
環境汚染有機化合物の代謝的活性化による複合効果機構の研究

On the mechanism of combined effect of environmental organic pollutants by metabolic activation

- 代表研究者 慶應義塾大学医学部教授 加藤 隆一
Prof., Dept. of Pharmacology, School of Medicine, Keio Univ.
Ryuichi KATO
- 協同研究者 慶應義塾大学医学部助教授 鎌滝 哲也*¹
Assoc. Prof., Dept. of Pharmacology, School of Medicine, Keio Univ.
Tetsuya KAMATAKI
- 慶應義塾大学医学部講師 山添 康
Assist. Prof., Dept. of Pharmacology, School of Medicine, Keio Univ.
Yasushi YAMAZOE
- 慶應義塾大学医学部助手 斉藤 和季*²
Assist. Dept. of Pharmacology, School of Medicine, Keio Univ.
Kazusue SAITO
- 慶應義塾大学医学部助手 篠原 厚子
Assist. Dept. of Pharmacology, School of Medicine, Keio Univ.
Atsuko SHINOHARA

To investigate the mechanism of combined effect of environmental organic pollutants, we studied metabolic activation and metabolic interaction of these organic compounds.

1) Polycyclic aromatic nitrocompounds, such as nitropyrenes were activated through the reduction by microsomal cytochrome P-450 in rat liver. However, the nitro-reduction was strongly inhibited in the presence of molecular oxygen and hydroxylamine-derivatives, postulated reactive intermediates, were not detected during the incubation.

2) The nitropyrenes and nitro-derivatives of Trp-P-2 and Glu-P-1 were easily reduced by *Salmonella typhimurium* and caused the mutation through hydroxylamine-derivatives. These results may account for their relatively low carcinogenicities in comparison with their very high mutagenicities toward the *Salmonella*.

3) Trp-P-2 and Glu-P-1 were oxidized to hydroxylamine-derivatives by cytochrome P-450 and we found that the hydroxylamine-derivatives were metabolically activated through acetyl-CoA dependent O-acetylation by arylhydroxylamine-O-acetyltransferase. We purified this new enzyme from *Salmonella typhimurium* TA98 to a homogeneity. The *K_m* value for acetyl-CoA of the bacterial enzyme was very low as compared with that of mammalian liver enzyme. These findings, therefore, may account for relatively low carcinogenicities of Trp-P-2 and Glu-P-1 in comparison with their very high mutagenicities toward the *Salmonella*.

4) Mutagenic activity of polycyclic nitrocompounds in *Salmonella typhimurium* TA98, TA98NR and TA98/1,8-DNP₆ was studied. The mutagenic activities of NO₂-Trp-P-2, NO₂-Glu-P-1 and 1-nitropyrene were much lower in TA98NR than those in TA98, whereas the mutagenic activities of NO₂-IQ and dinitropyrenes were similar in both strains. The mutagenic activities in TA98/1,8-DNP₆ of these nitrocompounds except NO₂-Trp-P-2 were very weak.

*¹ 現北海道大学薬学部教授

*² 現千葉大学薬学部助手

5) *N*-Hydroxyarylamine *O*-acetyltransferases were purified from rat and hamster livers and their natures were compared with that from *Salmonella typhimurium* TA98. *N*-Hydroxyarylamine *O*-acetyltransferases are essential enzymes for the metabolic activation of mutagenic *N*-hydroxyarylamines and both enzymes were inhibited by phenol derivatives, such as pentachlorophenol, and β -carboline derivatives, including harmine, and ellipticine.

6) Two acetyltransferases, AT-I and AT-II, were purified from hamster livers. AT-I showed high activities of acetyl CoA-dependent *O*-acetylation of *N*-hydroxy-Glu-P-1 and *N*-acetylation of 2-aminofluorene, arylhydroxamic acid-dependent *p*-aminoazobenzene *N*-acetylation and arylhydroxamic acid *N,O*-acetyltransfer. On the other hand, AT-II showed only activities of acetyl CoA-dependent *N*-acetylation of 2-aminofluorene and *p*-aminobenzoic acid and it was deficient in liver of slow acetylator phenotype.

7) Hamster skin showed a relatively high activity in various types of acetylation. A clear correlations between hepatic and cutaneous cytosolic activities and pharmacogenetic difference were observed for acetyl CoA-dependent *N*-acetylations of *p*-aminobenzoic acid and 2-aminofluorene. On the other hand, no clear correlation was found in *N*-hydroxyacetylaminobiphenyl dependent *N*-acetylation of 2-aminofluorene and acetyl CoA-dependent *O*-acetylation of *N*-hydroxy-Glu-P-1.

8) These results indicate the occurrences of complicated drug interactions for the *N*-hydroxylation, *N*-acetylation and *O*-acetylation of aromatic amines dosed simultaneously. Therefore, further studies on chronic toxicity and carcinogenicity by combined drug administration of various compounds will be necessary.

研究の目的

環境中には数多くの有機化合物が存在し、食品や呼気などを通じて生体内に取り入れられて種々の毒性を発見する。最近の研究によりこれら有機化合物は生体内ではチトクロム P-450 などにより代謝的活性化を受けることが、その毒性発現の第一歩であることが明らかにされた。例えば、ベンズピレン類はエポキシ化され、加熱食品中の変異・癌原性アミンは *N*-水酸化を受け、排気ガス中のニトロピレン類やニトロ基含有農薬などはニトロ基還元を受ける。しかし複雑なことにはこれらチトクロム P-450 などの活性は食品中の有機化合物、医薬品、PCB、上述の環境汚染物質により酵素誘導を受け、時には活性が 10 倍以上にも増加する。

代表研究者らは既に PCB やベンズピレンなどによる生体の代謝的活性化能の変化をチトクロム P-450 レベルで明らかにしている。また、加熱食品中の変異・癌原性のヘテロサイクリックアミンやニトロピレン類の代謝的活性化の研究を通じて、これら環境汚染物質の作用、特に複合効果の研究には単に組合せによる現象を記述するだけでなく、代謝活性化のレベルでその実体を認識する

ことが、動物間の種差の理解や動物で得られたデータをヒトに外挿するために不可欠であることを痛切に感じている。

それゆえ、本研究の目的は最近、特に問題になっている加熱食品中の変異・癌原性ヘテロサイクリックアミンおよびニトロピレン類の代謝的活性化機構を明らかにするとともに、これらの機構に影響する他の環境中に存在する有機化合物の影響につき検討し、これら環境物質の複合汚染における代謝的活性化の実体と役割を明らかにする。これらの結果から、ヒトにおける環境物質の複合汚染における毒性の予測に役立つ試料を作成するとともに代謝的活性化体の解毒を促進する化合物を開発することをめざした。

研究経過

1) ニトロピレンなどの多環ニトロ化合物の代謝的活性化と毒性発現機構

ニトロピレン類の代謝的活性化機構としてニトロ基の生体内還元が考えられているが、それを直接に証明したデータがなく、かつどのような酵素系が関与しているか不明であったので、まずこの点を明らかにした。

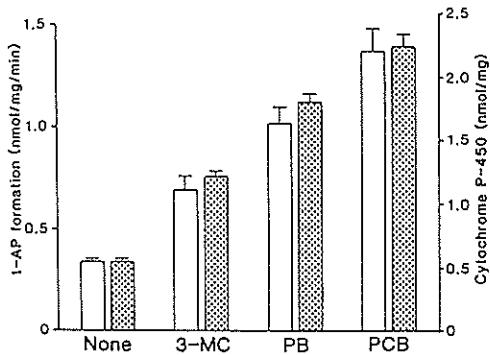


図1. フェノバルビタール3-メチルコラントレンあるいはPCB投与ラットよりの肝ミクロゾームにおけるチトクロム P-450 含量と1-ニトロピレン還元活性の増加。(Saito *et al.*, 1984).

a) 1-ニトロピレンのラット肝における還元
1-ニトロピレンの還元活性は主に肝ミクロゾームに存在し、補酵素として NADPH または NADH を必要とした。本還元活性は酸素の存在により著しく抑制され、フラビンアデニンモノヌクレオチドの添加によりその活性は著しく促進された。さらに活性は *n*-オクチルアミンや一酸化炭素などにより阻害された点からチトクロム P-450 の関与が想定された。

精製したチトクロム P-450 の再構成系を用いて検討した結果、NADPH-チトクロム c 還元酵素ではほとんど還元されず、チトクロム P-450 による還元が明らかにされた。それゆえ、フラビンアデニンモノヌクレオチドの作用は NADPH-チトクロム c 還元酵素とチトクロム P-450 間の電子輸送を促進するものと考えられた。そのほか、上清にはアルデヒド脱水素酵素依存性およびキサンチン酸化酵素依存性のニトロピレン還元活性が確認された。

一般にニトロ化合物はヒドロキシアミン体を経てアミン体に還元されるので、ヒドロキシアミンを検出、定量することが可能であるが、1-ニトロピレンの場合にはアミン体のみしか検出されなかった。おそらくヒドロキシアミン体への生成がおそく、かつ生成されたヒドロキシアミン体はすみやかにアミン体へ還元されるものと考えられる。

チトクロム P-450 依存性の1-ニトロピレン還元活性はフェノバルビタールおよびベンズピレンやポリクロールビフェニール (PCB) などの環境汚染物質により誘導された (図1)。これらの点は今後のニトロピレン類の毒性および発癌性研究において十分に考慮することが必要であることを示している。

以上、ニトロピレンの還元による代謝的活性化の特徴は 1) チトクロム P-450 により還元されること、2) 酸素阻害がきわめて強いこと、3) 予想される活性中間代謝物であるヒドロキシアミン体が検出できるほど留らないこと、4) ベンズピレンや PCB により活性が誘導されることである。

b) ニトロピレンと Trp-P-2 および Glu-P-1 のニトロ誘導体のバクテリア菌体内での還元と変異原性

ニトロピレン類はサルモネラ TA98 により還元されきわめて強い変異原性を示したが、1-ニトロピレンは TA98NR (いわゆるバクテリアニトロ還元酵素欠損株) では変異原性は弱く、また、1,8-ジニトロピレンは TA98/1,8DNP₆ では変異原性は弱かった。さらに、TA98/1,8DNP₆ の1,8-ジニトロピレンに対する抵抗性の原因はニトロ還元酵素の欠損ではなく、ヒドロキシアミン体のアセチル-CoA 依存性 O-アセチル化酵素の欠損であることが明らかにされた。

一方、Trp-P-2 および Glu-P-1 のニトロ誘導体もサルモネラ TA98 により還元されて、かなり強い変異原性を示した。しかし、TA98/1,8DNP₆ に対する変異原活性は TA98 に比べてかなり弱かった。また、TA98NR に対する変異原性も弱かった。Trp-P-2 および Glu-P-1 のニトロ誘導体の還元体、ニトロソ体およびヒドロキシ体も TA98 に対してかなり強い変異原性を示した。

以上の結果から、今後、ニトロピレン類の *in vivo* における毒性および癌原性を考えるとき、環水酸化体などのニトロ基の還元およびアミン体の再酸化によるヒドロキシアミン体の生成などに注目して検討することが必要と考えられた。

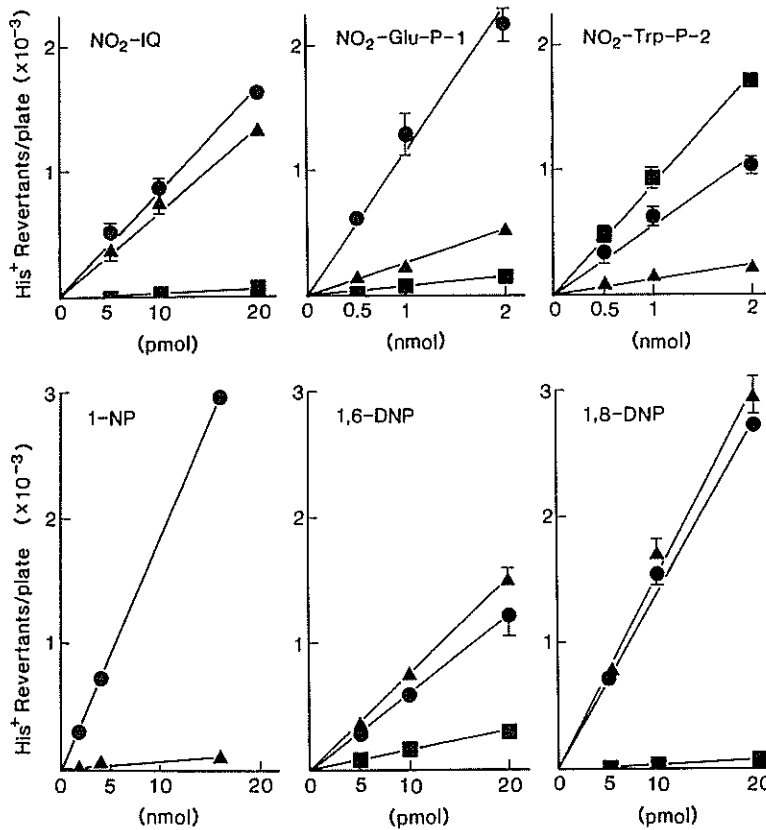


図2. サルモネラ TA98, TA98NR および TA98/1,8-DNP₆ に対する NO₂-IQ, NO₂-Glu-P-1, NO₂-Trp-P-2, 1-NP, 1,6-DNP および 1,8-DNP の変異原活性。
 —●— TA98, —▲— TA98NR, —■— TA98/1,8-DNP₆.

2) 加熱食品中のヘテロサイクリックアミンの Ames 試験菌における代謝的活性化

加熱食品中のヘテロサイクリックアミンは肝ミクロゾームにより *N*-水酸化されて活性化されることが必要である。*N*-水酸化体は Ames 試験菌 (サルモネラ TA98 など) の細胞膜を通り、菌体内酵素でさらに活性化されることが必要と考えられている。我々は Glu-P-1 などの *N*-水酸化体がアセチル-CoA 依存性のヒドロキシルアミン-*O*-アセチル化酵素という新しい酵素により活性化されることを酵素を精製して明らかにした。

本酵素はバクテリアでは活性が高く、アセチル-CoA に対する *K_m* 値が低い点から *N*-水酸化体の活性化に重要と考えられる。また、ペンタクロールフェノールなどの環境汚染物質により強く

阻害された。

我々はサルモネラ菌体内に加熱食品中変異原ヘテロサイクリックアミンの *N*-水酸化をアセチル-CoA 依存性のアрилヒドロキシルアミン-*O*-アセチル化酵素の存在を明らかにし、ほぼ均一までに精製した。この酵素のアセチル-CoA に対する *K_m* 値は哺乳動物の肝に存在する酵素の *K_m* 値に比べてきわめて低い。このことは Trp-P-2 や Glu-P-1 のバクテリアに対する変異原性が強い割には癌原性の弱いことの原因の一つと考えられた。

3) ニトロ還元酵素欠損およびニトロピレン抵抗性 Ames テスト変異菌における多環ニトロ化合物の代謝的活性化と変異原活性

我々は加熱食品中の環境変異原 Trp-P-2,

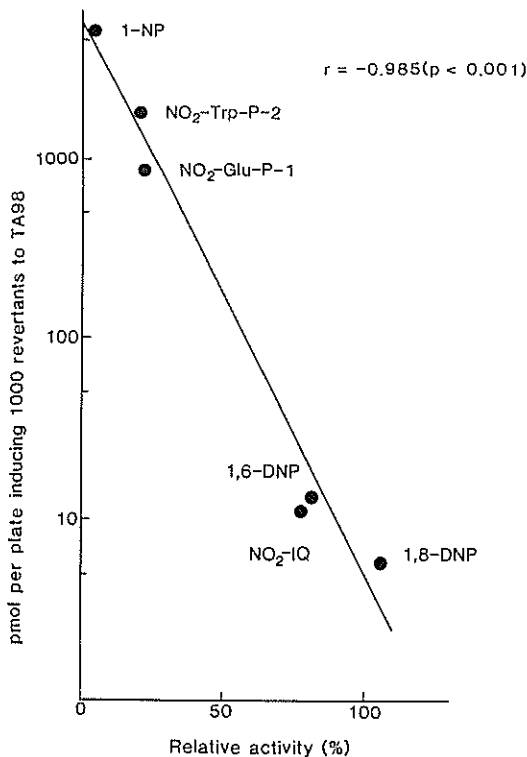


図3. 種々の多環ニトロ化合物のサルモネラ TA98NR と TA98 に対する変異原性の強さの比と TA98 に対する変異活性の強さとの相関性 TA98 に対する変異原性の強さは、1,000 個の復帰変異体を生ずるに必要な pmol で表現。

Glu-P-1 および IQ のニトロ誘導体を合成し、それらのニトロ還元酵素欠損およびニトロピレン抵抗性 Ames テスト菌における変異活性をモノニトロピレンおよびジニトロピレンと比較検討した。

サルモネラ TA98 の復帰変異体、1,000 個を引き起こす多環ニトロ化合物の量は、1,8-ジニトロピレン (1,8-DNP)、1,6-ジニトロピレン (1,6-DNP)、NO₂-IQ、NO₂-Glu-P-1、NO₂-Trp-P-2 および 1-ニトロピレン (1-NP) では 6.3、13.5、11.5、870、1,860、5,700 pmol であり、一方、ニトロ還元酵素欠損株 TA98NR では 1-NP、NO₂-Trp-P-2 や NO₂-Glu-P-1 の変異原活性はきわめて弱く、1,8-DNP、1,6-DNP、NO₂-IQ の活性は TA98 に比べてあまり差がない (図2)。TA98NR/TA98 の活性比と TA98 に対して 1,000 個の復帰変異体を生成するニトロ化合物の量をプロットしたものが、図3であ

り、変異原性が強く 1,8-DNP、1,6-DNP や NO₂-IQ などのように少量で十分な復帰変異を引き起こす化合物はニトロ還元酵素欠損株でも強い変異原活性を発揮している点に注目すべきであろう。

一方、サルモネラ TA98/1,8-DNP₆ (我々により既に *N*-hydroxyarylamine *O*-transacetylase 欠損株と同定されている) は NO₂-Trp-P-2 を除くすべての化合物に対して弱い変異原性しか示さなかった。NO₂-Trp-P-2 より生成される *N*-水酸化体は不安定で直接 DNA と反応するためか、または他の活性化系により活性化されるかにつき、今後の検討が必要とされよう。

4) 芳香族アミンの *N*-水酸化体のアセチル-CoA

およびヒドロキサム酸依存性の代謝的活性化と複合汚染

我々は先に、サルモネラ菌内に加熱食品中の芳香族アミンなど *N*-水酸化体をさらに代謝的活性化するアセチル-CoA 依存性の *O*-アセチル化酵素が存在することを見だし、精製し、その諸性質を明らかにした。今回はラットおよびハムスター肝からアセチル-CoA 依存性の *O*-アセチル化酵素を精製し、その性質をサルモネラ菌の酵素と比較し、さらにその代謝活性化に影響する諸因子につき検討した。

a) ハムスター肝からのアセチル-CoA 依存性の *N*-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase の精製とその性質

精製したハムスター肝の *N*-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase の性質をサルモネラ菌の酵素と比較し表1にまとめた。ハムスター肝とラット肝の酵素はその諸特性が類似していた。哺乳動物肝の *O*-acetyltransferase の主な特徴はバクテリアの酵素に比べてアセチル-CoA に対する *K_m* 値がかなり高いことおよび、バクテリアの酵素と異なりヒドロキサム酸をアセチル供与体として利用できることおよびチオラクトマイシンで阻害されないことであった。

b) *N*-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase による代謝的活性化と DNA 傷害の環境汚染物質による阻害と促進

加熱食品中の変異・癌原物質 Glu-P-1 の *N*-水

表1. 哺乳動物とサルモネラ菌の *N*-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase の比較.

| 局在性 | 哺乳動物 | サルモネラ菌 |
|------------------------------------|-----------|-----------|
| | 可溶性画分 | 可溶性画分 |
| 分子量 | 33,000 | 48,000 |
| 阻害実験 | | |
| SH 阻害薬 | 感受性 (+++) | 感受性 (+++) |
| Paraoxan | 感受性 (-) | 感受性 (-) |
| Pentachlorophenol | 感受性 (+++) | 感受性 (+++) |
| Thiolactomycin | 感受性 (-) | 感受性 (+++) |
| アセチル-CoA に対する <i>K_m</i> | 370 μM | 3.3 μM |
| <i>N, O</i> -アセチル転移活性 | +++ | - |

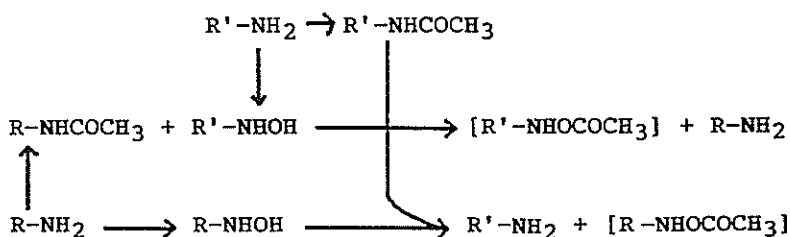


図4. 二つの芳香族アミンの代謝的活性化時における複合作用.

酸化体 (*N*-OH-Glu-P-1) はそれ自体は比較的安定で DNA と共有結合を起こさないが、*O*-acetyltransferase により *O*-アセチル化されて DNA に傷害を引き起こす。我々は *O*-アセチル化酵素活性が pentachlorophenol, 1-nitro-2-naphthol などのフェノール誘導体また harmine や ellipticine などの β-カルボリン誘導体によって阻害され、DNA 傷害が阻害されることを見いだした。一方、我々はグルタチオンなどの SH 化合物は *N*-OH-Glu-P-1 などの *O*-アセチル化体と反応して還元的に解毒化する反応をも見いだしたので、生体のグルタチオン含量を低下させる化合物により *N*-OH-Glu-P-1 などの DNA 傷害性が増加するものと考えられた。

c) 芳香族アミンの複合汚染時の代謝活性化

N-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase は哺乳動物芳香族アミンの *N*-水酸化体をアセチル CoA 依存性に代謝的活性化するとともにヒドロキサム酸をアセチル供与体としても利用出来るので、種々の芳香族アミンが同時に体内に入った場合には、それらの間における代謝的活性化の関係

はきわめて複雑になる。すなわち、体内に入った芳香族アミンはチトクロム P-450 により *N*-水酸化を受けるとともに *N*-アセチル化酵素により *N*-アセチル化され、ついでチトクロム P-450 により *N*-水酸化されヒドロキサム酸となる (図4)。このヒドロキサム酸は今度は他の芳香族アミンの *N*-水酸化体に対してアセチル供与体として作用し、代謝的活性化を起こす。その結果、それ自体毒性の弱い芳香族アミンでも、他の芳香族アミンに対してアセチル供与体としてその毒性を増強する。一方、芳香族アミンのアセチル-CoA 依存性の *N*-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase の活性は芳香族アミンにより阻害される。それゆえ体内に入った芳香族アミンの量や種類 (例えば Trp-P-2 の *N*-アセチル化活性は 2-アミノフルオレンに比べて 1/100 ぐらい) によって上述の相互作用の結果毒性が増強されたり減弱されたりする点に注意せねばならない (表2)。

5) ラット肝上清およびサルモネラ菌上清の *O*-アセチル化酵素のアシル供与体の比較

加熱食品中の環境変異原 Glu-P-1 の *N*-水酸化

表2. 肝上清による Trp-P-2 および 2-amino-fluore の *N*-アセチル抱合における種差 (Shinohara *et al.*, 1984)²⁹.

| 動物種 | <i>N</i> -アセチル化活性 (pmol/mg 蛋白/分) | |
|---------|-------------------------------------|--------|
| | Trp-P-2 | 2-AF |
| ハムスター | 320 | 30,150 |
| ウサギ | 120 | 12,100 |
| マウス (雄) | 40 | 16,930 |
| (雌) | 30 | - |
| モルモット | 4 | 11,700 |
| ラット | 7 | 2,360 |
| イヌ | 0 | 0 |

体である *N*-hydroxy-Glu-P1 はラット肝上清およびサルモネラ上清酵素により, acetyl CoA 依存性に *O*-アセチル化を受けて代謝的活性化されて, DNA を傷害する。

n-Propionyl CoA はアシル供与体となり, 代謝的活性化を起こすが, *n*-hexanoyl CoA はアシル供与体としては活性が低い。*p*-nitrophenylacetate のような外来化合物もラット肝上清ではアセチル供与体となるが, サルモネラ菌上清では低い。*N*-hydroxy-AABP (*N*-hydroxy-acetylaminobiphenyl) や *N*-hydroxy-AAF (*N*-hydroxyacetylaminofluorene) のようなヒドロキسام酸もラット肝ではアセチル供与体となるが, サルモネラ菌ではアセチル供与体とはならない。

すなわち, ラットにおいてのみ *N,O*-アセチル転移反応が認められ, 他の *N*-アセチル化アミンの *N*-水酸化体との間で相互作用が起こるものと考えられる。また, このことが *N*-hydroxy-AAF がサルモネラ菌に対してきわめて弱い変異原である原因と考えられる。

N-hydroxy-Glu-P-1 *O*-アセチルトランスフェラーゼの活性はラット肝とサルモネラ菌でほぼ同じ活性を示したが AF (2-aminofluorene) *N*-アセチルトランスフェラーゼの活性はサルモネラ菌ではラット肝の約5%にすぎなかった。さらにサルモネラ菌では *n*-propionyl CoA や *p*-nitrophenylacetate がアシル供与体にならず, *N*-

hydroxy-AABP がラット肝では acetyl CoA よりも3倍も効率の良いアセチル供与体であるにもかかわらず, サルモネラ菌ではアセチル供与体としての作用は全く認められなかった。すなわち, サルモネラ菌ではアリルヒドロキسام酸 *N,N*-アセチルトランスフェラーゼが欠損しているものと考えられる。

以上述べたようにサルモネラ菌における変異原性 *N*-hydroxyarylamine の *O*-アセチル化による代謝活性化におけるアセチル供与体は哺乳動物の肝に比べてその範囲が狭く, このことは変異原の相互作用上注意すべき点と考えられる。しかし, アセチル供与体の特性については, ラット肝とハムスター肝でも明らかな種差も認められた。

6) ハムスター肝のアセチルトランスフェラーゼの精製とその諸特性

先に *N*-hydroxyarylamine の *O*-アセチル化酵素をラットおよびハムスター肝より精製したが, さらにハムスター肝よりアセチル化酵素の精製を進め, 少なくとも2種の酵素が存在すること, さらにハムスターのうち, 薬理遺伝学上いわゆる slow acetylator には一つのアセチル化酵素 AT-II が欠損していることを明らかにした (図5, 表3)。

すなわち, ハムスター肝上清のアセチルトランスフェラーゼは FPLC の monoQ カラムからの溶出において明らかに二つに分離され, slow acetylator では AT-II が欠損しており, intermediate acetylator には AT-I は普通量存在しているが, AT-II は半量しか存在していない。

アセチル CoA 依存性の *N*-hydroxy-Glu-P-1 の *O*-アセチル化活性は AT-I のみに見られ, アセチル CoA 依存性の 2-aminofluorene の *N*-アセチル化活性は主として AT-II にみられ, 一部は AT-I にも認められた。一方, アセチル CoA 依存性の *p*-aminobenzoic acid の *N*-アセチル化活性はほとんど AT-II にのみ認められた。Arylhydroxamic acid 依存性の *p*-aminoazobenzene の *N*-アセチル化および arylhydroxamic acid の *N,O*-トランスアセチル化活性は AT-I のみに認め

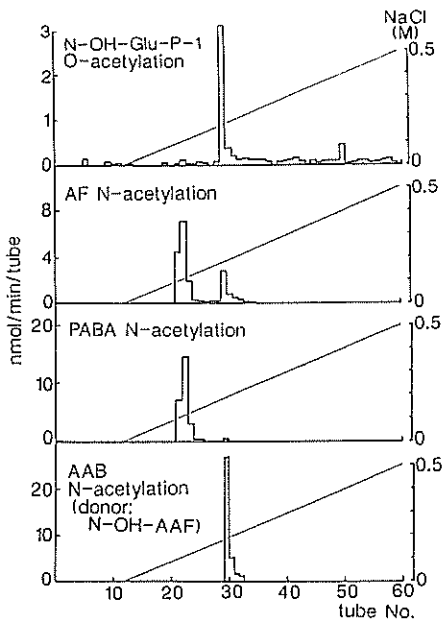


図5. ハムスター肝上清に含まれる2種のアセチル化酵素の分離・精製パターン (Tube No. 22 および No. 30 に溶出される酵素分子種をそれぞれ AT-II および AT-I と仮称).

られた。

AT-I による *N*-hydroxy-Glu-P-1 の *O*-アセチル化におけるアシル供与体の特性については 2-aminofluorene の *N*-アセチル化に比べて, hexanoyl CoA が全くアシル供与体にならない点, *N*-hydroxyacetylaminobiphenyl が貧弱なアセチル供与体であり, *N*-hydroxyacetylaminofluorene が全くアセチル供与体とならない点が特徴であり, アセチル供与体の特異性がかなり高いものと考えられた。

7) ハムスター肝と皮膚におけるアセチルトランスフェラーゼの相関性

皮膚は環境汚染物質の主要な代謝経路であり, チトクロム P-450 活性もかなり高いことが知られている。そこで我々はハムスター皮膚におけるアセチルトランスフェラーゼ活性につき, 肝との活性との関連性を rapid, intermediate, slow acetylator を用いて検討した。

図6に示すようにハムスター皮膚におけるアセチルトランスフェラーゼ活性は肝の活性の 1/5

表3. Rapid, intermediate および slow acetylator のハムスター肝のアセチルトランスフェラーゼ I (AT-I) およびアセチルトランスフェラーゼ II (AT-II) のアセチル化活性。

| Acetylation | Hamster liver | | |
|-------------|---------------|--------|------|
| | Rapid | Inter. | Slow |
| AT-I | 1) ++ | | |
| | 2) + | | |
| | 3) ± | ++ | ++ |
| | 4) ++ | | |
| | 5) ++ | | |
| AT-II | 1) - | | |
| | 2) ++ | | |
| | 3) ++ | ++ | + |
| | 4) - | | |
| | 5) - | | |

¹⁾ Acetyl CoA dependent *N*-hydroxyarylamine *O*-acetylation.

²⁾ Acetyl CoA dependent 2-AF *N*-acetylation.

³⁾ Acetyl CoA dependent *p*-aminobenzoic acid *N*-acetylation.

⁴⁾ Arylhydroxamic acid dependent AAB *N*-acetylation.

⁵⁾ Arylhydroxamic acid *N,O*-transacetylation.

~1/10 であり, アセチル CoA 依存性の *p*-aminobenzoic acid の *N*-アセチル化活性および 2-aminofluorene の *N*-アセチル化活性のみに明らかな相関性と薬理遺伝学的な差を認めたが, *N*-hydroxyacetylaminobiphenyl 依存性の 2-aminofluorene の *N*-アセチル化活性およびアセチル CoA 依存性の *N*-hydroxy-Glu-P-1 の *O*-アセチル化活性には明らかな相関性と薬理遺伝学的な差を認めなかった。

8) 哺乳動物肝とサルモネラ菌における *N*-hydroxyarylamine の *O*-エステル化による代謝活性化の比較

N-Hydroxyarylamine 類の代謝的活性化は表4に示すような *O*-エステル化反応により行なわれるが, その活性は肝上清とサルモネラ菌上清とは著しく異なる。すなわち, *O*-アセチル化反応は肝上清でもサルモネラ菌ではかなり高い。一方, アリルアミンの *N*-アセチル化反応は肝上清では高いが, 菌上清ではきわめて低い。

O-プロリル化は肝上清では基質により起こる

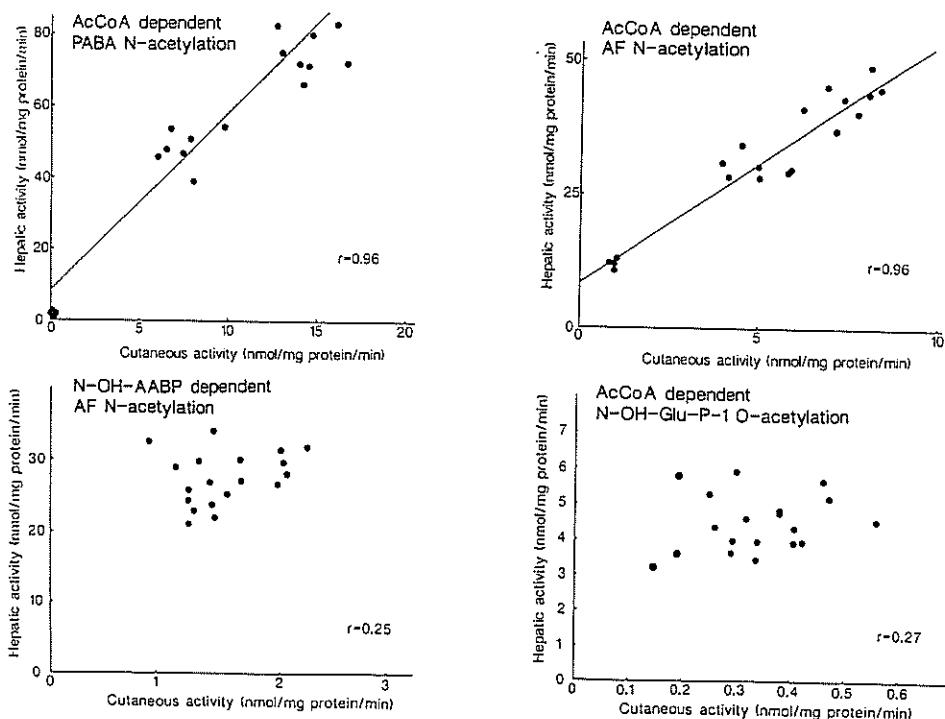


図 6. ハムスター肝と皮膚におけるアセチル化酵素活性の相関性.

表 4. 哺乳動物肝とサルモネラ菌における *N*-hydroxy-arylamines の *O*-エステル化による代謝的活性化の比較.

| Acetylating reactions | Liver | Bacteria |
|----------------------------------|---------|----------|
| 1) <i>O</i> -Acetylation | +~+++ | ++ |
| 2) <i>N</i> -Acetylation | ++~++++ | --~+ |
| 3) <i>O</i> -Prolylation | --~++ | --~± |
| 4) <i>O</i> -Sulfonylation | +~+++ | - |
| 5) <i>N, O</i> -Transacetylation | +~+++ | - |
| 6) <i>N, N</i> -Transacetylation | ++~++++ | - |

ものと起こらないものがあるが、菌上清ではきわめて低い。*O*-硫酸エステル化は肝上清ではかなり高いが、菌上清では全く認められない。

N, O-トランスアセチル化反応, *N, N*-トランスアセチル化反応は肝上清ではかなり高いが、菌上清では全く認められない。

それゆえ、サルモネラ菌体内では *N*-hydroxy-arylamines の代謝活性化にはアセチル CoA 依存性の *O*-アセチル化がきわめて重要な役を演じており、他のアリルアミン類の共存化でも他のアミンとの間の相互作用はあまり認められないものと

考えられる。

9) 哺乳動物肝におけるヘテロサイクリックアミンの代謝的活性化におけるアリルアミン間の相互作用

まず、生体に入ったヘテロサイクリックアミンはチトクロム P-450 により *N*-水酸化体になるとともに *N*-アセチル化される。*N*-アセチル化されたものはさらにチトクロム P-450 により *N*-水酸化されヒドロキサム酸になる。このものは肝上清では硫酸エステル化、または、*N, O*-アセチルトランスフェラーゼにより代謝的活性化される。それ

ゆえ、他のアミンの共存化では、*N*-アセチル化を始め、*N,O*-アセチルトランスフェラーゼによるアセチル転移にはかなりの相互作用が起こることと考えられる。

今後の課題

以上本研究を通じて、種々の環境変異・癌原物質の代謝的活性化機構を明らかにした。これらの代謝的活性化機構は多くの環境変異・癌原物質につき、共通な面が多い。それゆえ、複雑な環境汚染物質が体内に入った場合にはお互いに相手の代謝ひいては毒性発現に影響するいわゆる薬物相互作用が起こり、予期しない毒性が発現する可能性も考えられる。

今後、ヒトをも含めこれら環境汚染物質の相互作用の種差につき検討することが、環境物質の安全性確保のために必要とされよう。

研究発表

- 1) Saito, K., Kamataki, T., and Kato, R.: Participation of cytochrome P-450 in reductive metabolism of 1-nitropyrene by rat liver microsomes. *Cancer Res.*, **44**: 3169-3173, 1984.
- 2) Saito, K., Mita, S., Kamataki, T. and Kato, R.: DNA single-strand breaks by nitropyrenes and related compounds in Chinese hamster V79 cells. *Cancer Lett.*, **24**: 121-127, 1984.
- 3) Saito, K. and Kato, R.: Glutathione conjugation of arylnitroso compound: Detection and monitoring labile intermediates *in situ* inside a fast atom bombardment mass spectrometer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**: 1-5, 1984.
- 4) Saito, K., Shinohara, A., Kamataki, T., and Kato, R.: Metabolic activation of mutagenic *N*-hydroxyarylamines by *O*-acetyltransferase in *Salmonella typhimurium* TA98. *Arch. Biochem. Biophys.*, **239**: 286-295, 1985.
- 5) Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T., and Kato, R.: Fast-atom bombardment and electron-impact mass spectrometry of *N*-hydroxyarylamines, active intermediates of mutagenic aromatic amines. *Xenobiotica*, **15**: 327-332, 1985.
- 6) Kamataki, T. and Kato, R.: Activation of carcinogenic compounds by purified cytochrome P-450 in reconstituted system. "P-450 and Chemical Carcinogenesis, GANN Monograph on Cancer Research 30", p. 81-91, ed. by Y. Tagashira and T. Omura, Japan Scientific

Societies Press, Tokyo, 1985.

- 7) Saito, K., Shinohara, A., Kamataki, T., and Kato, R.: A new assay for *N*-hydroxyarylamines *O*-acetyltransferase: Reduction of *N*-hydroxyarylamines through *N*-acetoxyarylamines. *Analyt. Biochem.*, **152**: 226-231, 1986.
- 8) Saito, K., Shinohara, A., Kamataki, T., and Kato, R.: *N*-hydroxyarylamines *O*-acetyltransferase in hamster liver; Identity with arylhydroxamic acid *N,O*-acetyltransferase and arylamine *N*-acetyltransferase. *J. Biochem.*, **99**: 1689-1697, 1986.
- 9) Shinohara, A., Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T., and Kato, R.: Acetyl coenzyme A dependent activation of *N*-hydroxy derivatives of carcinogenic arylamines: Mechanism of activation, species difference, tissue distribution, and acetyl donor specificity. *Cancer Res.*, **46**: 4362-4367, 1986.
- 10) Shinohara, A., Saito, K., Yamazoe, Y., Kamataki, T., and Kato, R.: Inhibition of acetyl-coenzyme A dependent activation of *N*-hydroxyarylamines by phenolic compounds, pentachlorophenol and 1-nitro-2-naphthol. *Chem.-Biol. Interactions*, **60**: 275-285, 1986.
- 11) Kato, R., Kamataki, T., Saito, K., and Shinohara, A.: Acetyl-CoA dependent *O*-acetylation of *N*-hydroxyarylamines in bacterial and mammalian cells—The significance for mutagenesis and carcinogenesis. "Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part A: Basic Principles and Mechanisms of Action", pp. 507-514, ed. by C. Ramel, B. Lambert, and J. Magnusson, Alan R. Liss, Inc., New York, 1986.
- 12) Kato, R., Saito, K., Shinohara, A., and Kamataki, T.: Purification, properties and function of *N*-hydroxyarylamines *O*-acetyltransferase. "Biological Reactive Intermediates III", pp. 551-561, ed. by J. J. Kocsis, D. J. Jollow, C. M. Witmor, J. O. Nelson and R. Snyder, Plenum Publishing Corporation, New York, 1986.
- 13) Kato, R. and Yamazoe, Y.: Metabolic activations of heterocyclic amines from protein pyrolysates: Significance for genotoxicity and carcinogenicity. "Environmental Toxicity and Carcinogenesis", pp. 69-79, ed. by M. Ruchirawat and R. C. Shank, Text and Journal Corporation, Bangkok, 1986.
- 14) Kato, R.: Covalent binding to nucleic acids of *N*-hydroxyarylamines through direct *O*-acetylation. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program: Deployment of Shortterm Tests for Environmental Mutagens and Car-

- cinogens, Nikko, 1986.
- 15) Kato, R., Saito, K., Shinohara, A., and Yamazoe, Y.: Direct *O*-acetylation by liver cytosolic enzyme of *N*-hydroxyarylamines as a primarily metabolic pathway in DNA damage. IVth International Congress of Toxicology, Tokyo, 1986.
 - 16) 真部俊一, 山添 康, 加藤隆一: IQ の活性中間体, *N*-ヒドロキシ IQ の酵素的活性化. 日本環境変異原学会, 東京, 1986.
 - 17) 加藤隆一, 山添 康: 環境変異原のサルモネラ菌と哺乳動物細胞における代謝的活性化の差異. 1986 環境科学シンポジウム, 東京, 1986.
 - 18) Kato, R. and Yamazoe, Y.: Purification and characterization of *N*-hydroxyaryamine *O*-acetyltransferase of hamster liver and its comparison with bacterial enzyme. Third International Conference on Carcinogenic and Mutagenic *N*-Substituted Aryl Compounds, Dearborn (U.S.A.), 1987.