



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	https://hdl.handle.net/11094/24604
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

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 と同緩衝液に於て透析した成分.

Chx·Sup , Chx·sup ; 5mM シクロハキシイミド存在下で 吸水させた
子葉よりの Sup 及び sup.

BAPA ; N- α -ベンザイル-D,L アルギニン p-ニトロアニリン

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 ; フルオレセイン-イソチオシアネート

LPA ; ロイシン p-ニトロアニリン

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

PMSE ; フェニルメタン スルホニルフルオリド

SDS ; ドデシル 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 内胚乳の初期発育は 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 発育が進むと 胚の細胞内では 多種多様な有機物と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 胚が完全に発育するまでに 内胚乳の殆どが消化され、その栄養は 胚の子葉へ移されてしまう。この時期の発育の中断（休眠）は 胚の後の発育（発芽）にとって必須なものではない。若い胚と培養し 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（アブサイジン酸など）の蓄積などである。

これまでの胚発育の間重要な寄与を1つから頂戴

万能組織は発芽の際に活動と始る。この万能組織も
 基に印り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)。万能組織が子葉(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)へそして子葉から万能組織へと流れていく。
 有胚乳種子の場合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が、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ってくる。

子葉と内胚乳とでは組織の起源と全く異なっているに
 も関わらず、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2章では子葉中の
 この蛋白質顆粒の微細構造と発芽に伴ってそれらが融
 合と解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違いからアルブミン、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
 母とはじめ有胚乳種子の内胚乳の外側のアリユ-ロニ層(6,7)や
 まれに内胚乳に見い出されている(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が この両者と有に
 いる(5) 蛋白質と貯蔵物質とにもつ種子の場合 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°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).

オランダの第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 プロテリンが 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 あたりと 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, プロテリンが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重要となる物質の分類
 はかなり洗練利である. 無胚乳種子であるウリ科種子の貯蔵
 物質は脂質と プロテリンである. 脂質の代謝については ステ
 ロイド, グリコステロイド, ミトコンドリア, サイトプラスムで行なわれ,

エネルギーと供給可能同時に、大部分は最終的に肝臓で蓄積されて成育部位へ送られることが明らかになっている。一方蛋白質の代謝には関与する知識は少ない。

第3章第2節では カボチャ (*Cucurbita* sp.) 種子の プロリンの代謝中間産物の 発芽4日目の種子中に大量に蓄積されること、またその限定分解物の溶解度から プロリンの溶解度よりも低いことなどの結果から、プロリンが限定分解を受けるとにより 溶けやすくなり 続く分解を受けやすくなっているという基原則の制限について議論している。これは Reilly の報告 (10) によっても支持されている。

一方発芽時に 3 章に出現する 蛋白質分解酵素も エキリ、エントロフチンゼ 両者共に多数の報告がある (4, 11, 12)。しかしそれらの実際には 細胞内で 直接 貯蔵蛋白質の分解に関与しているのか否かについては 推論の域と述べていない。貯蔵蛋白質のこれらの酵素の基質になり得るという例は少ない (18, 19)。

貯蔵蛋白質の分解に寄与している 分解酵素には 恐らく複数の エキリ、エントロフチンゼ があると思われるが、これらの各々基質である 貯蔵蛋白質に どのような順序で作用するのか。またその各段階で どのような生成物を生ずるのか 知ることも重要である。この分解過程の調節は インスリンの存在、プロテアーゼの存在、ホルモンによる合成

の誘導，最終産物によるフィード・バック阻害，酵素の基質特異性，
酵素や基質の局在，pH などにより行なわれる可能性があげられる。

胚発育日頃とは異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12 成長部位に転流し
新しい蛋白合成を行なわせる。一度に蛋白の分解が起ると
蛋白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.) 種子のプロテオシンの限定
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ことに既に考察している。
他にもプロテオシに特異的に働く酵素についての報告がある(20)
が，実証は明らかではない。

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

発芽時に於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 (種子プロブリン) 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 クロボイド (球晶体) と リスフロイド (蛋白質結晶体) と各一つずつもっており、限界膜で被覆されていた。
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 リスフロイドは しばしば 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。リスフ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 再び 大きくなっていった。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、カボチャ種子プ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 リスフロイドは 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ールン層, 双子葉植物の子葉の細胞中の オ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 $1 \sim 10 \mu\text{m}$ の環状で 珪入体 (環晶体: フィテン酸の高積部位) や クリスタロイド (蛋白質結晶体) を含むものと, 珪入体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ある HS 717 の グロブリン と 同様の グロブリン と 貯蔵蛋白質 と 12 もつものに アサ (Cannabis sativa) 種子や マメ科の ブドウ (Phaseolus aureus) や リウマ (Vicia faba) の種子がある. 前者の蛋白質顆粒は グロブリン と クリスタロイド と もつ (5) が, 後者のそれは 珪入体 と もつ ない と言われている (6, 7). アサ種子の クリスタロイド は 単離されており, イテスタン (貯蔵蛋白質, グロブリン) から成る ことが 示されている (5). オク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 (Lupinus luteus) (8) や リウマ (9) などで 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 融合し, 液胞 になれ 言われている (10).

我々はカボチャ種子の全蛋白質量の90%以上を占めるプロ
テリンの発芽時の分解過程の研究の一環として、発芽子葉細胞中の
蛋白質顆粒のクリスロト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。またプロテリンの抗原
を用いて発芽途中の子葉組織にT1免疫法を試み、プロテリン
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 タキイ種苗株式会社 (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_{90} の調整は前に詳しく述べた (11, 12)。ただし F_{90} 溶液は 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 AcA 44 カラムの フロマトグラフィーにより 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, 0.05M カコシレート緩衝液 (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% ナスミウム酸で 3時間 後固定した。0.05M 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*-フタルフォルエーテル-Spurr's
 のしくは フロロレンオキサイド-Spurr's シリーズで樹脂と浸透させ, 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
 ラスナイフを用いて作製し, 酢酸ウランとフェン酸鉛で二重染色した (14).
 後, JEM 7型 のしくは JEM 100-B型 電子顕微鏡で観察した.

光学顕微鏡による観察: 上記と同様の方法で作られた包埋組

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
 溶液で脱樹脂後, Paragon で染色し オリンパス BHB型顕微
 鏡で観察した.

3葉組織を フォアン固定後 パラフィン切片をとり, マリッジ
 色に染めると 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% の限定分解

物 Fag 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法 (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% アカローステル (1M
 NaCl , 0.05 M リン酸緩衝液 ($\text{pH} 7.0$) と含む) 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

の(図.1), 全検出を行った。

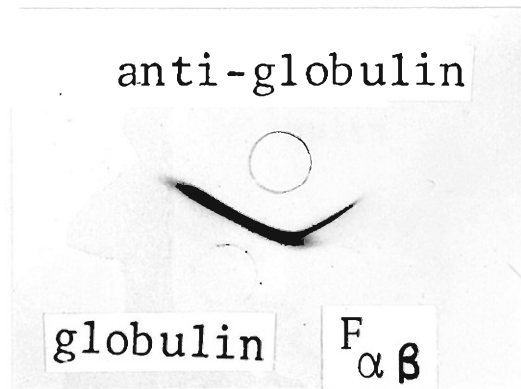


図.1. グロブリン及びF_{αβ}のゲル内=電泳散像

アガロースゲル1%にはグロブリンを溶解させるために

1M NaClを含むリ=酸緩衝液を入れた。各抗原

濃度は0.5mg/mlである。反応は室温で一晩行った。

免疫染色法: 発芽0, 1, 2, 3及び5日目の子葉より約1mmの厚さ

の横断切片をとり、2%ホルマリンで、0.05M カシレート緩衝液

(pH 6.7) に室温で1時間浸し固定した後、4℃の同緩衝液で

1時間組織片を洗った。Leica社のヒストリット-ムで5μmの凍結

切片をカバーガラスに1枚裂した。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。

免疫染色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 - 生理食塩水 (PBS と略す) で 20 倍に薄め、アセトンで 5 分間処理した薄切片と 20°C で 18 時間 - 2 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上清 あいはいは 正常ウサギ血清と同じ同様の操作を行った。一般に一次抗血清との反応は 37°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 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°C で 1.5 時間反応させた。二次反応後 再び PBS で薄切片を洗い 無 TI 光 フリセリン (10% の PBS を含む) で封入し、American Optical Corp 社の TI 顕微鏡で観察した。

一方直接法も 次のようにして試みた。種子プロブリンの抗血清を 3 回の硫酸アミン (33% 飽和硫酸 1:100 沈殿) で精製し、FITC 溶液と 4°C 5 時間反応させた。過剰の FITC をアルコックで除去後、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 光は認められなかった。間接法のとおり いくらか弱かった。

結果

カボチャ種子の子葉細胞は桿状 ($30 \times 80 \mu m$) で、1つに多数の蛋白質顆粒 (直径約 $5 \mu m$) と もつてつく (図. 2. C, D). 蛋白質顆粒は 脂肪を含む スフェロソーム にとり囲まれており、内部構造物として グロブレット (図. 2. A) と リスチロット (図. 2. B) があつた。グロブレットは マトリックス部との境に 膜と もつてつくが、固定が非常に難しく 脱落する場合が多かつた。一方 リスチロットと 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 融合を始めた。発芽 1, 2 目の 子葉細胞の 蛋白質顆粒は 大抵も 2 個近くになり、内部に リスチロットが 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、リスチロッ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). リスチロットが残つているものもある (図. 5. B), 融合をくり返して、網目構造も分解されて、わずかな蛋白質粒を残して 液胞化している細胞もあつた (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)ともし、中には電子密度の異なる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っている(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ものが速かった(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っていたものもある(図.8.C)が、そこから根に至るまでの細胞を順に見ていくと(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が、発芽8日目の子葉細胞中で全観望されることになる. 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 plasmodesma 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厚形質連絡

により内容物の移動の様子が目撃された(図. 9. A)。これは貯蔵物質の分解産物の転移に類似した現象といえる。

種子プロファイル及びその限定分解物 $F_{0.3}$ に溶解した血清を用いて各発芽段階の胚組織にT1蛍光法を試みた結果、未発芽種子は全くT1光を示さなかった(図. 10. A)。発芽種子のプリヌイトもT1光を示さなかったが、マトリックス部分にのみT1光が観察された(図. 10. B-D)。

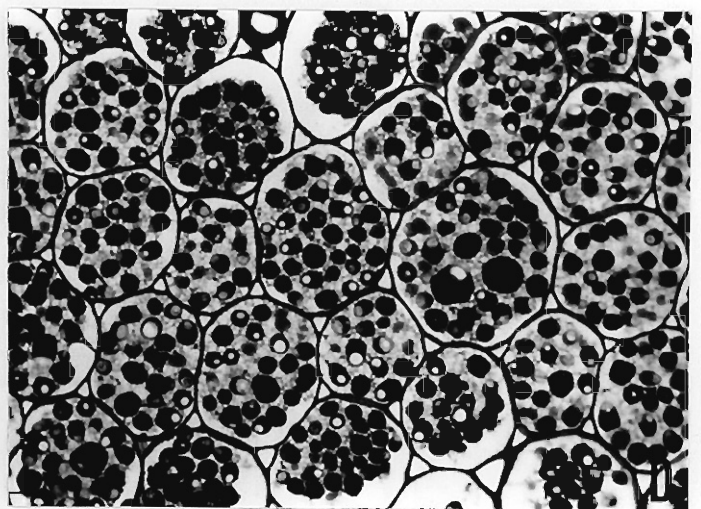
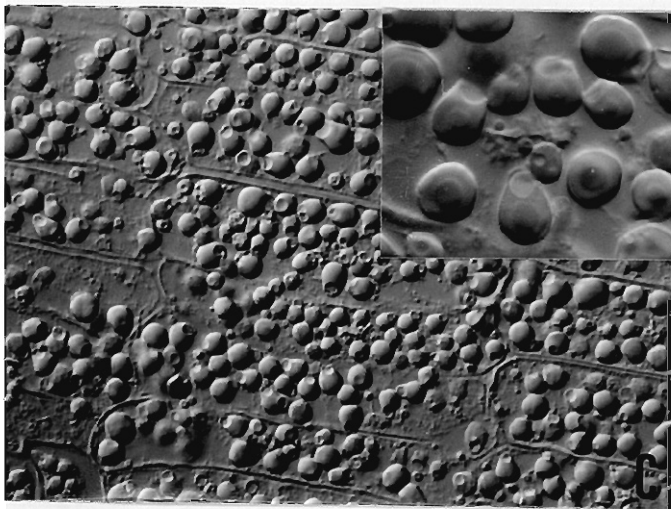
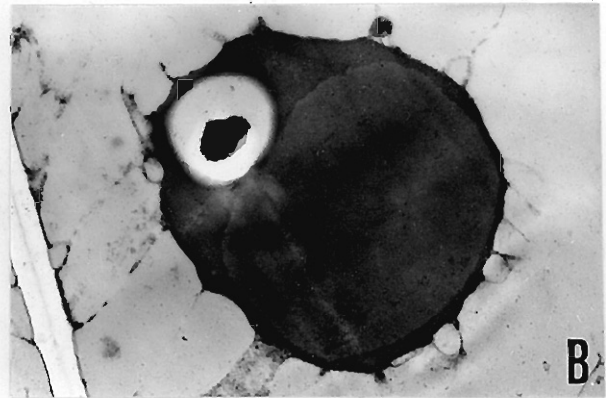
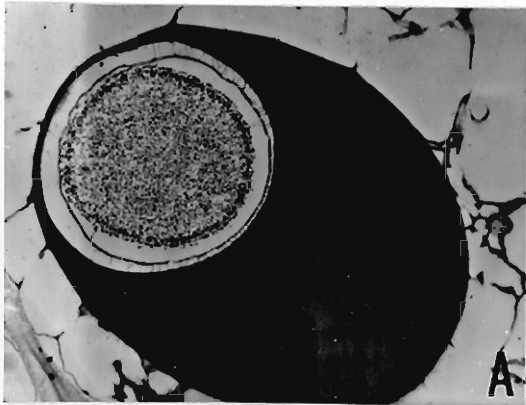


図.2. 乾燥種子の子葉細胞内及び蛋白質顆粒.

- A. 典型的な蛋白質顆粒の電顕像. グロブレットとそれと周囲の膜構造が見える. 組織をエタノールで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. フリステロイドをもつ蛋白質顆粒の電顕像. ($\times 10,000$)
- C. 子葉細胞内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 ($\times 660$) 石エーテル拡大像 ($\times 1,650$) である. フリステ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. 固定はフルタルテート・オスミウム酸により, 脱水後 Spurr's に包埋し, $1\mu\text{m}$ の切片を作製した ($\times 660$)

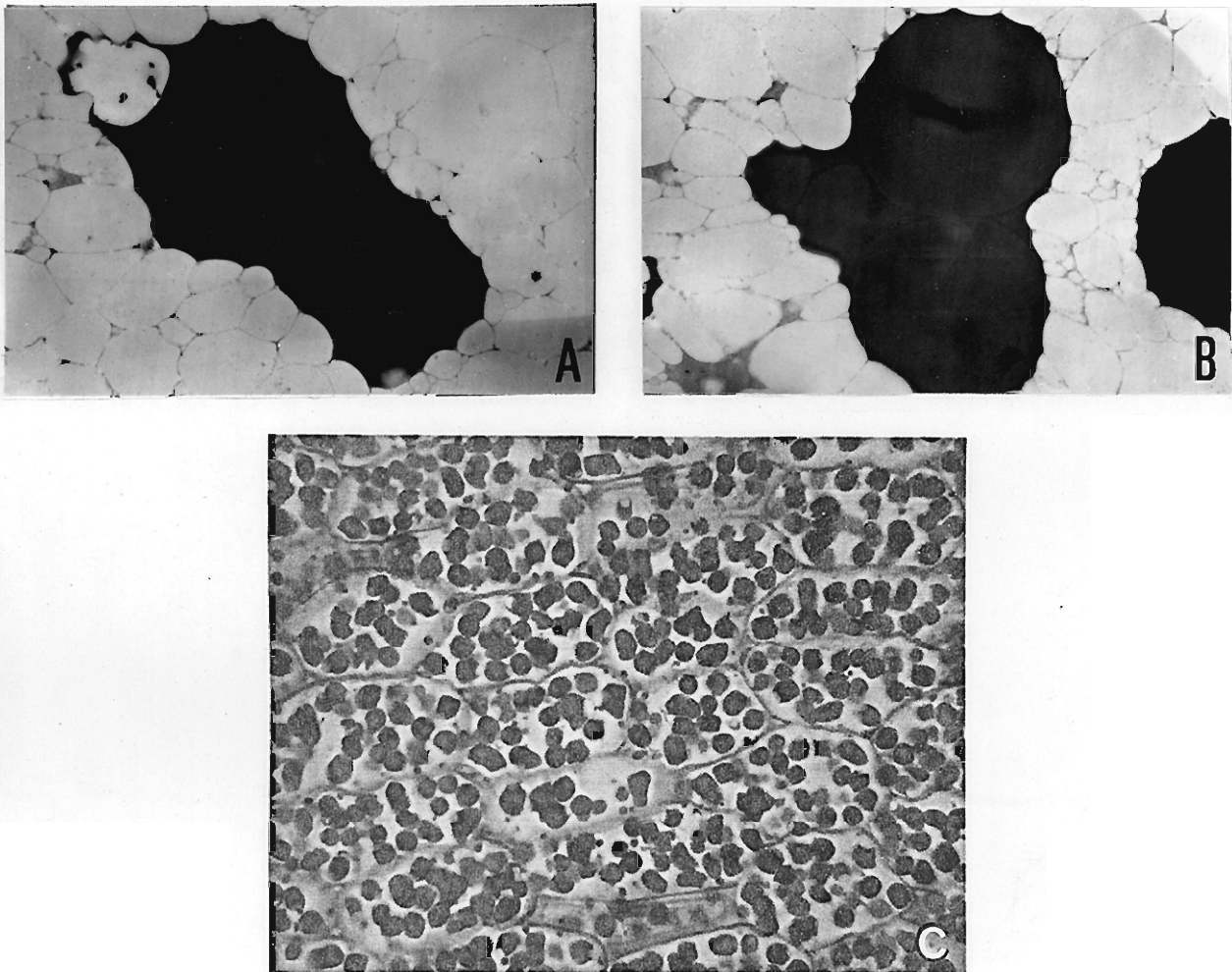


図. 3. 吸水後融合1始めの蛋白質顆粒

A, B. 発芽1日目の融合1に蛋白質顆粒の電顕像. 融合により

Aはクリスタリット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. ($\times 5,000$)

C. 発芽2日目の3葉細胞の光顕像. 蛋白質顆粒は融合に

おと様々な形をしては. クリスタリットを複数個も2118のかわか
められるものもある. 処理は図. 2. C と同じである ($\times 320$)

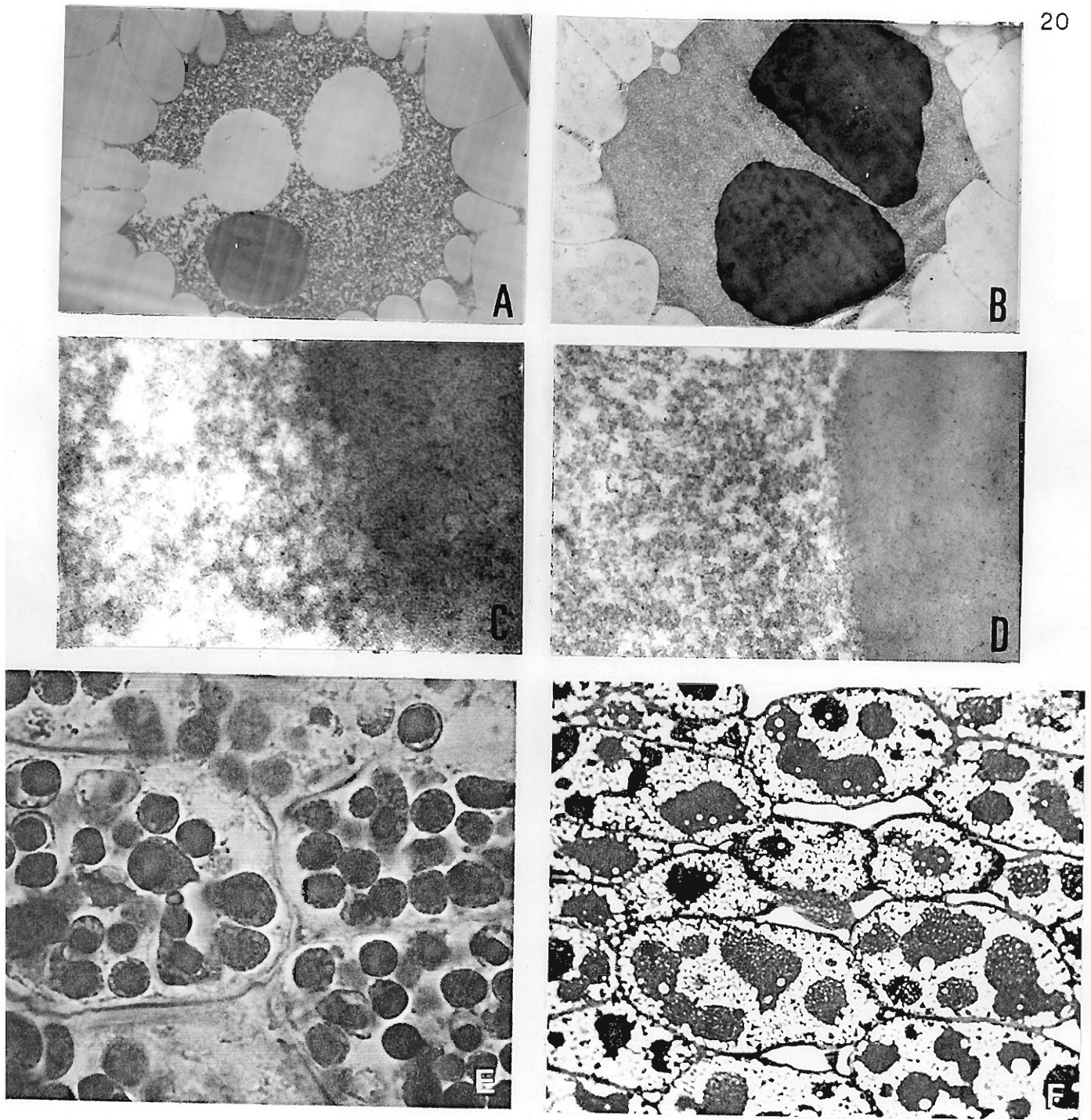


図. 4. 発芽に伴う融合と吸水によりマトリックス部での増大した蛋白質顆粒

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、クリスタロイドは少し小さく、マトリックス部は増大した

(A: $\times 5000$, B: $\times 8000$)

C, D. クリスタロイドとマトリックスの境の拡大図。 ($\times 150,000$)

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。 ($\times 800$)

F. 発芽5日目。子葉細胞の電顕像。処理は図. 2. Dと同じ。 ($\times 660$)

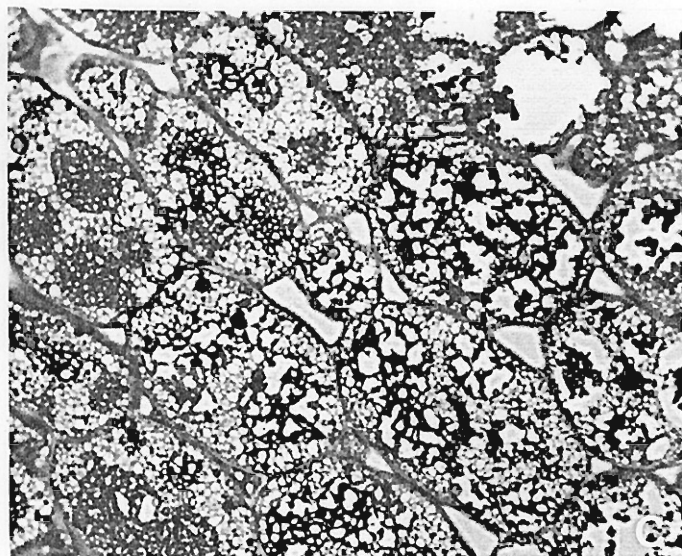
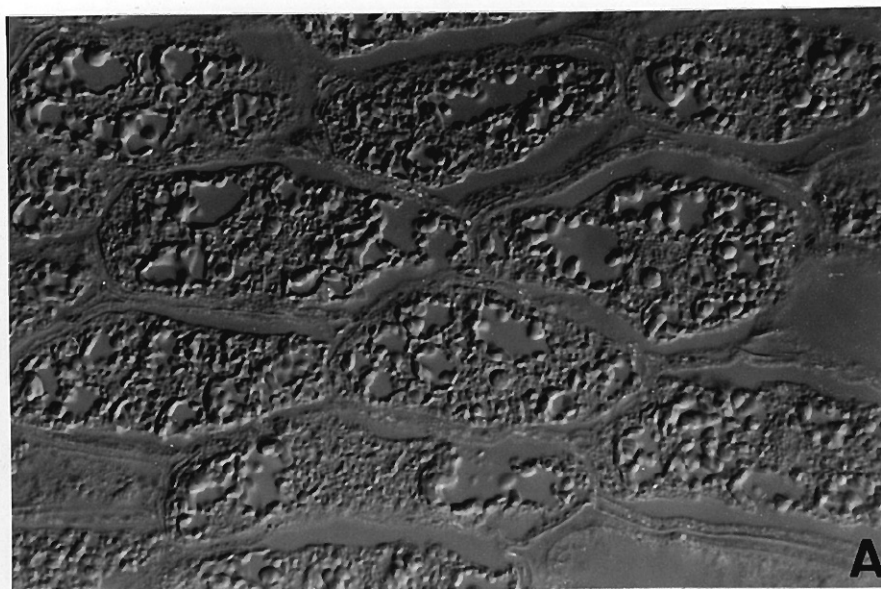


図.5 発芽8日月の子葉細胞: マトリックス部分の内部から網目状に
分解された蛋白顆粒.

- 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 (x 660)

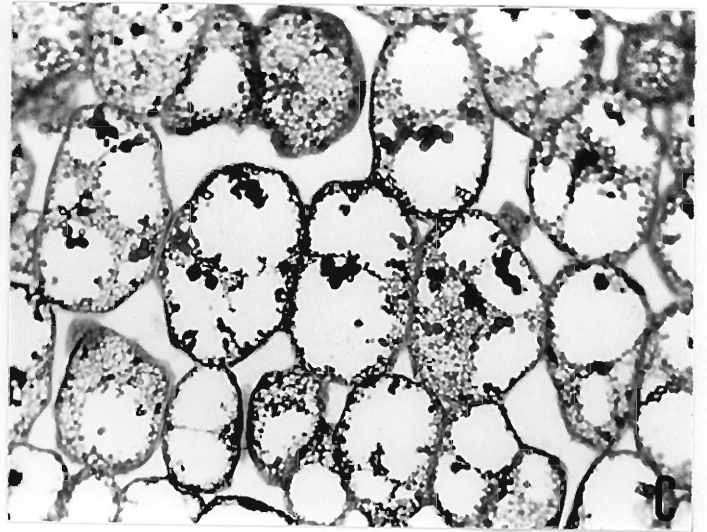
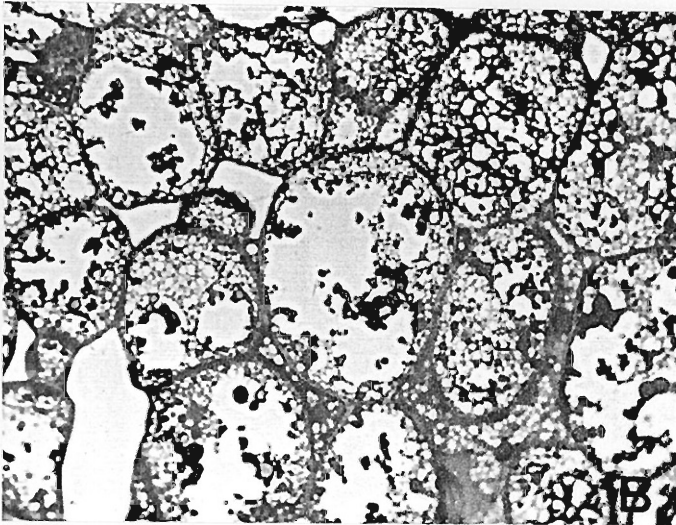
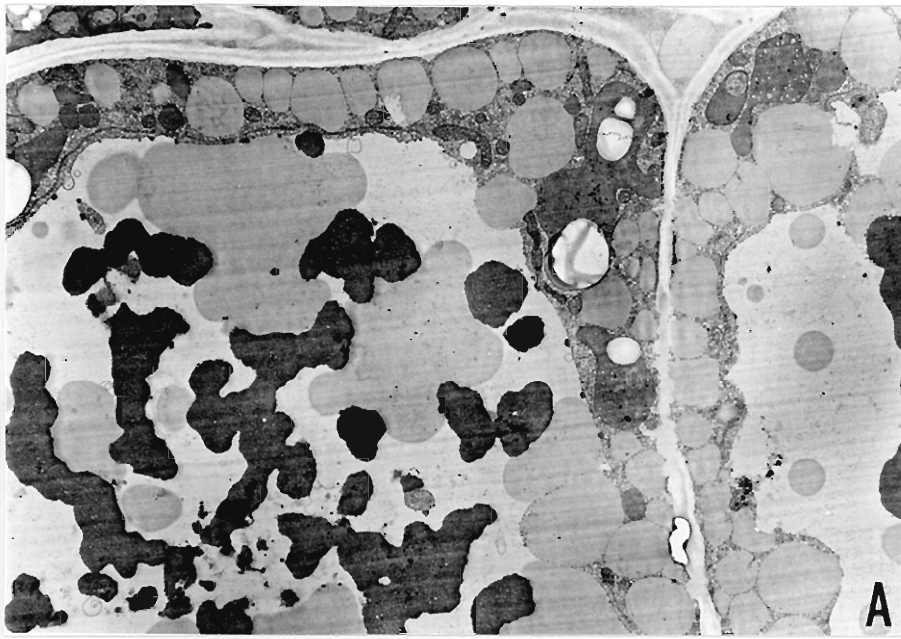


図.6. 蛋白質顆粒肉素の液胞

- A. 発芽14日目の子葉細胞の電顕像。液胞内に電子密度の異なる塊状の物質が分布する。細胞壁にも変化が見られる。細胞間隙にもアミロリウ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)

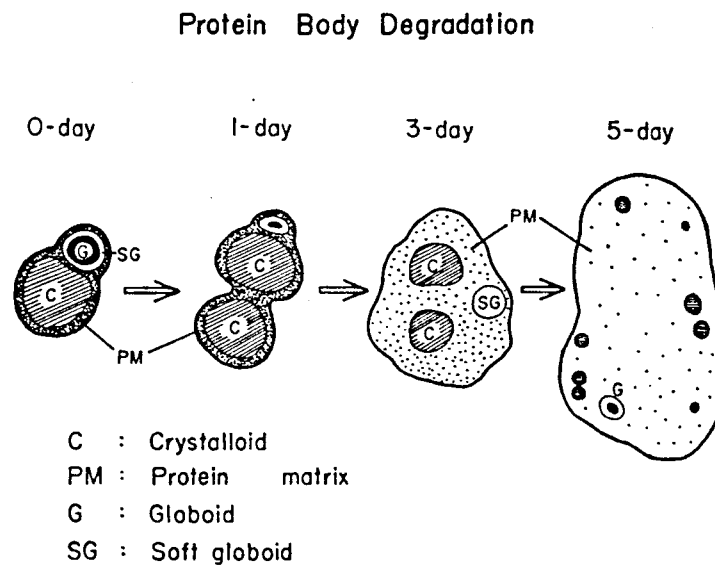


図.7. 発芽に伴う蛋白質顆粒の融合と分解の過程の
模式図.

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)

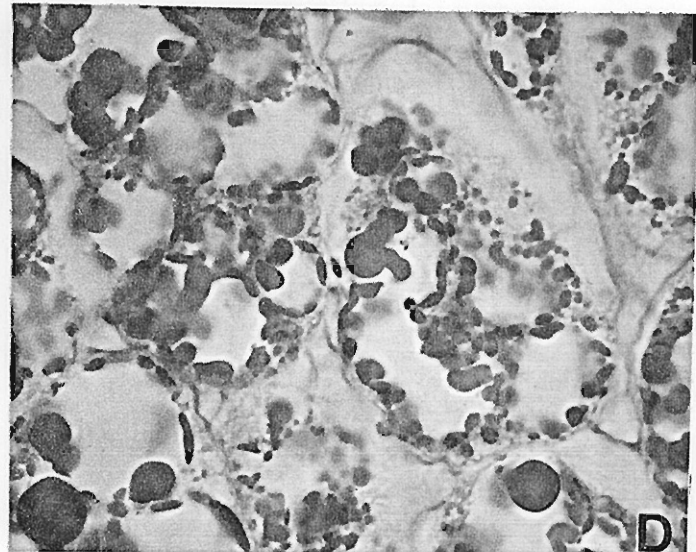
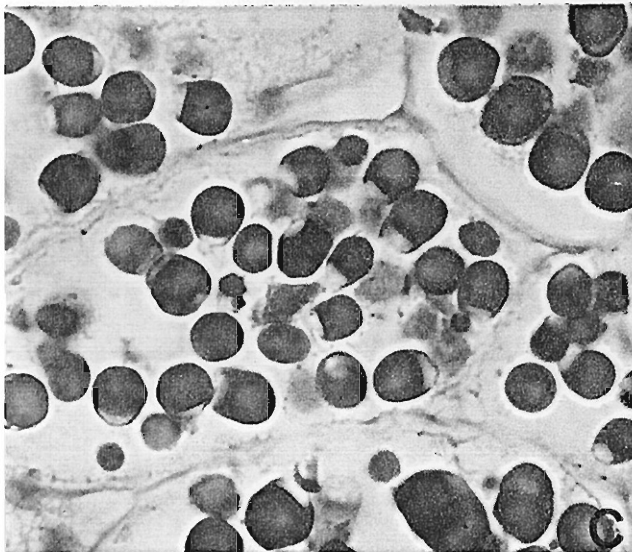
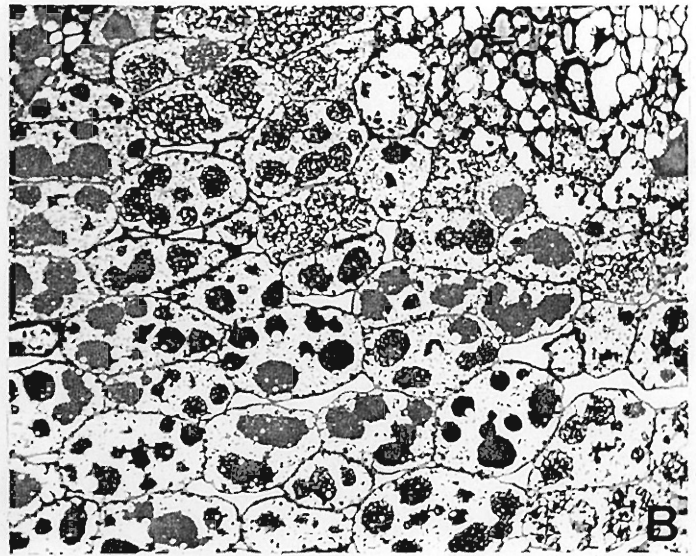
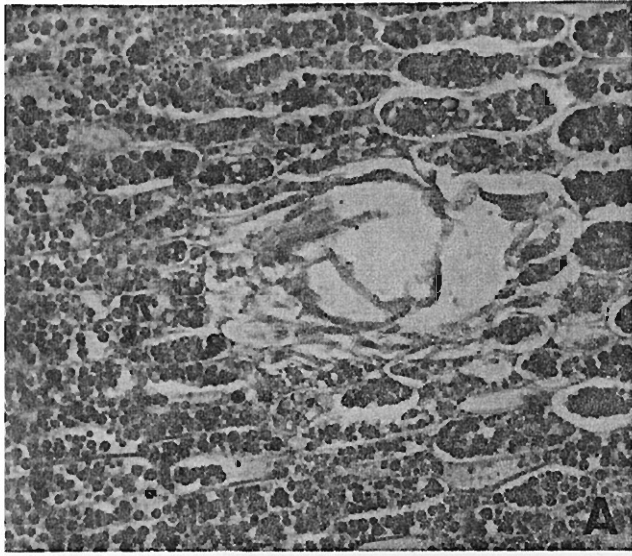


図. 8. 細胞の存在部位 による分解後の異なる蛋白質顆粒.

- A. 発芽3日目の維管束附近の子葉細胞の光顕像. 維管束に近い細胞の蛋白質顆粒の腐食合 所が速い. 処理は 図. 2. C と同じである. (x320)
- B. 発芽5日目の子葉細胞の光顕像. 維管束 (右) に近い細胞の蛋白質顆粒の液胞化が速く 始まっている. 処理は 図. 2. D と同じである. (x660)
- C, D. 発芽8日目の子葉細胞の光顕像. 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)

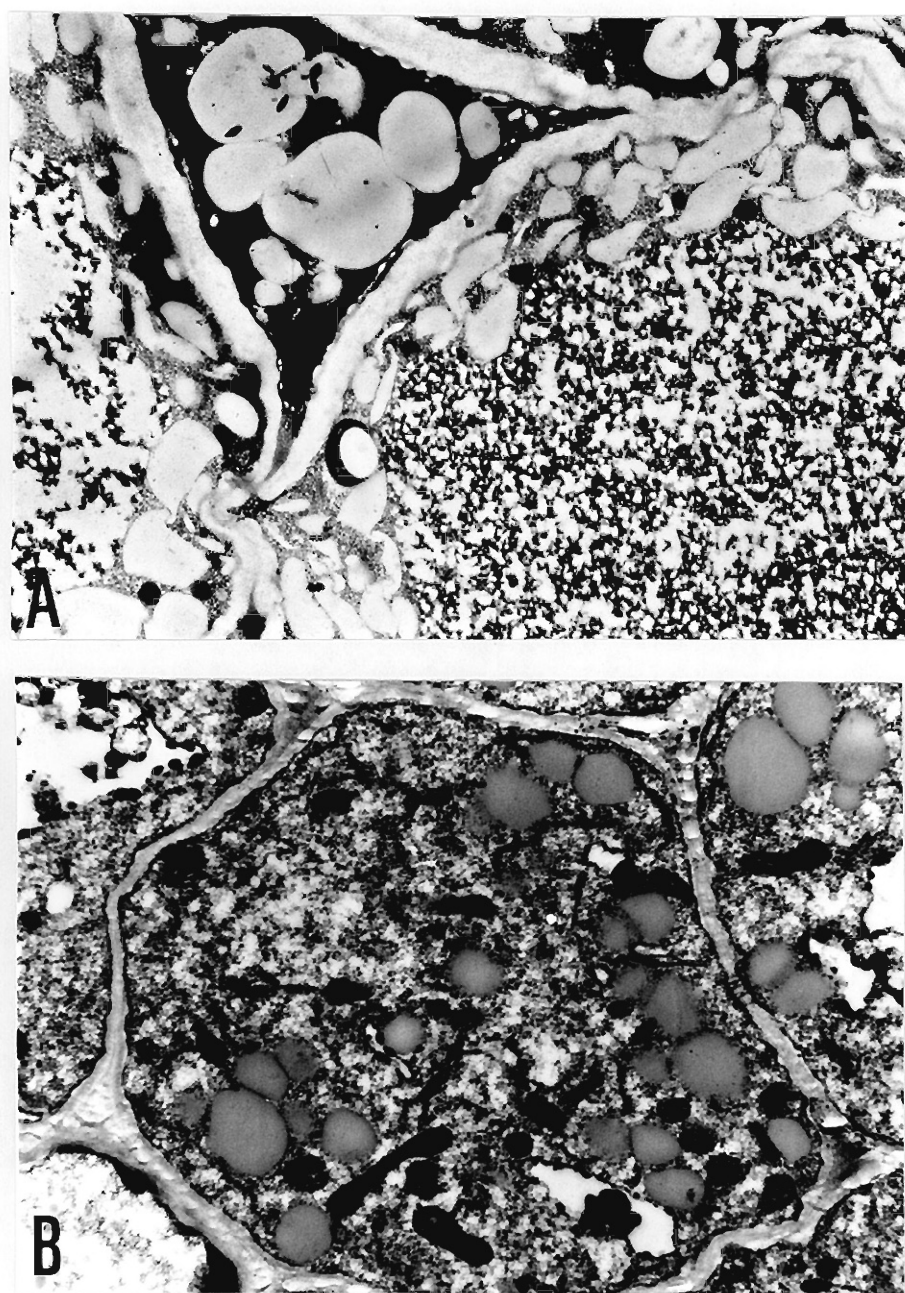


図. 9. 発芽途中の子葉細胞の多形質連絡

- 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. 細胞間隙にも密着の多い物質が存在している. 右下細胞の大部分を占めているのが 腐敗合によりつくられた量日質顆粒. ($\times 6,600$)
- B. 発芽8日目の子葉の電顕像. 右側細胞壁に plasmodesma が多数見られる. 量日質顆粒はわずかな量白粒を残して液胞化している. ($\times 4,200$)

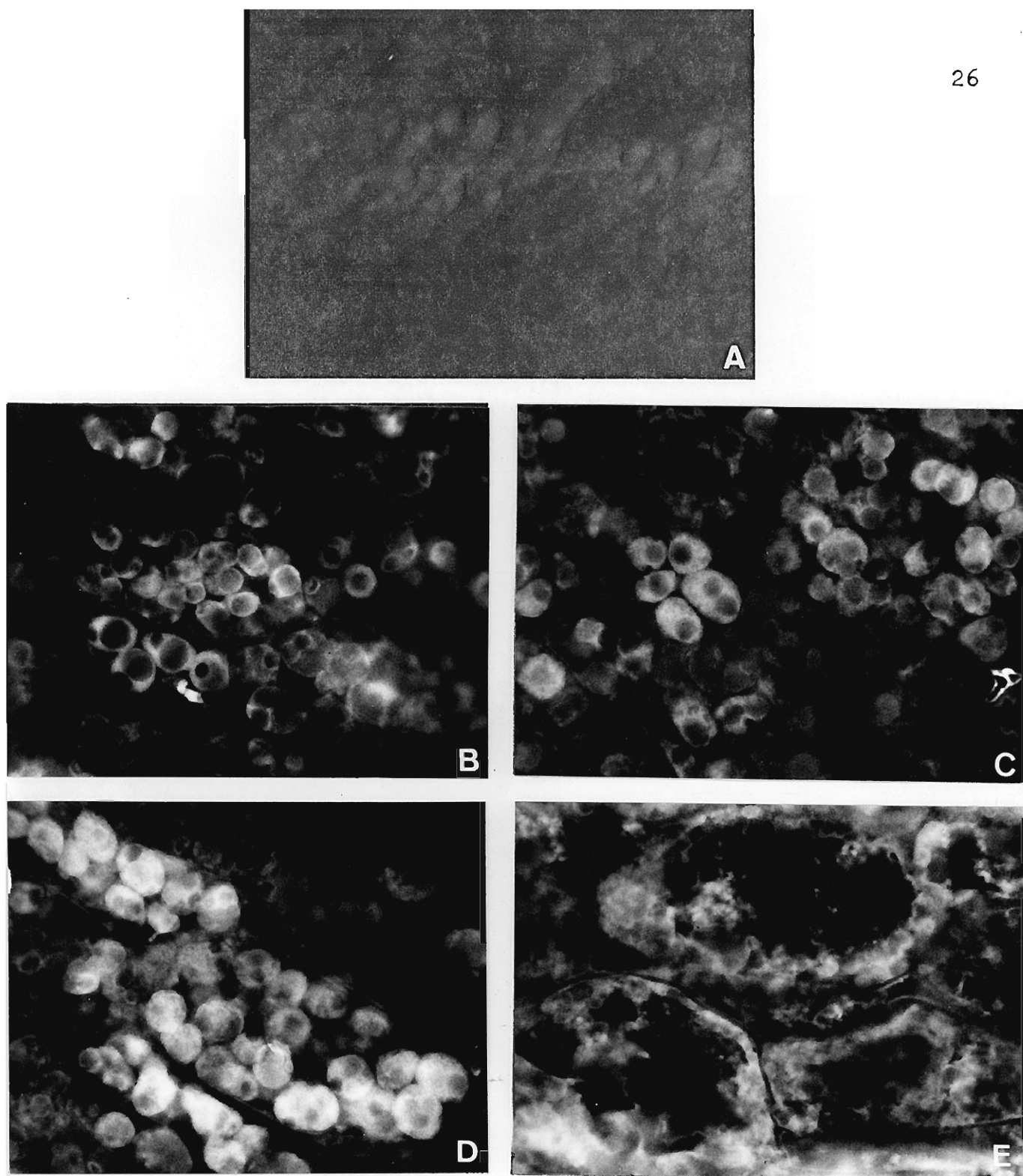


図.10. 各発芽子葉組織のT1免疫法

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光を全く示さない。

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-ルテリルで固定後、 $5\mu\text{m}$ の凍結切片を作製して。
($\times 750$)

考 察

カボチャ種子の胚細胞膜の蛋白質顆粒は Loff のフリス・エッテン方法による結果(17)と同様に フリス・ロイトと グロブイト各2つとその周辺をとり囲むマトリックス部から成っている。これは典型的な蛋白質顆粒の1つである。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。 グロブイトは P や K を多量に含むことが証明されており(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多い。

フリス・ロイトには貯蔵蛋白質の結晶状態で存在していることがアサ種子(5)やヒマ種子(19)で知られている。カボチャ種子の場合も同様のことはあるが、オ1に主要貯蔵蛋白質であるプロブリンの消滅経路(12)とここで観察されたフリス・ロイトの消滅経路はほぼ同じである。オ2に乾燥種子の重量の約25%、また全蛋白質量の90%以上を占めるプロブリンの存在場所としては乾燥種子のマトリックス部は小まじりなどから、フリス・ロイトにプロブリンは存在していると考えられる。この3つの種子プロブリンの抗14によるT1支抗14法ではフリス・ロイトは全くT1支とまじり、発芽2日目以降のマトリックス部からのみ

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
 オ1にクリスタロイドはT1光を阻害する物質である。オ2にフルタルテ
 ヒト固定処理により抗14-00入りになる。オ3にプロテリンが
 非常に密に詰められた状態でクリスタロイドを形成して、その
 抗14-00反応が起り得る。など、原因が考えられる。
 植物材料にT1光抗14-00と適用した例がまだ少なく、今回
 も常法通りではT1光を観察することができず、反応時間と長く
 して初めてマトリックス側方にT1光を認められた。固定処理を行
 った時に凍結切片を下げると細胞内構造が破壊されるなど
 技術的に改善される必要はないかと多く残されている。

オ4 マトリックス側方のT1光を透過する体について、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よ
 うなものは認められなかった。またクリスタロイドは水
 溶液中で分離されることは不溶性であるので、マトリックス側に
 出現した酵素によって一部分解を受け、プロテリンやクリスタロ
 イドの結晶構造から分解され、マトリックス側に移ることも考えら
 れる。即ち乾燥種子のマトリックスにはどのような蛋白質
 が存在するのかわからないが、発芽後のマトリックスはプロ
 テリン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 時間以内に融合と始めるとの
 大さくなり、クリスチロイドやプロポイドを複数個もつようになる。クリ
 スチロイドは 1 個に 1 個に 周辺から消化される、一方マトリックス部
 で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
 周辺からだけでなく 内部から 分解を受け 網目状の構造からなる
 小塊、それも やがて殆ど 分解されて わずかの蛋白質粒を残
 した細胞の大部を占める液状になっていく。液相に 分解酵素
 が蛋白質顆粒外から 吸水と同時に移って来るとはいへ、マトリ
 ッスの蛋白質成分は 周辺から 分解を受けるといわれる。蛋
 白質顆粒の 内部からの 分解は (Pisum sativa) (20) や (Vicia
faba) (9) などで観察されている。 また蛋白質顆粒中に蛋白質
 分解酵素の存在が認められている例も多い (5, 21-23)。 カボチャ
 (Cucurbita sp.) 種子の プロテリンは 元素不溶性であるが、
 発芽途中で 限定分解を受け 溶解液を増やすことがわかってゐる (12)。
 また 乾燥種子に プロテリンと限定分解する酵素 I 及びその限定
 分解物 F_{op} に 特異的に働く 分解酵素 II の存在について、
 その局在は不明であるが、第 4 章で 議論 される (21)。
 これらの 分解活性の 知見と 考え合わせると、 プロ・クリスチロ
 イドを形成している プロテリンは 吸水によって 賦活化されたマ

リッファス側 の 酵素 I により 限定分解物 F_{93} を主とし、 F_{93} は グロブリンに比べて 溶解度が高いので マトリッファス側へ拡散してゆき、珪壁的に働く 分解酵素 II の作用で、小分子アミノ酸と主とし、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るゝこともできる。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 蛋白質顆粒内で起っているか ということについては 不明であるが、発芽途中の 貯蔵蛋白質の 分解機構と考える上で 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 分解を助けている 可能性もあるが、最終産物は 王長節位へと 転流される。

発芽子葉細胞 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 多形質連絡が 見られ、スフィアーム 形と移動しているのか 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 パターンは 光顕でも 認められた。Briatx 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 (データは示していない) ことを示し、その 機能は 不明であるが、物質の 輸送と 関連している

のではないかと論じている(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ある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) 沢沢親房, 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, α and β , 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- β -(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), β -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 μ 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- β -(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 β -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-H₂SO₄ 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 CO₂ 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 CO₂ evolution was not observed when KOH was present in the center well, the gas evolved was considered to be solely CO₂. 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 μ , 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 $S_{20,w}^0$

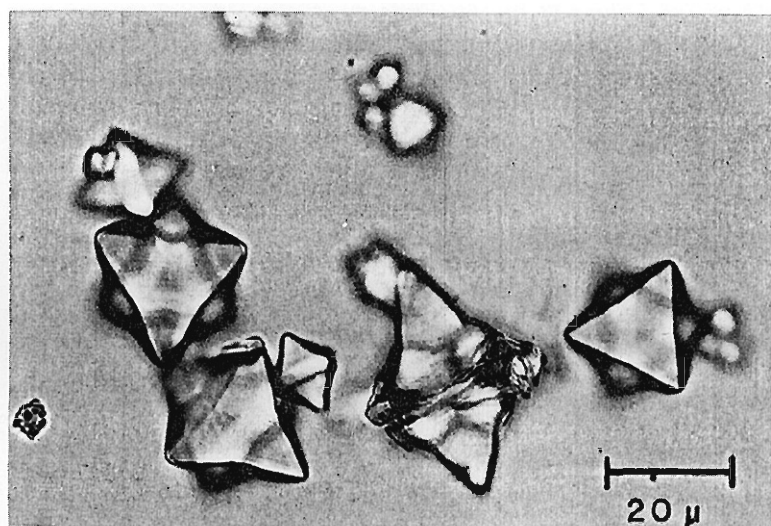


Fig. 1. Crystals of pumpkin seed globulin.

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

Amino acid	Crystalline globulin ^a	Residues per molecule		
		γ' -Chain (P-3) ^d	δ -Chain (P-1) ^e	$(\gamma' + \delta) \times 2$
Lysine	27 (14)	10	6	31
Histidine	18 (17)	5	4	19
Arginine	101 (122)	33	21	109
Tryptophan	19 ^b —	—	—	—
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 ^c (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

^a 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.

^b Determined by the UV absorption method.

^c Determined as cysteic acid and carboxymethylcysteine.

^d Based on the molecular weight of 36,000.

^e Based on the molecular weight of 22,000.

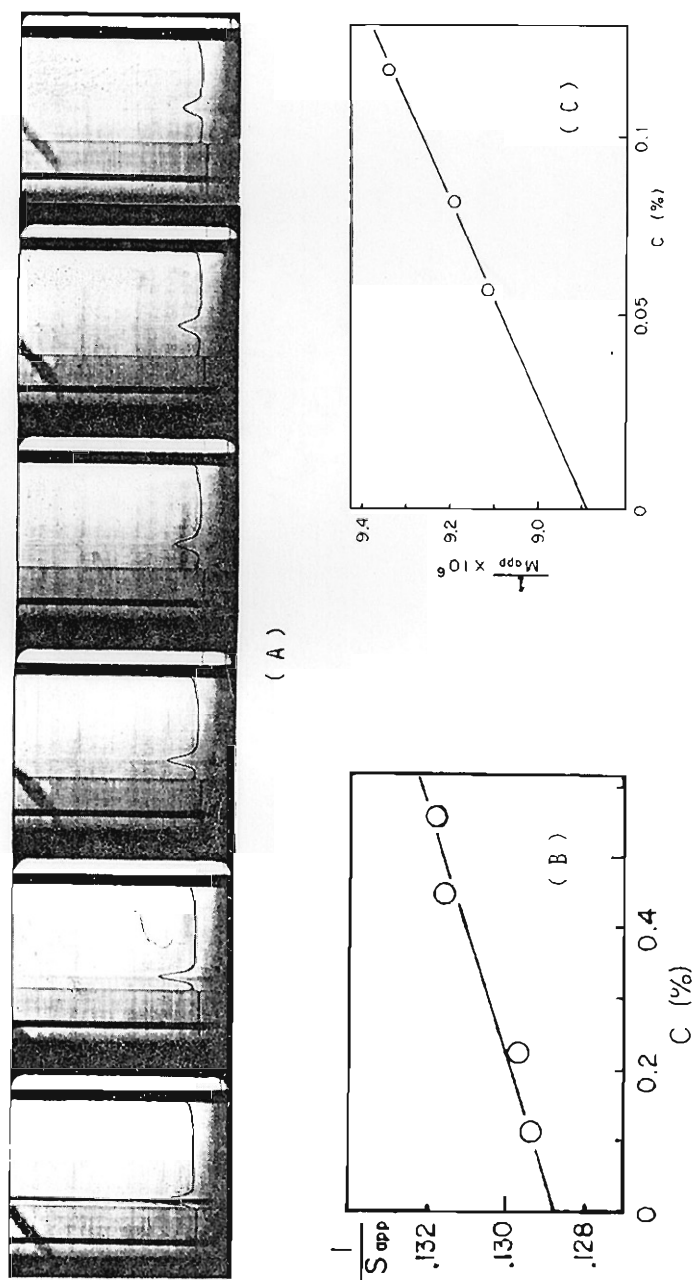
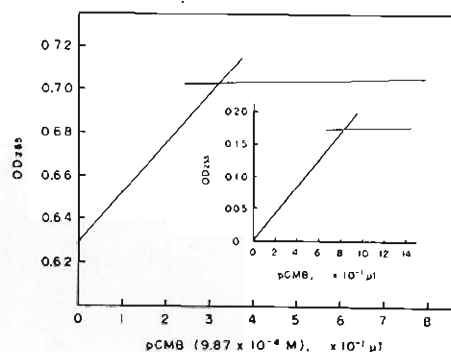


Fig. 2. (A) Sedimentation pattern of pumpkin seed globulin. The ultracentrifuge was run with 0.1 M Na-phosphate buffer, pH 7.0, containing 2 M NaCl. Photographs were taken at 13, 25, 37, 49, 61 and 73 min (from left to right) after reaching a speed of 40,000 rpm at 20°C. Protein concentration was 0.56%. (B) Plot for $1/S_{app}$ - 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 2.70×10^{-4} M glutathione. pCMB (9.87×10^{-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

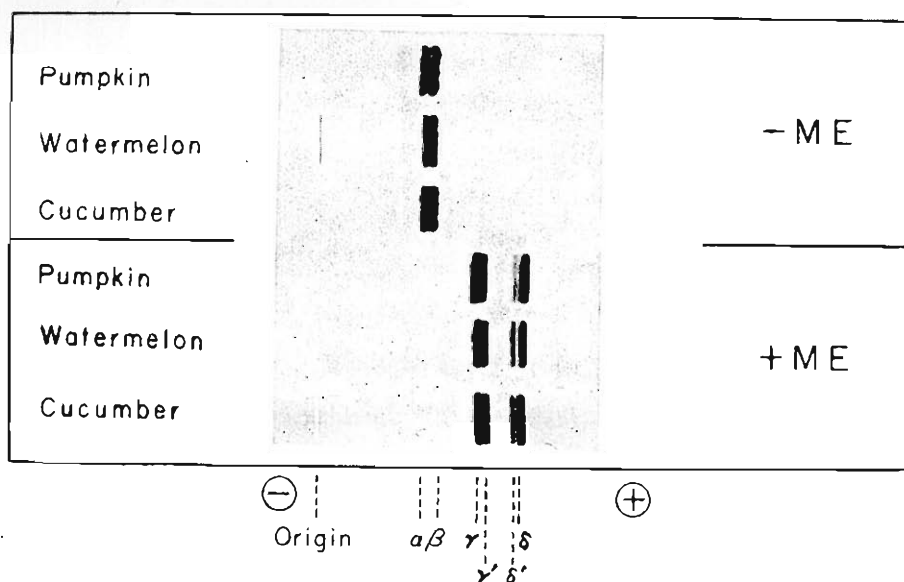


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of *Cucurbitaceae* seed globulin. Seed globulins of cucumber and watermelon were prepared as described in the text for pumpkin globulin. 7.5% gel was used. Gel buffer solution was 0.1 M Tris-acetate, pH 8.2, containing 0.5% SDS. Electrophoresis was carried out at 25 mA for 2.5 hr at 20°C. -ME and +ME represent the absence and presence of β -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 β 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, α and β , 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 α and 56,000 for β . The color strength of the α band developed by Coomassie brilliant blue was apparently a little less than that of the β band. After reduction with β -mercaptoethanol they were further separated into main bands, γ , γ' and δ , corresponding to molecular weights of about 36,000, 34,000 and 22,000 daltons, respectively. A minor band δ' was present near δ . To learn whether it is common in other seed globulins or unique in pumpkin globulin to have subunits, α and β , and the peptide chains, γ , γ' , δ and δ' , globulins were prepared in the same manner from cucumber and watermelon belonging to the same family, Cucurbitaceae. These globulins

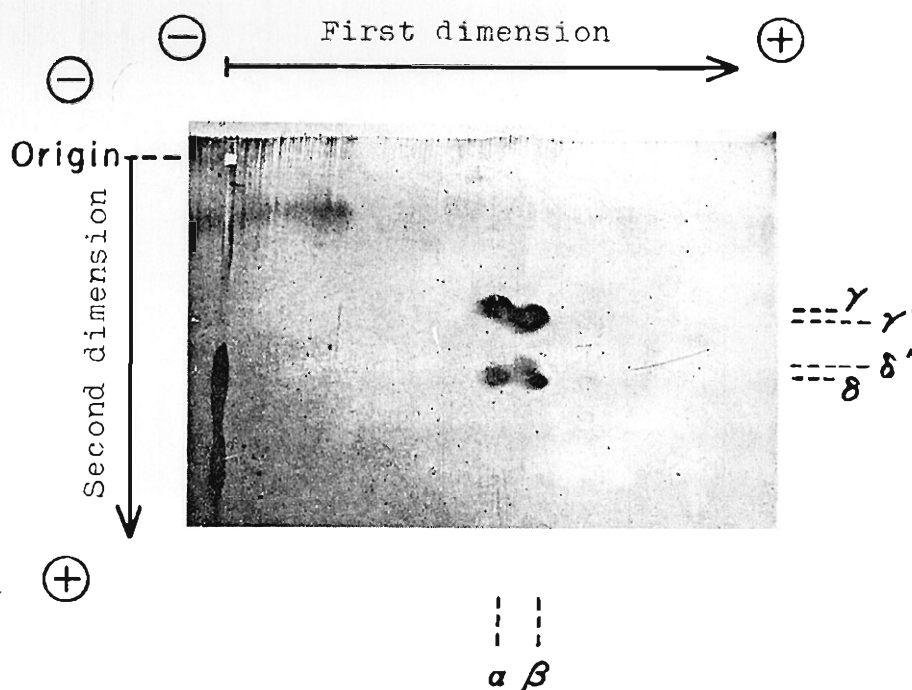


Fig. 5. Two-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoretic pattern of pumpkin seed globulin. 10% gel was used. After the first run, the gel plate was soaked in a gel buffer containing 5% β -mercaptoethanol for 30 min to reduce disulfide bonds. The second run was successively carried out at right 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 α and β . 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 α and β . 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 α and β bands.

The SDS-gel electrophoretic patterns in Fig. 4 indicate that both subunits α

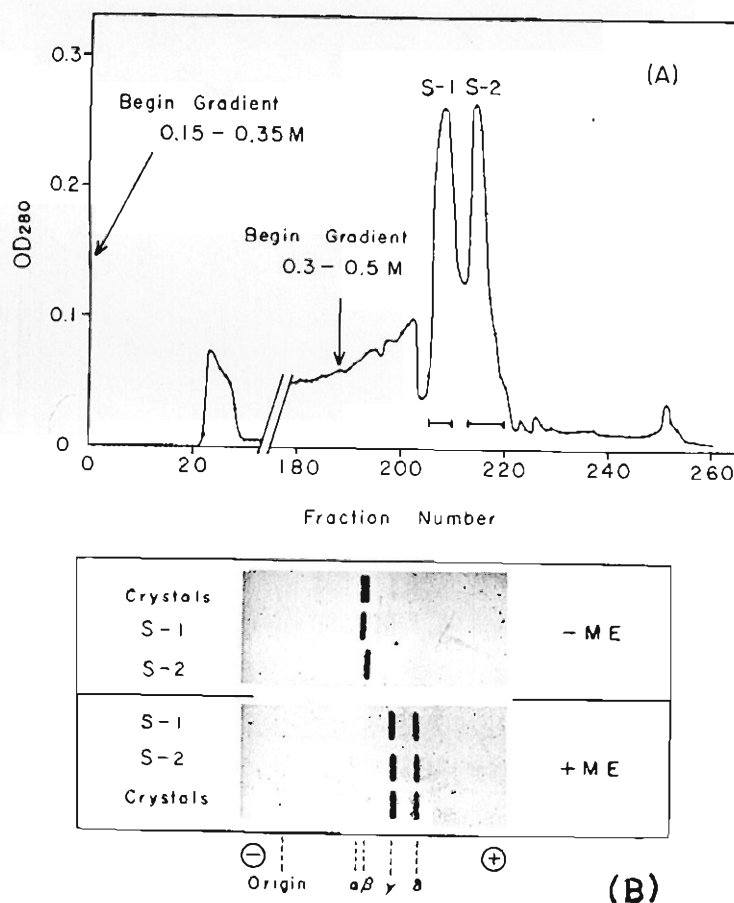


Fig. 6. (A) SDS-hydroxylapatite chromatography of SDS treated pumpkin seed globulin. Seed globulin dissolved in 0.01 M Na-phosphate buffer, pH 6.4, containing 2% SDS was heated at 100°C for 2 min and applied to a column (1.4 × 25 cm) of hydroxylapatite treated with SDS. After gradient elution between 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 β must have disulfide bonds in the molecules. Two dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis confirmed the fact that α and β subunits separated by the first electrophoresis were further separated by the second to give γ , γ' , δ , and δ' chains after reduction by β -mercaptoethanol (Fig. 5). The γ' spot derived from subunit β moved a little faster than the γ spot from subunit α . In contrast the δ spots from both α and β showed nearly the same mobilities. A faint spot apparently derived from the β subunit seemed to correspond to δ' shown in Fig. 4. Comparing the patterns shown in Fig. 4, it seems likely that γ and γ' derived from α and β have slightly different molecular weights, and δ derived from α and β have similar molecular weights. In order to characterize the α and β 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 α band and S-2 to the β . These two components had similar amino acid compositions. After reduction with β -mercaptoethanol, both S-1 and S-2 showed nearly an similar pattern having γ and δ bands (Fig. 6(B)). However, if the pattern was carefully examined, γ derived from S-2 moved a little faster than γ from S-1. This coincided well with the pattern shown by two dimensional electrophoresis. These results suggested that each subunit, α and β , had disulfide bonds combining each γ and γ' with δ chains.

Further, using carboxymethylated globulin, the separation of chains, γ , γ' , δ and δ' , 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 δ band, P-2 to the γ , and P-3 to the γ' (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 δ + composition of γ') $\times 2$ coincided very well with the composition of the original globulin.

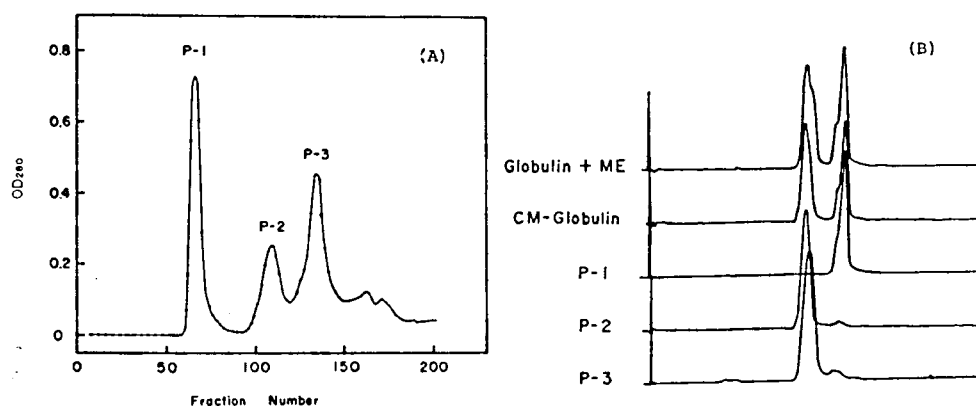


Fig. 7. (A) DEAE-cellulose chromatography of carboxymethylated globulin. Protein dissolved in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 6 M urea was applied to the column (2.6×40 cm). After passing 20 ml of the above buffer, a linear gradient to 0.6 M NaCl was conducted. Each fraction contained 2 ml. 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.

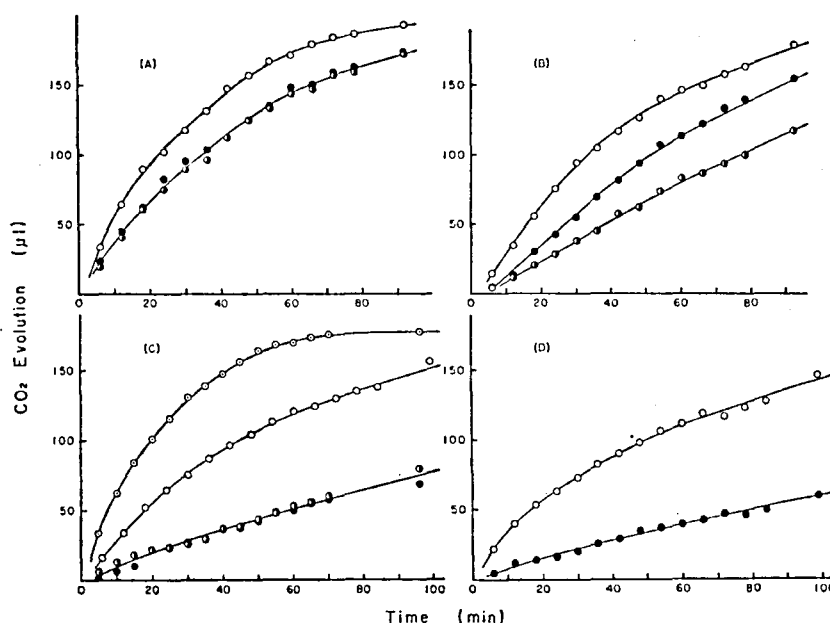


Fig. 8. Effect of Mn^{++} on the oxaloacetate decarboxylase activity of pumpkin seed globulin. The evolution of CO_2 from 10 μ moles of oxaloacetate was measured in 2 ml of 0.2 M Na-acetate buffer, pH 4.5, containing (A) 1 mM $MnCl_2$, (B) none, (C) 0.1 mM EDTA, and (D) 1 mM EDTA at 35°C by a Warburg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

Because the α and β 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 β subunit might be a product of partial proteolysis of the α 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

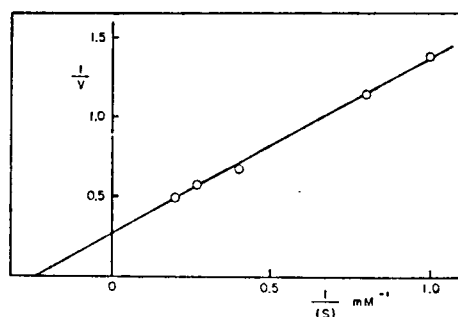


Fig. 9. The Lineweaver-Burk plot of oxaloacetate decarboxylase activity. The manometric measurement was carried out in 0.2 M Na-acetate buffer, pH 4.5, containing 1 mM EDTA at 35°C with 0.4 mg of seed globulin.

contaminating the reaction mixture which catalyzed the decarboxylation of oxaloacetate. The addition of 0.1 mM EDTA to the reaction system depressed the CO_2 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_2 evolution was slightly further depressed without practical change in the activity of the enzyme (Fig. 8(D)). These results suggested that Mn^{++} was not required to activate the decarboxylase in the pumpkin globulin. A higher CO_2 evolving activity was observed with a higher globulin concentration without affecting the control levels of CO_2 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_m 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 ^a (mg/2 ml)	EDTA (mM)	Activity ^b ($\mu\text{l}/\text{min}$)
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

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

^b The activity was expressed as CO_2 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 α and β 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, α - β , α - α , and/or β - β . The color strength of the α band after staining on SDS-gel electrophoresis was slightly less than that of the β band, although SDS-hydroxylapatite chromatography showed two similar peaks, S-1 corresponding to α and S-2 to β . Therefore, the crystalline seed globulin may have more β subunits than α subunits. The reduction of disulfide bonds separated α subunits into γ and δ chains with molecular weights of 36,000 and 22,000 daltons, and β subunit into γ' and δ chains of 34,000 and 22,000 daltons.

The carboxymethylated globulin was separated into γ , γ' and δ chains by DEAE-cellulose chromatography. Although the δ 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 γ and γ' , respectively.

Twice the value of the sum of the amino acid compositions of γ' (P-3) and δ (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 α and β 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 α and β 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 α subunit to produce the β 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, α or β , 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) Bencze, 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 γ -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- β -(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. Felsner: 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 α -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 γ globulin of rice embryo have 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

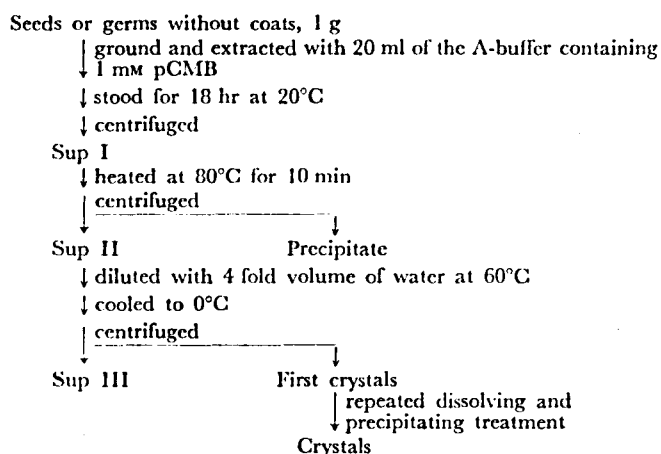


Fig. 1. A flow sheet for the preparation of seed globulin and other fractions.

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 α and β identified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis as described (8). The α and β subunits were further separated principally to γ and δ 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, α and β , 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 β band as was also observed previously (8). As germination proceeded, the α band initially decreased and disappeared in 2 to 3 days after germination and the β band also disappeared by 8 days. Concomitantly with the decrease of α and β bands, components of about 40,000 ($F_{4.3}$) 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

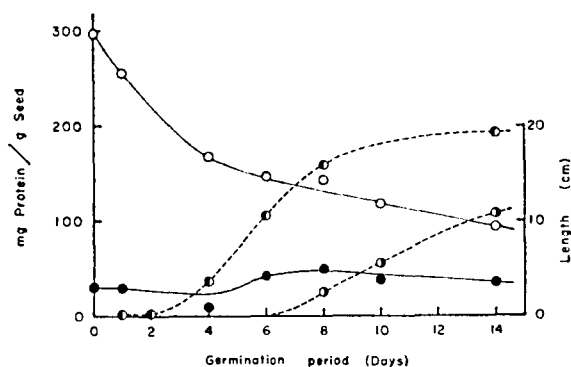


Fig. 2. Changes in the protein content in cotyledons, lengths of roots, and hypocotyls during germination. Seeds after removal of coats were placed on moist filter papers and allowed to imbibe water in the dark at 20°C for days. Determination of the protein content was by the biuret method. —○—, the 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.

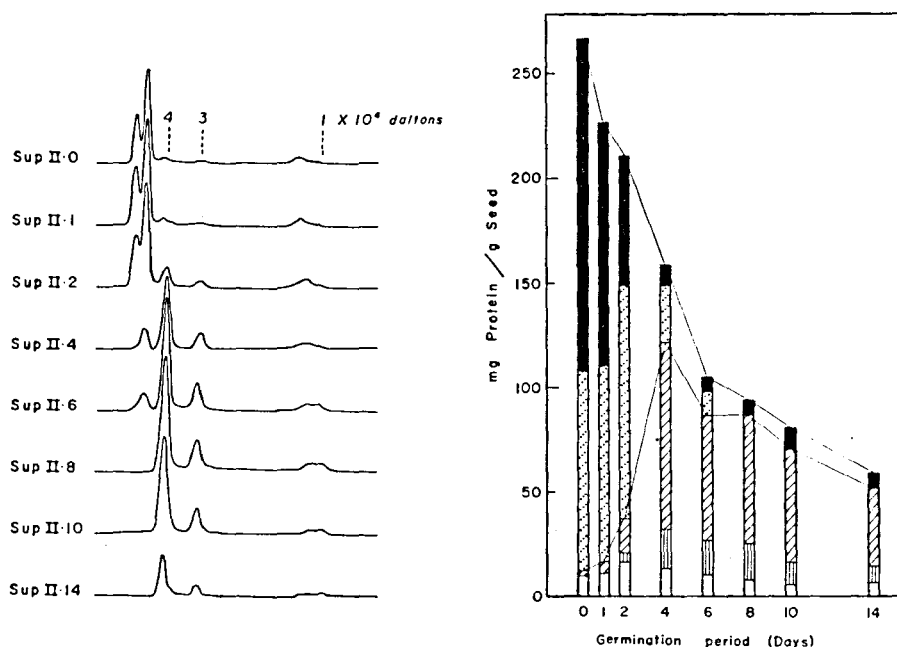


Fig. 3.

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 α and β 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 α and β , 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,

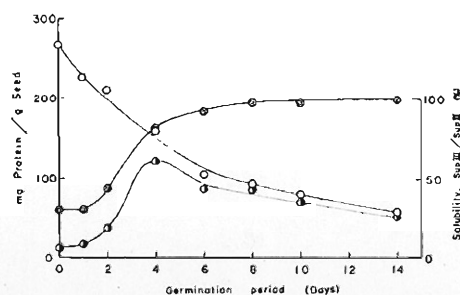


Fig. 5. Changes in components in cotyledons during germination. \circ —, total amount of protein in Sup II from cotyledons of 1 g of seed during germination; \odot —, the solubility expressed as the percentage of the amount of protein in Sup III to that in Sup II; \bullet —, total amount of protein with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

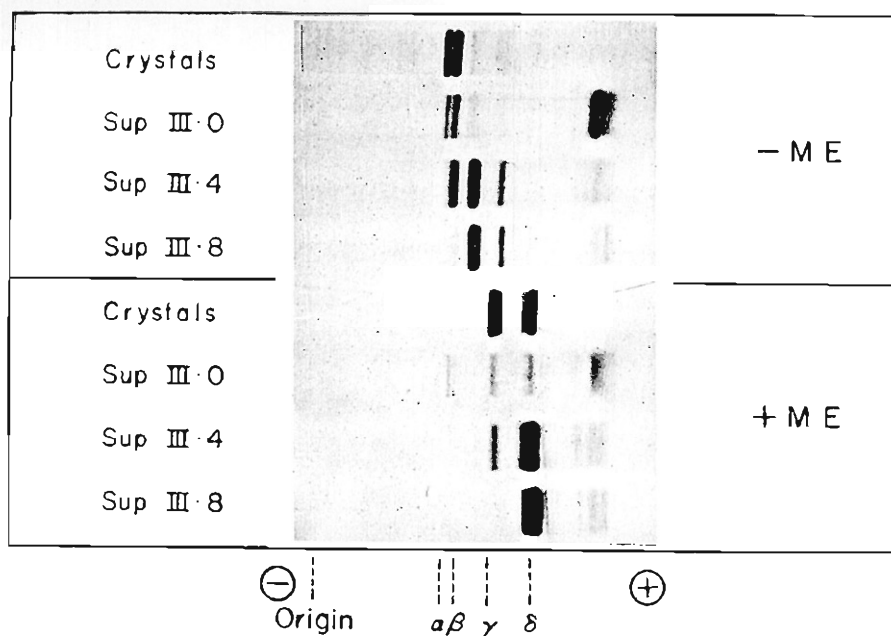


Fig. 6. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of Sup III extracted from 0-, 4-, and 8-day seeds. The conditions of germination and electrophoresis were the same as in Fig. 2 and 3 without any dilution of the sample. ME refers to β -mercaptoethanol.

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

Fraction	Activity ^a (μ 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

^a Manometric measurement of CO₂ evolution.

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

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 α and the other from β . 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, γ and γ' , of the α and β subunits. The δ chain was probably intact or very limitedly hydrolyzed, at this stage, and covalently bound to the hydrolyzed chain of γ and γ' by disulfide bonds originally present in α and β . 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) Catsimpoilas, 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 γ -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 γ globulin in rice seed and changes in γ 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, α and β bands for unreduced globulins and γ , γ' , δ and δ' bands for reduced ones. On gel electrophoresis in 6 M urea, reduced globulin gave two acidic and two basic bands. These corresponded to γ and γ' chains and δ_1 and δ_2 chains, respectively, identified by two-dimensional urea-SDS gel electrophoresis. The compositions of the α and β 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 α and β subunits with molecular weights of 63,000 and 56,000 daltons, respectively. The α and β subunits seemed to consist of two polypeptide chains, γ and δ for α and γ' and δ for β , 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 α , β , γ , γ' , δ and δ' 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% β -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% β -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% β -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-

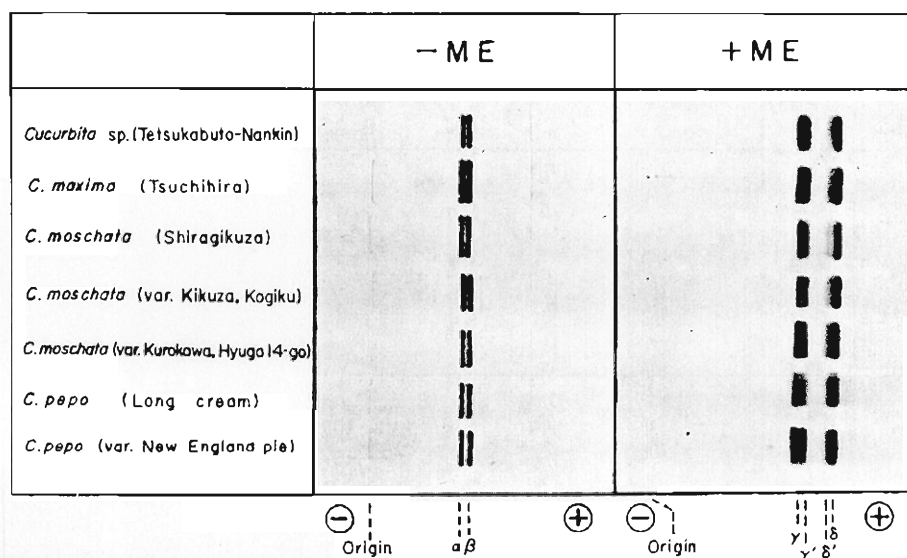


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of various *Cucurbita* seed globulins. Seed globulins were prepared as described before (8). 7.5% gel was used. Gel buffer solution was 0.1 M Tris-acetate, pH 8.2, containing 0.5% SDS. Electrophoresis was carried out at 0.025 amp and 20°C for 2.5 hr. -ME and +ME represent the absence and presence of β -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, α and β , but their color intensities after staining differed slightly from each other and the differences depended on each *Cucurbita* seed sample. After reduction by β -mercaptoethanol, they were separated into major γ , γ' and δ bands and a minor δ' 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

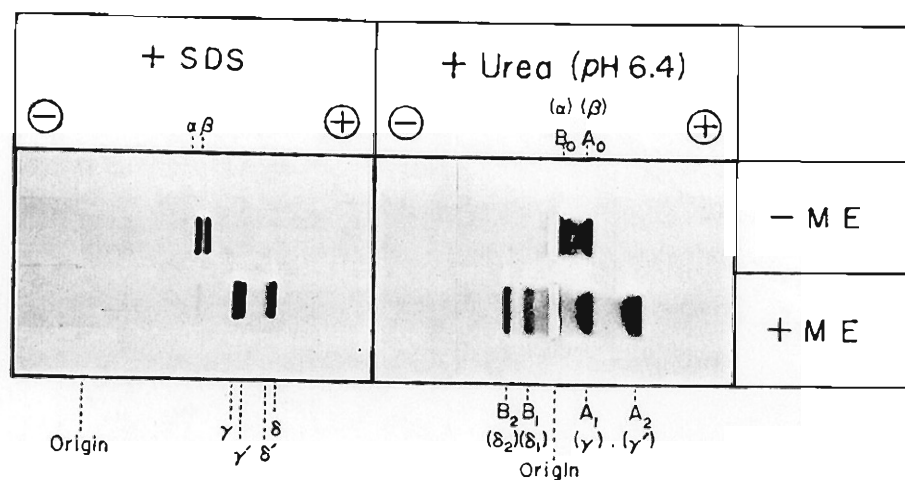


Fig. 2. Comparison between patterns of SDS-gel electrophoresis (left) and gel electrophoresis in 6 M urea (right) of pumpkin (*Tetsukabuto-Nankin*) seed globulin. Conditions for the former were the same as those in Fig. 1. The latter electrophoresis was carried out at 0.03 amp and 4°C for 6 hr on 5% 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 γ , γ' and δ chains (δ). 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 δ 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 α and β , respectively, by the second electrophoresis in SDS-gel. A_0 corresponded to the β subunit and B_0 to the α one. In the same manner, the globulin reduced with β -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 γ and γ' and the basic B_1 and B_2 ones to δ_1 and δ_2 , both of which were probably derived from the δ observed in SDS-gel electrophoresis. We have reported that both subunits α and β had polypeptide

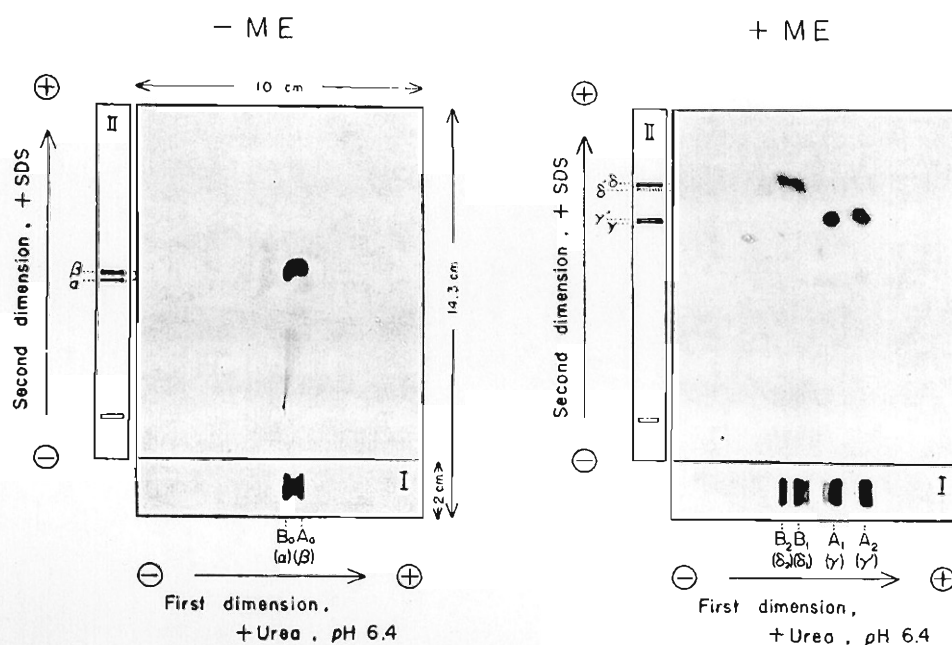


Fig. 3. Two-dimensional gel electrophoretic patterns of pumpkin (*Telsukabuto-Nankin*) seed globulin with (+ME) or without (-ME) prior reduction by β -mercaptoethanol on 5% gel in urea-SDS system. After the first runs at 0.06 amp and 4°C for 9 hr in a gel buffer containing 6 M urea, the gel plates were 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, $2.0 \times 10.0 \times 0.2$ cm, were cut off after the first electrophoresis.

chains, γ and δ for α and γ' and δ for β , and these peptide chains were linked by disulfide bonds (δ). Whether subunit α or β was the origin of the minor peptide chain δ' was not clear because it disappeared during two-dimensional electrophoresis. Each α and β 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 α and β , a two-dimensional gel electrophoresis in a urea system was used (Fig. 4). Clearly, from the results shown in Fig. 3 (left, without β -mercaptoethanol), A_0 and B_0 separated by the first run of the globulin without β -mercaptoethanol corresponded to β and α 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 α consisted of an acidic γ and a basic δ_1 chain and subunit β of an acidic γ' and a basic δ_2 chain. The previous paper (δ) suggested that as the δ chain showed only one cysteine residue, α and β each had an inter-chain disulfide bond between γ and δ_1 for α and γ' and δ_2 for β . All other disulfide bonds were probably intra-chain forms in peptides γ and γ' .

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

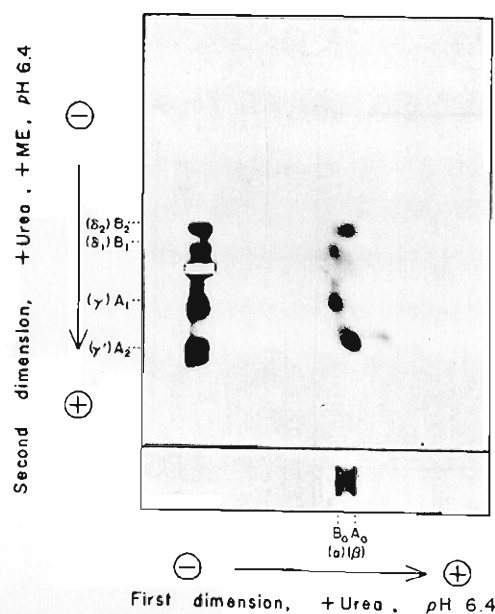


Fig. 4. Two-dimensional gel electrophoretic pattern of pumpkin (*Telsukabuto-Nankin*) seed globulin on 5% gel in a urea system. The conditions of both the first and second runs were the same as those of the first in Fig. 3. After the first run, the gel plates were soaked in a gel buffer containing 6 M urea and 5% β -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 δ_1 and δ_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 γ chain is quite dissimilar to that of γ' , 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-cedestine. *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-cedestin. *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 F_{80} 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, シクロハキシミド存在下で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 p CMB, PMST, EDTA, β -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 F_{80} , CM化グロブリン, δ 鎖に対しては 大きな変化を与えなかったが, γ '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 F_{80} や δ 鎖から 特異的にアミノ酸や小ペプチドを遊離させる活性が見つかった。グロブリンや γ 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 p CMB や EDTA に阻害され, β -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。プロフ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* で種子プロフ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、プロフ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)), これをもとにして作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時間でかなり高いプロフ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。発芽後しばらくはプロフ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あ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（吸水は起きている）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: シクロハキシミドは特級と 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 前の論文通りである (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 シャレ中で 水あるいは 5mM シクロハキシミドで 湿らせた 1 枚の紙の上に置き, 日陰で 20°C で 吸水させる。

種子 γ-グルタミン, その他の変異の調整: γ-グルタミン 及び 限定分解物 Fap の調整は 前の論文 に 詳述 (4.5)。 γ-グルタミンの CHCl₃ 抽出 及び 10% 酢酸溶液 (δ, γ, γ'-値) の 分離方法 についても 前の論文に 記した通りである (5)。

Sup I. m は 発芽 m 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 m 日目の子葉から 25mM リン酸緩衝液 (pH 5.8) 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 と 同緩衝液 により 0°C で 一夜 透析して sup ii. m を 得た。 Sup は γ-グルタミンと Fap と 含むが, sup は それらの 含量が 低い。 シクロハキシミド 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 表わしている。

Chx·Sup I に含まれる β -ロブリンの in vitro での限定分解活性の測定:

5mM シクロヘキシルトリスに於て 1日あるいは4日間 吸水させた芽,
乾燥種子 及び 正常に4日間発芽させた芽より 食塩抽出液
Chx·Sup I-1, Chx·Sup I-4, Sup I-0, Sup I-4 各々 0.05ml
と 0.15ml の水で希釈した。 37°C で 0 あるいは 18 時間放置し
た後, 0.5ml の SDS-PAGE 試料溶液を加え SDS-ゲル電気
泳動を行った。

Chx·Sup I-4 0.05ml に 0.1M リン酸緩衝液 0.14ml
加え 之に 100mM の pCHB, β -ME, DTT, EDTA, 10mM PMSE,
あるいは 3Units の カルテチ・トリプシン・インヒビター (精製品に
おける 2 倍) を 0.01ml 加えて, 37°C 0 及び 18 時間反応させた後
20% TCA と 0.1ml 添加し, 0°C で 30 分間放置した。 その遠心
上清 0.1ml に 0.2ml の 0.2M NaOH を加えて 1.0ml の ニトロリン
溶液 (2% ニトロリン, 0.04% SnCl_2 , 1M 酢酸緩衝液 (pH 5.5),
75% メタノール) を加えて 100°C 15 分間で発色させ A_{570} を測
定した。 1unit は 15 分間 A_{570} が 1 に達する場合に要する
酵素量とした。

最適 pH の測定は次のように行った。 0.05ml の
Chx·Sup I-4 に 各 pH の緩衝液 0.1ml 加え 37°C 18 時間放置

後 1.0 ml の SDS-PAGE 試料溶液を加えた。100°C 15 分の熱処理後、同溶液に再び透析して SDS-ゲル電気泳動にかけた。用いた緩衝液は 0.1 M Tris-酢酸緩衝液 (pH 3.5), 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 i:4 & α-Chx-sup ii:4 1-8 の 7-12 の 7, Fab, CHIC 7:

12 の 7, γ, γ', δ 全員の溶解性: 0.1 ml の Chx-sup i:4

および sup ii:4 1-8 を 0.1 ml の 1% 各基質溶液に加え、37°C で 0,

6, 18 時間反応させた後上記と同様に操作して TCA の溶解性

を画 α-ニトロリン 発色 (A_{570}) を測定した。一方沈殿分画は

アセトニトリル後 0.5 ml の SDS-PAGE 試料溶液に加え、SDS-

ゲル電気泳動にかけた。

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 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

前論文と同じに行なった (5)。

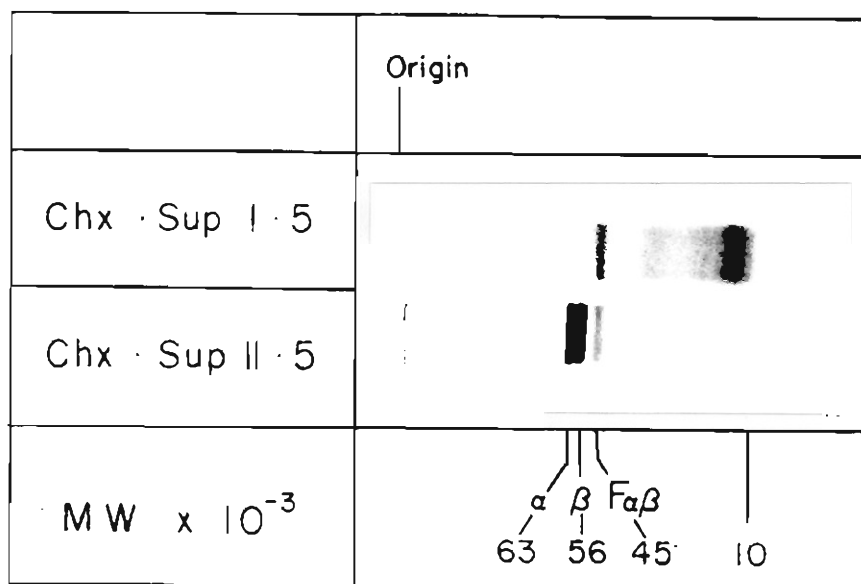


図. 1. Chx · Sup I · 5 及び Chx · Sup II · 5 の SDS - ジェル電気泳動図.

Chx · Sup I · 5 及び Chx · Sup II · 5 は 5 mM シロアリシド存在下, 脂中 20°C で 5 日間発芽させた子葉ソリン Sup I 及び Sup II である. Sup I, Sup II の調整は本文中. 各 Sup に終濃度 1% になるように SDS を加え, SDS-PAGE 試料溶液に於いて速析後 電気泳動にかけた. 泳動条件は本文中.

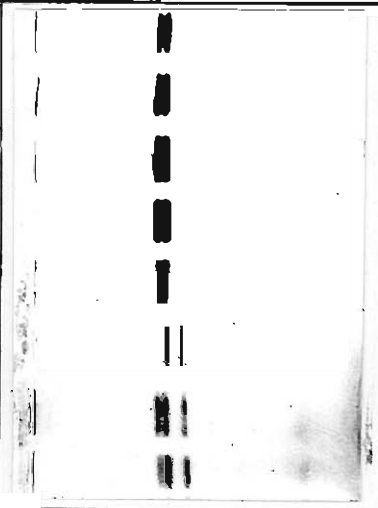
	Origin	α	β	$F_{\alpha\beta}$	Incubation time (hr)
Sup 1-0					0
					18
Chx · Sup 1-1					0
					18
Chx · Sup 1-4					0
					18
Sup 1-4					0
					18

図. 2. 0, 1, 4日間吸水子葉の各Sup I中に含まれる
グロブリンの 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 あるいは 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

シクロヘキシミド存在下で吸水させた子葉中のグロブリン *in vitro* における

変化: シクロヘキシミド存在下で 5 日間吸水させた子葉の
食塩抽出液の SDS-ゲル電気泳動図を図.1. に示す。
食塩抽出液を熱処理した Chx-Sup II.5 では グロブリン α と β の 24 のバンドが見られたが、熱処理前の Chx-Sup I.5 は
グロブリン α と β に相当するバンドが消失し、主として $F_{\alpha\beta}$ のバンドと
分子量約 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た グロブリンから抽出過程で
グロブリンから $F_{\alpha\beta}$ の限定分解が起ると考えられた。

シクロヘキシミド存在下での吸水時間による グロブリンの限定
分解活性の変動を調べた(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 グロブリン α 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
ポート1なかつた Chx-Sup I.4 は グロブリン α と β のバンドを示した。
正常に発芽させた子葉の Sup I.4 は α のバンドの染色強度が
弱くなり、 $F_{\alpha\beta}$ が現われたが、18時間インキポートした後のパ
ーティンには大きな変化は見られなかった。Chx-Sup I.4 では $F_{\alpha\beta}$

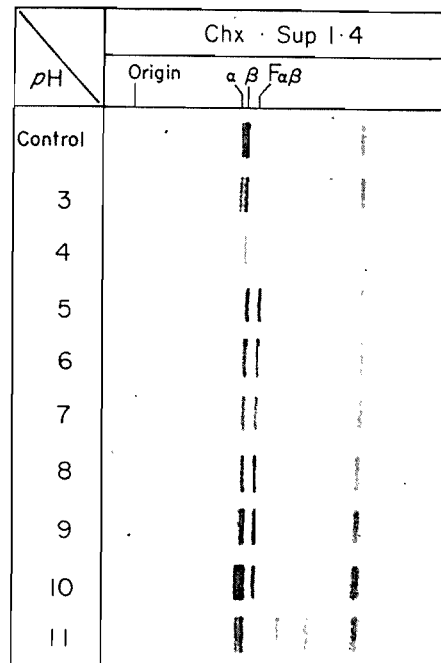


図. 3. Chx · Sup I · 4 のプロテリンの限定分解活性の至適 pH

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を用いた。

Enzyme source Substrate	Chx · sup i-4	Chx · sup ii-4	Incubation time (hr)
Globulin			0 18
F _{ab}			0 18
CM-Globulin			0 18
γ			0 18
γ'			0 18
δ			0 18

図4. Chx · sup i-4 及び Chx · sup ii-4 による F_{ab}, CM-Globulin, γ 鎖, γ' 鎖, δ 鎖の分解.

反応液は 1% α 氨基胍溶液 0.1ml と各 Chx sup
0.1ml を混合し, 37°C で 18 時間反応後 20% TCA と 0.1ml
を加え, 反応を中止後, SDS-PAGE 試料溶液に溶かす。

のバンドの位置と Sup I-4 の Fop のそれとは確かに一致していた。

Chx·Sup I-4 のもつ限定分解活性は pCHB, PMSF, β -ME, DTT, EDTA やカプチャ種より精製したトリプシン・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.)。

シクロハキシミド存在下で吸水させた芽胞の抽出液 (Chx·sup i-4, Chx·sup ii-4) のプロテリン, Fop, CHL プロテリン, γ , γ' , δ 鎖に及ぼす作用:

図.1. より予想された通り, Chx·sup i-4 は プロテリンの α のバンドを消失させ, 新たに Fop のバンドを生じさせた (図.4.)。試料溶液に β -ME を加えて SDS-ゲル電気泳動を行うと, 分子量 22,000 の δ の位置に主なバンドが生じた。CHL プロテリン, Fop 及び δ 鎖は大きな変化を示さなかった。一方 γ' 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 γ 鎖はあまり大きな変化を示さなかった。 γ' 鎖は反応溶液によく溶けるが, γ 鎖は非常に溶け難い。この溶解度の差が限定分解性の差を生じさせたとも考えられる。

一方 Chx·sup ii-4 は プロテリンを限定分解する活性と

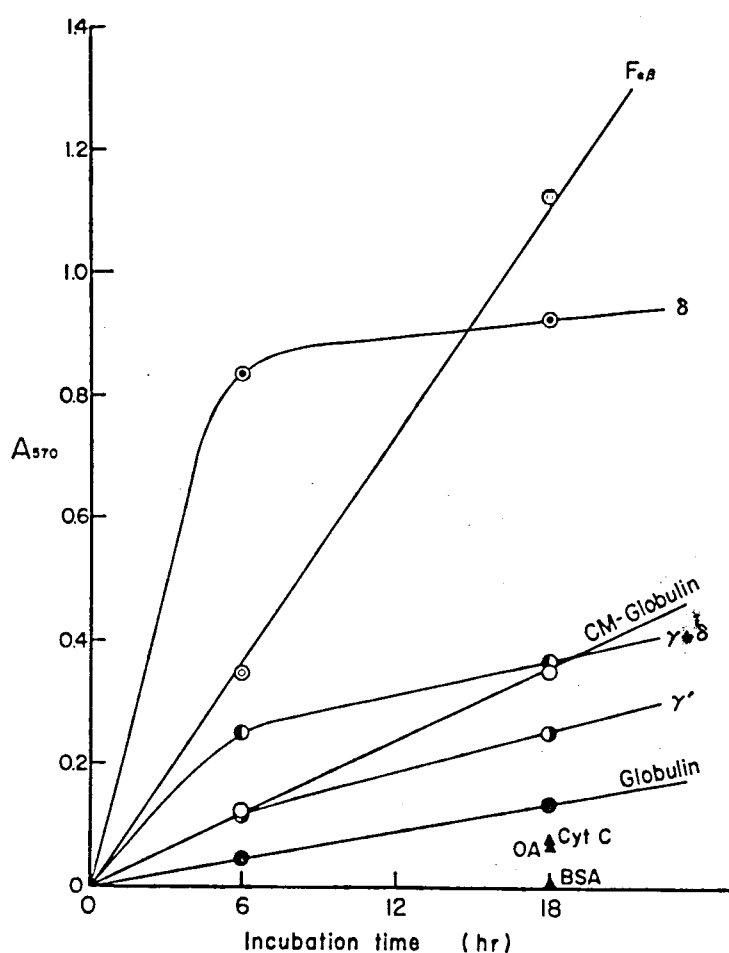


図.5. Chx-sup II-4 と δ 及び γ の反応, $F_{\alpha\beta}$, CM 化 γ の反応
 及び γ 鎖, γ' 鎖, δ 鎖の反応性

Chx-sup II-4 0.1ml に 1% の蛋白質溶液を加え,
 37°C で 6 時間又は 18 時間反応させた後、TCA の酸性
 溶液で反応を中止させ、 A_{570} を測定した。

失った(図4.)。 $F_{\alpha\beta}$, CH β プロテイン, δ 鎖の大きな変化も見られなかった。しかし γ 鎖と γ' 鎖に関しては $Chx \cdot sup ii \cdot 4$ と同様の变化と見られた。即ち γ' 鎖は溶解によって新たなバンドを呈し, γ 鎖は完全にバンドの色がうすくなる程度であった。

次に $Chx \cdot sup ii \cdot 4$ によって TCA の溶性を更に基質より遊離するアミノ酸あるいは小分子物質の時間変化を示した(図5)等量のウシ心筋チトロム C, 卵白アルブミン, ウシ血清アルブミンと基質と1の場合, 小分子物質あるいはアミノ酸の遊離は非常に少なかった。即ち TCA 沈殿物と SDS-ゲル電気泳動パターンも全く変化は見られなかった。

プロテイン, γ , γ' 鎖, CH β プロテインの溶解は小分子の比に $F_{\alpha\beta}$ や δ 鎖から小分子物質あるいはアミノ酸の大量に遊離した。プロテインは $Chx \cdot sup ii \cdot 4$ によって $F_{\alpha\beta}$ と異なる(図4)ので、プロテインに対する溶解性は非常に低い。 γ' 鎖は $Chx \cdot sup ii \cdot 4$ によって分子量 23,000 あるいは 13,000 の分子量の溶解はよく(図4)なので、これらから溶解は小分子物質と主として考えられる。 γ 鎖は $Chx \cdot sup ii \cdot 4$ によって完全に溶解しない(図4)ので、 γ 鎖と δ 鎖の混合物に対する溶解は δ 鎖の溶解パターンを反映していると考えられる。 δ 鎖の溶解は他の分子量と異なるパターン

表. 1. Chx-sup ii. 4 の プロテリン 及び Fap 分解活性に
対する インヒビター, SH 試薬, 金属キレート剤の影響.

Compound added	Concen- tration (mM)	Globulin		F _{αβ}	
		Activity ^{a)} (μ units)	Relative activity (%)	Activity ^{a)} (μ units)	Relative activity (%)
None	-	54	100	241	100
pCMB	5	10	19	44	18
PMSF	1	27	50	122	51
PTI ^{b)}	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 A₅₇₀ を 1 ユニット増加させるのに

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. supii-4 によるジロリニと Fab の分解は 5mM pCMB と EDTA による阻害された (表. 1.). 1mM PMSE による阻害は PMSE を溶解したエタノールによる阻害という可能性もある。また β -ME や DTT などの SH 試薬による活性化された。これは酵素が活性化されたためか、あるいは ジロリニと Fab のもつ 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ったためである。

考察

チ-7は示さなかったが、50%エタノールに3時間浸して種子からの Sup I・O には フロブ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、エタノール処理によりインヒビターは失活したと推定される。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考えられる。フロブ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ブリンの分解開始（オ4章、オ2節、図・10）（4）からこれは少し考え難い。

シフロキシミド存在下で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、シフロキシミドの作用に関しては全く不明である。シフロキシ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

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てもってプロテリンを分解
 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
 が失活されるが、酵素自体は膜に包われている蛋白質顆粒内
 へ入り込まないため *in vivo* でプロテリンを分解することはできないが、
in vitro で細胞を破壊した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 $p\text{CHB}$ 、 PNSE 、 EDTA や カピチアノトリフシ
 ン-インヒビターなどの影響は受けなかつた。従って、チオール酵素や
 セリンチロ酵素ではない。Reilly らはプロテリンの分解過

程につれ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すると限定分解物が生じるので、トリプ
 シン様のセリン・チロシン酵素が働いていて(8)から、振らの結果とは
 一致しない。我々の予備実験の結果ではトリプシン消化
 によって $F_{\alpha\beta}$ は生じるが、やがて次々と分解が進んでいった。

しかしここでシクロキシル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
 小分子物質を生じる活性は 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 α サブユニットが完全に分解を受けるのに対して、 β サ
 ブユニットの分解は進み難いことがわかる。 α サブユニットは γ 鎖を
 β サブユニットは γ' 鎖をもっている(9)。分解後の試料に β -ME を
 加えて SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うと、 γ 鎖が分解され γ' 鎖
 が残っているのが見られる。一方 CM 化 グロブリンより分離した
 γ 鎖と γ' 鎖とでは、 γ' 鎖の方が容易に分解を受けて新しい分子
 種を生成するのに対して、 γ 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。

プロブリンの場合には塩濃度と高くして溶解するので、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。この溶解によって万子量 36,000 の Y 鎖（あるいは万子量 34,000 の Y' 鎖）が 1 箇所切断されて、万子量 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）の万子種がさらに分解して 13,000 の万子種と主成分の問題となる。もし後者であるとするならば、Y (Y') 鎖がプロブリンと分解した際にかなりの量の小ペプ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。

次に図. 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 つの万子種に分解されると考える方が妥当である。

次にプロブリン由来の各基質から小ペプ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 δ 鎖に特異的である（図. 5.）。Fop は δ 鎖と Y (Y') 鎖の分解物とがジスルフィド結合したものと考えられる。Y 鎖は限定分解を受けているにもかかわらず、小ペプチドの遊離活性は低いので、Fop のない活性は δ 鎖が分解を受けると結果とみなすことができる。一方プロブリンも δ 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 δ 鎖の状態が単独で存在する場合や Fop の成分として存在する場合と異なり、分解を受け難い構造をとっていることを示唆している。

δ 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。 δ 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 $F_{\delta\beta}$ の一成分としての δ 鎖は ジスルフィド結合で他の α 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。 γ 鎖と δ 鎖の混合物の分解活性も曲線を描いているが、これは δ 鎖の分解を反映しているのであって、 γ 鎖は γ 鎖と同様に飽和分解していないであろう。CHCl₃ フロアリ- の場合は γ 鎖の分解方が重なり、直線的に増加したと考えられる。

この活性は pCHB, EDTA で阻害を受け、 β -ME や DTT により活性化される。この活性化は基質としての ジスルフィド結合が切れて δ 鎖が遊離したためとも考えられるが pCHB により阻害を受けるので一応チオール酵素とみなせる。

シフロキシミドによって BAPA 分解酵素の合成は止められた(後節, 図.1.). このように蛋白質合成が止まっているのであるから, $F_{\delta\beta}$ や δ 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られ, $\text{sup II} \cdot 0$ に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や因子の存在を仮定して現象を説明しなければならない。

レスにより貯蔵蛋白質プ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）限定分解酵素でプロブリンは $F_{\alpha\beta}$ の分子量 13,000 の多量種に分解される。この反応は吸水後間もなく速かに起り、発芽 4 日目までにプ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り 2 小アミノ酸に分解される。この反応は胚管内の還元状態や pH によってシスルフト結合が切れるとかあるが分解産物によって阻害を受ける可能性もある。いずれにしてもプロブリンの分解に比べて反応は遅いので $F_{\alpha\beta}$ が発芽直後に蓄積する。次に $F_{\alpha\beta}$ から生じた小アミノ酸や、限定分解でプロブリンより遊離した 13,000 の多量種はプロブリン同様 Arg 含量が高ければ、これらは発芽直後に出現する BAPA 分解酵素 (Arg のカルボキシ側を切断する) や LPA 分解酵素 (アミノアミノ酸) によりアミノ酸にまで分解されるものと考えられる (後節参照)。

シクロヘキシイミドの作用、休眠種子に分解酵素が存在するといふ点の不活性化の機構、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. 3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 分解活性及び種子グロブリンとその限定分解物 F_{ab} の分解活性は全くわがわがしか存在しなかった。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。その後の活性の減サパターンは各活性により異なり、最大活性の 50% に減サするのはグロブリンと F_{ab} 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_{ab} 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 3 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、 β -MEや DTT により活性化するが、PMSF, EDTA, 2価金属イオンやカビ糸種子のトリフシン・インヒビターには影響されなかった。BAPA分解活性にはブロブリンから $F_{0\beta}$ を生成する限定分解活性はなかった。またブロブリンや $F_{0\beta}$ から小ペプチドやアミノ酸と遊離させる活性も非常に弱かった。
4. 子葉中にトリフシン・インヒビターが存在していた。このトリフシン・インヒビターは発芽に伴ってゆっくり減かし、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
主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. 調べられた中でも
実際貯蔵蛋白質と分解した例は少なく(9,10), しかも11S γグ
ロブリンと分解した例はあまりない.

本章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かある.
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
定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2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, ヘモグロビンなど)
と 基質として分析した結果 活性は見えない場合も, 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. 芽主えの1つの分解活性を *in vitro* である時に基質として

同じ起るの種子貯蔵蛋白質を用いた例が多いが、実際には
 発芽時期において 基質となる蛋白質が自らも変化していることを忘
 れてはならない。即ち 貯蔵蛋白質が殆ど消失した時期の芽
 えの可溶性活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 グロブリンのみであり (11),
 蛋白質代謝の追跡には 有利な材料である。 本・グロブリン分
 子のサブユニット構造などの性質や 発芽途上に蓄積される グロブ
 リンの限定分解物 F_{90} 1 = 図 12 は すでに報告した (11, 13 ;
 お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 グロブリン量、代謝の
 テータ (12) と比較しながら考察した。

材料と方法

材料: N- α -ベンジル-D,L-アミノ酸 p-トリクロアレート (BAPA),
 ロイシン p-トリクロアレート (LPA), カゼイン, アソカゼイン, シクロハキシド,
 セファロース 4B の他試薬は特級と 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。
 トリプトシンは Worthington 社より購入した。 カビチ (テツカブト
 ナンキン交配種, *Cucurbita* sp.) 種子は マキイ種苗株式会社
 (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 分間滅菌
 後, 1 時間水洗したものを用了。殻を除去した種子を
 シャーレ中で水あるいは 5 mM シクロハキシドで湿らせたロ紙
 上に置き, 暗所 20°C で吸水・発芽させた。

種子プロブリン及びプロブリンの限定分解物 (Fap) の調整:

前の論文に詳述した (11, 13)。

トリプトシン・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, 冷却しつつ BrCN 水溶液 (750 mg/10 ml) を
 加え, 3 M NaOH で pH を 10~11 に保った。20 分間放置後,
 吸引口通しつつ, 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 トリフオン 溶液 ($20\text{mg}/10\text{ml}$ 0.1M 同緩衝液) と
 加えて 一夜 冷却振盪後, 300ml の 0.1M リン酸緩衝液
 ($\text{pH} 8.0$), 0.1M NaCl , 次に 300ml の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH
 4.0), 1M NaCl で洗った. ここに 塩酸で $\text{pH} 8$ に調整
 した エチレンジアミン 溶液 ($2\text{g}/20\text{ml}$) と加え, 4 時間 放置し
 た. 0.1M Tris -緩衝液 ($\text{pH} 8.0$) 300ml で洗滌後, 25
 mM γ -グルタミン酸緩衝液 ($\text{pH} 5.8$) に平衡化し, トリフオン-エフロ
 -ス カラム ($1 \times 15\text{cm}$) を作成した.

トリフオン・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 ($\text{pH} 8.0$) に溶解した) 0.5ml , 約 2m units の トリフ
 オン 溶液 0.1ml , インヒビターの溶液 $0.02 \sim 0.2\text{ml}$, 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.

1Im unit は 2m units のトリフオン・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, γ -グルタミン酸分解活性及び

トリフオン・インヒビター活性の ウルトロフィル・プロット法による:

暴発後5日目の子嚢 122個体 (33.6g) からの抽出液 (supil.5) を透析・遠心後 (supil.5), 硫酸方画 (20%-75%) を行った。沈殿を 25mM グエン酸緩衝液に溶かし, 同緩衝液で4倍化した ウルトロテール AcA 44 カラム (2.9 x 70 cm) にかいて溶出した。流速は 28ml / 時間, 各方画は 6ml ずつ集め, BAPA 及びトリプトシンの分解活性, 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 子嚢 4個体からの supil.5 を試料として, ウルトロテール 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 アフィニティー・プロトグラフ-1による精製:

supil.5 の下口通過後の トリプトシン・インヒビター方画を上記の通り調整したトリプトシン・セファロース カラム (1 x 15 cm) にかいて, 25 mM グエン酸緩衝液で A₂₈₀ がなくなるまで洗った後, 0.2 M KCl - HCl (pH 2.0) でインヒビター方画を溶出した。この方画はセファdex 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14.0からの7-ヒン酸緩衝液 1.0 ml 抽出液 (supernatant)

とトリプシン・エフロース・アフィニティー・カラム (1.5 ml) 1.0 ml につけ、吸着、

溶出液はインヒビター濃度の活性を測定した。

蛋白質分解活性の測定

BAPA 分解活性:

反応液は 0.2 M リン酸緩衝液

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

衝液で薄めた酵素溶液 0.1 ml 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 0.05 ml と酵素溶液 0.05 ml との混合、20 分間放

置後 0.5 ml の 1 mM BAPA を加えて反応を開始した。PMSF

(エタノール溶液) 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タノールを加えた。反応は 37°C

30 分間で、反応停止は 0.5 ml 1 M 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 μ 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:

0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶

解した 5 mM LPA (予め少量の DMSO に溶かして加えた) 1 ml

に酵素溶液 0.1 ml 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 分間に $1 \mu\text{mole}$ の LPA を分解するのに要する酵素溶液量と 1 分。

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°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°C で 30 分間 放置した。遠心分離の TCA の溶解性分画 0.1 ml には 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% 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°C 15 分間 処理して発色させ、 A_{570} を測定した。

1 unit は 1 分間に A_{570} が 1 単位増加させるのに要する酵素溶液量と 1 分。

グロブリン分解活性: 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) の

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して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。

suppl. 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% カゼインあるいは グロブリン 0.3 ml には 0.1 ml の各 pH の緩衝液と 0.2 ml の suppl. 5 を加えて 37°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、その遠心エタ 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% アジ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、遠心エタの 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。

プロテリン及び 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% プロテリンあるいは Fab 0.05 ml, ウルトロテール・フロート グラフィー万画 I あいは万画 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、その遠心エタ 0.1 ml について上記と同様に 12 = プロテリン を発色させ A_{520} を測定した。対照は未反応の溶液の TCA 可溶性万画を用いた。1 unit は 1 万回に

Asso を 1 分に 1 増加させる必要する酵素量と 1 分。

プロテリン 及び F_{ab} の分解活性の発芽に伴う変化: 酵素溶液

として Supilin を用い、0.1M グエン酸緩衝液 (pH 5.8) を用いた他
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 沈殿分画はアセトン洗滌後、0.1ml 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 (42.3g) に 200ml
の 0.1M グエン酸緩衝液 (pH 5.8) を加え攪拌した。= 窒カデ
で抽出液とし、遠心 (8000g × 30 分) で上清を集めた。

第 2 段階, DEAE-セルロース カラム フロマトグラフィー: 遠心上清と
25mM 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 × 8cm) に吸着させ、
同緩衝液で充分洗った後、0.5M NaCl を含む同緩衝液で
溶出した。活性分画と同緩衝液に対して透析した後、
遠心上清を集めた。

第 3 段階, DEAE-セルロース カラム フロマトグラフィー: 上清を DEAE
-セルロース カラム (2.4 × 45cm) に吸着させ、100ml の同緩衝
液を流した後、500ml の同緩衝液と 500ml の 0.7M NaCl を

含む同緩衝液の濃度勾配で溶出し、活性万画を集めた。

オ4段階, ウルトロテール AcA 34 フロマトグラフィー: 活性万画

を 85% 硫酸沈殿させた後, ウルトロテール AcA 34 カラム (3 × 116 cm) 1 本にかけ, 25 mM フェニ酸緩衝液 (pH 5.8) で溶出した。

オ5段階, DEAE-セルロース 1 本で濃縮:

オ6段階, ウルトロテール AcA 44 フロマトグラフィー: 濃縮した

活性万画を ウルトロテール AcA 44 カラム (3 × 190 cm) 1 本にかけ, 25 mM フェニ酸緩衝液 (pH 5.8) で溶出した。流速は 26 ml/時間。各万画は 10 ml ずつ集めた。活性万画は 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。

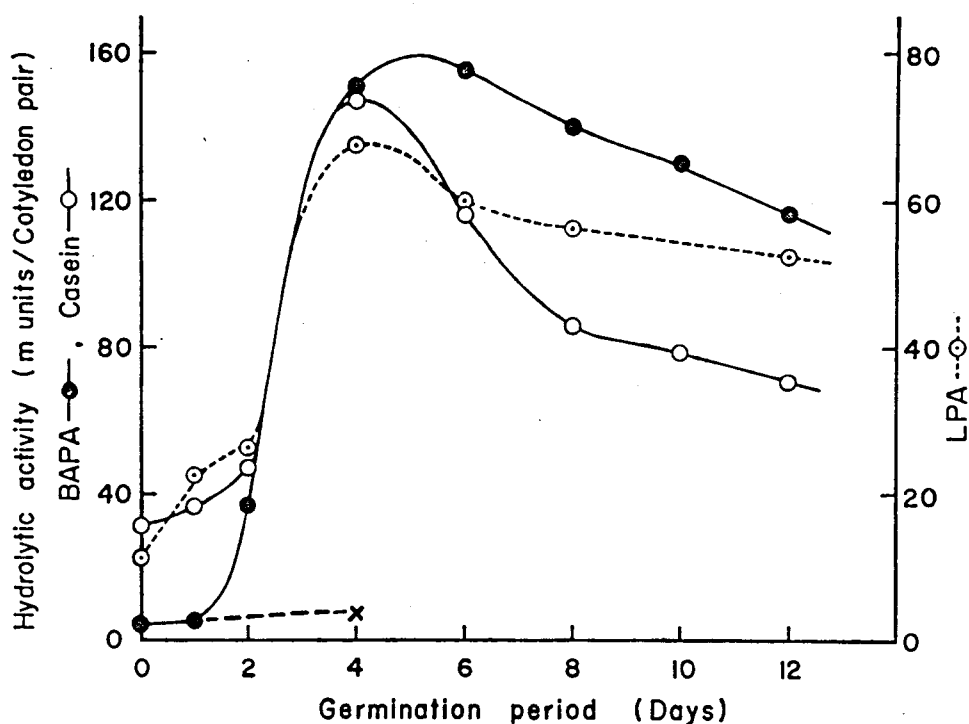


図. 1. 子葉中の蛋白質分解酵素活性の発芽に伴う変化.

発芽 4 日目の子葉の supernatant と BAPA と LPA 活性測定用には $\text{pH} 7.0$ の緩衝液で抽出し、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 $\text{pH} 5.8$ の緩衝液で抽出した supernatant とさらに透析した supernatant を酵素液として用いた。---x は 5 mM シクロキシイミド存在下で吸水させた子葉の Chx-supernatant の BAPA 分解活性を示した。

Substrate Enzyme source	Globulin			F _a β		Incubation time (hr)
	origin	α	β	origin	F _a β	
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-Globulin 及び F_aβ 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 (フェン酸緩衝液)

を酵素液として用い. 0.2% γ-Globulin あるいは F_aβ

(12.5mM フェン酸緩衝液, 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-ポリアクリルアミド凝縮法にかけた.

表. 1. γ -GTPase 及び Fap の肝活性の発現に伴う変化

Enzyme source	Activity ^{a)} (m Units/Cotyledon pair)	
	Substrate	
	Globulin	F _{$\alpha\beta$}
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 15% E 1 ml 中増加させたものに等しい

酵素量と 1 ml.

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 の分解活性の発芽時の変化と図.1.1に示した。未発芽種子中にもこれらの活性は少ないが存在していた。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日目まで半減したが、BAPA分解活性は発芽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。

プロテリンの限定分解活性は発芽4日目のsupil-4に現われた(図.2.)。即ちα-N-ペプチドが減少し、Fopが増えた。これは *in vivo* でのプロテリンの分解パターンと同じである。supil-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 supil-0, 1 には活性はなかった。Fopの分解に類似した特にペプチドの染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Fopからアミノ酸や小分子ペプチドと遊離する活性もやはりカゼイン, BAPA, LPA分解活性と同様発芽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)

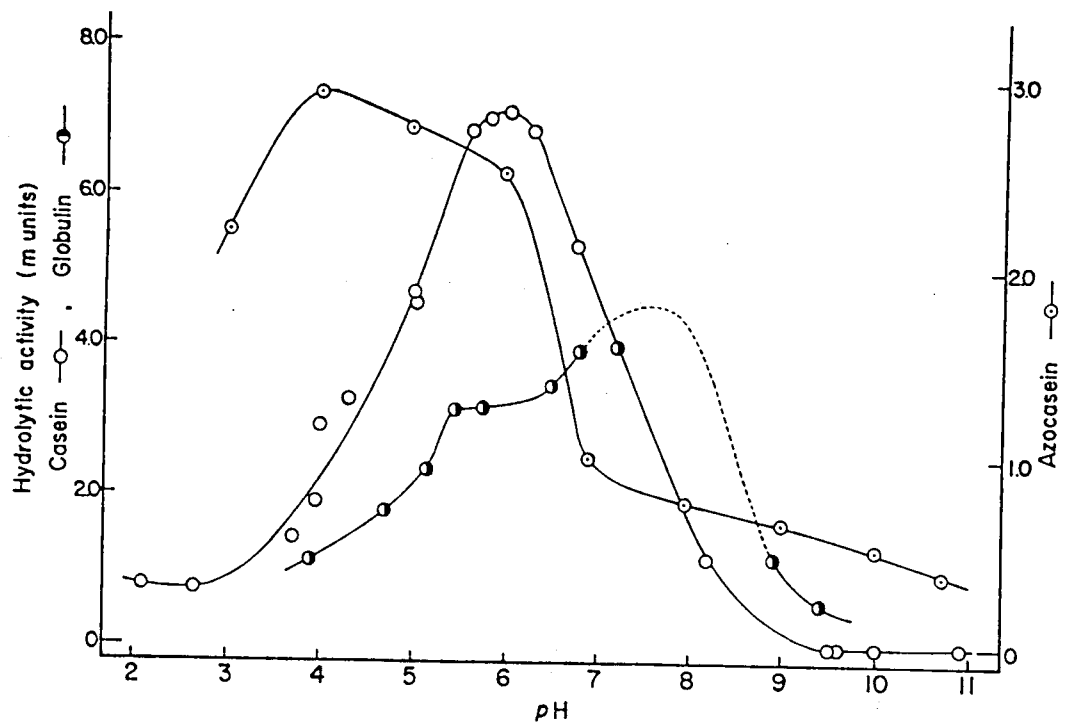


図. 3. 発芽5日目の子葉中の蛋白質分解活性の至適 pH

活性測定の詳細は 4 文中. 破線は

図. 5. 5 の推定で描いた.

Fap の分解活性は、ブロブリンの分解活性に比べて 21 倍近く強いことも特徴であった。

以上より カゼイン, BAPA, LPA, ブロブリン, Fap 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、ブロブリンと Fap の分解活性の減衰パターンは似ているが、カゼインや BAPA 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を示すと思われる $\text{supH} 5.5$ について分解活性の至適 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ろろの酸性側での活性が低下したと考えられる。

アルカゼインはカゼインに比べ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。一方ブロブリンの分解活性は pH 5.0 ~ pH 8.5 の範囲に存在しており、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.)。

$\text{supH} 5.5$ 中に存在する BAPA と ブロブリン 分解活性:

$\text{supH} 5.0$

ウルトラフィル・フロッタラフィ-1 による溶出パターンを図. 4. に示した。

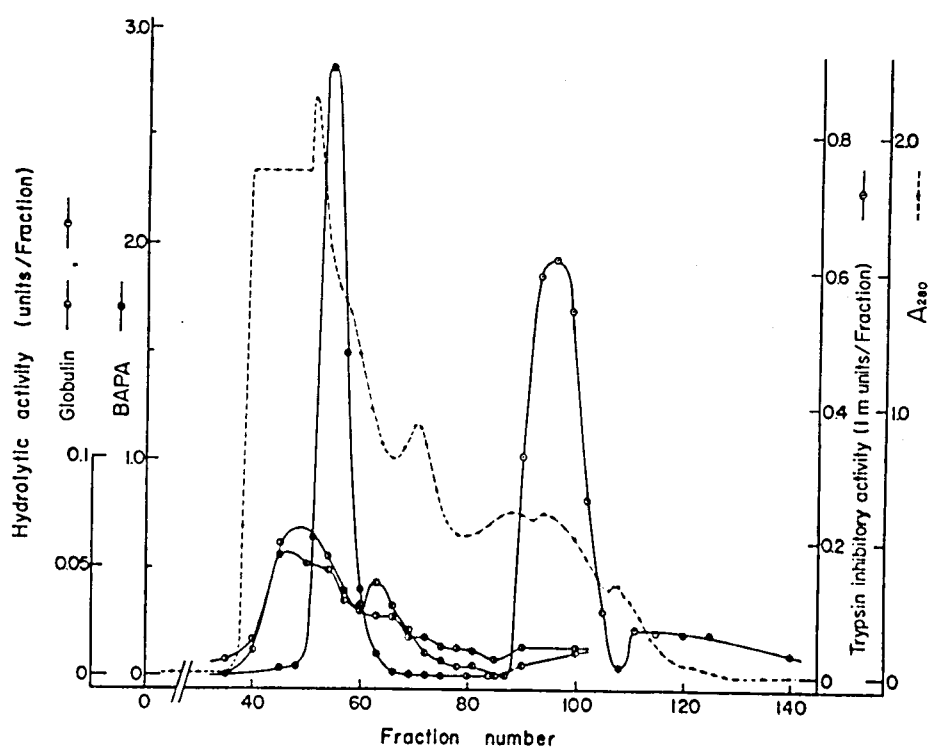


図. 4. 発芽5日目の子葉抽出液のウルトラセール・クロマトグラフィー:

BAPA, グロブリン: 及び トリプシン・インヒビター-の溶出パターン.

発芽5日目の子葉 1221個14・(33.6g) の抽出液 (supernatant)

を硫酸で沈殿した後 ウルトラセール・クロマトグラフィーを行. 左. グロ

ブリンの活性測定は 0.1M リン酸緩衝液 (pH8.0): —●—,

及び 0.1M フェン酸緩衝液 (pH5.8): —●— 中で

行った. 各分画は 6ml. 活性測定の詳細は

表4中.

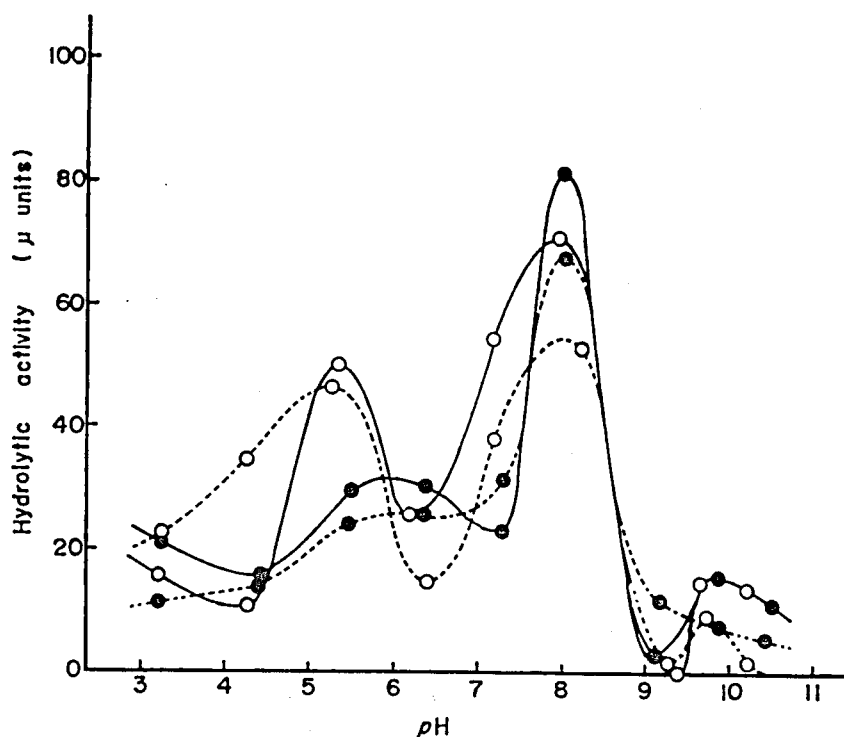
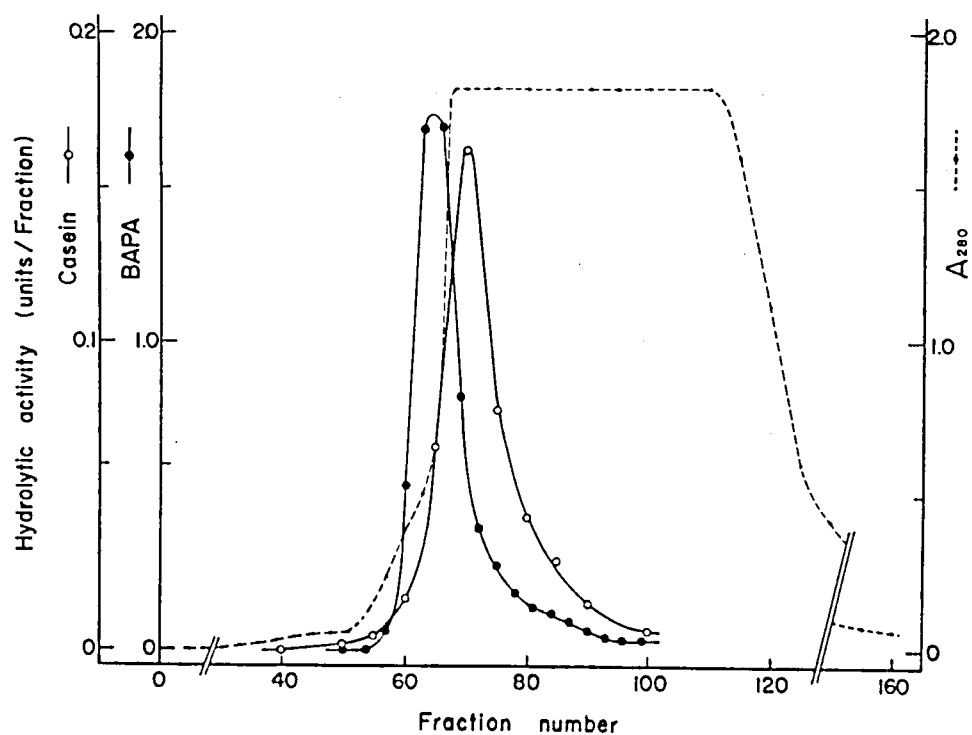


図. 5. ウルトゲル・フロマトグラーフの活性範囲と

II に於ける フロマトグラーフと F_{ap} の分解活性の pH による変化

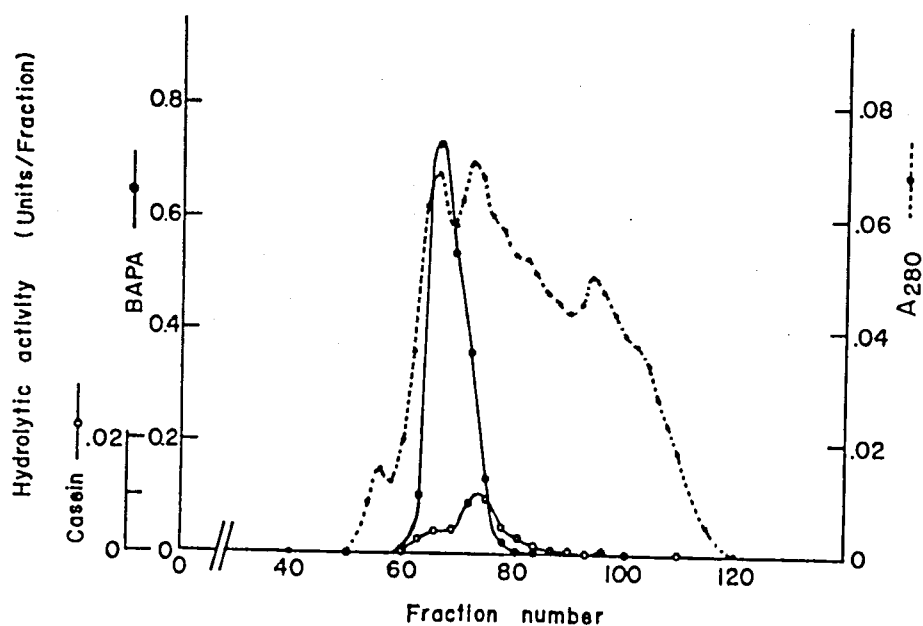
活性測定に用いた緩衝液は pH 7.5 以下で
 ケン酸緩衝液を用いた地は 図. 3. と同じである。反
 応条件は 図. 2. と同じ。酵素溶液は $sup II \cdot 5$ の
 ウルトゲル 溶出分画 I, II を用いた (図. 4.)



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 (pH8.0) で透析平衡化後、DEAE・セルロース
カラム・フロッティングを行った。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。



12.7. BAPA 及び カゼイン 分解酵素のウルトラゲル ACA

44 カラム 1=88 溶出パターン.

DEAE-セルロース カラム 溶出後の活性断面 (図.8.)

とウルトラゲル ACA 34 カラム・7027 グラフ-エフ.1=13, DEAE

セルロース で濃縮12 ウルトラゲル ACA 44 カラム 1=0.15に.

溶出は 25mM フェン酸緩衝液 で行, 各断面は

10ml. 活性測定の詳細は本文中.

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

ブロフリノの 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、活性のピークは 異なつた。一方 カゼイン 分解活性のピークは 画Ⅱのピークと一致し、しかも 活性は ブロフリノ 分解活性 より 高かった。F_{ab} の 分解活性は 画Ⅰでも Ⅱでも ブロフリノの 分解活性 より 少し低かった(図. 5.)。データは 示していないが、SPS-ゲル電気泳動で 各 pH 下での 画Ⅰ及び Ⅱ による ブロフリノの 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 減少し、F_{ab} 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・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 分解活性が 溶出されたが、大抵の 操作中に 失活して しまつた。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日目の子実のBAPA分解酵素の精製

Purification step	Total ^{a)} protein (mg)	Total ^{b)} activity (units)	Specific activity (μ units/ μ g 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 よる.

b) 1 unit は 1 分間に 1μ mole の BAPA を 分解するのに要する
酵素量と 1 に.

表. 3. 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

Compound added	Concentration (mM)	Activity ^{a)} (m units)	Relative activity (%)	Compound added	Concentration (mM)	Activity ^{a)} (m units)	Relative activity (%)
None	-	4.79	100	EDTA	1.0	5.00	104
PTI ^{b)}	3ImU	5.71	119	"	5.0	4.79	100
pCMB	0.1	4.58	96	CaCl ₂	1.0	5.00	104
"	1.0	3.54	74	"	5.0	4.71	98
PMSF ^{c)}	0.1	4.63 (4.66)	99	MgCl ₂	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 ₂	1.0	4.92	103
"	5.0	5.83	122	"	5.0	4.79	100
DTT	1.0	5.71	119	CoCl ₂	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 分間に $1 \mu\text{mole}$ の BAPA を分解するのに要する酵素量といた.

b) カボチャ種子より精製したトリフロン・インヒビター (本文参照)

c) PMSF 溶液中のエタノールによる阻害を補正した (本文参照)

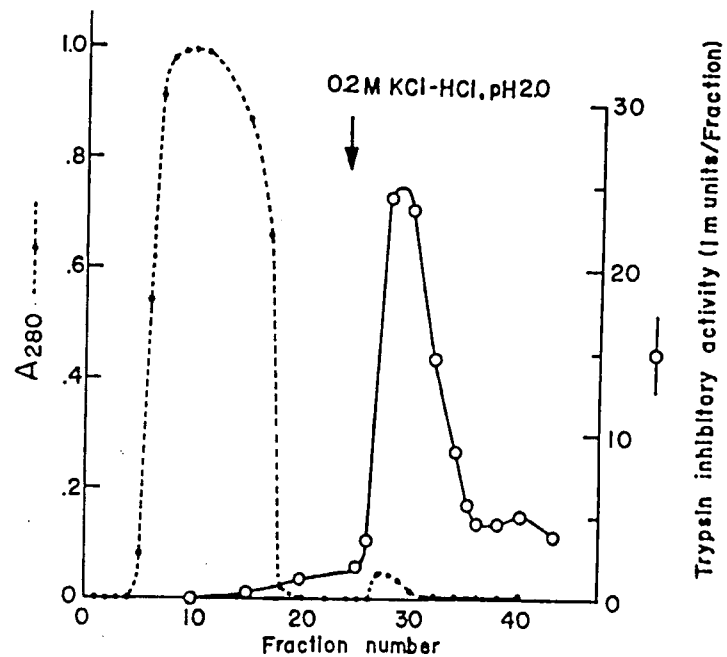


図. 8. トリプシン-セファロース・アフィニティー・カラムによる

トリプシン・インヒビターαの溶出パターン.

ウルトラマル・フロマト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、フェン酸緩衝液で洗脱後、0.2 M KCl-HCl
(pH 2.0) でインヒビター分画を溶出11。実験材
料は発生5日目の子葉4個19.2である。各分画は
3 ml.

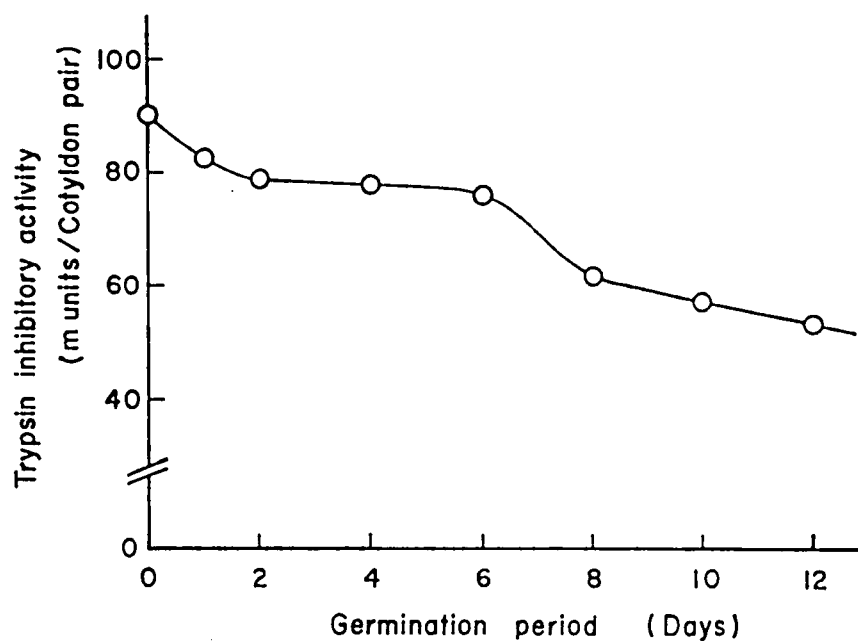


図. 9. 子葉中のトリプシン・インヒビター活性の発芽に伴う変化

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・セファローズ・アフィニティ・
 カラム にかけ, 吸着, 溶出 した 各 インヒビター 画の
 活性を測定した. 活性測定の詳細は 4 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やカプテゾールのトリフリン・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、 β -MEやDTTにより活性が上昇した。

BAPA分解活性のグロブリン、F_{ab}に対する作用：

図.4.のグロブリン分解活性のヒーフとBAPA分解活性のヒーフが重なることや、BAPA分解活性を含むグロブリン分解活性画には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の限定分解活性やグロブリン及びF_{ab}から小分子ペプチドを多量に遊離させる活性はなかった。

トリフリン・インヒビター活性： トリフリン・インヒビター活性は

ゲル口直で分子量10,500の所に溶出された(図.4.)。ゲル口直後のトリフリン・インヒビター画をトリフリン・セファロース・アフィニティー・カラムにかけ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、3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* 中に含まれる トリプシン・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じたが、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ていた。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。

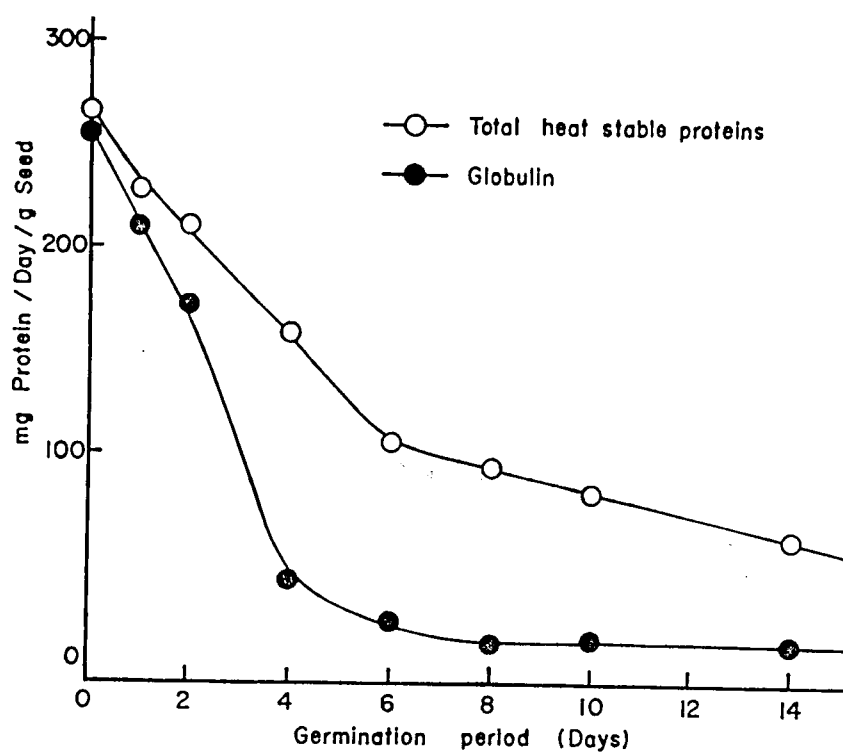


図.10. 芽中の全熱安定性蛋白質量とグロブリン量
の発芽に伴う変化

第3章 第2節の結果より、図を作成した。

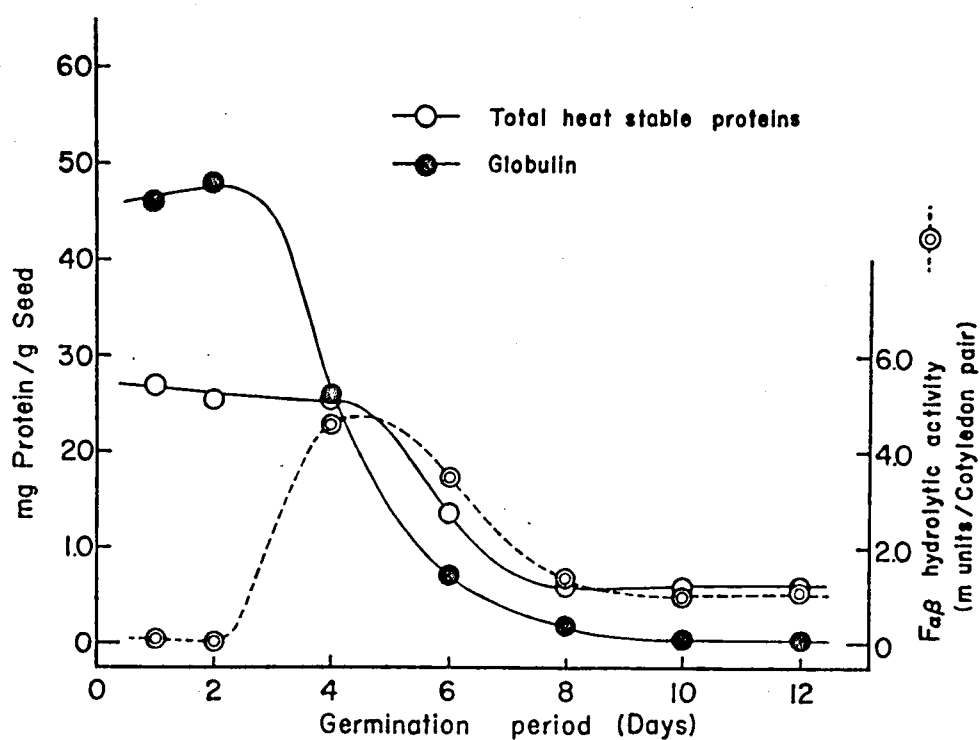


図.11. 子葉中の全熱安定性蛋白質とグロブリンの濃度及び発芽に伴う変化.

図.10. の蛋白質量の变化の各発芽時期の代表値と図.11. に表わした. 蛋白質の量(基質の量)が変化すると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. の結果より) の変動である.

考察

子葉中の全熱安定性蛋白質量とプロテリン量の発芽に伴う変化を第3章第2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とする。ただし基質濃度が変化しているので直接的ではない。

まず最初にプロテリンとその限定分解物 F_{ap} に関する発芽初期の分解について検討する。表.1.より発芽初期のプロテリン及び 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.の全蛋白質量及びプロテリン量の変動を見ると、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、プロテリンは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ったといえる。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まま反映しているとは考え難い。この食い違いの原因として考えられるのは、第1に抽出時の酵素の失活。第2に *in vivo* では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。第3に活性測定に用いた

フィロリンや F_{98} が *in vivo* の状態と異なっていた。が、あきらかに、
 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_{98} の分解活性の減サパターン(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_{98} の分解活性とフィロリンの分解活性に同じ
 1.5 活性の強度に差はあるが、変動のパターンは似ている(表.1.)。
 フィロリンの分解はフィロリンから F_{98} を生成するオ1段階と F_{98} からさらに
 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
 ようにオ1段階の活性が弱いため、フィロリンの分解活性が F_{98} の
 より低い低くなっているであろう。

フィロリンから F_{98} を生成するオ1段階の活性も発芽2日目まで
 殆どなく発芽4日目にも最も強い(図.2.)。ところが子葉のフィ
 リン量の減サをみると(図.10)、発芽初期から減サし、4日目まで
 に殆どフィロリンが消失している。この食い違いの原因も先に
 示したのと同様の3つが考えられる。先に述べたようにオ2.2.原因
 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日目以降急激に減サするという条件をつけると、ここにあげた
 現象は説明がつく。

乾燥種子に グロブリン や Fag の 分解酵素 があるか否かが
 残された問題である。 図. 11. 1 に示しても 吸水後 24 時間以内に
 急激に 酵素の *de novo* 合成 が起ったと見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 蛋白質酵素活性に 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
 Ⅱ において (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 ケル口遊で 同じ所に 溶出されること (図. 4, 図. 7)
 を通 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
 おもむくことが ともできる。 エボウの芽玉で 透過 pH 7-8 の BAPA 分
 解活性と 透過 pH 5.5 及び 7.0 の 2 種の カゼイン 分解活性が 見つかった
 (14) か、これは 今回の 結果と 類似している。

BAPA 分解活性は ケル口遊で 分子量 58,000 の所に 溶出さ
 れた。 7% PCMB で 阻害され、 β -ME や ジチオスレイトールで 活性化される
 一方 PMST, EDTA, 2 個の炭素イオンや 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
 カラム(トリフオンは吸着1た)にも吸着されなかった(デフは吸着しない)
 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)やエンドウ(8)の乾燥種子からも BAPA 分解酵素が
 精製されているが、前者は分子量 65,000-70,000 のセリン・アミ
 ノの酵素、後者はジイソプロピルフルオロリニ酸にもヨードアセチ
 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
 う点では一致している。

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
 携わっているのであろう。元来プロテリンはアルギニンと多量に含
 んでいるので、当然アルギ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、ライムやリマメの種子と同様トリフンシン・インヒビターが存在することを見つかった(図.4.)。トリフンシン-ヒドロロース・アミン・カラムでかなり精製することから(図.8.)から、分子量約8,000で A_{280} が非常に小さいので、ライムの Bownann-Birk のトリフンシン・インヒビターと同じと思われる。トリフンシン・インヒビターの実際の種子の発芽時の蛋白質の分解に関与しているかどう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ながら(表.3.)。一方プロテリンから F_{op} を生成する活性にもまたプロテリンや F_{op} から小分子肽と遊離する活性にも影響を与えていた(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日目までにまだ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りあげた酵素活性には無関係と言える。

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