グリシンに富むタンパク質の大豆種子 組織内分布と分離後の特性

福田 満*・松井美穂子*・高岡美津子*
角田聡子*・浜渦善一郎*・豊沢 功*

Distribution of Glycine-Rich Protein in Soybean Seed Tissue and Characterization of the Separated Protein

Mitsuru FUKUDA*, Miyoko MATSUI*,
Mitsuko TAKAOKA*, Satoko KAKUTA*,
Zen-ichiro HAMAIZUMI* and Isao TOYOSAWA*

* Department of Food Science, Mukogawa
Women's University, 6-46, Ikebiraki-cho,
Nishinomiya, Hyogo, 663

Glycine-rich protein (GRP) which is known as structural protein of plant cell walls was investigated on the distribution in soybean seed coat and adjacent tissues because of high level of glycine content. Soybean seed coat and adjacent tissues were separated into three parts, palisade and hourglass layers, spongy parenchyma layer, and aleurone and endosperm layers. The glycine molar percentage, 37%, in aleurone and endosperm layers was higher than those in the other layers. Although GRP in aleurone and endosperm layers was scarcely extracted with both of alkali and acid solutions at 4°C, it was effectively extracted with hot water at higher temperature than 80°C. GRP fraction was separated by gel filtration on Sephadex G-100 of fraction extracted with hot water. The fraction contained approximately 50% of glycine and 13% of serine. The estimated molecular weight of GRP was approximately 30 kDa.

(Received May 6, 1993)

種皮は種子の内部組織の保護や発芽時の吸水作用等に重要な役割を果たしている。種皮のアミノ酸組成については、多くの報告が見られるが、中でもグリシンが大豆の種皮¹⁾には25%、ウリの種皮²⁾には20%含まれていると報告されていることは注目に値し、グリシンに富むタ

ンパク質 (GRP, Glycine-Rich Protein) の存在を示唆する。

植物細胞壁にはヒドロキシプロリンを豊富に含む糖タンパク質 (HRGP, Hydroxyproline-Rich Glycoprotein) が存在すること^{3)~5)}はすでによく知られているが、また GRP⁶⁾ の存在も報告されており、両者とも細胞壁の構造タンパク質として重要な役割を果たしているとされている。また HRGP が植物組織全体に分布するのに対して GRP が種皮¹⁾²⁾や維管束部分⁷⁾⁸⁾のような特定部位に分布していることは特徴的である。さらに GRP の DNA 塩基配列についてはベチュニア⁹⁾、インゲン⁷⁾、オオムギ⁸⁾等で報告されており、糖タンパクと推定されるが、GRP 自体を分離し性質を調べた例はいまだ知られていなく分子量等も不明である。

著者らは大豆種皮部分の機能の解明や有効利用を目的として種皮および種皮に付随する隣接組織内の GRP の分布と分離した GRP の特性について調べ、若干の知見を得たので報告する。

1. 実験方法

(1) 大豆種皮および付随組織 (隣接組織) の部位別分離

実験材料として 1990 年富山県産大豆「エンレイ」を用いた。100 g の大豆を 4°C の蒸留水に一晩浸漬後、ルーペで観察しながら種皮を剥がすと種皮と付随組織 (種皮に隣接したアリューロン層と胚乳組織) が同時に外れるので、それを三つの部位 (外層から順に、棚状層および砂時計型細胞、海綿状柔細胞、アリューロンおよび胚乳層)¹⁰⁾に分けた。それぞれの組織の確認は光学顕微鏡観察により行った。アリューロンおよび胚乳層は本来は種皮の組織ではないが、大豆では種皮部分に付着しているので、種皮組織の一部として取り扱った。

(2) アリューロンおよび胚乳層のタンパク質抽出

分離したアリューロンおよび胚乳層の凍結乾燥物を粉碎し、佐藤ら¹¹⁾の方法に準じてタンパク質を抽出した。

4°C で乾燥試料の約 200 倍量の蒸留水、0.1 N NaOH、0.5 N 酢酸のそれぞれで 2 回ずつ順次抽出した後、抽出残渣を約 200 倍量の熱水 (80°C 以上) で 2 回抽出し、熱水抽出画分を得た。

(3) ゲル濾過

熱水抽出画分を凍結乾燥後、0.1 M NaCl に溶解し、同溶媒を用いて Sephadex G-100 カラム (1×120 cm) でゲル濾過した。

* 武庫川女子大学食物学科 (〒663 兵庫県西宮市池開町 6-46)

(4) アミノ酸分析

アミノ酸組成は6N塩酸で110℃、24時間加水分解した後、日立835型アミノ酸分析計で測定した。

2. 実験結果と考察

(1) 大豆種皮および付随組織内の部位別アミノ酸組成

大豆種皮および付随組織について部位別にアミノ酸組成を比較すると、Table 1 に示すように細胞壁タンパク質 HRGP の特徴であるヒドロキシプロリンの含有率は、外層の柵状層および砂時計型細胞、中間層の海绵状柔組織で高く10%以上になり、内層のアリューロンおよび胚乳層では4%以下の低い値を示した。しかし、アリューロンおよび胚乳層では他の部位よりグリシン含有率が高く、約37%を示した。したがって、種皮の高グリシン含有率は従来報告されている種皮組織ではなく、アリューロンおよび胚乳層のGRPに起因することが示唆される。HRGPとGRPの種皮内分布が異なるのは、両タンパク質の機能上の差異によると推測される。

(2) アリューロンおよび胚乳層からGRPの抽出

アリューロンおよび胚乳層からタンパク質を抽出するため、前述の各溶媒を用いたところ、低温においてはア

ルカリおよび酸溶液によってほとんどグリシン含有率の高いタンパク質は抽出されなかったが、熱水抽出により約46%のグリシン含有率を得ることができた。したがって、GRPは熱水によって抽出されることが明らかになったが、熱水抽出残渣にもグリシン含有率約42%のタンパク質がかなり存在していた。またアリューロンおよび胚乳層から熱水抽出されたタンパク質量は元の組織のタンパク質量の約45分の1であった。したがって、著者らは以前にピーマン細胞壁中のHRGP⁽¹²⁾について調べたところ、HRGPが細胞壁の多糖類に強く結合していることが分かったので、このGRPも同様の性質と推定される。さらに、GRPの抽出温度効果について調べてみると、80℃まで抽出温度の上昇にともなってGRP抽出率が増加する傾向のあることが分かった。

(3) 熱水抽出画分のゲル濾過

Fig. 1 に示すように、ゲル濾過によりグリシン含有率の高いフラクションが得られたが、その分子量サイズはかなりの巾を示していた。ゲル濾過フラクションのアミノ酸組成 (Table 2) を調べると、グリシン含有率が最大のフラクション (GRP フラクション) では約50%のグリシン比率を示し、セリンが約13%含まれていた。このGRPフラクションの推定分子量についてゲル濾過により Fig. 2 から求めると約30 kDaであった。このGRPフラクションはSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Table 1 Amino acid composition of different layers in soybean seed coat (molar %)

Amino acid	Layers		
	Palisade and hourglass	Spongy parenchyma	Aleurone and endosperm
Hyp	19.6	11.0	3.7
Asp	6.8	8.9	5.0
Thr	3.6	5.1	2.3
Ser	8.4	8.5	7.9
Glu	5.4	7.6	8.1
Pro	10.1	6.8	7.0
Gly	6.1	8.2	37.3
Ala	4.7	6.6	4.8
Val	5.2	5.8	4.9
Met	0.5	0.7	0.4
Ile	2.6	4.1	1.8
Leu	4.3	6.8	2.6
Tyr	5.3	3.6	2.6
Phe	2.6	3.6	1.7
Lys	8.6	6.9	6.4
His	4.1	2.5	1.4
Arg	2.1	3.2	2.2

Fig. 1 Sephadex G-100 gel filtration of fraction extracted from aleurone and endosperm layers with hot water

—○—: glycine molar percentage
—●—: glycine nmol/ml
-----: absorbance at 220 nm

Table 2 Amino acid composition of fractions separated by Sephadex G-100 gel filtration (molar %)

Amino acid	Separated fractions (fraction number)			
	13	21	26	33
Ser	13.5	12.8	11.5	16.7
Glu	9.5	7.9	9.2	11.3
Gly	28.4	50.4	45.0	21.2
Others	48.6	28.9	34.3	50.8

Fig. 2 Plot of molecular weight against elution volume of GRP

1. bovine serum albumin : 2. egg albumin : 3. β -lactoglobulin : and 4. cytochrome c.

で調べたところ、ほぼ単一であるが巾の広いバンドを示した。ゲル濾過後の GRP フラクシヨンのアミノ酸組成は維管束に存在するインゲン⁷⁾やオオムギ⁸⁾の GRP と比べると、セリンが多いことなどで異なっていた。熱水抽出画分のゲル濾過後に再ゲル濾過を行うと、大部分の GRP が担体に吸着したので、精製が進んだ段階では GRP は多糖類への吸着性の強いタンパク質であることが示唆され、その機能に興味もたれる。

3. 要 約

植物細胞壁の構造タンパク質である GRP が大豆種皮に多いと推定されるので、GRP の大豆種皮および付随

組織内分布と組織から分離した GRP の特性について調べた。三つの部位、棚状層および砂時計型細胞、海綿状組織、アリューロンおよび胚乳層に分けると、グリシン含有率はアリューロンおよび胚乳層で高く約 37% を示し、他の部位では非常に低かったので、GRP は種皮ではなくアリューロンおよび胚乳層に存在することが示唆された。アリューロンおよび胚乳層の GRP は 4℃ ではアルカリおよび酸溶液のどちらにも抽出されないが、80℃ 以上の熱水では効果的に抽出された。また熱水抽出残渣にも相当量の GRP が残存すると考えられるので、熱水で可溶化したのは細胞壁の GRP の一部であると推定される。熱水抽出画分を Sephadex G-100 でゲル濾過すると、約 50% のグリシンと約 13% のセリンを含む GRP が分離された。この GRP の推定分子量は約 30 kDa であった。

文 献

- 1) RACKIS, J.J., ANDERSON, R.L., SESAME, H.A., SMITH, A.K. and VAN ETEN, C.H.: J. Agric. Food Chem., 9, 409 (1961).
- 2) DREHER, M.L., WEBER, W., BEMIS, W.P. and BERRY, J.W.: J. Agric. Food Chem., 28, 364 (1980).
- 3) LAMPORT, D.T.A. and NORTHCOTE, D.H.: Nature, 188, 665 (1960).
- 4) LAMPORT, D.T.A.: J. Biol. Chem., 238, 1438 (1963).
- 5) STUART, D.A. and VARNER, J.E.: Plant Physiol., 66, 787 (1980).
- 6) VARNER, J.E. and CASSAB, G.I.: Nature, 323, 110 (1986).
- 7) KELLER, B., SAUER, N. and LAMB, C.J.: EMBO J., 7, 3625 (1988).
- 8) RHODE, W., ROSCH, K., KROGER, K. and SALAMINI, F.: Plant Mol. Biol., 14, 1057 (1990).
- 9) CONDIT, C. and MEAGHER, R.: Nature, 323, 178 (1986).
- 10) 渡辺篤二・斎尾恭子・橋詰和宗: 大豆とその加工 I, (建帛社, 東京), p. 6 (1987).
- 11) 佐藤健司・吉中禮二・佐藤 守・池田静徳: 日水誌, 52, 889 (1986).
- 12) 福田 満: 日食工誌, 35, 83 (1988).

(平成 5 年 5 月 6 日受理)