高等植物のアリルアシルアミダーゼ I, II, III の精製確認と プロパニルによる選択殺草機構

茨城大学農学部農業資材化学研究室 赤塚 尹 巳

Tadami AKATSUKA*: Purification of Aryl Acylamidase I, II, III
from Higher Plants and Selectivity of Propanil

1. はじめに

除草剤の選択性発現機構は一般論として除草剤の作用機構とは全く別のものである。除草剤一般の選択性機構についてはすでに松中¹⁵⁾の優れた研究がある。ここでは特に aryl acylamidase に限定してはいるが、酵素レベルにおける実験結果を提出し、選択性発現の根拠となるべき酵素およびこれと関連をもつ酵素の証明を行ったことに意義があると考えている。

本来、研究のあり方について大学、官庁、民間と区別されるべきではないが、おのずからそこになしうるより適切な方向性はあると信じている。この DCPA に関する研究も、発表は独自に行っているが、松中博士との協力研究によってなしとげたものである。つまり松中博士の研究の一部を酵素レベルにおいて深化させた結果であり、また別の見方をすれば農薬学者（雑草防除学者）と一生化学者（酵素化学者）との研究協力の産物と言てよいであろう。

DCPA (propanil, 化学名 3,4-dichloropropionanilide) はイネ-ヒエおよびその他の雑草間に極めて高い選択性を示す除草剤であることは周知の事実である。

DCPA による選択的殺草は、松中¹⁶⁾によれば、タイヌビエの場合 DCPA 処理濃度約 0.4%, イネの場合約 6.5% 濃度で 100% 枯死すると報告されている。そしてこの薬剤の作用機構¹⁷⁾は、MORELAND らの分類によれば阻害的除共役剤に入れられている。阻害的除共役剤は二つの作用点をもつと考えられている。DCPA は典型的な HILL 反応阻害剤であり、かつこの薬剤の散布により急激なネクロシスを示すことから作用機構は単純ではないようである。

さて、イネ-タイヌビエ間の選択性発現機構は、イネには DCPA 分解酵素（アリルアシルアミダーゼ）が存在するためにイネ植物体内で DCPA は分解され、無毒化されるために枯死しないが、タイヌビエの場合は、この

酵素をもたないかあるいは極めて微弱のために DCPA はヒエ植物体内で無毒化されずにヒエは枯死してしまう説¹⁶⁾と、イネの場合は前述の考え方と同様であるが、ヒエの場合は存在する酵素の基質特異性の差に起因するのではなかろうかという説⁹⁾が対立していた。

しかし、これらの研究はいずれも本格的酵素レベルのアプローチに欠けていた。

筆者ら¹⁾は 1968 年ごろから、この機構解明のため酵素レベルの研究に着手し、イネには DCPA をよく分解する aryl acylamidase I および DCPA を全く分解しないが 2,5-DCAA を分解する aryl acylamidase II の両酵素をもっていることを明らかにした。

またヒエは aryl acylamidase II のみをもっており、aryl acylamidase I は欠損していることを示唆した。すなわち DCPA によるイネ-ヒエ間の選択性発現に主要な役割を果たしている酵素は aryl acylamidase I であることを明確にした。その後児玉・赤塚¹³⁾は Triton X-100 を用いてイネ茎葉の aryl acylamidase I の可溶性に成功し、ゲル濾過により精製法を確立した。また吉井、赤塚²²⁾は 3-chloropropionanilide をリガントとした affinity chromatography を利用した新しい精製法を確立した。

イネ以外の植物の粗酵素による DCPA およびその類縁化合物の分解については HOAGLAND ら⁶⁾がセイヨウタンポポ、ノコギリソウ、野生ニンジン等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⁷⁾から DCPA 分解酵素の一種を部分精製したことを報告した。

赤塚ら²⁾は 28 種の植物の DCPA およびその類縁化合物の分解酵素活性、基質特異性等から 4 群に分類した。HOAGLAND ら⁸⁾は 10 科 38 種の工芸・園芸作物の DCPA 分解酵素の存在を調べ、レタス、スイカ、アサなどの葉に存在することを報告した。

加藤、赤塚^{10,14)}はイネ以外の植物を用いて強力な DCPA 分解酵素の検索を行った結果、セリ科のパセリ

* Laboratory of Agricultural Chemicals, Faculty of Agriculture, Ibaraki University.

(*Petroselinum sativum*), ミツバ (*Crytaenia japonica*) の茎葉部に aryl acylamidase I とは異なるタイプの DCPA 分解酵素を発見し, 精製法を確立し, この酵素を aryl acylamidase III と名付けた。

HOAGLAND らが報告したチューリップの球根から部分精製した DCPA 分解酵素は, 現在のところ著者らがミツバやパセリの茎葉から分離精製した aryl acylamidase III の性質に類似した酵素と考えている。

さらにイネ以外の高等植物でイネに含まれる aryl acylamidase I と同じ particle bound enzyme の検索を行った結果, オーチャードグラス¹¹⁾ (*Dactylis glomerata* L.) およびカモジグサ (*Agropyron tsukushiense*) の穂に存在することを発見し, 該酵素を精製し諸性質を調べた結果, イネの aryl acylamidase I と同じ酵素であることを明らかにした。

これまでの研究結果から aryl acylamidase I はイネ茎葉, オーチャードグラスおよびカモジグサの穂に存在し, aryl acylamidase II はイネ, ヒエ, メヒシバなどの茎葉に広く分布し, aryl acylamidase III は特にパセリ, ミツバ等に含まれていることを明らかにした。そして特にイネ茎葉中に含まれる aryl acylamidase I の存在意義を強調した。さらに吉井, 赤塚²³⁾ は aryl acylamidase I がイネの葉のどこの顆粒に結合しているかを調べた結果, クロロフィル a に結合していること, また葉緑体に存在する光化学反応系 I 粒子と光化学反応系 II 粒子の両方に存在するが, 特に光化学反応系 I 粒子に局在していることを認めた。

今回は, 主として最近数年間における著者らの研究成

果についてその概要を報告し, 御批判を仰ぎたい。なお, この総説とともに農薬科学 1, 55 (1973) および『蛋白質, 核酸, 酵素』別冊 植物酵素蛋白質研究法 161 (1976) の拙著を御参照いただきたい。

本稿では次に示す略号を用いた。

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-DCVA	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
3,4-DCBA	3,4-dichloro- <i>n</i> -butyranilide
3,4-DCCA	3,4-dichlorocaproanilide
2-MPA	2-methylpropionanilide
3-MPA	3-methylpropionanilide
4-MPA	4-methylpropionanilide
MCC	methyl <i>N</i> -(3,4-dichlorophenyl)-carbamate
NAC	1-naphthyl- <i>N</i> -methylcarbamate

2. Aryl acylamidase I の精製と性質

本酵素が顆粒酵素としてイネの葉に存在していること

Fig. 1. Purification of DCPA hydrolyzing enzyme from rice plant (sonication).

Fig. 2. Purification of DCPA hydrolyzing enzyme from rice plant.
(Triton X-100 treatment).

は“自然の妙”というべきであろう。何故ならば、酵素は particle bound enzyme として極めて安定な不溶化酵素（固体酵素）として解毒に関与しているからである。

このように顆粒酵素として存在している DCPA 分解酵素 (aryl acylamidase I) の酵素化学的性質を明らかにするためには酵素を抽出可溶化し、蛋白質化学的に均質なものとして取り扱う必要がある。そのために著者らの研究室ではこれまでにいくつかの方法を試み、すでに三つの方法を報告してきた。

- ① 超音波処理法 (Fig. 1)
- ② Triton X-100 処理法 (Fig. 2)
- ③ affinity chromatography 法 (Fig. 3)

それらの方法を Fig. 1 ~ Fig. 3 に示したが、現在までに報告した方法のなかでは affinity chromatography 法が最も推奨できる方法である。

Fig. 3 の方法により精製を行い、精製酵素液を DISC 電気泳動にかけ、同時に酵素活性を調べた結果を Fig. 4 に示した。

Fig. 3. Purification of DCPA hydrolyzing enzyme from rice plant.
(affinity chromatography).

この図から判るように、電気泳動的に単一であり、かつ酵素活性のパターンとよく一致していることが判った。この精製酵素を用いて基質特異性を調べた結果を Table 1 に示した。

水解順位は 2,3-DCPA > 2,4-DCPA > 2,3-DCAA >

Fig. 4. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of purified arylacylamidase I.

Electrophoresis on polyacrylamide gel in the presence of 0.1 % Triton X-100 was performed with 0.075 mg protein/tube at 4 °C and then stained with amido black 10 B. Gel concentration was 7.5 %. The activity was determined as described in the METHOD¹³.

2,5-DCPA $\geq$ 2,4-DCAA>3,4-DCPA>3,4-DCAA>2,5-DCAA>MCCであった。2,6-DCPAおよび2,6-DCAAは全く分解されなかった。

これまで aryl acylamidase が MCC に対して活性を示すという報告はなかったが、今回はじめて

MCC に対して若干の活性を示すことを明らかにした。5.において詳述するが、この結果は MCC によるイネ-ヒエ間の選択性発現に aryl acylamidase が関与していることを示唆するものである。

さらに著者らはイネ茎葉中に含まれる aryl acylamidase I と同じような酵素を求めて、各種の植物を試料として検索を続けた結果、オーチャードグラスおよびカモジグサの穂に顆粒結合酵素として存在することを発見した。

Fig. 5 はオーチャードグラスから aryl acylamidase I の精製過程を示したものである。イネ茎葉の場合と

Table 1. Substrate specificity of aryl acylamidase I in the presence of 0.02 % Triton X-100.

Substrate	Relative activity
3,4-DCPA	100 %
2,3-DCPA	151
2,4-DCPA	145
2,6-DCPA	0
2,5-DCPA	107
3,4-DCAA	62
2,3-DCAA	117
2,4-DCAA	107
2,6-DCAA	0
2,5-DCAA	39
MCC	5

Final concentration of substrates was 4.0×10^{-4} M. Incubation was carried out at 37°C for 120 min.

Fig. 6. Polyacrylamide gel disc electrophoresis of purified DCPA hydrolyzing enzyme from orchard grass.

Electrophoresis in polyacrylamide was performed with 0.04 mg/tube at 4°C, and stained with amido black 10 B. Gel concentration was 7.5 %.

同じように、アセトン処理、Triton X-100 による可溶化、ゲル濾過、DEAE-Sephadex column chromatography、ゲル濾過を順次行って精製した。精製酵素を DISC 電気泳動にかけた結果は Fig. 6 に示した。この図から、DISC 電気泳動的に単一な酵素であることが判った。カモジグサの場合も同様な結果を得ている。

Table 2 にはオーチャードグラスの aryl acylamidase I の基質特異性を示した。また Table 3 にはカモジグサから得た精製 aryl acylamidase I の基質特異性を示した。水解順位は 2,3-DCPA>2,3-DCAA>3,4-DCPA>2,4-DCPA>3,4-DCAA であり、両酵素とも同じ傾向を示した。オーチャードグラスおよびカモジグサから得た aryl acylamidase の酵素的諸性質は極めて類似している。Table 4 は、イネの aryl acylamidase I と対比してオーチャードグラスの酵素の諸性質を総括

Fig. 5. Purification of DCPA hydrolyzing enzyme from orchard grass.

Table 2. Substrate specificity of DCPA hydrolyzing enzyme from orchard grass on DCPA and the derivatives.

Substrate	Relative activity	Substrate	Relative activity
3,4-DCPA	100 %	3,4-DCAA	55 %
2,3-DCPA	354	2,3-DCAA	129
2,4-DCPA	73	2,4-DCAA	26
2,5-DCPA	18	2,5-DCAA	6
2,6-DCPA	0	2,6-DCAA	0

Table 3. Substrate specificity of DCPA hydrolyzing enzyme from *Agropyron tsukushiense* on DCPA and the derivatives.

Substrate	Relative activity	Substrate	Relative activity
3,4-DCPA	100 %	3,4-DCAA	79 %
2,3-DCPA	336	2,3-DCAA	164
2,4-DCPA	78	2,4-DCAA	62
2,5-DCPA	61	2,5-DCAA	59
2,6-DCPA	0	2,6-DCAA	0

Table 4. Properties of DCPA hydrolyzing enzyme from orchard grass and rice plant.

Properties	DCPA hydrolyzing enzyme from rice plant (Aryl acylamidase I)	DCPA hydrolyzing enzyme from orchard grass
State	Particle bound enzyme	Particle bound enzyme
Optimum pH	7.0	7.0
Optimum temperature	45°C	40°C
Km for DCPA	$3.5 \times 10^{-4} M$	$3.3 \times 10^{-4} M$
Best substrate	2,3-DCPA>3,4-DCPA	2,3-DCPA>3,4-DCPA
Effect of DFP	Yes	Yes
Effect of PMSF	No	No
Effect of PCMB	No	No
Effect of Sevin	Yes	Yes
Molecular weight	$1.5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$	1.5×10^5

したものである。

この表から明らかなように、いずれも顆粒酵素であり、至適 pH 7.0、至適温度 40°C または 45°C、Km 値は $3.3 \sim 3.5 \times 10^{-4} M$ 、分子量は 1.5×10^5 であり、若干の試薬に対する影響も全く同じ傾向をとることなどから、イネの aryl acylamidase I とオーチャードグラスおよびカモジグサの酵素は同一と判定される。

3. Aryl acylamidase II の精製と性質

DCPA のイネーヒエ間の顕著な選択性に興味を示した多数の研究者がイネの酵素については一様に検討を加えたのに反し、ヒエの酵素についてはこれといった手がかりなしに“微弱”とか“殆どない”といった非科学的

Table 5. Hydrolyzing activities of various barnyard grasses.

Substrate Enzyme fraction Sample	Relative activity (%)									
	2,5-DCAA		2,3-DCAA		2-CAA		3-CAA		3,4-DCPA	
	S	P	S	P	S	P	S	P	S	P
Tainubie F 62-37	100	0	64	0	29	0	48	0	5	0
" F 62-39	100	0	84	0	36	0	63	0	8	0
" F 62-44	100	0	58	0	28	0	56	0	5	0
" F 62-57	100	0	51	0	22	0	42	0	2	0
" C 62-1	100	0	63	0	52	0	62	0	13	0
" C 62-9	100	0	83	0	66	0	89	0	12	0
" C 64-19	100	0	63	0	42	0	64	0	37	0
" Mizobe C	100	0	58	0	33	0	68	0	2	0
Himetainubie Kurashiki	100	0	59	0	43	0	60	0	7	0
Inubie E 207	100	0	80	0	42	0	58	0	10	0
" E 326	100	0	56	0	35	0	35	0	29	0
Himeinubie W 3	100	0	82	0	49	0	63	0	47	0

S : Supernatant, P : Precipitate fraction

表現で片付けられてきた。石塚⁹⁾ はヒエ植物茎葉の抽出液を用いて若干の DCPA 類縁化合物に対する活性を調べ、基質特異性の異なる酵素の存在を示唆した。

著者ら³⁾ は、タイヌビエの酵素液を用いて、20 余種の DCPA 関連化合物を基質として水解活性を検討した結果、2,5-DCAA に対して強い活性を示す酵素の存在を認めたので、2,5-DCAA を指標基質として酵素を精製し aryl acylamidase II と名付けた。

さらに種または系統の異なる各種のヒエを供試植物として酵素を抽出し、8 種の基質に対する水解活性を調べた結果を Table 5⁴⁾ に示した。

この表から判るように、タイヌビエ、ヒメタイヌビエ、イヌビエ、ヒメイヌビエなどのヒエ類は 2,5-DCAA を最もよく水解することが明らかになった。また酵素活性は抽出液の上澄液にのみ見いだされ、沈澱区分には全く検出できなかった。しかも DCPA に対する水解活性は上澄液にも沈澱区分にも検出することができなかった。

タイヌビエを試料とした場合、aryl acylamidase II の精製法を Fig. 7 に示した。この酵素は、磨砕し、遠心分離により直ちに上澄液にくる可溶性酵素であり、硫酸アンモニウム飽和 60~80 % の画分に集まる酵素蛋白質である。Sephadex G-150 を用いたゲル濾過を 2 回

行うことにより原液の約 200 倍の活性をもつ精製酵素として得られた。推定分子量は約 6×10^4 で、Fig. 8 に示した DISC 電気泳動的にもほぼ単一なバンドを示した。精製 aryl acylamidase II の基質特異性を調べた結果は Table 6 に示した。

この表から明らかなように、各種基質に

Fig. 7. Purification procedure of aryl acylamidase II.

Fig. 8. Polyacrylamide gel disc electrophoresis of purified aryl acylamidase II.

The purified enzyme was electrophoresis at pH 8.3 with 3 mA per gel column using 7% polyacrylamide gel and protein was stained with 0.025% coomassie brilliant blue in 10% trichloroacetic acid.

Table 6. Substrate specificity of aryl acylamidase II.

Substrate	Relative activity	Substrate	Relative activity
2,5-DCAA	100 %	2,5-DCPA	48 %
2,3-DCAA	62	2,3-DCPA	45
2,4-DCAA	11	2,4-DCPA	28
2,6-DCAA	0	2,6-DCPA	0
3,4-DCAA	17	3,4-DCPA	0
3,5-DCAA	49	3,5-DCPA	0
2-CAA	26	2-CPA	32
3-CAA	86	3-CPA	19
4-CAA	0	4-CPA	0
3,4-DCBA	6	3,4-DCCA	3
MCC	0	CIPC	0

対する水解順位は 2,5-DCAA>3-CAA>2,3-DCAA>3,5-DCAA>2,5-DCPA>2,3-DCPA のようであり、明らかに propionanilides より acetanilides に親和性をもっており、特に 2,5-DCAA をよく水解する酵素であることが判る。

著者¹⁾は aryl acylamidase II をもつ数種の植物 (DCPA 感受性イネ、ヒエ、イタリアンライグラス、メヒシバ) から酵素を精製し、該酵素の主な性質を調べた結果、いずれの酵素も至適 pH 7、至適作用温度 40°C、最適基質 2,5-DCAA、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ による塩析画分 60~80% のように極めて類似しており、カーバメート、有機りん殺虫剤による阻害度やミハエリス定数についてもほぼ同じ傾向を示すことから、これらの植物は aryl acylamidase II をもっていることを確認した。特に松中により発見された DCPA 感受性のイネは、現在の段階では DCPA 感受性の唯一のイネで、このイネがヒエと同じように aryl acylamidase I を欠損し aryl acylamidase II のみをもつことを証明したことは意義深いものがあろう。

4. Aryl acylamidase III の精製と性質

DCPA を強力に水解する酵素を含む植物はイネ以外の植物にはないだろうかという素朴な疑問を、われわれの日常生活の周辺にある植物に向けてみた。このような考え方の一つの目的は、aryl acylamidase の植物体内

における役割とともに何故このような人工的化学物質を速やかに分解するのだろうか、類似の natural substrate はどんなものだろうか、という疑問を常に抱えながら酵素学者は実験に取り組んでいるからである。しかし多くの場合明らかにされていない現状であり、aryl acylamidase に関してもその例外ではない。

実験の結果、バセリ、ミツバの茎葉に強い活性を発見した。この両植物の場合、茎葉を磨砕し遠心分離を行うとき、DCPA に対する水解活性は上澄液に存在し、沈殿区分には全く存在しない結果を得た。この結果は普通のイネの場合と全く異なる現象である。

ミツバおよびバセリの DCPA 水解酵素の精製法はほぼ同様であるので、ここではミツバの場合を Fig. 9 に示した。得られた精製酵素を DISC 電気泳動にかけた結果を Fig. 10 に示した。この図から判るように、明らかに DISC 電気泳動的には単一の酵素蛋白質と考えられる。推定分子量は $3 \times 10^4 \sim 3.5 \times 10^4$ であった。

この酵素の主な性質は、至適 pH 6.2、至適作用温度 45°C、ミハエリス定数 $K_m 7.1 \times 10^{-4} \text{M}$ 、最適基質 3,4-

Fig. 9. Purification of DCPA hydrolyzing enzyme from Mitsuba.

Fig. 10. Polyacrylamide gel disc electrophoresis of purified DCPA hydrolyzing enzyme from Mitsuba.

Electrophoresis in polyacrylamide was performed with 0.02 mg/tube at 4°C, and stained with coomassie brilliant blue gel concentration was 7.5%.

DCPA, PI 4.90, カーバメートや有機りん殺虫剤により強力に阻害されることが挙げられる。そして基質特異性については Table 7 に示した。

Table 7. Substrate specificity of DCPA hydrolyzing enzyme from Mitsuba on DCPA and the derivatives.

Substrate	Relative activity	Substrate	Relative activity
3,4-DCPA	100 %	3,4-DCAA	78 %
2,3-DCPA	70	2,3-DCAA	37
2,4-DCPA	54	2,4-DCAA	34
2,5-DCPA	0	2,5-DCAA	0
2,6-DCPA	0	2,6-DCAA	0

この表から 3,4-DCPA (DCPA) を最もよく水解し、3,4-DCAA, 2,3-DCPA, 2,4-DCPA, 2,3-DCAA, 2,4-DCAA の順序に従って活性は低下した。興味ある事実は、この酵素は 2,5-DCPA, 2,5-DCAA に対して全く活性を示さない結果である。これまでに報告した aryl acylamidase I および II は 2,6-DCPA や 2,6-DCAA に対しては全く活性を示さなかったが、2,5置換化合物に対して全く活性を示さないのは新発見である。

パセリについても同様な実験結果を得ているが、ここでは省略する。ミツバやパセリにみられるように DCPA を最適基質とし、推定分子量 $3.0 \sim 3.5 \times 10^4$ で、酵素化学的諸性質も前述した aryl acylamidase I および II の場合と全く異なるので、われわれは aryl acylamidase III と名付けた。

5. Aryl acylamidase と除草剤 選択性発現機構

DCPA によるイネーヒエ間の選択殺草性の要因が何かにについては、葉面浸透性や移行性の差によるのか、あるいは生化学的要因によるのか、あるいはそれらの複合として起こるのか等に関しては、種々議論のあるところであった。しかしながら 1964 年 McRAE ら²¹⁾が DCPA を水解する酵素をイネ茎葉中に見だし、この酵素が選択性発現に関与していることを示唆して以来、多数の研究者による報告がなされ、著者らによる酵素レベルの研究へと発展してきた。

その結果明らかになったことは、イネの茎葉には除草剤 DCPA をよく水解できる aryl acylamidase I と DCPA は水解できないが性質の違うもう一つの酵素、すなわち aryl acylamidase II をもっているのに対し、タイヌビエは aryl acylamidase I を欠損しており、aryl acylamidase II のみをもっていることが判り、従

ってイネは DCPA を解毒できるがヒエは DCPA を解毒できないことから、DCPA を散布した場合、イネは薬剤の影響をほとんど受けずにすくすくと生長するが、ヒエは枯死してしまう結果となる。つまり、この選択性発現の主たる要因はイネに含まれる aryl acylamidase I によるものであることが明確になった。

さらにこの事実を証明するために最も好適な材料を発見し、われわれに提供してくれたのが松中¹⁸⁾による DCPA 感受性イネの登場であった。普通のイネは水稲陸稲を問わず抵抗性であり、その茎葉に DCPA 水解酵素すなわち aryl acylamidase I をもっているのに除草剤として DCPA を使用しても枯死しないが、ここに登場した DCPA 感受性イネはヒエと同じように枯死するのである。

われわれはこの DCPA 感受性イネの茎葉からは aryl acylamidase I の活性を検出することができなかった。しかし aryl acylamidase II を精製し、その性質を検討した結果、ヒエに含まれる aryl acylamidase II と全く同じ酵素であることを確認した。この結果から明らかなように、DCPA 感受性イネの場合は aryl acylamidase I を欠損した変異株であるため、aryl acylamidase II のみをもつものであろう。従って DCPA 散布によりヒエと同じように枯死してしまうことになる。

この点に関する研究について、松中¹⁹⁾は極めて興味ある報告を行っている。DCPA 抵抗性イネと DCPA 感受性イネとの交配試験を行うと同時にイネの葉の aryl acylamidase I の活性を測定した結果、F₂においては DCPA 感受性イネ 1 に対し DCPA 抵抗性イネ 3 の分離比を示すことを確認している。これらの結果から、DCPA による選択性発現機構の“かぎ”をにぎっているものは aryl acylamidase I であり、イネにおける aryl acylamidase I の欠損またはイネ植物体内で aryl acylamidase I がマスクされている場合、DCPA に対して感受性となることが理解されるであろう。

次に、イネ以外の植物でパセリやミツバのように DCPA を強く分解する aryl acylamidase III をもつ植物は果たして DCPA に対して抵抗性をもつかどうかについて簡単にふれておく。

イネ、パセリ、ミツバを用いて茎から DCPA 溶液 (0.01 % または 0.02 %) を吸収させ、茎葉における分解を、DCA を測定することにより、DCPA に対する分解率として算出した。その結果は、イネは 84 %/24 hr, パセリは 38 %/24 hr, ミツバは 20 %/24 hr であった。この結果から、吸収された DCPA は各植物体内で明らかに分解されることが判った。またヒエの場合は分

写真 1. イネ、タイヌビエ、パセリ、ミツバに対する DCPA 散布試験

解されなかった。さらにイネ、ヒエ、パセリ、ミツバを同一ポットに栽培し、各種濃度の DCPA 溶液 (0.02 %, 0.06 %, 0.1 %, 0.4 %) の散布試験を行った結果、0.4 % 溶液ではイネ以外の植物は枯死したが、0.1 % 溶液以下の濃度における試験では、ヒエ以外は枯死しなかった。

これらの結果から、aryl acylamidase III を植物の茎葉中を含む場合、少なくともパセリやミツバの場合に認められるように DCPA に対して抵抗性を示すことが明らかになった。

MCC (Swep) も稲作に用いられている選択性除草剤であることは広く知られている。これまでにイネ茎葉の磨砕液で MCC の分解活性を調べたが、確認することができなかった。しかし MATSUNAKA²⁰⁾ は、土壌処理した場合、イネ茎葉部に集積した MCC は徐々に消失することから、MCC 分解酵素の存在を示唆した。河村¹²⁾ は、土壌処理した場合、イネ茎葉中の MCC の消長や NAC を添加した場合の影響等について詳しく調べた。その結果、イネ茎葉中の MCC の集積量は 7 日後に最大に達し、その後徐々に減少し 7 日後にほぼ消失することを認めた。これらの結果から、MCC によるイネ-ヒエおよびその他の雑草間の選択性発現機構は DCPA の場合と類似しており、MCC もイネ植物体内で代謝され、無毒化される結果、選択性が発現されるものと想定していた。

最近われわれの研究室で aryl acylamidase I の精製に affinity chromatography を利用して大量の酵素を精製することができるようになったので、高濃度の酵

素を用いて実験した結果、MCC が aryl acylamidase I により分解されることを証明した。また MCC の分解も NAC により阻害されることも確認した。この実験結果は、MCC による選択性発現に aryl acylamidase I が関与していることを示唆するものである。

Aryl acylamidase に対する阻害剤の影響については、酵素の諸性質を調べた中で特に殺虫剤 (カーバメート化合物、有機りん化合物) の影響について注目していただきたい。この問題については既に多数の報告がある。この理由は改めて言うまでもなく、解毒酵素の阻害剤を除草剤と混合して施用すれば、解毒酵素に起因する選択性はカットされるためにある場合は作物に対する薬害となって現れるが、巧みに利用すれば共力剤 (synergist) となって除草効果を数倍以上拡大する結果になる。

この問題に早くから着目した例は HISADA⁵⁾ により報告されている。すなわち、成熟したメヒシバの除草に当たり、DCPA と NAC を 5:1 の割合で混合施用することにより除草効果を数倍増大することを発見し、WYDAC として実用化されているのは好例である。DCPA と NAC 混合剤がどの酵素系をカットするかについては、現在のところ確証はない。その他の例については、紙面の都合上割愛させていただきたい。

他方、見方を換えた場合、解毒酵素を阻害しない強力な殺虫剤が発見されれば、除草剤と同時に散布を行っても薬害を発生させないのみならず、近接散布による突発的薬害の発生もなくなるので、そのような殺虫剤の開発も強く期待される。

本研究を遂行するに当たり終始有益な御助言と御便宜を与えられた現神戸大学農学部松中昭一教授（前農林省農業技術研究所生理遺伝部）および名古屋大学農学部助教授鍬塚昭三博士に深謝申し上げます。また協同研究者である平松 昭，児玉 治，鈴木光一，深沢幸義，大関三男，笠倉紀夫，中川紀美子，大場達夫，加藤伸吉，吉井春夫の諸氏に謝意を表します。DCPA および関連化合物を提供された保土谷化学工業株式会社並びに日産化学工業株式会社に対し御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 赤塚尹巳：農薬科学 **I**, 55 (1973).
- 2) 赤塚尹巳・大場達夫：茨大農学術報告 **21**, 39 (1972).
- 3) 赤塚尹巳：植物酵素セミナー 大阪大学蛋白質研究所 (1971).
- 4) 赤塚尹巳・笠倉紀夫・副島正美：茨大農学術報告 **21**, 43 (1973).
- 5) HISADA, T.: Proceedings of 1st Asian-Pacific Weed Control Interchange, 107 (1969).
- 6) HOAGLAND, R. E. and G. GRAF: Weed Science **20**, 303 (1972).
- 7) HOAGLAND, R. E. and G. GRAF: Phytochemistry **11**, 521 (1972).
- 8) HOAGLAND, R. E., G. GRAF and E. D. HANDEL: Weed Research **14**, 371 (1974).
- 9) 石塚皓造：日米セミナー (Raleigh, N. C., USA) (1969).
- 10) 加藤伸吉・児玉 治・赤塚尹巳：日本農薬学会大会講演要旨集, 103 (1977).
- 11) 加藤伸吉・児玉 治・赤塚尹巳：同上 要旨集, 306 (1978).
- 12) 河村雄司：植物防疫 **23**, 23 (1969).
- 13) 児玉 治・赤塚尹巳：日農化関東支部大会講演 (1974).
- 14) 児玉 治・崎山 博・赤塚尹巳：日本農薬学会大会講演要旨集, 238 (1976).
- 15) 松中昭一：日本農薬学会誌 **3**, 195 (1978).
- 16) 松中昭一：新農薬創製法 (山本・野口編). 南江堂, 東京, 224 (1965).
- 17) 松中昭一：農薬デザインと開発指針 (山本・深見編). ソフトサイエンス社, 東京, 367 (1979).
- 18) 松中昭一：日農化大会講演要旨集, 16 (1969).
- 19) 松中昭一：同上 要旨集, 296 (1971).
- 20) MATSUNAKA, S.: Pure Appl. Chem., Sp. Issue, 343 (1971).
- 21) McRAE, D. H., R. Y. YIH and H. F. WILSON: Abst. Weed Soc. Amer., 87 (1964).
- 22) 吉井春夫・児玉 治・赤塚尹巳：日本農薬学会大会講演要旨集, 305 (1978).
- 23) 吉井春夫・児玉 治・赤塚尹巳：未発表

(1979年6月9日受理)