

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 第三報 発芽過程における大豆種子のエンド型プロテアーゼの分離精製

宇高 京子, 北村 陽子¹⁾, 酒井 弥生

(平成 14 年 10 月 3 日受理)

Physiological Biochemical Study on Legumes Storage Protein in Germination Process Part 3 Separation Refinement of End Type Protease of Soybean Seed in Germination Process

UDAKA, Kyoko KITAMURA, Youko and SAKAI, Yayoi

(Received on October 3, 2002)

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ま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)~12)}。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^{13)~23)}。前報²³⁾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分離精製について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、恒温機(20°C)内で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; 緩衝液Aとする。)を15ml加え、Ultra-turraxホモギナイザーで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) ゲル濾過法による粗酵素液の精製

上記(2)の粗酵素液10mlをBio-Gel A-1.5M (Bio-Rad社製)によるゲル濾過を行った。緩衝液A、カラムサイズ30×950mm、流速0.5ml/分で9.5mlずつ集め、280nmで

その吸光度を測定した。電気泳動的(ここではスラブゲル電気泳動像)に移動度の見られるフラクション番号のものをそれぞれ採取し、0.8飽和硫酸分画した。次にBio-Gel p-10(カラムサイズ10×300mm)で脱塩し、280nmでその吸光度を測定し、第2回目酵素液とした。

(4) 基質の調製

上記(1)の大豆乾燥完熟種子を粉末とし、エーテル抽出法で脱脂する。15倍の緩衝液Aで攪拌・抽出(4℃, 24時間)し、pH4.5で沈殿した区分(11S-蛋白質に富む区分)を取りだし、凍結乾燥粉末とした。この粉末0.04gを10mlの緩衝液Aで溶解し、基質とし、以下の実験に供した。

(5) 酵素液の調製

(5-1) 第1回精製酵素液の調製

Bio-Gel A 1.5Mのゲル濾過法で得たフラコレナンパー15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31のそれぞれ0.2mlと0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0) 0.6mlとを良く混和し、上記(4)の0.4%基質を用い、0分と70時間、38℃で保温し、以下の電気泳動法に用いた。

(5-2) 第2回精製酵素液の調製

Bio-Gel A 1.5Mのゲル濾過法で得たフラコレナンパー21, 25, 29, 33を硫酸濃縮、脱塩し第2回精製酵素液とした。

(5-2-1) 第2回精製酵素液0.05mlと0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0) 0.3mlと0.4%基質0.2mlを良く混和し、0分と70時間、38℃で保温し、以下の電気泳動法に用いた。

(5-2-2) 上記(5-2-1)にDTT(ジチオスレイトール) 1mgを加え、0分と70時間、38℃で保温し、以下の電気泳動法に用いた。

(5-2-3) 上記(5-2-1)にp-クロルマキュリア安息香酸(p-CMB, 10^{-5} M) 0.07mlをそれぞれに加え、0分と70時間、38℃で保温し、以下の電気泳動法に用いた。

(5-2-4) 上記(5-2-1)にN-エチルマレイミド(NEM, 10^{-2} M) 0.07mlをそれぞれに加え、良く混和し、0分と70時間、38℃で保温し、以下の電気泳動法に用いた。

(5-2-5) 第1回精製酵素液フラコレナンパー15, 19, 25, 41それぞれの0.2mlに第1回精製酵素液のフラコレナンパー25のみ0.1mlを加え、0分と70時間、38℃で保温し、以下の電気泳動法に用いた。

(5-2-6) 上記(5-2-5)の0分の精製酵素液0.3mlにN-エチルマレイミド(NEM, 10^{-2} M) 0.03mlを加え、70時間、38℃で保温した。

(5-2-7) 上記(5-2-5)の0分の精製酵素液0.3mlにp-クロルマキュリア安息香酸(p-CMB, 10^{-5} M) 0.03mlを加え、70時間、38℃で保温した。

(5-2-8) 上記(5-2-5)の0分の精製酵素液0.3mlに第1回酵素液フラコレナンパー41を0.2mlを加え、70時間、38℃で保温した。

(5-2-9) 上記(5-2-5)の70時間、38℃の精製酵素液の0.3mlに1N-酢酸緩衝液(pH5.0) 0.1mlを加え、pH5.5に下げ、再び70時間、38℃で保温した。

以上の試料溶液を以下の電気泳動法で解析した。

(6) 4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動法¹³⁾による解析

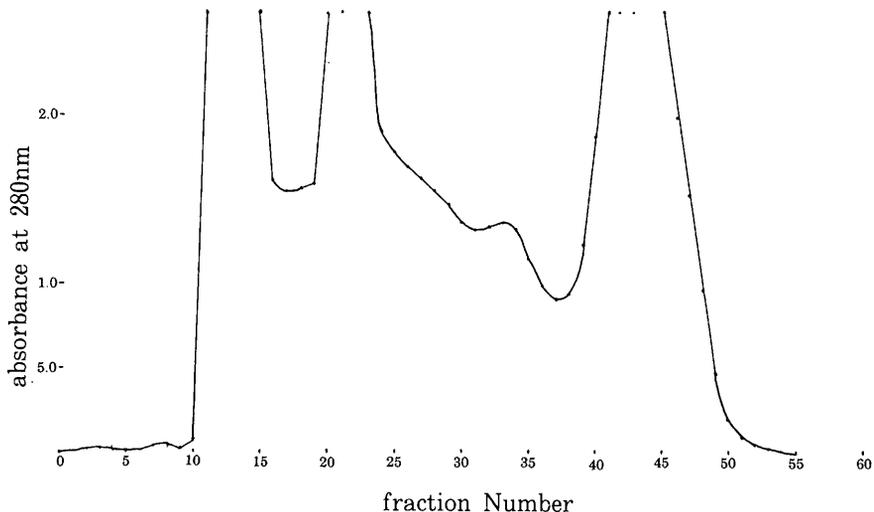


図1 発芽5日目大豆種子の粗酵素液からBio-Gel A 1.5Mのゲル濾過像である。

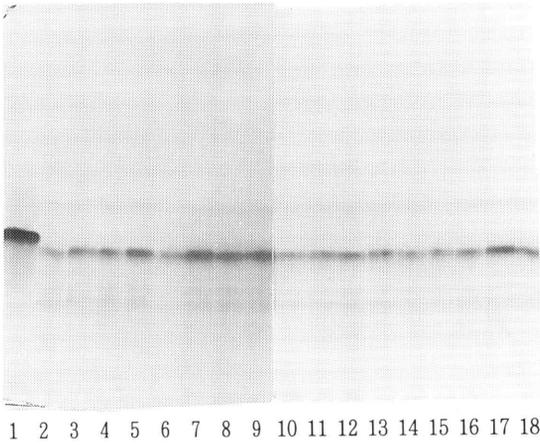


図2 発芽5日目大豆種子の粗酵素液からBio-Gel A 1.5 Mのゲル濾過法で得た酵素液に0.4%基質(グリシニン)を用いて0分および70時間、38°Cで保温し、4~30%のグラジエントスラブゲル電気泳動像である。1はグリシニン、2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18はフラコレ番号15, 17, 19, 20, 21, 23, 25, 27, 29番号で0分、38°Cで保温した。3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17はそれぞれのフラコレ番号のものを70時間、38°C保温した。

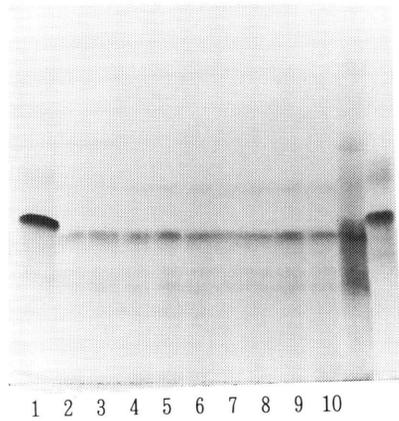


図3 電気泳動像である発芽5日目大豆種子の粗酵素液からBio-Gel A 1.5Mのゲル濾過法で得た酵素液に0.4%基質(グリシニン)を用いて0分および70時間、38°Cで保温し、4~30%のグラジエントスラブゲル、1はグリシニン、2, 4, 6, 8, 10はフラコレ番号29, 31, 33, 35, 37で0分、38°Cで保温し、3, 5, 7, 9はそれぞれのフラコレ番号のものを70時間、38°C保温した。

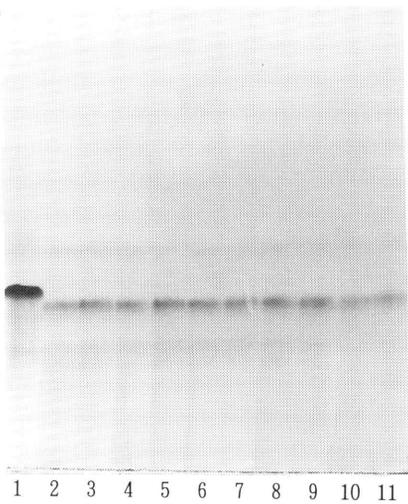


図4 発芽5日目大豆種子の粗酵素液からBio-Gel A 1.5 Mのゲル濾過法で得た酵素液に0.4%基質(グリシニン)を用いて0分および70時間、38°Cで保温し、4~30%のグラジエントスラブゲル電気泳動像、1はグリシニン、2, 4, 6, 8, 10はフラコレ番号37, 39, 40, 41, 43で0分、38°C保温した。3, 5, 7, 9, 11はそれぞれのフラコレ番号のものを70時間、38°C保温した。

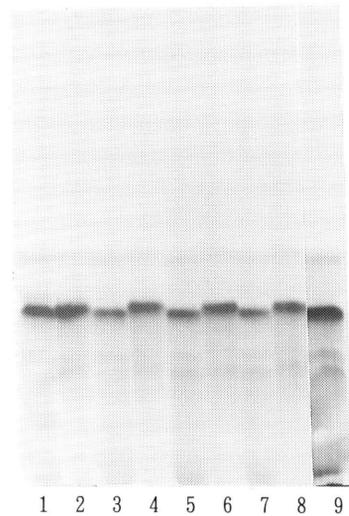


図5 発芽5日目大豆種子の粗酵素液からBio-Gel A 1.5 Mのゲル濾過法で得た酵素液を0.8飽和硫酸分画し、Bio-Gel p-10で脱塩、4~30%のグラジエントスラブゲル電気泳動像、1, 3, 5, 7, はフラコレ番号21, 25, 29, 33で0分、38°C保温した。2, 4, 6, 8はそれぞれのフラコレ番号で70時間、38°C保温した。9はグリシニン。

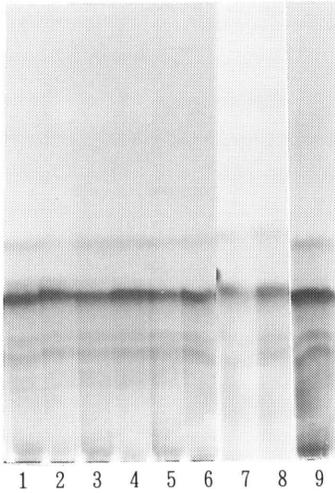


図6 発芽5日目大豆種子の粗酵素液からBio-Gel A 1.5 Mのゲル濾過法で得た酵素液に0.4%基質(グリシニン)を用いて、p-CMBを加え、0分および70時間、38°Cで保温し、4~30%のグラジエントスラブゲル像である、1, 3, 5, 7はフラコレ番号の21, 25, 29, 33で、0分、38°C保温、2, 4, 6, 8はそれぞれのフラコレ番号で70時間、38°C保温、9はグリシニン。

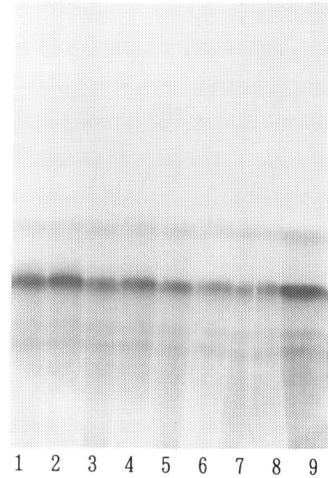


図7 発芽5日目大豆種子の粗酵素液からBio-Gel A 1.5 Mのゲル濾過法で得た酵素液に0.4%基質(グリシニン)を用いて、NEMを加え、0分および70時間、38°Cで保温し、4~30%のグラジエントスラブゲル像である、1, 3, 5, 7はフラコレ番号の21, 25, 29, 33で、0分、38°C保温、2, 4, 6, 8はそれぞれのフラコレ番号で70時間、38°C保温、9はグリシニン。

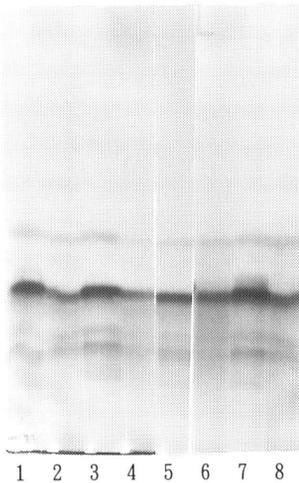


図8 発芽5日目大豆種子の粗酵素液からBio-Gel A 1.5 Mのゲル濾過法で得た酵素液に0.4%基質(グリシニン)を用いて、DTTを加え、0分および70時間、38°Cで保温し、4~30%のグラジエントスラブゲル像である、1, 3, 5, 7はフラコレ番号の25, 29, 33, 21, で70時間、38°C保温、2, 4, 6, 8はそれぞれのフラコレ番号で0分、38°C保温した。

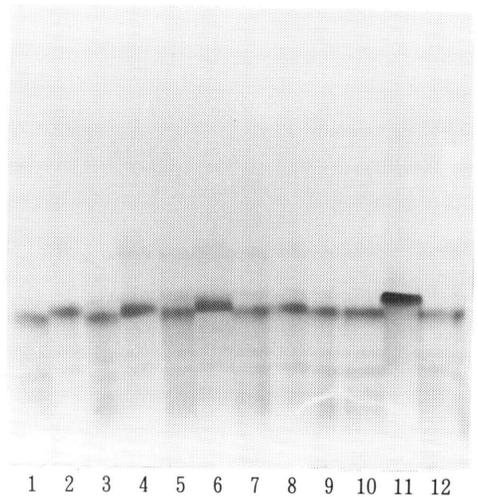


図9 第1回酵素液フラコレナンバー15, 19, 22, 25, 41のそれぞれにBio-Gel p-10で脱塩したフラコレナンバー25を加え、0分と70時間、40°Cで保温し、4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である、1, 3, 5, 7, 9, はフラコレ番25+15, 25+19, 25+22, 25+25, 25+41で0分、38°C保温、2, 4, 6, 8, 10はそれぞれのフラコレ番号で70時間、38°C保温、11はD5-6, 12はグリシニン。

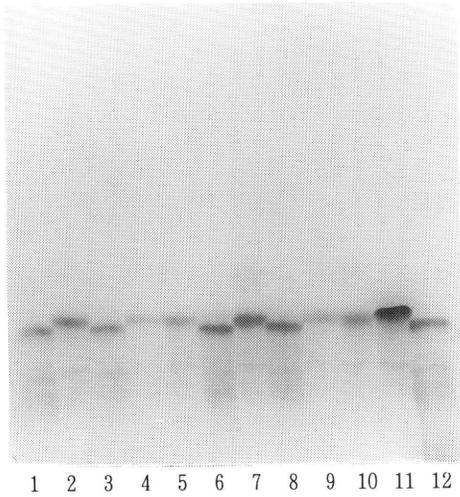


図10 Bio-Gel p-10で脱塩したフラコレナンバー25を用いて第1回酵素液フラコレナンバー15, 19にp-CMBおよびフラコレナンバー41を加えて, 0分と70時間, 40°Cで保温した, また, pH8.0からpH5.5に下げ, 0分と70時間, 40°Cで保温した, これらの酵素液を4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である, 1~5はフラコレ番号25+15, 6~10はフラコレ番号25+19, 1および6はそれぞれのフラコレ番号で, 0分, 38°C保温, 2および7はそれぞれのフラコレ番号で70時間, 38°C保温, 3および8はそれぞれのフラコレ番号でp-CMBを加え, 70時間, 38°C保温, 4および9はそれぞれのフラコレ番号でフラコレ番号41を加え, 70時間, 38°C保温, 5および10はそれぞれのフラコレ番号でpH8.0からpH5.5に下げ, 70時間, 38°C保温, 11はD8-b, 12はグリシニン.

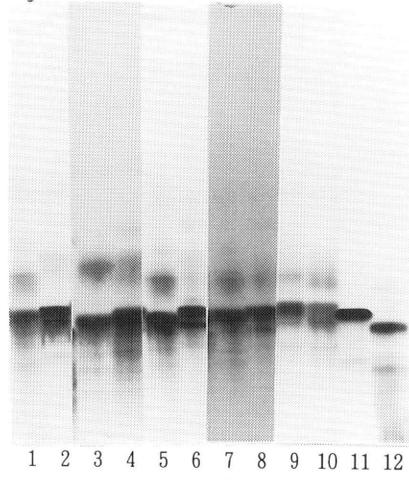


図12 発芽0, 1, 3, 5, 7日目のそれぞれの粗酵素液に第1回酵素液フラコレ番号41を加え, 0分と70時間, 40°Cで保温し, 4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である, 1は発芽0日目, 0分, 2は発芽0日目, 70時間, 38°C保温, 3は発芽1日目, 0分, 4は発芽1日目, 70時間, 38°C保温, 5は発芽3日目, 0分, 6は発芽3日目, 70時間, 38°C保温, 7は発芽5日目, 0分, 8は発芽5日目, 70時間, 38°C保温, 9は発芽7日目, 0分, 10は発芽7日目, 70時間, 38°C保温, 11はD8-8, 12はグリシニン.

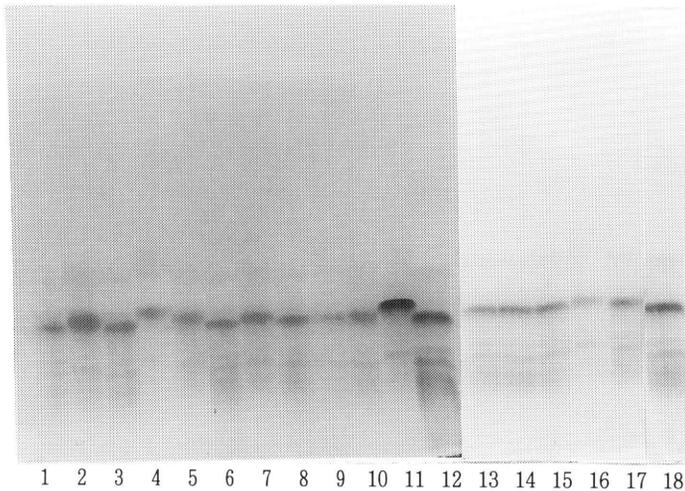


図11 Bio-Gel p-10で脱塩したフラコレナンバー25を用いて第1回酵素液フラコレナンバー22, 25, 41, にp-CMBおよびフラコレナンバー41を加えて, 0分と70時間, 40°Cで保温した, また, pH8.0からpH5.5に下げ, 0分と70時間, 40°Cで保温した, これらの酵素液を4~30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である, 1~5はフラコレ番号25+22, 6~10はフラコレ番号25+25, 13~17はフラコレ番号25+41, 1および6と13はそれぞれのフラコレ番号で, 0分, 38°C保温, 2および7と14はそれぞれのフラコレ番号で70時間, 38°C保温, 3および8と15はそれぞれのフラコレ番号でp-CMBを加え, 70時間, 38°C保温, 4および9と16はそれぞれのフラコレ番号でフラコレ番号41を加え, 70時間, 38°C保温, 5および10と16はそれぞれのフラコレ番号でpH8.0からpH5.5に下げ, 70時間, 38°C保温, 11はD8-b, 12および18はグリシニン.

実験結果と考察

図1は発芽5日目大豆種子の粗酵素液からBio-Gel A 1.5Mのゲル濾過像である。スラブゲル電気泳動像からフラコレ番号21, 23, 25, 27, 29, 31, 33付近にバンドの移動が見られた。図2～図4はBio-Gel A 1.5Mのゲル濾過法で得た酵素液に0.4%基質(11S蛋白質)を用いて0分と70時間, 38°Cで保温し, 4～30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。しかし, ここからは電気泳動的移動度は見られない。図5はBio-Gel A 1.5Mのゲル濾過法で得た酵素液を電気泳動的に移動度の見られるフラコレ番号21, 25, 29, 33をそれぞれ, 0.8飽和硫酸分画し, Bio-Gel p-10で脱塩した4～30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。フラコレ番号25, 29, 33において, 70時間, 38°Cでわずかな移動が見られる。図6はBio-Gel A 1.5Mのゲル濾過法で得た酵素液に0.4%基質(11S蛋白質)を用いて, p-CMBを加え0分と70時間, 38°Cで保温し, 4～30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。しかし, バンドの移動は全く見られない。図7はBio-Gel A 1.5Mのゲル濾過法で得た酵素液に0.4%基質(11S蛋白質)を用いて, NEMを加え, 0分と70時間, 38°Cで保温し, 4～30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。しかし, バンドの移動は見られない。図8はBio-Gel A 1.5Mのゲル濾過法で得た酵素液に0.4%基質(11S蛋白質)を用いて, DTTを加え, 0分と70時間, 38°Cで保温し, 4～30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。70時間, 38°Cの保温の時わずかにバンドの移動が見られた。図9は第1回酵素液フラコレ番号15, 19, 22, 25, 41のそれぞれにBio-Gel p-10で脱塩したフラコレ番号25を加え, 0分と70時間, 38°Cで保温し, 4～30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。フラコレ番号25+15, 25+19, 25+22, 25+25とバンドの移動が見られ, 25+41では全く移動は見られなかった。図10はBio-Gel p-10で脱塩したフラコレ番号25を用いて第1回酵素液フラコレ番号15, 19にp-CMBおよびフラコレ番号41を加えて, 0分と70時間, 38°Cで保温した。また, pH8.0からpH5.5に下げ, 0分と70時間, 38°Cで保温した。これらの酵素液を4～30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。フラコレ番号41以外はバンドの移動が見られプロテアーゼが存在する。図11はBio-Gel p-10で脱塩したフラコレ番号25を用いて第1回酵素液フ

ラコレ番号22, 25, 41にp-CMBおよびフラコレ番号41を加えて, 0分と70時間, 38°Cで保温した。また, pH8.0からpH5.5に下げ, 0分と70時間, 38°C保温した電気泳動像である。上記と同様, フラコレ番号41以外はバンドの移動が見られプロテアーゼが存在する。以上の結果からは, バンドの移動はグリシニン(11S蛋白質)の位置の移動であり, フラコレ番号21～33付近にエンド型プロテアーゼが存在することが明らかになった。図12は上記(1)の大豆乾燥完熟種子を0, 1, 3, 5, 7日間発芽さす。それぞれの酵素液に第1回酵素液フラコレ番号41を加え, 0分と70時間, 38°Cで保温した。これらの酵素液を4～30%グラジエントスラブゲル電気泳動像である。フラコレ番号41を加えた時, いずれの場合も阻害されず, グリシニンおよび7S蛋白質の移動が見られ, エンド型プロテアーゼが存在した。しかし, 発芽7日目においては, ほとんど移動が認められなかった。

要約

- (1) 発芽5日目大豆種子の粗酵素液からBio-Gel A 1.5Mのゲル濾過法で得た酵素液に0.4%基質(グリシニン)を用いて, p-CMBおよびNEMを加えて, 0分および70時間, 38°Cで保温し, 4～30%のグラジエントスラブゲル電気泳動像からはバンドの移動は見られないが, DTTを添加した時, 70時間, 38°C保温した時に僅かな移動が見られた。
- (2) Bio-Gel p-10で脱塩したフラコレ番号25を用いて, エンド型プロテアーゼの存在するフラコレ番号15, 19, 22, 25, 41では41以外はバンドの移動が見られた。
- (3) 同様にp-CMBおよびpH8.0からpH5.5に下げた時にバンドの移動が見られるが, 41を添加するとバンドの移動は見られない。
- (4) 発芽0, 1, 3, 5日目ではフラコレ番号41を加えた時, いずれの場合も阻害されず, グリシニンおよび7Sたんぱく質の移動が見られ, エンド型プロテアーゼが存在した。しかし, 発芽7日目ではほとんど移動が認められなかった。

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**, 6234-6239 (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 et al., : Protein Expression Purif., : **7**, 309-314 (1996)
- 9) M. Arahira, K. Udaka et al. : Biosci. Biotechn. Biochem., **62** (5), 108-1021 (1998)
- 10) A. Watanabe, K. Udaka et al., : Biosci. Biotechn. Biochem., **63** (2) 251-256 (1999)
- 11) M. Arahira, K. Udaka, et al. : Eur. J. Biochem. **267**, 2649-2657(2000)
- 12) Van Hai Nong, C. Fukazawa, K. Udaka et al. : J. Biochem., **132**, 291-300 (2002)
- 13) 宇高京子：東京家政大学生活科学研究報告，第13集（1990）
- 14) 宇高京子：東京家政大学研究紀要，第35集（1995）
- 15) 宇高京子：東京家政大学研究紀要，第36集（1996）
- 16) 宇高京子，川名広子：東京家政大学研究紀要，第37集（1997）
- 17) 宇高京子，森永真希子：東京家政大学研究紀要，第38集（1998）
- 18) 森永真希子，宇高京子：東京家政大学研究紀要，第38集（1998）
- 19) 宇高京子，星野かほり：東京家政大学研究紀要，第39集（1999）
- 20) 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）
- 21) 星野かほり，宇高京子：東京家政大学研究紀要，第41集（2001）
- 22) 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（2001）
- 23) 宇高京子，北村陽子，酒井弥生：東京家政大学研究紀要，第42集（2002）

Summary

When DTT was added, a little movement was observed though the straped was not moved when keeping incubate at 38°C for 0 minute and 70 hours adding p-CMB and NEM by using 0.4% glycinin for the enzyme which had been obtained from the crude enzyme of the soybean seed during the 5days germination by the gel filtration method of bio-gel A 1.5m. The movement of the straps is observed from 4~30% gragment slab gel electrophoetic method without fraction number 41, and protease exists.