

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II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0.5%トリプシンインヒビターと β -コングリシニンを用いた場合の
エンド型プロテアーゼ活性の変化

宇高 京子, 北村 陽子*, 田口 亜紀子
(平成11年9月30日受理)

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

Part 2. Changes in Endoproteolytic Activity derived from
Ungerminating Soybean Seeds or after Five Days Imbibition with 0.5%
Trypsin-inhibitor or 0.5% β -conglycinin as Substrate

Kyoko UDAKA, Yoko KITAMURA and Akiko TAGUTI

(Received on September 30, 1999)

1. 緒 言

子孫を絶やさず次世代に生命を残す植物種子は、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種子貯蔵蛋白質は、既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^{11~17)}の通り、本実験条件下では浸漬後、24時間後頃から発芽が始まり、発芽3日目頃から胚軸の伸びが大きくなり、発芽6日目頃から根毛の発達が著しくなり、発芽8日目頃から上胚軸の伸びが始まるなど形態的な変化も著しい。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^{2~10)}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・貯蔵に重要な知見を得るものと考え、そこで本論文では前報¹⁷⁾に続き、発芽0日目および発芽5日目における基質0.5%トリプシンインヒビターと β -コングリシニンを用いてエンド型プロテアーゼ活性の変化についての知見を得たので報告する。

2. 実験方法

(1) 試料の調製

前報¹²⁾の通り調製し発芽さす。大豆種子の採取は、発芽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き子葉に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15,000rpmで25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) 基質の調製

(3-1) 0.5%トリプシンインヒビター(TI)の調製

栄養科 食品学第一研究室

* 栄養学科 食品学第三研究室

5mgのTIに10mlの1.0M食塩を含む0.01Mバルビタール緩衝液に溶解した。

(3-2) 0.4% β -コングリシニンの調製

40mgの β -コングリシニン(大豆完熟種子からの7S蛋白質分画区分の凍結乾燥粉末)に10mlの上記同様の緩衝液に溶解した。

(4) 緩衝液の調製

- (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磷酸緩衝液)
- (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活性の測定

(5-1) 基質に0.5%TIを用いた場合

0.5%TI 0.3mlと粗酵素液0.02mlと緩衝液0.6ml(各々pH5.0, pH6.0, pH7.2およびpH8.0)を良く混和し, 38°Cで0分と40時間保温し, 試料とした。

(5-2) 基質に0.4% β -コングリシニンを用いた場合

0.4% β -コングリシニン0.2mlと粗酵素液0.05mlと緩衝液0.3ml(各々pH5.0, pH6.0, pH7.2およびpH8.0)を良く混和し, 38°Cで0分と40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¹²⁾
- (6-2) SDSゲル電気泳動法¹²⁾
- (6-3) 酢酸酸性尿素ゲル電気泳動法¹²⁾

3. 実験結果と考察

図1は基質0.5%TIを用い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。pH5.0においては、未発芽種子(発芽0日目)および発芽過程中期(発芽5日目)ともにプロテアーゼ活性は見られないが、前者はpH6.0以上、後者はpH7.2からグリシニンのバンド位置が移動しているのでエンド型プロテアーゼの活性が見られる。図2は基質0.5%TIを用い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。未発芽種子(発芽0日目)の場合、pH5.0ではプロテアーゼ活性は見られないが、pH6.0およびpH7.2では β -コングリ

シニン(7S大豆蛋白質)のバンド位置が移動しているのでエンド型プロテアーゼ活性が見られるが、pH8.0では活性が見られなかった。しかし、酸性グリシニンおよび塩基性グリシニンのエンド型プロテアーゼ活性はpH6.0, pH7.2およびpH8.0で見受けられる。発芽過程中期(発芽5日目)の場合も発芽0日目と同様な結果が得られた。図3は基質0.5%TIを用い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。未発芽種子(発芽0日目)の場合、pH6.0およびpH7.2ではコングリシニンのバンド位置の変化からプロテアーゼ活性が観察されるが、しかし、pH8.0では活性は見られない。発芽過程中期(発芽5日目)の場合も未発芽種子の場合と同様に観察された。図4は基質0.4% β -コングリシニンを用い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。pH5.0においては、発芽0日目は活性は見られないが、pH6.0<pH7.2<8.0とグリシニンの移動が見受けられるので活性が存在する。発芽5日目のpH8.0では活性は見られない。図5は基質0.4% β -コングリシニンを用いた場合のエンド型プロテアーゼ活性の変化を見たSDS-電気泳動像である。発芽0日目の場合pH5.0では活性は見られないが、pH6.0<pH7.2<pH8.0とpHが高くなるほどに、酸性グリシニン、塩基性グリシニンおよび7S蛋白質のバンド位置移動が見られ活性がある。図6は基質0.4% β -コングリシニンを用い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。発芽0日目の場合pH5.0では活性は見られないが、pH6.0<pH7.2<pH8.0とpHが高くなるほどに、酸性グリシニン、塩基性グリシニンおよび7S蛋白質のバンド位置移動が見られ活性がある。

4. 要 約

- (1) 基質0.5%TIを用いた場合のエンド型プロテアーゼ活性はpH5.0においては、発芽0日目および発芽5日目ともに活性は見られないが、pH6.0, pH7.2ではともに活性が見られた。
- (2) 基質0.4% β -コングリシニンを用いた場合のエンド型プロテアーゼ活性はpH5.0においては、発芽0日目および発芽5日目ともに活性は見られないが、pH6.0, pH7.2およびpH8.0では発芽0日目の場合は活性はみられるが、発芽5日目の場合は活性は見られない。

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) C. Fukazawa, K. Udaka, et al : Kulturflanze,
32,75-78 (1984)
- 3) C.fukazawa, K. Udaka, et al : J. Biol. Chem.,
260 T. Momma, K. Udaka, et al : FEBS Lett.,
118,117 - 122 (1985)
- 4) T. Momma, K. Udaka, et al : Eur. J. Bioch.,
149, 491 - 496 (1985)
- 5) T. Momma, K. Udaka, et al : FEBS Lett., 118,
117 - 122 (1985)
- 6) C. Fukazawa, K. Udaka, et al : Nucleic Acids
Res., 15 , 8117-8119 (1987)
- 7) C. Fukazawa, K. Udaka, et al : FEBS Lett.,
22 , 125 - 127 (1987)
- 8) N. A. Yeboah, K. Udaka, at al : Protein
Expresion Purif., 7 , 309 - 314 (1996)
- 9) M. Arahira, K.Udaka et al : Biosci. Biotechnem.
Biochem., 62 (5) 108 - 1021 (1998)
- 10) A. Watanabe, K. Udaka, et al : Biosci.,
Biotechnem. Biochem., 63 (2) 251 - 256 (1999)
- 11) 宇高京子：東京家政大学生活科学研究所報告
第 13 集 (1990)
- 12) 宇高京子：東京家政大学研究紀要第 35 集 (1995)
- 13) 宇高京子：東京家政大学研究紀要第 36 集 (1996)
- 14) 宇高京子：東京家政大学研究紀要第 37 集 (1997)
- 15) 宇高京子, 森永真希子：東京家政大学研究紀要
第 38 集 (1998)
- 16) 森永真希子, 宇高京子：東京家政大学研究紀要
第 38 集 (1998)
- 17) 宇高京子, 星野かほり：東京家政大学研究紀要
第 39 集 (1999)

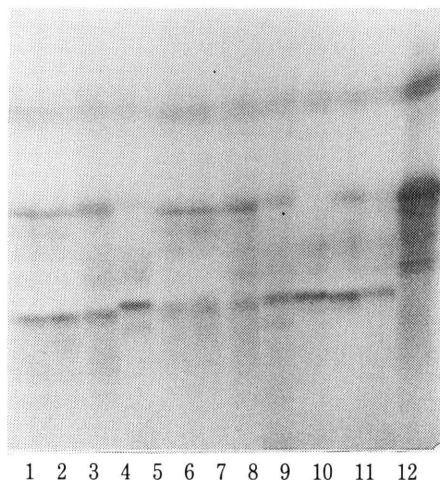


Fig.1. 4~30% gradient slab gel electrophoretic patterns of digested protein showing endoproteolytic activity with adding 0.4% trypsin-inhibitor as substrate to the reaction mixture

- (1) 0 day after imbibition (pH5.0), incubate 0 time (2) 0 day after imbibition (pH5.0), incubate 48 hours at 40°C
 (3) 0 day after imbibition (pH8.0), incubate 0 time (4) 0 day after imbibition (pH8.0), incubate 78 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) 0 day after imbibition, pH7.2, incubate 48 hours at 40°C
 (10) 0 day after imbibition, pH6.0, incubate 48 hours at 40°C
 (11) 5 days after imbibition, pH7.2, incubate 48 hours at 40°C (12) trypsin-inhibitor

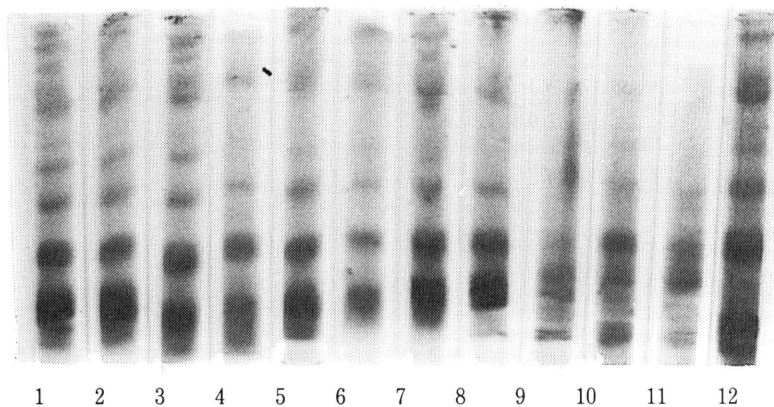


Fig.2 profile patterns of SDS-PAGE of digested proteins showing endoproteolytic activity with adding 0.5% trypsin-inhibitor as substrate to the reaction mixture.

- (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) 0 day after imbibition (pH7.2), incubate 48 hours at 40°C
 (10) 0 day after imbibition (pH6.0), incubate 48 hours at 40°C
 (11) 5 days after imbibition (pH7.2) incubate 48 hours at 40°C (12) trypsin-inhibitor

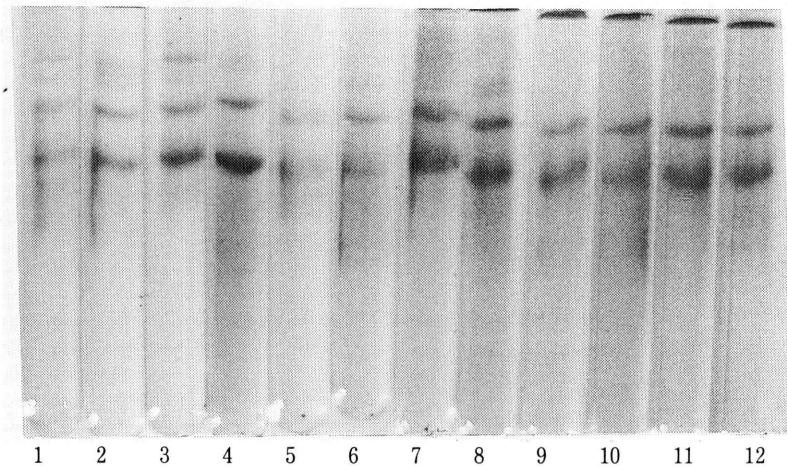


Fig.3. profile patterns of acetic acid-urea-PAGE of digested proteins showing endoproteolytic activity with adding 0.5% trypsin-inhibitor as substrate to the reaction mixture

- (1) 0 day after imbibition (pH5.0), incubate 0 time
- (2) 0 day after imbibition (pH5.0), incubate 48 hours at 40°C
- (3) 0 day after imbibition (pH8.0), incubate 0 time
- (4) 0 day after imbibition (pH8.0), incubate 48 hours at 40°C
- (5) 5 days after imbibition (pH5.0), incubate 0 time
- (6) 5 days after imbibition (pH5.0), incubate 48 hours at 40°C
- (7) 5 days after imbibition (pH8.0), incubate 0 time
- (8) 5 days after imbibition (pH8.0), incubate 48 hours at 40°C
- (9) 0 day after imbibition (pH7.2), incubate 48 hours at 40°C
- (10) 0 day after imbibition (pH6.0), incubate 48 hours at 40°C
- (11) 5 days after imbibition (pH7.2), incubate 48 hours at 40°C
- (12) 5 days after imbibition (pH6.0), incubate 48 hours at 40°C

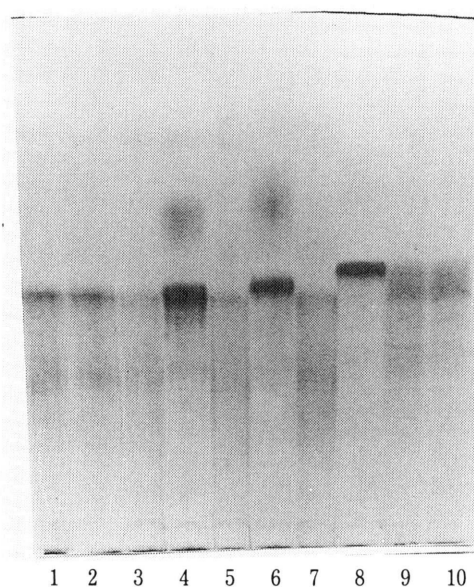


Fig.4. 4~30% gradient slab gel electrophoretic patterns of digested proteins showing endoproteolytic activity with adding 0.4% β -conglycinin as substrate to the mixture

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

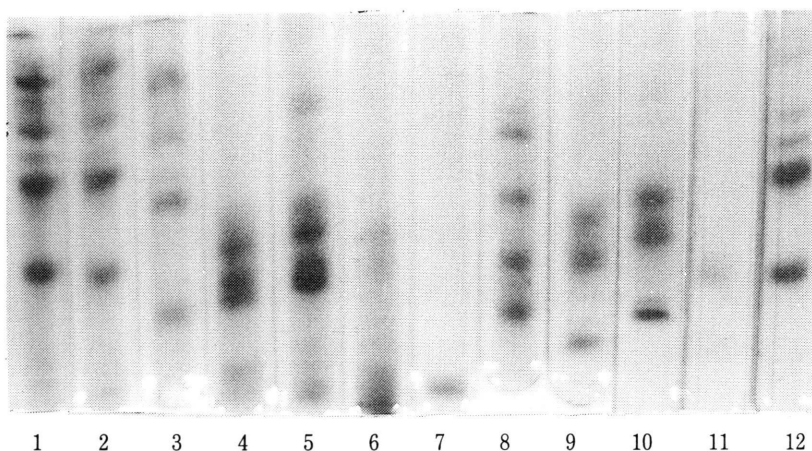


Fig.5. profile patterns of SDS-PAGE of digested proteins showing endoproteolytic activity with adding 0.4% β -conglycinin as substrate to the mixture

- (1) 0 day after imbibition (pH5.0), incubate 0 time (2) 0 day after imbibition (pH5.0), incubate 48 hours at 40°C
 (3) 0 day after imbibition (pH6.0), incubate 0 time (4) 0 day after imbibition (pH6.0), incubate 48 hours at 40°C
 (5) 0 day after imbibition (pH7.2), incubate 0 time (6) 0 day after imbibition (pH7.2), incubate 48 hours at 40°C
 (7) 0 day after imbibition (pH8.0), incubate 0 time (8) 0 day after imbibition (pH8.0), incubate 48 hours at 40°C
 (9) 5 days after imbibition (pH8.0), incubate 0 time (10) 5 days after imbibition (pH8.0), incubate 48 hours at 40°C
 (11) D8-b(glycinin) (12) conglycinin

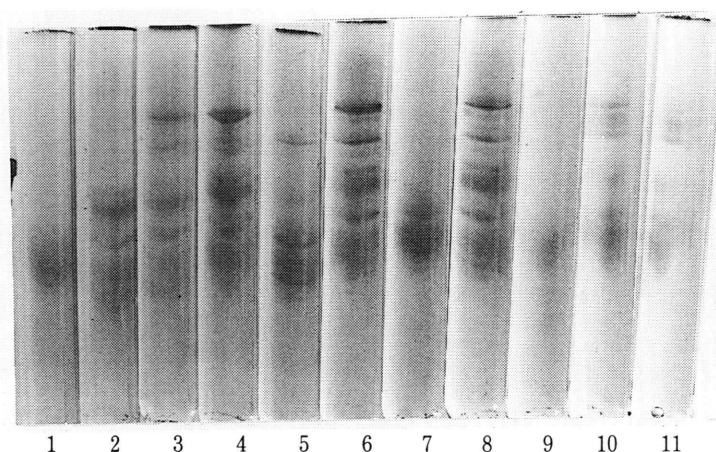


Fig.6. profile patterns of acetic acid-urea-PAGE of digested proteins showing endoproteolytic activity with adding 0.4% β -conglycinin to the mixture

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