

β-結合型糖鎖の構造と生理活性との相関

— β-(1,3) 及び (1,4) グリカンの生物における役割 —

三島 隆*・寺西克倫*・山田哲也**・臼井英夫***・久松 眞*

三重大学生物資源学部

*名城大学農学部

**三重大学教育学部

Correlation of Structures with Physiological Activity of β-linked Glycan —Rule of β-(1,3) and (1,4) glycan in life—

Takashi MISHIMA*, Katsunori TERANISHI*, Tetsuya YAMADA**,
Hideo USUI*** and Makoto HISAMATSU*,

*Faculty of Bioresources, Mie University

**Faculty of Agriculture, Meijo University

***Faculty of Education, Mie University

Abstract

Glycans are essential for food, clothing, and human life. Study was made of the correlation of physiological activity (antitumor activity of animal cells, elicitor activity of plant cells) and symbiosis with plant and *Leguminous bacteria*, and adhesion between glycans that exists in plant and microorganism cell walls.

Key Words : β-glycan • signal • recognition • adhesion

はじめに

植物は光エネルギーと水、そして二酸化炭素という無機物から光合成により、グルコースという有機物を作り出す。グルコース同士は化学的に繋がれ、植物の骨格を形成するセルロースと呼ばれる構造的に強固で長鎖の分子を作り出す。またその繋げ方を変えることにより、エネルギーを貯蔵する非常に大きな分子であるデンプンも

作り上げる。デンプンは、動物体内でいったんグルコースに分解され、再度動物性デンプンであるグリコーゲンに作り換えられる。そして必要に応じてグリコーゲンは動物体内で再度グルコースに分解され、さらに各組織の中でエネルギーと水と二酸化炭素に分解され、エネルギーが利用される。一部のグルコースは脂肪酸に作り換えられたり、窒素化合物と反応することによりアミノ酸に作り換えられたりもする。人は植物の作り出すデンプンを

平成12年2月10日受理

*514-8507 津市上浜町1515

**468-8502 名古屋市天白区塩釜口一丁目501

***514-8507 津市上浜町1515

食するだけでなく、セルロース自体を衣服に仕立てて身に付けたり、セルロースから成る木材を利用して住居を作り上げる。さらにはデンプンから成る穀物を家畜に与え、家畜からタンパク質や脂質を得ている。つまり糖鎖は衣・食・住すべてに関連する、いわば生活必需品であると言える(図1)。

糖鎖は一般に炭水化物と言われるように、多くの化合物が $C_n(H_2O)_m$ で表すことが出来る物質の総称である。しかし一概に糖鎖といっても、単糖の種類は非常に多く、また単糖同士の結合も他の分子と比べると結合部位が多く存在する。例えば、グルコースの分子式は $C_6H_{12}O_6$ であるが、 $C_6H_{12}O_6$ から成る単糖は、その分子中に存在する4個の光学活性中心のために、D, L-(+, -)-グルコース、D, L-(+, -)-マンノース、D, L-(+, -)-ガラクトース、そしてD, L-(+, -)-グルコースの計16の光学異性体が存在する。さらにその光学異性体同士が2つ結合した二糖類については、アノマー位における α と β 結合、そしてそれらに対応して結合する部位が $C_6H_{12}O_6$ 当たり5カ所存在するために、 $C_{12}H_{22}O_{11}$ 分子から成る二糖類の組み合わせだけで幾通りもの組み合わせが存在することになる。

単糖は植物により生産され、繋がることにより糖鎖となる。デンプンや細胞壁はどちらも植物細胞が作り出す糖鎖であり、デンプンは α -(1,4)および α -(1,6)結合からなるグルコースのみから構成される分子構造である(図2)。植物細胞壁構成多糖として知られている

ものは、セルロース、ヘミセルロース、そしてペクチンの大きく3つに分けることが出来る。このうち、セルロースもデンプンと同じようにグルコースのみから構成されているが、その結合様式は β -(1,4)型で直鎖状高分子である。ヘミセルロース成分の主な構成成分の一つであるキシログルカンには、セルロースと同じ β -(1,4)結合からなる主鎖部分にキシロース、ガラクトース、フコース等の側鎖が結合した構造である。ペクチンについては、現在ではラムノガラクトツロン酸といわれる α -(1,4)結合したガラクトツロン酸主鎖部に側鎖が結合した構造から成る。

このように、非常に種類に富んだ組み合わせを有する糖鎖であるが、近年特に生理活性を示す糖質についての研究が進んでおり、世間でもその効果について興味を持たれるようになってきた。例えば、酵母やキノコに含まれている「 β -グルカン」は癌に効くとか、「オリゴ糖」は善玉腸内細菌を育てるから良いとか、食物繊維は体内の不要物を外に持ち去るなど、テレビ番組やCM、雑誌等によく取り上げられるようになった。糖鎖の示す生理活性についてその現象が明らかにされつつあり、また分子構造の解析についても進んでいる。ところがその作用機構についてはまだ不明な部分が多い。そこで本報告では生理活性と作用機構との関係を解明すべく、糖鎖の中でもメジャーな部類に入る β -(1,3)および β -(1,4)グリカンに分類される糖鎖が動物や植物細胞、微生物に対して示す生理活性と、それらの分子の構造的な特徴から生じる糖鎖間に

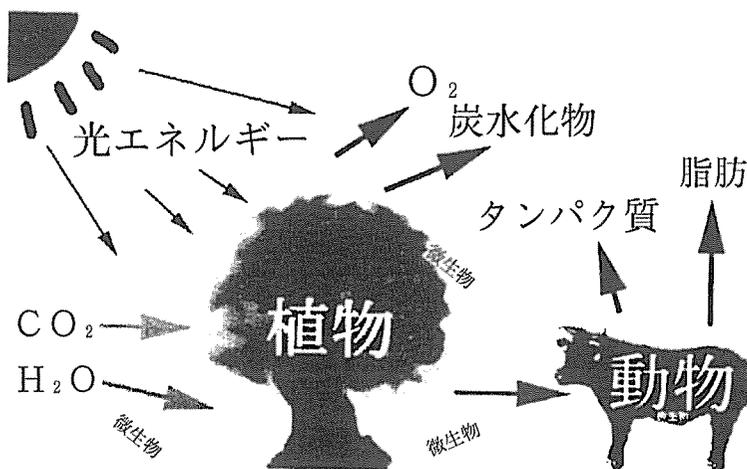


Fig. 1 Cycle of inorganic to organic elements on earth.

存在する吸着現象との関係について考察する。

β-(1,3) グリカン

β-(1,3) グリカンは、酵母やキノコ等の糸状菌の細胞壁を主に構成する多糖である。古来から和漢薬として用いられている靈芝 (*Ganoderma lucidum*) は、その効能として強壯、強心、解熱、鎮静、利尿、制汗、健胃、整腸、健脳、血圧降下、肝炎等様々な症状に対して

薬効があるといわれているが、特に癌や脳卒中、心臓病という生活習慣病に対して卓越した効果があるとして珍重されていた。近年になり、制ガン作用等に効果がある成分の正体がβ-(1,3) グリカンであることが判明し、その中の3種が医薬品として実用化されている¹⁾。体内に入ったβ-(1,3) グリカンはヘルパーT細胞の活性化²⁾、胸腺依存耐性免疫反応の増強³⁾、局所細胞生反応

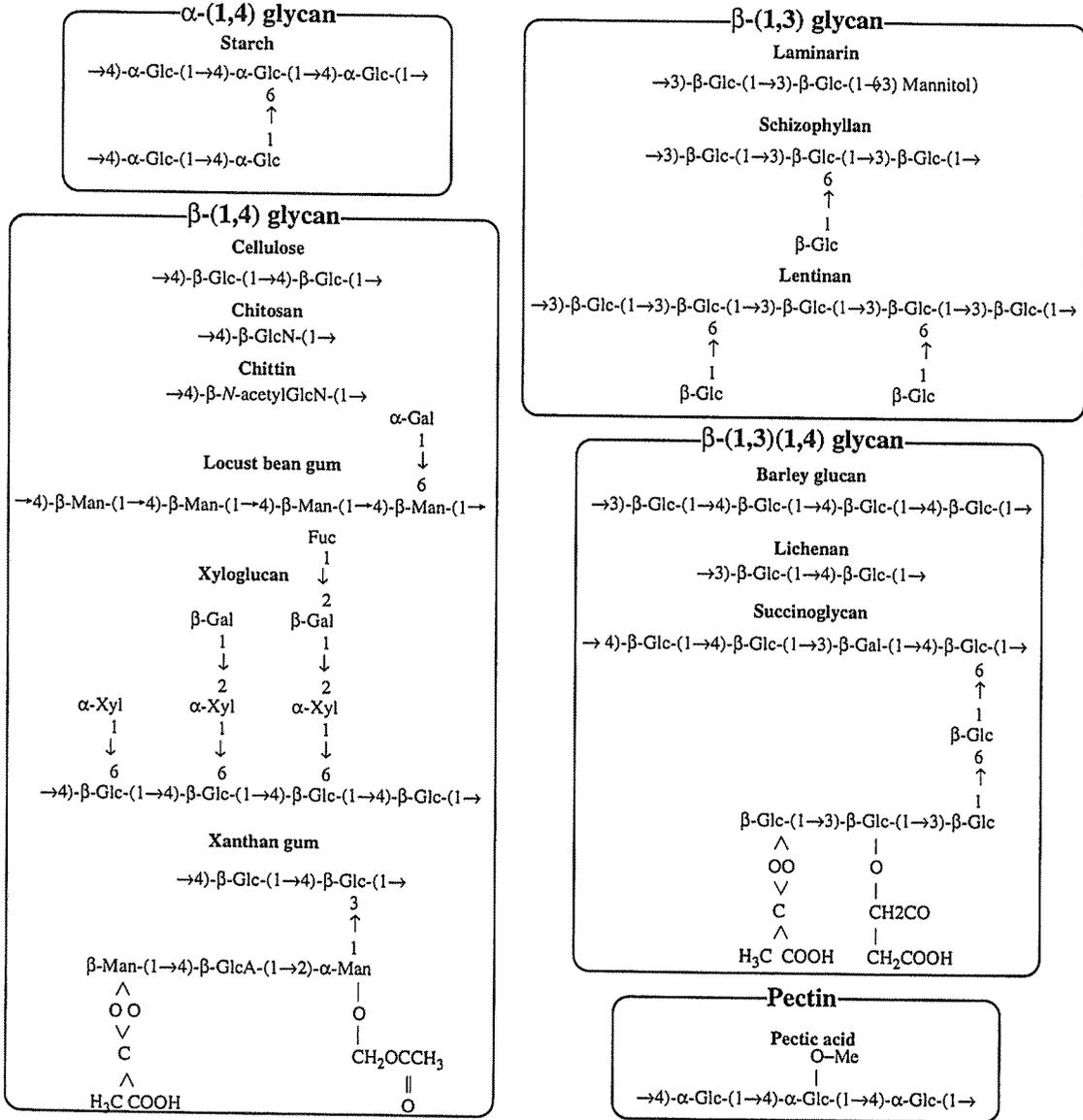


Fig. 2 Structures of polysaccharides.

活性化^{4, 5)}, 抗補体作用⁶⁾, 血清タンパク質成分の特異的増量^{7, 8)}, 抗 HIV 活性⁹⁾ 等, 様々な性質を有す。

β -(1,3) グリカンの中にも, シゾフィラン¹⁰⁾ やレンチナン^{11, 12)} のように抗腫瘍性を示すものと, ラミナリンのように示さないものが存在する。活性の有無については, それぞれの分子が高次構造, すなわち三重らせん構造との相関性が示唆されている^{12, 13)}。ちなみに, β -(1,3) グリカンは主鎖部にある β -(1,3) 結合以外に側鎖として β -(1,6) 結合したグルコースを有すものが多い。シゾフィランやレンチナンも β -(1,6) 結合したグルコースを有し, 重量平均分子量が数十万から数百万であることが知られている。それらの多糖をアルカリ溶液やジメチルスルフォキシドに溶かすことにより秩序ある構造である三重らせん構造はほどけ, 秩序ない構造であるランダムコイルとなる^{14, 15)}。そして一度ランダムコイルになった β -(1,3) グリカンは, もとの三重らせん構造に完全に戻ることは出来ない^{15, 16)}。しかし, 完全に戻ることは出来なくとも多くの部分で三重らせん構造を再構築する。つまり, 三重らせん-ランダムコイルの移行は完全な可逆性とは言えないが, 部分的に見れば可逆的である。

医薬品の場合, 抗腫瘍性のある β -(1,3) グリカンは非常に水に溶けにくいので, 注射液等に溶かすことが難しい。そこで β -(1,3) グリカンを低分子化したり, 官能基を導入することにより, より水に溶けやすい性質を持たせた場合の抗腫瘍性について検討されている。その

結果, 低分子や官能基導入に伴う三重らせん構造の崩壊がない限り生理活性が維持されることが, また再度三重らせん構造を構築したのものにも活性が見られることが知られている^{17, 18, 19)}。このことは三重らせんという高次構造に由来する分子の表面構造が免疫を司る細胞群に認識され, 免疫賦活化による抗腫瘍性が引き起こされることを示す。

高次構造を認識する例として, 酵母プロトプラスト再生の事例を挙げる事が出来る。酵母は細胞壁に β -(1,3) グルカン等を有す。プロトプラストは細胞壁を酵素的に取り去った状態の細胞であるが, その形態は細胞融合やエレクトロポレーション等による細胞工学や遺伝子工学にとって重要な役割を果たす。それらの処理が行われたあとに速やかな細胞壁再生及び細胞分裂が行われる必要があるが, 酵母の場合数万から数十万のプロトプラスト中の1個程度しか再生しない(表1)²⁰⁾。ところが, プロトプラスト再生培地中に β -(1,3) グルカンを添加することにより, 再生率が1200倍も上昇する^{21, 22)}。この作用は β -(1,3) グリカンは酵母プロトプラスト表面に対して吸着するために起こると考えられる。三量体の β -(1,3) グリカンはプロトプラストに対して再生率上昇効果を示すが, 一量体の β -(1,3) グルカンでは効果が現れなかった。同様に, 三量体の水溶性 β -(1,3) グルカンは酵母細胞壁を構成する水不溶性 β -(1,3) グルカンに対して *in vitro* で吸着するが, 一量体は吸着しな

Table 1 Correlation of Molecular Weight of Hydrolyzed Schizophyllan and Division of *Saccharomyces cerevisiae* Protoplast

Weight average molecular weight		Frequency of regeneration	Adhesion amount (μ g)
(in water)	(in DMSO)		
542000	187000	1200	630
90000	32100	1400	580
63600	23400	710	410
31300	11200	240	280
4100	4000	2	140

$$* : \text{Frequency of regeneration} = \frac{[\text{the number of colonies on plate by treatment}]}{[\text{the number of colonies on 0.8M KCl}]} \times 100 (\%)$$

** : Adhesion amount adhered to yeast glucan (50mg) was measured from the difference between the amount applied (1000 μ g of sample) and the amount not bound

い(表1)²⁰⁾。この点に関して詳細に調べるため、シゾフィランの低分子化物の酵母グルカンに対する吸着性および立体構造について検討した。重量平均分子量が約30,000以上のシゾフィランは $2\theta = 6^\circ$ 付近にピークが見られたが、それ以下では見られなかったことから(図3)、シゾフィランの立体構造再構築には重量平均分子量が約30,000以上必要であった。また三重らせん構造を組めない程度まで低分子化したシゾフィランは、酵母グルカンに対して吸着能が見られなかった(表1)。以上のことから、β-(1,3)グリカンが酵母プロトプラスト表層に吸着する条件と、吸着によるプロトプラスト再生率上昇との相関が推察された。

β-(1,3)グルカンの吸着現象について、シゾフィランと酵母グルカンの場合以外に、シゾフィランとセルロース間にも存在する。このときシゾフィランの三重らせん構造も影響するが、同様にセルロースの結晶系の違いも影響することがわかった。植物細胞壁中に含まれるセルロースの結晶系はI型で、マイクロフィブリルを形成するときに還元末端が一定方向にそろったパラレル配向をしているが、セルロースIを4N以上の強アルカリ溶液にて処理することにより隣り合ったセルロース分子の還元末端が逆方向を向いたアンチパラレル構造となるセルロースIIとなる(図4)。

シゾフィランはセルロースIに対しては吸着性を示すが、セルロースIIに対しては示さない。このことは、セルロースを分解する酵素であるセルラーゼがセルロースの結晶系を認識し、セルロースに吸着する性質を示すセルロースバインディングドメイン(CBD)の吸着機構と類似した吸着機構を示すものかもしれない(図5)。CBDはその構造の中に水素結合や疎水結合を引き起こすことが可能なアミノ酸であるプロリンやスレオニン、アスパラギンが存在し、それらがマイクロフィブリル中の3本程度のセルロース分子を認識して結合すると考えられている^{23,24)}。またセルロースIIよりもセルロースIの分解性が高いことが知られている²⁵⁾が、この現象はCBDがセルロースIIを認識できないためにセルロースに対してセルラーゼが吸着できず、そのために分解性の低下が起こったと想像される。β-(1,3)グリカンのセルロースへの吸着についても、何本かのセルロース分子を認識するためにセルロースIとセルロースIIでは吸着できるかできないかの違いが生まれたのではないかと考

えられる。

β-(1,3)グリカンオリゴ糖に関しては次のような植物の生理活性に関する報告がある。それはβ-(1,3)グリカンに植物の外敵からの防御反応の一つであるエリシター活性を引き起こすというものである。β-(1,3)グリカンの一種であるラミナリンは褐藻(*Eisenia bicyclis*)由来の多糖であるが、この多糖のオリゴ糖はアルファルファ子葉やインゲン子葉に処理することで処理することによりエリシター物質であるメディカルピンやキーピトン誘導する²⁶⁾。この活性を発現する時のラミナリンオリゴ糖の最小単位は3糖(LN-3)で(図6)、高次構造を作ることは出来ない。もちろんセルロースに対する吸着性はないと考えられるが、エリシター活性を引き起こすいわばシグナル物質である。キトオリゴ糖も同様に、エリシター活性を引き起こすシグナル物質であるが、こちらはセルロース吸着性を有す。そこで、多糖がエリシター活性を引き起こすかを検討すべく、エンドウ幼芽に対して様々な糖鎖を処理した後のエリシター物質生産性について検討した。ピサチンはエンドウが産する代表的なファイトアレキシンで、図7における逆相クロマトグラフィー条件において、保持時間約24分で溶出してくる。この実験ではあらかじめ多糖溶液を加えてインキュベートした2時間後にCuCl₂にてエリシター活性を誘導した。実際にはピサチンの生成はコントロールにおいても見られなかったが、β-(1,3)グリカン処理区分では明らかに全体的なピーク強度の減少が見られた。各ピークは細胞内の構成成分の一部を示すと考えられるが、上記のことはβ-(1,3)グリカンがエリシター活性を抑えるサプレッサーの様な効果を示すことが想像された。β-(1,3)(1,4)グリカンにおいては、未処理区より全体のピーク強度の上昇が見られた。このことはサプレッサー的な効果が見られないだけでなく、エリシターを誘導する可能性を示唆するものと思われる。β-(1,4)グリカンにおいては、β-(1,3)(1,4)グリカンと同様にピーク強度の上昇が見られたが、キサンタンガムについてはピーク強度の減少が見られた。キサンタンガムは植物病原菌*Xanthomonas campestris*の作り出す菌体外多糖であるが、この現象は実際の感染時にキサンタンガムがサプレッサー様効果を示す可能性を示唆する。キトサンは酸性溶媒に可溶であるが、中性溶液には不溶であるので図7中には示さなかったが、酸性溶媒下

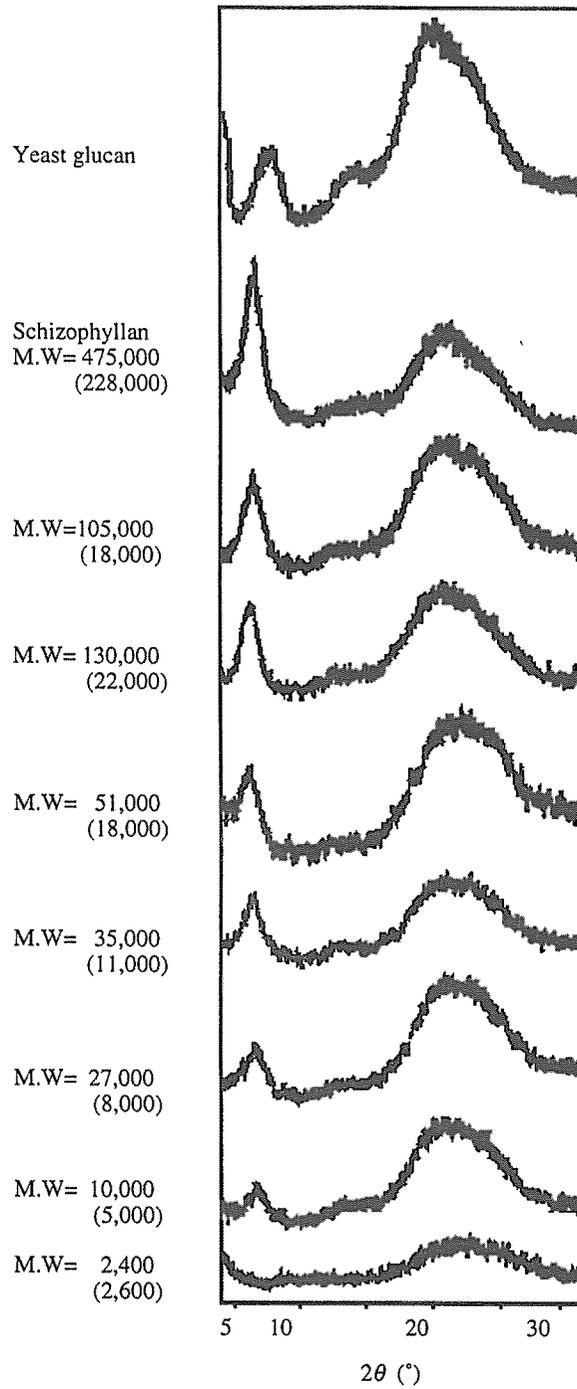


Fig. 3 X-ray diffraction patterns of yeast glucan, schizophyllan, and its derivatives. Schizophyllan derivatives were prepared by previous report²¹⁾.

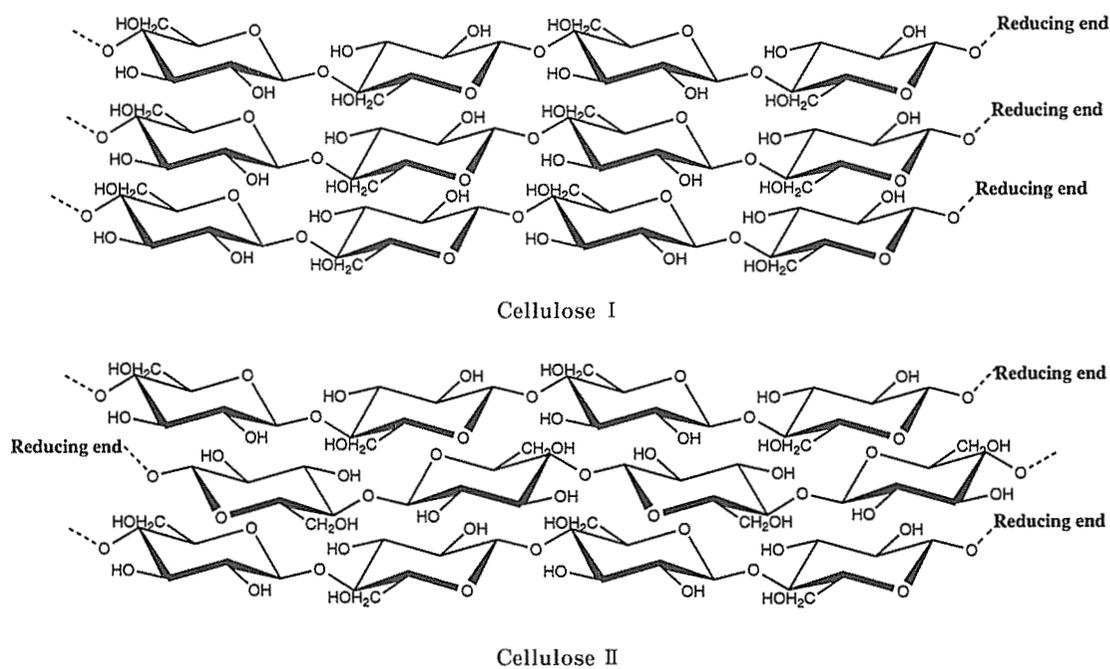


Fig. 4 Conformation of cellulose I and II.

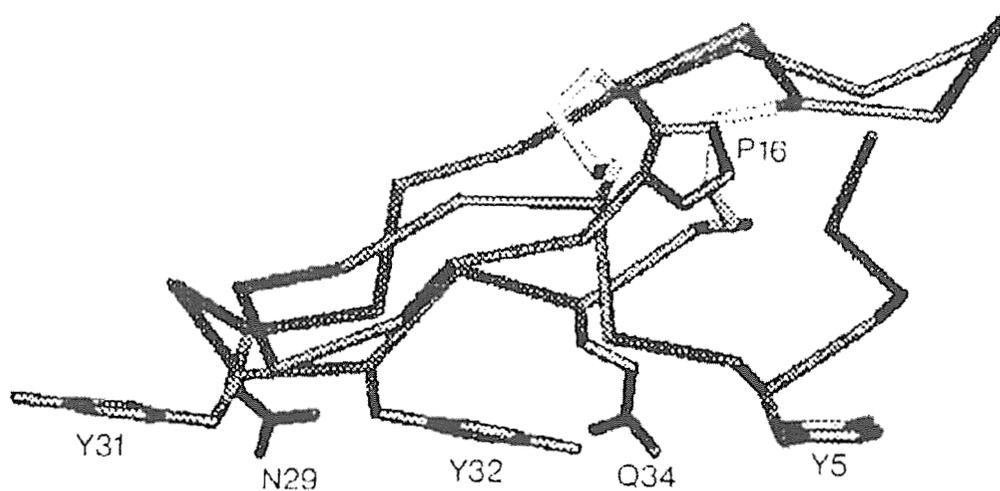


Fig. 5 α -carbontrace of cellulose-binding domain of *Tricoderma reesei*.
Position of tyrosine5, 31 and 32 is important to combine.
(M., Linder *et al.*, Protein Sci. 4 : 1056-1064 (1995))

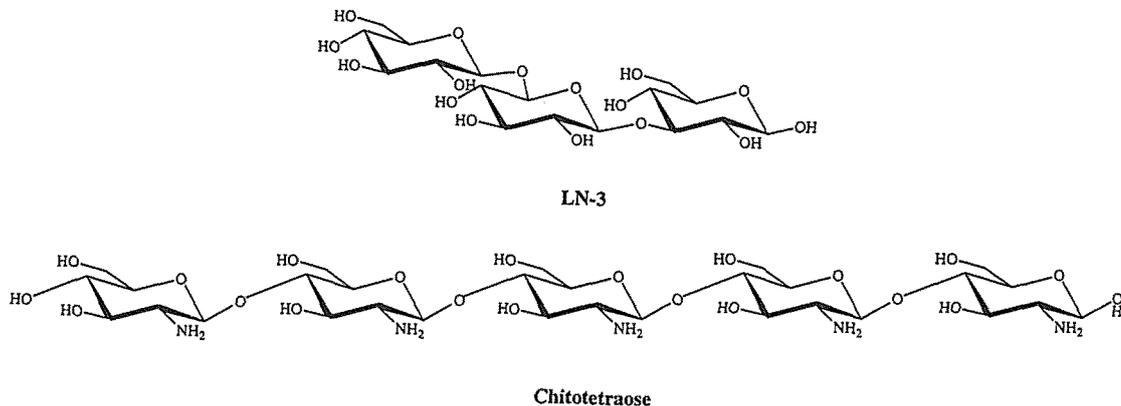


Fig. 6 Structure of oligosaccharide showing elicitor activity.

で上記実験を行ったところ、幼芽自体が褐変化した。エリクター活性は上昇していると思われる。

植物細胞は、ある条件下で β -(1,3) グリカンを作り出すことが知られている。それは、細胞分裂時に最後に細胞質を分断する細胞板²⁷⁾や、植物病原菌に細胞が侵された場合に作り出されるパピラや、セルラーゼ等により人工的に細胞壁を取り去った状態であるプロトプラストが再び細胞壁を再生される時²⁸⁾に初期に再生してくる細胞壁中に含まれる細胞壁多糖である。どれも β -(1,3) グルカンが多く含まれ、 β -(1,4) グルカンはあまり含まれない。また、植物細胞壁合成についての研究から、植物細胞壁合成酵素の単離が試みられているが、単離された酵素に対して基質を与えてもセルロースは合成されず、かわりに β -(1,3) グルカンが合成される。この現象は、酵素の立体構造の変化によるものであると推察されているが、セルロースと β -(1,3) グルカンとの関連から見てみると非常に興味深い現象である。

以上のように、 β -(1,3) グリカンに特有の高次構造である三重らせん構造が抗腫瘍活性等に関連があり、またセルロースに対する吸着性と高次構造との相関性が見られたことから、両者間に存在する吸着メカニズムの中に生物における分子認識のヒントがあるのではないかと推察される。

β -(1,4) グリカン

セルロースに代表される β -(1,4) グリカンは、その

強固な分子構造から、植物細胞の骨格の役割を担う細胞壁に多く存在する。セルロースは側鎖や官能基を有さない直鎖状の高分子で、40本程度の分子が集まることによりマイクロフィブリルという構造体を形成する。細胞壁はマイクロフィブリルに加え、ヘミセルロース、ペクチンから成る一次細胞壁と、さらに細胞内側から壁内側に作られるリグニン等から成る分厚い二次細胞壁より構成されている。しかし、植物細胞が伸長成長するために成長点付近ではほぼ一次細胞壁のみから構成される。

植物細胞が伸長成長するとき、細胞の周りを囲む細胞壁は伸長を阻害する。そこで、成長点付近の細胞ではセルロースの量が少なくヘミセルロースの量が多い。伸長時に細胞からはセルラーゼを細胞外に放出し、細胞壁をゆるめることが知られているが、この時、セルラーゼの基質となるのはセルロースマイクロフィブリルではなく、ヘミセルロースである。ヘミセルロースの主な成分であるキシログルカンは、セルロースマイクロフィブリル形成時にセルロースの代わりに混入し、混入した部位はマイクロフィブリル構造がとれない非結晶部分となる(図8)。その部分に対して細胞由来のセルロースが作用し、部分的に細胞壁構造がゆるめられ、伸長成長することができると考えられている。さらにその時の分解産物であるある種のキシログルカンオリゴ糖は、伸長成長を促すホルモンであるオーキシンに対してフィードバック作用を引き起こす²⁹⁾。同様の現象はまた、ペクチンの酵素分解物においても見られる³⁰⁾。細胞壁の伸長は、このフィード

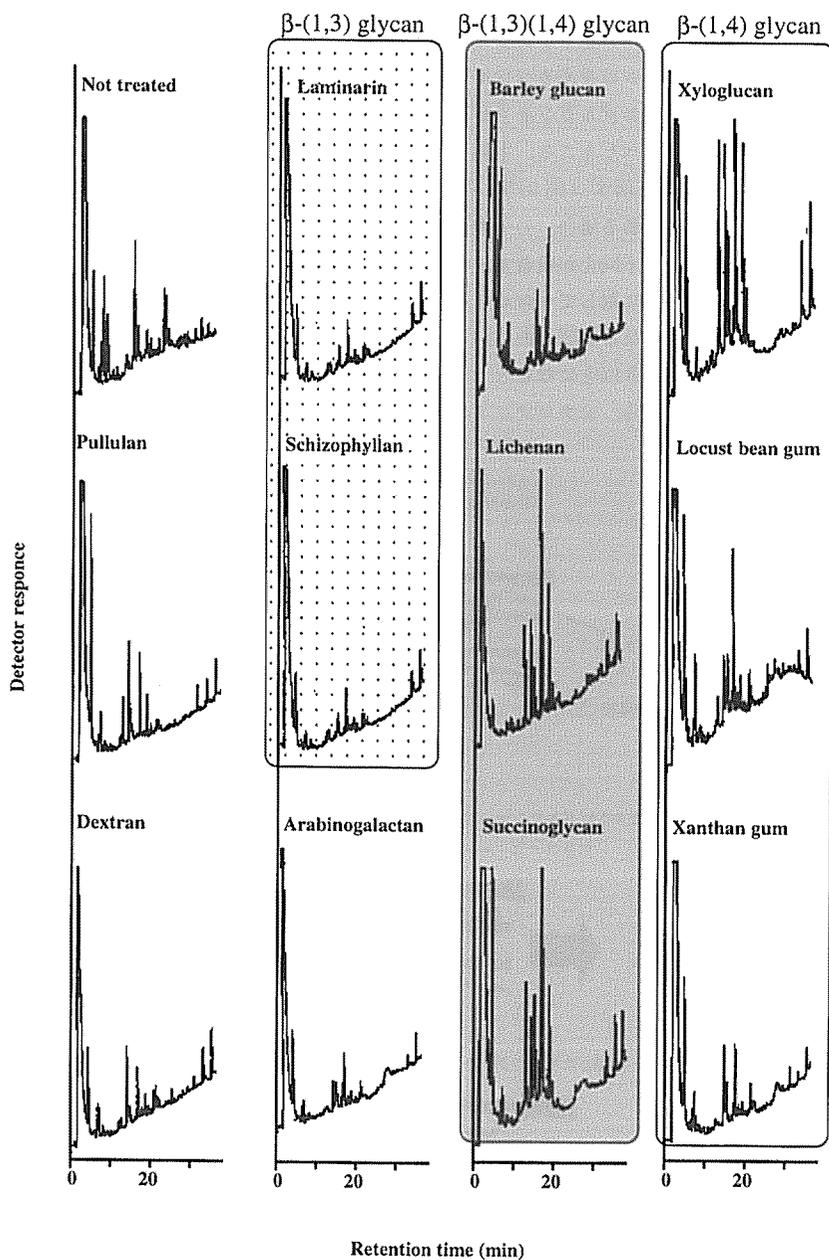


Fig. 7 HPLC profiles of pisatin and other unidentified compounds of accumulated in pea epicotyle sections treated by various polysaccharides for 18h and compounds were extracted by MeOH. 10 μ l compounds were analyzed by reversed phase HPLC system with ODS-80Ts (Tosoh) eluted with 30% MeOH-70% MeOH gradient condition containing 1% acetic acid and detected OD 310nm.

バック作用により制御されていると考えられる。

ここで、細胞壁中に存在するセルロースとキシログルカンとの関係について述べておく。キシログルカンはセルロースに対して吸着性を示し、キシログルカンオリゴ糖のセルロースに対する吸着挙動を調べたところ、主鎖重合度が5以上になると強い吸着性を示す(図9)³¹⁾。セルロースマイクロフィブリルが構成される場合、分子中にある水酸基由来の水素結合により分子同士が吸着すること考えられており、実際セルロースに対してセロオリゴ糖が吸着するには重合度が4以上になる必要がある。キシログルカンの場合も主鎖重合度が5以上になるとセルロースに対して吸着性を示すことから、マイクロフィ

リルを構成するときと同じ機構が働くと考えられる。特にキシログルカンの場合は側鎖を有することから、マイクロフィブリルのように多数の分子が吸着することは物理的に出来ず、その部分は非結晶構造となると考えられている。そのために、キシログルカンはマイクロフィブリル間をつなぐ接着剤として働くと考えられている。セルロース吸着性を示す他の多糖も、マイクロフィブリルに対して吸着する可能性は非常に高く、植物細胞の細胞壁を取り去った状態であるプロトプラストの保護に対しては非常に効果がある³²⁾ ことから

植物病原菌の一種である *Xanthomonas campestris* の作り出す菌体外多糖であるキサントタンガムは、セルロー

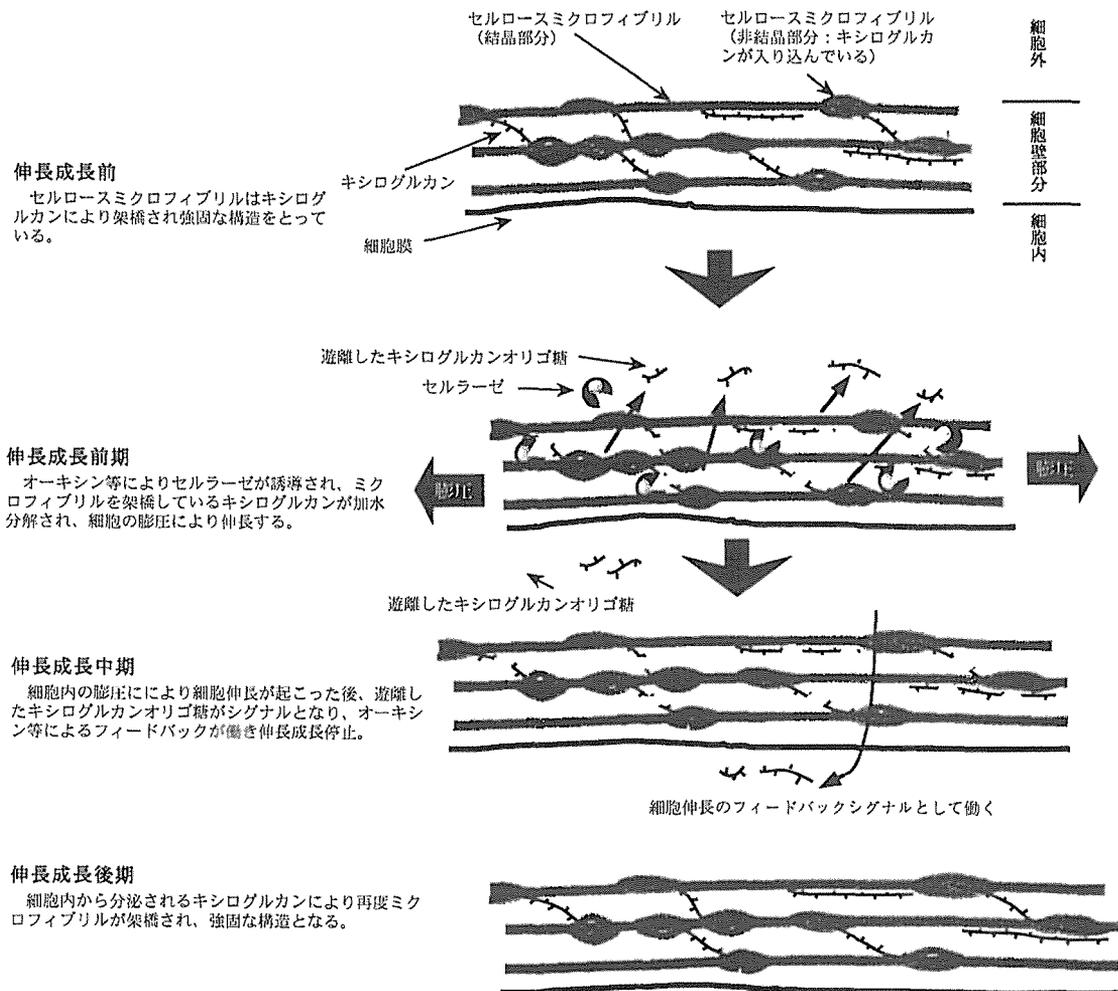


Fig. 8 Models of plant cell elongation.

スと同じβ-(1,4)グリコシド結合を主鎖に有し、側鎖部分にマンノース、グルクロン酸、ピルビン酸、コハク酸という官能基を有す³³⁾。そのため、当初はキシログルカンと同様にセルロースに対して吸着すると予想された。キサナンガムはキシログルカンと同様にβ-(1,4)グ

リコシド結合を主鎖に有すが、実際には吸着しない³³⁾。官能基の存在により阻害されているかを調べるため、官能基を除去した場合の挙動について調べてみると、水への可溶性が極端に減少した(表2)。このことは、官能基を除去することにより主鎖部分のセルロースの性質が

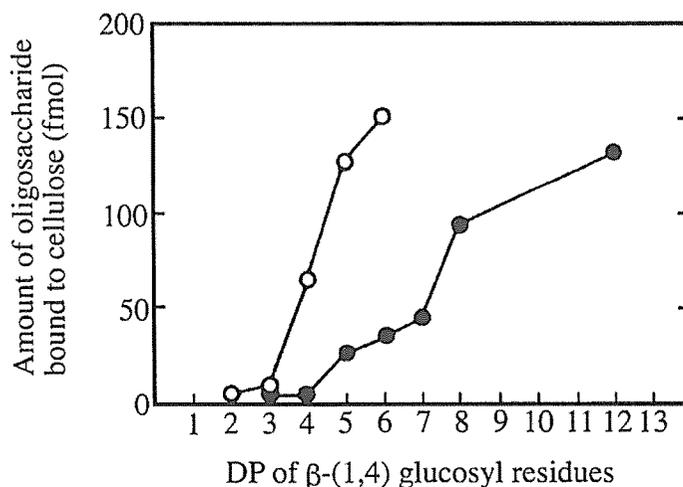


Fig. 9 Effects of the DP of β-(1,4) glycosyl residues on the binding to cellulose of xyloglucan oligosaccharides (●) and cellooligosaccharides (○)³³⁾.

Table 2 Characterization of Modified Xanthangum and Succinoglycan

	Acyl residue volume (μg)	Pyruvate volume (μg)	Glucuronic acid volume (μg/lmg)	Adhesive ratio to Cellulose I (%)
Succinylated schizophyllsan	0.69	N.D.	N.D.	0
Xanthan gum	0.20	0.18	0.36	1
Deacylated xanthan gum	0.40	0.17	N.D.	10
Depyruvate xanthan gum	0.14	0.00	N.D.	0
Deacylated and de pyruvate xanthan gum	0.30	0.00	N.D.	1
Deacylated, depyruvate, and reduced xanthan gum	0.30	0.00	0.18	0
Succinoglycan	0.29	0.20	N.D.	10
Deacylated succinoglycan	0.40	0.12	N.D.	0
Depyruvate succinoglycan	0.10	0.30	N.D.	0
Deacylated and depyruvic acid succinoglycan	0.50	0.30	N.D.	8

Acyl and pyruvate volume is quantity of the residue per 100 glucose moiety×100 (%)
N.D.; Not tested

表れてくるためかもしれない。キサンタンガムはまた β -(1,3)グリカンの示すリンパ球活性化作用を示すことが知られており³⁵⁾、その作用機構については非常に興味のもたれるところである。

次に、構成糖がグルコースではなくマンノースに置き換わった時の吸着性について調べてみた。天然にはマンノース重合体を産する植物も存在する。ローカストビーンガムはイナゴマメ (*Ceratonia siliqua*) から得られるマンナンで、 β -(1,4)マンノシド結合から成る主鎖により構成される。グルコースとマンノースの分子構造の相違は、C-2に結合している水素原子と水酸基との位置が相反するだけで、他の部分については相同である。事実、セルロースに対してローカストビーンガムは吸着し、そのオリゴ糖のセルロースに対する吸着性は主鎖重合度6以上から表れる (図10)³⁶⁾。

植物細胞の伸長時に細胞からセルラーゼが分泌されて

いるが、他にもグリカナーゼが定常的に分泌されていることが知られている。それは β -(1,3)グルカナーゼとキチナーゼである。植物病原菌はその細胞壁に、 β -(1,3)グルカンやキチンを有する。病原菌の感染機構は、まず宿主に対して接触することから始まる。接触後、細胞壁溶解酵素を駆使して植物細胞内に侵入するわけだが、植物側も病原菌の接触を認識すべく、それらの細胞壁を溶解する酵素を定常的に分泌している。各酵素は植物病原菌の細胞壁からオリゴ糖を遊離させ、そのオリゴ糖を植物細胞が認知することにより植物側の防御機構が発現する^{36,37)}。この時の植物側のオリゴ糖認識については、様々な植物病原菌細胞壁の部分分解物が調製され、 β -(1,3)グルカンやキチン、部分的脱アセチル化キチンなどにその活性が見られることが明らかとなっている (図6)³⁸⁾。

植物と微生物の関係は、植物の病気を引き起こす病原

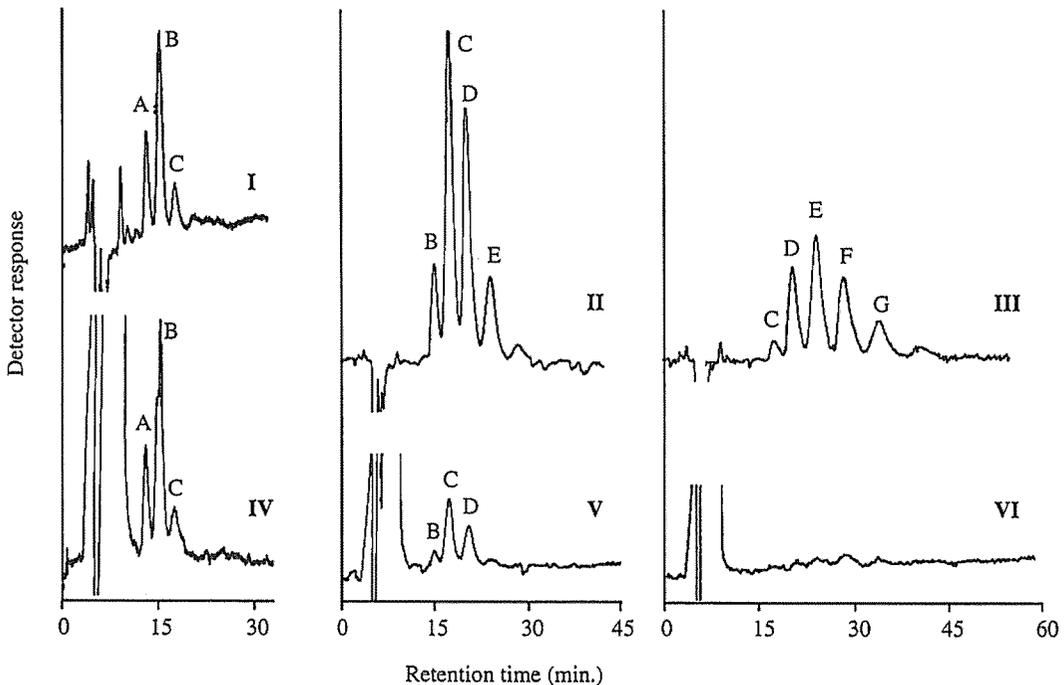


Fig.10 HPLC profiles of locust bean gum oligosaccharides.

Sample was prepared by previous report³⁰⁾. I, II, and III were purified sample number and IV, V, and VI were obtained after through out the cellulose I column by I, II, and III, respectively. The peaks detected in HPLC were marked A to G in order of eluting sequence. Peak E was analyzed by MS, and it is indicated that's DP was 6 (Mainchain DP is 5).

菌だけでなく、根粒菌等の共生生物の存在を忘れてはならない。根粒菌は土壌微生物の一種であるが、マメ科植物の根と共生することにより、空気中の窒素を固定する。この時、植物側としては根粒菌と共生したいのであって、

決して植物病原菌と共生したいわけではない。そこで、ある植物側とそれに対応した根粒菌としかわからない合い言葉を交わし、この合い言葉が成立したときに初めて共生できる(図11)。実際に植物や根粒菌とも言葉を喋

植物病原菌の感染過程

根粒菌の共生過程

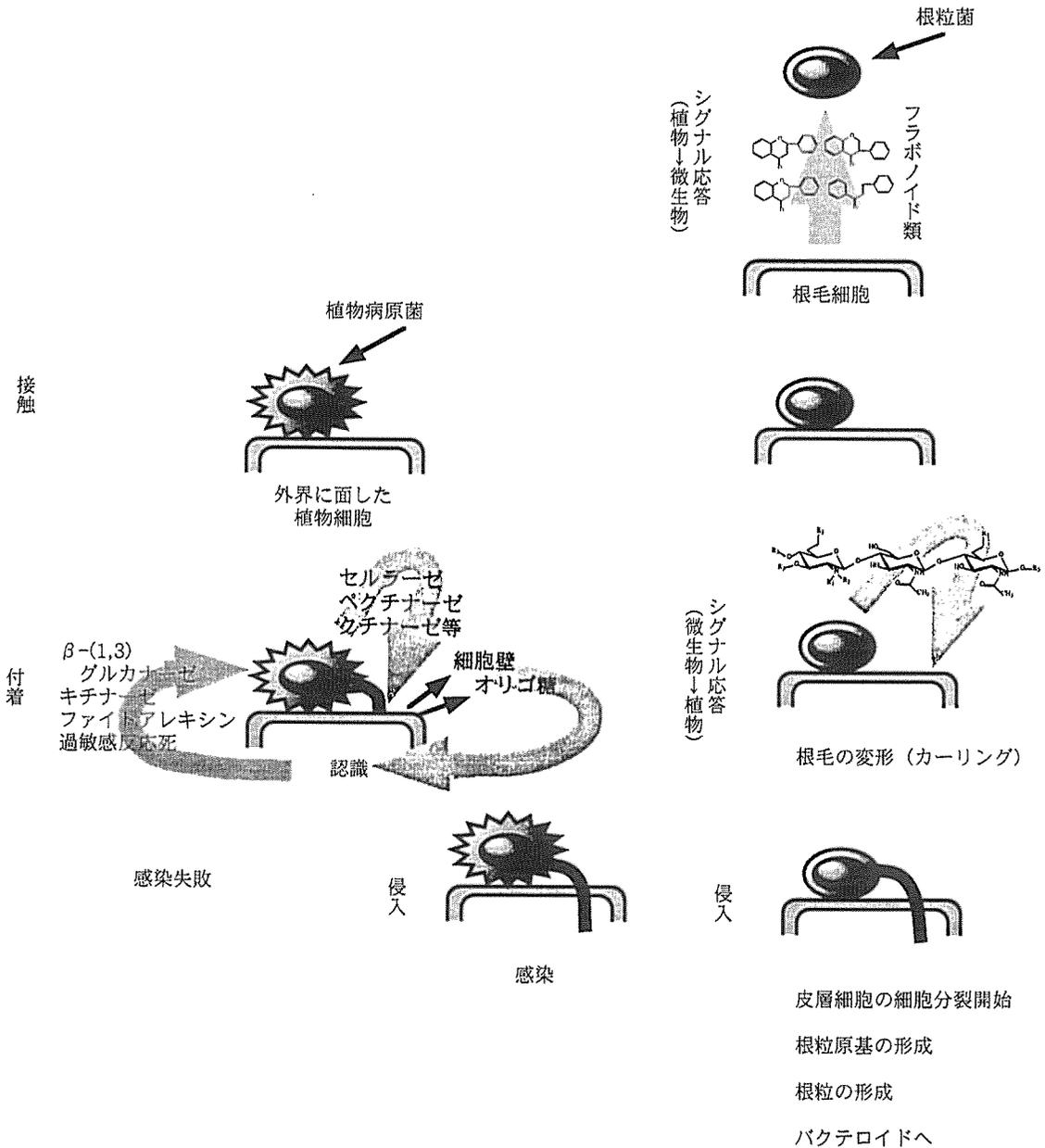


Fig.11 Models of infection and symbiosis of microorganisms to plant.

ることは出来ないので、シグナル物質を互いに認識しあうことになるのであるが、この時に用いられるシグナル物質の一つに部分脱アセチル化されたキチンオリゴ糖の脂肪酸誘導体 (LCOs) が用いられている。その構造は、 β -(1,4) 結合から成るキトオリゴ糖に対して種特異的な脂肪酸、アセチル基等の官能基が結合した構造を有し、それぞれ共生する植物種が異なる (表 3)³⁹⁾。官能基は根粒菌の種によって異なり、官能基を化学的に改変することにより感染能が失われる⁴⁰⁾。つまり植物側に種特異的な官能基に対するレセプターが存在することを示す。LCOs はまたエリシター物質としての性質も示す⁴¹⁾。このことは、キトオリゴ糖が示すエリシター活性を引き起こすことの裏付けともなり、またエリシター物質のレセプターであるキトオリゴ糖レセプターがアセチル基等の官能基により阻害されない、官能基の脱離等が起こっている、もしくは LCOs レセプターとエリシターレセプ

ターが同一レセプターであることが想像される。

キチン、キトサンは節足動物門の外骨格や微生物細胞壁を構成する成分の一つである。それぞれ N-アセチルグルコサミン、グルコサミンが β -(1,4) 結合により重合した構造から成り、キチンは不溶性、キトサンは酸性溶液に対し可溶性を示す。セルロースとの違いはそれぞれ 2 位に存在する N-アセチルアミノ基もしくはアミノ基が存在する点である。キチンとキシログルカンの間には吸着が見られるが、このことはキチンの 2 位に存在するアミド基が吸着を阻害するものでないか、阻害作用が吸着現象と比べ相対的に小さいためと考えられる。キトサンにおいても酸性溶液に溶かした場合にセルロースに対して吸着性を示す。またキトサンのオリゴ糖は重合度 4 以上になると強い吸着性を示す (図 12)。

キトサンのオリゴ糖に関しては、先に述べたように根粒菌と植物の共生時にシグナル物質として使われている

Table 3 Structure of lipopolysaccharides initiated root nodule

Species	R1	R2	R3	R4	R5	n
<i>R. meliloti</i>	-H	-C16 : 2 (2, 9) -C16 : 3 (2, 4, 9)	-COCH ₃ (O-6) -H	-SO ₃ H	-H	1, 2, 3
<i>R. l. bv. viciae</i>	-H	-C18 : 4 (2, 4, 6, 11) -C18 : 1 (11)	-COCH ₃ (O-6)	-H -COCH ₃	-H	2, 3
<i>B. japonicum</i>	-H	-C18 : 1 (9) -C18 : 1 (9, Me) -C16 : 1 (9) -C16 : 0	-COCH ₃ (O-6) -H	MGO	-H	3
<i>B. elkanii</i>	-H Me	-C18 : 1	-COCH ₃ (O-6) -H CB (O-3, O4, O6)	MGO Fucosyl group	-H GRO	2, 3
<i>R. sp. NGR 234</i>	-H	-C18 : 1 -C16 : 0	CB (O-3/O-3, O-4) -H	Sulfated MGO Acetylatd Mgo	-H -H	3 2, 3
<i>A. caulinodans</i>	Me	-C18 : 1 -C18 : 0	CB (O-6) -H	D-Arabinosyl -H		
<i>R. fredii</i>	-H	-C18 : 1	-H	Fucosyl group MGO	-H	1, 2, 3
<i>R. tropici</i>	Me	-C18 : 1	-H	-SO ₃ H	D-Mannosyl -H	3

n : DP of backbone N-acetylglucosamine

R1-R5 : Residue touched mainchain

R2 : Touched Fatty acid (Location of unsaturated bond)

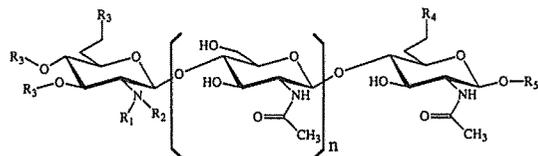
R3 : Touched residue

(O-n) suggested location for N-acetylglucosamine

CB : Carbamyl group

GRO : glyceryl group

MGO : 2-O-Methylfucosyl group



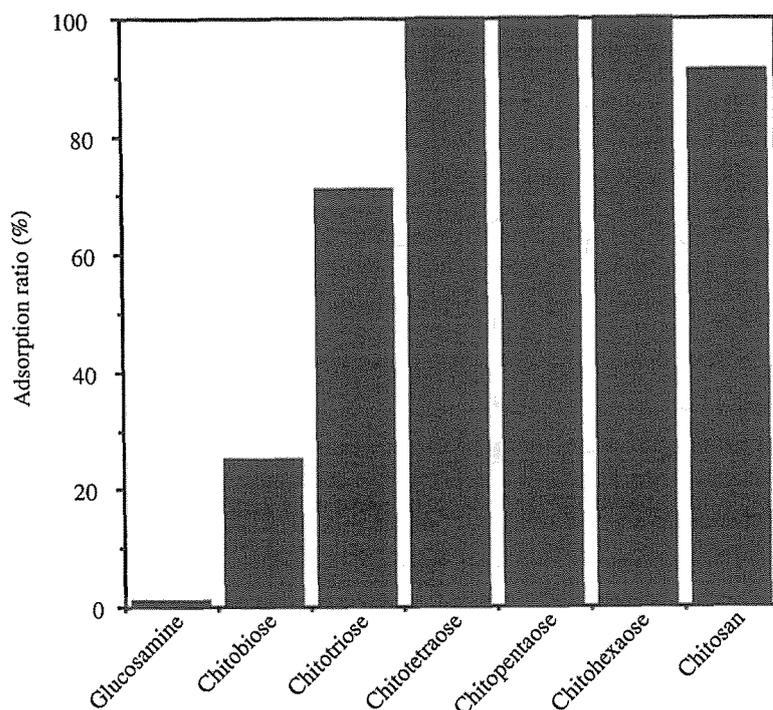


Fig.12 Adhesive properties to cellulose I of chitosan and chitooligosaccharides.

が、その認識部位として官能基が使われていることと、キトサンのセルロースに対する吸着性には植物側に存在すると考えられる LCOs レセプター構造の解析の一助となるのかもしれない。

以上のように、β-(1,4) グリカンに関してはその高分子においては強固な構造が、またオリゴ糖においてはシグナル物質としての働きを有すが、その機構というはどちらも非常に合理的に組み合わせられていると考えられる。

β-(1,3) (1,4) グリカン

根粒菌は菌体外にβ-(1,3), (1,4) グリカンを作り出すことが知られている。このグリカンの構造は主鎖部分がβ-(1,4) 結合のグルコースとβ-(1,3) 結合のガラクトースから成る^{42,43)}が、面白いことにこのグリカンは根粒菌の宿主が異なると生産する多糖の構造の一部が異なる。この事実から、このグリカンも共生を行うに当たり何らかの情報を有する物質なのかも知れない。面白いことに、ほとんど構造の同じグリカンが植物病原菌の一種である *Agrobacterium* が産することが知られている^{44,45)}。*Agrobacterium* がどのようにこのグリカンを

利用しているかはわからないが、構造的にほとんど同じグリカンを作り出すということは感染時に何らかの作用を及ぼすことも想像される。

リケナンはアイスランドゴケ等の地衣類が産する多糖で、酵素分解産物の分析結果からβ-(1,3) 結合とβ-(1,4) 結合の部分が規則的に順番に並んでいる⁴²⁾。パーレイグルカンもβ-(1,3) (1,4) グリカンであるがその存在比は(1,3) 結合:(1,4) 結合=1:3である。どちらの多糖もセルロースに対して吸着性を示す。キシログルカンオリゴ糖やローカストビーンガムオリゴ糖、そしてキチンオリゴ糖において吸着能を示すためにはβ-(1,4) 結合により構成される主鎖の重合度が4~5以上必要であるが、リケナンやパーレイグルカンにおける吸着が認められたことにより、次の2つの吸着機構が推察された。一つは、吸着に必要な主鎖部のβ-(1,4) 結合は連続している必要がない場合、もう一つは途中で存在するβ-(1,3) 結合部分は吸着に際して阻害作用を示さないもしくは促進作用を有すのかもしれない(図13)。

リケナンとパーレイグルカンは、植物において抗ウィ

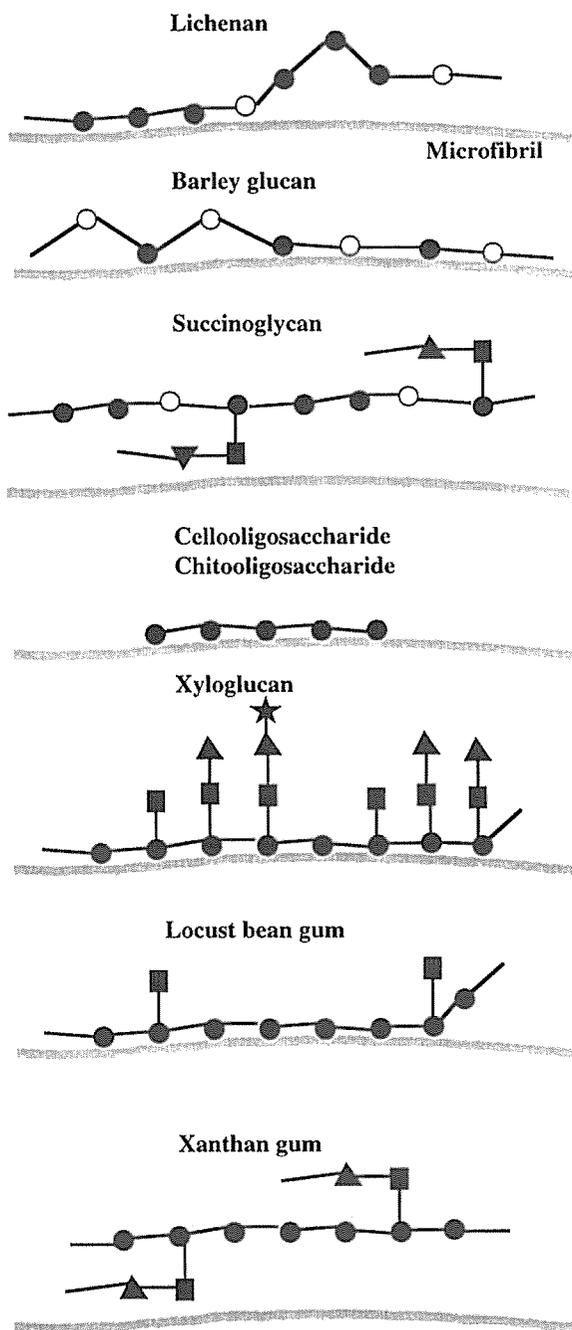


Fig.13 Models of adhesion from β -glycan to cellulose.

● : β - (1, 4) linked monosaccharide.

○ : β - (1, 3) linked monosaccharide.

other characters : other monosaccharides.

ルス活性を示す。タバコ (*Nicotiana tabacum* cv. 'Xanthine') の葉に対してそれぞれの多糖溶液をタバコモザイクウィルス TMV と共に葉の表面へセライトと共に塗ると、感染率がリケナンにおいては 20% まで、バーレイグルカンでは 75% まで減少する⁴⁰⁾。この時、リケナンの重合度の大きさと感染阻害効果にはそれほど大きな差が見られない。このことは植物内性セルラーゼによるオリゴ糖が、ラミナリンオリゴ糖と同様にエリシター活性を発現させている可能性を示唆する。他方、これらの多糖が細胞壁に吸着するという事は、植物細胞の有する病原菌細胞壁誘拐酵素が細胞壁に存在する可能性を示す。多糖吸着により植物細胞にとって病原菌侵入シグナルを早く受け取ることが出来るのかもしれない。

最後に

過去において、糖鎖の高次構造とその生理活性についての報告は、動物においては多糖による抗ガン性等の薬理作用と誘導化における高次構造の変化について推察されている程度であり、植物においては植物病原菌感染の予防等に効果がある等の報告程度で、高次構造との関連が詳細に検討された報告はあまりない。しかし近年になり、それまで生理活性的な生命現象と切り放されて考えられてきた糖鎖についての機能が徐々に明らかになるにつれ、生命現象における糖質の重要性が認識されるようになってきた。現在、糖質についての研究として注目されているのは糖タンパク質や糖脂質であるが、糖鎖同士の吸着現象の仕組みと、今までに知られている生物に対する生理活性との関連があるのではないかという事例が徐々に明らかになり、またその認識機構が糖-レセプターにおける認識と類似している可能性も考えらる。本報をまとめはじめた時点では、糖鎖にまつわる様々な現象を紹介し、最終的にこれらの現象が糖鎖の高次構造に起因した吸着現象と関連があるのではないかと結論づけようと考えていたが、そのための具体的証明は本報をまとめる段階では不十分であった。しかし、動物、植物、そして微生物に対して共通な構造を有す糖鎖が様々な生理活性現象を引き起こすことは非常に興味深い。また、その認識機構の解明により、さらに科学的に面白い現象が見つかるのかもしれない。

和文要約

最近の研究から、糖鎖の関与する生理活性機構が次第に明らかになってきている。本報はβ-(1,3)、β-(1,4)、およびβ-(1,3)(1,4)グリカンに着目し、それらの糖鎖が動物や植物、微生物に対して示す生理活性について、糖鎖の構造および糖鎖の示す吸着性との関連について概説するものである。

謝 辞

本論文をまとめるに当たり、論文掲載についての機会を賜りました大宮邦雄先生に心から感謝いたします。

引用文献

- 1: 小林昭一. 糖質の構造と機能およびその利用. 日本農芸化学会誌, 71 (6) : 617-620 (1997).
- 2: MIZUNO, M., M. MORIMOTO, K. MINATO, and H. TSUCHIDA. Polysaccharides from *Agaricus Blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 62 (3) : 434-437 (1998).
- 3: MAEDA, Y.Y. and G. CHIHARA, The effects of neonatal thymectomy on the antitumor activity of lentinan, carboxymethylpachimaran and zymosan, and their effects on various immune responses, *Int. J. Cancer*, 11 : 153-161 (1973).
- 4: TOKUZEN, R. Comparison of local cellular reaction to tumor grafts in mice treated with some plant polysaccharides, *Cancer Res.*, 31 (11) 1590-1593 (1971).
- 5: TOKUZEN, R. and W. NAKAHARA. Suppression of autochthonous grafts of spontaneous mammary tumor by induced allogenic graft rejection mechanism, *Cancer Res.*, 33 (4) 645-647 (1973).
- 6: OKUDO, T., Y. YOSHIOKA, T. IKEKAWA, G. CHIHARA and K. NISHIOKA. Antitumor activities of lichen polysaccharides, *Nature*, 238 : 102-104 (1972).
- 7: MAEDA, Y. Y., G. CHIHARA and K. ISHIMURA. Unique increase of serum proteins and action of antitumor polysaccharides, *Nature*, 252 (5480) 250-252 (1974).
- 8: 前田幸子, 石村和子, 千原具郎. 抗腫瘍性タンパク質と癌に対する宿主の抵抗. タンパク質核酸酵素, 21 (6) : 425-435 (1976).

- 9 : YOSHIDA, T., Y. YASUDA, T. MIMURA, Y. KANEKO, H. NAKASHIMA, N. YAMAMOTO and T. URYU. Synthesis of curdlan sulfates having inhibitory effects in vitro against AIDS viruses HIV-1 and HIV-2, *Carbohydr. Res.*, **276** : 425-436 (1995).
- 10 : YANAKI, T., W. ITO, K. TABATA, T. KOJIMA, T. NORISUYE, N. TAKANO and H. FUJITA. Correlation between the antitumor activity of a polysaccharide schizophyllan and its triple-helical conformation in dilute aqueous solution, *Biophysical Chem.* **17** : 337-342 (1983).
- 11 : SASAKI, T. and N. TAKASUKA. Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*, *Carbohydr. Res.*, **47** : 99-104 (1976).
- 12 : CHIHARA, G., J. HAMURO, Y.Y. MAEDA, Y. ARAI and F. FUKUOKA. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) sing. (an Edible Mushroom), *Cancer Res.*, **30** : 2776-2781 (1970).
- 13 : OHNO, N., N.N. MIURA, N. CHIBA, Y. ADACHI and T. YADOMAE. Comparison of the immunopharmacological activities of triple and single-helical schizophyllan in mice, *Biol. Pharm. Bull.*, **18** (9) 1242-1247 (1995).
- 14 : KITAMURA, S. and T. KUGE. A differential scanning calorimetric study of the conformational transitions of schizophyllan in mixtures of water and dimethylsulfoxide, *Biopolymers*, **28** : 639-654 (1989).
- 15 : KITAMURA, S., T. HIRANO, K. TAKEO, H. FUKADA, K. TAKAHASHI, B.T. FALCH and B.T. STOKKE. Conformational transitions of schizophyllan in aqueous alkaline solution, *Biopolymers*, **39** : 407-416 (1996).
- 16 : SATO, T., T. NORISUYE and H. FUJITA. Melting behavior of *Schizophyllum commune* polysaccharides in mixtures of water and dimethylsulfoxide, *Carbohydr. Res.*, **95** : 195-204 (1981).
- 17 : TABATA, K., W. ITO and T. KOJIMA. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* fries, *Carbohydr. Res.*, **89** : 121-135 (1981).
- 18 : WILLIAMS, D.L., H.A. PRETUS, R.B. MCNAMEE, E.L. JONES, H.E. ENSLEY and I. WILLIAMBROWDER. Development of a water-soluble, sulfated (1→3)- β -D-glucan biological response modifier derived from *Saccharomyces cerevisiae*, *Carbohydr. Res.*, **235** : 247-257 (1992).
- 19 : KIHO, T., M. MATSUSHITA, S. USUI and S. UKAI. Biological activities of (1→3)- β -D-glucans with reducing glucose side chains, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62** (3) : 270-272 (1998).
- 20 : HISAMATSU, M., Y. MIYAMOTO, S. KOSEKO, T. HAYANO, T. YAMADA, K. NAKASHIMA, W. ITOH and K. TABATA. Effects of schizophyllan on regeneration of protoplast cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57** (3) : 484-485 (1993).
- 21 : HISAMATSU, M., T. HAYANO, T. MISHIMA, K. TELANISHI and T. YAMADA. Effects of degraded schizophyllans on regeneration of protoplast cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59** (12) : 2307-2308 (1995).
- 22 : HISAMATSU, M., T. MISHIMA, K. TERANISHI and T. YAMADA. The correlation between adhesion of schizophyllan to yeast glucan and its effect on regeneration of yeast protoplast, *Carbohydr. Res.*, **298** : 117-121 (1997).
- 23 : ONG, E., N.R. GILKES, R.C. JR. MILLER, R. ANTONY, J. WARREN and D.G. KILBURN. The cellulose-binding domain (CBDCex) of an Exo-glucanase from *Cellulomonas fimi* : Production in *Escherichia coli* and characterization of the polypeptide, *Biotech. Bioeng.*, **42** : 401-409 (1993).
- 24 : TORMO, J., R. LAMED, A.J. CHIRINO, E. MORAG, E.A. BAYER, Y. SHOHAM and T.A. STEITZ. Crystal structure of a bacterial family-III cellulose binding domain : a general mechanism for attachment to cellulose, *EMBO J.*, **21** (21) : 5739-5751 (1996).
- 25 : KANDA, T., K. WAKABAYASHI and K. NISHIZAWA. Modes of Action of Exo- and Endo-cellulases in the degradation of cellulose I and II, *J. Biochem.*, **87** : 1635-1639 (1980).
- 26 : 小林昭雄. 植物二次代謝活性化因子に関する生物有機化学的研究. 植物の化学調節, **32** (1) : 1-9 (1997).
- 27 : KAKIMOTO, T. and H. SHIBAKA. Synthesis of plant polysaccharides in phragmoplasts isolated from Tobacco BY-2 cells, *Plant Cell Physiol.*, **33** (4) : 353-361 (1992).
- 28 : HAYASHI, T., D.R. PORONENKO, A. CAMIRAND and G. MACLACHLAN. Pea xyloglucan and cellulose IV. Assembly of β -glucans by pea protoplasts, *Plant*

- Physiol. 82 : 301-306 (1986).
- 29 : ALBERSHEIM, P. and A.G. DARVILL. Oligosaccharins, Sci. Am., 253 : 44-50 (1985).
- 30 : BRANKA, C., G. DE LORENZO and F. CERVONE. Competitive inhibition of the auxine-induced elongation by α -D-oligosaccharides in pea stem segments, Physiologia Plantarum, 72 : 499-504 (1988).
- 31 : HAYASHI, T., T. TAKEDA, K. OGAWA and Y. MITSUISHI. Effects of the degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose, Plant Cell Physiol., 35 (6) : 893-899 (1994).
- 32 : STEPHEN, A. M. The Polysaccharides, Vol. 2, (ed. by ASPINALL, G. O. X., Other Plant Polysaccharides. Academic Press, NY) p98-353 (1983).
- 33 : MISHIMA, T., M. HISAMATSU, K. TERANISHI and T. YAMADA. Adhesion of polysaccharides to intact cells and protoplasts of *Nicotiana tabacum* BY-2 and its stimulative effect on the protoplast growth, Journal of Biosci. and Bioengine., 87 (1) : 57-61 (1999).
- 34 : MISHIMA, T., M. HISAMATSU, W. S. YORK, K. TERANISHI and T. YAMADA. Adhesion of β -D-glucans to cellulose, Carbohydr. Res., 308 : 389-395 (1998).
- 35 : JANSSON, P.E., L. KENNE and B. LINDBERG. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*, Carbohydr. Res., 45 : 275-282 (1975).
- 36 : ISHIZAKA, S., I. SUGAWARA, T. HASUMA, S. MORISAWA and G. MÖLER. Immune responses to xanthan gum I. The characteristics of lymphocyte activation by xanthan gum, Eur. J. Immunol., 13 : 225-231 (1983).
- 37 : TAI, A., E. OHSAWA, K. KAWAZU and A. KOBAYASHI. A minimum essential structure of LN-3 elicitor activity in bean cotyledons, Z. Naturforsch., 51C : 15-19 (1996).
- 38 : HAHN, M.G., A.G. DARVILL and P. ALBERSHEIM. Host-pathogen interactions XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans, Plant Physiol., 68 : 1161-1169 (1981).
- 39 : INUI, H., Y. YAMAGUCHI and S. HIRANO. Elicitor actions of *N*-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinases and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture, Biosci. Biotech. Biochem., 61 (6) : 975-978 (1997).
- 40 : 阿部美紀子. 根粒菌の Nod ファクター. 植物の化学調節, 32 (2) : 172-185 (1997).
- 41 : JOURNET, E.P., M. PICHON, A. DEDIEU, DE. F. BILLY, G. TRUCKET and D.G. BARKER. *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. Plant Journal. 6 (2) : 241-9 (1994).
- 42 : MINAMI, E. Recognition of oligochitin fragments in legume plant, TIGG, 9 (50) : 477-478 (1997).
- 43 : ROCHE, P. F. DEBELLE, F. MAILLERT, P. LEROUGE, C. FAUCHER, G. TRUCHET, J. DENARIE and J.C. PROME. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti* : nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals, Cell,
- 44 : HISAMATSU, M., J. ABE, A. AMEMURA and T. HARADA. Structural elucidation on succinoglycan and related polysaccharides from *Agrobacterium* and *Rhizobium* by fragmentation with two special β -D-glycanases and methylation analysis, Agric. Biol. Chem., 44 : 1049-1055 (1980).
- 45 : HISAMATSU, M., A. AMEMURA, T. MATSUO, H. MATSUDA and T. HARADA. Cyclic (1 \rightarrow 2) - β -D-glucan and the octasaccharide repeating-unit of succinoglycan produced by *Agrobacterium*, J. Gen. Microbiol., 128 : 1873-1879 (1982).
- 46 : STÜBLER, D. and H. BUCHENAUER. Antiviral activity of the glucan lichenan (poly- β (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4) D-anhydroglucose) I. Biological activity in Tobacco plants, J. Phytopathology 144 : 37-43 (1996).