

微生物の除草剤 DCPA 分解酵素に関する研究

第1報 数種の *Paecilomyces* 菌種間の比較

赤塚尹己・三平房夫・正木武治

Studies on DCPA (Propanil) Hydrolase in Microorganisms

I. With special reference to the comparison among several *Paecilomyces* species.

TADAMI AKATSUKA, FUSAO MIHIRA and TAKEHARU MASAKI

1. 緒 言

土壌中における除草剤の分解に関する研究は数多い。何故ならば、葉面散布とともに土壌処理剤としての使用の可否が除草剤の価値を決定づける重要な factor であるためである。さらに最近農業公害との関連においてそれらの分解物、或は再合成された化合物が再び作物に吸収され、人体にとり込まれる可能性を含むからである。畑地土壌中での DCPA 分解は Bartha¹⁾, Chisaka, Kearney²⁾ 等により詳細に研究され、水田土壌については赤塚³⁾ によって詳しく研究されている。特に, Bordeleau 等⁴⁾ は DCPA から 3,3',4,4'-tetrachloroazobenzene への transformation が *Penicillium piscarium* や *Geotrichum candidum* によって行われることを報告した。しかしながら、微生物の酵素による DCPA の水解に関する研究は極めて少い。Kearney⁵⁾ は, *Pseudomonas striata* を用いて CIPC 及び DCPA 分解酵素を精製した報告があり、最近遠藤等⁶⁾ により MCC 分解菌のスクリーニングを行い、その菌株を同定した結果 *Paecilomyces* 属の一菌株であり、DCPA 分解酵素も含むことを報告し、MCC 分解酵素の部分精製を報告した。

著者等は、数種の *Paecilomyces* 菌を用いて菌を培養し、菌体中の DCPA 分解酵素の有無を検討した結果、比較的強力な活性をもつ菌株として *Paecilomyces varioti* Bainier AHU 9254, *Paecilomyces sp.* HUT 4017 を発見したので本酵素の予備的試験結果を報告する。

2. 実験方法

(A) 供試菌株

供試菌株として下記のものを使用した。

<i>Paecilomyces varioti</i> Bainier	AHU 9254
"	HUT 4018
<i>Paecilomyces sp.</i>	HUT 4017
<i>Paecilomyces marquandii</i> Hughes	IFO 6120
<i>Paecilomyces elegans</i> Mason et Hughes	IFO 6987
"	IFO 6619

(B) 菌の培養

馬鈴薯 200 g を水 1,000 ml で煮出し、グルコース 30 g を添加して pH 7.0 に調製した培地を用い 500 ml の三角フラスコにこの培地 100 ml を分注し、オートクレーブで殺菌し常法により菌を接種して 30°C の恒温器で 7 日間静置培養した。

(C) 酵素液の調製

菌蓋をとり出し、裏面を蒸留水で洗浄した後、大型濾紙の間にはさみ附着した水分を除き、菌体重量の 1/10 g の海砂を加え、菌体重量の 1/2 の phosphate buffer pH 7.0 を加えて乳鉢中で充分磨砕する。

磨砕物を三角フラスコに移し 40°C の恒温槽中に 1 時間放置して酵素を抽出する。1 時間後に 10,000×g, 10 分, 0°C で遠心分離を行い上澄液を酵素液として実験に用いた。

(D) 基質及び基質緩衝液の調製

酵素の基質は、主として 3,4-DCPA を用いたが、本実験に使用した二、三の関連化合物の略号は次の通りである。基質はすべて M/15 phosphate buffer pH 8.0 (1% ethanol を含む) に溶解し 400 μ モル溶液となるように調製した。

3,4-DCPA	3,4-dichloropropionanilide
2,3-DCPA	2,3-dichloropropionanilide
2,3-DCAA	2,3-dichloroacetanilide
2,5-DCAA	2,5-dichloroacetanilide

(E) 酵素力の測定法⁷⁾

DCPA が水解酵素の作用により、遊離放出される di-chloroaniline (DCA) , N-(1-naphthyl) ethylenedi-amine (NED) と coupling させ比色定量する後藤等の定量法を微量化した著者等の方法を用いた。実験法の要点を摘記すれば次の様である。

消化試験管に基質緩衝液 2.0 ml をとり、所定温度 (40°C) に 5 分間 preincubation を行ない 0.5 ml の酵素液を加えた瞬間を反応始発時間とする。一定時間毎に 0.5 ml 宛を小試験管にとり、氷冷水 2 ml, 2% NaNO₂ 溶液 0.1 ml, 醋酸, 塩酸, 水 (4:1:1) 混酸 1.5 ml を加えて攪拌し、20°C 以下で 5 分間放置する。ついで 10% NH₄OSO₂NH₂ 溶液 0.2 ml を加え 10 分後 1% NED 溶液 0.1 ml 及び、0.6 ml を加えて 15 分間放置後 550 m μ で比色定量した。DCA として 0.02~0.2 μ モルの範囲で満足すべき定量結果を得た。酵素活性の測定は、特記しない限り M/15 phosphate buffer pH 8.0, 反応温度 40°C, 反応時間 6 時間で行なった。酵素蛋白質の定量は Lowry 法により行った。

3. 実験結果と考察

実験結果は第 I 表, 第 II 表及び第 1 図, 第 2 図に示し

第 I 表 数種の *Paecilomyces* 属菌の DCPA 分解活度

菌 種	DCA m μ moles	比活性
<i>Paecilomyces varioti</i> AHU 9254	30.5	65
<i>Paecilomyces varioti</i> HUT 4018	2.5	9
<i>Paecilomyces sp.</i> HUT 4017	55.0	113
<i>Paecilomyces marquandii</i> IFO 6120	0	0
<i>Paecilomyces elegans</i> IFO 6987	0	0
<i>Paecilomyces elegans</i> IFO 6619	0	0

(註1) 基質は 3, 4-DCPA 400 μ M/pH 8.0 (M/15) phosphate buffer.

(註2) 反応条件は、40°C, 6 時間である。

た。

第 I 表の結果について

Paecilomyces 属菌 6 株について実験方法の項 2-C に従って酵素を調製し、3,4-DCPA を基質として水解活性を測定した結果第 I 表に示した通りである。この結果から *Paecilomyces* 属菌の菌体内 DCPA 水解酵素力は各菌株により、その差が著しかった。分解強力菌として *Paecilomyces sp.* HUT 4017 が比活性 113 を示し、最も強く、ついで *Paecilomyces varioti* AHU 9254 が比活性 65 を示した。ついで *Paecilomyces varioti* HUT 4018 では比活性 9 を示し、微弱な活性を示すにすぎなかった。その他の菌株は全く活性を示さなかった。また培地に 3,4-DCPA を 10⁻⁴ M 濃度になるように添加して、これら 6 株の *Paecilomyces* 属菌を培養した結果、全く活性を示さなかった 3 菌株は全く菌の生育がみられなかった。これに対して酵素活性を示した 3 菌株はどれも 10⁻⁴ M DCPA を含む培地に生育したことは興味深い。

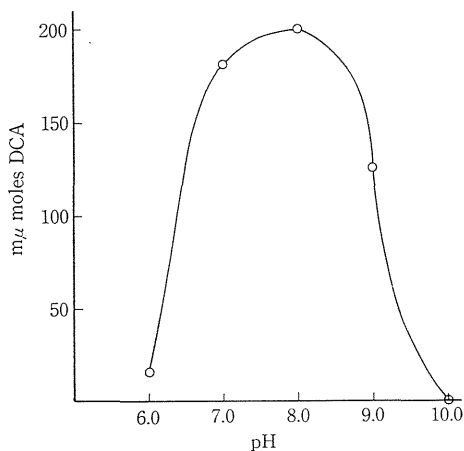
第 1 図について

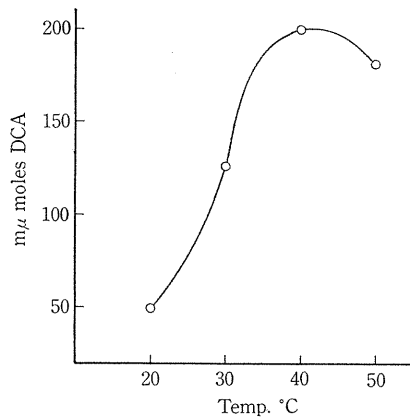
Paecilomyces varioti の菌体内 DCPA 分解酵素に対する pH の影響について調べた結果である。pH 6.0 から pH 10.0 までの 5 点について試験した結果、作用至適 pH は pH 8.0 付近にあることが判った。pH 10.0 では酵素は完全に失活することも判明した。

第 2 図について

第 1 図の場合と同じ酵素を用いて各温度即ち 20°C, 30°C, 40°C, 50°C の 4 点について試験した結果 40°C 付近で最大活性を示した。

第 1 図 *Paecilomyces varioti* 菌体内 DCPA 分解酵素に対する pH の影響



第2図 *Paecilomyces varioti* 菌体内 DCPA 分解酵素に対する温度の影響

第II表について

2, 3 の DCPA 関連化合物に対する活性を予備的に試験した結果である。この結果 3,4-DCPA に対する活性が最大を示し, 2,3-DCPA, 2,3-DCAA の順に減少し, 2,5-DCAA に対する活性は全くなかった。この結果は高等植物等の aryl acylamidase の基質特異性とは異なり注目される。今後さらに詳細な検討が期待される。

終りに保存菌株を提供されました北海道大学農学部, 広島大学工学部, 醗酵研究所に対し謝意を表します。また適切な御助言, 御指導をいただいた副島正美教授に深謝します。

第II表 *Paecilomyces varioti* 菌体内 DCPA 加水分解酵素の二, 三の基質に対する作用

基 質	相対活性度 (%)
3, 4-DCPA	100
2, 3-DCPA	69
2, 3-DCAA	44
2, 5-DCAA	0

(註1) 3, 4-DCPA を 100 とした場合の相対活性度で示した

(註2) 反応条件は pH 8.0 (M/15) phosphate buffer 20°C, 6 時間

4. 文 献

- Bartha, R. and D. Pramer: Science, **156**, 1617 (1967)
Bartha, R., H. A. B. Linke and D. Pramer: *ibid.*, **161**, 582 (1968)
- Chisaka, H. and P. C. Kearney: J. Agr. Food Chem., **18**, 854 (1970)
Plimmer, J. R., P. C. Kearney, H. Chisaka, J. B. Yount and U. I. Klingebiel: *ibid.*, **18**, 859 (1970)
- 赤塚昭三・早川 茂: 土壤肥料学会講演要旨集 **17**, 23 (1971)
- Bordeleau, L. M. and R. Bartha: Soil Biol. Biochem., **3**, 281 (1971)
- Kearney, R. C.: J. Agr. Food Chem., **13**, 561 (1965)
- 遠藤敬子・岡本栄子・高野 順・木崎忠重・林真守: 農化大会講演要旨集 **416** (1972)
- 赤塚尹己・鈴木光一・副島正美: 茨大農学術報告 **16**, 99 (1968)

Summary

We studied on a DCPA-hydrolase of *Paecilomyces* with special reference to the comparison among six species and the results obtained were shown Table I.

From the results of the survey, the activity of the DCPA-hydrolase was greatly different according to the several species of *Paecilomyces* used, and *Paecilomyces varioti* AHU 9254 and *Paecilomyces sp.* HUT 4107 were selected for this study.

The pH optimum for the hydrolysis of DCPA by this enzyme was found to be near pH 8.0 and the optimum temperature for incubation was found to be near 40°C (Figs. 1 and 2).

Further investigations of this enzyme will be published in the near future.