

氏 名 (本籍) か とう よう じ
加 藤 陽 治

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 博 第 2 1 8 号

学位授与年月日 昭和 5 3 年 3 月 2 4 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院農学研究科
(博士課程) 農芸化学専攻

学位論文題目 STUDIES ON THE STRUCTURE
AND FUNCTIONAL ROLE OF
XYLOGLUCAN IN IMMATURE
LEGUMINOSAE

(豆科幼植物細胞壁中のキシログルカンの構造と機能的役割に関する研究)

論文審査委員 (主 査)

教授 松 田 和 雄 教授 志 村 憲 助

教授 大 平 幸 次

論文内容要旨

緒論

高等植物の細胞壁は、細胞が若く生長過程にあるものでは、主としてセルロース、ヘミセルロース、ペクチン様物質から成る一次壁のみで、構成されている。植物細胞の伸長は、これら壁成分の構造変化による壁の力学的性質の変化（壁のゆるみ）によって生ずると考えられている。

しかし、今日まで、生長細胞壁について特にヘミセルロースの種類や分布の普遍性については十分に調べられていない。その為、どのような多糖がどのような変化を受けて壁のゆるみに関与するのか、明確な結論は得られていない。その中で、増田らは、アベナ子葉鞘のオーキシン誘導による伸長生長は、ヘミセルロース性 β -グルカンの β -1,3-グルカナーゼでの水解により引きおこされることを報告している。豆科幼植物に関しては、未だ一貫した研究が進められていないが、生長初期に多量のグルコースが非セルロース性多糖画分の構成糖として存在することが知られている。

一方、Albersheim らは、細胞伸長の解明を目的として一次壁構造の解析を各種培養細胞を使用して試み、単子葉植物のヘミセルロースはアラビノキシランで、双子葉植物のそれは、キシログルカンであること、また直鎖状 β -1,3: β -1,4-グルカンは、rye grass にのみしか認められずこの種の多糖は、貯蔵性多糖であろうということを報告している。

これらの事実から豆科幼植物の非セルロース性多糖画分に認められるグルコースがどのような多糖に由来するのかを明らかにすることは、植物種間で、また幼植物と培養細胞間で非セルロース性グルカンに違いがあるか否かを解明するのみならず植物細胞伸長の機構解明の上からも意義のあることと考えられる。

そこで本研究では、上記グルコースの由来する多糖の種類、構造及び普遍性を明らかにすることを第一目的とした。その結果この多糖は、キシログルカンの一種で、その構造は、培養細胞のそれと同じく、フコースを構成糖として含み、従来から貯蔵性多糖として知られている種子キシログルカン（アミロイド）とは異なることが明確にされた。次に、このような構造上の違いが、これらキシログルカンの機能性の違いを反映しているのか否か、更に本多糖が豆科幼植物伸長時に壁のゆるみに関与するのか否かを解明することを本研究の第二目的とした。

第1章 豆科幼植物細胞壁中の非セルロース性 β -グルカンについて

第1節 緑豆暗発芽下胚軸細胞壁中のキシログルカンの存在

豆科幼植物細胞壁中の非セルロース性 β -グルカンの種類を明らかにする目的で緑豆 (*mung bean*, *Phaseolus aureus*) 暗発芽下胚軸を用いて研究を行った。

緑豆暗発芽下胚軸切片をFig 1, 2に示すような一連の分画操作を行い、多量のグルコースを含む画分 (HC-11B-IP) を得、更にDEAE-Sephadex A-25 column chromatography により精製した。このものは、電気泳動、超遠心による分析結果から均一標品であることが確認された。この多糖はグルコース (10モル)、キシロース (7)、ガラクトース (2.5) とフコース (1) から成りヨードと特異的な呈色反応をしめた。酸部分水解、セルラーゼ水解の結果は、本多糖がセルロース様 β -1,4-グルカンを主鎖としてこれにキシロース、ガラクトース及びフコースが密に結合した構造をもつことを示唆した。

これらの結果から本多糖はキシログルカンの一種であることが確認された。

第2節 大豆及びさげ豆暗発芽下胚軸細胞壁からキシログルカンの分離

緑豆の場合とほぼ同様な方法で大豆、さげ豆暗発芽下胚軸細胞壁よりキシログルカンを分離することがで

きた。それらの主な性質は、緑豆のそれと類似していた (Table 1)。

次に緑豆、大豆、及びささげ豆からのキシログルカンの基本構造を比較する目的で、セルラーゼによる fragmentation analysis を行った。その結果、三者ともグルコース、キシロース、ガラクトース及びフコースから成るオリゴ糖(H-OS-I)とグルコースとキシロースから成るオリゴ糖(H-OS-II)を repeating oligosaccharide units として有することが確認された。また H-OS-I と -II の比は三者ではほぼ同じ(緑豆=62:38、大豆68:32、ささげ豆=65:35)であり、これらキシログルカンの基本構造の類似性が示唆された。

第II章 緑豆暗発芽下胚軸細胞壁から得られたキシログルカンの構造について

種子キシログルカン(アミロイド)、培養細胞キシログルカンと構造を比較する目的で緑豆暗発芽下胚軸細胞壁キシログルカン(MBXG)の構造解析を種々の fragmentation method を用いて行った。

Fig. 3 は、fragmentation method 及びそれによって得られたオリゴ糖の構造をまとめたものである。

- (1) 酸部分水解物より主要オリゴ糖として cellobiose (OS-I), cellotriose (OS-II), cellotetraose (OS-III) が得られた。このことは MBXG の主鎖がセルロース様 β -1, 4-グルカンであることを示す。
- (2) MBXG の A. oryzae 酵素標品加水分解物より主要オリゴ糖として OS-X 及び OS-Y を得た。OS-Y は種々の方法により isoprimeverose (6-O- α -D-Xylopyranosyl-D-glucose) と同定された。このことは、MBXG においてキシロース残基の大部分が、セルロース様 β -1, 4-グルカン主鎖のグルコース残基 C-6 の位置に α 結合していることを示す。OS-X は加酢分解及び酸部分水解により、Fig-3 に示すようなオリゴ糖 OS-XI, -XII a, -XII b 及び -XIII を与えることから、L-fucosyl-D-galactose-(1 \rightarrow 2)- α -D-Xylose-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucose (1 \rightarrow 4)-D-glucose であると推定された。このことは MBXG において、フコース及びガラクトース残基の大部分が fucosylgalactose としてキシロース残基 C-2 の位置に結合していることを示す。
- (3) MBXG の T. vivide セルラーゼ加水分解物より主要オリゴ糖として H-OS-I a, -I b 及び -II の三成分が得られた。これら三つのオリゴ糖の構造は、構成糖比、重合度及び A. oryzae 酵素標品から部分精製した β -グルコシダーゼ II で処理して得られるオリゴ糖の同定の結果と(1)と(2)の結果をもとにして推定された。これら三成分が MBXG の repeating oligosaccharide units であると考え、それらのモル比を求めると 1:4:4 であることから MBXG は Fig. 3 に示すような構造をもつものと推定した。また分子量は、ゲル濾過により約 16 万と推定された。

MBXG の構造を Tamarind アミロイド及び培養細胞キシログルカンと比較すると中間に位置するものであった。

第III章 緑豆植物細胞壁キシログルカンの機能的役割について

第1節 緑豆種子中のキシログルカンの分布

緑豆種子中に貯蔵性キシログルカン(アミロイド)が存在するかどうかを調べた。

緑豆種子を種皮、子葉、胚軸の三部に分け、各々について水(fr. WS), 0.25% シュウ酸アンモニウム酸(fr. PS) 4% KOH (fr. HC-I) 及び 2.4% KOH (fr. HC-II) で順次抽出分画後除澱粉操作を

行い多糖面分を得た。各面分の全糖量及びキシログルカン量、更に構成糖を調べると、いずれの部位でもキシログルカンはHC-II 画分に局在し、WS、PSの両画分にはほとんど存在が認められなかった (Table 2)。また、それぞれの部位のHC-II 画分から得られたキシログルカンは、先に分離された幼植物細胞壁からのキシログルカンと同様フコースを含んでいた。更にキシログルカンは一次壁に富む組織ほど多いことも判った (Table 2)。

これまで知られているアミロイドの大部分は、熱水抽出で得られ、構成糖としてフコースを含んでいない。従って、このような抽出条件及び構成糖の違いから考えると緑豆種子中のキシログルカンは、すべて真の一次壁成分として存在し貯蔵性のものではないと考えられる。

第2節 緑豆暗発芽下胚軸での壁キシログルカンの代謝

緑豆下胚軸の暗下での伸長時に壁キシログルカンが壁のゆるみに関与するか否かについて検討した。

- (1) 緑豆暗発芽下胚軸切片を butter と共に磨砕し、遠心上清画分から butter 可溶性多糖 (BS-PS) を調製した。この BS-PS から、先に分離された MBXG いわゆるヘミセルロースからのキシログルカン (以下 HC-XG とする) と類似性質をもつキシログルカン (BS-XG) を得ることができた。このものの HC-XG との基本構造の類似性は、セルラーゼ fragmentation analysis により明らかとされた。しかし、BS-XG の分子量は約 2 万と HC-XG のそれ (約 16 万) よりかなり低いことが判った。
- (2) 下胚軸中にキシログルカナーゼの存在が確認された。
- (3) 下胚軸切片各部位での HC-XG 及び BS-XG の全糖に対する比を調べたところ胚軸の下部位にいくにしたがいその比が減少することが判った。

これらの結果は、緑豆下胚軸の伸長時に壁キシログルカン (HC-XG) の一部がキシログルカナーゼによって水解され BS-XG を遊離する可能性を示唆していると思われる。

第四章 総合考察

今日まで植物細胞伸長の機構解明の為、壁多糖に多くの注目が払われてきたが、いずれも構成単糖の量的変動の研究が主で多糖レベルで一貫した研究はなされていなかった。

本研究により豆科幼植物細胞壁にフコースを含むキシログルカンの存在が明確にされた。

フコースを含むキシログルカンは、培養細胞からも得られているが、従来のアミロイドと構成糖が異なり、更に抽出条件においても異なっている。これは、単に植物種による違いではなく機能性の違いに起因するものと考えられる。即ちフコースを含むキシログルカンは 4% KOH で安定で 2.4% KOH 抽出操作で不安定な結合で、セルロースと何んらかの結合あるいは、それに複雑に組みこまれており、一次壁成分としての役割をもつものと考えられる。この考えは、本研究の終了と相前後して報告された研究例、即ち、Rape seed 中に水可溶性キシログルカンの他に、アルカリで抽出されるフコースを含むキシログルカンが存在する。また同材料の種皮からアルカリで得られるキシログルカンはフコースを含むという事実によっても支持される。

一方、最近、Labavitch ら及び Jacobs らは、Pea stem 切片のオーキシシンあるいは、低 PH 誘導の伸長時に壁キシログルカンが遊離して可溶性キシログルカンになることを 14 C ラベル実験の結果から明らかにしている。本研究において BS-XG と HC-XG の分子量の間に大きな違いが認められたこと、更にキシログルカナーゼの存在が明確にされたことは、壁キシログルカンの遊離は、その一部がキシログルカナーゼにより分解を受けて BS-XG を生ずることを示唆している。今後このキシログルカナーゼの細胞内分布を調べ

ること、更に、分離精製し性質を検討することが必要であろう。

また、豆科幼植物細胞壁中にフコースが規則性をもって結合しているキシログルカンの存在を明確にしたことは、これまでフコースに特異的に結合するレクチンが豆科植物から得られているが植物体内での生理的役割が不明であることを考えるとこのレクチンとキシログルカン及びキシログルカナーゼの細胞壁伸長時の相互関係なども考えられ今後の研究に期待されるところが大きい。

発表論文

1. Presence of a xyloglucan in the cell wall of Phaseolus aureus hypocotyls. Yoji Kato and Kazuo Matsuda
Plant and Cell Physiol. 17: 1185-1198 (1976)
2. Isolation of xyloglucans from etiolated Glycine max and Vigna sesquipedalis hypocotyls. Yoji Kato, Naohiro Asano and Kazuo Matsuda. *ibid.* 18: 821-829 (1977)
3. Distribution of xyloglucan in Phaseolus aureus seeds. Yoji Kato and Kazuo Matsuda. *ibid.* 18: 1089-1098 (1977)

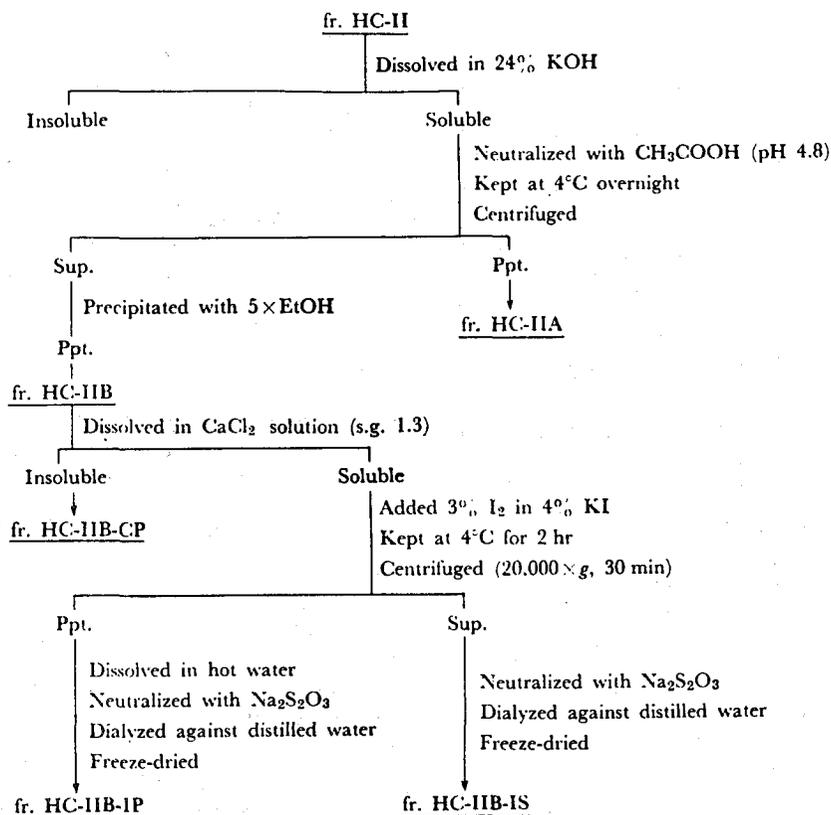


Fig. 2 Flow-chart of fr. HC-II fractionation. The hemicellulose-II fraction could be classified into groups A and B by neutralization followed by precipitation. By the procedure of Gaillard (9), the fr. HC-IIB obtained was divided into three subfractions.

Table 1

	<i>P. aureus</i>	<i>G. max</i>	<i>V. sesquipedalis</i>
Molar ratio of Glu.: Xyl.: Gal.: Fuc.	10:7:2.5:1	10:6:4:1	10:7:3:1
$[\alpha]_D^{20}$	+45°	+46°	+42°
Iodine staining reaction	+	+	+
Rates of hydrolysis by cellulase	17%	15%	13%
Percent of the total non-cellulosic frac- tions	13.9%	14.7%	13.9%

Fig. 3.

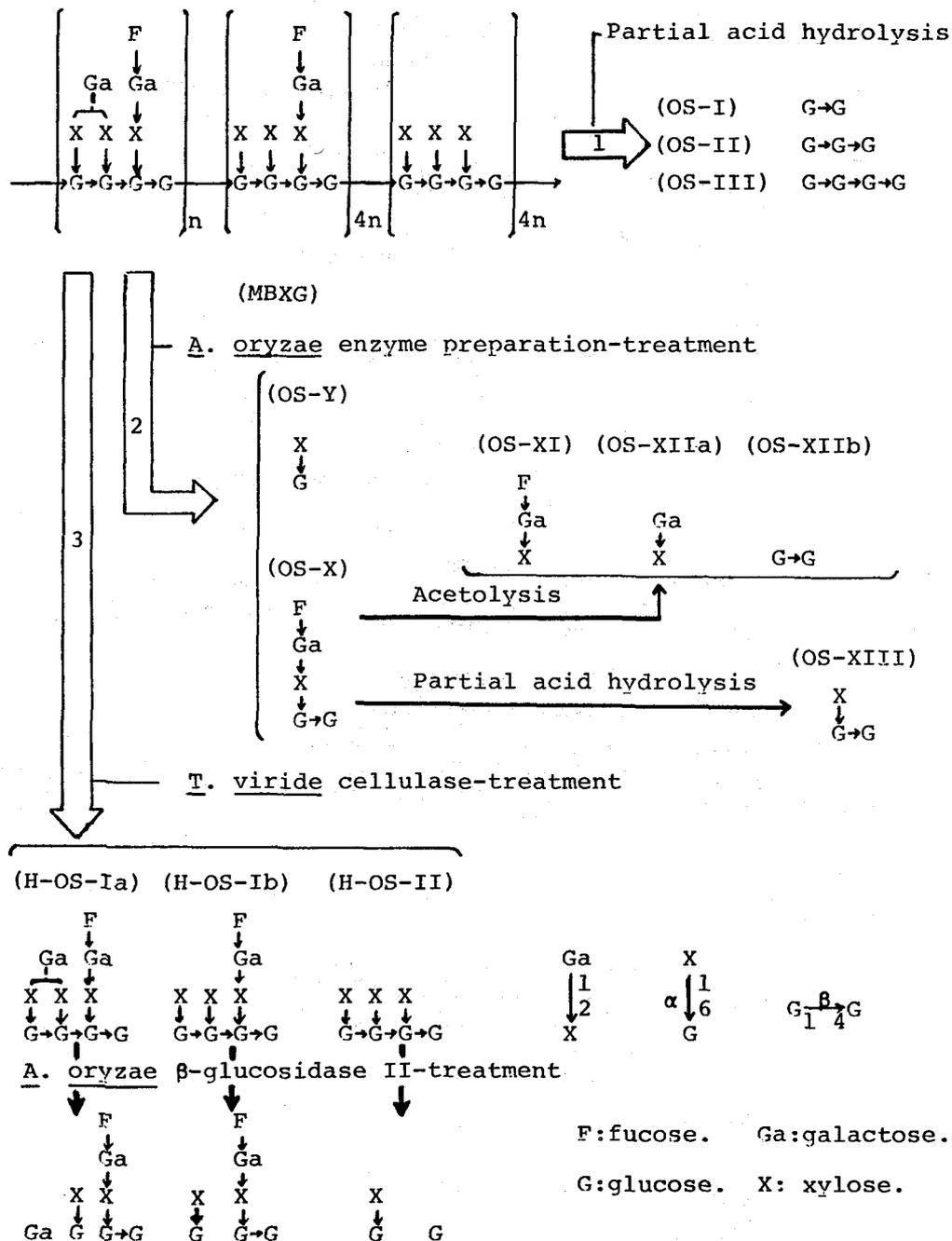


Table 2 *Total sugar and xyloglucan contents in the fractions studied*

Fraction	Total sugar (TS) and xyloglucan (XG) content/1400 seeds (mg)		XG/TS (%)
	TS	XG	
Hypocotyl			
WS	4.6	0.0	
PS	10.4	0.0	
HC-I	22.5	0.2	
HC-II	10.3	5.1	
CL	13.2	—	
Total	61.0	5.3	8.7
Cotyledon			
WS	1360.8	7.9	
PS	3229.3	8.6	
HC-I	1579.1	41.1	
HC-II	403.1	117.4	
CL	629.7	—	
Total	7202.1	175.0	2.4
Hull			
WS	37.8	0.0	
PS	278.8	1.4	
HC-IA	268.9	—	
HC-IB	194.8	1.2	
HC-IIA	932.2	—	
HC-IIB	113.7	21.6	
CL	3074.9	—	
Total	4901.1	24.2	0.5

One thousand four hundred mung bean seeds were separated into hulls, cotyledons and hypocotyls, then the polysaccharides in each part were fractionated by successive extraction. The total sugar content in each part was determined by the phenol-sulfuric acid method and expressed as the glucose polymer equivalent. The xyloglucan content in each fraction was determined by Kooiman's method for the quantitative analysis of amyloid coupled with cellulase treatment: xyloglucan content = $(OD_{640}$ of sample) - $(OD_{640}$ of cellulase-treated sample).

正 誤 表

頁	行	誤	正
2	4-5	oligosaccharideunits	oligosaccharide units
	12	cellebiose	cellobiose
	15	酸素標品	酵素標品
	23	<u>T. vivide</u>	<u>T. viride</u>
	24	酸素標品	酵素標品
	26	oligosaccharideunits	oligosaccharide units
3	11	butter butter	buffer buffer
	32	PH	pH

審査結果の要旨

植物細胞の伸長は細胞壁成分の構造変化による壁のゆるみにより生ずるという説が有力である。この壁のゆるみは壁成分である多糖が部分的に分解を受けるために生ずると推察されている。禾本科植物の子葉鞘においては、壁のゆるみに関与する多糖は $\beta-1, 3$: $\beta-1, 4$ -グルカンであろうと示唆されているが、豆科幼植物についてはこの点に関し十分な知見は得られていない。本論文は豆科幼植物において上記の役割を果たす多糖を検索し、植物細胞の伸長機構における機能を明らかにしようと試みたものである。

著者はまず、緑豆、大豆およびささげの暗発芽下胚軸から細胞壁を調製し、分画を行ない、24% KOH 抽出画分からグルコース、キシロース、ガラクトースおよび、フコースを構成糖とする多糖を均一な状態で分離した。上記構成糖から成るキシログルカンは *cycamore* 培養細胞の壁から分離されており、また、ある種の種子が貯蔵多糖としてグルコース、キシロース、ガラクトースから成る多糖を含有することが知られているが、培養細胞以外の幼植物組織からこの種の多糖の分離されたのは本論文が最初である。上記3種の豆科幼植物細胞壁から得られたキシログルカンはセルラーゼによる分解産物の検討結果から類似の基本構造を有することが示唆されたので、著者は緑豆からの標品について詳細な構造研究を行ないほぼその構造を明らかにした。本多糖の構造は *cycamore* 培養細胞から得られたキシログルカンの構造と類似しているが、ガラクトースの量が多く、微細構造には明らかに差異が認められた。

豆科幼植物細胞壁のキシログルカンは構成糖としてフコースを有し、貯蔵性キシログルカンと構造が異なるので、著者はこれらキシログルカンの構造と機能との関係を明らかにするため、緑豆種子中での本多糖の分布を調べた。その結果、種皮、子葉および胚軸のいずれの部位からもキシログルカンは24% KOH で抽出され、得られた多糖はいずれもフコースを含んでいた。また、一次壁に富む組織ほど本多糖の含量が高かった。これらの事実から、著者はフコースを含むキシログルカンはセルロースとかなり強固に結合するか、複雑に組み込まれた形で存在し、一次壁としての役割を有するものと推察した。

最後に著者は、一次壁多糖としてのキシログルカンの機能について考察し、もし本多糖が壁のゆるみに関与するならば、壁伸長時にその一部が酵素により分解を受けて低分子の多糖となり、壁から遊離するであろうと推察した。この推察を裏付けるため、著者は24% KOH 抽出画分以外の画分における本多糖の存在を検討した結果、熱水抽出画分に24% KOH 抽出画分のキシログルカンより小さな分子量を有する類似多糖の存在を確認し、さらに幼植物組織にキシログルカン分解酵素の存在することも確認した。

以上、本論文は幾つかの新しい知見を含み糖質生化学、植物生化学の分野に貢献するところが大きく、農学博士の学位を授与するに値するものと判定する。