

## イネ（コメ）の低分子タンパク質抽出と分離

續 順子\*・大土早紀子\*・中島けい子\*

Extraction and Separation of Small Proteins from Rice Seed

Junko TSUDZUKI, Sakiko OHTSUCHI and Keiko NAKASHIMA

植物ゲノムには20個程度のアミノ酸からなる低分子タンパク質をコードする遺伝子の存在が知られているが、最近、葉緑体ゲノムの ORF29が光合成電子伝達系の主要なサブユニットの遺伝子であることが明らかになる<sup>1)</sup>など、低分子タンパク質の生物学的機能についての研究からその分離、精製の必要性が高まっている。しかし低分子タンパク質の分離には2次元電気泳動法は不十分であり、他の低分子タンパク質の分離・精製法の活用が必要であるが、その方法は確立されていない。そこで本研究では、低分子タンパク質の分離・精製法の検討を行った。

ここで試料としたイネ (*Oryza sativa* L. cv. *Nipponbare*) は、わが国をはじめ世界各国で主食あるいは副食として広く利用されている重要な穀物である。その食料としての重要性および生産に関わる農学的・生物学的な価値から、多くの研究が行われ、高度な栽培技術の開発や品種改良に生かされ、単子葉植物のモデル植物として全塩基配列が決定されている<sup>2)</sup>。

イネの低分子タンパク質については未解明なところが多い。しかし種子の胚乳および糊粉層のプロテインボディには、貯蔵タンパク質や酵素などの高分子量タンパク質が存在し<sup>3,4)</sup>、これらは発芽時にプロテアーゼの消化作用を受けて低分子化され、生長する芽に運ばれて胚芽由来の地上部である苗条に移動することが知られている。

それゆえ、種子（粃）及び発芽後の苗条の低分子タンパク質が分離・精製されれば、そのアミノ酸配列を解析することで由来する遺伝子の同定も可能となる。

### 試料および実験方法

#### 1. 試料

イネ (*Oryza sativa* L. cv. *Nipponbare*)

---

\* 生活科学部 食品栄養学科

## 2. 実験方法

### (1) 試料調製

#### 1) 種子脱脂粉末

籾あるいは籾殻を剥皮した玄米を試料とした。粉碎機 (SIBATA PERSONAL MILL SCM-40A, 柴田科学機械工業(株)) を用いて凍結粉碎した。さらに、この種子粉末をジエチルエーテルで65℃、15時間脂質抽出を行い、脱脂粉末とした。

#### 2) イネの栽培法および苗条粉末試料の調製

イネ種子を次亜塩素酸ナトリウム水溶液中に30分間浸漬し、滅菌処理を行なった後、流水洗浄し、 $30 \pm 2$ ℃、暗所2日間栽培し、暗発芽させた後に明条件 (3,000 lux) に移し、栽培開始日を0日目として苗条の伸長測定を行なった。得られた生長曲線から、全長が約1cmとなる6日目の若芽、対数生長期にあり約4cmとなる9日目、約7cmとなる14日目のイネを、それぞれ経日試料とした。

各時期に採取した苗条は、種子と根を取り除き、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、使用時に乳鉢で凍結粉碎し、苗条粉末とした。

### (2) 全タンパク質の抽出・定量

種子脱脂粉末または苗条粉末をTCA処理し、NaOH抽出したタンパク質をLowry法<sup>5)</sup>で定量した。

### (3) 低分子タンパク質の抽出・定量

脱脂種子粉末または苗条粉末に5倍容の氷冷した抽出用緩衝液 (0.1Mリン酸緩衝液、5mM EDTA pH 7.4) を加え、ホモブレンド (HF93エムエステー(株)) を用いて、氷中でホモジェナイズ (1,000 rpm, 30 sec.) し、20分間静置した。このホモジェネートを冷却遠心 (15,900 rpm, 20 min.) し、その上澄を粗低分子タンパク質抽出液とし、Lowry法で定量した。

### (4) 硫安分画

上述の粗低分子タンパク質粗抽出液について硫安分画を行った。

得られた各硫安分画の沈殿を1N NaOHに溶解し、280 nmの吸光度を測定して、タンパク量を算出した。

### (5) ゲルろ過クロマトグラフィー

硫安分画で得られた各分画の沈殿を、緩衝液 (0.1Mリン酸緩衝液、0.5M塩化ナトリウム、0.05M EDTA pH 7.4) に懸濁し、これをSephadex G-50カラム (2×65cm) に吸着させ、流速0.5 ml/min. で溶出し、各フラクションを2 mlで分画し、280 nmの吸光度を測定した。検出された各ピーク分画を凍結乾燥した。

### (6) 逆相高速液体クロマトグラフィー (逆相 HPLC)

高速液体クロマトグラフィーシステムは、HITACHI 7000シリーズ (日立製作所(株)) を使用した。カラムオーブンはL-7100、分析用ポンプはD-7100、紫外-可視検出器は

## イネ（コメ）の低分子タンパク質抽出と分離

L-7420を用い、検出は280 nmで行った。カラムはODS系 Inertsil C18 (5 $\mu$ m、0.5 $\times$ 250 mm I.D.、GL Science (株)) およびガードカラム (4 $\times$ 10 mm I.D.、GL Science (株)) を使用した。

ゲルろ過クロマトグラフィーで確認されたピーク画分の凍結乾燥粉末に少量の0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) を加え懸濁し、その遠心 (15,000 rpm、20 min.) 上澄を試料溶液とした。0.1% TFA (溶離液 A) で平衡化したカラムに、送液条件を20 $^{\circ}$ C、流速 1 ml/min. とし、試料を吸着させた。溶離条件は、60% アセトニトリル /0.1% TFA を溶離液 B とし、はじめの10分間を A (%) : B (%) = 90 : 10、10~60分間を A (%) : B (%) = 0 : 100の直線濃度勾配とし、60分間溶離した。

### (7) 分子量の測定

Laemmli<sup>6)</sup>によって示された SDS 変性ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) で分子量の測定を行った。

試料に等量の試料緩衝液 (1.0M トリス-塩酸緩衝液 pH 6.8、グリセロール 1ml、 $\beta$ -メルカプトエタノール 0.6 ml、10% SDS 2 ml、ブROMフェノールブルー (BPB)) を添加し、一夜 4 $^{\circ}$ C で反応させ泳動試料とした。濃縮ゲル 4%、分離ゲル 20% とし、定電流 20 mA で約 1 時間、40 mA で約 1.5 時間泳動した後、クーマシーブリリアントブルー (CBB) あるいは銀染色キットワコー II (和光純薬工業(株)) を用いて染色し、同時に泳動したタンパク質分子量マーカー II (テフコ(株)) のバンドを基準として、検出されたバンドの分子量を推定した。

## 結果及び考察

### 1 種子

#### 1) 低分子タンパク質の抽出方法の検討

低分子タンパク質抽出方法については文献も少なく確立した方法が見当たらない。イネおよびコメの低分子タンパク質抽出は行われていない。しかし、カボチャ (*Curcubita maxima*) 種子<sup>7)</sup>、ヘチマ (*Luffa cylindrica*) 種子<sup>8)</sup>、白辛子 (*Brasica napus L.*) 種子<sup>9, 10)</sup>、カカオ (*Viscum album L.*) 種子<sup>11)</sup> やトウゴマ (*Ricinus communis*) 種子<sup>12)</sup>、トマト (*Lycopersicon esculentum*) の葉<sup>13)</sup> などを試料とした低分子タンパク質の分離、精製についての報告はある。そのうち、G. H. Naisbitt らが 5,490D の低分子タンパク質の分離に成功しているカボチャ種子の方法<sup>7)</sup> に準じてイネおよびコメの低分子タンパク質の分離・精製を試みた。

まず、各種粉砕機による粃の粉末化および均質化を試みた。粃は剥離した粃殻が軽いため均質化され難く、機器により差があった。一方、粃殻を剥皮する際に糊粉層に損失が生じている可能性が考えられることから、粃と粃殻を剥皮した玄米、各々の粉末を調製し、粗抽出を試みた。

G. H. Naisbitt らの抽出用緩衝液 (0.1M リン酸緩衝液、0.05M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、0.5% フェニルメタンсульフォニルフルオリド (PMSF)、0.2% Nonidet P-40 pH 7.4) により、遠心上澄に得られた低分子タンパク質抽出液は、表面に脂質膜が生じた。粉末試料調製過程で、この脂質のジエチルエーテル抽出を行い脱脂種子粉末を出発試

料とすることにした。また、この粗抽出した低分子タンパク質を硫酸分画する過程で、遠心上澄表面に白膜が生じた。これは、セリンプロテアーゼ阻害剤 PMSF を溶解するために界面活性剤として加えられた 0.2% Nonidet P-40 によるものと判断されたので、PMSF を加えない抽出緩衝液を用いた。この方法で低分子タンパク質の抽出が可能かどうかを判定するために SDS-PAGE を行ったところ、低分子領域 (3.5~6.5KD) にバンドが確認され、抽出可能であると判断された。

粗抽出液のタンパク質は、全タンパク質量の 30mg/g に比べ 18mg/g と有意に低い値を示したが、粳と玄米では有意差はなかった (Fig. 1)。

また、粳および玄米から抽出された粗抽出液の電気泳動結果において低分子領域 (3.5~6.5KD) にバンドが確認されたことから、いずれの場合も低分子タンパク質がこの方法で抽出されると判断された。さらに、粳と玄米で泳動パターンに差が見られないことから、粳から種皮を除去する操作による低分子タンパク質の損失はないものと判断された。

## 2) 硫酸分画による分離

上記低分子タンパク質粗抽出液を試料溶液として、硫酸分画を行った。各画分のタンパク質量は、40%飽和画分で最も多く約 14mg/画分であった。濃度が 50%、60%と上がるに従い減少し、90%、100%ではほぼ一定となった (Fig. 2)。この 30~100%画分の電気泳動パターンから、80~100%の画分に低分子領域のバンドが検出された。中でも 100%の画分は低分子領域のバンドが顕著に存在した。高分子量タンパク質は硫酸濃度が上がるに従い沈殿し、上澄から消失するが、低分子タンパク質は沈殿せずに、上澄に残存しているものと判断された (Fig. 3)。

80%飽和以上で低分子タンパク質も沈殿しはじめ、硫酸分画による低分子タンパク質の分離は可能であることが示唆された。さらに各硫酸濃度における遠心上澄のうち、100%飽和後の上澄にはバンドが検出されなかったことから、低分子タンパク質も 100%飽和までですべて回収できるものと判断された。

また、粳と玄米の泳動パターンに差異が認められなかったことから、粳を試料とすることにした (Fig. 3)。

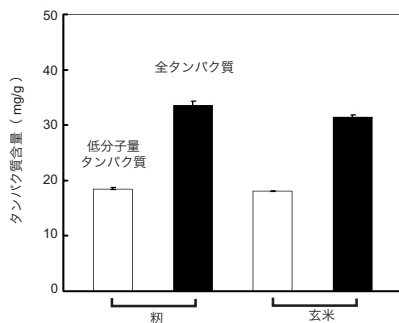


Fig. 1 粳および玄米の低分子タンパク質含量と全タンパク質含量の比較

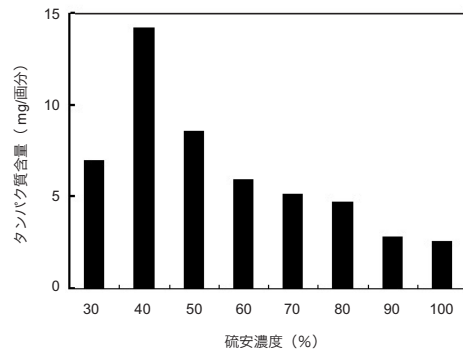


Fig. 2 粗抽出液の硫酸分画ごとのタンパク質含量

## イネ（コメ）の低分子タンパク質抽出と分離

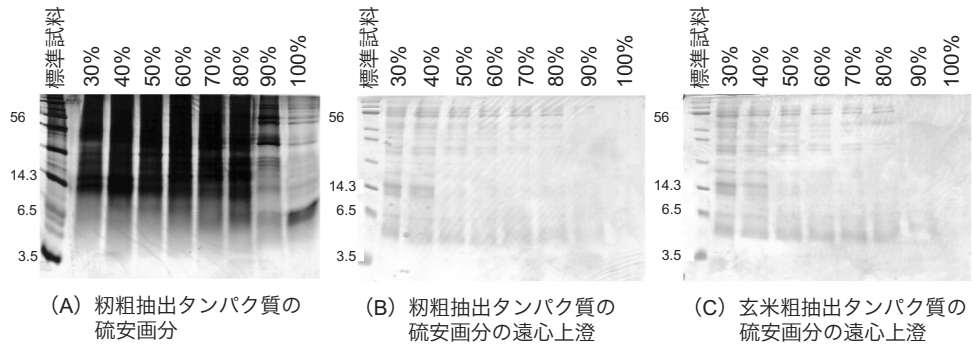


Fig. 3 硫安画分ごとの SDS-PAGE パターン比較  
標準試料脇の数値は kD、各列に硫安濃度を示している。

### 3) ゲルろ過クロマトグラフィーによる分離・精製

各飽和硫安画分のゲルろ過クロマトグラフィーを行い、低分子タンパク質の分離を試みることにした。

G. H. Naisbitt らの方法<sup>7)</sup>に従って、 $2 \times 65$  cm カラムに Sephadex G-50ゲル充填し、低温条件でゲルろ過クロマトグラフィーを行なったが、使用する緩衝液に結晶が生じたので、G. H. Naisbitt らの懸濁用緩衝液をもとに緩衝液の検討を行い、懸濁用緩衝液の組成を 0.5M 塩化ナトリウム、0.1M リン酸緩衝液、5mM EDTA pH 7.4 とした。

各硫安画分のゲルろ過クロマトグラムで検出されたピークのうち、フラクション 35～40 番をピーク Ia、60%以上の画分の 40～60 番を Ib、同じく 60%以上の 60～80 番を Ic、30～50%の 40～70 番を II、全ての濃度でピークを検出された 90～130 番を III とした。ピーク Ia、ピーク II およびピーク III は 30%画分で最も高い値となり、以降減少傾向となった (Fig. 4)。

上述のように、40%硫安画分のタンパク質含量が最も高かったが、この画分においてピーク Ia として検出されたフラクション数は 30～100% 中もっとも多かったことから、40%画分の各ピークの分子量を SDS-PAGE で確認したところ、ピーク Ia には高分子のバンドのみが検出され、ピーク II および III にも、低分子領域のバンドは見られなかった。このことから、ピーク Ia は高分子量タンパク質を含む画分であるとともに、40%画分にはこの高分子量タンパク質が多く、低分子タンパク質は含まれていないことが確認された。ピーク Ib および Ic は、60%以上の画分のクロマトグラムで検出され、硫安濃度が上がるに従い高くなる傾向が認められた。検出された各ピークの電気泳動パターンのうち、80～100%硫安画分のピーク Ic に低分子領域のバンドが検出された。これは、低分子領域にバンドが確認された飽和硫安画分の電気泳動結果 (Fig. 3) とよく一致した。80%画分のピーク Ic に検出されたシャープなバンドの分子量は約 6 kD であった。90%画分のピーク Ic の電気泳動パターンはダブルバンドで、それぞれ約 5 kD、100%のバンドは幅が広いが、約 5 kD であった (Fig. 5)。

以上のように、低分子タンパク質は、低分子タンパク質粗抽出液の 80～100%飽和硫安画分から分離することができることが示唆された。また、90%画分のピーク Ic がダブル

バンド、100%画分は幅の広いバンドであったことから、これらのバンドには、複数の低分子タンパク質が含まれていると推定された。

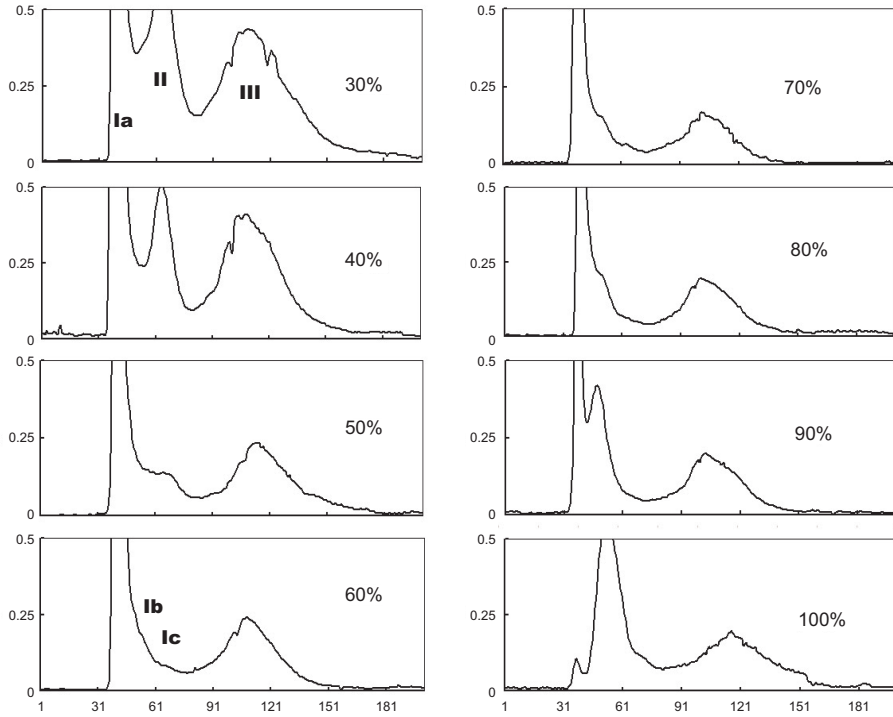


Fig. 4 粗抽出タンパク質の硫黄画分ごとの Sephadex G-50 溶出パターン  
縦軸は吸光度 (280nm)、横軸はフラクション番号

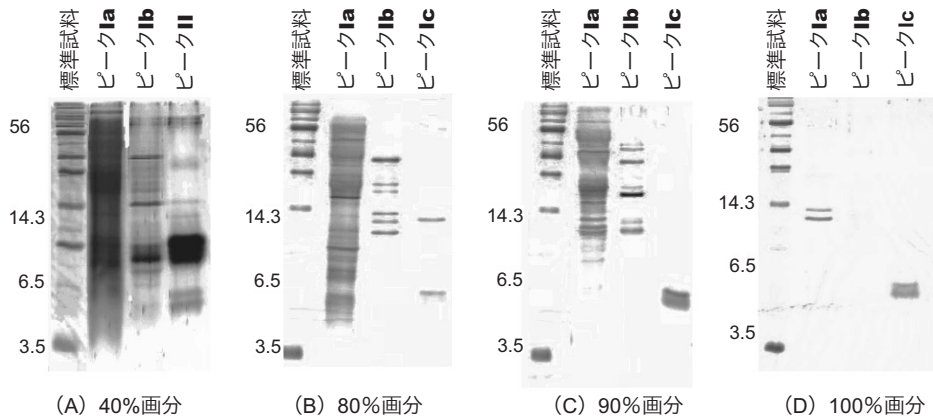


Fig. 5 各硫黄画分のピーク I を中心とした画分の SDS-PAGE パターン比較

## イネ（コメ）の低分子タンパク質抽出と分離

### 4) 逆相 HPLC による分離

80~100%画分のゲルろ過クロマトグラムのピーク Ic に、低分子タンパク質のバンドが検出されたことから、このピーク Ic 画分に含まれる低分子タンパク質のさらなる分離を目的として、逆相 HPLC を行った。

80%硫酸画分のクロマトグラムでは、濃度勾配開始24分後から、小さなピークが見られた。90%硫酸画分では、明確なピークが17分後と19分後に検出された。また80%画分で検出されたものと相同性のあるピークも検出された。100%硫酸画分では、17分後にピークが検出されたが、80および90%画分と相同性のあるピークは検出されなかった (Fig. 6)。

種子の80~100%硫酸画分、特に90~100%硫酸画分から、それぞれ約5 kD の数種の低分子タンパク質が分離できることが示された。

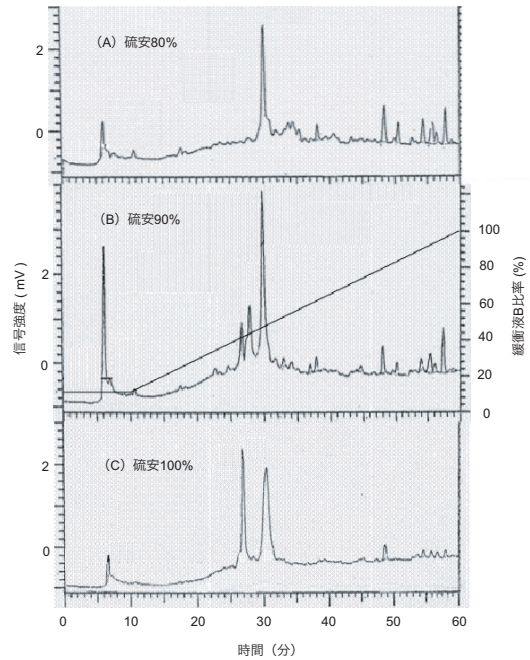


Fig. 6 逆相 HPLC による Sephadex G-50 ピーク Ic 画分の溶出パターン比較  
溶出塩濃度の変化は、(B)で示した。

## 2 苗条

### 1) 生長曲線

実験方法に示したように、種子を  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  で暗発芽させ、明所 (3000 lux) で培養した。暗発芽させた苗条は、3日目までほとんど伸長しなかったが、以降は対数伸長期を経て25日目には定常状態になり、通常の生長パターンを示した (Fig. 7)。

### 2) 低分子タンパク質の抽出・定量

籾の低分子タンパク質の抽出方法に従って6日、9日、14日の苗条の低分子タンパク質を抽出した。

全タンパク質は生長とともに増加するが、低分子タンパク質粗抽出液のタンパク質量は16mg/g とほぼ一定で、この生長の時期による有意な差は認められなかった。また、いずれの時期にも、全タンパク質量に比べて低い値となった

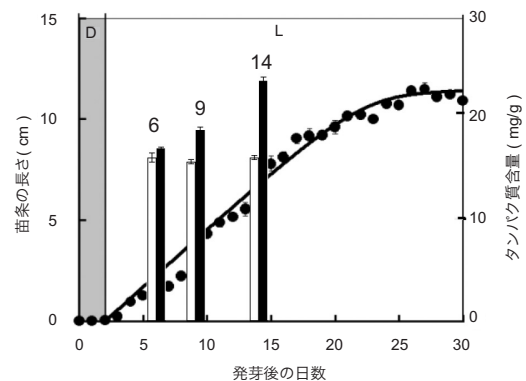


Fig. 7 イネ苗条の生長曲線 (左側目盛) と発芽6, 9, 14日での低分子タンパク質量 (白抜き) および全タンパク質量 (黒塗り) (右側目盛) の比較

(Fig. 7)。苗条の低分子タンパク質量は発芽後14日までの期間中、ほぼ一定を保っている  
と推定された。

### 3) 硫安分画による分離

種子において、硫安分画による低分子タンパク質の分離が可能であったことから、同一  
の方法により苗条の低分子タンパク質の抽出・分離を試みた。

各画分のタンパク質量測定の結果は、6, 9, 14日目のいずれの時点においても40%画  
分で急激に増加し、更に50%画分で最も多量のタンパク質が沈殿した (Fig. 8)。粉とは異

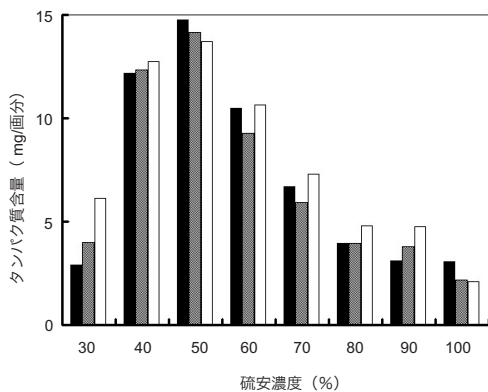


Fig. 8 発芽6日 (黒) 9日 (灰) 14日 (白)  
イネ苗条の粗抽出液の硫安分画ごとの  
タンパク質量

なるパターンを示し、粗低分子タンパク  
質抽出液中に高分子量タンパク質がより  
多く残存しているものと推定される。こ  
の測定試料の電気泳動結果、6日目、9  
日目、14日目、いずれの培養日数にお  
いても、50~100%画分のいずれにも低  
分子領域にバンドが検出された。中  
でも、100%画分は高分子領域のバンドが  
ほとんど見られず、低分子領域のバンド  
が顕著に存在することが確認された  
(Fig. 9)。

3時点の結果に差が見られなかったこ  
とから、以降の実験は栽培あたりの試料  
回収量をもっとも多い14日目を苗条試  
料とした。

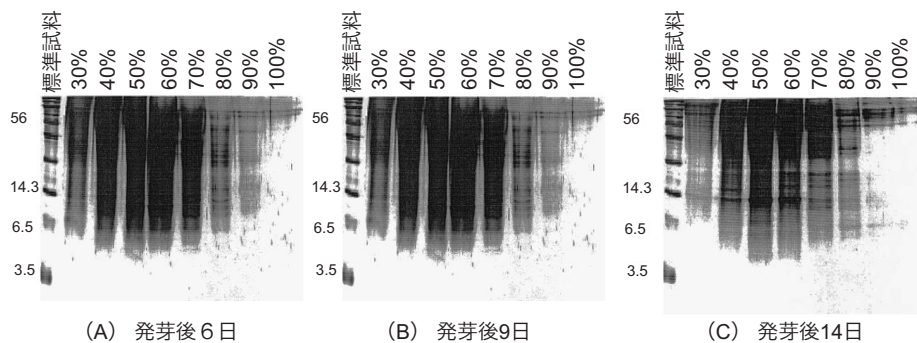


Fig. 9 発芽6日, 9日, 14日イネ苗条の硫安分画ごとの SDS-PAGE パタン比較

### 4) ゲルろ過クロマトグラフィー

各硫安分画のゲルろ過クロマトグラムを行い、検出されたピークのうち、フラクション  
35~40番をピーク Ia、40~90%画分の41~55番を Ib、90%画分の60~80番を Ic、30~  
100%画分の95~105番を IIa、50~100%画分の106~127番を IIb、130~140番を IIc、そ  
して30~100%画分の170~210番を III とした (Fig. 10)。



イネ（コメ）の低分子タンパク質抽出と分離

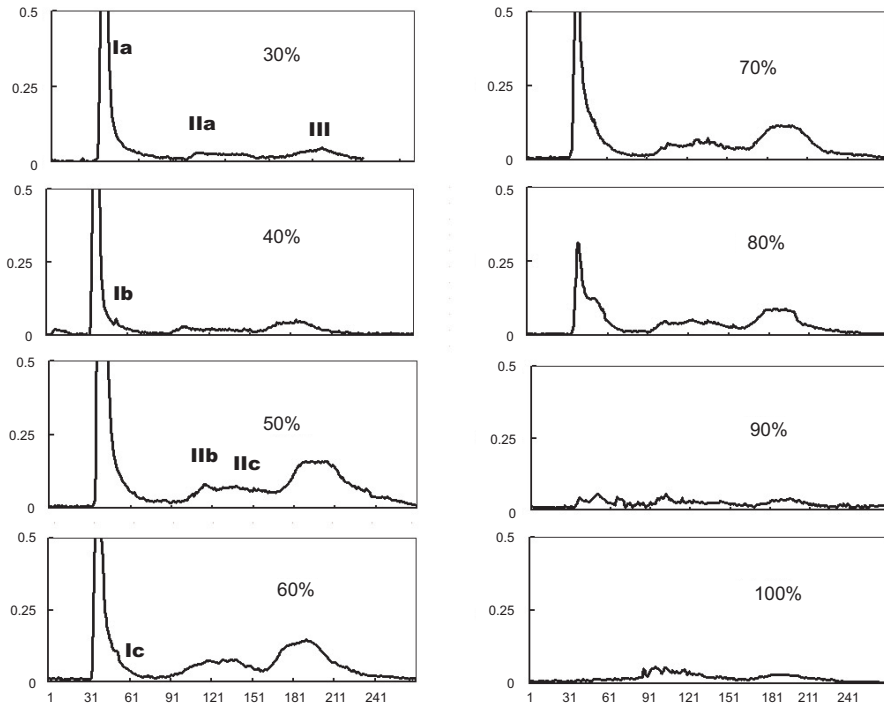


Fig. 10 発芽14日イネ苗条の硫安画分ごとの Sphadex G-50 溶出パターン  
縦軸は吸光度 (280nm)、横軸はフラクション番号

ピーク Ia、ピーク IIb およびピーク III は50%画分で最も高い値となり、硫安濃度が上がるに従い、減少傾向にあった。ピーク Ib とピーク IIc は80%画分で最も高くなった。

タンパク質濃度が最も高い50%画分は、ピーク Ia も吸光度が最も高く、30~100%画分中でフラクション本数が最も多かった。それゆえ、50%画分のタンパク質量が最も多かったのは、このピーク Ia 由来のタンパク質によると判断された。

各ピークの分子量を電気泳動法により確認した。50%画分のピーク Ia では高分子領域に加え、低分子領域にもバンドが検出された。このことから、50%画分のピーク Ia には、低分子タンパク質と高分子タンパク質が混在していることが確認され、分離不十分と判断された。80%画分の最も高いピーク Ib の、電気泳動法によって低分子領域に検出されたバンドは、約 6 KD と 4.5KD であった。しかし低分子領域以外に高分子領域にもバンド

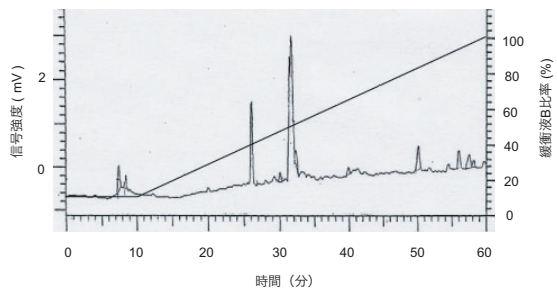


Fig. 11 発芽14日イネ苗条の硫安画分の Sphadex G-50 ピーク I 群あるいはピーク II 群についての SDS-PAGE パターン比較

が検出され、50%画分同様低分子タンパク質と高分子量タンパク質が混在している。90%画分のピーク Ia、100%画分のピーク IIa から検出されたバンドはそれぞれ約 4 KD であった (Fig. 11)。

以上の結果から、苗条の低分子タンパク質は、硫酸分画では分離され難いと判断された。

### 5) 逆相 HPLC による分離

低分子領域のみのバンドが検出された90%硫酸画分のゲルろ過クロマトグラムピーク Ia と100%画分のピーク IIa について、逆相 HPLC によるさらなる分離を行った。50%画分のピーク Ia の HPLC では、濃度勾配開始15分間に高いピークが検出され、34分から37分間にわたって、分離度の低いピークが検出された。80%画分のピーク Ia は、分離が悪く、シャープなピークは得られなかった。90%画分のピーク Ia からは、ピークが検出されなかった。100%画分のピーク IIa では、濃度勾配開始から16分後にピークが検出された (Fig. 12)。

以上の結果から、苗条では100%硫酸画分では分離が良好であったが、その他の画分では良好な結果が得られず、更なる方法の検討が必要と判断された。

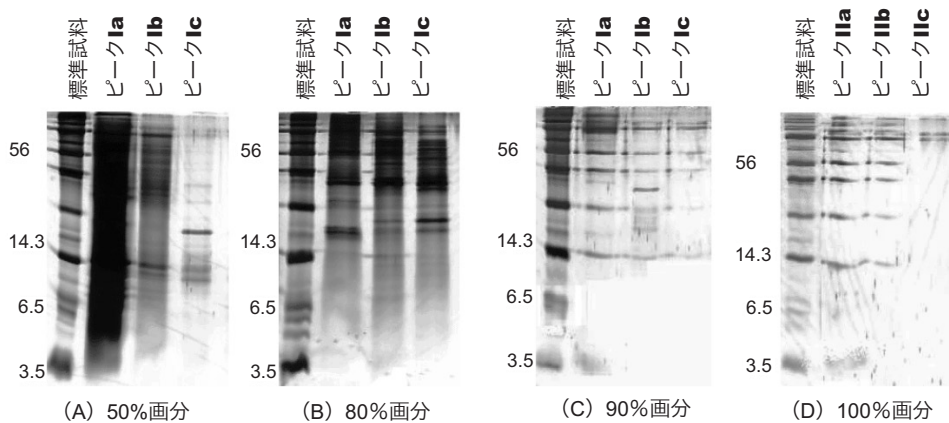


Fig. 12 逆相 HPLC による発芽14日イネ苗条100%硫酸画分の Sephadex G-50 ピーク IIa の溶出パターン

### まとめ

1. イネ種子 (粳) の粗抽出遠心上澄の電気泳動パターンの低分子領域 (3.5~6.5KD) にバンドが確認された。
2. 硫酸画分のタンパク質量測定の結果、タンパク質は40%飽和画分に最も多く画分されているが、各硫酸画分の電気泳動の結果から低分子領域のバンドが検出されたのは、80~100%の画分、中でも100%の画分は、高分子領域のバンドは消失し、低分子領域のバンドが顕著に存在することが確認された。また一方、100%飽和までの硫酸分画で

## イネ（コメ）の低分子タンパク質抽出と分離

低分子タンパク質はすべて回収される。

3. 硫安画分のゲルろ過クロマトグラフィーの結果及び検出された各ピークの電気泳動結果から、約5～6 kDの低分子タンパク質の存在が認められ、低分子タンパク質は80～100%硫安画分から分離可能と判断された。
4. ゲルろ過クロマトグラフィーで得られた複数の低分子タンパク質を分離するために行った逆相HPLCでは、種子の80～100%硫安画分、とくに90～100%硫安画分から、それぞれ約5 kDの低分子タンパク質が分離された。
5. 粳と同様、苗条についても分離を試みたが、良好な結果は得られなかった。
6. イネ種子の低分子タンパク質はG. H. Naisbittの方法を改良すれば、分離可能と判断されたが、苗条の低分子タンパク質は分離され難いため、さらに他の方法も検討する必要がある。

## 引用文献

- 1) M. Hager, K. Biehler, J. Illerhause, S. Ruf and R. Bock, *EMBO J.* 18(21), (1999)
- 2) J. Yu, S. Hu and J. Wang, *et.al.*, *Science* 296(5565), (2002)
- 3) G. B. Cagampang, L. J. Cruz, S. G. Espiritu, R. G. Santiago and B. O. Juliano, *Cereal Chem.*, 43, (1966)
- 4) Y. Morita and C. Yoshida, *Agric. Biol. Chem.*, 5, (1968)
- 5) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrought, A. L. Farr and R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, 193, (1951)
- 6) U. K. Laemmli, *Nature* 277, (1970)
- 7) G. H. Naisbitt, M-R. Lu, W. R. Gray and L. P. Vernon, *Plant Physiol.*, 88, (1988)
- 8) H. Ishihara, T. Sasagawa, R. Sasaki, M. Nishikawa, M. Kimura and G. Funatsu, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 11, (1977)
- 9) P. Ascenzi, M. Ruoppolo and A. Amoresan, *et.al.*, *Eur.J.Biochem.*, 261, (1999)
- 10) M. Ruoppolo, A. Amoresan, P. Pucci, F. Polticelli, M. Trovato, E. Menegatti and P. Ascenzi, *Eur. J. Biochem.*, 267, (2000)
- 11) J. Konopa, J. M. Woynaorowski and M. Lewandowska-Gumieniak, *Physiol. Chem.*, 361, (1980)
- 12) S. L. Steven, T. S. Thomas, L. Lin and M. Diameforde, *Biochemica et Biophysica Acta*, 492, (1977)
- 13) T. R. Green and C. A. Ryan, *Science*, 253, (1972)