

博士論文（要約）

論文題目

二環性ニトロソアミンが引き起こす  
トランスニトロソ化反応の機構研究

氏 名：猪股 悟

## 第一章 研究背景

一酸化窒素( $\bullet\text{NO}$ )の恒常的な濃度は 30 pM ほどだと考えられるようになってきた。一方で、S-ニトロソ化合物(SNO 化合物)は nM~ $\mu\text{M}$  レベルの濃度で存在するが調べられている<sup>1</sup>。

これは SNO 化合物が $\bullet\text{NO}$ を貯蔵する役割を担っていることを示唆する。さらには、近年になってタ

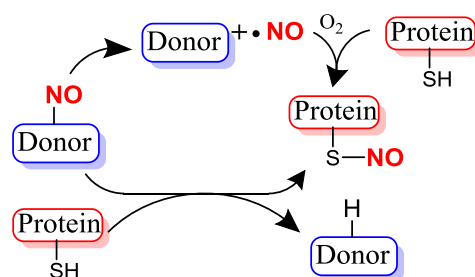


Fig. 1. S-nitrosation pathways.

ンパク質の S-ニトロソ化(SNO 化)は $\bullet\text{NO}$ の貯蔵だけでなくタンパク質の機能制御やシグナル伝達に重要な役割を持つことが明らかになってきている<sup>2</sup>。この SNO 化を引き起こす NONO-ate などの NO ドナーによる S-NO 化はドナーの自発的分解により放出された $\bullet\text{NO}$ が酸素により酸化され生成する $\text{NO}^+$ がチオール(RSH)と反応する経路と $\bullet\text{NO}$ を放出することなく直接 NO 基のやりとりによって S-NO 化する、トランスニトロソ化反応と呼ばれる経路の 2 つがあり、区別は困難である(Fig. 1)。特にトランスニトロソ化はタンパク質間でも起き、しかも酵素様の基質・残基特異的な反応であると考えられている<sup>3</sup>。そのためトランスニトロソ化反応の性質や機構は極めて重要である。しかし、SNO 化合物の不安定性や NO ドナーの SNO 化反応の経路の複雑さもあり、S-トランスニトロソ化反応の機構は未だに詳しく調べられていない。一方で、二環性ニトロソアミン **1** は $\bullet\text{NO}$ を放出せずトランスニトロソ化によってのみ S-NO 化を引き起こす(Fig. 2)<sup>4</sup>。

これは、二環性ニトロソアミンの N-NO 結合が構造的な要因で非平面化しており、N-N 間の二重結合性が弱

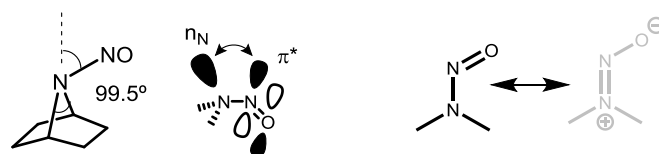


Fig. 2. Structural feature of bicyclic nitrosamine.

まっているために起きる、二環性ニトロソアミン特有の反応である。この二環性ニトロソアミンと S-NO 化体が例外的に安定なトリフェニルメタンチオール( $\text{Ph}_3\text{CSH}$ )を用い、生体内のトランスニトロソ化反応のモデル反応系を構築し、トランスニトロソ化反応の機構や化学的特徴を調べることを目的とした。加えて、二環性ニトロソアミンは波長 450 nm 付近の光で分解して $\bullet\text{NO}$ を放出することが分かっている<sup>5</sup>。トランスニトロソ化反応の速度と光照射による $\bullet\text{NO}$ 放出量に相関があるか、それに N-NO 間の結合強度は関係するかも合わせて調べた。

## 第二章 トランスニトロソ化反応の研究

**合成** 二環性ニトロソアミンをデザイン・合成した。Diels-Alder 反応の際に、反応温度を室温(~20°C)で行うと *endo* イミド体のみが、120°C で行うと *exo* イミド体が優先して生成した(*exo* : *endo* ~ 10:1)。次いで NBS による酸化的脱ベンジル化の後にニトロソ化することで各種の配向性・置換基をもった二環性ニトロソアミンの合成を達成した。

トランスニトロソ化反応の機構解析 トランスニトロソ化反応の反応速度式を  $\text{CHCl}_3$  中、二

環性ニトロソアミン **2, 6** と  $\text{Ph}_3\text{CSH}$  を用いて初速度法で決定したところ、ニトロソアミンが 1 次、チオールが 1 次の 2 次反応 ( $V = k[\text{nitrosamine}][\text{thiol}]$ ) であり、 $\text{S}_{\text{N}}2$  反応の速度式と一致した。すなわちニトロソアミンとチオールの濃度に反応速度が比例する  $\text{S}_{\text{N}}2$  様の反応であることが推察される。合わせて生成物である  $\text{Ph}_3\text{CSNO}$  の分解速度を測定したところ、 $k = 4.2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  であり極めて小さく分解速度を無視してよいことが分かった。一方で、アセトン、酢酸エチル、 $\text{DMSO}$  などを溶媒に用いて同様のトランスニトロソ化反応を行ったところ、全く反応が進行しなかった。次に二環性ニトロソアミンの  $\text{R}$  上の置換基効果とイミド基の配向性が及ぼす反応速度への効果を調べた。いずれの置換基  $\text{R}$  においても *exo* イミド体は *endo* イミド体よりもトランスニトロソ化反応が速いことが分かった。またイミド上の置換基  $\text{R}$  の効果は *endo* 体ではほとんどないが、一方で *exo* 体では  $\text{R}$  上に大きな置換基  $t\text{Bu}$  を導入すると **2** と比べ顕著に反応速度が遅くなった。*exo* イミド体では置換基  $\text{R}$  が反応点のそばに位置し、立体障害によって反応性を低下させるためであると考えている。*endo/exo* 配向性によるトランスニトロソ化の反応速度の違いを探るため、Eyring プロットを二環性ニトロソアミン **2, 6** で行った。DFT 計算(B3LYP/6-31+G\*)によって遷移状態を探索した結果 *exo, endo* イミド体の活性化自由エネルギー  $\Delta G_{293 \text{ K}}^\ddagger$  の大小は、実験結果の傾向と合致した。また、各種二環性ニトロソアミンの基底状態を計算によって調べたところ、*exo* 体のほうが *endo* 体よりも  $2^\circ$  ほど非平面化角が大きい、すなわち単結合性が強いことがわかった。計算により得られたいくつかの遷移状態のなかでも、 $\text{NO}$  基がピリジン環側に傾いているもののほうが *endo, exo* いずれにおいても安定であった。この要因としては、 $\text{NO}$  基と *exo* 方向の置換基(水素原子かイミド基)との立体障害による不安定化によるものであると考えている。また遷移状態は  $\text{S-H}$  から  $\underline{\text{N}}-\text{NO}$  へプロトンが移りつつ  $\text{NO}$  が  $\text{S}$  に近づくものであった。この遷移状態においてプロトン移動と  $\text{N-NO}$  結合の解離はどちらが主たる律速の要因なのかを調べるため、 $\text{Ph}_3\text{CSH}$  を  $\text{Ph}_3\text{CSD}$  へと重水素置換したものと、二環性ニトロソアミン **2** を用いて同位体効果を観察した。結果は、チオールを重水素置換しても一次同位体効果は観測されなかった。つまりプロトン移動が主たる律速ではなく、重水素よりも重い  $\text{NO}$  基の移動が主たる律速の要因であることが示唆される。トランスニトロソ化反応は  $\text{S-H}$  からのプロトン移動と  $\text{N-NO}$  間の結合の切断が同時に起きる協奏的な遷移状態ではないかと考えている。

### 第三章 光による $\cdot\text{NO}$ 放出

ニトロソアミンの  $\text{N-NO}$  結合の強度に相関のある  $\text{n}_\text{O}-\pi^*$  の遷移に起因する吸収ピークに置換基・配向性の効果があるかを調べたところ、吸収ピーク変化はほとんど無く( $\sim 400 \text{ nm}$ )モル吸光係数  $\epsilon$  もほぼ同じ程度の値( $70\sim 100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )であった。水/ $\text{DMSO}$  中  $50 \mu\text{M}$  に調製した各種ニトロソアミン溶液に  $420 \text{ nm}$  の光を照射し、 $\text{NO}$  放出量を測定したところ、置換基の種類や配向性によらずおおよそ同じ程度であった。また、 $\text{CBS-QB3}$  レベルで行った計算によってホモリティックな結合解離エネルギーを求めたところ、いずれの置換基や配向性でもほとんど同じであった。これら計算と実験結果から、二環性ニトロソアミンは置換基・

配向性によらずほぼ同じ結合強度であり、いずれも光照射によって同程度の•NOを放出することが分かった。

#### 第四章 総括

本研究により、トランスニトロソ化反応の遷移状態はSHからN-NOへのプロトン移動とN-NOの結合切断とが同時に起きる協奏的な遷移状態が強く示唆されることを明らかにした。またendo/exoの配向性によるトランスニトロソ化反応の速度の違いは、NO基の非平面化角に起因することも明らかにした。光分解による•NO放出は、置換基や配向性によらずほぼ同じであった。これらの結果から、二環性ニトロソアミンはendoイミド体とRに大きな置換基を導入したexoイミドでは光分解による•NO放出、Rが小さい置換基のexoイミド体はトランスニトロソ化反応によるNO供与と、NO供与の様式を置換基やイミド基の配向性によって制御可能なことを明らかにした。

#### 【参考文献】

1: (a) Hall, C. N., Garthwaite, J. *Nitric Oxide* **2009**, *21*, 92–103. ;(b) Tyurin, V. A. et al. *Circ. Res.* **2001**, *88*, 1210–1215.; Stamler, J. S., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, *89*, 7674–7677.; Abdalla, D. S. P. et al. *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, *30*, 318–326.; Marley, R. et al. *Free Rad. Res.* **2000**, *32*, 1–9.; 2: (a)Kabasawa, Y. et al. *Circ. Res.* **2013**, *112*, 327–334. (b) Kabasawa, Y. et al. *Mol. Pharmacol.* **2014**, *85*, 175. ;3: (a) Nakamura, T., Lipton, S. A. *Antioxidant & Redox Signaling* **2013**, *18*, 239–249. (b) Jie, J. et al. *Cell* **2014**, *159*, 623–634. ;4: Yanagimoto, T. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 736–737.; 5: Karaki, F. et al. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1127–1141.