Monofluoroacetanilides の毒性発現機構に 関する生化学的研究 (第6報)

マウスおよびニワトリ肝の fluoroacetanilide amidohydrolase の諸性質

中村利家, 上田隆之, 田中久一, 浜本義夫 (三共株式会社農薬研究所)

昭和 40 年 8 月 21 日 受 理

Studies on the Mechanism of the Monofluoroacetanilides Poisoning to Mammals Part VI. Properties of Fluoroacetanilide Amidohydrolase of Mouse and Chick Livers

By Toshiie NAKAMURA, Takayuki UEDA, Kyuichi TANAKA and Yoshio HAMAMOTO
Agricultural Chemicals Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

The enzymes which hydrolyze monofluoroacetanilides were extracted from mouse and chick livers, and their basal properties were examined comparatively. Fluoroacetanilide (FAn) was used as substrate, and the conditions for measurement of the activity were decided. The enzymes were tentatively named fluoroacetanilide amidohydrolase (fluoroacetanilidase) for convenience in a series of this study.

(1) Activities in both mouse and chick livers were almost found in cell sap, and not found in mitochondria at all. (2) In both mouse and chick livers, pH optimums of the enzymes were about 8.5, and temperature optimums were between 45 and 50°C. Both enzymes were considerably stable in wide range of pH at room temperature, and also between pH 7.5 to 8.5 even at 50°C. (3) Both enzymes were activated by addition of Mn^{2+} , but the degree of activation of mouse liver enzyme was larger than that of chick liver enzyme. (4) Michaelis constants for FAn of both enzymes were 1.2 mM in mouse and 2.9 mM in chick in no Mn^{2+} addition. However, their Michaelis constants became 2.4 mM and 2.2 mM, respectively, when 1 mM of Mn^{2+} was added. (5) Effects of possible inhibitors on both enzymes were remarkably similar. Both enzymes were inhibited by reagents which react with sulfhydryl and chelate with metallic ions. (6) The properties of the fluoroacetanilidases of both mouse and chick livers seem to be mutually coincidental.

(Received August 21, 1965)

ま え が き

すでに述べてきたように monofluoroacetanilides は極めてすぐれた殺虫剤であるが⁽¹⁾, 温血動物にもかなりの毒性を有する^(2,3). さきにこれらの生体内における酵素的加水分解を証明し^(3,4), これが毒性発現の第一段階であると考えた. すなわち monofluoroacetate それ自体の毒性は弱いと思われるが⁽⁵⁾, 生体内において速やかに酵素的加水分解をうけ⁽⁶⁾, その結果生ずる monofluoroacetate により毒性が発現すると考えられる.

この加水分解酵素は, マウスおよびラットにおいて, 肝臓に特異的に多量に存在し, ついで腎臓に, さらに僅

少なからず脾臓および血液にも存在が認められたが, その他の組織には全く活性が認められなかった^(3,4). またニワトリおよびウシの肝臓にも同様に強い活性が見出された⁽⁴⁾. すなわち本酵素は広く温血動物一般に存在し, 毒性発現機構上とくに肝臓における酵素分解を最も重視すべきであると考えられた.

本報では, マウスおよびニワトリの肝臓の粗酵素抽出液を用い, 酵素の活性測定条件および基礎的な諸性質を明らかにした結果を報告する.

なお本酵素は前報⁽⁴⁾で若干のべたように, いわゆる deacylase と類似の作用性を有し, 著者の知るところで

は、酵素特性のかなり明示された類似作用酵素として Nimmo-Smith⁽⁷⁾ (1960) のニワトリ腎臓のミトコンドリア中の aryl-acylamidase がある、しかしこの酵素とわれわれの酵素とは、二、三の点で必ずしも性質が一致しなかった。よって本酵素を便宜上 fluoroacetanilide amidohydrolase (fluoroacetanilidase) と仮称した。

実験方法

(1) 酵素抽出液: ddY 系マウス (星野マウス遺伝研究所, 3, 体重約 20 g) の肝臓をとり出し、直ちに蒸留水で洗い、10 倍量の 10 mM トリス緩衝液 (pH 8.5) を用いて常法どおりホモジネートとした。12,500×g, 5 分間遠沈した上澄液を粗酵素抽出液とし 0~5° で保存した。通常 10 mM トリス緩衝液 (pH 8.5) でさらに 3~5 倍に稀釈したものを反応に供した。

ニワトリ (白色ブリマスロック-白色レグホン交雑種, 3, ふ化後 10~15 週間) の場合は、殺した直後に肝臓をとり出して冷凍貯蔵し、その翌日に常法どおりアセトンパウダーとし 0~5° で保存した。使用時に 10 mM トリス緩衝液 (pH 8.5) の 20 倍量を徐々に加えつつ磨砕してホモジネートとした。以下マウスの場合と同様に粗酵素抽出液を調製し、通常さらに 2~3 倍に稀釈して反応に供した。

(2) 酵素反応: 基質としては、すべて fluoroacetanilide (FAn: メタノール再結晶, m. p. 74~74.5°) を用い、20 mM 水溶液として保存した。緩衝液は特に断わらない限り 0.1 M トリス緩衝液 (pH 8.5) を用いた。酵素の活性測定は、一般に試験管に基質溶液 4 ml, 緩衝液 3 ml, および粗酵素抽出液 1 ml をとり、25°, 15 分および 25 分後に 1 N-HCl 2 ml を加えて酵素反応を停止させ、生じたアニリン量を定量しておこなった。

ただし金属イオン添加の場合は、一般に緩衝液 (pH 7.5 または 8.5) 2 ml, 粗酵素抽出液 1 ml および金属イオン溶液 1 ml をとり、また阻害剤添加の場合は、緩衝液 (pH 8.5) 1 ml, 粗酵素抽出液 1 ml および阻害剤溶液 2 ml をとり、それぞれ 25°, 約 30 分放置後に基質溶液 4 ml を加え反応にうつった。この放置中に酵素の活性が低下するようなことはない (Fig. 4 の結果参照)。上記以外の条件については実験結果の項でのべる。

(3) アニリンの定量: 分解により生じたアニリンの定量は、先報^(3,8)のジアゾ化カップリング法に準じた。ただし先報のホモジネートの場合と異なり、本報の酵素抽出液を用いた場合は、塩酸添加後の遠沈操作は省略し

た。すなわち反応液全量をそのまま 50 ml メスフラスコにうつし、約 20 ml の蒸留水を加え、以下常法どおり比色定量をおこなった。

生成アニリン量から FAn 加水分解量を求め、酵素の活性は FAn の加水分解速度: $\mu\text{mol./min.}$ で示した。ただし、この値に 10^3 を乗じて表示する場合が多い。

実験結果

(1) 酵素活性の細胞内分布, 粗酵素抽出液の調製

あらかじめマウスおよびニワトリ肝臓のホモジネートについて、常法どおり 0.25 M ショ糖液より細胞分画をおこない、いずれにおいても活性の大部分が 12,500×g, 20 分間遠沈の上澄液部分にあり、ミトコンドリア部分には活性が認められないことを確認した。ミクロソーム分画はおこなわなかったが、本酵素の安定性、水易溶性 (後報) などから cytoplasm に存在する可溶性酵素と考えられた。よって以下の実験では、マウスの場合は肝臓ホモジネートの遠沈上澄液を粗酵素抽出液として用いた。このものは 0~5° 保存で少なくとも 2 週間は安定であった。ニワトリの場合には材料入手が容易であったので、肝臓をアセトンパウダーに調整して保存した。このものは非常に安定であり、2 カ月は十分活性を維持した。必要時にその抽出液を調製し粗酵素抽出液として用いたが、これも 0~5° 保存で少なくとも 2 週間は安定であった。

(2) 緩衝液の pH および濃度の活性への影響

前報⁽⁴⁾でのべたようにトリスおよびリン酸緩衝液は活性に悪影響をあたえないが、ペロナル緩衝液は阻害影響を示した。緩衝液の濃度もわずかながら活性に影響をおよぼすようであった。

よってトリス緩衝液をえらび、緩衝液濃度と活性の関係を追試し、Fig. 1 の結果をえた。緩衝液濃度の活性に及ぼす影響は概して小さいが、マウスおよびニワトリ肝酵素ともに 5~50 mM の範囲が適当と思われた。ついで 25 mM トリス緩衝液を用い pH の影響を検討したのが Fig. 2 である。マウスおよびニワトリ肝酵素ともに最適 pH はほぼ 8.5 であった。

(3) 温度の活性への影響

マウスおよびニワトリ肝酵素についての、温度の活性におよぼす影響は Fig. 3 のとおりであった。

いずれも最適温度は 45~50° の範囲内にあると考えられ、また 60° 付近より急激に活性が減少した。

(4) 安定性に対する pH と温度の影響

Fig. 1. Effect of Concentration of Tris Buffer on Activity.

The reaction mixture containing 4ml of 20 mM FAn soln. and 1ml of crude enzyme extract in a total volume of 8ml in the indicated conc. of tris buffer, pH 8.5, was incubated for 15 and 25 min. at 25°C.

* The activity indicates the hydrolyzing rate, $\mu\text{mol} \times 10^3/\text{min.}$, in an average of two replications.

Fig. 2. Effect of pH on Activity.

The reaction mixture containing 4ml of 20 mM FAn soln., 3ml of 0.1 M tris buffer, the indicated pH, and 1ml of crude enzyme extract was incubated for 15 and 25 min. at 25°C.

* cf. Fig. 1.

25° および 50° における酵素の安定性への pH の影響を検討し Fig. 4 の結果をえた。それぞれの温度および pH において 30 分間放置後一たん冷水中に入れ、それぞれの pH を 8.5 に再調整したのち、常法どおり活性の測定をおこなった。

本酵素は室温ではかなり広い pH 範囲で安定であり、50° においても pH 7.5~8.5 の範囲ではかなり安定であった。

(5) Mn^{2+} 添加および緩衝液濃度の関係

本酵素は Mn^{2+} の添加により活性が増大する⁽⁴⁾が、

Fig. 3. Effect of Temperature on Activity.

The reaction mixture [containing 4ml of 20 mM FAn soln., 3ml of 0.1 M tris buffer, pH 8.5 and 1ml of crude enzyme extract] was incubated for 15 min. at the indicated temperature.

* cf. Fig. 1.

Fig. 4. Effect of pH and Temperature on Enzyme Stability.

The buffered enzyme soln. in 20 mM tris buffer, the indicated pH, was incubated for 30 min. at the indicated temp. After the incubation, pH of the soln. was readjusted to 8.5 and substrate, FAn finally 10 mM, was added in order to determine the activity.

* cf. Fig. 1.

Mn^{2+} の濃度およびそのときの緩衝液濃度が活性化程度に影響するようであったので、この相互関係を検討し Fig. 5 の結果をえた。トリス緩衝液 (pH 7.5) 濃度を、図に示したごとく 3 段階とし、種々の Mn^{2+} 濃度における活性を測定した。Fig. 5 により Mn^{2+} 濃度は 1~2 mM, 反応液のトリス緩衝液濃度は 12.5 mM 以下とするのが適当とおもわれた。高濃度ではかえって阻害作用が見られるが、これは $\text{Mn}(\text{OH})_2$ の沈で生成の酵素タン

Fig. 5. Effect of Concentrations of Manganese and Tris Buffer on Activity.

The buffered enzyme soln., pH 7.5, was pre-incubated in the presence of Mn^{2+} for 30 min. at 25°C, and then FAn was added (finally 10 mM) in order to determine the activity. The conc. of Mn^{2+} and tris buffer indicated in figure show the final conc. in the reaction mixture.

パクへの影響によることが考えられる。

Mn^{2+} 添加による活性の増大は、マウス肝酵素ではかなり大きく約 80% に達したが、ニワトリ肝酵素では約 20% 増にとどまっている。この金属イオンの影響についてはさらに次回に十分に検討することにした。

(6) 酵素濃度および反応時間と活性の関係

活性測定条件、すなわち酵素反応が零次反応にしたがう範囲を決定するため、ニワトリ肝酵素の種々の濃度における反応曲線を測定し Fig. 6 の結果をえた。ニワトリ肝臓のアセトンパウダー抽出液を希釈しないで用いた場合 (a) を最高とし、以下図示のごとく希釈酵素液 (b ~ e) とした。基質濃度はなるべく低濃度にする意味で 0.5 mM とし、さらに活性を充分発揮せしめるため Mn^{2+} 1 mM を添加した。25°, 20 分までの測定で、いずれの場合もほぼ完全に零次反応にしたがい (A 図)、さらに 20 分における FAn 加水分解量と酵素濃度はほぼ完全な直線関係にあった (B 図)。

すなわちこの条件において、最高の酵素濃度 (a) でも一応 20 分程度までなら平均反応速度による活性測定が可能のように思われる。

Fig. 6. Relation between Hydrolytic Ratio and Relative Concentration of Chick-Liver Enzyme.

The reaction mixture containing 1 ml of the enzyme preparation, 2 ml of 0.1 M tris buffer, 4 ml of 1 mM FAn soln., and 1 ml of 8 mM Mn^{2+} soln. was incubated for the indicated min. at 25°C. Original enzyme soln. (a) was prepared by extracting from 1 g of chick liver acetone powder with 10 ml of 10 mM tris buffer, pH 8.5. Figures show averages of two replications.

しかし以下の実験では安全のため活性測定時の酵素濃度は本実験の (c) 以下とし、基質濃度も支障なき限り標準濃度 10 mM (後述) を用いることにした。

(7) 基質濃度と活性の関係, Michaelis 定数

マウスおよびニワトリ肝酵素の基質 (FAn) 濃度と活性の関係を Lineweaver-Burk plot で示したのがそれぞれ Fig. 7 および Fig. 8 である。

本酵素における金属イオンの役割は未だ明らかでないが、前述のようにマウス、ニワトリ肝酵素ともに Mn^{2+} の添加で明らかに活性が増大する。しかし活性化の程度は両者必ずしも同等でなかったので、ここで Mn^{2+} 添加による K_m の変化を併せて検討してみた。

Mn^{2+} 無添加のときの K_m は、マウス 1.2 mM およびニワトリ 2.8 mM であり、おおよそ近似していた。しかし Mn^{2+} 1 mM の添加により、それぞれ 2.4 mM および 2.2 mM となり、両者の値はいっそう酷似してきた。これは両酵素の近似性を示す 1 例と思われる。

なお最大活性 (V) に近い活性をうるには少なくとも基質濃度は K_m 値の 10 倍程度にする必要がある。本酵素の場合はマウスとニワトリの K_m 値から考えると 25

Fig. 7. Lineweaver-Burk Plot and Michaelis Constant for Mouse Liver Enzyme.

* v : The hydrolyzing rate of FAn, $\mu\text{mol/min.}$, at pH 8.5, 25°C.

Figures show averages of two replications.

Fig. 8. Lineweaver-Burk Plot and Michaelis Constant for Chick Liver Enzyme.

* v : cf. Fig. 7.

mmM以上にしたいところである。FAn の最大溶解度は約 50 mM⁽⁴⁾ であり, 反応時基質濃度 25 mM は一応可能であるが, 本研究では調製上無理のない FAn 20 mM 溶液を調製し, 反応時の標準基質濃度は 10 mM とした。

(8) 種々の阻害剤およびアミノ酸の影響

一般的な酵素阻害剤の影響を検討し Table I に示した結果をえた。酵素と阻害剤を約 30 分接触させたのちに基質を加えたが, 阻害剤の影響はマウスおよびニワトリ肝酵素ともに全く同傾向であり, SH 基反応試薬および金属イオンキレート剤により阻害された。

なお阻害剤と基質を同時に酵素に加えた場合についても一部検討したが, Table I カッコ内に示したように阻害程度は前の結果と変らなかった。

また dialkyl-fluorophosphatase⁽⁹⁾ が α, α -dipyridyl や cysteine, histidine, thiohistidine などのアミノ酸により活性化されることが知られているので, これらの

影響をニワトリ肝酵素について念のため検討し Fig. 9 の結果をえた。いずれも低濃度でわずかに活性化傾向が見られるが, それぞれある程度以上の濃度では阻害作用が明らかであった。

考 察

本報では温血動物の肝臓に特異的に多量に存在し, fluoroacetanilides の毒性発現上重要な役割を有すると思われる加水分解酵素の基礎的諸性質を明らかにせんとした。この酵素はその本来の基質が明らかになるまで, 便宜上 fluoroacetanilide amidohydrolase (fluoroacetanilidase) と仮称することにした。

供試動物は前報⁽⁴⁾で検討したもののうち, 哺乳類であるマウスと鳥類であるニワトリをえらび, それぞれ肝臓の粗酵素抽出液を調製して活性測定条件および基礎的諸性質を検討した。

得られた結果を要約すると, マウスおよびニワトリ肝

TABLE I. EFFECT OF POSSIBLE INHIBITORS

Inhibitors	Final Conc. in M	Inhibition(%)	
		Mouse	Chick
none	—	0	0
Sulfhydryl-			
Iodoacetate	0.002	0	10
Na-Arsenite	"	(88), 90	(89), 90
AgNO ₃	"	75 (64), 62	
p-Chloromercuri- benzoate	"	58 (33), 30	
Carbonyl-			
Hydroxylamine	0.002	0	0
Semicarbazide	"	5	10
Metal-			
K-Cyanate	0.002	6	3
Na-Fluoride	"	25 (50), 55	
Ethylenediamine tetraacetate	{ 0.01 0.002	— 10	5 5
o-Phenanthroline	{ 0.01 0.002	— —	65 45
8-Oxyquinoline	0.001	(33), 30	(60), 74
Thiourea	0.002	0	0
Cysteine	"	5	18

The buffered enzyme soln, pH 8.5, was pre-incubated in the presence of inhibitor for 30 min. at 25°C, and then FAn soln, was added (finally 10 mM) in order to determine the activity.

Figures in parenthesis show results when inhibitor and FAn were added simultaneously into the enzyme soln.

の酵素はいずれも cytoplasm に存在する可溶性酵素であり, 最適 pH 約 8.5, 最適温度 45~50° のかなり安定なものであった。また程度の差はあるが Mn^{2+} の添加により活性が増大した。FAn を基質としたときの Michaelis 定数 K_m はほぼ近似していたが, Mn^{2+} 1 mM の存在において K_m 値は両者ほとんど同一となった。さらに一般酵素阻害剤による影響も全く同傾向であり, 両酵素とも SH 基反応試薬および金属イオンキレート剤により同程度に阻害された。

以上の実験結果から, マウスとニワトリの肝臓に存在する fluoroacetanilidase の基礎的な性質はほとんど同一であると考えることができよう。ニワトリは Shaffer & Bieter⁽¹⁶⁾ により acetylsulfonamides に対する代謝が, ヒト, マウス, ウサギ, イヌなどの哺乳類と対照的であるとされているものであり, 以上の結果は興味深い。このような aromatic acylamine の加水分解酵素に関する研究は非常に少ないようである。

FAn 類似基質である acetanilide (AAn) についてはすでに 1937 年生体組織による加水分解が報告⁽¹⁰⁾されて

Fig. 9. Effect of Amino Acids and α, α' -Dipyridyl on Activity.

Reaction: cf. Table I.

○—○ α, α' -dipyridyl ⊙—⊙ serine
×—× tryptophan △—△ { histidine
●—● cysteine ▲—▲ { glutathione
proline

いる。このいわゆる deacylation⁽¹¹⁾ は, 解熱剤である AAn および関連誘導体の薬理学的興味から, その代謝の一段階として検討された⁽¹²⁾。酵素化学的には Bray ら⁽¹³⁾ はじめて AAn のとき aromatic acylamines 加水分解酵素と, N-acetylglycine のとき N-acyl-amino acids 加水分解酵素を区別した。しかし kynurenine formamidase⁽¹⁴⁾ は両作用を有することが知られている。近年では前報⁽⁴⁾でのべたように, Gomori⁽¹⁵⁾ (1954) が人の肝臓, 腎臓, すい臓および血液中に acetyl-naphthylamine および chloroacetyl naphthylamine 加水分解酵素の存在を明らかにし, すい臓の酵素の最適 pH は 6.0 であり, pH 8.0 ではほとんど活性が消失し, また肝臓の酵素は Mn^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} および Ca^{2+} により阻害されることを示したが, その他の性質は明らかでない。Nimmo-Smith⁽⁷⁾ (1960) は, ニワトリ腎臓のミトコンドリア中に aromatic acylamines 加水分解酵素を見出し, kynurenine formamidase と性質が異なることを明らかにした。しかしこの酵素は最適 pH 7.3 であり, その他の性質も本報における fluoroacetanilidase の性質とは完全に一致しないようである。

しかしながら本酵素および前述の類似作用酵素の本来の生理的意義は全く不明であり, 単に生理的異常物質の代謝に関与しているものかどうか甚だ興味深い。

要 約

マウスおよびニワトリ肝から抽出された monofluoroacetanilides 加水分解酵素について, その基礎的諸性質を比較検討した. 基質としては monofluoroacetanilide (FAn) を用い酵素反応条件を定めた. なお本酵素を便宜上 fluoroacetanilide amidohydrolase (fluoroacetanilidase) と仮称した.

(1) マウスおよびニワトリ肝臓ともに, 活性はほとんど cell sap に存在し, ミトコンドリア部分には活性が認められなかった.

(2) マウスおよびニワトリ肝酵素ともに, 最適 pH 約 8.5, 最適温度 45~50° であった. いずれも室温ではかなり広い pH 範囲で安定であり, 50° でも pH 7.5~8.5 でかなり安定であった.

(3) いずれも Mn^{2+} の添加により活性が増大するが, その程度はマウス肝酵素のほうがニワトリ肝酵素よりも大きかった.

(4) Michaelis 定数は Mn^{2+} 無添加の場合, マウス肝酵素では 1.2 mM, ニワトリ肝酵素では 2.9 mM でありほぼ近似した. しかし Mn^{2+} 1 mM 添加により, それぞれ 2.4 mM および 2.2 mM となりいっそう酷似した.

(5) 阻害剤の影響はマウスおよびニワトリ肝酵素ともに全く同様であり, いずれも SH 基反応試薬および金属キレート剤により阻害された.

(6) 以上からマウスおよびニワトリの肝臓の fluoroacetanilidase の性質はほとんど一致すると考えられる.

本研究の概要は日本農芸化学会関西支部昭和 40 年度春季大会 (第 219 回講演会) において講演した.

- (1) 中村利家, 伊集院忠正 : 本誌, **38**, 401 (1964).
- (2) 上田喜一 : 未発表.
- (3) 中村利家 : 本誌, **39**, 232 (1965).
- (4) 中村利家 : 本誌, **40**, 20 (1966).
- (5) 中村利家, 浜本義夫, 伊藤達郎 : 本誌, **39**, 420 (1965).
- (6) R. A. Peters : *Endeavour*, **13**, 147 (1954).
- (7) R. H. Nimmo-Smith : *Biochem. J.*, **75**, 1960 (1960).
- (8) 中村利家 : 本誌, **39**, 227 (1965).
- (9) L. A. Mounter et al. : *J. Biol. Chem.*, **204**, 221 (1953).
- (10) H. O. Michel et al. : *J. Pharmacol.*, **61**, 321 (1937).
- (11) R. T. Williams : "Detoxication Mechanisms", 2nd Ed., John Willy & Sons, Inc. N. Y., p. 438 (1959).
- (12) J. N. Smith, R. T. Williams : *Biochem. J.*, **42**, 538 (1948).
- (13) H. G. Bray et al. : *ibid.*, **47**, 483 (1950).
- (14) A. H. Mehler, W. E. Knox : *J. Biol. Chem.*, **187**, 431 (1950).
- (15) G. Gomori : *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.*, **85**, 570 (1954).
- (16) J. M. Shaffer, R. N. Bieter : *J. Pharmacol.*, **100**, 192 (1950).