

コイのアセチルコリンエステラーゼの精製と諸特性の解析

環境生物化学研究室 三谷一浩

指導教官 解良芳夫

山田良平

高橋祥司

1. はじめに

国内における農薬の使用量は減少傾向にあるものの、依然大量に使用されている。農薬の中で有機リン系化合物は、有機塩素系化合物と比較して環境中で容易に代謝分解されるため、近年、殺虫剤、殺菌剤又は除草剤として広く使用されている。また、有機リン化合物は壁材・電気用品・衣類・カーペット・カーテンなどに添加される難燃剤・可塑剤、あるいは油圧液や潤滑材などとしても広汎に大量使用され続けている。有機リン系殺虫剤の利用について、米英では Diazinon や Diazinon oxon, Dimethyl 4-nitro-m-tolylphosphorothionate (MEP), Parathion-methyl などの有機リン系殺虫剤の基準値の見直しや使用廃止など、子供の脳や神経の発達に与える影響も考慮して規制が強められている。それに対し日本ではその毒性があまり重視されず規制面で立ち遅れている。

アセチルコリンエステラーゼ (EC 3.1.1.7、以下、AChE) は、シナプス間隙において神経伝達物質アセチルコリンを加水分解する酵素である。殺虫剤の重要なグループである有機リン系殺虫剤は、AChE の触媒部位に存在するセリン残基との間に安定な共有結合性の複合体を形成することにより、AChE を阻害することが知られている。AChE が阻害されるとアセチルコリン受容体付近でアセチルコリンが増加し、受容体への刺激が増強される。その結果、縮瞳、けいれん、呼吸困難、意識消失などの症状を引き起こし、死に至る場合もある。

しかしながら、有機リン系殺虫剤による曝露が直ちに AChE の阻害に結びつくわけではない。例えば、哺乳類では曝露された有機リン系殺虫剤は血液中のブチリルコリンエステラーゼ (EC 3.1.1.8、以下、BtChE) やカルボキシルエステラーゼなどに結合することによって緩衝されるとともに、肝臓でパラオクソナーゼやカルボキシルエステラーゼなどの代謝酵素の働きによって分解される。有機リン系殺虫剤の選択毒性はこれらの酵素活性の有無から来ていると考えられている。

魚類の脳や筋組織における AChE の比活性の減少は、有機リン系殺虫剤曝露に対する有用なバイオマーカーとなると考えられ、多くの野外調査で様々な魚類の AChE の酵素活性が調べられている。一方、酵素学的な諸特性が明らかにされている魚類の AChE は、シビレイや電気ウナギの発電器官とカレイ筋組織の AChE だけである。我々は、AChE の比活性の減少をバイオマーカーとして用いて影響を正確に評価するためには、野外調査によく用いられる魚類の AChE の酵素的特性を把握することが不可欠であると考え、コイの AChE を精製し、その諸特性の解析を試みた。

2. AChE の組織分布

コイ組織中での AChE の分布を調べ、どの組織を精製に用いるかを検討した。検討には養魚場から購入した 200~400 g のコイを用いた。各組織ホモジネートの AChE の比活性を調べた結果、脳の比活性が $0.298 \pm 0.059 \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($n = 6$) と最も高く、ついで筋組織の比活性が高かった。また、AChE と BtChE の比活性を比較すると、筋組織ホモジネートでは 16 倍、血清や血漿では 10 倍以上高かった。以上の結果から、コイ組織では一般に、AChE の活性が BtChE の活性より

高いこと、組織には遊離型の AChE が少なく膜結合型の割合が高いことが明らかになった。なお、1 個体から得られる総活性量を考慮し、筋組織を精製材料に用いることにした。

3. 膜からの AChE 可溶化

精製に用いる画分を決めるために、コイ筋組織からの AChE の可溶化の検討を行った。その結果、筋組織の膜画分から高濃度塩類を含む緩衝液で 80% 以上の活性が可溶化されたことから、コイの筋組織の AChE はコラーゲン様尾部を有する非対称タイプであることが示唆された。

4. 筋組織からの AChE の精製

養魚場から購入した体重 30~50 g のコイから採取した筋組織、約 750g を精製材料に用いた。筋組織から、可溶化、Affinity column chromatography を経て、精製倍率約 79700 倍、収率約 45.8% で、比活性 14900 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ を有する精製標品が得られた。この比活性はシビレイの発電器官やカレイの筋肉から類似の方法で精製された酵素標品の比活性より、数倍高い値であった。得られた精製標品を SDS-PAGE で解析した結果、その泳動パターンは、シビレイの発電器官から精製されたコラーゲン様尾部を有する非対称タイプの SDS-PAGE 泳動パターンと同様に、触媒サブユニットと考えられるメインバンドの他に、コラーゲン様尾部に由来すると考えられる数本のマイナーバンドを示した。

Table 1 Purification of AChE from Koi carp muscle

Step	Total activity ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$)	Total protein (mg)	Specific activity ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)	Purification (fold)	Yield (%)
Homogenate	12500	66900	0.187	1	100
Solubilization with HS buffer	14700	26000	0.565	3.02	117
Affinity chromatography	5720	0.383	14900	79700	45.8

5. 酵素学的諸特性

このコイ AChE 精製標品の基本的な酵素学的諸特性の解析を行ったところ、酵素反応の至適温度は 40、至適 pH は 7.6-8.0 であった。3 種類の基質 (acetylthiocholine、propionylthiocholine、butyrylthiocholine) に対する Kinetic parameter を調べたところ、acetylthiocholine に対する K_m 値、 V_{max} 値はそれぞれ、 0.232 ± 0.02 mM、 15.6 ± 0.42 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ であり、この基質に対する V_{max}/K_m 値が他の 2 種類の基質に対する値より圧倒的に高く、acetylthiocholine が最も良い基質であった。また、いずれの基質によっても、高濃度領域で、基質による酵素阻害が認められた。

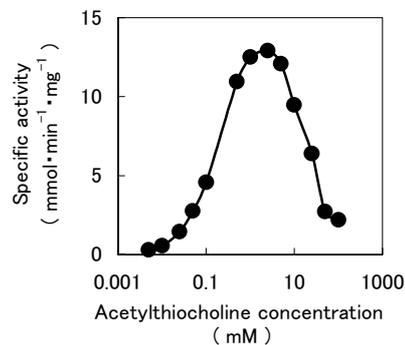


Fig.1 Effect of substrate concentration on purified carp AChE activity

Table 2 Kinetic parameters of purified Koi carp AChE

Substrate	K_m (mM)	V_{max} (mmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	V_{max}/K_m	K_i (mM)
Acetylthiocholine	0.232 ± 0.02	15.6 ± 0.42	67.2	5.6
Propionylthiocholine	0.526 ± 0.09	5.29 ± 0.41	10.1	15.6
Butyrylthiocholine	0.041 ± 0.007	0.089 ± 0.007	2.17	418

6. Inhibitor, pesticide, flame retardant の影響

AChE や BtChE の阻害剤や殺虫剤、当研究室で微生物分解が検討されている TDCPP や TCEP について、精製酵素への影響を調べた。

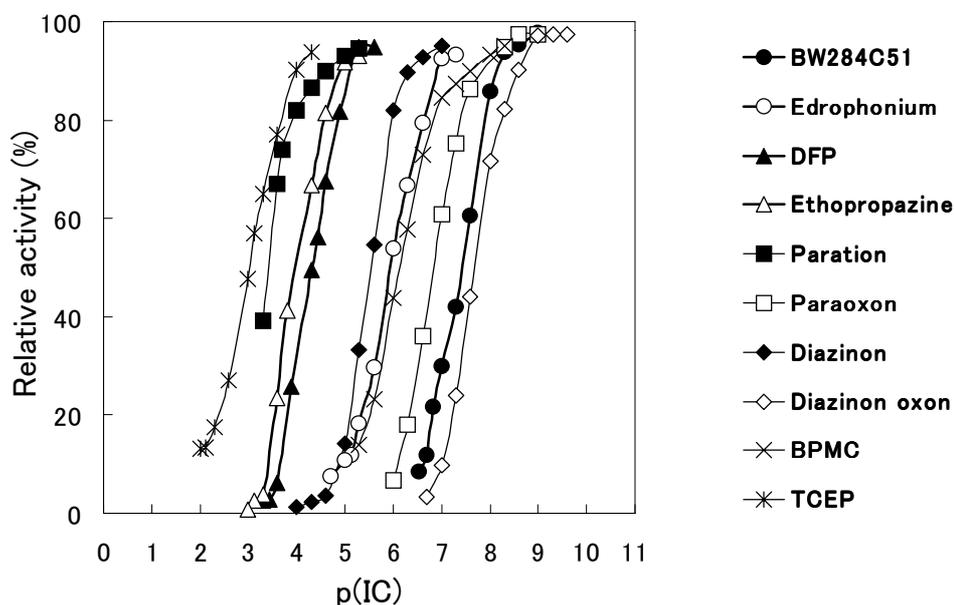


Fig. 2 Inhibition of purified Koi carp AChE by inhibitor, pesticide and flame retardant

その結果、BW284C51 や Edrophonium, DFP といった AChE の阻害剤やオクソン体の有機リン系殺虫剤、カルバメート系殺虫剤が強い影響を示した。また、チオン体の有機リン系殺虫剤は生体内でオクソン体に代謝され、数十倍から数百倍程度 AChE への影響が強くなるということが知られており、今回のチオン体、オクソン体の影響はそれと一致した。

20% 阻害濃度、50% 阻害濃度である $p(IC_{20})$ と $p(IC_{50})$ を算出した結果、BW284C51 や BtChE の阻害剤である Ethopropazine の $p(IC_{50})$ がシビレエイから精製されたコラーゲンを有する AChE とほぼ同じ値を示した。また、Diazinon oxon や Isoxathion oxon, Malaaxon などのオクソン体の有機リン系殺虫剤は、AChE の特異的な阻害剤である BW284C51 より $p(IC_{50})$ が高く、コイに対して強い影響を示した。

Table 3 p(IC₅₀) and p(IC₂₀) for inhibitors, flame retardants and pesticides of purified Koi carp AChE

Inhibitor	p(IC ₅₀)	p(IC ₂₀)	Specific group / reversibility
BW284C51	7.38	7.93	reversible
Edrophonium	5.98	6.65	reversible
DFP	4.33	4.84	P=O, irreversible
Ethopropazine	4.04	4.54	irreversible
Procaïnamide	3.08	3.76	reversible
PMSF	2.92	3.41	irreversible
Flame retardant			
TCEP	3.02	3.64	irreversible
TDCPP	n.d.	n.d.	n.d.
Pesticide			
Azinphos-ethyl	4.46	4.94	P=S, irreversible
Azinphos-methyl	4.27	4.87	P=S, irreversible
Chlorpyrifos	5.04	5.57	P=S, irreversible
Chlorpyrifos-methyl	4.45	4.97	P=S, irreversible
Diazinon	5.53	5.97	P=S, irreversible
Diazinon oxon	7.70	8.22	P=O, irreversible
DEP	4.92	5.46	P=O, irreversible
DDVP	5.75	6.37	P=O, irreversible
Ethion	n.d.	n.d.	n.d.
Ethoprosfos	4.43	4.91	P=O, irreversible
EPN oxon	7.26	8.03	P=O, irreversible
Isoxathion	n.d.	4.62	P=S, irreversible
Isozathion oxon	8.17	8.77	P=O, irreversible
Leptophos	4.58	5.16	P=S, irreversible
Malathion	3.77	4.43	P=S, irreversible
Malaaxon	7.31	7.98	P=O, irreversible
MEP	n.d.	3.64	P=S, irreversible
MEP oxon	5.67	6.26	P=O, irreversible
MPP	n.d.	4.21	P=S, irreversible
Parathion	3.42	3.76	P=S, irreversible
Paraaxon	6.86	7.42	P=O, irreversible
Parathion-methyl	3.22	3.79	P=S, irreversible
Paraaxon-methyl	6.22	6.98	P=O, irreversible
BPMC	6.12	6.85	carbamete, irreversible
PHC	6.02	6.60	carbamete, irreversible

The values for p(IC₅₀) and p(IC₂₀) were calculated from the Toutant plots.

The n.d. was not detectable.

略語表記

- 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl)pentan-3-one dibromide (BW284C51, AChE inhibitor)
 Edrophonium (AChE inhibitor), Procaïnamide (BtChE inhibitor)
 Diisopropyl fluorophosphate (DFP, AChE inhibitor)
 Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Serine protease inhibitor)
 Tetra isopropylpyrophosphoramidate (iso-OMPA, BtChE inhibitor)
 Tris (2-chloroethyl) phosphate (TCEP), Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP)
 Dimethyl 2,2,2-Trichloro-1-hydroxyethylphosphonate (DEP)
 2,2-Dichlorovinyl Dimethyl Phosphate (DDVP), *O*-Ethyl *O*-4-Nitrophenyl Phenylphosphonate (EPN oxon)
O, *O*-Dimethyl *O*-4-Nitro-*m*-tolyl Phosphorothioate (MEP)
O, *O*-Dimethyl *O*-3-Methyl-4-nitrophenyl Phosphate (MEP oxon)
O, *O*-Dimethyl-*O*-4-methylthio-*m*-tolyl Phosphorothionate (MPP)
 2-*sec*-Butylphenyl Methylcarbamate (BPMC), 2-Isopropoxyphenyl Methylcarbamate (PHC)