ヒ酸鉛がウンシュウミカン果肉中のコエンザイム A に及ぼす影響

八 巻 良 和

東京大学農学部附属農場二宮果樹園 259-01 神奈川県中郡二宮町

Effect of Lead Arsenate on Coenzyme A in Fruit Pulp of Satsuma Mandarin

Yoshikazu T. YAMAKI

*Experimental Orchard, Faculty of Agriculture, University of Tokyo,
Ninomiya, Naka-gun, Kanagawa 259-01*

Summary

The effect of lead arsenate on coenzyme A (CoA) was examined in order to investigate the involvement of CoA in the reduction of free acidity of juice by the chemical in hopes of finding non-toxic acid-reducing chemicals.

0.3% lead arsenate solution was sprayed on satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) trees 3 to 5 weeks after full bloom.

Total CoA concentration was not affected apparently, but acetyl coenzyme A (AcCoA) concentration decreased meaning a proportional decrease of AcCoA to total CoA. Meanwhile the free acidity of juice in lead arsenate sprayed fruits was 16 to 22% lower than that in unsprayed fruits.

The decrease in proportion of AcCoA in total CoA about five weeks after lead arsenate spraying showed a high correlation with the decrease of free acidity of juice at harvest in sprayed fruits. It was suggested that arsenolysis could cause acidity of juice to decrease by reducing production of citric acid.

緒 言

果実の発育段階の初期にカンキツ樹にヒ酸鉛を散布すると、果実中の遊離酸濃度が低下する。これはクエン酸濃度が低下することによる。クエン酸は、クエン酸縮合酵素の働きによって、アセチルコエンザイム A (以下 AcCoA) とオキサロ酢酸との縮合により生成される。Roe ら(5) はビルビン酸の代謝には、酵素活性よりも AcCoA 量が重要である可能性を示唆している。ヒ酸鉛処理をしたカンキツ果実の果肉中には、ヒ素が検出される(1,2,3) こと、AcCoA はヒ酸の存在下では加ヒ酸分解する(7) ことから、ヒ酸鉛処理を行った果実では、果肉中の AcCoA が加ヒ酸分解を起こし、それがクエン酸の生成量を低下させる一因となることが考えられる。しかし、ヒ酸鉛処理を行ったカンキツ果実の果肉中の AcCoA を測定し、無処理のものと比較した報告は見あたらない。そこで、本報告では無害の減酸剤の開発に資するため、クエン酸の生成・蓄積機構を解明する一助として、

ウンシュウミカンにヒ酸鉛処理を行い、果肉中の全コエンザイム A の濃度 (以下全 CoA 濃度)、AcCoA 濃度、及び全 CoA 濃度に占める AcCoA 濃度の割合 (以下“アセチル率”) が、どの程度変化するかを検討した。

材料及び方法

1. ヒ酸鉛処理及び果実の採取日

用いた樹及び処理の方法、試料にあてた果実の採取方法、供試果実数は前報(8) 同様である。

ヒ酸鉛散布処理の実施日及び分析用果実の採取日は年により異なったため、以下年毎に記載する。

1980 年：6 月 30 日 (満開後約 5 週) に処理、8 月 4 日 (同 10 週) に果実を採取。

1981 年：6 月 29 日 (満開後約 5 週) に処理、8 月 25 日 (同 13 週)、及び 9 月 24 日 (同 17 週) に果実を採取。

1982 年：6 月 16 日 (満開後約 4 週) に処理、7 月 21 日 (同 9 週)、及び 9 月 13 日 (同 17 週) 果実を採取。

1983 年：6 月 14 日 (満開後約 3 週) に処理、7 月 14 日 (処理後約 1 か月)、8 月 13 日 (同 2 か月)、9 月 13 日 (同 3 か月)、及び 11 月 11 日 (同 5 か月) に果実を採取した。

1989 年 7 月 20 日 受理

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金 (奨励研究 A) によって行われた。

ヒ酸鉛による減酸効果の確認のため、収穫期に果実を採取し、果汁の遊離酸濃度を測定した。

2. 試料の調製

コエンザイム A (以下 CoA) の抽出は, Tubbs と Garland(6) の方法に若干の改良を加えて行った。すなわち, 果肉試料に, 3～6 倍容量の 1 N・過塩素酸と, 1/10 重量～等重量のポリクラール AT (以下 PAT) を加えて磨砕し, 20,000×g で 20 分間遠心分離した。上澄を 2 N・水酸化カリウムで pH 6.0 とし, 20,000×g で 20 分間遠心分離して, CoA 抽出液を得た。なお, CoA の抽出に供した果肉試料は, 前報(8) で述べた手順に従って軸対称の位置の果肉片から取った。以上の抽出は 0～4℃で行った。なお, 果肉の磨砕に際し, 添加した過塩素酸と PAT の量及び抽出手順が年により異なったが, 全 CoA 量及び AcCoA 量には差が認められなかった。

3. 全 CoA 及び AcCoA の定量

全 CoA 及び AcCoA の定量は Michael と Bergmeyer(4) の方法に若干の改変を加えて行った。すなわち, 1980～1982 年は 3 ml 容の石英セルを用い, それに入れる CoA 抽出液を, 1980 年は 0.3 ml, 1981, 1982 年は 1.0 ml とした。1983 年は 1 ml 容の石英セルを用い, CoA 抽出液を, 7 月の試料では 125 μ l, 8, 9, 11 月の試料では 50 μ l とした。反応液は Michael と Bergmeyer(4) に従って調整した。

CoA 抽出液の代わりに純水を石英セルに入れた場合の吸光度変化と, CoA 溶液と AcCoA 溶液の一方または両方を入れた場合の, 全 CoA 量測定法及び AcCoA 測定法による吸光度変化を用いてそれぞれ検量線を作成した。この検量線を用い, CoA 抽出液の吸光度変化からその全 CoA 濃度と AcCoA 濃度を算出した。

4. CoA 抽出液使用量の違いによる全 CoA 及び AcCoA 量の測定値の相違

吸光度変化を測定する際, 石英セルに入れる CoA 抽出液量の違いが, 全 CoA の検出量に影響を及ぼすかどうかを調べた。1981 年 8 月の試料を用い, CoA 抽出液

の使用量を, 100 μ l～1 ml の間で変えてみたところ, 第 1 表に示したように, 測定値は CoA 抽出液の使用量が多くなるにつれて増加したが, 果肉 1 g 当りの算出 CoA 濃度は低下した。これらのことから, 石英セルに入れる CoA 抽出液の量が異なる測定例の間では, 測定値の比較ができない。このため, 同一日の果実試料からの CoA 抽出液の使用量は全て等量とした。

5. CoA 及び AcCoA の回収率

上記の手順で得た CoA 抽出液に, 果肉中に存在していた CoA や AcCoA がどの程度回収されたかが不明であるため, 予備実験として, 以下に述べるように回収率を求めた。

1983 年 9 月 13 日の無処理区の果実を用い, 果肉磨砕液を 3 等分した。一つ目はそのまま, 二つ目には既知濃度の CoA 溶液を一定量, 三つ目には既知濃度の AcCoA 溶液を一定量添加した。PAT を添加し, 上記 2 の方法により CoA 抽出液を得た。三つの CoA 抽出液につき, 回収される全 CoA 及び AcCoA を定量した。CoA を添加した CoA 抽出液の全 CoA 値と CoA 抽出液の全 CoA 値との差から CoA の回収率を, AcCoA を添加した CoA 抽出液の AcCoA 値と CoA 抽出液の AcCoA 値の差から AcCoA の回収率を算出した。

結果及び考察

1. 収穫期の遊離酸濃度

第 2 表に示したように, 収穫期の遊離酸濃度はいずれの年にも処理区で 16～17% 低く, 減酸効果が認められた。このことから, 今回の試料はいずれも CoA 分析に適したものであったことが確認された。

2. CoA, AcCoA の回収率

回収率を求める際, 上澄の量を計算の基準とした。上澄の量は, 加えた過塩素酸量の 1/2 弱であり, 沈澱中に上澄と等量以上の CoA や AcCoA が含まれたため, 回収率は 50% に満たなかった。無処理区より採取した果実を用い, 異なる日に 3 回回収率を求めたところ, CoA は 48.2%±2.4%, AcCoA は 41.9%±0.7% で, 安定していた。したがって, この平均値を用いて, 回収率が

Table 1. Effect of various volumes of CoA extract of *C. unshiu* pulp added to measuring cuvette on total CoA content in CoA extract and calculated concentration of total CoA of fruit pulp.

Volume of CoA extract added to cuvette (μ l/3 ml cuvette)	100 μ l	250 μ l	500 μ l	1,000 μ l
Content of total CoA in CoA extract	100	138	163	243
Calculated concentration of total CoA of fruit pulp	100	55	33	24

Data are expressed as ratio to the value obtained when 100 μ l of CoA extract was used.

[Concentration of CoA of fruit pulp]

$$= \frac{[\text{Content of CoA in CoA extract}] \times [\text{Volume of CoA extract}]}{[\text{Volume of CoA extract added to cuvette}] \times [\text{recovery rate}] \times [\text{pulp weight}]}$$

Table 2. Effect of lead arsenate spray on free acidity of juice at harvest.

Date of treatment	Date of harvest	Free acidity		Treated/Control
		Control	Treated	
		% Citric acid, with standard deviation		%
Jun. 30, 1980	Dec. 4, 1980	1.31±0.04	1.08±0.10	83.2±4.8
Jun. 29, 1981	Dec. 14, 1981	1.44±0.06	1.19±0.04	83.0±2.1
Jun. 16, 1982	Dec. 14, 1982	2.23±0.12	1.81±0.09	78.1±3.9
Jun. 14, 1983	Dec. 22, 1983	1.53±0.14	1.28±0.06	81.4±3.5

Table 3. Effect of lead arsenate spray on amount of total CoA and AcCoA.

Year	Date of treatment	Date of sampling	Total CoA			AcCoA		
			Control	Treated	Treat./Cont.	Control	Treated	Treat./Cont.
			n moles/g pulp		%	n moles/g pulp		%
1980	Jun. 30	Aug. 4	291.9	235.7	80.7	184.6	122.3	66.3
1981	Jun. 29	Aug. 25	986.2	944.0	95.7	836.6	494.3	59.1
		Sep. 24	1,125.0	981.9	87.3	882.2	722.6	81.9
1982	Jun. 16	Jul. 21	663.5	926.0	139.6	556.4	455.5	81.9
		Sep. 13	472.5	478.2	101.2	421.5	378.7	89.8
1983	Jun. 14	Jul. 14	376.3	398.0	105.8	322.9	252.2	78.1
		Aug. 13	331.7	349.1	105.2	215.5	179.8	83.4
		Sep. 13	126.7	154.6	122.0	113.7	100.3	88.2
		Nov. 11	315.5	226.2	71.7	268.4	151.3	56.4
	Average		521.0	521.5	102.1	422.4	317.4	76.1
	s. d.		318.1	317.0	19.1	264.4	198.4	11.7

100%であった場合の、果肉中の全 CoA 濃度と AcCoA 濃度を、果肉 1 g 当りの n mole で算出し、第3表に示した。

3. ヒ酸鉛処理が全 CoA 濃度に及ぼす影響

第3表に示したように、無処理果実の果肉中の全 CoA 濃度に対するヒ酸鉛処理果実の果肉中の全 CoA 濃度の割合は、72~140%で、一定の傾向は認められなかった。全測定値を一まとめにすると、差はわずか2%と、誤差の範囲内となり、ヒ酸鉛処理は果肉中の CoA 濃度に影響を及ぼさないようであった。

4. ヒ酸鉛が AcCoA 濃度に及ぼす影響

果肉中の AcCoA 濃度は、第3表に示したように、無処理果実に対するヒ酸鉛処理果実の割合は56%から90%で、平均76%であった。この低下の原因として、ヒ酸鉛処理された果実の果肉中にヒ素が検出されるという報告(1~3)もみられることから、AcCoA が加ヒ酸分解してアセチルとヒ素になった(7)ことが推測される。加ヒ酸分解による AcCoA 濃度の低下は、クエン酸の合成量の低下をもたらすであろう。したがって、ヒ酸鉛処理果における酸濃度の低下には、果肉中の AcCoA の加ヒ酸分解が関与している可能性は大きい。

5. ヒ酸鉛が“アセチル率”に及ぼす影響

果肉中の全 CoA 濃度及び AcCoA 濃度は、吸光度変化を測定する際、使用した CoA 抽出液量が異なる測定間では、比較が出来ない。しかし、“アセチル率”は同一 CoA 抽出液中の、全 CoA に占める AcCoA の割合であるため、また、予備実験で、磨砕時に添加した CoA 及び AcCoA の回収率に大差がなかったため、抽出方法が異なる試料の間で比較が可能と考えられる。この“アセチル率”は第4表に示したように、無処理対照区の果実で63~91%、平均83%であったが、ヒ酸鉛散布処理区の果実では50~79%、平均67%であった。“アセチル率”は処理の結果5~43%低くなり、平均低下率は24%であった。この結果は、先に述べた処理区における AcCoA 濃度の低下を確認したものと言え、ヒ酸鉛による AcCoA の加ヒ酸分解を強く示唆する。

なお、満開後3~5週にヒ酸鉛処理を行った果実における、処理後約5週目の“アセチル率”の低下率は14.9~43.0%であった。ヒ酸鉛処理果の収穫期の遊離酸濃度は16.8~21.9%の低下率を示し、“アセチル率”の低下率との間に第1図に示したように $r=0.955^{**}$ の相関関係を示した。ヒ酸処理は、クエン酸の生成蓄積が盛んな

Table 4. Effect of lead arsenate spray on proportion of AcCoA in total CoA.

Year	Date of treatment	Date of sampling	AcCoA/CoA		Proportion of Treat./Cont.
			Control	Treated	
1980	Jun. 30	Aug. 4	63.2	53.8	85.1
1981	Jun. 29	Aug. 25	85.2	65.1	76.4
		Sep. 24	78.5	74.7	95.2
1982	Jun. 16	Jul. 21	86.6	49.4	57.0
		Sep. 13	89.3	79.3	88.8
1983	Jun. 14	Jul. 14	83.8	63.5	75.8
		Aug. 13	77.7	49.9	64.2
		Sep. 13	91.1	60.6	66.5
		Nov. 11	87.9	68.2	77.6
Average			82.6	67.2	76.3
s.d.			8.1	9.9	11.6

Fig. 1. Relationship between decrease in proportion of AcCoA to total CoA (AcCoA/total CoA) of fruit pulp at about 5 weeks after lead arsenate spraying and decrease in free acidity of fruit juice at harvest.
Data from 1980 through 1983 were pooled.
Lead arsenate was sprayed 3 to 5 weeks after full bloom.

時期に、AcCoA を加ヒ酸分解することによりクエン酸の生合成を低下させる可能性が強く示唆された。

摘 要

満開後3～5週目のウンシュウミカンに0.3%ヒ酸鉛を散布し、その後の果肉中の全コエンザイムA濃度（全CoA濃度）、アセチルコエンザイムA濃度（AcCoA濃度）、全CoAに占めるAcCoAの割合（“アセチル率”）、及び収穫期の果汁遊離酸濃度に及ぼす影響を1980年から1983年にかけて調べた。

1. いずれの年にも果汁酸濃度は処理区で16～17%低く、減酸効果が認められた。

2. ヒ酸鉛処理により、果肉中の全CoA濃度は明らかな変化を示さなかったが、AcCoA濃度は低下し、“アセチル率”が低下した。

3. ヒ酸鉛処理後約5週目の“アセチル率”の、処理による低下率は、収穫期の遊離酸濃度の、処理による低下率と高い正の相関関係を示した。

4. ヒ酸鉛処理を受けた果実の果汁酸濃度が、無処理果実に比較して低い理由の一つは、AcCoAの一部が加ヒ酸分解されてクエン酸の生成に用いられないためである可能性が示唆された。

謝 辞 本稿をまとめるにあたり、ご指導を賜った東京大学名誉教授岩田正利博士、ご助言を下された農業生物資源研究所企画科長梶浦一郎博士、コエンザイムAの測定法をご教示下さった農林水産省果樹試験場興津支場育成第2研究室平井正志博士（現・野菜試験場育成部育成第1研究室長）に深謝の念を表す。また、コエンザイムAの測定に当り、便宜を図って下さった農林水産省果樹試験場興津支場に感謝の意を表す。

引用文献

1. 伊藤三郎・泉 嘉郎. 1966. ヒ酸鉛散布ナツカンとの素残留量について. 食品工誌. 13: 486-488.
2. 門屋一臣・倉岡唯行・松本和夫. 1966. ヒ酸鉛散布がナツダイダイの果実の発育ならびに糖・酸含量におよぼす影響. 園学雑. 35: 111-116.
3. MARLOTH, R. H. and F. J. STOFBERG. 1938. The effect of lead arsenate and copper carbonate sprays on the quality of oranges. J. Pomol. Hort. Sci. 16: 329-345.
4. MICHAEL, G. and H. U. BERGMAYER. 1974. Coenzyme A. p. 1967-1981. In: H. U. Bergmayer (ed.). Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 4. Verlag Chemie Weinheim Academic Press, Inc., New York and London.
5. ROE, B., P. L. DAVIS and J. H. BRUEMMER. 1984. Pyruvate metabolism during maturation

- of Hamlin oranges. *Phytochemistry*. 23: 713-717.
6. TUBBS, P. K. and P. B. GARLAND. 1964. Variations in tissue contents of coenzyme A thio esters and possible metabolic implications. *Biochem. J.* 93: 550-557.
7. 山田常雄・前川文夫・江上不二夫・八杉竜一(編). 1974. 生物学辞典. 第 11 刷. p. 160. 岩波書店. 東京.
8. 八巻良和. 1990. ヒ酸鉛がカンキツ果実の果肉中のクエン酸縮合酵素 (CS) 活性に及ぼす影響. *園学雑*. 59: 37-43.