The Japanese Society of Plant Physiologists

2Aa-1

Vigna mungo 発芽種子におけるSulfhydryl-endo-peptidaseの発現と活性化について

°三橋 渉，南川隆雄（都立大・理・生物）

Vigna mungo（ケツルアズキ）種子では，発芽に伴って貯蔵器官である子葉中に2種類の主要なエンドペプチダーゼ活性が増加してくる。これらはin vitroで同種子の貯蔵タンパク質である7Sグロブリンを限定分解するセリン型とスルフヒドリル型の酵素であった。*演着らは，2種のうちより活性の高いスルフヒドリル・エンドペプチダーゼ(SH-E)に注目し，同酵素活性の発現調節機構を明らかにする目的で研究を行ない，これまでに，SH-E・タンパク質に特異的なウサギ抗血清を用いて本酵素が発芽後de novoに合成されることを明らかにしてきた（本学会1986年度年会）今回はさらに，mRNAより翻訳されたSH-E前駆体が3段階にわたる切断を経て成熟型酵素となること，および，この成熟化に伴ない酵素が活性化することを見い出したので報告する。

27℃暗所で3日間発芽させたケツルアズキ芽ばえより黄化子葉を摘みとり，SDS-フェノール法によって調製した全RNA画分をコムギ胚無細胞系およびウサギ網状赤血球ライセートにより翻訳し，その産物を特異抗血清とプロテインAを用いて免疫沈殿させた。その結果，SH-E・mRNAのin vitroでの翻訳産物は45KDのペプチドとして検出された。この翻訳時にイヌ膵臓ミクロソーム画分を加えておくと，新たに43KDのペプチドが出現してくることから，2KDのシグナル配列の存在が示された。次に，発芽3日目の黄化子葉からポリソーム画分を調製し，コムギ胚の系で翻訳させたところ，SH-E・mRNAは膜結合型ポリソームによって翻訳されていることがわかった。この時，45KDペプチド以外にナッセント・ペプチド由来と思われる43KDペプチドも検出され，シグナル配列の存在が支持された。

ところで，単離された成熟型SH-Eは33KDのタンパク質であることから翻訳後プロセシングが推定される。そこで，in vivoでのSH-E・タンパク質の変化を追うため，発芽0~6日目の子葉から4M塩酸グアニジンによってタンパク質を抽出し，SDS-PAGEを行なったところ，発芽後de novoに合成され，抗血清に反応する3本のバンド（43,36,33KD）が見い出された。この43KDペプチドは10mMメルカプトエタノールを含む50mMトリス・塩酸緩衝液による子葉抽出液中にも検出されるが，同抽出液を4~6℃でインキュベートすると，43KDペプチドが消え36KDへの一時的な蓄積の後，30時間後には33KDペプチドのみが検出された。各移行段階に当る抽出液を非変性条件下で電気泳動し，活性染色を行なったところ，抽出直後の試料には殆んど活性が認められず，その後，3本の微弱な活性バンドが出現して，最終的には最も強い活性を示す33KDペプチドへと移行していくことが観察された。

以上の結果から，SH-E・タンパク質は発芽後mRNAから翻訳され，下図のような切断を経て成熟型酵素となり，活性化されるものと考えられる。

SH-E・mRNA →45KD→43KD→36KD→→→33KD
↓
2KD（シグナル配列）

*) Mitsuhashi W. et al (1986) Plant Physiol., 80, 628-634

NII-Electronic Library Service