

ルシフェリン-ルシフェラーゼ法によるアデニル酸定量のための 大麦根からのサンプル抽出方法の検討

秋山佳子・柴坂三根夫・河崎利夫*

Evaluation of Three Different Procedures for Extracting Adenylates from Barley Roots Prior to Luminometric Quantification

Yoshiko AKIYAMA, Mineo SHIBASAKA and Toshio KAWASAKI

Three methods were compared for extracting adenylates from barley roots prior to their quantification by a lumino-metric method. In respect of efficiency in extracting adenylates and easiness in handling, the best result was obtained in the root sample which was homogenized in perchloric acid, neutralized by mixing with octylamine dissolved in 1, 1, 2-trichloro-1, 2, 2-trifluoroethane and centrifuged.

Key words : Adenylate extraction, ADP, AMP, ATP, Barley roots

緒 言

アデニル酸は植物のエネルギー代謝の基本物質であり、各種代謝の主要な調節物質でもある。したがって、植物の代謝変動の研究にはアデニル酸の定量が重要となる場合がしばしばある。我々はオオムギの根では塩類高濃度ストレス下で呼吸活性が低下するなど、激しい代謝変動を示すという実験結果を得ている。この代謝変動を詳細に調べるためにはアデニル酸の定量は欠かすことができない。アデニル酸の定量法はいくつか開発されているが、高感度定量法としてルシフェリン-ルシフェラーゼ法が一般的に広く用いられている (Hampp 1983)。これは、ATP とルシフェリンとが、 Mg^{2+} とルシフェラーゼの存在下でアデニル酸ルシフェリンとなり、これが酸素により酸化的脱炭酸反応の形で分解される際に発する蛍光を

Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 710, Japan

平成7年1月10日受理 (Received January 10, 1995)

本研究の一部は平成6~7年度文部省科学研究費「塩生植物根における無機養分輸送の耐塩性メカニズムの解析: 課題番号06660080」によって行われた。

*岡山大学名誉教授

測定する方法である。この方法は酵素反応を利用するため、生体試料からの代謝産物抽出の常法である酸抽出で得た試料は中和しなければならない。よく用いられている過塩素酸で抽出し、水酸化ナトリウムや水酸化カリウムで中和する方法 (Hampp 1983) は、試料の量によって中和に必要な塩基の量が 10^{-3} ml オーダーで異なるため、多数の試料を抽出する場合は非常に手間と時間がかかるという欠点がある。この過塩素酸抽出の変法として、中和に要する手間を省くために、有機溶媒で過剰の酸・塩基を取り除く方法が開発されている (Rychter *et al.* 1992, Sagrio and Pradet 1980)。これらの方法は比較的最近に開発されたもので、他の方法と比較検討した報告はない。そこで本研究では、高等植物根のアデニル酸を定量する際のいくつかの抽出方法について若干の比較検討を試みた。また、試料植物を高濃度塩処理した場合に、アデニル酸定量にどのような影響がでるのかもあわせて検討した。

本論文を校閲していただいた中島進博士に感謝いたします。

材料および方法

1. 植物材料

オオムギ品種赤神力 (*Hordeum vulgare* L., cv. Akashinriki) の種子を10%過酸化水素水で5分間滅菌後、25°C の水中で24時間、暗条件下で通気しながら発芽させた。発芽種子を0.25 mM 硫酸カルシウム溶液で3日間、さらに培養液で1日間育成した。塩化ナトリウム処理は最終濃度が250 mM となるよう、食塩を培養液に加えた。培養液の基本組成は KNO_3 4.0 mM, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1.0 mM, CaCl_2 1.0 mM, MgSO_4 1.0 mM, Fe 1.0 mg/l, B 0.5 mg/l, Mn 0.5 mg/l, Zn 0.05 mg/l, Cu 0.02 mg/l, Mo 0.01 mg/l である。根を先端から1 cm 切りとり、液体窒素中で瞬間的に凍結させ、抽出するまで -80°C で保存した (Hampp 1983)。

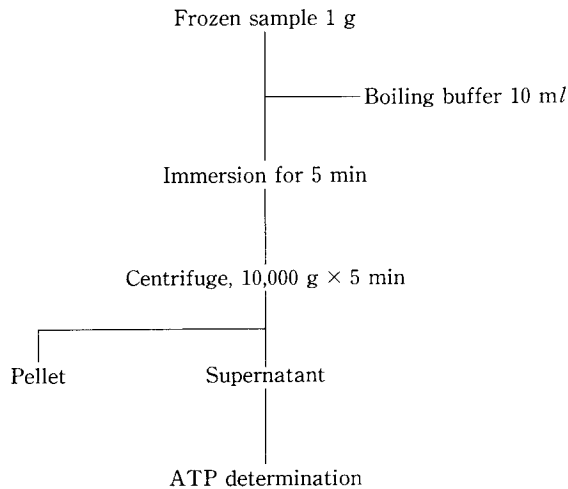


Fig. 1. Flow chart of adenylate extraction by boiling-method.

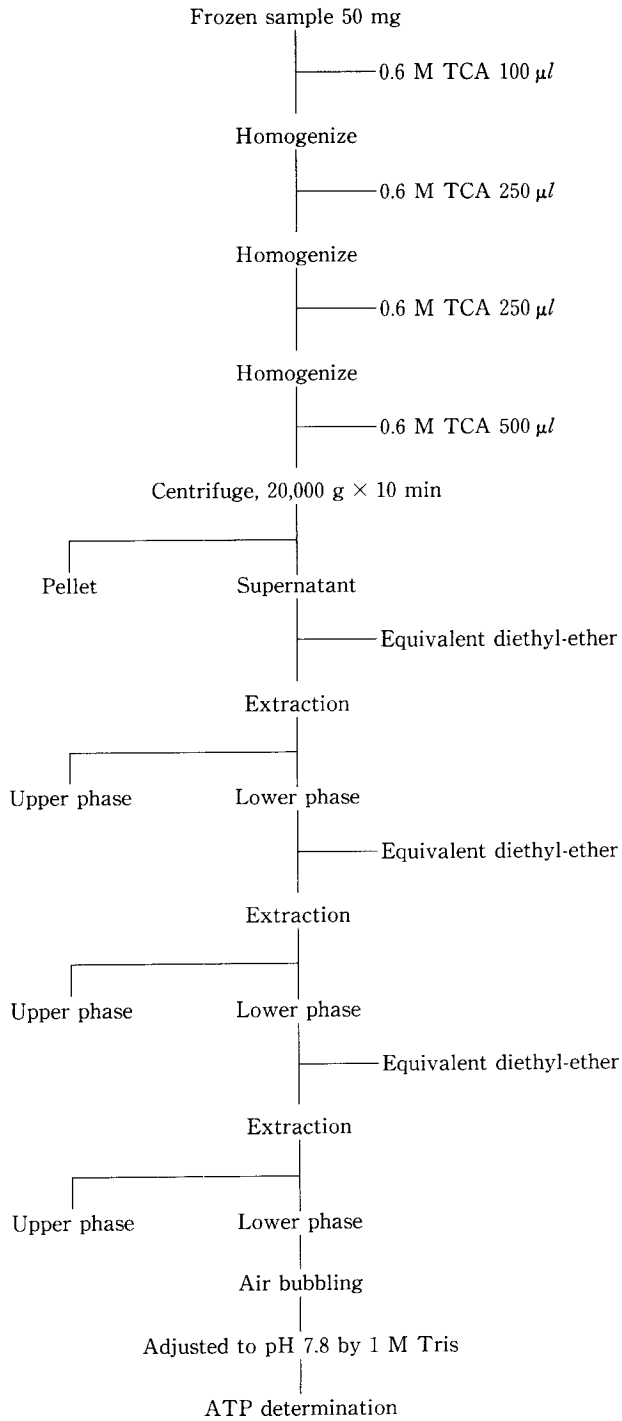


Fig. 2. Flow-chart of adenylate extraction by TCA-ether-method.

2. 抽出方法

(1) 凍結試料約 1 g を緩衝液 10 ml 中で 5 分間煮沸した。緩衝液の組成は 25 mM Hepes, 10 mM EDTA, 0.3% 過酸化水素 (水酸化カリウム溶液で pH 7.4 に調整) の水溶液である。得られた抽出液を 10,000 g で 5 分間遠心し, 上清を小分けして -20°C で保存した (Mimura *et al.* 1984) (Fig. 1)。以後この方法を「煮沸法」と簡略化して呼ぶ。

(2) 凍結試料約 50 mg をガラスホモジナイザーに入れ, 0.6 M トリクロロ酢酸 (TCA) 100 μl を加えて, 磨砕した。さらに, 0.6 M TCA 250 μl を 2 回, 500 μl を 1 回加えて磨砕した。得られた磨砕液を 20,000 g で 10 分間遠心後, 上清に等量のエチルエーテルを加えて 3 回抽出した。上層のエチルエーテル層を回収し, 通気して下層液に残っているエチルエーテルを取り除いた。これを 10 ml メスフラスコに取って脱塩水で 10 ml とし, 1 M トリスで pH 7.8 に調整した。以上の操作は 0°C で行った (Sagrìo and Pradet 1980) (Fig. 2)。以後この方法を「TCA-エーテル法」と簡略化して呼ぶ。

(3) 凍結試料約 50 mg をガラスホモジナイザーに入れ, 5% 過塩素酸 (PCA) 1 ml を加えて磨砕した。磨砕物を遠沈管に移した後, ガラスホモジナイザー中の残渣を 5% 過塩素酸 1 ml を用いて遠沈管に洗い込み, 6,500 g で 1 分間遠心した。上清に等量のトリオクチルアミ

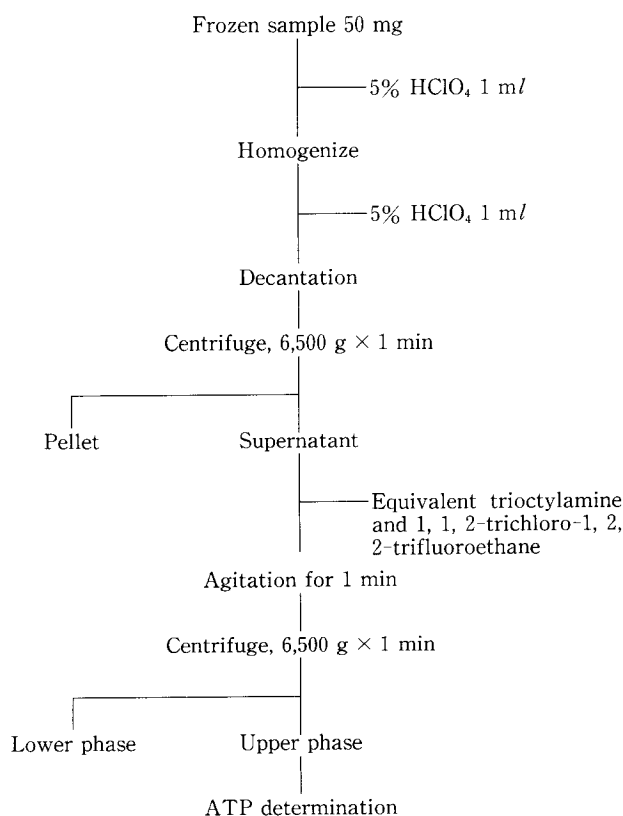


Fig. 3. Flow-chart of adenylate extraction by PCA-fro-m method.

ン(関東化学株式会社 東京)と1,1,2-トリクロロ-1,2,2-トリフルオロエタン(フロン)(ナカライテスク株式会社 京都)を加えて1分間激しく振とうした後, 6,500 gで1分間遠心した。水層(上層)を10 ml メスフラスコに取り脱塩水で10 mlとしたものを小分けして-20°Cで保存した。以上の操作は0°Cで行った(Rychter *et al.* 1992)(Fig. 3)。以後この方法を「PCA-フロン法」と簡略化して呼ぶ。

3. 定量方法

ATPは米国アミンコ社(Silver Spring, Md., USA)製ATPフォトメーターを用いて, ルシフェリン-ルシフェラーゼ法により定量した(Hampp 1983)。試料溶液中の阻害物質の影響は内部標準法で補正した。ATP量は試料溶液をそのまま測定に用いた。ホスホエノールピルベートとピルベートキナーゼを用いて試料溶液中のADPをATPに変換することによって測定した値を[ATP+ADP]量とし, ホスホエノールピルベート, ピルベートキナーゼ, アデニレートキナーゼを用いて試料溶液中のAMPとADPをATPに変換することによって測定した値を[ATP+ADP+AMP]量として各アデニル酸量を計算により求めた。反応に用いた酵素は, ATP bioluminescence HSキット(Boehringer Mannheim社)を用いた。

エネルギー充足率(EC)は, 次式により計算した(Atkinson 1968)。

$$EC = ([ATP] + 0.5[ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$$

結果および考察

アデニル酸の抽出法として理想的なものは, 試料からアデニル酸が100%抽出され, 且つ高エネルギー結合を完全に保存するものでなければならない。本研究では同一の生理条件の植物試料から, 異なる方法で抽出した抽出液を同一の定量法で定量しているのので, 総アデニル酸量がより大きい値を示した抽出法を抽出効率のよいものと判定し, ATP量が大きい値を示した抽出法を高エネルギー結合をよく保存したものと判定することにする。

オオムギ根のアデニル酸定量に及ぼす抽出法の違いによる影響をTable 1に示す。比較し

Table 1. Comparison of adenylate levels extracted by three methods from barley roots grown in the ordinary culture medium

Method	ATP	ADP	AMP	Total	EC*(%)
	nmol/g dry weight				
Boiling	84 (9.4)	161 (17.9)	653 (72.7)	898 (100.0)	18.32
TCA-ether	852 (45.5)	824 (44.0)	196 (10.5)	1872 (100.0)	67.52
PCA-fron	1385 (51.7)	773 (28.9)	520 (19.4)	2678 (100.0)	66.15

Values in brackets represent the percent of the total adenylates.

*Energy charge $EC = ([ATP] + 0.5[ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$

た3法の中では、煮沸法が最も抽出効率が悪く、PCA-フロン法が最も抽出効率が高く、総アデニル酸量が約3倍であった。煮沸法は抽出効率が悪いだけでなく、抽出過程で高エネルギー結合を失い易く、ATP量は総アデニル酸の約10%しか検出されず、総アデニル酸の72%以上がAMPであった。最も抽出効率のよかったPCA-フロン法では、総アデニル酸量の51%以上がATPで、AMPは20%以下であったことから、抽出過程で高エネルギー結合がよく保存されていると思われる。煮沸法に比べ、PCA-フロン法ではATP量が16.5倍以上の値を示した。このように抽出過程が高エネルギー結合の保存に影響を与えるので、エネルギー充足率(EC)も数倍の違いを示した。TCA-エーテル法は抽出効率で見ると、煮沸法とPCA-フロン法の間値を示した。ECはPCA-フロン法と同等の値を示しているが、抽出されたAMP量の値が低いことが原因であり、ATP量はPCA-フロン法に比べて低く、高エネルギー結合の保存が良好な方法とは言えない。

高濃度NaCl処理したオオムギ根から抽出した場合をTable 2に示した。抽出効率及び高

Table 2. Comparison of adenylate levels extracted by three methods from barley roots grown in medium with 250 mM NaCl

Method	ATP	ADP	AMP	Total	EC*(%)
	nmol/g dry weight				
Boiling	40 (5.1)	92 (11.8)	649 (83.1)	781 (100.0)	11.01
TCA-ether	568 (40.7)	458 (32.8)	370 (26.5)	1396 (100.0)	57.09
PCA-fron	799 (40.9)	585 (29.9)	570 (29.2)	1954 (100.0)	55.86

Values in brackets represent the percent of the total adenylates.

*Energy charge EC = $([ATP] + 0.5[ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$

エネルギー結合の保存の傾向はTable 1の場合と同様で、煮沸法が最も悪く、PCA-フロン法が最も抽出効率が高かった。煮沸法に対してPCA-フロン法では、総アデニル酸は約2.5倍、ATP量では約20倍であり、TCA-エーテル法は両者の間値を示した。AMP量はTable 1と同様にTCA-エーテル法で最も低くなったことから、この方法ではAMPが不安定になるのか、AMP測定用に用いるアデニレートキナーゼの活性が低下するなどの特別の理由があるのかも知れない。

この3法の中で、PCA-フロン法が最も抽出効率が高く、高エネルギー結合の保存も良好なので、最もよい方法であると言える。またこの方法は、操作が煮沸法より複雑であるが、比較的簡便な点も評価できるので、総合的に優秀な方法と言える。しかし、フロンはオゾン層破壊を引き起こすことで国際的に問題になっており、その代替品の開発が急務になっている現在、フロンを使用しない抽出法の検討が急がれる。

摘 要

高等植物根のアデニル酸をルシフェリン-ルシフェラーゼ法による定量に適する抽出法を捜すために、数種の抽出法を比べた。過塩素酸で抽出し、オクチルアミンで中和し、フロンで洗う方法が最も抽出効率が高く、また比較的操作が簡便であった。

キーワード：アデニル酸抽出，ADP，AMP，ATP，オオムギ根

引 用 文 献

- Atkinson, D. E. 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 7: 4030-4034.
- Hampp, R. 1983. Methods of enzymatic analysis. *In* "Metabolites 2, Tri- and dicarboxylic acids, purines, pyrimidines and derivatives, coenzymes, inorganic compounds, Vol. 7" (Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Grassl, M., eds.), 370-379. Verlag Chemie, Weinheim.
- Mimura, T., Shimmen, T. and Tazawa, M. 1984. Adenine-nucleotide levels and metabolism-dependent membrane potential in cells of *Nitellopsis obtusa* groves. *Planta* 162: 77-84.
- Rychter, A. M., Chauveau, M., Bomsel, J. and Lance, C. 1992. The effect of phosphate deficiency on mitochondrial activity and adenylate levels in bean roots. *Physiol. Plant.* 84: 80-86.
- Saglio, P. H. and Pradet, A. 1980. Soluble sugars, respiration, and energy charge during aging of excised maize root tips. *Plant Physiol.* 66: 516-519.