

②

ミトコンドリア電子伝達を阻害する殺菌剤  
flutolanil および殺ダニ剤 fenpyroximate の  
作用機構および選択毒性発現機構に関する研究

1993 年

元 場 一 彦

ミトコンドリア電子伝達を阻害する殺菌剤  
flutolanil および殺ダニ剤 fenpyroximate の作用機構  
および選択毒性発現機構に関する研究

目次

序論	1
第1編 Flutolanil の抗菌作用および選択的活性発現の機構	
第1章 <i>Rhizoctonia solani</i> に対する抗菌作用機構	
1-1 緒言	4
1-2 材料および方法	
1) 化合物	5
2) 供試菌株	5
3) ミトコンドリア画分の調製	5
4) 呼吸活性の測定	6
5) Succinate および glucose 代謝に及ぼす影響	7
1-3 結果	
1) <i>Rhizoctonia solani</i> 菌糸の酸素消費に対する影響	8
2) <i>R. solani</i> 菌糸ミトコンドリアの電子伝達に対する影響	9
3) <i>R. solani</i> 菌糸の glucose および succinate 代謝におよぼす影響	10
4) Flutolanil と関連化合物, mebenil および mepronil の比較	11
1-4 考察	12
1-5 本章の要約	15

## 第 2 章 選択的抗菌活性の発現機構

2-1 緒言	17
2-2 材料および方法	
1) 供試菌株	18
2) ミトコンドリア画分の調製および電子伝達活性の測定	18
2-3 結果	
1) 種々の糸状菌の生育およびミトコンドリア complex II 活性に及ぼす影響	18
2-4 考察	21
2-5 本章の要約	22

## 第 3 章 総合考察

## 第 2 編 Fenpyroximate の殺ダニ作用および選択毒性発現の機構

### 第 1 章 Fenpyroximate の殺ダニ作用機構

1-1 緒言	26
1-2 材料および方法	
1) 化合物	27
2) <i>Tetranychus urticae</i> Koch	27
3) <i>T. urticae</i> 虫体 ATP 含量の測定	28
4) ラット肝および <i>T. urticae</i> 分離ミトコンドリアの電子伝達活性の測定	29
5) <i>T. urticae</i> 雌成虫の超微細形態の観察	29

1-3 結果	……	30
1) <i>T. urticae</i> 雌成虫の ATP 含量に及ぼす影響	……	30
2) ラット肝および <i>T. urticae</i> 分離ミトコンドリアの 電子伝達に及ぼす影響	……	33
3) <i>T. urticae</i> 雌成虫の超微細形態に及ぼす影響	……	36
1-4 考察	……	36
1-5 本章の要約	……	41

## 第 2 章 ラットにおけるエステル加水分解機構

2-1 緒言	……	42
2-2 材料および方法		
1) 化合物	……	43
2) ラット単回経口投与における代謝	……	45
3) ラット肝ホモジネート 9000 x g 上清画分による代謝	……	46
4) 代謝中間体 A および B の精製および構造決定	……	46
5) 代謝中間体 A のエステル転位反応速度の測定	……	46
6) エステル加水分解速度の測定	……	46
2-3 結果		
1) ラットにおける初期代謝	……	47
2) ラット肝ホモジネート 9000 x g 上清画分による代謝	……	49
3) 代謝中間体の単離および構造決定	……	50
4) 代謝中間体のエステル転位反応	……	54
5) 代謝中間体および fenpyroximate 類縁体の エステル加水分解速度	……	55
2-4 考察	……	57
2-5 本章の要約	……	60



## 第 3 章 選択的活性発現の機構

3-1 緒言	61
3-2 材料および方法	
1) 呼吸阻害活性の測定	62
2) <i>T. urticae</i> による fenpyroximate の代謝	62
3) エステル加水分解速度の測定	62
4) 酸化代謝速度の測定	63
3-3 結果	
1) Fenpyroximate およびその代謝物の電子伝達阻害活性	63
2) <i>T. urticae</i> による fenpyroximate の代謝	64
3) ラット肝および <i>T. urticae</i> より調製した 9000 x g 上清画分のエステル加水分解活性	65
4) 各種生物の fenpyroximate 代謝活性の比較	66
3-4 考察	68
3-5 本章の要約	69

## 第 4 章 総合考察

総括	73
要約	75
謝辞	78
参考文献	79
公表論文	84

## 序 論

生命現象の生化学的な機構解明に阻害剤が "tool" として役だった例は枚挙に暇がない。例えば, penicillin, cephalosporin 類は細菌細胞壁の構造および合成機構の解明に (Demain, A. L., 1975), chloramphenicol, streptomycin, tetracycline, puromycin, erythromycin 等はタンパク合成およびリボゾームの構造と機能の解明に大いに貢献した (Pestka, S., 1969; 1971; 1972). ここでは特異的な阻害剤が複雑で連続した生化学反応を特定の段階で停止させることによって断面化し, 観察可能ならしめたのである。ここに挙げた阻害剤の場合, その作用機構研究そのものが作用点の生化学の理解に結びついており, 阻害剤の作用機構研究の歴史は生化学反応の機構解明の歴史そのものであるとしても過言ではあるまい。

"農薬" は昆虫, 植物病原菌, 雑草等における特定の生化学反応を攪乱し, その生育・増殖等を阻害する化学物質であり, その作用機構が明確となれば, 前述の如く生命現象解明のための "tool" としても利用でき, また対象生物の生化学に新たな知見をもたらすことも期待できるであろう。実際に, 既存の除草剤や植物生長調節剤のあるものは植物生理学および生化学の発展に寄与してきた (Fedtke, C., 1982) 例もある。

現在の新農薬の開発・探索の多くは試行錯誤的に進められており, その効率の低さはたびたび指摘される場所である。1つの農薬を開発するために数万におよぶ候補化合物を合成する必要があるとさえされている。加えて, 過去に DDT 等の有機塩素剤が引き起こした環境汚染に対する反省から, 新しい農薬の特性として環境に対するインパクトが小さいことも求められている。新しい農薬あるいはその候補化合物には高活性すなわち, 低薬量で効果を示し, かつ高選択性, すなわち哺乳類, 天敵, 環境生物等に対し低毒性であることが求められているのである。このように新農薬開発が低効率・困難となりつつある状況の



なかで、一方ではその創出のために種々の新たな試みもなされている。QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) 的アプローチや生合理的アプローチ、すなわちレセプターマッピングに基づくなどした化合物の合理的分子デザイン、等は その良い例としてあげられる (Yoshida, S., 1990)。このような化合物の合理的デザインを可能ならしめる基礎的な情報として、既存化合物の作用機構およびレセプターに関する情報は極めて重要である (Yoneyama, K., 1992)。また、選択毒性の発現機構に関する情報も、より低毒性で安全な薬剤の創出に貢献するであろう。

以上に述べてきたように、農薬あるいはその候補化合物の作用機構および選択毒性発現機構の研究は、基礎的な学問分野、新剤創出のための応用分野を問わず大きな意義を有している。日本農薬株式会社が発見・開発した2種の農薬、すなわち殺菌剤 flutolanil ( $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-3'-isopropoxy-*o*-toluanilide, Moncut™) および殺ダニ剤 fenpyroximate (*tert*-butyl (*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxypyrazol-4-ylmethyleneaminoxy)-*p*-toluate, Danitron™) はいずれも高活性でかつ選択性に優れた薬剤である (Araki, F. and Yabutani, K., 1981; Kurono, H., 1985; Araki, F., 1985; Konno, T. *et al*, 1990; Hamaguchi, H. *et al*, 1990)。これら化合物の作用機構および選択毒性発現機構について検討することは前述の如く基礎・応用の何れの分野にも寄与するところが大きく、さらに両化合物の安全性の科学的裏付けとしても重要な情報を提供するものと考えられた。このような理由から 両化合物の作用および選択毒性発現機構について種々検討した結果、flutolanil はミトコンドリア succinate dehydrogenase complex (complex II) の、そして fenpyroximate は NADH ubiquinone oxidoreductase complex (complex I) の特異的阻害剤であることを見出だした。またこれらの化合物の選択毒性は、前者においては作用点であるミトコンドリア succinate dehydrogenase complex の感受性自身に、後者においては標的生物と非標的生物間の代謝分解 (解毒代謝) 活性の差に起因することを明らかにした。さらに fenpyroximate の選択毒性発現機構について検討する過程で、生体内において生成した  $\beta$ -水酸化3級アルコー

ルエステルが非酵素的な分子内エステル転位反応によって1級アルコールエステルに転換し容易に加水分解を受けることを見出だした。本論文は以上の研究過程についてとりまとめ考察したものである。

一、はじめに

Phenyl 2-(2-oxocyclohexyl)acetate (I) は、植物界に分布する天然化合物に属する。Phenylacetate 系、Cinnamate 系、Tyrosine 系などでは  $\alpha$ -oxo- $\beta$ -keto 構造の分子内転位のことで有名な反応が知られており、天然の植物界において見出されている化合物である (Mull. & J. J. Yarnes, *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 194; S. K. Mitra, *J. Biol. Chem.*, 1953, 200, 100; H. H. G. Oelke, *J. Biol. Chem.*, 1957, 222, 100; J. J. Yarnes, *J. Biol. Chem.*, 1957, 222, 100)。また、1960年代に J. J. Yarnes 等は、天然の  $\alpha$ -oxo- $\beta$ -keto 構造の分子内転位のことで有名な反応が知られており、天然の植物界において見出されている化合物である (Mull. & J. J. Yarnes, *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 194; S. K. Mitra, *J. Biol. Chem.*, 1953, 200, 100; H. H. G. Oelke, *J. Biol. Chem.*, 1957, 222, 100; J. J. Yarnes, *J. Biol. Chem.*, 1957, 222, 100)。また、1960年代に J. J. Yarnes 等は、天然の  $\alpha$ -oxo- $\beta$ -keto 構造の分子内転位のことで有名な反応が知られており、天然の植物界において見出されている化合物である (Mull. & J. J. Yarnes, *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 194; S. K. Mitra, *J. Biol. Chem.*, 1953, 200, 100; H. H. G. Oelke, *J. Biol. Chem.*, 1957, 222, 100; J. J. Yarnes, *J. Biol. Chem.*, 1957, 222, 100)。



Fig. 1. Phenyl 2-(2-oxocyclohexyl)acetate (I).

# 第 1 編 Flutolanil の抗菌作用および 選択的活性発現の機構

## 第 1 章 *Rhizoctonia solani* に対する抗菌作用機構

### 1-1. 緒言

Flutolanil ( $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-3'-isopropoxy-*o*-toluanilide, 図 1) はイネ紋枯病をはじめとする, *Rhizoctonia* 属, *Corticium* 属, *Typhula* 属 および *Gymnosporangium* 属等の担子菌類によって引き起こされる植物病害に卓効を示し, 実際の農業場面において使用されている殺菌剤である (Araki, F. and Yabutani, K., 1981; Kurono, H., 1985; Araki, F., 1985; Mochizuki, H. *et al*, 1987). Carboxin (5,6-dihydro-2-methyl-*N*-phenyl-1,4-oxathiin-3-carboxamide) の発見 (Edginton, L. V., 1966) に端を発して, これまでに数多くの carboxanilide 系殺菌剤が見出だされてきたが, 1987年 Takahashi らは, 2-置換-3'-isopropoxy-benzanilide の構造活性相関について検討し, benzoic acid 環のオルト位の置換基は  $\text{CF}_3$  基, すなわち flutolanil の場合, が最適値に最も近いことを報告している (Takahashi, Y. *et al*, 1987). 本章においては, 本化合物の作用機構について, 実際の防除対象であり感受性菌でもある *Rhizoctonia solani* (イネ紋枯れ病菌) を用い生化学的に検討した結果について述べる.

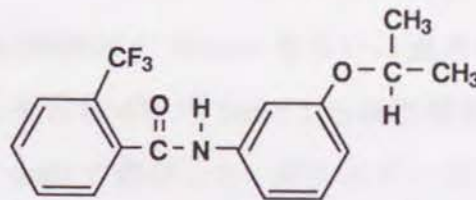


Fig. 1. Structure of Flutolanil.



## 1) 化合物

Flutolanil, mebenil (*o*-toluanilide), および mepronil (3'-isopropoxy-*o*-toluanilide) は日本農薬(株)化学研究所にて合成および精製された原体 (純度 99% 以上) を用いた. 2, 6-Dichlorophenolindophenol (DCIP) および phenazin methosulfate (PMS) は東京化成工業(株) (東京) 製のものを, ubiquinone (coenzyme Q10) および cytochrome *c* は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 製のものをを用いた. [2, 3-<sup>14</sup>C] succinic acid sodium salt (2.8 GBq/mmol), [6-<sup>14</sup>C] D-glucose (1.8 GBq/mmol) は Du Pont/NEN Research Products Inc. (Boston, Mass., USA) から購入した. その他の試薬および溶媒は市販特級品を用いた.

## 2) 供試菌株

*Rhizoctonia solani* IA は日本農薬(株)生物研究所において継代維持されている菌株を用いた. 継代培養は potato-dextrose 培地において 25°C で行なった. 液体培養は 1.8% sucrose, 0.5% polypeptone, 0.3% yeast extract, 0.17% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.14% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.005% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O より成る培地を用いて 25°C で行った. 菌糸生育阻害は既報の方法 (Araki, F., 1981) に従って, 菌糸乾燥重量を測定することによって評価した.

## 3) ミトコンドリア画分の調製

*R. solani* 菌糸のミトコンドリアは以下のようにして調製した. 対数増殖初期の *R. solani* 菌糸を遠心分離 (3000×*g*, 10min) あるいは濾過によって集菌し, 0.25 M sucrose, 1mM EDTA を含む 4°C の 3mM Tris-HCl 緩衝液を加え, 氷冷下にガラスビーズ (φ 0.5 ~ 1 mm) と磨碎した. ガラスビーズを濾別して得られた菌糸磨碎液を 4°C で 1000×*g*, 10 分間遠心分離し, 得られた上清をさらに, 4°C で 15,000×*g*, 15 分間遠心分離し, ミトコンドリア画分の沈澱を得た. 沈澱を

前述の緩衝液で洗浄した後、10 mg protein/ml となるよう EDTAを除いた同緩衝液に再懸濁し、ミトコンドリア画分として用いた (White, G. A. and Thorn, G. D., 1975; White, G. A. *et al*, 1978; White, G. A. and Georgopoulos S. G., 1978).

ラット肝分離ミトコンドリアは 6 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットから、以下の方法に従って調製した。ラットを一夜絶食の後に断頭放血・致死させ、速やかに肝を摘出し 9 倍量の氷冷した等張緩衝液 (0.25 M sucrose, 0.1 mM EDTA, 3mM Tris-HCl, pH 7.4) 中でホモジナイズした。得られたホモジネートを遠心分画し、ミトコンドリア画分 (1000×g 上清, 8000×g 沈澱画分) を得た。ミトコンドリア画分は洗浄の後、等張緩衝液 (0.21 M sorbitol, 0.04M sucrose, 0.1 mM EDTA, 3mM Tris-HCl, pH 7.4) に 10 mg protein/ml となるよう懸濁し以後の実験に用いた (Sanadi, D. R. *et al*, 1967)。

*R. solani* ミトコンドリアの soluble succinate dehydrogenase 活性は以下に示す方法に従って調製した。ミトコンドリア懸濁液に 1% となるよう Triton X-100 を加え、0°C で超音波処理 (Model B-15P, Branson Sonic Power, CT, USA) した後、遠心分離し (4°C, 10,000×g, 15 min), 得られた上清画分を可溶性画分とし、soluble succinate dehydrogenase 活性の測定に用いた (Georgopoulos, S. G. *et al*, 1975)。

ミトコンドリアあるいは可溶性画分のタンパク量は Bovine Serum Albumin (BSA) を標準とし Lowry の変法で測定した (Bensadoun, A. and Weinstein, D., 1976)。

#### 4) 呼吸活性の測定

対数増殖初期の *R. solani* 菌糸を 12mM glucose を含むあるいは含まないリン酸緩衝液 (48mM, pH 6.5) に 1 g wet mycelia/ml となるように懸濁し、15 分間のプレインキュベーションの後に、25°C における酸素消費速度をクラーク型酸素電極 (Model 100, Rank Brothers, Ltd., Cambridge, UK) によって測定した。ミトコンドリア画分の complex II (succinate dehydrogenase complex) 活性は、DCIP を



電子受容体として用い、DCIP の還元を 600 nm における吸光度の変化として分光学的に測定した (Ulrich, J. T. and Mathre, D. E., 1972). 可溶化 succinate dehydrogenase 活性は、Ulrich および Mathre の方法に従い、PMS を中間の電子受容体として用い、最終の電子受容体として用いた DCIP の還元を分光学的に測定することによって行った (Ulrich, J. T. and Mathre, D. E., 1972). NADH-あるいは succinate-cytochrome *c* oxidoreductase 活性は既報の方法に従って、cytochrome *c* の還元を 550 nm における吸光度の増加として測定した (Ulrich, J. T. and Mathre, D. E., 1972). NADH-あるいは succinate-ubiquinone oxidoreductase (complex I あるいは complex II) 活性は既報の方法に従い、反応生成物である還元型 ubiquinone を  $\alpha, \alpha$ -dipyridyl と  $\text{Fe}^{3+}$  により発色させた後に 518 nm において測定した (Ramasarma, T. and Lester, R. L., 1960). 分光学的測定には日立 A-220 自記分光光度計 (日立製作所(株), 東京) および 光路長 10 mm の石英セルを用いた.

#### 4) Succinate および glucose 代謝に及ぼす影響

対数増殖初期の *R. solani* 菌糸を、12 mM glucose を含むリン酸緩衝液 (10mM, pH 6.5) に 30 mg wet mycelia/ml となるよう懸濁した菌糸懸濁液に [2, 3- $^{14}\text{C}$ ] succinate を終濃度 1mM (37 kBq/ml) となるよう添加し、振盪しつつ 25°C でインキュベートした. [2, 3- $^{14}\text{C}$ ] succinate 添加 1 時間後に菌糸を回収し、リン酸緩衝液で洗浄した後に、10% TCA (trichloroacetic acid) により菌体中の可溶性放射能を抽出した. 抽出液を同容の diethyl ether で 2 回洗浄し、脂質を除いたアミノ酸画分を得た. 得られたアミノ酸画分の試料は薄層クロマトグラフィー (Plate: cellulose 0.25 mm thickness, Solvent: BuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O= 4/1/1) によって各アミノ酸を分離し、液体シンチレーションカウンター (LSC-903, Aloka (株), 東京) によって定量した.

Glucose を除いた緩衝液を用いて、上記と同様にして得られた *R. solani* 菌糸懸濁液に [6- $^{14}\text{C}$ ] D-glucose を 1mM (37 kBq/ml) となるよう添加し、25°C で 1 時間インキュベートした. インキュベーション中に生じた  $^{14}\text{CO}_2$  を 2N KOH 水溶液でトラップし、放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した.

1) *Rhizoctonia solani* 菌糸の酸素消費に対する影響

対照区の *R. solani* 菌糸の endogenous な酸素消費は 843 nmols O<sub>2</sub>/min/g wet mycelia の速度を示した。表 1 に示すとおり、この酸素消費 (呼吸) は 0.03  $\mu$  M 以上の flutolanil の添加によって阻害され、3  $\mu$  M の本化合物による阻害は 71% であった。本実験条件下において 5  $\mu$  g/ml の oligomycin は 35% の阻害を示し、30  $\mu$  M の 2,4-dinitrophenol は 41% の促進を示した。呼吸基質として 12mM の glucose を添加した場合の exogenous な酸素消費速度は、対照区においては 980 nmols O<sub>2</sub>/min/g wet mycelia を示し、前述の endogenous な酸素消費と同様に flutolanil によって阻害された (表 1)。Endogenous および exogenous 条件下における酸素消費速度の 50% 阻害濃度 (I<sub>50</sub>) はそれぞれ 0.31 および 0.51  $\mu$  M と算出された。

Table 1. Effect of Flutolanil on Oxygen Consumption of *R. solani* Mycelia

Chemicals	Conc. ( $\mu$ M)	Inhibition (%)	
		Endogenous	Exogenous <sup>a)</sup>
Control	-	0	0 <sup>c)</sup>
Flutolanil	0.03	45	43
	0.3	53	50
	3	71	75
Oligomycin	5 <sup>b)</sup>	35	35
2, 4-Dinitrophenol	30	- 41	- 38

a) Exogenous respiration was measured in the presence of 12 mM of glucose.

b) Oligomycin concentration is expressed in  $\mu$ g/ml.

c) Oxygen consumption rates of endogenous and exogenous control were 843 and 980 nmol O<sub>2</sub>/min/g wet mycelia, respectively.



2) *R. solani* 菌糸ミトコンドリアの電子伝達に対する影響<sup>31</sup>

対数増殖期の *R. solani* 菌糸から得られたミトコンドリア画分は succinate,  $\alpha$ -ketoglutarate あるいは NADH を酸化する能力を有していた. Cytochrome *c* を電子受容体とする電子伝達は, succinate を基質 (電子供与体) とした場合 (succinate-cytochrome *c* oxidreductase) 12.36 nmol/min/mg protein の速度で, NADH を基質とした場合 (NADH-cytochrome *c* oxidreductase) 48.36 nmol/min/mg protein の速度で進んだ. 10  $\mu$  M の flutolanil は, *R. solani* 菌糸ミトコンドリア画分の succinate-cytochrome *c* oxidreductase を完全に阻害したが, NADH を電子供与体とした場合には全く阻害を示さなかった (表 2). また, succinate を電子供与体とし ubiquinone および DCIP を電子受容体とした場合は, それぞれ対照区において 2.05 nmol/min/mg protein, 4.45 nmol/min/mg protein の電子伝達速度を示したが, これらの反応も 10  $\mu$  M の本化合物によって 78 および 81% の阻害を受けた. Flutolanil 濃度を 1  $\mu$  M とした場合でも, これらの活性は, それぞれ対照区の 76.5 および 63% の阻害を受けた.

Table 2. Effects of 10  $\mu$  M Flutolanil on the Respiratory Electron Transporting Activities of *R. solani* Mycelial Mitochondria

Reactions <sup>a)</sup>	Specific activity (nmol/min/mg protein)	Inhibition (%)
NADH-cytochrome <i>c</i> oxidreductase	12.36	100 <sup>b)</sup>
Succinate-cytochrome <i>c</i> oxidreductase	48.36	0
Succinate-ubiquinone oxidreductase	2.05	78
Succinate-DCIP oxidredctase	4.45	81
Succinate dehydrogenase	3.63	1

a) All reactions were measured according to the methods described in the text.

b) Each value is the mean of triplicated measurements.



一方、ミトコンドリア画分から界面活性剤存在下における超音波処理によって調製した可溶性画分を酵素として用い、PMS を中間の電子受容体として測定した succinate dehydrogenase 活性は  $10\ \mu\text{M}$  の flutolanil により全く阻害を受けなかった(表 2)。さらに、flutolanil 濃度を  $1\ \text{mM}$  とした場合も本活性の阻害はほとんど認められなかった。

### 3) *R. solani* 菌糸の glucose および succinate 代謝に及ぼす影響

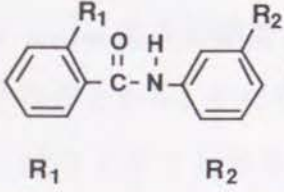
対数増殖期の *R. solani* 菌糸に  $[2, 3\text{-}^{14}\text{C}]$  succinate を添加した場合、60 分後に得られる可溶性の主代謝物は aspartate および glutamate であり、それぞれ添加放射能の 7 および 11 % を占めていた。これらのアミノ酸は、それぞれ oxaloacetate および  $\alpha$ -ketoglutarate を前駆体として生合成されるアミノ酸であり、succinate から TCA サイクルおよびアミノ基転移を経て合成されるものと考えられる。 $1\ \mu\text{M}$  の flutolanil の添加によって、これらのアミノ酸の生成は完全に阻害され、菌糸中には未変化の succinate の蓄積が認められた。また、脂質画分(エーテル可溶性画分)への放射能の取り込みも完全に阻害されていた。同時に、不溶性画分中の核酸 およびタンパク 画分への放射能の取り込みも完全に阻害された。

*R. solani* 菌糸による  $[6\text{-}^{14}\text{C}]$  D-glucose からの  $^{14}\text{CO}_2$  の生成におよぼす flutolanil の影響について検討した結果、対照区においては、 $[6\text{-}^{14}\text{C}]$  D-glucose から、 $6.0 \pm 1.4 \times 10^4$  dpm/g wet mycelia/hr の  $^{14}\text{CO}_2$  の生成が認められた。この glucose からの  $\text{CO}_2$  の生成は、 $10\ \mu\text{M}$  の flutolanil の添加によって、 $3.6 \pm 0.9 \times 10^4$  dpm/g wet mycelia/hr (対照区の 60.0%) に低下した。

### 4) Flutolanil と関連化合物 mebenil および mepronil の比較

Flutolanil およびその関連化合物、mebenil および mepronil はいずれも *R. solani* 菌糸の生育を濃度依存的に阻害した。しかし、その阻害濃度域は大きく異なり、flutolanil, mebenil および mepronil の  $\text{I}_{50}$  値はそれぞれ、 $7.6 \times 10^{-9}$ ,  $2.9 \times 10^{-7}$ , およ

Table 3. Effects of Flutolanil, Mebenil and Mepronil on Mitochondrial Succinate-DCIP or Ubiquinone Oxidoreductase and Mycelial Growth of *R. solani*

Chemicals			Concentration (μM)	Inhibition (%) <sup>a)</sup>		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>		Succinate-DCIP oxidoreductase	Succinate-ubiquinone oxidoreductase	Mycelial growth
Flutolanil	CF <sub>3</sub>	OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0.1	26	- <sup>b)</sup>	81 <sup>c)</sup>
			1	63	76	85
			10	81	-	100
Mebenil	CH <sub>3</sub>	H	1	9	40	66
			10	37	-	80
Mepronil	CH <sub>3</sub>	OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1	29	60	83
			10	47	-	95

a) All reactions were assayed according to the methods described in the text.

b) Not determined.

c) Each value is the mean of triplicated measurements.

び  $1.7 \times 10^{-8}$  M と算出され、*R. solani* 菌糸生育に及ぼす影響は flutolanil が最も強く、ついで mepronil, mebenil の順に減少した。これらの 3 化合物の *R. solani* ミトコンドリア complex II 活性 (succinate-DCIP oxidoreductase および succinate-ubiquinone oxidoreductase 活性) におよぼす影響について、菌糸生育におよぼす影響と併せて表 3 に示した。Flutolanil と同様に、mebenil および mepronil も DCIP および ubiquinone のいずれの電子受容体を用いた場合にもこれらの酵素系の阻害活性を示した。Succinate-DCIP oxidoreductase 活性に対する阻害活性もまた、flutolanil が最も強く、mepronil, mebenil の順に低下し、その  $I_{50}$  値はそれぞれ  $5.0 \times 10^{-9}$ ,  $1.4 \times 10^{-8}$  および  $3.0 \times 10^{-7}$  M と算出された。



Flutolanil は *R. solani* 菌糸の酸素消費を endogenous, exogenous に関わらず阻害した (表 1), このことから, その作用点は呼吸あるいは解糖系に存在するものと考察される. 表 2 に示すとおり, *R. solani* 菌糸から調製したミトコンドリア画分の電子伝達活性のうち, NADH-cytochrome c oxidoreductase 活性は本化合物による阻害を全く受けず, succinate-cytochrome c oxidoreductase 活性のみが強く阻害された.

既知の電子伝達のスキーム (図 2) から考えると, NADH および succinate の何れを電子供与体として用いても ubiquinone 以後のステップは共通であることから, 本化合物の電子伝達における阻害点は succinate から ubiquinone に至る間, すなわち complex II (succinate dehydrogenase complex, EC.1.3.99.1) であることが示唆される (図 2). また, ミトコンドリア膜画分から界面活性剤と超音波処理によって可溶化し, PMS を経由する DCIP の還元速度として測定した succinate

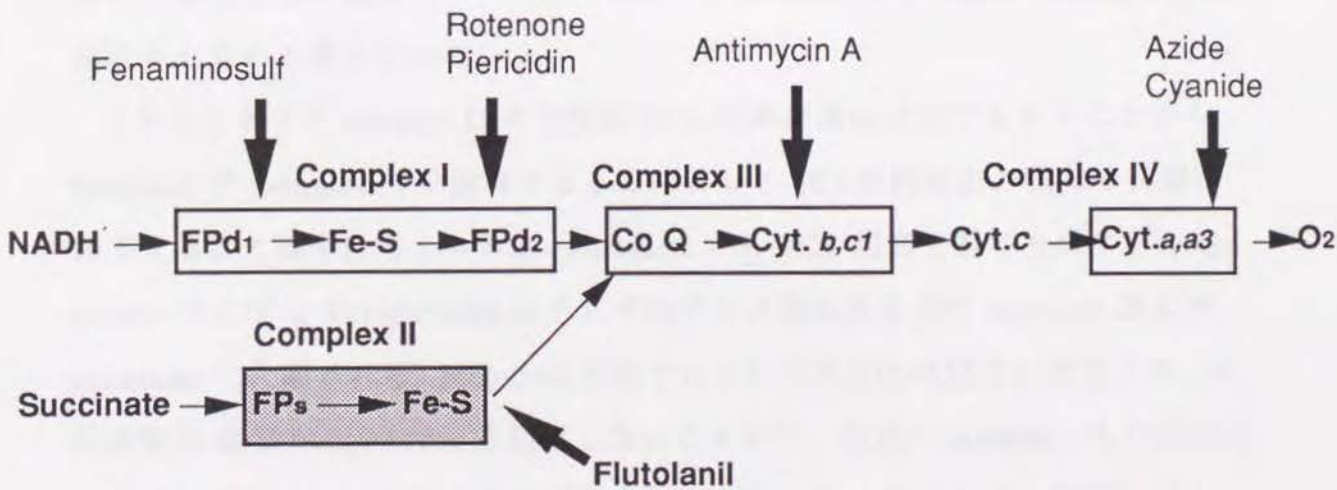


Fig. 2 Schematic Representation of Mitochondrial Electron Transport Chain and Sites of Action of Flutolanil and Other Respiratory Inhibitors. Abbreviations are as follows: FP, flavoprotein; Fe-S, non-heme iron protein; Co Q, coenzyme Q; Cyt, cytochrome.

dehydrogenase 活性は flutolanil に対する感受性を全く失っていた (表 2)。これらの実験事実は、本化合物の阻害点が complex II のフラビントタンパク以降の ubiquinone 近傍、即ち complex II の非ヘム鉄-イオウタンパク (IP) と ubiquinone の間にある、あるいは complex II から解離した succinate dehydrogenase は本化合物の結合部位を失っていることを示唆し、これらの結果は既に carboxin について得られている結果 (Mathre, D. E., 1971; White, G. A., 1971; Ulrich, J. T. and Mathre, D. E., 1972) と良く一致するものであった。

Ramsy らは、flutolanil と類縁のミトコンドリア complex II 活性の阻害剤である carboxin の光親和性標識化試薬、azidocarboxin (5, 6-dihydro-2-methyl-N-(3'-azidophenyl)-1,4-oxathiin-3-carboxamide), を用いてその結合部位について検討し、intact な complex II は azidocarboxin によってその活性が阻害されるが、特異的結合はフラビントタンパク (FP) や非ヘム鉄-イオウタンパク (IP) には認められず、主にリン脂質および低分子量のポリペプチド (CII-3 および CII-4) に認められること、さらに可溶化した succinate dehydrogenase は azidocarboxin による阻害を受けず、特異的結合も見られなかったことを報告している (Ramsy, R. R. *et al*, 1981)。今回、flutolanil については binding assay を行なってはいないが、前述の酵素活性の阻害パターンから考えて、carboxin 類と同様の binding site に結合するものと考えられる。

ミトコンドリア complex II の活性は TCA 回路の構成成分でもあることから、flutolanil が complex II を阻害することによって TCA 回路経由の種々の代謝を阻害することは十分考えられる。Succinate から TCA 回路を経て生成する oxaloacetate および  $\alpha$ -ketoglutarate はそれぞれアミノ基転移を受け aspartate および glutamate に代謝される。Flutolanil 存在下において本反応は完全に阻害され、本化合物は直接 transaminase を阻害しないことから、前述の complex II の阻害はミトコンドリアレベルのみならず菌糸レベル (*in vivo*) においても発現しており、この阻害によって *R. solani* 菌糸内の TCA 回路系全体の活性も低下していることが示唆された。また、[6- $^{14}$ C] D-glucose からの  $^{14}$ CO $_2$  の生成速度が fluto-



lanil によって低下したことも本考察を支持する. Carboxin についても別種の糸状菌である *Ustilago maydis* を用いた実験において, flutolanil と同様に glucose 酸化の阻害と succinate の菌糸内蓄積が認められることが報告されている (Mathre, D. E., 1970; Rangsdaie, N. N. and Sisler H. D., 1970).

互いに構造の類似した flutolanil, mebenil および mepronil の比較において, 菌糸生育の阻害における活性においても, 電子伝達阻害活性においても flutolanil が最強であり, さらに両活性に対する  $I_{50}$  値もほぼ同水準の濃度であったことから, これら化合物の抗真菌作用にはその電子伝達の阻害が直接反映しているものと考察される. Oxathiincaboxamide 類についても同様の考察がなされている (White, G. A. and Thorn, G. D., 1980). 菌糸生育およびミトコンドリア complex II の何れに対しても flutolanil が最強の阻害活性を示したことは, Takahashi らが報告している種々の 2-置換-3'-isopropoxy-benzanilide の防除活性に関する構造活性相関の結果, すなわち benzoic acid (tolic acid) 環 2 位 (オルト位) の置換基としては  $CF_3$  基が最高の活性を示すこと (Takahashi, Y. *et al*, 1987) と良く一致する結果であった. また, 化合物の浸透移行, 代謝を無視しうるミトコンドリア画分を用いた試験系において, flutolanil は mepronil および mebenil に比べ強い活性を示したことから, flutolanil においては作用点に対する親和性そのものが他の 2 化合物に比べ強いことが示唆された.



殺菌剤, flutolanil ( $\alpha, \alpha, \alpha$ -trifluoro-3'-isopropoxy-*o*-toluanilide) の作用機構について, flutolanil の防除対象菌株の 1 つである *Rhizoctonia solani* (イネ紋枯れ病菌) を用いて検討した。

*R. solani* 菌糸懸濁液の endogenous および exogenous な酸素消費速度はいずれも flutolanil により強い阻害を受けた。さらに,  $10 \mu\text{M}$  の flutolanil によって, *R. solani* 菌糸のミトコンドリア画分の succinate-cytochrome *c* oxidoreductase, succinate-ubiquinone oxidoreductase および succinate-DCIP oxidoreductase 活性は溶媒対照区の 100, 88 および 89% の阻害を受けた。同条件下において NADH-cytochrome *c* oxidoreductase 活性は全く阻害を受けなかったことから, 本化合物の作用点はミトコンドリア電子伝達の succinate から ubiquinone に至る部分, すなわち succinate dehydrogenase complex (complex II) であることが明らかとなった。

また, ミトコンドリア内膜画分から界面活性剤の存在下における超音波処理によって可溶化した succinate dehydrogenase 活性は本化合物に対する感受性を失っており, 前述の電子伝達の阻害は complex II の非ヘム鉄-イオウタンパク以後の redox-center から ubiquinone に至る部分の阻害による, あるいは本化合物のミトコンドリア complex II への結合には succinate dehydrogenase (complex II のFP) 以外の何かが必要であるものと推察された。

*R. solani* 菌糸による [2,3- $^{14}\text{C}$ ] succinate からの aspartate および glutamate の生成, および [6- $^{14}\text{C}$ ] D-glucose からの  $\text{CO}_2$  の生成に及ぼす影響について検討した結果, いずれの代謝も flutolani によって強く阻害されていた。このことから, 前述の本化合物によるミトコンドリア電子伝達の阻害は *in vivo* においても発現しており, 電子伝達の阻害は TCA 回路等の活性にも影響していることが示唆された。

Flutolanil とその類縁化合物である mebenil および mepronil について, それらの活性を比較したところ, 菌糸生育阻害活性においても, 電子伝達阻害活性に

においても flutolanil が最強であり、これらの両活性の阻害濃度域および I50 値は同水準であったことから、flutolanil の抗菌作用はその電子伝達阻害作用の直接の結果であると考察された。

## 第 2 章 選択的抗菌活性の発現機構

### 2-1.

### 緒言

Flutolanil は *Corticium* 属, *Typhula* 属および *Gymnosporangium* 属等の担子菌類あるいは *Rhizoctonia* 属等の担子菌の不完全世代には強力な抗菌作用を示すのに対し, 子囊菌, 藻菌類等の担子菌類以外の真菌や細菌等にはほとんど抗菌活性を示さないことが報告されている (Araki, F. and Yabutani, K., 1981; Kurono, H., 1985). また, 哺乳類に対しても極めて低毒性であり, その急性毒性の指標である LD<sub>50</sub> (半数致死用量) 値は経口投与で, ラットおよびマウスのいずれに対しても 10,000 mg/kg 以上と報告されている (Araki, F. and Yabutani, K., 1981; Kurono, H., 1985).

前章において, 本化合物の一次作用点はミトコンドリアの complex II (succinate dehydrogenase complex) であることが明かとなった. しかし, ミトコンドリア complex II は真核生物には普遍的に存在する酵素系であることから, 本化合物の高い選択性は標的となる酵素系の有無に起因するのではないと考えられ, その選択毒性発現機構に興味を持たれた. そこで, 本章においては, flutolanil の選択毒性発現機構を明らかにするべく, 種々の糸状菌およびラット肝から調製したミトコンドリア画分の complex II 活性に対する本化合物の影響について検討した結果について述べる.



## 2-2.

## 材料および方法

### 1) 供試菌株

*R. solani*, *Phytophthora infestans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Helicobasidium mompa*, *Typhula isikariensis*, *Corticium rolfsii*, *Rhizopus chinensis*, *Rosellinia necatrix* および *Pyricularia oryzae* は日本農薬(株)生物研究所において継代維持されている菌株を用いた。継代培養、液体培養および菌糸生育阻害の測定は前章と同様の方法で行った。

### 2) ミトコンドリア画分の調製および電子伝達活性の測定

糸状菌菌糸のミトコンドリアは前章に示したと同様の方法に従って調製した。ミトコンドリア complex II (succinate dehydrogenase complex) 活性の指標として、succinate-DCIP oxidoreductase 活性を用い、本酵素活性は前章に述べた方法に従って測定した。

## 2-3.

## 結果

### 1) 種々糸状菌の生育およびミトコンドリア complex II 活性におよぼす影響

各種糸状菌類の生育におよぼす flutolanil の影響について表4に示す。担子菌類は一般に本化合物に対して高い感受性を示すが、*Helicobasidium mompa* (紫紋羽病菌) は低感受性であった。担子菌以外では前章でも述べたように、*Rhizoctonia solani* (稲紋枯れ病菌) のみが高い感受性を示した。担子菌以外の真菌類には若干の感受性を示すものが散見されたが、細菌類には全く感受性を示すものがみられなかった。

表5に *R. solani* (不完全菌類), *Corticium rolfsii* (担子菌類), *Rhizopus chinensis* (藻菌類), *Rosellinia necatrix* (子囊菌類) および *Pyricularia oryzae* (不完全菌類) の

Table 4. Antifungal Activity of Flutolanil

Organisms		Growth inhibition (%)		
		Concentration (ppm)		
		100	10	1
<i>Rhizopus chunensis</i>	(Phycomycetes)	0	0	0
<i>Phytophthora infestans</i>	(Phycomycetes)	10	4	0
<i>Rosellinia necatrix</i>	(Ascomycetes)	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Ascomycetes)	0	0	0
<i>Corticium rolfsii</i>	(Basidiomycetes)	- a)	100	67
<i>Helicobasidium monpa</i>	(Basidiomycetes)	15	12	-
<i>Typhula isikariensis</i>	(Basidiomycetes)	100	100	99
<i>Rhizoctonia solani</i>	(Fungi imperfecti)	100	100	92
<i>Pyricularia oryzae</i>	(Fungi imperfecti)	11	2	-

a) Not determined.

4種の糸状菌の菌糸生育に及ぼす  $10 \mu\text{M}$  の flutolanil の影響、およびこれら糸状菌の菌糸およびラット肝より調製したミトコンドリア succinate-DCIP oxidoreductase 活性におよぼす影響について示した。 *R. solani* および *C. rolfsii* の2種糸状菌の菌糸生育は  $10 \mu\text{M}$  の flutolanil によって完全に阻害された。一方、 *R. chinensis* および *R. necatrix* の菌糸生育は全く阻害されず、 *P. oryzae* のそれも8%阻害されたにとどまった。

$10 \mu\text{M}$  の flutolanil によってその菌糸生育が完全に阻害された菌株、すなわち *R. solani* および *C. rolfsii* の菌糸から調製したミトコンドリア complex II 活性は、同濃度の本化合物によって、それぞれ81および87%の阻害を受けた。また、本化合物により菌糸生育阻害を全くあるいはほとんど受けなかった *R. chinensis*, *R. necatrix* および *P. oryzae* 菌糸由来ミトコンドリアの同活性は、それぞれ0, 13 および2%阻害されたのみであった。

ラット肝分離ミトコンドリアの同活性もまた flutolanil に対して非感受性であり、  $10 \mu\text{M}$  の本化合物によって15%の阻害を受けたにとどまった。



**Table 5. Effects of 10 $\mu$ M Flutolanil on the Mycelial Growth and Mitochondrial Complex II Activity in Various Fungi and Rat Liver**

Enzyme sources	Inhibition by 10 $\mu$ M flutolanil (%)	
	Mycelial growth	Complex II Activity <sup>a)</sup>
<i>Rhizoctonia solani</i> <sup>b)</sup> (Fungi imperfecti)	100	81 <sup>c)</sup>
<i>Corticium rolfsii</i> (Basidiomycetes)	100	87
<i>Rhizopus chinensis</i> (Phycomycetes)	0	0
<i>Rosellinia necatrix</i> (Ascomycetes)	0	13
<i>Pyricularia oryzae</i> (Fungi imperfecti)	8	2
Rat liver (mammal)	-	15

a) Complex II activity was measured as succinate-DCIP oxidoreductase according to the method described in the text. Specific activities in the controls were: *Rhizoctonia solani*, 4.47 ; *Corticium rolfsii*, 8.21; *Rhizopus chinensis*, 8.31; *Rosellinia necatrix*, 17.53; *Pyricularia oryzae*, 18.37; rat liver, 30.42 nmol/min/mg protein.

b) The imperfect stage of basidiomycetes fungi, *Thanatephorus cucumeris* .

c) Mean values of triplicated measurements.

本試験で用いた菌株のうち、担子菌類以外では *R. solani* のみが菌糸生育レベルにおいて flutolanil 感受性であった (表 4). *R. solani* は不完全菌類に分類されてはいるが、担子菌類である *Thanatephorus cucumeris* の不完全世代であることが既に確認されている。このことから、本化合物は担子菌類に特異的に強い生育阻害活性を示し、その他の菌類には活性を示さないと考えられる。

前章において本化合物の作用点であるとしたミトコンドリア complex II 活性もまた担子菌由来のもののみが感受性を示し、非感受性菌および哺乳類由来の同活性は阻害されず、菌糸生育レベルとミトコンドリアレベルでの感受性は完全にパラレルとなった。

一方、flutolanil と類似の骨格を有し、同様の作用点を阻害する carboxin は糸状菌のみならず、細菌、高等植物あるいは哺乳動物のミトコンドリアの同活性を阻害することが報告されている (Mathre D. E., 1971; Tucker A. N. and Lillich, T. T., 1974; Day D. A. *et al*, 1978). この結果から、Langcake らは carboxin の選択毒性発現には、carboxin のミトコンドリアへの到達量および作用点の感受性の双方に起因するとしている (Langcake, P. *et al*, 1983).

今回の実験では、分離ミトコンドリア画分を材料として用いていることから、ミトコンドリアへの薬剤到達量の差および代謝分解の差は無視できる。前述のように flutolanil は非感受性菌あるいはラット肝ミトコンドリアの complex II 活性を阻害しなかったことから、本化合物の示す高い選択性は carboxin の場合とは異なり、作用点であるミトコンドリア complex II の感受性そのものに起因するものと考察された。

5種の糸状菌, *Rhizoctonia solani* (不完全菌類), *Corticium rolfsii* (担子菌類), *Rhizopus chinensis* (藻菌類), *Rosellinia necatrix* (子囊菌類), および *Pyricularia oryzae* (不完全菌類) の菌糸およびラット肝よりミトコンドリアを調製し, その succinate-DCIP oxidoreductase 活性すなわち complex II の活性におよぼす flutolanil の影響について検討した. また, これら糸状菌の菌糸生育に対する影響についても検討した. その結果, 菌糸生育レベルで本化合物に感受性であった担子菌類あるいはその不完全世代である *R. solani* および *C. rolfsii* のミトコンドリアの complex II は本化合物によって強く阻害された. 一方, 菌糸生育レベルで本化合物に非感受性菌である *R. chinensis*, *R. necatrix* および *P. oryzae* のミトコンドリアの同活性はほとんど阻害を受けず, 菌糸生育の感受性と作用点そのものの感受性は良く対応する結果となった. また, ラット肝分離ミトコンドリアの succinate-DCIP oxidoreductase 活性も本化合物によって阻害されなかったことは, 本化合物の哺乳類に対する低毒性 (ラット, マウス 経口 LD<sub>50</sub>: > 10,000 mg/kg) と良く対応した. 以上の結果から, flutolanil の示す高い選択性は, その作用点であるミトコンドリアの complex II の本質的な感受性に支配されており, その原因は担子菌類のミトコンドリア complex II のみが flutolanil に対して特異的に感受性であるためと考えられた.



### 第 3 章 総合考察

*R. solani* 菌糸あるいはミトコンドリア画分を用いた生化学的検討によって、flutolanil の作用点は既報の carboxianilide 類と同様、ミトコンドリア電子伝達系の succinate から ubiquinone に至る部分、すなわち succinate dehydrogenase complex (complex II) の非ヘム鉄-イオウタンパク以後の redox-center から ubiquinone に至る部分にあると推察された。White らおよび ten Haken らは、carboxianilide 類の構造活性相関の検討結果から、succinate dehydrogenase complex 活性阻害の必須構造として図 3 に示した  $\alpha, \beta$ -不飽和カルボン酸の置換アニリンアミド構造を提唱した (ten Haken, P. and Dunn, C. L., 1971; White, G. A. and Thorn, G. D., 1975)。Flutolanil の場合、カルボン酸  $\beta$  位の  $\text{CH}_3$  基は  $\text{CF}_3$  基ではあるが、基本的にはこの必須構造を満足しており、ミトコンドリア complex II を作用点とすることに矛盾はないと考えられた。

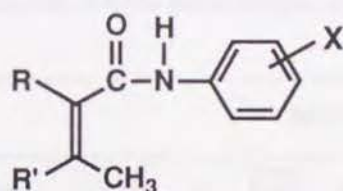


Fig. 3. Essential Structure for Complex II Inhibiting Activity Proposed by White and Thorn (1975).

各種糸状菌の菌糸レベルにおける flutolanil 感受性と分離ミトコンドリアの complex II 活性の本化合物 感受性は良い対応を示したことから、糸状菌間の感受性の違いは、ミトコンドリア complex II における本質的な感受性に起因すると考察された。White らは、carboxin のアナログである S-180 (5, 6-dihydro-2-methyl-N-(p-fluorophenyl)-1,4-oxathiin-3-carboxamide, p-fluorocarboxin) は carboxin

に対し負相関剤であること、すなわちcarboxin 耐性菌から調製したミトコンドリア complex II にのみ高い活性を示すことを報告している (White, G. A., 1978; White, G. A. and Thorn, G. D., 1980). また, carboxin に対して菌糸生育レベルで耐性を示すミュータントから調製したミトコンドリア complex II は carboxin に対する感受性を失っていることも報告されている (Georgopoulos, S. G. *et al*, 1972; Georgopoulos, S. G. and Vomvoyanni, V., 1972; Georgopoulos, S. G. *et al*, 1975; Gunatilleke, I. A. U. N. *et al*, 1976). これらの結果は, complex II を構成しているいずれかのタンパクの僅かな違いが carboxianilide 類への親和性を変化させること, またこの作用点での変化が菌糸生育レベルにおける感受性を規定しうることを示している. 前述のように flutolanil は担子菌類のミトコンドリア complex II にのみ高い阻害活性 (親和性) を示すことから, 担子菌類の complex II のみが他の菌類とは異なり, carboxianilide 類への親和性を付与しうる共通の構造を有しているものと推察される.

Table 6. Comparison of the Deduced Amino Acid Sequence within the S-3 Cluster of IP Subunit

Organisms	Amino acid sequences							
<i>Ustilago maydis</i> (carboxin sensitive)	R	C	H	T	I	M	N	C
<i>Ustilago maydis</i> (carboxin resistant)	R	C	L	T	I	M	N	C
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	R	C	H	T	I	M	N	C
<i>Shizosaccharomyces pombe</i>	R	C	H	T	I	M	N	C
<i>Escherichia coli</i>	R	C	H	T	I	M	N	C
Human liver	R	C	H	T	I	M	N	C
Human fibroblast	R	C	H	T	I	M	N	C
Beef heart	R	C	H	T	I	M	N	C
Rat	R	C	H	T	I	M	N	C
<i>Drosophila melanogaster</i>	R	C	H	T	I	M	N	C
<i>Arabidopsis thaliana</i>	R	C	H	T	I	M	N	C

a) The *U. maydis* sequences were deduced from Elamine P. L. *et al* (1992) and Koen J. P. *et al* (1991), that of *E. coli* was from Darlington M.G. and Guest J.R. (1984), that of *S. cerevisiae* was from Lombardo A. *et al* (1990), that of human liver was from Kita K. (1990), that of beef heart was Yao Y. *et al* (1986), those of other organisms were from Gould S.J. *et al* (1989).



Koen らは carboxin 耐性 *Ustilago maydis* から 耐性遺伝子をクローニングし、そのアミノ酸 sequence を決定している。この遺伝子はミトコンドリア complex II の非ヘム鉄イオウタンパク (IP, 図 4) をコードしており、S-3 クラスタ (3 番目の非ヘム鉄-イオウ酸化還元中心結合部位) の 258 番目の histidine が lucine に変化していることを報告している (Koen, J. P. *et al*, 1991)。表 6 にこれまでに決定された種々の生物の IP の S-3 クラスタのアミノ酸配列の一部を示す。表 6 に示すとおり、IP の S-3 クラスタのアミノ酸配列は生物間での相同性が良く、進化の過程で極めて良く保存されている。このことから、この部位の立体構造(アミノ酸配列) の差は耐性を誘導するものの選択性の原因であるとは考えにくい。また、carboxin はウシ心筋のミトコンドリアの complex II を阻害する (Mowley, P.C., 1977) が、flutolanil は哺乳類(ラット肝) の同活性を阻害しないことから、本化合物の complex II における親和性を規定している原因は IP の S-3 クラスタの構造以外にも存在するものと考察される。

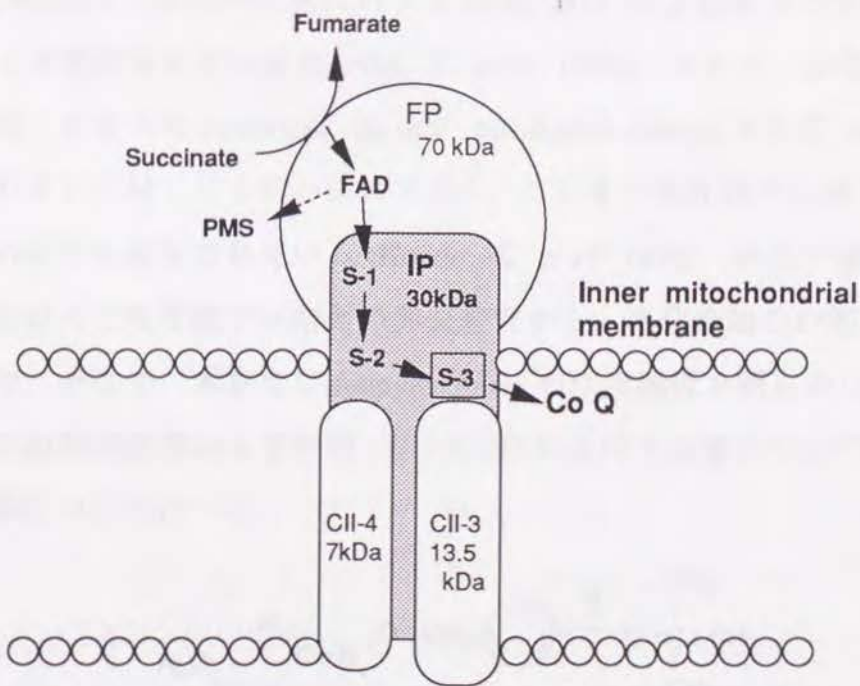


Fig. 4. Schematic Representation of the Proposed Distribution of Redox Center in Complex II (Redrawn from Cammack, 1986 and Johnson *et al*, 1987)

FP, flavoprotein; IP, non-heme iron sulfur protein; FAD, Flavine adenine dinucleotide; S-, none-heme iron sulfur redox center; PMS, phenazin methosulfate.



## 第 2 編 Fenpyroximate の殺ダニ作用 および選択毒性発現の機構

### 第 1 章 Fenpyroximate の殺ダニ作用機構

#### 1-1. 緒言

Fenpyroximate (*tert*-butyl (*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethylene-aminooxy)-*p*-toluate, 図 5) は, *Tetranychus urticae* (ナミハダニ), *Panonychus citri* (ミカンハダニ) 等の植物寄生性ダニに対して高い殺ダニ活性を示すのみならずノックダウン活性を示し, 既存の殺ダニ剤あるいは殺虫剤の何れとも構造類似性を有しない新規化合物である (Hamaguchi, H. *et al*, 1990; Konno, T. *et al*, 1990). その半数致死濃度 (LC<sub>50</sub>) は *T. urticae* 幼虫, 若虫, 成虫の何れに対しても 0.5  $\mu$ g/ml 以下であるが, 卵に対する LC<sub>50</sub> 値は 36  $\mu$ g/ml と比較的殺卵活性の低いことが報告されている (Konno, T. *et al*, 1990). さらに, 本化合物は既存の殺ダニ剤, すなわち cyhexatin, dicofol, pirimiphos-methyl および hexythiazox に抵抗性のダニに対しても高い活性を示し, これらの既存殺ダニ剤と交差耐性を示さないことも報告されている (Konno, T. *et al*, 1990). 以上に述べた化学構造の新規性および既存殺ダニ剤との非交差性から, 本化合物の作用機構に興味を持たれた. そこで, 本章では fenpyroximate の作用機構を明らかにするべく, *T. urticae* の超微細形態および呼吸 (電子伝達) に及ぼす影響について検討し, 考察した結果について述べる.

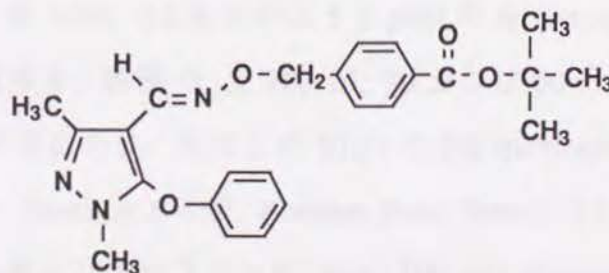


Fig. 5. Structure of Fenpyroximate.

## 1) 化合物

Fenpyroximate は日本農薬(株)化学研究所にて合成および精製された原体(純度 99% 以上)を用いた。その他の試薬および溶媒は市販特級品を用いた。Fenpyroximate 乳剤(EC)は 0, 0.05, 0.5 あるいは 5% の fenpyroximate, 10% 界面活性剤(SP-3005X, 東邦化学工業(株), 東京) および適当量の xylene より成るものを用いた。Fenpyroximate 処理は乳剤を蒸留水で 10,000 倍希釈し, 有効成分濃度 0 (溶媒対照群), 0.05, 0.5 あるいは  $5 \mu\text{g/ml}$  の希釈液を調製, 散布することによって行った。

2) *Tetranychus urticae* Koch

*Tetranychus urticae* Koch (two-spotted spider mite, ナミハダニ)として, 日本農薬(株)生物研究所の継代飼育系統の雌成虫を用いた。飼育はインゲン葉上で, 温度  $25^{\circ}\text{C}$ , 16 時間明期, 8 時間暗期の照明下で行った。*T. urticae* のサンプリングは, 綿栓を施したパスツールピペット中に物理的障害を与えないよう緩やかに吸引することによって行った。

3) *T. urticae* 虫体 ATP 含量の測定

*T. urticae* 虫体 ATP 含量は既報の方法に準じ, ホタルの luciferase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) および液体シンチレーションカウンター(LSC-903, Aloka (株), 東京)を用いて測定した (Leach, F. R., 1981; Lin, S. and Cohen, H. P., 1968)。0, 0.05, 0.5 あるいは  $5 \mu\text{g/ml}$  の fenpyroximate で処理した 5 頭の *T. urticae* 雌成虫を, 処理 0, 5, 10, 15, 30 および 60 分後にサンプリングした。サンプリング後直ちに, 氷冷した  $50 \mu\text{l}$  の 2% trichloroacetic acid を加え超音波ホモジナイザー (Sonifier B-15P, Branson Sonic Power, CT, USA) でホモジナイズした。得られたホモジネートに 4.95 ml の 100 mM glycine 緩衝液 (pH 9.0) を



加え中性化, 遠心分離 (10,000×g, 10分)により得られた上清を ATP 濃度の測定に供した. 測定は 1区 5連で行い, 検出限界は 1.65 pmol/mite であった. また, 統計学的有意差の検定は Welchi の検定を用いて行なった.

#### 4) ラット肝および *T. urticae* 分離ミトコンドリアの電子伝達活性の測定

*T. urticae* のミトコンドリア画分は以下の手順に従って調製した. 氷冷下で約 2 g (約 100,000 頭) の *T. urticae* 雌成虫を 10 ml の 3 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4, 含 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol, 0.1% Bovine Serum Albumin) 中で緩やかに圧搾, 体液を除き, 1000×g, 10 分間遠心分離した. 得られた沈澱を再び 2 ml の同緩衝液中でテフロンホモジナイザーを用い磨砕した. ホモジネートの 1000×g 上清を 10,000×g, 15分間遠心分離し, 沈澱を得た. 沈澱を BSA free の同緩衝液で 2回洗浄し, 500 μl の同緩衝液に懸濁し粗ミトコンドリア画分とした. ラット肝ミトコンドリア画分は既報 (Sanadi, D.R., 1967) に準じて, 6 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットより調製した. ミトコンドリア画分のタンパク量は Lowry の変法で測定した (Bensadoun, A. and Weinstein, D., 1976).

*T. urticae* ミトコンドリア画分の NADH-ubiquinone oxidoreductase 反応は既報 (Ulrich, J.T. and Mathre, D.E., 1972) に準じて行った. 反応液中の反応生成物である還元型 ubiquinone (hydroquinone) を cyclohexane で抽出し (Ramasarma, T. and Lester, R.L., 1960), N<sub>2</sub> 封入, triethylamine 存在下で dansyl chloride と 60°C で 30 分間反応させ, 蛍光誘導体とした. Dansyl 化 coenzyme Q-hydroquinone の定量は蛍光検出器を装備した高速液体クロマトグラフ (HPLC) で行った. 分析条件を以下に示す. ポンプ: LC-6A (島津製作所(株), 京都), カラム: YMC-A312 (φ 6 × 150 mm, 山村化学研究所(株), 京都), 検出器: RF-535A (島津製作所(株), 京都), 溶離液: acetonitrile/H<sub>2</sub>O (775/225), 励起波長: 318 nm, 検出波長: 520 nm.

ラット肝分離ミトコンドリアの succinate, α-ketoglutarate, isocitrate および ascorbate plus tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD) を基質とする呼吸活性は



Taniguchi らの方法に準じ、酸素電極 (Model 100, Rank Brothers Ltd., Bottisham, UK) によって測定した (Taniguchi, M. *et al*, 1985). NADH-cytochrome *c* oxidoreductase, NADH-ubiquinone oxidoreductase および Succinate-ubiquinone oxidoreductase の各活性は既報に準じ、分光学的方法で測定した (Ulrich, J. T. and Mathre, D. E., 1972; Ramasarma, T. and Lester, R. L., 1960; Tripath, P. K. and Gottlieb D., 1969). NADH dehydrogenase 活性は Schewe らの方法に従い, potassium ferricyanide を電子受容体として分光学的に測定した (Schewe, T. *et al*, 1975). 分光学的測定には日立 A-220 自記分光光度計 (日立製作所(株), 東京) および光路長10 mm の石英セルを用いた.

#### 5) *T. urticae* 雌成虫の超微細形態の観察

0 あるいは 0.5  $\mu$ g/ml の fenpyroximate で処理した *T. urticae* 雌成虫を, 処理 5, 15, 30 および 60 分後にサンプリングし, 氷冷下, 1/2 強度の Karnovsky 固定液 (2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde, 100mM リン酸緩衝液, pH 7.4) 中で 4 時間浸漬固定した. 4% sucrose を含む 100mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄後, 氷冷下で 2% osmium tetroxide, 4% sucrose を含む 100mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に 2 時間浸漬し, 後固定した. 固定したサンプルは 4% sucrose を含む 100mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗浄の後, ethanol 系列 および propyleneoxide で脱水し, Spurr 樹脂 (TAAB Laboratories Equipment, Adermaston, UK) に抱埋した. 65°C にて 24 時間の硬化後, 正中線に沿って薄切し (Ultra-Nova, Pharmacia-LKB Co., Turk, Finland), uranyl acetate および lead citrate で二重染色し (Laynolds, E. S., 1963), 加速電圧 180 KV で検鏡 (JEM-1200EX, 日本電子(株), 東京) した.

1) *T. urticae* 雌成虫の ATP 含量に及ぼす影響

Fenpyroximate 処理前の *T. urticae* 雌成虫の ATP 含量は  $88.96 \pm 10.32$  pmol/mite であった. 図 6 に示すとおり, 溶媒対照群 (0% 乳剤処理) の *T. urticae* の ATP 含量は, 処理後に一過性の統計的に有意ではない減少傾向を示したのみであり, 乳剤基成分 (xylene および SP-3005X) の ATP 含量に対する影響は小さかった. Fenpyroximate 0.05, 0.5 および  $5 \mu\text{g/ml}$  処理群でそれぞれ, 処理 60, 15 および 10 分後から溶媒対照群に比べ統計学的に有意 (危険水準  $p < 0.05$ ) な ATP 含量

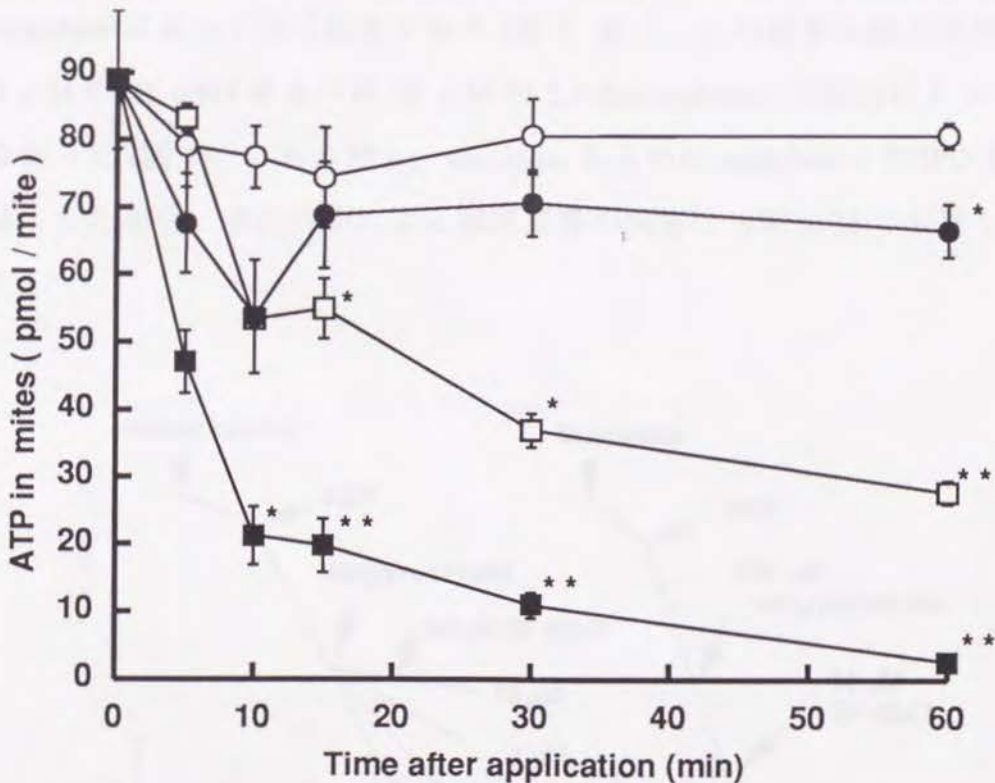


Fig. 6. ATP Concentrations in Adult Female *T. urticae* Treated with Fenpyroximate.

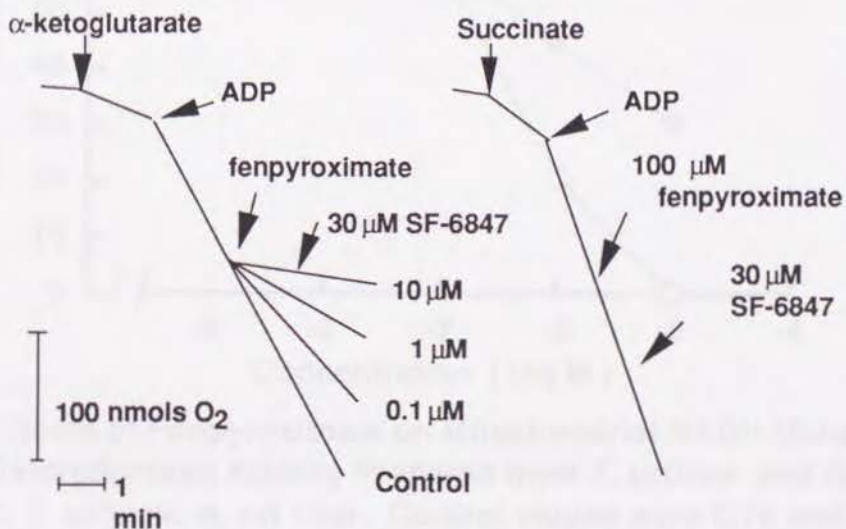
○, Control; ●, Treated with  $0.05 \mu\text{g/ml}$  fenpyroximate; □, treated with  $0.5 \mu\text{g/ml}$  fenpyroximate; ■, treated with  $5 \mu\text{g/ml}$  fenpyroximate.

Each value and bar represents the mean of five replicates and standard error.

の低下が観察され、処理 60 分後には、0.05, 0.5 および 5  $\mu\text{g/ml}$  処理群の ATP 含量はそれぞれ  $66.57 \pm 3.93$ ,  $22.76 \pm 1.77$  および  $2.62 \pm 1.39$  pmol/mite (それぞれ処理前の 74.8, 31.2 および 2.9%) となり、ATP 含量の速やかかつ処理濃度依存的な減少が認められた。本実験条件下において、fenpyroximate 処理 60 分後における *T. urticae* の致死率は溶媒対照, 0.05, 0.5 および 5  $\mu\text{g/ml}$  処理群でそれぞれ 0, 2, 18 および 46% であった。

## 2) ラット肝および *T. urticae* 分離ミトコンドリアの電子伝達に及ぼす影響

Isocitrate,  $\alpha$ -ketoglutarate のような NADH 依存基質を電子供与体とするラット肝分離ミトコンドリアの酸素消費速度は  $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$  ( $0.042 \sim 4.2 \mu\text{g/ml}$ ) の fenpyroximate によって強く阻害された (図 7, 表 7)。この阻害は脱共役剤 (終濃度  $30 \mu\text{M}$  の SF-6847 あるいは  $50 \mu\text{M}$  の 2,4-dinitrophenol) の添加によっても回復しなかった (図 7)。これに対し, succinate あるいは ascorbate + TMPD を電子供与体とした場合, 本化合物による酸素消費の阻害は  $100 \mu\text{M}$  でも見られなかった。



**Fig. 7. Effect of Fenpyroximate on Oxygen Consumption Rate of Rat Liver Mitochondria.**



Table 7. Effect of 10  $\mu$ M Fenpyroximate on Respiratory Enzyme Activities of Rat Liver Mitochondria

Reactions <sup>a)</sup>	Residual activity (% of control)	Control value (nmol/min/mg protein)
$\alpha$ -Ketoglutarate oxidase	29	63.2
Succinate oxidase	91	319.0
Cytochrome oxidase	100	456.0
NADH-cytochrome c oxidoreductase	46	61.1
NADH-ubiquinone oxidoreductase	31	86.0
NADH dehydrogenase	99	282.0

a) All reactions were measured according to the method described in the text.

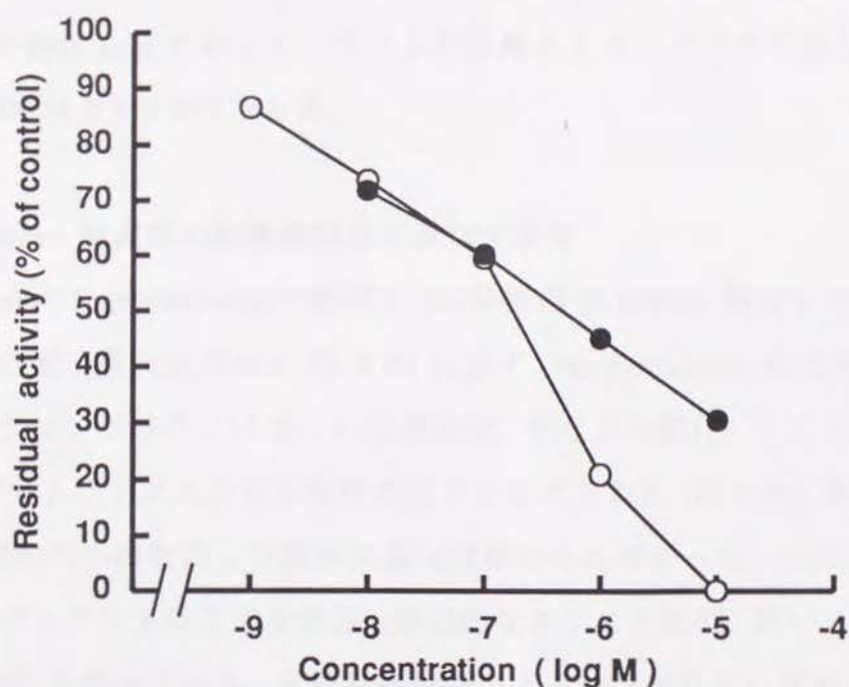


Fig. 8. Effects of Fenpyroximate on Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase Activity Prepared from *T. urticae* and Rat Liver. O, *T. urticae*; ●, rat liver. Control values were 0.78 and 3.09 nmol/min/mg protein. Each value was the mean of duplicate.

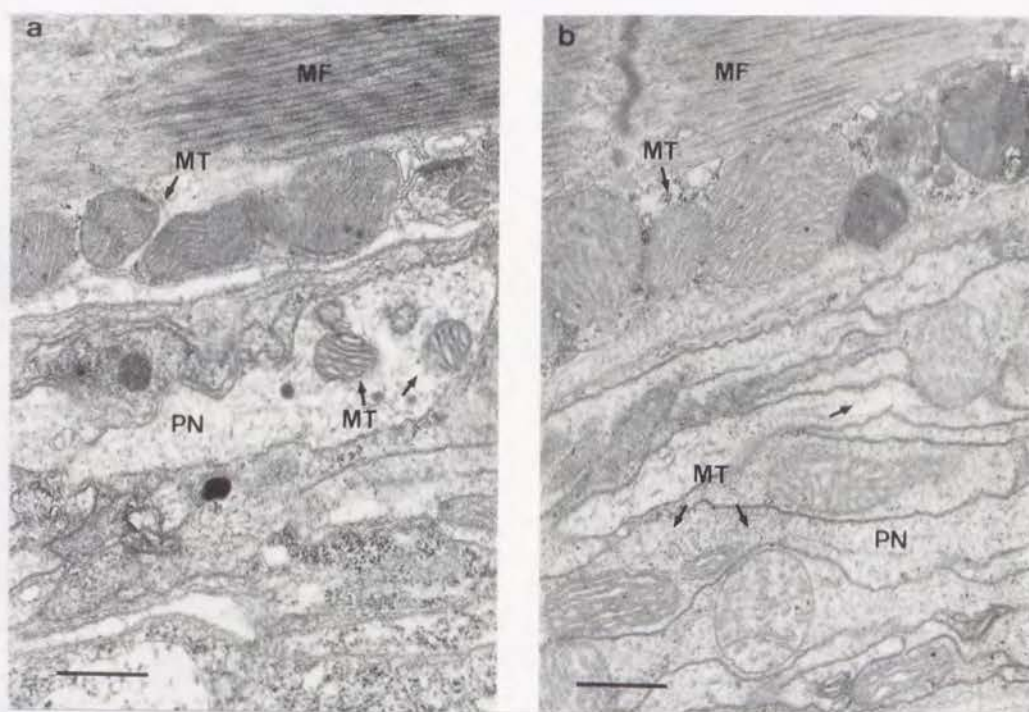
NADH-ubiquinone oxidoreductase および NADH-cytochrome *c* oxidoreductase もまた 10  $\mu$ M の fenpyroximate によって、それぞれ溶媒対照の 31 および 46%にまで阻害された(表 7)。一方、NADH dehydrogenase は同濃度の本化合物では全く阻害されず(表 7)、さらに、1 mM という高濃度であっても全く阻害されなかった。本条件下において 3  $\mu$ M の antimycin A は NADH-cytochrome *c* oxidoreductase を 70%、1  $\mu$ M の rotenone は NADH-ubiquinone oxidoreductase を 95%、1 mM の NaN<sub>3</sub> は cytochrome oxidase を 90%、1 mM の fenaminosulf (sodium *p*-dimethylaminobenzene diazosulfonate) は NADH-dehydrogenase を 91% 阻害した。

図 8 に *T. urticae* 雌成虫およびラット肝分離ミトコンドリアの NADH-ubiquinone oxidoreductase 活性に及ぼす fenpyroximate の影響について示す。*T. urticae* 雌成虫より調製したミトコンドリア画分の NADH-ubiquinone oxidoreductase 活性は fenpyroximate によって濃度依存的に阻害され、その I<sub>50</sub> 値(最小二乗法によって算出)は 0.08  $\mu$ M であった。ラット肝分離ミトコンドリアの場合も同様に阻害され、I<sub>50</sub> は 0.4  $\mu$ M となった。

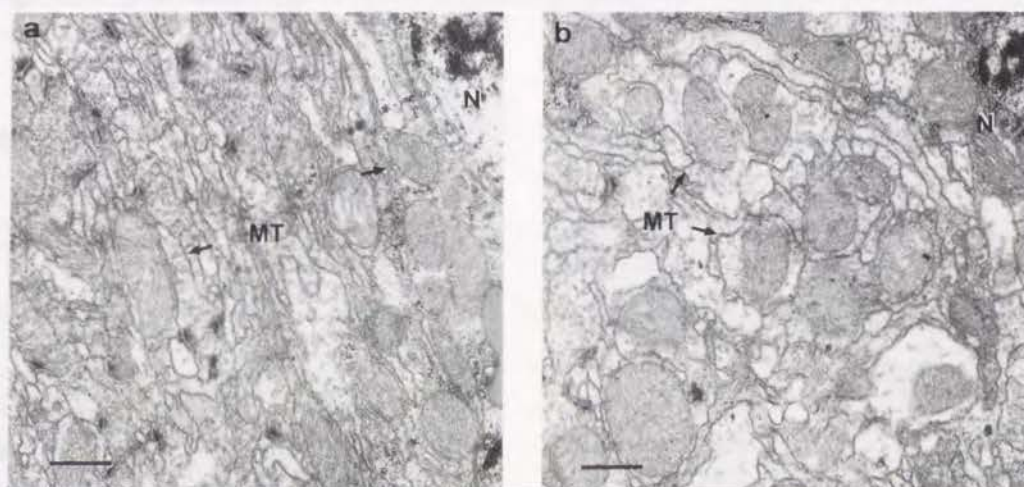
### 3) *T. urticae* 雌成虫の超微細形態に及ぼす影響

0.5  $\mu$ g/ml の fenpyroximate で処理し 15 分後の *T. urticae* 雌成虫の筋肉および末梢神経の電子顕微鏡写真を 図 9 (b) に示す。Fenpyroximate 処理群の末梢神経細胞のミトコンドリアには著しい形態変化、すなわち膨化、クリステ配列の乱れおよびマトリックスの電子密度の低下が認められた(図 9 (b)、矢印)。このとき、他の細胞内小器官および膜系に変化は認められなかった。一方、筋肉においてはミトコンドリアは正常な形態(規則的なクリステ配列、高いマトリックスの電子密度)を保っていた。末梢神経細胞のミトコンドリアに認められた形態異常は fenpyroximate 処理 30 あるいは 60 分後でも処理 15 分後と同様に認められた。また、筋肉のミトコンドリアには処理 60 分後でも形態変化は認められなかった。



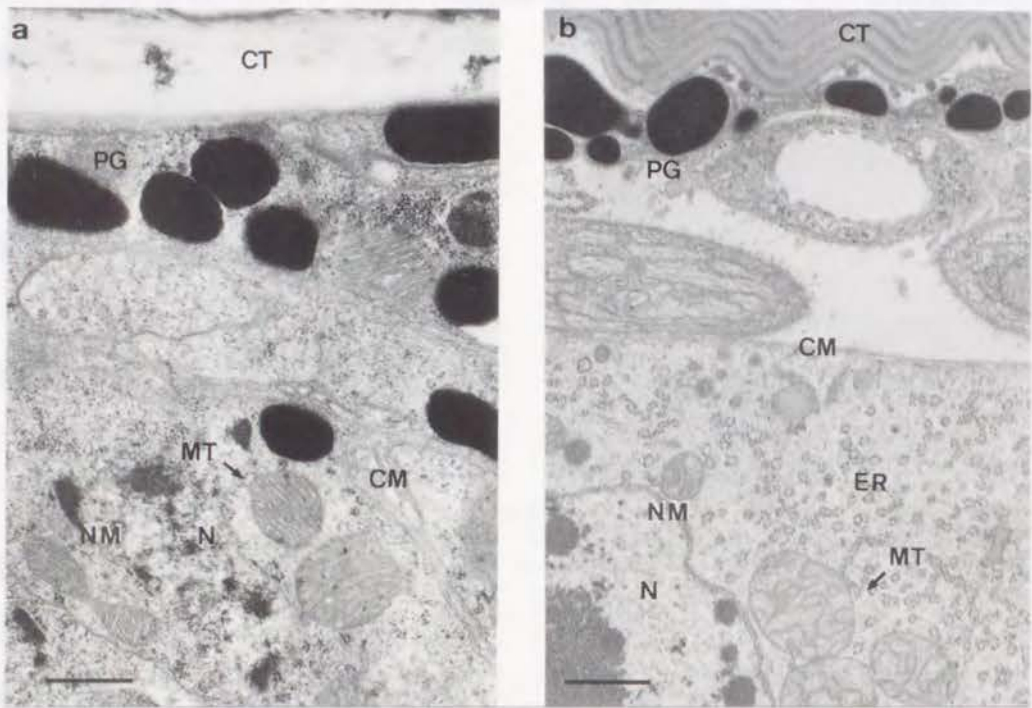


**Fig. 9.** Cross Sections of Muscle and Peripheral Nerve of Control (a) and Fenpyroximate (0.5 µg/ml for 15 min) Treated (b) *T. urticae*. Original magnifications were 10,000 and 15,000, respectively. Bars represent 500 nm. Abbreviations used: MF, muscular filament; PN, peripheral nerve; MT, mitochondria.



**Fig. 10.** Cross Sections of Central Nervous Mass of Control (a) and Fenpyroximate (0.5 µg/ml for 60 min) Treated (b) *T. urticae*. Original magnifications were 8,000 and 10,000, respectively. Bars represent 500 nm. Abbreviations used: MT, mitochondria; N, nucleus.





**Fig. 11. Cross Sections of Epidermal Cells of Control (a) and Fenpyroximate (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for 15 min) Treated (b) *T. urticae*. Original magnifications were 5,000. Bars represent 500 nm. Abbreviations used: CM, cell membrane; CT, cuticle; ER, endoplasmic reticulum; MT, mitochondria; N, nucleus; NM, nuclear membrane; PG, pigment granule.**

**Table 8. Effect of Fenpyroximate (0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) on Mitochondrial Fine Structure of Adult Female *T. urticae***

Organ/tissue	Morphological change <sup>a)</sup>			
	Time after treatment (min)			
	5	15	30	60
Edpidermal cell	+	+	+	+
Central nervous mass	-	-	-	-
Peripheral nerve cell	+	+	+	+
Intestinal epidermis	-	+	+	+
Muscle	-	-	-	-
Silk gland	-	-	+	+

a) +, Morphological changes were observed in mitochondria;  
 -, no change was observed.

図 10 に溶媒対照 (a) および fenpyroximate 処理 60 分後 (b) の *T. urticae* 雌成虫中枢神経細胞の電子顕微鏡写真を示す。末梢神経細胞で認められたミトコンドリアの形態変化は認められず、他の細胞内小器官および膜系も正常な形態を保っていた。また、fenpyroximate 処理後 60 分においても、ミトコンドリアの形態変化は認められなかった。

図 11 に溶媒対照 (a) および fenpyroximate 処理 15 分後 (b) の *T. urticae* 雌成虫表皮細胞の電子顕微鏡写真を示す。ミトコンドリアに末梢神経細胞 (図 9) で認められたものと同様の形態変化が認められ、さらに小胞体が平行に配列した管状から vesicle (小胞) 状に変化していた。他の細胞内小器官および膜系に形態変化は認められなかった。

末梢神経細胞および表皮細胞以外にも、卵 (卵母) 細胞、消化管上皮細胞および絹糸腺細胞にミトコンドリアの形態変化が、fenpyroximate 処理の 15 分あるいは 30 分後から認められた。ミトコンドリアの形態変化の有無について、表 8 にまとめて示した。

#### 1-4.

#### 考察

Fenpyroximate は NADH 依存基質 ( $\alpha$ -ketoglutarate 等) を電子供与体とするラット肝分離ミトコンドリアの酸素消費を阻害し、その阻害は脱共役剤 (SF-6847 あるいは 2,4-dinitrophenol) のによっても回復しなかった (図 7, 表 7)。このことから、本化合物は電子伝達に共役した ADP のリン酸化ではなく、電子伝達そのものを阻害することが示唆された。本化合物の NADH および NADH 依存基質を電子供与体とする電子伝達の阻害は電子受容体が ubiquinone であっても cytochrome c であっても認められた (表 7)。一方、succinate を電子供与体とした場合、何れの電子受容体を用いても電子伝達の阻害が全く認められなかった。これらの結果および既知の電子伝達のスキームから、fenpyroximate の電子伝達

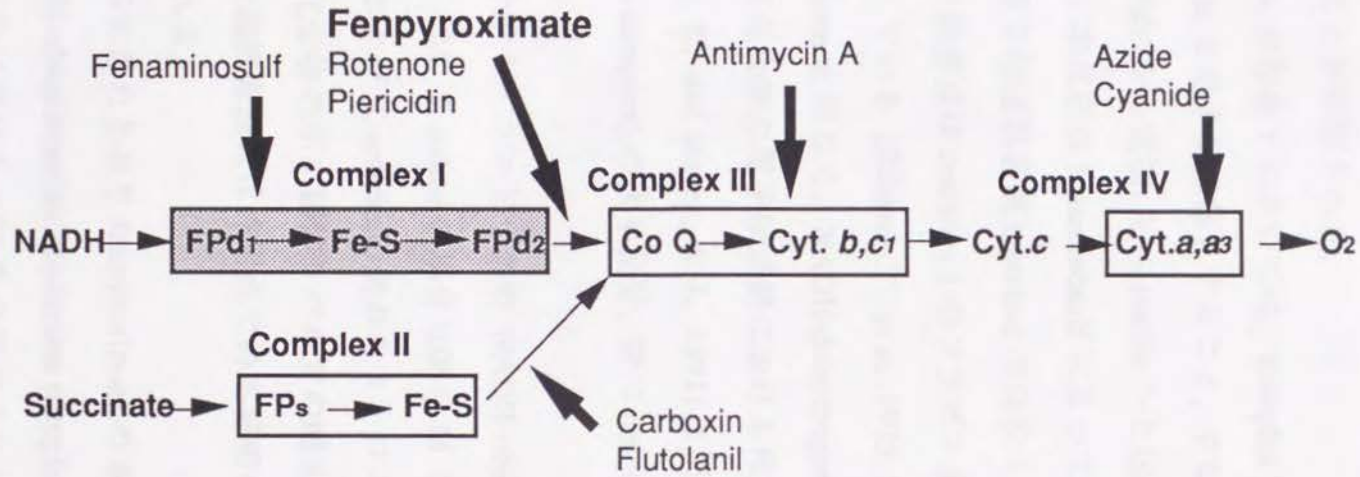


Fig. 12. Schematic Representation of Mitochondrial Electron Transport Chain and Sites of Action of Fenpyroximate and Other Respiratory Inhibitors. FP, flavoprotein; Fe-S, non-heme iron protein; Co Q, coenzyme Q; Cyt, cytochrome.



阻害における作用点は、NADH から ubiquinone に至る電子伝達鎖の前半部分すなわち complex I にあり、本化合物は ubiquinone から 酸素に至る部分 (complex III および IV) あるいは succinate から ubiquinone へ至る部分 (complex II) には影響しないことが推察された。

Ferricyanide の存在下においては、complex I は ubiquinone を電子受容体とせず ferricyanide を電子受容体とすること、すなわち電子は complex I のフラビントタンパク (FPd2) から直接 ferricyanide へと伝達されることが知られている。Schewe らは、本反応は fenaminosulf によって特異的に阻害され、代表的な complex I 電子伝達阻害剤 rotenone では全く阻害されないことを見出だし、fenaminosulf の阻害点は complex I のフラビン還元段階 (NADH dehydrogenase) であると考察している (Schewe, T. et al, 1975; Schewe, T. et al, 1979)。Fenpyroximate は rotenone と同じく、NADH-dehydrogenase を阻害しなかった (表 7)。この結果から、本化合物の電子伝達鎖における作用点は rotenone あるいは piericidin 類 (Van Dam, K. and Mayer, A. J., 1971) と同様、complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase complex) の後半部分、特に ubiquinone 還元の段階であると推察される (図 12)。

ラット肝分離ミトコンドリアの NADH-ubiquinone oxidoreductase 活性に対する  $I_{50}$  値は  $0.4 \mu\text{M}$ 、*T. urticae* の場合  $0.08 \mu\text{M}$  と大きな感受性差はなかったことから、ラットおよび *T. urticae* の何れもミトコンドリアレベルにおいては感受性であり、本化合物の示す個体レベルでの哺乳類 (ラット) と植物寄生性ダニ (*T. urticae*) 間の選択毒性には作用点での本質的な感受性以外の原因が存在するものと考えられる。

以上に述べてきたとおり fenpyroximate の本質的な第 1 次作用点はミトコンドリアの NADH-ubiquinone oxidoreductase complex すなわち complex I であると考えられ、真核生物における ATP 生合成のほとんどがミトコンドリアにおける電子伝達と共役していることを勘案すると、*T. urticae* を本化合物で処理した際に認められた ATP 含量の低下 (図 6) は本化合物による電子伝達阻害に起因する 2 次

的現象と考えられる。また、ミトコンドリアの形態はそのエネルギー状態（電子伝達成分の酸化/還元状態）を反映するものであることから、fenpyroximate 処理によって引き起こされた *T. urticae* のミトコンドリア形態異常（図 9～11）もまた本化合物による電子伝達の阻害によって引き起こされたものと推察される。

Fenpyroximate と同じ site を阻害する代表的な電子伝達阻害剤である rotenone も、本化合物と同様のミトコンドリアの形態異常を惹起することが既に報告されている。すなわち、Stoner と Sirak は、*in vitro* において rotenone がウシ心筋分離ミトコンドリアにマトリックスの膨化等の形態変化 ("configuration change") を引き起こすことを見出し、この変化は rotenone の電子伝達の阻害に基づく現象であると報告している (Stoner, C. D. and Sirak, H. D., 1969)。

Konno らは 50  $\mu$ g/ml の fenpyroximate で処理した *T. urticae* の半数が処理 51 分以内に knock-down (麻痺) することを報告している (Konno, T. *et al*, 1990)。このことから fenpyroximate 処理は *T. urticae* の神経伝達になんらかの影響を与えたことが示唆される。Fenpyroximate 処理された *T. urticae* の電子顕微鏡観察において、末梢神経細胞のミトコンドリアに特異的に形態変化が認められたこと、即ち末梢神経細胞のエネルギー代謝が阻害されていることから、本化合物は pyrethroids, DDT 等のように神経伝達に直接作用しているのではなく、末梢神経細胞におけるエネルギー代謝を阻害することを通じて神経伝達を攪乱し、knock-down を引き起こしているものと考えられた。本考察を支持するものとして、fenpyroximate で認められたものと同様の knock-down が rotenone で処理された昆虫で認められるという報告がある (Matumura, F., 1985; Brown, A. W. A., 1963; Yamamoto, I., 1970)。さらに、Fukami らは rotenone 類縁体の電子伝達阻害活性と神経伝達の阻害活性に関する構造-活性相関研究において、rotenone 類縁体においてはその電子伝達阻害が神経伝達阻害の主たる原因であり、最終的に麻痺を引き起こす原因であることを明らかにしている (Fukami, J. *et al*, 1959)。

速効的な致死濃度以下の fenpyroximate で処理された *T. urticae* 幼虫は第一若



虫あるいは第二若虫まで生存し、脱皮時に脱皮不全で死亡する現象が報告されている (Konno, T. *et al*, 1990). この現象は、fenpyroximate が直接脱皮を阻害した結果ではなく、本化合物の電子伝達阻害により ATP 供給が減少し、新しい表皮の形成が阻害されたために惹起された現象と考えられる。実際、電子顕微鏡観察の結果 (図 11) から、表皮細胞における電子伝達が阻害されていることは明白である。

以上に述べてきた様に、fenpyroximate の示す高い殺ダニおよび knock-down 活性はミトコンドリアの complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase complex) における電子伝達の阻害に基づいており、死亡、麻痺および脱皮不全等の症状は全て電子伝達阻害に起因する 2 次的な現象であることが示唆された。

Fenpyroximate の作用機構について, *Tetranychus urticae* Koch (Two-spotted spider mite, ナミハダニ) およびラット肝分離ミトコンドリアを用い生化学的および形態学的に検討した.

Fenpyroximate で処理することによって *T. urticae* 虫体の ATP 含量は速やかかつ著しく減少し, この現象は死亡に先立って起こることから, 本化合物は *T. urticae* のエネルギー代謝を阻害し, 死に至らしめることが示唆された. ラット肝分離ミトコンドリアを用いた実験結果から, 本化合物はミトコンドリアの NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) 活性を阻害し, その詳細な作用点は rotenone, piericidin 類と同じくフラビントンパク (FPd2) から ubiquinone への電子伝達のステップであることが明らかとなった. また, *T. urticae* から調製したミトコンドリアにおいても, ラット肝分離ミトコンドリアを用いた場合とほぼ同様の濃度で NADH-ubiquinone oxidoreductase 活性が阻害され, 分離ミトコンドリアレベルでは哺乳類もダニも本化合物に同程度に感受性であることが明らかとなった.

Fenpyroximate を *T. urticae* に処理した場合, 末梢神経細胞, 表皮細胞等のミトコンドリアに膨化, クリステ配列の乱れ等の形態異常が惹起された. このことから, 本化合物の *in vitro* でみられた NADH-ubiquinone oxidoreductase の阻害は *in vivo* においても発現していることが示唆された.

以上の結果から, 本化合物の電子伝達阻害が ATP 含量の低下およびミトコンドリアの形態異常を引き起こし, ひいては knock-down, 死亡, 脱皮不全等の生物学的現象 (症状) を引き起こしているものと推察された.



## 第 2 章 ラットにおけるエステル加水分解機構

### 2-1. 緒言

Fenpyroximate をラットに経口投与した場合、その代謝および排泄は速やかであり、主たる代謝経路は *tert*-butyl エステル結合の加水分解、オキシムエーテル結合の開裂、*tert*-butyl 基、ピラゾール環 3 位メチル基、フェノキシ基 4 位の酸化等であることが報告されている (Nishizawa, H. *et al*, 1993). 一般にエステル結合は、その  $\alpha$  位の分岐によって酵素あるいは塩基による加水分解に対して安定化する、すなわち 3 級アルコールのエステルは、対応する 1 あるいは 2 級アルコールエステルに比べ、酵素あるいは塩基によって加水分解され難くなることが知られている (Uchida, M. *et al*, 1982). しかし、ラット肝ミクロソームによる *in vitro* 代謝系に 10  $\mu$ g の fenpyroximate を添加した場合、15 分間で添加量の 28.8%、60 分間で 62.7% が加水分解されると報告され、またラットにおける主代謝経路として *tert*-butyl エステルの加水分解が挙げられていることから (Nishizawa, H. *et al*, 1993), 本化合物の *tert*-butyl エステル結合は一般の 3 級アルコールエステルと異なり加水分解を受け易く、その加水分解にはカルボキシエステラーゼによる直接の加水分解以外の反応機構が存在することが伺われた。そこで、本章では、ラットにおける fenpyroximate の *tert*-butyl エステル加水分解反応機構について検討するべく行なった代謝中間体の単離・構造決定および加水分解速度の測定結果について述べる。

## 1) 化合物

[Pyrazole-3- $^{14}\text{C}$ ] fenpyroximate は  $^{14}\text{C}$ -acetoethylacetate から日本農薬(株) 安全性研究所にて合成したものをを用いた。比活性は 851 MBq/mmolであり、使用に際して薄層クロマトグラフィー (TLC: plate, kieselgel G-60 F254, E.Merck, Darmsdatt, FRG; solvent, *n*-hexane/acetone = 4/1) によって精製し、放射化学的純度を 99.0% 以上として用いた。Fenpyroximate およびその代謝物標品は日本農薬(株)化学研究所にて合成および精製されたものをを用いた。表 9 に使用した fenpyroximate 代謝物の構造および略号を示す。Fenpyroximate の *tert*-butyl 基を methyl, ethyl, *n*-propyl, *i*-propyl, *n*-butyl, *i*-butyl および *sec*-butyl 基に置換したアナログは 図 13 にその概略を示す方法に従って合成した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

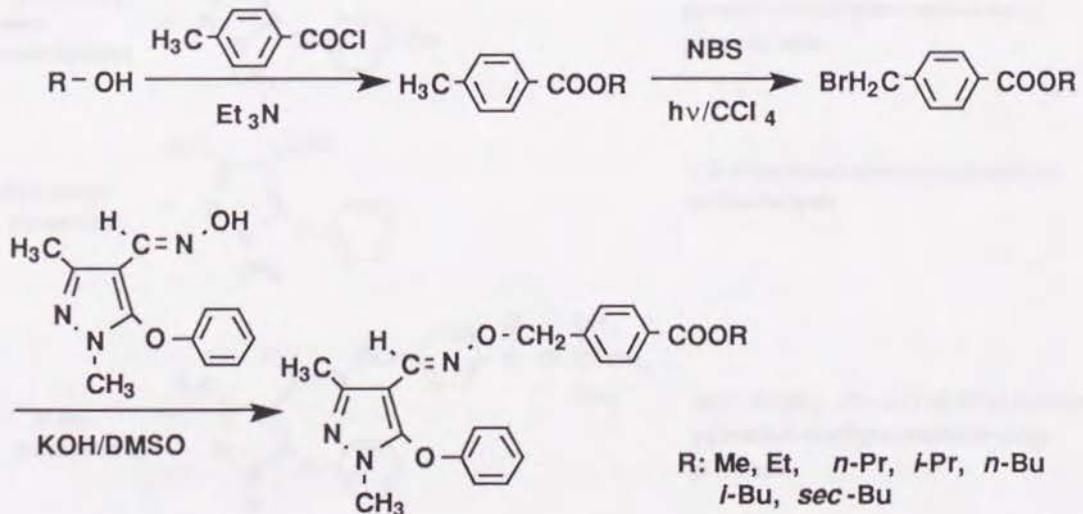


Fig. 13. Synthesis of Fenpyroximate Analogs.

NBS; *N*-bromo-succinimide



Table 9. Structures of Fenpyroximate and Its Metabolites Used in This Study

Compounds	Structure	Chemical name
Fenpyroximate		<i>tert</i> -butyl ( <i>E</i> )- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy)pyrazol-4-methyleneamino-oxy)- <i>p</i> -toluate
M-1 ( <i>Z</i> -isomer)		<i>tert</i> -butyl ( <i>Z</i> )- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy)pyrazol-4-methyleneamino-oxy)- <i>p</i> -toluate
M-2 ( <i>p</i> -hydroxylated)		<i>tert</i> -butyl ( <i>E</i> )- $\alpha$ -[1,3-dimethyl-5-(4'-hydroxyphenoxy)pyrazol-4-methyleneamino-oxy]- <i>p</i> -toluate
M-3 (ester hydrolyzate)		( <i>E</i> )- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy)pyrazol-4-methyleneamino-oxy)- <i>p</i> -toluic acid
M-5 ( <i>p</i> -hydroxy, ester hydrolyzate)		( <i>E</i> )- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-(4'-hydroxyphenoxy)pyrazol-4-methyleneamino-oxy)- <i>p</i> -toluic acid
M-6 (4-formylpyrazole)		1,3-dimethyl-5-phenoxypyrazol-4-carbaldehyde
M-12 ( <i>N</i> -demethylated)		<i>tert</i> -butyl ( <i>E</i> )- $\alpha$ -(1-methyl-5-phenoxy)pyrazol-4-methyleneamino-oxy)- <i>p</i> -toluate
M-22		( <i>E</i> )-2-[4-[(1,3-dimethyl-5-phenoxy)pyrazol-4-yl]methyleneamino-oxy]methyl]-benzoyloxy]-2-methylpropionic acid

## 2) ラット単回経口投与における代謝

[Pyrazole-3-<sup>14</sup>C] fenpyroximate をコーン油に溶解し、1.5 mg/0.9 MBq/kg の割合で 6 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットに強制経口投与した。投与 1, 3, 6, 12 および 24 時間後に軽度エーテル麻酔下に開腹し、ヘパリンを抗凝固剤として用い腹部大静脈より採血、肝を摘出した。全血を遠心分離 (4°C, 3000×g, 10 分) し血漿を得、その一部をそのままシンチラント (Atomlight™, DuPont/NEN Research products, Boston, Mass., USA) に混和し液体シンチレーションカウンター (1410, Pharmacia-Wallac Co., Turku, Finland) で放射エネルギーを測定した。肝は生理的食塩水で灌流して血液を除きホモジナイズした。得られたホモジネートの一部を燃焼し (全自動試料燃焼装置, ASC-113, Aloka (株), 東京) <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> とした後、液体シンチレーションカウンターで放射エネルギーを測定した。

血漿に等容の methanol/acetone (1/1) を加え遠心分離 (4°C, 10,000×g, 15 分) して得られた上清、および肝ホモジネートを 3 倍量の methanol/acetone (1/1) で 2 回抽出して得られた抽出液を代謝物の定量に用いる試料とした。試料を 2 次元 *co*-TLC (plate: Kieselgel G-60F254, E. Merck, Darmstadt, FRG; 1 次元展開溶媒: benzene/dioxane/acetic acid = 90/25/4, 2 次元展開溶媒: n-hexane/acetone = 1/1) で分離し、オートラジオグラムを作製 (Konica macro ARG film <sup>3</sup>H-type, Konica Co., 東京) し、放射能が検出された部分のシリカゲルを掻き取り、液体シンチレーションカウンター (1410, Pharmacia-Wallac, Turku, Finland) で定量した。

## 3) ラット肝ホモジネート 9000×g 上清画分による代謝

6 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットから肝を摘出、氷冷下に生理食塩水で洗浄し、100mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.25M sucrose を含む) で 10% ホモジネートとした。9000×g, 15 分間遠心分離し、得られた上清を S-9 画分として用いた。[Pyrazole-3-<sup>14</sup>C] fenpyroximate 100 μM (4 kBq/ml), NADPH 1mM, ラット肝 S-9 画分 10 mg liver eq./ml, 100mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) からなる反応系を用い、終濃度 100 μM の diisopropylfluorophosphate (DFP) の添加あるいは無添加で反応



させた。反応は 37°C で行ない、反応液に等量の acetone を添加することで反応を停止した。Acetone 添加後、遠心分離 (10,000×g, 10 分) によって得られた上清を上記と同条件の 2 次元 co-TLC に供し、反応生成物を分離、定量した。

#### 4) 代謝中間体 A および B の精製および構造決定

代謝中間体 A および B は、前述と同様の方法で調製したラット肝 S-9 10 g 肝相当, fenpyroximate 100  $\mu$  mole, DFP 40  $\mu$  mole および 400ml の 100m M リン酸緩衝液 (pH 7.4) より成る系で生成せしめ、酢酸エチル抽出, シリカゲルカラムクロマトグラフィー, 分取 TLC 等によって単離・精製した。<sup>1</sup>H-核磁気共鳴スペクトラム (<sup>1</sup>H-NMR) は、重クロロホルム溶媒中 300 MHz で VXR-300 (Varian Instrument Co. Japan, 東京) を用い、質量スペクトラムは二重収束質量分析計 (JMS-DX-300, 日本電子(株), 東京) を用い電子衝突イオン化 (EI, イオン化エネルギー: 70 eV) で測定した。

#### 5) 代謝中間体 A のエステル転位反応速度の測定

pH 7, 8 および 9 の緩衝液 (100mM リン酸あるいは 100mM ホウ酸) およびラット血漿 (100  $\mu$  M の DFP を含む) に代謝物 A の acetonitrile 溶液を 5  $\mu$  M とするよう添加し、一定時間後に HPLC によって代謝物 A およびエステル転位生成物 (代謝物 B) を定量した。HPLC 条件を以下に示す。ポンプ: LC-6A (島津製作所(株), 京都), 検出器: SPD-6A (島津製作所製(株), 京都), カラム: Wako-pack 5C18T ( $\phi$  6×150 mm, 和光純薬(株), 大阪), 移動相: acetonitrile/H<sub>2</sub>O/acetic acid = 650/349/1, 流速: 1 ml/min, 検出波長: 258 nm。

#### 6) エステル加水分解速度の測定

前述と同様にして調製したラット肝 S-9 画分を酵素液として用い、代謝物 B, fenpyroximate およびその類縁体の加水分解速度を測定した。酵素液をリン酸緩衝液 (100 mM, pH 7.4) で適宜希釈したもの 100  $\mu$  l に各基質の 10 mM DMSO

溶液 1  $\mu$ l を添加して反応を開始した。25°C で 5 ~ 30 分間反応の後、200  $\mu$ l の acetonitrile を添加して反応を停止し、遠心分離 (10,000 x g, 10 分) により得られた上清中の反応生成物 (M-3, (E)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethylene-aminoxy)-*p*-toluic acid) を HPLC で定量した。HPLC 条件を以下に示す。ポンプ: LC-6A (島津製作所(株), 京都), 検出器: SPD-6A (島津製作所製(株), 京都), カラム: YMC-A312 ( $\phi$  6 $\times$ 150 mm, 山村化学研究所(株), 京都), 移動相: acetonitrile/H<sub>2</sub>O/acetic acid = 700/298/2, 流速: 1.2 ml/min, 検出波長: 258 nm.

## 2-3. 結果

### 1) ラットにおける初期代謝

1.5 mg/kg の用量で fenpyroximate を雄性ラットに経口投与した際の、血漿中代謝物の濃度推移を図 14 に示す。血漿中の fenpyroximate 濃度は極めて低いレベルで推移し、C<sub>max</sub> (最大濃度) は 8 ng/ml に過ぎなかった。血漿中主代謝物は fenpyroximate がエステル加水分解を受けた M-3 であり、この代謝物は投与 6 時間後には 296 ng/ml に達し、以後減衰した。その他の代謝物として、M-5 および M-22 が投与 12 時間後まで認められた。投与 12 時間後までの比較的早い時期には、図 14 中に ▲ で示される未同定代謝物が最も高濃度で存在し、この未同定代謝物は fenpyroximate 経口投与ラットの尿あるいは糞中に検出された代謝物のいずれとも一致せず、その構造に興味を持たれた。

図 15 に同様の投与条件下における肝中代謝物の濃度推移を示す。Fenpyroximate は投与後比較的早い時間では検出されたがその減衰は速やかで、投与 12 時間後からは検出限界以下となり、本化合物の代謝あるいは排泄が速やかであることが示唆された。また、肝中でも血漿と同様に M-3 および M-22 が主代謝物であり、fenpyroximate の主たる代謝経路の 1 つが *tert*-butyl エステル結合の加水分解であることが示唆された。血漿中に見出だされた未同定代謝物 (図中



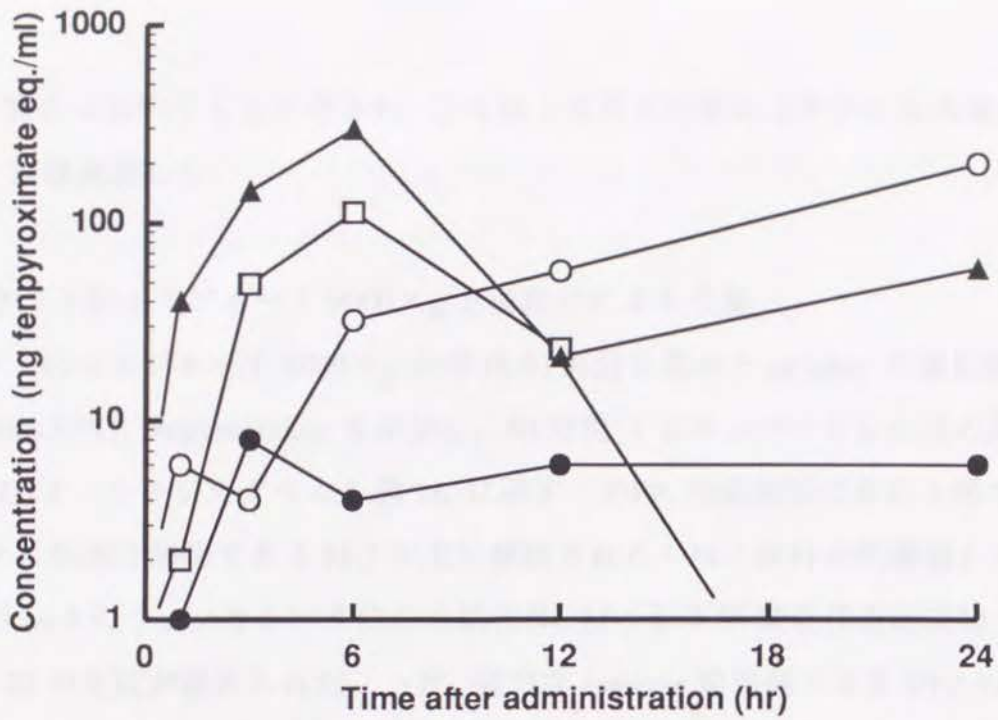


Fig. 14. Concentrations of Fenpyroximate and Its Metabolites in Rat Plasma After Single Oral Administration of [Pyrazole -3-<sup>14</sup>C] Fenpyroximate (1.5 mg/kg).  
 ●, fenpyroximate; ○, M-3; □, M-22; ▲, unknown metabolite.

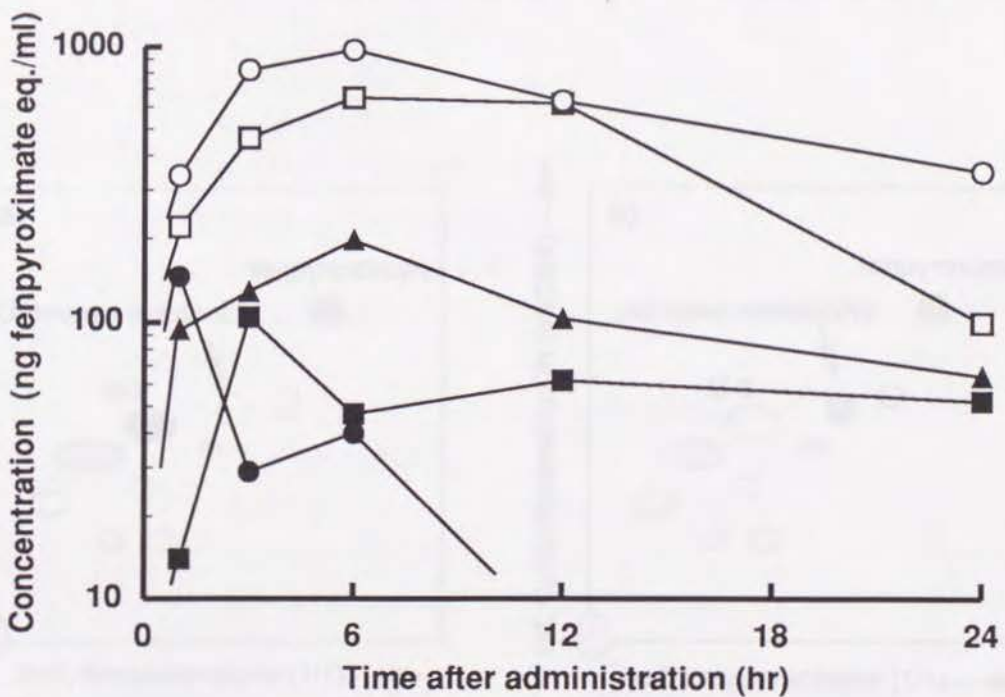


Fig. 15. Concentrations of Fenpyroximate and Its Metabolites in Rat Liver After Single Oral Administration of [Pyrazole -3-<sup>14</sup>C] Fenpyroximate (1.5 mg/kg).  
 ●, fenpyroximate; ○, M-3; ■, M-5; □, M-22; ▲, unknown metabolite.

▲) は肝中においても見出だされ、投与後 6 時間と比較的速やかに最高濃度に達し、以後減衰した。

2) ラット肝ホモジネート 9000×g 上清画分による代謝

ラット肝ホモジネート 9000×g 上清 (S-9) 画分を用いた *in vitro* 代謝反応系に、[pyrazole-3-<sup>14</sup>C] fenpyroximate を添加し、30 分間 インキュベートした後の反応液の TLC-オートラジオグラムを図 16 に示す。DFP 無添加区の反応上清中には、エステル加水分解物である M-3 が主に検出された。M-3 以外の代謝物として、少量の M-3 のフェノキシパラ位の水酸化体、M-5 および 酸化代謝生成物である M-22 の生成が認められた。一方、強力な esterase 阻害剤である DFP の添加区では M-3 および M-5 の生成は認められず、代わって図中に ↓ で示される未同定代謝物が生成していた。この未同定代謝物の黒化スポットは極めて Rf 値の近似した 2 成分より成ることが別溶媒系での TLC の結果から明らかとなったが、このうちの 1 成分は fenpyroximate 投与ラットの血漿および肝中で認めら

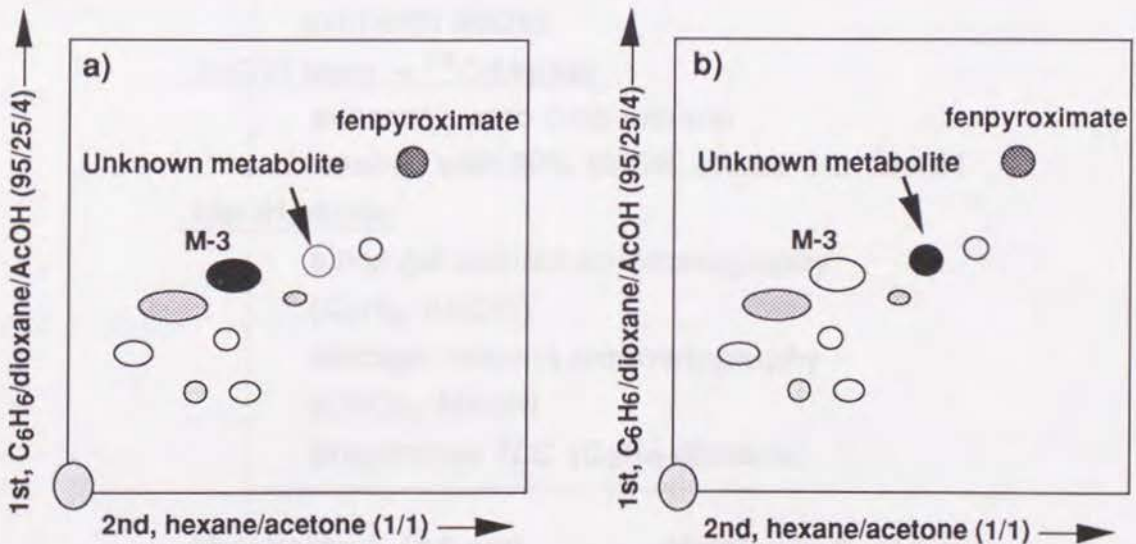


Fig. 16 Thin Layer Chromatography-Autoradiograms of [pyrazole-3-<sup>14</sup>C] Fenpyroximate Metabolized with Rat Liver S-9 under an Absence (a) or Presence (b) of 100 μM Diisopropylfluorophosphate (DFP).



れた未同定代謝物とクロマトグラフィー的に一致し、同一物質と考えられた。また、DFPの添加区における未同定代謝物の生成速度は2成分の合計で0.159  $\mu$  mol fenpyroximate eq./min/mg proteinであった。

### 3) 代謝中間体の単離および構造決定

*In vitro* 系で生成せしめた未同定代謝物の精製過程の概略を図17に示す。図17に示した方法に従って得られた代謝物を以後、代謝物Aおよび代謝物Bとする。代謝物AおよびBの<sup>1</sup>H-NMRデータおよびシグナルの帰属を表10に示す。この2代謝物はクロマトグラフィー的挙動が類似したのみならず、極めて類似したスペクトラムを与え、相違点は代謝物Aにおいては3.74 ppmに検出されたヘテロ原子に隣接するメチレンプロトンに帰属されるべきシグナルが、代謝物Bでは4.19 ppmに低磁場シフトしている点のみであった。代謝物A

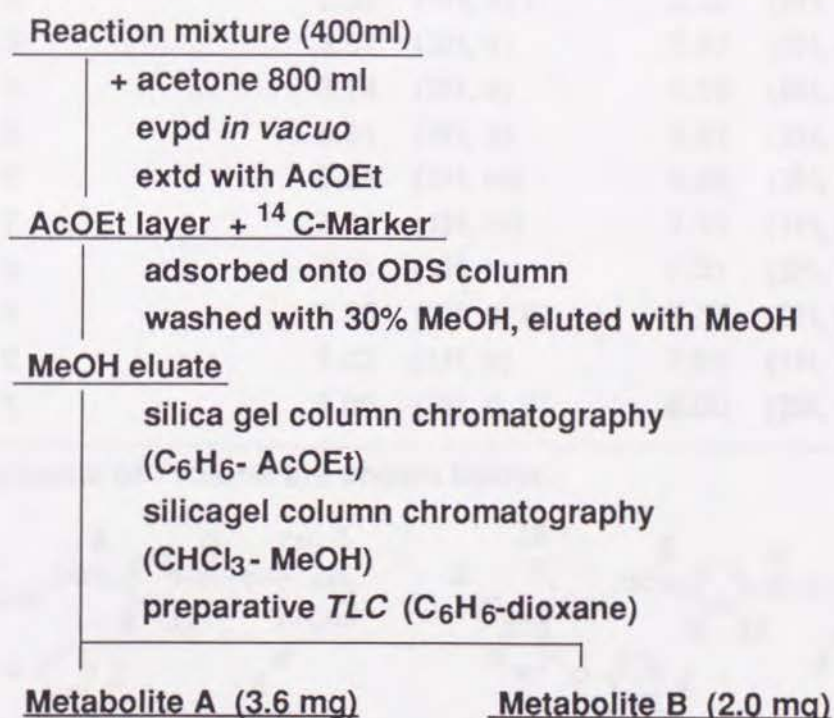


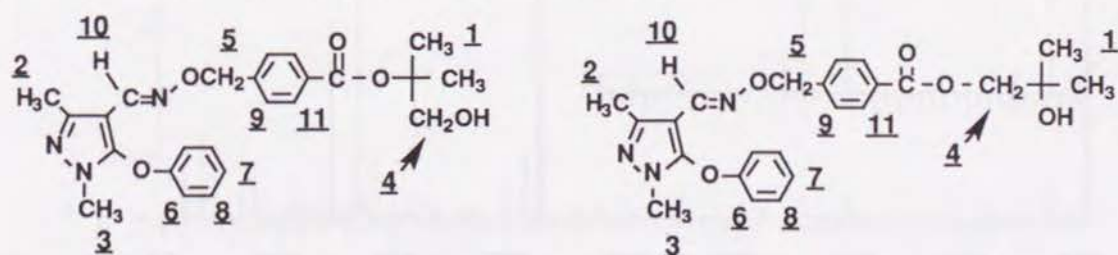
Fig. 17. Purification Procedure of Unknown Metabolite A and B

および B の EI-MS (電子衝突-マススペクトル) および推定フラグメントパターンを 図 18 および 19 に示す. EI-MS においても, 代謝物 A および B は極めて類似したスペクトラムを与え,  $m/z$  437 に分子イオンピークを,  $m/z$  348, 239, 213, 135 に特徴的なフラグメントピークを与えた. 以上の結果から, 代謝物 A および B の構造を 図 20 に示すように, それぞれ 1-hydroxymethyl-1-methylethyl (*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethyleneamino-oxy)-*p*-toluate および 2-

Table 10.  $^1\text{H-NMR}$  Data and Their Assignments of Unknown Metabolite A and B

Assignments <sup>a)</sup>	Protons ( $\delta$ in ppm, multiplicity, $J$ in Hz)	
	Metabolite A	Metabolite B
1	1.53 (6H, s)	1.53 (6H, s) <sup>b)</sup>
2	2.32 (3H, s)	2.32 (3H, s)
3	3.57 (3H, s)	3.57 (3H, s)
4	3.74 (2H, s)	4.19 (2H, s)
5	5.01 (2H, s)	5.01 (2H, s)
6	6.86 (2H, m)	6.85 (2H, m)
7	7.11 (1H, m)	7.11 (1H, m)
8	7.31 (2H, m)	7.31 (2H, m)
9	7.35 (2H, d, 8)	7.35 (2H, d, 8)
10	7.83 (1H, s)	7.81 (1H, s)
11	8.00 (2H, d, 8)	8.00 (2H, d, 8)

a) Assignments of Protons are shown below.



b) s, singlet; d, doublet; m, multiplet.



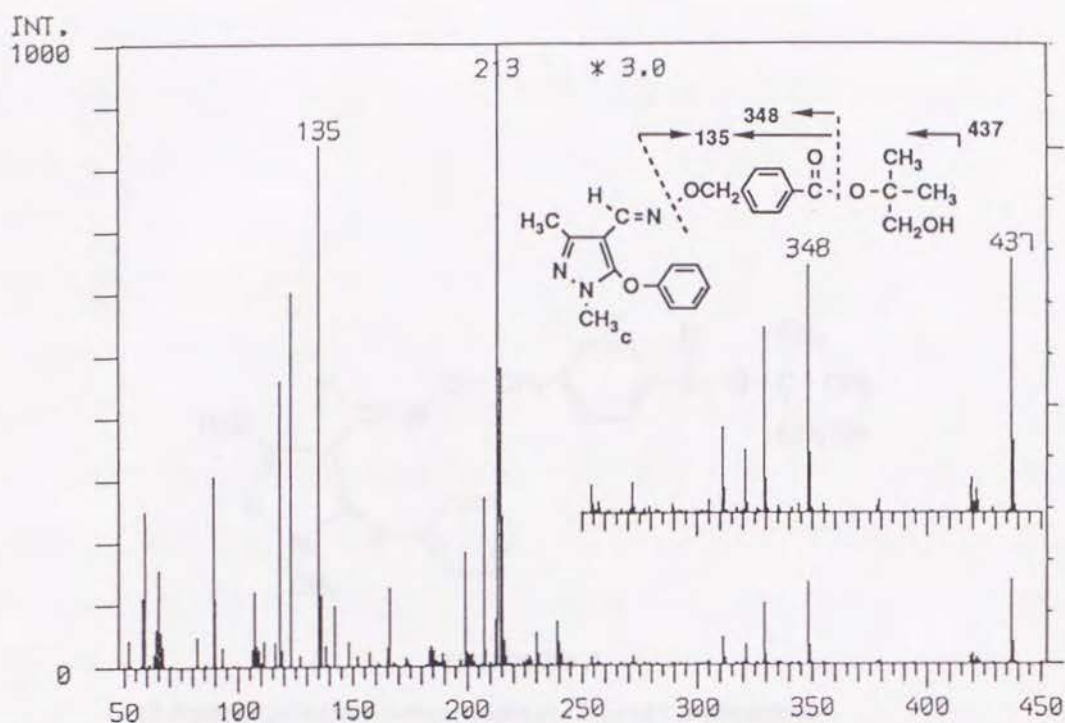


Fig. 18. Electron-impact (EI) Mass Spectrum and Proposed Fragmentation Pattern of Unknown Metabolite A (70 eV)

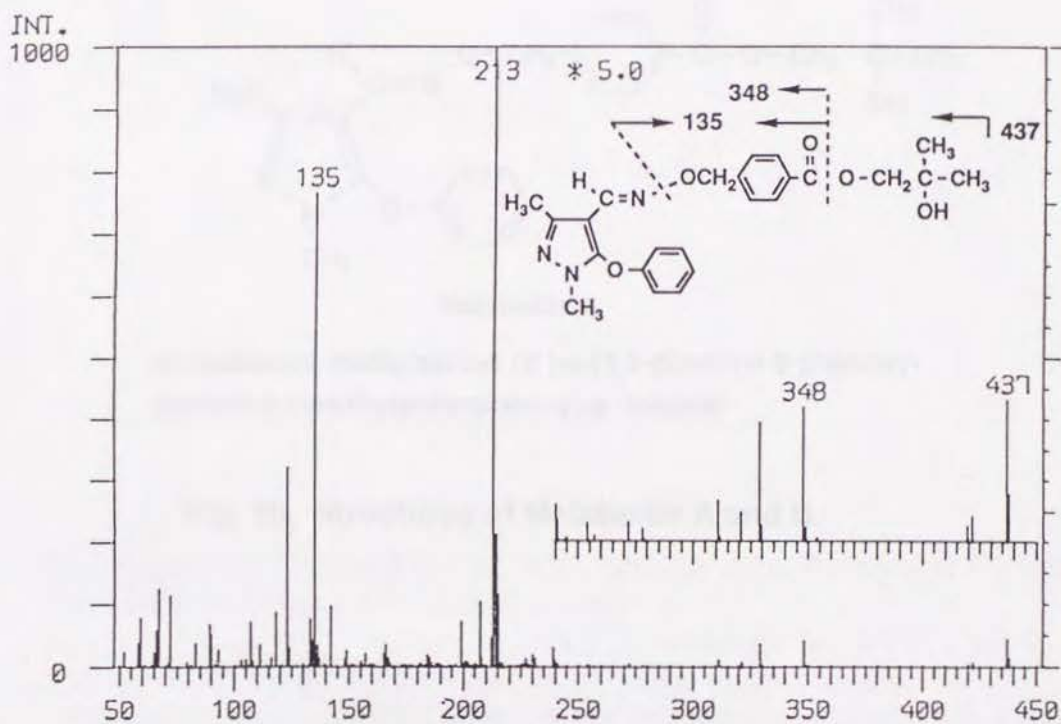
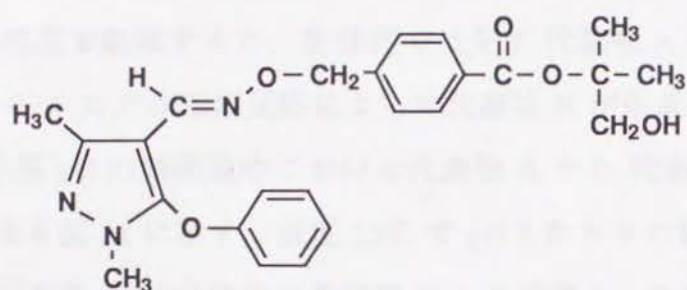
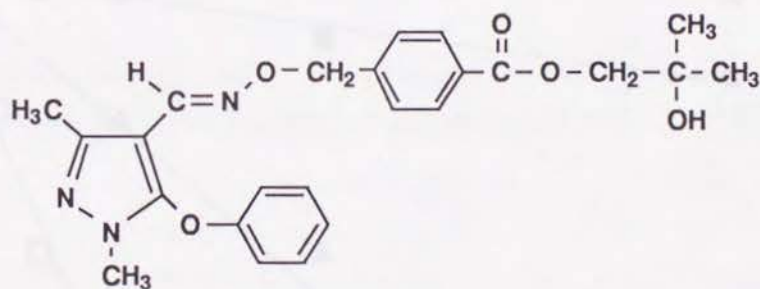


Fig. 19. Electron-impact (EI) Mass Spectrum and Proposed Fragmentation Pattern of Unknown Metabolite B (70 eV).



**Metabolite A**

(1-hydroxymethyl-1-methylethyl (*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethyleneaminoxy)-*p*-toluate)



**Metabolite B**

(2-hydroxy-2-methylpropyl (*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethyleneaminoxy)-*p*-toluate)

**Fig. 20. Structures of Metabolite A and B.**



hydroxy-2-methylpropyl (*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethyleneamino-oxy)-*p*-toluate と決定し、化学合成品との機器分析値およびクロマトグラフィー的一致によって確認した。

#### 4) 代謝中間体のエステル転移反応

Fenpyroximate の構造を勘案すると、生体内では先ず代謝物 A が生成し、その後代謝物 A からエステル転位反応によって代謝物 B が生成するものと考えられる。そこで各種 pH の緩衝液中における代謝物 A から代謝物 B への転換速度を測定した結果を図 21 に示す。温度 25°C で pH 7 から 9 の範囲において、初発濃度 5  $\mu$ M の代謝物 A は定量的に代謝物 B へと変換し、その他の分解物

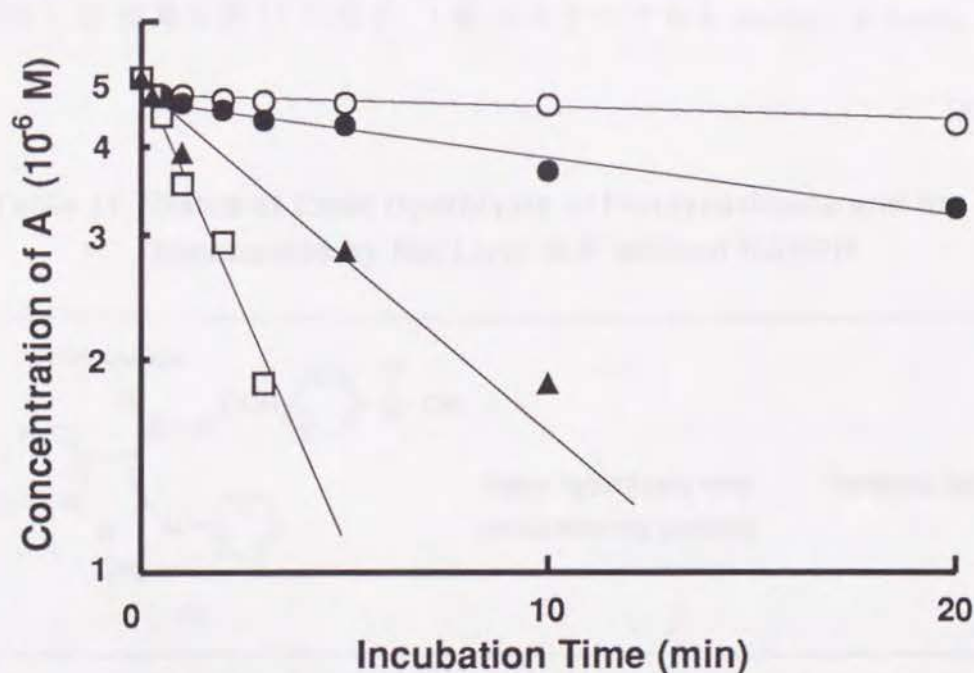


Fig. 21. Stoichiometric Conversion from Metabolite A to Metabolite B under Various Conditions and with Rat Plasma.

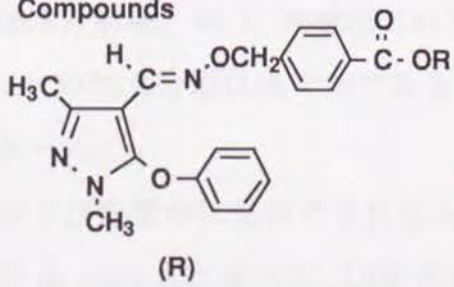
O, pH 7 (phosphate buffer); ●, pH 8 (phosphate buffer); □, pH 9 (borate buffer); ▲, Rat plasma. The initial concentration of metabolite A was 5  $\mu$ M. Under these conditions, metabolite A was stoichiometrically converted to metabolite B

を与えなかった。また、pH 4 以下においては代謝物 A から B へのエステル転位に比べエステル結合の加水分解 (M-3 の生成) が優先した。本実験条件下において、代謝物 A の pH 7, 8 および 9 における半減期 ( $T_{1/2}$ ) は 170.9, 40.6 および 2.1 分であり、代謝物 A から代謝物 B への転換は塩基性条件下においてより速やかであった。ラット血漿 (100  $\mu$ M の DFP を含む) に代謝物 A を添加した場合も、代謝物 A から代謝物 B への転換は速やかで、代謝物 A の  $T_{1/2}$  は 5.9 分であり、pH 7 および 8 の緩衝液中よりも速やかであった。また、代謝物 A の初期濃度を増減してもその  $T_{1/2}$  に変化はなかった。

#### 5) 代謝中間体および fenpyroximate 類縁体のエステル加水分解速度

Fenpyroximate (*tert*-butyl エステル), methyl, *n*-butyl, *i*-butyl および *sec*-butyl エステルアナログおよび代謝物 B のラット肝 S-9 による加水分解速度について検討した結果を表 11 に示す。1 級 エステルである methyl, *n*-butyl, *i*-butyl

**Table 11. Rates of Ester Hydrolysis of Fenpyroximate and Its Metabolites by Rat Liver S-9 without NADPH**

Compounds		Ester hydrolysis rate (nmol/min/mg protein)	Relative rate
	(R)		
- CH <sub>3</sub>	(Me)	4.529	1.000
- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	( <i>n</i> -Bu)	2.328	0.514
- CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	( <i>i</i> -Bu)	2.644	0.584
- CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	( <i>sec</i> -Bu)	1.368	0.300
- C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	(fenpyroximate)	0.015	0.003
- C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	(metabolite A)	N.D. a)	-
- CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OH	(metabolite B)	2.035	0.449

a) Not determined.



アナログおよび代謝物 B は速やかに加水分解され、*sec*-butyl エステルアナログは 1 級エステル類の約半分速度で加水分解された。3 級エステルである fenpyroximate の加水分解速度は代謝物 B の 1/100 以下と carboxyesterase による加水分解に対して極めて安定であった。

## 2-4. 考察

一般に、エステル結合を形成しているアルコールの  $\alpha$  位の分岐は、そのエステル結合を塩基あるいは酵素による加水分解に対して安定化することが知られている。例えば、Uchida らおよび Soderlund らは、3 級アルコールのエステルは、その対応する 1 あるいは 2 級アルコールのエステルに比べ esterase による加水分解に対し安定であることを報告している (Uchida, M. *et al*, 1982; Soderlund, D. M. and Casida, J. E., 1977)。一方、fenpyroximate のラットにおける代謝経路は図 22 のように推定されており、fenpyroximate の主たる代謝経路の 1 つとして *tert*-butyl エステル結合の加水分解が挙げられている。また fenpyroximate を経口投与したラットの血漿中あるいは肝中には、投与 1 時間後にはエステル加水分解物、M-3、が検出されていることから (図 15 および 16)、fenpyroximate の加水分解は速やかであると考えられ、前述の一般則に合致しない結果となった。

肝および血漿中に見出だされた未同定代謝物 A および B はラット肝 S-9 を用いた *in vitro* 系において、DFP 添加区にのみ特異的に見出だされ、対照区では M-3 のみが主に検出されたこと (図 16) から、代謝物 A および B は fenpyroximate から M-3 へ至る中間代謝物であると推定された。

図 21 に示したとおり、代謝物 A から B への分子内エステル転位反応は塩基性条件下においてより速やかであり、非酵素的に起こることから、この反応は水酸基からのプロトンの引き抜きに始まる図 23 に示す経路すなわち、分子内

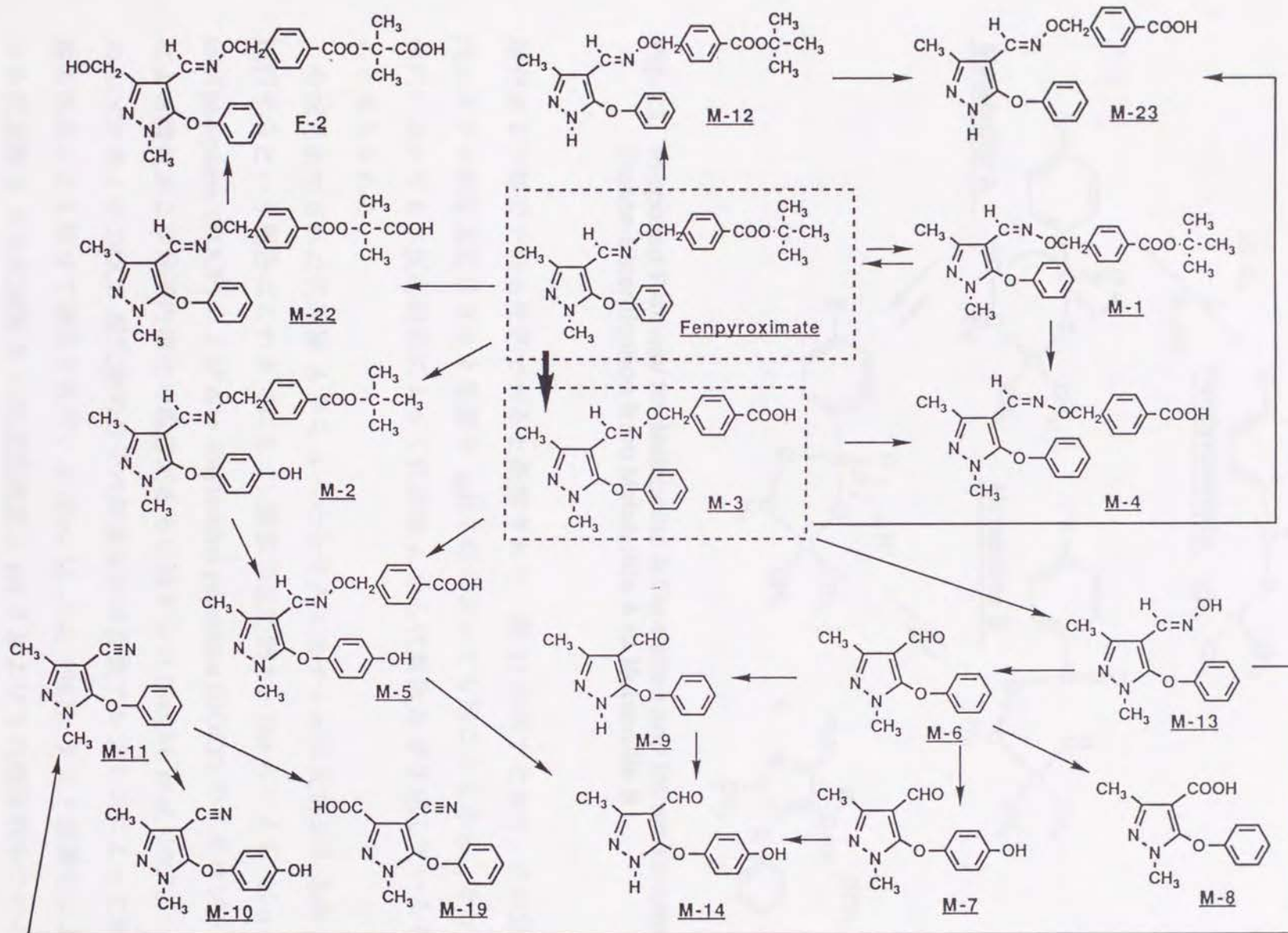


Fig. 22. Proposed Metabolic Pathway of Fenpyroximate in Rats



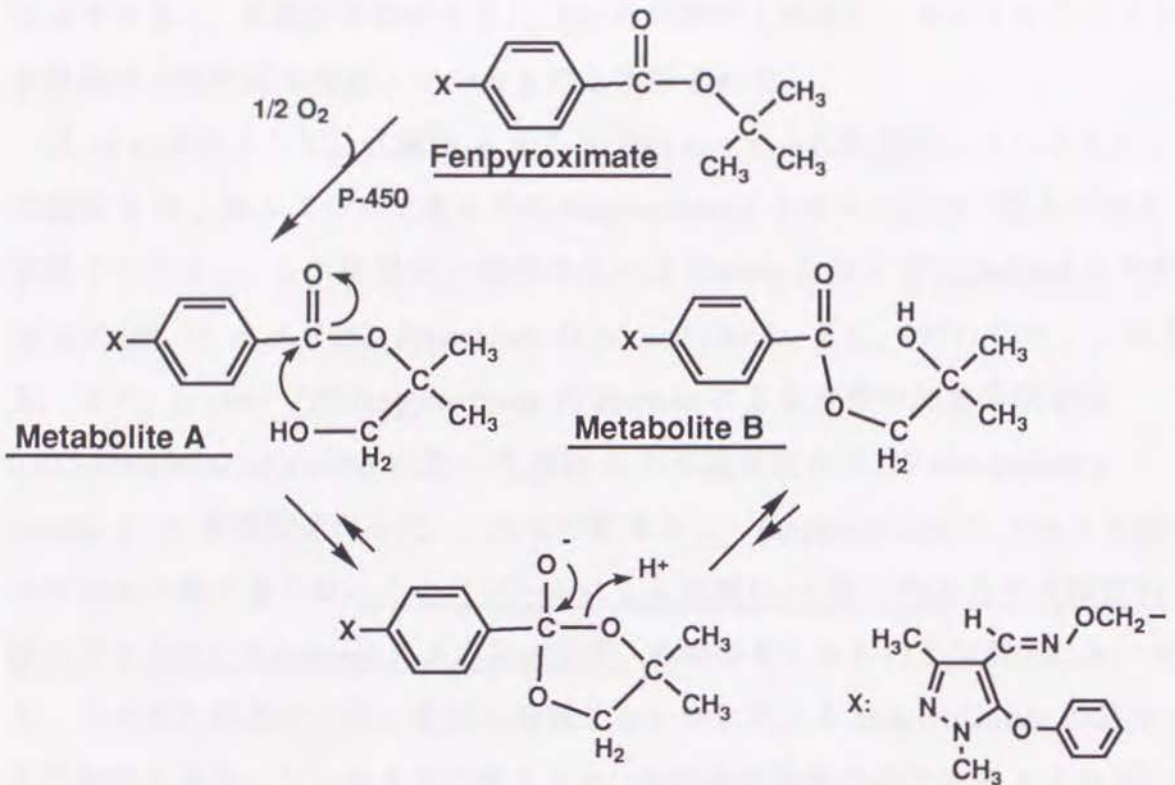


Fig. 23. Proposed Pathway for Metabolite A Formation and Intramolecular Transe-Esterification from Metabolite A to Metabolite B

環化および開裂を経る反応であると推察された。図 21 に示すとおり、この分子内エステル転位反応はラット血漿中 (pH 7.4) においても起こるとから、ラット体内においても本反応経路によって代謝物 A から代謝物 B が生成しているものと考えられる。

今回見出だされた代謝物 A から B への分子内エステル転位反応が生体内で進行するという報告はこれまでになく、類似の反応例も、Eto らによる tri-*o*-tolyl phosphate (TOCP) および di-*o*-tolylmethyl phosphate (DOCP) のマイクロゾームによる酸化および分子内環化の報告があるに過ぎない (Eto, M. *et al*, 1967)。この TOCP および DOCP 酸化物の分子内閉環反応は血漿アルブミンによって触媒されることも併せて報告されている (Eto, M. *et al*, 1967)。ラット血漿中における代謝物 A から代謝物 B への反応速度は pH 7 および 8 の緩衝液中でのそ

れより大きく、本反応の場合もまた Eto らの報告と同様に、なんらかのラット血漿成分が本反応を触媒しているものと推察された。

表 11 に示すように、代謝物 A から分子内エステル転位反応によって生じた代謝物 B は 1 級エステルであるため fenpyroximate そのものに比べ遥かに加水分解されやすく、この結果は一般則あるいは Uchida らおよび Soderlund らの報告 (Uchida, M. *et al*, 1982; Soderlund, D. M. and Casida, J. E., 1977) に良く一致する。また、*in vitro* での fenpyroximate の esterase による直接の加水分解速度 0.015 nmol/min/mg protein に比べ代謝物 A の生成速度は 0.159 nmol/min/mg protein と 10 倍程度速かった。これらの結果から、fenpyroximate のエステル結合の加水分解の多くは、ミクロゾームによる水酸化 → 分子内エステル転位 (1 級エステル化) → esterase による加水分解、の経路をとるものと推察される。また、この反応経路が一見一般則に合致しないかに見える fenpyroximate の易加水分解性に寄与しているものと考えられ、本経路の初発反応であるミクロゾームによる *tert*-butyl 基の水酸化反応速度が fenpyroximate の加水分解速度全体を規定しているものと推察された。



Fenpyroximate の代謝について、ラットを供試動物とし *in vitro* および *in vivo* で検討し、本化合物の *tert*-butyl エステル結合は速やかに加水分解されることを明らかにした。Esterase を阻害した条件下でのみ得られる中間代謝物 A および B を単離し、その構造をそれぞれ、fenpyroximate の *tert*-butyl 基が水酸化を受けた 1-hydroxymethyl-1-methylethyl (*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethyleneaminoxy)-*p*-toluate およびそのエステルの分子内転位を起こした 2-hydroxy-2-methylpropyl (*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethyleneaminoxy)-*p*-toluate と同定した。代謝物 A は、非酵素的に生理的条件下において、分子内エステル転位反応によって定量的に代謝物 B を生じた。個々の反応速度の比較から、fenpyroximate の *in vivo* におけるエステル加水分解の多くは、ミクロゾームによる水酸化によって生成した代謝物 A が分子内エステル転位反応によって代謝物 B (1 級エステル) を生じ、その代謝物 B が加水分解されるという経路に依存することを明らかにした。

## 第 3 章 選択的活性発現の機構

### 3-1. 緒言

Fenpyroximate は動物寄生性あるいは土壌寄生性ダニおよび多くの昆虫に対して殺虫あるいは殺ダニ活性を示さず、さらに哺乳類に対する経口急性毒性は低いといった特徴を持つ、すなわち高い選択性を示す化合物である (Konno, T. *et al.*, 1990; Hamaguchi, H., 1990). しかし第 1 章で述べたように、primary な作用点と考えられるミトコンドリアの NADH-ubiquinone oxidoreductase そのものは、ラット肝由来であっても、*T. urticae* 由来であっても fenpyroximate に対して同様に感受性を示した。このことから、本化合物においては作用点の感受性以外の原因で選択性が発現しているものと考えられる。そこで本章では fenpyroximate の選択毒性発現機構について、その解毒代謝、特に第 2 章で述べたエステル加水分解に着目し検討した結果について述べる。



## 3-2.

## 材料および方法

### 1) 呼吸阻害活性の測定

ラット肝分離ミトコンドリアの  $\alpha$ -ketoglutarate を基質とする酸素消費速度を酸素電極 (Model 100, Rank Brothers Ltd., Bottisham Cambridge, UK) を用い, 第1章で述べた方法に従って測定した. Fenpyroximate およびその代謝物は ethanol 溶液として添加した.

### 2) *T. urticae* による fenpyroximate の代謝

[Pyrazole-3-<sup>14</sup>C] fenpyroximate 1  $\mu$ g (2 kBq) の acetone 溶液を N<sub>2</sub> ガスを用い, パイレックスガラス製試験管内壁にフィルム状にコーティングした (Hamed, M.S., and Knowles, C. O., 1988). Fenpyroximate をコーティングした試験管内に *T. urticae* 雌成虫 100 頭 (約 2 mg) を放虫し fenpyroximate と接触させた. 25°C, 暗所で 1 時間放置した後, *T. urticae* を別の試験管に移し換え, 再び 25°C, 暗所でインキュベートし, 24 時間後に methanol 1 ml を添加しホモジナイズした. ホモジネートを遠心分離し, 得られた上清を前章と同条件の co-TLC に供し, 代謝物の定量を行った.

### 3) エステル加水分解速度の測定

基質として fenpyroximate およびその類縁体を用い, 前述と同様の方法で調製したラット肝 S-9 画分をリン酸緩衝液 (100 mM, pH 7.4) で適宜希釈し, その 100  $\mu$ l に各基質の 10mM DMSO 溶液 1  $\mu$ l を添加して反応を開始した. 25°C で反応の後, 200  $\mu$ l の acetonitrile を添加して反応を停止し, 遠心分離の後, 反応生成物である M-3 ((*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-yl)methyleneaminoxy)-*p*-toluic acid) を HPLC で定量した. HPLC 条件を以下に示す. ポンプ: LC-6A (島津製作所(株), 京都), 検出器: SPD-6A (島津製作所製(株), 京都), カラム: YMC-A312 ( $\phi$  6 $\times$ 150 mm, 山村化学研究所(株), 京都), 移動相: acetonitrile/H<sub>2</sub>O/acetic

acid = 700/298/2, 流速: 1.2 ml/min, 検出波長: 258 nm.

#### 4) 酸化代謝速度の測定

Sprague-Dawley 系雄性ラット肝, ddy 系雄性マウス肝, NewZealand white 系雄性ウサギ肝, 雄性カニクイザル肝, 雄性ウズラ肝, コイ肝臓 および ハスモンヨトウ中腸 を 0.25 M sucrose 含む 100mM リン酸緩衝液でホモジナイズし, 1000 × g, 10 分間 遠心分離した. 得られた上清を再度 9000 × g, 10 分間遠心分離し, 得られた上清を S-9 画分とした. また, *T. urticae* 雌成虫を酵素源として用いた場合は, 第 1 章で述べたミトコンドリア画分の調製と同様に, いったん緩衝液中で圧搾し体液を除いた後に S-9 の調製に用いた. このようにして調製した S-9 画分 (30~100 μg タンパク当量) を用い, 100 μM fenpyroximate を, 1mM NADPH, 100 μM DFP, 100 mM リン酸緩衝液より成る反応系で, 25°C において 5~30 分間代謝させた. 反応液に等量の acetonitrile を添加, 反応を停止し, 遠心分離 (10,000 × g, 10 分) により得られた上清の一部を以下の条件の HPLC で分析し, 生成した代謝物を定量した. ポンプ: LC-6A (島津製作所(株), 京都), 検出器: SPD-6A (島津製作所製(株), 京都), カラム: Fine-pack 5C18 (φ 4 × 250 mm, 日本分光(株), 東京), 移動相: acetonitrile/H<sub>2</sub>O/acetic acid = 600/398/2, 流速: 1.5 ml/min, 検出波長: 258 nm. 定量対象化合物は fenpyroximate, Z-異性体 (M-1), phenoxy 基 4 位 水酸化体 (M-2), エステル加水分解物 (M-3), pyrazole 環 1 位 N-脱メチル体 (M-12), pyrazole 環 3 位メチル基水酸化体 (M-20) および代謝物 A (*tert*-butyl 基水酸化体) とした.

### 3-3. 結果

#### 1) Fenpyroximate および その代謝物の電子伝達阻害活性

図 24 に fenpyroximate および その代謝物の α-ketoglutarate を基質とした際の



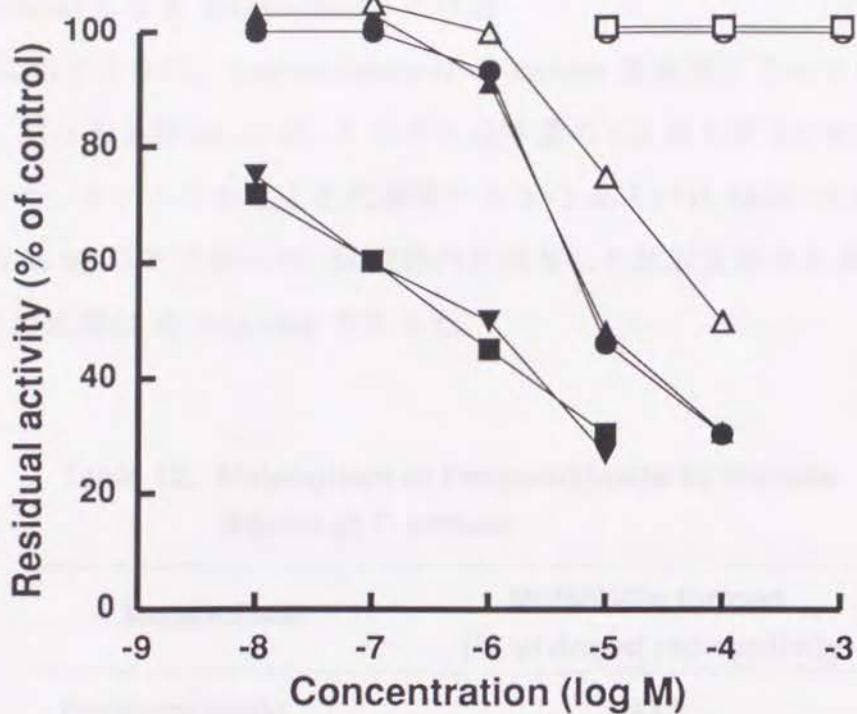


Fig. 24. Effect on Rat Liver Mitochondrial Respiration of Fenpyroximate and Its Metabolites.  
 ■, fenpyroximate; ●, metabolite A; ▲, metabolite B, ▼, M-1; ○, M-3; □, M-5; △, M-22.

ラット肝分離ミトコンドリア 酸素消費速度におよぼす影響を示す。第1章でも述べたとおり、fenpyroximate はラット肝分離ミトコンドリアの酸素消費を阻害し、その  $I_{50}$  値は  $0.4 \mu\text{M}$  と算出された。Fenpyroximate の Z-異性体である M-1 は母化合物に匹敵する阻害活性を示した。代謝物 A、代謝物 B および M-22 もまた阻害活性を示したが、その程度は弱く代謝物 A および B の  $I_{50}$  値は  $3 \mu\text{M}$ 、M-22 では  $30 \mu\text{M}$  であった。一方、M-3 および M-5 のように *tert*-butyl エステル結合が加水分解された代謝物あるいは M-6 のようにベンジル環部分を失った化合物は  $1 \text{mM}$  という高濃度でも本酵素活性に対して全く阻害活性を示さなかった。



2) *T. urticae* による fenpyroximate の代謝

表 12 に示すように、fenpyroximate は *T. urticae* 雌成虫によってほとんど代謝されず、M-6 および M-12 が、それぞれ投与量の 0.5 および 2.6 % 認められたのみであった。ラットにおける主代謝物である M-3 あるいは M-22 は検出限界 (投与量の 0.05 %) 以下であった。試験管内に残存した放射エネルギーから算出した fenpyroximate の用量は約 1 ng/mite であった。

Table 12. Metabolism of Fenpyroximate by Female Adults of *T. urticae*

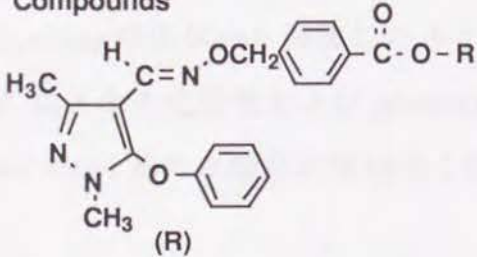
Metabolites	Metabolite formed (% of dosed radioactivity)
Fenpyroximate	93.2
M-1 (Z-isomer)	3.1
M-3 (Ester hydrolyzate)	< 0.05
M-6 (4-formylpyrazole)	0.5
M-12 (N-demethylated)	2.6
M-22	< 0.05

3) ラット肝および *T. urticae* より調製した 9000 x g 画分のエステル加水分解活性

表 13 にラット肝 および *T. urticae* S-9 画分の fenpyroximate およびその類縁体の加水分解速度をまとめて示す。ラット肝 S-9 においては、今回用いた基質のなかで *tert*-butyl エステルすなわち fenpyroximate が最も加水分解され難く、15.0 nmol/min/mg protein の加水分解速度を示したに過ぎず、methyl エステルアナログの加水分解速度 (452.9 nmol/min/mg protein) に対する相対速度は約 1/300 であった。第 2 章でも述べたように、エステル加水分解速度は塩基触媒による化学的な場合と同じく、エステル結合の  $\alpha$  位の分岐に従って低下していた

が、1級エステル同士の比較では、アルキル鎖が ethyl の場合に最大の被加水分解性を示し、それ以上の鎖長ではその増加に伴ない被加水分解性は減少する傾向にあった。 *T. urticae* S-9 画分を用いた場合は、ラット肝の場合とは異なり、methyl エステルの被加水分解速度が最も大きく、76.0 nmol/min/mg protein を示し、エステル結合の  $\alpha$  位が置換された場合その速度は低下していた。 *tert*-Butyl エステルの場合、その被加水分解は検出限界 (0.5 nmol/min/mg protein) 以下となった。

Table 13. Rates of ester hydrolysis of fenpyroximate and its analogs by S-9 fraction of rat liver and *T. urticae*

Compounds		Ester hydrolysis rate (nmol/min/mg protein)			
 (R)		rat liver		<i>T. urticae</i>	
- CH <sub>3</sub>	(Me)	4.529	(1.000)	0.076	(1.000) <sup>a)</sup>
- CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	(Et)	5.053	(1.116)	0.013	(0.176)
- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	( <i>n</i> -Pr)	3.899	(0.861)	0.055	(0.719)
- CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	( <i>n</i> -Bu)	2.328	(0.541)	0.062	(0.812)
- CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	( <i>i</i> -Bu)	2.644	(0.584)	0.058	(0.761)
- CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	( <i>i</i> -Pr)	1.945	(0.426)	0.009	(0.116)
- CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	( <i>sec</i> -Bu)	1.368	(0.302)	0.003	(0.004)
- C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	(fenpyroximate)	0.015	(0.003)	< 0.0005	(>0.007)
- C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	(metabolite A)	N.D.		N.D.	<sup>b)</sup>
- CH <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> OH	(metabolite B)	2.035	(0.449)	N.D.	

a) Values in the parenthesis represent the relative rate to methyl ester hydrolysis.

b) Not determined.



#### 4) 各種生物の fenpyroximate 代謝活性の比較

前章で述べたとおり，ラット肝から調製した S-9 は DFP の存在下で fenpyroximate の *tert*-butyl 基を水酸化し代謝物 A を生成した．この反応の速度は 159.1 nmol/min/mg protein と全ての反応の中で最も速く，*tert*-butyl 基の水酸化反応は pyrazole 環 1 位の *N*-脱メチル化，phenoxy 基 4 位の水酸化，pyrazole 環 3 位メチル基の水酸化等の反応に優先して起きることが明らかとなった (表 14)．表 14 に示したとおり，マウス，ウサギ，カニクイザル，ウズラ，コイおよびハスモンヨトウより調製した S-9 画分には程度の差はあるが，いずれにも *tert*-butyl 基を水酸化する活性が認められた．しかし，ウサギ，カニクイザル，コイ および ハスモンヨトウでは，pyrazole 環 1 位の *N*-脱メチル化反応が，コイでは pyrazole 環 3 位メチル基の水酸化反応速度が最も優先して起こっていた．*T.urticae* の虫体から調製した S-9 画分の活性は弱く，僅かに pyrazole 環 1 位の *N*-脱メチル化活性および phenoxy 基 4 位の水酸化活性が認められたのみで *tert*-butyl 基の水酸化活性は全く認められなかった．

**Table 14. *In vitro* Metabolism of Fenpyroximate with S-9 Fractions Prepared from Various Organisms**

Enzyme sources	Rate of metabolite formation (nmol/min/mg protein)			
	Metabolite A	M-2	M-12	M-20
Rat liver	159.14 ± 4.54	28.49 ± 5.60	40.71 ± 0.91	3.06 ± 0.91 <sup>a)</sup>
Mouse liver	13.19 ± 0.98	< 0.005	77.34 ± 5.25	7.60 ± 1.08
Rabbit liver	6.86 ± 0.28	0.80 ± 0.05	24.08 ± 0.82	1.15 ± 0.05
Monkey liver	32.63 ± 0.23	0.37 ± 0.01	50.18 ± 0.36	3.56 ± 0.05
Quail liver	2.18 ± 0.25	0.59 ± 0.90	6.48 ± 0.35	22.36 ± 2.67
Carp liver	5.04 ± 0.02	< 0.005	17.57 ± 0.31	0.62 ± 0.07
<i>S. litura</i> mid gut	5.46 ± 0.18	0.26 ± 0.06	10.87 ± 0.20	6.60 ± 0.29
<i>T. urticae</i>	< 0.005	< 0.005	0.14 ± 0.02	0.19 ± 0.02

a) Each value was the mean of triplicated measurement and standard error.



Fenpyroximate は第 1 章でも述べたように強力な電子伝達阻害活性を示すが、その代謝物はいずれも母化合物に比べ弱い電子伝達阻害活性しか示さず (図 24)、代謝分解は解毒として働くものと推察された。代謝物の中でも、エステル加水分解物、すなわち M-3 は 1 mM という高濃度でも全く阻害活性を示さず、エステルの加水分解は解毒代謝に大きな割合を占めるものと考察された (図 24)。表 13 に示すとおり、ラット肝 S-9 による (*in vitro* における) fenpyroximate の直接の加水分解速度は大きくない。しかし、ラット肝 S-9 においては、第 2 章で述べた経路による速やかな加水分解が期待できる。事実、ラット *in vivo* における代謝試験では M-3 が投与量の 4.1 % を占める主代謝物の 1 つであることが報告されている (Nishizawa, H. *et al*, 1993)。表 14 に示したとおり、サル肝、マウス肝、ウサギ肝、ウズラ肝、コイ肝臓およびハスモンヨトウ中腸の S-9 画分にはラットと同様に、*tert*-butyl 基の水酸化活性が認められており、ラットの場合と同様の加水分解経路の存在が示唆された。

一方、*T. urticae* の S-9 画分には他の生物に認められた *tert*-butyl 基の水酸化活性が認められず (表 14)、このことから *in vivo* においては、第 2 章で述べた経路によるエステル加水分解が起こっていないものと推察される。実際、*T. urticae* 雌成虫を用いた *in vivo* における代謝実験では、fenpyroximate の代謝物として M-6 および M-12 が認められたのみであった (表 12)。また、*in vitro* 代謝実験においても *tert*-butyl エステルの加水分解活性を示さず (表 13)、*in vitro* および *in vivo* における代謝実験の結果はよく整合するものであった。これらの結果から、*T. urticae* の fenpyroximate 解毒代謝能は前述のラット、マウス、サル、ウサギ、ウズラ、コイ および ハスモンヨトウに比べ極めて弱く、この解毒代謝能の欠如が本化合物の選択毒性発現に大きく寄与しているものと考えられた。

Fenpyroximate 自身は第 1 章で述べたように強力な電子伝達阻害活性を示すが、その代謝物の電子伝達阻害活性は母化合物に比べ弱く、M-3 (エステル加水分解物) は全く活性を示さなかった。このことから、*tert*-butyl エステルの加水分解は fenpyroximate の解毒代謝に大きな割合を占めるものと推察された。各種生物から調製した S-9 画分による *in vitro* 代謝系を用いて本化合物の代謝について精査した結果、*T. urticae* を除く全ての生物、すなわちラット、マウス、サル、ウサギ、ウズラ、コイおよびハスモンヨトウから調製した S-9 画分には第 2 章で述べた代謝物 A の生成すなわち *tert*-butyl 基の水酸化活性が認められた。このことから、前述の哺乳類、鳥類、魚類、昆虫等にはラットの場合と同様に *tert*-butyl 基の水酸化→エステル転位→加水分解 なる経路が存在し、*in vivo* においては速やかな加水分解、すなわち解毒が起きていることが示唆された。

一方、*T. urticae* の場合、*in vivo* および *in vitro* のいずれにおいても fenpyroximate の加水分解は認められず、また *tert*-butyl 基の水酸化活性も認められなかったことから、fenpyroximate の *tert*-butyl エステル結合の加水分解活性が欠如していることが示唆された。これらの結果から、標的生物 (*T. urticae*) における解毒代謝能の欠如が本化合物の選択毒性発現の原因であると推察された。



## 第 4 章 総合考察

生命維持は相互に関連した多数の生化学的反応の結果と考えられ、任意の 1 つの生化学反応に影響する物質 (阻害剤) が最終的に複数の細胞機能に影響し、種々の症状 (現象) を引き起こすであろうことは容易に想像できる。Fenpyroximate の場合、第 1 章で述べたように本質的な第 1 次作用点はミトコンドリアの NADH ubiquinone oxidoreductase complex (complex I) であると考えられる。真核生物における ATP 生合成のほとんどがミトコンドリアにおける電子伝達と共役していることから、*T. urticae* を本化合物で処理した際に認められた ATP 含量の低下 (図 6)、ミトコンドリアの形態変化 (図 9~11) 等は全て本化合物による電子伝達の阻害に起因する現象と考え得る。

Konno らによって報告された fenpyroximate 処理 *T. urticae* の knock-down および麻痺の様な行動異常 (Konno, T. et al, 1990) は本化合物が *T. urticae* の神経伝達になんらかの影響を与えたことを示唆する。一方、電子顕微鏡による形態観察において、fenpyroximate 処理を施した *T. urticae* では、末梢神経細胞のミトコンドリアに特異的な形態変化が認められたこと (図 9)、すなわち末梢神経細胞においてエネルギー代謝が阻害されていることを考えあわせると、本化合物は pyrethroids, DDT 等のように神経伝達を直接攪乱しているのではなく、末梢神経細胞におけるエネルギー代謝を阻害することを通じて神経伝達を攪乱し、その結果 knock-down 等の現象を引き起こしていると考えられた。Fukami らは、本化合物と同作用点の電子伝達阻害剤である rotenone 処理された昆虫に認められる knock-down 現象について、同様の結論を下している (Fukami, J. et al, 1959)。

速効的な致死濃度以下の fenpyroximate で処理された *T. urticae* 幼虫に観察される脱皮不全 (脱皮時における死亡, Konno, T. et al, 1990) もまた、本化合物の呼吸阻害による ATP 供給の減少に起因する現象と考えられる。すなわち、ATP の枯渇によって新しい表皮の形成が阻害されるために脱皮不全となり死亡

が見られるものと推察される。

これまで述べてきたように、fenpyroximate の示す高い殺ダニおよび knock-down 活性はミトコンドリアの NADH-ubiquinone oxidoreductase の阻害に基づいており、ATP 含量の減少、ミトコンドリアの形態変化、死亡、麻痺および脱皮不全等の症状は全て呼吸阻害に起因する 2 次的な現象、症状と解釈でき、これによって本化合物の引き起こす様々な生物現象が統一的に説明できた。

第 3 章において述べたように fenpyroximate 自身は強力な電子伝達阻害活性を示すが、その代謝物はいずれも母化合物に比べ弱い活性しか示さず、代謝分解は解毒と位置づけられた。代謝物の中でも、エステル加水分解物すなわち M-3 は 1 mM という高濃度でも全く阻害活性を示さず、エステルの加水分解は解毒代謝に大きな割合を占めるものと推察された。表 11 および 13 に示すとおりラット肝 S-9 を用いた *in vitro* における fenpyroximate の直接の加水分解速度は大きくない。しかし、fenpyroximate のラットにおける代謝経路は図 22 のように推定されており、本化合物の主たる代謝経路の 1 つとして *tert*-butyl エステル結合の加水分解が挙げられている (Nishizawa, H. *et al.*, 1993)。実際、fenpyroximate を投与したラットの血漿中あるいは肝中には、投与後速やかに M-3 (エステル加水分解物) が検出されていることから fenpyroximate の *in vivo* における加水分解は速やかであると考えられる。この一見速やかな *tert*-butyl エステルの加水分解は、ミクロゾームによる水酸化 → 分子内エステル転位 (1 級エステル化) → esterase による加水分解、の経路をとるものと推察される。

*In vitro* における fenpyroximate の加水分解速度、15.0 nmol/min/mg protein に比べ代謝物 A の生成速度は 159.0 nmol/min/mg protein と 10 倍程度速いことから、fenpyroximate のエステル結合の加水分解の多くは上記の反応経路をとり、また、この反応経路の初発反応であるミクロゾームによる *tert*-butyl 基の水酸化反応速度が fenpyroximate の加水分解速度すなわち解毒代謝速度を規定しているものと推察される。

*In vitro* において、ラット肝と同じく、マウス肝、サル肝、ウサギ肝、ウズラ肝、



コイ肝臓およびハスモンヨトウ中腸の S-9 画分には *tert*-butyl 基の水酸化活性、すなわち代謝物 A の生成活性が認められている。このことから、これら生物においては *in vivo* において、ラットの場合と同様、fenpyroximate が速やかに加水分解、すなわち解毒分解されると推察される。標的生物である *T. urticae* の S-9 画分は *tert*-butyl 基の水酸化活性を示さず、*tert*-butyl エステルの直接の加水分解活性も示さなかったことから、解毒代謝能は前述のラット、マウス、サル、ウサギ、ウズラ、コイ および ハスモンヨトウに比べ極めて弱いと考えられる。

Fenpyroximate の電子伝達鎖における作用点である NADH-ubiquinone oxidoreductase はラットあるいは *T. urticae* 虫体の何れから調製したのも fenpyroximate に感受性であり、本化合物の哺乳類(ラット)と植物寄生性ダニ(*T. urticae*)間の選択毒性には作用点の本質的な感受性以外の原因の関与が示唆される。前述の fenpyroximate 解毒代謝活性の種差についての結果と考えあわせると、哺乳類(ラット、マウス、サル、ウサギ)、鳥類(ウズラ)、魚類(コイ)および昆虫(ハスモンヨトウ)には *tert*-butyl 基の水酸化とそれに引き続く分子内エステル転位さらに carboxyesterase による加水分解という速やかな解毒代謝経路が存在しており、*T. urticae* には存在しないことが本化合物の選択毒性発現機構の主たる要因であると推察される。

## 総括

殺菌剤 flutolanil および殺ダニ剤 fenpyroximate の作用機構はいずれもミトコンドリアにおける電子伝達の阻害に帰せられ、その作用点を前者は succinate-ubiquinone oxidoreductase (complex II) に、後者は NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) に持つことが明らかとなった。いずれの化合物の作用点も既知の電子伝達阻害剤、すなわち flutolanil においては 2-thenoyl trifluoroacetone および carboxin 類と、fenpyroximate においては rotenone および piericidin 類と同一であったため、残念ながら新たな生化学的知見を得るには至らなかった。しかし、rotenone および piericidin 等の NADH-ubiquinone oxidoreductase 阻害剤はいずれも天然物であり、その構造の複雑さや、光、熱および酸化に対する不安定さのために、生化学的 "tool" あるいは "probe" としての利用には自ずと制限があったと考えられる。今回、NADH-ubiquinone oxidoreductase 阻害剤であることを明らかにした fenpyroximate は化学合成によって得られ、種々の誘導体の調製が容易であること、前述の2種の天然物に比べ光、熱および酸化等に対し安定であること等から、生化学的 "tool" あるいは "probe" として有用であると考えられる。Flutolanil についても、前述の同一作用点を有する阻害剤に比べ強力であることから、fenpyroximate と同様に生化学的 "tool" として有用であると考えられる。

Flutolanil および fenpyroximate の両化合物の選択毒性発現機構について検討した結果、これらの化合物の選択毒性は前者においては作用点自身(ミトコンドリア complex II)の本質的な感受性の種差に、後者においては解毒代謝活性の種差に起因することを明らかにした。Flutolanil に代表される succinate-ubiquinone oxidoreductase の阻害剤には作用点レベルでの感受性の種差の大きい化合物が多く、2-thenoyl trifluoroacetone が唯一の例外であるかと思われる。また、fenpyroximate, rotenone 等の NADH-ubiquinone oxidoreductase 阻害剤には、昆虫から哺乳類のいずれ由来の酵素に対しても阻害活性を示す、すなわち作用点



レベルでの感受性の種差の小さい化合物が多い。このことから、NADH dehydrogenase complex の構造は進化の過程で良く保存されており種間差が小さく、それに対し succinate dehydrogenase complex においては変異が激しく、その構造の種間差が大きいのではないかと推察される。

Fenpyroximate の選択毒性発現機構について検討する際に見出だされた  $\beta$ -水酸化3級エステルの非酵素的分子内エステル転位反応 (代謝物 A からの代謝物 B の生成) が生体内で起こるといふ例はこれまでに全く報告がなく、新しい発見であると言える。また、本反応の初発物質である  $\beta$ -水酸化3級エステルを生成する代謝活性についてもこれまで知られておらず、本研究が最初の報告である。この  $\beta$ -水酸化3級エステル生成活性の種差は大きいことから、fenpyroximate の場合と同様の機構によって、作用点レベルでの選択性の小さい化合物に *in vivo* における選択性を付与することも可能であると考えられ、今後の応用に期待が持たれる。

## 要 約

殺菌剤 flutolanil の作用機構および選択毒性発現機構について感受性菌である *Rhizoctonia solani* および数種の感受性の異なる糸状菌を用いて生化学的検討を加えた。本化合物は *R. solani* 菌糸の生育および酸素消費を極低濃度で阻害することを見出し、さらに *R. solani* 菌糸から調製したミトコンドリア画分の種々電子伝達系酵素活性におよぼす影響から、本化合物の作用点はミトコンドリア電子伝達系の succinate dehydrogenase complex (complex II) であることを明らかにした。その阻害は complex II の非ヘム鉄-イオウタンパク以後の redox center- ubiquinone 間で起こっている、あるいは本化合物の complex II への結合には succinate dehydrogenase 構成タンパク以外の complex II 構成成分が必要であると推察された。さらに、*R. solani* 菌糸の succinate および glucose 代謝におよぼす影響について検討し、この電子伝達の阻害は *in vivo* においても発現していることを明らかにした。Flutolanil とその類縁化合物である mebenil および mepronil について、菌糸生育阻害および電子伝達阻害活性を比較し、何れの活性も flutolanil において最強であり、本化合物の抗真菌作用はその電子伝達阻害作用の直接の結果と推察されることを見出した。

5種の糸状菌すなわち、*R. solani* (不完全菌類)、*Corticium rolfsii* (担子菌類)、*Rhizopus chinensis* (藻菌類)、*Rosellinia necatrix* (子囊菌類)、および *Pyricularia oryzae* (不完全菌類) の菌糸およびラット肝よりミトコンドリアを調製し、作用点の flutolanil 感受性について検討し、菌糸生育レベルで本化合物に感受性であった担子菌類のミトコンドリア complex II 活性のみが本化合物によって強く阻害され、菌糸レベルで本化合物に非感受性の糸状菌およびラット肝ミトコンドリアの同酵素系はほとんど阻害を受けないことを見出した。*In vivo* における感受性と作用点そのものの感受性は良く対応することから、本化合物の示す高い選択性はその作用点であるミトコンドリアの complex II の本質的な感受性に支配されているものと考察された。



新規殺ダニ剤, fenpyroximate の作用機構について, 本化合物の標的生物である *Tetranychus urticae* Koch および ラット肝分離ミトコンドリアを用いて, 生化学および形態学的に検討した. Fenpyroximate で処理された *T. urticae* 虫体 ATP 含量は, 濃度依存的に速やかかつ著しく減少し, 本化合物のエネルギー代謝系への影響が示唆された. 種々電子伝達系酵素活性におよぼす影響から, 本化合物はミトコンドリアの NADH-ubiquinone oxidoreductase complex (complex I) のフラビンタンパク (FPd2) から ubiquinone への電子伝達を阻害することを明らかにした. さらに, 本化合物はラット肝および *T. urticae* 虫体の何れから調製したミトコンドリアの NADH-ubiquinone oxidoreductase 活性をも同程度に阻害したことから, その選択毒性は作用点の本質的な感受性以外に起因すると考察された.

本化合物で処理された *T. urticae* の末梢神経細胞, 表皮細胞, 卵 (母) 細胞, 消化管上皮細胞等のミトコンドリアにはクリステ配列の乱れ, 膨化, マトリックスの電子密度の低下等の特異な形態異常が認められたことから, 前述の電子伝達阻害は *in vivo* においても発現していることを明らかにした. さらに, この結果から本化合物の持つ速効的な致死あるいは knock-down 活性, および遅効的な脱皮阻害活性等は全て本化合物の電子伝達 阻害活性に基づく2次的現象であると推察された.

Fenpyroximate のラット代謝について, *in vitro* および *in vivo* で検討したところ, 本化合物の *tert*-butyl エステル結合は速やかに加水分解されることが明らかになった. Esterase を阻害した条件下でのみ得られる中間代謝物を単離し, その構造を fenpyroximate の *tert*-butyl 基が水酸化を受けた, 1-hydroxy- methyl-1-methylethyl (*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethyleneamino-oxy)-*p*-toluate (代謝物 A) およびそのエステルが分子内転位を起こした 2-hydroxy-2-methylpropyl (*E*)- $\alpha$ -(1,3-dimethyl-5-phenoxy-pyrazol-4-ylmethyleneamino-oxy)-*p*-toluate (代謝物 B), と同定した. 代謝物 A は生理的条件下で非酵素的, 定量的に分子内エステル転位反応によって代謝物 B を生じたことから, fenpyroximate のエステル加水分解の多くは, ミクロゾームによる酸化によって生成した代謝

物 A が分子内エステル転位を起こし、生じた代謝物 B (1 級エステル) が加水分解される経路を通り、代謝物 A の生成速度が fenpyroximate の加水分解速度全体を規定していることが明らかとなった。本化合物のエステル加水分解物は全く電子伝達阻害活性を示さなかったことから、このエステル加水分解が解毒代謝のキーステップであることが示唆された。尚、このような分子内エステル転位反応が生体内で起こるとい報告はこれまでになく、動物代謝における新たな発見と言える。

各種生物の S-9 画分を用いた *in vitro* 代謝実験において、*T. urticae* を除く全ての生物 (ラット、マウス、ウサギ、サル、コイ、ウズラおよびハスモンヨトウ) には *tert*-butyl 基の水酸化活性が認められ、ラットの場合と同様の加水分解経路の存在が示唆された。*T. urticae* の場合、*in vivo* および *in vitro* いずれの実験系でも *tert*-butyl エステルの直接の加水分解は認められず、また *tert*-butyl 基の水酸化活性も認められなかったことから、本化合物の解毒代謝能を欠損していることが示唆された。これらの結果から、本化合物の哺乳類 - 植物寄生性ダニ間の選択毒性発現は、作用点 (NADH-ubiquinone oxidoreductase complex) の本質的な感受性ではなく、解毒代謝、特に *tert*-butyl 基の水酸化による代謝物 A の生成活性の有無に起因しているところを見出だした。



## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始御指導と御鞭撻を賜りました日本農薬株式会社安全性研究所々長、内田又左衛門博士ならびに 同代謝・作用機構研究Gチーフ、鈴木孝博士に感謝いたします。また、本稿の御校閲と多大な御助言を賜りました京都大学農学部農芸化学科細胞有機化学研究室、岩村俣教授ならびに三芳秀人博士に深謝いたします。さらに、本稿の公表の許可をいただきました、日本農薬株式会社常務取締役・武島正巳研究本部長、同副本部長・笠井勉博士に感謝の意を表わします。最後に、本研究は日本農薬株式会社安全性研究所においてなされたものであり、種々の御協力、御助言ならびに激励を頂きました、故 宮城幸男博士、今埜隆道博士、廣岡卓博士(以上生物研究所)、金井和夫博士(医薬研究所)ならびに諸先輩・同僚の皆様に深謝いたします。

## 参考文献

- Araki, F., and Yabutani, K.**, Proceedings of Brighton Crop Protection Conference (1981) held at Brighton, **vol. 1**, pp. 3.
- Araki, F.**, *Jpn. Pesticide Inf.*, **47**, 23 (1985).
- Bensadoun, A., and Weinstein, D.**, *Anal. Biochem.*, **70**, 241 (1976).
- Brown, A. W. A.**, "Insect Pathology: An Advanced Treatise" (Steinhaus, E. A. ed.), **Vol. 1**, pp. 65, Academic Press, London/New York, 1963.
- Chapman, K. B., Solomon, S. D., Boeke, J. D.**, *Curr. Gene.*, **118** 131 (1992).
- Corbett, J. R., Wright, K., and Baillie, A. C.**, "The Biochemical Mode of Action of Pesticides", 2nd ed., pp.21, Academic Press, London, 1984.
- Darlington, M. G., and Guest, J. R.**, *Biochem. J.*, **223**, 507 (1984).
- Day, D. A., Arron, G. P., and Laties, G. G.**, *FEBS Lett.*, **85**, 99 (1978).
- Demain, A. L.**, *Chem. Technol.*, 287 (1975).
- Edginton, L. V., Watson, G. S., and Miller, P. M.**, *Science*, **153**, 307 (1966).
- Eto, M., Oshima, Y., and Casida, J. E.**, *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 295 (1967).
- Fedtke, C.**, "Biochemistry and Physiology of Herbicide Action", Springer-Verlag, Berlin, 1982.
- Fukami, J., Nakatsugawa, T., and Narahashi, T.**, *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.*, **3**, 259 (1959).
- Georgopoulos, S. G., and Vomvayani, V.**, in "Herbicides, Fungicides, Formulation Chemistry" (Tahori A. S. ed.) pp. 337, Gordon and Breach, New York.



- Georgopoulos, S. G., Chrysayi, M., and White G. A.,** *Pestic. Biochem. Physiol.*, **5**, 543 (1975).
- Gould, S. J., Subramani, S., and Scheffier, I. E.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1934 (1989).
- Gunatilleke, I. A. U. N., Arst, H. N., and Scazzocchio, C.,** *Genet. Res.* **26**, 297 (1976).
- Hamaguchi, H., Oshima, T., Takaishi, H., Akita, Y., Konno, T., and Kajihara, O.,** Proceedings of 7th International Congress of Pesticide Chemistry (1990) held at Hamburg, **vol. 1**, p 31.
- Hamed, M. S. and Knowles, C. O.,** *J. Economic Entomol.*, **81**, 1295 (1988).
- Johnson, M. K., Morningstar, J. E., Kearney, E. B., Cecchini, G., and Ackrell, B. A. C.,** in "Cytochrome System-Molecular Biology and Bioenergetics (Papa S, Chance B and Ernster L eds)", Plenum Press, New York/London, pp. 473.
- Kita, K., Oya, H., Gennis, R.B., Ackrell, B. A. C., Kasahara, M.,** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **166**, 101 (1990).
- Koen, J. P., White, G. A., and Hargreaves, A.,** *Curr. Gene.*, **19**, 475 (1991).
- Konno, T., Kuriyama, K., Hamaguchi, H., and Kajihara, O.,** Proceedings of Brighton Crop Protection Conference (1990) held at Brighton, **vol. 2-8**, pp. 71.
- Kurono, H.,** *Jpn Pesticide Inf.*, **46**, 6 (1985).
- Langcake, P., Kuhn, P. J., and Wade, M.,** *Prog. Pestic. Biochem. Toxicol.* **3**, 1 (1983).
- Laynolds, E. S.,** *J. Cell Biol.*, **17**, 208 (1963).
- Leach, F. R.,** *J. Appl. Biochem.*, **24**, 531 (1968).
- Lin, S., and Cohen, H. P.,** *Anal. Biochem.*, **24**, 531 (1968).

- Lombardo, A., Carine, K., and Scheffier, I. E.,** *J. Biol. Chem.*, **265**, 10419 (1990).
- Mathre, D. E.,** *Phytopathol.*, **60**, 671 (1970).
- Mathre, D. E.,** *Pestic. Biochem. Physiol.*, **1**, 216 (1971).
- Matsumura, F.,** "Toxicology of Insecticides" 2nd ed. , pp.159, Plenum press, New York, 1985.
- Mochizuki, H., Araki, F., and Yabutani, K.,** *J. Pesticide Sci.*, **12**, 29 (1987).
- Mowley, P. C., Steenkamp, D. J., Ackrell, B. A. C., Singer, T. P., and White, G. A.,** *Arch. Biochem. Biophys.* **178**, 495 (1977).
- Nishizawa, H., Motoba, K., Suzuki, T., Ohshima, T., Hamaguchi, H., and Uchida, M.,** *J. Pesticide Sci.*, (1993) in Press.
- Pestka, S.,** *Cold Spring Horbar Symp. Quant. Biol.*, **34**, 395 (1969).
- Pestka, S.,** *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 697 (1971).
- Pestka, S.,** *J. Biol. Chem.*, **247**, 4669 (1972).
- Ragsdale, N. N., and Sisler, H. D.,** *Phytopathol.*, **60**, 1422 (1970).
- Ramasarma, T., and Lester, R. L.,** *J. Biol. Chem.*, **235**, 3309 (1960).
- Ramsy, R. R., Ackrell, B. A. C., Coles, C. J., Singer, T. P., White G. A., and Thorn, G. D.,** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 825 (1981).
- Sanadi, D. R., Pharo, R. L., and Sordahl, L. A.,** "Methods in Enzymology" (Estabrook R. W. and Pullman M. E. eds), **Vol. 10**, pp. 297 (Accademic Press, San Diego).
- Schewe, T., Hiebsch, C., and Halangk, W.,** *Acta. Biol. Med. Germ.*, **34**, 1767 (1975).
- Schewe, T., Muller, W., Lyr, H., and Zanke, D.,** "Systemfungizide" (H. Lyr and Polter C. eds.), pp. 241, Akademie-verlag, Berlin, 1979.



- Soderlund, D. M., and Casida, J. E.,** *Pestic. Biochem. Physiol.*, **7**, 391 (1977).
- Stoner, C. D., and Sirak, H. D.,** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **35**, 59 (1969).
- Takahashi, Y., Sasaki, S., Tamaru, M., Shimazaki, I., Ito, S., Kawada, S., and Suda, Y.,** *Quant. Struct.-Act. Relat.*, **6**, 17 (1987).
- Taniguchi, M., Haraguchi, H., Higuchi, H., Oi, S., Chapaya, A., and Kubo, I.,** *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3051 (1985).
- ten Haken, P., and Dunn, C. L.,** Proceedings of 6 th Brighton Insecticide and Fungicide Conference (1971) held at Brighton, **vol. 2**, pp. 453.
- Tucker, A. N., and Lillich, T. T.,** *Antimicrob., Agents Chem. Ther.*, **6**, 527 (1974).
- Tripath, P. K., and Gottlieb, D.,** *J. Bacteriol.*, **100**, 310 (1969).
- Uchida, M., Funayama, S., and Sugimoto, T.,** *J. Pesticide Sci.*, **7**, 181 (1982).
- Ulrich, J. T., and Mathre, D.E.,** *J. Bacteriol.*, **110**, 628 (1972).
- Van Dam, K., and Meyer, A. J.,** *Annu. Rev. Biochem.*, **40**, 115 (1971).
- White, G. A., and Thorn, G. D.,** *Pestic. Biochem Physiol.*, **5**, 380 (1975).
- White, G. A., and Thorn, G. D.,** *Pestic. Biochem Physiol.*, **14**, 26 (1980).
- White, G. A., Thorn, G. D., and Georegopoulos, S. G.,** *Pestic. Biochem. Physiol.*, **9**, 165 (1978).
- White, G. A., and Georegopoulos, S. G.,** *Pestic. Biochem. Physiol.*, **25**, 188 (1986).
- White, G. A.,** *Pestic. Biochem. Physiol.*, **27**, 249 (1987).
- Yao, Y., Wakabayashi, S., Matsuda, S., Matsubara, H., Yu, L., and Yu C. A.,** in "Iron-Sulfer Protein Research" (Matsubara H., Katsube Y., and Wada, K. eds), pp. 240, Springer-Verlag, New York (1986).

**Yamamoto, I.**, *Annu. Rev. Entomol.* **15**, 257 (1970).

**Yoneyama, K.**, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **64**, 1723 (1990).

**Yoshida, S.**, *Z. Naturforsch.*, **45c**, 329 (1990).

*Artificially Induced and Spontaneous Mutations in *Drosophila melanogaster*, *Agrobacterium tumefaciens*, and *Escherichia coli*, *Genetics*, **113**, 1443 (1985).*

*Kazuhiko Mitsuoka, Hideo Nishimura, Takashi Suzuki, Hiroshi Yamaguchi, and Masamune Uchida. "Rapid Hydrolytic Pathway for Tryptophan Metabolism: Evidence from Molecular Transcription in Bacteria", *Journal of Bacteriology*, **161**, 1401 (1991).*

*Kazuhiko Mitsuoka, Takashi Suzuki, and Masamune Uchida. "Effect of a New Amino Acid, Pteropyridoxine, on Energy Metabolism and Mitochondrial Morphology in Adult Female *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophila)", *Antonie van Leeuwenhoek*, **63**, 27 (1992).*



## 公表論文

**Kazuhiko Motoba, Matazaemon Uchida, and Etsuo Tada**, "Mode of Antifungal Action and Selectivity of Flutolanil", *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1445 (1988).

**Kazuhiko Motoba, Hideo Nishizawa, Takashi Suzuki, Hiroshi Hamaguchi, and Matazaemon Uchida**, "Rapid Hydrolysis Pathway for a Tertiary Alcohol Ester through Intramolecular Transesterification in Rats", *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 366 (1992).

**Kazuhiko Motoba, Takashi Suzuki, and Matazaemon Uchida**, "Effect of a New Acaricide, Fenpyroximate, on Energy Metabolism and Mitochondrial Morphology in Adult Female *Tetranychus urticae* (two-spotted Spider Mite)", *Pesticide Biochem., Physiol.*, **43**, 37 (1992).