

芳香族 *N*- ニトロソ化合物の NO 遊離能と DNA 切断活性NO-Release Ability and DNA-Damage Activity
of Aromatic *N*-Nitroso Compounds丹野雅幸[#]・末吉祥子・福原 潔・宮田直樹^{*}・奥田晴宏Masayuki Tanno[#], Shoko Sueyoshi, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata^{*}, Haruhiro Okuda

To develop a new nitric oxide-donor (NO-donor) that is useful for chemical and biochemical research, we synthesized several aromatic *N*-nitroso compounds including 1-[*N*-nitroso-*N*-(4-tolyl)carbamoyl] piperidine-4-carboxylic acid (1f) and phenyl(2-pyridyl)-*N*-nitrosamines, which spontaneously generate NO at ambient temperature. Thermal decomposition of these compounds was run under mild conditions. Gaseous NO released from them was quantified by means of the Griess reaction using a specially designed apparatus in which NO₂⁻ is generated from NO. The structure of products arose from the radical cleavage of N-NO bond was clarified by chemical and spectral studies. Generation of NO from the *N*-nitroso compounds was also confirmed by ESR spectroscopy. The action of these NO-releasing compounds against DNA was examined. When the pBR 322 DNA was treated with 1f at 37 °C for 3 h, the DNA single-strand breaks was 31 % for 1 mM of 1f. The denitrosated compound and sodium nitrite did not show any effective DNA-cleaving activity. On the other hand, aromatic *N*-nitrosamines induced weak DNA-cleaving activity under the same condition.

Keywords: NO-donor, *N*-nitrosourea, phenylpyridyl-*N*-nitrosamine, DNA-cleaving activity

緒言

N- ニトロソ化合物の N-NO 結合は酸触媒下ではイオンの容易に切断されるが、中性条件下では光や高温加熱によりラジカル的に切断されることが知られている。¹⁾ 我々は最近、Fig.1 に示すような芳香環を持つ *N*- ニトロソ化合物 (1-4) (1e, 3c, 4d を除く) が中性条件下室温でもラジカル的に N-NO 結合の解裂を起こし、一酸化窒素 (NO) を遊離することを見出した。それに対し脂肪族 *N*- ニトロソ化合物 (5, 6) は同一条件下ではラジカル解裂しないことを明らかにした。²⁾ さらに、芳香環を持つ *N*- ニトロソ化合物の N-NO 結合が温和な条件下で NO を与えるようにラジカル解裂しやすい原因は、*N*- ニトロソ化合物のコンホメーションに起因することを明らかにした。³⁾

本論文では生物学及び化学的に有用なNOドナーを開発する目的で水溶性芳香族 *N*- ニトロソ尿素類 (1f) や複素環 *N*- ニトロソアミン類 (4f-k) を合成し、その分解反応を検討すると共に、これらの *N*- ニトロソ化合物の NO 発生能とプラスミド DNA に対する作用を調べた。

[#] To whom correspondence should be addressed:

Masayuki Tanno; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext. 223;

E-mail: tanno@nihs.go.jp

^{*} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, 3-1 Tanabetori, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Tokyo, 467-0027 Japan

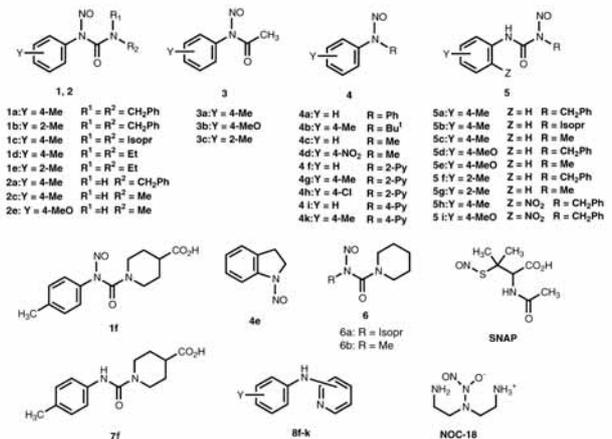


Fig.1 Structure of *N*-nitroso derivatives and related compounds

実験方法

1. 芳香族尿素 (7f) の合成

クロロホルム (CHCl₃) (70 ml) とジメチルスルホキシド (DMSO) (10 ml) の混合溶媒にイソニペコチン酸 (2.0 g, 16 mmol) を溶解し、4-トリルイソシアナート (2.4 g, 18 mmol) を徐々に加え、さらに、クロロホルムを加えて溶媒の全量を 90 ml とし、室温で 5 日間攪拌。反応液は黄色透明になる。TLC (シリカゲル薄層板, 展開溶媒はクロロホルム) で原料が残っているかどうかを確認。残ってい

ばさらに攪拌を続ける。生じた白色の固体をろ過して採取。得られた白色の固体をクロロホルムに溶解し、不溶物のジトリル尿素をろ過して除き、溶解物をクロロホルムで再結晶して針状晶の **7f** を得た。融点 130-131°C, 収率は 27%。スペクトルデータを Table 1 に示した。

2. 複素環アミン類 (8f-k) の合成

典型例として化合物 (8f) について示す。複素環アミン (8f) の合成: アニリン (2.8 g, 3 mmol) に 2-クロロピリジン (3.4 g, 3mmol) を加え, 150°C, 3 時間熱した。反応後, 氷水を加え, 炭酸水素ナトリウムでアルカリにする。エーテルで抽出。無水硫酸ナトリウムでエーテル溶媒を乾燥後, ろ過し, エーテル溶媒を減圧濃縮して褐色の固体アミン (8f) を 98% の収率で得た。他の複素環アミン類 (8g-k) も同様にして得た。NMR スペクトルデータを Table 1 に示す。なお, これらの化合物を得る際の抽出溶媒にはジクロロメタンを用いた。

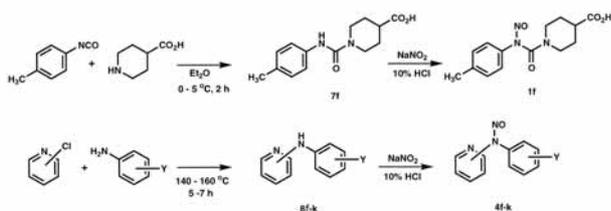


Fig.2 Syntheses of aromatic *N*-nitrosourea (**1f**) and *N*-nitrosamines (**4f-k**)

3. NO を遊離する *N*-ニトロソ化合物 (**1f**, **4f-k**) の合成

典型例として 1-[*N*-ニトロソ-*N*-(4-トリル)カルバモイル]ピペリジン-4-カルボン酸 (**1f**) とフェニル(2-ピリジル)-*N*-ニトロソアミン (**4f**) について示す (Fig. 2)。化合物 **1f** の合成: 芳香族尿素 (**7f**) (1.02 g, 3.9 mmol) を 99% ギ酸 5 ml に溶解させ 5°C 以下で, 激しく攪拌しながら亜硝酸ナトリウム (0.56 g, 8.0 mmol) を約 20 分間かけて徐々に加えると, 反応液は黄色になった。これを 30 分間冷却下で反応させた後, 氷片を加えると橙色油状物が生じた。この油状物を冷クロロホルムで抽出し, 氷水で洗浄水が酸性を呈さなくなるまで洗浄した。冷クロロホルム層をシリコン処理ろ紙 (silicone-treated filter paper (1 ps phase separators, Whatman Ltd.)) でろ過し, ろ液は冷却下で減圧濃縮した。収率は 58.6%。冷凍庫に保存。

化合物 **4f** の合成: 複素環アミン (**8f**) (0.31 g, 2.0 mmol) を 20% 塩酸 (15ml) に溶解した後, 冷却下で水 (10 ml) に溶かした亜硝酸ナトリウム (170 mg, 2.5 mmol) 溶液を加え, 0°C 下で攪拌し, 30 分間, 反応させた。冷水を加えた後, 炭酸水素ナトリウムで中和し, 冷時ジクロロメタンで抽出した。冷ジクロロメタン層をシリコン処理ろ紙 (silicone-treated filter paper (1 ps phase separators, Whatman Ltd.)) でろ過し, ろ液は冷却下で減圧濃縮した。残留物は冷エーテル

で再結晶。他のニトロソアミン類 (**4g-k**) も同様にして得た。NMR スペクトルデータを Table 1 に示した。なお, ¹³C-NMR は室温で測定したが, **4f-k** は速やかに操作することによりデータが得られた。しかし, **1f** の場合は測定中に一部分分解が認められた。

4. 化合物 **1f** と **4f** の分解反応と分解生成物の別途合成

化合物 **1f** の分解反応: **1f** (0.73 g, 2.5 mmol) をクロロホルム (100 ml) に溶かし, 37°C で 3 時間放置させた後, 生じた *N*-NO 解裂由来¹⁾ の各分解生成物 (**7f**, **11f**) をカラムクロマトグラフィーで精製した。この時, *N*-NO 解裂由来以外の生成物である副生物トリアゼン⁴⁾ の単離精製は行わなかった。各分解生成物の構造は Fig. 3 に示した経路から別途に合成し, 融点, NMR スペクトルデータから決定した (Table 1)。

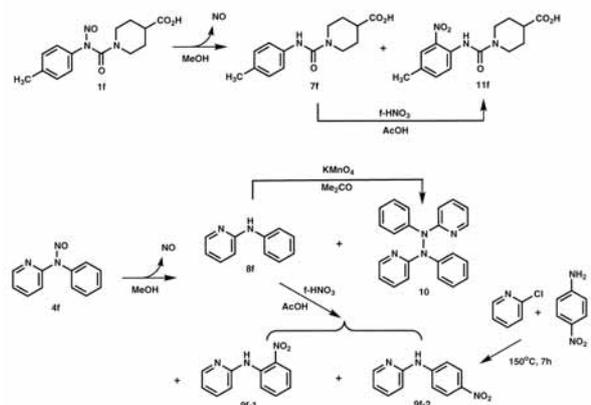


Fig.3 Decomposition of *N*-nitrosourea (**1f**) and *N*-nitrosamine (**4f**)

11f の別合成: 尿素 **7f** (0.65 g, 2.4 mmol) を酢酸 (10 ml) に溶解し, 攪拌しながら 15°C 以下に保つように冷却して, 発煙硝酸 (0.6 ml) を少量ずつ滴下していくと, 黄色溶液になる。約 1 時間攪拌し, 反応混合液を氷の中へ少量ずつ注ぎ込むと, 白黄色油状物質が析出してくる。これをクロロホルムで抽出し, 水槽が酸性を示さなくなるまでクロロホルムを水で洗った。このクロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 溶媒を留去すると, 黄色の結晶 (融点 156-157°C) の **11f** が 0.56 g (収率 73.9%) 得られた。

4f の分解反応: 化合物 (**4f**) (0.80 g, 4.0 mmol) を有機溶媒 (メタノール又はクロロホルム) (50 ml) に溶かし, 37°C で 5 時間放置させた。この時, 出発原料の *N*-ニトロソ体の分解率は 4% であった。発生する NO 以外の分解生成物は展開溶媒 (n-ヘキサン: エーテル: クロロホルム = 5:4:1) を用いて TLC (シリカゲル) を行うと, **9f-1**, **4f** と **10**, **8f**, **9f-2** の順で展開された。これらの分解生成物の構造は Fig. 3 に示した経路から別途に合成し, 融点及び NMR スペクトルデータから決定した (Table 1)。

8f から **9f-1** と **9f-2** の合成: **8f** (0.85 g, 5.0 mol)

を酢酸(10ml) に溶解し, 攪拌しながら 15°C 以下に保つように冷却して, 発煙硝酸 (0.6 ml) を少量ずつ滴下していくと, 黄色溶液になる. 約 1 時間攪拌し, 反応混合液を氷の中へ少量ずつ注ぎ込むと, 油状物質が析出した. これをクロロホルムで抽出し, 水槽が酸性を示さなくなるまでクロロホルム層を水で洗った. このクロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 溶媒を留去すると, **9f-1** と **9f-2** の混合物が得られた. この混合物を少量のクロロホルムに溶かし, シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した. クロロホルムとエーテルの混液 (8 : 2) を展開溶媒とした. 最初のフラクションから **9f-1** (融点 66-67°C, 収率 3.0 %) が得られた. 次に **9f-2** (融点 66-67°C, 収率 36.0 %) が得られた. NMR スペクトルデータを Table 1 に示す. さらに, **9f-2** は 2-クロロピリジンと 4-ニトロアニリンを反応させても得られた. 2-クロロピリジン (2.3 g, 20 mmol) と 4-ニトロアニリン (2.7 g, 20 mmol) を混合し, 150°C 7 時間攪拌しながら反応させた. 反応後, 氷水を加え, 炭酸水素ナトリウムでアルカリにする. クロロホルムで抽出. 無水硫酸ナトリウムでクロロホルム層を乾燥後, ろ過し, クロロホルム溶媒を減圧濃縮して黄色のニトロ体 **9f-2** を 79 % の収率で得た.

ヒドラジノ誘導体 (10) の別途合成⁵⁾: 過マンガン酸カリ (79 mg, 5 mmol) のアセトン (10 ml) 溶液に **8f** (0.26 g, 1.5 mmol) と硫酸ナトリウム (0.5 g) のアセトン (10 ml) 溶液を 0°C で加えて, 一夜攪拌した. ろ過してアセトンを留

去し, 残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した. 最初のフラクションは原料の **8f**, 次に化合物 (10) を得た (分解点 182°C 収率 9.0 %). NMR スペクトルデータを Table 1 に示した.

5. 遊離 NO の確認と発生能の測定

一定量の *N*-ニトロソ化合物が一定温度下で, 一定時間内に分解して発生する NO 量の測定は, 我々が考案した簡易型装置³⁾を用いて行った. *N*-ニトロソ化合物 (1×10^{-3} mol) を有機溶媒 (CHCl₃) (2 ml) または緩衝液 (Krebs buffer: pH 7.4) に溶解し, 37°C で 2 時間加温した. 発生するガスを捕集し, NO₂ に変えて呈色させた. 呈色試薬としてグリース試薬 (4-アミノベンゼンスルホン酸および *N*-ナフチルエチレンジアミンの希酢酸溶液) (2 ml) を使用した. 2 時間反応後, 546 nm における吸光度を測定し, 亜硝酸ナトリウム標準液を用いて作成した検量線から NO₂ の量を算出した. 結果を Table 2 に示した.

6. ESR 装置による NO の確認

2-(4-カルボキシフェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン-1-オキシド 3-オキシドのナトリウム塩 (Carboxy-PTIO) および *N*-(ジチオカルバモイル)-*N*-メチル-D-グルカミンのナトリウム塩 - 二価イオン鉄錯体 (MGD-Fe²⁺ 錯体) を NO 検出試薬として使用して日本電子製 JES-FA100 で電子共鳴スピン ESR (x-band ESR) を測定した. MGD-Fe²⁺

Table 1 ¹³C-NMR Chemical shift (ppm) of *N*-nitroso compounds (1, 4) and related compounds ^{a)}

Compd. No.	Y-Ph-N(X)-Z			Phenyl						Pyridyl (or Piperidyl)					Me	CO
	X	Y	Z	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6		
4f	NO	H	2-Py	135.42	127.89	129.55	129.55	129.55	127.89	155.31	121.72	138.45	113.45	148.52		
8f	H	H	2-Py	140.62	120.49	129.25	122.74	129.55	120.49	156.29	108.08	137.70	114.79	148.27		
4g	NO	4-Me	2-Py	132.67	127.58	130.31	139.70	130.31	127.58	155.43	138.40	137.64	113.39	148.53	21.39	
8g	H	4-Me	2-Py	132.72	121.28	129.81	137.04	129.81	121.28	156.71	137.64	149.92	114.46	148.34	20.82	
4h	NO	4-Cl	2-Py	135.50	129.13	129.83	133.59	129.83	129.13	155.04	121.85	138.56	113.33	148.46		
8h	H	4-Cl	2-Py	139.23	121.32	129.32	129.10	129.32	121.32	155.75	108.54	137.86	115.23	148.25		
4i	NO	H	4-Py	134.47	127.86	130.37	130.53	130.37	127.86	149.83	111.73	149.92	149.92	111.73		
8i	H	H	4-Py	139.60	121.61	129.54	124.09	129.54	121.61	150.72	109.46	150.16	150.16	109.46		
4k	NO	4-Me	4-Py	131.97	127.51	130.89	140.68	130.89	127.51	149.26	111.67	150.55	150.55	111.67	21.32	
8k	H	4-Me	4-Py	134.36	122.46	130.15	136.59	130.15	122.46	151.74	109.08	149.18	149.18	109.08	21.90	
9f-1	H	2-NO ₂	2-Py	129.30	138.97	126.24	119.69 ^{d)}	135.70	119.59 ^{d)}	153.61	113.83	138.06	117.86	147.96		
9f-3	H	3-NO ₂	2-Py	142.08	116.40	148.90	116.29	129.73	124.44	154.66	110.06	138.06	113.12	148.12		
9f-2 ^{b)}	H)	4-NO ₂	2-Py	147.34	116.53	125.19	139.89	125.19	116.53	154.58	112.36	137.53	116.44	147.34		
10		^{c)}		141.78	120.17	128.81	123.66	128.81	120.17	156.16	110.57	138.24	116.99	147.88		
1f ^{e)}	NO	4-Me	^{d)}	132.95 136.29	120.47 125.34	129.46 130.28	137.05 130.28	129.46 130.28	120.47 125.34	43.70	27.49 ^{e)}	39.98	27.49 ^{e)}	43.70	20.73 21.09	155.58, -
7f	H	4-Me	^{d)}	130.42	119.92	128.53	137.96	128.53	119.92	43.26	27.89	40.37	27.89	43.26	20.32	155.08, 175.67
11f	H	4-Me-2-NO ₂	^{d)}	131.50	135.05	125.32	135.56	137.05	121.53	43.61	27.90	40.85	27.90	43.61	20.37	153.65, 174.05

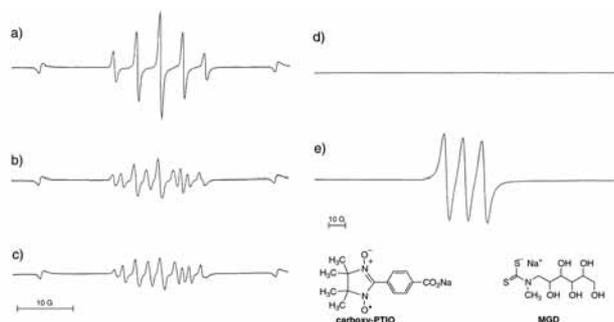
^{a)} Measured in CDCl₃ with TMS as an internal standard. Ph=phenyl, Py=pyridyl ^{b)} Data in DMSO-d₆ ^{c)} Ph(2-Py)N-NPh(2-Py) ^{d)} Z=CO(CH₂)₂C₂H₅ ^{e)} Decomposed during the measurement. ^{f)} Assignments may be reversed. ^{g)} Coincidences

Table 2 NO-Releasing ability of various *N*-nitroso compounds ^{a)}

Compd.	Y-Ph-N(NO)-X ^{b)}		mM
	Y	X	
1a	4-Me	CON(Bn) ₂	4.79
1a	4-Me	CON(Bn) ₂	0.45 ^{f)}
1f	4-Me	CON(CH ₂) ₅ CO ₂ H	2.04
1f	4-Me	CON(CH ₂) ₅ CO ₂ H	0.04 ^{e)}
4a	H	Ph	0.02 ^{d)}
4f	H	2-Py	0.52 ^{c)}
4g	4-Me	2-Py	0.46 ^{c)}
4h	4-Cl	2-Py	0.52 ^{c)}
4i	H	4-Py	0.52 ^{c)}
4k	4-Me	4-Py	0.26 ^{c)}
NOC-18			0.46 ^{e)}
SNAP			0.55
SNAP			0.50 ^{f)}

^{a)} Concentration of each *N*-nitroso compound and SNAP for thermal decomposition in CHCl₃ was 1-10 x 10⁻³ M. Reactions were carried out at 37°C for 2h. Detection as NO₂⁻ using the Griess method. The values are amounts of NO₂⁻ generated via NO from the 100 mM CHCl₃ solution of the compound. ^{b)} Bn=benzyl, Ph=phenyl, Py=pyridyl. ^{c)} Reacted for 4h. ^{d)} Reacted for 7h. ^{e)} Reacted in the Krebs buffer (pH 7.4). ^{f)} Reacted in the mixture of DMSO-Krebs buffer (1:9).

錯体はアルゴン置換した塩化第一鉄 (FeCl₂) (3mM) と MGD (5mM) の水溶液を測定直前に混合して作成した。Carboxy-PTIO による検出は 5 μM Carboxy-PTIO と 20 μM 化合物のジメチルホルムアミド (DMF) と蒸留水 の 1 : 4 溶液を調整して行った。MGD-Fe²⁺ 錯体による検出は、MGD-Fe²⁺ 錯体と 200 μM 化合物の DMSO と pH 7.2 リン酸緩衝液の

Fig.4 ESR spectra of variable PTIO derivatives MGD with NO produced from *N*-nitrosamine (4f)

a) 5 μM of carboxy-PTIO in H₂O ; b) 5 μM of carboxy-PTIO and 20 μM of 4f in a mixture of DMF and H₂O (1:4) ; c) after 20 sec.; d) 15mM of MGD and 3 mM of FeCl₂ in a mixture of DMSO and phosphate buffer, pH 7.2 (1:4) ; e) 200 μM of 4f, 5mM of MGD and 3mM of FeCl₂ in a mixture of DMSO and phosphate buffer, pH 7.2 (1:4)

1 : 4 溶液を調整して行った。結果を Fig.4 に示した。

7. DNA 切断活性

芳香族 *N*-ニトロソ尿素 (1f), *N*-ニトロソアミン (4a, 4f-i) および 1-ヒドロキシ-2-オキシ-3,3-ビス(2-アミノエチル)トリアゼン (NOC-18) について DNA 切断活性を測定した。化合物を DMF と Tris-HCl-buffer (pH 7.2) の混液 (1 : 4) に溶解し、調製した pBR 322 プラスミド DNA を加えて 37°C で 3 時間振盪した後、アガロース電気泳動 (70 V, 2 時間) を行った。泳動帯の量比を画像解析 (NIH-Image) により算出した。結果を Table 3 および 4 に示した。

Table 3 DNA-Cleaving activity of various *N*-nitroso compounds^{a)}

Compd.	mM	DNA Cleavage	
		Form I (%)	Form II (%)
1f	1	67	33
1f	10	31	69
4f	1	96	4
4f	10	93	7
7f	1	97	3
7f	10	95	4
8f	1	98	2
8f	10	95	5
NOC-18	1	69	31
NOC-18	10	60	40
NaNO ₂	1	96	4
NaNO ₂	10	96	4

^{a)} Treated for 3 h

Table 4 DNA-Cleaving activity of aromatic *N*-nitrosamines^{a)}

Compd.	mM	DNA Cleavage	
		Form I (%)	Form II (%)
4a	10	97	3
4f	10	95	5
4g	10	88	12
4h	10	93	7
4i	10	80	20
NaNO ₂	10	97	3

^{a)} Treated for 3 h

結果及び考察

N-ニトロソ化合物 (1f, 4f-k) は Fig.2 に示したように合成した。*N*-ニトロソ尿素誘導体 (1f) の場合はアリールイソシアナートにイソニペコチン酸を反応させて得た尿素誘導体 (7f) をニトロソ化して合成した。また、複素環

N-ニトロソアニリン類 (4) はアニリン誘導体にハロゲンピリジン類を加熱反応して得たアミン類 (8) を酸性下に亜硝酸ナトリウムでニトロソ化して得た。次に、得られた *N*-ニトロソ体 (1f) を室温下及び種々の条件下で分解させた (Fig.3)。*N*-ニトロソ尿素 (1f) をクロロホルム中で分解させると、尿素誘導体の分解生成物 (7f, 11f) を生じた。また、ニトロ体 (11f) は別途合成として 7f をニトロ化して得られた。これら尿素誘導体の構造は NMR スペクトルデータで確認した (Table 1)。一方、複素環 *N*-ニトロソアニリン (4f) の分解は 37°C 5 時間で行った。この時、出発原料の *N*-ニトロソ体の分解率は 4 % であった。Fig.3 に示したように 3 種類のアリールアミン類 (8f, 9f-1, 9f-2) とテトラ置換ヒドラジン類 (10) が生成することがわかった。これらの生成物の構造は、また別ルートで合成を行い (Fig.3)、それら化合物の構造が間違いないことをスペクトルデータで確認した (Table 1)。なお、*N*-ニトロソ尿素体 (1f) や複素環 *N*-ニトロソアニリン (4f) が分解の際に相当する 2-ニトロ体や 4-ニトロ体が生じることは (3-ニトロ体 (9f-3) の生成は認められなかった)、分解過程で NO の生成を示している。³⁾ そこで、これらの化合物からの単位時間あたりの NO 発生量を調べた。合成した *N*-ニトロソ化合物を有機溶媒に溶かし、また、やや水溶性のある化合物は DMSO-Krebs 緩衝液に、水溶性化合物は Krebs 緩衝液に溶かし、37°C で NO を発生させた。各種の *N*-ニトロソ化合物 (4f-k, 1f) (Fig.1) の NO 発生能 (単位 mmol と時間あたりに発生する NO の量) を既知の NO ドナーである *S*-ニトロソ-*N*-アセチル-DL-ペニシラミン (SNAP) や水溶性 NOC-18 と共に Table 2 に示した。また、既に NO 発生に関し、報告済みの化合物 (1a, 4a) もこの表に加え、比較検討した。芳香族 *N*-ニトロソ化合物の NO 発生能は、三置換尿素誘導体 (1a) が最も大きい、今回合成した 1f は 1a の約半分の NO 発生能を示した。1a は、水に難溶であったが、1f は Krebs 緩衝液中 NO 発生能を調べることが可能になり、その結果 NOC-18 の 1/10 であることがわかった。また、ジアリールニトロソアミン (4) については、フェニル基をピリジル基にすることによって発生能が約 20 倍増加した (Table 2: 報告済み 4a と今回合成した 4f-i を比較)。なお、脂肪族 *N*-ニトロソ化合物 (5, 6) からの NO 発生は室温下では認められていない。³⁾ さらに、*N*-ニトロソ化合物 (1, 4) から NO が遊離していることの確認は、一酸化窒素のテトラフェニルポルフィリン錯体 (NO-TPP-Co(II) 錯体) の単離と Carboxy-PTIO および MGD-鉄錯体を用いた ESR 測定法でも行った。即ち、ニトロソ化合物の添加により Carboxy-PTIO が 2-(4-カルボキシフェニル)-4,4,5,5-テトラメチルイミダゾリン-1-オキシルのナトリウム塩 (Carboxy-PTI) へ変わるのに伴い経時的に ESR スペクトルが変化した (Fig.4, a-c)。さらに、塩化第一鉄存在下で MGD と化合物の反応では MGD-鉄錯体に NO が配位し、MGD-

Fe-NO 錯体が生成し、特有のスペクトルを示した (Fig.4, d,e)。

一方、芳香族 *N*-ニトロソ尿素 (1f)、*N*-ニトロソアミン (4a, 4f-i)、非ニトロソ体 (7f, 8f) および NOC-18 について DNA 切断活性を測定した。化合物を DMF と Tris-HCl-buffer (pH 7.2) の混液 (1 : 4) に溶解し、調製した pBR 322 プラスミド DNA を加えて 37°C で 3 時間振盪した後、アガロース電気泳動 (70 V, 2 時間) を行った。泳動帯の量比を画像解析により算出した。結果を Table 3 および 4 に示した。芳香族ニトロソ化合物、1f の DNA 切断活性を NOC-18 と比較すると、NOC-18 の一本鎖切断活性 (Form II の生成) は 1 mM で 31 %、10 mM で 40 % であったのに対して、1f は一本鎖切断型 (Form II) が 1 mM で 33 %、10 mM で 69 % 生成し、より強力な活性を示した (Table 3)。一方、脱ニトロソ体 (7f) や亜硝酸ナトリウム (NaNO₂) では切断活性を示さず、また NO 生成能が低い芳香族ニトロソアミンの活性は非常に弱いことがわかった。この結果は、既に報告した細胞障害作用における活性とニトロソ体の NO 生成能が相関する³⁾ ことと一致し、1f による DNA 切断反応が化合物より生成した NO または NO 由来の活性種に起因していることを示唆している。NOC-18 の NO 生成能は 1f より大きいにもかかわらず活性が低いのは、1f に比べて分解速度が速いので NOC-18 から遊離した NO が DNA に化学的に付加反応を起こす前に DNA 以外へ物理的に拡散してしまい効率よく DNA に作用しない可能性と芳香環を持つ 1f の方が DNA に対する親和性が高いこと等の影響によると推定した。一方、芳香族ニトロソアミンから生ずる NO による生物作用の報告は無い。ピリジルフェニルニトロソアミン類 (4f-i) は芳香族 *N*-ニトロソ尿素 (1f) と比較すると活性は弱い、その切断反応は有意に進行した (Table 4)。ピリジルフェニルニトロソアミン類 (4f-i) の DNA 切断活性はジフェニルニトロソアミン (4a) よりも大きく、NO 生成能の傾向とも一致した。したがって、これらの化合物についても芳香族ニトロソ尿素と同様に NO または NO 由来化合物が活性種である可能性を示している。さらに 4f-k は 1f に比べ、分解速度は遅いが、徐放性を持つ NO ドナーの開発に発展する可能性を示すもので興味深い結果である。

文 献

- 1) a) S.S.Singer, W.Lijinsky, and G.M.Singer, *Tetrahedron Lett.*, 1613-1616 (1977); b) S.S.Singer, G.M.Singer, and B.B.Cole, *J.Org.Chem.*, **45**, 4931-4935 (1980); c) B.C. Challis and M.R.Osborne, *J.Chem.Soc., Parkin II*, 1973, 1526-1533. d) J.N.Tam, R.W.Yip, and Y.L.Chow, *J.Amer. Chem.Soc.*, **96**, 4543-4549 (1974); e) R.H.Smith, Jr., M.B.Kroeger-Koepke, and C.J.Michejda, *J. Org. Chem.*, **47**, 2907-2910 (1982); f) P. Welzel, *Chem. Ber.*, **104**, 808-821 (1971); g)

- A.J.Buglass,B.C.Challis and M.R.Osborne,*IARC Sci. Publ.*,**9**,94-100 (1974); h)R.S.Lowe,J.N.S.Tam,K.Hanaya,and Y.L.Chow,*J.Am.Chem.Soc.*,**97**,215-216 (1975)
- 2) a) S.Sueyoshi and M.Tanno, *Chem.Pharm.Bull.*,**33**, 488-496(1985);b)M.Tanno and S.Sueyoshi,*ibid.*,**35**,1360-1371(1987);c)M.Tanno,S.Sueyoshi,and S.Kamiya,*ibid.*,**38**, 49-54(1990);d)M.Tanno,S.Sueyoshi,and S.Kamiya,*ibid.*, **38**,2644-2649(1990)
- 3) M.Tanno,S.Sueyoshi,N.Miyata,and K.Umehara,*Chem. Pharm.Bull.*,**45**,595-598(1997)
- 4) M.Tanno,S.Sueyoshi,N.Miyata,and S.Nakagawa,*Chem. Pharm.Bull.*,**44**,1849-1852(1996)
- 5) F.A.Neugebauer and P.H.H.Fischer,*Chem.Ber.*,**98**,844-850(1965)