

原 著

Studies on the Mechanisms of Resistance in Diazinon Resistant Hokota Strain of Houseflies. III. Diazinon Degradation by Glutathione-S-transferase. Toshio SHONO (Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Agriculture, University of Tokyo) Received March 26, 1974. *Botyu-Kagaku*, 39, 75, 1974. (with English Summary 79)

15. 銚田産 diazinon 抵抗性イエバエの抵抗性の機構に関する研究 III. Glutathione-S-transferase による diazinon の分解 正野俊夫 (東京大学農学部害虫学研究室) 49. 3. 26 受理

Diazinon 抵抗性の銚田系と感受性の NAIDM 系イエバエの磨砕液上清分画による diazinon の分解を、 ^{32}P または ^{14}C で標識した diazinon を用いて調べた。上清分画は、還元型 glutathione の存在下に diazinon を分解するが、分解量は銚田系と NAIDM 系の間に差がみられなかった。上清分画による diazinon の主な代謝物は diethyl phosphorothioic acid と S-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) glutathione であった。上清分画に存在する glutathione-S-transferase による diazinon の分解は銚田系の diazinon 抵抗性の機構としては重要な役割を果たしていないことが確認された。

茨城県銚田町産の diazinon [O, O-diethyl O-(2-isopropyl-4-methyl-pyrimidinyl) phosphorothioate] 抵抗性イエバエ (以下銚田系) の抵抗性機構を調べたところ、銚田系のイエバエは、diazinon の生体内活性化物である diazoxon [O, O-diethyl O-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphate] を体内にほとんど蓄積せず (正野, 1974a)¹⁾、また銚田系では diazoxon を加水分解する phosphatase の活性が高いことが明らかにされた (正野, 1974b)²⁾。

Lewis and Sawicki (1971)³⁾ は diazinon 抵抗性の SKA 系イエバエでは、上清分画に存在し、diazinon, diazoxon を、還元型 glutathione (以下 GSH) の存在下に脱 ethyl 分解する glutathione-S-transferase の活性が高く、これが抵抗性の機構として働いていることを報告している。

本実験では、 ^{32}P または ^{14}C で標識した diazinon を用いて、上清分画に存在する glutathione-S-transferase の活性を、抵抗性の銚田系と感受性の NAIDM 系の間で比較し、あわせて、glutathione-S-transferase の性質を調べるとともに、この酵素の抵抗性機構における役割について検討した。

材料および方法

イエバエ Diazinon 抵抗性の銚田系と感受性の NAIDM 系イエバエを用い、羽化後4~6日の成虫を実験に供した。局所施用法による diazinon の LD_{50} はそれぞれ 4.03, 0.0643 $\mu\text{g}/\text{fly}$ であった。

供試薬剤 ^{32}P -diazinon: The Radiochemical Center (Amersham, Buckinghamshire, England) より購入した。入手時の比放射能は 10mCi/mM であっ

た。Ethyl- ^{14}C -diazinon: 住友原子力工業株式会社より購入した。入手時の比放射能は 0.68mCi/mM であった。Pyrimidine- ^{14}C -diazinon: 理化学研究所深見順一博士より譲り受けた。入手時の比放射能は 1.2mCi/mM であった。S-ethyl-glutathione は英国 Rothamsted Experimental Station の R. W. Sawicki 博士より提供された。S-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) glutathione, *n*-propyl paraoxon, EPN oxide は農業技術研究所穴戸孝博士より提供された。

酵素液 イエバエの成虫を、3倍量の氷冷した 0.25 M のショ糖を含む緩衝液で、homogenizer を用いて磨砕した。緩衝液はリン酸緩衝液 (0.05M, pH 7.4) または所定 pH のトリス緩衝液を用いた。磨砕液はガーゼでろ過した後、500g で5分間遠沈し、核、細胞などを取り除き、10,000g で10分遠沈して、mitochondria を、その上清を 104,000g で1時間遠沈して microsome を得た。Mitochondria, microsome はそれぞれ、緩衝液に懸濁させた。酵素液として、mitochondria 分画, microsome 分画, および 104,000g の上清分画を用いた。

酵素活性の測定 反応液は 30 μg の ^{32}P -diazinon, 10^{-3}M GSH, 酵素液 2.1 ml および蒸留水よりなり、全量は 3.0 ml とした。金属イオンおよび有機リン化合物の影響を調べる際は、これらの化合物と酵素液を、まず10分間 incubate し、その後、GSH と ^{32}P -diazinon を加えて反応を開始した。27°C で120分 incubate した後、反応液を 100°C で1分間加熱して、酵素を失活させ、1 ml の蒸留水と 4 ml の chloroform を加え、よく振とうした。この混合液を遠沈して、水と chloroform を分液し、水層 2 ml を放射能測定用

試料皿に取り、赤外線ランプで乾燥後、GM-counterを用いて、放射能の活性を測定した。水溶性分画の放射能活性をもって、酵素の活性とした。

代謝物の同定 上清分画24ml, GSH 9.2mg, ethyl-1-¹⁴C-または、pyrimidine-2-¹⁴C-diazinon, 300 μg および蒸留水 6 ml からなる反応液を27°Cで120分 incubate した後、100°Cで1分間加熱し、冷却後、20mlのchloroformで未分解のdiazinonを抽出し、水溶性代謝物を含む水溶液を得た。この水溶液を、50°Cの温水浴上で減圧濃縮し、イオン交換 column chromatography の試料とした。

イオン交換 column chromatography: Yang et al. (1971)⁴⁾ が改変した、Plapp and Casida (1958)⁵⁾ の方法に従った。イオン交換樹脂 Dowex 1-X8 (100~200メッシュ)を用い、次の溶出液で溶出した、溶出液 (IV) および (V) は gradient 法による。

- (I) pH 3 HCl 200ml
- (II) pH 2 HCl 200ml
- (III) pH 1 HCl 200ml
- (IV) pH 1 HCl + methanol (1:3) 200ml ~
1 N HCl + methanol (1:3) 200ml
- (V) 1 N HCl + methanol (1:3) 200ml ~
conc. HCl + H₂O + methanol (1:1:6)
200ml

溶出液は10gずつ分画し、各分画から2mlをとり、液体シンチレーションスペクトロメーターで、放射能活性を測定した。

TLC: 厚さ0.25 mmの silica gel G (Merk社製)の薄層を110°Cで1時間活性化し、isopropanol, アンモニア水, 水 (25:2:12)で展開した。放射性代謝物は、radioautographyで、S-ethyl-glutathione, S-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) glutathione はニンヒドリン試薬で検出した。

結 果

イエバエ磨砕液の mitochondria 分画, microsome 分画および上清分画による diazinon の分解を比較すると、上清分画による分解が最も顕著であった (第1表)。上清分画による diazinon の分解量は、抵抗性の銚田系, 感受性の NAIDM 系の間に差は認められ

Table 1. Degradation of ³²P-diazinon in subcellular fractions of housefly homogenates.

Fraction	Diazinon degradation (μg/hr/ml homogenate)	
	HOKOTA	NAIDM
Mitochondria	34.3	0.0
Microsomes	58.7	26.7
Supernatant	180.2	181.6

なかった。銚田系イエバエの mitochondria 分画, microsome 分画では、GSH を添加しても diazinon の分解量は増加しないが、上清分画においては、GSH の添加によって、diazinon の分解量は約3倍に増加した (第2表)。GSH を添加した上清分画による diazinon 分解の time course を第1図に示したが、銚田系と NAIDM 系の間に diazinon 分解量に差が認められず、上清分画に存在する diazinon 分解酵素の活性は両系統間に差がないことが明らかにされた。

Table 2. Effect of reduced glutathione on the degradation of ³²P-diazinon by the enzymes of HOKOTA strain.

Fraction	Diazinon degradation (μg/hr/ml homogenate)	
	None	GSH*
Mitochondria	33.3	34.1
Microsomes	51.1	51.7
Supernatant	175.9	545.9

* Final concentration of GSH was 2×10⁻³M.

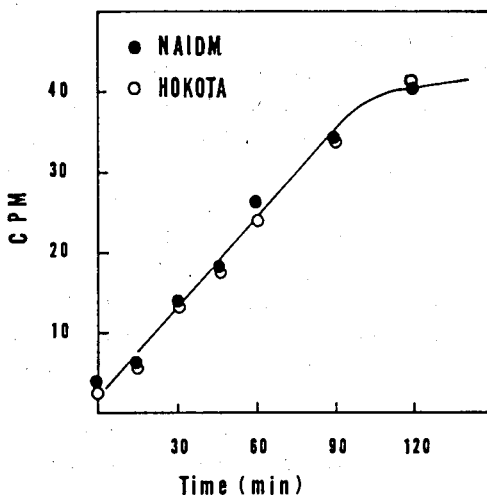


Fig. 1. Degradation of ³²P-diazinon by the supernatant of HOKOTA and NAIDM strain, as a function of time.

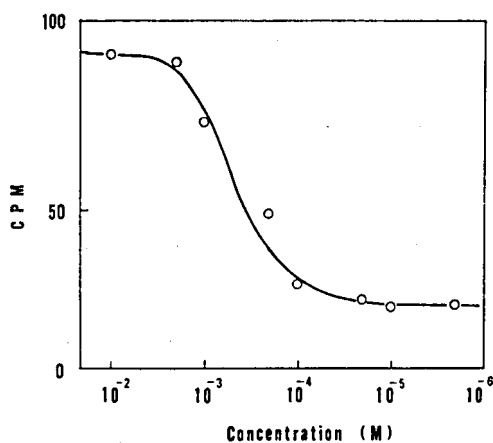
上清分画に存在する diazinon 分解酵素の活性に及ぼす SH 化合物の影響を調べたところ、酵素の活性を増強するのは GSH のみで、酸化型の glutathione, L-cysteine, 2-mercaptoethanol, thioglycolic acid は酵素活性に影響を与えなかった (第3表)。GSH は 10⁻³M 以上の濃度で有効であった (第2図)。

0.25M のショ糖を含んだ pH の異なるトリス緩衝液を用いて、銚田系イエバエを磨砕して、その磨砕液から上清を得た。この pH の異なる上清による diazinon

Table 3. Effect of SH compounds on the degradation of diazinon by the supernatant of HOKOTA strain.

SH compound*	Degradation of diazinon (%)
Glutathione (reduced)	397
Glutathione (oxidized)	101
L-Cysteine	103
2-Mercaptoethanol	87
Thioglycolic acid	93
None	100

* Final concentration of SH compounds was 10^{-3} M.

Fig. 2. Effect of GSH on the degradation of 32 P-diazinon by the supernatant of HOKOTA strain.

の分解を調べたところ、pH 8.5付近で、酵素の活性は最も強かった(第3図)。

銻田系イエバエの上清分画による diazinon の分解におよぼす金属イオンの影響を第4表に示した。EDTA は酵素の活性に影響を与えなかった。Cu⁺、Cu⁺⁺、Hg⁺、Hg⁺⁺ は diazinon 分解酵素を阻害するが、Mn⁺⁺、Co⁺⁺、Mg⁺⁺、Ca⁺⁺、Fe⁺⁺、Fe⁺⁺⁺、Zn⁺⁺ は酵素の活性に影響を与えなかった。また、検索した金属イオンの中には酵素を活性化するのは発見できなかった。Alicerastase の阻害剤である triphenyl phosphate, phosphatase の阻害剤である EPN oxide, *n*-propyl paraoxon は diazinon の分解をまったく阻害しなかった(第5表)。これは、上清分画による diazinon の分解が esterase によるものでないことを示唆している。

Ethyl-1- 14 C-diazinon および pyrimidine-2- 14 C-diazinon をそれぞれ基質として、GSH とともに、銻

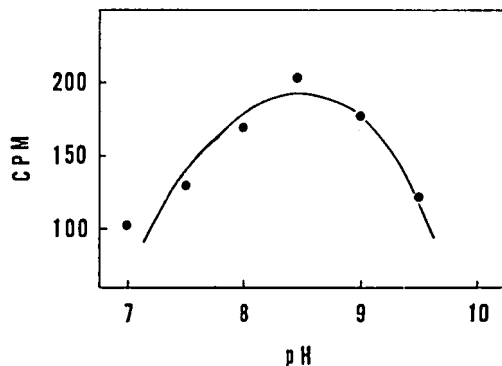


Fig. 3. pH-activity curve for diazinon degrading enzyme of the supernatant of HOKOTA strain.

Table 4. Effect of cations on the degradation of diazinon by the supernatant of HOKOTA strain.

Cation*	Diazinon degradation (%)
Mn ⁺⁺	99
Co ⁺⁺	102
Mg ⁺⁺	97
Cu ⁺	58
Cu ⁺⁺	23
Hg ⁺	58
Hg ⁺⁺	54
Fe ⁺⁺	82
Fe ⁺⁺⁺	93
Ca ⁺⁺	96
Zn ⁺⁺	105
EDTA	96
None	100

* Final concentration of cations and EDTA was 10^{-3} M.

Table 5. Effect of several phosphorus esters on the degradation of diazinon by the supernatant of HOKOTA strain.

Phosphorus ester*	Diazinon degradation(%)
<i>n</i> -Propyl paraoxon	97
EPN oxide	97
Triphenyl phosphate	110
Diazoxon	102
None	100

* Final concentration of phosphorus esters was 10^{-4} M.

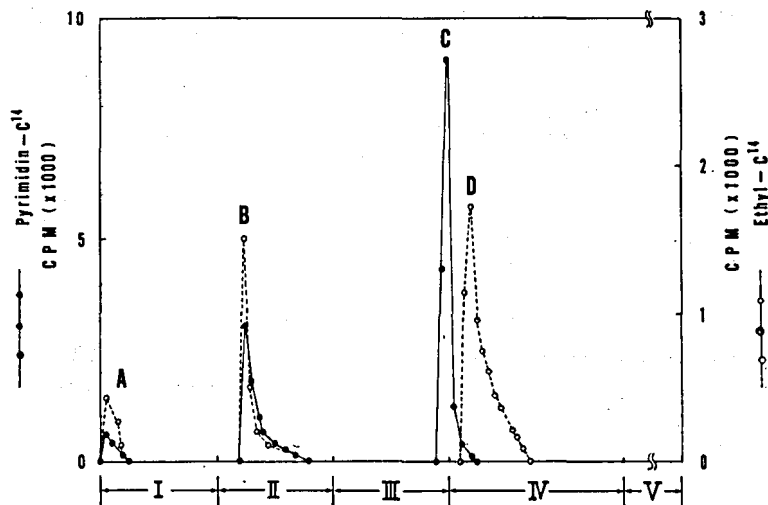


Fig. 4. Ion-exchange column chromatography of water soluble degradation products of ethyl-1-¹⁴C- and pyrimidine-2-¹⁴C-diazinon by the supernatant of HOKOTA strain. The Roman numerals shown on the bottom of the figure are in accordance with those of the solvent system mentioned in the text.

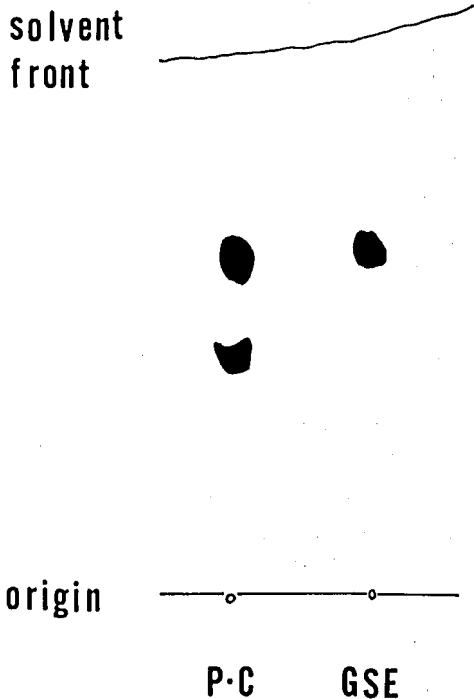


Fig. 5. Autoradiogram showing Peak B (P·B) separated by ionexchange chromatography from the water soluble metabolites of ethyl-¹⁴C-diazinon by the supernatant of HOKOTA strain. The developer for TLC was isopropanol, ammonia and water (25 : 2 : 12). Authentic S-ethyl glutathione (GSE) was detected by the ninhydrin reagent.

田系イエバエの上清分画と incubate し、水溶性の代謝物を得た。そのイオン交換 chromatogram を第4図に示した。それぞれの基質について3個ずつ、計4個のpeak が得られた。Peak C は、S-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) glutathione (以下 GSPy) であることが TLC で確認された。Peak D は diethyl phosphorothioic acid (以下 DEPTA) であることが cochromatography で確認された。Ethyl-1-¹⁴C-diazinon の代謝物から得た peak B を TLC で展開すると、radioautogram から2個の代謝物が検出された(第5図)。そのうち1個は S-ethyl glutathione (以下 GSE) と一致した。他の1個は pyrimidine-2-¹⁴C-diazinon の代謝物 peak B と TLC の Rf が一致したが、その構造を同定するに至らなかった。また、peak A もその構造を同定することができなかった。

Ethyl-1-¹⁴C-diazinon を基質にした場合、鉦田系上清分画による代謝物の64%は DEPTA であり、pyrimidine-2-¹⁴C-diazinon を基質にした場合、62%が GSPy である(第6表)。それゆえ、diazinon は鉦田系の上清分画での GSH の存在下に、主として(1)のように分解されることが明らかになった。

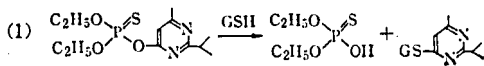


Table 6. Metabolism of ethyl-1-¹⁴C- and pyrimidine-2-¹⁴C-diazinon by the supernatant of HOKOTA strain.

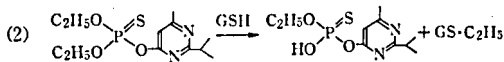
Substrate	Radioactivity recovered from ion-exchange column chromatography as indicated product (%)			
	Peak A	Peak B	Peak C	Peak D
	Unidentified	S-Ethyl glutathione + Desethyl diazinon ?	S-Pyrimidinyl glutathione*	Diethyl thiophosphate
Ethyl-1- ¹⁴ C-diazinon	12.0	23.9	—	64.1
Pyrimidine-2- ¹⁴ C-diazinon	5.6	32.4	62.0	—

* S-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl)-glutathione.

考 察

ラッテ肝臓およびワモンゴキブリ脂肪体の上清分画には、diazinon を (1) に従って、DEPTA と GSPy に分解する glutathione-S-transferase が存在する (Shishido *et al.*, 1972)⁹⁾。Yang *et al.* (1971)¹⁰⁾ は、イエバエの上清分画に、GSH の存在下に diazinon を DEPTA に分解する酵素が存在することを認めているが、この酵素が、ラッテの肝臓やワモンゴキブリの脂肪体と同様に diazinon を DEPTA と GSPy に分解する glutathione-S-transferase であることが、ここで確認された。

Yang *et al.* (1971)¹⁰⁾ はイエバエの上清分画による ethyl-¹⁴C-diazinon の主な代謝物として、DEPTA のほかに、peak B と同じ位置に構造不明の代謝物が存在することを報告し、これが desethyl diazinon [O-ethyl O-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) hydrogen phosphorothioate] である可能性が大きいことを示唆している。一方、Lewis and Sawicki (1971)⁸⁾ は抵抗性の SKA 系イエバエの上清分画では、diazinon は GSH の存在下に (2) のように、desethyl diazinon と GSE に代謝されることを報告している。



銚田系上清分画による diazinon の代謝物のうちで、peak B は2つの代謝物よりなり、一方は GSE であることが確認された。他の構造未確認の代謝物は、ethyl-1-¹⁴C-diazinon, pyrimidine-2-¹⁴C-diazinon, 双方の代謝物として得られることから、ethyl 基と pyrimidine 基を持っていることは明らかである。それゆえ、この代謝物が desethyl diazinon である可能性は大きく、この代謝物を desethyl diazinon であると仮定すると、銚田系の上清には、diazinon を (2) に従って、desethyl diazinon と GSE に分解する

glutathione-S-transferase も存在することが推定される。

イエバエにおける有機リン剤抵抗性の機構として、glutathione-S-transferase が重要な働きをしている例は、aziphosmethyl (Motoyama and Dauterman)¹¹⁾ と diazinon (Lewis and Sawicki)⁸⁾ で知られている。しかし、銚田系の場合、diazinon を分解する glutathione-S-transferase の活性が感受性の NAIDM 系との間に差が認められないことから、glutathione-S-transferase は、抵抗性の機構として、大きな役割を果たしていないことが明らかになった。

謝辞 本研究のご指導を賜った東京大学農学部山崎輝男名譽教授、同松本義明教授、ならびにご助言と各種化合物をご提供くださった理化学研究所深見順一博士、農業技術研究所宍戸孝博士に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 正野俊夫：衛生動物, 24, 249 (1974a).
- 2) 正野俊夫：防虫科学, 39, 54 (1974b).
- 3) Lewis, J. B. and R. M. Sawicki: *Pesticide Biochem. Physiol.*, 1, 275 (1971).
- 4) Yang, R. S., E. Hodgson and W. C. Dauterman: *J. Agr. Food Chem.*, 19, 14 (1971).
- 5) Plapp, F. W., Jr. and J. E. Casida: *Analyt. Chem.*, 11, 1622 (1962).
- 6) Shishido, T., K. Usui, M. Sato and J. Fukami: *Pesticide Biochem. Physiol.*, 2, 51 (1972).
- 7) Motoyama, N. and W. C. Dauterman: *Pesticide Biochem. Physiol.*, 2, 113 (1972).

Summary

Degradation of radioactive diazinon by the supernatant from the homogenates of diazinon-resistant Hokota strain and -susceptible NAIDM

strain of housefly, was studied. The supernatant from the housefly homogenates degraded diazinon efficiently in the presence of reduced glutathione. There was no significant difference between the rates of diazinon degradation by the supernatant of Hokota and NAIDM strain. The main degradation products were identified as diethyl phosphorothioic acid and S-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) glutathione. The optimum pH for diazinon degradation was situated approximately at 8.5. Diazinon degradation by glutathione-S-transferase in the supernatant seems not to play an important role in the resistance mechanism of diazinon-resistant Hokota strain.

phorothioic acid and S-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) glutathione. The optimum pH for diazinon degradation was situated approximately at 8.5. Diazinon degradation by glutathione-S-transferase in the supernatant seems not to play an important role in the resistance mechanism of diazinon-resistant Hokota strain.

Studies on the Mechanism of Resistance in Diazinon Resistant Hokota Strain of Houseflies.

IV. Diazinon Metabolism by Mixed-Function Oxidase. Toshio SHONO (Laboratory of Applied Entomology, Faculty of Agriculture, University of Tokyo) Received April 1, 1974. *Botyukagaku*, 39, 80, 1974. (with English Summary 84)

16. 銚田産 diazinon 抵抗性イエバエの抵抗性の機構に関する研究 IV. Mixed-function oxidase による diazinon の代謝 正野俊夫 (東京大学農学部害虫学研究室) 49. 4. 1 受理

^{14}C で標識した diazinon と diazoxon の microsome による代謝を、diazinon 抵抗性の銚田系と感受性の NAIDM 系のイエバエで調べた。Diazinon は、NADPH の存在下に、microsome の mixed-function oxidase によって diazoxon と diethyl phosphorothioic acid に代謝された。一方、diazoxon は mixed-function oxidase により構造未確認の ether 可溶性の物質に代謝された。Diazinon, diazoxon を代謝する microsome の mixed-function oxidase の活性は、銚田系の方が NAIDM 系より約3倍強く、また、mixed-function oxidase の阻害剤である sesamex が、銚田系のイエバエで、diazinon に共力作用を示すことから、mixed-function oxidase が、銚田系の diazinon 抵抗性の機構として大きな役割を果たしていることが明らかになった。

Diazinon [O, O-diethyl O-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphorothioate] 抵抗性の銚田系イエバエについて、その抵抗性の機構を調べたところ、銚田系のイエバエでは、皮膚の diazinon 透過性が低下し、また、体内における diazoxon [O, O-diethyl O-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphate] の蓄積量が少ないことが明らかにされた(正野, 1974a)¹⁾。更に、銚田系のイエバエでは、diazoxon を分解する phosphatase の活性が高く、これが抵抗性の機構として大きな役割を果たしていることも明らかにされた(正野, 1974b)²⁾。

本実験では、microsome に存在する mixed-function oxidase (以下 mfo) による diazinon, diazoxon の代謝を、抵抗性の銚田系と感受性の銚田系の間で比べ、mfo の diazinon 抵抗性機構において果たす役割について検討した。

材料および方法

イエバエ Diazinon 抵抗性の銚田系と感受性の NAIDM 系イエバエを用い、羽化後4～5日の成虫を実験に供した。

供試薬剤 Ethyl-1- ^{14}C -diazinon, ethyl-1- ^{14}C -diazoxon: 住友原子力工業株式会社より購入した。入手

時の比放射能活性は、それぞれ0.600 mCi/mM, 0.645 mCi/mM であった。Sesamex [2-(3,4-methylenedioxyphenyl)-3,6,9-trioxadecane]: 工業用原体を中外製薬株式会社より譲り受けた。

酵素液 Tsukamoto and Casida (1967)³⁾ によれば、イエバエの頭胸部には mfo の inhibitor が存在するので、実験には腹部のみを用いた。羽化4日後のイエバエ成虫の腹部を切り取り、その2gを10mlの0.25M ショ糖, 0.01 M EDTA を含むリン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.05 M) で、homogenizer を用いて磨砕した。磨砕液をガーゼでろ過した後、10,000gで10分遠沈して、mitochondria を取り除き、その上清を104,000gで1時間遠沈した。得られた沈殿を1.5%の bovin serum albmine fraction V (Armour Pharmaceutical Co.製) を含むリン酸緩衝液 (pH 7.5, 0.05M) に懸濁させ、microsome 分画を得、これを酵素液とした。

酵素活性の測定 50 μg の ^{14}C -diazinon または ^{14}C -diazoxone を 0.1 ml の n-hexane に溶かし、15 ml の三角フラスコに入れ、hexane を蒸発させた後、1 ml の酵素液と、1mM の NADPH を加え、27°C で、フラスコを振とうしながら2時間 incubate した。反応時間終了後、反応液に3 ml の蒸留水を加え、蒸留し