薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
93 (2) 134-139 (1973)

UDC 547.551.09 : 615.35.011.5 : 615.31.015.11

ラット肝 Formamidase に関する研究 (第 2 報¹⁾) *o*-Aminophenol および
芳香族アミノ化合物による活性化について

篠原力雄, 吉田正雄, 佐久間礼三郎, 石黒伊三雄
岐阜薬科大学²⁾

Studies on Rat Liver Formamidase. II.¹⁾ Activation of Rat Liver Formamidase
by *o*-Aminophenol and Aromatic Amino Compounds

RIKIO SHINOHARA, MASAO YOSHIDA, REIZABURO SAKUMA and ISAO ISHIGURO
Gifu College of Pharmacy²⁾

(Received August 16, 1972)

Since *o*-aminophenol, which activates rat liver formamidase, possesses an amino group and an electron-donating hydroxyl group, examinations were made on the effect of compounds having an aromatic amino group and an electron-donating group such as methyl group by using toluidine, phenylenediamine, and their position isomers on the activity of formamidase, and some considerations were made on the relationship between chemical structure and activation effect. Such activation effect was observed in aniline, *o*- and *m*-amidophenol, *o*- and *m*-phenylenediamine, and *m*- and *p*-toluidine. In contrast, *p*-aminophenol showed an inhibitive action, *o*-toluidine showed activation and inhibition according to substrate concentration, and *p*-phenylenediamine had no effect on the enzyme activity. Thus, the compounds having an electron-donating group besides an amino group do not necessarily activate the enzyme and the relative position of the amino group and electron-donating group was found to be more important.

Acylation of the amino group in aniline, which activates the enzyme, resulted in the disappearance of this activating effect, while aliphatic amino group had entirely no effect on the activation. Naphthylamine had no activating effect or, rather, it showed an inhibitive action. It was concluded from these results that a primary amino group bonded to the benzene ring was a requisite for the appearance of activating effect on formamidase.

前報³⁾ において著者らはラット肝より精製した formamidase がかなり特徴的な基質特異性を示し、その反応生成物であるアントラニール酸, *o*-aminoacetophenone およびキヌレニンなどによって強く阻害されることを明らかにした。そしてさらにこれら反応生成物の位置異性体および構造類似体など 16 種の化合物を用いてその化学構造と阻害率および阻害様式との関係について観察した。その結果、反応生成物で顕著な阻害作用を示したアントラニール酸についてその位置異性体および脱オルトアミノ体である安息香酸の阻害率と阻害様式の面から観察すると、オルト位のアミノ基が阻害作用に関与することが明らかとなった。また、*o*-aminoacetophenone については、脱オルトアミノ体のみが低い阻害率と拮抗型阻害を示したのに対し、各位置異性体は強い阻害作用を示すとともに阻害様式は互いに異なり aminoacetophenone のアミノ基は位置異性体の場合でも阻害作用に主要な役割を有していた。またキヌレニンはアントラニール酸, *o*-aminoacetophenone とは全く異なり不拮抗型阻害を示した。その脱オルトアミノ体である α -amino- β -benzoylpropionic acid の阻害作用は著しく減少し、ほぼ拮抗型阻害に変化したことよりやはりオルト位のアミノ基が阻害率および阻害様式の変化に対して主要な役割を有していることが認められた。

すでに著者ら⁴⁾ は formamidase が *o*-aminophenol によって活性化されることを報告したが、この化合物は前報³⁾ の阻害剤と異なりアミノ基の他に電子供与性基である水酸基を有する。この化合物が formamidase に対

1) 第 42 回 日本生化学会で発表, 広島, 1969 年 10 月.

2) Location: 492-36 Mitahora, Gifu, 501-21, Japan.

3) 篠原力雄, 吉田正雄, 佐久間礼三郎, 石黒伊三雄, 薬誌, 93, 127 (1978).

4) R. Shinohara, I. Ishiguro, *Biochim. Biophys. Acta*, 198, 324 (1970).

して著しい活性化作用を示すことは阻害剤にみられる官能基と比較して活性化に関与する作用基の解明が重要と思われる。そこで芳香環にアミノ基と電子供与性基を有する数種の化合物およびその位置異性体が formamidase 活性にどのような影響をおよぼすかについて実験し化学構造と活性化作用の関連性を考察したのでその成績について述べる。

実験の部

1. 酵素標品の調製 酵素の調製は別報⁴⁾にしたがって Wistar 系ラットの肝ホモジネートより熱処理、硫酸分割、ストレプトマイシン処理、リン酸カルシウムゲル処理、Sephadex G-200 によるゲルロカ、DEAE-cellulose カラムクロマトの各操作を行ない約 1800 倍までに精製した。この精製酵素はディスク電気泳動法ではほぼ単一と認められたので、これを酵素標品として使用した。

2. 酵素反応系に添加した化合物 酵素反応系に添加された化合物は次のような物質を用いた。

o-, *m*-, および *p*-aminophenol, フェノール, アニリン, ホルムアニリド, アセトアニリド, *o*-, *m*-, および *p*-phenylenediamine, *o*-, *m*-, および *p*-toluidine, プチルアミン, α および β -naphthylamine.

上記化合物はそれぞれ 0.3—15.0 mm の水溶液となし、各濃度の溶液 1.0 ml を反応系に添加した。また、これらの化合物はすべて市販品を用いた。

3. 酵素活性測定法 酵素活性の測定は Jakoby の方法⁵⁾にしたがって実施した。すなわち、基質として pH 7.5, 0.2M リン酸緩衝液に溶解した 20 mm ホルミルアントラニール酸 1.0 ml, 蒸留水 1.0 ml を反応系に加え、37° 5 分加温後、精製酵素液 1.0 ml を添加して反応を開始した。添加化合物は蒸留水の代りに上述の各濃度の溶液 1.0 ml を反応系に加え同様に実施した。反応液は 37° 10 分間インキュベーション後、0.1M NaHSO₃ 0.5 ml を加えて反応を停止させ直ちに 330 nm おける吸光度を測定し、アントラニール酸の分子吸光係数より生成量を算出した。

結果

1. Formamidase 活性に対する *o*-Aminophenol および構造類似体の影響

著者ら³⁾は先にラット肝 formamidase に対して *o*-aminophenol が顕著に活性化することを認めたが、この化合物はアミノ基と水酸基を官能基として有するのでその位置異性体の活性化作用を調べた。その成績は Table I に示すようにオルト体では 5.0 mm 添加により約 75% 活性化されたが、メタ体の活性化率はオルト体に比し著しく減少した。これに対し、パラ体は活性化作用は認められず、逆に阻害作用を示した。このパラ体による阻害は 0.2 mm 添加時に最も強く、そして添加濃度の増加にしたがって阻害率は減少し、5.0 mm 添加では全く阻害が認められなかった。このことから *o*-aminophenol のいずれの官能基が活性化作用に関与するかを検索するため

TABLE I. Activation or Inhibition of Formamidase Activity of *o*-Aminophenol and Its Related Compounds

Concn. (mm)	Compounds						
				(a)		(a)	(a)
Activation or inhibition %							
0.1	10.4	※	-14.5	※	4.0	※	※
0.2	16.7	※	-35.0	※	5.1	※	※
0.5	27.1	5.0	-33.0	※	13.1	※	※
1.0	33.1	13.6	-28.0	- 7.8	20.0	- 6.9	- 7.5
2.0	55.4	19.7	-20.0	-13.5	38.5	-12.9	-12.5
5.0	24.7	26.7	0.0	-28.1	63.0	-25.3	-29.7

The substrate concentration used was 6.7 mm, but in case of (a) the substrate concentration used was 1.7 mm. (-) symbol exhibited the inhibition percentage.

5) W.B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, **207**, 657 (1954).

に、アミノ基の欠除したフェノール、水酸基をもたないアニリンの formamidase 活性におよぼす影響を調べた。アニリンは *o*-aminophenol とほぼ同様の活性化率を示したが、フェノールには活性化作用は全くみられず、高濃度の添加により若干の阻害が認められた。また、アニリンをアシル化したホルムアニリド、アセトアニリドの formamidase 活性におよぼす影響はいずれも活性化作用が消失しフェノールと同様な作用を認めた。

すでに報告したようにアントラニール酸は formamidase 活性を強く阻害するが、その脱オルトアミノ体である安息香酸および位置異性体である *m*- および *p*-aminobenzoic acid の阻害作用はいずれも著しく減少し阻害様式にも変化がみられた。このようにアントラニール酸の場合芳香族アミノ基の有無およびカルボキシル基とアミノ基の位置的関係は阻害作用に重要な関連性を有していた。

一方、*o*-aminophenol についても位置異性体および構造類似体による formamidase 活性におよぼす影響を調べた結果、芳香族アミノ基の有無、アミノ基と水酸基の位置的関係は活性化作用においても主要な役割を有していることが明らかとなった。

2. *o*-Aminophenol およびその構造類似体による作用様式について

o-Aminophenol による formamidase の活性化様式は Fig. 1 のように K_m 値, V_{max} ともに増加の傾向を示した。また、*o*-aminophenol の位置異性体である *m*-aminophenol はオルト体と同様な活性化様式を示した。しかし、*p*-aminophenol は低濃度添加時に阻害率は高く、添加濃度の増加とともに阻害率は減少する傾向を示したので、formamidase 活性を強く阻害する 0.1 mM, 0.2 mM 添加系と阻害率がやや回復の傾向を示す 1.0 mM 添加系の Lineweaver-Burk の plot をとると Fig. 1 のように混合型阻害を示した。

Fig. 1. Lineweaver-Burk's Plots of *o*-Aminophenol and Its Position Isomers

- (a) *o*-aminophenol
 ●: control, ○: 0.2 mM, ×: 0.5 mM, △: 2.0 mM
 (b) *m*-aminophenol
 ●: control, ○: 1.0 mM, ×: 2.0 mM, △: 5.0 mM
 (c) *p*-aminophenol
 ●: control, ○: 0.1 mM, ×: 0.2 mM, △: 1.0 mM

Fig. 3. Lineweaver-Burk's Plots of Formanilide and Acetoanilide

- (a) formanilide
 ●: control, ○: 2.5 mM, ×: 5.0 mM, △: 7.5 mM
 (b) acetoanilide
 ●: control, ○: 2.5 mM, ×: 5.0 mM, △: 7.5 mM

Fig. 2. Lineweaver-Burk's Plots of Phenol and Aniline

- (a) phenol
 ●: control, ○: 2.5 mM, ×: 5.0 mM, △: 7.5 mM
 (b) aniline
 ●: control, ○: 1.0 mM, ×: 2.0 mM, △: 5.0 mM

先に述べたように *o*-aminophenol の官能基のうち水酸基のみを有するフェノールは阻害作用、アミノ基のみを有するアニリンは活性化作用を示したがそれぞれの阻害および活性化様式について調べるとフェノールは Fig. 2 のように混合型阻害を示し、アニリンは *o*-aminophenol と同型の活性化様式であった。

また、アニリンのアシル体であるホルムアニリド、アセトアニリドの阻害様式は Fig. 3 のようにいずれも混合型阻害を示したが、control とアシル体添加系の交点の位置から推察すると、これらのアシル体は基質との拮抗性が強いことが考えられる。

以上のように aminophenol の各位置異性体の中で、オルト体が最も高い活性化率を示しついでメタ体であった。またオルト体の活性化様式についてみると、0.2 mM, 0.5 mM 添加例の Lineweaver-Burk の plot は、ほぼ control と平行し、2.0 mM 添加例においてはやや勾配が異なる。メタ体では、1.0 mM, 2.0 mM 添加例では control に平行し、5.0 mM 添加例においてはやや勾配が異なり、オルト体と比較すると濃度的には異なるがよく類似していた。またこれら両位置異性体の活性化様式はアニリンともよく類似していることから、オルト体メタ体の活性化作用は、主としてアミノ基に基づいていることが推察された。しかしパラ体では活性化作用は全くみられず、混合型阻害を示した。このパラ体による阻害は、フェノールと比較して高値を示すが、様式は同型であることから水酸基が主要な役割を有していることが考えられる。一般的にオルト体とパラ体は電子論的にはよく類似しているが、ある化合物の二つ以上の官能基が関与して酵素蛋白質へ結合する場合には、配向性の他官能基の位置の違い（特にオルト位とパラ位）は、結合性に差異を生ずることが推察される。パラ体の活性化作用の欠除はこのような理由によるものと思われる。なおパラ体の阻害が添加濃度を増加させると阻害率が減少する理由についてはまだ不明である。

3. Phenylenediamine による活性化について

Aminophenol の水酸基の代りにアミノ基を置換した化合物、すなわち phenylenediamine の各位置異性体の formamidase 活性におよぼす影響を調べると、Table II のようにオルト体メタ体に活性化作用を認めた。しかしパラ体は酵素活性に全く影響を与えなかった。

TABLE II. Activation of Formamidase Activity by *o*-Phenylenediamine, *o*-Toluidine and Their Position Isomers

Concn. (mM)	Compounds					
			Activation %			
0.1	5.1	5.5	no effect	2.5	5.7	8.9
0.2	10.2	6.0	no effect	5.7	11.2	13.6
0.5	16.2	7.5	no effect	9.7	23.0	25.7
1.0	28.8	24.0	no effect	11.3	37.1	45.0
2.0	56.2	51.5	no effect	11.8	55.0	64.9
5.0	77.0	71.0	no effect	26.1	68.0	79.0

4. Phenylenediamine による活性化様式について

o- および *m*-phenylenediamine による formamidase の活性化様式は Fig. 4 のように control とほぼ平行の plot が得られ、アニリン、*o*- および *m*-aminophenol とよく類似した様式を示したが、2.0 mM 添加例においても、plot の勾配の変化はみられなかった。

5. Toluidine による活性化について

o- および *m*-aminophenol, *o*- および *m*-phenylenediamine のように、芳香族第一級アミノ基と水酸基、アミノ基などの電子供与性基を有し、しかもアミノ基と供与性基が、ある位置関係にある化合物が formamidase を活性化することが観察されたので、アミノ基の他に電子供与性基の一つであるメチル基をもつ toluidine の位置異性体の formamidase 活性におよぼす影響を調べた。その結果は Table II のように、基質 6.7 mM 存在下で各位置異性体はともに活性化作用を示すが、その活性化率はパラ体が最も高く、ついでメタ体、オルト体の順であった。しかしオルト体は一概に活性化剤とはいえず、基質 2.0 mM 以下では阻害的に作用した (Fig. 5)。

6. Toluidine による活性化様式について

o-Toluidine の作用様式は Fig. 5 に示すように、アニリン、*o*- および *m*-aminophenol, *o*- および *m*-phenylenediamine などの活性化の様式と異なり、基質 2.0 mM の濃度において、control の plot と交わる。すな

Fig. 4. Lineweaver-Burk's Plots of *o*- and *m*-Phenylenediamine

- (a) *o*-phenylenediamine
 ●: control, ○: 0.5 mM
 ×: 1.0 mM, △: 2.0 mM
 (b) *m*-phenylenediamine
 ●: control, ○: 0.5 mM
 ×: 1.0 mM, △: 2.0 mM

Fig. 5. Lineweaver-Burk's Plots of *o*-Toluidine and Its Position Isomers

- (a) *o*-toluidine
 ●: control, ○: 1.0 mM, ×: 2.0 mM, △: 5.0 mM
 (b) *m*-toluidine
 ●: control, ○: 0.5 mM, ×: 1.0 mM, △: 2.0 mM
 (c) *p*-toluidine
 ●: control, ○: 0.5 mM, ×: 1.0 mM, △: 2.0 mM

TABLE III. Effects of Butylamine and Naphthylamine on Formamidase Activity

Concn. (mM)	Compounds		
	<chem>CH3CH2CH2CH2NH2</chem>	<chem>Nc1ccc2ccccc2c1</chem>	<chem>Nc1ccc2ccccc2c1</chem>
		Inhibition %	
0.1	no effect	19.3	10.7
0.2	no effect	26.1	15.0
0.5	no effect	63.9	37.1
1.0	no effect	100.0	64.0
2.0	no effect	※	100.0
5.0	no effect	※	※

わち, *o*-toluidine は基質 2.0 mM より低濃度側では阻害的に作用するのに対し, 基質 2.0 mM 以上の濃度では活性化する。これに対し, メタ体, パラ体の活性化様式は, アニリン, *o*- および *m*-aminophenol などと類似した様式を示した。

Fig. 6. Lineweaver-Burk's Plots of α - and β -Naphthylamine

- (a) α -naphthylamine
 ●: control, ○: 0.15 mM, ×: 0.30 mM
 (b) β -naphthylamine
 ●: control, ○: 0.2 mM, ×: 0.5 mM

7. Formamidase 活性におよぼす Naphthylamine および脂肪族アミンの影響

Santti⁶⁾ らはモルモット肝 formamidase によるホルミルキヌレニンの脱アシル化反応は, アニリン, α -naphthylamine によって促進されるが, ラット肝 formamidase による反応はいずれの化合物も影響しないことを報告している。しかし, 先に述べたようにアニリンは明らかに formamidase を活性化することから, さらに脂肪族アミンの一つブチルアミン, また α - および β -naphthylamine について formamidase 活性におよぼす影響を調べた。Table III に示すようにブチルアミンは formamidase 活性には

6) R.S. Santti, V.K. Hopsu-Havu, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 791 (1970).

全く影響を与えなかったのに対し、 α - および β -naphthylamine はいずれも formamidase 活性を阻害した。阻害率は α -体の方が β -体に較べ高値を示した。

8. Naphthylamine による阻害様式について

Fig. 6 に示すように α -naphthylamine, β -naphthylamine いずれも混合型阻害を示した。

考 察

Sannti ら⁶⁾ はモルモットの肝 formamidase はアニリン, α -naphthylamine などのアミンにより活性化されると報告しているが、この活性化の機作については、基質のホルミル基がこれらのアミンに転移することに基づくとしている。

一方、著者ら⁴⁾ はすでに *o*-aminophenol がラット肝 formamidase を活性化することを明らかにしたが、その活性化の機作を明らかにするため官能基を変化させた数種の構造類似体および各位置異性体を用いて検索した結果、アニリン, *o*- および *m*-aminophenol, *o*- および *m*-phenylenediamine, *m*- および *p*-toluidine などに活性化作用が認められた。なお *o*-toluidine については基質 2.0 mM 以上の濃度の際に活性化が認められた。これらの化合物は、ベンゼン核にアミノ基あるいはアミノ基の他に電子供与性基である水酸基, メチル基などを有していることが共通してみられた。しかし *p*-aminophenol は阻害作用, *p*-phenylenediamine は活性には影響を与えず, *o*-toluidine は基質濃度 2.0 mM 以下では阻害作用がみられた。このように芳香族アミノ基の他に電子供与性基を有する化合物はすべて活性化作用を示すのではなく、各化合物のアミノ基と電子供与性基の位置関係が活性化作用発現に対して重要である。またベンゼン核にアミノ基のみを有するアニリンが活性化作用を有することから、アミノ基が活性化に主要な役割を有していると思われるが、活性化に対する電子供与性基の影響としては、電子の配向性が考えられる。しかし、活性化作用を有する数種の化合物の各位置異性体と活性化作用の強弱との関係についてみると、aminophenol の活性化作用は、オルト体>メタ体, phenylenediamine ではオルト体>メタ体, toluidine ではパラ体>メタ体のように一定の関係が認められず、さらにまた各化合物の位置異性体の中でオルト体とパラ体とは formamidase 活性におよぼす影響は互いに全く異なることなどから、供与性基の配向性に基づくとは考えられない。おそらく供与性基も酵素蛋白質への結合に関与しているため、立体構造的あるいは両官能基(アミノ基と電子供与性基)の位置的関係によって活性化されることが推察される。なお *p*-aminophenol の阻害作用, *o*-toluidine の基質濃度の変化にともなう活性化と阻害作用の機作, および *p*-phenylenediamine が活性に影響をおよぼさない理由などについてはまだ不明である。

一方、活性化に関与するアミノ基の性質は、Table III のように脂肪族性のアミノ基は酵素活性には影響を与えず、また naphthylamine のようにナフタレン核に結合したアミノ基には活性化作用は認められず、naphthylamine はむしろ強い混合型阻害を示した。これらの結果からベンゼン核に結合したアミノ基のみが活性化作用を有することが観察された。またホルムアニリド, アセトアニリドにみられるようにアミノ基をアシル化するとその活性化作用は消失し阻害作用が認められたことから活性化にあずかるアミノ基は遊離していることが作用基として重要である。