

選択性除草剤に関する研究

第5報 数種の雑草の Aryl Acylamidase による DCPA と その類縁化合物の分解

赤塚 尹己・笠倉 紀夫

Studies on Selective Herbicides

V. Substrate specificity of aryl acylamidase from several weeds.

TADAMI AKATSUKA and NORIO KASAKURA

1. 緒 言

選択性除草剤 DCPA (Propanil) がイネには殆んど害がなく、ヒエその他の雑草を枯死させることは周知の事実である。そして、その選択性のメカニズムは、DCPA を加水分解する aryl acylamidase がイネに存在し、ヒエには存在しないか、又は微弱であるために起る事も McRae¹⁾、足立²⁾、松中³⁾、石塚⁴⁾、C. C. Still⁵⁾ 等により報告された。赤塚⁶⁾ 等はこの選択性発現機構の主役であるイネの aryl acylamidase を単一の酵素蛋白質として精製する事に初めて成功し、酵素化学的諸性質を明らかにした。

しかし、1968年 Frear⁷⁾ 等により、約2倍の酵素活性を持つ部分精製酵素として得られた報告はある。その後赤塚、笠倉⁸⁾ はヒエの粗酵素液を用いて、約20種のDCPA類縁化合物に対する水解活性を検討した結果、2,5-DCAA (2,5-dichloroacetanilide) に対して、比較的強い活性を示すことを発見し、2,5-DCAA を指標基質としてヒエの aryl acylamidase の精製に成功し、その酵素化学的諸性質について報告した。

今回は雑草のうちヒエ、メヒシバ、オーチャードグラス、ツユクサ、ミズガヤツリを選び、20種のDCPA類縁化合物に対する水解活性を検討した結果、二、三の新知見を報告する。

2. 実験方法

(A) 試料植物 本実験に使用したイネは日本晴(5葉期)、タイヌビエ(5葉期)、メヒシバ(5~6葉期)、オーチャードグラス、ツユクサ、ミズガヤツリの6種である。

(B) Aryl acylamidase の抽出 試料植物を採取後直ちに中性洗剤で軽く洗った後、蒸留水で充分洗い附着した水分を濾紙で吸い取り、生体重量と等量の phosphate buffer (M/15) pH 7.0 (0.01 M EDTA, 0.05 M 2-mercaptoethanol を含む) を加え、海砂と共に乳鉢中で充分磨砕し、磨砕液は冷凍遠心器で 1,000×g, 10分 0°C で遠心分離を行ない、上澄液を更に 20,000×g, 120分, 0°C で遠心分離を行ない、上澄液はそのまま、そして、沈殿物は前記の少量の phosphate buffer に懸濁し、酵素実験に供した。

(C) 基質及び基質緩衝液の調製 酵素実験に使用した、20種のDCPA及びその類縁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 7.0 (1% ethanol を含む) に溶解し、400μ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
PA	propionanilide
2, 3-DCAA	2, 3-dichloroacetanilide
2, 4-DCAA	2, 4-dichloroacetanilide
2, 5-DCAA	2, 5-dichloroacetanilide
2, 6-DCAA	2, 6-dichloroacetanilide

3, 4-DCAA	3, 4-dichloroacetanilide
3, 5-DCAA	3, 5-dichloroacetanilide
2-CAA	2-chloroacetanilide
3-CAA	3-chloroacetanilide
4-CAA	4-chloroacetanilide
AA	acetanilide

(D) 酵素力の測定法 DCPA が水解酵素の作用により、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の定量法⁹⁾ を微量化した、著者等¹⁰⁾ 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

第 I 表 タイヌピエ, メヒシバ, DCPA 感受性イネの aryl acylamidase の基質特異性

植物 基質	相 対 活 性 度 (%)					
	タイヌピエ		メヒシバ		感受性イネ	
	上澄液	沈 澱 区 分	上澄液	沈 澱 区 分	上澄液	沈 澱 区 分
2, 5-DCAA	100	0	100	0	±	-
2, 3-DCAA	62	0	48	0	+	-
2, 4-DCAA	11	0	54	0	-	-
2, 6-DCAA	0	0	0	0	-	-
3, 4-DCAA	17	0	39	0	±	-
3, 5-DCAA	49	0	18	0	-	-
2-CAA	26	0	22	0	+	-
3-CAA	86	0	26	0	+	-
4-CAA	0	0	0	0	-	-
AA	0	0	0	0	-	-
2, 3-DCPA	45	0	28	0	+	-
2, 4-DCPA	28	0	53	0	+	-
2, 5-DCPA	48	0	6	0	-	-
2, 6-DCPA	0	0	0	0	-	-
3, 4-DCPA	0	0	0	0	-	-
3, 5-DCPA	0	0	0	0	-	-
2-CPA	32	0	27	0	-	-
3-CPA	19	0	6	0	-	-
4-CPA	0	0	0	0	-	-
PA	0	0	0	0	-	-

(註1) 数値は 2, 5-DCAA を 100 とした場合の相対活性度を示した。
 (註2) 反応条件は pH 7.0 (phosphate buffer) 40°C で 24 時間 incubation を行った結果である。

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), 混液 1.5 ml を加えて攪伴し, 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 及び水 0.6 ml を加えて, 15 分間放置後 550 mμ で比色定量した。DCA として 0.02~0.2 μ mol 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, phosphate buffer pH 7.0, 反応温度 40°C, 反応時間 24 時間(但しイネの場合は 2 時間)で行なった。

3. 実験結果と考察

実験結果は第 I 表及び第 II 表に示した。

第 II 表 オーチャードグラス, ツユクサ, 抵抗性イネの aryl acylamidase の基質特異性

植物 基質	相 対 活 性 度 (%)					
	オーチャード グラス		ツユクサ		DCPA 抵抗性イネ	
	上澄液	沈 澱 区 分	上澄液	沈 澱 区 分	上澄液	沈 澱 区 分
3, 4-DCPA	100	100	100	100	100	100
2, 3-DCPA	408	472	65	95	85	55
2, 4-DCPA	46	56	50	30	85	72
2, 5-DCPA	0	0	3	0	25	32
2, 6-DCPA	0	0	0	0	0	0
3, 5-DCPA	0	41	17	0	73	79
2-CPA	154	149	34	31	108	110
3-CPA	404	477	65	125	105	109
4-CPA	0	15	69	75	60	78
PA	0	0	0	0	20	12
2, 3-DCAA	208	210	30	276	83	74
2, 4-DCAA	42	52	40	51	83	98
2, 5-DCAA	150	0	8	0	23	30
2, 6-DCAA	0	0	0	0	0	0
3, 4-DCAA	92	73	62	71	58	83
3, 5-DCAA	39	36	2	0	15	34
2-CAA	65	76	5	33	80	78
3-CAA	115	224	50	48	85	112
4-CAA	0	20	48	46	25	31
AA	0	-	0	0	10	16

(註1) 3, 4-DCPA に対する水解活性を 100 とした場合の相対活性度 % で示した。
 (註2) 反応条件は pH 7.0 (phosphate buffer) 40°C, 24 時間で行った。但し, イネの場合は反応時間は 2 時間で行った。

第 I 表の結果について

第 I 表は水田雑草の代表的存在であるタイヌビエと畑地雑草の代表的存在であるメヒシバ、そして松中によって発見された DCPA 感受性イネの酵素を 2 区分に分けて DCPA 関連化合物に対する水解活性を調べた結果である。この結果から注目すべきことは、20,000×g, 120 分遠心分離による上澄液と沈殿区分に分けて酵素活性を調べた結果、明らかに、雑草と DCPA 感受性イネの沈殿区分は、20 種の基質に対して全く活性を示さない事実である。この結果は抵抗性イネについて、既に著者等が指摘したように、aryl acylamidase (I) は particle bound enzyme であり、沈殿部に大部分の活性を示す場合と全く反対の結果である。

さらに第 I 表の結果からわかる様に、20 種の基質に対する活性を調べた結果、2, 5-DCAA がこれらの雑草の aryl acylamidase に対し、最も好適な基質である事を発見した。そしてこの酵素は、乳鉢磨砕により容易に可溶化酵素として、20,000×g, 120 分の遠心分離による上澄液として得られる事がわかった。

又、類縁化合物の中で 2, 3-DCPA, 2, 4-DCPA, 2, 3-DCAA, 2, 4-DCAA に対する活性が強く、2, 6-DCPA 及び 2, 6-DCAA, 4-CAA 及び 4-CPA, AA 及び PA に対しては殆ど活性を示さなかった。

第 II 表の結果について

第 II 表は、イネ科牧草で日本の三大牧草の一つであるオーチャードグラス、広葉雑草で比較的 DCPA に抵抗性を持つツユクサ、対照実験として DCPA 抵抗性イネの 20,000×g, 120 分の上澄区分と沈殿区分とに分けて、20 種の除草剤 DCPA の類縁化合物に対する水解活性を調べた結果である。この結果から供試した 3 つの試料がともに、上澄区分と沈殿区分の両者に活性を示す事が判った。この結果は既に一部報告したイネの場合とほぼ同じ傾向を示したが、オーチャードグラスとツユクサの茎葉には aryl acylamidase がともに particle bound enzyme として存在する事である。そして、3, 4-DCPA (実用化除草剤) に対する活性が両区分にある事は、これらの植物がともに DCPA に対して比較的抵抗力を持つ事と考え合わせる時 DCPA 分解酵素の役割が解毒酵素としての証拠を更に強調するだろう。オーチャードグラス及びツユクサに共通している点は 2, 3-DCPA, 2, 3-DCAA, 2-CPA, 3-CPA, 2-CAA, 3-CAA に対する活性が強く、2, 6-DCPA, 2, 6-DCAA, PA, AA に対する活性が殆ど見られない事である。

第 I 表及び第 II 表の結果の比較と考察

第 I 表の結果と第 II 表の結果から明らかな様に、aryl acylamidase (DCPA 分解酵素) の植物の茎葉における存在様式に 2 つのタイプが存在するように考えられる。

即ち第 I 表のグループは particle bound enzyme として存在しないタイプであるが、しかし、特に 2, 5-DCAA を最も良く水解する soluble enzyme を持つタイプである。又、第 II 表のグループは、particle bound enzyme を植物の茎葉中に持ち、同時に第 II 表のデータは soluble enzyme をも茎葉中に持っているグループである事を示唆している。換言すれば第 I 表のグループはヒエ型と考えられ、第 II 表のグループはイネ型と考えられる。

さらに第 II 表のグループが粗抽出液そのままでは、3, 4-DCPA と、48 時間反応しても活性が測定されない事、及び 3, 4-DCPA 散布により枯死する事から DCPA 感受性型と言ってもよく第 II 表のグループは、3, 4-DCPA に対する活性が強い事から DCPA 抵抗性型と言っても良いと考えられる。そして DCPA の選択性のメカニズムの解明は aryl acylamidase のイネとヒエの対比から DCPA 抵抗性イネと感受性イネとの対比に進展し、更に第 I 表、第 II 表にあげた雑草との比較、特にこの酵素の性質を明確にするところまで発展させる事により解決に近づくものと考えられる。

ミズガヤツリ (*Cyperus serotinus*) の抽出液について、同様の実験を行なったが、現在迄、いつれの化合物に対しても活性を示さなかった。今後更に検討を加えたい。

本研究の課題の第 3 報で finger grass (crab grass) の酵素で 2, 4-DCPA を最も良く水解すると報告したが、その後の検討結果 2, 5-DCAA を最も良く水解する事が判明したので訂正する。

本研究は農林省、農林水産業特別試験研究費により実施した。DCPA 関連化合物を提供された名古屋大学農学部飯塚昭三博士および保土谷化学工業株式会社に謝意を表します。また DCPA 感受性イネなどの実験材料を提供され、助言を戴いた農業技術研究所、松中昭一博士に謝意を表します。

終りに終始御指導をいただいた副島正美教授に深謝致します。

4. 文 献

- 1) McRae, D. H., R. Y. Yih and H. F. Wilson: Weed Soc., Abs., 87 (1964)
- 2) 足立明朗・利根川和江・上島俊治: 農業生産技術 No. 14, 19 (1966)
- 3) 松中昭一: 農業技術, 21, 6 号 (1966)

- | | |
|---|--|
| 4) 石塚皓造・三井進午：農化大会講演要旨集 62 頁 (1922) | 913 (1968) |
| 5) Still C. C. and D. Kuzirian: Nature, 216 , 799 (1967) | 8) 赤塚尹己・笠倉紀夫：農化大会講演要旨集 416 頁 (1972) |
| 6) 赤塚尹己・深沢幸義：農化大会講演要旨集 395 頁 (1971) | 9) 後藤真康・佐藤六郎：農薬生産技術 10 , 16 (1964) |
| 7) Frear D. S. and G. G. Still: Phytochemistry 7, | 10) 赤塚尹己・鈴木光一・副島正美：茨大農學術報告 16 . 99 (1968) |

Summary

Acylanilide hydrolase activities from two kinds of rice plants and several kinds of weeds, such as barnyardgrass, crabgrass, orchardgrass and asiatic dayflower, were determined using twenty DCPA derivatives as a substrate, and the results obtained were shown on the Table I and II.

A group of Table I showed that the enzyme was not present as a particle bound enzyme in stem and leaves, but was present as a soluble enzyme which hydrolyze 2, 5-DCAA especially, and the most particular things of this soluble enzyme had no activity for 3, 4-DCPA.

A group of Table II showed that several kinds of plant leaves contain both particulate and soluble enzymes. Plants such as orchard grass and asiatic dayflower have faint resistance for DCPA, but rice plant has the great resistance for DCPA in all plants tested, because of the bound aryl acylamidase from rice plants in the most active for DCPA.