The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

Environ. Mutagen Res., 22 : 173 - 181 (2000)

シンポジウム

ポルフィリン・鉄モデル酸化系による変異原活性化の機構

稲見　圭子，大河内　江里子，望月　正隆

共立薬科大学　〒105-8512 東京都港区芝公園1-5-30

Activation mechanism of environmental mutagens by porphyrin iron model oxidation systems

Keiko Inami, Eriko Okochi, Masataka Mochizuki

Kyoritsu College of Pharmacy, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

Summary

Many environmental carcinogens damage DNA at an initiation step in carcinogenesis, and Ames test is a short term screening of possible carcinogens. Most carcinogens require enzymatic activation through oxidation by cytochrome P450, which metabolizes promutagens to active species in the mutation assay. Iron (III) porphyrin and an oxidant catalyze the oxidation mimicking the metabolism by cytochrome P450. In this study, some carcinogens were tested in order to generalize the use of the chemical models. We investigated the best conditions for mutation assay with the chemical models. The activation of 2-aminofluorene, benzo[*a*]pyrene and tryptophan pyrolysates (Trp-P-1 and Trp-P-2) and 2-acetylaminofluorene (AAF) in mutation assay using Fe(F_5P)Cl and three oxidants ; *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BuOOH), *m*-chloroperoxybenzoic acid (*m*CPBA), and magnesium monoperoxyphthalate (MPPT). Aromatic amines displayed higher levels of mutagenicity with *t*-BuOOH, whereas the polycyclic hydrocarbon was preferentially activated when *m*CPBA was used. All promutagens were mutagenic in the presence of Fe(F_5P)Cl/MPPT. Our results show that this activation system will be generally useful as an alternative of the conventional assay with S9 mix, and a type of mutagens will be able to be estimated from the difference of activity in different models used.

On the other hands, the mechanism of metabolic activation of AAF was investigated with Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOH. A major product obtained from this reaction was 2-nitro-9-fluorenone (NO_2F = O), which showed mutagenicity on *Salmonella typhimurium* TA1538. During the oxidation of AAF by the chemical model, the formation of NO_2F = O attended with a decrease of AAF, which was analyzed by HPLC. In order to estimate the contribution of NO_2F = O to the total mutagenicity after chemical model oxidation, mutagenicity was assayed using *Salmonella typhimurium* YG7131 which is deficient in nitroreductase, and the result was compared to that in a parent strain *Salmonella typhimurium* TA1538. The mutagenicity of AAF decreased significantly in *Salmonella typhimurium* YG7131, which suggested that most of the mutagenicity derived from AAF in the presence of the chemical model was due to NO_2F = O formed. Furthermore, the amount of NO_2F = O formed in the incubation mixture accounted for the mutagenicity, and suggested further that the mutagen formed in the models was NO_2F = O.

Keywords : Cytochrome P450 model, metalloporphyrin, metabolic activation, oxidation, 2-acetylaminofluorene

緒　　言

生体に取り込まれた異物は，通常は水溶性の化合物に

受付：2000年7月10日　受理：2000年7月10日

©日本環境変異原学会

本稿は日本環境変異原学会第11回公開シンポジウム「環境変異原の活性発現と抑制の化学的機構」で発表された.
This paper was presented at the 11th JEMS Annual Symposium at the ABC Hall, Tokyo, June 3rd 2000. The Symposium entitled "Chemical Mechanisms of Depression and Repression of Activity In Environmental Mutagenesis", was organized by Masataka Mochizuki and sponsored by the Japanese Environmental Mutagen Society.

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

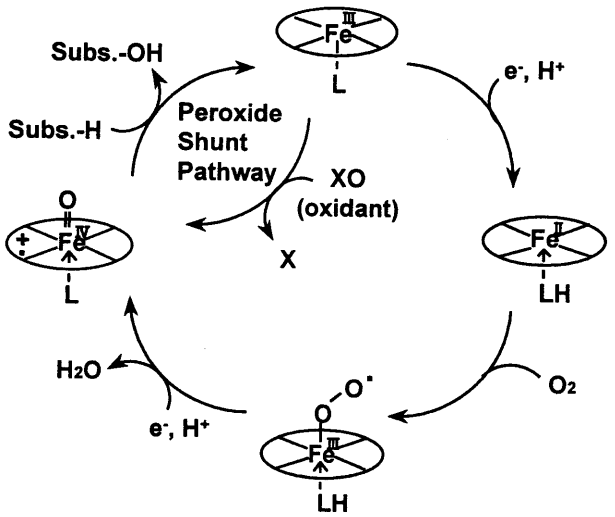

Fig. 1 Mechanism of cytochrome P450-catalyzed oxidation

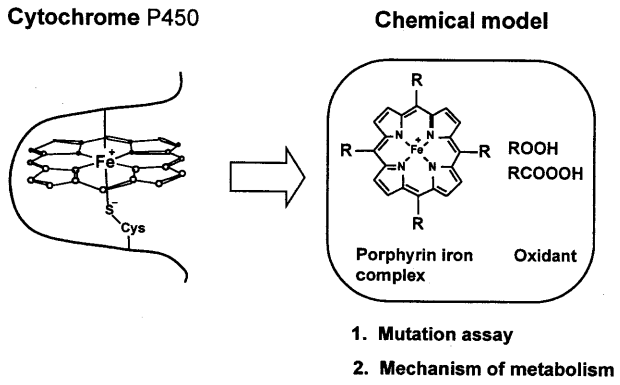

Fig. 2 Alternatives for cytochrome P450

変換されて生体外に排泄されるが，一方で代謝活性化を起こし毒性を発現することがある．代謝により親化合物から予測できない毒性を生じることもあり，代謝機構をふまえた研究は重要である(Wright, 1980)．生体内酵素を用いた代謝研究は，酵素系を含むために反応温度，pH，イオン強度などの制約を受ける(Paolini and Cantelli-Forti, 1997)．また酵素系では大量の基質を用いることができないことに加えて，生成した代謝物がタンパク質に吸着されて生成物を十分に検出することができず，代謝研究における限界となっている．それらを改善する目的で，タンパク質を含まない代謝系の開発が重要となる(Meunier, 1994；Mansuy et al., 1989)．酵素モデルはpHや反応温度に影響を受けにくく，取り扱いに制限が少ない．さらに用いる実験動物によるロット差や種差の違いによる代謝能の変化がなく，一定の結果が得られる．このように酵素モデルを用いることでさまざまな反応条件を設定することができ，不安定な反応中間体の捕捉や微量代謝生成物の単離が可能となり，詳細な代謝機構の解明に有用である．

代謝反応のうち最も重要なのが酸化反応であり，ミクロソームに含まれるcytochrome P450が中心的な役割を担っている．Cytochrome P450の作用は一原子酸素添加酵素で，NADPH由来の還元力を利用して酸素原子を活性化し，その結果，酸素原子が異物に導入されることによって水溶性の高い化合物へと変換する(Sheldon, 1994)(Fig. 1)．Cytochrome P450の触媒サイクルでは休止状態のcytochrome P450に基質が導入されると，一電子還元されてポルフィリンオキセノイド中間体を生じて基質を酸化し，それ自身は再び休止状態に戻る．Cytochrome P450の活性中心であるポルフィリン鉄錯体は酸化剤が共存すると直接酸素原子が供給され，すみやかに活性種であるポルフィリンオキセノイド中間体を形成し基質を酸化する“ペルオキシドシャント”を形成することが知られている(Groves et al., 1979)．そのcytochrome P450をはじめとする生体内の酸化酵素の多くが，ポルフィリン鉄錯体を活性中心に持つこととペルオキシドシャントを形成することから，ポルフィリン鉄錯体と酸化剤から成る化学モデルの構築を目的とした(Fig. 2)．

これまでは主に*N*-nitrosodialkylamineの代謝産物であるアルデヒドとアルコールの生成を指標にして，酸化が進行する化学モデルの確立を行った(Okochi and Mochizuki, 1995)．さらに変異原性発現に基づく生物活性を指標に*N*-nitrosodialkylamineの酸化を追跡したところ，アルキル化剤に感受性の高い*Salmonella typhimurium* YG7108で4種のアルキル基(メチル，エチル，プロピル，ブチル)を持つ*N*-nitrosodialkylamineの変異原性が発現し，その変異原性がアルキル基由来であることを明らかにした(Okochi et al., 1995；Okochi et al., 1997)．つまり化学モデルによって*N*-nitrosodialkylamineは生体内と同様にα-水酸化経由で代謝されることが示された．

本研究では化学モデルを用いた変異原性試験において，反応溶媒や酸化剤の違いによる変異原活性への影響を検討したうえで，いくつかの変異原を用いて変異原性を検出し，化学モデルの変異原性試験への応用拡大を目的とした．さらに化学モデルを用いて変異原の酸化機構を解明することで化学モデルの有用性を検討した．

1．変異原性試験における化学モデルの有用性

化学モデルを代謝系としてAmes法に応用している研究はあるものの，それらの方法では代謝活性化体を溶媒抽出した後に試験を行っているために中間体が安定な場合に限られ操作が面倒である(Salmeen et al., 1988；Rueff et al., 1992)．本研究ではAmes法において化学モデルを代謝酵素の代わりに用いて，化学モデルを含んだままの反応液を直接プレートに添加して試験した．本実

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

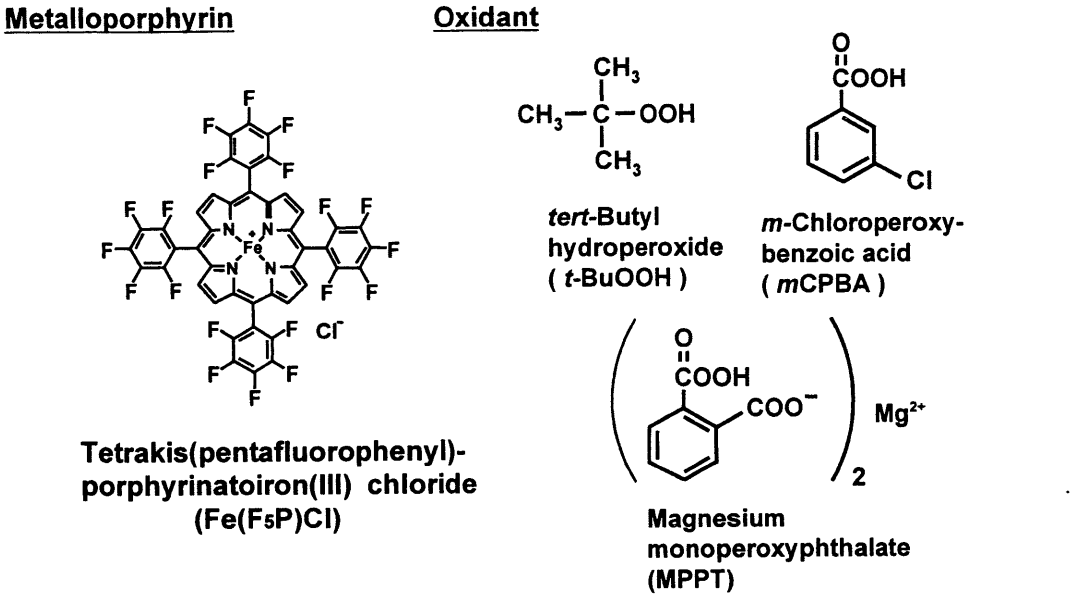

Fig. 3 Structures of chemicals used

験に用いた化合物の構造をFig. 3に示した．

1）変異原活性への溶媒の影響

変異原である2-aminofluorene(AF)は詳細な反応機構がすでに検討されていることに加え，容易に入手できることから，本研究において条件を検討するための化合物として選んだ．AFの変異原性発現機構はアミノ基がcytochrome P450により酸化されてヒドロキシルアミノ体になった後，アセチル化などの抱合化を受けて究極的な活性体である*N*-acetoxy-2-aminofluoreneとなりDNAと反応する(Heflich and Neft, 1994)．

検討した反応溶媒は変異原を溶かし，さらに菌液を混和するためにCH_3CN，dioxaneまたはdimethylformamide(DMF)を用いた．AFを溶媒(CH_3CN, dioxaneまたはDMF)に溶解し，Fe(F_5P)Cl 50 nmol/(CH_3CN, dioxaneまたはDMF)を試験管に分注し，*t*-BuOOH 150 nmol/リン酸緩衝液 (pH7.4)を添加して反応開始とした．その反応液をインキュベート(25℃, 1, 3, 5, 10, 20 min)した後，*Salmonella typhimurium* TA1538とリン酸緩衝液 (pH7.4)の混液を加え，さらにトップアガーを手早く加えて最小グルコース寒天培地に一様に広げた．この寒天培地を培養し，出現した復帰変異コロニーを数えた．変異原活性の比較は，各反応時間(1, 3, 5, 10, 20 min)のなかで最も高い活性を示した時間でのコロニーで比較した．CH_3CN，dioxaneまたはDMFのいずれの反応溶媒を用いてもAFの変異原性は発現したが，その変異原活性はCH_3CN > dioxane > DMFの順であった(Fig. 4A)．溶媒による反応性の違う原因は，溶媒によって生成する酸化活性種が異なることや溶媒自身が酸化活性種と反応することなどがあげられる．DMFは生体内のcytochrome P450により*N*-メチル基の酸化が報告されており(Iley, 1990)，本研究においてもDMFは化学モデルと反応するためにAFの変異原性が低下すると考えた．

2）変異原活性への酸化剤の影響

化学モデルは用いる酸化剤により生成する酸化活性種が異なり，変異原に対する酸化力も異なる(Guengerich and MacDonald, 1984)．そこでヒドロペルオキシドとして*t*-BuOOH(Traylor and Xu, 1990)，過酸として*m*-chloroperoxybenzoic acid(*m*CPBA) (Groves et al., 1981)，とmagnesium monoperoxyphthalate(MPPT) (Querci and Ricci, 1989；Hoffmann et al., 1990)を用いて変異原性を試験した．酸化剤の違いによる反応性の違いを検討するために，芳香族アミンであるAFと多環式芳香族炭化水素であるbenzo[*a*]pyrene (B[*a*]P)を用いて検討した．

AFを用いた場合はいずれの酸化剤を用いても変異原性が発現し，その変異原活性の強さは*t*-BuOOH > MPPT > *m*CPBAであった(Fig. 4B)．AFについて最も高い変異原活性が得られた条件で，Fe(F_5P)Cl，または酸化剤を除く系で変異原性を試験した(Fig. 4C)．その結果，Fe(F_5P)Clまたは酸化剤を除く系では変異原性を発現せず，Fe(F_5P)Clと酸化剤が共存した系のみで変異原性を発現した．

一方，B[*a*]Pの変異原性試験では*m*CPBAとMPPTとも明らかに変異原性が発現した(Fig. 5A)．*t*-BuOOHを用いた系ではコントロールでのコロニー数が20で，B[*a*]Pでは最も多いコロニー数が90であったので，わずかではあるが変異原性を発現した．B[*a*]Pについて最も高い変異原活性が得られた条件で，Fe(F_5P)Cl，または酸化剤を除く系で変異原性を試験した(Fig. 5B)．その結果，

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

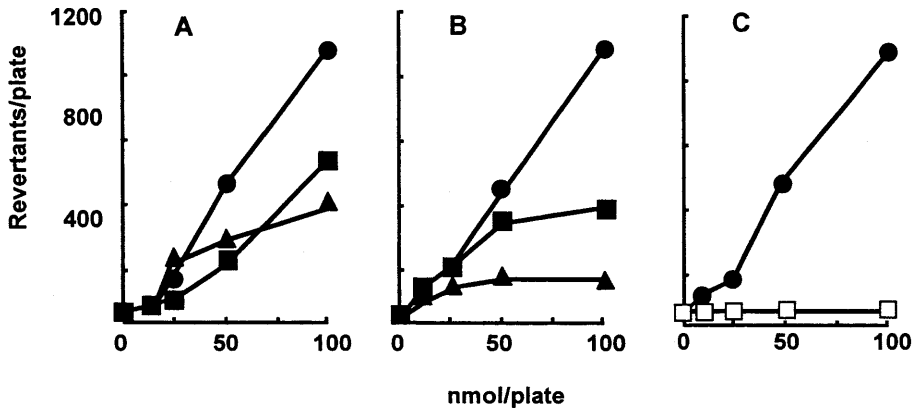

Fig. 4 Mutagenicity of AF in *Salmonella typhimurium* TA1538
(A) Effect of oxidant on the mutagenicity of AF in *Salmonella typhimurium* TA1538 in the presence of Fe(F_5P)Cl. Fe(F_5P)Cl 50 nmol/plate and *t*-BuOOH (●); 150 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 3 min, *m*CPBA (■): *m*CPBA 500 nmol/dioxane, 20 min, MPPT (▲); MPPT 500 nmol/ phosphate buffer (pH 7.4), 20 min.
(B) Effect of solvent on the mutagenicity of AF in *Salmonella typhimurium* TA1538 in the presence of Fe(F_5P)Cl and *t*-BuOOH. Fe(F_5P)Cl 50 nmol/plate and *t*-BuOOH 150 nmol/plate. CH_3CN (●), dioxane (■), DMF (▲)
(C) Mutagenicity of AF in *Salmonella typhimurium* TA1538
AF/CH_3CN, Fe(F_5P)Cl 50nmol/CH_3CN, *t*-BuOOH 150 nmol/ phosphate buffer (pH 7.4), 3 min; Complete (●), −Fe(F_5P)Cl (△), −*t*-BuOOH (□)

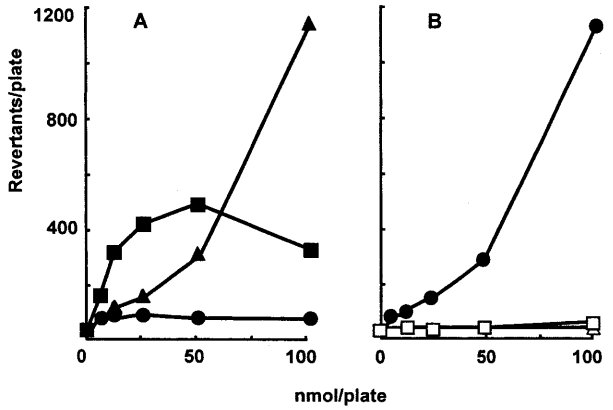

Fig. 5 Mutagenicity of B[*a*]P in *Salmonella typhimurium* TA1538
(A) Effect of oxidant on the mutagenicity of AF in *Salmonella typhimurium* TA1538 in the presence of Fe(F_5P)Cl. Fe(F_5P)Cl 50 nmol/plate and *t*-BuOOH (●); 150nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 20 min, *m*CPBA (■): *m*CPBA 500 nmol/dioxane, 20 min, MPPT (▲); MPPT 200 nmol/ phosphate buffer (pH 7.4), 20 min
(B) Mutagenicity of B[*a*]P in *Salmonella typhimurium* TA1538. B[*a*]P/CH_3CN, Fe(F_5P)Cl 50nmol/CH_3CN MPPT 200 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 20 min; Complete (●), −Fe(F_5P)Cl (△), −*t*-BuOOH (□)

Fe(F_5P)Cl または酸化剤を除く系では変異原性を発現せず，Fe(F_5P)Cl と酸化剤が共存した系でのみ変異原性を発現した．

同じ基質に対する酸化剤の活性の違いは，ヒドロペルオキシドと過酸を用いた化学モデルでは，酸化活性種が違うために異なる変異原が活性を発現していることが考えられるが，本研究では変異原をはじめ酸化生成物を同定していないので反応機構の詳細はわからない．

3) 種々の変異原を用いた変異原性発現

これまでの結果から，Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOH が芳香族アミン類を強く活性化し，Fe(F_5P)Cl/*m*CPBA と Fe(F_5P)Cl/MPPT は多環式芳香族炭化水素を強く活性化し，変異原に対する酸化剤の特異性が認められた．芳香族アミン類を酸化する Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOH を用いてヘテロサイクリックアミンである Trp-P-1 と Trp-P-2 の変異原性を試験した．Trp-P-1 と Trp-P-2 もアミノ基が酸化されてヒドロキシルアミノ体を形成した後に変異原性を発現する (Mita et al., 1981)．Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOH の反応溶媒を検討した結果より，CH_3CN > dioxane > DMF の順に変異原性が発現したことから，その優先順位と化合物の溶解性に基づいて変異原性を試験した．Trp-P-1 は CH_3CN を用いて試験したが，Trp-P-2 は CH_3CN と dioxane には溶解しなかったため DMF を用いて試験した．その結果は AF の変異原性試験と同じ条件で，Trp-P-1 と Trp-P-2 のいずれの化合物も変異原性を発現した (Fig. 6)．Trp-P-1 では酸化剤のみでも変異原性を発現したが，その変異原活性は Fe(F_5P)Cl の共存によってさらに増加した．Trp-P-2 では Fe(F_5P)Cl あるいは *t*-BuOOH を除く系では変異原性を発現せず，Fe(F_5P)

NII-Electronic Library Service

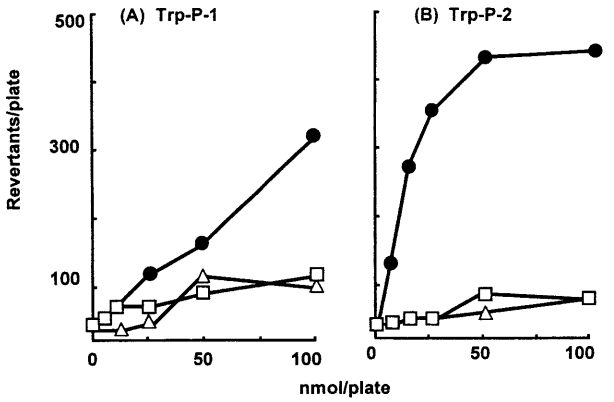

Fig. 6 Mutagenicity of Trp-P-1 (A) and Trp-P-2 (B) in *Salmonella typhimurium* TA1538
(A) Trp-P-1/CH_3CN, Fe(F_5P)Cl 50 nmol/CH_3CN, *t*-BuOOH 150 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 20 min ; Complete (●), − Fe(F_5P)Cl (△), − *t*-BuOOH (□)
(B) Trp-P-2/DMF, Fe(F_5P)Cl 50 nmol DMF, *t*-BuOOH 150 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 20 min ; Complete (●), − Fe(F_5P)Cl (△), − *t*-BuOOH (□)

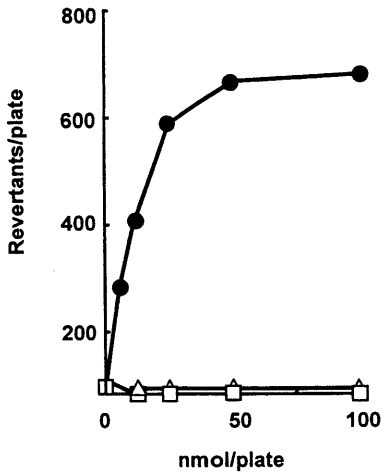

Fig. 7 Mutagenicity of AAF in *Salmonella typhimurium* TA1538
AAF/CH_3CN, Fe(F_5P)Cl 250 nmol/CH_3CN, *t*-BuOOH 750 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 10 min ; Complete (●), − Fe(F_5P)Cl (△), − *t*-BuOOH (□)

Clと*t*-BuOOHが共存した系でのみ変異原性を検出した.

また, 芳香族アミン誘導体である2-acetylaminofluorene(AAF)はアミノ基がアセチル化されており, アセトアミド基の*N*-水酸化体を形成して変異原性を発現する(Heflich and Neft, 1994). AFではFe(F_5P)Cl 50 nmol/*t*-BuOOH 150 nmolで変異原性を検出できたが, AAFはAFと同じ条件では変異原性を発現しなかった. そこでAAFの量を増やすと同時に化学モデルの量を増やした条件であるFe(F_5P)Cl 250 nmol/*t*-BuOOH 750 nmolで検討したところ, AAFは用量に依存して変異原性を発現した(Fig. 7). またFe(F_5P)Clあるいは*t*-BuOOHを除く系では変異原性を発現せず, Fe(F_5P)Clと*t*-BuOOHが共存した系でのみAAFの活性を検出した. AAFの変異原活性はAFよりも低く, アミノ基に比べてアミド基の方が酸化されにくいためにAAFの変異原活性が低下したと考えた.

これまでの結果をTable 1にまとめた. 異なる酸化剤を用いることで生成する変異原が異なる可能性もあるものの, 種々の変異原は濃度に依存して変異原性を発現しており, 化学モデルによって酸化されて変異原性を発現した. Rueffらは種々の化学モデルを用いて変異原性試験に応用しているが, 反応液を溶媒抽出した後に変異原性を試験している(Rueff et al., 1992). その結果では芳香族アミン(AF, AAF)やヘテロサイクリックアミン(IQ)は*t*-BuOOHで強く活性化され, 多環式芳香族炭化水素(B[*a*]P, 7, 12-dimethylbenzo[*a*]anthracene, 3-methylcholanthrene)はPhIOで高い変異原性を発現することを報告している. 化学モデルとして*t*-BuOOHは芳香族アミンやその誘導体を活性化するのに対し, MPPTや*m*CPBAは多環式芳香族炭化水素をより強く活性化した. 本研究での結果は, Rueffらの報告と変異原に対する酸化剤の特異性が同じ傾向であった. Fe(F_5P)Cl, 酸化剤あるいは基質を除く系では変異原性を発現せず, 化学モデルがS9 mixの代替として変異原性試験に応用できることがわかった.

2. 化学モデルによる2-acetylaminofluoreneの変異原性発現機構の解明

化学モデルを用いて代謝機構の検討に応用するために, 化学モデルによって変異原性を発現したAAFから変異原活性体の単離・同定を試みた. AAFはMillerらによって発がん物質の代謝活性化の概念が確立した化合物であり, 現在までに詳細な代謝機構が検討されている(Miller et al., 1961).

反応条件は変異原性試験の条件(AAF 500 nmol, Fe(F_5P)Cl 250 nmol, *t*-BuOOH 750 nmol)よりも大量の化学モデルを用い(AAF 0.5 mmol, Fe(F_5P)Cl 0.06 mol, *t*-BuOOH 15 mmol), さらに反応時間を2時間と長くしてAAFを酸化させて変異原を追跡した. 得られた反応液を溶媒抽出したのちオープンカラムクロマトグラフィーにより分離し, 得られた各分画の変異原活性を検定し, 変異原活性体を単離した. ^{1}H-NMR, IR, MSの機器データより, 代謝を必要としない変異原として2-nitro-9-fluorenone(NO_2F = O)を同定した(Fig. 8).

そこで変異原性試験の条件下でのNO_2F = Oの生成を検討するために, 基質であるAAFとNO_2F = Oの経時的な変化をHPLCで検討した. AAFはFe(F_5P)Clのみ, または*t*-BuOOHのみの存在下では減少しなかったが, Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOHの存在下ではAAF 500 nmolは反応

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

Table 1 Mutgenicity of some mutagens activated by Fe(F_5P)Cl and oxidant

mutagen		oxidant
Aromatic amine	AF, AAF	*t*-BuOOH > MPPT
Polycyclic aromatic hydrocarbon	B[*a*]P	MPPT > mCPBA
Heterocyclic amines	Trp-P-1, Trp-P-2,	*t*-BuOOH
N-Nitroso compounds	*N*-Nitrosodialkylamine Alkyl = methyl, ethyl, propyl, butyl	*t*-BuOOH

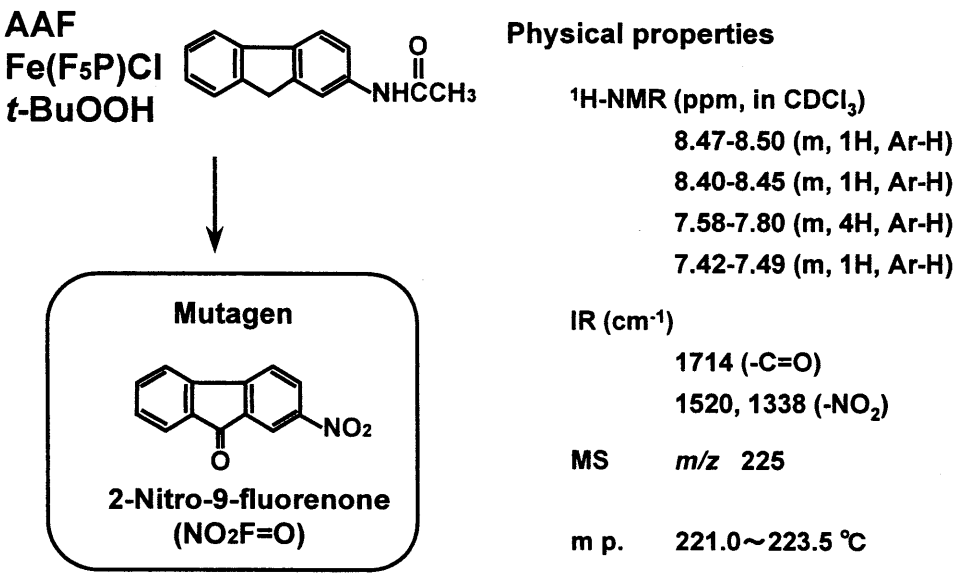

Fig. 8 Identification of $NO_2F = O$ from AAF by Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOH

時間に依存して221.5 nmol(約50％)まで減少した(Fig. 9A)．変異原性試験の結果より，Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOHで変異原性を発現し，Fe(F_5P)Clまたは*t*-BuOOHを除く系では変異原性を発現しないこととも一致した．またFe(F_5P)Cl/*t*-BuOOHの存在下において，AAFから直接的な変異原として同定した$NO_2F = O$の生成を観察した(Fig. 9B)．その結果，$NO_2F = O$の生成は反応時間に依存して増加し，減少したAAFのうち$NO_2F = O$は3.6％を生成した．

さらに化学モデルの存在下における$NO_2F = O$の変異原性発現への寄与を観察するために，ニトロレダクターゼを欠損した*Salmonella typhimurium* YG7131を用い，親株である*Salmonella typhimurium* TA1538との変異原活性を比較した．ニトロレダクターゼを欠損した*Salmonella typhimurium* YG7131は，ニトロ化合物をヒドロキシルアミンに還元することができないために変異原活性が低下する(Yamada et al., 1997)．標品である$NO_2F = O$は*Salmonella typhimurium* TA1538に比べて*Salmonella typhimurium* YG7131で著しい変異原活性の低下がみられ，$NO_2F = O$が活性化されず変異原性が低下した(Fig. 10A)．同様にFe(F_5P)Cl/*t*-BuOOHによるAAFの変異原活性も*Salmonella typhimurium* YG7131において著しい低下がみられたことから，化学モデルの存在下におけるAAFの変異原活性の大部分が$NO_2F = O$によるものであることがわかった(Fig. 10B)．

そこでFe(F_5P)Cl/*t*-BuOOHによりAAFから生成した$NO_2F = O$量に対してAAFの変異原性をプロットし，標品の$NO_2F = O$の変異原活性と比較したところ，両方の活性は一致し，AAFの変異原活性は生成する$NO_2F = O$で説明できた(Fig. 11)．

以上の結果より，Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOHによってAAFは$NO_2F = O$に酸化されることを証明し，さらに化学モデルの存在下におけるAAFの変異原活性は$NO_2F = O$による活性であることが明らかになった(Fig. 12)．

フルオレン環の9位の酸化は報告されており，NO_2Fの9位酸化は線虫である*C. elegance*での主代謝経路であり，またラット肝のミクロソームによっても生成する(Pothuluri et al., 1996；Cui et al., 1996)．ラットやウサギの肝ミクロソームを用いたAAFの代謝機構では，AF, 7-hydroxy-AAF, 5-hydroxy-AAF, 3-hydroxy-AAF, 1-

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

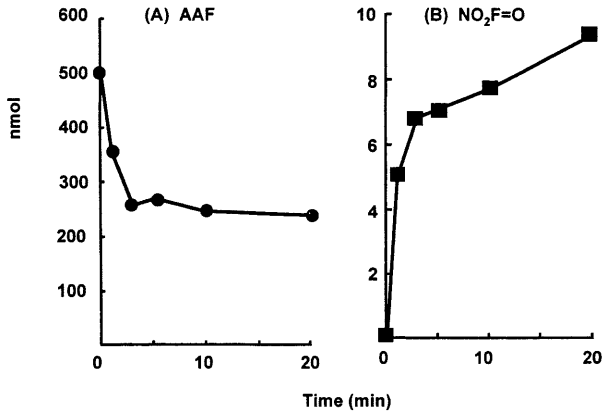

Fig. 9 Decrease of AAF (A) and increase of NO_2F = O (B) by Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOH AAF/CH_3CN, Fe(F_5P)Cl 250 nmol/CH_3CN, *t*-BuOOH 750 nmol/phosphate buffer (pH 7.4), 25℃

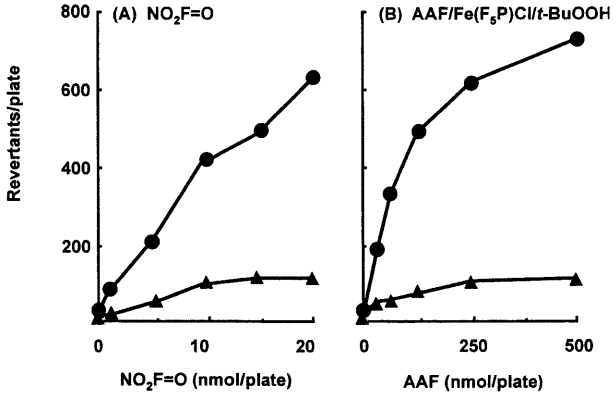

Fig. 10 Mutagenicity of NO_2F = O (A) and AAF with Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOH (B) in *Salmonella typhimurium* TA1538 (●) and *Salmonella typhimurium* YG7131 (▲)

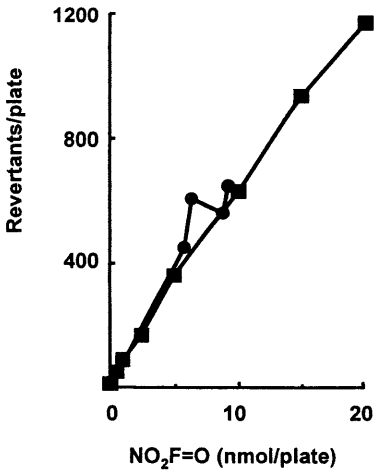

Fig. 11 Correlation of mutagenicity of AAF by Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOH with that calculated based on NO_2F = O formed under the same conditions
Mutagenicity of AAF in the presence of Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOH (●), mutagenicity of 2-nitro-9-fluorenone (○)

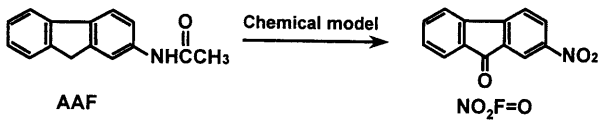

Fig. 12 Formation of NO_2F = O from AAF by Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOH

hydroxy-AAFなどが知られているが，その中でフルオレン環の9位の酸化で2-acetylamino-9-fluorenolと2-acetylamino-9-fluorenoneが生成することが報告され，さらに9位酸化は主代謝経路であった(Smith and Thorgeirsson, 1981；Lenk and Rosenbauer-Thilmann, 1993)．つまり化学モデルによるAAFの酸化反応では，生体内と同様にフルオレン環の9位を酸化することが示された．

一方，N酸化によるニトロ化合物の生成は，prostaglandin H synthaseやperoxidaseを酸化酵素として用いた研究で，AFから2-nitrofluorene(NO_2F)の生成が報告されている(Boyd et al., 1983；Boyd and Eling, 1984)．Prostaglandin H synthaseによるAFの酸化で変異原性を発現することが確認されており，詳細な酸化機構および変異原性発現機構が検討されているが，その変異原活性体はニトロ化合物以外の酸化生成物とされ，特にAF由来のフリーラジカルとされている(Boyd and Eling, 1985；Boyd et al., 1985)．またNO_2Fから生体内の腸内細菌によってAFを経由してAAFが生成し，NO_2FとAAFでは同じDNA付加体を形成することが報告されている(Möller et al., 1987；Möller and Zeisig, 1993；Möller et al., 1994)．AFとNO_2Fはそれぞれ酸化還元されて変換する可能性があるが，アセトアミド基がアミノ基になるにはペプチターゼが関与する．化学モデルではペプチターゼ等の酵素は存在せず，酸化系によってアミド結合が切断されることを示した(Peng et al., 1995)．化学モデルによるAAFの酸化によりアセトアミド基の*N*-酸化とフルオレン環の9位が酸化されたNO_2F = Oを同定したことは，これまでに報告されておらず，新規酸化経路である．

結　　語

細菌の突然変異原性試験の代謝系として化学モデルを用いたところ，変異原である2-aminofluorene，benzo[*a*]pyrene，トリプトファン熱分解物であるTrp-P-1とTrp-P-2，2-acetylaminofluoreneの変異原性を検出した．さらにポルフィリン金属錯体，酸化剤を含まない系では変異原性は発現せず，化学モデルの共存下のみで活性を検出した．このように変異原性試験において，化学モデルによって変異原を活性化することができ，化学モデルの代謝代替系としての有用性が明らかになった．さらに用いるポルフィリン鉄錯体と酸化剤の酸化力を制御するこ

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

とであらゆる変異原を一様に検出することも可能となり，また逆に構造あるいは置換基の異なる変異原を選択的に活性化する化学モデルの構築も期待できる．

化学モデルによって生成する変異原と代謝中間体の同定を行うことで，いままで解明されていない代謝過程の詳細な分子機構を化学的に解明した．化学モデルによるAAFの酸化経路と変異原性発現機構を解明した．Fe(F_5P)Cl/*t*-BuOOHによるAAFの変異原活性の大部分が2-nitro-9-fluorenoneによるものであった．化学モデルを用いることで酵素タンパク質の影響を受けず大量の基質を用いて反応を行うことができた．さらに容易に反応液中での酸化生成物を同定でき，化学モデルが代謝研究に応用できることを示した．純粋な化学触媒系である化学モデルが代謝研究における反応機構の検討に有用であると同時に，新規代謝経路の発見につながることが明らかになった．

参考文献

Boyd, J. A., D. J. Harvans and T. E. Eling (1983) The oxidation of 2-aminofluorene by prostaglandin endoperoxide synthetase, J. Biol. Chem., 258, 8246-8254.

Boyd, J. A. and T. E. Eling (1984) Evidence for a one-electron mechanism of 2-aminofluorene oxidation by prostaglandin H synthase and horseradish peroxidase, J. Biol. Chem., 259, 13885-13896.

Boyd, J. A. and T. E. Eling (1985) Metabolism of aromatic amines by prostaglandin H synthase, Environ. Health Perspect., 64, 45-51.

Boyd, J. A., E. Zeiger and T. E. Eling (1985) The prostaglandin H synthase-dependent activation of 2-aminofluorene to products mutagenic to *S. typhimurium* TA98 and TA98NR, Mutat. Res., 143, 187-190.

Cui, X., J. Bergman and L. Möller (1996) Preneoplastic lesions DNA adducts formation and mutagenicity of 5-, 7-and 9-hydroxy-2-nitrofluorene, metabolites of the air pollutant 2-nitrofluorene, Mutat. Res., 369, 147-155.

Groves, J. T,, T. E. Nemo and R. S. Myers (1979) Hydroxylation and epoxidation catalyzed by iron porphyrin complexes. Oxygen transfer from iodosylbenzene, J. Am. Chem. Soc., 101, 1032-1033.

Groves, J. T., R. C. Haushalter, M. Nakamura, T. E. Nemo and B. J. Evans (1981) High-valent iron-porphyrin complexes related to peroxidase and cytochrome P-450, J. Am. Chem. Soc., 103, 2884-2886.

Guengerich, F. P. and T. L. MacDonald (1984) Chemical mechanisms of catalysis by cytochrome P450 : a unified view, Acc. Chem. Res., 17, 9-16.

Heflich, R. H., R. E. Neft (1994) Genetic toxicity of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene and some their metabolites and model metabolites, Mutat. Res., 318, 173-174.

Hoffmann, P., G. Labat, A. Robert and B. Meunier (1990) Highly selective bromination of tetramesitylporphyrin : an easy access to robust metalloporphyrins, M-Br8TMP and M-Br8TMPS, Tatrahedron Lett., 31, 1991-1994.

Iley, J. (1990) Oxidation of methyl groups of *N, N*-dimethylbenzamides by a cytochrome P450 mono-oxygenase model system, Tetrahedron Lett., 31, 4921-4922.

Lenk, W. and R. Rosenbauer-Thilmann (1993) Metabolism of 2-aminofluorene. I, metabolism *in vitro* of 2-acetylaminofluorene and 2-acetylaminofluoren-9-one by hepatic enzymes, Xenobiotica, 23, 241-257.

Mansuy, D., P. Battioni and J. Battioni (1989) Chemical model systems for drug-metabolizing cytochrome P450-dependent monooxygenases, Eur. J. Biochem., 184, 267-285.

Meunier, B. (1994) General overview on oxidation catalyzed by metalloporphyrins, In : F. Montanari and L. Casella (Eds.), Catalysis by metal complexes, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 1-47.

Miller, E. C., J. A. Miller and H. A. Hartmann (1961) *N*-Hydroxy-2-acetylaminofluorene : a metabolite of 2-acetylaminofluorene with increased carcinogenic activity in the rat, Cancer Res., 21, 815-824.

Mita, S., K. Ishii, Y. Yamazoe, T. Kamataki, R. Kato and T. Sugimura (1981) Evidence for the involvement of *N*-hydroxylation of 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4, 3-*b*]indole by cytochrome P450 in the covalent binding to DNA, Cancer Res., 41, 3610-3614.

Möller, L., J. Rafter and J. -Å. Gustafsson (1987) Metabolism of the carcinogenic air pollutant 2-nitrofluorene in the rat, Carcinogenesis, 8, 637-645.

Möller, L. and M. Zeisig (1993) DNA adduct formation after oral administration of 2-nitrofluorene and *N*-acetyl-2-aminofluorene, analyzed by ^{32}P-TLC and ^{32}P-HPLC, Carcinogenesis, 14, 53-59.

Möller, L., M. Zeisig, T. Midtvedt and J. -Å. Gustafsson (1994) Intestinal microflora enhances formation of DNA adducts following administration of 2-NF and 2-AAF, Carcinogenesis, 15, 857-861.

Okochi, E. and M. Mochizuki (1995) Dealkylation of *N*-nitrosodibenzylamine by metalloporphyrin/oxidant model systems for cytochrome P450, Chem. Pharm. Bull., 43, 2173-2176.

Okochi, E., E. Namai, K. Ito and M. Mochizuki (1995) Activation of *N*-nitrosodialkylamines to mutagens by a metalloporphyrin /oxidant model system for cytochrome P450, Biol. Pharm. Bull., 18, 49-52.

Okochi, E., A. Kurahashi, K. Ito and M. Mochizuki (1997) Detection of mutagenicity in Ames test using a metalloporphyrin /oxidants model system for cytochrome P450, Mutat. Res., 373, 99-105.

Paolini, M. and G. Cantelli-Forti (1997) On the metabolizing systems for short-term genotoxicity assays, Mutat. Res., 387, 17-34.

Peng, H., G. M. Raner, A. D. N. Vaz and M. J. Coon (1995) Oxidative cleavage of esters and amides to carbonyl products by cytochrome P450, Arch. Biochem. Biophys., 318, 333-339.

Pothuluri, J. V., F. E. Evans, T. M. Heinze, P. P. Fu and C. E. Cerniglia (1996) Fungal metabolism of 2-nitrofluorene, J. Toxicol. Environ. Health, 47, 587-599.

Querci, C. and M. Ricci (1989) A very efficient alkene epoxidation by magnesium monoperoxyphthalate catalysed by manganese porphyrins, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 14, 889-890.

Rueff, J., A. Rodrigues, A. Laires and J. Gaspar (1992) Activation of promutagens by porphyrinic biomimetic systems, Mutat. Res., 269, 243-250.

Salmeen, I. T., S. Foxall-VanAken and J. C. Ball (1988) A preliminary study of an iron porphyrin-iodosylbenzene system for activation of mutagens in Ames assay, Mutat. Res., 207, 111-115.

Sheldon, R. A., (1994) Oxidation catalysis by metalloporphyrins, A historical perspective, In : R. A. Sheldon (Eds.), Metalloporphyrins in Catalytic Oxidation, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1-27.

NII-Electronic Library Service

The Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)

Smith, C. L. and S. S. Thorgeirsson (1981) Am improved high-pressure liquid chromatographic assay for 2-acetylaminofluorene and eight of its metabolites, Anal. Biochem., 113, 62-67.

Traylor, T. G. and F. Xu (1990) Mechanisms of reaction of iron (Ⅲ) porphyrins with hydrogen peroxide and hydroperoxides : solvent and solvent isotope effects, J. Am. Chem. Soc., 11, 178-186.

Wright, A. S. (1980) The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis, Mutat. Res., 75, 215-241.

Yamada, M., J. J. Espinosa-Aguirre, M. Watanabe, K. Matsui, T. Sofuni and T. Nohmi (1997) Targeted disruption of gene encoding the classical nitroreductase enzyme in *Salmonella typhimurium* Ames test strains TA1535 and TA1538, Mutat. Res., 375, 9-17.

NII-Electronic Library Service