

.....
 解 説

Agrochemistry and Biology Series

エチレン生合成研究の最近の進歩 —ACC 合成酵素の研究を中心として—

佐藤 茂, 楊 祥 発*

東北大学教養部生物学科, *カリフォルニア大学デービス校蔬菜学科

(平成2年11月20日受理)

Recent Progress in Research of 1-Aminocyclopropane- 1-Carboxylate Synthase, the Key Enzyme in Ethylene Biosynthesis

Shigeru SATOH and Shang Fa YANG*

*Department of Biological Sciences, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai 980, Japan***Mann Laboratory, Department of Vegetable Crops, University of California, Davis, CA 95616, USA*

はじめに

エチレンは、種子の発芽、茎葉の老化、花卉の萎凋などの植物の生活環のなかで見られる正常な成長と分化の過程を調節するホルモンとして生成される。また、植物に加えられる物理的傷害、重金属イオンや化学薬剤による傷害、乾燥や湛水、低温暴露などのさまざまなストレスや、別のホルモンであるオーキシンの処理によっても生成が誘導される^{1,13)}。

エチレンは、図1に示したように、L-メチオニン→S-アデノシルメチオニン(SAM)→1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)→エチレンの経路で生合成される³⁰⁾。また、ACCはN-マロニル-ACC(MACC)にも代謝される。それぞれの反応を触媒する酵素は、メチオニンアデノシル転移酵素(EC 2.5.1.6)、ACC合成酵素(EC 4.4.1.14)、ACC酸化酵素(または、エチレン合成酵素、EFE、とも呼ばれる)、ACC-N-マロニル転移酵素である。植物体から生成される最終的なエチレン量は、生合成経路の上からは、これらのすべての反応の活性、すなわち各酵素の存在量や酵素活性に影響を与える物質の存在によって調節される可能性が考えられる。しかし、現在、上で述べたエチレン生成が高まる条件下では例外なくACC合成酵素活性の上昇が確認されており、エ

チレン生合成の調節に最も重要な役割を果たしているのはACC合成酵素であることが明らかにされている³⁰⁾。ACC合成酵素活性の増加は、この酵素の生合成によるものである²⁾。一方、メチオニンからSAMが生成する反応は、エチレン生合成の制限因子にはならない^{30,35)}。SAMはエチレン生成に使われるばかりでなく、生体内で起こるメチル化反応やポリアミン生合成などの基礎的代謝経路の重要な中間体であるため代謝回転速度が非常に大きい。既存のSAMのプールサイズは十分に大きく、ACC合成酵素活性が高まってACCの合成が亢進する場合でも、必要なSAMの供給を賄うことができる。ACCのエチレンへの分解活性については、エチレン生成が増加した植物組織で数倍に増加した例が報告されている³⁰⁾。しかし、多くの植物組織では外からACCを与えるとエチレン生成が格段に増加することが観察され、植物体内には構成的に十分な量のACC分解活性が存在していることが示される。したがって通常はこの活性はエチレン生成の律速因子にならない。一方、MACCはACCの最終代謝産物として生成されるが、この合成は過剰に生産されたACCをエチレン生合成経路から取り除く働きをしていると考えられている。以上の知見をまとめると、エチレン生合成はACC合成酵素活性の上昇によるACC供給の増加という粗調整(coarse

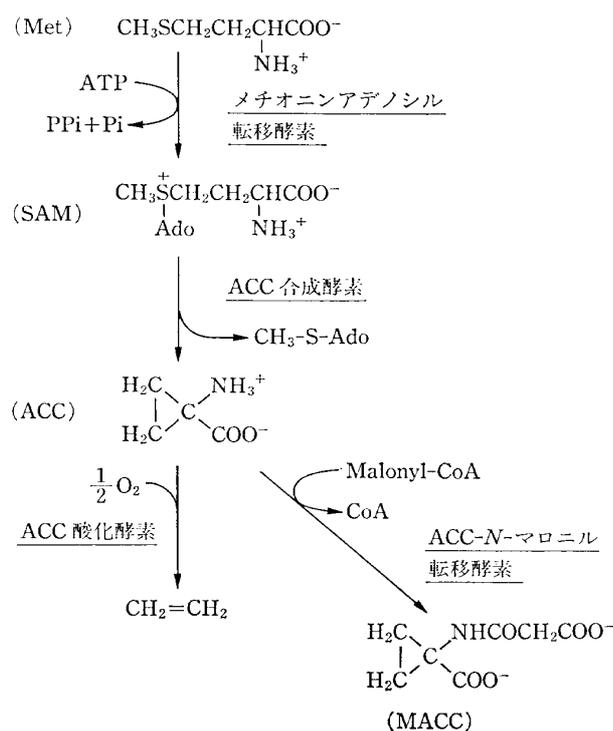


図1 エチレン生成経路

tuning) がまず働き, さらに ACC 酸化酵素活性の変動による ACC のエチレンへの分解活性の調節や MACC 合成によるエチレン生成に利用可能な ACC 量の調節という微調整 (fine tuning) が働いて, 全体として調節されると考えられる。

ところで, 上述した植物体によるエチレン生成にはその経時変化 (エチレン生成速度が上昇し最大値を示した後, 初めのレベルに低下する) がきわめて短時間内におこる特徴がある。これは, 植物の成長・分化過程の「必要な時に必要な量だけ」エチレンが生成されてホルモンとして働いたりストレスにたいする正常なレスポンスを引き起こすためには, 必須の調節作用であると考えられる。なぜなら, 高濃度のエチレン処理が上偏成長の誘導, 伸長成長の抑制, 肥大化の促進, 落葉の促進など植物の成長にとってむしろ有害な作用を及ぼす¹⁾ ことから考えて, もしも一旦高まったエチレン生成活性がいつまでも続くならば, エチレンが成長阻害物質としてしか働かないことを意味するからである。このエチレン生成速度の一過性の経時変化は, 植物体内での ACC 合成酵素の速やかな代謝回転 (エチレン生成の増加に先行して *de novo* 合成され ACC 合成の機能を果たした後, 速やかに活性を失う) によって引き起こされる。植物体内で ACC 合成酵素が急速に不活性化されることは, この酵素の半減期 (初めに存在した酵素活性が, 半分に減少す

るまでの時間) を測定して, その値がきわめて短いことから示された。半減期は, 黄白化緑豆の下胚軸組織では 25 分³³⁾, トマト果実では 0.5~2 時間¹⁰⁾ の値が得られている。以上のことから, エチレン合成の調節の問題とは, ACC 合成酵素活性の上昇に関しては ACC 合成酵素遺伝子の発現による酵素の合成の調節の問題であり, 酵素活性の減少については酵素の不活性化反応の問題である, ということができる。

ここでは, ACC 合成酵素について最近の研究の現状を紹介するとともに, ACC 合成酵素が触媒反応中に基質の SAM によって不活性化されるという発見を契機に行なってきた筆者らの研究を紹介したい。なお, エチレン合成に関する総説としては, Yang と Hoffman³⁰⁾ によるもの, ACC 合成酵素については Kende⁹⁾ のものがあるので参照していただきたい。

ACC 合成酵素

この酵素の研究がよく行なわれてきた植物材料は, トマト果実^{2,5,6,34,35)}, カボチャ果肉¹⁶⁾, 黄白化緑豆下胚軸²⁷⁾, リンゴ果肉⁷⁾ などである。いずれの材料から得られた酵素もその性質がよく似ている。この酵素の反応の最適 pH は 8.5~9.0 であり, 基質 SAM の K_m 値は 10~20 μM である。また補酵素としてピリドキサルリン酸 (PLP) を必要とする。したがって, 他の多くの PLP-酵素の阻害剤として知られるアミノエトキシビニルグリシン (AVG) やアミノオキ酢酸による阻害を受け^{6,30)}, 阻害様式は基質 SAM に対する拮抗阻害である。とくに, AVG は強力な阻害剤として作用し K_i 値は 0.2~2.0 μM である。また分子量は, トマト果肉およびカボチャ果肉由来の酵素では 48 kDa, 緑豆下胚軸由来のものでは 65 kDa と報告されている。

最近, この酵素に対する cDNA のクローニングがいくつかの材料で成された。Sato と Theologis²⁰⁾ はズッキーニ (*Cucurbita pepo* L.) 果肉の酵素の cDNA をクローニングした。また, Van Der Straeten ら²⁸⁾ および中嶋ら¹⁷⁾ は, それぞれ傷害誘導したトマト果肉の酵素と, カボチャ果肉の酵素, そして Dong ら (未発表) は成熟したリンゴ果肉の酵素の cDNA をクローニングし全塩基配列を決定した。

In vitro での ACC 合成酵素の不活性化反応

ACC 合成酵素活性の急速な低下が明らかにされた当初は, 酵素の可逆的不活性化反応やタンパク質分解酵素による不活性化反応の存在が考えられた。筆者らは, 実際にはどんなメカニズムが働いて ACC 合成酵素が不活

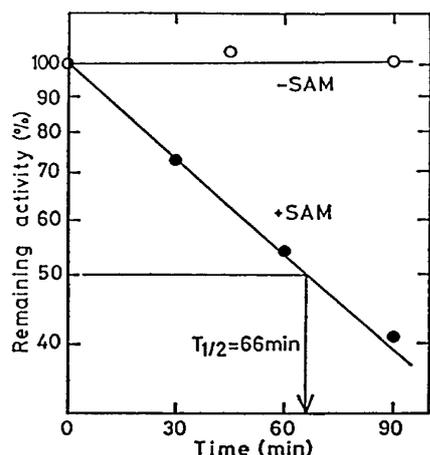


図 2 SAMによるACC合成酵素の不活性化反応²²⁾
ACC合成酵素を $5\mu\text{M}$ PLPの存在下で $200\mu\text{M}$ SAMとインキュベーションし、所定時間後に酵素を分離して残存活性を測定した。
-SAM, 対照; $T_{1/2}$, 半減期。

性化されるのか興味をもち研究を進めてきた。

筆者らは、黄白化緑豆幼植物の下胚軸組織から得たACC合成酵素が、触媒反応中に基質のSAMによって不活性化されているのを見だし²¹⁾、さらにトマト果実由来の酵素でも不活性化反応が起きることを確かめた²²⁾。トマト果実のACC合成酵素の場合は、酵素を $5\mu\text{M}$ PLPの存在下で $200\mu\text{M}$ SAMと 30°C で反応させ、一定時間後に反応液の一部をとりSephadex G-25カラムに通して高分子画分を分離し、この画分の酵素活性を測定して残存活性を求めた。図2は残存活性の対数値を反応時間に対してプロットした結果である。SAMの存在下では酵素の不活性化が起き、残存活性が減少したことがわかる。反応液にSAMが入っていない場合は酵素の不活性化は起きなかった。また、このグラフから不活性化反応が1次反応に従って起こることがわかり、酵素の半減期は66分と求められた。酵素反応液には、時間の経過とともに反応生成物であるACCとメチルチオアデノシン(MTA)が蓄積してくるが、これらの化合物には酵素の不活性化作用は認められなかった。AVGは、トマト果実の酵素でもACC合成反応を阻害したが、同時に、SAMによる酵素の不活性化反応も阻害した。すなわち、初濃度が $100\mu\text{M}$ のSAMとACC合成酵素を反応させると酵素不活性化反応の半減期は55分であったが、反応液に $2.5\mu\text{M}$ のAVGを添加すると108分に延長した。

ACC合成酵素の不活性化反応が、反応生成物であるACCやMTAではなく基質のSAMによって引き起こされること、そしてSAMと拮抗するAVGがこの反応

を阻害することは、SAMが酵素の活性部位に結合し(そしておそらく酵素の触媒作用によってSAM分子が活性化され)た後、酵素の不活性化が起きることを示している。酵素学分野では、このような反応様式をもつ酵素阻害剤がすでに知られており、酵素自殺基質と呼ばれている。しかし、従来知られていたこのタイプの酵素阻害剤は、酵素反応機構研究の目的で合成された化合物やその知見を生かして強力な酵素キラーとして働くようにデザインされた薬剤がほとんどであり、一般的な代謝経路のなかで重要な中間体として働くSAMのような物質が酵素自殺基質として作用する例は知られていなかった。

*in vitro*で求められたACC合成酵素の不活性化反応の半減期は、緑豆下胚軸由来の酵素では23.5分、トマト果肉由来の酵素では約60分である。オーキシン処理した緑豆下胚軸におけるACC合成酵素の半減期は25分であり、この値は組織をAVG前処理することにより50分に延長したことが報告されている³³⁾。したがって、*in vitro*で求められたACC合成酵素の半減期は、植物組織で求められた値とよく一致する。このことから、筆者らはSAMによる不活性化反応が植物体内でのACC合成酵素活性の速やかな減少の初発反応である可能性を推定している。しかし、植物体内でこの不活性化反応が起きているか否かは今後実証されなければならない課題として残されている。最近、Spanuら²⁶⁾は、緑豆下胚軸における実験結果³³⁾とは異なって、傷害を与えたトマト緑葉ではAVGがACC合成酵素の代謝回転に影響を及ぼさず、AVG処理しても半減期の値は変わらないことを報告した。それゆえ彼らは、*in vivo*におけるACC合成酵素の不活性化は、*in vitro*でみられるSAMによる不活性化反応によって起こるのではないと考えている。

SAMによるACC合成酵素の不活性化機構

SAMが酵素自殺基質として働くとする、酵素反応によって活性化されたSAM分子(の一部分)が酵素の活性部位に共有結合することが、酵素の不活性化の原因として考えられる。そこでACC合成酵素をメチオニン部分を ^{14}C で標識した $[3,4-^{14}\text{C}]$ -SAMと反応させ、酵素タンパク質に ^{14}C が取り込まれるかどうかを調べた²²⁾。反応液からタンパク質画分を回収し、SDS-PAGEでACC合成酵素を分離してからフルオログラムを作成したところ、分子量が50 kDaのタンパク質だけが ^{14}C -標識されることがわかった。標識されたタンパク質は、分子量がACC合成酵素の既知の分子量値と一致し、さらにトマト果肉由来のACC合成酵素に対するモノクロ

ーナル抗体をリガンドにしたイムノアフィニティゲル⁵⁾に結合したことから、ACC 合成酵素タンパク質と考えられた。次に、SAM のメチオニン部分の標識位置をかえて、メチオニン部分のどの骨格が酵素タンパク質に取り込まれるのかを調べたところ、メチオニン残基の-COOH と C-3,4 は ACC 合成酵素に取り込まれるが、CH₃S- は取り込まれないことが示された²³⁾。この結果は、ACC 合成酵素に結合するのは SAM のメチオニン残基の4炭素部分(2-アミノ酪酸部分)であることを示している。この4炭素部分は、ACC 合成酵素の本来の触媒反応では ACC に変換される部分である。

初めに述べたように、ACC 合成酵素の触媒反応には PLP が補酵素として必要である。触媒反応では、まず酵素の活性部位のリジン残基の ϵ -NH₂ に結合していた PLP のアルデヒド基と SAM のメチオニン残基の α -NH₂ との間でシッフ結合が形成され、酵素-基質複合体が作られる。この後、SAM のメチオニン部分の α -H の脱離と C γ 位の MTA の脱離が起こり、C α と C γ の間に共有結合が形成されて三員環が生成し ACC の骨格ができあがる。ACC 合成酵素が触媒する α , γ -脱離反応は、PLP-酵素が触媒する一群のアミノ酸の脱離反応のなかではめずらしい特異な反応である。より一般的には、 α -H の脱離後転移反応が起こり C β と C γ の間に二重結合が導入される。このような例として、メチオニン- γ -リアーゼやシスタチオン- γ -リアーゼが触媒する反応が挙げられ、反応の結果ビニルグリニン (と PLP がシッフ結合した化合物) が生成することが知られている²⁹⁾。これとは別に、他の PLP-酵素、たとえば L-アスパラギン酸アミノ基転移酵素^{8,19)}、D-アミノ酸アミノ基転移酵素²⁵⁾ やキヌレニンアミノ基転移酵素⁴⁾ では、ビニルグリニンが酵素自殺基質として働き酵素を不活性化することが知られている。

筆者らは、SAM による ACC 合成酵素の不活性化反応の機構として、この酵素の本来の触媒作用では ACC に変換される SAM のメチオニン残基の4炭素部分が副反応によってビニルグリニンに変換され、これが酵素自殺基質として働いて酵素を不活性化することを推定した。もしもこの仮説が正しければビニルグリニンも酵素の不活性化作用を持つことが期待される。そこで、実際に L-ビニルグリニンを ACC 合成酵素と反応させたところ、酵素の不活性化が起きることが確かめられた²⁴⁾ (図3)。不活性化反応には PLP が必須であり、ビニルグリニンのアナログである 2-アミノ酪酸、アリルグリニン、プロパルギルグリニンには不活性化作用が認められなかった。ACC 合成酵素に対する L-ビニルグリニンの

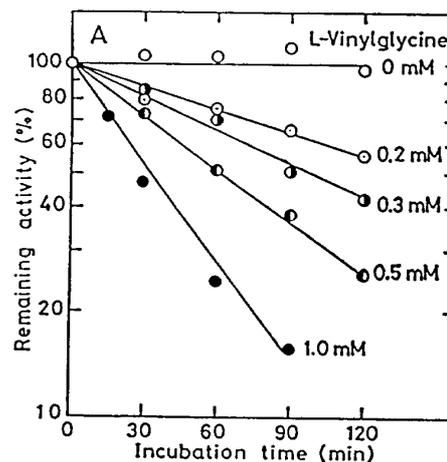
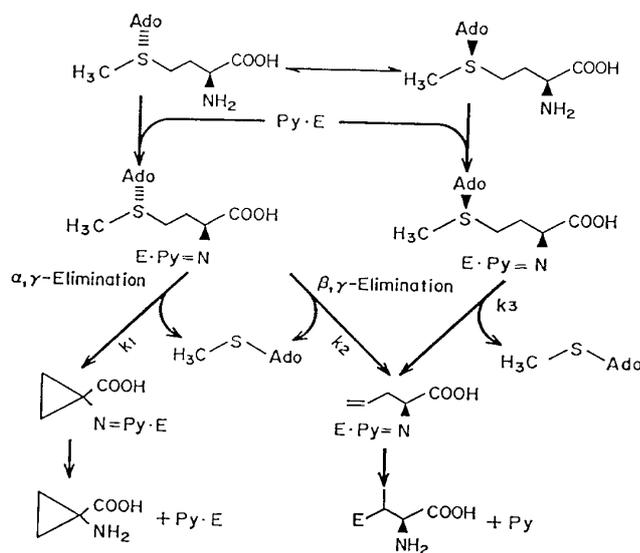


図3 L-ビニルグリニンによる ACC 合成酵素の不活性化反応²⁴⁾

ACC 合成酵素を 5 μ M PLP の存在下で所定濃度の L-ビニルグリニンとインキュベーションし、一定時間後に残存活性を測定した。



$$k_1 = 300 \text{ min}^{-1}, \quad k_2 = 0.01 \text{ min}^{-1}, \quad k_3 = 0.03 \text{ min}^{-1}$$

$$k_1/k_2 = 30,000$$

$$k_3/k_2 = 3$$

図4 SAMによるACC合成酵素不活性化反応機構
Ado, アデノシン残基; E, アポ ACC 合成酵素; Py, ピリドキサールリン酸。

K_m 値は 3.3 mM と求められたが、この値は SAM の K_m 値より約 100 倍大きい。一方、ACC 合成酵素反応の速度定数を求めると、SAM からの ACC 合成反応では 300 min^{-1} 、SAM による不活性化反応では、0.01 min^{-1} 、またビニルグリニンによる不活性化反応では 0.1 min^{-1} の値が得られた。したがって、SAM による酵素の不活性化反応がビニルグリニンの生成を経て起こるとすると、不活性化反応全体の反応速度定数は 0.009 min^{-1} にな

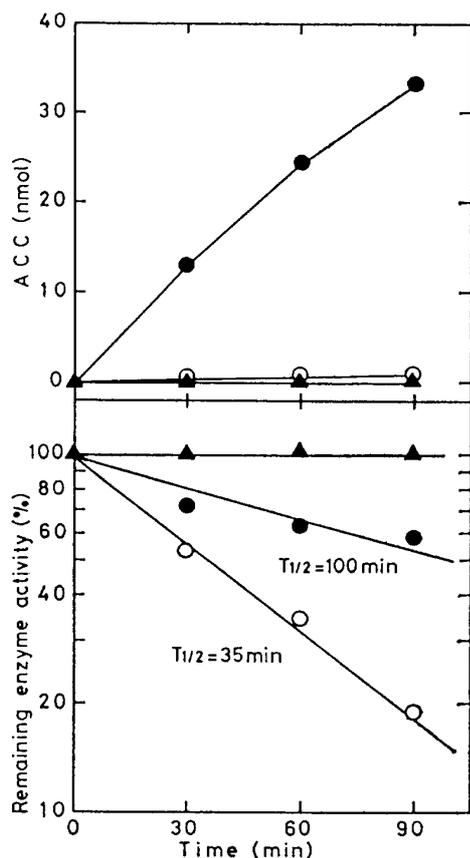


図5 SAM ジアステレオマーの基質と不活性化剤としての作用の比較²³⁾

ACC 合成酵素を $100 \mu\text{M}$ の (*S*)-SAM (●) または (*R*)-SAM (○) と反応させ、生成した ACC 量 (上) と酵素の残存活性 (下) を求めた。▲, 対照 (-SAM)。

る。SAM による ACC 合成反応の速度定数と酵素の不活性化反応の速度定数の比は 30,000 である。この分配比は、30,000 分子の ACC の合成が起きるごとに 1 回の不活性化反応が起きること、言い換えれば 1 分子の ACC 合成酵素は不活性化されるまでの間に 30,000 個の ACC を生成することを意味している。これらの実験結果から推定された ACC 合成酵素の SAM による不活性化機構を図 4 に示した。あとで述べるように、SAM の 2-アミノ酪酸部分が結合するのは、酵素の活性部位にあるリジン残基の $\epsilon\text{-NH}_2$ であることが最近明らかにされた。

ビニルグリニン、ACC 合成酵素を不活性化する作用をもつが、酵素に対する親和性が低い (SAM の 1/100) ので実用的なエチレン合成阻害剤にはならない。実際黄白化緑豆下胚軸切片でのエチレン生成阻害作用における I_{50} が 10 mM 以上であることが報告されている³⁾。

ACC 合成酵素の不活性化における SAM の立体特異性

SAM 分子には、分子中の S (イオウ) に関して (*S*)-型と (*R*)-型の 2 種のジアステレオマーが存在する。通常生物体内で合成され種々の酵素の基質になるのは (*S*)-SAM である。(*R*)-SAM は酵素反応の基質にならない非天然型とみなされている。(*R*)-SAM は ACC 合成酵素による ACC 合成反応の場合も基質にならないが、酵素の活性部位に結合することができ (*S*)-SAM からの ACC 合成反応を拮抗的に阻害することが示されている^{11,12)}。この場合 (*R*)-SAM の酵素の活性部位に対する親和性が (*S*)-SAM と同程度であることが、 K_i 値と K_m 値の比較から示されている。

筆者らは、SAM による ACC 合成酵素の不活性化反応を見いだした当初、SAM 市販品のロットによって ACC 合成酵素の不活性化活性が大きく異なることに気がついた。SAM 市販品には (*S*)-SAM 以外に (*R*)-SAM や SAM の分解産物であるアデニンやメチルチオリボースが不純物として含まれているので、これらの不純物が ACC 合成酵素の不活性化に影響を与えている可能性を検討した。ACC 合成酵素の生成産物である ACC と MTA には、酵素の不活性化作用は認められなかった。そこで、ACC 合成酵素の不活性化反応が (*S*)-SAM だけではなく非天然型の (*R*)-SAM によっても起きている可能性を考え、SAM 市販品から (*S*)-SAM と (*R*)-SAM を HPLC を用いて精製し、ACC 合成酵素の不活性化剤と ACC 合成反応の基質としての二つの作用を比較した²³⁾ (図 5)。ACC の生合成は (*S*)-SAM だけが基質になり、(*R*)-SAM は基質にならなかった。他方、ACC 合成酵素の不活性化反応は、(*S*)-SAM と (*R*)-SAM の両者によって引き起こされた。(*R*)-SAM と (*S*)-SAM の不活性化作用の反応速度定数はそれぞれ 0.03 min^{-1} および 0.01 min^{-1} と求められ、(*R*)-SAM が (*S*)-SAM より約 3 倍不活性化作用が大きいことが示された。

この結果は、植物組織内で SAM による ACC 合成酵素の不活性化が起きているとすると、(*S*)-SAM だけではなく (*R*)-SAM も反応に寄与する可能性を示している。そこで、エチレン生成活性の高い植物材料として、オーキシン処理した黄白化緑豆下胚軸組織とエンドウ上胚軸組織、および切断傷害を与えたトマト果肉組織を用いて (*R*)-SAM が含まれているか否かを検討した。(*S*)-SAM と (*R*)-SAM は植物抽出試料を HPLC で分離し定量した。いずれの組織でも、(*S*)-SAM は検出されたが、(*R*)-SAM はトマト果肉組織で痕跡程度検出されただけ

で、ほかの二つの植物組織ではまったく検出できなかった。したがって植物体内での ACC 合成酵素の不活性化反応における (R)-SAM の関与は考えられない。一方、(S)-SAM の含量はこれらの植物組織で ACC 含量が増加しエチレン生成が高まったときでさえ、処理前と同じレベル (トマト果肉 $10\sim 20\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$; 黄白化緑豆下胚軸組織 $20\sim 30\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$; エンドウ上胚軸組織 $100\text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1}$) であった。これは「はじめに」で述べた SAM の供給がエチレン生合成の律速因子にならない^{30,35)}ことと一致している。

¹⁴C-SAM による酵素活性部位の標識と 活性部位ペプチドの一次構造

ACC 合成酵素の植物体内での存在量はきわめて少ないことが知られている。比較的含量が高いことがわかっている登熟トマト果実でさえ、その含量は可溶性タンパク質の 0.0001% 以下である⁹⁾。したがってこの酵素では、酵素を精製してから両末端のアミノ酸や一次構造を決定するという研究手段を採ることが難しかった。現在、トマト²⁸⁾やカボチャ¹⁷⁾果実の酵素ではアミノ酸配列が知られるようになったが、これは酵素に対する cDNA の塩基配列から推定されたものである。

Privale と Graham¹⁸⁾ は、トマト果実の ACC 合成酵素の粗酵素標品を PLP の存在下で NaB^3H_4 で処理した後、SDS-PAGE を行ない分子量が約 50 kDa のタンパク質が ³H 標識されることを見いだした。彼らはこのタンパク質を ACC 合成酵素と考えたが、構造決定に十分な純度と量の酵素タンパク質を得ることができなかったためかその後の研究は行なわれていない。

NaB^3H_4 で処理し ³H 標識することはほかの多くの PLP-酵素でも行なわれている方法であり、ACC 合成酵素に特異的ではない。したがって、完全に単一のタンパク質にまで精製されていない ACC 合成酵素標品を材料にする場合は、 NaB^3H_4 処理で標識されたタンパク質より、¹⁴C-SAM で処理して標識されたタンパク質のほうが ACC 合成酵素であることが確実であるといえる。そこで、¹⁴C-SAM で処理して活性部位を標識した ACC 合成酵素から、活性部位ペプチドを単離しそのアミノ酸配列を決定することを計画した。とくに、トマト果実⁹⁾とリンゴ果実³¹⁾の酵素に対するモノクローナル抗体が得られ、これらの抗体とそれから作成されたイムノアフィニティゲルが使えるようになったことが、この研究を進展させることになった。これらの抗体は、活性を有する ACC 合成酵素だけでなく、SAM で不活性化された ACC 合成酵素タンパク質とも結合する。まず、Yip ら³²⁾はリ

ンゴ果肉から調製された ACC 合成酵素標品を ¹⁴C-SAM で処理した後、イムノアフィニティゲルを使って ¹⁴C-標識 ACC 合成酵素を精製した。これをトリプシンで消化し、消化物を逆相系のカラムを用いた HPLC にかけて ¹⁴C-標識化活性部位ペプチドを単離した。このペプチドの一次構造をエドマン分解法で調べると、12 個のアミノ酸から構成され次の配列をしていることが明らかになった。H₂N-Ser-Leu-Ser-X-Asp-Leu-Gly-Leu-Pro-Gly-Phe-Arg-COOH。このなかで、¹⁴C-標識されたアミノ酸 (X) は N-末端から 4 番目に位置していた。さらにこのペプチドのマススペクトルの解析から、このアミノ酸はリジンに 2-アミノ酪酸が結合した物質と同じ分子量をもつことがわかった。この後、 NaB^3H_4 で処理し、³H-標識した ACC 合成酵素でも同様の検討が行なわれた。得られた ³H-標識された活性部位ペプチドのアミノ酸配列の解析から、このペプチドもやはり 12 個のアミノ酸からなり N-末端から 4 番目のアミノ酸が ³H-標識されていること、この修飾されたアミノ酸をのぞく他のアミノ酸の配列は、上記の ¹⁴C-SAM 処理して得られたペプチドのアミノ酸配列と同じであることが明らかになった。また、³H-標識されたペプチドの加水分解産物から ³H-標識された Nε-pyridoxyl-L-lysine が同定された。これらの結果は、PLP のアルデヒド基がシッフ結合するリジンの ε-NH₂ 基に、SAM の 2-アミノ酪酸部分が結合することを示している。最近、Dong ら (未発表) は、登熟リンゴ果実から ACC 合成酵素の cDNA を単離しその塩基配列を決定したが、その結果は上記のアミノ酸配列が正しく、かつ 4 番目のアミノ酸が Lys であることを確認している。

続いて、トマト果実由来の ACC 合成酵素でも標識化活性部位ペプチドのアミノ酸配列が検討された。この場合は、12 個のアミノ酸のなかで 1 個だけが異なる 2 種類のアミノ酸配列が得られた。このうち、量が少ないほうのペプチドのアミノ酸配列はリンゴ果実の ACC 合成酵素から得られたペプチドのアミノ酸配列と同じであったが、量が多いほうのペプチドでは N-末端から 6 番目のアミノ酸が Leu ではなく Met であった。この結果はトマト果実から得られた ACC 合成酵素標品には少なくとも 2 種類の ACC 合成酵素アイソザイムが存在していたことを示している。トマト果実の酵素から得られた量の多いほうのペプチドのアミノ酸配列は、最近報告されたトマト²⁸⁾とカボチャ¹⁷⁾果実の ACC 合成酵素の cDNA の塩基配列から推定されたアミノ酸配列と一致していた。

ACC 合成酵素のアイソザイム

先ほど述べたように、異なる植物組織から得られた ACC 合成酵素の間には、分子量、触媒する反応の性質や酵素阻害剤に対する感受性などにほとんど違いが認められない。また、この酵素では植物体中の含量がきわめて低く精製が難しいことから、タンパク質化学的に単一の成分にまで精製したうえでアイソザイムの存在を実証した報告はまだなされていない。しかしながら、植物組織内にいくつかの ACC 合成酵素のアイソザイムが存在していることを示唆する報告が近年いくつかなされるようになり、ACC 合成酵素のアイソザイムが個々の植物組織でいくつあるのか、ということが ACC 合成酵素研究の現在の一つの焦点になっている。すでに前節で述べたように、トマト果実には少なくとも 2 種類のアイソザイムが存在することを示唆する結果が得られている。

名古屋大学の今関教授らのグループは、切断傷害を与えて誘導したカボチャ果肉の ACC 合成酵素に対するポリクローナル抗体が、同酵素だけでなくトマト幼植物下胚軸やカボチャ幼植物下胚軸に同じように傷害を与えて誘導して得た酵素を認識するが、緑豆、トマトおよびカボチャ幼植物の下胚軸をオーキシン処理して誘導した酵素は認識しないことを見だし、植物に加えられる刺激によって異なる種類の ACC 合成酵素アイソザイムが誘導されることを考察している¹⁴⁾。さらに、カボチャ下胚軸から得たオーキシン誘導酵素と傷害誘導酵素がヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーで分離されることを見だしている¹⁵⁾。

Sato と Theologis²⁰⁾はズッキーニ果実の ACC 合成酵素に対する cDNA をプローブとしてサザンブロットを行ない、2 種類のジェノミック DNA の Eco RI 断片を検出し、この植物に 2 個の遺伝子コピーが存在する可能性を示した。また、Van Der Straeten ら²⁹⁾はトマト果実の ACC 合成酵素に対する cDNA を 2 種類単離した。一つは完全長の cDNA で他方は部分的な長さの cDNA であるが、その塩基配列から推定されたアミノ酸配列は一部分で異なっていた。部分的な長さの cDNA では、上で述べた活性部位のアミノ酸配列はわかっていない。リンゴ (Dong ら、未発表)、トマト²⁸⁾およびカボチャ¹⁷⁾果実の ACC 合成酵素の cDNA 塩基配列から明らかにされた ACC 合成酵素のアミノ酸配列を比べると、そのホモロジーはリンゴとトマトの間で 52%、リンゴとカボチャの間で 53%、トマトとカボチャの間では 62% である。

最近、筆者らは ACC 合成酵素活性のポリアミンによ

る阻害様式が、植物材料によって異なることを見だしている。すなわち、トマトとリンゴ果実の ACC 合成酵素はスペルミンやスペルミジンによって拮抗的に阻害されたが、カボチャ果肉の酵素と緑豆下胚軸の酵素は非拮抗的に阻害された。また、 K_i 値にも植物種間で差が認められた。この結果は、植物の種によって ACC 合成酵素の活性部位の構造が異なっていることを示唆しているのではないかと考えている。しかし、この結果は組織抽出液を用いて行なわれたものなので、今後精製した酵素を用いても同様な差が見られることを確かめる必要がある。

ACC 合成酵素のアイソザイムの検証については、現在酵素タンパク質そのものの一次構造と遺伝子レベルでの研究が活発に行なわれているので、大筋が明らかにされるのは時間の問題と思われる。

おわりに

ここでは、エチレン生合成経路の鍵酵素である ACC 合成酵素の研究の現状を紹介する目的で、現在の知見をまとめながら筆者らの行なってきた研究を紹介した。現在、ACC 合成酵素の研究のなかでは、この酵素の cDNA のクローニングと塩基配列の決定の進展が最も著しい。すでにトマトとカボチャ果実の ACC 合成酵素では報告がなされたが、さらにいくつかの植物材料ではここ 1 年以内に同様な報告が現われることが期待される。それらの知識を基礎として、植物の成長と分化の過程やさまざまなストレスによって ACC 合成酵素遺伝子の発現が調節される機構の解明が現実のものとなるであろう。さらに、いくつかの植物種での ACC 合成酵素遺伝子の構造が明らかにされることにより、この酵素の遺伝子の進化が議論できるようになることも期待される。この問題は、植物がエチレンをホルモンの一つとして採用するようになった起源とも直接係わる魅力的なテーマである。一方、ACC 合成酵素そのものについても、この酵素が触媒する α , γ -脱離反応 (ACC 生成反応) と β , γ -脱離反応 (酵素不活性化反応) の速度の比は植物種を異にする酵素の活性部位とどう関係があるか、さらにその詳しいメカニズムはどのようなかは未知の部分として残されている。また、植物種を異にする ACC 合成酵素間で見られるポリアミンに対する反応性の違いはどのような酵素活性部位の違いを反映しているのか、ポリアミンのほかに ACC 合成酵素間で異なる作用を与える化学物質がさらに見つかるか、SAM による不活性化反応が植物体内で実際に起きているか、植物体内で不活性化された ACC 合成酵素タンパク質はさらにどのように分解され

るか, など検討すべき課題は山積している. 筆者らは, 今後もこのような課題の一つでも解答を与えるような研究を行なっていきたいと考えている.

引用文献

- 1) F. B. Abeles: "Ethylene in Plant Biology," Academic Press, New York, 1973
- 2) M. A. Acaster & H. Kende: *Plant Physiol.* **72**, 139 (1983)
- 3) N. Amrhein & D. Wenker: *Plant Cell Physiol.* **20**, 1635 (1979)
- 4) Y. Asada, K. Tanizawa, K. Yonaha & K. Soda: *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2873 (1988)
- 5) A. B. Bleeker, W. H. Kenyon, S. C. Somerville & H. Kende: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 7755 (1986)
- 6) T. Boller, R. C. Herner & H. Kende: *Planta* **145**, 293 (1979)
- 7) J-G. Dong, W-K. Yip & S. F. Yang: *Plant Physiol.* **86**, 63 (suppl.) (1988)
- 8) H. Gehring, R. R. Rando & P. Christen: *Biochemistry* **16**, 4832 (1977)
- 9) H. Kende: *Plant Physiol.* **91**, 1 (1989)
- 10) H. Kende & T. Boller: *Planta* **151**, 476 (1981)
- 11) S. Khani-Oskouee, J. P. Jones & R. W. Woodard: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **121**, 181 (1984)
- 12) S. Khani-Oskouee, K. Ramalingam, D. Kalvin & R. W. Woodard: *Bioorg. Chem.* **15**, 92 (1987)
- 13) M. Lieberman: *Annu. Rev. Plant Physiol.* **30**, 533 (1979)
- 14) N. Nakagawa, N. Nakajima & H. Imaseki: *Plant Cell Physiol.* **29**, 1255 (1988)
- 15) 中川直樹, 中嶋信美, 今関英雅: 日本植物生理学会 1989 年度年会および第 29 回シンポジウム講演要旨集, p. 89, 1989
- 16) N. Nakajima & H. Imaseki: *Plant Cell Physiol.* **27**, 969 (1986)
- 17) N. Nakajima, H. Mori, Y. Yamazaki & H. Imaseki: *Plant Cell Physiol.* **31**, 1021 (1990)
- 18) L. S. Privalle & J. S. Graham: *Arch. Biochem. Biophys.* **253**, 333 (1987)
- 19) R. R. Rando: *Biochemistry* **13**, 3859 (1974)
- 20) T. Sato & A. Theologis: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 6621 (1989)
- 21) S. Satoh & Y. Esashi: *Plant Cell Physiol.* **27**, 285 (1986)
- 22) S. Satoh & S. F. Yang: *Plant Physiol.* **88**, 109 (1988)
- 23) S. Satoh & S. F. Yang: *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 107 (1989)
- 24) S. Satoh & S. F. Yang: *Plant Physiol.* **91**, 1036 (1989)
- 25) T. S. Soper, J. M. Manning, P. A. Marcotte & C. T. Walsh: *J. Biol. Chem.* **252**, 1571 (1977)
- 26) P. Spanu, G. Flex & T. Boller: *Plant Physiol.* **93**, 1482 (1990)
- 27) D-S. Tsai, R. N. Arteca, J. M. Bachman & A. T. Phillips: *Arch. Biochem. Biophys.* **264**, 632 (1988)
- 28) D. Van Der Straeten, L. Van Wiemeersch, H. M. Goodman & M. Van Montagu: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4859 (1990)
- 29) C. T. Walsh: "Enzymatic Reaction Mechanisms," Freeman Press, San Francisco, p. 823, 1979
- 30) S. F. Yang & N. E. Hoffman: *Annu. Rev. Plant Physiol.* **35**, 155 (1984)
- 31) W-K. Yip, J-G. Dong & S. F. Yang: *Plant Physiol.* **93**, 64 (suppl.) (1990)
- 32) W-K. Yip, J-G. Dong, J. W. Kenny, G. A. Thompson & S. F. Yang: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7930 (1990)
- 33) H. Yoshii & H. Imaseki: *Plant Cell Physiol.* **23**, 639 (1982)
- 34) Y-B. Yu, D. O. Adams & S. F. Yang: *Arch. Biochem. Biophys.* **198**, 280 (1979)
- 35) Y-B. Yu & S. F. Yang: *Plant Physiol.* **66**, 281 (1980)