植物培養細胞におけるゴルジ複合体の構造と機能†

三ツ井敏明, 木村 信, 伊賀上郁夫

(新潟大学農学部)

ゴルジ複合体は、動植物細胞に普遍的にみられるオルガネラの1つである。このオルガネラは複雑な形態を示し、その構造は湾曲した偏平囊が数枚平行に重層したものと偏平囊の側面に沿って存在する小胞とからなっている。ゴルジ複合体の構成成分はその形態および組織化学的観察より極性を持つことが知られており、それぞれの面をシス面、トランス面と呼んでいる。最もよく知られているゴルジ複合体の機能は、粗面小胞体(RER)で新しく合成された糖タンパク質等の修飾・熟成を行うとともに、それらを正しい細胞内局在部位へ輸送するための選別を行うことである。RERで合成された糖タンパク質等はシス面からゴルジ複合体に入り、シスからトランスへの輸送の間に修飾・熟成が起こり、トランス面から各局在部位に移行する。さらに、最近シスゴルジからトランスゴルジへの輸送は輸送小胞を介して行われることがRothmanらの研究によって明らかにされている⁽¹⁾。

高等植物細胞におけるゴルジ複合体の構造と機能は動物細胞のそれと比べて不明な点が多いが、糖タンパク質糖鎖や細胞壁多糖の合成・修飾が植物ゴルジ複合体の重要な機能の1つとして知られている。植物培養細胞はゴルジ複合体の研究の進展に大きく貢献している。ゴルジ複合体研究のために植物培養細胞を用いる利点は、(1)細胞が活発に増殖し、糖タンパク質や細胞壁多糖を多量に合成することからゴルジ複合体が著しく発達していること、(2)均一な細胞が得られ、また細胞への種々の薬剤投与が容易であること等があげられる。イネ培養細胞を用いた著者らの研究を中心に、高等植物におけるゴルジ複合体研究の流れを紹介したい。

1. アスパラギン結合型糖鎖の合成

アスパラギン結合型糖鎖は、RERでコア糖鎖(高マンノース型)がco-translationalにポリペプチド鎖に導入され、そしてpost-translationalに修飾され複合型糖鎖になる。発芽イネ種子胚盤上皮細胞はアスパラギン結合型糖鎖を持つ α -amylaseを分泌する。ゴルジ複合体に作用して糖タンパク質の糖鎖修飾、細胞内輸送を阻害することが知られているモノニンシンをイネ細胞に与えると、複合型糖鎖を持つ α -amylaseの分泌が抑えられ、細胞内に高マンノース型糖鎖を持つ酵素分子が蓄積することから、植物ゴルジ複合体においても高マンノース型から複合型への糖鎖修飾が行われることが示唆された⁽²⁾。Aliら⁽³⁾は、アスパラギン結合型糖鎖を持つlaccase-type polyphenol oxidaseを活発に分泌するシカモア培養細胞からショ糖密度勾配遠心法によってゴルジ膜を調製し、複合型糖鎖の合成に関与していると考えられる α -mannosidase, galactosyltransferase, fucosyltransferase, xylosyltransferaseがゴルジ膜に局在していることを示した。また、不連続ショ糖密度勾配遠心法によって、glycosyltransferasesが主に含まれるものと α -mannosidaseが多く含まれるものとの2つのゴルジ膜画分が存在することが示され、2つのコンパートメント(シスゴルジとトランスゴルジ)で異なる糖鎖修飾が行われていることが示唆された。さらに、手塚ら⁽⁴⁾は、シカモア培養細胞から単離したゴルジ膜を用いて、キシロースを含むアスパラギン結合型糖鎖のプロセッシング酵素の基質特異性の詳細な検討によりその合成経路を明らかにした(図1)。この結果は、高等植物特有のアスパラギン結合型糖鎖のプロセッシング経路が存在していることを明確に示している。

2. 細胞壁多糖および糖タンパク質糖鎖の合成

植物培養細胞や細胞分裂が活発に行われている組織におけるゴルジ複合体の主要な合成産物は、細胞壁の構成成分である複合多糖や高ヒドロキシプロリン糖タンパク

† Structure and Function of Golgi Complex in Cultured Plant Cells.

Toshiaki MITSUI, Shinn KIMURA, and Ikuro IGAUE (Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Niigata University, 2-Ikarashi, Niigata 950-21)

図1 シカモア培養細胞におけるアスパラギン結合型糖鎖の合成経路。●, マンノース; ■, N-アセチルグルコサミン; □, キシロース; △, フコース; ○, ガラクトース; ▲, グルコース。

質と考えられる。細胞壁マトリクス多糖には中性ヘミセルロースと酸性ペクチン多糖があり、高ヒドロキシプロリン糖タンパク質の代表的なものとして extensin と arabinogalactan protein (AGP) があげられる。川崎⁽⁵⁾は、タバコ培養細胞に ^{14}C -アラビノースを取り込ませると、ラベルはまずゴルジ体に集中し、その後細胞壁へ

の取り込みが始まることから、AGP 等のアラビノシル化はゴルジ体で起こることを明らかにした。つづいて、細胞壁マトリクス多糖の合成に関与している2, 3の酵素が同定され、それらがゴルジ複合体に局在することが示された。最近、Moore ら⁽⁶⁾は、ヘミセルロースの主成分である xyloglucan (XG) およびペクチン多糖の1つである polygalacturonic acid/rhamnogalacturonan-I (PGA/RG-I) に対する特異抗体を用いて、ゴルジ複合体におけるそれらの合成・構築の過程を免疫組織化学的に解析した。XG 抗体による標識はトランスゴルジおよびトランスゴルジネットワーク (TGN) に集中し、一方 PGA/RG-I 抗体による標識はほとんどシスおよび中間ゴルジにのみみられた。また、モノニン処理されたニンジン培養細胞では、著しく膨化したトランス側のゴルジ槽に extensin と同様に XG の蓄積が観察されたが、これとは対照的に、PGA/RG-I の顕著な蓄積はみられなかった。これらの結果から、彼らは以下のようなゴルジ複合体における複合多糖の合成部位と輸送パターンに関するモデルを提唱している: PGA/RG-I の合成に関与している酵素はシスおよび中間ゴルジに局在し、XG 合成に関与している酵素はトランスゴルジおよび TGN に局在する。PGA/RG-I 分子は中間ゴルジから直接細胞壁に輸送され、XG 分子は高ヒドロキシプロリン糖タンパク質とともに TGN より輸送される。

3. イネ培養細胞におけるゴルジ複合体の構造と機能

イネ種子の胚より誘導した培養細胞は、強い増殖力を有するとともに、 α -amylase を活発に分泌しており、顕著なゴルジ複合体の発達がみられる^(7,8)。しかし、これまでイネ細胞からのゴルジ膜の単離は成功していなかった。われわれは、種々の方法を用いてイネ培養細胞からのゴルジ膜の単離を試み、イネ細胞においてはグリセロール密度勾配遠心法が最も有効であることを見出した。また、peroxidase 標識レクチンを用いたレクチンプロット法により、Con-A, LCA (Man 特異的), WGA (GlcNAc 特異的), RCA-I, PNA (Gal 特異的), および UEA-I (Fuc 特異的) のゴルジ膜糖タンパク質への結合性を調べたところ、PNA と UEA-I はゴルジ膜に存在する数種の糖タンパク質に特異的に結合するが、他の膜糖タンパク質にはまったく結合しないことがわかった^(9,10)。われわれは、以下の実験結果から PNA および UEA-I によって認識される糖タンパク質の糖鎖は O-結合型糖鎖であると考えている。(1) PNA と UEA-I は、

それぞれ O-結合型糖鎖特有の $\text{Gal}\beta 1-3 \text{GalNAc}$ -構造と $\text{Fuc}\alpha 1-2 \text{Gal}\beta 1-4 \text{GlcNAc}$ -構造を強く認識する。(2) N-結合型糖鎖には影響しない条件で、PNA-, UEA-I-認識糖タンパク質をアルカリ処理するとその糖鎖が消失する。(3) $\text{Gal}\beta 1-3 \text{GalNAc}$ -構造に特異的に作用する O-glycanase は PNA-認識糖タンパク質の糖鎖を部分的に切断するが、N-結合型糖鎖を切断することができる glycopeptidase (almond) は PNA-, UEA-I-認識糖タンパク質のそれらにまったく作用しない。現在、これらの糖鎖構造の決定を試みている。

ゴールドコロイド標識レクチンを用いた組織化学的研究から、PNA と UEA-I の結合部位がゴルジ複合体に集中していることが確認された。これらの結合部位は特定のコンパートメントに限られているわけではなく、ゴルジ槽の先端構造に多くみられた。UEA-I の場合、液胞の内容物にも顕著なラベルが観察されたが、液胞膜にはまったくラベルはみられなかった⁽⁸⁾。これらの結果は上述の生化学的実験結果と一致するものである。次に、PNA-, UEA-I-認識糖タンパク質の糖鎖合成および局在化に及ぼすブレフェルディン A (BFA)、モノニンシン、そしてツニカマイシンの影響を調べた。BFA は、最近注目を集めている細胞内輸送阻害剤で、ゴルジ複合体においては RER からシスゴルジへの輸送あるいは非クラスリン被覆小胞によるゴルジ間輸送を抑えることが報告されている^(11,12)。イネ培養細胞に BFA を与えると、動物細胞でみられるような顕著なゴルジ複合体の層状構造の消失は起こらないが、正常細胞ではみられない細長の構造体や cup-shape 様の構造体が観察された。また、PNA-, UEA-I-認識糖タンパク質の糖鎖合成が BFA 処理によってほぼ完全に阻害されることが、組織化学的お

よび生化学的実験結果により示された。モノニンシン処理されたイネ細胞においては、ゴルジ複合体の著しい膨化が観察されたが、PNA-, UEA-I-認識糖タンパク質は膨化したゴルジ嚢に局在していることがみられ、単離ゴルジ膜にもこれらが存在していることが確認された。一方、ツニカマイシン処理では BFA でみられた糖鎖合成阻害はまったく起こらなかった (図 2)。以上の結果は、トランスゴルジ以前のコンパートメントで、PNA-, UEA-I-認識糖タンパク質の糖鎖合成が行われることを強く示唆するものである。

UDP-glucose pyrophosphorylase は、多糖、糖タンパク質の糖鎖、ショ糖等の合成におけるグルコース供与体である UDP-グルコースの細胞内レベルを調節している酵素である。一般的に、この pyrophosphorylase は細胞質に局在する酵素であるといわれている。本酵素に対する特異抗体を用いてイネ細胞における免疫組織化学的局在性を調べたところ、興味深いことにゴルジ複合体にも抗体の結合が観察された。本酵素がゴルジ複合体に局在することは、単離ゴルジ膜を用いた生化学的実験によっても確認された。ゴルジ複合体では、細胞壁多糖や糖タンパク質の糖鎖合成が UDP-グルコースを用いて行われており、このオルガネラに本酵素が局在していても何の矛盾もないと思われる⁽¹³⁾。上述の実験結果が真実ならば、膜結合型ポリソームに本酵素をコードする mRNA が存在するはずである。現在、われわれはこのゴルジ膜結合型 UDP-glucose pyrophosphorylase の mRNA を検索している。

われわれは、inosine diphosphatase (IDPase) や 1, 4- β -glucan synthase (GS-I) 等のゴルジ複合体に局在することが知られている酵素の精製も試みている。GS-I

図 2 PNA 認識糖タンパク質の局在化に及ぼすモノニンシンと BFA の影響
○, PNA-認識糖鎖; ●, PNA-非認識糖鎖; 〰, ポリペプチド鎖。

の精製法は先に伊賀上らが述べているとおりである。IDPase は、ゴルジ膜から Triton X-100 で可溶化し、Con A-Sepharose, DEAE-Toyopearl, EAH-Sepharose, Cellulofine GCL-2000 sf 等のカラムを用いることによって精製された。IDPase の分子量は、ゲル濾過法より 200 kDa, SDS-PAGE 法より 55 kDa と推定され、同一サブユニットからなるオリゴメリック構造をとっていると考えられる。精製酵素の基質特異性を調べたところ、本酵素は、IDP, UDP, および GDP に対して高い特異性を示す nucleoside diphosphatase であることが明らかになった。これは、本酵素がゴルジ複合体で行われる糖鎖合成の調節に関与していることを強く示唆するものである。さらに、GS-I が存在するゴルジ膜に精製した IDPase を加えると、GS-I の酵素活性が促進されることが見出されており、IDPase の存在意義が確認された。

最近、高等動物細胞において、ゴルジ体膜タンパク質の局在化機構に関するきわめて興味深い知見が報告されている。すなわち、ゴルジ体膜タンパク質のキメラタンパク質の局在を追跡することによって、ゴルジ局在シグナルはトランスメンブレンドメインにあることが示唆されたのである⁽¹⁴⁾。高等植物細胞においてもゴルジ局在シグナルがあるのか？ 動物同様にそれはトランスメンブレンドメインにあるのか？ われわれが最も知りたい疑問である。

- (1) J. E. Rothman and L. Orci : *FASEB J.*, **4**, 1460—1468 (1990).
- (2) T. Mitsui, T. Akazawa, J. T. Christeller, and A. M. Tartakoff : *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**, 315—328 (1985).
- (3) M. S. Ali, T. Mitsui, and T. Akazawa : *Arch. Biochem. Biophys.*, **241**, 421—431 (1986).
- (4) K. Tezuka, M. Hayashi, H. Ishihara, T. Akazawa, and N. Takahashi : *Eur. J. Biochem.*, **203**, 401—413 (1992).
- (5) 川崎信二 : 化学と生物, **21**, 420—422 (1983).
- (6) P. J. Moore, K. M. M. Swords, M. A. Lynch, and L. A. Staehelin : *J. Cell Biol.*, **112**, 589—602 (1991).
- (7) M. Hayashi, A. Tsuru, T. Mitsui, N. Takahashi, H. Hanzawa, Y. Arata, and T. Akazawa : *Eur. J. Biochem.*, **191**, 287—295 (1990).
- (8) S. Kimura, T. Mitsui, and I. Igaue : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1656—1657 (1992).
- (9) T. Mitsui, S. Kimura, and I. Igaue : *Plant Cell Physiol.*, **31**, 15—25 (1990).
- (10) S. Kimura, K. Matsuda, T. Mitsui, and I. Igaue : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 340—341 (1992).
- (11) 高月 昭 : 化学と生物, **30**, 236—243 (1992).
- (12) H. R. B. Pelham : *Cell*, **67**, 449—451 (1991).
- (13) S. Kimura, T. Mitsui, T. Matsuoka, and I. Igaue : *Plant Physiol. Biochem.*, in press.
- (14) S. M. Hurtley : *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 2—3 (1992).