ブラックマッペ発芽体の各部位におけるタンパク質 および酵素活性の変動について

吉 田 恵 子^{*1}, 四十九院 成子^{*2}, 福 場 博 保^{*3}

田 所 忠 弘^{*4}, 前 川 昭 男^{*4}

^{*1} 土浦短期大学生生活科学科

^{*2} 東京家政学院短期大学生生活科学科

^{*3} 昭和女子大学生生活科学部生活科学科

^{*4} 東京農業大学農学部農芸化学科

Changes of Proteins and Enzyme Activity in Black Matpe Organs during Germination

Keiko YOSHIDA,^{*1} Shigeko TSURUSHIIN,^{*2} Hiroyasu FUKUBA,^{*3}

Tadahiro TADOKORO^{*4} and Akio MAEKAWA^{*4}

^{*1} Department of Living Sciences, Tsuchiura Junior College, Tsuchiura 300

^{*2} Department of Science of Life Management, Tokyo Kasei Gakuin Junior College, Chiyoda-ku, Tokyo 103

^{*3} Department of Food Science and Nutrition, Showa Women's University, Setagaya-ku, Tokyo 154

^{*4} Department of Agricultural Chemistry, Tokyo University of Agriculture, Setagaya-ku, Tokyo 156

J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., **50**, 153~159 (1997)

The protein content of black matpe cotyledon decreases gradually following germination, whereas that of the hypocotyl increases slightly in the first week after germination. Cotyledon and hypocotyl proteins in ungerminated seeds were separated into three peaks (P1, P2, P3 in elution order) by column chromatography on Sephadex G-200. The proportions of P1, P2 and P3 were 7 : 2 : 1 in cotyledon, and 4 : 5 : 1 in hypocotyl. After germination in the cotyledon, the lower-molecular-weight peak area became broader while the high-molecular-weight peak area (storage protein) remained. In the hypocotyl and radicle, the lower-molecular-weight peak area occupied a greater proportion, and in the plumule the high-molecular-weight area developed. Protease inhibitor activity was detected only in the cotyledon of ungerminated and germinated seeds and the hypocotyl of ungerminated seeds. In the cotyledon it decreased during 7 days of germination. In the cotyledon, APase, BAPAase, CPase and LNAase activities reached a maximum in one or two days from the beginning of germination. In the hypocotyl, APase, CPase and LNAase activities increased in 5 or 7 days from the beginning of germination. The dominant free amino acids of 7-day hypocotyl and radicle were L-aspartic acid, L-valine, L-isoleucine and L-arginine.

Key Words black matpe organs, germination, peptides, amino acids, proteases.

(Received October 16, 1996)

豆類の発芽期では貯蔵タンパク質が酵素で分解され、生成したアミノ酸を素材に新タンパク質が合成されて発芽体が成長する。すなわち豆類の貯蔵タンパク質に、エンドペプチダーゼが働くことにより、可溶性ペプチドにまで分解され、次いでアミノペプチダーゼやカルボキシペプチダーゼの作用により、ペプチドや、アミノ酸に分

解される¹⁾。この作用について Chrispeels ら^{2)~7)} がマングビーンを用いて詳細な研究を行った結果、エンド型の酸性プロテアーゼ活性が発芽初期に増大するのに対し、エキソ型のアミノペプチダーゼ活性は後半期に増大すると報告している。しかし著者らがブラックマッペについて発芽期の酵素活性の変動を調べた結果、エンド型の酸性プロテアーゼと、エキソ型のカルボキシペプチダーゼおよびアミノペプチダーゼの3酵素とも発芽初期に活性増大が認められ、貯蔵タンパク質の分解はこれらの協同作用によるものであると推察した⁸⁾。その後、Mitsubishi

^{*1} 〒300 土浦市真鍋 6-7-10

^{*2} 〒103 東京都千代田区三番町 22

^{*3} 〒154 東京都世田谷区太子堂 1-7-57

^{*4} 〒156 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

ら⁹⁾は、エンドペプチダーゼであるシステインプロテアーゼとセリンプロテアーゼとがともに貯蔵タンパク質を分解すると報告した。

以上のように発芽と酵素活性の変動について調べた報告はあるが、貯蔵タンパク質の面から検討した報告は、Kruger ら¹⁰⁾が、小麦の発芽時の貯蔵タンパク質の変化を検討しているほかは少ない。そこで著者ら¹¹⁾はブラックマッペについて発芽時のタンパク質の変化を、ゲル濾過と電気泳動を用いて検討した。その結果、高分子量のタンパク質が減少し、低分子量のペプチドやアミノ酸画分が増加するものの、おもな貯蔵タンパク質は発芽7日目でも残存しており、発芽において貯蔵タンパク質のすべては分解されないことを認めた。そこで今回は、発芽体を部位（子葉、胚軸、幼根、幼芽）に分け、それぞれのタンパク質の変動をゲル濾過により検討し、ペプチドについては、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで分析した。併せて部位別のプロテアーゼインヒビター活性、プロテアーゼ活性も測定した。また未発芽豆の子葉、および7日発芽体の部位別の遊離アミノ酸組成も検討した。

実験方法

1. 試料

ブラックマッペ (*Vigna mungo*) は前報¹¹⁾と同様タイ国産のものを使用した。

2. 発芽

ブラックマッペは水洗後50°Cの湯浴中で1時間浸漬後24°Cの恒温器中で、適宜水を加えながら発芽させた。発芽日数は、1, 2, 3, 5, 7日の5区分とした。

3. タンパク質および粗酵素液の抽出法

未発芽豆（子葉、胚芽）および発芽体を部位（子葉、胚軸、幼根、幼芽）に分けた。未発芽豆の子葉は粉末とし、5倍量の0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で1時間攪拌抽出を行い、未発芽豆の胚芽、および発芽体の各部位（子葉、胚軸、幼根、幼芽）はそれぞれ5倍量の0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) でホモジネートした。その後おのおのを、10,000 rpm で15分間冷却遠心分離を行い、上澄液を得た。この操作を2回繰り返し上澄液をあわせてタンパク質溶液および粗酵素液とした。

4. ゲル濾過

あらかじめ0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した Sephadex G-200 (Pharmacia) をカラム (1.7×57.5 cm) に充填し、流速8.0 ml/h、1フラクション4.0 ml で同緩衝液を用いゲル濾過を行った。供したタンパク質量は一定 (5.9 mg) とした。次に得られた低分子量画分 (フラクション 32~48) を濃縮後、Sephadex G-25 のカラム (1.95×75 cm) に供し、流速20 ml/h、1フラク

ション4.0 ml で、0.1 M 酢酸アンモニウムを用いゲル濾過を行った。

5. HPLC による分析

Sephadex G-200 でのゲル濾過で得られた各部位の低分子量画分 (フラクション 32~48) を濃縮後、10 μ l を Asahipak C 4 P-50 (4.6×150 mm) のカラムを用いた逆相系 HPLC に供した。溶出は0.05%トリフルオロ酢酸中で、アセトニトリル濃度0~60%のリニアグラディエント (5分~65分) によった。流速は0.5 ml/min、検出は225 nm で行った。

6. タンパク質の定量

Lowry の改良法¹²⁾を用いた。

7. 遊離アミノ酸の分析

未発芽の子葉、および7日発芽体の各部位（子葉、胚軸、幼根、幼芽）について、Sephadex G-200 でのゲル濾過で得られた低分子量画分 (フラクション 32~48) を濃縮後、日立 L-8500 型高速アミノ酸分析計を用い分析した。

8. プロテアーゼインヒビターおよび各種プロテアーゼの活性測定法

これらの活性測定は、前報に従い測定した。プロテアーゼインヒビター活性は、カゼインを基質し、pH 7.6 におけるトリプシン活性に対する阻害度を測定した¹³⁾。酸性プロテアーゼ⁸⁾ (APase) 活性は酸変性ヘモグロビンを基質とし pH 4.0 で測定した。*N*- α -benzoyl-DL-arginine

Fig. 1. Gel filtration patterns of ungerminated cotyledon and hypocotyl in black matpe on Sephadex G-200.

Proteins (5.9 mg) of ungerminated cotyledon and hypocotyl were applied on the column (1.7×57.5 cm), pre-equilibrated with 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8.0). The flow rate was 8.0 ml/h and one fraction was 4.0 ml. Protein contents of peak 1 (Fraction 16~21), peak 2 (Fraction 24~30) and peak 3 (Fraction 35~42) were measured by Lowry's methods.

p-nitroanilide 分解酵素⁸⁾ (BAPAase) 活性は, *N*- α -benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide を基質とし, pH 8.3 で測定した。アミノペプチダーゼ⁹⁾ (LNAase) 活性は L-Leucyl- β -naphthylamide-HCl を基質とし, pH 7.0 で測定した。カルボキシペプチダーゼ⁹⁾ (CPase) 活性は, carbobenzoxy-phenylalanyl-alanine を基質とし, pH 6.0 で測定した。

結果および考察

1. 未発芽豆の各部位におけるタンパク質組成

未発芽豆を子葉 (cotyledon), 胚芽 (hypocotyl) に分け, タンパク質を抽出後, Sephadex G-200 に供した。おのおのの溶出曲線を Fig. 1 に示した。子葉, 胚芽ともに P1 (フラクション 16~21), P2 (フラクション 24~30), P3 (フラクション 35~42) の三つのピークに分かれ, これらのタンパク質量の割合は, 子葉では P1, P2, P3 の

比率が 7:2:1, 胚芽では 4:5:1 と異なっていた。貯蔵タンパク質と思われる P1 について, ディスク電気泳動でタンパク質組成を比較したところ, 同じバンドが存在した (未掲載) ことから, 子葉と胚芽の貯蔵タンパク質

Fig. 2. Changes of total protein contents in black matpe organs during germination.

Fig. 3. Gel filtration patterns of black matpe organs during germination on Sephadex G-200. Experimental conditions were as same as conditions which were described under Fig. 1.

は同種のものであることが認められた。

2. 発芽によるタンパク質の変化

1) 各部位のタンパク質量の変化 各部位の発芽日数別のタンパク質量を Fig. 2 に示した。子葉においてはタンパク質量は急激に減少しており、これは貯蔵タンパク質が分解し、新たに生ずる発芽体の構成成分として移行したためと考えられる。胚軸においては、発芽とともに増加が認められた。

2) 各部位におけるタンパク質組成の変化 Fig. 3 に各部位の発芽日数別の Sephadex G-200 での溶出曲線を示した。

未発芽豆の子葉においては、分子量 160,000 のタンパク質 (P1) が全体の 70% を占めていたが、発芽とともに減少した。また、分子量 12,500 以下の低分子量のピークは増加し、7 日目には低分子量のピークが大半を占めた。供したタンパク質量は一定であることから、子葉内で構成される高分子量のタンパク質、低分子量のペプチド、アミノ酸の比率が発芽とともに変化し、貯蔵タンパク質の分解とともにペプチド、アミノ酸の増加が示唆されたが、他の部位に比較すると低分子量のものは少なく、子葉中では発芽 7 日目でも貯蔵タンパク質は残存していた。

未発芽豆の胚芽では、P1, P2, P3 の割合が、4:5:1 であったが発芽とともに P2 が減少し P3 が増加した。7 日発芽体の胚軸は大部分が低分子量のもので占められている。子葉に蓄えられた貯蔵タンパク質が分解し、胚軸を成長させる¹⁴⁾といわれているが、この結果より胚芽中でも高分子のものが分解されていることが推察された。

幼根は 2 日目から現れたが、これには高分子量のタンパク質はほとんど存在せず、低分子量のもののみであった。胚軸や幼根において低分子量のピークが大きいのが、これは発芽にともない子葉のタンパク質が分解し、生成したペプチド、アミノ酸等が胚軸や幼根に移行したためと考えられる。

幼芽は 3 日目から現れ、低分子量の大きなピークとともに、貯蔵タンパク質と思われる高分子量のものも存在し、新たにタンパク質が合成されたものと推察される。

3) 各部位の低分子量画分の変化 未発芽豆と 7 日発芽体について、Sephadex G-200 で得られた分子量 12,500 以下の低分子量画分を、分画範囲が 5,000 以下である Sephadex G-25 でさらに分画した。子葉と胚芽 (胚軸) の未発芽と 7 日発芽体を比較したところ、未発芽のものに比べ 7 日発芽体の溶出曲線はより低分子量域に移行し、発芽にともない低分子量のペプチド、アミノ酸の増加が示唆された (未掲載)。また、7 日発芽体の各部位別の溶出曲線を Fig. 4 に示した。子葉、胚軸、幼根の溶出

Fig. 4. Gel filtration patterns of black mame organs of 7 days' sprouts on Sephadex G-25.

Low molecular fractions obtained from Sephadex G-200 chromatography (Fraction 32~48) were applied on the column (1.95×75 cm), pre-equilibrated with 0.1 M ammonium acetate. The flow rate was 20 ml/h and one fraction was 4 ml.

曲線は同様のパターンを示したが、幼芽では低分子量域に大きなピークが認められた。

4) 各部位の 7 日発芽体のペプチド構成 Fig. 5 に、未発芽の子葉と 7 日発芽体の部位別の、HPLC の溶出曲線を示した。7 日子葉では、種々のペプチドが認められたが、他の部位では顕著なピークは少なく、疎水性のペプチドの存在は少ないものと推察された。

3. 発芽過程での各部位におけるプロテアーゼインヒビターおよび各種プロテアーゼ活性の変動

Fig. 6 に各部位のプロテアーゼインヒビターの発芽時の活性の変動を示した。インヒビター活性は子葉と胚芽に認められたが、胚芽での活性は非常に弱く、発芽後の胚軸には活性は認められなかった。子葉においては、発芽 2 日目に最大活性を示しその後は減少した。

Fig. 7 に発芽時の 4 種の酵素の各部位における活性の変動を示した。エンドペプチダーゼである APase 活性は子葉、胚芽、胚軸に認められ、子葉では発芽初期に強い活性を示し、胚軸では発芽 5 日目に最大活性が認めら

Fig. 5. HPLC patterns of peptides in ungerminated cotyledon and 7 days' sprouts organs.

Low molecular fractions obtained from Sephadex G-200 chromatography (fraction 32~48) were concentrated and 10 μ l substances were injected into column (Asahipak C 4 P-50, 4.6 $\times$ 150 mm). Eluent: 0~60% CH₃CN in 0.05% TFA (linear gradient, 5~65 min). Flow rate: 0.5 ml/min.

Fig. 6. Changes of inhibitory activity in black matpe organs during germination.

れた。また、BAPAase も子葉では 2 日目に強い活性が認められ、幼芽においては、3 日目から僅かながら活性が発

現した。エキソペプチダーゼである CPase は、子葉において発芽初期から高い活性を示し、3 日目に活性の低下がみられたが、その後 7 日目まで徐々に活性が増加し、他の三つの部位においては、すべての活性が発芽後期に増大した。また、LNAase は、子葉では発芽初期から活性が認められ、2 日目で最大活性を示し、その後減少したが、他の部位においては発芽後期に若干の増加にとどまった。

一般に、発芽にともなうプロテアーゼ活性の調節因子として、インヒビターが活性化することが考えられている。4 種の酵素活性およびインヒビター活性を、部位別に検討したところ、子葉において強い活性が認められたことから、プロテアーゼインヒビターは、子葉における発芽時の貯蔵タンパク質の分解の調節に関与していること

Fig. 7. Changes of four protease activities in black mame organs during germination.

が示唆された。

著者らは、既にエンド型のシステインプロテアーゼに属する APase と、エキソ型のセリンプロテアーゼに属する CPase、および LNAase の 3 酵素がブラックマツペの発芽初期の分解において、協同的に作用する可能性について指摘した⁸⁾。今回発芽における各部位の酵素活性を測定することによって、子葉においては、これら 3 種に加え BAPAase も加えた 4 種の酵素の協同作用によって、発芽初期における貯蔵タンパク質の分解が行われているものと推察された。胚軸では、APase 活性が発芽後期に高い活性を示していることから、APase は発芽体の成長にも関与しているものと推察された。また Mitsuhashi⁹⁾ らは、ブラックマツペには 2 種のエンドペプチダーゼ(システインプロテアーゼ、セリンプロテアーゼ)が存在し、*in vitro* においてこれらを同時に作用させることにより、貯蔵タンパク質であるグロブリンがすみやかに分解されたと報告しているが、彼らの報告しているセリンプロテアーゼは各種阻害剤による検討から、トリプシン様でも、キモトリプシン様でもないとして述べ、エキソペプチダーゼの関与している可能性についても推論している⁹⁾。本報で明らかにされた点を考え合わせると、ブラックマツペ子葉においては、エンド型とエキソ型のプロテアーゼの協同作用により、発芽初期の分解が行われていることが確認できた。

胚軸、幼根、幼芽においては、発芽にともないエキソ型のプロテアーゼ活性が増加していることから、ペプチドからアミノ酸への分解が、発芽にともなっていることが示唆された。

4. 未発芽および 7 日発芽体の遊離アミノ酸組成

Fig. 8 に未発芽の子葉、7 日発芽体の各部位における

Fig. 8. Amino acid composition of ungerminated cotyledon and 7 days' sprouts organs.

遊離アミノ酸組成を示した。未発芽の子葉、7 日発芽体の子葉、幼芽の遊離アミノ酸量はわずかであった。7 日発芽体の胚軸、幼根には同種のアミノ酸が認められ、アスパラギン酸、バリン、イソロイシン、アルギニンが多く存在した。

なお、Fig. 2, 6, 7 および 8 については、いずれも 3 回実験を繰り返した中の、代表的な結果を示したものである。

要 約

ブラックマツペの発芽にともなう各部位のタンパク質の変化を、ゲル濾過法を用い検討した。同時にプロテアーゼインヒビター活性およびプロテアーゼ活性を調べ、タンパク質の変化と酵素活性の変動との関連性をも検討した。さらに 7 日発芽体の部位別の、遊離アミノ酸組成を

調べたところ以下のことが明らかとなった。

- 1) 発芽にともない、子葉のタンパク質量は減少したが、胚軸では、発芽とともにわずかではあるが増加した。
- 2) 未発芽豆の子葉と胚芽のタンパク質組成を比較したところ、三つのピークが認められ、子葉においてその比率は、分子量の大きいものから順に、7:2:1、胚芽では4:5:1であった。また貯蔵タンパク質と思われるピーク1(分子量の最も大きいもの)について、ディスク電気泳動でタンパク質組成を比較したところ、同じパターンを示した。
- 3) 発芽にともない、子葉では低分子量のピークが増加したが、発芽7日目でも貯蔵タンパク質は残存していた。胚軸、幼根では低分子量のものが大部分を占めていたが、幼芽においては高分子量のタンパク質のピークも認められた。
- 4) 低分子量画分をさらに分画すると、発芽にともないピークは、より低分子量域に移行していた。
- 5) プロテアーゼインヒビターは子葉、胚芽のみに存在した。また子葉ではAPase, BAPase, LNAase, CPaseとも発芽初期に活性が増大し、胚軸では発芽後期にAPase, CPase, LNAaseの活性が増加した。
- 6) ブラックマップの7日発芽体の遊離アミノ酸は、胚軸、幼根に多く認められ、アスパラギン酸、バリン、イソロイシン、アルギニンが多かった。

文 献

- 1) 南川隆雄：植物の機能（旭 正編），75（1991），岩波書店（東京）
- 2) Eriscon, M.C. and Chrispeels, M.J. : *Plant Physiol.*, **52**, 98 (1973)
- 3) Chrispeels, M.J. and Boulter, D. : *Plant Physiol.*, **55**, 1031 (1975)
- 4) Harris, N. and Chrispeels, M.J. : *Plant Physiol.*, **56**, 292 (1975)
- 5) Baumgartner, B. and Chrispeels, M.J. : *Plant Physiol.*, **58**, 1 (1976)
- 6) Chrispeels, M.J., Baumgartner, B. and Harris, N. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**, 3168 (1976)
- 7) Baumgartner, B. and Chrispeels, M.J. : *Eur. J. Biochem.*, **77**, 223 (1977)
- 8) 四十九院成子, 吉田恵子, 福場博保：栄食誌, **34**, 373 (1981)
- 9) Mitsuhashi, W., Koshiba, T. and Minamikawa, T. : *Plant Physiol.*, **80**, 628 (1986)
- 10) Kruger, J.E. and Marchyld, B.A. : *Creal Chem.*, **62**, 1 (1985)
- 11) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保：栄食誌, **39**, 415 (1986)
- 12) Lowry, O.H. and Bushuk, W. : *Can. J. Plant Sci.*, **50**, 9 (1970)
- 13) 四十九院成子, 吉田恵子, 福場博保：栄食誌, **32**, 321 (1979)
- 14) 種子生理生化学研究会（編）：種子のバイオサイエンス, 71 (1995), 学会出版センター（東京）

（1996年10月16日受理）