

論文概要

酸アミド系除草剤 Propanil の選択作用機構に関する研究

(1985年 農学博士論文)

筑波大学大学院

農学研究科

応用生物化学専攻

與語靖洋

## 論文概要

本研究は除草剤 Propanil に対し抵抗性を有する植物の選択作用機構に関して比較生理生化学的に研究を進めたものである。

まずイネ科植物の中で、幼植物段階での Propanil 抵抗性の植物種間差について調べた。シコクビエ・コムギは根部及び茎葉部浸漬処理において、イネには若干及ばないが、Propanil に対してかなりの抵抗性を示し、タイヌビエ、メヒシバ及びオヒシバは感受性を示すことが認められた。

次に植物の齢及び生育地による Propanil 感受性の差異を調べた。本研究で調べた範囲内では、メヒシバは生育地の如何に関わらず、Propanil に対し感受性を示すことが認められた。また発芽時では、イネ、タイヌビエ及びメヒシバの3植物とも強く阻害を受けたが、イネは2葉期ですでに Propanil に対し抵抗性を示したのに対し、メヒシバ及びタイヌビエは、4葉期までは感受性を示し、6葉期以上の発育段階で初めて抵抗性を示すことが認められた。

Propanil に対する抵抗性機構を明らかにするため、第一に Propanil の植物体内代謝及び Arylacylamidase による加水分解について調べた。

Propanil の植物体内挙動に関する研究に先立ち、 $^{14}\text{C}$  - 標識

Propanil を合成するとともに、Propanil の種々の同族体を合成した。

$^{14}\text{C}$ -Propanil を用い、その体内代謝について検討したところ、根部及び茎葉部両浸漬処理の場合に $^{14}\text{C}$ -Propanil の代謝能はイネで最も大きく、コムギでもかなりの部分が代謝された。しかしシコクビエやタイヌビエでは、根部処理の際に根部内で若干代謝物が確認されたものの、24時間後でも吸収された $^{14}\text{C}$ -放射能量のうち大部分が親化合物のまま残存しており、ほとんど代謝されなかった。

次に各種植物体より抽出した Arylacylamidase の粗酵素を用い、Propanil 抵抗性との関係を調べた。残存 Propanil 及び生成3,4-dichloroaniline (3, 4-DCA) を合せて検出することによって Propanil 加水分解酵素活性を調べたところ、イネではかなりの量の Propanil が消失していた。コムギにおいてもイネ同様3, 4-DCA の生成が認められたが、その活性は著しく弱かった。シコクビエ、タイヌビエ及びメヒシバではほとんどがそのままの形で残存していた。

また Propanil を基質としない Arylacylamidase II の加水分解酵素活性を調べたところ、供試した植物では一様にその活性は Arylacylamidase I 活性に比べて極めて低かった。

次に Propanil に対し抵抗性を示した6葉期のメヒシバにおける加水分解酵素活性を調べたところ、茎葉のいずれの部位でも活性は検出されなかった。6葉期のタイヌビエでも同様の結果が得られた。

さらに分子内に酸アミド結合を有する除草剤の Naproanilide 及び MY-15 を用いてその殺草活性と加水分解能との関係を調べるとともに、Arylacylamidase の isozymes の存在の可能性について検討した。

Naproanilide 及び MY-15 は根部及び茎葉部両処理において、ともに加水分解した代謝産物であるCOOH体の方が、親化合物に比べ殺草作用が強いことが見られたが、また親化合物、COOH体ともに、根部及び茎葉部両処理でイネ科植物より広葉植物に高い殺草活性を有することが明らかとなった。

$^{14}\text{C}$ -Naproanilide 及び  $^{14}\text{C}$ -MY-15 の植物体内代謝の一次反応は、どの植物種においても酸アミド結合の加水分解であることが明らかとなった。この場合、Propanil の加水分解酵素とは異なる酵素の存在が示唆された。

抵抗性機構に関する第二の研究として、薬剤の植物体内移動の視点から $^{14}\text{C}$ -Propanil を用いて、吸収・移行の種特異性を検討した。初めに Propanil 茎葉部浸漬処理において、シコクビエでは茎葉からの吸収量が少ないことが明らかとなり、次に Propanil 根部

浸漬処理において、シコクビエは他の被検植物と比較して、

Propanil の根からの吸収量は多いが、根中に多く蓄積し、茎葉部への移行率が小さいことが示された。

また齡の異なるメヒシバの茎葉部からの Propanil の吸収特性について調べたところ、メヒシバは齡が進むにつれて茎葉からの吸収量が少なくなり、抵抗性の強さと高い相関が示された。

第三に茎葉処理 Propanil に対するシコクビエの抵抗性機構を明確にするために、Propanil の植物代謝に対する作用を検討した。

初めに Propanil 茎葉部処理後における葉の光合成及び呼吸の変化を調べたところ、Propanil 感受性の異なるイネ、シコクビエ及びタイヌビエの3植物とも、Propanil 処理直後光合成が阻害されることが明らかとなった。光合成阻害からの回復を見ると、イネで速やかな回復が見られたのに対し、シコクビエでは回復が緩やかであり、タイヌビエでは回復が見られなかった。一方呼吸は3植物とも光合成と同様の急激な阻害を受けたが、抵抗性の如何に関わらず、3植物とも同様の緩やかな回復を見せた。

次に葉片における Propanil 処理後の生理的变化と薬剤挙動を合せて追跡した。初めに Propanil の光合成に及ぼす影響を調べたところ、完全葉の実験に用いた濃度の1/10の濃度のPropanilで、葉片は短時間内に顕著な光合成阻害を受けた。但しイネでは阻害が

低かった。一方阻害からの回復過程を調べると、完全葉では緩やかな回復を示していたシコクビエでも、完全葉で回復が見られなかったタイヌビエ同様著しく回復が遅かった。

次に $^{14}\text{C}$ -Propanil を用いてその蓄積・放出及び代謝について調べたところ、葉片における Propanil の蓄積量に植物種間差がないが、 $^{14}\text{C}$ -放射能量の葉片から外液への放出がイネにおいては比較的少なかった。またイネでは $^{14}\text{C}$ -Propanil は速やかに代謝され、Propanil の葉片内濃度は他の2植物に比べて極めて低くなっていた。

さらに葉緑体に直接処理し、Propanil の葉緑体への吸着を検討したところ、供試した3植物で Propanil に対する感受性の如何に関わらず、Propanil の葉緑体との吸着及び光合成電子伝達系の阻害に顕著な差はなく、選択性の要因として作用点との吸着を考えることはできなかった。

以上のことから Propanil に対し抵抗性を有するイネでは従来提唱されている Propanil 加水分解酵素 Arylacylamidase I による分解がその抵抗性の主要因であることが明らかとなり、またコムギでもイネ同様 Propanil 加水分解酵素がその抵抗性に関与していることが明らかとなった。

しかしシコクビエでは、Propanil の植物体内代謝、及びその加

水分解酵素活性、また他の除草剤の加水分解に着目した代謝能の3点から検討した結果、Naproanilide 及び MY-15 を加水分解する Arylacylamidase 活性は認められたが、Propanil 加水分解酵素は存在しないことが明らかとなった。さらに植物体内挙動を検討したところ、シコクビエでは茎葉処理のときの吸収量が少ないこと、及び根部処理のときの根部から茎葉部への移行が少ないことが認められた。そのため作用点としての茎葉部内の Propanil の蓄積が少なくなり、これが Propanil 抵抗性機構の要因の一つとなっていることが推測された。また葉片や葉緑体を用いた実験によって、このことはさらに確認された。

Propanil 感受性の齢による差異について、メヒシバを中心に調べたところ、4葉期のメヒシバでは生育地の違いに関わらず Propanil に対して感受性であったが、6葉期の場合には抵抗性を示してくることが認められた。その際メヒシバは、タイヌビエと同様に Propanil 加水分解酵素活性を示さなかった。しかし Propanil の茎葉からの吸収を見ると、植物による Propanil に対する感受性の強弱にかかわらず、齢が進むに伴い Propanil の吸収量が減少し、メヒシバで特に顕著であったことから、このことが発育に伴う抵抗性の変化の要因として大きく関与していることが明らかとなった。

植物種間及び齢の違いによる Propanil に対する感受性の差の機

構の要因として吸収・移行過程の差が明らかにされた。



DA  
368  
1985  
①

寄	贈
與語靖洋氏	平成 年 月 日

酸アミド系除草剤 Propanil の選択作用  
機構に関する研究

(1985年 農学博士論文)

筑波大学大学院

農学研究科

応用生物化学専攻

與語靖洋

89001569

目次

序論	1
第1章 植物の Propanil 感応性に関する研究	10
第1節 Propanil に対する感応性の植物種間差	
1. 目的	11
2. 材料と方法	11
3. 結果	13
4. 考察	16
第2節 Propanil に対する植物の齢及び生育地による感応性の差異	
1. 目的	25
2. 材料と方法	25
3. 結果	26
4. 考察	28
摘要	34
第2章 Propanil の植物体内代謝に関する研究	37
第1節 $^{14}\text{C}$ -Propanil 及び関連化合物の合成	
1. 目的	40
2. 材料と方法	41
3. 結果	41
4. 考察	42
第2節 Propanil の植物体内代謝	
1. 目的	47

2.	材料と方法	47
3.	結果	48
4.	考察	49
第3節 Propanil 加水分解酵素活性		
第1項 Propanil 加水分解酵素活性の植物種間差		
1.	目的	57
2.	材料と方法	57
3.	結果	58
4.	考察	59
第2項 Propanil 加水分解酵素活性の基質特異性の植物種間差		
1.	目的	65
2.	材料と方法	65
3.	結果	65
4.	考察	66
第3項 成熟植物における Propanil 加水分解酵素活性		
1.	目的	69
2.	材料と方法	69
3.	結果	69
4.	考察	70
第4節 各種除草剤の酸アミド結合加水分解酵素活性の植物種間差		
		72
第1項 Naproanilide 及び MY-15 に対する感応性の植物種間差		
1.	目的	73
2.	材料と方法	73
3.	結果	74

4. 考察	76
第2項 Naproanilide 及び MY-15 の植物体内体謝から見た酸アミド 結合の加水分解酵素活性の植物種間差	
1. 目的	83
2. 材料と方法	83
3. 結果	84
4. 考察	96
摘要	106
第3章 Propanil の吸収・移行に関する研究	
	111
第1節 Propanil の吸収・移行の植物種間差	
第1項 茎葉部浸漬処理における <sup>14</sup> C-Propanil の吸収	
1. 目的	113
2. 材料と方法	113
3. 結果	113
4. 考察	114
第2項 根部浸漬処理における <sup>14</sup> C-Propanil の吸収・移行	
1. 目的	117
2. 材料と方法	117
3. 結果	117
4. 考察	118
第2節 Propanil の吸収の齢による差異	
1. 目的	123
2. 材料と方法	123
3. 結果	123

4. 考察	124
摘要	126
第4章 植物代謝生理系に及ぼす Propanil の影響及びその挙動に関する研究	128
第1節 完全葉における茎葉部 Propanil 処理後の生理的变化	
1. 目的	130
2. 材料と方法	130
3. 結果	131
4. 考察	131
第2節 葉片における Propanil 処理後の生理的变化と薬剤挙動	
第1項 Propanil 処理後の光合成能の変化	
1. 目的	134
2. 材料と方法	134
3. 結果	135
4. 考察	136
第2項 Propanil の葉片内濃度変化	
1. 目的	138
2. 材料と方法	138
3. 結果	138
4. 考察	139
第3節 Propanil の作用性及び作用点との親和性	
第1項 葉緑体の光合成電子伝達系に及ぼす Propanil の影響	
1. 目的	145
2. 材料と方法	145
3. 結果	146

4. 考察	147
第2項 $^{14}\text{C}$ -Propanil の葉緑体への親和性の植物種間差	
1. 目的	150
2. 材料と方法	150
3. 結果	150
4. 考察	151
摘要	157
総合考察	161
謝辞	166
引用文献	167

## 序論

現在人類が利用できる陸地は全体の10%にすぎない。つまり我々はこの僅かな土地を利用して増加する人類の食糧を確保しなければならない。そのためには単位面積あたりの収穫量を増加させることが必要となってくる。このように農業の生産性を向上させる方法としては土壌改良による土壌の肥沃化、作物の品種改良及び栽培技術の改良等がある。しかし中でも最も簡単で確実と考えられる方法は作物を様々な生物的害（害虫、病気及び雑草）から守ることであろう。この目的で使用されるのが農薬である。

農業生産性に対する農薬の貢献度は周知のことであり(127,129,141)、その利用も年々増加している。しかし農薬の価値は単に生産性の向上だけで評価することはできず、常に経済性・社会性等に立脚していなければならない。経済性の面では特に農薬使用に関わる経費があげられるが、実際は農薬使用による生産性の増加のみならず労働時間の短縮により、その増収は大きいものとなっている。また現在のように第2種兼業農家が増加している農業社会では、このような労働時間の短縮は重要であろう。一方、農薬はその有用性から農作物の生産地のみならず、人間を含む様々な生物が存在している場所（森林・芝生・荒地等）で広く使用されており、その残留による生物濃縮等、生物環境に悪影響を及ぼすことが社会的問題となっている。

現在使用されている農薬には殺虫剤・殺菌剤・除草剤・殺センチュウ剤・殺ソ剤及び植物生長調節剤等、様々な種類があり、中でも殺虫剤・殺菌剤・除草剤が主要なものとなっている(127,129,141)。殺虫剤は作物（植物）に害を与えず、害虫（昆虫及びダニ類）を防除するものであるため、その間の選択作用性を実現することは比較的容易である。殺菌剤は植物病原菌から作物を保護するものであり、この間の選択性を実現することも殺虫剤同様比較的容易である。それに対し、

除草剤は同一圃場にある雑草を有用植物に害を与えないで死滅させる必要がある。植物界の中での選択性を実現することは、前二者に比べ難しく、またその選択性に重点が置かれている。

このように雑草防除は前述のごとく、作物の雑草に対する競争力を向上させることにより、作物の生産性の向上をはかることである。雑草の防除には種々のものがあり、1) 生態的防除法、2) 機械的防除法、3) 化学的防除法、4) 生物的防除法及び5) 物理的防除法に分類されている(138)。除草剤はこのうち化学的防除法に分類されている。除草剤は特に選択性除草剤の出現により、他の防除法に比べて畦内除草を効果的・持続的かつ安全に行うことができ、耕地での使用が容易となった。またそれに伴い、労働時間の短縮にともなう人件費の減少及び繁雑な農作業の簡略化を進めることができた。そのことによって生産性の増大と合わせて、経済性も飛躍的に増大し、かつ余剰時間を他の仕事または余暇に費やすことで、生活の向上も導いている。

しかし一方では除草剤の持つ微量で強力な作用と裏腹に、1) 作物への薬害(使用量及び環境要因にともなう選択性の減少)、2) 環境への影響(他の生物への毒性や生物濃縮、さらには環境汚染等、他の生態系への影響)、3) 雑草の変化(雑草相の変化ならびに抵抗性の獲得)等について充分注意することが必要となる。従って除草剤を用いた化学的防除法は他の防除法とうまく組み合わせることで、その特徴が充分発揮されることを認識しなければならない。

薬剤による雑草防除の研究は19世紀末に Bonnet が硫酸銅によりノハガラシを駆除したことに始まり、各種無機化合物による防除法が20世紀まで進められた。しかしこれらは非選択的除草剤であり、危険性等の面からなかなか実用化には至らなかった。1940年に Zimmerman によりナフタレン酢酸が合成され、ここで始めて選択的除草剤が開発された。1942年にはイネ科植物と広葉植物の間で選択的な2,4-D(2,4-ジクロロフェノキシ酢酸)が発表され、世



界中に広まるとともに1947年には我が国にも紹介された(138)。

除草剤の歴史を開発傾向から見ると大きく分けて6つの特徴がある。1つは前述のごとく非選択的除草剤から選択的除草剤への変遷である。これは同一場所・時期に作物と雑草が存在するとき必須のものである。その例として、Propanil やシメトリンはイネと同じ環境に存在するヒエを、イネに害を与えないで効果的に防除することができる。2番目には多量施用から微量施用の方向で、初期に開発された除草剤は100g/10a以上も施用されるものがあるのに対し、近年では例えばシメトリンのように40~60g/10aが一般的になっている(132)。また最近2~3g/10a施用というスルホニルウレア系除草剤が出てきており、微量化が進んでいる。3番目には低毒化の方向で、『沈黙の春』や『複合汚染』等の著書、またはいわゆる枯れ葉剤作戦後の生態系への影響等で知られているように多くの社会問題が巻き起こってきたことに起因して、除草剤の使用基準が各国ごとに定められ、低毒性の薬剤の開発が進められてきた。4番目には混合剤の開発で、施用時期が同一な2種類の除草剤を混合施用することでより広い範囲の雑草を防除する方法が開発されている。除草剤同志の混合剤にかぎらず、特に最近ではSafener または Antidote (106) といって除草剤の作用を作物だけ選択的に軽減するという解毒剤の開発も進められており、種子にまぶしたり、除草剤と混用して使用されている。5番目は施用方法の変遷で、まず剤形は飛散による作物・人体及び他の生態系への影響を考え、水和剤から水田剤及び微粒剤へ変遷し、また処理時期は水稻移植前後に集中してきている。最後にあげる防除傾向の変遷として、殺草による「田ぎれい」から、抑草剤や植物生長調節剤等、生産性を考えた雑草防除が1つの方向性として出されている。

この除草剤研究には大きく分けて2つの側面がある。1つはいわゆる除草剤開発で、化合物の合成から始まり、混合剤を含めスクリーニングにより実用化へと

進めてゆくものである。もう1つはこれら除草剤の作用機作を中心に研究をするものである。後者にももちろん開発上の意義はあるのだが、その研究には大きく分けて3つの柱があると考えられる。

前述のように除草剤が植物種間で選択的に作用する、すなわち雑草に対して強く作用し、作物の生育に負の影響を与えないことは極めて重要である。この機構を探ることが第1の点と言えよう。一方このことを植物の側から見ると、植物の除草剤に対する感応性の種間差いわば植物の有する多様性であり、この性質を追求することが第2の点であり、両者は互いに裏打ちされている。そして植物の生育に影響を与える外部環境を考え、1つの生態系の中で除草剤と植物との相互作用を捉えてゆくのが第3の点である。したがって除草剤研究の目的は、植物が存在する環境の中で、本来植物が種特異的に具備している多様な形質を、植物にとっては異物であり、かつ生理活性を有する除草剤に対応し、発現してゆく機構を探ることにある(65,66)。

このような除草剤研究は選択性と作用性に大別できる。

前者の選択性発現には、1) 植物の生態的または形態的な差に基づくもの、2) 耕種的な差に基づくもの、3) 植物の生理的な差に基づくもの、4) 植物の生化学的な差に基づくもの等いくつかの要因があげられる(138)。

これらは主に植物を中心としたものであるが、他にも様々な環境要因、1) 土壌条件、2) 天候(光、温度、湿度等)、3) 生物間の相互作用(アレロパシー等)、4) 他の薬剤との拮抗及び相乗作用等が選択性を左右する(138)。

また作用性については、各除草剤によって植物に特徴的に起る生理的変化、主に第一次作用点を中心に研究が進められている(138)。

これらを解析してゆくにはその過程を除草剤の施用から植物における作用発現に至るまで除草剤の挙動を追跡し、個々の過程が作用発現に対してどのように関与しているかを調べてゆく必要がある(65,66)。

Propanil (3,4-dichloropropionanilide、略号3,4-DCPA、商品名スタム、分子量 218.1) は Rhom & Haas 社より、イネ耕地においてタイヌビエの防除を目的として開発された酸アミド系除草剤である(120,132)。

酸アミド系除草剤は acylamide 型と chloroacetamide 型に大別される(64, 132)。後者は1959年 Monsanto 社により開発された allidochlor に始まるもので、酸アミド結合のカルボン酸のアシル基に塩基が結合しているのを基本骨格にしている。この系列共通の特性はイネ科植物に高い選択性を有しており、タンパク質生合成阻害をその殺草機構に持っている。また発芽抑制剤として土壤処理されるものがほとんどである(Figure 1)。

また前者は Propanil を代表としたアニリンと低級脂肪酸との酸アミド結合体であり、茎葉接触型選択活性を有し、主に光合成を阻害するとされているものが多い(17,30,46,58,64,99,119,132)。また多くは茎葉散布処理される(Figure 1)。

これら以外に酸アミド結合を有する除草剤はいくつかあり、Propanil に非常に類似しているものもある。ウレア系の Diuron、Linuron は作用の面で、カーバメート系の Swep は作用や施用方法の面でも非常に共通点が多い(17,22,27,32, 64,72,99,112,113,132)。他にもカーバメート系(チオールカーバメート系も含む)、またはフェノキシ系・ナフトキシ系除草剤の中にも酸アミド結合を有するものがあるが、その作用は主に前者はタンパク質生合成阻害でむしろ chloro-acetoamide 型に類似し、後者はホルモン作用を有している(17,18,41,132) (Figure 1)。

Propanil は通常 200~300 g a. i. (active ingredient)/10 a を雑草の幼植物の時期に茎葉散布する。Propanil が現在使用されている適用分野は水田の他に畑地・芝地・樹園地等広くある。適用農作物から見ると、イネの他にイモ類・ナス科作物等がある。対象雑草は1年生イネ科雑草及び1年生広葉雑草であり、多年生雑草や冬期雑草を防除することは難しい。また対象雑草も幼

植物の時期には有効であっても、発育が進むに伴い殺草効果が低くなってくる。混合剤としては Benthocarb との混合で水稻直播栽培に(142)、 $\beta$ -NACとの混合で生育期のノビエに、またカルバリル、XMC、MPMCとの混合で樹園地の下草枯殺剤として有効に利用されている(132)。またタイでは2,4-Dとの混合剤で中期除草剤としても使われている。

Propanil 散布後の挙動に関しては多くの研究がある。Propanil は土壌中の移動性が少なく、土壌微生物により速やかに加水分解され、3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) になる(9,13,19~21,24,29,37,102)。3,4-DCA は大部分土壌に吸着されるが、次第に $\text{CO}_2$ にまで分解される(29)。一方3,4-DCAは土壌中で3,3',4,4'-tetrachloroazobenzene (TCAB) 等の縮合体を形成することが知られている(19~21,26,29,74,76,109)。Propanil から3,4-DCAへの変化は細菌から糸状菌に至るまで多くの菌で起るが(9,13,24)、3,4-DCAからTCABへの反応は限られた菌でしか行われぬという研究がある(26,74)。

また光による分解は複雑で塩素の水酸基置換・脱塩素・加水分解からのTCABの生成等の報告がある(132)。

一方植物体においては、散布されたPropanilは植物体内に侵入し、ほとんど移行せず侵入した場所の作用点を阻害する。Propanilの作用点としては主に光合成が考えられるが、他にもいくつか知られている(後述)。

Propanilの植物体内挙動に関しては詳細に調べられている(2~5,10~13,39,45,53,57,66,69,71,83,87~90,99,111,122~124,137,144~146,148)。この薬剤は抵抗性植物、特にイネで3,4-DCAに加水分解される。この反応が解毒とされているが、その中間代謝産物として3,4-dichlorolactanilide (3,4-DLA)が形成されるという説もある(145)。反応生成物のプロピオン酸は $\beta$ -酸化により速やかに $\text{CO}_2$ にまで分解されるが(122)、3,4-DCAはGlucoseや

Lignin等と抱合体を形成する(38,57,144)。

Propanil の選択作用性、特にイネとヒエの間の選択性はその加水分解酵素の存在の有無による解毒反応の大小が作用点における Propanil の蓄積の差を生じることによると考えられ、Propanil に関わる選択作用性はそのほとんどがこの段階の理解にとどまっている(10,66,83,124,145)。しかし前述のごとく、その選択作用性を論ずる場合、単に Propanil 加水分解能における差異だけで Propanil と植物との関係の全てを認識することは不可能といえよう。

石塚ら(67)は Propanil と同族の種々の塩素置換または側鎖の異なるものを用いて加水分解能を調べ、ヒエ葉にも Arylacylamidase (Propanil 加水分解酵素もこの中に含まれる) が存在することを確認している。つまり加水分解反応を植物の種特異性に由来する Arylacylamidase の基質特異性の差異としてとらえたのである。このことを受けて赤塚ら(3-5)はさらに酵素を精製し、Arylacylamidase にアイソザイムを見出し、このアイソザイムの存在の有無が Propanil の抵抗性に関与しているとした。ここにあげたように、除草剤と植物との関係を植物が元来有する種特異性、言い換えれば植物の多様性を比較生理生化学的側面から理解することが、除草剤研究にとって重要となってくる(65,66)。

本研究では、この考えに基づき、イネ科植物の中に Propanil に対し抵抗性を有する植物を検索した。またそこで見出された植物に対し、これまで Propanil 抵抗性の主要因として考えられてきた酸アミド結合の加水分解による解毒のみならず、その植物体内挙動を主に作用点における Propanil の蓄積への寄与度として捉え、総体的に調べた。特に酸アミド結合の加水分解については基質特異性の植物種間差の見地から詳細に検討した。一方、植物の Propanil に対する反応を特に光合成を中心に調べることで裏打ちしながら、Propanil と植物との相互作用を探り、Propanil、ひいては酸アミド系除草剤の選択殺草作用機構を解明す

ることを目的とした。

なおここで用いた略号を下記に示した。

D C P A ; dichloropropionanilide

D C A A ; dichloroacetanilide

C P A ; chloropropionanilide

C A A ; chloroacetanilide

P A ; propionanilide

A A ; acetanilide

D C A ; dichloroaniline

D L A ; dichlorolactanilide

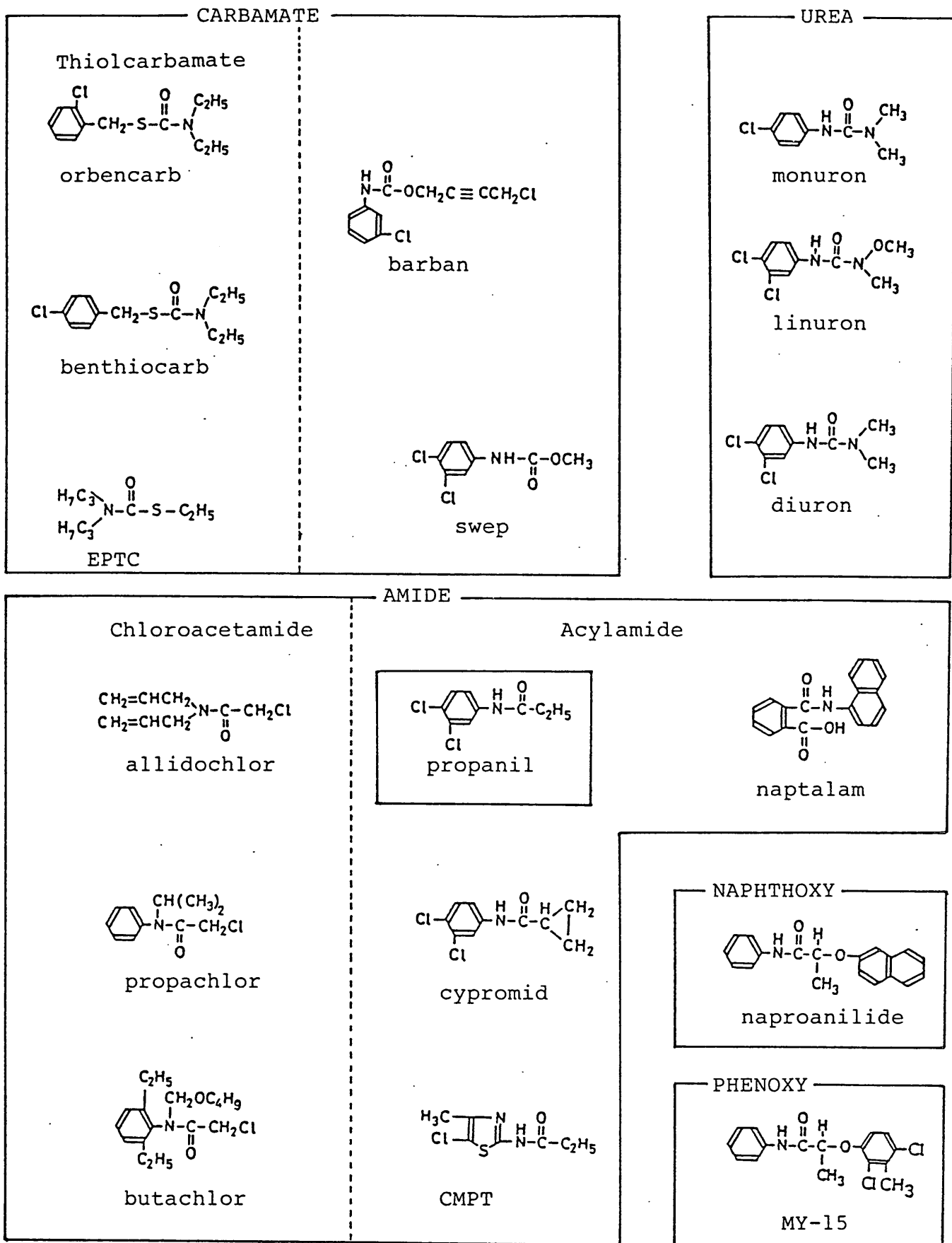


Figure 1. Chemical structure of herbicide which have acylamide-binding.

## 第1章 植物の Propanil 感応性に関する研究

Propanil は序論で述べたように、イネ耕作地におけるタイヌビエ防除剤として開発されたものである。施用方法としては雑草の幼植物時期に乳剤または水和剤を200~300 g a. i. / 10 aを茎葉散布する。使用場面としては水田以外にも畑地や芝地があり、他にも混合剤として樹園地にも用いられている。対象雑草は1年生イネ科雑草（ノビエ、メヒシバ、エノコログサ等）及び1年生広葉雑草（イヌビユ、タデ類、カヤツリグサ、コニシキソウ等）である。殺草効果の低いものとしてはスベリヒユ、ツユクサ以外に冬期雑草及び多年生雑草がある(132)。Propanil 抵抗性植物はイネ科以外ではこのようにいくつか知られているが(58,121,132)、イネ科植物では最近コムギの例が示されている(95)他は、タイヌビエにおいて Propanil 耐性の種内変異が存在することが報告されているにすぎない(143)。

また別に幼植物段階で Propanil に対して感受性を示しているイネ科雑草でも齢が進むにつれて抵抗性を獲得してくることが知られている(132)。

そこでイネ科植物の中で、幼植物段階での Propanil 抵抗性の植物種間差、及び齢による Propanil 耐性の差異に注目し、その感応性を探ることを目的とした。



## 第1節 Propanil に対する感応性の植物種間差

### 1. 目的

Propanil に対し抵抗性を有する植物を数種のイネ科植物について検索した。またここでは除草剤と植物の相互関係をより明確に捉えるために、主に水耕法を用いて土壌要因を排除した。処理方法としては再現性も高く、以後の分析に有効である浸漬処理を用いた。また植物に内在する多様性を引出す目的で、茎葉部処理以外に通常実用場面では行われぬ根部処理も合わせて行い、Propanil に対する感応性差異を検索した。また茎葉部浸漬処理に関してはその効果を散布処理と比較し、その正当性も調べた。

### 2. 材料と方法

供試植物として、イネ (*Oryza sativa* L. 品種名 日本晴、英名 rice)、コムギ (*Triticum aestivum* L.、品種名 ウシオコムギ、英名 wheat)、シコクビエ (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn. 品種名 白峰、英名 finger millet)、タイヌビエ (*Echinochloa oryzicola* Vasing. 採種地 上尾市、英名 barnyard-grass)、オヒシバ (*Eleusine indica* (L.) Gaertn. 採種地 ドイツ、英名 goose grass)、メヒシバ (*Digitaria ciliaris* (Retz.) Koeler 採種地 日野市、英名 large crabgrass) の5種類のイネ科植物を用いた。コムギを除く各植物の種子を水道水に浸し、2日間28℃の暗所で発芽させた。コムギの種子は湿らせた紙タオルに播種し同様に1日間で発芽させた。催芽種子をガーゼを敷いた水切りバットに播種し、水道水で生育させた。2葉期まで生育させた植物はその後茶色のポリエチレン製広口ビンに移植し、培養液 (Table 1) にて所定の葉期まで生育させた。

まず始めに、自然光温室 (昼間25℃、夜間20℃) にて水耕法で4葉期まで

育てたイネ、シコクビエ、タイヌビエの茎葉に Propanil 濃度 1000 ppm ~ 4000 ppm (モル濃度にして  $4.6 \times 10^{-3} \sim 1.8 \times 10^{-2} M$ ) に蒸留水で希釈したスタム乳化剤(クミアイ化学)を  $1 m^2$  あたり 50 ~ 80 ml 散布した。散布時にはアルミホイルで根部を包み、薬剤が触れないようにした。散布後、葉の間にたまっている薬液をろ紙ですいとり、その後水耕法で生育させ、経日的に障害の程度を観察した。

同様に水耕法で4葉期まで育てたイネ、シコクビエ、タイヌビエの茎葉を 5000 倍ネオエステリン液(界面活性剤、クミアイ化学製)で洗浄後、水洗し、 $4.6 \times 10^{-5} \sim 6.9 \times 10^{-4} M$  の Propanil 水溶液(アセトン 1%を含む)に90分間浸漬処理した。浸漬部を水洗後再び水耕法で7日間生育させ、障害の程度を観察するとともに、根部及び茎葉部の新鮮重及び乾物重を測定した。また各植物の根部を、界面活性剤で洗浄しないことを除いて茎葉部処理と同様の方法により、 $4.6 \times 10^{-5} \sim 6.9 \times 10^{-4} M$  の Propanil 水溶液(アセトン 1%を含む)に3時間浸漬した。処理後浸漬部を水洗し同様に観察・測定を行った。

次に草種を拡げて、自然光温室(昼間 25℃、夜間 20℃)にて、3~4葉期まで土耕法により生育させたイネ、シコクビエ、オヒシバ、メヒシバを用いて試験を行った。1ℓの白色ポットにポットあたり5gの肥料(N:P:K=14:14:14)を土壌混和し、催芽種子を播種し、イネは水田状態で、他の3植物は畑地状態で4葉期まで生育させた。各植物の茎葉に Propanil 濃度 1000 ppm ~ 3000 ppm (モル濃度にして  $4.6 \times 10^{-3} \sim 1.3 \times 10^{-2} M$ ) のスタム乳化剤を散布し、その後、経日的に障害の程度を観察した。なおイネの場合散布時に落水し、どの草種も散布前に土壌表面にパーミキュライトを敷き詰め、散布後除去した。また同じ草種を水耕法にて4葉期まで生育させ、上記と同様に Propanil 水溶液( $2.3 \times 10^{-4} \sim 6.9 \times 10^{-4} M$  (アセトン 1%を含む))に根部及び茎葉部を浸漬処理した。また人工気象室(昼間 25℃、

夜間20℃、相対湿度60～70%)内で水耕法により3葉期まで生育させたイネ及びコムギを用いて、上記と同様の茎葉部散布処理を行った。根部・茎葉部両浸漬処理は両処理とも処理時間を2時間にし、処理濃度を $1.0 \times 10^{-4}$ ～ $5.0 \times 10^{-3}$ Mにした以外は上記と同様に行い、10日目に観察・測定を行った。

### 3. 結果

#### 3-1. スタム乳化剤散布処理が植物の生育に及ぼす影響

水耕法で4葉期まで育てたイネ、シコクビエ、タイヌビエの茎葉に Propanil 濃度1000ppm～4000ppmのスタム乳化剤を散布し、その後経日的に障害の程度を観察した。イネは、処理後1週間たっても、4000ppmの散布処理でも処理葉の葉先に若干の葉枯れがでている程度で、ほとんど障害が認められなかった。しかし、タイヌビエは、処理後2日目から1000ppmの処理でも葉の基部が折れ曲がり、かつ葉色に若干の変化が見られた。3000ppm以上の散布処理では処理後2日目に葉に著しいクロロシスが認められた。処理後1週間目では、タイヌビエは3000ppm以上の散布処理で、根腐れを伴い、完全に枯死し、2000ppm以下の処理でも若干上位葉及び茎の一部に緑色部分が残っているものの、新葉の展開は見られず、全ての植物が倒伏していた。それに対しシコクビエは、処理後2日目では、4000ppmの散布処理でもほとんど障害は認められず、処理後3日目に3000ppm以上の処理で、処理葉の葉先に若干のクロロシスが認められたにすぎなかった。処理後1週間たつと、全ての処理区でわい化が認められ、3000ppm以上の散布処理では、処理葉にかなりのクロロシスが見られたが、新葉が展開し、枯死には至らなかった。

次に草種を拡げて、土耕法により3～4葉期まで生育させたイネ、シコクビエ、オヒシバ、メヒシバにスタム乳化剤を散布処理し、15日目に観察したところ、

処理後、シコクビエは、1000 ppm 処理区において、無処理区と比べて葉先にクロロシスがでている程度であるが、3000 ppm 処理区において、そのほとんどが枯死していた。それに対しオヒシバやメヒシバはどちらも1000 ppm 処理区においても完全に枯死していた。しかしイネは3000 ppm 処理区においてもほとんど障害が認められなかった。

また水耕法により3葉期まで生育させたイネ及びコムギを用いて、スタム乳化剤を茎葉部散布処理したところ、処理後10日目にイネは、4000 ppm 処理区においてもほとんど障害が認められなかった。コムギも、1000 ppm ~ 4000 ppm の全ての処理区で、わい化及び処理葉にクロロシスが見られたものの、その程度は小さく、4000 ppm 処理によっても枯死しているものはなかった。

### 3-2. 茎葉部浸漬処理 Propanil が植物の生育に及ぼす影響

4葉期まで育てたイネ、シコクビエ、タイヌビエの茎葉を  $4.6 \times 10^{-5} \sim 6.9 \times 10^{-4} M$  の Propanil 水溶液に浸漬処理したところ、処理後1週間でシコクビエは、 $6.9 \times 10^{-4} M$  の処理において、無処理区に比べやや生育が劣り、葉先にクロロシスが見られる程度であったのに対し、タイヌビエは、 $6.9 \times 10^{-4} M$  の処理で完全に枯死した。一方イネは、 $6.9 \times 10^{-4} M$  の処理でもほとんど障害が認められなかった。また Propanil を含まない液（アセトン 1%のみ含む）に同様に浸漬処理し、それを無処理区として、障害の程度を植物体全体の新鮮重の対無処理区比で表した。処理1週間後でタイヌビエは、 $I_{50}$  が  $2.3 \times 10^{-4} \sim 4.6 \times 10^{-4} M$  の間にあるのに対し、イネ及びシコクビエは、 $6.9 \times 10^{-4} M$  の処理でも  $I_{50}$  に達しなかった (Figure 2)。この傾向は乾物重、また部位別に新鮮重・乾物重及び葉長・根長で見ても同様であった(70)。

次に草種を拡げて、水耕法にて4葉期まで生育させたイネ、シコクビエ、オヒシバ、メヒシバを用いて、同様に Propanil を茎葉部浸漬処理したところ、処理

1週間後でメヒシバ及びオヒシバは、 $4.6 \times 10^{-4}$  M以上の処理で枯死に至った。一方イネ及びシコクビエは、前述の試験とほぼ同様の傾向であった。また植物体全体の新鮮重の対無処理区比においても、処理1週間後でメヒシバ及びオヒシバは、 $I_{50}$ が $2.3 \times 10^{-4} \sim 4.6 \times 10^{-4}$  Mの間にあるのに対し、イネ及びシコクビエは、 $6.9 \times 10^{-4}$  Mの処理によっても $I_{50}$ に達しなかった (Figure 3)(70)。この傾向は乾物重や部位別、また葉長・根長の対無処理区比においても同様であった。

同様に3葉期まで生育させたイネ及びコムギを用いて Propanil を茎葉部浸漬処理を行ったところ、処理後10日目でも両植物とも全処理区で障害がほとんど認められなかった。また処理後10日目に植物体全体の新鮮重の対無処理区比においても、イネ及びコムギとも $5 \times 10^{-4}$  Mの処理でも影響がほとんど見られなかった (Figure 4)。

### 3-3. 根部浸漬処理 Propanil が植物の生育に及ぼす影響

4葉期まで育てたイネ、シコクビエ、タイヌビエの根部を $4.6 \times 10^{-5} \sim 6.9 \times 10^{-4}$  Mの Propanil 水溶液に浸漬処理し、処理1週間後に観察した。シコクビエは、若干の生育抑制や葉先にクロロシスが見られる程度であったのに対し、タイヌビエは、完全に枯死しているものはなかったが、強い生育障害を受け、一方、イネはほとんど影響が見られなかった。また茎葉部浸漬処理同様、植物体全体の新鮮重の対無処理区比においても、タイヌビエは、 $6.9 \times 10^{-4}$  Mの濃度において $I_{50}$ に達しているのに対し、イネ及びシコクビエは、 $6.9 \times 10^{-4}$  Mの濃度においても $I_{50}$ に達しなかった (Figure 5)(70)。

次に草種を拡げて、水耕法により4葉期まで生育させたイネ、シコクビエ、オヒシバ、メヒシバを用いて、同様に処理したところ、メヒシバ及びオヒシバは、処理1週間後で $6.9 \times 10^{-4}$  Mの処理において枯死に至った。全体の新鮮重の対無処理区比においても、メヒシバ及びオヒシバは、 $I_{50}$ が $2.3 \times 10^{-4}$  M～

4.  $6 \times 10^{-4} M$ の間であった。一方イネ及びシコクビエは、前述の試験とほぼ同様の傾向であった (Figure 6)(70)。

また同様に3葉期まで生育させたイネ及びコムギを用いて、 $1.0 \times 10^{-4} M$  ~  $5.0 \times 10^{-4} M$ の Propanil 水溶液に根部浸漬処理したところ、両植物とも処理後10日を経てもなお、全処理区でほとんど障害が認められなかった。また全体の新鮮重の対無処理区比においても、全ての処理でほとんど影響を受けなかった (Figure 7)。

#### 4. 考察

シコクビエは実際の農業に使用されているスタム乳化剤の茎葉散布に対しては、慣行量 (Propanil 濃度 3000 ppm) 付近の濃度で強く障害を受けたが、なおメヒシバ、オヒシバ及びタイヌビエに比べて、抵抗性を示すことが明らかとなった。また別に根部及び茎葉部浸漬処理においてイネには若干及ばないが、Propanil に対してかなりの抵抗性を示し、他の感受性植物との間に顕著な差が見出された。

一方コムギの場合、Propanil はアメリカでコムギ畑におけるエノコログサの防除剤として実際に使用されているが、本研究でスタム乳化剤の茎葉散布に対して、慣行量付近で若干障害が見られるものの、イネに匹敵する抵抗性を示した。また別に、根部及び茎葉部浸漬処理においても、Propanil に対しイネと同程度の抵抗性を示すことが明らかとなった。

散布処理と浸漬処理では、方法及び助剤も異なっており、直接的比較はできないが、これらの結果から茎葉部浸漬処理の影響は散布処理とほぼ同様の影響を示し、その処理法が抵抗性機構を探る上で適切なことが示された。従って以後の分析には、再現性及び放射性同位元素使用時の安全性等の面から考えて、浸漬処理を用いることにした。

以上のことから、シコクビエ及びコムギはイネには若干及ばないが、Propanil に対し抵抗性を有することが明らかとなった。従って、現在コムギ畑で防除剤として実際に使用されている例(95)を考えると、製剤や施用方法の検討結果の如何によっては実用化の可能性が残されており、作物の中に新たに Propanil に対し抵抗性を有する植物、シコクビエを見出したことは、農業上重要であると言えよう。またイネ科植物の中ではこれまで Propanil に対し抵抗性を有する植物はイネ以外にほとんど見出されておらず、このような近縁の種の中で Propanil 抵抗性植物を見出したことは、抵抗性機構研究の上で、特に選択殺草作用を知る上で意味のあるものと考えられる。またイネ、シコクビエ及びコムギは茎葉部処理のみならず根部処理においても Propanil に対して抵抗性を示したことから、その他の観察結果等も含め、抵抗性機構研究上大きな示唆を与えるものと思われた。

Table 1. Composition of the nutrient solution

Element	Chemical	Concentration(mg/l)	(mg/l)
N	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	73.4	$\text{NH}_4\text{-N}$ 20
	$\text{NaNO}_3$	27.4	$\text{NO}_3\text{-N}$ 20
P	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	201.7	$\text{P}_2\text{O}_5$ 40
K	KCl	64.2	$\text{K}_2\text{O}$ 40
Mg	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	61.1	MgO 10
Ca	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	105.0	CaO 40
Fe	EDTA-Fe	26.41	$\text{Fe}_2\text{O}_3$ 5
Mn	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.809	Mn 0.5
B	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.286	B 0.05
Mo	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.0920	Mo 0.05
Cu	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0786	Cu 0.02
Zn	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2197	Zn 0.05

Chemicals were dissolved in distilled water and pH was adjusted to 5.5-6.0 with 1N HCl.



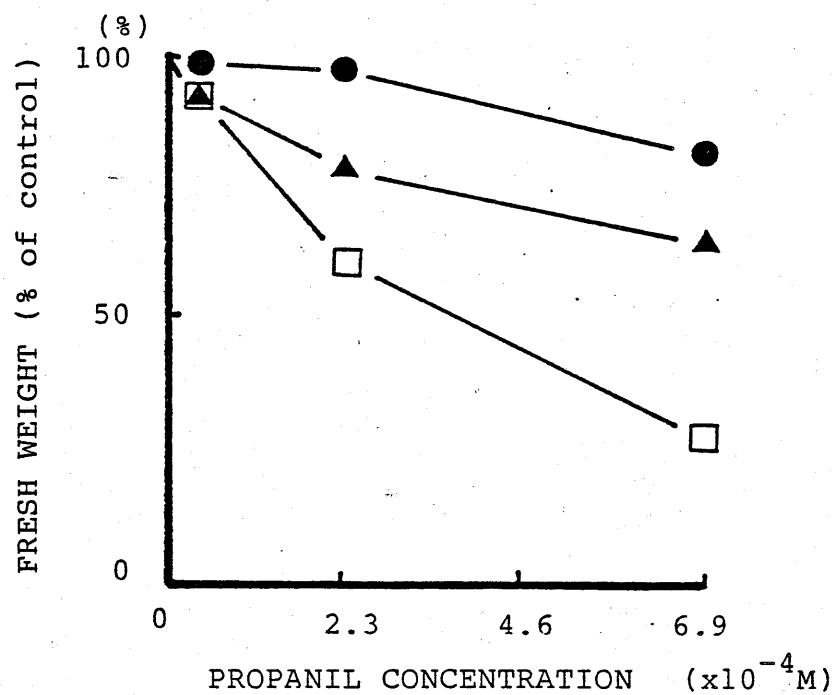


Figure 2. Relative effect of foliar-applied propanil on growth of rice, barnyardgrass and finger millet seedlings.

● rice    □ barnyardgrass    ▲ finger millet



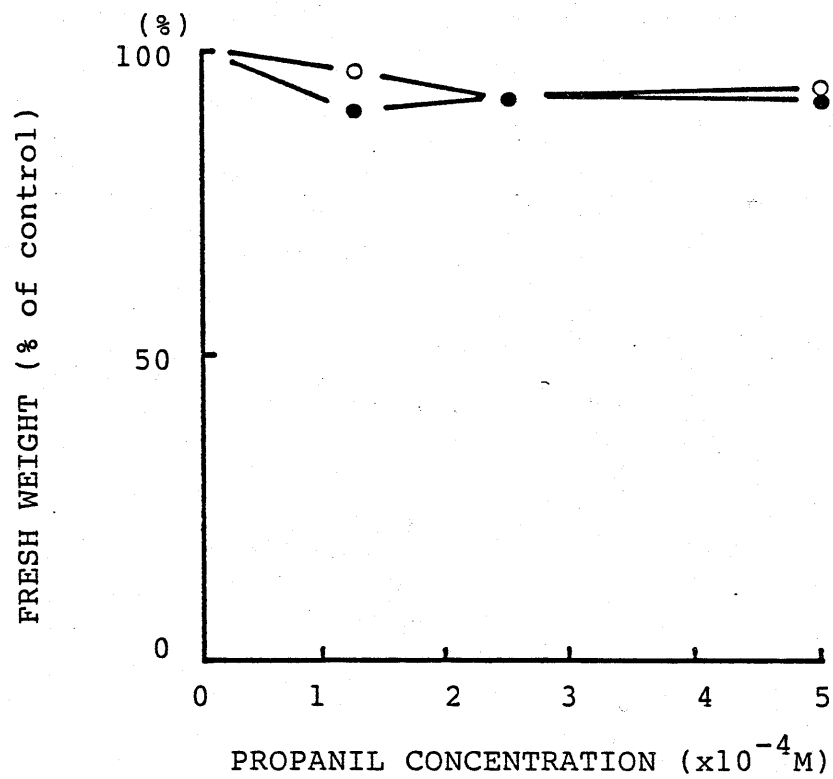


Figure 4. Relative effect of foliar-applied propanil on growth of both rice and wheat seedlings.

● rice      ○ wheat

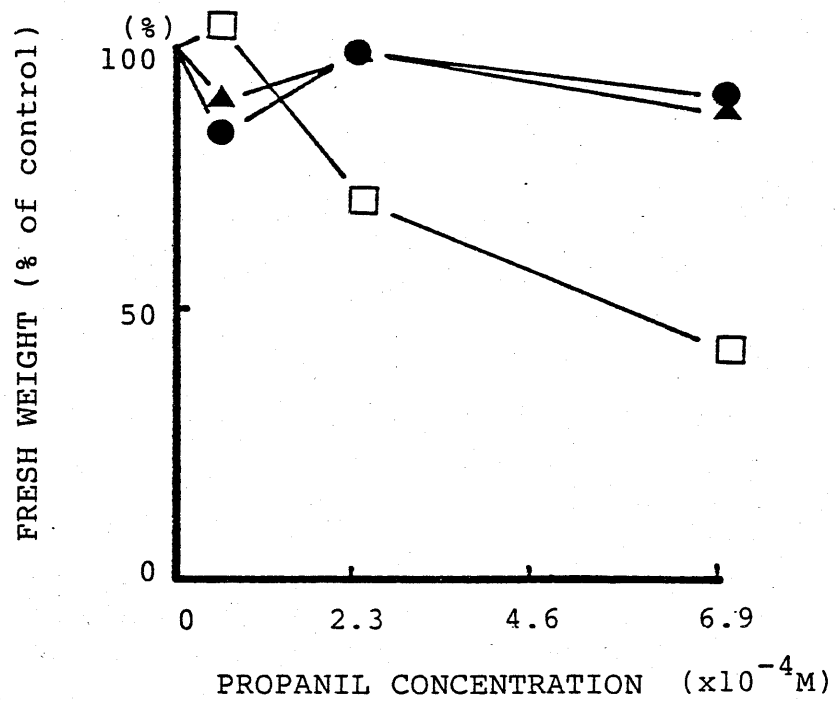


Figure 5. Relative effect of root-applied propanil on growth of rice, barnyardgrass and finger millet seedlings.

● rice    □ barnyardgrass    ▲ finger millet



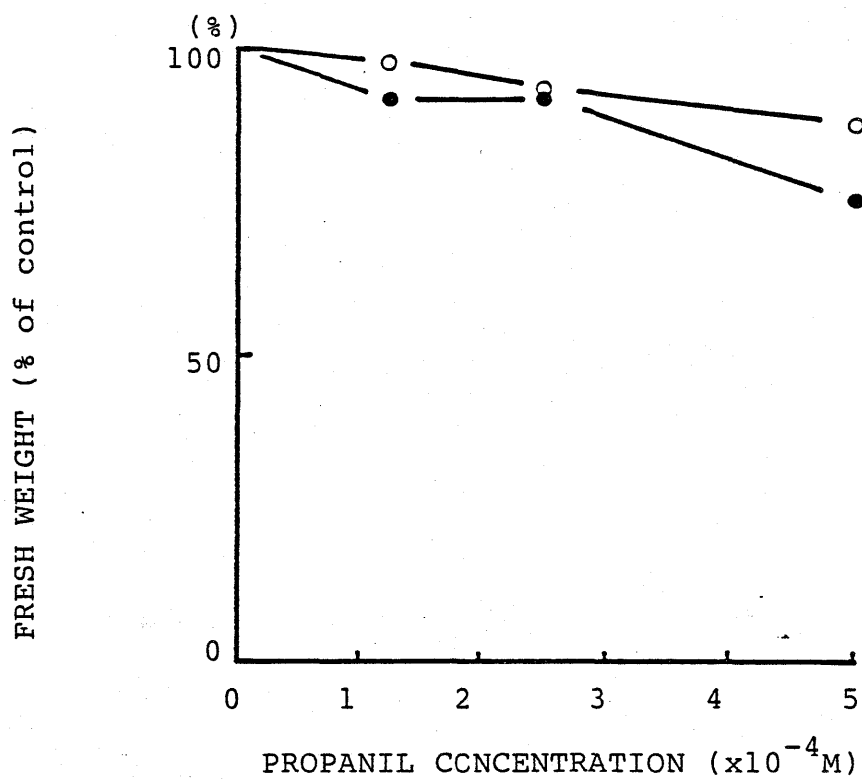


Figure 7. Relative effect of root-applied propanil on growth of both rice and wheat seedlings.

● rice    ○ wheat

## 第2節 Propanil に対する植物の齡及び生育地による感応性の差異

### 1. 目的

Propanil に対し幼植物の時期に感受性であった植物も、その生育に伴い抵抗性を獲得してくる例が知られており、メヒシバもその一例である。しかしこの植物に関しては元来幼植物でも Propanil に対し抵抗性であるとしている例(128)があり、メヒシバの Propanil 感応性に関しては未だ明らかになっていない。一方タイヌビエにおいて、500 ppm (通常施用濃度の1/6)で選別したところ、Propanil に対する感応性に種内変異が存在することが報告されていることから(143)、メヒシバにおいても Propanil 感応性に種内変異が存在する可能性が考えられた。

ここではまず始めに、日本各地からメヒシバの種子を採取し、幼植物時期を用いて、メヒシバの Propanil 感応性の種内変異を検索した。また齡による Propanil 感応性差異をイネ及びタイヌビエと比較しながら検索し、メヒシバの Propanil 抵抗性の一側面を明らかにすることを目的とした。

### 2. 材料と方法

まず始めに生育地を異にするメヒシバの Propanil 抵抗性について検討した。ポットあたり200gの畑地土壌に1gの肥料(N:P:K=14:14:14)を土壌混和し、1973年から1978年にかけて日本の各地から採取したメヒシバの種子を播種した。その後自然光温室内(昼間25℃、夜間20℃)で4葉期まで生育させた。Propanil 濃度にして1000 ppm及び3000 ppmのスタム乳化剤を茎葉散布した後、1週間生育させ障害の程度を観察するとともに、その除草活性を5段階評価法で表した。また処理後3週間目にその回復の有無を調べた。

また水耕法で3葉期または6葉期まで人工気象室内(昼間25℃12時間、夜

間 20℃ 12 時間、相対湿度 60～70%) で生育させたメヒシバに、Propanil 濃度にして 1000 ppm～3000 ppm のスタム乳化剤を茎葉散布した後、10 日間生育させ障害の程度を観察するとともに、茎葉部と根部に分け、新鮮重を測定した。

次に対象植物としてイネ及びタイヌビエを用いて、発育段階別に Propanil に対する感応性を調べた。まず発芽時の植物体への影響を調べた。3 植物の種子を 28℃ 暗所で発芽させた後、 $1 \times 10^{-5}$ ～ $1 \times 10^{-3}$  M の Propanil を含む培養液の入った寒天培地 (寒天 0.4%) に播種した。なお無処理区には、Propanil を含まない培養液の入った寒天培地を用いた。その後人工気象室内 ( 昼間 25℃ 12 時間、夜間 20℃ 12 時間、相対湿度 60～70%) で 1 週間生育させ、葉長及び根長を測定した。次に 2 葉期、4 葉期または 6 葉期まで水耕法によって人工気象室内で生育させた植物の茎葉部を 5000 倍ネオエステリン液で洗浄後、水洗し、 $5 \times 10^{-4}$ ～ $1 \times 10^{-3}$  M の Propanil 水溶液 (アセトン 1% を含む) に 2 時間浸漬処理した。無処理区は Propanil を含まない 1% アセトン水溶液に同様に処理した。処理後処理部を水洗し、10 日間生育させ根部及び茎葉部の新鮮重及び乾物重を測定した。

### 3. 結果

#### 3-1. 生育地の異なるメヒシバに対するスタム乳化剤の茎葉散布処理の影響

4 葉期まで生育させたメヒシバにスタム乳化剤を茎葉散布した後、処理 1 週間後に障害の程度を観察したところ、Propanil 濃度 1000 ppm (モル濃度にして  $4.6 \times 10^{-3}$  M) でも全てのメヒシバでクロロシスが認められ、障害の程度は 5 段階評価法 (Table 2 の脚注参照) で 3～4 であった。3000 ppm ではさらにその程度がひどく、5 段階評価法で 4～5 であり、中には完全に枯死しているものもあった。処理 3 週間後に回復の程度を観察したところ、1000



ppmでは、ほとんどのメヒシバが新葉の展開を見せているが、3000 ppm (モル濃度にして $1.3 \times 10^{-2} M$ )では全てのメヒシバが回復せず、完全に枯死していた (Table 2)。

### 3-2. 発芽時の生育に及ぼす Propanil の影響

3-2~3-4、及び次章からの実験では、メヒシバについては、Sample No. 11 (Table 2 参照)を用いた。発芽時の植物体への影響を調べるため、Propanil を含む培養液の入った寒天培地に催芽種子を播種し、その後1週間生育させ、葉長及び根長を測定したところ、イネ、タイムピエ及びメヒシバの3植物ともクロロシスは見られなかったが、根及び茎葉の伸長が抑えられた。 $1 \times 10^{-6} M$ 及び $1 \times 10^{-5} M$ でイネの茎葉の生育が他に比べて悪いものの、全般的に見て、これら3植物に同程度の生長阻害が認められ、 $1 \times 10^{-3} M$ ではどの植物も根及び茎葉の伸長が全く見られなかった (Figure 8)。なお Propanil濃度 $1 \times 10^{-3} M$ は218 ppm、1 ppmは $4.6 \times 10^{-6} M$ である。

### 3-3. 齢の異なるメヒシバに対するスタム乳化剤の茎葉散布処理の影響

水耕法により3葉期または6葉期まで生育させたメヒシバにスタム乳化剤を茎葉散布したところ、3葉期のメヒシバは、1000 ppmでもほとんど枯死しており、植物体全体の新鮮重の対無処理区比においても、処理後10日目で、 $I_{50}$ は1000 ppm以下であるのに対し、6葉期のメヒシバは、生育抑制やクロロシスが見られるものの、その程度は少なく、 $I_{50}$ は3000 ppm付近であった (Figure 9)。

### 3-4. 齢の異なるイネ、タイムピエ及びメヒシバに対する Propanil 茎葉浸漬処理の影響

次にイネ及びタイムピエを対照植物として、生育時期の異なるメヒシバの Propanil 感応性を調べるため、2葉期、4葉期または6葉期まで水耕法によって生育させた植物の茎葉部を Propanil 水溶液に浸漬処理した。イネはどの生育

時期でも  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  (218 ppm) においてもほとんど影響を受けなかった (Figure 10(A))。それに対し、メヒシバは2葉期及び4葉期で、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  (109 ppm) においてもかなりの障害を受け、ほとんど枯死しており、植物体全体の新鮮重から見た  $I_{50}$  は、処理後10日目で  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  以下であった。しかし6葉期になると、若干の生育抑制やクロロシスが見られるが、 $I_{50}$  は  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  付近であった (Figure 10(C))。また同様にタイヌビエは2葉期及び4葉期には、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  でかなりの障害を受けており、 $I_{50}$  が  $5 \times 10^{-4} \text{ M}$  以下であったが、6葉期になると、障害の程度が少なく、 $I_{50}$  は  $5 \times 10^{-4} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ M}$  付近であった (Figure 10(B))。また部位別で見ると、Propanil による障害の程度は下位葉が最も大きく、次いで上位葉、茎の順で大きかった。

#### 4. 考察

日本各地からメヒシバの種子を採取し、Propanil 感応性の種内変異を検索したが、本研究で調べた範囲内では、メヒシバは生育地の如何に関わらず、Propanil に対し感受性を示すことが明らかとなった。Yamasue らは、500 ppm (慣行量の1/6のPropanil濃度) のスタム乳化剤のみを用いて、タイヌビエにおいてPropanil に対する感応性に種内変異があったとしている。しかし本研究では、メヒシバの中に、元来Propanil に対し抵抗性の種内変異が存在するかを調べることを目的とした。慣行量3000 ppmのスタム乳化剤を散布したところ、その濃度では変異幅は大きなものではなく、全ての植物が枯死した。また1/3の濃度の1000 ppmでも、生育地の違いによる抵抗性に顕著な差は認められず、供試した全てのメヒシバが感受性を示した。次に齡によるPropanil 感応性差異を検索した。発芽時の植物体への影響に関しては、 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$  及び  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  でイネの茎葉の伸長が他に比べて強く抑制されていることについてさらに検討を要するが、全般的に見てイネ、タイヌビエ及びメヒシ

バの3植物ともほぼ同程度の阻害が認められ、幼植物段階で Propanil に対し抵抗性を有しているイネも強い阻害を受けた。Still ら(124)はイネ種子中に茎葉中の  $1/4 \sim 1/10$  の Propanil 加水分解酵素活性が存在するとしており、行本ら(148)は種子中でも茎葉中に匹敵するほどの活性が存在するとしているが、何れも発芽時の植物体への影響は調べておらず、阻害度と Propanil の種子中の挙動との関連を詳細に検討する必要があるだろう。しかしイネは2葉期で、既に Propanil に対し抵抗性を示しているのに対し、メヒシバ、タイヌビエは4葉期まで Propanil に対して感受性を示し、6葉期以上の発育段階で始めて抵抗性を示すことが明らかとなった。また前節での結果と同様に浸漬処理と散布処理との間に明確な相関性が見られることから、浸漬処理の妥当性がここでも示され、以後の分析に用いることにした。

以上のことから、メヒシバは元来、幼植物段階では Propanil に対し感受性を示し、その発育が進むに伴い抵抗性を獲得することが明らかとなった。

Table 2. Effect of foliar-applied propanil on growth of large crabgrass in various habitats.

Sample No.	Origin source for collection (year)	Herbicidal activity**		Rcovery***		Germination
		1000	3000	1000	3000	percentage (10 days) (%)
1	Sapporo, Hokkaido (1977)	3	4	+	-	4
2	Ushiku, Ibaraki-pref. (1977)	3	4	+	-	100
3	Seta, Gunma-pref. (1975)	3	4	+	-	92
4	Gunma AES* (1978)	3	4	+	-	60
5	Gunma AES* (1978)	3	5	+	-	90
6	Shiraoka, Saitama-pref. (1970)	3	4	+	-	90
7	Ageo, Saitama-pref. (1977)	3	5	+	-	99
8	Chiba AES* (1978)	4	5	-	-	54
9	Kamata, Tokyo (1978)	3	5	+	-	90
10	Hino, Tokyo (1978)	3	4	+	-	97
11	Hino, Tokyo (1981)	3	5	+	-	92
12	Yokohama, Kanagawa-pref. (1977)	3	4	+	-	91
13	Hiratsuka, Kanagawa-pref. ( )	3	5	+	-	100
14	Fujieda, Shizuoka-pref. (1977)	3	4	+	-	99
15	Kikukawa, Shizuoka-pref. (1977)	3	4	+	-	61
16	Kikukawa, Shizuoka-pref. (1978)	4	4	+	-	46
17	Niigata AES* (1978)	3	4	+	-	65
18	Toyama AES* ( )	3	4	+	-	85
19	Ishikawa AES* ( )	4	4	+	-	98
20	Gifu AES* ( )	3	4	+	-	80
21	Yasu, Shiga-pref. (1974)	4	5	-	-	14
22	Yasu, Shiga-pref. (1975)	4	5	+	-	38
23	Yasu, Shiga-pref. (1977)	3	4	+	-	42
24	Yasu, Shiga-pref. (1978)	4	4	+	-	81
25	Koga, Shiga-pref. (1976)	4	4	+	-	100
26	Fukuchiyama, Kyoto ( )	4	5	+	-	88
27	Osaka ( )	4	4	+	-	93
28	Takarazuka, Hyogo-pref. (1977)	3	4	+	-	90
29	Shimane AES* ( )	3	4	+	-	86
30	Yamaguchi AES* (1976)	4	4	+	-	93
31	Tokushima AES* (1978)	3	4	+	-	59
32	Kagoshima-pref. (1975)	3	5	+	-	29
33	Okinawa AES* (1978)	3	5	+	-	11

This treatment was conducted in 1982.

\* AES ; Agricultural Experimental Station

\*\* evaluated one week after treatment

the index of herbicidal activity

0 .... no effect

1 .... very slightly injured

2 .... slightly injured

3 .... moderately injured

4 .... severely injured

5 .... completely killed

\*\*\* evaluated three weeks after treatment

+ .... recovered

- .... not recovered

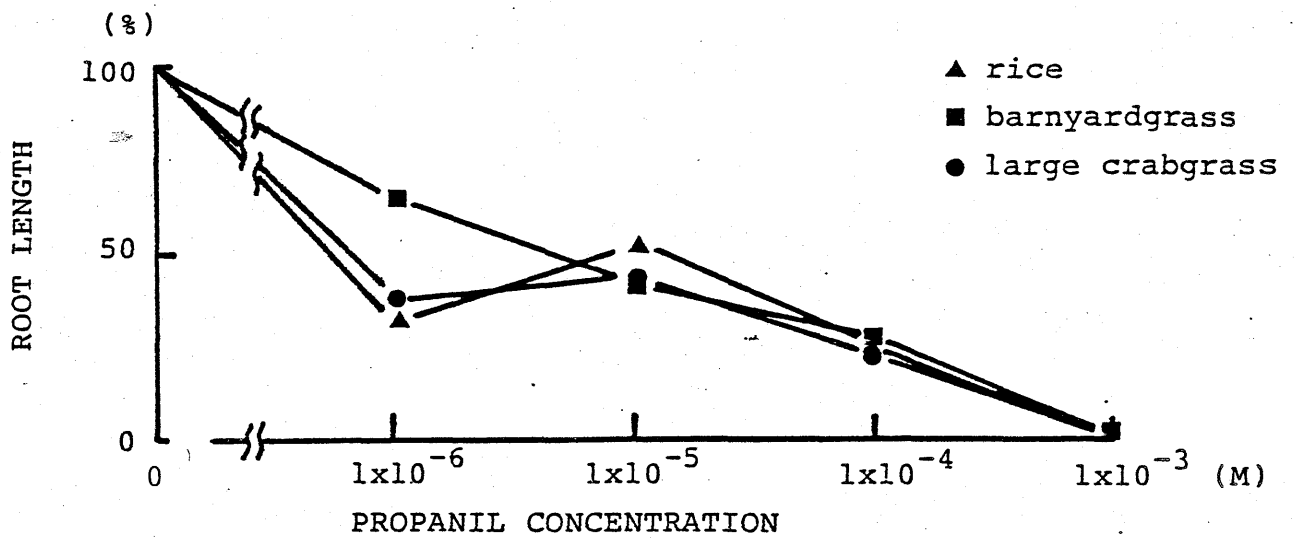
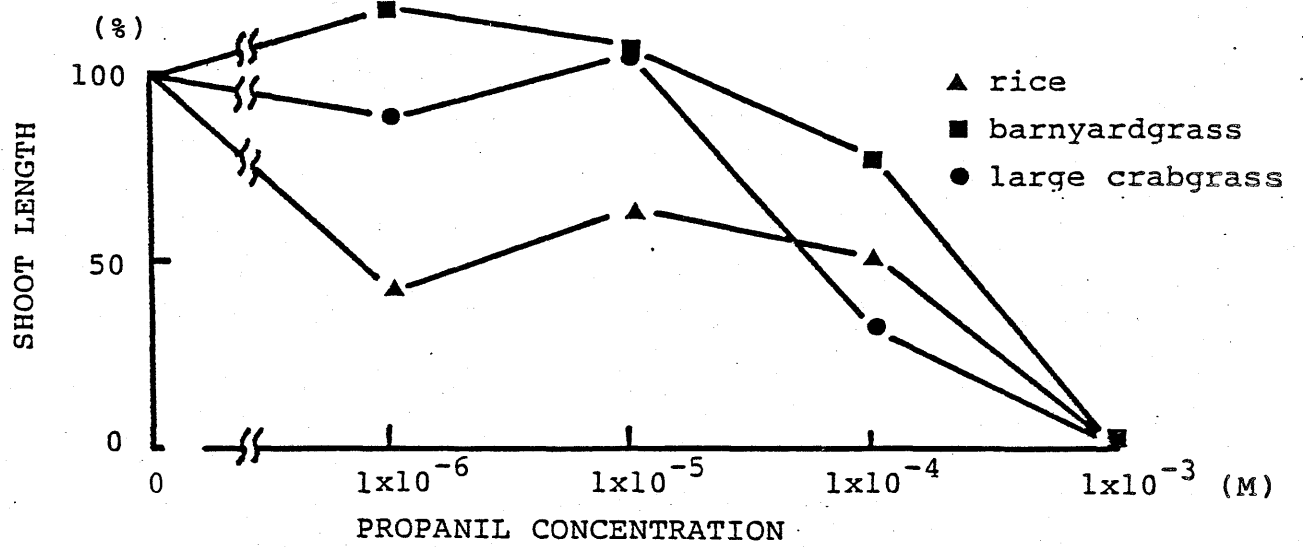


Figure 8. Effect of propanil on growth of three gramineous plants at germination stage.

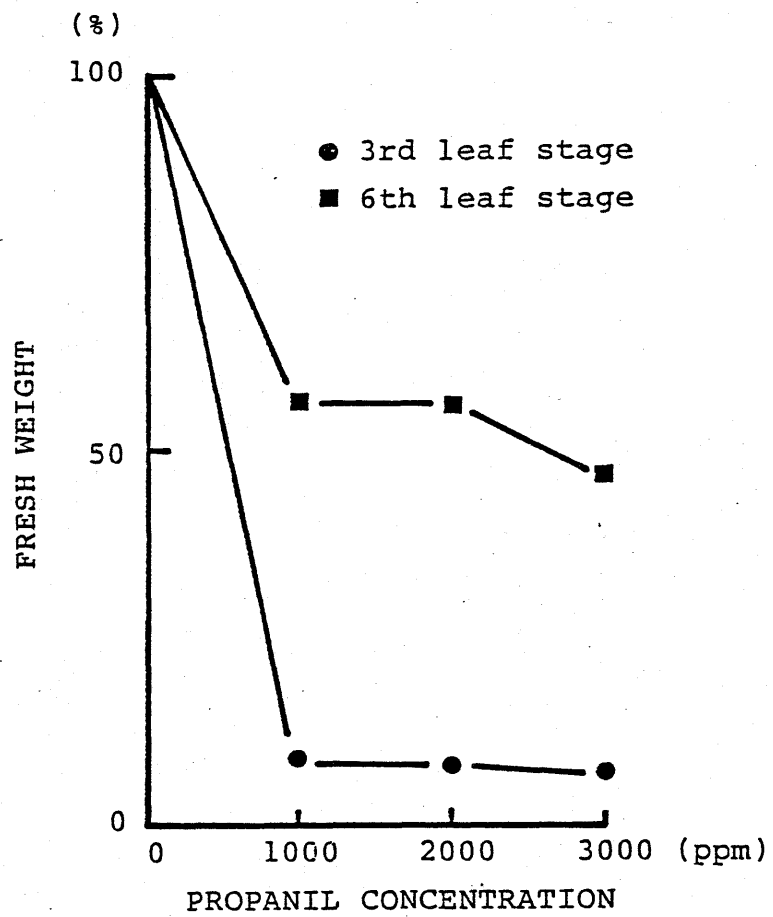


Figure 9. Effect of foliar-applied propanil on growth of large crabgrass at the 3rd and 6th leaf stage.

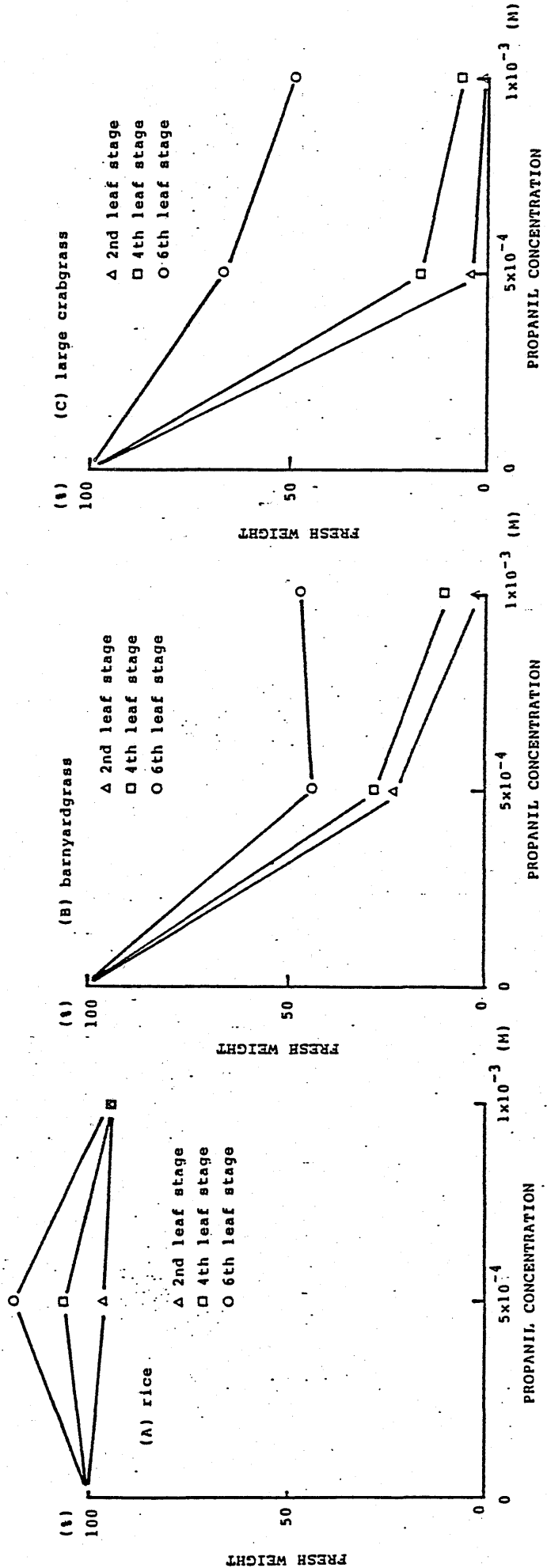


Figure 10. Effect of foliar-applied propanil on growth of three gramineous plants at the 2nd, 4th and 6th leaf stage.

## 摘要

イネ科植物の中で、幼植物段階での Propanil 抵抗性の植物種間差、種内変異及び齢による差異について調べた。

### 第1節 Propanil に対する感応性の植物種間差

(1) 水耕法で4葉期まで育てたイネ、シコクビエ、タイヌビエ及び3葉期まで生育させたイネ及びコムギを用いて、茎葉にスタム乳化剤を散布したところ、イネは、ほとんど障害が認められなかったのに対し、タイヌビエは、ほとんどの濃度区で枯死に至った。またシコクビエは、全ての処理区で新葉が展開してきており、枯死には至らなかった。コムギは全ての処理区で障害が見られたものの、その程度は小さく、枯死しているものはなかった。草種を拡げて、土耕法にて同様の試験を行ったところ、シコクビエは1000 ppmで、無処理区と比べてやや障害がでていた程度であった。オヒシバやメヒシバは、どちらも1000 ppmでも完全に枯死していた。それに対しイネは、3000 ppmでもほとんど障害が認められなかった。

(2) 3~4葉期まで水耕法で育てた植物の茎葉を Propanil に浸漬処理したところ、シコクビエは、 $6.9 \times 10^{-3} M$ で無処理区に比べやや生育が劣り、葉先にクロロシスが見られる程度であったのに対し、タイヌビエは、完全に枯死した。またメヒシバ及びオヒシバは、 $4.6 \times 10^{-3} M$ で枯死に至った。一方イネ・コムギとも、全ての濃度区で障害がほとんど認められなかった。またタイヌビエ、オヒシバ、メヒシバは、 $I_{50}$ が $2.3 \times 10^{-3} \sim 4.6 \times 10^{-3} M$ の間にあるのに対し、イネ、シコクビエ、コムギは、 $6.9 \times 10^{-3} M$ でも $I_{50}$ に達しなかった。

(3) 4葉期まで育てた植物の根部に Propanil を浸漬処理したところ、シコク



ビエは、高濃度区で若干の生育抑制やクロロシスが見られる程度であったのに対し、タイヌビエ、オヒシバ、メヒシバは、強い生育障害を受けていた。またイネ、コムギとも、影響がほとんど見られなかった。またタイヌビエ、オヒシバ、メヒシバは、 $4.6 \times 10^{-4} \text{ M}$ で $I_{50}$ に達しているのに対し、イネ、シコクビエ、コムギは、 $6.9 \times 10^{-3} \text{ M}$ でも $I_{50}$ に達しなかった。

(4) シコクビエ・コムギは根部及び茎葉部浸漬処理においてイネには若干及ばないが、Propanil に対してかなりの抵抗性を示すことが明らかとなった。また慣行量程度のスタム乳化剤の茎葉散布に対しても、他の感受性植物に比べて抵抗性を示すことが明らかとなった。茎葉部浸漬処理は散布処理とほぼ同様の傾向を示し、その処理法の正当性が示された。

(5) 以上のことから、作物であるシコクビエやコムギが Propanil に対し抵抗性を示したことは農業上重要である。またイネ科植物の中ではこれまでイネ以外に Propanil に対し抵抗性を有する植物はほとんど見出されておらず、抵抗性機構研究の上で、特に選択殺草作用を知る上で意味のあるものと考えられる。

## 第2節 Propanil に対する植物の齢及び生育地による感応性の差異

日本各地からメヒシバの種子を採取し、Propanil 感応性の種内変異を検索するとともに、齢による感応性差異を併せて検索することを目的とした。

(1) 4葉期まで生育させた生育地の異なるメヒシバにスタム乳化剤を茎葉散布したところ、 $1000 \text{ ppm}$ 処理では、後に回復はしたが、処理後1週間では、5段階評価法で3~4に当る強い障害を受けた。 $3000 \text{ ppm}$ 処理では障害の程度は4~5であり、その後回復せず、完全に枯死した。

(2) 発芽時の植物体への影響を調べたところ、イネ、タイヌビエ及びメヒシバの3植物ともほぼ同程度、根及び茎葉の伸長が押えられ、 $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ ではどの植物も根及び茎葉の伸長が全く見られなかった。

(3) 水耕法で生育させたメヒシバにスタム乳化剤を茎葉散布したところ、3葉期のメヒシバと6葉期のメヒシバの間で阻害に顕著な差異が見られた。

(4) 水耕法によって生育させた植物の茎葉部を Propanil に浸漬処理したところ、イネはどの生育時期でも  $1 \times 10^{-3}$  M までほとんど影響を受けなかったが、メヒシバ・タイヌビエは、2葉期及び4葉期でもかなりの障害を受け、ほとんど枯死しており、 $I_{50}$  は  $5 \times 10^{-4}$  M 以下であった。しかし6葉期になると、若干の生育抑制やクロロシスが見られるが、 $I_{50}$  は  $1 \times 10^{-3}$  M 付近であった。

(5) 本研究で調べた範囲内では、メヒシバは生育地の如何に関わらず、Propanil に対し感受性を示すことが明らかとなった。発芽時の植物体への影響については、イネ、タイヌビエ及びメヒシバの3植物ともほぼ同程度の阻害が認められ、幼植物段階で Propanil に対し抵抗性を有しているイネも強く阻害を受けた。しかしイネは2葉期ですでに Propanil に対し抵抗性を示しているのに対し、メヒシバ、タイヌビエは、4葉期までの幼植物段階で Propanil に対し感受性を示し、6葉期以上の発育段階で始めて抵抗性を示すことが明らかとなった。

(6) 以上のことから、メヒシバは幼植物段階では Propanil に対し感受性を示し、その発育が進むに伴い抵抗性を獲得することが明らかとなった。

## 第2章 Propanil の植物体内代謝に関する研究

除草剤の植物体内挙動は前述のごとくいくつかの段階に分けられるが、特に作物と雑草の間の生化学的差異により選択殺草作用を発現している例は数多く報告され、主に除草剤の化学形態変化の程度の差に依存したものが多い(17,18,30,40~42,65~69,73,91,92,94,114)。

これら変化はその作用性を基準に考えると、大きく活性化反応と不活性化反応(解毒反応)に分けられる(25,42,118)。Propanil は序論で述べたように、土壌・動植物及び光により様々な変化を受けるが、植物体内でも第1段階としての酸アミド結合の加水分解(2~5,10~13,39,45,53,57,66,70,71,83,87~90,99,111,123,124,137,144~146,148)と第2段階の Glucose または Lignin 等(38,57,144)との抱合反応の2つに分けられる。Propanil 加水分解酵素(Arylacylamidase 正式名; Aryl-acylamido amidohydrolase EC 3.5.1.13)はこの第1段階を司っていると考えられ、広く生物界に分布している(9,14,100)。

1968年 Still (122,123)はイネ体中に Propanil 加水分解物3,4-DCAとその抱合体を見出している。同年 Yih ら(145)はイネ及びタイヌビエを用いて Propanil が一度中間代謝物として3,4-DLAになり、その後3,4-DCAに変化するとしており、このことから、イネ体中に特異的に存在する Propanil 加水分解酵素による解毒が、イネ-ヒエ間の選択性に大きく寄与していることを明らかにしている。その後多くの研究者によって広く高等植物・動物・土壌微生物にその酵素の存在が明らかにされた(1,3~5,10,12,14,24,37,39,41,44,45,52~55,85,100,124,137,145,146,148)。特に Hoagland ら(55)は12科19属の高等植物のうち70%が Propanil を加水分解する能力を有しており、また別に(52)10科38属の作物のうち半数以上が同様に評価されている。また赤塚・大場(10)は約30種の植物を用いて同様の検討を行った結果、約30%の植物が

Propanil を分解するとしている。これらの研究のうちイネ科植物に関しては Hoagland らがオオムギ、オーチャードグラス、ジョンソングラス、ソルガムの茎葉から抽出した粗酵素に、Propanil 加水分解酵素活性を見出している。また赤塚らも同様の種でその活性を見出しているが、それらはイネに比べて極めて弱いものであった(10)。また根における Propanil 加水分解酵素活性はほとんどの高等植物で検出されなかった(55)。一方イネの根のカルスや細胞培養で Propanil 加水分解酵素活性が見出されていることは興味あるところである(111)。このように Propanil 加水分解酵素活性については多くの研究例があるが、この加水分解酵素活性と Propanil の殺草機構との関連について調べた例は限られている。

序論で述べたように、石塚ら(67)は基質特異性の植物種間差による選択性の発現を提唱した。それをきっかけに赤塚ら(3-5)は Propanil 関連化合物を用い、広く高等植物に Arylacylamidase を検索した結果、この酵素に3つのアイソザイムを見出した。Arylacylamidase I は若干の変異はあるもののイネに特異的に含まれており、高い Propanil 加水分解酵素活性を示し、これがイネの Propanil 抵抗性に関与していると報告した。また Arylacylamidase II は高等植物に普遍的に存在しているが、Propanil 加水分解酵素活性はなく、Arylacylamidase III はセロリ、ミツバ等に存在し、Propanil 加水分解酵素活性を有すると報告しており、石塚らの提唱を確実なものとしている。

また Arylacylamidase の特徴としてもう一つ重要なことは、有機リン剤やカーバメート系薬剤による加水分解酵素活性の阻害である。圃場でこれら化合物が Propanil と同時または直前に施用されると、イネに薬害が生じる事実が見出された(11,28,35,75,87-90,137,147)。Frear と Still (39)はイネから抽出した Arylacylamidase を用いて調べたところ、この加水分解酵素活性がこれら化合物によって強く阻害されることを見出し、イネの薬害の原因はこれら化合物による

解毒機構の阻害によって、茎葉中に Propanil が蓄積することにあるとしている(87)。同様に樹園地で使用されるカルバリルとの混合剤 W I D A C は、この原理に基づき、メヒシバに存在する Arylacylamidase の加水分解酵素活性をカルバリルが阻害することを利用して、この植物を防除するために開発されたものとされている(88)。

前章で Propanil に対し、イネ以外に抵抗性を有する植物としてコムギ及びシコクビエを見出したこと、また幼植物段階で感受性のメヒシバも発育が進むに伴い抵抗性を獲得してくることを示した。ここでは Propanil の抵抗性機構として従来提唱されてきている Arylacylamidase による加水分解に着目し、これら植物の抵抗性要因を探ることにした。また特に植物種間差では 1)  $^{14}\text{C}$ -Propanil を用いた植物体内代謝、2) 基質特異性の植物種間差、さらに 3) 他の除草剤の酸アミド結合の加水分解性の差異の 3 点から検討を加え、Arylacylamidase の植物種特異性という観点から比較を行った。

## 第1節 $^{14}\text{C}$ -Propanil 及び関連化合物の合成

### 1. 目的

植物体内代謝を含め、除草剤の挙動を追跡するための手段として、 $^{14}\text{C}$  標識化合物を用いることは、検出感度及び検出方法から見て非常に有効である。そこで Propanil の植物体内挙動に関する研究に先立ち、 $^{14}\text{C}$ -Propanil を合成するとともに、同様の手法を用いて、Arylacylamidase の基質特異性の植物種間差を調べるため、Propanil の種々の同族体を合成した。

Propanil の合成法には大きく分けて2種類ある(43,132)。Propanil (3,4-dichloropropionanilide) は Figure 1 に示すとおり、3,4-DCAとプロピオン酸が酸アミド結合した構造をしているが、1つはそのアニリンにプロピオン酸を縮合させるもので、もう1つはジクロロベンゼンから合成するものである。後者は反応が3段階にわたり、前者に比べて複雑である。一方前者は1段階反応であるが、これも大別すると、混酸無水物法と酸塩化物法に分けられる。両者の根本的な違いは前者が無水プロピオン酸を基質としているのに対して、後者は塩化プロピオニルを基質としているところにある。つまり前者は合成の過程で理論上基質の半分をむだにすることになる。 $^{14}\text{C}$ -Propanil を合成する際、問題となるのは収量と比活性の維持である。その意味で前者は $^{14}\text{C}$ -Propanil の合成には適しない。後者の中でもプロピオン酸から塩化プロピオニルを合成する過程では、 $\text{PCl}_3$ 、 $\text{PCl}_5$ 、 $\text{SOCl}_2$ 、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCl}$ 、 $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COCl})_2$  と様々な方法が用いられる。しかし $\text{SOCl}_2$ 、 $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COCl})_2$ を除く他のものは蒸溜操作を必要とし、微量では難しい。また $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCl}$ 、 $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COCl})_2$ を除く他のものは沸点が塩化プロピオニルに大変近いいため不純物として除くことが難しい(43)。以上の理由から、ここでは酸塩化物法のうち塩素置換の際 $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COCl})_2$ を用いて $^{14}\text{C}$ -Propanil の合成を行った。

また Propanil の同族体の合成も酸塩化物法により行った。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 酸塩化物法による $^{14}\text{C}$ -Propanil の合成

1位の位置に $^{14}\text{C}$ 標識したプロピオン酸ナトリウムを用いて $^{14}\text{C}$ -Propanil を合成した。合成は次の3段階の反応で行った。まず始めに $^{14}\text{C}$ -プロピオン酸ナトリウムに非標識プロピオン酸を、 $^{14}\text{C}$ -プロピオン酸ナトリウムの10倍量加えることによって、 $^{14}\text{C}$ -プロピオン酸ナトリウムのナトリウムイオンと水素を置換し、 $^{14}\text{C}$ -プロピオン酸に変換した。次に $^{14}\text{C}$ -プロピオン酸を塩化フタロイルと反応させ、 $^{14}\text{C}$ -塩化プロピオニルに変換し、最後にトリエチルアミンを触媒にして $^{14}\text{C}$ -塩化プロピオニルと3,4-ジクロロアニリンとを反応させ $^{14}\text{C}$ -Propanil を合成した。この合成は空気中に $^{14}\text{C}$ を含む化合物が飛散する危険性を考え、合成過程のほとんどを真空閉鎖系で行った。また各反応化合物の混合・分離は真空移動法により行った。なお合成法の詳細を Figure 11 に示した。合成及び精製過程において全放射エネルギーを測定し、回収率を調べるとともにシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製後、比活性及び薄層クロマトグラフィーによる放射化学的純度の検定を行った。

### 2-2. Propanil 関連化合物の合成

塩素による各種の1置換、2置換体アニリンと塩化アセチルまたは塩化プロピオニルをトリエチルアミンを触媒として反応させることにより、Propanil の同族体を合成した。また反応は開放系で行い、方法の詳細を Figure 12 に示した。なお純度の検定は薄層クロマトグラフィー及び融点測定により行った。なお3,4-DCPA及び2,5-DCAAを用いて、赤外線吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル及び混融法により、混酸無水物法と酸塩化物法の比較も併せて行った。

### 3. 結果

#### 3-1. $^{14}\text{C}$ -Propanil の合成

酸塩化物法のうち塩素置換の際  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COCl})_2$  を用いて  $^{14}\text{C}$ -Propanil の合成を行った結果、 $^{14}\text{C}$ -Propanil の合成反応の段階で収量がほぼ  $1/4$  に減少しており、精製の段階では、更に 2 割程度減少した。G-M カウンターで調べた結果、 $^{14}\text{C}$  塩化プロピオニルの 3 回目の真空移動が効率よく行われず、容器内に残存していること、また反応直後の薄層クロマトグラフィーで、 $^{14}\text{C}$ -Propanil 以外にかなりの量の  $^{14}\text{C}$  塩化プロピオニルや  $^{14}\text{C}$  プロピオン酸が残存していることが明らかとなった。しかしこの方法によって、液々分配の過程までには、ほぼ完全に単一になることが薄層クロマトグラフィーにより確認された。その後カラムクロマトグラフィーによりさらに精製し、比放射能  $0.918 \text{ mCi/mmole}$ 、放射化学的純度  $>98\%$  の  $^{14}\text{C}$ -Propanil を合成することができた (Table 3)。

#### 3-2. Propanil 関連化合物の合成

塩素による各種置換体アニリンと塩化アセチルまたは塩化プロピオニルから Propanil の同族体を合成したところ、収量に差が見られたものの、全ての酸アニリドの合成に成功し、薄層クロマトグラフィーで単一であることが確認された。なお混酸無水物法と酸塩化物法の比較を行ったところ、赤外線吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル及び混融法を用いて両者により同じ化合物が合成されていることが明らかとなった。

### 4. 考察

ナトリウムイオンを水素と置換する過程で非標識プロピオン酸を添加しているため、比放射能が減少してはいるが、この方法により合成された  $^{14}\text{C}$ -Propanil



は比放射能や放射化学的純度から考えても、Propanil の植物体内挙動の研究に充分使用できるものであった。しかし $^{14}\text{C}$ -Propanil の合成反応の段階で収量が著しく減少しており、 $^{14}\text{C}$ -塩化プロピオニルの真空移動の効率の点や、反応効率が低い点等、標識化合物の合成法としては、さらに検討を要するであろう。なお非標識化合物による確認からもこの合成法の正当性が示され、今後利用するものと考えられた。

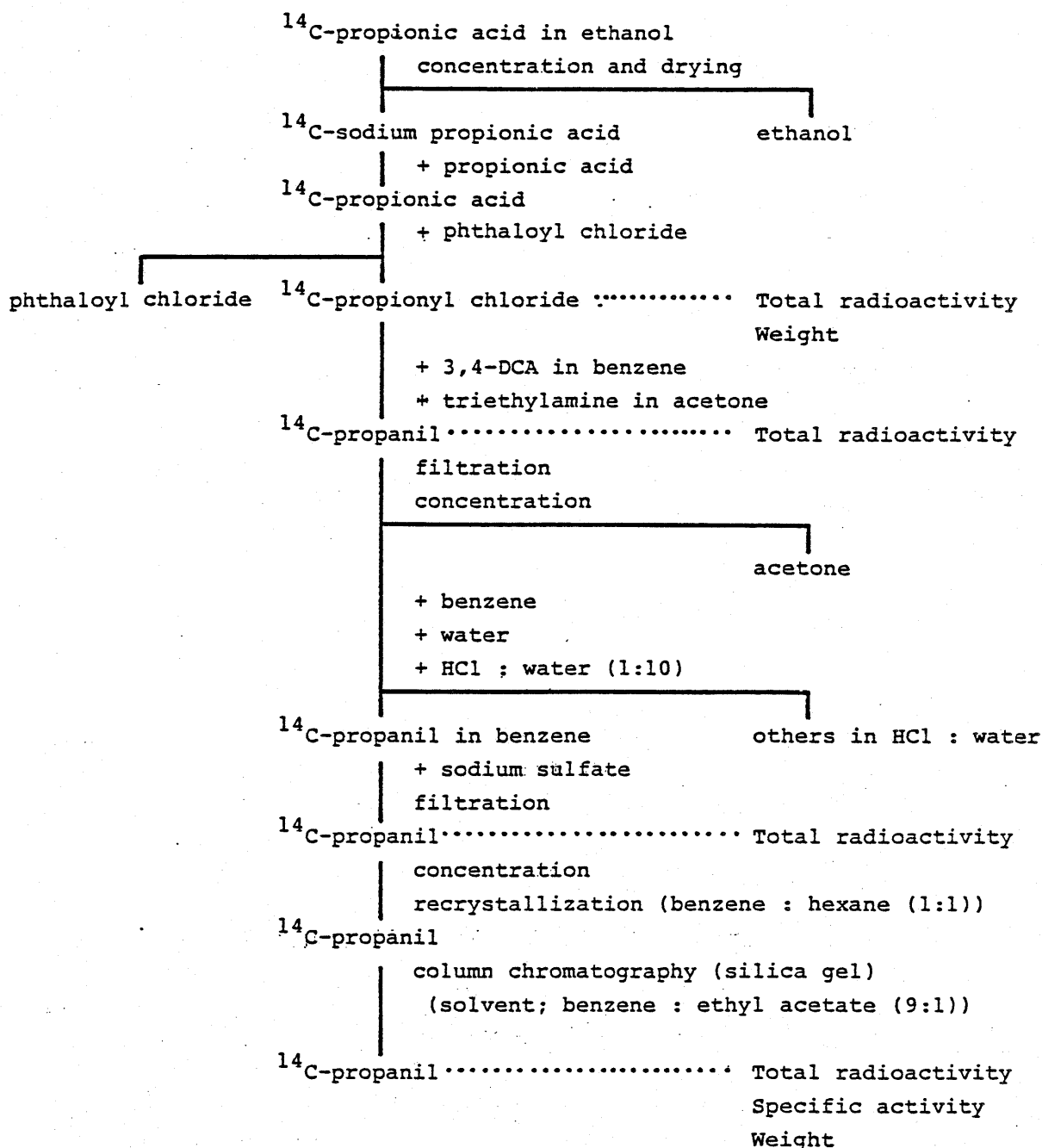


Figure 11. Synthesis of  $^{14}\text{C}$ -propanil.

Substrate

- + benzene
- + triethylamine
- + propionyl chloride  
or acetyl chloride
- + water
- + benzene
- + 3-5% HCl

Product in benzene                      others in HCl aq

- + 3-5% HCl

Product in benzene                      others in HCl aq

- + magnesium sulfate
- + activated charcoal
- filtration
- concentration
- recrystallization  
(benzene : hexane (1:1))
- drying

Product ..... Thin-layer chromatography

Infrared absorption spectroscopy

Nuclear magnetic resonance

Mixed examination

Figure 12. Synthesis of the compounds related to propanil.

Table 3. The result of the synthesis of  $^{14}\text{C}$  -propanil

Compound	Total radioactivity (mCi) (Specific activity (mCi/mmole))	Percentage
Sodium propionic acid	2.00 (2.20)	100.0
Propionic acid	1.50	75.0
Propanil (crude)*	0.574	28.7
Propanil (pure)**	0.485 (0.918)	24.3

\* Propanil after filtraion

\*\* Propanil after column chromatography

## 第2節 Propanil の植物体内代謝

### 1. 目的

本研究で Propanil に対し抵抗性を示したコムギ及びシコクビエの抵抗性の要因が従来イネにおいて提唱されている Arylacylamidase による Propanil の加水分解であるか否かを確かめるために、Propanil に対し抵抗性であり Propanil 加水分解酵素活性を有しているイネ、及び本剤に対して感受性で加水分解酵素活性を有していないと考えられているタイヌビエを比較植物に用いて、前節で合成した $^{14}\text{C}$ -Propanil を用いてその体内代謝について検討した。

### 2. 材料と方法

供試植物として水耕法で4葉期まで生育させたイネ、コムギ、シコクビエ、タイヌビエを用いた(第1章、第1節参照)。 $^{14}\text{C}$ -Propanil (比放射能  $0.918\text{ mCi/mmole}$ , 放射化学的純度  $>98\%$ )  $3.59\ \mu\text{Ci}/300\text{ ml}$ 、モル濃度にして  $1.3 \times 10^{-5}\text{ M}$  の薬液に生育試験と同様の方法によって、各植物の根部または茎葉部をそれぞれ3時間または90分浸漬させた後、24時間生育させ、根部及び茎葉部に分けて $^{14}\text{C}$ -Propanil の代謝を調べた。各部位別に新鮮重を測定した後、細かく切り、重量で10倍量の90%メタノール中でワーリングブレンダーを用いて磨碎・抽出した。メンブランフィルター(東洋ろ紙、Type TM-2P)を用いてろ過し、残渣を再び90%メタノール中で抽出・ろ過した。ろ液を集めて90%メタノール画分とし、エタノールとともに液体シンチレーター(組成はトルエン1ℓに対してDPO 0.1g、POPOP 4.0g)を加え、液体シンチレーションカウンターで全放射エネルギーを測定した。残渣は90℃で1昼夜乾燥させ、乾物重を測定するとともに試料自動燃焼装置(AlocaASC-113)で燃焼し、 $^{14}\text{CO}_2$ にして吸収剤 Oxi-sorb  $\text{CO}_2$  (NEN製)に吸収させ、液体シンチレーター Oxi-prep-2 (NEN製)を加えて、液体シン

チレーションカウンターで放射エネルギーを測定した。

次に供試植物にコムギを加えて、 $87.6 \mu\text{Ci} / 20$ 、モル濃度にして  $4.8 \times 10^{-5} \text{M}$  の薬液に、生育試験と同様の方法で各植物の根部または茎葉部をそれぞれ2時間ずつ浸漬処理し、処理後4時間及び24時間生育させ、根部及び茎葉部に分けて磨碎・抽出した。その後90%メタノール画分及び未抽出残渣の放射エネルギーを測定した。また90%メタノール画分はロータリーエバポレーターで濃縮・乾固した後、少量のメタノールに溶解し薄層クロマトグラフィーによって分離した〔薄層プレート；シリカゲルアルミプレート Art 5554 メルク社製、展開溶媒；クロロホルム：メタノール：ピリジン = 100 : 5 : 1 (124)、及びベンゼン：アセトン = 85 : 15 (145)]。薄層プレートはオートラジオグラフィーをとるとともに、薄層をかきとりメタノールで1昼夜振とう・抽出し、液体シンチレーションカウンターで放射エネルギーを測定した。

### 3. 結果

4葉期まで生育させたイネ、シコクビエ及びタイヌビエを用い、 $^{14}\text{C}$ -Propanil を用いて根部及び茎葉部浸漬処理における体内代謝を検討したところ、シコクビエやタイヌビエに比べて、イネでは未抽出残渣に多くの $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーが見出された。90%メタノール画分をさらに薄層クロマトグラフィーにより分析すると、イネだけは親化合物である Propanil の部分に放射エネルギーが検出されなかった (Table 4)。

供試植物にコムギを加えて、その体内代謝をさらに詳しく検討し、90%メタノール画分の薄層クロマトグラフィーを細かく分析したところ、供試した植物全てにおいて茎葉部浸漬処理では $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーの大部分が茎葉にとどまり、根にはほとんど移行しなかった。茎葉中の $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーをさらに詳しく調べると、 $^{14}\text{C}$ -Propanil の代謝能はイネで最も速く、4時間でもその70%以上が、2

4時間では90%以上が代謝され、 $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーの大部分が未抽出残渣及び薄層クロマトグラフィー展開後の原点部分（以後 origin という）に見出された。コムギでも24時間以内に $^{14}\text{C}$ -Propanil のほぼ50%が代謝された。それに対しシコクビエやタイヌビエでは吸収された $^{14}\text{C}$ -Propanil のうち90%以上が親化合物のまま残存しており、ほとんど代謝されなかった (Figure 13)。しかしタイヌビエにおいて 24時間で、わずかながら、未知の化合物が検出された (Figure 14)。

一方根部浸漬処理における体内代謝を調べると、イネやコムギでは24時間でも全放射エネルギーの半分が根に残存しているのに対し、シコクビエやタイヌビエでは大部分が茎葉へ移行していた。茎葉中の $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーをさらに詳しく調べると、 $^{14}\text{C}$ -Propanil の代謝能はイネで最も速く、4時間でもその90%近くが、24時間ではそのほとんどが代謝され、大部分が未抽出残渣及び origin に見出された。コムギでも24時間以内に $^{14}\text{C}$ -Propanil のほぼ50%が代謝された。それに対し、シコクビエやタイヌビエでは24時間でも、移行した $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーのうち大部分が親化合物のまま残存しており、ほとんど代謝されなかった。根における代謝はイネで茎葉中に比べて若干遅く、コムギではほぼ茎葉中と同程度であった。シコクビエやタイヌビエでも若干代謝が確認されたが、全体的に少なかった (Figure 15,16,17)。

#### 4. 考察

これまでイネの Propanil 加水分解反応について、酵素の側だけから論議されており、植物体内の Propanil の化学形態変化から検討した研究は、わずかに Yihらの例があるにすぎない。本研究では $^{14}\text{C}$ -Propanil を合成し、Propanil の植物体内代謝の面から検討した。根部及び茎葉部両浸漬処理において、茎葉部における $^{14}\text{C}$ -Propanil の代謝能はイネで最も大きく、コムギでもかなりの部

分が代謝された。それに対し、シコクビエやタイヌビエでは根部処理の根部内で若干代謝物が確認されたものの、24時間経過した後でも、吸収された $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーのうち大部分が親化合物のまま残存しており、ほとんど代謝されなかった。なおこれまでイネの根には Propanil 加水分解酵素活性が見出されなかったと報告されているが(67)、本研究では根にも未抽出残渣及び origin に $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーが見出された。Propanil の主要な作用点は光合成であると考えられるため、Propanil 抵抗性との関わり合いは少ないと思われるが、さらに根における代謝を検討することが必要であろう。一方コムギではこれまで Propanil 加水分解酵素活性がその茎葉中に検出されないとしている例(56)と、Propanil は加水分解されるとしている例(34)があり、この研究では後者を支持する結果を得た。

以上のことから、さきの生育試験と合せて考えると、根部及び茎葉部両浸漬処理において、イネ及びコムギは、Propanil を代謝することによって Propanil に抵抗性を示していること、またタイヌビエは Propanil に対し感受性を示し、Propanil はほとんど代謝しないことが明らかとなった。タイヌビエでわずかに検出された未知の化合物が、Yih らによって多量検出された 3, 4-DLA であるかは、今後検討することが必要であろう。それに対し、シコクビエでは Propanil に抵抗性を示すのにもかかわらず、Propanil はほとんど代謝されなかった。つまりシコクビエは Propanil を加水分解することで Propanil に抵抗性を示しているのではないことが明らかとなり、代謝以外の要因で Propanil に抵抗性を示していることが推察された。

またコムギにおいては、Propanil の代謝による消失が抵抗性の要因であることが明らかとなった。



Table 4. Metabolism of root- and foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -propanil in roots and shoots of gramineous plants over a 24 hour periods

	Rice				Barnyardgrass				Finger millet				
	Shoot*		Root*		Shoot*		Root*		Shoot*		Root*		
	S**	R**	S**	R**	S**	R**	S**	R**	S**	R**	S**	R**	
90% Methanol													
insoluble	29.4	19.6	27.4	53.9	3.9	2.6	11.1	23.3	4.2	1.1	5.2	7.4	
soluble	70.6	80.4	72.6	46.1	96.1	97.4	88.9	76.7	95.8	98.9	94.8	92.6	

\*  $^{14}\text{C}$ -Propanil fed part in each plant

\*\* Plant part analyzed for radioactivity after feeding experiments

S and R represent shoot and root respectively.

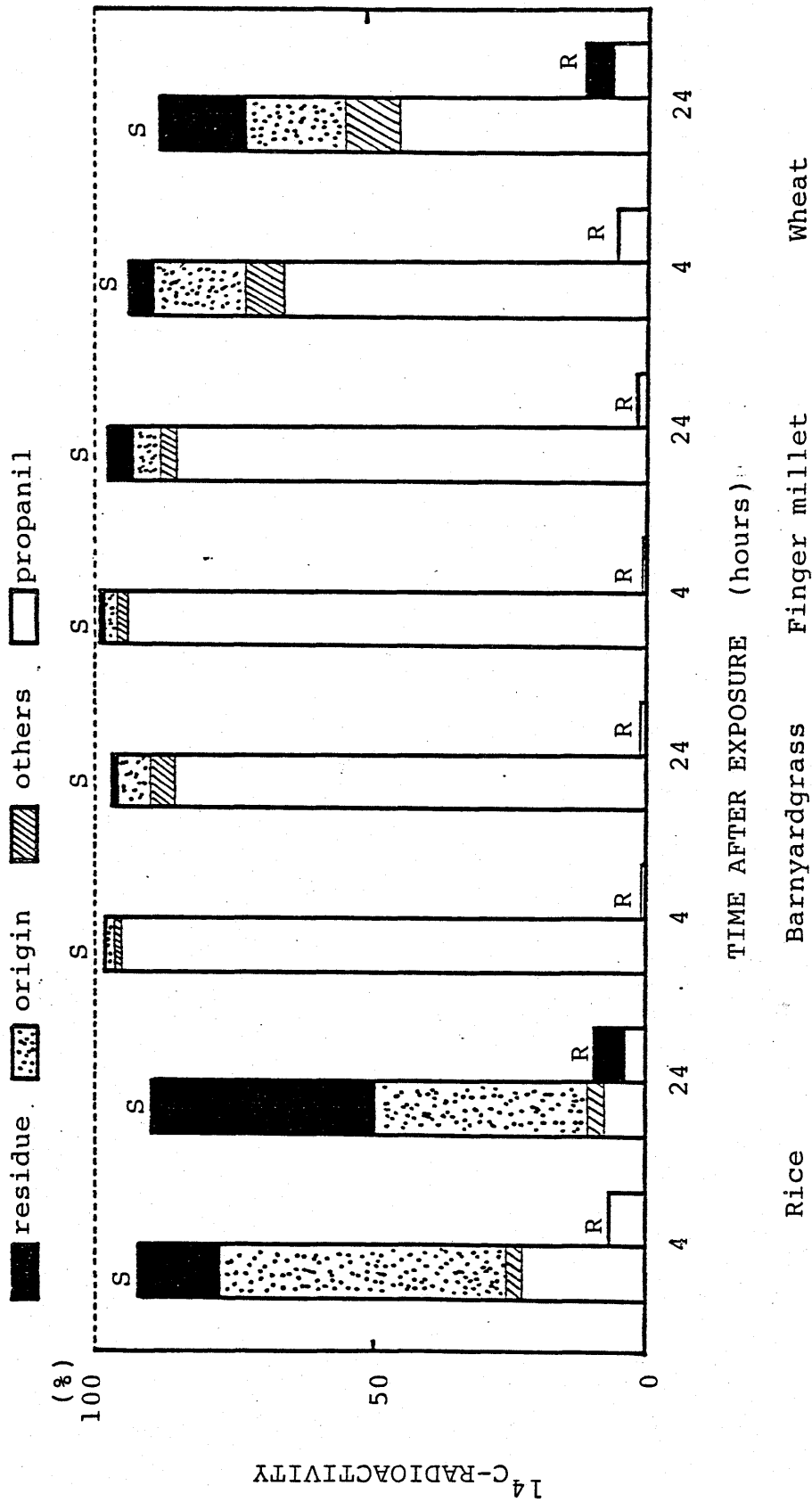


Figure 13. Metabolic changes of foliar-applied <sup>14</sup>C-propanil in roots and shoots of gramineous plants

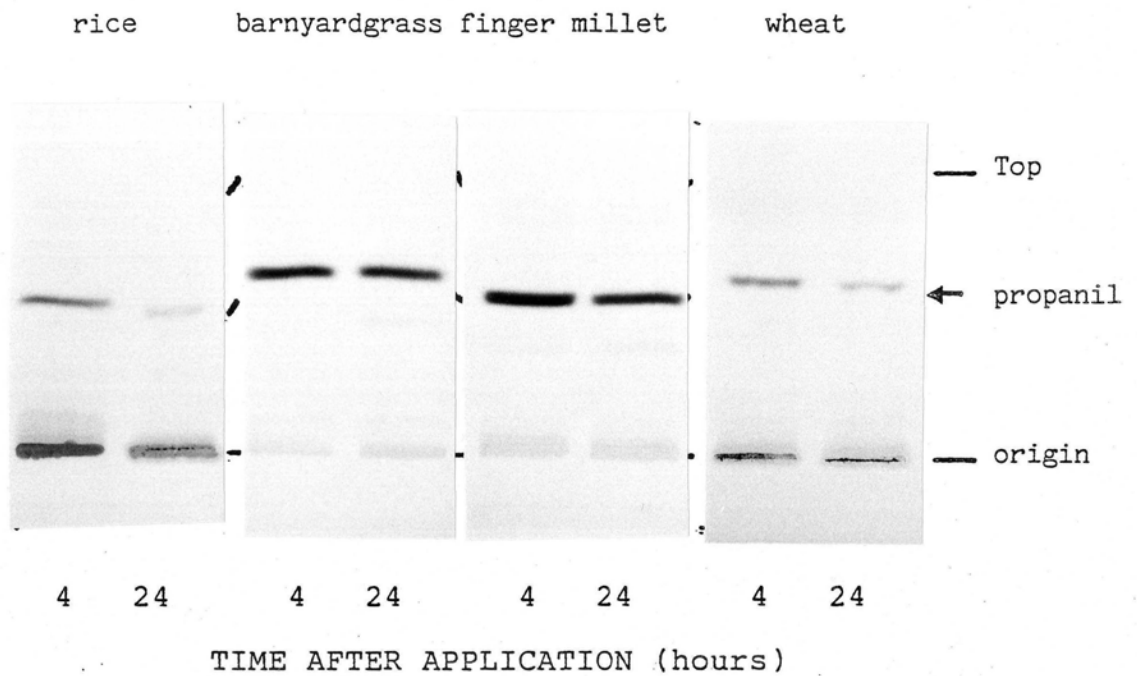


Figure 14. Autoradiograph of thin-layer chromatogram of methanol soluble metabolites of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -propanil in shoots of gramineous plants.

Thin-layer plates were developed with chloroform : methanol : pyridine (100:5:1).

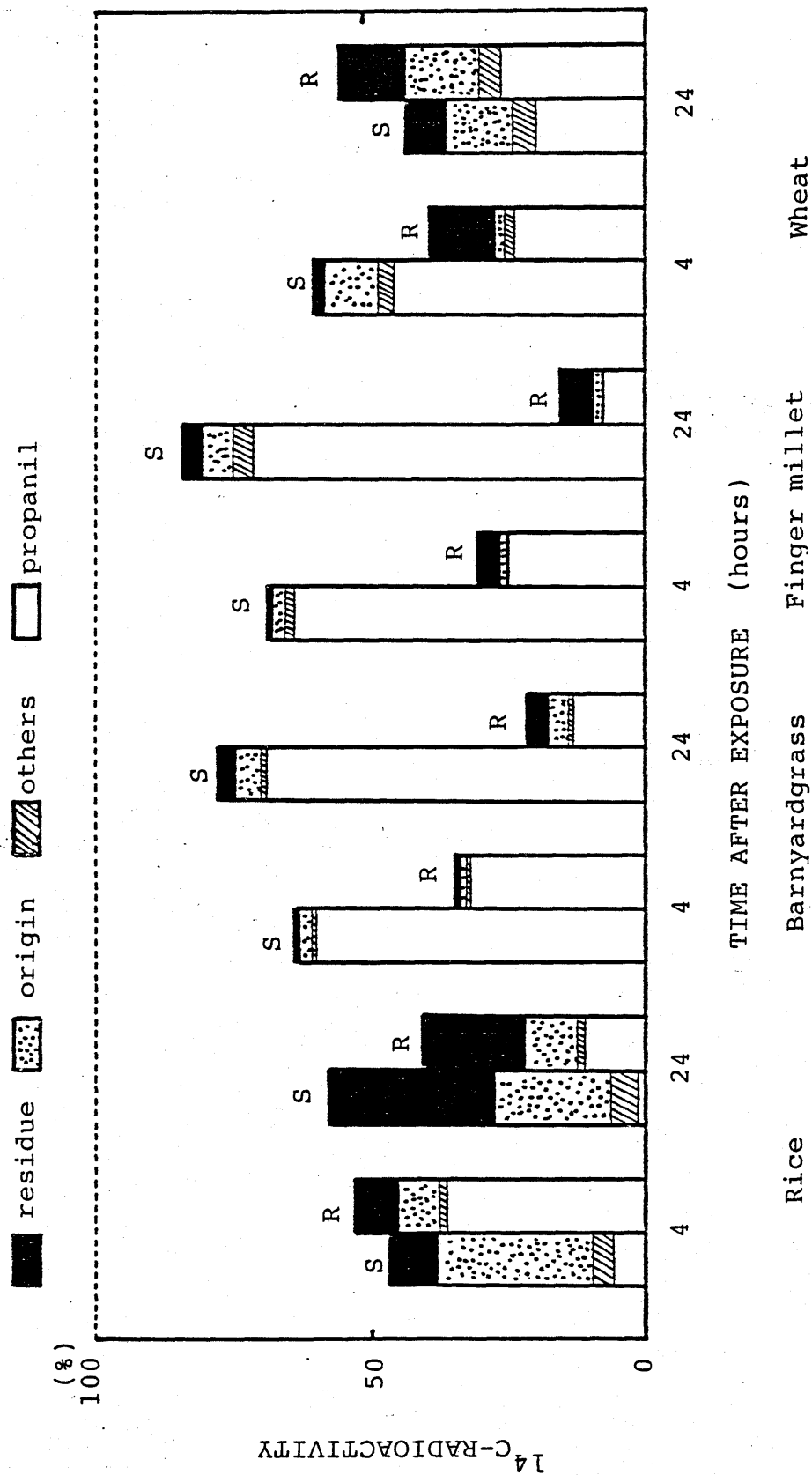


Figure 15. Metabolic change of root-applied <sup>14</sup>C-propanil in roots and shoots of gramineous plants

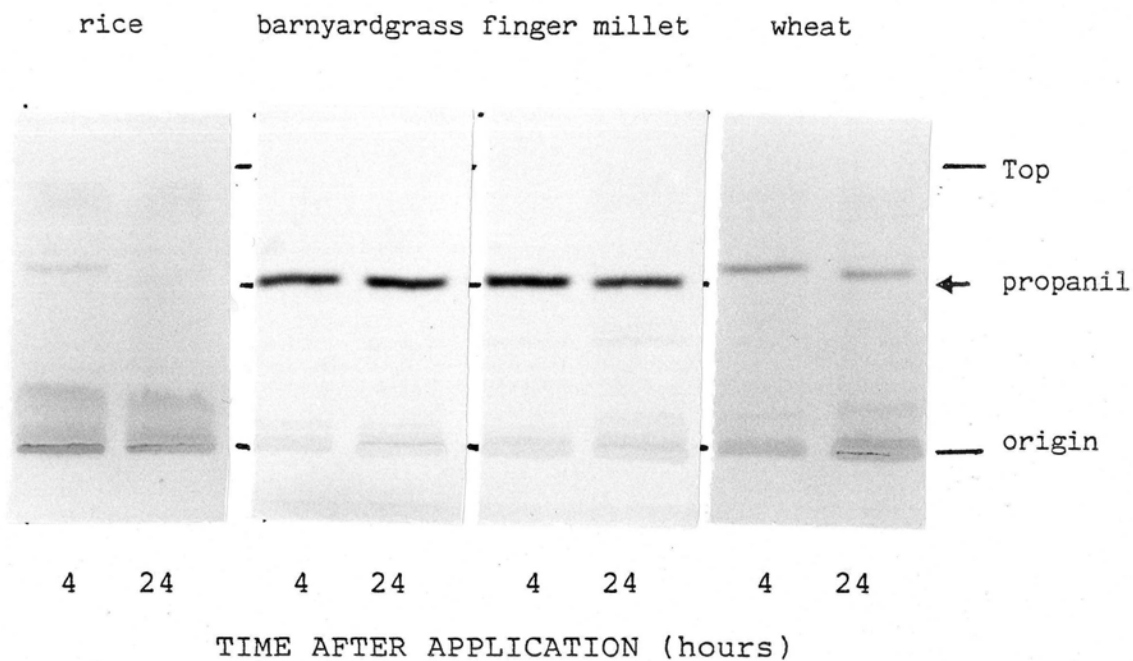


Figure 16. Autoradiograph of thin-layer chromatogram of methanol soluble metabolites of root-applied  $^{14}\text{C}$ -propanil in shoots of gramineous plants.

Thin-layer plates were developed with chloroform : methanol : pyridine (100:5:1).

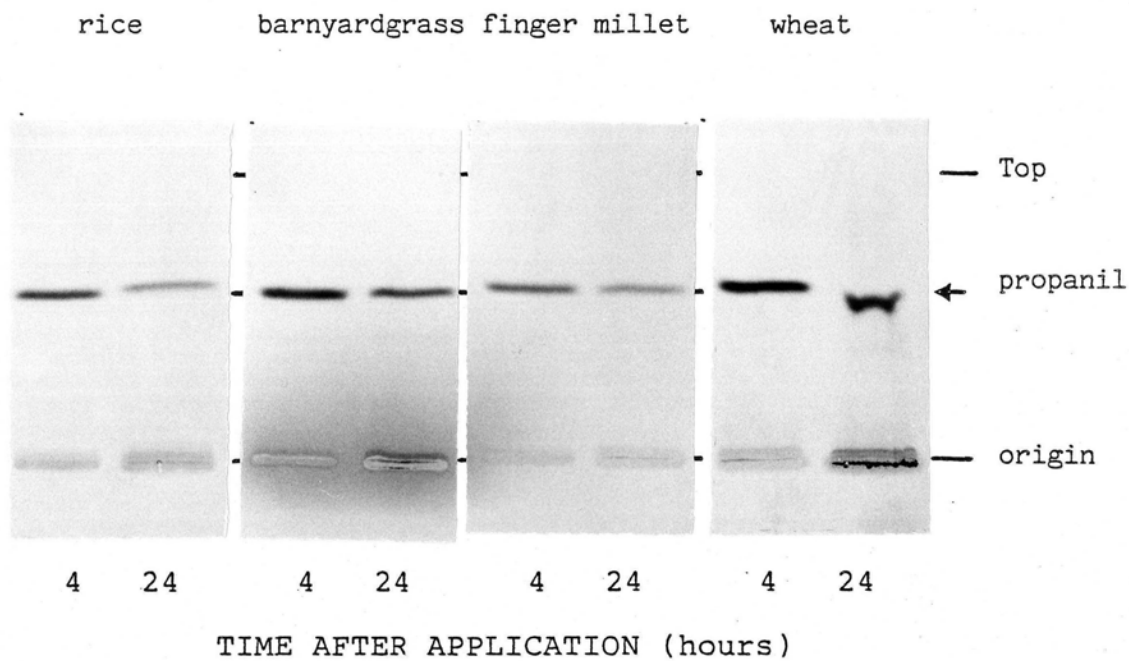


Figure 17. Autoradiograph of thin-layer chromatogram of methanol soluble metabolites of root-applied  $^{14}\text{C}$ -propanil in roots of gramineous plants.

Thin-layer plates were developed with chloroform : methanol : pyridine (100:5:1).

### 第3節 Propanil 加水分解酵素活性

前節において、イネ・コムギは代謝による Propanil の消失が要因で抵抗性を示しているが、シコクビエではその要因として代謝過程を想定することができないことが明らかとなった。ここでは Propanil の植物体内代謝のうち解毒に関与している酸アミド結合の加水分解反応に着目し、植物体から抽出した Arylacylamidase の粗酵素を用いて、前節の結果をさらに確かめるとともに、メヒシバが発育に伴い Propanil 抵抗性を獲得する要因を探ることを目的とした。

#### 第1項 Propanil 加水分解酵素活性の植物種間差

##### 1. 目的

現在まで知られている Arylacylamidase I、II 及び III を全て含む画分をとり (Figure 18)、その粗酵素を用いて残存 Propanil 及び生成 3,4-DCA を併せて検出し、Propanil 加水分解酵素活性を調べた。

##### 2. 材料と方法

供試植物として水耕法で4葉期まで生育させたイネ、コムギ、シコクビエ、タイヌビエ、メヒシバを用いた(第1章、第1節参照)。

##### 2-1. 粗酵素液の抽出

各植物の茎葉を蒸留水で洗浄後細かく切り、生体重の2倍量の  $6.7 \times 10^{-2}$  Mリン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.01M EDTA, 0.05M 2-メルカプトエタノールを含む) を加えながら石英砂とともに乳鉢中で充分磨砕し、4層ガーゼでろ過した。ろ液を  $1000 \times g$  で10分間遠心分離し沈殿物を除去した。その上澄液をさらに  $10000 \times g$  で15分間遠心分離を行い、上澄液を粗酵素

液A (Arylacylamidase I、II及びIIIを含む)とした。次にその上澄液を  $20000 \times g$  で120分間遠心分離を行い、上澄液を粗酵素液B (Arylacylamidase II及びIIIを含む)とした。またその沈殿をリン酸緩衝液に懸濁し、それを粗酵素液C (Arylacylamidase Iを含む)とした (Figure 18)(3-5)。

なおタンパク質はローリー法によって定量した(84)。

## 2-2. 粗酵素液による基質分解反応

### 2-2-1. 残存 Propanil の定量

$25 \mu g / ml$  の基質を含むリン酸緩衝液  $7 ml$  に粗酵素液Aを  $5 ml$  加えて反応を開始した。反応は  $40^\circ C$  で3時間行い、 $50\%$  TCAを  $2 ml$  加えて反応を停止した。残存 Propanil の定量は後藤・佐藤の微量分析法によった(47)。

### 2-2-2. 生成アニリンの定量

基質を含むリン酸緩衝液  $2 ml$  に粗酵素液A  $0.5 ml$  を加えて反応を開始した。反応は  $37^\circ C$  で行い、経時的にサンプリングした。反応生成物としてのアニリンの定量はナフチルエチレンジアミン比色法 (NED法) (3,107,114)及びパラジメチルアミノシンナムアルデヒド比色法 (p-DACA法) (3,82)によった。なお反応の停止は前者は  $25\%$  TCAを、後者は  $0.2 N HCl$ 、 $0.5 ml$  を加えて行った。

## 3. 結果

### 3-1. 残存 Propanil 量の変化から見た Propanil 加水分解酵素活性

4葉期まで生育させたイネ、シコクビエ、タイヌビエ及びメヒシバを用いて、粗酵素液反応液中において残存する Propanil 量の変化から Propanil 加水分解酵素活性を算出した。またその時TCAによって失活させた酵素液に Propanil を添加し、対照区とした。イネではかなりの量の Propanil が消失しているのに対し、シコクビエ、タイヌビエ及びメヒシバでは添加した Propanil のうち、ほ



とんどがそのままの形で残存していた (Table 5)(70)。

### 3-2. 生成アニリンの変化から見た Propanil 加水分解酵素活性

反応液から経時的にサンプリングし、反応生成物としてのアニリンの定量を NED 法により行ったところ、イネでは短時間に速やかに加水分解物である 3, 4-DCA の生成が見られたのに対し、シコクビエ及びタイヌビエでは添加した Propanil のうち、アニリンとして検出されたのは皆無であった。p-DACA 法を用いて検出してもほとんど同じ値が得られた (Figure 19)(70)。

同様にコムギを用いて、アニリンの定量を p-DACA 法により行ったところ、コムギにおいてもイネ同様 3, 4-DCA の生成が認められた。しかしその活性は弱く、イネの 1/7 程度であった (Figure 20)。

## 4. 考察

残存 Propanil 量の変化及び生成アニリンの変化の両面から Propanil 加水分解酵素活性を見たところ、イネ及びコムギにおいては Propanil が加水分解されることが明らかとなった。またその加水分解酵素活性はイネで大きくコムギで著しく少なく、他のイネ科植物シコクビエ、タイヌビエ及びメヒシバでほとんど検出されなかったことは前節の結果をさらに裏付けることとなった。前節で述べたとおり、コムギの Propanil 加水分解酵素活性の有無には、賛否両論があるが (34,56)、本研究では<sup>14</sup>C-Propanil の植物体内代謝及び Propanil 加水分解酵素活性の両面から確かめていることから、本研究で用いたコムギ (品種名 ウシオコムギ) が Propanil 加水分解能を有することは確実である。Eberlein と Behrens (34) は、品種は異なるが、コムギ (品種名 Ela) が Propanil に対し抵抗性を有するのはその加水分解能を有するためとしている。また代謝産物として、アニリンの抱合体は多く見出されるが、3, 4-DCA はほとんど検出されなかったと報告している。従って本研究で、アニリンの生成から見たコムギの加

水分解酵素活性が少なかったこと、Hoagland ら(56)が、コムギから抽出した粗酵素に Propanil 加水分解能を見出さなかった理由として 3, 4-DCA の抱合反応が Propanil 加水分解反応よりも速やかに進行することが考えられた。その他にコムギに Propanil 加水分解能に関する種内変異が存在する可能性もあり、今後さらに検討を要することと思われた。

前節の結果と合せて考えると、コムギにおける水解活性が著しく低いものの、イネ及びコムギは、Propanil を加水分解することによって抵抗性を示していることがさらに確かめられた。またシコクビエは Propanil 加水分解能を有しておらず、ほかの機構により抵抗性を示していることが推察された。一方、加水分解酵素活性の基質特異性の植物種間差という観点から考えると、シコクビエの持つ Aryl-acylamidase の特性を知ることは、除草剤と植物との相互作用を総合的にとらえる意味で重要であると思われた。

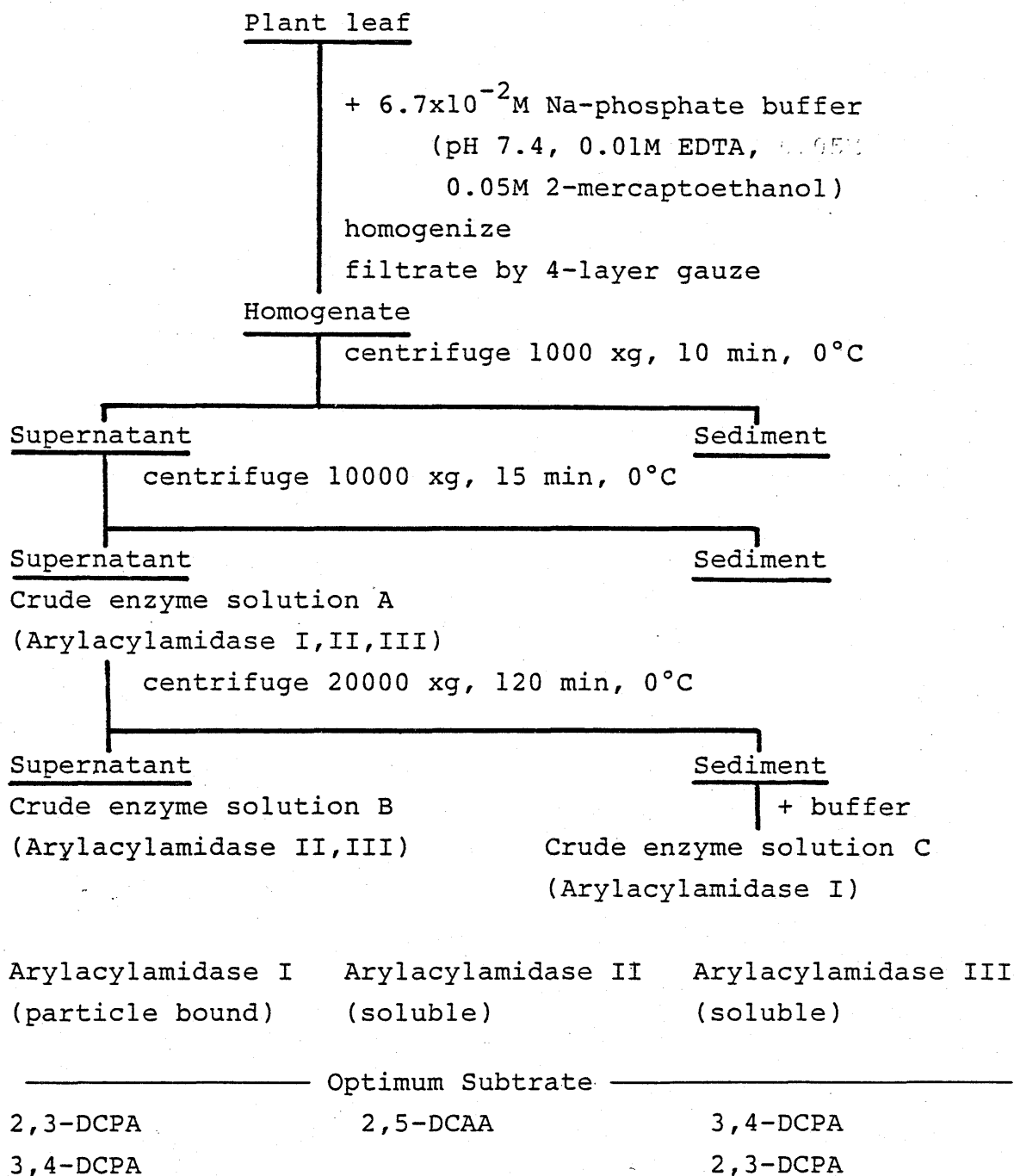


Figure 18. Method of preparation of arylacylamidase and their characteristics.

Table 5. Activity of arylacylamidase in gramineous plant species

Plant species	Rate of degradation ( $\mu$ g/ml/hrs) (A)	Protein content (mg/ml) (B)	Specific activity ( $\mu$ g/mg protein/hrs) (A)/(B)
Rice	1.45	0.304	4.76
Barnyardgrass	none	0.147	-
Finger millet	none	0.133	-
Large crabgrass	none	0.083	-

substrate; propanil

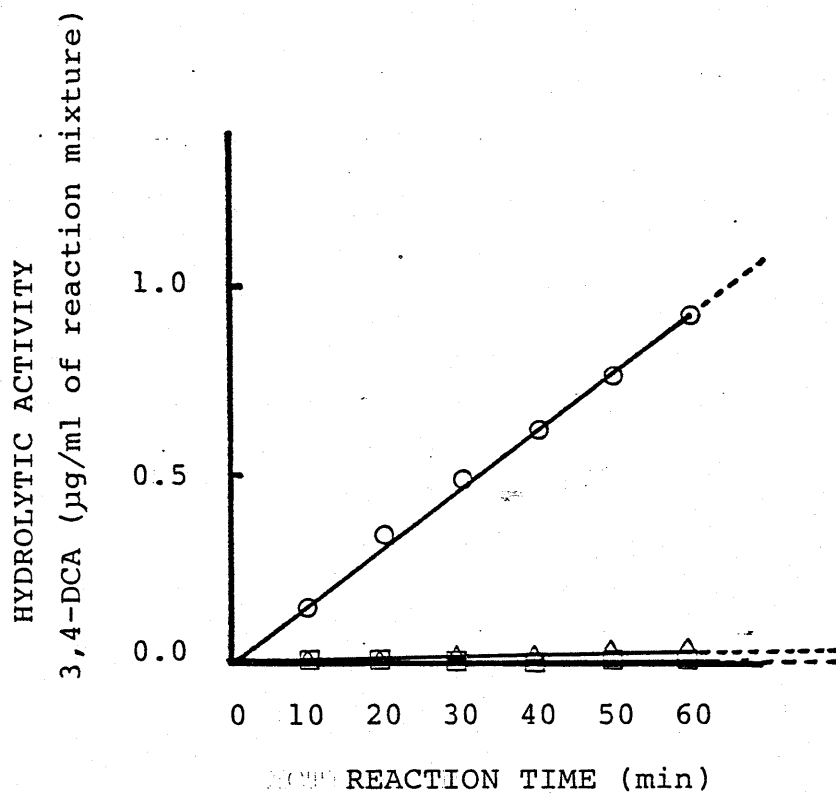


Figure 19. Arylacylamidase I activity in leaves of rice, barnyardgrass and finger millet seedlings.

(substrate; propanil)

○ rice    □ barnyardgrass    Δ finger millet

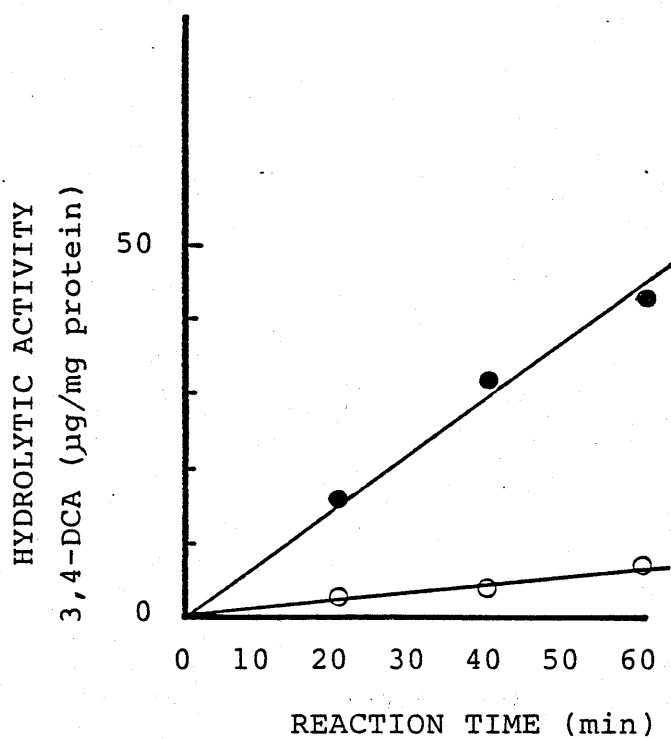


Figure 20. Arylacylamidase I activity in leaves of both rice and wheat seedlings. (substrate; propanil)

● rice ○ wheat

## 第2項 Propanil 加水分解酵素活性の基質特異性の植物種間差

### 1. 目的

前項で Propanil 加水分解酵素活性を示さなかったシコクビエ、タイヌビエの Arylacylamidase 活性を正確に把握するため、赤塚らの提唱している Aryl-acylamidase I 及び II (3-5) に注目し、その基質特異性の植物種間差について調べた。

### 2. 材料と方法

供試植物として水耕法で4葉期まで生育させたイネ、シコクビエ、タイヌビエを用いた。各植物の茎葉から前項の方法に従い粗酵素液A、粗酵素液B及び粗酵素液Cを調製した。反応は37℃で行い、所定時間反応させた後、NED法及びp-DACA法で比色定量した。また Arylacylamidase I の基質として Propanil 2, 3-DCPA 及び PA を、Arylacylamidase II の基質として 2, 5-DCAA, 3-CAA 及び AA を用いた (3-5, 67)。

### 3. 結果

前項で用いた粗酵素液Aにより、Arylacylamidase II の最適基質とされている 2, 5-DCAA を用いて、その加水分解酵素活性を NED 法により調べたところ、イネで最も高く、シコクビエやタイヌビエではわずかに検出されたにすぎなかった (Figure 21)。また p-DACA 法でも同様の値を示した。しかし粗酵素液Bを用いて、更に基質として 3-CAA 及び AA を加えて、長時間の反応で見ると、若干シコクビエで活性が低いものの、3植物とも 2, 5-DCAA を加水分解しており、次いで 3-CAA, AA の順で分解した (Figure 22)。また粗酵素液Cを用いた結果では、イネのみが各基質を加水分解しており、Propanil、2, 3-DCPA、PA ともほぼ同程度に分解していた。なお粗酵素液B及び粗

酵素液Cに関してはp-DACA法だけを用いて、生成アニリン量を測定した(70)。

#### 4. 考察

シコクビエにもタイヌビエ同様 Arylacylamidase II 活性を有していることから、赤塚らが Arylacylamidase II が植物一般に存在しているという仮説を支持する結果となった。しかし供試した植物の中ではその Arylacylamidase II 活性は Arylacylamidase I 活性に比べて低い、1/100程度のものであり、Propanil 抵抗性に関与しているものとは考えられなかった。このことからシコクビエの有する Arylacylamidase についてさらに広く検討し、除草剤の代謝に関わる加水分解酵素活性の基質特異性の植物種間差を調べることによって、Propanil 抵抗性機構と Arylacylamidase との関連を明らかにする必要がでてきた。なお Arylacylamidase I および II の基質特異性に関する結果は研究者により若干の差異があり(2,4,5,12,39,53,67,137,146,147)、本研究の結果も多少ほかの研究と矛盾するところがあるが、このことは別に酵素化学的アプローチを詳細に行っていく必要がある。



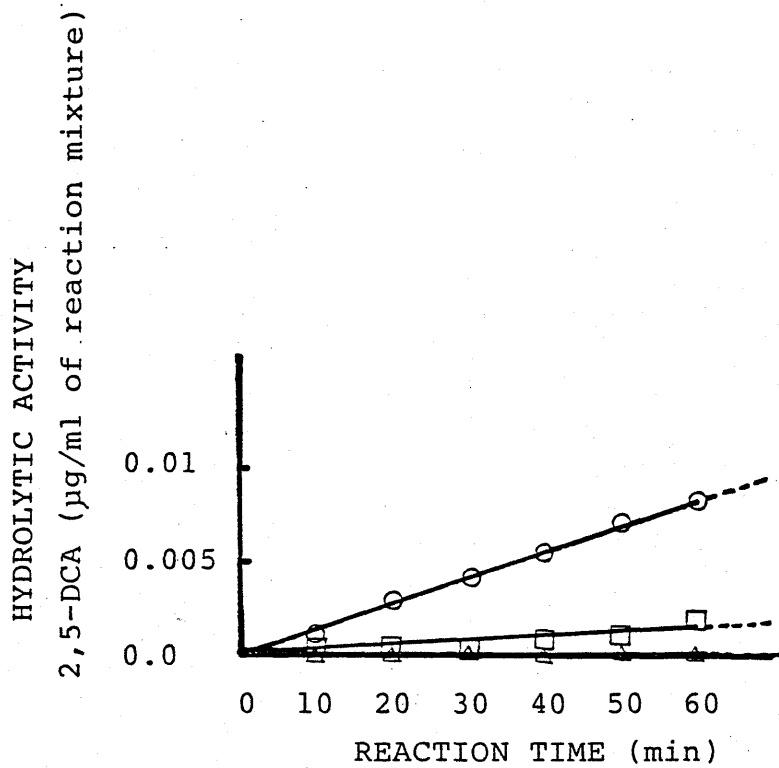


Figure 21. Arylacylamidase II activity in leaves of gramineous plants.

Orice    □ barnyardgrass    Δ finger millet  
 (substrate; 2,5-DCAA)

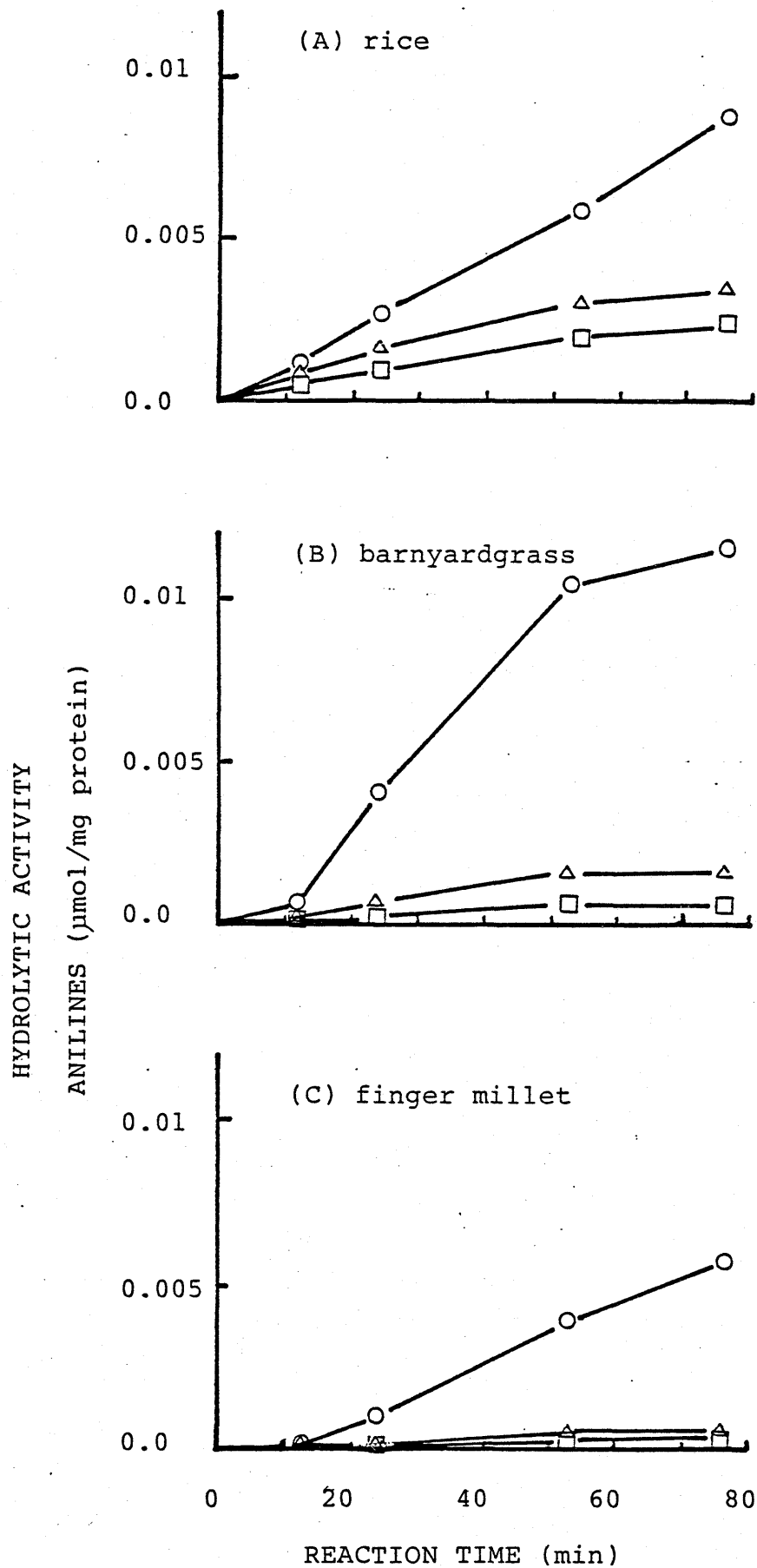


Figure 22. Substrate specificity of arylacylamidase II in leaves of gamineous plants.

substrate; O2,5-DCAA  $\Delta$ 3-CAA  $\square$ AA

### 第3項 発育の進んだ植物における Propanil 加水分解酵素活性

#### 1. 目的

前章の結果から、メヒシバはその発育が進むに伴い Propanil に対し抵抗性を示してくることが明らかとなった。足立ら(1)によれば発育の進んだメヒシバの若芽から抽出した粗酵素はイネに匹敵する Propanil 加水分解酵素活性を示した。松中(87,88)は Propanil とカルバリルとの混合剤 W I D A C はこのことを利用してメヒシバを防除するものとしている。しかし赤塚ら(6)はメヒシバからの抽出酵素液を用いて調べたところ、メヒシバの Arylacylamidase はイネの Arylacylamidase と異なり、2, 4-D C P A を特異的に加水分解するものであり、Propanil 加水分解酵素活性は皆無であると報告している。また本研究でも前項の結果から4葉期のメヒシバに Propanil 加水分解酵素活性が検出されなかった。そこで Propanil に抵抗性を示した発育の進んだメヒシバにおける Propanil 加水分解酵素活性を確かめるため、茎葉をいくつかの部位に分け、粗酵素を用いてその水解酵素活性を調べた。

#### 2. 材料と方法

供試植物として水耕法にて6葉期まで生育させたイネ、タイヌビエ、メヒシバを用いた。各植物の茎葉を上位葉、下位葉及び茎の3部分に分け、前項と同様の方法で粗酵素液Aを抽出した。また反応は基質として Propanil を用い、前項の生成アニリンの定量に準じて行い、37℃で16時間まで反応させた後、p-DACA法によって比色定量した。

#### 3. 結果

メヒシバはタイヌビエ同様6葉期の茎葉のいずれの部位でも Propanil 加水分

解酵素活性は検出されなかった。それに対しイネは、茎葉のいずれの部位でも Propanil を加水分解した。またその水解活性は茎>上位葉=下位葉の順であり、茎の加水分解酵素活性は後2者のほぼ2倍であった (Figure 23(A),(B),(C))。

#### 4. 考察

6葉期のメヒシバを用いて、その茎葉を上位葉、下位葉及び茎の3部分に分けて Propanil 加水分解酵素活性を調べたところ、下位葉にも足立ら(1)が加水分解酵素活性を見出した上位葉にもその活性が見出されず、Propanil 加水分解酵素活性と発育の進んだメヒシバの Propanil 抵抗性との間に何等関連性はなかった。またタイヌビエでも発育が進むに伴い Propanil に対し抵抗性を示してくるが、Propanil 加水分解酵素活性が検出されなかった。以上のことから、メヒシバがその発育が進むに伴い Propanil に対し抵抗性を示してくるが、その機構に関し、発育が進むにつれ Propanil 加水分解酵素活性が現れてくる事実は見出されず、他の要因によることが推察された。従って、有機リン剤やカーバメート系化合物の混合施用の Propanil に対する共力効果の機構は必ずしも解毒酵素の阻害のみではないことが考えられた。

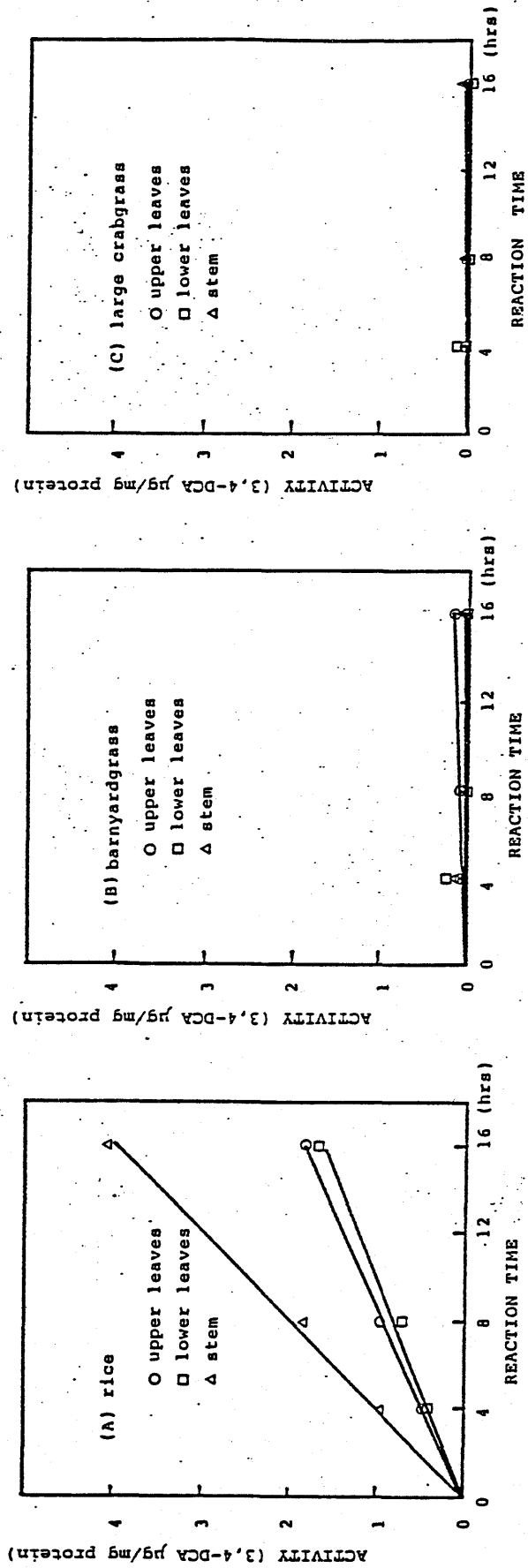


Figure 23. Rates of hydrolysis of propanil in leaves of three gramineous plants at the 6th leaf stage.

#### 第4節 各種除草剤の酸アミド結合加水分解酵素活性の植物種間差

これまでの結果から、Arylacylamidase I が Propanil の加水分解を通して Propanil の不活性化に結びついていることが明らかとなった。またこの酵素はイネ及びコムギに特異的に存在していることも示された。またシコクビエやタイヌビエも微弱ながら Arylacylamidase II 活性を有していることが明らかとなった。

Propanil 同様酸アミド結合を有しており、植物体内でその結合が切れることが示されているものはいくつか知られている。その中でも Propanil 同様不活性化反応に関わるものは多く、酵素化学的アプローチもなされている(17,41,51,55,59,73)。

一方この反応によって除草剤が活性化されて、殺草作用を示すと考えられているものは、わずかにナフトキシ系の Naproanilide (2-(2-naphthoxy)propionanilide (Figure 1)商品名ウリベスト)における知見があるだけである(133)。この除草剤はイネ科植物と広葉植物との間に選択性を有し、ホルモン作用を持つ(132)。高沢ら(133)は感受性植物の1つウリカワにおいて酸アミド結合の加水分解によるカルボン酸体の形成が薬剤の活性化に結びついていると報告している。また他にもこの除草剤の加水分解や作用性について示している例がいくつかある(78-80,104,105)。別にフェノキシ系除草剤 MY-15 (2-(2,4-dichloro-3-methylphenoxy)propionanilide (Figure 1)) は Naproanilide と類似した構造、作用及び選択性を有し、圃場実験から酸アミド結合の加水分解が選択性発現に関与している可能性を推察している。

そこでここではこの Naproanilide 及び MY-15 を用いてその殺草活性と加水分解能との関係を調べ、酸アミド結合の加水分解酵素 Arylacylamidase の存在をより広く検索し、植物の種特異性と薬剤との関り合いを明確にすることを目的

とした。

## 第1項 Naproanilide 及び MY-15 に対する感応性の植物種間差

### 1. 目的

Naproanilide 及び MY-15 はイネ科植物と広葉植物との間に高選択性を有することが知られている(132)。ここでは加水分解酵素活性と除草剤の殺草活性との関係を調べるための供試植物を選抜する目的で、イネ科植物及び広葉植物を用い、広くその感応性を検索するとともに、活性体と考えられている酸アミド結合の加水分解生成物、naproanilide では 2-(2-naphthyloxy)propionic acid (MT-1)、また MY-15 では 2-(2,4-dichloro-3-methylphenoxy)propionic acid (MY-1) (以後COOH体と呼ぶ)を用い、親化合物との殺草活性の差異及び植物の感応性の植物種間差を調べた。

### 2. 材料と方法

#### 2-1. 各種植物を用いた Naproanilide 及び MY-15 の根部処理

供試植物として自然光温室内(昼間25℃、夜間20℃)で2葉期まで生育させたイネ科植物(イネ、コムギ、シコクビエ、タイヌビエ、メヒシバ及びトウモロコシ(Zea Mays L. 品種名 ゴールデンエリート70、英名 maize)及び第1本葉展開時まで生育させた広葉植物(カラシナ(Brassica juncea Czern. et Coss. 品種名 葉からしな、英名 mustard)、キャベツ(Brassica oleracea L. var. capitata L. 品種名 将軍甘藍、英名 cabbage)、キュウリ(Cucumis sativus L. 品種名 霜知らず地這胡瓜、英名 cucumber)、ダイコン(Raphanus sativus L. var. acanthiformis Makino 品種名 時なし大根、英名 radish)及びトマト(Lycopersicon esculentum Mill 品種名 大型赤福ト

マト、英名 tomato))を用いた。 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  Mの Naproanilide 及び $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$  Mの MY-15 を含む培養液（アセトン1%を含む）に根部を浸漬して2週間連続的に処理した。なお処理液は2日に1回交換した。処理の間に観察を続けるとともに、処理後茎葉部と根部に分け、新鮮重を測定した。

#### 2-2. Naproanilide、MY-15 及びそれらの酸アミド結合の加水分解物の根部処理

供試植物として人工気象室内（昼間25℃12時間、夜間20℃12時間、相対湿度60~70%）で2葉期まで生育させたイネ科植物（イネ、タイヌビエ）及び第1本葉展開時まで生育させたダイコンを用いた。 $1 \times 10^{-7}$ ~ $1 \times 10^{-5}$  Mの Naproanilide、 $1 \times 10^{-8}$ ~ $1 \times 10^{-6}$  Mの MY-15 及びそれらのCOOH体を含む培養液（アセトン1%を含む）に根部を浸漬して10日間連続的に処理した。なお処理液は2日に1回交換した。処理の間に観察を続けるとともに、処理後茎葉部と根部に分け、新鮮重を測定した。

#### 2-3. Naproanilide、MY-15 及びそれらの酸アミド結合の加水分解物の茎葉部処理

供試植物として前項と同様に生育させたイネ及びダイコンを用いた。各植物の茎葉を5000倍ネオエステリン液で洗浄後、アセトン1%、Tween-20 0.1%を含む $1 \times 10^{-6}$ ~ $1 \times 10^{-3}$  Mの Naproanilide、MY-15 及びCOOH体の薬液に2時間浸漬して水洗後、培養液に移して10日間生育させた。処理後症状を観察するとともに、茎葉部と根部に分け、新鮮重を測定した。

### 3. 結果

3-1. 各種一年生植物に対する Naproanilide 及び MY-15 の根部処理の影響  
各種一年生植物に Naproanilide 及び MY-15 を根部処理したところ、その観



察結果から、両薬剤に対してイネ科植物のイネ、コムギ及びトウモロコシは高い抵抗性を示し、シコクビエ、タイヌビエ及びメヒシバは中程度の抵抗性を示した。それに対して広葉植物のカラシナ、キャベツ、キュウリ、ダイコン及びトマトは Naproanilide 及び MY-15 に対して高い感受性を示し、ホルモン剤特有の茎葉の黄化や根腐れが見られた。その影響を新鮮重の変化においても、MY-15 ではあまり明確ではないが、Naproanilide では観察結果と相応していた (Figure 24)。

### 3-2. Naproanilide、MY-15 及びそれら C O O H 体の根部処理が植物の生育に及ぼす影響

‡ Naproanilide 及び MY-15 に対して抵抗性を示したイネ及びタイヌビエと両薬剤に対して感受性を示したダイコンを用い、両薬剤及びそれらの C O O H 体を根部浸漬処理して、両薬剤の性質をさらに詳しく調べたところ、抵抗性のイネ及びタイヌビエと感受性のダイコンの間で両薬剤及びそれらの C O O H 体に対する感応性に顕著な差が認められた (Figure 25,26)。各薬剤とそれらの C O O H 体の作用を比較すると、両薬剤ともに抵抗性のイネは、根数の増加とともに根重の増大し、特に MY-15 で顕著であった。またタイヌビエは、親化合物である Naproanilide 及び MY-15 ではイネ同様に根重の増大が若干認められるものの、それらの C O O H 体では逆に減少した。それに対してダイコンは、各薬剤及びそれらの C O O H 体のどちらもホルモン剤特有の茎葉の黄化や根腐れが見られ、根重・茎葉重とも減少していた。但し、その作用は C O O H 体の方で強く現れた。また同一濃度で薬剤間比較を行うと、MY-15 の C O O H 体でその作用が強く出た。

### 3-3. Naproanilide、MY-15 及びそれら C O O H 体の茎葉部処理が植物の生育に及ぼす影響

根部処理で両薬剤及びそれらの C O O H 体に対して抵抗性のイネと感受性のダ

アイコンにそれぞれを茎葉部処理し、両薬剤の性質をさらに詳しく調べたところ、Naproanilide 及びそのCOOH体の $1 \times 10^{-4}$ Mでダイコンの根重の増加が、またMY-15のCOOH体の $1 \times 10^{-4}$ Mでダイコンの根重の増加及び茎葉重の減少が見られたものの、イネとダイコンの間で新鮮重に根部処理ほどの顕著な変化は認められなかった (Figure 27,28)。しかし感受性を示したダイコンでは新鮮重に変化がない場合でも、茎の開張・肥大及び根源体の形成や葉のわい化等ホルモンによる奇形化作用が強く現れているのに対し、イネでは可視障害が全く認められなかったことからこれら薬剤に対する感応性に植物種間で顕著な差が認められた。

#### 4. 考察

これらの結果から Naproanilide 及び MY-15 は根部及び茎葉部両処理において、イネ科植物と広葉植物との間に高い選択性を有することが明らかとなった。また加水分解酵素活性と除草剤の殺草活性との関係を調べるため、活性体と考えられている加水分解生成物であるCOOH体を用い、親化合物との殺草活性の差異及び植物の感応性の植物種間差を調べた。感受性のダイコンではNaproanilide 及び MY-15 とともに親化合物に比べ、COOH体の方が作用が強いことが根部処理で顕著に現れていることから、ダイコンでは親化合物からCOOH体への変化が活性化に結びついていることも推論された。しかし、Naproanilide 及び MY-15 と同様にそれらのCOOH体においても、根部及び茎葉部両処理でイネ科植物と広葉植物との間に高い選択性を有することが明らかとなった。従って高沢らのウリカワによる研究(133)で、Naproanilide において、酸アミド結合の加水分解によるカルボン酸体の形成によって薬剤が活性化され、殺草活性を示すという仮説が、抵抗性植物にもあてはまるものであるか、言い換えるとこの薬剤の加水分解酵素活性の植物種間差が選択殺草作用に結びついているかは今後検討の余

地を残している。しかしイネ科植物と広葉植物との間でこれら薬剤が高い選択性を有することが明らかとなったことから、Propanilの加水分解酵素活性の基質特異性の植物種間差との関連から、これら薬剤の植物体内代謝を調べることは、広く植物体内に存在する Arylacylamidase と殺草活性との結びつきを知る上で重要と考えられた。

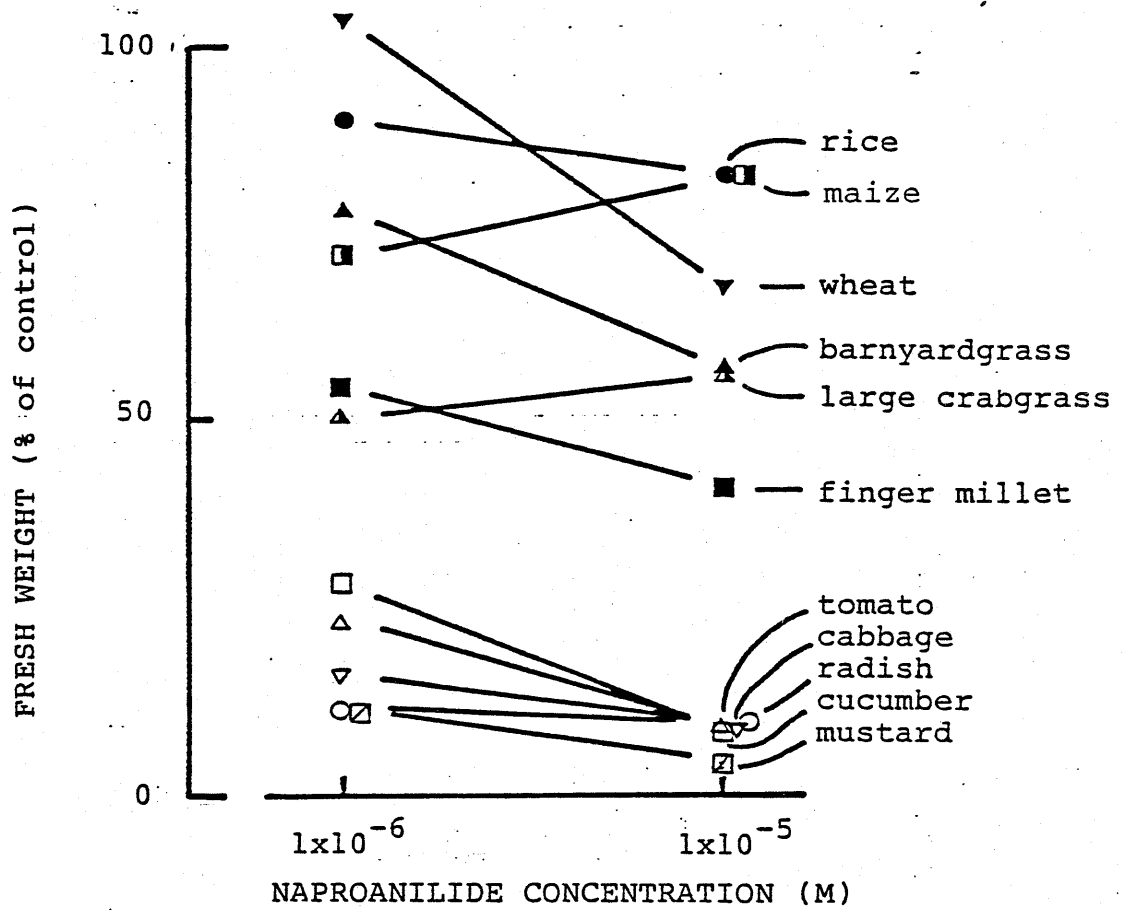


Figure 24. Effect of root-applied naproanilide on growth of various plant species.

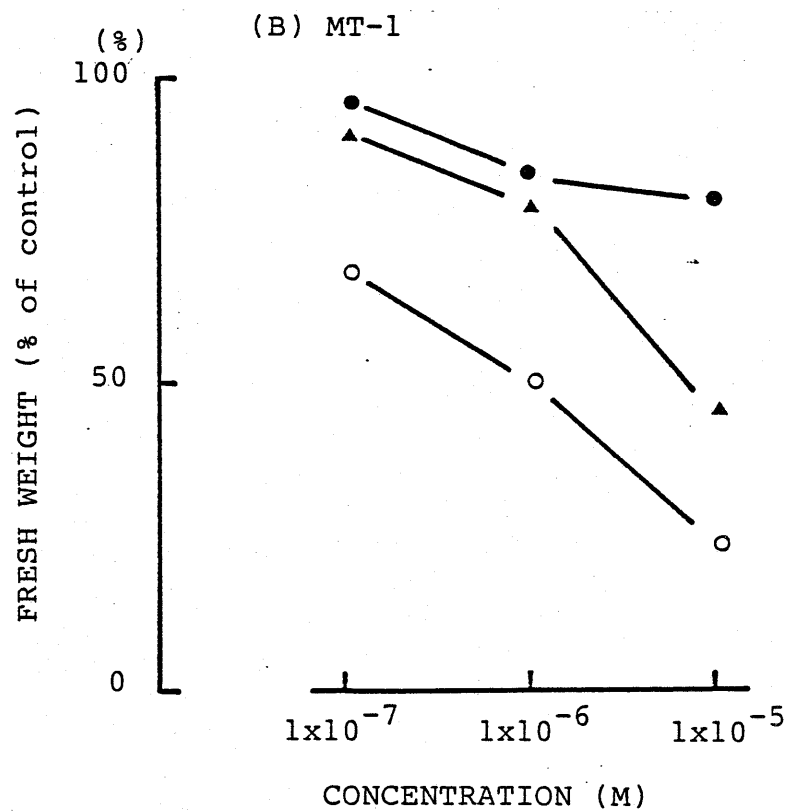
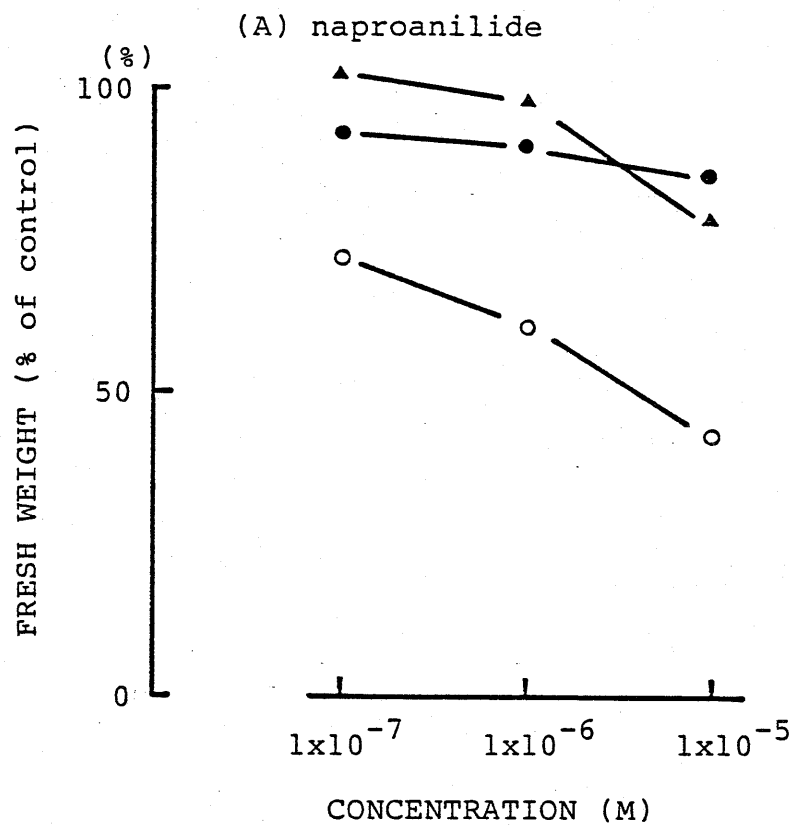


Figure 25. Effect of root-applied naproanilide and MT-1 on growth of three plant species.

● rice ▲ barnyardgrass ○ radish

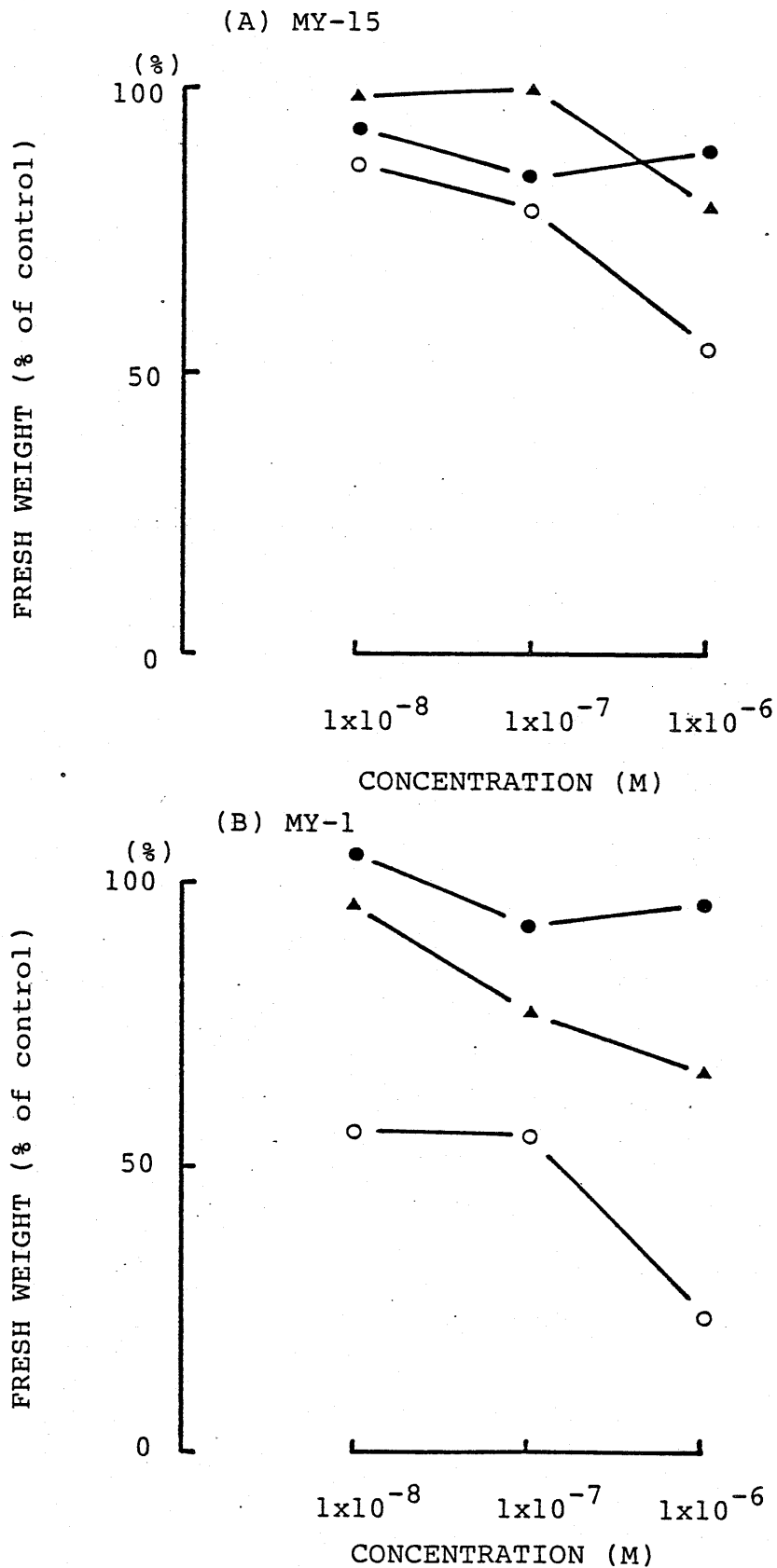


Figure 26. Effect of root-applied MY-15 and MY-1 on growth of three gramineous plants.

● rice ▲ barnyardgrass ○ radish

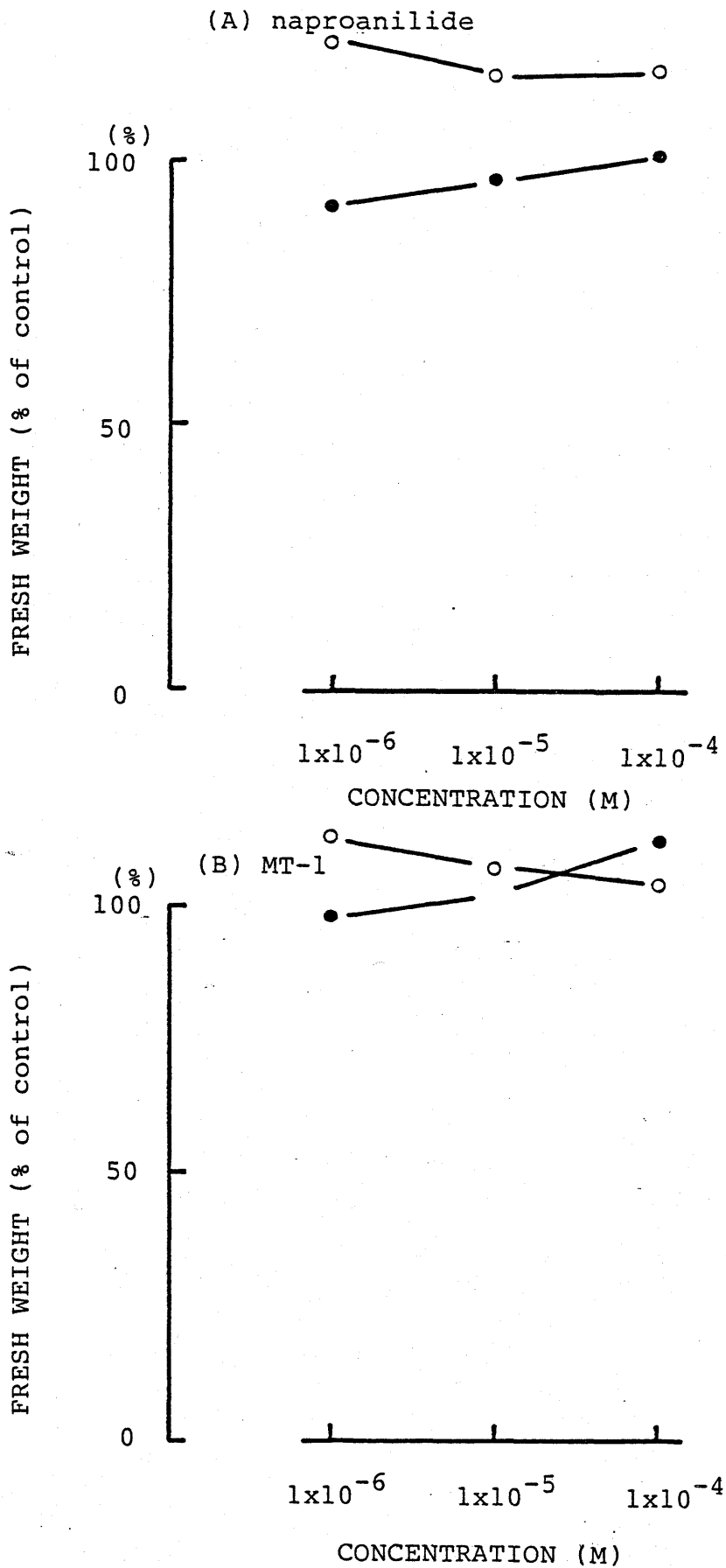


Figure 27. Effect of foliar-applied naproanilide and MT-1 on growth of both rice and radish seedlings.  
 ● rice      ○ Radish

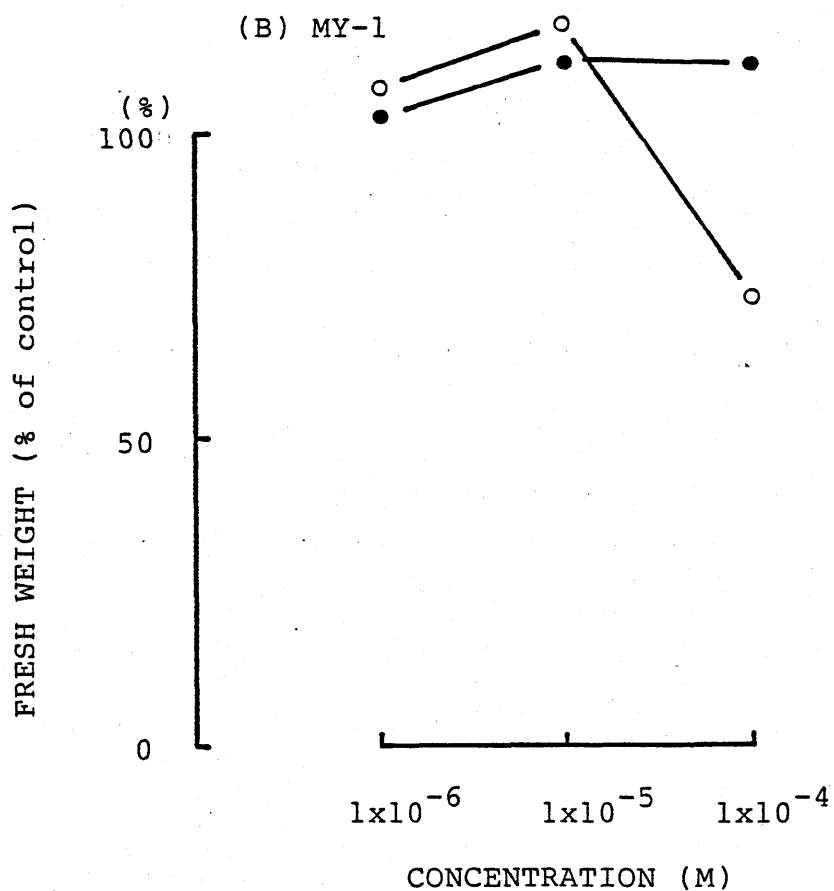
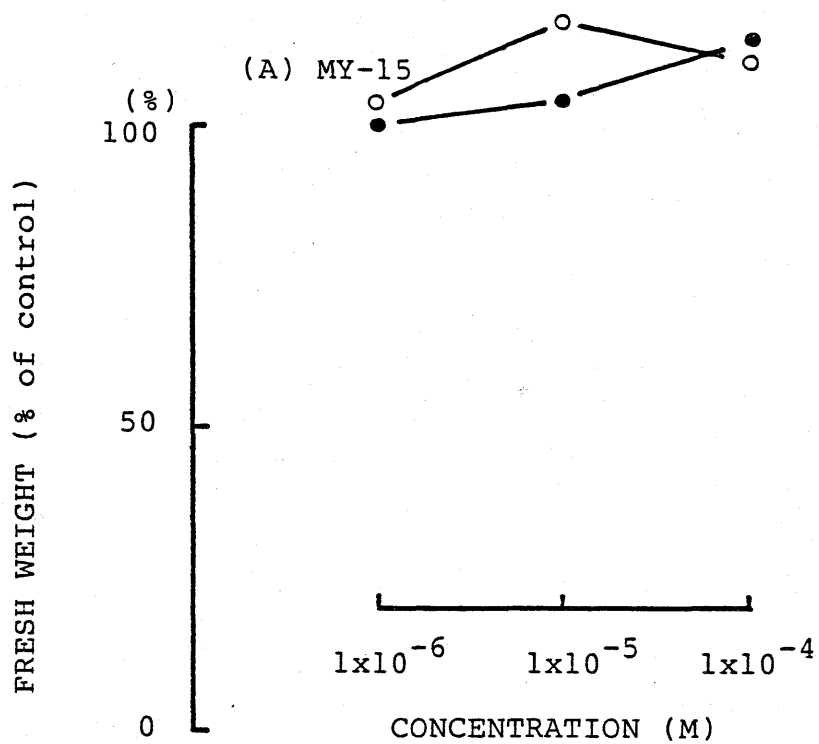


Figure 28. Effect of foliar-applied MY-15 and MY-1 on growth of both rice and radish seedlings.

● rice ○ radish



## 第2項 Naproanilide 及び MY-15 の植物体内代謝から見た酸アミド結合の加水分解酵素活性の植物種間差

### 1. 目的

前項で Naproanilide 及び MY-15 に対して感受性を示したダイコンと合せて、Propanil に対し抵抗性を検討してきた植物の中からイネ、シコクビエ及びタイヌビエを用い、 $^{14}\text{C}$ -Naproanilide 及び  $^{14}\text{C}$ -MY-15 の植物体内代謝を特に酸アミド結合の加水分解に注目して検討した。なお、ここでは短時間の処理で効果があり、また薬剤を処理した部位と症状の発生する部位が一致しており、かつ二次的影響の少ないと思われる茎葉部浸漬処理を用いて、その茎葉部内の薬剤代謝を調べた。

### 2. 材料と方法

供試植物として水耕法で3葉期まで生育させたイネ、シコクビエ、タイヌビエ及び第2本葉展開時まで育てたダイコンを用いた。12.1  $\mu\text{Ci}/1200\text{ml}$ 、モル濃度にして $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ の [Naphthalene- $^{14}\text{C}$ ]-Naproanilide 水溶液 (比放射能 0.987  $\text{mCi}/\text{mmole}$ , 放射化学的純度  $>96\%$ )、及び35.5  $\mu\text{Ci}/1200\text{ml}$ 、モル濃度にして $8.0 \times 10^{-6}\text{M}$ の [Phenol- $^{14}\text{C}$ ]-MY-15 水溶液 (比放射能 4.43  $\text{mCi}/\text{mmole}$ , 放射化学的純度  $>99\%$ ) に生育試験と同様の方法で各植物の茎葉部を1時間浸漬させた後、24時間まで生育させ、茎葉部の $^{14}\text{C}$ -Naproanilide 及び  $^{14}\text{C}$ -MY-15 の代謝を調べた。各部位は新鮮重を測定し、細かく切り、重量で10倍あたりの90%メタノール中でワーリングブレンダーを用いて磨砕・抽出した。メンブランフィルター (東洋ろ紙、Type TM-2P) を用いてろ過し、残渣を再び90%メタノール中で抽出・ろ過した。ろ液を集めて90%メタノール画分とし、液体シンチレー

シンカウンターで全放射エネルギーを測定した。残渣は90℃で1昼夜乾燥させ、乾物重を測定し、試料自動燃焼装置で燃焼後、液体シンチレーションカウンターで放射エネルギーを測定した。また90%メタノール画分はロータリーエバポレーターで濃縮・乾固した後、少量のメタノールに溶解し、薄層クロマトグラフィーによって分離した〔薄層プレート；シリカゲルアルミプレート Art 5554 メルク社製、展開溶媒；Naproanilide はベンゼン：酢酸=9：1、MY-15 はベンゼン：酢酸=7：1〕。薄層プレートはオートラジオグラフィーをとるとともに、薄層をかきとり、メタノールで1昼夜振とう・抽出し、液体シンチレーションカウンターで放射エネルギーを測定した。次に両薬剤とも薄層クロマトグラフィー展開後の原点部分（origin）の薄層をかきとり、90%メタノールで1昼夜振とう・抽出した。ロータリーエバポレーターで濃縮・乾固した後、最終濃度1NになるようにHCl水溶液を加え、85℃で4時間酸加水分解を行った。その後水-ジクロロメタンの系で液々分配を2回繰り返す、ジクロロメタン画分を集め、濃縮・乾固した後、少量のメタノールに溶解し、薄層クロマトグラフィーによって2次元展開を行った〔展開溶媒；Naproanilide は1次元目をベンゼン：酢酸=9：1、2次元目をn-ブタノール：水：メタノール：酢酸=10：10：3：1 またMY-15 は1次元目をベンゼン：酢酸=7：1、2次元目をn-ブタノール：水：メタノール：酢酸=10：10：3：1〕。

### 3. 結果

#### 3-1. 茎葉処理 Naproanilide の植物体内代謝の植物種間差

各植物の茎葉部を $^{14}\text{C}$ -Naproanilide 水溶液に浸漬処理したところ、いずれの植物も親化合物が経時的に減少しており、その程度はダイコンで最も大きかった。また親化合物の減少に伴い、初期に Naproanilide のCOOH体（MT-1）の生成が確認された。その生成の程度はダイコンで最も大きく、シコクビエ=イ

ネ>>タイヌビエの順であった (Figure 29,30,31,32)。タイヌビエでのMT-1は、全放射エネルギーから見ると少ないが、オートラジオグラフィにより確認された (Figure 33,34,35,36)。小林ら(79)は他に主要な代謝産物としてMT-1のメチルエステル体、methyl-2-(2-naphthyl)propionate (MT-2)を見出しているが、本研究でもオートラジオグラフィにより、各植物の処理後24時間で若干認められるものの、量的に少なくその変化を検出することができなかった。originや未抽出残渣は経時的に増加し、特にoriginの増加は親化合物の減少と対応していた。originを加水分解してそのジクロロメタン画分を薄層クロマトグラフィの2次元展開にかけた結果から、いずれの植物でも、大部分がMT-1及びMT-2であることが判明した。一方この代謝傾向を濃度変化の観点から見ると、シコクビエの処理後3時間目では全吸収量が少なかったため、Naproanilide及びMT-1の濃度が若干低くなっているが、イネ、シコクビエ及びダイコンではNaproanilideの茎葉中濃度はほぼ同様であるのに対して、タイヌビエでは極めて大きくなっていた。またMT-1の茎葉中濃度は一般にNaproanilideに比べて著しく低く、その程度は特に3時間目においてダイコン、イネで高く、次いでシコクビエ、タイヌビエの順であった (Table 6)。

### 3-2. 茎葉処理 MY-15 の植物体内代謝の植物種間差

各植物の茎葉部を $^{14}\text{C}$ -MY-15水溶液に浸漬処理したところ、いずれの植物も親化合物が経時的に減少しており、その程度はダイコンで最も低かった。また親化合物の減少に伴い、いずれの植物でもMY-15のCOOH体(MY-1)の生成が確認され、イネ科植物では初期にその増加が見られた。MY-1の生成の程度はシコクビエで最も大きく、イネ>ダイコン>タイヌビエの順であった (Figure 37,38,39,40)。しかしダイコンでは24時間までその量が徐々に増加していた。タイヌビエでのMY-1は全放射エネルギーから見ると少ないが、オートラジオグラフィにより確認された (Figure 41,42,43,44)。他に代謝産物としてM

Y-1 のメチルエステル体、methyl-2-(2,4-dichloro-3-methylphenoxy)-propionate (MY-2) がオートラジオグラフィにより、タイヌビエを除く各植物で認められた。その量はシコクビエでかなり検出されたものの、他では量的に少なかった。origin や未抽出残渣は経時的に増加し、特に origin の増加は親化合物の減少と対応していた。またここで特に顕著であったのは、イネで未抽出残渣と同程度の量、未知の代謝物 (Unknown 1) が見出されたことである。別に origin を酸加水分解した結果から、いずれの植物でも、分解物のほとんどが MY-1 のヒドロキシメチル体であることが推察された。一方この代謝傾向を濃度変化の観点から見ると、ダイコンの処理直後では全吸収量が少なかったため、MY-15 及び MY-1 の濃度が若干低くなっているが、MY-15 の茎葉中濃度はタイヌビエ > イネ > ダイコン > シコクビエの順で高かった。また MY-1 の茎葉中濃度は一般に MY-15 に比べて著しく低く、その程度は、処理後 6 時間までにイネ  $\geq$  シコクビエ > タイヌビエ > ダイコンの順であったが、24 時間においては、シコクビエ及びダイコンで最も多くなっていた (Table 7)。

#### 4. 考察

$^{14}\text{C}$ -Naproanilide 及び  $^{14}\text{C}$ -MY-15 植物体内代謝を特に酸アミド結合の加水分解に注目して検討したところ、親化合物の減少と対応して増加する origin を酸加水分解した結果や両薬剤の COOH 体の初期における増加から、両薬剤代謝の一次反応は酸アミド結合の加水分解であることが明らかとなった。従って親化合物の減少を酸アミド結合の加水分解と考えることができる。このことから酸アミド結合の各植物による加水分解を、両薬剤を用いて比較すると、イネ科植物のイネ、シコクビエ及びタイヌビエは、両薬剤とも同程度に強く加水分解した。しかしダイコンは Naproanilide を強く加水分解するのに対し、MY-15 の加水分解能は弱かった。以上のことから Naproanilide 及び MY-15 の酸アミド結合

の加水分解に関与している Arylacylamidase は、イネ科植物と広葉植物との間で異なっていることが推察された。また両薬剤は供試した植物の全てにおいて、その程度に差があるものの加水分解されることが明らかとなり、その後抱合反応が起ると推察された。しかし生育試験の結果と考え合せると、植物体内の C O O H 体濃度と殺草活性との間に明確な関係が見出せなかったことから、この加水分解酵素活性の基質特異性の植物種間差が直接選択殺草作用に関与しているとは考えがたく、両薬剤の有するホルモン作用に対する感応性の植物種間差やその作用機構についてもさらに検討する必要があると思われた。

以上のことから、イネ科植物においてイネだけでなく、シコクビエやタイヌビエにも Naproanilide 及び MY-15 のような酸アミド結合を有する除草剤を短時間のうちに加水分解する Arylacylamidase が存在することが確認された。一方前節までの結果から、Propanil はイネ及びコムギのみで加水分解されシコクビエやタイヌビエでは分解されなかった。このことから Propanil 加水分解酵素と考えられている Arylacylamidase I 以外に低分子の薬物の酸アミド結合を短時間に加水分解する Arylacylamidase が供試した全ての植物に存在する可能性が考えられた。

Propanil の場合、その加水分解が解毒（不活性化）に関与し、選択性の要因となっている。しかし Naproanilide 及び MY-15 ではその加水分解が活性化に関与しているか、ひいてはその差異が選択性の要因となっているかに関しては、更に Propanil の植物体内挙動について詳細に検討する必要がある。またこの Arylacylamidase が赤塚らの提唱しているアイソザイムのいずれであるか、またはそれ以外のアイソザイムであるかについても、更に酵素化学的検討を要する。

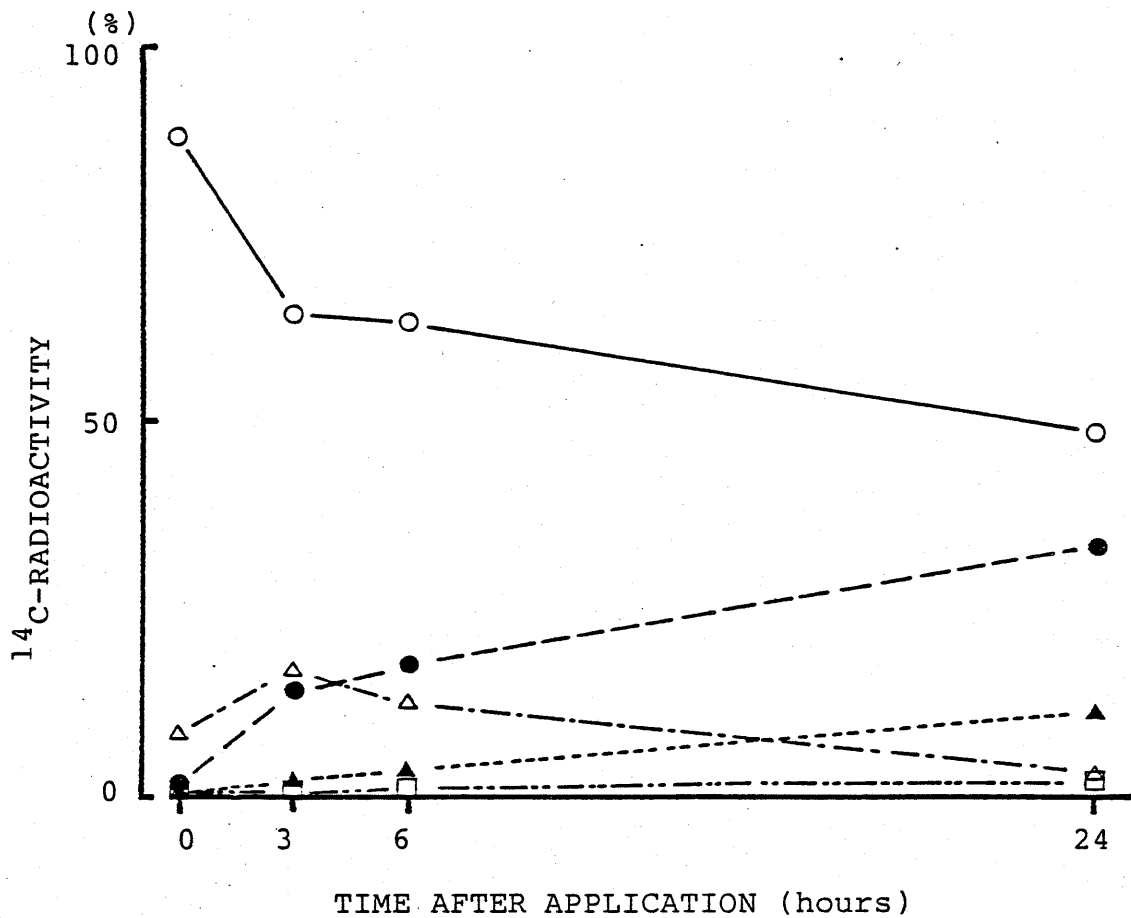


Figure 29. Changes in time course of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -naproanilide in shoots of rice seedlings.

○ ——— ○ naproanilide    △ — · — · — △ MT-1  
 ● — — — ● origin        □ — — — — □ MT-2  
 ▲ — · — · — ▲ residue

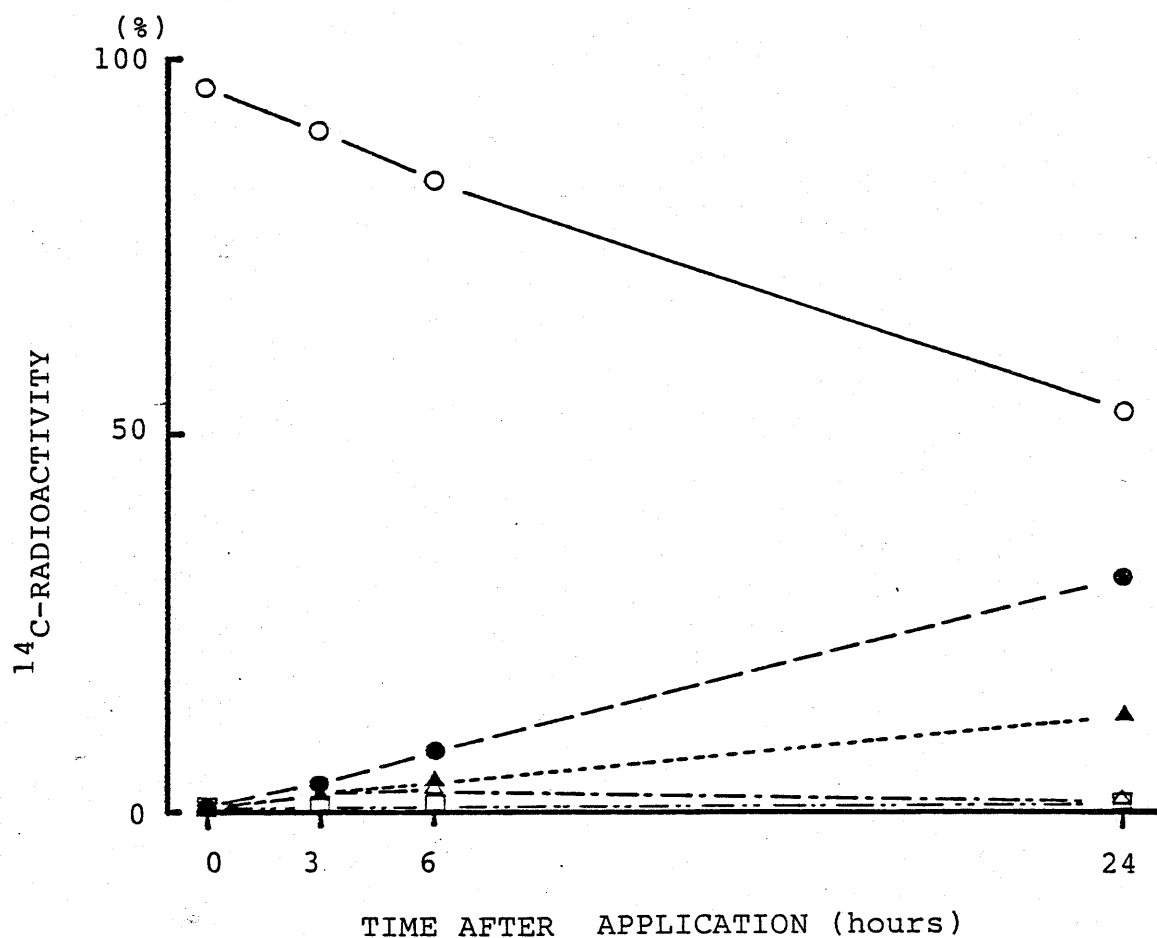


Figure 30. Changes in time course of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -naproanilide in shoots of barnyardgrass seedlings.

○ ——— ○ naproanilide    △ — · — · — △ MT-1  
 ● — — — ● origin        □ — — — — □ MT-2  
 ▲ — · — · — ▲ residue

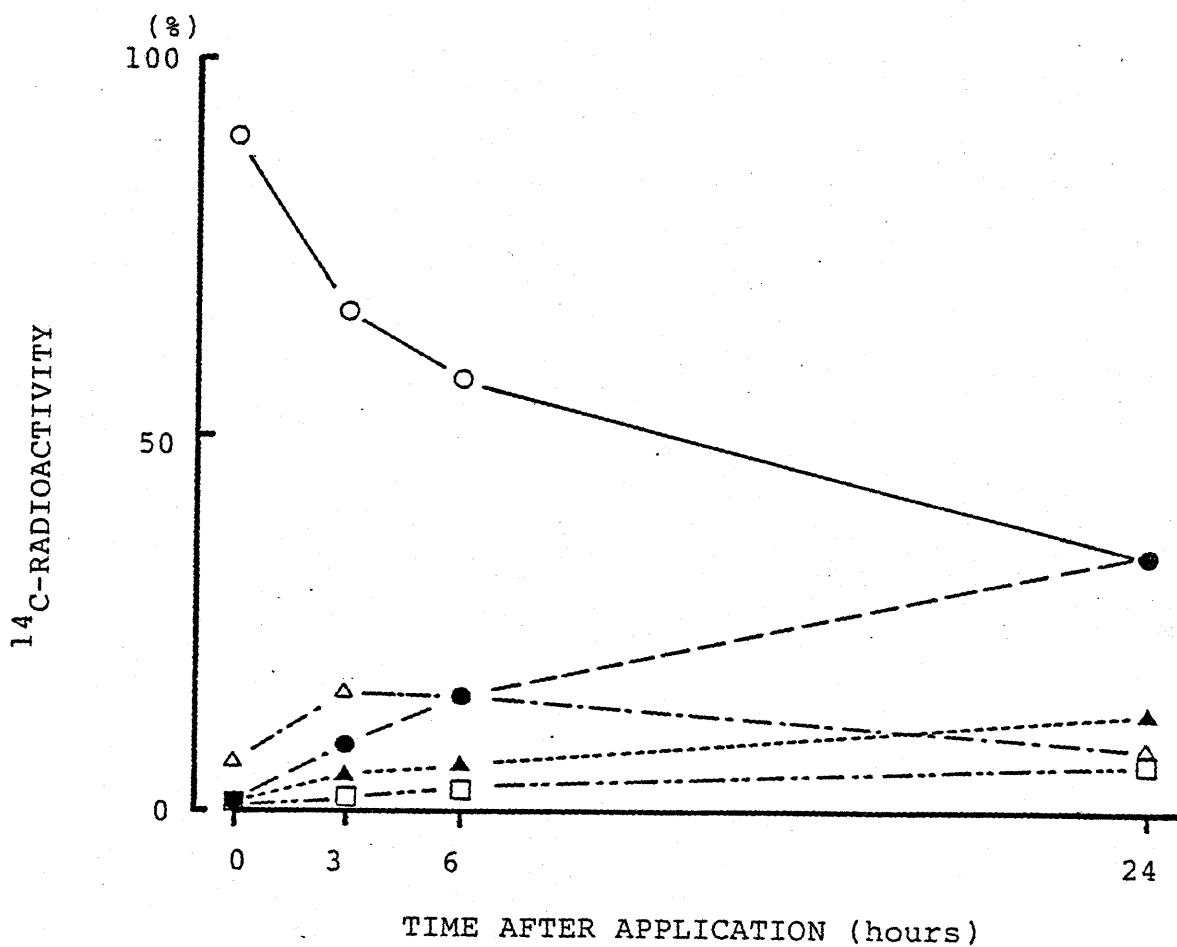


Figure 31. Changes in time course of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -naproanilide in shoots of finger millet seedlings.

○ ——— ○naproanilide    △ ——— △ MT-1  
 ● ——— ●origin        □ ——— □ MT-2  
 ▲ ——— ▲residue



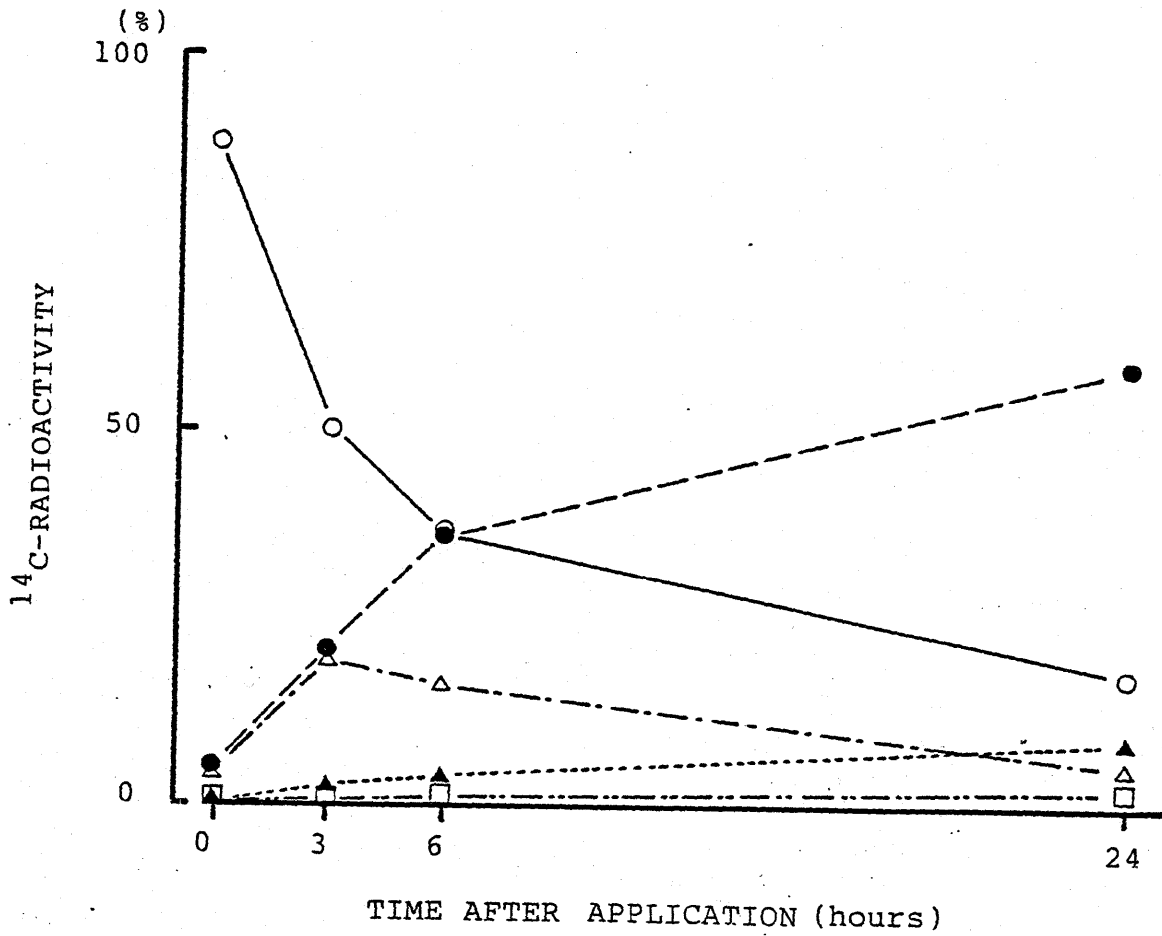


Figure 32. Changes in time course of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -naproanilide in shoots of radish seedlings.

○ ——— ○ naproanilide    △ ——— △ MT-1  
 ● ——— ● origin        □ ——— □ MT-2  
 ▲ ——— ▲ residue

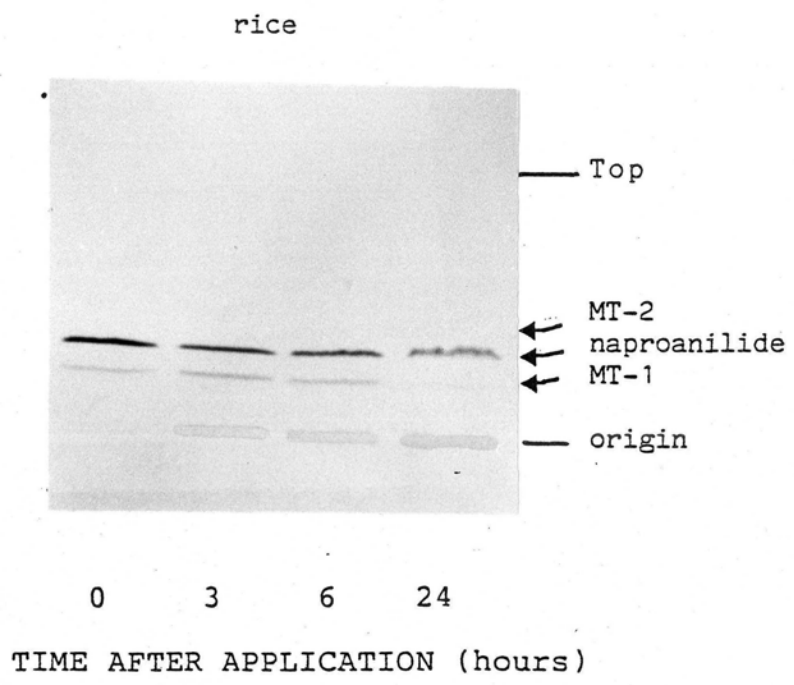


Figure 33. Autoradiograph of thin-layer chromatogram of methanol soluble metabolites of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -naproanilide in shoots of rice.

Thin-layer plates were developed with benzene : acetic acid (9:1).

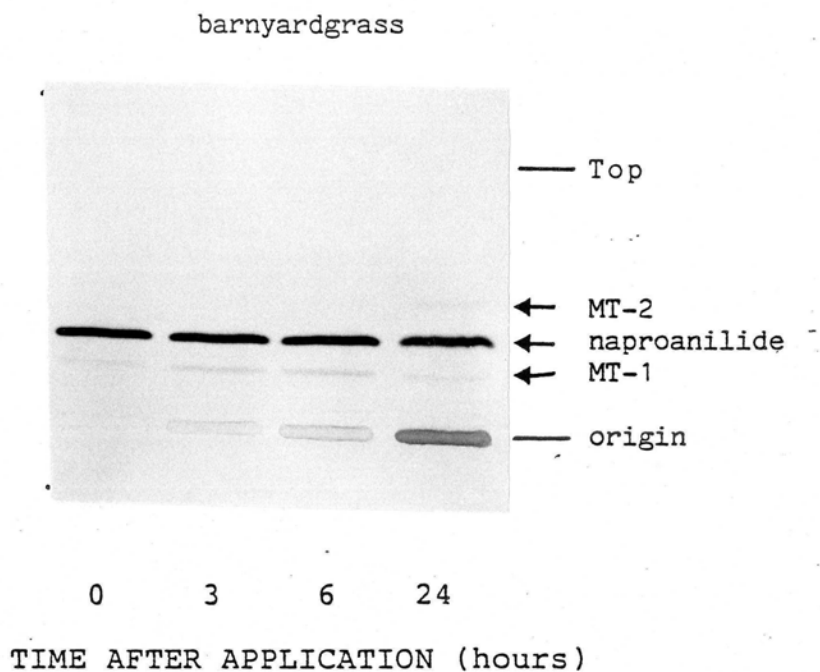


Figure 34. Autoradiograph of thin-layer chromatogram of methanol soluble metabolites of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -naproanilide in shoots of barnyardgrass.

Thin-layer plates were developed with benzene : acetic acid (9:1).

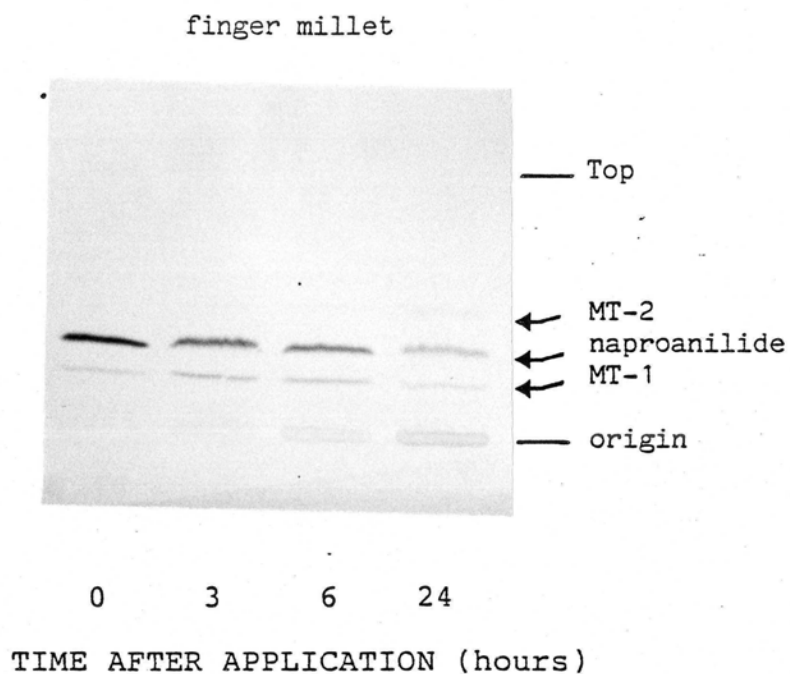


Figure 35. Autoradiograph of thin-layer chromatogram of methanol soluble metabolites of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -naproanilide in shoots of finger millet.

Thin-layer plates were developed with benzene : acetic acid (9:1).

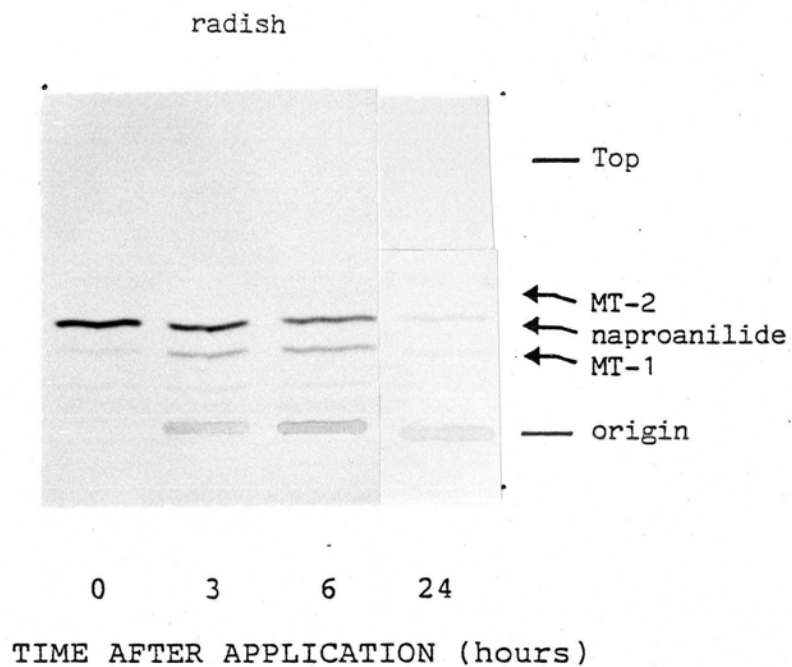


Figure 36. Autoradiograph of thin-layer chromatogram of methanol soluble metabolites of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -naproanilide in shoots of radish.

Thin-layer plates were developed with benzene : acetic acid (9:1).

Table 6. Changes in time course of concentration of naproanilide and MT-1 in shoots of rice, barnyardgrass, finger millet, and radish seedlings

Time after application	Naproanilide				MT-1				Naproanilide + MT-1			
	0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24 (hrs)
Rice	6.19	5.50	4.88	3.07	0.63	1.45	0.98	0.20	6.82	6.95	5.86	3.27
Barnyardgrass	22.13	20.63	18.83	8.85	0.34	0.51	0.63	0.26	22.47	21.14	19.46	9.11
Finger millet	4.44	2.83	3.50	1.39	0.32	0.68	0.95	0.35	4.76	3.51	4.45	1.74
Radish	5.17	3.09	2.15	0.92	0.22	1.17	0.96	0.32	5.39	4.26	3.11	1.24

( nmole/g f.w. )

<sup>14</sup>C-Naproanilide was applied to shoots of each plant for 1 hour.

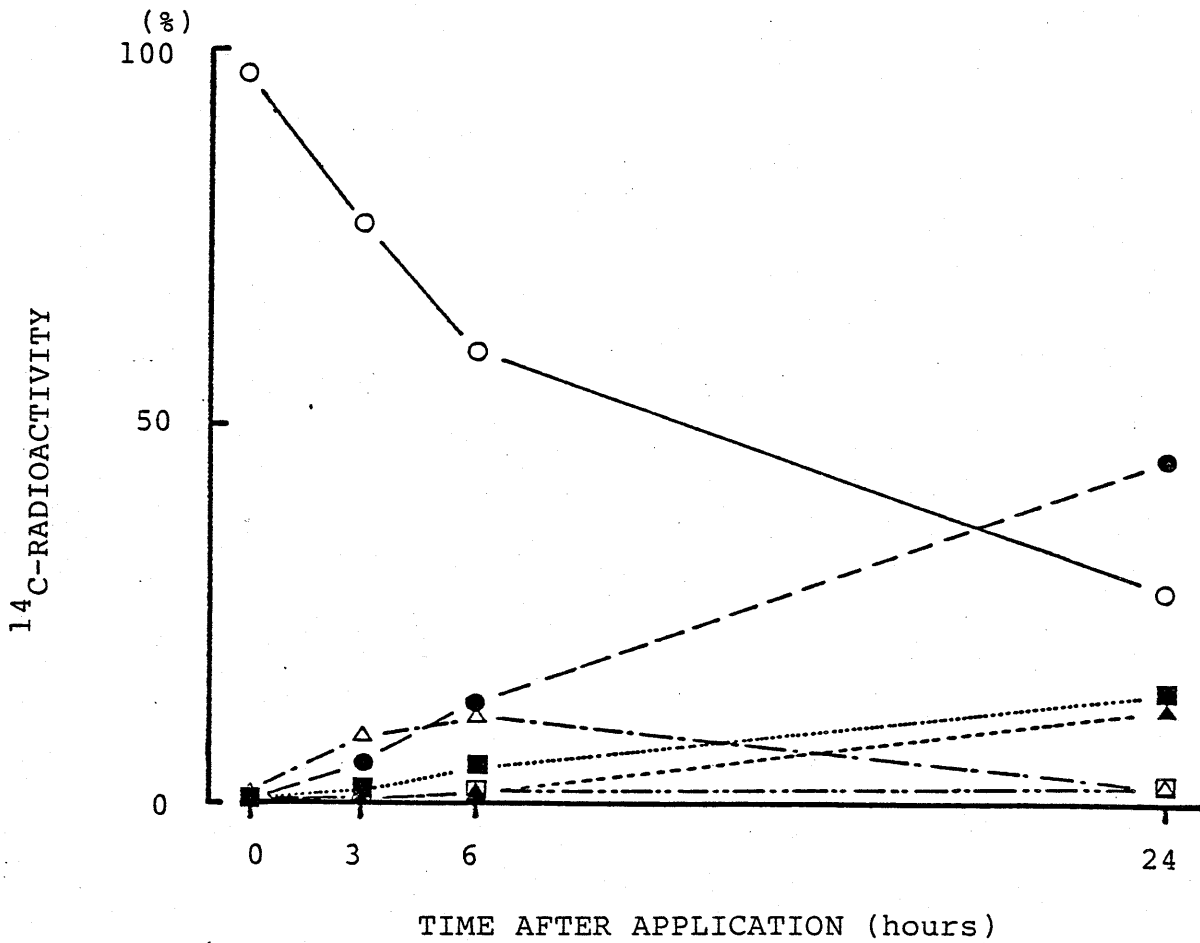


Figure 37. Changes in time course of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -MY-15 in shoots of rice seedlings.

○—○ MY-15	△—△ MY-1
●—● origin	□—□ MY-2
▲—▲ residue	■—■ Unknown 1

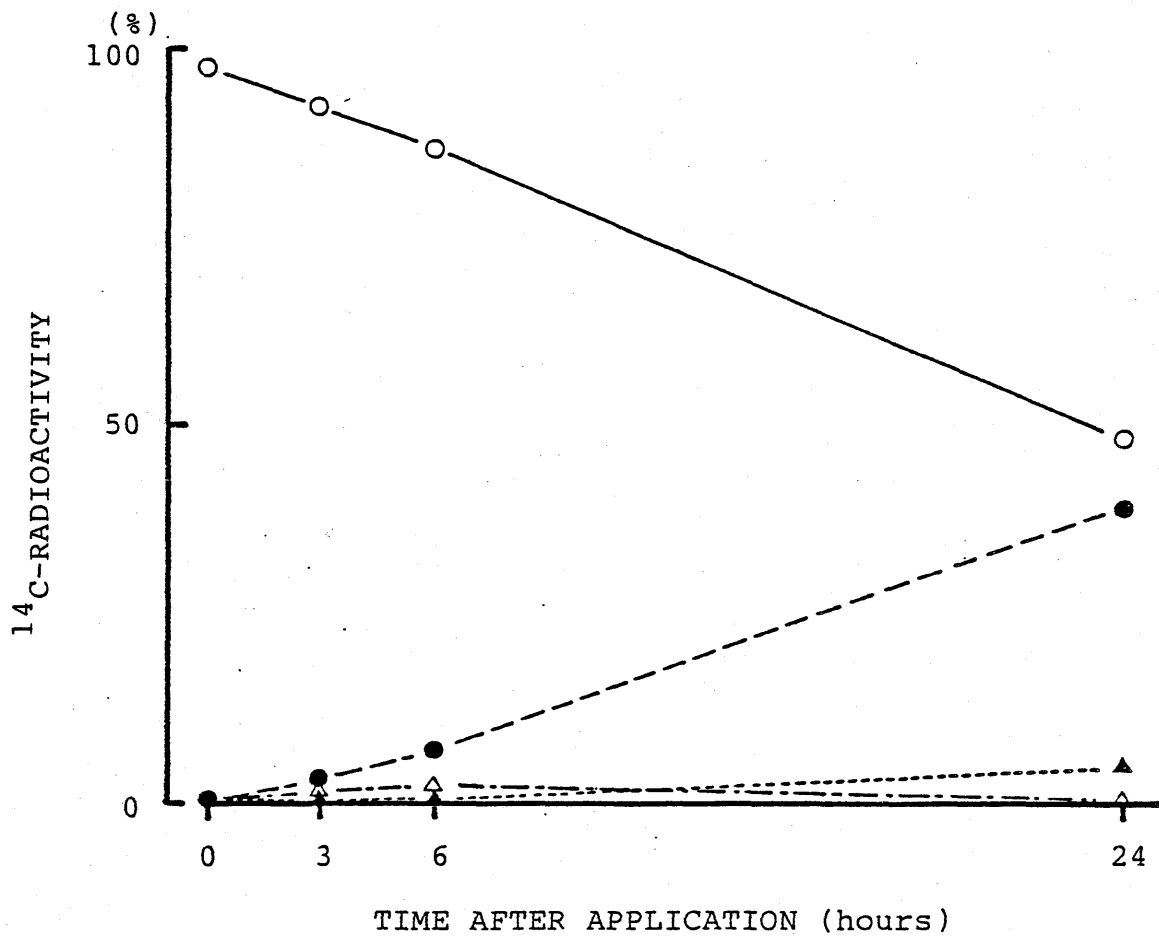


Figure 38. Changes in time course of foliar-applied <sup>14</sup>C-MY-15 in shoots of barnyardgrass seedlings.

○—○ MY-15                      △—△ MY-1  
 ●—● origin  
 ▲—▲ residue



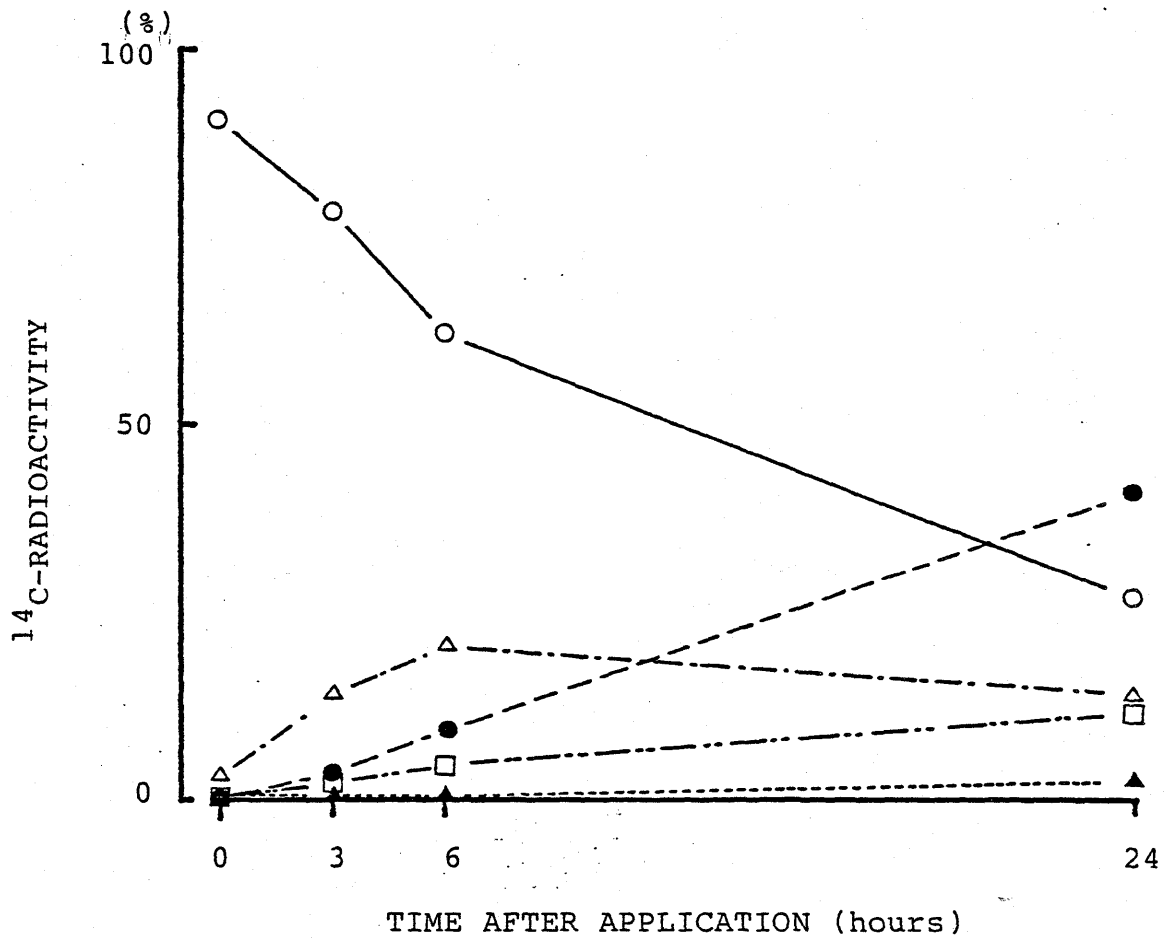


Figure 39. Changes in time course of foliar-applied <sup>14</sup>C-MY-15 in shoots of finger millet seedlings.

○ ——— ○ MY-15                      △ ——— △ MY-1  
 ● ——— ● origin                      □ ——— □ MY-2  
 ▲ ——— ▲ residue

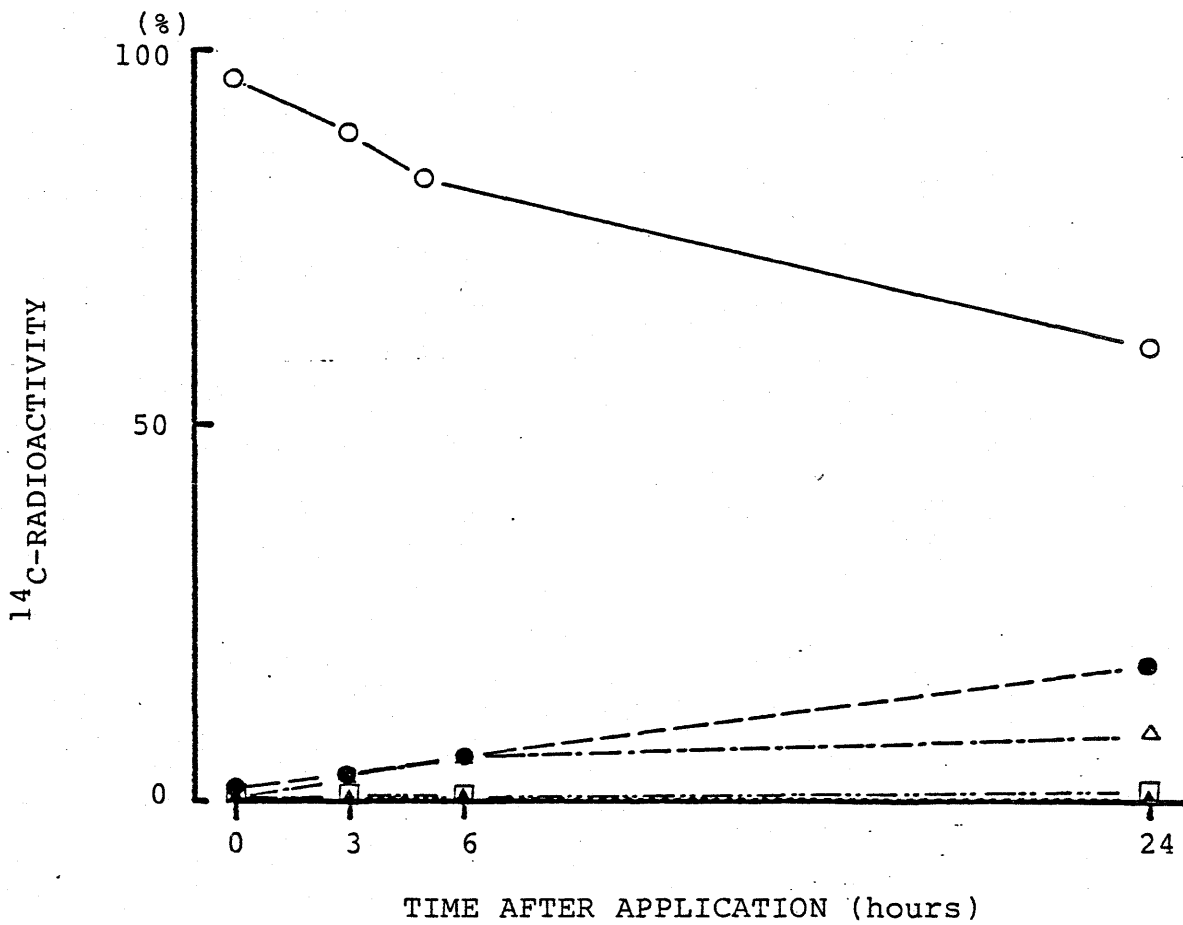


Figure 40. Changes in time course of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -MY-15 in shoots of radish seedlings.

○ ——— ○ MY-15                      △ ——— △ MY-1  
 ● ——— ● origin                      □ ——— □ MY-2  
 ▲ ——— ▲ residue

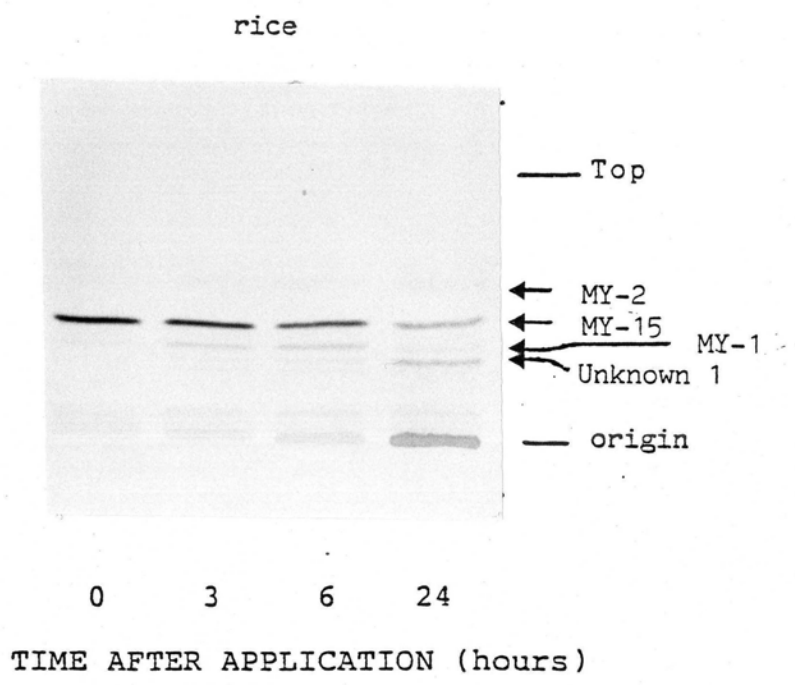


Figure 41. Autoradiograph of thin-layer chromatogram of methanol soluble metabolites of foliar-applied <sup>14</sup>C-MY-15 in shoots of rice.

Thin-layer plates were developed with benzene : acetic acid (9:1).

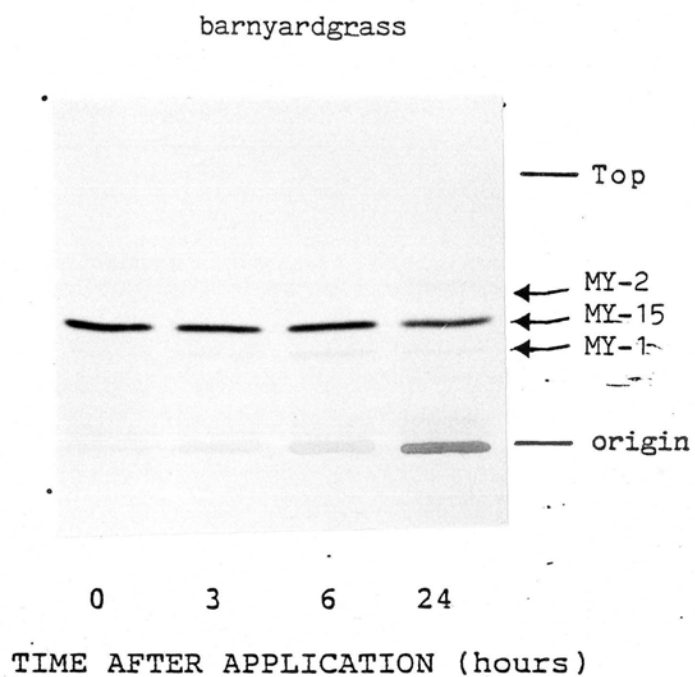


Figure 42. Autoradiograph of thin-layer chromatogram of methanol soluble metabolites of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -MY-15 in shoots of barnyardgrass.

Thin-layer plates were developed with benzene : acetic acid (9:1).

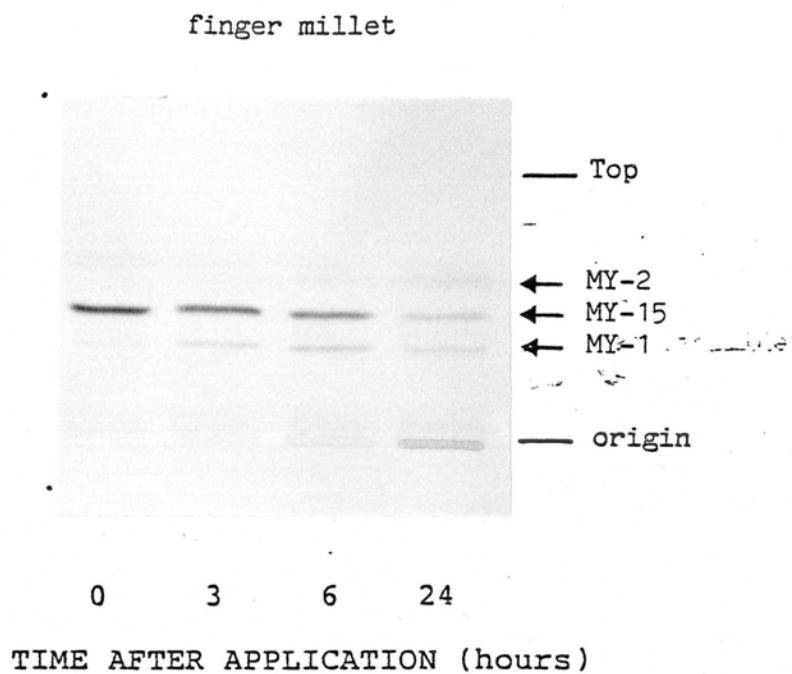


Figure 43. Autoradiograph of thin-layer chromatogram of methanol soluble metabolites of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -MY-15 in shoots of finger millet.

Thin-layer plates were developed with benzene : acetic acid (9:1).

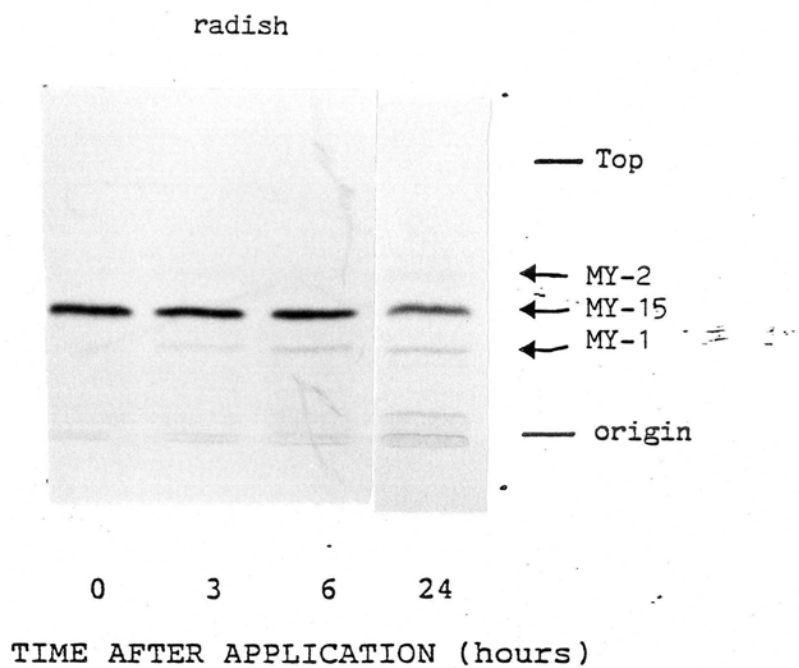


Figure 44. Autoradiograph of thin-layer chromatogram of methanol soluble metabolites of foliar-applied  $^{14}\text{C}$ -MY-15 in shoots of radish.

Thin-layer plates were developed with benzene : acetic acid (9:1).

Table 7. Changes in time course of concentration of MY-15 and MY-1 in shoots of rice, barnyardgrass, finger millet, and radish seedlings

Time after application	MY-15				MY-1				MY-15 + MY-1			
	0	3	6	24	0	3	6	24	0	3	6	24 (hrs)
Rice	5.44	4.99	3.33	0.79	0.08	0.56	0.63	0.09	5.52	5.55	3.96	0.88
Barnyardgrass	9.53	8.73	8.27	3.19	0.08	0.19	0.25	0.09	9.61	8.92	8.52	3.28
Finger millet	2.70	2.12	1.76	0.61	0.09	0.38	0.58	0.31	2.79	2.50	2.34	0.92
Radish	2.21	3.21	2.62	1.90	0.02	0.14	0.19	0.28	2.23	3.35	2.81	2.18

( nmole/g f.w. )

<sup>14</sup>C—MY-15 was applied to shoots of each plant for 1 hour.

## 摘要

ここでは Propanil の抵抗性機構として従来提唱されてきている Arylacylamidase による加水分解に着目し、前章で抵抗性を示した植物の抵抗性要因を調べた。

### 第1節 $^{14}\text{C}$ -Propanil 及び関連化合物の合成

Propanil の植物体内挙動に関する研究に先立ち、 $^{14}\text{C}$ -Propanil を合成するとともに、Propanil の種々の同族体を合成した。

(1) 酸塩化物法のうち塩素置換の際  $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COCl})_2$  を用いて  $^{14}\text{C}$ -Propanil の合成を行った結果、比放射能  $0.918\text{mCi/mmole}$ 、放射化学的純度  $>98\%$  の  $^{14}\text{C}$ -Propanil を合成することができた。

(2) 各種塩素置換体アニリンと塩化アセチルまたは塩化プロピオニルから Propanil の同族体を合成したところ、全ての酸アニリドの合成に成功した。なお混酸無水物法と酸塩化物法の比較を行ったところ、両者により同じ化合物が合成されていることが明らかとなった。

(3) この方法により合成された  $^{14}\text{C}$ -Propanil は比放射能や放射化学的純度から見ても、Propanil の植物体内挙動の研究に充分使用できるものであった。

### 第2節 Propanil の植物体内代謝

Propanil に抵抗性を示したコムギ及びシコクビエの抵抗性の要因が従来イネにおいて提唱されている Arylacylamidase による Propanil の加水分解であるか確かめる端緒として、前節で合成した  $^{14}\text{C}$ -Propanil を用いてその体内代謝を検討した。

(1) Propanil の植物体内代謝を検討したところ、根部及び茎葉部両浸漬処理



において $^{14}\text{C}$ -Propanil の代謝能はイネで最も大きく、コムギでもかなりの部分が代謝された。しかしシコクビエやタイヌビエでは根部処理の根部内で若干代謝物が確認されたが、24時間後でも吸収された $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーのうち大部分が親化合物のまま残存しており、ほとんど代謝されなかった。

(2) 根部及び茎葉部両浸漬処理において、イネ及びコムギは、Propanil を代謝することによって Propanil に対する抵抗性を示していることが明らかとなった。またタイヌビエは Propanil をほとんど代謝しないため、感受性を示した。しかしシコクビエは、Propanil を加水分解することによって Propanil に対し抵抗性を示しているのではないことが明らかとなった。

### 第3節 Propanil 加水分解酵素活性

植物体から抽出した Arylacylamidase の粗酵素を用いて、前節での結果を確かめるとともに、メヒシバの発育が進むに伴い Propanil 抵抗性を獲得する要因を探ることを目的とした。

#### 第1項 Propanil 加水分解酵素活性の植物種間差

粗酵素を用いて残存 Propanil 及び生成 3, 4-DCA を合せて検出することにより、Propanil 加水分解酵素活性を調べた。

(1) 残存 Propanil の変化から加水分解酵素活性を見ると、イネではかなりの量の Propanil が消失していたが、シコクビエ、タイヌビエ及びメヒシバではほとんどがそのままの形で残存していた。

(2) 生成アニリンの変化から加水分解酵素活性を見ると、イネでは短時間に速やかに加水分解されるが、シコクビエ及びタイヌビエでは Propanil は加水分解されなかった。コムギにおいてもイネ同様 3, 4-DCA の生成が認められたが、その活性は著しく弱かった。

(3) 以上のことからイネ及びコムギにおいて Propanil が加水分解されること

が明らかとなり、前節の結果をさらに裏付けることとなった。またシコクビエは Propanil 加水分解能を有しておらず、ほかの機構により抵抗性を示していることが推察された。

#### 第2項 Propanil 加水分解酵素活性の基質特異性の植物種間差

Arylacylamidase の基質特異性の植物種間差について調べた。

(1) Arylacylamidase II の加水分解酵素活性を調べたところ、長時間の反応で見ると、シコクビエで活性が若干低いものの、3植物とも2, 5-DCAAを加水分解しており、次いで3-CAA, AAの順で分解した。

(2) Arylacylamidase I の加水分解酵素活性においてはイネだけが Propanil, 2, 3-DCPA及びPAをほぼ同程度に分解していた。

(3) 供試した植物の中でその Arylacylamidase II 活性は Arylacylamidase I 活性に比べて低く、1/100程度であり、Propanil 抵抗性に関与しているものとは考えられなかった。

#### 第3項 発育の進んだ植物における Propanil 加水分解酵素活性

Propanil に抵抗性を示した発育の進んだメヒシバにおける Propanil 加水分解酵素活性を調べた。

(1) メヒシバはタイヌビエ同様6葉期の茎葉のいずれの部位でも活性は検出されなかったが、イネは茎葉のいずれの部位でも Propanil を加水分解し、茎の加水分解酵素活性は葉の活性のほぼ2倍であった。

(2) メヒシバはその発育が進むに伴い Propanil に対し抵抗性を示してくるが、その機構に関し、発育が進むにつれ Propanil 加水分解酵素活性が現れてくる事実は見出されなかった。

#### 第4節 各種除草剤の酸アミド結合加水分解酵素活性の植物種間差

Naproanilide 及び MY-15 を用いてその殺草活性と加水分解能との関係を調

べ、Arylacylamidase の存在を広く検索し、植物の種特異性と薬剤との関わり合いを明確にすることを目的とした。

#### 第1項 Naproanilide 及び MY-15 に対する感応性の植物種間差

加水分解酵素活性と除草剤の殺草活性との関係を調べるための供試植物を選抜する目的で、イネ科植物及び広葉植物を用いて、広くその感応性を検索するとともに、C<sub>0</sub>O<sub>0</sub>H<sub>0</sub>体と親化合物との殺草活性の差異及び植物の感応性の植物種間差を調べた。

(1) 各種一年生植物に Naproanilide 及び MY-15 を根部処理したところ、その観察結果から、両薬剤に対してイネ科植物は比較的高い抵抗性を示したが、広葉植物は高い感受性を示し、後者にはホルモン剤特有の作用が見られた。

(2) 両薬剤及びそれらC<sub>0</sub>O<sub>0</sub>H<sub>0</sub>体の根部処理が植物の生育に及ぼす影響を詳しく調べたところ、抵抗性のイネ及びタヌビエと感受性のダイコンの間で両薬剤及びそれらのC<sub>0</sub>O<sub>0</sub>H<sub>0</sub>体に対する感応性に顕著な差が認められた。各薬剤とそれらのC<sub>0</sub>O<sub>0</sub>H<sub>0</sub>体の作用を比較すると、両薬剤とも抵抗性のイネ科植物では、若干の変化が認められる程度であるのに、ダイコンでは各薬剤及びそれらのC<sub>0</sub>O<sub>0</sub>H<sub>0</sub>体のどちらもホルモン剤特有の症状が見られ、その作用はC<sub>0</sub>O<sub>0</sub>H<sub>0</sub>体の方で強く現れた。薬剤間では MY-15 のC<sub>0</sub>O<sub>0</sub>H<sub>0</sub>体で作用が強かった。

(3) 両薬剤及びそれらC<sub>0</sub>O<sub>0</sub>H<sub>0</sub>体の茎葉部処理が植物の生育に及ぼす影響を調べたところ、イネとダイコンの間で新鮮重に根部処理ほどの顕著な変化は認められなかった。しかし感受性を示したダイコンではホルモンによる奇形化作用が強く現れたが、イネでは可視障害が全く認められず、薬剤に対する感応性に植物種間で顕著な差が認められた。

(4) Naproanilide 及び MY-15 は根部及び茎葉部両処理において、イネ科植物と広葉植物との間に高い選択性を有することが明らかとなった。

(5) 両薬剤ともに親化合物に比べ、C<sub>0</sub>O<sub>0</sub>H<sub>0</sub>体の方が作用が強いことが根部処

理で顕著に現れていることから、ダイコンでは親化合物からCOOH体への変化が活性化に結びついていることも推論されたが、親化合物と同様にCOOH体も、根部及び茎葉部両処理でイネ科植物と広葉植物との間に高い選択性を有することが明らかとなった。

## 第2項 Naproanilide 及び MY-15 の植物体内代謝から見た酸アミド結合の加水分解酵素活性の植物種間差

$^{14}\text{C}$ -Naproanilide 及び  $^{14}\text{C}$ -MY-15 の植物体内代謝を特に酸アミド結合の加水分解に注目して検討した。

(1) 両薬剤とも、親化合物の減少と対応して増加する origin を酸加水分解した結果や両薬剤のCOOH体の初期における増加から、代謝の一次反応は酸アミド結合の加水分解であることが明らかとなった。

(2) 酸アミド結合の各植物による加水分解を、両薬剤を用いて比較すると、イネ科植物のイネ、シコクビエ及びタイヌビエは、両薬剤とも同程度に強く加水分解していたが、ダイコンは、Naproanilide を強く加水分解するのに対し、MY-15 の加水分解は弱かった。

(3) 両薬剤は供試した植物の全てにおいて加水分解され、その後抱合反応が起ると推察されたが、植物体内のCOOH体濃度と殺草活性との間に明確な関係が見出せなかった。

(4) 以上のことから、イネだけでなくシコクビエやタイヌビエでも酸アミド結合を有した除草剤を短時間のうちに加水分解する Arylacylamidase を有していることが確認され、その酵素が Arylacylamidase I と異なる可能性が考えられた。

### 第3章 Propanil の吸収・移行に関する研究

除草剤の選択性が吸収過程に起因する例はいくつか存在する。中でも Barban (77,31)、チアジアゾール尿素(141)、オルベンカーブ(130)等の例や、Baker と Warren のキュウリとカボチャの接木実験の例(138,141)は、近縁の植物種間でも吸収に著しい種特異性が存在することを示している。

また除草剤の植物体内移動は apoplastic 移動と symplastic 移動に分けられている(18)。移行・分布過程に選択性の要因を持つ除草剤としては、Diuron、Linuron、Monuron 等の尿素系除草剤において、地上部から地下部への移行率の大小が関与するとしている例がある(40,138)。

Propanil は前述のごとく茎葉処理接触型除草剤として知られており、吸着に関する研究もあるが(34,52)、吸収過程の植物種間差に関して、竹松(17)らや足立ら(1)はイネ-ヒエ間で Propanil の吸収過程に差があり、このことが選択性発現の要因であるとしている。これに対し $^{14}\text{C}$ -Propanil を用いて、Yih ら(145)や山田ら(140)は植物種間で Propanil の吸収過程にほとんど差のないことを示している。別に石塚ら(67)は同様の植物種でヒエの方がイネより若干多く吸収することを示している。また移行性に関しては山田ら(140)の研究で Propanil は茎葉部内をほとんど移行しないとしている。これらの研究から Propanil 抵抗性の要因として吸収・移行過程が関係する可能性が推察された。

前章の植物体内代謝の研究から、イネ及びコムギは Propanil の酸アミド結合の加水分解能を有しており、それによる Propanil の解毒によって抵抗性を示していることが示された。しかしシコクビエの Propanil 抵抗性及びメヒシバが発育が進むに伴い抵抗性を獲得してくる機構は代謝によるものではないことが明らかとなった。そこでここではそれらの抵抗性機構を明らかにするために、薬剤の植物体内移動の視点から、 $^{14}\text{C}$ -Propanil を用いて、吸収・移行過程の種特異

性を検討した。

## 第1節 Propanil の吸収・移行の植物種間差

ここではシコクビエの Propanil 抵抗性に焦点を絞り、茎葉部及び根部浸漬処理における $^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収・移行特性を検討した。またこのとき種特異性を明確にする目的で、 $^{14}\text{C}$ -Propanil の濃度は植物の生育に影響を及ぼさない範囲を選んで検討した。

### 第1項 茎葉部浸漬処理における $^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収

#### 1. 目的

初めに生育試験における Propanil 茎葉部浸漬処理に対するシコクビエの抵抗性の要因をその吸収特性に求めた。

#### 2. 材料と方法

供試植物として自然光温室内（昼間 $25^{\circ}\text{C}$ 、夜間 $20^{\circ}\text{C}$ ）で水耕法により4葉期まで生育させたイネ、シコクビエ、タイヌビエを用いた。各植物の茎葉部を生育試験同様5000倍ネオエテリン液で洗浄後、 $8.49\ \mu\text{Ci}/\ell$ 、モル濃度にして $9.4 \times 10^{-6}\ \text{M}$ の $^{14}\text{C}$ -Propanil 水溶液（アセトン 1%を含む）に4時間まで浸漬した。浸漬部を水洗後、根部と茎葉部に分け、 $90^{\circ}\text{C}$ で1日乾燥させた。なお処理は人工気象室内（ $30^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度60%、 $15\ \text{klux}$  連続照射下）で行った。各試料は乾物重測定後、試料自動燃焼装置で燃焼させ、 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ にして吸収剤に吸収させ、液体シンチレーターを加えて、液体シンチレーションカウンターにより $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーを測定した。

#### 3. 結果

各植物の茎葉部からの $^{14}\text{C}$ -Propanilの吸収力は次式によって算出した。

吸収力 = 植物体に吸収された全放射エネルギー / 吸収部位 (茎葉部) の乾物重

各植物の茎葉部を $^{14}\text{C}$ -Propanilに所定時間浸漬したところ、いずれの植物もその吸収は浸漬時間とともに増加した。しかし $^{14}\text{C}$ -Propanilの吸収力には植物種間差があり、タイヌビエ>イネ>シコクビエの順で吸収しており、吸収開始4時間後では、シコクビエはタイヌビエの1/3、イネの1/2程度しか吸収していなかった (Figure 45) (70)。また茎葉部内 $^{14}\text{C}$ -Propanil濃度で表しても同様の傾向であった。

#### 4. 考察

茎葉部浸漬処理における $^{14}\text{C}$ -Propanilの吸収から見ると、シコクビエはタイヌビエに比べて $^{14}\text{C}$ -Propanilの吸収が極めて少なく、このことがシコクビエのPropanil抵抗性機構に関与していることが明らかとなった。なおこれまでYihら(145)や山田ら(140)は $^{14}\text{C}$ -Propanilを用いて、イネ-タイヌビエ間ではPropanilの吸収に差がないとしてきたが、本研究ではイネの方がタイヌビエに比べて吸収が少なく、 $^{14}\text{C}$ -Propanilを用いた石塚ら(67)、生育試験により調べた竹松ら(17)及び、後藤・佐藤の微量分析法により調べた足立ら(1)の結果を支持するものであった。研究者によってこのような差異が生じた原因として、イネ及びヒエの種内変異の可能性、山田らはオートラジオグラフ法を用いており、半定量的分析にとどまっていること、Yihらは慣行量付近の $^{14}\text{C}$ -Propanilを長時間処理しているため、Propanilに対して感受性のタイヌビエの吸収が少なくなった可能性、それに対し石塚らは、生育に影響のない濃度で処理していること等が考えられる。本研究においても、生育に影響のない濃度を選んでおり、



薬剤自体が吸収に影響を及ぼさないと推測される。従って本実験の結果は供試した植物の Propanil 吸収特性を表していると考えられる。また茎葉から根への移行率は、先の代謝試験からもわかるように、全体的に少なく、選択殺草作用に関与しているとは考えられなかった。

以上のことから、シコクビエの茎葉処理 Propanil 抵抗性は、茎葉からの吸収量が少ないことにより、茎葉における Propanil の蓄積が少ないことに起因していると考えられた。

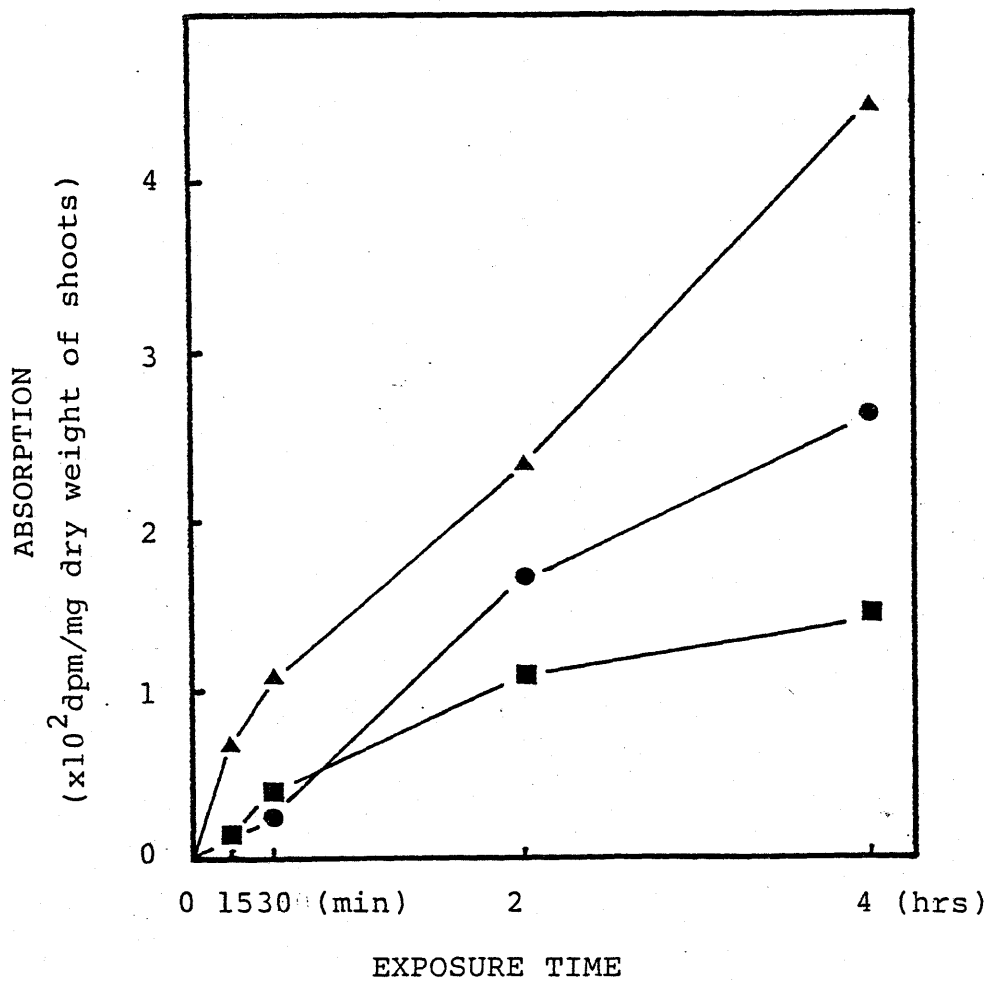


Figure 45. Absorption of <sup>14</sup>C-propanil by leaves of gramineous plants.

● rice    ▲ barnyardgrass    ■ finger millet

## 第2項 根部浸漬処理における $^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収・移行

### 1. 目的

生育試験における Propanil 根部浸漬処理に対するシコクビエの抵抗性の要因をその吸収・移行特性に求めた。

### 2. 材料と方法

供試植物として自然光温室内（昼間 $25^{\circ}\text{C}$ 、夜間 $20^{\circ}\text{C}$ ）で水耕法により4葉期まで生育させたイネ、シコクビエ、タイヌビエを用いた。各植物の根部を $8.83\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$ 、モル濃度にして $9.8 \times 10^{-6}\ \text{M}$ の $^{14}\text{C}$ -Propanil 水溶液（アセトン 1%を含む）に、生育試験と同様の方法によって48時間まで浸漬処理を行った。各試料は乾物重を測定後、試料自動燃焼装置で燃焼させ、 $^{14}\text{C}$   $\text{O}_2$ にして吸収剤に吸収させ、液体シンチレーターを加えて、液体シンチレーションカウンターにより $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーを測定した。

### 3. 結果

各植物の根部からの $^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収・移行は次式によって算出した。

吸収力 = 植物体に吸収された全放射エネルギー / 吸収部位（根部）の乾物重

移行率 = 移行した部位の放射エネルギー / 植物体に吸収された全放射エネルギー

各植物の根部を $^{14}\text{C}$ -Propanil に所定時間浸漬したところ、いずれの植物もその吸収は浸漬時間とともに増加した。しかし $^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収力には植物種間差があり、シコクビエ > タイヌビエ  $\geq$  イネの順で吸収しており、吸収開始48時間後では、シコクビエはタイヌビエやイネの2倍以上の $^{14}\text{C}$ -Propanil

を吸収していた (Figure 46)。しかし茎葉部への移行を見ると、シコクビエは初期には他の植物と同程度移行していたが、吸収開始 24 時間以降でイネやタイヌビエに比べ、薬剤の移行率は 1/2 以下になっていた (Figure 47)。また根部及び茎葉部内の  $^{14}\text{C}$ -Propanil 濃度を乾物重あたりで表すと、さらにそのことが明確になり、吸収開始 48 時間後では、根部内  $^{14}\text{C}$ -Propanil 濃度はシコクビエでタイヌビエやイネの 3 倍になっているのに対し、茎葉部内  $^{14}\text{C}$ -Propanil 濃度を見ると、シコクビエは初期には他の植物と同程度であったが、吸収開始 24 時間以降でイネ同様タイヌビエに比べ、薬剤の茎葉部内濃度が低くなっていた (Figure 48)(70)。

#### 4. 考察

根部浸漬処理における  $^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収特性から見ると、シコクビエはイネ、タイヌビエに比べて  $^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収力が極めて強かったが、茎葉部への移行率は、逆にシコクビエで他の 2 植物に比べて低かった。つまりシコクビエは Propanil を根中に多く蓄積し、茎葉部への移行が抑えられており、 $^{14}\text{C}$ -Propanil の茎葉中濃度が感受性のタイヌビエに比べて低くなっていた。Propanil の作用点として光合成以外に呼吸が考えられ、根の生育、機能を阻害する可能性がある。しかし生育試験でシコクビエが抵抗性を示したことを考え合わせると、Propanil は光合成を行っている茎葉への影響が強いことが推察され、根部から茎葉部への移行率が少ないことにより、作用点における Propanil の蓄積が少なくなることがシコクビエの根部処理 Propanil 抵抗性に関与していると考えられた。別に、山田ら(140)はイネ及びヒエを用いて、 $^{14}\text{C}$ -Propanil のスポット処理により、オートラジオグラフ法にて半定量的に分析した結果、Propanil は茎葉中をほとんど移行しないとしているが、本研究では根部から茎葉部へは多く移行しており、根部処理での移行の様相と茎葉部から吸収されたと

きの様相が異なる可能性もあり、今後詳細な検討を要する。

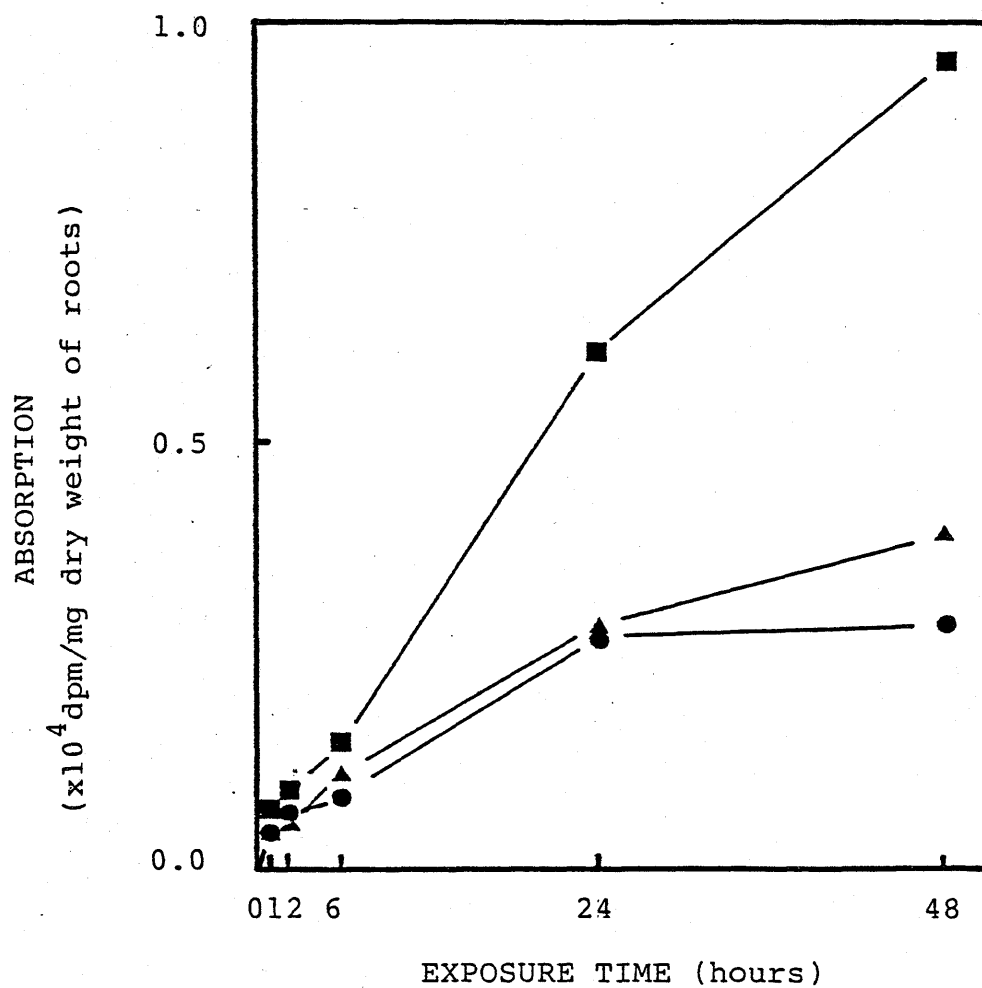


Figure 46. Absorption of <sup>14</sup>C-propanil by roots of gramineous plants.

● rice    ▲ barnyardgrass    ■ finger millet

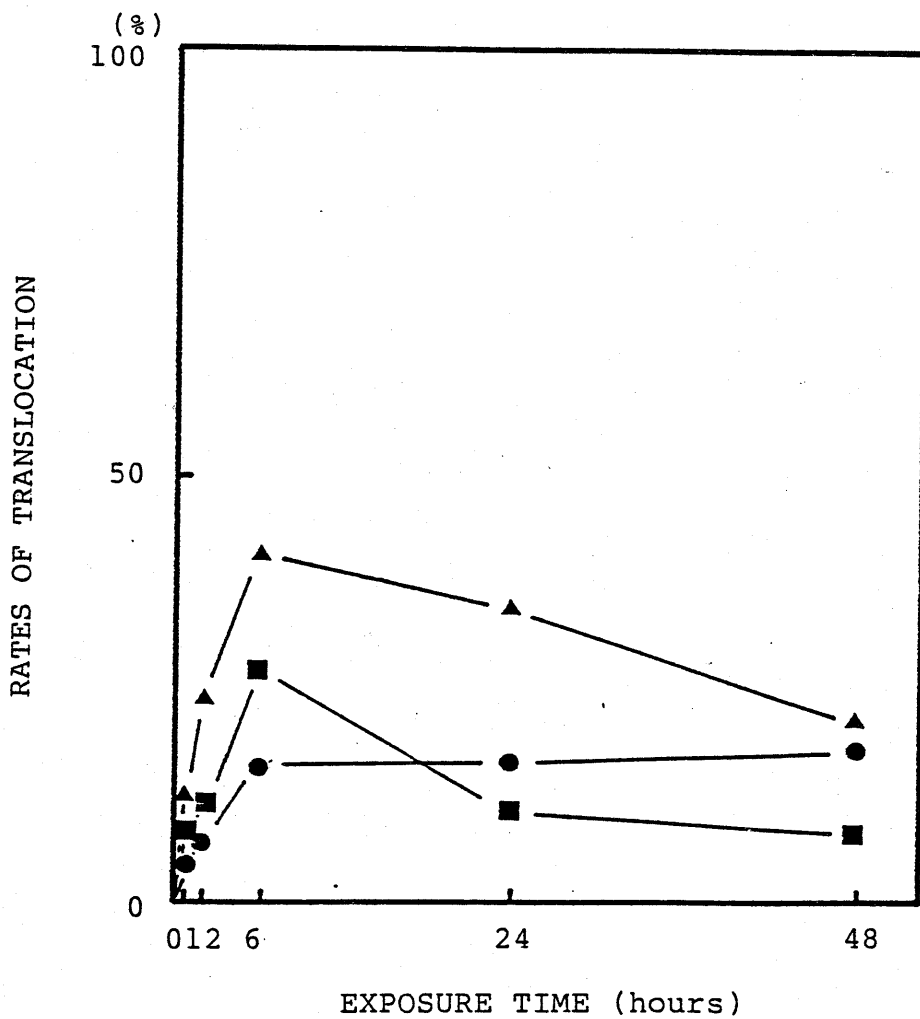


Figure 47. Translocation of root-applied  $^{14}\text{C}$ -propanil to shoots in gramineous plants.

● rice    ▲ barnyardgrass    ■ finger millet

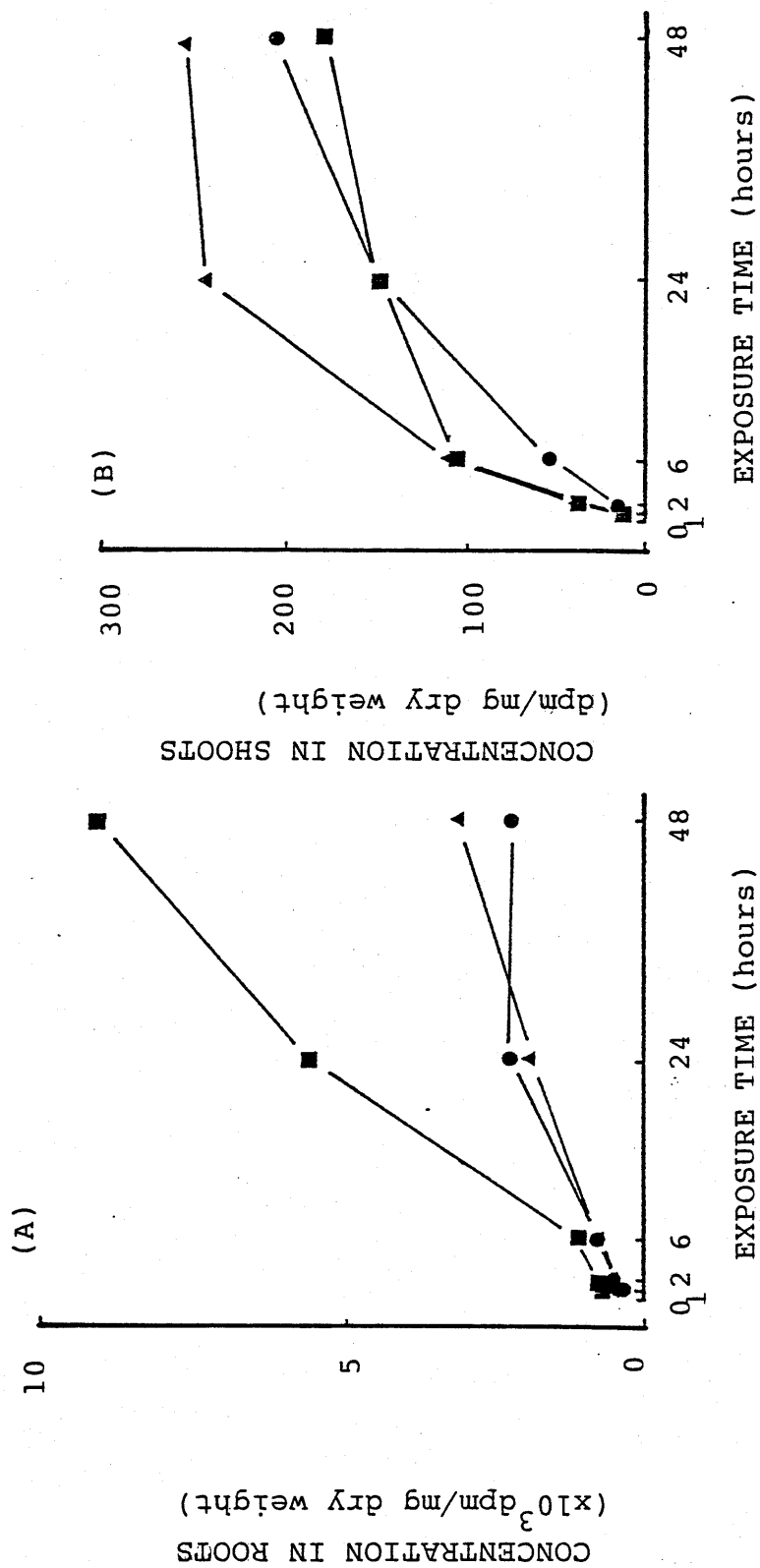


Figure 48. Changes in concentration of <sup>14</sup>C-radioactivity derived from root-applied <sup>14</sup>C-propanil in roots (A) and shoots (B) of rice, barnyardgrass and finger millet seedlings.



## 第2節 Propanil の吸収の齢による差異

### 1. 目的

メヒシバの発育が進むに伴い抵抗性を獲得してくることの要因を明らかにするために、特に茎葉部からの Propanil の吸収過程に焦点をしぼり、幼植物段階と発育が進んだ段階での吸収を調べた。

### 2. 材料と方法

供試植物として人工気象室内（昼間 25℃ 12 時間、夜間 20℃ 12 時間、相対湿度 60～70%）で水耕法により 3 葉期または 6 葉期まで生育させたイネ、メヒシバ及びタイヌビエを用いた。各植物の茎葉部を生育試験同様 10.59  $\mu\text{Ci} / 2\text{l}$ 、モル濃度にして  $5.9 \times 10^{-6} \text{M}$  の  $^{14}\text{C}$ -Propanil（アセトン 1% を含む）に前項の茎葉部処理と同様に 4 時間まで浸漬した。その後 3 葉期の植物は茎葉部全体を一括し、6 葉期の植物は茎葉部を上位葉・下位葉・茎の 3 部分に分け、前項の茎葉部処理と同様に各試料を試料自動燃焼装置で燃焼させ、 $^{14}\text{CO}_2$  にして液体シンチレーションカウンターにより  $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーを測定した。

### 3. 結果

メヒシバの茎葉部からの Propanil の吸収過程に焦点をしぼり、幼植物段階と発育が進んだ段階での吸収をイネ及びタイヌビエとともに調べた。茎葉からの  $^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収をみると、3 葉期の植物ではメヒシバ > タイヌビエ > イネの順で吸収していたが、6 葉期になると、植物間に吸収の顕著な差は認められなかった。また各植物ともに 3 葉期には、6 葉期よりも  $^{14}\text{C}$ -Propanil を多く吸収しており、齢による吸収の差はメヒシバにおいて顕著であった。また 6 葉期

における部位別の吸収量はいずれの植物でも、下位葉>上位葉>茎の順で高かった (Figure 49)。

#### 4. 考察

以上のことから先の加水分解酵素活性の結果と考え合せると、メヒシバが齢が進むにつれて抵抗性を獲得してきた要因は Propanil の加水分解能によるものでなく、莖葉からの吸収量が少ないことによることが推察された。またこのことは供試した植物において共通に言えることであり、植物の発育が進むに伴いその葉面構造または葉内及び細胞内の構成の変化が起ることが推察された。メヒシバにおいては、そのことによる吸収量の減少が、特に大きく、この事実がその抵抗性が齢の進行とともに、著しく増大することの原因となっていることが推察された。今後さらに Propanil と有機リン剤やカーバメート剤との関連をこの薬剤の植物体内挙動から総体的にとらえることが重要であるが、メヒシバが齢の進行につれて Propanil に対して抵抗性を獲得した要因は、松中(88)が想定したように Propanil 加水分解能が高くなり、Propanil を速やかに解毒することではなく、主として莖葉からの吸収量が少ないことが、その主要な要因であることが示唆された。また部位別の吸収量は、下位葉>上位葉>茎の順序で、この傾向は第1章第2節に、タイヌビエやメヒシバにおいて見られた Propanil の阻害程度と対応していた。

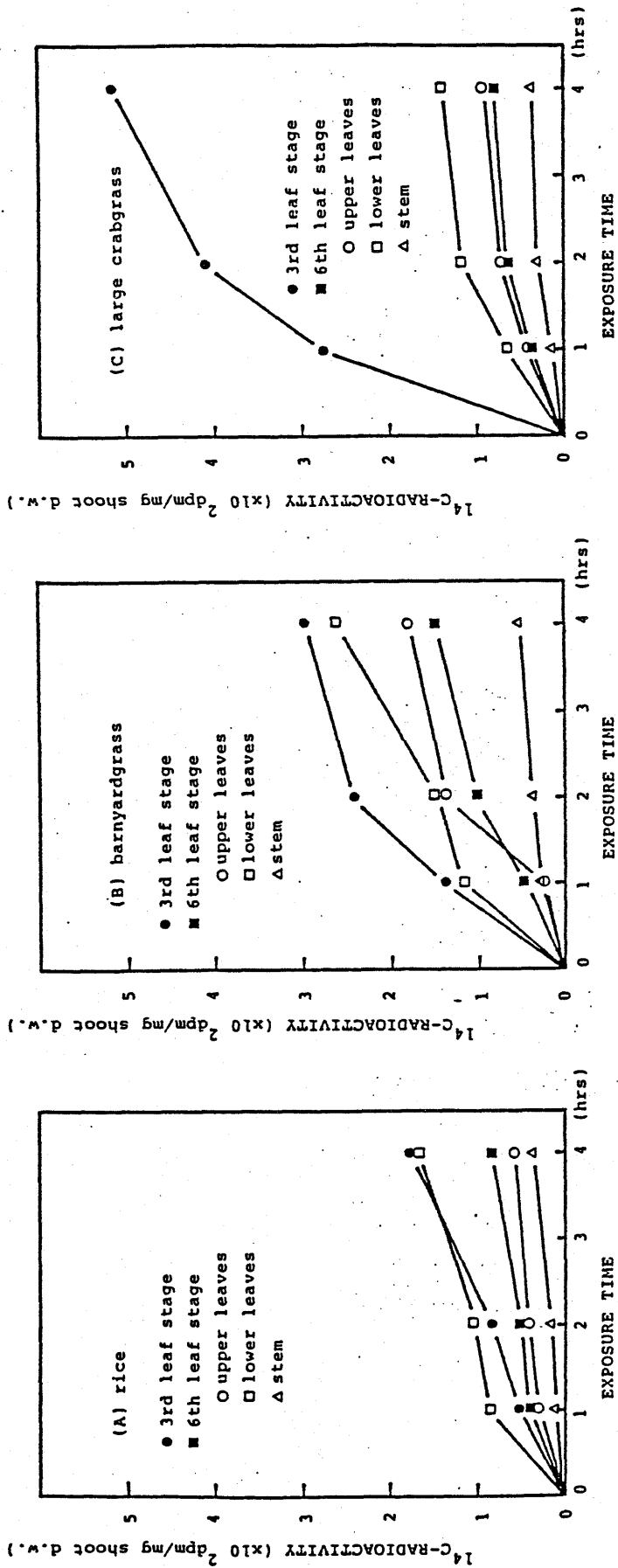


Figure 49. Changes in concentration of <sup>14</sup>C-radioactivity derived from foliar-applied <sup>14</sup>C-propanil of three gramineous plants at the 3rd and 6th leaf stages.

## 摘要

ここではシコクビエ及び発育の進んだメヒシバの Propanil 抵抗性機構を明らかにするために、薬剤の植物体内移動の観点から、 $^{14}\text{C}$ -Propanil を用いて吸収・移行過程の種特異性について検討した。

### 第1節 Propanil の吸収・移行の植物種間差

#### 第1項 茎葉部浸漬処理における $^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収

初めに Propanil 茎葉部浸漬処理に対するシコクビエの抵抗性の要因をその吸収特性に求めた。

(1)  $^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収力には植物種間差があり、タイヌビエ>イネ>シコクビエの順で吸収しており、吸収開始4時間後では、シコクビエはタイヌビエの1/3、イネの1/2程度しか $^{14}\text{C}$ -Propanil を吸収していなかった。

(2) 以上のことから、茎葉からの吸収量が少ないことによって茎葉中の Propanil の蓄積が少ないことがシコクビエの茎葉処理 Propanil に対する抵抗性の要因となっていると考えられた。

#### 第2項 根部浸漬処理における $^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収・移行

Propanil 根部浸漬処理に対するシコクビエの抵抗性の要因をその吸収・移行特性に求めた。

$^{14}\text{C}$ -Propanil の吸収力は、吸収開始48時間後の根中の $^{14}\text{C}$ -Propanil 濃度で表すと、シコクビエでタイヌビエやイネの3倍であった。またシコクビエの茎葉部内濃度は吸収開始24時間以降、イネ同様タイヌビエに比べ、低くなっていた。このことから、シコクビエは Propanil の根からの吸収量は多いが、根中に多く蓄積し、根部から茎葉部への移行率が少ないことが示され、茎葉中の Propanil の蓄積が少ないことがシコクビエの根部処理 Propanil 抵抗性を大き

くしていると考えられた。

## 第2節 Propanil の吸収の齢による差異

メヒシバの発育が進むに伴い抵抗性を獲得してくる要因を、特に茎葉部からの Propanil の吸収特性において調べた。

(1) 3葉期の植物では、 $^{14}\text{C}$ -Propanil をメヒシバ>タイヌビエ>イネの順で吸収していたが、6葉期になると、吸収に植物間の顕著な差は認められず、また各植物ともに、3葉期には6葉期よりも多く吸収していた。吸収の齢による差は、メヒシバにおいて特に顕著であった。いずれの植物でも、下位葉>上位葉>茎の順で吸収しており、タイヌビエやメヒシバにおいては、その傾向とPropanil の阻害程度、下位葉>上位葉>茎とが対応していた。

(2) メヒシバが齢が進むにつれて抵抗性を獲得してきた要因は Propanil の加水分解能によるものでなく、茎葉からの吸収量が少ないことによることが明らかとなった。

#### 第4章 植物代謝生理系に及ぼす Propanil の影響及びその挙動に関する研究

Propanil の作用として光合成のヒル反応の阻害が考えられている(17,23,27,32,41,46,49,58,59,98,99,101)。Nishimura と Takamiya (101)は Propanil の光合成阻害を明反応系のチトクローム  $b_{553}$  の還元として、また Bethlenfalvay と Castelfranco (23)はキノンとプラストキノンの間にあるとしてとらえ、Diuron と同じ作用点であるとしている。また Alsop と Moreland (15)は光合成電子伝達系に共役したATP生成も阻害することを示している。呼吸に関してもその阻害が認められており(33,49,58,60-62)、その阻害部位はチトクローム  $b$  からチトクローム  $c$  の間にあるとしている(60-62)。

Propanil の作用点は他にもいくつか見出されているが、タンパク質生合成阻害やRNA生合成阻害に関しては賛否両論存在している(49,86,96)。この他葉緑体膜の破壊(58)、膜透過性の増大(58)、蒸散流の減少(98)、染色体への影響(110,131)等様々考えられているが、これら作用点のうち主要なものは光合成と考えられている(132)。Propanil の光合成阻害に関しては抵抗性植物と感受性植物を用いて調べた例があり、Hofstra と Switzer (58)はトマト(抵抗性)とシロザ(感受性)を用い、松中(88,90)はイネ(抵抗性)とヒエ(感受性)を用い、それぞれ抵抗性植物でも処理後阻害を受け、その後の回復によって Propanil に対し抵抗性を示していると報告している。しかしこれらの研究では原因と結果の関係が明確にされていない。

本研究ではこれまで Propanil 抵抗性機構に関して、植物体内の薬剤挙動の面から検討し、シコクビエの Propanil 抵抗性は茎葉中に Propanil の蓄積が少ないことによることを示してきた。この章では、茎葉処理 Propanil に対するシコクビエの抵抗性機構を Propanil の存在量と阻害度との関係から研究する目的で、葉片及び葉緑体を用いて検討した。葉片は吸収過程の障壁が排除できるために、

薬物代謝を薬物による生理的变化との関連から遠やかに評価でき、他の生理的因子の影響を調べることも容易となる(77,81)。また葉緑体は光合成器官そのものであり、薬物の作用点との直接的な関わり合いを調べることができる。

そこで Propanil の抵抗性が吸収の差にどの程度起因しているかを、薬剤挙動と植物生理的反応、特に光合成の両面から確かめるとともに、さらには葉緑体との親和性と光合成の阻害との関連からも検討を加えた。

## 第1節 完全葉における莖葉部 Propanil 処理後の生理的变化

### 1. 目的

初めに Propanil を莖葉部浸漬処理した後の植物生理的变化を知るため、Propanil の作用点である光合成及び呼吸の経時的变化を葉片を用いて調べた。

### 2. 材料と方法

供試植物として自然光温室内（昼間 25℃、夜間 20℃）で水耕法により5葉期まで生育させたイネ、シコクビエ及びタイヌビエを用いた。各植物の莖葉部を  $4.59 \times 10^{-4}$  M の Propanil 水溶液（アセトン 1% を含む）に生育試験と同様の方法で90分浸漬し、水洗後再び水耕法で生育させた。

経時的に第5葉葉身の中肋及び縁を除いた中央部分から葉片（1 mm × 2 mm）を40枚切りとり、酸素電極（Y S I Model 53 Biological Oxygen Monitor）を用いて、光合成能及び呼吸能を測定した。切りとった葉片は直ちに反応液（0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ 、0.33 M Sorbitol、1.0 mM  $\text{MgCl}_2$ 、1.0 mM  $\text{MnCl}_2$ 、2.0 mM EDTA、50 mM HEPES NaOHでpH 7.2に調整）3 ml 中に入れ、減圧脱気することにより、気泡を取り除くとともに、葉片を反応液になじませ、溶存酸素濃度を40～60%飽和にした。セル内の温度を28℃に保ち、5分間前照射した後、10分間暗条件にし呼吸能を測定した。再び光を照射して光合成能を測定した。なお光源にはブロムランプ（35 klux）を用いた。光合成能及び呼吸能は溶存酸素濃度の増減から算出した(63)。なおここでの光合成能は $\text{O}_2$ の収支より求めた見かけの光合成量である。また Propanil を含まない水溶液（アセトン 1% を含む）で同様に処理し、経時的に光合成能を求め、それぞれの対照区とした。



### 3. 結果

各植物の茎葉を Propanil 水溶液に浸漬したところ、処理1時間後で、イネで若干程度が弱いものの、供試した植物全ての光合成能が阻害された。阻害度から見ると、阻害の少なかったイネでも対照区の活性の30%を割っており、ここでの光合成阻害の  $I_{50}$  は処理濃度  $4.59 \times 10^{-4} M$  以下であることが示された。また呼吸は3植物とも同様に阻害された。ここでの呼吸阻害の  $I_{50}$  も光合成同様処理濃度  $4.59 \times 10^{-4} M$  以下であることが示された。

次に光合成における阻害からの回復を見ると、イネでは速やかな回復を見せ、12時間から24時間の間にほぼ対照区と同程度の活性を示したのに対し、シコクビエでは処理後12時間以降に緩やかな回復を見せ、1週間後には対照区とほぼ同程度の活性を示していた。しかしタイヌビエでは48時間までほとんど回復の兆候を見せず、1週間後には完全にネクロシスを起していた。

一方呼吸における回復では、若干の差異はあるものの、3植物とも1時間後以降緩やかな回復を見せ、イネ及びシコクビエでは1週間後にほぼ対照区と同程度の活性を示していた。タイヌビエも24時間ころには50%ほどの回復を見せていたが、クロロシスが進行し、1週間後には測定不可能であった (Figure 50) (70)。

### 4. 考察

光合成能の阻害度に関し、イネは他の2植物に比べて阻害の程度が少ないが、3植物とも処理直後光合成が阻害されることから、光合成は植物種間に差があるものの、Propanil に対する感応性の如何に関わらず、Propanil によって阻害されることが明らかとなった。イネで若干阻害が弱い理由として、葉内の Propanil 分布、加水分解酵素活性及び作用点である葉緑体等に植物種間差がある可能性があり、さらに詳細に検討する必要がある。

次に光合成阻害からの回復を見ると、イネで速やかな回復を見せたのに対し、シコクビエでは緩やかな回復を見せた。イネにおける回復は Hofstra ら(58)や松中(88,90)による結果とよく一致した。このことから、イネが Propanil に対し抵抗性を示すのは、体内に侵入した Propanil が光合成を一時的には阻害するが、短時間のうちに阻害から回復するために、2次的影響や致死的影响を受けないことによると考えられた。またその回復の機構は本研究の第2章の結果と考えると、酸アミド結合の加水分解による解毒である可能性が高い。一方シコクビエでは第2章の結果から、回復の要因として、加水分解酵素活性をあげることができない。またシコクビエはイネと異なり、Propanil により光合成が48時間後までかなりの阻害を受けている。しかしその後回復することによって、イネには若干及ばないが、Propanil に対し抵抗性を示していると推察された。一方タイヌビエは完全にネクロシスを起しており、その光合成能が長期間阻害されることが、タイヌビエの枯死に至る原因となっていると推測された。これらイネ科植物の間での光合成阻害からの回復の差、特にシコクビエにおいて吸収の要因がこの回復にどの程度関与しているかを、作用点との関連からさらに詳細に検討することが Propanil 抵抗性機構の解明に重要であると考えられた。

一方呼吸では若干の差異はあるものの、3植物とも光合成同様の急激な阻害が見られたことから、その阻害は光合成同様 Propanil の直接的影響のように思われる。しかしその回復に関しては、3植物とも同様の緩やかな回復を見せたことから、Propanil の植物体内濃度の変化による直接的影響の他に何か要因があることが推察された。

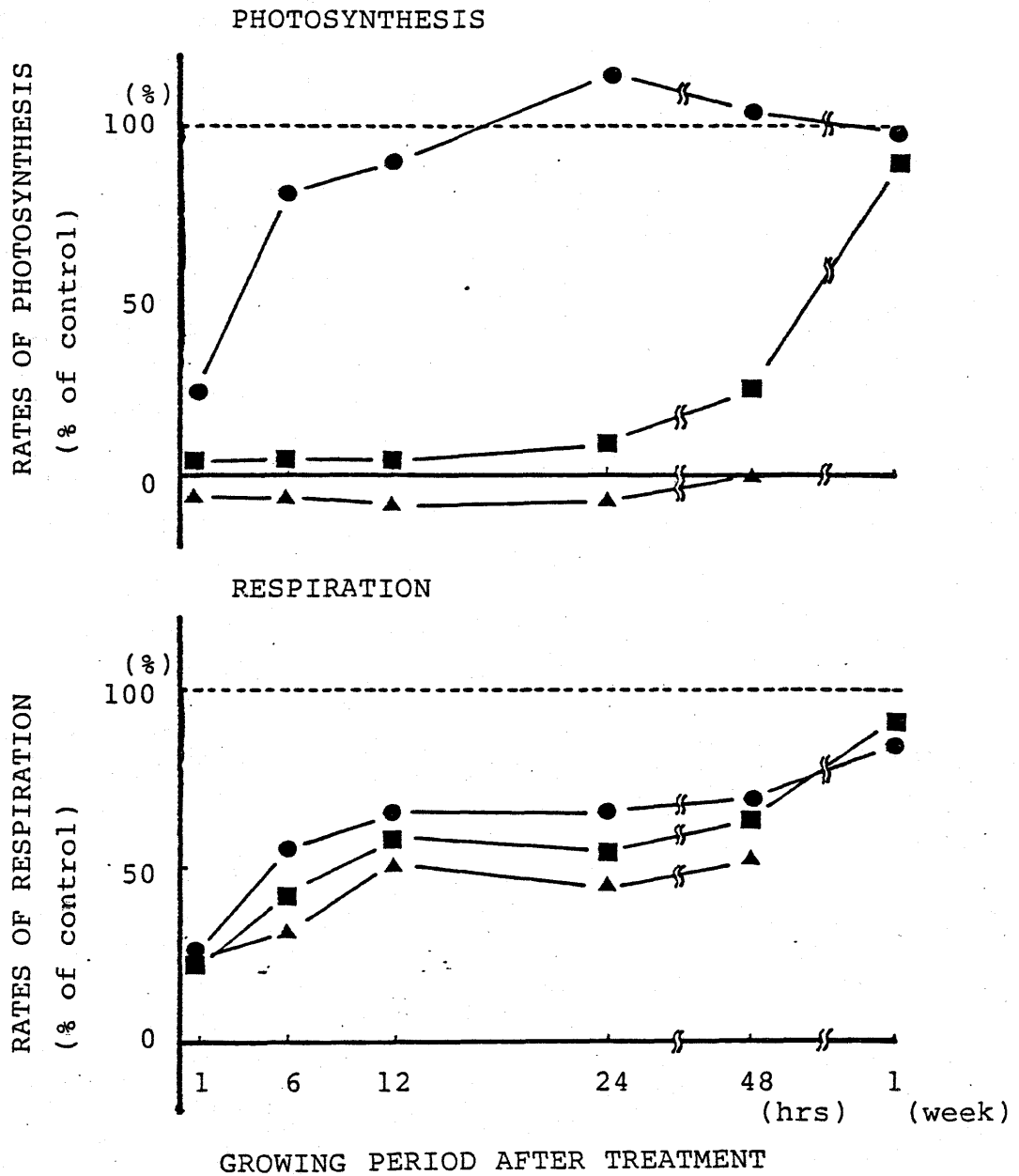


Figure 50. Effect of foliar-applied propanil on apparent photosynthesis and respiration of gramineous plants.

● rice    ▲ barnyardgrass    ■ finger millet

## 第2節 葉片における Propanil 処理後の生理的変化と薬剤挙動

これまでの結果からシコクビエの莖葉処理 Propanil 抵抗性の要因として吸収量が少ないことがあげられた。また完全葉で Propanil 処理後の生理的変化の観察から、シコクビエはイネ同様、光合成の阻害からの回復により抵抗性を示して行くことが明らかとなった。別に小林ら(77,81)は葉片を用いた Barban に関する研究の中で、完全葉による吸収には植物種間に差があっても、葉片にすると蓄積量に差がなくなるとしている。そこで吸収過程を排除した場合のシコクビエにおける Propanil 処理に対する生理的変化を明らかにするために、葉片に直接 Propanil を処理し、その光合成能に及ぼす影響を調べるとともに、Propanil の葉片における挙動も合わせて追跡した。

### 第1項 Propanil 処理後の光合成能の変化

#### 1. 目的

吸収過程を排除した場合の各植物における Propanil 処理に対する生理的変化を調べるために、葉片に Propanil を直接処理し、Propanil の主要な作用点である光合成に及ぼす影響を経時的に調べた。

#### 2. 材料と方法

イネ、シコクビエ及びタイヌビエは第1節に準じ、ほぼ1ヶ月生育させた。最上位展開葉の葉身の中肋及び縁を除いた中央部分から円形の葉片(直径 2 mm)を30枚打ち抜いた。打ち抜いた葉片は直ちに保存液(0.5 mM  $\text{CaSO}_4$ 、50 mM HEPES NaOHでpH 7.2に調整)5 ml 中に入れ、減圧脱気によって、気泡を取り除くとともに、葉片を保存液になじませた。その後室温

で蛍光灯下 (8 klux) に置き、処理の間及び処理後その状態を維持した。処理は Propanil を最終濃度で  $5 \times 10^{-5} M$  (エタノール 0.1%) 加えて開始した。10分、30分、1時間または2時間処理後、葉片をすばやく蒸留水で洗浄し、Propanil の入っていない HEPES 緩衝液に移した。0、1、3または6時間放置した後、葉片をすばやく蒸留水で洗浄し、反応液 3 ml 中に移し、第1節と同様に減圧脱気し、5分間前照射した後、10分間暗条件にし、再び光を照射し、酸素電極を用いて光合成能を測定した。セル内の温度は  $26^{\circ}C$  に保ち、光源にはブロムランプ (35 klux) を用いた。光合成能は溶存酸素濃度の増加から算出した(116)。なおここで求めた光合成能は見かけの光合成量である。また Propanil を含まない液で同様に処理し、その後放置して光合成能を求め、それぞれの対照区とした。

### 3. 結果

Propanil を10分間処理後、葉片を Propanil の入っていない HEPES 緩衝液に移した直後では、3植物とも光合成が阻害されたが、シコクビエやタイヌビエでは90%近く阻害されたのに対して、イネではその程度は弱く、約25%の阻害であった。その後の回復を見ると、イネでは処理後1時間以内にほぼ完全に回復したのに対して、シコクビエでは比較的緩慢な回復を見せていた。タイヌビエでも回復が見られたが、著しく遅かった (Figure 51(A))。

処理時間をさらに長くしたときの光合成阻害を見ると、シコクビエやタイヌビエでは特に2時間処理で、見かけの光合成量が負の値を示した。またイネでも最高50%まで阻害されたが、短時間処理のときと同様に、その阻害は他の2植物に比べて低いものであった。光合成の回復においても、イネではどの処理時間も、処理後短時間に著しい回復を見せたのに対して、シコクビエとタイヌビエでは処理時間を長くしてゆくと、両植物の間の差が次第になくなり、かつ回復もほとん

ど見られなくなった(Figure 51(B),(C),(D))。

#### 4. 考察

葉片を用い、完全葉の実験に用いた濃度の1/10濃度の Propanil による光合成阻害の変化を調べた結果、短時間内に顕著な阻害が現れた。

一方回復を見ると、10分処理においてのみ完全葉で見られた回復が観察されたが、処理時間をさらに長くしたとき、完全葉では緩やかな回復を示していたシコクビエでもタイヌビエ同様回復が著しく遅かった。葉片に処理したとき、Propanil の蓄積量の差がないと仮定すると、10分処理でのシコクビエ及びタイヌビエにおける回復の差は、処理後の Propanil の葉片内残存量の差、組織内分布の差、または作用点における Propanil に対する感受性の差等により現出している可能性が考えられる。しかし処理時間を長くすると、両植物とも著しく回復が遅くなり、植物種間の差がなくなることから、30分以上の長時間処理では Propanil の蓄積量が多いため、Propanil の葉片内残存量、組織内分布、または作用点の感受性の差等の要因では、調べた時間内で回復を現出できないと考えられた。このことから、完全葉における吸収量の差がシコクビエの Propanil 抵抗性の主要因であると推定された。しかしさらに Propanil の葉片内挙動との関連を詳細に調べ、完全葉における吸収量の差がシコクビエの Propanil 抵抗性にどの程度寄与しているかを検討する必要がある。

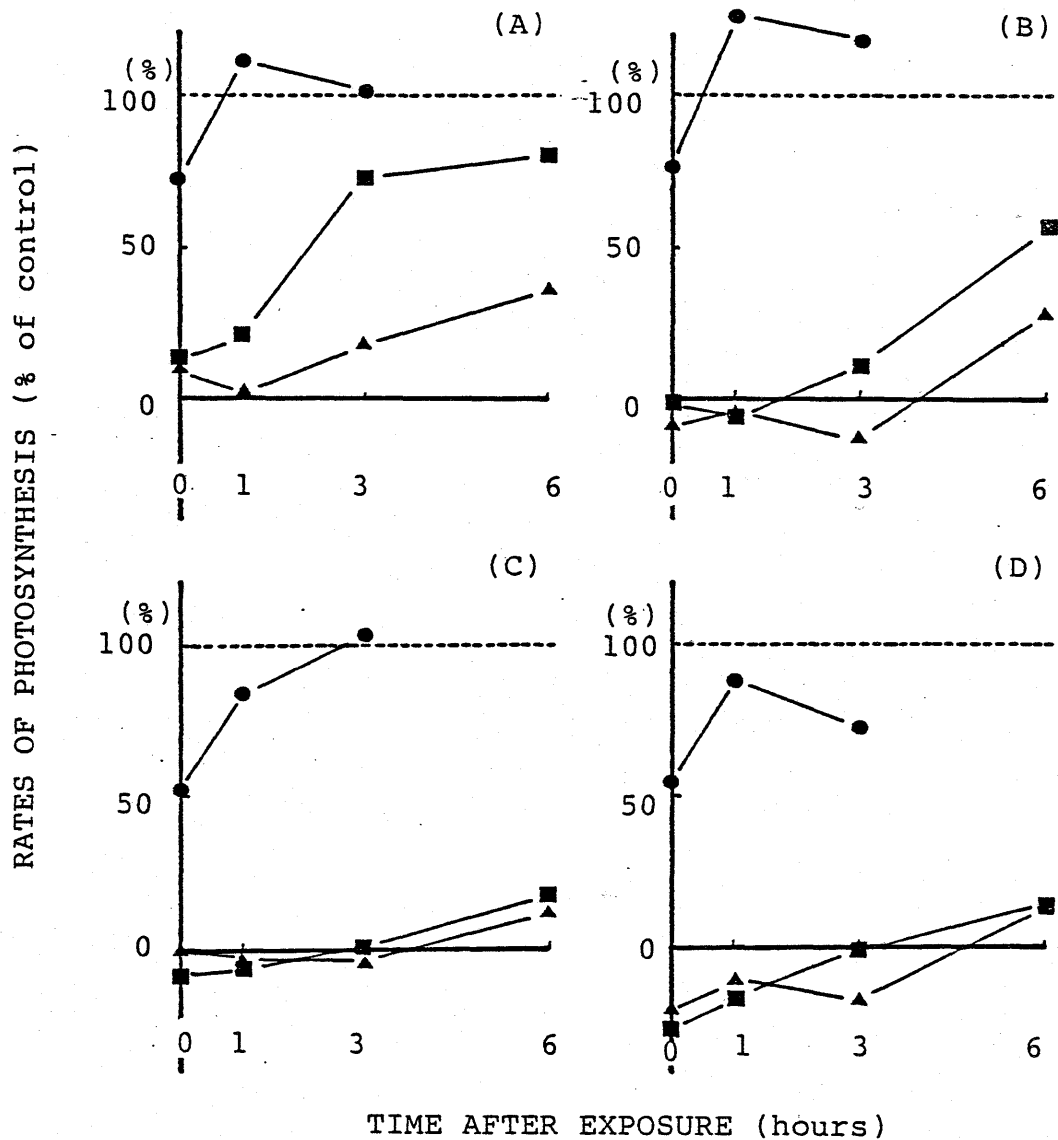


Figure 51. Apparent photosynthetic activities of leaf discs of gramineous plants exposed to propanil for different periods, i.e. (A) 10 min, (B) 30 min, (C) 1 hour and (D) 2 hours.

● rice    ▲ barnyardgrass    ■ finger millet

## 第2項 Propanil の葉片内濃度変化

### 1. 目的

前項での Propanil 処理に対する光合成能の変化を裏打ちする意味で、 $^{14}\text{C}$ -Propanil を用いてその蓄積・放出及び代謝について、特に光合成の回復に植物種間差が見られた短時間処理を中心に Propanil の挙動を調べた。

### 2. 材料と方法

#### 2-1. 葉片内残存 $^{14}\text{C}$ -放射能量の測定

供試植物としてイネ、シヨクビエ及びタイヌビエを用いて、前項と同様に調製した葉片を用いて、 $^{14}\text{C}$ -Propanil を前項と同様の方法で10分から2時間まで処理し、その後6時間まで放置して、葉片をすばやく蒸留水で洗浄後、試料自動燃焼装置で燃焼し、液体シンチレーションカウンターで葉片内に残存している全放射能量を測定した。

#### 2-2. 葉片内残存 $^{14}\text{C}$ -Propanil の定量

前項と同様に調製した葉片を用いて、 $^{14}\text{C}$ -Propanil  $5.5 \sim 5.9 \times 10^{-5}$  M水溶液で前項と同様の方法を用いて10分間処理し、その後 Propanil を含まない液に移して、0、1または6時間放置した後、葉片をすばやく蒸留水で洗浄後、90%メタノール中でガラスホモジナイザーを用いて磨碎・抽出した。その後の手続きは第2章第2節の方法に準拠した。薄層プレートはオートラジオグラフィをとるとともに、薄層をかきとり、試料自動燃焼装置で燃焼後、液体シンチレーションカウンターで放射能量を測定した。

### 3. 結果

$^{14}\text{C}$ -Propanil 10分処理で3植物ともその葉片内に同程度の $^{14}\text{C}$ -放射能



量の蓄積が起った。その後1時間以内に3植物ともその葉片から同程度の $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーの放出が起った。その後シコクビエ及びタイヌビエでは、緩慢な放出が見られたが、イネではほとんど見られなかった (Figure 52)。

$^{14}\text{C}$ -Propanil の処理時間を延長しても、処理直後、葉片内における $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーの蓄積に3植物間の差がなかった。しかし処理後 Propanil を含まない液に移したとき、 $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーの葉片内残存量に、植物種間で大きな違いがあり、イネでは多くの $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーが葉片内に残存していた。そしてその傾向は、処理時間の延長や処理後の放置時間の延長とともに顕著となっていた (Figure 53) (70)。

$^{14}\text{C}$ -Propanil 10分間処理での代謝を3植物で比較すると、 $^{14}\text{C}$ -Propanil の割合はイネで1時間以内に速やかに減少しており、それに伴って origin の $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーが特に増加していた。その後も親化合物は緩やかに減少し、origin の放射エネルギーはほとんど変化しないが、未抽出残渣の放射エネルギーがそれに伴い増加していた。これに対してシコクビエやタイヌビエでは若干の変化は見られるものの、全放射エネルギーのうちほとんどが親化合物である Propanil の形で存在していた (Figure 54) (70)。

#### 4. 考察

前項の研究では葉片における Propanil の蓄積量に植物種間差がないことを前提に光合成への影響を調べた。この項の $^{14}\text{C}$ -Propanil を取り込ませた結果からその前提が立証され、Barban (77,81)のみならず Propanil においても同様の結果が得られたことから、この仮説が広く除草剤に適用できる可能性が広がった。

一方葉片内全放射エネルギーと $^{14}\text{C}$ -Propanil の量との関連を見ると、 $^{14}\text{C}$ -Propanil を10分間処理した場合、イネで処理後1時間以降の $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーの放出が遅くなっており、処理後6時間ではシコクビエ及びタイヌビエのそれぞれ

れ 2.5 及び 2.9 倍であった。しかしイネでは $^{14}\text{C}$ -Propanil が速やかに代謝され、6 時間目の濃度は他の 2 植物に比べて極めて低くなっていた。従って葉片においてイネで光合成阻害からの回復が早いのは、完全葉同様の Propanil の不活性化によるものであることが明らかとなった。ここでの代謝産物はプロピオン酸由来のものであること、また Propanil はイネ体中で速やかに加水分解されることから、葉片においても完全葉と同様の反応が起り、その不活性化された代謝産物（ここでは origin や未抽出残渣）が、親化合物である Propanil よりも強固に吸着していると考えられた。一方、特に $^{14}\text{C}$ -Propanil 10 分処理で処理後の葉片内 $^{14}\text{C}$ -Propanil 濃度が同じでもシコクビエとタイヌビエの間で光合成阻害からの回復に差があったことから、Propanil の作用点との親和性等の植物種間差についても詳細に検討する必要がでてきた。

$^{14}\text{C}$ -Propanil の処理時間を延長すると、 $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーの蓄積の植物種間差がさらに顕著になること、またイネと他の 2 植物との間の光合成阻害からの回復の差も同様に大きくなることから、処理時間が長いときも、イネは他の 2 植物と異なり、短時間に Propanil が消失し、著しい回復を見せていることが推察され、イネでは Propanil 抵抗性機構の要因として、これまで提唱されてきた酸アミド結合の加水分解がその主要なものであることがさらに確かめられた。またシコクビエやタイヌビエではイネと比べて、 $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーの残存量が少ないものの、処理時間を長くするに伴い、その量が多くなっている。第 2 章の結果及び 10 分処理での代謝の結果を考え合せると、両植物で残存している $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーのほとんどが Propanil であると考えられた。従って処理時間が長いときには Propanil が多く蓄積するため、光合成が著しく阻害されるとともに、回復もほとんど見られなくなると推察された。

このように、シコクビエにおいて葉片を用いて、Propanil の体内含量を感受性のタイヌビエと等しくすると、短時間処理の場合を除き、Propanil の阻害が

ほぼ等しくなることが明らかとなった。従って、シコクビエにおいて Propanil の茎葉からの吸収量が少ないこと、及び根から茎葉への移行率が少ないことによる茎葉部における蓄積が少ないことが、Propanil 抵抗性機構の主要因であることがさらに明らかとなった。

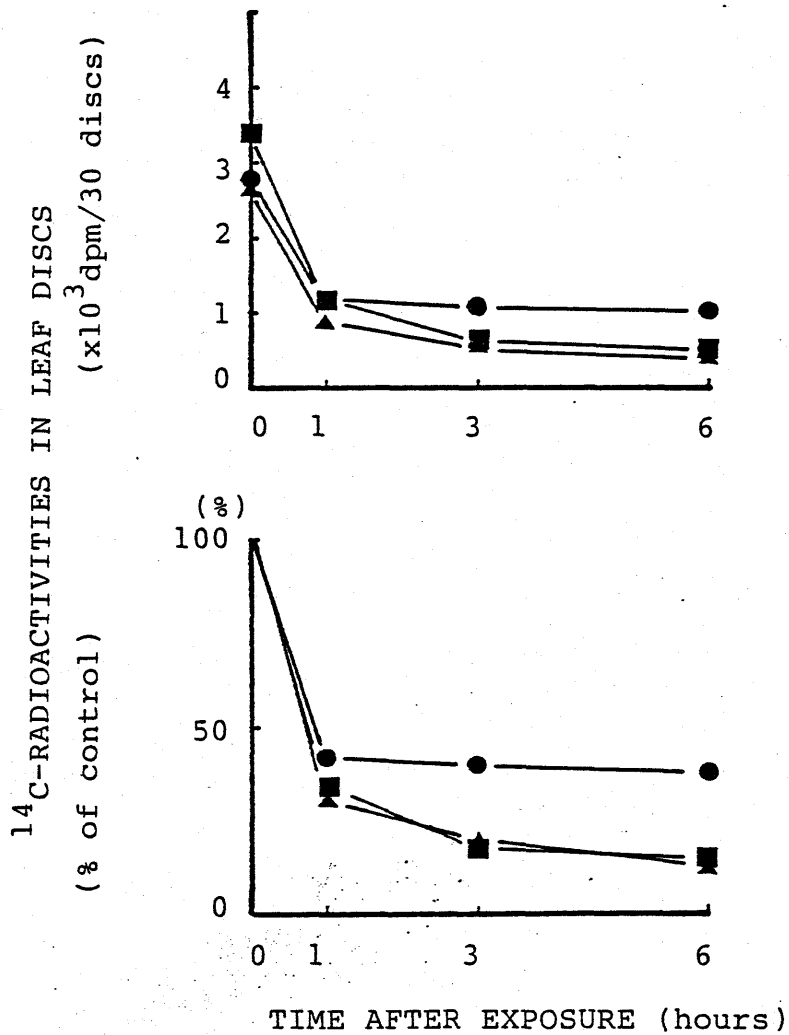


Figure 52. Changes in  $^{14}\text{C}$ -radioactivities in leaf discs exposed to  $^{14}\text{C}$ -propanil for 10 min.

● rice    ▲ barnyardgrass    ■ finger millet

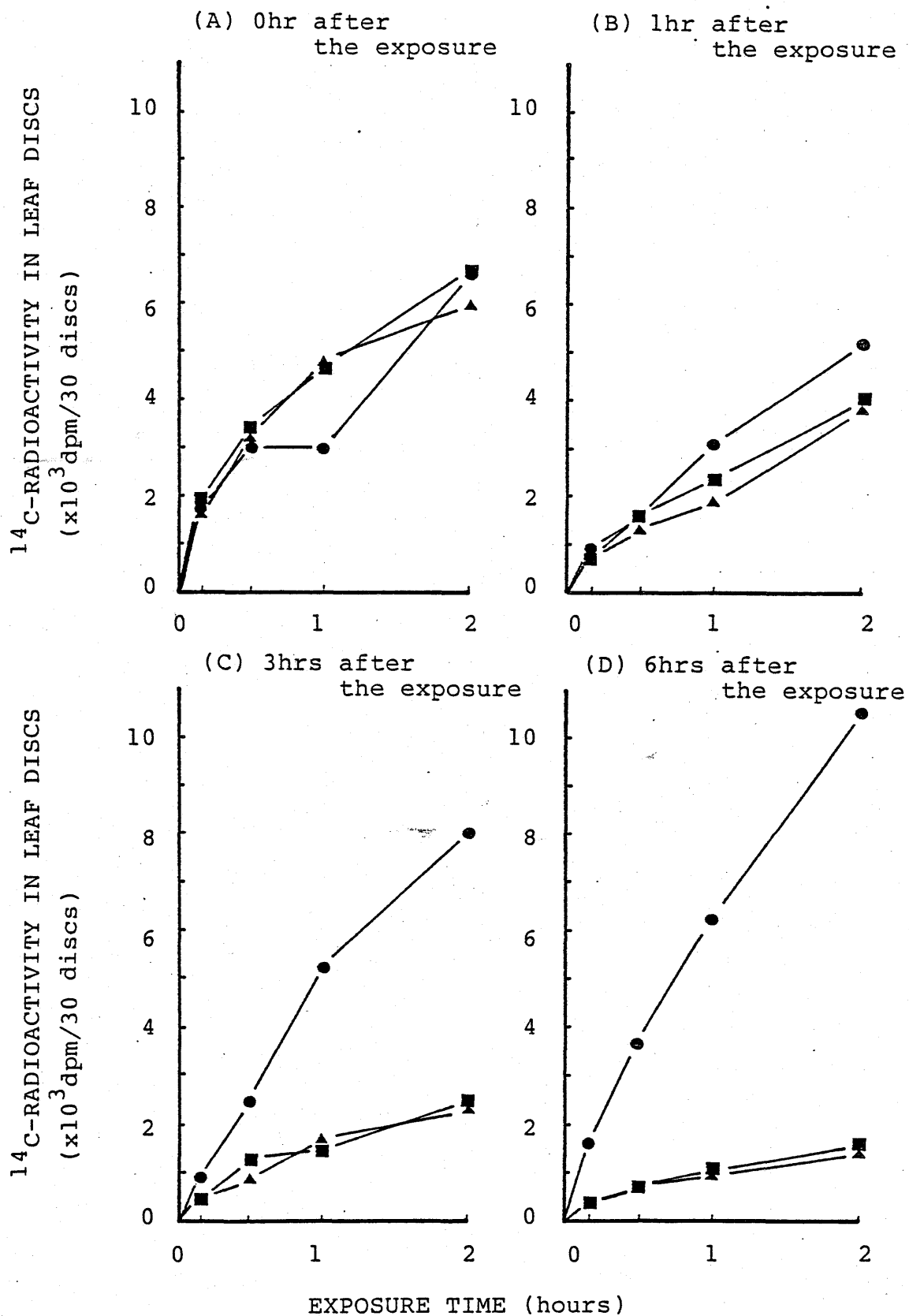


Figure 53. Remaining amounts of  $^{14}\text{C}$ -radioactivity in leaf discs exposed to  $^{14}\text{C}$ -propanil for various periods.

● rice    ▲ barnyardgrass    ■ finger millet

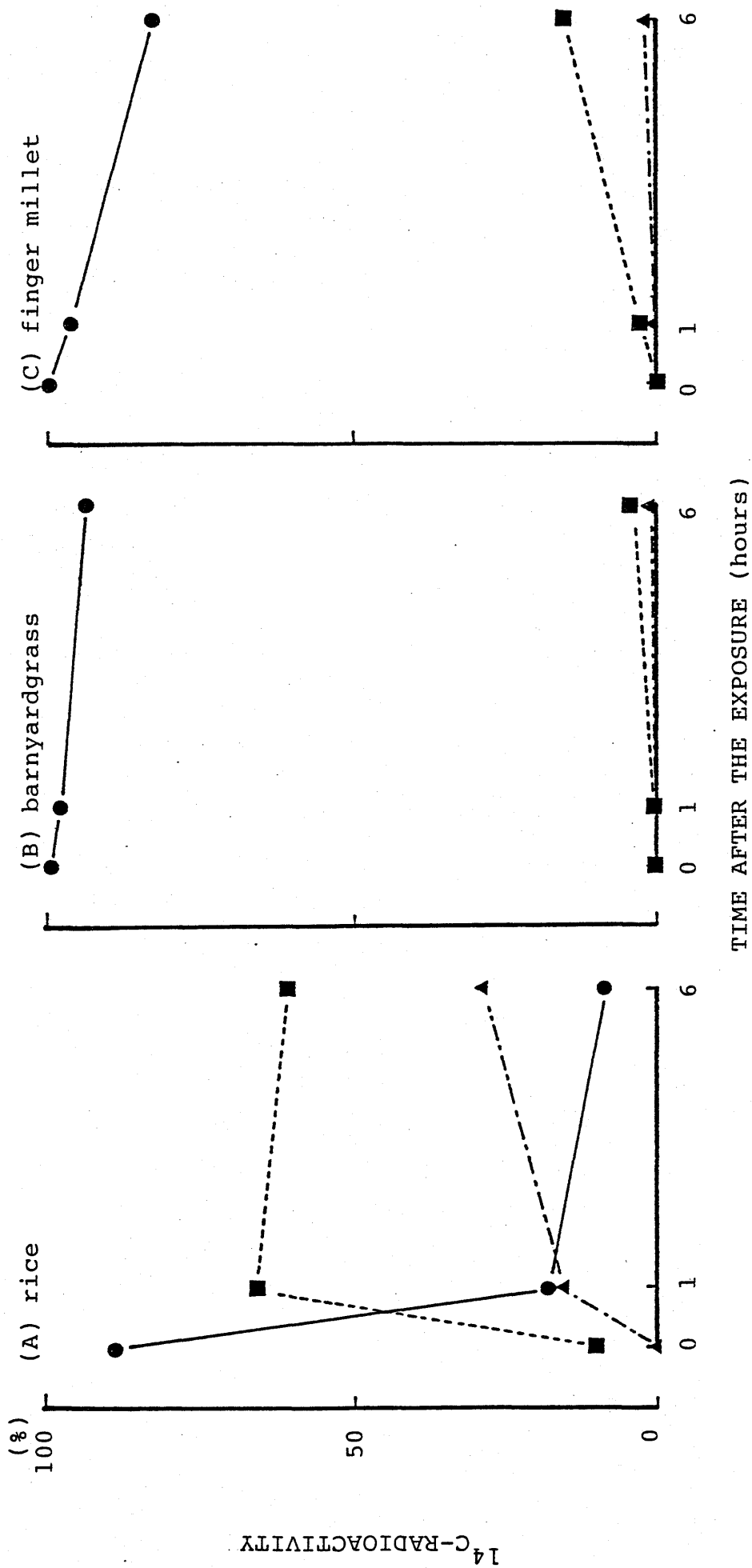


Figure 54. Changes in time course of  $^{14}\text{C}$ -radioactivities in leaf discs of rice, barnyardgrass and finger millet exposed to  $^{14}\text{C}$ -propanil for 10 min.

### 第3節 Propanil の作用性及び作用点との親和性

光合成阻害活性を有する除草剤を用いて、その阻害活性または阻害部位を葉緑体により調べた例は多く(17,18,22,23,27,31,41,46,48,50,58,72,93,97,101,103,108,112,113,115-119,125,126,134,135,149)、Propanil にもいくつか見られるが(17,23,27,32,41,46,50,58,93,99,101)、葉緑体との親和性を検索した例は限られている(108,117,125,126,134,135)。Tischer ら(125,126,135)は光合成阻害と葉緑体への吸着には明確な相関性があり、同じ吸着部位を共有する除草剤によってその親和性が著しく減少するとしている。この事実を捉え、Pfister ら(108)はトリアジン系の光合成阻害型除草剤アトラジンに対して抵抗性を有している *Senecio vulgaris* L. の種内変異は葉緑体にその吸着部位を持たないことで抵抗性を発現していることを明らかにしている。

ここではシコクビエの Propanil 抵抗性機構をさらに明確に捉える目的で、Propanil の作用点である光合成を司っている葉緑体に直接処理することにより、作用点における選択性の有無を阻害度と親和性の関係から検討した。

#### 第1項 葉緑体の光合成電子伝達系に及ぼす Propanil の影響

##### 1. 目的

葉緑体の Propanil 感応性に植物種間差が存在するかを調べる目的で、葉緑体を用いて Propanil の光合成電子伝達系阻害について検討した。

##### 2. 材料と方法

###### 2-1. 葉緑体の抽出

供試植物として自然光温室内(昼間25℃、夜間20℃)で水耕法により3～

4葉期まで生育させたイネ、シコクビエ及びタイヌビエを用いた。各植物の茎葉を蒸留水で洗浄後、細かく裁断し、乳鉢中で抽出液（0.4 M Sorbitol、10 mM  $MgCl_2$ 、10 mM NaCl、50 mM Tricine-NaOH pH 8.0）とともに磨砕した。磨砕液は直ちに4層ガーゼでろ過し、ろ液を1000×g、5分間遠心分離した。ろ液はさらに5000×g、10分間遠心分離した。沈殿は同じ抽出液に懸濁し、この懸濁液から残渣を取り除くために、再び300×g、2分間遠心分離した。なお全ての操作を0～4℃の温度範囲で行った(41,93)。クロロフィルの濃度は Arnon の方法によって測定した。

#### 2-2. 葉緑体における光合成電子伝達系の測定

光合成電子伝達系の測定はメチルビオロゲン (MV) による過酸化水素の形成の結果起る溶存酸素の減少を利用して行った。反応混液（31～35  $\mu g$  chlorophyll / ml、0.1 M Sorbitol、10 mM  $MgCl_2$ 、10 mM NaCl、2.0 mM  $NH_4Cl$ 、2.0 mM  $NaN_3$ 、0.1 mM MV、50 mM Tricine-NaOH pH 8.0）を26℃に保ち、光を照射して光合成を開始した(41,93)。なお光源にはスライドプロジェクター (mini CABIN、キャビン工業) の光源を用い、光強度は200  $\mu E / m^2 \cdot sec$  (LI-COR, Inc. quantitum model LI-1600 にて測定) であった。5×10<sup>-9</sup>～1×10<sup>-6</sup> Mの Propanil を最終濃度0.3%になるように加えて、光合成電子伝達系阻害度の測定を開始した。

#### 3. 結果

葉緑体の光合成に対する Propanil 阻害活性を調べたところ、供試したイネ、シコクビエ及びタイヌビエともに光合成が阻害され、それぞれ  $I_{50}$  は3.2×10<sup>-7</sup> M、3.7×10<sup>-7</sup> M及び2.8×10<sup>-7</sup> Mであり、植物種間に明確な差は見出されなかった (Figure 55)。阻害度を逆数プロットすると、供試した3植



物とも単相性の阻害であった (Figure 56)。Propanil の光合成電子伝達系の阻害度は次式により求めた(135)。この  $K_i$  で見ても、この 3 植物間で顕著な差はなかった (Table 8 次項に掲載)。

$$I = a / (K_i + a)$$

$I$  ; 阻害度 ( Propanil と吸着部位の複合体の濃度 ( $X_a$ ) / 特異的吸着部位の濃度 ( $X_t$ ) )

$a$  ; 吸着していない Propanil の濃度

$K_i$  ; 阻害定数

#### 4. 考察

このことから作用点である葉緑体に直接 Propanil を処理すると、Propanil に対する感応性の異なる 3 植物間に、光合成電子伝達系阻害程度の差異がなかった。従ってシコクビエの Propanil 抵抗性の要因として、作用点の差異は考えられなかった。一方 Propanil の光合成電子伝達系阻害の  $I_{50}$  は研究者によって多少の差があることから(27,32,41,46,50)、吸着との関連からさらに詳しく調べる必要が出てきた。

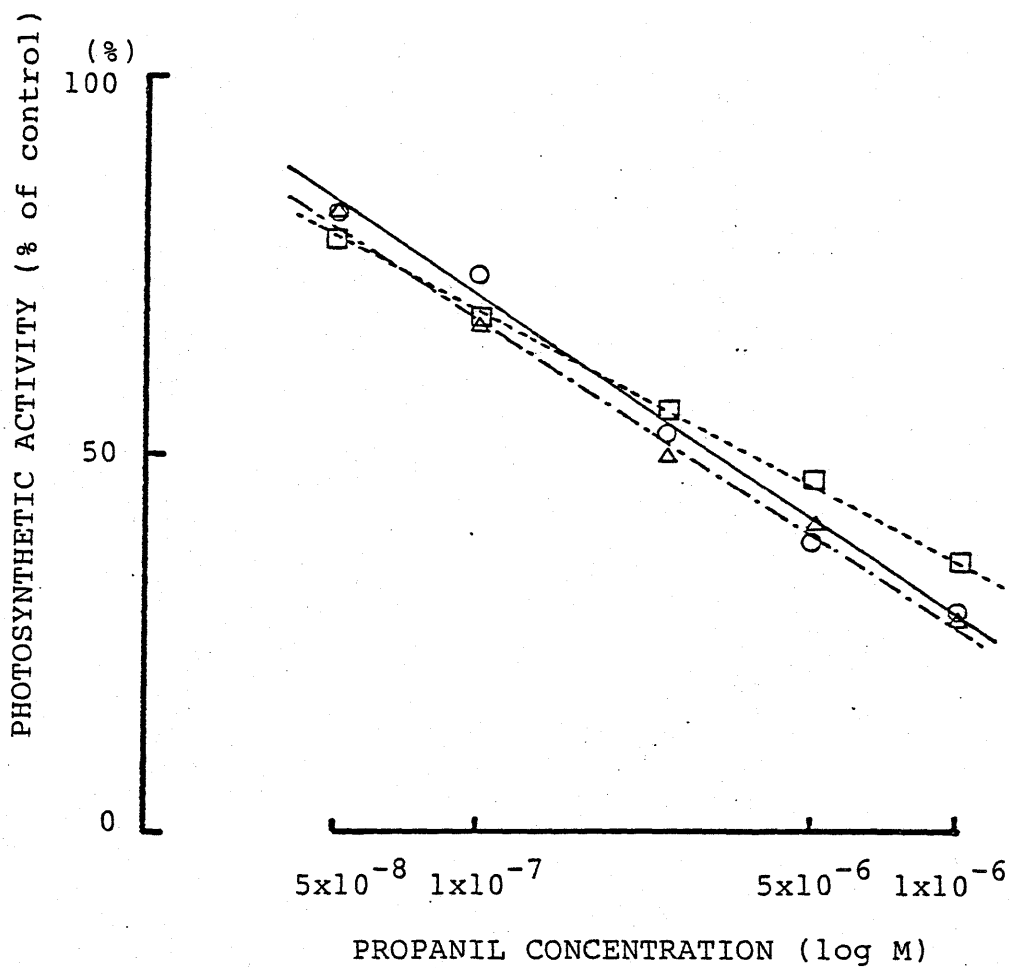


Figure 55. Effect of propanil on the whole chain of photosynthetic electron transport ( $H_2O \rightarrow MV$ ).

○—○ rice    Δ—Δ barnyardgrass    □—□ finger millet

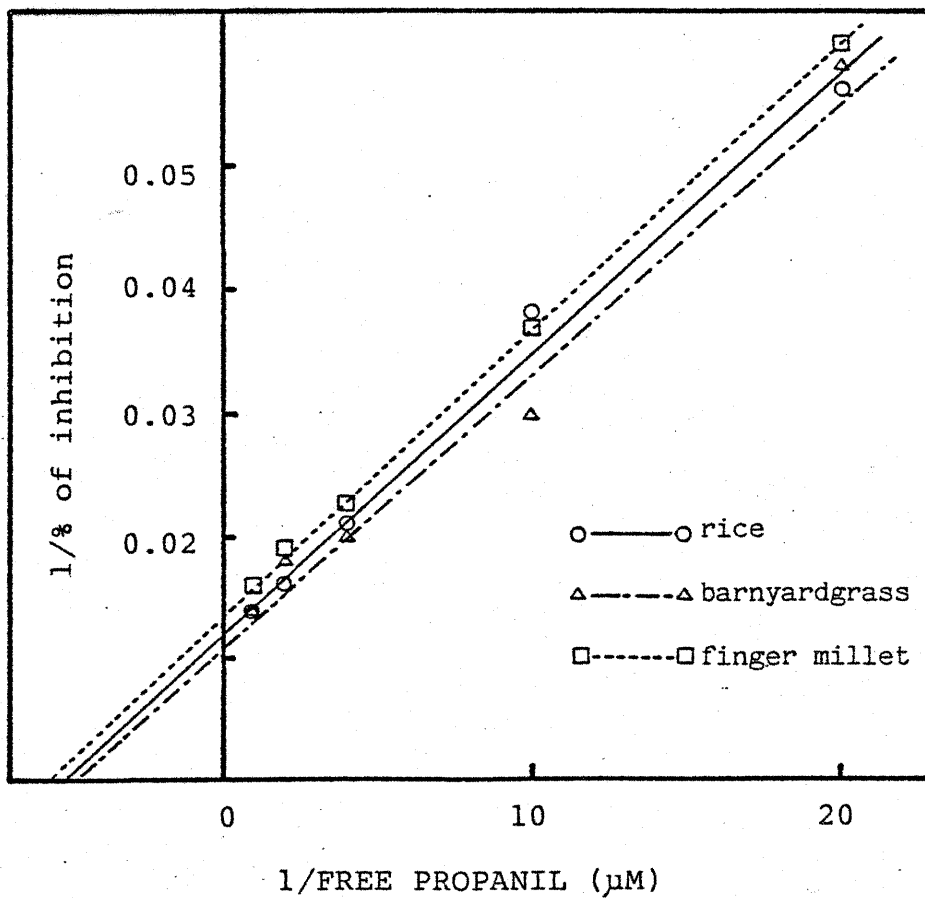


Figure 56. Double-reciprocal plots of inhibition of photosynthesis electron transport by propanil.

## 第2項 $^{14}\text{C}$ -Propanil の葉緑体への親和性の植物種間差

### 1. 目的

ここでは $^{14}\text{C}$ -Propanil の葉緑体への吸着を調べることにより、前項での結果と比較し、Propanil の光合成阻害と吸着度との関係から Propanil の作用点における挙動を詳細に検討した。

### 2. 材料と方法

前項と同様の方法で調製した葉緑体標品を用いて検討を行った。反応混液は  $\text{NaNO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、MVを除いたことの他は前項と同じものを用いた。全ての吸着実験は室温、蛍光灯下で行った。吸着反応は1mlの反応混液(86 $\mu\text{g}$  chlorophyll/mlを含む)に10 $\mu\text{l}$ の $^{14}\text{C}$ -Propanilを加えることにより開始し、添加後すばやく攪拌した。2分後に12000 $\times\text{g}$ で3分間遠心分離(Kubota KM-15200)し、上澄液の $^{14}\text{C}$ -放射エネルギー及び反応混液中の $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターで測定し、反応混液中の全放射エネルギーから上澄液の $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーを差し引き、葉緑体への吸着量を算出した(108,135)。

### 3. 結果

この吸着実験の操作中 $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーの消失はほとんどなかった。また2分から20分の吸着時間中に $^{14}\text{C}$ -Propanil の葉緑体への吸着量の変化は供試したイネ、シコクビエ及びタイヌビエのいずれにおいてもほとんど見られなかった(Figure 57)。

そこで2分間の吸着時間により、 $^{14}\text{C}$ -Propanil の葉緑体への吸着を検討したところ、 $^{14}\text{C}$ -Propanil の葉緑体への吸着量は与えた Propanil の濃度に比例して増加した。またその吸着の程度は Propanil の低濃度区では供試した3植

物の間で顕著な差はなかったが、Propanil の高濃度区ではイネが若干大きかった (Figure 58)。吸着に関わる逆数プロットをとると、Propanil の低濃度区における高親和性反応と Propanil の高濃度区における低親和性反応の二相性反応に分かれた (Figure 59)。前者から吸着定数 (K) 及び吸着部位の数を次式により求めたところ (135)、供試した 3 植物間に顕著な差は認められなかった (Table 8)。

$$X_a = X_t \cdot a / (K + a)$$

阻害定数 ( $K_i$ ) は理論上吸着定数 (K) と同じになるはずであるが、ここでは  $K_i$  と K はほぼ同じ値を示していた。しかし Propanil あたりのクロロフィル量はシコクビエやタイヌビエに比べ、イネで若干多かった (Table 8)。

#### 4. 考察

この結果と前項の結果とを合せて考察すると、第一に、Propanil の葉緑体への親和性及び光合成電子伝達系の阻害に供試した 3 植物は、Propanil に対する感応性が異なるにも関わらず、 $^{14}\text{C}$ -Propanil の葉緑体への吸着に顕著な差はなく、Propanil の選択性の要因として作用点を考えることはできなかった。第二にここで求めた Propanil の光合成電子伝達系の阻害定数 ( $K_i$ ) は Propanil の低濃度区における高親和性反応の吸着定数 (K) とよく一致しており、その  $I_{50}$  は約  $3 \times 10^{-7}$  M 付近であることがより確かなものとなった。さらにイネを除いた 2 植物では Propanil あたりのクロロフィル量は約 500 分子であり、光合成電子伝達系の活性中心あたりのクロロフィル量 (400~600 分子) と対応しており、このことを裏打ちしていた。しかしイネにおいて Propanil あたりのクロロフィル量がやや多いのは、Propanil 加水分解酵素と

の親和性が考えられるが、さらに詳細に検討する必要がある。

以上のことから、その親和性及び阻害度の両面から見ても、作用点である葉緑体と Propanil との間に顕著な植物種間差はないことが明らかとなり、従ってシコクビエでは、茎葉からの吸収が少ないこと、または根から茎葉への移行が少ないことにより、結果として茎葉部における Propanil の蓄積が少ないこと、またイネでは酸アミド結合の加水分解が Propanil 抵抗性の主要因であることがさらに明らかなものとなった。

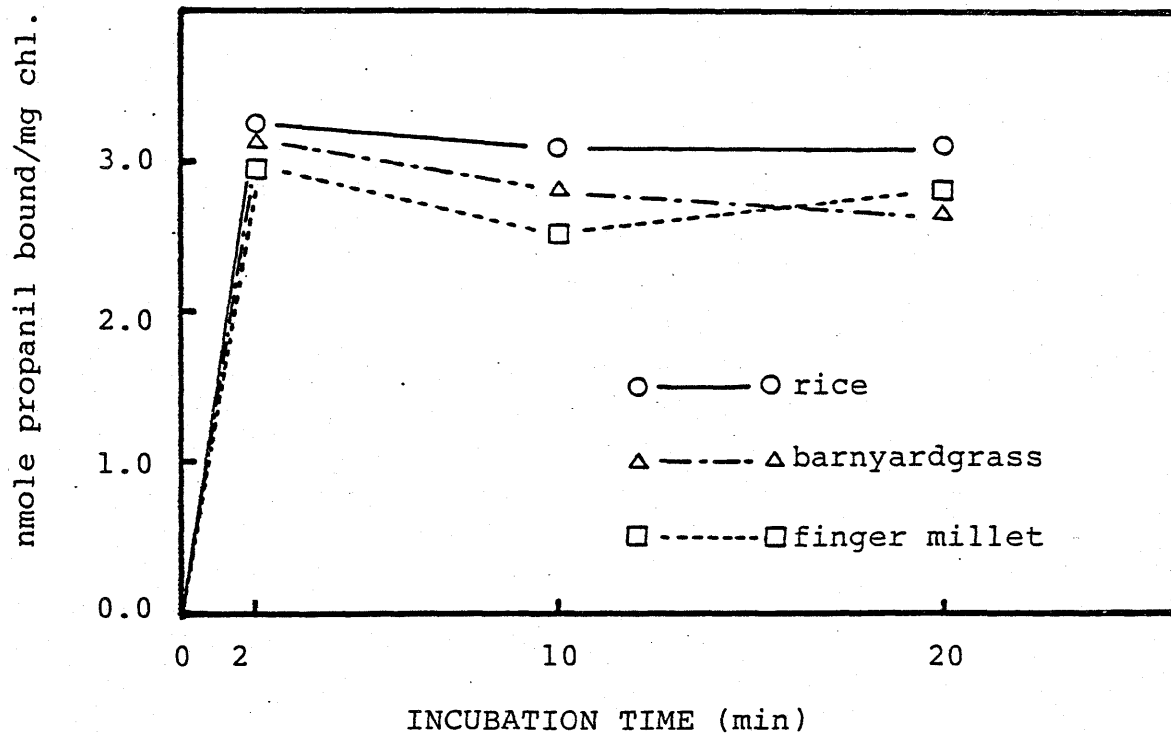


Figure 57. Relationship between incubation time and amounts of binding of  $^{14}\text{C}$ -propanil.

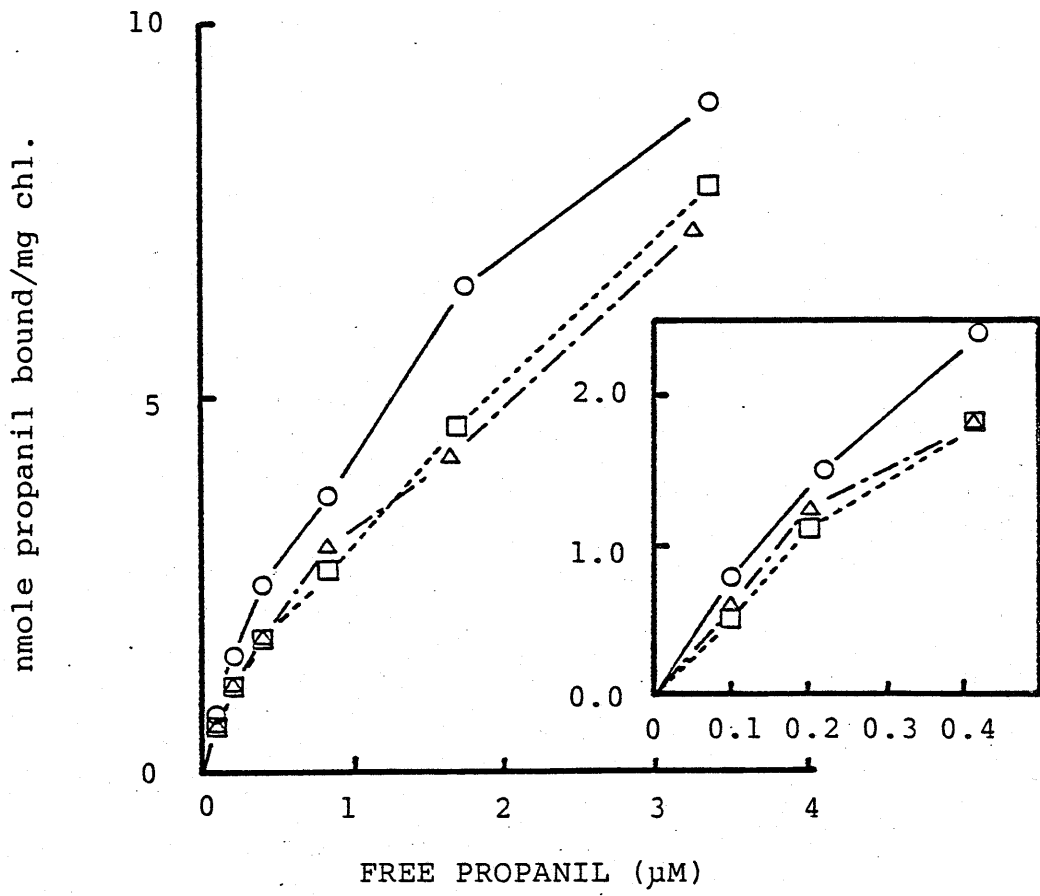


Figure 58. Binding of <sup>14</sup>C-propanil to chloroplasts of three gramineous plants.

○—○ rice    Δ—Δ barnyardgrass    □—□ finger millet



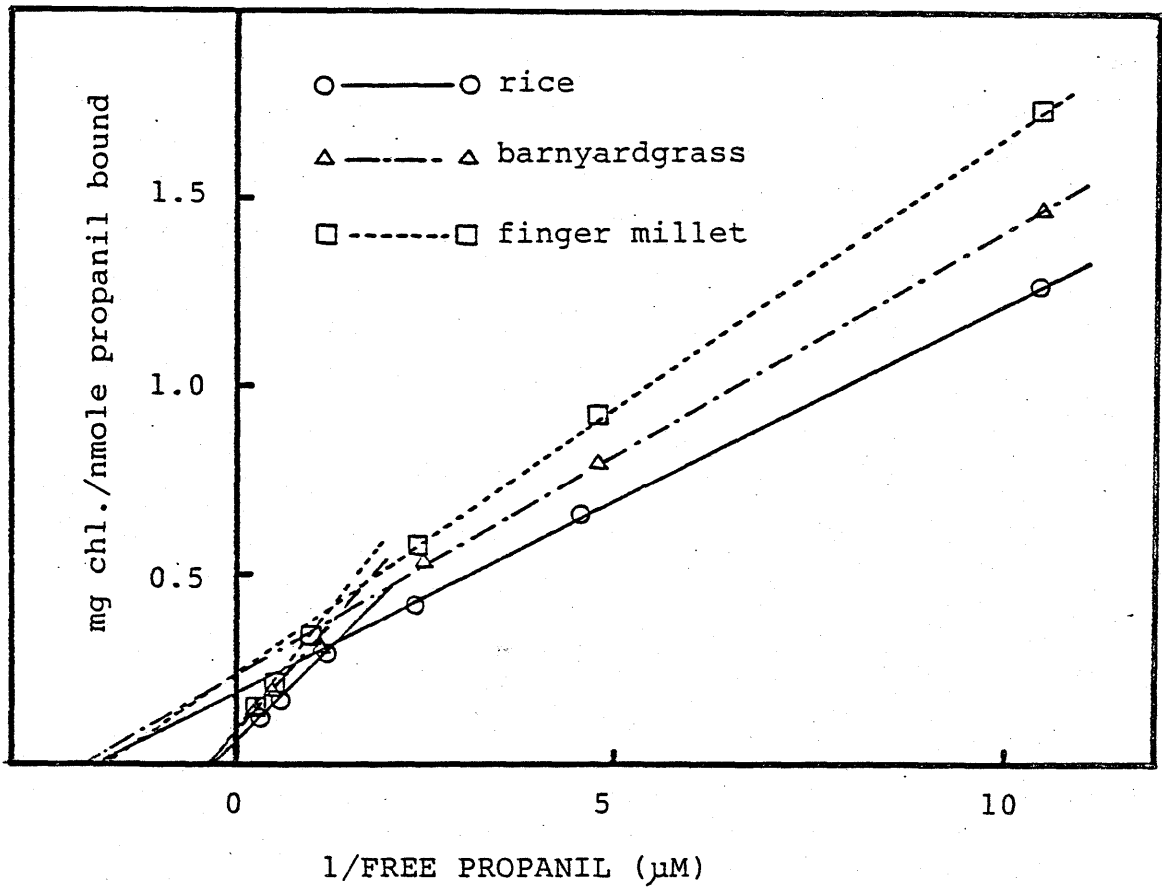


Figure 59. Double-reciprocal plots of binding of  $^{14}\text{C}$ -propanil to chloroplast of three gramineous plants.

Table 8. Calculated inhibition constant ( $K_i$ ), binding constant ( $K$ ) and number of binding sites ( $X_t$ ; chlorophyll per one bound inhibitor molecule) for propanil.

	Chloroplasts		
	Rice	Barnyardgrass	Finger millet
$K_i$ ( $\mu M$ )	0.38	0.42	0.34
$K$ ( $\mu M$ )	0.52	0.50	0.55
$X_t$ (chl./inhibitor)	658	520	500

Correlation coefficient were between 0.994 and 0.991 for inhibition study, and 0.999 and 0.984 for binding study.

## 摘要

ここでは茎葉処理 Propanil に対するシコクビエの抵抗性機構をさらに確かめるために、Propanil に対する植物生理的反応の観点から検討を加えた。

### 第1節 完全葉における茎葉部 Propanil 処理後の生理的変化

Propanil を茎葉部浸漬処理した後の光合成及び呼吸の経時的変化を葉片を用いて調べた。

(1) Propanil に対する感応性の異なるイネ、シコクビエ及びタイヌビエの3植物とも、Propanil 処理直後光合成が阻害されることが明らかとなった。光合成阻害からの回復を見ると、イネで速やかな回復を見せたのに対し、シコクビエでは緩やかな回復を見せた。

(2) イネにおける回復は酸アミド結合の加水分解による解毒である可能性が高い。一方シコクビエでは回復の要因として、加水分解酵素活性をあげることができなかった。

(3) 呼吸では3植物とも光合成と同様の急激な阻害が見られたことから、呼吸阻害は光合成と同様 Propanil の直接的影響と考えられたが、抵抗性の如何に関わらず、3植物とも同様の緩やかな回復を見せた。

### 第2節 葉片における Propanil 処理後の生理的変化と薬剤挙動

吸収過程を排除した場合のシコクビエにおける Propanil 処理に対する生理的変化を見るため、葉片に直接 Propanil を処理し、その光合成能に及ぼす影響を調べるとともに、Propanil の葉片における挙動も合わせて追跡した。

#### 第1項 Propanil 処理後の光合成能の変化

葉片に Propanil を直接処理し、Propanil の光合成に及ぼす影響を調べた。

(1) 葉片において完全葉の実験に用いた濃度の1/10の濃度の Propanil で短時間内に顕著な光合成阻害が現れた。しかしイネでは阻害が低かった。一方回復で見ると、10分処理においてのみ、完全葉で見られた回復が観察されたが、処理時間をさらに長くしたとき、完全葉では緩やかな回復を示していたシコクビエでもタイヌビエ同様著しく回復が遅かった。

(2) このことから、完全葉における吸収量の差がシコクビエの Propanil 抵抗性機構の主要因であることが推察された。

## 第2項 Propanil の葉片内濃度変化

$^{14}\text{C}$ -Propanil を用いてその蓄積・放出及び代謝について調べた。

(1) 葉片における Propanil の蓄積量に植物種間差がないという前提が広く除草剤に適用できる可能性が拡がった。

(2) 葉片内全放射エネルギーと $^{14}\text{C}$ -Propanil の量との関連を見ると、10分処理のとき、イネで処理後1時間以降の $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーの放出が遅くなっていたが、イネでは $^{14}\text{C}$ -Propanil は速やかに代謝され、6時間目の Propanil 濃度は他の2植物に比べて極めて低くなっていた。

(3) 処理時間を延長すると、 $^{14}\text{C}$ -放射エネルギーの蓄積の植物種間差がさらに顕著になることから、ここでも Propanil の植物体内代謝の差により、イネと他の2植物との光合成阻害からの回復の差が現れていると考えられた。

(4) 葉片においてイネの光合成阻害からの回復が速いのは、完全葉同様 Propanil の不活性化によるものであることが明らかとなった。

(5) 葉片においてシコクビエの Propanil 残存量がタイヌビエと同じとき、10分処理の場合を除いて、光合成阻害もほぼ等しくなることが明らかとなった。

(6) 以上のことから、シコクビエにおいて Propanil の茎葉からの吸収量が少ないこと、及び根から茎葉への移行率が少ないことによる茎葉中の蓄積が少ないことが、Propanil 抵抗性機構の主要因であることが明らかとなった。またイネ

では Propanil 抵抗性機構の要因として、酸アミド結合の加水分解がその主たるものであることがさらに確かめられた。

### 第3節 Propanil の作用性及び作用点との親和性

供試植物としてイネ、シコクビエ及びタイヌビエを用い、Propanil の作用点である光合成を司っている葉緑体に直接処理し、作用点における選択性の有無を阻害度と親和性の関係から検討した。

#### 第1項 葉緑体の光合成電子伝達系に及ぼす Propanil の影響

葉緑体を用いて Propanil の光合成電子伝達系阻害について検討した。

(1) イネ、シコクビエ及びタイヌビエともに光合成が阻害され、それぞれ  $I_{50}$  は  $3.2 \times 10^{-7} M$ 、 $3.7 \times 10^{-7} M$  及び  $2.8 \times 10^{-7} M$  であり、植物種間に明確な差は見出されなかった。阻害度を逆数プロットした (阻害定数)  $K_i$  で見ても、この3植物間に顕著な差はなかった。

(2) 葉緑体に直接処理すると、Propanil に対する感応性の如何にかかわらず、光合成電子伝達系の阻害程度はほぼ等しいことが明らかとなったことから、シコクビエの Propanil 抵抗性の要因として、作用点の差異は考えられなかった。

#### 第2項 $^{14}C$ -Propanil の葉緑体への親和性の植物種間差

$^{14}C$ -Propanil の葉緑体への吸着を調べた。

(1)  $^{14}C$ -Propanil の葉緑体への吸着量は低濃度区では供試した3植物で顕著な差はなかったが、高濃度区ではイネで若干大きかった。吸着に関わる逆数プロットをとると、Propanil の低濃度区における高親和性反応と Propanil の高濃度区における低親和性反応の二相性反応に分かれた。前者から吸着定数 ( $K$ ) 及び吸着部位の数に顕著な差は認められなかった。またここでは  $K_i$  と  $K$  はほぼ同じ値を示していた。

(2) Propanil の葉緑体との親和性及び光合成電子伝達系の阻害に供試した3

植物で、Propanil に対する感応性の如何に関わらず顕著な差はなく、選択性の要因として作用点を考えることはできなかった。

(3)  $K_i$  は  $K$  とよく一致しており、 $I_{50}$  は約  $3 \times 10^{-7}$  M 付近であることがより確かなものとなり、Propanil あたりのクロロフィル量は光合成電子伝達系の活性中心あたりのクロロフィル量と相応していた。

(4) 以上のことから、葉緑体と Propanil との間に顕著な植物種間差はないことが明らかとなり、シコクビエでは、茎葉からの吸収が少ないこと、または根から茎葉への移行が少ないこと、またイネでは酸アミド結合の加水分解が Propanil 抵抗性の主要因であることがさらに明らかなものとなった。

## 総合考察

農業は作物を様々な生物的害（害虫、病気及び雑草）から守り、農業生産性を高めることを目的として、経済性・社会性及び安全性を考え、開発が進められ、かつ使用されている。除草剤は雑草防除の中では化学的防除法に分類されており、同一圃場にある雑草を有用植物に害を与えないで死滅させる必要があり、実際は属間や種間の選択性が重要となってくる。

除草剤研究の目的は、ある環境の中で、本来植物が具備している多様な形質を、除草剤に対応し、発現してゆく機構を探ることにある。このような除草剤研究は選択性と作用性に大別できるが、これらを解析してゆくには除草剤の挙動を追跡し、個々の過程が作用発現に対してどのように関与しているかを調べてゆく必要がある。

Propanil はイネ耕地においてタイヌビエの防除を目的として開発されたた酸アミド系除草剤であり、茎葉接触型選択活性を有し、主に光合成を阻害するとされており、茎葉散布処理される。Propanil 散布後の挙動に関しては多くの研究があり、これまでの研究から、Propanil の選択作用性はその加水分解酵素の存在の有無による解毒反応の大小が作用点における Propanil の蓄積に差を生じることによると考えられている。しかし単に Propanil 加水分解能における差異だけでその選択作用性の全てを認識することは難しい。従ってそれらを植物の多様性から総合的に理解することが重要となってくる。

この考えに基づき、本研究では除草剤として世界的に汎用性の高い Propanil に対し抵抗性を有する植物をイネ科植物の中に検索し、その選択作用機構に関して比較生理生化学的に研究を進めた。特にここでは作用点における Propanil の蓄積に重点を置き、薬剤の植物体内挙動と薬剤に対する植物生理生化学的反應の両面から検討した。

第1に Propanil に対する感応性の植物種間差については、イネ科植物の中で、イネ以外にシコクビエ・コムギが Propanil に対し抵抗性を有することが明らかとなった。コムギは世界の主要な穀物の1つであり、シコクビエも青刈り作物として利用されている他、主食等に行っている国々もある。このような点からも、近縁の種に Propanil に対し抵抗性を示すことを見出したことは選択作用機構を研究する上で有効であるだけでなく、農業上重要な意義があると考えられる。

これら Propanil に対し抵抗性を有する植物の抵抗性機構を見ると、イネでは吸収量が少ないことも若干寄与していると考えられるが、完全葉のみならず、吸収に植物種間差のない葉片においても顕著な抵抗性を示し、そこでも Propanil が速やかに代謝されていた。このことから、イネでは従来提唱されてきている Propanil 加水分解酵素 Arylacylamidase I による分解がその抵抗性の主要因であることが明らかとなった。

またコムギでも吸収・移行過程等 Propanil の植物体内挙動を総体的に捉え、さらに詳細に検討することが必要ではあるが、イネ同様 Propanil 加水分解酵素がその抵抗性の要因に関与していることが明らかとなった。

しかしシコクビエでは、Propanil の植物体内代謝、Propanil 加水分解酵素活性及び他の除草剤の加水分解に着目した代謝能の3点から検討した結果、Naproanilide 及び MY-15 を加水分解する Arylacylamidase 活性は認められるが、Propanil 加水分解酵素は存在しないことが明らかとなった。これにより、さらに酵素化学的検討が必要ではあるが、Arylacylamidase の種特異性から見た植物の多様性と除草活性との間に新しい知見が得られた。さらには、除草活性を加水分解酵素活性との関連から調べたところ、ホルモン系除草剤の選択作用機構に新しい示唆が与えられた。シコクビエに関し、さらに植物体内挙動のうち吸収・移行過程に焦点を絞って検討したところ、シコクビエでは茎葉処理のときの吸収量が少ないこと、根部処理のときの根部から茎葉部への移行が少ないことが



示された。このことにより、結果として作用点である光合成器官としての葉緑体が存在する茎葉部内のPropanilの蓄積が少ないことが、シコクビエのPropanil抵抗性機構の要因になっていることが明らかとなった。また葉片に処理すると、吸収過程における要因が排除されるため、シコクビエのPropanil抵抗性が著しく低下することから、シコクビエでは吸収・移行過程にPropanil抵抗性機構の主要因があることが明らかとなった。加えて、葉緑体ではPropanilに対する感応性の如何に関わらず、一様に阻害を受け、このことをさらに確かなものとした。

第2にPropanilに対する感応性の齢による差については、メヒシバを中心に調べたところ、メヒシバの幼植物段階では生育地の違いに関わらずPropanilに対して感受性であったが、発育が進むに伴い抵抗性を示してくることが明らかとなった。またPropanilの茎葉からの吸収特性を見ると、Propanilに対する感応性の如何にかかわらず、その発育が進むに伴いPropanilの吸収量が減少し、特にメヒシバで顕著であった。またタイヌビエ同様メヒシバにおいても、発育の進んだ植物でもPropanil加水分解酵素活性を示さなかったことから、発育が進むに伴いPropanilの吸収量が減少することが、抵抗性の要因として大きく関与していることが明らかとなった。このことは防除に困難を極める発育の進んだ雑草の薬剤による化学的防除に大きな示唆を与えるものである。

以上のことから、Propanilに対する感応性の差について植物種間及び齢の違いから検討したところ、Propanil抵抗性機構の要因として吸収・移行過程の差が明らかにされたのは新知見であり、研究上だけでなく農業上からも重要なものと考えられた。

ここではPropanil抵抗性の植物種間差に関して薬剤挙動及び植物の生理的反応の両面から詳細に検討してきた。供試したイネ、シコクビエ及びタイヌビエにおいて、クロロフィル量から光合成電子伝達系の活性中心の量を算出し、活性中

心あたりの Propanil 量を概算した。

作用点である葉緑体においては Propanil の光合成電子伝達系阻害が  $I_{50}$  付近で、Propanil に対する感応性の完全葉における違いにかかわらず、活性中心の  $1/2$  の Propanil が存在しており、両者がほぼ対応していた。一方葉片や完全葉で葉緑体が均一に分布すると仮定すると、葉片による試験では、10分間処理で、回復の速かったイネは処理後6時間で活性中心あたり約  $1/5$  以下になっているのに対し、シコクビエやタイヌビエは Propanil と活性中心がほぼ同程度存在していた。さらに完全葉において  $5 \times 10^{-4} M$  の茎葉処理 Propanil (シコクビエは抵抗性を示し、タイヌビエが感受性を示す濃度) の吸収量から概算すると、タイヌビエでは活性中心あたり約5倍の Propanil が吸収されているのに対し、イネではその約3倍、シコクビエでは2倍以下しか吸収していなかった。従って葉片や完全葉では葉緑体と Propanil の存在比と阻害度との関係が必ずしも対応していなかった。明確な結論を出すにはさらに詳細に検討を要するが、このような観点から考えると、葉片や完全葉で Propanil がどのように分布・集積するかを阻害度との関連から解析することがシコクビエだけでなく発育の進んだメヒシバにおいても、その Propanil 抵抗性機構をさらに明確にしてゆく上で重要であることが明らかとなった。またこのように作用点における薬剤の存在量を、薬剤挙動と植物の反応との関連から検討した例は少なく、本研究は Propanil に限らず、除草剤と植物との相互作用を調べる上でも重要であると考えられる。

以上のことから、本研究は酸アミド系除草剤 Propanil の選択作用機構に関して、薬剤挙動と植物の反応との両面から総合的に解析することにより、第1に除草剤研究の面からは、選択作用機構に関わる研究の方向性を示し、第2に実用上では除草剤感応性の植物種間差の機構を知ることにより、現存する選択性や問題点を含む他の環境要因との関わり合いを解析し、迅速に対処するために有効に利用できるとともに、新規化合物の開発及び合理的防除法を確立してゆく上で重要な

示唆を与えるものと考えられる。

## 謝辞

本研究の遂行に際し、多くの方々から御指導・御助言及び御援助を頂いた。

本研究を遂行するにあたり日々御指導・御助言を賜り、また論文の作成にあたっても貴重な御意見・御助言を下さりました本学応用生物化学系教授石塚皓造博士に深く感謝申し上げます。また常に貴重な御助言・御協力を下さった本学応用生物化学系文部技官松本宏博士に深く感謝いたします。

本研究の標識化合物の合成にあたり御助言・御協力を下さった第一化学薬品株式会社の深作昇氏に深く感謝いたします。また標識化合物を提供して下さい了三井東圧株式会社及び三菱油化株式会社に深く感謝いたします。

終始、本研究の遂行及び論文の取りまとめにあたり、貴重な御指導と御助言を賜りました本学応用生物化学系教授太田安定博士に深く感謝申し上げます。

また本学植物制御研究室の諸先輩方ならびに同輩・後輩諸氏には絶えず御協力と御助言を頂き深く感謝いたします。

## 引用文献

- (1) 足立明朗・利根川和江・上島俊治：3,4-dichloropropionanilide の選択殺草作用に関する研究（第1報）植物体への浸透および解毒分解について 農薬生産技術 14,19-22(1966).
- (2) 足立明朗・利根川和江・上島俊治：3,4-dichloropropionanilide の選択殺草作用に関する研究（第2報）イネDCPA分解酵素について 農薬生産技術 15,11-14(1966).
- (3) 赤塚尹巳：顆粒結合酵素—アリルアシルアミダーゼI— 植物酵素・蛋白質研究法 蛋白質・核酸・酵素編集部 160-164(1970).
- (4) 赤塚尹巳：高等植物のDCPA（Propanil）分解酵素（aryl acylamidase）とDCPAによる選択性殺草機構 農薬科学 1,55-64(1973)
- (5) 赤塚尹巳：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 雑草研究 24,55-63(1979).
- (6) 赤塚尹巳・服部正裕：選択性除草剤に関する研究（第3報）メヒシバ（*Digitaria sanguinalis*）の2,4-dichloropropionanilide（2,4-DCPA）水解酵素に関する知見 茨城大学農学部学術報告書 17,49-52(1969).
- (7) 赤塚尹巳・笠倉紀夫：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 茨城大学農学部学術報告書 20,17-20(1972).
- (8) 赤塚尹巳・笠倉紀夫・副島正美：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とその類縁化合物の水解とDCPAによる殺草効果 茨城大学農学部学術報告書 21,43-48(1973).
- (9) 赤塚尹巳・三平房夫・正木武治：微生物の除草剤DCPA分解酵素に関する

- る研究 (第1報) 数種の *Paecilomyces* 菌種間の比較 茨城大学農学部学術報告書 20,21-23(1972).
- (10) 赤塚尹巳・大場達夫: 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 茨城大学農学部学術報告書 21,39-42(1973).
- (11) 赤塚尹巳・大関三男・鎌塚昭三: 選択性除草剤に関する研究 (第4報) 稲葉DCPA (Propanil) 水解酵素活度に及ぼす有機燐化合物の影響 茨城大学農学部学術報告書 18,23-27(1970)
- (12) 赤塚尹巳・鈴木光一・鎌塚昭三: 選択性除草剤に関する研究 (第2報) イネDCPA (Propanil) 水解酵素の部分精製と該酵素の性質 茨城大学農学部学術報告書 17,45-48(1969).
- (13) 赤塚尹巳・鈴木光一・副島正美: 選択性除草剤に関する研究 (第1報) 特に稲品種間DCPA (Propanil) 水解酵素活度の比較及び該酵素の性質 茨城大学農学部学術報告書 16,99-104(1968).
- (14) 赤塚尹巳・内山隆: 微生物の除草剤DCPA分解酵素に関する研究 (第1報) *Paecilomyces* sp. HUT 4017 の Aryl Acylamidase の部分精製と該酵素の若干の性質 茨城大学農学部学術報告書 21,49-52(1973).
- (15) Alsop, W. R. and D. E. Moreland: Effect of herbicide on the light-activated, magnesium-dependent ATPase of isolated spinach (*Spinacia oleracea* L.) chloroplasts. *Pestic. Biochem. Physiol.* 5,163-170(1975).
- (16) Arnon, D. I.: Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol.* 24,1-15(1949).
- (17) Ashton, F. M. and A. S. Craft: "Mode of action of herbicide" second Edition Wiley-interscience, 504pp (1981).

- (18) Audus, L. J. : ``The physiology and biochemistry of herbicide''  
Academic Press, 555pp (1964).
- (19) Bartha, R. and D. Pramer : Pesticide transformation to aniline  
and azo compounds in soil. *Science* 156,1617-1618(1967).
- (20) Bartha, R. : Biochemical transformation of anilide herbicide in  
soils. *J. Agr. Food Chem.* 16,602-604(1968).
- (21) Bartha, R. : Fate of herbicide derived chloroanilines in soil.  
*J. Agr. Food Chem.* 19,385-387(1971).
- (22) Bennoun, P. and Y-S. Li : New results on the mode of action of  
3,-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea in spinach chloroplasts.  
*Biochim. Biophys. Acta* 292,162-168(1973).
- (23) Bethlenfalvay, G. J. and P. A. Castelfranco : Enhancement of  
energy conservation by Hill reaction inhibitors in isolated  
spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fragments. *Weed Sci.* 26,  
84-89(1978).
- (24) Blake, J. and D. D. Kaufman : Characterization of acylanilide-  
hydrolysing enzyme(s) from *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Pestic.  
Biochem. Physiol.* 5,305-313(1975).
- (25) ボンゼ・メツラー : 薬物代謝 有吉敏彦・渡辺烈訳 朝倉書店  
176pp (1980).
- (26) Bordeleau, L. M. and R. Bartha : Ecology of a herbicide trans-  
formation : Synergism of two soil fungi. *Soil Biol. Biochem.* 3,  
281-284(1971).
- (27) Camper, N. D. and D. E. Moreland : Correlations between acidity  
of substituted phenylamides and inhibition of the Hill reaction.

- Biochim. Biophys. Acta 94,383-393(1965).
- (28) Chang, F-Y. ,G. R. Stephenson and L. W. Smith : Influence of herbicide on insecticide metabolism in leaf tissues. J. Agr. Food Chem. 19,1187-1190(1971).
- (29) Chisaka, H. and P. C. Kearney : Metabolism of propanil in soils. J. Agr. Food Chem. 18,854-858(1970).
- (30) Colby, S. R. and G. F. Warren : Selective action of solan on tomato and eggplant. Weeds 13,257-263(1965).
- (31) Darr, S., V. S. Machado and C. J. Arntzen : Uniparental inheritance of a chloroplast photosystem II polypeptide controlling herbicide binding. Biochim. Biophys. Acta 634,219-228(1981).
- (32) Declaire, M. and W. D. Cat : Rapid detection of microamounts of photosynthetic inhibitor herbicides by the inhibition of the light nitrite reduction. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 82 S. 310-314 (1977).
- (33) Ducruet, J. M. and C. Gauvrit : The effect of substituted urea herbicides on phosphorilant oxidations of mitochondria of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.) : comparison with the effect on liposomes. Weed Res. 18,327-334(1978).
- (34) Eberlein, C. V. and R. Behrens : Propanil selectivity for green foxtail (*Setaria Viridis*) in wheat (*Triticum aestivum*). Weed Sci. 32,13-16(1984).
- (35) El-Refai, A. R. and M. Mowafy : Interaction of propanil with insecticides absorbed from soil and translocated into rice plants. Weed Sci. 21,246-248(1973).



- (36) Engelhardt, G., P. R. Wallnofer and R. Plapp : Degradation of linuron and some other herbicides and fungicides by a linuron-inducible enzyme obtained from *Bacillus sphaericus*. *Appl. Microbiol.* 22,284-288(1971).
- (37) Engelhardt, G., P. R. Wallnofer and R. Plapp : Purification and properties of an aryl acylamidase of *Bacillus sphaericus*, catalyzing the hydrolysis of various phenylamide herbicides and fungicides. *Appl. Microbiol.* 26,709-718(1973).
- (38) Frear, D. S. : Herbicide metabolism in plants— I. Purification and properties of UDP-glucose : Arylamine N-glucosyl-transferase from soybean. *Phytochemistry* 7,381-390(1968).
- (39) Frear, D. S. and G. G. Still : The metabolism of 3,4-dichloropropionanilide in plants. Partial purification and properties of an aryl acylamidase from rice. *Phytochemistry* 7,913-920(1968).
- (40) 深見順一・上杉康彦・石塚皓造 : 薬剤抵抗性 ソフトサイエンス社 412pp (1983).
- (41) 深見順一・上杉康彦・石塚皓造・富沢長次郎 : 農薬実験法 3. 除草剤編 ソフトサイエンス社 499pp (1981).
- (42) 深見順一・上杉康彦・石塚皓造・富沢長次郎 : 農薬実験法 4. 環境科学及び分析編 ソフトサイエンス社 524pp (1981).
- (43) 船久保英一 : 有機化合物確認法 II 養賢堂 114-147(1969).
- (44) Gaynor, J. J. and C. C. Still : Subcellular localization of chicken kidney aryl acylamidase activity. *Biochem. J.* 186,507-513(1980).
- (45) Gaynor, J. J. and C. C. Still : Subcellular localization of

- rice leaf aryl acylamidase activity. *Plant Physiol.* 72,80-85 (1983).
- (46) Good, N. E. : Inhibition of Hill reaction. *Plant Physiol.* 36, 788-803(1961).
- (47) 後藤真康・佐藤六郎 : DCPA, MCPCAの微量分析法 農業生産技術 10,16-22(1964).
- (48) Gressel, J., Y. Regev, S. Malkin and Y. Kleifeld : Characterization of an s-triazine-resistant biotype of *Brachypodium distachyon*. *Weed Sci.* 31,450-456(1983),
- (49) Gruenhagen, R. D. and D. E. Moreland : Effect of herbicides on ATP levels in excised soybean hypocotyls. *Weed Sci.* 19,319-323(1971).
- (50) Hansch, C. and E. W. Deutsch : The structure-activity relationship in amides inhibiting photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 112,381-391(1966).
- (51) 林善晴・藤田稔夫・深海浩 : N-(3,4-Dichlorophenyl)acylamide 類の構造とイネの aryl acylamidase による加水分解速度との相関関係の定量的解析 日本農薬学会誌 9,13-18(1984).
- (52) Hess, F. D., D. E. Bayer and R. H. Falk : herbicide dispersal patterns : III. As a function of formulation. *Weed Sci.* 29, 224-229(1981).
- (53) Hoagland, R. E. : Isolation and some properties of an aryl acylamidase from red rice, *Oryza sativa* L., that metabolizes 3',4'-dichloropropionanilide. *Plant and Cell Physiol.* 19,1019-1027 (1978).

- (54) Hoagland, R. E. and G. Graf : An aryl acylamidase from turip which hydrolyzes 3',4'-dichloropropionanilide. *Phytochemistry* 11,521-527(1972).
- (55) Hoagland, R. E. and G. Graf : Enzymatic hydrolysis of herbicides in plants. *Weed Sci.* 20,303-305(1972).
- (56) Hoagland, R. E., G. Graf and E. D. Handel : Hydrolysis of 3',4'-dichloropropionanilide by plant aryl acylamidases. *Weed Res.* 14,371-374(1974).
- (57) Hodgson, R. H. : Influence of environment on metabolism of propanil in rice. *Weed Sci.* 19,501-507(1971).
- (58) Hofstra, G. and C. M. Switzer : The phytotoxicity of proanil. *Weed Sci.* 16,23-28(1962).
- (59) Hopkins, T. R., R. P. Neighbors and L. V. Phillips : Synthesis and herbicidal activity of small-ring compounds. *J. Agr. Food Chem.* 15,501-507(1967).
- (60) Inoue, Y., K. Ishizuka and S. Mitsui : Inhibition of respiration of yeast by photosynthesis inhibiting herbicides. *J. Agr. Food Chem.* 31,422-427(1967).
- (61) Inoue, Y., K. Ishizuka and S. Mitsui : Effect of Photosynthesis inhibiting acylanilides on the activity of mammal mitochondria. *J. Agr. Food Chem.* 33,1798-1801(1969).
- (62) Inoue, Y., K. Ishizuka and S. Mitsui : Responses of isolated plant mitochondria to photosynthesis inhibiting acylanilides. *J. Agr. Food Chem.* 34,1029-1038(1970).
- (63) Ishii, R., T. Yamaguchi and Y. Murata : On a method for measur-

- ing photosynthesis and respiration of leaf slices with an oxygen electrode. Japan. Jour. Crop Sci. 46,53-57(1977).
- (64) 石塚皓造：酸アミド系およびカーバメート系除草剤の化学構造と作用機  
作 雑草研究 6,8-20(1967).
- (65) 石塚皓造：除草剤を通してみた植物の種特異性 雑草研究 20,1-6  
(1975).
- (66) 石塚皓造：除草剤の選択殺草作用機構に関する生理生化学的研究 雑  
草研究 28,229-242(1983).
- (67) Ishizuka, K., Y. Inoue and S. Mitsui : Mode of action of anilide  
herbicides on plant growth. Japan U-S Cooperative Science  
Program (1969).
- (68) Ishizuka, K., H. Matsumoto and T. Imahase : Selective mode of  
action of simetryn among rice cultivars. Weed Res. (Japan) 29,  
289-294(1984).
- (69) Ishizuka, K., H. Matsumoto and Y. kakumoto : Effect of temper-  
ature on absorption and translocation of simetryn in rice  
cultivars. Weed Res. (Japan) 29,116-122(1984).
- (70) Ishizuka, K. and Y. Yogo : Tolerance of finger millet to  
propanil. Proceedings of Tenth Conference of the Asian-Pacific  
Weed Science Society (1),81-89(1985).
- (71) 伊藤堯・利根川和江・上島俊治：3,4-Dichloropropionanilide の選択  
殺草作用に関する研究 第3報 水稻の栽培条件及び生育ステージ別の  
DCPA解毒分解について 雑草研究 6,71-74(1967).

- (72) Izawa, S. and N. E. Good : The number of sites sensitive to 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, 3-(4-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea and 2-chloro-4-(2-propylamino)-6-ethylamino-s-triazine in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 102, 20-38(1965).
- (73) Jaworski, E. G. : Metabolism of  $\alpha$ -Chloro-N,N-diallylacetamide(CDAA) and 2-chloroallyl-N,N-diethylthiocarbamate(CDEC) by plant. *J. Agr. Food Chem.* 12,33-37(1964).
- (74) Kaufman, D. D., J. R. Plimmer, J. Iwan and U. I. Klingebiel : 3,3',4,4'-Tetrachloroazoxybenzene from 3,4-dichloroaniline in microbial culture. *J. Agr. Food Chem.* 20,916-919(1972).
- (75) 河村雄司 : 除草剤と殺虫剤の相互作用 植物防疫 23,71-76(1969).
- (76) Kearney, P. C. and J. R. Plimmer : Metabolism of 3,4-dichloroaniline in soils. *J. Agr. Food Chem.* 20,584-585(1972)
- (77) 小林勝一郎 : 除草剤の選択殺草機構とその解析法に関する研究—とくにフェニルカーバメート系化合物 barban を中心に— 農学博士論文 京都大学 (1981).
- (78) Kobayashi, K., H. Hyakutake and K. Ishizuka : Selective action of naproanilide on growth and RNA synthesis between smallflower umbrellaplant and rice. *Weed Res. (Japan)* 26,30-36(1981).
- (79) Kobayashi, K. and K. Ichinose : Absorption, translocation and metabolism of root-applied naproanilide in rice and cyperaceous weeds. *Weed Res. (Japan)* 29,38-44(1984).
- (80) Kobayashi, K. and K. Ichinose, H. Hyakutake and K. Ishizuka : Effect of naproanilide on tuberrization and RNA synthesis of

- Cyperus serotinus Rottb. Weed Res. (Japan) 28,43-50(1983).
- (81) Kobayashi, K. and K. Ishizuka : Selectivity of barban : absorption, translocation and chemical transformation. J. Pesticide Sci. 2,59-65(1977).
- (82) 児玉治・赤塚尹巳 : DCPA分解酵素の迅速測定法 茨城大学農学部  
学術報告書 22,49-50(1974).
- (83) 児玉治・赤塚尹巳 : 選択性除草剤に関する研究 (第8報) DCPAの  
吸収と茎葉における分解について 茨城大学農学部学術報告書 23,  
49-52(1975).
- (84) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall :  
Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol.  
Chem. 193,265 (1951).
- (85) Mahadevan, S. and A. L. Tappel : Arylamidases of rat liver and  
kidney. J. Biol. Chem. 242,2369-2374(1967).
- (86) Mann, J. D., L. S. Jordan and B. E. Day : A survey of herbicide  
for their effect upon protein synthesis. Plant Physiol. 40,  
840-843(1965).
- (87) Matsunaka, S. : Propanil hydrolysis : Inhibition in rice plants  
by insecticides. Science 160,1360-1361(1968).
- (88) Matsunaka, S. : Activation and inactivation of herbicide by  
higher plants. Residue Reveiws 25,45-58(1969).
- (89) 松中昭一 : 除草剤と有機リン剤 植物防疫 26,125-129(1972).
- (90) 松中昭一 : 除草剤の作用機構および選択殺草性機構に関する研究 日  
本農薬学会誌 3,195-201(1978).

- (91) Matsumoto, H. and K. Ishizuka : Herbicidal selectivity of foliar-applied simetryne : Its absorption, tranlocation and metabolism in gramineous plants. Weed Res. (Japan) 25,185-193(1980).
- (92) Matsumoto, H. and K. Ishizuka : Herbicidal selectivity of root-applied simetryne : Its absorption, tranlocation and metabolism in gramineous plants. Weed Res. (Japan) 26,135-141(1981).
- (93) Matsumoto, H. and K. Ishizuka : Effect of simetryne on the photochemical reaction of isolated chloroplasts of rice and barnyardgrass plants. Weed Res. (Japan) 27,91-97(1982).
- (94) Matsumoto, H. and K. Ishizuka : Effect of temperature on metabolism of simetryn in rice cultivars. Weed Res. (Japan) 29, 159-164(1984).
- (95) Miller, S. D., J. D. Nalewaja and I. B. Edwards : Hard red spring wheat (*Triticum aestivum*) response to propanil. Weed Sci. 32,191-193(1984).
- (96) Moreland, D. E., S. S. Malhotra, R. D. Gruenhagen and E. H. Shokraii : Effect of herbicide in RNA and protein synthesis. Weed Sci. 17,556-563(1969).
- (97) Murata, N., M. Nishimura and A. Takamiya : Fluorescence of chlorophyll in photosynthetic systems. II. Induction of fluorescence in isolated spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 120,23-33(1966).
- (98) 中村拓・小泉順三・松中昭一 : 除草剤 propanil (DCPA) のイネおよびタイヌビエの水分代謝と光合成とに及ぼす影響 雑草研究 7, 100-104(1968).

- (99) 中村拓・松中昭一：除草剤 propanil (DCPA) と関連除草剤の諸性質の比較 雑草研究 8,33-39(1969).
- (100) Nimmo-Smith, R. H. : Aromatic N-deacylation by Chick-kidney mitochondria. Biochem. J. 75,284-293(1960).
- (101) Nishimura, M. and A. Takamiya : Energy- and electron-transfer systems in algal photosynthesis. I. Action of two photochemical systems in oxidation-reduction reactions of cytochrome in porphyrin. Biochim. Biophys. Acta 120,45-56(1966).
- (102) 小田雅庸・行本峰子：土壌中の propanil の代謝 1. Propanil 添加土壌における DCAA の生成について 雑草研究 20,12-16 (1975).
- (103) Ort, D. R., W. H. Ahrens, B. Martin and E. W. Stoller : Comparison of photosynthetic performance in triazine-resistant and susceptible biotypes of *Amaranthus hybridus*. Plant Physiol. 72,925-930(1983).
- (104) Oyamada, M., K. Igarashi and S. Kuwatsuka : Degradation of the herbicide naproanilide, 1-(2-naphthoxy)propionanilide, in flooded soils under oxidative and reductive conditions. J. Pesticide Sci. 5,495-501(1980).
- (105) Oyamada, M. and S. Kuwatsuka : Absorption, translocation and metabolism of the herbicide naproanilide, 1-(2-naphthoxy)-propionanilide, in rice plants. J. Pesticide Sci. 7,9-14 (1982).
- (106) Pallos, F. M. and J. E. Casida : Chemistry and action of herbicide antidotes. Academic Press 171pp (1978).



- (1 0 7) Pease, H. L. : Separation and colorimetric determination of monuron and diuron residues. J. Agr. Food Chem. 10,279-281 (1962).
- (1 0 8) Pfister, K., S. R. Radosevich and C. J. Arntzen : Modification of herbicide binding to photosystem II in two biotype of *Senecio vulgaris* L. Plant Physiol. 64,995-999(1979).
- (1 0 9) Plimmer, J. R., P. C. Kearney, H. Chisaka, J. B. Yount and U. I. Klingebiel : 1,3-Bis(3,4-dichlorophenyl)triazine from propanil in soils. J. Agr. Food Chem. 18,859-861(1970).
- (1 1 0) Prasad, I. and D. Pramer : Cytogenetic effect of propanil and its degradation products on *Allium cepa* L.. Cytologia 34, 351-352(1969).
- (1 1 1) Ray, T. B. and C. C. Still : Propanil metabolism in rice : A comparison of propanil amidase activities in rice plants and callus cultures. Pestic. Biochem. Physiol. 5,171-177(1975).
- (1 1 2) Renger, G. : The action of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethyl-urea on the water-splitting enzyme system Y of photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta 314,113-116(1973).
- (1 1 3) Rensen, J. J. S., D. Wong and Govindjee : Characterization of the inhibition of photosynthetic electron transport in pea chloroplasts by the herbicide 4,6-dinitro-o-cresol by comparative studies with 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. Z. Naturforsch. 33c,413-420(1978).
- (1 1 4) Rinden, J. R. and T. R. Hopkins : Decline and residue studies on 4-chloro-2-butyl-N-(3-chlorophenyl)carbamate. J. Agr. Food

Chem. 9,47-49(1961).

- (115) Ridley, S. M. : Interaction of chloroplasts with inhibitors. Effects of two diphenylether herbicides, fomesafen and nitrofluorfen, on electron transport, and some comparison with dibromothymoquinone, diuron and paraquat. Plant Physiol. 72, 461-468(1983).
- (116) 坂齊・千坂英雄：酸素電極による光合成・呼吸測定法の検討とその除草剤作用検定への利用 雑草研究 26,304-310(1981).
- (118) Saroja-Subbaraj, G. and S. Bose : Binding characteristics of methyl parathion to photosynthetic membranes of Chlorella. Pestic. Biochem. Physiol. 20,188-193(1983).
- (118) 佐藤了：薬物代謝－肝小胞体を中心として－ 講談社サイエンス 234pp (1973).
- (119) 白川憲夫：酸アミド系化合物の選択殺草性ならびにその作用機構に関する研究 農学博士論文 京都大学 (1972).
- (120) Smith, R. J. : 3,4-Dichloropropionanilide for control of barnyardgrass in rice. Weeds 9,318-322(1961).
- (121) Smith, R. J. and C. E. Caviness : Differential responses of soybean cultivars to propanil. Weed Sci. 21,279-281(1973).
- (122) Still, G. G. : Metabolic fate of 3,4-dichloropropionanilide in plants. : The metabolism of the propionic acid moiety. Plant Physiol. 43,543-546(1968).
- (123) Still, G. G. : Metabolism of 3,4-dichloropropionanilide in plants. : The metabolic fate of the 3,4-dichloroaniline moiety. Science 159,922-923(1968).

- (124) Still, C. C and O. Kuzirian : Enzymatic detoxication of 3',4'-dicloropropionanilide in rice and barnyard grass, a factor in herbicide selectivity. *Nature* 216,799-800(1967).
- (125) Strotmann, H., H. Hesse and K. Edelman : Quantative determination of coupling factor CF<sub>1</sub> of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 314,202-210(1973).
- (126) Strotmann, H. and K. Edelman : Specific binding of inhibitors by electron carriers of the photosynthetic electron transport chain. *Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd.* 87, S.457-463(1974).
- (127) 須賀原亮三・新井勇治編：生物のケミカルコントロール 朝倉書房 170pp (1984).
- (128) 鈴木直治：農薬の生理作用 南江堂 184-187(1976).
- (129) 鈴木幸男・宮本純之：最新農薬概論－改稿版－ 廣川書店 382pp (1983).
- (130) Takahashi, A. and K. Ishizuka : Selective mode of action of orbencarb in wheat and crabgrass. *Weed Res. (Japan)* 30,21-29 (1985).
- (131) 武久慎・石川尚雄・藤巻定雄・野口照久：DCPA, NIP, ATAの細胞遺伝学的効果に関する研究 雑草研究 5,154-156(1966).
- (132) 竹松哲夫：除草剤研究総覧 博友社 721pp (1982).
- (133) 高沢良夫：Naproanilide (MT-101)の作用特性 植物の化学調節 16,51-63(1981).
- (134) Thiel, A. and P. Boger : Comparative herbicide binding by photosynthetic membranes from resistant mutants. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22,232-242(1984).

- (135) Tischer, W. and H. Strotmann : Relationship between inhibitor binding by chloroplasts and inhibition of photosynthetic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta* 460,113-125(1977).
- (136) 豊里友良・萩本宏・渡辺光夫 : 植物調節剤の開発に関する研究 - N-Methyl-3',4'-dichloropropionanilide と 3',4'-dichloropropionanilide の除草作用の比較 - 雑草研究 4,123-127(1965).
- (137) Tsai W. : metabolism of propanil. : Solubilization and purification of a propanil hydrolyzing aryl acylamidase from rice leaves. Ph. D. University of California, Davis (1974).
- (138) 植木邦和・松中昭一 : 雑草防除大要 養賢堂 200pp (1979).
- (139) Wallnofer, P. R. and J. Bader : Degradation of urea herbicides by cell-free extracts of *Bacillus sphaericus*. *Appl. Microbiol.* 19,714-717(1970).
- (140) Yamada, N. and H. Nakamura : Chemical control of plant growth and development. (3) Some herbicidal properties of Stam F-34 (3,4-dichloropropionanilide). *Proc. Crop Sci. Soc. Japan* 32,69-76(1964).
- (141) 山本出・深見順一 : 農薬 - デザインと開発指針 - ソフトサイエンス社 1222pp (1979).
- (142) 山根国男・越生博次・高見武夫 : 水稲乾田直播栽培における propanil と benthocarb 混用処理の実用化 雑草研究 19,57-63(1975).
- (143) Yamasue, Y., S. Koda, K. Ueki and S. Matsunaka : Variations in growth, seed dormancy and herbicide susceptibility among strains of *Echinochloa oryzicola* Vasing.. *Weed Res. (Japan)*

26,6-13(1981).

- (144) Yie, R. Y., D. H. McRae and H. F. Wilson : Metabolism of 3',4'-dichloropropionanilide. : 3,4-Dichloroaniline-lignin complex in rice plants. *Science* 161,376-377(1968).
- (145) Yie, R. Y., D. H. McRae and H. F. Wilson : Metabolism of selective action of 3',4'-dichloropropionanilide. *Plant Physiol.* 43,1291-1296(1968).
- (146) 吉井春夫 : 高等植物の薬剤分解酵素に関する研究 農学修士論文 茨城大学 (1979).
- (147) 行本峰子・小田雅庸 : 除草剤 propanil とカーバメート系殺虫剤の近接散布によるイネの葉害について 雑草研究 16,28-31(1973).
- (148) 行本峰子・小田雅庸 : イネ種子の propanil 分解酵素活性 農薬科学 2,117-120(1974).
- (149) Zweig, G., I. Tamas and E. Greenberg : The effect of photosynthesis inhibitors on oxygen evolution and fluorescence of illuminated chlorella. *Biochim. Biophys. Acta* 66,196-205 (1963).