カンザワハダニのアセチルコリンエステラーゼと 非特異的エステラーゼの性質

桑 原 雅 彦

農林水産省農業技術研究所

Properties of Acetylcholinesterase and Non-Specific Esterases of the Kanzawa Spider Mite, *Tetranychus kanzawai* KISHIDA (Acarina : Tetranychidae). Masahiko KUWAHARA (National Institute of Agricultural Sciences, Kannondai 3-1-1, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan). *Jap. J. appl. Ent. Zool.* **26** : 288-293 (1982)

The activity of acetylcholinesterase of mites susceptible and resistant to organophosphates in the reaction with acetylthiocholine esters and the properties of the non-specific esterases which hydrolyze α and β -naphthyl acetate was studied. The acetylcholinesterase activity of the susceptible strain was higher with propionylthiocholine as substrate than with acetylthiocholine, but that of the resistant strains was higher with acetylthiocholine than with propionylthiocholine. The activities of the enzymes of both strains with butyrylthiocholine as substrate were much lower than that with the other two substrates. An almost similar difference between the resistant and susceptible strain was observed in the Michaelis constants (K_m) and maximal velocity (V_{max}) of the reaction of the enzymes with the three acetylthiocholine esters. Thus, the properties of the acetylcholinesterase from the resistant strains were characterized by lower V_{max} and larger K_m than those from the susceptible strain in the reaction with propionylthiocholine. Non-specific esterases responsible for the hydrolysis of α and β -naphthyl acetate had similar values for the bi-molecular reaction constants (k_t), inhibition constants (K_i) as well as similar esterase zymogram patterns as revealed by agar-gel electrophoresis.

緒 言

ハダニの有機リン剤抵抗性機構に関する研究が進展するにつれ、その標的と考えられるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の薬剤感受性や基質特異性をはじめ、薬剤の分解、解毒に関与すると考えられるエステラーゼの諸性質が次第に明らかにされてきた。

ナミハダニやニセナミハダニの有機リン剤抵抗性系統 (R 系統) の AChE は、有機リン剤感受性系統 (S 系統) の AChE とはかなり異なった基質特異性を有することが報告されている (VOSS and MATSUMURA, 1965; SMISSAERT et al., 1970; ZAHAVI et al., 1971)。すなわち、S 系統の AChE 活性はその基質であるコリンエステルのアシル残基がプロピオニル基の時に最も活性が高く、アセチル基、ブチリル基の順に低下するのに対し、R 系統の AChE 活性はアセチル基の時に最も高く、プロピオニル基、ブチリル基の順に低下する。これに対し、カンザワハダニの AChE 活性はアセチル基よりもむしろ

ブチリル基の場合に活性が高いとされ (SAKAI, 1967)、ナミハダニやニセナミハダニとはかなり異なった基質特異性を有することが報告されている。こうした基質特異性の差異は生理学上の興味のみならず、農薬創製の際などには特に重要なものと思われる。

一方、ハダニの有機リン剤抵抗性と非特異的エステラーゼ活性の関係は、ダニの種類によってかなり異なった結果が報告されている。すなわち、ナミハダニでは R 系統のエステラーゼ活性は S 系統のそれより概して低い (SMISSAERT, 1965; MATSUMURA and VOSS, 1964) のに対し、ミカンハダニやカンザワハダニでは R 系統のエステラーゼ活性は S 系統のそれより高い (TAKAHASHI et al., 1973; KUWAHARA et al. 1982)。しかし、これらの報告では主として α 又は β -ナフチルアセテート (NA) の一方を基質として行っているため、両基質の水解に関与するエステラーゼがはたして同一のものか否かは不明である。カンザワハダニでは NA の水解には複数の非特異的エステラーゼが関与しており、しかも α および β -NA

に対する エステラーゼ活性には同一系統では差がほとんど無いことが報告されている (KUWAHARA et al., 1982)。

本報告では以上の点から、カンザワハダニの有機リン剤感受性と AChE の基質特異性との関係、ならびに NA を水解する非特異的エステラーゼの基質特異性、特に α -NA と β -NA の水解に関与するエステラーゼの諸性質について検討した結果を報告する。

本文に入るに先立ち、各種の阻害剤を御提供下さった東京農業大学 山本 出教授、同木村修一博士、九州大学 江藤守総教授、ならびにエステラーゼの測定に際し有益な御助言をいただいた農業技術研究所農薬科 小池久義技官に深謝の意を表する。

材料および方法

1. 供試ハダニ

1 系統のカンザワハダニを有機リン剤で淘汰および逆淘汰を行って育成した有機リン剤感受性系統 (NsPs) と 3 系統の有機リン剤抵抗性系統 (NsD, NsM, NsP), および野外で採集した 1 系統の有機リン剤抵抗性系統 (ZoR) を供試した。各系統の由来、育成手順ならびに薬剤感受性は既に報告した (KUWAHARA, 1982; KUWAHARA et al., 1982)。

2. AChE 活性の測定法

AChE 活性は KUWAHARA (1982) に準じて行った。すなわち、チオコリンエステルを基質とする ELLMAN et al. (1961) の方法により、アセチルチオコリン (ATCh), プロピオニルチオコリン (PrTCh) およびブチルチオコリン (BuTCh) を用い、リン酸緩衝液 (0.067 M, pH 7.0) 中でハダニを磨砕し酵素液とした。0.9 ml の酵素液 (1.43 mg ハダニ/ml) と 0.025 ml の基質を 30°C で 30 分間反応させた後、0.075 ml のエゼリン (9×10^{-4} M) を加えて反応を止め、412 nm の吸光度を求めた。酵素活性のパラメーターである Michaelis 定数 (K_m) と最大速度 (V_{max}) は LINE-

WEAVER and BURK (1934) の方法で求めた。

3. エステラーゼ活性の測定法

非特異的 エステラーゼ 活性の測定は VAN ASPEREN (1962) の方法に準じ、ハダニを蒸留水中で磨砕しリン酸緩衝液 (0.067 M, pH 7.0) 中に溶解させて酵素液とした。反応は 1 ml の酵素液 (0.0143 mg ハダニ/ml) に 0.01 ml の基質を加えて 30°C で 20 分間反応させた後、0.5 ml の diazoblue laurylsulfate 液 (DBLS) を加えて発色させ、 α -NA は 600 nm, β -NA は 550 nm の吸光度を測定した。阻害実験は KUWAHARA et al. (1982) の方法に準じ、1 ml の酵素液に 0.01 ml の阻害剤を加えて 30°C で 10 分間前阻害させた後、0.5 ml の DBLS 液を加えて残存活性を測定した。エステラーゼの 2 分子反応速度定数 (k_i) は ALDRIDGE (1950) の方法で求めた。基質の α -NA, β -NA および阻害剤の K-1, dichlorvos, EPN-oxon, methyl paraoxon, Tributyrin は 2% の Triton X-100 を含んだエタノールに溶解させた。

4. 電気泳動

非特異的 エステラーゼを分離するため、KUWAHARA et al. (1981) の方法に準じ、薄層寒天電気泳動を行った。50 mg のダニをリン酸緩衝液 (0.067 M, pH 7.0) で磨砕し、濾紙片に吸着させて寒天上に置き、寒天中に酵素液を浸潤させ、1 cm 当たり 2 mA の電流を流し、4°C で 60 分間泳動した。泳動後 0.1% の α 又は β -NA と 2% の Fast Blue BB 混液を噴霧し、30°C の湿室中で発色させてエステラーゼバンドを検出した。

結 果

1. AChE の基質特異性

各系統の AChE 活性および活性のパラメーターである V_{max} と K_m は Table 1 と Table 2 に、S 系統 (NsPs) と R 系統 (ZoR) の種々の基質濃度における初速度を LINEWEAVER and BURK (1934) の方法でプロットして図示したのが Fig. 1 である。

S 系統の AChE 活性はいずれの基質に対しても R 系

Table 1. Activity of cholinesterases from three strains of mites with acylthiocholine esters as substrates

Strain	Substrate				
	ATCh		PrTCh		BuTCh
	2×10^{-4} M	1×10^{-3} M	2×10^{-4} M	1×10^{-3} M	1×10^{-3} M
NsPs	78.9	87.6	88.0	102.4	7.4
NsP	62.7	75.1	26.6	41.6	4.7
ZoR	59.5	68.4	23.4	39.5	3.3

Figures are expressed as μ moles of substrate hydrolyzed/gr mite/hr.

Table 2. Maximal velocity ($V_{\max}$) and Michaelis constants (K_m) of the reaction of cholinesterases from various strains with acylthiocholine esters as substrates

Strain	Substrate					
	ATCh		PrTCh		BuTCh	
	$V_{\max}$	$K_m \times 10^4$	$V_{\max}$	$K_m \times 10^4$	$V_{\max}$	$K_m \times 10^4$
NsPs	96.9	0.425	109.0	0.418	10.2	3.77
NsM	80.4	0.433	51.3	1.81	8.88	18.1
NsD	82.7	0.489	46.5	1.78	9.20	17.7
NsP	78.9	0.442	50.0	1.75	8.90	18.4
ZoR	72.7	0.451	47.2	2.02	9.16	18.2

$V_{\max}$ are expressed as μ moles substrate hydrolyzed/gr mite/hr.

Fig. 1. Double reciprocal plot of acylthiocholine hydrolysis by acetylcholinesterase of Kanzawa spider mite susceptible (NsPs) and resistant (ZoR) to organophosphate. Acetylthiocholine (●), propionylthiocholine (○), butyrylthiocholine (×).

統のそれより高い。PrTCh でその差は最も大きく、特に低濃度でこの傾向は顕著であった。すなわち、S 系統の AChE 活性は PrTCh に対し最も高く、ATCh がこれに次ぎ、BuTCh に対する活性は急激に低下し、ATCh, PrTCh のその 1/12 以下となった。これに対し、R 系統の AChE 活性は ATCh に対し最も高く、PrTCh, BuTCh の順に低下し、基質のアシル基の炭素数が多くなるに従って急激に活性が低下した。

PrTCh に対する活性は、ATCh のその 1/2 以下となった。この 2 系統間の基質特異性の違いは、 K_m を比較すればより明確である。

S 系統の K_m は PrTCh に対し最も小さな値を示し、ATCh にはこれよりやや大きい。本質的に両基質間で差は認められない。しかし BuTCh では前者の約 9 倍の値を示した。これに対し、R 系統の K_m 値はいずれも ATCh に対し最も小さく、以下 PrTCh, BuTCh の順に大きくなり、PrTCh の K_m 値は ATCh のその約 4 倍、BuTCh では ATCh のその約 40 倍であった。

以上の結果から S 系統と R 系統の K_m 値は ATCh に対し両系統間で差は認められないが、基質のアシル残基の炭素数が多くなると R 系統の K_m 値が大きくなるため、R 系統の K_m 値は S 系統のそれに比較して PrTCh では約 4 倍、BuTCh では約 5 倍程度の高い値を示した。

2. 非特異的エステラーゼの基質特異性

エステラーゼの阻害剤に対する k_i は Fig. 2 に、Tributyrin による NA 水解反応の阻害は Fig. 3 に、薄層寒天電気泳動によるエステラーゼバンドは Fig. 4 に示した。

各阻害剤によるエステラーゼ活性の阻害は、阻害剤により異なった様相を示すが、 α -NA, β -NA の両基質間ではその阻害にはほとんど差異が認められない。Dichlorvos を除けば、途中で直線が折れ曲ることや、縦軸を 100% 以下のところで切る場合があることから、明らかに異なった薬剤感受性を持った複数のエステラーゼが α -NA, β -NA の水解に関与していることが判る。そして両基質の阻害剤に対する k_i は非常に近似した数値が得られた。又 Tributyrin による両基質のエステラーゼ活性の阻害を示したのが Fig. 3 で、両基質の交点はそれぞれ横軸の上側にあることから、Tributyrin は

Fig. 2. *In vitro* inhibition of esterase(s) hydrolysing α (●) and β (○)-naphthyl acetate in homogenate of the NsPs strain by several inhibitors and bimolecular rate constants (k_i : litre·mole⁻¹·min⁻¹). Upper figures: α -naphthyl acetate and lower: β -naphthyl acetate.

Fig. 3. Dixon plot of α -naphthyl acetate (●) and β -naphthyl acetate (○) hydrolysis in NsPs strain to show competitive inhibition by tributyrin. Concentration shown is that of substrate.

α -NA, β -NA とはエステラーゼの活性中心を奪いあう拮抗型阻害をすることが明らかである。そして α -NA および β -NA に対する Tributyrin の阻害物質定数 (K_i) はそれぞれ 2.35, 2.40 mM となり、ほぼ一致している。

α -NA, β -NA を基質として薄層寒天電気泳動によりハダニのエステラーゼを分離すると、6本のバンドに分離された (Fig. 4)。各バンドの発色呈度は系統間で差が見られるが、どちらを基質としてもバンドの相対的位置は変わらない。又 S 系統にくらべ、R 系統では E_3 、

Fig. 4. Esterase zymogram patterns of mite on agar gel.

E_4 バンドの活性が顕著に高い。

考 察

S 系統の AChE 活性は基質のアシル残基がプロピオニル基の時に最も活性が高く、アセチル基がこれに次ぎ、ブチリル基では活性は急激に低下した。これに対し、R 系統の AChE 活性はアセチル基の時に最も活性が高く、プロピオニル基やブチリル基に置換されると急激に活性が低下した。つまり S 系統と R 系統の AChE 活性は、PrTCh に対する活性において明らかな差異が認められる (Table 1)。これは S 系統の AChE の

“esteratic site”がプロピオニル基には充分対応できるほど広いが、ブチリル基に対応するほど広くはないのに対し、R系統のAChEのそれはプロピオニル基に対してすらうまく対応できないほど狭くなっていることを示すものと思われ、これらの結果はカンザワハダニのAChEは、ATChよりもむしろBuTChに対して活性が高いとするSAKAI (1967)の報告とは明らかに異なっており、VOSS and MATSUMURA (1965), SMISSAERT et al. (1970)がナミハダニで、ZAHAVI et al. (1971)がニセナミハダニで報告した結果とはほぼ一致した。

尚、本報で得られた各系統のAChE活性は、前報(KUWAHARA, 1982)で得られた同一系統のそれより60~70%程度高い。これは本実験ではハダニをリン酸緩衝液中で磨砕したのに対し、前報では蒸留水中で磨砕したため活性が低下したものと思われる。しかし系統間の活性に同一傾向が認められることから、各系統の活性は正しく表現されているものと思われる。これとは逆にオウシマダニ、*Boophilus microplus*ではリン酸緩衝液中でダニを磨砕すると、蒸留水中で磨砕した場合よりもAChE活性が著しく低下することが知られており(NOLAN et al., 1972)、酵素液を調整する際には充分考慮すべき点であろう。

次にAChE活性のパラメーターである K_m と V_{max} をみると、両系統間の基質特異性の違いはさらに明確になる。すなわち、S系統における K_m は基質がPrTChの時に最小値を示すが、ATChのそれとは大差なく、BuTChでは急激に増加する。しかしR系統の K_m はATChの時に最も小さく、PrTChの K_m はATChのその約4倍、BuTChではさらに大きくなり、基質のアシル基の炭素数が多くなるにつれて明らかに大きくなっている。一方、S系統の V_{max} はPrTChの時に最も大きい。ATChとは本質的な差は認められず、BuTChでは急激に低下する。しかしR系統の V_{max} はATChの時に最も大きく、PrTChではATChよりもかなり小さくなり、BuTChでは急激に低下することから、基質のアシル残基の炭素数が多くなるにつれて活性が低下することが明らかである。したがってR系統のAChEの基質特異性は、S系統のそれに比較して、PrTChに対する V_{max} が小さく、 K_m が大きいという点で顕著に異なっており、これは上述したR系統のAChEの“esteratic site”の幅がS系統のAChEのそれよりも狭いことに基因するものとしたZAHAVI et al. (1971)の報告を支持するものである。

ハダニではNAの水解に異なった薬剤感受性を有す

る複数のエステラーゼが関与しており(SMISSAERT, 1965; KUWAHARA et al., 1981, 1982)、さらに同一系統では α -NA、 β -NAのエステラーゼ活性にはほとんど差が無いこと、すなわちエステラーゼの両基質に対する基質特異性が低いことが報告されている(KUWAHARA et al. 1982)。Fig. 2に示した如く、各種の阻害剤に対するNAのエステラーゼの阻害様式から、阻害剤に対し異なった感受性を有する複数のエステラーゼがNAの水解に関与していることが判る。そして両基質のエステラーゼの阻害剤に対する k_i は互に近似している。KUWAHARA et al. (1982)はTributyrinが β -NAのエステラーゼ活性を拮抗的に阻害することを報告したが、Fig. 3から明らかなように、Tributyrinが α -NAと β -NAのエステラーゼを拮抗的に阻害し、しかも両基質のエステラーゼに対する K_i はほとんど一致している。又電気泳動により分離したエステラーゼバンドの相対的位置が両基質間で全く差異が見られないことは、非常に類似した理化学的性質を有するエステラーゼによりNAが水解されていることを示している。

イエバエやカでは、両基質に対するエステラーゼ活性や電気泳動で分離した両基質のエステラーゼパターンには明確な差が認められている(VAN ASPEREN, 1962; STORDEUR, 1976; GEORGHIOU and PASTEUR, 1978)。カンザワハダニでは阻害剤による両基質のエステラーゼの阻害様式、エステラーゼの阻害剤への k_i や K_i が両基質間でよく一致すること、電気泳動による両基質のエステラーゼの泳動パターンに差が見られないことから、両基質は同一か、又は極めて近似した基質特異性や理化学的性質を有するエステラーゼにより水解されるものと思われ、これらの点からハダニと昆虫では、NAの水解に関与するエステラーゼの諸性質はかなり異なっていることが推定されるが、NAの両基質を同時に比較した事例が昆虫およびハダニでは少ないので、さらに一層の検討が必要であろう。

摘 要

1系統の有機リン剤感受性系統(S系統)と4系統の抵抗性系統(R系統)を供試し、3種のアシルチオコリン(ATCh, PrTCh, BuTCh)に対するアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の基質特異性と、 α および β -ナフチルアセテート(NA)を水解するエステラーゼの理化学的性質を阻害剤や電気泳動法により検討した。

S系統のAChE活性はR系統のそれより高い。S系統のAChE活性はPrTCh>ATCh>BuTChの順に

低下するのに対し、R系統のAChE活性は $ATCh > PrTCh > BuTCh$ の順に低下した。したがって両系統のAChEは、PrTChに対する活性に関して顕著な差異が認められ、これらの結果は、両系統のAChEの反応速度のパラメーターである最大速度(V_{max})やMichaelis定数(K_m)からも支持された。

α -NA および β -NA の水解には薬剤感受性の異なる複数の非特異的エステラーゼが関与している。両基質のエステラーゼは、阻害剤に対する2分子反応速度定数(k_i)や阻害物質定数(K_i)、電気泳動による泳動帯が互に良く一致することから、両基質は同一か又は互に良く類似した基質特異性や理化学的性質を有するエステラーゼにより水解されているものと思われる。

引用文献

- ALDRIDGE, W. N. (1950) Some properties of specific cholinesterases with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl *p*-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochem. J.* **46**: 451—456.
- ASPEREN, K. VAN (1962) A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* **8**: 401—416.
- ELLMAN, G. L., K. D. COURTNEY, V. ANDRES and R. M. FEATHERSTONE (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88—95.
- GEORGHIOU, G. and N. PASTEUR (1978) Electrophoretic esterase patterns in insecticide-resistant and susceptible mosquitoes. *J. econ. Ent.* **71**: 201—205.
- KUWAHARA, M. (1982) Insensitivity of the acetylcholinesterase from organophosphate-resistant Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* KISHIDA, to organophosphorus and carbamate insecticides. *Appl. Ent. Zool.* **17**: 486—493.
- KUWAHARA, M., T. MIYATA, T. SAITO and M. ETO (1981) Relationship between high esterase activity and *in vitro* degradation of ^{14}C -malathion by organophosphate-resistant and susceptible strains of the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* KISHIDA (Acarina: Tetranychidae), and their inhibition with specific synergists. *Appl. Ent. Zool.* **16**: 297—305.
- KUWAHARA, M., T. MIYATA, T. SAITO and M. ETO (1982) Activity and substrate specificity of esterase associated with organophosphorus insecticide resistance in the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* KISHIDA (Acarina: Tetranychidae). *Appl. Ent. Zool.* **17**: 82—91.
- LINEWEAVER, L. and D. BURK (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**: 658—666.
- MATSUMURA, F. and G. VOSS (1964) Mechanism of malathion and parathion resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *J. econ. Ent.* **57**: 911—916.
- NOLAN, J., H. J. SCHNITZERLING and C. A. SCHUNTNER (1972) Multiple forms of acetylcholinesterase from resistant and susceptible strains of cattle tick, *Boophilus microplus* (CAN.) Pest. Biochem. Physiol. **2**: 85—94.
- SAKAI, M. (1967) Hydrolysis of acetylthiocholine and butyrylthiocholine by cholinesterases of insects and a mite. *Appl. Ent. Zool.* **2**: 111—112.
- SMISSAERT, H. R. (1965) Esterases in spider mite hydrolysing α -naphthyl acetate. *Nature* **205**: 158—160.
- SMISSAERT, H. R., S. VOERMAN, L. OOSTENBRUGGS and N. RENOY (1970) Acetylcholinesterases of organophosphate-susceptible and resistant spider mite. *J. Agric. Food Chem.* **18**: 66—75.
- STORDEUR, E. DE (1975) Esterases in the mosquito *Culex pipiens pipiens* L.: Formal genetics and polymorphism of adult esterases. *Biochem. Genet.* **14**: 481—493.
- 高橋洋治・斎藤哲夫・弥富喜三・江藤守総 (1973) 薬剤抵抗性ミカンハダニに対する有機リン剤の連合作用II. 有機リン剤抵抗性ミカンハダニにおける malathion と K-1 (2-phenyl-4-H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide) の共力作用の機作. *防虫科学* **38**: 13—21.
- VOSS, G. and F. MATSUMURA (1965) Biochemical studies on a modified and normal cholinesterases found in the Leverkusen strains of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Can. J. Biochem.* **43**: 63—72.
- ZAHAVI, M., A. S. TAHORI and F. KLIMER (1971) Insensitivity of acetylcholinesterases to organophosphorus compounds as related to size of esteratic site. *Molec. Pharmacol.* **7**: 611—619.