

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 第二報 発芽過程における 大豆種子のエンド型プロテアーゼ活性の特性の検討

宇高 京子, 北村 陽子, 酒井 弥生

(平成13年10月4日受理)

Physiological Biochemical Study on Leguminous Seed Storing Protein in Germination Process

Part 2 Examination of characteristic of end type protease revitalization of soybean seed in germination process

Kyoko UDAKA, Youko KITAMURA and Yayoi SAKAI

(Received on October 4, 2001)

キーワード: 大豆, 発芽, 種子, エンド型プロテアーゼ

Key words: soybean, germination, seed, endoprotease

緒言

完熟した種子の組織は脱水状態にあり, 形態的には未分化で, 細胞内生理活性は極めて低い個体である。しかし, 食用マメ科種子は穀類蛋白質に比較しても蛋白質含量が高く, 昔から有用な植物性蛋白質の供給源であり, 調理・加工などの食材として多く用いられて来た。また, いったん休眠が解除されると種子内休眠器官の代謝系が活発化し胚が発育できうる状態に置かれる。さらに光, 水, 温度, ガス, pHなど外的条件に影響されながらも, さらに成長を続け, ついに「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。このような種子休眠および発芽は, 生体内における遺伝的機構に組み込まれた高位の制御によってもたらされた特殊な生理的状态にあると考えられる。従来から宇高らは, 大豆貯蔵蛋白質の生合成と分解作用について検討している^{2)~11)}。また, 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も検討している^{12)~21)}。前報²¹⁾に続き, 大豆種子を5日間発芽させ,

そのエンド型プロテアーゼの特性を検討したので報告する。

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。大豆種子を1%洗剤で洗った後, 70%エタノール中で30秒, 次に5%晒し粉液中に60分浸漬し, 殺菌する。これを滅菌水で十分に晒し粉液を洗い流した後, 滅菌シャーレー上で滅菌水を浸み込ませたガーゼを置き, 恒温器 (20°C) 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)の発芽5日目大豆種子を20粒採取し, 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, 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, 30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) 1.0M酢酸緩衝液：pH5.0およびpH5.5

(3-2) 0.1M トリス塩酸緩衝液：pH8.0およびpH9.0

(4) 粗酵素液と各緩衝液との割合

(4-1) 粗酵素液0.1mlと緩衝液 (pH5.5およびpH8.0) 0.6mlを良く混和する。

(4-2) 粗酵素液0.1mlと緩衝液 (pH5.5およびpH8.0) 0.6mlとp-クロロメリクリ安息香酸 (PCMB, 10^{-5} M) 0.07mlを加え混和する。

(4-3) 粗酵素液0.1mlと緩衝液 (pH5.5およびpH8.0) 0.6mlとN-エチルマレイミド (NEM, 10^{-2} M) 0.07mlを加え混和する。

(4-4) 粗酵素液0.1mlと緩衝液 (pH5.5および

8.0) 0.6mlとジチオスレイトール (DTT, 1 mg)を加え混和する。

(5) エンド型プロテアーゼ活性の測定

上記(4)の(4-1)から(4-4)の各試料を0分と40時間、38°Cで保温し、反応させて、その試料を用い、以下の電気泳動法でエンド型プロテアーゼ活性を測定した。

(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-スラブゲル電気泳動法¹²⁾

(6-3) 酢酸酸性尿素ゲル電気泳動法¹²⁾

表1 発芽5日目大豆種子の4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動像

	pH8.0 0分	pH8.0 0分 ↓ pH5.5 0分	pH8.0 40時間 ↓ pH5.5 0分	pH8.0 40時間 ↓ pH5.5 40時間	pH8.0 40時間 ↓ pH8.0 40時間	pH5.0 0分	pH5.5 0分 ↓ pH8.0 0分	pH5.5 40時間	pH5.5 40時間 ↓ pH8.0 0分	pH5.5 40時間 ↓ pH8.0 40時間	pH5.5 40時間 ↓ pH5.5 40時間
粗酵素+緩衝液(A)	×	×	○	○	×	×	×	×	×	×	×
(A)+PCMB	×	○	◎	△	×	×	×	×	×	×	×
(A)+NEM	×	○	◎	△	×	×	×	×	×	×	×
(A)+DTT	×	×	○	×	×	×	×	×	×	×	×

※エンド型プロテアーゼ活性 ◎→○→△→×

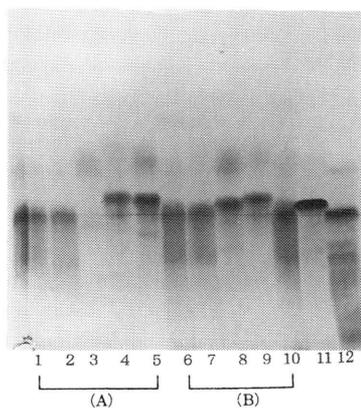


Fig.1 (A) 4~30% Gradient Slab Gel Electrophoretic Patterns showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days 1;pH8.0, 0 min. 2;pH8.0→pH5.5,0min. 3;pH8.0,40hs.→pH5.5,0min. 4;pH8.0,40hs.→pH5.5,40hs. 5;pH8.0,40hs.→pH8.0,40hs. (B) 4~30% Gradient Slab Gel Electrophoretic Patterns showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the PCMB 6;pH8.0, 0min. 7;pH8.0,0 min.. 8;pH8.0,40hs.→pH5.5,0min. 9;pH8.0,40hs.→pH5.5,40hs. 10;pH8.0,40hs.→pH8.0,40hs. 11;glycinin 12;7S-protein

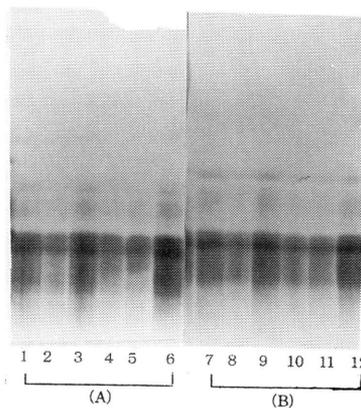


Fig.2 (A) 4~30% Gradient Slab Gel Electrophoretic Patterns showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days 1;pH5.5,0min. 2;pH5.5,0min.→pH8.0,0min. 3;pH5.5,40hs. 4;pH5.5,40min.→pH8.0,0min. 5;pH5.5,40hs.→pH8.0,40hs. 6;pH5.5,40hs→pH5.5,40hs. (B) 4~30% Gradient slab Gel Electrophoretic Patterns showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the PCMB 7;pH5.5,0min. 8;pH5.5,0min.→pH8.0,0min. 9;pH5.5,40hs. 10;pH5.5,40min.→pH8.0,0min. 11;pH5.5,40hs.→pH8.0,40hs. 12;pH5.5,40hs→pH5.5,40hs.

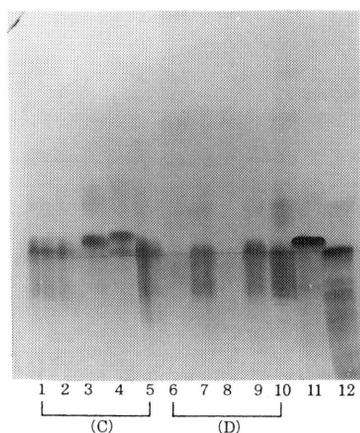


Fig.3 (C) 4~30% Gradient slab Gel Electrophoretic Patterns showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the NEM 1; pH8.0, 0min. 2; pH8.0,0min.→pH5.5,0min. 3; pH8.0, 40hs.→pH5.5,0min. 4; pH8.0, 40hs.→pH5.5, 40hs. 5; pH8.0, 40hs.→pH8.0,40hs. (D) 4~30% Gradient slab Gel Electrophoretic Patterns showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the DTT 6;pH8.0, 0min. 7;pH8.0,0min.→pH5.5, 0min. 8 ; pH8.0,0min..→pH5.5, 40hs. 9;pH8.0,40hs.→pH5.5,40hs. 10 ; pH8.0,40hs.→pH8.0, 40hs. 11 ;glycinin 12 ;7S-protein

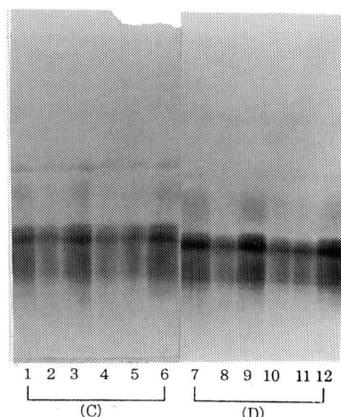


fig.4 (C) 4~30% Gradient slab Gel Electrophoretic Patterns showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the NEM 1; pH5.5,0min. 2; pH5.5,0min.→pH8.0,0min. 3; pH5.5, 40hs. 4; pH5.5,40min.→pH8.0,0min. 5; pH5.5, 40hs.→pH8.0, 40hs. 6; pH5.5,40hs→pH5.5,40hs. (D) 4~30% Gradient slab Gel Electrophoretic Patterns showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the DDT 7; pH5.5,0min. 8; pH5.5,0min.→pH8.0,0min. 9; pH5.5,40hs .10; pH5.5,40min.→pH8.0,0min. 11; pH5.5,40hs.→pH8.0,40hs. 12; pH5.5,40hs→pH5.5,40hs.

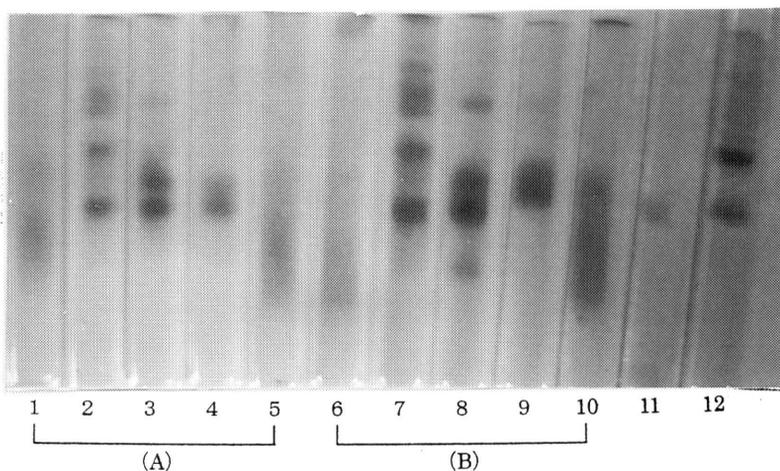


fig.5 (A) Profile Patterns of SDS-PAGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days 1; pH8.0, 0min. 2; pH8.0→pH5.5,0min. 3; pH8.0,40hs.→pH5.5,0min. 4; pH8.0,40hs.→pH5.5,40hs. 5; pH8.0,40hs.→pH8.0,40hs. (B) Profile Patterns of SDS-PAGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the PCMB 6; pH8.0, 0min. 7; pH8.0,0min.→pH5.5,0min. 8; pH8.0,40hs.→pH5.5,0min. 9; pH8.0, 40hs.→pH5.5,40hs. 10; pH8.0,40hs.→pH8.0,40hs. 11; glycinin 12; 7S-protein

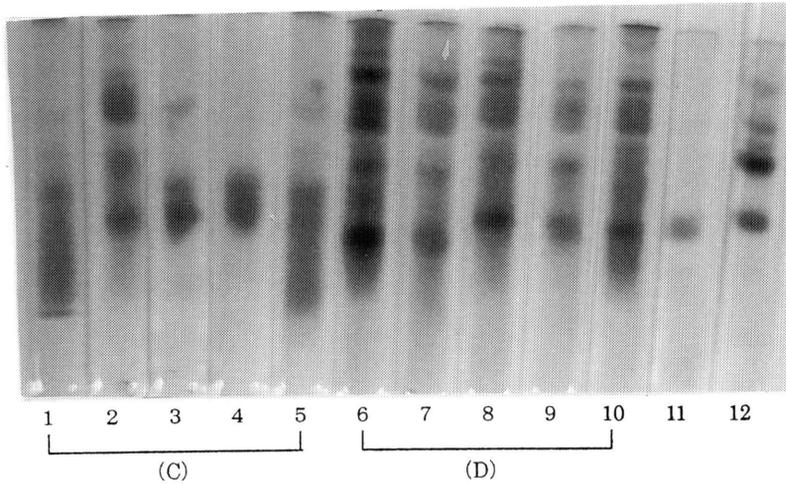


fig.6 (C) Profile Patterns of SDS-PPAGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the NEM 1; pH8.0, 0min. 2; pH8.0, 0min.→pH5.5, 0min. 3; pH8.0, 40hs.→pH5.5, 0min. 4; pH8.0, 40hs.→pH5.5, 40hs. 5; pH8.0, 40hs.→pH8.0, 40hs. (D) Profile Patterns of SDS-PAGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the DTT 6; pH8.0, 0min. 7; pH8.0, 0min.→pH5.5, 0min. 8; pH8.0, 40hs.→pH5.5, 0min. 9; pH8.0, 40hs.→pH5.5, 40hs. 10; pH8.0, 4 0h.→pH8.0, 40hs. 11; glycinin 12; 7S-protein

表2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像

	pH8.0 0分	pH8.0 0分 ↓ pH5.5 0分	pH8.0 40時間 ↓ pH5.5 0分	pH8.0 40時間 ↓ pH5.5 40時間	pH8.0 40時間 ↓ pH8.0 40時間
粗酵素液+緩衝液(A)	×	×	△ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン 塩基性グリシニン
(A)+PCMB	×	×	△ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン 塩基性グリシニン
(A)+NEM	×	×	△ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン 塩基性グリシニン
(A)+DTT	×	×	×	×	×

※エンド型プロテアーゼ活性 ◎→○→△→×

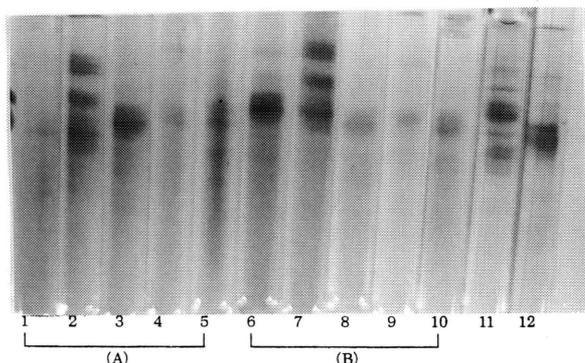


fig.7(A) Profile Patterns of Acetic Acid-Urea SDS-PAGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days 1;pH8.0, 0min. 2;pH8.0,0min.→pH5.5,0min. 3;pH8.0,40hs.→pH5.5,0min. 4;pH8.0,40hs.→pH5.5,40hs. 5;pH8.0,40hs.→pH8.0,40hs. (B) Profile Patterns of Acetic Acid-Urea SDS-PAGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the PCMB 6;pH8.0, 0min. 7;pH8.0,0min.→pH5.5, 0min. 8;pH8.0,40hs.→pH5.5,0min. 9;pH8.0,40hs.→pH5.5,40hs. 10;pH8.0,40hs.→pH8.0,40hs. 11;glycinin 12;7S-protein

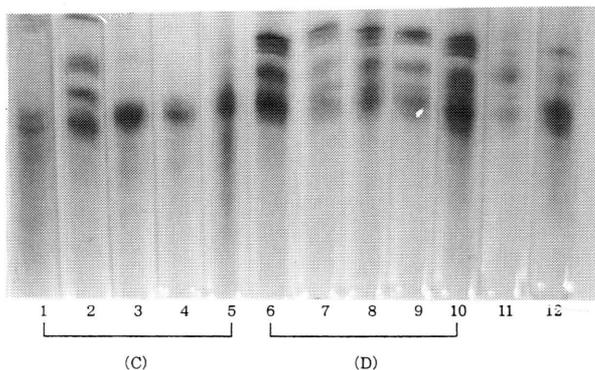


fig.8 (C) Profile Patterns of Acetic Acid-Urea SDS-PAGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the NEM 1;pH8.0, 0 min. 2;pH8.0,0min.→pH5.5,0min. 3;pH8.0,40hs.→pH5.5,0min. 4;pH8.0,40hs.→pH5.5,40hs. 5;pH8.0,40hs.→pH8.0,40hs. (D) Profile Patterns of Acetic Acid-Urea SDS-PAGE showing Endoproteolytic Activity driven from Germinating Soybean Seeds of 5 Days adding the DTT 6;pH8.0, 0min. 7;pH8.0,0min.→pH5.5,0min. 8;pH8.0,40hs.→pH5.5,0min. 9;pH8.0,40hs.→pH5.5,40hs. 10;pH8.0,40sh.→pH8.0,40hs. 11;glycinin 12;7S-protein

表1 発芽5日目大豆種子の酢酸酸性尿素ゲル電気泳動像

	pH8.0 0分	pH8.0 0分 ↓ pH5.5 0分	pH8.0 40時間 ↓ pH5.5 0分	pH8.0 40時間 ↓ pH5.5 40時間	pH8.0 40時間 ↓ pH8.0 40時間
粗酵素液+緩衝液(A)	×	×	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン 塩基性グリシニン
(A)+PCMB	×	×	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン 塩基性グリシニン
(A)+NEM	×	×	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン	○ 7S-たん白質 酸性グリシニン 塩基性グリシニン
(A)+DTT	×	×	×	×	×

※エンド型プロテアーゼ活性 ○→○→△→×

実験結果と考察

図1～図4までは発芽5日目の大豆種子の4～30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。図1の①～⑤までは粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH8.0)0.6mlを加え良く混和し、38℃で0分または40時間保温反応させた。⑥～⑩は粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH8.0)0.6mlおよびPCMB0.07mlを加え、良く混和し、38℃で0分または40時間保温反応させた。⑪は大豆11S蛋白質(グリニン)、⑫は大豆7S蛋白質である。図2の①～⑥までは粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH5.5)0.6mlを良く混和し、38℃で保温反応させた。⑦～⑫は粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH5.5)0.6mlおよびPCMB0.07mlを加え、良く混和し、38℃で0分または40時間保温反応させた。図3の①～⑤までは粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH8.0)0.6mlおよびNEM0.07mlを加え、良く混和し、38℃で0分または40時間保温反応させた。⑥～⑩は粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH8.0)0.6mlおよびDTT(1mg)を加え、良く混和し、38℃で0分または40時間保温反応させた。⑪は大豆11S蛋白質(グリニン)⑫は大豆7S蛋白質(コングリニン)である。図4の①～⑥は粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH5.5)0.6mlおよびNEM0.07mlを加え、良く混和し、38℃で0分または40時間保温反応させた。⑦～⑫は粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH5.5)0.6mlおよびDTT(1mg)を加え、良く混和し、38℃で0分または40時間保温反応させた。以上の結果を表1にまとめた。(1)粗酵素液と緩衝液(pH8.0)のみの場合は、38℃、40時間保温反応させた時と、この反応液を再びpH5.5(緩衝液)に下げ、38℃、40時間保温反応させた時にエンド型プロテアーゼ活性が認められた。すなわち、グリニンのバンドが移動している。pH5.5(緩衝液)の場合はいずれも活性は認められない(バンドの移動は認められない)。(2)粗酵素液と緩衝液(pH8.0)にPCMBを加え、38℃、40時間保温反応させ、その反応液をpH5.5(緩衝液)に下げた時と、再び38℃、40時間保温反応させた時にエンド型プロテアーゼ活性が認められた。(3)粗酵素液と緩衝液(pH8.0)にNEMを加え、38℃、40時間保温反応させ、その反応液をpH5.5(緩衝液)に下げた時と、再び38℃、40時間保温反応させた時にエンド型プロテアーゼ活性が認められた。これはPCMBを加えた場合と同様である。(4)粗酵素液と緩衝液(pH8.0)にDTTを加え、38℃、40時間保温反応させ、次にpH5.5(緩衝液)に下げ、再

び38℃、40時間保温反応させた時にエンド型プロテアーゼ活性が認められた。図5および図6は発芽5日目大豆種子のSDS-ポリアクリルアミドスラブゲル電気泳動像である。図5の①～⑤までは粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH8.0)0.6mlを加え、38℃、0分と40時間保温反応させた。⑥～⑩は粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH8.0)0.6mlおよびPCMB0.07mlを良く混和し、38℃、0分および40時間保温反応させた。⑪は大豆11S蛋白質(グリニン)、⑫は大豆7S蛋白質である。図6の①～⑤までは粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH8.0)0.6mlを加え良く混和し、38℃、0分および40時間保温反応させた。⑥～⑩は粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH8.0)0.6mlおよびDTT(1mg)を加え、混和し、0分および40時間保温反応させた。⑪は大豆11S蛋白質(グリニン)⑫は大豆7S蛋白質である。以上の結果を表2にまとめた。(1)粗酵素液と緩衝液(pH8.0)のみの場合は、38℃、40時間保温反応させた時エンド型プロテアーゼ活性が認められた(7S蛋白質と酸性グリニンおよび塩基性グリニンのバンドの移動)。また、pH5.5(緩衝液)に下げ、38℃、40時間保温反応させた時にも、活性が認められた(7S蛋白質と酸性グリニンの移動)。(2)粗酵素液と緩衝液(pH8.0)にPCMBを加えた場合は、38℃、40時間保温反応させた時エンド型プロテアーゼ活性が認められた(7S蛋白質と酸性グリニンおよび塩基性グリニンのバンドの移動)。また、pH5.5(緩衝液)に下げ、38℃、40時間保温反応させた時にも、活性が認められた(7S蛋白質と酸性グリニンの移動)。(3)粗酵素液と緩衝液(pH8.0)にNEMを加えた場合は、38℃、40時間保温反応させた時エンド型プロテアーゼ活性が認められた(7S蛋白質と酸性グリニンおよび塩基性グリニンのバンドの移動)。また、pH5.5(緩衝液)に下げ、38℃、40時間保温反応させた時にも、活性が認められた(7S蛋白質と酸性グリニンの移動)。(4)粗酵素液と緩衝液(pH8.0)にDTTを加えた場合は、どれも活性は認められなかった。図7と図8は発芽5日目大豆種子の酢酸酸性尿素ゲル電気泳動像である。図7の①～⑤までは粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH8.0)0.6mlを加え、38℃、0分および40時間保温反応させた。⑥～⑩は粗酵素液0.1mlと緩衝液(pH8.0)0.6mlおよびPCMB0.07mlを良く混和し、38℃、0分および40時間保温反応させた。⑪は大豆11S蛋白質(グリニン)、⑫は大豆7S蛋白質である。図8の①～⑤までは粗酵素液0.1mlと緩衝液

(pH8.0) 0.6ml および N E M を加え良く混和し, 38°C, 0 分および40時間保温反応させた。⑥~⑩は粗酵素液 0.1ml と緩衝液 (pH8.0) 0.6ml および D D T 1 mg を良く混和し, 0 分および40時間保温反応させた。⑪は大豆11S 蛋白質 (グリシニン) ⑫は 7 S 蛋白質である。以上の結果を表 3 にまとめた。

(1) 粗酵素液と緩衝液 (pH8.0) のみの場合は, 38°C, 40時間保温反応させた時エンド型プロテアーゼ活性が認められた (7S 蛋白質と酸性グリシニンのバンドの移動)。また, pH5.5 (緩衝液) に下げ, 38°C, 0 分および40時間保温反応させた時にも, 活性が認められた (7S 蛋白質と酸性グリシニンの移動)。(2) 粗酵素液と緩衝液 (pH8.0) に P C M B を加えた場合は, 38°C, 40時間保温反応させた時エンド型プロテアーゼ活性が認められた (7S 蛋白質と酸性グリシニンのバンドの移動)。また, pH5.5 (緩衝液) に下げ, 38°C, 0 分および40時間保温反応させた時にも, 活性が認められた (7S 蛋白質と酸性グリシニンの移動)。(3) 粗酵素液と緩衝液 (pH8.0) に N E M を加えた場合は, 38°C, 40時間保温反応させた時エンド型プロテアーゼ活性が認められた (7S 蛋白質と酸性グリシニンのバンドの移動)。また, pH5.5 (緩衝液) に下げ, 38°C, 0 分および40時間保温反応させた時にも, 活性が認められた (7S 蛋白質と酸性グリシニンの移動)。(4) 粗酵素液と緩衝液 (pH8.0) に D D T を加えた場合は, どれも活性は認められなかった。

要 約

(1) 4~30% グラジエントスラブゲル電気泳動法での観察では, 粗酵素液と pH8.0 緩衝液と P C M B および N E M を加えて, 38°C, 40時間保温反応させ, 再び pH5.5 緩衝液に下げ, 38°C, 40時間保温反応させた時に, エンド型プロテアーゼ活性が認められた (グリシニンの移動から)。また, pH5.5 緩衝液からのスタートでは, いずれも活性は認められなかった。

(2) S D S -スラブゲル電気泳動法での観察では, 粗酵素液と pH8.0 緩衝液と P C M B および N E M をくわえて, 38°C, 40時間保温反応させた時と, 再び pH5.5 緩衝液に下げ, 38°C, 40時間保温反応させた時に, エンド型プロテアーゼ活性が認められた。すなわち, 粗酵素液と pH8.0 緩衝液のみの時, 7 S 蛋白質と酸性グリシニンおよび塩基性グリシニンのバンドの移動が認められた。また, P C M B および N

E M を加えた時も 7 S 蛋白質と酸性グリシニンおよび塩基性グリシニンのバンドの移動が認められた。粗酵素液と pH8.0 緩衝液と P C M B および N E M を加え, 38°C, 40時間保温反応させた時, 7 S 蛋白質と酸性グリシニンのバンドの移動が認められた。D D T を加えた場合はどれも活性は認められなかった。

(3) 酢酸酸性尿素ゲル電気泳動法での観察では, 粗酵素液と pH8.0 緩衝液のみの場合と粗酵素液と pH8.0 緩衝液と P C M B および N E M を加えて混和し, 38°C, 40時間保温反応させた場合と, 再び pH5.5 緩衝液に下げ, 38°C, 0 分および40時間保温反応させた場合に, エンド型プロテアーゼ活性が認められた。すなわち, 粗酵素液と pH8.0 緩衝液のみの場合, 7 S 蛋白質および酸性グリシニンのバンドの移動が認められた。また, P C M B および N E M を加えた場合も同様に 7 S 蛋白質および酸性グリシニンのバンドの移動が認められた。D D T を加えた場合はどれも活性は認められなかった。

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：東京家政大学生活科学研究所報告，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)
- 20) 星野かほり，宇高京子：東京家政大学研究紀要，第41集(2)，(2001)
- 21) 宇高京子，北村陽子，田口亜紀子，星野かほり：東京家政大学研究紀要 第41集(2)，(2001)

Abstract

When the endoproteolytic activity was made to react for 40 hours at 38°C with the pH8.0 buffer solution adding PCMB and NEM, and then to lowered pH5.5 buffer solution again, the strongest revitalization was seen. The reason can be confirmed by moving the strap of 7S-Protein and the glycinin. Moreover, the protease revitalization is not seen as for each case when starting from the pH5.5 buffer solution.