

大豆種子の発芽過程におけるエンド型プロテアーゼ活性の検索 (第1報)未発芽種子(発芽0日目)および発芽過程中期(発芽5日目)における 基質0.2%と0.4%大豆蛋白質を用いた場合と用いない場合の エンド型プロテアーゼ活性の変化

宇高 京子, 星野かほり

(平成10年9月30日受理)

Studies on Endoproteolytic Activity driven from Germinating Seeds of Soybean(*Glycine max(L.)Merr.*)

Part 1. Changes in Endoproteolytic Activity driven from Ungerminating Soybean Seeds or after 5 Days Imbibition with or without 11S-Soybean Protein (0.2% or 0.4%) as Substrate

Kyoko UDAKA and Kaori HOSHINO

(Received on September 30, 1998)

1. 緒 言

一般に豆科植物の種子は蛋白質を多く含み、重要な蛋白質の供給源である。種子形成後、脱水状態で休眠に入る場合が多く、そして種子の発芽は吸水で始まる。この発芽過程を通じて貯蔵蛋白質は、概存の酵素の活性化や新たに合成された酵素により最終的にアミノ酸まで分解され胚の成長に用いられる¹⁾。大豆完熟乾燥種子の発芽は前報の通り^{2~6)}、本実験条件下では浸漬後、24時間頃から発芽が始まり、発芽3日目から胚軸の伸びが大きくなり(発芽過程前期)、発芽6日目から根毛の発達が著しくなり(発芽過程中期)、発芽8日目から上胚軸の伸びが始まる(発芽過程後期)など形態的な変化も著しく、これらは発芽各時期での異なる酵素の存在か、或いは新たに合成された酵素によるものかを明らかにする事は興味深いことである。従来から宇高らは大豆貯蔵蛋白質の生合成と異化^{7~14)}について検討しているが、特に分解過程における異化作用に関与するプロテアーゼとの関連について検討することは大変意義があり、豆類の加工、

貯蔵に大切な知見を得るものと考えられる。そこで本論文では大豆未発芽種子(種子0日目)と発芽過程中期(発芽5日目)におけるエンド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

前報²⁾の通り調製し発芽さす。大豆種子の採取は、発芽後0日目と発芽5日目に行い以下の実験に供した。

(2) 発芽大豆からの粗酵素液の抽出

発芽大豆を20粒ずつ採取し、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℃)。つぎに日立高速冷却遠心機(20PR-52)で15,000rpm, 20分間遠心し、その上澄み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%11S大豆蛋白質の調整

11S大豆蛋白質(大豆グリシン分画区分の凍結乾燥

粉末) 20mgを上記の1.0M食塩を含むバルビタール緩衝液 (pH8.0) 10mlに溶解した。

(3-2) 0.4%11S大豆蛋白質の調整

11S大豆蛋白質 (大豆グリシニン分画区分の凍結乾燥粉末) 40mgを上記の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) 緩衝液の調整

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

(5) エンド型プロテアーゼの測定

(5-1) 基質を加えない場合

粗酵素液0.1mlと緩衝液0.6ml (pH5.0およびpH8.0) を混和し、40°Cで0分と39時間保温し、試料とした。

(5-2) 基質に0.2%11S大豆蛋白質を用いた場合

0.2%基質0.2mlと粗酵素液0.05mlと緩衝液0.3ml (pH5.0, pH6.0, pH7.2およびpH8.0) を良く混和し、40°Cで0分と39時間保温し、試料とした。

(5-3) 基質に0.4%11S大豆蛋白質を用いた場合

0.4%基質0.3mlと粗酵素液0.02mlと緩衝液0.6ml (pH5.0およびpH8.0) を良く混和し、40°Cで0分と39時間保温し、試料とした。

(6) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE) による解析

- (6-1) 4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動法⁵⁾
- (6-2) SDSゲル電気泳動法⁵⁾
- (6-3) 酢酸酸性尿素ゲル電気泳動法⁵⁾

3. 実験結果と考察

図1は基質を加えない場合のエンド型プロテアーゼ活性の変化を見た4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。未発芽種子 (発芽0日目) 及び発芽過程中期 (発芽5日目) でのpH5.0ではプロテアーゼ活性は見られず、pH8.0ではグリシニンのバンド位置が移動しているためエンド型プロテアーゼの活性が見られる。

図2は基質を加えない場合のエンド型プロテアーゼ活性の変化を見たSDSゲル電気泳動像である。発芽0日目及び発芽5日目でのpH5.0においては活性は見られず、pH8.0では発芽0日目において7S蛋白質および酸性グリシニン、塩基性グリシニンのバンド位置の移動があり、

プロテアーゼ活性がある。また、発芽5日目では7S蛋白質および酸性グリシニンのバンド位置の移動があり、プロテアーゼ活性が見られる。

図3は基質を加えない場合のエンド型プロテアーゼ活性の変化を見た酢酸酸性尿素ゲル電気泳動像である。発芽0日目および発芽5日目でのpH5.0においては活性は見られず、pH8.0においては両時期とも7S蛋白質および酸性グリシニンのバンド位置の移動が見られるのでプロテアーゼ活性が存在する。

図4、図5および図6は基質0.2%11S大豆蛋白質 (大豆グリシニン分画区分) を加えた場合のエンド型プロテアーゼ活性の変化を見た4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。発芽0日目および発芽5日目のpH5.0においては活性は見られず、pH6.0, pH7.2およびpH8.0において両時期ともグリシニンのバンド位置の移動が見られエンド型プロテアーゼ活性が見られた。

図7は基質0.2%11S大豆蛋白質 (大豆グリシニン分画区分) を加えた場合のエンド型プロテアーゼ活性の変化を見たSDSゲル電気泳動像である。発芽0日目および発芽5日目ではpH5.0において活性は見られず、発芽5日目においてpH6.0, pH7.2, pH8.0に7S蛋白質および酸性グリシニンのバンド位置の変動が見られエンド型プロテアーゼ活性が見られた。

図8は基質0.2%11S大豆蛋白質 (大豆グリシニン分画区分) を加えた場合のエンド型プロテアーゼ活性の変化を見た酢酸酸性尿素ゲル電気泳動像。発芽0日目および発芽5日目ではpH5.0においては活性は見られず、発芽5日目ではpH6.0, pH7.2, pH8.0に7S蛋白質および酸性グリシニンのバンド位置の変動が見られプロテアーゼ活性がみうけられる。

図9は基質0.4%11S大豆蛋白質 (大豆グリシニン分画区分) を加えた場合のエンド型プロテアーゼ活性の変化を見た4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。発芽0日目および発芽5日目のpH5.0においてはいずれも活性は見られず、pH8.0においていずれもグリシニンのバンド位置の変動が見られ活性がある。

図10は基質0.4%11S大豆蛋白質（大豆グリシニン分画区分）を加えた場合のエンド型プロテアーゼ活性の変化を見たSDSゲル電気泳動像である。pH5.0においては発芽0日目および発芽5日目も活性は見られず、pH8.0では両時期ともに7S蛋白質および酸性グリシニンのバンド位置に変動が見られ活性がある。

図11は基質0.4%11S大豆蛋白質（大豆グリシニン分画区分）を加えた場合のエンド型プロテアーゼ活性の変化を見た酢酸酸性尿素ゲル電気泳動像である。pH5.0では発芽0日目および発芽5日目も活性は見られず、pH8.0では両時期ともに7S蛋白質および酸性グリシニンのバンド位置の変動が見られることから活性がある。

4. 要 約

- (1) 基質を加えない場合のエンド型プロテアーゼ活性はpH5.0では発芽0日目および発芽5日目ともに活性はなく、pH8.0では両時期とも7S蛋白質および酸性グリシニンのバンド位置の移動があり、プロテアーゼ活性が見られる。
- (2) 基質0.2%11S大豆蛋白質を加えた場合のエンド型プロテアーゼ活性はpH5.0では発芽0日目および発芽5日目ともに活性は見られず、発芽5日目においてpH6.0, pH7.2, pH8.0に7S蛋白質および酸性グリシニンのバンド位置の移動があり、プロテアーゼ活性が見られる。
- (3) 基質0.4%11S大豆蛋白質を加えた場合のエンド型プロテアーゼ活性はpH5.0では発芽0日目および発芽5日目ともに活性は見られず、pH8.0では両時期ともに7S蛋白質および酸性グリシニンのバンド位置の移動があり、プロテアーゼ活性が見られる。

5. 文 献

- 1) 旭正編：分子生物科学12（植物の機能）岩波書店1993
- 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) 宇高京子：東京家政大学研究紀要第37集（1997）
- 5) 宇高京子, 森永真希子：東京家政大学研究紀要第38集（1998）
- 6) 森永真希子, 宇高京子：東京家政大学研究紀要第38集（1998）
- 7) C. Fukazawa, K. Udaka, et al : *Kulturflanze*, 32, 75-78 (1984)
- 8) C. Fukazawa, K. Udaka. et el : *J. Biol. Chem.*, 260, 6234-6239 (1985)
- 9) T. Momma. K. Udaka, et al : *Eur. J. Bioch.*, 149, 491-496 (1985)
- 10) T. Momma. K. Udaka, et al : *FEBS Lett.*, 118, 117-122 (1985)
- 11) C. Fukazawa, K. Udaka, et al : *Nucleic Acids Res.*, 15, 8117-8119 (1987)
- 12) C. Fukazawa, K. Udaka, et al : *FEBS Lett.*, 22, 125-127 (1987)
- 13) N.A.Yeboah, K.Udaka et al : *Protein Expresion Purif.*, 7, 309-314 (1996)
- 14) M.Arahira, K. Udaka et al : *Biosci. Biotechem. Biochem.*, 62(5) 1018-1021 (1998)

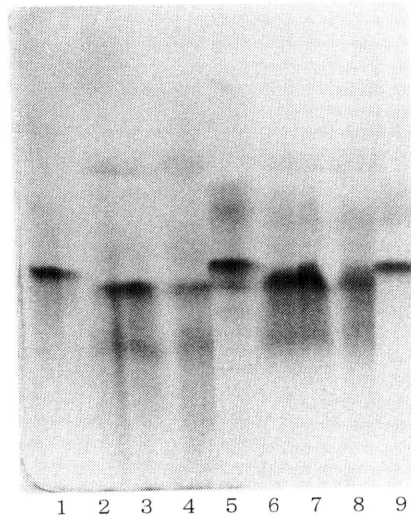


Fig.1 4~30% Gradient Slab Gel Electrophoretic Patterns of digested Protein showing Endoproteolytic Activity without adding 11S-soybean Protein to the Reaction Mixture.

(1) glycinin (2) 0 day after imbibition, pH5.0 (3) 0 day after imbibition, pH5.0, incubate 39 hours at 40°C (4) 0 day after imbibition, pH8.0 (5) 0 day after imbibition, pH8.0, incubate 39 hours at 40°C (6) 5 days after imbibition, pH5.0 (7) 5 days after imbibition, pH5.0, incubate 39 hours at 40°C (8) 5 days after imbibition, pH8.0 (9) 5 days after imbibition, pH8.0, incubate 39 hours at 40°C

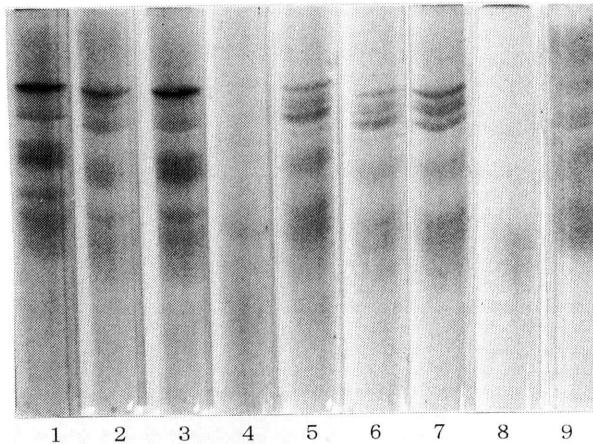
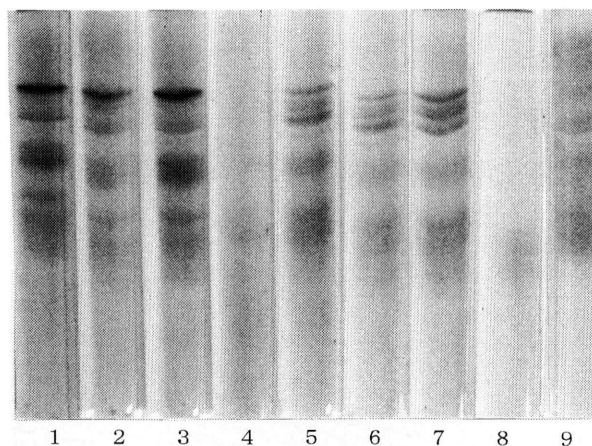


Fig.2 Profile Patterns of SDS-PAGE of digested Proteins showing Endoproteolytic Activity without adding 11S-soybean Protein to the Reaction Mixture.

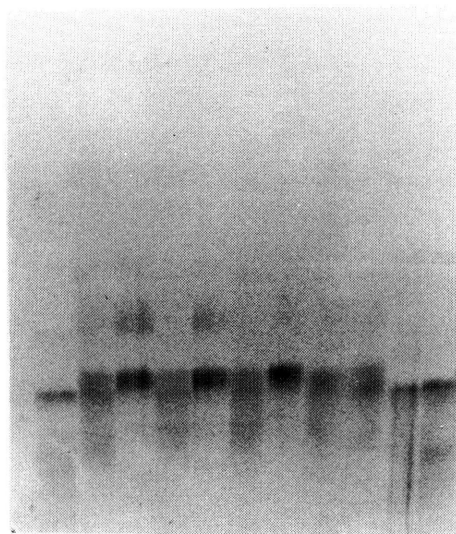
(1) 0 day after imbibition, pH5.0 (2) 0 day after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C (3) 0 day after imbibition, pH8.0 (4) 0 day after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C (5) 5 days after imbibition, pH5.0 (6) 5 days after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C (7) 5 days after imbibition, pH8.0 (8) 5 days after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C (9) glycinin



1 2 3 4 5 6 7 8 9

Fig.3 Profile Patterns of Acetic Acid Urea-PAGE of digested Proteins showing Endoproteolytic Activity without adding 11S-soybean Protein to the Reaction Mixture.

- (1) 0 day after imbibition, pH5.0 (2) 0 day after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C
 (3) 0 day after imbibition, pH8.0 (4) 0 day after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C
 (5) 5 days after imbibition, pH5.0 (6) 5 days after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C
 (7) 5 days after imbibition, pH8.0 (8) 5 days after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C
 (9) glycinin



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Fig.4 4~30% Gradient Slab Gel Electrophoretic Patters showing Endoproteolytic Activity with adding 0.2% 11S-soybean Protein as Substrate to the Reaction Mixture.

- (1) glycinin (2) 5 days after imbibition, pH8.0 (3) 5 days after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C
 (4) 5 days after imbibition, pH7.2 (5) 5 days after imbibition, pH7.2, incubate 48 hours at 40°C
 (6) 5 days after imbibition, pH6.0 (7) 5 days after imbibition, pH6.0, incubate 48 hours at 40°C
 (8) 5 days after imbibition, pH5.0 (9) 5 days after imbibition, incubate 48 hours at 40°C
 (10) 0 day after imbibition, pH5.0 (11) 0 day after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C

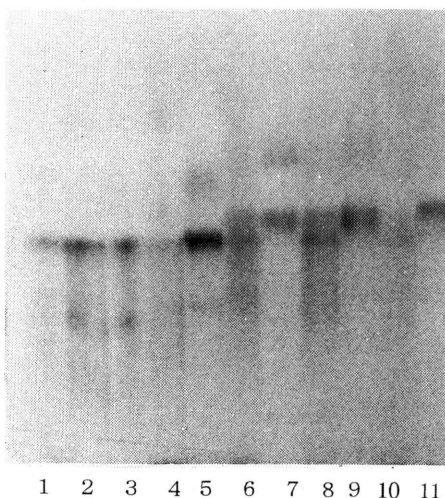


Fig.5 4~30% Gradient Slab Gel Electrophoretic Patterns showing Endoproteolytic Activity with adding 0.2% 11S-soybean Protein as Substrate to the Reaction Mixture.

(1)glycinin (2)0 day after imbibition, pH5.0 (3)0 day after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C (4)0 day after imbibition, pH8.0 (5)0 day after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C (6)5 days after imbibition, pH8.0 (7)5 days after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C (8)5 days after imbibition, pH7.2 (9)5 days after imbibition, pH7.2, incubate 48 hours at 40°C (10)5 days after imbibition, pH6.0 (11)5 days after imbibition, pH6.0, incubate 48 hours at 40°C

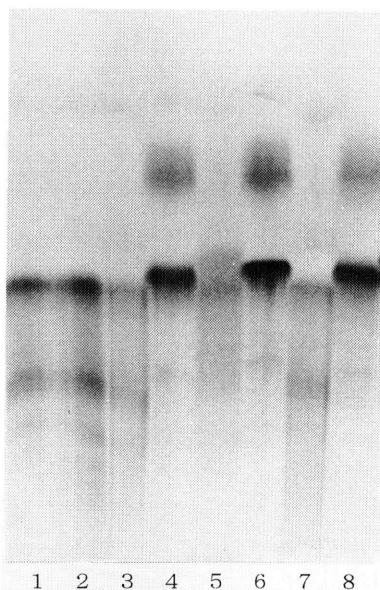


Fig.6 4~30% Gradient Slab Gel Electrophoretic Patterns showing Endoproteolytic Activity with adding 0.2% 11S-soybean Protein as Substrate to the Reaction Mixture.

(1)0 day after imbibition, pH5.0 (2)0 day after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C (3)0 day after imbibition, pH6.0 (4)0 day after imbibition, pH6.0, incubate 48 hours at 40°C (5)0 day after imbibition, pH7.2 (6)0 day after imbibition, pH7.2, incubate 48 hours at 40°C (7)0 day after imbibition, pH8.0 (8)0 day after imbibition, incubate 48 hours at 40°C

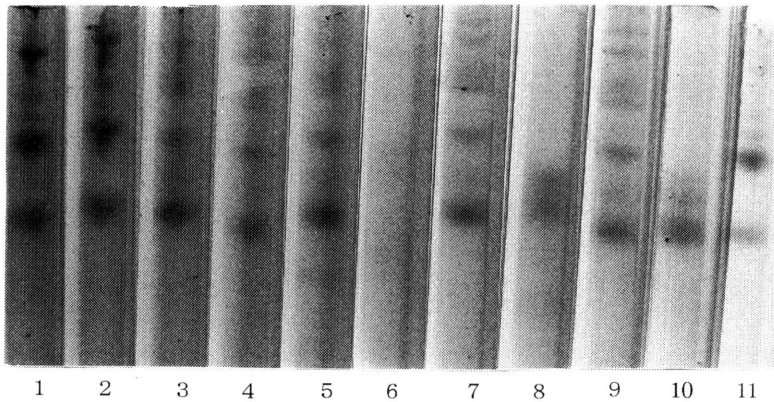


Fig.7 Profile Patterns of SDS-PAGE of digested Proteins showing Endoproteolytic Activity with 0.2% 11S-soybean Protein as Substrate to the Reaction Mixture.

- (1)0 day after imbibition, pH5.0 (2)0 day after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C
(3)5 days after imbibition, pH5.0 (4)5 days after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C
(5)5 days after imbibition, pH6.0 (6)5 days after imbibition, pH6.0, incubate 48 hours at 40°C
(7)5 days after imbibition, pH7.2 (8)5 days after imbibition, pH7.2, incubate 48 hours at 40°C
(9)5 days after imbibition, pH8.0 (10)5 days after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C
(11)glycinin

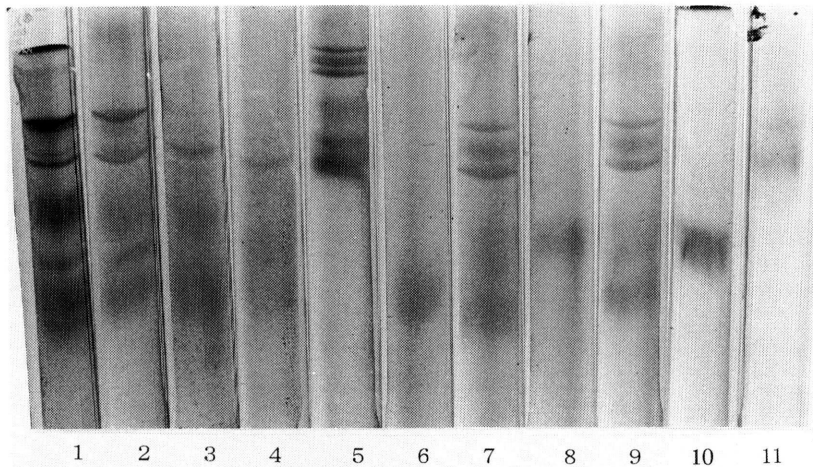


Fig.8 Profile Patterns of Acetic Acid-Urea-PAGE of digested Proteins showing Endoproteolytic Activity with adding 0.2% 11S-soybean Protein as Substrate to the Reaction Mixture.

- (1)0 day after imbibition, pH5.0 (2)0 day after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C
(3)5 days after imbibition, pH5.0 (4)5 days after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C
(5)5 days after imbibition, pH6.0 (6)5 days after imbibition, pH6.0, incubate 48 hours at 40°C
(7)5 days after imbibition, pH7.2 (8)5 days after imbibition, pH7.2, incubate 48 hours at 40°C
(9)5 days after imbibition, pH8.0 (10)5 days after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C
(11)glycinin

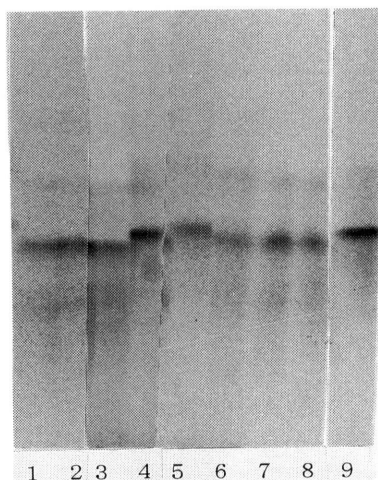


Fig.9 4~30% Gradient Slab Gel Electrophoretic Patterns of digested Proteins showing Endoproteolytic Activity with adding 0.4% 11S-soybean Protein as Substrate to the Reaction Mixture.

- (1)0 day after imbibition, pH5.0 (2)0 day after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C
(3)0 day after imbibition, pH8.0 (4)0 day after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C
(5)5 days after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C (6)5 days after imbibition, pH8.0
(7)5 days after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C (8)5 days after imbibition, pH8.0
(9)glycinin

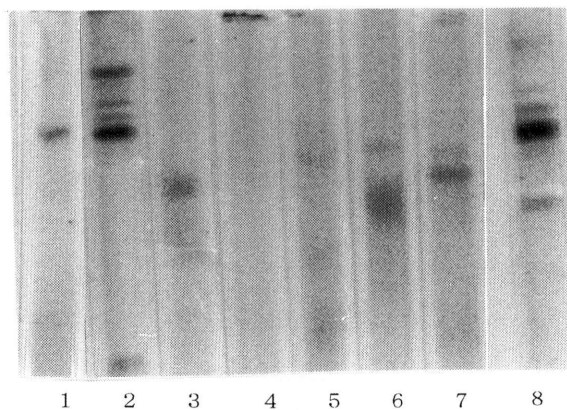


Fig.10 Profile Patterns of SDS-PAGE of digested Proteins showing Endoproteolytic Activity with adding 0.4% 11S-soybean Protein as Substrate to the Reaction Mixture.

- (1)0 day after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C (2)0 day after imbibition, pH8.0
(3)0 day after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C (4)5 days after imbibition, pH5.0
(5)5 days after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C (6)5 days after imbibition, pH8.0
(7)5 days after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C (8) glycinin

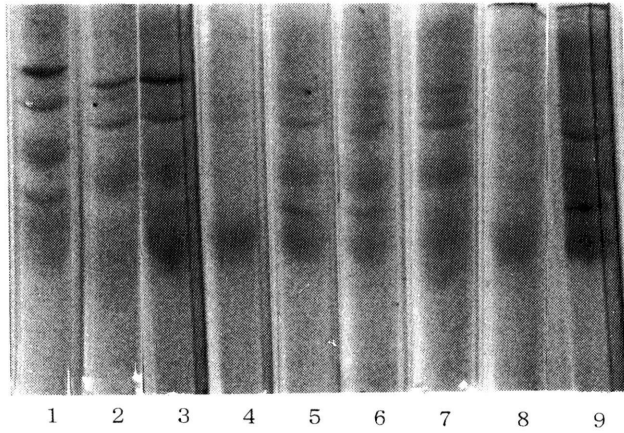


Fig.11 Profile Patterns of Acetic Acid-Urea-PAGE of digested Proteins showing Endoproteolytic Activity with adding 0.4% 11S-soybean Protein as Substrate to the Reaction Mixture.

- (1)0 day after imbibition, pH5.0 (2)0 day after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C
(3)0 day after imbibition, pH8.0 (4)0 day after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C
(5)5 days after imbibition, pH5.0 (6)5 days after imbibition, pH5.0, incubate 48 hours at 40°C
(7)5 days after imbibition, pH8.0 (8)5 days after imbibition, pH8.0, incubate 48 hours at 40°C
(9)glycinin