

選択性除草剤に関する研究

第6報 高等植物における DCPA およびその類縁化合物の酵素的な水解

赤塚 尹巳・大場 達夫

Studies on Selective Herbicides

VI. Enzymatic hydrolysis of DCPA and its derivatives in higher plants

TADAMI AKATSUKA and TATSUO OHBA

1. 緒 言

高等植物における DCPA 或はその類縁化合物の酵素的な水解, aryl acylamidase I (基質, 3,4-DCPA), aryl acylamidase II (基質, 2,5-DCAA) 等の分布およびこれら植物間における aryl acylamidase 活性の量的関係等を調べるために本研究を行った。特に量的関係では DCPA 抵抗性イネを基準にして比較検討を行った。

イネ以外の高等植物における DCPA の水解については 1972 年 Hoagland 等¹⁾により西洋タンポポ, ノコギリソウ, 野生ニンジンなどの植物が若干の活性を示すことを報告した。またチューリップから 3,4-DCPA 水解酵素の一種を分離した報告²⁾がある。

今回著者等は約 30 種の植物について実験した結果, 特にイネ科植物に関しては 4 群に分けられる。

第 1 群は 3,4-DCPA やその類縁化合物に対し強い活性を示しこの群に属する植物は DCPA 抵抗性イネ全般にわたり, 普通我が国において栽培されている水陸稲など殆ど全部のイネである。(選択性除草剤に関する研究第 1 報参照)³⁾

第 2 群は 2,5-DCAA に対し最も強い活性を示し, この群に属する植物はタイヌビエをはじめとしイヌビエ, オヒシバ, メヒシバ, エノコログサ等の雑草群である。

第 3 群は DCPA やその誘導体に広く活性を示すが, しかしその活性はイネ即ち 1 群に比較して微弱である。この群に属する植物はオーチャードグラス, イタリアンライグラス, カゼクサ等である。

第 4 群は DCPA およびその誘導体に対し殆んど活性を示さない植物群でススキ, チカラシバ等がこの群に属するようである。

イネ科以外の植物ではセリ科, ナス科, キク科の若干

の植物が DCPA などの基質に対して活性を示すことが判った。以下これらの結果について報告する。

2. 実験方法

(A) 試料植物

本実験に使用した植物は 28 種である。イネは日本晴タイヌビエ, イヌビエ等は 5 葉期の茎葉を用いた。メヒシバ, オヒシバ, オーチャードグラス, カゼクサ, チカラシバ, エノコログサ等は出穂期のものを採取した。セリ科, ナス科の若干の植物は実験圃場より採取した。その他の植物は 7 月から 9 月にかけて山野に自生する植物を採取して実験に用いた。

(B) 酵素の抽出

試料植物を採取後, 蒸留水で充分洗い附着した水分を濾紙で吸いとり, 生体重量と等量の 1/15 M phosphate buffer pH 7.0 (0.01 M EDTA, 0.05 M 2-mercapto ethanol を含む) を加え, 氷冷しながら乳鉢中で海砂と共に充分磨碎し, 磨碎物は冷凍遠心器ではじめ 1,000 × g, 10 分, 0°C で遠心分離を行い, 上澄液をさらに 20,000 × g, 20 分, 0°C で遠心分離を行い, 上澄液を粗酵素液として用いた。

(C) 基質緩衝液の調製

酵素実験に使用した 4 種の基質およびその略号は次の通りである。

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

基質はすべて 1/15 M 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。

(D) 酵素力の測定法

DCPA 或はその類縁化合物が aryl acylamidase の作用により amide bond が切断され、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⁴⁾の定量法を著者等⁵⁾により酵素試験のために微量化した方法を用いた。

即ち酵素反応管に基質緩衝液 2.0 ml をとり所定温度 (40°C が普通である) に 5 分間 preincubation を行い、0.5 ml の酵素液を加えた瞬間を反応始発時とし直ちに 0.5 ml を試験管にとる。さらに一定時間反応させた後毎に 0.5 ml 宛を試験管にとり、すべてに氷冷水 2 ml, 2% NaNO₂ 溶液 0.1 ml, 酢酸, 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 を加えてよく攪拌し 15 分間放置後 550 m μ で比色定量する。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 1/15 M phosphate buffer pH 7.0, 40°C, 24 時間反応を行った。タンパク量の測定は Lowry 法⁶⁾により行った。この実験における比活性は上記の反応条件下で遊離放出される DCA の m μ モルを反応混液中に含まれる酵素タンパク量 mg で除した値を比活性とした。

3. 実験結果と考察

実験結果は第 I 表に示した。今回の実験に用いた約 30 種の植物の内訳はイネ科 11, セリ科 6, ナス科 5, キク

第 I 表 各種植物の DCPA とその誘導体の酵素的水解

植 物	比 活 性				タンパク量 mg
	3,4-DCPA	2,3-DCPA	2,5-DCAA	3,4-DCAA	
イ ネ	199	136	70	151	0.89
タ イ ス ビ エ	—	3	138	—	0.44
イ ス ビ エ	—	2	68	—	0.90
オ ヒ シ バ	—	—	11	—	0.99
メ ヒ シ バ	—	7	25	9	0.68
エ ク コ ロ グ サ	—	13	19	—	0.96
カ ゼ ク サ	39	84	59	54	0.34
オーチャードグラス	2	8	3	2	0.36
イタリアンライグラス	4	12	5	4	0.42
ス ス キ	—	—	—	—	0.87
チ カ ラ シ バ	—	—	—	—	0.50
ミ ツ バ	32	25	3	22	0.77
バ セ リ	44	19	28	30	0.33
セ ル リ	—	46	28	—	0.51
ニ ン ジ ン	—	—	3	—	0.38
セ リ	—	—	—	—	0.42
チ ド メ グ サ	—	—	—	—	0.62
ビ ー マ ン	1	31	17	14	0.71
ナガトウガラシ	—	7	5	—	0.96
ホシトウガラシ	—	6	12	—	0.67
ト マ ト	—	5	—	—	0.68
ナ ス	—	—	—	—	0.97
タ ン ポ ボ	60	25	3	25	0.81
ヨ モ ギ	7	—	—	—	1.25
シ ン	—	—	—	—	1.17
イ ス タ デ	—	—	—	—	0.31
ア カ ザ	—	—	—	—	0.97
オ オ バ コ	—	—	—	—	0.55

科2, その他4である。

基質として用いた化合物は4種で aryl acylamidase I の代表的基質として 3,4-DCPA と 2,3-DCPA を選び, aryl acylamidase II の代表的基質として 2,5-DCAA と 3,4-DCAA を選んだ。これら4種を基質とし, 28種の高等植物から酵素を抽出して反応させた結果を第I表に示した。

イネ科植物の場合現在までの結果からおよそ4つの群に分類することが可能である。

第I群は普通のイネ即ち DCPA 抵抗性イネであり一般に栽培されている水陸稲全般を含みこの群に属するイネはコシヒカリ, 日本晴, レイメイ, フジミノリ, ミヨウジョウ, トドロキワセ, 農林8号, 農林糯26号, 田優などがあげられる。しかもこれらのイネは4種の基質に対する活性も強く既に赤塚⁷⁾により報告されているように aryl acylamidase I, II を含む植物である。

第II群はヒエによって代表される植物群でその他の植物ではオヒシバ, メヒシバ, エノコログサ等がこの群に含まれる。4種の基質のうち特に 2,5-DCAA に対し強い活性を示すいわゆる“aryl acylamidase II”のみを含む植物群である。この植物群のもう一つの大きな特徴はすでに著者によって指摘したように 3,4-DCPA に対する活性が全く検出できないことである。このことはこれに属する植物群がいわゆる“aryl acylamidase I”を欠損していると考えられる。松中⁸⁾の発見した DCPA 感受性イネもこの群に属するものである。

第I群に属するイネと第II群に属するヒエを中心とした若干の雑草群との間の DCPA による選択的殺草機構は前述の2つの酵素系の結果から見事に説明できたわけである。

第III群はカゼクサをはじめとしオーチャードグラス, イタリアンライグラスがこれに属する。即ち4つの基質に対し活性を示すが, 第I群に比較して活性は極めて微弱である。

DCPA に対する活性のみを第I群のイネと第III群のカゼクサを比較した場合, カゼクサの全活性はイネの全

活性の約5%であり, イタリアンライグラスの場合はイネの約1%に過ぎない。この事実は既に著者等⁵⁾によって指摘したように第III群に属する植物は第II群の植物よりは DCPA 処理によって若干の抵抗性を示す結果を得た。

第IV群に属する植物はススキ, チカラシバ等であり, 4種の基質に対していづれにも作用しない。この群についてはさらに多数のイネ科植物に対して実験を試み, 同時に DCPA 散布による試験も併せて検討しなければならない。

その他の植物について試験した結果, セリ科ではパセリ, ミツバの場合かなり強い活性を示し, ナス科ではピーマンが比較的強い活性を示した。またすでに Hoagland 等¹⁾により報告されているようにタンポポが DCPA に対して強い活性を示した。

DCPA に対する水解活性についてイネのそれと比較した場合, ミツバの場合約10%, タンポポの場合約20%であった。

セリ, チドメグサ, ナス, シソ, イヌタデ, アカザ, オオバコ等の植物の場合いづれの基質に対しても活性は認められなかった。

4. 文 献

- 1) Hoagland R. E. and G. Graf: Weed Science, **20**, 303 (1972)
- 2) Hoagland R. E. and G. Graf: Phytochemistry, **11**, 521 (1972)
- 3) 赤塚尹巳・鈴木光一・副島正美: 茨大農学術報告, **16**, 99 (1968)
- 4) 後藤真康・佐藤六郎: 農業生産技術, **10**, 16 (1964)
- 5) 赤塚尹巳・笠倉紀夫: 茨大農学術報告, **20**, 17 (1972)
- 6) Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randal: J. Biol. chem., **193**, 265 (1951)
- 7) 赤塚尹巳: 農業科学, **1**, 55 (1973)
- 8) 松中昭一: 日米セミナー (Raleigh, N. C., U.S.A) (1969)

Summary

About thirty different plants were surveyed for hydrolytic enzymes which were able to split 3,4-dichloropropionanilide (DCPA) and its derivatives, and the results were shown in Table I as specific activities.

Distribution of DCPA hydrolytic enzyme (aryl acylamidase I) was approximately 30% of plants tested, but, 2,5-DCAA hydrolytic enzyme (aryl acylamidase II) was distributed widely about 60% of the plants tested.

The level of the hydrolysis of these compounds was quite variable in the different plant extracts. The highest specific activity on DCPA was found in rice plant stem and leaf extracts, and the highest specific activity on 2,5-DCAA was found in barnyard grass stem and leaf extracts.

In Gramineae plants tested in this report, we classified 4 plant groups. The plants belong to first group should be called DCPA resistant rices plant which distribute widely and commonly in Japan and these rice plants have both aryl acylamidase I and II.

The plants belong to second group should be called DCPA sensitive plants which distribute widely such as barnyard grass, crab grass, etc, and these plants just have aryl acylamidase II.

The plants belong to third group were love grass, orchard grass, etc. These plants also have both aryl acylamidase I and II, but the activities were extremely weak as compared with first group.

The plants belong to fourth group are swanp foxtail, Japanese plume-grass, etc., and no activities were found in 4 substrates tested.