

報告番号

※ 甲 第 1817 号

# 主論文の要旨

題名

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

氏名 三ツ井 敏明

# 主論文の要旨

報告番号

※甲第

号

氏名

三ッ井敏明

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、生化学の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  $\alpha$ -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した。得られた成果を以下に示す。

【1】発芽イネ種子胚盤上皮細胞から分泌される  $\alpha$ -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- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase H (Endo- $\beta$ -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- $\beta$ -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  $\alpha$ -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成し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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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、「 $\alpha$ -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 Golgi 体の顕著な膨化が観察され、それとともに  $\alpha$ -amylase の細胞外への分泌が抑制された。つづいて、R型、S型  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amylase の生成が Golgi 体で行われていることを示唆しており、 $\alpha$ -amylase 分子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が推察された。

【3】胚盤上皮細胞における  $\alpha$ -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。  $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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、 $[Ca^{2+}+Mg^{2+}]$ -ATPase による  $Ca^{2+}$  の細胞外への放出が  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 ( $40^{\circ}C$ - $42^{\circ}C$ ) にさらすと、 $\alpha$ -amylase 分子の生合成は急激に減少するけれども、細胞内輸送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、 $\alpha$ -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 $\alpha$ -amylase 分子の分泌に及ぼす温度の効果を検討した結果、10mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下、温度条件を  $40^{\circ}\text{C}$  以上にすると R型酵素分子だけが分泌され、一方  $15^{\circ}\text{C}$  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。

上記の研究成果から、発芽イネ種子胚盤上皮細胞における $\alpha$ -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  $\text{Ca}^{2+}$  濃度" や "温度" 環境によって制御され、R型、S型  $\alpha$ -amylase の分泌が調節されていることが示唆された。