

カンザワハダニとナミハダニのアセチルコリンエステラーゼの 2,3の性質

誌名	日本応用動物昆虫学会誌
ISSN	00214914
巻/号	274
掲載ページ	p. 310-312
発行年月	1983年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



を求めるとき、葉端まで行き、方向転換のときに小さくなった場合の速度は除いてある。

第1表にみるように、歩行速度は温度と有意の関係にあった。まず、両世代の雌雄間の回帰係数の差をみると、第1世代では有意差はみられたが、第2世代では雌の回帰係数が大であったものの、有意差はみられなかった。これには、29°C 付近以上から雌には小さな歩行速度がみられ、回帰係数が小さくなっていることが関係している。この原因としては高温抑制ばかりでなく、高温の出現時が歩行虫の定着間際でもあるためと思われる。とはいっても、雌雄別の回帰係数、回帰定数ともに第1, 2世代間では有意差はみられず、それぞれ一つの回帰式にまとめることができた。このまとめた回帰係数は雌雄間で5%水準で有意差がみられ、雌雄で温度に対する反応の差が明らかとなった。

ヤノネカイガラムシ幼虫の行動をみると、周知のように、雌は母虫の寄生葉から他葉へ移動することはほとんどなく、雌は逆に母虫の寄生葉に留まることが少ない。したがって樹内の分散、移動をみるには雌の歩行のみを考えればよい。第1, 2世代の活動時刻の平均気温 19 および 27°C から求めると、それぞれの平均歩行速度は 5.5 および 10.0 mm/min となり、その平均到達距離は 48 および 88 cm と推定された。

この歩行速度について野口 (1928, 1931) は幼虫を方眼紙上で歩行させ、その雌雄には触れていないが、6月中旬で 9 mm/min、6月末で 14 mm/min と、著者よりやや大きい値を得ている。また、アカマルカイガラムシについて、酒井 (1940) は介殻下の幼虫を用い、16°C と 25°C で定着するまでの距離と時間を

測定して 16°C で 25 分間に 6.4 cm、平均 2.6 mm/min、25°C では 42 分間に 18 cm、平均 4.3 mm/min の値を得ている。なお、マルカイガラムシではないが、VAYSSIERE (1926)—BODENHEIMER (1951) より引用—はイセリヤカイガラムシ幼虫で 15°C では 2.8 cm/min、25°C では 3.5 cm/min のかなり大きな値を得ている。

著者らはこれとは別に、第2世代幼虫の移動分散をみるために野外のウンシュウミカン成木を用い、その1葉に第1世代の本種を接種し、それからの到達距離を第2世代幼虫についてみたが (未発表)、それによると最長 110 cm、平均 30~50 cm であり、30 cm と 60~70 cm (接種葉と寄生葉との葉柄間の距離) に寄生のピークがみられた。これらとの関係については今後の検討にまわりたい。

引用文献

- BODENHEIMER, F.S. (1951) *Citrus entomology*. The Hague: Uitgeverij Dr. W. Junk, 663 p.
 桑名伊之吉 (1923) 病菌害虫彙報 10: 1—88.
 野口徳三 (1928) 静岡農試臨報 2: 1—59.
 野口徳三 (1931) 静岡農試臨報 11: 1—40.
 奥代重敬・是永龍二・坂神泰輔 (1970) 園試報 B 10: 171—180.
 酒井久馬・春田伝一・池田米男 (1940) 鹿児島農試臨報 1: 1—145.
 WILLARD, J.R. (1973) *Aust. J. Zool.* 21: 217—229.

カンザワハダニとナミハダニの アセチルコリンエステラーゼの2,3の性質

桑原雅彦
農業技術研究所昆虫科

Some Properties of Acetylcholinesterase from the Kanzawa Spider Mite, *Tetranychus kanzawai*, and the Two-Spotted Spider Mite, *T. urticae*. Masahiko KUWAHARA (Division of Entomology, National Institute of Agricultural Sciences, Kannondai, Yatabe, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan). *Jap. J. appl. Ent. Zool.* 27: 310—312 (1983)

有機リン剤抵抗性のカンザワハダニでは薬剤感受性の低下したアセチルコリンエステラーゼ (AChE) が有機リン剤抵抗性に共通した主要な機構であり (KUWAHARA, 1982)、この要因によって抵抗性系統の有機リン剤感受性スペクトルの類似性や有

機リン剤間の交差抵抗が理解された (KUWAHARA, 1982; 桑原ら, 1983)。そしてナミハダニでも薬剤抵抗性系統の有機リン剤感受性スペクトルに類似性が認められることから (桑原ら, 1983)、有機リン剤に対する AChE の薬剤感受性の低下が各系統に共通した機構として関与していることが考えられた。

ハダニの AChE と基質の結合は静電的な化学結合よりも、むしろ物理的な吸着力が重要であることがコリンエステルの N-アルキル部分を置換した各種のエステルに対する活性から推定されている (DAUTERMAN and MEHROTRA, 1963)。すでに各種のアシルコリンおよびアシルチオコリンに対する AChE 活性の変化や AChE の薬剤感受性の系統間の差異から、抵抗性系統のもつ AChE (insensitive AChE) の触媒部位 'esteratic site' における構造的または立体的な変化が指摘されているが (SMISSAERT et al., 1970; ZAHAVI et al., 1971; 桑原, 1982)、結合部位 'anionic site' における性状について、薬剤感受性の異なる系統間で比較した事例はない。そこで AChE の 2, 3 の性質について検討する目的で、遠心分画した酵素液の AChE

第1表 カンザワハダニ (NsPs 系統) とナミハダニ (札幌 PS 系統) の磨砕液の各画分における AChE 活性の分布^{a)}

基 質	系 統	画 分				回収率 ^{a)} (%)
		700 g 沈殿	20,000 g 沈殿	105,000 g 沈殿	105,000 g 上澄	
ACh ^{b)}	NsPs	11.2	42.6	27.6	— ^{d)}	81.4
	札幌 PS	12.1	38.1	29.9	— ^{d)}	80.1
ATCh ^{c)}	NsPs	7.6	47.1	19.7	6.2	80.6
	札幌 PS	13.0	41.8	17.3	8.9	81.0

a) ハダニ磨砕液を 700 g で 10 分, 20,000 g で 30 分, 105,000 g で 60 分間それぞれ遠心分離し, 各画分における AChE 活性を測定した。各画分の酵素活性および回収率は分画前の磨砕液の活性に対する割合 (%) で示した。

b) 酵素濃度: 20 mg ハダニ/1 ml 緩衝液, 基質濃度: 2×10^{-3} M.

c) 酵素濃度: 1.43 mg ハダニ/1 ml 緩衝液, 基質濃度: 1×10^{-3} M.

d) 酵素活性が検出できなかった。

第2表 ナミハダニの dichlorvos 感受性と AChE の薬剤感受性の関係

系 統 ^{a)}	抵抗性比 ^{b)}	AChE の薬剤感受性比 ^{c)}
札幌 PS	1	1
日 農	1	1.2
福島 (飯坂)	26	72
群馬 (太田)	22	79
千葉 (鴨川)	32	88
佐賀 (神崎)	19	66
長崎 (芦辺)	19	59

a) 各系統の略歴, 薬剤感受性は桑原ら (1983) 参照。

b) 札幌 PS 系統の LC₅₀ 値に対する各系統の LC₅₀ 値の比で示した。

c) 各系統の AChE と dichlorvos の 2 分子速度定数 k_i に対する札幌 PS 系統の AChE と dichlorvos の k_i (5.27×10^{-5} l/mol/min) の比で示した。

活性の分布や各種の阻害剤に対する感受性の差異について系統間で比較した。

材 料 と 方 法

カンザワハダニの NsPs, ZoR 系統とナミハダニの札幌 PS, 日農系統および薬剤抵抗性の福島 (飯坂), 群馬 (太田), 千葉 (鴨川), 佐賀 (神崎), 長崎 (芦辺) の各系統を供試した。各系統の由来, 薬剤感受性についてはすでに報告したとおりである (KUWAHARA, 1982; 桑原ら, 1983)。AChE 活性の測定は KUWAHARA (1982) の方法に準じ, アセチルコリン (ACh) を基質とする HESTRIN (1949) の方法とアセチルチオコリン (ATCh) を基質とする ELLMAN et al. (1961) の方法で行った。酵素液の調整は桑原 (1982) の方法に準じ, リン酸緩衝液 (0.067 M, pH 7.0) でハダニを磨砕し, 酵素活性に応じてリン酸緩衝液で希釈して用いた。AChE の阻害実験は KUWAHARA (1982) の方法に準じ, 酵素液に阻害剤を加えて 30°C で 10 分間ブリンキューベートしてから ATCh を加えて 30 分間酵素反応を行わせる前阻害法で行った。阻害剤の dichlorvos は 2% Triton X-100[®] を含んだエタノールに溶解させ, 第四級アンモ

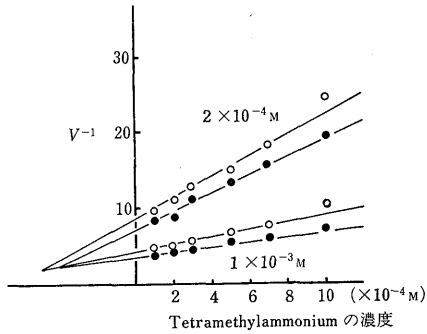
ニウム化合物の tetramethylammonium chloride と phenyltrimethylammonium chloride は脱イオン水に溶解させて用いた。AChE と dichlorvos の 2 分子速度定数 k_i は ALDRIDGE (1950) の方法で求め, 第四級アンモニウム化合物の AChE に対する阻害物質定数 K_i は DIXON (1953) の方法で求めた。

結果および考察

カンザワハダニとナミハダニの磨砕液の各画分における AChE 活性の分布を第 1 表に示した。両種の AChE の活性の分布には差が認められず, 活性の大部分が 105,000 g 以下の沈澱画分に認められることから, 両種の AChE は膜付着酵素であると判断された。また, HESTRIN 法では 105,000 g 上澄画分に酵素活性が検出されなかったが, これは ELLMAN 法に比べて酵素濃度をかなり高くしなければならぬことから, 活性の検出感度が低いことが一因ではないかと思われる。

ナミハダニの dichlorvos 抵抗性と AChE の dichlorvos 感受性の関係を第 2 表に示した。感受性系統に対する抵抗性比 (X) と AChE の感受性比 (Y) の間には $Y = 1.431 + 2.969 X$ ($r^2 = 0.955$) の関係が認められ, 両者の間には高い相関が認められた。したがって, 各系統の dichlorvos 抵抗性は AChE の薬剤感受性の低下という共通した要因が関与していると判断され, 本種の有機リン剤間の交差抵抗性や薬剤感受性スペクトルの系統間の類似性もこうした要因によって支配されていると考えられた。

第四級アンモニウム化合物による AChE 活性の阻害を DIXON (1953) の方法で検討した結果を第 1 図と第 2 図に示した。また, この方法で得られた阻害物質定数 K_i を第 3 表にまとめて示した。第 1 図と第 2 図から明らかなように, ATCh と両アンモニウム化合物は拮抗阻害の関係にあり, AChE の阻害力はいずれの系統でも phenyltrimethylammonium のほうが tetramethylammonium よりも高かったが, AChE 活性の阻害度は両種の系統間では大差なかった。第四級アンモニウム化合物は AChE の結合部位である 'anionic site' と結合し, 基質と AChE の結合を阻害するといわれる (WILSON, 1952)。した



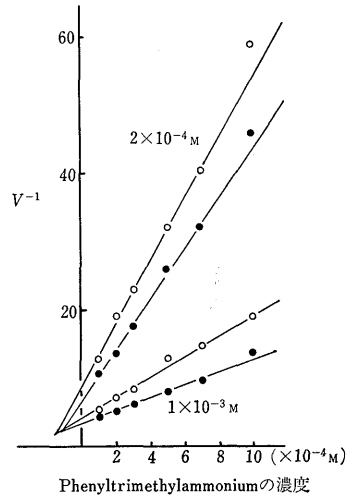
第1図 カンザワハダニのNsPs系統(黒丸)とZoR系統(白丸)のAChE活性に及ぼすtetramethylammoniumの影響を示すDIXONのプロット. 図中の数値は基質の濃度を示す.

第3表 カンザワハダニとナミハダニの各系統のAChE活性に及ぼす第四アンモニウム化合物の影響^{a)}

系 統	阻害物質定数 (K_i)	
	Phenyltrimethylammonium	Tetramethylammonium
<i>T. kanzawai</i>		
NsPs	1.3×10^{-4}	4.1×10^{-4}
ZoR	1.6×10^{-4}	5.0×10^{-4}
<i>T. urticae</i>		
札幌 PS	1.7×10^{-4}	5.4×10^{-4}
千葉(鴨川)	2.2×10^{-4}	5.8×10^{-4}
長崎(芦辺)	2.2×10^{-4}	6.1×10^{-4}

^{a)} AChE活性はATChを基質に ELLMAN et al. (1961)の方法で測定した.

がって、第四級アンモニウム化合物によるAChEの阻害度が両種の系統間で大差なかったことは、抵抗性系統のもつ insensitive AChEの‘anionic site’では変化が起こっていないことを示唆している。この点に関し O'BRIEN (1976)はAChEの結合部位として‘anionic site’以外の部位の存在を指摘しており、insensitive AChEの結合部位についてはさらにいっそうの検討が望まれる。



第2図 カンザワハダニのNsPs系統(黒丸)とZoR系統(白丸)のAChE活性に及ぼすphenyltrimethylammoniumの影響を示すDIXONのプロット. 図中の数値は基質の濃度を示す.

引用文献

ALDRIDGE, W.N. (1950) *Biochem. J.* **46**: 451—460.
 DAUTERMAN, W.C. and K.N. MEHROTRA (1963) *J. Insect Physiol.* **9**: 257—263.
 DIXON, M. (1953) *Biochem. J.* **55**: 170—171.
 ELLMAN, G.L., K.D. COURTNEY, V. ANDRES and R.M. FEATHERSTONE (1961) *Biochem. Pharmacol.* **7**: 88—95.
 HESTRIN, S. (1949) *J. Biol. Chem.* **180**: 249—261.
 桑原雅彦 (1982) *応動昆* **26**: 288—293.
 KUWAHARA, M. (1982) *Appl. Ent. Zool.* **17**: 486—493.
 桑原雅彦・沢田正明・久保田篤男・岩田直記 (1983) *応動昆* **27**: 289—294.
 O'BRIEN, R.D. (1976) *Insecticide biochemistry and physiology*. (C.F. WILKINSON, ed.), New York: Plenum Press, 768 p.
 SMISSAERT, H. R., S. VOERMAN, L. OOSTENBRUGGS and N. RENOY (1970) *J. Agric. Food. Chem.* **18**: 66—75.
 WILSON, I.B. (1952) *J. Biol. Chem.* **197**: 215—225.
 ZAHAVI, M.A., A.S. TAHORI, and F. KLIMER (1971) *Mol. Pharmacol.* **7**: 611—619.