

# 大豆未発芽種子の酸性エキソ型プロテアーゼの精製

宇高 京子, 川名 広子

(平成8年10月7日受理)

## Purification of the Acidic Exoproteases derived from Ungermination Soybean Seed

Kyoko UDAKA and Hiroko KAWANA

(Received October 7, 1996)

### 1. 緒 言

大豆乾燥完熟種子は極度な脱水状態にある。非休眠種子を発芽に好適な条件下に置くと「幼根が種皮を破る」という形態的な現象を最終過程として、それに先立って起こる一連の細胞内生理生化学的变化を一般に「発芽」と言う。前報の通り、乾燥完熟大豆種子は本実験条件下では、24時間後から発芽が始まり、発芽3日目から胚軸の伸びが大きくなり、発芽6日目から根毛の発達が著しく、発芽8日目から上胚軸の伸びが始まるという形態的な変化が著しい<sup>(1)</sup>。

従来から宇高らは発芽過程での第一段階であるこの異化作用 (catabolism) に関与するプロテアーゼ<sup>(2-3)</sup>と大豆種子たんぱく質の生合成について検討している<sup>(4-10)</sup>。そこで前報<sup>(3)</sup>では、発芽各時期より得た酸性エキソ型プロテアーゼ活性は基質0.2%変性ヘモグロビンおよび0.4%大豆11Sたんぱく質を用いた場合も発芽0日目最大であり、その後、活性は減少していく傾向が得られたので、本論文ではその発芽0日目(未発芽種子)を用いて、その酸性エキソ型プロテアーゼの精製とその活性を検討したので報告する。

### 2. 実験方法

#### (1) 試料の調整

大豆乾燥完熟種子(ボンミノリ種, 遺伝子型a, 早生)は低温保存2年以内のものを用いた。種子を1%洗剤で洗った後、70%エタノール中で30秒、次に5%さらし粉液に浸漬し、これを滅菌水で十分に洗い流した後、滅菌シャーレーに滅菌水をしみこませたガーゼを敷き、発

芽さす(20°C)。試料採取は0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8および9日目に行ったが、本実験では未発芽種子(発芽0日目)を用い以下の実験に供した。

#### (2) 未発芽種子からの粗酵素液の抽出

未発芽大豆種子を40粒採取し、1.0 M食塩を含む0.01 Mバルビタール緩衝液(pH8.0)を30ml加え、ultra-turraxホモジナイザーで3分間(4°C)摩砕した、次に日立高速冷却遠心機(20PR-52)でx15000 rpm, 20分間遠心し、その上澄液を粗酵素液とした。

#### (3) ゲル濾過法による粗酵素液の精製

上記(2)の粗酵素液10mlをBio-gel A-1.5 M (Bio-Rad社製)によるゲル濾過を行った。1.0 M食塩を含む0.01Mバルビタール緩衝液(pH8.0)、カラムサイズ30x950 nm, 流速0.5ml/分で9.5mlずつ集め、280nmでその吸光度を測定した。次にプロテアーゼ活性の見られるところを集め、0.8 飽和硫酸アンモニウムで硫酸分画し(第一回プロテアーゼ活性区分)、再度ゲル濾過をおこない、分離精製した(第二回プロテアーゼ活性区分)。また同様にこの内、プロテアーゼ活性のみうけられるところを集め、0.8 飽和硫酸アンモニウムで硫酸分画し、Bio-gel P-100でゲル濾過をおこなった、カラムサイズ15x200mm, 流速0.5ml/分で4.8 mlずつ集め、その吸光度を280 nmで測定した(第三回および第四回プロテアーゼ活性区分)。

#### (4) プロテアーゼ活性の測定

(4-1) 第一回目プロテアーゼ活性区分を用いた場合0.2%変性ヘモグロビン(pH7.5) 0.2mlと1M酢酸緩衝液(pH5.0) 0.5 mlに第一回目プロテアーゼ活性区

分0.2mlを加え、攪拌混和する。全て盲験は純水を用いた。次に38°C恒温槽で0分と120分反応させ、終了後ただちに50%TCA(トリクロロ酢酸)0.2ml加え、攪拌混和し、氷水中に15分放置、次に卓上遠心機(x2800rpm, 10分)で遠心し、その上澄液0.7mlに純水0.8mlを加え攪拌混和し、その吸光度を280nmで測定した。その結果をFig. 1に示した。

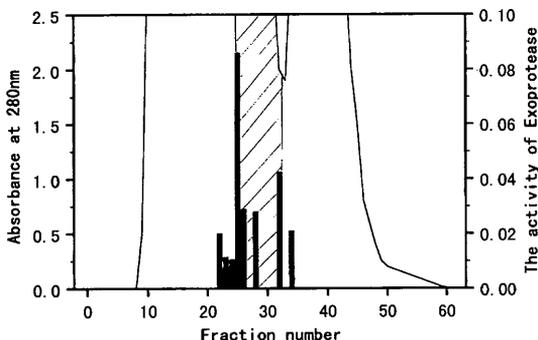


Fig. 1 Gel Filtration Pattern on Bio-gel A-1.5M and the Activity of Acidic Exoprotease derived from Ungermination Soybean Seed

\* Fraction Number 25~32 is precipitated by 80% Ammonium Sulfate

(4-2) 第二回目プロテアーゼ活性区分を用いた場合0.2%変性ヘモグロビン(pH7.5)0.2mlと1M酢酸緩衝液(pH5.0)0.5mlおよび第二回目プロテアーゼ活性区分0.5mlを加え、攪拌混和する。次に38°C恒温槽で0分と120分反応させ、終了後ただちに50%TCA0.2ml加え、攪拌混和し、氷水中に15分放置、次に卓上遠心機(x2800rpm, 10分)で遠心し、その上澄液0.3mlを分取し、280nmでその吸光度を測定した。その結果をFig. 2に示した。

(4-3) 第三回目プロテアーゼ活性区分を用いた場合0.2%変性ヘモグロビン(pH7.5)0.2mlと1M酢酸緩衝液(pH5.0)0.5mlおよび第三回目プロテアーゼ活性区分0.8mlを加え、攪拌混和する。次に38°C恒温槽で0分と120分反応させ、終了後ただちに50%TCA0.2ml加え、攪拌混和し、氷水中に15分放置、次に卓上遠心機(x2800rpm, 10分)で遠心し、その上澄液1.6mlを分取し、280nmでその吸光度を測定した。その結果をFig. 3に示した。

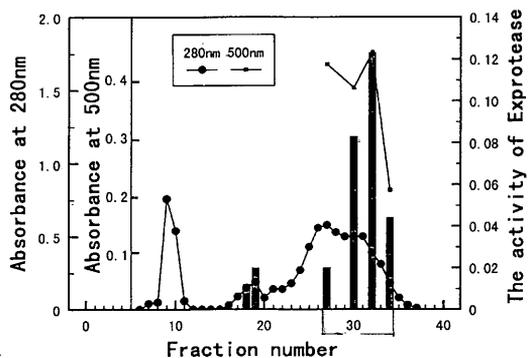


Fig. 2 ● Gel Filtration Pattern on Bio-gel A-1.5M  
 ◆ Quantity of Ungermination Soybean Protein  
 ■ The Activity of Acidic Exoproteases at 280nm Absorbance  
 \* Fraction Number 27~34 is Precipitated by 80% Ammonium Sulfate

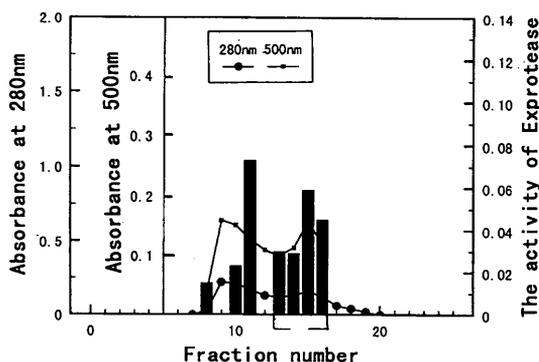


Fig. 3 ● Gel Filtration Pattern on Bio-gel P-100  
 ◆ Quantity of Ungermination Soybean Protein  
 ■ The Activity of Acidic Exoproteases at 280nm Absorbance  
 \* Fraction Number 13~16 is Precipitated by 80% Ammonium Sulfate

(4-4) 精製したプロテアーゼ活性の検討

0.2%変性ヘモグロビン(pH7.5)0.2mlと1M酢酸緩衝液(pH5.0)0.5mlおよび第四回目プロテアーゼ活性区分酵素液0.5mlを加え、攪拌混和する。次に38°C恒温槽で0分、90分および120分反応させ、終了後ただちに50%TCA0.2ml加え、攪拌混和し、氷水中に15分放置、次に卓上遠心機(x2800rpm, 10分)で遠心し、その上澄液1.3mlを分取し、280nm

大豆未発芽種子の酸性エキソ型プロテアーゼの精製

でその吸光度を測定した。その結果をFig. 4 に示した。

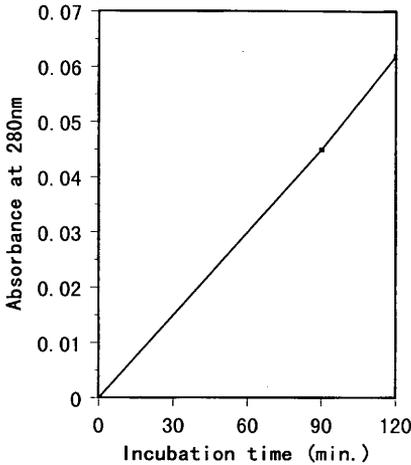


Fig. 4 The Activity of Acidic Exoprotease from the Purified Ungermination Soybean Seed  
\* Substrate(0.2% Denatured Hemoglobin (pH7.5)0.2ml, 1M Acetic Acid Buffer (pH5.0)0.5ml, Engyme Solution 0.5ml

5. Folin - フェノール試薬法によるたんぱく質量の定量

酵素液0.1mlと純水0.1mlおよびアルカリ性銅溶液1ml加え、良く混和し、室温で10分放置し、フェノール試薬0.1mlを加え、30分以上経過してから500 nmでその吸光度を測定した。盲験は純水を用い、たんぱく質標準

溶液は牛血清アルブミンを用い、その検量線をFig. 5 に示した、またその結果をFig. 2およびFig. 3 に示した。

3. 実験結果と考察

Fig. 1は未発芽大豆種子(発芽0日目)からの粗酵素液をBio-gel A-1.5 Mを用いてのゲル濾過図とそのプロテアーゼ活性図である。フラクションNo. 25~32にその活性が強く見られたので、その区分を集め、0.8飽和硫酸アンモニウムで硫酸分画した。Fig. 2は上記の硫酸分画したプロテアーゼ活性区分をBio-gel A-1.5 Mを用いての再ゲル濾過図とそのプロテアーゼ活性図とたんぱく質量を示した。

フラクションNo. 27~34にその活性が強く見られたので、その区分を集め、80%硫酸アンモニウムで硫酸分画し、以下の実験に供した。

Fig. 3は硫酸分画したプロテアーゼ活性区分をBio-gel P-100を用いてのゲル濾過図とそのプロテアーゼ活性図とたんぱく質量を示した。

フラクションNo. 13~16にその活性が強く見られたので、その区分を集め、80%硫酸アンモニウムで硫酸分画し、透析、遠心し、それを0.5mlと基質0.2%変性ヘモグロビン0.2mlと1M酢酸緩衝液0.5mlとでのプロテアーゼ活性を検討したのがFig. 4である。すなわちプロテアーゼ活性は保温90分で0.045と保温120分で0.062と活性が認められた。

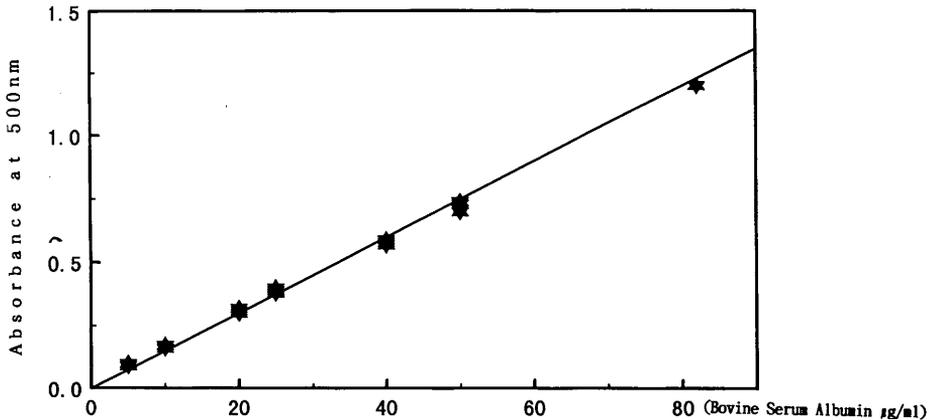


Fig. 5 Protein Standard Curve by Cu-Folin's Method

#### 4. 要 約

前報<sup>(3)</sup>で大豆発芽各時期より得た酸性エキソ型プロテアーゼ活性は基質0.2%変性ヘモグロビンおよび基質0.4%大豆11Sたんぱく質を用いた場合も発芽0日目が最大であり、その後、活性が減少していく傾向が得られたので、発芽0日目(未発芽大豆)を用いて酸性エキソ型プロテアーゼを分離・精製し、その確認実験をおこなった。その結果は前報と同様に、基質0.2%ヘモグロビンで酸性エキソ型プロテアーゼ活性が認められた。

#### 5. 文 献

- 1) 宇高 京子：東京家政大学生生活科学研究研究所研究報告, 13 (1990)
- 2) 宇高 京子：東京家政大学研究紀要 第35集 (1995)
- 3) 宇高 京子：東京家政大学研究紀要 第36集 (1996)
- 4) C. Fukazawa, K.Udaka, et al : Kulturflance, 32, 7578 (1984)
- 5) C. Fukazawa, K.Udaka et al : J.Biol. Chem., 260, 6234-6239(1985)
- 6) T.Momma K.Udaka et al: Eur. J.Biochem., 149, 491-496 (1985)
- 7) T.Momma K.Udaka et al : FEBS Lett., 118, 117-122 (1985)
- 8) C.Fukaxawa K.Udaka et al : Nucleic Acids Res., 15, 8117-8119(1987)
- 9) C.Fukaxawa K.Udaka et al : FEBS Lett., 22,125-127(1987)
- 10) N.A.Yeboah K.Udaka et al : Protein Expression Purif., 7, 309-314 (1996)