

Cholinesterase Activity and Its Sensitivity to Inhibitors in Resistant and Susceptible Strains of the Green Rice Leafhopper, *Nephotettix cincticeps* Uhler. Hiroshi HAMA (Division of Entomology, National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Kita-ku, Tokyo) Received Dec. 7, 1976. *Botyu-Kagaku*, 42, 82, 1977. (with English Summary 88)

10. 抵抗性および感受性ツマグロヨコバイにおける cholinesterase 活性とその薬剤感受性*
浜 弘司 (農林省農業技術研究所) 51. 12. 7 受理

ツマグロヨコバイにおける ChE 活性とその薬剤感受性の関係は感受性の S, 抵抗性の M, Rmc, N の 4 系統を用いて検討した。ChE 活性は酵素液ならびに基質の違いにかかわらず系統間で最大 5.5 倍の違いが認められたが、いずれの場合も N 系統が最も高く次いで $Rmc \geq M > S$ 系統の順序であった。超遠心分離 (105,000g, 60分) によって調製された soluble fraction と bound fraction の ChE 活性はいずれの系統でも前者は後者の 10% 程度であったが、aliesterase 活性は逆に大半が soluble fraction に存在した。しかし、系統間の ChE 活性比は fraction 間で類似し、さらに propoxur および malaoxon に対する ChE の感受性も fraction 間で著しい違いはなかった。N, Rmc 両系統の ChE は S, M 両系統の ChE より明らかに propoxur および malaoxon に対する感受性が低かったが、それと ChE 活性との関係は明瞭でなかった。Malaoxon による ChE 阻害実験の結果から供試系統の酵素はいずれも均一性が高いことが示唆された。

は じ め に

カーバメート系殺虫剤抵抗性ツマグロヨコバイで発見された薬剤に対し感受性の低い cholinesterase (ChE) は本種のカーバメート剤抵抗性の主因子であると同時に malathion や fenitrothion など一部の有機リン剤抵抗性にも関与していることが酵素ならびに遺伝学的に解明された¹⁻⁴⁾。さらに著者⁵⁾は抵抗性系統の低感受性の ChE と感受性系統の ChE がカラムクロマトグラフィーでそれぞれ単一ピークを示すことおよび両酵素がゲルクロマトグラフィーでは区別されないがイオン交換クロマトグラフィーで互に分離されることをみだし、低感受性の ChE を modified ChE, 高感受性の方を normal ChE と称した。

このようにツマグロヨコバイの ChE には質的に異なる少なくとも 2 型の存在が確認された。また、浜・岩田¹⁻³⁾は本種の ChE 活性が個体群間で異なることを認めたが、ChE 活性とその薬剤感受性の低下との関連は低いものと結論した。しかし、小島ら⁶⁾は本種の ChE 活性が抵抗性系統で顕著に高いことを指摘し、抵抗性との関連を示唆した。

著者は主に両者の結論の矛盾を明らかにするため、ツマグロヨコバイの ChE 活性およびその薬剤感受性について 4 系統を用い詳しい検討を行なった。

本文に入るに先だち、日頃ご指導を賜わり、また本論文のご校閲をいただいた岩田俊一博士に厚くお礼申し上げます。

材 料 と 方 法

供試虫：既報^{1,7,8)}の 4 系統のツマグロヨコバイを用いた。それらの系統の由来と特徴は Table 1 に示すとおりで、S は感受性系統、M は有機リン剤抵抗性系統、Rmc はカーバメート剤抵抗性系統、N は有機リン剤とカーバメート剤の双方に抵抗性の系統である。なお Rmc 系統は、S と N 系統の交雑 F_1 を S へ戻し交配させその子世代をカーバメート剤で選抜処理するという操作を繰り返すことにより、N のカーバメート剤抵抗性の主因子を S へ導入、育成した系統である^{4,8)}。本実験中の検定では N 系統の propoxur に対する抵抗性レベルは採集後累代飼育当初の値に比べて幾分低下していた。また、Rmc と N 系統は薬剤に低感受性の modified ChE をもつことが確認されている^{1,4,9)}。実験にはいずれも羽化後 4~9 日の成虫を用いた。

供試薬剤：ChE の薬剤感受性の検定には再結晶あるいは薄層クロマトグラフィーで精製した propoxur と malaoxon を用いた。

酵素液の調製：頭部摩砕液—雌成虫の頭部を蒸留水 (15 雌の頭部/ml) で摩砕し、遠心分離 (700g, 10分) にかけてその上清を酵素液とした。Bound fraction と soluble fraction—両 fraction の調製は既報^{5,9)}に準じ、雌成虫あるいは雌雄成虫を 10 倍量の蒸留水で摩砕し、その液を低速の遠心分離 (700g, 10分) にかけてその上清をさらに超遠心分離 (105,000g, 60分) し、

* 本報告の概要は昭和 50 年度日本応用動物昆虫学会大会で講演した。

Table 1. Characteristics of the four strains tested

Strain	LD ₅₀ (μ g/g) ^{a)}		Sensitivity of ChE to propoxur
	malathion	propoxur	
S (susceptible) ^{b)}	0.57	2.6	high sensitive
M (organophosphate-resistant) ^{c)}	220	7.9	high sensitive
Rmc (carbamate-resistant) ^{d)}	5.5 ^{e)}	450	low sensitive
N (organophosphate- and carbamate-resistant) ^{f)}	330	440 (256) ^{g)}	low sensitive

a) Values from references 1), 4) and 7).

b) Population collected at Sendai, Miyagi Pref.

c) Population collected at Doi, Ehime Pref. and selected with malathion in this laboratory.

d) Population derived from S and N strains by a technique of repeated backcrossing of their hybrids to S strain under selection pressure of a carbamate insecticide.

e) Value is not accurate as its dosage-mortality relationship was not linear.

f) Population collected at Nakagawara, Ehime Pref.

g) Value in parenthesis was obtained during the course of this study.

その上清を soluble fraction, 沈澱部を bound fraction と称し, 後者は適当量の蒸留水にけん濁させて使用した。

タンパクの定量: 酵素液のタンパク量の測定は bovine serum albumin を標準物質とし Lowry-Folin 法によった。

ChE および AliE 活性の測定: ChE 活性の測定は既報^{1,6)}に準じ acetylcholine (ACh) を基質にした Hestrin 法と acetylthiocholine (ATCh) を基質にした Ellman 法によった。非特異的な aliesterase (AliE) 活性の測定は既報⁷⁾に準じ methyl-*n*-butyrate を基質に Hestrin 法によった。ただし, いずれの反応も 30°C 下で行なった。

ChE の薬剤感受性の測定: 既報⁸⁾に準じ Ellman 法により測定した。すなわち, 阻害剤の acetone 希釈液を一定量試験管にとり acetone を揮散させた後, 1/6M リン酸緩衝液 pH7.4 を 4.8ml 加えて阻害剤を溶解させた。次いで酵素液 0.2ml を加え 30°C で10分あるいは15分間反応させ, 基質と DTNB 液各 0.1ml を加え残存活性を測定した。

結 果

ChE および AliE 活性: ツマグロヨコバイ頭部摩擦液の ChE 活性は Table 2 に示すように, いずれの系統も ATCh を基質にした場合の活性は ACh を用いた場合より 2~3 倍高かったが, 系統間の活性比は両基質で類似し N>Rmc>M>S の順序であった。

著者^{8,9)}は本種の ChE 活性は大半が 105,000g; 60 分の超遠心で沈澱し, その上清には 10% 程度の活性が

Table 2. ChE activity in head homogenate of female adults of the four strains.

Strain	nM of the following substrates/min/head	
	ACh	ATCh
S	1.42(1) ^{a)}	4.06(1) ^{a)}
M	2.28(1.6)	5.37(1.3)
Rmc	2.10(1.5)	5.06(1.2)
N	2.75(1.9)	6.29(1.5)

a) Figures in parentheses are ratio of activity to that of S strain.

残存するにすぎないことおよび AliE 活性はそれとは逆に大半が上清部にあることを示した。そこで各系統より bound fraction と soluble fraction を調製しそれらの ChE および AliE 活性を測定した。その結果は Table 3 に示すようにいずれも AliE 活性の大半は soluble fraction に分布し, bound fraction には極めて低い活性しか認められなかった。一方, ChE 活性はいずれの系統も bound fraction で高かったが, 系統間の活性比は両 fraction とともに先の頭部摩擦液の結果と類似した。ChE 活性についてはさらに ATCh の濃度を $8.65 \times 10^{-4} \sim 5.8 \times 10^{-5}$ M の間に 5 点とり測定し Lineweaver-Burk のプロット (Fig. 1) より V_{max} , K_m を算出し Table 4 に示した。Bound fraction の V_{max} はどの系統でも soluble fraction の値より 10 倍程度高く, 系統間の活性比は先の結果と類似した傾向であったが, 系統間の違いが最も顕著であった。ChE の基質に対する親和性を示す

Table 3. ChE and AliE activities in the bound and the soluble fractions from female adults of the four strains.

Fraction ^{a)}	Strain	AliE activity μM of methyl- <i>n</i> - butyrate/10 ♀ equivalent /30min	ChE activity	
			μM of ACh/10 ♀ equivalent/40min	nM of ATCh/ min/mg of protein
Bound fraction	S	0.36(1) ^{b)}	1.65(1) ^{b)}	63.7(1) ^{b)}
	M	0.18(0.5)	1.83(1.1)	84.9(1.3)
	Rmc	0.18(0.5)	1.80(1.1)	66.8(1.0)
	N	0.85(2.4)	2.55(1.5)	148.7(2.3)
Soluble fraction	S	1.98(1)	0.58(1)	22.8(1)
	M	8.55(4.3)	0.58(1.0)	30.3(1.3)
	Rmc	2.37(1.2)	0.73(1.3)	23.8(1.0)
	N	30.61(15.5)	0.86(1.5)	35.9(1.6)

a) Two fractions were prepared by the following method ; whole body homogenate of adults was centrifuged at 700g for 10 min and the supernatant was further centrifuged at 105,000g for 60 min. Supernatant and precipitate thus obtained were referred to as soluble and bound fractions, respectively.

b) Figures in parentheses are ratio of activity to that of S strain.

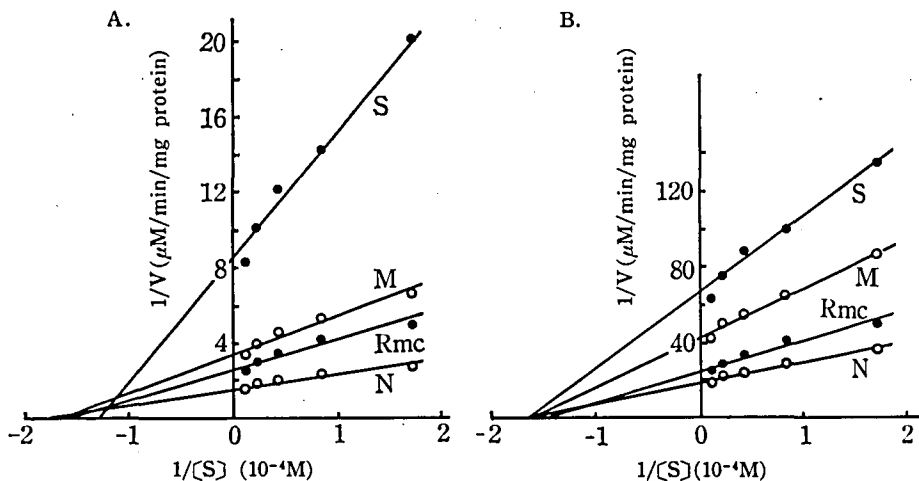


Fig. 1. Lineweaver-Burk plot of ATCh by ChE in the bound (A) and the soluble (B) fractions from female adults of the four strains. Each plot is a mean value from 4 to 6 replicates.

K_m はいずれも 10^{-5}M のオーダーで、系統および fraction 間の違いは明瞭でなかった。

ChE の propoxur および malaoxon に対する感受性：4 系統より調製した bound fraction と soluble fraction における ChE の propoxur および malaoxon に対する感受性を Fig. 2, 3 および Table 4 に示した。Rmc, N 両系統の ChE は, S, M 両系統に比べて明らかに両薬剤に対する感受性が低く、また S と M 系統の間では感受性はほぼ同じ位であったが、N と

Rmc 系統の間では Rmc の方がより感受性が低く、この傾向は特に propoxur に対して著しかった。一方、fraction 間の感受性の違いはどの系統でも比較的小さかった。

著者⁴⁾が前報で ChE の propoxur 感受性を Hestrin 法により測定した結果では N と Rmc 両系統の ChE 感受性は同程度であったが、本実験における Ellman 法による結果では N 系統の propoxur 濃度—ChE 阻害度曲線の傾斜はゆるく、かつ Rmc 系統より感受性はかなり高かった。その原因については必ずしもはっ

Table 4. ChE activity in the bound and the soluble fractions from female adults of the four strains and its sensitivity to inhibitors.

Fraction ^{a)}	Strain	Protein(mg/g) in enzyme source	V_{max} (nM of ATCh /min/mg of protein)	K_m of ATCh (10^{-5} M)	I_{50} (M) ^{b)}	
					propoxur	malaoxon
Bound fraction	S	15.2	113(1) ^c	7.69	2.3×10^{-6}	5.0×10^{-8}
	M	17.0	280(2.5)	6.02	2.3×10^{-6}	4.0×10^{-8}
	Rmc	14.1	379(3.4)	6.58	$>10^{-4}$	4.0×10^{-7}
	N	13.4	626(5.5)	5.44	2.2×10^{-6}	1.7×10^{-7}
Soluble fraction	S	34.4	15(1)	6.02	1.0×10^{-6}	5.0×10^{-8}
	M	40.6	23(1.5)	6.25	1.0×10^{-6}	5.0×10^{-8}
	Rmc	33.5	39(2.6)	6.94	$>10^{-4}$	5.0×10^{-7}
	N	37.5	54(3.6)	6.17	5.0×10^{-6}	3.8×10^{-7}

a) See footnote in Table 3.

b) Pre-incubation with propoxur for 15min, and with malaoxon for 10min at 30°C.

c) Figures in parentheses are ratio of value to that of S strain.

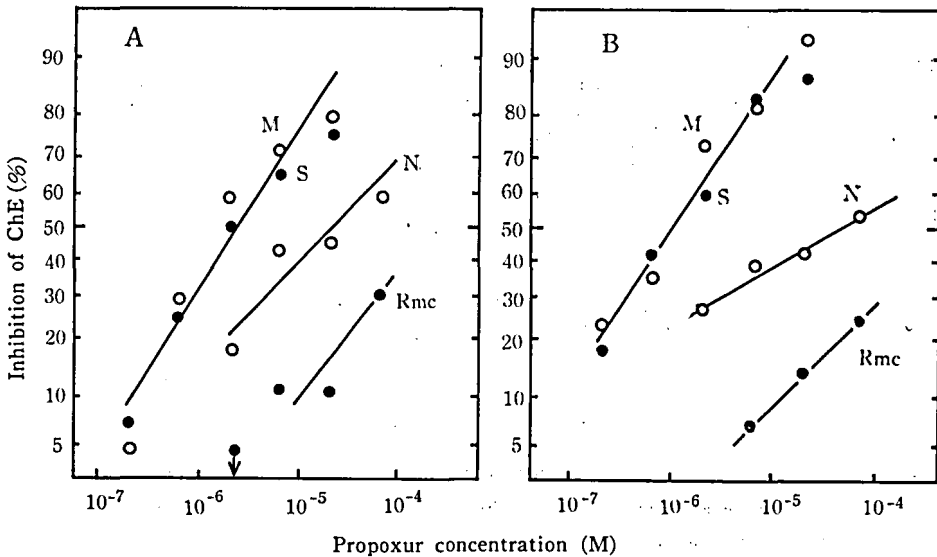


Fig. 2. Sensitivity to propoxur of ChE in the bound (A) and the soluble (B) fractions from female adults of the four strains. Pre-incubation with propoxur for 15min at 30°C.

きりしないが、本実験で供試した N 系統の propoxur に対する抵抗性レベルが前回に比べて 2 倍程度低かったことが影響したものと思われる (Table 1 参照)。

Propoxur の I_{50} は Hama and Iwata¹⁾ が Hestrin 法によって得た値より全体に 1 ケタ程低かった。前回¹⁾の阻害条件が 37°C、30 分に対し、本実験では 30°C、15 分であるにもかかわらず低い値、すなわち ChE の感受性が高かったのは ACh と ATCh の酵素に対する親和性の違いも影響していると思われるが、次の 2 つの要因の影響を無視できない。すなわち、前

回の基質濃度が 2×10^{-4} M ACh に対し本報では 5.8×10^{-4} M ATCh であったこと、酵素と propoxur の反応後基質液の添加による反応液の希釈率が前回の 2 倍に対し僅か 1.04 倍であったことである。カーバメート系化合物による ChE の阻害様式は有機リン系化合物に比べて不安定であって、基質やその濃度の違いあるいは反応液の希釈率が ChE の阻害度に大きく影響することが知られている。しかしながら、ChE の薬剤感受性における系統間の違いは前回の値と近似したものであった。

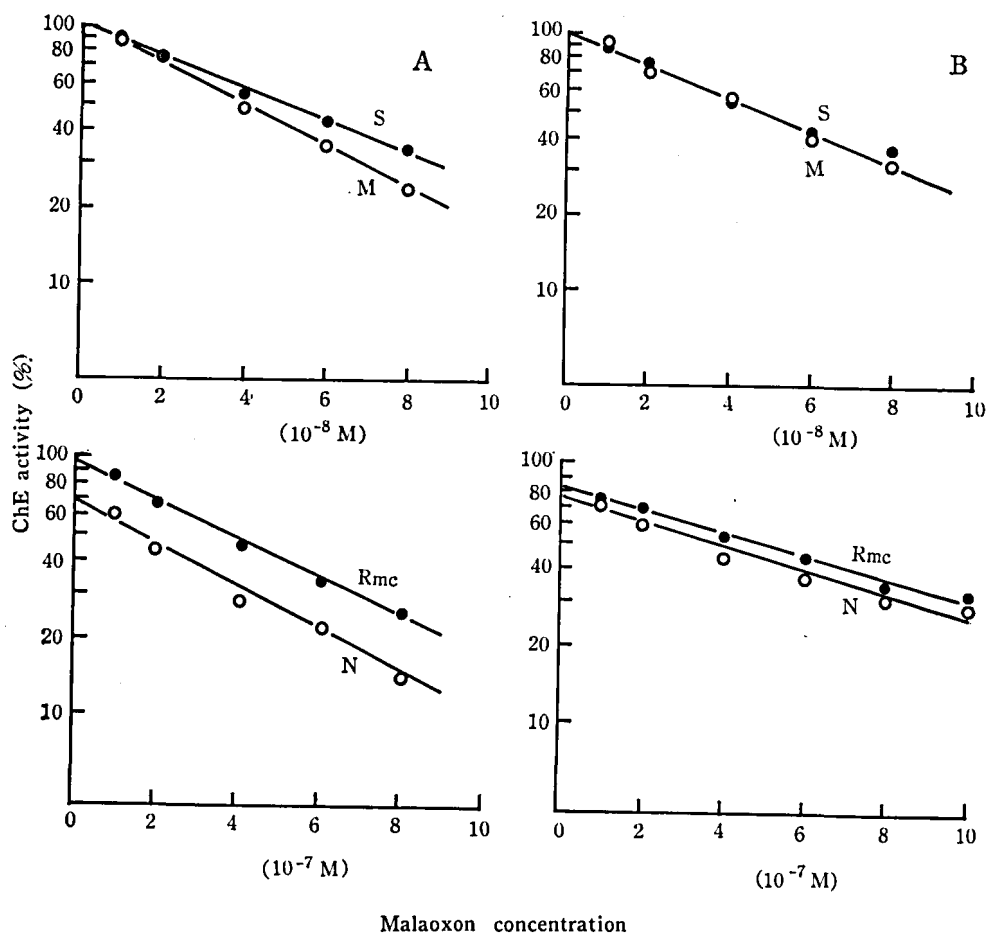


Fig. 3. Sensitivity to malaoxon of ChE in the bound (A) and the soluble (B) fractions from female and male adults of the four strains. Pre-incubation with malaoxon for 10 min at 30°C.

Malaoxon の濃度に対する ChE 活性の関係は Fig. 3 に示すようにいずれも直線にのり、S と M 系統ではたて軸を丁度 100% のところで、また Rmc と N 系統では Rmc の bound fraction が 100% の他は 70~80% のところでたて軸を切った。N 系統が 70~80% のところを切ったことは前述のように供試虫の抵抗性レベルが低下していたことが一因と思われる。

考 察

浜・岩田はカーバメート剤に著しく低い感受性を示す modified ChE をもつ N 系統の ChE 活性は S 系統の酵素活性と著しく違わないこと^{1,2)}、S 系統と同じ性質の ChE をもつ M、P 両系統の ChE 活性は

S や N 系統より明らかに高いこと⁷⁾、さらに N 系統と同じ性質の ChE をもつ九州産の抵抗性個体群の ChE 活性は N 系統より低いこと⁸⁾を報告し、ツマグロヨコバイでは系統や地域間で ChE 活性に違いが認められるものの、薬剤感受性の変化に伴う ChE 活性の量的変化はあっても比較的小さいものと考えた。

一方、小島ら⁹⁾は AChE を基質に Ellman 法によって N 系統と同一地域で採集した中川原系統を含む 4 系統の ChE 活性とその個体別変異を調べ、中川原系統の ChE 活性が感受性の小田原系統に比べて約 2.5 倍高く、中位の抵抗性の 2 系統の活性はそれらの中間にあること、また抵抗性の高い系統程 ChE 活性の個体間の変異が大きくなることを示した。

そこで本実験ではすでに由来や特徴が明らかな4系統を用いそれらの ChE 活性とその薬剤感受性の比較を行なった。頭部摩擦液あるいは全虫体摩擦液から調製した bound fraction と soluble fraction のいずれを酵素液に用いても、また ACh, ATCh のいずれを基質にしても系統間の ChE 活性比は類似の傾向であって、N系統が最も高く次いで $Rmc \geq M > S$ の順序であった。N系統の ChE 活性が供試したいずれの系統よりも顕著に高かったことは小島ら⁶⁾の結果を裏づけている。

AliE を含む soluble fraction とほとんど含まない bound fraction で系統間の ChE 活性比が近似したことは ChE 活性が AliE の影響をほとんど受けないことを示している。

本種の ChE に対する ATCh の K_m は $10^{-5}M$ のオーダーで系統間の違いは明瞭でなかった。しかし、最近高橋ら⁹⁾はN系統と同一地域から採集した抵抗性系統の ChE に対する ATCh の K_m が感受性系統の値より低いことを明らかにした。著者¹⁰⁾も Rmc 系統より分離した modified ChE の ATCh に対する親和性がS系統より分離した normal ChE より1.5倍低いことを確認している。

N系統の ChE はS系統の ChE より propoxur に対し I_{50} で100倍以上、malaoxon に18倍感受性が低いこと^{1,2)}、Rmc 系統の ChE は propoxur に対しN系統と同程度感受性が低いこと⁴⁾およびM系統の ChE は propoxur にS系統と同じく高い感受性を示すこと⁷⁾がすでに明らかにされているが、bound fraction, soluble fraction のいずれを酵素液としてもN, Rmc 両系統の ChE はS, M両系統の ChE より明らかに propoxur および malaoxon に感受性が低いことが確認された。AliE をほとんど含まず膜構造に付着した状態の bound ChE と AliE を含む遊離状態の soluble ChE の薬剤感受性がSとM系統ではほぼ同じ位であったが、Rmc とN系統では bound ChE の感受性が soluble ChE より幾分高いようであった。著者⁶⁾は本種の bound fraction から可溶化した ChE と soluble ChE が Sepharose 6B ゲルおよび DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーで同一位置に溶出されることを確認した。一方、本種の AliE は propoxur や malaoxon に高い感受性を示すことが知られている¹¹⁾。よって Rmc, N両系統の ChE 感受性における fraction 間の差は酵素の本質的な違いによるものではなく酵素の存在様式の違いあるいは AliE など他の因子の影響によるものと思われるが、その違いが2系統に限られるところからそれらの直接的な影響によるものではないようである。

さて、供試した4系統間で ChE の量的ならびに質

的な違いが確認され、modified ChE をもつN系統の ChE 活性はS, M両系統より明らかに高かった。しかし、SとN系統より育成した modified ChE をもつ Rmc 系統の ChE 活性はN系統より明らかに低くM系統と同じか幾分高い程度であった。最近、岩田・浜¹²⁾は低感受性の ChE をもつ熊本個体群を propaphos で選抜処理を繰り返したところ、その個体群の ChE は質的变化を生じ、propoxur に対する感受性が著しく高まることを明らかにしたが、ChE 活性自体は元の個体群と同じ位であった。したがって、normal ChE から modified ChE への質的变化にともなう ChE 活性の変化が生ずるにしても、地域性による量的変異はそれ以上に大きいものと結論される。

最近、著者¹⁰⁾は本種の ChE の部分精製標品を用い ATCh の濃度と活性の関係を検討した結果、normal ChE は基質が $3 \times 10^{-5}M$ より高濃度になると活性は抑制されて典型的な鐘状型の曲線をえがくのに対し、modified ChE は $10^{-2}M$ でも活性は阻害されないことをみいだした。よって、ATCh を用い本種の ChE 活性を測定、比較する場合には基質濃度の選定には注意を要する。

ChE の薬剤感受性低下とその活性の関係についてはダニ類でよく知られている。すなわち、ナミハダニ *Tetranychus urticae* やオウシマダニ *Boophilus microplus* では薬剤感受性の低い ChE をもつ抵抗性系統の ChE 活性は感受性系統の活性の $\frac{1}{2}$ あるいはそれ以下にすぎない^{13,14)}。しかし、イスラエルの数カ所から採集されたナミハダニでは ChE の低活性と抵抗性の間に必ずしも一定の関係が認められないことが指摘されている¹⁵⁾。

Malaoxon の濃度に対する ChE 活性の関係 (Fig. 3) から、S, M, Rmc 系統の ChE の均一性が示唆され、またN系統の酵素も供試時の抵抗性レベルの低下を考慮すれば比較的均一性が高いといえる。このことは先にSおよび Rmc 系統の ChE が Sepharose 6B ゲルおよび DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーで各々が単一ピークとして溶出されることを示した結果⁹⁾と一致する。さらに、これらの系統における酵素の均一性はカーバメート剤抵抗性の主要因子が単一因子に支配されているとした Hama and Iwata¹⁶⁾の遺伝学的研究結果からも支持される。ツマグロコバイで得られたこれらの結果は、最近オウシマダニで明らかにされた複雑な結果¹⁷⁾と著しく対照的である。すなわち、オウシマダニでは阻害剤との速度論、電気泳動およびイオン交換カラムクロマトグラフィーの結果から、感受性および抵抗性の双方の系統に感受性の高い成分と低い成分とが存在し、それぞれの成分はさらに幾つかの活性ピークに分離されることが示されている。

引用文献

- 1) Hama, H. and T. Iwata : *Appl. Ent. Zool.*, 6, 183 (1971).
- 2) Iwata, T. and H. Hama : *J. Econ. Entomol.*, 65, 643 (1972).
- 3) 浜 弘司・岩田俊一 : 応動昆, 17, 154 (1973).
- 4) 浜 弘司 : 昭和49年度応動昆大会講演 (1974).
- 5) Hama, H. : *Appl. Ent. Zool.*, 11, 239 (1976).
- 6) 小島建一・井上博之・土館丈夫・尾崎幸三郎・佐々木善隆 : 昭和49年度応動昆大会講演 (1974).
- 7) Hama, H. and T. Iwata : *Appl. Ent. Zool.*, 7, 177 (1972).
- 8) 浜 弘司 : 防虫科学, 40, 14 (1975).
- 9) 高橋洋治・興村伸夫・山本 出 : 昭和51年度応動昆大会講演 (1976).
- 10) 浜 弘司 : 昭和51年度応動昆大会講演 (1976).
- 11) Ozaki, K. and H. Koike : *Jap. J. appl. Ent. Zool.*, 9, 53 (1965).
- 12) 岩田俊一・浜 弘司 : 昭和51年度応動昆大会講演 (1976).
- 13) Smisseart, H. R. : *Science*, 143, 129 (1964).
- 14) Lee, R. M. and P. Bathan : *Ent. exp. & appl.*, 9, 13 (1966).
- 15) Zahavi, M., A. S. Tahori and F. Stolerio : *Biochem. Pharmacol.*, 19, 219 (1970).
- 16) Hama, H. and T. Iwata : In preparation.
- 17) Nolan, J., H. J. Schnitzerling and C. A. Schuntner : *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2, 85 (1972).

Summary

Relationships between cholinesterase (ChE) activity and its sensitivity to inhibitors were evaluated for 1 susceptible (S) and 3 resistant strains (M, Rmc, N) of the green rice leafhopper (See Table 1). A distinct variation was found in ChE activity among the four strains, ranging up to 5.5-fold, regardless of enzyme sources and

substrates. N strain had highest ChE activity and was followed by the other three strains ($Rmc \geq M > S$) in all tests. The soluble and bound fractions were separated from whole body homogenates by centrifugation at 105,000g for 60 min. The ChE activity in the soluble fraction was only 10% of the activity in the bound fraction, and the most of aliesterase activity was found in the soluble fraction in all the strains tested. However, ratios of ChE activity among the four strains were the similar between the soluble and bound fractions, indicating that aliesterase hardly affect ChE activity.

The K_m values of acetylthiocholine for soluble and bound ChEs from the four the strains were in the order of $10^{-5}M$.

The ChE in N and Rmc strains was shown to be less sensitive to both propoxur and malaoxon than that in S and M strains, regardless of the enzyme sources and the homogenate fractions. Sensitivity of ChE to inhibitors was not much different between two fractions in all the strains tested.

The ChE activity in N strain was highest among the four strains but the activity in Rmc strain derived from S and N strains was similar to or a little higher than that in M strain, suggesting that the change in ChE activity accompanied with alteration of its sensitivity to inhibitors, if any, was relatively small in comparison with the variations among populations or strains of this leafhopper.

The ChE activity in log scale vs concentration of malaoxon plots passed through a point of 100% activity, though the plot of N strain passed through a point of 70 to 80% activity (Fig. 3). This suggests that the enzymes in the four strains are relatively homogeneous.