植物細胞表層糖鎖の細胞生物学的研究†

(1992 年度農芸化学奨励賞受賞)

林 隆 久

(京都大学木質科学研究所)

高等植物の細胞壁は、原形質を包み込み、吸水の程度によって成長をコントロールし、細胞のサイズや形を決めている。すなわち、その植物の顔(形態)を決定しているといえる。植物細胞は、その壁と膨圧との平衡で力学的に保たれているが、植物ホルモン・オーキシンにより、壁に“ゆるみ”が生じると細胞は伸長・肥大することができるようになる。この壁のゆるみは、セルロースミクロフィブリル間のゆるみであり、このフィブリルを架橋している表層糖鎖キシログルカンの分解によってもたらされることがわかってきた。キシログルカンとセルロースの化学構造を図1に示す。本研究は、ダイズ培養細胞、エンドウ胚軸およびコットン繊維細胞を用いて、細胞表層糖鎖キシログルカンとセルロースの生合成・生分解を細胞生物学的に研究するなかで、オーキシンによる細胞の伸長・肥大という、植物細胞の成長メカニズムの最も基本的なしくみについて重要な知見が得られたものである。本総説では、紙面の関係でこれら糖鎖生合成・生分解を中心に植物細胞の成長・生理について述べるにとどめる。

1. 糖鎖の生合成とその制御

植物細胞表層糖鎖は、ゴルジ体(膜)または原形質膜で合成される。原形質膜で合成される糖鎖は、セルロースと1,3-β-グルカンのみで、その他の糖鎖はすべてゴルジ体で合成される。ゴルジ体で合成された糖鎖はゴルジ小胞を経由して輸送され、細胞外へ分泌される。その際のゴルジ膜と原形質膜との融合時において、糖鎖が細胞壁構成成分として組み込まれていく集合機構は、セルロースの合成と深くかかわっている。

高等植物の原形質膜を電子顕微鏡によって観察すると、外原形質膜に結合しているセルロースミクロフィブリル末端の複合体(20~30 nm)と、内原形質膜に存在するロゼットとの巨大な複合体が観察される⁽¹⁾。この巨大な複合体がセルロース合成酵素複合体であり、基質となるUDP-グルコースは細胞内より取り込まれて細胞外にセルロースを分泌する。合成されたセルロース分子はたがいに水素結合で結びつき、結晶構造を形成してミクロフィブリルとなる。

ゴルジ体における糖鎖の合成は、細胞質中の糖供与体(糖ヌクレオチド)がゴルジ体内部のルーメンに特異的なキャリアーによって移送された後、膜内層に結合した糖転移酵素によって糖鎖が合成されていく。ヘミセルロース、ペクチンおよび糖蛋白は、すべてここで糖鎖の合成が完了する。ゴルジ小胞中には、セルロース合成酵素前駆体が存在し、糖鎖が分泌されてゴルジ膜が原形質膜と融合する時点でセルロース合成酵素が活性型となる。

(1) 糖鎖供与体

植物の糖鎖合成は、糖ヌクレオチドの高エネルギーリン酸結合のエネルギーを利用して、糖転移酵素が特異的な結合様式に糖鎖を重合していく。UDP糖は、植物糖鎖構成単糖の大部分の生合成に関与しており、その制御機構は複雑に制御されている。図2にUDP糖の生合成経路を示す。UDP-グルコースからUDP-グルクロン酸を経てUDP-キシロースが合成される経路は、不可逆的な反応である。それぞれUDP-グルコース・デヒドロゲナーゼ[EC 1.1.1.22]およびUDP-グルクロン酸カルボキシラーゼ[EC 4.1.1.35]によって触媒されるが、最終産物であるUDP-キシロースは両酵素をアロステリックに阻害する⁽²⁾。また、UDP-グルコースはUDP-グルクロン酸カルボキシラーゼをアロステリックに活性化する⁽³⁾。

UDP-キシロースは、高等植物はもとより微生物・動

† Cell Biological Studies on the Surface Carbohydrate of Plant Cell.
Takahisa HAYASHI (Wood Research Institute,
Kyoto University, Uji 611)

図 1 キシログルカンとセルロースの化学構造式

物において広くその存在が認められている。しかしながら、生体内における UDP-キシロースの存在量はきわめて少ない⁽⁴⁾。これは、UDP 糖修飾反応系において、UDP-キシロースがフィードバックインヒビターとしてその系を制御しているだけでなく、糖鎖合成反応系においてその代謝回転が非常に速いためと考えられる。UDP-キシロース生合成に関与している UDP-グルクロン酸カルボキシリアーゼには、ゴルジ膜結合型と可溶性の2つの性状のものが存在する。

ダイズのゴルジ膜結合型 UDP-グルクロン酸カルボキシリアーゼは、ゴルジ膜にジギトニンを加えて可溶化することにより活性が増大することから、膜の内側に酵素が存在することが示唆された。脱炭酸に関与するこの酵素の基質に対する親和性 K_m 値が $240 \mu\text{M}$ であるのに対して、UDP-グルクロン酸を直接ゴルジ膜に与えてキシログルカン合成させたときの見かけ上の K_m 値は $31 \mu\text{M}$ であった⁽⁵⁾。この値は、UDP-キシロースに対するキシログルカン合成酵素の K_m 値 ($28 \mu\text{M}$) とほぼ同じである⁽⁶⁾。このことは、ゴルジ体中で UDP-キシロースの合成が起こるとともに、そのターンオーバーが非常に速いことを示している。

可溶性の UDP-グルクロン酸カルボキシリアーゼ活性を、幼植物を用いてその成長・分化とともに活性の変

動を追うと、すでに成長の終了したあるいは分化した組織、すなわち二次壁の合成が起きている部位で活性が高くなることが認められている⁽⁷⁾。このことは、可溶性の酵素はキシログルカンの合成よりもキシランの合成に関与しており、生成した UDP-キシロースがキャリアによってゴルジ膜を直接通過し、キシランの糖鎖合成に供されていることを示唆している。高等植物において、主要なヘミセルロースであるキシログルカンとキシランはそれぞれ一次壁および二次壁に由来するものであり、これらがどのような調節により作り分けられるのか、植物細胞の成長と分化が UDP-キシロースの代謝変化に負うところのものは大きい。

UDP-キシロース、UDP-グルコースまたは UDP-ガラクトースをエンドウのミクロソーム画分とインキュベートすると、ポリプレニル酸キシロース⁽⁸⁾やポリプレニル酸グルコース⁽⁹⁾およびポリイソプレニルニリン酸ガラクトース⁽¹⁰⁾様の脂質中間体が生成したが、現在のところキシログルカン生合成に関与している証拠は得られていない。

(2) キシログルカンの生合成

キシログルカンは、高等植物の一次壁に特異的に存在する多糖で、その骨格構造はセルロースと同じ β -1,4-グルカンである⁽¹¹⁻¹³⁾。グルコース残基にキシロースを転移する活性 6- α -キシロシルトランスフェラーゼは、合成された糖鎖混合物を *Aspergillus oryzae* の酵素標品によって分解し、その分解物のペーパークロマトグラムからイソプリメバロース (6-O- α -D-xylopyranosyl-D-glucopyranose) の量を測定することによって得られた⁽¹⁴⁾。この酵素標品は、セルラーゼ、 β -グルコニダーゼ

その他多くの糖鎖分解酵素活性を有するが、 α -キシロシダーゼ活性を欠いているため、キシログルカンに特異的な2糖が得られたものである。

キシログルカン合成酵素は、UDP-グルコースとUDP-キシロースを基質として、endogenousなプライマーの還元末端グルコース残基のO-4の位置にグルコースを β 型で転移し、O-6の位置にキシロースを α 型で転移させる。キシロースの転移は、UDP-グルコースの添加により増大する($K_s=24\ \mu\text{M}$)。グルコースの転移もまたUDP-キシロースにより活性化される($K_s=10\ \mu\text{M}$)が、高濃度のUDP-キシロースは反応を阻害する^(6,15,16)。このようにキシログルカン合成酵素は、UDP糖レベルの制御のもとにグルコースとキシロースを交互に転移させて協同的に糖鎖を合成する。

酵素により合成されたキシログルカンをエンド-1,4- β -グルカナーゼで分解することにより、主としてヘプタサッカライド(グルコース-キシロース=4:3)およびペンタサッカライド(グルコース-キシロース=3:2)が得られた。ペンタサッカライドより低級のオリゴ糖の生成が認められなかったことから、キシログルカン複合酵素は5糖単位までをすみやかに組み立てることが示唆された⁽¹⁷⁾。

コットン繊維細胞は、3週間、同調的に細胞を伸長させる。キシログルカン合成酵素活性は、16日目で最大となり、その後急激に低下する⁽¹⁸⁾。細胞の伸長が止まる3週目にセルロースが急激に合成され、32日間で細胞壁にセルロースが沈着する。このことは、キシログルカン合成酵素とセルロース合成酵素は、細胞の成長・分化とともに制御されていることを示唆している。

(3) セルロースの生合成

セルロースは、植物の細胞表層をおおい、細胞の大きさや形を決めている細胞壁の主要な構成成分である。しかしながら、現在のところ、その生合成機構に関する知見は非常に乏しく、高等植物においてはいまだに*in vitro*での合成に成功していない⁽¹⁹⁾。

一般に、植物の膜酵素標品を用いてUDP-グルコースから合成された産物は、 β -1,4-グルカンの他に、 β -1,3-グルカン、 β -1,3:1,4-グルカンおよびキシログルカン等の混合物になる。現時点ではそれぞれの合成酵素を可溶化して分離することに成功していないため、高濃度(mMレベル)のUDP-グルコースを基質として用いた場合には β -1,3-グルカン合成が活性化され、低濃度

(μM レベル)の基質と Mg^{2+} イオン(10mM)の存在下では、 β -1,4-グルカンの合成が活性化されるといった現象がみられる^(20,21)。これら両酵素活性は細胞内で局在しており、 β -1,4-グルカン合成酵素[EC 2.4.1.12]はゴルジ膜(マーカーとしてグルカンシンテターゼIと呼ばれている)に、 β -1,3-グルカン合成酵素[EC 2.4.1.34]は原形質膜(グルカンシンテターゼII)に局在している。したがって、このUDP-グルコースを基質とする β -1,4-グルカン合成酵素活性はゴルジ体には存在するが、セルロース合成の場合がゴルジ体ではなくて原形質膜であることは、電子顕微鏡による観察や生化学的実験からも証明されている。したがって、まだ誰も原形質膜からの酵素を用いて真のセルロースを合成することには成功していないわけである。

原形質膜由来の酵素によって合成される β -1,3-グルカンは、高等植物では主要な細胞壁構成成分とは認められず、傷害応答合成多糖であると考えられている。したがって、植物の細胞壁や原形質膜がなんらかの損傷を受けたとき(原形質分離、化学・物理的損傷等)、 β -1,3-グルカンの合成が誘導される。また、プロトプラストから再生された初期の細胞壁は、セルロースに比べて β -1,3-グルカン含量が非常に高い⁽²²⁾。プロダクトエントラップメント法により、マングマメ由来の β -1,3-グルカン合成酵素活性をジギトニンで可溶化して部分精製した。この合成酵素を電子顕微鏡によって観察したところ、20~30nmのドーナツ形の巨大な複合体が認められた(図3)⁽²³⁾。このことから、セルロース合成酵素蛋白のコンフォメーションが*in vitro*で変化し、 β -1,3-グルカン合成酵素に変換するという仮説を提唱した。

図3 部分精製した β -1,3-グルカン合成酵素の電子顕微鏡写真(スケールは0.1 μm)

2. 細胞伸長する一次壁における糖鎖

(1) キシログルカンとセルロースのネットワーク

キシログルカンは、骨格が β -1,4-グルカンであるため、*in vitro* でセルロースに水素結合することができる。その結合反応は酸性 pH で安定で、pH 6 以上では結合反応が阻害される。キシログルカンとセルロースが結合する条件下に各種多糖を加えて、その阻害効果をみたところ、他の糖鎖の存在下でも反応が阻害されないことが示された⁽²⁴⁾。このことから、キシログルカンとセルロースの水素結合は特異的に起こり、細胞壁中では、キシログルカンがセルロースマイクロフィブリルに特異的に結合していくことが示唆された。生細胞に $[^3\text{H}]$ フコースを取り込ませてキシログルカンのフコース残基をトリチウムでラベルしたのち、そのオートラジオグラフィをみたものや、複合体を蛍光色素でラベルしたフコース結合レクチンで染めて蛍光顕微鏡で観察したところ、フコース残基は、セルロースマイクロフィブリルに均一に分散しているとともに、フィブリルに密着していることが認められた。表層のキシログルカンをグルカナーゼ処理によって除くと、マイクロフィブリルどうしの結びつきが弱くなり、細胞の形を維持することが困難になることも示された。複合体の表層を電子顕微鏡によって観察したところ、キシログルカンを除去することにより、マイクロフィブリルの繊維が鮮明に現れた⁽¹²⁾。

キシログルカンはセルロースマイクロフィブリルを架橋

するような形で存在することが示唆された。横と横で平行なフィブリルや、垂直に交わったフィブリルどうしを架橋して、細胞壁に強さを与えていると考えられる。すなわち、キシログルカンは、セルロースマイクロフィブリルをクロスリンキング（架橋）している糖鎖であるといえる。このように成長する細胞壁においてキシログルカンは、セルロースとネットワークを形成している。その形成機構として、細胞内から分泌されるキシログルカンがセルロースと直ちに結合し、それぞれのマイクロフィブリルが架橋されて巨大複合体を作るように伸展していくモデルを提唱した（図 4）⁽²⁵⁾。

(2) オーキシニンにより誘導されるエンド-1,4- β -グルカナーゼの性質

成長している植物の細胞壁には、エンド-1,4- β -グルカナーゼが分泌されている。これらグルカナーゼ活性は、キシログルカンの β (1 $\rightarrow$ 4) グルコシド結合だけでなく、カルボキシメチルセルロース、 β -1,3:1,4-グルカンやセロオリゴ糖も分解することができる⁽²⁶⁾。植物のエンド-1,4- β -グルカナーゼがキシログルカンを分解する様式は、微生物のセルラーゼとまったく同じであり、グルコース 4 残基に 1 個存在する、枝のないグルコース残基の還元末端側を加水分解する。

キシログルカンに対する親和性は、各種 β -1,4-グルカンに対する親和性とほぼ同じであるが ($K_m=2.5\sim 3.5$ mg/ml), V_{max} の値が 10~50 分の 1 であるという

図 4 キシログルカンが分泌されてセルロースと複合体を形成するモデル

結果が示された⁽²⁷⁾. このことは、グルコース 4 残基に 1 箇所しか分解できないというキシログルカンの構造上の点から、プロダクティブな酵素・基質複合体をとりにくいためであろうと考えられる. したがって、この酵素はキシログルカンをノナサッカライドおよびヘプタサッカライドといった高級オリゴ糖に分解する⁽²⁸⁾. 生成したオリゴサッカライドは、細胞壁中のグリコシダーゼにより、さらに単糖にまで分解されることになる⁽²⁹⁾.

エンド-1, 4- β -グルカナーゼの抗体を用いた免疫電顕から、分子量 70 kd の酵素は、細胞壁の内表面に分泌されている⁽³⁰⁾. この酵素は、エチレンによっては誘導されず、グルカン合成酵素とともにオーキシンによって誘導されることが認められた⁽³¹⁾.

(3) セルロースはエンド-1, 4- β -グルカナーゼの基質か?

オーキシンはエンド-1, 4- β -グルカナーゼの生合成を *in vivo* で誘導する⁽³²⁾. 合成されたグルカナーゼは細胞壁に分泌されて、そこで内層面のキシログルカンに結合する. 精製した酵素を用いて、キシログルカンとセルロースからなる複合体を基質として、インキュベイトするとキシログルカンが著しく可溶化された. セルロースに

強固に結合しているままのキシログルカン分子も還元末端の数が増加し、低分子化していた. このことから、キシログルカンはより加水分解されやすいことが示された (表 1)⁽²⁷⁾.

植物組織をオーキシン処理することにより、キシログルカンとセルロース含量が増加するとともに、エンド-1, 4- β -グルカナーゼ活性が誘導される. その結果、キシログルカンの平均分子量が著しく低下するとともに、低分子化した可溶性のキシログルカンが増加する (表 2)⁽²⁷⁾. このような現象は、*in vivo* では細胞壁の内表面で生じているに違いない. キシログルカンの分解はセルロースミクロフィブリルの架橋をゆるめ、フィブリルどうしをすべりやすくするだろう. このように、エンド-1, 4- β -グルカナーゼ活性の誘導はキシログルカンの分解につながっている. エンド-1, 4- β -グルカナーゼは、*in vivo* ではキシログルカン分解酵素として機能していると結論した.

3. オーキシンによる伸長成長

植物細胞は、細胞質が原形質膜という薄い脂質二重層の膜で包まれ、それを細胞壁という強固な壁で押さえつ

表 1 エンド-1, 4- β -グルカナーゼによるキシログルカン/セルロース複合体の分解

時間 (h)	複合体減少量 (mg)		可溶化糖量 (mg)	還元末端増加量 (ng Glc)	
	キシログルカン	セルロース		キシログルカン	セルロース
0	2.9	3.9	0	0	0
3	2.8	3.9	0.18	393	10
6	2.4	3.8	0.56	600	11
9	2.1	3.8	1.12	1200	15
48	1.6	3.6	1.79	1155	19

還元末端増加量は NaBT₄ で処理した後、各糖鎖へ取り込まれた放射能から換算した.

表 2 キシログルカンとセルロースに対するオーキシンの効果

糖鎖の変化	0 時間	48 時間後	
	コントロール	無処理	オーキシン
含量	$\mu\text{g}/\text{胚軸切片}$		
細胞壁キシログルカン	28	59	137
可溶化キシログルカン	0.5	0.2	1.3
セルロース	40	515	615
重合度	$\text{DP} \times 10^3$		
細胞壁キシログルカン	1.1	0.76	0.17
セルロース	8.4	11.0	9.2

エンドウ上胚軸の伸長部位 5 mm をペンで印をつけて、オーキシン (4.5 mM) をスプレーした. エンド-1, 4- β -グルカナーゼ活性は、この処理により、85 倍に増加した.

つみ込んでいる。すなわち植物細胞は、細胞質に基づく浸透圧と、内に押さえ込もうとする壁圧との均衡によって保たれているといえる。

細胞にオーキシンを与えることにより、原形質膜のプロトンポンプが活性化され、生成した H^+ によって細胞壁が酸性になる。細胞壁が酸性になることによって細胞壁構成糖鎖間の結びつきが弱まる。これは直接的には、エンド-1,4- β -グルカナーゼを活性化させることによって、セルロースマイクロフィブリルに水素結合しているキシログルカン分解し、マイクロフィブリルの架橋を弱めて細胞壁にゆるみをもたらすことになる。その結果、均衡がくずれ、吸水が生じて細胞伸長に結びつくというスキームが示唆された^(25,33)。さらにオーキシンはエンド-1,4- β -グルカナーゼの遺伝子を発現させ、酵素蛋白を誘導してキシログルカンの低分子化を引き起こした。壁に存在する細胞表層糖鎖が、植物細胞の最も基本的な成長メカニズムをコントロールしていることを示すものである。

本研究は、東北大学農学部農芸化学科農産利用学研究室、カナダ国 McGill 大学生物学科および米国 Atlantic Richfield 社植物細胞研究所で行われたものである。終始ご指導いただきました東北大学名誉教授松田和雄先生、McGill 大学教授 G. A. MacLachlan 先生、Atlantic Richfield 社主任研究員 D. P. Delmer 先生（現在イスラエル国 Hebrew 大学教授）および弘前大学助教授加藤陽治先生に厚くお礼を申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦いただきました農芸化学会関西支部および東北支部の諸先生方に御礼申し上げます。

- (1) S. Muller and R. M. Brown, Jr.: *J. Cell Biol.*, **84**, 315—326 (1980).
- (2) J. L. Strominger and L. W. Mapson: *Biochem. J.*, **66**, 567—572 (1957).
- (3) K. V. John, J. S. Schutzbach, and H. Ankel: *J. Biol. Chem.*, **252**, 8013—8017 (1977).
- (4) T. Hayashi and K. Matsuda: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2907—2908 (1981).
- (5) T. Hayashi, T. Koyama, and K. Matsuda: *Plant Physiol.*, **87**, 341—345 (1988).
- (6) T. Hayashi and K. Matsuda: *J. Biol. Chem.*, **256**, 11117—11122 (1981).
- (7) G. Dalessandro and D. H. Northcote: *Planta*, **134**, 39—44 (1977).
- (8) T. Hayashi and G. MacLachlan: *Biochem. J.*, **217**, 791—803 (1984).

- (9) A. Camirand, K. Torossian, T. Hayashi, and G. MacLachlan: *Can. J. Bot.*, **63**, 867—871 (1985).
- (10) T. Hayashi and G. MacLachlan: *Phytochemistry*, **23**, 487—492 (1984).
- (11) T. Hayashi, Y. Kato, and K. Matsuda: *Plant Cell Physiol.*, **21**, 1405—1418 (1980).
- (12) T. Hayashi and G. MacLachlan: *Plant Physiol.*, **75**, 596—604 (1984).
- (13) T. Hayashi and D. P. Delmer: *Carbohydr. Res.*, **181**, 273—277 (1988).
- (14) T. Hayashi, Y. Kato, and K. Matsuda: *J. Biochem.*, **89**, 325—328 (1981).
- (15) T. Hayashi and K. Matsuda: *Plant Cell Physiol.*, **22**, 517—523 (1981).
- (16) T. Hayashi and K. Matsuda: *Plant Cell Physiol.*, **22**, 1571—1584 (1981).
- (17) T. Hayashi, T. Nakajima, and K. Matsuda: *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1023—1027 (1984).
- (18) D. P. Delmer, G. Cooper, D. Alexander, J. Cooper, T. Hayashi, C. Nitsche, and M. Thelen: *J. Cell Sci.*, **2**, 33—50 (1985).
- (19) 林 隆久, 松田和雄: 澱粉科学, **33**, 47—58 (1986).
- (20) W. J. Van Der Woude, C. A. Lembi, D. J. Morre, J. I. Kindinger, and L. Ordín: *Plant Physiol.*, **54**, 333—340 (1974).
- (21) T. Hayashi and G. MacLachlan: "Cellulose: Structure, Modification, and Hydrolysis," ed. by R. A. Young and R. M. Rowell, Wiley, New York, 1986, pp. 67—76.
- (22) T. Hayashi, D. R. Polonenko, A. Camirand, and G. MacLachlan: *Plant Physiol.*, **82**, 301—306 (1986).
- (23) T. Hayashi, S. M. Read, J. Bussell, M. Thelen, F. C. Lin, R. M. Brown, Jr., and D. P. Delmer: *Plant Physiol.*, **83**, 1054—1062 (1987).
- (24) T. Hayashi, M. P. F. Marsden, and D. P. Delmer: *Plant Physiol.*, **83**, 384—389 (1987).
- (25) T. Hayashi: *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 139—168 (1989).
- (26) Y. S. Wong, G. B. Fincher, and G. A. MacLachlan: *J. Biol. Chem.*, **252**, 1402—1407 (1977).
- (27) T. Hayashi, Y. S. Wong, and G. MacLachlan: *Plant Physiol.*, **75**, 605—610 (1984).
- (28) T. Koyama, T. Hayashi, Y. Kato, and K. Matsuda: *Plant Cell Physiol.*, **22**, 1191—1198 (1981).
- (29) T. Koyama, T. Hayashi, Y. Kato, and K. Matsuda: *Plant Cell Physiol.*, **24**, 155—162 (1981).
- (30) A. K. Bal, D. P. S. Verma, H. Byrne, and G.

- A. Maclachlan : *J. Cell Biol.*, **69**, 97—105 (1976).
- (31) T. Hayashi and G. Maclachlan : *Plant Physiol.*, **76**, 739—742 (1984).
- (32) D. P. S. Verma, G. A. Maclachlan, H. Byrne, and D. Ewings : *J. Biol. Chem.*, **250**, 1019—1026 (1975).
- (33) T. Hayashi : "The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form," ed. by C. W. Lloyd, Academic Press, London, 1991, pp. 131—144.
-