

大豆種子の発芽に伴う酸性エキソ型プロテアーゼ活性の変化

宇高 京子

(平成7年9月30日受理)

Changes in the Activity of Acidic Exoproteases derived from Soybean Seed during Germination

Kyoko UDAKA

(Received September 30, 1995)

1. 緒言

完熟した種子の組織は高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、それに先だ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」という。前報の通り¹⁾乾燥完熟大豆種子は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。

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²⁾と大豆蛋白質の生合成について^{2~7)}検討している。そこで本論文では大豆種子の発芽に伴う酸性エキソ型プロテアーゼ活性の変化についての実験結果を得たので報告する。

2. 実験方法

(1) 試料の調製

乾燥完熟種子 (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。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、滅菌シャーレで滅菌水をしみこ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日目に以下の実験に供した。

(2) 発芽各時期からの粗酵素液の抽出

発芽大豆を毎日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、Ultura-turraxホモゲナイザーで3分間摩砕した (4°C)。次に日立高速冷却遠心機 (20PR-52) で15000rpm, 20分間遠心し、その上澄液を粗酵素液とした。

(3) 基質の調製

(3-1) 0.2%変性ヘモグロビンの調製

牛ヘモグロビン2gに40ml純水を加え、溶解後、36g尿素、1M水酸化ナトリウム8mlを加え、攪拌溶解後、1M硼酸10mlを加え、2M塩酸でpH7.5に調製し、純水で100mlに定溶した。

(3-2) 0.4%11S大豆蛋白質の調製

11S大豆蛋白質 (凍結乾燥した11S蛋白質分画区分粉末) 40mgに1.0M食塩を含む0.01Mバルビタール緩衝液 (pH8.0) 10mlに溶解した。

(4) 酸性エキソ型プロテアーゼ活性の測定

(4-1) 上記(3-1)の0.2%変性ヘモグロビン溶液0.3mlに1M酢酸緩衝液 (pH5.0) 0.5mlと粗酵素液0.2mlを加え、良く混和し、恒温槽 (38°C) で0分, 60分, 90分, 120分, 150分, 180分間反応さす。次に50% T C

Aを0.1ml加え、攪拌後15分間水水中に放置し、遠心(x2800rpm, 10分)した。その上澄液0.5mlに純水0.8mlを加え攪拌混和する。その0.1mlに純水2mlを加え、その吸光度を280nmで測定した。

(4-2) 上記(3-2)の0.4%11S大豆蛋白質0.2mlに1M酢酸緩衝液(pH5.0)0.5mlと粗酵素液0.02mlを加え、混和し、恒温槽(38°C)で、0分、60分、90分、120分、150分、180分間反応さす。次に10%TCA(トリクロロ酢酸)を0.35ml加え、攪拌後15分間水水中に放置し遠心(x2800rpm, 10分)した。その上澄液1mlに純水0.6mlを加え、その吸光度を280nmで測定した。

(5) 未発芽大豆種子中の酸性エキソ型プロテアーゼ活性の濃度変化

A基質(0.4%11S大豆蛋白質)0.2ml, 1M酢酸緩衝液(pH5.0)0.500ml, 粗酵素液0.02ml

B基質(0.4%11S大豆蛋白質)0.2ml, 1M酢酸緩衝液(pH5.0)0.510ml, 粗酵素液0.01ml

C基質(0.4%11S大豆蛋白質)0.2ml, 1M酢酸緩衝液(pH5.0)0.515ml, 粗酵素液0.005ml

測定方法は上記(4-2)と同様である。

すなわち、それぞれを混和し、恒温槽(38°C)で、0分、60分、90分、120分、190分間反応さす。次に10%TCAを0.35ml加え、攪拌後15分間水水中に静置し遠心した(x2800rpm, 10分)。その上澄液1mlに純水0.6mlを加え、その吸光度を280nmで測定した。

Table 1 Changes in the Activity of Acitic Axoproteases derived from soybean Seed during Germination

After Germination (day)	Incubation Time (Munite)					
	0	60	90	120	150	180
0	0.131	0.382	0.504	0.452	0.498	0.434
1	0.074	0.310	0.201	0.264	0.239	0.271
2	0.112	0.251	0.230	0.341	0.295	0.350
4	0.109	0.139	0.210	0.220	0.191	0.200
6	0.061	0.130	0.163	0.163	0.161	0.180
7	0.119	0.160	0.173	0.200	0.340	0.202
8	0.089	0.262	0.189	0.204	0.130	0.167
9	0.100	0.230	0.160	0.166	0.086	0.120

* Substrate (0.2% Denatured Hemogiobin 0.3ml) 1M Acetic Acid Buffer (pH5.0) 0.5ml Enzyme Solution 0.02ml

Table 2 Changes in the Activity of Acitic Axoprotease derived form Soybean Seed during Germination

After Germination (DAY)	Incubation Time (Munite)					
	0	60	90	120	150	180
0	0.140	0.672	0.714	0.780	0.778	0.680
1	0.130	0.502	0.730	0.900	0.693	0.793
2	0.120	0.280	0.328	0.404	0.520	0.530
3	0.139	0.389	0.400	0.364	0.360	0.390
4	0.140	0.380	0.239	0.273	0.260	0.250
5	0.083	0.171	0.181	0.170	0.198	0.207
6	0.112	0.224	0.220	0.275	0.274	0.270
8	0.144	0.230	0.220	0.230	0.239	0.204
8	0.130	0.202	0.188	0.179	0.160	0.160

* Substrate (0.4% 11S Rich Protein 0.2ml) 1M Acetic Acid Buffer (pH5.0) 0.5ml Enzyme Solution 0.02ml

大豆種子の発芽に伴う酸性エキソ型プロテアーゼ活性の変化

Table 3 Change in the Contents of the Activity of Exoproteases derived from Ungermination Soybean Seed

Incubation Time (Munite)	A		B		C	
		(A-0 Time)		(B-0 Time)		(C-0 Time)
0	0.383	0	0.190	0	0.120	0
6 0	0.475	0.092	0.263	0.073	0.135	0.015
9 0	0.553	0.170	0.280	0.090	0.152	0.032
1 2 0	0.600	0.217	0.63	0.173	0.275	0.155

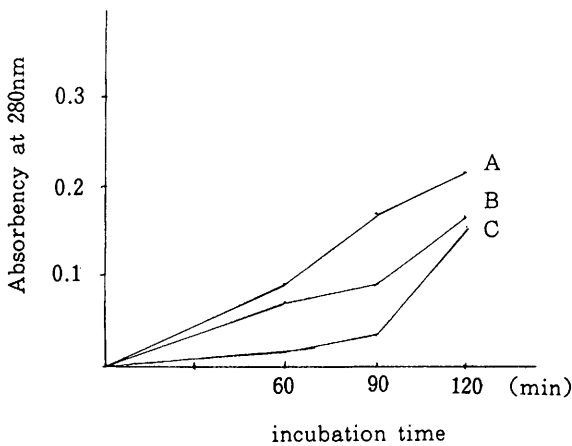


Fig 1 Change in the Contents of the Activity of Exoproteases derived from Ungermination Soybean Seed

3. 実験結果と考察

Table 1は0.2%変性ヘモグロビンによる酸性エキソ型プロテアーゼ活性の変化を発芽各時期より検討した。その結果、発芽0日目最大の活性を示した(0.131, 0.382, 0.504, 0.452, 0.498, 0.434)。その後、活性は減少していった。すなわち発芽9日目では0.100, 0.230, 0.160, 0.166, 0.086, 0.120であった。ただし発芽中期(発芽4日目~発芽6日目)は発芽7日目に比較して活性が低い。Table 2は発芽各時期より0.4%大豆11S蛋白質による酸性エキソ型プロテアーゼ活性の変化を検討した。その結果、発芽0日目および発芽1日目が最大の活性を示した。(発芽0日目は0.140, 0.672, 0.714, 0.780, 0.680で発芽1日目は0.130, 0.502, 0.730, 0.900, 0.693, 0.790であった)。その後、活性は減少していった。すなわち発芽8日目では0.130, 0.202, 0.188, 0.179, 0.160, 0.160の活性を示した。ただし発芽中期(特に発

芽5日目)は発芽7日目に比較して活性が低い。この結果はTable 1の0.2%変性ヘモグロビンを用いた場合と同様であった。以上の結果からは発芽初期、発芽中期および発芽後期とでは、それぞれ異なった酵素の存在あるいは酵素特異性があるのではと考えられるので今後検討したい。Table 3は未発芽種子中の酸性エキソ型プロテアーゼ活性の酵素濃度での変化を0.4%大豆11S蛋白質を用いて検討した。その結果、酵素濃度が高くなるに従ってプロテアーゼ活性は強くなった。すなわちC(酵素0.005ml), B(酵素液0.01ml)およびA(酵素液0.02ml)の順に活性が強くなった。これをグラフに示したのがFig. 1である。

4. 要 約

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蛋白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結果が得られた。ただし両者ともに発芽中期(発芽4日目~発芽6日目)は発芽7日目に比較して活性が低い、したがって発芽初期(発芽0~3日目)、発芽中期(発芽4~6日目)および後期(発芽7~9日目)とでは前報¹⁾の通り、大豆種子の形態的变化も著しいのでそれぞれ異なった酵素の存在か、あるいは酵素特異性があるのではと考えられる。

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) C.Fukazawa, K.Udaka et al: Kulturflance, 32, 7578 (1984)
- 3) C.Fukazawa, K.Udaka et al: J.Biol.Chem., 260, 6234-6239 (1985)
- 4) T.Momma K.Udaka et al: Eur.J.Biochem.,

宇高 京子

149, 491-496 (1985)

Res., 15, 8117-8117 (1987)

5) T.Momma K.Udaka et al:FEBS Lett., 118,
117-122 (1985)

7) C.Fukazawa, K.Udaka et al:FEBS Lett., 22,
125-127 (1987)

6) C.Fukazawa, K.Udaka et al:Nucleic Acids

8) 宇高 京子:東京家政大学研究紀要 第35集 (1995)