

大豆種子の発芽に伴う蛋白質分解酵素活性の変化

宇高京子

(平成6年9月30日受理)

Changes in the Proteolytic Activity of Soybean Seed during Germination

Kyoko UDAKA

(Received September 30, 1994)

1. 緒言

完熟した種子の組織は極端な脱水状態にあり、形態的にも未分化な状態である。細胞内生理活性も極めて低い固体でもある。しかし、いったん休眠が解除されると休眠器官内部の代謝系が活発化し、胚が発育できうる状態におかれる。さらに外的環境条件に影響されながらも生長を続け、ついに「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科学的变化を一般的に「発芽」という。このように休眠および発芽は、生体内遺伝機構に深く組み込まれた高位の制御によってもたらされた特殊な生理状態にあると考えられる。

従来から宇高^{1)~9)}らは大豆貯蔵蛋白質の生合成と異化について検討を続けているが、本論文では異化作用に関与するプロテアーゼ特に、大豆発芽過程での蛋白分解酵素活性との関係について基礎的実験結果を得たので報告する。

2. 実験方法

(1) 試料の調製

大豆種子(ボンミノリ種、遺伝子型II a、早生)は低温保存2年以内のものを用いた。乾燥完熟大豆種子を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さらし粉液を洗い流した後、滅菌シャーレー上で滅菌水を浸み込ませたガーゼを敷き、20°Cの恒温室で発芽さす。試料採取は0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14日目に各々行い以下の実験に供した。

(2) 発芽各時期からの蛋白質の抽出

発芽大豆を各日ごとに20粒づつ採取し、胚軸および幼根を取り除いた後、1.0M食塩を含む0.01Mバルビタール緩衝液(pH8.0)を15ml加え、Ultora-Turraxホモゲナイザーで3分間摩擦する(4°C)。次に日立高速冷却遠心機(20PR-52)で15000rpm, 20分間遠心し、その上澄液を試料とした。

(3) ゲル濾過法による大豆発芽可溶性蛋白質の分画

上記(2)から得た各試料をn-ヘキサンで脱脂し、Bio-Gel-A-0.5mによるゲル濾過法で蛋白分画を行い、280mnでその吸光度を測定した。また、その蛋白分画を図1~15のように分画し、それぞれを凍結乾燥し、以下(4)の実験に用いた。

(4) 蛋白分解酵素活性の測定

上記(3)の凍結乾燥した蛋白質分画サンプルを用い、その10mgに1.0M食塩を含む0.01Mバルビタール緩衝液(pH8.0) 2mlを加え、良く混和し、酵素液とした。反応系は基質(0.1%トリプシンインヒビター) 0.5ml, 酵素液0.2mlおよび1M酢酸緩衝液0.5mlを加え、良く混和する。38°Cで一定時間保温後、50%TCA液1ml加え、攪拌後10分間氷水中に放置し、上記遠心機で2800rpm, 20分間遠心した。この上澄液に、ニンヒドリン法を用い570nmでその吸光度を測定した。

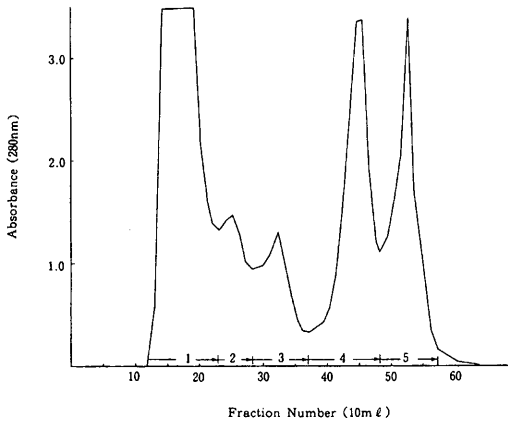


Fig.1 Gel Filtration Patterns of Ungerminated Soybean Proteins

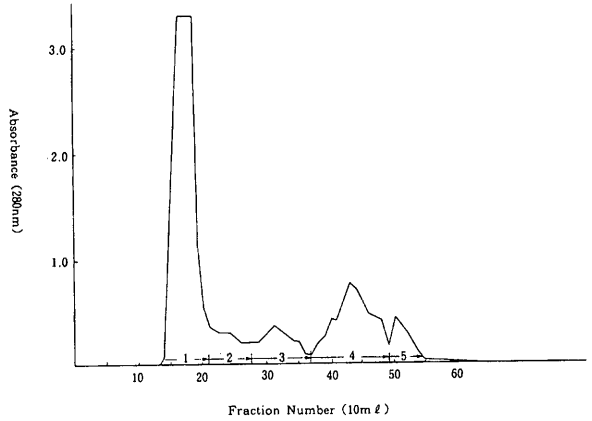


Fig.2 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 1 Day after Germination

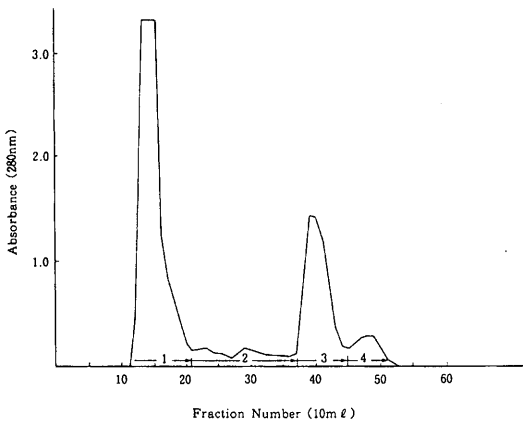


Fig.3 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 2 Day after Germination

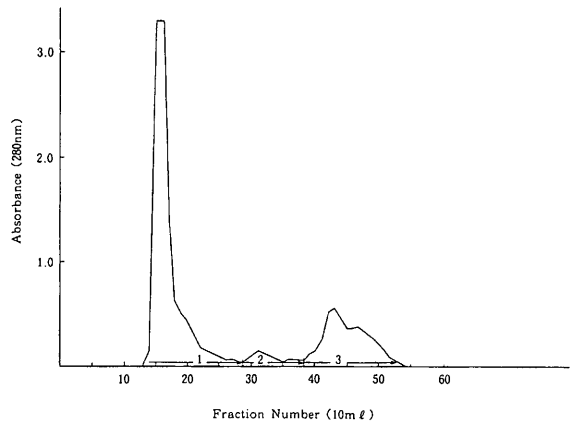


Fig.4 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 3 Day after Germination

大豆種子の発芽に伴う蛋白質分解酵素活性の変化

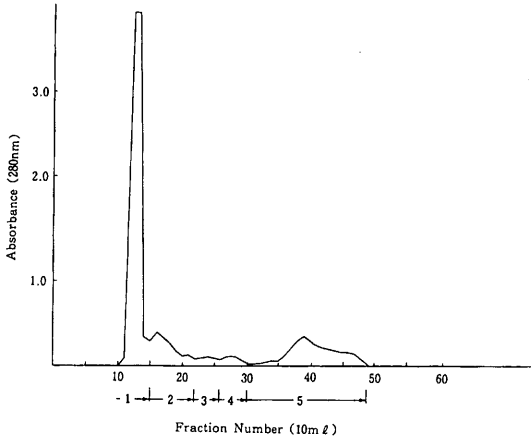


Fig.5 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 4 Day after Germination

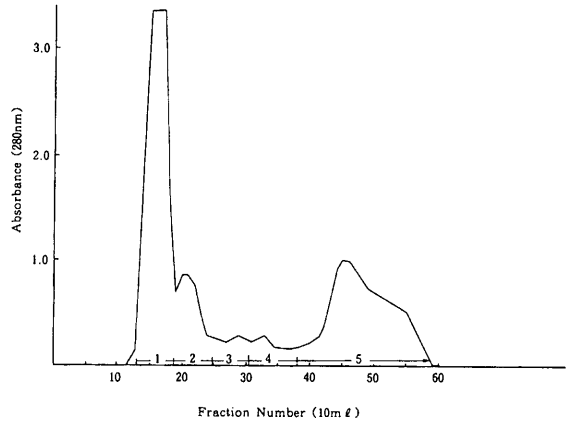


Fig.6 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 5 Day after Germination

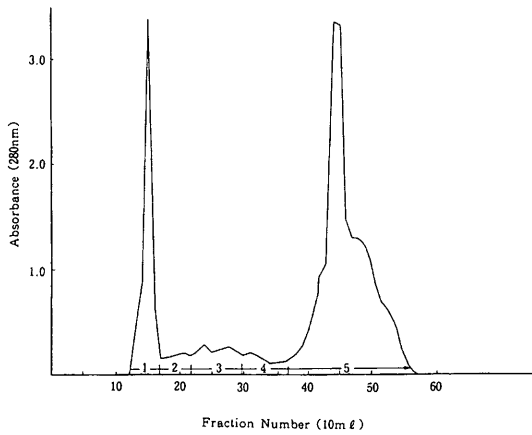


Fig.7 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 6 Day after Germination

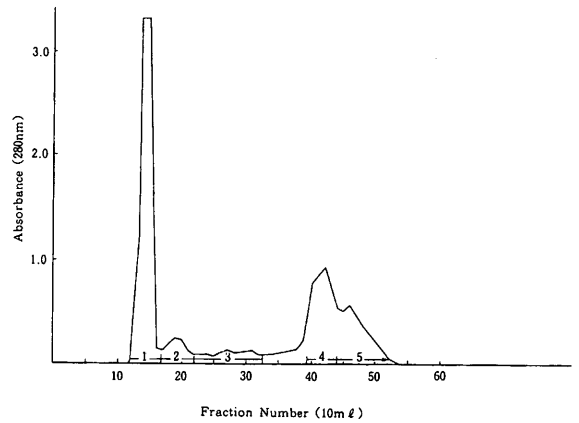


Fig.8 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 7 Day after Germination

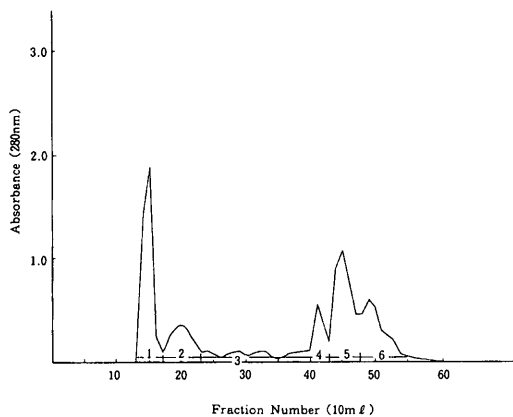


Fig.9 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 8 Day after Germination

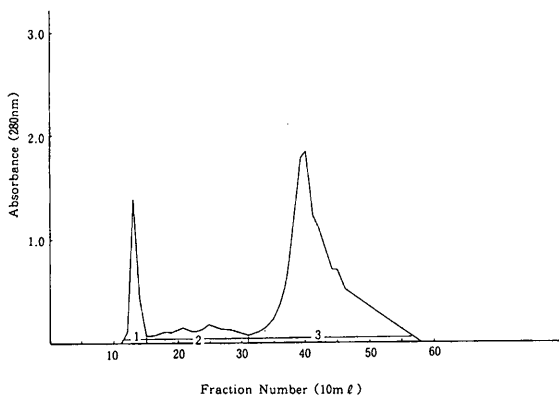


Fig.10 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 9 Day after Germination

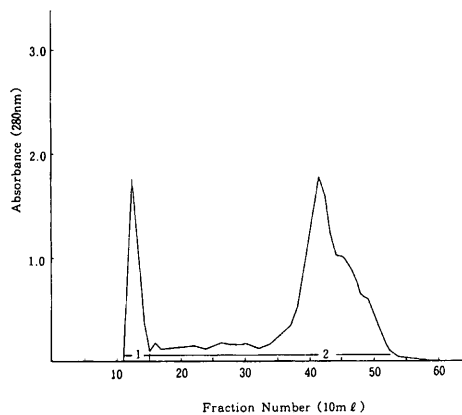


Fig.11 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 10 Day after Germination

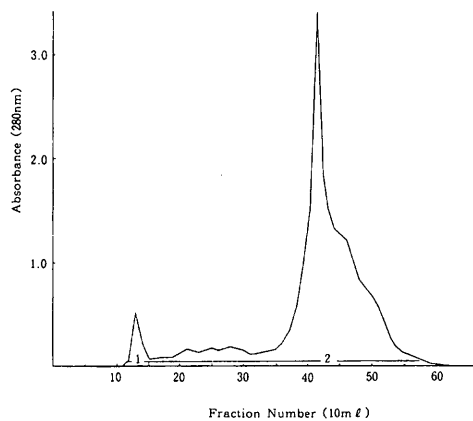


Fig.12 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 11 Day after Germination

大豆種子の発芽に伴う蛋白質分解酵素活性の変化

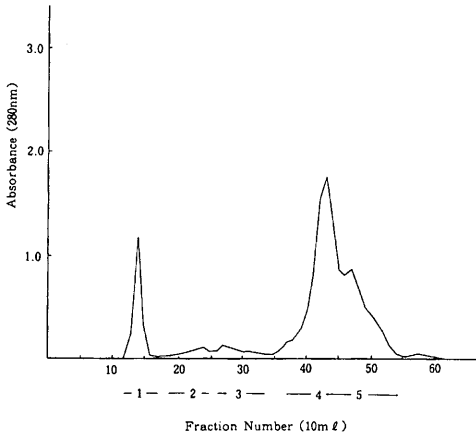


Fig.13 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 12 Day after Germination

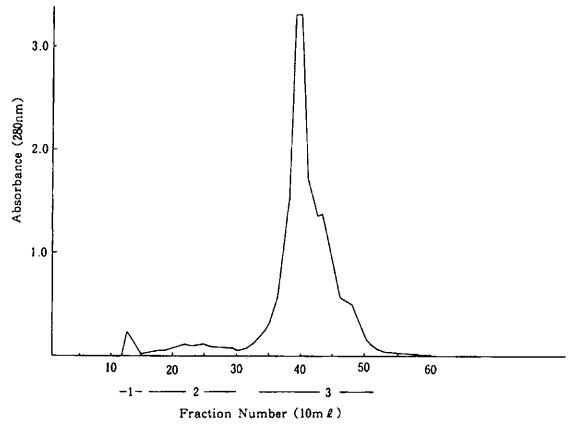


Fig.14 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 13 Day after Germination

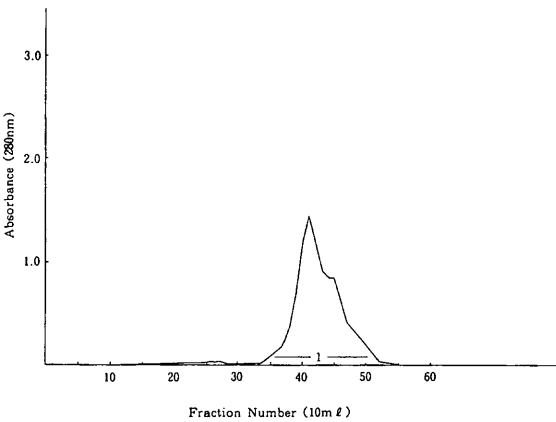


Fig.15 Gel Filtration Patterns of Soybean Proteins 14 Day after Germination

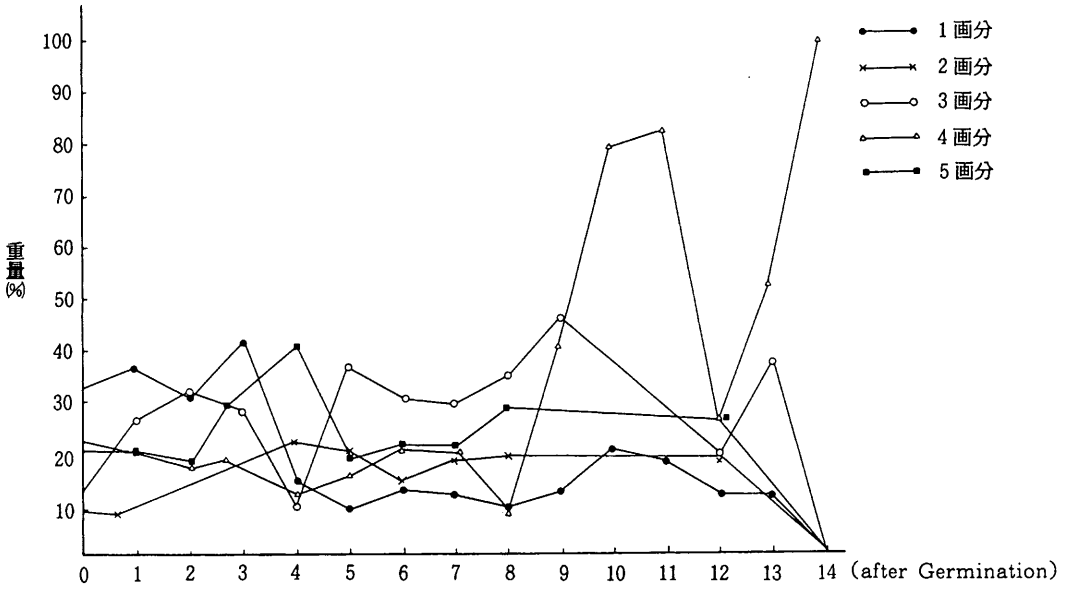


Fig.16 Change in the Contents of each Soybean Proteins Fraction during Germination

Table 1. Proteolytic Activity of Soybean Seed during Germination

発芽日	分画No.	比活性	Total	発芽日	分画No.	比活性	Total	
0	1	0	1.46	7	1	0.34	2.82	
	2	0			2	0.60		
	3	0			3	0.48		
	4	0.42			4	0.98		
	5	1.04			5	0.42		
1	1	0	2.84	8	1	1.34	8.62	
	2	0.70			2	1.26		
	3	0.88			3	1.76		
	4	0.84			4	1.58		
	5	0.42			5	1.80		
2	1	0.20	2.26	9	6	0.88	3.64	
	2	0.76			1	1.12		
	3	0.70			2	1.08		
	4	0.60			3	1.44		
3	1	1.72	4.16	10	1	0.92	2.22	
	2	1.24			2	1.30		
	3	1.20			1	0.54		
4	1	1.70	5.44	11	2	0.74	1.28	
	2	1.08			12	1		0.34
	3	1.24				2		0.46
	4	0.50				3		0.14
	5	0.92				4		0.20
5	1	3.84	22.54	13		5	0.38	1.52
	2	4.68			1	0.60		
	3	2.86			2	0.96		
	4	7.28			4	0.60		
	5	3.88			1	0.64		
6	1	1.78	6.86	14	1	0.64	0.64	
	2	1.04						
	3	1.10						
	4	1.60						
	5	1.34						

3. 実験結果と考察

乾燥完熟大豆種子は前報の通り、本実験条件下では浸漬後、24時間後から発芽が始まる。すなわち発芽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なり、発芽8日目から上胚軸の伸びが始まる。このような発芽過程での形態的变化を確認するためにBio-Gel-A-0.5mを用いて大豆発芽可溶性蛋白質のゲル濾過法で検討した(図1~15)、発芽3~4日目を境にして急激な蛋白高分子画分の分解が見られる。すなわち5日目になるとピーク1の画分の分解物がピーク2画分へ、6日目以降になると、ピーク3および4画分へと移行していく。発芽8日目を境にして分解は急激に進み、ほとんどピーク4および5画分のみになり、低分子化していった。この変化をさらに検討したのが図16である。すなわち、高分子画分(分子量約30万以上)は、発芽3日目を境に急激に分解され始め発芽14日目では完全に分解された。このように発芽過程での形態的变化とゲル濾過図との変化は一致する。次に各蛋白画分のプロテアーゼ活性の検索を行った。その結果、発芽0日目(未発芽大豆)では、活性は弱く、低分子画分に存在し、ピーク1からピーク3まではまったく活性が認められなかった。発芽3日目から活性は増し、発芽5日目には急激に活性が高まり、発芽9日目以降は活性が低下していく傾向にある。その結果をまとめたのが表1である。その間、高分子画分にも活性が認められるが、その理由については、現在検討中である。しかしチモゲン様のプロテアーゼであった場合には、不活性の高分子前駆体の存在が知られている。この場合も不活性な全駆体が存在し、その一部が発芽過程で切れ、次第に活性の高い低分子の、いわゆる

活性型プロテアーゼに変化して行くことも予想される。

4. 要約

(1) 大豆発芽3日目から胚軸の伸びが大きくなり、その可溶性蛋白質のゲル濾過図から急激な蛋白高分子画分の分解がみられる。すなわちピーク1画分の分解物がピーク2画分へ移行し、そのプロテアーゼ活性は発芽3日目から増加し、発芽5日目にはその活性が急激に高まっている。

(2) 大豆発芽6日目から根毛の発達が著しくなる。その可溶性蛋白質のゲル濾過図からピーク1画分の分解物はピーク3および4画分へと低分子画分へ移行する。

(3) 大豆初が8日目から上胚軸の伸びが始まる。その可溶性蛋白質のゲル濾過図では高分子画分は急激に分解が進み、ピーク4および5画分のみとなった。またそのプロテアーゼ活性は低下していく。

5. 文献

- 1) C. Fukuzawa, K. Udaka et al: J. Bio. Chem., **260**, 6234-6239(1985)
- 2) C. Fukuzawa, K. Udaka et al: FEBS Lett., **188**, 117-122(1985)
- 3) C. Fukuzawa, K. Udaka et al: Eur. J. Bioch., **149**, 491-496(1985)
- 4) C. Fukuzawa, K. Udaka et al: Nucl. Acids Resarch **15**, 8117-8118(1987)
- 5) C. Fukuzawa, K. Udaka et al: FEBS Lett. **224**, 125-127(1987)
- 6) 宇高 京子: 東京家政大学生生活科学研究報告, **13**(1990)