

岡大資生研報 (Bull. Res. Inst. Bioresour. Okayama Univ.) 2: 149-157 (1994)

## イネ水中芽生えの酸素適応過程におけるチトクロム *c* と 11.9kDa タンパク質の増加

柴坂三根夫・丑丸敬史\*,\*\*・大久保勝之\*・  
土田進一\*・辻英夫\*

Increase in Cytochrome *c* and a 11.9 kDa Protein  
in Submerged Rice Seedlings after Exposure to Air

Mineo SHIBASAKA, Takashi USHIMARU, Katsuyuki OOKUBO,  
Shin-ichi TSUCHIDA, and Hideo TSUJI

To examine the changes in cytochrome *c* content in submerged rice seedlings after exposure to air, antiserum was prepared against purified cytochrome *c* from rice bran. Western blotting analysis revealed that cytochrome *c* was detected 6 h after exposure to air, but not detected in submerged rice seedling. On a fresh weight basis, the same level of cytochrome *c* as that of the aerobic control was found in the 24-h-air-adapted seedlings. Judging from the high  $A_{408}/A_{280}$  ratio (4.66), the cytochrome *c* preparation used as antigen was considered to be well purified. However, the antiserum reacted other several polypeptides. One of them reacted more strongly against the antiserum than cytochrome *c* and its molecular weight was estimated as 11.9 kDa. The polypeptide increased during air adaptation and the levels found in both submerged seedlings and aerobic control were lower than that in 24-h-air-adapted seedlings.

**Key words:** Air adaptation, Anti-cytochrome *c* serum, Cytochrome *c*,  
Cytochrome *c* purification, *Oryza sativa*

---

Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 710, Japan  
平成6年1月10日受理 (Received January 10, 1994)

\* 京都大学理学部

\*\* 現所属: 静岡大学理学部

## 緒 言

イネ種子は水中のような低酸素条件でも発芽するが、酸素に関与した代謝系の活性は低いままである。水中で発芽した芽生えは空気に触れると、呼吸系(Shibasaka and Tsuji 1988a, 1988b, 1991, 柴坂・辻 1994) および光合成系(Ushimaru *et al.* 1992a), 活性酸素消去系(Ushimaru *et al.* 1992b, 1994)の活性が急速に増加し正常な芽生えの状態に近づいて行く。我々はその過程を酸素適応過程と呼んでいるが、イネは水中ではその生活環を完結することができないので、酸素適応過程は種子の吸水による水和過程では進まなかった諸反応が進行する「第2の発芽」とも言える重要な過程である。

呼吸系および活性酸素消去系の中には、酸素適応過程において特徴的な増加を示す酵素群と、そうでない酵素群があり、筆者のグループで既に多くの酵素について詳細に調べられている(Shibasaka and Tsuji 1988a, 1988b, 1991, 柴坂・辻 1994, Ushimaru *et al.* 1992b)。酵素のほとんどは、活性測定により、その量的変動が示されているが、チトクローム*c*の変動はミトコンドリアの低温スペクトルの数学的解析によって推定されているだけで(柴坂・辻 1994)、まだ完全には示されていない。そこでチトクローム*c*タンパク質量の増加を直接的に示す方法を用いる必要があると考え、チトクローム*c*の抗体を用いて量的変動を調べ、低温スペクトルより示唆されていた結果と対照することを試みた。

本論文を校閲していただいた中島進博士に感謝いたします。

## 材料および方法

### 1. 植物材料

チトクローム*c*抗原を精製するためには、市販の米ぬかを用いた。酸素適応過程の解析には、イネ品種やまびこ(*Oryza sativa* L. cv. Yamabiko)を用い、Ushimaru *et al.* (1992a)の方法に従って6日間水中または空気中で育てたもの及び、6日間水中で育て1日空気中に出した芽生えを用いた。

### 2. チトクローム*c*の精製

【抽出及び塩析】米ぬか5 kgに脱イオン水5 lを加え、よくこね、凍結融解を二度繰り返した。融解させたスラリーに20%飽和硫酸水溶液10 lを加えて、かき混ぜ、一夜冷蔵庫で保存した後、丈夫な布袋で包んで絞った。絞り液に硫酸を加えて30%飽和にし、一時間攪拌した後、遠心(8,000g・10分)し、沈澱物と液面に浮きでた脂質類を除いた。上清に硫酸粉末を加えて100%飽和にし、沈澱を遠心(8,000g・20分)で集めた。沈澱に2倍量の蒸留水を加えて懸濁し、透析チューブに詰め、流水に対し1日間透析した。更に3夜、透析内液の30倍以上の0.01Nリン酸アンモニウム緩衝液(pH7.0)に透析した。その間、透析緩衝液を数回取り替えた。緩衝液の濃度はアンモニウムイオンに関してのもので、以下の緩衝液も特に断らない限りリン酸アンモニウム緩衝液(pH7.0)のことである。透析サンプルから遠心(8,000g・10分)で沈澱物を除いた後、0.01N緩衝液に平衡化したアンバーライトCG-50(type1)カラム(3.3×11cm)に吸着させた(7 ml/分)。カラムの3倍容量以上の同緩衝液で洗った

後、1.0N 緩衝液で溶出した（3 ml/分）。

溶出サンプルに硫酸を50%飽和になるまで加え、一時間の抽出の後、遠心（8,000g・10分）で上清を得た。また、沈澱を50%飽和硫酸水溶液で洗い、遠心（8,000g・10分）で上清に洗液を得る操作を沈澱の色が赤く無くなるまで繰り返し沈澱からチトクロム *c* を回収した。上清と洗液を合わせ、硫酸粉末を100%飽和になるまで加え、遠心（8,000g・10分）で沈澱を得、沈澱に2倍量の蒸留水を加えて懸濁し、1日流水に透析した。更に3夜、透析内液の30倍以上の0.01N 緩衝液に透析した（数回緩衝液を替えた）。

【イオン交換及びゲル濾過】 サンプルを0.01N 緩衝液に平衡化した DEAE-セルロースカラム（1.6×3.3cm）に通し（3 ml/分）、通過液の赤色画分を集め、0.9倍量の0.2N 緩衝液を加え、0.1N 緩衝液に平衡化した CM-セファデックスカラム（3.3×30cm）に吸着させた（1.5 ml/分）、0.2N 緩衝液でカラムを洗い（1.5ml/分）、0.3N 緩衝液でゆっくりと溶出させた（0.3 ml/分）。赤色画分を蒸留水で6倍に薄め、0.05N 緩衝液に平衡化しておいたアンバーライト CG-50 (type2) カラム（1×6 cm）に吸着させ（1.5ml/分）、1.0N 緩衝液でゆっくり溶出することによって濃縮し（0.5ml/分）、0.1N 緩衝液に平衡化したセファデックス G-75カラム（1×100cm）にサンプルを通し（0.14ml/分）、通過液の赤色画分を集めた。CM-セファデックスによるイオン交換及びゲル濾過をもう一度行った。

【ヒドロキシアパタイト】 サンプルを蒸留水で2倍に薄め、0.05N 緩衝液に平衡化したヒドロキシアパタイトカラム（1×5 cm）に吸着させた（3 ml/分）。0.1N 緩衝液で洗った（3 ml/分）後、0.2N 緩衝液でゆっくりと溶出した（0.5ml/分）。赤色画分を集め、上述の方法でアンバーライト CG-50 (type2) カラムを用い濃縮した。

【SDS-PAGE】 サンプルの電気泳動は Laemmli (1970) の方法に従った。サンプルを等量の可溶化緩衝液（12%ショ糖，2%ドデシル硫酸リチウム塩，0.05M トリス塩酸，60mM ジチオスレイトール）と混合し、SDS-PAGE（アクリル18%，ゲル厚3 mm，濃縮ゲル3 cm，分離ゲル9 cm）で50mA・90分—12mA・21時間（分離）の泳動プログラムで展開した。ゲルの着色部分を切り出し、PBS で洗った後、少量の PBS と共にガラスホモジナイザーで擦り潰し、遠心（8,000g・10分）で上清にチトクロム *c* を抽出した。

### 3. チトクロム *c* の分光学的測定

精製過程は、チトクロム *c* の吸光度を日立556 自記分光光度計を用いて測定することによって追跡した。チトクロム *c* 量はサンプルを極少量のジチオナイトで還元し、550nm と 540 nm の吸収の差から、差モル吸光係数を  $19.1\text{cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$  (Wang 1980) として計算で求めた。精製度は酸化型チトクロム *c* の 408nm の  $\gamma$  バンドの吸収とタンパク質の 280nm の吸収の比で求めた。

### 4. 抗チトクロム *c* 抗体の作製

抗チトクロム *c* ウサギ血清は Shimada *et al.* (1990) の方法に従い若干の変更を加えた。1 回目の完全アジュバンドを用いて注射した抗原にチトクロム *c* 以外のタンパク質の混入が見られたので、ブースターとして注射する抗原を注意深く用意し、1 回目の注射の3週間後と4週間後に注射した。採血は最後の注射の1週間後に行った。

Table 1. Purification of cytochrome *c* from rice bran

Purification step	Total cytochrome <i>c</i> (mg)	$A_{408}/A_{280}$	Purification (-fold)	Yield (%)
1st dialyzate	44.3	0.024	1	100
1st Amberlite CG-50	32.7	—*	—*	74
1st CM-Sephadex	20.9	0.73	33	47
1st Sephadex G-75	—*	1.09	50	—*
2nd CM-Sephadex	7.6	2.23	102	17
2nd Sephadex G-75	—*	2.61	119	—*
Hydroxyapatite	3.1	4.66	212	7

Starting material was 5 kg bran. Estimation for purification was started at first dialyzate because cytochrome *c* peak in spectrum of crude extract was not detected.

\*Not determined

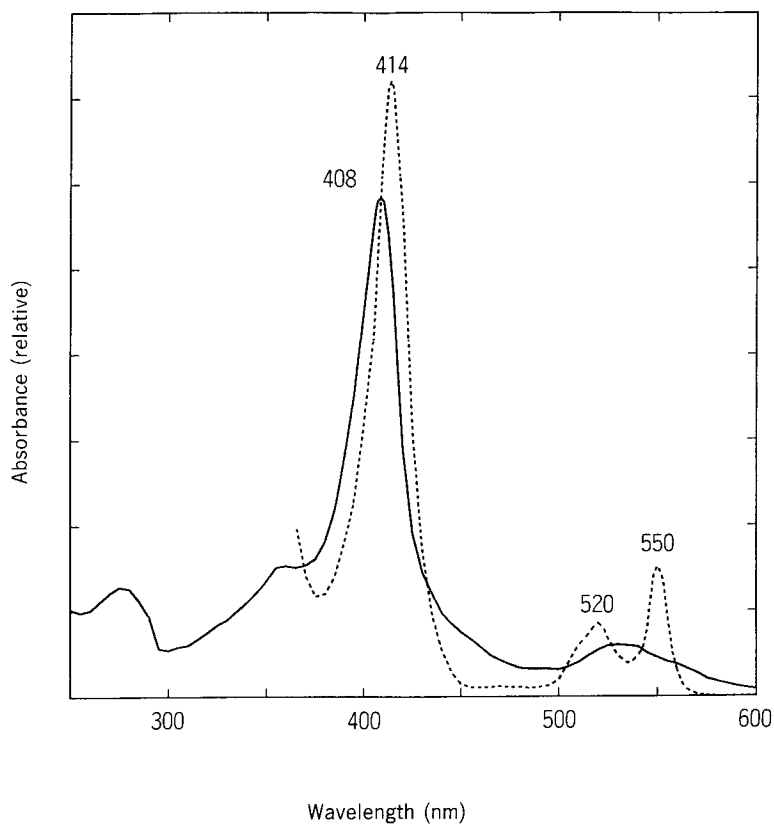


Fig. 1. Absorption spectra of rice cytochrome *c*. The protein was dissolved in 0.2 N ammonium phosphate buffer, pH 7.0. —, reduced with a small amount of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  powder; ·····, oxidized.

### 5. ウェスタンブロットによるイネ芽生えチトクロム *c* の検出

生重量 2 g の葉身を芽生えより切りとり、予冷した 10 ml の摩砕液 (0.1 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100 を含む 100 mM リン酸カリウム緩衝液, pH 7.8) 中でポリトロンによって摩砕した。抽出液は遠心 (1,000 g · 10 分) し、得た上清を上述の SDS-PAGE で展開した後、Blake *et al.* (1984) の方法に従ってウェスタンブロットによるチトクロム *c* の検出を行った。

## 結 果

### 1. チトクロム *c* の精製及び抗血清の特異性

Table 1 に示すように、米ぬか 5 kg より約 3 mg のチトクロム *c* を得た。精製標品の  $A_{408}/A_{280}$  比は 4.66 となり、高度に精製されていることを示している (Fig. 1)。Ida and Morita (1969) は 85 kg の米ぬかより  $A_{408}/A_{280}$  比 3.58 の精製標品を 30 mg 得ているが、我々の方法は収率及び精製度において優れた方法といえる。本研究で得られた精製度はイネ種子胚を出発材料にした場合 (Morita and Ida 1968) の  $A_{408}/A_{280}$  比 4.64 と同程度であった。

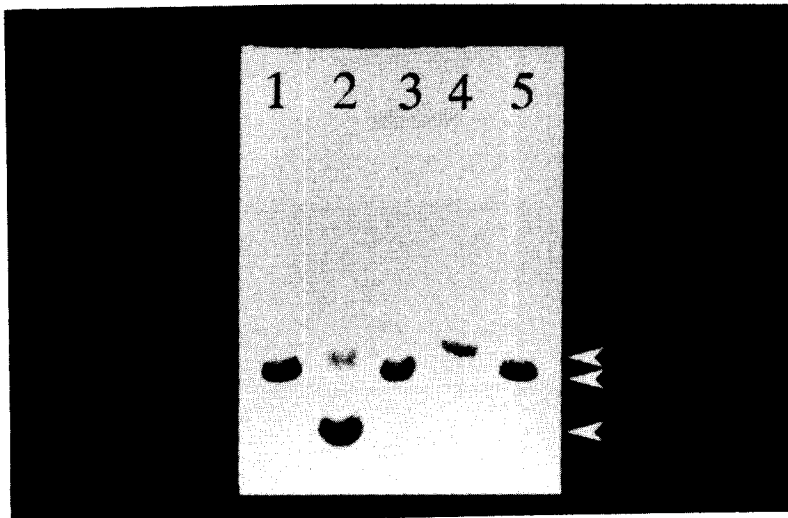


Fig. 2. SDS-PAGE of cytochrome *c* preparation. The bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. Lane 1, 3, and 5, cytochrome *c* from horse heart; 2, rice cytochrome *c* used for first injection; 4, rice cytochrome *c* used as a booster. Arrows indicate rice cytochrome *c* (upper), cytochrome *c* from horse heart (middle), and 11.9 kDa polypeptide (lower).

本研究で得られた抗チトクロム *c* 血清は、イネチトクロム *c* (分子量 14.8 kDa) だけでなくウマ心臓チトクロム *c* (分子量 12.4 kDa) とも反応した (Fig. 2)。1 回目にウサギに注射した抗原の精製の際にはハイドロキシアパタイトカラムによる精製を省略し、アクリル濃度 14 % の SDS-PAGE による精製を行ったため、分子量 11.9 kDa のタンパク質が混入していた。

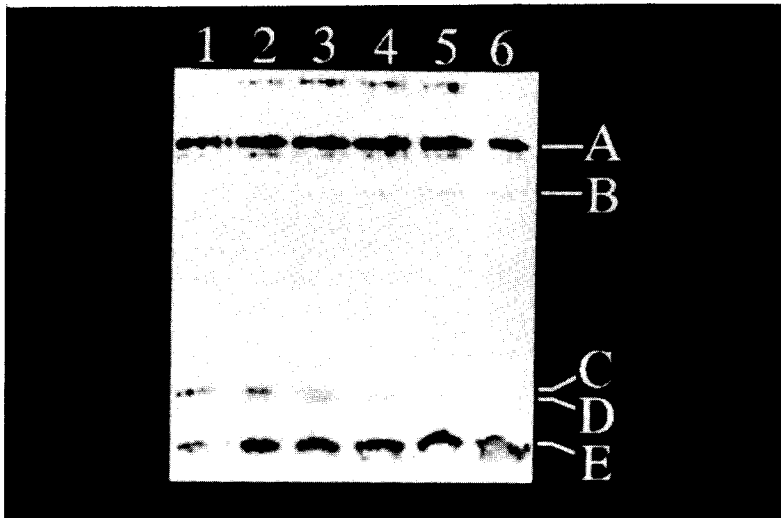


Fig. 3. Changes in cytochrome *c* content of rice seedlings during air adaptation. Total protein was extracted from shoots of rice seedlings, subjected to SDS-PAGE and electroblotted onto a nitrocellulose filter. The blot was treated with an antiserum against the cytochrome *c* and immunostained. Lane 1, aerobic control ; 2-6, submerged seedlings 24, 18, 12, 6, and 0 h, respectively, after exposure to air. Location of band A-E were estimated as 43.9, 34.5, 14.8, 13.5, and 11.9 kDa, respectively. Cytochrome *c* appeared as band C.

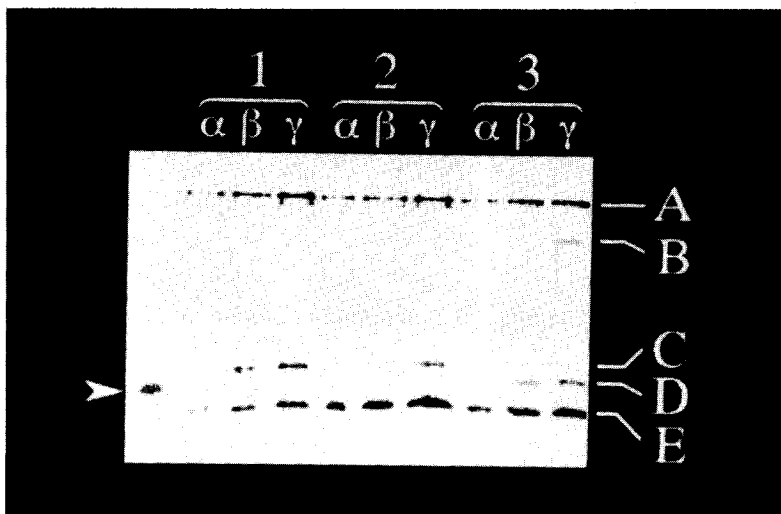


Fig. 4. Comparison of cytochrome *c* contents using serial dilution. Total protein was extracted from shoots of aerobic control (1), 24-h-air-adapted seedlings (2), and submerged seedlings (3). Extracts corresponding to 2, 4, and 8 mg fresh weight were loaded on lane  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ , respectively. Bands A-E correspond to those in Figure 3. Arrow indicates cytochrome *c* from horse heart.

その結果、この抗血清は11.9kDa タンパク質も認識し、むしろイネチトクロム *c* よりも強く反応した (Fig. 3, Fig. 4).

## 2. 酸素適応過程におけるチトクロム *c* 量の変化

ここで用いた抗血清ではウェスタンブロットによるチトクロム *c* のバンドが水中で発芽したイネ芽生えには検出できなかった (Fig. 3). この芽生えを空気中に移すと少なくとも6時間後にはバンドが検出され、その後だいに増加し、生重量あたりでは24時間後に好気対照とほぼ同程度に達した.

半定量的な検討を加えるために、希釈系を用いて水中芽生え、24時間酸素適応芽生え、好気対照を比較した (Fig. 4). 水中芽生えでは最多サンプル (生重量 8 mg 相当量) をロードしたレーンでもバンドはほとんど見られず、24時間酸素適応芽生えの2倍希釈レーン (生重量 4 mg 相当量) 以下であることから、チトクロム *c* が24時間の酸素適応過程で少なくとも2倍以上に増加していることが示された. また、24時間酸素適応芽生えでのチトクロム *c* 量は好気対照の半分以上から同程度であることが判った.

## 3. 抗血清に反応するチトクロム *c* 以外のバンド

先に述べたように、抗血清作成に用いたチトクロム *c* に他のタンパク質の混入があったため、本研究に用いた抗血清はチトクロム *c* 以外のタンパク質とも反応した. 主なものは4種あり、分子量はそれぞれ43.9, 34.5, 13.5, 11.9kDa であった. 43.9kDa タンパク質は芽生えの育った環境と無関係にほぼ同レベル存在していたが、他の3種はそれぞれ特異的な挙動を示した. 34.5kDa と13.5kDa タンパク質は水中芽生えに存在するマイナーな成分であるが、酸素適応過程の途中で若干の増加がみられるものの、好気対照では検出されなかった (Fig. 3). 11.9kDa タンパク質は抗原に混入していた主要な成分であったが、水中芽生えと酸素適応芽生えに多量に存在し、好気対照ではずっと少なかった (Fig. 3, Fig. 4).

## 考 察

米ぬかを材料とするチトクロム *c* の精製法としては、我々の方法は、収率、精製度ともに過去の報告 (Ida and Morita 1969) よりかなり優れていた. 凍結融解を行ったことにより収率が、ハイドロキシアパタイトカラムを使用したことにより精製度がそれぞれ向上したと考えられる.

チトクロム *c* はイネ水中芽生えでは検出されない程度に低レベルであり、酸素適応過程で2倍以上に増加する結果は、スペクトル解析の結果 (柴坂・辻 1994) とほぼ一致するが、より大きな変動を示している. 本研究では水中芽生えにチトクロム *c* が検出されなかったが、チトクロム *c* が低レベルではあるが存在することは既に示されている (Shibasaka and Tsuji 1988b). 今回使用した抗体の力価が低かったため検出できなかったと思われ、そのため増加の程度も強調された結果になったものと考えられる.

作成された抗血清はイネ芽生え及びウマ心臓のチトクロム *c* と反応したが (Fig. 2), 抗原の調製に不適切な点があったため他のいくつかのポリペプチドと反応し (Fig. 3, Fig. 4), 特異性にも問題がある. 力価と特異性の両方に難点があるので、我々は抗血清を新たに作成

し、特異性及び力価が改善されたものを得ているが、これを用いた結果を含む報告は他誌に投稿中である。

本研究で用いた抗血清と反応する11.9kDa タンパク質は米ぬかに大量に存在した。DEAE-セルロースカラムを通過し、アンバーライト CG-50及びCM-セファデックスに吸着されることから、チトクロム*c*と同様に塩基性のタンパク質であると思われる。このタンパク質は酸素適応過程で増加し、乾燥種子由来の米ぬかに大量に存在することから、乾燥ストレスに関与した核タンパク質である可能性がある。乾燥ストレスによって誘導されるタンパク質の中には相当する分子量のもの報告はないので、今後の興味ある研究課題である。34.5及び13.5kDa タンパク質は好気対照では検出されないことから、低酸素環境に特異的なタンパク質(Sachs 1991)であろうと思われる。チトクロム*c*以外のこれらのタンパク質を同定することは、まだできていない。

本研究の結果は、前報の結果(柴坂・辻 1994)を不完全ながらも裏付けている。すなわち、ミトコンドリア呼吸系が働かない環境で発芽したイネ芽生えは、チトクロム*c*が欠乏した状態のまま生育を続け、酸素が利用できるようになった後にチトクロム*c*が合成される。このような量的な変化は同じ電子伝達系を形成しているチトクロム*b*類には見られず(Shibasaka and Tsuji 1988b, 柴坂・辻 1994)、酸素環境による電子伝達系成分の生合成の調節はチトクロム*aa<sub>3</sub>*(Shibasaka and Tsuji 1988b)とチトクロム*c*によって行われていると思われる。

## 摘 要

イネ水中芽生えを空気に触れさせた後のチトクロム*c*含量の変動を調べるために、米ぬかから精製したチトクロム*c*を用いて抗チトクロム*c*血清を作成した。ウェスタンブロット分析によると、水中芽生えにはチトクロム*c*は検出されなかったが、空気に触れてから6時間以降に検出された。酸素適応24時間の芽生えには生重量あたりで好気対照と同レベルのチトクロム*c*が存在した。抗血清作成の抗原として用いたチトクロム*c*標品は、 $A_{408}/A_{280}$ 比の値(4.66)が高いことから、よく精製されていると考えられるが、抗血清はいくつかの他のポリペプチドと反応した。そのうちの一つはチトクロム*c*よりも抗血清に強く反応し、その分子量は11.9kDaであった。このポリペプチドは酸素適応過程で増加し、水中芽生えや好気対照では24時間酸素適応芽生えよりも少なかった。

**キーワード：**イネ、抗チトクロム*c*血清、酸素適応、チトクロム*c*、チトクロム*c*精製

## 引 用 文 献

- Blake, M.S., Johnston, K.H., Russell-Johns, G.J. and Gotshlich, E.C. 1984. A rapid sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated antiantibody of Western blots. *Anal. Biochem.* 86 : 142-146.
- Ida, S. and Morita, Y. 1969. Studies on respiratory enzymes in rice kernal. Part II. Isolation and purification of cytochrome *c* and blue protein from rice bran. *Agric. Biol. Chem.* 33 : 10-17.



- Laemmli, O.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685.
- Morita, Y. and Ida, S. 1968. Studies on respiratory enzymes in rice kernel. Part I. Isolation and purification of cytochrome *c* and peroxidase 556 from rice embryo. *Agric. Biol. Chem.* 32 : 441-447.
- Sachs, M.M. 1991. Molecular response to anoxic stress in maize. *In* "Plant Life under Oxygen Deprivation: Ecology, Physiology and Biochemistry" (Jackson, M.B., Davies, D.D. and Lambers, H., eds.) 129-139. SPB Academic Publishing, Hague.
- Shibasaka, M. and Tsuji, H. 1988a. Respiratory properties of mitochondria from rice seedlings germinated under water and their changes during air adaptation. *Plant Physiol.* 86 : 1008-1012.
- Shibasaka, M. and Tsuji, H. 1988b. Cytochromes of mitochondria from rice seedlings germinated under water and their changes during air adaptation. *Plant Cell Physiol.* 29 : 629-635.
- Shibasaka, M. and Tsuji, H. 1991. Changes in the respiratory system of submerged rice seedlings after exposure to air. *In* "Plant Life under Oxygen Deprivation: Ecology, Physiology and Biochemistry" (Jackson, M.B., Davies, D.D. and Lambers, H., eds.) 169-186. SPB Academic Publishing, Hague.
- 柴坂三根夫・辻英夫, 1994, イネ水中芽生への酸素適応過程におけるミトコンドリアスペクトルの変化. Gaussian Deconvolutionによる解析. 岡大資生研報 2 : 135-147.
- Shimada, Y., Tanaka, A., Tanaka, Y., Takabe, T., Takabe, T. and Tsuji, H. 1990. Formation of chlorophyll-protein complexes during greening. 1. Distribution of newly synthesized chlorophyll among apoproteins. *Plant Cell Physiol.* 31 : 639-647.
- Ushimaru, T., Shibasaka, M. and Tsuji, H. 1992a. Changes in levels of heme a, protoheme and protochlorophyll(ide) in submerged rice seedlings after exposure to air. *Plant Cell Physiol.* 33 : 771-778.
- Ushimaru, T., Shibasaka, M. and Tsuji, H. 1992b. Development of the O<sub>2</sub><sup>-</sup>-detoxification system during adaptation to air of submerged rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* 33 : 1065-1071.
- Ushimaru, T., Shibasaka, M. and Tsuji, H. 1994. Resistance to oxidative injury in submerged rice seedlings after exposure to air. *Plant Cell Physiol.* (in press)
- Wang, W. 1980. Photoactivation of chlorophyll synthesis and cytochrome oxidase activity in anaerobically germinated seedlings of *Echinochloa crusgalli* var. *Oryzicola*. *Plant Physiol.* 65 : 451-454.