

Aldehyde oxidase の薬物還元能に関する研究

杉原数美

1997

目次

序章	1
第1章 肝 aldehyde oxidase によるヒドロキサム酸の還元的代謝	
I. 緒論	3
II. ウサギ肝画分における芳香族及び複素環ヒドロキサム酸還元活性	5
III. ウサギ肝 aldehyde oxidase の芳香族及び複素環ヒドロキサム酸還元活性	7
IV. ウサギ肝 aldehyde oxidase の N-アリル脂肪族ヒドロキサム酸還元活性	8
V. ヒドロキサム酸還元活性の種差	9
第2章 肝 aldehyde oxidase による <i>S</i> -(-)-nicotine-1'- <i>N</i> -oxide の還元的代謝	
I. 緒論	10
II. ラット肝画分における <i>S</i> -(-)-nicotine-1'- <i>N</i> -oxide 還元活性	11
III. ラット肝 aldehyde oxidase による <i>S</i> -(-)-nicotine-1'- <i>N</i> -oxide 還元活性	12
第3章 肝 aldehyde oxidase による抗てんかん薬 zonisamide の還元的代謝	
I. 緒論	13
II. ウサギ肝画分における zonisamide 還元活性	14
III. 肝 aldehyde oxidase の zonisamide 還元活性	15
IV. Zonisamide 還元活性の種差	17
V. 肝 aldehyde oxidase の 1,2-benzisoxazole 還元活性	18
VI. Zonisamide 還元機構に関する検討	19

第4章 肝 aldehyde oxidase のラットにおける系統差

I. 緒論	21
II. 各種ラット肝サイトソール画分における aldehyde oxidase 活性	21
III. 各種ラット肝サイトソール画分における xanthine oxidase 活性	25
IV. 酵素反応速度論的解析および Western blot 解析	26
考察	27
結論	31
本論文の基礎となる原著	33
謝辞	34
実験の部	35
引用文献	42

略号

AHA:	anthranilhydroxamic acid
BHA:	benzohydroxamic acid
NHA:	nicotinohydroxamic acid
N-HAAB:	<i>N</i> -hydroxy-4-acetylaminobiphenyl
N-HAAF :	<i>N</i> -hydroxy-2-acetylaminofluorene
N-HP:	<i>N</i> -hydroxyphenacetin
NNO:	<i>S</i> -(-)-nicotine-1'- <i>N</i> -oxide
SHA:	salicylhydroxamic acid
ZNS:	zonisamide

序 章

薬物は生体内で種々の代謝を受ける。その主たる役割を担っている臓器は、肝臓であり、様々な薬物代謝酵素が肝細胞内各オルガネラおよび可溶性画分に存在している。薬物代謝反応の型式を大別すると、酸化、還元、加水分解そして抱合である。これらのうち、酸化、還元、加水分解は第1相反応と呼ばれ、これにより水酸基やアミノ基が生成し極性が高くなるとともに、次に続く第2相反応と呼ばれる抱合反応の基質となる。そして、抱合によりさらに極性が高まり、排泄されやすくなる。

これら薬物代謝反応のうち酸化反応としては、芳香環の水酸化、アルキル基の水酸化、O-, N-およびS-脱アルキル化、エポキシ化、N-およびS-酸化、脱アミノ化などがある。これら酸化反応を触媒する酵素として、細胞ミクロソーム画分の cytochrome P450 系や FAD-containing monooxygenase が大変よく研究されてきた。

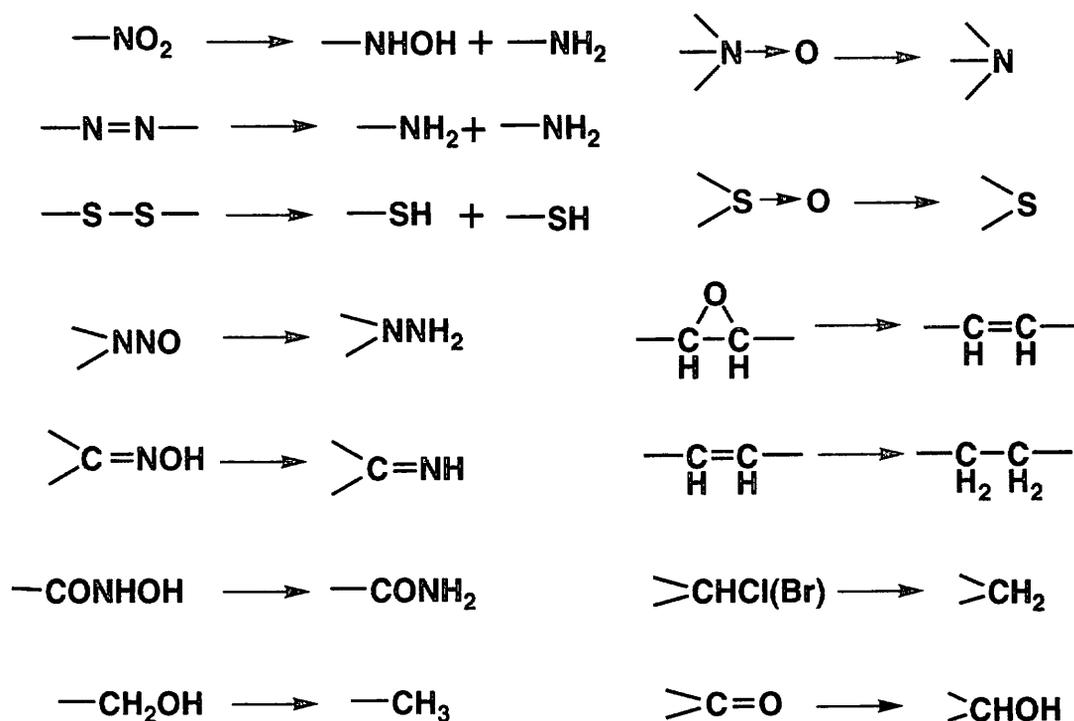


Figure 1. 薬物の還元的代謝反応

これに対し、薬物還元反応としては、ニトロ基、アゾ基、N-オキシド、スルホキシド、ニトロソ基、オキシム基、カルボニル基、そしてヒドロキサム酸などの還元や還元的脱ハロゲン化が知られているが (Figure 1.)、これまでこれらの還元反応を触媒する酵素としては、ニトロ基、N-オキシド、アゾ基などの還元における cytochrome P450 系や xanthine oxidase、あるいは DT-diaphorase などの関与がわずかに報告されていたに過ぎなかった。そこで、本研究では薬物還元酵素に関する研究の一環として、各種ヒドロキサム酸、S-(-)-nicotine-1'-N-oxide および zonisamide の還元酵素について検討した。

第一章

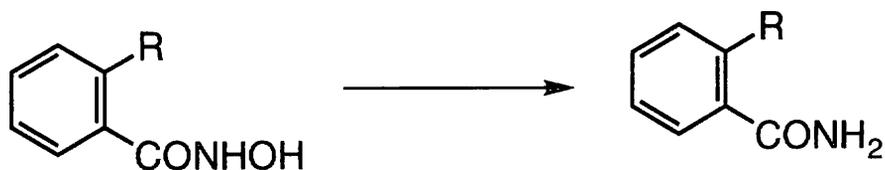
肝 aldehyde oxidase によるヒドロキサム酸の還元的代謝

I. 諸論 (原著 1~3)

ヒドロキサム酸には、抗結核作用、urease 阻害作用、抗トリパノソーマ作用、発癌作用など生理活性を示す化合物が多く知られている¹⁾。

生体におけるヒドロキサム酸の主要な代謝経路の一つとして、相当するアミド体への還元が知られているが、従来 *in vitro* では、ラット肝ホモジネートによる、salicylhydroxamic acid (SHA) の salicylamide への還元²⁾、マウス肝ミトコンドリアによる nicotinohydroxamic acid (NHA) の nicotinamide への還元³⁾、ラットおよびマウス肝スライスによる anthranilhydroxamic acid (AHA) の anthranilamide への還元が⁴⁾、知られているに過ぎず、これら還元反応に関与する酵素(系)については、全く不明であった。一方、*N*-アリル脂肪族ヒドロキサム酸である *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene (*N*-HAAF) の 2-acetylaminofluorene への還元を触媒する酵素は、既に、当研究室においてウサギ肝サイトソール画分より精製し、その性質を明らかにしているが⁵⁾、これ以外にも *N*-HAAF の還元酵素が存在する可能性が考えられた。そこで、本研究では、芳香族ヒドロキサム酸として salicylhydroxamic acid (SHA)、benzohydroxamic acid (BHA)、anthranilhydroxamic acid (AHA) を、複素環ヒドロキサム酸として nicotinohydroxamic acid (NHA) を、*N*-アリル脂肪族ヒドロキサム酸としては *N*-HAAF、*N*-hydroxy-4-acetyl-aminobiphenyl (*N*-HAAB)、*N*-hydroxyphenacetin (*N*-HP) をそれぞれ基質として用い、それらのアミド体への還元的代謝に関与する酵素について検討を加えた (Figure 2)。

I. 芳香族ヒドロキサム酸



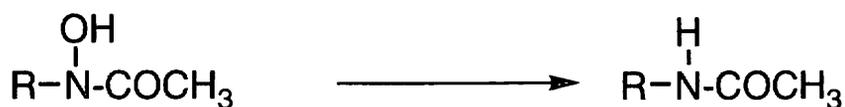
R= H Benzohydroxamic acid
OH Salicylhydroxamic acid
NH₂ Anthranilhydroxamic acid

II. 複素環ヒドロキサム酸



Nicotinohydroxamic acid

III. N-アリル脂肪族ヒドロキサム酸



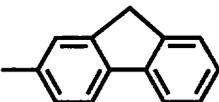
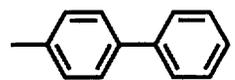
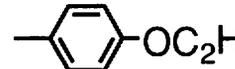
R=  N-Hydroxy-2-acetylaminofluorene
 N-Hydroxy-4-acetylaminobiphenyl
 N-Hydroxyphenacetin

Figure 2. ヒドロキサム酸の構造

II. ウサギ肝画分における芳香族及び複素環ヒドロキサム酸還元活性

まず、雄性白色ウサギの肝ミトコンドリア、ミクロソームおよびサイトソール画分の SHA、BHA、AHA および NHA に対する還元活性を嫌氣的条件下で検討した。その結果、ミトコンドリア画分およびミクロソーム画分では、いずれの基質の場合にも NADPH あるいは NADH の添加時に、弱い活性しか検出できなかった。サイトソール画分においても、NADPH あるいは NADH の添加時には、ほとんど活性が見られなかった。しかし、2-hydroxypyrimidine、*N*¹-methylnicotinamide、benzaldehyde あるいは butyraldehyde のような aldehyde oxidase の電子供与体を添加した時には、著しい還元活性の発現が認められ、これらの電子供与体のうちでは、2-hydroxypyrimidine で最高の活性がみられ、次いで *N*¹-methylnicotinamide あるいは benzaldehyde で、基質により多少の相違が認められた。また、これら4種のヒドロキサム酸の中では、NHA が最も還元されやすかった。更に、この 2-hydroxypyrimidine 依存性の還元活性は、aldehyde oxidase の特異的阻害剤である menadione および chlorpromazine によって著しく阻害され、また酸素によっても著しく阻害された。以上のことより、肝サイトソール画分の aldehyde oxidase が、本還元反応に関与していることが強く示唆された。

これに対して、肝サイトソール画分に xanthine oxidase の電子供与体である xanthine や hypoxanthine を加えても、ほとんどヒドロキサム酸還元活性は発現せず、xanthine oxidase の関与はないと考えられた (Table 2)。

Table 1 . ウサギ肝画分におけるヒドロキサム酸還元活性

Fraction	Amide formed (mmol / 10 min / g liver)			
	Salicyl-hydroxamic acid	Benzo-hydroxamic acid	Anthranil-hydroxamic acid	Nicotino-hydroxamic acid
Mitochondria ^a				
None	ND	ND	ND	ND
NADPH	0.12	0.09	0.08	0.02
NADH	0.14	0.10	0.26	0.08
Microsomes ^a				
None	ND	0.02	0.12	ND
NADPH	0.11	0.05	0.22	0.01
NADH	0.11	0.06	0.16	0.02
Cytosol ^b				
None	ND	ND	ND	0.01
NADPH	0.19	ND	ND	0.12
NADH	0.13	ND	ND	0.63
Xanthine	ND	ND	ND	0.01
Hypoxanthine	ND	ND	ND	0.04
2-Hydroxypyrimidine	7.69	2.68	2.77	12.50
<i>N</i> ⁷ -Methylnicotinamide	1.05	0.69	2.44	6.83
Benzaldehyde	5.69	1.42	1.53	3.06
Butyraldehyde	1.71	1.28	1.24	4.99
2-Hydroxypyrimidine	0.15	0.09	0.11	0.21
+ O ₂ ^c				
2-Hydroxypyrimidine	0.23	—	—	0.88
+ menadione ^d				
2-Hydroxypyrimidine	0.77	—	—	1.25
+ chlorpromazine ^d				

各値はウサギ 4 例の平均。

a 肝0.05 g 相当使用。

b 肝0.01 g 相当使用。

c 好氣的条件下で反応。

d 0.1 mM menadione あるいはchlorpromazine存在下で反応。

ND = not detected

III. ウサギ肝 **aldehyde oxidase** の芳香族及び複素環ヒドロキサム酸還元活性

前述のように、ウサギ肝サイトソール画分におけるヒドロキサム酸還元活性は **aldehyde oxidase** によることが示唆されたので、Rajagopalan らの方法⁶⁾に従ってウサギ肝から **aldehyde oxidase** を精製し、その精製酵素のヒドロキサム酸還元活性について検討した。その結果、本酵素は嫌氣的条件下、その電子供与体の添加時に、著しい活性を発現した。前記肝サイトソール画分の場合と同様に、電子供与体の中では、2-hydroxypyrimidineでの活性が最も高く、また、ヒドロキサム酸の中では、やはり NHA が最も還元されやすかった (Table 3)。

Table 3. ウサギ肝 **aldehyde oxidase** におけるヒドロキサム酸還元活性

addition	Amide formed ($\mu\text{mol} / 10 \text{ min} / \text{mg protein}$)			
	Salicyl-hydroxamic acid	Benzo-hydroxamic acid	Anthranil-hydroxamic acid	Nicotino-hydroxamic acid
None	ND	ND	ND	ND
2-Hydroxypyrimidine	10.47	1.15	1.62	13.08
N ¹ -Methylnicotinamide	3.06	0.90	1.12	4.22
Benzaldehyde	4.77	0.97	1.36	3.49
Butyraldehyde	1.23	0.61	1.06	2.46

各値は 4 例の平均値。

0.02 mg タンパク質相当の **aldehyde oxidase** を使用。

ND = not detected.

IV. ウサギ肝 aldehyde oxidase の *N*-アリル脂肪族ヒドロキサム酸還元活性

精製ウサギ肝 aldehyde oxidase は芳香族ヒドロキサム酸および複素環ヒドロキサム酸に対してだけではなく、*N*-HAAF、*N*-HAAB および *N*-HP のような *N*-アリル脂肪族ヒドロキサム酸に対しても、その電子供与体の存在下で、著しい還元活性を発現した (Table 4)。これら3種の基質の中では、*N*-HAAB が最もよく還元され、次いで *N*-HP の順であった。

N-HAAF に対する活性が低い理由は、*N*-HAAF 自体が aldehyde oxidase の阻害剤としての働きがあるためと考えられる⁵⁾。

Table 4. ウサギ肝 aldehyde oxidase によるヒドロキサム酸還元活性

Addition	Amide formed ($\mu\text{mol} / 10 \text{ min} / \text{mg protein}$)		
	<i>N</i> -hydroxy-2-acetyl-aminofluorene	<i>N</i> -hydroxy-4-acetyl-aminobiphenyl	<i>N</i> -hydroxy-phenacetin
None	ND	ND	ND
2-Hydroxypyrimidine	6.98	16.81	12.43

ND : not detected.

V. ヒドロキサム酸還元活性の種差

次に、ハムスター、モルモット、ラット、およびマウス肝サイトソールのヒドロキサム酸還元活性について比較検討した。その結果、SHA および NHA ではハムスター、次いでモルモットの順で高い活性が検出され、これらに比較しラットおよびマウスでは相対的に低い活性しか認められなかった (Table 5)。

これに対し N-HAAF では、活性にあまり大きな種差が認められなかった。

Table 5 . 各種動物肝サイトソール画分におけるヒドロキサム酸還元活性

Substrate	Addition	Amide formed ($\mu\text{mol} / 10 \text{ min} / \text{g liver}$)			
		Hamster	Guinea pig	Rat	Mouse
Salicylhydroxamic acid	None	0.01	0.02	0.02	0.03
	2-Hydroxypyrimidine	9.22	5.38	1.04	1.37
	2-Hydroxypyrimidine + menadione ^a	0.19	0.22	0.15	0.05
Nicotinohydroxamic acid	None	0.01	ND	ND	ND
	2-Hydroxypyrimidine	14.15	10.58	3.07	4.40
N-Hydroxy-2-acetyl-amino-fluorene	None	—	0.33	0.34	0.15
	2-Hydroxypyrimidine ^b	—	7.88	5.27	6.64
	2-Hydroxypyrimidine ^b	—	0.92	0.56	0.21
	+ menadione ^a				

各値は 4 例の平均値 \pm SD。

0.01 g 肝相当のサイトソール画分を使用。

^a 0.1 mM menadione 存在下で反応。

^b 50 mM NaF (deacetylaseの阻害剤) 存在下で反応。

ND = not detected.

第二章

ラット肝 aldehyde oxidase による *S*-(-)-nicotine-1'-*N*-oxide の還元的代謝

I. 諸論 (原著 4)

Nicotine はタバコに含まれる主要なアルカロイドで、喫煙により多くの人に摂取されている。Nicotine の生体内における主な代謝経路としては、Figure 2 に示したように、まず cytochrome P450 系で酸化され生成したカルビノールアミン体がさらに aldehyde oxidase によって酸化され、cotinine が生成する経路と、FAD-containing monooxygenase によって、nicotine-1'-*N*-oxide (NNO) へ酸化される経路が知られている。これらのうち、NNO は *in vivo* 及び *in vitro* で、再び nicotine に還元されるという報告がある⁷⁾ (Figure 3)。この反応は、排泄されやすい形に変換された NNO が、再び毒性の高い元の nicotine に戻ることを意味し、毒性学的にも注目されるものである。しかし、本還元反応に関与する酵素(系)については、いまだ説明されていない。そこで、本研究ではこの点について検討した。

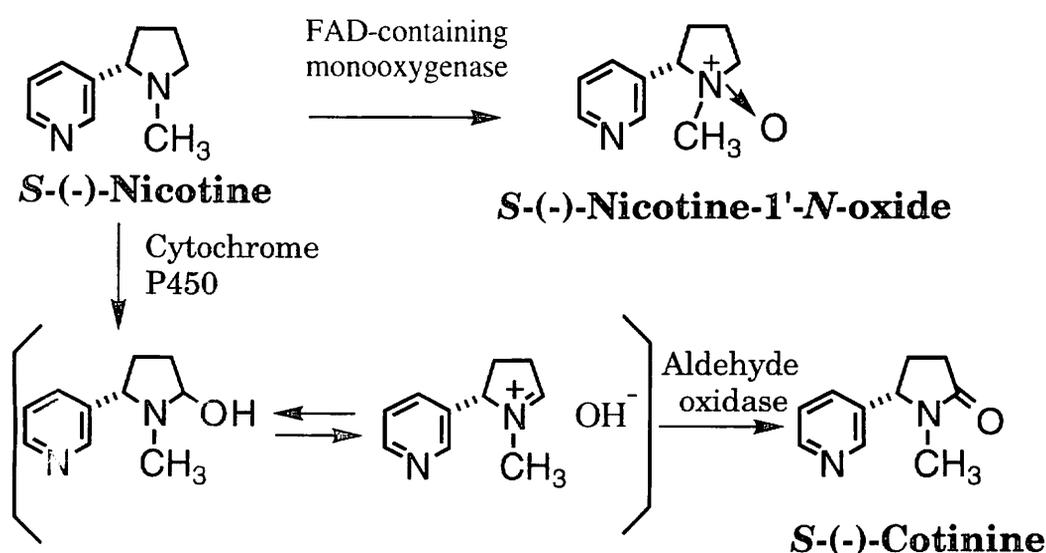


Figure 3. *S*-(-)-Nicotine の主代謝経路

II. ラット肝画分における *S*-(-)-nicotine-1'-*N*-oxide の還元活性

ラット肝サイトソール画分は、嫌氣的条件下 aldehyde oxidase の電子供与体の存在下で強力な NNO 還元活性を発現した (Table 6)。今回使用した電子供与体の中では、2-hydroxypyrimidine で最も高い活性が得られた。また、その活性は menadione をはじめとする aldehyde oxidase の阻害剤によって著しく阻害された (Table 7)。以上より、本還元反応は aldehyde oxidase によって触媒されることが強く示唆された。

Table 6 ラット肝サイトソール画分における *S*-(-)-nicotine-1'-*N*-oxide 還元活性

Addition	Nicotine formed (nmol / 10 min / mg protein)
None	0.93 ± 0.05
2-Hydroxypyrimidine	7.78 ± 1.58
<i>N</i> ¹ - Methylnicotinamide	3.64 ± 0.98
Pyridoxal	2.95 ± 0.82
Benzaldehyde	3.07 ± 0.52
Butyraldehyde	2.26 ± 0.53

各値はラット 4 例の平均値 ± SD。

Table 7. ラット肝サイトソール画分における *S*-(-)-nicotine-1'-*N*-oxide 還元活性に対する阻害剤の影響

Addition ^a	Reductase activity % of control
None	100
Menadione	11
Chlorpromazine	27
uinacrine	10
Amytal	41
Cupric sulfate	35
Antimycin A	22

^a 1x10⁻⁴ M

III- ラット肝 aldehyde oxidase の *S*-(-)-nicotine-1'-*N*-oxide 還元活性

そこで、Ohkubo らの方法⁸⁾により、ラット肝より精製した aldehyde oxidase を用いて、その *S*-(-)-nicotine-1'-*N*-oxide 還元活性について検討した。その結果、本酵素はその電子供与体の存在下で、著しい NNO 還元活性を発現し、menadioneによって、完全に阻害されることを明らかにした (Table 8)。

Table 8. ラット肝aldehyde oxidase の*S*-(-)-nicotine-1'-*N*-oxide 還元活性

Addition	Nicotine formed (nmol / 10 min / mg protein)
None	ND
2-Hydroxypyrimidine	25.1 ± 3.5
2-Hydroxypyrimidine plus menadione ^a	ND

N.D. = not detected

^a 10⁻⁴ M

第三章

肝 aldehyde oxidase による抗てんかん薬 zonisamide の還元的代謝

I. 諸論 (原著 5)

Zonisamide(ZNS)は、わが国で開発された benzisoxazole 系の抗てんかん薬で、種々のタイプのでんかん患者および難治性てんかん患者に対して、有効であることが臨床的に示されている。

ZNS の *in vivo* における主要な代謝経路を Figure4 に示した⁹⁾。これらのうち主代謝物は、ZNS の 1,2-benzisoxazole 環が還元的に開裂した 2-sulfamoylacetylphenol で、ヒト、サル、イヌおよびラット尿中よりその抱合体として検出されている^{10, 11)}。この還元的代謝反応に関しては、ラット^{12, 13)}およびヒト¹⁴⁾において、主に肝ミクロソーム画分の cytochrome P450 3A が関与し、肝サイトソール画分にはほとんど活性が存在しないとされていた。そこで、本研究では、肝サイトソール画分に重点を置き、本還元反応に関与する酵素を検索すると共に、肝ミクロソームおよびサイトソール両画分における ZNS 還元活性の種差について検討した。

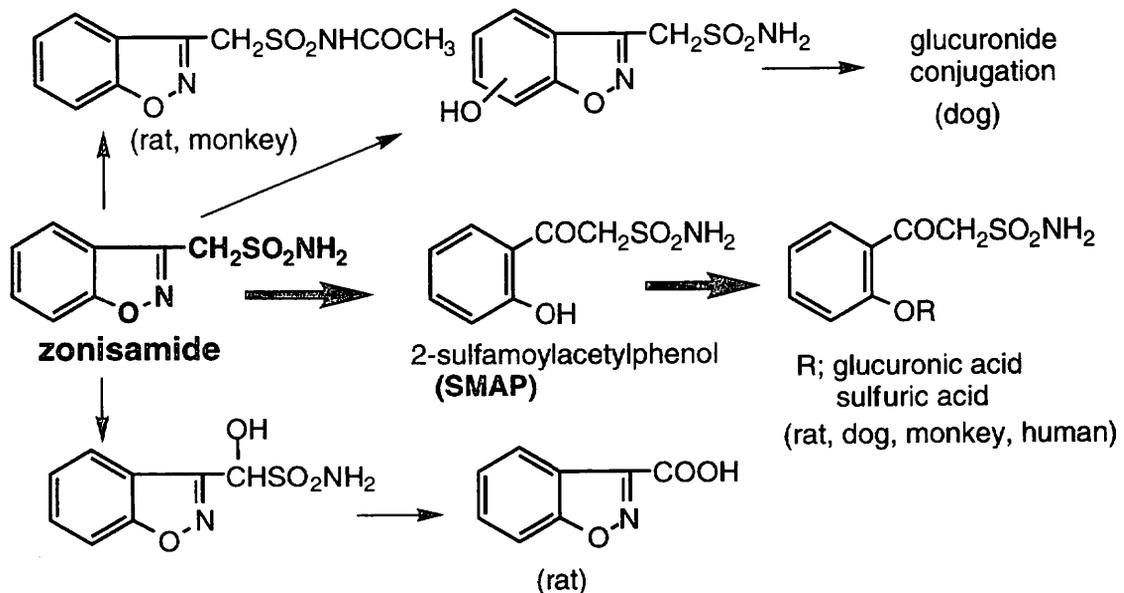


Figure 4. Zonisamideの各種動物における主代謝経路

II. ウサギ肝画分における zonisamide還元活性

ウサギ肝ミクロソーム画分およびサイトソール画分における ZNS 還元活性について、比較検討した。その結果、ミクロソーム画分は嫌氣的条件下で、ラットを用いた実験で既に報告されているように¹²⁾、NADPH あるいは NADH の存在下で還元活性を示し、この活性は FAD の添加により促進され、一酸化炭素で阻害された。一方、サイトソール画分は NADPH あるいは NADH を添加しても全く活性が認められなかったが、aldehyde oxidase の電子供与体の存在下で還元活性を発現し、特に 2-hydroxypyrimidine 添加時には、ミクロソーム画分の活性をはるかに上回る高い活性を示した (Table 9)。

Table 9. ウサギ肝ミクロソームおよびサイトソール画分における zonisamide還元活性

	2-Sulfamoylacetylphenol formed (nmol / 10 min /g liver)
Microsomes ^a	ND
NADH	4.2 ± 0.6
NADPH	12.5 ± 2.1
NADPH, FAD ^a	28.4 ± 6.7
NADH, CO ^b	ND
NADPH, CO ^b	ND
NADPH, FAD ^a , CO ^b	1.5 ± 0.4
Cytosol	ND
NADPH	ND
NADH	ND
Xanthine	ND
2-Hydroxypyrimidine	106.2 ± 10.2
N ¹ -Methylnicotinamide	62.3 ± 6.6
Benzaldehyde	20.8 ± 4.1

各値はウサギ 4 例の平均値 ± SD。

^a 0.1 mM

^b 一酸化炭素気相下で反応。

ND = not detected

サイトソール画分における 2-hydroxypyrimidine依存性の ZNS 還元活性と、benzaldehyde 酸化活性を指標とした aldehyde oxidase 活性は、menadione、quercetinあるいは allopurinolによって、同程度の阻害を受けた (Table 10.)。

以上の結果から、ZNS は肝ミクロソーム画分の cytochrome P450 系だけではなく、肝サイトソール画分中の aldehyde oxidase によっても、2-sulfamoylacetylphenol へ還元されることが示唆された。

Table 10. ウサギ肝サイトソール画分における zonisamide還元活性および aldehyde oxidase活性に対する各種阻害剤の影響

Addition	Concentration (M)	Zonisamide reductase activity ^a	Aldehyde oxidase activity ^b
		% of control	
None (control)		100	100
Menadione	10 ⁻⁵	0	0
Quercetin	10 ⁻⁴	0	0
Allopurinol	10 ⁻⁴	89	98

^a 2-hydroxypyrimidine存在下で反応。

^b benzaldehyde 酸化活性

III. 肝 aldehyde oxidase の zonisamide還元活性

そこで、Felsted らの方法¹⁵⁾により、ウサギ肝から精製した aldehyde oxidase を用いて、その ZNS 還元活性について検討したところ、電子供与体存在下で高い還元活性を示した。また、Ohkubo らの方法⁸⁾によりラット (Sea:SD)肝から精製した aldehyde oxidase も、同様に ZNS 還元活性を示し、ウサギ酵素より高い活性を発現した (Table 11)。

更に、本還元活性について反応速度論的検討を行ったところ、 K_m はウサギの方が小さいが、 V_{max}/K_m がラットの方が大きく、ラット酵素の方が活性が高いことが確認された (Table 12)。

Table 11. ウサギおよびラット肝aldehyde oxidaseのzonisamide還元活性

	2-Sulfamoylacetylphenol formed ^a (nmol / 10 min / mg protein)
Rabbit enzyme	23.3 ± 5.6
Rat enzyme	43.7 ± 8.9

^a 2-Hydroxypyrimidine存在下で反応。

Table 12. ウサギおよびラット肝aldehyde oxidaseのzonisamide還元反応の
 K_m , V_{max} 値

	K_m (μM)	V_{max} (nmol / 10 min / mg protein)	V_{max}/K_m
Rabbit enzyme	217	42	0.19
Rat enzyme	542	382	0.70

K_m , V_{max} 値はLineweaver-Burkプロットにより求めた。

肝aldehyde oxidaseは、ウサギは0.11mg タンパク質相当、ラットは0.18 mg タンパク質相当使用。

反応は1 mM 2-hydroxypyrimidine存在下、 zonisamide濃度 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 および0.8 mMで行った。

IV. Zonisamide還元活性の種差

ウサギ以外の動物種として、ハムスター、マウスおよびモルモットを取り上げ、それらの肝画分におけるZNS還元活性を比較検討した。

いずれの動物種でもミクロソーム画分の活性は低く、あまり種差が認められなかった。これに対し、サイトソール画分における活性はいずれの動物においてもミクロソーム画分の活性より高く、特にハムスターとマウスあるいはモルモット間で、著しい種差が認められた (Table 13)。

Table 13. ハムスター、マウスおよびモルモット肝ミクロソームあるいはサイトソール画分におけるzonisamide還元活性

Animal	2-Sulfamoylacetylphenol formed (nmol / 10 min / g liver)	
	Microsomes ^a	Cytosol ^b
Hamster	47.9 ± 1.3	5368.4 ± 375
Mouse	31.3 ± 7.0	829.9 ± 15
Guinea pig	25.0 ± 7.2	700.8 ± 92

各値は4例の平均値 ± SD。

a NADPH存在下で反応。

b 2-hydroxypyrimidine存在下で反応。

V. 肝 aldehyde oxidase の 1,2-benzisoxazole 還元活性

ZNS の骨格部分である 1,2-benzisoxazole 自身も aldehyde oxidase によって還元的開裂をうけるかどうかについて検討した。その結果、ZNS 同様に aldehyde oxidase の電子供与体存在下で、ウサギ肝サイトソール画分および aldehyde oxidase によって還元的開裂を受け、salicylaldehyde が生成した (Table 14)。

Table 14. ウサギ肝サイトソール画分および aldehyde oxidase の 1,2-benzisoxazole 還元活性

	Salicylaldehyde formed ^a
	(nmol / 10 min / g liver)
Cytosol	232.5 ± 16.5 ^b
	(nmol / 10 min / mg protein)
Aldehyde oxidase	29.6 ± 0.43 ^b

^a 2-hydroxypyrimidine 存在下で反応。

^b 値は 4 例の平均値 ± SD。

VI. Zonisamide 還元機構

ZNS の 2-sulfamoylacetylphenol への酵素的還元機構について検討した。

これまで、当研究室においてオキシムからオキシソ体への変換は、まず、オキシムが aldehyde oxidase によってイミノ体に還元され、それが加水分解を受けて、オキシソ体 になることが示されている¹⁶⁾ (Figure5)。

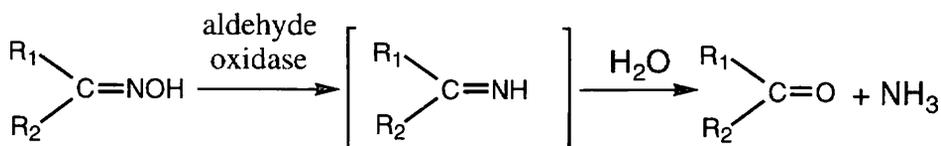
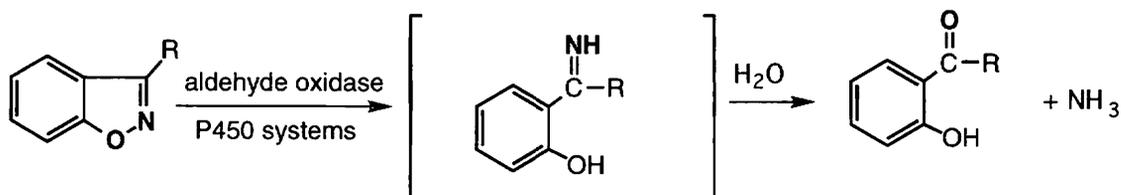


Figure 5. オキシムの還元機構

そこで、ZNS の場合も、1,2-benzisoxazole 環が aldehyde oxidase あるいは cytochrome P450 系により還元的に開裂されてイミノ体が生成し、それが加水分解によって 2-sulphamoylacetylphenol とアンモニアに変換されると推定された (Figure6)。



Zonisamide : R= CH₂SO₂NH₂

1,2-Benzisoxazole: R= H

Figure 6. Zonisamide と 1,2-benzisoxazole の還元機構

そこで、最も活性の高かったハムスター肝サイトソール画分を用いて、ZNS代謝に伴う、還元生成物 2-sulfamoylacetylphenol の生成量とアンモニアの生成量の関係について調べた。その結果、インキュベーション 20 分までは、ほぼ等量の 2-sulfamoylacetylphenol とアンモニアの生成が認められた (Figure 7a)。また、反応に用いるサイトソール画分の量をいろいろ変化させた場合にも、両者の生成量は等量関係にあった (Figure 7b)。

以上の結果より、本還元機構は Figure 6 に示した経路によると考えられる。

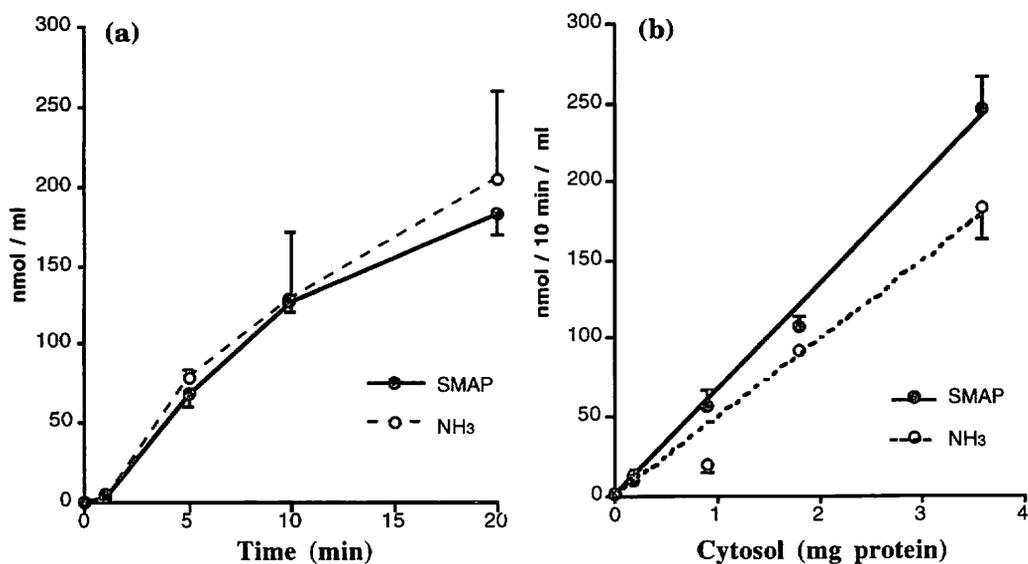


Figure 7. ハムスター肝サイトソール画分による zonisamide還元反応にともなう 2-sulfamoylacetylphenol とアンモニアの生成

第四章

肝 aldehyde oxidase のラットにおける系統差

I. 諸論 (原著 6)

実験動物として多用されているラットの系統として、Wistar 系、Sprague-Dawley (SD)系、Fisher 系等がある。このうち、SD 系は一応 1 種だが、Wistar 系は系統という概念が出来る前に種々の経路でわが国に導入されており、現在いくつもの亜種が存在する。これら系統および亜種間には遺伝的性質などについてかなり違いがあることが知られており、この様な遺伝的差異に起因する実験結果の相違が問題となってきた^{17, 18)}。

ところで、肝 aldehyde oxidase 活性の系統差については、これまでにマウスにおいて一例¹⁹⁾ 報告されているが、ラットにおいては個体差の報告²⁰⁾ があるのみで、系統差に関する検討は全くなされていなかった。そこで、薬物代謝実験あるいは毒性試験によく使用される 8 種の Wistar 系、3 種の SD 系および 1 種の Fisher 系ラットを用いて、肝 aldehyde oxidase の薬物代謝活性について比較検討した。

II. 各種ラット肝サイトソール画分における aldehyde oxidase 活性

12 系統の 5 週令雄性ラットを用い、肝サイトソール画分における benzaldehyde 酸化活性を比較した。その結果、最も高い活性を示した Sea:SD と最も低い活性の WKA/sea の間で、63.5 倍の著しい活性の系統差が認められた (Figure8)。

更に、12 系統間で、本酸化活性の著しい差違が認められ、高活性の 1 種 (Sea:SD)、中活性の 5 種 (WKY、Wistar Imamichi、Jcl:Wistar、Sea:Wistar、Jcl:SD) そして低活性の 6 種 (Std:Wistar/ST、LEW/Sea、WKAH/Sea、WKA/Sea、Slc:SD、F344/NSlc) に大まかに分類された (Figure8)。

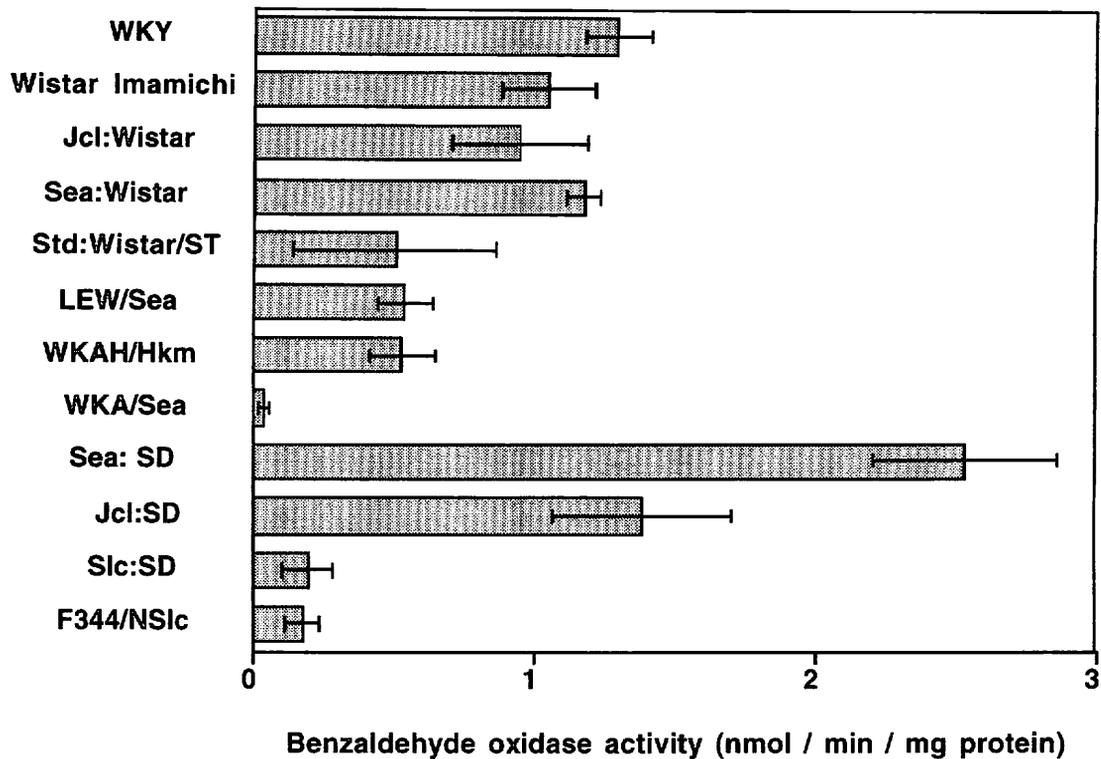


Figure 8. 12系統のラット肝サイトソール画分における benzaldehyde 酸化活性

また、2-hydroxypyrimidine および phthalazine 酸化活性を測定し、benzaldehyde酸化活性との関係を調べたところ、それぞれ、 $r=0.984$ 、 $r=0.963$ と高い相関性が認められた (Figure 9a および 9b)。

次に、各ラット肝サイトソール画分における薬物還元活性として、2-hydroxypyrimidine 依存性の imipramine *N*-oxide 還元活性および NNO 還元活性を調べた。その結果、それらの活性も benzaldehyde酸化活性との相関関係が $r=0.940$ および $r=0.929$ となり、それぞれよく相関した (Figure 10)。

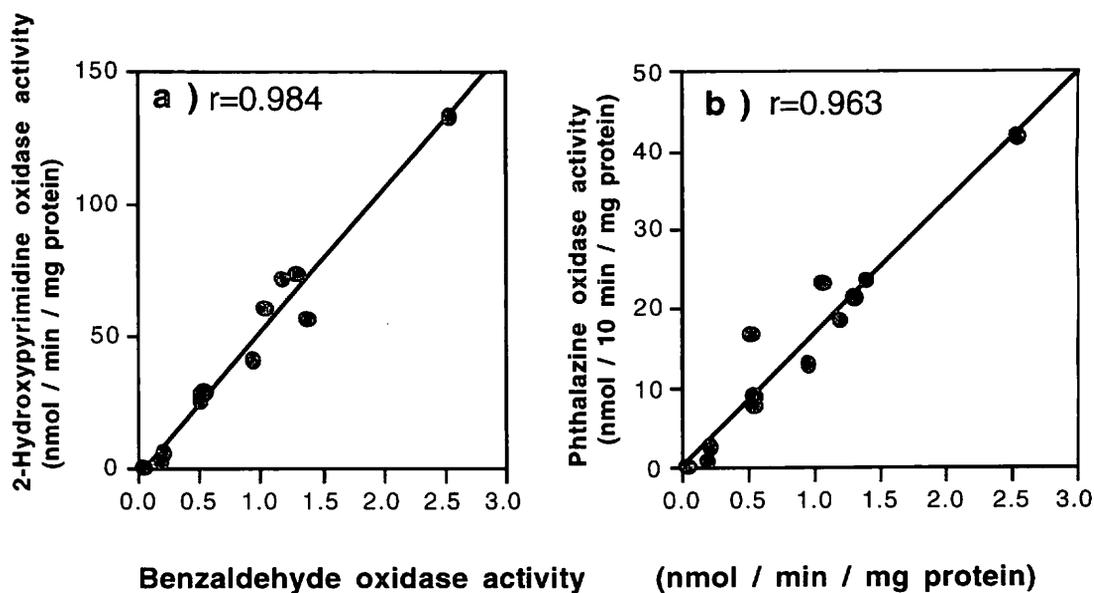


Figure 9. 12系統のラット肝サイトソール画分における benzaldehyde 酸化活性と 2-hydroxypyrimidineあるいは phthalazine 酸化活性との相関

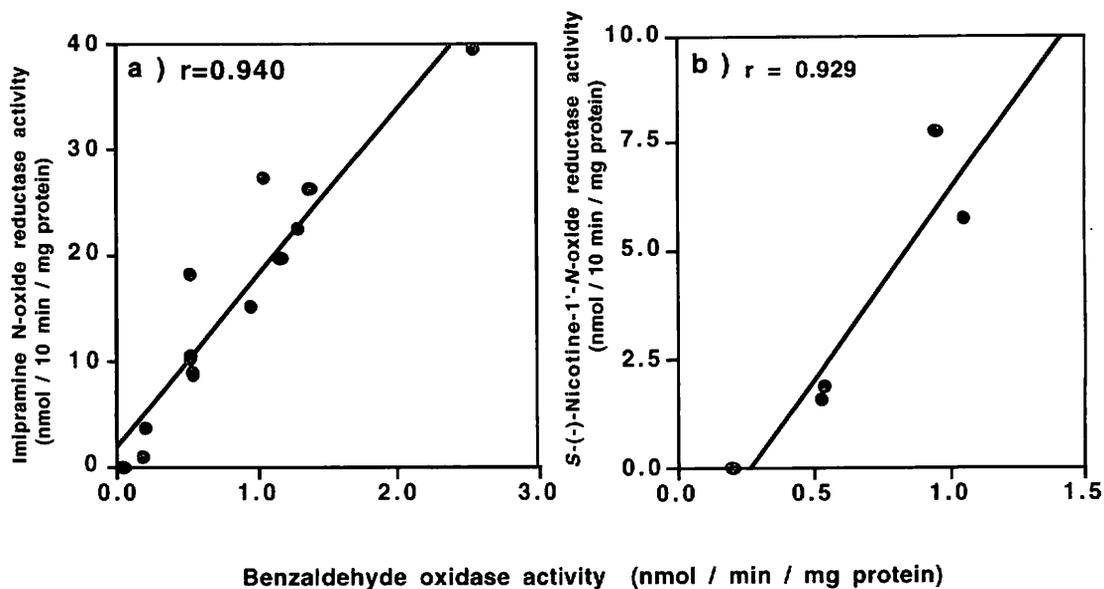


Figure 10. 各種系統ラット肝サイトソール画分における benzaldehyde 酸化活性と imipramine N-oxide あるいは S-(-)-nicotine-1'-N-oxide 還元活性との相関

さらに、これらラットにおける ZNS 還元活性を検討したところ、サイトソール画分の 2-hydroxypyrimidine 依存性の還元活性に著しい系統差が認められ、aldehyde oxidase 活性と相関した。一方、肝ミクロソーム画分の NADPH 依存性還元活性には、あまり大きな系統差が認められなかった (Table 14)。

Table 14. 各種系統ラット肝ミクロソームおよびサイトソール画分における zonisamide 還元活性

Strain	2-Sulfamoylacetylphenol formed (nmol / 10 min / g liver)	
	Microsomes ^a	Cytosol ^b
Sea:SD	61.2 ± 8.1	584.8 ± 91.7
Slc:SD	54.0 ± 1.4	10.8 ± 4.1
Wistar Imamichi	54.1 ± 6.3	340.9 ± 36.0
Jcl:Wistar	83.1 ± 3.5	251.9 ± 46.9
Std:Wistar/ST	107.0 ± 15.6	170.8 ± 14.7
WKA/Sea	66.5 ± 8.8	2.0 ± 0.2
F344/NSlc	48.6 ± 1.5	2.2 ± 0.5

各値は 4 例の平均値 ± SD。

^a NADPH 存在下で反応。

^b 2-hydroxypyrimidine 存在下で反応。

III. 各種ラット肝サイトソール画分における **xanthine oxidase** 活性

Xanthine oxidaseは aldehyde oxidaseの類似酵素である。各系統のラット肝サイトソール画分における xanthine oxidase の活性を測定した。その結果、本酵素活性にも系統差が認められたが、それは前述の aldehyde oxidase 活性の系統差ほど顕著ではなかった (Figure 11)。

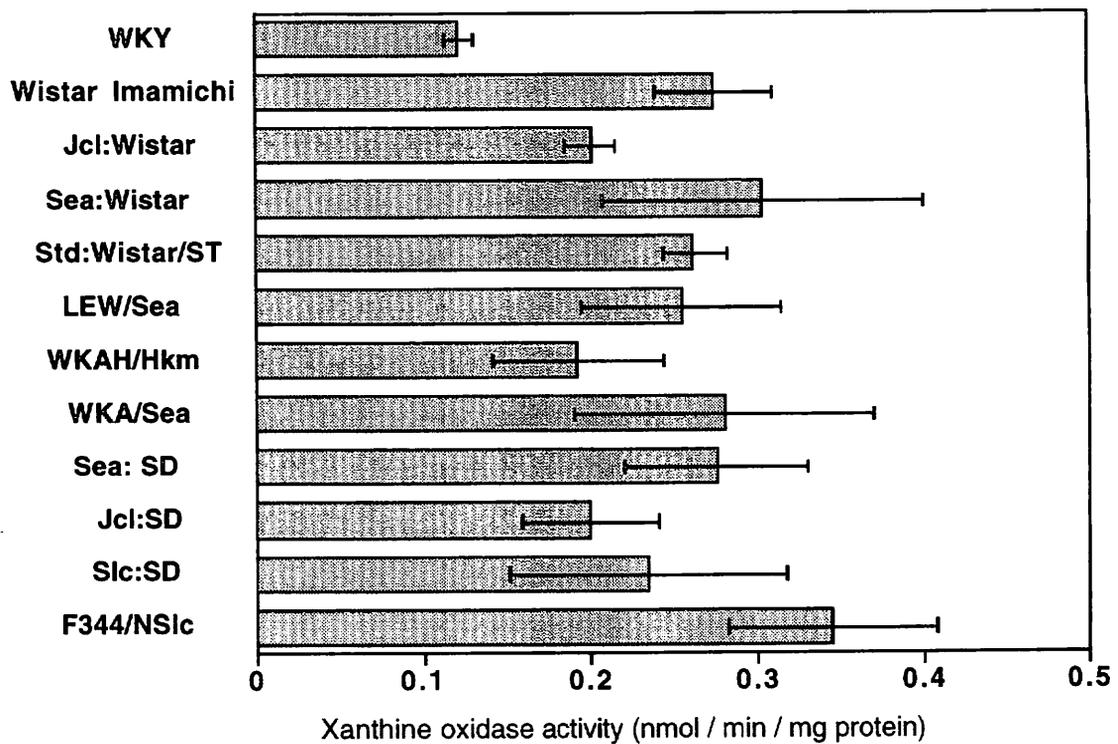


Figure 11. 12系統ラット肝サイトソール画分における **xanthine oxidase** 活性

IV. 酵素反応速度論的解析および Western blot 解析

5種の系統 (Jcl:Wistar、Std:Wistar/ST、Sea:SD、Jcl:SD、Slc:SD) のラット肝サイトソールを用いて、aldehyde oxidase の benzaldehyde に対する K_m 値を求めたところ、いずれの系統のラットからもほぼ同じ値が得られた (Table 15)。また、これら肝サイトソール画分につき Western blot 解析を行った結果、各バンドの相対濃度は、先の aldehyde oxidase 活性の系統差にほぼ一致した (Table 15)。

Table 15. 各種系統ラット肝サイトソール画分における benzaldehyde 酸化活性の K_m 値および Western blot 解析

Strain	K_m ^a (μ M)	Relative density of bands ^b in Western blot analysis (ratio)
Jcl:Wistar	27.0	21.7
Std:Wistar/ST	30.1	21.6
Sea:SD	37.8	30.6
Jcl:SD	31.8	22.5
Slc:SD	37.8	1.0

a K_m 値はLineweaver-Burkプロットにより求めた。

20 mg 肝相当のサイトソール画分を使用して、benzaldehyde濃度18, 30, 60, 90 および 120 μ Mで反応。

b Western blot 解析の結果は、NIH image (v. 1.54) を用いて測定。

考 察

Aldehyde oxidase (EC 1.2.3.1)は、モリブデン含有フラビン酵素で、xanthine oxidase (EC 1.2.3.2)、xanthine dehydrogenase (EC 1.2.1.37)と共に、molybdenum hydroxylaseと呼ばれている^{21, 22)}。

これらのうち、xanthine oxidaseは、xanthine dehydrogenaseが精製途中、SH基の酸化、プロテアーゼの影響によって dehydrogenase 活性を失ったもので、生体内ではほとんど xanthine dehydrogenase の形で存在していることが証明されている²³⁾。これら酵素は哺乳動物の各組織内に広く分布し、細胞内では細胞質に存在しており、発生学的には、腔腸類をはじめ *Drosophila melanogaster* など多くの動物で見出されている²⁴⁾。また、最近植物組織からも aldehyde oxidaseが精製されており、植物ホルモンである indole aldehydeの酸化に働いていると考えられている²⁵⁾。Aldehyde oxidase 活性を組織別にみると、肝臓で最も高く、次いで腎臓、肺などの順となる²¹⁾。本酵素の生理的働きは、いまだ明らかにされておらず、数例報告されている本酵素欠損症の患者においても重篤な症状は見られていない²⁶⁾。

Aldehyde oxidase の分子量は約 30 万であって、分子量約 15 万のサブユニットの二量体である。サブユニットあたり、Mo が 1 個、フェレドキシンタイプの Fe-S cluster が 2 個、そして FAD が 1 分子が含まれており、xanthine dehydrogenase と分子量、補欠分子族、分子内電子伝達機構などの点で、非常に類似した酵素である²⁷⁾。両酵素ともプリン、プテリン類などの含窒素複素環化合物やアルデヒド類を水酸化し、基質特異性は非常に広い。しかし、両酵素間での基質特異性の違いは大きい。例えば、xanthine dehydrogenase は hypoxanthine を xanthine に、さらに uric acid へと酸化し、プリンヌクレオチド分解系に関わっていることが有名であるが、aldehyde oxidase の xanthine に対する K_m 値は大きく、この酸化反応はほとんど行わない。

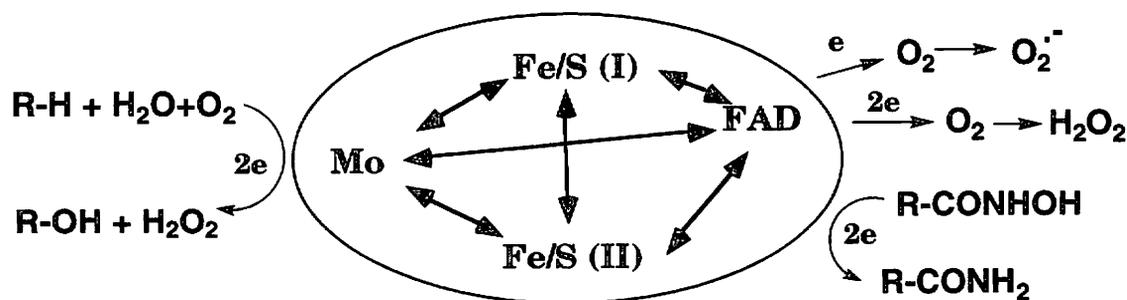


Figure 12. Aldehyde oxidase の酵素分子内および分子外電子伝達機構

Figure 12. に aldehyde oxidase の酸化還元反応と分子内電子伝達について図示した。Aldehyde oxidase はアルデヒド類や含窒素複素環化合物などの薬物を、Mo と Mo コファクターと呼ばれるプテリン誘導体が結合した部分で酸化する²²⁾。この反応では求核的に水の酸素が基質に取り込まれる²⁸⁾。酸化によって酵素にとりこまれた電子は、酸化還元電位差などの関連で、酵素内の2つの Fe/S あるいは FAD へと移動して行く²⁹⁾。これにより、再び Mo 部分は酸化状態となり、つぎの基質を酸化し得るようになる。この酸化反応は、酸素を用いて親電子的に薬物を酸化する cytochrome P450 と全く異なる。また、薬物還元反応は主に FAD 部分で行われていると言われており、還元型 FAD より一電子ずつ基質に受け渡されると考えられている。基質としてはこれまでに、*N*-オキシド³⁰⁾、スルホキシド³¹⁾、ニトロ化合物³²⁾ などの還元を触媒することが明らかにされている。この還元反応は酸素によって阻害される。これは酸素存在下では酸素が aldehyde oxidase から先に電子を受け取るためと考えられている。また、aldehyde oxidase には NAD^+ を NADH に還元する活性はない。

本研究においては、aldehyde oxidase の薬物還元酵素としての機能について精査した。これまで、ヒドロキサム酸のアミド体への還元的代謝反応に関与する酵素(系)に関しては、筆者らの研究室で見出したウサギ肝 N-HAAF 還元酵素以外はほとんど知られていなかった⁵⁾。この N-HAAF 還元酵素は、分子量は約 34,000 で、cystein、glutathione、dithiothreitol、2-mercaptoethanol のような SH 化合物や、 NADPH 、 NADH を電子供与体とし、酸素による阻害を受けない。また、基質特異性が高く、N-HAAF には高い還元活性を示すが、

N-HAAB に対しての活性は弱く、N-HP はほとんど還元せず、さらに芳香族および複素環ヒドロキサム酸も還元しないという特徴がある。本研究では、N-HAAF 還元酵素以外のヒドロキサム酸還元酵素の検索を試み、肝サイトソール画分に存在する aldehyde oxidase が芳香族、複素環および N-アリル脂肪族の各種ヒドロキサム酸に対し、広く還元酵素として機能し得ることを明らかにした。基質特異性、電子供与体、酸素感受性などに関して、これらのヒドロキサム酸還元酵素は異なった性質を有する。Aldehyde oxidase によって触媒される本還元反応は、特に毒性、発癌性の高い N-アリル脂肪族ヒドロキサム酸 N-HAAF、N-HAAB および N-HP に対して、重要な解毒的代謝反応となる。

Nicotine の主要代謝物の一つに、肝ミクロゾーム画分の FAD-containing monooxygenase によって生成される nicotine-1'-N-oxide(NNO)がある³³⁾。本研究では、肝 aldehyde oxidase が、NNO の nicotine への還元反応を触媒し得ることを明らかにした。この還元反応は、生体内で解毒的代謝を受けた NNO が再び毒性の高い nicotine に戻ることを意味し、一種の代謝活性化とも考えられる。Aldehyde oxidase と類似する酵素である xanthine oxidase も xanthine のような電子供与体存在下で NNO 還元活性を示したが、aldehyde oxidase の活性よりはるかに低かった。Aldehyde oxidase は本還元反応以外に、nicotine から cotinine への酸化反応にも関わっており、nicotine 代謝において非常に重要な酵素であると言える。

抗てんかん薬 zonisamide (ZNS) の 2-sulfamoylacetylphenol への還元的代謝に、aldehyde oxidase が関与していることを明らかにした。本還元反応には、肝ミクロソーム画分中の cytochrome P450 系の関与も報告されているが、ウサギ、ハムスター、マウスおよびモルモット肝では、cytochrome P450 系による活性より、aldehyde oxidase による活性の方が高いという結果を得た。また、これらの動物中では、ハムスターにおいて著しく高い aldehyde oxidase 依存性の還元活性が認められ、本還元活性に著しい種差が存在することが明らかになった。この ZNS 還元機構として、オキシムの還元と同様に、まず ZNS が酵素的にイミノ体に還元され、その後イミノ体が加水分解され、2-sulfamoylacetylphenol とアンモニアが生成するという機構を提唱した。

ラット肝 aldehyde oxidase 活性には著しい系統差が存在することを、12 系統のラットを用いて確認した。これに対し、xanthine oxidase 活性では、このような著しい系統差は認められなかった。本系統差の原因としては、酵素の質的な違いと、量的な違いが考えられる。これまでに、C57B1/6J と C58/J のマウスにおける aldehyde oxidase の系統差が、酵素の質的な差異に起因するという報告がある¹⁹⁾。これに対して、本研究で見出したラットにおける系統差は、1) ラット系統間での benzaldehyde 酸化活性の K_m 値にほとんど差が認められない。2) Western blot 解析により、系統により発現している酵素タンパク質の量が異なることが確認された。3) 阻害剤などによる影響が変わらない。ということより、酵素の質的相違ではなく、その発現量の違いが反映した結果であることが示唆された。本研究で用いた 12 系統のラットは、aldehyde oxidase 活性で高中低の 3 グループに分類することができる。また、データには示していないが性差はほとんど認められなかったことより、常染色体上の遺伝子によるメンデル型の遺伝が予測された。この点に関しては、F1 の作成など、現在検討中である。このラットにおける系統差は、主に aldehyde oxidase によって代謝される薬物の薬理学的試験あるいは代謝研究に有用であると考えられる。

本研究では、aldehyde oxidase による新たな薬物の還元活性を見出した。aldehyde oxidase は基質特異性の幅が広く、多くの薬物に還元活性を示す。Aldehyde oxidase 以外にも近年、 α,β -ketoalkene double bond reductase³⁴⁾、15-ketoprostaglandin Δ^{13} -reductase³⁵⁾、*N*-hydroxy-2-actylaminofluorene reductase⁵⁾、methyl sulfoxide reductase³⁶⁾などが薬物還元酵素として見出されている。

結論

第1章

芳香族ヒドロキシ酸 (SHA、AHA、BHA)、複素環ヒドロキシ酸 (NHA) およびN-アリル脂肪族ヒドロキシ酸 (N-HAAF、N-HAAB、N-HP)を、相当するアミド体へ還元する反応に関与する酵素の検索を行った。その結果、肝サイトソール画分において、aldehyde oxidaseの電子供与体によって著しい還元活性が発現すること、この活性は aldehyde oxidase の特異的阻害剤で阻害されること、およびウサギ肝より精製した aldehyde oxidase が著しく高いヒドロキシ酸還元活性を有していることなどより、aldehyde oxidaseがヒドロキシ酸還元酵素として働き得ることを明らかにした。また、各種間での aldehyde oxidase 依存性のヒドロキシ酸還元活性を比較したところ、ハムスター>ウサギ、モルモット>>ラット、マウスの順であった。

第2章

S-(-)-Nicotine-1'-N-oxide の nicotine への還元反応をラットを用いて精査したところ、肝サイトソール画分において aldehyde oxidase 依存性の高い還元活性が認められた。ラット肝より精製した aldehyde oxidase でも本活性が認められることより、肝 aldehyde oxidase が本還元反応を触媒し得ることが明らかとなった。

第3章

ZNS の主要代謝物 2-sulfamoylacetylphenol への代謝には、肝サイトソール画分の aldehyde oxidase が関与していることを明らかにした。肝ミクロソーム画分中の cytochrome P450 系による活性より、aldehyde oxidase 依存性の活性の方が著しく高いことが確認された。また、種差を調べたところ、ハムスターで最も高い活性が得られ、次いでマウス、モルモットの順であった。ウサギおよびラット肝より精製した酵素を用いて反応速度論的解析を行ったところ、

それぞれ K_m 値が 217、542 μM 、 V_{max} 値が 42、382 nmol/10 min/mg protein であった。Aldehyde oxidase による ZNS 還元反応により、等量の 2-sulfamoylacetylphenol とアンモニアが生成することから、本反応機構はまず ZNS がイミノ体に酵素的に還元され、その後加水分解により 2-sulfamoylacetylphenol とアンモニアが生成することを提唱した。

第4章

12 系統のラットにおいて肝 aldehyde oxidase 活性に著しい系統差が存在することを見出した。この系統差は、基質特異性、反応速度論的解析および Western blot 解析の結果より、酵素自体の相異ではなく、酵素発現量の差によることが示唆された。また、類似酵素である xanthine oxidase では、このような系統差はほとんど認められなかった。

論文の基礎となる原著

1. Sugihara, K., Kitamura, S. and Tatsumi, K., Evidence for reduction of hydroxamic acids to the corresponding amides by liver aldehyde oxidase, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3366-3369 (1983)
2. Sugihara, K. and Tatsumi, K., Participation of liver aldehyde oxidase in reductive metabolism of hydroxamic acids to amides, *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 289-293 (1986)
3. Kitamura, K., Sugihara, K. and Tatsumi, K., Reductase activity of aldehyde oxidase toward the carcinogen *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene and the related hydroxamic acids, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **34**, 1197-1203 (1994)
4. Sugihara, K., Kitamura, S. and Tatsumi, K., *S*-(-)-Nicotine-1'-*N*-oxide reductase activity of rat liver aldehyde oxidase, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **40**, 535-541 (1996)
5. Sugihara, K., Kitamura, S. and Tatsumi, K., Involvement of mammalian liver cytosols and aldehyde oxidase in reductive metabolism of zonisamide, *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 199-202 (1996)
6. Sugihara, K., Kitamura, S. and Tatsumi, K., Strain differences of liver aldehyde oxidase activity in rats, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **37**, 861-869 (1995)

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました
広島大学医学部総合薬学科 辰巳 淳教授に、厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、有益かつ的確な御教示と御助言を賜りました広島大学
医学部総合薬学科 北村繁幸助教授に心から御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり御助言御協力を頂きました広島大学医学部総合薬学科
吉原新一助教授に深く感謝いたします。

本論文の作成にあたり有益な御助言と御校閲を頂きました広島大学医学部総
合薬学科 石橋貞彦教授並びに木村榮一教授に深謝致します。

ラット系統差の研究を行うにあたって御助言、各種資料を頂きました成和実
験動物研究所 浜田佑二博士に心から感謝致します。

本研究を行うにあたって、御協力を頂きました広島大学医学部総合薬学科
社会薬学講座の方々に深く感謝致します。

実験の部

第 1 章の実験

1. 試薬

Salicylhydroxamic acid (SHA)、benzohydroxamic acid (BHA)、2-hydroxypyrimidine、*N*¹-methylnicotinamide、benzaldehyde および butyraldehyde は東京化成 (株) より購入。Anthranilhydroxamic acid は、Bernheim らの方法⁴⁾、nicotinohydroxamic acid (NHA) は Anderson らの方法³⁷⁾、*N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene (N-AAF) は Creamer らの方法³⁸⁾、*N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl (N-HAAB) は Miller らの方法³⁹⁾、そして *N*-hydroxyphenacetin (N-HP) は Hinson らの方法⁴⁰⁾ で合成した。

2. 動物

雄性白色ウサギ (2.2-3.4 kg)、ゴールデンハムスター (90-140 g)、ハートレイ系モルモット (290-410 g)、ウイスター系ラット (270-380 g)、ddY系マウス (20-25 g) を使用した。

3. 肝画分の調製

肝ミクロゾームおよびサイトソール画分は、以下の方法で調製した。肝を 4 倍量の 1.15% KCl 中でホモジナイズし、9,000 x g、20 min 遠心分離。その上清を更に 105,000 x g、60 min 遠心分離し、そこで得た上清をサイトソール画分とした。また、沈殿を 1.15% KCl で 1 回洗浄し、同じ KCl 溶液に溶解したものをミクロゾーム画分とした。ミトコンドリア画分は Kaufman らの方法⁴¹⁾ で調製した。ウサギ肝 aldehyde oxidase は Rajagopalan らの方法⁶⁾ で精製した。

4. ヒドロキサム酸の還元反応

基質、電子供与体および肝酵素を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中、ツンベルグ管を用いて、嫌氣的条件下 37°C で反応後、5N NaOH を加えて反応止め、内部標準物質を加えた後、5 倍量の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を分取し、減圧下で蒸発乾固した後、少量の methanol に溶解し、HPLC にて還元生成物を測定した。

5. HPLC 条件

a) SHA、BHA、AHA

カラム : LS-410K (東洋曹達 (株) 、 300 x 4 mm)

溶離液 : 0.1 M KH₂PO₄ : acetonitrile (4 : 1)

流速 : 1.2 ml / min

検出波長 : 254 nm

保持時間 : salicylamide 8.5 min 、 benzamide 3.8 min 、
anthranilamide 5.6 min

b) NHA

カラム : M & S Pack C18 (エムエス機器、150 x 4.6 mm)

溶離液 : methanol : H₂O (1 : 9)

流速 : 1.1 ml / min

検出波長 : 254 nm

保持時間 : nicotinamide 6.3 min

c) N-HAAF、N-HAAB

カラム : M & S Pack C18 (エムエス機器、150 x 4.6 mm)

溶離液 : acetonitrile : H₂O (1 : 1)

流速 : 0.7 ml / min

検出波長 : 254 nm

保持時間 : 2-acetylaminofluorene 9.2 min 、
4-acetylaminobiphenyl 8.7 min

d) N-HP

カラム : M & S Pack C18 (エムエス機器、150 x 4.6 mm)

溶離液 : acetonitrile: H₂O (3 : 7)

流速 : 0.7 ml / min

検出波長 : 254 nm

保持時間 : phenacetin 7.0 min

6. タンパク定量

標準品として BSA を用い、Lowry らの方法⁴²⁾に従って測定した。

第 2 章の実験

1. 試薬

S-(-)-Nicotine は東京化成から購入。S-(-)-Nicotine-1'-N-oxide は Brandäge らの方法⁴³⁾で合成。*trans* 体と *cis* 体 (75:25) の混合物を使用。

2. Benzaldehyde 酸化活性の測定

Johns らの方法⁴⁴⁾を用いて測定。

日立自記分光光度計 320 型を用い、165 mM K-Na phosphate buffer (pH 7.8) 中、25℃で 249 nm における benzaldehyde の減少を測定。

3. S-(-)-Nicotine-1'-N-oxide 還元活性の測定

嫌氣的反応は、第 1 章ヒドロキサム酸の還元反応に準じて行った。反応終了後、2 倍量の acetonitrile を加え遠心分離、上清の一部を HPLC に付し、還元代謝物 (-)-nicotine を定量した。

4. HPLC 条件

カラム : Licrospher 100 NH₂ (Cica-Merck、125 x 4 mm)

溶離液 : ethanol : methanol : 10 mM NH₄H₂PO₄ (20 : 10 : 3)

流速 : 0.5 ml/min

検出波長 : 254 nm

保持時間 : nicotine 7.7 min、nicotine-1'-N-oxide 9.4 min

5. ラット肝画分の調製

第1章 3. 肝画分の調製に準じて行った。

ラット肝 aldehyde oxidase は Ohkubo らの方法⁸⁾で精製した。

第3章の実験

1. 試薬

Zonisamide(ZNS) および 2-sulfamoylacetylphenol は大日本製薬(株)より
供与。1,2-Benzisoxazole は東京化成より購入。

2. 肝画分の調製

第1章、第2章の方法に準じて行った。

ウサギ肝 aldehyde oxidase は、Felsted らの方法¹⁵⁾で精製。

3. ZNS および 1,2-benzisoxazole還元活性の測定

還元反応は、第2章 S-(-)-nicotine-1'-N-oxide 還元活性の測定に準じて行っ
た。還元活性はそれぞれの還元代謝物 2-sulfamoylacetylphenol および
salicylaldehyde を HPLC で測定して定量した。

4. HPLC 条件

a) ZNS

カラム : Inertsil ODS-2 (GL Sciences、125 x 4 mm)

溶離液 : acetonitrile : 0.1 M KH₂PO₄ (4 : 6)

流速 : 0.5 ml/min

検出波長 : 254 nm

保持時間 : 2-sulfamoylacetylphenol 8.9 min、ZNS 9.9 min

b) 1,2-Benzisoxazole

カラム : Licrospher Select B (Cica-Merck、125 x 4 mm)

溶離液 : acetonitrile : 0.1 M KH₂PO₄ (4 : 6)

流速 : 0.5 ml/min

検出波長 : 254 nm

保持時間 : salicylaldehyde 5.6 min、1,2-benzisoxazole 7.9 min

5. アンモニア生成量の測定

Fergusonらの方法⁴⁵⁾で測定。α-Ketoglutaric acid 存在下、NH₄⁺が、glutaric dehydrogenaseによって、glutaric acid に変換されるとき NADH の消費量を分光光度計で測定し、定量した。

第4章の実験

1. 動物

12系統の5週令雄性ラットを使用した。

Std:Wistar/ST、WKAH/HKm、Slc:SD および F344/NSlc は日本エスエルシー（株）より購入。Jcl:Wistar および Jcl:SD は、日本クレア（株）より購入。Sea:SD、Sea:Wistar、LEW/Sea および WKA/Sea は成和実験動物（株）より購入。WKY は星野実験動物（株）より購入。Wistar Imamichi はイマミチ実験動物（株）より購入。

2. 肝画分の調製

第1章 の方法に準じて行った。

3. 肝サイトソール画分の酸化活性

a) Benzaldehyde酸化活性の測定

第2章 2.の方法に準じて行う。

b) 2-Hydroxypyrimidine酸化活性

Yoshihara らの方法 ⁴⁶⁾を用いて測定。日立自記分光光度計 320 型を用い、100 mM K-Na phosphate buffer (pH 7.4)中、25℃での uracil の生成を 259 nm で測定。

c) Xanthine oxidase 活性

Hunt らの方法 ⁴⁷⁾を用いて測定。0.1 M pyrophosphate buffer (pH 8.3) 中、25℃での尿酸の生成を 295 nm で測定。

d) Phthalazine酸化活性

Phthalazineと肝サイトソール画分を 100 mM K-Na phosphate buffer (pH 7.4)中、37℃10 分反応後、5 倍量の酢酸エチルで抽出。酢酸エチル層を減圧乾固後、少量の methanol に溶解し HPLC に付し、酸化代謝物 1-phthalazone を定量して測定した。

HPLC 条件

カラム : Licrospher 100 NH₂ (Cica-Merck、125 x 4 mm)

溶離液 : acetonitrile

流速 : 0.5 ml / min

検出波長 : 254 nm

保持時間 : 1-phthalazone 6.5 min、phthalazine 9.2 min

4. 還元活性の測定

Imipramine *N*-oxide還元活性は、第2章 *S*-(-)-nicotine-1'-*N*-oxide還元活性の測定に準じて測定。還元生成物 imipramine を HPLC にて定量。

HPLC 条件

カラム : Inertsil ODS-2 (GL Sciences、125 x 4 mm)

溶離液 : acetonitrile:0.1 M KH₂PO₄ (3 : 7)

流速 : 0.65 ml/min

検出波長 : 254 nm

保持時間 : imipramine 22.5 min、 imipramine *N*-oxide 26.0 min

5. Polyclonalウサギ抗ラット aldehyde oxidase 抗体の調製

ラット(Wistar Imamichi)より精製した aldehyde oxidase (0.1 mg protein/ml) を Freund's complete adjuvant 等量と混合し、雌性白色ウサギ前足に皮下注射で免疫し、2週間後、抗ラット aldehyde oxidase 抗体を含む血清を得た。血清は使用まで-80℃で保存した。

6. ラット肝 aldehyde oxidase の Western blot 解析

各ラット肝サイトソール (5 mg protein) を 7.5% SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写、5.で作成した抗血清 (200 倍希釈) で一夜インキュベート後洗浄。二次抗体 goat anti-rabbit IgG-HRP (第一化学 (株)) とインキュベート後、diaminobenzidineと過酸化水素で発色させた。発現したバンド像は、スキヤナー (Hewlett Packard Scanjet II) を用いてコンピューター (Macintosh Quadra 700) に取り込み、NIH Image (version 1.54) で測定した。

引用文献

- 1) Munson, J. W., *in* Chemistry and Biology of Hydroxamic Acids (Karger, A. Ed.), pp 1-13, Academic Press, New York (1982)
- 2) Lowenthal, J., Enzymatic conversion of salicylhydroxamic acid to salicylamide, *Nature*, **174**, 36-37 (1954)
- 3) Hirsch, P. F., Kaplan, N. O., The conversion of pyridine hydroxamic acid to amide by mouse liver mitochondria, *J. Biol. Chem.* , **236**, 926-930 (1961)
- 4) Bernheim, M. L., Metabolism of anthranilic hydroxamic acid by rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.* , **112**, 191-195 (1965)
- 5) Kitamura, S., Tatsumi, K., Purification of *N*-hydroxy-2-acetylaminofluorene reductase from rabbit liver cytosol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **133**, 67-74 (1985)
- 6) Rajagopalan, K. V., Fridovich, I., Handler, P., Hepatic aldehyde oxidase, *J. Biol. Chem.*, **237**, 922-928 (1962)
- 7) Kyerematen, G. A., Vesell, E. S., Metabolism of nicotine, *Drug Metab. Rev.* , **23**, 3-41 (1991)
- 8) Ohkubo, M., Sakiyama, S., Fujimura, S., Purification and characterization of *N*¹-methylnicotinamide oxidase I and II separated from rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.* , **221**, 534-542 (1983)

- 9) Ito, T., Yamaguchi, H., Sekine, Y., Shimizu, S., Ishida, S., Yagi, K., Nakegawa, N., Seino, M., Wada, T., Pharmacokinetic studies of AD-810, a new antiepileptic compound, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* , **32**, 1581-1586 (1982)
- 10) Stiff, D. D., Zemaitis, M. A., Metabolism of the anticonvulsant agent zonisamide in the rat, *Drug Metab. Dispos.* , **18**, 888-894 (1990)
- 11) Stiff, D. D., Robicheau, J. T., Zemaitis, M. A., Reductive metabolism of the anticonvulsant agent zonisamide, a 1,2-benzisoxazole derivative, *Xenobiotica* , **22**, 1-11 (1992)
- 12) Nakasa, H., Komiya, M., Ohmori, S., Kitada, M., Rikihisa, T., Kanakubo, Y., Formation of reductive metabolite, 2-sulfamoylacetylphenol, from zonisamide in rat liver microsomes, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* , **77**, 31-41 (1992)
- 13) Nakasa, H., Komiya, M., Ohmori, S., Rikihisa, T., Kitada, M., Rat liver microsomal cytochrome P-450 responsible for reductive metabolism of zonisamide, *Drug Metab. Dispos.* , **21**, 777-781 (1993)
- 14) Nakasa, H., Komiya, M., Ohmori, S., Rikihisa, T., Kiuchi, M., Kitada, M., Characterization of human liver microsomal cytochrome P450 involved in the reductive metabolism of zonisamide, *Mol. Pharmacol.* , **44**, 216-221 (1993)
- 15) Felsted, S. L., Chu, A. E.-Y., Chaykin, S., Purification and properties of the aldehyde oxidase from hog and rabbit livers, *J. Biol. Chem.* , **248**, 2580-2587 (1973)
- 16) Tatsumi, K., Ishigai, M., Oxime-metabolizing activity of liver aldehyde oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* , **253**, 413-418 (1987)

- 17) Tanaka, S., Matsuzawa, A., The history of the "*deutsche Maus*", the origin of the dd mouse group, *Exp. Anim.* , **39**, 141-153 (1990)
- 18) 山田淳三, Wistar 研究所のラットコロニー及びわが国に導入された Wistar ラット, 第 37 回日本実験動物学会講演要旨集, 42 (1990)
- 19) Huff, S. D., Chaykin, S., Genetic and androgenic control of N¹-methylnicotinamide oxidase activity in mice, *J. Biol. Chem.* , **25**, 1265-1270 (1967)
- 20) Stanulović, M., Chaykin, S., Aldehyde oxidase : Catalysis of the oxidation of N¹-methylnicotinamide and pyridoxal, *Arch. Biochem. Biophys.* , **145**, 27-34 (1971)
- 21) Beedham, C., Molybdenum hydroxylases : Biological distribution and substrate-inhibitor specificity, *Drug Metab. Rev.* , **16**, 119-156 (1985)
- 22) Beedham, C., Molybdenum hydroxylases as drug-metabolizing enzymes, *Prog. Med. Chem.* , **24**, 85-459 (1987)
- 23) Corte, D. E., Stirpe, F., Regulation of xanthine oxidase in rat liver: modifications of the enzyme activity of rat liver supernatant on storage at 20 degrees, *Biochem. J.* , **108**, 349-351 (1968)
- 24) Krenitsky, T. A., Tuttle, J. V., Cattau, E. L. J., Wang, P., A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase, *Comp. Biochem. Physiol.* , **49B**, 687-703 (1974)
- 25) Koshiha, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N., Sato, M., Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleotiles of maize, *Plant Phys.* , **110**, 781-789 (1996)

- 26) Sebastian, R., Simmonds, H. A., Zöllner, N., Braun, S. L., Knedel, M., Demonstration of a combined deficiency of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in xanthinuric patients not forming oxipurinol, *Clinica. Chimica. Acta.* , **187**, 221-234 (1990)
- 27) Krenitsky, T. A., Neil, S. M., Elion, G. B., Hitchings, G. H., A comparison of the specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.* , **150** , 585-599 (1972)
- 28) George, G. N., Bray, R. C., Studies by electron paramagnetic resonance spectroscopy of xanthine oxidase enriched with molybdenum-95 and with molybdenum-97, *Biochemistry* , **27**, 3603-3609 (1988)
- 29) Porras, A. G in *Flavins and Flavoproteins*; (Palmer, G., Eds.), pp 810-820 Elsevier: New York (1987)
- 30) Kitamura, S., Tatsumi, K., Reduction of tertiary amine *N*-oxides by liver preparations: Function of aldehyde oxidase as a major *N*-oxide reductase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **121**, 749-754 (1984)
- 31) Tatsumi, K., Kitamura, S., Yamada, H., Sulfoxide reductase activity of liver aldehyde oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* , **747**, 86-92 (1983)
- 32) Tatsumi, K., Kitamura, S., Narai, N., Reductive metabolism of aromatic nitro compounds including carcinogens rabbit liver preparations, *Cancer Res.* , **46**, 1089-1093 (1986)
- 33) Damani, I. D., Pool, W. F., Crooks, P. A., Kaderlik, R. K., Ziegler, D. M., Stereoselectivity in the *N'*-oxidation of nicotine isomers by flavin-containing monooxygenase, *Mol. Pharmacol.* , **33**, 702-705 (1988)
- 34) Kitamura, S., Tatsumi, K., Purification of NADPH-linked α,β -ketoalkene double bond reductase from rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.* , **282**, 183-187 (1990)

- 35) Westbrook, C., Jarabak, J., 15-Ketoprostaglandin Δ^{13} -reductase from placenta: Purification, kinetics, and inhibitor binding, *Arch. Biochem. Biophys.* , **185**, 429-442 (1978)
- 36) Fukazawa, H., Tomisawa, H., Ichihara, S., Tateishi, M., Purification and properties of methyl sulfoxide reductases from rat kidney., *Arch. Biochem. Biophys.* , **256**, 480-489 (1987)
- 37) Anderson, B. M., Ciotti, C. J., Kaplan, N. O., Chemical properties of 3-substituted pyridone analogues of diphosphopyridine nucleotide, *J. Biol. Chem.* , **234**, 1219-1225 (1959)
- 38) Creamer, J. W., Miller, J. A., Miller, E. C., *N*-Hydroxylation: A new metabolic reaction observed in rat with the carcinogen 2-acetylaminofluorene, *J. Biol. Chem.* , **235**, 885-888 (1960)
- 39) Miller, J. A., Wyatt, C. S., Miller, E. C., Hartmann, H. A., The *N*-hydroxylation of 4-acetylaminobiphenyl by rat and dog and the strong carcinogenicity of *N*-hydroxy-4-acetylaminobiphenyl in the rat, *Cancer Res.* , **21**, 1465-1473 (1961)
- 40) Hinson, J. A., Mitchell, J. R., *N*-Hydroxylation of phenacetin by hamster liver microsomes, *Drug Metab. Dispos.* , **4**, 430-435 (1976)
- 41) Kauffman, T. B., Kaplan, N. O., Mechanism of depletion of mitochondrial pyridinenucleotides, *Biochim. Biophys. Acta* , **39**, 332-342 (1960)
- 42) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randell, R. L., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biochem.* , **193**, 265-275 (1951)
- 43) Bandäge, S., Lindblom, L., The enzyme "aldehyde oxidase" is an iminium oxidase reaction with nicotine iminium ion, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , **91**, 991-996 (1979)

- 44) Johns, D. G., Human liver aldehyde oxidase : Differential inhibition of oxidation of charged and uncharged substrates, *J. Clin. Invest.* , **46**, 1492-1505 (1967)
- 45) Ferguson, D. A., Boyd, J. W., Phillips, A. W., Continuous assays of L-asparaginase by coupling with glutamic dehydrogenase, and by cationic glass electrode, *Anal. Biochem.* , **62**, 81-90 (1974)
- 46) Yoshihara, S., Tatsumi, K., Guinea pig liver aldehyde oxidase as a sulfoxide reductase: Its purification and characterization, *Arch Biochem. Biophys.* , **242**, 231-224 (1985)
- 47) Hunt, J., Massey, V., Purification and properties of milk xanthine dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* , **267** , 21479-21485 (1992)