

whether this methyl-*n*-butyrate and malathion were hydrolyzed by a single enzyme. As pointed out by Asperen and Oppenoorth,^{1,2)} in the housefly, there are more than two kinds of carboxylic ester hydrolases having different characteristics, and the characteristics of hydrolyse have overlapping substrate specificities. Furthermore, until being clear the characteristic of enzyme, authors would like to consider that, as they are very complicated, the so-called B-esterase shows the activity of enzyme which hydrolyzes carboxylic esters of non-insecticidal properties, and also carboxyesterase means the activity of enzyme which hydrolyzes insecticides containing carboxylic ester.

4) Resistant strain hydrolyzed malathion *in vitro* more rapidly than susceptible strain, but both strains did not hydrolyze malaaxon, and also, these results suggest that the resistance to malathion in this insect is corresponding to the increase of carboxyesterase activity hydrolyzing malathion.

5) At this stage of investigation, it was considered that activities of phosphatases hydrolyzing malaaxon (malaaxonases), paraoxon (paraoxonases) and DDVP (DDVPases) did not increase in resistant

strain. Malaaxonase and paraoxonase activities, however, could not be measured in both strains by the analytical method used in this experiment. DDVPase activity did not show any difference between the both strains *in vitro*.

6) Carboxyesterase actions of both strains *in vitro* were inhibited by inhibitors such as paraoxon, malaaxon, DDVP and Dibrom. The sensitivities of carboxyesterase to paraoxon, DDVP and Dibrom did not show any difference between the both strains, but the carboxyesterase of resistant strain had more resistance to malaaxon than that of susceptible strain, as pointed out above.

7) Remarkable synergism was recognized when malathion and Dibrom was applied jointly to female adults of resistant strain. The maximum synergism was obtained in a mixture of malathion and Dibrom in the ratio of 1:1.

8) At the same time, Dibrom potentiated the oral toxicity of malathion to mice when malathion and Dibrom administrated jointly as water emulsion. The degrees of potentiation were 5.0, 6.9 and 6.2 in the 75:25, 60:40 and 50:50 mixtures of malathion and Dibrom respectively.

抄 録

置換 phenyl N-methyl carbamate の位置異性と生物活性

Position isomerism in relation to activity of substituted-phenyl N-methyl carbamates.

R. L. Metcalf, J. R. Fukuto, and M. Y. Winton. J. Econ. Ent. 55 889. (1962)

従来の研究では置換 phenyl N-methyl carbamate (以下PNMCと略す)の殺虫力は、一般に meta, ortho, para, の順序にあるものとされている。しかしながら, alkoxy-PNMC 置換体では o-isopropoxy-PNMC のような ortho 置換体が, それらの meta 置換体よりも強い活性を示すことから, PNMC 置換体の化学構造と比較虫力を調べるべく, 49種 (そのうち22種新化合物)の PNMC 置換体を合成し, それらの, 三種の昆虫に対する抗 chE 作用と毒性に就いて検討した。

材料と方法

すでにいくつかの PNMC 置換体に就いては述べら

れているが, 一般には, 相当する phenol と過剰の 50 % methyl-isocyanate とをトルエン中耐圧瓶を用いて 100°C で反応せしめて合成し, 得られた carbamates は skellysolve B や hexane 等から再結した。その他の合成法としては, たとえば m-iodophenol は m-amino phenol から diazonium 中間体を経て, o-cyclopentyl oxy phenol は pyrocatecol と cyclopentyl bromide から Klarmann の方法で合成した。これらはいずれも N-methyl carbamate ester として元素分析により確認した。

昆虫に対する毒性並びに抗 chE 作用の検定は夫々, Fukuto, Kolbezen の方法によった。

その結果, 以前得られていた I_{50} 値がごく僅かに修正されるものがいくつかみられた。

考 察

Cabamates は昆虫の chE に対する拮抗的阻害剤であって, 阻害剤の存, 不存時の酵素作用速度に対して

のその速度論的表現から阻害恒数 K_i は次の様に言うことが出来る。

$$\text{阻害恒数 } K_i = I_{50} \times \frac{K_s}{K_s + S}$$

I_{50} : 50%速度への阻害剤のモル濃度

K_s : ハエの chE と Ach ($1.75 \times 10^{-3} M$) の Michaelis 恒数

S : Ach 濃度 ($1 \times 10^{-2} M$)

従って、 $K_i = 0.149 \cdot I_{50}$ となる。

I_{50} 値は引きつける力の尺度であり、chE に対する carbamates の親和力を意味するもので、PNMC に対する PNMC 置換体の I_{50} 値の割合は PNMC に対する各種の置換体によってもたらされる結合の長さ、或いは、相対的親和力にとって定量的に用いられるべきものである。従って、表に示されている I_{50} 値は carbamates と酵素間の構造の補足性を指示し、これらの carbamates に対する生物活性への最小量的な限度を示すものである。

Carbamates の昆虫毒としての意義は、作用面においての固有の生化学的作用のみならず、この作用面に対する透過とか、或いは生化学的に活性をもっている他の場所での解毒作用等の二次的因子として反映するので一層複雑なものであるといえる。従って多種の置換基や異性体の相対的な毒性と抗chE作用の間には本質的に一致する規準があることは注目すべきである。また、piperonyl butoxide の如き、methylenedioxy-phenyl 共力剤と carbamates との共力作用は、例えばイエバエに対しては共力剤が carbamates の生体内解毒を著しく阻害し、表に示されているように、carbamates と piperonyl butoxide とを 1:5 の割合で用いて得られる LD_{50} 値は、carbamates のみで得られる LD_{50} 値より強い毒性を示している。

多くの研究から Ach、 $(CH_3)_3N^+CH_2 \cdot CH_2O \cdot \overset{O}{\parallel} CCH_3$ が chE と多点結合されていることが示されている。ester 側で求電子的な C=O 基が cyclic nitrogen の求核的攻撃によって、おそらく、glycyl-aspartyl-seryl-glycin の oxazoline 環に結合されている。酵素の protein chain から凡そ 5\AA の距離のところ強く負に荷電した anion おそらく aspartic 或いは glutamic acid の COO^- 基がある。この anion が正に荷電した Ach の N^+ を静電力で引きつけ、そして短い幅の Van der Waals 力によってほぼ球形に近い二つの CH_3 基に結合した形をしている。

PNMC 置換体にもみられる chE 阻害の作用機構の説明には、これらの酵素表面の構造学的形態と、Ach 分子と carbamate 分子間の大きさとか形状とかの同一性を考慮にいれなければならない。このことは chE 阻

害に対してのみならず、Ach に対しても、Ach と carbamates の間の直接的拮抗作用にもあてはまることである。これは被作用蛋白質と Ach が補足的構造をもつが故にみられることである。

以上要約すれば、殺虫剤として、また、抗 chE 剤としての最大の活性度は、その構造が chE の作用面に対して極めて密接した補足関係にある時に発揮される。このことは carbonyl 基から凡そ 5\AA の距離にあって相互作用の大きな Van der Waals 力をもった bulky な phenyl 置換基と結合している化合物に認められた。

ハロゲン置換 PNMC

ハロゲン置換 PNMC の chE に対する親和力 ($-log I_{50}$) は Van der Waals radius との関係を見ると、各位置異性体は親和力とその大きさとの間に事実上の直線関係にあり、ortho 異性体は meta 異性体より明らかに効果的であり、para 異性体は何も置換基をもたない phenyl 化合物とほぼ同程度の効果しかもたないことから、最大補足の概念に一致して anion 側での適合が ortho 置換体で最大なることを示している。すなわち、C=O 基から N^+ までが約 5\AA の距離にあるような広がりをもつ Ach の Fischer-Hirschfelder model を用いると、ortho 異性体がこの構造に対して最も補足的であり、また、C=O からハロゲン原子の中央までの距離が約 5\AA であることを示し、また一方、para 置換化合物ではハロゲンは全く anion 側の境界外にあることを示すことが出来る。

Alkyl-及び alkoxy-PNMC

ChE 阻害と殺虫作用が、phenyl 置換基の大きさと、枝分れに従って漸進的に増加し、Ach の trimethyl ammonium 部と、isosteric な関係にある isopropyl 基と、sec-butyl 基で最高に達する。更に置換基の大きさが増しても、つまった状態にある cyclo-pentyl 基や、cyclo-hexyl 基になると生物活性は減少する。このように、前者が平面的であるのに対して、後者が、ねじれ型や椅子型の空間構造をとることに注目しなければならぬ。

phenyl 置換基の大きさが増加するに従って、種々の位置異性による活性度の差は、alkyl 基では meta 位 alkoxy 基では ortho 位で増加する。para 置換基は一般に劣るが、sec-butyl 基や cyclo-hexyl 基のように大きな置換基のものではかなり活性である。

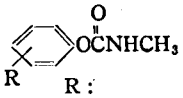
これら alkyl 基と alkoxy 基のいずれにおいてもその置換基の大きさ、枝分れの増加に伴って得られる結果は同一のもので、alkyl 基系では meta 配向性、alkoxy 基系では ortho 配向性であることは興味ある

ことである。至適配向性におけるこの違いは、C=O基と anion 側の Ach に見出された 5Å の距離に一致させる様な原子団の中央との間の空間の必要性をもつばら反映したものと考えられる。この距離は meta 置換化合物において一炭素原子分だけ長く、1.39Å の芳香族の C-C 結合の長さの作用によるものである。しかし、ortho-alkoxyl 基系においては、1.42Å の C-O 結合の長さをもつて附加した酸素原子の存在によって補われる。それ故に、原子間距離は二つの系においては 1/10Å 前後しか違わない。

Foldes らは prostigmine 型の chE 類縁体に対する結晶の原子間距離の性質について、分子模型の測定及びその他の考察から、chE の最高活性は C=O の N⁺ に対する距離が、4.7~5.3Å の場合であると結論している。この測定は、carbamates の C-O-C 結合がとり得る共鳴構造に対して平面的であるとの仮定に基くものである。研究された最も活性ある化合物は、

(2-hydroxy-benzyl)-trimethyl ammonium (bromide) dimethyl carbamate で、この物質は o-isopropoxy-PNMC が m-isopropyl-PNMC に対して同じ空間的な相関性をもつと同様に、prostigmine に対して同様の空間的関係をもっている。C-N結合(1.47 Å)と C-O 結合 (1.42Å) の間の長さの違いは小さく、結晶の原子間距離の近似値に影響しない。従って、Foldes らによって与えられた C=O と N⁺間の距離を o-及び m-isopropyl 並びに o-及び m-isopropoxy-PNMC の C=O と isopropyl 基の中央の炭素原子の間の距離として用いることが出来るので o-isopropoxy-PNMC では 4.6Å, m-isopropyl-PNMC では 5Å を与える Fischer-Hirschfelder model の測定と近似的に一致する値を与える。実際に chE に対する親和性を (-log I₅₀ として) 原子間距離に対して表示すれば 5Å の範囲に明瞭な最低値を示している。

置換 phenyl N-methyl carbamates の生物活性

	ハエの chE に対する I ₅₀ M	相対的親和力	イエバエに対する LD ₅₀ µg/gFly		共力効果 A/B	イエカの一型に対する LC ₅₀ P.P.M.	ヤガの幼虫近似的 LC ₅₀ mg/Leaf disc.
			A carbamate のみ	B 1:5p. b.*			
unsubstituted	2.0×10 ⁻⁴	1.0	500	38	13.2	>10	>10
o-Br	2.2×10 ⁻⁶	91	60	19	3.1	>10	3-10
m-Br	1.3×10 ⁻⁵	15	170	28.5	6.0	>10	3-10
p-Br	1.0×10 ⁻⁴	2.0	>500	220	>2.3	>10	10
o-iso-C ₃ H ₇	6.0×10 ⁻⁶	33	95	24	4	0.56	1-3
m-iso-C ₃ H ₇	3.4×10 ⁻⁷	590	90	9	10	0.03	0.1-0.3
p-iso-C ₃ H ₇	7.0×10 ⁻⁵	2.9	>500	500	>1	>10	3-10
o-iso-C ₃ H ₇ O	6.9×10 ⁻⁷	290	25.5	7	3.6	0.3	0.3-1
m-iso-C ₃ H ₇ O	9.2×10 ⁻⁶	22	180	19.5	9.2	3	3-10
p-iso-C ₃ H ₇ O	8.8×10 ⁻⁵	2.3	500	340	>1.5	>10	>10
o-cyclo-C ₆ H ₉	1.1×10 ⁻⁶	180	135	15.0	9.0	0.57	3-10
m-cyclo-C ₆ H ₉	1.5×10 ⁻⁶	130	400	17.0	23.5	0.14	3-10
p-cyclo-C ₆ H ₉	2.7×10 ⁻⁵	7.5	>500	500	>1.0	>10	>10
o-cyclo-C ₆ H ₉ O	4.0×10 ⁻⁷	500	90	9.0	10	0.7	10
m-cyclo-C ₆ H ₉ O	8.0×10 ⁻⁶	25	>500	175	>2.9	>10	>10
p-cyclo-C ₆ H ₉ O	1.7×10 ⁻⁵	12	>500	240	>2.1	>10	10

* Piperonyl butoxide.