

植物のアラビノガラクトタン-プロテインの構造と関連酵素

Studies on arabinogalactan-proteins, a family of proteoglycan occurred in plants

理工学研究科生命科学部門 円谷 陽一

Graduate School of Science and Engineering Yoichi Tsumuraya

Arabinogalactan-proteins (AGPs) are a family of proteoglycans found in cell walls, plasma membranes, and extracellular secretions of plants. They are rich (usually >90%) in carbohydrates, which contain a high proportion of galactose and L-arabinose residues, and may also contain smaller amounts of auxiliary sugars such as glucuronic acid, 4-*O*-methyl-glucuronic acid, and L-fucose. The carbohydrate moieties of AGPs have been recognized to be biological regulatory polymers functioning in various aspects of plant growth and development, such as cell division, programmed cell death, and embryogenesis. The carbohydrate moieties have very complex structures. Hence, our laboratory has focused on several microbial and plant glycoside hydrolases degrading the carbohydrate moieties of AGPs in order to clarify their structures, leading to find out the relationships between their structures and physiological functions.

1. はじめに: 植物細胞壁多糖とは

筆者は主に微生物多糖, 植物細胞壁多糖を研究テーマに生化学的アプローチでその構造と機能を明らかにすることを目的に研究を進めてきた. この分野は, 糖質科学, 糖質生化学の範疇に含まれるが, 最近「糖鎖生物学」とも呼ばれている. 植物の細胞壁多糖(または植物糖鎖)は古くから知られているが, 一般的には馴染みがないと思われる. 植物細胞壁は複雑な構造体であり, セルロース, ヘミセルロース, ペクチン, などの各種植物細胞壁多糖で構成される. セルロースはグルコースが β -(1 \rightarrow 4)-結合した多糖で細胞壁の骨格である. セルロースはご存じのように紙製品等で日常的に使用されている. ヘミセルロースという用語は古くから慣用的に使われてきているが, 総称名であり, 植物種によって異なるが, アラビノキシラン, キシログルカン, β -(1 \rightarrow 3)/(1 \rightarrow 4)-グルカン, 等を含んでいる. ヘミセルロースはセルロース繊維を架橋するように働く. ペクチンは細胞壁を埋め尽くすように存在している. ペクチンはその特性が食品素材に適し, 粘稠性(viscosity)を示すジャムやゼリーの製造に用いられている.

植物細胞壁は細胞膜の外側にあつて細胞質を保護するとともに, 細胞を強固にし, 形を保持する役割を担っている. しかしながら, 成長が盛んな組織では, 植物細胞は肥大伸長するので, 細胞壁を構成する多糖は絶えず分解され, 新たに合成された多糖成分が組み込まれなければならない. また, 植物細胞壁は生育環境, ホルモン等でその構造が制御されており, 最近では, 成長・分化・生体防御反応, 等の多彩な生命活動に関わるダイナミックな構造体であると理解されている. ヒトは, これらの細胞壁多糖を消化できないので栄養にはならないが, 食物繊維として整腸作用に関わっており, 最近では生活習慣病の予防・改善効果の面からも注目されている.

2. アラビノガラクトタン-プロテイン(AGP)

植物細胞壁には上記の多糖ばかりでなく, 含量は低いタンパク質, 糖タンパク質も含まれている. 本稿で取り上げるアラビノガラクトタン-プロテイン(arabinogalactan-protein, AGP)も糖とタンパク質が共有結合

した複合糖質である。しかしながら、糖含量が高い(≥90%)ので、糖タンパク質とは呼ばず、プロテオグリカン(proteoglycan)と呼ばれている。AGP は単子葉、双子葉植物を問わず、高等植物各組織に普遍的に存在し、細胞膜や細胞壁に局在している。AGP が細胞膜に留まるにはグリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーという糖鎖を介して膜に結合しており、膜との結合が切れて、細胞壁に移行すると考えられている。AGP の含量は一般的に少なく(植物組織乾燥重量の約 0.2%)、我々の研究室で扱っているダイコン成根の場合、1 kg の生組織から得られる AGP は約 50 mg である。一般的に、AGP の分子量は数万~数十万、AGP のコアペプチドは全体の約 10%を占め、プロリン(Pro)、ヒドロキシプロリン(Hyp)、アラニン(Ala)、セリン(Ser)、トレオニン(Thr)に富んでいるのが特徴である。分子種が多く、シロイヌナズナでは少なくとも 47 個のコアタンパク質遺伝子が同定されている。AGP は水に良く溶け、情報分子として、様々な生理機能に関わっていることが知られている。特に糖鎖部分(アラビノガラクトサン, AG)は植物組織の分化、成長、等の様々な生理機能に関わっていることが知られている¹⁾。

2-1 AGP の糖鎖構造

AGP はコアとなるポリペプチド鎖に多数の糖鎖が結合している。糖鎖を構成する主要な糖はガラクトース(Gal)と L-アラビノース(L-Ara)である。図 1 に AGP の糖鎖に含まれる単糖の構造を示す。糖の構造は一般的ではないので、図 1 の単糖を良く見比べるとその違いは判りにくいと思う。しかし、タンパク質を構成するアミノ酸 20 種類の構造と性質が異なるように、単糖の構造の違いは糖鎖の働きに大きく影響する重要な特性である。AGP の糖鎖の基本構造は連続した β -(1→3)-ガラクトシル残基から成る主鎖に、 β -(1→6)-ガラクトシル残基から成る側鎖が分岐結合した β -(1→3)/(1→6)-ガラクトサンである。図 2 に留学生の Md. Ashraful Haque 君の論文²⁾から引用した模式図を示す。このガラクトサン骨格の側鎖にはさらに L-Ara 残基が分岐結合している。ダイコン成葉 AGP の場合、側鎖によっては非還元末端に、グルクロン(GlcA)酸または 4-O-メチル-グルクロン酸(4-Me-GlcA)が結合している。4-O-メチル-グルクロン酸はグルクロン酸の O-4 位にメチル基がエーテル結合している特殊な糖である。また、L-Ara 残基の先に L-フコース(L-Fuc)が結合する場合もある。植物細胞壁多糖は一般的に複雑な構造であるが、その中でも AGP の糖鎖はかなり複雑である。

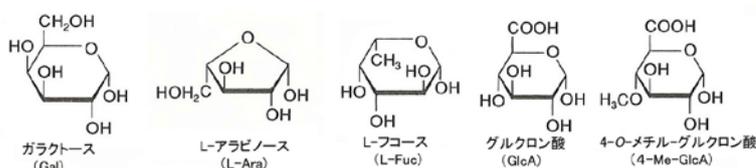


図 1 アラビノガラクトサン-プロテイン(AGP)の糖鎖を構成する主な単糖
単糖はアミノ酸の場合と同じく D-型, L-型の区別がある。慣用的に、D-は省略して、L-は付けてある。

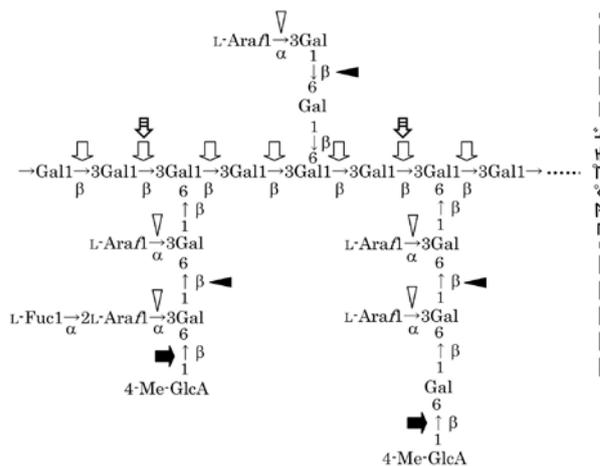


図 2 ダイコン成葉 AGP の部分糖鎖構造模式図

構造は簡略に描いてあるが、 β -(1→6)-ガラクトシル残基から成る側鎖は 1 残基から少なくとも 20 残基までの長い側鎖も含まれている。f はフラノース(5 員環)を示す。他の糖はピラノース(6 員環)である。

糖鎖分解酵素の作用点も合わせて示してある。↓, エキソ- β -(1→3)-ガラクトナーゼ; ◀, エンド- β -(1→6)-ガラクトナーゼ; ➡, β -グルクロニダーゼ; ▽, α -L-アラビノフラノシダーゼ; ↘, エンド- β -(1→3)-ガラクトナーゼ。

2-2 AGP の局在性と器官特異的発現

我々の研究室ではダイコンを研究材料に用いているが、ダイコン AGP の局在性を調べた。AGP の特徴の一つは連続した β -(1→6)-ガラクトシル鎖なので、 β -(1→6)-ガラクトテトラオースに対する抗体を作成して、ダイコン一次根(ダイコンの若い根)を免疫染色した。二次抗体には金粒子が結合しており電子顕微鏡で観察した結果、AGP 分子は細胞膜と細胞壁(細胞外マトリックス)に局在しているのが確認できた(図 3)³⁾。本実験は金子康子先生(教育学部教授)のご指導の下に、当時の橋本洋一教授の下で勉学していた修士課程の菊池純夫君が主に担当した。

さらに、AGP の糖鎖の特徴として植物の器官や成長段階で、糖組成や糖鎖構造が異なることが知られており、AGP が情報分子として組織の分化・増殖に関わっている根拠の一つとなっている。ダイコンの成長に伴う AGP の構成糖の変化を図 4 に示す。発芽後 2 週間までのダイコンの一次根(スーパーストアで売られている貝割れダイコン位の成長段階)では AGP の L-Fuc 含量が高く、子葉、胚軸には L-Fuc が含まれていないことが判る。ダイコンが肥大・成長すると根の L-Fuc は消失し、代わりに、葉の AGP に L-Fuc が含まれるようになる⁴⁾。“植物の血液型”と言うと奇異に感じると思われるが、当時の科学警察研究所の山本茂先生のご研究で、動物の血液型判定の手法を植物に適用とすると植物も ABO 式血液型類似活性を示すことが知られている。L-Fuc は動物の血液型 O(H)型の抗原決定基であり、ダイコンでも同様な活性があることが判った。確かに、AGP 糖鎖はダイコンでは器官特異的に発現しているがその生理的意義は今も不明のままである。

3. AGP の分解酵素

上述のように、細胞膜と細胞壁に局在する AGP 糖鎖は、重要な生理機能を担っていると以前から指摘されてきたが、その糖鎖構造は複雑であり、糖鎖-生理機能の相関性の解析はなかなか進展しなかった。多糖の構造解析には様々な分析手法が用いられる。例えば、NMR 分析、質量分析、等が広く用いられている。しかしながら、タンパク質の一次構造解析(アミノ酸配列解析)の際には、異なる基質特異性を持つタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)を用いるが、糖鎖の場合でも同様に、異なる基質特異性を持つ酵素は糖鎖の構造解析、糖鎖の生理機能解析に有効なはずである。当研究室で AGP の研究を始めた頃は糖鎖

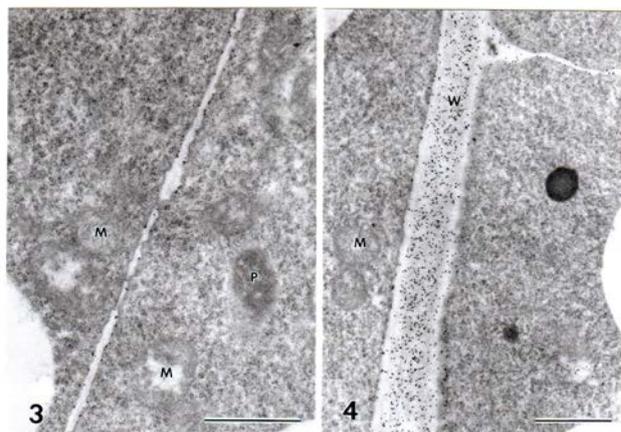


図 3 ダイコン一次根の根端細胞 AGP の免疫電子顕微鏡観察

AGP をウサギ抗 β -(1→6)-Gal₄抗体で検出した。二次抗体は金粒子を結合させたヤギ抗ウサギ IgG 抗体を使用した。図中の多数の小さな黒点が AGP の存在場所を示す。バー:1 μ m M, ミトコンドリア; P, 色素体; W, 細胞壁。

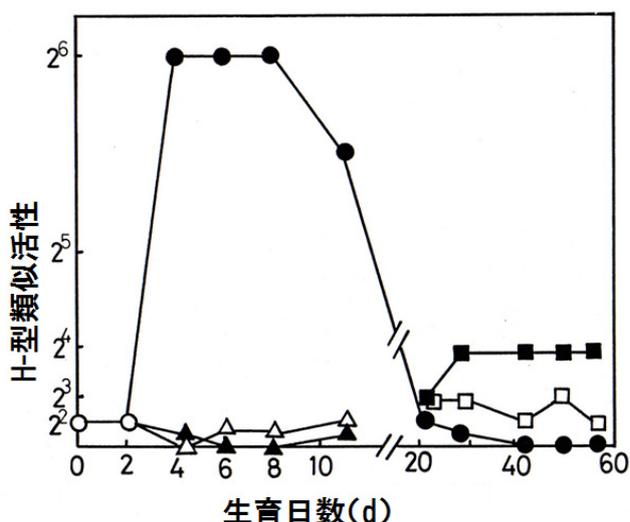


図 4 ダイコンの生長段階に伴う各器官の AGP の変化
横軸がダイコンの生育日数、縦軸がウサギ抗 H 凝集素を用いて調べた各器官の血液型 H-型類似活性(血球凝集阻止活性の強さ)を示す。活性が高いほど AGP 中の L-フコース(L-Fuc)含量が高い。

△ 子葉; ▲ 胚軸; ● 根; ■ 葉; □ 中肋(葉脈)

の分解酵素としては L-Ara 残基に作用する α -L-アラビノフラノシダーゼ以外は知られていなかった。AGP の特性である組織中の含量の少なさ、糖鎖構造の複雑性が AGP 糖鎖の分解酵素活性探索・酵素精製の足かせになっており、研究者が手を出すことができなかつた(躊躇した)ためと思われる。我々は、AGP 糖鎖の分解酵素が自然界にあるはずと考えて基質調製に取り組み、酵素活性の探索、酵素の精製、遺伝子クローニング、を行ってきた。以下に個別に取り上げるが、エキソ- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクタナーゼ、エンド- β -(1 \rightarrow 6)-ガラクタナーゼ、エンド- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクタナーゼ、 β -グルクロニダーゼ、等を見出してその性質を明らかにしてきた。今までに見出した酵素とその作用点のまとめを図 2 の糖鎖構造模式図に重ねて示す。

3-1 エキソ- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクタナーゼ

研究に着手した頃は、AGP 糖鎖の分解酵素の探索に用いることのできる基質はなかつた。AGP そのものを基質にすると、どの部位が作用を受けているのか判らないので、酵素活性検出のための基質作りから始めた。市販のアカシアガムをスミス分解して β -(1 \rightarrow 3)-ガラクトタンを調製した。スミス分解はメタ過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO₄)を用いた多糖の化学修飾方法で、1960 年代にミネソタ大学の Fred Smith 先生が開発した手法である。スミス教授のもとで研究をされてきた三崎 旭先生(大阪市立大学教授、当時)が多糖の構造解析に適用されており、筆者が大阪市立大学博士課程在学時に教えて頂いた手法である。 β -(1 \rightarrow 3)-ガラクトタンを基質に用いて酵素活性を探索したところ、キノコの仲間であるウスバタケ(*Irpex lacteus*)由来の酵素製剤「ドリセラゼ」(飼料用添加物、協和発酵バイオ(株)製、当時)に活性を認めた。キノコは木材腐朽菌として、植物組織を分解して栄養源としているので、各種の植物細胞壁多糖分解酵素の宝庫といえる。

当時の橋本 洋一教授のもとで卒業研究を行っていた望月 伸悦君に手伝ってもらって各種クロマトグラフィーで酵素を精製しその性質を調べた⁵⁾。酵素研究一般に通じるが、酵素の基質特異性を調べることは、酵素の生体内での働きを明らかにする上で大切となる。各種基質への作用のまとめを表 1 に示す。本酵素は連続した β -(1 \rightarrow 3)-結合したガラクトオリゴ糖に特異的に作用し、 β -(1 \rightarrow 3)-ガラクトタン、 β -(1 \rightarrow 3)-結合した 2 糖、3 糖、4 糖、5 糖を分解することが判った。 β -(1 \rightarrow 4)-、 β -(1 \rightarrow 6)-結合したガラクトオリゴ糖には作用しない。ここで、メチル- β -ガラクトオリゴシドは National Institutes of Health (NIH) の Pavol Kováč 先生から提供して頂いた。

表 1 エキソ- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクタナーゼの多糖、オリゴ糖への作用

Substrate	Conc.	Relative rate of hydrolysis
		%
β -(1 \rightarrow 3)-D-Galactan	5 mg/ml	100
β -(1 \rightarrow 3)-Linked oligosaccharide		
Galactobiose	5 mM	34.9
Galactotriose	5 mM	43.1-67.4
Methyl β -D-galactotetraoside	5 mM	66.1
Methyl β -D-galactopentaoside	5 mM	90.6
Galactobiitol	5 mM	0.2
Galactotriitol	5 mM	0.9
β -(1 \rightarrow 4)-Linked oligosaccharide		
Galactobiose	1 mg/ml	0
Galactotriose	1 mg/ml	0
Galactotetraose	1 mg/ml	0
Galactopentaose	1 mg/ml	0
β -(1 \rightarrow 6)-Linked oligosaccharide		
Galactobiose	2 mM	0
Galactotriose	2 mM	0
Methyl β -D-galactopentaoside	2 mM	0
Methyl β -D-galactohexaoside	2 mM	0
Methyl β -D-galactoside	2 mM	0
<i>p</i> -Nitrophenyl β -D-galactoside	1 mM	0

エキソ- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクタナーゼは β -(1 \rightarrow 3)-結合ガラクトオリゴ糖、多糖を分解するが、 β -(1 \rightarrow 4)-、 β -(1 \rightarrow 6)-結合したガラクトオリゴ糖には作用しない。

本酵素は図5のように β -(1 \rightarrow 3)-ガラクトン主鎖の非還元末端から糖鎖を順番に切り出す作用機作を示した。 β -(1 \rightarrow 6)-ガラクトン側鎖が結合している分岐部分はバイパスして分解が進行するので、側鎖が結合していない場合はGalが遊離し、側鎖はオリゴ糖として丸ごと切り出されることが判った。酵素生成物の構造を調べるため、ダイコン根AGPにエキソ- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクタナーゼを作用させ、分解物を酸性糖画分と中性糖画分を分けた。酸性糖画分をDionex社のHPLCで調べたところ、約20のピークが検出された。その構造は1残基から約20残基までの β -(1 \rightarrow 6)-結合したガラクトオリゴ糖の非還元末端に4-Me- β -GlcAが結合していることが判った(図6)。それまではAGP糖鎖の平均的構造しか判らなかつたが、本酵素を用いて調べた結果、AGPの糖鎖は重合度分布が広い β -(1 \rightarrow 6)-ガラクトシル側鎖を有することが明らかとなった。本酵素の作用特異性は従来知られていないタイプの酵素で、新たなEC番号(EC 3.2.1.145)が付与された。EC番号(酵素番号, Enzyme Commission numbers)は国際生化学分子生物学連合の酵素委員会が命名する酵素分類である。筆者の得た研究を進める上での教訓は、“基質があれば新規な酵素が見つかる”である。その後、本酵素をコードしている遺伝子は当研究室の小竹敬久准教授らによってクローニングされ、組換え酵素が調製されて用いられている。

3-2 エンド- β -(1 \rightarrow 6)-ガラクタナーゼ

エキソ- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクタナーゼが見つかったので、他の特異性を持つ酵素も探してみた。エキソ- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクタナーゼの場合と同じであるが、酵素活性探索のための基質作りから始める必要があった。前述のNIHのKováč先生から教えて頂いて、緑藻類の一種である*Prototheca zopfii*の細胞壁から多糖を調製した。本多糖は比較的 β -(1 \rightarrow 6)-結合したGalの含量が高いので、本酵素の活性測定に有用であった。この藻類は緑藻類に分類されているが葉緑体を持たず、以前は酵母に分類されていた。本藻類は寒天培地で生育できるので作業は単純であるが、必要量の多糖を調製するにはかなりの作業が伴った。エンド- β -(1 \rightarrow 6)-ガラクタナーゼの活性はカビの一種である*Trichoderma viride*の酵素製剤「オノズカ R-10」に見いだせたので、修士課程の桶本和男君に手伝ってもらって本酵素剤から酵素を精製した。エンド- β -(1 \rightarrow 6)-ガラクタナーゼは2糖には作用しないが、3糖以上の連続した β -(1 \rightarrow 6)-結合したガラクトオリゴ糖を特異

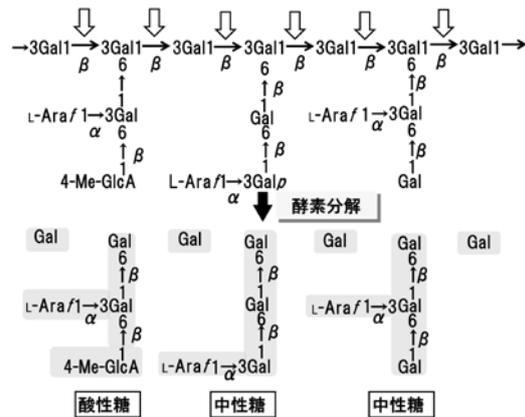


図5 エキソ- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクタナーゼのAGP糖鎖への作用と酵素分解生成物

本酵素は \downarrow で示したように β -(1 \rightarrow 3)-ガラクトン主鎖の非還元末端から糖鎖を順番に切り出す酵素である。 β -(1 \rightarrow 6)-ガラクトン側鎖が結合している分岐部分はバイパスして分解が進行するので、側鎖が結合していない場合はGalが遊離し、4-Me-GlcAが付加した側鎖(酸性糖)も付加していない側鎖(中性糖)もオリゴ糖として丸ごと切り出される。

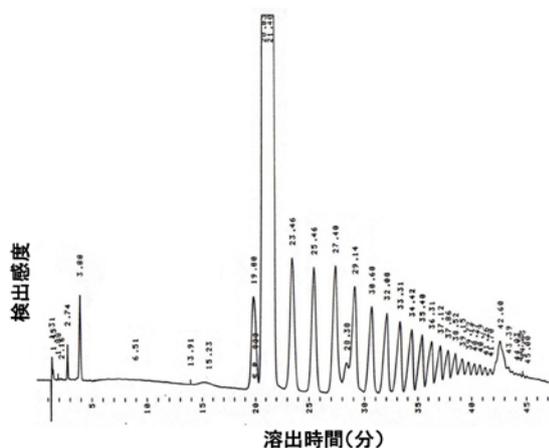


図6 AGP糖鎖のエキソ- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクタナーゼ分解で生じるオリゴ糖の分離

ダイコン根AGP糖鎖をエキソ- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクタナーゼで分解し、生じた酸性オリゴ糖をDionex社のHPLCで分離した。約20の重合度の異なるオリゴ糖が検出された。

的に分解した。β-(1→3)-, β-(1→4)-結合したオリゴ糖には作用しない。非還元末端にβ-GlcA または 4-Me-β-GlcA が結合しているβ-(1→6)-ガラクトシル部分に作用できる。Kováč 先生から頂いたメチル-β-(1→6)-ガラクトヘキサオシドに本酵素を作用させて経時的に反応生成物を標識して HPLC で調べた(図 7)。反応初期には 2, 3, 4, 5 糖が生じ、最終段階では Gal と 2 糖(Gal₂)が生じた。本法では酵素で分解されて生じる還元末端を持つオリゴ糖のみが検出されるので、本酵素はエンド型に AGP の側鎖構造を分解する酵素であることが判った⁶⁾。本酵素も新規なタイプの酵素なので、新たな EC 番号(EC 3.2.1.164)が付与された。

3-3 エンド-β-(1→3)-ガラクタナーゼ

最近(2011 年)に見いだしたのがエンド-β-(1→3)-ガラクタナーゼである。本酵素は主に修士課程の平田 尚弘君が実験を行い、酵素を精製してその性状を明らかにした⁷⁾。上記のエクソ-β-(1→3)-ガラクタナーゼと本項のエンド-β-(1→3)-ガラクタナーゼはどこが違うのか、一般にはイメージは湧かないのではないかと思います。簡単に説明すれば、エクソ型は端から分解し、エンド型は内部に作用するという作用部位の違いがある。本分野に携わる者にとっては、結構面白い研究課題であり、長年探索し続けた酵素である。繰り返しになるが、やはり基質作りが必要で、当研究室前任教授でおられて前田昌徹先生のご指導を頂いた。酵素活性はエノキタケ(*Flammulina velutipes*)に見いだすことができた。エノキタケはスーパーストア等でよく見かける食材だが、酵素はキノコ(子実体)ではなく液体培養して増殖する菌糸体から精製した。培養日数も 20 日間程必要なので、基質の存在によって誘導される誘導酵素と思われる。各種オリゴ糖を用いて基質特異性を調べた所、2 糖には作用しないが、3 糖以上の連続したβ-(1→3)-結合したガラクトオリゴ糖を特異的に分解した。β-(1→6)-, β-(1→4)-結合したオリゴ糖には作用しないことが判った(図 8)。つまり、基質への作用の点では、上記のエンド-β-(1→6)-ガラクタナーゼのβ-(1→3)-版と言える。本酵素も新規なタイプなので EC 番号(EC 3.2.1.181)が

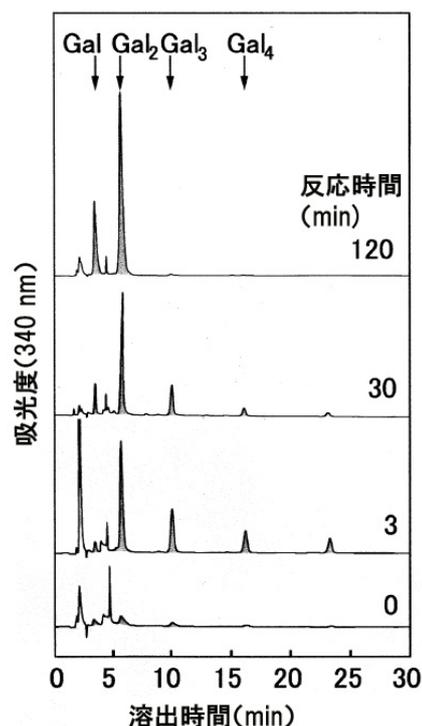


図 7 エンド-β-(1→6)-ガラクタナーゼによるメチル-β-(1→6)-ガラクトヘキサオシド分解の経時変化
酵素分解物を *p*-aminobenzoic acid ethyl ester で蛍光標識し、経時的に HPLC で分析した。反応初期には 2~5 糖が検出され、最終産物は Gal と 2 糖(Gal₂)であった。図中の Gal, Gal_{2,3,4} は標準β-(1→6)-ガラクトオリゴ糖の溶出位置である。

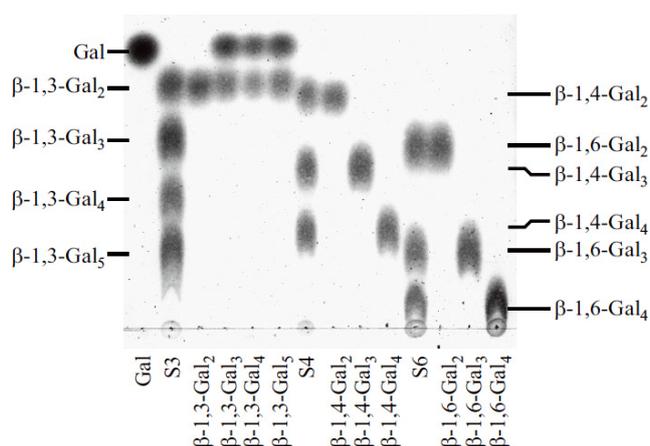


図 8 エンド-β-(1→3)-ガラクタナーゼの各種オリゴ糖への作用

酵素を結合様式の異なる各種オリゴ糖に作用させて分解産物を薄層クロマトグラフィーで分離検出した。酵素はβ-(1→3)-結合した 3 糖以上のガラクトオリゴ糖(β-1,3-Gal_{3,4,5})を分解して、Gal と Gal₂を生じた。一方、β-(1→6)-, β-(1→4)-結合したオリゴ糖には作用しなかった。図中の S3, S4, S6 はβ-(1→3)-, β-(1→4)-, およびβ-(1→6)-結合したガラクトオリゴ糖標準糖混合物である。

付与されている。このようにして、AGP糖鎖の β -(1 \rightarrow 3)/(1 \rightarrow 6)-ガラクトン骨格へ作用する3種類の酵素を用いることができるようになったので(図2), 糖鎖の構造解析に弾みがつくと共に, 当研究室では酵素分解で得られるオリゴ糖などの生理機能解析を進めている。

3-4 β -グルクロニダーゼ

AGP糖鎖の非還元末端にはGlcAまたは4-Me- β -GlcA残基が結合している。このウロン酸残基に作用する酵素は知られていなかったため, 本酵素活性を探索した。ここでも基質作りが必要なため, 東京大学生産技術研究所名誉教授の熊野谿 従先生のご指導を得て, 漆を購入して多糖画分を調製してGlcAと4-Me- β -GlcAを含んだ各種酸性オリゴ糖を調製した。オリゴ糖の構造例を図9に示す。これらのオリゴ糖に作用する β -グルクロニダーゼは黒コウジカビ(*Aspergillus niger*)の酵素製剤「Pectinex Ultra SP-L」から精製してその性質を調べた⁸⁾。実験は主に修士課程の黒山浩之君, 組換え酵素に関しては博士課程の古西智之君が行った。その結果, 本酵素はこれらのオリゴ糖に良く作用し, β -GlcA-(1 \rightarrow 6)-Gal_{1,2}や4-Me- β -GlcA-(1 \rightarrow 6)-Gal_{1,2,3}をウロン酸(GlcA, 4-Me-GlcA)とGalまたはガラクトオリゴ糖(Gal_{2,3})に分解した。また, ガラクトオリゴ糖の鎖長が長くなるにつれ分解度が高まることも判った。ただし, AGP糖鎖由来の酸性オリゴ糖には良く作用するがGlcAがGalと β -(1 \rightarrow 3)-結合しているオリゴ糖にはあまり作用しない。本酵素は糖転移活性を示すことも判った。パラニトロフェニル- β -グルクロナイドを供与体, 各種単糖を受容体として反応させた。受容体にはGal, グルコース(Glc), キシロース(Xyl)を用いた。反応産物として, グルクロン酸とGalが結合したオリゴ糖, Glc, Xylが結合したと思われるオリゴ糖が生じた。これらのオリゴ糖の構造は未同定のままだが, AGP由来のオリゴ糖の生理活性を調べる際の対照標品になるかもしれない。

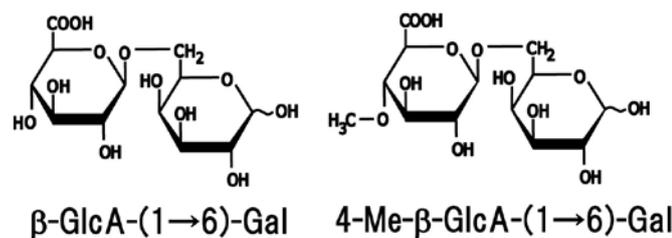


図9 ウロン酸(GlcA, 4-Me-GlcA)を含んだガラクトオリゴ糖の構造

3-5 植物体内でのAGPの分解

以上は微生物由来のAGP糖鎖分解酵素に関する研究であるが, 植物体内でのAGP糖鎖の代謝はどうなっているか興味を持ち, 植物組織の分解酵素を調べた。AGPは情報分子として認識されているので, AGP糖鎖の合成と分解の仕組みに関心がもたれている¹⁾。植物体内では, 今のところエキソ- β -(1 \rightarrow 3)-ガラクトナーゼ, エンド- β -(1 \rightarrow 6)-ガラクトナーゼ, といった酵素(glycanase)活性は見つからず, 各種グリコシダーゼ(glycosidase)が作用して糖鎖が分解されると思われる。ダイコン種子から β -ガラクトシダーゼを精製してその性質を調べたところ, 酵素は β -(1 \rightarrow 3)-, (1 \rightarrow 6)-結合したガラクトオリゴ糖に良く作用し, 鎖長が伸びるほど分解度が高まることが判った。 β -(1 \rightarrow 4)-結合したオリゴ糖には作用しないが, ラクトース[β -Gal-(1 \rightarrow 4)-Glc]には比較的良く作用する。図10はダイコンの組換え β -ガラクトシダーゼと微生物由来の α -L-アラビノフラノシダーゼと β -グルクロニダーゼを単独で, または同時に作用させてAGP糖鎖の経時的分解率を調べた結果である。三種類の酵素をそれぞれ単独で作用させた場合は糖鎖の分解はあまり進まないが, 酵素を同時に働かせるとAGP糖鎖の約85%が分解された。これらの実験は主に修士課程の関亦正幸君, 畠 恵司君, 留学生のDina Sorayaさんが行った。植物体内では, AGPの代謝回転は各種グリコシダーゼの協調作用で制御されていると思われる⁹⁾。キビ細胞を使った研究ではAGP糖鎖の組織内での代謝回転(turnover)は非常に速いことが知られている¹⁰⁾。しかしながら, 植物組織に含まれる β -グルクロニダーゼは一般的に活性が弱く, ダイコン葉の場合, β -ガラクトシダーゼの活性を100とすると, β -グルクロニダーゼの活性は0.2と極めて低い。AGPの代謝回転の制御は複雑であり生合成と分解が調和を保っているはずである。生体内には, β -グルクロニダーゼの働きを促進するような未知な仕組みが備わっているのだ

ろうか？

3-6 AGP 糖鎖分解酵素の活用

このような酵素を用いて AGP 糖鎖の構造解析を進めた。修士課程の下田良平君、岡部耕平君が担当してダイコン根の AGP 糖鎖構造、特に、糖鎖中の L-Ara 残基の存在様式に着目して解析した¹¹⁾。解析を進めるにあたっては理工学研究科機能材料工学コースの松岡浩司先生、小山哲夫博士、等のご協力を頂いた。世界的には AGP に携わる研究者は多いとは言えないが、当研究室の見出した酵素への問い合わせも多く、各種の微生物培養液等から精製した酵素、組換え酵素を各国の研究者に提供してきた。とりわけ、ケンブリッジ大学の Paul

Dupree 教授, Theodora Tryona 博士らと共同で、アラビドプシス AGP の糖鎖構造等に関して研究成果を挙げることができた¹²⁾。AGP に関する研究の目的の一つは糖鎖-生理機能の相関性の解析であるが、糖鎖構造解析の進展に相まって実験を進めている。また、今までは AGP の糖鎖に着目してきたが、コアタンパク質の代謝の仕組みの解析にも取り組んでいる。AGP コアタンパク質はプロリン (Pro)、ヒドロキシプロリン (Hyp) に富んでいるので AGP 特異的タンパク質分解酵素の存在が推定される。一方で、植物体の中にこれらの AGP 糖鎖分解酵素を組み込み、様々なタイミングに働かせて植物体の AGP 糖鎖の構造を変化させて表現型を調べることができる。このような取り組みを通した AGP の機能解析の進展を期待したい。

参考文献

1. Showalter AM, "Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function", Cell. Mol. Life Sci., 58, 1399-1417 (2001).
2. Haque MA, Kotake T, and Tsumuraya Y, "Mode of action of β -glucuronidase on the sugar chains of arabinogalactan-protein", Biosci. Biotechnol. Biochem., 69, 2170-2177 (2005).
3. Kikuchi S, Ohinata A, Tsumuraya Y, Hashimoto Y, Kaneko Y, and Matsushima H, "Production and characterization of antibodies to the β -(1 \rightarrow 6)-galactotetraosyl group and their interaction with arabinogalactan-proteins", Planta, 190, 525-535 (1993).
4. Tsumuraya Y, Ogura K, Hashimoto Y, Mukoyama H, and Yamamoto S, "Arabinogalactan-proteins from primary and mature roots of radish (*Raphanus sativus* L.)", Plant Physiol., 86, 155-160 (1988).
5. Tsumuraya Y, Mochizuki N, Hashimoto Y, and Kováč P, "Purification of an exo- β -(1 \rightarrow 3)-D-galactanase of *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) and its action on arabinogalactan-proteins", J. Biol. Chem., 265, 7207-7215 (1990).
6. Okemoto K, Uekita T, Tsumuraya Y, Hashimoto Y, and Kasama T, "Purification and characterization of an endo- β -(1 \rightarrow 6)-galactanase from *Trichoderma viride*", Carbohydr. Res., 338, 219-230 (2003).

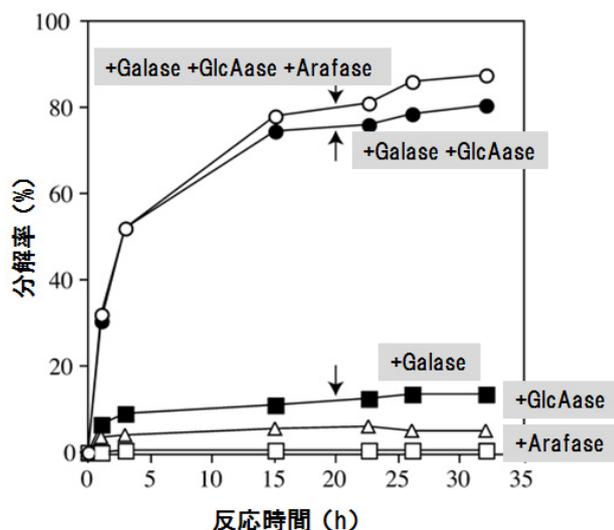


図 10 ダイコン AGP 糖鎖の各種グリコシダーゼの協同作用による分解予め α -L-アラビノフラノシダーゼ (Arafase) で処理したダイコン AGP にダイコンの組換え β -ガラクトシダーゼ (Galase), 微生物由来の Arafase, β -グルクロシダーゼ (GlcAase) を単独, または同時に添加して糖鎖の分解率を継時的に調べた。図中の矢印は反応 20 時間目の反応液への Galase の追加を示す。3 種の酵素の協同作用で AGP 糖鎖のほとんど (85%) が分解された。

7. Kotake T, Hirata N, Degi Y, Ishiguro M, Kitazawa K, Takata R, Ichinose H, Kaneko S, Igarashi K, Samejima M, and Tsumuraya Y, “Endo- β -1,3-galactanase from winter mushroom (*Flammulina velutipes*)”, *J. Biol. Chem.*, 286, 27848-27854 (2011).
8. Kuroyama H, Tsutsui N, Hashimoto Y, and Tsumuraya Y, “Purification and characterization of a β -glucuronidase from *Aspergillus niger*”, *Carbohydr. Res.*, 333, 27-39 (2001).
9. Kotake T, Dina S, Konishi T, Kaneko S, Igarashi K, Samejima M, Watanabe Y, Kimura K, and Tsumuraya Y, “Molecular cloning of a β -galactosidase from radish that specifically hydrolyzes β -(1 \rightarrow 3)- and β -(1 \rightarrow 6)-galactosyl residues of arabinogalactan protein”, *Plant Physiol.*, 138, 1563-1576 (2005).
10. Gibeaut DM and Carpita NC, “Tracing cell wall biogenesis in intact cells and plants”, *Plant Physiol.*, 97, 551-561 (1991).
11. Shimoda R, Okabe K, Kotake T, Matsuoka K, Koyama T, Tryfona T, Liang H-C, Dupree P, and Tsumuraya Y, “Enzymatic fragmentation of carbohydrate moieties of radish arabinogalactan-protein and elucidation of the structures”, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 78, 818-831 (2014).
12. Tryfona T, Liang H-C, Kotake T, Tsumuraya Y, Stephens E, and Dupree P, “Structural characterization of Arabidopsis leaf arabinogalactan polysaccharides”, *Plant Physiol.*, 160, 653-666 (2012).