

## カブのフロログルシノール酸化酵素に 及ぼすマンガンの賦活作用\*

藤 田 修 二・東 野 哲 三

(園芸工学研究室)

昭和59年8月24日 受理

### Activating Effect of Manganese on Phloroglucinol Oxidase of Turnip

Shuji FUJITA and Tetsuzo TONO

(Laboratory of Food Science and Horticultural Engineering)

Received August 24, 1984

#### Summary

A natural activating factor of phloroglucinol oxidase(PhO), which we found in the root of turnip(*Brassica rapa* L.), seemed to be a low molecular weight substance(LMWS)<sup>5)</sup>. In this study, ultrafiltrate(UF) obtained from the root extract by use of Amicon UM 2 membrane filter was employed as the LMWS fraction. UF activated PhO remarkably. Atomic absorption analysis indicated that UF contained  $Mn^{2+}$  ( $1.8 \times 10^{-4}M$ ),  $Zn^{2+}$  ( $3.0 \times 10^{-5}M$ ) and a trace amount of other metal ions. PhO was markedly activated by  $Mn^{2+}$  and inhibited a little by  $Zn^{2+}$ . The activating action of  $Mn^{2+}$  ( $5 \times 10^{-4}M$ ) was slightly affected by the addition of  $Zn^{2+}$  ( $5 \times 10^{-4}M$ ). The mode of activation by UF on PhO was in good agreement with that by  $Mn^{2+}$ .

From above results, it is likely that one of the natural activating factor of PhO in turnip is manganese.

#### 結 言

これまでに著者ら<sup>3-5)</sup>はカンキツ類果実およびアブラナ科野菜にフロログルシノール酸化酵素(PhO)が存在することを認め、温州ミカン幼果およびカブ根部よりPhOを精製し、それらの一般的性質等を明らかにしてきた。さらに、既報<sup>5)</sup>ではカブPhOの精製過程において、硫酸分画とこれに続く透析処理によってPhOの比活性が著しく低下することを報告したが、この事実はカブ根の磨碎汁液中に低分子量のPhO賦活因子が存在することを示唆している。一方、Oku<sup>8)</sup>はイネの葉の磨碎汁液中にPhO活性が存在することおよび同酵素が $Mn^{2+}$ を補助因子として必要とすることを認め、また、Chmielnicka<sup>2)</sup>はキャベツのペルオキシダーゼがPhO活性をも有し、その活性が $Mn^{2+}$ により著しく賦活化されることを見出している。このような $Mn^{2+}$ のPhOに対する顕著な賦活作用については著者ら<sup>3,4)</sup>もミカンおよびカブのPhOの特異的な性質の一つとして認めている。 $Mn^{2+}$ は他の金属と同様に植物体に含まれることが知られているので<sup>7-10)</sup>,

\* 本報を農産物のトリヒドロキシベンゼン酸化酵素に関する研究(第5報)とする。前報は文献6)である。

カブ磨砕汁液に含まれる低分子量の賦活因子の本体も  $Mn^{2+}$  である可能性が考えられる。そこで、本実験においてはカブ磨砕汁液より低分子画分として限外濾過液 (UF) を調製し、まず、UF 中に PhO 賦活因子が存在することを確かめ、ついで、その因子の本体と  $Mn^{2+}$  との関係について追究した。

## 実験方法

### 1. PhO 標品

既報<sup>5)</sup>においてカブの磨砕汁液より硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過により精製した PhO 標品を使用した。

### 2. UF の調製

カブ根部をおろし金ですりおろし、綿布で濾過した汁液を遠心分離 (8,000rpm, 15分間) した。その上澄液についてメンブランフィルター (アミコン社, UM 2, 分画分子量1,000) を用いて限外濾過を行い、その濾液を UF として使用した。

### 3. PhO 活性の測定

PhO 活性は検圧法<sup>9)</sup>により測定した。すなわち、ワールブルグ検圧計の主室に PhO 標品0.1 ml, UF あるいは金属塩溶液0.2ml (対照は水を同量) および0.1Mリン酸緩衝液 (pH6.8) 1.2 mlを、側室に  $2 \times 10^{-2}$ Mフロログルシノール溶液0.5ml (最終濃度  $5 \times 10^{-3}$ M) を、また、副室

に0.1mlの20%水酸化カリウム溶液を入れ、30°Cで、15分間 preincubation を行った後、側室の基質溶液を主室に移し、20分間反応させた。その際の酸素吸収量を5分毎に測定し、反応初期5分間の酸素吸収量で酵素活性を表した。

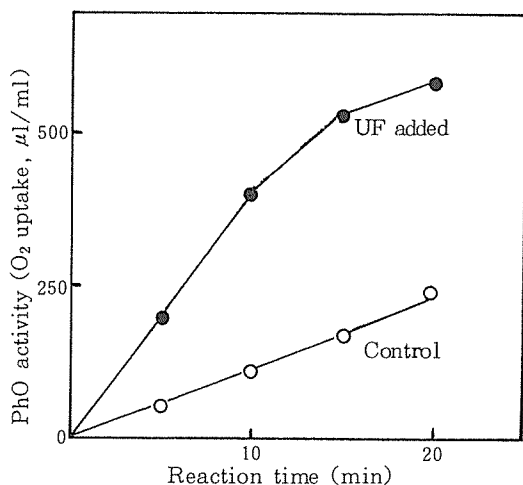


Fig. 1 Effect of the ultrafiltrate(UF) on phloroglucinol oxidase(PhO) activity.

PhO activity was measured by manometric method. The flask was composed of 1.2 ml of 0.1 M phosphate buffer(pH 6.8), 0.1 ml of the enzyme solution and 0.2 ml of UF in main room, 0.5 ml of phloroglucinol solution(final concentration,  $5 \times 10^{-3}$  M) in side room and 0.1 ml of 20% potassium hydroxyde solution in center well. The reactions were carried out at 30°C.

### 4. 金属の検出

原子吸光分析<sup>11)</sup>により金属の検出および定量を行った。

## 結果および考察

### 1. UF の PhO 賦活作用

まず、UF 中に PhO の賦活因子が存在するかどうかを知るために、反応系に UF を添加した場合と無添加の場合の PhO 活性を測定し、比較した。その結果、Fig. 1 に示したように PhO 反応の初速度は UF の添加により無添加の場合の約 4 倍に賦活

された。このことより、UF 中に PhO の賦活因子が存在することが明らかとなった。また、UF の調製に用いたメンブランフィルターの分画分子量から、この賦活因子の本体は分子量1000以下のかなり低分子量の化合物であることが示唆された。

つぎに、UF 中の賦活因子の本体がタンパク性の化合物であるか否かを調べるためにその耐熱性について検討した。すなわち、100°C、60分間加熱処理した UF を反応系に添加し、その賦活作用について調べた。その結果、処理 UF 添加の場合の PhO 反応の初速度は無処理 UF 添加の場合と同一であり、加熱処理を行っても UF の PhO に対する賦活作用には全く変化がみられなかった。このことは UF 中の PhO 賦活因子がきわめて高い耐熱性を有することを示している。したがって、その因子の本体は非タンパク性の低分子化合物、おそらく金属塩などの無機化合物であろうと考えられる。

## 2. UF 中の金属の検出

上記の結果から、UF 中の賦活因子の本体はミカン<sup>4)</sup>およびカブ<sup>5)</sup>の PhO を著しく賦活化した  $Mn^{2+}$ 等の金属と関係があるのではないかと推察される。そこで、UF 中に溶存する金属を調べ、それと賦活因子との関係を追究した。まず、原子吸光分析により UF 中の金属の検出を行ったところ、既報<sup>5)</sup>でカブ PhO に影響を与えることが認められた金属のうち、 $Mn^{2+}$ が $1.8 \times 10^{-4}$  M、 $Zn^{2+}$ が $3 \times 10^{-5}$  Mの濃度で存在することが明らかとなった。なお、 $Fe^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ および  $Co^{2+}$ も存在したが、それらは定性的に検出される程度の微量に過ぎなかった。

## 3. $Mn^{2+}$ の濃度と賦活作用との関係

前記の UF 中の  $Mn^{2+}$ 濃度において、どの程度の賦活効果がみられるのかを確かめるために、反応系に添加した  $Mn^{2+}$ の濃度とその際の PhO 活性との関係を調べた。すなわち、PhO 反応系に各濃度の  $Mn^{2+}$ を添加し、5 分間反応させた時の酸素吸収量を測定した。それら測定値より無添加の場合を 1 としたときの相対活性を求め、それら活性値と  $Mn^{2+}$ 濃度との関係を作図した結果が Fig. 2 である。 $Mn^{2+}$ は $10^{-4}$  Mにおいて PhO 活性を約 6 倍、また、 $10^{-6}$  Mにおいてもなお約 2 倍賦活化することが認められた。したがって、カブ UF 中に含まれる  $Mn^{2+}$ 濃度 ( $1.8 \times 10^{-4}$  M) は PhO 活性を賦活化するのに十分な濃度であることが明らかとなった。なお、既報<sup>5)</sup>で報告したように  $Fe^{2+}$ も PhO 活性をやや賦活化するものの、その賦活作用は  $Mn^{2+}$ に比べてかなり低く、かつ、前記のように UF 中の  $Fe^{2+}$ はきわめて低濃度であった。これらのことから、カブ根においては  $Fe^{2+}$ の賦活因子としての役割は極めて小さいものと思われる。

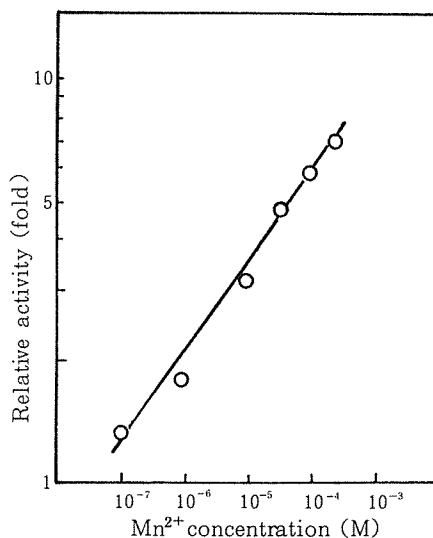


Fig. 2 Effect of manganese on PhO activity.

PhO activity was measured by the same method as in Fig. 1, except that UF was replaced by various concentration of  $Mn^{2+}$ . Relative activity was expressed as follows;

$$\text{Relative activity (fold)} = \frac{\text{O}_2 \text{ uptake in the reaction system}}{\text{O}_2 \text{ uptake in the control system}^*}$$

\* Control system is the same as reaction system, except that  $Mn^{2+}$  was replaced by water.

#### 4. $Mn^{2+}$ および UF の賦活様式

これまでの実験結果から、UF 中の賦活因子の本体は  $Mn^{2+}$  であろうと推定されるが、そうであるなら、UF および  $Mn^{2+}$  は PhO に対して同一の賦活様式を示すことが考えられる。そこで、両者の PhO に対する賦活様式について追究した。すなわち、 $Mn^{2+}$  あるいは UF を含む PhO 反応系における基質濃度と反応速度との関係を調べ、Lineweaver-Burk の方法により作図した結果を Fig. 3 および 4 に示した。この図より  $Mn^{2+}$  あるいは UF 添加時の見かけの  $K_m$  値および  $V_{max}$  値を求めたところ、 $Mn^{2+}$  添加時のそれらは 0.50 mM および 20 unit/min であり、UF 添加時のそれらは 0.50 mM および 7.1 unit/min であった。これに対して、両者が存在しない場合にはそれぞれ 0.67 mM および 4.2 unit/min であった。このように、

$Mn^{2+}$  あるいは UF の添加によって、いずれの場合にも見かけの  $K_m$  値の減少と  $V_{max}$  値の増加がみら

れることは両者の PhO に対する賦活様式が一致することを意味するものである。同様な  $Mn^{2+}$  による賦活様式はミカンの PhO 反応系<sup>4)</sup>の場合にも認められており、見かけの  $K_m$  値の減少は PhO の基質結合能力を、また、 $V_{max}$  値の増加は PhO の触媒能力をそれぞれ賦活化するものと考えられる。このような  $Mn^{2+}$  および UF の PhO に対する賦活様式の一致は UF 中の賦活因子の本体が  $Mn^{2+}$  であることの根拠を与えるものである。

#### 5. $Mn^{2+}$ の賦活作用に及ぼす $Zn^{2+}$ および $Cu^{2+}$ の影響

前記のように、UF 中には  $Mn^{2+}$  とともに PhO 活性を阻害する金属 ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  等) も微量な

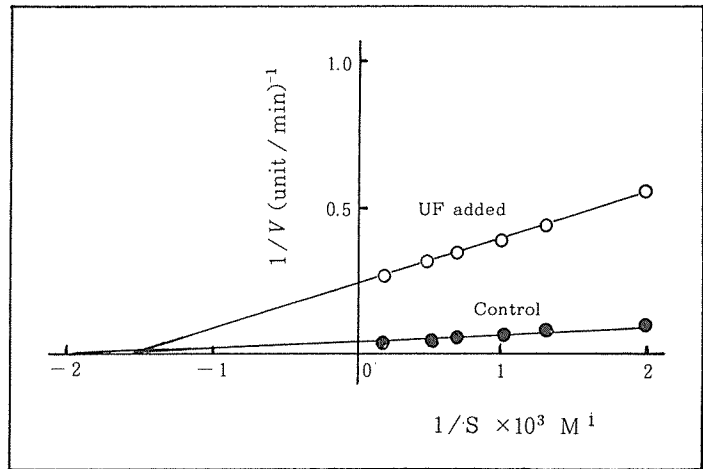


Fig. 3 Activating effect of UF on PhO activity.

PhO activity was measured by the same method as in Fig. 1, except that final concentration of phloroglucinol was 0.5–10 mM.

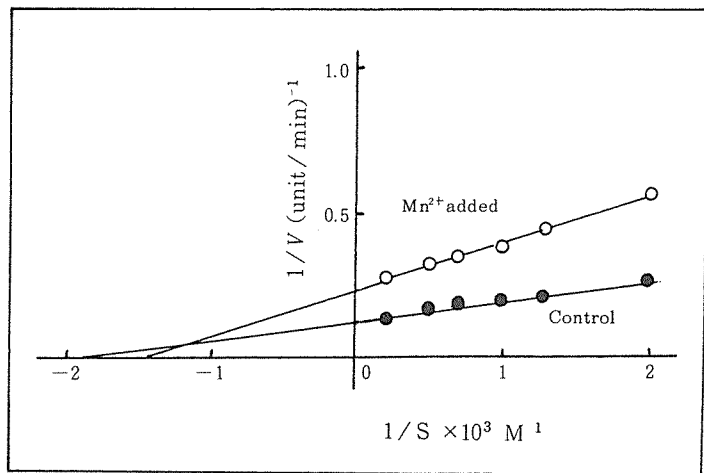


Fig. 4 Activating effect of manganese on PhO activity.

PhO activity was measured by the same method as in Fig. 3, except that UF was replaced by  $Mn^{2+}$  (final concentration,  $5 \times 10^{-4} M$ ).

Table 1 Effects of copper and zinc on the activation of manganese for PhO

| Metal ions added (final concentration)  | Relative oxidation rate (%) |
|---|-----------------------------|
| None  | 100                         |
| $\text{Mn}^{2+}$ ( $5 \times 10^{-4}\text{M}$ )   | 420                         |
| $\text{Mn}^{2+}$ ( $5 \times 10^{-4}\text{M}$ ) + $\text{Cu}^{2+}$ ( $5 \times 10^{-5}\text{M}$ ) | 339                         |
| $\text{Mn}^{2+}$ ( $5 \times 10^{-4}\text{M}$ ) + $\text{Zn}^{2+}$ ( $5 \times 10^{-4}\text{M}$ ) | 396                         |

PhO activity was measured by the same method as in Fig. 1, except that UF was replaced by metal ions.

Relative oxidation rate of PhO in the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  ( $5 \times 10^{-5}\text{M}$ ) and  $\text{Zn}^{2+}$  ( $5 \times 10^{-4}\text{M}$ ) were 17 and 75 percent, respectively.

がら共存する。したがって、それら金属の  $\text{Mn}^{2+}$  の賦活作用に及ぼす影響についても確かめる必要がある。そこで、 $\text{Mn}^{2+}$  ( $5 \times 10^{-4}\text{M}$ ) を含む PhO のモデル反応系を設定し、この反応系に対する  $\text{Cu}^{2+}$  および  $\text{Zn}^{2+}$  の影響について調べた。Table 1 に示したように、 $\text{Mn}^{2+}$  と同濃度の  $\text{Zn}^{2+}$  ( $5 \times 10^{-4}\text{M}$ ) は  $\text{Mn}^{2+}$  の賦活作用にあまり大きな影響を及ぼさなかったが、 $\text{Mn}^{2+}$  の 1/10 濃度の  $\text{Cu}^{2+}$  ( $5 \times 10^{-5}\text{M}$ ) は賦活作用をやや低下させるようであった。しかし、前記のように UF 中に含まれるこれら金属イオンの濃度はこの実験の場合よりはるかに低濃度であるので、UF 中に共存するこれら金属の  $\text{Mn}^{2+}$  の賦活作用に及ぼす影響はきわめて小さいものと思われる。

以上のように、UF 中に含まれる PhO 賦活因子がかなり低分子量の物質であること、その熱安定性が高いこと、PhO を賦活するのに十分な量の  $\text{Mn}^{2+}$  が UF 中に存在すること、さらに、PhO に対する賦活様式が UF と  $\text{Mn}^{2+}$  との間でよく一致することが明らかになった。これらの結果から、UF 中の PhO 賦活因子の本体は  $\text{Mn}^{2+}$  であろうと推定される。

## 摘 要

カブ根磨砕汁液の限外濾過液 (UF) がフロログルシノール酸化酵素 (PhO) の賦活作用を有すること、ならびに、その UF 中には  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  および定性的に検出できる程度の  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  等の金属が存在することが認められた。そこで、UF 中の賦活因子の本体とこれら金属イオンとの関係を究明するために、UF および金属イオンの PhO に及ぼす影響について検討した。PhO 活性は  $\text{Mn}^{2+}$  および UF によって著しく賦活化され、両者の PhO に対する賦活様式はよく一致した。UF 中には、 $\text{Mn}^{2+}$  は PhO を賦活化するのに十分な量で存在したが、既報<sup>5)</sup>で賦活作用が認められた  $\text{Fe}^{2+}$  はきわめて低濃度であった。また、UF 中に共存する  $\text{Zn}^{2+}$  および  $\text{Cu}^{2+}$  等の微量の金属は  $\text{Mn}^{2+}$  による PhO の賦活作用にほとんど影響を与えなかった。

以上のことから、カブ根中に存在する PhO の賦活因子の本体は  $\text{Mn}^{2+}$  であろうと推定した。

## 文 献

- 1) Cheniae, G. M. (1970). *Ann. Res. Plant Physiol.*, **21**, 467.
- 2) Chmielnicka, C. J. (1967). *Acta Pol. Pharm.*, **24**, 199. [*C. A.*, 85870g (1970)].
- 3) 藤田修二・東野哲三 (1979). *農化*, **53**, 233.
- 4) 藤田修二・東野哲三 (1980). *農化*, **54**, 201.
- 5) 藤田修二・東野哲三 (1980). *農化*, **54**, 429.

- 6) 藤田修二・東野哲三 (1982). 佐賀大農彙, **53**, 17.
- 7) Kok, B. and G. M. Cheniae (1966). *Current Topics in Bioenergetics*, **1**, 2, Academic Press Inc., New York.
- 8) Oku, H. (1968). Proceeding of the International Symposium of Plant Biochemical Regulation in Viral and Other Diseases on Injury, Phytophathol. Soc. of Japan, p 253.
- 9) Onishi, T., H. Yamazaki, T. Iyanagi, T. Nakamura and I. Yamazaki (1969). *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 357.
- 10) Sarutton, N. C. (1971). *Biochemistry*, **10**, 3897.
- 11) 東大農芸化学教室編 (1978). 実験農芸化学 (上), p 66, 朝倉書店, 東京.
- 12) Yamazaki, I. and L. H. Piette (1963). *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 47.