

α - および β -naphthyl acetate を加水分解するミカンハダニの 非特異的エステラーゼの性質¹⁾

刑 部 正 博

果樹試験場安芸津支場

Properties of Non-Specific Esterases of the Citrus Red Mite, *Panonychus citri* (McGREGOR), Which Hydrolyze α - and β -Naphthyl Acetate. Masahiro OSAKABE (Akitsu Branch, Fruit Tree Research Station, Akitsu, Hiroshima 729-24, Japan). *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* 29 : 50-54 (1985)

The zymogram patterns obtained by electrophoresis and the sensitivity to the inhibitor (dichlorvos) of non-specific esterases which hydrolyze α - and β -naphthyl acetate (NA) were studied. The esterases which hydrolyze α - and β -NA showed very similar zymogram patterns by agar-gel electrophoresis. Esterase activity from the non-diapausing strain was slightly higher toward α -NA than β -NA, but that from the diapausing strain was not significantly different between the two substrates. These esterases showed similar values for the bimolecular rate constants (k_i) as well as similar inhibition patterns by dichlorvos.

緒 言

ミカンハダニ *Panonychus citri* (McGREGOR) の非特異的エステラーゼを電気泳動法により分離した場合、全部で 6 本の活性泳動帯 (陽極側より $E_1 \sim E_6$) が検出される (刑部, 1984)。このうち E_1 および E_2 泳動帯が有機リン剤抵抗性に関与している (武久・田中, 1967; 田中ら, 1972) ことや E_3 泳動帯の活性が寄主植物の種類によって変化する (刑部, 1984) ことなどが報告されている。またエステラーゼ zymogram 型の比較により不休眠系統と休眠系統を識別しうる可能性も示されている (刑部, 1984)。

このような非特異的エステラーゼの検出に当たって、一般的に α -または β -naphthyl acetate (NA) が基質として用いられるが、ハダニ類に対してこれら両基質を同時に用いて活性の差異を検討した例は少なく、桑原 (1982) がカンザワハダニ *Tetranychus kanzawai* KISHIDA について報告した以外はあまり見当たらない。そこで著者は今後エステラーゼ活性のハダニの系統間の差異や寄主植物との関係について研究を進める上での基礎資料とするため、 α -NA と β -NA を分解するミカンハダニの非特異的エステラーゼの性質について検討したので、ここにその結果を報告する。

本文に入るに先立ち、エステラーゼ活性の測定法のご

教授と阻害剤のご提供ならびに本稿のご校閲を賜った農業環境技術研究所の桑原雅彦博士、測定機器の取扱いについてご指導くださった当支場の小林省蔵技官ならびにご助言を賜った同井上晃一室長と芦原 亘技官に対し、深謝の意を表する。

供試材料および方法

供試したミカンハダニはそれぞれ神奈川県平塚市、愛媛県松山市、広島県安芸津町、福岡県山川町のカンキツから採集した不休眠系統および鳥取県大栄町のナンから採集した休眠系統の個体群で、採集年月日等についてはすでに報告した (刑部, 1984)。

電気泳動法は刑部 (1984) の方法に準じ、ガラス板 (15×20 cm) 上に 20~25 ml のアガロース緩衝液 (pH 8.04, イオン強度 0.02 μ) を流したものを支持体とし、2 mA/cm で 70~80 分間通電した。各個体群から雌成虫を 12 個体ずつ抽出し、これらを 1 個体ずつ 10 μ l の蒸留水中で磨砕したものを酵素液とした。泳動に際しては、各個体の酵素液をそれぞれ 2 枚のセルロースアセテート膜片 (2×15 mm) に 2~3 μ l ずつ吸着させて支持体に乗せた。またエステラーゼの検出においては 2 枚の膜片のうち一方の基質を α -NA (1% アセトン溶液) とし、もう一方には β -NA を用い、個体ごとに両基質に対する活性泳動帯をナフタニルジアゾブルー B (0.5% 水溶

1) 果樹試験場番号 : E-82.

1984年7月27日受領 (Received July 27, 1984)

液)で検出した。

in vitro におけるエステラーゼ活性の測定法ならびに dichlorvos によるエステラーゼ阻害曲線の検出法はそれぞれ VAN ASPEREN (1962) の方法と KUWAHARA et al. (1982) の方法に準じた。すなわち、エステラーゼ活性の測定においては雌成虫を1個体ずつ 3 ml のリン酸緩衝液 (0.067 M, pH 7.0) 中で磨砕し、酵素液とした。この酵素液 (3 ml) に 10 μ l の基質 (5×10^{-2} M) を加えて、30°C で 20 分間反応させ、0.5 ml の diazoblue laurylsulfate 液 (DBLS) (ナフタニルジアゾブルー B 1% 溶液 : ラウリル硫酸ナトリウム 5% 溶液 = 2 : 5) を加えて発色させ、吸光度を測定した。また、阻害実験ではそれぞれの個体群について雌成虫 50 個体を 100~150 ml のリン酸緩衝液中で磨砕したものを酵素液とし、1 ml の酵素液中に必要に応じて希釈した阻害剤 (dichlorvos) を 10 μ l 加えて 30°C で 10 分間前阻害させた後、基質を加えて 30°C で 20 分間反応させ、DBLS を加えて残存活性を吸光度により測定した。反復回数は個々の個体群について 5~7 回である。吸光度は分光光度計を用いて、

α -NA は 600 nm, β -NA は 550 nm で測定した。エステラーゼの dichlorvos に対する 2 分子速度定数 (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 dichlorvos は 2% の Triton X-100 を含んだエタノール中に溶解させた。

結 果

α -NA および β -NA を基質とした場合のエステラーゼ zymogram 型を Fig.1 に示した。 β -NA を用いた場合の zymogram 型はすでに報告したもの (刑部, 1984) と同様で、不休眠系統ではいずれの個体群も E₃~E₅ の泳動帯を有し、愛媛と福岡産の個体群ではそれぞれ E₂ と E₁ 泳動帯が確認できた。また鳥取産の休眠系統では E₄~E₆ の位置に泳動帯が検出された。 α -NA による zymogram 型もこれと同様で、ミカンハダニのエステラーゼ zymogram 型は不休眠系統および休眠系統のいずれにおいても、 α -NA と β -NA の両基質間で泳動帯の相対的位置に差異は認められなかった。

雌成虫 1 個体当りのエステラーゼ活性を Table 1 に示

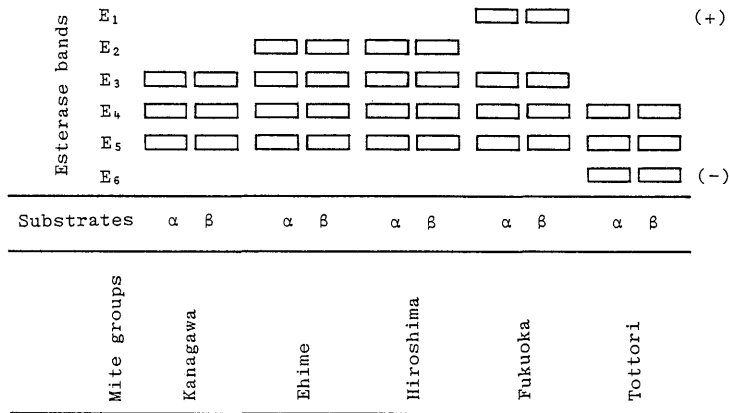


Fig. 1. Zymogram patterns obtained by agar-gel electrophoresis of the esterases which hydrolyze α - and β -naphthyl acetate (NA). Substrates are α : α -NA and β : β -NA. In the mite groups, Tottori is a diapausing strain, and the other groups include non-diapausing strain.

Table 1. Esterase activity toward naphthyl acetate for 20 min at 30°C

Strains	Groups	Esterase activity ^{a)}				Activity ratio (α/β)
		α -NA		β -NA		
		Mean	CV	Mean	CV	
Non-diapausing	Kanagawa	5.01	0.05	3.66	0.28	1.37
	Ehime	8.25	0.27	4.59	0.27	1.79
	Fukuoka	6.96	0.29	4.95	0.22	1.41
Diapausing	Tottori	2.61	0.25	2.46	0.23	1.06

^{a)} CV: coefficient of variation (=standard deviation/mean value). Data include the average of fifty individual females. Activity was expressed as 1×10^{-5} M substrate hydrolyzed/ml/female.

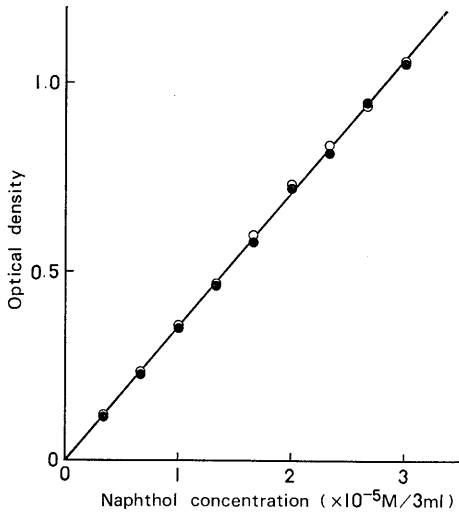


Fig. 2. Calibration lines for α - and β -naphthol. \circ : α -naphthol, \bullet : β -naphthol.

した。エステラーゼ活性は Fig. 2 に示した naphthol 量と吸光度の関係から求めた。これらを不休眠系統の 3 個体群についてみると、 α -NA ではいずれの個体群間でも有意水準 1% で差が認められ、活性の高いものから愛媛、福岡、神奈川産の順であった。また β -NA においても神奈川産の個体群の活性は他の 2 個体群より低く、1% の水準で有意差が認められた。このように神奈川産の個体群の活性が低いのは他の 2 個体群がそれぞれ E_1 , E_2 泳動帯を有するのに対して、神奈川産のものはこのいずれの泳動帯ももたないことによるものかもしれない (Fig. 1)。系統間では α -NA と β -NA のいずれにおいても鳥取産の休眠系統の活性は不休眠系統のいずれの個体群よりも低く、有意水準 1% で差が認められた。次に各

個体群について α -NA と β -NA に対する活性を比較すると、不休眠系統ではいずれの個体群においても 1% の水準で有意差が認められ、 α -NA に対する活性のほうが β -NA に対する活性よりやや高かった。休眠系統では基質間で活性の差異は認められなかった。

愛媛、福岡および鳥取産のミカンハダニについて dichlorvos によるエステラーゼの阻害曲線を Fig. 3 と Fig. 4 に示し、エステラーゼの dichlorvos に対する 2 分子速度定数 (k_i) を Table 2 に示した。Fig. 3 および Fig. 4 を各個体群について見ると、 α -NA と β -NA のいずれを基質とした場合にも dichlorvos によるエステラーゼの阻害様式はきわめて類似しており、どの個体群においても各濃度での阻害程度ならびに縦軸との交点や直線の折れ曲がる位置について、基質間の差異はほとんど見られなかった。次に個体群間では愛媛と福岡産の個体群のパターンが類似しているのに対して、鳥取産の休眠系統ではこれらの不休眠系統に比べて、高濃度の dichlorvos による阻害程度が低く、直線の折れ曲がる位置もやや異なっていた。

直線が縦軸を 100% 以下のところで切ることは、さらに低濃度の dichlorvos によって阻害されるエステラーゼの存在を示唆するものであり、また直線が途中で折れ曲がることは測定範囲内においても dichlorvos に対する感受性の異なったエステラーゼが存在していることを示すものである。これらのことから、両基質の加水分解には dichlorvos に対して異なった感受性を有する複数のエステラーゼが関与していることがうかがえる。

これらの阻害曲線を 99% の信頼区間によって直線部分に分けるとすれば、いずれも 2 本の直線に区別されるが、ここでは個々の実験データに基づき 3 本の直線に分

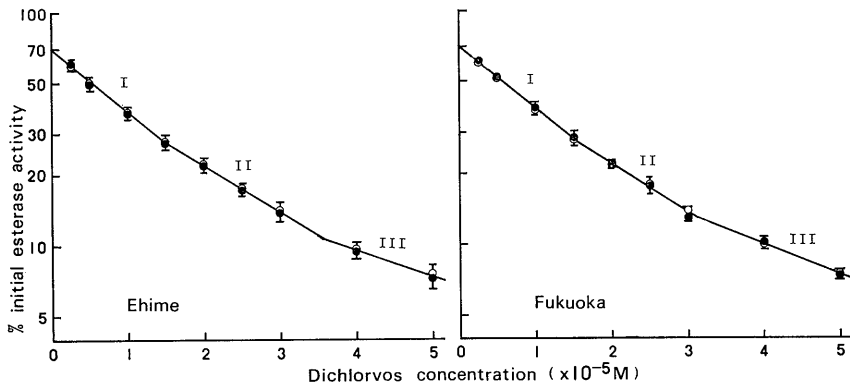


Fig. 3. *In vitro* inhibition of esterase hydrolyzing α - and β -NA in homogenates of groups of Ehime and Fukuoka consisting of non-diaapausing strain. \circ : α -NA, \bullet : β -NA, vertical lines: 99% confidence limit.

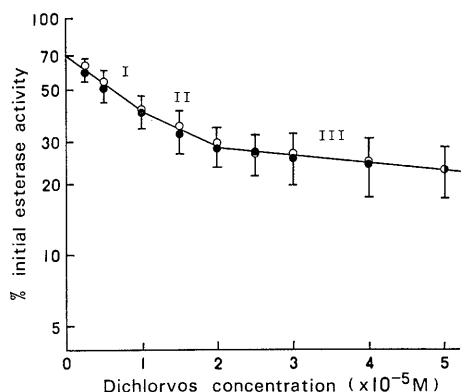


Fig. 4. *In vitro* inhibition of esterase hydrolyzing α - and β -NA in homogenates of the group of Tottori which consists of diapausing strain. ○: α -NA, ●: β -NA, vertical lines: 99% confidence limit.

けるのが適当と考え、それぞれの個体群について直線 I, II, III を定め (Fig. 3, Fig. 4), これらについて k_i を求めた。 k_i について個体群間で比較してみると、阻害様式の場合と同様に愛媛と福岡産の個体群が類似しているのに対して、鳥取産の休眠系統では直線 II の k_i が不休眠系統の直線 III のそれとほぼ同等であった以外はいずれもやや異なった数値を示した。次に α -NA と β -NA について k_i を比較すると、いずれの個体群においても各直線でほぼ近似した数値が得られた。

考 察

カンザワハダニにおける NA の加水分解には電気泳動法において易動度の異なる複数のエステラーゼが関与しており (KUWAHARA et al., 1981), これらのエステラーゼの α -NA と β -NA に対する活性は同一系統ではほとんど差がなく (KUWAHARA et al., 1982), 電気泳動法による zymogram 型, 各種阻害剤による阻害様式とそれに対する k_i および阻害物質定数 (K_i) などが両基質間でほとんど一致している (桑原, 1982) ことが報告され

ている。

ミカンハダニにおいても、電気泳動法における易動度 (武久・田中, 1967; 刑部, 1984; Fig. 1) ならびに dichlorvos に対する感受性 (Fig. 3, Fig. 4) の両面から、複数のエステラーゼが NA の加水分解に関与していることが明らかとなった。また、これらのエステラーゼにおいて α -NA と β -NA のいずれを基質とした場合でも、電気泳動法により分離した泳動帯の相対的位置にはまったく差異が見られない (Fig. 1) ことから、両基質を分解するエステラーゼは非常に類似した、もしくはまったく同一の易動度を有するものと考えられる。さらに dichlorvos による阻害様式についても各個体群において基質間の差異がほとんどなく (Fig. 3, Fig. 4), k_i もかなり近似した数値が示された (Table 2) ことから、両基質を加水分解するエステラーゼは dichlorvos に対してほとんど同じ感受性を有するものと判断される。このように α -NA および β -NA を加水分解するミカンハダニのエステラーゼは、電気泳動法による易動度ならびに dichlorvos に対する感受性が両基質間でよく一致していることから、きわめて類似した理化学的性質を有するものと考えられる。

ミカンハダニ雌成虫の個体別のエステラーゼ活性 (30 °C, 20 分間) は不休眠系統では $3.66 \sim 8.25 \times 10^{-5}$ M/ml で (Table 1), KUWAHARA et al. (1982) がカンザワハダニについて示した活性 ($4.08 \sim 7.80 \times 10^{-5}$ M/ml) にほぼ近い。一方、休眠系統のエステラーゼ活性はこれらに比べてやや低かった。また、カンザワハダニの同一系統では両基質に対する活性がほとんど一致している (KUWAHARA et al., 1982) のに対し、ミカンハダニの不休眠系統では α -NA に対する活性のほうがやや高く、基質特異性の点で両種のエステラーゼに若干の相違があるものと思われた。なお、休眠系統では両基質に対する活性はほぼ等しく、特異性の低いことが示された。

また電気泳動法による zymogram 型において、鳥取

Table 2. Bimolecular rate constants (k_i) for dichlorvos for the *in vitro* inhibition of esterase

Strains	Groups	Substrates	k_i ($\times 10^3$ l · mol ⁻¹ · min ⁻¹)		
			Line ^{a)} I	II	III
Non-diapausing	Ehime	α -NA	2.79	2.29	1.50
		β -NA	2.91	2.31	1.61
	Fukuoka	α -NA	2.86	2.26	1.70
		β -NA	2.81	2.51	1.78
Diapausing	Tottori	α -NA	2.60	1.61	0.46
		β -NA	2.37	1.75	0.40

a) See Figs. 3 and 4.

産および岡山県岡山市産の休眠系統が他の不休眠系統の個体群と明瞭な差異を有することはすでに報告したが(刑部, 1984), 今回の実験で鳥取産休眠系統のミカンハダニは NA に対するエステラーゼ活性が不休眠系統の個体群より低く (Table 1), さらに dichlorvos に対するエステラーゼの感受性も異なる (Fig. 4, Table 2) ことが示された。不休眠系統ではエステラーゼ活性がカンキツ寄生の個体群とナン寄生の個体群とでは違いが見られ, ナン寄生の個体群ではとくに E₃ 泳動帯の活性が低下していることが知られており (刑部, 1984), 寄主植物とエステラーゼ活性との関係についてはさらに詳しい検討が必要と思われる。一方, dichlorvos によるエステラーゼの阻害様式において系統間の差異が見られたことは, zymogram 型の相違とともに, NA を加水分解する両系統のエステラーゼの間に明らかに異なった性質をもつ酵素が含まれていることを強く示唆するものであり, 休眠性の異なる両系統のミカンハダニの生理学的性質を比較する上でたいへん興味深い。

摘 要

α - および β -naphthyl acetate (NA) を加水分解するミカンハダニの非特異的エステラーゼについて, 電気泳動法や阻害剤を用いて理化学的性質を検討した。

1) α - および β -NA を基質としたときの非特異的エステラーゼのアガロース電気泳動法による zymogram 型は非常に類似していた。

2) NA に対する雌成虫の個体別のエステラーゼ活性 (30°C, 20 分間) は, 不休眠系統では α -NA のほうがやや高かったが, 休眠系統では差異は見られなかった。

3) 両基質を加水分解するエステラーゼに対する dichlorvos の阻害様式および 2 分子速度定数 (k_i) はよく

一致していた。

引用文献

- ALDRIDGE, W.N. (1950) Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl *p*-nitrophenyl thiophosphate (E 605) and analogues. *Biochem. J.* **46**: 451—456.
- 桑原雅彦 (1982) 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. *応動昆* **26**: 288—293.
- KUWAHARA, M., T. MIYATA, T. SAITO and M. ETO (1981) Relationship between high esterase activity and *in vitro* degradation of ¹⁴C-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 the esterase associated with organophosphorus insecticide resistance in the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* KISHIDA (Acarina: Tetranychidae). *Appl. Ent. Zool.* **17**: 82—91.
- 刑部正博 (1984) カンキツおよびナン寄生のミカンハダニのエステラーゼ zymogram 型. *応動昆* **28**: 1—4.
- 武久 喬・田中 学 (1967) 寒天薄層電気泳動法によるミカンハダニ薬剤抵抗性の検定法について. *九病虫研会報* **13**: 126—132.
- 田中 学・井上晃一・喜多奎理 (1972) ミカンハダニの薬剤抵抗性に関する研究. IX. E₁ エステラーゼ活性泳動帯による CMP 剤 (Phenkapton) 抵抗性の検定法に関する遺伝的実証. *園試報* **D7**: 39—44.
- VAN ASPEREN, K. (1962) A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* **8**: 401—416.