

イネ水中芽生え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

柴坂三根夫・辻 英夫*

Changes in Mitochondrial Spectra of Submerged Rice Seedlings
after Exposure to Air
Gaussian Deconvolution Analysis

Mineo SHIBASAKA and Hideo TSUJI

Quantitative changes in mitochondrial cytochromes of submerged rice seedlings after exposure to air were investigated using gaussian deconvolution analysis on absorption spectrum at liquid nitrogen temperature. Difference spectra were obtained from subtracting the absorption spectra of oxidized mitochondria from reduced mitochondria by succinate with antimycin-A. They showed three kinds of b-type cytochrome and a spectral component similar to cytochrome c_1 . Subtraction of the cytochrome c_1 -like component from the spectrum by curve analysis showed that three cytochrome bs had similar absorption maximum and that on a mitochondrial protein basis they were constant during air-adaptation. Cytochrome c per mitochondrial protein in submerged seedlings was about half of that in aerobic seedlings and increased by 1.5-fold during air-adaptation. The change in cytochrome c content was in paralleled with that of cytochrome aa_3 . These findings revealed that there were two groups of cytochromes in the response to air-adaptation, i.e., three cytochrome bs were constant and cytochromes c and aa_3 increased in parallel.

Key words: Absorption spectrum, Air-adaptation, Cytochrome,
Gaussian deconvolution analysis, *Oryza sativa*

Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki 710, Japan
平成5年12月16日受理 (Received December 16, 1993)

* 京都大学理学部

結 言

イネ種子は水中のような嫌気環境下においても発芽する (Taylor 1942, Vartapetian *et al.* 1978, Shibasaka and Tsuji 1991). その芽生えの呼吸活性は好氣的に発芽した対照に対しかなり低いが, 芽生えを空気に触れさせると, この活性は大きく増加する (Shibasaka and Tsuji 1991). 水中で発芽した芽生えが好氣的環境に適應する過程で, ミトコンドリア呼吸鎖の発達 (Shibasaka and Tsuji 1988b) にともない, ミトコンドリアの有機酸酸化活性が増加することは既に報告した (Shibasaka and Tsuji 1988a).

液体窒素温度におけるミトコンドリア吸収スペクトルによると, 水中で発芽した芽生え (水中芽生え) は既に呼吸鎖チトクロムは全て揃っていて, 芽生えが空気に触れるとチトクロム *c* と *aa₃*が増加する (Shibasaka and Tsuji 1988b). しかし, 単純に吸収スペクトルを調べるだけではチトクロム *c* とチトクロム *c₁* の吸収が互いに重なり合っているため, チトクロム *c* の増加について定量的な議論をするには不適當であった.

一方, Butler and Hopkins (1970) は *Prototheca zopfii* の細胞懸濁液の低温吸収スペクトルを4次微分することにより, チトクロム *c* とチトクロム *c₁* が区別されることを示し, 各チトクロムに対応する吸収成分を数学的モデルで表現して, その合成スペクトルを4次微分すると細胞懸濁液の4次微分スペクトルとよく似ることを示した. また, French *et al.* (1970) はクロロフィルの数学的モデル成分を仮定し, その合成スペクトルと葉緑体画分の吸収スペクトルが最も一致するようなモデル成分のパラメータを求めた. その結果, 植物種の違いを越えて共通なモデル成分が存在することを見出し, この様なカーブアナリシスの手法がスペクトルを構成する成分の分析に有効であることを示した.

そこで, 我々は非線形最小自乗法を用いて, スペクトルを数学的モデル成分 (ガウス曲線及びローレンツ曲線) に展開するコンピュータプログラムを作成し (Shibasaka *et al.* 1993), イネ水中芽生えの酸素適応過程におけるチトクロムスペクトルの変化を特にチトクロム *b* 類と *c* 類について調べた. その結果からミトコンドリアの発達に伴うチトクロム類の合成の調節について考察した.

本稿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

イネ *Oryza sativa* L. 品種ヤマビコを用いた.

2. 滅菌の手順と生育条件

種子は無菌条件で発芽させた. 乾燥種子を60%エタノール水溶液で3分間洗い, アンチフォルミン (1%活性塩素) 液中に20分間置く. その後, 無菌蒸留水で十分洗った. 直径15 cm, 高さ5 cmのステンレス製のふるいを発芽床として用いた. ふるいの網面を上にして, その上に種子を蒔いてガーゼで覆い, 緩まないようにシリコン樹脂製の輪ゴムでふるいの側面に固定した. 滅菌した内径18cmのWittの濾過ビンを培養容器として用い, 上部と横の開

口部はそれぞれシリコン樹脂製のスポンジとゴム栓で塞いだ。播種面が水深10cmとなるように無菌蒸留水中に発芽床を沈めた。以上の無菌的な処理はすべて日立製のクリーンベンチ内で行った。培養容器は30℃の恒温暗室内に静置した。種子が発芽するとき、根や芽はふるいやガーゼの網目を通して伸びることができる。吸水開始から5日後、水を捨て、発芽床のすぐ下の面まで水面を下げることににより芽生えを空気に曝した。

この論文の中では[1]5日間水中で発芽したもの、[2]5日間水中で発芽した後1日空気中に出されたもの、[3]6日間空気中で発芽したものの3つの型の芽生えを用い、それぞれを「水中芽生え」、「酸素適応芽生え」、「好気芽生え」と呼ぶ。それぞれの芽生えから得たミトコンドリアも同様に「水中ミトコンドリア」、「酸素適応ミトコンドリア」、「好気ミトコンドリア」と簡略化して呼ぶ。

3. ミトコンドリアの単離

芽生えをメソコチルのすぐ上で切り、芽の部分を集めた。蒸留水ですすいだ後、十分水分を拭ってから秤量した。切りとった芽を2mmの切片に刻み、よく冷えた摩砕用溶液を生重量の2倍量加え、予冷しておいた乳鉢で擦り潰した。摩砕用溶液は0.3M マンニトールと、0.1M HEPES-KOH (pH7.5)、5mM EDTA、0.05%システイン、0.1%ウシ血清アルブミンの水溶液である。得られた摩砕液は1層のナイロンシート(メッシュサイズ25 μ m)で濾過し、1,000 \times gで10分間遠心した。上清を更に10,000 \times gで15分間遠心した。その沈澱物を洗浄用溶液中に懸濁し、再び10,000 \times gで10分間遠心した。洗浄用溶液は0.3M マンニトールと、50mM HEPES-KOH (pH7.2)、0.3%ウシ血清アルブミンの水溶液である。得られた沈澱物は再懸濁用溶液に懸濁した(粗ミトコンドリア)。再懸濁用溶液は0.3M マンニトール、4mM 塩化マグネシウム、50mM TES-KOH (pH7.2)の水溶液である。全ての操作は4℃のもとで行った。ミトコンドリアからチトクロムcを除く操作は、Kusel and Storey (1973)に従い、0.15M 塩化カリウム溶液で洗うことによって行なった。

4. ミトコンドリアの精製

粗ミトコンドリア懸濁液を28%パーコール、50mM TES-KOH (pH7.2)、0.3M マンニトールの溶液と混合した。40,000 \times g、40分間遠心し、自己形成密度勾配によって分画されたミトコンドリアのバンドを集めた。その後の数回の希釈と遠心によってパーコールを除去したサンプルを実験に用いた。

ミトコンドリア懸濁液のタンパク質量はLowry *et al.* (1951)の方法に従った。

5. 低温差スペクトルの測定

日立556型二波長自記分光光度計を用い液体窒素中で差スペクトルを測定した。標品は光路長0.2cmのアクリル樹脂製のキュベット中で凍結させた。分光器のスリット巾は1nmの半巾中に設定した。詳細は前報 (Shibasaka and Tsuji 1988b) に述べた。

6. カーブアナリシス

吸収スペクトルのデータは0.7042nm間隔で読み取り、コンピューターに入力した。測定波長は波数(波長の逆数;光のエネルギーに比例する値)に変換して扱った。光エネルギーは

量子化されているので、単一の電子遷移によって生じる吸収スペクトルは単一の分離した線からなっていないなければならないが、電子吸収には振動および回転副準位が重なっているので分離した線が得られない。電子基底状態にある大部分の分子は基底振動準位にあるので、多くの電子遷移はこの準位から生じるが(吸収極大波長)、その近傍に副準位の多重度に由来する吸収が生じる。したがって、単一の電子遷移によって生じた吸収スペクトルを、エネルギーに比例する値である波数に対して描くと、近似的には吸収極大波長を中心としたガウス曲線で表されると仮定することができる。この仮定を拡張し、ガウス曲線で表現した成分(モデル成分)の代数和を、多成分からなる吸収スペクトルの数学的モデルとみなし、構成するモデル成分のパラメータを Gaussian deconvolution analysis の手法 (Shibasaka *et al.* 1993) を用いて決めた。解析に必要な初期値をできるだけ妥当な値にするために、解析の手順は、単純な成分から成ると考えられるスペクトルからモデル成分のパラメータを決定し、その結果を用いてより複雑なスペクトルを解析して行った。

7. コンピュータプログラム

カーブアナリシスプログラムは前処理、高次微分及びカーブフィッティングの部分よりなり、前処理プログラムによって波数変換および正規化を行う。前処理及び高次微分プログラムは日本電気製の N88-BASIC (DOS 版) で書かれ、同社製の BASICC コンパイラで中間言語にコンパイルされている。カーブフィッティングプログラムは、測定誤差を含む任意の曲線を非線形最小自乗法により最も一致する数学モデルに当てはめる。膨大な量の繰り返し演算を要し、高速化が必要なため、米国マイクロソフト社製の Microsoft C Professional Development System Version 6.00A を使用して書かれ、インテル社製 80286CPU コードにコンパイルされている。プログラムの詳細は省略する。これらのプログラムの実行は日本電気製 PC-9801 シリーズのパーソナルコンピュータで行なった。

ここで用いたカーブフィッティングプログラムはスペクトルのモデル成分としてガウス曲線とローレンツ曲線を、また、ベースラインの成分として任意の n 次式も扱うことができるが、簡単のために数学的モデルとしてはガウス曲線のみを、また、ベースラインとしては 1 次式の直線を用いる設定でプログラムを実行した。

8. チトクロム成分の判定

ガウス曲線よりなる単一吸収のモデルは次の式によって表される。波数 λ における吸収 (A) は

$$A = A_0 e^{-4 \ln 2 \frac{(\lambda - \lambda_0)^2}{W^2}}$$

となる。ここで用いた記号の定義は

A_0 : 吸収極大

W : 半値巾

λ_0 : ピーク位置 (波数)

である。すなわち、この式で表される曲線はこれら 3 つのパラメータで決まる。しかし、これは吸収のモデルであるので、吸収成分の固有性はピーク位置と半値巾で決まり、吸収極大はその存在量を表すことになる。

チトクロムの吸収ピーク位置に関しては多くの報告のデータが蓄積されているが、半値巾に関するデータは皆無である。したがって、本研究では主に吸収ピーク位置でチトクロム成分の判定を行い、半値巾は各解析間での整合性の判定に使用した。

結 果

好気芽生え、酸素適応芽生え、水中芽生えそれぞれから単離したミトコンドリアをジチオナイト還元して得た絶対スペクトルの4次微分スペクトルは非常に複雑な結果となり解析に適しなかったため、本研究では、スペクトルの成分数及びその吸収極大波長を4次微分スペクトルによって推定する方法は採らなかった。そこで、少数の成分のみを含むと期待されるスペクトルから順に各モデル成分のパラメータを決定する方法を採った。その目的を達成するために酸化還元差スペクトルを解析の対象とした。

1. チトクロム c_1 (c_{549}) に対応するモデル成分パラメータの決定

0.15M 塩化カリウムを含む緩衝液で可溶性のチトクロム c を十分洗い去った好気ミトコンドリアを用い、アスコルビン酸と TMPD で還元したものと酸化型のものの差スペクトルにはチトクロム c_1 のみが現れることが期待される (Kusel and Storey 1973)。得られたスペ

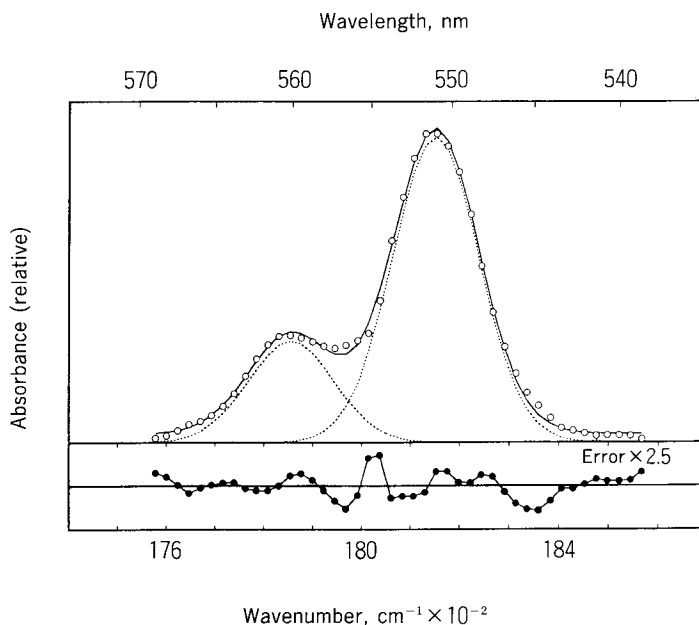


Fig. 1. Absorption spectrum at liquid nitrogen temperatures of cytochrome c_1 in aerobic mitochondria fitted with the component bands. The observed data (\circ) are plotted versus wavenumber. Wavelength corresponding to wavenumber is shown on the top of the panel. The solid line through open circles is the sum of the component curves. The component bands are represented as dotted lines. The error of fit at each point is shown below the spectrum on a scale with 2.5-fold magnification.

クトルには560nm 付近に別の成分が現れたが、吸収極大波長が大きく離れていることから、チトクロム c_1 のピークの解析には影響ないものと判断した (Fig. 1). チトクロム c_1 の吸収極大波長は551.0nm であり、半値巾は6.27nm であった.

2. チトクロム b 類に対応するモデル成分パラメータの決定

アンチマイシン A 存在・コハク酸還元による差スペクトルを用いてチトクロム b 類に対応

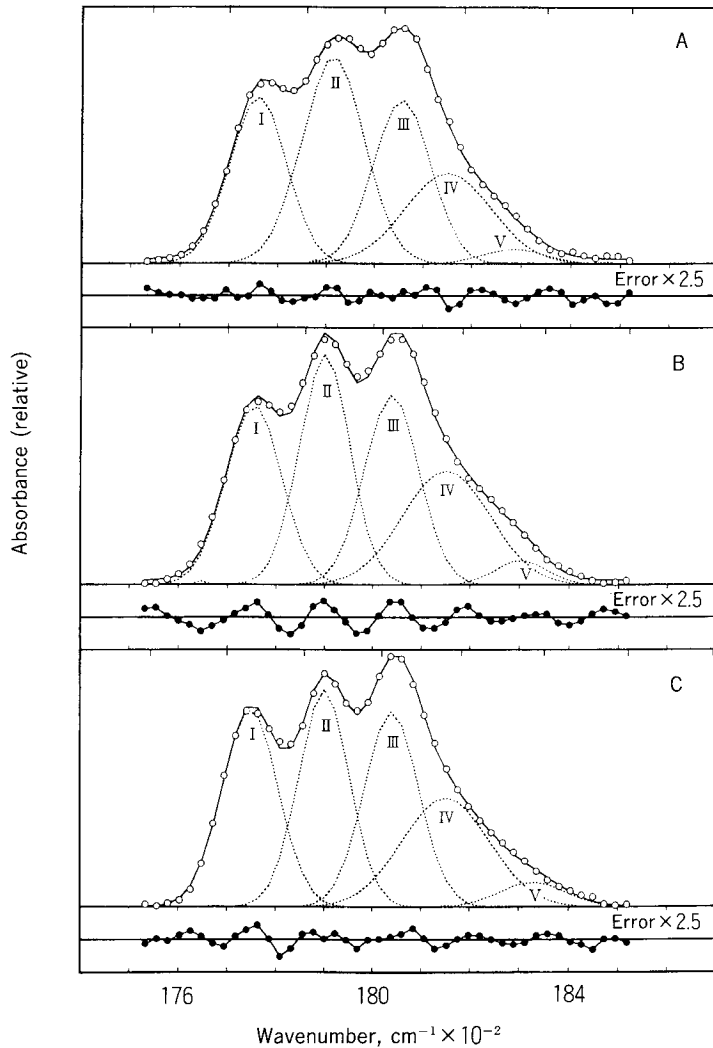


Fig. 2. Absorption spectra at liquid nitrogen temperatures of cytochromes b in submerged (A), air-adapted (B), and aerobic (C) mitochondria fitted with the component bands. The component bands are represented as dotted lines and are designated by Roman numerals corresponding to ones in Table 1. The error of fit at each point is shown below each spectrum on a scale with 2.5-fold magnification. Other details are the same as in Fig. 1.

Table 1. Peak wavelength of component bands obtained from curve analysis of the difference absorption spectra* of mitochondria reduced by succinate with antimycin-A minus oxidized

Seedlings	Component band*			
	I	II	III	IV
	Peak wavelength (nm)			
Submerged	563.2	558.2	553.8	551.0
Air-adapted	563.3	558.7	554.4	551.0
Aerobic	563.5	558.7	554.4	551.0
Cytochrome suggested	b_{563}	b_{557}	b_{553}	c_1

*Component bands designated by Roman numerals are shown in Fig. 2. Component band V is not shown.

Table 2. Peak height of cytochromes b obtained from curve analysis of the difference absorption spectra of mitochondria reduced by succinate with antimycin-A minus oxidized

Seedlings	Cytochromes		
	b_{563}	b_{557}	b_{553}
	$A \cdot \text{protein } g^{-1} \cdot \text{ml}$		
Submerged	3.11 (3.47)	4.02 (4.30)	2.91 (4.56)
Air-adapted	3.01 (3.08)	3.83 (4.14)	3.17 (4.12)
Aerobic	3.27 (3.19)	3.56 (3.76)	3.22 (4.08)

Figures in parentheses represent peak height obtained from direct measurement of the spectrum shown in Fig. 2.

するモデル成分のパラメータを決定した。Fig. 2 に示すように、3つのチトクロム b と対応する3つのモデル成分の他に2つの付加的な成分が必要であった。チトクロム b に対応のつかない成分の中で大きな寄与を示すものはチトクロム c_1 に対応するモデル成分とよく似たパラメータを持っていた。水中、酸素適応、好気ミトコンドリアいずれの場合も、この3つのチトクロム b の吸収極大波長の間に差がなかったが (Table 1)、水中ミトコンドリアのチトクロム b_{557} の半値巾が他のものに比べやや大きかった (Fig. 2A)。

Table 2 にこのようにして見積ったチトクロム b 類のミトコンドリアタンパク質当りのピーク高をまとめた。カーブアナリシスの結果はベースラインから直接測ったピークの高さよりそれぞれ小さくなったが、チトクロム b_{553} はチトクロム c_1 によく似た成分の影響を最も受けていて約85—65%に減少した。そのためチトクロム b に関して、3つの型のミトコンドリアの間にはほとんど差がないことが判明した。チトクロム b_{563} を1として他のチトクロム b のピーク高を表すと、 b_{553} がほとんど1であり、 b_{557} が1.1—1.3と若干大きな値を示した。

3. チトクロム *c* に対応するモデル成分のパラメータの決定

パーコールの自己形成密度勾配遠心によって得られた好気芽生えからの精製ミトコンドリアを用いた。そのジチオナイト還元による差スペクトルに、上で得られたチトクロム *a*₁ 及びチトクロム *b* のモデル成分を当てはめ、チトクロム *c* に対応するモデル成分を求めた。チトクロム *c* は液体窒素温度では α バンドが2つのピークに分裂しているため (Ida and Morita 1969) 2つのモデル成分を割り当てた (Fig. 3, Table 3)。また、実測スペクトルをモデルと一致させるためには2つの付加的成分を追加する必要があったが、その寄与は非常に小さかった。3種のチトクロム *b* に対応するモデル成分のパラメータは初期値として与えたものと計算結果として得られたもの間に有意な差がなかった。チトクロム *c* の長波長側のピークに対応するモデル成分の吸収極大波長は548.9nm であった。この値は Ducet (1985) の主張する実測値 (549nm) に近く、Lance and Bonner (1968) の報告した実測値 (547nm) よりもやや長波長に寄っている。

4. 粗ミトコンドリアのスペクトルの解析

水中芽生えと酸素適応芽生えからはパーコールの密度勾配を用いて精製するのに十分な量の粗ミトコンドリアが得られないので、精製ミトコンドリアをこの実験に用いることは困難であった。そこで、各タイプの芽生えから単離した粗ミトコンドリアを用いて、そのジチオナイト還元差スペクトルを解析した (Fig. 4)。得られた結果の各モデル成分の吸収極大波長

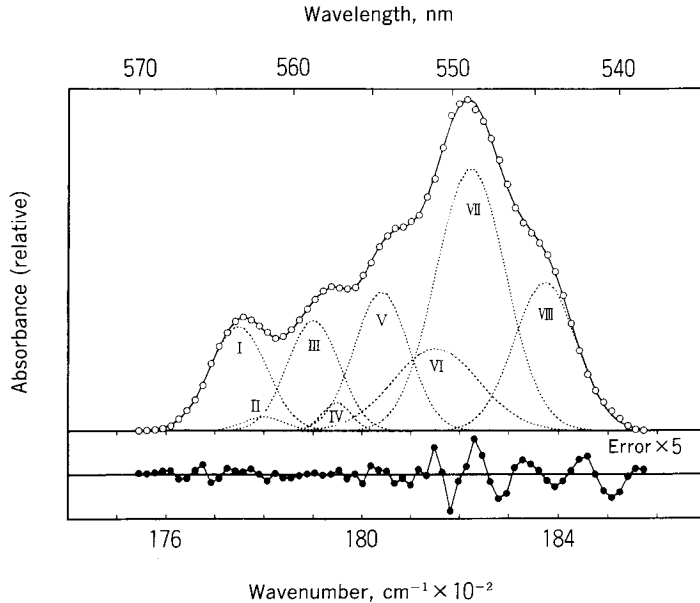


Fig. 3. Absorption spectra at liquid nitrogen temperatures of cytochromes in purified mitochondria isolated from aerobic seedlings fitted with the component bands. The component bands are designated by Roman numerals corresponding to ones in Table 3. The error of fit at each point is shown below the spectrum on a scale with 5-fold magnification. Other details are the same as in Fig. 1.

を Table 4 に示した。精製ミトコンドリアスペクトルモデルで仮定した 2 つの付加的成分のうち、557.2nm の成分が消失し、561.9nm の成分はやや短波長にシフトした。チトクロム b_{557} に対応するモデル成分は半値巾が 3.49nm と若干小さくなり、チトクロム b_{553} のモデル成分の吸収極大波長は好気ミトコンドリアと酸素適応ミトコンドリアでは 555.1nm、水中ミトコ

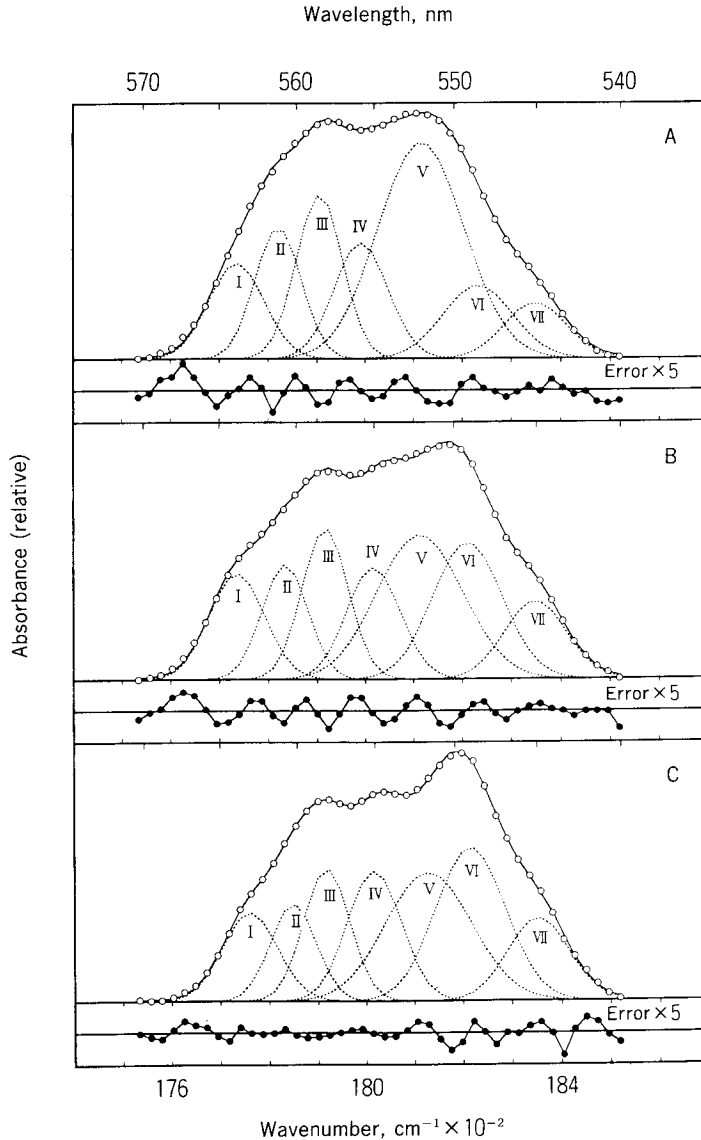


Fig. 4. Absorption spectra at liquid nitrogen temperatures of cytochromes in washed mitochondria from submerged (A), air-adapted (B), and aerobic (C) seedlings fitted with the component bands. The component bands are designated by Roman numerals corresponding to those in Table 4. The error of fit at each point is shown below each spectrum on a scale with 5-fold magnification. Other details are the same as in Fig. 1.

Table 3. Parameters of component bands obtained from curve analysis of the difference absorption spectra of purified mitochondria reduced by dithionite minus oxidized

Parameter	Component band*							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Wavelength (nm)	563.5	561.9	558.7	557.2	554.4	551.0	548.9	544.4
Half width (nm)	4.23	3.06	3.85	2.10	4.03	6.03	5.01	4.35
Cytochrome suggested	b_{563}	—	b_{577}	—	b_{553}	c_1	c	c

Mitochondria were isolated from aerobic seedlings.

*Component bands designated by Roman numerals are shown in Fig. 3.

Table 4. Peak wavelength of component bands obtained from curve analysis of the difference absorption spectra of washed mitochondria reduced by dithionite minus oxidized

Seedlings	Component band*						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
	Peak wavelength (nm)						
Submerged	563.9	561.2	558.5	555.9	552.1	548.6	545.1
Air-adapted	563.9	560.8	558.2	555.1	552.2	549.2	545.1
Aerobic	563.1	560.3	558.1	555.1	551.7	549.1	544.9
Cytochrome suggested	b_{563}	—	b_{557}	b_{553}	c_1	c	c

*Component bands designated by Roman numerals are shown in Fig. 4.

Table 5. Peak height of cytochromes obtained from curve analysis of the difference absorption spectra* of washed mitochondria reduced by dithionite minus oxidized

Seedlings	Cytochromes					
	b_{563}	b_{557}	b_{553}	c_1	c	c
	A·protein g ⁻¹ ·ml					
Submerged	2.74	4.73	3.33	6.26	2.10	1.59
Air-adapted	3.26	4.70	3.46	4.48	4.24	2.41
Aerobic	3.14	4.75	4.66	4.60	5.49	2.93

*The spectra are shown in Fig. 4.

ンドリアでは555.9nmへと、かなり長波長側にシフトした。チトクロム c_1 に対応するモデル成分も552nm付近へシフトした。このようにスペクトルの中央部に位置していて、多くの他の成分と重なり合っている成分のパラメータが大きく変化した。

ミトコンドリアタンパク質当りの各モデル成分の寄与を Table 5に示した。チトクロム

b_{557} と b_{563} に対応するモデル成分は、ここでみた3種のミトコンドリア間でほとんど同じ値を示した。特にチトクロム b_{563} の値はTable 2で示した値とよく一致した。

考 察

1. モデル及び解析方法の妥当性

Gaussian deconvolution analysisの手法では、ピークが不明瞭な場合はモデル成分の初期値として与えるパラメータが不相当であると異なった結果を得ることがある。それを防ぐために、今回はミトコンドリアを適当に前処理することで、ピークの明瞭な少数のチトクロム成分からなるスペクトルを得た。それを先に解析することによって、チトクロム成分と推定されたモデル成分のパラメータを、より複雑なスペクトルを解析する時に初期値として用いた。初期値として与えたパラメータは、演算途中に変動し、ある値に収束して行くが、今回の結果はチトクロム成分と推定されたモデル成分のパラメータがチトクロム成分とは認められないほどに大きく変動するという事はなかった。したがって、ここで採用したモデルは実際のスペクトルをよく反映していると考えられ、解析方法も妥当であると思われる。

2. チトクロム成分の推定

Fig. 1の大きなピークは、ミトコンドリアの処理方法から考えて、チトクロム c_1 であると思われるが、560nm付近のピークがなにに由来するのかは不明である。粗ミトコンドリア標品には僅かながらプラスチドが混入していること予想されるが、アスコルビン酸で還元され、この付近にピークを持つプラスチド成分はチトクロム f である。これまで知られているチトクロム f のピークは553nmから555nmであり(山中 1973)、この可能性は除外される。おそらく、チトクロム c_1 からチトクロム b へ一部の電子が逆流したものと思われる。

Fig. 2にチトクロム c_1 成分とよく似たパラメータを持つモデル成分が出現したが、これはチトクロム c_1 の部分還元が生じたものと思われる。アンチマイシンAによる電子伝達の阻害は、チトクロム b とチトクロム c_1 の間を単純にブロックするのではなく、チトクロム b - c_1 複合体の立体構造変化を阻害することによって生じているので、チトクロム c_1 が部分還元している可能性は大いにあると思われる。他の物質の吸収に隠れている吸収を検出することはカーブアナリシスの手法によって初めて可能となったので、この問題を更に追求することは、ミトコンドリアにおける電子伝達の機構に関する興味深い結果が得られることが期待される。

3. 粗ミトコンドリアスペクトルのカーブアナリシスによる解析結果の検討

今回の解析では簡単のために全てのモデル成分をガウス曲線に近似したが、粗ミトコンドリアスペクトル以外はモデル成分のパラメータをほとんど変化させることなく実測スペクトルとよく一致した。しかし、粗ミトコンドリアの場合はかなりパラメータが変化したことから(Table 3, Table 4)、他のオルガネラの混入などにより、ミトコンドリアの呼吸鎖チトクロム以外の物質が含まれているように思われる。また、水中芽生えのミトコンドリアでは各チトクロムに対応するモデル成分のパラメータが他の芽生えのものとはやや異なっているので(吸収極大に関してはTable 4、半値巾に関してはデータを示していない)、各チトクロムの存在状態が他の芽生えとは異なっている可能性がある。しかし、水中ミトコンドリアでは実

際にはもっと多くの成分を含んでいるのに、少ないモデル成分数を仮定したために異なるパラメータを得た可能性も否定できない。現時点では2つの可能性のいずれかを判定することはできない。

スペクトルの長波長側の端に位置するチトクロム b_{563} に対応するモデル成分は粗ミトコンドリアの場合でも精製ミトコンドリアやアンチマイシン A 存在・コハク酸還元の場合と同じ吸収極大波長と半値巾、ピーク高を示した。このことから、スペクトルの端のモデル成分は成分間の重なりが少なく粗ミトコンドリアの場合でも信頼のおけるパラメータを得ることができると考えられる。同様に、スペクトルの短波長側の端に位置するチトクロム c の545nmのピークに対応するモデル成分のパラメータも定量的な評価に耐えうると考えた。

4. 酸素適応過程における各チトクロム類の量的変化のまとめ

チトクロム b 類のミトコンドリアタンパク質当たりのピーク高は酸素適応過程でほとんど変化がなく (Table 2, Table 5), 前報 (Shibasaka and Tsuji 1988b) の結果と一致した。Table 4 で得たチトクロム c の545nmのモデル成分を用いると、前報では得られなかったチトクロム c の量的変化を知ることができる。水中芽生えを1とすると、酸素適応芽生え、好気芽生えはそれぞれ1.53, 1.84となり、チトクロム aa_3 の対応する値1.60, 1.97 (Shibasaka and Tsuji 1988b) とほとんど同じであることから、チトクロム aa_3 とチトクロム c は、酸素適応過程で平行的に増加していることが分かる。

Breidenbachら (1967) は発芽時のピーナツ子葉に含まれるチトクロム類の変動を報告している。発芽2.5日から4.5日の間のチトクロムの吸収の増加は、チトクロム c を100とした相対値でチトクロム aa_3 が110, チトクロム b が78であった。この結果もチトクロム aa_3 と c が平行的に増加していて、チトクロム b の増加より大きかった。

おそらく3種のチトクロム b はそのレベルの維持が同一の制御下に置かれているものと思われる。同様にチトクロム aa_3 と c も何らかの機構で協調的に制御されていると思われる。このように、酸素環境に対する応答の異なる2つのグループが見出された。

摘 要

吸収スペクトルをカーブアナリシスの手法を用いて解析し、水中で発芽した芽生えが空気に触れたときに生じるミトコンドリアチトクロム類の量的変動を調べた。アンチマイシン A 存在下でのコハク酸還元による差スペクトルには3種のチトクロム b が見出されるが、チトクロム c_1 とよく似た成分がかなりの寄与で存在していることが判った。その寄与を除くといずれの芽生えから単離したミトコンドリアにおいても、3種のチトクロム b は互いにほとんど同程度の吸収を示した。また、水中芽生え、酸素適応芽生え、好気芽生えから単離したミトコンドリアの間には、3種いずれのチトクロム b の吸収 (タンパク質当り) に関しても差がなかった。チトクロム c は水中芽生えでは好気芽生えの約半分の量が存在し、酸素適応過程で1.5倍に増加した。これはチトクロム aa_3 の変化と全く同じであった。

チトクロム類の中には、酸素適応過程において酸素に対する応答の異なる2つのグループが存在することを示した。

キーワード：イネ, 吸収スペクトル, チトクロム, 酸素適応, カーブアナリシス

引用文献

- Breidenbach, R.W., Castelfranco, P., and Criddle, R.S. 1967. Biogenesis of mitochondria in germinating peanut cotyledones II. Changes in cytochromes and mitochondrial DNA. *Plant Physiol.* 42: 1035-1041.
- Butler, W.L. and Hopkins, D.W. 1970. Higher derivative analysis of complex absorption spectra. *Photochem. Photobiol.* 12: 439-450.
- Ducet, G. (1985) Plant mitochondrial cytochromes. *In* "Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol. 18 Higher Plant Cell Respiration" (Douce, R. and Day., D.A., eds.) 72. Springer-Verlag, Berlin.
- Ducet, G. and M. Diano (1978) On the dissociation of the cytochrome *b-c₁* of potato mitochondria. *Plant Sci. Lett.* 11: 217-226.
- French, C.S., Brown, J.S. and Lawrence, M.C. 1972. Four universal forms of chlorophyll *a*. *Plant Physiol.* 49: 421-429.
- 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.
- Kusel, J.P. and Storey, B.T. 1973. Low-temperature spectral properties of the respiratory chain cytochromes of mitochondria from *Crithidia fasciculata*. *Biochim. Biophys. Acta* 305: 570-580.
- Lance, C. and Bonner, W.D., Jr. 1968. The respiratory chain components of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* 43: 756-766.
- Lowry, O.H., Rosebrough, O.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 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.
- Shibasaka, M., Tanaka, A. and Tsuji, H. 1993. Changes in spectral properties of chlorophyll during greening of barley leaves. *Photochem. Photobiol.* 58: 431-436.
- Taylor, D.L. 1942. Influence of oxygen tension on respiration, fermentation, and growth in wheat and rice. *Amer. J. Bot.* 29: 721-738.
- Vartapetian, B.B., Andreeva, I.N. and Nuritdinov, N. 1978. Plant cells under oxygen stress. *In* "Plant Life in Anaerobic Environments" (Hook, D.D. and Crawford, R.M.M., eds.) 13-88. Ann Arbor Science, Michigan.
- 山中 健生. 1973. チトクロム概説. (奥貫一男教授退官記念会編), チトクロムの研究. 3-19. 東京大学出版会, 東京.