

## 環境中の変異・癌原性芳香族アミン *N*-水酸化体の DNA 傷害 における相互作用

Interaction of chemicals on DNA damages and binding of muta/carcinogenic *N*-hydroxyarylamines derived from environment

代表研究者	慶應義塾大学医学部講師 Lecturer, Keio Univ. Sch. of Med. Yasushi YAMAZOE	山 添 康
協同研究者	慶應義塾大学医学部助手 Assist. Prof., Keio Univ. Sch. of Med. Shunichi MANABE	眞 部 俊 一

Interaction of chemicals on the arylamine-induced DNA-damages has been studied to understand the mechanism of the modulation on mutagenic and carcinogenic effects of arylamines. *N*-Hydroxy-Glu-P-1, which was an active intermediate of environmental promuta/carcinogenic Glu-P-1, was further activated through the enzymatic *O*-acetylation and *O*-sulfation in rat livers. These reactions were catalyzed by cytosolic acetyltransferase and sulfotransferase, which require acetyl CoA and phosphoadenosylphosphosulfate, respectively. Addition of *t*-butylhydroxytoluene, a food additive used for antioxidant, caused the decrease in the DNA binding of *N*-hydroxy-Glu-P-1 in the cytosolic activating systems. Serum albumin also had similar inhibitory effect, but to a lesser extent. A well known endogenous scavenger, glutathione, also effectively reduced the rate of the DNA binding, in the sulfotransferase-mediated system, whereas the chemical had no inhibitory, but rather stimulatory effect on the acetyltransferase-mediated activation of *N*-hydroxy-Glu-P-1. Similar enhancement was also observed with cysteine and *N*-acetylcysteine, but non-peptide sulfhydryls, dithiothreitol and mercaptoethanol inhibited the binding. The stimulative effect of peptide sulfhydryls depended on the concentration in the reacting mixture. The highest binding was observed at 10 mM, and significant inhibition of the DNA binding was observed at 1 mM, indicating the dual, inhibitory and stimulative, actions of peptide sulfhydryls. These sulfhydryls, however, had no stimulative effect on the enzymatic *O*-acetylation of *N*-hydroxy-Glu-P-1, and the adduct formed was not distinguished from that formed in the system without the sulfhydryls after the hydrolysis of the modified DNA into the mono nucleoside adduct. These results indicate the peptide sulfhydryls have dual effects on the activation of *N*-hydroxyarylamines: At the low concentration (1 mM) the compounds inhibited the binding of arylamines to DNA probably as acting a scavenger of *N*-hydroxyarylamines, and at higher concentrations (~10 mM), these chemicals may stabilize the reactive species formed by *O*-acetyltransferase-mediated reaction and indirectly enhanced the DNA binding induced by the activated form of *N*-hydroxyarylamines.

### 研究の目的

これまでの多くの研究から、癌原性化合物は生体内でその構造の一部が酵素的に変換された後 DNA に作用して、突然変異を誘発し、癌化を促進させると考えられている。環境中には非常に多

くの有機物質が存在しており、これらは食物とともに、あるいは環境汚染の結果として体内に取り込まれている。これらの環境物質の中には、数多くの癌原物質が含まれているが、さらに生体内において癌原物質の活性化を修飾すると考えられる

**Table 1.** Requirements for the reconstitution of the acetyl-transferase- and sulfotransferase-mediated binding system.

System	Amounts of <i>N</i> -hydroxy-Glu-P-1 bound to DNA	
	(pmol/mg of DNA/30 min)	Relative percent
<b>I. Acetylation</b>		
Complete	472	(100 )
minus acetyl CoA	13	( 2.7)
minus cytosol	4	( 0.8)
minus acetyl CoA and cytosol	2	( 0.4)
<b>II. Sulfation</b>		
Complete	90	(100 )
minus PAPS	6	( 6.6)
minus cytosol	2	( 2.2)
minus PAPS and cytosol	2	( 2.2)

物質も同時に含まれている。これらのことから実際の人環境で起こっているような、すなわち複合汚染状況下での生体内における癌原物質の代謝活性化の実態は、癌原性物質のみが作用する場合とはかなり異なるものと予想されるが、その修飾の機構はよくわかっていない。そこでこのような複合汚染の代謝活性化における効果を明らかにするため本研究を行なった。

#### 研究の計画

1) 複合汚染の代謝活性化への影響を知るため、癌原性アリルアミンの活性中間体である *N*-ヒドロキシアリルアミンの酵素的活性化に及ぼす種々物質の効果を検討した。

2) 生体内においてアリルアミンによる発癌の重要な変動因子と考えられる SH 化合物についてその修飾機構を検討した。

#### 研究の成果

1) *N*-ヒドロキシアリルアミン活性化に対する物質添加効果

アリルアミンは一般に *N*-水酸化により *N*-ヒドロキシアミン体となり一部はそのまま DNA と反応するが、大部分の *N*-ヒドロキシルアミンはさらに酵素的エステル化を受けて *O*-エステル体となった後 DNA を損傷する。アミノ酸や食品の加熱によって、生成する癌原性ヘテロサイクリックアミン Glu-P-1 もこれら 2 段階の活性化を受けることが知られている。第 1 段階の活性化 (*N*-水

酸化) については従来から種々物質がこの反応に競合し、活性化のレベルを変動させることが明らかにされているが、第 2 段階の DNA との反応種を生成する反応を修飾する物質については、最終活性化を行なう重要な過程であるにもかかわらず、その不安定性のためあまり検討されていない。そこで *N*-ヒドロキシ-Glu-P-1 の酵素的エステル化にどのような物質が影響を与えるかを DNA への共有結合を指標として調べた。

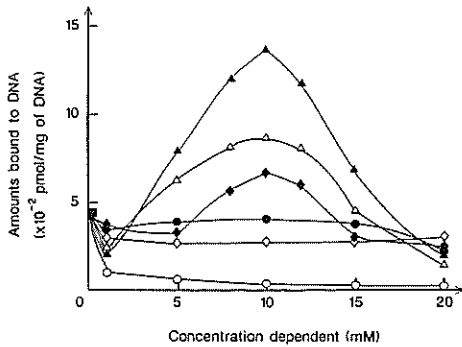
Table 1 に示したように *N*-ヒドロキシ-Glu-P-1 は肝可溶性画分の存在下、*O*-アセチル化および *O*-スルホニル化によって活性化され、Glu-P-1 分子が DNA 塩基に共有結合する。これら反応はアセチル CoA を補酵素とするアセチルトランスフェラーゼとホスホアデノシルホスホスルフェート (PAPS) を補酵素とするスルホトランスフェラーゼによって触媒される。そこで *N*-ヒドロキシ-Glu-P-1 の両活性化反応系に各種物質を添加し、その影響を調べた (Table 2)。

内因性の解毒物質としてよく知られているグルタチオン (10 mM) を加えた場合、PAPS 依存性の硫酸エステル化による活性化反応は顕著に阻害された。しかしながらグルタチオンは *O*-アセチル化による活性化反応を阻害せず、むしろ微かに増加させた。同様の傾向は L-システインや *N*-アセチルシステインを添加した場合にも認められた。他の SH 化合物である 2-メルカプトエタノー

**Table 2.** Effect of chemicals on the cytosolic acetyl CoA- and PAPS-dependent binding of *N*-hydroxy-Glu-P-1 to DNA

Chemical	Amounts bound to DNA (pmol/mg of DNA/30 min)	
	Acetyl CoA-dependent	PAPS-dependent
None	472 (100 )	140 (100.0)
Glutathione	581 (123.1)	36 ( 25.7)
Methionine	282 ( 59.7)	174 (124.2)
Butylated hydroxy toluene	52 ( 11.0)	19 ( 13.5)
Bovine serum albumin	315 ( 66.7)	130 ( 92.8)
L-Cysteine	969 (205.3)	113 ( 80.7)
L-Cystine	451 ( 95.6)	161 (115.0)
<i>N</i> -Acetyl-L-cysteine	1400 (296.6)	96 ( 68.6)
2-Mercaptoethanol	2 ( 0.4)	65 ( 46.4)
Dithiothreitol	68 ( 14.4)	84 ( 60.0)

All chemicals used at 10 mM as final concentration, except bovine serum albumin at 10 mg/ml incubation mixture.



**Fig. 1.** ペプチドSH化合物添加効果の濃度依存性。  
 ▲: *N*-アセチルシステイン, △: L-システイン,  
 ◆: グルタチオン, ●: L-システイン, ◇: メチ  
 オニン, ○: メルカプトメタール

ルやジチオスレイトールには増強作用はなく、むしろ阻害した。これらSH化合物はいずれもグルタチオンと同様、O-スルホニル化による活性化を有意に増強しなかった。

抗酸化剤として用いられるブチルヒドロキシトルエンはO-アセチル化およびO-スルホニル化による*N*-ヒドロキシ-Glu-P-1の活性化を強く阻害した。また血清アルブミンは生体内において捕捉基質として作用し、スカベンジャーの役割をはたしていると考えられているが、その阻害効果はそれ程顕著ではなかった。

## 2) SH化合物作用の濃度依存性

上述の実験でグルタチオンや*N*-アセチル-L-システインが*N*-ヒドロキシ-Glu-P-1のO-アセチル化によるDNA共有結合を阻害せず、むしろ増加させた。生体内においてグルタチオンの濃度は著しく変動し、食物摂取直後には肝中濃度は10 mMとなることが知られている。そこでこれらSH化合物の濃度とDNA結合との関係を調べた。Fig. 1に示したように*N*-アセチルシステイン、システインおよびグルタチオンの増強効果は10 mM付近の濃度域で顕著となることがわかった。

興味あることには、L-システインや*N*-アセチルシステインは1 mM濃度条件のもとでは、いずれも*N*-ヒドロキシ-Glu-P-1のO-アセチル化による活性化に対して阻害を示しており、これらの結果からこれらSH化合物はその濃度の違いによって阻害と増強の相反する効果を示すことが明らかとなった。

## 3) SH化合物によるDNA共有結合の増強機構

ペプチド性SH化合物のDNA共有結合に対する増強効果がどのようにして起こるのかを知るため、*N*-ヒドロキシ-Glu-P-1の活性化において、増強効果の認められるO-アセチル化と認められないO-スルホニル化に対するこれらSH化合物

の影響を調べた。Fig. 2 に示したように *N*-ヒドロキシ-Glu-P-1 が *O*-アセチル化あるいは *O*-スルホニル化された後還元的に生成する Glu-P-1 の量はエステル体の生成量に比例するものと考えられるが、この還元体の生成量には両反応において

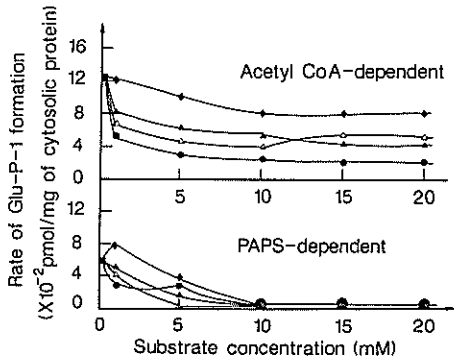


Fig. 2. *O*-アセチル化および *O*-スルホニル化系における Glu-P-1 の生成速度と SH 化合物濃度。  
●: L-システイン, ▲: *N*-アセチルシステイン,  
△: L-システイン, ◆: グルタチオン

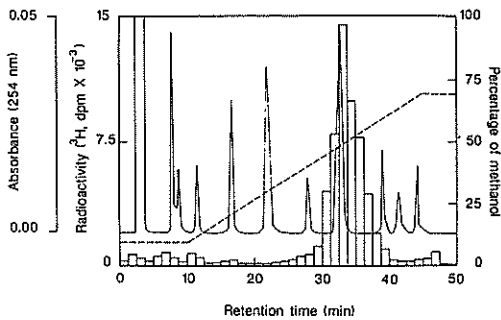


Fig. 3. Glu-P-1 スクレオチド付加体の hplc.  
Rt. 33 分に唯一の放射活性ピークが検出された。

著しい差異が認められ、アセチル化反応系で高く、*O*-スルホニル化反応系では 10 mM 以上の SH 濃度条件での Glu-P-1 の生成はほとんど認められなかった。このような結果はペプチド性 SH 化合物が *N*-ヒドロキシ-Glu-P-1 の酵素的 *O*-スルホニル化を *O*-アセチル化よりもより強く阻害するかあるいは含硫化合物をより効率良く形成するものと考えられた。しかしながら *O*-アセチル化反応系において 1 mM 濃度と 10 mM 濃度条件での結果を比較した場合、Glu-P-1 の生成量はむしろ 1 mM で高い値を示した。これらの結果から

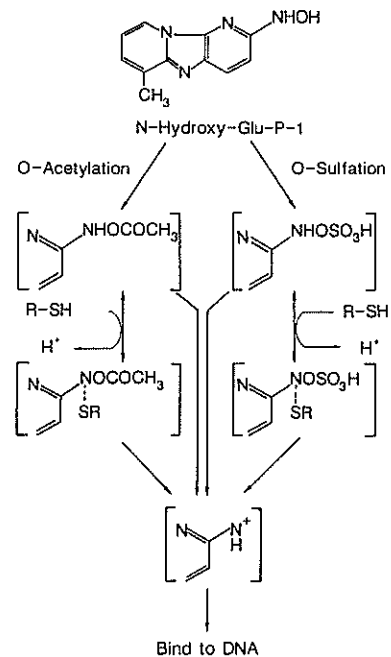


Fig. 4. ペプチド SH 化合物による *N*-ヒドロキシ-Glu-P-1 活性化促進の機構。

Table 3. Requirements for the reconstitution of *N*-acetyl-L-cysteine effect in acetyltransferase-mediated binding system

System	Amounts of <i>N</i> -hydroxy-Glu-P-1 bound to DNA	
	(pmol/mg of DNA/30 min)	Relative percent
Complete	1311	(100.0)
minus sulfhydryl	453	( 34.5)
minus acetyl CoA	39	( 3.0)
minus cytosol	17	( 1.3)
minus sulfhydryl, cytosol and acetyl CoA	9	( 0.7)

もペプチド性 SH 化合物による DNA 共有結合の促進は *O*-アセチル化反応の促進に由来するものではないことが明らかになった。また Table 3 に示したように *N*-アセチル-L-システインによる増強効果はアセチル CoA と可溶性酵素画分の共存下のみで認められ、ペプチド性 SH 化合物は *N*-ヒドロキシ-Glu-P-1 とではなく *N*-アセトキシ-Glu-P-1 と反応することが示唆された。

またペプチド性 SH 化合物が通常の Glu-P-1 ヌクレオシド付加体と異なる付加体を形成する可能性が考えられるが、*N*-アセチルシステインの存在、および非存在下で反応させた *N*-ヒドロキシ-Glu-P-1 結合 DNA を酵素水解によりモノヌクレオシド付加体に変換し、HPLC により比較したところ、HPLC 保持時間や吸収スペクトルにおいても両 DNA 由来のヌクレオチドに差は認められなかった (Fig. 3)。

以上の結果から、ペプチド性 SH 化合物は *N*-ヒドロキシアシルアミンの *O*-アセチル体と反応して、SR (R=残基) が付加した中間体を形成し、アシルオキシ体と平衡状態を作ることによって結果的にアシルオキシ体を安定化し、反応活性種の半減期を延長させて、活性化の増強を示したものと考えられる (Fig. 4)。これらの結果からペプチド性 SH 化合物は、従来解毒代謝としてのみ作用するものと考えられて来たが、活性化反応の種類によってはむしろ増強因子として作用すること、また濃度によって阻害と増強の相反する方向に作用することが明らかとなった。

#### 研究の課題と発展

従来内因性の防御物質と考えられていたグルタ

チオンなどペプチド性 SH 化合物が、むしろ高濃度域で DNA 損傷を促進することが明らかとなった。促進を示す濃度はちょうど飽食時の生体内濃度に当たり、生体内においても促進が起こっている可能性があり、今後検討すべき課題であろう。また本実験を通じて生体内に存在あるいは取り込まれた物質が直接活性化された癌原物質と反応するだけでなく、活性化酵素の調節などを行ない間接的にも作用することにより、癌原アミンの DNA 傷害の程度を変動させる可能性が示唆された。今後この点についても検討を進めて行きたい。

#### 発表論文

- Y. Yamazoe, S. Manabe, N. Murayama and R. Kato: "Regulation of Hepatic Sulfotransferase Catalyzing the Activation of *N*-Hydroxyarylamine and *N*-Hydroxyarylamine by Growth Hormone", *Molec. Pharmacol.*, **32**, 536-541 (1987).
- Y. Kawakubo, S. Manabe, Y. Yamazoe, T. Nishikawa and R. Kato: "Properties of Cutaneous Acetyltransferase Catalyzing *N*- and *O*-Acetylation of Carcinogenic Arylamines and *N*-Hydroxyarylamine", *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 265-270 (1988).
- R. Kato and Y. Yamazoe: "Metabolic Activation and Covalent Binding to Nucleic Acids of Carcinogenic Heterocyclic Amines from Cooked Foods and Amino Acid Pyrolysates", *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 297-311 (1987).
- R. Kato and Y. Yamazoe: "*N*-Hydroxyarylamine *O*-Acetyltransferase in Mammalian Livers and *Salmonella*" In *Carcinogenic and Mutagenic Responses to Aromatic Amines and Nitroarenes*, ed. by C. M. King, L. J. Romano, and D. Schuetzle, pp. 125-136, Elsevier Science Publishing (1988).