、マウス及びヒト精子においてチトクロムP-450活性が検出されないこと¹⁹⁾及び精子はその形成過程において小胞体を欠落するという報告³³⁾とも一致する。③のピルビン酸脱炭酸酵素(EC 4.1.1.1)による経路は酵母⁶⁴⁾及びクロレラ⁶⁵⁾等において見出されたものである。本研究で認められたN-OH-AA生成

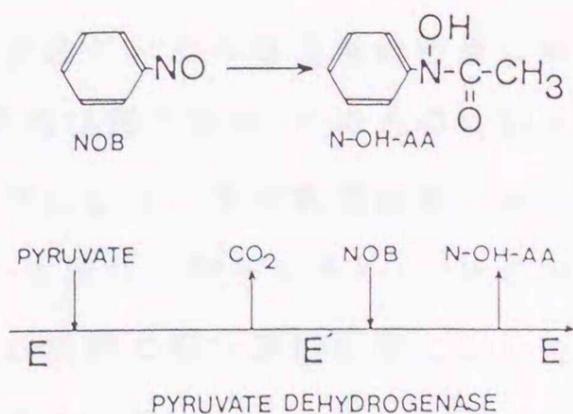
は、この③に類似した反応が哺乳動物精子においても起こり得ることを意味するものである。 N-OH-AA生成がミトコンドリア局在酵素であるPDHCにより触媒されている可能性を示す実験結果を、以下に述べる。

(1) 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いた。 ラット肝ミトコンドリアにはN-水酸化、N-アセチル化及びN-脱アセチル化等の異物代謝経路が報告されているが⁶⁶⁻⁶⁸⁾、用いられた基質は本論文のものと異なっており、詳細な知見も記載されていない。 今回用いた基質及び活性測定条件においては上記活性は何れも不検出であった。 PDHCの構成酵素の一つであるピルビン酸脱水素酵素(EC 1.2.4.1)は、ピルビン酸の酸化的脱炭酸と酸化型リポ酸残基の還元的アセチル化⁶⁹⁾の二つの反応を触媒する酵素であることから、NOBとピルビン酸からのN-OH-AA生成機構としてNOBの還元的アセチル化の可能性が考えられる。

(2) 本活性はチアミン添加により影響を受けなかったが、PDHCのコファクターである Mg^{2+} 及びTPP添加により増強され、TPP依存酵素の特異的阻害剤である TTPPにより抑制された。 リン酸化合物の細胞膜透過性に関する研究では、フォスフォエノールピルビン酸^{70,71)}、ピリドキサル-5'-モノリン酸⁷²⁾、及びツバサイジン-5'-モノリン酸⁷³⁾ は赤血球及びミトコンドリアの膜を透過するという報告があり、今回の実験でもフォスフォエノールピルビン酸が豚精子内へ透過している可能性が示された。 また、TPPに関しては脱ピロリン酸化を受けることなくE. coliに取り込まれる⁵⁶⁾ことも報告されている。 さらに、TPPはラット肝臓のミトコンドリアにより取り込まれること⁷⁴⁾が最近報告されている。 これらの報告と本実験で明らかにしたTPPによる活性増強作用、TTPPによる活性阻害作用及び³¹P-NMRによる取り込み実験から、TPP及びTTPPは 脱ピロリン酸化されることなく直接精子の細胞膜を透過していることが明かとなった。 近年、ヒトを含めた数種の哺乳動物の人工受精が行われており、精子の保存方法の開発が進められている。 精子の生存性を延長させる目的でチアミンプロピルジスルフィドが TPP前駆体として精子保存剤あるいは希釈剤中に添加されている⁷⁵⁾が、今回の実験でTPPはチアミンより即効性を含めて利用度が高く、精子の保存目的に対する TPPの有効性が示唆された。

(3) 豚精子による N-OH-AA生成反応のピルビン酸に対する見かけの K_m 値は、豚心筋PDHCのNADH生成反応のピルビン酸に対する K_m 値⁷⁶⁾と同じオーダーであり、N-OH-AA生成反応はPDHCの正常反応機構⁷⁷⁾と同様にピンポンBiBi機構(Scheme IV)に従うことが示唆された。

PDHC の正常反応において報告されている機構に照らしてみると、NOBは酸化型リポ酸のかわりにピルビン酸からの2電子還元当量及びアセチル基の直接受容体として作用していることが考えられる。



SCHEME IV. Ping-pong BiBi reaction mechanism.

芳香族ニトロソ化合物は、GSH等の低分子量のSH化合物やタンパク質のシステイン残基と反応して付加物や還元成績体ヒドロキシルアミノ体を生成することが知られている^{78,79)}。また、太糸期の精母細胞には比較的高濃度のGSHが存在していること⁸⁰⁾が報告されている。従って、豚精子のN-OH-AA生成に見られた物質収支の不一致はGSH、タンパク質等のSH基との付加物生成反応によるものであり、アゾキシベンゼンの生成はSH基によるNOBの還元反応に由来するものと考えられる。

哺乳動物精子において、発ガン性が認められているビフェニル及びフルオレンのニトロソ誘導体からも対応する近接発ガン物質 N-アリルアセトヒドロキサム酸が生成したことは、以下に示す二つの重要な毒性学的問題点を提起することになる。

第一点は、精子においてこの近接発ガン物質がさらに代謝活性化され得る場合、発ガン性芳香族含窒素化合物に暴露された精子の遺伝子突然変異の頻度が増大し、結果として先天的な機能欠損、奇形及び腫瘍発生等を引き起こす可能性が考えられる。また、精子に代謝活性化能が認められないとしても、この近接発ガン物質を担った精子が受精に関与した場合、その受精卵内での代謝活性化による遺伝子障害が上記した毒性を引き起こす可能性が考えられる。即ち、精子は近接発ガン物質のキャリアとなり得るものと考えられる。第二点は、N-アリルアセトヒドロキサム酸生成に関与しているPDHCは、解糖系とTCA回路を連結するエネルギー代謝及び物質代謝上重要な役割を担う中間代謝酵素である。従って、近接発ガン物質N-アリルアセトヒドロキサム酸の生成は、PDHCが触媒するNADH及びアセチルCoAの生成を阻害することになり、結果として細胞の正常な代謝を乱すことが考えられる。

精子の中片部を構築するミトコンドリアは、機能的には種々の動物組織細胞に見られるミトコンドリアと同様な酵素的特性を有していること⁸¹⁾が知られている。従って、このミトコンドリア局在酵素であるPDHCによる芳香族ニトロソ化合物からのN-アリルアセトヒドロキサム酸生成は、種々の動物細胞のミトコンドリアにおいても起こり得る可能性が高い。理論的には本反応は動物界、植物界のみなら

ず全ての好氣的生物において起こり得るものであり、その毒性学的意義は単に発ガン性の問題に留まらず、生物の存在(個体維持及び種の保存)そのものに対する危険性にも及ぶものと考えられる。さらに、本反応は、芳香族含窒素化合物による発ガン或いは細胞壊死が必ずしも肝臓等のN-水酸化に関与するP-450活性の高い組織細胞のみならず、小胞体を欠損或いはP-450活性の低い組織細胞においても認められることを説明し得る代謝経路の一つと考えられる。

1. 4 要約

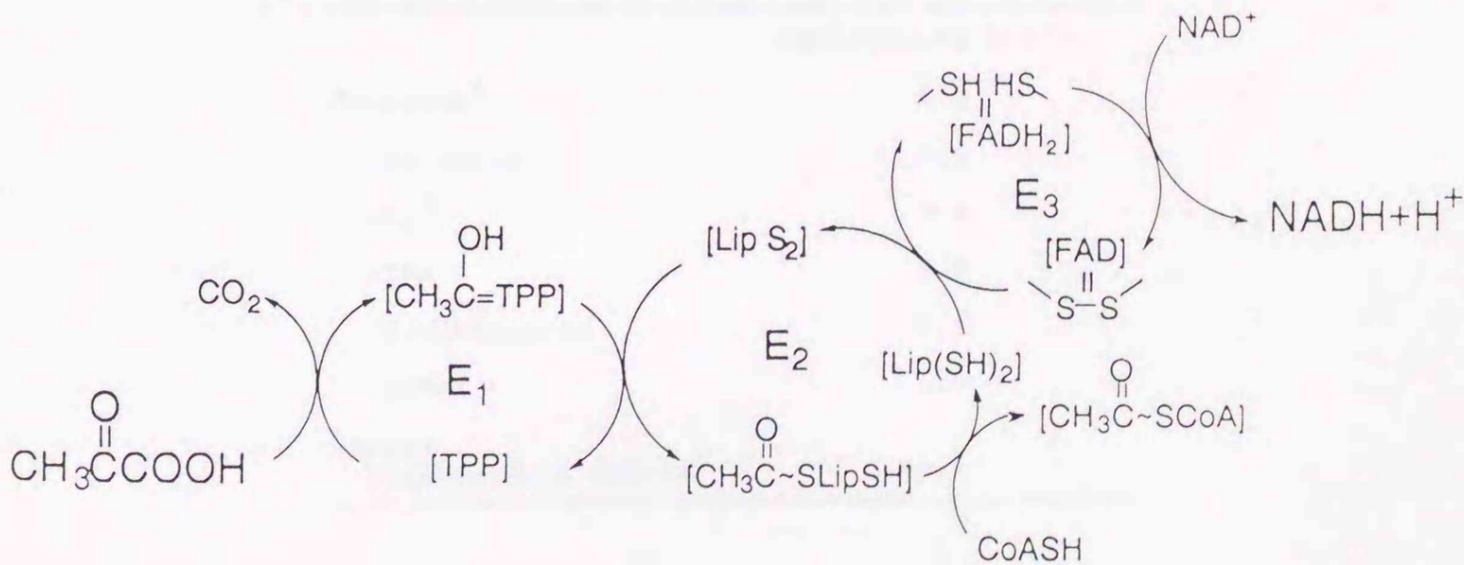
芳香族含窒素化合物として、アニリン、アセトアニリド、N-OH-AA、NOB、及びニトロベンゼンの哺乳動物精子による代謝について調べた。グルコースを添加した条件で、豚精子は上記化合物に対するアセチル化、脱アセチル化及びモノオキシゲナーゼ活性を示さなかった。ニトロベンゼンでは僅かに還元反応が認められたが、NOBに対してはより高い還元活性を示した。後者の反応における有機層転溶性代謝物として、N-OH-AA及びアゾキシベンゼンの生成が認められた。NOBからのN-OH-AA生成にはピルビン酸が関与しており、さらにこの反応はピンポンBiBi機構に従うことが示唆された。NOB及びピルビン酸に対する見かけのKm値は、各々 0.27 ± 0.01 mM及び 0.07 ± 0.01 mMであり、Vmax値は 2.5 ± 0.4 nmol/min/ 10^8 精子であった。一方、アゾキシベンゼン及び有機層非転溶性代謝物の生成はピルビン酸非依存性の非酵素的な反応によるものであった。[3- ^{13}C]標識ピルビン酸を用いた実験では、生成するN-OH-AAのメチル基に ^{13}C が希釈及び乱雑化を受けることなく完全に保持されていることが確認され、ピルビン酸がN-OH-AA生成における直接の反応物質であることが証明された。豚精子のN-OH-AA生成活性は中片部に局在しており、本活性はTPP(チアミン添加による影響は認められない)及び Mg^{2+} 添加により増強し、また、TTPPにより阻害された。 ^{31}P -NMRを用いた実験等により、TPPは直接豚精子内に取り込まれることが証明された。NOF及びNOBPからも対応する近接発ガン物質N-アリルアセトヒドロキサム酸の生成が認められた。N-OH-AA生成活性は豚精子以外に、ラット及びヒト精子においても認められた。これらの結果から、哺乳動物精子による芳香族ニトロソ化合物とピルビン酸からのN-アリルアセトヒドロキサム酸生成には、ミトコンドリア局在酵素であるPDHCが関与していることが強く示唆された。

第2章 哺乳動物心筋ミトコンドリア及び単離豚心筋PDHCによるN-アリルアセトヒドロキサム酸生成

2.1 緒論

前章では、哺乳動物精子が芳香族ニトロソ化合物とピルビン酸から、発ガン代謝上、重要な役割を担うN-アリルアセトヒドロキサム酸を生成することについて論述した。その際、好氣的細胞が有するミトコンドリア局在酵素PDHCが、本反応に関与していることが強く示唆された。精子のミトコンドリアは、通常の体細胞のミトコンドリアと機能的には同一の酵素特性を有している⁸¹⁾ことが知られている。それ故、本章では本活性がミトコンドリア局在酵素PDHCによることを直接証明するために分離法が確立されている哺乳動物心筋ミトコンドリア及び単離豚心筋PDHCを用いてN-アリルアセトヒドロキサム酸生成の検討を行った。通常の体細胞においても近接発ガン物質の生成が起こり得る可能性は高く、本反応は発ガン性芳香族含窒素化合物の代謝活性化経路として重要な意義を有するものと思われる。

PDHCは、TPP依存性のピルビン酸脱水素酵素(E1)、ジヒドロリポイルアセチル転移酵素(E2)及びジヒドロリポイル脱水素酵素(E3)の主要な三種の構成酵素からなる複合体である。さらに、E1酵素活性の調節酵素であるピルビン酸脱水素酵素キナーゼ及びピルビン酸脱水素酵素フォスファターゼも構成酵素の一員である³⁴⁻³⁷⁾。PDHCによるNADH及びアセチルCoAの生成機構³⁶⁾をScheme Vに示す。PDHCが芳香族ニトロソ化合物からのN-アリルアセトヒドロキサム酸生成に関与し



SCHEME V Reaction scheme for the oxidative decarboxylation of pyruvate by PDHC.

ている場合、Scheme V に示した幾つかの遷移中間体^{82, 83)}がアセチル供与体として作用している可能性が考えられる。従って、N-アシルアセトヒドロキサム酸生成におけるPDHCの各構成酵素の役割を明らかにすることは、反応機構を理解する上でも重要な意味を持っているものと思われる。本章では、N-アシルアセトヒドロキサム酸生成の活性発現に関与する構成酵素を解明し、また、活性に影響を及ぼす因子について検討を行った。さらに、上述したPDHCのアセチル転移反応に関与する遷移中間体と関連させて、N-アシルアセトヒドロキサム酸の生成機構についても考察する。

2. 2 結果

2. 2. 1 哺乳動物心筋ミトコンドリアによるN-アシルアセトヒドロキサム酸生成

NOBを豚心筋ミトコンドリア存在下、Table V に示した種々の条件でインキュベートした。豚精子と同様(ページ14)に、ピルビン酸を添加した場合には有機層転溶性代謝物として、N-OH-AA及びアゾキシベンゼンの生成が認められた。

TABLE V

Requirements for N-OH-AA formation by porcine heart mitochondria

Incubation mixture	N-OH-AA activity nmol/min/mg protein
Complete ^a	9.6
-pyruvate	<0.1
-Mg ²⁺	7.4
-TPP	6.9
-mitochondria	<0.1
+TTPP ^b	5.5
Heated mitochondria system ^c	<0.1

^aConsisted of 5 mM NOB, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM TPP, and 15 mM sodium pyruvate. Each incubation was initiated by addition of porcine heart mitochondria(0.24 mg protein) and carried out at 30 °C with shaking(60 strokes/min).

^bAdded instead of TPP at a concentration of 0.1 mM.

^cMitochondria(0.24 mg protein) were heated in boiling water saturated with ammonium sulfate for 15 s.

ピルビン酸を添加しない場合及び熱処理ミトコンドリアを使用した場合、何れもN-OH-AAの生成が認められなかったことは、N-OH-AA生成がピルビン酸依存性の酵素反応によるものであることを意味している。一方、アゾキシベンゼンの生成は豚精子の場合（ページ14）と同様に、ピルビン酸非依存性の非酵素反応によるものであった。

N-OH-AA生成活性は Mg^{2+} 及びTPPの添加によって増強し、TTPPによって阻害された。この結果は、豚心筋ミトコンドリアにおいても、TPP及びTTPPが精子と同様に取り込まれることを意味している（ページ16）。最近、単離ラット肝臓のミトコンドリア内にTPPが取り込まれること⁷⁴⁾が報告されており、このことは、上記の結果を支持するものである。

N-OH-AA生成の至適pH (Fig. 15)及び活性化エネルギー (Fig. 16)は、各々 pH 6.8及び 98 ± 4 kJ/molであった。これらの値は、後述（ページ34）する豚心筋PDHCによるN-OH-AA生成で得られた値と一致している。このことは、豚心筋ミトコンドリアのN-OH-AA生成における必須因子 (Table V)の結果と合わせて考えると、豚心筋ミトコンドリアによるN-OH-AA生成にはミトコンドリア酵素であるPDHCが関与していることを示唆している。

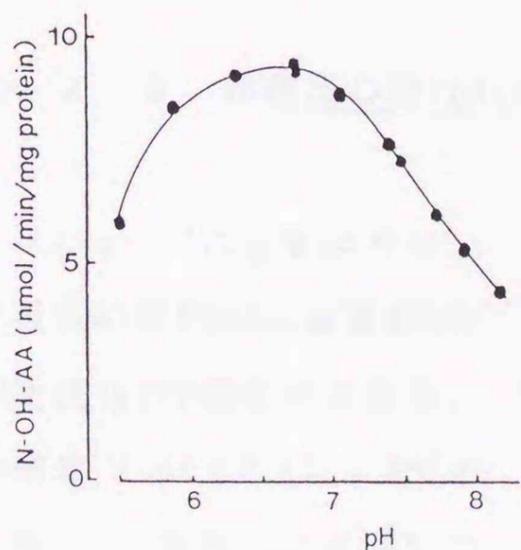


FIG. 15. Optimum pH of N-OH-AA formation by porcine heart mitochondria.

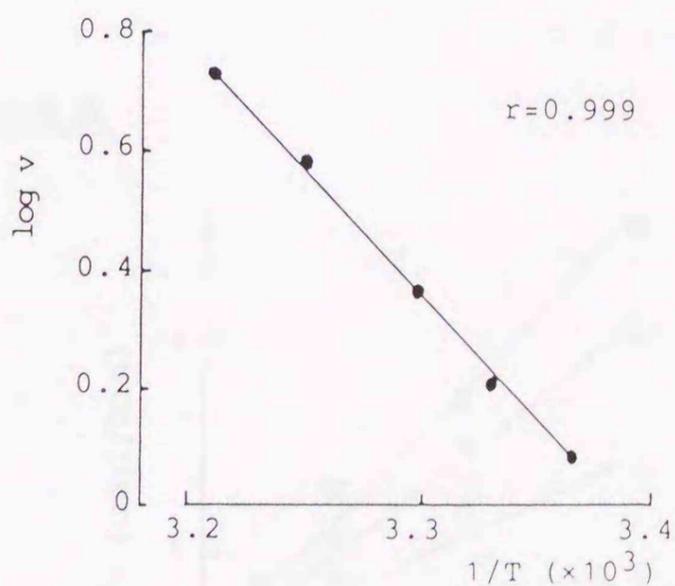


FIG. 16. Activation energy of N-OH-AA formation by porcine heart mitochondria.

心筋ミトコンドリアによるN-アシルアセトヒドロキサム酸生成における種差及びニトロソ体に対する基質特異性について検討するために、牛及びヒト心筋ミトコンドリアについても活性を測定した。Table VIに示すように、NOF及びNOBP

からも対応するN-アセトヒドロキサム酸体の生成が認められた。三種類のN-アリルアセトヒドロキサム酸の生成比は、豚、牛、及びヒト心筋ミトコンドリアの何れにおいても、N-OH-AA : N-OH-FAA : N-OH-BAA = 25 : 1 : 1であった。この実験から、芳香族ニトロソ化合物からのN-アリルアセトヒドロキサム酸生成反応は哺乳動物のミトコンドリアに普遍的に起こり得るものと思われる。

TABLE VI
N-Hydroxy-N-arylacetamide formation activities
of mammalian heart mitochondria

The amounts of N-hydroxy-N-arylacetamides formed were determined at pH 6.8 and 30 °C in an assay medium containing 0.5 mM TPP, 10 mM MgCl₂, 15 mM pyruvate, and 0.25 mM nitroso compound. For NOF and NOBP, Triton X-100 (final concentration of 0.2% (w/v)) was added as a solubilizer. Incubation was performed for 30 min with shaking (60 strokes/min).

Mitochondria	Activity		
	N-OH-AA	N-OH-FAA	N-OH-BAA
	nmol/30 min/mg protein		
Bovine	90	3.6	3.6
Human	36	1.4	1.4
Porcine	76	3.0	2.8

2. 2. 2 単離豚心筋PDHCによるN-OH-AA生成

Fig. 17に示すように、単離豚心筋PDHCによるN-OH-AA生成はTPP依存性であり、K_m値は1.02 ± 0.12 μMであった。また、この活性はTTPPにより競合的に阻害され、K_i値は0.22 ± 0.03 μMであった。この結果は、TPP依存性であるE1酵素がPDHCのN-OH-AA生成活性に関与していることを示唆するものである。

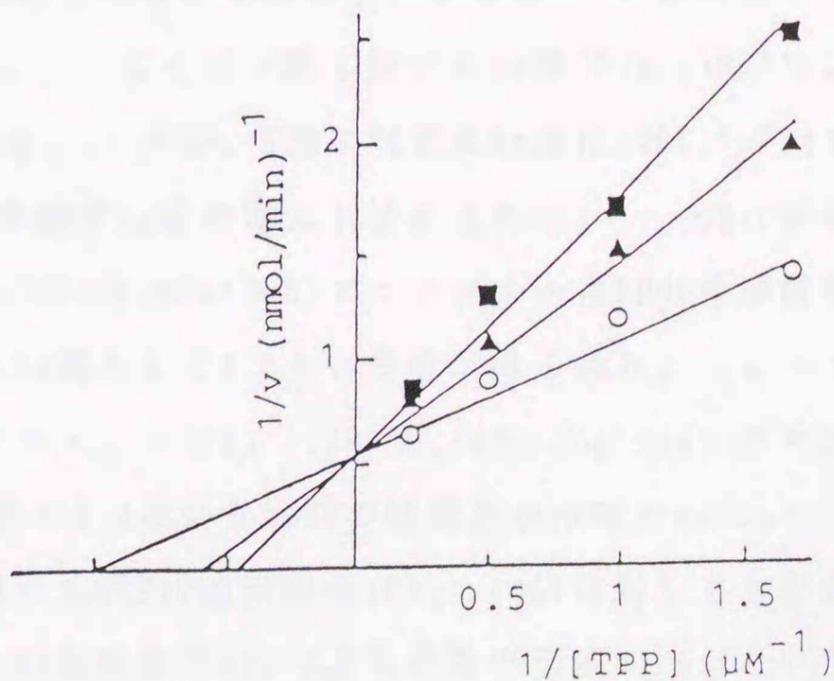


FIG. 17. Competitive inhibition of PDHC-catalyzed N-OH-AA formation by TTPP. Initial velocities of N-OH-AA formation were measured as described under "Experimental Procedures." Incubation was initiated by adding PDHC (4.5 μg protein) to the assay mixture without (O) or with 0.11 μM (▲) and 0.22 μM (■) of TTPP.

PDHCによるN-OH-AA生成の反応機構に関する情報を得るために、NOB及びピルビン酸を二基質反応とする酵素反応速度論的解析を行った。両基質濃度を可変にした条件で得られた初速度の逆数を基質濃度の逆数に対してプロットすると、Fig. 18 に示すように平行な直線群が得られた。脚注に記したように、反応速度式は N-OH-AA生成反応がピルビン酸BiBi機構に従って進行していることを示唆している。Vmax値は、 $0.36 \pm 0.05 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$ であった。ピルビン酸及びNOB に対するKm値は、各々 $0.05 \pm 0.01 \text{ mM}$ 及び $0.25 \pm 0.07 \text{ mM}$ であった。

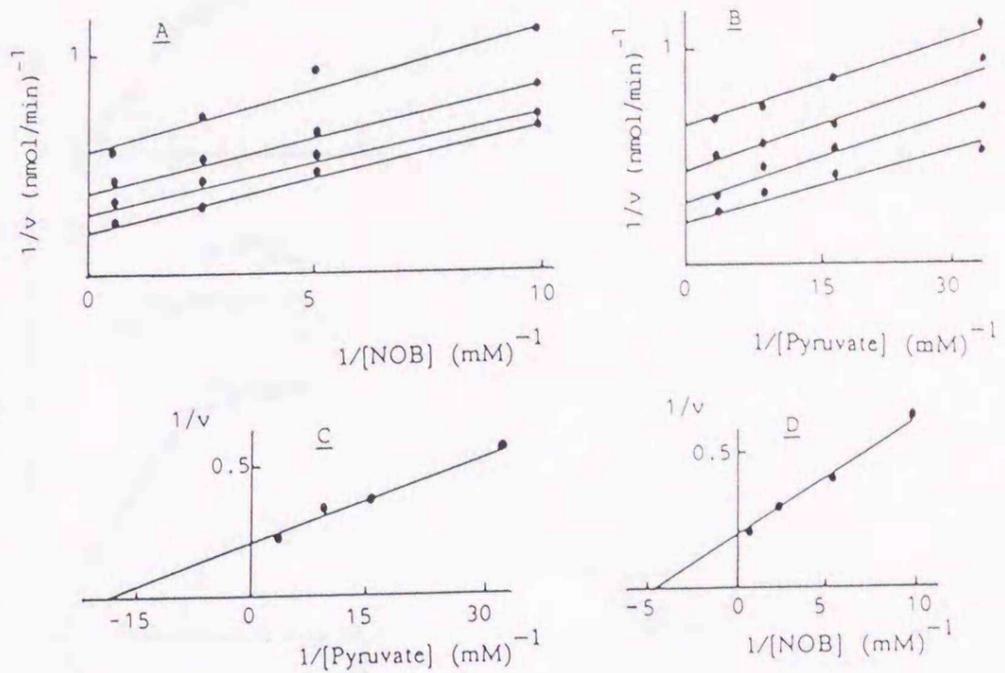


FIG. 18. Initial velocity profiles for PDHC-catalyzed formation of N-OH-AA from NOB and pyruvate. Initial velocities of N-OH-AA formation were measured as described under "Experimental Procedures." Incubation was initiated by adding PDHC (13 μg protein). A, NOB as a variable substrate at different fixed concentrations of pyruvate; B, pyruvate as a variable substrate at different fixed concentrations of NOB; C, replotting of the intercepts of A; D, replotting of the intercepts of B.

$$\frac{V_{\max}}{v} = 1 + \frac{0.05}{[\text{Pyruvate}]} + \frac{0.25}{[\text{NOB}]} + \frac{0.00}{[\text{Pyruvate}][\text{NOB}]}$$

ピルビン酸に対するKm値は、豚心筋PDHCのNADH生成活性におけるピルビン酸に対するKm値⁷⁶⁾と一致しており、また、豚精子の結果(ページ19)とも一致した。

Fig. 19 にPDHCのN-OH-AA生成活性における反応動力学定数のpH依存性について30°C、pH 5.2-7.4の結果を示す。ピルビン酸に対するKm値(Fig. 19A)は、この範囲内ではpH非依存性であった。一方、NOBに対するKm値はpH 6.7-7.4まではほぼ一定値を示したが、より酸性側でKm値の増大が認められた。NOBは解離し得る官能基を有していないので、このpH-pKm(NO B)プロファイルはPDHCの解離基に由来するものと考えられる。pKa値として6.3という値が得られた。ピルビン酸に対するpH-log(Vmax/Km)プロファイル(Fig. 19B)は、pH-log Vmaxプロファイルと同一であり、pKaとして5.6及び7.4というPDHCの解離基が示唆された。pKa 7.4の解離基は、E1酵素が触媒するDCPIP還元活性(Fig. 19B)に対しても影響していることが認められた。N-OH-AA活性及びDCPIP還元活性の至適pH 6.8という値は、豚心筋PDHCのE1酵素のピルビン酸の酸化的脱炭酸反応の至適pH⁸⁴⁾と一致している。

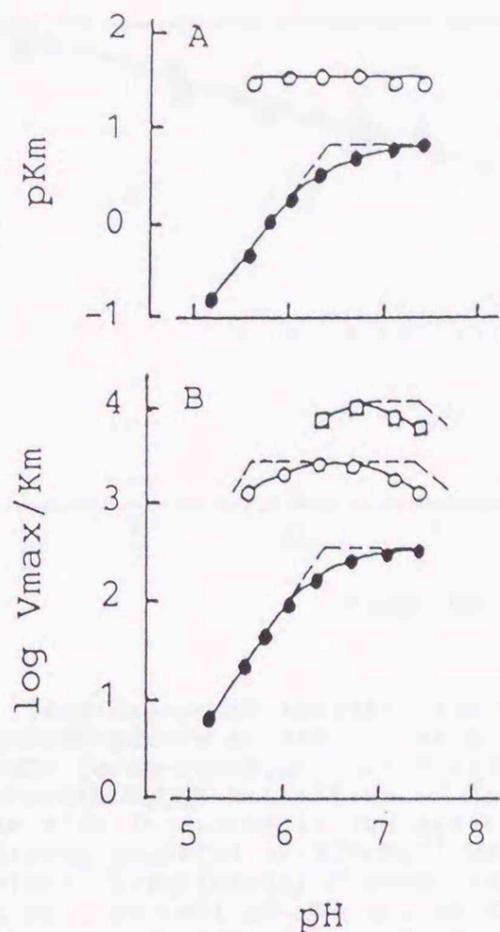


FIG. 19. The pH dependence of kinetic parameters of PDHC-catalyzed N-OH-AA formation and DCPIP activity. Initial velocities of N-OH-AA formation were measured at 13 mM NOB for measurement of $K_m(\text{NOB})$ or 15 mM pyruvate for measurement of $K_m(\text{pyruvate})$. A, $pK_m(\text{NOB})$ (●) and $pK_m(\text{pyruvate})$ (○) versus pH in N-OH-AA formation; B, $\log V_{\max}/K_m(\text{NOB})$ (●) and $\log V_{\max}/K_m(\text{pyruvate})$ (○) in N-OH-AA formation, and $\log V_{\max}/K_m(\text{pyruvate})$ (□) in DCPIP activity versus pH. Breaks in straight lines (slopes -1, 0, +1) denote pK_a values of about 5.6, 6.3, and 7.4.

2. 2. 3 N-OH-AA生成に関するPDHC構成酵素の同定

前述した豚心筋PDHCによるN-OH-AA生成反応の至適pH及びTPP、 Mg^{2+} 要求性から、E1酵素が活性発現に必須であるものと思われる。E1酵素活性は、E1酵素の調節酵素であるキナーゼ及びフォスファターゼによるリン酸化(不活性化)及び脱リン酸化(活性化)を介して調節³⁴⁾されている。従って、PDHCのN-OH-AA生成活性は、E1酵素の活性調節に関するキナーゼによって影響を受けることが予想される。Fig. 20に、ATP- Mg^{2+} 添加によるPDHCのDCPIP還元活性、NADH生成活性及びN-OH-AA生成活性の消失の経時変化を示す。何れの活性も、約55%の活性消失まで擬一次反応速度式に従って減少することが認められ、また、上記三種の活性の消失速度定数には有意な差は認められなかった(Fig. 20の脚注参照)。なお、これらの活性低下は、ATP- Mg^{2+} を添加しない場合には認められなかった。この結果から、PDHCによるN-OH-AA生成活性は、活性型E1酵素(非リン酸化状態)に起因することが示唆された。

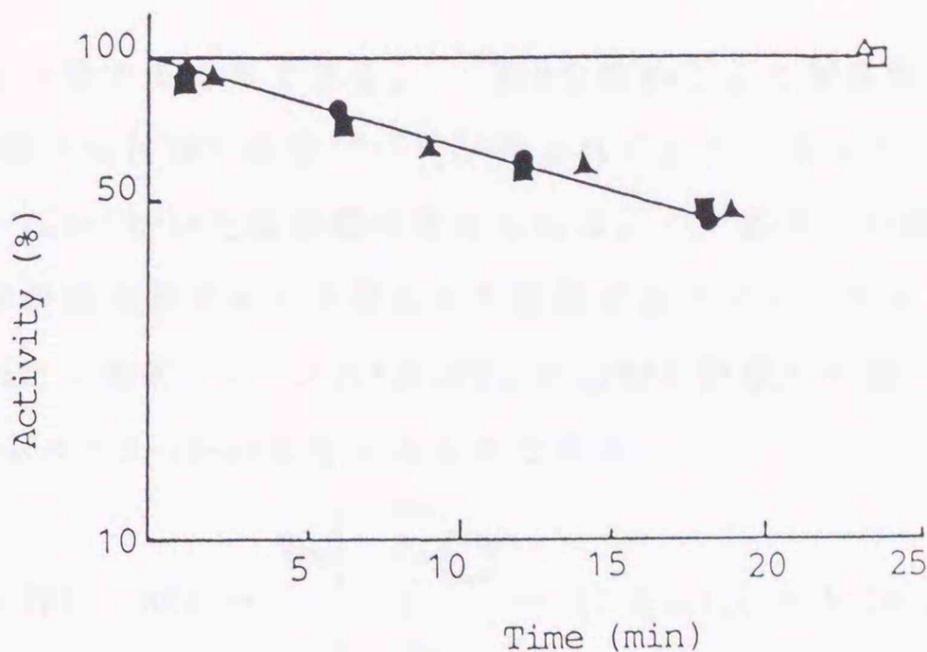
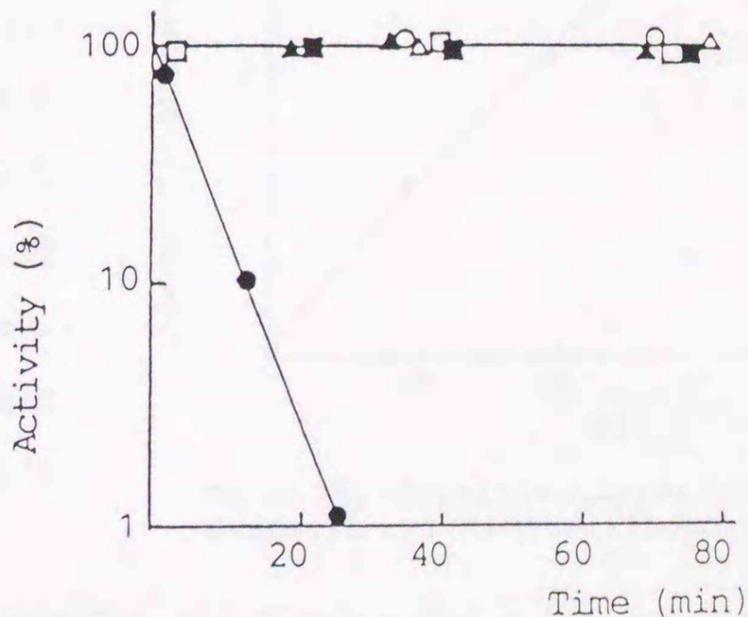


FIG. 20. Time-dependent inactivation of PDHC mediated by pyruvate dehydrogenase kinase in the presence of ATP-Mg^{2+} . Residual NADH formation (\bullet, \circ), DCPIP reduction ($\blacktriangle, \triangle$), and N-OH-AA formation (\blacksquare, \square) activities of PDHC were measured at appropriate time intervals in the presence (filled symbols) or absence (open symbols) of ATP-Mg^{2+} under the described conditions (see "Experimental Procedures"). Each activity is plotted as a percent of the untreated control. Apparent first-order rate constant (k_{app}) of inactivation, determined by semilogarithmic plots, were as follows:
 for the NADH activity, $k_{app} = (7.2 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
 for the DCPIP activity, $k_{app} = (6.5 \pm 0.4) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$
 for the N-OH-AA activity, $k_{app} = (6.5 \pm 0.7) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

次に、E2及びE3酵素がN-OH-AA生成に関与しているか否かを調べるために、PDHCのN-OH-AA生成活性に対するN-エチルマレイミド(NEM)の影響を経時的に追跡した。NEMはE2酵素のアセチルジヒドロリポイル残基のSH基を選択的に修飾することにより、E2酵素活性を不可逆的に阻害する。その結果、PDHCはE1酵素とE3酵素との連結が遮断されるため、NADH生成活性を消失すること⁸⁵⁾が報告されている。Fig.

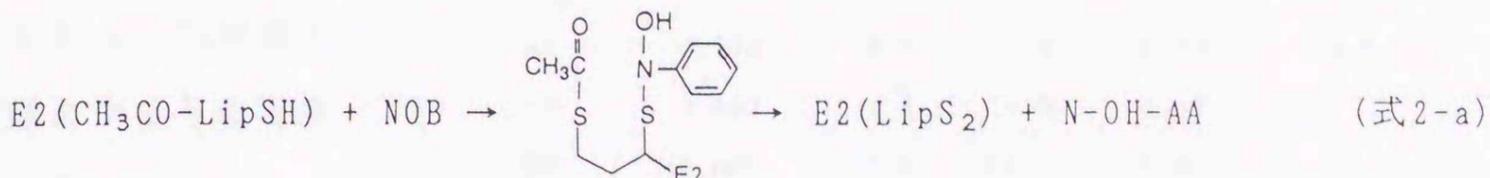
21に示したように、NEM処理によってPDHCのNADH生成活性は擬一次反応速度式に従って減少し、25分後には認められなくなった。一方、N-OH-AA生成活性及びDCPIP還元活性は、NEM処理による影響を受けず、75分後でも活性低下は認められ



なかった。この結果は、PDHCのN-OH-AA生成活性がE2及びE3酵素活性には依存し

FIG. 21. Time-dependent inactivation of PDHC by NEM. Residual NADH formation (\bullet, \circ), DCPIP reduction ($\blacktriangle, \triangle$), and N-OH-AA formation (\blacksquare, \square) activities of PDHC were measured at various time intervals in the presence (filled symbols) or absence (open symbols) of NEM under the described conditions (see "Experimental Procedures"). Each activity is plotted as percent of untreated control. The apparent first-order rate constant (k_{app}) of the inactivation was $(3.4 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$.

ていないことを示唆するものである。 NOBを始めとして芳香族ニトロソ化合物は、NEMと同様にSH基との付加反応性^{78,79)}が知られており、従って、可能性として(式2-a)に示すようなN-OH-AA生成機構が考えられる。 即ち、E1酵素による E2酵素のリポイル残基の還元的アセチル化により生成するモノ-S-アセチルジヒドロリポイル残基(Scheme V参照; ページ26)がNOBと付加物を形成した後、分子内でのS, N-アセチル転位によりN-OH-AAを与えるものである。



この反応機構は、上述したNEMによるN-OH-AA生成活性の阻害実験から否定し得るものであるが、さらに以下に示す実験により(式2-a)の可能性を直接否定することができた。 第一に、E2酵素のモノ-S-アセチルジヒドロリポイル残基に相当する(±)-モノ-S-アセチルジヒドロリポアミドとNOBとの反応を行ったが、N-OH-AAの生成は認められなかった。 第二に、アセチル-CoA及び(±)-ジヒドロリポアミドをPDHC存在下でN-フェニルヒドロキシルアミンとインキュベートした反応においても、N-OH-AAの生成は認められなかった。 後者の反応条件では、PDHCのE2酵素によるアセチル転移反応により(±)-モノ-S-アセチルジヒドロリポアミドの生成を確認している(Fig. 22)。この結果はN-フェニルヒドロキシルアミンの(式2-a)による直接的アセチル化によるN-OH-AA生成の可能性も否定し得るものと思われる。 これらの結果も、PDHCによるN-OH-AA生成活性がE1酵素単独の関与によるものであることを支持するものである。

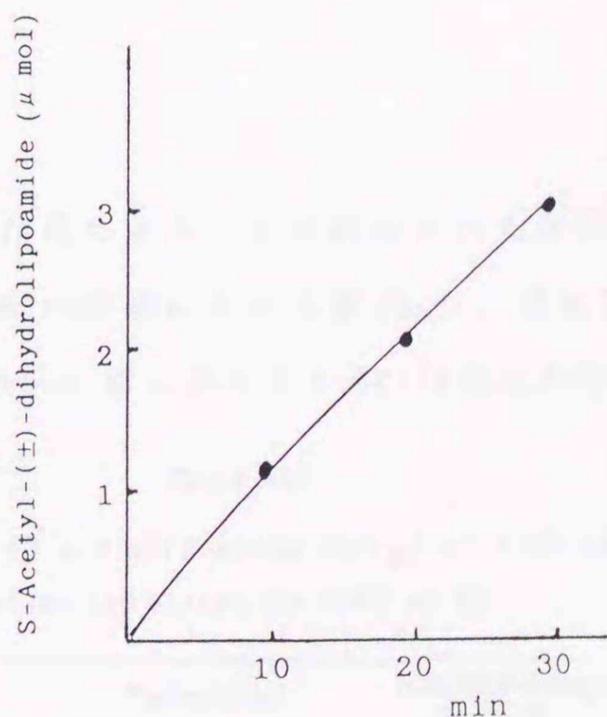


FIG. 22. E2-Catalyzed formation of S-acetyl-(±)-dihydrolipoamide.

E1酵素がN-OH-AA生成活性の本体であることをさらに確認するために、豚心筋PDHCをE1、E2及びE3酵素に分画し、各画分についてE1、E2、E3酵素活性及びN-OH-AA生成活性を測定した。 Table VIIに示すようにN-OH-AA生成活性は分離E3酵素では認められず、分離E1酵素が最も高いN-OH-AA生成活性を示した。 N-OH-AA生成活性とDCPIP還元活性の比から、N-OH-AA生成活性はE1酵素単独の作用によることが確

認められた。分離
E2酵素に認められた
N-OH-AA生成活性は、
活性比の値がPDHC及
び分離E1酵素で得ら
れた値と同一である
ことから、E1酵素の
夾雑によるものと思
われる。

TABLE VII
DCPIP reduction, Ac-HLA formation, LA reduction, and N-OH-AA formation activities of PDHC and its component enzymes

Enzyme	Specific activity				Ratio ^b
	DCPIP ^a	Ac-HLA ^a	LA ^a	N-OH-AA ^a	
μ mol/min/mg protein					
PDHC	0.037	3.5	1.1	0.38	10
E1	0.076	0.0	0.1	0.72	9.5
E2	0.007	4.4	0.0	0.07	10
E3	<0.001	0.0	16	<0.01	-

^aDCPIP(reduction), Ac-HLA(formation), LA(reduction), and N-OH-AA(formation) activities of PDHC and its isolated component enzymes(E1, E2, and E3) were assayed as described under "Experimental Procedures."

^bRatio means N-OH-AA activity/DCPIP activity.

2. 2. 4 E1酵素によるN-OH-AA生成

PDHCによるN-OH-AA生成がE1酵素単独の作用によることが確認されたので、PDHC及びそれより分離したE1酵素によるN-OH-AA生成における至適pH、活性化エネルギー及び反応動力学定数を比較した。Table VIIIに示したN-OH-AA生成の至適pH、6.8、及び同pHにおける活性化エネルギー値において、PDHC及び分離E1酵素には差が認められなかった。Fig. 23には、PDHC及び分離E1酵素を用いたN-OH-AA生成反応のCornish-Bowdenプロット⁶⁰⁾の結果を示す。

TABLE VIII
Optimum pH and activation energy of N-OH-AA formation catalyzed by PDHC or E1

	Optimum pH	Activation energy (kJ/mol)
E1	6.8	98 ± 10
PDHC	6.8	96 ± 8

Fig. 23の脚注に示したように、N-OH-AA生成のKm(NO_B)値及び μ mol/min/unit(E1酵素)で表したVmax値の何れにおいても、両酵素には差が認められなかった。これらの結果は、分離E1酵素にはN-OH-AA生成活性に影響を与えるような立体的なコンホメーションの変化が認められないことを意味している。

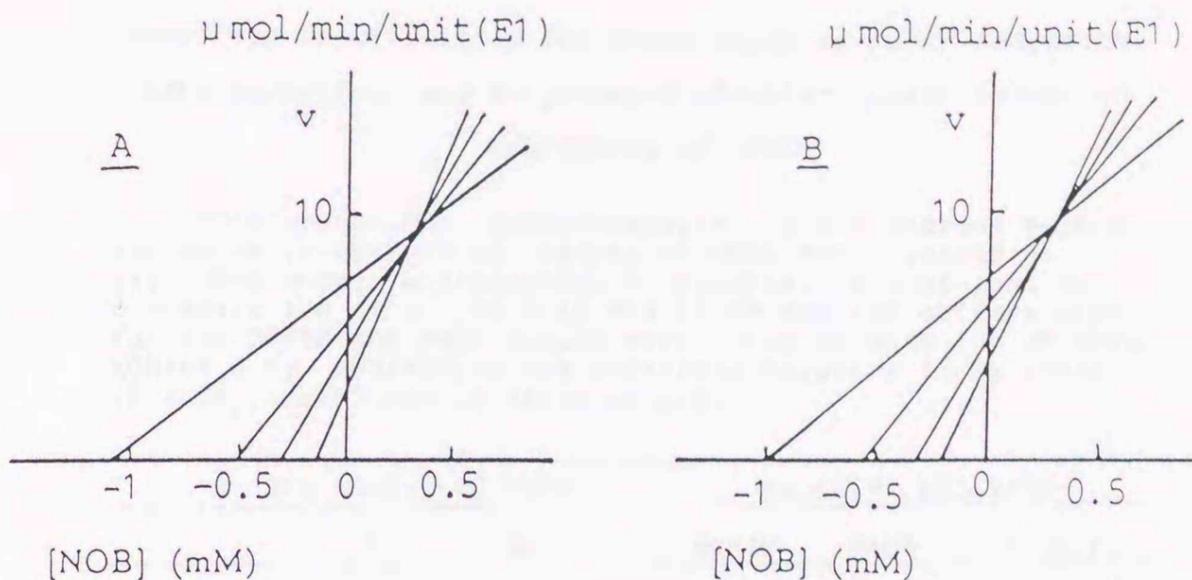


FIG. 23. Cornish-Bowden plots for N-OH-AA formation catalyzed by PDHC(A) and the isolated component enzyme E1(B). Initial velocities were measured at variable concentrations of NOB in the presence of 15 mM pyruvate (saturated level) as described under "Experimental Procedures" and expressed as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{unit}(\text{E1})$, in which 1 unit of E1 reduces 1 μmol of DCPIP per minute under the conditions described for the DCPIP activity (see "Experimental Procedures"). A, apparent $K_m(\text{NOB})$ and V_{max} values are 0.26 ± 0.08 mM and 9.7 ± 0.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{unit}(\text{E1})$, respectively. B, apparent $K_m(\text{NOB})$ and V_{max} values are 0.34 ± 0.07 mM and 9.2 ± 0.4 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{unit}(\text{E1})$, respectively.

2. 2. 5 PDHCによるNOBと α -オキソ酸からのN-フェニルアシルヒドロキサム酸生成

ピルビン酸以外の α -オキソ酸が対応するN-アシルアシルヒドロキサム酸生成において有効な基質であるか否かを調べるために、NOBと6種の α -オキソ酸との反応性について検討した。Table IXに示すように、ピルビン酸と α -オキソ酪酸は対応するN-フェニルアシルヒドロキサム酸生成の有効な基質であったが、その他の α -オキソ酸からはN-フェニルアシルヒドロキサム酸の生成は認められなかった。同様に、NADH生成においてもピルビン酸と α -オキソ酪酸(α -オキソ吉草酸にも僅少な活性有)にのみ有意な活性が認められた。

一方、E1酵素が触媒するDCPIP還元活性においては、N-フェニルアシルヒドロキサム酸生成及びNADH生成の場合とは異なり、ピルビン酸と α -オキソ酪酸に高い特異性は認められたが、使用した全ての α -オキソ酸が基質となり得る結果が得られた。このDCPIP還元活性にTaft則を適用すると、R基の立体置換基定数(E_s)⁸⁶⁾及び極性置換基定数(σ^*)⁸⁷⁾と \log [DCPIP相対活性]との間には、(式2-1)に示される相関性($r=0.939$, $n=6$, $P<0.05$)が認められた。

TABLE IX

Substrate specificities for α -oxo acids in DCPIP reduction, NADH formation, and N-hydroxy-N-phenylacetylamine formation activities of PDHC

DCPIP(reduction), NADH(formation), and N-hydroxy-N-phenylacetylamine(formation) activities of PDHC were assayed as described under "Experimental Procedures," except that the concentration of α -oxo acid was 15 mM and the buffers used for the DCPIP and NADH assays were replaced with 100 mM MOPS-KOH(pH 6.8). Activities are expressed relative to pyruvate (R = CH₃), arbitrarily taken as 100.

α -Oxo acid(R-CO-COOH)		Relative activity		
R	Es	DCPIP	NADH	N-OH-PA ^a
		% of control		
CH ₃ -	0.00	100	100	100
CH ₃ CH ₂ -	-0.07	55	62	82
CH ₃ CH ₂ CH ₂ -	-0.36	32	1	0.0
(CH ₃) ₂ CH-	-0.47	24	0.0	0.0
CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH-	-1.13	7	0.0	0.0
(CH ₃) ₂ CHCH ₂ -	-0.93	3	0.0	0.0

^aN-OH-PA: N-Hydroxy-N-phenylacetylamine.

$$\log [\text{DCPIP 相对活性}] = 1.28 E_s - 0.98 \sigma^* + 1.84 \quad (\text{式 2-1})$$

(1.03) (0.13)

括弧内に記した標準化回帰係数の値から、R基の立体的効果が電子的効果よりも大きく反応性に寄与していることが示唆された。このことは、Fig. 24に示すようにR基のEs項のみでもlog [DCPIP相対活性]との間に良い相関性($r=0.935$, $n=6$, $P<0.01$)が認められたことから支持される。Es項のみからなるTaft式は、図の脚注に示した。何れのTaft式においてもEs項の係数 δ 値が正の値を示したことは、 α -オキソ酸のR基の立体的かさ高さの増大(Es値の減少に対応)により、E1酵素が触媒する α -オキソ酸の酸化的脱炭酸活性が減少することを意味している。従って、N-フェニルアシルヒドロキサム酸生成に対する高い基質特異性は、 α -オキソ酸の酸化的脱炭酸反応及び反応により生じた活性中間体とNOB間の反応の両方において、R基の立体的効果がE1酵素活性に影響していることを示唆している。

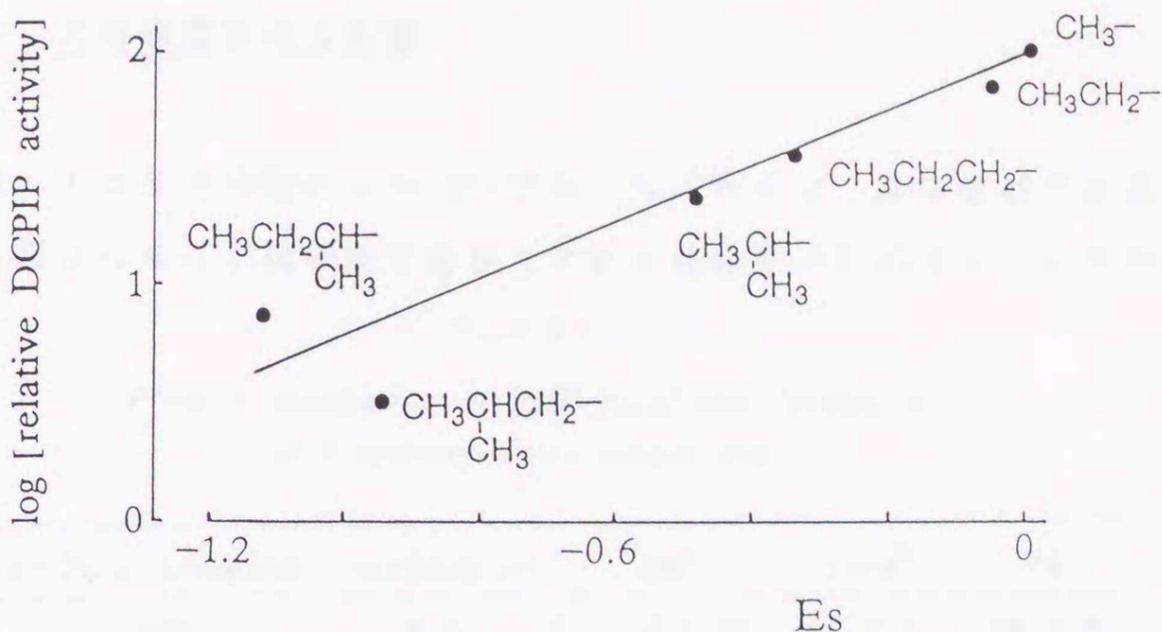


FIG. 24. Correlation of log [relative DCPIP activity] of PDHC with Taft's E_s constants of α -oxo acids. DCPIP activities were expressed relative to pyruvate ($R=CH_3$), arbitrarily taken as 100. The correlation equation obtained was as follows.

$$\log [\text{relative DCPIP activity}] = (1.16 \pm 0.14)E_s + (1.90 \pm 0.14)$$

E1酵素によるピルビン酸の酸化的脱炭酸反応において、ピルビン酸由来の活性中間体としてScheme V (ページ26)に示したように2-(1-ヒドロキシエチリデン)-TPPの生成が考えられている^{82, 83)}。この物質のプロトン付加体に相当する2-(1-ヒドロキシエチル)TPP⁸³⁾は化学合成されているが、そのC₂- α 位のpK_aは19以上と推定されており⁸⁸⁻⁹⁰⁾、それ故、解離型である前者への可逆性は非常に低いものと思われる。2-(1-ヒドロキシエチル)TPPは、ハト胸筋PDHCのE1酵素による酸化的分解反応の基質となること⁹¹⁾が報告されているので、NOBと2-(1-ヒドロキシエチル)TPPからのN-OH-AA生成の可能性について検討した。2-(1-ヒドロキシエチル)TPPは、報告されているように、豚心筋PDHCのE1酵素によるDCPIP還元活性の基質とはなり得たが、NOBとの反応によるN-OH-AAの生成はPDHC存在下あるいは非存在下の何れの条件においても認められなかった。また、2-(1-ヒドロキシエチル)TPPは、PDHCのNADH生成活性の基質とはなり得なかった(Table X)。これらの結果から、2-(1-ヒドロキシエチル)TPPは、NOBと直接反応し得る中間体ではなく、活性カルボアニオン中間体である2-(1-ヒドロキシエチリデン)TPPがN-OH-AA生成に関与しているものと考えられる。

TABLE X

Efficiency of 2-(1-hydroxyethyl)TPP for substrate in DCPIP reduction and NADH formation

Substrate (2 mM)	Activity (μ mol/min)	
	NADH formation	DCPIP reduction
pyruvate	0.13	0.0036
2-(1-hydroxyethyl)TPP	0.00	0.0011

2. 2. 6 芳香環置換基の影響

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の反応機構に関する知見を得るために、数種の芳香族ニトロソ化合物の反応性について検討した。

TABLE XI.

Kinetic parameters of PDHC-catalyzed formation of N-hydroxy-N-arylacetamides

Nitroso compound	Optimum pH	Km ^a	Vmax ^b	Ea ^c
NOB	6.8	0.31 ± 0.06	65 ± 4	96 ± 8
2-Cl-NOB	6.8 (6.8) ^d	0.28 ± 0.06 (0.24 ± 0.03)	79 ± 8 (29 ± 3)	94 ± 8 (88 ± 8)
3-Cl-NOB	6.8	0.24 ± 0.02	104 ± 4	79 ± 4
4-Cl-NOB	6.8	0.30 ± 0.04	71 ± 4	100 ± 8
4-Me-NOB	-	0.30 ± 0.03	31 ± 1	-
4-OEt-NOB	-	0.27 ± 0.02	19 ± 1	-
NOBP ^e	-	0.30 ± 0.02	3.5 ± 0.3	-
NOF ^e	-	0.35 ± 0.04	2.7 ± 0.3	-

^aKm values, measured in the presence of 15 mM pyruvate, for the nitroso compound: mM.

^bVmax values are expressed as nmol/min/unit(PDHC), in which 1 unit of PDHC forms 1 μmol of NADH per minute under the condition described for the NADH activity(see "Experimental Procedures").

^cObtained by Arrhenius plots(in the range of 24 to 36 °C.); expressed as kJ/mol.

^dValues in parentheses are for the formation of 3-chloro-4-aminophenol.

^eTo the incubation mixture, Triton X-100(final concentration of 0.2 % (w/v)) was added as a solubilizer.

Table XI に示したように、ニトロソ化合物に対する Km 値及び至適 pH は、調べた基質において差が認められなかった。

一方、Vmax 値あるいは活性化エネルギーには、芳香環置換基の種類及び置換位置の影響が認められた。Brown の σ^+ 値を用いた Hammett プロット⁹²⁾ (Fig. 25) において、正の ρ 値(傾き)が得られたことから、電子供与性置換基によりニトロソ化合物の反応性が低くなることが示唆された。得られた Hammett 式は、(式 2-2; $r=0.975$, $n=5$, $P<0.01$) に示す。

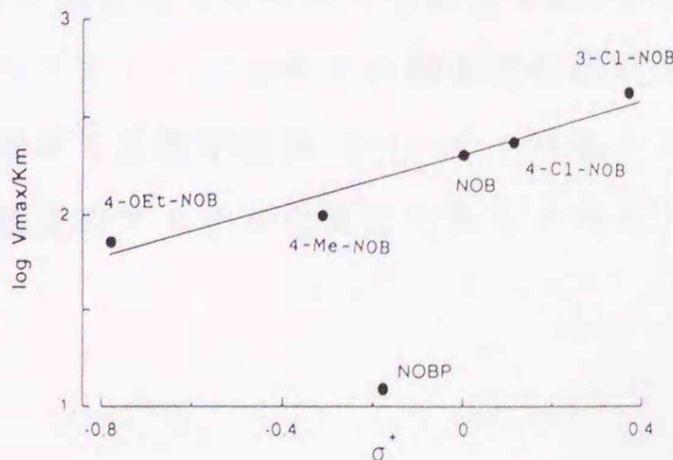


FIG. 25. Correlation of log Vmax/Km for nitroso aromatic compounds in the formation of N-arylaceto-hydroxamic acids vs Brown's σ^+ constants.

$$\log V_{\max}/K_m = (0.69 \pm 0.09) \sigma^+ + (2.32 \pm 0.04) \quad (\text{式2-2})$$

NOBP及びNOFは予想される値よりも低い $\log V_{\max}/K_m$ 値を示したことから、立体的要因の関与が示唆された。この点に関しては、第4章(ページ66)で論述する。

2-クロロニトロソベンゼン(2-C1-NOB)では、対応する N-アセトヒドロキサム酸体の他に N-(2-クロロフェニル)ヒドロキシルアミンと3-クロロ-4-アミノフェノールの生成が認められた。N-アセトヒドロキサム酸体の生成に対しては、2-クロル基の影響は認められず、NOBと同等以上の反応動力学定数を与えた(Table X I)。2-C1-NOBとピルビン酸を豚心筋ミトコンドリアあるいは分離E1酵素を用いてインキュベートした場合でも、同様に上述した三種の代謝物の生成が認められた。転位代謝物である3-クロロ-4-アミノフェノールは、用いた条件下では N-(2-クロロフェニル)ヒドロキシルアミンあるいは N-(2-クロロフェニル)アセトヒドロキサム酸より生成するのではなく、後者の生成と併発して進行しているものと考えられる。転位代謝物生成における至適pH、活性化エネルギー並びに2-C1-NOB に対する K_m 値(Table X I の括弧内に示した数値)は、N-(2-クロロフェニル)アセトヒドロキサム酸生成において得られた値と一致した。この結果は、両代謝物が共通の中間体から生成していることを示唆している。Table X I に示した転位代謝物及び N-(2-クロロフェニル)アセトヒドロキサム酸生成の V_{\max} 値から、この中間体の生成速度定数は2-C1-NOBが異常に高い値であることが示唆された。

PDHCが触媒する正常な反応において、律速段階はE1酵素が触媒するピルビン酸の酸化的脱炭酸反応であることが報告されている⁹³⁾。ピルビン酸を基質とした場合、豚心筋PDHCによるNADH生成反応の活性化エネルギーは pH 6.8において 47 ± 2 kJ/mol(図不掲載)であり、N-OH-AA生成反応の活性化エネルギーは前者の約2倍の 96 ± 8 kJ/molであった。従って、N-アリルアセトヒドロキサム酸生成反応の律速段階は、ピルビン酸の脱炭酸反応により生成する活性中間体 2-(1-ヒドロキシエチリデン)TPPによる芳香族ニトロソ化合物の還元的アセチル化反応であると考えられる。

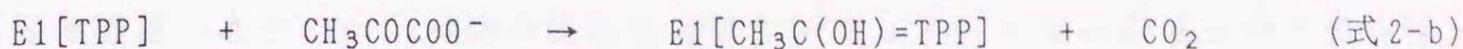
2. 3 考察

芳香族ニトロソ化合物とピルビン酸からの N-アシルアセトヒドロキサム酸の生成は、牛、豚、及びヒトの心筋ミトコンドリアにおいて観察された。豚心筋ミトコンドリアによる N-OH-AA 生成活性は TPP により増大し、TTPP により阻害され、豚精子において認められた反応と同様な特徴を示した。また、N-OH-AA 生成活性におけるピルビン酸に対する K_m 値が精子とミトコンドリアで一致していることから、異なる組織においても同一種のミトコンドリアが機能しているものと考えられる。また、これらの結果と、豚心筋ミトコンドリアによる N-OH-AA 生成の至適 pH 及び活性化エネルギーの値が、豚心筋 PDHC による反応で得られた値と一致することから、ミトコンドリアによる N-アシルアセトヒドロキサム酸生成は PDHC 関与によることが示唆された。さらに、PDHC による N-OH-AA 生成において、PDHC の構成酵素の一つである E1 酵素が活性の本体であることを示す以下の結果が得られた。

- 1) PDHC による N-OH-AA 生成はピルビン酸と $TPP-Mg^{2+}$ 存在下で進行し、TTPP は反応を阻害した。
- 2) PDHC による N-OH-AA 生成は、PDHC の NADH 生成⁷⁷⁾ と同様にピンポン BiBi 機構に従って進行した。
- 3) Walsh 等が報告した $ATP-Mg^{2+}$ 存在下での E1 酵素キナーゼが仲介する E1 酵素のリン酸化による不活性化⁹⁴⁾ に同調して、PDHC の N-OH-AA 生成活性も減少した。
- 4) PDHC の N-OH-AA 生成活性は、E2 酵素を選択的に阻害する NEM 処理によっても影響を受けなかった。
- 5) N-OH-AA 生成は、E2 酵素のモノ-S-アセチルジヒドロリポイル残基に相当するモノ-S-アセチルジヒドロリポアミドと NOB との反応、あるいは、豚心筋 PDHC 存在下での N-フェニルヒドロキシルアミンとアセチル CoA 及び(±)ジヒドロリポアミドとの反応の何れの場合にも認められなかった。
- 6) 分離 E1 酵素はそれ自体で N-OH-AA 生成活性を示した。その至適 pH は PDHC 同様 6.8 であり、分離 E1 酵素が触媒するピルビン酸の酸化的脱炭酸の至適 pH⁸⁴⁾ と一致した。
- 7) PDHC 並びに分離 E1 酵素の N-OH-AA 生成における NOB に対する K_m 値、 V_{max} 値及び活性化エネルギー値は、両者において一致した。

PDHC による N-OH-AA 生成及び NADH 生成の両反応におけるピルビン酸に対する K_m

値が一致したことから、PDHCによるN-アシルアセトヒドロキサム酸生成において、E1酵素はNADH生成反応の場合と同様に機能しているものと考えられる。E1酵素が触媒する反応は、ピルビン酸の脱炭酸反応による2-(1-ヒドロキシエチリデン)TPPの生成(式2-b)とそれに続くE2酵素のリポイル残基の還元的アセチル化(式2-c)の2段階反応である。



E1酵素触媒によるN-アシルアセトヒドロキサム酸生成は、(式2-c)の段階において、芳香族ニトロソ化合物がE2酵素に結合しているリポ酸残基の代わりに、E1酵素のアセチル転位部位を占有し、2-(1-ヒドロキシエチリデン)TPPによる還元的アセチル化を受けることによるものと考えられる。

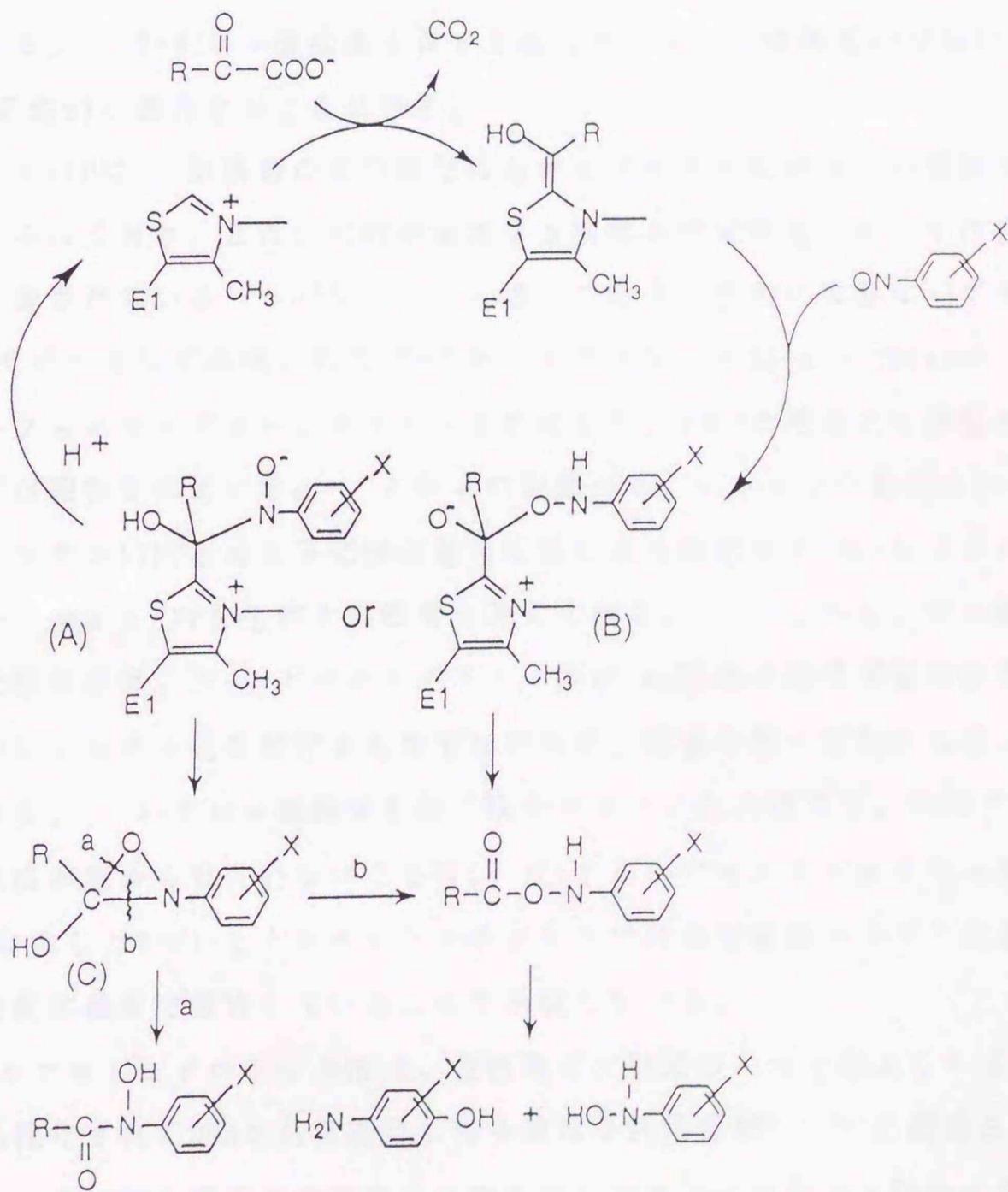
PDHCによるN-OH-AA生成において、ピルビン酸に対するKm値はpH5.6-7.4までの範囲内においてpH非依存性であった。ハト胸筋PDHCのE1酵素の基質結合部位に関する構造的な研究で、E1酵素の正電荷を有するアルギニン残基がピルビン酸の結合及び脱炭酸反応に関与していること⁹⁵⁾が報告されており、豚心筋PDHCにおいても同様にアルギニン残基の関与が考えられる。従って、この結果は、正電荷を有するアルギニン残基以外にピルビン酸の親和性に影響を与える解離基が存在していないことを示唆している。pH-log Vmax/Km(pyruvate)からは、酵素活性に影響を与える解離基についての情報が得られた。pKa7.4の解離基はlog Vmax/Km(NO₂)に対して影響を与えないが、DCPIP還元活性に対してその効率を減少させた。この結果は、この解離基がピルビン酸の脱炭酸反応の活性発現に関与していることを示唆している。pKm(NO₂)及びlog Vmax/Km(NO₂)とpHの関係から、pKa6.3の解離基の存在が示唆され、これは二段階目、即ち、NO₂の還元的アセチル化に関与しているものと思われる。この解離基は、E1酵素の触媒作用において必須の役割を担っていること⁹⁵⁾が報告されているヒスチジンのイミダゾール基に帰属されるものと考えられる。酸性側でKm(NO₂)値が増大する理由としては、イミダゾール残基のプロトン化によるE1酵素のコンホメーション変化がNO₂に対する親和性を減少させたためと思われる。

芳香族ニトロソ化合物は、第3章で述べるように、酸性条件下では非酵素的にα-オキソ酸と反応してN-アシルアシルヒドロキサム酸を生成することが明らかに

された。この非酵素的な反応の律速段階においては、芳香環上の電子供与性置換基が反応性を促進させること等から、芳香族ニトロソ化合物は求核剤として作用していることが示唆されている。また、2-置換基は主にその立体的効果により反応性を著しく低下させることも認められている。しかし、本章で述べたPDHCによる酵素的なN-アシルアセトヒドロキサム酸生成では、これら置換基の効果は上記した非酵素的な反応の場合と全く異なっている。特に2-置換基の影響に関する相違は顕著であり、2-C1-NOBの反応性はアミノフェノール体の副成を伴う点を除いて、NOBと同等以上の反応性を示した。この結果は、2-クロル置換基は2-C1-NOBのE1酵素活性部位に対する親和性及び還元的アセチル化における効率に対して影響を与えないことを意味している。一般に、2-置換ニトロベンゼン類の還元反応において、2-置換基は立体的な要因による促進効果を示すこと⁹⁶⁾が報告されている。また、2-置換ニトロベンゼン類はNOBよりも高い酸化還元電位を示すこと⁹⁷⁾が報告されており、2-置換基は芳香族ニトロソ化合物の親電子的な反応性を増大させるものと考えられる。従って、2-C1-NOBからの酵素的及び非酵素的なN-アシルアセトヒドロキサム酸生成における反応性の相違は、酵素的な反応においては非酵素的な反応とは全く逆に、ニトロソ化合物が親電子剤として作用していることで説明し得るものと考えられる。

酵素的なN-アシルアシルヒドロキサム酸生成の反応機構について考察してみたい。(式2-b)に示したように、E1酵素による α -オキソ酸の脱炭酸がN-アシルアシルヒドロキサム酸生成の第一段階と考えられる。その際、 α -オキソ酸のR基の立体的効果⁹⁵⁾は、対応する2-(1-ヒドロキシアルキリデン)TPP中間体生成に関与するE1酵素活性に対して影響していることが認められた。さらに、PDHCによるN-フェニルアシルヒドロキサム酸生成に見られたピルビン酸及び α -オキソ酪酸に対する高い基質特異性は、二段階目の反応、即ちE1酵素活性部位における2-(1-ヒドロキシアルキリデン)TPP中間体とNOBとの反応においても、R基の立体的効果が影響していることを意味している。一方、E1酵素によるDCPIP還元活性の基質として作用した2-(1-ヒドロキシエチル)TPPは、NOBとの反応によるN-OH-AA生成の基質としての作用が認められなかった。これらの結果から、N-OH-AAの生成機構として、DCPIPの還元反応機構(DCPIPの還元とそれに伴って生成する2-アシルTPPの加水分解)とは異なり、NOBに対する2電子移動とアセチル転移が同時に起こり得る機構が想定された。また、2-C1-NOBを基質として用いた場合、対応するN-アセトヒドロキサム酸体の他に、N-(2-クロロフェニル)ヒドロキシルアミノ体及びその

Bamberger転位産物である3-クロロ-4-アミノフェノールの生成が認められている。この転位産物は、上記した N-ヒドロキシアルミノ体から生成するものではないことから、恐らく、N-O結合の解裂を起こし易い N-アセトキシ-2-クロロアニリンから生成するものと思われる。Bamberger転位は、2-置換基による立体的効果により促進される⁹⁸⁾ことが報告されているので、この仮想O-アセチル化合物は加水分解により N-ヒドロキシアルミノ体に、また、転位反応によりアミノフェノール体に変換するものと考えられる。これらの知見を説明し得る反応機構として、E1酵素による α -オキソ酸の脱炭酸反応により生成するカルボアニオン、即ち2-(1-ヒドロキシアルキリデン)TPP中間体のNOBに対する求核付加反応機構(Scheme VI)が想定された。



SCHEME VI. A proposed mechanism of E1-catalyzed N-OH-AA formation.

2-(1-ヒドロキシアルキリデン)TPP中間体とNOBとの求核付加反応は、活性化エネルギーの値から、律速段階であることが示唆される。 前述した仮想的なO-アセチル化合物の生成は、N-体(A)に由来するオキサジリジン(oxaziridine)中間体(C)の転位(経路b)またはO-体(B)の直接分解によって生成するものと考えられる。 2-C1-NOBの場合は、求核付加物形成の段階で(A)よりも立体障害が少ない(B)を生成し易いものと思われる。 また、(A)のカルビノール炭素上での分子内置換反応による(C)の生成も、2-クロル置換基の立体障害を減少させ得る経路と考えられる。(C)は対応するN-アリルアシルヒドロキサム酸の互変異性体であること⁹⁹⁾が報告されていることから、(C)からN-アシル体(経路a)及びO-アシル体(経路b)が生成することは起こり得るものと考えられる。 立体的因子を考慮しなければ、熱力学的に有利なN-アリルアシルヒドロキサム酸が(C)から優位に生成すると考えることは妥当である。 2-クロル置換基を有する場合は、より立体障害の少ないO-アシル体生成(経路b)が競合することになる。

2-アセチルTPPは、E1酵素の活性部位におけるアセチル転移反応の遷移中間体の一つと考えられており、また、PDHCが触媒する反応の定常状態において存在していることも報告されている^{100, 101)}。 一方、この生化学的に重要な2-アセチルTPPの化学的モデルとして合成された2-アシルチアゾリウム(2-acylthiazolium)化合物は、N-フェニルヒドロキシルアミンと反応して、(B)に相当する物質が生成すること¹⁰²⁾が報告されている。 これらの知見から、ニトロソ化合物と2-(1-ヒドロキシエチリデン)TPPとの分子間酸化還元反応により対応するN-ヒドロキシルアミノ体と2-アセチルTPPを生成する機構も考えられる。 しかし、その後続くアセチル転移反応は、N-ヒドロキシルアミノ体がE1酵素の活性部位に強固に結合して効率的にアセチル化を受けるものでなければ、質量作用の法則から起こり得ないものである。 2-クロル置換体を除く他のニトロソ化合物では、対応するO-アシル体の生成が認められていないことは、N-アリルアセトヒドロキサム酸生成がScheme VIに示した2-(1-ヒドロキシアルキリデン)TPPの芳香族ニトロソ化合物に対する求核的反応機構で進行していることを示唆している。

N-アリルアセトヒドロキサム酸は、近接発ガン物質の一つと考えられており、さらに代謝活性化されてDNAと共有結合し得る親電子性活性種²²⁻²⁶⁾に変換される。 ミトコンドリアのDNAも芳香族含窒素化合物を含む或種の化学発ガン物質の標的であり、DNAの損傷がミトコンドリアの機能及び形態異常を誘発すること¹⁰³⁾が報告されている。 最近、肝毒性が知られている芳香族含窒素系医薬品アセトアミノフ

ェンは、ミトコンドリアの電子伝達系機能を阻害する¹⁰⁴⁾ことも報告されている。これは、アセトアミノフェンからミクロゾーム酵素チトクロムP-450関与のN-水酸化により生成する親電子性の高いN-アセチル-p-ベンゾキノイミンがミトコンドリアに移行し、毒性を発現するものと考えられている。従って、PDHCによるN-アセチル-p-ベンゾキノイミンと同様の化学的反応性を有するN-アリルアセトヒドロキサム酸生成は、ミトコンドリアの形態的・機能的異常を伴うミトコンドリア病¹⁰⁵⁾発症等の毒性発現と密接に関連している可能性が考えられる。

PDHCはピルビン酸の酸化的脱炭酸によりアセチルCoA及びNADHを生成する反応を触媒しており、従って、E1酵素によるN-アリルアセトヒドロキサム酸生成はTCAサイクル及び電子伝達系の機能を阻害することになり得る。さらにこのことが細胞内のATP濃度の減少をもたらし、その結果、E1酵素はATP依存のキナーゼ作用による活性調節効果を受けることなくN-アリルアセトヒドロキサム酸を生成し続ける状況が考えられる。従って、PDHCによるN-アリルアセトヒドロキサム酸生成は、ミトコンドリアを有する全ての生物種に対し、核及びミトコンドリアのDNAに障害を与えるだけでなく細胞のエネルギー及び物質代謝を乱すことにもなる。

2. 4 要約

牛、ヒト、及び豚心筋ミトコンドリア及び単離豚心筋PDHCは、ピルビン酸依存の芳香族ニトロソ化合物からの N-アシルアセトヒドロキサム酸生成活性を示した。PDHCによるNOBからのN-OH-AA生成の至適pHは6.8であり、活性発現には TPP (K_m 値 $1.02 \pm 0.12 \mu\text{M}$)を必要とした。TTPP (K_i 値 $0.22 \pm 0.02 \mu\text{M}$)は競合的に本活性を阻害した。N-OH-AA生成はピルビン酸依存のBiBi機構に従うことが示唆され、ピルビン酸及びNOBに対する K_m 値はそれぞれ $0.05 \pm 0.01 \text{ mM}$ 及び $0.25 \pm 0.07 \text{ mM}$ であった。ピルビン酸に対する K_m 値は調べたpH範囲内(5.2-7.4)において一定値を示したが、NOBに対する K_m 値はpHの低下に伴って増大し、この現象は pK_a 値6.3の酵素の解離基によるものであることが示唆された。pHの低下に伴う $\log V_{\max}/K_m(\text{NOB})$ 値の減少にもこの解離基の関与が認められた。 $\log V_{\max}/K_m(\text{pyruvate})$ -pH 相関から、 pK_a 値5.6及び7.4の酵素の解離基がPDHCのN-OH-AA生成活性に関与していることが示唆された。本活性はATPによりfeedback阻害されるが、NEMには影響されなかった。PDHCの構成酵素の一つであるピルビン酸脱水素酵素(E1)はそれ自体でN-OH-AA生成活性を有し、PDHCで得られた速度論的パラメーターと同様な値を示した。E1酵素が触媒する α -オキソ酸の酸化的脱炭酸反応において正の Taft定数(δ)が得られたことから、E1酵素の活性部位における α -オキソ酸のR基の立体的効果が活性に影響していることが示唆された。PDHCによるN-アシルアセトヒドロキサム酸生成で得られたニトロソ化合物に対する K_m 値には有意な差は認められなかったが、正の Hammett定数(ρ)が得られたことから、電子吸引性置換基を有するニトロソ化合物がより酵素作用を受け易いことが示唆された。2-Cl-NOBでは、その2-クロル置換基の立体的効果により転位産物アミノフェノール体の生成も認められたが、対応する N-(2-クロロフェニル)アセトヒドロキサム酸生成においては、2-クロル置換基の立体障害を受けることなく NOBと同等以上の反応性を示した。反応機構としては、E1酵素が触媒するピルビン酸の酸化的脱炭酸反応により生成する 2-(1-ヒドロキシアリキリデン)TPPによる芳香族ニトロソ化合物の還元的アシル化機構が考えられ、その際、ニトロソ化合物は親電子剤として作用しているものと考えられた。N-OH-AA生成の活性化エネルギー($96 \pm 8 \text{ kJ/mol}$)が NADH生成の活性化エネルギーよりも大きな値を示したことから、この還元的アセチル化反応が律速段階であることが示唆された。

第3章 酸触媒による芳香族ニトロソ化合物と α -オキソ酸からのN-アシルヒドロキサム酸生成

3.1 緒論

前章までにおいて、PDHCによる酵素的な芳香族ニトロソ化合物とピルビン酸からの近接発ガン物質N-アシルヒドロキサム酸生成について論述した。本反応は熱力学的には、 ΔG が負の ΔH に比較してより負になる反応種であるから、本質的には自発的に進行し得るものである。本反応による近接発ガン物質の生成が自然界(生物圏)において非酵素的にも有意に起こり得るならば、毒性学的にさらに重要な問題を提起することになる。非酵素的な反応が起こる場合、pHは反応性を支配する要因の一つと考えられるので、酸あるいは塩基触媒による近接発ガン物質N-アシルヒドロキサム酸生成の有無を検討してみる必要がある。現在までに報告されている酵素的なN-アシルヒドロキサム酸生成は記述(ページ3)したように三経路に大別されるが、非酵素的な生成反応についてもそれぞれに対応させて整理することができる。即ち、①アセチル転移酵素によるN-ヒドロキシルアミノ化合物のN-アセチル化³⁰⁾、に対しては、カルボン酸クロライド等の活性アセチル化剤によるN-ヒドロキシルアミノ化合物のN-アセチル化¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾、②チトクロムP-450によるN-アセチルアミノ化合物のN-水酸化²¹⁾、に対しては、モリブデンオキシド化合物によるN-アセチルアミノ化合物のN-水酸化¹⁰⁹⁾、及び③第1, 2章で論述したPDHCによるニトロソ化合物の還元的アセチル化、に対しては、グリオキシル酸によるニトロソ化合物の還元的ホルミル化¹¹⁰⁾、が知られている。上記した③の非酵素的なN-アシルヒドロキサム酸生成に類似した反応例として、アシルピルビン酸類と4-ジメチルアミノニトロソベンゼンの反応¹¹¹⁾並びに芳香族ニトロソ化合物とアルデヒド類との反応によるN-アシルヒドロキサム酸体生成¹¹²⁾が、最近報告されている。

本章では、ピルビン酸を含む数種の α -オキソ酸と芳香族ニトロソ化合物との反応を検討し、酸性条件下では非酵素的に対応するN-アシルヒドロキサム酸が生成することを見出したので、前章までに述べた酵素的生成反応と関連させて論述する。また、N-アシルヒドロキサム酸の合成法としての適用についても検討を行った。

3. 2 結果

3. 2. 1 反応条件の検討

芳香族ニトロソ化合物とグリオキシル酸からの N-ホルミルヒドロキサム酸体生成¹¹⁰⁾に用いられた反応条件は、グリオキシル酸に特異的であり、ピルビン酸との反応による N-アセトヒドロキサム酸体生成は認められないことが報告されている。従って、芳香族ニトロソ化合物と α -オキソ酸からの非酵素的な N-アシルアシルヒドロキサム酸生成の一般性を確立する

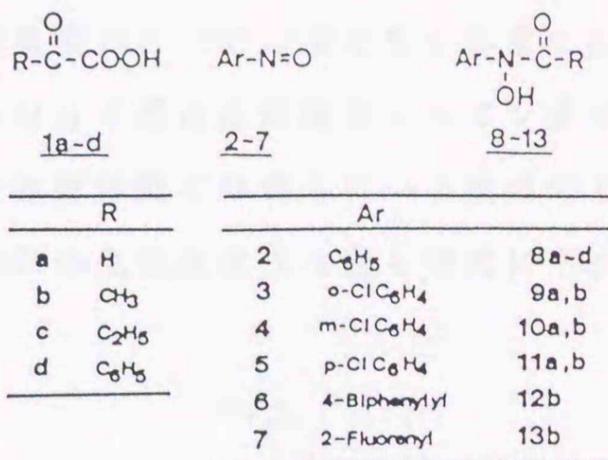


FIG. 26. Structures and abbreviations.

ための実用的なアプローチは、芳香族ニトロソ化合物とピルビン酸からの N-アセトヒドロキサム酸体生成条件を見出すことであると考えられる。従って、NOBをモデル化合物としてピルビン酸との反応性の検討、具体的には N-OH-AA生成の至適条件の検討から始めた。Fig. 26には、本章で用いた芳香族ニトロソ化合物及び α -オキソ酸、並びに対応する N-アシルアシルヒドロキサム酸の構造と略号を示す。

(1) 反応速度定数に対する pH の影響

NOBとグリオキシル酸からの N-ホルミルヒドロキサム酸体生成は、中性条件下で進行すること¹¹⁰⁾が報告されている。第1章(ページ14)で述べたように中性条件下では NOBとピルビン酸からの

N-OH-AA生成は認められていないので、N-OH-AA生成に対する pH 効果について検討した結果、酸性水溶液中では、N-OH-AA 及びアゾキシベンゼンの生成が認められた。なお、アルカリ性条件下の反応では N-OH-AA生成は認められ

なかった。Fig. 27に、pH と N-OH-AA 生成の反応速度定数の相関を示す。

調べた pH 範囲内(0.3-4.7)において、

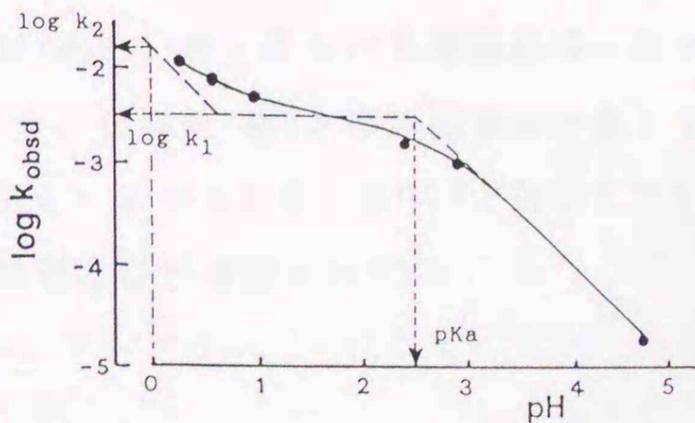


FIG. 27. Plot of $\log k_{\text{obsd}}$ vs pH for the formation of N-phenylacetohydroxamic acid(8b). The solid line represents the theoretical plot of $\log k_{\text{calcd}}$ calculated using Eq. (3-2), where $k_1 = 3.5 \times 10^{-3} \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, $k_2 = 1.9 \times 10^{-2} \text{M}^{-2} \text{s}^{-1}$, and $K_a = 3.1 \times 10^{-3} \text{M}$. Dashed lines indicate asymptotic slopes (slopes -1.0).

N-OH-AA の生成速度は二次反応速度式(各基質濃度に対し一次)に従い、その二次反応速度定数(k_{obsd})はpHの低下に伴い増大する傾向を示した。アゾキシベンゼンの副成も酸性側ほど顕著であり(図不掲載)、この反応については 3. 2. 2 (3) で詳述する。

ピルビン酸が殆ど解離型で存在している中性条件(pH 7)では反応性が非常に低いことから、NOB との反応に関与するピルビン酸の分子種は非解離型ピルビン酸であると考えられる。また、ピルビン酸が殆ど非解離型で存在している酸性側でも速度定数の増大が認められることから、N-OH-AA の生成速度式は最も単純に下式(式3-1)で表される。

$$v = (k_1 + k_2[H^+]) [NOB][CH_3COCO_2H] \quad (\text{式3-1})$$

ここで、 k_1 及び k_2 は各々 N-OH-AA生成反応における無触媒反応速度定数及び酸触媒反応速度定数を表す。あるpHの反応液中における非解離型ピルビン酸濃度の総ピルビン酸濃度に対する比は、ピルビン酸の酸解離定数を K_a とおくと、 $[H^+] / ([H^+] + K_a)$ で表される。従って、(式3-1)に示した生成速度式は、溶液中に存在する総ピルビン酸濃度(totalの頭字tの添え字で表す)を用いると、次式(式3-2)のようになる。

$$v = k_{\text{obsd}} [NOB][CH_3COCO_2H]_t \quad (\text{式3-2})$$

ここで、 $k_{\text{obsd}} = (k_1[H^+] + k_2[H^+]^2) / ([H^+] + K_a)$ である。観測された各pHにおける k_{obsd} から、最小二乗法により求めた k_1 、 k_2 及び K_a の値をFig. 27の脚注に示した。これらの値は(式3-2)から得られる理論曲線に対する漸近線からも求められる(Fig. 27参照)。観測値(●)と理論曲線が一致していること及び得られた K_a 値も文献値¹¹³⁾($pK_a = 2.40 \pm 0.01$; 25°C)と対応していることから、(式3-2)で表される反応速度式の妥当性が確認された。

(2) 活性化エネルギー

塩酸水溶液(pH 0.6)中におけるNOBとピルビン酸からのN-OH-AA生成の活性化エネルギーは、Arrhenius プロットにより 61 ± 4 kJ/molと算定された(図不掲載)。

(3) 反応溶媒の検討 (合成法としての展開)

N-OH-AA 生成には酸性条件が必要であるという知見が得られたが、酸性水溶液中での反応には、N-アシルアシルヒドロキサム酸合成法として次の二つの問題点、即ち、①芳香族ニトロソ化合物は一般的に難水溶性であること、②アゾキシ体の副成を伴うこと、があげられる。これらの問題点を克服するために種々の反応溶媒を検討した結果、プロティック溶媒である酢酸がアゾキシ体の副成を伴わず、また、両基質に対して高い溶解性を示すという点で最も適した溶媒であることが判明した。さらに、酢酸中における反応では反応の進行に伴う気体(CO₂)の発生とニトロソ化合物特有の青緑色の退色が認められ、反応の進行を視覚で確認することができる利点もある。水酢酸に難溶性の α -オキソ酸塩を用いる場合は、中和当量の塩酸を加えて分子型 α -オキソ酸に変換する必要がある。この場合、水添加による反応速度の低下(後述)は伴うが、合成法として許容できる時間内で収率良く N-アシルアシルヒドロキサム酸を得ることができた。

3. 2. 2 N-アシルアシルヒドロキサム酸生成に対する置換基効果

反応溶媒としてpH 0.6の塩酸水溶液及び酢酸を用いて、数種の芳香族ニトロソ化合物と α -オキソ酸からのN-アシルアシルヒドロキサム酸生成の反応性を検討した。但し、水酢酸中での反応性の比較実験において、水(分子型 α -オキソ酸を使用する場合)あるいは塩酸(α -オキソ酸ナトリウム塩を使用する場合)を加えて行った時の反応を”含水酢酸中での反応”、また、水酢酸中での反応を単に酢酸中での反応と呼ぶこととする。

(1) 芳香族ニトロソ化合物の環置換基の影響

芳香環置換基の反応性に対する影響を調べるため、ピルビン酸と数種の芳香族ニトロソ化合物からの N-アシルアセトヒドロキサム酸生成の反応速度定数を上記した二種の反応溶媒中で測定した。含水酢酸中におけるNOBとピルビン酸からの N-OH-AA生成反応も、Fig. 28から明かなように塩酸水溶液中と同様に二次反応速度式に従っていることが確認された。Table X IIに示すように、何れの溶媒中でも速度定数の序列は、NOBP(6) > NOB(2) > 4-Cl-NOB(5) > 3-Cl-NOB(4) > 2-Cl-NOB(3)

の順であった。2-C1-NOBは、3-C1-NOB及び4-C1-NOBに比べて著しく低い反応性を示した。塩酸水溶液中では2-C1-NOBの溶解度が低いため、対応するN-(2-クロロフェニル)アセトヒドロキサム酸の生成を検出することはできなかった。このニトロソ化合物からのN-アセトヒドロキサム酸体生成は、形式上還元的アセチル化反応と見なすことができるので、ニトロソ化合物の酸化還元電位(π_0)⁹⁷⁾が反応性に寄与していると予想される。しかし、Table XIIで明らかかなように反応性と酸化還元電位の間には相関性が認められなかった。

3-及び4-置換体の反応速度定数について Hammett則⁹²⁾を適用してみると、置換基定数 σ よりも σ^+ に対するプロットの方が何れの反応溶媒中においても良い相関性が認められた (Fig. 29)。得られた直線の傾き、即ち ρ 値は何れも同様な負の値を示していることから、芳香族ニトロソ化合物の反応性は電子供与性置換基により増大し、N-アセトヒドロキサム酸体生成の律速段階は、ニトロソ窒素原子のピルビン酸に対する求核反応であることが示唆された。

2-C1-NOBに見られた著しい反応性の低さの要因の一つとして、2-位の電子吸引性クロル基によるニトロソ窒素原子の求核反応性の減少が考えられる。しかし、一般的に2-置換基は反応中心との空間的距離が近いため、立体的な要因による異常な反応性を示すことが知られている。それ故、2-クロル基による立体的な影響について調べるために、 d_4 -酢酸中におけるニトロソ化合物(2-6)の¹H-NMRスペクトル解析を行った。

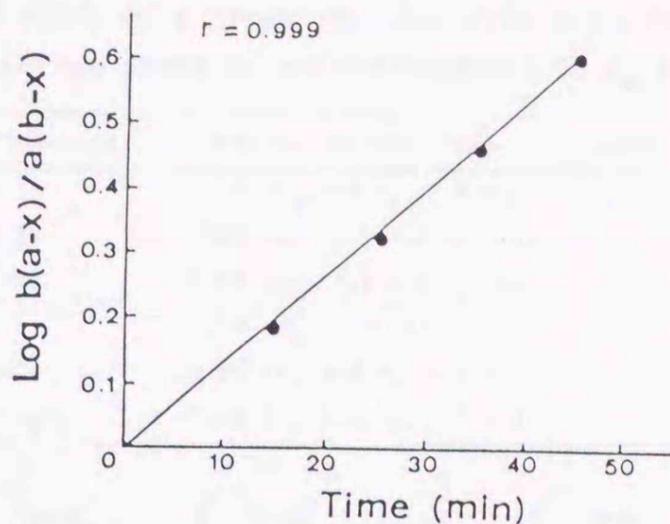


FIG. 28. Plot of the second-order rate equation vs time for the formation of *N*-phenylacetohydroxamic acid in aqueous acetic acid. *a* is the initial concentration of pyruvic acid, which was 1.68 M; *b* is the initial concentration of nitrosobenzene, which was 0.67 M; and *x* is the amount of product at the time.

TABLE XII
Rate constants, k_{obsd} ($M^{-1}s^{-1}$), for the reaction of nitrosobenzenes with pyruvic acid

nitroso compd	k_{obsd}		$\pi_0, ^\circ V$
	in HCl at pH 0.6	in aqueous AcOH	
2	$(7.7 \pm 0.7) \times 10^{-3}$	$(5.3 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	0.582
3	ND ^b	ca. 1×10^{-7}	0.598
4	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-4}$	0.583
5	$(5.0 \pm 0.4) \times 10^{-3}$	$(3.8 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	0.576
6	$(2.1 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	$(2.5 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	

^a Vs NHE in 0.1 N HCl in 50% acetone-water at 50 °C (from ref. 97).

^b ND means not detectable.

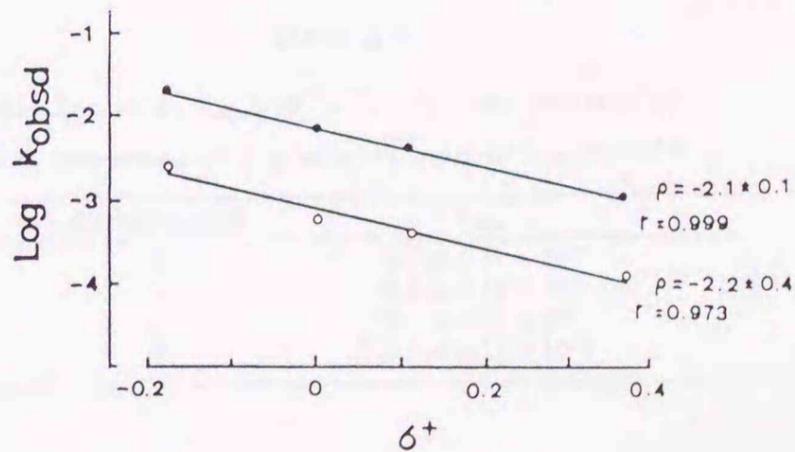


FIG. 29. Correlation of $\log k_{obsd}$ for the formation of *N*-aryl-acetohydroxamic acids vs Brown's σ^+ constants. Open circles, in aqueous acetic acid; closed circles, in HCl at pH 0.6.

Table XIII に示すように、NOB及び3-, 4-置換ニトロソ化合物では、ニトロソ基に対するオルト位水素が δ 7.77-8.06 ppmに観測された。一方、2-Cl-NOBでは、オルト位水素が δ 6.22 ppmに観測された。

この大きな高磁場シフトはニトロソ基の磁気異方性効果によるもので、クロル基以外に2-アルキル置換基を有するニトロソ化合物¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾においても報告されている。

この結果は、2-Cl-NOBは2-クロル

基による立体障害のために C-N結合間の自由回転が束縛され、より安定なアンチ型(クロル原子とニトロソ基の窒素原子が離れている)で存在していることを意味している。 前述した芳香族ニトロソ化合物の求核反応中心がニトロソ基の窒素原子であることを考え合わせると、2-Cl-NOBの反応性が低い主要因は、2-Cl-NOBがアンチ型で存在しており、窒素原子の求核反応性がクロル基の立体障害によって著しく減じられているためと考えられる。

Table XIV に、グリオキシル酸とニトロソ化合物(2-5)からのN-ホルミルヒドロキサム酸体生成における酢酸中での二次反応速度定数を示す。

芳香環置換基の電子的及び立体的効果はピルビン酸とニトロソ化合物(2-5)との反応で認められた結果と同様であった($\rho = -1.8 \pm 0.1$)。

反応速度定数は何れもピルビン酸

との反応で得られた値よりも約20倍大きかった。 この理由としては、酢酸溶媒中における含水量の相違(後述)とピルビン酸(R基: Me)及びグリオキシル酸(R基: H)におけるR基の相違によるものと考えられる。

TABLE XIII

Chemical shift of a proton at the ortho position to the nitroso group of nitrosobenzenes in d_4 -AcOH

nitroso compound	chemical shifts(δ /ppm in d_4 -AcOH)
2 X = H	7.89 (H_2 and H_6 , 7.0 and 1.6 Hz)
3 X = 2-Cl	6.22 (H_6 , 8.1 and 1.5 Hz)
4 X = 3-Cl	8.06 (H_6 , 7.6 and 1.6 Hz) 7.77 (H_2 , 1.6 Hz)
5 X = 4-Cl	7.88 (H_2 and H_6 , 8.6 Hz)
6 X = 4-C ₆ H ₅	7.97 (H_3 and H_5 , 9.0 Hz)

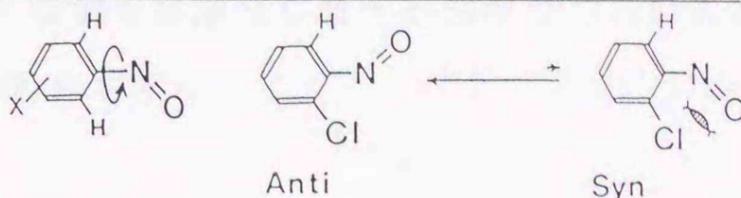


TABLE XIV

Rate constants, $k_{obsd}(M^{-1}s^{-1})$, for the reaction of nitrosobenzenes with glyoxylic acid in acetic acid

nitroso compd	k_{obsd}
2	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^{-2}$
3	$(3.5 \pm 0.1) \times 10^{-6}$
4	$(3.3 \pm 0.2) \times 10^{-3}$
5	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-2}$

(2) α -オキソ酸のR基の影響

Table XIVの結果から、N-アシルヒドロキサム酸体生成反応において、 α -オキソ酸のR基の影響が予想されたので、数種の α -オキソ酸(1a-d)を用いてNOBとの反応におけるN-アシルヒドロキサム酸体生成の二次反応速度定数を測定した。Table XVに、塩酸水溶液(pH 0.6)及び含水酢酸中での速度定数の測定値及びR基の立体置換基定数(E_s)⁸⁶⁾及び極性置換基定数(σ^*)⁸⁷⁾を用いたTaft則による解析から得られた計算値(k_{calcd})を示す。塩酸水溶液及び含水酢酸中でのTaft式を、各々(式3-3; $r=0.999$)及び(式3-4; $r=0.999$)に示す。

TABLE XV

Rate constants, $k_{\text{obsd}}(M^{-1}s^{-1})$, for the reaction of nitrosobenzene with α -oxo acids

α -oxo acid	R	σ^*	E_s^a	in HCl at pH 0.6		in aqueous AcOH	
				$\log k_{\text{obsd}}$	$\log k_{\text{calcd}}^b$	$\log k_{\text{obsd}}$	$\log k_{\text{calcd}}^c$
1a	H	0.49	1.24	-1.201	-1.196	-2.456	-2.455
1b	CH ₃	0	0	-2.114	-2.155	-3.276	-3.288
1c	C ₂ H ₅	-0.10	-0.07	-2.268	-2.233	-3.367	-3.357
1d	C ₆ H ₅	0.60	-2.55	-3.602	-3.600	-4.509	-4.509

^aThe σ^* (polar substituent constant) and E_s (steric substituent constant) values are from ref. 87 and 86, respectively. ^{b,c}Calculated using Eq. (3-3) (for b) and Eq. (3-4) (for c) using parameters determined by the least-squares method.

$$\log k_{\text{obsd}} = 0.329\sigma^* + 0.644E_s - 2.115 \quad (\text{式3-3})$$

(0.116) (1.034)

$$\log k_{\text{obsd}} = 0.307\sigma^* + 0.551E_s - 3.288 \quad (\text{式3-4})$$

(0.127) (1.037)

(式3-3)及び(式3-4)は何れも良い相関性を示し、括弧内に示した標準化回帰係数から明らかのように E_s 項、即ちR基の立体的効果はR基の電子的効果 σ^* よりも反応性に大きく影響していることが示唆された。このことは、 E_s 項単独でも相関性が認められるのに対して、 σ^* 項単独では有意な相関性が認められないことから支持された。(式3-3)及び(式3-4)の E_s 項の係数 δ 値が正の値を示すことは、R基の立体的かさ高さの増大(E_s 値の減少に対応)につれて反応性が低下することを意味している。

α -オキソ酸以外の類似化合物としてピルビン酸エチル及び(±)-乳酸について

も含水酢酸中におけるNOBとの反応性を調べた結果、何れもN-OH-AAの生成は認められなかった(表省略)。

水添加による反応性の低下は、NOB とグリオキシル酸との反応速度定数の相違から確認された。即ち、Table XIVに示した水を添加しない酢酸中での速度定数は、Table XVに示した含水酢酸中での速度定数の約4倍の値であった。従って、分子型の α -オキソ酸が入手可能ならば、N-アリルアシルヒドロキサム酸の合成は水酢酸中で行うのが好ましいと考えられる。

(3) N-フェニルアシルヒドロキサム酸の加水分解に基づくアゾキシ体の副成

前述したように、NOBとピルビン酸の塩酸水溶液(pH 0.3-4.7)中の反応において、N-OH-AAの他にアゾキシベンゼンの副成が認められた。このことは、反応液中でN-ヒドロキシルアミノ体が生成していることを意味している。最近、N-アリルアセトヒドロキサム酸の酸性水溶液中での加水分解によるN-ヒドロキシルアミノ体の生成についての報告¹¹⁷⁾がなされ、本反応においてもNOBとピルビン酸から生成するN-OH-AAが酸触媒による加水分解を受け、そこで生じるN-ヒドロキシルアミノ体がNOBと反応してアゾキシベンゼンを生成するものと考えられる。

この点を明らかにするために、4種のN-フェニルアシルヒドロキサム酸を用いて塩酸水溶液中(pH 0.6)での加水分解反応について調べた。何れのN-アシルヒ

ドロキサム酸体からも 二次生成

物としてアゾキシベンゼン 及び

N-フェニルヒドロキシルアミン

のBamberger転位産物が検出され

た。基質の残存量から求めた酸

触媒による加水分解反応の擬一

次反応速度定数(k_H)を、Table

XVIに示す。また、加水分解に対するアシル基のR基の影響について、 E_s 及び

σ^* を用いたTaft則による解析結果を(式3-5; $r=0.999$)に示す。

TABLE XVI

*Hydrolysis rate constants, $k_H(s^{-1})$, for
N-phenylhydroxamic acids in HCl at pH 0.6*

hydroxamic acid	R ^a	log k_H	log $k_{H(calcd)}$ ^b
8a	H	-3.721	-3.718
8b	CH ₃	-4.456	-4.481
8c	C ₂ H ₅	-4.553	-4.532
8d	C ₆ H ₅	-5.865	-5.864

^aThe σ^* and E_s values used are shown in Table XV. ^bCalculated with Eq. (3-5) using parameters determined by the least-squares method.

$$\log k_H = 0.115 \sigma^* + 0.577 E_s - 4.481 \quad (\text{式3-5})$$

$$(0.045) \quad (1.014)$$

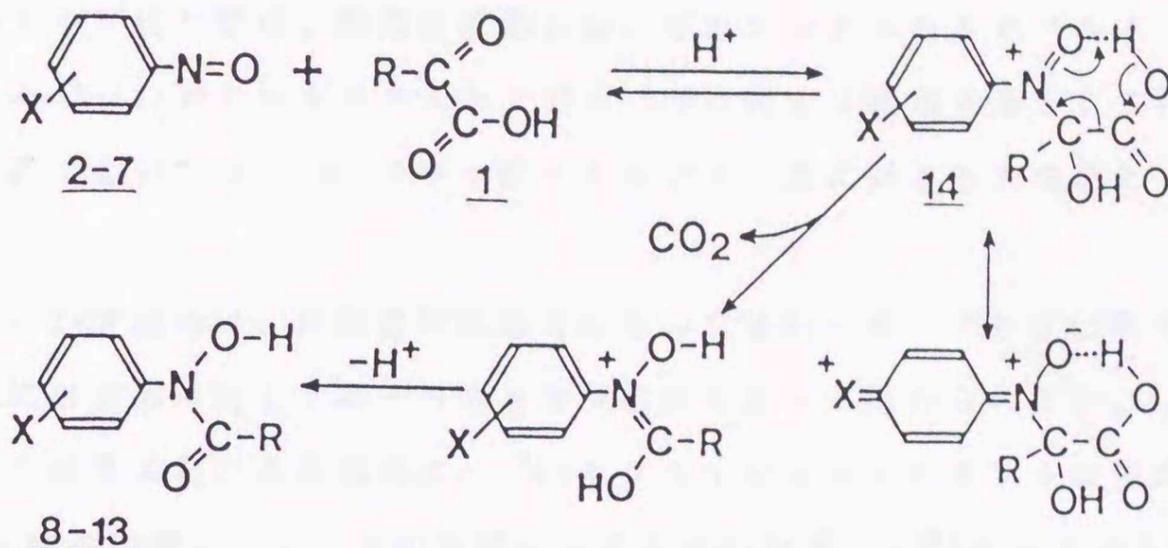
標準化回帰係数の値から明らかなようにR基の立体的効果が電子的効果よりも反応性に強く影響していること、及びEs項の係数 δ 値が正の値を示すことから、この加水分解反応においてもR基の立体的かさ高さの増大(Es値の減少に対応)に伴って、反応性が低下することが示唆された。このR基の立体的効果に関しては、同様の結果が脂肪族N-アシルヒドロキサム酸の酸触媒加水分解反応¹¹⁸⁾においても報告されている。アゾキシベンゼンの副成は、NOBとグリオキシル酸との反応の際において最も顕著であり、この結果はN-フェニルホルミルヒドロキサム酸の加水分解反応速度定数が最も大きい値を示すことと一致している。これらの結果から塩酸水溶液中でのアゾキシ体の副成は、N-フェニルアシルヒドロキサム酸生成と併発して起こる α -オキソ酸によるNOBの直接的な還元反応によるものではなく、生成したN-アシルヒドロキサム酸体の酸触媒加水分解によって生ずるN-ヒドロキシルアミノ体とNOBとの反応に起因することが明かとなった。この点においても、N-アリルアシルヒドロキサム酸の合成には非水系が適していることが示唆された。

(4) NOBとアセトアルデヒドからのN-OH-AA生成

酸性条件下でホルムアルデヒドが芳香族ニトロソ化合物と反応して、対応するN-ホルミルヒドロキサム酸体を生成するという報告¹¹²⁾があるので、アセトアルデヒドとNOBとの反応について検討した。塩酸水溶液(pH0.6)中ではN-OH-AAの生成が認められたが、反応速度定数は約 $10^{-4}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であり、ピルビン酸との反応速度定数よりも著しく低かった(図不掲載)。一方、含水酢酸中ではN-OH-AAの生成は認められなかった。これらの結果は、N-アシルヒドロキサム酸体生成において α -オキソ酸は脱炭酸して対応するアルデヒド体を生成することなく、直接ニトロソ化合物と反応していることを示唆している。このことは、N-アリルアシルヒドロキサム酸生成が二次反応速度式(ニトロソ体及び α -オキソ酸に対し各一次)に従うことから支持される。

3. 3 考察

得られた結果から、酸性条件下における芳香族ニトロソ化合物と α -オキソ酸からの非酵素的なN-アシルヒドロキサム酸生成における推定反応機構を、Scheme VIIに示す。



SCHEME VII. Proposed mechanism for an acid-catalyzed formation of N-arylacetylhydroxamic acids from nitroso aromatic compounds and α -oxo acids.

塩酸水溶液及び含水酢酸中の反応において、Hammettの反応定数 ρ 値が何れも負の値を示すこと、及びTaft式での δ 値が何れも正の値を示すことは、芳香族ニトロソ化合物のニトロソ窒素原子が α -オキソ酸のカルボニル炭素へ求核攻撃し、求核付加反応中間体(14)の生成が律速段階であることを意味している。また、 σ ではなく σ^+ に対するHammettプロットの方が相関性が高いことは、電子供与性パラ置換基により共鳴安定化されるような正電荷を持った中間体を経由する機構を示唆するものであり、中間体(14)の妥当性が裏付けられる。律速段階における置換基X及びR基の立体的効果(主要因)及び電子的効果(副要因)は、Scheme VIに示した反応機構で良く説明され得る。中間体(14)からのN-アシルヒドロキサム酸への変換においては、脱炭酸反応が反応全体を促進させるための駆動力となっているものと考えられる。このことは、今回用いた条件では脱炭酸反応が起こり得ないピルビン酸エチルエステルとの反応では、N-OH-AAの生成が認められなかったことから支持される。

一般に、芳香族ニトロソ化合物は、ニトロソ基に対する還元あるいは求核剤による攻撃を受け易く、アルデヒド化合物と同様な親電子剤としての性質が知られているが、ニトロソ基の窒素原子は分子内で最も負の静電電位を有しており、求核反応性が最も高い部位である^{119, 120)}ことも報告されている。前章までに論述して

きた酵素的な N-アシルヒドロキサム酸の生成と本章で述べた酸触媒による非酵素的な生成とにおいて、芳香族ニトロソ化合物が示す化学的反応性を比較すると、下記の二点において最も顕著な相違が両者の間に認められる。

①芳香族ニトロソ化合物と α -オキソ酸からのN-アシルヒドロキサム酸生成は形式上、脱炭酸反応を伴う一種の混合ベンゾイン縮合反応と見なすことができる。芳香族ニトロソ化合物は、酵素的反応においてはアセチルカルボアニオン等価体と見なし得る 2-(1-ヒドロキシアルキリデン)TPPに対する親電子剤として作用し、非酵素的反応においては、 α -オキソ酸のカルボニル基に対する求核剤として作用している。

②芳香環の2-置換基は、非酵素的反応ではその立体的効果により反応性を低下させるが酵素的な反応に対してはそのような反応性の低下が認められない。一方、両生成系における共通点は、N-アシルヒドロキサム酸生成に対する α -オキソ酸の影響として、そのR基による立体的効果(E_s 項)が極性効果(σ^*)よりも大きく、立体的かさ高さの増大に伴って反応性が減少する傾向が認められたことである。

芳香族ニトロソ化合物とピルビン酸からの N-アシルヒドロキサム酸の生成は、中性付近のpHでは主に酵素的な反応により進行し、より酸性側のpHでは逆に非酵素的な反応により進行し得ることが示唆された。非酵素的な N-OH-AA 生成反応の活性化エネルギーはPDHCによる酵素的反応よりも低い値であり、また、その値からこの非酵素的反応は室温下でも充分進行し得るものである。 α -オキソ酸含量の高い発酵食品や乳酸飲料ではそれ自体が α -オキソ酸の供給源であると同時に、本反応が進行し得る液性(pH 3-5)をも有しているので、これら食品が芳香族含窒素化合物で汚染された場合は、直接 N-アシルヒドロキサム酸を生成することが考えられる。また、食品添加物や医薬品等として摂取された芳香族含窒素化合物との食べ合わせによっては、生体内(例えば胃の中)においても本反応に基づくN-アシルヒドロキサム酸体生成の可能性が考えられる。

有機合成的に見た場合、一般的に近接発ガン物質等の毒性物質の合成においては、ヒトへの暴露を最小限に止めるためにも簡便で高収率の合成法が要求される。本章で論述した酢酸酸性条件下における芳香族ニトロソ化合物と α -オキソ酸からのN-アシルヒドロキサム酸の生成は、種々のN-アシルヒドロキサム酸体合成に適用し得る実用的な合成法としても有用性が高いものと考えられる。

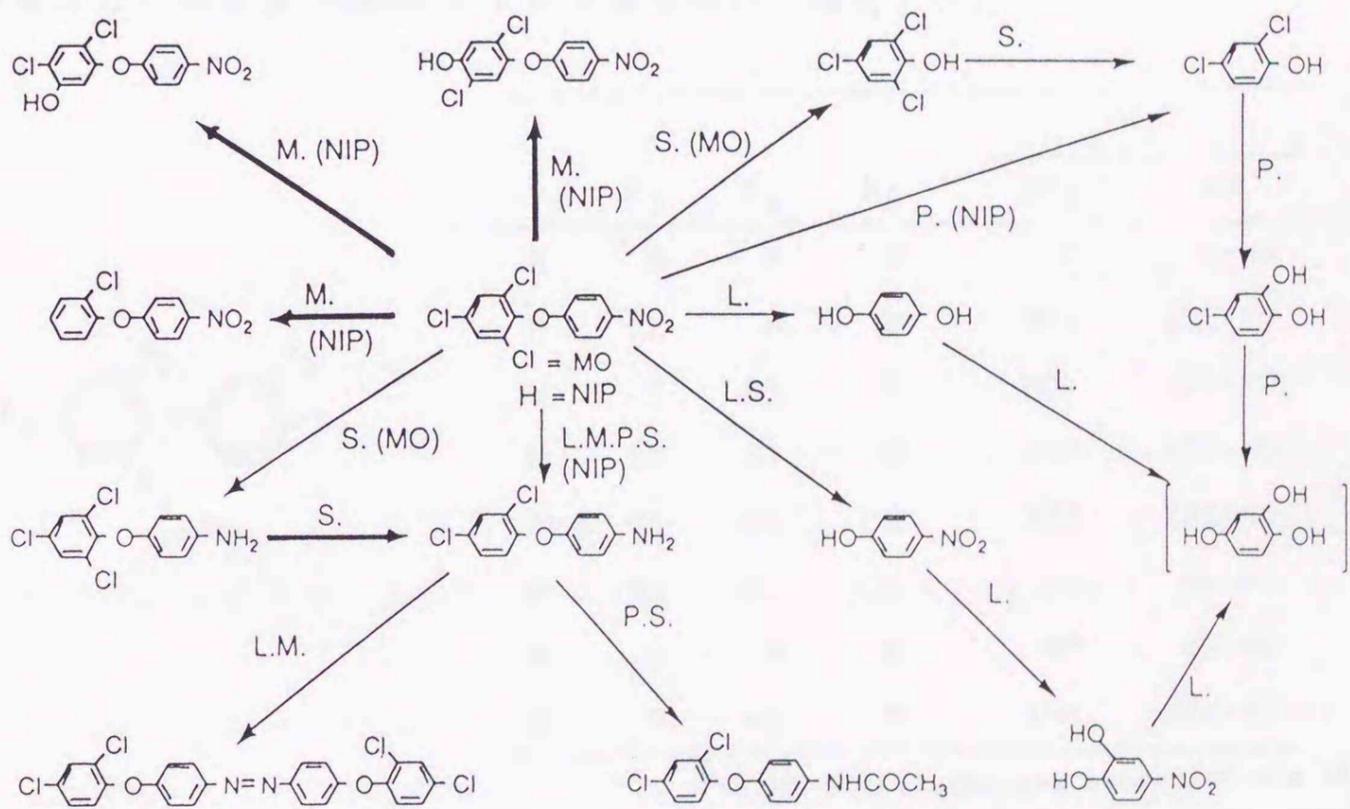
3. 4 要約

芳香族ニトロソ化合物と α -オキソ酸(1a-d)からのプロトン依存性の非酵素的なN-アシルアシルヒドロキサム酸生成反応を見出した。N-アシルヒドロキサム酸体生成に関する速度論的解析の結果、酸性水溶液及び含水酢酸中の何れにおいても二次反応速度式が得られた。酸性水溶液中でのN-OH-AA生成の二次反応速度定数(k_{obsd})はpHの減少に伴って増大し、それに伴って副反応であるアゾキシベンゼンの生成も増大する傾向を示した。塩酸水溶液(pH0.6)及び含水酢酸中において、NOBと α -オキソ酸との反応の k_{obsd} は、グリオキシル酸(1a)>ピルビン酸(1b)> α -オキソ酪酸(1c)>ベンゾイルギ酸(1d)の順であった。Taft則による解析の結果、正の δ 値が得られたことから、 α -オキソ酸の反応性はR基の立体的かさ高さの増大により減少することが示唆された。ピルビン酸と置換ニトロソベンゼン類との反応の k_{obsd} は、NOBP(6)>NOB(2)>4-Cl-NOB(5)>3-Cl-NOB(4)>>2-Cl-NOB(3)の順であった。Hammett則による解析の結果、負の ρ 値が得られたことから、芳香族ニトロソ化合物の反応性は電子供与性置換基により増大することが示唆された。塩酸水溶液(pH0.6)中の反応で認められたアゾキシベンゼンの副成は、生成したN-アシルヒドロキサム酸体の酸触媒加水分解によるものである。含水酢酸中で測定したN-OH-AA生成の k_{obsd} は、塩酸水溶液(pH0.6)で得られた k_{obsd} の約1/10と低い値ではあったが、酢酸に対する両基質の溶解度が高いため反応速度を高く設定できるという点と、アゾキシ体等の副成を伴わないという点で、合成反応溶媒としての酢酸の有用性が示唆された。この方法により、近接発ガン物質であるフルオレン及びビフェニルのN-アセトヒドロキサム酸体(12b)及び(13b)を簡便に合成することができた。前章までに論述した酵素的なN-アシルアシルヒドロキサム酸の生成と、本章で述べた非酵素的なN-アシルアシルヒドロキサム酸生成の両者において、反応に影響する因子並びに反応機構に関する同異について考察した。

第4章 ニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体からの
豚精子並びに酸触媒によるN-アセトヒドロキサム酸体生成

4.1 緒論

環境中で広く使用されているニトロジフェニルエーテル系除草剤は突然変異原性、発ガン性、及び催奇形成性等の毒性³⁹⁻⁴³⁾が認められ、これら除草剤の一つであるNIPは我国においては既に1982年に農薬として失効している。また、これら除草剤はポリ塩化ビフェニル等と同様に環境拡散物質としての特徴を有しており、これら除草剤の環境中における光分解^{44, 45)}、土壌中での分解⁴⁷⁾、植物⁴⁷⁾及び哺乳動物⁴⁶⁾での代謝等の研究がなされている。Scheme VIIIに、主要な分解経路⁴⁷⁾としてニトロ基の還元、クロル基の脱離、芳香環の水酸化、及びエーテル結合の解裂を示す。



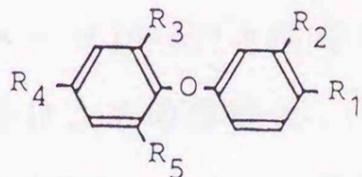
SCHEME VIII. Metabolic map for chlorinated 4-nitrodiphenyl ether herbicides.
L=Light, P=Plant, S=Soil, M=Mammal

ニトロ基の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すものである。ニトロジフェニルエーテル系除草剤及びそれらの環境中での還元的分解産物は変異原性^{39, 40, 48)}を有しており、特にN-ヒドロキシルアミノ体及びN-アセトヒドロキサム酸体が強い変異原性を示した。また、それらの変異原性はフェノキシ基上のクロル置換

基数の減少に伴って増大することが認められている。この結果は、これら除草剤の毒性が、そのニトロ基に由来する窒素官能基の存在形態及びクロル置換基数によって影響されることを示唆している。

前章までにおいて、著者は芳香族ニトロソ化合物からの N-アセチドヒドロキサム酸生成経路を哺乳動物精子に見出し、この反応には動植物を含む好氣的生物が普遍的に有している PDHC が関与していることを論述した。また、酸性条件下では、本反応が非酵素的にも進行し得ることについても論述した。従って、ニトロジフェニルエーテル系除草剤が環境中で広く使用されていることを考慮すれば、これら除草剤のニトロソ体からの N-アセチドヒドロキサム酸体生成が生物圏において酵素的或いは非酵素的に起こり得る可能性は高いものと予想される。

本章では、豚精子による酵素的並びに酸性条件下での非酵素的なニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体からの N-アセチドヒドロキサム酸体生成について、Fig. 30 に示す除草剤 (NIP, X52, MO) 及び環境中において生成し得る脱クロル誘導体並びに 4F 及び 4Me のニトロソ体を用いて検討した。



R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₁	
				NO ₂	NO
H	H	H	H	P	P-NO
H	Cl	H	H	3Cl	3Cl-NO
H	H	Cl	H	4Cl	4Cl-NO
H	Cl	Cl	H	NIP	NIP-NO
OMe	Cl	Cl	H	X52	X52-NO
H	Cl	Cl	Cl	MO	MO-NO
H	H	F	H	4F	4F-NO
H	H	Me	H	4Me	4Me-NO

FIG. 30. Structures and abbreviations of 4-nitrodiphenyl ether derivatives.

4. 2 結果

4. 2. 1 豚精子による酵素的 N-アセチドヒドロキサム酸体生成

豚精子が触媒するニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体からの N-アセチドヒドロキサム酸体生成は、NOB の場合と同様にピルビン酸存在下において認められた。以下の実験では、豚精子の本活性系に対する飽和濃度として、13 mM のピルビン酸を用いて行った。典型的な例として P-NO からの N-アセチドヒドロ

キサム酸体生成速度の経時変化をFig. 31Aに示す。また、Fig. 31Bには、P-NOからのN-アセトヒドロキサム酸体生成のCornish-Bowdenプロット⁶⁰⁾を示す。

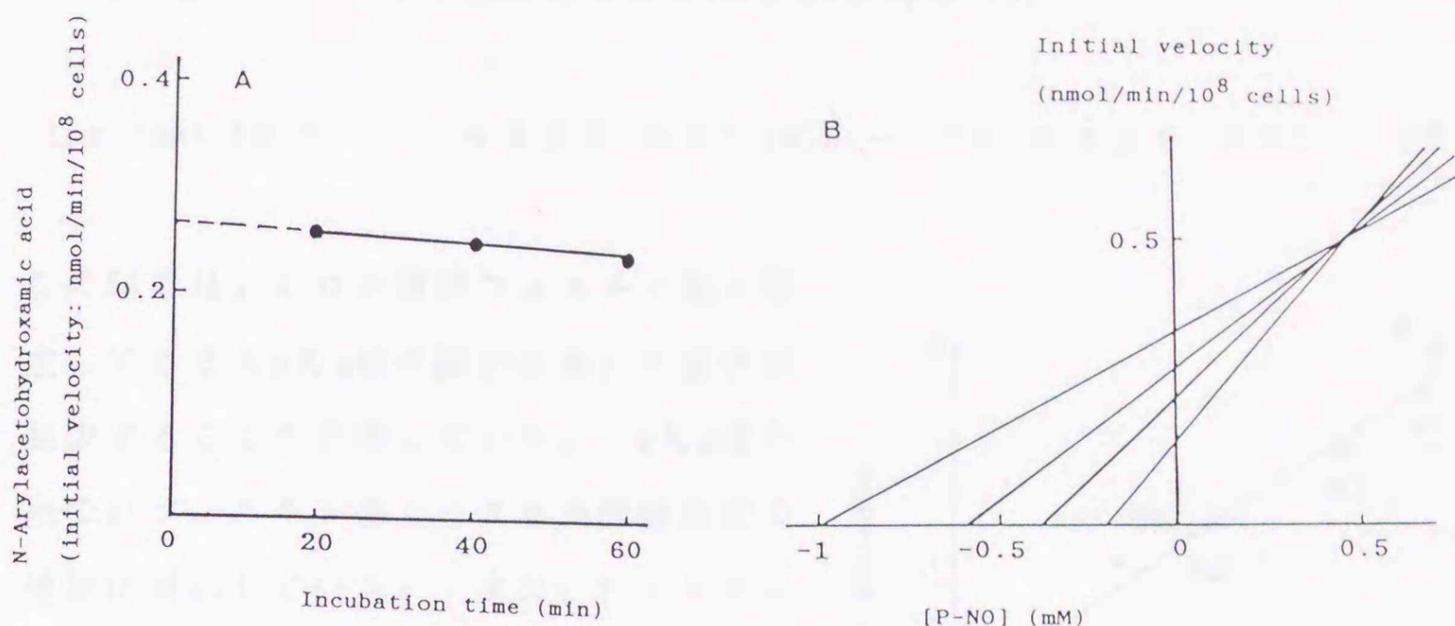


FIG. 31. A, Initial velocity of the formation of N-acetohydroxamic acid derivative from P-NO(0.6 mM) and pyruvate(13 mM).
B, Cornish-Bowden plot of the formation of N-acetohydroxamic acid derivative from P-NO in the presence of pyruvate.

本活性に対する置換フェノキシ基の影響を調べるために、Fig. 30に示した8種のニトロソ化合物について対応するN-アセトヒドロキサム酸体生成の反応動力学定数を測定した。Table XVIIに、測定結果を示す。8種のニトロソ体に対する見かけのKm値には有意な差は認められず、何れも第1章で得られたNOBに対するKm値(ページ19-20)と同等な値を示した。一方、Vmax値は置換フェノキシ基の影響を受け、その序列は、P-NO > 4F-NO > 4Cl-NO > 4Me-NO > 3Cl-NO > NIP-NO = X52-NO > MO-NOであった。クロル置換フェノキシ基に関しては、クロル置換基数の増大に伴ってVmax値は減少し、P-NOのVmax/Km値はMO-NOの値の20倍であった。

TABLE XVII

Apparent kinetic constants for 4-nitrosodiphenyl ethers in the formation of N-arylacetohydroxamic acid derivatives

nitroso compound	Km	Vmax	Vmax/Km	pKa ^a
	mM	nmol/min/10 ⁸ cells		
P-NO	0.50 ± 0.16	0.51 ± 0.06	1.00	10.00
4F-NO	0.42 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.64	9.92
4Cl-NO	0.34 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.36	9.38
4Me-NO	0.40 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.23	10.26
3Cl-NO	0.63 ± 0.12	0.10 ± 0.02	0.16	8.48
NIP-NO	0.43 ± 0.18	0.05 ± 0.01	0.11	7.85
X52-NO	0.46 ± 0.19	0.05 ± 0.01	0.11	7.85
MO-NO	0.45 ± 0.11	0.02 ± 0.01	0.05	7.42

^a pKa values of phenols corresponding to the phenoxy substituents are from ref. 121 and 122.

触媒効率の指標となる $\log V_{\max}/K_m$ 値と置換フェノキシ基に対応するフェノール類の pK_a との間には、4Me-NOを除くとFig. 32に示すように相関性 ($r=0.986$, $n=7$, $P<0.01$) が認められ、回帰直線式として(式4-1)が得られた。

$$\log V_{\max}/K_m = (0.43 \pm 0.03) pK_a - (4.44 \pm 0.29) \quad (\text{式4-1})$$

この結果は、クロル置換フェニキシ基に限定してみると pK_a 値の減少に伴って活性が減少することを示唆している。 pK_a 値の減少はフェニキシ基上のクロル置換基数の増加に対応している。また、2-メトキシ基を有する NIP-NO誘導体である X52-NOの V_{\max}/K_m 値は、NIP-NOで得られた値と同等であり、豚精子による N-アセトヒドロキサム酸体生成活性に対する2-メトキシ基の影響が認められないことを示唆している。この結果は、第2章(ページ39)で述べた PDHCによる酵素的な N-アリルアセトヒド

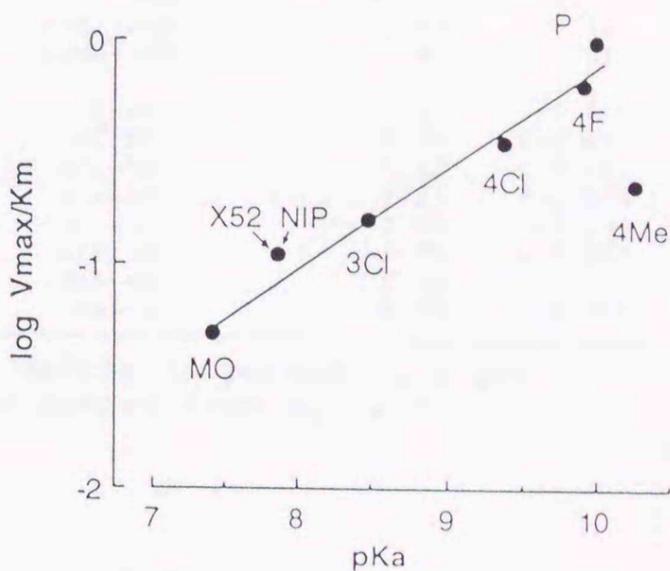


FIG. 32. A plot of $\log V_{\max}/K_m$ vs pK_a of phenols corresponding to the substituted phenoxy groups.

ロキサム酸生成において、NOBと2-Cl-NOBとの反応性には2-クロル基の立体的影響による反応性の低下が認められなかった結果と一致している。また、2-Cl-NOBで観測された転位反応がX52-NOにおいても進行していることはHPLC上で認められたが、転位産物の単離・同定は行わなかった。

4. 2. 2 酸触媒による非酵素的 N-アセトヒドロキサム酸体生成

Table XVIIIに、ニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体及びNOB、4-Cl-NOB、4-Me-NOBからの含水酢酸中(30°C)における非酵素的な N-アセトヒドロキサム酸体生成の二次反応速度定数 (k_{obsd}) を示す。ジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体の $\log k_{obsd}$ 値は、前述した豚精子による酵素的な N-アセトヒドロキサム酸体生成における V_{\max}/K_m 値の序列と同様にフェノキシ基のクロル置換基数の増大に伴って減少することが認められたが、P-NOとMO-NOとの k_{obsd} 比は2.6倍と小さい値であった。X52-NOとNIP-NOとの k_{obsd} の比較では、2-メトキ

シ基を有するX52-NOがNIP-NOの約50%の値を示したが、この相違は第3章で述べた非酵素的なN-アシルアセトヒドロキサム酸生成に対する2-置換基の立体的効果(ページ51-52)で説明され得るものである。その際、クロル基に比較してメトキシ基による反応性低下の程度が小さいことは、Es値¹²³⁾(括弧内の数値)から示唆されるように、2-メトキシ基(Es;+0.97)は2-クロル基(Es;+0.18)よりも立体的かさ高さが小さいことを反映するものである。¹H-NMRにおけるX52-NOのオルト位水素が δ 6.50 ppm(2-Cl-NOBでは δ 6.22 ppm;ページ52)とより低磁場側に観測されたことも、上記の結果と矛盾していない。Fig. 33には、 σ^+ 値が既知のニトロソ体4種(Table XVIII参照)について得られたHammettプロット⁹²⁾を示した。回帰直線式として、(式4-2; $r=0.991$, $n=4$, $P<0.01$)が得られた。

$$\log k_{\text{obsd}} = -(1.86 \pm 0.18) \sigma^+ - (3.20 \pm 0.05) \quad (\text{式4-2})$$

σ^+ 項の係数 ρ 値は第3章で得られた値(ページ51)と一致しており、この結果からも非酵素的なN-アセトヒドロキサム酸体生成に対する電子供与性置換基の促進効果が支持された。

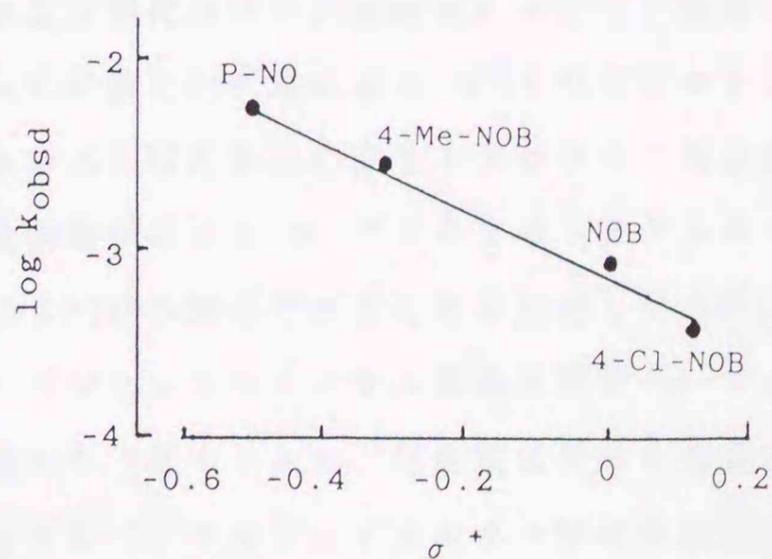


FIG. 33. Correlation of $\log k_{\text{obsd}}$ values obtained for the formation of N-arylaceto-hydroxamic acids with Brown's σ^+ constants.

上述したニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体からのN-アセ

トヒドロキサム酸体生成において、置換フェノキシ基に対応するフェノール類のpKaとlog k_{obsd}の間には、X52-NOを除いて正の相関性(Fig. 34)が認められ、回帰直線式として(式4-3; r=0.980, n=7, P<0.001)が得られた。

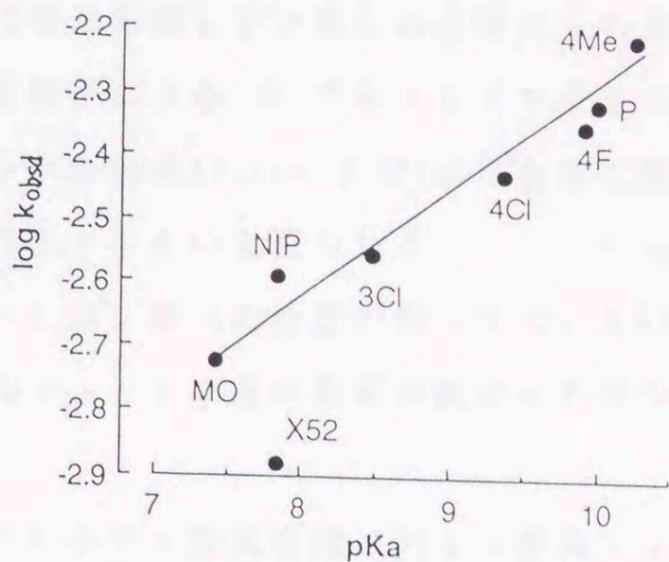


FIG. 34. A plot of log k_{obsd} vs pKa of phenols corresponding to the substituted phenoxy groups.

$$\log k_{\text{obsd}} = (0.15 \pm 0.01) \text{pKa} - (3.85 \pm 0.13) \quad (\text{式4-3})$$

4. 3 考察

生殖細胞系や精子形成過程に対する薬物及び環境化学物質を含めた生体異物の毒性⁹⁻¹⁴⁾及び精巣における異物代謝能に関する知見⁴⁹⁻⁵¹⁾が報告されている。芳香族含窒素化合物の発ガン代謝において、N-アシルヒドロキシルアミン及びN-アシルアセトヒドロキサム酸生成は重要な代謝経路の一つであり²⁰⁻²⁶⁾、これら化合物はさらに活性化されてDNAに作用し得る親電子種(究極発ガン物質)に変換される。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おいて、著者は芳香族ニトロソ化合物とピルビン酸からの非酸化的代謝によるN-アシルアセトヒドロキサム酸生成経路を見出した。さらに、哺乳動物心筋ミトコンドリア及び豚心筋PDHCを用いた実験結果から、哺乳動物精子によるN-アシ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であるPDHCの関与であることを論述してきた。

本章で述べた豚精子によるニトロジフェニルエーテル系除草剤のN-アセトヒドロキサム酸体生成においては、調べた8種のニトロソ化合物は何れも基質として作用したが、Table X VIIに示したようにN-アセトヒドロキサム酸体生成活性にはかなりの相違が認められた。その際、クロル置換基数の減少に伴ってN-アセトヒドロキサム酸体生成活性が増大する傾向は、突然変異原性^{39, 40, 48, 124)}、メトヘモグロビン形成能¹²⁵⁾及びアセチル転移活性¹²⁶⁾においても認められている。これらニトロジフェニルエーテル系除草剤の上記活性発現には、置換フェノキシ

基が有する脂溶性及び電子的・立体的効果等が影響しているものと考えられる。置換フェノキシ基の脂溶性に関しては、豚精子による N-アセトヒドロキサム酸体生成におけるニトロソ誘導体に対する見かけの K_m 値 (Table X VII) には有意な差が認められないことから、脂溶性による影響は小さいものと思われる。これらニトロソ誘導体はそれ自体かなり脂溶性が高いため、疎水的性質が知られている PDHC の TPP 結合部位¹²⁷⁾ に対する親和性には置換フェノキシ基の影響が認められなかったものと考えられる。

酵素的及び非酵素的な N-アセトヒドロキサム酸体生成に対する置換フェノキシ基の電子的及び立体的効果の関係については、次の如く推論することができる。最初に、置換フェノキシ基の電子的効果を定量的に検討するために、(式4-2)に示した酸触媒による非酵素的な N-アセトヒドロキサム酸体生成 (k_{obsd}) において得られた Hammett 式から置換フェノキシ基の置換基定数 σ^+ の推定値を算定した。得られた推定 σ^+ 値は Table X VIII に括弧内の数値として表記した。試験したニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体は何れも NOB より大きい k_{obsd} 値を示したことは、第3章(ページ 51)で述べたように、これら一連の置換フェノキシ基は全て電子供与性置換基(負の σ^+ 値に相当)であることを示唆している。また、予想されるように、クロル置換基数の増加に伴って対応するクロロフェノキシ基の推定 σ^+ 値の絶対値が減少する(電子供与性の低下)傾向が伺える。

次に、置換基の立体的効果について考察する。第2章(ページ 39)で述べたように、豚心筋 PDHC による N-アリルアセトヒドロキサム酸生成において NOBP 及び NOF は σ^+ 値で表される電子的効果では説明し得ない低い反応性 (V_{max}/K_m) を示した。この結果は、芳香環置換基の立体的効果も反応性に影響を及ぼし得ることを示唆している。豚心筋 PDHC による N-アリルアセトヒドロキサム酸生成について、芳香環置換基の立体的効果も合わせて反応性の検討を行うために、置換基の立体的かさ高さの指標として Taft の立体置換基定数 E_s 値¹²⁸⁾ 及び Brown の σ^+ 値⁹²⁾ を併用した Taft 則による解析を試みた。Table X I (ページ 38) に示した豚心筋 PDHC の実験に用いたニトロソ化合物のうち、NOB(H; $E_s: 1.24; \sigma^+ 0$) 及び 4-置換ニトロソ化合物として、4-Cl-NOB(Cl; $E_s: 0.27; \sigma^+: 0.11$)、4-Me-NOB(Me; $E_s: 0; \sigma^+: -0.31$)、NOBP(Phenyl; $E_s: -2.55; \sigma^+: -0.18$) について解析した結果、(式4-4; $r=0.970$) に示す相関性が認められた (Fig. 35)。

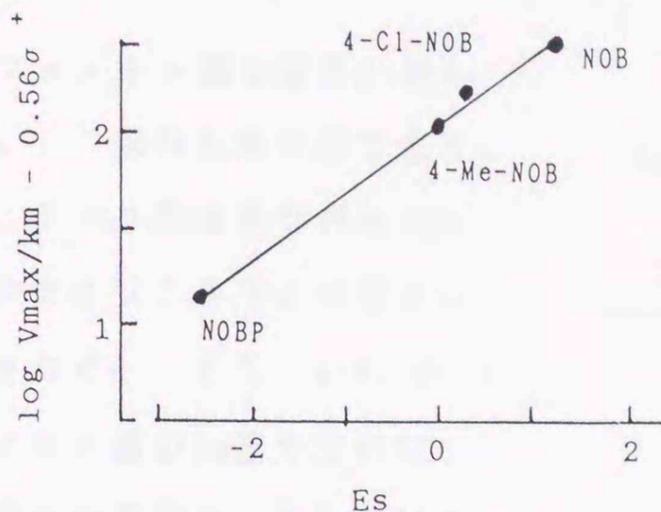


FIG. 35. Correlation of $\log V_{\max}/K_m$ values obtained for PDHC-catalyzed N-arylaceto-hydroxamic acid formation with Taft's E_s constants.

$$\log V_{\max}/K_m = 0.33 E_s + 0.56 \sigma^+ + 2.08 \quad (\text{式 4-4})$$

(0.88) (0.17)

この結果は、第一に σ^+ 項の係数 ρ 値が正の値を示すことから電子供与性置換基により反応性 (V_{\max}/K_m) が低減することを意味しており、第2章 (ページ 38) で述べたHammett則による解析結果と矛盾しておらず、 ρ 値の絶対値も同等な値であった。第二に、 E_s 項の係数 δ 値も正の値を示すことから4-置換基の立体的かさ高さの増大 (E_s 値の減少に対応) に伴って反応性が低減することが示唆される。第三に、(式 4-4) の括弧内に示した標準化回帰係数の値から、4-置換基は電子的効果よりも立体的効果が反応性に大きく影響していることが示唆された。従って、本章で述べたニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体からの N-アセトヒドロキサム酸体生成においても、置換フェノキシ基の立体的効果が現れている可能性は高いと考えられる。第1、2章で論述したように、豚精子による N-アセトヒドロキサム酸体生成はPDHC関与による反応であることが強く示唆されている。従って、本章で得た豚精子におけるニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体の反応性 (V_{\max}/K_m ; Table X VII) においても置換フェノキシ基の電子的効果及び立体的効果が(式 4-4) と同等に作用しているものと思われる。

その場合、実測した豚精子による V_{\max}/K_m 値及び Table X VIII に示した置換フェノキシ基の推定 σ^+ 値と(式 4-5) に示す関係式から、置換フェノキシ基の推定 E_s 値を求めることができる。なお、(式 4-5) の定数項は(式 4-4) に豚精子における NOB の $\log V_{\max}/K_m$ 値、 E_s 及び σ^+ 値を代入して求めたものである。

$$\log V_{\max}/K_m = 0.33 E_s + 0.56 \sigma^+ + 0.56 \quad (\text{式4-5})$$

得られた（置換）フェノキシ基の推定Es値を Table XIXに示す。 何れも負の値であり、予想されるように、クロル置換基数の増加に伴って絶対値が増大する（かさ高さの増大に対応）傾向が示唆される。 また、4-F, 4-Cl, 及び4-Me置換フェノキシ基のEs値の序列は4位置換基の立体的高さの序列と一致している。

Fig. 34（ページ64）に示したX52-N0以外の7種のニトロソ体の $\log K_{\text{obsd}}$ と pK_a とに相関性が認められたことは、 pK_a 値が置換フェノキシ基の電子的効果の尺度となり得ることを示唆している。 Fig. 32（ページ62）に示した $\log V_{\max}/K_m$ と pK_a との相関においては、4-Me-N0の V_{\max}/K_m はその pK_a 値から予想される値よりも低いものであった。この結果は、置換フェノキシ基の電子的効果と上述した立体的効果（Es項）によって説明され得るものである。置換フェノキシ基のEs値（立体的要因）と対応するフェノールの pK_a 値との間には、本質的には有意な相関性は認められないので（式4-1）に示した $\log V_{\max}/K_m$ と pK_a との相関式は他の置換フェノール類には適用し得るものではない。（式4-5）に示した芳香環置換基のEs及び値 σ^+ 値をパラメーターとする解析によって、より適用範囲が広く一般性のある反応性の予測が可能と思われる。 Table XVIII及びTable XIXに示した推定 σ^+ 値及び推定 Es値の信憑性を確認するために、Table XVIIIに示した含水酢酸中の非酵素的な N-アシルアセトヒドロキサム酸生成の $\log K_{\text{obsd}}$ に対して、Es及び σ^+ 値が文献既知の4種を含む計8種のニトロソ化合物について Taft則による解析を行った。 その結果を（式4-6; $r=0.993$ ）及びFig. 36に示す。

$$\log K_{\text{obsd}} = -1.89 \sigma^+ + 0.008 E_s - 3.20 \quad (\text{式4-6})$$

(1.02) (0.05)

TABLE XIX

Estimated Es values of phenoxy groups

substituent	Es
H	-0.85
4-F	-1.52
4-Cl	-2.36
4-Me	-2.73
3-Cl	-3.51
2,4-di-Cl	-4.03
2,4,6-tri-Cl	-5.18

非酵素的な反応性 ($\log k_{\text{obsd}}$) と σ^+ 及び E_s 値との間には良い相関性が認められた。また、括弧内の数値で示した標準化回帰係数から E_s 項で表される立体的効果の寄与が電子的効果に比較して非常に小さく、 ρ 値が (式4-2) 及び Fig. 29 (ページ51) に示した値と同等であることは、第3章で述べた実験結果と一致するものである。また δ 値 (0.008) 及び (式4-6) の括弧内の数値で示した標準化回帰係数から、非酵素的反応では予想されるように、 E_s 項で表される立体的効果の寄与は非常に小さいことが示唆された。これらのことは置換フェノキシ基の推定 E_s 及び σ^+ 値の妥当性を裏付けるものである。

第3章ではPDHCによる酵素的及び酸触媒による非酵素的な N-アシルアセトヒドロキサム酸体生成の両者において、芳香族ニトロソ化合物の芳香環置換基による電子的効果及び2-置換基による立体的効果が正反対になっていることについて論述した。本章の実験結果から、芳香環の4-置換基は酵素的な N-アシルアセトヒドロキサム酸生成に対して、その電子供与性による芳香族ニトロソ化合物の酸化還元電位の低下^{97, 129)} 作用のみならず、その立体的効果によってもさらに反応性の低下が引き起こされる可能性が強く示唆された。

環境中においてジフェニルエーテル系除草剤がニトロソ誘導体に変換される経路としては、光による還元^{44, 45)}、腸内細菌¹³⁰⁾ や土壌⁴⁷⁾ 及び動植物^{46, 47, 131)} における還元等多くの経路が報告されている。従って、除草剤として環境中で広く使用されていることを考慮すると、ニトロジフェニルエーテル系除草剤が生物圏においてニトロソ体に変換され、酵素的及び非酵素的に対応する N-アセトヒドロキサム酸体を生成する可能性は高く、その際、以下に示す点において毒性学的な問題が予想される。

(1) ニトロソ化合物からの近接発ガン物質 N-アシルアセトヒドロキサム酸体生成は、ミトコンドリアを有する全ての生物種において起こり得るものである。 周

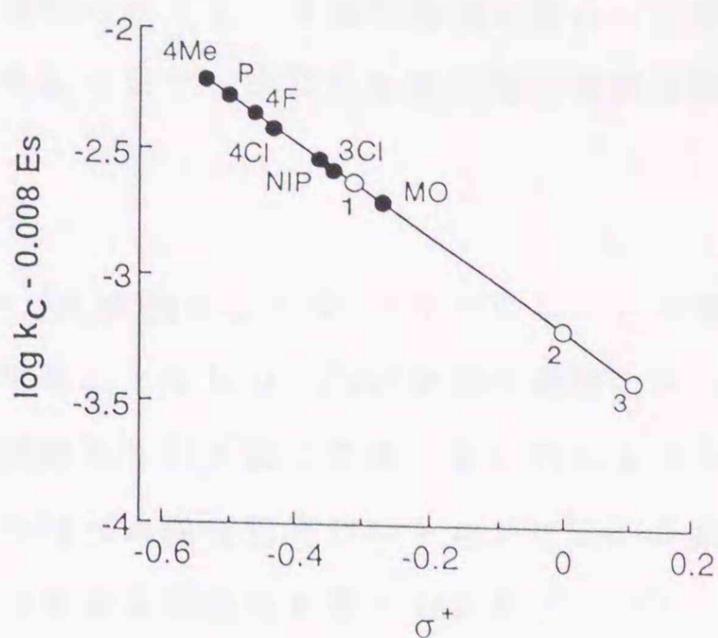


Fig. 36 Correlation of $\log k_{\text{obsd}}$ versus σ^+ constants. Abbreviations in the figure indicate the nitroso derivatives of substituted diphenyl ethers. Open circles (1, 2 and 3) indicate 4-Me-NOB, NOB and 4-Cl-NOB, respectively.

知のように、植物→動物→ヒトあるいは植物→ヒトという食物連鎖の頂点に位置するヒトにおいては濃縮暴露の危険性をも有しており、本反応は環境毒性学的な問題を提起するものと思われる。

(2) 第2章で述べたように芳香族ニトロソ化合物からのN-アセトヒドロキサム酸生成は、PDHCの正常な機能を阻害することになり、PDHCが担う細胞のエネルギー代謝及び物質代謝に対する影響は細胞壊死を引き起こす等、致命的なものと考えられる。本反応に基づく植物細胞のPDHCの機能阻害がニトロジフェニルエーテル系除草剤の除草作用¹³²⁾の原因の一つである可能性も考えられる。

(3) 第1章で述べたように、哺乳動物精子における近接発ガン物質の生成は精子の遺伝子突然変異の頻度を増大させ、結果として次世代以降に対して先天的遺伝障害、奇形及び腫瘍発生等を引き起こすという可能性を否定できない。

(4) ニトロジフェニルエーテル系除草剤は環境中における分解経路の一つである脱クロル化によりクロル置換基数が減少した物質程、対応するニトロソ誘導体からのN-アセトヒドロキサム酸体生成が、精子及び酸触媒による両反応系とも高くなることが明らかにされた。精子の反応においてMO-NOとP-NOの V_{max}/K_m 値に20倍もの相違が見られた。両者の毒性が同等であり、また、MO-NOの分解経路の内P-NO経路が5%を占めると仮定した場合でさえ、P-NOはMO-NOに匹敵する毒性発現が予想されることになり、除草剤原体よりも分解産物が毒性学的に重要な意義をもつことが示唆される。

4. 4 要約

豚精子によるニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体からの N-アセトヒドロキサム酸体生成について、構造活性相関を検討した。 N-アセトヒドロキサム酸体生成において、ニトロソ誘導体に対する見かけの K_m 値には有意な差は認められなかったが、 V_{max} 値はクロルフェノキシ基により影響を受けた。 $\log V_{max}/K_m$ 値及び $\log K_{obsd}$ は何れも、置換フェノキシ基に対応するフェノールの pK_a 値との関係において相関性 ($P < 0.01$) を示した。 両反応系における置換フェノキシ基の効果について、電子的及び立体的観点から考察した。 NIP-NO の 2-メトキシ置換体である X52-NO では、その $\log V_{max}/K_m$ 値は NIP-NO で得られた値と同じであり、本活性に対する 2-置換基の影響は認められなかった。 酸触媒による非酵素的な N-アセトヒドロキサム酸体生成では、いずれのニトロソ誘導体も NOB に比較して高い反応性を示した。 また、酵素的な生成反応の場合と異なり、X52-NO では NIP-NO に比較して、その 2-メトキシ基の立体効果による反応性の低下が認められた。 酵素的及び非酵素的な N-アセトヒドロキサム酸体生成におけるニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体の反応性の序列は、何れもニトロジフェニルエーテル系除草剤の環境中における分解経路の一つである脱クロル化によりクロル置換基数が減少する方向と同じであり、環境毒性学的に重要な問題が示唆された。

結語

(1) グルコースを始めとする解糖経路中の中間代謝物を添加した条件で行った豚精子による芳香族含窒素化合物の代謝において、アセチル化、脱アセチル化及びモノオキシゲナーゼ活性は認められなかったが、NOBからのN-OH-AA及びアゾキシベンゼン生成が認められた。N-OH-AA生成活性は精子中片部に局在しており、またTPP及び Mg^{2+} 添加により増強され、TTPPにより阻害された。豚精子によるTPPの取り込みは ^{31}P -NMRにより確認された。[3- ^{13}C] 標識ピルビン酸を用いた実験において生成するN-OH-AAのメチル基に ^{13}C が希釈及び乱雑化を受けることなく完全に保持されていることが証明され、さらにNOBとピルビン酸を二基質反応とするピンポンBiBi機構が示唆された。一方、アゾキシベンゼンの生成はピルビン酸非依存性の非酵素反応によるものであった。NOF及びNOBPも対応するN-アセトヒドロキサム酸体に変換された。本活性はラット及びヒト精子においても認められた。哺乳動物精子による芳香族ニトロソ化合物とピルビン酸からのN-アリルアセトヒドロキサム酸生成には、ミトコンドリア局在酵素PDHCの関与が示唆された。(第1章)

(2) 牛、ヒト及び豚心筋ミトコンドリア並びに豚心筋PDHCは、ピルビン酸依存性の芳香族ニトロソ化合物からのN-アリルアセトヒドロキサム酸生成活性を示した。豚心筋ミトコンドリア及び豚心筋PDHCによるNOBからのN-OH-AA生成の至適pHは何れも6.8であった。PDHCの活性発現にはTPPが必要であり、TTPPは競合的に本活性を阻害した。N-OH-AA生成はピンポンBiBi機構に従い、ピルビン酸及びNOBに対する K_m 値は各々 0.05 ± 0.01 mM及び 0.25 ± 0.07 mMであった。ピルビン酸に対する K_m 値はpH非依存性であるが、NOBに対する K_m 値はpH低下に伴って増大した。この現象は pK_a 約6.3のPDHCの解離基によるものであることが示唆された。 $\log V_{max}/K_m(\text{pyruvate}) - pH$ 相関から、 pK_a が約5.6及び7.4のPDHCの解離基もN-OH-AA生成活性に関与していることが示唆された。本活性はATPによりfeedback阻害されるが、E2酵素阻害剤NEMには影響されなかった。分離E1酵素はそれ自体でN-OH-AA生成活性を有し、PDHCで得られた速度論的パラメーター(K_m 及び V_{max} 値、至適pH及び活性化エネルギー)と同様な値を示した。E1酵素がN-OH-AA生成活性の本体であることが証明された。E1酵素による α -オキソ酸の酸化的脱炭酸反応に対する α -オキソ酸のアルキル基による立体的効果が、E1酵素活性に影響することが示唆された。PDHCによるN-アリルアセトヒドロキサム酸生成では、電子吸引性置換基を有するニトロソ化合物は酵素反応を受け易く、芳香族ニトロソ化合物は親電子剤として作

用しているものと考えられた。2-Cl-NOBはアミノフェノール体を副成することを除いて、2-クロル置換基による立体障害を受けることなく効率良く対応するN-アセトヒドロキサム酸体に変換された。反応機構として、E1酵素が触媒するピルビン酸の酸化的脱炭酸反応により生成する2-(1-ヒドロキシエチリデン)TPPによる芳香族ニトロソ化合物の還元的アセチル化(律速段階)が示唆された。(第2章)

(3) 芳香族ニトロソ化合物と α -オキソ酸からの酸触媒による非酵素的N-アシルアシルヒドロキサム酸生成を見出した。N-OH-AA生成の二次反応速度定数(k_{obs})はpH低下に伴って増大した。また、生成するN-アシルヒドロキサム酸体の酸触媒加水分解反応に由来するアゾキシベンゼンの副成も増加した。塩酸水溶液(pH 0.6)及び含水酢酸中におけるNOBと α -オキソ酸の k_{obs} は、グリオキシル酸>ピルビン酸 \geq α -オキソ酪酸>ベンゾイルギ酸の順であった。Taft則による解析の結果、正の δ 値が得られたことから、 α -オキソ酸の反応性はR基の立体的かさ高さの増大により減少することが示唆された。ピルビン酸と置換ニトロソベンゼン類の k_{obs} は、4-フェニル体>NOB>4-クロル体>3-クロル体>>2-クロル体の順であった。Hammett則による解析の結果、負の ρ 値が得られたことから、芳香族ニトロソ化合物の反応性は電子供与性置換基により増大することが示唆された。酵素的N-アシルアシルヒドロキサム酸生成では芳香族ニトロソ化合物が親電子剤として作用しているのに対し、非酵素的N-アシルアシルヒドロキサム酸生成においては、芳香族ニトロソ化合物が α -オキソ酸のカルボニル基に対する求核剤として作用する反応機構が証拠立てられた。(第3章)

(4) 豚精子によるニトロジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体からのN-アセトヒドロキサム酸体生成において、ニトロソ誘導体に対する K_m 値には有意な相違は認められなかったが、 V_{max} 値はフェノキシ基上のクロル置換基数の減少に伴って増大した。 $\log V_{max}/K_m$ 値は、置換フェノキシ基に対応するフェノールの pK_a 値との関係において良い相関性を示した。2-メトキシ基を有するX52-NOでは、その $\log V_{max}/K_m$ 値はNIP-NOで得られた値と同等であり酵素的生成に対する2-置換基の影響は認められなかったが、酸触媒による非酵素的生成では立体的効果による反応性の低下が認められた。酵素的及び非酵素的N-アセトヒドロキサム酸体生成におけるジフェニルエーテル系除草剤のニトロソ誘導体の反応性は、ジフェニルエーテル系除草剤の環境中での一分解経路である脱クロル化によるクロル置換基数の減少に伴って高くなる傾向を示した。この結果から、除草剤原体よりも環境中での分解産物が毒性学的に重要な意義を持つことが示唆された。(第4章)

実験の部

各章共通の実験

第1章から4章までの実験に用いた試薬及び装置について、共通のものを以下にまとめる。

装置

核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$) スペクトルは、JEOL GX-270 (日本電子) でテトラメチルシランを内部標準物質として測定した。質量分析 (MS) スペクトルは、LKB-9000B (島津) あるいは M-2000 (日立) で測定した。赤外吸収 (IR) スペクトルは、JASCO A-102あるいは JASCO FT/IR-7000 (いずれも日本分光) で測定した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析は、紫外部検出器 SPD-2A を備えた LC-5A (いずれも島津) を用いて行った。カラムは逆相型の LiChrosorb RP-8 (4×250 mm) を使用した。

物質

ピルビン酸ナトリウムは、Merck より購入した。ニトロソベンゼン (NOB) は東京化成 (株) より購入し、使用前にエタノールから再結晶した。N-フェニルアセトヒドロキサム酸 (N-OH-AA)¹³³⁾ は文献の方法に従って合成した。イソプロピルエーテルは安定剤無添加のもの (ナカライテスク) を、予め塩基性酸化アルミニウムカラムを通して過酸化物を除去した後、実験に用いた。

第1章に関する実験

装置

^{31}P -NMRは、JEOL EX-400 (^{31}P ; 162 MHz) (日本電子) を用いて測定した。豚精子の超音波破碎による断片化は、UR-200P 型超音波破碎機 (トミー精工; 10 Kc, 25 W) を用いて行った。

物質

[3- ^{13}C] 標識ピルビン酸ナトリウム (標識化率 99.5 atom %) は、MSD ISOTOPES より購入した。塩酸アニリン、アセトアニリド、ニトロベンゼン及びアゾキシベンゼン、フルクトース、コハク酸、ジヒドロキシアセトン、ヘキサメチルフォスフォラミドは和光純薬 (株) より購入した。ショ糖はSchwarz/Mann Biotech より購入した。グルコース、塩化マグネシウム、塩酸チアミン、(±) 乳酸、酢酸は関東化学 (株) より購入した。チアミンピロリン酸 (TPP) 及びフォスフォエノールピルビン酸三ナトリウム、グリセルアルデヒドは、Sigmaより購入した。マイペニン A 錠は武田薬品工業 (株) から購入した。チアミンチアゾロンピロリン酸 (TTPP) は文献の方法¹³⁴⁾に従って合成した。N-フェニルヒドロキシルアミン¹³³⁾、2,2'-アゾキシフルオレン¹³⁵⁾、4,4'-ビフェニルアゾキシベンゼン¹³⁶⁾、N-(2-フルオレニル) アセトヒドロキサム酸¹³⁷⁾、及びN-(4-ビフェニルイル) アセトヒドロキサム酸¹³⁸⁾は、各々文献の方法に従って合成した。2-ニトロソフルオレン (NOF) 及び 4-ニトロソビフェニル (NOBP) は、各々対応するアセトヒドロキサム酸体の赤血塩酸化法¹³⁹⁾により合成した。両ニトロソ化合物は融点及びスペクトルデータがそれらの文献値^{140, 141)}と一致したこと、及び元素分析値からその構造を確認した。その他の試薬は全て特級品を使用した。

哺乳動物精子の懸濁液調製

豚精液は、北海道滝川畜産試験場の大原博士より恵与された豚射出精液、あるいは札幌市農業協同組合 (藤野支店) より購入した豚射出精液をガーゼろ過にて膠様物を除去後、等容量の保存液¹⁴²⁾ (100 ml 当たりグルコース 6 g, クエン酸三ナトリウム 0.37 g, 炭酸水素ナトリウム 0.12 g, EDTA二ナトリウム 0.37 g, 及びマイペニン A 10 錠を含む) を加えて保存した。豚精子懸濁液の調製は、上記の保存精液を室温下で遠心分離 (200×g, 15 min) して得た精子沈渣を、沈渣の約10

倍量の100 mM 2-(N-モルフォリノ)プロパンスルホン酸 (MOPS) -NaOH緩衝液 (pH 6.8) で再懸濁後、同条件下で遠心分離する洗浄操作を4回繰り返して行った。得られた最終精子沈渣に同緩衝液を加えて、精子濃度が $10^8 \sim 10^9$ 精子/mlになるように精子懸濁液を調製し実験に使用した。

ラット精子懸濁液の調製は、体重250~300 g のSD ラットから摘出した精巣上体尾部より 0.25 M ショ糖溶液に遊出してくる精子を用いて、上記した豚精子の遠心洗浄操作に従って行った。

ヒト精子懸濁液の調製は、健常成人の射出精液を30分間室温放置して液化させた後で、上記した豚精子の遠心洗浄操作に従って行った。

上記哺乳動物の精子数は、位相差顕微鏡下、血球計算盤を用いて算定した。

インキュベーション条件

インキュベーション溶液 (全量500 μ l) は、100 mM MOPS-NaOH (pH 6.8) 緩衝液、0.5 mM TPP、20 mM $MgCl_2$ 、13 mM ピルビン酸ナトリウム、15 mM NOB (25 μ l のビス (2-メトキシエチル) エーテル溶液として加える) 及び哺乳動物精子 ($10^7 \sim 10^8$ 精子) で構成されている。NOF及びNOBPの実験では、上記組成液に溶解補助剤として0.2 % (W/V) Triton X-100 を添加して行った。インキュベーションは精子懸濁液を加えることにより開始し、30 $^{\circ}C$ で振盪 (70往復/min) 条件下行った。適当な時間毎に沸騰水浴中 (100 $^{\circ}C$) で30秒間加熱処理して反応を停止させ、氷冷後 100 mM MOPS-NaOH (pH 6.8) 緩衝液を飽和したイソプロピルエーテル 500 μ lを加えて10分間振盪抽出を行い、その有機層10 μ lをHPLCによる有機層転溶性代謝物の分離定量に供した。

HPLC分析条件

移動相には、0.01% (W/V) デスフェラルメシレート¹⁴³⁾を含む CH_3CN-H_2O (1:1, v/v)を使用した。流速は、NOBの実験では1 ml/min、NOF及びNOBPの実験では1.5 ml/minで行った。

種々のベンゼン誘導体の代謝

上述したインキュベーション条件下において、アニリン、アセトアニリド、N-OH-AA、NOB、及びニトロベンゼンの豚精子による代謝を調べた。各基質の濃度、インキュベーション時間及び用いた精子数はTable Iに示した。アニリン、アセ

トアニリドを基質とした場合、N-OH-AA生成は認められず(検出限界 0.5 nmol)、N-OH-AAを基質とした場合も、N-脱アセチル化等の変化は認められなかった。

N-OH-AA生成における添加基質の効果

豚精子によるNOBからのN-OH-AA生成に対する基質の有効性を調べるために、上述したインキュベーション条件下、グルコース、フルクトース、グリセルアルデヒド、ジヒドロキシアセトン、コハク酸、(±)乳酸、フォスフォエノールピルビン酸、ピルビン酸、あるいはピルビン酸+酢酸(各基質濃度は10 mM)を基質としてNOB(5 mM)からのN-OH-AA生成量を測定した。用いた精子数はFig. 4に示した。

NOBから生成したN-OH-AAの同定

全量 50 ml のインキュベーション溶液(13 mM ピルビン酸ナトリウム、5 mM NOB、及び 2×10^9 豚精子を含む)を、30 °Cで10時間反応させた。インキュベーション後、反応液の酢酸エチル抽出物をシリカゲルTLCにて酢酸エチルーベンゼン(1:3, v/v)で展開した。N-OH-AA標準品と同一Rf値を示し、また、FeCl₃試薬陽性バンドをかきとり、エーテル抽出した。エーテル留去後の残渣について、¹H-NMR(CDCl₃)及びMSスペクトル(EI)を測定した。N-OH-AA標準品についても精子を含むインキュベーション組成液から同様に回収操作を行い、同条件下でスペクトルを測定した。

(1)¹H-NMRスペクトル(d₆-DMSO)：代謝により生成したN-OH-AA; δ : 2.20(s, 3H), 7.14(t, 1H, J=7.3Hz), 7.33-7.40(m, 2H), 7.62(d, 2H, J=8.6Hz), 10.58(s, 1H).
N-OH-AA標準品の回収試料; δ : 2.20(s, 3H), 7.14(t, 1H, J=7.3Hz), 7.32-7.39(m, 2H), 10.59(s, 1H).

(2)MSスペクトル(EI)：代謝により生成したN-OH-AAは、N-OH-AA標準品の回収試料と同じスペクトルを与えた。両スペクトルとも、m/z:151(M⁺)の分子イオンの他に、135(M⁺-16), 109(M⁺-42), 及び93(M⁺-58)の解裂イオンが認められた。

TPP取り込み実験

TTPP処理した豚精子は次のように調製した。100 mM MOPS-NaOH(pH 6.8)緩衝液で二回洗浄後の豚精子を同緩衝液中、20 μ M TTPPと30°Cで13分間インキュベート後、同温度で遠心分離(600 \times g, 2min)を行った。得られた精子沈渣は100 mM MOPS-NaOH(pH 6.8)緩衝液に再懸濁し、30°Cで15分間インキュベートした後、再度同条件下で遠心分離した。TTPP未処理の豚精子の調製は、TTPPを添加しない点

を除いて上記同様に行った。 TPP処理及び未処理の豚精子のN-OH-AA生成活性は100 mM MOPS-NaOH (pH 6.8) 緩衝液中、10 mM NOB、20 mM MgCl₂、及び13 mMピルビン酸ナトリウムの存在下、TPP 添加濃度を可変にした条件で30分間インキュベーションを行いN-OH-AA生成量を測定した。

³¹P-NMRによるTPPの膜透過立証実験

豚精子は5 mM グルコース及び60 mM NaClを含む100 mM MOPS-NaOH (pH 7.4) 緩衝液で室温(20~22°C)下、4回遠心洗浄した。 最終洗浄精子(2~3×10⁹精子/ml)をNMR資料管(10 mmφ)に移し、2 mM TPP(最終濃度)、5 mM グルコースを含む150 mM MOPS-NaOH (pH 7.4) 緩衝液中、25°Cで³¹P-NMRを測定した。 TPP添加後10分以内に積算を開始し、900回(30分間)ずつ3時間まで積算した。 外部標準物質としてヘキサメチルフォスホラミド(δ 30.17 ppm)を用い、広領域プロトン照射モードで、45°パルス幅、繰り返し時間2秒の条件で測定した。 データは、最初の30分間の積算データに対する差スペクトルで表示した。

N-OH-AAへの¹³C取り込み実験

0.3 mmolのNOB、1 mmolの[3-¹³C]ピルビン酸ナトリウム(標識化率99.5 atom %)、及び1×10⁹豚精子を含むインキュベーション溶液30 mlを12時間インキュベーション後、エーテル抽出した。 生成したN-OH-AAを有機層から0.1 M NaOHで抽出し、得られたアルカリ水層をエーテル洗浄した後、リン酸酸性(pH 6に調整)としてからエーテル抽出した。 シリカゲルTLCによる分離精製操作は、上記した方法に準じて行った。 生成したN-OH-AAの¹³C標識化率の算出及び標識部位の確認は、¹H-NMR(CDCl₃)及びLC-API/MSスペクトル(liquid chromatography-atmospheric pressure ionization; M-2000使用)測定により行った。 ¹³C-NMR(d₆-DMSO)スペクトル測定も行った。 なお、LC-API/MSスペクトルの測定は日立分析センターの沼尻氏に依頼した。

酵素反応動力学定数の測定

経時的にN-アシルアセトヒドロキサム酸体の生成量を定量し、各測定時間で得られた平均生成速度から、各基質濃度におけるN-アシルアセトヒドロキサム酸生成初速度を算定した。 NOF及びNOBPの場合は対応するN-アセトヒドロキサム酸体の生成量が少なく、測定値の変動係数を10%未満とするために対応するN-アセトヒドロキサム酸体の標準品を各々8.9 nmol及び3.8 nmol含む500μlのイソプロピ

ルエーテルを用いて、インキュベーション反応液の抽出を行った。

N-アリルアセトヒドロキサム酸生成における見かけの K_m 値及び V_{max} 値は、Taylor展開を併用した最小二乗法¹⁴⁴⁾にて最適値を算出した。

豚精子頭部、中片部、及び尾部のN-OH-AA生成活性

(1) 豚精子の断片化

豚精子の断片化は文献の方法⁸¹⁾を一部改変して行った。即ち、豚精子の最終遠心沈渣を、約10倍量の1 mM EDTA二ナトリウムを含む0.25 M ショ糖溶液に懸濁し氷冷下、超音波破碎(15秒間 3回で 1回毎に45秒間の休止期をとる)により断片化した。頭部、中片部及び尾部は遠心分離法により分画し、各断片は100 mM MOPS-NaOH (pH 6.8) 緩衝液で懸濁溶液とした。

(2) 活性測定

前述したインキュベーション条件下で、未破碎の豚精子、及び上記の方法により分画して得た各画分を用いて、45分間インキュベーションを行い、N-OH-AA生成量を測定した。

豚、ラット及びヒト精子のN-OH-AA生成活性

ラット及びヒト精子のN-OH-AA生成活性は、豚精子の場合と同一の条件を用いて測定した。

第2章に関する実験

物質

ピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHC)、(±)-リポアミド、チアミンピロリン酸 (TPP)、フォスフォアセチル転移酵素 (*Leuconostoc mesenteroides* 由来; EC 2.3.1.8)、 α -オキソ酪酸ナトリウム、(±)- β -メチル- α -オキソペンタン酸ナトリウム、 α -オキソイソペンタン酸ナトリウム、及び α -オキソイソカプロン酸ナトリウムは Sigma から購入した。2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム (DCPIP) はキシダ化学(株)から購入した。チアミンチアゾロンピロリン酸 (TTPP)¹³⁴⁾、2-(1-ヒドロキシエチル)チアミンピロリン酸¹⁰⁰⁾、及び(±)-ジヒドロリポアミド¹⁴⁵⁾は、それぞれ文献の方法に従って合成した。(2-, 3-, 及び4-)クロロニトロソベンゼン、4-メチルニトロソベンゼン及び4-エトキシニトロソベンゼンは文献の方法⁹⁷⁾に従って合成し、対応するN-アセトヒドロキサム酸体も文献の方法^{146, 147)}を適用することにより合成した。その他のニトロソ化合物及びN-アリルアセトヒドロキサム酸については、第1章で紹介したものをを用いた。N-フェニルアシルヒドロキサム酸類 (プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、イソワレリル、及びsec-ワレリル) はNOBと対応する α -オキソ酸から、第3章に述べる方法に従って合成した。合成したヒドロキサム酸体の収率、融点、元素分析値、並びに機器データは以下の通りである。

N-Phenylpropionylhydroxamic acid: 収率 84%、白色針状晶、融点 49-51°C (benzene/hexane); 元素分析、計算値 ($C_9H_{11}NO_2$): C, 65.44; H, 6.71; N, 8.48. 実測値: C, 65.54; H, 6.70; N, 8.45; IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3150, 2860, 1650, 1630, 1480, 1400, 1290; 1H -NMR (d_6 -DMSO) δ : 1.06 (3H, t, J=7.3Hz), 2.58 (2H, q, J=7.3Hz), 7.10-7.65 (5H, m), 10.45 (1H, brs, D_2O 添加にて消失); MS (EI, 40eV) m/z: 165 (M^+), 149, 109 (base), 93; UV (EtOH) λ_{max} : 254 nm (ϵ 10700).

N-Phenylbutyrylhydroxamic acid: 収率 88%、白色プリズム晶、融点 80-81°C (benzene/hexane) (文献値¹⁴⁸⁾ 80-81°C); 元素分析、計算値 ($C_{10}H_{13}NO_2$): C, 67.02; H, 7.31; N, 7.82. 実測値: C, 67.12; H, 7.39; N, 7.90; IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3150, 2950, 1620, 1480, 1400, 1270; 1H -NMR (d_6 -DMSO) δ : 0.93 (3H, t, J=7.3Hz), 1.59 (2H, m, J=7.3Hz), 2.53 (2H, t, J=7.3Hz), 7.10-7.63 (5H, m), 10.45 (1H, s, D_2O 添

加にて消失); MS(EI, 40eV) m/z: 179(M⁺), 163, 93(base); UV(EtOH) λ max: 254 nm(ε 10400).

N-Phenyl(iso-butyryl)hydroxamic acid: 収率 88%、無色板状晶、融点 53-54°C (hexane); 元素分析、計算値 (C₁₀H₁₃NO₂): C, 67.02; H, 7.31; N, 7.82. 実測値: C, 67.15; H, 7.45; N, 7.80; IR ν_{max}(KBr)cm⁻¹: 3150, 2950, 1620, 1590, 1490, 1390, 1280; ¹H-NMR(d₆-DMSO) δ: 1.10(6H, d, J=7.0Hz), 3.18(1H, m), 7.12-7.62(5H, m), 10.45(1H, s, D₂O添加にて消失); MS(EI, 40eV) m/z: 179(M⁺), 163, 93(base); UV(EtOH) λ max: 254 nm(ε 10300).

N-Phenyl(iso-valeryl)hydroxamic acid: 収率 82%、白色針状晶、融点 69-70°C (benzene/hexane); 元素分析、計算値 (C₁₁H₁₅NO₂): C, 68.37; H, 7.82; N, 7.25. 実測値: C, 68.36; H, 7.90; N, 7.25; IR ν_{max}(KBr)cm⁻¹: 3150, 2950, 1620, 1590, 1480, 1400, 1270; ¹H-NMR(d₆-DMSO) δ: 0.93(6H, d, J=6.6Hz), 2.12(1H, m), 2.45(2H, d, J=6.9 Hz), 7.14-7.62(5H, m), 10.45(1H, s, D₂O添加にて消失); MS(EI, 40eV) m/z: 193(M⁺), 177, 93(base); UV(EtOH) λ max: 254 nm(ε 10800).

N-Phenyl(sec-valeryl)hydroxamic acid: 収率 90%、シロップ; 元素分析、計算値 (C₁₁H₁₅NO₂): C, 68.37; H, 7.82; N, 7.25. 実測値: C, 68.22; H, 7.98; N, 7.09. ; IR ν_{max}(CHCl₃)cm⁻¹: 3250, 3000, 2950, 1640, 1630, 1590, 1460, 1400, 1210; ¹H-NMR(d₆-DMSO) δ: 0.87(3H, t, J=7.3Hz), 1.08(3H, d, J=6.6Hz), 1.38(1H, m), 1.65(1H, m), 3.05(1H, m), 7.15-7.61(5H, m), 10.45(1H, s, D₂O添加にて消失); MS(EI, 50 eV) m/z: 193(M⁺), 177, 93(base); HR-MS m/z: 193.1091 (Calcd for C₁₁H₁₅NO₂, 193.1102, M⁺, 誤差 -1.1mmu); UV(EtOH) λ max: 254 nm(ε 10100).

3-クロロ-4-アミノフェノール (分解点158°C、白色針状晶、benzene) (文献値¹⁴⁹⁾ 160°C) は、2-クロロフェニルヒドロキシルアミン¹⁵⁰⁾ から合成し、また、ピリジン-無水酢酸でアセチル化して2-クロロ-4-アセトキシアセトアニリド (融点 127-128°C、白色針状晶、benzene/hexane) (文献値¹⁵¹⁾ 130 °C) へと変換した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

心筋ミトコンドリアによるN-アシルアセトヒドロキサム酸生成

(1) ミトコンドリアの調製

牛及び豚の心臓は屠殺直後のものを使用した。ヒト心臓は2人の男性の死体（年齢57才及び68才）から死後22及び30時間後に摘出したものを北海道大学医学部法医学教室高取教授（現、東京大学教授）より恵与され、 -80°C にて保存した。

ミトコンドリアは、牛、豚、及びヒトの心臓から文献の方法¹⁵²⁾に従って $0-4^{\circ}\text{C}$ にて調製した。但し、心臓は Polytron PT-10（トミー精工）を用いて1000 rpmで45秒間のホモジネーション操作を3回繰り返した。ミトコンドリアは、グリセリンを10%(v/v)になるように加えてから、使用まで -80°C にて保存した。

豚心筋ミトコンドリアの典型的な呼吸調節率及びP/O比は、酸素電極を用いた測定法¹⁵³⁾で、それぞれ2.5及び2.8以上の値を示した。

(2) 活性測定

N-OH-AA生成活性の測定は、第1章の方法を改変して行った。即ち、活性測定（最終液量1 ml）は、100 mM MOPS-KOH緩衝液（pH 6.8）、0.5 mM TPP、10 mM MgCl_2 、5 mM NOB（50 μl のビス（2-メトキシエチル）エーテル溶液として加える）、及び15 mMピルビン酸ナトリウム存在下、2 mlのテフロンシール付きのスクリーブバイアル中でニトロソ体の揮散を防ぐために行った。NOF及びNOBPの実験では、上記組成液に溶解補助剤として0.2%(w/v) Triton X-100を添加して行った。インキュベーションはミトコンドリアを加えることにより開始し、 30°C で振盪下（60回/min）を行った。酵素反応の停止は、沸騰飽和硫酸アンモニウム水溶液中で15秒間の加熱操作により行った。豚精子の実験と同様に、イソプロピルエーテル（1 ml）抽出を行い、有機層転溶性代謝物をHPLCにて分離定量した。

(3) N-OH-AA生成活性の至適pH

N-OH-AA生成の至適pHは、100 mM 2-(N-モルフォリノ)エタンスルホン酸-KOH緩衝液（pH 5.5, 5.9, 6.3, 及び6.7）及びMOPS-KOH緩衝液（pH 6.8, 7.1, 及び7.5）中で、豚心筋ミトコンドリア（0.49 mg protein）を用いて20分間インキュベーションを行い、そのN-OH-AA生成量から求めた。

(4) N-OH-AA生成反応の活性化エネルギー

活性化エネルギーの測定は、24, 27, 30, 34, 37°Cにおける豚心筋ミトコンドリア (0.24 mg protein) 触媒の N-OH-AA生成初速度から、Arrheniusプロットにより求めた。

PDHCによるN-アシルアセトヒドロキサム酸生成

(1) PDHCの調製

Sigma から購入した単離豚心筋PDHCは、10 mg/mlのBSA、30 %ショ糖、2.5 mM 2-メルカプトエタノール、2.5 mM EDTA、2.5 mM EGTA、0.5% Triton X-100、0.005 % アジ化ナトリウム、及び25 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) を含む50% グリセリン溶液となっている。PDHC (25 ユニット/1.4 ml) の500 μ lを 25 mlの5 mM EDTAを含む100 mM 3-(N-モルフォリノ)プロパンスルホン酸 (MOPS) -KOH 緩衝液 (pH 6.8) で希釈し、2-メルカプトエタノール及びBSA等の添加物を除去するため4 °Cで 140,000 \times g、2 時間の遠心でPDHCを沈降させた。ロット違いのPDHC (25 ユニット/3.6 ml) の場合は上記緩衝液 50 mlで希釈した後、氷冷下限外ろ過 (PM-10) により約10 mlまで濃縮し、上記緩衝液を加えて25 mlとした後、前述した遠心条件 (140,000 \times g、2 hrs) でPDHCを沈降させた。PDHC沈渣は 100mM MOPS-KOH緩衝液 (pH 6.8) に溶解後、不溶物は2,000 \times g、5 分間の遠心で除去した。得られた上清を実験に使用した (5-6 ユニット/mg protein)。この操作過程¹⁵⁴⁾において、PDHCに結合していたTPPは殆どが除去され、PDHCの活性発現に対するTPP要求性が認められた。 α -ケトグルタル酸脱水素酵素活性、及び分枝 α -オキソ酸脱水素酵素活性は、NADH生成による活性測定法では、このPDHC調製液には認められなかった。

PDHCの主要な三種の構成酵素 (E1:EC 1.2.4.1; E2:EC2.3.1.12; E3:EC 1.6.4.3) への分画は、文献の方法¹⁵⁵⁾に従って行った。

蛋白質定量はSDSを用いるLowry法の変法¹⁵⁶⁾に従って、BSAを標準にして行った。

(2) N-フェニルアセトヒドロキサム酸生成活性 (N-OH-AA生成活性)

N-OH-AA 生成の活性測定は、上記したミトコンドリアの活性測定の場合と同様に行った。インキュベーションは、酵素液 (PDHC或いはその分離酵素) を加えることにより開始し、振盪せずに30°Cで行った。NOB以外のニトロソ化合物及びピルビン酸以外の α -オキソ酸を用いた反応のインキュベーション条件及び活性測定法

は対応するTable及びFigureの脚注に記した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による N-アリルアシルヒドロキサム酸体の定量操作法は、前章の方法に従って行った。移動相 (CH₃CN-H₂O (1:1, v/v)) の流速は1 ml/minで行った。但し、全ての移動相には0.01%(w/v)デスフェラルメシレート¹⁴³⁾を溶解させてある。その他の移動相として、CH₃CN-MeOH-H₂O(1:4:5, v/v)は、N-(2-クロロフェニル)アセトヒドロキサム酸生成の分析に、CH₃CN-MeOH-H₂O(2:5:3, v/v)は、N-(4-ビフェニルイル)アセトヒドロキサム酸及びN-(2-フルオレニル)アセトヒドロキサム酸生成の分析に用いた。

N-(4-ビフェニルイル)アセトヒドロキサム酸及びN-(2-フルオレニル)アセトヒドロキサム酸生成の分析においては、変動係数が10%未満の測定値を得るために、インキュベーション後各々の標準品(1.9 nmol、及び4.5 nmol)を含む酢酸エチル(1 ml)で抽出を行った。

得られた酵素反応の初速度は、基質濃度との両逆数プロットにより直線性の検定を行い、K_m及びV_{max}値の最適値はTaylor展開を併用した最小二乗法¹⁴⁴⁾を用いて算定した。

PDHC、E1、E2、及びE3の活性測定法

(1)PDHCのNADH生成活性

PDHCのNADH生成活性は文献の方法¹⁵⁷⁾に従って0.5 mM EDTA, 5 mM 2-メルカプトエタノール、1 mM MgCl₂、2 mM ピルビン酸ナトリウム、0.2 mM CoASH、1 mM TPP、及び1 mM NAD⁺を含む100 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.8)中、30°Cでの340 nmの吸光度の増加初速度より求めた。

5%(v/v)のビス(2-メトキシエチル)エーテルを含む100 mM MOPS-KOH 緩衝液(pH 6.8)中でのNADH生成の活性化エネルギーは、22、24、29、31、35及び39°Cで測定した初速度のArrheniusプロットから求めた。

(2)E1酵素のDCPIP還元活性

DCPIP還元活性は文献の方法¹⁵⁴⁾に従って2 mM MgCl₂、2 mM ピルビン酸ナトリウム、0.2 mM TPP、及び0.04 mM DCPIPを含む50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7)中、30°Cでの600 nmの吸光度の減少初速度より求めた。

(3) E2酵素のAc-HLA生成活性及びE3酵素のLA還元活性

Ac-HLA生成活性¹⁵⁸⁾及びLA還元活性¹⁵⁹⁾は各々文献の方法に従って測定した。

内在性のE1キナーゼによるPDHCの不活性化

ATP-Mg²⁺存在下のE1キナーゼ (EC 2.7.1.99) による PDHCの不活性化は、2-メルカプトエタノールを添加しない点を除いて文献の方法¹⁶⁰⁾に従って行った。即ち、PDHC(4.4 ユニット, 0.79 mg protein)の50 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7)溶液2.5 mlに、50 μ lの5 mM ATP及び10 mM MgCl₂を同緩衝液に溶かした溶液を加え30°Cでインキュベートした。経時的に一定量を抜き取り、残存するNADH生成活性、DCPIP還元活性及びN-OH-AA生成活性を同緩衝液中で測定した。

N-エチルマレイミド (NEM) によるPDHCの不活性化

NEMによるPDHCの不活性化は、文献の方法⁸⁵⁾を少し改変して次のように行った。即ち、PDHC (2 ユニット, 0.36 mg protein) を、0.4 mM TPP、2mM MgCl₂ 及び0.2 mM ピルビン酸ナトリウムを含む100 mM MOPS-KOH (pH 6.8) 中 (最終液量1.5 ml) で、0.5 mM NEM 存在下及び非存在下で0 °Cでインキュベートした。経時的に一定量を抜き取り、NADH生成活性、DCPIP還元活性及びN-OH-AA生成活性を測定した。

2-(1-ヒドロキシエチル)TPPとNOBとの反応

2-(1-ヒドロキシエチル)TPP (5 mM) と NOB (1 mM) の反応は、10 mM MgCl₂を含む100 mM MOPS-KOH (pH 6.8) 中でPDHC (2.9 μ g protein) 存在下及び非存在下、30°C、20分間インキュベーションという条件で行った。

アセチルジヒドロリポアミド関与のN-OH-AA生成の可能性

(±)-モノアセチルジヒドロリポアミド(2 mM)との反応では、100 mM MOPS-KOH (pH 6.8) 中、NOB(1 mM)を0.5 mM TPP、及び10 mM MgCl₂とPDHC(32 μ g protein) 存在下30°C、10分間インキュベーションする条件で行った。

N-フェニルヒドロキシルアミンを用いた実験は、100 mM MOPS-KOH (pH 6.8) 中、4 mM (±)-ジヒドロリポアミドと5 mM アセチルCoAを PDHC (37 μ g protein) 存在下30°C、30分間インキュベーションする条件で行った。その際、PDHCの E2酵素活性作用により生成する(±)-モノアセチルジヒドロリポアミド量は、上記のAc-HLA活性測定法に準じて求めた。

2-クロロニトロソベンゼンからの3-クロロ-4-アミノフェノールの生成

(1) 単離と同定

3-クロロ-4-アミノフェノールの単離は、45 mM ピルビン酸ナトリウム、0.7 mM TPP、10 mM $MgCl_2$ 、590 μmol の2-クロロニトロソベンゼン(700 μl のビス(2-メトキシエチル)エーテル溶液として加える)、及び豚心筋ミトコンドリア(105 mg protein)を100 mM MOPS-KOH緩衝液(pH 6.8)(最終液量 14 ml)中、30°Cで振盪しながらインキュベートした。2時間後、ニトロソ体(590 μmol)とピルビン酸ナトリウム(630 μmol)を固体のまま追加した。ミトコンドリアは、1時間毎に30 mg protein相当を反応液に追加した。4時間後、NaOH(0.8 g)及びNaCl(4.5 g)を反応液に加え、そのアルカリ水溶液をイソプロピルエーテル(3×10 ml)で洗浄した。水層に濃塩酸(1.7 ml)を加えてから炭酸水素アンモニウムでpHを6.7に調整し、イソプロピルエーテル(3×10 ml)で抽出した。合した有機層は溶媒を減圧留去した後、得られる残渣を酢酸エチル:ベンゼン(1:2, v/v)を展開溶媒としてシリカTLC(Merck、Art. 5554)により分離した。3-クロロ-4-アミノフェノールはイソプロピルエーテルで溶出し、MSスペクトル(EI, 70 eV)を測定した; m/z: 143(145)(base), 80, 78, 52。一部は、ジアセチル誘導体に変換して 1H -NMR及びMSスペクトルを測定した。 1H -NMR(d_6 -DMSO) δ : 2.08(3H, s), 2.26(3H, s), 7.10(1H, dd, J=2.6, 8.9 Hz), 7.35(1H, d, J=2.6 Hz), 7.67(1H, d, J=8.9 Hz), 9.56(1H, s, D_2O で消失); MS(EI, 70 eV) m/z: 227(229)(M^+), 185(187), 143(145)(base), 43。括弧内の数値は ^{37}Cl 由来のアイソトープピークを示している。High-MS: 計算値 m/z: 227.0349 ($C_{10}H_{10}NO_3Cl$), 測定値 227.0370 (誤差2.1mmu)。

(2) 3-クロロ-4-アミノフェノールの生成条件

100 mM MOPS-KOH 緩衝液(pH 6.8)、10 mM $MgCl_2$ 、0.5 mM TPP、15 mM ピルビン酸ナトリウム、及び1 mM 2-クロロニトロソベンゼンを、PDHC(20 μg protein)、熱処理(100 °C 15 秒間) PDHC、E1酵素(9.5 μg protein)、あるいは水を添加して30°C、15分間インキュベートした。

2-クロロフェニルヒドロキシルアミンあるいはそのN-アセチル体(各々1 mM)の3-クロロ-4-アミノフェノールへの非酵素的転位反応の実験は0.5 mM TPP、10 mM $MgCl_2$ 及び15 mM ピルビン酸ナトリウムを含む100 mM MOPS-KOH緩衝液(pH 6.8)中で30°Cにて30分間インキュベートした。

第3章に関する実験

物質

グリオキシル酸及びベンゾイルギ酸は、各々和光純薬(株)及び東京化成(株)より購入した。その他の α -オキソ酸及びニトロソ化合物は前章までに紹介したものをを用いた。その他の試薬は、全て特級品を使用した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

移動相は、0.01%(w/v) デスフェラルメシレート¹⁴³⁾を含む以下の組成のものを使用した。

CH₃CN-H₂O 1:1(v/v) ; ヒドロキサム酸体(8a-d)及び(9-13b)の生成とヒドロキサム酸体(8a-d)の加水分解

CH₃CN-H₂O 9:11(v/v); ヒドロキサム酸体(9-11a)の生成

移動相の流速はヒドロキサム酸体(12b)及び(13b)の生成では1.5 ml/min、その他の場合は1 ml/minであった。

N-アシルヒドロキサム酸体、ニトロソ化合物、及びアゾキシ体の検出は、各々260 nm, 260 nm(または322 nm)、及び322 nmを用いて行った。

N-アシルヒドロキサム酸体生成の速度論的解析

(1) 水溶液中での反応

反応はpH 0.3-7の水溶液中、30 °Cで行った。各pH溶液の組成は、以下の通りである。pH 0.3 : 1M HCl; pH 0.6 : 0.5M HCl; pH 1 : 0.17M HCl/KCl; pH 2.4 : 0.01M HCl/KCl; pH 2.9 及び4.7 : 0.1M 酒石酸ナトリウム緩衝液; pH 7 : 0.18M リン酸カリウム緩衝液。

反応は上記の各水溶液1.7 mlに α -オキソ酸水溶液0.2 ml(最終濃度2-100 mM)を加え、ニトロソ体のビス(2-メトキシエチル)エーテル溶液 0.1 ml(最終濃度0.1-10.7 mM)を加えることにより開始した。pH 0.3の塩酸水溶液以外の反応液はイオン強度をNaClあるいはKClを加えて0.4 Mに調整した。経時的に0.2 mlを引き抜き、0.1 mlのリン酸二カリウム水溶液を加えpHを6.8に合わせた後、0.3 mlのイソプロピルエーテル(予め塩基性酸化アルミニウムカラムを通して過酸化物を除去し、0.5M HCl : 2M リン酸二カリウム(2:1, v/v)溶液を飽和させたもの)で

10分間振盪抽出した。有機相10 μ lをHPLCで分析した。

(2) 含水酢酸中での反応

反応は1 mmolのニトロソ化合物を含む氷酢酸1 mlにグリオキシル酸及びベンゾイルギ酸の水溶液(0.5 ml)を加えて開始し、 25 ± 2 $^{\circ}\text{C}$ で行った。ピルビン酸ナトリウム及び α -オキソ酪酸ナトリウムの場合は、5 M HClで中和した水溶液(0.5 ml)を使用した。経時的に50あるいは100 μ lの反応液を抜き取り、5 mlの CH_3CN あるいはHPLCの移動相で希釈した後、その10 μ lをHPLCで分析した。

ヒドロキサム酸体の加水分解反応の速度論的解析

N-アシルヒドロキサム酸体(8a-d)の30 $^{\circ}\text{C}$ における塩酸水溶液中(pH 0.6)での加水分解反応は、0.5M HCl(1.7 ml)と水(0.2 ml)の混液にN-アシルヒドロキサム酸体のビス(2-メトキシエチル)エーテル溶液(0.1 ml)を加えて開始した。

加水分解速度定数の算定は、上記した酸性水溶液中でのN-アシルヒドロキサム酸体の減少速度から行った。

反応例

ニトロソ化合物(20 mmol)を含む氷酢酸20 mlに、ピルビン酸ナトリウム(50 mmol)を5 M HClで中和した水溶液(10 ml)を加えてニトロソ化合物の消失を追跡しながら室温で反応させた。グリオキシル酸(50 mmol)の場合は、10 mlの酢酸溶液として加えた。反応終了後、炭酸水素アンモニウム(50 mmol)を加えてから溶媒を減圧留去した。残渣を1M水酸化ナトリウム(50 ml)に溶かした後、エーテルで洗浄(3 \times 10 ml)した。アルカリ水層を氷冷しながら5 M リン酸水溶液でpH 5.5に調整した後、エーテル(3 \times 40 ml)で抽出した。合した有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧留去して得られる粗生成物を再結晶により精製した。

N-(2-クロロフェニル)アセトヒドロキサム酸(9b)¹²⁶⁾及びN-フェニルベンゾイルヒドロキサム酸(2d)¹⁶¹⁾は、各々文献の方法に従って対応するヒドロキシルアミノ体のアセチル化により合成した。他のN-アシルヒドロキサム酸体は上記した方法で対応するニトロソ化合物と α -オキソ酸から合成した。

反応時間、収率、融点、元素分析値、及び機器分析値は以下の通りである。

N-Phenylformohydroxamic acid (8a): 反応時間 0.5hr; 収率 95%、無色板状

晶、融点 67-69°C (benzene/hexane) (文献値¹¹⁰⁾ 67-69°C) ; 元素分析、計算値 (C₇H₇NO₂) : C, 61.31; H, 5.15; N, 10.21. 実測値: C, 61.65; H, 5.10; N, 10.27. ; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 7.27-7.46(5H, m), 8.51(1H, s), 9.50(1H, brs). ; IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3100, 2800, 1630, 1590, 1340. ; UV(EtOH) 253 nm (ε 11200).

N-Phenylacetohydroxamic acid (8b): 反応時間 2hr ; 収率 93%、無色プリズム晶、融点 66-67°C (benzene/hexane) (文献値¹³³⁾ 67°C) ; 元素分析、計算値 (C₈H₉NO₂) : C, 63.56; H, 6.00; N, 9.27. 実測値: C, 63.70; H, 6.00; N, 9.27. ; ¹H-NMR(d₆-DMSO) δ : 2.20(3H, s), 7.11-7.39(3H, m), 7.63(2H, d, J=8.6Hz), 10.59(1H, s). ; IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3150, 2900, 1630, 1590, 1480, 1390. ; UV(EtOH) 254 nm (ε 9900).

N-(o-Chlorophenyl)formohydroxamic acid(9a): 反応時間 17hr ; 収率 88%、無色プリズム晶、融点 76-77°C (benzene/hexane) (文献値¹⁶²⁾ 80°C) ; 元素分析、計算値 (C₇H₆NO₂Cl) : C, 49.00; H, 3.52; N, 8.16; Cl, 20.66. 実測値: C, 49.05; H, 3.49; N, 8.08; Cl, 20.79. ; ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 7.34-7.41(2H, m), 7.48-7.56(2H, m), 8.23(1H, s), 9.57(1H, brs). ; IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3100, 2850, 1640, 1470, 1380. ; UV(EtOH) 249 nm (ε 4600).

N-(4-Biphenyl)acetohydroxamic acid(12b): 反応時間 2hr ; 収率 80%、白色針状晶、融点 147-148°C (benzene/hexane) (文献値¹⁶³⁾ 147-148°C) ; 元素分析、計算値 (C₁₄H₁₃NO₂) : C, 73.99; H, 5.77; N, 6.16. 実測値: C, 73.70; H, 5.76; N, 6.11. ; ¹H-NMR(d₆-DMSO) δ : 2.24(3H, s), 7.45-7.72(9H, m), 10.65(1H, s). ; IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3100, 2900, 1630, 1480, 1390. ; UV(EtOH) 280 nm (ε 22000).

N-(2-Fluorenyl)acetohydroxamic acid(13b): 反応時間 0.5hr ; 収率 84% ; 淡黄色針状晶、融点 148-149°C (ethyl acetate/hexane) (文献値¹⁶³⁾ 148-151°C) ; 元素分析、計算値 (C₁₅H₁₃NO₂) : C, 75.30; H, 5.48; N, 5.85. 実測値: C, 74.90; H, 5.42; N, 5.89. ¹H-NMR(d₆-DMSO) δ : 2.22(3H, s), 3.93(2H, s), 7.29-7.40(2H, m), 7.55-7.65(2H, m), 7.84-7.88(3H, m), 10.66(1H, s). ; IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3150, 2900, 1610, 1480, 1390. ; UV(EtOH) 291 nm (ε 22400), 302 nm (ε 18800).

アセトアルデヒドとの反応

塩酸水溶液 (pH 0.6) 中の反応では、NOBのビス(2-メトキシエチル)エーテル溶液 0.1 ml (最終濃度 10 mM) を、50 mMアセトアルデヒドを含む塩酸水溶液 (pH 0.6) に加えて反応させた。含水酢酸中の反応では、1 mmolのNOBを溶かした酢酸 (1 ml) に、2.5 mmolのアセトアルデヒドを含む水 (0.5 ml) を加えて反応させた。

第4章に関する実験

物質

4F-NO₂及び4Me-NO₂は、文献⁴⁸⁾の方法に従って合成した。4F-NO、4Me-NO及びX52-NOは、対応するN-アセトヒドロキサム酸体の赤血塩酸化法¹³⁹⁾により合成した。X52-NOを例として合成条件等を記述する。

X52-NO: X52のN-アセトヒドロキサム酸誘導体¹²⁶⁾ (4.9 g、14.3 mmole) をMeOH (60 ml)及び濃NH₃水(20 ml)に溶かし、攪拌しながらフェリシアン化カリウム(11.3 g、34.3 mmole)を少しずつ加えた。20分後、150 mlの水を加えベンゼンで抽出(3×50 ml)した。有機層を合し無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧下留去し、緑色の残渣をフロリジルカラム(2.6×7 cm)にて30%(v/v)ベンゼンを含むヘキサンで溶出した。収率 80% ; 緑色プリズム晶、融点 103-104°C (benzene/hexane) ; ¹H-NMR (d₆-DMSO) δ : 4.17(3H, s), 6.31(1H, dd, J=2.3, 9.2Hz), 6.41(1H, d, J=9.2 Hz; 6.50 ppm in d₄-AcOH), 7.14(1H, d, J=2.3Hz), 7.44(1H, d, J=9.0Hz), 7.56(1H, dd, J=2.0, 9.0Hz), 7.87(1H, d, J=2.0Hz); IR ν_{max}(KBr)cm⁻¹: 1610, 1570, 1460, 1240, 1220, 1090. ; MS(EI) m/z: 301(M⁺+4), 299(M⁺+2), 297(M⁺, base peak), 240, 204, 124. ; 元素分析、計算値(C₁₃H₉NO₃Cl₂): C, 52.38; H, 3.04; N, 4.70. 実測値: C, 52.48; H, 2.97; N, 4.73. ; UV(EtOH) 366nm(ε 10800).

4F-NO: 収率 85% ; 青色板状晶、融点 61-63 °C (EtOH) ; ¹H-NMR (d₆-DMSO) δ : 7.17(2H, d, J=8.9Hz), 7.27-7.39(4H, m), 7.99(2H, d, J=8.6Hz) ; IR ν_{max}(KBr)cm⁻¹: 1600, 1580, 1410, 1260, 1210, 1120. ; MS(EI) m/z: 217(M⁺), 203, 101(base peak) ; 元素分析、計算値(C₁₂H₈NO₂F): C, 66.36; H, 3.71; N, 6.45. 実測値: C, 66.28; H, 3.74; N, 6.41. ; UV(EtOH) 336nm(ε 16800).

4Me-NO: 収率 76% ; 青色リン片状晶、融点 41-42 °C (EtOH) ; ¹H-NMR(d₆-DMSO) δ : 2.35(3H, s), 7.12(2H, d, J=8.5Hz), 7.15(2H, d, J=8.5Hz), 7.32(2H, d, J=8.5Hz), 7.97(2H, d, J=8.5Hz) ; IR ν_{max}(KBr)cm⁻¹: 1600, 1490, 1410, 1250, 1110. ; MS(EI) m/z: 213(M⁺), 199, 101(base peak) ; 元素分析、計算値(C₁₃H₁₁NO₂): C, 73.26; H, 5.20; N, 6.57. 実測値: C, 73.39; H, 5.17; N, 6.58. ; UV(EtOH) 339nm(ε 18700).

4F及び4MeのN-アセトヒドロキサム酸体は既に報告した方法¹²⁶⁾に従って合成した。

N-[4-(4-Fluorophenoxy)phenyl]acetohydroxamic acid: 収率 57 % ; 淡黄色プリズム晶、融点 81-83°C (ethyl acetate/hexane); ¹H-NMR(d₆-DMSO) δ : 2.17(3H, s), 7.00(2H, d, J=8.9Hz), 7.05(2H, dd, J=4.2, 8.9Hz), 7.22(2H, t, J=8.9Hz), 7.59(2H, d, J=8.9Hz), 10.60(1H, s); IR ν_{max}(KBr)cm⁻¹: 3100, 2850, 1620, 1500, 1250.; MS(EI)m/z: 261(M⁺), 245, 219, 202(base peak); 元素分析、計算値(C₁₄H₁₂NO₃F): C, 64.36; H, 4.63; N, 5.36. 実測値: C, 64.26; H, 4.58; N, 5.38.; UV(EtOH) 258nm(ε 15100).

N-[4-(4-Methylphenoxy)phenyl]acetohydroxamic acid: 収率 34 % ; 白色板状晶、融点 77-78°C (ethyl acetate/hexane); ¹H-NMR(d₆-DMSO) δ : 2.17(3H, s), 2.29(3H, s), 6.91(2H, d, J=8.2Hz), 6.96(2H, d, J=8.9Hz), 7.19(2H, d, J=8.2Hz), 7.57(2H, d, J=8.9Hz), 10.58(1H, s); IR ν_{max}(KBr)cm⁻¹: 3100, 2900, 1620, 1500, 1240.; MS(EI)m/z: 257(M⁺), 241(base peak), 215, 199; 元素分析、計算値(C₁₅H₁₅NO₃): C, 70.02; H, 5.88; N, 5.44. 実測値: C, 70.07; H, 5.88; N, 5.38.; UV(EtOH) 259nm(ε 15900).

上記以外のニトロジフェニルエーテル化合物(P、4Cl、3Cl、NIP及びM0)のニトロソ及びN-アセトヒドロキサム酸体は、既に報告した方法^{126, 139)}に従って合成した。

速度論的解析

(1) 豚精子によるN-アセトヒドロキサム酸体生成

豚精子の調製は第1章で述べた方法に従った。インキュベーション溶液(全量1 ml)は、100 mM MOPS-NaOH緩衝液(pH 6.8)、20 mM MgCl₂、0.5 mM TPP、13 mM ピルビン酸ナトリウム、溶解補助剤として0.1%(w/v) Triton X-100、ニトロソ化合物(50 μlのビス(2-メトキシエチル)エーテル溶液として加える)から構成されており、豚精子(約10⁸精子)を添加することにより反応を開始し、30 °Cで振盪(70往復/min)しながらインキュベートした。反応容器にはニトロソ体の揮

散を防ぐためテフロンシール付きの 2 ml 容量のスクリーバイアルを使用した。反応は沸騰飽和硫酸アンモニウム水溶液中で15秒間加熱により停止し、氷冷後1 ml のイソプロピルエーテル（予め塩基性酸化アルミニウムカラムにて精製したもの）を加えて、10分間振盪抽出した。遠心した後、有機層を窒素気流下で留去し、残渣を250 μ l のHPLC用移動相で溶かしHPLCにて分析した。流速は1 ml/minで、移動相は 0.01 % (w/v) デスフェラルメシレート¹⁴³⁾ を含み、その組成は以下の通りである。

P-NO, 4F-NO, 4Me-NO, 4Cl-NO及びX52-NOの分析：MeOH : 0.01 M 酢酸 (2:1, v/v)

3Cl-NO, NIP-NO及びMO-NOの分析：CH₃CN : MeOH : H₂O (1:9:7, v/v)

N-アセトヒドロキサム酸体の検出波長は 254 nm を用いた。

(2) 酸触媒によるN-アセトヒドロキサム酸体生成

酸触媒の非酵素的なアセトヒドロキサム酸体生成の速度論的実験は第3章で述べた方法に従って含水酢酸中、30°Cで行った。生成したN-アセトヒドロキサム酸体の機器データは各々の標準品と一致した。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学薬学部 米光 宰 教授に心より感謝の意を表します。

有益なる御教示、御指導を頂きました北海道薬科大学 植松 孝悦 教授に深謝いたします。

本研究に御協力頂きました北海道薬科大学衛生化学教室 坂本 安子氏、鈴木俊洋、美口 恭範の各修士及び石原 博氏、また、有益なる御助言、御討論を頂きました 大野 裕昭氏及び葦崎 美佳 博士に感謝いたします。

豚射出精液を恵与して頂いた北海道立滝川畜産試験場 大原 睦生 博士、ヒト心臓を恵与して頂いた東京大学医学部 高取 健彦 教授に感謝いたします。

^{31}P -NMR スペクトルの測定に際し、有益なる御教示、御助言を頂きました日本電子応用研究センター長 今成 司氏並びに主任研究員 鴨 修氏に感謝いたします。

マススペクトル及び ^1H -NMRの一部を測定して頂いた北海道薬科大学中央機器センター 和田 浩二氏、元素分析をして頂いた北海道大学機器分析センター 前田 暁子氏並びに松本 弘子氏に感謝いたします。

文献

1. Enzymatic Basis of Detoxication(Jakoby, W. B., ed): Vol I and II(1980), Academic Press, New York.
2. Metabolism of Xenobiotics(Gorrod, J. W., Oelschlager, H. and Caldwell, J., eds)(1988), Taylor & Francis, London.
3. Nomura, T. (1989) Protein, Nucleic Acid and Enzyme, 32, 292-298.
4. Dop, C. V., Hutson, S. M. and Lardy, H. A. (1977) J. Biol. Chem., 252, 1303-1308.
5. Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H. and Sugita, Y. (1985) J. Biol. Chem., 260, 9699-9705.
6. Tombes, R. M. and Shapiro, B. M. (1985) Cell, 41, 325-334.
7. Guraya, S. S. (1987) in Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals, pp. 338-360, Springer-Verlag, Heidelberg, Federal Republic of Germany.
8. Okumura, K., Lee, I. P. and Dixon, R. L. (1975) J. Pharmacol. Exp. Ther., 194, 89-95.
9. Schrag, S. D. and Dixon, R. L. (1985) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 25, 567-592.
10. Linder, R. E., Strader, L. F. and McElroy, W. K. (1986) Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36, 317-324.
11. Drife, J. O. (1987) Drugs 33, 610-622.
12. Wyrobek, A. J. and Bruce, W. R. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 72, 4425-4429.
13. Wyrobek, A. J. (1983) Environ. Health Perspect., 48, 53-59.
14. Bruce, W. R. and Heddle, J. A. (1979) Can. J. Genet. Cytol., 21, 319-334.
15. Nomura, T. (1975) Cancer Res., 35, 264-266.
16. Dixon, R. L. and Lee, I. P. (1980) Fed. Proc., 39, 66-72.

17. Nomura, T. (1982) *Nature*, **296**, 575-577.
18. Generoso, W. M. (1982) *Cytogenet. Cell Genet.*, **33**, 74-80.
19. Mukhtar, H., Lee, I. P., and Bend, J. R. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 1093-1098.
20. Frederick, C. B., Hammons, G. J., Beland, F. A., Yamazoe, Y., Guengerich, F. P., Zenser, T. V., Ziegler, D. M. and Kadlubar, F. F. (1985) in *Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules: Chemistry, Toxicology and Pharmacology*(Gorrod, J. W. and Damani, L. A., eds), pp. 131-148, Ellis Horwood, Chichester, England.
21. Lotlikar, P. D. (1985) in *Biological Oxidation of Nitrogen in Organic Molecules: Chemistry, Toxicology and Pharmacology*(Gorrod, J. W. and Damani, L. A., eds), pp. 163-174, Ellis Horwood, Chichester, England.
22. Schut, H. A. J. and Castonguay, A. (1984) *Drug Metab. Rev.*, **15**, 753-839.
23. Hanna, P. E. and Banks, R. B. (1985) in *Bioactivation of Foreign Compounds*(Anders, M. W., ed), pp. 375-402, Academic Press, New York.
24. Beland, F. A. and Kadlubar, F. F. (1985) *Environ. Health Perspect.*, **62**, 19-30.
25. Lotlikar, P. D. (1991) in *N-Oxidation of Drugs: Biochemistry, Pharmacology, Toxicology*(Hlavica, P. and Damani, L. A., eds) pp. 313-329, Chapman & Hall, London.
26. Kadlubar, F. F. (1991) in *Xenobiotics and Cancer: Implications for Chemical Carcinogenesis and Cancer Chemotherapy*(Ernster, L., Esumi, H., Fujii, Y., Gelboin, H. V., Kato, R. and Sugimura, T., eds), pp. 329-338,

- Japan Scientific Societies Press, Japan.
27. Maehr, H. (1971) *Pure Appl. Chem.*, 28, 603-636.
 28. Armour, C. A. and Ryan, D. E. (1957) *Can. J. Chem.*, 35, 1454-1460.
 29. Chatterjee, B. (1978) *Coord. Chem. Rev.*, 26, 281-303.
 30. Lotlikar, P. D. and Luha, L. (1971) *Biochem. J.*, 123, 287-289.
 31. Corbett, M. D. and Corbett, B. R. (1982) in *Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids*(Kehl, H., Ed.), pp. 160-164, Karger, Basel, Switzerland.
 32. Yoshioka, T., Suzuki, T. and Uematsu, T. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264, 12432-12438.
 33. Guraya, S. S. (1987) in *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*, pp. 162-169, Springer-Verlag, Heidelberg, Federal Republic of Germany.
 34. Wieland, O. H. (1983) *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 96, 123-170.
 35. Reed, L. J. and Yeaman, S. J. (1987) in *The Enzymes*, Vol. 18: Part B(Boyer, P. D. and Krebs, E. G., eds) pp. 77-95, Academic Press, United States.
 36. Yeaman, S. J. (1989) *Biochem. J.*, 257, 625-632.
 37. Reed, L. J. and Hackert, M. L. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 8971-8974.
 38. Sakamoto, Y., Yoshioka, T. and Uematsu, T. (1989) *J. Org. Chem.*, 54, 4449-4453.
 39. Miyauchi, M., Haga, M., Takou, Y. and Uematsu, T. (1983) *Chem.-Biol. Interact.*, 44, 133-141.
 40. Miyauchi, M., Haga, M., Takou, Y. and Uematsu, T.

- (1984) Chem.-Biol. Interact., 51, 49-62.
41. Milman, H. A., Ward, J. M. and Chu, K. C. (1978) J. Environ. Pathol. Toxicol., 1, 829-840.
42. Gray, L. E. Jr., Kavlock, R. J., Chernoff, N., Ferrell, J., McLamb, J. and Ostby, J. (1982) Science, 215, 293-294.
43. Hurt, S. S. B., Smith, J. M. and Hayes, A. W. (1983) Toxicology, 29, 1-37.
44. Nakagawa, M. and Crosby, D. G. (1974) J. Agric. Food Chem., 22, 849-853.
45. Draper, W. M. and Casida, J. E. (1985) J. Agric. Food Chem., 33, 103-108.
46. Hunt, L. M., Chamberlain, W. F., Gilbert, B. N., Hopkins, D. E. and Gingrich, A. R. (1977) J. Agric. Food Chem., 25, 1062-1065.
47. Aizawa, H. (1982) in Metabolic maps of pesticides, pp. 33-36, Academic Press, New York.
48. Draper, W. M. and Casida, J. E. (1983) J. Agric. Food Chem., 31, 1201-1207.
49. Bend, J. R. and Serabjit-Singh, C. J. (1984) in Drug metabolism and drug toxicity (eds. by Mitchell, J. R. and Horning, M. G.), pp. 99-136, Raven Press, New York.
50. Dibiasio, K. W., Silva, M. H., Schull, L. R., Overstreet, J. W., Hammock, B. D. and Miller, M. G. (1991) Drug Metab. Dispos., 19, 227-232.
51. Georgellis, A., Parvinen, M. and Rydstrom, J. (1989) Chem.-Biol. Interact., 72, 79-92.
52. Guraya, S. S. (1987) in Biology of Spermatogenesis and spermatozoa in mammals, pp. 266-286, Springer-Verlag,

- Heidelberg, Federal Republic of Germany.
53. Davies, N. W., Lenk, W. and Mclean, S. (1982) *Org. Mass Spectrom.*, 17, 649-651.
 54. Horn, F. and Bisswanger, H. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 6912-6919.
 55. Shreve, D. S., Holloway, M. P., Haggerty, J. C., III and Sable, H. Z. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258, 12405-12408.
 56. Nishimune, T. and Hayashi, R. (1980) *Experientia*, 36, 916-918.
 57. Robitaille, P-M. L., Robitaille, P. A., Martin, P. A. and Brown, G. G. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.*, 87B, 285-296.
 58. Lachmann, H., Freund, A. and Schnackerz, K. D. (1984) *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 317, 697-698.
 59. Stothers, J. B. (1972) *Organic Chemistry, A Series of Monographs* (Blomquist, A. T., and Wasserman, H., eds), Vol. 24, *Carbon-13 NMR Spectroscopy*, pp. 331-348, Academic Press, New York.
 60. Eisenthal, R. and Cornish-Bowden, A. (1974) *Biochem. J.*, 139, 715-720.
 61. Brooks, D. E. and Mann, T. (1973) *J. Reprod. Fert.*, 34, 105-119.
 62. Guraya, S. S. (1987) in *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*, pp. 286-292, Springer-Verlag, Heidelberg, Federal Republic of Germany.
 63. Brooks, D. E. and Mann, T. (1972) *Biochem. J.*, 129, 1023-1034.
 64. Corbett, M. D. and Chipko, B. R. (1980) *Bioorg. Chem.*, 9, 273-287.

65. Corbett, M. D., Chipko, B. R. and Paul, J. H. (1978)
J. Environ. Pathol. Toxicol., 1, 259-266.
66. Blume, H. (1980) *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 30,
1566-1571.
67. Blume, H. (1982) *Pharmazie*, 37, 433-438.
68. Blume, H., Oelschlager, H, and Herok, J. (1984)
Xenobiotica, 14, 463-473.
69. Tsai, C. S., Burgett, M. W. and Reed, L. J. (1973)
J. Biol. Chem., 248, 8348-8352.
70. Hamasaki, N., Hardjono, I. S. and Minakami, S. (1978)
Biochem. J., 170, 39-46.
71. McCoy, G. D. and Doeg, K. A. (1975) *J. Biol. Chem.*,
250, 3510-3514.
72. Lui, A., Lumeng, L. and Li, T.-K. (1982) *J. Biol. Chem.*,
257, 14903-14906.
73. Smith, C. G., Gray, G. D., Carlson, R. G. and Hanze, A.
R. (1967) *Advan. Enzyme Regul.*, 5, 121-151.
74. Barile, M., Passarella, S. and Quagliariello, E. (1990)
Arch. Biochem. Biophys., 280, 352-357.
75. 哺乳動物の精子(飯田 勲 編、西川 義正 監修; 学窓社、1972) pp. 331.
76. Cooper, R. H., Randle, P. J. and Denton, R. M. (1974)
Biochem. J., 143, 625-641.
77. Cleland, W. W. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 8353-8355.
78. Eyer, P. (1985) in *Biological Oxidation of Nitrogen in
Organic Molecules: Chemistry, Toxicology, and
Pharmacology*(Gorrod, J. W., and Damani, L. A., eds), pp.
386-399, Ellis Horwood, Chichester, England.
79. Hinson, J. A. and Mays, J. B. (1986) *J. Pharmcol. Exp.*

- Ther., 238, 106-112.
80. Grosshans, K. and Calvin, H. I. (1985) Biol. Reprod., 33, 1197-1205.
81. Mohri, H., Mohri, T. and Ernster, L. (1965) Exp. Cell Res., 38, 217-246.
82. Kluger, R., Gish, G. and Kauffman, G. (1984) J. Biol. Chem., 259, 8960-8965.
83. Kluger, R. (1987) Chem. Rev., 87, 863-876.
84. Hamada, M., Hiraoka, T., Koike, K., Ogasawara, K., Kanzaki, T. and Koike, M. (1976) J. Biochem.(Tokyo), 79, 1273-1285.
85. Bradford, A. P., Howell, S., Aiken, A., James, L. A. and Yeaman, S. J. (1987) Biochem. J., 245, 919-922.
86. Taft, R. W., Jr. (1952) J. Am. Chem. Soc., 74, 2729-2732.
87. Taft, R. W., Jr. (1953) J. Am. Chem. Soc., 75, 4231-4238.
88. Jordan, F., Kudzin, Z. H. and Ribs, C. B. (1987) J. Am. Chem. Soc., 109, 4415-4416.
89. Washabangh, M. W. and Jencks, W. P. (1988) Biochemistry, 27, 5044-5053.
90. Crosby, J., Stone, R. and Lienhard, G. E. (1970) J. Am. Chem. Soc., 92, 2891-2900.
91. Frey, P. A., Flournoy, D. S., Gruys, K. and Yang, Y.-S. (1989) Ann. N. Y. Acad. Sci., 573, 21-35.
92. Hammett, L. P. (1970) in Physical Organic Chemistry, pp. 347-390, McGraw Hill, New York.
93. Akiyama, S. K. and Hammes, G. G. (1980) Biochemistry, 19, 4208-4213.
94. Walsh, D. A., Cooper, R. H., Denton, R. M., Bridges, B. J.

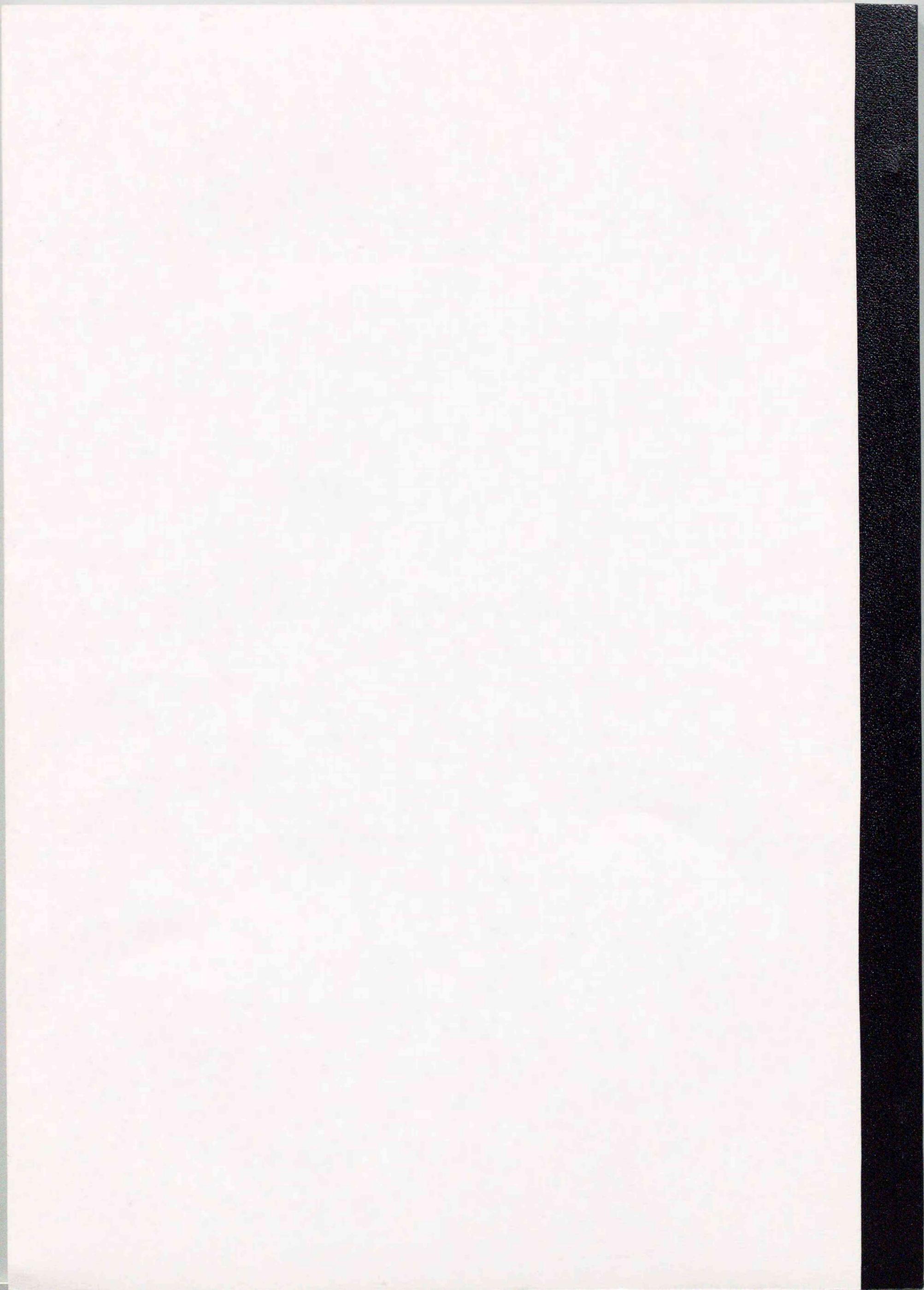
- and Randle, P. J. (1976) *Biochem. J.*, 157, 41-67.
95. Khailova, L. S., Korochkina, L. G. and Severin, S. E. (1989) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 573, 36-54.
96. Xing, W.-K. and Ogata, Y. (1982) *J. Org. Chem.*, 47, 3577-3581.
97. Lutz, R. E. and Lytton, M. R. (1938) *J. Org. Chem.*, 2, 68-75.
98. Sone, T., Hamamoto, K., Seiji, Y., Shinkai, S. and Manabe, O. (1981) *J. Chem. Soc. Perkin II*, 1596-1598.
99. Lhoest, G., Razzouk, C., and Mercier, M. (1976) *Biomed. Mass Spectrom.*, 3, 21-27.
100. Gruys, K. J., Halkides, C. J. and Frey, P. A. (1987) *Biochemistry*, 26, 7575-7585.
101. Gruys, K. J., Datta, A. and Frey, P. A. (1989) *Biochemistry*, 28, 9071-9080.
102. Ferreira, L. M., Lobo, A. M., Prabhakar, S., Marcelo-Curto, M. J., Rzepa, H. S. and Yi, M. Y. (1991) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1127-1128.
103. Ebringer, L. (1990) *Teratg. Carcinog. Mutagen.*, 10, 477-501.
104. Burcham, P. C. and Harman, A. W. (1981) *J. Biol. Chem.*, 266, 5049-5054.
105. Harding, A. E., Holt, I. J., Cooper, J. M., Schapira, A. H. V., Sweeney, M., Clark, J. B. and Morgan-Hughes, J. A. (1990) *Biochem. Soc. Trans.*, 18, 519-522.
106. Bamberger, E. (1918) *Ber.*, 51, 636-640.
107. Yost, Y. and Gutmann, H. R. (1969) *J. Chem. Soc., C*, 345-350.

108. Yost, Y. and Gutmann, H. R. (1970) J. Chem. Soc., C. 2497-2499.
109. Matlin, S. A., Sammes, P. G. and Upton, R. M. (1979) J. Chem. Soc., Perkin Trans.1, 2481-2487.
110. Corbett, M. D. and Corbett, B. R. (1980) J. Org. Chem., 45, 2834-2839.
111. Hassner, A., Ruse, M., Gottlieb, H. E. and Cojocaru, M. (1988) J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 733-737.
112. Kronja, O., Matijevic-Sosa, J. and Ursic, S. (1987) J. Chem. Soc., Chem. Commun., 463-464.
113. Forsberg, O., Gelland, B., Ulmagren, P. and Wahlberg, O. (1978) Acta Chem. Scand., A, 32, 345-352.
114. Sundberg, R. J. (1967) Tetrahedron, 23, 1583-1589.
115. Okazaki, R. and Inamoto, N. (1970) J. Chem. Soc., B. 1583-1586.
116. The steric effect of the o-substituent on N-arylaceto-hydroxamic acids is also briefly discussed in relation to their ^1H -NMR and UV spectra(see ref. 126).
117. Novak, M., Bonham, G. A., Mohler, L. K. and Peet, K. M. (1988) J. Org. Chem., 53, 3903-3908.
118. Berndt, D. C. and Sharp, J. K. (1973) J. Org. Chem., 38, 396-397.
119. Politzer, P. and Bar-Adon, R. (1987) J. Phys. Chem., 91, 2069-2073.
120. Politzer, P., Lane, P., Jayasuriya, K. and Domelsmith, L. N. (1987) J. Am. Chem. Soc., 109, 1899-1901.
121. Meites, L. (1963) in Handbook of analytical chemistry, pp. 1-22 and 1-26, McGraw-Hill, New York.

122. Buckingham, J. (1982) in Dictionary of organic compounds
5th Ed, pp. 1767 and 5435, Chapman and Hall, New York.
123. Taft, R. W., Jr. (1952) J. Am. Chem. Soc., **74**, 3120-3128.
124. Yoshioka, T., Takou, Y. and Uematsu, T. (1986) Mutation
Res., **170**, 93-102.
125. Miyauchi, M., Koizumi, M. and Uematsu, T. (1981) Biochem.
Pharmacol., **30**, 3341-3346.
126. Kumano, T., Yoshioka, T. and Uematsu, T. (1986) Drug
Metab. Dispos., **14**, 487-493.
127. Wittorf, J. H. and Gulber, C. J. (1970) Eur. J.
Biochem., **14**, 53-60.
128. Unger, S. H. and Hansch, C. (1976) Prog. Phys. Org.
Chem., **12**, 91-118.
129. Kovacic, P., Kassel, M. A., Feinberg, B. A., Corbett, M.D.
and McClelland, R. A. (1990) Bioorg. Chem., **18**, 265-275.
130. Miyauchi, M., Takagi, M. and Uematsu, T. (1980) Japan Soc.
Sci. Fish, **46**, 837-844.
131. Shimotori, H. and Kuwatsuka, S. (1978) J. Pesticide Sci.,
3, 267-275.
132. Scalla, R. and Matringe, M. (1990) Z. Naturforsch.,
45C, 503-511.
133. Yoshioka, T. and Uematsu, T. (1985) J. Chem. Soc., Perkin
Trans. 1, 1261-1269.
134. Kluger, R., Gish, G. and Kauffman, G. (1984) J. Biol.
Chem. **259**, 8960-8965.
135. Iorio, M. A., Mazzeo-Farina, A., Seneca, L. and
Boniforti, L. (1985) Biomed. Mass Spectrom. **12**, 30-37.
136. Von Jagow, R., Kiese, M. and Renner, G. (1966) Biochem.

- Pharmacol. 15, 1899-1910.
137. Poirier, L. A., Miller, J. A. and Miller, E. C. (1963)
Cancer Res. 23, 790-800.
138. Shirai, T., Fysh, J. M., Lee, M. S., Vaught, J. B. and
King, C. M. (1981) Cancer Res. 41, 4346-4353.
139. Miyauchi, M., Takou, Y., Watanabe, M. and Uematsu, T.
(1984) Chem.-Biol. Interact., 51, 49-62.
140. Uehleke, H. and Nestel, K. (1967) Naunyn-Schmiedeberg's
Arch. Pharmakol. Exp. Pathol., 257, 151-171.
141. Lotlikar, P. D., Miller, E. C., Miller, J. A. and
Margreth, A. (1965) Cancer Res., 25, 1743-1752.
142. Haeger, V. O. and Mackle, N. (1971) Dtsch. Tierarztl.
Wschr., 78, 395-397.
143. Corbett, M. D. and Chipko, B. R. (1979) Anal. Biochem.,
98, 169-177.
144. Sakoda, M. and Hiromi, K. (1976) J. Biochem., 80, 547-555.
145. Gunsalus, I. C., Barton, L. S. and Gruber, W. (1956)
J. Am. Chem. Soc., 78, 1763-1766.
146. Mangold, B. L. K. and Hanna, P. E. (1982) J. Med. Chem.,
25, 630-638.
147. Hinson, J. A. and Mitchell, J. R. (1976) Drug Metab.
Dispos., 4, 430-435.
148. Kushner, D. J., Landry, T. A., Tyrrell, M. C. and Akers,
H. A. (1983) Anal. Biochem., 133, 116-119.
149. Le Guyader, M., Tallec, A. and Legoff, R. (1964) Compt.
Rend., 258, 6175-6177.
150. Harman, R. E. (1963) Org. Synth. Coll. Vol. 4, 148-154.
151. Theilacker, W. (1938) Ber., 71B, 2065-2070.

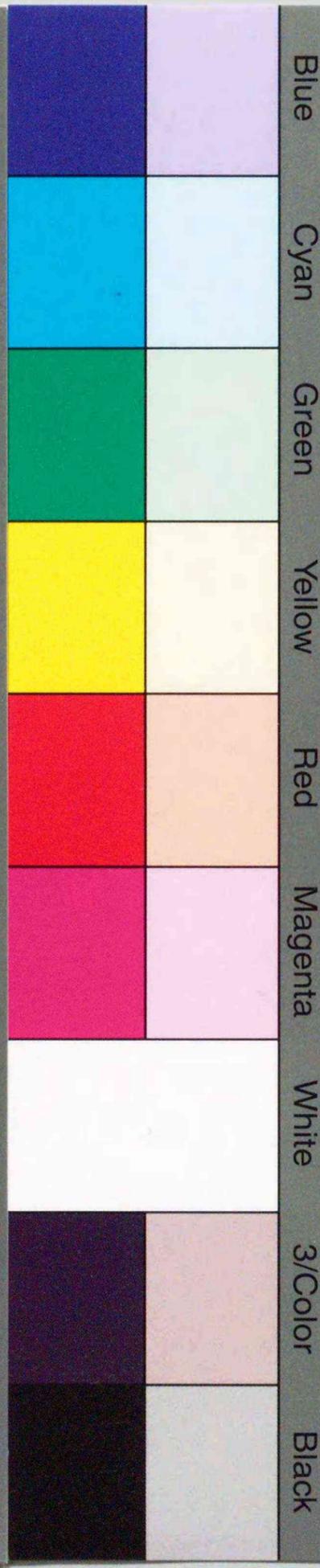
152. Azzone, G. F., Colonna, R. and Ziche, B. (1979)
Methods Enzymol., 72, 296-303.
153. Max, S. R., Garbus, J. and Wehman, H. J. (1972)
Anal. Biochem., 46, 576-584.
154. Sumegi, B. and Alkonyi, I. (1983) Eur. J. Biochem.,
136, 347-353.
155. Koike, M., Urata, Y., Koike, K., Tsuji, A. and Moriyasu, M.
(1988) in Thiamin Pyrophosphate Biochemistry Vol. II: The
Pyruvate Dehydrogenase Complex and Prospects for the
Future (Schellenberger, A., and Schowen, R. L., eds) pp.
37-43, CRC, United States.
156. Markwell, M. A. K., Hass, S. M., Tolbert, N. E. and
Bieber, L. L. (1981) Methods Enzymol., 72, 296-303.
157. Walsh, D. A., Cooper, R. H., Denton, R. M., Bridges, B.
J. and Randle, P. J. (1976) Biochem. J., 157, 41-67.
158. Reed, L. J. and Willms, C. R. (1966) Methods Enzymol.,
9, 247-265.
159. Koike, M. and Hayakawa, T. (1970) Methods Enzymol., 18,
298-307.
160. Cooper, R. H., Randle, P. J. and Denton, R. M. (1974)
Biochem. J., 143, 625-641.
161. Ayyangar, N. R., Kalkote, U. R. and Nikard, P. V.
(1983) Indian J. Chem., 22B, 872-877.
162. Ayyangar, N. R., Brahme, K. C. and Srinivasan, K. V.
(1987) Synthesis, 64-65.
163. Shirai, T., Fysh, J. M., Lee, M. S., Vaught, J. B. and
King, C. M. (1981) Cancer Res., 41, 4346-4353.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

