

# 発芽各時期における大豆種子蛋白質の 自己分解に及ぼすpHの影響

宇高 京子, 森永真希子

(平成9年10月2日受理)

## Studies on the Autolysis have an effect of pH derived from Soybean Seed Protein during Germination

Kyoko UDAKA and Makiko MORINAGA

(Received on October 2, 1997)

### 1. 緒 言

「幼根が種皮を破る」という形態的变化を最終過程として、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」という。

従来から宇高らは、この発芽過程での第一段階であるこの異化作用に関与するプロテアーゼについて検討している<sup>1)~6)</sup>。そこで本論文では発芽に伴う大豆種子蛋白質の自己分解に与えるpHの影響についての実験結果を得たので報告する。

### 2. 実験方法

#### (1) 試料の調整

前述<sup>5)</sup>の通り大豆種子を発芽させ、試料採取は発芽0, 1, 3, 5および7日目に行い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

上記(1)の発芽時期から20粒ずつ採取し、胚軸および幼根を除去し、1.0M食塩を含むバルビタール緩衝液(pH8.0)を15ml加え、Ultra-turrax ホモジナイザーで3分間(氷水中)磨砕した。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て、以下の実験に供した。

#### (3) 緩衝液の調整

- (3-1) pH4.0 (0.1M酢酸緩衝液)
- (3-2) pH5.0 (0.1M酢酸緩衝液)
- (3-3) pH6.0 (0.1M磷酸緩衝液)

- (3-4) pH7.2 (0.1M磷酸緩衝液)
- (3-5) pH8.0 (0.1Mトリス塩酸緩衝液)
- (3-6) pH9.0 (0.1Mトリス塩酸緩衝液)

#### (4) 試料の調整

上記(2)の発芽各時期からの各粗酵素液0.1mlと各緩衝液0.6mlを加え、試料調整し、0分および38°Cで120分間保温した。また、大豆11S蛋白質分画区分0.2mlと各粗酵素液0.1mlおよび緩衝液(pH8.0)0.6mlを加え、0分と38°Cで120分間保温した。

#### (5) 試料の純度の検定方法

##### (5-1) グラジエントスラブゲル電気泳動法

E液: トリスアミノメタン(メルク社製)10.75gと硼酸5.04gとNa<sub>2</sub>EDTA0.93gを純水で1000mlとする。

F液: アクリルアミド57.6gとビスアクリルアミド2.4gをE液で100mlとする。

G液: アクリルアミド7.68gとビスアクリルアミド0.32gをE液で100mlとする。

H液: 3-ジメチルアミノプロピルニトリル0.3mlをE液で100mlとする。

I液: 過硫酸アンモニウム0.3gをE液で100mlとする。

以上の溶液でF液:H液:I液=2:1:1で混合し30%ゲル溶液作成、次にG液:H液:I液=2:1:1で混合し、4%ゲル溶液作成し4~30%グラジエントスラブゲルを作成し、電気泳動を行う。アミドブラック10Bで染色し、7%酢酸で脱色する。

(5-2) SDS電気泳動法

A液: 0.5M 磷酸緩衝液 (pH7.2)

B液: 1% SDS溶液

C液: アクリルアミド22.2gとビスアクリルアミド0.6gを純水で100mlとする。

D液: N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)

E液: 過硫酸アンモニウム0.0225gに純水1.5mlを加える。

F液: 2-メルカプトエタノール (またはDTT)

以上の溶液で10%ゲルカラム22本分を作成する (A液 6ml, B液 3ml, 純水 6ml, C液13.5ml, TEMED0.045ml, E液1.5mlを加え, 気泡が生じないように, 良く攪拌する)。電気泳動を行い, アミドブラック10Bで染色し, 7%酢酸で電気脱色する。

(5-3) 酢酸酸性尿素ゲル電気泳動法

A液: アクリルアミド60gとビスアクリルアミド0.4gと尿素36gを純水で100mlとする。

B液: 水酢酸43.2mlとTEMED4mlと尿素36gを純水で100mlとする。

C液: 過硫酸アンモニウム0.14gと尿素36gを純水で100mlとする。

D液: 尿素54gを純水で100mlとする。

E液: 0.1M酢酸溶液

F液: 2-メルカプトエタノール (またはDTT)

以上の溶液でA液: B液: C液=2:1:5の割合で混和し, 良く脱気し, ゲルカラムを作成する。サンプル量: D液=1:2の割合でサンプル調整し, DTTを加え, 50°Cで2時間保温しておく。上槽を陽極に, 下槽を陰極にE液を満たし, 電気泳動を行う。アミドブラック10Bで染色し, 7%酢酸で電気脱色する。

Table. 1 SDS-Gel Electrophoresis Pattern of the Autolysis have an Effect on pH during Germination

day after germination	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.2	pH 8.0	pH 9.0	pH 8.0+glycine
0	×	×	×	○	@	×	*
1	×	×	@	@	@	○	○
2	×	×	@	@	@	*	@
3	×	×	@	@	@	*	○
5	×	×	○	○	○	○	○
7	×	×	×	×	×	×	×

@ a large movement

\* a little movement

○ middle movement

× not movement

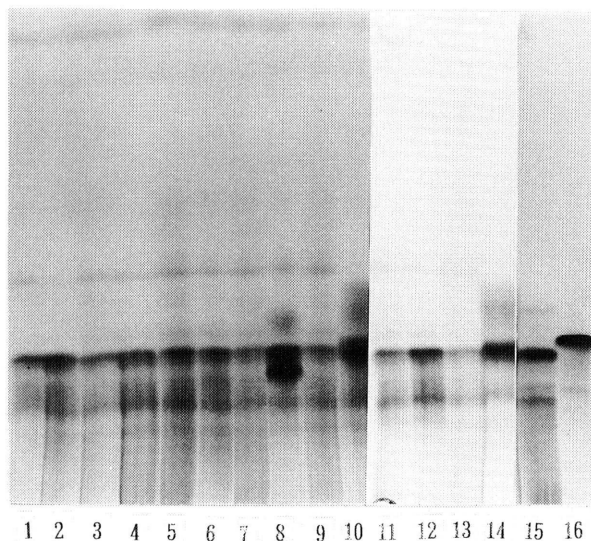


Fig. 1 Gradient slab Gel Electrophoresis Pattern of the autolysis have an effect on pH derived from Soybean Seed Protein during Ungermination.

- (1) pH 4. 0, 0min. (2) pH 4. , 120min. (3) pH 5. 0, 0min. (4) pH 5. 0, 120min.  
 (5) pH 8. 0, 0min. (6) pH 6. 0, 120min. (7) pH 7. 2, 0min. (8) pH 7. 2, 120min.  
 (9) pH 8. 0, 0min. (10) pH 8. 0, 120min. (11) pH 9. 0, 0min. (12) pH 9. 0, 120min.  
 (13) pH 8. 0, add to glycinin, 0min. (14) pH 8. 0, add to glycinin, 120min.  
 (15) glycinin (16) conglycinin

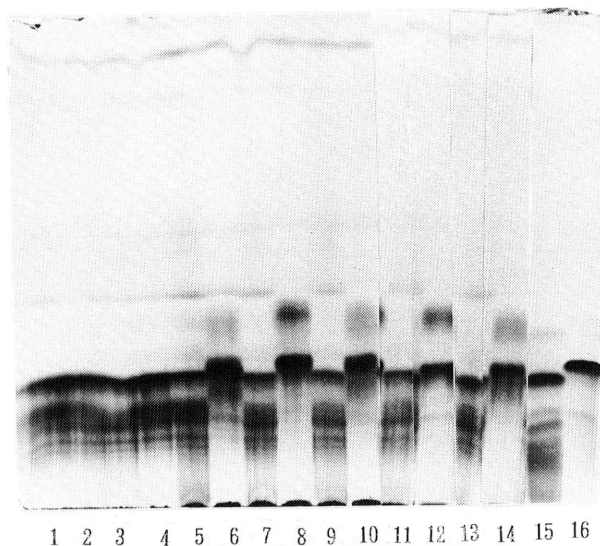


Fig. 2 Gradient Slab Gel Electrophoresis Pattern of the autolysis have an effect on pH driven from Soybean Seed Protein during one Day after Germination.

- (1) pH 4. 0, 0min. (2) pH 4. 0, 120min. (3) pH 5. 0, 0min. (4) pH 5. 0, 120min.  
 (5) pH 6. 0, 0min. (6) pH 6. 0, 120min. (7) pH 7. 2, 0min. (8) pH 7. 2, 120min.  
 (9) pH 8. 0, 0min. (10) pH 8. 0, 120min. (11) pH 9. 0, 0min. (12) pH 9. 0, 120min.  
 (13) pH 8. 0, add to glycinin, 0min. (14) pH 8. 0, add to glycinin. 120min.  
 (15) glycinin (16) conglycinin

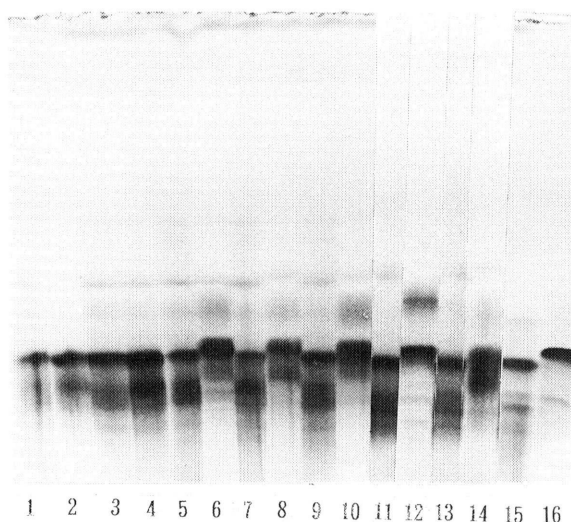


Fig. 3 Gradient Slab Gel Electrophoresis Pattern of the Autolysis have an effect on pH driven from Soybean Seed Protein during 2 Days after Germination.

- (1) pH 4.0, 0min. (2) pH 4.0, 120min. (3) pH 5.0, 0min. (4) pH 5.0, 120min.  
 (5) pH 6.0, 0min. (6) pH 6.0, 120min. (7) pH 7.2, 0min. (8) pH 7.2, 120min.  
 (9) pH 8.0, 0min. (10) pH 8.0, 120min. (11) pH 9.0, 0min. (12) pH 9.0, 120min.  
 (13) pH 8.0, add to glycinin, 0min. (14) pH 8.0, add to glycinin, 120min.  
 (15) glycinin (16) conglycinin

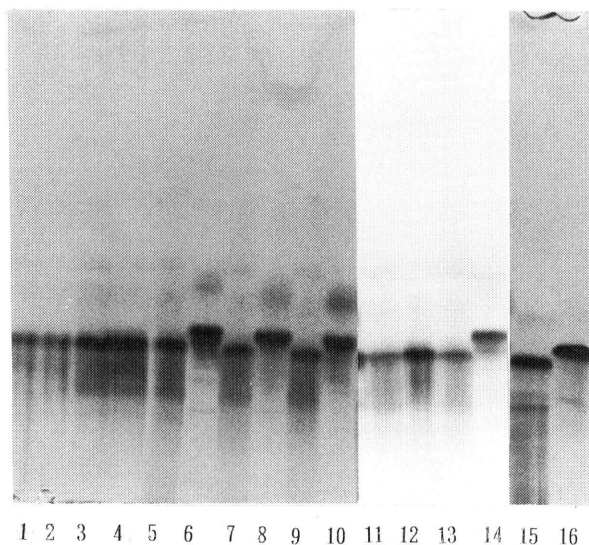


Fig. 4 Gradient Slab Gel Electrophoresis Pattern of the Autolysis have an effect on pH driven from Soybean Seed Protein during 3 Days after Germination.

- (1) pH 4.0, 0min. (2) pH 4.0, 120min. (3) pH 5.5, 0min. (4) pH 5.0, 120min.  
 (5) pH 6.0, 0min. (6) pH 6.0, 120min. (7) pH 7.2, 0min. (8) pH 7.2, 120min.  
 (9) pH 8.0, 0min. (10) pH 8.0, 120min. (11) pH 9.0, 0min. (12) pH 9.0, 120min.  
 (13) pH 8.0, add to glycinin, 0min. (14) pH 8.0, add to glycinin, 120min.  
 (15) glycinin (16) conglycinin

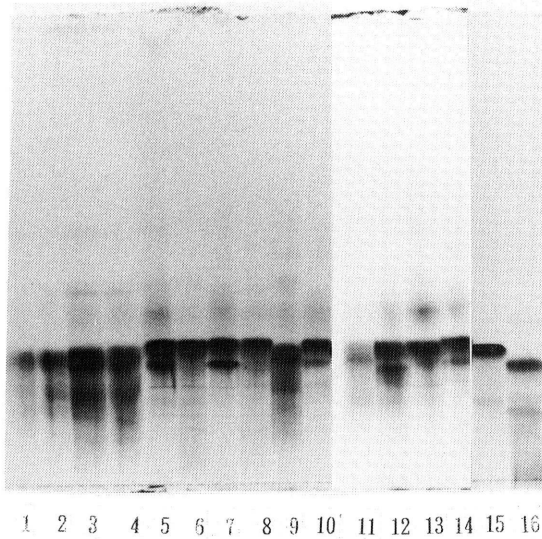


Fig. 5 Gradient Slab Gel Electrophoresis Pattern of the Autolysis have an effect on pH driven from Soybean Seed Protein during 5 Days after Germination.

- (1) pH 4.0, 0min. (2) pH 4.0, 120min. (3) pH 5.0, 0min. (4) pH 5.0, 120min.  
 (5) pH 6.0, 0min. (6) pH 6.0, 120min. (7) pH 7.2, 0min. (8) pH 7.2, 120min.  
 (9) pH 8.0, 0min. (10) pH 8.0, 120min. (11) pH 9.0, 0min. (12) pH 9.0, 120min.  
 (13) pH 8.0, add to glycinin, 0min. (14) pH 8.0, add to glycinin, 120min.  
 (15) conglycinin (16) glycinin

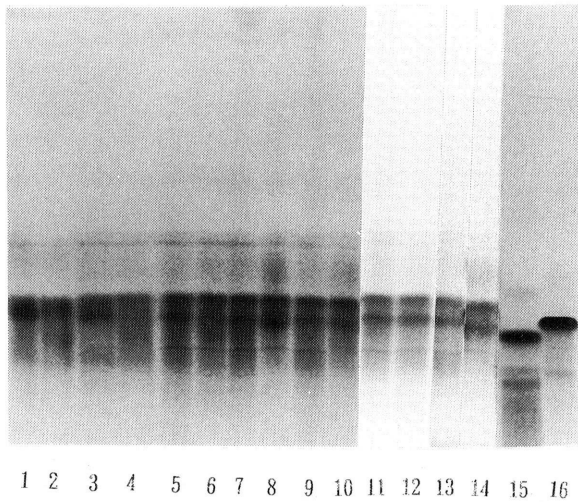


Fig. 6 Gradient Slab Gel Electrophoresis Pattern of the Autolysis have an effect on pH driven from Soybean Seed Protein during 7 Days after Germination.

- (1) pH 4.0, 0min. (2) pH 4.0, 120min. (3) pH 5.0, 0min. (4) pH 5.0, 120min.  
 (5) pH 6.0, 0min. (6) pH 6.0, 120min. (7) pH 7.2, 0min. (8) pH 7.2, 120min.  
 (9) pH 8.0, 0min. (10) pH 8.0, 120min. (11) pH 9.0, 0min. (12) pH 9.0, 120min.  
 (13) pH 8.0, add to glycinin, 0min. (14) pH 8.0, add to glycinin, 120min.  
 (15) glycinin (16) conglycinin

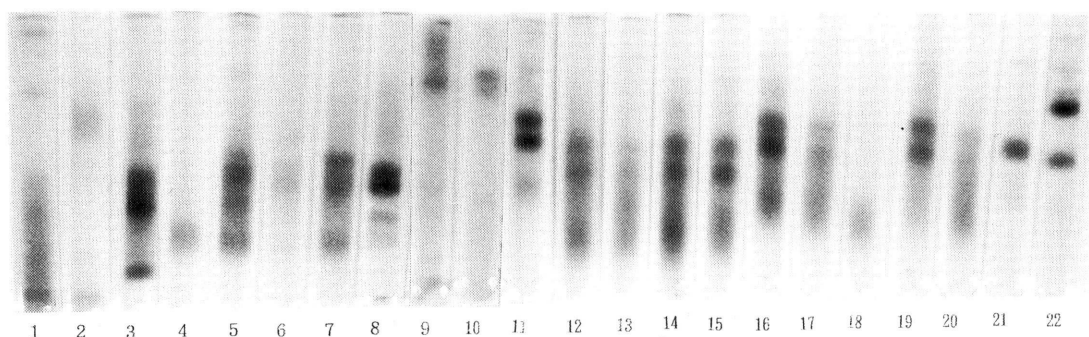


Fig. 7 SDS-Electrophoresis Pattern of the Autolysis have an effect on pH8.0 driven from Soybean Seed Protein during Germination.

(1) 0 day after germination, 0min. (2) 0 day after germination, 120min. (3) 0 day after germination, add to glycinin, 0min. (4) 0 day after germination, 120min. (5) 1day after germination, 0min. (6) 1 day after germination, 120min. (7) add to glycinin, 1 day after germination, 0min. (8) add to glycinin, 1 day after germination, 120 min. (9) 3days after germination, 0min. (10) 3days after germination, 120min. (11) 3 days after germination, add to glycinin, 0min. (12) 3 days after germination, add to glycinin, 120min. (13) 1 day after germination, 0min. (14) 5 days after germination, 120min. (15) 5 days after germination, add to glycinin, 0min. (16) 5 days after germination, add to glycinin, 120min. (17) 1 day after germination, 0min. (18) 7 days after germination, 120min. (19) 7 days after germination, add to glycinin, 0min. (20) 7 days after germination, add to glycinin, 120min. (21) conglycinin (22) glycinin

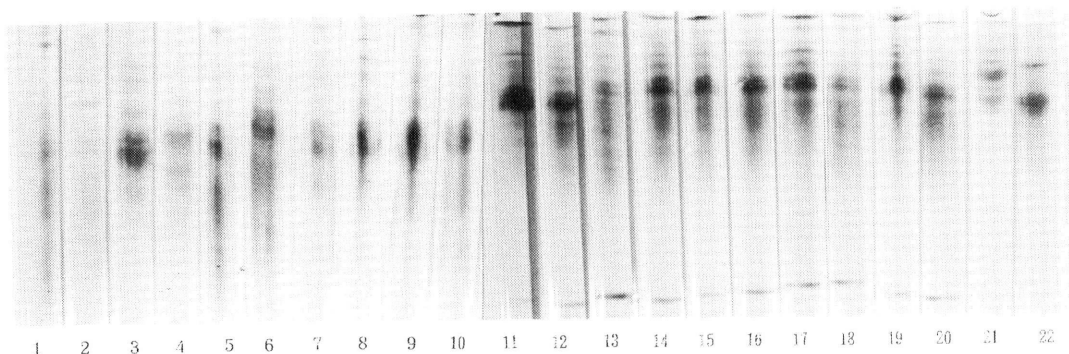


Fig. 8 Acetic Acid-Urea-Gel Electrophoresis Pattern of the Autolysis have an effect on pH8.0 driven from Soybean Seed Protein during Germination.

(1) 0 day after germination, 0min. (2) 0 day after germination, 120min. (3) 0 day after germination, add to glycinin, 0min. (4) 0 day after germination, 120min. (5) 1 day after germination, 0min. (6) 1 day after germination, 120min. (7) add to glycinin, 1 day after germination, 0min. (8) add to glycinin, 1 day after germination, 120min. (9) 3 days after germination, 0min. (10) 3 days after germination, 120min. (11) 3 days after germination, add to glycinin, 0min. (12) 3 days after germination, add to glycinin, 120min. (13) 5 days after germination, 0min. (14) 5 days after germination, 120min. (15) 5 days after germination, add to glycinin, 0min. (16) 5 days after germination, add to glycinin, 120min. (17) 7 days after germination, 0min. (18) 7 days after germination, 120min. (19) 7 days after germination, add to glycinin, 0min. (20) 7 days after germination, add to glycinin, 120min. (21) glycinin (22) conglycinin

### 3. 実験結果と考察

図1は発芽0日目におけるpHの影響を見たグラジエントスラブゲル電気泳動像である。図2は発芽1日目におけるpHの影響を見たグラジエントスラブゲル電気泳動像である。図3は発芽2日目におけるpHの影響を見たグラジエントスラブゲル電気泳動像である。図4は発芽3日目におけるpHの影響を見たグラジエントスラブゲル電気泳動像である。図5は発芽5日目におけるpHの影響を見たグラジエントスラブゲル電気泳動像である。図6は発芽7日目におけるpHの影響を見たグラジエントスラブゲル電気泳動像である。以上の結果を一覧表にまとめたのが、表1である。全体的にpH6.0~pH8.0あたりに大豆11S蛋白質(グリシニン)および大豆7S蛋白質に影響を与えている。pH9.0では、大豆11Sおよび7S蛋白質にわずかに影響を与えている。また、pH4.0およびpH5.0においては、発芽各時期から得た大豆蛋白質の自己分解像には影響を及ぼしていないことがわかった。発芽7日目においては、いずれのpHも影響を受けていない。他の移動した位置に、すべての自己分解像が得られている。図7は発芽各時期におけるpH8.0での影響を見たSDSゲルカラム電気泳動像である。発芽各時期より得た大豆蛋白質はpH8.0および、それに大豆11S蛋白質分画区分を加えると、蛋白質の自己分解像に変動を起こさせ影響を与えていることが見られた。図8は発芽各時期から得た蛋白質のpH8.0での影響を見た酢酸

性尿素ゲル電気泳動像である。pH8.0および、それらに大豆11S蛋白質分画区分を加えても、グリシニンには、あまり顕著な影響を与えず、わずかな変動が見られた。

### 4. 要 約

発芽各時期から得た大豆種子蛋白質の自己分解はpH6.0~pH8.0あたりで発芽初期(1~4日目)頃に11S蛋白質および7S蛋白質の分解が起こり、発芽8日目前後には、7S蛋白質は分解消失され認められなくなり、グリシニンも段々と分解していくという結果が得られた。

### 5. 文 献

- 1) 宇高 京子; 東京家政大学生活科学研究報告, 13 (1990)
- 2) 宇高 京子; 東京家政大学研究紀要 第35集 (1996)
- 3) 宇高 京子; 東京家政大学研究紀要 第36集 (1995)
- 4) N.A. Yeboah, K. Udaka et al; Protein Expression Purif., 7, 309-314 (1996)
- 5) 宇高 京子, 川名 広子; 東京家政大学研究紀要 第37集 (1997)
- 6) 森永真希子, 宇高 京子; 東京家政大学研究紀要 第38集 (1998)