

## 単離したダイズオイルボディの構造解析と酵素による分解

都留尊美・森 恵・地阪光生・横田一成・滝波弘一

### Isolation and Structural Analysis of Soybean Oil Bodies and *in vitro* Enzymatic Degradation of the Bodies

Takami TSURU, Megumu MORI, Mitsuo JISAKA, Kazushige YOKOTA  
and Koichi TAKINAMI

**Abstract** Plant seed oils which are stored in cotyledons and embryos from small discrete intracellular particles called oil bodies. An oil body has a matrix of TAG, which is surrounded by a layer composed of phospholipids and proteins termed oleosins. In order to investigate the physicochemical and biochemical properties of oil bodies, the isolated and purified oil bodies were prepared from native soybean by the methods of flotation centrifugation, and then they were provided for the following experiments. Oil bodies were considerably stable at neutral pH and at less than 100°C. The surface active agents used here except sodium dodecyl sulfate did not decompose the oil bodies. Thus, an oil body structure was indicated that the surface of the membrane was occupied by oleosins behind which there existed phospholipids. On the other hand, lipase broke the oil bodies and hydrolyzed triacylglycerol in them. Trypsin hydrolyzed partially the surface protein of the oil body, but the particle from of the oil body was maintained further. Lipase has been reported to hydrolyze the triacylglycerol in oil bodies during seed germination. The *in vivo* lipase reaction was reappeared *in vitro* in this investigation. It seems that oleosins, oil body membrane proteins, would be necessary to maintain the oil body structure and would play an important role in the lipase reaction.

Key words: Oilbody; oleosin; lipase.

#### 緒 言

植物種子は、発芽や実生発育のためのエネルギー源として、種子中にタンパク質、脂質、糖質を蓄えている。種子中の油脂貯蔵形態であるオイルボディについては、1980年代より世界的に研究が進められている。<sup>1-8)</sup>その構造は、Tzenら<sup>3, 4)</sup>によって、*maize* (トウモロコシ) のオイルボディについては以下のように明らかにされている。*maize*のオイルボディは平均直径0.5~2  $\mu\text{m}$ 範囲の微粒子であり、低分子量タンパク質を埋め込んだリン脂質単一層膜が、中性脂質マトリックスを取り囲んだ形態をしている。他方、オイルボディの組成については、ダイズを除く種子植物で明らかになっており、平均値として中性脂質95%、タンパク質3%、リン脂質2%で構成され、植物種間の差は3~5%とわずかである。<sup>9)</sup>このオイルボディタンパク質は、オイルボディ特有の膜タンパク質であり、“オレオシン”と呼ばれ、分子量は15~26kDで

あると報告されている。<sup>3)</sup>

ダイズのオイルボディについては、HERMAN<sup>6)</sup>、LOERらと<sup>7)</sup> HERMANら<sup>8)</sup>はダイズ子葉のオイルボディを電子顕微鏡により観察し、細胞免疫化学的手段を用いてオイルボディ膜タンパク質の研究を行っている。その結果、超遠心浮上法で単離したダイズオイルボディのオレオシンは、分子量17, 18, 24, 34kDの4つのタンパク質から構成されると報告している。しかし、この中には膜構成ではないタンパク質も含まれているので、Herman<sup>8)</sup>らは、膜結合タンパク質を取り除くためにFujikiら<sup>9)</sup>の $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 洗浄法を改良して用いていた。この方法によりオイルボディ膜から34kDは除かれたので、ダイズオイルボディ膜タンパク質(ダイズオレオシン)は、18および24kDタンパク質であると述べている。さらに、この24kDのアミノ酸配列等の研究も行われているが、<sup>10)</sup>他の種子植物と同様に、ダイズオイルボディ膜タンパク質の生化学的特性を特徴づけるほどには解明されていない。

本研究では、このダイズオイルボディの構造的、生化学的特性を解明することを目的とした。まず、Loerら<sup>7)</sup>の超遠心浮上法とFujikiら<sup>9)</sup>の $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 洗浄を組み合わせた改良法によって、イズ種子よりオイルボディを単離精製し、その構成成分の分析を行った。ついで、単離オイルボディに対して界面活性剤による可溶化を行い、オイルボディの構造的な特性を調べた。

オイルボディの基礎的な構造特性を把握してから、その次に、酵素がオイルボディに対してどのように作用するのかを調べた。種子発芽期に*in vivo*リパーゼがオイルボディ内のトリアシルグリセロールを加水分解することは明らかにされているが、<sup>11-14)</sup>単離オイルボディに対して*in vitro*の酵素(リパーゼ、トリブシン)反応を行い、*in vivo*の酵素分解活性の*in vitro*での再現を試みた。その結果、オイルボディはいずれの酵素の作用も受けやすく、この分解活性にもオイルボディタンパク質が大きく影響していることが明らかとなった。

## 実験材料と方法

### 材料

1993年秋収穫のアメリカ産ダイズを東洋製油(株)より分譲してもらい、窒素充填して4°Cで保存した。リパーゼ(*Rhizopus delemar*, 600 units/mg)とトリブシン(臍臓, 4700 units/mg)は生化学工業(株)、和光純薬工業(株)からそれぞれ購入して用いた。

### オイルボディの単離

ダイズ種子からオイルボディを単離するためには、Loerらの単離法<sup>7)</sup>に従い、オイルボディ精製には、Fujikiら<sup>9)</sup>の $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 洗浄法を応用して行った。ダイズ種子30gに24時間水を吸収させ、3mM  $\text{MgCl}_2$ -0.1M Tris-HCl (pH8.6)でホモジェナイズし、オイルボディを単離した。ホモジェネートを3層のチーズクロスで濾過し、Beckman SW-28 rotorで20,000rpm、20分間遠心した。浮上したオイルパッドをホモジェネーション・バッファーに再懸濁し、同様に遠心した。再度0.5M NaClを含むホモジェネーション・バッファーに懸濁し、遠心した。浮上オイルパッド(粗オイルボディ)を0.1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ に懸濁し、膜に組み込まれていないタンパク質を除くために氷上で30分間インキュベートし、超遠心浮上させた。この洗浄操作を3回行い、最終的に得られたオイルパッド(精製オイルボディ)を以降の実験に用いた。

### オイルボディ構成成分の分析

単離オイルボディから中性脂質をジエチルエーテルで抽出し、その残渣をクロロホルム-メタノール(2:1)で抽出分画し、クロロホルム画分にリン脂質を得た。メタノール-水層とクロロホルム層との界面にある中間物質を集め、アセトンで数回洗浄後、1mlの2.4% SDS (sodium dodecyl sulfate)に溶解した。それぞれの画分について、脂質成分を薄層クロマトグラフィー<sup>15)</sup>で分離、確認し、ガスクロマト分析<sup>15)</sup>と乾燥重量法により中性脂質、リン脂質量を求めた。中間物質溶液中のタンパク質を、Lowry法<sup>16)</sup>で定量し、SDS-PAGE<sup>17)</sup>で分析した。

### オイルボディに対する物理化学的処理

単離オイルボディを0.5~2%の界面活性剤を含むTris-HCl (pH7.5)中で氷上、1時間インキュベートした。また、0~120°Cの加熱を30分間行った。さらに、色々なpHのバッファー中で、37°C、3時間振盪インキュベートした。各々、処理したオイルボディ懸濁液を、20,000rpm、20分遠心した。浮上してくるオイルボディを回収し、アセトンで数回脂質を抽出除去した。最終的に1mlの2.4%SDSに溶解し、タンパク質定量とSDS-PAGE分析を行った。

### Nativeなオイルボディと加熱したオイルボディに対するトリブシンの作用

各温度で加熱した単離オイルボディを0.05Mリン酸バッファー(pH8.0)に懸濁し、トリブシン溶液を添加して、それぞれ37°Cで2時間酵素反応を行った。反応終了後、クロロホルム-メタノール-水(1:2:0.8)を加えて攪拌し、分液した。3層に分かれた中間の界面層(中間物質)を回収し、アセトンで洗浄後、1mlの2.4%SDSに溶解して、タンパク質の定量とSDS-PAGEの分析を行った。

### オイルボディに対するリパーゼ作用

単離オイルボディを0.05Mリン酸バッファー(pH5.7)に懸濁し、リパーゼ溶液を添加して40°Cで酵素反応を行った。反応終了後、クロロホルム-メタノール-水(1:2:0.8)を加えて攪拌し、分液した。下層のクロロホルム溶液の遊離脂肪酸を定量<sup>18)</sup>した。

同様に各温度で加熱したオイルボディに対してリパーゼを2時間作用させ、オイルボディへの作用を調べた。

結果と考察

オイルボディの単離

一般にオイルボディは約95%の脂質とわずかなタンパク質から成る低密度の構造物 (d=0.93) であるため、ダイズ粉碎溶液を超速心で分離するとオイルパッドとして浮上してくる。別に行ったTzenら<sup>9)</sup>のスクロース密度勾配遠心法と比較して、超速心浮上法はオイルボディ単離に優れた方法であることを確認した。Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>洗浄効果は、図1に示すように、洗浄なしではダイズ分離タンパク質 (SPI) と同様な複数のダイズタンパク質が混じった

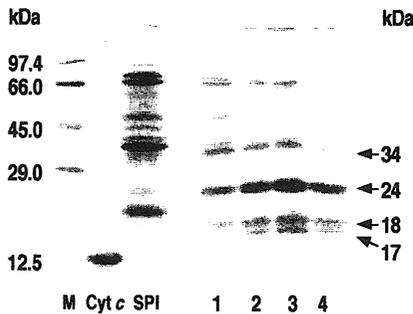


図1 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>洗浄による単離オイルボディの精製

- レーン1：Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>洗浄，無し
- レーン2：　　〃　　，1回
- レーン3：　　〃　　，2回
- レーン4：　　〃　　，3回

泳動パターンを示したが、一般にダイズオイルボディタンパク質といわれる分子量17, 18, 24, 34kDaのタンパク質を確認した。洗浄を3回繰り返すことによってオイルボディ膜結合タンパク質である34kDaは、ほぼ除かれた。

この単離・精製したダイズオイルボディの各成分は、表1に示すように中性脂質92.7%、リン脂質2.1%、タンパク質5.2%で、この値は、Tzenら<sup>9)</sup>が他の種子植物で報告した値とほぼ一致している。また、植物種により固有のオレオシンをもつことから、ダイズオレオシンは18と24kDaである。

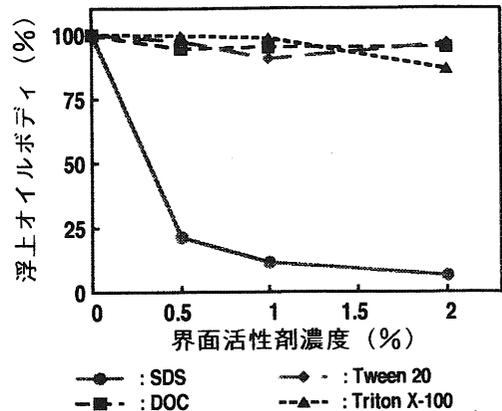


図2 オイルボディに対する界面活性剤の影響

表1 単離・精製オイルボディの構成成分

	重量 (mg)	構成比 (%)
オイルボディ (wet pad)	300.00	—
中性脂質	137.42	92.7
リン脂質	3.09	2.1
タンパク質 (オレオシン)	7.71	5.2
三成分の合計	148.22	100.0

\* 水分量は含まない

界面活性剤によるオイルボディの可溶化

単離オイルボディに対して4種類の界面活性剤処理を行った結果、図2に示すように、DOC, Tween20, Triton X-100には変化は認められず、約95%のオイルボディが回収された。これらの膜可溶化の性質をもつ界面活性剤で変化しないことから、オイルボディは一般に考えられる膜構造とは異なるものと思われる。

一方、SDS処理ではオイルボディは低濃度でさえ影響

を受け、2%SDSで約7%にまで分解、減少した。このように、タンパク質変性作用のあるSDSだけが影響を及ぼしたことから、オイルボディ膜の外側をタンパク質が覆っていることが推定される。そして、このタンパク質がオイルボディ構造維持の役割を担うことと思われる。

オイルボディに対するpHの影響

これらのオイルボディの構造的性質が生化学的にどの

ような特性を示すものか、酵素作用によって検討した。まず、オイルボディに対して酵素反応を行うための基礎的性質を解明するため、pHと加熱の影響を調べた。

pHの影響については、中性付近のpH5.7-8.0の範囲でオイルボディは安定していた(図3)。しかし、より酸性、よりアルカリ性のバッファー中では約75%前後の減少が見られ、浮上オイルボディを回収した後の溶液も白濁していた。SDS-PAGEによるタンパク質の分析ではいずれも24と18kDaが見られ、変化は認められなかった。従って、この減少はタンパク質の溶出あるいはpHによるパッド形成の阻害に起因することと思われる。リパーゼ、トリブシン反応は、オイルボディが安定しているpH5.7-8.0の範囲で行った。

### オイルボディに対する加熱の影響

加熱処理では、0~120°Cの範囲で温度の上昇とともに若干のオイルボディの減少が見られた(図4)。0~70°C付近までは約90%のオイルボディが存在し、120°Cでは約72%に減少した。データは示していないが、SDS-PAGEの結果では、タンパク質自体の変化は見られなかった。これらより、オイルボディ膜は100°C以下の温度では安定していると考えられる。

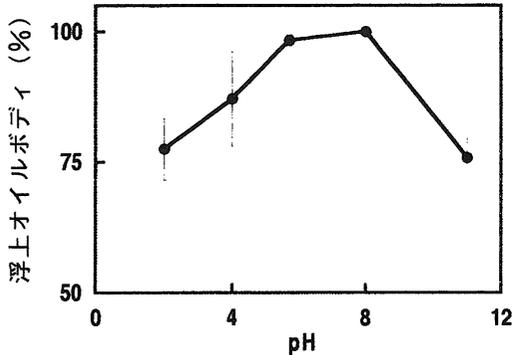


図3 オイルボディに対するpHの影響

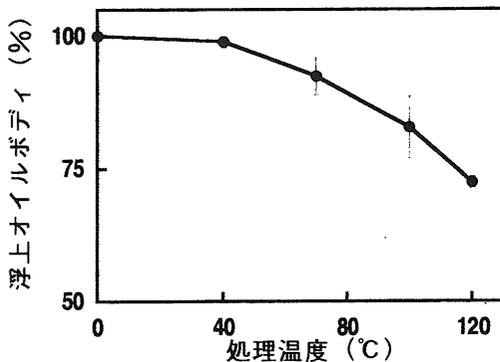


図4 オイルボディに対する加熱の影響

### トリブシンの作用

オイルボディに対して *in vitro* での酵素(トリブシン, リパーゼ) 反応を行った。

まず、トリブシンについてみると、クロロホルム/メタノール抽出の界面に得られるタンパク質をSDS-PAGEで分析すると、37°C、2時間の反応では、トリブシン無添加に比べ、オレオシンの低分子化が見られる(図5)。さらに、各温度で加熱したオイルボディにトリブシンを作用させると、37°C処理に比べ、加熱温度の上昇で24kDは完全に低分子化した。加熱することでトリブシンの作用を受けやすくなることから、加熱により若干のオレオシンの変化が伺われるが、SDS-PAGE上ではその差異は認められなかった。なお、TLC分析の結果を示していないが、トリブシン反応では脂質への影響はなかった。

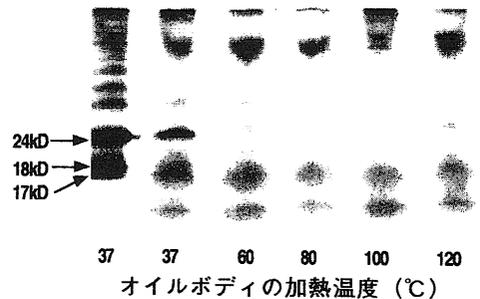


図5 トリブシンによるオイルボディの分解  
C/M抽出の界面画分中に含まれるタンパク質のSDS-PAGE  
左レーン：トリブシン無添加，他：トリブシン添加

### 単離オイルボディに対するリパーゼの作用

リパーゼ反応では、遊離された脂肪酸量から明らかのように、オイルボディはリパーゼによる作用を受け、オイルボディ内の中性脂質が加水分解されている(図6)。トリブシンの場合と同様に、加熱したオイルボディに対してリパーゼを作用させたところ、加熱温度の上昇に伴い、遊離した脂肪酸量が減り、リパーゼが作用しにくくなっていった(図7)。これはオイルボディを覆うオレオシンの変性のため、リパーゼが内部のトリアシルグリセロールに作用できなくなったと思われる。また、リパーゼ作用後のオイルボディタンパク質をSDS-PAGEで分析すると、nativeなオイルボディも加熱したものに対してもタンパク質への影響は見られなかった(データは示していない)。

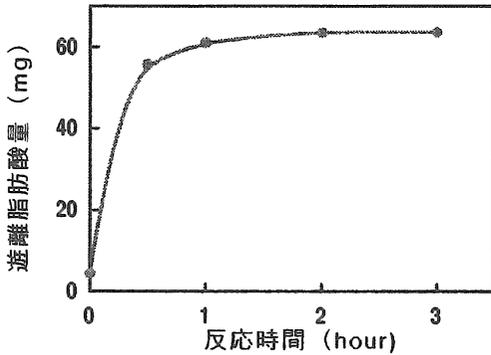


図6 オイルボディに対するリパーゼの脂質分解活性

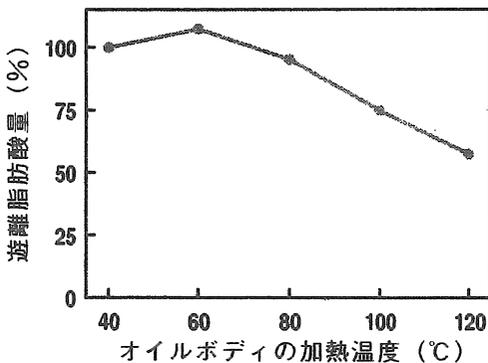


図7 リパーゼによる加熱したオイルボディの分解

### まとめ

これまでの結果から、オイルボディは構造的には強固であるが、酵素分解は受け易いといえる。植物種子において、代謝活性期に、貯蔵トリアシルグリセロールの減少に付随してリパーゼ活性が発現すると報告されている。<sup>12)</sup>これは、*in vivo*のオイルボディがリパーゼの脂質分解作用を受けることを示し、オレオシンがそのリパーゼ作用を介することが示唆されている。今回、*in vitro*でもオイルボディは同様にリパーゼの脂質分解作用を受けることが明らかとなった。従って、オイルボディ膜を形成しているタンパク質、いわゆるオレオシンは、オイルボディ外にあるリパーゼが、オイルボディ内部のトリアシルグリセロールに作用しやすいような働きをしているものと思われる。オレオシンは、種子成熟時にはトリアシルグリセロールの貯蔵庫としてのオイルボディを安定化させ、種子発芽の際には、この貯蔵トリアシルグリセロールを素早くかつ確実にエネルギーに変換するため、

リパーゼ作用を助ける何らかの役割を担うものと考えられる。

### 引用文献

- 1) WANNER, G., H. FORMANEK and R. R. THIMER, The ontogeny of lipid bodies (spherosomes) in plant cells. *Planta*, **151**: 109-123, 1981.
- 2) ADAMS, C. A., S. W. NORBY and R. W. RINNE, Ontogeny of lipid bodies in developing soybean seeds. *Crop Science*, **23**: 757-759, 1983.
- 3) TZEN, J. T. C. and A. H. C. HUANG, Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J. Cell Biol.*, **117**: 327-335, 1992.
- 4) ———, G. C. LIE and A. H. C. HUANG, Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies. *J. Biol. Chem.*, **267**: 15626-15634, 1992.
- 5) ———, Y. Z. CAO, P. LAURENT, C. RATHAYAKE and A. H. C. HUANG, Lipids, proteins, and surface of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiol.*, **101**: 267-276, 1993.
- 6) HERMAN, E. M., Immunogold-localization and an oil-body membrane protein in developing soybean seeds. *Planta*, **172**: 336-345, 1987.
- 7) LOER, D. S. and E. M. HERMAN, Cotranslational integration of soybean (*glycine max*) oil body membrane protein oleosin into microsomal membranes. *Plant Physiol.*, **101**: 993-998, 1993.
- 8) ———, D. L. MELROY and T. J. BUCKHOUT, Apparent processing of a soybean oil body protein accompanies the onset of oil mobilization. *Ibid.*, **94**: 341-349, 1989.
- 9) FUJIKI, Y., A. L. HUBBARD, S. FOWLER and P. B. LARAROW, Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, **93**: 97-102, 1982.
- 10) KALINSKI, A., D. S. LOER, J. M. WEISEMANN, B. F. MATTHEWS and E. M. HERMAN, Isoforms of soybean seed oil body membrane protein 24 kDa oleosin are encoded by closely related cDNAs. *Plant Molecular Biol.*, **17**: 1095-1098, 1991.
- 11) LIN, Y. H., R. A. MOREAU and A. H. C. HUANG, Involvement of glyoxysomal lipase in the hydrolysis of storage triacylglycerols in the cotyledons of soybean seedlings. *Plant Physiol.*, **70**: 0108-0112, 1982.
- 12) ———, L. T. WIMER and A. H. C. HUANG, Lipase in the lipid bodies of corn scutella during seedling growth. *Ibid.*, **73**: 460-463, 1983.
- 13) ———, and A. H. C. HUANG, Purification and initial

- characterization of lipase from the scutella of corn seedlings. *Ibid.*, **76**: 719-722, 1984.
- 14) WANG, S. M. and A. H. C. HUANG, Biosynthesis of lipase in the scutellum of maize kernel. *J. Biol. Chem.*, **262**: 2270-2274, 1987.
  - 15) 藤野 安彦, 脂質分析入門. 学会出版センター, 東京, 265 pp, 1990.
  - 16) 福井 哲也・伊藤 正樹, タンパク質定量法. 広川書店, 東京, pp. 9-20, 1991.
  - 17) LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685, 1970.
  - 18) NIXON, M. and S. H. P. CHAN, A simple and sensitive colorimetric methods for the determination of long-chain free fatty acids in subcellular organellas. *Anal. Biochem.*, **97**: 403-409, 1979.