

短 報

酵素免疫測定法によるサツマイモの内生
アブシジン酸の簡易な定量法

中 谷 誠
(農業研究センター)

Application of Enzyme Immunoassay for Determination of
Endogenous Abscissic acid in Sweet Potato

Makoto NAKATANI
(National Agriculture Research Center, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan)
昭和63年6月22日受理

折谷ら²⁾はサツマイモ栽培種では塊根形成期の根の内生アブシジン酸 (ABA) 含量が塊根形成しない野生種と比べ高いことを報告し、サツマイモの塊根形成と ABA の関係を示唆している。このことをさらに解明していくためには簡易な内生 ABA の定量法が必要となる。従来、ABA の定量には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やガスクロマトグラフィーが用いられてきたが、試料調製の手数のため、多点数の分析は必ずしも容易ではなかった。ところが、近年免疫反応を用いた植物ホルモン検出法の研究が進展し、ABA についてもモノクローナル抗体を用いた酵素免疫測定法 (EIA) が開発された¹⁾。この分析キットは市販されている (Phytdotek-ABA: Idetek Inc.)。これはアルカリフォスファターゼを結合させた ABA をトレーサーとして、試料中の ABA と競合的に抗体に結合したトレーサーを酵素反応による吸光度変化で測定するものである。同法と HPLC とによる定量値を比較したところ、塊根についてはほぼ一致した値が得られ、従来法よりも簡易に塊根内生の ABA を定量することが明らかになったので報告する。

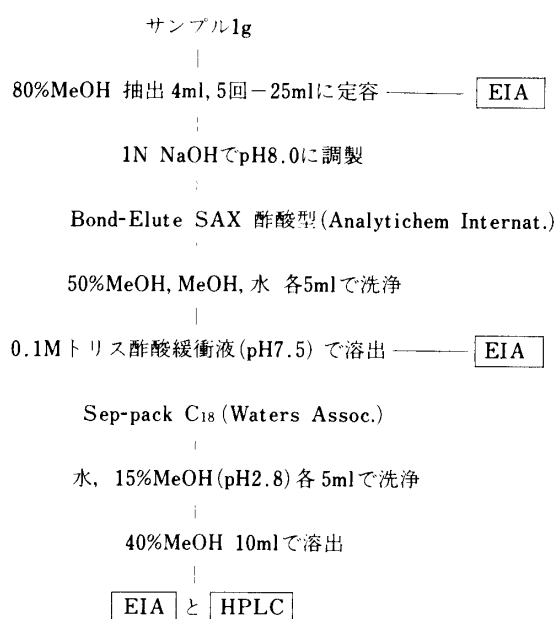
キーワード: ABA, 酵素免疫測定法, サツマイモ。

材料と方法

1. 分析材料

サツマイモの品種コガネセングンの植え付け約3ヶ月後の生育中の地上部並びにコガネセングン、高系14号、沖縄100号、紅赤、ベニアズマの同じ時期の生育中の塊根並びに貯蔵庫に貯蔵中の塊根を材料とした。なお、標準物質としては全てシス体のABA (CALBIOCHEM-BEHRING Corp.) を用いた。

2. 抽出・精製



第1図 EIA および HPLC 分析サンプルの精製過程。

塊根および地上部器官各1gを80%メタノール (MeOH) 4 ml 中で摩砕し、冷暗所で1夜放置し、遠心分離した。残渣をさらに80% MeOH 4 ml で4回抽出し、上澄を併せ、25 ml に定容した。これらを第1図に示す方法で精製段階の試料を EIA にて定量するとともに、最終精製物を HPLC にて分析した。

3. EIA による定量

Phytdotek-ABA キットを用いた。有機溶媒を含む試料はロータリーエバポレータで40°Cにて有機溶媒を留去した。各試料は25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) にて100 μ l がサンプル1 mg 相当になるよう希釈した。この溶液100 μ l とトレーサー溶液100 μ l を抗体を塗布したウェルに加え、4°Cで3時間放置した後、溶液を棄てた。200 μ l の洗浄

第1表 サンプル精製に伴う EIA による定量値と純品回収率の変化。

	無精製	Bond-Elut SAX	Sep-pak C ₁₈
定量値の平均 (pmole/gFW)	533.3	316.8	207.0
対無精製比率の平均±標準偏差 (%)	100	59.4±14.3	38.8±14.9
純品の回収率±標準偏差 (%)	100	59.0±8.3	29.5±10.8

注) サンプルは地上部 6 点, 塊根 14 点, 計 20 点の平均, 純品の回収率は 4 反復の平均。

第2表 各精製段階の EIA による定量値および HPLC による定量値間の相関係数。

		EIA			HPLC
		無精製	Bond-Elut SAX	Sep-pak C ₁₈	Sep-pak C ₁₈
地上部 および 塊根	無精製 (EIA)	—	0.98**	0.93**	0.68**
	Bond-Elut SAX (EIA)	—	—	0.96**	0.74**
	Sep-pak C ₁₈ (EIA)	—	—	—	0.79**
	Sep-pak C ₁₈ (HPLC)	—	—	—	—
塊根のみ	無精製 (EIA)	—	0.97**	0.90**	0.81**
	Bond-Elut SAX (EIA)	—	—	0.94**	0.90**
	Sep-pak C ₁₈ (EIA)	—	—	—	0.96**
	Sep-pak C ₁₈ (HPLC)	—	—	—	—

注) サンプルは地上部 6 点, 塊根 14 点, **は 1% 水準で有意を示す。

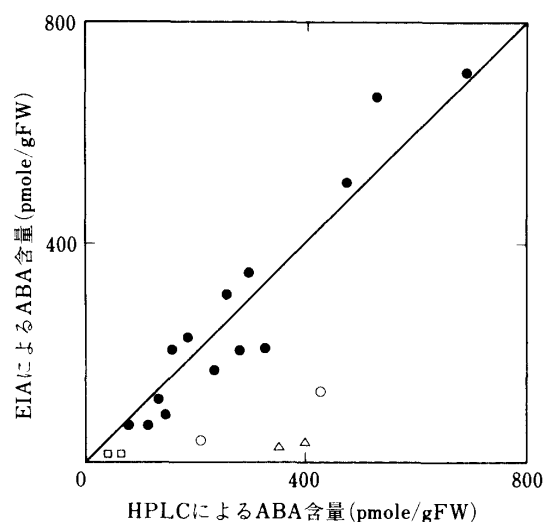
液で3回洗浄した後, 200 μ l の基質溶液を加え, 37°Cで1時間反応させ, MR 600 MicroPlate Reader (Dynatech Inc.) で 410 nm の吸光度を測定した。100 pmole の ABA を加えたものを非特異的結合とし, プランクに対するトレーサの結合比率 (B/B₀%) を Logit 変換して検量線を作成した。なお, 本キットの定量可能範囲は 0.02~5.0 pmole である。

4. HPLC による定量

6000 A 型ポンプ, 440 型アブソ-バンスディテクター, μ -Bondapack C₁₈ 3.9 mm×30 cm カラム (Waters Assoc.) を用いた。溶媒は 60% アセトニトリル/0.2 N 酢酸のリニアグラジエント (35:65 → 65:35 15 分間) とした。検出・定量は 280 nm の吸光で行った。

結果および考察

第1表には地上部と塊根抽出物合計 20 サンプルの第1図に示した各精製段階の EIA による定量値の平均値と無精製物に対する比率および各精製段階における純品の回収率を示した。また第2表には地上部も含めた場合と塊根のみの場合の各定量値間の相関係数を示した。各精製段階の EIA 定量値間には比較的大きな差があり, 精製程度が高いものほど定量値は低下したが, その低下率は純品の回収率とほぼ一致した。また, 各精製段階の EIA による定量値間の相関係数はいずれも 0.9 以上と高く, 精製による定量値の低下は回収率の低下によるものと思



第2図 Sep-pak C₁₈ 精製物の EIA および HPLC による定量値。

●: 塊根, ○: 葉身, △: 葉柄, □: 茎。

われる。第2図に示すように最終精製物の EIA と HPLC による定量値は塊根に限ればほぼ一致した。また, 塊根の定量値自体も折谷ら²⁾の報告とほぼ一致するものであった。無精製物の EIA と最終精製物の HPLC とによる定量の相関係数はやや低かったものの, これは回収率の変動によるものと思われる。このように塊根については無精製物でも EIA によりシス体の ABA を定量できるものと思われる。

しかし, 地上部器官については HPLC と EIA による定量値は一致しなかった。EIA は特異性の高い方法ではあるが, 定量は交差反応物質や酵素反応

の阻害，促進物（フェノール化合物等）により妨害される。地上部器官は塊根に比べ夾雑物が多く，これらが EIA の定量を妨害しているものと思われる。本実験での最終精製物でも妨害を受けていることや地上部器官の EIA による定量値の各精製段階間の相関は高いことから妨害物質の化学的性質は ABA に近いものと想像され，これらを除くには HPLC による精製が必要と考えられる。EIA をサツマイモの地上部器官の ABA 定量に適用するのは簡便性の点では実際的ではないと思われる。

その他の問題としては本法ではトランス ABA は定量できないことがあるが，この点はトランス ABA の抗体を作成すれば解決される問題である。

以上より，サツマイモの塊根については抽出液を緩衝液に移すだけで ABA を EIA で定量できるものと思われる。これは操作の点で非常に簡便で，回収率の問題もない。また，感度の点では HPLC が 1 回の分析に約 0.1 g 相当のサンプルを要するのに対し，EIA では 1 mg 相当あれば十分で，約 100 倍の感度である。これらから，EIA はサツマイモ塊根の形成・肥大と内生 ABA との関連等の研究において有効な方法と思われる。

引用文献

1. Merterns, R. et al. 1983. FEBS Lett. 160 : 269—272.
2. 折谷隆志ら 1983. 日作紀 52(別 1) : 115—116.