

カーバメート系農薬分解酵素の活性測定法と酵素の精製

川崎医科大学 生化学教室*, 医用中毒学教室**, 公衆衛生学教室***

日高和夫*・富田正文**・渡辺洋子*・勝山博信***・叶内宏明*・湊川洋介*

(平成15年10月13日受理)

Determination and purification of esterase with carbamate hydrolyzing activity

Kasuo HIDAKA*, **Masahumi TOMITA****, **Yoko WATANABE***,
Hironobu KATSUYAMA***, **Hiroaki KANOUCHI*** and **Yohsuke MINATOOGAWA***

*Department of Biochemistry,
Department of Medical Toxicology,
Department of Public Health,
Kawasaki Medical School,*

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

(Received on October 13, 2003)

概 要

ヒト血液中にはカーバメート系殺虫剤 (carbamate) を加水分解する酵素が存在する。そこで私共はカーバメート剤のうち、使用頻度の高い Carbaryl (1-naphthyl methylcarbamate) と XMC (3,5-xylyl methylcarbamate) を用いて、日本人53名の健常者の血漿によるこれらのカーバメート剤の分解活性を測定した。その結果、両カーバメート剤の分解活性の間には高い正の相関関係が見られた ($r=0.85$)。しかしこれらの分解活性には大きな個体差が見られた。この個体差の要因の一つとして遺伝子多型が考えられる。そこでこの酵素の遺伝子解析を計画し、最初に DEAE カラムによる高速液体クロマト法 (HPLC) を進め、酵素の分離精製を行った。キーワード: Carbaryl, XMC, HPLC

Abstract

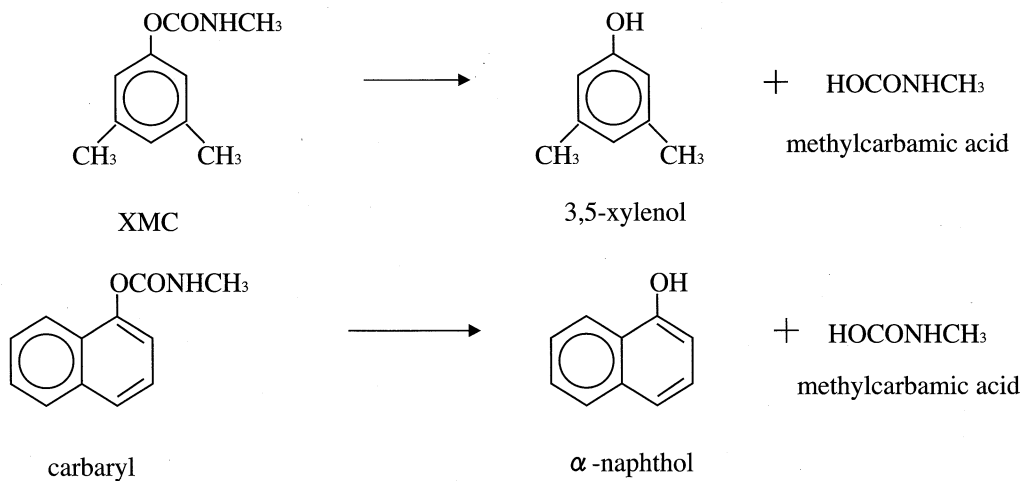
Human plasma is known to hydrolyse esters of carbamic acid (carbamate). The hydrolyzing activity for both Carbaryl and XMC (3,5-xylyl methylcarbamate), which are widely used as pesticides, was measured in plasma from 53 healthy subjects using a new method. A significant correlation was found between these two carbamates ($r=0.85$). However, an individual difference in the hydrolyzing activity of human plasma for carbamates seems to exist. To investigate the possibility that genetic polymorphism is involved in this strength of carbamate hydrolyzing activity in human plasma, separation and purification of Carbaryl hydrolase from human plasma have been carried out by means of high performance liquid chromatography with DEAE 5 PW gel, as first step of genetic studies.

はじめに

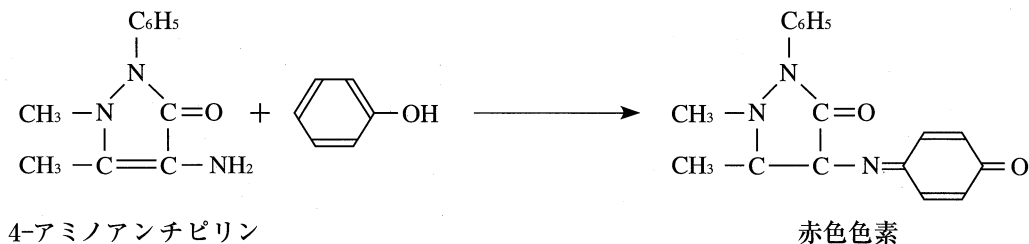
カーバメート剤は種類も多く、殺虫剤、除草剤および殺菌剤として農業あるいは家庭用、その他に有機リン剤について広く用いられている。従って、身近にあって容易に入手できるため、常に中毒の危険性に曝されており、中毒の発生件数も多い。特に農薬として使用される際の急性中毒はその散布時¹⁾やこれらの高濃度に暴露された農作物を摂取した際にみられる軽症から重症の中毒例の報告²⁾に散見されている。今回、私共はこれらのカーバメート剤がヒト血液中の酵素によって分解されることに注目し、分解活性の測定法を確立した。そこで健康者を対象にその分解活性を測定したところ、活性におおきな個体差が認められた。この個体差が中毒例の症状の軽重にかかわっている可能性が大きい。さらに個体差は酵素の遺伝子多型の存在を示唆するものであった。従って、現在遺伝子解析のためにヒト血漿中の分解酵素の分離精製を進めた。

材料と方法

Carbaryl と XMC の分解反応は次の如くである。



分解生成物のフェノール類は4-アミノアンチピリンと反応させると赤色色素が生成する。従って、この赤色色素の吸光度増減から酵素活性値を求めた。



試 薬

- a) 活性測定用緩衝液：50mM リン酸塩, 0.1%トリトン X-100, pH8.0
- b) 100mM Carbaryl/EtOH 保存液
1.6mM Carbaryl 使用液：保存液を活性測定用緩衝液で希釈して使用液とする。
- c) 100mM XMC/EtOH 保存液
1.6mM XMC 使用液：保存液を活性測定用緩衝液で希釈して使用液とする。
- d) b) HPLC 用緩衝液：A. 20mM Tris-HCl pH8.0, B. 20mM Tris-HCl, 0.5MNaCl pH8.0

発色用試薬

4-アミノアンチプリン溶液：4-アミノアンチプリン90mg を炭酸緩衝液 (50mM, pH8.0) の 200ml に溶かし, これにトリトン X-100を200 μ l 加える。

赤血塩溶液：ホウ酸2.6g を水200ml に溶かし, これにフェリシアン化カリウム (赤血塩) 0.38g とトリトン X-100を200 μ l 加える。

材 料

- a) カーバメート系農薬基質に対する分解酵素の相関関係のための試料は健常者の凍結保存血漿を用いた。
- b) 分離精製用血漿は DEAE Toyopearl gel カラムを作製して前処理を行った。
- c) 分離用カラム：TSK gel DEAE-5PW 21.5 (ID) \times 150mm

Carbaryl 分解活性測定法

Carbaryl 使用液200 μ l を試験管に入れ, これに血漿希釈液 (血漿90 μ l, 緩衝液30 μ l) を加え, 37 $^{\circ}$ C の恒温槽で60分間反応させる。反応後1.5ml の4-アミノアンチプリン溶液を加える。次に攪拌しながら1.5ml の赤血塩溶液を加えた。5分後再度攪拌し, 500nm で吸光度測定を行う。

XMC 分解活性測定法

XMC 使用液200 μ l を試験管に入れ, これに血漿希釈液 (血漿100 μ l, 緩衝液20 μ l) を加え, 37 $^{\circ}$ C の恒温槽で90分間反応させる。反応後1.5ml の4-アミノアンチプリン溶液を加える。次に攪拌しながら1.5ml の赤血塩溶液を加えた。5分後再度攪拌し, 550nm で吸光度測定を行う。

TSK-DEAE 5PW High performance Liquid Chromatography (HPLC)

前処理した血漿の希釈液を A 緩衝液で平衡化されたカラムに注入した。5 ml/min の流速で 45分間 0 ~ 0.5MNaCl の直線勾配により分解酵素の分離を行った。分解酵素の検出はカラム溶出液の各フラクション444 μ l に56 μ l の11mM Carbaryl 希釈液を加え, 37 $^{\circ}$ C で60分間反応させた。この反応液に4-アミノアンチプリン溶液 (1.5ml) および赤血塩溶液 (1.5ml) を加えて発色

させ、500nm で測定した。発色した分画のうち目的領域を集めて凍結乾燥した。

結 果

活性測定

人血漿中の分解酵素に対するカーバメート系農薬の Carbaryl と XMC, それぞれの基質濃度を変えて, その反応性を調べた。その結果を Lineweaver-Burk の二重逆数プロットで解析した (図 1)。Carbaryl に対しては $K_m=1.0\text{mM}$, XMC に対しては $K_m=2.0\text{mM}$ であった。この結果は Carbaryl, XMC の順に基質に対する分解酵素の親和性の強さを示した。

健常者53名の凍結血漿を用いて Carbaryl と XMC に対する分解酵素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 $\gamma=0.85$ であり, 両者は高い相関関係を示した (図 2)。

酵素の分離精製

前処理した血漿を注入した TSKgel DEAE-5PW の高速液体クロマトによる溶出パターンと

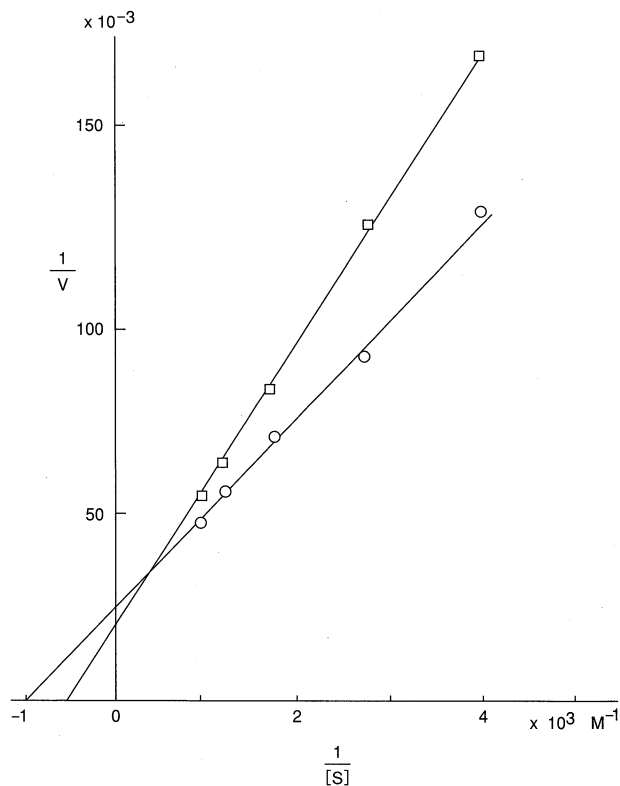


図 1 Carbaryl と XMC の分解活性に対する基質濃度の影響
Carbaryl は $K_m=1.0\text{mM}$, XMC は $K_m=2.0\text{mM}$ を示した
 \circ は Carbaryl, \square は XMC を示す。

Cabaryl を基質とした分解活性を示した (図 3)。分解活性分画を集め凍結乾燥して得られた乾燥物の比活性を求めた (表 1)。血漿から108倍の濃縮率を示した。

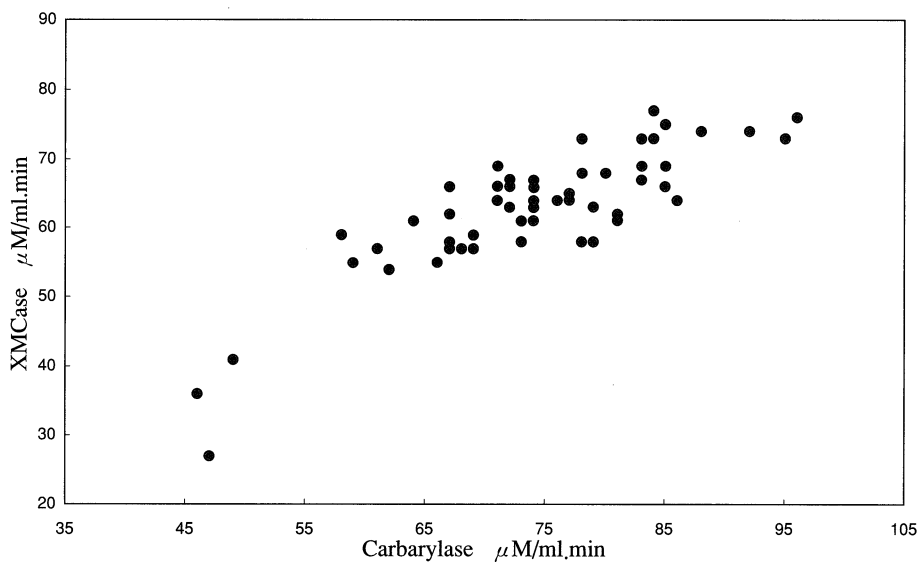


図 2 健常者の Carbaryl 分解活性と XMC 分解活性の関係
両者は高い正の相関関係を示した ($\gamma = 0.85$)

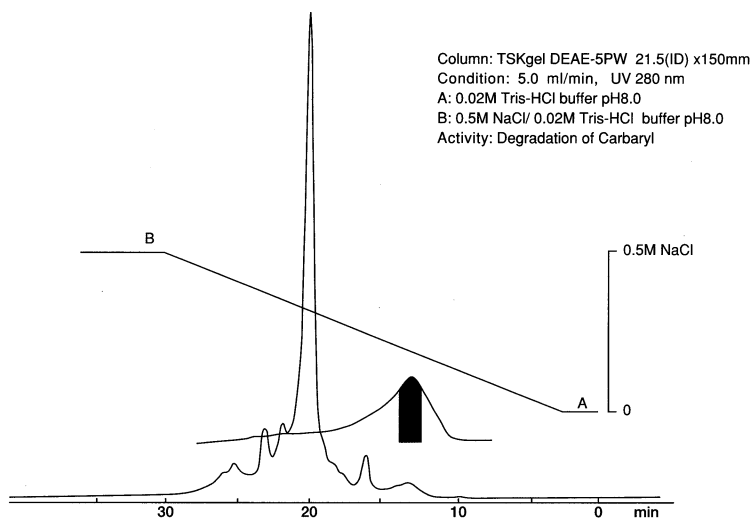


図 3 血漿内分解酵素の高速液体クロマトグラフィー (HPLC)
Carbaryl 分解活性曲線中の ■ は回収した領域を示している

表 1 分解酵素の精製

	mg/ml	$\mu\text{M}/\text{ml}\cdot\text{min}$	Sp Act
前処理試料	154	150	0.974
TSK-DEAE	0.44	46	105

考 察

今日、農薬は農作物の生産性の向上を目的として必要不可欠な存在となっている。しかし、病害虫や雑草の駆除もさることながら人体に与える強い毒性も問題視されるようになり、多くの農薬が販売禁止や制限の措置がとられるようになった。かつて使用された強毒性の TEPP やパラチオンなどの有機リン剤やエンドリンや BHC などの有機塩素剤は使用禁止となり、これらに代わるものとして低毒性の有機リン剤やカーバメート剤が農薬として注目されるようになった³⁾。カーバメート剤はカルバミル酸エステルの総称で、有機リン剤と同様にアセチルコリンエステラーゼ (AchE) 活性を阻害する。そのためニューロンのシナプスでアセチルコリン (ACh) の分解能が低下し、その結果 ACh の蓄積がおこり副交感神経、中枢神経系は刺激状態となり、縮瞳、徐脈、血圧低下など、有機リン剤と同様の臨床症状を呈し、時には死亡する場合もある⁴⁾。今回はカーバメート剤のうち Carbaryl と XMC について報告した。図 2 に示したように Carbaryl と XMC の分解活性の間に高い相関関係 ($r=0.85$) があった。また各個人の活性値に個体差がみられた。この個体差、すなわち、活性の強弱の要因の一つとして分解酵素の遺伝的偏り (genetic heterogeneity)、すなわち多型の存在が示唆される。カーバメート分解酵素の多型を知る事は各個人のカーバメート剤への危険性の度合を認識することができ、その取り扱いへの注意を喚起することができる。

分解活性への NaCl の影響を調べると NaCl の含有量に逆比例して活性は減少した (データは示さない)。DEAE カラムによる HPLC の溶出パターンでの分解活性の領域の凍結乾燥処理した物を溶解し、この溶解液の Carbaryl 分解活性を測ると高い比活性を示した (表 1)。HPLC からの溶出に NaCl を使用しているためこの凍結乾燥物は多量の NaCl が残存しており、従って、上記に記した NaCl の影響を考えると NaCl だけが除去されれば比活性はさらに増加すると思われる。しかしながら、実際に NaCl の除去のために透析を行うと活性は消失した。また HPLC の活性領域を凍結乾燥せずに遠心濃縮を実施した場合も活性は消失した。この事は透析という手段によりホロ酵素である酵素から補酵素等が遊離したため活性が消失したものと思われる。現在、透析した分離溶液の再活性化を検討している。

研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (14-116, 15-110A) によって行われた。

参 考 文 献

- 1) Simpson GR, Bermingham S: Poisoning by carbamate pesticide. *Med J Aust* 2:148-149, 1977
- 2) Goes EA, Savage EP, Gibbons G, Aaronson M, Ford SA, Wheeler HW: Suspected foodborne carbamate pesticide intoxications associated with ingestion of hydroponic cucumbers. *Am J Epidemiol* 3:254-260, 1980
- 3) 内藤裕史: 中毒百科, 事例, 病態, 治療, 第 2 版 南江堂, 2000
- 4) 西村正雄: 有機リン剤, カーバメート剤, 救急医学 12(10):1427-1437, 1988