

# アジンフォスメチル抵抗性におけるグルタチオンS-トランスフェラーゼの役割とその酵素化学的解明

誌名	日本農薬学会誌
ISSN	03851559
著者	本山, 直樹
巻/号	7巻3号
掲載ページ	p. 415-425
発行年月	1982年8月

## 学会賞受賞論文

(奨励賞)

## アジンフォスメチル抵抗性におけるグルタチオン S-トランスフェラーゼの役割とその酵素化学的解明

本山直樹

千葉大学園芸学部環境生物学研究室

## Characterization of Glutathione S-Transferases in Relation to Azinphosmethyl Resistance

Naoki MOTOYAMA

*Laboratory of Environmental Biology, Faculty of Horticulture,  
Chiba University, Matsudo, Chiba 271, Japan*

A field population of the predaceous mite, *Amblyseius fallacis* (Garman), was 300,000 fold resistant to azinphosmethyl. Demethylation of the insecticide by glutathione S-transferase appeared to be the major cause for resistance. Rutgers strain of the housefly was over 1,600 fold resistant to azinphosmethyl comparing to CSMA strain. The major mechanism of the resistance was again attributed to an increased degradation of the compound by glutathione S-transferase. The enzyme catalysed only GS-methyl conjugation. Soluble fraction from Rutgers strain demonstrated higher activities toward all the substrates tested for glutathione-dependent reactions, i.e., azinphosmethyl, diazinon, methyl iodide, and 1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB), than that from CSMA strain. Various chromatographies, interstrain comparisons, and genetic studies all failed to distinguish enzymes responsible for alkyl and aryl conjugations from each other. Glutathione S-transferase was partially purified from both housefly strains using DCNB as the substrate. A protein band extracted from unstained electrophoretic gels was active for methyl iodide and DCNB indicating both conjugations were catalysed by the same enzyme. The partially purified enzyme was active for several organophosphorus (OP) insecticides as well as for  $\gamma$ -BHC, though it was inactive for dehydrochlorination of *p,p'*-DDT. The ratio of *O*-alkyl and aryl conjugations with OP substrates varied depending upon the chemical structure. The enzyme was further purified from another housefly strain to study a possible existence of multiple forms. Results suggested multiple forms of the enzyme obtained upon electrophoresis were not evidence for different enzyme species.

## はじめに

有機リン殺虫剤の解毒分解反応を触媒する酵素の中で、抵抗性の機構に関与するものとして、リン酸トリエステル加水分解酵素（いわゆるフォスファターゼ）とカルボキシエステルラーゼについては古くから研究されている。薬物酸化酵素（mixed function oxidases）についても最近多くの知見が集積されつつある<sup>1)</sup>。本研究はフ

ァラシスカブリダニ *Amblyseius fallacis* (Garman) およびイエバエ *Musca domestica* (L.) におけるアジンフォスメチル抵抗性の機構を研究し、抵抗性の機構に寄与するもう一つの酵素としてグルタチオン S-トランスフェラーゼの役割について明らかにしたものである。多くの有機リン殺虫剤のグルタチオン S-トランスフェラーゼによる分解には *O*-アルキル抱合とアリル抱合の二つの反応が存在するが、本研究で用いたイエバエの抵抗性

系統は感受性系統に比較して両抱合活性とも高かった。そこでイエバエではこれらの反応がおのおの別の酵素によるかあるいは単一の酵素によるものかという疑問が生じ、このことについても検討した。以下は、抵抗性現象の観察に始まり、そのメカニズムの探求、酵素化学的性質の解明へと発展した一連の研究の概要である。

### 抵抗性のメカニズム

#### 1. カブリダニの場合<sup>2-4)</sup>

ファラシスカブリダニはハダニ類の重要天敵であり、アメリカ東部においては優先種である。1969年当時アジンフォスメチルを数年間連用したノース・カロライナ州のリンゴ園では、薬剤散布後もこのカブリダニがリンゴ樹上に多数生息し、ハダニ類を旺盛に捕食しているということが観察された。そこでこのカブリダニを採集して室内に持ち帰り薬剤感受性を検定したところ、アジンフォスメチルに対して異常に高い抵抗性を発達させていることが確認された (Table 1)。害虫よりも一般に抵抗性を発達させにくいと考えられている天敵においてこのように抵抗性が発見されたということは当時珍しいことであり、そのメカニズムを明らかにすることは学問上興味深いだけでなく、天敵の働きを損なわない害虫管理計画を立てるうえでも意味があると考えられた。

まずインゲン葉ディスクに接種したカブリダニにアジンフォスメチルを散布後、経時的にアセチルコリンエステラーゼ活性を測定した。その結果感受性系統ではほとんど100%近く阻害されていたのに対して抵抗性系統の阻害度はわずかであった。そこで両系統のホモジネートを酵素液として、アジンフォスメチルの P=O 体によるアセチルコリンエステラーゼの阻害度を *in vitro* で比較したが、両系統の間に有意な差は見いだされなかった。また、Table 1 にみられるごとく、このカブリダニにはアジンフォスメチルと同じくアセチルコリンエステラー

ゼ阻害剤であるカーバリルに対してはまったく抵抗性が存在しなかった。以上のことから、抵抗性のカブリダニにおいてはアセチルコリンエステラーゼの阻害剤感受性の低下はおこっていないと推定された。*in vivo* においてアジンフォスメチル処理後抵抗性系統のアセチルコリンエステラーゼがあまり阻害されなかったことは、実は抵抗性の原因ではなくむしろ結果であると考えられた。

*in vivo* におけるアジンフォスメチルの分解を比較するために、<sup>14</sup>C-アジンフォスメチルを両系統に散布後、経時的にカブリダニを水で磨砕し、ただちにベンゼン/水で分配し、おのおのの層に含まれる放射能の割合を測定した。その結果、抵抗性系統では感受性系統よりも水溶性代謝物の生成割合が高く、代謝物はシリカゲル *tlc* で分析したところ、おもに脱メチルアジンフォスメチルであることがわかった。*in vitro* における分解については、<sup>32</sup>P-アジンフォスメチルとホモジネートを補酵素の存在下で反応させてしらべたところ、やはり抵抗性系統の分解能は感受性系統よりも高く、その差は還元型グルタチオン (GSH) 添加区で最も大きかった (Table 2)。ホモジネートを細胞分画したところ、この分解活性は100,000×gの上清画分に存在し、GSH依存性であることがわかった。また、*in vitro* における代謝物も、*in vivo* の場合と同様に脱メチルアジンフォスメチルであった。これらの結果は、抵抗性カブリダニにおけるアジンフォスメチルの主要代謝経路がグルタチオン S-トランスフェラーゼによる脱メチル化であることを示唆した。

一般にグルタチオン S-トランスフェラーゼはメチル基に対して基質特性を示し、アルキル基が長くなると活性が著しく低くなることが知られる。そこでグルタチオン S-トランスフェラーゼのアジンフォスメチル抵抗性のメカニズムに果たす役割を評価する一つの方法として、アジンフォスメチルの O-アルキル置換体を合成し抵抗性に対する影響をしらべてみた。その結果、メチル

Table 1 Relative toxicity of technical grade azinphosmethyl, parathion, and carbaryl to 2 strains of adult female *T. fallacis* by contact method.

Compound	Time of mortality reading (hr)	LC <sub>50</sub> (μg/cm <sup>2</sup> )		Resistance factor (R/S)
		Susceptible strain (S)	Resistant strain (R)	
Azinphosmethyl	12	0.127 (0.089-0.176) <sup>a)</sup>	100,688 (366-27×10 <sup>6</sup> ) <sup>a)</sup>	79,287
	24	0.048 (0.031-0.074)	14,134 (12,000-16,600)	294,458
Parathion	12	0.151 (0.122-0.403)	26.2 (16.7-41.0)	173
	24	0.084 (0.061-0.117)	8.7 (3.7-20.1)	103
Carbaryl	12	0.711 (0.22-2.3)	0.723 (0.31-1.7)	1
	24	0.213 (0.11-0.40)	0.217 (0.08-0.61)	1

<sup>a)</sup> 95% CL (μg/cm<sup>2</sup>).

Table 2 The effect of cofactors on the *in vitro* degradation of <sup>32</sup>P-azinthophosmethyl by homogenates of a resistant (R) and a susceptible (S) strain of *N. fallacis*.

Strain	Cofactor	Degradation <sup>a)</sup> (min)		
		30	60	120
S	None	—	—	0
	GSH	—	—	10.8
	NADPH	—	—	9.8
	GSH and NADPH	16.4	17.4	25.0
R	None	—	—	6.0
	GSH	—	—	61.2
	NADPH	—	—	17.2
	GSH and NADPH	55.2	67.4	75.8

<sup>a)</sup> Azinthophosmethyl equivalents  $\mu\text{g}/100\text{ mg mites}$ .

基を他のアルキル基で置換することにより抵抗性は急激に減少した。したがって抵抗性にはメチル基が重要であることがわかり、すなわちグルタチオン S-トランスフェラーゼによる脱メチル化がこのカブリダニにおけるアジンフォスメチル抵抗性の主要メカニズムであると推察された。

## 2. イエバエの場合<sup>5)</sup>

Rutgers 系と呼ばれるイエバエは米国 Rutgers 大学の Forgash ら<sup>6)</sup> によってダイアジノンで淘汰して作られた複合抵抗性系統であり、米国において最も強い系統の一つである。このイエバエはアジンフォスメチルに対しては、感受性の CSMA 系と比較して 1,600 倍以上の抵抗性を示したが、アジンフォスエチルに対してはわずか 25 倍の抵抗性しか示さず、カブリダニの場合と同様にメチル基が抵抗性にとって必須であることを暗示した。

イエバエにおいてもアセチルコリンエステラーゼの阻害剤感受性は変化していないことを確認後、*in vitro* における <sup>14</sup>C-アジンフォスメチルの分解活性についてしらべた。分解活性は主としてミクロゾーム画分と上清画分にあり、おのおの補酵素として NADPH および GSH を要求した (Table 3)。抵抗性系統は両酵素活性とも感受性系統より高かったが、メチル基が抵抗性にとって重要であるという上記殺虫試験の結果から、カブリダニの場合と同じくグルタチオン S-トランスフェラーゼによるアジンフォスメチルの脱メチル化が抵抗性のメカニズムとして主要であろうと推定された。

アジンフォスメチルの *in vitro* における代謝経路は Fig. 1 に示す。カブリダニ、イエバエ、マウス肝<sup>7)</sup> の場合とも共通しているが、グルタチオン S-トランスフェラーゼは脱メチル化反応だけを触媒し、ベンザジミド残基と GSH との抱合反応を示唆するような代謝物は検出されなかった。ダイアジノンやパラチオンのようなチオリン酸エステルに対しては O-アルキル抱合とアリル抱合の両方がおこることが知られているので<sup>8)</sup>、供試したイエバエにはアリル抱合反応を触媒するグルタチオン S-トランスフェラーゼが欠如していたのか、あるいはジチオリン酸エステルであるアジンフォスメチルについてはアリル抱合はおこらないのか、という疑問が生じた。

## アルキル抱合活性とアリル抱合活性

### 1. 数種基質に対する活性<sup>9)</sup>

抵抗性・感受性イエバエのホモジネートの上清画分を酵素液として、アジンフォスメチル、ダイアジノン、1,2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB)、およびヨウ化メチルに対するグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性をしらべたところ、いずれの基質に対しても活性があり、抵抗性系統は感受性系統よりも活性が高かった (Fig.

Table 3 Degradation of <sup>14</sup>C-azinthophosmethyl by subcellular fractions of housefly abdomen homogenates in the presence and absence of cofactors.

Fraction	$\mu\text{g/hr}/12\text{ Abdomens}\pm\text{SD}$			
	None	NADPH	GSH	
Resistant	Nuclei	0.1 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.4
	Mitochondria	0.4 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.5
	Microsomes	1.2 $\pm$ 0.6	7.1 $\pm$ 0.9	1.9 $\pm$ 0.8
	Soluble	2.1 $\pm$ 0.6	2.4 $\pm$ 0.5	17.7 $\pm$ 6.2
Susceptible	Nuclei	0.1 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.3
	Mitochondria	0.7 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.3	0
	Microsomes	1.1 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 1.3	1.0 $\pm$ 0.7
	Soluble	2.0 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.9

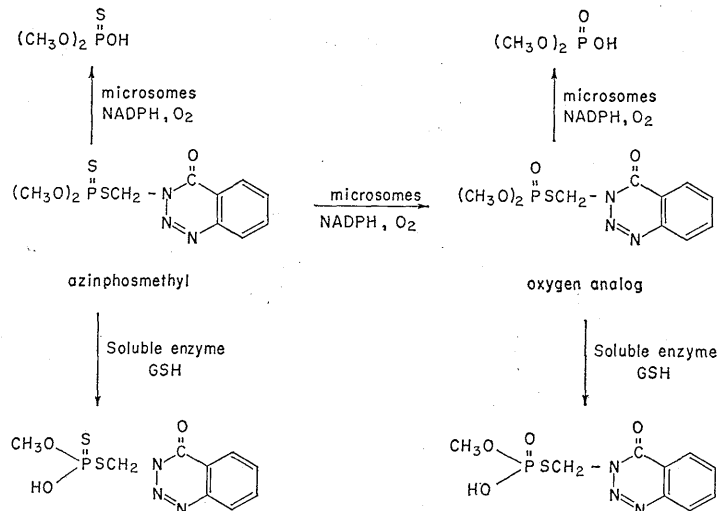


Fig. 1 Proposed metabolic pathway of azinphosmethyl in the housefly.

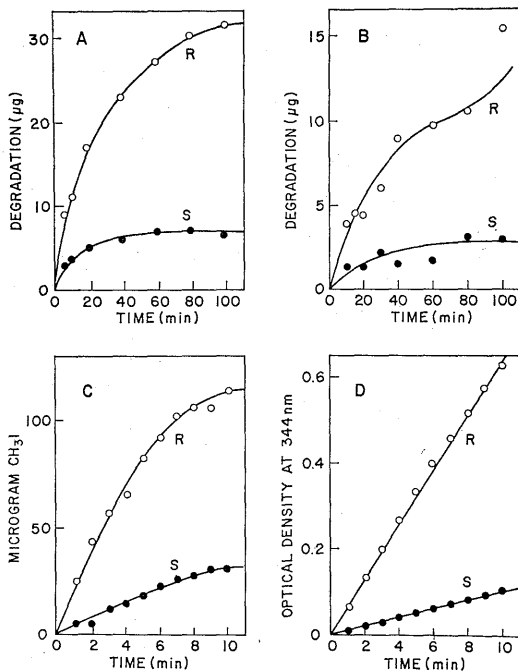


Fig. 2 Glutathione transferase activities in the soluble fractions from resistant (R) and susceptible (S) houseflies.

A: azinphosmethyl, B: diazinon, C: methyl iodide, D: 3,4-dichloronitrobenzene.

A, C, and D: Motoyama and Dauterman (1972),<sup>7)</sup>

B: Motoyama and Dauterman, unpublished data.

2). グルタチオン *S*-アリルトランスフェラーゼの基質と考えられる DCNB に対してこのような結果が得られたということは、イエバエにもアリル抱合活性が存在するにもかかわらず、ジチオリン酸エステルのアジンフォスメチルが基質の場合は、アリル抱合がおこらないということを示した。

抵抗性イエバエでは感受性イエバエよりもアルキル抱合活性・アリル抱合活性とも高かったが、それでは両抱合を触媒しているのはおのおの別の酵素なのか、あるいは一つの酵素なのかという疑問が生じた。上清画分のセファデックス G-100 ゲルカラムクロマトグラフィを行なったところ、上記4種類の基質に対する活性のピークは共通のフラクションから得られた (Fig. 3)。各種イオン交換カラムクロマトグラフィ、吸着カラムクロマトグラフィ、硫酸塩析等においてもアルキル抱合活性とアリル抱合活性のピークを分離することはできなかった。

## 2. 系統間における活性比<sup>10)</sup>

イエバエにおいてはアルキル抱合もアリル抱合も同一の酵素による反応ならば、活性の異なる系統間におけるおのおの抱合活性の比は平行するはずである。そこで抵抗性・感受性5系統の上清画分の各種基質に対する活性を比較した (Table 4)。いずれの基質に対しても活性が最も高かった Rutgers 系の値を 100 として各系統の活性を相対的に表わすと、ヨウ化メチル、DCNB、ダイアジノンの *O*-エチル抱合、および  $\gamma$ -BHC 分解活性はきわめて近似した系統間活性比を示した。しかしダイアジノンのピリミジン抱合と *p,p'*-DDT の脱塩酸反応は上記反応と明らかに系統間活性比が異なった。パラチオ

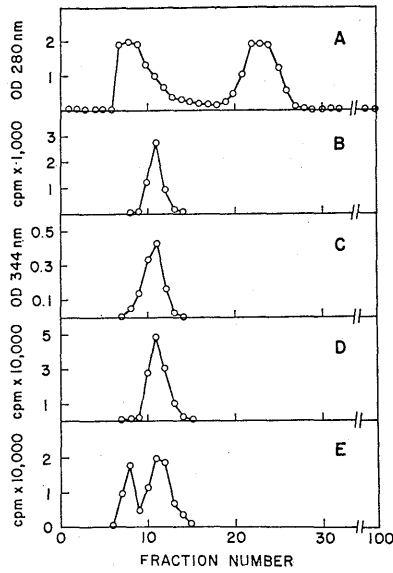


Fig. 3 Sephadex G-100 chromatography of glutathione-dependent soluble enzymes from resistant houseflies.

A: protein level, B: methyl iodide, C: 3,4-dichloronitrobenzene, D: azinphosmethyl, E: diazinon.

A, B, C, and D: Motoyama and Dauterman (1972),<sup>7)</sup> E: Motoyama and Dauterman, unpublished data.

ンが基質の場合は、O-エチル抱合とヨウ化メチル、DCNB 抱合活性とはほぼ一致したが、パラニトロフェニル抱合は一致しなかった。

3. 遺 伝<sup>11)</sup>

Rutgers 系イエバエの♀と、第2, 第3, および第5染色体に遺伝的マーカーを有する sbo 系イエバエの♂を集団で交配し、F<sub>1</sub>の♂を sbo 系の♀と戻し交配すると8種類のフェノタイプが得られる。おのおののフェノタイプを示すイエバエの酵素活性をしらべることによって、アルキル抱合活性・アリル抱合活性を支配する遺伝子がどの染色体に乗っているかがわかる。このような実験の結果、両抱合活性およびγ-BHC分解活性のいずれも第2染色体にある遺伝子によって支配されていることがわかった。次に第2染色体にあるダイアジノン抵抗性の因子を遺伝的交叉(crossing-over)によって一部 sbo 系に導入したところ、その系統は sbo 系に比べて LC<sub>50</sub> 値の増加とともに、アルキル抱合活性、アリル抱合活性も増加した。この系統の抱合活性は個体によって著しく差異があり、ヘテロな個体群であったが、ヨウ化メチルと

Table 4 Interstrain comparison of glutathione-dependent degradation of diazinon, γ-BHC, p,p'-DDT and glutathione S-transferase activities.

Strain	CH <sub>3</sub> I		DCNB		Diazinon		γ-BHC		p,p'-DDT	
	Activity <sup>a)</sup>	Relative (%) rate	Activity <sup>b)</sup>	Relative (%) rate	GS-pyrimidinyl	Desethyl diazinon	Activity <sup>d)</sup>	Relative (%) rate	Activity <sup>e)</sup>	Relative (%) rate
	Activity <sup>c)</sup>	Relative (%) rate	Activity <sup>c)</sup>	Relative (%) rate	Activity <sup>c)</sup>	Relative (%) rate	Activity <sup>c)</sup>	Relative (%) rate	Activity <sup>c)</sup>	Relative (%) rate
Rutgers	31.1±0.4	100	45.2±0.9	100	2.03±0.21	6.65±0.64	100	100	15.4±0.9	100
NAIDM	6.9±0.6	22	11.0±0.2	25	1.23±0.29	1.42±0.49	21	—	—	—
sbo	6.0±0.5	19	9.5±0.5	21	2.19±0.42	1.42±0.21	21	23	0.2±0.2	1
Fc	14.0±0.9	45	20.6±0.7	46	1.97±0.06	3.11±0.25	47	36	9.3±0.9	60
Baygon	15.8±1.1	51	26.1±0.4	58	2.06±0.20	4.18±0.05	63	50	3.9±0.4	25

a) <sup>12</sup> mol GS-methyl/0.6 ♀ flies/5 min.  
 b) <sup>1</sup> OD×100 at 344 nm/0.75 ♀ flies/5 min.  
 c) <sup>12</sup> mol/3.75 ♀ flies/hr.  
 d) <sup>12</sup> mol/0.75 ♀ flies/hr.  
 e) <sup>12</sup> mol DDE/0.75 ♀ flies/hr.

DCNB に対する抱合活性の間には高い相関関係 ( $r=0.9203$ ) がみとめられた。これらの結果から、両抱合活性は同一の遺伝子によって支配されているか、あるいはむしろ同一の酵素による反応である可能性が示唆された。

### 部分精製と性質<sup>12)</sup>

#### 1. 精製

Rutgers 系成虫 95g および CSMA (殺虫剤感受性) 系成虫 112g のホモジネートの 10,000×g 遠心の上澄液を出発材料とし、おのおのからグルタチオン S-トランスフェラーゼを部分精製した (Table 5, 6)。活性は DCNB を基質に用いてモニターした。Rutgers 系の酵素のほうが mg タンパク当り活性度でみても、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) におけるタンパク染色帯でみても、CSMA 系の酵素よりも精製度が少し高かった。ゲルから未染色のバンドを切りとって緩衝液で抽出し、ヨウ化メチルと DCNB に対する活性をしらべたところ、単一のタンパク帯から両基質に対する活性が得られたので、イエバエでは今まで推察してきたとおりアルキル

抱合もアリル抱合も同一の酵素による反応であることが確認された。

#### 2. 性質

精製した酵素の分子量は約 50,000 で (Fig. 4)、マウスヤットの肝の酵素とほぼ同じであった。文献によってグルタチオン S-トランスフェラーゼの分子量に多少違いがみられるので、同一のセファデックスゲルカラムを用いて、イエバエの精製酵素と粗酵素液 (100,000×g 上清)、およびマウス肝の粗酵素液の分子量を比較したところ、いずれも同じ値を示した。したがって昆虫でも動物でもグルタチオン S-トランスフェラーゼの分子量に関しては大きな差がなく、文献値が異なるのは、溶出緩衝液の違いによるゲルカラムのキャリブレーションの誤差に起因するものと考えられた。SDS 電気泳動法でサブユニットの分子量をしらべたところ約 23,000 という値が得られ、これも文献にみられる動物のグルタチオン S-トランスフェラーゼの場合とほぼ同じであった。

精製した酵素の DCNB 活性の至適 pH は 9.5~10.0 のあたりにあり、抵抗性・感受性系統の酵素間に差はなかった (Fig. 5)。ワモンゴキブリの脂肪体から精製され

Table 5 Purification of glutathione S-transferase from the Rutgers strain of housefly.

Procedure	Vol (ml)	Units/ml	Total units	Protein (mg/ml)	Units/mg	Yield (%)	Purification (fold)
1. 10,000 g Sup.	200	0.580	116	42.00	0.014	100	1
2. DEAE-cellulose	136	0.478	65	43.88	0.011	56	0.8
3. AS 40-70% precipitate	11	6.091	67	182.97	0.033	58	2
4. Sephadex G-200	64	0.688	44	5.87	0.117	38	8
5. Hydroxylapatite I	80	0.600	48	0.85	0.706	41	50
6. Hydroxylapatite II	56	0.411	23	0.47	0.874	20	62

Protein concentration was determined at 280 nm. Unit of activity is defined as 1  $\mu$ mol of DCNB conjugated with GSH per min at 25°C. The reaction mixture consisted of 1.5 ml of 8 mM GSH, 20  $\mu$ l of 60 mM DCNB, enzyme solution, and 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 buffer to make a final volume 3.0 ml.

Table 6 Purification of glutathione S-transferase from the CSMA strain of housefly.

Procedure	Vol (ml)	Units/ml	Total units	Protein (mg/ml)	Units/mg	Yield (%)	Purification (fold)
1. 10,000 g Sup.	340	0.079	27	79.47	0.001	100	1
2. DEAE-cellulose	265	0.075	20	43.68	0.002	74	2
3. AS 40-70% precipitate	20	0.600	12	160.91	0.004	44	4
4. Sephadex G-200	73	0.178	13	9.12	0.020	48	20
5. Hydroxylapatite I	72	0.125	9	0.90	0.139	33	139
6. Hydroxylapatite II	55	0.109	6	0.54	0.202	22	202

Protein concentration was determined at 280 nm. Unit of activity is defined as 1  $\mu$ mol of DCNB conjugated with GSH per min at 25°C. The reaction mixture consisted of 1.5 ml of 8 mM GSH, 20  $\mu$ l of 60 mM DCNB, enzyme solution, and 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 buffer to make a final volume 3.0 ml.

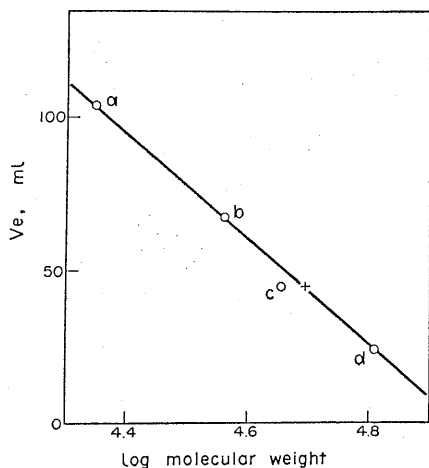


Fig. 4 Molecular weight determination of glutathione S-transferase.

The elution volume from the column of Sephadex G-100 is plotted against the logarithm of the molecular weight of the following standards: cytochrome c (a),  $\beta$ -lactoglobulin (b), ovalbumin (c), haemoglobin (d) and (+) for glutathione S-transferase.

たグルタチオン S-トランスフェラーゼの至適 pH は、分子種 I と V が約 6.5 (基質はダイアジノン), 分子種 II, III, および IV が約 8.5 (基質はメチルパラチオン) と報告されている<sup>13)</sup>. 至適 pH は基質の種類によって影響を受けることが考えられるので、すべての分子種が活性を示す 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) を基質に用いて、ラット肝から精製された計 10 の分子種の至適 pH をしらべたところ、二つのグループに分かれた<sup>14)</sup>. すなわち、I 型分子種は 8 付近に、II 型分子種は 6.5~7.0 の付近に至適 pH があった。したがってイエバエのグルタチオン S-トランスフェラーゼの至適 pH は、ワ

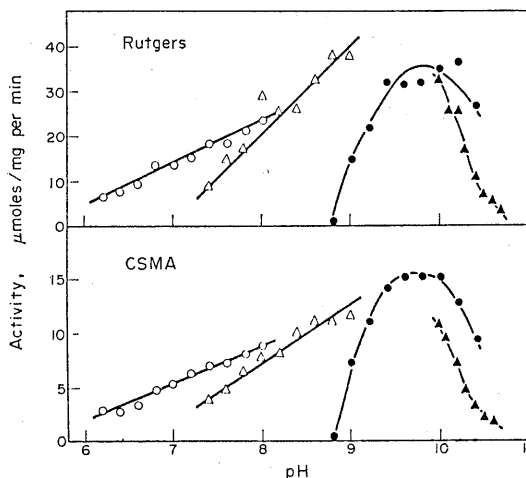


Fig. 5 Effect of pH on the activity of glutathione S-transferase activity from the Rutgers and CSMA strain of housefly. Buffers used were sodium phosphate buffer (○), Tris-HCl buffer (Δ), glycine-NaOH buffer (●), and carbonate-bicarbonate buffer (▲).

モンゴキブリの脂肪体やラット肝の酵素よりも比較的高いところにあるという点で異なった。

殺虫剤基質に対する活性は、殺虫剤の化学構造によって異なり、ダイアジノンとダイアゾクソンの比較から  $P=S$  体の方が  $P=O$  体よりも高く、メチルパラチオンとエチルパラチオンの比較から  $O$ -アルキルはメチルの方がエチルよりも高いことがわかった (Table 7).  $\gamma$ -BHC を分解する GSH 依存性酵素はイエバエの上清画分に存在し、その性質はグルタチオン S-トランスフェラーゼと似ていることが知られていたが<sup>15-17)</sup>、精製した酵素は  $\gamma$ -BHC に対しても高い活性を示したので両方とも同じ酵素であることが明らかになった。同様に、 $p,p'$ -DDT

Table 7 Specific activity of a partially purified glutathione S-transferase against insecticidal substrates.

Substrate	(Concentration)	nmol/min/mg of protein	
		Rutgers	CSMA
Diazinon	(0.084 mM)	17	5
Diazinon	(0.23 mM)	117	48
Diazoxon	(0.23 mM)	77	24
Methyl parathion	(0.25 mM)	482	78
Ethyl parathion	(0.25 mM)	92	5
Malathion	(0.20 mM)	238	99
$\gamma$ -BHC	(0.15 mM)	199	72
$p,p'$ -DDT	(0.25 mM)	0	0



Table 8 The ratio of *O*-alkyl and "leaving group" conjugations of organophosphorus substrates by glutathione *S*-transferase from the Rutgers strain.

Substrate	% Reaction	
	<i>O</i> -alkyl	"Leaving group"
Diazinon	63	37
Diazoxon	0	100
Methyl parathion	100	0
Ethyl parathion	28	72
Malathion	100	0

脱塩酸酵素も GSH 依存性で上清画分に存在するが、精製した酵素はこの殺虫剤に対してはまったく活性を示さなかった。グルタチオン *S*-トランスフェラーゼとは別の酵素であることがわかった。

有機リン殺虫剤が基質の場合、精製した酵素は *O*-アルキル抱合物とアリル抱合物を生成したが、その生成割合は基質によって異なった (Table 8)。すなわち、ダイアジノンでは *O*-エチル抱合 > ピリミジン抱合、エチルパラチオンでは逆に *O*-エチル抱合 < パラニトロフェニル抱合であった。ダイアゾクソンではピリミジン抱合だけなのに対して、メチルパラチオンとマラチオンでは *O*-メチル抱合だけであった。先に述べた系統間活性比あるいは遺伝をしらべた研究では、有機リン殺虫剤の *O*-アルキル抱合とアリル抱合活性は必ずしも平行ではなかった。しかし DCNB を基質に用いて精製した本酵素には両抱合活性があり、この矛盾は、イエバエには DCNB では検出されないグルタチオン *S*-トランスフェラーゼが存在し、有機リン殺虫剤のアリル抱合反応の一部に参与している可能性を暗示している。そのような性質を持った酵素の例として、すでにワモンゴキブリ脂肪体から

精製された分子種 I は、ダイアジノンのピリミジン抱合に特異性を示すが、ヨウ化メチル、DCNB、その他の基質には活性を示さないということが報告されている<sup>19)</sup>。

#### 分子的多様性の問題<sup>18)</sup>

これまで述べてきた研究結果は、イエバエに存在するグルタチオン *S*-トランスフェラーゼの一つは、ヨウ化メチル、DCNB、有機リン殺虫剤の *O*-アルキル抱合とアリル抱合、および  $\gamma$ -BHC の分解にまで活性を有することを示した。しかしイエバエでも、電気泳動、イオン交換カラム、あるいは遺伝的手法によって複数の分子種が分離されるという報告もある<sup>16,19-21)</sup>。そこで再びイエバエのグルタチオン *S*-トランスフェラーゼを精製し、電気泳動で分離する分子種間の関係について検討した。イエバエは Rutgers 系よりさらに活性が高いことが知られる Cornell-R 系 (Cornell 大学において Tripathi and O'Brien<sup>22)</sup> が tetrachlorovinphos で淘汰して作った系統) を用いた。精製の方法は前とほとんど同じであるが、イエバエをホモジナイズする段階で内因性阻害物質によって活性が相当失われることがわかったので<sup>23)</sup>、1% BSA を加えて保護することによって最終的な収率は 48% に上がった。その結果、mg タンパク当り活性度においても前の Rutgers 系に比べて約 10 倍高い酵素標品が得られた。

この酵素をプロモフェノールブルー (BPB) なしで PAGE にかけてると 7 本 (A<sub>1</sub>~A<sub>7</sub>) のタンパク帯に分かれ、その中の 2 本 (A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>) がタンパク染色度においても DCNB 抱合活性においても主要バンドであった (Table 9)。BPB 存在下で PAGE を行なうと 9 本 (B<sub>1</sub>~B<sub>9</sub>) のタンパク帯に分かれ、その中の 5 本 (B<sub>3</sub>~B<sub>7</sub>) がタンパク染色度および DCNB 抱合活性とも強かった (Table 10)。この 5 本は BPB と結合していて、泳動中

Table 9 Separation of glutathione *S*-transferase by polyacrylamide gel electrophoresis in the absence of BPB.

Band number	Relative $\pm$ S.D. mobility ( $n=8$ )	Relative intensity of protein stain	DCNB conjugated <sup>a)</sup> ( $\mu$ mol/min)
A <sub>1</sub>	0.06 $\pm$ 0.02	±	0.190
A <sub>2</sub>	0.16 $\pm$ 0.01	≡	1.018
A <sub>3</sub>	0.31 $\pm$ 0.02	≡≡	2.253
A <sub>4</sub>	0.43 $\pm$ 0.02	+	0.096
A <sub>5</sub>	0.52 $\pm$ 0.02	+	0
A <sub>6</sub>	0.61 $\pm$ 0.02	+	0
A <sub>7</sub>	0.71 $\pm$ 0.02	±	0

<sup>a)</sup> Each band was extracted twice with 0.01 M potassium phosphate, pH 7.4 buffer, containing 30% glycerol, 2 mM GSH, and 0.1 mM EDTA. Recovered 84% of the enzyme activity.

Table 10 Separation of glutathione S-transferase by polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of BPB.

Band number	Relative $\pm$ S.D. mobility ( $n=8$ )	Relative intensity of protein stain	Relative intensity of BPB-bound colour	DCNB conjugated <sup>a)</sup> ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )
B <sub>1</sub>	0.12 $\pm$ 0.02	±		0
B <sub>2</sub>	0.20 $\pm$ 0.01	±		0
B <sub>3</sub>	0.27 $\pm$ 0.01	++	++	0.054
B <sub>4</sub>	0.31 $\pm$ 0.01	+	+	0.119
B <sub>5</sub>	0.36 $\pm$ 0.02	≡	≡	0.176
B <sub>6</sub>	0.39 $\pm$ 0.02	+	+	0.258
B <sub>7</sub>	0.43 $\pm$ 0.02	≡	≡	0.300
B <sub>8</sub>	0.54 $\pm$ 0.03	±		0
B <sub>9</sub>	0.65 $\pm$ 0.03	±		0

a) Each band was extracted once with 0.01 M potassium phosphate, pH 7.4 buffer, containing 30% glycerol, 2 mM GSH, and 0.1 mM EDTA. Recovered 64% of the enzyme activity.

Table 11 Molecular weight determination by SDS gel electrophoresis of glutathione S-transferase and its individual electrophoretic bands.

Bands obtained	Mol wt $\pm$ S.D. ( $n=6$ )	Glutathione S-transferase <sup>a)</sup>	Protein bands applied					
			A <sub>1</sub> <sup>b)</sup>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>
S <sub>1</sub>	9,300 $\pm$ 300	+ <sup>c)</sup>			+			
S <sub>2</sub>	10,900 $\pm$ 400	±						
S <sub>3</sub>	16,600 $\pm$ 500	±						
S <sub>4</sub>	19,200 $\pm$ 700	++		+++	+++			
S <sub>5</sub>	22,700 $\pm$ 800	+++++	+++	+++++	+++++	+++	++	±
S <sub>6</sub>	26,000 $\pm$ 1,400	+++	+++	±		±	±	±
S <sub>7</sub>	34,700 $\pm$ 1,200			+		±		
S <sub>8</sub>	37,000 $\pm$ 600	±				±		
S <sub>9</sub>	40,900 $\pm$ 1,200	±	++	++	+			
S <sub>10</sub>	45,000 $\pm$ 2,100		+	+	+			
S <sub>11</sub>	48,700 $\pm$ 2,400		+	±	+		+	±
S <sub>12</sub>	53,800 $\pm$ 1,900	++	+	++	++	++	+	+
S <sub>13</sub>	57,100 $\pm$ 1,400		±	±	+	++	+	+
S <sub>14</sub>	60,500 $\pm$ 700			±			±	
S <sub>15</sub>	63,300 $\pm$ 700		±	++	+			
S <sub>16</sub>	65,500 $\pm$ 1,600	±		+	+	++	+++	+++
S <sub>17</sub>	70,600 $\pm$ 400	±		±				
S <sub>18</sub>	74,300 $\pm$ 1,200					±	±	±
S <sub>19</sub>	78,000 $\pm$ 1,400			±	±			

a) Estimated from 9 runs.

b) Estimated from 6 runs.

c) The relative intensity of the protein stain is indicated by the number of +'s.

青色のバンドとして明瞭に観察された。しかしこれらのバンドを未染色のゲルから切りとって緩衝液で抽出し再び泳動にかけると、おのおのから元のバンド以外に泳動度が大きいバンドが少しずつ分離してきた。したがって、A<sub>2</sub> と A<sub>3</sub> は別々の酵素ではなくて、A<sub>2</sub> のサブユニットが泳動中に解離して A<sub>3</sub> ができ、B<sub>3</sub>~B<sub>7</sub> の場合は BPB との結合具合によって異なる泳動度を示したもの

と推察された。20~45°C の温度範囲で DCNB 抱合に及ぼす温度の影響をしらべ、いわゆる Arrhenius プロットをすると、精製した酵素と A<sub>2</sub> はほとんど同様な直線を示したのに対して、A<sub>3</sub> は 35°C で折れ曲がった (Fig. 6)。またゲル濾過法で推定した A<sub>3</sub> の分子量は 37,000 であり、先に求めた約 50,000<sup>12)</sup> よりも小さいということも、A<sub>3</sub> は A<sub>2</sub> に由来するという上の推察を支持するものと

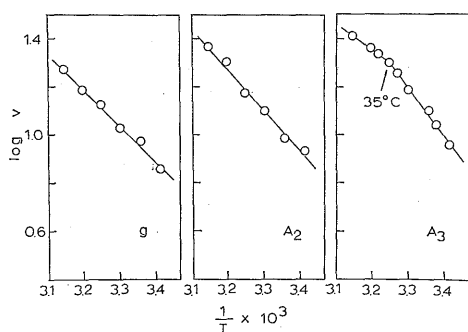


Fig. 6 Arrhenius plot for DCNB conjugation. g: the purified glutathione S-transferase, A<sub>2</sub>: extract of the A<sub>2</sub> band, A<sub>3</sub>: extract of the A<sub>3</sub> band.

考えられる。SDS-PAGE においては A<sub>1</sub>~A<sub>6</sub> いずれから S<sub>9</sub> (分子量 22,700) という共通した主要サブユニットのほかに、分子量の異なる多くのバンドが検出されたが、これらはサブユニットの解離や解合によってできたものと推察された (Table 11)。したがってイエバエでは DCNB を基質に検出されるグルタチオン S-トランスフェラーゼは 1 種だけであり、電気泳動その他によって複数に分離することがあるのは人為的な影響にあるものと結論された。

### おわりに

グルタチオン S-トランスフェラーゼは Shishido and Fukami<sup>24)</sup> により、メチルパラチオンやフェニトロチオンの動物と昆虫という生物種間における選択毒性のメカニズムに主要な役割を果たすことが明らかにされた。本研究ではさらにカブリダニやイエバエにおいては抵抗性という同一種内における差異をもたらす主要因でもあるということが明らかになったわけである。薬物酸化酵素 (MFO) と同様に本酵素にも、各種生物に広く分布している、基質になる化合物の範囲が広い、分子的多様性が存在する、などの特徴がある。DCNB を基質に用いて精製されたイエバエの酵素は、有機リン殺虫剤の O-アルキル抱合とアリル抱合、 $\gamma$ -BHC 分解反応にも活性を有した。しかし、このほかにも、有機リン殺虫剤のアリル抱合に活性を有するが、DCNB では検出されないグルタチオン S-トランスフェラーゼの存在も暗示された。このような本酵素の分子種と基質特異性の関係、ならびにその生物学的意味の解明は今後の興味ある研究課題である。

本研究は著者が 1969 年から 1978 年にかけて米国ノース・カロライナ州立大学に留学中に行なったものである。その間終始ご指導くださった恩師でありまた親しき友でもある W. C. Dauterman 教授に深く感謝する。

### 引用文献

- 1) F. J. Oppenoorth & W. Welling: "Insecticide Biochemistry and Physiology," ed. by C. F. Wilkinson, Plenum Press, New York and London, p. 507, 1976
- 2) N. Motoyama, G. C. Rock & W. C. Dauterman: *J. Econ. Entomol.* **63**, 1439 (1970)
- 3) N. Motoyama, G. C. Rock & W. C. Dauterman: *Pestic. Biochem. Physiol.* **1**, 205 (1971)
- 4) N. Motoyama, W. C. Dauterman & G. C. Rock: *J. Econ. Entomol.* **70**, 475 (1977)
- 5) N. Motoyama & W. C. Dauterman: *Pestic. Biochem. Physiol.* **2**, 113 (1972)
- 6) A. J. Forghash, B. J. Cook & R. C. Riley: *J. Econ. Entomol.* **55**, 544 (1962)
- 7) N. Motoyama & W. C. Dauterman: *Pestic. Biochem. Physiol.* **2**, 170 (1972)
- 8) N. Motoyama & W. C. Dauterman: "Reviews in Biochemical Toxicology," ed. by E. Hodgson, J. R. Bend & R. M. Philpot, Vol. 2, Elsevier North-Holland, New York, p. 49, 1980
- 9) N. Motoyama & W. C. Dauterman: *J. Agric. Food Chem.* **22**, 350 (1974)
- 10) N. Motoyama & W. C. Dauterman: *Pestic. Biochem. Physiol.* **5**, 489 (1975)
- 11) N. Motoyama & W. C. Dauterman: *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**, 443 (1977)
- 12) N. Motoyama & W. C. Dauterman: *Insect Biochem.* **7**, 361 (1977)
- 13) K. Usui, J. Fukami & T. Shishido: *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**, 249 (1977)
- 14) N. Motoyama & W. C. Dauterman: *J. Agric. Food Chem.* **26**, 1296 (1978)
- 15) M. Ishida & P. A. Dahm: *J. Econ. Entomol.* **58**, 383 (1965a)
- 16) M. Ishida & P. A. Dahm: *J. Econ. Entomol.* **58**, 605 (1965b)
- 17) M. Ishida: *Agric. Biol. Chem.* **32**, 947 (1968)
- 18) N. Motoyama & W. C. Dauterman: *Insect Biochem.* **8**, 337 (1978)
- 19) H. Ohkawa, R. Ohkawa, I. Yamamoto & J. E. Casida: *Pestic. Biochem. Physiol.* **2**, 95 (1972)
- 20) A. G. Clark, J. N. Smith & T. W. Speir: *Biochem. J.* **135**, 385 (1973)
- 21) F. J. Oppenoorth, H. R. Smitsaert, W. Welling, L. J. T. van der Pas & K. J. Hitman: *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**, 34 (1977)

- 22) R. K. Tripathi & R. D. O'Brien: *Pestic. Biochem. Physiol.* **3**, 495 (1973)
- 23) N. Motoyama, A. P. Kulkarni, E. Hodgson & W. C. Dauterman: *Pestic. Biochem. Physiol.* **9**, 255 (1978)
- 24) T. Shishido & J. Fukami: *Botyu-Kagaku* **28**, 69 (1963)

略歴

本山直樹

生年月日: 1942年6月26日

最終学歴: 名古屋大学大学院農学研究科修士課程  
修了

趣 味: 空手道, フィッシング (目標は10ポンドクラスの Bass をつること)