



# 青果物中の1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC)含量とACC synthaseの活性の測定法について

寺井, 弘文

---

(Citation)

神戸大学農学部研究報告, 17(1):19-23

(Issue Date)

1986

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/00225583>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00225583>



## 青果物中の 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)含量と ACC synthase の活性の測定法について

寺 井 弘 文\*

(昭和60年8月10日受理)

### ON THE PROCEDURE OF MEASUREMENT OF 1-AMINO- CYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) CONTENT AND ACC SYNTHASE ACTIVITY IN FRUITS AND VEGETABLES

Hirofumi TERAJI

#### Abstract

This paper dealt with the procedure of measurements of content of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and activity of ACC synthase in plant tissue.

With regard to the extraction and determination of ACC, when  $\text{HgCl}_2$  and the mixture of 5% NaOCl and saturated NaOH (NaOCl/NaOH) were added in a water soluble fraction, ethylene production was variable according to the amount of NaOCl/NaOH in a vessel. Addition of 0.1 ml of NaOCl/NaOH was not enough to produce sufficient ethylene from ACC when 0.8 ml of water soluble fraction was extracted from more than 1/2 grams of cucumber tissue, but this amount of NaOCl/NaOH was sufficient to the fraction extracted from less than 1/4 grams of the tissue. These results indicate that when the plant tissues contained little amount of ACC, large amount of tissue and enough quantity of NaOCl/NaOH were required for analysis as shown in Fig. 3.

Figure 4 shows the procedure of extraction and measurement of activity of ACC synthase. The fractions excluded protein produced ethylene by adding the EPPS buffer for reaction without incubation as well as the fraction included protein produced ethylene (Fig. 7). These results suggest that attention was required to avoid the contamination of these constituents from enzyme fraction for measurement of ACC synthase activity.

#### 緒 論

エチレンは植物ホルモンの一つであり、その生成の経路は Adams and Yang<sup>1)2)</sup>により methionine  $\rightarrow$  S-adenosyl-methionine (SAM)  $\rightarrow$  1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)  $\rightarrow$  ethylene であると提唱されている。その生成経路の発表以来、それに関し多くの研究がなされる様になった。なかでも ACC の含量がエチレンの生成量と深い関係を持つこと<sup>4)</sup>と ACC を生成する酵素すなわち ACC synthase がこの経路の key enzyme であること<sup>11)</sup>から特に多くの研究がこの点に集中している。

ACC の能率的な定量法は Lizada and Yang<sup>6)</sup>により発表され、また ACC synthase の活性の測定は Yu<sup>11)</sup>や Boller<sup>3)</sup>により開発され、現在ではそれぞれこれらの方法に準じて定量ないしは活性の測定が行われている。しかし、これらの方法は発表されてからまだ日も浅く、十分検討され尽しているとはいえず、まだ改良の余地がある様に思われる。

本報告は筆者がエチレンの生成経路を研究する際、ACC の定量と ACC synthase の活性の測定について、気づいた事からについて若干検討したものである。

#### 材料と方法

材料として市販のキュウリ果実と神戸大学で栽培された '米寿' トマトを使用した。キュウリ果実は厚さ 3 mm

\* 保蔵加工学研究室

に輪切り切片としたものを液体チッソで凍結した。‘米寿’トマトは mature green のものを直径1 cmのコルクボーラーで打ち抜き、表皮の付いた側を厚さ3 mmに切断し、さらにそれを扇形に4等分した。それを30℃下で6時間インキュベートし、液体チッソで凍結した。キュウリ切片はACCの定量に用い、‘米寿’トマトの切片はACC synthase 活性の測定に用いた。ACCの定量は第3図に、またACC synthase の活性の測定は第4図に示した様に行った。なお第5図に示したタンパク質の定量はCoomassie brilliant blue法<sup>10)</sup>によって行った。

### 結果および考察

#### ACCの定量

Lizada and Yang<sup>6)</sup>の方法によると組織からのACCの抽出は5%のスルホサリチル酸によって行われ、イオン交換樹脂により精製される。そして、もとの組織量に換算して1 g以下の抽出液を1つの容器に入れ、それにHgCl<sub>2</sub>及び5% NaOClと飽和NaOHの混合液（以下NaOCl/NaOHと記す）0.1 mlを投入し、抽出液中に含まれるACCをエチレンに交換し、そのエチレン量によりACCの量を推定する。最近では抽出は80%のエタノールにより行われることが多く、<sup>5)7)8)9)</sup>イオン交換樹脂による精製は行われない。そこでこの方法ではNaOCl/NaOHの量がACCのエチレンへの交換にいかに関与するのかをみたのが第1図である。これは

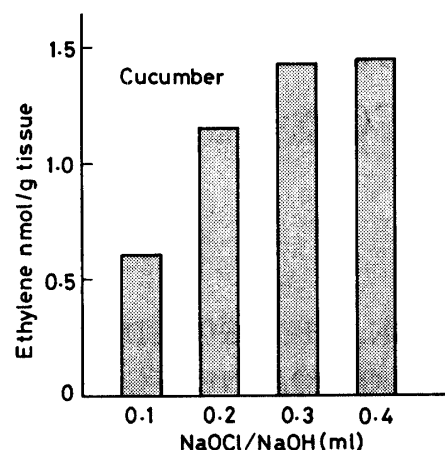


Fig. 1 Changes in ethylene evolution of the extracts from 2 grams of fresh fruit tissue per reaction vessels by adding the various amounts of NaOCl/NaOH.

The extracts were assayed by the method of Lizada and Yang.<sup>6)</sup>

1容器に対し、キュウリの生鮮重に換算して、2 g分の抽出液0.8 mlに一定量のHgCl<sub>2</sub>とNaOCl/NaOHを0.1 mlずつ増して加え、その時のエチレン発生量を調べたものである。0.1 mlのNaOCl/NaOHにさらに0.1 mlを加え、計0.2 mlとすれば発生量は約2倍となり、さらに加えると増加し、0.3 mlでは飽和量となった。つぎに、1容器当たり何gの組織量であればNaOCl/NaOHを増しても発生するエチレン量は増加せず飽和量となるかを

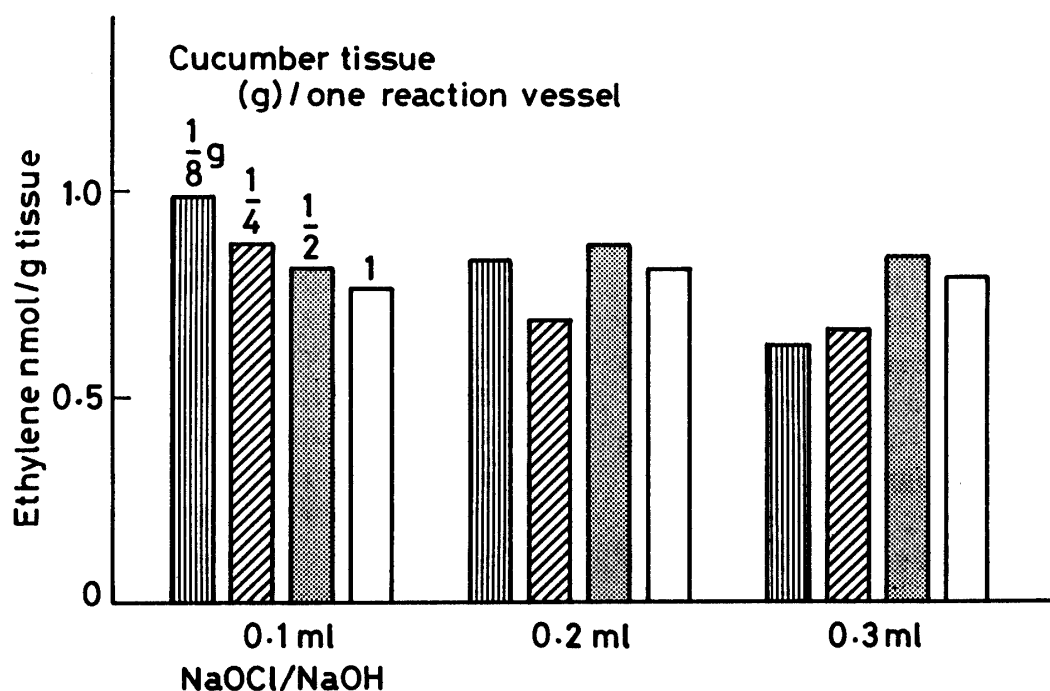


Fig. 2 Changes in ethylene evolution of the extracts from various amounts of fresh fruit tissue. The extracts were assayed by the method of Lizada and Yang.<sup>6)</sup>

### Extraction of ACC

Sliced tissue of the fruit was frozen in liquid nitrogen.



The frozen sample (5 g) was boiled with 80% Et-OH (50ml) in water bath for 30 minutes at 70°C.



The tissue was homogenized in a homogenizer at 1000 rpm for 10 minutes in ice bath.



The homogenate was centrifuged at 10000xg for 15 minutes at 0°C.



The supernatant was stored at -20°C until analysis.

### Assay of ACC

The Et-OH solution (tomato : 11ml, cucumber : 22ml) was dried up under vacuo at 40°C.



The dried sample was dissolved with 4ml of water and the water solution was filtrated with millipour filter (pore size :  $\phi 1.0\mu\text{m}$ )



The water soluble fraction (0.8ml) and 20 mM  $\text{HgCl}_2$  (0.05ml) are sealed with a serum rubber stopper in a reaction vessel (capacity about 20ml), then 0.1ml (tomato) or 0.2ml (cucumber) of a mixture of 5%  $\text{NaOCl}$  and saturated  $\text{NaOH}$  (2 : 1, V/V) is added by a syringe in an ice bath. The reaction mixture in vessel was agitated on a shaker for 5 minutes. Produced ethylene was measured by GLC.

Fig. 3 Procedure used for extraction and assay of ACC.

### Preparation of ACC synthase

Sliced tissue of the fruit was frozen in liquid nitrogen.



The frozen sample (7g) was homogenized in 5 times volume (35ml) of 100 mM EPPS buffer pH 8.5 (5 mM DTT and 5  $\mu\text{M}$  pyridoxal phosphate) containing 10% (W/W) polyclar AT with a mortar and pestle in ice bath.



The homogenate was squeezed through four layers of cheesecloth and then centrifuged at 10000xg for 15 minutes at 0°C



The crude extract (supernatant) was purified by precipitation with ammonium sulfate (90% saturation, supernatant 20ml : ammonium sulfate 13g) for 40 minutes at 1°C and then centrifuged at 3000xg for 15 minutes at 0°C.



The precipitation was dissolved with 2 ml 5 mM EPPS buffer pH 8.5 (1mM DTT and 5  $\mu\text{M}$  pyridoxal phosphate) and passed through Sephadex G-25 (fine) column (2  $\times$  10cm) with same EPPS buffer at 1°C.

### Assay of ACC synthase

Reaction mixture

enzyme fraction, 0.8 ml

500 mM EPPS buffer pH 8.5, 0.1 ml

500  $\mu\text{M}$  SAM, 0.1 ml



The mixture was incubated at 30°C for 2 hours.



After incubation, the reaction vessel was sealed with rubber serum stopper, and 0.1ml of 20 mM  $\text{HgCl}_2$  and 0.1ml of mixture of 5%  $\text{NaOCl}$  and saturated  $\text{NaOH}$  (2 : 1, V/V) were injected through the stopper by means of syringe.



The mixture in the reaction vessel was agitated on a shaker for 5 minutes at 1°C, after which 1 ml gas sample was withdrawn for ethylene determination.

Fig. 4 Procedure used for preparation and assay of ACC synthase.

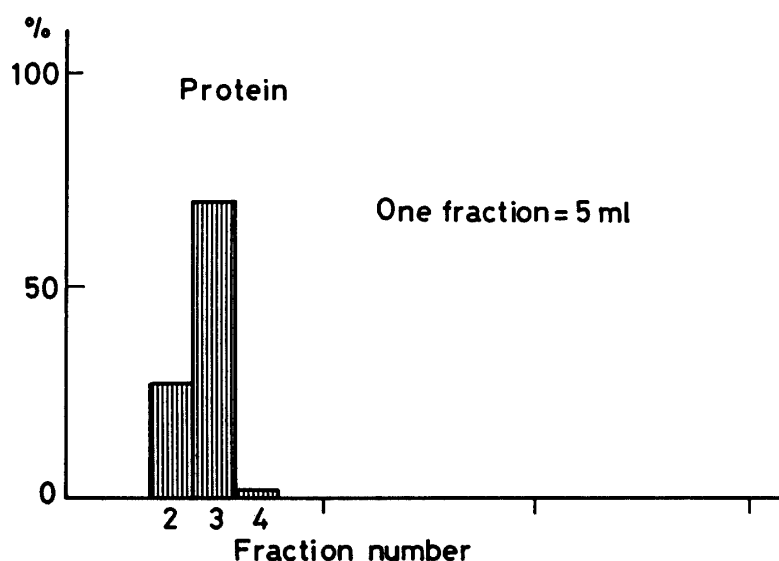


Fig. 5 Elution pattern of protein obtained by Sephadex G-25 (fine) gel column ( $2 \times 10$  cm) using the extract from sliced tomato tissue allowed to stand for 6 hr at  $30^\circ\text{C}$

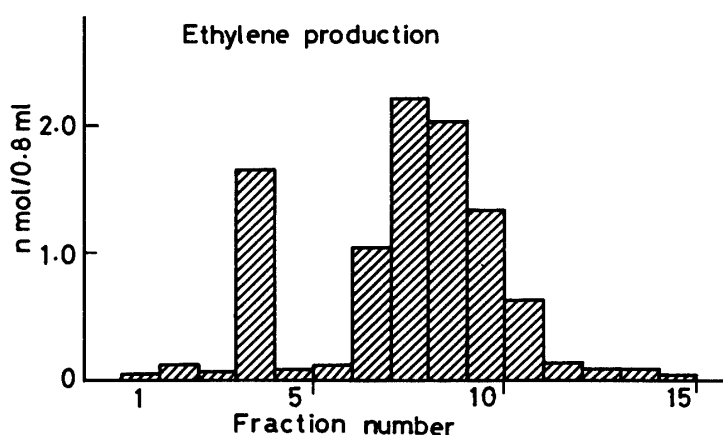


Fig. 6 Ethylene evolution of the fractions obtained by Sephadex G-25 (fine) gel column ( $2 \times 10$  cm) using the extract from sliced tomato tissue allowed to stand for 6 hr at  $30^\circ\text{C}$ .

The procedure of chromatography was same as given in Fig. 4 (preparation of ACC synthase) and each fraction was assayed by the procedure as shown in Fig. 4 (Assay of ACC synthase) except the incubation of reaction mixture.

みたのが第2図である。なお発生量は1g当りのエチレン量に換算した。その結果、NaOCl/NaOH 0.1 mlでは、1容器内に入れる組織量が少ないほど1g当りのエチレン発生量は多くなった。また、NaOCl/NaOHを増加した場合、1/8gと1/4gではエチレンの発生量は減少した。これは同じ容器から続けてガスを採取したためと考えられる。それに対し、1/2gや1gではNaOCl/NaOHが0.2mlになるとやや増加した。このことから、1容器内の組織量が1/2g以上になると0.1mlのNaOCl/NaOHでは十分エチレンが発

が発生せず、飽和量に達しないことがわかった。

以上のことから、青果物からのACCの抽出および定量法としては第3図に示すように、抽出は80%エタノールで行い、1容器内にはACC含量の少ない材料、例えばキュウリ等では生鮮組織量に換算して0.4gとし、NaOCl/NaOHを0.2ml量とした。一方、ACC含量の比較的多い材料(トマト等)に対してはそれぞれキュウリの1/2量とした。

#### ACC synthase 活性の測定

ACCを生体内で生成する酵素としてACC synthaseがある。その酵素の抽出と活性の測定は、まずpH8.5のbufferにより抽出・塩析の後Sephadexで脱塩精製するか、または抽出後透析により精製する。その酵素液に基質としてSAMを加え、インキュベーションの後生成したACCをLizada and Yang<sup>6)</sup>の方法によりエチレンに変換し、その量により酵素の活性とする。第4図は塩析とSephadexによる脱塩法を採用した測定法の一例を示したものであるが、やや問題が認められたので詳しく検討した。第5図はSephadex G-25によるタンパク質の流出パターンである。1フラクション5mlとして分画すると、主に2と3の画分にタンパク質がみいだされた。し

かし、第6図に示した様にタンパク質を含まない4と7~11の画分にも酵素を含む画分と同じ様に基質と反応用のEPPS bufferを混在させるとインキュベーションを行わなくてもエチレンの発生することが認められた。第7図は各種の条件で各画分のエチレン生成の状況を見たものである。a~dは3の画分をe, g, hは4や8の画分をfは8の画分を使用して調査した。その結果a~dのタンパク質画分を使用したものはインキュベーションを行わなかったり(b), または熱により失活させたり(c), 基質(SAM)を加えなかったり(d)するとエチレンは発生

	Eluate 0.8 ml	Boil	EPPS Buffer pH8.5 500 $\mu$ M 0.1 ml	SAH 500 $\mu$ M 0.1 ml	Incubation 30°C 2h	HgCl <sub>2</sub> & NaOCl/NaOH	Ethylene
a							+
b							tr
c							tr
d							tr
e							+
f							+
g							+
h							tr
i							tr

Fig. 7 Ethylene evolution with or without treatments

Of the fractions obtained by Sephadex G-25 (fine) gel column as shown in Fig.5 and Fig.6, No.3 fraction was used for the experiments of a, b, c and d, and No.4 and No.8 were used for e, g, and h, and No. 4 was used for f.

▨ with treatment,  
□ without treatment

しなかった。しかしe~hではインキュベーションを行わなくてもエチレンが発生したり、また基質を加えなくてもエチレンが発生した。しかしhやiの様に画分にEPPS buffer を加えなかったものや、EPPS buffer だけのものではエチレンが発生しなかった。このことから、e, f, gの様なエチレンの発生は4や7~11の画分と反応用のEPPS buffer が共存する時のみみられる現象であることがわかった。以上のことから第4図に示した方法でACC synthase を精製し活性を測定する時は、3のタンパク質画分に4や7~11の画分が混在しない様に留意し、また同じカラムを再度使用の際は十分洗浄することに心がけねばならないと思われる。

### 摘 要

本報告は1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) の含量とACC synthase の活性の測定における問題点について検討したものである。

ACCの定量はLizada and Yang の方法<sup>6)</sup>に準じて行われたが、抽出した水溶液フラクション(0.8ml)にHgCl<sub>2</sub>や5% NaOClとNaOHの飽和液の混合液(NaOCl/NaOH)を投入する時、水溶液フラクション中に含まれる組織量によっては、0.1mlのNaOCl/NaOHでは、十分なエチレンが発生しないことがわかった。すなわち0.8mlの水溶液のフラクション中に含まれる組織の量をもとの新鮮重に換算した時、キュウリ1/2g以上に対し、0.1mlのNaOCl/NaOHでは不足であり、1/4g以下では十分であることが明らかとなった。このことからACC含量の少ない材料を測定する際、組織量を増した場合にはNaOCl/NaOH量を増す必要があるものと思われる。

ACC synthaseの抽出および活性の測定を第4図に示した方法で行う時、Sephadex G-25の流出フラクション

中、タンパク質が含まれない画分にも、反応用のEPPS bufferを混合するとインキュベーションを行わなくてもエチレンの発生があることがわかった。したがって、ACC synthaseをSephadex G-25で精製する時、酵素画分にこのような成分が混入しない様に留意する必要があるものと思われる。

### 引用文献

- 1) ADAMS D. O. and S. F. YANG : *Plant Physiol.*, **60**, 892-896, 1977.
- 2) ADAMS D. O. and S. F. YANG : *Proc. Nat Acad. Sci. (U.S.A.)*, **76**, 170-174, 1979.
- 3) BOLTER T., R. C. HERNER, and H. KENDE : *Planta*, **145**, 293-303, 1979.
- 4) CAMERON A. C., C. A. L. FENTON, Y. YU, D. O. ADAMS, and S. F. YANG : *Hort-Science*, **14**, 178-180, 1979.
- 5) KAO C. H. and S. F. YANG : *Planta*, **155**, 261-266, 1982.
- 6) LIZADA M. C. C. and S. F. YANG : *Anal. Biochem.*, **100**, 140-145, 1979.
- 7) McKEON T. A., N. E. HOFFMAN, and S. F. YANG : *Planta*, **155**, 437-443, 1982.
- 8) McKEON T. A. and S. F. YANG : *Planta*, **160**, 84-87, 1984.
- 9) RIOV J. and S. F. YANG : *Plant Physiol.*, **70**, 136-141, 1982.
- 10) 菅原 潔・副島正美：蛋白質の定量法（生物化学実験法7）瓜谷郁三ら編, 162-165, 学会出版センター, 1982.
- 11) YU Y., D. O. ADAMS, and S. F. YANG : *Arch. Biochem. Biophys.*, **198**, 280-286, 1979.