小豆種子蛋白の代謝に関する研究(第 2 報)

発芽に於けるアズキプロテアーゼの役割について

高 木 茂 明 (九州大学農学部農芸化学科)

昭和 34 年 11 月 17 日 受 理

緒 言

前報⁽¹⁾に於て小豆休眠種子中にある蛋白分解酵素の種々の特性について実験を行い、更に酵素の部分的精製を行った結果を報告した。種子中のプロテアーゼは現在迄 arachain 他数種⁽²⁻⁵⁾しか報告されておらずしかもその生理的意義についてはあまり報告されていない。筆者は小豆種子を、明所、暗所に於て発芽させ一定日時後に於けるアズキプロテアーゼの活性の変化と pH 曲線の変化を観察し、更に子葉と幼芽、幼根に分離して夫々の活性を測った。又アズキ蛋白に対するアズキプロテアーゼの作用についても観察を行った。

実 験

実験方法並びに材料

(1) 酵素調製法：小豆種子は昭和 32 年度産の市販品を用いた。休眠種子について実験を行うときは前報と同様にそのまま種子を粉碎して 2M 食塩水にて抽出した。

発芽種子の場合は金属性ホーロー引きのバットにガーゼを敷き、その上に種子を並べ、更にガーゼをかぶせて蒸溜水が下のガーゼすれすれに浸るようにする。こうした容器を明所、暗所に夫々室温で放置する。所定時間の後に皮をむいてウォーリングブレンダーにより磨砕した。抽出は 10 倍容の 2M 食塩水(磷酸緩衝液により pH 7.0 に調節)によって行った。

酵素調製の方法は前報に従い、その C₂ フラクションを使用した。

(2) 酵素試験：前報同様 Folin 法⁽⁶⁾に準じて TCA 濾液中のチロシン、トリプトファン量を測定した。

(3) 基質：基質には尿素変性カゼイン⁽⁷⁾と、表 1 に従って調製された小豆蛋白を用いた。この表の C₃Ppt を主に基質とした。C₃はそのままでも比較的単一であるが C₃Ppt は更に純化されており、電気泳動的に殆ど均一であって、小豆種子蛋白の 70% 以上を占める。又 C₃を 0.1M 酢酸緩衝液(pH 4.0)に徹底的に透析して得られる上澄液は電気泳動像が C₃Ppt と酷似していた。C₃Ppt を基質として用いる場合、6M 尿素溶液として沸騰水中に 3 分間浸し、充分変性させて使用した。

第 1 表 基質用小豆蛋白の調製

抽出原液	硫酸 0.4 飽和とし、2 時間放置後、濾過助剤を用いて吸引濾過
濾液 S ₂	硫酸 0.7 飽和、吸引濾過
沈殿 C ₃	多量の dist. Water に対し、4° で 36 時間セロファン膜を通して透析
沈殿 C ₃ Ppt	そのまま凍結乾燥して、乾物 200 mg と尿素 3.6 g を 0.1M 酢酸緩衝液(pH 4.0)に溶解し全容を 10ml とする。
基質溶液	

実 験 結 果

(1) 発芽時の明暗によるアズキプロテアーゼ活性の変化：プロテアーゼが種子発芽に際してどのような役割を果しているかを知るために、休眠種子、明所発芽幼植物、暗所発芽幼植物中のプロテアーゼ活性を pH 曲線により観察した。それを一括して第 1 図に示す。

酸性側 pH に於て 6M 尿素変性カゼインに作用するアズキプロテアーゼは pH 4.5 附近に極大を持つ pH 曲線を描く。これから見ると酸性側プロテアーゼは休眠状態の種子に於ては 1 種類しかないと一応考えられる。

小豆種子を明所で発芽させて含有プロテアーゼの pH-活性曲線を描くと第 1 図の曲線 (2)(3) のようになり、アズキプロテアーゼよりも更に酸性側の pH 3.4 附近に 1 つの山が現われて来た。

次に同じ種子を暗所で発芽させて幼植物中のプロテアーゼの pH 依存曲線を観察すると、休眠種子のその曲線

* Studies on the Metabolism of Azuki Seed Protein. Part II. On the Role of Azuki Protease in Germination

By Shigeaki TAKAGI (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

と同じ傾向を示しはするが、幼植物の場合、単位蛋白量当りの活性（比活性）は約2倍となっていた。

（2）発芽幼植物の部位的プロテアーゼ活性の相異：この実験も明所と暗所に分けて行われた。6日間発芽させた幼植物の子葉の部分（幼芽、幼根部）と注意して切り離し、前記の溶媒を用いて別々に抽出して、プロテアーゼ活性を測った。その結果は第2図のようである。

子葉区と幼芽区との protease 活性には明暗何れに於ても著しい差がみられる。即ち幼芽区に於ては明暗何れもプロテアーゼ活性が著しく弱いのに反して子葉区は活性が強く、第1図の幼植物全体区に類似した結果がみられる。

この事実は子葉が多量の貯蔵蛋白を含み、これが発芽に際してプロテアーゼによって分解されて生長する部分へ送り込まれていることを明らかに示している。

（3）小豆貯蔵蛋白に対するプロテアーゼの作用：基質用貯蔵蛋白としては C_3^{ppt} を用いた。プロテアーゼ溶液は暗所に於て2日間発芽させた幼植物から調製した C_2 を用いた。これは休眠種子から調製された試料よりも活性の強いことは前記の通りである。

初めに生の小豆蛋白 C_3^{ppt} に作用させてみたが殆ど分解を行わなかった。アズキプロテアーゼが生的小豆蛋白に対して作用しないことは色々の理由があるであろう。

基質蛋白質が消化され難い分子状態にあることや、豆類の種子に広く分布しているプロテアーゼインヒビターの存在等もその一つとしてあげられる。小豆についてはプロテアーゼインヒビターについての報告はないが、この場合も一応予想されることである。それ故これらの障害を除く為に凍結乾燥したもの、熱処理したものを基質に用いた。先ず凍結乾燥した C_3^{ppt} を基質に用いると、弱いながら分解が観察される。従ってこの基質は生の基質蛋白と被消化性の

点で異なっている。次に熱処理された C_3^{ppt} 溶液を作る際、 100° の水浴に凍結乾燥 C_3^{ppt} を5分間浸すと蛋白は凝固し、不溶性沈澱を生ずるからこの場合基質として使用出来なかった。そこで 60° に温度を下げ8分間と15分間夫々処理した C_3^{ppt} 溶液は僅かに濁るけれども、基質として用いた。その結果は凍結乾燥 C_3^{ppt} の示す

第1図 発芽時の明暗によるアズキプロテアーゼ活性の変化

基質：尿素変性カゼイン，温度： 31.5° ，反応時間：30分
 曲線 1 (○—○) 休眠種子，曲線 2 (◐—◐) 明所2日発芽，
 曲線 3 (●—●) 明所6日発芽，曲線 4 (◑—◑) 暗所2日発芽，
 曲線 5 (●—●) 暗所6日発芽

第2図 発芽種子に於ける、子葉区と幼芽、幼根区とのプロテアーゼ活性

基質：尿素変性カゼイン，温度： 30° ，時間：30分，○—○ 明所発芽幼芽区，●—● 暗所発芽幼芽区，◐—◐ 明所発芽子葉区，◑—◑ 暗所発芽子葉区

挙動とはほぼ同じであり、僅かに低い値を示すのは熱処理の場合の蛋白濃度の減少に起因するものであろう。それに引続いて、凍結乾燥 C_3^{ppt} を 6M 尿素変性させた溶液を基質とした。何れの場合も 0.1M 酢酸緩衝液に溶解させ蛋白濃度を 2% とした。アズキプロテアーゼは尿素に対して抵抗性大であり、少くとも 6M 尿素溶液中に於て 6 時間は活性に変動のないことを確認しているから、この場合に酵素の失活は測定条件内では起らない。

以上のようにして調製された C_3^{ppt} 溶液にアズキプロテアーゼを加えて反応させた結果は第 3 図のようであって、尿素変性させた C_3^{ppt} は凍結乾燥 C_3^{ppt} 、熱処理 C_3^{ppt} に比べて非常に分解され易いことがわかる。しかし尿素変性カゼインよりは消化され難いようである。

考 察

pH 曲線 (第 1 図) から明所に於て発芽させた幼植物のプロテアーゼに見られる pH 3.5 附近の山は、発芽日時と共に大きくなっている。即ちアズキプロテアーゼ活性の強さには余り変動がなく、それよりも更に酸性側に於て作用するプロテアーゼが生成されている。この山を P_2 成分とする。一方暗所に於て発芽させた幼植物中にはこの P_2 が見当たらないが、アズキプロテアーゼ活性の強さは明所の場合よりも約 2 倍となっている。暗所に於ては、光合成が全く行われていないから窒素源として貯蔵蛋白が専ら使われ、プロテアーゼの活性が増加すれば、それは貯蔵蛋白分解にのみ貢献するものであろうと考えられる。

現在迄の植物生理学的知見⁽⁸⁾によれば、暗所に於て種子を発芽させた場合種子蛋白の分解は旺盛に行われ、その窒素成分はアスパラギン、グルタミンの如きアミド態窒素として一時貯蔵され、蛋白合成は種子内に含まれる物質とエネルギーを利用した範囲内で行われると云われている。従って明所発芽と暗所発芽の場合のプロテアーゼの活性の強弱の相異、並びに活性の種類の相異は光合成が起る時と、起らない時との差と云うことが出来る。

更に明所発芽、暗所発芽の何れの場合も幼植物の幼芽区は子葉区と比較すると、活性の面に於てはるかに低く、アズキプロテアーゼが子葉に存在する事は明瞭である。又暗所発芽幼植物に於ては幼芽区に P_2 成分がなく、 P_2 は子葉中にあって発芽に伴って二次的に活性を得たプロテアーゼとしか考えられない。換言すれば、幼芽区には測定の範囲内ではプロテアーゼ活性は殆どなく、只明所発芽の場合のみ、アズキプロテアーゼに相当する山が僅かにあるに過ぎない。

次に C_3^{ppt} に対する作用については、 C_3^{ppt} が生の状態では全く作用を受けないが、アズキプロテアーゼが尿素に強い事を利用して 6M 尿素溶液中で変性をさせると消化されるようになる。プロテアーゼインヒビターについては前に述べた。尿素変性させることによってアズキプロテアーゼの作用を受け易くなるもう一つの原因は蛋白の解離会合の点にあると思われる。林⁽⁹⁾は小豆蛋白のグロブリン区分について、色々の実験を行っているが、その内で休眠種子と発芽種子と両方のグロブリン区分を取り出し、その電気泳動像、超遠心像を観察して、発芽種子の場合に解離度の大きい事を認め、発芽と解離度との間に一定の関係があるとするならば、種子が発芽する際に蛋白はプロテアーゼによって作用され易いような形、即ち解離した状態にあるのではなからうかと云っている。尿素は変性剤であると同時に強い解離剤でもあり、生体内に於てこのような変性、解離条件は存在しないだろうが、以上の事を考えれば、基質蛋白が分解を受ける為には解離の状態になるであろうということも妥当性のあることと考える。

要 約

(1) 小豆種子発芽の際にアズキプロテアーゼの活性の変化は、暗所に於ては明所に於けるよりも 2 倍となり。

第 3 図 C_3^{ppt} に対するアズキプロテアーゼの作用
温度: 31.5°, pH 4.5, 酵素蛋白濃度: 1.41mg/ml, 基質:
○—○ 6M 尿素変性; ●—● 凍結乾燥; ○—○ 60° に 8 分加熱; ●—● 60° に 15 分加熱, 蛋白濃度: 1.41 mg/ml

明所に於ては P_2 なるプロテアーゼ成分が二次的に生成した。

(2) アズキプロテアーゼも P_2 成分も幼芽区にはなく, 子葉区に存在した。これは明所暗所共に同じ傾向を示した。

(3) アズキプロテアーゼは尿素変性 C_8^{ppt} をよく消化するが, 生の C_8^{ppt} には殆ど作用しない。

(4) 以上の事実により, アズキプロテアーゼは子葉に存在していて, 種子蛋白を分解する酵素であり, 発芽に伴って活性も増加すると考えられる。

終りに臨み, 数々の御鞭撻, 御指導を賜った本学部阿久根了教授, 渡辺忠雄助教授, 並びに林勝哉助教授に深く御礼申し上げます。

(1) 阿久根, 高木 : 本誌, 34, 352 (1960).	(5) W. G. Jaffe : <i>J. Biol. Chem.</i> , 149, 1(1943).
(2) G. W. Irving Jr. et al. : <i>Arch. Biochem.</i> , 6, 351(1945).	(6) O. Folin, V. Ciocalteu : <i>J. Biol. Chem.</i> , 73, 627(1927).
(3) J. D. Mounfield : <i>Biochem. J.</i> , 30, 549(1936); <i>Ibid</i> 1778 (1936).	(7) M. Kunitz : <i>J. Gen. Physiol.</i> , 30, 291(1947).
(4) D. M. Greenberg, T. Winnick : <i>J. Biol. Chem.</i> , 135, 761(1940).	(8) J. Bonner : 植物生理化学(朝倉書店).
	(9) 林勝哉 : 農化会第 73 回西日本支部会講演.

麦角菌に関する研究(第34報)*

カモジグサ型麦角菌の培養から2種の新水溶性アルカロイド Pyroclavine ならびに Costaclavine の分離

阿部又三, 大和谷三郎, 山野藤吾, 楠本貢 (財団法人醸酵研究所)

昭和 34 年 11 月 27 日 受理

著者ら^(1,2)はさきにカモジグサ型麦角菌の菌核と培養とから agroclavine, elymoclavine などを単離するとともに当時“X”および“Y”と仮称していた二つの水溶性アルカロイドをも結晶として単離してそれぞれを secaclovine および festuclavine と名づけた。著者らはその際 festuclavine を結晶としてとり出した母液中にさらにもう一つの未知水溶性アルカロイド“Z”の存在することを発見したが, 微量のためこれを結晶状に得るには至らなかった。

今回著者らはこのカモジグサ型麦角菌の菌核から新たに1菌株を分離するとともにその培養について今度は向流抽出法によってこれを追求して見た。その結果, 目的とする未知アルカロイド“Z”を結晶として得ることに成功したばかりでなく, 試料中にさらにいずれも微量ながらも二つの未知水溶性アルカロイド“U”および“V”の存在することを認めるとともにそれらをも結晶として単離することに成功した。

ここに得た3種の未知物質のうち, アルカロイド“Z”は酢酸エチルあるいはメタノールから無色の針状結晶として析出し, 組成 $C_{16}H_{20}N_2$, mp. 204° (uncorr.), $[\alpha]_D^{20} = -90^\circ$ (pyridine), $[\alpha]_D^{20} = -43^\circ$ ($CHCl_3$) を示した。また van Urk 試薬あるいは Keller 試薬によってそれぞれ青色あるいは紫青色の反応を与え, 紫外線吸収スペクトルは secaclovine, festuclavine あるいは dihydrolysergol 類のそれによく一致した。次にアルカロイド“U”はメタノールから無色の柱状結晶として析出し, 組成 $C_{16}H_{20}N_2$, mp. 182° (uncorr.), $[\alpha]_D^{20} = +44^\circ$ (pyridine), $[\alpha]_D^{20} = +30^\circ$ ($CHCl_3$) を示した。また種々の呈色試薬によっても上記の“Z”と同様の反応を与え, 紫外線吸収スペクトルも“Z”のそれと全く一致した。さらにアルカロイド“V”は酢酸エチルから柱状の結晶として析出し, 組成 $C_{16}H_{18}ON_2$, mp. 224° (decomp. uncorr.), $[\alpha]_D^{18} = +109^\circ$ (pyridine) を示した。このアルカロイドは著者ら^(3,4)がさきに得た triseclavine と同様 van Urk 試薬によって緑色~黄緑色の反応を与える半面, 濃硫酸によ

* Researches on Ergot Fungus. Part XXXIV. Isolation of Two New Water-Soluble Ergot Alkaloids, Pyroclavine and Costaclavine, from the Saprophytic Culture of the Agropyrum-Type Ergot Fungus. By Matazō ABE, Saburō YAMATODANI, Tōgo YAMANO and Mitsugi KUSUMOTO (The Institute for Fermentation, Osaka)