

Title	発芽時における種子貯蔵蛋白質の変動
Author(s)	原, いくこ
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/24604">https://hdl.handle.net/11094/24604</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

大阪大学理学博士  
学位申請論文

発芽時における種子貯蔵蛋白質の変動

1979年2月8日

原 いくこ

80SC00361

## 目 次

第 1 章	序 論 .....	1
第 2 章	発芽時における子葉細胞中の蛋白質顆粒の形態的变化 および貯蔵蛋白質(種子グロブリン)の局在性 .....	8
第 3 章	カボチャ種子グロブリン	
第 1 節	精製, 特性 および サブユニット構造 (Plant & Cell Physiol. (1976) 17, 799) .....	34
第 2 節	発芽に伴う変化 (Plant & Cell Physiol. (1976) 17, 815) .....	50
第 3 節	Cucurbita 属の他種の種子グロブリンとの比較 およびペプチド鎖成分の性質 (Plant & Cell Physiol. (1978) 19, 237) .....	59
第 4 章	蛋白質分解酵素と貯蔵蛋白質(種子グロブリン)の分解	
第 1 節	未発芽種子中の蛋白質分解活性 ; 種子グロブリンの分解 .....	66
第 2 節	発芽子葉中に出現する蛋白質分解活性 .....	89
参考 総説	カボチャ種子蛋白質 (蛋白質・核酸・酵素 (1976年2月) 別冊, 植物酵素・蛋白質研究法, 465) .....	126
	謝 辞 .....	133

## CONTENTS

Chapter 1.	Introduction .....	1
Chapter 2.	Morphological changes of protein bodies in cotyledon cells during germination and local- ization of storage protein, seed globulin .....	8
Chapter 3.	Pumpkin seed globulin	
I.	Purification, characterization, and subunit structure (Plant & Cell Physiol. (1976) <u>17</u> , 799) .....	34
II.	Alteration during germination (Plant & Cell Physiol. (1976) <u>17</u> , 815) .....	50
III.	Comparison of subunit structures among seed globulins of various <u>Cucurbita</u> species and characterization of peptide components (Plant & Cell Physiol. (1978) <u>19</u> , 237) .....	59
Chapter 4.	Proteolytic enzymes and degradation of storage protein, seed globulin	
I.	Proteolytic activities in cotyledons of ungerminated seeds, hydrolyzing seed globulin .....	66
II.	Proteolytic activities in cotyledons of germinating seeds .....	89
Reference (Review).	A pumpkin seed globulin .....	126
	Acknowledgment .....	133

## 略号

- Sup·I·n ; 発芽 n 日目の子葉からの 2M NaCl と含む緩衝液による抽出液。  
 Sup II·n ; Sup II·n 中の熱安定性成分。  
 sup i·n ; 発芽 n 日目の子葉からの 25mM 緩衝液による抽出液。  
 sup ii·n ; sup i·n と同緩衝液に於し透析した成分。  
 Chx·Sup , Chx·sup ; 5mM シクロヘキシルイミド存在下で吸水させた  
 子葉のりの Sup 及 α<sup>o</sup> sup.
- BAPA ; N-α-ベンザイル-D,L-アルギニン p-ニトロア=リト  
 CM 化 ; カルボキシメチル化  
 pCMB ; p-フロロマーキエリ安息香酸  
 DEAE-セルロース ; ジエチルアミノエチル-セルロース  
 DTT ; ジチオスレイトール  
 EDTA ; エチレンジアミンテトラ酢酸  
 FITC ; フルオレインイソチオシアネート  
 LPA ; ロイシン p-ニトロア=リト  
 β-ME ; β-メルカプトエタノール  
 PAGE ; ポリアクリルアミドゲル電気泳動  
 PMSF ; フェニルメタン スルフォニルフルオリト  
 SDS ; ナトリウム硫酸ナトリウム  
 TCA ; トリフロロ酢酸

# 第1章

## 序論

顕花植物では 内胚乳の初期発芽は 胚に比べて  
 早くから起っており、ごく初期の胚は 成長に必要な栄養分  
 からホルモン様物質に至るまで 胚を完全にとりまわっているこの内  
 胚乳に依存している。胚は内胚乳を消化し、内胚乳の  
 退化に伴って成長する。形態的にも 生化学的にも 発芽が  
 進むと 胚の細胞内では 多種多様な有機物分子を合成す  
 る代謝機構が 活性化されてくる。内胚乳の高い浸透圧が  
 この活性化に役立っているとも言われている。即ち内胚乳は  
 栄養を供給するのみでなく 胚を独立栄養へと誘導する。  
 無胚乳種子では 胚が完全に発芽するまでに 内胚乳の殆  
 どが消化され、その栄養分は 胚の子葉へ移されてしまう。この  
 時期の発芽の中断(休眠)は 胚のこの後の発芽(発芽)に  
 対して必須なものではない。若い胚を培養し 幼植物に成  
 長させた例もある(1)。休眠の原因として考えられているのは  
 種皮として分化しつつある 外側の組織の厚く硬い細胞壁の発達、  
 脱水状態の進行、酸素濃度の低下、また成長を抑える物質  
 (アブサイシン酸など)の蓄積などである。

これらでの胚発芽の間重要な寄与と1つから頂端

分岐組織は 発芽に際して活動を開始する。この分岐組織も  
 胚に印し出して 適当な 培地中で 成長させ、葉を形成させることが  
 できる(2)。分岐組織から 子葉 (無胚乳種子の場合) から 送ら  
 れる 栄養液や エネルギー 源を得て 成長と 続けるのは 初期の 胚が  
 内胚乳と 栄養液として 発芽して いくのと 非常に 似ているように  
 思われる。以上のように 無胚乳種子の場合 物質は 内胚  
 乳から 胚(子葉)へ そして 子葉から 分岐組織へ と 流れていく。  
 有胚乳種子の場合には 内胚乳が 消化し 尽される前に 休  
 眠に入ることが できる。無胚乳種子と同様の 物質の流れ  
 を考える ことが できる。即ち 胚発芽の どの時期で 休眠が  
 始まったか によって 種子の 貯蔵組織も 異なる。

子葉と 内胚乳とは 組織の 起源と 全く 異なっている  
 ものかわらず、貯蔵物質としての 蛋白質は いずれも 細胞中の  
 いくつかの 蛋白質 顆粒中に 存在する。オリーブでは 子葉中の  
 この 蛋白質 顆粒の 微細構造と 発芽に伴って どれほど 融  
 合と 離り 返して 液態へと 変化 する 様子 と について 詳しく 述べる。

貯蔵蛋白質は その 溶解後の 遊離成分として アルブミン、グロブ  
 リン、プロラミン、グルテリンの 4種に 分類されている(3)。この内  
 プロラミンと グルテリンは 穀類の 内胚乳にのみ 存在が 知られているが

プロテリンは種子一般に広く存在しており(4,5), 無胚乳種子の  
 母とほじの 有胚乳種子の内胚乳の外側の アリゾ-ロニ層(6,7)や  
 それに 内胚乳に見い出される(8).

プロテリンはさらに 11S プロテリンと 7S プロテリンの 2つに  
 主に大別される(5). マメ科の種子の場合殆どこの両者と有ら  
 ない(5) 蛋白質と 貯蔵物質とにともなう種子の場合 同時に  
 新種の蛋白質も存在する例が多い. とは3か アサ種子やウリ科  
 種子では 貯蔵蛋白質も 11S 717<sup>0</sup> のプロテリンに限られており,  
 これが全蛋白質含量の 90% 以上を占める(9).

オランダの 1,3 節では カボチャ (Cucurbita sp.) 種子より  
 結晶化により得られた プロテリンの分子量約 60,000 の サブユニット  
 から成り, そのサブユニットは分子量 36,000 あるいは 34,000 の 酸  
 性ペプチド鎖と分子量 22,000 の塩基性ペプチド鎖が S-S 架  
 橋で結合していることを中心に, プロテリン分子自身の性質について  
 議論を進める.

生体内の物質代謝を調べる際に 対象となる物質の種類  
 はかなり広い有利である. 無胚乳種子では ウリ科種子の貯蔵  
 物質は 脂質と プロテリンである. 脂質の代謝については 不  
 飽和脂肪酸, 脂肪酸, シトコリン, サイトラスムで行われ,



エキリ-と供給可能同時に、大部分は最終的に173の糖となつて成糖部へ送られることが明らかになつてゐる。一方蛋白質の代謝に關する知識は少ない。

初稿第2節ではカボチャ (Cucurbita sp.) 種子の7:107:11の代謝中間産物の間、発芽4日目の種子中に大量に蓄積されること、またその限定可解物の溶解度から7:107:11のそれより高くなるとの結果から、7:107:11が限定可解と受けることにより溶けやすくなり、続く可解と受けやすくなつてゐるという基原則の制限に於いて議論してゐる。これはReillyらの報告(10)によつても支持されてゐる。

一方発芽時に子葉に出現する蛋白質可解酵素もエキリ、エト、 $\Lambda$ 7:107:11-で両者共に多数の報告がある(4, 11, 17)。しかしそれらの實際に細胞内で直接貯蔵蛋白質の可解に關与してゐるかどうかについては推論の域と云つて可い。貯蔵蛋白質のこれらの酵素の基質に於いて得たという例は少ない(18, 19)。

貯蔵蛋白質の可解に關与してゐる可解酵素には恐らく複数のエキリ、エト、 $\Lambda$ 7:107:11-のものと云われるが、これらから各々基質である貯蔵蛋白質にどのような順序で作用する。またその各段階でどのような生成物を生ずるかの知識も重要である。この可解過程の調節は、 $\text{Ca}^{++}$ の存在、7:107:11酵素の存在、ホルモンによる合成

の誘導，最終産物におよぶフィード・バック阻害，酵素の量調節性，  
酵素や量調節の局在，pH などにより行なわれる可能性があげられる。

卵黄蛋白質は単なるアミノ酸供給源ではあるが，胚発育の  
段階では分解と受付けに，そして発芽時にはその分解活性と調節が  
から分解生成されるアミノ酸とアミノ酸の形に成長部位に転流し  
新しい量調節合成を行なわせる。一度に量調節の分解が起ると  
量調節阻害が浸透圧で破壊されるのを防ぐためにも分解の調  
節は必要であると考えられる。

オ4章ではカボチャ (*Cucurbita* sp.) 種子のグルタミンの限定  
分解活性が乾燥種子中にも存在するらしい。またこの限定分解  
物に特異的に働く分解酵素が存在するに關して考察している。  
他にもグルタミンに特異的に働く酵素に關しての報告がある(20)  
が，実行は明らかではない。

## References

- (1) V. Raghavan, J. G. Torrey: Amer. J. Bot. (1963) 50, 540
- (2) R. H. Wetmore: Brookhaven Symposia in Biology (1954)  
6, 22
- (3) T. B. Osborne: Amer. Chem. J. (1892) 14, 662
- (4) F. M. Ashton: Ann. Rev. Plant Physiol. (1976) 27, 95
- (5) E. Derbyshire, D. J. Wright, D. Boulter: Phytochem.  
(1976) 15, 3
- (6) Y. Morita, M. Horikoshi: Agric. Biol. Chem. (1972) 36,  
651
- (7) H. S. Dhaliwal: Theor. Appl. Genet. (1977) 51, 71
- (8) R. E. Tully, H. Beevers: Plant Physiol. (1976) 58, 710
- (9) V. Dlouhá, B. Keil, F. Šorm: Coll. Czech. Chem. Commun.  
(1963) 28, 2969
- (10) C. C. Reilly, B. T. O'Kennedy, J. S. Titus, W. E.  
Splittstoesser: Plant & Cell Physiol. (1978) 19, 1235
- (11) C. A. Ryan: Ann. Rev. Plant Physiol. (1973) 24, 173
- (12) A. Tomomatsu, N. Iwatsuki, T. Asahi: Agric. Biol.  
Chem. (1978) 42, 315
- (13) M. Nishimura, H. Beevers: Plant Physiol. (1978) 62, 44
- (14) J. A. Crump, D. R. Murray: Proc. Aust. Biochem. Soc.  
(1978) 11, 26
- (15) M. Abe, S. Arai, M. Fujimaki: Agric. Biol. Chem. (1977)  
41, 893
- (16) K. Preston, J. Kruger: Phytochem. (1977) 16, 525

- (17) I. B. Emseva, M.A. Belozerskii: Biokhimiya (1977) 42,  
560
- (18) B. Baugartner, M. J. Chrispeels: Eur. J. Biochem.  
(1977) 77, 223.
- (19) V. P. Bul'maga, A. D. Shutov: Biokhimiya (1977) 42,  
1983
- (20) P. W. Spencer, R. D. Spencer: Plant Physiol. (1974)  
54, 925

## オ 2 章

### 発芽時における子葉細胞中の蛋白質顆粒の形態的変化 及び貯蔵蛋白質(種子グロブリン)の局在性

---

#### 要約

1. カボチャ(Cucurbita sp.)種子の子葉細胞は稜状( $30 \times 80 \mu\text{m}$ )で、中に卵形( $5 \times 7 \mu\text{m}$ )の蛋白質顆粒が蓄存在していた。電顕観察によると、蛋白質顆粒は封入体としてグロブライド(球晶体)とグリスグロイド(蛋白質結晶体)と各一つずつもっており、限界膜で被われていた。
2. 蛋白質顆粒は種子の吸水後24時間以内に融合を始め、発芽3日目になるとグリスグロイドは次第に小さくなり、逆に周辺のマトリックスは内容物の密度の低下と同時に大きくなっていった。グリスグロイドとマトリックスの境には膜構造はなかった。融合と吸水をくり返して、発芽5-8日目には細胞の大部分を占める液胞へと変化してゆき、マトリックスの内容物もその間をばらばらになっていった。この頃原形質連絡が良く見られた。発芽14日目には液胞にわずかな蛋白質顆粒を残し液胞となった。
4. テイ抗体法によって、カボチャ種子グロブリンの局在を調べたが、乾燥種子の組織は全くテイ光を示さず、発芽子葉のマトリックスにテイ光が見られた。しかしグリスグロイドはテイ光を示さなかった。

はじめに

被子植物の場合 種子の貯蔵蛋白質は 単子葉植物の胚乳やアリュ-ロン層, 双子葉植物の子葉の細胞中の スルガネラ蛋白質顆粒に存在する (1-3). この蛋白質顆粒は直径 1-10 $\mu$ m の球状で 珪入層と 12 グロブレット (球晶層: フィテン酸の高積部位) と グリスタロイド (蛋白質結晶層) を含むものと, 珪入層を全く含まないものがある (4). カボチャ (Cucurbita sp) 種子の貯蔵蛋白質では 11S タイロソグロブリンと 同様の グロブリンと 貯蔵蛋白質として もつものに アサ (Cannabis sativa) 種子や マメ科のブドウ (Phaseolus aureus) や ソラマメ (Vicia faba) の種子がある. 前者の蛋白質顆粒は グロブレットと グリスタロイドと もつ (5) が, 後者の どれは 珪入層と もつないと言われている (6,7). アサ種子の グリスタロイドは 単離されており, イテスタイン (貯蔵蛋白質, グロブリン) から成るだけとされている (5). -オグリスタロイドの周辺のマトリックス部も蛋白質から成ると言われているが 両者の関係は不明である.

発芽種子の蛋白質顆粒については ハウチワマメ (Lupinus luteus) (8) や ソラマメ (9) などについて調べられているが 知見は少ない. 蛋白質顆粒は 発芽に際し融解し, 液胞に分解されている (10).

大豆の胚乳種子の全蛋白質量の90%以上を占めるプロ  
テインの発芽時の分解過程の研究の一環として、発芽子葉細胞内の  
蛋白質顆粒のクリスタロイドとマトリックスを中心に、その蛋白質の存在状態  
の変化を光顕、電顕の両観察で調べた。またプロテインの抗原  
を用いて発芽大豆の子葉組織にT免疫法を試み、プロテイン  
の局在性について検討した。

## 材料と方法

材料: カボチャ (Cucurbita sp., テツカブトナニキン交配種) 種子は タキイ種商株式会社 (京都) より購入した。Paragon は Paracon C. & C. Co. Inc. (Bronx, N. Y.) より、他の試薬は 特級のもは 電顕用を用い、半井化学薬品株式会社 (京都) 及び 和光純薬工業株式会社より購入した。

カボチャ種子 プロテイン 及び その限定分解物  $F_{98}$  の調整は前に詳しく述べた (11, 12)。ただし  $F_{98}$  は  $0.4M NaCl$  と含む  $0.02M$  リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した ウルトロゲル A44 カラムの プロトドウフィー により さらに精製したものを用いた。

電子顕微鏡による観察: 組織片 ( $0.5mm^3$ ) は発芽 0, 1/2, 1, 3, 5, 8 及び 14 日目の子葉の中央部からとった。2% パラホルムアルデヒド, 2.5% グルutaraldehyde, 0.05 M カコミルト緩衝液 (pH 6.7) で 1時間, 次に 2.5% グルutaraldehyde, 20% DMSO, 同緩衝液で 1時間赤固定した後, 2% ナスニウム酸で 3時間後固定した。0.05 M 同緩衝液 で 2時間 組織片を洗った。



後, アセトン・シリーズで脱水し, *m*-フェニルグリセロエーテル-Spurr's  
 のいは ジョロレンチキイト-Spurr's シリーズで樹脂を浸透させ, Spurr's  
 に包埋した (13). 超薄切片を LKB社のウルトラミクロトームでカ  
 ラナイフを用いて作製し, 酢酸ウランとフェニル酸鉛で二重染色した (14)  
 後, JEM 7型 のいは JEM 100-B型 電子顕微鏡で観察した.

光学顕微鏡による観察: 上記と同様の方法を以て作製した包埋組

織片からウルトラミクロトームで  $1\mu\text{m}$  の切片を作製し, KOH-エタノール  
 溶液で樹脂を脱した後, Paragon で染色し オリンパス BHB型 顕微  
 鏡で観察した.

子葉組織をフアン固定後 パラフィン切片を作り, マリヤン  
 色 1 滴と 同顕微鏡で観察した.

抗種子グロブリン血清の調整: 種子グロブリンは  $1\mu\text{g}$  の限定溶解

物 F<sub>02</sub> は 生理食塩水には溶解しないので, 1.5 M 食塩を  
 含む 0.1 M リン酸緩衝液に溶かした (0.25 mg/ml). Freund  
 の完全アジュバント (15) により, ウサギの四肢の指掌部に各  
 0.1 ml ずつ注入し, 2週間後 再び同様の免疫操作を行った.  
 その2週間後 耳静脈より試採血し, 1% アカロ-2 テル (1M  
 NaCl, 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を含む) を用いて Ouchter-  
 long の二重抗原法 (16) により, 充分な抗血清の存在を確認した.

の(図.1), 全検出を行った。

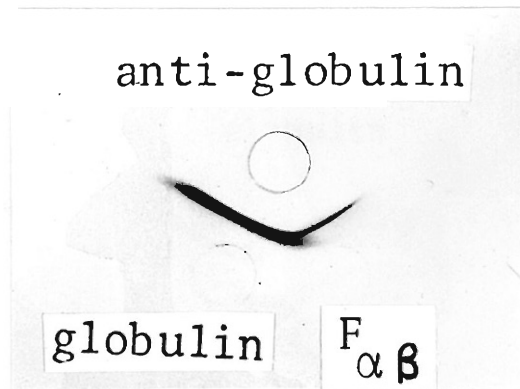


図.1. グロブリンと  $F_{\alpha\beta}$  のゲル内免疫拡散像

アガロースゲル1Pにはグロブリンを溶解させるために  
1M NaCl を含むリニ酸緩衝液を入れた。各抗原  
濃度は  $0.5 \text{ mg/ml}$  である。反応は室温で一晩行った。

免疫蛍光法: 発芽 0, 1, 2, 3 及び 5 日目の子葉より約  $1 \text{ mm}$  の厚さ  
の横断切片をとり出し、2% ホルマリンで、 $0.05 \text{ M}$  カリウムリン酸緩衝液  
( $\text{pH} 6.7$ ) に室温で1時間浸し固定した後、 $4^\circ\text{C}$  の同緩衝液で  
1時間組織片を洗った。Leica社のヒストグリト-ム  $2: 5 \mu\text{m}$  の凍結  
切片をカバーガラス上に作製した。組織を固定せずに凍結融  
解を行うと、細胞内構造が著しく破壊された。

免疫蛍光法は間接法を用いた。種子グロブリンは

いは  $F_{op}$  の抗血清は リン酸緩衝液-玉埋合塩水 (PBS+BSA) で  
 20倍に薄め、アセトンで5分間処理した薄切片と  $20^{\circ}\text{C}$  で18時  
 間一次反応を行なった。対照実験として、各抗血清と過剰の  
 抗原で沈殿させた後の遠心血清 あいはいは正常ウサギ血清と同じ  
 同様の操作を行なった。一般に一次抗血清との反応は  $37^{\circ}\text{C}$  で  
 1時間行なわせるが、この条件では最終的に薄切片には TI  
 光を観察することはできなかった。抗血清と反応させた薄切片  
 は PBS で1.5時間洗った後、FITC 標識抗ウサギ血清 (ヤ  
 ギ) を PBS で15倍に薄めたものと  $37^{\circ}\text{C}$  で1.5時間反応させた。  
 この二次反応後再び PBS で薄切片を洗い 無TI 支 フリセリン  
 (10%の PBS を含む) で取り出し、American Optical Corp 社の TI  
 光顕微鏡で観察した。

一方直接法も次のように試みた。種子アロワリアの  
 抗血清を3回の硫酸処理 (33% 飽和硫酸による沈殿) で精  
 製し、FITC 溶液と  $4^{\circ}\text{C}$  5時間反応させた。過剰の FITC  
 をトルロムで除去後、DEAE セルロース カラムで FITC 標識抗  
 血清を精製し、上記と同様に操作した。TI 光は認められ  
 ない。間接法のとおりいくぶん弱かった。

## 結果

カボチャ種子の子葉細胞は桿状 ( $30 \times 80 \mu\text{m}$ ) で、1つに多数の蛋白質顆粒 (直径約  $5 \mu\text{m}$ ) と もつて (図. 2. C, D). 蛋白質顆粒は脂肪を含みスフェロソームに包みこまれており、内部構造物として グロホイト (図. 2. A) と リスフロイト (図. 2. B) があつた。グロホイトはマトリックス部との境に膜をもつており、固定が非常に難しく脱落する場合が多かつた。一方リスフロイトとマトリックスとの境に膜構造は見られなかつた (図. 4. C).

吸水後 24 時間以内に蛋白質顆粒は融解を始めた。発芽 1, 2 目の子葉細胞の蛋白質顆粒は大半も 2) 付近にあり、内部にリスフロイトが複数個存在しているのが認められた (図. 3.). さらに吸水が続き発芽 5 目になると、リスフロイトの大きさは少し小さくなる程度であつたが、マトリックス部の電子密度が急に低下し、領域も増大した (図. 4). 発芽 8 目では蛋白質顆粒のマトリックス部は内容物が内部から分解され、網目状に残つた像が見られた (図. 5). リスフロイトが残つているものもある (図. 5. B), 融解をくり返して、網目構造も分解されて、わずかな蛋白質を残して液態化した細胞にあつた (図. 5. C, 図. 6. B). 発芽 14 日目になると殆どの細胞が

細胞の大部分を占める液胞(蛋白質顆粒由来)とも、中には電子密度の高い2種の物質が存在している(図.6.A).

このように発芽に伴って子葉細胞の蛋白質顆粒は融合と溶解をくり返して液胞へと変化していく(図.7.). しかしその変化の程度は子葉細胞の存在部位により異なる(図.8.). 蛋白質顆粒の融合や液胞化は維管束の近くの細胞のほど遅かった(図.8.A,B). また表皮や根に近い細胞の蛋白質顆粒の融合、液胞化は中央部の細胞に比べて早く起る.

同じ発芽8日目の子葉細胞の蛋白質顆粒でも、子葉中央部の細胞ではやがて融合が始まる(図.8.C)が、そこから根に至るまでの細胞を順に見ると(図.4.D ⇒ 図.5.B ⇒ 図.8.D), 根に近い細胞では融合、溶解の進行が速いことがわかった. 即ち発芽1~14日の各時期の子葉中央部の細胞の変化は発芽8日目の子葉細胞中で全く観察されることになる. しかし同一細胞内の蛋白質顆粒の状態は殆ど同じであった(図.8.).

発芽5~8日目の子葉細胞の細胞壁にはかなりの頻度で plasmodesm が見られた(図.9.B). また発芽5日目の子葉細胞では細胞壁が破壊され隣接細胞と完全な原形質連絡

1. およそ 内容物の移動の様子が見つかつた (図. 9. A). これら  
 は 貯蔵物質の分解産物の転移に 1 対 1 対応するもの  
 だ.

種子プロファイル及びその限定分解物  $F_{0.3}$  に 対応する 抗原血清を  
 用いて 各発芽段階の 子葉組織に T 抗原分析法を試みれば結果、  
 未発芽種子は 全く T 抗原を示さなかつた (図. 10. A). 発芽子  
 葉の クリスチロイドも T 抗原を示さなかつたが、マトリックス部では  
 のみ T 抗原が観察された (図. 10. B-D).

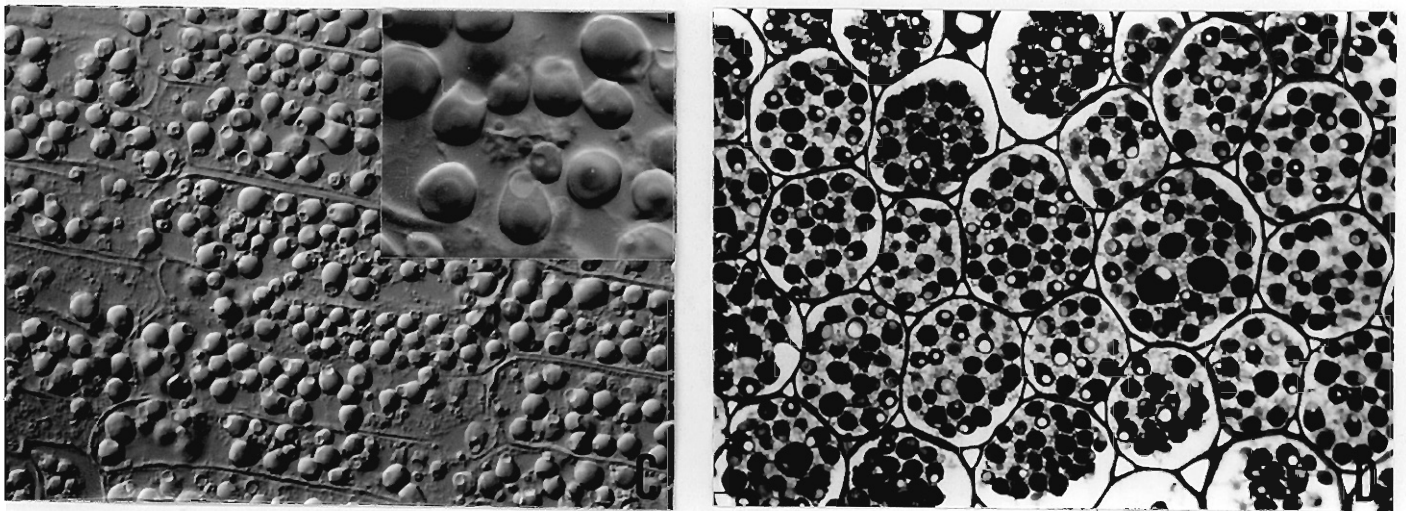
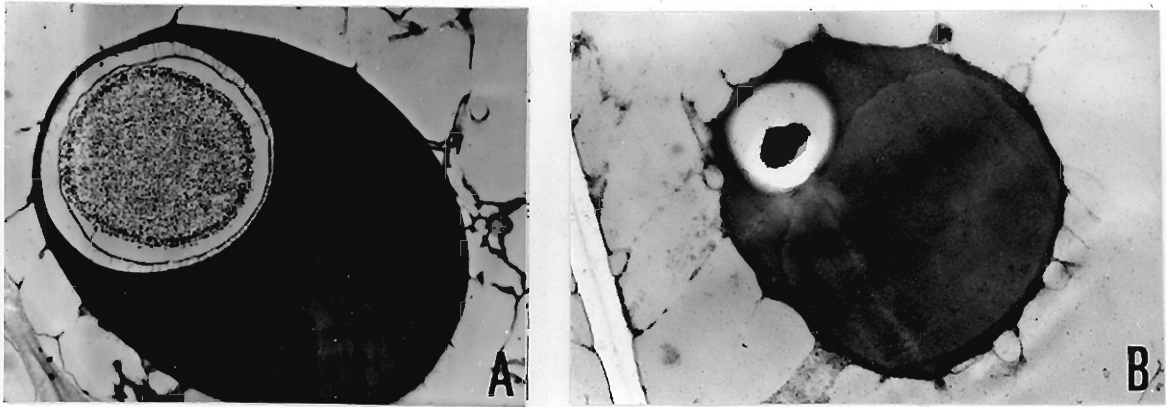


図.2. 乾燥種子の子葉細胞及び蛋白質顆粒.

- A. 典型的な蛋白質顆粒の電顕像. グロブレットとそれと隣接する膜構造が見られる. 組織とエプソールで10日間脱脂した後固定した. 固定法の詳細は本文中. ( $\times 6,500$ )
- B. クリスタロイドと蛋白質顆粒の電顕像. ( $\times 10,000$ )
- C. 子葉細胞の微分干渉顕微鏡像. 桿状の細胞内に多数の蛋白質顆粒が存在している. フォーム固定後のパラフィン切片 ( $\times 660$ ) 石工による拡大像 ( $\times 1,650$ ) である. クリスタロイドとグロブレットが見られる.
- D. 子葉細胞の横断面の光顕像. 固定はフルタルテヒト-オスmium酸による. 脱脂後 Spurr's に処理し,  $1\mu\text{m}$  の切片を作製した ( $\times 660$ )

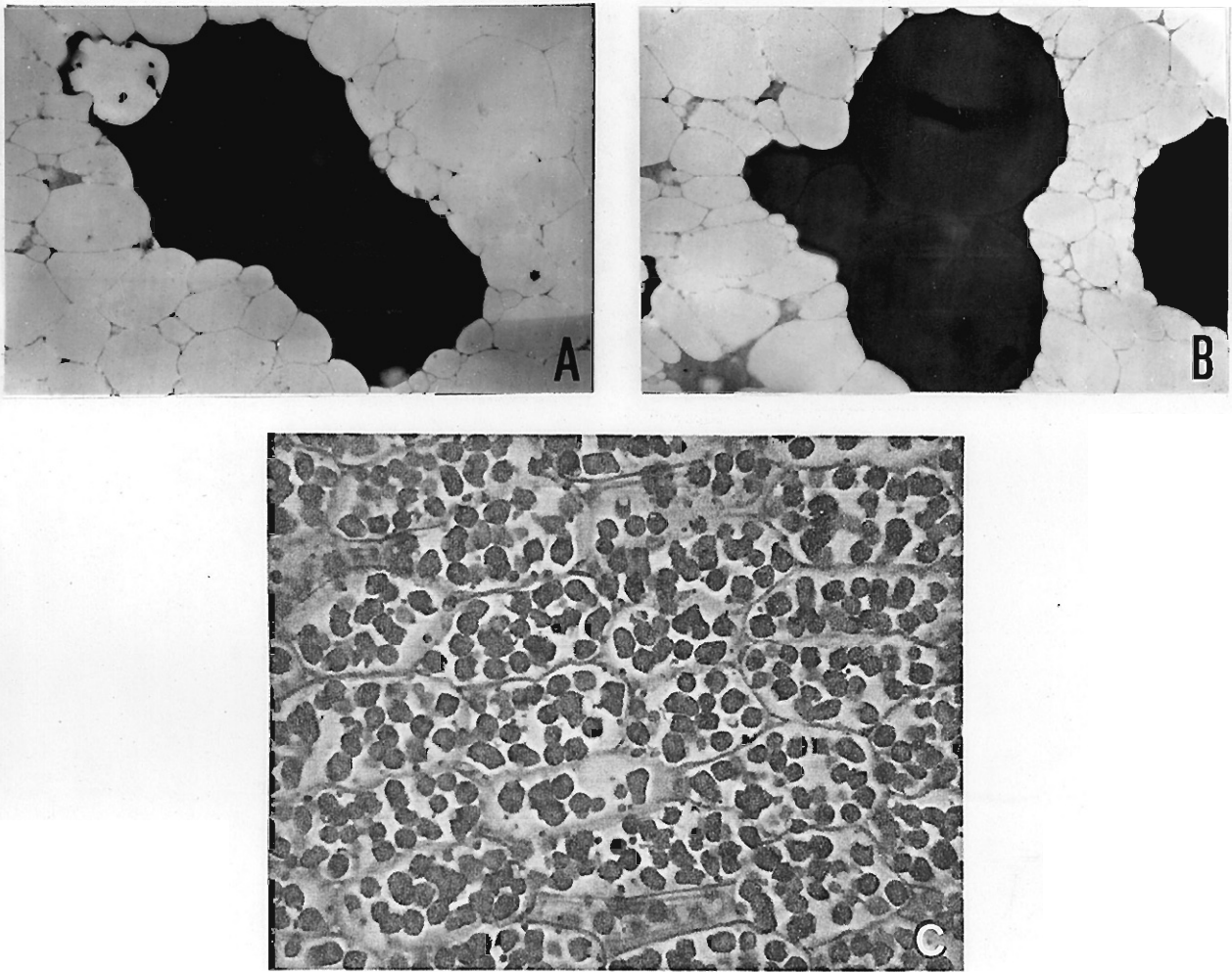


図. 3. 吸水後融合1始めの蛋白質顆粒

A, B. 発芽1日目の融合1た蛋白質顆粒の顕像. 融合1は

Aはクリスタリト2個, Bは4個も2118のかわかる. 周辺は  
スフェロソームである. (x 5,000)

C. 発芽2日目の子葉細胞の顕像. 蛋白質顆粒は融合1

お2種255形と1211. クリスタリトと複数個も2118のか認  
められることもある. 処理は図. 2. C と同じである (x 320)



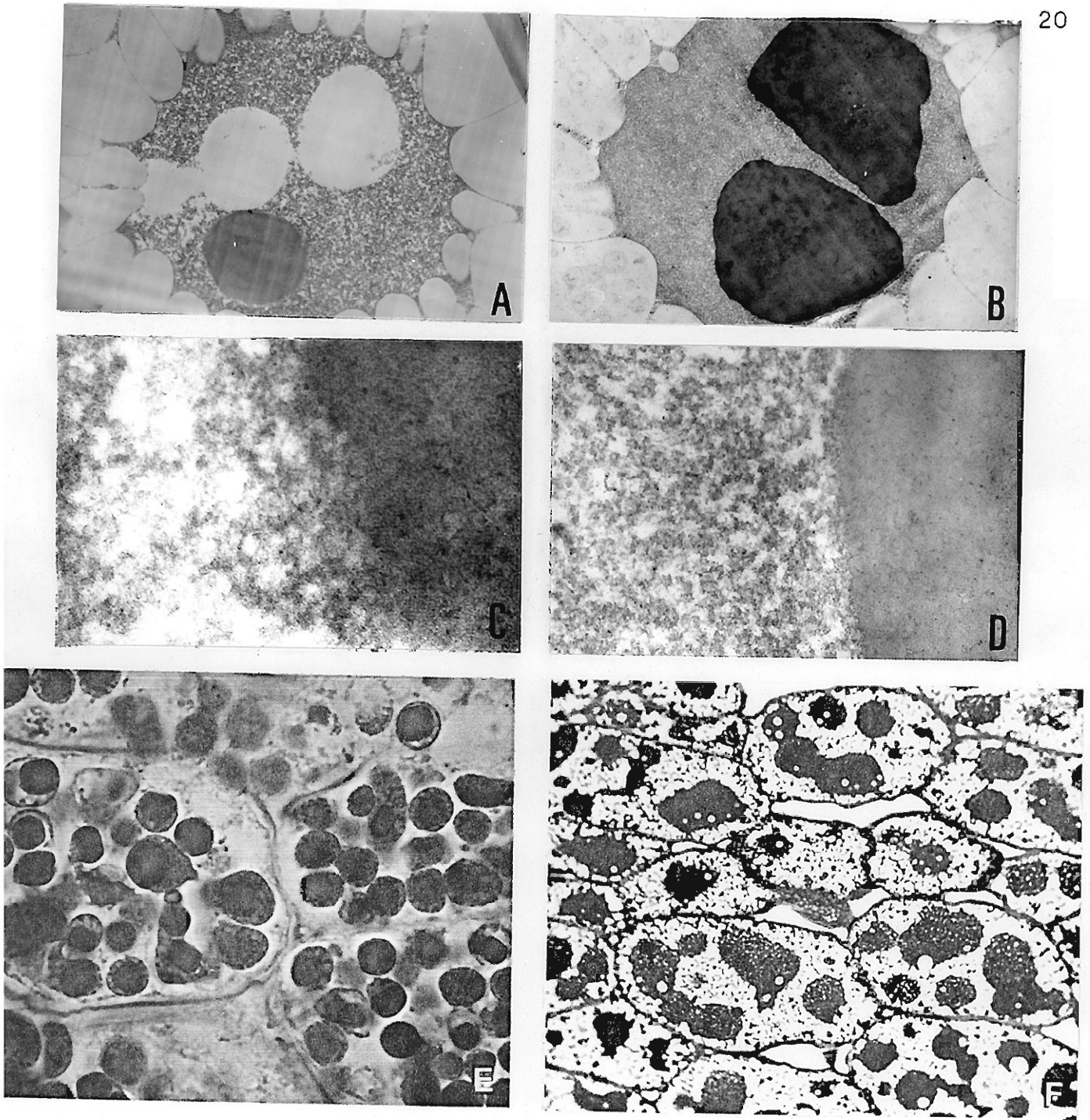


図. 4. 発芽に伴う融合と吸水によりマトリックス部での増大した蛋白質顆粒

A, B. 発芽5日目。蛋白質顆粒の電顕像。未発芽および発芽初期のものに比べて7日経過したものは小さく、マトリックス部は増大した

(A: x5000, B: x8000)

C, D. 7日経過したマトリックス部の拡大図。(x150,000)

E. 発芽8日目。子葉の中央部の電顕像。処理は図. 2. Cと同じ。(x800)

F. 発芽5日目。子葉細胞の電顕像。処理は図. 2. Dと同じ。(x660)

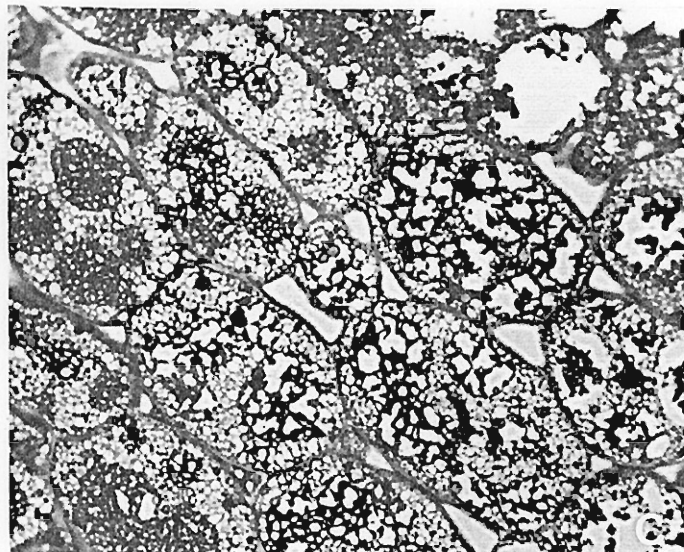
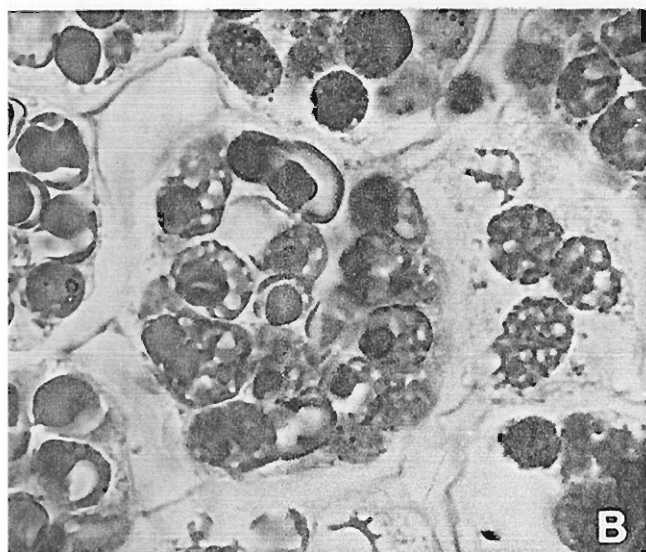
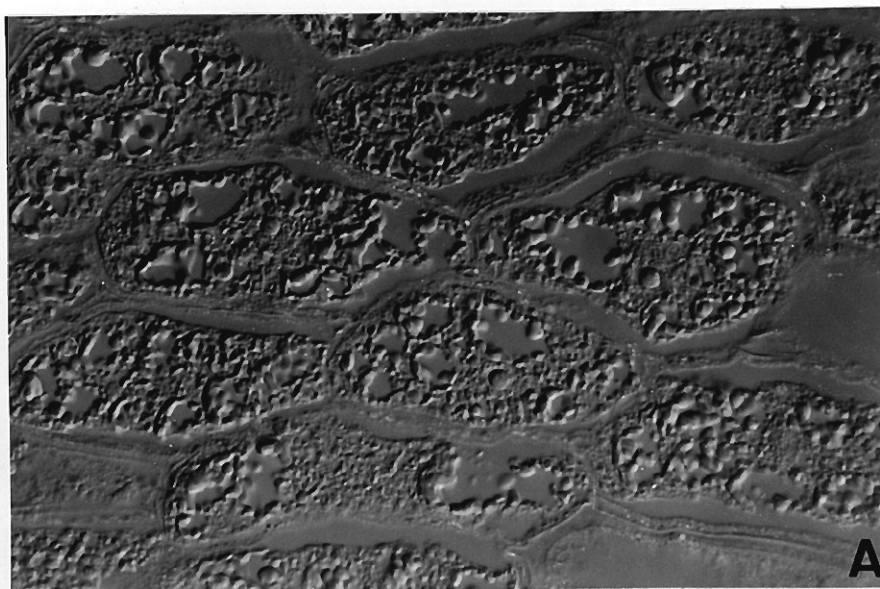


図.5 発芽8日月の子葉細胞: マトリックス部分の内部から網目状に分解された蛋白質顆粒.

A. 微万干涉顕微鏡像. 処理は図.2.Cと同じである. (x 660)

B. 光顕像. 処理は 図.3.C と同じである. (x 800)

C. 光顕像. 処理は 図.2.D と同じである (x660)

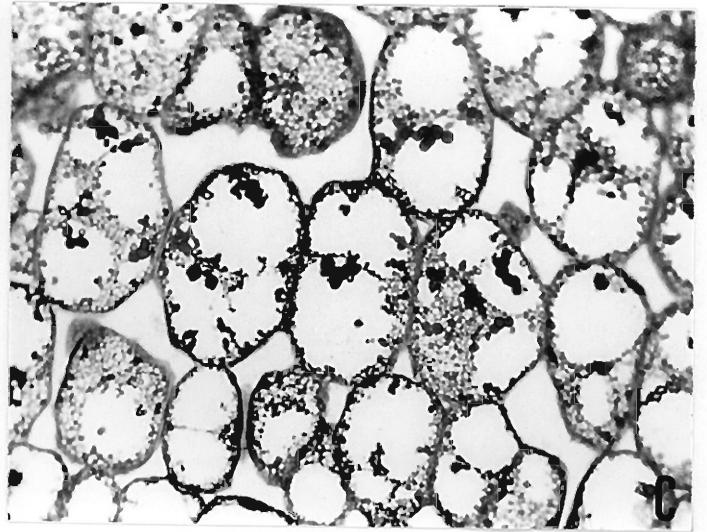
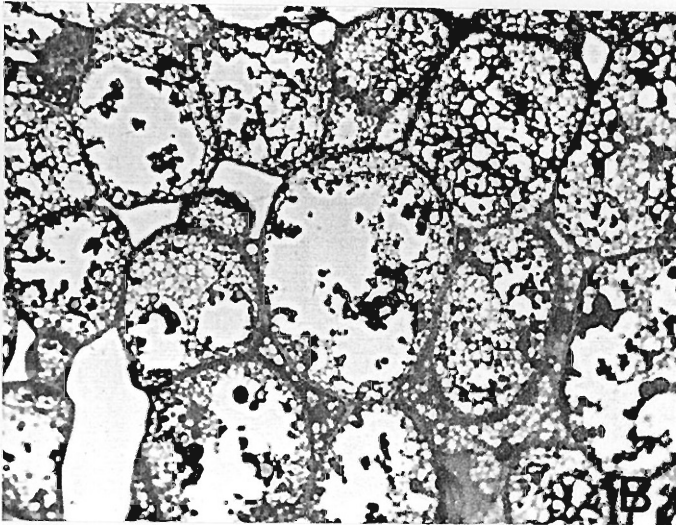
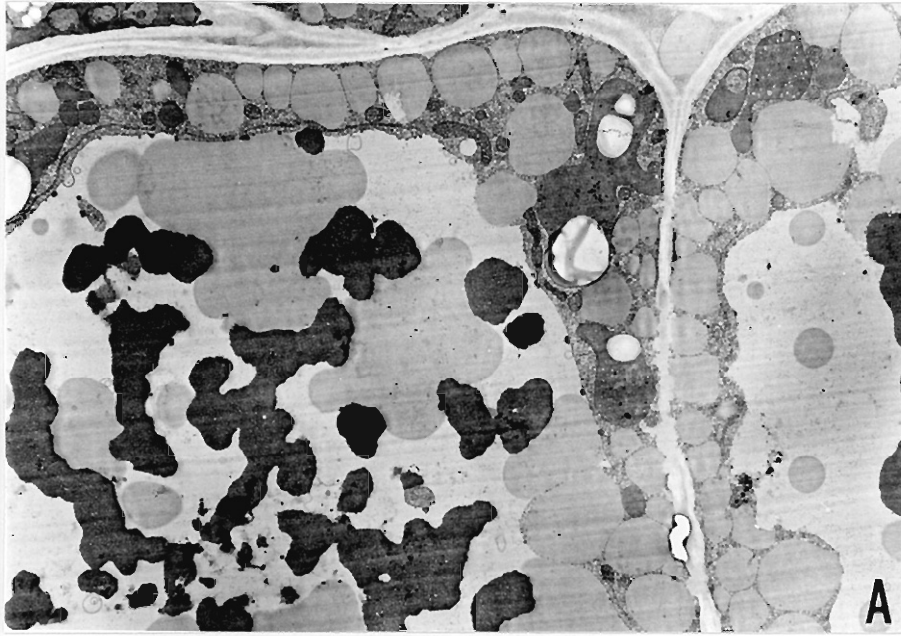


図.6. 蛋白質顆粒肉素の液胞

- A. 発芽14日目の子葉細胞の電顕像。液胞内に発芽後の増分の塊状の物質が貯蔵。細胞壁にも変化が見られる。細胞間隙にも7Sとリソソーム様の顆粒が見える。(×4,000)
- B, C. 発芽8日目の子葉細胞の電顕像。細胞により液胞化の進行度が異なる。処理は図. 2. Dと同じ。(×660)

## Protein Body Degradation

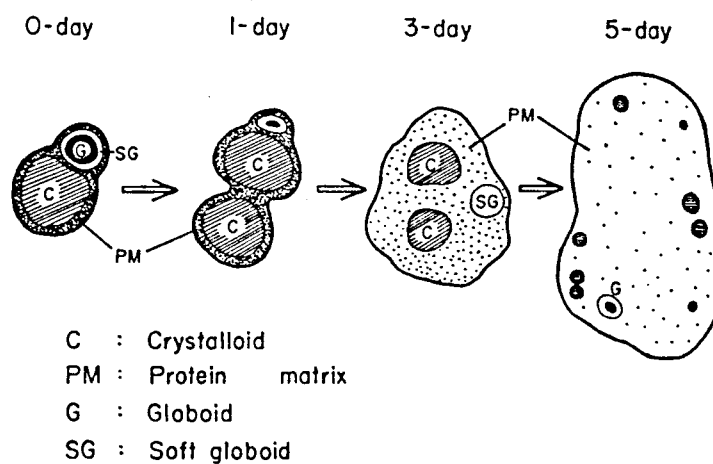


図.7. 発芽に伴う蛋白質顆粒の融合と分解の過程の  
模式図.

発芽1日以内に蛋白質顆粒は融合を始め、3日目には吸水が進みマトリックス部は増大し、内容物の密度は低下してくる。さらに融合、吸水をくり返し、同時にクリスタロイドの分解も進行して発芽5日目くらいから液態化していく(図2.~図.6より)

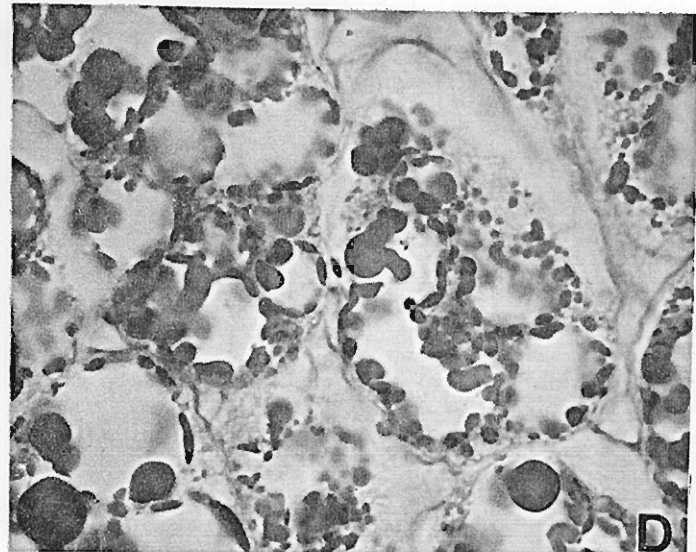
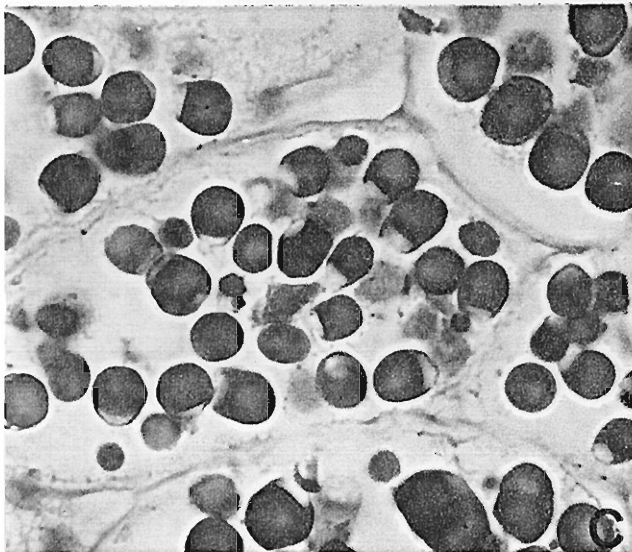
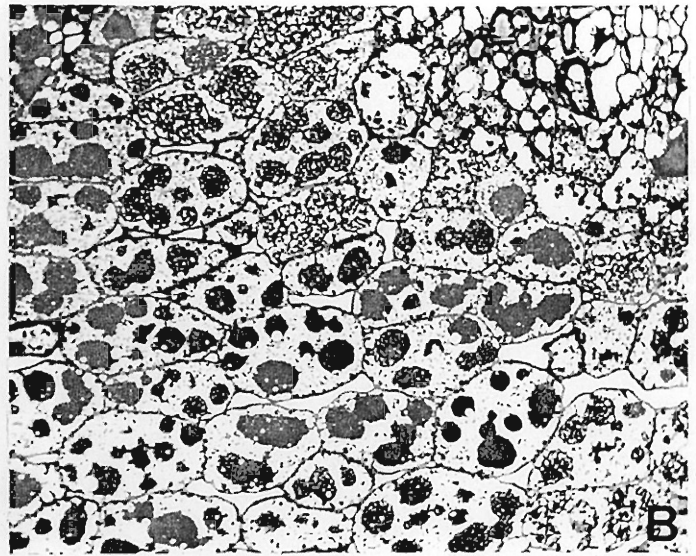
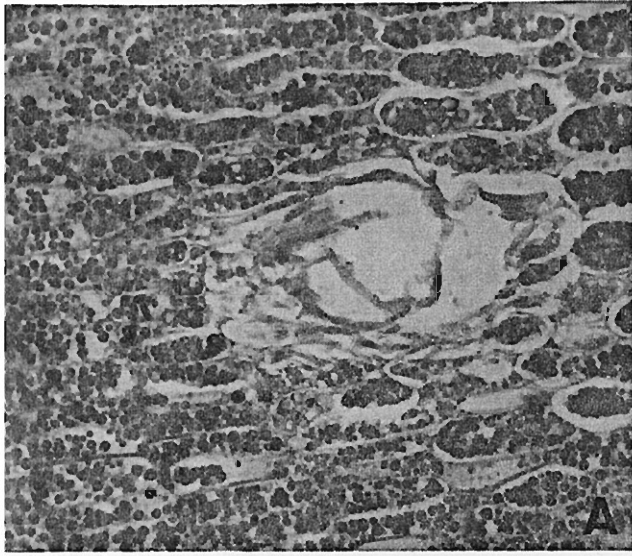


図. 8. 細胞内の存在部位 による分解後の異なる蛋白質顆粒.

- A. 発芽3日目の維管束附近の子葉細胞の走査像. 維管束に近い細胞の蛋白質顆粒の崩壊が速い. 処理は図. 2. Cと同じである.(x320)
- B. 発芽5日目の子葉細胞の走査像. 維管束(右)に近い細胞の蛋白質顆粒の液胞化がすでに始まっている. 処理は図. 2. Dと同じである.(x660)
- C, D. 発芽8日目の子葉細胞の走査像. Cは子葉の中央部の細胞, Dは根に近い細胞である. 処理はAと同じである.(x800)

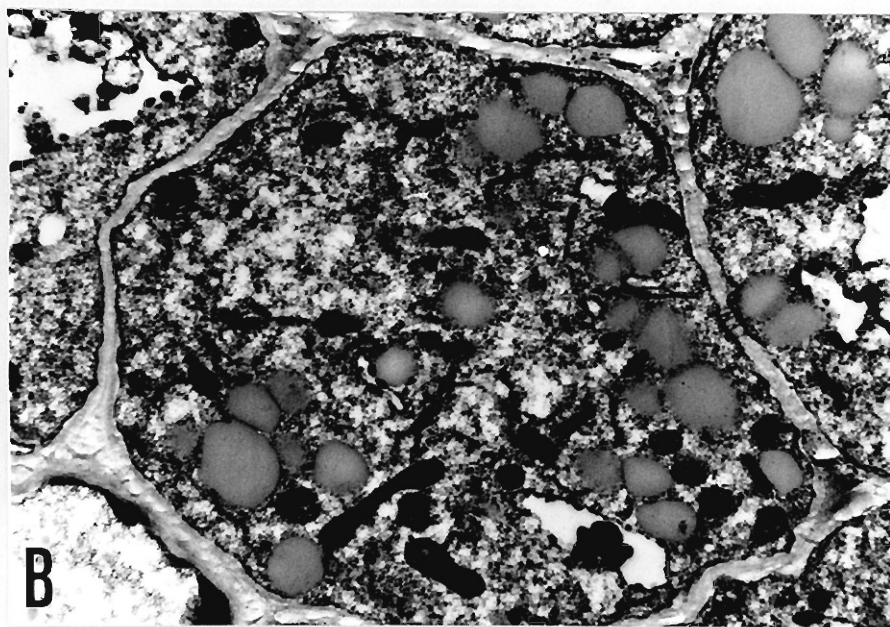
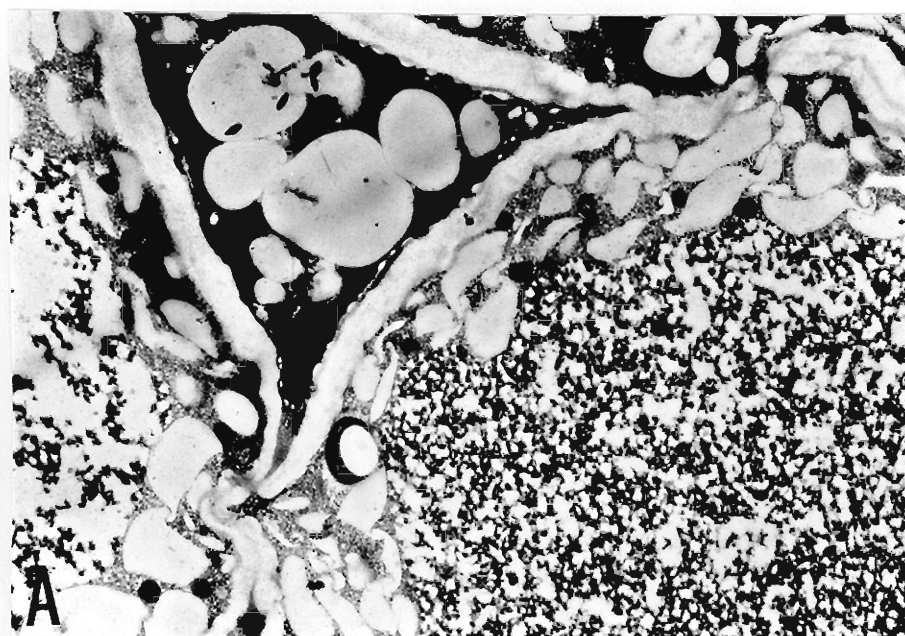


図. 9. 発芽途中の子葉細胞の多形復連絡

- A. 発芽5日目の子葉の電顕像。細胞壁が破壊され内容物の移動が見られる。細胞間隙にも若干密接の若い物質が形成している。右下細胞の大部分を占めるものは、腐蝕によりほとんど量目質顆粒。(×6,600)
- B. 発芽8日目の子葉の電顕像。右側細胞壁に plasmodesma が観察される。量目質顆粒はわずかな量白粒を残して液胞化している。(×4,200)

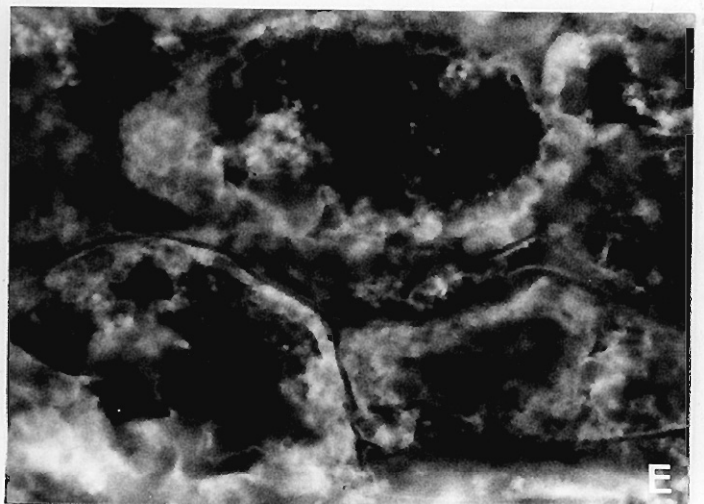
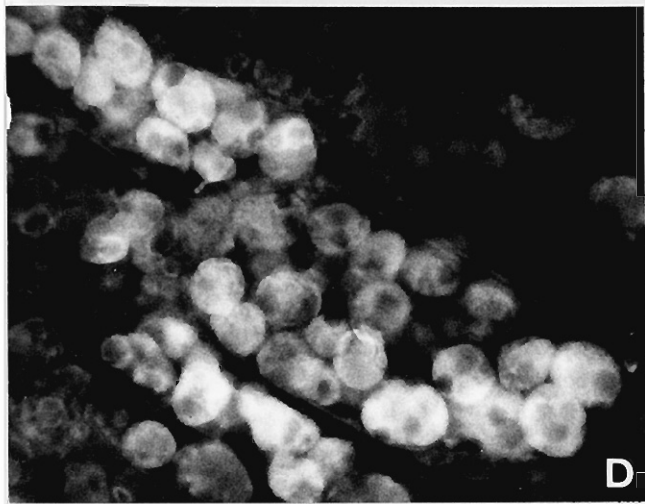
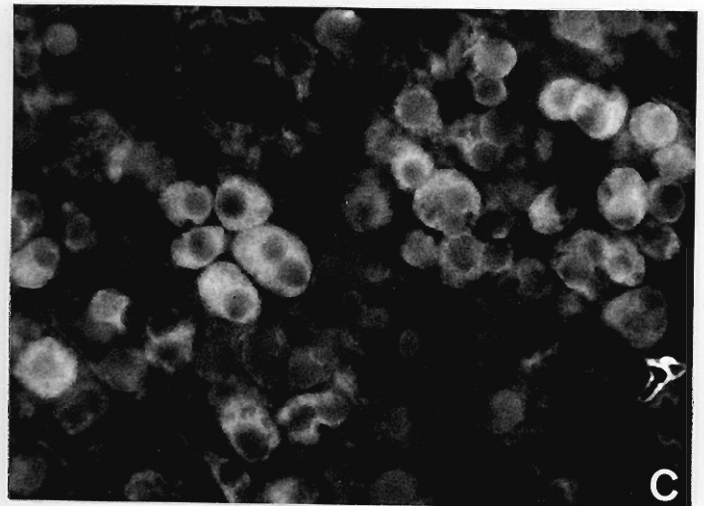
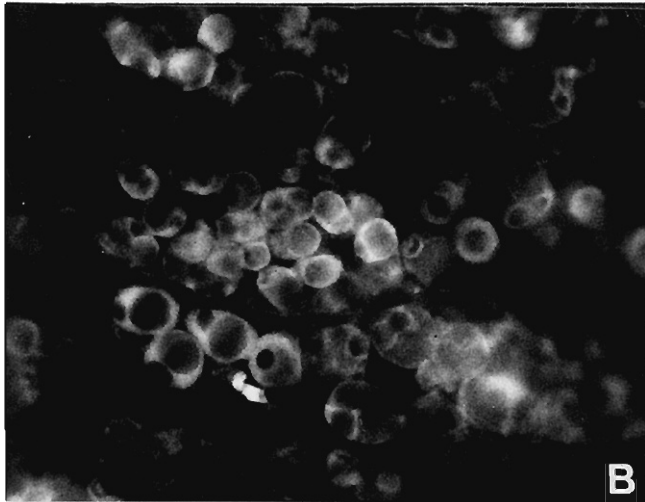
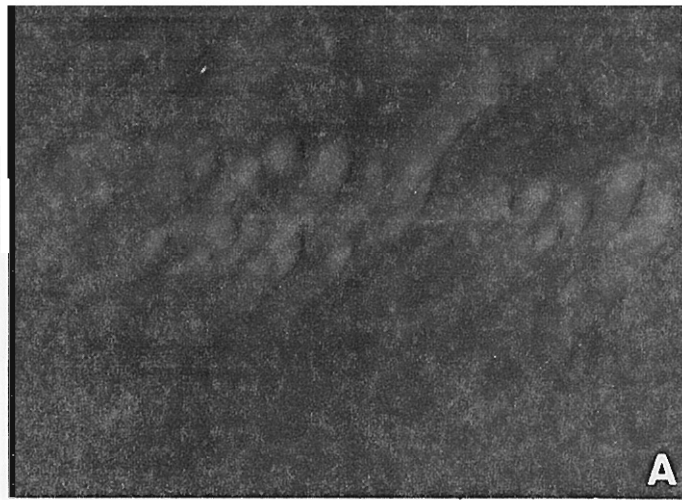


図.10. 各発芽子葉組織の T1 免疫抗体法

A. 正常ウサギ血清と一次抗体とに用いた対照。乾燥種子の組織も同じく T1 免疫を全く示さなかった。

B, C, D, E は 各々 発芽 2, 3, 3, 5 日目の子葉組織。

いずれも 組織を 7-10% ホルマリンで固定後、5 $\mu$ m の凍結切片を作製して、(x750)

## 考察

カボチャ種子の子葉細胞の蛋白質顆粒は Lott の グリス  
 エッチング法による結果 (17) と同様に グリスタロイドと グロブリン  
 各2つとその周辺をとり囲むマトリックス層とから成っている。  
 これは典型的な蛋白質顆粒の形である。一般に蛋白質顆  
 粒は単に膜に囲まれていると言われているが、限界膜程度の  
 しか観察できなかった。 グロブリンは P や K を多量に含む  
 のが証明されており (18)、フィテン酸の蓄積部位であるが、  
 固定が難しく切片作製の際に脱落する場合がある。

グリスタロイドには貯蔵蛋白質の結晶状態が存在している  
 ことがアサ種子 (5) やヒマワリ種子 (19) によって知られている。カボチャ  
 種子の場合も間接的にはあるが、オ1に主要貯蔵蛋白質で  
 あるグロブリンの消滅遅延 (12) とここで観察されたグリスタロ  
 イドの消滅遅延 (12) はほぼ同じである。オ2に乾燥種子の重量  
 の約 25%、すなわち全蛋白質量の 90% を占めるグロブリンの存在  
 場所としては乾燥種子のマトリックス層は小まらざるを  
 得から、グリスタロイドはグロブリンが存在していると考えられる。オ3の  
 種子グロブリンの抗14.1によるT1支抗14.1法ではグリスタロイド  
 は全くT1支とまらざる、然るに2日目以降のマトリックス層にのみ



T1光で見られた。クリスタロイドはT1光を透過するが、その1/2  
 分にはクリスタロイドはT1光を阻害する物質である。オ2にはフルクトー  
 ール固定処理により抗14.00入りになるが、オ3にはフルクトー  
 ール非常に密に詰められた状態でクリスタロイドを形成し、その後の  
 抗14.00反応は起り得るが、その原因は考えらる。  
 植物材料にT1光抗14.00と適用した例はほとんどなく、今回  
 も常法通りではT1光を観察可能な状態にするが、反応時間と長  
 くと初めマトリックス部分にT1光を認められた。固定処理を行  
 った際には凍結切片を下げると細胞内構造が破壊されるなど  
 技術的に改善されたおぼろげな結果も報告されている。

オマトリックス部分のT1光を透過する体にはついては、電  
 顕観察でクリスタロイドとマトリックスの間には特に膜構造の  
 違いは認められなかった。またクリスタロイドは水  
 溶液中で単離されるのは不溶性であるので、マトリックス側には  
 出現した酵素による一部分解を受け、フルクトーールはクリスタ  
 ロイドの結晶構造から分解され、マトリックス側に移行したと考えら  
 れる。即ち乾燥種子のマトリックスにはそのよりの蛋白質  
 が存在するのかわからないが、発芽後のマトリックスはフル  
 クトーールの分解産物に占められているのであろう。

蛋白質顆粒は 吸水 24 時間以内に融解と始めるとの  
 大なり、クリストイドもプロポイドも複数個もつたくなる。クリ  
 ストイドは 1 個に 1 個に 周辺から消化される、一方マトリックス部  
 分は蛋白質顆粒の吸水による膨張に伴って広がり、蛋白質は  
 周辺からではなく 内部から溶解を受け 網目状の構造からなる  
 ため、これも やがて殆ど溶解されて わかかな蛋白質粒を残  
 した細胞の大部分を占める液態になる。仮りに溶解酵素  
 が蛋白質顆粒外から吸水と同時に移って来たとしても、マトリ  
 ッスの蛋白質成分は 周辺から溶解を受けるといわれる。蛋  
 白質顆粒の内部からの溶解は (Pisum sativa) (20) や (Vicia  
faba) (9) などで見られる。また蛋白質顆粒中に蛋白質  
 溶解酵素の存在が認められている例もある (5, 21, 23)。カボチャ  
 (Cucurbita sp.) 種子の グロブリンは 元素不溶性であるが、  
 発芽途中で限定溶解を受け 溶解後と増量とがわかる (12)。  
 また 乾燥種子に グロブリンと限定溶解酵素 I 及びその限定  
 溶解物  $F_{op}$  は 特異的に働く溶解酵素 II の存在について、  
 その局在は不明であるが、才 4 巻で議論をなさる (21)。  
 これらの溶解活性の 知見と 考へ合わせると、特に クリストイ  
 ドを形成している グロブリンは 吸水によって 賦活化された

リッファス側(II)の酵素Iにより限定分解物  $F_{n3}$  を生じ、 $F_{n3}$  はア  
 ロカリニに比べて溶解度が高いので、マトリッファス側へ拡散して  
 ゆき、珪肥的に働く分解酵素IIの作用で、小分子アミノ酸  
 アミノ酸を生じ、この結果蛋白質顆粒の浸透圧は増加して、  
 さらに吸水を促す。以上のように考えられる。実際  
 潜在酵素の活性化か、どのような機構で起るのか、またどの  
 段階までの分解が蛋白質顆粒内で起るのかという点につい  
 ては不明であるが、発芽途中の貯蔵蛋白質の分解機構と考える  
 べき興味ある問題である。発芽途中で出現するいくつかの酵素が  
 これらの分解産物の続く分解を助けると可能性もあるが、最終  
 産物は王長節へへと転流される。

発芽子葉細胞間には多くの plasmodesm が観察される。特に  
 発芽5日目の細胞では完全な三角形連絡が見られ、その  
 一部が移動していくつか認められた。これらの細胞間  
 隙には電子密度の高い物質が存在している。このようなパ  
 ーは光顕でも認められた。Briaty らも (*Vicia faba*) で  
 原形質膜の陥入がしばしば見られることを示し、細胞間隙  
 に電子密度の高い物質が存在する(テ-71は示していない)ことに関  
 してその機能は不明であるが、物質の輸送と関連している

のことはなにかと論じている(9)。しかし原形質の完全な連絡が観察された例は基本組織系では他にない。

蛋白質顆粒の構造変化は維管束、根、あるいは表皮に近い細胞ほど早く進行した。これは吸水の起りやすい細胞から先に内部の蛋白質の分解が始まっていくためであろう。

## References

- (1) F. M. Ashton: *Ann. Rev. Plant Physiol.* (1976) 27, 95
- (2) 深沢親房, 宇高京子: *蛋白質・核酸・酵素* (1978) 22, 1320
- (3) J. Pernollet: *Phytochemistry* (1978) 17, 1473
- (4) T. L. Rost: *Amer. J. Bot.* (1972) 59, 607
- (5) A. J. St. Angelo, L. Y. Yatsu, A. M. Altschul: *Arch. Biochem. Biophys.* (1968) 124, 199
- (6) N. Harris, M. J. Chrispeels: *Plant Physiol.* (1976) 37, 229
- (7) C. J. Bailey, A. Cobb, D. Boulter: *Planta* (1970) 95, 103
- (8) F. Młodzianowski: *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* (1978) 86, 1
- (9) L. G. Briarty, D. A. Coult, D. Boulter: *J. Exp. Bot.* (1970) 21, 513
- (10) M. S. Buttrose: *Aust. J. Biol.* (1963) 16, 305
- (11) I. Hara, K. Wada, S. Wakabayashi, H. Matsubara: *Plant & Cell Physiol.* (1976) 17, 799
- (12) I. Hara, K. Wada, H. Matsubara: *Plant & Cell Physiol.* (1976) 17, 815
- (13) A. R. Spurr: *J. Ultrastruct. Res.* (1969) 26, 31
- (14) E. S. Reynolds: *J. Cell Biol.* (1963) 17, 208
- (15) J. Freund: *Ann. Rev. Microbiol.* (1947) 1, 291
- (16) O. Ouchterlony: *Progr. Allergy.* (1962) 6, 30
- (17) J. N. A. Lott, P. L. Larsen, J. J. Darley: *Can. J. Bot.* (1971) 49, 1777

- (18) J. N. A. Lott: Plant Physiol. (1975) 55, 913
- (19) R. E. Tully, H. Beevers: Plant Physiol. (1976)  
58, 710
- (20) J. M. Bain, F. V. Mercer: Aust. J. Biol. Sci.  
(1966) 19, 69
- (21) C. A. Adams, L. Novellie, N. V. W. Liebenberg:  
Cereal Chem. (1976) 53, 1
- (22) T. N. Koreleva, M. V. Alekseeva, A.D. Shutov,  
I. A. Vaintraub: Sov. Plant Physiol. (Engl. transl.)  
(1973) 20, 650
- (23) G. F. I. Morris, D. A. Thurman, D. Boulter:  
Phytochemistry (1970) 9, 1707

### Chapter 3

*Plant & Cell Physiol.* 17: 799-814 (1976)

#### **Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin I. Purification, characterization, and subunit structure**

Ikuko Hara, Keishiro Wada, Sadao Wakabayashi, and Hiroshi Matsubara

Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka 560, Japan

(Received April 9, 1976)

A heat stable globulin present in the cotyledons of pumpkin seeds was prepared as crystals which were soluble in a dilute saline solution below pH 4.5 or in a solution with a high ionic strength at neutral pHs. The protein was nearly homogeneous by ultracentrifuge analysis, and had a molecular weight of about 112,000 daltons. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis separated the globulin into two subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , corresponding to molecular weights of about 63,000 and 56,000 daltons, respectively. By reduction of disulfide bonds, the two subunits were each separated into two polypeptide chains with molecular weights of around 36,000 and 22,000 daltons, judged by gel electrophoresis. The amino acid composition of whole globulin indicated high contents of arginine, glutamic acid and aspartic acid. The total number of half-cystine residue was nine and only one residue was shown to be free. The subunit structure of the globulin is discussed. The protein has been shown to have oxaloacetate decarboxylase activity, and this fact was confirmed. However, the activity decreased markedly at pH 4.5 in a fairly short period. It did not require  $Mn^{++}$ , and the  $K_m$  for oxaloacetate was determined to be 4.1 mM.

The germination process of plant seeds is one of the most important biological events. This process begins just after water uptake by the dormant seeds, and includes various complicated physiological changes to develop the hypocotyledon and root. Among the changes in seeds during the very early germinating stage (awakening step) the most prominent one is probably the degradation of reserves to supply the necessary materials and energy to active sites. It has long been known that dicotyledonous seeds, especially those with a high protein content, have various globulins as so-called storage proteins, mostly in crystalline forms (1). The characterization, metabolism, and synthesis of the proteins present in various stages of developmental and germination processes have been extensively studied (9, 11, 18) but still far more detailed experiments are necessary to understand the events, germination as well as development.

In order to understand the early germination process we focussed our attention on the changes in storage proteins. As a typical storage protein, the crystalline pumpkin globulin was chosen, because early workers found that it existed in a large

Abbreviations: SDS, sodium dodecyl sulfate; pCMB, *p*-chloromercuribenzoate; A-buffer, 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.0, containing 2 M NaCl; PE-cysteine, S- $\beta$ -(4-pyridylethyl)cysteine; DEAE-cellulose, diethylaminoethylcellulose.

quantity, at least 25% of total weight in seed cotyledons (20), it was heat stable and easily crystallized (30), it was extensively and rapidly broken down during the early stage of germination (8), some proteolytic enzymes degrading this storage protein have been isolated and the effects of hormones studied (2, 26, 28), and it must be rapidly accumulated during maturation of the seeds as reported in other seed globulins (14). It was also reported that the globulin had oxaloacetate decarboxylase activity (29) and that it was digested by a bacterial protease, and the susceptibility of this protein was related to stages of the germination process (Tagawa, personal communication). Further, the metabolic systems of amino acids released from pumpkin seeds during germination (22) and the amino acid composition of the globulin (8) have recently been reported. The composition was also reported by Smith and Greene (24).

The investigation of structure and mechanism of degradation of the globulin during germination must contribute to a better understanding of the process. This paper describes the purification and characterization of the pumpkin seed globulin, and the following paper will describe the alterations in the protein during germination, and further studies of the structure of the protein molecule.

#### Materials and methods

**Materials:** Pumpkin (*Cucurbita* sp., hybrid, Tetsukabuto-nankin) seeds, cucumber (*Cucumis* sp.) seeds, and watermelon (*Citrulus* sp.) seeds were purchased from Takii Seed Co. (Kyoto). EDTA, Na-oxaloacetate, sodium dodecyl sulfate (SDS),  $\beta$ -mercaptoethanol, *p*-chloromercuribenzoate (pCMB) and other chemicals were reagent grade and purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka) and Nakarai Chemicals, Ltd. (Kyoto).

**Procedures for isolation, purification and crystallization of pumpkin seed globulin:** The isolation and crystallization procedures for seed globulin was exactly the same as that reported in 1941 by Vickery et al. (30). After removal of seed coats, about 10 g of the seeds were ground in a mortar and stood overnight at room temperature with 30 ml of 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.0, containing 2 M NaCl (A-buffer). The mixture was centrifuged and the supernatant solution was heated at 80°C for 10 min. After centrifugation, the supernatant solution was diluted with a 4 fold volume of deionized water at 60°C. With gradual cooling of the solution crude crystals appeared. The crystals were collected by centrifugation and dissolved in the A-buffer. The second crystals were obtained after dilution of this solution as mentioned above. The crystallization procedure was repeated several times and finally about 300 mg of purified crystals were prepared. Three other preparative methods were also carried out as follows. (a) To avoid proteolysis during extraction, the heat treatment (80°C, 10 min) was carried out before standing the mixture of ground seeds with the A-buffer overnight. (b) The extraction of globulin was carried out with the A-buffer containing 1.1 mM pCMB. (c) Instead of dry seeds the maturing seeds in fruits were used as the starting material.

**Purity and molecular weight determination:** The purity of the crystalline globulin was analyzed by the sedimentation pattern in the Spinco model E ultracentrifuge with a protein concentration of 0.56% in the A-buffer at 20°C and 40,000 rpm. The sedimentation coefficient of the globulin at infinite dilution,  $S_{20,w}^{\circ}$ , was



calculated for various concentrations of the protein from 0.1 to 0.56%. The molecular weight was determined by the sedimentation equilibrium procedure (36) at 20°C and 4,800 rpm in the same solvent as above.

*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis:* SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was carried out in principle according to the method of Weber and Osborn (34). The flat type gels were used as Wada and Snell described (32). The gel slab, 14.3 × 10 × 0.1 cm, was polymerized with 7.5 or 10% of acrylamide using N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine and ammonium persulfate, and soaked overnight in 0.1 M Tris-acetate buffer, pH 8.2, containing 0.5% SDS. The reservoir buffer was 0.05 M Tris-acetate containing 0.5% SDS. Samples with or without prior reduction by 1% β-mercaptoethanol were dissolved in 0.025 M Tris-acetate buffer containing 1% SDS and heated at 100°C for 1 min to make the SDS-protein complex. Electrophoresis was carried out at 25 mA and ca. 150 v for 2–3 hr at 20°C. The gels were stained overnight with 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 in a mixture of 30% methanol and 10% trichloroacetic acid, and then destained with a mixture of 7% acetic acid and 30% methanol. After destaining, the gels were scanned at 570 nm by a Fuji Riken Densitometer, Type FD-A IV.

*Two-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis:* A 10% gel slab was prepared as described above, except that a groove, 0.2 × 0.2 × 0.1 cm, was made at a corner about 1.5 cm off from the two edges of the slab. After the sample was applied in the groove with bromophenol blue, an internal standard, the first dimensional electrophoretic run was conducted at 25 mA for 3 hr. The gel slab was then dipped in the gel buffer with 5% β-mercaptoethanol for 30 min in order to split disulfide bonds in the protein. The second run was successively carried out at a right angle to the first at 25 mA for 2.5 hr. The conditions for staining, destaining etc. were as described above.

*SDS-hydroxylapatite chromatography:* Hydroxylapatite and brushite (27) were used for SDS-hydroxylapatite chromatography according to Moss and Rosenblum (19). The globulin (4 mg per ml, in 0.01 M Na-phosphate buffer, pH 6.4, containing 1% SDS) was boiled in a water bath for 2 min to make the SDS-protein complex, and dialyzed against 0.01 M Na-phosphate buffer, pH 6.4, containing 0.1% SDS overnight. The column (1.4 × 25 cm) made of a mixture of hydroxylapatite and brushite in 3 to 7 ratio (w/w) was washed with a buffer containing 0.1% SDS and 2 ml of protein solution were loaded on it. A linear gradient was performed between 50 ml of 0.3 M and 50 ml of 0.5 M Na-phosphate buffer containing 0.1% SDS. The flow rate was 10 ml per hr and each fraction (1.5 ml) was monitored at 280 nm. Aliquots of the main fractions were dialyzed against 0.025 M Tris-acetate buffer, pH 8.2, containing 1% SDS for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The remainders were dialyzed against water and lyophilized for analysis of amino acid composition and N-terminal amino acid residues.

*DEAE-cellulose chromatography:* A DEAE-cellulose column (2.6 × 40 cm) was equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 6 M urea. About 40 mg of carboxymethylated globulin (7) were dissolved in 4 ml of the equilibration buffer and loaded on the column. After passing 20 ml of the equilibration buffer through the column, a linear gradient elution was performed between each 190 ml of the equilibration buffer and the same buffer containing 0.6 M NaCl at a flow rate of 10 ml per hr at room temperature. Each fraction (2 ml) was monitored at 280 nm.

After dialyzing against water and lyophilization, the main fractions were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and amino acid analyzer.

*Analysis of amino acid composition:* Amino acid composition was determined by a Beckman analyzer, 120 B, after hydrolysis of the protein with 6 N HCl at 110°C for 24 hr (25). The half-cystine content of seed globulin was determined on carboxymethylated and performic acid oxidized globulin prepared as described (7, 15). The tryptophan content was estimated by the UV absorption spectral method (3).

*Determination of sulfhydryl groups:* Determination of free sulfhydryl groups was performed as follows. (a) The reaction with pCMB according to Boyer (5) as modified by Benesch and Benesch (4) was used in 6 M urea. Glutathione was used as a standard material. A 10  $\mu$ l aliquot of the pCMB solution was added to 3 ml of 0.1% protein solution in 0.33 M Na-acetate buffer, pH 4.6, containing 6 M urea and to an equal volume of buffer without protein. The increase of absorbance was measured at 255 nm. (b) The chromatographic determination of cysteine residue as S- $\beta$ -(4-pyridylethyl)cysteine (PE-cysteine) was performed according to Friedman et al. (12). Alkylation of protein by 4-vinylpyridine was carried out in Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 6 M urea without  $\beta$ -mercaptoethanol. After incubation the solution was adjusted to pH 3, dialyzed against 0.01 M acetic acid, and lyophilized. The alkylated sample was hydrolyzed with 6 N HCl in a sealed, evacuated tube at 110°C for 24 hr, and analyzed on the amino acid analyzer (25). Free sulfhydryl group content was calculated by the ratio of PE-cysteine to histidine on the molar basis.

*N-terminal residues:* Determination of the N-terminal residues was carried out by Edman degradation method (16).

*Hexose and hexosamine analysis:* Hexose content of globulin was determined by the orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method and the content of hexosamine by the *p*-dimethylamino-benzaldehyde method (23).

*Assay for oxaloacetate decarboxylase activity:* A Warburg manometer was used to measure the evolution of CO<sub>2</sub> from oxaloacetate. The system finally set for the assay was as follows. The main vessel contained 0.4 mg of globulin dissolved in 1.9 ml of 0.2 M Na-acetate buffer, pH 4.5, containing 1 mM EDTA. The side arm contained 0.1 ml of 0.1 M oxaloacetate dissolved in 1 mM EDTA. The reaction was carried out at 35°C. Since CO<sub>2</sub> evolution was not observed when KOH was present in the center well, the gas evolved was considered to be solely CO<sub>2</sub>. The other product was confirmed to be pyruvate by using a lactate dehydrogenase system (31).

## Results

*Purity and molecular weight of crystalline pumpkin seed globulin:* Crystals of pumpkin seed globulin were regular octahedrons with each side 10–20  $\mu$ , or octahedron-like shape with acute vertical angles (Fig. 1).

The Schlieren pattern of the globulin in the ultracentrifuge gave a single and symmetrical peak in the A-buffer (Fig. 2 (a)). A small peak preceding the main one appeared at 73 min-run. The plot of  $1/S_{app} \cdot C$ , where  $S_{app}$  and  $C$  represent the apparent  $S$  value and the protein concentration, respectively, determined  $S_{20,w}^0$

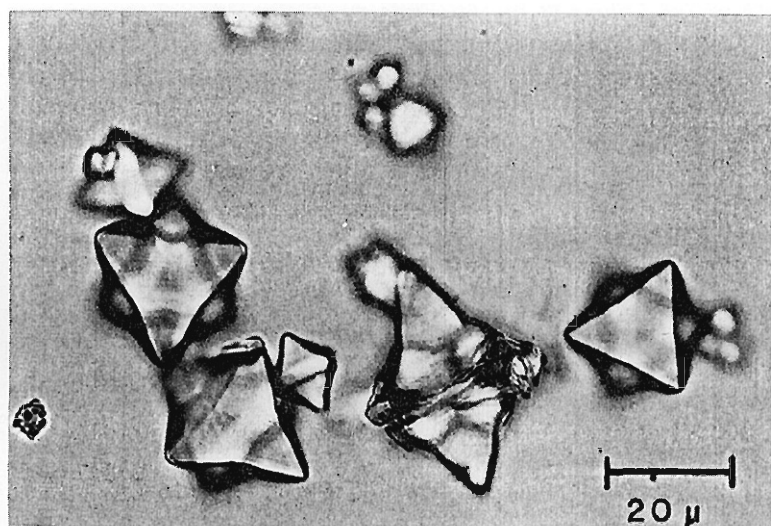


Fig. 1. Crystals of pumpkin seed globulin.

Table 1 Amino acid composition of pumpkin seed globulin and its subunits

Amino acid	Residues per molecule			
	Crystalline globulin <sup>a</sup>	$\gamma'$ -Chain (P-3) <sup>d</sup>	$\delta$ -Chain (P-1) <sup>e</sup>	$(\gamma' + \delta) \times 2$
Lysine	27 ( 14)	10	6	31
Histidine	18 ( 17)	5	4	19
Arginine	101 (122)	33	21	109
Tryptophan	19 <sup>b</sup> —	—	—	—
Aspartic acid	87 ( 92)	28	16	86
Threonine	30 ( 31)	7	10	34
Serine	64 ( 69)	24	15	78
Glutamic acid	159 (190)	60	25	169
Proline	43 ( 4)	14	8	45
Glycine	72 ( 74)	26	12	77
Alanine	64 ( 64)	20	14	67
Half-cystine	9 <sup>c</sup> ( 6)	4	1	10
Valine	54 ( 53)	16	13	58
Methionine	16 ( 14)	4	5	17
Isoleucine	39 ( 35)	13	8	43
Leucine	69 ( 77)	22	15	74
Tyrosine	27 ( 14)	6	6	23
Phenylalanine	38 ( 42)	14	8	44

<sup>a</sup> Based on the molecular weight of 112,000. The values in parentheses are those reported (8) multiplied by a factor of 9.19 to make comparison with the present analysis easy.

<sup>b</sup> Determined by the UV absorption method.

<sup>c</sup> Determined as cysteic acid and carboxymethylcysteine.

<sup>d</sup> Based on the molecular weight of 36,000.

<sup>e</sup> Based on the molecular weight of 22,000.

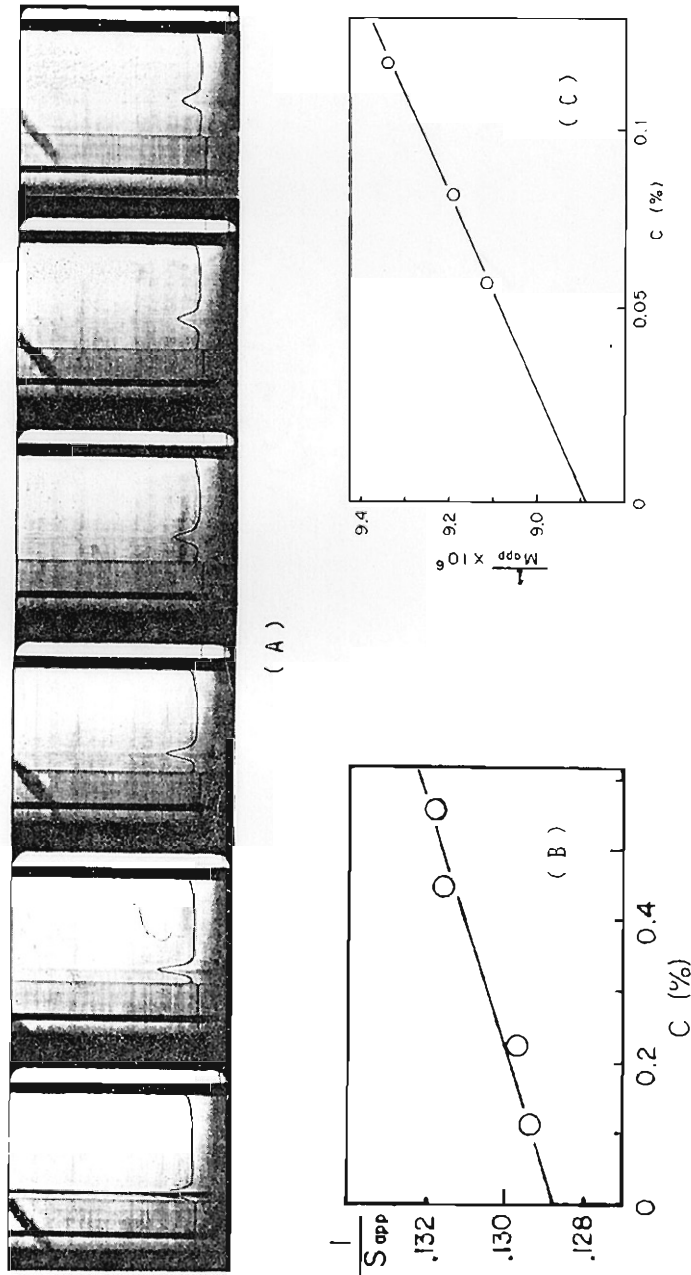
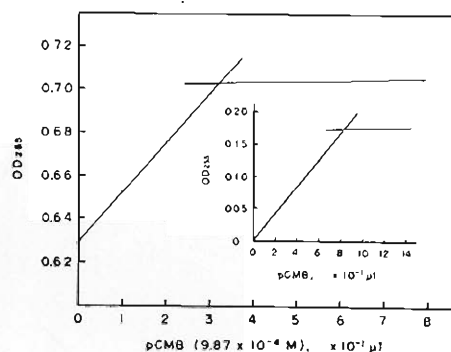


Fig. 2. (A) Sedimentation pattern of pumpkin seed globulin. The ultracentrifuge was run with 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.0, containing 2 M NaCl. Photographs were taken at 13, 25, 37, 49, 61 and 73 min (from left to right) after reaching a speed of 40,000 rpm at 20°C. Protein concentration was 0.56%. (B) Plot for  $1/S_{app} \cdot C$  by sedimentation velocity. The conditions were as given in (A).  $S_{app}$  and  $C$  represent the apparent  $S$  value and protein concentration of seed globulin, respectively. (C) Estimation of the molecular weight of pumpkin seed globulin by sedimentation equilibrium. Analysis was carried out in 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.0, containing 2 M NaCl, at 20°C and 4,800 rpm.

Fig. 3. The titration of sulfhydryl groups in seed globulin by the pCMB titration method. The inset shows the standardization curve for the pCMB solution used by 3 ml of  $2.70 \times 10^{-4}$  M glutathione. pCMB ( $9.87 \times 10^{-4}$  M),  $10 \mu\text{l}$  at a time, was added to 3 ml of 0.1% protein solution in 0.33 M Na-acetate buffer, pH 4.6, containing 6 M urea and to 3 ml of the buffer in the absence of the protein. The absorbance increase was measured at 255 nm.



to be 7.8 (Fig. 2(B)). The sedimentation equilibrium method showed the molecular weight of the protein to be 112,000 daltons (Fig. 2(C)).

**Chemical properties of globulin:** The amino acid composition of carboxymethylated globulin is shown in Table 1 together with that reported by Chou and Splittstoesser (8). The contents of arginine, aspartic acid and glutamic acid were remarkably high, having the general properties of other seed storage proteins. This composition was similar not only to those of the globulins from squash, cucumber and watermelon which belong to *Cucurbitaceae*, but also to that of edestin from hemp (*Cannabis sativa*) seed (24). The half-cystine content, 9 residues per 112,000 daltons, was very low. The number of free sulfhydryl groups was 0.9–1.2 mole per protein by both pCMB

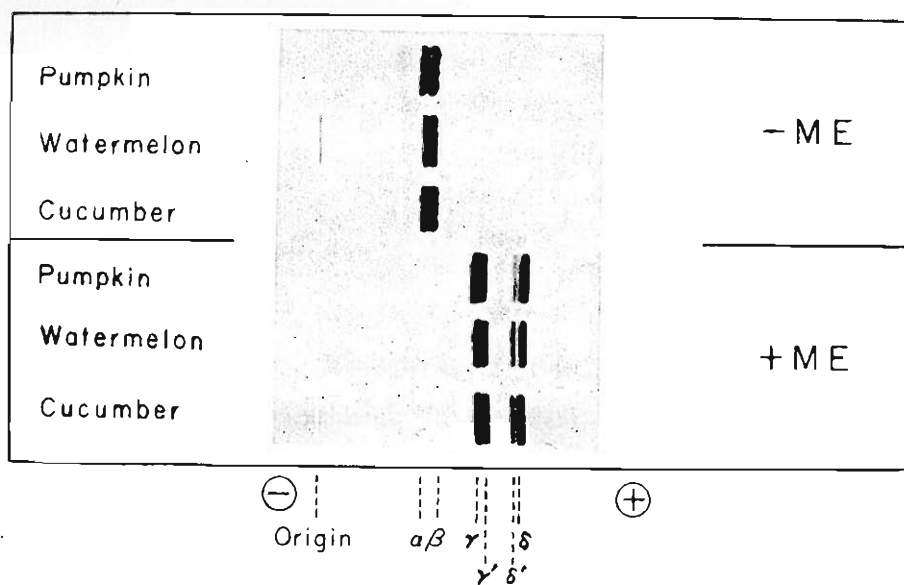


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of *Cucurbitaceae* seed globulin. Seed globulins of cucumber and watermelon were prepared as described in the text for pumpkin globulin. 7.5% gel was used. Gel buffer solution was 0.1 M Tris-acetate, pH 8.2, containing 0.5% SDS. Electrophoresis was carried out at 25 mA for 2.5 hr at 20°C. -ME and +ME represent the absence and presence of  $\beta$ -mercaptoethanol, respectively.

titration (Fig. 3) and PE-cysteine determination in 6 M urea. Probably the other 8 residues formed disulfide bonds.

The Edman degradation procedure revealed the N-terminal residue to be only glycine. The second step showed leucine. The N-terminal residue of  $\beta$  subunit separated by SDS-hydroxylapatite chromatography (Fig. 6) was also glycine. The quantitative determination of the terminal residue will be reported in the future.

Hexose and hexosamine were not detected.

*Subunit structure of globulin:* SDS-polyacrylamide gel electrophoresis separated the globulin into two subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , which were shown as corresponding bands on the gel electrophorogram in the absence of sulfhydryl reducing agent as shown in Fig. 4. The molecular weights of these corresponded to 63,000 for  $\alpha$  and 56,000 for  $\beta$ . The color strength of the  $\alpha$  band developed by Coomassie brilliant blue was apparently a little less than that of the  $\beta$  band. After reduction with  $\beta$ -mercaptoethanol they were further separated into main bands,  $\gamma$ ,  $\gamma'$  and  $\delta$ , corresponding to molecular weights of about 36,000, 34,000 and 22,000 daltons, respectively. A minor band  $\delta'$  was present near  $\delta$ . To learn whether it is common in other seed globulins or unique in pumpkin globulin to have subunits,  $\alpha$  and  $\beta$ , and the peptide chains,  $\gamma$ ,  $\gamma'$ ,  $\delta$  and  $\delta'$ , globulins were prepared in the same manner from cucumber and watermelon belonging to the same family, Cucurbitaceae. These globulins

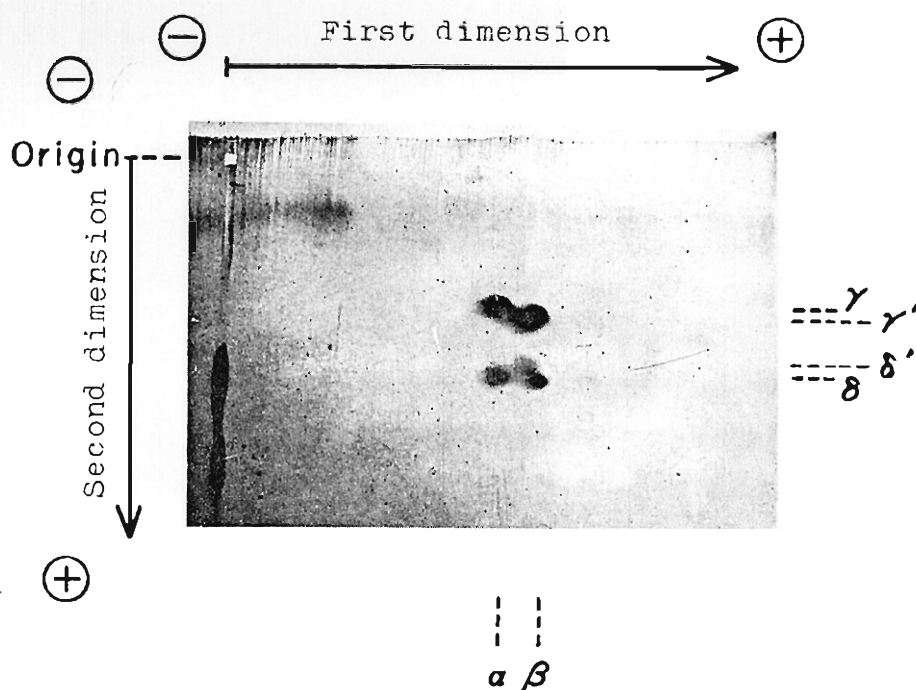


Fig. 5. Two-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of pumpkin seed globulin. 10% gel was used. After the first run, the gel plate was soaked in a gel buffer containing 5%  $\beta$ -mercaptoethanol for 30 min to reduce disulfide bonds. The second run was successively carried out at right angle to the first dimension. The conditions were as in Fig. 4.

showed similar SDS-gel electrophoretic patterns except for minor difference in migration distance (Fig. 4).

It is interesting to note that when 0.1% SDS was used, the globulin showed only one broad band with approximately the same mobility as those of  $\alpha$  and  $\beta$ . Using 0.05% SDS in order to visualize protein-SDS complexes in gels by chilling according to Wallace et al. (33), again only one band appeared without any separation of  $\alpha$  and  $\beta$ . Therefore, it was necessary to use a high concentration, 0.5%, of SDS in both reservoir and gel buffer to obtain a clear separation of the  $\alpha$  and  $\beta$  bands.

The SDS-gel electrophoretic patterns in Fig. 4 indicate that both subunits  $\alpha$

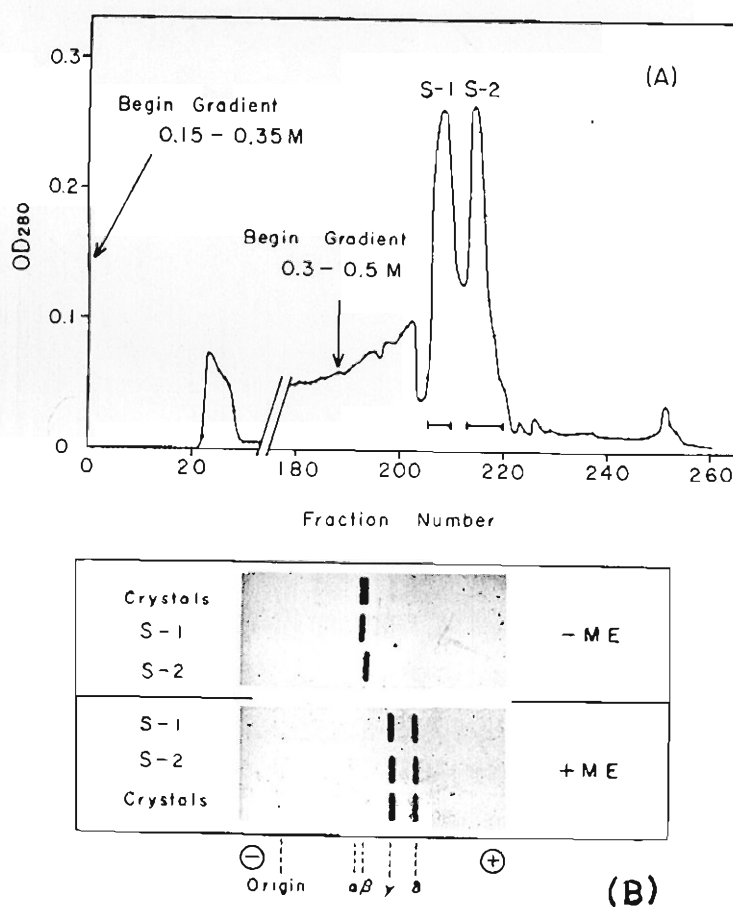


Fig. 6. (A) SDS-hydroxylapatite chromatography of SDS treated pumpkin seed globulin. Seed globulin dissolved in 0.01 M Na-phosphate buffer, pH 6.4, containing 2% SDS was heated at 100°C for 2 min and applied to a column (1.4 × 25 cm) of hydroxylapatite treated with SDS. After gradient elution between 0.15 M and 0.35 M of Na-phosphate buffer containing 0.1% SDS, another gradient elution between 0.3 M and 0.5 M phosphate buffer was carried out. Each fraction volume was 1.5 ml. The fractions were monitored at 280 nm. (B) SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of two peaks, S-1 and S-2, obtained by the chromatography shown in (A). The electrophoretic conditions were as in Fig. 4.

and  $\beta$  must have disulfide bonds in the molecules. Two dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis confirmed the fact that  $\alpha$  and  $\beta$  subunits separated by the first electrophoresis were further separated by the second to give  $\gamma$ ,  $\gamma'$ ,  $\delta$ , and  $\delta'$  chains after reduction by  $\beta$ -mercaptoethanol (Fig. 5). The  $\gamma'$  spot derived from subunit  $\beta$  moved a little faster than the  $\gamma$  spot from subunit  $\alpha$ . In contrast the  $\delta$  spots from both  $\alpha$  and  $\beta$  showed nearly the same mobilities. A faint spot apparently derived from the  $\beta$  subunit seemed to correspond to  $\delta'$  shown in Fig. 4. Comparing the patterns shown in Fig. 4, it seems likely that  $\gamma$  and  $\gamma'$  derived from  $\alpha$  and  $\beta$  have slightly different molecular weights, and  $\delta$  derived from  $\alpha$  and  $\beta$  have similar molecular weights. In order to characterize the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits, further separation was performed on an SDS-hydroxylapatite column. Column chromatography yielded two main peaks, S-1 and S-2 (Fig. 6(A)). SDS-gel electrophoresis of the protein in each peak showed that the fraction S-1 corresponded to the  $\alpha$  band and S-2 to the  $\beta$ . These two components had similar amino acid compositions. After reduction with  $\beta$ -mercaptoethanol, both S-1 and S-2 showed nearly an similar pattern having  $\gamma$  and  $\delta$  bands (Fig. 6(B)). However, if the pattern was carefully examined,  $\gamma$  derived from S-2 moved a little faster than  $\gamma$  from S-1. This coincided well with the pattern shown by two dimensional electrophoresis. These results suggested that each subunit,  $\alpha$  and  $\beta$ , had disulfide bonds combining each  $\gamma$  and  $\gamma'$  with  $\delta$  chains.

Further, using carboxymethylated globulin, the separation of chains,  $\gamma$ ,  $\gamma'$ ,  $\delta$  and  $\delta'$ , was performed by DEAE-cellulose column chromatography in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 6 M urea. The chromatography gave three main peaks, P-1, P-2, and P-3 (Fig. 7(A)). SDS-gel electrophoresis of these showed that P-1 corresponded to the  $\delta$  band, P-2 to the  $\gamma$ , and P-3 to the  $\gamma'$  (Fig. 7(B)). The amino acid compositions of P-1 and P-3 are shown in Table 1. Twice the value of the sum of the compositions of P-1 and P-3, (composition of  $\delta$  + composition of  $\gamma'$ )  $\times 2$  coincided very well with the composition of the original globulin.

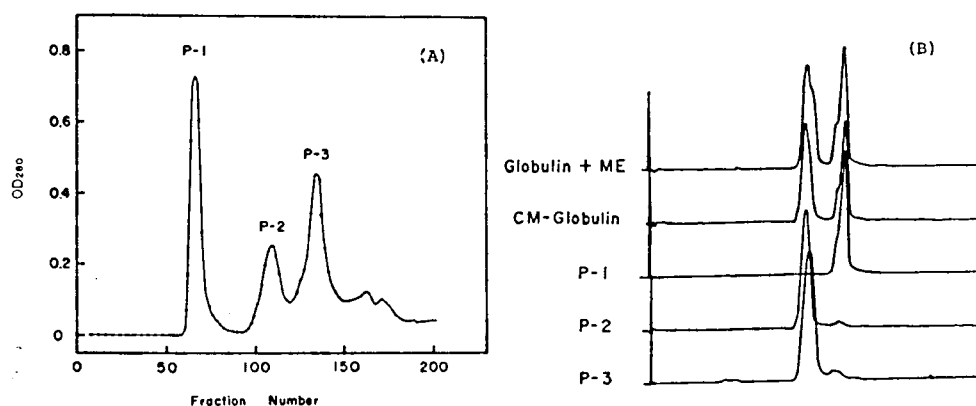


Fig. 7. (A) DEAE-cellulose chromatography of carboxymethylated globulin. Protein dissolved in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 6 M urea was applied to the column (2.6  $\times$  40 cm). After passing 20 ml of the above buffer, a linear gradient to 0.6 M NaCl was conducted. Each fraction contained 2 ml. The flow rate was 10 ml per hr. (B) The densitograms of SDS-gel electrophoresis of the main peaks, P-1, P-2 and P-3, as shown in (A). The electrophoretic conditions were as in Fig. 4.



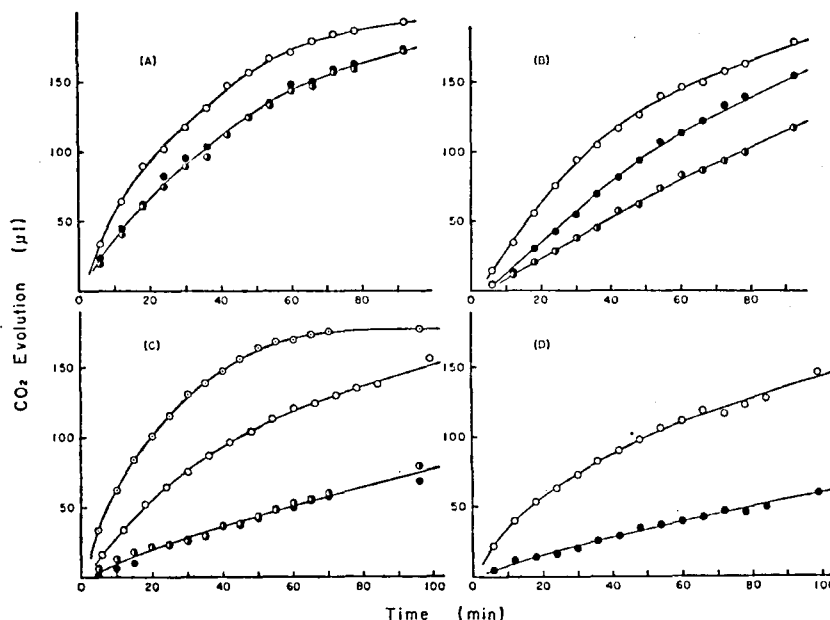


Fig. 8. Effect of  $Mn^{++}$  on the oxaloacetate decarboxylase activity of pumpkin seed globulin. The evolution of  $CO_2$  from 10  $\mu$ moles of oxaloacetate was measured in 2 ml of 0.2 M Na-acetate buffer, pH 4.5, containing (A) 1 mM  $MnCl_2$ , (B) none, (C) 0.1 mM EDTA, and (D) 1 mM EDTA at 35°C by a Warburg manometer.  $\circ$ —, with 0.4 mg of seed globulin;  $\ominus$ —, with 1 mg of seed globulin;  $\square$ —, with 0.4 mg of heat treated seed globulin; and  $\bullet$ —, without globulin.

Because the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits had similar amino acid compositions and SDS-gel electrophoretic patterns except for minor differences in their molecular weights, it was possible to assume that the  $\beta$  subunit might be a product of partial proteolysis of the  $\alpha$  subunit. In order to inhibit the action of protease, if any, during preparation, we tried the heat treatment before extraction, the addition of 1 mM pCMB to the buffer, or using the maturing seeds in the fruits as the starting material. However, no particular change in SDS-gel electrophoretic pattern was observed in any case.

*Oxaloacetate decarboxylase and other biological activities of globulin:* It is known that pumpkin seed globulin has oxaloacetate decarboxylase activity (29). We confirmed this, and will show some additional data here. The optimum pH of the activity was determined to be 4.5 using 0.2 M Na-acetate buffer. The effect of  $Mn^{++}$  on the activity was examined in the same buffer, as shown in Fig. 8. In the presence of 1 mM  $Mn^{++}$ , the  $CO_2$  evolution of the control systems with or without heat inactivated enzyme were nearly the same as that of the active enzyme system (Fig. 8(A)). This result was probably due to the decarboxylation of oxaloacetate catalyzed by the metal itself. In the absence of  $Mn^{++}$  the  $CO_2$  evolution of those systems decreased as a whole, and that of the control system with the heat inactivated enzyme was less than that of the system without the heat inactivated enzyme (Fig. 8 (B)). This was probably caused either by the adsorption of  $CO_2$  evolved on the heat inactivated enzyme or by the trapping in the heat inactivated enzyme of metal ions

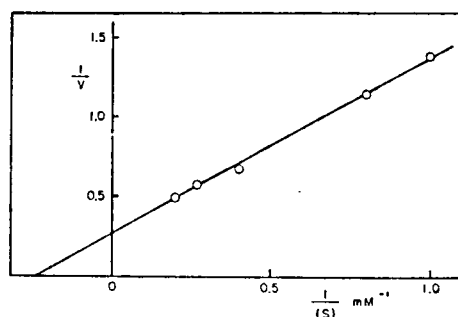


Fig. 9. The Lineweaver-Burk plot of oxaloacetate decarboxylase activity. The manometric measurement was carried out in 0.2 M Na-acetate buffer, pH 4.5, containing 1 mM EDTA at 35°C with 0.4 mg of seed globulin.

contaminating the reaction mixture which catalyzed the decarboxylation of oxaloacetate. The addition of 0.1 mM EDTA to the reaction system depressed the CO<sub>2</sub> evolutions of control systems to a reasonably low level but still the enzyme activity was seen to be fairly in a high level (Fig. 8(C)). By increasing the concentration of EDTA to 1 mM, the control CO<sub>2</sub> evolution was slightly further depressed without practical change in the activity of the enzyme (Fig. 8 (D)). These results suggested that Mn<sup>++</sup> was not required to activate the decarboxylase in the pumpkin globulin. A higher CO<sub>2</sub> evolving activity was observed with a higher globulin concentration without affecting the control levels of CO<sub>2</sub> evolution (Fig. 8 (C)). However, the initial rates were difficult to measure, and the following experiments were carried out in a buffer containing 1 mM EDTA with 0.4 mg of seed globulin. Using this system, the K<sub>m</sub> value for oxaloacetate was calculated by Lineweaver-Burk plots to be 4.1 mM (Fig. 9), which was fairly high compared to the usual value for other oxaloacetate decarboxylase (35).

Table 2 shows the decrease in activity by standing the globulin in Na-acetate buffer, pH 4.5, containing EDTA, but the cause of this phenomenon was unknown. Pyruvate, malate, succinate, maleate, malonate, citrate, and glutamate were not decarboxylated by the globulin under the same conditions used for the assay of oxaloacetate decarboxylase activity. It showed no other biological activities such as antibiotic activities against yeast, fungi, *E. coli*, and *B. subtilis*, toxin activity against mice, or phosphoenolpyruvate carboxylase activity.

Table 2 Effect of incubation time on the oxaloacetate decarboxylase activity

Time	Enzyme <sup>a</sup> (mg/2 ml)	EDTA (mM)	Activity <sup>b</sup> (μl/min)
30 min	1.0	0.1	4.89
150 min			1.92
30 min	0.4	0.1	1.78
4 days			0
30 min	0.4	1.0	2.06
4 days			0.37

<sup>a</sup> The enzyme was dissolved in 0.2 M Na-acetate buffer, pH 4.5, containing EDTA at 20°C.

<sup>b</sup> The activity was expressed as CO<sub>2</sub> evolution per min in the manometric measurement.

### Discussion

The pumpkin seed globulin prepared by repeated crystallization was shown to be nearly homogeneous by ultracentrifuge analysis. The molecular weight of crystalline globulin was 112,000 daltons in a neutral buffer containing 2 M NaCl. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the globulin yielded  $\alpha$  and  $\beta$  bands of 63,000 and 56,000 daltons, respectively. Therefore, the molecule of 112,000 daltons was considered to be a dimer of the subunits,  $\alpha$ - $\beta$ ,  $\alpha$ - $\alpha$ , and/or  $\beta$ - $\beta$ . The color strength of the  $\alpha$  band after staining on SDS-gel electrophoresis was slightly less than that of the  $\beta$  band, although SDS-hydroxylapatite chromatography showed two similar peaks, S-1 corresponding to  $\alpha$  and S-2 to  $\beta$ . Therefore, the crystalline seed globulin may have more  $\beta$  subunits than  $\alpha$  subunits. The reduction of disulfide bonds separated  $\alpha$  subunits into  $\gamma$  and  $\delta$  chains with molecular weights of 36,000 and 22,000 daltons, and  $\beta$  subunit into  $\gamma'$  and  $\delta$  chains of 34,000 and 22,000 daltons.

The carboxymethylated globulin was separated into  $\gamma, \gamma'$  and  $\delta$  chains by DEAE-cellulose chromatography. Although the  $\delta$  chain was obtained as a single peak, it might be heterogeneous and composed of two different components with a similar molecular weight. Fractions P-2 and P-3 seem to correspond to  $\gamma$  and  $\gamma'$ , respectively.

Twice the value of the sum of the amino acid compositions of  $\gamma'$  (P-3) and  $\delta$  (P-1) was quite similar to the original composition of globulin. It is thus tentatively postulated that the crystalline seed globulin is a unit of 112,000 molecular weight composed of two subunits, each of which has a molecular weight of about 60,000. Each subunit is composed of two unequal polypeptide chains joined by disulfide bonds.

Subunits  $\alpha$  and  $\beta$  showed similar compositions and similar SDS-gel electrophoretic patterns after reductive cleavage of disulfide bonds, but the presence of one mole of free sulfhydryl group per 112,000 molecular weight suggested that  $\alpha$  and  $\beta$  subunits had differences in their polypeptide chains though to a minor extent. One of the differences might be due to a partial proteolysis of the  $\alpha$  subunit to produce the  $\beta$  subunit. However, the several other preparation procedures preventing proteolysis resulted in the same SDS-gel electrophoretic pattern. The partial proteolysis, if any, might occur during seed development and maturation after flowering, and not during preparation. Another possibility of the different subunit composition was due to the material itself, which was a hybrid.

The amino acid composition of pumpkin globulin prepared as described above had a composition very similar to that reported by Chou and Splittstoesser (8). The notable differences were in the contents of lysine, arginine, glutamic acid, proline, half-cystine and tyrosine. These differences might be due to the difference in the strain of pumpkin seed. In general, the arginine and acidic amino acid contents were rather high, and this fact might be related to the metabolic process at the early germination stage as suggested by Lignowski and Splittstoesser (17). Only one free sulfhydryl group was detected in the molecular weight of 112,000, and therefore only one of the subunits,  $\alpha$  or  $\beta$ , must have it. The location of this group is now under investigation.

It is known that the pumpkin seed globulin has the oxaloacetate decarboxylase

activity (29). The optimum pH of the enzymatic activity was determined to be 4.5. The real optimum pH might lie at a higher pH, but the decrease in solubility of the globulin at higher pH regions in low ionic strengths lowered the activity. Although the solubility of the globulin increased at higher pH regions and ionic strengths, the activity became lower. Byrrum et al. investigated this phenomenon in fairly detail (6). Usually oxaloacetate decarboxylase activity requires or is activated by metal ions such as  $Mn^{++}$  and  $Mg^{++}$  (10, 21, 35). However, in this experiment the decarboxylase activity was not affected by the presence of  $Mn^{++}$ . Since the turnover number of this activity, 25.8, was very low compared to usual enzymatic activities, its physiological role in seed cotyledons is not clear. The following paper will discuss this problem. The  $K_m$  value for oxaloacetate of this enzyme was calculated to be 4.1 mM which was quite high, when compared to others (10, 21). The reaction in seeds is considered to be more like a solid phase reaction and therefore, even if the  $K_m$  value is high, the reaction necessary in the early germination process, if any, will be fulfilled by that enzymatic catalysis. This activity decreased rather rapidly by standing the solution in the Na-acetate buffer, pH 4.5. The reason for the loss of activity at lower pH is not known, but at this pH region the globulin might be in a dissociation-association equilibrium depending on the protein concentration, pH value and incubation time, as suggested by Fuerst et al. (13). Therefore, at this pH the globulin might form polymers which induced the loss of activity.

The storage protein might not merely be one supplying amino acids to germinating cells for de novo protein synthesis but might also have additional functional roles. For example, the globulin structure might be suitable for packing in a dense state in the dehydrated conditions in seeds. Also the unique structure might be suitable for limited proteolysis to release only necessary amino acids and peptides in the early germination stage as one of the regulatory mechanisms. Further, the protein might have some enzymatic activities controlling the germination process, or it might be precursors which would be activated during germination. We are investigating these possibilities, and the oxaloacetate decarboxylase activity might be such a case.

The authors express their thanks to Dr. K. Kakiuchi for his kind assistance with the ultracentrifuge analysis, Drs. S. Yoshikawa and Dr. Y. Morinaga for their helpful support and discussion on the manometric measurement. They also thank Dr. H. Yoshizumi for the assay of antibiotic activity, Dr. M. Funatsu for the toxin assay, and Dr. H. Nakagawa for the phosphoenolpyruvate carboxylase assay.

#### References

- (1) Altschul, A. M., L. Y. Yatsu, R. L. Ory and E. M. Engleman: Seed proteins. *Ann Rev. Plant Physiol.* 17: 113-136 (1966).
- (2) Ashton, F. M. and W. J. Dahmen: A partial purification and characterization of two aminopeptidases from *Cucurbita maxima* cotyledons. *Phytochem.* 6: 641-653 (1967).
- (3) Benze, W. L. and K. Schmid: Determination of tyrosine and tryptophan in proteins. *Anal. Chem.* 29: 1193-1196 (1957).
- (4) Benesch, R. and R. E. Benesch: Determination of -SH groups in proteins. *Methods Biochem. Anal.* 10: 43-70 (1962).

- (5) Boyer, P. D.: Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials. *J. Am. Chem. Soc.* 76: 4331-4337 (1954).
- (6) Byerrum, R. U., S. A. Brown and C. D. Ball: The action of electrolytes on oxalacetic decarboxylase from *Cucurbita* seeds. *Arch. Biochem.* 26: 442-456 (1950).
- (7) Canfield, R. E. and C. B. Anfinsen: Chromatography of pepsin and chymotrypsin digests of egg white lysozyme on phosphocellulose. *J. Biol. Chem.* 238: 2684-2690 (1963).
- (8) Chou, K. H. and W. E. Splittstoesser: Changes in amino acid content and the metabolism of  $\gamma$ -aminobutyrate in *Cucurbita moschata* seedlings. *Physiol. Plant.* 26: 110-114 (1972).
- (9) Chrispeels, M. J. and D. Boulter: Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung beans: Role of endopeptidase. *Plant Physiol.* 55: 1031-1037 (1975).
- (10) Dean, B. and W. Bartley: Oxaloacetate decarboxylase of rat liver. *Biochem. J.* 135: 667-672 (1973).
- (11) Dure, L. S. III: Seed formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 256-278 (1975).
- (12) Friedman, M., L. H. Krull and J. F. Cavins: The chromatographic determination of cystine and cysteine residues in proteins as S- $\beta$ -(4-pyridylethyl)cysteine. *J. Biol. Chem.* 245: 3868-3871 (1970).
- (13) Fuerst, C. R., A. G. McCalla and J. R. Colvin: Electrophoretic and sedimentation characterization of crystalline squash seed globulin. *Arch. Biochem. Biophys.* 49: 207-221 (1954).
- (14) Hill, J. E. and R. W. Breidenbach: Proteins of soybean seeds II. *Plant Physiol.* 53: 747-751 (1974).
- (15) Hirs, C. H. W.: Determination of cysteine as cysteic acid. In *Methods in Enzymology* 11. Edited by S. P. Colowick and N. O. Kaplan. p. 59-62. Academic Press Inc., New York, N.Y., 1967.
- (16) Iwanaga, S., P. Wallén, N. J. Gröndahl, A. Henschen and B. Blombäck: On the primary structure of human fibrinogen. Isolation and characterization of N-terminal fragments from plasmic digests. *Eur. J. Biochem.* 8: 189-199 (1969).
- (17) Lignowski, E. M., W. E. Splittstoesser and K. H. Chou: Glutamine synthesis in germinating seeds of *Cucurbita moschata*. *Plant & Cell Physiol.* 12: 733-738 (1972).
- (18) Millerd, A.: Biochemistry of legume seed proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 53-72 (1975).
- (19) Moss, B. and E. N. Rosenblum: Hydroxylapatite chromatography of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.* 247: 5194-5198 (1972).
- (20) Osbone, T. B.: Crystallized vegetable proteids. *Am. Chem. J.* 14: 662-689 (1892).
- (21) Plaut, G. W. E. and H. A. Lardy: The oxalacetate decarboxylase of *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 180: 13-27 (1949).
- (22) Rena, A. B. and W. E. Splittstoesser: The metabolism of proline in cotyledons of pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Plant & Cell Physiol.* 15: 681-686 (1974).
- (23) Rosevear, J. W. and E. L. Smith: Glycopeptides I. *J. Biol. Chem.* 236: 425-435 (1961).
- (24) Smith, E. L. and R. D. Greene: Further studies on the amino acid composition of seed globulins. *J. Biol. Chem.* 167: 833-842 (1947).
- (25) Spackman, D. H., W. H. Stein and S. Moore: Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* 30: 1190-1206 (1958).
- (26) Spencer, P. W. and R. D. Spencer: Globulin-specific proteolytic activity in germinating pumpkin seeds as detected by a fluorescence assay method. *Plant Physiol.* 54: 925-930 (1974).
- (27) Tiselius, A., S. Hjertén and Ö. Levin: Protein chromatography on calcium phosphate columns. *Arch. Biochem. Biophys.* 65: 132-155 (1956).
- (28) Tsay, R. and F. M. Ashton: *De novo* synthesis and hormonal regulation of a dipeptidase in *Cucurbita maxima*. *Phytochem.* 13: 1759-1763 (1974).
- (29) Vennesland, B. and R. Z. Felsler: Oxalacetic and pyruvic carboxylases in some dicotyledonous plants. *Arch. Biochem.* 11: 279-306 (1946).
- (30) Vickery, H. B., E. L. Smith, R. B. Hubbell and L. S. Nolan: Cucurbit seed globulins I. *J. Biol. Chem.* 140: 613-624 (1941).

- (31) von Korff, R. W.: Purity and stability of pyruvate and  $\alpha$ -ketoglutarate. In *Methods in Enzymology* 13. Edited by J. M. Lowenstein. p. 519-523. Academic Press Inc., New York, N.Y., 1969.
- (32) Wada, H. and E. E. Snell: Isolation of large peptides by flat-bed polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 46: 548-556 (1972).
- (33) Wallace, R. W., P. H. Yu, J. P. Dieckert and J. W. Dieckert: Visualization of protein-SDS complexes in polyacrylamide gels by chilling. *ibid.* 61: 86-92 (1974).
- (34) Weber, K. and M. Osborn: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412 (1969).
- (35) Wojtczak, A. B. and E. Walajtys: Mitochondrial oxaloacetate decarboxylase from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 347: 168-182 (1974).
- (36) Yphantis, D. A.: Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions. *Biochem.* 3: 297-317 (1964).

*Plant & Cell Physiol.* 17: 815-823 (1976)

## **Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin II. Alterations during germination**

Ikuko Hara, Keishiro Wada, and Hiroshi Matsubara

Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University,  
Toyonaka, Osaka 560, Japan

(Received April 9, 1976)

Alterations in pumpkin seed globulin during germination were examined mainly by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The total protein content of etiolated cotyledons decreased to 32% of the initial content 14 days after germination, and the globulin was rapidly degraded to produce new components with molecular weights of about 40,000 (major component) and 30,000 daltons, which were soluble in a solution with relatively low concentrations of salt at neutral pHs in contrast to insoluble crystalline globulin. The proportion of these soluble proteins to the total amount of protein extracted in 2 M NaCl solution increased rapidly during the period of 2 to 4 days after planting. During this period, the globulin was rapidly degraded with progressive increase of the component of 40,000 daltons. This species was separated into two polypeptide chains with molecular weight of about 20,000 daltons by treatment with sulfhydryl reducing reagent. The soluble fraction preserved oxaloacetate decarboxylase activity. These changes in solubility and subunit structure, and the preservation of the decarboxylase activity of heat stable proteins obtained from etiolated cotyledons are discussed.

The degradation of seed proteins during germination has been studied for many years, especially using legume seeds (14), such as *Glycine max* (3), *Phaseolus aureus* (5, 9), *Vicia faba* (2) and *Pisum sativum* (6). Some proteolytic enzymes have been found in various seeds (5, 10, 12, 16, 19). Biochemical and histochemical methods have also been used in these studies. Recently, using immunological techniques, the development and degradation of  $\gamma$  globulin of rice embryo has been studied (11). Splittstoesser et al. have reported the metabolic systems of amino acids released from pumpkin cotyledonary reserve protein (4, 13, 15) hydrolyzed by proteolytic enzymes (1).

The pumpkin globulin has been shown to have a molecular weight of 112,000 daltons and to be dissociated in sodium dodecyl sulfate (SDS) solution into two subunits of around 60,000 daltons composed of two non-identical peptide chains

Abbreviations: SDS, sodium dodecyl sulfate; pCMB, *p*-chloromercuribenzoate; A-buffer, 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.0, containing 2 M NaCl; B-buffer, 0.02 M Na-phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.4 M NaCl; Sup I, II, and III, supernatant solutions I, II, and III, respectively; Sup II-n and Sup III-n, the supernatant solution II and III prepared from the cotyledons germinated for *n* days.

of about 36,000 and 22,000 daltons linked by disulfide bonds as described in the preceding paper (*8*).

Following the detailed process of the degradation of this seed globulin during germination, particularly in its early stage, must give an insight into the regulatory mechanism of degradation relating to the utilization of amino acids released. Further it is interesting to see whether the oxaloacetate decarboxylase activity does show any difference in its catalytic manner after degradation. The study of the proteolytic enzyme system relating to the early germination stage is also quite interesting.

This paper describes the alterations in the subunit structure, the properties and the activities of pumpkin seed globulin during germination.

### Materials and methods

**Materials:** Pumpkin seeds and all other reagents were the same as those described in the preceding paper (*8*).

**Germination of the pumpkin seeds:** Pumpkin seeds were weighed after removal of the coats, allowed to germinate on moist filter papers in Petri dishes and grown in the dark at 20°C for various periods up to 14 days.

**Preparation of the crystals and other fractions from etiolated cotyledons:** Crystallization procedure of pumpkin globulin was almost the same as that described (*8*) except for the volume (20 ml per 1 g of dry seeds) of 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.0, containing 2 M NaCl (A-buffer) used for the extraction, and the addition of 1 mM pCMB, as shown in Fig. 1. After the seeds (about 1 g) were grown in the dark for a certain period, the cotyledons were ground in a mortar and stood for 18 hr at 20°C in 20 ml of the A-buffer with 1 mM pCMB. The homogenate was centrifuged at 12,000 rpm for 20 min and the supernatant solution (Sup I) was heated at 80°C for 10 min. After centrifugation a supernatant solution (Sup II) was obtained. Sup II was gradually cooled and maintained at 0°C overnight to precipitate crude crystals. Sup II was separated into the first crystals and supernatant

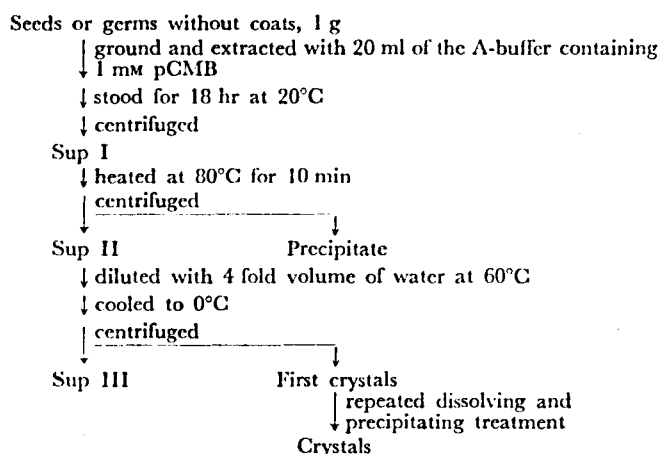


Fig. 1. A flow sheet for the preparation of seed globulin and other fractions.



solution (Sup III) by centrifugation. Since the protein concentration in cotyledons obtained at different germination stages decreased with time, it was assumed to be inaccurate to use an equal amount of buffer solution for extraction of proteins and estimation of their solubilities. Therefore, in a separate experiment an alternative preparative procedure was employed. Namely, the proportion of the volume of the A-buffer with 0.1 mM pCMB to the total amount of proteins estimated by the above experiment was made constant, that is, 20 ml per 250 mg of total protein, although there was no practical difference between the results obtained by these two extraction methods.

*Estimation of the protein content:* The content of proteins in Sup II or Sup III extracted from germinated cotyledons was estimated by the biuret reaction of Gornall et al. (7). Sup II or Sup III of the cotyledons obtained after a certain period of germination was diluted with the A-buffer or 0.02 M Na-phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.4 M NaCl (B-buffer) to make the protein concentrations 1 to 10 mg per ml. After the mixture of 1 ml of Sup II or Sup III and 4 ml of biuret reagent was stood for 30 min at 20°C, the absorbance was measured at 540 nm with a Hitachi spectrophotometer, type 124. A calibration curve was prepared using crystalline globulin.

*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis:* Sup II at each stage was diluted 15 fold with 0.025 M Tris-acetate buffer, pH 8.2, containing 1% SDS for Sup II-0 and Sup II-1, 10 fold for Sup II-2 and Sup II-4, and 5 fold for Sup II-6, Sup II-8, Sup II-10 and Sup II-14, and dialyzed for 4 hr at 20°C against the same solution as that used for dilution before applying to SDS-gel electrophoresis. Each Sup III was applied to SDS-gel electrophoresis after dialysis. The detailed conditions of SDS-gel electrophoresis have been described in the preceding paper (8). After staining followed by destaining, the gel slabs were scanned at 570 nm with a Fuji Riken Densitometer, type FD-A IV. In order to determine the relative amounts of components in Sup II, the area under each peak in the densitogram was measured.

*Determination of the solubility and the components in Sup II:* It was tentatively defined that the solubility was the percentage of the amount of soluble protein in Sup III soluble in the B-buffer to the total amount of proteins in Sup II. In other words the solubility corresponded to the proportion of the amount of soluble components in 0.4 M NaCl solution to that of heat stable protein extracted by 2 M NaCl solution from germinated cotyledons. Both the protein content and the relative amounts of components on the densitogram obtained by SDS-gel electrophoresis were determined as described above.

*Assay method for oxaloacetate decarboxylase activity:* Manometric measurement was used. The protein content of each fraction of Sup II was estimated by the biuret method. Each Sup II was diluted with the A-buffer containing 1 mM EDTA to make the protein concentration 0.4 mg per 0.035 ml, and its final concentration was adjusted to be 0.4 mg per 0.1 ml by successive dilution with 1 mM EDTA. The main vessel contained 0.1 ml of the sample solution and 1.8 ml of 0.2 M Na-acetate buffer, pH 4.5, containing 1 mM EDTA. The side arm contained 0.1 ml of 0.1 M oxaloacetate dissolved in 1 mM EDTA. The other conditions were the same as described (8).

### Results

The globulin crystals obtained from dry seeds showed a subunit structure composed of  $\alpha$  and  $\beta$  identified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis as described ( $\beta$ ). The  $\alpha$  and  $\beta$  subunits were further separated principally to  $\gamma$  and  $\delta$  polypeptide chains after cleaving the disulfide bonds.

Germinating seeds showed elongation of the roots followed by the appearance of hypocotyls by utilizing materials derived from the so-called storage protein (Fig. 2). Sup I prepared as described in Fig. 1 from these cotyledons at various germination stages contained proteins soluble in 2 M NaCl solution, which decreased to 32% of the initial content after 14 days (Fig. 2). Sup I was separated into Sup II and precipitate by centrifugation after heat treatment at 80°C, 10 min (Fig. 1). The protein content of the heat unstable precipitate showed little change during germination (Fig. 2). Namely, as the total amount of protein in Sup I decreased during germination, the heat stable proteins also decreased. The crystals prepared as shown in Fig. 1 from the cotyledons of seeds germinated for various periods showed exactly the same gel electrophoretic patterns as those for crystals obtained from dry seeds.

Sup II prepared from the cotyledons at different germination stages subjected to SDS-gel electrophoresis. The results are shown in Fig. 3. Sup II-0 prepared from dry seeds gave two bands,  $\alpha$  and  $\beta$ , with molecular weights of 63,000 and 56,000 daltons, respectively, which were mostly derived from crystalline globulin. A slightly higher density was observed at the position of  $\beta$  band as was also observed previously ( $\beta$ ). As germination proceeded, the  $\alpha$  band initially decreased and disappeared in 2 to 3 days after germination and the  $\beta$  band also disappeared by 8 days. Concomitantly with the decrease of  $\alpha$  and  $\beta$  bands, components of about 40,000 ( $F_{\alpha\beta}$ ) and 30,000 daltons increased rapidly by 4 days and then decreased by 10 days. Essentially the same pattern was observed with the changes of various

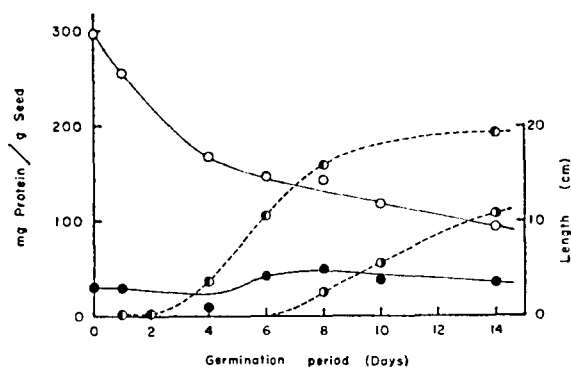


Fig. 2. Changes in the protein content in cotyledons, lengths of roots, and hypocotyls during germination. Seeds after removal of coats were placed on moist filter papers and allowed to imbibe water in the dark at 20°C for days. Determination of the protein content was by the biuret method. —○—, the total amount of protein in Sup I from cotyledons of 1 g seed during germination; —●—, the content of heat unstable protein included in Sup I; that is, the amount of precipitate of Sup I produced by heat treatment (80°C for 10 min) —●—, the average length of roots of the seedlings; —○—, the average length of hypocotyls of the seedlings.

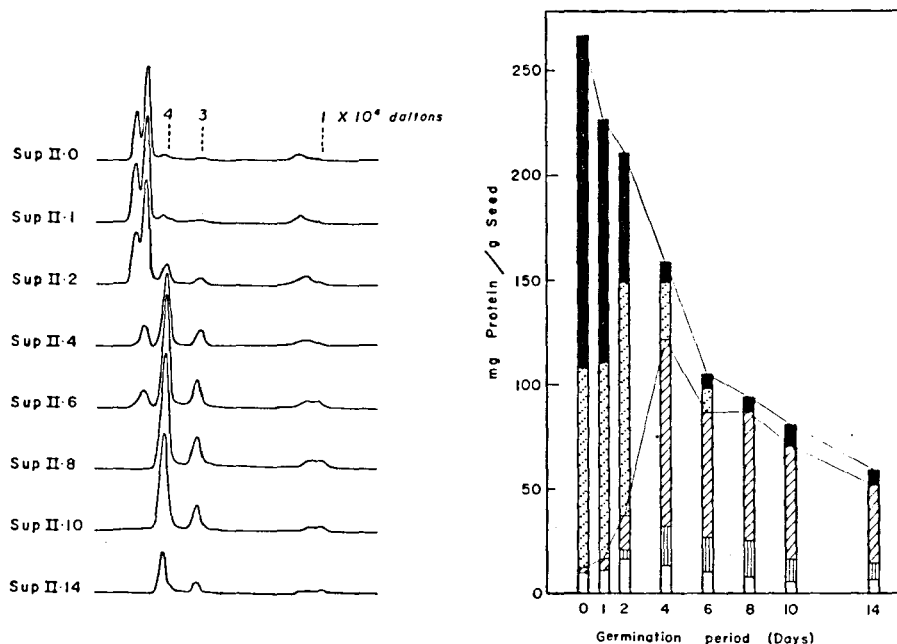


Fig. 3.

Fig. 4 .

Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Sup II from cotyledons at different germination stages. Sup IIs were obtained as described in Fig. 1 and 2. They were diluted 15 fold for Sup II-0 and Sup II-1, 10 fold for Sup II-2 and Sup II-4, and 5 fold for Sup II-6, Sup II-8, Sup II-10 and Sup II-14, with 0.025 M Tris-acetate buffer, pH 8.2, containing 1% SDS. After dialyzing against the same solution as that used for dilution, they were applied to SDS-gel electrophoresis. The conditions for electrophoresis were described previously (8). The gels were scanned at 570 nm by a Fuji Riken Densitometer, type FD-A IV.

Fig. 4. Changes in the components in Sup II. Sup II, Sup III and first crystals were prepared as shown in Fig. 1. The amount of  $\alpha + \beta$ ,  $F_{\alpha\beta}$  and the components with molecular weights of about 30,000 and 10,000 daltons were calculated by the ratio of each area under the peak in the densitogram shown in Fig. 3 to the total amount of the protein in Sup II. ■,  $\alpha + \beta$  (first crystals); ▨,  $\alpha + \beta$  (in Sup III); ▩,  $F_{\alpha\beta}$  (in Sup III); □, the component with molecular weight of about 30,000 daltons (in Sup III); ◻, the component with molecular weight of about 10,000 daltons (in Sup III).

components in Sup III. The quantitative changes in the components in Sup II during germination are summarized in Fig. 4. A remarkable change was noted in the pattern of the components during the period of 2 to 4 days after planting. In this stage the  $\alpha$  and  $\beta$  components decreased rapidly while the  $F_{\alpha\beta}$  increased simultaneously with the increase of the component of about 30,000 daltons, although the amount of this component was relatively small. The total amount of heat stable protein, mostly composed of  $\alpha$  and  $\beta$ , extracted from the dry seeds was about 27% of the total weight of seeds without coats and that extracted from etiolated cotyledons decreased to 22% of the initial protein content after 14 days (Fig. 5). On the other hand, the solubility, the proportion of the amount of soluble components in 0.4 M NaCl solution to the total amount of protein in Sup II, increased rapidly,

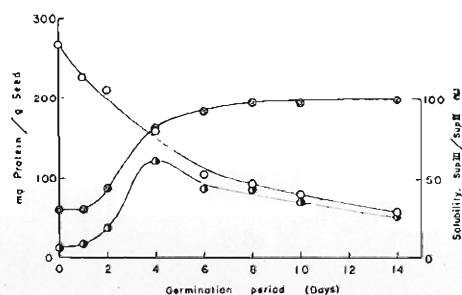


Fig. 5. Changes in components in cotyledons during germination.  $\circ$ —, total amount of protein in Sup II from cotyledons of 1 g of seed during germination;  $\odot$ —, the solubility expressed as the percentage of the amount of protein in Sup III to that in Sup II;  $\ominus$ —, total amount of protein with molecular weights of about 40,000 ( $F_{\alpha\beta}$ ), 30,000 and 10,000 daltons, excluding  $\alpha$  and  $\beta$  derived from crystalline globulin.

especially during the period of 2 to 4 days and almost all proteins were found to be soluble in 0.4 M NaCl solution by 6 days (Fig. 5). The total amount of protein of about 40,000 ( $F_{\alpha\beta}$ ), 30,000 and 10,000 daltons increased rapidly by 4 days and then gradually decreased (Fig. 5).

It was clear from Fig. 4 that the  $F_{\alpha\beta}$  was rapidly accumulated by 4 days of germination and slowly degraded afterwards. To learn the molecular changes in globulin in more detail SDS-gel electrophoresis was again used for Sup III as

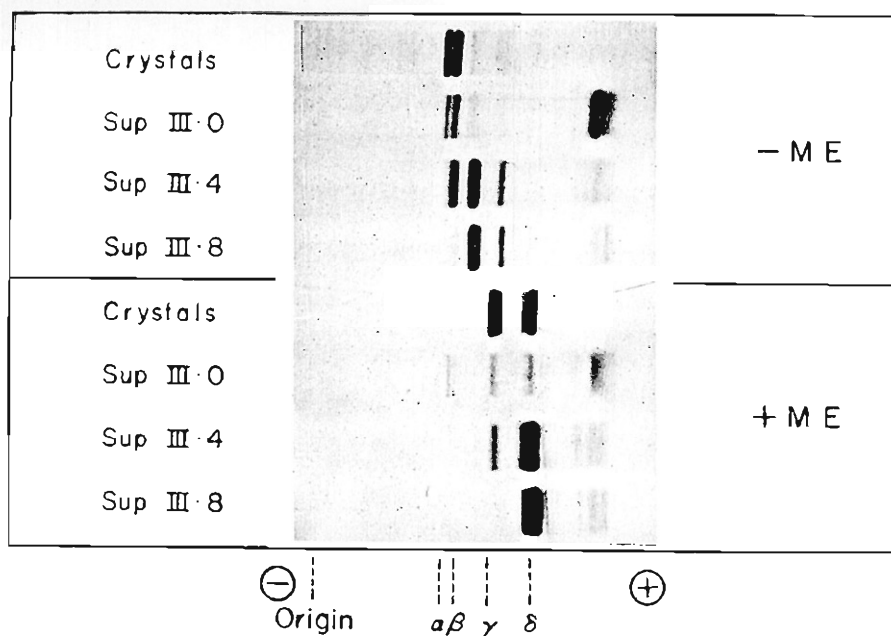


Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Sup III extracted from 0-, 4-, and 8-day seeds. The conditions of germination and electrophoresis were the same as in Fig. 2 and 3 without any dilution of the sample. ME refers to  $\beta$ -mercaptoethanol.

Table 1 Changes in oxaloacetate decarboxylase activity of Sup II during germination

Fraction	Activity <sup>a</sup> ( $\mu$ l/min)
Sup II·0	2.48
Sup II·2	1.98
Sup II·4	2.45
Sup II·6	1.87
Sup II·8	2.07
Sup II·10	1.88
Sup II·12	2.15

<sup>a</sup> Manometric measurement of CO<sub>2</sub> evolution.

shown in Fig. 6. Compared to the pattern of crystalline globulin, Sup III·0 showed a higher content of material corresponding to the  $\beta$  subunit than the  $\alpha$  and also a strong band corresponding to a low molecular weight at around 10,000 daltons. This pattern suggested that the  $\beta$  subunit seemed to be more soluble than the  $\alpha$  in the B-buffer. The Sup III·8 gave a major band,  $F_{\alpha\beta}$ , and the addition of  $\beta$ -mercaptoethanol produced one major band corresponding to the molecular weight of about 20,000 daltons. This suggested that the larger polypeptide chains,  $\gamma$  and  $\gamma'$  with molecular weight of about 36,000, of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits were probably degraded to produce the new molecular species,  $F_{\alpha\beta}$ .

Pumpkin seed globulin is known to have oxaloacetate decarboxylase activity (18), and this fact was confirmed as previously shown (8). The activity of each fraction from the cotyledons at different germination stages showed little change in the assay system employed (Table 1). Therefore, at least some of the components derived by partial proteolysis of crystalline globulin must preserve this activity.

### Discussion

As germination proceeded, the proteins in Sup I extracted in 2 M NaCl solution decreased and those in Sup II, heat stable proteins, also decreased, to 22% of their initial content after 14 days of germination. The proteins degraded were considered to be utilized to support the growth and development of the roots and hypocotyls. In our experiments, seeds were allowed to germinate after removal of the coats, and therefore the germination might be faster than that of seeds with the coats, because of their high permeability to water, gas, etc., and lack of mechanical resistance to the increase in volume by imbibition. Although it might be different from the normal germination, the essential mechanism of the germination process was assumed to be the same.

Sup II was separated into Sup III and a precipitate by centrifugation after dilution. The precipitate consisted mostly of crystalline globulin, which had two similar subunits with molecular weights of around 60,000 daltons. They were dissociated into two non-identical polypeptide chains of about 36,000 and 22,000 daltons by sulfhydryl reducing agent as described (8). At any germination stage, the precipitate showed essentially the same SDS-gel electrophoretic pattern as that

of crystalline globulin obtained from dry seeds. However, the amount of the precipitate showing this pattern decreased as germination proceeded, while the amount of protein in Sup III soluble in 0.4 M NaCl solution increased. Namely, the solubility, as expressed by Sup III/Sup II, increased with time. This change in solubility was probably due to the change in the structure of globulin molecule itself.

The SDS-gel electrophoretic patterns of Sup II and Sup III extracted from etiolated cotyledons of different stages showed the degradation pattern of the globulin itself, that is,  $\alpha$  subunit of the globulin was first degraded and the degradation of  $\beta$  subunit followed, with the production of new components of about 40,000 ( $F_{\alpha\beta}$ ) and 30,000 daltons. Although these new components might not be homogeneous, there were no other components in a noticeable amount. However, the possibility cannot be excluded that some of these components were newly synthesized during germination. In spite of this possibility, the  $F_{\alpha\beta}$  was considered to be a product of partial proteolysis of the globulin, for the following reasons. (a) It was soluble in 2 M NaCl solution and heat stable as the globulin was. (b) It increased concomitantly with the decrease of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the globulin. (c) It was separable into two polypeptide chains of about 20,000 daltons by cleavage of disulfide bonds. (d) It preserved oxaloacetate decarboxylase activity.

Both Sup III-0 and crystalline globulin have  $\alpha$  and  $\beta$  subunits, but the proportion of the  $\beta$  content to  $\alpha$  in Sup III was higher than that found in crystalline preparation. The  $\beta$  subunit may be more soluble in the B-buffer than  $\alpha$ . Therefore, solubility of the protein in a neutral solution with low salt concentrations seemed to increase with the increase of the extent of limited proteolysis, that is, the solubility of  $\beta$  is larger than  $\alpha$  and that of  $F_{\alpha\beta}$  larger than  $\beta$ .

The components  $F_{\alpha\beta}$  corresponded to 40,000 daltons on the SDS-gel electrophoresis, but they might be heterogeneous and composed of two different molecular species, one derived from  $\alpha$  and the other from  $\beta$ . Both had two chains of about 20,000 daltons linked by disulfide bands. It is likely that  $F_{\alpha\beta}$  is a hydrolytic product of the heavier chain,  $\gamma$  and  $\gamma'$ , of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. The  $\delta$  chain was probably intact or very limitedly hydrolyzed, at this stage, and covalently bound to the hydrolyzed chain of  $\gamma$  and  $\gamma'$  by disulfide bonds originally present in  $\alpha$  and  $\beta$ . The globulin thus became soluble in 0.4 M NaCl solution and yet preserved decarboxylase activity after removal of a portion corresponding to the molecular weight of about 20,000 daltons. The insoluble nature of globulin might prevent rapid proteolysis which would produce excess nutrients before the synthetic systems are ready to handle them. The limited proteolysis changed insoluble globulin to a soluble form which might be suitable for subsequent proteolysis and for migration, if necessary. This might be considered a regulatory mechanism of seed germination.

The real physiological function of oxaloacetate decarboxylase activity of the globulin is obscure. However, even after proteolysis producing the component  $F_{\alpha\beta}$  the oxaloacetate decarboxylase activity was found to the same extent as the original globulin. Therefore, this activity might have some relation to plant metabolic systems. Incidentally oxaloacetate is a strong feed-back inhibitor of, for example, isocitrate lyase (17) which participates in the glyoxalate cycle. Also the decarboxylated product of oxaloacetate, pyruvate, is an important intermediary

compound in various metabolic pathways. The real biological significance of the activity and the search for other biological activities should be considered in future.

The authors thank Dr. K. Tagawa for his encouragement and many valuable suggestions.

#### References

- (1) Ashton, F. M. and W. J. Dahmen: A partial purification and characterization of two amino peptidases from *Cucurbita maxima* cotyledons. *Phytochem.* 6: 641-653 (1967).
- (2) Boulter, D. and J. T. Barber: Amino-acid metabolism in germinating seeds of *Vicia faba* L. in relation to their biology. *New Phytol.* 62: 301-316 (1963).
- (3) Catsimpoolas, N., T. G. Campbell and E. W. Meyer: Immunochemical study of changes in reserve proteins of germinating soybean seeds. *Plant Physiol.* 43: 799-805 (1968).
- (4) Chou, K. H. and W. E. Splittstoesser: Changes in amino acid content and the metabolism of  $\gamma$ -aminobutyrate in *Cucurbita moschata* seedlings. *Physiol. Plant.* 26: 110-114 (1972).
- (5) Chrispeels, M. J. and D. Boulter: Control of storage protein metabolism in the cotyledons of germinating mung beans: role of endopeptidase. *Plant Physiol.* 55: 1031-1037 (1975).
- (6) Danielsson, C. E.: The breakdown of the high molecular reserve proteins of peas during germination. *Acta Chem. Scand.* 5: 541-554 (1951).
- (7) Gornall, A. G., C. J. Bardawill and M. M. David: Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177: 751-766 (1948).
- (8) Hara, I., K. Wada, S. Wakabayashi, and H. Matsubara: Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin I. Purification, characterization, and subunit structure. *Plant & Cell Physiol.* 17: 799-814 (1976).
- (9) Harris, N. and M. J. Chrispeels: Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans. *Plant Physiol.* 56: 292-299 (1975).
- (10) Harvey, B. M. R. and A. Oaks: The hydrolysis of endosperm protein in *Zea mays*. *Plant Physiol.* 53: 453-457 (1974).
- (11) Horikoshi, M. and Y. Morita: Localization of  $\gamma$  globulin in rice seed and changes in  $\gamma$  globulin content during seed development and germination. *Agr. Biol. Chem.* 39: 2309-2314 (1975).
- (12) Ihle, J. N. and L. S. Dure, III.: The developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. *J. Biol. Chem.* 247: 5034-5047 (1972).
- (13) Lignowski, E. M. and W. E. Splittstoesser: The change in arginine levels and the metabolism of urea and ornithine in *Cucurbita moschata* seedlings. *Physiol. Plant.* 25: 225-229 (1971).
- (14) Millerd, A.: Biochemistry of legume seed proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26: 53-72 (1975).
- (15) Rena, A. B. and W. E. Splittstoesser: The metabolism of proline in cotyledons of pumpkin (*Cucurbita moschata*). *Plant & Cell Physiol.* 15: 681-686 (1974).
- (16) Ryan, C. A.: Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 173-196 (1973).
- (17) Spector, L. B.: Citrate cleavage and related enzymes. In *The Enzymes* 7. Edited by P. D. Boyer. p. 357-389. Academic Press, New York and London, 1972.
- (18) Vennesland, B. and R. Z. Felsher: Oxalacetic and pyruvic carboxylases in some dicotyledonous plants. *Arch. Biochem.* 11: 279-306 (1946).
- (19) Yomo, H. and K. Srinivasan: Protein breakdown and formation of protease in attached and detached cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 52: 671-673 (1973).

*Plant & Cell Physiol.* 19(2): 237-243 (1978)

**Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin III.  
Comparison of subunit structures among seed globulins  
of various *Cucurbita* species and characterization of  
peptide components**

Ikuko Hara, Morikazu Ohmiya and Hiroshi Matsubara

Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University,  
Toyonaka, Osaka 560, Japan

(Received September 8, 1977)

Various *Cucurbita* seed globulins showed patterns similar to one another on SDS-gel electrophoresis,  $\alpha$  and  $\beta$  bands for unreduced globulins and  $\gamma$ ,  $\gamma'$ ,  $\delta$  and  $\delta'$  bands for reduced ones. On gel electrophoresis in 6 M urea, reduced globulin gave two acidic and two basic bands. These corresponded to  $\gamma$  and  $\gamma'$  chains and  $\delta_1$  and  $\delta_2$  chains, respectively, identified by two-dimensional urea-SDS gel electrophoresis. The compositions of the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits were proposed.

**Key words:** Pumpkin seed — Seed globulin — Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.

The subunit structure of the seed globulin of *Cucurbita* sp. hybrid Tetsukabuto-Nankin has been discussed in previous papers together with the limited degradation of the globulin during germination (7, 8). The globulin was separated in SDS solution into  $\alpha$  and  $\beta$  subunits with molecular weights of 63,000 and 56,000 daltons, respectively. The  $\alpha$  and  $\beta$  subunits seemed to consist of two polypeptide chains,  $\gamma$  and  $\delta$  for  $\alpha$  and  $\gamma'$  and  $\delta$  for  $\beta$ , of about 36,000 and 22,000 daltons, respectively, linked by disulfide bond(s). In order to clarify whether the heterogeneities of these molecular compositions such as  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\gamma'$ ,  $\delta$  and  $\delta'$  are due to the hybrid nature of the material used and also to obtain more information on the subunit structures of this protein, we analyzed seed globulins obtained from various *Cucurbita* species by SDS-gel electrophoresis and the globulin of *Cucurbita* sp., Tetsukabuto-Nankin by two-dimensional urea-SDS gel electrophoresis.

**Materials and methods**

*Materials and procedures for isolation of various Cucurbita seed globulins:* Seeds of *Cucurbita* sp. hybrid Tetsukabuto-Nankin and all chemicals used were the same as those described in the preceding paper (8). Seed samples of *Cucurbita pepo* (var. New England pie) were supplied by Dr. C. Rick, University of California, Davis. *C. moschata* (var. Kikuza, Kogiku) and *C. moschata* (var. Kurokawa, Hyuga 14-gō)

Abbreviations: SDS, sodium dodecyl sulfate; DEAE-cellulose, diethylaminoethyl-cellulose.



self-fertilized for 14 generations were provided by Dr. T. Nakatsuru, Agricultural Experimental Station in Kumamoto. *C. moschata* (Shiragikuza), *C. pepo* (Long cream) and *C. maxima* (Tsuchihira) came from Dr. S. Marukawa, Ibaragi Horticulture Experimental Station. The isolation and crystallization procedures of seed globulins were exactly the same as those reported previously (8).

**Polyacrylamide gel electrophoresis:** The methods of preparing flat-type gels and the detailed conditions for SDS-gel electrophoresis on 7.5% polyacrylamide gel were described in the previous paper (8). For the gel electrophoresis in 6 M urea, 5% gel slabs were prepared as described elsewhere (8), except that grooves,  $1.0 \times 0.15 \times 0.1$  cm, for placing samples to start electrophoresis were made in the center between the two electrodes (Fig. 2, right). The slabs were soaked overnight in 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 6.4, containing 6 M urea. The sample with or without prior reduction by 1%  $\beta$ -mercaptoethanol was dissolved in 0.025 M Na-phosphate buffer, pH 6.4, containing 6 M urea. Electrophoresis was performed at 0.03 amp and 4°C for 6 hr. Staining and destaining methods were described previously (8).

**Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis:** To examine not only the charge characteristics of each subunit and its peptide components but also the correlation between them, two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis was carried out in urea and urea-SDS systems. For two-dimensional electrophoresis in urea-SDS systems, two 5% gel slabs,  $14.3 \times 10.0 \times 0.2$  cm, were prepared and two different types of grooves, a small one of  $0.2 \times 0.2 \times 0.2$  cm and a larger one of  $0.8 \times 0.2 \times 0.2$  cm were made in the middle of the lower part of each slab as shown in Fig. 3. The gels were soaked overnight in 0.1 M Na-phosphate buffer containing 6 M urea. The sample (4 mg per ml in 0.025 M Na-phosphate buffer containing 6 M urea) was placed in both grooves with 1%  $\beta$ -mercaptoethanol for one slab and without it for the other. After the first electrophoresis at 0.04 amp and 4°C for 9 hr, the lower part of the gel slab,  $2.0 \times 10.0 \times 0.2$  cm, with the larger groove was cut off and stained to obtain a marker pattern. The rest of the gel slab was dipped in 0.1 M Tris-acetate buffer, pH 8.2, containing 1% SDS for 16 hr. The second run was subsequently carried out at right angle to the first at 0.04 amp and 20°C for 4.5 hr.

For electrophoresis in urea system alone, a 5% gel slab of the same size with three grooves was prepared. A small groove,  $0.2 \times 0.2 \times 0.2$  cm, was made at the center of the gel slab and two larger ones,  $0.8 \times 0.2 \times 0.2$  cm, were made in the middle of the lower part and of the left part for marker patterns of the first and second runs, respectively, as shown in Fig. 4. After the gel slab had been soaked overnight in phosphate buffer with urea, sample solution without reducing agent was applied to both the small and lower large grooves. The first run was performed under the same conditions as those described above, and the lower part of the gel including one large groove was cut off and stained. The rest of the gel was dipped in phosphate buffer containing 6 M urea and 5%  $\beta$ -mercaptoethanol for 12 hr in order to split the disulfide bonds in the protein. Before the second run at right angle to the first at 0.06 amp and 4°C for 9 hr, a sample which had been reduced was applied to the other large groove to obtain a marker pattern for the second run.

## Results and discussion

Various *Cucurbita* seed globulins all gave similar patterns on SDS-gel electro-

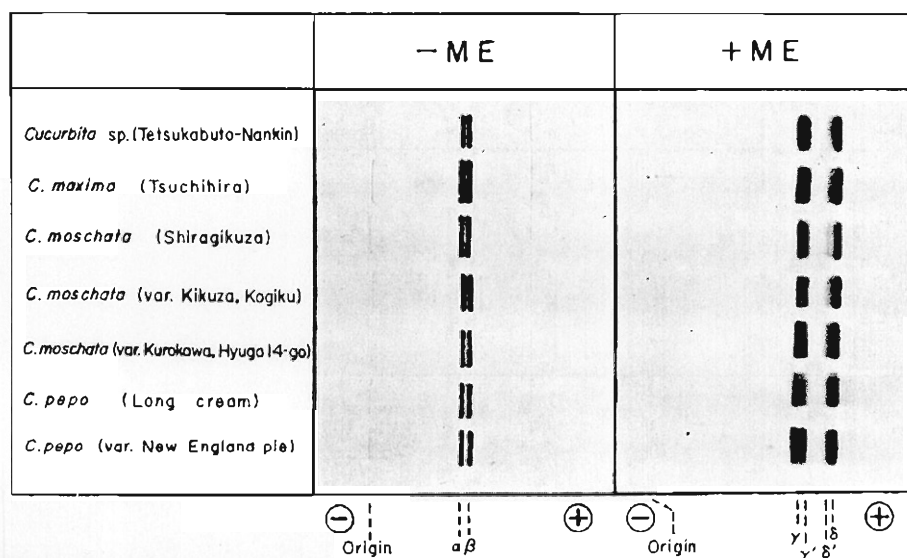


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of various *Cucurbita* seed globulins. Seed globulins were prepared as described before (8). 7.5% gel was used. Gel buffer solution was 0.1 M Tris-acetate, pH 8.2, containing 0.5% SDS. Electrophoresis was carried out at 0.025 amp and 20°C for 2.5 hr. -ME and +ME represent the absence and presence of  $\beta$ -mercaptoethanol, respectively, in sample solutions.

phoresis to that of the globulin of hybrid Tetsukabuto-Nankin, which had been previously examined (7, 8), as shown in Fig. 1. All unreduced globulins showed two bands,  $\alpha$  and  $\beta$ , but their color intensities after staining differed slightly from each other and the differences depended on each *Cucurbita* seed sample. After reduction by  $\beta$ -mercaptoethanol, they were separated into major  $\gamma$ ,  $\gamma'$  and  $\delta$  bands and a minor  $\delta'$  band. Therefore, it seems likely that these heterogeneities are not due to a special hybrid nature of Tetsukabuto-Nankin and are common characteristics of probably all *Cucurbita* seed globulins. Tetsukabuto-Nankin (hybrid) was thus employed in the following experiments as a standard species for investigating the germination process of *Cucurbita* seeds. Such heterogeneities are well known in the component molecules of several 11S globulins (5). In our previous investigation (8), the globulin had a molecular weight of around 112,000 daltons in a neutral buffer containing 2 M NaCl. The protein, however, is very similar in its peptide chain components to legumin or the so-called 11S globulins, including edestin, which have molecular weights of 300,000-400,000 daltons. All these globulins are composed of a large and a small polypeptide chain with similar size and amino acid composition. The amino-terminal residues of their smaller chains are all glycine (3, 6, 8, 10, 12-15). Most of the two types of polypeptide chain were heterogeneous (2, 4, 9), which seemed to be a common property of seed globulin.

Pichl reported polyacrylamide gel electrophoretic patterns with urea or SDS of globulins of various Cucurbitaceae seeds (11), which were more complex than those shown in Fig. 1 and 2. His results, however, account for the heterogeneous aggregations of acidic and basic polypeptide chains. Those aggregations seemed to be due

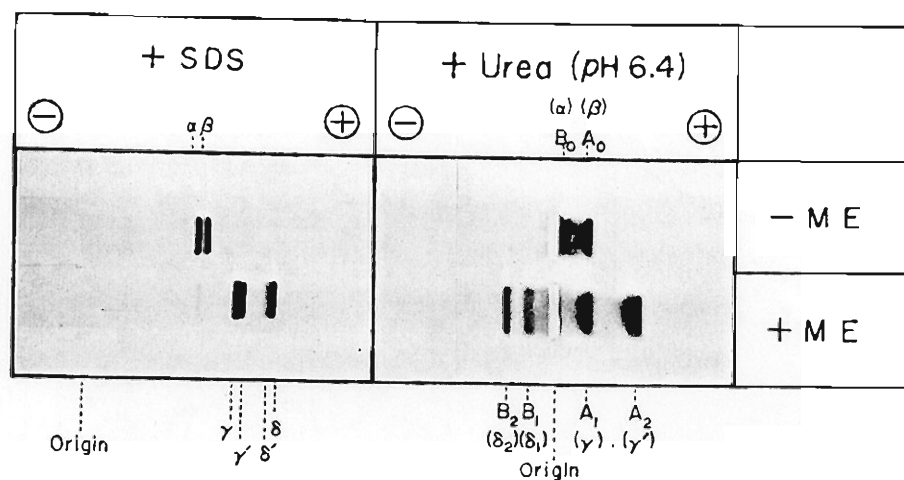


Fig. 2. Comparison between patterns of SDS-gel electrophoresis (left) and gel electrophoresis in 6 M urea (right) of pumpkin (*Tetsukabuto-Nankin*) seed globulin. Conditions for the former were the same as those in Fig. 1. The latter electrophoresis was carried out at 0.03 amp and 4°C for 6 hr on 5% gel in 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 6.4, containing 6 M urea. The symbols in parentheses refer to the corresponding components finally assigned from the experiments shown in Fig. 3 and 4.

to the preparation procedure of globulins or to high ionic strength, 2 M NaCl, in the sample solutions for polyacrylamide gel electrophoresis with urea.

Fig. 2 shows gel electrophoretic patterns of the pumpkin seed globulin with or without prior reduction of the disulfide bonds in SDS and 6 M urea. In the SDS system, the electrophoretic patterns were the same as those shown in Fig. 1. In the urea system, unreduced globulin gave the two bands  $A_0$  and  $B_0$  with slightly stronger color densities for  $A_0$  upon staining and reduced globulin gave four bands, two acidic ( $A_1$  and  $A_2$ ), and two basic ( $B_1$  and  $B_2$ ). However, a longer electrophoretic run separated the  $A_2$  band into two.

From the previous results of DEAE-cellulose column chromatography, carboxymethylated globulin was separated into three fractions corresponding to  $\gamma$ ,  $\gamma'$  and  $\delta$  chains ( $\beta$ ). However, Fig. 2, shows clearly that urea electrophoresis separated the globulin into four major bands ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $B_1$  and  $B_2$ ) and therefore, the  $\delta$  band was expected to be separated also.

In order to find the correlation between these bands in urea gel electrophoresis and those in SDS-gel electrophoresis, we carried out two-dimensional electrophoresis in a urea-SDS system (Fig. 3). The unreduced globulin was first separated into  $A_0$  and  $B_0$  by electrophoresis in 6 M urea as observed in Fig. 2, then further moved to  $\alpha$  and  $\beta$ , respectively, by the second electrophoresis in SDS-gel.  $A_0$  corresponded to the  $\beta$  subunit and  $B_0$  to the  $\alpha$  one. In the same manner, the globulin reduced with  $\beta$ -mercaptoethanol was separated into two acidic,  $A_1$  and  $A_2$ , and two basic,  $B_1$  and  $B_2$ , bands by the first run in 6 M urea. The second SDS-gel electrophoresis moved the acidic  $A_1$  and  $A_2$  bands respectively to  $\gamma$  and  $\gamma'$  and the basic  $B_1$  and  $B_2$  ones to  $\delta_1$  and  $\delta_2$ , both of which were probably derived from the  $\delta$  observed in SDS-gel electrophoresis. We have reported that both subunits  $\alpha$  and  $\beta$  had polypeptide

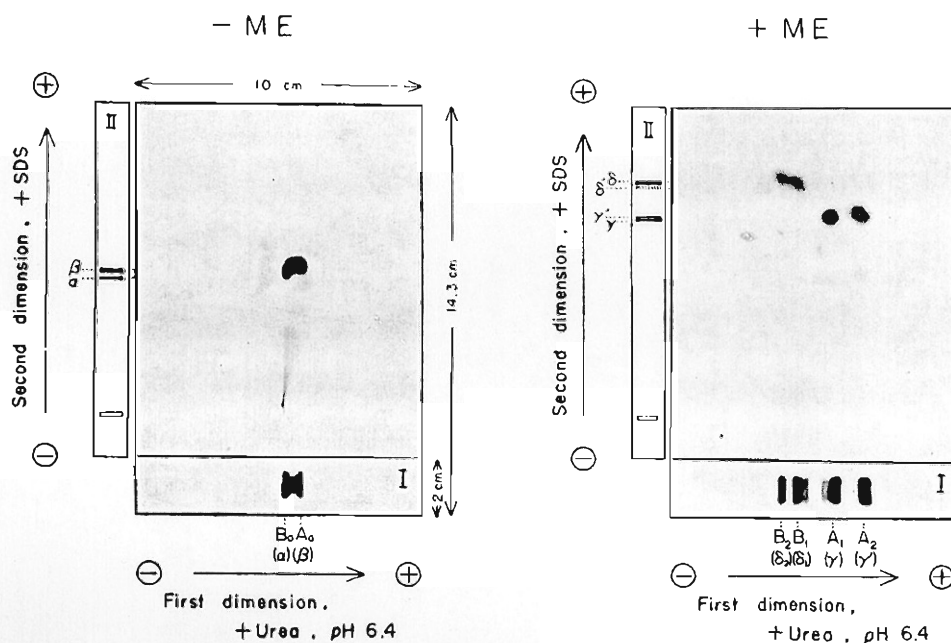


Fig. 3. Two-dimensional gel electrophoretic patterns of pumpkin (*Tetsukabuto-Nankin*) seed globulin with (+ME) or without (-ME) prior reduction by  $\beta$ -mercaptoethanol on 5% gel in urea-SDS system. After the first runs at 0.06 amp and 4°C for 9 hr in a gel buffer containing 6 M urea, the gel plates were soaked in Tris-buffer containing 1% SDS for 16 hr. The second runs were successively carried out at right angle to the first at 0.04 amp and 20°C for 4.5 hr. The two electrophoretic patterns on plates I and II are for the marker patterns of the first and second runs, respectively. See Fig. 2 for symbols in parentheses. The lower parts of the gel slabs, 2.0 × 10.0 × 0.2 cm, were cut off after the first electrophoresis.

chains,  $\gamma$  and  $\delta$  for  $\alpha$  and  $\gamma'$  and  $\delta$  for  $\beta$ , and these peptide chains were linked by disulfide bonds ( $\delta$ ). Whether subunit  $\alpha$  or  $\beta$  was the origin of the minor peptide chain  $\delta'$  was not clear because it disappeared during two-dimensional electrophoresis. Each  $\alpha$  and  $\beta$  was found to consist of an acidic and a basic chain, but the detailed composition of each subunit is still not clear.

To clarify which chains were combined with disulfide bridges to compose subunits  $\alpha$  and  $\beta$ , a two-dimensional gel electrophoresis in a urea system was used (Fig. 4). Clearly, from the results shown in Fig. 3 (left, without  $\beta$ -mercaptoethanol),  $A_0$  and  $B_0$  separated by the first run of the globulin without  $\beta$ -mercaptoethanol corresponded to  $\beta$  and  $\alpha$  subunits, respectively. The second run in 6 M urea after reduction of these two subunits, revealed that  $A_0$  separated into  $A_2$  and  $B_2$  and  $B_0$  into  $A_1$  and  $B_1$ . These results together with those shown in Fig. 3 indicated that subunit  $\alpha$  consisted of an acidic  $\gamma$  and a basic  $\delta_1$  chain and subunit  $\beta$  of an acidic  $\gamma'$  and a basic  $\delta_2$  chain. The previous paper ( $\beta$ ) suggested that as the  $\delta$  chain showed only one cysteine residue,  $\alpha$  and  $\beta$  each had an inter-chain disulfide bond between  $\gamma$  and  $\delta_1$  for  $\alpha$  and  $\gamma'$  and  $\delta_2$  for  $\beta$ . All other disulfide bonds were probably intra-chain forms in peptides  $\gamma$  and  $\gamma'$ .

Soybean 11S globulin was shown to be a dimer and its monomer consisted of

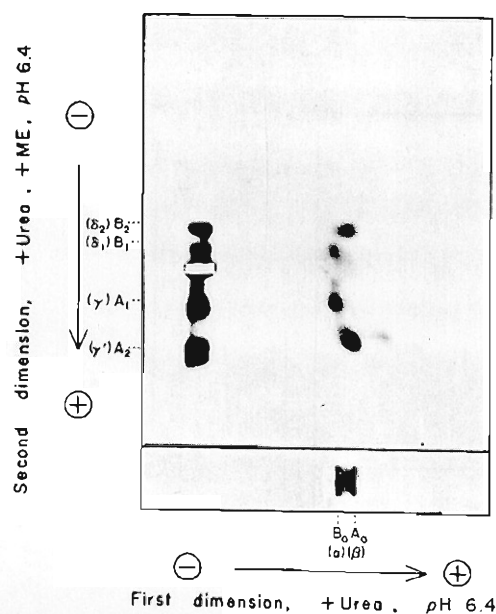


Fig. 4. Two-dimensional gel electrophoretic pattern of pumpkin (*Telsukabuto-Nankin*) seed globulin on 5% gel in a urea system. The conditions of both the first and second runs were the same as those of the first in Fig. 3. After the first run, the gel plates were soaked in a gel buffer containing 6 M urea and 5%  $\beta$ -mercaptoethanol for 12 hr to reduce the disulfide bonds and the second run was carried out successively. Two patterns under and on the left of the gel plate were marker ones for each run. See Fig. 2 for explanation of the symbols in parentheses. The lower part of the gel slab was cut off after the first run and stained. The gel was 0.2 cm thick.

three acidic polypeptide chains each with a molecular weight of 37,000 daltons and three basic chains of 22,300 daltons each (2). Recently, however, four acidic and four basic polypeptide chains have been found in the 11S globulin on the basis of a combination of chromatography and gel electrophoresis (9).

Chemical studies are now in progress on these subunits and preliminary results suggest that  $\delta_1$  and  $\delta_2$  chains have the amino-terminal sequence Gly-Leu-Glu(Asp)-Glu-Thr-Ile- and the C-terminus Arg but the amino-terminal sequence, Ile-Gln-Gly-Tyr- of the  $\gamma$  chain is quite dissimilar to that of  $\gamma'$ , which has a blocked amino-terminus, according to the Edman degradation procedure (1). Detailed experiments will be published in the near future.

The present experiment using two-dimensional gel electrophoresis in urea-SDS system and urea system was very useful and simple to use for elucidation of the constitution of peptide chains in heterogeneous subunit components.

We are grateful to Drs. C. Rick, T. Nakatsuru, and S. Marukawa for the generous supply of seeds and to Drs. T. Matsui of Kyushu University and T. H. Jukes of University of California for the kind arrangements. We also thank Mr. S. Wakabayashi for his aid in the analysis of amino-terminal amino acid.

#### References

- (1) Blombäck, B., M. Blombäck, P. Edman and B. Hessel: Human fibrinopeptides isolation, characterization and structure. *Biochim. Biophys. Acta* 115: 371-396 (1966).

- (2) Catsimpoolas, N.: Isolation of glycinin subunits by isoelectric focusing in urea-mercaptoethanol. *FEBS Letters* 4: 259-261 (1969).
- (3) Catsimpoolas, N., J. A. Kenney, E. W. Meyer and B. F. Szuhaj: Molecular weight and amino acid composition of glycinin subunits. *J. Sci. Food Agr.* 22: 448-450 (1971).
- (4) Derbyshire, E. and D. Boulter: Isolation of legumin-like protein from *Phaseolus aureus* and *Phaseolus vulgaris*. *Phytochem.* 15: 411-414 (1976).
- (5) Derbyshire, E., D. J. Wright and D. Boulter: Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. *ibid.* 15: 3-24 (1976).
- (6) Dlouhá, V., B. Keil and F. Šorm: On proteins. LXXXV. Separation of the two polypeptide chains of S-sulpho-edestine. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 28: 2969-2976 (1963).
- (7) Hara, I., K. Wada and H. Matsubara: Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin II. Alterations during germination. *Plant & Cell Physiol.* 17: 815-823 (1976).
- (8) Hara, I., K. Wada, S. Wakabayashi and H. Matsubara: Pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed globulin I. Purification, characterization, and subunit structure. *ibid.* 17: 799-814 (1976).
- (9) Kitamura, K., T. Takagi and K. Shibasaki: Subunit structure of soybean 11S globulin. *Agr. Biol. Chem.* 40: 1837-1844 (1976).
- (10) Okubo, K., M. Asano, Y. Kimura and K. Shibasaki: On basic subunits dissociated from C (11S) component of soybean proteins with urea. *ibid.* 33: 463-465 (1969).
- (11) Pichl, I.: Seed globulins of various species of Cucurbitaceae. *Phytochem.* 15: 717-722 (1976).
- (12) Vaintraub, I. A. and Nguyen Thanh Thien: Separation of vetch legumin subunits by chromatography on DEAE-cellulose. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* 180: 1239-1241 (1968).
- (13) Vaintraub, I. A. and Nguyen Thanh Thien: Quaternary structure of the vetch seed legumin. *Mol. Biol.* 5: 59-68 (1971).
- (14) Wright, D. J. and D. Boulter: Purification and subunit structure of legumin of *Vicia faba* L. (broad bean). *Biochem. J.* 141: 413-418 (1974).
- (15) Zmrhal, Z.: Amino acid composition of A- and B-chains of S-sulfo-edestin. *Coll. Czech. Chem. Commun.* 32: 2337-2342 (1967).

## 第4章

### 蛋白質分解酵素と貯蔵蛋白質(種子グロブリン)の分解

---

#### 第1節 未発芽種子中の蛋白質分解活性; 種子グロブリンの分解 要約

1. グロブリンから Fop を生成する限定分解活性は 乾燥種子の抽出液には見いだせなかったが, シクロヘキシミド存在下で4日間 吸水させた子葉からの抽出液には存在した。この活性は pCMB, PMST, EDTA,  $\beta$ -ME, DTT 及び カボチャのトリプシン・インヒビターの影響を受けなかった。
2. この限定分解活性は Fop, CM化グロブリン,  $\delta$ 鎖に対しては 大きな変化を与えなかったが,  $\gamma$ 鎖を良く分解して 分子量約 23,000 と 13,000 の分子種と生成した。
3. この抽出液には さらに Fop や  $\delta$ 鎖から 特異的にアミノ酸や小分子物質と遊離させる活性が見つかった。グロブリンや  $\gamma$ 鎖に対する活性は 低く, 卵白アルブミンなどの蛋白質は殆ど分解されなかった。この活性は pCMB や EDTA に阻害され,  $\beta$ -ME や DTT によって活性化された。

## はじめに

貯蔵蛋白質の分解に関与する酵素が休眠種子中にすでに存在しているのか、それとも発芽に伴って *de novo* 合成されるのか、また存在しているとすればその活性化の機構はどのようなものであるかなどに関してはまだ何も知られていない。序論で述べたが、種によって休眠が胚発生の様々な段階で起きているとすれば、休眠種子中の酵素の有無も種によって異なるかもしれない。グロブリンと貯蔵蛋白質としても様々な乾燥種子でいくつかの蛋白質分解酵素が見つかっている(1-3)が、いずれも *in vitro* で種子グロブリンを殆ど分解しない。

カボチャ (*Cucurbita* sp.) 種子の場合、後節でも議論しているが、グロブリンの消失が吸水のかなり初期から始まっており(後節, 図. 10, (4)), これともしして行った分解活性の変動パターン(同エ, 図. 11)をみると、吸水後24時間でかなり高いグロブリンの分解活性を現わしていることになる。続く発芽1日目から少なくとも2日目までの活性には大きな変化はない。発芽後しばらくはグロブリンの消失速度が増すということはないのである。即ち酵素の *de novo*



合成があると考えれば、それは吸水直後に始まり、24時間以内にしっかりと合成は加えられたことになる。

一方、胚発芽時に合成された不活性な形の酵素が吸水直後活性化される（機構は不明）と考えれば、発芽初期からのプロブリンの消失パターン（後節、図.10.）は理解できる。

ここでは乾燥種子には見い出せなかった、プロブリンと限定分解する活性がシフロキシミド処理により未発芽（吸水は起っていない）種子に出現したこと、またプロブリンの限定分解物  $T_{98}$  をさらに特異的に分解する活性の存在について報告する。

## 材料と方法

材料: シクロアキシミト<sup>1</sup>は特級と 羊井化学薬品株式会社から購入した。種子や他の試薬についてはその論文通りである(4)。

種子の発芽: 1%次亜塩素酸ナトリウムで1時間滅菌後、1時間水洗した種子をシャーレ中で水あるいは5mMシクロアキシミトで湿らせた10紙工に置き、日陰で20°Cで吸水させた。

種子γ-irradiation, その他の変数の調整: γ-irradiation 及び有限分解物Fapの調整はその論文に詳述(4.5)。γ-irradiationのCHICの方法及び<sup>180</sup>Coγ線源(δ, γ, γ'線)の分離方法についてもその論文に記した通りである(5)。

Sup I・mは発芽n日目の子葉より2M NaCl, 0.1M リン酸緩衝液(pH 7.0) (1.5ml/子葉) により抽出した。Sup I・mを80°C 10分間熱処理後の遠心上清はSup II・mと表わす(5)。

sup i・mは発芽n日目の子葉から25mM リン酸緩衝液(pH 5.0) あるいは25mM リン酸緩衝液(pH 7.0, 8.0) (1.5ml/子葉) により抽出した。sup i・mを同緩衝液に浸して0°Cで一夜透析して

sup ii・mを得た。Supはγ-irradiationによるFapを含有し、supはそれらの含量が低い。シクロアキシミト存在下で吸水させた子葉からの抽出液はChx-SupあるいはChx-supと表わす(5)。



後 1.0 ml の SDS-PAGE 試料溶液を加えた。 100°C 15 分の熱処理後、同溶液を透析して SDS-ゲル電気泳動を行った。 用いた緩衝液は 0.1 M Tris-酢酸緩衝液 (pH 8.5)、0.2 M Tris-酢酸緩衝液 (pH 6.8)、0.2 M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 9-11) である。

Chx-sup ii:4 & α: Chx-sup ii:4 1=δδ 7:127:11=, Fab, CMIC 7:

127:11=, γ, γ', δ 自身を分析定性: 0.1 ml の Chx-sup ii:4

あり sup ii:4 1= 0.1 ml の 1% 各基質溶液を加え、37°C 2= 0,

6, 18 時間反応させた後上記と同様に操作して TCA 処理性

方面 α=β:11= 発色 (A570) を測定した。 一方沈殿方面は

アトリエ後 0.5 ml の SDS-PAGE 試料溶液を加え、SDS-

ゲル電気泳動を行った。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE): 試料溶液

(7 1% SDS を含む Tris-酢酸緩衝液 (pH 8.2) (SDS-PAGE 試

料溶液と同様) を用いた。 ゲル濃度は 7.5%。 泳動条件は

前論文と同じに行った (5)。

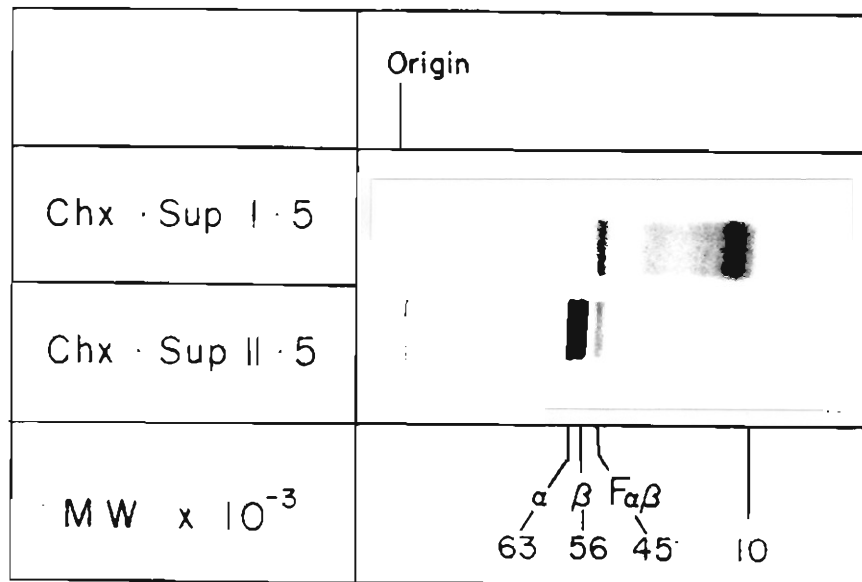


図. 1. Chx · Sup I · 5 及び Chx · Sup II · 5 の SDS - ジェル電気泳動図.

Chx · Sup I · 5 及び Chx · Sup II · 5 は 5 mM ヲキサレート存在下, 旨中 20°C 2.5 日間発芽させた子葉より Sup I 及び Sup II である. Sup I, Sup II の調整は本文中. 各 Sup は終濃度 1% に至るよう SDS を加え, SDS-PAGE 試料溶液に添加後 電気泳動にかけた. 泳動条件は本文中.

	Origin	$\alpha$	$\beta$	$F_{\alpha\beta}$	Incubation time (hr)
Sup 1·0					0
					18
Chx · Sup 1·1					0
					18
Chx · Sup 1·4					0
					18
Sup 1·4					0
					18

図. 2. 0, 1, 4日間吸水子葉中の各Sup I中に含まれる

タンパク質の in vitro での分解状態を示す SDS-ゲル電気泳動.

0.05 ml の各 Sup I に 0.15 ml の水を加えて 37°C で

0 時間または 18 時間放置した後 0.5 ml の SDS-PAGE 試料

溶液を加えて SDS-ゲル電気泳動にかけた。

## 結果

シクロヘキシムド存在下での吸水させた子葉中のプロテリン a in vitro における

変化: シクロヘキシムド存在下での5日間吸水させた子葉の抽出液の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動図を図.1.1に示す。抽出液を熱処理した Chx-Sup II.5 ではプロテリン a の  $\alpha$  と  $\beta$  の 24 のバンドが見られたが、熱処理前の Chx-Sup I.5 はプロテリン a の  $\alpha$  と  $\beta$  に相当するバンドが消失し、主として  $F_{\alpha\beta}$  のバンドの分子量が約 12,000 に相当するバンドの 24 が現われた。従って子葉中には未分解のまま存在しているプロテリン a の抽出過程でプロテリン a から  $F_{\alpha\beta}$  の限定分解が起ると考えられた。

シクロヘキシムド存在下での吸水時間によるプロテリン a の限定分解活性の発動を調べた(図.2.)。乾燥種子からの Sup I.0 及び1日吸水させた子葉の Chx-Sup I.1 には共に活性は見られなかった。Chx-Sup I.4 ではプロテリン a の  $\alpha$  のバンドが消失し、新たに  $F_{\alpha\beta}$  のバンドが出現した。対照としてインキペート1を用いた Chx-Sup I.4 はプロテリン a の  $\alpha$  と  $\beta$  のバンドを示し、正常に発芽させた子葉の Sup I.4 は  $\alpha$  のバンドの染色強度が弱く、 $F_{\alpha\beta}$  が現われたが、18時間インキペート1した後のプロテリン a には大きな変化は見られなかった。Chx-Sup I.4 では  $F_{\alpha\beta}$

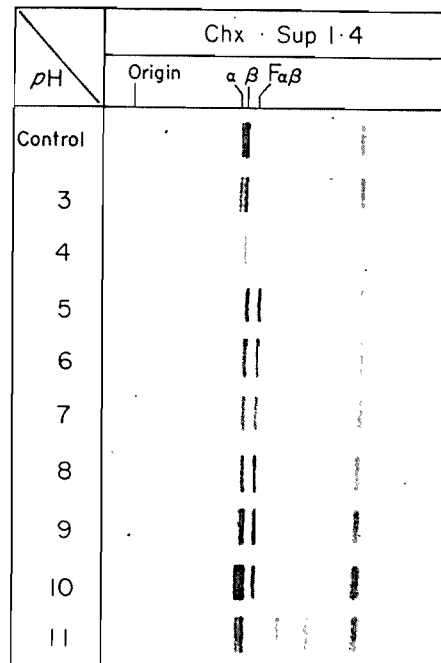


図. 3. Chx·Sup I·4 の プロポリンの 限定分解活性の 至適 pH

Chx·Sup I·4, 0.05 ml に 0.1 ml の 各 pH の 緩衝液を加え, 37°C で 18 時間 反応後, 1.0 ml の SDS-PAGE 試料溶液を加えた. 対照は 反応前に 熱処理したものと用いた.



Enzyme source Substrate	Chx · sup i · 4	Chx · sup ii · 4	Incubation time (hr)
Globulin			0
			18
F <sub>ab</sub>			0
			18
CM-Globulin			0
			18
γ			0
			18
γ'			0
			18
δ			0
			18

図4. Chx · sup i · 4 及 Chx · sup ii · 4 による F<sub>ab</sub>, CM-Globulin, γ 鎖, γ' 鎖, δ 鎖の分解.

反応液に 1% の 6 基質溶液 0.1ml と各 Chx sup  
0.1ml を加え、37°C で 18 時間反応後 20% TCA を 0.1ml  
加える。アセトン沈降後、SDS-PAGE 試料溶液に溶かす。

のバンドの位置と Sup I-4 の  $F_{\alpha}$  のそれとは確かに一致していた。

Chx-Sup I-4 のも限定溶解性は pCHB, PMSF,  $\beta$ -ME, DTT, EDTA や カボチャ 種子より精製した トリフリン-インヒビター (後節参照) に影響されなかった。この活性の至適 pH は 5-8 の広い範囲に存在していた (図.3.)。

シクロヘキサイド存在下で吸水させた子葉の抽出液 (Chx-sup i-4, Chx-

sup ii-4) の プロテリン,  $F_{\alpha}$ , CHC プロテリン,  $\gamma$ ,  $\gamma'$  鎖は 以下の作用:

図.1. より予想された通り, Chx-sup i-4 は プロテリンの  $\alpha$  のバンドを消失させ, 新たに  $F_{\alpha}$  のバンドを生じさせた (図.4.)。試料溶液に  $\beta$ -ME を加えて SDS-ゲル電気泳動を行うと, 分子量 22,000 の  $\delta$  の位置に主なバンドが生じた。CHC プロテリン,  $F_{\alpha}$  及び  $\delta$  鎖は大きな変化を示さなかった。一方  $\gamma'$  鎖は明らかにバンドの染色が薄くなると共に, 分子量 23,000, 24,000 と 13,000 の位置に新たなバンドを生じた。これに比べて  $\gamma$  鎖はあまり大きな変化を示さなかった。 $\gamma'$  鎖は反応溶液によく溶けるが,  $\gamma$  鎖は非常に溶け難い。この溶解度の差が 限定溶解性の差を生じさせたとも考えられる。

一方 Chx-sup ii-4 は プロテリンを限定溶解する活性と

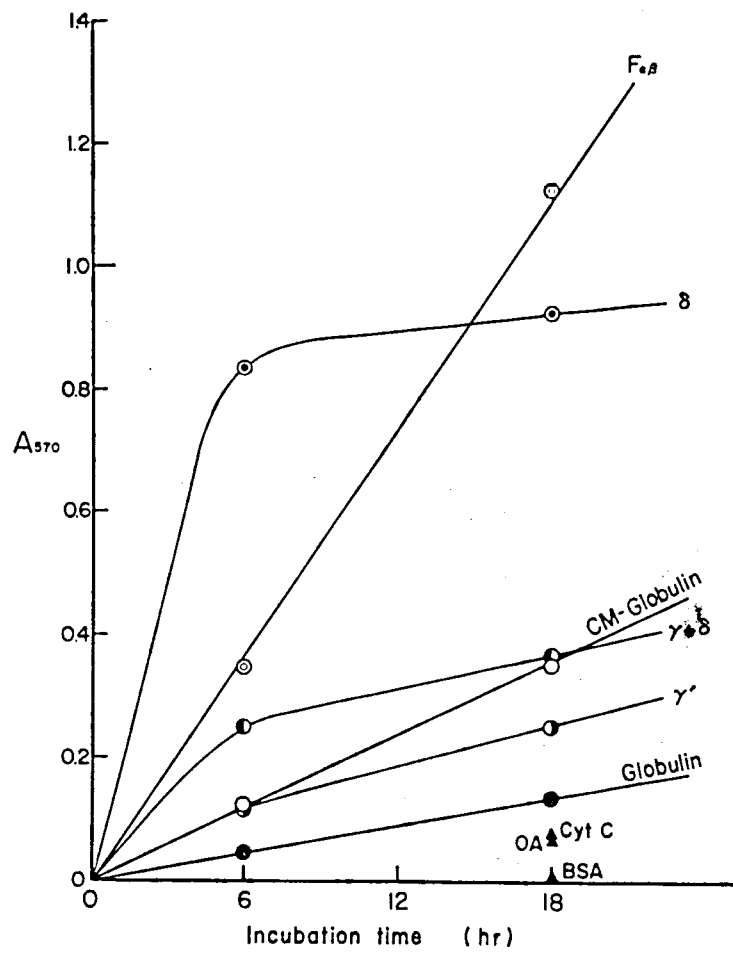


図.5. Chx-sup ii. 4 1=δδ 7'10 7'11 =, F<sub>αβ</sub>, CH 化 7'10 7'11 =  
及 α: γ 鎖, γ' 鎖, δ 鎖 の 溶解性

Chx. sup ii. 4 0.1ml 1= 1% の 炭酸溶液 と 加え,  
37°C で 6 時間 18 時間 反応 させ 後。TCA の 溶解性  
を 画 ε => 対 して 発色 させ, A<sub>570</sub> と 測定 した。

夫より更に(図4.)  $F_{\alpha\beta}$ , CM化ジロジリン,  $\delta$ 鎖の大きな変化も見られ  
たから、 $\gamma$ 鎖と $\gamma'$ 鎖に同じくは  $Chx \cdot sup ii \cdot 4$ と同様の  
の変化をまじらせた。即ち $\gamma'$ 鎖は溶解による新たなバンドをま  
じ、 $\gamma$ 鎖は完全にバンドの色がうすくなるに程度である。

次に  $Chx \cdot sup ii \cdot 4$  による TCA の溶解性もまた 基質より  
遊離するアミノ酸あるいは小分子種に時間変化を示した(図5)  
等量のウツ心筋チトクロム C, 卵白アルブミン, ウツ血清アルブミンと基  
質と同一の場合、小分子種あるいはアミノ酸の遊離は非常に少なかった。  
また TCA 沈殿物中の SDS-ゲル電気泳動パターンも全く変化は見られ  
なかった。

ジロジリン,  $\gamma$ ,  $\gamma'$ 鎖, CM化ジロジリンの溶解は小分子の  
比に  $F_{\alpha\beta}$  や  $\delta$ 鎖から見た小分子種あるいはアミノ酸の大量に遊離  
した。ジロジリンは  $Chx \cdot sup ii \cdot 4$  による  $F_{\alpha\beta}$  をまじらせた(図4)  
のためジロジリンに特有な溶解性は非常に低い。 $\gamma'$ 鎖は  $Chx \cdot$   
 $sup ii \cdot 4$  による分子量 23,000 あるいは 13,000 の分子種へ溶解し  
た(図4)のためこれらから見た溶解は小分子種をまじらせた  
と考えられる。 $\gamma$ 鎖は  $Chx \cdot sup ii \cdot 4$  による遊離は溶解しない(図4)  
のため  $\gamma$ 鎖と $\delta$ 鎖の混合物に特有な溶解は  $\delta$ 鎖の溶解パターン  
を反映しうると考えられる。 $\delta$ 鎖の溶解は他の分子種と異なるパターン

表. 1. Chx-sup ii. 4 の プロテリン 及び F<sub>αβ</sub> 分解活性に  
 与える インヒビター, SH 試薬, 金属キレート剤の影響.

Compound added	Concentration (mM)	Globulin		F <sub>αβ</sub>	
		Activity <sup>a)</sup> (μ units)	Relative activity (%)	Activity <sup>a)</sup> (μ units)	Relative activity (%)
None	-	54	100	241	100
pCMB	5	10	19	44	18
PMSF	1	27	50	122	51
PTI <sup>b)</sup>	3ImU	61	113	206	85
β-ME	5	197	365	600	249
DTT	5	269	498	325	135
EDTA	5	19	35	44	18

a) 1 unit は 1 分間に A<sub>570</sub> を 1 単位増加させるのに  
 要する酵素量とした。

b) カボチャ種子より精製したトリプロシン・インヒビター (第4章,  
 第2節参照)

を示した。

Chx. sup ii. 4 には  $\gamma$ -D-グルタミル  $\gamma$ -D-Glu の分解は  $5 \mu\text{M}$  の pMBE と EDTA による阻害された (表. 1.)。  $1 \text{ mM}$  PMSE による阻害は PMSE を溶解した  $\gamma$ -D-グルタミルによる阻害と同等である。  $\beta$ -ME や DTT などの SH 試薬による還元化された。 これは酵素が還元化されたためか、あるいは  $\gamma$ -D-グルタミル  $\gamma$ -D-Glu の  $\text{S-S}$  架橋の切断による遊離した鎖の分解を受けやすくなるためである。

## 考察

子-7は示さなかつたが、50%エチールに3時間浸した  
 種子からの Sup I.O には フロアリンの限定分解活性が存在した。  
 このような処理で発現される活性が 乾燥種子で見出せない  
 原因として次のようなことが考えられる。乾燥種子中にはインヒビター  
 が存在し、抽出液ではこのインヒビターが作用して活性は測定され  
 なかったが、エチール処理によりインヒビターは失活したと推定され  
 明かつた。乾燥種子に酵素が存在する場合、種子の胚発芽  
 (休眠中)中、同じ細胞内で貯蔵蛋白質の合成が盛んな時  
 期に分解酵素も合成されることになる。このような際に合成される  
 分解酵素は不活性な状態であることが期待される。安全装置と  
 してのインヒビターの存在も充分考えられる。フロアリンと存在した  
 場合にはそれを活性化させるのに他の酵素の合成が必要になる。  
 発芽直後の早いフロアリンの分解開始(オ4章、オ2節、図.10) (4)  
 からこれは少し考え難い。

シロハキシイミド存在下で4日間吸水させた種子にもこの  
 活性が発現した(図.1, 図2.)が、シロハキシイミドの作用に  
 関しては全く不明である。シロハキシイミド存在下で吸水さ  
 せることにより乾燥種子(大麦)には、フォスファターゼのアイソマ

イムが出現したという報告がある(6)。

以下は得られた結果を説明するための推測であるが、  
 このような調節機構を考えると可能である。上の考察の通り、  
 休眠種子中に限定分解活性をもつ酵素とそのインヒビターが存在  
 している。正常な発芽ではインヒビターを失活させる因子が働き、  
 出現する。この因子の活性は遊離のアミノ酸量に依存しており、ア  
 ミノ酸量が多くなると低くなり、逆に遊離のアミノ酸量が少なくなると因子の  
 活性は高くなる。即ちインヒビター活性を失活させるものとプロテリンを分解  
 させるように働く。シクロハキシミド存在下では吸水した種子は  
 アミノ酸遊離量が非常に少ないので因子の活性が上昇しインヒビター  
 が失活される。酵素自体は膜に包われている蛋白質顆粒内  
 へ入り込むための *in vivo* でプロテリンを分解することはできないが、  
*in vitro* で細胞を破壊しやると酵素活性が発現される。

シクロハキシミドが膜の透過性を変えるという報告はある(7)。

以上は考えられる可能性のひとつである。インヒビターの存在に  
 関しては第4章第2節でも議論している。

限定分解活性は pCHB, PMSF, EDTA や カピチアのトリフシ  
 ンインヒビターなどの影響は受けなから、従ってチロシル酵素や  
 セリンチロシル酵素ではない。Reilly らはプロテリンの分解途



程について 限定分解物が生じるという我々の結果を支持しているが、  
 グロブリンとトリプシン消化可と 限定分解物が生じるので、トリプ  
 シン様のセリニプロン酵素が働くとしている(8)が、我々の結果とは  
 一致しない。我々の予備実験の結果では トリプシン消化  
 において  $F_{\alpha\beta}$  は生じず、やがて次々と分解が進んでいった。  
 しかし ここで シロアキシド存在下で吸水した子葉の限定分解活  
 性は pCMBで阻害を受けないが、グロブリンや  $F_{\alpha\beta}$  から アミノ酸や  
 小アミノ酸を生じる活性は pCMBにより阻害される。従って両者は  
 異なるタイプの酵素活性とみなせる。この点でもトリプシンとは異  
 なることがわかる。

グロブリン由来のいくつかの基質の限定分解の結果(図4)か  
 ら グロブリンでは  $\alpha$  サブユニットが完全に分解を受けるとして、 $\beta$  サ  
 ブユニットの分解は進み難いことがわかる。  $\alpha$  サブユニットは  $\gamma$  鎖を  
 $\beta$  サブユニットは  $\gamma'$  鎖をもっている(9)。分解後の試料に  $\beta$ -MEを  
 加入し SDS-ゲル電気泳動を行うと、 $\gamma$  鎖が分解され  $\gamma'$  鎖  
 が残っているのが見られる。一方 CM化 グロブリンより分解した  
 $\gamma$  鎖と  $\gamma'$  鎖とでは、 $\gamma'$  鎖の方が容易に分解を受けて新しい分  
 種を生成するのに対して、 $\gamma$  鎖も同じ傾向はあるが、分解を  
 受け難い。これは両者の溶解度の差によるものであろう。

フロアリンの場合には塩濃度と低く可溶性の2、この状態では  
 Y鎖の方が溶解を受けやすいと考えられる。この溶解による万子種  
 36,000のY鎖(あるいは万子種34,000のY'鎖)が17所切断  
 された、万子種23,000(あるいは24,000)と13,000の2つの万子種  
 に分かれるのか、23,000(24,000)の万子種がさらに溶解して  
 13,000の万子種と生じたか問題となる。もし後者であるとすれば、  
 Y(Y')鎖がフロアリンと溶解した際にかなりの量の小アポチドが  
 遊離されてくるはずである。図.5.の結果はこれを否定している。

更に図.4.の23,000と24,000の染色度と13,000の染色度に大差がな  
 いのでY(Y')鎖はこの2つの万子種に溶解されると考える方が妥当である。

次にフロアリン由来の各基質から小アポチドあるいはアミノ  
 酸と遊離させる活性についてみると、Fopと $\delta$ 鎖に特異的である  
 (図.5.)。Fopは $\delta$ 鎖とY(Y')鎖の溶解物とが「シスルスト」  
 結合したものと考えられる。Y'鎖は限定溶解を受けるとしてもか  
 かわらず、小アポチドの遊離活性は低いので、Fopのない活性  
 は $\delta$ 鎖が溶解を受けると結果とみなすことができる。一方フ  
 ロアリンも $\delta$ 鎖をもっているが活性は低い。これはY(Y')鎖と共に存在  
 する $\delta$ 鎖の状態が単独で存在する場合もFopの成分として存在する  
 場合と異なり、溶解を受け難い構造をとっていることを示唆している。

$\delta$ 鎖の分解活性の初速度が非常に速く、反応があたかも飽和に達したような曲線を描く理由は不明である。 $\delta$ 鎖の分解産物が阻害的に働いているのかもしれない。この場合  $F_{\beta}$  の一成分としての  $\delta$ 鎖は シスルフィド結合で他の  $\Delta$ 7-チド鎖とつながっているための分解産物による阻害を受けなかったと考えることができる。  $\gamma$ 鎖と  $\delta$ 鎖の混合物の分解活性も曲線を描いているが、これは  $\delta$ 鎖の分解を反映しているのであって、 $\gamma$ 鎖は  $\gamma$ 鎖と同様に殆ど分解していないであろう。CH<sub>2</sub>プロポリンの場合は  $\gamma$ 鎖の分解率が重なり直線的に増加したと考えられる。

この活性は pCMB, EDTA で阻害を受け、 $\beta$ -ME や DTT により活性化される。この活性化は基質分子のシスルフィド結合が切れて  $\delta$ 鎖が遊離したためとも考えられるが pCMB により阻害を受けるので一応チオール酵素とみなせる。

シフロキシイミドにより BAPA 分解酵素の合成は止められる (後節, 図. 1.)。このように蛋白質合成が止まっているのであから、 $F_{\beta}$  や  $\delta$ 鎖を分解する酵素も乾燥種子中にすでに存在していると考えれば、sup ii-01 はこの活性はなかった (後節, 表. 1.) から、限定分解活性と同様のインヒビター因子の存在を仮定して現象を説明しなければならない。

スエリ 貯蔵蛋白質 グロブリンの分解過程を追うと、吸水により活性化された(機構は不明)限定分解酵素で グロブリンは  $F_{\alpha\beta}$  の分子量 13,000 の多量種に分解される。この反応は吸水後同じく速かに起り、発芽 4 日目までに グロブリンは殆ど消失する。一方  $F_{\alpha\beta}$  はこれに特異的な分解酵素による 2 小分子に分解される。この反応は胚内の還元状態や pH 1 によるシスチン結合が切れることあるいは分解産物による阻害の可能性がある。いずれにしても グロブリンの分解に比べて反応の遅いので  $F_{\alpha\beta}$  が発芽途中に蓄積する。次に  $F_{\alpha\beta}$  から生じた小分子も、限定分解で グロブリンより遊離した 13,000 の多量種は グロブリン同様 Arg 含量が低いので、これらは発芽途中で出現する BAPA 分解酵素 (Arg のカルボキシ側を切断する) と LPA 分解酵素 (アミノ酸側を分解する) による分解されるものと考えられる (後節参照)。

シクロヘキシミドの作用、休眠種子に分解酵素が存在するかどうかはその不活性化の機構、また発芽時の酵素の活性化の機構など残された問題は多い。またこれら一連の酵素群が細胞内のどこで働いているか。即ちどこまでの分解が実際に蛋白質顆粒内で行われているか、検討する必要がある。

## References

- (1) A. G. Iordan, M. A. Belozerskii: *Biokhimiya* (1976) 41, 673
- (2) A. Tomomatsu, N. Iwatsuki, T. Asahi: *Agric. Biol. Chem.* (1978) 42, 315
- (3) J. B. Caldwell, L. G. Sparrow: *Plant Physiol.* (1976) 57, 795
- (4) I. Hara, K. Wada, H. Matsubara: *Plant & Cell Physiol.* (1976) 17, 815
- (5) I. Hara, K. Wada, S. Wakabayashi, H. Matsubara: *Plant & Cell Physiol.* (1976) 17, 799
- (6) N. Papageorgakopoulou, J. G. Gerogatsos: *Int. J. Biochem.* (1978) 9, 133
- (7) R. Ezekeil, K. S. K. Sastry, M. Udayakumar: *Indian J. Exp. Biol.* (1978) 16, 519
- (8) C. C. Reilly, B. T. O'Kennedy, J. S. Titus, W. E. Splittstoesser: *Plant & Cell Physiol.* (1978) 19, 1235
- (9) I. Hara, M. Ohmiya, H. Matsubara: *Plant & Cell Physiol.* (1978) 19, 237

## オ 2 節 発芽種子中に出現する蛋白質分解活性

### 要約

1. 子葉中のいくつかの蛋白質分解活性の発芽に伴う変化を調べた。乾燥種子中にはカゼイン分解活性と LPA 分解活性が少し存在し、BAPA 分解活性及び グロブリンとその限定分解物  $F_{\alpha\beta}$  の分解活性は全く見られなかった。いずれの活性も発芽 2-4 日目に急激に増大し、それぞれの活性が 4-6 日目に最大に達した。その後の活性の減少パターンは各活性により異なり、最大活性の 50% に減少するのは グロブリンと  $F_{\alpha\beta}$  の分解活性が最も早く発芽 7 日目、次いでカゼイン分解活性が 10-12 日目であった。BAPA 及び LPA 分解活性は発芽 12 日目に約 75% の活性を保持していた。一方 グロブリンから  $F_{\alpha\beta}$  を生じる限定分解活性も乾燥種子には存在せず、発芽 4 日目が最大であった。
2. 発芽 5 日目の子葉の抽出液をアルミ過し、各活性の溶出パターンを調べた。グロブリン分解活性は I 及び II の 2 つのピークを示し、BAPA 分解活性のピークとは異なったが、カゼイン分解活性は グロブリン分解活性 II と同じ所に溶出された。

3. BAPA分解活性の精製を試みた。却る精製した BAPA分解活性は pCMBの阻害を受け、 $\beta$ -MEや DTTによる活性化されるが、PMSF, EDTA, 2価金属イオンやカビ糸種子のトリアシン・インヒビターには影響されなかった。BAPA分解活性にはフロアリンから $F_{0\beta}$ を生成する限定分解活性はなかった。またフロアリンや $F_{0\beta}$ から小ハプロチドやアミノ酸と遊離させる活性も非常に弱かった。
4. 子葉中にトリアシン・インヒビターが存在していた。このトリアシン・インヒビターは発芽に伴ってゆっくり減出し、発芽12日目に最大阻害活性の60%を保持していた。発芽時の蛋白質分解酵素との関係は不明である。

## はじめに

貯蔵蛋白質として グロブリンをもつ種子 あるいはその芽  
 玉えに出現する蛋白質分解酵素 について多くの報告があり(1-5),  
 単離・精製されたものもある(6-10). しかしこの時期に蛋白質  
 の代謝が盛んであるからといって 必ずしもこれらの酵素が貯蔵  
 蛋白質の分解に直接関与しているとは限らない. 調べられた中で  
 実際貯蔵蛋白質と分解した例は少なく(9,10), しかも118317  
 のグロブリンと分解した例はあまりない.

予業中で貯蔵蛋白質の分解に関与している一連の酵素に  
 ついて研究する場合 注意しなければならない点はいくつもある.  
 第1に 精製して得られた酵素が同じ起源の種子貯  
 蔵蛋白質と分解しない場合でも, 一概にその酵素が貯蔵蛋白質  
 の分解に関与していないとは言えない. 貯蔵蛋白質に限  
 る分解などの変化と与えてやることにより分解活性と現わすこと考  
 えられる. 即ち貯蔵蛋白質の分解に二次的に働いている可能性  
 がある. 第2に 動物性起源の蛋白質(カゼイン, アルブミンなど)  
 と基質として分析した結果 活性が見いだせない場合も, 貯蔵  
 蛋白質に特異的に働く酵素が存在する可能性が残される.  
 第3に. 芽玉えの時の分解活性を *in vitro* でやる時に基質として



同じ起るの種子貯蔵蛋白質を用いた例が多か、実際には  
 発芽時期におて 基質となる蛋白質分子自体も変化して忘れ  
 れて下らない。即ち貯蔵蛋白質の殆どは消失した時期の芽  
 への可溶性の基質となるのは in vivo では貯蔵蛋白質の分解  
 産物なのである。

カボチャ (Cucurbita sp.) 種子では 発芽初期の蛋  
 白質分解の基質となるのは 11S 7170 の フロリンのみであり (11),  
 蛋白質代謝の追跡には有利な材料である。そのフロリン分  
 子のサフ=2=7 ト構造などの性質や 発芽途中に蓄積される フロ  
 リンの限定分解物 F<sub>90</sub> 1=10 12 は 前に報告した (11, 13 ;  
 表 3 章)。ここでは 発芽に伴って子葉に出現するいくつかの酵素  
 活性について調べ、発芽時の全蛋白質量やフロリン量の発芽の  
 予-7 (12) と比較しながら考察した。

## 材料と方法

材料: N- $\alpha$ -ベンジル-D,L-アミノ酸 p-トリコアラート (BAPA),  
 ロイシン p-トリコアラート (LPA), カゼイン, アソカゼイン, シロハキシト  
 セファロース 4B の純度は特級と 羊井化学薬品株式会社  
 (京都) 及び 和光純薬工業株式会社 (大阪) より購入した。  
 トリコシンは Worthington 社より購入した。カビチキ (テツカブト  
 ナンキン交配種, *Cucurbita* sp.) 種子は 羊井種苗株式会社  
 (京都) より購入した。

種子の発芽: 種子は 次亜塩素酸ナトリウムで 30 万回滅菌  
 後, 1 時間水洗したものを 1 回用いた。殻を除去した種子を  
 シャーレ中で水あらいは 5 mM シロハキシトで湿らせたに口紙  
 上に置き, 暗所 20°C で 吸水・発芽させた。

種子プロアリン及びプロアリンの限定分解物 (Fap) の調整:

前の論文に詳述した (11, 13)。

トリコシン・セファロースの調整: 約 10 ml のセファロース 4B を 10 倍  
 量の水で洗った後, 冷却して BrCN 水溶液 (750 mg/10 ml) を  
 加え, 3 M NaOH で pH を 10~11 に保った。20 万回放置後,  
 吸引口通して, 100 ml の冷水, 続いて 100 ml の 0.1 M 炭酸  
 ナトリウム炭酸水素ナトリウム冷緩衝液 (pH 9.0) で洗った。

これに トリプトシン 溶液 (20mg / 10 ml 0.1M 同緩衝液) を加えて 一夜冷却振盪後, 300 ml の 0.1M リン酸緩衝液 (pH 8.0), 0.1M NaCl, 次に 300 ml の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 4.0), 1M NaCl で洗った。ここに 塩酸で pH 8 に調整した エチレンジアミン 溶液 (2g / 20ml) を加え, 4時間放置した。0.1M Tris-緩衝液 (pH 8.0) 300ml で洗滌後, 25 mM 7-イン酸緩衝液 (pH 5.8) に平衡化し, トリプトシン-エポキシカラム (1 x 15cm) を作成した。

トリプトシン・インヒビター活性の測定: 反応液の組成は

1mM BAPA (予め少量の DMSO に溶かした後, 0.2M リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した) 0.5ml, 約 2m units の トリプトシン 溶液 0.1ml, インヒビターの溶液 0.02 ~ 0.2ml, 及び同緩衝液 から成り, 全容量 1.3ml で 37°C 1時間反応させた。0.5ml の 1M 酢酸を加えて反応を停止させた後,  $A_{410}$  を測定した。

1 Im unit は 2m units の トリプトシンの活性を 50% 阻害するのに要する インヒビター量とした。

Sup II.5 に含まれる BAPA の分解活性, 7-インドール-7-アミド分解活性及び

トリプトシン・インヒビター活性のウルトロパル・70317-37-1:

蒸発後5日目の子葉 122個分 (33.6g) からの抽出液 (supii.5) を透析・遠心後 (supii.5), 硫酸方画 (20%-75%) を行った。沈殿を 25mM グェン酸緩衝液に溶かし, 同緩衝液で平衡化した ウルトロフィル AcA 44 カラム (2.9 x 70 cm) 1本にかけ溶出した。流速は 28ml / 時間, 各分画は 6ml ずつ集め, BAPA 及びトリプトファン の分解活性, 及び トリプトシン・インヒビター 活性の測定を行った。

#### BAPA 活性方画 及び トリプトシン・インヒビター 活性方画 の分子量の推定:

上記と同様の操作と 子葉 4個分の supii.5 を試料として, ウルトロフィル AcA 44 カラム (2 x 100 cm) で行った。マーカーとして用いた蛋白質は ウシ血清アルブミン (分子量, 66,000), 卵白アルブミン (分子量, 46,000), RNase (分子量, 12,800), 及びウマ心筋チトクロム C (分子量, 11,700) である。

#### トリプトシン・インヒビター の アフィニティ・プロット グラフ による精製:

supii.5 の下口通過後の トリプトシン・インヒビター 分画を上記の通り調整した トリプトシン・セファロス カラム (1 x 15 cm) 1本にかけ, 25mM グェン酸緩衝液で A<sub>280</sub> がなくなるまで洗った後, 0.2M KCl - HCl (pH 2.0) で インヒビター 分画を溶出した。この分画はセファテックス G-25 で脱塩後, 凍結乾燥し他の実験に用いた。

トリプシン・インヒビター活性の発芽に伴う変化:

発芽の日

目の各3葉 10個1行からの7-ヒン酸緩衝液 1mlの抽出液 (supim)

とトリプシン・エフロース・アフィニティー・カラム (1×15cm) 1mlにかけ、吸着、

溶出液はインヒビター活性を測定した。

### 蛋白質分解活性の測定

BAPA分解活性:

反応液は 0.2M リン酸緩衝液

(pH 8.0) に溶解した 1mM BAPA 0.5ml 及び必要に応じて同緩

衝液で薄めた酵素溶液 0.1ml から成る。インヒビター、SH

試薬、2価金属イオンの効果とみた場合は、適切な濃度の

試薬 0.05ml と酵素溶液 0.05ml との混液、20分間放

置後 0.5ml の 1mM BAPA を加えて反応を開始した。PMSF

(エチル溶液) は基質溶液に加えて加え、対照として用いた

基質溶液にも同量のエチルを加えた。反応は 37°C

30分間で、反応停止は 0.5ml 1M 酢酸の添加で行った。

活性は  $A_{410}$  を測定し、1 unit は 1分間に  $1 \mu\text{mole}$  の BAPA

を分解するのに要する酵素溶液量とした。対照は酵素

溶液の代わりに同緩衝液を入れたものを用いた。

LPA分解活性:

0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶

解した 5mM LPA (予め少量の DMSO に溶かして加えた) 1ml

に酵素溶液 0.1ml を加え、20°C で反応を開始し、 $A_{405}$

の変化を日立 124型 分光光度計で追った。1 unit は 1 週間 =  $1 \mu\text{mole}$  の LPA を分解するのに要する酵素溶液量と 1 丁。

カゼイン分解活性: 0.1 M フェン酸緩衝液 (pH 5.8) に溶解した 2% カゼイン 0.1 ml に 酵素溶液 0.1 ml と加え、 $37^\circ\text{C}$  で 2-20 時間 反応させた。20% TCA を 0.1 ml 加えて 反応を停止した後、 $0^\circ\text{C}$  で 30 分間 放置した。遠心 上清の TCA 不溶性分画 0.1 ml に 0.2 ml の 0.2 M NaOH を加えて 中和した後、1.0 ml の ニヒトリニ 試薬 (2% ニヒトリニ, 0.04%  $\text{SnCl}_2$ , 1M 酢酸緩衝液 (pH 5.5), 75% エチルアルコール) を 添加し、 $100^\circ\text{C}$  15 分間 処理して 発色させ、 $A_{570}$  を 測定した。

1 unit は 1 週間 =  $A_{570}$  が 1 丁だけ 増加させるのに 要する 酵素溶液量と 1 丁。

グロブリン分解活性: 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) あるいは 0.1 M フェン酸緩衝液 (pH 5.8) (共に 1M NaCl を含む) に溶解した 2% グロブリンと 基質溶液とに 用いて 上記と同様の 操作を行った。ただし 反応時間は 4 時間とした。

sup II.5 による分解活性の pH 依存性: 10 mM フェン酸緩衝液に 溶解した 1% カゼイン ありは グロブリン 0.3 ml に 0.1 ml の 各 pH の緩衝液と 0.2 ml の sup II.5 を加えて  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間

反応させた。各反応液の pH を調べた後 1.65 ml の 10% TCA を添加し、その遠心工清 0.1 ml について上記と同様の操作を行い、 $A_{520}$  を測定した。

用いた緩衝液は pH 2-7 ; 0.1 M フェニ酸緩衝液, pH 7-8 ; 0.2 M リン酸緩衝液, pH 8-11.5 ; 0.2 M 炭酸ナトリウム-炭酸水素ナトリウム緩衝液 である。

カゼインは pH 5.0 以下になると溶解度が悪くなるので、2% アソカゼインを用いて同様の操作を行った。0.5 ml の 8% TCA の添加で反応を停止後、遠心工清の  $A_{366}$  を測った。1 unit は 1 万回に  $A_{366}$  を 1 分だけ増加させるのに要する酵素溶液量とした。

ブロフリニ及び Fab の分解活性の pH 依存性: 1 M NaCl を含む

12.5 mM フェニ酸緩衝液 (pH 5.8) に溶解した 0.2% ブロフリニあるいは Fab 0.05 ml, ウルトラ・トル・グロスト 7-571-5 画 I あいは 5 画 II を 0.1 ml, 各 pH の緩衝液 (上記と同様) 0.4 ml から成る反応液を 37°C 18 時間反応させた。pH を調べた後、0.5 ml 20% TCA を添加し、その遠心工清 0.1 ml について上記と同様に 12 = ストリニを染色して  $A_{520}$  を測定した。対照は未反応の溶液の TCA 可溶性画を用いた。1 unit は 1 万回に

As70 と 1 T=1 T 増加 2 倍 以下 必要 酵素 量 と 1 T.

プロテリン 及び Fab の 分解 活性 の 発芽 に 伴う 変化: 酵素 溶液

として Supilin を 用い, 0.1 M フェン酸 緩衝液 (pH 5.8) を 用いた 地

は 全て 上記 の pH 依存性 の 測定 の 場合 と 同様 に 操作 した.

TCA 沈殿 方法 は アセトン 洗滌 後, 0.1 ml の SDS-PAGE 試料

溶液 を 加え, SDS-ゲル 電気泳動 を 行った.

### BAPA 分解 酵素 の 精製

第 1 段階, 抽出: 発芽 5 日 目 の 子葉 149 個 19 (42.3 g) に 200 ml

の 0.1 M フェン酸 緩衝液 (pH 5.8) を 加え 取り 混ぜ した. "窒カ-セ"

で 抽出 液 と し, 遠心 (8000 g × 30 分) で 清 と 集めた.

第 2 段階, DEAE-セルロース カラム フロタ グラフィー: 遠心 上清 と

25 mM リン酸 緩衝液 (pH 8.0) で 透析 後 再び 遠心 で 沈殿 を

除き 上清 を DEAE-セルロース カラム (6 × 8 cm) に 吸着 させ,

同 緩衝液 で 充分 洗った 後, 0.5 M NaCl と 含む 同 緩衝液 で

溶出した. 活性 分画 と 同 緩衝液 に 対し 透析 した 後,

遠心 上清 と 集めた.

第 3 段階, DEAE-セルロース カラム フロタ グラフィー: 上清 を DEAE

-セルロース カラム (2.4 × 45 cm) に 吸着 させ, 100 ml の 同 緩衝

液 を 流した 後, 500 ml の 同 緩衝液 と 500 ml の 0.7 M NaCl と



含む同緩衝液の濃度勾配で溶出し、活性画を集めた。

才4段階, ウルトロナル AcA 34 フロマトグラフィー: 活性画

と 85% 硫酸沈殿させた後, ウルトロナル AcA 34 カラム (3 × 116 cm) にかける, 25 mM フェニ酸緩衝液 (pH 5.8) で溶出した。

才5段階, DEAE-セルロース 1=83 濃縮:

才6段階, ウルトロナル AcA 44 フロマトグラフィー: 濃縮した

活性画を ウルトロナル AcA 44 カラム (3 × 190 cm) にかける, 25 mM フェニ酸緩衝液 (pH 5.8) で溶出した。流速は 26 ml/時間。各画は 10 ml ずつ集めた。活性画は DEAE-セルロースで濃縮した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE): 試料

溶液は 1% SDS を含む 25 mM Tris-酢酸緩衝液 (pH 8.2) (SDS-PAGE 試料溶液と略す) を用いた。泳動条件は全て前論文の通りに行った (11)

蛋白量の定量法: ビュレット反応 あるいは UV 吸収 ( $A_{280}$ ,  $A_{280}$ ) 法により求めた。

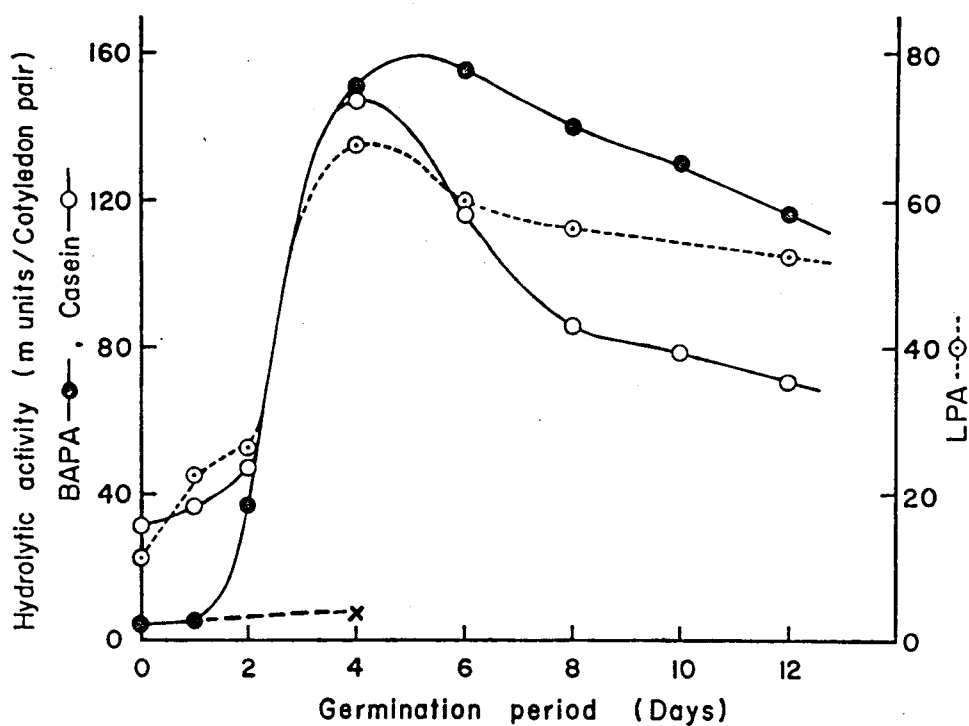


図. 1. 子葉中の蛋白質分解酵素活性の発芽に伴う変化.

発芽  $n$  日目の子葉の  $\text{supi} \cdot \text{m}$  と BAPA と  $\alpha$  LPA 活性測定用には  $\text{pH}$  緩衝液 ( $\text{pH} 7.0$ ) で抽出し、これを酵素液として用いた。一方カゼイン、アジカゼイン分解活性の測定用には  $\text{pH}$  緩衝液 ( $\text{pH} 5.8$ ) で抽出した  $\text{supi} \cdot \text{m}$  と  $\text{Ch} \cdot \text{supi}$  に透射した  $\text{supi} \cdot \text{m}$  を酵素液として用いた。---x は  $5 \text{mM}$  シクロキシイミド存在下での吸水させた子葉の  $\text{Ch} \cdot \text{supi}$  の BAPA 分解活性を示した。

Substrate Enzyme source	Globulin			F <sub>aβ</sub>		Incubation time (hr)
	origin	α	β	origin	F <sub>aβ</sub>	
sup ii·2						0
						18
sup ii·4						0
						18
sup ii·6						0
						18
sup ii·8						0
						18
sup ii·10						0
						18

図. 2. γ-D711-2 及び F<sub>aβ</sub> の分解活性の発現に伴う変化.

発芽 m 日目の子葉の sup ii·m (γ-D711-2 抽出液)

を酵素液として用いた。0.2% γ-D711-2 及び F<sub>aβ</sub>

(12.5mM γ-D711-2 抽出液, 1M NaCl 溶解) を基質溶

液として 37°C 18 時間反応させた後, TCA 沈澱

法による SDS-PAGE 泳動を行った。

表. 1. γ-GTase 及 α-Fop の肝活性の発現に伴う変化

Enzyme source	Activity <sup>a)</sup> (m Units/Cotyledon pair)	
	Substrate	
	Globulin	F <sub>αβ</sub>
sup ii·0	0.09	----
sup ii·1	0.09	0.09
sup ii·2	0.23	0.02
sup ii·4	2.07	4.56
sup ii·6	1.70	3.47
sup ii·8	0.75	1.37
sup ii·10	0.92	0.98
sup ii·12	0.42	1.08

a) 1 unit は 15 分間 1500 μl 反応液に 1 単位を加えて 15 分間反応

酵素量と 1 分。

## 結果

発芽に伴う種子中に出現する酵素活性: カゼイン, BAPA,

LPA の可解活性の発芽時の変化と図.1. に示した。未発芽種子中にもこれらの活性は少なからず存在していた。これらの活性も発芽2日目から4日目にかけて急激な増加を示した。カゼインの活性は発芽12日目まで半減したか、BAPA 可解活性は発芽5日目から6日に最大となり、12日目でもその70%以上の活性を保持していた。

プロテリンの限定可解活性は発芽4日目の  $\text{sup II} \cdot 4$  に現われた(図.2.)。即ち  $\alpha$  のバンドは消えなくなり、 $F_{\alpha\beta}$  が主になった。これは *in vivo* でのプロテリンの可解パターンと同じである。 $\text{sup II} \cdot 6, 8, 10$  にもわずかに活性が見られた。図には示していないが  $\text{sup II} \cdot 0, 1$  には活性はなかった。 $F_{\alpha\beta}$  の可解に類似した保持にバンドの色強度が大きく減少したものはなかった。

一方プロテリン及び  $F_{\alpha\beta}$  から  $P_{\text{ミノ}}$  酸や小分子物質と遊離する活性もやはりカゼイン, BAPA, LPA 可解活性と同様発芽2日目から4日目にかけて急激に増大し、その後減少した。発芽12日目には最大活性の20%近くになった(表.1)

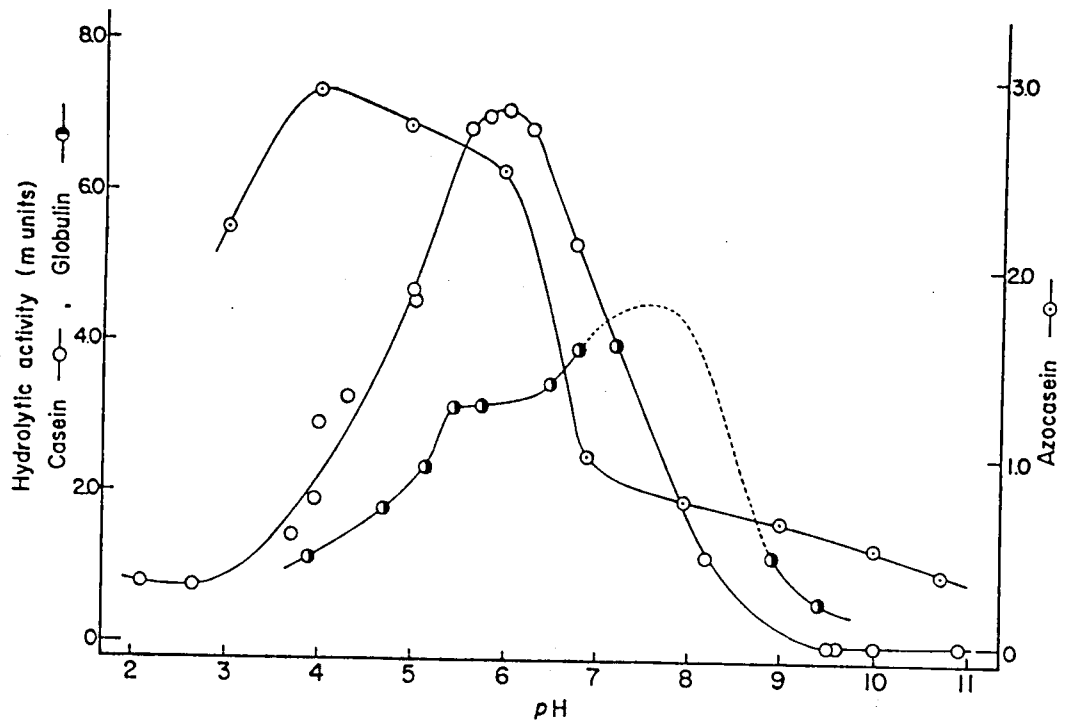


図. 3. 発芽5日目の子葉中の蛋白質分解活性の至適pH

活性測定の詳細は本文中。破線は

図. 5. への推定で插いた。

Fop の分解活性は、ブドウ糖の分解活性に比べて 21 倍近く強いことも特徴であった。

また、カゼイン、BAPA、LPA、ブドウ糖、Fop の分解活性は、いずれも発芽 2 日目までは大きな変化は見られず、その後急激に上昇し、発芽 4 日目近くで最大になったが、その後の活性の減衰をみると、ブドウ糖と Fop の分解活性の減衰パターンは似ているが、カゼインや BAPA の分解活性の減衰パターンとは異なり、非常に急激であった。

いずれの活性もほぼ最大と認められる  $\text{sup II} \cdot 5$  についで分解活性の至適 pH を調べた (図. 3)。カゼイン分解活性の至適 pH は 5.9 であったが、pH 5.0 以下ではカゼインの溶解度がおろしたの酸性側での活性が低下したと考えられる。アミノカゼインはカゼインに比して酸性側での溶解度が高い。その分解活性の至適 pH は 4~6 に存在した。一方ブドウ糖の分解活性は pH 5.0 ~ pH 8.5 の範囲に存在した。至適 pH も pH 8 付近と pH 5-6 の少なくとも 2 つのピークが存在した (図. 3, 図. 5.)。

Sup II. 5 中に存在する BAPA とブドウ糖の分解活性:  $\text{sup II} \cdot 50$

ウルトラフィル・ブドウ糖ラフィー-1-86 溶出パターンを図. 4. に示した。

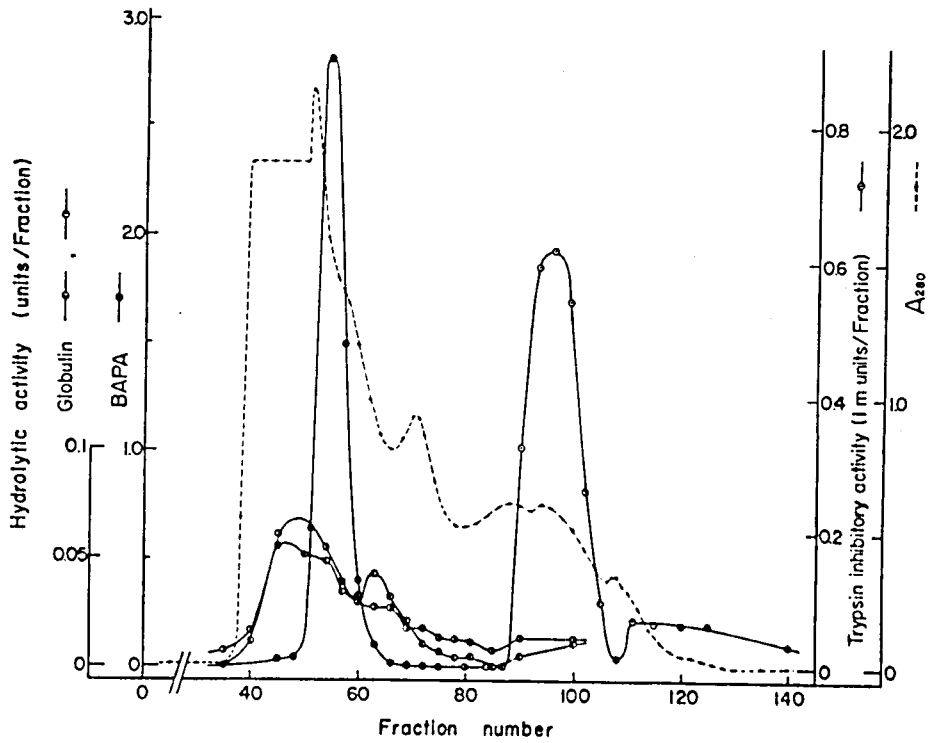


図. 4. 発芽5日目の子葉抽出液のウルトラゼル・ゴマトグラフ:

BAPA, グロブリン: 及び トリプトシン・インヒビター-の溶出パターン.

発芽5日目の子葉 122個14. (33.6g) の抽出液 (sup: 1: 5)  
 を硫酸万画の後 ウルトラゼル・ゴマトグラフ-で行った。 グロ  
 ブリンの活性測定は 0.1M リン酸緩衝液 (pH 8.0): —●—,  
 及び 0.1M フェン酸緩衝液 (pH 5.8): —○— 中で  
 行った。 各万画は 6ml。 活性測定の手続は  
 4. 示す。



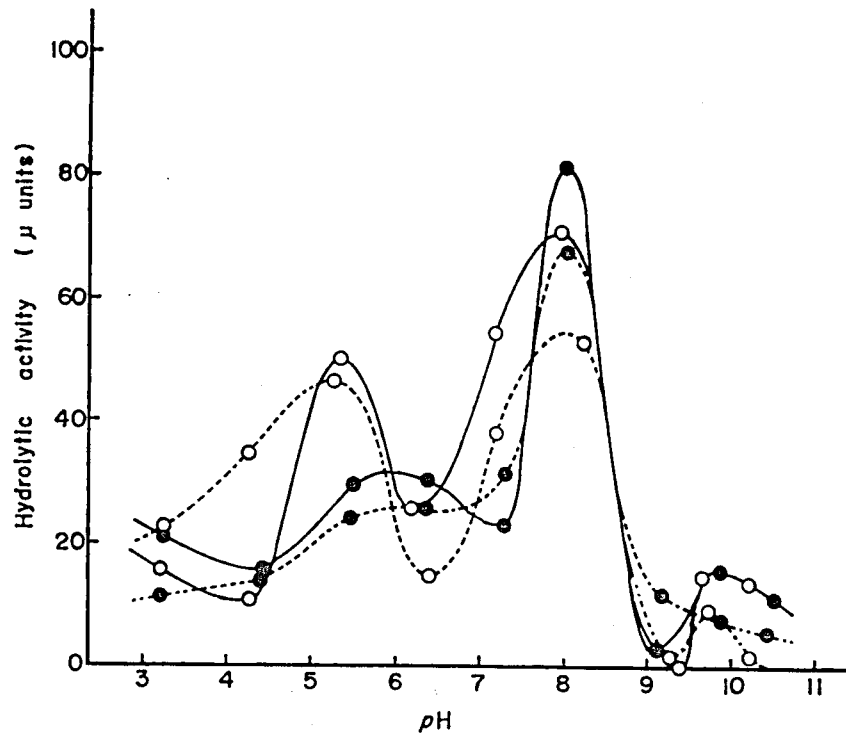


図. 5. ウルトラセル・コロトグラフの活性分画I及II

II によるコロトグラフと  $F_{90}$  の分解活性の pH による変化

活性測定に用いた緩衝液は pH 7.5 以下で  
 フェン酸緩衝液を用いた場合は図. 3. と同じである。反  
 応条件は図. 2. と同じ。酵素溶液は sup II. 5 の  
 ウルトラセル 溶出分画 I, II を用いた (図. 4.)

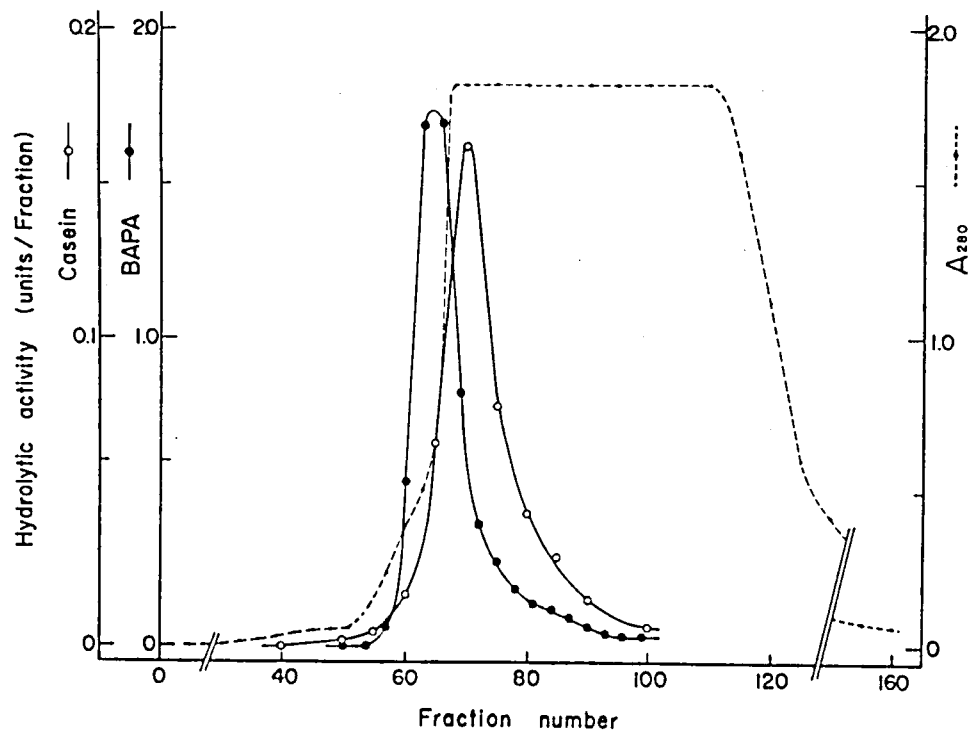


図. 6. BAPA及びカゼイン分解活性の DEAE-セルロース

カラム 1-88 溶出パターン

発芽5日目の子葉の抽出液 (sup: 5) と DEAE  
セルロースカラムで段階的に吸着。溶出させた分画を 25mM  
リソ酸緩衝液 (pH 8.0) で透析平衡化後、DEAE-セルロース  
カラムで再分画を行った。塩濃度勾配は 500 ml の  
同緩衝液と 500 ml の 0.7M NaCl を含む同緩衝液  
で作成した。各分画は 6ml。活性測定の詳細  
は本文中。

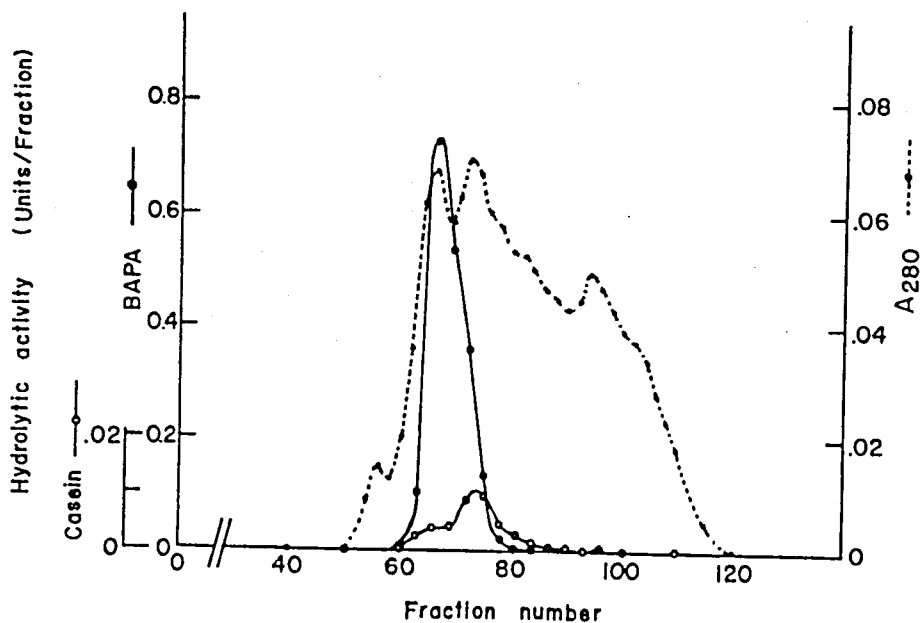


図. 7. BAPA 及び カゼイン 分解酵素の ウルトロゲル ACA

44 から 1=88 溶出 パターン.

DEAE-セルロース から 溶出後の 活性 断面 (図. 8.)

と ウルトロゲル ACA 34 から フロマトグラフィー を行. したが, DEAE

セルロース で 濃縮 した ウルトロゲル ACA 44 から 1=88 につい.

溶出 は 25mM フェン酸緩衝液 で行. た. 各断面 は

10ml. 活性測定の詳細は 不文中.

BAPA 分解活性は ゲル透過で 分子量 58,000 の所に 溶出された。

ブドウ球菌の 分解活性は 主に 画Ⅰと 画Ⅱに 示され、画Ⅰは pH 8.0, 画Ⅱは pH 5.8 の方が それぞれ 高い 活性を示した。BAPA 分解活性は 画Ⅰに 含まれるが、活性の比は 異なる。一方 カゼイン分解活性の比は 画Ⅱの比と 一致し、10% 活性は ブドウ球菌分解活性より 高かった。F<sub>0</sub>β 分解活性は 画Ⅰと 画Ⅱとも ブドウ球菌の 分解活性より 低い かった(図.5.)。データは 示していないが、SDS-ゲル電気泳動で 各 pH 下での 画Ⅰ及 画Ⅱによる ブドウ球菌の 限定分解について 調べたが、α のバンドの 染色強度が 著しく 減り、F<sub>0</sub>β のバンドを 生じたものは なかった。

BAPA 分解活性の精製: 図.6. に BAPA 及び カゼインの 分解活性

の DEAE-セルロース カラムによる 溶出パターンを示した。明らかに

BAPA 分解酵素と カゼイン分解酵素とは 異なることが わかった。

図.7. に ウルトラフィル・カラムによる 溶出パターンを示した。BAPA 分解

活性より 少し 低く、カゼイン分解活性の 溶出されたが、大抵の

操作中に 失活して しまっていた。最終的に BAPA 分解活性と カゼ

イン分解活性を 分離することは できなかった。各精製段階の

表.2. 発芽5日目の子葉のBAPA分解酵素の精製

Purification step	Total <sup>a)</sup> protein (mg)	Total <sup>b)</sup> activity (units)	Specific activity (m units/mg protein)	Purification ratio	Recovery of activity (%)
Extraction	3180	47.2	14.8	1.0	100
DEAE-cellulose chromatography	1330	25.1	18.9	1.28	53.2
DEAE-cellulose chromatography	616	17.0	27.6	1.86	36.0
Ultrogel AcA 34 chromatography	34.4	17.3	503	34.0	36.7
DEAE-cellulose concentration	21.9	6.60	301	20.3	14.0
Ultrogel AcA 44 chromatography	4.22	4.80	1140	77.0	10.2

a) 蛋白質定量は ビレット法 あるいは UV法 に する。

b) 1 unit は 1分間に  $1 \mu$  mole の BAPA と 分解するに 要する 酵素量 と 1に。

表. 3. BAPA 分解活性に対する 2価金属イオンの効果2価金属イオンの効果

Compound added	Concentration (mM)	Activity <sup>a)</sup> (m units)	Relative activity (%)	Compound added	Concentration (mM)	Activity <sup>a)</sup> (m units)	Relative activity (%)
None	-	4.79	100	EDTA	1.0	5.00	104
PTI <sup>b)</sup>	3ImU	5.71	119	"	5.0	4.79	100
pCMB	0.1	4.58	96	CaCl <sub>2</sub>	1.0	5.00	104
"	1.0	3.54	74	"	5.0	4.71	98
PMSF <sup>c)</sup>	0.1	4.63 (4.66)	99	MgCl <sub>2</sub>	1.0	5.00	104
"	1.0	4.46 (4.59)	97	"	5.0	5.13	107
β-ME	1.0	5.75	120	MnCl <sub>2</sub>	1.0	4.92	103
"	5.0	5.83	122	"	5.0	4.79	100
DTT	1.0	5.71	119	CoCl <sub>2</sub>	1.0	4.88	102
"	5.0	5.92	124	"	5.0	4.58	96

a) 活性の測定法は本文中, 1 unit は 1 時間 に 1 μmole の

BAPA を分解するに要する酵素量といた。

b) カブチャ種子より精製したトリプシン・インヒビター (本文参照)

c) PMSF 溶液中のエチルによる阻害を補正した (本文参照)

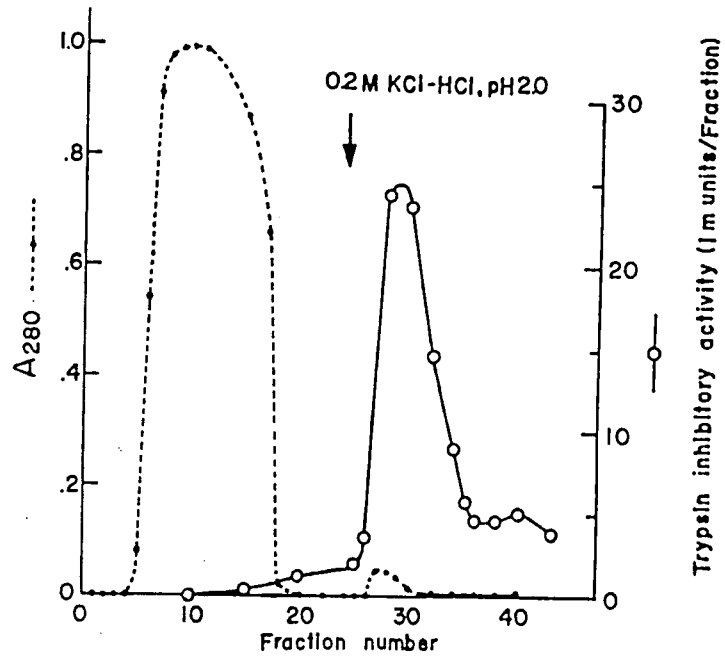


図. 8. トリプシン-セファロース・アフィニティー・カラムによる

トリプシン・インヒビターαの落しパターン。

ウルトラマル・フロタグラフィーで得られたトリプシン  
 インヒビター分画をトリプシン・セファロース・カラム (1.0 × 15 cm) に  
 かけ、フェニ酸緩衝液で洗脱後、0.2 M KCl-HCl  
 (pH 2.0) でインヒビター分画を落し下す。実験材  
 料は発芽5日目の子葉4個19.2gである。各分画は  
 3ml.

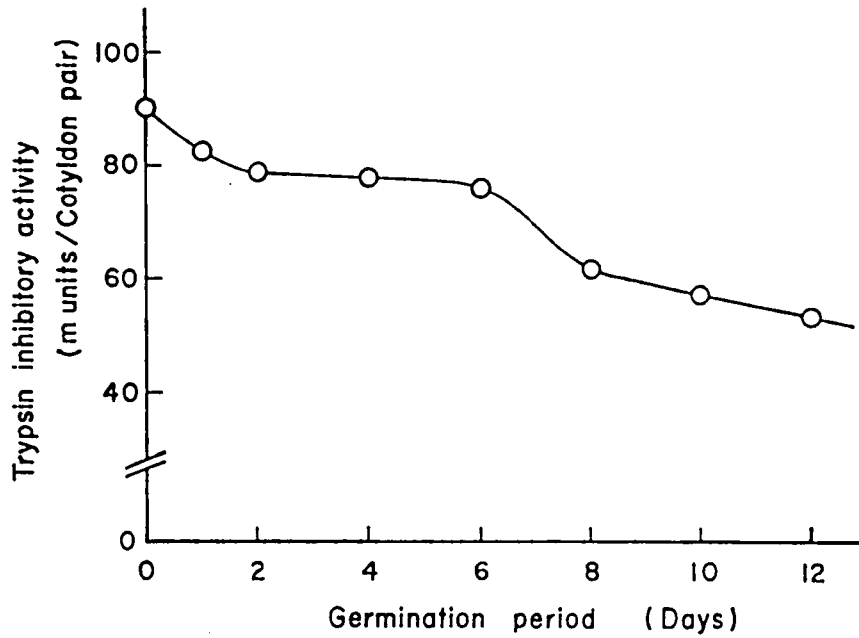


図. 9. 子葉中のトリプシン・インヒビター活性の発芽に伴う変化

発芽  $n$  日目の子葉 各 10 個 1% から  $sup 11 \cdot n$   
 (25mM フェン酸緩衝液) を トリプシン・セファロス・アステイ・  
 カラム にかき, 吸着, 溶出 した 各 インヒビター 5 画 の  
 活性 を 測定 した. 活性 測定 の 詳細 は 本文中.



比活性と精製倍率及び回収率を表.2.1に示した。

BAPA分解酵素は約77倍精製された。

BAPA分解活性におけるインヒビター、SH試薬、及び2価

金属イオンの効果： BAPA分解活性は2価金属イオン

やEDTAに影響されなかった(表.3)。 またPMSFやカプ

チ種子のトリフオン・インヒビターにも阻害されることはなかった。

一方pCMBでは1mMで26%の失活が見られ、 $\beta$ -MEやDTT

において活性が上昇した。

BAPA分解活性のグロブリン、F<sub>ab</sub>に対する作用：

図.4.のグロブリン分解活性のヒートとBAPA分解活性のヒート

で示すこと、BAPA分解活性を含むグロブリン分解活性画に

にグロブリン限定分解活性が殆どなかったことから予想さ

れた通り、BAPA分解活性にはグロブリン限定分解活性や

グロブリン及びF<sub>ab</sub>から小分子成分を多量に遊離させる活性は

なかった。

トリフオン・インヒビター活性： トリフオン・インヒビター活性は

ゲル通過で分子量10,500の所に溶出された(図.4)。ゲル

通過後のトリフオン・インヒビター画をトリフオン・セファロス・ア

フィニティー・カラムにかかると非常に良く精製することができた(図.8)。

この精製標品を用いて、芽葉中のいくつかの蛋白質分解活性に及ぼす影響について調べた(表3., 前節, 表1.).

一方このカラムを使って *supernatant* に含まれる トリプトシン・インヒビター活性量を測定し、発芽に伴うインヒビターの変動を示した(図9). インヒビターは発芽に従って減少した; その減少はゆるやかに、発芽12日目に66%のインヒビター活性を保持した。即ち諸々の蛋白質分解活性が 発芽2日目から4日目にかけて急増する(図1., 表1.) のに反して、インヒビター量は急減することもなかった。

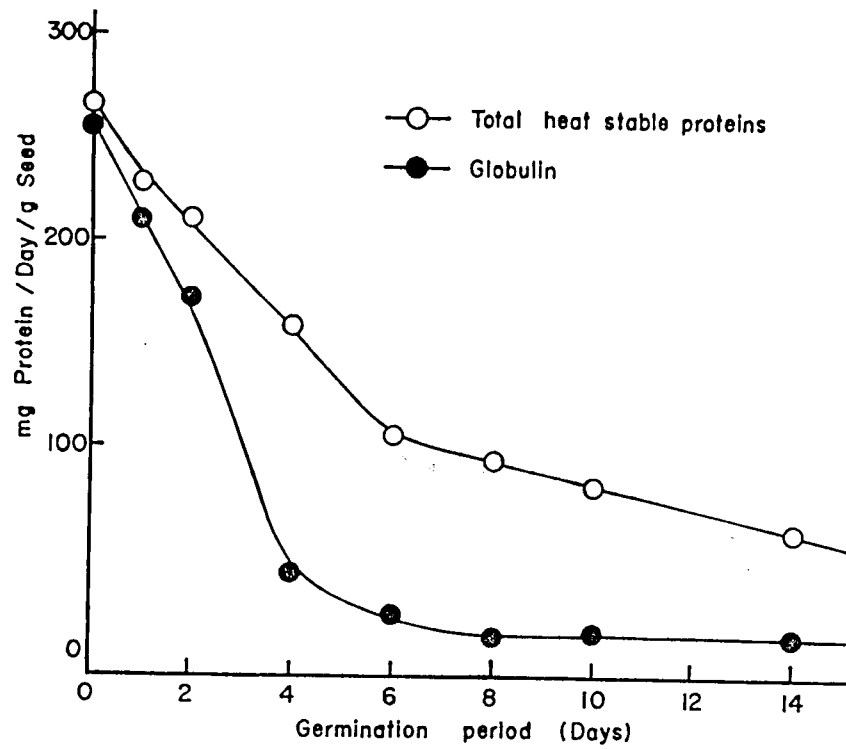


図.10. 子葉中の全熱安定性蛋白質量とグロブリン量  
の発芽に伴う変化

本3章 本2節の結果より、図を作成した。

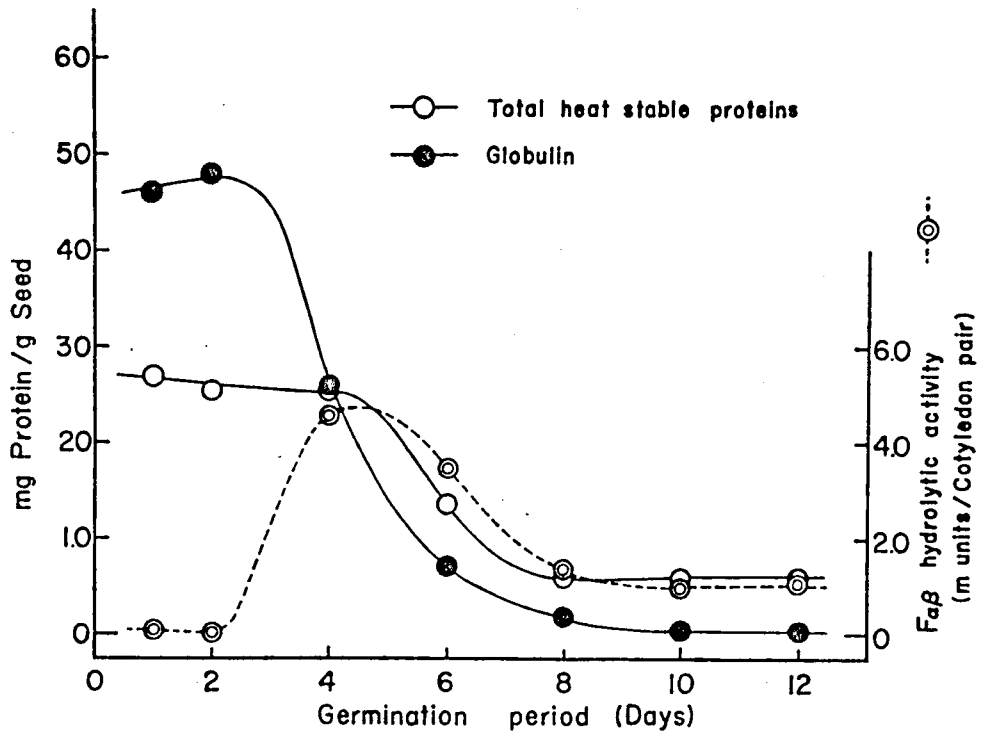


図.11. 子葉中の全熱安定性蛋白質とグロブリンの濃度及び発芽に伴う変化。

図.10. の蛋白質量の变化の各発芽時期の統計係数を図に表わした。蛋白質の量(基準の量)の变化が必ず直接的なとは言えないが、各時期の蛋白質の分解活性を反映している。破線は子葉抽出液の Fag の分解活性(表.1.の結果)の變動である。

## 考察

子葉中の全熱安定性蛋白質量とグルコシリシ量の発芽に伴う変化を初草初節の結果から図.10.に表わした。またこの図をもとに各時期の蛋白質量変化の微分係数を図.11.に示した。これは発芽各時期での蛋白質の消化速度即ち蛋白質分解活性の強さを表わしている。ただし基質濃度が変化しているので直接的ではない。

まず最初にグルコシリシとその限定分解物  $F_{ap}$  に関する発芽初期の分解について検討する。表.1.より発芽初期のグルコシリシ及び  $F_{ap}$  の分解活性は発芽2日目まで非常に低く、その後急増した。ところが図.10.の全蛋白質量及びグルコシリシ量の変動をみると、発芽0日目から4日目までほぼ一定の速度で減少しており、発芽2日目までに、グルコシリシは30%、全蛋白質量は20%減少している。即ち図.11.からわかるように、発芽1,2日目の子葉中には4日目の子葉に匹敵するほどの分解活性があるといえる。従って今回測定された活性が *in vivo* で働いている活性とその不足を反映しているとは考え難い。この食塩水の要因として考えられるのは、オ1に抽出時の酵素の失活。オ2に *in vivo* での存在場所を異にするための作用しなかったインヒビターが、細胞の破壊によって阻害活性を発現した。オ3に活性測定に用いた

フィロリシヤや  $F_{90}$  が in vivo の状態と異なっていた。かゝられる。  
 発芽4日目以降の抽出液の分解活性が測定されていることから、  
 オ1, オ3の可能性は少ない。

次に発芽4日目以降の  $F_{90}$  の分解活性の減少パターン(表.1.)  
 は子葉中の全蛋白質量の消化速度から考えられる活性の変動と良く  
 一致する(図.11)。  $F_{90}$  の分解活性とフィロリシヤの分解活性に同じ  
 1.5 活性の強さに差はあるが、変動のパターンは似ている(表.1.)。  
 フィロリシヤの分解はフィロリシヤから  $F_{90}$  と生成するオ1段階と  $F_{90}$  から  
 分解されるオ2段階とから成ると考えられるが、図.2.で明らか  
 によりオ1段階の活性が弱いため、フィロリシヤの分解活性が  $F_{90}$  の  
 より低い低下しているであろう。

フィロリシヤから  $F_{90}$  と生成するオ1段階の活性も発芽2日目  
 弱くなく発芽4日目も最も強い(図.2.)。ところが子葉のフィ  
 リシヤ量の減少をみると(図.10)、発芽初期から減少し、4日目  
 に殆どフィロリシヤが消失している。この急激な原因も先に  
 示したと同様の3つが考えられる。先に述べたようにオ2の要因  
 が最も可能性が高いとすれば、そのインヒビター(実質は不明である)は  
 発芽3日目以降急激に減少するという条件をつけると、これに  
 一致する現象は説明がつかない。

乾燥種子に グロブリン や Fog の 分解酵素 がある 否か が 残された 問題 である。 図. 11. 1 に 示す も 吸水 後 24 時間 以内 に 急激 に 酵素 の de novo 合成 が 起った と する 可能性 も 否定 でき ない。 しかし BAPA 分解 酵素 ( シクロヘキシミド で 合成 阻害 される ) など の 発芽 時 の 活性 出現 の パターン と 比較 して みれば 考え 難い。 この 点 に 関し て は 前 節 で も 議論 した の と 同様, 吸水 による 不活性 酵素 ( 乾燥 種子 に 存在 する ) の 活性化 の 可能性 が 示唆 される。

発芽 に 伴って 子葉 中に 出現 する 各種 酵素 活性 に LPA 分解 活性, BAPA 分解 活性, カゼイン 分解 活性, グロブリン 分解 活性 などが あり ( 図. 1, 図. 4, 表. 1 ), この 内 カゼイン 分解 活性 は グロブリン 分解 活性 II と 全く 同様 の 所に 溶 出 される こと も ( 図. 4, 図. 2 ) 至適 pH も 共に 5~6 附近 である ( 図. 3, 図. 5 ) ことから, 同じ 酵素 活性 に 対し とも なる こと できる。 エボウ の 芽 玉 での 至適 pH 7-8 の BAPA 分解 活性 と 至適 pH 5.5 及び 7.0 の 2 種 の カゼイン 分解 活性 が 見 つかる ( 14 ) から, これは 今回 の 結果 と 類似 した こと である。

BAPA 分解 活性 は 下 列 の 試薬 で 分子 量 58,000 の 所に 溶 出 された。 7% pCMB で 阻害 され,  $\beta$ -ME や シチオスレートル で 活性化 される。 一方 PMSE, EDTA, 2 個 以上 の イオン や カルシウムの トリフリン・インヒビター に

影響されなかった (表.3.)。その上 調整1にサルミン-セファロース  
 から (トリフオンは吸着1に) にも吸着されなかった (セファロース12114)。  
 ので、トリフオンとは異なり、チオール酵素であろうと考えられる。  
 ソバ(15)やエトウ(8)の乾燥種子からも BAPA 分解酵素が  
 精製されているが、前者は孢子量 65,000-70,000 ユニティ  
 の酵素、後者は シイソフコピルフルオロリニ酸 1に ヨド乙酸ア  
 ドにも影響されないなどの点から性質はかなり異なる。  
 しかし いずれの酵素も 各々の種子プロテリンを分解しないとい  
 うことは一致している。

BAPA 分解活性や LPA 分解活性は 発芽 4-6 日目に最  
 大になった後 発芽 12 日目までかなり保持されている (図.1.)。  
 一方 この時期には プロテリンは殆ど存在しない (図.10.) し、 $F_{ap}$   
 の分解活性も 発芽 7 日目で半減していた (表.1., 図.11.)。  
 従って BAPA 分解活性や LPA 分解活性が 貯蔵番目頃の分  
 解に関与しているとしても、 $F_{ap}$  の分解産物の小アミノ酸の分解に  
 携わっているのではあろう。元来 プロテリンは アルキニンと多量に含  
 んでいるので、当然 アルキニンを多く含む分解産物が生じる  
 ことが予想される。このような小アミノ酸の分解に BAPA 分解  
 酵素が関与しているのではないだろうか。



本種子には、 $\gamma$ -イヌビロもリママメの種子と同様トリコシン・インヒビターが存在することを見つかった(図.4.)。トリコシン-セフプロス・アミン・カラムでかなり精製することもできた(図.8.)が、分子量約8,000で  $A_{280}$  が非常に小さいので、 $\gamma$ -イヌビロの Bownann-Birk のトリコシン・インヒビターであろうと思われる。トリコシン・インヒビターが実際種子の発芽時の蛋白質の分解に関与しているかという問題がある。子葉中に出現する BAPA 分解活性の阻害は1%以下(表.3.)。一方  $\gamma$ -ロブリンから  $F_{op}$  を生成する活性にもまた  $\gamma$ -ロブリンや  $F_{op}$  から小分子物質を遊離する活性にも影響を与えておられる(オ4頁.オ1節)。発芽時の阻害活性の変動パターンをみると、減少はゆるやかで、発芽4日目までに急減することなく、12日目にはまだ60%の阻害活性を保持している(図.9.)。従って少なくとも今回と見かけた酵素活性には無関係である。

## References

- (1) F. M. Ashton: *Ann. Rev. Plant Physiol.* (1976) 27, 95
- (2) a. M. M. Basha, L. Becvers: *Planta* (1975) 124, 77
- (3) J. Mikola: *Physiol. Plant.* (1976) 36, 255
- (4) J. A. Crump, D. R. Murray: *Proc. Aust. Biochem. Soc.* (1978) 11, 26
- (5) S. M. Mahaboob, J. P. Cherry: *J. Agric. Food Chem.* (1978) 26, 229
- (6) J. B. Caldwell, L. G. Sparrow: *Plant Physiol.* (1976) 57, 795
- (7) P. J. Du Toit, J. C. Schabort, P. G. Kempff, S. A. Lawbscher: *Phytochemistry* (1978) 17, 365
- (8) A. Tomomatsu, N. Iwatsuki, T. Asahi: *Agric. Biol. Chem.* (1978) 42, 315
- (9) V. P. Bul'maga, A. D. Shutov: *Biokhimiya* (1977) 42, 1983
- (10) B. Baumgartner, M. J. Chrispeels: *Eur. J. Biochem.* (1977) 77, 223
- (11) I. Hara, K. Wada, S. Wakabayashi, H. Matsubara: *Plant & Cell Physiol.* (1976) 17, 799
- (12) I. Hara, K. Wada, H. Matsubara: *Plant & Cell Physiol.* (1976) 17, 815
- (13) I. Hara, M. Ohmiya, H. Matsubara: *Plant & Cell Physiol.* (1978) 19, 237
- (14) L. Beevers: *Phytochemistry* (1968) 7, 1837
- (15) I. B. Emtseva, M. A. Belozerskii: *Biochem. Engl. Transl.* (1977) 42, No. 4, part 1, 560