

植物生長促進ペプチドを生成する起源大豆たん白質の解析

久保 幹*・山地洋平・松倉琢磨・住吉紗世子・平野聡子

立命館大学工学部

Analysis of Soybean Protein for Producing Root Hair Promoting Peptide

Motoki KUBO, Youhei YAMAJI, Takuma MATSUKURA,
Sayoko SUMIYOSHI and Satoko HIRANO

Faculty of Science and Technology, Ritsumeikan University, Kusatsu 525-8577

ABSTRACT

The growth of plants was promoted by the degradation of soybean meal products (DSP). The root hair number of *Brassica campestris* was increased when DSP was added. The whey protein, SPI protein, and the insoluble protein were separated, and their degraded products obtained by digestion with protease from *Bacillus circulans* HA12, were assayed for analyzing the root hair promoting activity. Degradation products from the whey protein had the root hair promoting activity. The whey protein was further separated by chromatography, and the degradation products from each peak were analyzed by the root hair assay. Degradation products from 20 kDa protein showed the root hair promoting activity and the protein was identified as Kunitz trypsin inhibitor. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 85-89, 2004.

Key words: soybean, whey protein, trypsin inhibitor, *Bacillus circulans*, alkaline protease, root hair

大豆から油分搾取後に残った廃棄物である大豆ミールは、良質の植物性たん白質を含んでいる。現在大豆ミールのほとんどが飼料として再利用されているが、その高付加価値化と有効利用が望まれている。

かつて、大豆ミールは肥料として用いられていた¹⁾が、大豆ミールは化学肥料のように即効性が無く徐々に効果が現れるため、現在ではほとんど利用されなくなった。有機物である大豆ミールは土壤微生物の栄養

源となるなど、化学肥料のように土壤の劣化を引き起こすことはなく、環境への負荷は少ないと考えられている。このように天然有機物である大豆ミールは、農地環境浄化・改善に貢献できるバイオマスであると考えられる。そのようなことから、我々は化学肥料の使用量を抑え、環境の浄化・改善を行うことを目的とし、大豆ミールの土壤中での無機化促進と植物生長への即効性付与に関する研究を行ってきた²⁻⁴⁾。

土壤中大豆ミールの無機化を促進するため、大豆ミールを高速に分解する高プロテアーゼ生産菌である

*〒525-8577 草津市野路東1-1-1

Bacillus circulans HA12株を自然界から分離した²⁾。HA12株は10% (w/v) 大豆ミールを50℃, 48時間でほぼ完全分解し, 約30 mg/mLのペプチドアミノ酸を生成した。その分解物DSP (Degradation Soybean meal Products) は, 低濃度で化学肥料と同程度の植物生長活性化効果を有していた^{2,3)}。DSPは, 根毛を著しく増殖させる効果を有しており, 植物生長の要因の一つであると考えている。

この根毛増殖活性に関して, DSP中のペプチドを塩酸加水分解すると, 根毛増殖活性を失うことから, これらの活性は大豆たん白質由来ペプチドに起因することが示唆された³⁾。本研究では, 根毛増殖因子であるペプチドを解明するため, 大豆たん白質中の起源たん白質の解析を目的とした。

材料と方法

使用菌株およびDSP作製方法

DSP作製およびDSP作製用プロテアーゼ取得には, *B. circulans* HA12株を用いた²⁾。10%大豆ミール (ホーネン, 東京) にLB培地で前培養 (37℃, 一晚) したHA12株を1%植菌し50℃で48時間培養したものをDSPとした。

大豆たん白質の分画および解析

大豆たん白質の分画は, Nagano等の方法に従った⁵⁾。たん白質のN末端アミノ酸配列決定は, PPSQ-10 (島津製作所, 京都) を用いた。

イオン交換クロマトグラフィーによるホエー画分中のたん白質の分離

陰イオン交換樹脂 (TOYOPERL DEAE-650C, 東ソー, 東京) を1.5×20 cmカラムに充填後, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化した。ホエー画分をカラムにアプライし, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) から1 M NaCl + 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) のリニアグラジエントを行い, 各たん白質を溶離させた。各フラクションは, 波長280 nmによる吸光度をUV-160A (島津製作所, 京都) で測定した。

根毛増殖活性測定法およびSDS-PAGE分析

根毛増殖活性は, Hasegawa等の方法に従った³⁾。SDS-PAGE分析は, Laemmliの方法に従った⁶⁾。

試薬および種子

大豆由来トリブシンインヒビターは和光純薬 (大阪), 小松菜はタキイ種苗 (京都) から購入した。低変性脱脂大豆は不二製油 (大阪) より分与いただいた。

結果と考察

大豆たん白質の分画とそれら分解物の根毛増殖活性化効果

根毛増殖に關与するペプチドを同定するため, 大豆たん白質の分画を行った。その後, それぞれの画分をHA12株由来プロテアーゼで分解後, 根毛増殖活性をみた (Fig. 1)。不溶性画分の分解物には根毛増殖活性が認められず, 根毛増殖活性を引き起こすペプチドの起源たん白質を含んでいないことが明らかとなった。

そこで, 可溶性画分中の根毛増殖活性を有するペプチドの起源たん白質を同定するため, 可溶性画分をホエー画分とSPI画分に分けた。さらにSPI画分中に含まれる主要たん白質である, 11Sグロブリンと7Sグロブリンを分画した。これらの画分の分解産物の根毛増殖活性をみた (Fig. 1)。その結果, 11Sグロブリンとホエー画分分解物に根毛増殖活性があることが明らかとなった。特に, ホエー画分には強い根毛増殖活性が認められた。

ホエー画分の分画とそれら分解物の根毛増殖活性化効果

可溶性画分の分解物で最も根毛増殖活性の高かったホエー画分中に含まれるたん白質を分画し, 根毛増殖活性に關与するペプチドの起源たん白質の同定を行った。陰イオン交換クロマトグラフィーで各たん白質を分離し (Fig. 2), それぞれのたん白質分解物の根毛増殖活性を測定した (Fig. 3)。

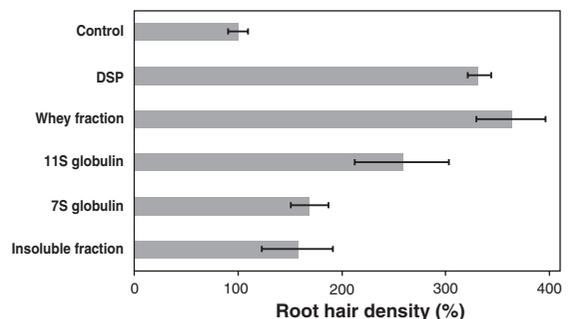


Fig. 1. Root hair assay of the degradation products from whey fraction, 11S globulin, 7S globulin, and insoluble fraction from soybean protein. Each protein was degraded by an alkaline protease from *Bacillus circulans* HA12. The assay was carried out by the same concentration of peptides + amino acids DSP (300 μg/10 mL plant growth medium). The values are means ±SD of 3 samples.

ピーク5に含まれるたん白質分解物に強い根毛増殖活性があり、その他のピークには根毛増殖活性は認められなかった。そこで、ピーク5を解析するため、SDS-PAGEにより分析後、N末端アミノ酸配列を決定した (Fig. 4)。ピーク5の分子量は約20 kDaであり、N末端配列10残基はAsp-Phe-Val-Leu-Asp-Asn-Glu-Gly-Asn-Proであった。この配列は、大豆由来Kunitzトリプシンインヒビターと一致し、また分子量もほぼ同じであることから、本20 kDaのたん白質は、Kunitzトリプシンインヒビターであることが示唆された。

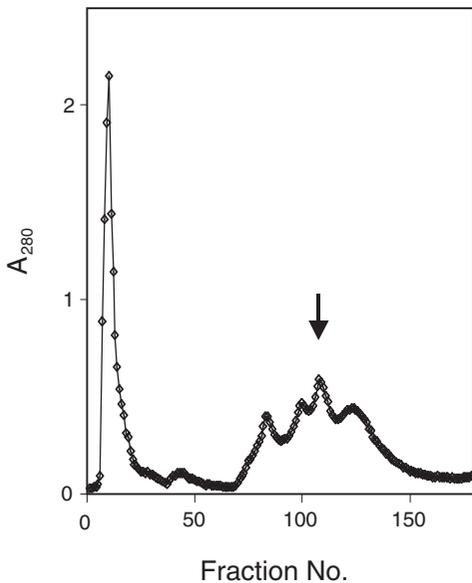


Fig. 2. Ion exchange chromatography of whey protein. No. 5 peak is indicated by an arrow.

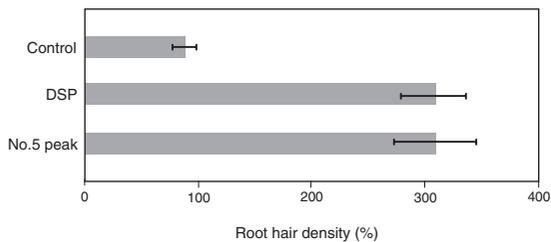


Fig. 3. Root hair assay of the degradation products from No. 5 peak. No. 5 peak was degraded by an alkaline protease from *B. circulans* HA12. The assay was carried out by the 1/3 concentration of peptides + amino acids DSP (300 μ g/10 mL plant growth medium). The values are means \pm SD of 3 samples.

KunitzトリプシンインヒビターのHA12株由来プロテアーゼ分解物の根毛増殖活性

KunitzトリプシンインヒビターをHA12株由来プロテアーゼで分解後、分解物の根毛増殖活性を調べた (Fig. 5)。Kunitzトリプシンインヒビター分解物には、DSPとほぼ同程度の活性があり、根毛増殖活性を有するペプチドの起源たん白質の一つはKunitzトリプシンインヒビターであることが明らかとなった。

DSPはペプチド・アミノ酸濃度30 μ g/mLで根毛増殖活性を有していたのに対し、Kunitzトリプシンイン

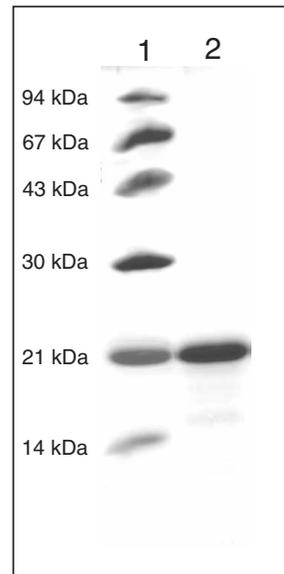


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of No. 5 peak. Lane 1, molecular mass marker proteins; lane 2, No. 5 peak.

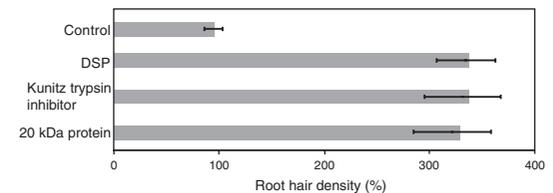


Fig. 5. Root hair assay of degradation products from Kunitz trypsin inhibitor and 20 kDa protein. Kunitz trypsin inhibitor and 20 kDa were degraded by an alkaline protease from *B. circulans* HA12. The assay was carried out by 1/3 concentration of peptides + amino acids DSP (300 μ g/10 mL plant growth medium). The values are means \pm SD of 3 samples.

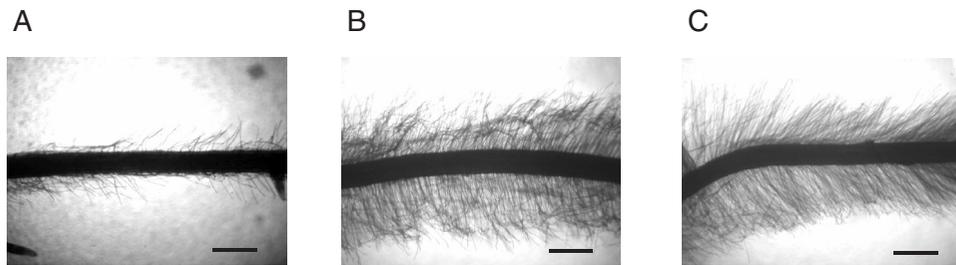


Fig. 6. Effect of the degradation products from kunitz trypsin inhibitor on root hair. (A) plant growth medium (B) DSP (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (C) degradation products from kunitz trypsin inhibitor (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Bar denotes 1 mm.

ヒビター分解物は10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でほぼ同等の根毛増殖活性を示した (Fig. 6). これは, Kunitzトリプシンインヒビター分解物中に高濃度の根毛増殖活性化ペプチドを含んでいることを意味している.

大豆たん白質は, 様々な生理作用を有することが知られている. 例えば, 大豆中の主要たん白質であるグリシニンには, コレステロールやインスリンの血中濃度を低下させる作用があり, 同じく主要たん白質である β -コングリシニンには体脂肪低下作用があるということが報告されている⁶⁾. また, 多くのマメ科植物に含まれるトリプシンインヒビターにはがんや成人病を予防する効果が示唆されている⁷⁾. 一方, β -コングリシニン由来のペプチドであるソイメイド-4は抗脱毛作用を示し⁸⁾, 大豆ペプチドには体脂肪の代謝促進作

用や抗酸化作用などを有することが知られている. このように, 大豆たん白質成分や大豆たん白質由来ペプチドには様々な生理活性作用がある.

本研究では, 大豆由来Kunitzトリプシンインヒビターを *B. circulans* HA12株由来プロテアーゼで分解したペプチドに根毛増殖活性化効果があることを見出した. これは, 大豆たん白質が偏りの少ないアミノ酸から構成されており, いろいろな種類のたん白質分解酵素を用いることにより, 様々なタイプのペプチドが形成されたため, 新規な生理活性が見出されたと考えられる. 今後, 活性のあるペプチド画分の分子量解析とKunitzトリプシンインヒビターのアミノ酸配列から根毛増殖活性ペプチドを同定していく予定である.

要 約

大豆たん白質由来根毛増殖活性ペプチドを生成する起源たん白質を明らかにするため, 大豆たん白質を分画し, *B. circulans* HA12株由来プロテアーゼで分解後, 根毛増殖活性を調べた. ホエー画分分解物と11Sグロブリン分解物に根毛増殖活性が認められ, 特にホエー画分分解物に強い活性が見られた. ホエー画分をさらに分画後, それぞれのたん白質分解物の根毛増殖活性を調べたところ, 20 kDaたん白質が起源たん白質であることが明らかとなった. このたん白質のN末端アミノ酸配列を明らかにしたところ, Kunitzトリプシンインヒビターと一致した. 市販のKunitzトリプシンインヒビター分解産物にも強い根毛増殖活性が認められたことから, 根毛増殖活性に関与するペプチドの大豆由来起源たん白質の一つは, Kunitzトリプシンインヒビターであることが明らかとなった.

文 献

- 1) 山内文雄, 大久保一良 (1992): 大豆の化学. 朝倉書店, 東京, P10-11.
- 2) Kubo M, Okajima J and Hasumi F (1994): Isolation and characterization of soybean waste-degrading microorganisms and analysis of fertilizer effects of the degraded products. *Appl Environ Microbiol*, **60**, 243-247.
- 3) Hasegawa N, Fukumoto Y, Minoda M, Plikomol A and Kubo M (2002): Promotion of plant and root growth by soybean meal degradation products. *Biotechnol Lett*, **24**, 1483-1486.
- 4) Hasegawa N, Yamaji Y, Minoda S and Kubo M (2003): Effects of D-methionine or L-methionine on root hair of *Brassica rapa*. *J Biosci Bioeng*, **95**,

419-420.

- 5) Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, Kohyama K and Nishinari K (1992): Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans. *J Agric Food Chem*, **40**, 941-944.
- 6) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 7) 福島男児 (2001): 大豆たん白質の科学その2. キッコーマン技術情報, **130**, 16-19.
- 8) 吉川正明 (2001): 食品由来の生理活性ペプチドとその生理作用. 必須アミノ酸研究, **162**, 4-6.