

小麦の発芽にともなうキモトリプシンインヒビターの変化

光永俊郎*・清水まゆみ**

Changes in Chymotrypsin Inhibitors
in Wheat during Germination

Toshio MITSUNAGA* and Mayumi SHIMIZU**

Synopsis

Changes in the chymotrypsin inhibitors of wheat were investigated at different stages of germination up to 10 days. The total chymotrypsin inhibitory activity decreased greatly during germination, slightly increasing again on the 6th day only. In the different parts of wheat, chymotrypsin inhibitory activity increased up to the 6th day in plumules, decreased in the seeds, and was detected at very low levels in the radicles. The results suggested that the role of chymotrypsin inhibitors was to control the proteases in the wheat.

The molecular weight ranges of the chymotrypsin inhibitors did not change greatly, although those of wheat proteins tended to become smaller during germination. There are a number of chymotrypsin inhibitors in wheat; they change in various ways during growth.

I 結 言

小麦種子にはトリプシンやキモトリプシンなどのプロテアーゼに対するインヒビターが多数存在する¹⁾。これらのうち、トリプシンインヒビター (TI) については4種類が単離され、性質が明らかにされている²⁻⁴⁾。小麦種子、とくに胚乳には強いキモトリプシンインヒビター (CTI) 活性が認められるが¹⁾、その詳細はまだ明白でない。

一方、植物体に哺乳動物のプロテアーゼに作用するインヒビターが存在することについて、植物体中の代謝調整、自己分解防止、外敵防御のため、または貯蔵タンパク質であるなどさまざまな論議がなされているが、いずれも憶測にすぎない。この点につき、われわれは小麦種子の発芽にともなう TI の変動について調べ、若干の知見を得た⁵⁾。

本研究では小麦種子の CTI に着目し、プロテアーゼインヒビターの存在意義の考察の一助とするべ

く、発芽にともなう変化を検討した。

II 実験材料および方法

実験材料

小麦種子はカナダ産硬質小麦 (*Triticum vulgare*) を日清製粉より入手した。α-キモトリプシン (牛膝臓, 3回結晶) は Sigma 社より購入した。基質としてはカゼイン (Merck 社製品)、グルタリル-L-フェニルアラニン-p-ニトロアニド (GPNA, 半井化学薬品株式会社製品) を用いた。ゲルろ過に使用したセファデックス G-75 および分子量推定用標準タンパク質は Pharmacia Fine Chemicals 社より入手した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

実験方法

1. 試料の調製

精秤した小麦種子を20~23°Cで水栽培した。一定時間経過後、全部位または幼芽、幼根、種子部に分

* 食品栄養学食品化学研究室 (Lab. of Food Chemistry, Dept. of Food and Nutrition, Kinki Univ., Higashiosaka 577 Japan)

** 京都女子大学家政学部食物学食品学研究室 (Lab. of Food Chemistry, Dept. of Food Science, Kyoto Women's Univ., Higashiyama-ku, Kyoto 605 Japan)

けて採取した。採取試料に同量の海砂を混合し、3倍量の0.05 M リン酸緩衝液(0.1 M NaCl 含有, pH 7.5)を加え、5°Cで2時間放置後、遠心分離(10,000 g, 15分, 5°C)した。得られた上清の窒素量(可溶性窒素量とした。また透析後透析内液窒素量を求め非透析性窒素量とした。), CTI 活性を測定した。この上清に1.0飽和となるよう硫酸アンモニウムを加えた。沈でん物を0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.5)に対して透析し、ゲルろ過の試料液とした。調製用電気泳動には0.1 M β -アラニン-酢酸緩衝液(pH 4.0)で透析して用いた。

2. 窒素の定量

ケルダール法⁹⁾で行った。なお総窒素量は全部をそのまま分解し求めた。

3. タンパク質の定量

オボアルブミン (Sigma 社) を標準タンパク質とし、Lowry らの方法⁷⁾で行った。

4. キモトリプシン活性およびインヒビター活性の測定

カゼイン法⁸⁾または GPNA 法⁹⁾によりキモトリプシン活性を測定した。インヒビター活性はインヒビターが存在する場合のキモトリプシン活性の減少率から計算し、キモトリプシン 1 μ g の酵素活性を100%阻害するインヒビター量を1単位 (unit) とした。なお100%阻害するインヒビター量は阻害曲線の50%阻害の点の接線を延長して求めた。

発芽試料の CTI 活性はカゼイン法で、クロマトグラフィーおよびポリアクリルアミドゲル電気泳動法で得た画分の CTI 活性は GPNA 法で測定した。

5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ディスクポリアクリルアミドゲル電気泳動は Davis らの方法¹⁰⁾により、7.5%ゲル、 β -アラニン-酢酸緩衝液(pH 4.0)中で行った。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Shapiro らの方法¹¹⁾により、1% SDS を含む10%ゲルを用い、0.1 M リン酸緩衝液(1% SDS 含有, pH 7.1)中で行った。

III 結 果

1. 発芽にともなう窒素量の変化

小麦種子の発芽にともなう窒素量の変化を Fig. 1 に示した。総窒素量は栽培10日間で、ほとんど変化しなかった。可溶性窒素量は幼葉鞘より第1葉が突出する6日目まで徐々に増加し、以後はわずかに増加した。このうち非透析性窒素量に大きな変化はなく、4、6日目の値がやや高かった。透析性窒素量(可溶性窒素量-非透析性窒素量)は時間経過とともに

増加し続け、10日目には未発芽種子の約8倍量になった。

2. 発芽にともなう CTI 活性の変化

Fig. 2 は未発芽種子10gの栽培10日間の CTI 活性の変化である。総 CTI 活性(全部位の CTI 活性)は栽培開始後徐々に減少し、6日目にやや増加した。以後再び減少し、10日目には発芽前の約30%にまで

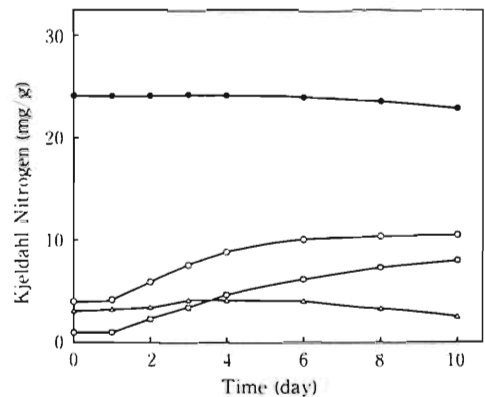


Fig. 1. Changes in Nitrogen Content in Wheat during Germination. Germination is expressed as days after the soaking of dry seeds (on day 0). ●, Total nitrogen; ○, soluble nitrogen; △, nondialyzable nitrogen; □, dialyzable nitrogen.

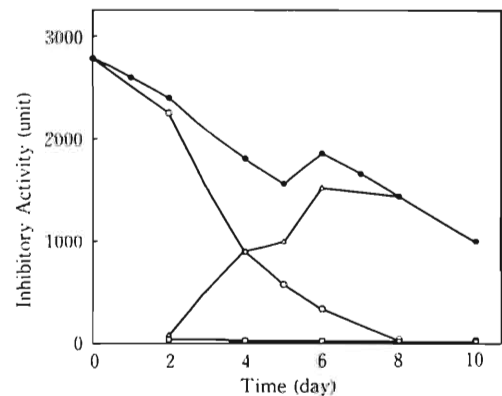


Fig. 2. Changes in Chymotrypsin Inhibitory Activity in Wheat during Germination. Germination is expressed as days after the soaking of dry seeds (on day 0). ●, Total chymotrypsin inhibitory activity; ○, chymotrypsin inhibitory activity in seeds; △, chymotrypsin inhibitory activity in plumules; □, chymotrypsin inhibitory activity in radicles.

低下した。各部位に分けてみると、種子部では発芽後減少し、特に2～4日目に著しく、8日目には完全に消失した。幼芽部は逆に急増し、6日目に最大値を示し、8日目まで活性を保持した後、10日目は減少した。幼根部では発芽初期にわずかに活性が認められたが、4日目以後は消失した。

Fig. 3. Elution Profile of Wheat Proteins at Different Stages of Germination by Gel Filtration on a Sephadex G-75 Column. Sample solutions (2 ml) prepared from germinated wheat by extraction, saturation, and dialysis were put on the column (1×46 cm). Proteins were eluted with 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5). The flow rate was 4 ml/hr and 1.5-ml fractions were collected. —, Protein of ungerminated seeds; - - -, protein on the 6th day of germination; ·····, protein on the 10th day of germination.

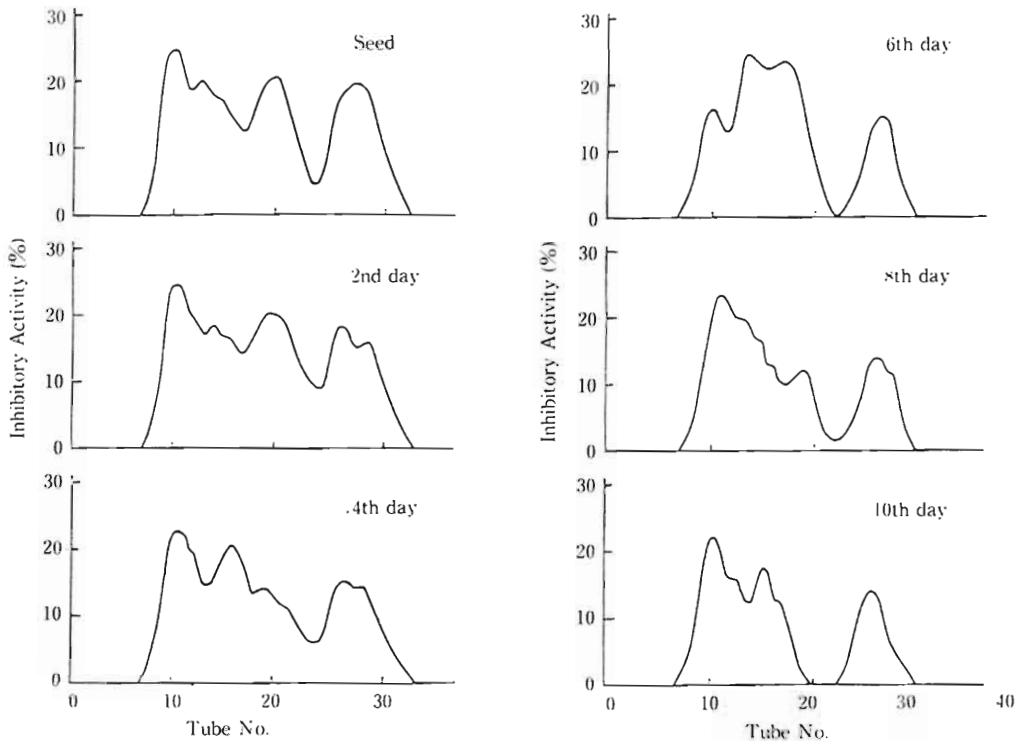
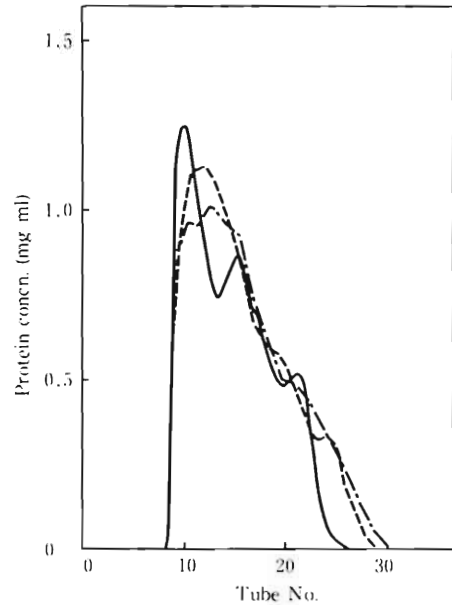


Fig. 4. Elution Profile of Wheat Chymotrypsin Inhibitors at Different Stages of Germination by Gel Filtration on a Sephadex G-75 Column. Procedures were the same as in the legend of Fig. 3. Inhibitory activity was assayed by the glutaryl-L-phenylalanine-*p*-nitroanilide method.

3. 発芽にともなう可溶性タンパク質およびCTI活性成分のクロマトグラムの変化

セファデックス G-75カラムによるゲルろ過を行い、発芽にともなうクロマトグラムの変化を比較した。未発芽種子、6、10日目の可溶性タンパク質の溶出パターンは Fig. 3 のようになり、発芽日数を経るにつれ低分子化する傾向にあった。Fig. 4 は CTI 活性についてのクロマトグラムである。活性はタンパク質の溶出するほぼ全域にわたって認められ、多種類の CTI が存在することが示唆された。活性のピークは、栽培日数によりさまざまなパターンを示した。ポイド容積付近に溶出する最初のピークは6日目に小さくなったが、後、再び増大した。最後に溶出する低分子のピークは徐々に小さくなった。これらの間に溶出する中間分子量の CTI 活性物質も変化し、特に6日目に特徴的なクロマトグラムを現した。

4. CTI 活性画分の分子量の推定

未発芽種子および CTI 活性総量が極大値となり、特徴的なクロマトグラムを示した栽培6日目の試料中の CTI の分子量を推定した。まず、長さ15 cm、直径2.5 cm のガラスカラムを用い、調製用ディスク電気泳動を行った。100 mg のタンパク質を含む試料液10 ml を泳動させた後、ゲルを5 mm 幅に切断し、0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) で抽出した。このうち CTI 活性を示した切片の抽出液について再びディスク電気泳動を行った。両試料とも CTI 活性が8切片に認められた。再電気泳動像はすべて単一のバンドであった (Fig. 5)。均一タンパク質であると認められたこれら8活性画分の分子量を SDS 電気泳動により推定した。Table 1 に示すように、未発芽種子の CTI 活性画分の分子量は11,000~61,000に、6日目では17,500~50,000に分布していた。両試料間での顕著な差異はなく、CTI は発芽によって分子量の分布がほとんど変化しないことがわかった。

IV 考 察

小麦種子の発芽にともない、総窒素量は変化しないが、可溶性透析性窒素量は増加したため、タンパク質が可溶化し、さらに低分子化する傾向が認められた (Fig. 1)。

小麦種子の発芽にともなう CTI 活性の変化は TI 活性の変化⁹⁾とは異なった様相を呈した。総活性量は TI の場合、発芽とともに急激に増加し、栽培6日目で最大値となり、未発芽種子の2倍もの値になっ

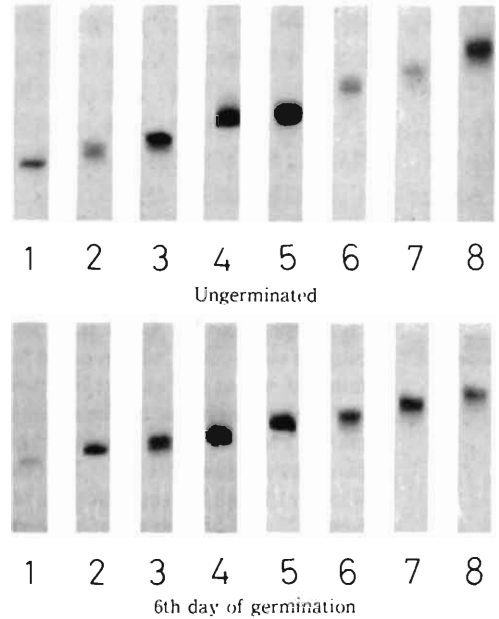


Fig. 5. Gel Electrophoresis of Chymotrypsin Inhibitor Fractions.

Electrophoresis was done on 7.5% gels with the buffer system of Davis and Ornstein¹⁰⁾.

Table 1. Molecular Weights of the Chymotrypsin Inhibitor Fractions.

Molecular weights were estimated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Gel electrophoresis was done on 10% polyacrylamide gel in 0.1 M phosphate buffer containing 1% SDS (pH 7.1) with phosphorylase (M.W. 94,000), bovine serum albumin (M.W. 67,000), ovalbumin (M.W. 43,000), soybean trypsin inhibitor (M.W. 20,100), and α -lactalbumin (M.W. 14,400) as the standards.

Fraction	Ungerminated seeds	6th day of germination
1	11,000	17,500
2	21,000	23,000
3	33,000	34,000
4	23,000	32,000
5	31,000	50,000
6	52,000	46,000
7	61,000	35,000
8	29,000	38,000

た。CTI の場合は減少する一方で、同じ 6 日目で極大値を示したがわずかな増加であった。しかしこれらを部位別に測定してみると、同様な変化を示した。すなわち、両活性とも幼芽部での増加が著しく、6 日目まで増大し以後減少した。種子部においては激減した。また幼根部ではもともと活性が少く、あまり変動しなかった (Fig. 2)。活性が幼芽部でのみ増加し、しかも幼葉鞘から第 1 葉の生成する 6 日目で最大値を示すなど、生育の盛んな部分に多いことから、小麦の TI, CTI の存在は内生のプロテアーゼの制御が目的ではないかと思われる。総活性量の変化は幼芽部での挙動が反映されており、植物体中で幼芽の占める活性量が TI の場合大きいため、総活性量も 6 日目を最大値とする形になったが⁹⁾、CTI の場合は少く、6 日目でわずかな増加にとどまった。このことから、小麦種子の発芽に際しては、キモトリプシンタイプよりトリプシンタイプのプロテアーゼの制御が重要であると推察される。

栽培日数にともなうクロマトグラムの変化を調べたところ、可溶性タンパク質は徐々に低分子化する傾向にあり、これは可溶性窒素量の変化とも一致した。しかし CTI は 10 日目まで広範囲にわたって溶出し、全体的に低分子化するという様子は示さなかった。未発芽種子と栽培 6 日目の活性画分の分子量を SDS 電気泳動法で推定しても、分子量の分布に大きな差はなかった。また、活性物質の溶出パターンは数多くのピークを現し、多種類の CTI の存在がうかがえた。電気泳動的にも未発芽種子と 6 日目でそれぞれ 8 活性画分を認めた。しかもこれらのピークは栽培日数により増大するもの、縮小するもの、中には消失するものもあった。つまり CTI は分子量の分布は大きく変化しないものの、合成や分解は盛んにおこっており、時間経過にともない種類はさまざまに変化するようである。

以上、小麦種子の発芽にともなう CTI の変化について調べたが、非常に多種類の CTI が存在することにつき、それぞれに対応するプロテアーゼが小麦に存在するのか、1 種類のプロテアーゼに数種類のインヒビターが働くのか、なお検討が必要である。また、栽培日数を経るにしたがって、CTI の種類が変化するが、これは CTI の修飾によるのか、それとも新たな合成、消失を繰り返しているのか、この現象と可溶性透析性窒素量の増加、タンパク質の低分子化との関連があるのか、興味深いところである。これ

に呼応し、小麦のプロテアーゼも生育にともないどのように変化するのか、関心が持たれる。

V 要 約

小麦種子の発芽にともなう CTI の変化を調べた。CTI 総活性量は栽培 6 日目にわずかに増加するが、全体的には 10 日目まで大きく減少した。部位別には、種子部で減少、幼根部でほとんど検出されず、幼芽部でのみ増加し、しかも第 1 葉の生成する 6 日目に最大値を示した。これより CTI はプロテアーゼの制御のために存在するのではないかと考えられた。発芽にともなう窒素量、クロマトグラムの変化から、タンパク質は低分子化する傾向にあったが、CTI の分子量分布は見かけ上大きな変化はなかった。小麦には CTI が多数存在し、生育にともない、その種類がさまざまに変化していることが認められた。

引用文献

- 1) T. MITSUNAGA: J. Nutr. Sci. Vitaminol., 20, 153~159 (1974)
- 2) T. MITSUNAGA: *ibid.* 25, 43~52 (1979)
- 3) 光永俊郎・清水まゆみ: 農化, 56, 7~12, (1982)
- 4) T. MITSUNAGA, Y. KIMURA and M. SHIMIZU: J. Nutr. Sci. Vitaminol., 28, 419~429 (1982)
- 5) 光永俊郎・朝倉直子・清水まゆみ: 農化, 57, 857~862 (1983)
- 6) W. HORWITZ: in "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists" 16, 858 (1970)
- 7) O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL: J. Biol. Chem., 193, 265~275 (1951)
- 8) B. HAGIHARA, H. MATSUBARA, M. NAKAI and K. OKUNUKI: J. Biochem., 45, 185~193 (1958)
- 9) B.F. ERLANGER, F. EDEL and A.G. COOPER: Arch. Biochem. Biophys. 115, 206~210 (1966)
- 10) B. DAVIS and L. ORNSTEIN: Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321~349 (1964)
- 11) A.L. SHAPIRO and J.Y. MAZIEL: Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 815~820 (1967)

(昭和63年11月30日受理)