

氏名・(本籍)	ほ せん たか ゆき 保 尊 隆 享
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理第 805 号
学位授与年月日	昭和60年9月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最終学歴	昭和54年3月 東北大学大学院理学研究所 (前期2年の課程)生物学専攻修了
学位論文題目	イネ葉鞘細胞壁に存在するグルコサミン含有糖タンパク質の部分構造と生理的機能
論文審査委員	(主査) 教 授 駒 嶺 穆 教 授 小 西 和 彦 助 教 授 和 田 俊 司

## 論 文 目 次

序 章

第一章 細胞壁中に存在するグルコサミン含有糖タンパク質の部分構造

第二章 細胞壁中に存在するグルコサミン含有糖タンパク質の生理的機能

総合考察

摘 要

謝 辞

引用文献

# 論文内容要旨

## 序章

細胞壁は植物細胞の最外層をおおう被膜であり、植物の形や大きさを最も直接的に規定している。植物の生活環中の主要な過程である“生長”の調節機構を理解するためには、細胞壁を構成する諸成分の構造、代謝、機能、そして、それらの間の結合や相互作用について明らかにする必要がある。

細胞壁の主成分は多糖類であるが、壁乾重量の数～20%を占めるタンパク質も、また、構造タンパク質や酵素として、重要な役割を担っている。これらのうち、ヒドロキシプロリンを含む糖タンパク質（Hyp-GP）については、比較的良く調べられており、この糖タンパク質は、壁多糖間に架橋して細胞壁を固くし、生長を抑える働きを持つと考えられている。しかしながら、それ以外のタンパク質の構造や機能については、不明な点が多い。とりわけ、生長生理学上興味深い系であるイネ科植物の子葉鞘では、細胞壁中のHypの量が少なく、他のタンパク質の性質が問題になる。

本研究は、イネ子葉鞘を材料とし、Hyp-GP以外の細胞壁構築に関与するタンパク質の存在の可能性を検討し、その性質について明らかにすることを目的とした。その結果、未報告の糖-アミノ酸結合、アスパラギン-N-N-アセチルグルコサミン（Asn-N-GlcNAc）を含む糖タンパク質が細胞壁中に存在することが明らかとなり、同結合周辺部の部分構造が推定された（第一章）。また、この糖タンパク質が細胞壁伸展性の調節を通して生長抑制や生長停止に関与していることが示された（第二章）。

## 第一章 細胞壁中に存在するグルコサミン含有糖タンパク質の部分構造

細胞壁中にHyp-GP以外の糖タンパク質が存在するか検討するため、細胞壁に含まれる糖-アミノ酸結合の種類について調べた。まず、細胞壁をヒドラジン処理してアミノ酸組成の変化を追跡したところ、スレオニン、セリン、アスパラギンおよびアスパラギン酸量の減少が認められた。また、NaOH-NaBH<sub>4</sub>による限定分解、還元の結果、やはりこれらアミノ酸の量が減少した。この時、アラニン量は増加したが、 $\alpha$ -アミノ酪酸は生成しなかった。以上より、細胞壁中にセリンおよびアスパラギンと糖残基との結合が存在する可能性が示された。

細胞壁中に存在する糖-アミノ酸結合の種類をより明確にするため、NaOH処理時の還元剤としてNaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>を用い、結合に関与している糖、アミノ酸残基を標識し、同定した。NaOH-NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>処理した細胞壁のアミノ酸分画をTLCで展開すると、二つの放射活性のピークが認められた。このうちの一方は、標準物質の位置より、アラニンであることが示され、グリコシド結合するセリンの存在が確認された。しかし、他のピークに関しては、相当するアミノ酸が見当らず、実体が問題となった。そこで、NaOH濃度を変更してこのピークの生成に対する影響を調べたところ、この物質は中程度のアルカリ耐性を示す糖-アミノ酸結合を構成していると判明した。さ

らに、NaOH-NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> 処理後の加水分解条件の変更や、あらかじめ [<sup>14</sup>C]-グルコサミンを取り込ませた細胞壁の NaOH-NaBH<sub>4</sub> 処理の結果を考慮して、このピークは、Asn-N-GlcNAc 結合のグルコサミン残基に由来すると考えられた。

一方、NaOH-NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> 処理した細胞壁の中性精分画に含まれる標識産物は、ガラクトールだけであった。NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> による細胞壁標識量に対するNaOH濃度の影響は、グルコサミンとセリンとの結合を否定するので、ガラクトースがセリンと結合していると考えられる。以上の様に、イネ子葉鞘細胞壁中に、セリン-O-ガラクトース、Asn-N-GlcNAc の2種の糖-アミノ酸結合が存在することが示された。

高等植物の細胞壁にAsn-N-GlcNAcを含む糖タンパク質が存在するという報告はない。その存在を確認し、性質について明らかにするため、イネ子葉鞘細胞壁の一部をプロテアーゼ処理で遊離させ、精製、分析した。細胞壁をスブチリシン処理すると、重量ベースで2.5%のヘキソサミンを含む成分が遊離された。このうちの糖鎖を含む部分を、GlcNAc、あるいは、マンノース、グルコース残基を特異的に吸着するレクチンを用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製し、ゲルろ過で分画化した。中性糖としてはマンノースのみから成り、セリン、グリシンに富む糖ペプチドが得られた。

この糖ペプチドのうちの糖-アミノ酸結合周辺部分を、さらに、他の型のプロテアーゼによる分解と、アフィニティ、ゲルろ過、イオン交換等のクロマトグラフィーの繰り返しによって精製し、最終的に、グリシンをN末とするヘプタペプチドを含む糖ペプチドを得た。この糖ペプチドを構成するアミノ酸のうちで糖残基と結合し得るものは、Asnだけであるので、Asn-N-GlcNAc 結合が存在するのは明らかである。また、同糖ペプチドは、 $\alpha$ -マンノシダーゼ、エンド- $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼD、および、アーモンド由来グリコペプチダーゼによって分解され、典型的なアスパラギン結合型の糖鎖構造を有することが示された。

以上の様に、イネ子葉鞘細胞壁中には、Hyp-GP 以外に、アスパラギン結合型糖タンパク質も存在している。高等植物の細胞壁にヘキソサミンが含まれることが指摘されながら、その由来は不明のままであったが、本研究により、少なくとも一部は糖タンパク質の成分として存在し、細胞壁構築に役立っていることが明らかとなった。

## 第二章 細胞壁中に存在するグルコサミン含有糖タンパク質の生理的機能

前章で述べた研究の結果その存在が示されたグルコサミン含有糖タンパク質は、細胞壁の一成分として、様々な壁の機能に関与しているものと考えられる。この糖タンパク質の生理的機能、特に、生長調節における役割を明らかにするため、培養条件の変更や生長ホルモン投与によって生長速度を変化させた時にその量がどのように変動するか調べ、また、逆に、この糖タンパク質量を増減させる化合物が生長速度や細胞壁伸展性にどのように影響するか検討した。

イネ子葉鞘の伸長生長は水中培養により促進され、気中 $\rightleftharpoons$ 水中の培養条件転換に伴って、生長速度の増減が認められる。この糖タンパク質量の指標となる細胞壁のグルコサミン含量は、水

中培養子葉鞘では明らかに少なく、水中 $\rightleftharpoons$ 気中の転換に伴って増減した。水中における伸長促進は細胞壁伸展性の増大によることが知られており、水中では、この糖タンパク質の量が少なく保たれる結果、細胞壁が伸びやすくなり、伸長が促進されるものと理解される。また、細胞壁中のグルコサミン量は、子葉鞘の生長が停止する時期に急増し、この糖タンパク質が生長停止にも関与していることを示唆する。

イネ子葉鞘の生長に影響するホルモン類のうち、オーキシンによって伸長生長が促される場合には、細胞壁中のグルコサミン量は低く保たれていた。オーキシンの生長促進効果は、主に、細胞壁伸長性の増大によってもたらされたものであり、オーキシン作用の少なくとも一部は、この糖タンパク質の量を少なく維持する結果生じたと考えられる。

ところで、この糖タンパク質の合成において、グルコサミン残基の供給は重要な調節過程であるが、それは、主に、フルクトース-6-リン酸のアミノ化によってまかなわれている。また、これとは別に、外から与えたグルコサミンも、ヘキソキナーゼによりリン酸化され、活発に利用される。そこで、この過程におけるアミノ基供与物質、および、グルコサミンの生長に対する影響を調べた。これらのうち、グルコサミンおよびアンモニウムイオンは、インタクト系、切片系の伸長生長を抑制した。この時、細胞壁中のグルコサミン量は増加しており、生長パラメータとの間には、強い負の相関が認められた。子葉鞘の生長速度とこの糖タンパク質の量とは密接に関連していることになる。

一方、グルコサミン-6-リン酸合成を阻害するアザセリン、および、アスパラギン結合型糖タンパク質の合成において重要な脂質結合中間体の形成阻害剤ツニカマイシンは、イネ子葉鞘の伸長生長を促進し、応力緩和法によって測定される細胞壁伸展性を増大させた。また、両阻害剤の存在下で、細胞壁中のグルコサミン量が低く保たれるか、あるいは、 $[^{14}\text{C}]$ -グルコサミンの細胞壁への取り込みが減少した。この糖タンパク質の合成抑制によって細胞壁が柔らかく保たれ、その結果生長が促進される、という機構が考えられる。

これらの結果は、イネ子葉鞘細胞壁に存在するグルコサミン含有糖タンパク質が、細胞壁伸展性を低下させて生長を抑制あるいは停止させる働きを持つことを示している。もちろん、生長調節には、他の多くの要因も関係しており、この糖タンパク質の役割だけでは説明できない例も見受けられた。しかしながら、生長速度とグルコサミン含有糖タンパク質量との関連は、幅広い条件下で認められ、この糖タンパク質は、生長調節因子として、普遍的な重要性を保持しているものと思われる。

なお、パルス-チェイスによる $[^{14}\text{C}]$ -グルコサミンの取り込み実験の結果、この糖タンパク質が原形質内の顆粒分画で合成され、その過程がツニカマイシンによる特異的な阻害を受けることが判明した。同糖タンパク質は、一般的なアスパラギン結合型糖タンパク質と同様の経路で合成されるものと考えられる。

以上の様に、本研究によって、イネ子葉鞘細胞壁中に未報告のアスパラギン結合型糖タンパク

質が存在し、細胞壁構築に関与して生長を抑制する働きを担っていることが明らかとなった。植物の生長速度は、生長を促す要因と抑える要因のバランスの上に決定されるが、この糖タンパク質は後者の中で重要な役割を果たしていると考えられる。この糖タンパク質と他の細胞壁成分との結合の様式等、本研究の結果生み出された新たな問題を引き続き解明する必要があるが、この新しい壁成分の存在を考慮することによって、細胞壁構造の、そして、生長調節機構の理解がより発展するものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

高等植物の細胞壁構造は結晶性のセルロース微繊維とその間を埋めるマトリックスから成る。マトリックスの主要成分は多糖類であるが、ある種の糖タンパク質も共存することが知られている。従来、イミノ酸のヒドロキシプロリンを多く含む糖タンパク質（Hyp-GP）がマトリックス・ゲルの構造成分として広く高等植物の細胞壁に存在し、特に双子葉植物において含量の多いことが報告されている。本研究は、単子葉植物のイネの1次細胞壁中の構造的タンパク質について、Hyp-GP 以外の糖タンパク質の存在をさぐることから始まった。

最初に、細胞壁構造中の糖-アミノ酸結合を知るため、細胞壁標品のヒドラジン処理、アルカリ性  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  による限定分解、還元前後におけるアミノ酸組成の変化と  $^3\text{H}$  標識生成物を調べた。その結果セリン-ガラクトース結合の他に糖残基と結合するアスパラギンの存在が推定された。そこで、あらかじめ  $^{14}\text{C}$ -グルコサミンを取りこませた細胞壁を処理し、グルコサミン-アスパラギン結合の存在を確認した。グルコサミンを含む糖タンパク質は、これまで高等植物の細胞壁では知られていなかったものである。

この成分について、さらにくわしく調べるために、細胞壁をプロテアーゼのサブチリシンで処理し、遊離してくるヘキサミンを含む糖ペプチド成分をレクチンを用いたアフィニティ・クロマト、ゲル濾過法で分離、精製した。その結果、グルコサミンの他、中性糖としてマンノースのみを含み、セリン、グリシンに富む糖ペプチドを得た。糖-アミノ酸結合周辺部の構造を知るために、他のプロテアーゼによる分解とクロマトグラフィーによる分画、精製を進め、グリシンをN末端とするヘプタペプチドを得た。これについて特異的グルコシダーゼ、グリコペプチダーゼによる分解からアスパラギン結合型の糖鎖の存在を実証した。

この新しく見出したグルコサミンを含む糖ペプチド（GAGP）の生理的役割を検討するため次のような実験を行っている。イネ子葉鞘の水中、気中における伸長速度変化、aging、オーキシン処理等において、成長速度とGAGP含量との間に相関が認められた。一般的にこのGAGPの生成が細胞壁の成長に抑制的に働くことが示唆された。これに関連してGAGPの合成を阻害するアザセリンやツニカマイシンの効果を調べた。ツニカマイシンによって  $^{14}\text{C}$ -グルコサミンの取りこみが阻害され、同時に成長促進効果が認められた。また、細胞壁の粘弾性測定をあわせて行い、この糖タンパク質の合成が抑制されると、細胞壁の伸展性が高い状態に維持されることを明らかにした。

以上、細胞壁の新しい成分を見出し、その生理的役割についても示唆に富む知見を得たことは、植物細胞の成長機構の解明に寄与するものであり、また保尊隆享が自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。

よって、保尊隆享提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。