

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基質特異性

森永真希子, 宇高 京子

(平成9年10月2日受理)

Substrate-specificity of an Acidic Exoprotease from Germinating Seeds of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.)

Makiko MORINAGA and Kyoko UDAKA

(Received on October 2, 1997)

1 緒 言

大豆乾燥完熟種子は極度な脱水状態にある。「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」という。前報¹⁾の通り、本実験条件下では乾燥完熟大豆種子の発芽は浸漬後、24時間後から始まり、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著しく、発芽8日目から上胚軸の伸びがはじまるなど形態的な変化は著しい。

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と大豆種子蛋白質の生合成について検討している^{2~11)}。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基質特異性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

大豆乾燥完熟種子 (*Glycine max* (L.) Merr.) は低温貯蔵2年以内のものをを用いた。種子を1%液体洗剤で洗った後、70%エタノール中で30秒、次に5%さらし粉液に浸漬殺菌し、これを滅菌水で十分に洗い流した後、滅菌シャーレに滅菌水をしみこませたガーゼを敷き、20℃の恒温室で発芽さす。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

上記の発芽大豆を各時期から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以下の実験に供した。

(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0.2gに純水40mlを加え、溶解後、尿素36gと1.0M水酸化ナトリウム8mlを加え、攪拌溶解後、1M硼酸10ml加え、2M塩酸でpH7.5に調製し、純水で100mlに定溶した。

(3-2) 0.1%トリプシンインヒビター (TI) の調製

トリプシンインヒビター (TI) 粉末10mgを1.0M食塩を含むバルビタール緩衝液 (pH8.0) 10mlに溶解した。

(3-3) 0.2%11S大豆蛋白質の調製

11S大豆蛋白質 (大豆11S蛋白質分画区分の凍結乾燥粉末) 20mgを1.0M食塩を含むバルビタール緩衝液 (pH8.0) 10mlに溶解した。

(3-4) 0.4%11S大豆蛋白質の調製

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

(3-5) 0.2%7S大豆蛋白質 (β -Conglycinin)

の調製

7 S大豆蛋白質 (β -Conglycinin分画区分の凍結乾燥粉末) 20mgを1.0M食塩を含むバルビタール緩衝液 (pH8.0) 10mlに溶解した。

(4) 緩衝液の調製

- (4-1) pH4.0 (1.0M酢酸緩衝液)
- (4-2) pH5.0 (1.0M酢酸緩衝液)
- (4-3) pH6.0 (0.1M磷酸緩衝液)
- (4-4) pH7.2 (0.1M磷酸緩衝液)
- (4-5) pH8.0 (0.1Mトリス塩酸緩衝液)
- (4-6) pH9.0 (0.1Mトリス塩酸緩衝液)

(5) エクソ型プロテアーゼ活性の測定

(5-1) 0.2%変性ヘモグロビンと0.1%TIおよび0.2%11S大豆蛋白質を基質として用いた場合

上記の各基質0.3mlに緩衝液 (pH5.0, 6.0, 7.2, および8.0) 0.6mlを加え攪拌後, 粗酵素液 (発芽0日目と発芽5日目) を0.1ml加え攪拌し, 38°Cで0分, 60分,

90分, 120分間反応さす。反応後ただちに50%TCAを0.1ml加え, 氷水中に15分間放置する。その後, 遠心し (2800rpm, 10分), その上澄液0.8mlに純水0.8mlを加え, その吸光度を280nmで測定した。

(5-2) 0.4%11S大豆蛋白質を基質として用いた場合

基質0.3mlに緩衝液 (pH5.0, 6.0, 7.2, 8.0および9.0) 0.6mlを加え攪拌後, 粗酵素液 (発芽0, 1, 3, 5および7日目) を0.1ml加え攪拌後, 38°C 0分, 60分, 90分, 120分間反応さす。反応後, 50%TCAを0.1ml加え, 氷水中に15分間放置する。次に遠心 (2800rpm, 10分) し, その上澄液0.8mlに純水0.8mlを加え, その吸光度を280nmで測定した。

(5-3) 0.2% β -Conglycininを基質として用いた場合

基質0.3mlに緩衝液 (pH5.0) 0.6mlを加え攪拌後, 粗酵素液 (発芽0日目と発芽5日目) を0.1ml加え攪拌し, 38°Cで0分, 60分, 90分および120分間反応さす。反応後, 50%TCAを0.1ml加え, 氷水中に15分間放置

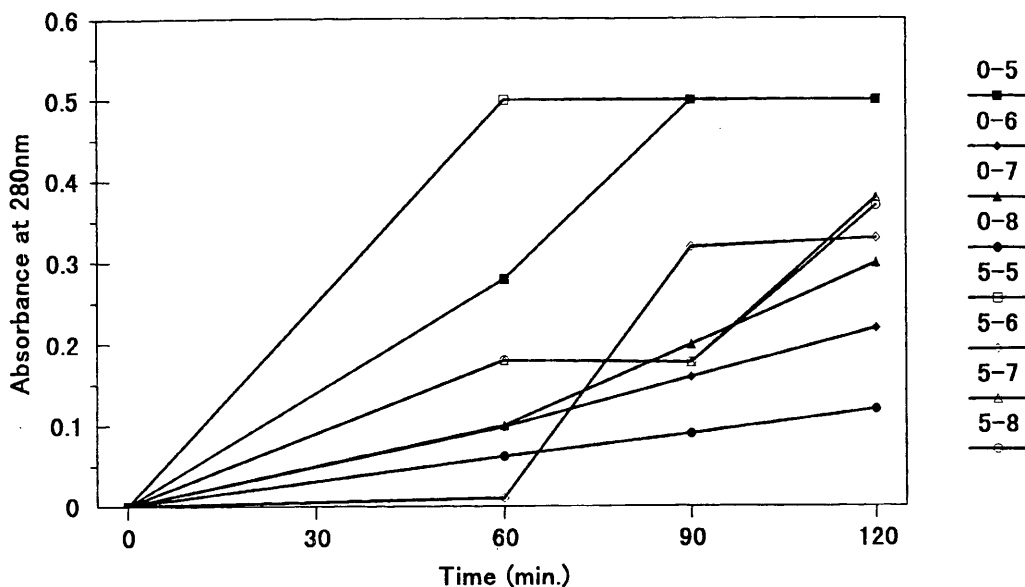


Fig.1 Comparison of exoproteolytic activities derived from soybean seed after 0 day and 5 days imbibition employing 0.2%(W/V) denatured hemoglobin as a substrate.

* Time(min.) is incubation period(min.)

- 0-5(0 day after imbibition, pH5.0)
- 0-6(0 day after imbibition, pH6.0)
- 0-7(0 day after imbibition, pH7.0)
- 0-8(0 day after imbibition, pH8.0)

- 5-5(5 days after imbibition, pH5.0)
- 5-6(5 days after imbibition, pH6.0)
- 5-7(5 days after imbibition, pH7.0)
- 5-8(5 days after imbibition, pH8.0)

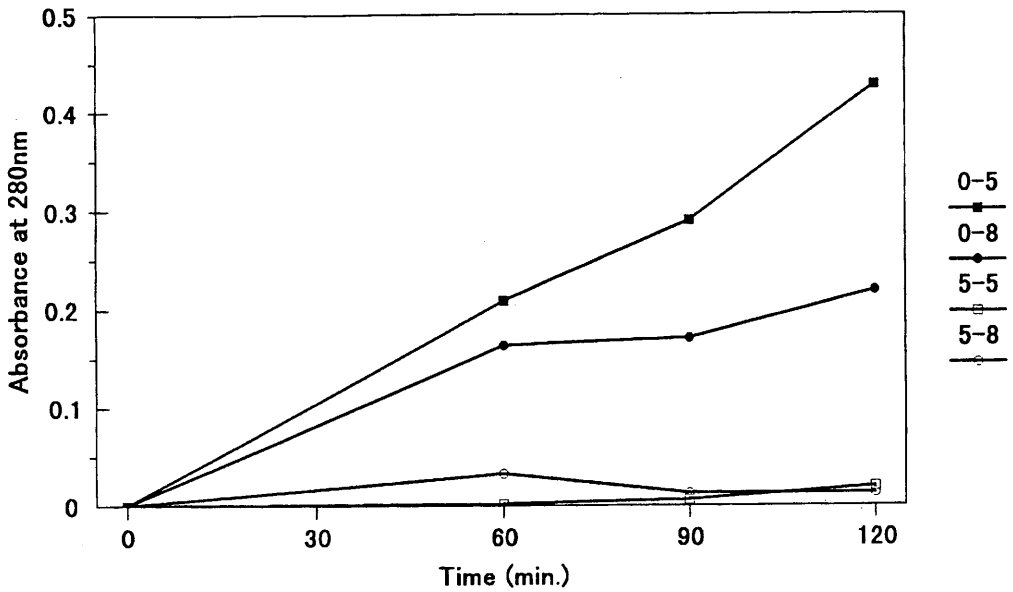


Fig.2 Comparison of exoproteolytic activities from soybean germinating seeds. Trypsin inhibitor[0.1% (W/V)] was used as substrate

0-5(0 day after imbibition, pH5.0)
5-5(5 days after imbibition, pH5.0)

0-8(0 day after imbibition, pH8.0)
5-8(5 days after imbibition, pH8.0)

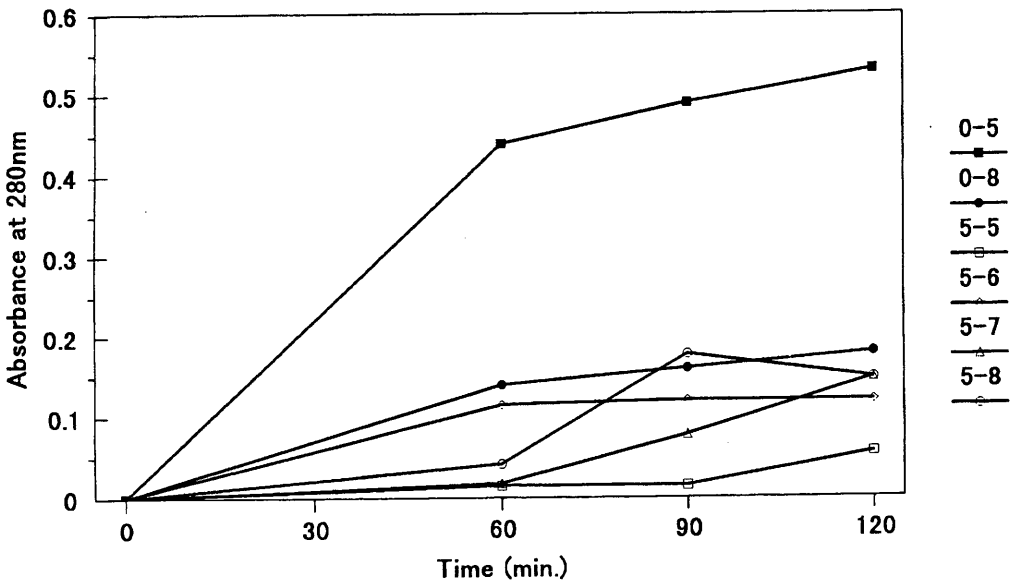


Fig.3 comparative demonstration of exoproteolytic activities from soybean germinating seeds by using 0.2%(W/V) soybean 11S-protein(glycinin) solution.

0-5(0 day after imbibition, pH5.0)
0-8(0 day after imbibition, pH8.0)
5-5(5 days after imbibition, pH5.0)

5-6(5 days after imbibition, pH6.0)
5-7(5 days after imbibition, pH7.0)
5-8(5 days after imbibition, pH8.0)

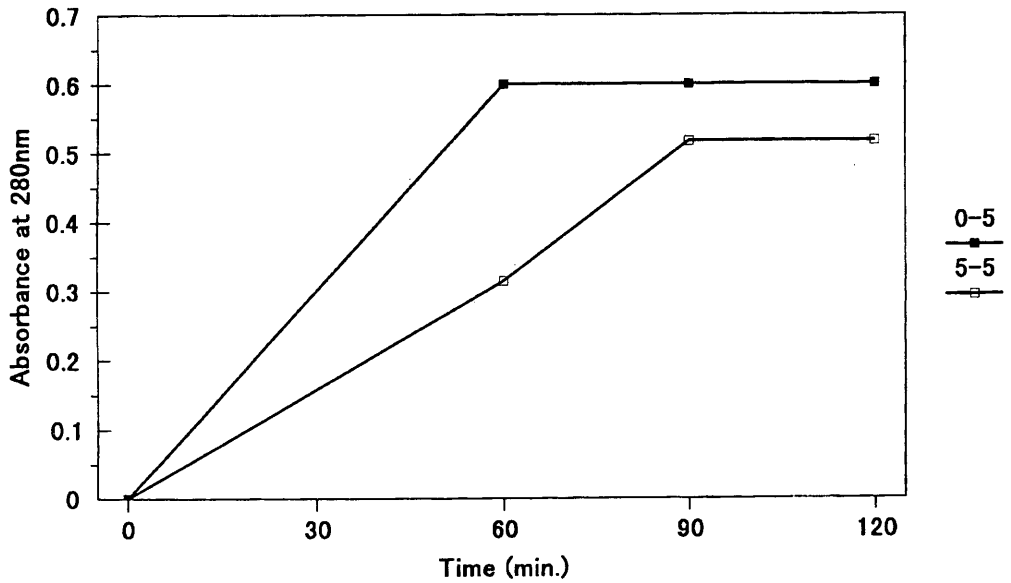


Fig.4 Substrate-specificity of soybean exoprotease derived from the germinating seeds employing a 0.2 % (W/V) 7S-soybean strage protein(β -conglycinin) as substrate.

0-5(0 day after imbibition, pH5.0)
 5-5(5 days after imbibition, pH5.0)

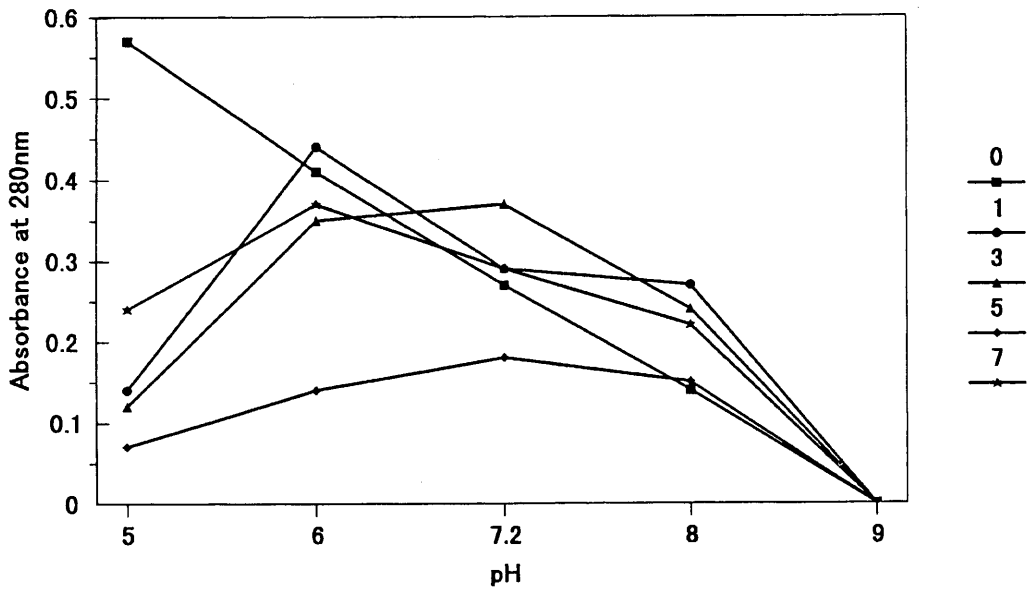


Fig.5 Comparison of soybean exoproteolytic activities derived from several germinating stages of the seeds.

0; ungerminating seed, —■—
 1; one day after imbibition, —●—
 3; 3 days after imbibition, —▲—
 5; 5 days after imbibition, —◆—
 7; 7 days after imbibition, —★—

する。次に遠心(2800rpm, 10分間)し, その上澄液0.8mlに純水0.8mlを加え, その吸光度を280nmで測定した。

3 実験結果と考察

図1では0.2%変性ヘモグロビンを基質として用いた場合の発芽0日目および発芽5日目のプロテアーゼ活性の比較を見ると, 両者ともpH5.0(酸性側)に強いプロテアーゼ活性が見受けられた。図2では, 0.1%トリプシンインヒビターを基質とした場合の発芽0日目と発芽5日目のプロテアーゼ活性の比較を見ると, 発芽0日目にpH5.0とpH8.0に強く活性が見られるが, 発芽5日目ではpH5.0とpH8.0ともに活性は見られない。図3では, 0.2%11S大豆蛋白質(glycinin)を基質とした場合の発芽0日目と発芽5日目のプロテアーゼ活性の比較を見ると, 発芽0日目に, 酸性側(pH5.0)に強い活性が見られた。図4では, 0.2% β -conglycininを基質とした場合の発芽0日目と発芽5日目のプロテアーゼ活性の比較を見ると, 共に酸性側(pH5.0)で強い活性がみられたが, 前報(3)と同様に発芽0日目の方が発芽5日目よりも, 強い活性を見た。図5では, 0.4%11S大豆蛋白質を基質とした場合の発芽0, 1, 3, 5および7日目のプロテアーゼ活性をpH5.0と6.0と7.2と8.0および9.0と変化させ, pHとの比較を検討した。その結果, 0.2%変性ヘモグロビンを基質として用いた場合と反対にpH5.0の酸性側においては, 発芽0日目以外は活性が弱く, pH6.0~pH8.0に活性が強く認められた。また, pH9.0では, 活性はまったく認められなかった。

4 要 約

- 1) 基質0.2%変性ヘモグロビンをを用いた場合, 発芽0日目および発芽5日目ともに酸性側に強いエキソ型プロテアーゼ活性が見られた。
- 2) 基質0.1%トリプシンインヒビターを用いた場合, 発芽0日目の方にpH5.0およびpH8.0に強いエキソ型プロテアーゼ活性が見られた。

- 3) 基質0.2%11S大豆蛋白質を用いた場合, 発芽0日目の酸性側(pH5.0)に強いエキソ型プロテアーゼ活性が見られた。
- 4) 基質0.2% β -conglycininを用いた場合, 発芽0日目および発芽5日目共に酸性側(pH5.0)にエキソ型プロテアーゼ活性が見られた。
- 5) 基質0.4%11S大豆蛋白質を用い, 発芽0, 1, 3, 5および7日目におけるプロテアーゼ活性とpHとの比較を検討した。その結果, pH5.0の酸性側のプロテアーゼ活性は, 発芽0日目以外は, 活性は弱く, pH6.0~8.0辺りにエキソ型プロテアーゼ活性が強く認められた。

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; Kulturfiandce, 32, 75-78(1984)
- 5) C. Fukazawa, K. Udaka, et al; J. Biol. Chem., 260, 6234-6239(1985)
- 6) T. Momma, K. Udaka et al; Eur. J. Bioch., 149, 491-496(1985)
- 7) T. Momma, K. Udaka et al; FEBS Lett., 118, 117-122(1985)
- 8) C. Fukazawa, K. Udaka et al; Nucleic Acids Res., 15, 8117-8119(1987)
- 9) C. Fukazawa, 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)
- 11) 宇高京子, 川名広子; 東京家政大学研究紀要・第37集(1997)