

微生物の除草剤 DCPA 分解酵素に関する研究

第2報 *Paecilomyces* sp. HUT 4017 の Aryl Acylamidase の 部分精製と該酵素の若干の性質

赤塚 尹巳・内山 隆

Studies on DCPA (Propanil) Hydrolyase in Microorganisms

II. Partially purification and some properties of an aryl acylamidase from *Paecilomyces* sp. HUT 4017

TADAMI AKATSUKA and TAKASHI UCHIYAMA

1. 緒 言

前報¹⁾において各種の *Paecilomyces* 属菌株より除草剤 DCPA を分解する強力菌株として *Paecilomyces varioti* AHU 9254 および *Paecilomyces* sp. HUT 4017 を発見し若干の予備的実験結果を報告した。

本報告においては *Paecilomyces* sp. HUT 4017 を大量培養し、菌体より酵素を抽出し、硫酸アンモニウムによる塩析により部分精製酵素を得た。この酵素を用いて若干の性質を検討した結果興味ある知見を得た、即ち本酵素の基質特異性を検討した結果、特に塩素の核置換化合物において 3-chloro 型、4-chloro 型、3,4-dichloro 型、2,3-dichloro 型のようにフェニル基の3位の炭素に塩素置換のあるアニライド化合物に特によく作用し、この酵素の最適基質は 3,4-DCPA であった。この事実は DCPA やその類縁化合物の殺草効果がフェニル基の3位或は4位の炭素の塩素置換と密接な関連を示す結果から、自然界における薬剤抵抗性或は解毒を行う微生物の立場からも極めて興味深い。

1972年遠藤等²⁾は大気中或は水中から分離した微生物 (*Paecilomyces* 属の一株) からの抽出酵素は MCC (Swep) と DCPA (Propanil) の両者を分解することを報告し、MCC 分解酵素の部分精製と性質について報告した。

著者等は *Paecilomyces* sp. HUT 4017 を用いて本菌株の生産する aryl acylamidase は MCC には作用せず、DCAA, DCPA および DCBA 等のアニライドによく作用することを確認した。また若干の性質特に至適 pH, 至適温度, ミハエリス定数, 有機試薬および金属イオンの影響等に関する実験結果を報告する。

2. 実験方法

(A) 供試菌株

Paecilomyces sp. HUT 4017 を使用した。本菌株は北海道大学農学部、応用菌学教室、佐々木西二博士の御厚意により恵送されたものである。

(B) 菌の培養

馬鈴薯 200 g を水 1000 ml で煮出し、グルコース 50 g を添加して pH 7.0 に調整した液体培地を用い、500 ml の三角フラスコに 100 ml 宛を分注し、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 M/15 phosphate buffer pH 7.0 を加えて乳鉢中で充分磨砕する。磨砕物に三角フラスコに移し 40°C の恒温槽中に 90 分間放置して酵素を抽出する。その後 12,000 r.p.m, 20 分, 0°C で遠心分離を行い、上澄液を粗酵素液とした。

150 g の菌体から約 115~120 ml の粗酵素液が得られる。

(D) 硫酸アンモニウムによる塩析

(C) で得られた粗酵素液に対して Dixon の方法に従って 40% 硫酸飽和とし、12,000 r.p.m, 20 分, 0°C で遠心分離を行い、上澄液に対してさらに 60% 硫酸飽和を行い、前記同様の条件で遠心分離を行い沈殿物を phosphate buffer (pH 7) に溶解し、セロハンチューブを用いて 1°C で 24 時間透析を行い、この酵素液を部分精製

酵素液として実験に用いた。精製度は粗酵素液の約6倍であり比活性は約630であった。

(E) 基質及び基質緩衝液の調製

基質は主として 3,4-DCPA を用いたが、本実験に使用した各種の DCPA 関連化合物とそ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
2,4-DCPA	2,4-dichloropropionanilide
2,5-DCPA	2,5-dichloropropionanilide
2,6-DCPA	2,6-dichloropropionanilide
3,5-DCPA	3,5-dichloropropionanilide
2-CPA	2-chloropropionanilide
3-CPA	3-chloropropionanilide
4-CPA	4-chloropropionanilide
3-MPA	3-methylpropionanilide
2,4-DCAA	2,4-dichloroacetanilide
2,5-DCAA	2,5-dichloroacetanilide
3,4-DCAA	3,4-dichloroacetanilide
3-CAA	3-chloroacetanilide
3-MAA	3-methylacetanilide
3,4-DCBA	3,4-dichloro-n-butyranilide
MCC	methyl N-(3,4-dichlorophenyl) carbamate

(F) 酵素力の測定法

DCPA 或はその誘導体が aryl acylamidase の作用により遊離放出される dichloroaniline (DCA) を N-(1-naphthyl) ethylenediamine (NED) と coupling させ比色定量する後藤等³⁾の定量法を微量化した著者等の方法を用いた。測定法は第1報¹⁾と同様である。但し酵素反応時間は特記しない限り24時間行った。酵素蛋白質の定量は Lowry 法⁴⁾により実施した。

(G) 各種試薬の酵素に対する影響に関する試験

今回の試験に用いた試薬は有機りんおよびカーバメート殺虫剤、並びに若干の金属イオンを含む13種である。実験結果の表に示した濃度は酵素反応における最終濃度を示した。金属イオンは塩化物を用いた。各種試薬の略号は次の通りである。

CPMC	2-chlorophenyl-N-methylcarbamate
DFP	diisopropylfluorophosphate
NAC	naphthyl-N-methylcarbamate
PCMB	p-chloromercuric benzoate (Na)
EDTA	ethylenediaminetetraacetate (2 Na)

glutathion (R) (R) は reduced form を示す。

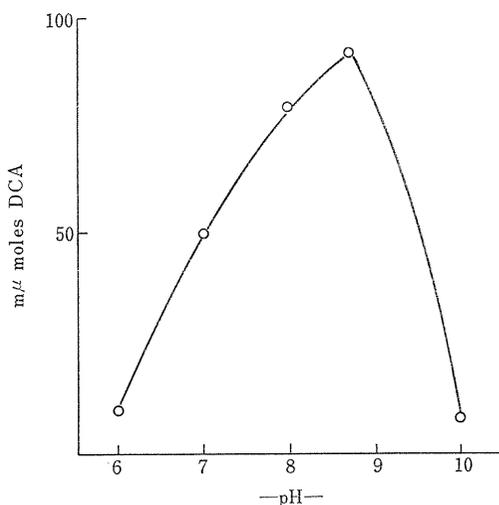
3. 実験結果と考察

実験結果は第I表~第III表並びに第1図~第3図に示した。

部分精製酵素の調製は 2-(C), (D) において示したが、粗酵素液の約6倍の力価をもつ比活性630の部分精製酵素を得た。この段階で収率は28~38%であった。現在クロマトグラフィーにより精製を行っているので近い将来、単一な酵素蛋白質として得られると考えられる。

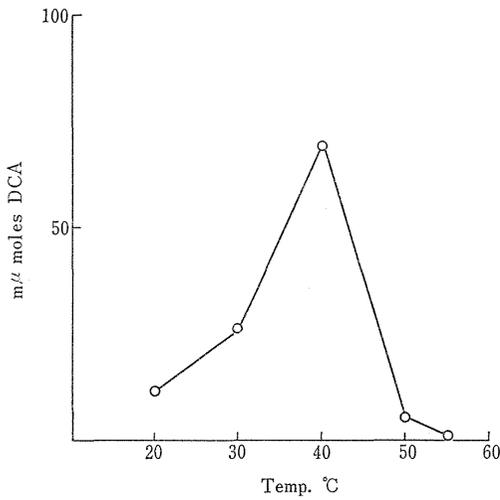
該酵素の性質について検討した結果、次の通りである。至適 pH は第1図に示した通り pH 8.6 付近で最高の活性を示した。反応最適温度は第2図に示したように 40°C 付近で最高の活性を示した。また 50°C では本酵素は殆んど失活した。ミハエリス定数を測定した結果 $K_m = 1.67 \times 10^{-3} M$ (第3図) であった。

基質特異性について実験した結果、本酵素の最適基質は 3,4-DCPA であった。3,4-DCPA (Propanil) に対する活性を100とし他の基質に対する相対活性度を示した結果が第I表である。この結果から塩素の核置換が3位の炭素を含む場合、即ち 3,4-Cl, 2,3-Cl 等の型に対して活性が強く monochlor 置換では 3-Cl, 4-Cl 等の型に対して活性が強く、2-Cl 型では活性を極端に減じた。CH₃ 基の導入によっても極端に活性を減じた。



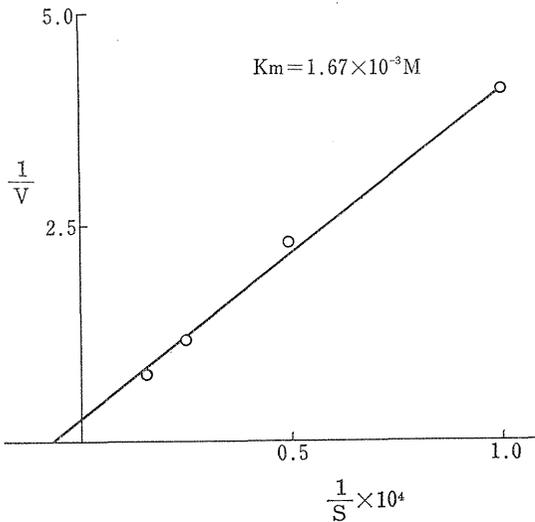
反応条件: pH 6~8.6, 1/15 M phosphate buffer, pH 10, glycine-NaOH buffer, 40°C, 24 hr., 3,4-DCPA

第1図 Paecilomyces Aryl Acylamidase の pH 活度曲線



反応条件: pH 8.0 1/15 M phosphate buffer, 24 hr., 3,4-DCPA.

第2図 Paecilomyces Aryl Acylamidase の反応温度の影響



反応条件: pH 8.0 1/15 M phosphate buffer, 40°C, 24 hr., 3,4-DCPA.

第3図 Paecilomyces Aryl Acylamidase の基質濃度の影響

2,6-DCPA, 2,6-DCAA などの 2,6-CI 型の場合, 高等植物の酵素の場合と同じように全く水解しなかった。アルキルアナログの場合 3,4-DCBA に対してかなりの活性を示すことは興味深い。アルキルアナログの場合極めて水に難溶のため普通の濃度では酵素反応試験が不可能である。さらに多くの基質に対する試験は次報に報告したい。Paecilomyces sp. 4017 の生産する aryl

第I表 Paecilomyces Aryl Acylamidase の基質特異性

基 質	相 対 活 性 度
3,4-DCPA	100 %
2,3-DCPA	41.4
2,4-DCPA	22.4
2,5-DCPA	0
2,6-DCPA	0
3,5-DCPA	2.4
2-CPA	6.6
3-CPA	96.2
4-CPA	104
3-MPA	7.9
2,4-DCAA	11.2
2,5-DCAA	14
3,4-DCAA	72.8
3-CAA	118.6
3-MAA	16.9
3,4-DCBA	89.7
MCC (Swep)	0

反応条件: pH 8.0 1/15 M phosphate buffer, 40°C, 24 hr.

第II表 有機リン及びカーバメート殺虫剤の影響

試 薬	濃 度	相 対 活 性 度
None	—	100 %
Parathion	10 ⁻⁴ M	84.9
Paraoxon	10 ⁻⁶ M	90.5
DPMC	10 ⁻⁶ M	87.5
DFP	10 ⁻⁴ M	71.3
NAC	10 ⁻⁴ M	18.4
NAC	10 ⁻⁶ M	82.9

反応条件: pH 8.0 1/15 M phosphate buffer, 40°C, 24 hr., 3,4-DCPA.

acylamidase は粗酵素液で試験を行っても MCC (Swep) に対する活性は検出できなかった。部分精製酵素液を用いた試験でも活性は全く検出できなかった。

遠藤等²⁾ は自然界から分離した Paecilomyces 属の一菌株を用いて実験した結果 MCC と DCPA を分解する酵素の存在について報告し, MCC 分解酵素について詳しく報告した。

著者等は現在まで MCC 水解酵素を検出していないが, 培養条件を適当に選ぶことにより誘導的に生成されるものと考えられる。

第II表は 2,3 の有機りんおよびカーバメート殺虫剤の

第III表 二、三の試薬及び金属イオンの影響

試薬・金属イオン	濃度	相対活性度
None	—	100 %
Glutathion (R)	10 ⁻⁴ M	114.3
PCMB	10 ⁻⁴ M	2.4
PCMB	10 ⁻⁶ M	47.2
Hg ²⁺	10 ⁻³ M	3.4
Zn ²⁺	10 ⁻³ M	16.2
Co ²⁺	10 ⁻³ M	29.3
Ca ²⁺	10 ⁻³ M	112.7
Mg ²⁺	10 ⁻³ M	110.5
EDTA	10 ⁻³ M	102.7

反応条件: pH 8.0 1/15 M phosphate buffer, 40°C, 24 hr., 3,4-DCPA.

影響について調べた結果である。この結果から有機りん剤による阻害は少く植物の aryl acylamidase の場合と明確に異なる性質と考えられる。カーバメート剤による阻害も植物酵素と比較した場合鋭敏でなかったが NAC の場合 10⁻⁴M で 80% の阻害を示した。

第III表は2,3の試薬と若干の金属イオンの影響につ

いて調べた結果である。PCMB や Hg²⁺ により激しく阻害され還元型グルタチオンにより活性が促進される結果から本酵素は“SH 酵素”と考えられる。EDTA により全く阻害をうけないことから金属酵素ではないと考えられる。酵素の性質に関する詳細は今後さらに検討されるであろう。

本研究に当り DCPA およびその関連化合物を戴きました名古屋大学農学部鍬塚昭三博士, 保土谷化学工業株式会社に対し心から謝意を表します。また供試菌株を戴いた北海道大学農学部佐々木西二博士に謝意を表します。また適切なる御助言, 御鞭達をいただいた副島正美教授に深謝します。

4. 文 献

- 1) 赤塚尹己・三平房夫・正木武治: 茨大農学術報告, 20, 21 (1972)
- 2) 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, p. 416 (1972)
- 3) 後藤真康・佐藤六郎: 農薬生産技術, 10, 17 (1964)
- 4) Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randal: J. Biol. chem., 193, 265 (1951)

Summary

An aryl acylamidase from *Paecilomyces sp.* 4017, which hydrolyzes 3,4-dichloropropionanilide (DCPA). was partially purified and characterized.

The pH optimum for the hydrolysis of DCPA was found to be near pH 8.6 (Fig. 1), and optimum temperature for incubation was found to be near 40°C (Fig. 2).

The apparent Km for DCPA was found to be 1.67×10⁻³M (Fig. 3).

As to the substrate specificity, the effect of ring substitution on *Paecilomyces* aryl acylamidase was shown in Table I. 3,4-Dichloropropionanilide was shown to be a better substrate for this enzyme, but no activity was found for MCC as a substrate.

Substitution of chlorine in the *meta* and *para* position of propionanilide results in an increase of the enzymatic hydrolysis. A chlorine atom in the *ortho* position greatly decreased activity.

The enzyme was inhibited by sulfhydryl reagents and was some accelerated by reduced glutathion (Table II and III).