

有機リン殺虫剤プロチオホスのイエバエ腹部 グルタチオン S-転移酵素 6B による新奇抱合反応

箕川 剛*・須恵雅之**・宮本 徹**

(平成 16 年 5 月 24 日受付/平成 16 年 7 月 30 日受理)

要約: 感受性高槻系, 抵抗性八千代系イエバエ腹部グルタチオン S-転移酵素 (GST) 分子種 6A, 6B の遺伝子をクローニングし大腸菌内で発現させた。イエバエ腹部 GST 分子種 6B は, 6A と同様にプロチオホスオキソンに対してグルタチオン (GSH) のアルキル抱合を担うが, 6A と異なるのは抵抗性由来の GST6B の方が感受性由来の GST6B より脱エチル体の生成量が約 1/2 と少なく, 解毒化への抱合反応を抑制していた。また, *in vitro* の酸化的 GSH 抱合反応は GST6B が新奇な GSH 抱合反応を少なくとも一つ担うことを示唆した。プロチオホスオキソン S-オキシドの GSH との反応を BioMedCAChe を用いた計算化学において予測した。一つは GS⁻ のリン原子への SN₂ 反応, もう一つは GS⁻ のエトキシル基のメチレン炭素原子への SN₂ 反応であった。十分な証拠に欠けるが GST6B の存在がイエバエの抵抗性発現を抑制するのに重要な役割を演じているかもしれない。

キーワード: 有機リン殺虫剤プロチオホス, イエバエグルタチオン S-転移酵素 6B, 抵抗性

緒言

有機リン殺虫剤の大半はチオノ体構造をもち, 酸化されてオキソン体に変化, アセチルコリンエステラーゼ (AChE) を阻害して殺虫活性を呈する。しかし, オキソン体構造をもつアセフェート, プロフェノホス, ピラクロホス, プロチオホスオキソン等は AChE を阻害せず更に酸化されて AChE を阻害, 殺虫力を呈する。この活性体は S-オキシドであることが証明されている。著者らはプロチオホスオキシソンの S-オキシドが更にグルタチオン S-転移酵素 (GST)-グルタチオン (GSH) の作用により殺虫力が増し, 特に有機リン剤抵抗性イエバエに卓効あることを既に明らかにしている¹⁾。本研究は感受性, 抵抗性イエバエ腹部 GST を分子種のレベルで明らかにし, プロチオホスが昆虫に対して今尚抵抗性を発現しない秘密を酸化的抱合化に視点を置いて, 広く抱合反応を *in vitro* 代謝により解析, GST 分子種の役割を精査し, 計算化学により反応を予測した。

材料及び方法

1. 供試化合物

本研究に用いた有機リン殺虫剤プロチオホスとその酸化及び抱合反応で生成する想定代謝物の構造式と略語または化学名を図 1 に記す。

2. 供試イエバエ

感受性イエバエは大阪府高槻市で採集され国立予防衛生

研究所で累代飼育された高槻系統イエバエで, 抵抗性イエバエは千葉県八千代市で採集され千葉大学で累代飼育された有機リン剤に抵抗性を示す八千代系統イエバエで, いずれも譲渡を受けた後に当研究室で室温約 30°C, 湿度 70~80%, 蛍光照射条件下で累代飼育したものである。八千代系イエバエは, 3 サイクルごとに有機リン殺虫剤ダイアジノン (10 µg/♀) で淘汰し抵抗性を維持した。

3. 酵素調製

(1) ラット肝ミクロソーム画分

一晚絶食させた 7 週齢のウィスター系雄ラットを断首し, 摘出した肝臓を 1.15% KCl 溶液中で細断し, 肝重量の 4 倍量の pH 7.4 の 40 mM トリス塩酸緩衝液 (1.15% KCl, 4 mM EDTA, 5 mM DTT を含む) で 30 秒間の磨砕と 60 秒間の水中での静置を 3 回繰り返してテフロンポッター内で磨砕した。その磨砕液を 4°C 下で 10,000×g, 20 分間遠心分離し, 上澄み液を更に 4°C 下で 105,000×g, 90 分間遠心分離して上清 (ラット肝サイトソーム画分) と沈殿物に分画した。沈殿物をこの上清と同容積のトリス塩酸緩衝液で洗浄後再度 4°C 下で 105,000×g, 90 分間遠心分離した。3 層からなるこの沈殿物の最上層をボルテックスミキサーでトリス塩酸緩衝液により削り取って集め, その全容積が前述の上清と同量になるように調整した。これをラット肝ミクロソーム画分として液体窒素で凍結させ -80°C 下で凍結保存した。

* 東京農業大学大学院農学研究科農芸化学専攻

** 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

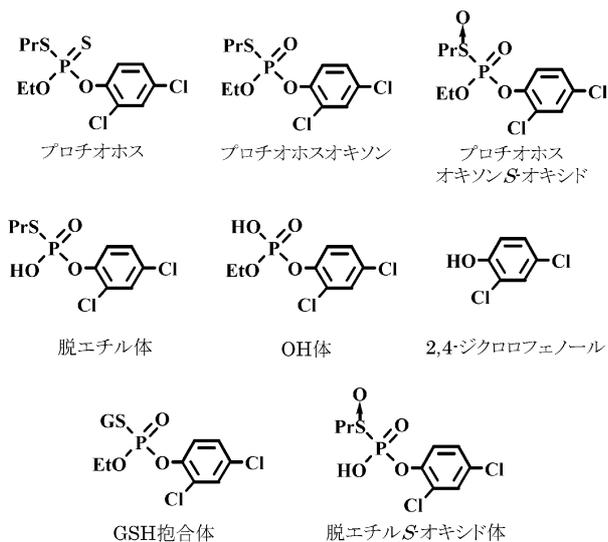


図1 有機リン殺虫剤プロチオホスとその酸化及び抱合反応で生成する想定代謝物

(2) イエバ工腹部サイトソール画分

羽化7日目の高槻系あるいは八千代系イエバ工を4°C下で20分間放置した後、虫体を液体窒素で凍結させ、ドライアイスで冷却したふるい(φ2.0mm)で腹部を集めた。腹部重量に対し2倍量のpH7.4の40mMトリス塩酸緩衝液(1.15%KCl, 4mMEDTA, 5mMDTTを含む)を加えながら乳鉢で適度にすりつぶした後、ポリトロンホモジナイザー(回転速度8)を用いて30秒間の磨砕と60秒間の氷中で静置を3回繰り返して磨砕した。その磨砕液を4重にしたガーゼで濾過して4°Cで10,000×g, 20分間遠心分離し、得られた上澄み液を更に4°Cで105,000×g, 90分間遠心分離した。その上清を集めて液体窒素で凍結させ-80°C下で凍結保存した。

(3) ラット肝、イエバ工腹部GSTの部分精製

(1) で得たラット肝サイトソール画分あるいは前述の両系統のイエバ工腹部サイトソール画分をpH7.4の10mMトリス塩酸緩衝液で平衡化した2×20cmのS-ヘキシルグルタチオンアフィニティーカラムに供し、200mM NaClを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)700mlで雑多なタンパクを除去し、次に200mM NaClと5mM S-hexylglutathioneを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)で目的のGSTタンパクを溶出させた。分取はUV検出器(280nm)でモニタリングし、GST活性はCDNB(1-chloro-2,4-dinitrobenzene)を基質にそのGSH抱合体生成量を分光光度計で測定して求めた。タンパク定量はbovine IgGを標準タンパク質とするBradford法を用いた。

(4) イエバ工腹部GST分子種6A, 6B

a) 高槻系、八千代系イエバ工腹部GST6A, 6B遺伝子のクローニング

羽化3日目の高槻系、八千代系イエバ工腹部0.5gからAGPC法で抽出したイエバ工全RNAを用いて3'-RACEを行った。3'-RACEはアダプター配列をもったオリゴ(dT)とSUPERSCRIPT II RTを用いて逆転写し、得られた高

槻系、八千代系イエバ工cDNAを鋳型としてTaq PCR Core Kit (QIAGEN社)を用いて30サイクルのPCRを行なった。PCRを行なうに当たり、Cornell-R系統イエバ工由来GST6A (GenBank: AF147205)とGST6B (GenBank: AF147206)の塩基配列から遺伝子特異的なセンスプライマー(GSP)を設計し、逆転写に用いたアダプター配列をアンチセンスプライマーとして用いた。GSPの設計とアーニリング温度は下記の通りである。

GST6A: 5'CAGAACTGCTGCAGCTAATT 3' (53°C)

GST6B: 5'GCGTCGTGCAAAATTAATTCA 3' (51°C)

そのPCR産物をpBluescriptSK(-) (Stratagene社)のEcoR I部位にライゲーションし、DH5α株大腸菌を形質転換した。ライゲーション反応はBlunting Kination Ligation Kit (Takara BIO社)を用い、そのプロトコールに従った。さらにプラスミドをアルカリSDS法で精製し、BigDye Terminator Ver. 3.1 (Applied Biosystem社)を用いたシーケンシングで高槻系、八千代系イエバ工GST6A, 6B遺伝子の塩基配列を解析した。

b) 高槻系、八千代系イエバ工腹部GST6A, 6Bの発現

高槻系、八千代系イエバ工GST6A, 6B遺伝子が挿入された精製プラスミドを鋳型に、Nde I認識配列をもつプライマーを設計し、30サイクルのPCRを行った。設計したプライマーとアーニリング温度は下記の通り。

GST6A: 5'ATACCATGGGAAAACCTTGTCTATACGGC 3' (53°C) GST6B: 5'GGCATATGGGAAAACCTTGTCTATATGG 3' (53°C)

得られたPCR産物と発現用ベクターpET21a(Novagene社)をNde I, Sal Iで制限酵素処理し、pET21aのNde I, Sal I部位にライゲーションし、BL21-CodonPlus (DE3) RIL系統大腸菌(Stratagene社)を形質転換した。ライゲーション反応はDNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara BIO社)を用いた。こうして得られた高槻系、八千代系イエバ工GST6A, 6B遺伝子を導入した大腸菌をアンピシリン(50μg/ml)、クロラムフェニコール(50μg/ml)を含むLB培地10mlに植菌し、37°Cで16時間培養した。さらにその培養液を同LB培地1,000mlに移し、OD₆₀₀値がおよそ0.5になるまで37°C, 150rpmで振とう培養した。IPTG(最終濃度1mM)を添加して更に37°C, 150rpmで3時間培養した。培養後5,000×gで20分間遠心分離して集菌した。集めた大腸菌体を10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.3)50mlで懸濁し、氷冷しながら超音波破碎を行った。超音波破碎は100Wで30秒間の破碎と90秒間の氷中静置を5回繰り返して行った。この破碎液を5,000×gで1時間遠心分離し、その上清を高槻系、八千代系イエバ工GST6A, 6B大腸菌破碎液として得た。

4. 酵素活性

角型セル(1cm×1cm)に酵素液0.1ml, 1.25mM GSHを含む100mMリン酸緩衝液(pH6.5)を0.8ml入れ、U-3200 HITACHI紫外可視分光光度計で25°C, 1分間ブリーンキュベート後、CDNB60%含水エタノールを0.1ml加えて(反応開始後55~65秒の間ピペティングにより攪拌

しながら) 波長 340 nm で 3 分間レイトアッセイを行った。対照区では CDNB の代わりに 60% 含水エタノールを加えた。部分精製したイェバエ腹部 GST は両系統ともに約 5,000 倍に、両系統イェバエ腹部 GST6A, 6B 大腸菌破砕液は約 10,000 倍にそれぞれ 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で希釈し供試酵素液とした。また非酵素反応として酵素液の代わりに 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) を 1.0 ml 加えた反応を同様に行い、この値を差し引いた値を酵素活性値とした。

5. *In vitro* 抱合反応

氷水中にて、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 400 μ l にラット肝ミクロソーム画分 100 μ l と CDNB 抱合体生成量が 1 μ mol/min/ml になるよう調整した高槻系または八千代系イェバエ腹部の GST6A または 6B 大腸菌破砕液 100 μ l を添加し、GSH 添加区では 10 mM GSH 水溶液 100 μ l を、NADPH 添加区では NADPH 再構成系試薬として 25 mM NADP⁺ 同リン酸緩衝液 100 μ l と 50 mM グルコース-6-リン酸、5 units/ml のグルコース-6-リン酸脱水素酵素、60 mM MgCl₂ の同リン酸緩衝液 100 μ l を、NADPH + GSH 添加区では NADPH 再構成系試薬と GSH 両方を加え、両補酵素フリー区を含む各区の反応液を同リン酸緩衝液で 900 μ l に調整し、最後に 7.5×10^{-4} M プロチオホスオキソン 70% アセトン溶液 100 μ l を加えて 37°C で 1 時間インキュベートした。反応液に 6N 塩酸を加えて酵素反応を停止、10,000 rpm で 10 分間遠心分離して変性したタンパクを沈殿させ、その上清をサンプレップ LC13R フィルター (0.22 μ m) で濾過した。OH 体と 2,4-ジクロロフェノールは上清からそのまま HPLC で定量、また脱エチル体は上清を酢酸エチルで抽出しジアゾメタンでメチル化後その溶液を濃縮して未反応のプロチオホスオキソンと共に HPLC で定量した。分析条件は以下の通りである。検出波長 270 nm、固定相には C8 カラム (4.6 \times 250 mm)、移動相には 0.1% TFA とメタノール混合溶媒を用い、その混合比は、OH 体、2,4-ジクロロフェノールの分析では 41 : 59、メチル化した脱エチル体と未反応のプロチオホスオキシソンの分析では 35 : 65 であった。

6. プロチオホスオキソン S-オキシドと GSH の計算化学による SN2 反応

三次元モデリングシステム BioMedCACHe Ver 6.1 (富士通株式会社) の「SN2 反応の遷移状態における計算」により、S-オキシドと GSH の反応を検討した。S-オキシドは不斉リン原子を構造中にもつため、(R)_p と (S)_p の両配置の構造をディスプレイ上でつくりその最適構造を CACHe CONFLEX により構築した。また GSH は PDB ファイル中のマラリア蚊 GST 分子種の一つ AdGST1-5 にある GSH スルホン酸を構造改変し S-オキシドの場合と同様に構造の最適化を図った。この両化合物を用いて二つの反応を下記のような計算手順で行い、その遷移状態の構造と生成物を予測した。

1) Chemical sample conformations の optimized map

を PM3 energies (one label) により計算した。

- 2) Calc energy の最も高い構造を選択して reaction and transition states の 2-1) refine transition state を PM3 transition state geometry により、2-2) verify transition state を MOPAC PM3 FORCE によりそれぞれ計算した。
- 3) IR transitions の振動スペクトルの負の波数領域にピークが一つあるか否かを、またベクトル表示された構造から振動の方向が反応の方向と一致しているかを確認した。
- 4) reaction and transition states の find transition paths を PM3 intrinsic reaction coordinate (mode = +1) により計算し反応経路を確認した。

結果及び考察

1. ラット肝、高槻系、八千代系イェバエ腹部部分精製 GST 下での *in vitro* 酸化

プロチオホスオキソンは部分精製 GST を含むラット肝ミクロソーム画分 + NADPH 代謝 (表 1 中の GSH 無添加の 3 試験区) では、OH 体と 2,4-ジクロロフェノールが GST の違いに係わらずほぼ同量生成し、2 つの代謝物が酸化的加水分解物であることが分かった (表 1 と図 4)。この 3 試験区の反応液中に GSH を加えて酸化抱合すると、ラット肝 GST の試験区では OH 体、2,4-ジクロロフェノールの生成量は GSH 無添加区と差が認められなかったが、高槻系イェバエ腹部 GST の区では 2,4-ジクロロフェノールの生成量が、八千代系イェバエ腹部 GST の区では OH 体と 2,4-ジクロロフェノールの生成量が、いずれも各 GSH 無添加区に比べて有意に減少した。これは、既知の GSH のアルキル抱合²⁾ によりプロチオホスオキソンが脱エチル化されたため、S-オキシドの生成が減って結果的に OH 体や 2,4-ジクロロフェノールの生成が減少したものと考えられた。しかし、この脱エチル化はラット肝 GST の試験区でも既知反応ゆえ同様に進行するはずであるから、表 1 の両代謝物に減少が認められないことは矛盾である。これらのことはイェバエ腹部部分精製 GST にはこれを解く鍵となる分子種が少なくとも一つあることを示唆した。そこで両イェバエ腹部 GST のプロチオホスオキソンに対する GSH 抱合反応を広く分子種のレベルで検討した。

2. 高槻系、八千代系イェバエ腹部 GST6A, 6B 下での酸化的抱合反応

In vitro 代謝の結果を表 2 に示す。GSH 添加区では、いずれの区にも脱エチル体が生成し、既知の解毒化への抱合反応²⁾ が進行したことを示した。詳細に見ると、分子種 6A では抵抗性イェバエ由来の GST の方が感受性イェバエ由来の GST より脱エチル体の生成が若干多く、6A が既知のアルキル抱合による解毒代謝を担う分子種であることが窺え、Wei *et al.*³⁾ の報告とも一致する。しかし、分子種 6B では逆に抵抗性イェバエ由来の GST の方が感受性イェバエ由来の GST より脱エチル体の生成が少なく (約 1/2 余り

表 1 ラット肝、高槻系、八千代系イエバエ腹部の部分精製 GST 存在下でのプロチオホスオキシソンのラット肝ミクロソーム NADPH 再構成系による *in vitro* 酸化

部分精製 GST の種類	GSH	生成物 (%)	
		OH 体	2,4-ジクロロフェノール
ラット肝 GST	-	35 ± 4.3	28 ± 1.9
	+	35 ± 3.6	28 ± 1.2
高槻系イエバエ腹部 GST	-	33 ± 3.3	28 ± 0.72
	+	32 ± 3.4	25 ± 1.4
八千代系イエバエ腹部 GST	-	35 ± 2.2	27 ± 2.1
	+	28 ± 2.6	24 ± 1.8

means ± SD (n=3)

ラット肝ミクロソーム NADPH 再構成系に各部分精製 GST を加え、37°C で 1 時間インキュベート。
GST は 1 ml 当たり CDNB 抱合体生成量が 1 μmol/min になるよう調整。

表 2 プロチオホスオキシソンのラット肝ミクロソーム酸化条件下でのイエバエ腹部 GST6A, 6B による *in vitro* 抱合反応

GST の種類と補酵素の有無	生成物 (%)			プロチオホス オキシソン残量 (%)
	脱エチル体	OH 体	2,4-ジクロロ フェノール	
高槻系イエバエ GST6A				
補酵素フリー	1.9 ± 1.2	N.D	N.D	93 ± 3.5
+GSH	7.3 ± 1.9	N.D	N.D	85 ± 3.2
+NADPH	1.4 ± 1.2	31 ± 3.5	21 ± 3.6	8.6 ± 3.6
+NADPH+GSH	3.3 ± 2.1	28 ± 2.9	17 ± 2.5	10.2 ± 3.8
八千代系イエバエ GST6A				
補酵素フリー	1.5 ± 1.1	N.D	N.D	95 ± 4.3
+GSH	9.1 ± 2.1	N.D	N.D	85 ± 3.5
+NADPH	1.6 ± 0.81	31 ± 3.1	20 ± 2.7	8.1 ± 2.1
+NADPH+GSH	4.6 ± 1.5	28 ± 3.2	16 ± 2.2	8.3 ± 2.3
高槻系イエバエ GST6B				
補酵素フリー	1.9 ± 1.1	N.D	N.D	91 ± 4.1
+GSH	10.3 ± 2.6	N.D	N.D	85 ± 3.8
+NADPH	3.7 ± 1.9	26 ± 3.1	22 ± 3.1	9.1 ± 3.3
+NADPH+GSH	6.1 ± 2.1	17 ± 2.8	18 ± 2.4	8.4 ± 3.5
八千代系イエバエ GST6B				
補酵素フリー	1.4 ± 0.83	N.D	N.D	91 ± 3.9
+GSH	5.3 ± 1.9	N.D	N.D	85 ± 3.8
+NADPH	1.4 ± 1.1	26 ± 2.8	20 ± 3.5	9.5 ± 2.8
+NADPH+GSH	4.6 ± 2.3	11 ± 2.2	16 ± 2.8	8.6 ± 3.1

means ± SD (n=3)

ラット肝ミクロソーム NADPH 再構成系に各 GST 分子種を加え、37°C で 1 時間インキュベート。
GST は 1 ml 当たり CDNB 抱合体生成量が 1 μmol/min になるよう調整。

で、6B が脱エチル体生成による解毒化を抑制する分子種であることが示唆された。補酵素を両方加えない試験区でも脱エチル体の生成が若干どの区からも認められたが、これは酵素発現時に少量生成した GSH を含む大腸菌破砕液を GST 分子種として用いたからである。

NADPH 添加区では、4 つの試験区とも酸化的加水分解がよく進み OH 体と 2,4-ジクロロフェノールが多く生成した。但し、6A と 6B 下での本 *in vitro* 反応は別途に試験したため OH 体と 2,4-ジクロロフェノールの生成量は異なるが、各々の高槻系と八千代系試験区での生成量はほぼ同じであった。また少量の脱エチル体の生成が見られるが、これは前述の大腸菌破砕液に含まれる GSH により酸化反応とは別途に抱合反応が進んだ結果であろう。ここに

も分子種 6A, 6B による GSH のエチル抱合を論じた前述の考察を支持する傾向が認められた。

NADPH と GSH を両方加えた試験区では、多くの OH 体、2,4-ジクロロフェノールと脱エチル体が比較的多く生成した。この脱エチル体は既知の GSH のアルキル抱合による生成物である。これが生成する分だけ酸化的加水分解を受ける S-オキシドの生成は減少するため OH 体と 2,4-ジクロロフェノールの生成量は減るが、その生成比は GSH の添加、無添加に係わらず同じはずである。この視点で詳細に OH 体と 2,4-ジクロロフェノールの生成比を見てみた。高槻系、八千代系イエバエ腹部 GST6A の試験区では、NADPH+GSH 添加区の両代謝物の生成量は NADPH 添加区に比べて減少するが、その生成比は約 3:2 と変化が

見られなかった。しかし、高槻系イェバ工腹部 GST6B の試験区では 6:5 から 4.5:5 へと GSH を反応液中加入すると生成比も変化した。また、八千代系イェバ工腹部 GST6B の試験区では 6:5 から 3:5 へと更に大きな変化し、OH 体の生成が相対的に減少した。このことはプロチオホスオキシソンの酸化が相対的に減少した。このことはプロチオホスオキシソンが酸化的加水分解と抱合反応を別途単独に受けるだけでなく、酸化を経て GST-GSH により新奇な抱合反応を少なくとも一つ以上受けていることを示している。本論文ではデータを記述していないが、GST6B による反応で 2,4-ジクロロフェニルリン酸が高槻系で 4%、八千代系で 6% 程度他の代謝物と共に検出され、脱エチル S-オキシドの生成を強く示唆した。この酸化的抱合反応を証明する鍵となる化合物として、前報¹⁾で報告した GSH 抱合体と共にこの脱エチル S-オキシド体を推定 (図 1 と図 4) して有機化学的に証明を試みたが、いずれも合成の上で困難な問題があり未だ成功裏に至っていない。本研究ではその反応と鍵となる化合物の構造を以下に記す計算化学により予測した。

3. 計算化学による新奇 GSH 抱合の反応予測

GSH 抱合は GSH が GST により活性化されて GS^- となり親電子性基質を求核攻撃することから、 GS^- をプロチオホスオキシソン S-オキシドの不斉リン原子あるいはエトキシル基のメチレン炭素原子に SN_2 反応させた。本計算は、プロチオホスオキシソンの酸化により生成する S-オキシドは PrS(O) のイオウ原子とリン原子の結合距離が (R)p, (S)p 共に 2.36 Å と大きく極めて不安定で PrS(O) が GS^- により容易に置換されることが想起されること、もう一つは有機リン化合物のアルキル基またはアリール基が GST

により引き抜かれ GSH に抱合されることが薬物代謝で既知の事実としてよく知られていることから試みた。

(1) 不斉リン原子への求核攻撃

(R)p-プロチオホスオキシソン S-オキシドと GSH の反応で得られた遷移構造の振動スペクトルにおいて -122.76 cm^{-1} に一つのピークが認められたため、この構造が遷移状態の構造の一つであることが示され、また遷移構造に表示されたベクトル表示は振動の方向が反応の方向とよく一致した。生成系では PrS(O) のイオウ原子とリン原子間の結合が大きくなり、代わって GS^- のイオウ原子がリン原子に結合し新たな SP^3 混成リン原子ができていく様子が見られた (図 2)。しかし、(S)p-プロチオホスオキシソン S-オキシドと GSH の反応では、(R)p-S-オキシドの反応と計算回数を同程度行っても遷移構造の振動スペクトルの負の領域にピークが認められず、また小さなピークが認められた時も IRC (intrinsic reaction coordinate) 計算の結果には反応系、遷移状態、生成系の経路が確認されなかった。これらの結果は、(R)p-S-オキシドは GSH と反応して図 2 のような GSH 抱合体を生成するが、(S)p-オキシドは GSH と反応しないか、または反応してもわずかしが抱合体を生成しないことを示唆した。

(2) エトキシル基のメチレン炭素原子への求核攻撃

本反応も GSH 抱合が進行するのは (R)p-プロチオホスオキシソン S-オキシドだけで、(S)p-S-オキシドは十分な証拠はないが反応しないことが窺えた。(R)p-S-オキシドの遷移構造の振動スペクトルでは -733.94 cm^{-1} に大きなピークが一つ認められ、この構造が遷移状態の構造の一つであることが示唆され、また遷移構造に表示されたベクトル表示は振動の方向が反応の方向と一致した。生成系では

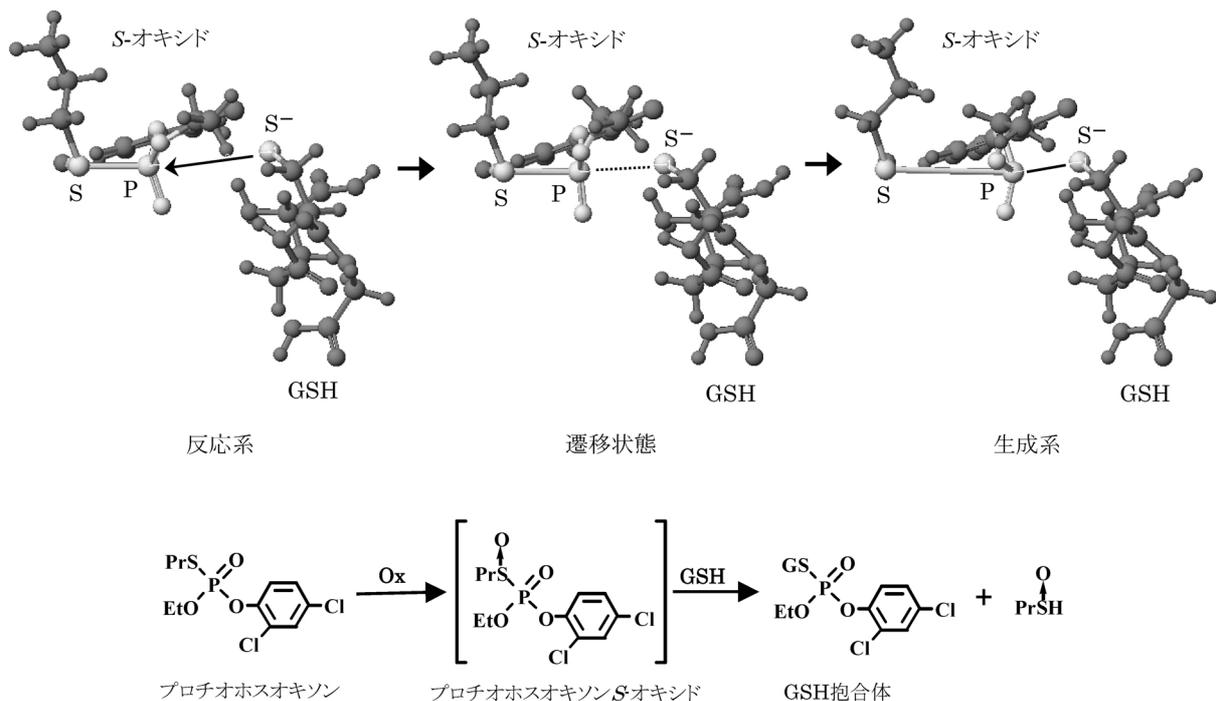


図 2 (R)p-プロチオホスオキシソン S-オキシドの不斉リン原子への GSH の SN_2 反応

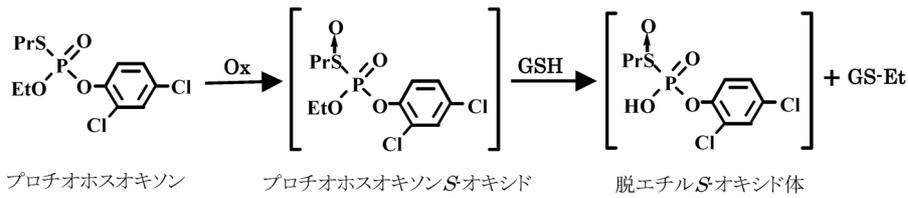
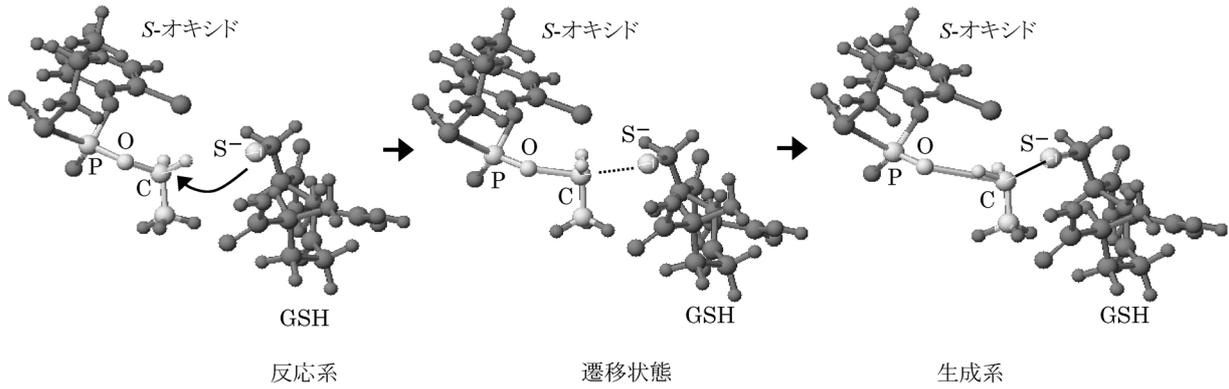


図 3 (R)p-プロチオホスオキソン S-オキシドのエトキシル基のメチレン炭素原子への GSH の SN2 反応

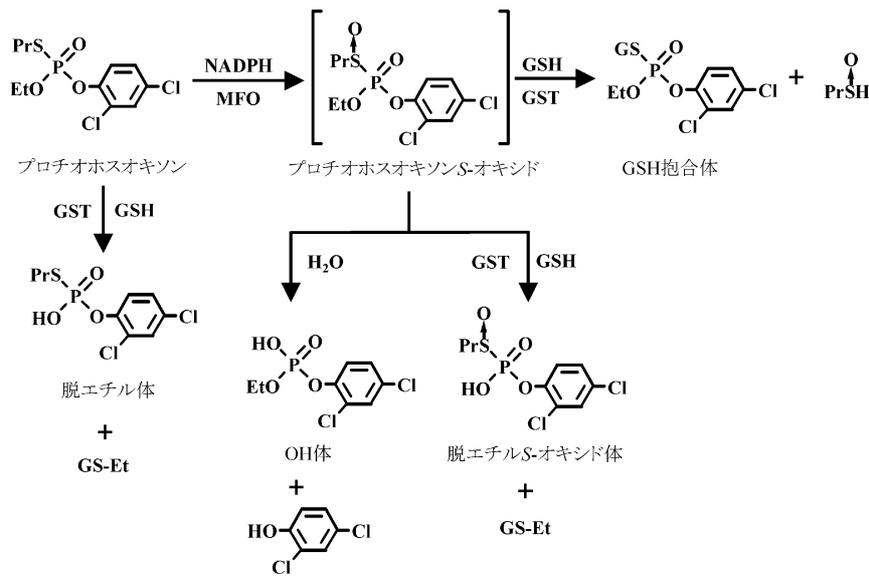


図 4 プロチオホスオキソンの酸化的抱合反応

酸素原子とメチレン炭素原子間の結合が大きくのび、代わってGS⁻のイオン原子がメチレン炭素原子に結合、エチル基がGSHに抱合化されていく様子が見られた(図3)。

4. イェバ工腹部 GST 分子種 6B の役割と新奇抱合反応
有機リン殺虫剤の多くはリン酸アルキルあるいはアリールエステルをもつチオノ体構造でオキソン体に酸化(酸化的脱イオウ)されて AChE を障害、殺虫活性を呈して虫を殺す。GST による GSH のアルキルあるいはアリール抱合により解毒化に差が生じ、酸化的脱イオウ反応と相まって昆虫と哺乳動物あるいは昆虫間で選択毒性を生み農業として利用される。有機リン剤に抵抗性を発現した昆虫は GST

活性が高いことが知られているが、近年 Wei *et al*³⁾ は抵抗性 Cornell-HR イェバ工の GST 分子種 6A がこれに大きく係わっていることを報告した。著者らは感受性高機系、抵抗性八千代系イェバ工腹部から GST 分子種 6A, 6B の遺伝子をクローニングし、大腸菌内で GST6A, 6B を発現させて、抵抗性昆虫にも殺虫活性を有する有機リン殺虫剤プロチオホスのオキシソンの *in vitro* 酸化反応をこれらの GST 分子種を加えて行い、新奇な酸化的抱合反応を予測した。イェバ工腹部 GST 分子種 6B は、6A と同様に GSH のアルキル抱合を担うが、6A と異なるのは抵抗性由来の GST6B の方が感受性由来の GST6B より脱エチル体の生成量が約 1/2 と少なく、解毒化への抱合反応を抑制してい

た。また、GST6BはS-オキシドをGSHに抱合し、脱エチル化し、その作用は抵抗性のGST6Bの方が感受性のGST6Bより強く、薬物の活性化を示唆した。十分な証拠に欠けるがGST6Bの存在が有機リン殺虫剤プロチオホスに今なお抵抗性昆虫が出現しない理由かもしれない。計算化学から予測される新奇抱合反応は、図4示したGSH抱合体を生成する経路と、脱エチルS-オキシド体を生成する経路の

2通りである。

参考文献

- 1) 宮本 徹・山本 出, (1991) *農業誌*, **16**, 449-455.
- 2) LEWIS, J.B. and SAWICKI, R.M., (1971) *Pesticide. Biochemistry and Physiology*, **1**, 275.
- 3) WEI, S.H., CLARK, A.G. and SYVANEN, M., (2001) *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **31**, 1145-1153.

A Novel Glutathione Conjugation of the Organophosphorus Insecticide Prothiophos by the Housefly Abdomen Glutathione S-transferase 6B

By

Tsuyoshi MIKAWA*, Masayuki SUE** and Toru MIYAMOTO**

(Received May 24, 2004/ Accepted July 30, 2004)

Summary : The cloning of glutathione S-transferase (GST) 6A and 6B genes in the susceptible and resistant houseflies (Takatsuki and Yachiyo strains) and the expression of their genes in *Escherichia coli* were carried out to obtain the GST6A and 6B enzymes. Similarly to the housefly abdomen GST 6A enzymes, the housefly abdomen GST6B enzymes conjugated alkyl group on phosphorus atom of prothiophos oxon with glutathione. However, the GST6B enzyme derived from the resistant housefly had only 1/2 level of GST activity for the above GSH conjugation reaction, compared with the GST6 B derived from the susceptible housefly, to decrease the ability in detoxification. On the other hand, *in vitro* oxidative GSH conjugation reaction indicated that their GST6B enzymes cover a novel GSH conjugation reaction at least. The reaction of prothiophos oxon S-oxide with GSH was predicted on computational chemistry using BioMedCACHe software. One was SN2 reaction of GS⁻ to phosphorus atom, and the other was SN2 reaction of GS⁻ to methylene carbon atom of ethoxyl group. The GST6 B enzyme probably plays an important role in the control of resistant decrease for houseflies.

Key words : Organophosphorus Insecticide Prothiophos, Housefly glutathione S-transferase 6B isozyme, Resistance

* Department of Agricultural Chemistry, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture