

DCPA分解酵素の迅速測定法

児玉 治・赤塚 尹巳

A Rapid Colorimetric Assay for DCPA (Propanil) Hydrolase

OSAMU KODAMA and TADAMI AKATSUKA

I 緒 言

DCPAは選択性除草剤として広く使用されており、その選択性機構は主に、イネ茎葉中に存在するDCPA分解酵素 aryl acylamidase¹⁾の働きによることが明らかにされている。

従来本酵素の活性測定には、後藤等²⁾の方法が主として用いられているが、操作が複雑であり、検体が多数で迅速を要する場合は必ずしも適切な方法ではない。

そこで著者等は、坂井等³⁾の報告しているアミン類と p-dimethylaminocinnamaldehyde (p-DACA) との呈色反応を、aryl acylamidase により遊離放出されるアニリンの検出反応に応用した結果、迅速かつ精度よく測定出来る事を確認したので、その結果について報告する。

II 実験方法

A) 酵素液の調製法

DCPA 抵抗性イネ(農林8号)の5~6葉期の茎葉を試料として用いた。酵素液の調製法は新鮮なイネ茎葉部を水洗後蒸留水で再度洗った後、濾紙を用いて附着水を除去し一定重量の試料を乳鉢内に細切してとり、生体重量の2倍量の phosphate buffer (6.7×10^{-2} M, pH 7.0) および少量の海砂を加えて充分磨砕する。磨砕液をガーゼを用いて濾過し、濾液をさらに $1,000 \times g$, 10分間、0°Cで遠心分離を行い沈殿物を除去し、上澄液をさらに $10,000 \times g$, 15分間、0°Cで遠心分離を行い、上澄液を酵素液として本実験に使用した。

B) 3,4-dichloroaniline (DCA) の検量線の作成

DCA 16.2 mg をとり 2 ml のエタノールに溶解し、水を加えて 1 l にする。この溶液の濃度は DCA, $0.05 \mu\text{mole} / 0.5 \text{ ml}$ である。この DCA 溶液を水で希釈し、0.001, 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, $0.05 \mu\text{mole} / 0.5 \text{ ml}$ の濃度の標準溶液を調製した。次に各標準溶液 0.5 ml に 0.2 N HCl 0.5 ml を加え、さらに 0.1% p-DA-

CA エタノール溶液 2 ml を加えて 15 分間反応させ、540 nm で吸光度を測定した。

C) 基質の調製法

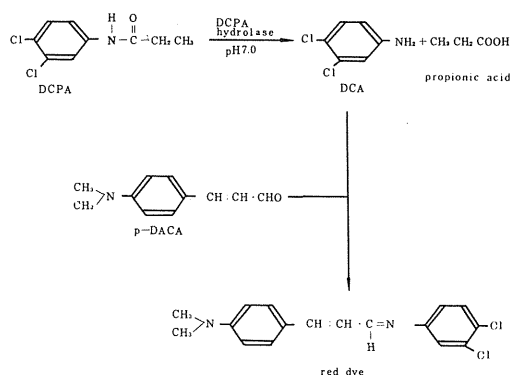
DCPA 17.4 mg をとり 2 ml のエタノールを加えて溶解し、さらに水を加えて 100 ml にする。この DCPA 溶液の濃度は 8×10^{-4} M である。

D) 酵素活性の測定法

8×10^{-4} M の基質溶液 1 ml に、 1.3×10^{-2} M phosphate buffer (pH 7.0) 1 ml を加えた後、酵素液 0.5 ml を加えて、37°C, 20分間反応させた。反応混液より 0.5 ml を、あらかじめ用意した 0.2 N HCl 溶液 0.5 ml を含む試験管にとり、反応を停止させた後、0.1% p-DACA 溶液 2 ml を加え、15分後 540 nm 吸光度を測定した。1分間に $1 \mu\text{mole}$ の DCA を遊離する酵素量を 1 単位とした。

III 実験結果と考察

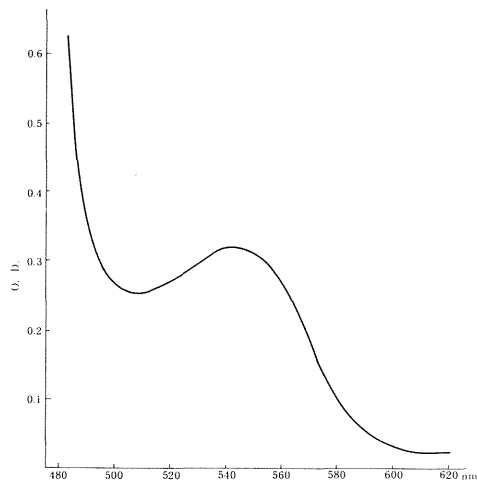
第1図はDCPA分解酵素により遊離放出されたDCAとp-DACAとの反応系を示したものである。



第1図 DCPA分解酵素により生成したDCAとp-DACAとの呈色反応

第2図は反応生成物の吸収曲線を求めた結果 540 nm

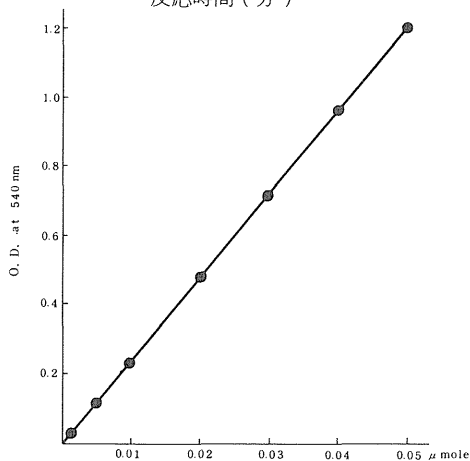
に極大吸収を示すことが判明した。この結果から以下の実験は540nmにおける吸光度を測定した。



第2図 p-DACAによるDCA呈色の吸収曲線

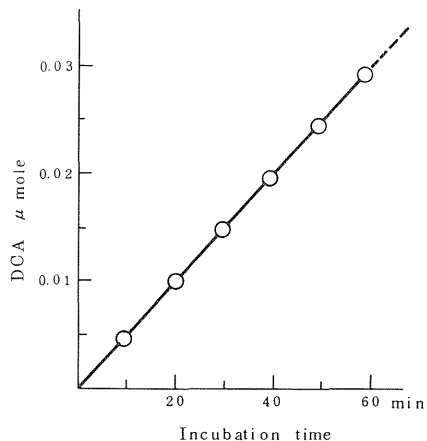
第3図に示したようにDCAの濃度とp-DACA添加による反応生成物の吸光度との間に比例関係が成立し、特に0.001 μmole ~ 0.05 μmoleの濃度範囲では明確に直線関係が成り立つことを認めた。この結果からO.D₅₄₀ = 1は0.0416 μmole DCAに相当し、酵素単位は次式によって求められる。

$$\text{酵素単位}/\text{ml} = \text{O.D.} \times 0.208 \times \frac{1}{\text{酵素液}(\text{ml})} \times \frac{1}{\text{反応時間}(\text{分})}$$



第3図 p-DACAによるDCAの標準曲線

本法をイネDCPA分解酵素に適用した結果は、第4図に示した通り好結果が得られた。



第4図 イネDCPA分解酵素の反応時間とDCAの遊離放出との関係

本法と、後藤等のジアゾカップリング法とを比較した場合、発色の感度は約10倍増大し、発色の際、冷却等の必要もない。本法は微弱な酵素活性の測定にも利用出来るばかりでなく、又多数の検体の測定にも簡単に利用出来る特徴をもつものである。

文 献

- 1) 赤塚尹己：農薬科学，1，55(1973)
- 2) 後藤真康・佐藤六郎：農薬生産技術，10，16(1964)
- 3) 坂井節雄・鈴木圭一・森元・藤野陸夫：分析化学，9，862(1960)

Summary

A sensitive method was developed for rapid estimation of DCPA (Propanil) hydrolase activity in the rice plant using DCPA as a substrate.

The determination of 3, 4-dichloroaniline (DCA) which liberated by DCPA hydrolase is performed colorimetrically using p-dimethylaminocinnamaldehyde (p-DACA) as a color reagent.

The rapid estimation method was follows:

A typical 2.5 ml incubation mixture contained 0.5 ml of the enzyme solution, 1 ml of 8×10^{-4} M DCPA, and 1 ml of 1.3×10^{-1} M phosphate buffer (pH 7.0)

After incubation at 37 °C for 20 minutes, 0.5 ml of this mixture was transferred to another test tube containing 0.5 ml of 0.2 N HCl in order to stop the enzyme reaction and then 2 ml of 0.1 % p-DACA solution in ethanol was added to the test tube. After 15 minutes, the color density of azo dye was measured with a photometric colorimeter at 540nm.