

Effects of Rotenone on the *l*-Glutamic Oxidase System in Insect. Jun-ichi FUKAMI (Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Agriculture, University of Tokyo) and Chōjirō TOMIZAWA (National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Tokyo) Received Oct. 29, 1956. *Botyu-Kagaku*, 21, 129, 1956 (with English résumé 133)

27. 昆虫のグルタミン酸酸化酵素系に及ぼすロテノーンの影響 深見順一 (東京大学 農学部 害虫学研究室), 富沢長次郎 (農林省 農業技術研究所) 31. 10. 29 受理

ロテノーンによる神経および筋肉の細胞呼吸抑制をさらに詳細に追究した結果、ロテノーンは昆虫の神経および筋肉の *l*-グルタミン酸酸化酵素系を抑制して呼吸代謝を攪乱し、麻痺をもたらすことが明かになった。

ロテノーンはゴキブリの神経および筋肉の細胞呼吸を抑制して麻痺に導くことはすでに報告した。すなわちロテノーンの *in vivo* および *in vitro* 処理によつて、筋肉の基質無添加 homogenate 呼吸は抑制され<sup>5)</sup>、基質無添加 TTC 呈色反応も低下を来す<sup>4) 6)</sup>。しかし筋肉コハク酸酸化酵素系はロテノーンの *in vivo* 処理で抑制を受けるが、*in vitro* では抑制は極めて小さかつた<sup>4)</sup>。よつてコハク酸酸化酵素系以外の酸化酵素系が侵されるのではないかと推論した<sup>5)</sup>。またバツタ翼筋の、酸化的磷酸化に及ぼす影響を調べると、P/O が僅かながら低下することが明かになった<sup>14)</sup>。一方ゴキブリ神経においても、ロテノーンの *in vivo* および *in vitro* 処理によつて基質無添加 TTC 呈色反応が低下する<sup>6)</sup>。高等動物の脳においては、*l*-グルタミン酸と神経機能との密接な関係が広く知られているが<sup>9) 10)</sup>、ゴキブリ神経の TTC 呈色反応も筋肉のそれと異なつて、*l*-グルタミン酸の利用は著しい<sup>5)</sup>。さらにロテノーン中毒のゴキブリでは、神経が筋肉に先立つて麻痺される<sup>4) 6)</sup>。

以上のような諸事実を考へあわせると、ゴキブリの神経、筋肉のロテノーンによる麻痺は呼吸代謝の抑制に基づくものであるが、それはコハク酸酸化酵素系以外の酸化酵素系、特にグルタミン酸酸化酵素系の阻害によるのではないかと推察される。よつてこの線に沿つて探究を進めたところ、予期された通りの結果が得られたので報告する次第である。

本研究を行うに当り御指導を賜つた東大農学部山崎輝男助教授および橋橋敏夫氏、また種々有益な御助言を得た京大農学部中島稔助教授および農林省農業技術研究所石井象二郎博士に厚くお礼申し上げる。

実験材料並びに方法

供試昆虫はワモンゴキブリ *Periplaneta americana* L. である。

神経の TTC 呈色反応 前報<sup>5)</sup> の方法に従い、摘出したゴキブリ雄の神経索を 1/15M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 2.5 ml に薬剤 0.5 ml を加えたものの中に 10 分間 pre-incubation したのち、0.5% TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 1 ml、および基質 0.5 ml (最終濃度 0.033 M) を加えて放置し、TTC の呈色を一定時間ごとに記録した。なお実験はすべて 31±2°C で行つた。

筋肉ミトコンドリア分散液の分離 Sacktor<sup>11)</sup> の方法に準じて行つた。すなわちゴキブリ雌雄各 10 頭づつの中脚、後脚の腿筋および胸筋を含む胸部約 5 g を基質 0.02 M、磷酸緩衝液 0.02 M (pH 7.2) および蔗糖 0.25 M (すべて最終濃度) からなる混合液 50 ml で磨砕し、ガーゼで濾過したのち、5 分間 500×g で遠心分離し、上澄を 15 分間 10000×g で遠心分離してその沈澱を集めた。さらにこの沈澱を基質 0.02 M、磷酸緩衝液 0.02 M (pH 7.2) および塩化カリ 0.9% (すべて最終濃度) からなる混合液 13 ml に分散させたのち 5 分間 8000×g で遠心分離して沈澱を集めた。この沈澱を基質 0.02 M、磷酸緩衝液 0.02 M (pH 7.2)、塩化カリ 0.9% およびチトクローム c 10<sup>-5</sup> M (すべて最終濃度) を含む混合液 5 ml に懸濁させたものをミトコンドリア分散液として酸素吸収量を測定した。供試液の最終 pH は 7.1~7.2 である。この液にはヤースグリーン B で染色する顆粒が認められたので、ミトコンドリアであることは疑ない。なお以上の操作はすべて 0~3°C で行つた。

ミトコンドリア分散液の酸素吸収量の測定 上記のミトコンドリア分散液 1.8 ml にアセトン 10% 水溶液あるいはロテノーン 10<sup>-6</sup> M の 10% アセトン水溶液を加え、ワールブルク検圧計を用いて 30°C で 10 分間 pre-incubation を行つたのち酸素吸収量を測定した。

α-ケトグルタル酸の定量 上記の反応液は酸素吸収量を測定したのち、2 ml の 10% トリクロール

醋酸を加え、蛋白質を沈澱せしめて濾過し、Friedemann & Haugen 法を改良した清水法<sup>3)</sup>により 2,4-dinitrophenyl-hydrazon として比色定量した。

アミノ酸のペーパクロマトグラフィー フェノール：水(4:1)、およびブタノール：醋酸：水(4:1:1)の2溶媒を使用して2次元展開を行い、ニンヒドリンのブタノール溶液を噴霧して発色せしめた。

実験結果

1. 神経に基質を添加した場合の TTC 呈色反応に及ぼすロテノーンの影響 結果は Table 1 に示した通りで *l*-グルタミン酸 添加の場合は対照に比較して明かに呈色が低下していた。

次にこの神経で得た定性的な結果を定量的に追究するために、材料として取り扱い易い筋肉のミトコンドリア分散液を使用し、ロテノーンの影響を調べた。

2. 筋肉のミトコンドリア分散液に基質を添加した場合の酸素吸収量に及ぼすロテノーンの影響 結果は Table 2 および Fig. 1 に示した通りで homogenate の場合と同じように、コハク酸添加では、 $10^{-4}$ M のロ

Table 1. *In vitro* effect of rotenone on the degree of TTC staining of the nerve cord of the American cockroach in the presence of 0.033M of substrate. Final concentration of rotenone is  $5 \times 10^{-5}$ M, pH 7.4,  $31 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Substrate	Insecticide	Incubation time (min.)		
		5	15	60
Endogenous	Control	-~±	+	+
	Rotenone	-	-~±	-~±
Succinate	Control	+	++	+++
	Rotenone	+	++	+++
<i>l</i> -Glutamate	Control	++	++	+++
	Rotenone	-	-~+	+

+++ : Deep red. ++ : Light red. + : Pink. ± : Light Pink. - : No staining.

Table 2. *In vitro* effect of rotenone on the O<sub>2</sub> uptake of mitochondrial fraction of the muscle of the American cockroach in the presence of 0.02M of several substrates. pH 7.1~7.2,  $30^\circ\text{C}$ .

Substrate	Incubation time (min.)	Control	Concentration of rotenone (M)		
			$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
Succinate	30	170.7	175.0	147.0	
Citrate	30	24.9	-3.5	-4.8	
Pyruvate		0			
$\alpha$ -Keto-glutarate	30	8.9	-3.5	-4.8	
	60	17.8	-1.8	9.6	
<i>l</i> -Glutamate	exp. 1 30	55.1		8.8	4.8
	exp. 2 30	59.5	12.8	10.0	
	exp. 2 45	84.5	24.0	16.7	
<i>d</i> -Glutamate		0			

exp. 1 : Without coenzyme concentrate.  
exp. 2 : Added with coenzyme concentrate.

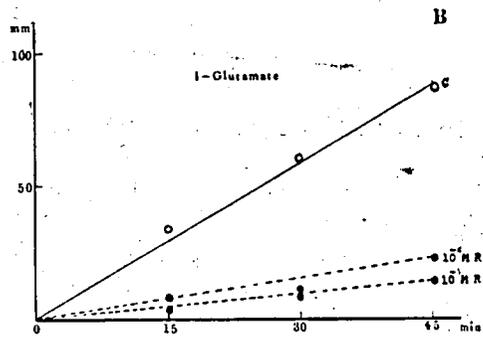
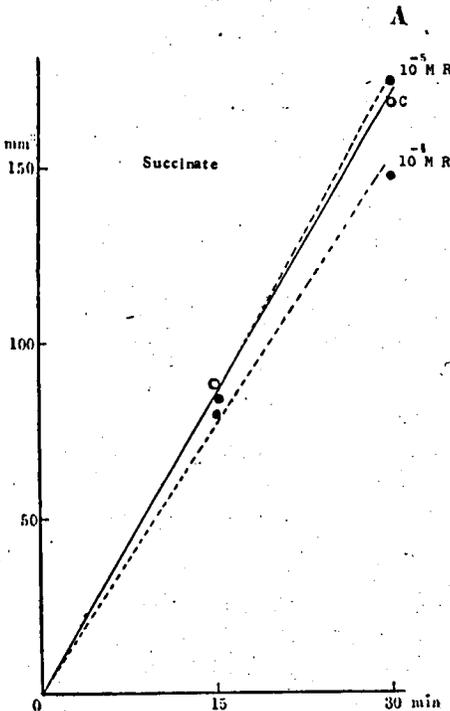


Fig. 1. *In vitro* effect of rotenone on the O<sub>2</sub> uptake of mitochondrial fraction of the muscle of the American cockroach in the presence of 0.02 M succinate or *l*-glutamate. pH 7.1~7.2. Final concentration,  $10^{-4}$ M~ $10^{-6}$ M.

C : Control —○—

R : Rotenone .....●.....

テノーンで僅かな阻害が認められるが、 $10^{-5}$  M あるいはそれ以下では影響が認められない。しかるに *L*-グルタミン酸の添加では、神経の呈色反応と同じく  $10^{-4}$  ~  $10^{-6}$  M のロテノーンで高度の抑制が認められた。しかるにクエン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、焦性ブドウ酸および *d*-グルタミン酸を添加した場合には、対照区の活力が極めて低くてロテノーンの影響を十分検討できず、co-factor を加えて測定する必要があるのでは下検討中である。

なお *L*-グルタミン酸を基質とした場合 exp. 1 では coenzyme concentrate\* を添加せず exp. 2 において添加したが、その影響は極めて小さかった。

**3. *L*-グルタミン酸の酸化による $\alpha$ -ケトグルタル酸の生成に及ぼすロテノーンの影響** *L*-グルタミン酸と  $\alpha$ -ケトグルタル酸の比の変動は容易に TCA サイクル構成物質の量を変動させるので、この比を支配している *L*-グルタミン酸酸化酵素は呼吸調節上重要な意義をもつものと考えられている<sup>9)</sup>。もしロテノーンにより *L*-グルタミン酸の酸化が抑制されれば当然  $\alpha$ -ケトグルタル酸の生成が阻害されるはずである。そこで前記の *L*-グルタミン酸を基質として酸素吸収量を測定した反応液中の  $\alpha$ -ケトグルタル酸の生成量を定量したところ、Table 3 に示すような結果がえられ、明かに  $\alpha$ -ケトグルタル酸の生成が阻害されていた。

Table 3. The formation of  $\alpha$ -ketoglutarate from *L*-glutamate by the mitochondrial fraction of the muscle of the American cockroach. Figures show  $\mu$ M of  $\alpha$ -ketoglutarate per 2 ml. of reaction mixture.

	Incubation time (min.)	
	0	45
Control	0.31	3.64
$10^{-5}$ M Rotenone		0.14
$10^{-6}$ M Rotenone		0.34

**4. 神経および筋肉の遊離アミノ酸組成** 高等動物の脳においては *L*-グルタミン酸は神経の機能と密接な関係のあることが知られており<sup>10)</sup>、*L*-グルタミン酸は酸化される唯一のアミノ酸で、各種の臓器の中で脳に最も多く含まれている<sup>10)</sup>。しかるに昆虫の神経では、*L*-グルタミン酸と機能との関係だけでなく、その

含有アミノ酸組成についても殆んど知られていない。筆者らはこれらを検索する意味で特に神経と筋肉の遊離アミノ酸組成をペーパクロマトグラフィーにより調べた。結果は Table 4 に示す如く、筋肉ではグルタミン酸は量的にはかなり多く存在するが他の遊離アミノ酸も同程度あるいはそれ以上存在する。一方神経では *L*-グルタミン酸は他のアミノ酸に比べて量的に圧倒的に多いことが認められた。

Table 4. The free amino acid content in the nerve cord and muscle of the American cockroach examined by paperchromatography.

	Nerve cord	Muscle
Glutamic acid	++++	+++
Aspartic acid	+	++
Alanine	+	++
Glycine	+	++
Arginine	+	++
Histidine	+	++
Cystine	+	++
Valine	+	++
Leucine	+	++

考 察

前報<sup>6)</sup>までの結果から、ロテノーンの殺虫作用の大きな要因は神経および筋肉の細胞呼吸抑制であると考えられたが、本実験によつて少くとも筋肉においては TCA サイクルと密接に結びついている *L*-グルタミン酸酸化の抑制であることが明らかになった (Fig. 2)。

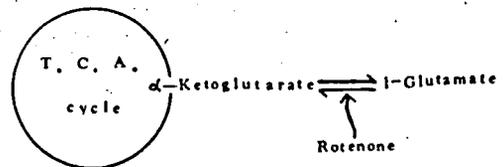


Fig. 2. The inhibitory action of rotenone on the respiratory metabolism of the muscle in insect.

一方また昆虫筋肉の呼吸代謝は高等動物のそれと高度の類似性をもっていることが証明されている。すなわちゴキブリ筋肉においてはコハク酸酸化酵素系の存在<sup>11)</sup>、各基質の利用や代謝阻害剤の影響<sup>12)</sup>、TCA サイクルの存在<sup>13)</sup>、酸化的磷酸化の存在 (深見・富沢未発表) などが明かにされ、バツタ筋肉やイエバエにお

\* 東京大学農学部生物化学教室大村京生氏より譲り受けた。豚の肝臓から LePage & Mueller<sup>14)</sup> の TPN 調整法にしたがつて作ったアセトン粉末で 20% のピリジンスクレオテリドを含む。

いても酸化的磷酸化の存在<sup>10) 11) 14)</sup>が証明されていて、一応高等動物の筋肉の場合と同様な呼吸代謝が想定されている。したがってゴキブリ筋肉においてはロテノール中毒により L-グルタミン酸 酸化酵素系が抑制されて TCA サイクルの攪乱が起り、それによつて呼吸代謝が失調して麻痺に導くものと考えられる。

ゴキブリ神経においても基質無添加 TTC 呈色反応はロテノールによつて抑制され、基質添加の場合には筋肉と同様に L-グルタミン酸 を添加したときに著しい抑制が認められた。

一方またゴキブリ筋肉および神経の遊離アミノ酸を定量的に調べたところ、L-グルタミン酸は筋肉では量的にかなり存在するが他のアミノ酸も同程度あるいはそれ以上存在するのに反し、神経ではL-グルタミン酸は他のアミノ酸に比べ圧倒的に多かつた。この事実は昆虫神経においても高等動物の脳と同様にL-グルタミン酸が呼吸代謝に重要な位置を占め、神経機能と密接に関係している事を暗示するものであろう。

以上あわせ考えると、ロテノール中毒によつて神経においても L-グルタミン酸 の酸化が抑制されて代謝攪乱が起り、神経麻痺がもたらされるものと推論される。しかしこれは定性的な実験結果をもとにしたもので、さらに定量的な実験を行つたのちでなければつきりした結論を下せない。

昆虫神経組織の定量的な呼吸代謝については現在までに僅かしか観察がなされていない。Sacktor & Thomas<sup>15)</sup> はゴキブリ筋肉のコハク酸チトクローム c 還元酵素を測定し、また酸化酵素と還元酵素の比が筋肉と脳および神経索で異なることから、コハク酸以外の基質によるチトクローム c 還元酵素が多いと推量した。また筆者らがゴキブリ筋肉および神経索への P<sup>32</sup> の incorporation を観察したところでは、ATP + ADP (P<sup>32</sup>) と orthophosphate (P<sup>32</sup>) の比が神経では筋肉に比較してかなり小さいことを認めた<sup>15)</sup>。これらのデータは昆虫の神経の呼吸代謝が筋肉の場合と定性的には同じだとしても、定量的には明かに異なることを示すものであり、ロテノールの阻害作用についてもさらに定量的な研究が必要であらう。

神経の電気生理学的研究からも、本研究の推論を裏づけるような事実が得られている。一般にカエルの神経では代謝阻害剤(青酸カリ、モノヨード醋酸、高濃度の一酸化炭素など)は脱分極を起させて伝導阻害をもたらすといわれているが<sup>13) 17) 19)</sup>、ゴキブリの神経においても、青酸カリやモノヨード醋酸は脱分極によつて伝導阻害を起させ、ロテノールも同様に作用することが知られている<sup>20)</sup>。これらの実験は筆者らが生化学的方法で得た知見に対して確証を与えるものとして興

味がある。

## 要 約

ワモンゴキブリの神経および筋肉の呼吸代謝、とくにグルタミン酸酸化酵素系に対するロテノールの影響を調べた。

1. 神経のコハク酸添加 TTC 呈色反応は  $5 \times 10^{-6} M$  ロテノールによつて抑制を受けないが、L-グルタミン酸添加の場合は明かに抑制されていた。
2. 筋肉のミトコンドリア分散液の酸素吸収量は、コハク酸を添加した場合は  $10^{-4} M$  のロテノールによつて僅かに抑制されるが、 $10^{-5} M$  以下は全く影響がない。しかるに L-グルタミン酸 添加の場合は、 $10^{-4} \sim 10^{-6} M$  のロテノールによつて高度に抑制されていた。
3. L-グルタミン酸 酸化による  $\alpha$ -ケトグルタル酸の生成量は、ロテノールによつて著しく低下していた。
4. 神経および筋肉の遊離アミノ酸組成を調べ、特に神経において L-グルタミン酸 の含量が高いことを認めた。
5. 以上の結果からロテノールは神経および筋肉の L-グルタミン酸酸化酵素系を抑制して呼吸代謝を攪乱し、麻痺をもたらすものと考えられる。

## 引用文献

- 1) Barron, E. S. G. & T. N. Tahmisian: J. Cell. Comp. Physiol., **32**, 57—76 (1948)
- 2) Braunstein, A. E.: Advance in Protein Chemistry, **3**, 1 (1947)\*
- 3) 江上等編: 標準生化学実験, 文光堂, 36—38 (1953)
- 4) 深見順一: 応動, **19**, 29—37 (1954)
- 5) 深見順一: 応動, **19**, 148—154 (1955)
- 6) 深見順一: 防虫科学, **21**, 122—128 (1956)
- 7) Harvey, G. T. & S. D. Beck: J. Biol. Chem., **201**, 765—773 (1953)
- 8) Le Page, G. A. & G. C. Mueller: J. Biol. Chem., **180**, 975—984 (1949)
- 9) 岡本彰裕: 神経化学, 医学書院, 263—295 (1954)
- 10) Rees, K. R.: Biochem. J., **58**, 196—202 (1954)
- 11) Sacktor, B.: Arch. Biochem. & Biophys., **45**, 349—365 (1953)
- 12) Sacktor, B. & G. M. Thomas: J. Cell. Comp. Physiol., **45**, 241—245 (1955)
- 13) Shanes, A. M.: J. Gen. Physiol., **33**, 75—102 (1949)

- 14) 富沢長次郎・深見順一：応昆，12，1—7(1956)  
 15) 富沢長次郎・深見順一：防虫科学，21，133—139 (1956)  
 16) 塚田裕三：生体の科学，5，107—116 (1953)  
 17) Von Euler, C. & C. R. Skoglund : Acta Physiol. Scandinav., 14, Suppl., 47, 1—19 (1947)\*  
 18) Waelsch, H. : Advance in Protein Chemistry, 6, 301 (1951)\*  
 19) Wright, E. B. : Am. J. Physiol., 148, 174—184 (1947)  
 20) 山崎輝男・石井敏夫：昭和31年度，応動・応昆大会講演 (1956)

\* 間接引用

Résumé

It has been concluded in the previous report (Fukami, 1956) that the primary action of rotenone is the inhibition of the respiratory metabolism of the nerve cord and muscle of insects. In this report the effects of rotenone on the respiratory enzymes of the nerve and muscle of *Periplaneta americana* L., the glutamic oxidase system was emphasized.

1. The degree of TTC staining of the nerve was depressed by *in vitro* treatment of rotenone

in the presence of *l*-glutamate, but was not depressed in the presence of succinate.

2. The oxygen uptake of the mitochondrial fraction of the muscle in the presence of succinate was slightly inhibited by *in vitro* treatment with  $10^{-4}$  M rotenone, but was not inhibited by  $10^{-5}$  M or lower concentrations. However, rotenone strongly inhibited the oxygen uptake in the presence of *l*-glutamate at concentrations of  $10^{-4}$  M,  $10^{-5}$  M or  $10^{-6}$  M.

3. The formation of  $\alpha$ -ketoglutarate from *l*-glutamate by the mitochondrial fraction of the muscle was inhibited by rotenone.

4. The amount of *l*-glutamate in the nerve cord was abundant when compared with the other free amino acids contained, but it was not so in the muscle. The physiological function of *l*-glutamate in the nerve of insects was discussed in comparison with that of the brain of mammal.

From the results mentioned above, it has been concluded that the inhibitory action of rotenone on the respiratory metabolism of the nerve and muscle is due to interference with the oxidation of *l*-glutamate to  $\alpha$ -ketoglutarate.

**Phosphorus Metabolism of Insect and the Influences of Insecticides.** Biochemical Studies on the Action of Insecticides. 3. Chōjirō TOMIZAWA (National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Tokyo) and Jun-ichi FUKAMI (Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Tokyo) Received Oct. 29, 1956. *Botyu-Kagaku*, 21, 133, 1956 (with English résumé, 139)

28. 昆虫の磷酸代謝と殺虫剤の影響 殺虫剤の作用に関する生化学的研究 3 富沢長次郎 (農林省 農業技術研究所 農薬科) 深見順一 (東京大学 農学部 害虫学研究室) 31. 10. 29 受理

昆虫の各種臓器における物質代謝に及ぼす殺虫剤の影響を調べる事は、作用機構の解明に寄与する、処が大きい。本報は特に磷酸代謝に注目しゴキブリ成虫の雄に  $P^{32}$  を注射し、その各種臓器への移動状態を調べ特に腿節筋および神経索内の磷酸代謝中間物質への  $P^{32}$  のとり入れに対する殺虫剤の影響を調べた。

著者らは前報<sup>3)</sup>に於てバツクの翼筋の oxidative phosphorylation に及ぼす DDT, lindane, methyl parathion, rotenone の作用を調べ、これらの殺虫剤は直接的には本反応を阻害しない事を示した。然しながら昆虫体内には解糖を初めとして磷酸の関与する幾多の酵素系が知られており、上記の殺虫剤がこれらの系に干渉しないという証拠はない。本報においてはこ

の点を検討するための基礎実験としてゴキブリ体内の  $P^{32}$  の移動状態を調べ、また機能的に大きな相異の認められる腿節筋と神経索における磷酸代謝中間物質への  $P^{32}$  のとり入れに対する上記殺虫剤の影響を比較した。

本研究を行うに当り御懇切なる御指導を賜わつた 東大農学部山崎輝男助教授および農林省農業技術研究