

サツマイモネコブセンチュウのアセチルコリン エステラーゼの薬剤感受性

遠藤 正造・佐藤 善一¹⁾・中園 和年・風野 光²⁾ (九州農業試験場)

Insecticide susceptibility of acetylcholinesterase of *Meloidogyne incognita*.
Shozo ENDO, Zenichi SANO¹⁾, Kazutoshi NAKASONO and Hikaru KAZANO²⁾ (Kyushu
National Aricultural Experiment Station, Kikuchi-gun, Kumamoto 861-11)

Characteristics of acetylcholinesterase (AChE) of *Meloidogyne incognita* and its inhibition by several insecticides were studied. When ¹⁴C-acetylcholine was used as a substrate, AChE activity of *M. incognita* could be measured by using less than 10,000 second stage larvae. Optimum pH for AChE activity was pH 7.2-7.7.

The AChE of *M. incognita* was strongly inhibited by carbofuran and diazoxon. Fenitrothion, diazinon, and parathion were less inhibitory to the AChE.

緒 言

近年、畑作物や各種野菜の産地の団地化、固定化に伴う連作障害の発生が大きな問題となっている。その要因としては土壌の理化学性の劣化、土壌微生物、土壌昆虫相の変化とともに植物寄生性有害線虫の増加等が考えられている。これらの線虫の制御のため、対抗植物や天敵の利用についての研究も行われている。しかし、いまのところ十分な効果がなく土壌処理による防除が主流となっている。

薬剤で線虫を効率的に防除するためには、その作用機構を解明し、薬剤の特性を十分に生かした方法を開発することが重要である。しかし、線虫は形態的に微小なため通常の方法による薬剤の作用機構の検討は容易ではない。一般に殺虫剤の作用点はアセチルコリンエステラーゼ (以下 AChE と略す) 阻害であるものが多い (山下ら, 1979)。

そこで筆者らは、代表的な線虫であるサツマイモネコブセンチュウの AChE 特性を¹⁴C-アセチルコリンを用いて検討し、若干の知見を得たので報告する。

本文に入るに先立ち各種原体を恵与いただいた日本火薬株式会社、住友化学株式会社、クミアイ化学株式会社の関係各位に深謝する。

材料および方法

線虫の増殖および採取

- 1) 現在 四国農業試験場
- 2) 現在 野菜・茶業試験場

供試線虫は各種作物に寄生するサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*, 単卵のう系) とした。殺菌土壌約 2.3kg を詰めた素焼鉢にトマト (品種: 福寿 2 号) を栽培, これにサツマイモネコブセンチュウを接種, 温室内で 1989 年 10 月 4 日から 11 月 21 日および 10 月 20 日から 12 月 12 日まで栽培した後, 根系を掘り上げ十分水洗した。根系はエアレーションした水中に浸し, 着生した卵のうからふ化する 2 期幼虫を 24 時間毎に採取した。その後線虫懸濁液は 100 メッシュの分析ふるいを通して一旦夾雑物を除いた後, さらに比重 1.2 のショ糖液を用いて 2 層遠心浮遊法により, 2500rpm, 5 分間, 遠心分離し, 夾雑物を除去した。その後孔径 8 μm のミリポアフィルターを用いて蒸留水で数回洗浄した。この精製した線虫懸濁液は単位溶液当りの虫数を計数後, -20℃ 以下で冷凍保存した。

供試試薬および阻害剤

¹⁴C 標識塩化アセチルコリン, 塩化アセチルコリン, リン酸一カリ, リン酸二ナトリウム, 1, 4-ジオキササン, ナフタレン, POPO (1, 4-ビス [2- (4-メチル-5-フェニルオキサゾール)] 1-ベンゼン), DPO (2, 5-ジフェニルオキサゾール), アンバーライト GC-120 樹脂の 1 型。

阻害剤: ダイアジノン, ダイアゾクソン, フェニトロチオン, フェニトロオクソン, パラチオン, パラオクソン (以上有機リン剤) とカルボフラン, メソミル (以上カーバメート剤)。

有機リン剤のオクソン体は有機リン剤の原体を m-クロル過安息香酸を用いてクロロホルム中で酸化した後,

薄層クロマトグラフィーとカラムクロマトグラフィーで分離精製して用いた。化合物の確認は GC-MS (日本電子 DX300-DA500) で行った。

^{14}C 標識塩化アセチルコリン 0.165mg (2.05GBq/mmol, 放射化学的純度 98.0%) に非標識塩化アセチルコリン 90.65mg を加え、これを 50ml の蒸留水に溶解し、 1×10^{-2} M のアセチルコリン液として -20°C で保存した。保存アセチルコリン液は解凍後、所定リン酸緩衝液を用いて 10 倍に希釈、使用した。

線虫ホモジネートの調整および AChE 阻害測定法

線虫懸濁液を解凍後、蒸留水を適宜加え、1ml 当りの線虫数を 80 万頭に調整した。これを氷冷しながらテフロンポッター型ホジナイザーで磨砕し、ナイロンゴースで濾過後、粗酵素液とした。また、一部は遠沈を行い各画分における AChE 活性を測定した。

AChE 阻害試験：所定濃度の薬剤のアセトン液をマイクロシリンジを用いて 10ml の目盛り付き共栓試験管に入れた後、アセトンを除去した。この試験管に粗酵素液 0.10ml を加え、 27°C で 10 分間プレインキュベートした。これにリン酸緩衝液で希釈したアセチルコリン液 0.1ml を加え、 27°C で 15 分間インキュベートした。その後、反応液を直ちに氷冷し、アンバーライト CG-120 樹脂を懸濁したジオキサン液 5ml を加えた。さらにジオキサンのみを加えて、全容を正確に 10ml とし、栓をして激しく振とうしてから、一夜静置後、上清液 5.0ml をバイアルに採った。これにジオキサンシンチレータ 10ml を加え、アセチルコリンが分解されて生成した酢酸の放射能を液体シンチレーションカウンター (Beckman LS-5000TD 型) で測定した。

結果および考察

サツマイモネコブセンチュウの AChE 活性は最初に比較的感度が高いと言われている ELLMAN 法で測定を試みたが、1 検体当り 100 万頭の線虫 (2 期幼虫) を用いても、その吸光度変化は 0.000478Abs/分しかなく、本種の AChE 活性を ELLMAN 法で測定することは困難であった。しかし、 ^{14}C で標識したアセチルコリンを用いて AChE の活性測定を試みたところ、本方法では 1

Table 1 Distribution of AChE activity

Fraction	Relative activity (%)
original homogenate	100
10000 \times g 10min (supernatant)	51
10000 \times g 10min (pellet)	49

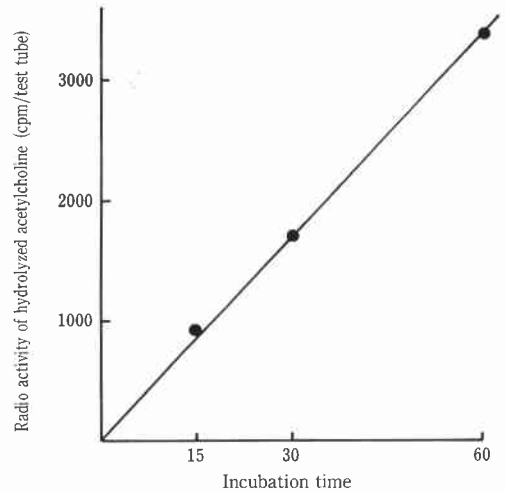


Fig. 1. Relation of acetylcholine hydrolyzed by AChE of *Meloidogyne incognita* and incubation time

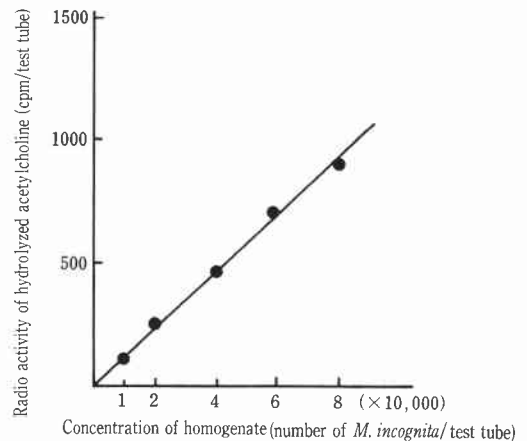


Fig. 2. Activity of *Meloidogyne incognita* AChE

検体当り 1 万頭供試した場合でも AChE 活性を十分測定できた。

AChE は 10,000 \times g で 10 分遠沈した場合、その活性の約 50% が沈澱部分に存在した (Table 1)。この存在比はトビイロウンカやコブノメイガの場合とほぼ同じであった (遠藤, 未発表)。

粗酵素液によるアセチルコリンの分解はインキュベート時間の増加とともに直線的に増加し、さらに粗酵素濃度にほぼ比例することから、本反応系で AChE 活性が測定できることが分かった (Fig. 1, 2)。

至適 pH: AChE 活性に対する pH の影響は Fig. 3 に示したとおり、本酵素の至適 pH は 7.2~7.7 の範囲であった。したがって、以後の AChE の阻害実験は pH7.4

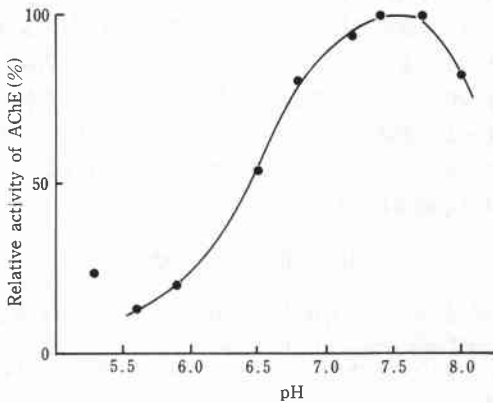


Fig. 3. Effect of pH on the AChE activity of *Meloidogyne incognita*

Table 2 Inhibition of acetylcholinesterase of *Meloidogyne incognita* by various insecticides

Chemicals	I_{50}	M
diazinon	1.6×10^{-3}	
diazoxon	2.2×10^{-6}	
fenitrothion	$>2.0 \times 10^{-3}$	
fenitroxon	1.6×10^{-5}	
parathion	7.4×10^{-3}	
paraoxon	3.4×10^{-5}	
carbofuran	3.6×10^{-7}	
methomyl	1.2×10^{-5}	

Preincubation of the nematode homogenate with the respective insecticides were conducted for ten min.

の条件で行った。この至適 pH はダニの場合 (本山, 1981) とほぼ同じ傾向であったが、ツマグロヨコバイ、ウシ赤血球 (浜, 1980) 等の AChE の至適 pH とはやや異なった。松浦・細野 (1987) はマツノザイセンチュウの至適 pH は pH7 であり、pH8 ではその活性は著しく低下すると報告しているが、サツマイモネコブセンチュウでは pH8 になっても大きな低下はなく、本酵素活性に及ぼす pH の影響はマツノザイセンチュウのそれとはかなり異なると思われる。

AChE に対する各薬剤の阻害度を Table 2 に示した。プレインキュベーションなしの場合では、カルボフランには若干の阻害が認められたものの、その他の薬剤はいずれも阻害効果は低かった。一方、プレインキュベーションした場合には、阻害力が顕著となり、中でもカルボフランの阻害が最も強く、メソミルがこれにつぎ、フェニトロチオン、ダイアジノンおよびパラチオンは弱かった。しかし、後3化合物はオクソン体とすることにより (フェニトロオクソン、ダイアゾクソンおよびパラオク

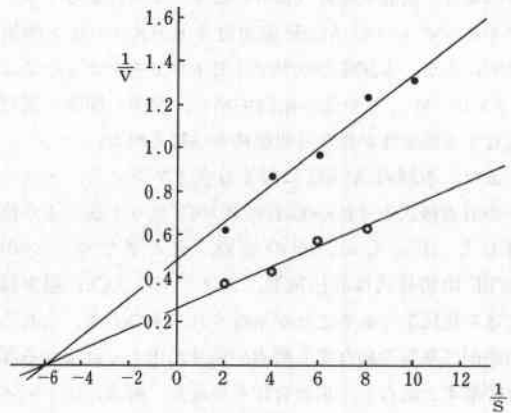


Fig. 4. LINEWEAVER-BRUK plots for evaluation of type of inhibition by diazoxon.

S: Concentration of substrate (mM),
V: Velocity (Hydrolyzed acetylcholine, nmole/min /tube)

●: diazoxon: $4 \times 10^{-6}M$ ★: no inhibitor

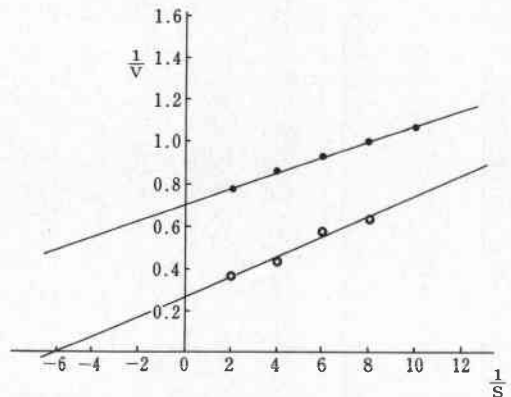


Fig. 5. LINEWEAVER-BRUK plots for evaluation of type of inhibition by methomyl.

S: Concentration of substrate (mM),
V: Velocity (Hydrolyzed acetylcholine, nmole/min /tube)

●: methomyl: $8 \times 10^{-6}M$ ★: no inhibitor

ソン), AChE 阻害力が親化合物の100~1,000倍に増大した。

PREE et al (1987, 1989) はニセネグサレセンチュウ (*Aphelenchus avenae*) やキタネグサレセンチュウ (*Pratylenchus penetrans*) の AChE の各種薬剤に対する感受性を報告しているが、両種の AChE のカルボフランによる I_{50} はともに $10^{-7}M$ のオーダーと考えられる。今回サツマイモネコブセンチュウで得られた I_{50} は $3.6 \times 10^{-7}M$ でありカルボフランに対する感受性はこれらの3種の線虫間で大きな違いはないと思われる。しかし、メソミ

ルの場合、松浦・細野 (1987) はメソミルによるマツノザイセンチュウの AChE 阻害度を $6.0 \times 10^{-7} M$ と報告しているが、本試験のサツマイモネコブセンチュウでは $1.2 \times 10^{-5} M$ とやや低い傾向を示し、線虫の種間で薬剤に対する感受性が異なる可能性も示唆された。

また、本種の AChE に対するダイアジノン、メソミルの阻害様式を LINEWEAVER-BURK プロット法により検討した (Fig. 4, 5)。その結果、ダイアゾクソンの AChE 阻害様式は非拮抗型、メソミルの AChE 阻害様式は不拮抗型であることが示唆され、すなわち、これらの薬剤は基質の結合する酵素の活性の中心とは異なる部位で酵素と結合し三重複合体を生成し、酵素反応を阻害すると考えられる。

以上のように本試験ではサツマイモネコブセンチュウの AChE の至適 pH、AChE に対する阻害様式、薬剤の作用特性の一部について明らかにした。しかし、線虫制御剤の作用機構については薬剤の虫体における分解代謝、作用点への到達経路等今後解明すべき点も多い。

線虫が非肉眼的微小動物であることもあって、現在までのところ線虫に対する薬剤の作用機作の解明はあまり行われていない。今後はラジオアイソトープや免疫反応等を利用し、さらに感度の高い検定、測定手法を開発し、薬剤の作用機構についての詳細な検討が必要である。それらの結果に基づいて合理的な薬剤の使用法を早急に開発する必要がある。

引 用 文 献

- 1) 浜 弘司 (1980) 農技研報 C 34: 75-138.
- 2) 松浦邦昭・細野隆次 (1987) 日本線虫研究会誌 17: 17-22.
- 3) 本山直樹 (1981) 農業実験法 1 殺虫剤編ソフトサイエンス社 東京 pp. 438.
- 4) PREE, D. J., TOWNSHEND, J. L., and ARCHIBALD, D. E. (1987) J. Nematol. 19: 188-193.
- 5) PREE, D., TOWNSHEND, J. L., and ARCHIBALD, D. E. (1989) J. Nematol. 21: 483-489.
- 6) 山下恭平・水谷純也・藤田稔夫・丸茂晋吾・江藤守総・高橋信孝 (1979) 農業の科学 文永堂 pp. 370.

(1991年 5月31日 受領)