

性を基準としてダイコン、アブラナ、カブの葉からO型活性物質を熱生理食塩水で抽出し、エタノール沈澱、イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過によりO型活性AGPを精製した。

精製標品の分析と血清学的試験の結果、3種の植物の葉から得たAGPはいずれもL-アラビノース (L-Ara)、D-ガラクトース (D-Gal)、L-Fuc及びウロン酸から構成される糖部分 (含量 90-97%) が少量のヒドロキシプロリン (Hyp) に富むポリペプチド (含量 3-10%) と結合したPGであり、5-10 μ gの濃度でO型血球凝集反応を完全に阻止する。また、分子量、旋光度等の物理化学的性質やAGPが特異的に結合する β -グルコシルYariv人工抗原 (図2) と反応して沈降反応を起こす特性によりこれらのPGは典型的なAGPであることが明らかになった。セイヨウカラシナやイヌナズナのようなアブラナ科植物の葉にも同様なL-Fucを含みO型活性を示すAGPの存在が証明され、分類学的見地からも興味深い。

AGPの糖部分の構造研究はグラジオラスの花柱から調製したAGPについて行われ、 β -(1-3)-ガラクトランの主鎖に β -(1-6)結合したD-Gal残基からなる側鎖が適当な間隔で結合した基本骨格(3,6-ガラクトラン)になり、その側鎖に α -L-アラビノフラノシル残基(α -L-Araf)が結合した分枝構造が提出されていた。

ダイコンの葉のAGPの糖鎖構造はメチル化、スミス分解、酵素による断片化、およびNMRとGC-MS等の機器分析で得たデータに基づいて解析を行い、図3のように推定された。

基本的な構造は3,6-ガラクトランであるが、側鎖のD-Gal残基に α -L-Araf残基に加えてL-Fuc α (1-2)- α -L-Arafの2糖単位が結合し、また、末端にウロン酸残基(主に4-O-メチル-D-

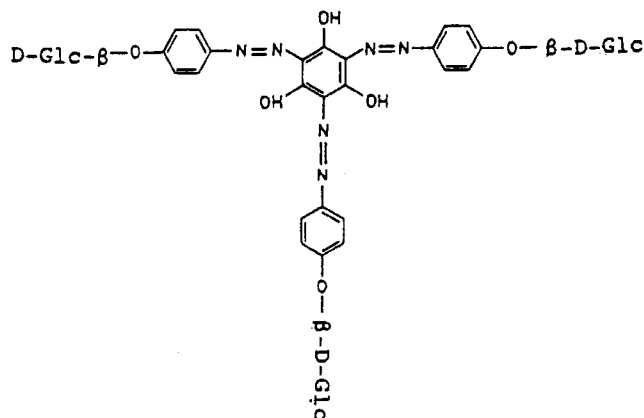


図2. Yariv β -D-グルコピラノシル人工抗原の構造

AGPはこの化合物と特異的に結合して赤色の沈澱を形成する。

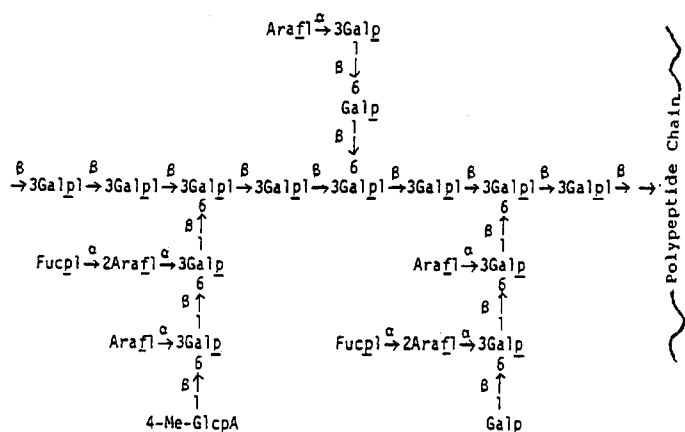


図3. ダイコンの葉のアラビノガラクトラン-プロテイン (AGP) の糖鎖の推定構造

グルクロン酸、4MeGlcA) が結合している点に特徴が認められた。この2糖単位はヒトのO型抗原決定基、L-Fuc α (1-2)- β -D-Galに相当し、O型凝集素が認識して結合する植物に特有な構造であることがはじめて証明された。

同様な構造解析によりこの2糖単位はアブラナの葉のAGPにも確認されている。また、ダイコンの葉のAGPをアルカリ処理したのちNaBH₄で還元すると、 β -脱離反応が起こり、糖とアミノ酸の共有結合が切断され糖部分と蛋白部分が分離した。分解産物を分析した結果、D-ガラクトトールが検出される一方、アラニン量の増加が認められ

た。これは糖鎖の還元末端D-Galの還元とセリンの2-アミノプロペン酸を経てアラニンへの還元を示し、還元末端のD-Galがポリペプチド鎖のセリン残基の水酸基とO-グリコシド結合で結合していることが推定できた。

AGPの多様性

2、3の植物の種々の組織の抽出液をゲル電気泳動分析したのち、Yariv試薬で染色する間接的な方法でAGPの多様性が指摘されていた。ダイコンの種子と発芽後に発達する葉及び根の生長の過程におけるO型血液型活性を調べると、種子にはO型活性がなく、葉と若い根にO型活性が検出された(図4)。根のO型活性はその発達の初期に限られ、その生長とともに消失し、組織の分化生長に関連したAGPの糖組成の変化が観察された。各組織からそれぞれAGPを抽出、精製して分析データを比較した結果、種子のAGPはD-キシロース(D-Xyl)を含み、分岐度が高い糖鎖構造のPGであり、発達初期の根は葉と同様な糖組成で、強力なO型活性を示すAGPを合成し分泌することが判明した。成熟した根のAGPの糖組成はL-Ara、D-Gal及びウロン酸であり、余分な糖を含まない。しかも、これらAGPのアミノ酸組成も明らかに異なり、組織の分化生長に対応するAGPの組成及び

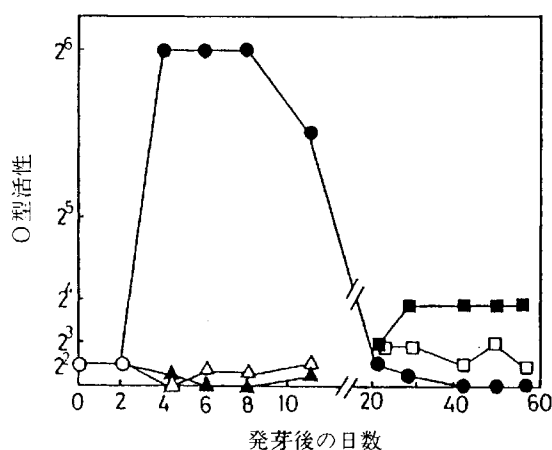


図4. ダイコン種子の発芽後の生長過程における各組織のO型活性の変動 (△…子葉, ▲…胚軸, ●…根, ■…葉, □…中央脈)

糖鎖構造の変化が明瞭になった。

AGPの酵素分解

複雑に分岐した糖鎖構造の研究には、糖残基間の結合を特異的に切断する加水分解酵素の使用が不可欠である。アブラナ科植物のAGPの構造解析においても α -L-アラビノフラノシターゼや β -ガラクトシターゼが側鎖に結合した α -L-Araf残基の除去あるいはアノマーの決定に用いられた。特に、担子菌の一種、ウスバタケが生産する β -1, 3-ガラクターゼはAGPの主鎖である β -1, 3-ガラクトンの非還元末端からD-Gal残基を順次切断する作用があり、遊離した側鎖の構造解析に極めて有効であった。

図5はこの酵素を α -L-Araf残基を除いた肥大生長したダイコン根のAGPに作用させたときの分解機序で、側鎖は主鎖のD-Gal残基を含む少糖として遊離してくる。

図6は高速液体クロマトグラフィーで分解産物である酸性少糖を分離したときの溶出プロフィールで、重合度が2-20の糖が検出された。中性の側鎖でも同様な結果が得られ、肥大生長したダイコンの根のAGPの基本糖鎖は2糖単位が主要な側鎖であるが、鎖長は多様でさらに複雑な分枝構造である可能性を示唆している。

一方、ダイコン種子には β -1, 3-及び β -1, 6-結合したD-Gal残基を特異的に切断する β -ガラクトシターゼがあり、 α -L-アラビノフラノシターゼや β -グルクロニダーゼとの共同作用により発芽の過程でAGPの分解に関与している可能性が高い。

現状と展望

内在する酵素が段階的にはたらいでAGPが分解する過程を解明する目的で、ダイコン種子から α -L-アラビノフラノシターゼを精製しその特異性とAGPに対する作用を調べている。この酵素には β -キシロシターゼ作用があり、D-Xylを含有する種子AGPの分解に関連して興味深い。AGPはL-ArafやD-Galに対するモノクロナル抗体など免

疫組織化学的方法を用いて細胞間隙における局在が報告されている。細胞膜に会合したAGP様の糖蛋白質が細胞壁多糖に結合してマトリックスを形成している局在性を示す免疫組織化学的データもある。しかしながら、使用された抗体は必ずしもAGPに特異的ではなく不明な点が多い。われわれは、 β -1,3-および β -1,6-結合した3糖をウシ血清アルブ

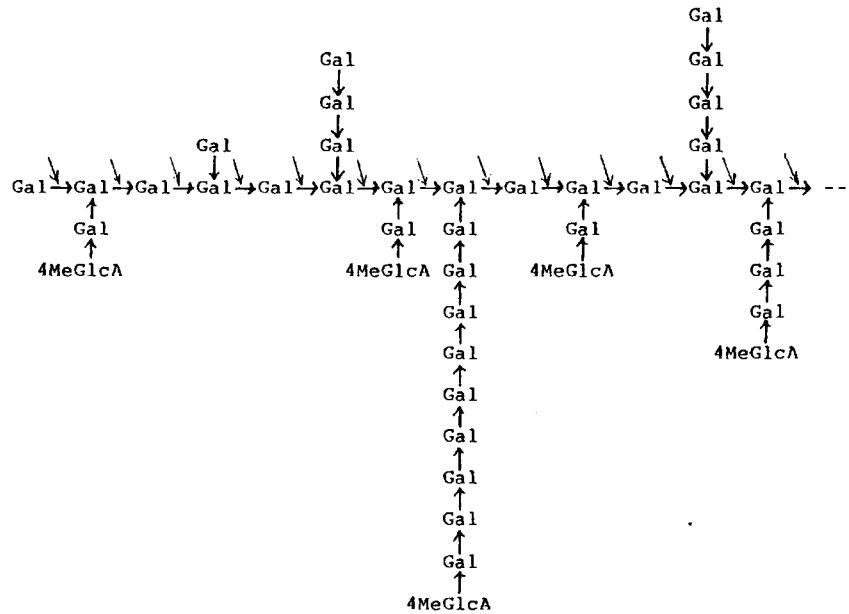


図5. ウ斯巴タケのエキソ- β -1,3-ガラクターゼの作用によるL-アラビノフラノシダーゼ処理したダイコン根のアラビノガラクトナン-プロテインの糖鎖の分解

4MeGlcA: 4-O-メチル- β -D-グルコピラノシルウロン酸残基
 $-\text{Gal} \rightarrow \text{Gal}-$: β -1,3結合
 $\text{Gal} \downarrow$: β -1,6結合
 \swarrow : 酵素により切断される結合

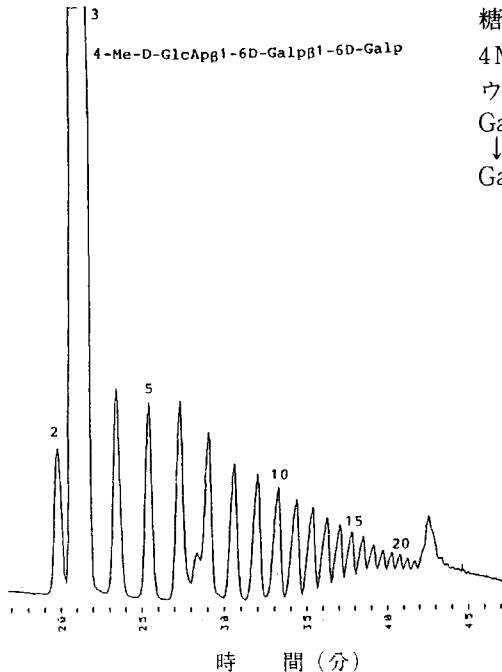


図6. ウ斯巴タケのエキソ- β -(1-3)-ガラクターゼによるダイコン根AGPの分解産物(酸性少糖)の高速液体クロマトグラフィーによる分離 *数字は重合度
 Dionex CarboPac PA-1 カラム

ミンに結合させた人工抗原を調製しAGPと特異的に結合する抗体を作製してAGPの組織内局在性の検討を行っている。

アブラナ科植物のAGPにはL-Fucを含み、鋭敏な血清学的方法で検出できる特徴があり、糖鎖の生合成と分泌機構の研究対象としてすぐれている。葉や若い根の組織も材料になるが、細胞内含有物が少なくホルモンを含む無機合成培地で増殖する培養細胞が好適である。ダイコンとアブラナの葉組織由来の培養細胞を得て懸濁培養を行った結果、いずれも培地中にL-Fucを含有するAGPを分泌し、糖鎖の生合成ばかりでなくその分泌機構やAGPの存在様式の研究材料として有望である。また、Yariv人工抗原に結合すると言われていたAGPの蛋白部分を酵素及び化学的方法により調製しその構造を決定することは、AGPの機能を

解明するうえで重要な研究課題であろう。

ほ乳動物では細胞外マトリックスを構成する種々の高分子の生化学及び分子生物学の研究の進歩は目覚ましい。高等植物では細胞壁の構成成分の構造と機能が研究の主眼であったが、あらたにそれと関連するPGが普遍的分布、器官組織における組成と構造の変動、組織内局在性から注目される

ようになった。AGPの生理的機能の解明には多面アプローチが要求され、化学及び生物学的データを地道に蓄積し、総合的に追求していくことが必要であろう。

この一連の研究には円谷博士が主導的役割を果たし、また、多くの学生諸君の熱意と努力の成果であることを最後に付記しておく。

References

1. S. Yamamoto
Immunological comparison of carbohydrates with blood group ABH-activities contained in vegetable foods: A preliminary study. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 1971–1974 (1982).
2. K. Nakamura, Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto, S. Yamamoto
Arabinogalactan-proteins reacting with eel anti-H agglutinin from leaves of cruciferous plants. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 753–760 (1984).
3. Y. Tsumuraya, K. Nakamura, Y. Hashimoto, S. Yamamoto
Immunological properties of arabinogalactan-proteins from leaves of cruciferous plants. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2915–2917 (1984).
4. Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto, S. Yamamoto, N. Shibuya
Structure of L-arabino-D-galactan-containing glycoproteins from radish leaves. *Carbohydrate Res.* **134**, 215–228 (1984).
5. K. Ogura, Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto, S. Yamamoto
An arabinogalactan-protein from rape leaves. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2851–2857 (1985).
6. Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto, S. Yamamoto
An L-arabinogalactan-D-galactan and an L-arabino-D-galactan-containing proteoglycans from radish (*Raphanus sativus*) seeds. *Carbohydrate Res.* **161**, 113–126 (1987).
7. Y. Tsumuraya, K. Ogura, Y. Hashimoto, H. Mukoyama, S. Yamamoto
Arabinogalactan-proteins from primary and mature roots of radish (*Raphanus sativus* L.). *Plant Physiol.* **86**, 155–160 (1988).
8. M. Sekimata, K. Ogura, Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto, S. Yamamoto
 β -Galactosidase from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *Plant Physiol.* **90**, 567–574 (1989).
9. Y. Tsumuraya, N. Mochizuki, Y. Hashimoto, P. Kovac
Purification of an *exo*- β -(1-3)-D-galactanase of *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*) and its action on arabinogalactan-proteins. Submitted to *J. Biol. Chem.*