

ツニカマイシン存在下での培養における水稻 α -グルコシダーゼの細胞内分布の変化

山崎良樹・今野晴義

糖蛋白質は、糖を共有結合した蛋白質で、自然界に広く分布している。しかし糖鎖の意義については、それほど重要に考えられてなかった。ところが最近になって各種認識への糖鎖の関与が論じられるようになり、糖蛋白質糖鎖が重要な生物学的意義を有していると考えられるようになった^{1,7,12)}。しかし明白に実証されたケースは殆どない。糖鎖の意義の一つに細胞内での存在部位への運搬^{5,11)}が考えられている。糖蛋白質糖鎖には、N-グリコシド型とO-グリコシド型の2種がある。前者は、多くの糖蛋白質にみられ、研究も多い。N-グリコシド型糖鎖の生合成は、粗面小胞体でドリコールリン酸サイクルを介する蛋白質のグリコシル化後、粗面小胞体とゴルジ体でプロセッシングを受けて完成する。プロセッシング完了後、糖蛋白質は、目的部位へ運搬される。このゴルジ体での目的部位毎の選別に糖鎖が重要な役割を演じていると考えられている。

我々は、水稻培養細胞から存在部位を異にする3種の α -グルコシダーゼを単離して以前に報告した¹⁸⁾。それら酵素は、いずれもCon A-Sepharoseに吸着され、メチル α -D-グルコシドにより溶出される糖蛋白質である。

一方、*Streptomyces lysosuperificus*により生産される抗生物質ツニカマイシン¹⁴⁾は、N-グリコシド型糖鎖の生合成を特異的に阻害することが動植物で報告された⁴⁾。それ以後、糖鎖の研究にツニカマイシンがよく使用されるようになった。

本報では、水稻細胞の生産する3種の α -グルコシダーゼについて存在部位と糖鎖との関係を明らかにするため、ツニカマイシン添加と無添加で培養を行い、得られた α -グルコシダーゼの諸性質に検討を加えた。

実験方法

1. 実験材料と試薬

水稻培養細胞(農林16号)は東北大学農学部小島邦彦助教授から恵与され、1982年以後当研究室で継代培養したものである。ツニカマイシンは和光純薬工業株式会社の製品である。他の試薬は前報¹⁸⁾と同じ製品である。

2. 細胞培養

水稻培養細胞をR-2培地⁹⁾中で暗所、25°C、15日間振盪培養(88 strokes/min)して生育させた。ツニカマイシンは別に滅菌し、培養直前に培地に無菌的に加えた。培養終了後、細胞と外液とを濾過で分離し、それぞれ使用するまで-20°Cで保存した。

3. 分析方法

α-グルコシダーゼ活性の測定 50 mM 酢酸緩衝液(pH 4.5) 0.5ml中にマルトース 2.8 μmole と適当量の酵素を加え、37°Cで1時間反応させた。反応後、沸騰水浴中に反応液を5分間浸漬して反応を停止させ、生成したグルコースをDahlqvist²⁾が改変したPapadopoulos & Hess¹⁰⁾の方法で測定した。上記の反応条件下で1時間にマルトースからグルコース1 μmole を遊離させる酵素量を1単位とした。

蛋白質量の測定 蛋白質の定量は、Warburg & Christian¹⁵⁾の方法によった。カラムクロマトグラフィーの各々の画分の蛋白質は、280 nmにおける吸光度測定によった。

ディスク電気泳動 Reisfeld *et al.*¹³⁾の方法によりポリアクリルアミド中、pH 4.0で電気泳動を行った。ゲルの染色と脱色はWeber & Osborn¹⁶⁾の方法によった。

ペーパークロマトグラフィー 東洋濾紙(No.51)に試料をスポットし、1-ブタノール：ピリジン：水(6：4：3, v/v/v)の展開剤を使用し室温で上昇法により3回の反復展開を行い風乾後、硝酸銀発色試薬¹⁷⁾にて検出した。

ガスクロマトグラフィー 中性糖の分別定量は、Laine らの方法⁸⁾によって試料をTMS化後ガスクロマトグラフィーで行った。ガスクロマトグラフィーは、3%OV-1をクロモソルブW(80~100メッシュ)にコートした樹脂を充填した2本のガラスカラム(3×3000mm)とFID検出器を付属した日立ガスクロマト装置(163型)にて行った。各々の中性糖の分離は、窒素ガス流量を40ml/分に設定し、140~220°Cを5°C/分の昇温にて行った。

実 験 結 果

1. ツニカマイシンによる細胞生育およびα-グルコシダーゼ生産に及ぼす影響

ツニカマイシンを培養液中に1 μg/ml, 3 μg/ml, 5 μg/mlになるように加え実験方法で述べたように培養した。Table 1のようにツニカマイシン添加量の増加にともない細胞の生育は抑えられるが、細胞外へ分泌されるα-グルコシダーゼ(α-グルコシダーゼI)活性/細胞は著しく増加した。細胞内にとどまるα-グルコシダーゼについては、超音波破碎後の細胞から緩衝液のみで回収される酵素(α-グルコシダーゼII)が非常に影響を受けて減少したが、可溶化に2M塩化ナトリウムを必要とする酵素(α-グルコシダーゼIII)は殆ど影響を受けなかった。ツニカマイシンを5 μg/mlになるように加えて培養したのち、著しく生育が抑制された細胞をツニカマイシン無添加の培養液へ移植すると細胞は正常な生育をした。Table 2のようにツニカマイシン無添加培養では、細胞の生育度に関係なくα-グルコシダーゼI活性/細胞は殆ど同じであった。

ツニカマイシンを培養液中に5 μg/mlになるように加え実験方法に従って培養したのち各種酵素活性を測定した(Table 3)。この結果細胞外へ分泌されるマルトースおよび

Table 1. Effect of tunicamycin concentration on the production of α -glucosidases

	Tunicamycin concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	0	1	3	5
Cell (g, wet weight)	22.4	16.0	9.7	3.2
Protein (mg/cell, g)				
I *	0.42	0.30	0.65	1.29
II *	0.71	1.13	0.47	0.67
III *	0.22	0.52	0.44	0.42
α -Glucosidase activity (units/cell, g)				
I *	0.29	0.28	0.43	2.16
II *	0.57	0.67	0.14	0.03
III *	0.51	0.75	0.46	0.34

I *, Culture filtrate secreted in the culture medium during growth.

II *, Buffer-soluble fraction extracted from sonicated cell homogenate with the buffer alone.

III *, Sodium chloride-soluble fraction required NaCl to be solubilized from the cell debris.

Table 2. α -Glucosidase activity during the growth of cell

	Days of growth			
	5	10	15	20
Cell (g, wet weight)	3.5	9.8	21.4	29.3
Protein (mg/cell, g)				
I *	0.42	0.76	0.54	0.58
II *	0.83	0.94	0.65	0.41
III *	0.39	0.31	0.27	0.15
α -Glucosidase activity (units/cell, g)				
I *	0.11	0.35	0.21	0.17
II *	0.31	0.55	0.58	0.39
III *	0.47	0.41	0.52	0.27

I *, Culture filtrate; II *, buffer-soluble fraction; III *, sodium chloride-soluble fraction.

スクロース分解活性は、ツニカマイシン無添加培養と比較してそれぞれ約10倍と4倍に増加した。しかしセロビオースおよびラクトース分解活性は殆ど同じであった。ツニカマイシン無添加培養では細胞外へ分泌される諸酵素活性の中でセロビオース分解活性が他の分解活性より約3倍以上高かったが、ツニカマイシン添加培養ではマルトース分解活性がセロビオース分解活性よりも高くなり約2.4倍であった。

2. α -グルコシダーゼの精製

ツニカマイシン無添加培養で得られた培養液と細胞から前報¹⁸⁾の方法により3種の α -グルコシダーゼI, II, IIIを単離した。

一方、ツニカマイシンを $5\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加えた培養液中で15日間培養し培養液と

Table 3. Effect of tunicamycin on the production of various enzymes

	Culture with TM*			Control		
	I	II	III	I	II	III
Protein (mg/cell, g)	1.29	0.67	0.42	0.42	0.71	0.22
Activity (glucose liberated, μ mole/h/cell, g)						
Maltose	2.16	0.03	0.34	0.29	0.57	0.51
Cellobiose	0.89	0.09	0.28	0.93	0.37	0.47
Sucrose	0.44	0.17	0.27	0.11	0.30	0.23
Lactose	0.31	0.13	0.11	0.25	0.59	0.13

I, Culture filtrate; II, buffer-soluble fraction; III, sodium chloride-soluble fraction.

*. The cells were grown in the R-2 medium containing 5 μ g/ml of tunicamycin.

細胞を得た。Table 1 のように α -グルコシダーゼ II, III は α -グルコシダーゼ I に比較して非常に少ないので今回は, α -グルコシダーゼ I についてのみ精製を行った。

培養液625mlを限外濾過器 (G-05 T膜, バイオエンジニアリング社) で40mlに濃縮し, 硫酸アンモニウムを0.9飽和まで加えた。生じた沈殿物を8,000 \times gで10分間の遠心分離で集め, 25 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に懸濁した。不溶物を8,000 \times gで10分間の遠心分離で除去後, 25 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で一夜透析した。透析内液を同緩衝液で平衡化したCM-セルロースカラム (1.6 \times 8cm) に添加した。カラムを同緩衝液で洗浄し未吸着画分を除去後, α -グルコシダーゼ I を同緩衝液で塩化ナトリウム濃度勾配 (0~0.3M) によって溶出した。活性画分を集め限外濾過器 (PM-10膜, アミコン社) で濃縮し, 25 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で一夜透析した。透析内液を調製用ディスク電気泳動でさらに精製した。泳動カラム (1.5 \times 15cm) に分離用ゲル16mlと濃縮用ゲル3mlを調製した。ゲルと電極用緩衝液は実験方法で述べたように調製した。25 mA で15時間の泳動後, 分離用ゲルを0.5cm間隔で切り取り, 磨砕後25 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) に懸濁した。活性画分を集め同緩衝液で一夜透析し透析内液を酵素標品とした。Table 4 に本酵素標品の比活性と収率を示す。

3. α -グルコシダーゼの性質

(1)最適温度および耐熱性 標準組成の反応液を各種温度で反応させると, ツニカマイシン存在下での α -グルコシダーゼ I は55 $^{\circ}$ Cで最も高い活性を示した。また50 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.5) で15分間各種温度で加温しその残存活性を測定すると, ツニカマイシン存在下での α -グルコシダーゼ I は45 $^{\circ}$ Cまで殆ど変化がなかった。

(2)基質特異性 各種基質に対する酵素標品の作用を Table 5 に相対速度比で示した。ツニカマイシン存在下での α -グルコシダーゼ I は, マルトース, イソマルトース, 溶性澱粉によく作用し, 基質特異性において α -グルコシダーゼ I および II と類似していた。またツニカマイシン存在下での α -グルコシダーゼ I を5%マルトースに作用させ, 生成物をペーパークロマトグラフィーで調べた。その結果前報¹⁸⁾での α -グルコシダーゼ I, II, III と同様に主転移生成物としてパノースを作った。

Table 4. Purification of α -glucosidase I from rice cells grown with tunicamycin

	Total protein (mg)	α -Glucosidase activity		
		Total activity (units)	Specific activity (U/mg prot.)	Yield (%)
1. Ammonium sulfate fractionation	39.5	66.0	1.67	100
2. Dialysis	33.5	40.9	1.22	62.0
3. CM-cellulose column chromatography	15.6	33.8	2.17	51.2
4. Preparative disc gel electrophoresis	0.6	2.6	4.33	3.9

Table 5. Substrate specificity

	Culture with TM		Control	
	I	I	II	III
Maltose	100	100	100	100
Isomaltose	28.3	42.2	35.0	15.5
Maltotriose	—	58.9	52.0	59.3
Maltotetraose	—	66.3	69.5	54.9
Amylose	—	25.5	19.8	22.6
Soluble starch	25.5	22.8	28.8	29.2

I, α -Glucosidase I; II, α -glucosidase II, III, α -glucosidase III. values=relative rate of hydrolysis (%)

(3)糖組成 α -グルコシダーゼ II, III を 2 N 塩酸中 100°C で 5 時間加水分解し、遊離された糖を TMS 化後ガスクロマトグラフィーで分別定量した (Fig. 1). α -グルコシダーゼ II の主要構成糖はグルコースであり、他の構成糖としてアラビノース、キシロースおよびマンノースを含んでいた。一方 α -グルコシダーゼ III は主要構成糖としてマンノースを、他の構成糖としてアラビノース、キシロース、グルコースを含んでいた。 α -グルコシダーゼ I, II, III に含まれている全糖量をフェノール硫酸法³⁾で求めそれぞれの分子中の比率で表わすと 2.3%, 6.5%, 12.4% であった。

考 察

従来、 α -グルコシダーゼは、 α -アミラーゼや β -アミラーゼと共に澱粉分解に関与すると考えられていた。最近になって Grinna & Robbins⁶⁾ は、膜結合の α -グルコシダーゼが粗小胞体で糖蛋白質糖鎖生合成のプロセッシングに関与していることを報告した。著者ら¹⁹⁾ も α -グルコシダーゼ作用を受ける非澱粉性画分が水稻細胞壁中に存在することを報告した。本報において水稻細胞より単離された 3 種の α -グルコシダーゼも、抽出法の

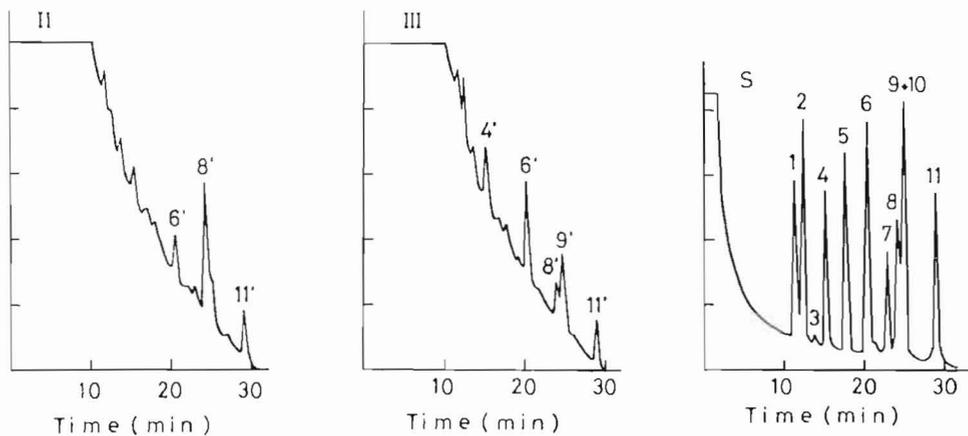


Fig. 1. Gas-liquid chromatograms of TMS derivatives of neutral sugar constituent of α -glucosidases II and III.
 S, Standard mixture of reference sugars; II, α -glucosidase II;
 III, α -glucosidase III; 1, α -arabinose; 2, β -arabinose; 3, γ -arabinose;
 4, α -xylose; 5, β -xylose; 6, α -mannose; 7, α -galactose; 8, α -glucose;
 9, β -mannose; 10, β -galactose; 11, β -glucose.

相違から同一細胞内の異った部位に存在し、異った生理作用を担っていると考えられる。

一方、Gascon *et al.*⁵⁾は、酵母を使用し細胞外へ分泌されるインペルターゼと細胞内にとどまるインペルターゼとは各々の糖含量に大きな差があることを報告した。Prentice & Robbins¹¹⁾も大麦についてグリコシル化されたインペルターゼは細胞壁に結合しているが、グリコシル化されてない酵素は緩衝液で容易に抽出されることを報告した。同一細胞内の異った部位に存在すると考えられる α -グルコシダーゼI、II、IIIにおいても各々の糖含量に大きな差があるので、それら酵素のグリコシル化の程度がそれぞれの存在部位に大きな影響を及ぼしていると推測される。

α -グルコシダーゼIIとIIIは、各々の主要構成糖において異なるけれども、どちらもマンノースを相当量含んでいる (Fig. 1)。そのため両酵素の糖鎖はいずれもN-グリコシド型であると思われる。そこでN-グリコシド型糖鎖の生合成を特異的に阻害することが知られているツニカマイシンを培養液に加え、その結果生産される α -グルコシダーゼの分布を検討した。ツニカマイシン存在下では細胞外へ分泌される α -グルコシダーゼIが約10倍に増加したが、細胞内にとどまる α -グルコシダーゼIIは約1/20に減少した。ツニカマイシン存在下で得られた α -グルコシダーゼIは、ディスク電気泳動により幅広い活性分布を示し、ツニカマイシンを含まない培養で得られた同酵素と異なった挙動をした。両酵素は、基質特異性においても異なった。以上の結果、ツニカマイシン存在下で得られた α -グルコシダーゼIは数種の蛋白質が集合したものであり、 α -グルコシダーゼIIはその糖鎖に変化を生じ細胞外へ分泌されて α -グルコシダーゼIを形成した可能性が考えられる。

またツニカマイシン存在下で生育が著しく抑制された細胞をツニカマイシンを含まない培地へ移し15日間培養した。その結果得られた細胞の重量と α -グルコシダーゼ活性は、

コントロールと比較してほぼ同じ値を示した(細胞重量:コントロール100, ツニカマイシン処理123; α -グルコシダーゼ活性:コントロール100, ツニカマイシン処理97.4)。従って、ツニカマイシン存在下で細胞は死滅したのではなくて細胞構成々分中のN-グリコシド型糖鎖を持つ糖蛋白質の生合成が抑制されたために細胞の生育抑制がおこったと考えられる。また増加した α -グルコシダーゼIは、細胞が死滅し自己消化によって細胞外へ溶出されたのではなく細胞外へ分泌されたものである。ツニカマイシン無添加培養であればどの細胞生育段階でも3種の α -グルコシダーゼ活性はそれほど変動しなかったのに、 α -グルコシダーゼIの分泌は細胞の生育段階と無関係にコンスタントである。そのためツニカマイシン存在下で細胞の生育が著しく抑制された生育初期に α -グルコシダーゼIが増加するのでなく、ツニカマイシンにより糖鎖の生合成に影響を及ぼした結果、同酵素が増加したと考えられる。

今後、ツニカマイシン存在下での α -グルコシダーゼIの糖鎖を詳細に研究することにより糖鎖と存在部位との関係を明らかにすることができるであろう。

摘 要

水稻細胞を液内培養すると α -グルコシダーゼは、細胞外へ分泌される酵素(α -グルコシダーゼI)と細胞内にとどまる酵素とに分かれる。後者は、さらに細胞を超音波破碎後に緩衝液のみで抽出される酵素(α -グルコシダーゼII)と可溶化に2M塩化ナトリウムを必要とする酵素(α -グルコシダーゼIII)とに分れる。 α -グルコシダーゼI, II, IIIはそれぞれ2.3%, 6.5%, 12.4%の中性糖を含む糖蛋白質であった。 α -グルコシダーゼIIとIIIの主要構成糖は、それぞれグルコースとマンノースであった。ツニカマイシンを含む培地中で培養すると細胞の生育および α -グルコシダーゼII活性・細胞⁻¹はコントロールと比較してそれぞれ1/7と1/20に減少したが、 α -グルコシダーゼI活性・細胞⁻¹は10倍に増加した。ツニカマイシン存在下での培養で得られた α -グルコシダーゼIを硫酸分画, CM-セルロースカラムクロマトグラフィー, 調製用ディスク電気泳動により精製した。その精製酵素をディスク電気泳動にかけると幅広い活性分布を示した。従ってツニカマイシン存在下で細胞外へ分泌された α -グルコシダーゼIは数種類の蛋白質からなり、ツニカマイシンの影響で糖鎖に変化を生じた α -グルコシダーゼIIも細胞外へ分泌されたと考えられる。

文 献

1. Clarke, A. E. and Gleeson, P. A. 1981. Molecular aspects of recognition and response in the pollen-stigma interaction. "Recent Advances in Phytochemistry", vol. 15, ed. by F. A. Loewus and C. A. Ryan, 161-211, Plenum Press, New York.
2. Dahlqvist, A. 1961. Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose-oxidase reagent. *Biochem. J.*, 80, 547-551.
3. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356.

4. Elbein, A. D., Gafford, J. and Kang, M. S. 1979. Inhibition of lipid-linked saccharide synthesis: Comparison of tunicamycin, streptovindin, and antibiotic 24010. *Arch. Biochem. Biophys.*, 196, 311-318.
5. Gascon, S., Neumann, N. P., and Lampen, J. O. 1968. Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. *J. Biol. Chem.*, 243, 1573-1577.
6. Grinna, L. S. and Robbins, P. W. 1979. Glycoprotein biosynthesis. Rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides. *J. Biol. Chem.*, 254, 8814-8818.
7. Harford, J. and Ashwell, G. 1982. The hepatic receptor for asialoglycoproteins. "The Glycoconjugates", ed. by M. I. Horowitz, 27-55. Academic Press, New York.
8. Laine, R. A., Esselman, W. J. and Sweeley, C. C. 1972. Gas liquid chromatography of carbohydrates. "Methods in Enzymology", vol. 28 B, ed. by V. Ginsburg, 150-167. Academic Press, New York.
9. Ohira, K., Ojima, K. and Fujiwara, A. 1973. Studies on the nutrition of rice cell culture. I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.*, 14, 1113-1121.
10. Papadopoulos, N. M. and Hess, W. C. 1960. Determination of neuraminic (sialic) acid, glucose, and fructose in Spinal fluid. *Arch. Biochem. Biophys.*, 88, 167-171.
11. Prentice, N. and Robbins, G. S. 1976. Composition of invertases from germinated barley. *Cereal Chem.*, 53, 871-880.
12. Reading, C. L. 1984. Carbohydrate structure, biological recognition, and immune function "The Biology of Glycoproteins", ed. by R. J. Ivatt, 235-321. Plenum Press, New York.
13. Reisfeld, R. A., Lewis, U. J. and Williams, D. E. 1967. Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195, 281-283.
14. Takatsuki, A., Kawamura, K., Okina, M., Kodama, Y., Ito, T. and Tamura, G. 1977. The structure of tunicamycin. *Agric. Biol. Chem.*, 41, 2307-2309.
15. Warburg, O. and Christian, W. 1942. Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.*, 310, 384-421.
16. Weber, K. and Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 244, 4406-4412.
17. Welker, N. E. and Campbell, L. L. 1963. Effect of carbon sources on formation of α -amylase by *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.*, 86, 681-686.
18. Yamasaki, Y. and Konno, H. 1985. Three forms of α -glucosidase from suspension-cultured rice cells. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 3383-3390.
19. Yamasaki, Y. and Konno, H. 1987. Wall-bound α -glucosidase of suspension-cultured rice cells. *Phytochemistry*, 26, 711-713.

Changes in Distribution of α -Glucosidases in Rice Cells Grown with Tunicamycin

Yoshiki YAMASAKI and Haruyoshi KONNO

Summary

Three forms of α -glucosidase (EC 3. 2. 1. 20), designated as I, II and III, have been isolated from suspension-cultured rice cells. α -Glucosidase I was secreted in the culture medium during growth, α -Glucosidase II was readily extracted from the sonicated cell homogenate with the buffer alone, and α -glucosidase III required NaCl to be solubilized from the cell debris. α -Glucosidases I, II and III were glycoproteins containing 2.3%, 6.5%, and 12.4% neutral sugars, respectively. The main neutral sugar was glucose in α -glucosidase II and mannose in α -glucosidase III. During growth with tunicamycin, α -glucosidase I \cdot cell⁻¹ increased by about ten times that without tunicamycin, although the cell growth decreased by one-seventh and one-twentieth for α -glucosidase II.