

# 発芽過程におけるマメ科種子貯蔵蛋白質に関する生理生化学的研究 第一報 大豆種子の発芽過程におけるエンド型プロテアーゼの出現時期の検討

宇高 京子, 北村 陽子\*, 田口 亜紀子, 星野 かほり

(平成12年10月5日受理)

## Physiological Biochemical Study Drived from Germinating Seeds Strage Proteins

part 1 studies on appearance time of endoproteolytic  
activity drived from germinating soybean seeds

Kyoko UDAKA, Youko KITAMURA, Akiko TAGUTI and Kahori HOSHINO

(Received on October 5, 2000)

キーワード: 大豆, 種子, 発芽, アルファ-アマニチン

Key words: Soybean, Seed, Germinate,  $\alpha$ -amanitin

### 緒言

高等植物に普遍的な散文体である種子は, 特にマメ科種子では蛋白質含量が高く, 昔から有用な植物性蛋白質の供給源であり, また調理・加工などの材料として多く用いられている. 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り幼芽や幼根が種皮を破って顔をだす形態的变化のある単純な発芽過程である. しかし, それに先立って起こる一連の細胞内生理生化学的变化は複雑・多岐である<sup>1)</sup>. 従来から宇高らは大豆貯蔵蛋白質の生合成と異化について検討している<sup>2)~11)</sup>. また, 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も検討している<sup>12)~19)</sup>. 発芽過程を通じて貯蔵蛋白質の分解は, 既存の酵素の活性化によるものか, それとも *de novo* 合成されるのかを明らかにするために, 有核生物における mRNA 合成の阻害剤である  $\alpha$ -アマニチン (ベーリンガーハイム社製) および翻訳レベルの阻害剤であるシクロヘキシミド (ベーリンガーハイム社製) を有胚および無胚種子に各々添加し 5 日間発芽させ, そのプロテアーゼの出現時期の検討を行ったので報告する.

### 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 年以内のものを用いた. 前報<sup>13)</sup>の通り前処理を行い発芽させ, 大豆有胚種子および無胚種子に  $\alpha$ -アマニチンを浸み込ませたガーゼに冠水しない程度に滅菌水を加え, 恒温室 (20°C) で 5 日間発芽させ, また, 同様に, 大豆有胚種子および無胚種子にシクロヘキシミドを浸み込ませたガーゼに冠水しない程度に滅菌水を加え, 恒温室で 5 日間発芽させ.

#### (2) 発芽大豆種子からの粗酵素液の抽出

上記 (1) の各発芽大豆種子を 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 パルビタル緩衝液 (pH8.0) を 15ml 加え, ultra-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, 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) 緩衝液の調製

(3-1) pH5.0 (1.0M 酢酸緩衝液)

(3-2) pH8.0 (0.1M トリス塩酸緩衝液)

#### (4) エンド型プロテアーゼ活性の測定

上記 (2) の各粗酵素液 0.1ml と緩衝液 0.6ml (pH5.0 および pH8.0) を良く混和し, 0 分と 40 時間, 38°C で保温し, 試料とした.

栄養科 食品第 1 研究室

\* 食品第 3 研究室

(5) ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による解析

- (5-1) 4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動法<sup>12)</sup>  
 (5-2) SDS-ゲル電気泳動法<sup>12)</sup>  
 (5-3) 酢酸酸性尿素ゲル電気泳動法<sup>12)</sup>

実験結果と考察

図1と図2は $\alpha$ -アマニチンを大豆有胚種子(図1)および無胚種子(図2)に添加して5日間発芽させた光学顕微鏡像である。無添加の発芽5日目の大豆有胚種子と比較して発芽の伸び率は低く、無胚種子では、全く発芽は見られない。図3と図4はシクロヘキシミドを大豆有胚種子(図3)および無胚種子(図4)に添加して5日間発芽させた光学顕微鏡像である。ともに発芽は見られない。図5は $\alpha$ -アマニチン(A)およびシクロヘキシミド(B)を大豆有胚種子および無胚種子に添加して5日間発芽させて、その粗酵素液を抽出しpH5.0およびpH8.0でのエンド型プロテアーゼ活性の結果を観察した4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。(A)および(B)ともにpH5.0の場合は大豆有胚種子および無胚種子ともに活性は認められない。しかし、pH8.0の場合は(A)および(B)ともにグリシニンの移動が観察されプロテアーゼ活性を確認した。図6は $\alpha$ -アマニチン(A)およびシクロヘキシミド(B)を大豆有胚種子および無胚種子に添加して、5日間発芽させて、その粗酵素液を抽出しpH5.0とpH8.0でのエンド型プロテアーゼ活性の結果を観察したSDS-アクリルアミドゲル電気泳動像である。(A)および(B)ともにpH5.0の場合は大豆有胚種子および無胚種子には活性は認められない。しかし、pH8.0の場合は(A)および(B)ともに7S蛋白質および塩基性グリシニンの移動が観察されプロテアーゼ活性を確認した。図7は $\alpha$ -アマニチン(A)およびシクロヘキシミド(B)を大豆有胚種子および無胚種子に加えて5日間発芽させ、その粗酵素液を抽出しpH5.0およびpH8.0でのエンド型プロテアーゼ活性を観察した酢酸酸性尿素ゲル電気泳動像である。pH5.0の場合は(A)および(B)ともに大豆有胚種子も無胚種子との活性は認められない。しかし、pH8.0の場合は(A)および(B)ともに7S蛋白質とグリシンにわずかな移動が観察されプロテアーゼ活性を確認した。以上の実験結果より、エンド型プロテアーゼの出現時期としては、もともと大豆完熟種子(未発芽種子)中にすでに存在しているものと思われる。

文 献

- 1) 旭正編：分子生物学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, 6234-6239 (1985)
- 4) T. Momma, K. Udaka et al. : Eur. J. Biochem., 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 et al., : Protein Expression Purif., 7, 309-314 (1996)
- 9) M. Arahira, K. Udaka et al. : Biosci. Biotechnol. Biochem., 62 (5), 108-1021 (1998)
- 10) A. Watanabe, K. Udaka et al. : Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (2) 251-256 (1999)
- 11) M. Arahira, K. Udaka, et al. : Eur. J. Biochem. 267, 2649-2657 (2000)
- 12) 宇高京子：東京家政大学生生活科学研究報告, 第13集(1990)
- 13) 宇高京子：東京家政大学研究紀要, 第35集(1995)
- 14) 宇高京子：東京家政大学研究紀要, 第36集(1996)
- 15) 宇高京子, 川名広子：東京家政大学研究紀要, 第37集(1997)
- 16) 宇高京子, 森永真希子：東京家政大学研究紀要, 第38集(1998)
- 17) 森永真希子, 宇高京子：東京家政大学研究紀要, 第38集(1998)
- 18) 宇高京子, 星野かほり：東京家政大学研究紀要, 第39集(1999)
- 19) 宇高京子, 北村陽子, 田口亜紀子：東京家政大学研究紀要, 第40集(2000)



Fig. 1 Profile of Light Microscope derived from Germinating Soybean Seed 5 Days after Imbibition with Embryo adding the  $\alpha$ -amanitin

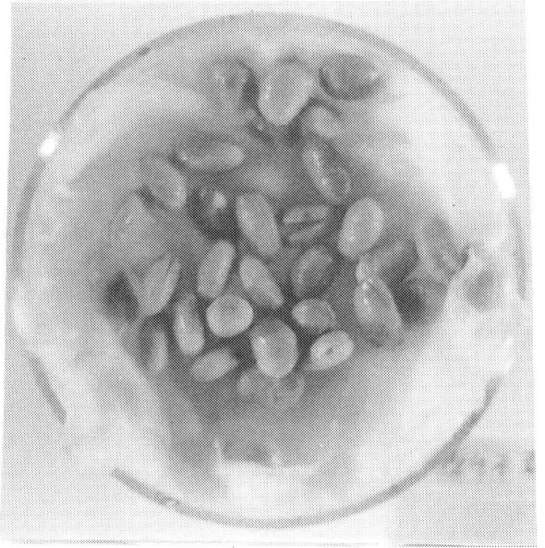


Fig. 3 Profile of Light Microscope derived from Germinating Soybean Seeds of 5 Days after Imbibition with Embryo adding the Cycloheximide

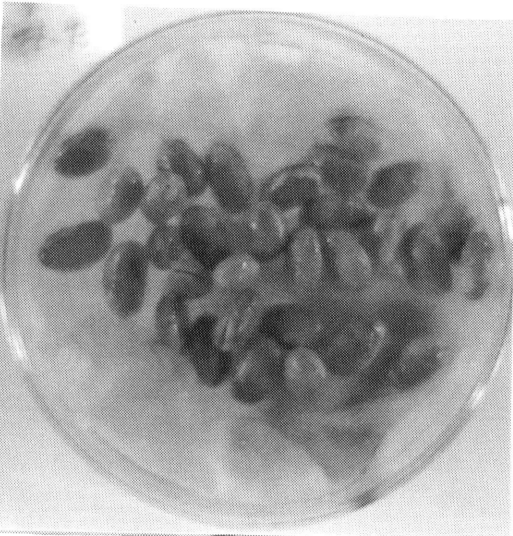


Fig. 2 Profile of Light Microscope derived from Germinating Soybean Seed 5 Days after Imbibition without Embryo adding the  $\alpha$ -amanitin

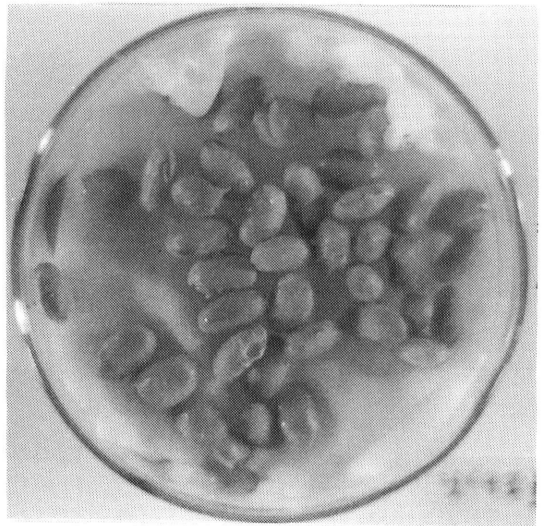


Fig. 4 Profile of Light Microscope derived from Germinating Soybean Seeds of 5 Days after Imbibition without Embryo adding the Cycloheximide

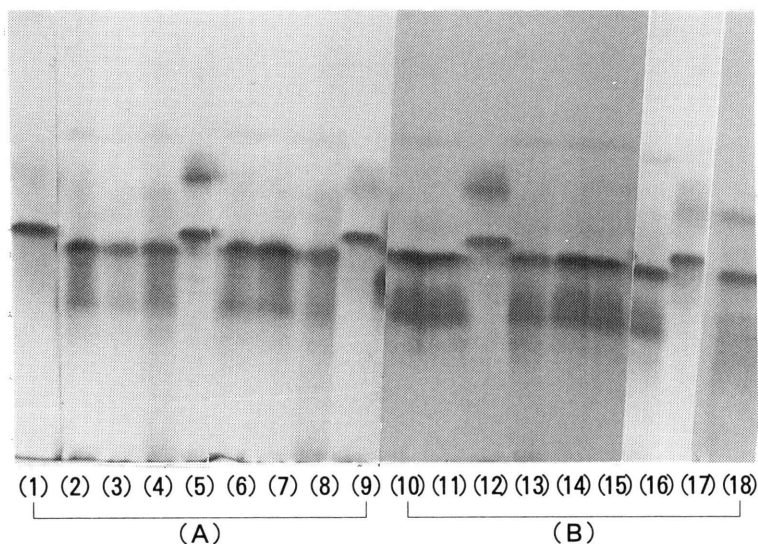


Fig. 5 (A) 4~30% Gradient Slab Gel Electrophoretic Patterns showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days after Imbibition with Embryo or without Embryo adding the  $\alpha$ -amanitin (B) 4~30% Gradient Slab Gel Electrophoretic after Imbibition with Embryo or without Embryo adding the Cycloheximide (2)~(9) adding  $\alpha$ -amanitin, (10)~(17) adding cycloheximide, (1) glycinin (2) without embryo pH5.0, 0min. (3) without embryo pH5.0,40h. (4) without embryo pH8.0,0min. (5) without embryo pH8.0,40h. (6) with embryo pH5.0,0min. (7) with embryo pH5.0,40h. (8) with embryo pH8.0,0min. (9) with embryo pH8.0,40h. (10) without embryo pH5.0,0min. (11) without embryo pH5.0,40h. (12) with embryo pH8.0,40h. (13) with embryo pH8.0,0min. (14) with embryo pH5.0,40h. (15) with embryo pH5.0,0min. (16) without embryo pH8.0,0min. (17) without embryo pH8.0,40h. (18) 7 S-protein

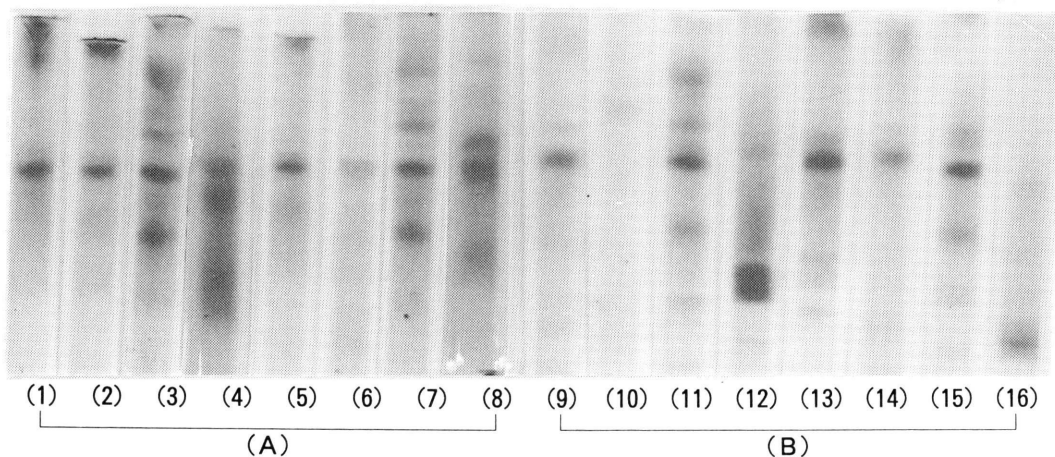


Fig. 6 (A) Profile Patterns of SDS-PEGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days after Imbibition with Embryo or without Embryo adding the  $\alpha$ -amanitin (B) Profile Patterns of SDS-PEGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days after Imbibition with Embryo or without Embryo adding the Cycloheximide (1)~(8) adding  $\alpha$ -amanitin (9)~(16) adding cycloheximide (1) without embryo pH5.0,0min. (2) without embryo pH5.0, 40h. (3) without embryo pH8.0,0min. (4) without embryo pH8.0,40h. (5) with embryo pH5.0,0min. (6) with embryo pH5.0,40h. (7) with embryo pH8.0,0min. (8) with embryo pH8.0,40h. (9) with embryo pH5.0,0min. (10) with embryo pH 5.0,40h. (11) with embryo pH8.0,0min. (12) with embryo pH8.0,40h (13) without embryo pH5.0,0min. (14) without embryo pH5.0,40h. (15) without embryo pH8.0,0min. (16) without embryo pH8.0,40h

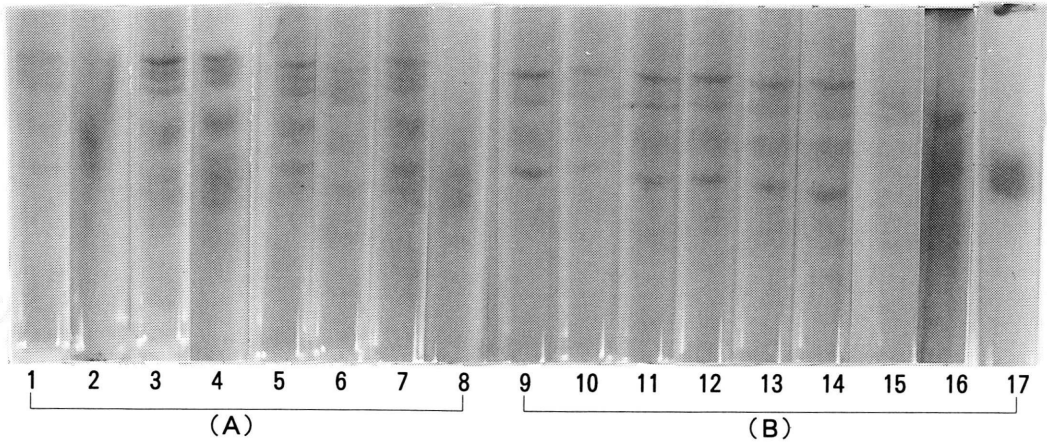


Fig. 7 (A) Profile Patterns of Acetic Acid-Urea-SDS-PAGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days after Imbibition with Embryo or without Embryo adding the  $\alpha$ -amanitin  
 (B) Profile Patterns of Acetic Acid-Urea-SDS-PAGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days after Imbibition with Embryo or without Embryo adding the Cycloheximide (1)~(8) adding  $\alpha$ -amanitin (9)~(17) adding cycloheximide (1) without embryo pH5.0,0min. (2) without embryo pH5.0,40h. (3) without embryo pH8.0,0min. (4) without embryo pH8.0,40h. (5) with embryo pH5.0,0min. (6) with embryo pH5.0,40h. (7) with embryo pH8.0,0min. (8) with embryo pH8.0,40h. (9) with embryo pH5.0,40h. (10) without embryo pH8.0,0min. (11) without embryo pH8.0,40h. (12) without embryo pH5.0,0min. (13) without embryo pH5.0,40h. (14) with embryo pH8.0,0min. (15) 7 S-protein (16) trypsin inhibitor (17) with embryo pH8.0,40h.

#### SUMMARY

When driven from germinating soybean seeds of 5 days after imbibition with embryo or without embryo adding the  $\alpha$ -amanitin and cycloheximide, it's only germinating soybean seeds with embryo adding the  $\alpha$ -amanitin. Endoproteolytic activity driven from germinating soybean seeds of 5 days after imbibition with embryo or without embryo adding the  $\alpha$ -amanitin and cycloheximide was observed in the case of pH8.0, but in the case of pH5.0 was not recognized.

As the results of an experiment, appearance time of endoproteolytic activity will result in ungerminating soybean seeds.