

選択性除草剤に関する研究

第7報 各種ヒエの Aryl Acylamidase による DCPA および その類縁化合物の水解と DCPA による殺草効果

赤塚 尹巳・笠倉 紀夫・副島 正美

Studies on Selective Herbicides

VII. Relation between enzymatic hydrolysis of DCPA and its derivatives and herbicidal effect of DCPA in various barnyard grass

TADAMI AKATSUKA, NORIO KASAKURA and MASAMI SOEJIMA

1. 緒 言

DCPA (Propanil) はイネ-ヒエ間およびその他の雑草間に極めて顕著な選択的殺草効果を示す除草剤である。選択性発現の機構は McRae 等¹⁾によってイネ茎葉中には DCPA 水解酵素が多量に含まれることが指摘された。その後、Frear 等²⁾と赤塚等³⁾により本酵素の精製が試みられたが赤塚等により始めて可溶化に成功し、aryl acylamidase I として精製され、この酵素の存在の有無がイネヒエ間の選択性発現の決定的要因と考えられるに至った。その後、赤塚、笠倉⁴⁾はタイヌビエから aryl acylamidase II を発見し、本酵素の精製と性質について報告した。

aryl acylamidase II はタイヌビエ等の茎葉中に含まれるが、aryl acylamidase I のように particulate enzyme ではなく homogenizer により簡単に可溶化されてくる amidase で 3,4-DCPA には作用しないが 2,5-DCAA を比較的良好に水解する酵素である。

さて、これまでの多くの研究がタイヌビエを試料として用いた実験が多く、反面イヌビエ、ヒメイヌビエ、ヒメタイヌビエなど各種のヒエを試料とした実験結果に乏しく、この分野における研究が期待されてきた。特に西日本における乾田直播地帯において DCPA が除草剤として用いられているが、タイヌビエが減少し代ってイヌビエ等の雑草が増加する傾向にあることが指摘された。

著者等は 12 種のヒエを試料として選択性機構の解明と同時に前述のような実用的見地からこの問題に取り組み興味ある知見を得たので報告する。

2. 実験方法

(A) 試料植物 本実験に使用した各種のヒエは下記の通りである。

(i) タイヌビエ	溝辺 C	F 62-37
	C 62-1	F 62-39
	C 62-9	F 62-44
	C 64-19	F 62-57

(ii) ヒメタイヌビエ 倉敷

(iii) イヌビエ E 207 E 326

(iv) ヒメイヌビエ W 3

試料は播種後、5 葉期の植物を用いた。

(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沓紙で吸い取り、生体重量と等量の phosphate buffer (M/15) pH 7.0 (0.01 M EDT A, 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) 基質および基質緩衝液の調製 酵素実験に使用した、8 種の DCPA およ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、400 μ モル溶液となるように調製した。

2,5-DCAA	2,5-dichloroacetanilide
2,3-DCAA	2,3-dichloroacetanilide

2-CAA	2-chloroacetanilide
3-CAA	3-chloroacetanilide
3,4-DCPA	3,4-dichloropropionanilide
2,3-DCPA	2,3-dichloropropionanilide
2-CPA	2-chloropropionanilide
3-CPA	3-chloropropionanilide

(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⁵⁾ を微量化した、赤塚等⁶⁾ 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開始時間とする。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 および水 0.6 ml を加えて、15 分間放置後 550 nm で比色定量した。DCA として 0.02~0.2 μmol の範囲で満足すべき定量結果を得た。酵素活性の測定は phosphate buffer pH 7.0, 反応時間 24 時間, 反応温度 40°C で行なった。酵素蛋白量は Lowry 法⁷⁾ により測定した。

3. 実験結果

実験結果は第 I 表並びに第 1 図~第 6 図に示した。第 I 表は 12 種のヒエについて、常法により酵素を抽出し、上澄液と沈殿区分の 2 つを酵素液として用い、8 種類の DCPA とその類縁化合物に対する水解活性を測定した結果である。先に著者等が指摘したようにタイヌビエの場合、沈殿区分を酵素として用いた場合殆ど活性が検出されず上澄液を酵素として用いた場合 2,5-DCAA を最もよく水解する aryl acylamidase II の存在を報告したがこの表から判る様に 12 種のヒエ全部について全く先

第 I 表 各種ヒエ植物の DCPA とその類縁化合物に対する水解活性

試料植物	相 対 活 性 度 (%)															
	2,5-DCAA		2,3-DCAA		2-CAA		3-CAA		3,4-DCPA		2,3-DCPA		2-CPA		3-CPA	
	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P		
タイヌビエ																
F62-37	100	0	64	0	29	0	48	0	0	0	5	0	26	0	5	0
//																
F62-39	100	0	84	0	36	0	63	0	0	0	8	0	17	0	6	0
//																
F62-44	100	0	58	0	28	0	56	0	0	0	5	0	6	0	2	0
//																
F62-57	100	0	51	0	22	0	42	0	0	0	2	0	4	0	3	0
//																
C62-1	100	0	63	0	52	0	62	0	0	0	13	0	18	+	13	0
//																
C62-9	100	0	83	0	66	0	89	0	0	0	12	0	18	+	49	0
//																
C64-19	100	0	63	0	42	0	64	0	0	0	37	0	30	0	29	0
//																
溝辺 C	100	0	58	0	33	0	68	0	0	0	2	0	12	0	3	0
ヒメタイヌビエ																
倉敷	100	0	59	0	43	0	60	0	0	0	7	0	5	0	15	0
イヌビエ																
E207	100	0	80	0	42	0	58	0	0	0	10	0	9	+	12	0
//																
E326	100	0	56	0	35	0	35	0	0	0	29	0	35	+	28	0
ヒメイヌビエ																
W3	100	0	82	0	49	0	63	0	0	0	47	0	49	+	36	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。

(註 3) S は 20,000×g, 120 分, 0°C の上澄液を示し, P はその場合の沈殿区分を示す。



1) 対照区 2) 散布1日後 3) 散布4日後

第1図 タイヌビエ (C62-1) に対する DCPA 散布試験



1) 対照区 2) 散布1日後 3) 散布4日後

第2図 タイヌビエ (F62-37) に対する DCPA 散布試験

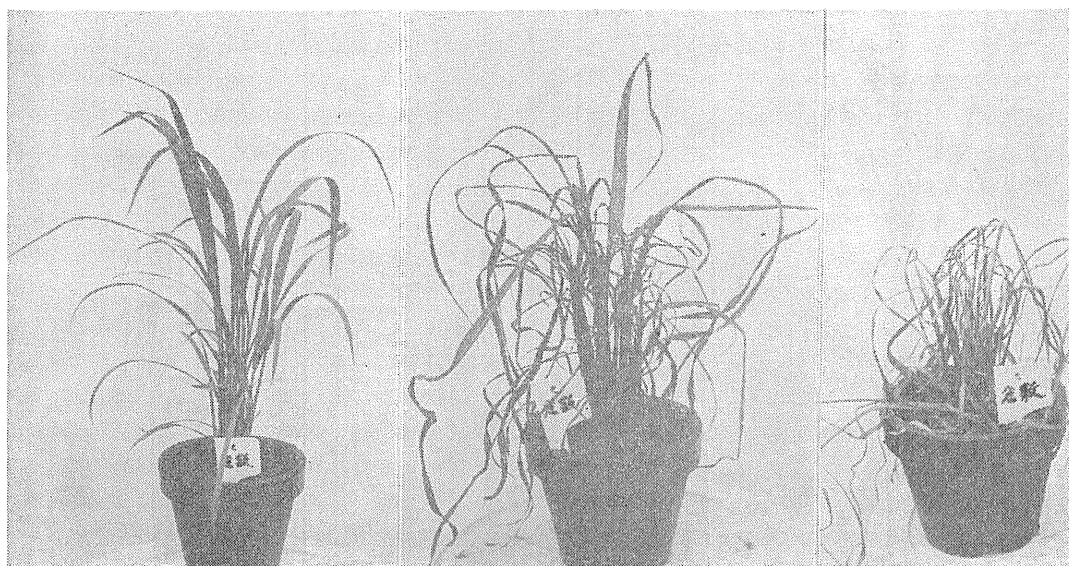


1) 対照区

2) 散布1日後

3) 散布4日後

第3図 タイヌビエ (溝辺C) に対する DCPA 散布試験



1) 対照区

2) 散布1日後

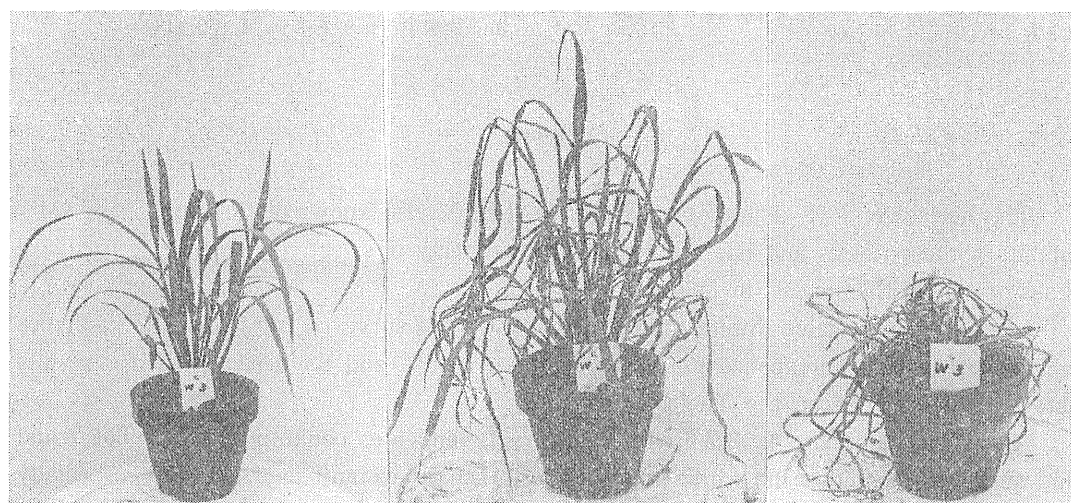
3) 散布4日後

第4図 ヒメタイヌビエ (倉敷) に対する DCPA 散布試験



1) 対 照 区 2) 散 布 1 日 後 3) 散 布 4 日 後

第5図 イヌビエ (E326) に対する DCPA 散布試験



1) 対 照 区 2) 散 布 1 日 後 3) 散 布 3 日 後

第6図 ヒメイヌビエ (W3) に対する DCPA 散布試験

の報告と同じ傾向を示した。

即ち、タイヌビエ、ヒメタイヌビエ、イヌビエ、ヒメイヌビエのすべてについて上澄液は 2,5-DCAA の活性が最大であり、2,3-DCAA, 3-CAA, 2-CAA の順に水解されるが 3,4-DCPA に対する活性は全く示さなかった。

以上のように 3,4-DCPA に対する活性は沈殿区分、上澄液の両酵素区分において全く検出できなかったことから少なくともこれらの 12 種のヒエについては aryl

acylamidase I (3,4-DCPA 水解酵素) は欠損しているものと考えられる。

第1図～第6図は各種のヒエに対する DCPA (0.3%) 散布試験を行った結果である。第1図～第6図においてすべての場合 1) は対照区であり、2) は DCPA 散布後 1 日経過後の写真であり、3) は DCPA 散布後 4 日経過後の写真である。これらの結果から試験した 12 種のヒエはすべて DCPA 散布 4 日後に枯死することが証明された。

4. 考 察

第1表に示したように12種のヒエ植物から酵素を抽出してDCPAとその類縁化合物に対する活性を検討した結果、先に赤塚等の指摘した2,5-DCAAをよく水解するところのいわゆる“aryl acylamidase II”を検出したが3,4-DCPAや2,3-DCPA, 2,4-DCPAなどをよく水解するいわゆる“aryl acylamidase I”は検出することができなかった。

さらに第1図～第6図の写真で示したように各種のヒエに対してDCPA散布試験を行った結果、タイヌビエヒメタイヌビエ、イヌビエ、ヒメイヌビエ等の実験したすべてのヒエがDCPA散布により枯死した。イネーヒエ間の選択的殺草機構に関してはイネ茎葉中には少なくともaryl acylamidase I, IIが存在するが、ヒエ茎葉中にはaryl acylamidase IIのみが存在し、実用除草剤である3,4-DCPAを分解する酵素が欠損していると考えられる“赤塚説”⁸⁾が各種ヒエに対するDCPAの散布試験および第I表に示した酵素実験の両者から説明できたと考えられる。

本研究に当りDCPA関連化合物を提供された名古屋大学農学部颯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。また本実験に当り適切な助言を戴きました農林省農業技術研究所松中昭一博士並びに各種ヒエを戴きました大阪府立大農学部篠野友三郎博士に謝意を表します。

5. 文 献

- 1) McRae, D. H., R. Y. Yih and H. F. Wilson: Weed Soc., Abs., 87 (1964)
- 2) Frear D. S. and G. G. Still: Phytochemistry 7, 913 (1968)
- 3) 赤塚尹己・深沢幸義: 農化大会講演要旨集, p. 395 (1971)
- 4) 赤塚尹己・笠倉紀夫: 農化大会講演要旨集, p. 416 (1972)
- 5) 後藤真康・佐藤六郎: 農薬生産技術, 10, 16(1964)
- 6) 赤塚尹己・鈴木光一・副島正美: 英大農學術報告, 16, 99 (1968)
- 7) Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randal: J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
- 8) 赤塚尹己: 農薬科学, 1, 55 (1973)

Summary

The herbicide, 3',4'-dichloropropionanilide (DCPA, also known as 'Propanil', 'STAM') inhibits photosynthesis and has the remarkable property of selectively destroying barnyard grass or some other weeds in field of rice plant.

In this paper, twelve different barnyard grass were surveyed for hydrolytic enzymes which were able to metabolize the amide bonds in DCPA and its derivatives, and results obtained were shown on the Table I.

An aryl acylamidase I, 3,4-DCPA hydrolysing enzyme, could not detect but could find an aryl acylamidase II, which hydrolyze 2,5-dichloroacetanilide (2,5-DCAA) especially in all barnyard grass tested.

Another experiment was carried out and illustrated in Fig. 1~6. The foliage effects produced by DCPA begin to develop within 24 hours after treatment and increased in severity for about 5 days in all cases.

These results support the mechanism of selective herbicidal action between rice plant and darnyard grass which reported by Akatsuka⁸⁾.