速 報

Phosphine の作用点について

中 北 宏

農林省食品総合研究所食品保全部貯蔵害虫研究室

東京都江東区塩浜 1-4-12

(昭和51年3月16日受理)

The Inhibitory Site of Phosphine

Hiroshi NAKAKITA

Stored-Product Entomology Laboratory, Food Preservation Division, National Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry, Koto-ku, Tokyo 135, Japan

The inhibitory site of Phosphine (PH_3) on electron transport chain of rat liver and maize weevil mitochondria was studied. PH_3 completely inhibited the respiration of ascorbate+tetramethyl phenyldiamine as substrates under the conditions of ion pumping state (Ca^{2+} , Gramicidin), state 3 and uncoupled state (DNP). However, state 4 respiration could not be completely inhibited. The difference spectrum of PH_3 -added mitochondria clearly showed α -cyt *a* (600nm for maize weevil, 602nm for rat liver) and γ -cyt *a* (445nm). These results strongly suggested that PH_3 acted on cytochrome oxidase. However, the peak positions of α -cyt *a* and γ -cyt *a* in both mitochondria shifted to different positions compared with the anaerobic mitochondria and HCN treated mitochondria. Although low concentration of PH_3 (100 μM) did not give a complete appearance of difference spectrum, the addition of Ca^{2+} to it gave the clear spectrum. The degree of inhibition of oxidase activity of mitochondria by various concentrations of PH_3 was also observed by means of an oxidation rate of the reduced cyt *c* from horse heart which showed complete inhibition at very low concentration of PH_3 .

ホスフィン(PH_3)は、効力、作業性、残留などの点でくん蒸剤として優れた性質を有しており(くん蒸剤としては PH_3 の発生はリン化アルミニウムを主成分とする固型剤を用いている)、現在、臭化メチル(CH_3Br)とならんで多くの諸国で大量に使用されている。しかし、このものは実用化後の歴史が浅いことから、毒性機構については十分解明されていない¹⁾。

Bond *et al.*²⁾、佐藤^{3,4)}ら、そして著者ら⁵⁾は、昆虫の呼吸に対してこのものは抑制作用をもつことを観察した。また、著者ら⁶⁾は、ラット肝ミトコンドリアを用いた検討から、 PH_3 は、呼吸の電子伝達系に阻害作用を有することを明らかにした。

本報においては、 PH_3 の電子伝達系阻害点をラット肝臓とコクゾウ成虫の両ミトコンドリアを用いて、呼吸速度とチトクロームのスペクトル変化を中心にして検討

を行なったので報告する。

実験方法

1. ミトコンドリア

ラット肝ミトコンドリアは、Chance *et al.*⁷⁾の方法で精製し、また、コクゾウ成虫ミトコンドリアは、著者の方法⁸⁾で精製した。

PH_3 溶液の調製：ゴム栓で封じた Vial 中のエタノール(1)+水(4)の混合液中に PH_3 を注射器を用いて飽和させ、0°Cに保持し、実験に平行して経時的に、ガスクロマトグラフ(島津 5A, FPD)にて濃度を測定した。

2. 呼吸量の測定

ガルバニ電極式溶存酸素計⁹⁾(給水化学製)を用いて25°Cの呼吸速度を記録観察した。なお、呼吸測定における反応液の最終濃度は、ラット肝では0.3M マンニト

ール, 10mM KCl, 2.5mM $MgCl_2$, 0.25mM EDTA, 10mM KH_2PO_4 であり, コクゾウでは, ラット肝の反応液を基本組成として, $MgCl_2$ と KH_2PO_4 をそれぞれ 7.0mM, 5.0mM とした (最終 pH 7.4). いずれのミトコンドリアも反応液中に蛋白質濃度として 2mg/ml となるように調製した. PH_3 の添加は, マイクロシリンジを用いた.

3. 差スペクトルの測定

エンドオンタイプ二波長自記分光光度計 (島津 UV 300) を用いて, 試料側, 対照側のキュベットにそれぞれ 2.8mg 蛋白量/ml のミトコンドリアを入れ, ベースラインを記録後, 試料側に PH_3 を加え, 差スペクトルを記録した.

チトクローム酸化酵素活性の反応阻害: 還元チトクローム *c* (ウマ心臓から) mg/3ml に一定量の PH_3 溶液を添加し, ラット肝ミトコンドリア (0.4mg 蛋白量/ml) をさらに加えて, チトクローム *c* の酸化速度を分光光度計にて測定した. 反応液は, 0.5M KH_2PO_4 , 0.065% v/v Tween 20 (pH 7.2) を用いた.

4. 蛋白量の測定

ミトコンドリアの蛋白濃度は, ビュレット法¹⁰⁾にて測定した.

実験結果および考察

著者らは, 先に⁹⁾, ラット肝ミトコンドリアにおいて, ビルビン酸+リンゴ酸とコハク酸を基質とした実験で, PH_3 は, State 4 呼吸に阻害作用を与えず, State 3 呼吸と Ca^{2+} や DNP による解放あるいは脱共役呼吸に強

Fig. 1 Inhibitory effect of PH_3 on various steady state respiration of rat liver mitochondria. In addition to basic reaction mixture (Fig. 1) were added. 5mM Ascorbate and 0.1mM TMPD. The reaction mixtures contained 0.2 μ g Gramicidin (ion pumping state), 0.4mM Ca^{2+} (ion pumping state), 20 μ M DNP (uncoupled state) and 1mM ADP (state 3). PH_3 was added into the respiration system at concentrations indicated.

い阻害効果をみたので, ここでは, ラット肝ミトコンドリアを用いて, アスコルビン酸+TMPD (Tetramethyl Phenylldiamine) を基質とし, 種々呼吸条件下で, PH_3 の濃度に対応した阻害効果を検討した (Fig. 1). Ca^{2+} , グラミシジンによる解放呼吸, State 3 呼吸, DNP による脱共役呼吸のいずれも, PH_3 の濃度の上昇にともなって

Fig. 2 Difference spectra of rat liver mitochondria induced by PH_3 , HCN and Anaerobic state. All spectra were recorded in same reaction mixture in Fig. 1 at a final concentration of 2.8mg mitochondrial protein/ml. Each of PH_3 (about 10mM) and HCN (100 μ M) was added to a sample cuvette, and ADP (1mM)+succinate (8mM) were added to a sample cuvette for the experiment anaerobic state.

Fig. 3 Difference spectra of maize weevil adult mitochondria induced by PH_3 , PH_3 + Antimycin A and HCN. Experimental conditions were same as Fig. 4. Antimycin A (10 μ M) was added after PH_3 addition to a sample cuvette.

阻害度は高まったが、State 4 呼吸は、ほとんど阻害をうけなかった。

Fig. 2, 3 は、ラット肝、コクゾウ成虫両ミトコンドリアの PH_3 による差スペクトルを各種条件における差スペクトルとともに示した。 PH_3 の添加は、ラット肝では、602 nm (cyt *a* の α 吸収帯), 551 nm (cyt *c* の α 吸収帯), 445 nm (cyt *a* の γ 吸収帯), コクゾウでは、600 nm (cyt *a* の α 吸収帯), 551 nm (cyt *c* の α 吸収帯), 445 nm (cyt *a* の γ 吸収帯) に明瞭な差スペクトルを生じた。しかし、両ミトコンドリアとも、青酸添加の差スペクトルにくらべ、 PH_3 の添加は cyt *a* の α 吸収帯の位置を 3 nm 短波長側にずらすとともに γ 吸収帯の位置を 2 nm 長波長側に移動させた。

上記実験では、高濃度の PH_3 (約 10 mM) を用いたため PH_3 の添加直後にスペクトルの発現を見たが、低濃度 PH_3 (100 μM) の添加は、明瞭な α 吸収帯を生じなかった (Fig. 4-A)。しかし、この濃度でも、 Ca^{2+} を添加することによって、短時間内に、尖鋭な cyt *a* と *c* の α 吸収帯のスペクトルを生じた (Fig. 4-B)。この現象は、呼吸阻害でみられた Ca^{2+} の作用をチトクロームレベルで観察したものと考えられる。同様な現象は、ADP やグラミシジンの添加でも確認された。

Fig. 4 Effect of Ca^{2+} on difference spectra of PH_3 added rat liver mitochondria.

Experimental conditions were same as Fig. 4. The measurement was started 30 sec after the addition of PH_3 (100 μM) and Ca^{2+} (0.4 mM) to rat liver mitochondrial suspension (2.5 mg protein/ml) in a sample cuvette.

Fig. 5 Effect of PH_3 on cytochrome oxidase activity in rat liver mitochondria.

Rat liver mitochondria (0.4 mg/ml) were suspended in 2.8 ml medium of 50 mM KH_2PO_4 and 0.065% v/v Tween 20. Reduced horse heart cyt C (1 mg) and PH_3 solution were mixed with the mitochondrial medium. Rate of oxidation of cyt C was followed by monitoring changes of apparent optical density at 550 nm.

ラット肝ミトコンドリア中のチトクローム酸化酵素の PH_3 による阻害状態を Fig. 5 に示した。濃度の上昇に対応して還元チトクローム *c* の酸化は抑制され、80 μM の PH_3 でチトクローム酸化酵素の活性は完全に阻害された。

上記、呼吸阻害、差スペクトル、チトクローム酸化酵素の活性阻害の実験事実は、 PH_3 の電子伝達系における *in vitro* での阻害 site は下記 scheme に示したごとくチトクローム酸化酵素 (cyt *a*) であることを証明するものである。

Scheme 1

しかし、 PH_3 は、State 4 呼吸に作用しにくい特徴をそなえているので、青酸とは阻害様式は異なると予想される。この点に関して、やはり、State 4 呼吸に阻害作用のないチトクローム酸化酵素阻害剤アザイド (NaN_3)¹¹⁾ との類似性が考えられる。

なお、最近、著者らとは独立に、Chefurka *et al.*¹²⁾ はマウス肝、ハエ、グラナリアコクゾウのミトコンドリアを用いて、呼吸に関する PH_3 の阻害実験から、このもののチトクローム酸化酵素阻害を報じている。

最後に、本論文をまとめるのに種々ご教示、ご助言をいただいた東京農業大学山本出教授ならびに理化学研究所深見順一博士に感謝の意を表する。また、本研究に対して、終始ご指導をいただいた名古屋大学弥富喜三名誉教授ならびに斎藤哲夫教授に深甚なる謝意を表する。また、本研究の遂行にご便宜をはかっていただいた食品総合研究所、食品保全部松浦慎治部長ならびに三井英三室長、そして、測定法についてご指導をいただいた微生物第一研究室長伊藤 寛氏に厚くお礼申し上げる。

要 約

ホスフィン (PH_3) の電子伝達系における阻害部位をラット肝とコクゾウのミトコンドリアを用いて検討した。 PH_3 は、アスコルビン酸+TMPD を基質として、イオンポンプ (Ca^{2+} , グラミシジン), State 3 および脱共役 (DNP) 呼吸を完全に阻害した。しかし、State 4 呼吸に対しては強い阻害効果を認めなかった。 PH_3 を添加したミトコンドリアは、チトクローム *a* の α 吸収帯 (コクゾウでは 600 nm, ラット肝では 602 nm) と γ 吸収帯 (445 nm) に明瞭な差スペクトルを生じた。このことは、 PH_3 はチトクローム酸化酵素に強く作用していることを証明するものである。しかし、両吸収帯のピークの位置は青酸や嫌気条件のものとは異なっていた。また、 Ca^{2+} は、低濃度 (100 μM) の PH_3 のスペクトル発現を

助長した。一方、 PH_3 によるミトコンドリア中のチトクローム酸化酵素の活性阻害を、還元チトクローム *c* の酸化速度より観察し、低濃度の PH_3 の強い阻害効果を確認した。

引用文献

- 1) R.W. Howe: *J. Stored Prod. Res.* **10**, 167 (1974)
- 2) E.J. Bond, J.R. Robinson & C.T. Buckland: *J. Stored Prod. Res.* **5**, 289 (1969)
- 3) 佐藤仁彦, 樋口義弘, 諏訪内正名: 防虫科学 **38**, 22 (1973)
- 4) 佐藤仁彦, 諏訪内正名: 防虫科学 **38**, 213 (1973)
- 5) H. Nakakita, T. Saito & K. Iyatomi: *J. Stored Prod. Res.* **10**, 87 (1974)
- 6) H. Nakakita, Y. Katsumata & T. Ozawa: *J. Biochem.* **69**, 589 (1971)
- 7) B. Chance & B. Hagihara: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 1 (1960)
- 8) H. Nakakita: *Jap. J. Appl. Ent. Zool.* に投稿中
- 9) 内海耕造, 小田琢三, 倉田研吾, 宮原正信, 保田雅夫: 蛋白質核酸酵素 **14**, 621 (1969)
- 10) E. Layne: "Method in Enzymology," ed. by S.P. Colowick & N.O. Kaplan, Vol. III, Academic Press Inc., New York, p. 450, 1957
- 11) F. Palmieri & M. Klingenberg: *European J. Biochem.* **1**, 439 (1967)
- 12) W. Chefurka, K.P. Kashi & E.J. Bond: *Pestic. Biochem. and Physiol.* **6**, 65 (1976)