

## 毒物分解酵素の活性測定法の確立と酵素遺伝子の多型解析

川崎医科大学 生化学教室\*, 法医学教室\*\*

日高和夫\*・富田正文\*\*・渡辺洋子\*・湊川洋介\*

(平成13年10月13日受理)

Improved Determination of Esterase with Poison Hydrolyzing Activity and  
Detection of DNA Polymorphism

Kazuo HIDAKA\*, Masahumi TOMITA\*\*, Yoko WATANABE\*  
and Yohsuke MINATOGAWA\*

\*Department of Biochemistry,

\*\*Department of Legal Medicine,

Kawasaki Medical School,

577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192, Japan

(Received on October 13, 2001)

### 概 要

ヒト血液中には有機リン殺虫剤の parathion の代謝物 paraoxon(POX) を加水分解する酵素 paraoxonase(PON) がある。この酵素は他の有機リン剤も加水分解することが出来る。そこで私共は現在使用頻度の高い有機リン殺虫剤である O,O-dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphate(DDVP) と POX を用いて、日本人102名の健常者の血漿 PON によるこれらの有機リン剤の分解活性を測定した。その結果、両有機リン剤の分解活性の間には高い正の相関関係が見られた ( $\gamma=0.86$ )。また PON は遺伝子多型 [Arg<sub>192</sub>(R), Gln<sub>192</sub>(Q)] があり POX の分解活性には個体差が見られた。すなわち、Arg<sub>192</sub> allele は POX 分解活性が高く、Gln<sub>192</sub> allele はそれが低い。102名中の Arg<sub>192</sub> allele の頻度は0.64であり、Gln<sub>192</sub> allele の頻度は0.36であった。これは欧米人の Arg<sub>192</sub> allele の0.26~0.33と異なっていた。キーワード: PON, POX, DDVP, 多型解析

### Abstract

Plasma paraoxonase(PON) is an enzyme which hydrolyzes paraoxon(POX), an active metabolite of the insecticide parathion, and also hydrolyzes the toxic metabolites of a variety of organophosphorous compounds(OP). O,O-dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphate(DDVP) is an OP widely used as a pesticide and anthelmintic drug. We found that human PON has good catalytic efficiency for the hydrolysis of DDVP. PON activity for both POX and DDVP in plasma from 102 healthy subjects was measured using a new assay method. A significant correlation was found between these two OPs ( $\gamma=0.86$ ) as substrates. However, the PON gene has polymorphic, and the Arg<sub>192</sub> isoform showed higher affinity to POX(Km=0.2mM), then the Gln<sub>192</sub> isoform(Km=

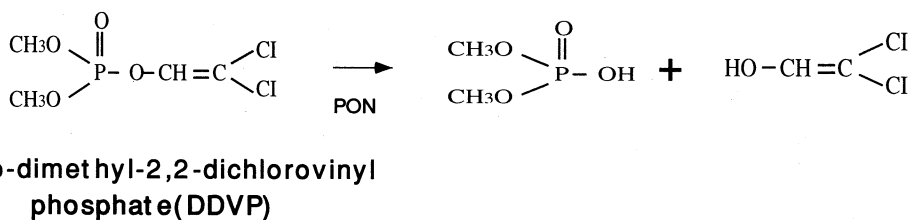
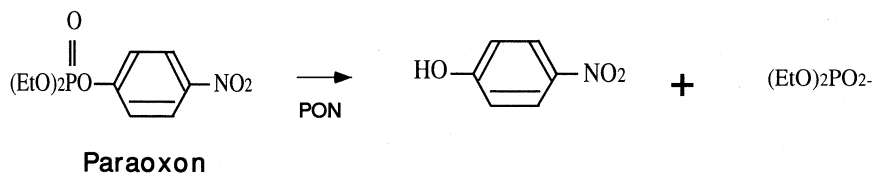
0.4mM). We investigated the prevalence of this polymorphism in the 102 subjects. The results revealed that the frequency of the Arg<sub>192</sub> allele ranged around 0.64 and that of the Gln<sub>192</sub> allele around 0.36(Caucasian Arg<sub>192</sub> allele: 0.26~0.33). Key words: PON, POX, DDVP, polymorphism

### はじめに

有機リン剤は極めて有効な殺虫剤であり、種類も多く、農業、園芸分野はもちろん地域社会や家庭のペットに至るまで病害虫駆除に広く用いられている。しかも身近にあって容易に入手できるため、中毒の発生件数が多い<sup>1)</sup>。特に有機リン剤の製造従事者、使用頻度の高い農業従事者は常に有機リン剤中毒の危険性に曝されており、中毒による死亡者も出ている。また有機リン剤の空中散布により広範囲の空散周辺地域でしばしば周辺住民が健康障害を訴えており無視できない問題となっている。この様な有機リン農業による中毒には同じような暴露環境にあつて中毒を発症しても、その程度に個人差、個体差がみられる事が特徴である。この様な個体差の原因は血中の毒物分解酵素の活性に遺伝的偏りを有しているためであると考えられている。すなわち、parathionの代謝物のparaoxon(POX, diethyl-4-nitrophenyl phosphate)を分解する酵素 paraoxonase(PON)が肝臓および血液中に存在する。このPONの活性の強弱がこの酵素の遺伝子多型 [Arg<sub>192</sub>(R), Gln<sub>192</sub>(Q)] に依存しており、それが個体差として現れると考えられている<sup>2)</sup>。このPONは他の有機リン農業に対しても分解活性を有するので、現在使用頻度の高い有機リン農業の一つであるDDVP(O,O-dimethyl-2,2-dichlorovinyl phosphat)<sup>3)</sup>についてもその分解活性を測定し、さらにDDVPに対する多型の影響を調べた。これらの測定には私共が新しく確立したPOXおよびDDVPの分解活性測定法を用いた。

### 材料と方法

POX および DDVP の分解反応は次の如くである。



従って、POX は分解生成物の p-nitrophenol の吸光度の増減から酵素活性値を求めた。DDVP の場合は一定時間後に反応溶液中に残存している DDVP による BchE の阻害率から酵素活性値を求めた。

## 試 薬

- a) 緩衝液：0.3M Tris-HCl 1.0M NaCl 1.0mM CaCl<sub>2</sub>, pH8.5
- b) 60mM POX/EtOH 保存液  
100 $\mu$ M POX 使用液：保存液を緩衝液で希釈して使用する。
- c) 100mM DDVP/EtOH 保存液  
30 $\mu$ M DDVP 使用液：保存液を緩衝液で希釈して使用する。
- d) 5 x 10<sup>-4</sup>M BTC 溶液  
ヨー化ブチリルチチオコリン (BTC) 15.9mg を 0.1M phosphate (pH 8.0) に溶かして 100 ml にする。
- e) 停止液  
5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) 20mg を 0.1M phosphate 50ml に溶かし、等量の 0.6 % SDS 水溶液を加える。
- f) 過塩素酸 (Perchloric acid, PCA)
- g) トリトン X-100 (Triton X-100)

## 材 料

a) 血液試料は健常者からヘパリン加採血し、DNA は全血 300 $\mu$ l を用いて DNA purification kit (Promega 社) によって精製した。血漿は使用直前まで凍結保存した。採血にあたり各個人に対して informed consent を得た。

### b) PCR-primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA)<sup>4)</sup>

ゲノム DNA から Saiki らの方法に準じて PON 遺伝子の領域の増幅を行った。すなわち、1 ~ 2  $\mu$ g の DNA を 100 $\mu$ l の PCR 反応液に加え、反応は 94°C, 1.5min, 50°C, 1.5min, 72°C, 3 min を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。この時使用した 2 つの primer は次の通りである。  
sense : 5'-GATATTGTTGCTGTGGGACTGAG-3', antisense 5'-ACCACGCTAAACCAAATACATCTCCACG-3' である。3' 末端から 2 つ目の塩基は G を C に換えて、R 型の遺伝子に特異的に *Pvu*I 切断部位が出来るようにした。ただし、Q 型遺伝子は切断されない。

### c) POX 分解活性測定法

1 POX 使用液 600 $\mu$ l をチューブに入れ、これに血漿希釈液 (血漿 40 $\mu$ l, 緩衝液 60 $\mu$ l) を加

え, 26°Cの恒温槽で15分間反応させる。40 $\mu$ lのPCAを加え, 激しく攪拌し白濁させる。その後120~130 $\mu$ lの3M-NaOH溶液を加え, 中和する。10 $\mu$ lのトリトンXを加えた後14,000rpmで2分間遠心し, その上澄の405nmでの吸光度を測定する。

#### d) DDVP 分解活性測定法

DDVP 使用液600 $\mu$ lをチューブに入れ, 血漿希釈液(血漿54 $\mu$ l, 緩衝液29 $\mu$ l)を加え, 素早く攪拌後200 $\mu$ lをPCA 3 $\mu$ lの入ったチューブに入れ, 攪拌して遠心し上澄を別のチューブに移し, 反応0分の試料とする。残りの反応液は26°Cの恒温槽で120分間反応させる。反応液200 $\mu$ lにPCA 3 $\mu$ lを加え, 遠心後上澄を得る。0分と120分の上澄に3M-NaOH12 $\mu$ lを加え, pHを8以上にする。

#### 残留 DDVP による BchE の阻害率の測定

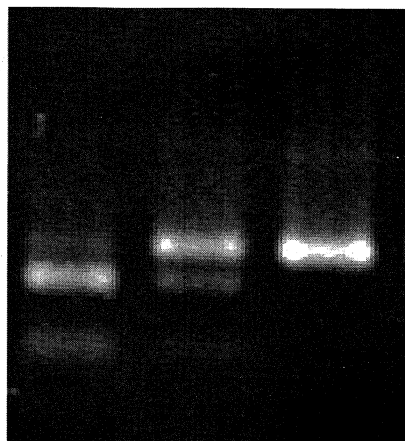
試験管に0分, 120分の上澄およびコントロールとして0.3M Tris-HCl 緩衝液200 $\mu$ lを入れ, それぞれの試験管に全量が1.5mlになる様にBTC溶液を加える。20倍希釈した同一の正常人の血漿溶液20 $\mu$ lを各試験管に加え, 60分間25°Cで反応させる。各試験管に停止液1.5mlを加え, 発色させ412nmで吸光度を測定する。

コントロールを0%, 0分を100%として120分後の阻害率から分解活性を求める。

## 結 果

### 1 PCR-PIRA

健常者のDNAからPCR-PIRAにより得られた105bpのPCR産物に*Pvu*Iを作用させると



PON 遺伝子のコドン192に Arg(R)を有する場合は30bpと75bpの2つの断片に分解された。これはRRのホモ接合体である。他方, コドン192のアミノ酸がGln(Q)の場合は*Pvu*I分解に抵抗し切断されず105bpのまま残った。これはQQのホモ接合体である。また30bp, 75bp, 105bpの3本のバンドが見られる場合はQRのヘテロ接合体である(図1)。

2 遺伝子多型 QQ, QR および RR の三者の PON に対して基質 POX 濃度を変えて, その影響を調べた。その結果を Lineweaver-Burk の二重逆数プロットで解析した(図2)。RR は  $K_m=0.20\text{mM}$ , QR は  $K_m=0.32\text{mM}$  および QQ は  $K_m=0.41\text{mM}$  であった。この結

図1. PCR産物の*Pvu*Iによる加水分解物のアガロースゲル電気泳動図多型 RR は30bp, 75bpの2本のバンド, QR は30bp, 75bp, 105bpの3本のバンド, QQ は105bpの1本のバンドが見える。

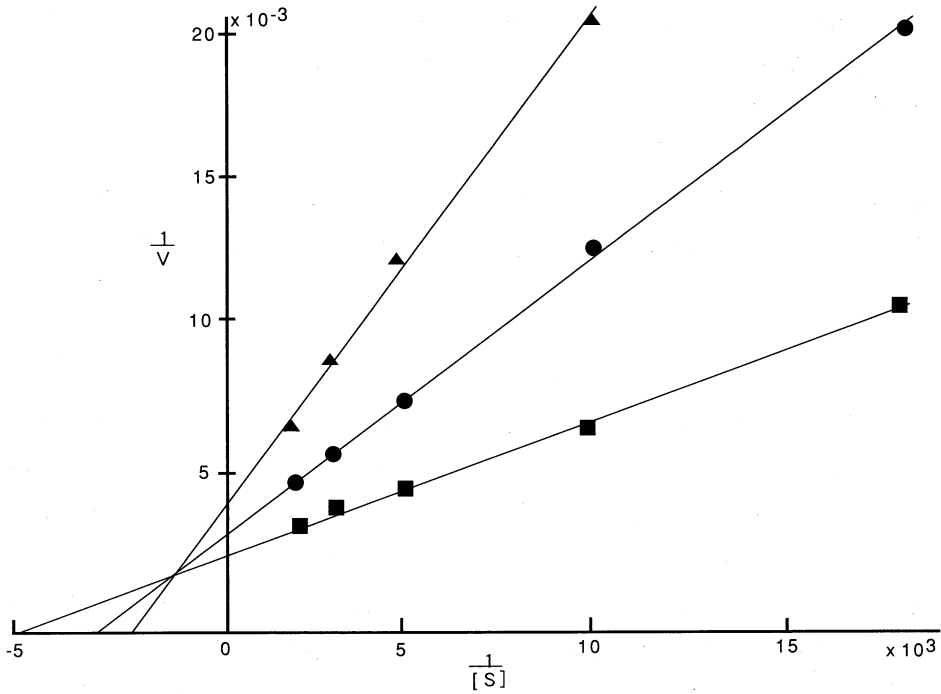


図2. ヒト血漿 PON の POX 分解活性に対する基質濃度の影響  
 $K_m$  値は  $1/[S]$  に対して  $1/V$  をプロットすることによって求めた。多型 RR は  $K_m=0.20\text{mM}$ , QR は  $K_m=0.32\text{mM}$ , QQ は  $K_m=0.41\text{mM}$  を示した。  
 ■は RR, ●は QR, ▲は QQ を示している。

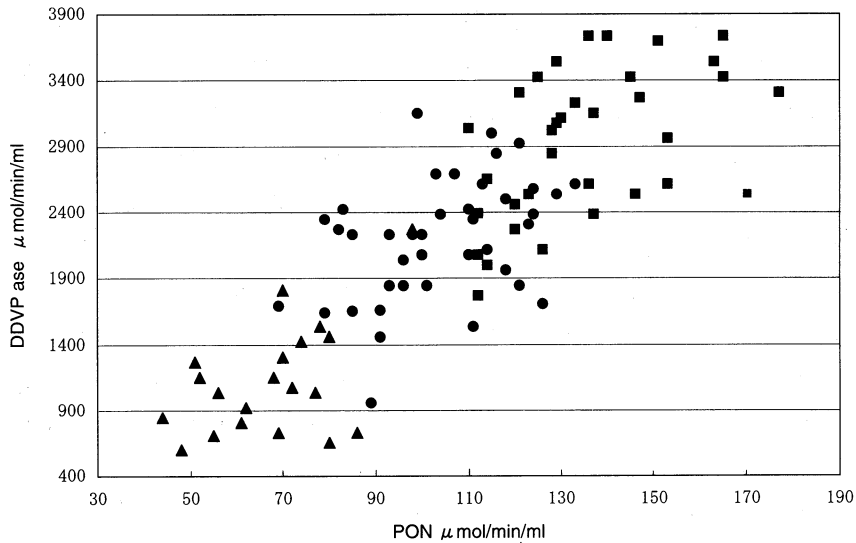


図3. 健常者の PON 活性に対する DDVPase 活性のプロット  
 両者は高い正の相関関係を示した ( $\gamma=0.86$ )。  
 ▲は QQ, ●は QR, ■は RR を示している。

果はRR, QR, QQの順に基質に対するPONの親和性の強さを示した。また、同じ血漿量を用いているにもかかわらず、 $V_{max}$ はRR>QR>QQであった。これらの事からPOX分解活性の強さがRR>QR>QQであることが示唆された。

- 3 健康者102名の血漿を用いて、有機リン農薬POXとDDVPそれぞれのPONによる分解活性を測定し両者の間の相関関係を調べた。相関係数 $r$ は0.86であり、両者は高い相関関係を示した(図3)。

## 考 察

有機リン殺虫剤は中枢および末梢神経系でアセチルコリンエステラーゼ(AchE)を阻害する。多くの有機リン殺虫剤はAchEへの作用の弱いP=Sチオノ型をしており、これが肝臓などのチトクローム酸化酵素によってP=Oオキソン型になって活性化され毒性を発揮し神経伝達物質のアセチルコリン(Ach)を分解する酵素、AchE、の活性を阻害する。するとAchが分解されず神経筋接合部などに蓄積し、過剰な神経興奮が起こる。その結果、急性期中毒症状としてムスカリン様症状、ニコチン様症状、交感神経症状および中枢神経症状など多彩な症状を引き起こす<sup>5)</sup>。また農業、園芸分野はもちろん公園の樹木、街路樹にも広く農薬が散布されており、しかも有機リン剤は農薬として使われるばかりではなく、疥癬治療用軟膏、動物内服用駆虫剤、金魚など鑑賞魚の寄生虫駆除剤、犬のノミ、シラミ、ダニ駆除のための首輪、木材防腐剤、シロアリ駆除剤、電車、バス、タクシーなどの車内消毒などにも使われている<sup>6)</sup>。従って、直接農薬を扱う農薬製造従事者および農業従事者ばかりでなく、一般の人々も有機リン剤との接触が避けられない現状にある。従って接触の回数やその量が増え、しかも農薬に対する感受性が高ければそれほどの量でなくても、慢性有機リン中毒症が発症する可能性がある。このような慢性薬物中毒では、急性中毒のような量-反応関係がみられず、同じような環境にあっても発症しないこともあり、また発症してもその程度に個人差、個体差がみられ、その差は最大40倍あるともいわれている。つまり有機リン剤に対する感受性に40倍の差があることになる。この要因としてPONの遺伝的偏り(genetic heterogeneity)、すなわち、RとQの多型が知られている<sup>7)</sup>。故に多型の型を知ることは有機リン剤への危険性の度合いを認識し、その取扱いへの注意を喚起することができる。実際、WHOでも有機リン剤による死亡事故防止対策としてPONの多型検索の必要性を報告している<sup>8)</sup>。現在私共は使用頻度の高い有機リン農薬についてPONが分解活性を有するか否かを検討し、またPON多型との関連を調べている。今回はDDVPについて報告した。図3に示したようにDDVPはPOXと高い相関関係を示した( $\gamma=0.86$ )。従って、RR型がDDVPに対して最も分解活性が高いことが示された。他の有機リン農薬について現在検討中である。また、健康者の中でのRR型の頻度は0.64であり、QQ型は0.36であった。これは阪大グループのRR型の0.66とほぼ等しい値であった<sup>9)</sup>。しかし、欧米人がRR型の0.26~0.31であるとの報告とは著しい差が見られた。

## 参 考 文 献

- 1) 内藤裕史：中毒百科，事例，病態，治療，第2版 南江堂2000，pp230-248
- 2) Richter RJ, Furlong CE: Determination of paraoxonase(PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 9:745-753, 1999
- 3) Reiner E, Simeon V, Skrinjaric-Spoljar M: Hydrolysis of O,O-dimethyl-2,2 - dichlorovinyl phosphate(DDVP) by esterases in parastic helminthes, and in vertebrate plasma and erythrocytes. *Comp Biochem Physiol* 66C:149-152, 1980
- 4) Hidaka K, Higashi M, Watanabe Y, Ueda N, Minatogawa Y, Iuchi I: Identification of a missense mutation(LDH-H: R171P) in a lactate dehydrogenase deficiency patient using the reverse transcription-polymerase chain reaction. *Kawasaki Med J* 25:7-14, 1999
- 5) Carlton FB, Simpson WM, Haddad LM: The organophosphates and other insecticides. *Clinical Management Poisoning and Drug Overdose* 3ed edition:836-845, 1998
- 6) Davis HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE: The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature genetics* 14:334-336, 1996
- 7) Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN: Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase(PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharm* 122:265-268, 1997
- 8) Yamasaki Y, Sakamoto K, Watada H, Kajimoto Y, Hori M: The Arg<sub>192</sub> isoform of paraoxonase with low sarin-hydrolyzing activity is dominant in the Japanese. *Hum Genet* 101:67-68, 1997