

ヒマ種子胚乳カルボキシペプチダーゼの発芽過程における変動に関する研究

山本, 知子
筑紫女学園短期大学

下田, 忠久
九州大学農学部生物化学教室

船津, 軍喜
九州大学農学部生物化学教室

<https://doi.org/10.15017/22286>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 36 (2/3), pp.71-78, 1982-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :

ヒマ種子胚乳カルボキシペプチダーゼの 発芽過程における変動に関する研究

山本知子*・下田忠久・船津軍喜

九州大学農学部生物化学教室

(1981年11月28日 受理)

Carboxypeptidase of Castor Bean Endosperm during Germination

TOMOKO YAMAMOTO, TADAHISA SHIMODA
and GUNKI FUNATSU

Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture
Kyushu University 46-02, Fukuoka 812

緒 言

植物種子の貯蔵蛋白質は、発芽に際しアミノ酸まで分解されたのち、新しい組織を作るための蛋白質の合成に利用される (Mayer and Poljakoff-Mayber, 1975)。ヒマ種子に含まれる可溶性蛋白質としては、毒性と細胞凝集活性を有するレクチンが主体をなすが、これらは発芽の進行とともに分解されることが知られている (Funatsu *et al.*, 1973)。このような種子貯蔵蛋白質の分解は、プロティナーゼ、エンドペプチダーゼおよびエキソペプチダーゼの協同作用によって行なわれるが、ヒマ種子の場合、プロティナーゼ、アミノペプチダーゼおよびカルボキシペプチダーゼの存在が認められており (Tully and Beever, 1978)、ヒマ種子レクチンの分解に関与するものと思われる。ヒマ種子レクチンは分子量 31,000 のA鎖と分子量 33,000 のB鎖が1個のS-Sで結合した糖蛋白質で、そのままではトリプシン、キモトリプシンおよびペプシンなどの動物性プロティナーゼによる分解を受けず、両鎖間のS-S結合を還元切断することによって初めて分解を受ける。従つて、胚乳の蛋白体中に存在するレクチンが、発芽過程において如何なる機構によつて分解されるか興味深い問題である。我々は、ヒマ種子レクチンの発芽過程における分解の分子機構を解明するため、まず胚乳中に含まれる蛋白分解酵素を分

離し、その性質について調べた。ここでは、それらのうちカルボキシペプチダーゼについて行なつた研究結果について報告する。

材料と方法

実験材料

ヒマ種子 (*Ricinus communis* L.) は九州大学農場で栽培した小粒種の一年ものおよび伊藤製油株式会社によつて輸入されたタイ国産の大粒種 (保存期間不明) を用いた。カルボペンゾキシジペプチドは蛋白質奨励会から購入したもの、および九州大学理学部酵素化学教室から恵与されたものを用いた。CM-セルロースおよびセフェデックスはファルマシア社製のものを、試薬は市販一級品を用いた。

ヒマ種子の発芽

7°C で2日間流水に浸し膨潤させたヒマ種子を水分を十分に含む脱脂綿に重ねた濾紙上に並べ、殺菌消毒した 30°C の恒温器中で発芽させた。この間、雑菌の混入を防ぐため、1日1回種子を水洗するとともに、乾燥を防ぐため脱イオン水を散布した。種子の発芽は必ずしも一致しないので、般に割れ目が生じた種子を発芽1日目として選別し、以後発芽を継続した。

酵素の抽出

殻を除いた発芽種子胚乳に、0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) の適当量 (国産小粒種9粒、タイ国産大粒種3粒に対しそれぞれ 20 ml) を加え3分間磨砕した。10,000回転で30分間冷却遠心分離を行なつたの

* 筑紫女学園短期大学

ち、得られた上清液を脱イオン水に対し 24 時間、さらに 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対し 24 時間透析を行ない、生じた沈殿を除去し、粗酵素液とした。

カルボキシペプチダーゼ (CPase) の活性測定

CPase 活性の測定はカルボベンゾキシフェニアラニルアラニン (Z-Phe-Ala) を基質とし、遊離したアラニンを定量することによって行なつた。すなわち、1 mM Z-Phe-Ala 溶液 (0.1 M 酢酸カリウム-酢酸緩衝液, pH 4.5) 1 ml に試料溶液 (0.05~0.1 ml) を加え、37°C で 30 分間反応させたのち、10% トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液 1 ml を加えた。得られた濾液 0.5 ml に 2 mM シアン化ナトリウム-酢酸緩衝液 0.25 ml と 3% ニンヒドリン溶液 0.25 ml を加え 15 分間煮沸したのち、5 分間流水冷却し、50% イソプロピルアルコール溶液 5 ml を加えて希釈し、570 nm での吸光度を測定した (Rosen, 1957)。

CM-セルロースカラムクロマトグラフィー

1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) を含む 5 mM 酢酸カリウム-酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して十分透析した試料溶液を、予め同緩衝液で平衡化した CM-セルロースカラムに供与した。同緩衝液により素通りの蛋白質を溶出したのち、同緩衝液中、塩化ナトリウム濃度を 0 から 0.1 M または 0.3 M まで直線的に上昇させることにより、吸着された蛋白質を溶出した。溶出液中の蛋白質量は 280 nm における吸光度によって測定した。

ディスク電気泳動

ディスク電気泳動は Ornstein と Davis の方法にしたがって行なつた (Ornstein and Davis, 1964)。すなわち、8% のアクリルアミドゲルを用い、pH 4.0 において 2 mA/管の電流でブロムフェノールブルー (BPB) が 4.5 cm 移動するまで泳動を行なつた。ゲル内の蛋白質の染色は 1% アミドブラックを用い室温で 20 分間行ない、脱色には 7% 酢酸を用いた。

ゲル濾過

1 mM 酢酸カリウム-酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化したセファデックス G-100 カラム (1×70 cm) に、同緩衝液に溶解した試料溶液 1 ml を供与したのち、同緩衝液を用いて展開を行なつた。標準蛋白質としては、アルドラーゼ (M. W. 147,000)、牛血清アルブミン (M. W. 60,000)、キモトリプシノーゲン (M. W. 25,000)、チトクローム C (M. W. 13,500) を用い、またブルーデキストランおよび DNP-アラニンをを用いて、それぞれ間隙容積および全容積を求め、次式にしたがい相対移動度に対し既知分子量の対

数をプロットした標準曲線より分子量を算出した (Andrews, 1965)。

$$Kd = \frac{V_e - V_0}{V_i - V_0}$$

V_0 : 間隙容積
 V_i : 全容積
 V_e : 溶出容積

pH 安定性の測定

試料溶液 (O.D._{280nm}=0.2) 0.1 ml に種々の pH をもつ 0.1 M 緩衝液 (pH 2.5~3.5: クエン酸緩衝液, pH 4.0~6.0: 酢酸緩衝液, pH 6.5~9.0: リン酸緩衝液) 0.4 ml を加えたのち、5°C で 24 時間放置した。これに 0.2 M 酢酸カリウム-酢酸緩衝液 (pH 4.5) 1.0 ml を加え、さらに 0.01 N の塩酸溶液または水酸化ナトリウム溶液で pH を 4.5 に調節し、水を加えて 2.0 ml にした。その 0.9 ml をとり、10 mM Z-Phe-Ala 溶液 0.1 ml を加え、37°C で 30 分間反応させ、酵素活性を測定した。対照には、試料の硫酸沈殿物を溶解し、0.1 M 酢酸カリウム-酢酸緩衝液 (pH 4.5) で平衡化したセファデックス G-25 カラムで脱塩したものをを用いた。

Michaelis 定数 (K_m) および最大反応速度 (V_{max}) の測定

1.0 mM, 1.5 mM および 2.0 mM の Z-Phe-Ala 溶液 1 ml (pH 4.5) を各 6 点調製し試料溶液 (O.D._{280nm}=0.15) 0.05 ml を加え 37°C で反応を行なつた。反応開始後 5 分間隔で反応液に 10% TCA 溶液 1 ml を加え酵素反応を止めた。濾過後、濾液 0.5 ml を用い遊離したアラニン量を定量し、各基質濃度について反応速度を求めたのち次式の Lineweaver-Burk の方法 (Lineweaver, 1934) によって K_m および V_{max} を求めた。

$$\frac{1}{V} = -\frac{1}{K_m} \cdot \frac{1}{S} + V_{max}$$

V = 反応速度

K_m = Michaelis-Menten's constant

S = 基質濃度

V_{max} = 最大反応速度

結 果

1. 種子の発芽

タイ国産大粒種は国産小粒種より大きく、約 3 倍の重量を有するが、胚乳量および脂肪含量にはほとんど差がなかつた。両種子の発芽を 30°C で行なつた結果、国産小粒種では水浸後 4 日目に半数近くの種子の殻が破れて発芽が始まり、最終的には約 70% の種子が発芽したのに対し、タイ国産大粒種では発芽がおそ

く不揃いで、最も早いものは水浸後5日目から発芽が始まったが、以後10日間に亙つて約1/3の種子が発芽したに過ぎなかつた。

2. 発芽過程における CPase 活性の変動

発芽過程における CPase 活性の変動を発芽1日目から8日目迄の種子胚乳から得られた抽出液について調べた結果、Fig. 1 に示す如く、国産小粒種もタイ国産大粒種も CPase 活性は発芽2日目から急速に上昇し、4日目で最高に達するが、5日目に一旦低下したのち、7日目に再び上昇し、8日目から減少することがわかつた。いずれも、4日目と7日目に活性のピークをもつが、国産小粒種では4日目の活性が7日目の活性より高いのに対し、タイ国産大粒種では、7日目の活性は国産小粒種とほぼ等しかつたが、4日目の活性はかなり低かつた。一方、1年間室温で貯蔵した種子について、発芽過程における CPase の活性変動を調べた結果、国産小粒種では大きい変化はなかつたが、タイ国産大粒種では、4日目の CPase 活性が著しく低下していることがわかつた。

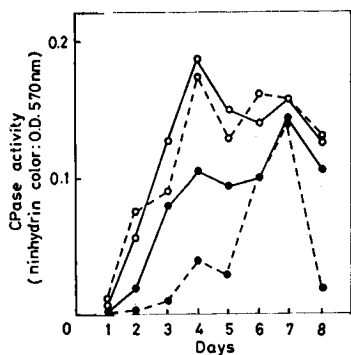


Fig. 1. Changes in CPase activity in castor bean endosperm during germination. The enzyme activity was measured by ninhydrin method using Z-Phe-Ala as substrate. ○—○: small grain produced in Japan. ○---○: after one year's storage of small grain. ●—●: large grain produced in Thailand. ●---●: after one year's storage of large grain.

3. CPase の不均一性

ヒマ種子の発芽過程において出現する CPase が、同種のものかあるいは異種のものかを調べる目的で、発芽2日目、4日目および6日目の胚乳に含まれる CPase のイオン交換クロマトグラフィーにおける溶出位置を比較した。国産小粒種(150粒, 50g)の発芽2日目、4日目および6日目の胚乳から抽出された

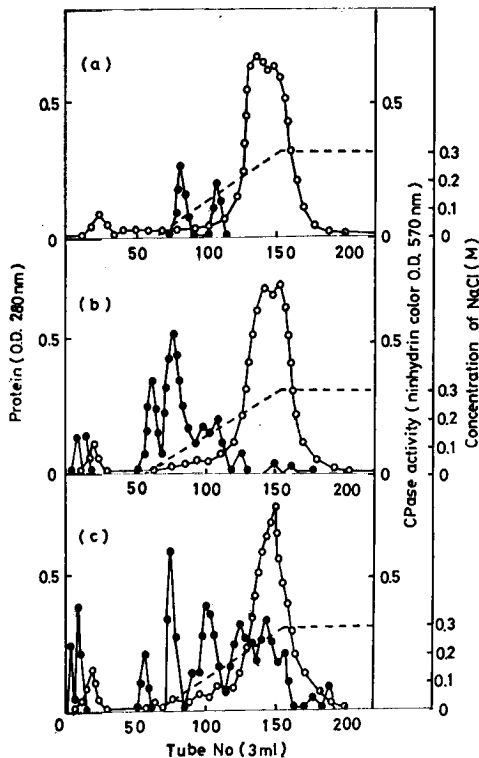


Fig. 2. Elution profiles of CPase from endosperm of small grain castor bean on CM-cellulose column chromatography. Crude extracts of CPase from 2-day (a), 4-day (b) and 6-day (c) seedlings of small grain castor beans were applied to a CM-cellulose column (1.5 × 23 cm) preequilibrated with 5mM acetate buffer, pH 5.0, containing 1mM EDTA and eluted by a linear gradient of NaCl from 0 to 0.3 M in the same buffer. ○—○: protein, ●—●: CPase activity, ----: NaCl concentration.

蛋白量を 280 nm における全吸光度で求めた結果、それぞれ 200, 183, 100 で発芽の経過とともに減少することがわかつた。この抽出液の確率 1/2~2/3 飽和沈殿画分 (CPase 活性はすべてこの画分に含まれる) を脱イオン水に対して2日間、ついで 1mM EDTA を含む 5mM 酢酸カリウム-酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して十分透析平衡化したのち、全吸光度 100 に相当する蛋白量を CM-セルロースカラムに供し、クロマトグラフィーを行なつた。Fig. 2 に示す如く、いずれもほぼ等しい蛋白質の溶出曲線を示し、大部分の蛋白質は 120~170 本の間に溶出された。一方、CPase の溶出曲線は、発芽日数によつて著しく異なり、発芽

2日目では80本目と105本目の2か所しか活性はみられなかったが、発芽4日目では、素通り画分に2か所とさらに60本目付近に新しい活性のピークが出現し、2日目で見られる80本目の活性はさらに上昇していることがわかった。発芽6日目の胚乳では、発芽4日目の胚乳でみられた60本目と80本目付近の活性はやや低下したのに対し、素通り画分と100本目付近の活性は上昇し、特に2日目と4日目の胚乳ではほとんど活性がみられなかった120本以降の部分に多量のCPaseが溶出された。

タイ国産大粒種のCPaseを国産小粒種のCPaseと比較するため、約200gの種子の発芽4日目の胚乳から粗CPaseを分離し、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なった結果、Fig. 3に示す如く、ほぼ等しい蛋白質の溶出曲線が得られたが、主なCPase活性は、国産小粒種 (Fig. 3a) の場合、

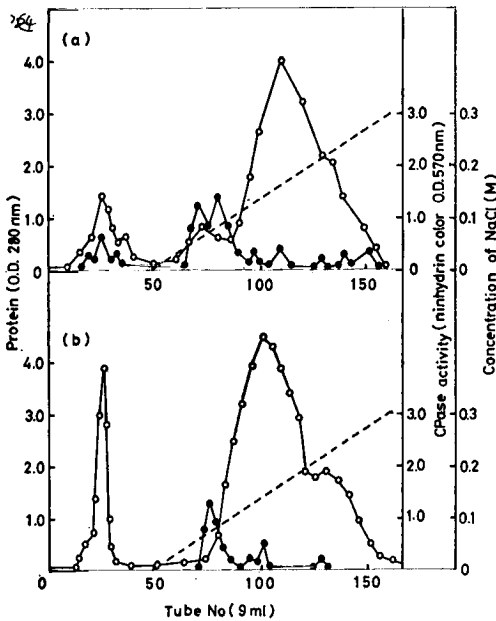


Fig. 3. Comparison of elution profiles of CPase from endosperms of 4-day seedlings of small grain and large grain castor beans on CM-cellulose column chromatography. Crude extracts of CPase from 4-day seedlings of 200 g of small grain (a) and large grain (b) castor beans were applied to a CM-cellulose column (3×45 cm) preequilibrated with 5 mM acetate buffer, pH 5.0, containing 1 mM EDTA and eluted by a linear gradient of NaCl from 0 to 0.3 M in the same buffer. ○—○: protein, ●—●: CPase activity, ---: NaCl concentration.

0 M, 0.06 M および 0.09 M 塩化ナトリウムで溶出される3つのピークを与えたのに対し、タイ国産大粒種では、0.09 M で溶出されるピークのみで、素通り画分には全く活性はないことがわかった。

4. CPase の部分精製

国産小粒種の発芽4日目の胚乳のCPaseを部分精製するため、CM-セルロースカラムクロマトグラフィー (Fig. 3a) における主CPase活性画分 (65本目から95本目) を集め、塩化ナトリウムの濃度勾配をより緩やかな条件で再びCM-セルロースカラムクロマトグラフィーを行なった結果、Fig. 4に示す如く2つのCPase活性画分 (A画分とB画分) に分離された。AおよびB画分の比活性は、いずれも約2倍に上昇したが、ゲル電気泳動ではなお数本のバンドを与え、単一成分にまで純化することはできなかった。

次に、両画分に含まれるCPaseの分子量をみるためゲル濾過を行なった。すなわち、両画分溶液 0.2 ml を予め1 mM 酢酸カリウム-酢酸緩衝液 (pH 5.0) で平衡化したセファデックスG-100カラム (1×70 cm) に供し、同緩衝液で展開を行ないCPase活性を測定した結果、Fig. 5に示す如く、A画分では単一の大きな活性ピークが得られたのに対し、B画分

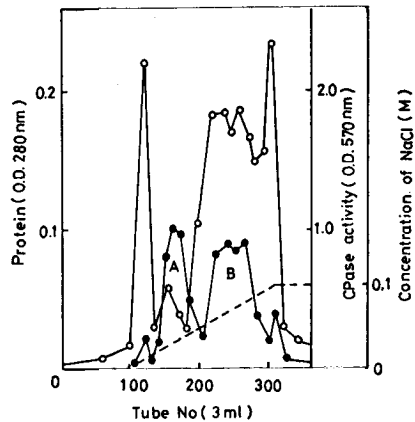


Fig. 4. Chromatography of the fraction from tube No. 65 to 95 obtained in Fig. 3a on a CM-cellulose column. The fraction from tube No. 69 to 95 obtained in Fig. 3a was dialyzed against 5 mM acetate buffer, pH 5.0, containing 1 mM EDTA and applied to a CM-cellulose column (1.5×18 cm) preequilibrated with the same buffer. The adsorbed protein was eluted by a linear gradient of NaCl from 0 to 0.1 M in the same buffer. ○—○: protein, ●—●: CPase activity, ---: NaCl concentration.

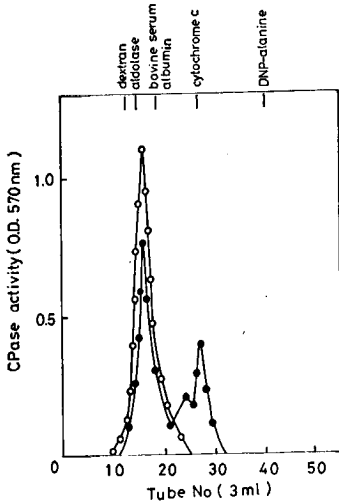


Fig. 5. Elution profiles of fractions A and B obtained in Fig. 4 on a Sephadex G-100 gel-filtration. Fractions A and B obtained in Fig. 4 were applied to a Sephadex G-100 column (1×70 cm) preequilibrated with 1 mM acetate buffer, pH 5.0, and developed with the same buffer. CPase activities were measured by ninhydrin method using Z-Phe-Ala as substrate. ○—○: fraction A, ●—●: fraction B.

ではA画分と同一の活性ピークに加え、さらに2つの活性ピークが得られた。A画分に含まれる CPase の分子量はそれぞれ約 110,000、25,000 および 15,000 であることがわかった。

5. 部分精製 CPase の性質

前述の如く、国産小粒種の発芽 4 日目の胚乳から、CM-セルロースカラムクロマトグラフィーによつて 2 つの CPase 活性画分 (A 画分と B 画分) が得られたが、A 画分は分子的に単一の CPase 活性ピークを与えたので、この A 画分について作用最適 pH、pH 安定性、基質特異性および K_m と V_{max} 値を調べた。

(a) 最適 pH

0.1 M 酢酸カリウム-酢酸緩衝液に溶かした 10 mM Z-Phe-Ala 溶液 0.1 ml に 0.1 M の各緩衝液 (pH 2.0~3.5: クエン酸緩衝液, pH 4.0~6.0: 酢酸緩衝液, pH 6.5~9.0: リン酸緩衝液) 0.9 ml を加えたものを基質溶液とし、これに A 画分溶液 (O.D._{280nm}=0.2) 50 μ l を加え 37°C で 30 分間反応後、10% TCA 溶液 1 ml を加えた。生じた沈殿を濾過後、ニンヒドリン発色を行ない 570 nm での吸光度を測定した結果、Fig. 6 に示す如く CPase の最

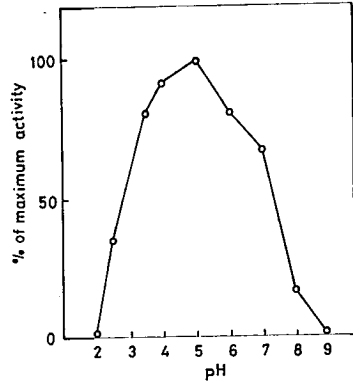


Fig. 6. Effect of pH on endosperm CPase activity. CPase assays at pH 2.0~3.5, at pH 4.0~6.0 and at pH 6.5~9.0 were carried out in 0.1 M citrate buffer, 0.1 M acetate buffer and 0.1 M phosphate buffer, respectively, using Z-Phe-Ala as substrate.

適 pH は 5.0 付近であることがわかった。

(b) pH 安定性

種々の pH において、5°C で 24 時間処理した A 画分溶液の残存 CPase 活性を、新しく調製した A 画分溶液の CPase 活性と比較した結果、Fig. 7 に示す如く、いずれの pH でも活性は低下し、特に pH 3 以下および pH 8 以上で不安定であることがわかった。

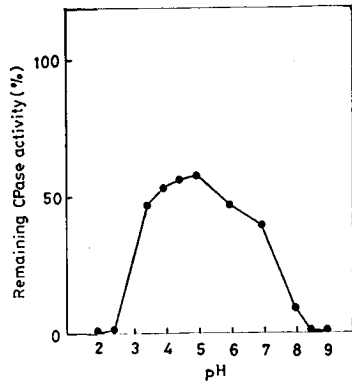


Fig. 7. Endosperm CPase was preincubated at different pH and 5°C for 24 hrs. The remaining enzyme activity was measured by ninhydrin method.

(c) 基質特異性

基質特異性をカルボベンゾキシジペプチドを用いて調べた。すなわち、1 mM カルボベンゾキシジペプチド溶液 1 ml (緩衝液 pH 4.5) に A 画分溶液 50 μ l

Table 1. Hydrolysis of various substrates by the partially purified CPase, assayed by the ninhydrin method.

Substrates (50 μ l)	Relative activity (%)
Z-Phe-Ala	100
Z-Glu-Phe	74.1
Z-Glu-Tyr	72.6
Z-Tyr-Glu	66.1
Bz-Gly-Lys	0
Bz-Gly-Arg	0
Bz-Arg-Am	0
Bz-Tyr-OEt	0

を加えて 37°C, 30 分間酵素反応を行なったのち, 遊離したアミノ酸をニンヒドリンで発色し, 570 nm における吸光度を測定した. Table 1 に示す如く, Z-Phe-Ala を最もよく分解し, 次いで Z-Glu-Phe, Z-Glu-Tyr, Z-Tyr-Glu の順に分解したが, C末端に塩基性アミノ酸, エステルおよびアミドが存在すると作用しないことがわかった.

(d) K_m と V_{max} 値

A 画分につき, Z-Phe-Ala を基質として K_m および V_{max} を測定した結果, Fig. 8 のような Lineweaver-Burk のプロットが得られ, K_m は 2.9×10^{-3} (M^{-1}), V_{max} は 8.0×10^{-7} (mol/sec) と算出された.

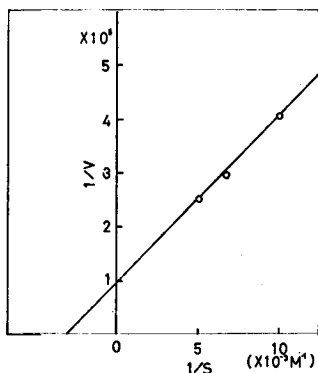


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot of CPase activity on Z-Phe-Ala. The enzyme activity was measured by ninhydrin method.

考 察

我々は, 先に黒緑豆の発芽過程におけるアミラーゼ活性は, 発芽 3 日目と 5 日目にピークをもつ, いわゆる二峰性を示したが (山本・川上, 1980), ヒマ種子胚乳の CPase 活性も, 発芽 4 日目と 7 日目にピーク

をもつ二峰性を示すことがわかった. この発芽初期に出現する CPase (初期 CPase とする) と発芽後期に出現する CPase (後期 CPase とする) が同一遺伝子に由来するものであるかどうかをみるため, 発芽 2 日目, 4 日目および 6 日目の胚乳 CPase の CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける溶出位置を比較した結果, 発芽 2 日目と 4 日目の胚乳からの CPase すなわち初期 CPase は低塩濃度で溶出される (恐らく等電点がより低いと推定される) のに対し, 6 日目の胚乳には高塩濃度で溶出される CPase (恐らく等電点がより高いと推定される) が多く含まれることが明らかになった. 発芽 4 日目の胚乳からの粗 CPase 抽出液を, 1 日間放置しても, CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける CPase の溶出パターンには変化はなかつたので, 6 日目の胚乳に含まれ高塩濃度で溶出される CPase すなわち後期 CPase は初期 CPase の分解によつて二次的に生じたものではなく, 両者は明らかに異なる遺伝子によつてコードされた別種の CPase であることが明らかになった.

国産小粒種とタイ国産大粒種の発芽過程における CPase の活性変動を比較した結果, 後期 CPase 活性には大差はなかつたが, 初期 CPase 活性は国産小粒種の方がタイ国産大粒種より高いことがわかった. 両種子の発芽 4 日目の胚乳を用い, CPase 活性の CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける溶出パターンを比較した結果, 国産小粒種の初期 CPase には 3 つの主な活性のピークが存在するのに対し, タイ国産大粒種の初期 CPase には, その中の 1 つしか存在しないことがわかった. この結果は, 毒蛋白質シリングが, 国産小粒種に 3 種類存在するのに対し, タイ国産大粒種には 2 種類しか存在しないこと (Funatsu, 1980) と併せ考え, 国産小粒種がタイ国産大粒種より, より分化していることを示唆するものである.

発芽過程における CPase の活性変動に対する種子の貯蔵の影響を調べた結果, 国産小粒種の新しい種子では, 1 年貯蔵後も発芽率や CPase の活性にはほとんど変化はみられなかつたが, タイ国産大粒種の古い種子では, 1 年貯蔵後の発芽率はさらに低下し, 約 1/5 が発芽したに過ぎず, 一方, CPase の活性については, 後期 CPase の活性にはほとんど変化なかつたのに対し, 初期 CPase 活性が著しく低下していることがわかった.

以上の結果から, 初期 CPase は発芽前に既に種子

中に存在するいわゆる貯蔵型 CPase で、発芽に際し、種子が水分を吸収することによって活性を現わし、種子の発芽開始に重要な役割を果たすものと思われる。この貯蔵型 CPase は、種子が新しい間はその活性を保っているが、古くなると活性を失い、発芽が著しく抑制されるものと推察される。一方、後期 CPase は種子の発芽後、新たに生合成される CPase で、一旦発芽を開始した種子では、種子の新旧にかかわらず同程度の活性を示し、成長を続けるものと思われる。

本実験で CPase の分離に使用した CM-セルロースカラムクロマトグラフィーの条件は、Tully ら (Tully and Beevers, 1978) によってなされた条件と同じであるが、彼らの場合、発芽6日目の胚乳 CPase はすべて未吸着で溶出されており、我々の結果と異なっている。その原因が種子の品種の違いによるのか、CM-セルロースの違いによるかは明らかではない。我々は、比較的純化し易いと思われる初期 CPase の CM-セルロースに吸着される部分を、再 CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにより部分的に精製し作用最適 pH と K_m を測定し彼らの CPase と比較した結果、最適 pH は pH 5.0~5.5 に対し pH 5.0, K_m は 3.47 mM に対し 2.9 mM の値が得られ、両者に大差がないことがわかった。また、ここで部分精製した CPase は C 末端に塩基性アミノ酸、エステル、およびアミドが存在すると作用しないので、膵臓カルボキシペプチダーゼ A 型に相当するが、予備実験 (未発表) では蛋白質には作用しない結果が得られているので、ペプチドにのみ作用する CPase の可能性がある。

要 約

1. ヒマ種子発芽過程における胚乳の CPase 活性は、発芽4日目と7日目にピークをもつ二峰性を示すことがわかった。

2. 発芽2日目、4日目および6日目の胚乳 CPase の CM-セルロースカラムクロマトグラフィーにおける挙動から、発芽初期に出現する CPase (初期 CPase) と発芽後期に出現する CPase (後期 CPase) は異なる CPase であることが明らかになり、前者は未発芽種子に含まれ、後者は発芽後生合成されることが推察された。

3. 国産小粒種の新しい種子とタイ国産大粒種の古

い種子の主な初期 CPase について比較した結果、前者に3種類の、後者に1種類の CPase が存在することが明らかになった。

4. 貯蔵1年後の両種子の発芽率と発芽過程における CPase の活性変動を調べた結果、国産小粒種では変化はなかつたのに対し、タイ国産大粒種では、発芽率の著しい低下とともに初期 CPase の減少が観察され、種子の発芽開始における初期 CPase の重要性が示唆された。

5. 初期 CPase は分子量11万、作用最適 pH 5 を有し、カルボキシペプチダーゼ A 型に属することが明らかになった。

文 献

- Andrew, P. 1965 The gel-filtration behavior of proteins related to their molecular weight over a wide range. *Biochem. J.*, 96 : 595-606
- Davis, B. J. 1964 Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404-427
- 船津軍喜 1980 植物毒. 医学の歩み, 112(13): 917-925
- Funatsu, M., K. Hara, M. Ishiguro, G. Funatsu, H. Otsuka and M. Ide 1973 Structure and toxic function of ricin VII. Behavior of ricin in the process of germination of castor seeds. *Proc. Jap. Acad.*, 49(10): 835-839
- Lineweaver, H. and D. Burk 1934 The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658-666
- Mayer, A. M. and A. Poljakoff-Mayber 1975 In "The Germination of Seed", 2nd ed., ed. by Wareing and Galston, Pergamon Press, Oxford, pp. 93-104
- Ornstein, L. 1964 Disc electrophoresis I. Background and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 321-349
- Rosen, H. 1957 A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 67: 10-15
- Tully, R. E. and H. Beevers 1978 Proteases and peptidases of castor bean endosperm. Enzyme characterization and changes during germination. *Plant Physiol.*, 62: 746-750
- 山本知子・川上いつゑ 1980 発芽過程における黒緑豆子葉タンパク顆粒の変化とアミラーゼ活性の変動に関する研究. 筑業女学園短期大学紀要, 15: 149-160

Summary

Carboxypeptidase (CPase) in the endosperm of castor bean (*Ricinus communis* L.) showed high activity at day 4 and 7 on germination.

From the behavior of CPases on CM-cellulose column chromatography, the early stage CPases, which appeared before 4 day germination, were different from the later stage CPases which appeared after 6 day. Probably the former arised from ungerminated seeds and the latter was synthesized during the germination.

The early stage endosperm of small grain castor bean contained three species of CPases, contrary to this, these of large grain contained only one species.

With respect to the small grain castor bean, the changes of both percentage of germination and CPase activity during the germination did not observed even after one year storage. In the case of old large grain castor bean, the decrease in early stage CPase activity was associated with the decline of percentage of germination. The evidence suggested that the early stage CPase plays the important role for early stage of germination.

The early stage CPase had optimum pH at 5.0 and molecular weight of 110,000. The substrate specificity was carboxypeptidase A type.