

発芽イネ種子胚盤上皮細胞における
 α -アミラーゼの
分泌とその調節機構に関する研究

三ツ井 敏明

図・本誌

発芽イネ種子胚盤上皮細胞における
 α -アミラーゼの
分泌とその調節機構に関する研究

三ツ井 敏明

名古屋大学図書
和 960734

報告号 甲第 1817 号

目次

序論	1
本論	
第一章 α -Amylase の Isoforms	8
第二章 α -Amylase の細胞内輸送と糖鎖修飾	28
第三章 α -Amylase の分泌に及ぼす Ca^{2+} の影響	49
第四章 α -Amylase の分泌に及ぼす温度の影響	71
総合討論	91
要約	94
文献	97
謝辞	107

略号

本論文では下記の略号を用いた。但し、しばしば慣用として用いられるもの（例えば、DNA、ATP等）は除外した。

S R P	:	signal recognition particle
G A	:	gibberellic acid
A s n	:	asparagine
S e r	:	serine
T h r	:	threonine
T M	:	tunicamycin
E R	:	endoplasmic reticulum
r E R	:	rough endoplasmic reticulum
GlcNAc	:	N-acetylglucosamine
M a n	:	mannose
D o l	:	dolichol
T r i s	:	tris(hydroxymethyl)-amino methane
D E A E	:	diethylaminoethyl
I g G	:	immunoglobulin G
S D S	:	sodium dodecylsulfate
P A G E	:	polyacrylamide gel electrophoresis
C B B	:	coomassie brilliant blue
Endo- β -H	:	Endo- β -N-acetylglucosaminidase H
E G T A	:	ethylene glycol bis(β -amino ethyl ether)-N,N,N',N'- tetraacetate

C o n A : concanavalin A
F u c : fucose
G a l : galactose
X y l : xylose
poly(A) : polyadenylic acid
S F V : semliki forest virus
T C A : trichloroacetic acid
W - 7 : N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide
C C C P : carboxylcyanide m-chlorophenylhydrazone
H O Q N O : 2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide
NAP-aurine : N-(4-azido-2-nitrophenyl)-2-aminoethylsulfonate
h s p : heat shock protein
V S V : vesicular stomatitis virus
B S A : bovine serum albumin
M O P S : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
M e t : methionine

序論

Amylase はデンプンを加水分解する酵素の総称であり diastase ともいう。Amylase には 非還元末端から特定数の glucose 単位を切り離していくエキソ型、および無差別に近い分解様式をもつエンド型がある。前者は、glucoamylase、 β -amylase、exo-maltotriohydrolase、exo-maltotetraohydrolase、exo-maltohexaohydrolase が知られており、それぞれ、 α -1,4-glucan 鎖を逐次切断して glucose、maltose、maltotriose、maltotetraose、maltohexaose を生成する。後者には、 α -1,4-glucoside 結合のみを加水分解する α -amylase のほかに α -1,6-glucoside 結合のみを選択的に切断する pullulanase や iso-amylase などの枝切り酵素がある。 β -Amylase は植物と微生物起源のものが、またその他のエキソ型 amylase は微生物起源のものが知られている。 α -Amylase は動植物および微生物に普遍的に存在している。

発芽種子を実験材料とする amylase に関する研究は、古くから醸造とのかかわりなどの応用的な見地から精力的に行われてきたが、植物生理学的な研究は比較的近年になってはじまり、発展してきたのである (3)。

種子の発芽は、高等植物の生理現象のなかでも特に重要な研究課題の一つとして、多くの研究者によってとりあげられてきた (9)。イネ、コムギ、オオムギ、トウモロコシに代表される穀類種子 (デンプン性種子) は、大きく分けて胚と胚乳の2つの部分からなっている。種子の発芽後の成育、発達等に関する遺伝情報の一切は胚にたくわえられており、組織学的には根、幼芽の起源も胚にある。胚乳部分にはデンプンが蓄積されており、発芽の際にデンプンが分解され、種子が成長するためのエネルギー源または新生組織における物質合成のための素材として利用される。このデンプンを分解する酵素が種々の amylase であり、なかでも中心的な役割を果しているのが α -amylase である。

穀類種子における α -amylase の生成に関する研究は、半切無胚オオムギ種子に植物ホルモン gibberellin を与えると α -amylase の活性が上昇するという発見 (95,147) が発端となって展開した。 α -Amylase の生合成機構を gibberellin の作用機作との関連のもとに解明する研究は、その後主として Varner および彼の協同研究者が 精密な実験手段によって大きく展開させた (134)。そして、「オオムギをはじめとするデンプン性穀類種子においては、発芽とともに胚で合成される gibberellin が糊粉層に輸送されて引金的に α -amylase の誘導合成をひき起こす」という仮説が一般に信じられるようになったのである。現在では、遺伝子操作法の発展により、gibberellin による α -amylase 合成の誘導機構の研究は遺伝子発現レベルの解析という新たな段階にはいつている (8,48,85,107)。

しかしながら、「発芽穀類種子において α -amylase を合成する最も主要な組織はどこなのか」という問題に関しては、本研究室の岡本らの研究報告 (91,92) によって再び議論が沸騰することになった。彼等は、発芽初期におけるイネ種子の薄い切片を作製し、starch film 法を用いてデンプン分解酵素活性の局在性とその変動を調べる実験を行った。その結果、amylase 活性がみとめられる部位は胚盤であること、そして、発芽の進行とともに、分泌された amylase によって胚乳部の貯蔵デンプンが徐々に分解されること等が見いだされた。さらに、発芽の後期になると糊粉層に由来すると考えられる amylase の分泌によってデンプンの分解が見られるようになることも観察された (91)。この組織化学的方法によって、イネ種子のみならず、他の多くのデンプン性穀類種子例えばオオムギ、コムギ、ライムギ、エンバク、トウモロコシにおいても amylase 活性が発芽初期に認められるのは胚盤上皮細胞であることが確かめられた (92)。その後、胚盤組織を [^{35}S]methionine と反応させると [^{35}S]methionine が活発に α -amylase 分子に取りこまれ、そして [^{35}S] α -amylase は細

胞外に分泌される全[³⁵S]蛋白質の約 15%を占めることが、宮田ら (72) によって明らかにされた。このように、発芽初期においては、胚盤上皮細胞が α -amylase を合成し分泌する最も重要な組織であることが明らかになった。図 1 は、これまでの研究から考えられる、発芽イネ種子における貯蔵デンプンの分解機構に関する仮説を示している (2)。発芽オオムギ種子に関しては、この問題はいまだに議論されている (1,67,101) が、イネ種子においては、胚盤上皮細胞がデンプン分解に最も大きな役割を果たしていることは間違いない。

Redman (103) によって、血清アルブミンが肝の膜結合型ポリゾームで合成されることが報告されて以来、分泌性蛋白質は例外なく膜結合型ポリゾームで合成されることが確立された。分泌性蛋白質は合成されつつ小胞体内腔へ隔離されること (104)、リボゾーム上の新生ペプチドがリボゾームと膜との結合に重要な役割を果たしていること (12) などの知見から、Blobel と Sabatini は分泌性蛋白質の N 末端に特殊なアミノ酸配列が存在することを予想し、これが膜結合ポリゾームの形成を決定づけるシグナルとなる可能性を示唆した (13) 相前後して、Milstein らは、免疫グロブリン L 鎖の mRNA を小胞体膜を含まない無細胞蛋白合成系で翻訳させると、得られる L 鎖の分子サイズが粗面小胞体 (rER) で合成されたものや、細胞外に分泌されたものより若干大きく N 末端に余分なペプチドが存在することを観察した (69)。その後 Blobel らは、数種の分泌性蛋白質についてこの事実を確認すると同時に、さらに、signal recognition particle (SRP) の発見によって、以下に述べるような「シグナル説」へと発展させた (11,41,138,139,140)。

ペプチド合成が開始されるとまずシグナルペプチドが合成される。すると、細胞質に存在する SRP がシグナルペプチドに結合し、リボゾームとの間に複合体を形成するとともにペプチド合成が一時的に停止される。この SRP 複合

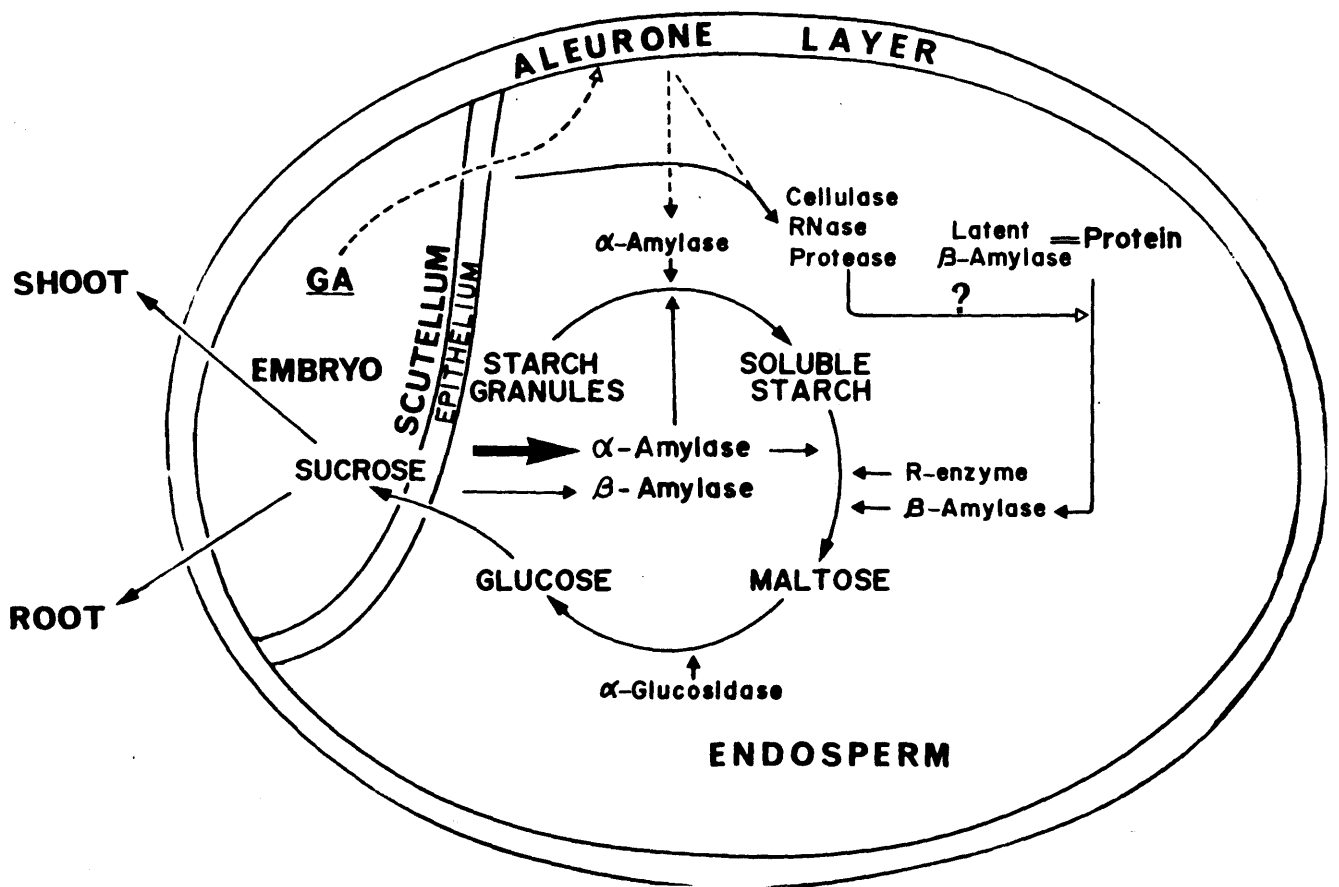


Fig.1. Scheme illustrating enzyme formation and breakdown of reserve starch in endosperm tissue of rice seed. α -Amylase and other hydro-lases are synthesized in scutellar epithelium and secreted into endosperm.

体が小胞体膜上のSRP受容体に結合することによって、ペプチドの伸長が再開される。また、リボソームは膜上のリボソーム受容体とも結合し、ここで小胞体膜にペプチド鎖の通過しうるチャンネルが形成される。膜内チャンネルを通過して小胞体内腔に到達した新生ペプチドは、内側に存在するシグナルペプチダーゼによってシグナルペプチドが切断される。ペプチド合成が完了すると蛋白質はリボソームから遊離し小胞体内腔へ完全に放出され、分泌への細胞内移行経路に入る。リボソームは膜から遊離すると同時に mRNAからもはずれ、大小のサブユニットに解離する。

植物起源の α -amylaseにおけるこのようなシグナルペプチドの存在は、Higginsら(47)によってはじめて観察された。その後、poly(A)⁺-RNAやポリゾームを用いた α -amylaseの*in vitro*合成に関する多くの研究によって、動物における分泌性蛋白質と同様に、 α -amylaseの合成はrERで行われることが明らかになっている(15,72,73,74,75,82,93)。

分泌性蛋白質には血清アルブミン、インスリン、成長ホルモンのような単純蛋白質も存在するが、大部分の分泌性蛋白質は糖蛋白質である。動物細胞においては、分泌性糖蛋白質のasparagine(Asn)結合型糖鎖の形成機構についても研究が進展している(46)。rER内腔に伸長しつつある新生ペプチドにAsn-X-Thr(Ser)の配列が出現すると、dolichol pathwayを通して糖鎖が脂質中間体からAsnにco-translationalに転移される。そして、Golgi体に輸送された後、まず糖鎖のtrimmingが行われ つづいてterminal glycosylationによって成熟型糖蛋白質が生ずるのである。

発芽イネ種子胚盤上皮細胞から分泌される α -amylaseはasparagine結合型糖鎖を持つ典型的な分泌性糖蛋白質であることが宮田らによって明らかにされた(72,73,74,75)。彼等は、dolichol pathwayの阻害剤であるtunicamycin(TM)で処理した胚盤組織から分泌された α -amylase分子が、*in vitro*

系で合成された α -amylase 前駆体より 1.8 kd、正常な α -amylase 分子より 2.9 kd 分子量が小さいことを見いだした (73)。また、この 2.9 kd の分子量の違いは α -amylase 分子の糖鎖の有無によって生じたものであることを明らかにした (73)。さらに、胚盤組織から調製したポリゾームおよびマイクロゾームを用いて *in vitro* 系による α -amylase 合成を詳細に解析した結果、 α -amylase は r E Rにおいて合成されること、そして、glycosylation はシグナルペプチドが切断された後 co-translational に起こることを証明した (図 2) (74,75)。

上記のように、本研究室において発芽イネ種子胚盤上皮細胞における α -amylase の生合成機構の研究が行われてきた。しかしながら、 α -amylase が r E Rで合成された後、細胞内をどのように移行して分泌されるのかという細胞内輸送機構に関する問題には多くの不明な点がある。そこで、著者は α -amylase の細胞内輸送経路を解明すべく研究を進めた。また、細胞内 Ca^{2+} 濃度および温度条件が α -amylase の細胞外への分泌に大きな影響を及ぼすことを見いだしたことから、細胞内 Ca^{2+} 濃度 および温度による酵素分子の細胞内輸送の調節機構に興味を持ち、これに関する研究をも行った。それらの研究成果を本論において詳細に述べたい。

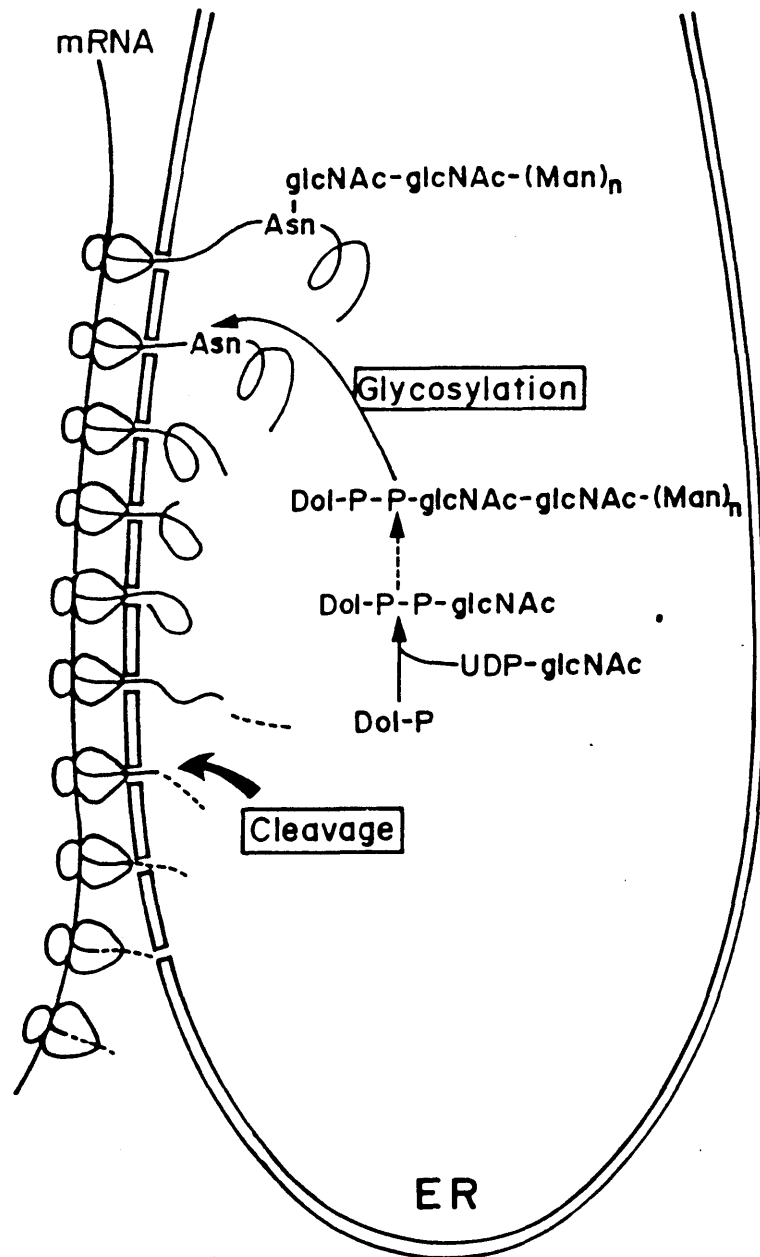


Fig.2. Hypothetical mechanism illustrating biosynthesis of α -amylase, a typical secretory glycoprotein, in relation to glycosylation and processing of nascent polypeptide in rER.

本論

第一章 α -Amylase の Isoforms

酵素蛋白質の isozymes の存在は植物において広く見られ、その生成メカニズムについての研究が精力的に行われている (2,114)。しかしながら、isozymes の生理的意義に関してはいまだにはっきりしていない。穀物種子の発芽時に合成される α -amylase においても電気的性質によって区別される isozymes の存在が、オオムギ (36,49,80,122)、コムギ (87,132)、トウモロコシ (17,113)、イネ (90,123) で報告されている。この中で isozymes の研究が最も進んでいるのは オオムギの α -amylase である。オオムギ種子 α -amylase の isozymes は等電点の高いグループ (pI 6 付近) と低いグループ (pI 5 付近) に分類される (15,50)。そして、蛋白質の限定分解によって作成したペプチドマップは、同じグループの isozymes の間ではよく似ているが、異なるグループ間ではかなり違っていることが示された (15,50)。また、それぞれのグループの isozymes は免疫化学的性質も全く異なっていることが明らかにされた (50)。最近、 α -amylase の cDNA が調製され (85,108)、これを用いた解析から、2つの isozymes グループは異なる遺伝子によってコードされていることが見いだされた (108,109)。さらに、異なるグループの isozyme の DNA 配列の間にはシグナルペプチド部分で 50 %、酵素蛋白質部分で 80 % の homology があることが示された (16,107)。

α -Amylase の isozymes に関する研究は、染色体レベルにおいても進展が見られる。Brown と Jacobsen (14) はコムギ-オオムギ染色体添加系統の α -amylase の isozymes パターンの解析から、低等電点グループはオオムギの染色体 1 の Amy 2 locus によって、一方 高等電点グループは染色体 6 上の Amy

1 locus によって制御されるということを報告した。さらに、Muthukrishnan ら (84) は α -amylase cDNA クローンを用いて、 α -amylase の構造遺伝子は染色体 1 と 6 に局在していること、および各々の α -amylase 遺伝子は相当異なっていることを明らかにし、Brown と Jacobsen の示した結果を支持している。このように、2つのグループの α -amylase isozymes は、異なる染色体の遺伝子にコードされていることが示され、 α -amylase の isozymes は post-translational な修飾によって生じたものではないことがわかってきた。

発芽イネ種子 α -amylase に関しては、A、B、D および E 等の isozymes が見いだされている (26,73,90,91,123)。これらの中で最も多量に存在する isozyme A と B の等電点は 4.6 付近で、免疫化学的に区別できない分子構造を持っていることが示されている (26)。また、胚盤組織より調製した poly(A)⁺-RNA を *in vitro* で翻訳させ、生成した α -amylase 分子を等電点電気泳動法で解析したところ、等電点の異なるポリペプチドが検出された (73) ことから、オオムギ種子 α -amylase の場合と同様に、イネ種子における α -amylase isozymes (A と B) の生成は post-translational な修飾よりむしろ遺伝子レベルで規定されていることが示唆された。

ただ、発芽イネ種子胚盤上皮細胞で合成され分泌される α -amylase は、dolichol pathway の初期段階を阻害して糖鎖の蛋白質への導入を阻害することが知られている tunicamycin (TM) (30,121) によって、その糖鎖合成が完全に阻害されることから、asparagine 結合糖鎖を持つ典型的な分泌性糖蛋白質であることが示されている (2,72,73,74,75)。したがってイネ種子 α -amylase には、糖鎖の heterogeneity による isoforms が存在している可能性がある。そこで、著者は α -amylase 分子の糖鎖構造を解析し、糖鎖構造の違いによって区別される isoforms の存在の有無を検討しようと試みた。

材料と方法

【1】 α -Amylase の精製：

岡本らの精製方法 (90) 及び宮田らの方法 (72) を組み合わせ、改良した手法を用いて α -amylase を精製した。

イネ種子 (*Oryza sativa* L. cv. Kimmaze; 金南風) を 1% アンチホルミンで約 15 分間殺菌し、蒸留水でよく洗ったものを、暗所 (30°C) で約 7 日間発芽させた。発芽イネ種子 100g あたり 300ml の homogenizing buffer [50mM Tris-HCl (pH7.0)、3mM CaCl₂、4mM NaCl] を加えミキサーで摩砕した。この摩砕物をガーゼで濾過した後、1,500×g、20 分間遠心し得られた上清を DEAE-cellulose カラム (上清 5l の場合; 7φ×25cm) にかけた。そして、0.1M NaCl を含む homogenizing buffer で十分に洗った後、0.5M NaCl を含む溶液で溶出した。さらに、溶出液を硫酸 (65% 飽和) で濃縮し、得られた濃縮酵素液を 70°C、15 分間熱処理した。熱変性した蛋白質を遠心 (1,500×g、20 分間) によって除いた後、透析によって 50mM acetate buffer (pH 5.3; 3mM CaCl₂、4mM NaCl を含む) に buffer 交換した。つづいて β -cyclodextrin-Sepharose 6B カラム (30) にかき、0.3M NaCl を含む上記 acetate buffer でよく洗った後、 α -amylase を β -cyclodextrin (8mg/ml) によって溶出した。得られた精製 α -amylase をコロジオンバックで濃縮した後、15mg/ml glucose 溶液 (homogenizing buffer を含む)、次に homogenizing buffer で透析し、最終精製 α -amylase 標品 (1mg/ml) とした。

【2】Anti- α -amylase IgG の調製：

1ml の完全アジュバントと 1ml の抗原 (0.5mg α -amylase) をよく混合しウサギ (雌; 2.5kg) に注射した。3 週間後、同量の抗原と不完全アジュバント

の混合物を再度ウサギに注射した。この1週間後から、ウサギの血を耳から採取し、抗血清を得た。次に常法にしたがって、血清を硫酸分画した後、DEAE-cellulose カラムを通すことによって IgG 画分を得た (97)。この IgG の特異性を Ouchterlony 二重拡散法 (54) によって調べたところ、 α -amylase とのみ特異的沈降線を作ることがわかった。また、25 μ g の anti- α -amylase IgG は 1 μ g の α -amylase の活性を完全に阻害した。

【3】胚盤組織の調製：

1%アンチホルミンで滅菌したイネ種子を暗所(30°C)で4日間発芽させた。発芽イネ種子を蒸留水で十分に洗浄した後、胚盤組織(胚盤上皮細胞と胚盤細胞を含む)を注意深く分離した。得られた胚盤組織は蒸留水で十分に洗浄した後、種々の放射性物質の取込み実験に使用した。

【4】[³⁵S]Methionine、[³H]Leucine または [³H]糖 の α -Amylase 分子への取込み：

胚盤組織(20個)を buffer A 溶液 [20mM Tris-HCl (pH7.0)、10mM CaCl₂ 10 μ g/ml streptomycin、10 μ g/ml penicillin G] 中で 30°C、2時間 preincubation した後、20 μ Ci [³⁵S]methionine (1100Ci/m mol)、20 μ Ci [³H]leucine または 100 μ Ci [³H]糖 ([³H]mannose ; 28 Ci/m mol、[³H]fucose ; 56 Ci/m mol または [³H]galactose ; 11 Ci/m mol) を含む buffer A 溶液中で 30°C 3-6時間 incubation した。Tunicamycin の効果を調べる場合には、30 μ g/ml の濃度の tunicamycin を preincubation (3hr) および incubation (3hr) の両溶液に加えた。反応終了後、incubation 溶液に存在する [³⁵S]methionine、[³H]leucine、または [³H]糖 で標識された α -amylase 分子は、以下に述べるように、immunoprecipitation、SDS-polyacrylamide ゲル電気泳動 (SD

S-PAGE) を行った後、fluorography によって検出した。

【5】 Immunoprecipitation、SDS-polyacrylamide ゲル電気泳動 と Fluorography :

Immunoprecipitation は宮田らの方法 (72) に従って行った。試料(100 μ l) に SDS (最終濃度 1% w/v) を加えて 1 分間煮沸した後、Triton X-100 (最終濃度 2% v/v) を加えた。次に、500 μ l の immunoprecipitation buffer [20mM Tris-HCl (pH7.5)、0.14M NaCl、0.1% Triton X-100] と混合した後、25 μ g の anti- α -amylase IgG を加え、そして 30°C、1 時間 抗原抗体反応をさせた。さらに、この混合液に 2.5mg の protein A-Sepharose CL-4B を加え、激しく振盪させながら 30°C、2 時間 incubation した。 α -Amylase-IgG-protein A-Sepharose 複合体だけを得るため、上記混合物を小さなカラムに入れ immunoprecipitation buffer、20mM Tris-HCl(pH7.5)-1M NaCl、20mM Tris-HCl(pH7.5)-0.14M NaCl、蒸留水の順にカラムを洗浄した。そして、 α -amylase-IgG 複合体を SDS sample buffer [10mM Tris-HCl (pH 6.8)、2% SDS、5% 2-mercaptoethanol、10% glycerol、0.005% bromophenol blue] によって溶出し、1 分間煮沸した後、Laemmli の方法 (61) に従って SDS-PAGE を行った。

Fluorography は Laskey らの方法 (63) に従って行った。電気泳動後、ゲルは Coomassie brilliant blue (CBB) で染色、脱色し、Enhance (NEN) 処理した後、ろ紙上に置き減圧条件下で加熱乾燥させた。乾燥ゲルは H_2 処理および前閃光した X 線フィルム (Fuji Rx) と接触させ、フィルムの感光によって放射性的 α -amylase 分子を検出した。Fluorogram はデンスitomーター (Shimadzu CS-910 Dual-wavelength Scannor) を用いて解析した (図-2B)。

【6】 Endo- β -N-acetylglucosaminidase H による糖鎖の消化実験：

試料 (100 μ l) に acetate buffer (pH 5.0 ; 最終濃度 0.1M) と Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo- β -H ; \geq 20 mU/ml) を加えた後、30°C、3時間反応させた。この反応条件で、Endo- β -H に対して感受性をもつ糖鎖は完全に切断される (cf.75)。また、Endo- β -H 処理は [3 H]fucose 標識 α -amylase の放射活性の回収率には全く影響しないこと (cf. 図4-B)、および 2価陽イオンや EGTA はこの酵素反応に影響しないこと (58) を確認した。精製 α -amylase を含む反応液は、SDS-PAGE 後、CBB による蛋白染色を行って α -amylase を検出した。 [35 S] α -amylase を含む反応液においては、pH を中性にした後、上記のように、immunoprecipitation、SDS-PAGE および fluorography を行って [35 S] α -amylase を検出した。

【7】 Concanavalin A-Sepharose Affinity Column Chromatography：

精製 α -amylase (40 μ g) の Endo- β -H 処理試料を Concanavalin A (Con A) -Sepharose 4B カラム (packed gel volume ; 50 μ l) にかけた。初めに、0.5 ml の溶出 buffer [20mM Tris-HCl (pH7.0)、0.5M NaCl、3mM CaCl₂、1mM Mg Cl₂] で Con A に結合しない α -amylase を溶出し、次に 0.5M α -D-methylmannoside を含む上記溶出 buffer で Con A に結合している α -amylase を溶出した。溶出された α -amylase は、SDS-PAGE 後、銀染色 (Bio-Rad) によって検出した。

【8】 Polyacrylamide ゲル等電点電気泳動：

田中らの方法(9)に従って、 α -amylase の polyacrylamide ゲル等電点電気泳動を行った。電気泳動後、isozyme バンドは銀染色 (Bio-Rad) および immunoblotting によって検出した。

【9】 ペプチドマッピング：

Cleveland らの方法 (22) に従って行った。1 回目の SDS-PAGE のゲル (1 mm 厚) から調製した試料蛋白質 (5-10 μ g) を Staphylococcus aureus V8 protease [Miles] (0.2 μ g と 2 μ g) と反応させた後、2 回目の SDS-PAGE (2 mm 厚) を行った。電気泳動後、ペプチドバンドは銀染色 (Bio-Rad) および immunoblotting によって検出した。

【10】 Immunoblotting：

Towbin らの方法 (133) に従って、ゲル中の抗原を nitrocellulose フィルターに blotting した。Nitrocellulose フィルターに blotting された抗原の検出は、Blake らの方法 (10) に従って alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody (二次抗体) を用いて行った。

【11】 酵素活性測定：

α -Amylase の活性測定は、岡本らの方法 (10) に従った。

【12】 蛋白質量の測定：

蛋白質量の測定は、Bio-Rad Protein Assay の方法に従って行った。標準蛋白質は bovine gamma globulin を用いた。

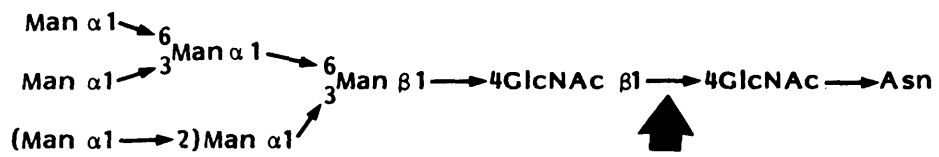
結果

【1】 α -Amylase 分子の糖鎖構造：

α -Amylase 分子の糖鎖構造を検討するために、まず Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo- β -H) による asparagine 結合糖鎖の消化実験を試みた。Endo- β -H は、asparagine 結合糖鎖の高-mannose 型および混合型の N, N'-di-acetylchitobiose 構造にのみ作用し、複合型には全く働かないという反応特異性を持っており (図 1)、asparagine 結合糖鎖の解析に極めて有用であることが知られている (6,58,65,124,125)。図 2-A の結果は、精製 α -amylase の Endo- β -H 消化を経時的に調べたものである。Endo- β -H による消化反応は約 2 時間で定常状態となり、2 つの α -amylase 分子が観察されるようになった。1 つは、Endo- β -H の作用を受けない分子、もう 1 つは Endo- β -H の作用を受けて分子量が小さくなった分子である。後者の α -amylase 分子は、Con A-Sepharose カラムに吸着しないこと (cf. 図 5)、および TM 処理された組織で合成される糖鎖のない α -amylase とほぼ同じ分子量であることから、その糖鎖が Endo- β -H によって切断されたものであることがわかった。したがって、イネ種子 α -amylase 分子には、Endo- β -H の酵素反応に対して耐性 (R) 型と感受性 (S) 型があることが明らかになった。胚盤上皮細胞から分泌される α -amylase 分子についても Endo- β -H の消化実験を試みた (図 2-B)。胚盤組織を [35 S]methionine と 6 時間反応させ、分泌された [35 S]標識の α -amylase 分子に Endo- β -H を作用させたところ、やはり R 型と S 型 α -amylase がほぼ 1 対 1 の割合で存在していることがわかった。以上の結果は、胚盤上皮細胞より糖鎖構造の異なる α -amylase isoforms (R 型と S 型) が分泌されることを示している。

次に、[3 H]mannose、[3 H]fucose および [3 H]galactose の α -amylase 分子

A) High-Mannose chains (Ovalbumin glycopeptides)



B) Complex chains (Bovine IgG glycopeptides)

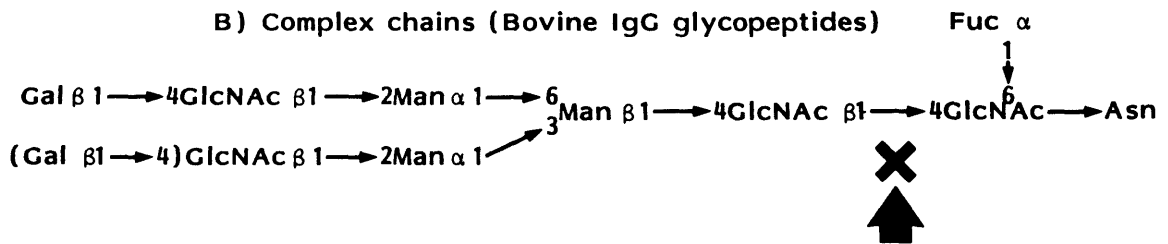


Fig.1-1. Mode of action of Endo- β -N-acetylglucosaminidase H on mannosyl glycoproteins.

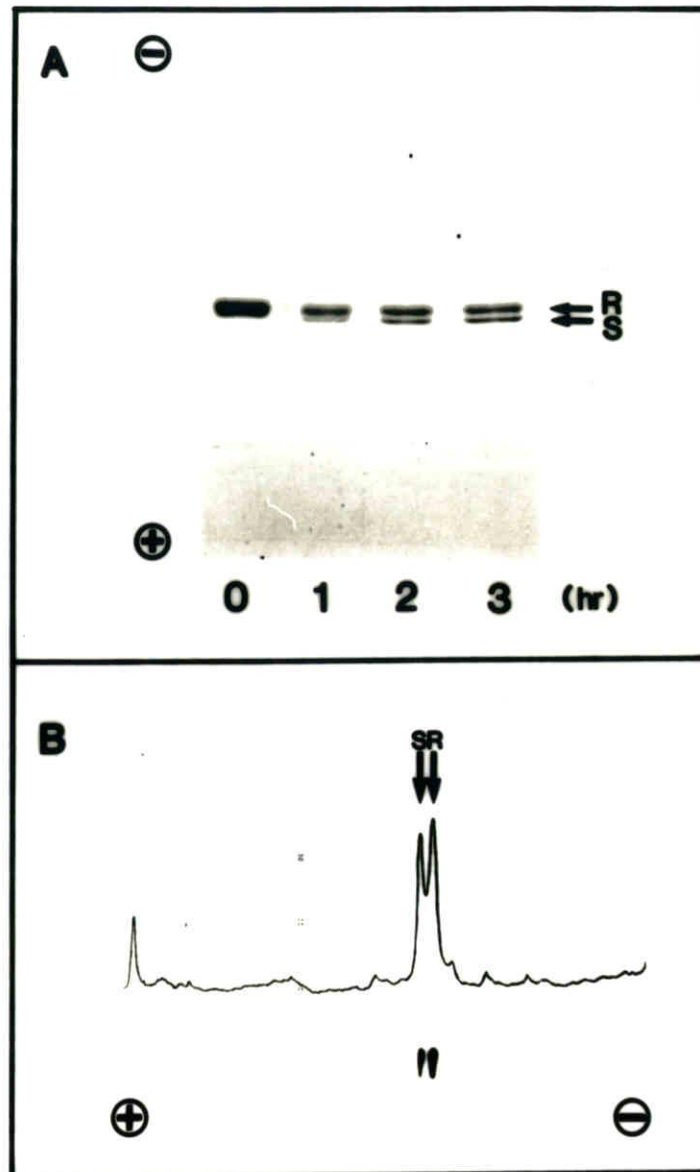


Fig.1-2. Hydrolytic digestibility of α -amylase against Endo- β -H. The basic experimental conditions are described in the text, using purified enzyme preparation or ^{35}S -labeled α -amylase molecules as substrate. (A) Purified preparation of α -amylase ($10\ \mu\text{g}$) and 1mU of Endo- β -H were added to 0.1M citrate buffer ($\text{pH } 5.0$) in a total volume of $50\ \mu\text{l}$, and incubation continued up to 3hr at 30°C . The reaction mixture was subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue. (B) Ten scutella were incubated with $[^{35}\text{S}]\text{methionine}$ ($20\ \mu\text{Ci}$) in 0.3ml of buffer A for 6hr at 30°C . α -Amylase molecules extracellularly secreted were then digested with Endo- β -H (2mU) in 0.1M acetate buffer ($\text{pH } 5.0$) in a total volume of $100\ \mu\text{l}$ for 3hr at 30°C followed by immunoprecipitation, SDS-PAGE, and fluorographic analysis.

への取り込み実験を行った。胚盤組織を [^3H]leucine、[^3H]mannose、[^3H]fucose または [^3H]galactose と反応させ、分泌された種々の [^3H]標識の α -amylase を免疫化学的方法によって同定した。図3の fluorogram の結果は、[^3H]mannose、[^3H]fucose および [^3H]galactose が確かに α -amylase 分子に取り込まれていることを示している。つづいて、[^3H]mannose および [^3H]fucose の α -amylase 分子への取り込みに対する TM の効果を調べた。組織を TM 存在下または非存在下に [^3H]mannose または [^3H]fucose と反応させ、分泌された [^3H]標識 α -amylase 分子を免疫化学的方法により定量した。その結果、TM 処理した組織においては、[^3H]標識の α -amylase が検出されなかった (cf. 73、図4-A)。これは、上記の [^3H]糖が分解され [^3H]アミノ酸になってポリペプチドに取り込まれることはなく、糖鎖のみに取り込まれることを示している。さらに、精製 α -amylase に含まれる糖の組成を分析したところ、mannose、N-acetylglucosamine、fucose、galactose および xylose が検出され、そして、その組成比は Man : GlcNAc : Fuc : Gal : Xyl = 3.0 : 1.3 : 0.23 : 0.09 : 0.46 であった。このように、 α -amylase 分子の糖鎖には複合型糖鎖特有の fucose や galactose が含まれていることから、 α -amylase は複合型様の糖鎖を持っていることが示唆された。

そして次に、[^3H]mannose または [^3H]fucose で標識された α -amylase 分子の Endo- β -H に対する感受性を検討した。その結果、[^3H]fucose で標識された α -amylase 分子の糖鎖はすべて Endo- β -H 耐性であり、一方、[^3H]mannose 標識の糖鎖には Endo- β -H の酵素反応によって切断されるものとされないものがあることが示された (図4-B、C)。また、この結果は、細胞内で起こることが予想される GDP-[^3H]mannose と GDP-[^3H]fucose との間の相互変換が、[^3H]mannose および [^3H]fucose の α -amylase 分子への取込みにはほとんど影響していないことをも示している。

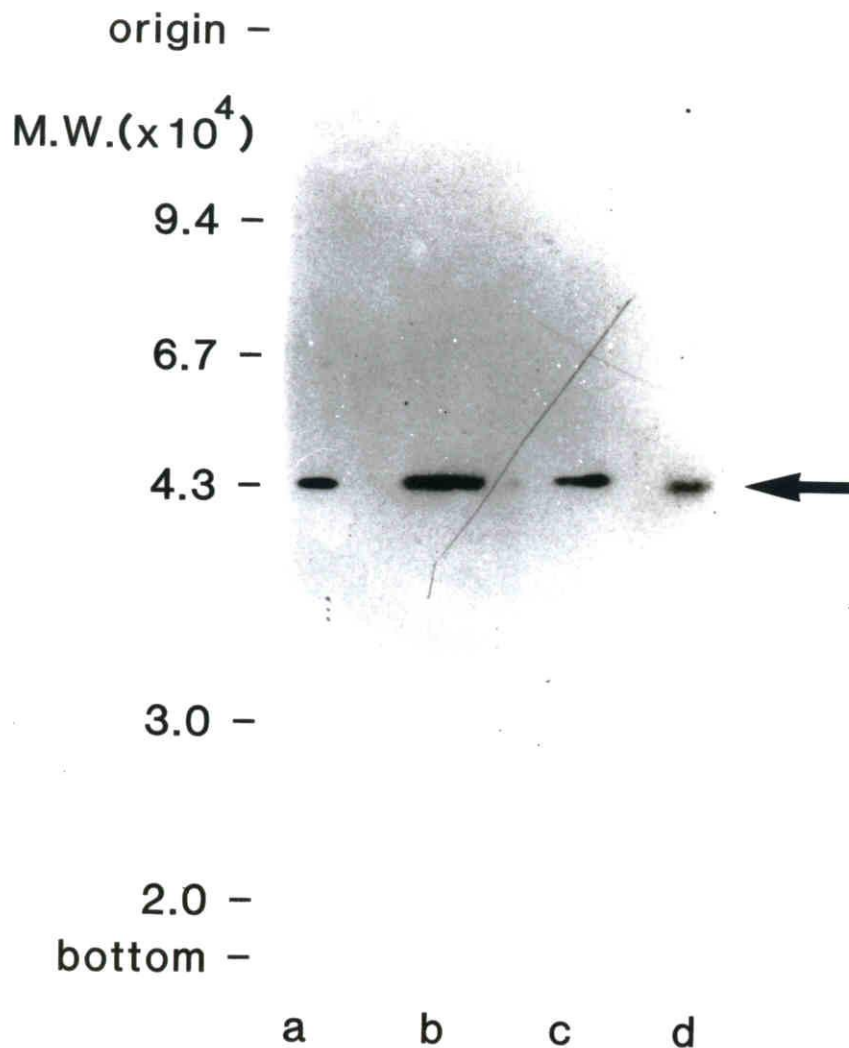


Fig.1-3. Incorporation of [³H]leucine, [³H]mannose, [³H]fucose, and [³H]galactose into α -amylase. Ten scutellar segments were preincubated for 2hr at 30°C in 0.3ml of buffer A, and additional incubation was performed for 4hr using fresh buffer containing either (a) [³H]leucine (20 μ Ci), (b) [³H]mannose (100 μ Ci), (c) [³H]fucose (100 μ Ci), or (d) [³H]galactose (100 μ Ci). α -Amylase in the incubation medium was identified by immunoprecipitation, SDS-PAGE and fluorography.

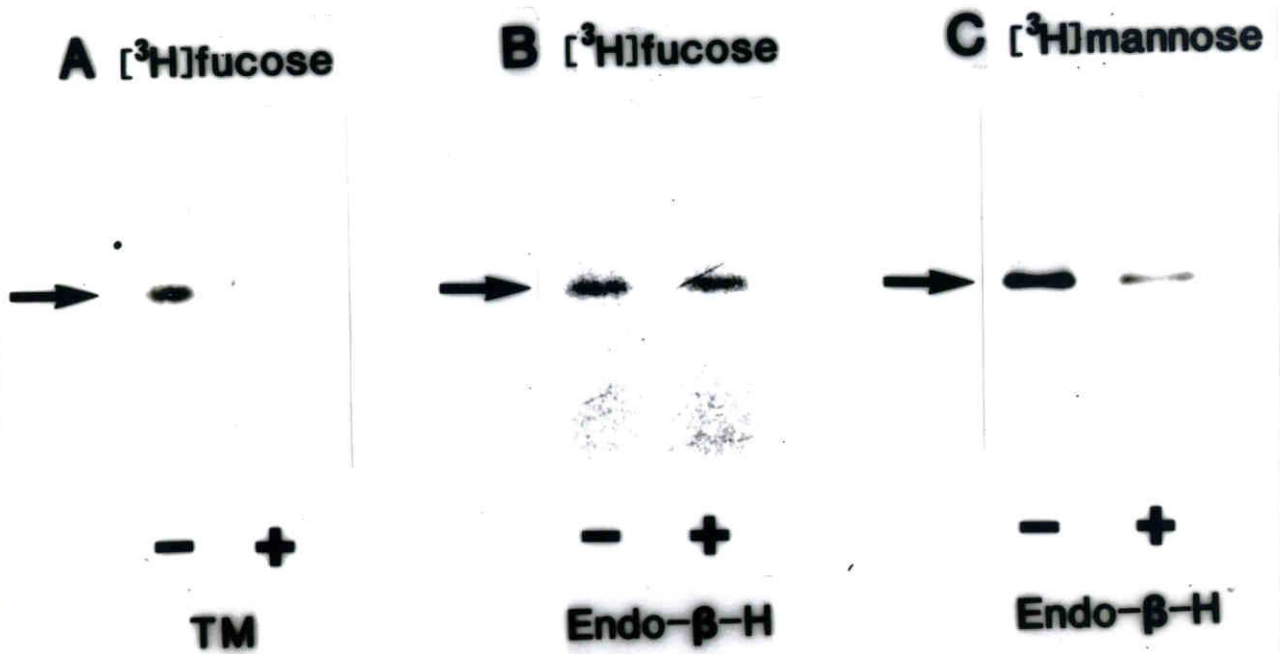


Fig.1-4. Effect of TM on incorporation of [^3H]fucose into α -amylase (A) and Endo- β -H digestion of (B)[^3H]fucose- and (C)[^3H]mannose-labeled molecules. (A) Ten scutella were preincubated for 3hr in 0.3ml of buffer A in the absence or presence of TM(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). This incubation was followed by the addition of [^3H]fucose(100 μCi) for 3hr. The incubation media were then subjected to immunoprecipitation, SDS-PAGE, and fluorography as before. (B) Ten scutella were preincubated for 2hr in 0.3ml of buffer A, followed by 6hr incubation in fresh buffer containing [^3H]fucose(100 μCi). Following incubation, the reaction media were divided into equal two parts; one half of each(150 μl) was subjected to Endo- β -H digestion as described in the text. Immunoprecipitation, SDS-PAGE, and fluorography were performed as before. (C) Experimental conditions were same as (B), except [^3H]fucose was replaced by [^3H]mannose(100 μCi).

以上述べた結果より、R型 α -amylase分子は複合型糖鎖を持ち、またS型 α -amylase分子は高-mannose型糖鎖を持っていることが示唆された。

【2】R型およびS型 α -Amylaseの蛋白質構造の比較：

イネ種子 α -amylaseには、等電点電気泳動によって区別することのできる isozymes（主にAとB）がある(90,91)。上記のように、 α -amylase分子に含まれる糖鎖はすべて中性糖であることから、等電点の違いはポリペプチド部分によるものであると考えられる。そこで、R型、S型 α -amylaseと isozyme A、Bの間に対応関係があるかどうかを検討した。精製 α -amylaseをEndo- β -II処理した後、Con A-Sepharose affinity column chromatographyによってR型とS型 α -amylaseを分離することを試みた(図5)。各フラクションに存在する α -amylaseをSDS-PAGEした後、銀染色によって検出した結果、す通り画分(fraction No.1)にはS型 α -amylase、吸着画分(fraction No.6、7)にはR型 α -amylaseのみが見られた。次に、R型 α -amylase(fraction No.6)およびS型 α -amylase(fraction No.1)を等電点電気泳動(pH 4-6)にかけ、isozymesパターンを調べた。図6は等電点電気泳動を行った後銀染色したものである。R型とS型分子の間には、等電点によって区別される isozymesの差異は全く見られなかった。また、isozymesパターンを immunoblottingの手法を用いて検索したところR型、S型はともに同じ割合の isozyme A、Bを含んでいることがわかり、銀染色の場合と同じ結果であった。以上の結果から、R型、S型 α -amylase分子は遺伝子レベルで規定されている isozyme A、Bとは対応関係のないことが明らかになった。

つづいて、R型とS型 α -amylaseの蛋白質構造をさらに詳細に検討するため、ペプチドマッピングによる解析を行った。SDS-PAGEを行うことによって高純度のR型 α -amylaseを調製し、そのprotease V8消化によるペプチドマ

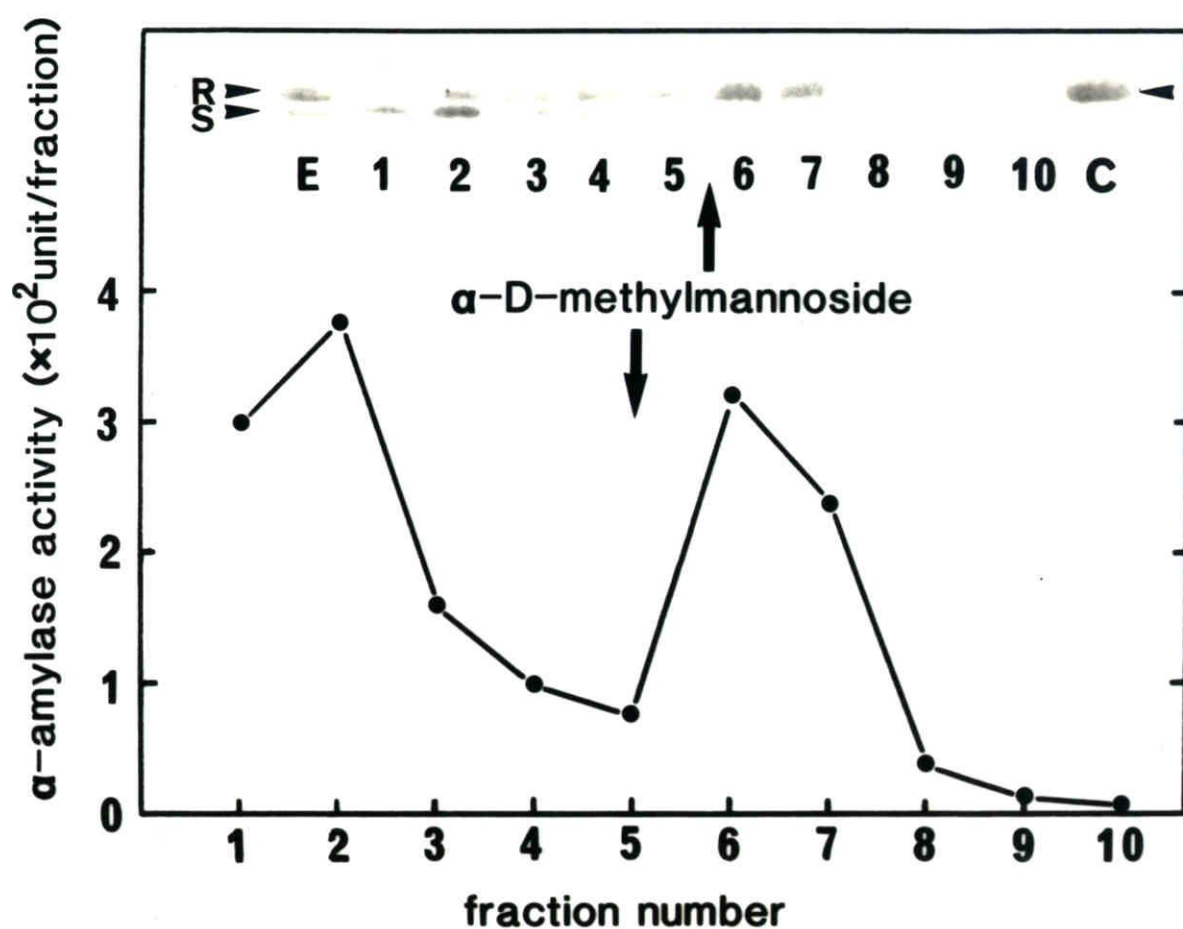


Fig.1-5. Con A-Sepharose affinity column chromatographic separation of S- and R-type α -amylase polypeptide. Purified α -amylase preparation ($40 \mu\text{g}$) was digested by Endo- β -H for 12hr at 30°C , and the whole mixture was applied to a Con A-Sepharose column (packed gel volume, $50 \mu\text{l}$) following the method described in the text. Eluting buffer used was 20mM Tris-HCl (pH 7.0) containing 0.5M NaCl, 3mM CaCl_2 and 1mM MgCl_2 up to tube No.5, and changed to the same buffer B containing 0.5M α -D-methylmannoside from tube No.6 (arrow). An aliquot of the effluents was used for the α -amylase assays as well as for the SDS-PAGE. Silver stained band patterns of S- and R-type α -amylase in each fraction are shown in the upper inset. (E), Endo- β -H treated α -amylase sample prior to column chromatography; (C), Endo- β -H untreated α -amylase.

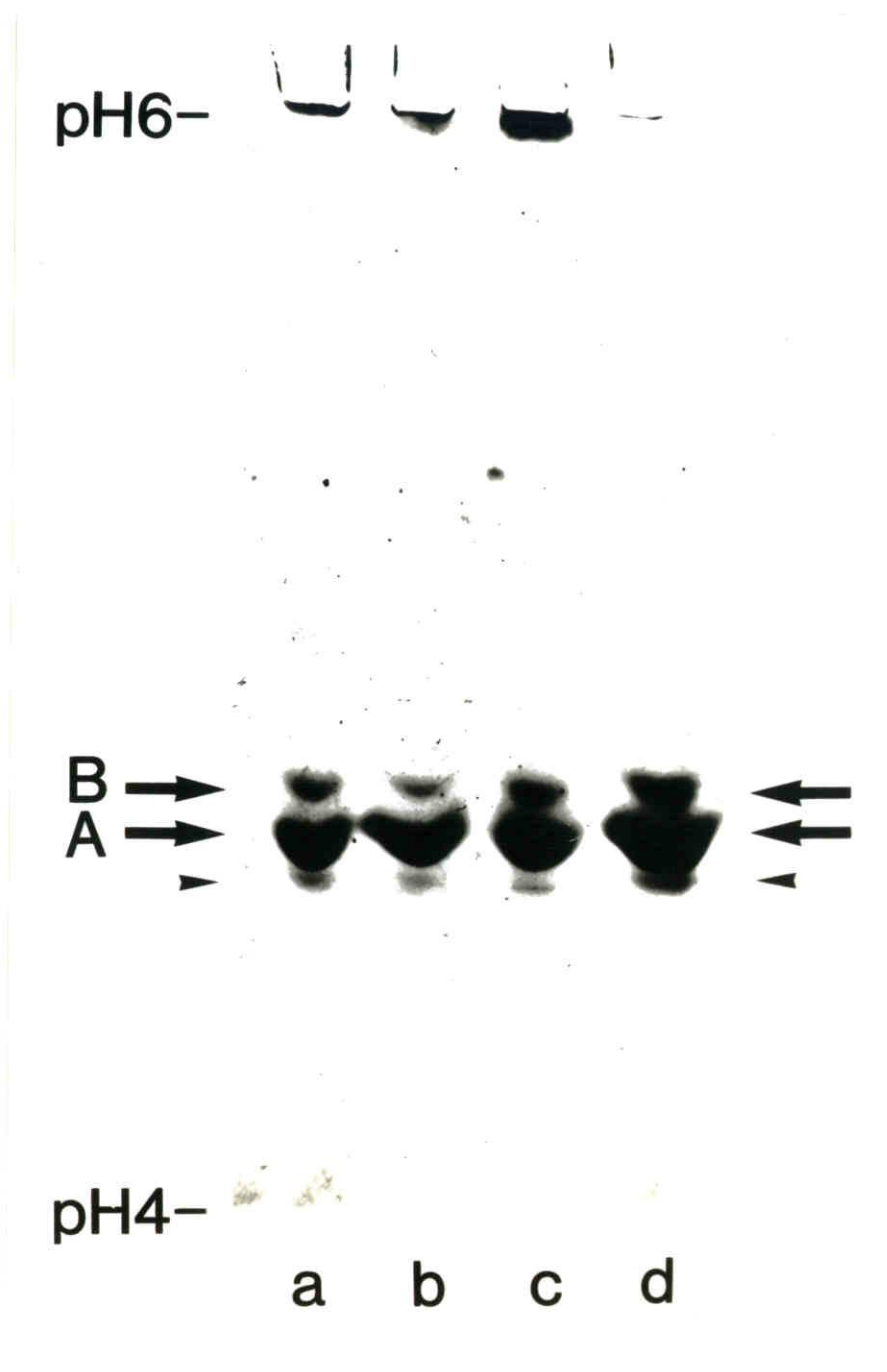


Fig.1-6. Presence of multiple polypeptide chains in S- and R-type α -amylase molecules separated by isoelectrofocusing polyacrylamide gel electrophoresis. Each of S- and R-type α -amylase separated by the Con A affinity column chromatography as shown in Fig.5 (tube No.1 and No.6) was applied to isoelectrofocusing polyacrylamide gel electrophoresis (pH 4-6). After electrophoresis protein bands were detected by the Bio-Rad silver stain. (a) α -amylase without Endo- β -H digestion; (b) S-type α -amylase; (c) R-type α -amylase; (d) mixture of S- and R-type α -amylase without Endo- β -H digestion.

ップを Endo- β -H 未処理 α -amylase のそれと比較した。図7に示されているように、R型 α -amylase と Endo- β -H 未処理 α -amylase のペプチドマップの間に差異は見られなかった。上記の結果は銀染色によって検出したものであるが、immunoblotting で調べた場合も同じ結論が得られた。対照実験として行った糖鎖のない α -amylase と正常な α -amylase のペプチドマッピングの結果の間には有意の差が見られることから、このペプチドマップの結果は信頼のできるものと考えられる。以上示した結果より、R型 および S型 α -amylase の蛋白質構造は同じであることが示唆された。

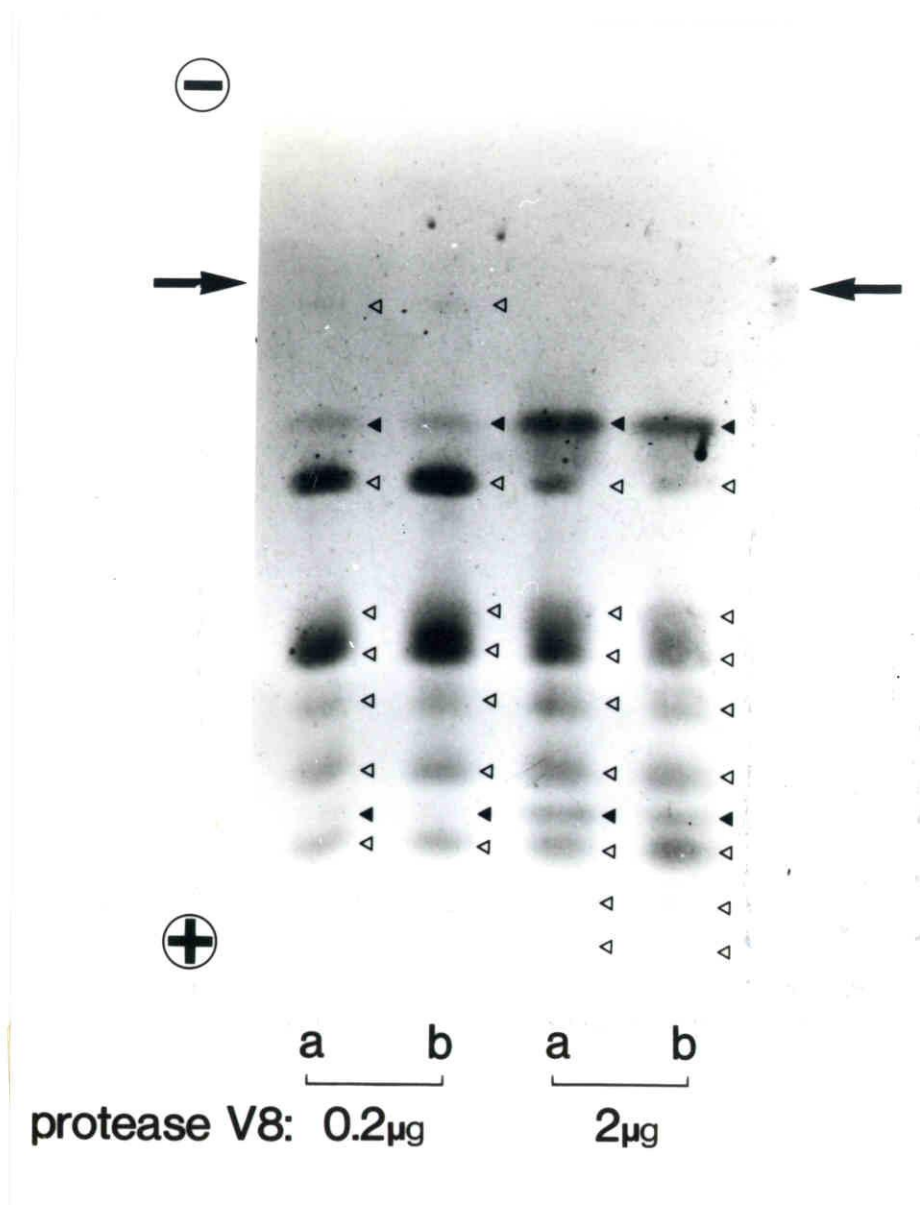


Fig.1-7. Peptide analysis of R-type α -amylase. Gel fragment containing each of R-type α -amylase (a) and Endo- β -H untreated α -amylase (b) was cut from the first SDS-PAGE (slab gel), and then directly applied to the slot of the second slab gel together with Staphylococcus aureus protease V8 (0.2 or 2 μ g per slot). After electrophoresis, peptides were detected by the Bio-Rad silver stain. Arrows indicate the position of native α -amylase. Open triangles show peptides produced by the protease V8 hydrolysis and closed triangles protease V8, respectively.

考察

発芽イネ種子胚盤上皮細胞において合成される α -amylase 分子への糖鎖の導入は、rER において co-translational に起こることが、胚盤組織から調製された poly(A)⁺-RNA、ポリゾーム、および ミクロゾーム を用いて *in vitro* 合成させた α -amylase 分子を解析することによって明らかにされた (74, 75)。さらに、ミクロゾームで *in vitro* 合成された α -amylase 分子の糖鎖は Endo- β -H によって完全に切断されること、および、TM処理した組織から調製されたポリゾーム および ミクロゾーム で *in vitro* 合成された α -amylase 分子には糖鎖が全くついていないことから (74, 75)、dolichol pathway を通して高-mannose 型糖鎖が α -amylase 分子に導入されることが示された。

胚盤組織から分泌される α -amylase 分子には、Endo- β -H の作用によって区別できる2つの isoforms、すなわち Endo- β -H 耐性 (R) 型と感受性 (S) 型が存在していることが明らかになった (図2)。そして、R型 α -amylase 分子は複合型糖鎖を持ち、S型 α -amylase 分子は高-mannose 型糖鎖を持っていることを示唆する結果が得られた (図4)。細胞外に分泌されるR型 α -amylase 分子の糖鎖構造は rER において co-translational に導入される糖鎖の構造とは明らかに異なっており、したがって、細胞内輸送の間に post-translational な糖鎖修飾を受けて生じたものと考えられる。S型 α -amylase 分子の構造に関しては、rER で合成される α -amylase 分子のそれとは区別できなかった。しかしながら、post-translational な糖鎖修飾 (trimming) を受けている可能性を否定することはできない。この問題は、 α -amylase 分子の糖鎖構造を完全に決定することによって解決されるであろう。

R型とS型 α -amylase はともに同量の isozyme A、B を含んでいることから、発芽イネ種子 α -amylase には少なくとも4つの isoforms (A-R、

B-R、A-S、およびB-S)があることがわかった(図6)。そして、R型とS型は post-translational な糖鎖修飾の違いによって生じた isoform であることがわかった。

第二章 α -Amylase の細胞内輸送と糖鎖修飾

動物細胞における蛋白質の分泌について、種々の細胞系を用いて膨大な研究が行われた結果、すべての分泌性蛋白質は r E R で生合成された後、Golgi 体を経由して細胞外に分泌されることが明らかになった (32,94,110)。また、細胞膜蛋白質やリソゾーム蛋白質も分泌性蛋白質と同様に Golgi 体を経由した後、それぞれの局在部位に輸送されることが明らかにされた (32)。この蛋白質の細胞内輸送に中心的な役割を果たしている Golgi 体の構造と機能に関する研究が、最近、飛躍的に進展した。Golgi 体は、分泌顆粒の packaging、糖蛋白質の糖鎖修飾、糖脂質の glycosylation、proteoglycan の硫酸化、蛋白質前駆体から活性型酵素への proteolysis、および リボ蛋白質の packaging 等の機能を持つことが観察されているが、そのなかでも糖蛋白質の糖鎖修飾の研究は最も進んでおり、そのメカニズムの大綱は確立されたといつてよい。分泌性糖蛋白質や細胞膜糖蛋白質は、r E R において高-mannose 型糖鎖を持つ未成熟型糖蛋白質として合成される。すべての glucose と 1 分子の mannose が glucosidase および mannosidase によって trimming された後、cis 面から Golgi 体に入る。Medial cisternae において、mannose の trimming が完了するとともに N-acetylglucosamine transferase によって N-acetylglucosamine が糖鎖に付加される。次に、trans cisternae に存在する galactosyltransferase、fucosyltransferase、sialyltransferase 等によって terminal glycosylation が行われ、成熟型糖蛋白質が生成される (29,46,59,60)。そして、成熟型糖蛋白質は trans 面から細胞膜に輸送されるのである。

Tartakoff らによって報告された分泌に対する monensin 阻害効果は、Golgi 体の機能局在に関する知見の解明の面で大きい貢献をした (127)。Monensin は 1 価陽イオン、特に Na^+ に特異性の高い carboxylic ionophore の 1 つ

であり、細胞に与えると Golgi cisternae の著しい膨化をひき起こす (127, 129)。そして、monensin は、分泌性蛋白質や細胞膜蛋白質の細胞内輸送を阻害し、Golgi 体にそれらを蓄積させるとともに、terminal glycosylation 等の trans cisternae で起こる プロセッシングを阻害することも明らかにされた (126,127,128,129,130,131)。最近、Semliki Forest Virus (S F V) を感染させたハムスターの腎臓細胞に monensin 処理をほどこすと、S F V 由来の膜蛋白質の medial Golgi から trans Golgi 間の輸送が阻害されることが組織化学的方法によって見いだされた (42)。Golgi 体に対する monensin の作用は Na^+/K^+ のバランスが変化するために起こると考えられている (127,129) が、詳細な作用機序は十分解明されていない。しかしながら、その作用効果は明確であり、種々の分泌性蛋白質の細胞内輸送における Golgi 体の役割を調べる上で有用であると考えられる。

植物細胞における Golgi 体は、電子顕微鏡を用いた組織化学的研究より分泌過程に何等かの役割を果していることが示唆されていた (78,79,81) が、それを生化学的に研究した例はきわめてすくない。植物 Golgi 体の役割を調べた初期の生化学的研究は、cell wall polysaccharides の生合成に関連して行われた (38,89,102)。また登熟過程の French bean の子葉において合成される貯蔵蛋白質 phytohemagglutinin に $[^3\text{H}]$ fucose が取り込まれること、細胞分画実験において phytohemagglutinin が Golgi-enriched 画分に見られること、そして phytohemagglutinin のプロテインボディへの輸送が monensin によって阻害されることから、この貯蔵蛋白質は Golgi 体を經由してプロテインボディに輸送されることが示唆された (19,20)。しかし、分泌性蛋白質 α -amylase の細胞内輸送に果す Golgi 体の役割を調べた生化学的研究は全くなかった。

第一章において、 α -amylase 分子は細胞内輸送中にその糖鎖の修飾を受け

ることを明らかにした。この post-translational な糖鎖修飾は、動物細胞における Golgi 体の機能に関する知見の類推から、Golgi 体において起こっているものと考えられる。本章では、 α -amylase の細胞内輸送における Golgi 体の役割を分泌阻害剤 monnensin を用いて さらに詳細に検討した実験結果について述べる。

材料と方法

【1】Pulse Labeling 実験：

発芽4日目の胚盤組織（20個）を buffer A [20mM Tris-HCl (pH 7.0)、10 mM CaCl₂、10 μg/ml streptomycin、10 μg/ml penicillin G] 溶液中で2時間 30°C で preincubation した後、種々の濃度（10⁻⁶M、10⁻⁵M、10⁻⁴M）の cycloheximide 存在下または非存在下、20 μCi [³⁵S]methionine を含む buffer A 溶液中で 30°C、1時間 incubation した。反応終了後、組織を 0.1% Triton X-100を含む buffer A 溶液（500 μl）中で摩砕し蛋白質を抽出した。抽出液に含まれる [³⁵S]methionine で標識された蛋白質（hot TCA-insoluble fraction）の放射活性は、液体シンチレーションスペクトロメーター（Aloka liquid scintillation system LSC-700）を用いて測定した。 [³⁵S]α-amylase の放射活性は、immunoprecipitation、SDS-PAGE、fluorography を行った後、fluorogram をデンストメーター（Shimadzu CS-910 Dual-wavelength Scanner）を用いて解析した。

【2】Pulse-chase Labeling 実験：

胚盤組織（20個）は buffer A 溶液中で 30°C、2時間 preincubation を行った後、50 μCi [³⁵S]methionine と 30°C、1時間反応させた。反応終了後 10⁻⁶M cycloheximide 存在下または非存在下において 1mM methionine で5時間 chase を行った。Monensin の効果を調べる場合には、chase 溶液に 10⁻⁷M の monensin を加えて上記の実験条件で pulse-chase した。Chase 終了後、細胞内（組織抽出溶液）および細胞外（chase 溶液）に存在する [³⁵S]α-amylase 分子は immunoprecipitation、SDS-PAGE を行った後、fluorography によって検出し、定量した。

【3】 Pulse-chase Double-labeling 実験：

Cycloheximide の効果を調べる場合には、胚盤組織を 30°C、2 時間 preincubation し、20 μ Ci [35 S]methionine および 100 μ Ci [3 H]leucine、または 20 μ Ci [35 S]methionine および 100 μ Ci [3 H]糖 ([3 H]mannose、[3 H]fucose、または [3 H]galactose) と 1 時間反応させた後、 10^{-6} M cycloheximide 存在下または非存在下、非放射性物質 (1mM methionine、1mM leucine、10mM mannose、10mM fucose、10mM galactose) で 5 時間 chase を行った。Monensin の効果を調べる場合にも 10^{-7} M monensin を preincubation、pulse-chase 溶液すべてに加えたことを除いて、上記と同じ条件で行った。Chase 終了後、chase 溶液中に存在する種々の放射性物質で標識された α -amylase 分子の放射活性は、 α -amylase を immunoprecipitation した後、液体シンチレーションスペクトロメーターで測定した。

【4】 Data Analysis：

α -Amylase 分子に取り込まれた放射活性の定量は、fluorogram をデンストメーターで測定し、 α -amylase のピークの面積を計算することによって行った。免疫化学的方法によって完全に精製された α -amylase の放射活性と fluorogram に現われた α -amylase のピークの面積との間には直線的関係が得られた。

【5】 Endo- β -H による糖鎖の消化実験：

第一章で述べた方法で α -amylase 分子の Endo- β -H 処理を行った。Endo- β -H 処理後、[35 S] α -amylase 分子は、immunoprecipitation、SDS-PAGE、つづいて fluorography を行うことによって検出した。

【6】電子顕微鏡観察：

胚盤組織は 10^{-7} M monensin 存在下または非存在下において buffer A 溶液中で 30°C 、3時間 incubation した後、改良 Karnovsky's 固定液 [2% paraformaldehyde、4% glutaraldehyde、80mM phosphate buffer (pH7.0)、20mM collidine buffer (pH 7.0)] で 4°C 、24時間前固定した。そして、1% OsO_4 -0.1mM cacodylate-HCl (pH7.3) で 4°C 、1時間後固定した後、ethanol で脱水し、エポン樹脂で包埋した。超薄切片をクエン酸鉛と酢酸ウランで染色した後電子顕微鏡 (Philips 300 EM) 観察を行った。

結果

【1】 α -Amylase 生合成と細胞内輸送は独立した過程である：

α -Amylase 分子の細胞内輸送に対する生合成の "連続性" の重要度を検討するために、 α -amylase 分子の細胞外分泌に及ぼす蛋白質合成阻害剤、cycloheximide の効果を調べた。胚盤組織を 10^{-6}M 、 10^{-5}M 、または 10^{-4}M cycloheximide 存在下、 $[^{35}\text{S}]\text{methionine}$ と1時間反応させた後、蛋白質画分 (hot TCA-insoluble fraction) および immunoprecipitable α -amylase に取り込まれた放射活性を測定した。Cycloheximide は 10^{-6}M の濃度において蛋白質合成を 70% 阻害し、 10^{-5}M 以上では 85% 阻害した。 α -Amylase の生合成の場合には、 10^{-6}M においては 86%、 10^{-5}M 以上では 96% の阻害効果が見られた (図1)。次に、胚盤組織を $[^{35}\text{S}]\text{methionine}$ で1時間標識した後、 10^{-6}M cycloheximide 存在下または非存在下において、非放射性的の methionine (1mM) で1-5時間 chase を行った。図2に示した結果より、 $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase 分子の細胞外への分泌パターンは、cycloheximide 添加の有無にかかわらず全く同じであることがわかった。これらの結果から、胚盤上皮細胞における α -amylase 分子の生合成と細胞内輸送の過程はそれぞれ独立していることが示された。

【2】 α -Amylase 分子の糖鎖修飾に及ぼす Cycloheximide の効果：

α -Amylase 分子は、その細胞内輸送中に post-translational な糖鎖修飾を受ける (第一章)。この糖鎖修飾に対する cycloheximide の効果を調べるために以下に示す pulse-chase 実験を行った。胚盤組織を $[^{35}\text{S}]\text{methionine}$ と $[^3\text{H}]\text{leucine}$ または $[^{35}\text{S}]\text{methionine}$ と $[^3\text{H}]\text{糖}$ で1時間 double-labeling した後、 10^{-6}M cycloheximide 存在下または非存在下において5時間 cha-

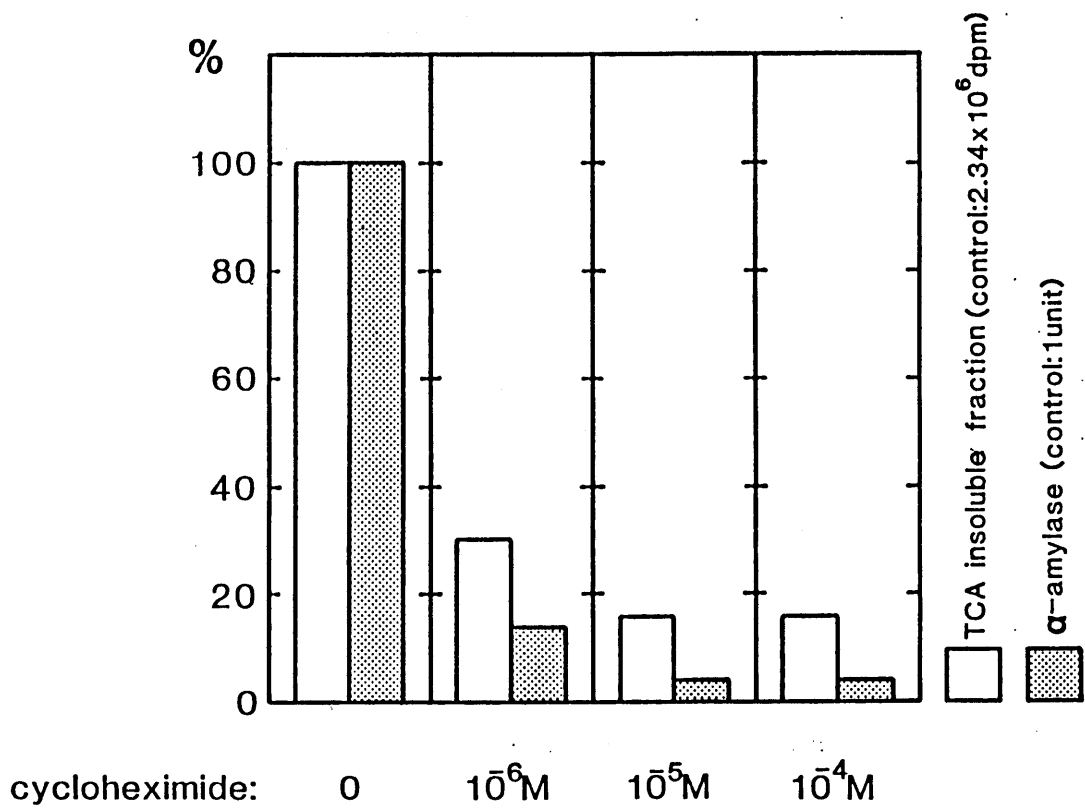


Fig.2-1. Effect of cycloheximide on the incorporation of [^{35}S]methionine into α -amylase. Details of experimental protocols and subsequent treatments are described in the text. For the measurement of radioactivity incorporation into α -amylase, the sample solution was subjected to the immunoprecipitation, SDS-PAGE and fluorographic analysis. The radioactivities of hot TCA-insoluble fraction and immunoprecipitable α -amylase molecules in the control system were set out 100%.

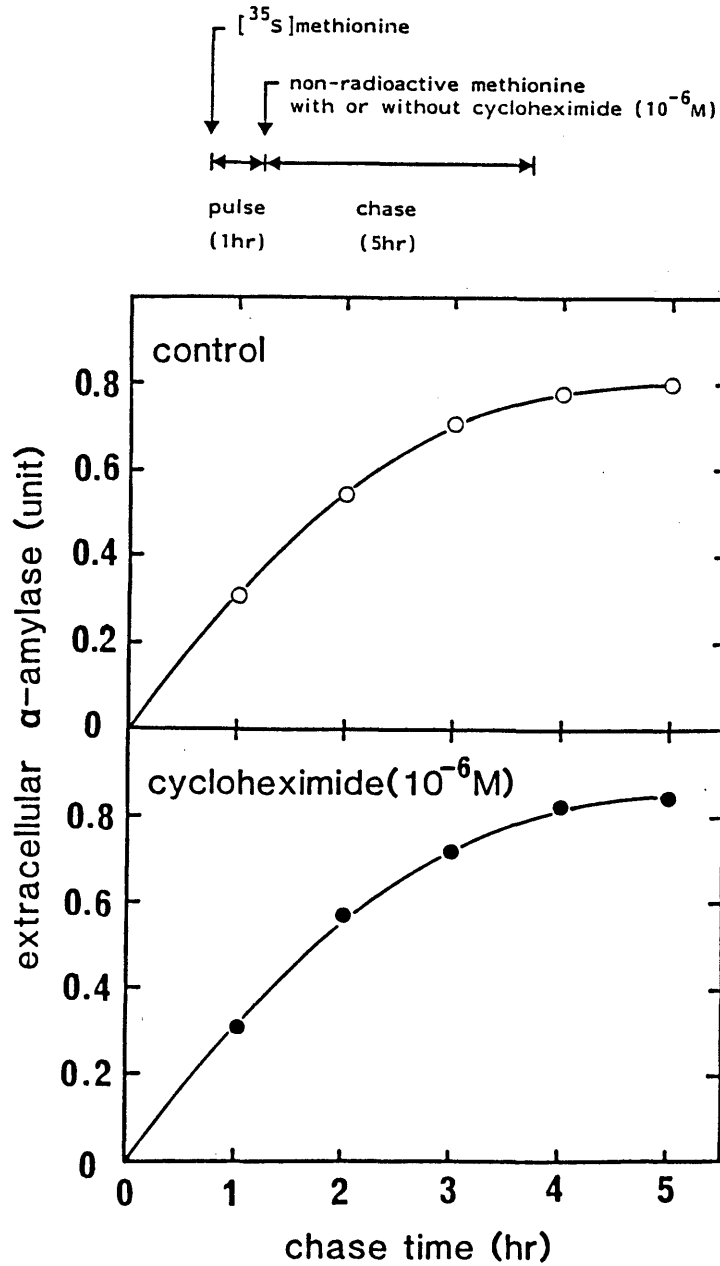


Fig.2-2. Effect of cycloheximide on the extracellular secretion of $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase. Details of experimental protocols are described in the text. The chase media and tissue extracts were subjected to the immunoprecipitation, SDS-PAGE and fluorographic analysis. In the control experiment, the total amount of $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase in intracellular plus extracellular fractions after 5hr chase period was arbitrarily defined as 1 unit.

se した。Chase 終了後、細胞外に分泌された α -amylase 分子の放射活性を測定した。 $[^3\text{H}]$ leucine/ $[^{35}\text{S}]$ methionine (Exp.1)、 $[^3\text{H}]$ mannose/ $[^{35}\text{S}]$ methionine (Exp.2)、 $[^3\text{H}]$ fucose/ $[^{35}\text{S}]$ methionine (Exp.3)、および $[^3\text{H}]$ galactose/ $[^{35}\text{S}]$ methionine (Exp.4) の比は、cycloheximide によってほとんど影響を受けなかった (表 1)。これらの結果は、分泌された α -amylase 分子の糖組成は cycloheximide によって変化しないことを示しており、したがって、cycloheximide は α -amylase 分子の糖鎖修飾に影響を与えないことを示唆している。さらに、R型およびS型 $[^{35}\text{S}]$ α -amylase の生成に及ぼす cycloheximide の効果を調べるために、図 2 と同じ条件で、組織を $[^{35}\text{S}]$ methionine で pulse-chase し、細胞内および細胞外に存在する $[^{35}\text{S}]$ α -amylase 分子を Endo- β -H 処理した。図 3 の結果は、cycloheximide は R型およびS型 $[^{35}\text{S}]$ α -amylase の生成に全く影響しないことを明らかに示している。以上の結果より、すでに生合成された α -amylase 分子は、それにつづく蛋白質合成が阻害されても正常に post-translational な糖鎖修飾を受け、細胞内を輸送されることが明らかになった。

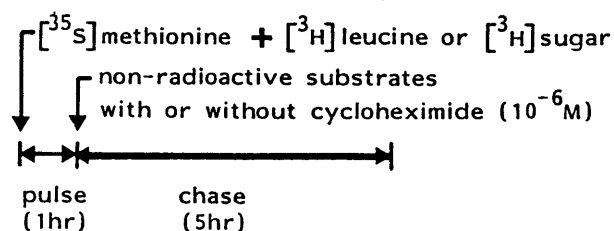
【3】胚盤上皮細胞に及ぼす Monensin の作用：

胚盤組織を 10^{-7}M monensin で 3 時間処理した後、電子顕微鏡を用いて胚盤上皮細胞の Golgi 体の形態を観察した。正常な細胞 (図 4-C、D) においては、Golgi 体の層板構造が見られた。Monensin 処理した細胞 (図 4-A、B) においては、Golgi cisternae 間の付着は残されているが、cisternae の著しい膨化が観察された。また、rER には何等変化は見られなかった。

【4】 α -Amylase の細胞内輸送と糖鎖修飾に及ぼす Monensin の効果：

胚盤組織を 10^{-7}M monensin 存在下または非存在下において、 $[^{35}\text{S}]$ methio-

Table 2-1. Effect of cycloheximide on the modification of oligo-saccharide chains of α -amylase molecules. Twenty scutella were incubated in buffer A containing a pair of [^{35}S]methionine ($20\ \mu\text{Ci}$) and either one of [^3H]-labeled ($100\ \mu\text{Ci}$) leucine or three different kind of sugars as indicated for 1 hr at 30°C . The whole reaction mixture was then chased with the medium containing nonradioactive substrates with or without 10^{-6}M cycloheximide for additional 5 hr. The chased media were then subjected to the immunoprecipitation and radioactivity measurements.



Expt.	Substrate	Radioactivity in α -amylase (dpm)	
		none	cycloheximide (10^{-6}M)
(1)	$[\text{}^3\text{H}]\text{leucine}$ (a)	1.21×10^4	1.24×10^4
	$[\text{}^{35}\text{S}]\text{methionine}$ (b)	1.85×10^4	2.22×10^4
	(a)/(b)	0.65	0.56
(2)	$[\text{}^3\text{H}]\text{mannose}$ (a)	1.79×10^4	2.03×10^4
	$[\text{}^{35}\text{S}]\text{methionine}$ (b)	2.25×10^4	2.54×10^4
	(a)/(b)	0.80	0.80
(3)	$[\text{}^3\text{H}]\text{fucose}$ (a)	1.86×10^3	1.67×10^3
	$[\text{}^{35}\text{S}]\text{methionine}$ (b)	2.36×10^4	2.47×10^4
	(a)/(b)	0.08	0.07
(4)	$[\text{}^3\text{H}]\text{galactose}$ (a)	2.36×10^3	2.45×10^3
	$[\text{}^{35}\text{S}]\text{methionine}$ (b)	2.33×10^4	2.16×10^4
	(a)/(b)	0.10	0.11

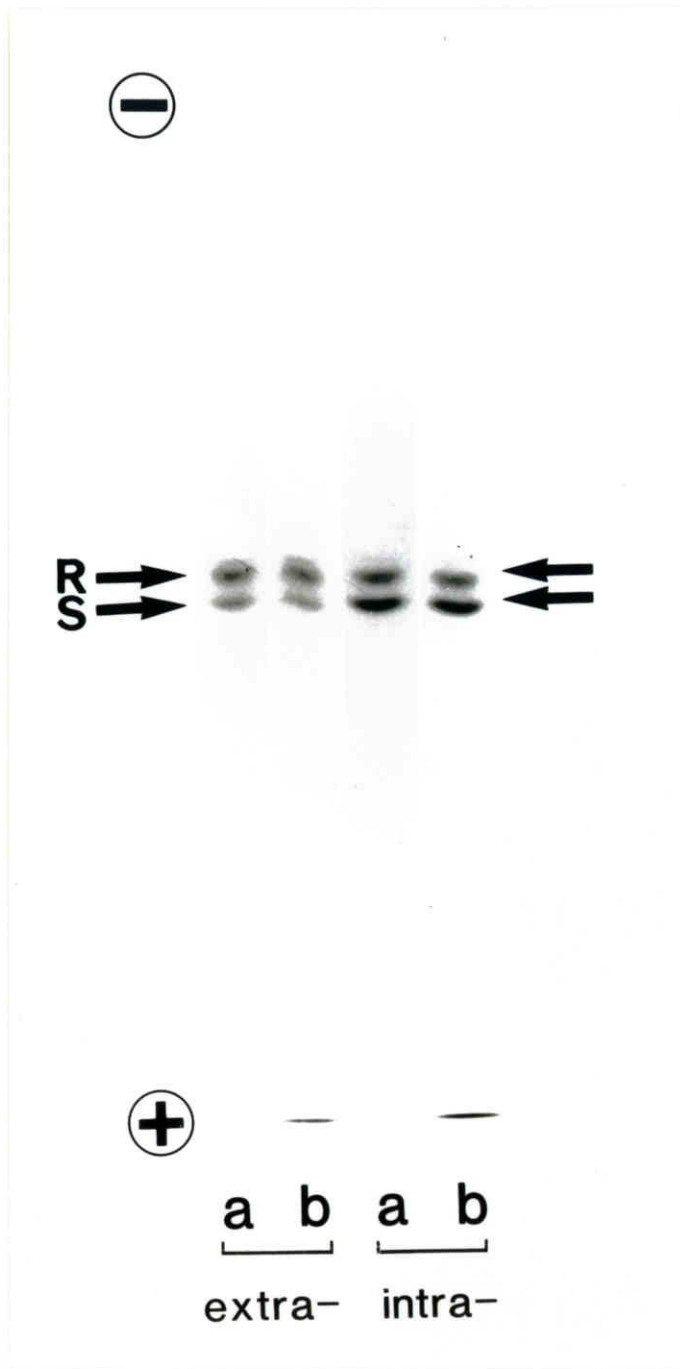


Fig.2-3. Formation of S- and R-type^[35S]α-amylase molecules by rice scutellum in the presence or absence of cycloheximide. Twenty rice scutellar segments were pulsed with [³⁵S]methionine for 1hr and then chased for 2hr in the presence (b) or absence (a) of 10⁻⁶M cycloheximide. [³⁵S]α-amylase molecules in either intracellular (tissue extracts) or extracellular (incubation media) fractions were subjected to the Endo-β-H digestion for 3hr period at 30°C. After enzymic hydrolysis, the sample mixtures were immunoprecipitated with anti-α-amylase IgG and S- and R-type polypeptides were separated by the SDS-PAGE. Other experimental details were described in the text.

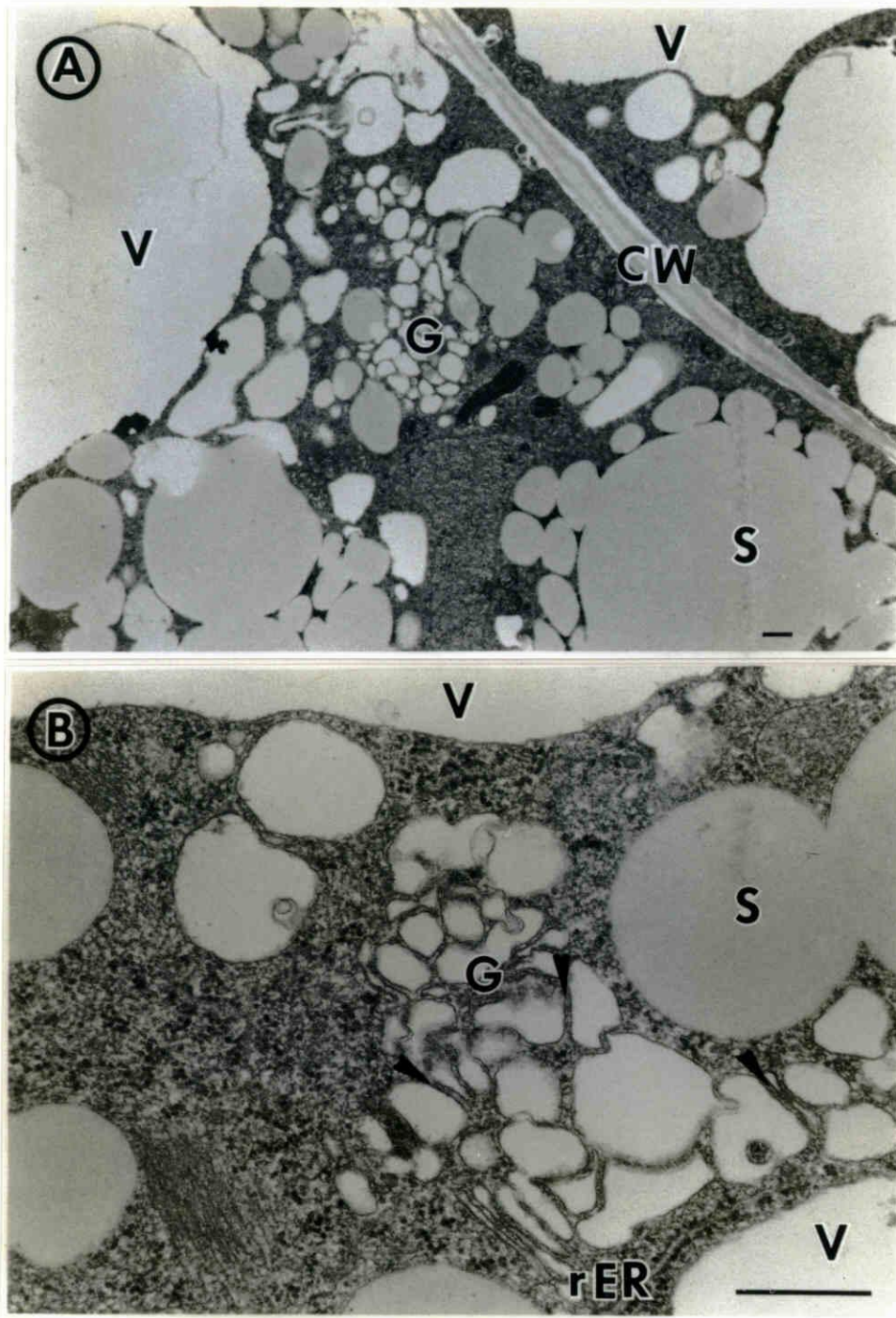
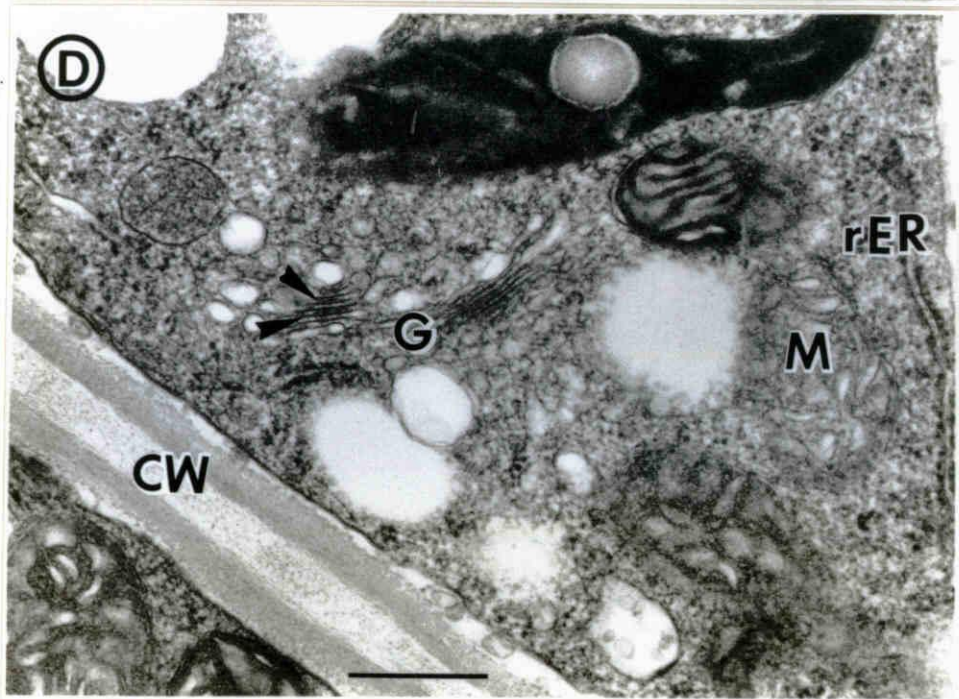
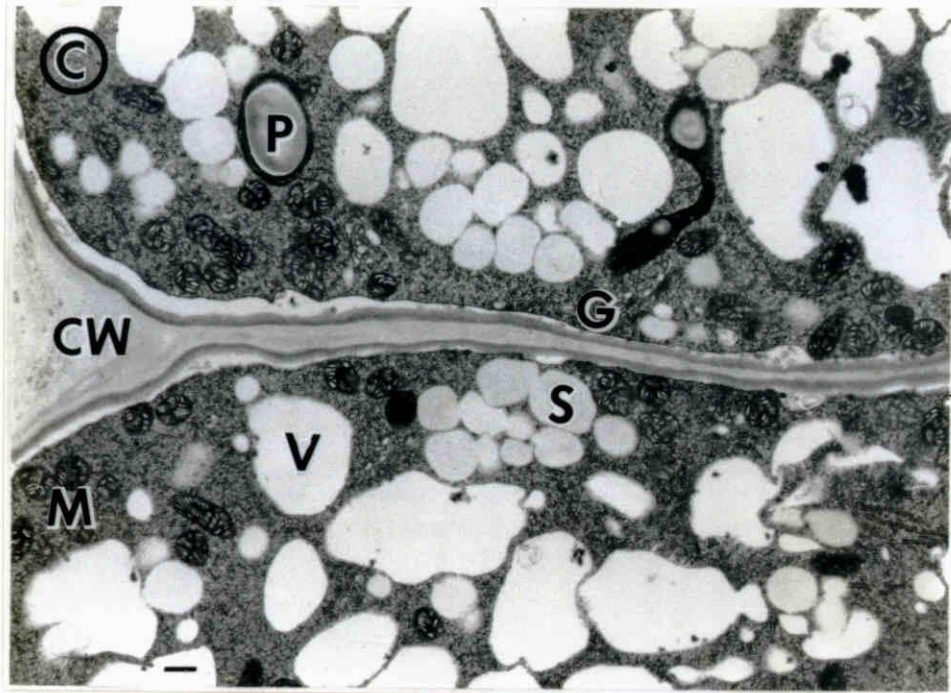


Fig.2-4. Ultrastructure of scutellar epithelium with (A,B) or without (C,D) monensin ($10^{-7}M$) treatment. Arrowheads indicate the characteristic intercisternal material found between Golgi saccules (78). G, Golgi complex; rER, rough ER; V, vacuole; CW, cell wall; D, lipid droplet (spherosome); M, mitochondria; P, plastid. bar= $0.5\mu m$.



nine および [^3H]leucine、または [^{35}S]methionine および [^3H]糖で pulse-chase した後、chase 溶液に分泌された α -amylase の放射活性を測定した。その結果、[^{35}S] α -amylase 分子の細胞外への分泌は、monensin によって 35-50 % 阻害されることがわかった (表 2)。また、[^3H]leucine/[^{35}S]methionine (Exp.1) と [^3H]mannose/[^{35}S]methionine (Exp.2) の比は monensin 処理によってほとんど変化しないが、[^3H]galactose/[^{35}S]methionine (Exp.3) と [^3H]fucose/[^{35}S]methionine (Exp.4) の比は、monensin 処理によって対照の約 1/2 に減少することが見いだされた。これらの結果は、monensin が galactose や fucose の糖鎖への付加つまり terminal glycosylation を阻害することを示唆するものである。

つづいて、monensin による R 型と S 型 α -amylase の生成に及ぼす効果を調べた。胚盤組織を [^{35}S]methionine と 1 時間反応させた後、 10^{-7}M monensin 存在下または非存在下において 0.5-5 時間 chase を行った。種々の chase 時間において細胞内に存在する [^{35}S] α -amylase を定量したところ、monensin 処理の組織では対照に比べて顕著な [^{35}S] α -amylase 分子の蓄積が見いだされた (図 5)。さらに、図 5 で得られた細胞内および細胞外に存在する [^{35}S] α -amylase を Endo- β -H で消化し、R 型と S 型の量比を調べた。正常な組織においては、chase 時間が進むにつれて R 型 [^{35}S] α -amylase の生成が見られた (図 6-A)。一方、monensin 処理した組織においては、chase 時間が進んでも R 型 [^{35}S] α -amylase の生成は見られず、S 型 [^{35}S] α -amylase の細胞内蓄積が観察された (図 6-B)。細胞外に分泌された [^{35}S] α -amylase を比較してみると、monensin 処理した組織から分泌された [^{35}S] α -amylase にはほとんど R 型がないことがわかった (図 6)。以上の monensin の阻害実験の結果は、 α -amylase の細胞内輸送において Golgi 体が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。

Table 2-2. Double labeling of extracellular α -amylase molecules in pulse-chase incubations. In each experiment using 20 scutellar segments, tissues were incubated in buffer A for 2 hr at 30°C with or without monensin (10^{-7} M), followed by 1 hr pulse with a pair of radioactive substrates as indicated in each column. Subsequently the tissues were chased with nonradioactive substrates for 2 hr at 30°C. The procedures for determining radioactivity in the immunoprecipitable α -amylase in the extracellular fraction (secreted) are given in the text. Values in parentheses in the first columns are numbers of experiments performed. In Experiments 2,3, and 4, the ratio of [3 H]sugar(a)/[3 H]leucine was calculated using the radioactivities of [3 H]leucine-labeled α -amylase given in Experiment 1.

Expt.	Substrate	Radioactivity in α -amylase (dpm)	
		none	monensin (10^{-7} M)
1 (2)	[3 H]leucine (a)	2133 \pm 44	1253 \pm 219
	[35 S]methionine (b)	3737 \pm 803	2294 \pm 122
	(a)/(b)	0.56	0.55
2 (2)	[3 H]mannose (a)	4182 \pm 141	2631 \pm 1065
	[35 S]methionine (b)	4199 \pm 195	2273 \pm 306
	(a)/(b)	1.00	1.16
	(a)/[3 H]leucine	1.96	2.10
3 (3)	[3 H]galactose (a)	821 \pm 141	182 \pm 14
	[35 S]methionine (b)	4086 \pm 917	1982 \pm 144
	(a)/(b)	0.20	0.09
	(a)/[3 H]leucine	0.38	0.15
4 (2)	[3 H]fucose (a)	732 \pm 63	230 \pm 69
	[35 S]methionine (b)	4214 \pm 366	2753 \pm 468
	(a)/(b)	0.17	0.08
	(a)/[3 H]leucine	0.34	0.18

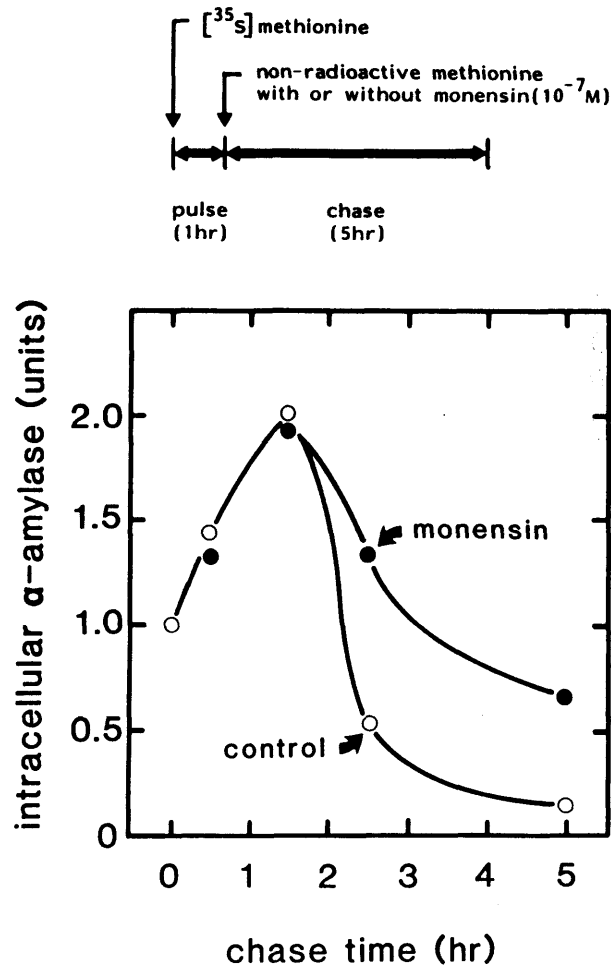


Fig.2-5. Effect of monensin on the intracellular accumulation of α -amylase. To 20 scutella in 0.3ml buffer A was added $[^{35}\text{S}]$ methionine ($50 \mu\text{Ci}$) and incubation continued for 1hr. Then, 1mM nonradioactive methionine dissolved in buffer A was added with or without monensin (10^{-7}M) and chased for additional 5hr. At the selected chase periods as indicated, tissue extracts were prepared following the method described in the text and used for the immunoprecipitation, SDS-PAGE, and fluorographic analysis. In the control system, the amount of α -amylase synthesized during 1hr pulse period was arbitrarily defined as 1 unit.

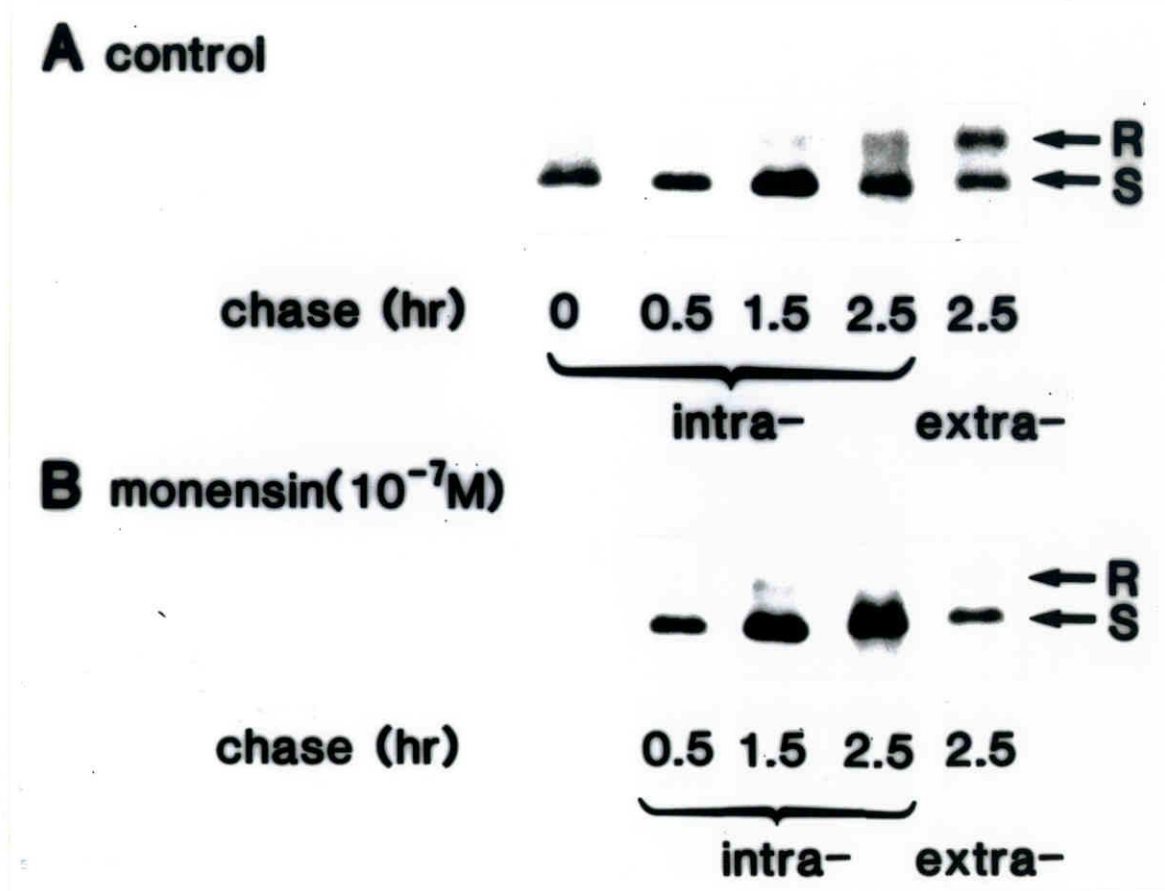


Fig.2-6. Effect of monensin on glycosylation of α -amylase as examined by Endo- β -H digestibility. Reaction protocols were exactly the same as those shown in Fig.2-5. At the selected time periods of chase with nonradioactive methionine with or without monensin, either scutellar tissue extracts (intracellular) or the incubation medium (extracellular) were digested by Endo- β -H (40mU/ml) in 0.1M acetate buffer (pH 5.0) in a total volume of 100 μ l. Reaction was carried out at 30°C for 3hr, and at the end of reaction the whole mixture was neutralized, immunoprecipitated, electrophoresed, and fluorographed.

考察

α -Amylase の細胞内輸送の機構を解析する上で 蛋白合成の "連続性" との関係を明らかにすることは極めて重要である。Jamieson と Palade は、pulse-chase labeling および細胞分画の手法を駆使して、pancreatic exocrine 細胞における分泌性蛋白質の生合成と細胞内輸送は独立した過程であることを証明した (51)。胚盤上皮細胞においては、cycloheximide を用いた実験からすでに生合成された α -amylase 分子は それにつづく蛋白質の合成が阻害されても、正常に細胞内を輸送されることが見いだされた (図 2、図 3、表 1)。したがって、「 α -amylase の生合成と細胞内輸送は全く別の過程である」と結論した。

植物起源の分泌性蛋白質である α -amylase の細胞内輸送における Golgi 体の役割を生化学的研究によって論じた例はこれまでなかった。そこで、胚盤上皮細胞における Golgi 体の機能を carboxylic ionophore、monensin を用いて検討した。Monensin は、Golgi 体の形態変化をひき起こし、Golgi 体に分泌性蛋白質を蓄積させるとともに、trans Golgi における terminal glycosylation 等のプロセッシングを阻害するという作用効果を持っており、Golgi 体を研究する上できわめて有用であることが知られている (127,129)。この monensin を用いた pulse-chase 実験の結果から、胚盤上皮細胞における α -amylase の細胞内輸送には Golgi 体が関与していることが示唆された (図 5、図 6、表 2)。Monensin が R 型 α -amylase の細胞外への分泌を阻害し、S 型 α -amylase を細胞内に蓄積させることから、R 型 α -amylase の生成が Golgi 体で行われていると考えられる。しかし、S 型 α -amylase の分泌は monensin によって阻害されなかった (図 6)。Vigil と Ruddat は、オオムギ糊粉層の組織化学的研究から、 α -amylase が r E R から直接細胞膜に輸送され分泌さ

れることを示唆している(136)。S型 α -amylaseの輸送はGolgi体を經由しないのかもしれない。

これまでの実験結果から考えられる α -amylaseの細胞内輸送に関する仮説を図7に示した。 α -AmylaseはrERにおいて高-mannose型糖鎖を持つ未成熟型糖蛋白質として合成された後、Golgi体に輸送され、そこで糖鎖修飾を受け成熟型糖蛋白質(R型)となって細胞膜に輸送される。ただS型 α -amylaseがGolgi体を經由するのかどうかという問題は未解決の問題として残されている。

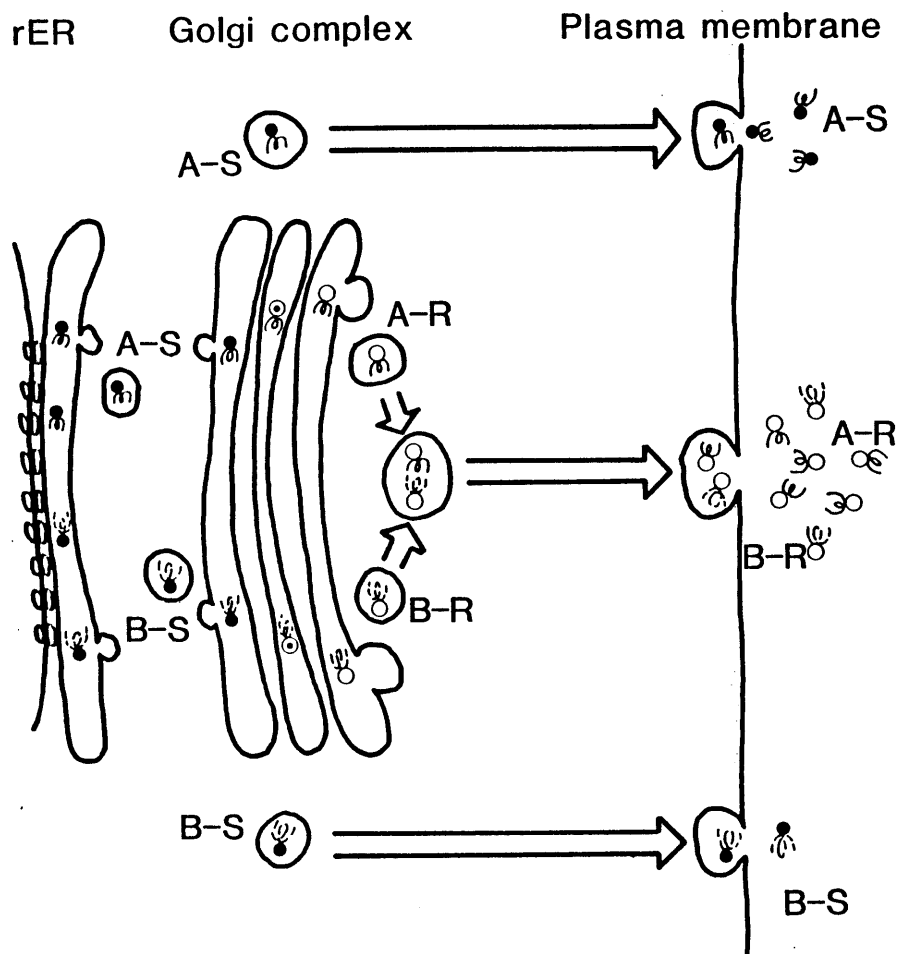


Fig.2-7. A hypothetical model for intracellular transport pathways of α -amylase isoforms. Stepwise processes of (i) polypeptide elongation and co-translational glycosylation directed by polysomes attached to ER, (ii) carbohydrate modification on Golgi, and (iii) transport to the cell surface (plasma membrane) are schematically illustrated in the figure. For brevity, it is shown that two polypeptides (A and B) are synthesized by the different mRNAs, and stepwisely transported to ER cisternae, Golgi complex, secretion vesicles and plasma membrane. Symbols: straight chain, polypeptide A; dotted chain, polypeptide B; (●), high-mannose type carbohydrate chain; (⊙), hypothetical intermediate carbohydrate chain; (○), modified complex type carbohydrate chain.

第三章 α -Amylase の分泌に及ぼす Ca^{2+} の影響

Ca^{2+} が植物の正常な発育のための必須要素の一つであることはよく知られているところである。現在では、 Ca^{2+} の役割が細胞レベルで論じられるようになってきた (143)。植物の分泌細胞においては、gibberellin 処理したオオムギ種子の糊粉層に Ca^{2+} を与えると α -amylase の放出が促進されることが、Chrispeels と Varner (21) および Varner と Mense (135) によって観察された。そして、Varner と Mense は、 α -amylase の細胞壁からの拡散が Ca^{2+} によって促進されることを示唆した。しかし、その後 Moll と Jones (77) は、automatic flow-through 装置を用いて、 α -amylase の放出は細胞壁からの拡散よりむしろ細胞膜からの分泌が律速過程であり、 Ca^{2+} は後者を促進することを示した。さらに、Jones と Jacobsen (52) は、グループ B の α -amylase isozyme の分泌が Ca^{2+} によって調節されていることを報告した。

動物細胞における種々の蛋白質やホルモンの分泌に Ca^{2+} が重要な役割を果たしていることも広く知られている (99, 119, 130, 142)。動物の分泌細胞は、“non-regulated” 細胞 (fibroblasts、plasma cells、macrophages 等) と “regulated” 細胞 (pancreatic、pituitary cell types 等) とに分類される。前者の細胞における蛋白質の分泌は、連続的で、細胞外部からの刺激には影響されない。一方、後者の細胞においては、分泌性蛋白質は分泌顆粒に一度蓄積され、その後細胞外部からの刺激によってその exocytosis が起こる (126)。 Ca^{2+} による分泌調節の研究は主に “regulated” 細胞で進められた。そして、細胞内 (細胞質中) の Ca^{2+} 濃度が 10^{-7}M から 10^{-5}M 以上に上昇すると、急激に分泌顆粒が細胞膜と fusion をはじめ、その内容物が細胞外に放出されることから、exocytosis が Ca^{2+} 依存性の細胞運動であることが明らかにされた (142)。また、最近 exocytosis の過程に synexin や calmodulin 等の Ca^{2+}

結合性蛋白質が関与していることが示唆されている(23,24,25,40,99,120)。

本章では、発芽イネ種子胚盤上皮細胞から分泌される α -amylaseの生合成および細胞内輸送に Ca^{2+} が如何なる影響を及ぼすのかという問題について検討を試みた。

材料と方法

【1】Pulse Labeling 実験：

(A) 発芽4日目の胚盤組織(10個)を種々の濃度の CaCl_2 (0.1-30 mM) または 0.1mM EGTA を含む beffer B [20mM Tris-HCl (pH 7.0)、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin G] 中で 30°C、2時間 preincubation した後、20 μCi [^{35}S]methionine を含む上記溶液 (300 μl) 中で 30°C、3時間 incubation を行った(図1)。

(B) 胚盤組織(10個)を、0.1mM EGTA、および 10mM CaCl_2 、10mM MgCl_2 、10mM SrCl_2 、10mM BaCl_2 または 100mM KCl を含む buffer B 中で 30°C、2時間 preincubation した後、20 μCi [^{35}S]methionine を含む上記溶液 (300 μl) 中で 30°C、3時間 incubation を行った(図2)。

(C) 胚盤組織(10個)を buffer B 中で 30°C、2時間 preincubation した後、20 μCi [^{35}S]methionine、1mM CaCl_2 および種々の濃度の Ca^{2+} -ionophore A-23187 (0、0.01、0.1 または 1 μM) を含む buffer B (300 μl) 中で 30°C、3時間 incubation を行った(表1)。

(D) 胚盤組織(10個)を 10mM または 1.0mM CaCl_2 を含む buffer B 溶液 (pH7.0 または pH8.0) 中で 30°C、2時間 preincubation した後、20 μCi [^{35}S]methionine および種々の濃度の calmodulin antagonist W-7 (0、50 または 250 μM) を含む上記溶液 (300 μl) 中で 30°C、3時間 incubation した(図4)。

(E) 胚盤組織(20個)を 10mM または 0.1mM CaCl_2 を含む buffer B 溶液中で 30°C、2時間 preincubation した後、20 μCi [^{35}S]methionine を含む上記溶液 (300 μl) 中で 30°C、6時間 incubation した。ただし incubation 溶液は1時間ごとに新しい溶液に変えた(図5)。

それぞれの条件で pulse labeling した後、incubation 溶液と組織を分離した。組織は 0.1% Triton X-100 溶液 (500 μ l) 中で摩砕し、組織抽出液を得た。そして incubation 溶液および組織抽出液に存在する [35 S] α -amylase の放射活性は、immunoprecipitation、SDS-PAGE、fluorography を行った後、fluorogram に現われた [35 S] α -amylase をデンストメーターで測定することによって定量した。これらの条件において、[35 S]methionine の α -amylase への取り込みはすくなくとも 4 時間以上定常的に行われた (cf.72)。

【2】Pulse-chase Labeling 実験：

(A) 胚盤組織 (10 個) を buffer A [20mM Tris-HCl (pH 7.0)、10mM CaCl₂、10 μ g/ml streptomycin、10 μ g/ml penicillin G] 溶液中で 30°C、2 時間 preincubation した後、20 μ Ci [35 S]methionine を含む buffer A (300ml) 溶液中で 30°C、2.5 時間 incubation し、つづいて、1mM methionine、および 0.1mM LaCl₃ または 50 μ M ruthenium red を含む buffer A 溶液 (300 ml) 中で 30°C、4 時間 chase を行った (図 3)。

(B) 胚盤組織 (20 個) を 10mM または 0.1mM CaCl₂ を含む buffer B 溶液中で 30°C、3 時間 preincubation した後、100 μ Ci [35 S]methionine を含む上記溶液 (300ml) 中で 30°C、1 時間反応させ、つづいて、1mM methionine および 10mM CaCl₂、0.1mM CaCl₂ または 0.1mM EGTA を含む buffer B 溶液 (300ml) 中で 30°C、5 時間 chase を行った (図 6、表 2)。

それぞれの条件で pulse-chase labeling を行った後、細胞内 (組織抽出液) および細胞外 (incubation 溶液) に存在する [35 S] α -amylase の放射活性は、immunoprecipitation、SDS-PAGE、fluorography を行った後、fluorogram を解析することによって定量した。

【3】Endo- β -Hによる糖鎖の消化実験：

第一章で述べた方法を用いて行った。

結果

【1】 α -Amylase の生合成と分泌に対する Ca^{2+} 及び EGTA の効果：

胚盤組織における α -amylase の生合成および分泌に及ぼす Ca^{2+} の影響を調べるために、組織を種々の濃度の Ca^{2+} (0.1-30 mM) または 0.1mM EGTA 存在下に [^{35}S]methionine と 3 時間反応させ、細胞内および細胞外に存在する [^{35}S] α -amylase の放射活性を測定した。図 1 において、secretion は細胞外 [^{35}S] α -amylase の放射活性を、synthesis は細胞内と細胞外 [^{35}S] α -amylase の放射活性の和 (全 [^{35}S] α -amylase 量) を示している。図 1 の結果から、 [^{35}S] α -amylase の生合成および分泌はともに Ca^{2+} が必要であることが明らかになった。特に、組織を 0.1mM EGTA で処理して Ca^{2+} 欠乏状態にすると、生合成も分泌もほとんど起こらなくなることがわかった。さらに、 [^{35}S] α -amylase の生合成は Ca^{2+} 濃度が 0.5mM 以上になると定常状態になるが、一方分泌に関しては、 Ca^{2+} 濃度が 10mM 以上になっても上昇しつづけることが示された。これらの結果より、 [^{35}S] α -amylase の生合成と分泌はともに Ca^{2+} を必要とするが、それぞれの Ca^{2+} の濃度依存性は異なっていることが示された。

【2】促進効果における陽イオン特異性：

図 1 で示された Ca^{2+} による α -amylase の生合成と分泌の促進効果が、 Ca^{2+} の特異的な作用によるものなのか、それとも陽イオンの正電荷の影響なのかを調べることは、 Ca^{2+} の役割を知る上で重要であると考えられる。種々のアルカリ土類金属 (Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} または Ba^{2+}) または K^{+} 存在下に、組織を [^{35}S]methionine と反応させ、細胞内、細胞外に存在する [^{35}S] α -amylase の量を測定した。Synthesis (全 [^{35}S] α -amylase 量) は Ca^{2+} の添加によって対照の 8 倍、 Sr^{2+} の場合には 10 倍の促進効果が見られた (図 2-A)。Secretion (細胞外 [^{35}S] α -amylase 量) においても、 Ca^{2+} と Sr^{2+} による促進効果が見

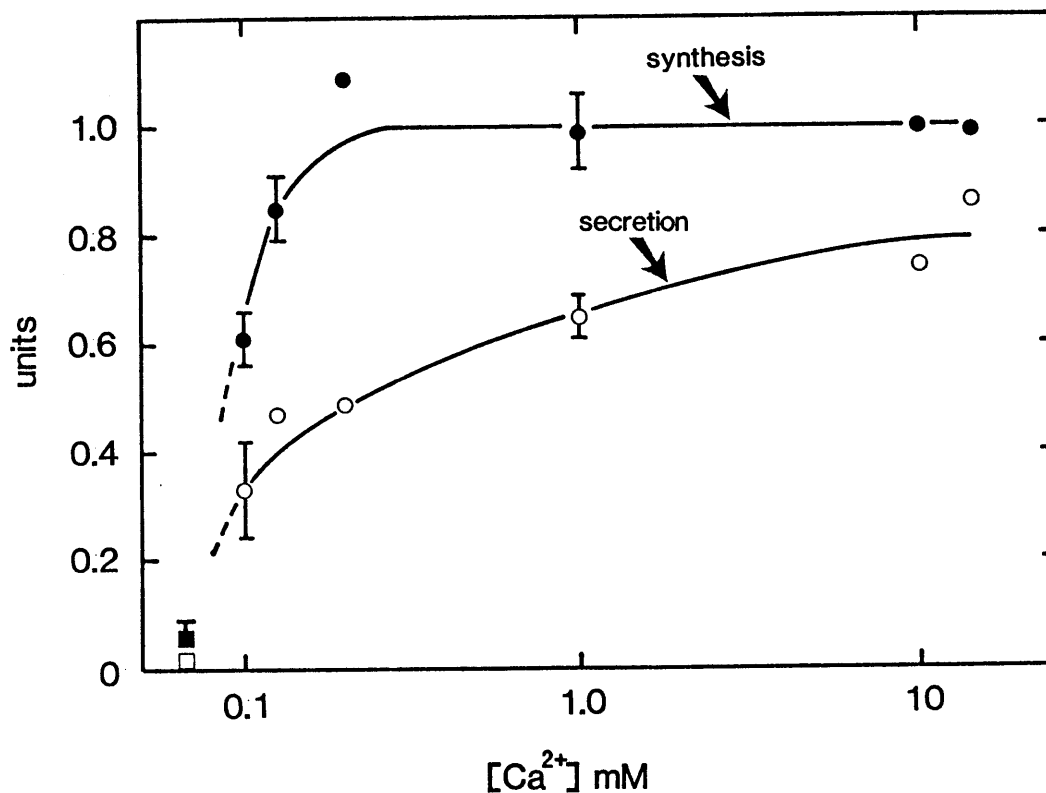


Fig.3-1. Effect of Ca^{2+} and EGTA on synthesis and secretion of α -amylase. Ten scutellar segments per treatment were preincubated for 2 hr at 30°C in 10mM Tris-HCl (pH 7.0) containing antibiotics and Ca^{2+} of various concentrations as indicated (\bullet , \circ). 0.1mM EGTA (\blacksquare , \square). The media were then replaced with fresh solution containing [^{35}S]methionine ($20\ \mu\text{Ci}$) and incubated for 3 hr. Tissue extracts and incubation media were finally subjected to analysis of intracellular and extracellular α -amylase. Secretion (\circ , \square) shows the value of extracellular α -amylase, whereas synthesis (\bullet , \blacksquare) signifies the sum of intracellular and extracellular α -amylase. Total α -amylase synthesis in the presence of 10mM Ca^{2+} was normalized to 1.0. Values given are SEM (vertical bar) of four experiments.

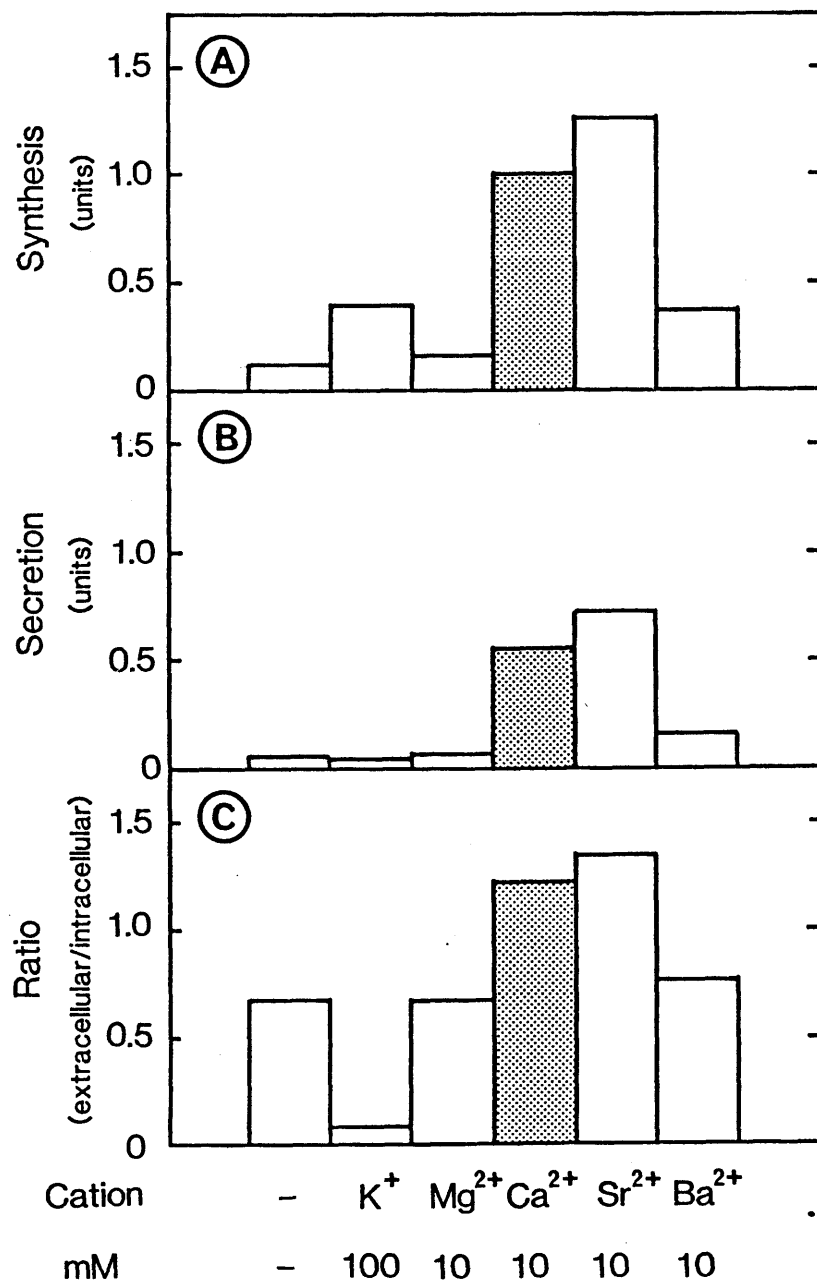


Fig.3-2. Effect of different cations on synthesis and secretion of α -amylase. Ten scutellar segments were preincubated for 2hr at 30°C in 10mM Tris-HCl (pH 7.0) and 0.1mM EGTA, containing various cations as shown in the figure. The reaction mixture containing [³⁵S]methionine (20 μ Ci) for 3 hr incubation at 30°C were then used to label α -amylase. Procedures for the quantitative analysis of α -amylase in both intracellular and extracellular fractions are described in the text. Total α -amylase synthesis (intracellular+extracellular) in the presence of 10mM Ca²⁺ was normalized to 1.0. All salts were added as chlorides.

られた（図2-B）。分泌に対する促進効果をより詳細に検討するために、それぞれの ratio（細胞外 $[^{35}\text{S}]\alpha\text{-amylase}$ 量/細胞内 $[^{35}\text{S}]\alpha\text{-amylase}$ 量）を計算し対照と比較したところ、やはり、 Ca^{2+} と Sr^{2+} のみ ratio の増加が観察された。 K^+ の添加では逆に ratio の減少が観察された（図2-C）。以上示した結果から、 Ca^{2+} と Sr^{2+} が $\alpha\text{-amylase}$ の生合成と分泌を促進することがわかった。他の動植物の分泌細胞においても、 Ca^{2+} と Sr^{2+} が分泌に対して同じような作用効果を示すことが報告されている（52,53,115）。

【3】 Ca^{2+} -ionophore A-23187 の効果：

Ca^{2+} -ionophore A-23187 は、細胞質中の Ca^{2+} 濃度を変化させるためにしばしば用いられている（39,115）。胚盤組織を、 1mM Ca^{2+} および種々の濃度の A-23187（0.01、0.1 または $1\mu\text{M}$ ）存在下、 $[^{35}\text{S}]\text{methionine}$ と反応させ、 $[^{35}\text{S}]\alpha\text{-amylase}$ の生合成と分泌に及ぼす A-23187 の効果を調べた。0.01 μM の A-23187 で処理すると、synthesis（全 $[^{35}\text{S}]\alpha\text{-amylase}$ 量）、secretion（細胞外 $[^{35}\text{S}]\alpha\text{-amylase}$ 量）、および ratio（細胞外 $[^{35}\text{S}]\alpha\text{-amylase}$ 量/細胞内 $[^{35}\text{S}]\alpha\text{-amylase}$ 量）の値はともに対照と比べて明らかに大きくなった（表1）。この結果は、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇が $[^{35}\text{S}]\alpha\text{-amylase}$ の生合成と分泌を増大させたことを強く示唆している。しかし、A-23187 の濃度を 0.1 μM 以上にすると、促進効果は除々に減少することが観察された（表1）。A-23187 は、CCCP、antimycin A、valinomycin および HOQN0 と同様に ATP 合成を効果的に阻害する（5,105,145）ことが知られている。そして ATP 合成阻害剤によって分泌が著しく抑制される（130,135）ことから、このような A-23187 の効果が生じたものと考えられる。

【4】 $\alpha\text{-Amylase}$ の分泌に $[\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}]\text{-ATPase}$ が関与している可能性：

Table 3-1. Effect of A-23187 on synthesis and secretion of α -amylase. Ten scutellar segments were preincubated for 2 hr at 30°C in 10mM Tris-HCl (pH 7.0) containing antibiotics. They were then transferred to the fresh media containing [³⁵S]methionine (20 μ Ci), 1mM Ca²⁺, and A-23187 of 3 different concentrations as indicated. After incubation for 3 hr, immunoprecipitable α -amylase in both intracellular and extracellular fractions were determined as described in the text. Synthesis signifies the sum of intracellular and extracellular α -amylase, where as secretion means the extracellular α -amylase. Total α -amylase synthesis in the presence of 1mM Ca²⁺ but not A-23187, was normalized to 1.0. Experiments were carried out in triplicates (brackets) and the values are presented as SEM.

Experment	Ca ²⁺	A-23187	Synthesis (a)	Secretion (b)	Ratio (b/a-b) (extracellular/intracellular)
	mM	μ M	units	units	
1 (3)	1.0		1.00	0.70 \pm 0.08	2.33
2 (3)	1.0	0.01	1.23 \pm 0.09	0.96 \pm 0.09	3.56
3 (3)	1.0	0.1	1.16 \pm 0.14	0.79 \pm 0.10	2.14
4 (3)	1.0	1.0	1.00 \pm 0.12	0.66 \pm 0.05	1.94

細胞質中の Ca^{2+} の濃度は、細胞内のオルガネラや細胞膜に存在する能動輸送系が働くことによって調節されていると考えられている。確かに、動植物の細胞膜には Ca^{2+} transporting $[\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}]$ -ATPase が存在しており、そして、その性質が研究されている (7,28)。 $[\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}]$ -ATPase の性質を以下に示した：(A) Ca^{2+} の高い結合性；(B) Mg^{2+} が必須；(C) ATP が必須；(D) La^{3+} 、ruthenium red、および NAP-aurine によって特異的に阻害される；(E) Ca^{2+} -calmodulin によって活性化される (7, 57,71,100,137,141)。

胚盤上皮細胞における α -amylase の分泌に $[\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}]$ -ATPase が関与しているか否かを検討するために、 α -amylase の分泌に対する La^{3+} および ruthenium red の効果を調べた。胚盤組織を $[\text{}^{35}\text{S}]\text{methionine}$ と 2.5 時間反応させた後、 0.1mM La^{3+} または $50\mu\text{M}$ ruthenium red 存在下に 4 時間 chase を行った。図 3 の結果は、 La^{3+} と ruthenium red はともに $[\text{}^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase の細胞外分泌を著しく阻害することを示している。これらの結果、および α -amylase の分泌には Ca^{2+} が必要であり、また 種々の ATP 合成阻害剤 (CCCP、antimycin、valinomycin、および HOQNO) は α -amylase の分泌を阻害する (cf.76) ことから、 $[\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}]$ -ATPase が α -amylase の分泌に何等かの関与をしていることが示唆された。 α -Amylase の分泌に対する Mg^{2+} の必要性を確かめることが出来なかった (図 2) が、上記の実験条件では細胞内の Mg^{2+} を完全に除くことができなかつたためであろうと考えられる。

【5】 α -Amylase の分泌に対する Calmodulin Antagonist W-7 の効果：

図 4 に示した種々の反応条件下において、胚盤組織を $[\text{}^{35}\text{S}]\text{methionine}$ と反応させ、calmodulin antagonist W-7 [N-(6-aminoethyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide] (55) の $[\text{}^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase 分泌に及ぼす効果を調べた。

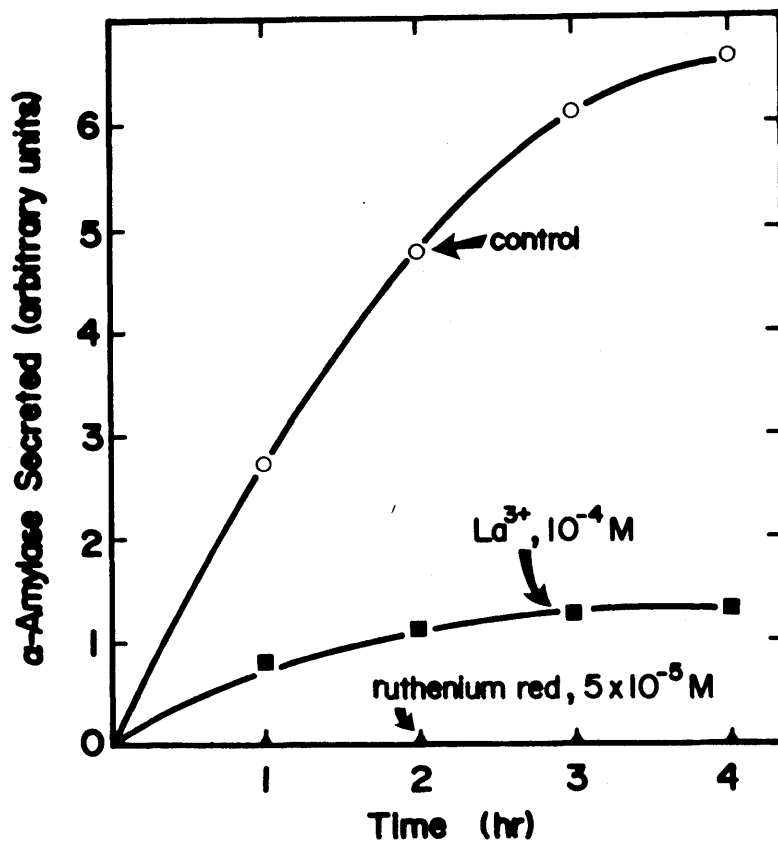


Fig.3-3. Effect of La^{3+} and ruthenium red, inhibitors of $[\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}]$ -ATPase, on secretion of α -amylase. Ten scutellar segments were pre-incubated for 2.5 hr at 30°C in 10mM Tris-HCl (pH 7.0) containing antibiotics, 10mM Ca^{2+} and $[\text{}^{35}\text{S}]$ methionine ($20\ \mu\text{Ci}$) but no inhibitors. Scutella were then rinsed, and incubated in the above buffer minus $[\text{}^{35}\text{S}]$ methionine but with the following additions: control (○), 0.1mM LaCl_3 (■), and $50\ \mu\text{M}$ ruthenium red (▲). At the selected time intervals, the external medium was removed and analyzed for the labeling of α -amylase as described in the text.

Synthesis (全 ^{35}S α -amylase 量) および secretion (細胞外 ^{35}S α -amylase 量) はともに W-7 処理によって減少したが、ratio (細胞外 ^{35}S α -amylase 量/細胞内 α -amylase 量) に関しても W-7 処理によって顕著な低下が見られた (図4)。これは、 ^{35}S α -amylase の分泌が W-7 によって阻害されることを示しており、 α -amylase の分泌における calmodulin の関与が示唆された。

【6】R型、S型 α -Amylase の分泌に及ぼす Ca^{2+} の影響:

第一章および第二章において、胚盤上皮細胞から分泌される α -amylase には糖鎖構造の異なる R 型と S 型が存在していることを示した。この R 型、S 型 α -amylase isoform の分泌に Ca^{2+} が影響するか否かという問題に関する検討を試みた。胚盤組織を、0.1mM または 10mM Ca^{2+} 存在下、 ^{35}S methionine と反応させ、細胞外に分泌された ^{35}S α -amylase を Endo- β -H 処理し、R 型および S 型分子の量を定量した。図5-A、Bは、それぞれの pulse 時間における ^{35}S α -amylase の分泌速度を示し、図5-C、Dは、それぞれの pulse 時間までに細胞外に分泌された ^{35}S α -amylase の総量を示している。Pulse 6時間後、R/R+S 比は 10mM Ca^{2+} 存在下において 0.6 である (図5-C) が、0.1mM Ca^{2+} 存在下の場合には 0.25 に低下した (図5-D)。また図5-A、Bの結果は、R型 ^{35}S α -amylase の細胞外への分泌は Ca^{2+} 濃度によって著しい影響を受けるが、S型 ^{35}S α -amylase に関してはほとんど Ca^{2+} の影響を受けないことを示している。さらに、図5-Aは、S型 ^{35}S α -amylase の分泌速度が R 型よりも速いことも示している。これらの事実から、胚盤上皮細胞の α -amylase の分泌には、 Ca^{2+} 依存性のもの (R 型 α -amylase) と Ca^{2+} 非依存性のもの (S 型 α -amylase) とがあると考えられた。

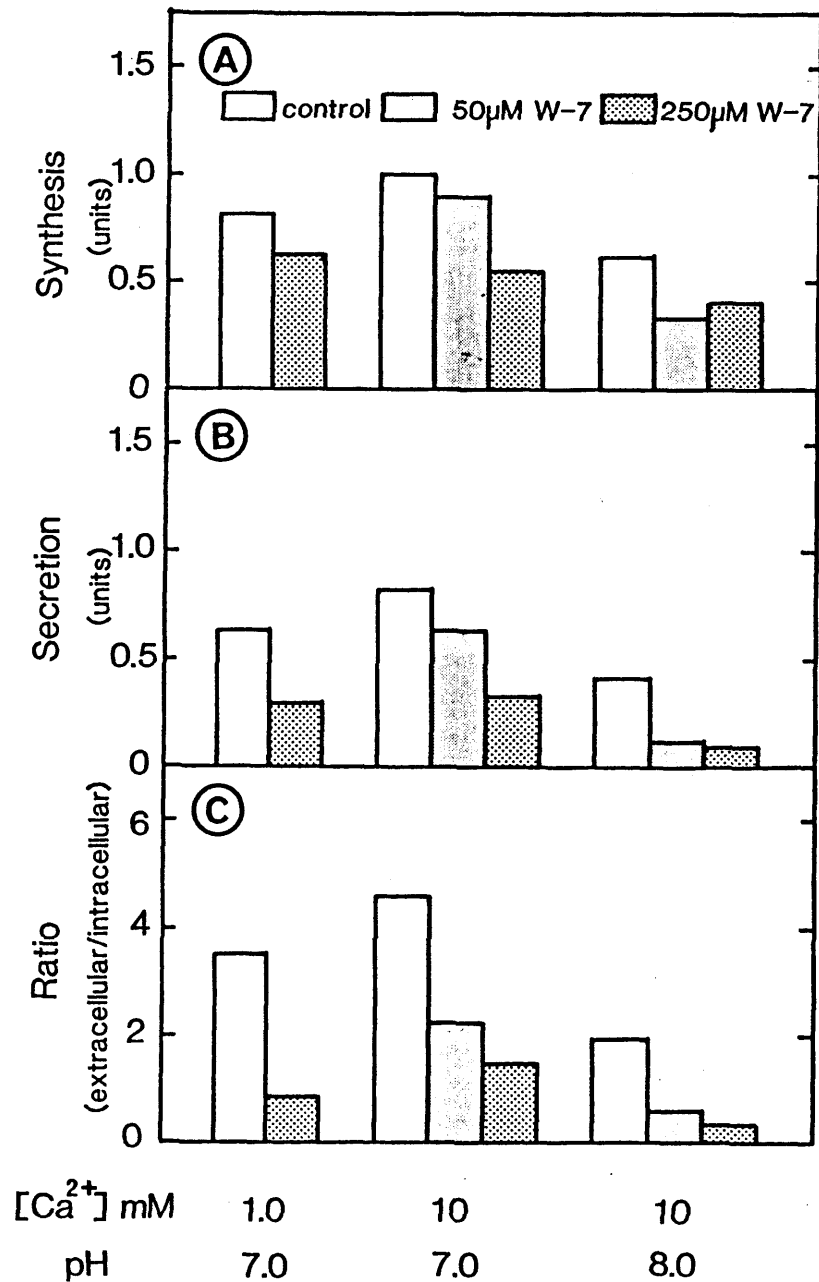


Fig.3-4. Effect of calmodulin antagonist, W-7, on synthesis and secretion of α -amylase. Ten scutellar segments were preincubated for 2 hr at 30°C in 10mM Tris-HCl of various pH and containing Ca²⁺ of various concentrations as indicated. They were then transferred to the fresh media containing [³⁵S]methionine (20 μCi) and W-7 and incubation continued for 3 hr. α -Amylase in both intracellular and extracellular fractions was determined as described in the text. Total α -amylase synthesis (intracellular+extracellular) in the presence of 10mM Ca²⁺ and at pH 7.0 was normalized to 1.0.

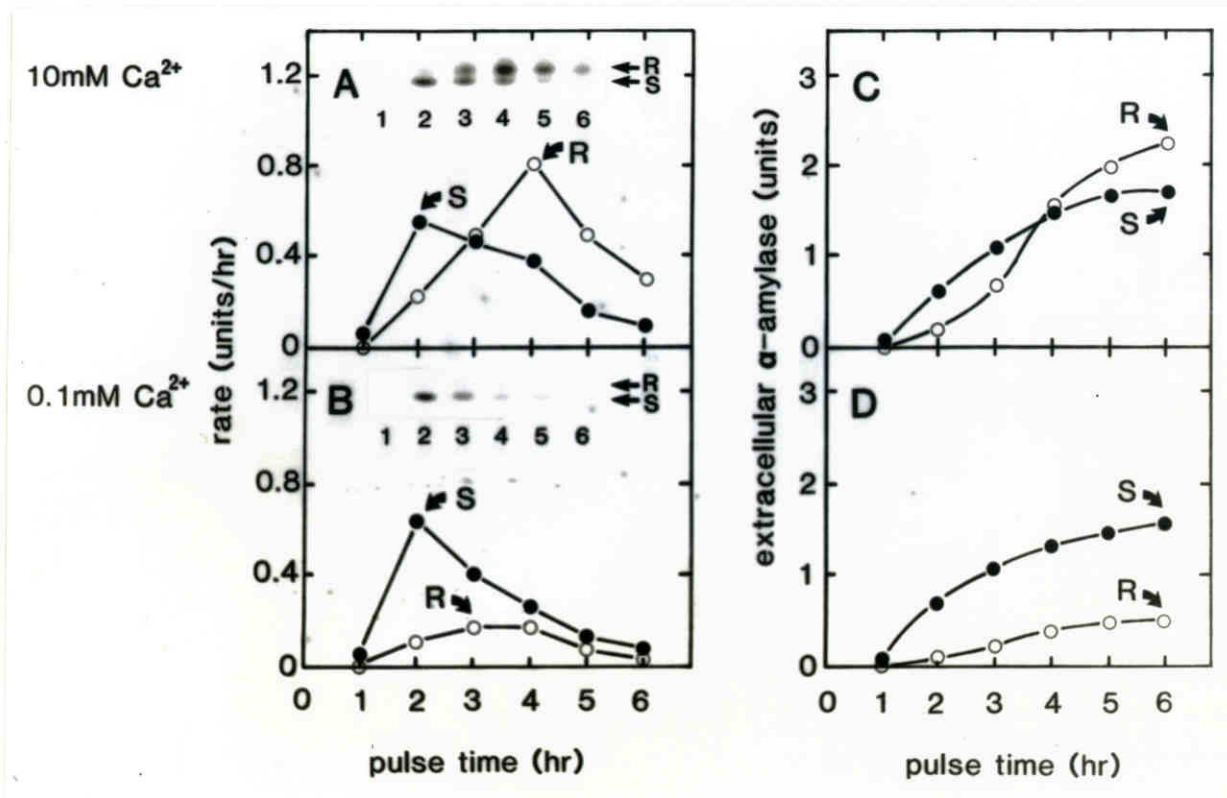


Fig.3-5. Effect of Ca^{2+} level on the formation of two types of α -amylase molecule. Twenty scutella were incubated in the pulse medium containing 20mM Tris-HCl (pH 7.0), $[\text{}^{35}\text{S}]$ methionine ($20 \mu\text{Ci}$), streptomycin and penicillin G ($10 \mu\text{g/ml}$), and either 10mM (A,C) or 0.1mM (B, D) for 6 hr at 30°C . At selected time intervals, the incubation media were treated with Endo- β -H as described in the text. The resulting mixtures were then subjected to the immunoprecipitation, SDS-PAGE, and fluorographic analysis as shown in the text. Fluorograms are given in the insets of (A) and (B). The amount of $[\text{}^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase synthesized during the 1 hr pulse period in the presence of 10mM CaCl_2 was set at 1 unit. The rate of secretion (unit/hr) indicates an average rate of the secreted $[\text{}^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase (R or S) at the selected incubation periods. Extracellular α -amylase (unit) indicates the sum of the secreted $[\text{}^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase (R or S) during the incubation periods.

【7】 α -Amylase の細胞内輸送における Ca^{2+} の役割：

α -Amylase の細胞内輸送に及ぼす Ca^{2+} の影響を調べるために、種々の pulse-chase labeling 実験を行った。組織を 0.1mM 存在下に [^{35}S]methionine と 1 時間反応させた後、10mM または 0.1mM Ca^{2+} 存在下、5 時間 chase を行い、chase 溶液中に分泌された R 型、S 型 [^{35}S] α -amylase を定量した。その結果、R 型 [^{35}S] α -amylase の細胞外への分泌は Ca^{2+} 濃度によって著しく変化するが、S 型 [^{35}S] α -amylase の分泌は Ca^{2+} にあまり影響されなかった（図 6 - A、B）。また、10mM Ca^{2+} で pulse を行い、10mM Ca^{2+} または 0.1mM EGTA で chase した場合においても、図 6 - A、B と同様の結果が得られた（図 6 - C、D）。これらの結果から、R 型 [^{35}S] α -amylase の細胞内輸送に Ca^{2+} が作用していることが推察された。つづいて、 α -amylase の細胞内輸送における Ca^{2+} の役割をより詳細に検討するために、0.1mM Ca^{2+} で 1 時間 pulse を行った後、0.1mM EGTA、0.1mM Ca^{2+} 、または 10mM Ca^{2+} で 5 時間 chase した。そして、chase 終了後、細胞内および細胞外に存在する R 型、S 型 [^{35}S] α -amylase を定量した。表 2 に示した Total α -amylase (R + S) の結果は α -amylase の細胞内輸送には Ca^{2+} が必要であり、 Ca^{2+} 濃度が低くなるに従って α -amylase が細胞内に蓄積することを示している。R 型 [^{35}S] α -amylase の細胞外分泌が Ca^{2+} 濃度の低下にともなって著しく減少するのは図 6 で述べたとおりであるが、一方、細胞内 [^{35}S] α -amylase に関しては、 Ca^{2+} 濃度の低下に従って R 型 [^{35}S] α -amylase の細胞内蓄積が観察された。S 型 [^{35}S] α -amylase においても蓄積は見られるが、R/R + S 比が、 Ca^{2+} 濃度の低下とともに上昇することから、R 型の細胞内蓄積が S 型よりも著しいことがわかった。以上の結果は、 Ca^{2+} が α -amylase の細胞内輸送、特に R 型 α -amylase の輸送に作用していることを示している。

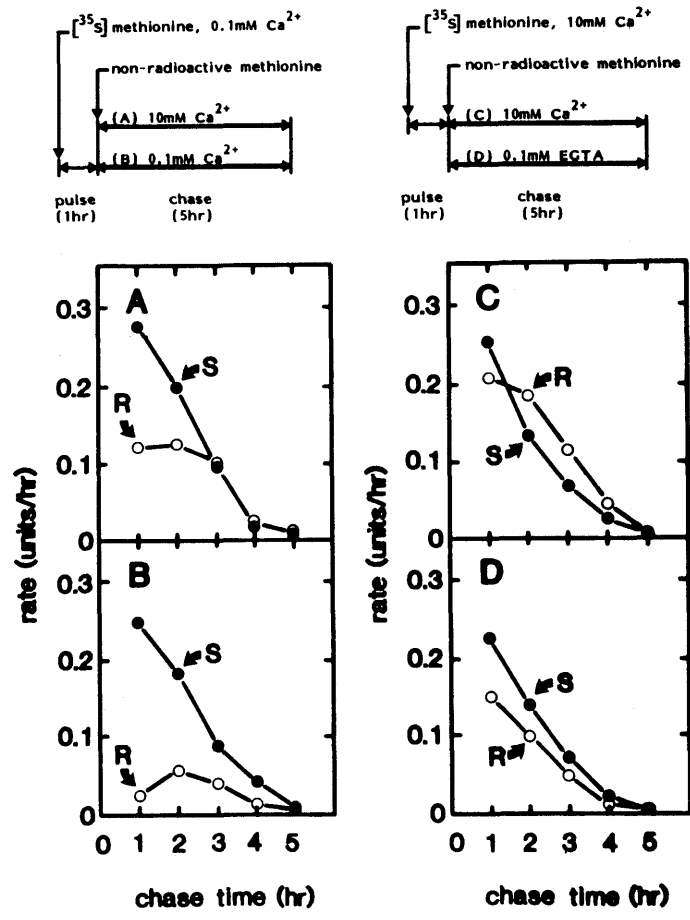
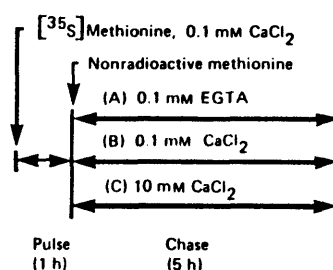


Fig.3-6. Effect of Ca^{2+} on the extracellular secretion of two types of α -amylase molecule. Twenty scutella were pulsed with $[^{35}\text{S}]$ methionine ($100\ \mu\text{Ci}$) in the presence of 0.1mM (A,B) or 10mM CaCl_2 (C,D) for 1 hr at 30°C , and subsequently chased with 1mM nonradioactive methionine in the presence of either 10mM (A,C) or 0.1mM CaCl_2 (B) or 0.1mM EGTA (D) for an additional 5 hr. The chase media were then treated with Endo- β -H, followed by immunoprecipitation, SDS-PAGE, and fluorographic analysis, employing the same procedures as described in the text. The amount of the secreted $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase (R+S) during the 5 hr chase period as 1 unit. The rate of secretion (unit/hr) indicates an average rate of the secreted $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase (R or S) at the selected chase periods.

Table 3-2. Effect of Ca^{2+} on the Endo- β -H digestibility of α -amylase molecules in intracellular and extracellular fractions. In each experiment, 20 scutella were pulsed with [^{35}S]methionine (100 μCi) in the presence of 0.1mM CaCl_2 for 1 hr at 30°C, and then chased with 1mM nonradioactive methionine in the presence of either 0.1mM EGTA (A) or 0.1mM (B) , or 10mM CaCl_2 (C) for an additional 5 hr. At the end of incubation, either tissue extracts or chased media were treated with Endo- β -H, followed by immunoprecipitation, SDS-PAGE, and fluorographic analysis as described in the text.



Fractions	Additions	α -Amylase		Total α -amylase R + S (unit)	$(\text{R}/\text{R} + \text{S}) \times 100$ (%)
		R (unit)	S (unit)		
Intracellular	(A) 0.1 mM EGTA	0.13	0.30	0.43	30
	(B) 0.1 mM CaCl_2	0.06	0.22	0.28	21
	(C) 10 mM CaCl_2	0.02	0.19	0.21	9.5
Extracellular	(A) 0.1 mM EGTA	0.06	0.32	0.38	16
	(B) 0.1 mM CaCl_2	0.12	0.41	0.53	23
	(C) 10 mM CaCl_2	0.30	0.49	0.79	40

考察

胚盤上皮細胞における α -amylaseの生合成および分泌には Ca^{2+} が必要であることが明らかになった(図1)。また、 Ca^{2+} -ionophore A-23187の実験結果は、細胞内 Ca^{2+} 濃度が α -amylaseの生合成および分泌に影響を及ぼしていることを強く示唆した(表1)。さらに、 La^{3+} 、ruthenium red、および calmodulin antagonist W-7の阻害実験より、 $[\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}]$ -ATPaseによる Ca^{2+} の細胞外への放出が α -amylaseの細胞外分泌とcoupleしていることが推察された(図3、図4)。この詳細なメカニズムはまだはっきりしないが、血小板における Ca^{2+} とN-acetylglucosamine細胞外分泌もcalmodulin antagonistによって阻害されることが報告されている(33)。最近、植物細胞(giant alga)の細胞内 Ca^{2+} 濃度が測定され、その濃度は 10^{-7}M - 10^{-6}M に保たれているという(144)。また、calmodulinが植物細胞においても存在することが知られていることから(4,18,86)、 Ca^{2+} -calmodulinが α -amylaseの分泌を調節している可能性は十分考えうる。

R型、S型 α -amylase isoformの分泌に及ぼす Ca^{2+} の役割、すなわち、R型 α -amylase分子の細胞外分泌は Ca^{2+} 依存性であるが、S型 α -amylaseは Ca^{2+} 非依存性であるという実験結果(図5、図6)は、非常に興味深い。またR型とS型 α -amylase分子の細胞外分泌速度に顕著な差があることが見いだされた(図5、図6)。動物細胞においても、分泌性蛋白質や細胞膜蛋白質の細胞内輸送速度は、それぞれの蛋白質によって異なることが報告された(34, 35,44,64,66)。FittingとKabat(34)は、細胞質膜蛋白質(ネズミ白血病ウイルス遺伝子にコードされている糖蛋白質)がそのアミノ酸配列にrERから細胞膜への輸送に必要な"signal"をもっていることを示唆している。一方Lodishら(66)は、種々の分泌性蛋白質(血清蛋白質)をそれぞれの細胞

内輸送に選択的に導くことができる膜結合性レセプターが存在することを示唆している。しかしながら、それぞれの実体はまだ明らかになっていない。また胚盤上皮細胞における α -amylaseのように、1つの分泌性蛋白質が2つの細胞内輸送経路を経由して分泌される例もある。Gumbiner と Kelly (44) は、脳下垂体のガン細胞には2つの区別される細胞内輸送経路があることを示した。1つは、adrenocorticotropic hormoneの成熟型の分泌で、これは Ca^{2+} やcAMP依存性である。ところが、その前駆体の細胞外への放出は Ca^{2+} 等を必要としないことを示した。前駆体から成熟型へのプロセッシングはproteolytic digestionによるものであって、 α -amylaseの場合とは異なるが、 Ca^{2+} に対する反応には類似性がありおもしろい。

最近、オオムギ種子糊粉層における α -amylase isozymesの生成はgibberellic acid (GA_3) および Ca^{2+} によって調節されることが報告された。Jones と Carbonell (53) は、 α -amylase isozyme 1の生成には GA_3 が必要であり、 α -amylase isozyme 3、4の生成には GA_3 と Ca^{2+} (または Sr^{2+})の両方が必要であることを示した。さらにDeikman と Jones (27) は、 α -amylase cDNAを用いたmRNAの定量の結果から、mRNAの蓄積およびプロセッシングの後のisozyme 3、4の生合成のステップに Ca^{2+} が必要であることを示唆した。イネ種子胚盤上皮細胞の α -amylaseにおいても Ca^{2+} は生合成に必要である(図1)が、isozyme A、Bの生成に関しては Ca^{2+} による影響が見られなかった。

"Regulated" 分泌細胞におけるexocytosisには Ca^{2+} を必要とすることは広く知られている(99,142)が、植物細胞におけるexocytosisに関する研究はきわめてすくない。表2の結果は、Golgi体において行われるterminal glycosylationによって生ずるR型 α -amylaseの細胞内輸送が Ca^{2+} 依存性であることを示しており、R型 α -amylaseのexocytosisに Ca^{2+} が必要である

ことを示唆するものである。

図7は、第2章図6に Ca^{2+} に関する実験結果から考えられる α -amylase の細胞内輸送メカニズムを加えたものである。胚盤上皮細胞における α -amylase の分泌には R型 α -amylase のように Ca^{2+} によって調節される（"Regulated pathway"）ものと、S型 α -amylase のように "Constitutive pathway" で分泌されるものがあることがわかってきた。

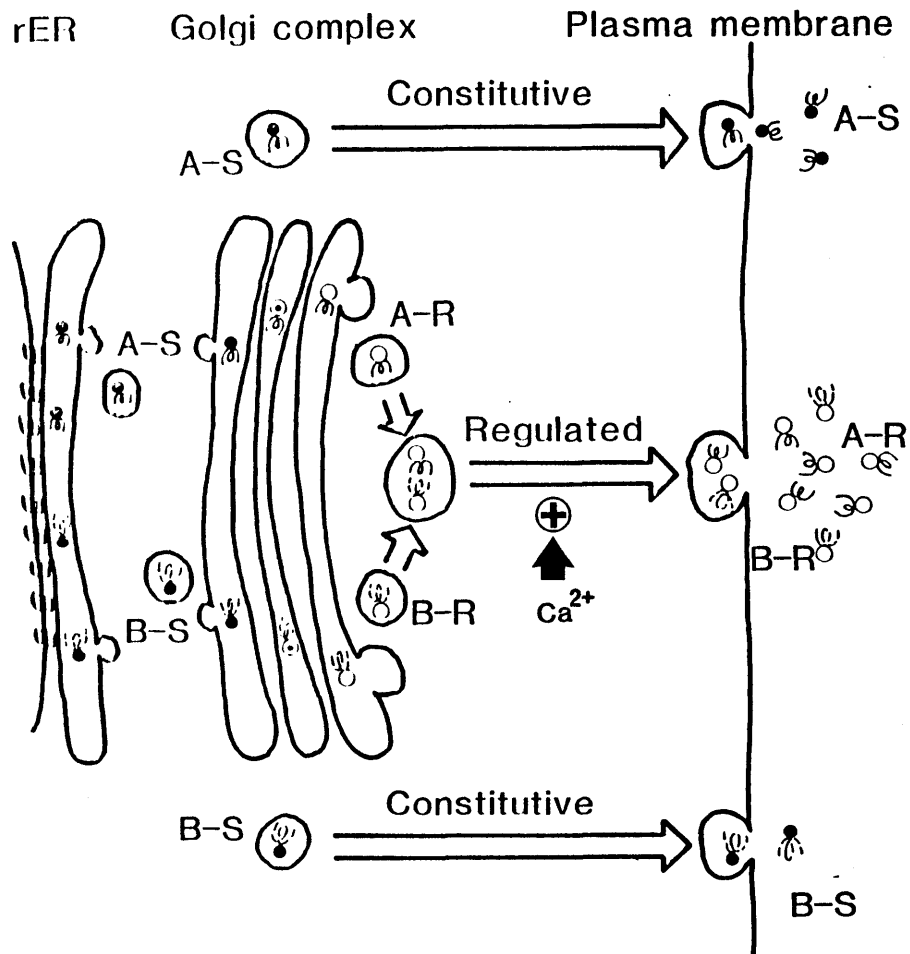


Fig.3-7. A hypothetical model for "Regulated" and "Constitutive" pathways of α -amylase. The intracellular transport of R-type α -amylase molecule is dependent on Ca^{2+} , whereas that of S-type is not affected by Ca^{2+} . Symbols: straight chain, polypeptide A; dotted chain, polypeptide B; (●), high-mannose type carbohydrate chain; (⊙), hypothetical intermediate chain; (○), modified complex type carbohydrate chain.

第四章 α -Amylase の分泌に及ぼす温度の影響

温度は、生物が生命を維持する上できわめて重要な環境条件である。自然界の温度環境は常に変動し、その温度変化は生物または細胞に大きな影響を与え細胞構造や代謝にさまざまな変化を起こさせる。これらの変化のなかで、現象が劇的でしかもよく研究されているのが heat shock protein (h s p) の誘導である (56,83,116,117)。生物が正常に成育する温度より 5°C-10°C 温度を上昇させると、一群の h s p の生合成が起こり、それに伴って、細胞に存在する正常蛋白質の生合成は抑制される。このような熱ストレスに対する反応は、原核生物から真核生物にいたるまで広く観察されており、h s p の機能や h s p 遺伝子の転写制御が注目されている。

高等動植物における蛋白質の細胞外分泌に関しても、温度は重大な影響を及ぼすことが知られている。分泌性蛋白質および細胞膜蛋白質の exocytosis は温度条件が 20°C 前後になると起こらなくなることが動物細胞において見いだされた (37,42,62,68,98,106,111)。例えば、犬の腎臓細胞に感染させた influenza の hemagglutinin や vesicular stomatitis virus (V S V) の G 蛋白質は温度条件を 37°C から 20°C にすると Golgi 画分に蓄積される (37,68)。しかし、大部分の hemagglutinin 分子の糖鎖は Endo- β -H に耐性となり (68)、また、G 蛋白質はシアル酸を持つことが明らかになった (37)。この結果は、これらの蛋白質が少なくとも terminal glycosylation の行われる trans Golgi cisternae に到達していることを示唆している。さらに、V S V を感染させたハムスターの腎臓細胞を 20°C の温度条件下におくと、trans Golgi cisternae は G 蛋白質の蓄積によって形態が変化することが免疫組織化学的に観察され、trans Golgi から細胞膜への輸送が抑制されることが明らかになった (42)。植物細胞においても蛋白質の分泌過程が温度に影響されること

が報告されている。たとえば Fadeel ら (31) は、発芽オオムギ種子の糊粉層において合成される α -amylase の細胞外への放出に及ぼす温度効果を酵素の活性測定によって調べた。その結果、 α -amylase の細胞外への放出量は温度条件が 20°C 以下になると著しく減少することが見出された。そして、糊粉層から抽出される α -amylase の量が種々の温度条件 (10°C - 28°C) の間で変化しないことから、彼等は、主として温度が α -amylase の輸送過程に作用していると結論している。

イネ種子に関しては、西山 (88) が発芽活性に対する温度の効果、とくに低温条件下における影響を Arrhenius plot を用いて解析し、 17°C 付近に発芽活性の転移点があることを示している。本章では、胚盤上皮細胞における α -amylase 分子の生合成および分泌に及ぼす温度の効果、特に、h s p の誘導が起こるような高温条件において α -amylase の生合成と細胞内輸送がどのような影響を受けるかという問題について調べた実験結果を述べる。つづいて α -amylase 分子の糖鎖修飾に及ぼすユニークな温度の影響についても述べる。

材料と方法

【1】Pulse Labeling 実験:

(A) 発芽4日目の胚盤組織 (20 個) を buffer A [20mM Tris-HCl(pH 7.0)、10mM CaCl₂、10 μg/ml streptomycin、10 μg/ml penicillin G] 溶液中で 30°C、3 時間 preincubation した後、[³⁵S]methionine (20 μCi)、[³H]mannose (100 μCi)、または [³H]fucose (100 μCi) を含む buffer A 溶液 (300 μl) 中で種々の温度条件 (10°C-42°C) で 3 時間 incubation を行った。

(B) 胚盤組織 (20 個) を 0.1mM EGTA を含む buffer B [20mM Tris-HCl (pH 7.0)、10 μg/ml streptomycin、10 μg/ml penicillin G] 溶液中で 30°C、3 時間 preincubation した後、[³⁵S]methionine (20 μCi) を含む上記溶液 (300 μl) 中で種々の温度条件 (15°C-42°C) で 3 時間 incubation を行った。

それぞれの条件で pulse labeling した後、組織と incubation 溶液を分離し、組織は 0.1% Triton X-100 溶液 (500 μl) 中で摩砕して組織抽出液を得た。組織抽出液および incubation 溶液に含まれる種々の放射性化合物で標識された蛋白質 (hot TCA-insoluble fraction) の放射活性は、液体シンチレーションスペクトロメーター (Aloka liquid scintillation system LSC-700) を用いて測定した。また、それぞれの放射性蛋白質は、SDS-PAGE 後、fluorography を行うことによって検出した。一方 組織抽出液および incubation 溶液に存在する [³⁵S]α-amylase の放射活性は、immunoprecipitation、SDS-PAGE、fluorography によって検出し、定量した。これらの条件において、[³⁵S]methionine の α-amylase および他の蛋白質への取込みは少なくとも 4 時間以上定常的に行われた (cf.72)。また、実験 (B) においては、温度条件が 20°C 以下になると [³⁵S]methionine の α-amylase への取り込みは検出されな

かった。

【2】 Pulse-chase Labeling 実験：

胚盤組織（20 個）を buffer A 溶液中で 30°C、3 時間 preincubation した後、 $[^{35}\text{S}]$ methionine (50 μCi) を含む buffer A 溶液中で 30°C、1 時間反応させ、さらに 1mM 非放射性 methionine を用いて種々の温度 (12°C-40°C) において 3-6 時間 chase した。Chase 終了後、組織抽出液および chase 溶液に存在する $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase の放射活性は、immunoprecipitation、SDS-PAGE、fluorography を行うことによって定量した。

【3】 Endo- β -H による α -Amylase および細胞内糖蛋白質の糖鎖消化実験：

種々の放射性化合物で標識された糖蛋白質の Endo- β -H 処理は第一章で述べた方法を用いて行った。Endo- β -H による加水分解終了後、反応液の蛋白質画分 (hot TCA-insoluble fraction) の放射活性を測定した。また、反応液に含まれる $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase は、immunoprecipitation、SDS-PAGE、そして fluorography を行うことによって検出した。

【4】 α -Amylase および細胞内蛋白質の熱変性度の測定：

(A) 胚盤組織を 15°C または 40°C の温度条件で $[^{35}\text{S}]$ methionine で pulse labeling したときに得られた $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase を含む incubation 溶液 (500 μl) に、BSA (最終濃度 0.5mg/ml) と MOPS buffer (pH 7.0; 最終濃度 0.1M) を加えた。この混合液は、85°C において種々の時間 (0-30分) 熱処理した後、15,000 x g、5 分間遠心して上清画分を得た。上清画分に存在する $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase の放射活性は、immunoprecipitation、SDS-PAGE、fluorography を行うことによって定量した。そして、熱処理していない上清画分の R 型

[³⁵S]α-amylase (40°C で合成された [³⁵S]α-amylase) または S 型 [³⁵S]α-amylase (15°C で合成された [³⁵S]α-amylase) の放射活性を それぞれ 100% とし、熱処理を行ったときに上清画分に残存している放射活性の割合を計算した。

(B) 胚盤組織を 15°C または 40°C の温度条件で [³⁵S]methionine、[³H]mannose または [³H]fucose と pulse labeling したときに得られる種々の放射化合物で標識された蛋白質を含む組織抽出液 (500 μl ; 0.5mg protein/ml) に MOPS buffer (pH 7.0 ; 最終濃度 0.1M) を加えた。この混合液を種々の温度 (30°C-70°C) で 10 分間熱処理した後、15,000 x g、5 分間遠心し、上清画分に存在する蛋白質 (hot TCA-insoluble fraction) の放射活性を測定した。そして、30°C で処理したときの上清画分の放射活性を 100% とし、45°C 以上で熱処理を行ったときに上清画分に残っている放射活性の割合を計算した。

結果

【1】 α -Amylase の生合成と細胞内輸送に対する温度の効果：

胚盤上皮細胞における α -amylase の生合成と細胞内輸送に対する温度の効果、pulse および pulse-chase の手法を用いて調べた。図 1-A は、胚盤組織を種々の温度 (10°C - 42°C) において [^{35}S]methionine と反応させ、生成した [^{35}S] α -amylase 分子を免疫化学的方法によって定量した結果である。 [^{35}S] α -amylase 生合成の相対速度は 35°C で最大となり、温度条件がそれ以上になると生合成速度が急激に低下することが見られた。図 1-B 中に挿入された fluorogram は図 1-A において [^{35}S]methionine と反応させた胚盤組織から抽出した [^{35}S]標識の全蛋白質の SDS-PAGE のパターンを示している。この結果から、 37°C 以上で組織を処理すると 70kd の [^{35}S]heat shock protein (h s p) が出現することがわかった。図 1-B のグラフは fluorogram から全 [^{35}S]標識蛋白質に占める 70kd [^{35}S]h s p の割合を計算したものである。図 1-B の結果は、 37°C 以上になると 70kd [^{35}S]h s p の生合成が始まるとともに、細胞内に存在する正常蛋白質の生合成が抑制されることを示している。さらに、70kd [^{35}S]h s p の生合成は 42°C においても増大し続け [^{35}S]標識の全蛋白質の 20% 以上を占めるようになることがわかった。

次に、 α -amylase の細胞内輸送に対する温度の効果を探るため、胚盤組織を [^{35}S]methionine と 30°C で 1 時間反応させた後、1mM の非放射性 methionine を用いて、種々の温度条件 (12°C - 40°C) において 3-6 時間 chase を行った。そして、細胞内および細胞外に存在する [^{35}S] α -amylase 分子を免疫化学的方法で定量した。図 1-C の結果は、種々の温度条件下で chase した時に分泌された [^{35}S] α -amylase の放射活性を示している。そして図 1-C よりこの pulse-chase labeling 実験条件における [^{35}S] α -amylase 分泌の

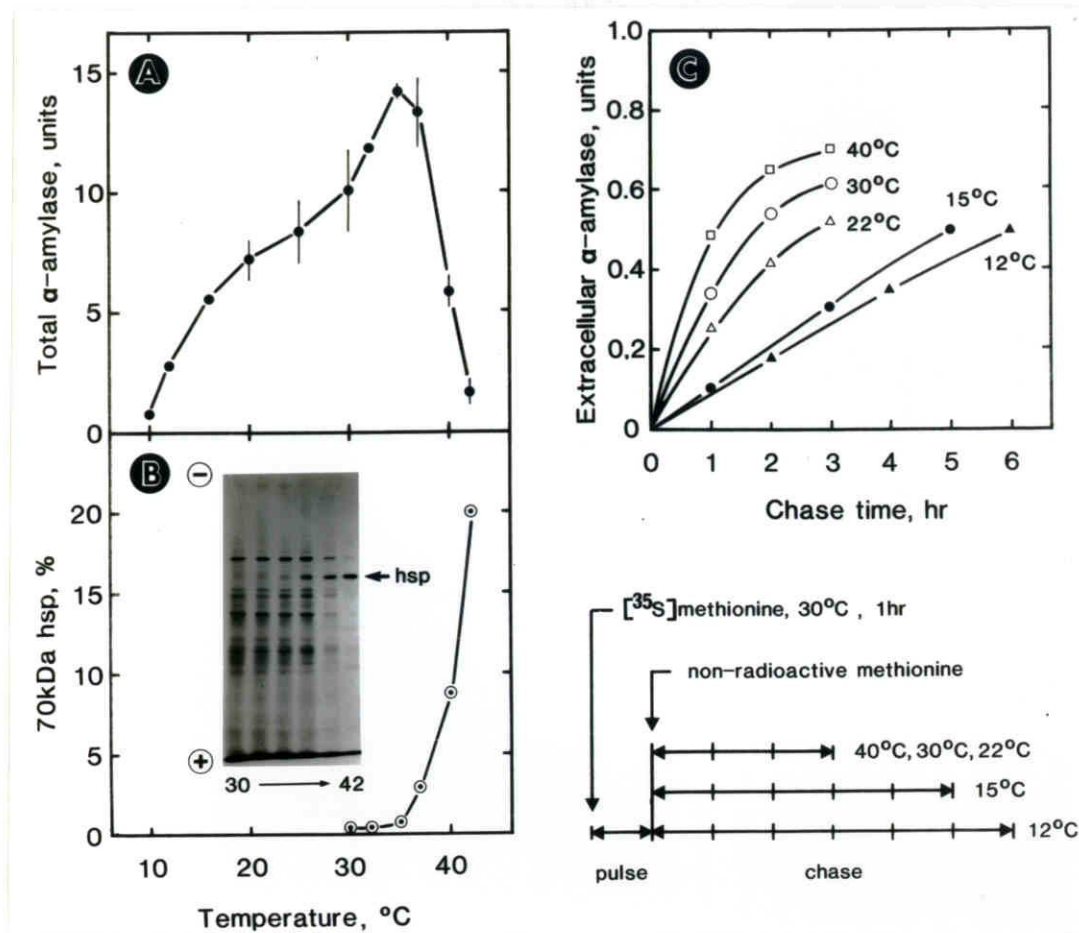


Fig.4-1. Effect of temperature on biosynthesis, intracellular and extracellular secretion of α -amylase. Twenty pieces of freshly dissected scutellar segments from rice seedlings at 4-day germination stage were placed in buffer A, and incubated for various periods at various temperatures as indicated. (A) [^{35}S]methionine (20 μCi) was added to the reaction mixture, and at the end of 3 hr incubation the ^{35}S -labeled total α -amylase in both intracellular and extracellular fraction were immunoprecipitated by the anti- α -amylase IgG following the method as described in the text. The total radioactivities of the enzyme synthesized at 30 $^{\circ}\text{C}$ were arbitrarily defined as 10 units. The data are average of triplicate experiments at each incubation temperature. (B) Incorporation of [^{35}S]methionine into the total protein fraction at various incubation temperatures was examined by the fluorography as shown in inset. From the densitometric titration the % of 70 kd hsp in the total protein component is expressed. (C) Experimental protocols for the pulse-chase labeling to determine the intracellular transport of [^{35}S] α -amylase molecules synthesized is given in the lower scheme. Amount of secreted α -amylase molecules at various incubation temperatures, as indicated as a function of chase time are shown in the upper part.

相対初速度 (V_i) を求めた; V_i (40°C) =14.7; V_i (30°C) =10.0; V_i (22°C) =7.4; V_i (15°C) =2.9; V_i (12°C) =2.3 (30°C における相対初速度を 10.0 とした)。Pulse-chase 実験で分泌される [^{35}S] α -amylase の量は pulse labeling したときに合成された [^{35}S] α -amylase にかぎられること、および図 1-C の pulse-chase 実験における pulse labeling 条件はすべて同じであり、したがって chase 前の細胞内に存在する [^{35}S] α -amylase の量はすべて等しいことから、初速度が [^{35}S] α -amylase の細胞内輸送のパラメーターとして適当であると考えられる。これらの結果から、 α -amylase の輸送速度は 40°C 以上になっても増加し続けるという興味深い事実が明らかになった。

α -Amylase の生合成および細胞内輸送に及ぼす温度の効果をさらに詳しく調べるために、図 1 で得られた結果を Arrhenius plot し、それぞれの温度依存性を検討した。 α -Amylase の生合成速度に対する plot (図 2-A) と細胞内輸送速度 (V_i をパラメーターにした) に対する plot (図 2-B) を比較すると、生合成速度においては 13°C と 37°C に転移温度が見られるが、輸送速度においては 22°C 付近にのみ転移温度があることがわかった。この結果は、生合成速度と輸送速度の温度依存性が異なっており、第二章で示した「 α -amylase の生合成と分泌はそれぞれ独立した過程である」という結論をさらに強力に支持するものである。また、図 2-A の結果は、70kd h s p の出現する温度で α -amylase の生合成速度の Arrhenius plot の転移点 (37°C) が見られこの温度から生合成速度が減少し始めることを示している。以上示した結果から分泌性蛋白質である α -amylase の生合成も、細胞内に存在する蛋白質と同様に熱ストレスによって抑制されることが明らかになった。しかしながら、 α -amylase の細胞内輸送に関しては生合成で見られる熱ショックの現象が見られないこともわかった (図 2-B)。

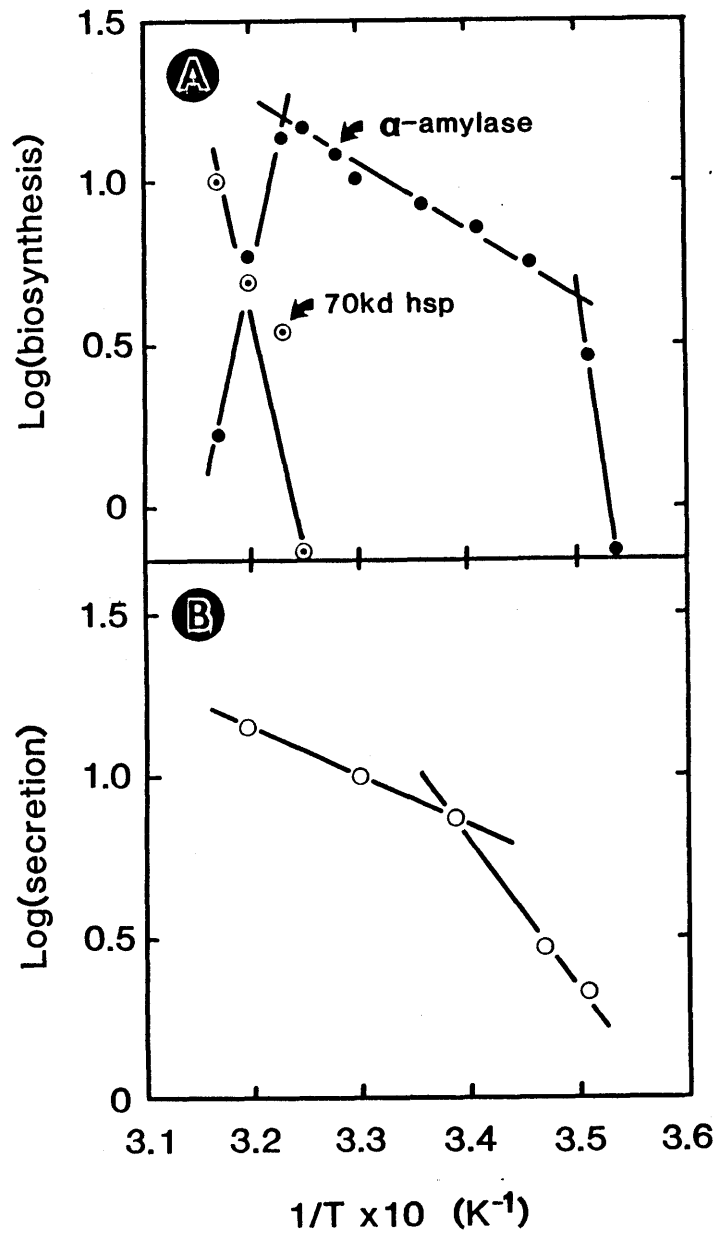


Fig.4-2. Arrhenius plot analysis of biosynthesis and secretion of α -amylase. Data obtained in experiments shown in Fig.4-1. were concerted to the Arrhenius plots. (A) for the biosynthesis rate of α -amylase from Fig.4-1. A. and for 70 kd hsp from Fig.4-1. B . (B) for the initial velocity of extracellular secretion of α -amylase from Fig.4-1 C .

【2】 α -Amylase 分子の Terminal Glycosylation に及ぼす温度の効果：

胚盤組織を 10mM Ca^{2+} または 0.1mM EGTA 存在下、種々の温度 (4°C – 42°C) において [^{35}S]methionine と 3 時間反応させた。細胞外に分泌された [^{35}S] α -amylase 分子と細胞内 [^{35}S] α -amylase 分子を Endo- β -H 処理し、R 型および S 型 [^{35}S] α -amylase の量を調べた。図 3-A に示されている fluogram は細胞外 [^{35}S] α -amylase 分子の Endo- β -H 消化実験の結果である。この結果は、温度が上昇するに従って、分泌される [^{35}S] α -amylase 分子中に含まれる R 型分子の割合が大きくなることをはっきりと示している。そして温度条件が 40°C 以上になると R 型 [^{35}S] α -amylase のみ分泌され、一方、 15°C 以下になると S 型分子のみが分泌されることも示している。図 3-B (10mM Ca^{2+}) と 図 3-C (0.1mM EGTA) は細胞内 [^{35}S] α -amylase 分子を Endo- β -H 処理したものである。0.1mM EGTA 存在下においては、10mM Ca^{2+} 存在下で見られる α -amylase 分子の terminal glycosylation の温度による影響が全く見られなかった。以上の結果から、 α -amylase 分子の terminal glycosylation は 10mM Ca^{2+} 存在下において温度の影響を受けることが明らかになった。

【3】非分泌性糖蛋白質の Terminal Glycosylation に及ぼす温度の効果：

胚盤組織を 40°C および 15°C で [^3H]mannose または [^3H]fucose と 3 時間反応させた後、組織を 0.1% Triton X-100 溶液で摩砕し、蛋白質画分 (hot-TCA insoluble) に取り込まれた放射活性を測定した (表 1)。糖蛋白質に取り込まれた放射活性の [^3H]fucose/[^3H]mannose 比は、 40°C で反応させた方が 15°C の場合よりも大きかった。次に、 [^3H]mannose または [^3H]fucose で標識された糖蛋白質を Endo- β -H 処理し、その感受性を調べた (表 1)。 15°C において [^3H]mannose 標識された糖蛋白質分子は、 40°C において標識された

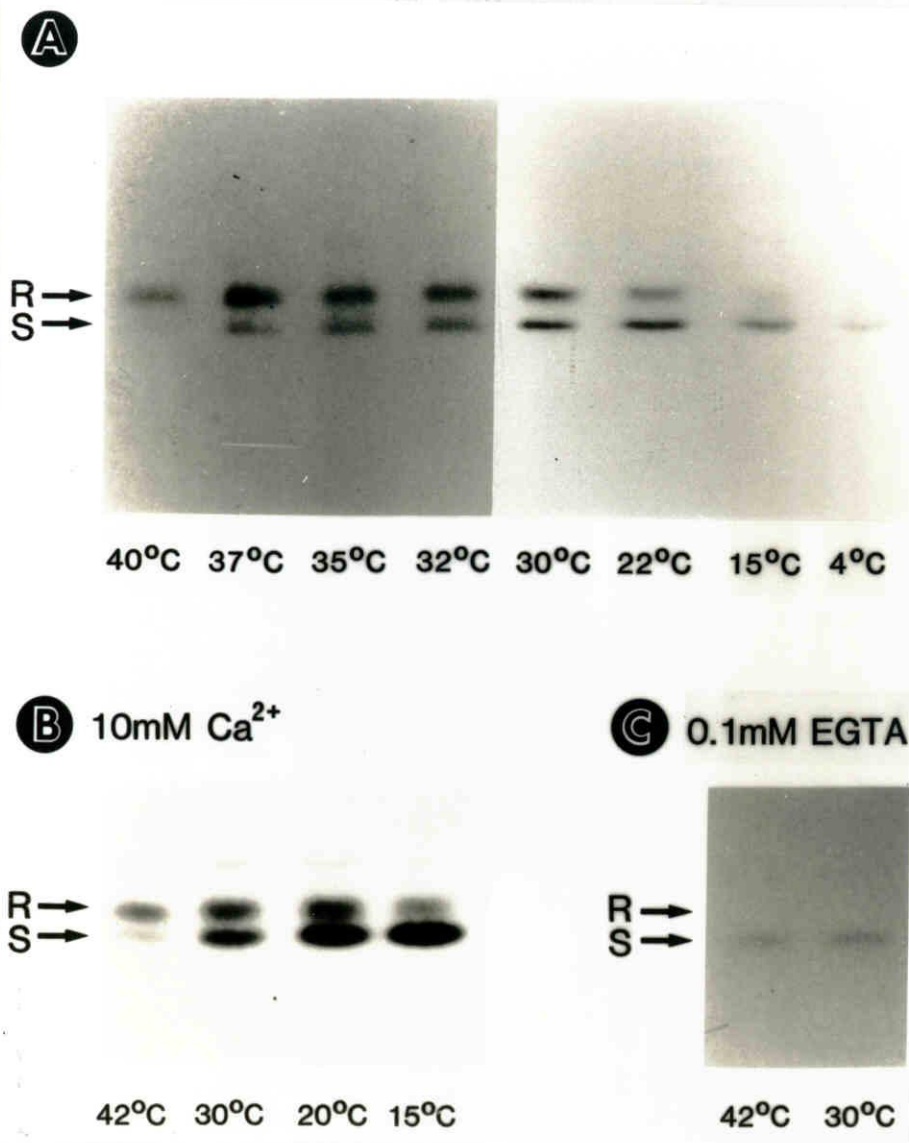


Fig.4-3. Effect of temperature on terminal glycosylation of α -amylase molecules. The basic experimental protocols for distinguishing R- and S-type ^{35}S - α -amylase molecules by Endo- β -H digestion are described in the text. (A) Distribution pattern of R- and S-type ^{35}S - α -amylase molecules in the extracellular fractions synthesized at various incubation temperatures as indicated. The pulse labeling reaction mixture contained 10mM Ca^{2+} , and incubation was performed for 3 hr. (B) Distribution pattern of R- and S-type ^{35}S - α -amylase molecules intracellularly accumulated at 4 different incubation temperatures. The reaction mixture contained 10mM Ca^{2+} . (C) Absence of R-type ^{35}S - α -amylase in the intracellular fractions synthesized without Ca^{2+} at two different incubation temperatures (30°C and 42°C). All experimental conditions were the same as above, except adding 0.1mM EGTA instead of 10mM Ca^{2+} into the preincubation and incubation mixtures.

Table 4-1. Effect of temperature on terminal glycosylation of cellular glycoproteins. Scutella were incubated with [³H]mannose or [³H]fucose for 3 hr at two different temperatures (15°C or 40°C). After removing incubation medium, they were homogenized with 0.1% Triton solution. Aliquots of tissue extracts were subjected to the Endo-β-H digestion as described in the text. Radioactivity in the hot TCA-insoluble fraction of either Endo-β-H treated or non-treated tissue extracts was measured.

Substrate		Radioactivity in proteins (dpm)	
		Temperature	
		40°C	15°C
[³ H]mannose	(A) control	1.14 × 10 ⁶	0.77 × 10 ⁶
	(B) Endo-β-H treated	0.72 × 10 ⁶	0.29 × 10 ⁶
	(B)/(A)	0.63	0.38
[³ H]fucose	(C) control	0.95 × 10 ⁶	0.40 × 10 ⁶
	(D) Endo-β-H treated	0.73 × 10 ⁶	0.32 × 10 ⁶
	(D)/(C)	0.77	0.80
[³ H]fucose	(C)/(A)	0.83	0.52
[³ H]mannose			

分子よりも明らかに Endo- β -H に対して感受性であった。一方、 $[^3\text{H}]$ fucose で標識された糖蛋白質分子は Endo- β -H 耐性であった。これらの結果は、胚盤組織の非分泌性糖蛋白質に関しても、 α -amylase と同様に terminal glycosylation が温度の影響を受けることを示している。

【4】糖蛋白質の糖鎖構造と熱安定性の関係：

糖蛋白質の糖鎖構造が温度によって変化することの生理的な意味を明らかにするために、 40°C および 15°C において生合成させた α -amylase 分子および細胞内糖蛋白質分子の熱安定性を検討した。図4-Aは、R型 $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase (40°C でつくられた $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase) 分子 および S型 $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase (15°C でつくられた $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase) 分子の熱安定性を調べた結果である。 α -Amylase 分子は熱に非常に安定であるため、 85°C で処理し、その熱変性度を経時的に測定した。 85°C で 20 分間処理すると、S型 $[^{35}\text{S}]\alpha$ -amylase 分子はほぼ完全に変性したが、R型分子は 50% 程度の変性にとどまった。つづいて、細胞内蛋白質分子の熱安定性を調べるために、胚盤組織を 40°C および 15°C の温度条件下で $[^{35}\text{S}]\text{methionine}$ 、 $[^3\text{H}]\text{mannose}$ または $[^3\text{H}]\text{fucose}$ と反応させ、生合成された $[^{35}\text{S}]$ 標識 および $[^3\text{H}]$ 標識の全細胞内蛋白質を種々の温度 (30°C - 70°C) で 10 分間処理し、その熱変性度を測定した。その結果、 40°C で生合成された $[^3\text{H}]$ 標識の糖蛋白質は 55°C まで熱変性は起こらないが 15°C でつくられた $[^3\text{H}]$ 標識の糖蛋白質は 45°C になると熱変性が起り始めることがわかった (図4-B)。一方、 $[^{35}\text{S}]$ 標識の蛋白質はともに 45°C から熱変性が観察され、この実験系では熱安定性の差異を見出すことは出来なかった (図4-C)。 $[^{35}\text{S}]$ 標識の蛋白質の中には糖蛋白質も含まれているが、この SDS-PAGE のパターンが $[^3\text{H}]$ 標識の糖蛋白質のそれとは全く異なる (図5) ことから、 $[^{35}\text{S}]$ 標識蛋白質の熱安定性は非糖蛋白質の熱安定性を反映して

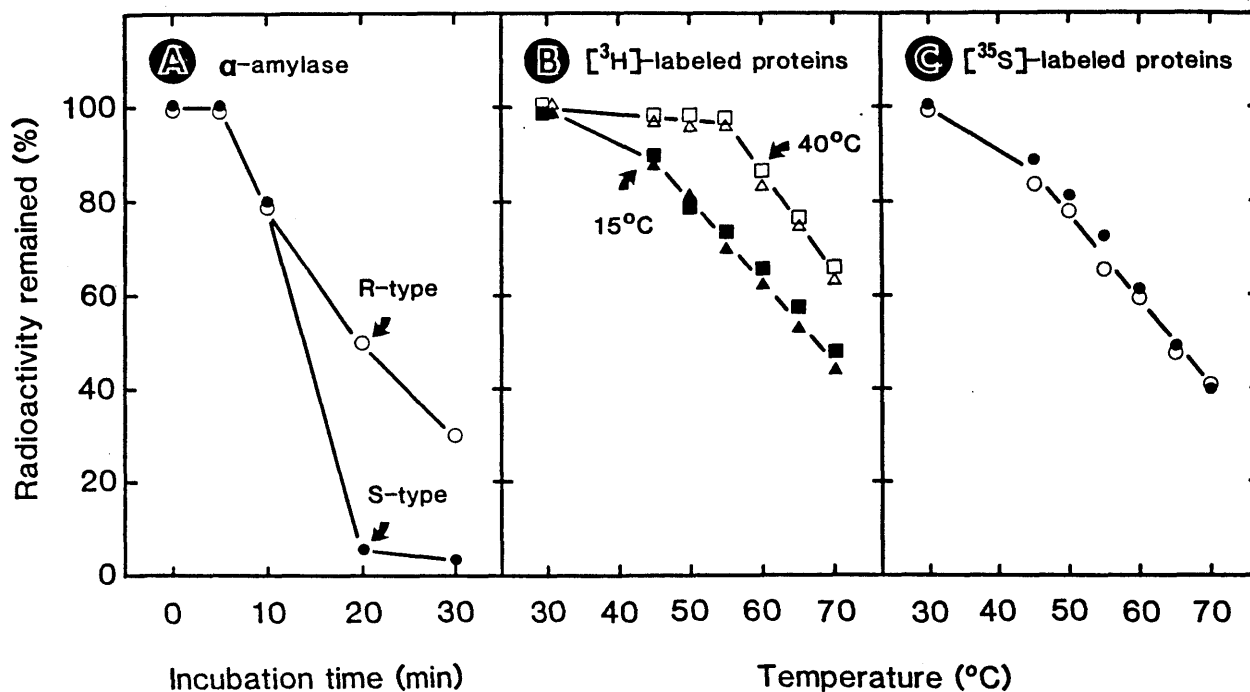


Fig.4-4. Heat stability of complex-type α -amylase molecules and total cellular glycoproteins synthesized at various incubation temperatures. Basic experimental protocols are described in the text. (A) Comparison of heat stabilities between R- and S-type [^{35}S] α -amylase molecules. Incubation media containing R-type [^{35}S] α -amylase (synthesized at 40°C) or S-type [^{35}S] α -amylase (synthesized at 15°C) were heated at 85°C for various periods as indicated. Afterwards, the reaction mixture was settled down in a Beckman microfuge and the radioactivities of [^{35}S] α -amylase in the supernatant were determined. (B) and (C) Comparison of heat stability of total cellular proteins labeled with [^3H]mannose (\square , \blacksquare), [^3H]fucose (\triangle , \blacktriangle) or [^{35}S]methionine (\circ , \bullet) during incubation at 40°C (open symbols) and 15°C (closed symbols) under heat treatment at various temperatures as indicated. After heat treatment for 10 min, the whole reaction mixture was settled down in a Beckman microfuge, and the remaining radioactivities in the supernatant were determined.

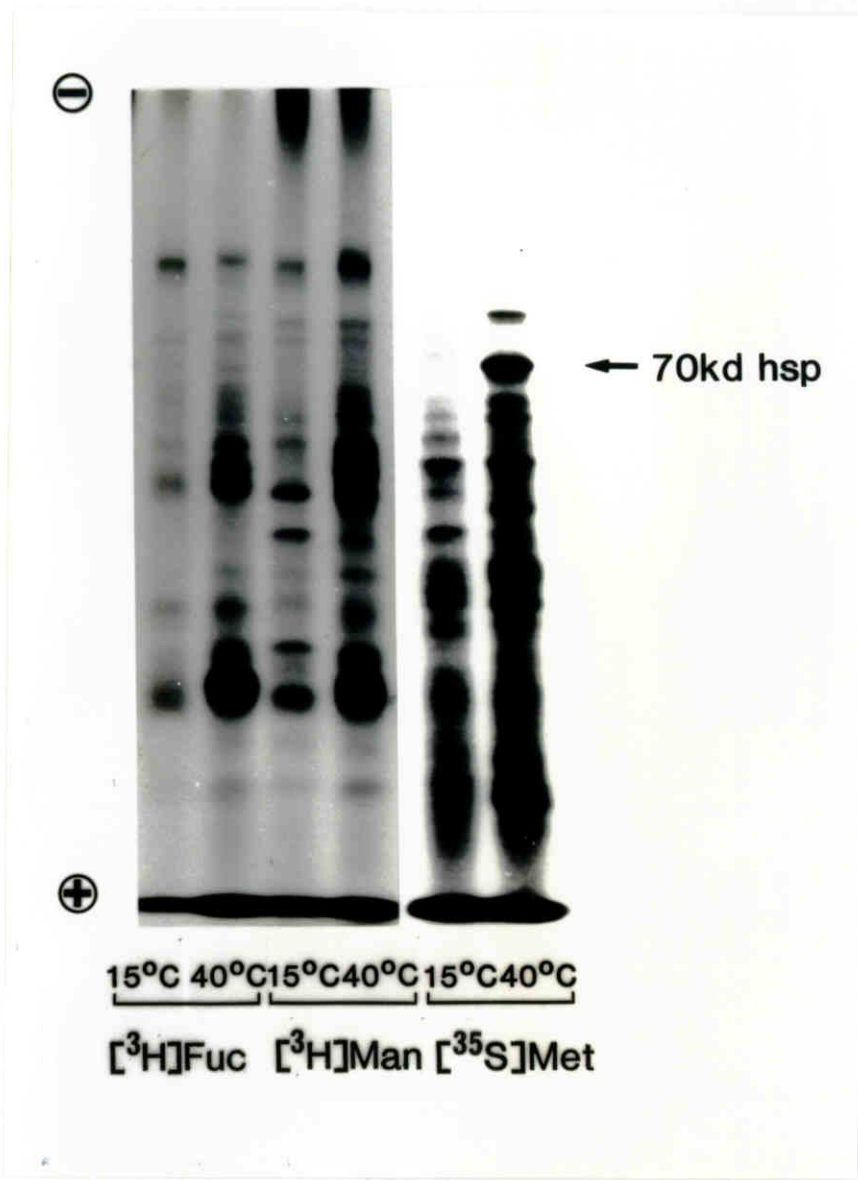


Fig.4-5. Incorporation of [³⁵S]methionine, [³H]mannose and [³H]fucose into cellular proteins at different temperatures. Details of experimental protocols are described in the text. [³⁵S]methionine-, and [³H]mannose- and [³H]fucose-labeled cellular proteins synthesized at 15°C or 40°C were subjected to SDS-PAGE, and fluorography.

いると考えられた。また 図5の結果は、70kd h s p が糖蛋白質でないことを示している。以上の結果から、糖蛋白質の糖鎖構造が複合型になると分子の熱安定性が増すことが示唆された。非糖蛋白質に関しては、異なる温度条件でつくられる蛋白質の間に熱安定性の差異はみとめられなかったが、高温条件で特異的につくられる蛋白質（post-translational なプロセッシングによって生成されるものも含む）のなかに熱に安定であるものがあるという可能性を否定することはできない。

考察

イネ種子胚盤組織を 37°C 以上の高温条件にさらすと、他の動植物の組織細胞 (56,83,117) と同様、h s p 生合成の誘導という熱ストレスに対する反応が見られる。そして、42°C になると、h s p の生合成のみが活発に行われ、細胞内の正常蛋白質はその生合成がほとんど抑制される (図 1 - B)。このような熱ストレスに対する反応が起こる温度で、分泌性糖蛋白質 α -amylase の生合成および細胞内輸送はどのような影響を受けるのかを検討した。生合成に関しては、37°C 以上になると細胞内に存在する非分泌性の正常蛋白質と同じように著しく抑制された (図 1 - A、図 2 - A)。しかしながら、細胞内輸送は抑制されず、むしろその速度は温度の上昇に従って増加しつづけた (図 2 - B)。いかえると、 α -amylase の細胞内輸送は熱ストレスの影響を全く受けないことが明らかになった。この結果は、h s p が核、細胞骨格さらには細胞内オルガネラ (ミトコンドリア、葉緑体等) に局在化し、細胞の代謝装置を熱ストレスから保護する役割を持っているという仮説 (56,116) に矛盾しない。

発芽オオムギ種子の糊粉層において合成され分泌される α -amylase は、温度条件が 20°C 以下になるとその放出量が著しく減少することが見いだされ、そして、それは生合成の低下よりもむしろ輸送過程によることが示唆された (31)。イネ種子の胚盤細胞においても、低温条件下では α -amylase の生合成速度および細胞内輸送速度はともに抑制される (図 1、図 2)。しかしながら図 3 - Bに見られるように、組織内に存在する [35 S] α -amylase 分子の量は明らかに 30°C の場合よりも 20°C および 15°C の場合の方が多い。この結果は、20°C-15°C の温度条件におくと [35 S] α -amylase 分子が細胞内に蓄積することを示しており、低温条件 (20°C-15°C) 下における α -amylase 分子の細

胞外分泌の抑制は主に細胞内輸送速度の低下が起因していることをはっきりと示している。動物細胞系における蛋白質の細胞内輸送においては、20°C 以下にすると exocytosis がおさえられ、蛋白質は trans Golgi cisternae に蓄積されることが報告されている (37,42,68)。図3-Bの結果は、また、15°C では主としてS型の蓄積が観察されるが、20°C では R型の蓄積も起こることを示している。したがって、胚盤組織における α -amylase の輸送に関しては 20°C では おそらく exocytosis の過程が抑制されるのであろう。しかし、15°C になると、exocytosis の過程よりむしろ rER から cis Golgi の間の過程が抑制されている可能性が強い。

分泌性糖蛋白質である α -amylase の terminal glycosylation は、温度条件によって著しい影響を受け、高温 (40°C) では複合型糖鎖を持つ R型 α -amylase 分子が、低温 (15°C) では 高-mannose 型糖鎖を持つ S型分子のみが細胞外に分泌されることが明らかになった (図3-A)。また、非分泌性糖蛋白質においても、その terminal glycosylation は分泌性糖蛋白質と同様に温度変化によって影響を受け、異なる糖鎖構造を生ずる (表1)。これまで、terminal glycosylation の温度による影響を報告した例はなく、上記の結果は興味深い発見である。さらに、糖蛋白質の糖鎖構造が温度条件によって変化することの意味を検討するため、それぞれの糖蛋白質の熱安定性を調べたところ、複合型糖鎖を持つ糖蛋白質分子は 高-mannose 型糖鎖を持つ糖蛋白質分子よりも熱に対して安定であることが示唆された (図4)。ただし、この結果は in vitro 系で調べたものであり、生理的に意味をもっているのかどうかは現在のところ明確でない。けれども、何等かの原因でこのような糖蛋白質の糖鎖構造が変化する例は いくつか報告されている。例えば、細胞に感染した sindbis virus のコートを形成する糖蛋白質の糖鎖構造が、宿主細胞の増殖状態によって異なることが知られている (45)。また、ガン化した細胞膜糖蛋白質は正常

細胞に比較して asparagine 結合糖鎖の分岐化が 著しくなる傾向が見られる (112) ことも示されている。

以上の結果にもとずいて、R型、S型 α -amylase isoform の "温度" 及び " Ca^{2+} " による分泌調節機構の仮説を図6に示した。胚盤上皮細胞を $10\text{mM}\text{Ca}^{2+}$ 存在下に 40°C - 42°C の高温条件におくとR型 α -amylase 分子のみが分泌される。一方、 15°C 以下の温度条件におくとS型 α -amylase 分子のみが分泌される。

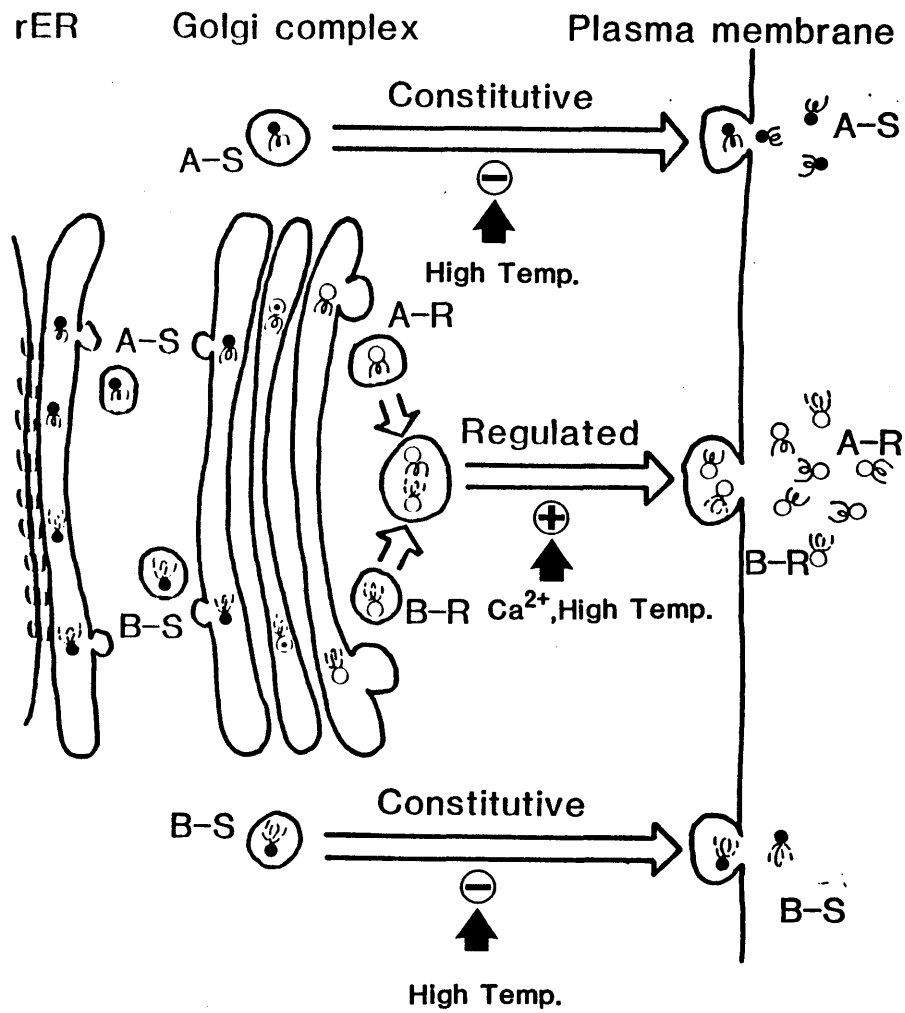


Fig.4-6. A possible mechanism for the regulation of secretion of R- and S-type α -amylase isoforms. The secretion of R- and S-type α -amylase is regulated by "temperature" and " Ca^{2+} ". Symbols: straight chain, polypeptide A; dotted chain, polypeptide B; (●), high-mannose type carbohydrate chain; (⊙), hypothetical intermediate chain; (○) modified complex type carbohydrate chain.

総合討論

蛋白質の分泌は、高等動植物から微生物にいたるまで普遍的に見られる生命現象であり、極めて重要な研究課題である。著者は、高等植物細胞、特に、発芽イネ種子胚盤上皮細胞における糖蛋白質 α -amylase の分泌およびその調節機構を解明することを目的として研究を行った。

第一章で述べたように、胚盤上皮細胞から分泌される α -amylase には、R型（複合型糖鎖を持つもの）とS型（高-mannose 型糖鎖を持つもの） isoform が存在している。糖蛋白質の糖鎖には heterogeneity があることは知られているが、イネ種子 α -amylase のような例はめずらしい。分泌性糖蛋白質においては、このような例はいまのところ見いだされていない。ちなみに、人間の耳下腺の α -amylase の糖鎖構造が決定され、その糖鎖が複合型であることが示されている（70）。また微生物由来 (*Aspergillus oryzae*) の Taka-amylase は 高-mannose 型糖鎖のみ持っていることが知られている（146）。このような、同じ酵素活性を持つ糖蛋白質の糖鎖構造の差異は、進化の観点からも興味深い問題といわねばならない。

R型 α -amylase の生成、つまり α -amylase の糖鎖の post-translational な修飾は、monensin (carboxylic ionophore) を用いた分泌阻害実験の結果から、Golgi 体で行われていることが示唆された（第二章）。ただし、これは間接的な証拠であり、したがって、さらに直接的な証拠を得る必要があるであろう。そのためには、胚盤組織をショ糖密度勾配遠心法等を用いて細胞分画し、単離 Golgi 体における α -amylase の糖鎖修飾を研究しなければならない。しかし、この胚盤組織の Golgi 体を単離する試みには細胞壁の存在という植物細胞特有の大きい問題が立ちはだかっている。Golgi 体は細胞内にあるオルガ

ネラの中でも最もデリケートなオルガネラの1つであるため、細胞壁をもつ細胞を摩砕して内容物を抽出しようとするとき Golgi 体はすべて破壊されてしまうのである。この問題を解決する唯一の方法は、プロトプラストを調製した後細胞分画を行うことであろう。これにも、胚盤組織の量的問題が生ずるかもしれないが、放射性化合物等を用いた微量検出法を駆使すれば、Golgi 体で起こる α -amylase の糖鎖修飾を検討することは不可能ではないと考えられる。いずれにしても、高等動物細胞における Golgi 体の研究と比較して著しく立ち遅れている現時点においては、上記の実験結果から得られるであろう知見は極めて有益であり、植物 Golgi 体の研究の発展に寄与するものと思われる。

胚盤上皮細胞における α -amylase の分泌には、 Ca^{2+} 依存性と Ca^{2+} 非依存性の2つの細胞内輸送経路が存在していることが明らかになった（第三章）。R 型 α -amylase の細胞内輸送は前者であり、S 型 α -amylase のそれは後者である。R 型 α -amylase の細胞内輸送が Ca^{2+} によって調節されていることはわかってきたが、その詳細なメカニズムの解明が今後の大きな問題として残されている。また、胚盤上皮細胞は、 α -amylase の他にも proteinase、RNAase 等の加水分解酵素を分泌することが報告されている（92）ことから、これらの分泌性蛋白質が Ca^{2+} 依存性か、それとも Ca^{2+} 非依存性のどちらの細胞内輸送経路を通るのかという問題も興味深い。 α -Amylase の生合成もまた Ca^{2+} によって促進されることを示したが、この Ca^{2+} の促進効果は、転写のレベルで起こっているのかそれとも翻訳のレベルで起こっているのかという問題も今後の研究課題である。

さらに、胚盤上皮細胞における R 型、S 型 α -amylase isoform の分泌は、“細胞内 Ca^{2+} 濃度” および “温度” 環境によって高度に調節されていることが明らかになった（第四章）。細胞内部の Ca^{2+} 濃度および温度条件を操作することによって R 型 α -amylase 分子のみを分泌する系、または S 型 α -amylase

のみを分泌する系を作ることができることから、R型 および S型 α -amylase 分子の細胞内輸送経路をより綿密に検討することができるものと期待される。また、分泌性糖蛋白質 α -amylase および 非分泌性糖蛋白質の terminal glycosylation は温度条件によって大きく変化し、糖鎖構造の著しく異なる糖蛋白質が生成されることが明らかになったとともに、複合型糖鎖を持つ糖蛋白質は高-mannose 型糖鎖を持つものより熱安定性が高いことが示唆された。この結果は、胚盤上皮細胞から糖鎖構造の異なる R型とS型 α -amylase isoform が分泌される生理的意味を考察する上できわめて示唆に富むものである。ただし、上記の実験は蛋白質の熱変性度を調べただけなので、さらに詳細な研究、たとえばR型とS型 α -amylase を分離精製し、それぞれの酵素学的な性質を調べること、また、異なる環境条件（温度条件等）下で成育するイネの種子中に存在するR型、S型 α -amylase の量比を定量し 比較検討すること等によってその意義を考察する必要があるであろう。

作物育種という農業、および 醸造工業との密接なかかわりから、発芽穀類種子を実験材料とする amylase に関する研究は古くから重要視されてきた。しかしながら、分泌性糖蛋白質としての α -amylase の分泌調節のメカニズムを追求した研究は決して多くはない。したがって、本研究は amylase の生物学の発展に寄与するものと期待され、かつ応用生物学的にも有用な知見を与えるものと考えられるのである。

要約

【1】 発芽イネ種子胚盤上皮細胞から分泌される α -amylase は asparagine 結合糖鎖を持つ典型的な分泌性糖蛋白質であるが、この酵素蛋白質には糖鎖構造の異なる2つの isoform (R型とS型) が存在していることが明らかになった。Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Endo- β -H) の作用に対して耐性であるR型酵素分子は、複合型糖鎖に特有な fucose を含んでいることから複合型様の糖鎖を持つことが示唆された。一方、S型分子は Endo- β -H によって糖鎖が切断されることから 高-mannose 型糖鎖を持つと考えられた。細胞外に分泌されたR型 α -amylase 分子の糖鎖構造は、粗面小胞体において co-translational に導入される糖鎖の構造とは明らかに異なっており、したがって細胞内輸送の間に post-translational な糖鎖修飾を受けて生じたものと推察された。

R型およびS型酵素分子はともに isozyme A、B を含んでいることから、イネ種子 α -amylase には少なくとも4つの isoform (A-R、B-R、A-S と B-S) があることがわかった。また、ペプチドマッピング法を用いてR型とS型分子のポリペプチド構造を解析した結果、R型とS型分子の間には差異が見られなかった。

【2】 胚盤上皮細胞における α -amylase の細胞内輸送は、蛋白質合成阻害剤 cycloheximide によって全く影響を受けなかった。さらに、 α -amylase 分子の post-translational な糖鎖修飾に関しても、cycloheximide の影響は観察されなかった。これらの結果から、「 α -amylase の生合成と細胞内輸送はそれぞれ独立した過程である」と結論した。

胚盤組織を carboxylic ionophore、monensin (10^{-7} M) で処理すると、Gol-

gi 体の顕著な膨化が観察され、それとともに α -amylase の細胞外への分泌が抑制された。 つづいて、R型、S型 α -amylase の分泌に及ぼす monensin の効果を検討したところ、対照に比べてR型酵素分子の分泌が著しく阻害され、細胞内にS型分子の蓄積が見られた。 以上の結果は、R型 α -amylase の生成が Golgi 体で行われていることを示唆しており、 α -amylase 分子の細胞内輸送において Golgi 体が重要な役割を果していることが推察された。

【3】胚盤上皮細胞における α -amylase の生合成および分泌には Ca^{2+} が必要であることが示された。 α -Amylase の生合成と分泌における Ca^{2+} の促進効果は Ca^{2+} -ionophore A-23187 によって より増大することから、 α -amylase の分泌調節における細胞内の Ca^{2+} 濃度の重要性が示唆された。 さらに、 La^{3+} 、ruthenium red および calmodulin antagonist W-7 の阻害実験の結果から、 $[\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}]$ -ATPase による Ca^{2+} の細胞外への放出が α -amylase の細胞外分泌と couple していることが推察された。

R型、S型 α -amylase の分泌に及ぼす Ca^{2+} の効果を調べたところ、R型酵素分子の分泌は Ca^{2+} によって著しい影響を受けるが、S型分子の分泌はほとんど Ca^{2+} に影響されない事が明らかになった。 また、胚盤組織を 0.1mM EGTA で処理して Ca^{2+} 欠乏状態にすると、R型酵素分子の細胞外分泌が抑制され、細胞内にR型分子が蓄積することが見いだされた。 したがって、 Ca^{2+} は R型 α -amylase の exocytosis の過程に必要であると考えられた。

【4】胚盤組織を heat shock protein の合成の誘導が生ずる高温条件 (40°C - 42°C) にさらすと、 α -amylase 分子の生合成は急激に減少するけれども、細胞内輸送に関しては全く抑制されずむしろその速度は温度の上昇に従って増加しつづけた。 この結果から、 α -amylase の生合成と輸送の温度依存性には大

きな違いがあることが明らかになった。

さらに、R型、S型 α -amylase分子の分泌に及ぼす温度の効果を検討した結果、10mM Ca^{2+} 存在下、温度条件を40°C以上にするとR型酵素分子だけが分泌され、一方15°C以下の低温条件におくとS型酵素分子のみ分泌されることが見いだされた。

上記の研究成果より、発芽イネ種子胚盤上皮細胞における α -amylaseの分泌には2つの細胞内輸送経路が存在しており、それぞれの経路が“細胞内 Ca^{2+} 濃度”や“温度”環境によって制御され、R型、S型 α -amylaseの分泌が調節されていることが示唆された。

文献

1. 赤沢 堯 (1985) 化学と生物 23, 140-141.
2. Akazawa, T. and S. Miyata (1982) Essays Biochem. 18, 41-71.
3. 赤沢 堯、岡本和男 (1982) 化学と生物 20, 38-44.
4. Anderson, J.M. and M.J. Cormier (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 595-602.
5. Andreo, C.S. and R.H. Vallejos (1974) FEBS Lett. 46, 343-346.
6. Arakawa, M. and T. Muramatsu (1974) J. Biochem. 76, 307-317.
7. Barritt, G.J. (1981) Trends Biochem. Sci. 6, 322-325.
8. Baulcombe, D.C. and D. Buffard (1983) Planta 157, 493-501.
9. Beweley, J.D. and M. Black (1978) Physiology and Biochemistry of Seeds (in Relation to Germination) 1. Development, Germination and Growth Spring-Verlag, Berlin.
10. Blake, M.S., K.H. Johnston, G.J. Russell-Jones, and E.C. Gotshlich (1984) Anal. Biochem. 136, 175-179.
11. Blobel, G. and B. Dobberstein (1975) J. Cell Biol. 67, 835-851.
12. Blobel, G. and D.D. Sabatini (1970) J. Cell Biol. 45, 130-145.
13. Blobel, G. and D.D. Sabatini (1971) in Biomembranes (Manson, L.D., ed.) Vol.3, pp.193-195.
14. Brown, A.H.D. and J.V. Jacobsen (1982) Genet. Res. Camb. 40, 315-324.
15. Callis, J. and T.-H.D. Ho (1983) Arch. Biochem. Biophys. 224, 224-234.
16. Chandler, P.M., J.A. Zwar, J.V. Jacobsen, T.J.V. Higgins, and

- A.S. Inglis (1984) Plant Mol. Biol. 3, 407-418.
17. Chao, S.E. and J.G. Scandalios (1971) Genetics 69, 47-61.
 18. Cheung, W.Y. (1980) Science 207, 19-27.
 19. Chrispeels, M.J. (1983) Planta 157, 454-461.
 20. Chrispeels, M.J. (1983) Planta 158, 140-151.
 21. Chrispeels, M.J. and J.E. Varner (1967) Plant Physiol. 42, 398-406.
 22. Cleveland, D.W., S.G. Fischer, M.W. Kirschner, and U.K. Laemmli (1977) J. Biol. Chem. 252, 1102-1106.
 23. Creutz, C.E., L.G. Dowling, J.J. Sando, C. Villar-Palasi, J.H. Whipple, and W.J. Zaks (1983) J. Biol. Chem. 258, 14664-14674.
 24. Creutz, C.E., C.J. Pazoles, and H.B. Pollard (1978) J. Biol. Chem. 253, 2858-2866.
 25. Creutz, C.E., C.J. Pazoles, and H.B. Pollard (1979) J. Biol. Chem. 254, 553-558.
 26. Daussant, J., S. Miyata, T. Mitsui, and T. Akazawa (1983) Plant Physiol. 71, 88-95.
 27. Deikman, J. and R.L. Jones (1985) Plant Physiol. 78, 192-198.
 28. Dieter, P. and D. Marmé (1982) in Plasmalemma and Tonoplast: Their Functions in the Plant Cell (Marmé, D., E. Marré, and R. Hartel, eds.) pp.353-360, Elsevier Biomedical Press, New York.
 29. Dunphy, W.G. and J.E. Rothman (1983) J. Cell Biol. 97, 270-275.
 30. Elbein, A.D. (1981) Trends. Biochem. Sci. 6, 219-221.
 31. Fadeel, A., B.A. Moll, and R.L. Jones (1980) Plant Physiol. 66, 466-470.

32. Farquhar, M.G. and G.E. Palade (1981) J. Cell Biol. 91, 77s-103s.
33. Feinstein, M.B. and R.A. Hadjian (1982) Mol. Pharmacol. 21, 422-431.
34. Fitting, T. and D. Kabat (1982) J. Biol. Chem. 257, 14011-14017.
35. Fries, E., L. Gustafsson, and P.A. Perterson (1984) EMBO J. 3, 147-152.
36. Frydenberg, O. and G. Nielsen (1965) Hereditas 54, 123-139.
37. Fuller, S.D., R. Bravo, and K. Simons (1985) EMBO J. 4, 297-307.
38. Gardiner, M. and M.J. Chrispeels (1975) Plant Physiol. 55, 536-541.
39. Gardner, J.D., M.D. Walker, A.J. Rottman (1980) Am. J. Physiol. 238, G458-G466.
40. Geisow, M.J. and R.D. Burgoyne (1983) Nature 301, 432-435.
41. Gilmore, R., P. Walter, and G. Blobel (1982) J. Cell Biol. 95, 470-477.
42. Griffiths, G., S. Pfeiffer, K. Simons, and K. Matlin (1985) J. Cell Biol. 101, 949-964.
43. Griffiths, G., P. Quinn, and G. Warren (1983) J. Cell Biol. 96, 835-850.
44. Gumbiner, B. and R.B. Kelly (1982) Cell 28, 51-59.
45. Hakimi, J. and P.H. Atkinson (1980) Biochemistry 19, 5619-5624.
46. Hanover, J.A. and W.J. Lannarz (1981) Arch. Biochem. Biophys. 211, 1-19.

47. Higgins, T.J.V., J.A. Zwar, and J.V. Jacobsen (1976) Nature 260, 166-168.
48. Jacobsen, J.V. and L.R. Beach (1985) Nature 316, 275-277.
49. Jacobsen, J.V., J.G. Scandalios, and J.E. Varner (1970) Plant Physiol. 45, 367-371.
50. Jacobsen, J.V. and T.J.V. Higgins (1982) Plant Physiol. 70, 1647-1653.
51. Jamieson, J.D. and G.E. Palade (1968) J. Cell Biol. 39, 580-588.
52. Jones, R.L. and J.V. Jacobsen (1983) Planta 158, 1-9.
53. Jones, R.L. and J. Carbonell (1984) Plant Physiol. 76, 213-218.
54. Johnstone, A. and R. Therpe (1982) Immunochemistry in Practice pp.120-139, Blackwell Sci. Publ., London.
55. Kanamori, M., M. Naka, M. Asano, H. Hidaka (1981) J. Pharmacol. Exp. Ther. 217, 494-499.
56. Kimpel, J.A. and J.L. Key (1985) Trends Biochem. Sci. 10, 353-357.
57. Kirchberger, M.A. and T. Antonetz (1982) J. Biol. Chem. 257, 5685-5691.
58. Koide, J.D. and T. Muramatsu (1974) J. Biol. Chem. 249, 4897-4904.
59. Kornfeld, R. and S.Kornfeld (1980) in The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans (Lennarz, W.J., ed.), pp.1-34, Plenum, New York.
60. Kornfeld, S., E. Li, and I. Tabas (1978) J. Biol. Chem. 253,

7771-7778.

61. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
62. Lagunoff, D. and H. Wan (1974) J Cell Biol. 61, 809-811.
63. Laskey, R.A. and A.D. Mills (1975) Eur. J. Biochem. 56, 335-341.
64. Ledford, B.E. and D.F. Davis (1983) J. Biol. Chem. 258, 3304-3308.
65. Liang, C.-J., K. Yamashita, and A. Kobata (1980) J. Biochem. 88, 51-58.
66. Lodish, H.F., N. Kong, M. Snider, and G.J.A.M. Strous (1983) Nature 304, 80-83.
67. MacGregor, A.W., F.H. MacDougall, C. Mayer, and J. Daussant (1984) Plant Physiol. 75, 203-206.
68. Matlin, K. and K. Simons (1983) Cell 34, 233-243.
69. Milstein, C., G.G. Brownlee, T.M. Harrison, and M.B. Mathews (1972) Nature, New Biol. 239, 117-120.
70. Minobe, S., H. Nakajima, N. Itoh, I. Funakoshi, and I. Yamashita (1979) J. Biochem. 86, 1851-1854.
71. Minocherhomjee, A. and B.D. Roufogalis (1982) J. Biol. Chem. 257, 5426-5430.
72. Miyata, S., K. Okamoto, A. Watanabe, and T. Akazawa (1981) Plant Physiol. 68, 1314-1318.
73. Miyata, S. and T. Akazawa (1982) Plant Physiol. 70, 147-153.
74. Miyata, S. and T. Akazawa (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6566-6568.
75. Miyata, S. and T. Akazawa (1983) J. Cell Biol. 96, 802-806.

76. 三ツ井敏明 (1983) 修士論文
77. Moll, B.A. and R.L. Jones (1982) Plant Physiol. 70, 1149-1155.
78. Mollenhauer, H.H. and D. J. Morr  (1978) in Subcellular Biochemistry (Roodyn, D., ed.) Vol.5, pp.327-357, Plenum, New York.
79. Mollenhauer, H.H. and D.J. Morr  (1980) in Biochemistry of Plants (Stumpf, P.K. and E.E. Conn, eds.) Vol.1, pp.437-488, Academic Press, New York.
80. Momotani, Y. and J. Kato (1966) Plant Physiol. 41, 1395-1396.
81. Morr , D.J., W. Boss, H.Grimes, and H.H. Mollenhauer (1983) Eur. J. Cell Biol. 30, 25-32.
82. Mozer, T.J. (1980) Plant Physiol. 65, 834-837.
83. Munro, S. and H. Pelham (1985) Nature 317, 477-478.
84. Muthuktishnan, S., B.S. Gill, M.Swegle, and G.R. Chandra (1984) J. Biol. Chem. 259, 13637-13639.
85. Muthukrishnan, S., G.R. Chandra, and E.S.Maxwell (1983) J. Biol. Chem. 258, 2370-2375.
86. Muto, S. and S. Miyachi (1977) Plant Physiol. 59, 55-60.
87. Nishikawa, K. and M. Nobuhara (1901) Japan J. Genetics 46, 345-353.
88. Nishiyama, I. (1975) Plant Cell Physiol. 16, 533-536.
89. Northcote, D.H. and J.D. Pickett-Heaps (1966) Biochem. J. 98, 159-167.
90. Okamoto, K. and T. Akazawa (1978) Agric. Biol. Chem. 42, 1379-1384.
91. Okamoto, K. and T. Akazawa (1979) Plant Physiol. 63, 336-340.

92. Okamoto, K., H. Kitano, and T. Akazawa (1980) Plant Cell Physiol. 21, 201-204.
93. Okita, T.W., R. Decaleya, and L. Rappaport (1979) Plant Physiol. 63, 195-200.
94. Palade, G.E. (1975) Science 189, 347-358.
95. Paleg, L.G. (1960) Plant Physiol. 35, 293-297.
96. Pelham, H.R.B. (1984) EMBO J. 3, 3095-3100.
97. Peterson, E.A. and H.A. Sober (1962) in Methods in Enzymology (Colowick, S.P. & N.O. Kaplan, eds.) ,Vol.5, pp.3-27, Academic Press, New York.
98. Pfeiffer, S., S.D. Fuller, and K. Simons (1985) J. Cell Biol. 101, 470-476.
99. Pollard, H.B., C.E. Creutz, and C.J. Pazoles (1981) in Methods in Cell Biology (Hand, A.R. and V. Oliver, eds.) Vol.23, pp.313-334, Academic Press, New York.
100. Quist, E.E. and B.D. Roufogalis (1975) FEBS Lett. 59, 135-139.
101. Ranki, H. and T. Sopanen (1984) Plant Physiol. 75, 710-715.
102. Ray, P.M., T.L. Shninger, and M.M. Ray (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 605-612.
103. Redman, C.M. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 845-850.
104. Redman, C.M. and D.D. Sabatini (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 608-615.
105. Reed, P.W. and H.A. Lardy (1972) J. Biol. Chem. 247, 6970-6977.
106. Rodriguez-Boulan, E., K.T. Paskiet, P.J.I. Salas, and E. Bard (1984) J. Cell Biol. 98, 308-319.

107. Rogers, J.C. (1985) J. Biol. Chem. 260, 3731-3738.
108. Rogers, J.C. and C. Milliman (1983) J. Biol. Chem. 258, 8169-8174.
109. Rogers, J.C. and C. Milliman (1984) J. Biol. Chem. 259, 12234-12240.
110. Rothman, J.E. (1981) Science 213, 1212-1219.
111. Rotund , R.L. and D.M. Fambrough (1980) Cell 22, 595-602.
112. Santer, U.V., F. Gilbert, and M.C. Glick (1984) Cancer Res. 44, 3739-3735.
113. Scandalios, J.G. (1966) Planta 69, 244-248.
114. Scandalios, J.G. (1974) Ann. Rev. Plant Physiol. 25, 225-258.
115. Scheele, G. and A. Haymovits (1980) J. Biol. Chem. 255, 4918-4927.
116. Schlesinger, M.J., G. Aliperti, and P.M. Kelley (1982) Trends Biochem. Sci. 1, 222-225.
117. Schlesinger, M.J., M. Ashbournner & A. Tissieres, eds. (1982) Heat Shock from Bacteria to Man , Cold Spring Harbor.
118. Silvanovich, M.P. and R.D. Hill(1976) Anal. Biochem. 73,430-433.
119. Steiner, D.F., W. Kemmler, H.S. Tager, and J.D. Peterson (1974) Fred. Proc. 33, 2105-2115.
120. Steinhardt, R.A. and J.M. Alderton (1982) Nature 295, 154-155.
121. Struck, D.K. and W.J. Lennarz (1980) in The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans (Lennarz, W.J., ed.) pp. 35-83, Plenum, New York.
122. Tanaka, Y. and T. Akazawa (1970) Plant Physiol. 46, 586-591.

123. Tanaka, Y., T. Ito, and T. Akazawa (1970) Plant Physiol. 46, 650-654.
124. Tarentino, A.L. and F. Maley (1974) J. Biol. Chem. 249, 811-817.
125. Tarentino, A.L., T.H. Plummer, Jr, and F. Maley (1974) J. Biol. Chem. 249, 818-824.
126. Tartakoff, A.M. (1980) Int. Rev. Exp. Pathol. 22, 228-251.
127. Tartakoff, A.M. (1983) Cell 32, 1026-1028.
128. Tartakoff, A.M. (1983) Int. Rev. Cytol. 85, 221-252.
129. Tartakoff, A.M. (1983) in Methods in Enzymology (Fleischer, S and B. Fleischer, eds.) Vol.98, pp.47-59, Academic Press, New York.
130. Tartakoff, A.M. and P. Vasalli (1978) J. Cell Biol. 79, 694-707.
131. Tartakoff, A.M. and P. Vasalli (1978) J. Cell Biol. 83, 284-299.
132. Tkachuk, R. and J.E. Kruger (1974) Cereal Chem. 51, 508-529.
133. Towbin, H., T. Staehlin, and J. Gordon (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.
134. Varner, J.E. and D.T.-H. Ho (1979) in Plant Biochemistry (Bonner, J. and J.E. Varner, eds.), pp.713-770, Academic Press, New York and London.
135. Varner, J.E. and R.M. Mense (1972) Plant Physiol. 49, 187-189.
136. Vigil, E.L. and M. Ruddat (1973) Plant Physiol. 51, 549-558.
137. Waisman, D.M., J.M. Gible, D.B.P. Goodman, and H. Rasmussen (1981) J. Biol. Chem. 256, 409-414.

138. Walter, P. and G. Blobel (1981) J. Cell Biol. 91, 551-561.
139. Walter, P. and G. Blobel (1982) Nature 299, 691-698.
140. Walter, P., I. Ibrahim, and G. Blobel (1981) J. Cell Biol. 91, 545-550.
141. Watson, E.L., F.F. Vincenzi, and P.W. Davis (1971) Biochim. Biophys. Acta 249, 606-610.
142. Williams, J.A. (1980) Am. J. Physiol. 238, G269-279.
143. Williamson, R.E. (1982) What's New in Plant Physiol? 12, 45-48.
144. Williamson, R.E. and C.C. Ashley (1982) Nature 296, 647-651.
145. Wong, D.T., J.R. Wilkinson, R.L. Hamill, and J.-S. Horng (1973) Arch. Biochem. Biophys. 156, 578-585.
146. Yamashita, K., Y. Tachibana, T. Nakayama, M. Kitamura, Y. Endo, and A. Kobata (1980) J. Biol. Chem. 255, 5635-5642.
147. Yomo, H. (1960) 醱酵協会誌 18, 600-602.

謝 辞

本研究の遂行にあたって、始終、御指導と御鞭撻を頂ました赤沢堯教授に心から感謝の意を表すものであります。また、随時有益な御助言、御指導を賜りました John T. Christeller 先生、Alan M. Tartakoff 先生、西村いくこ先生に深く感謝致します。さらに、日常不断に御助言と激励を頂ました第一部門の西村幹夫先生、高倍鉄子先生、小島峯雄先生をはじめとする生化学制御研究施設の教官、職員、大学院生の皆様に厚く御礼を申し上げます。

報文目録

- (1) T. Mitsui, J.T. Christeller, I. Hara-Nishimura and T. Akazawa (1984) Possible roles of calcium and calmodulin in the biosynthesis and secretion of α -amylase in rice seed scutellar epithelium. Plant Physiol. 75, 21-25.
- (2) T. Mitsui, T. Akazawa, J.T. Christeller and A.M. Tartakoff (1985) Biosynthesis of rice seed α -amylase: Two pathways of amylase secretion by the scutellum. Arch. Biochem. Biophys. 241, 315-328.
- (3) T. Mitsui and T. Akazawa (1985) Secondary modification of carbohydrate chains in α -amylase molecules synthesized in rice seed scutellum. submitted to Arch. Biochem. Biophys.
- (4) T. Mitsui and T. Akazawa (1986) Dominance of complex-type α -amylase secreted in rice seedling grown in high temperature regime. manuscript in preparation (to be submitted to Plant Physiol.)