

β -グルカンの酵母及びタバコ培養細胞への 特異的吸着とその生理的効果

三 島 隆

三重大学生物資源学部*

Adhesion of β -glucans to Yeast and Tobacco Culture Cell and Its Stimulative Effect

Takashi MISHIMA

Faculty of Bioresources, Mie University

Abstract

Schizophyllan secured from fungus, *Shizophyllum commune*, is a water-soluble (1,3)- β -D-glucan with side chains consisting (1,6)- β -D-glucosyl residues attached to O-6 of the backbone residues, at has a triple helical conformation and shows antitumor activity foward Sarcoma 180. Schizophyllan is effective for promoting protoplast division of *Saccharomyces cerevisiae*. The frequency of regeneration of yeast protoplast with schizophyllan is 1,000 times times the control. The effect of stability mechanism was examined and found to improve plant protoplast stability. Various water-soluble-polysaccharides were examined stability to adhere to cellulose and effects on protoplast stability.

Key Words : β -glycan • protoplasts • cell wall • adhesion • division

緒 言

スエヒロタケの産するシゾフィランは、抗腫瘍活性を示す¹⁾ことから抗ガン剤として用いられている。著者の属している研究室では、以前酵母の細胞壁と類似構造を持つ多糖について着目し、酵母プロトプラストに対する細胞壁再生効果について研究を進めていた。プロトプラストは微生物や植物細胞の細胞壁を酵素的な方法等により取り除いた細胞である。細胞壁の存在は遺伝子の導入という観点からは大きな障害となるが、微生物や植物が生きていく上で外界からの隔離された環境を構築するた

めに重要な役割を果たしている。プロトプラストから完全な状態へ細胞壁が再生するまでには長い時間が必要なため、その取り扱い是非常に難しい。1968年、建部らはプロトプラストを容易に得る方法を報告し²⁾、その後プロトプラストの培養が可能となり^{3,4)}、さらに1970年代になると、プロトプラストの融合の事例が数多く報告された。現在においては、プロトプラストの形態は、細胞融合法を用いて細胞間雑種を作り出すだけでなく、エレクトロポレーションを用いた遺伝子導入なども行われている。プロトプラストは動物細胞と同様に細胞壁がないために、浸透圧を調製した溶液中でなければ形態を保

持することができない。また、生理的にも普段とは異なる状態であると考えられている。そこで我々は、酵母におけるプロトプラスト及びその融合個体の再生に関する研究を行った。酵母細胞壁は β - (1, 3) -グルカン等から構成されているが、様々な水溶性多糖を酵母プロトプラストに与え、再生個体数に影響するかを検討した結果、シゾフィランがプロトプラスト再生率の上昇を引き起こすことを発見した⁹⁾。シゾフィランはスエヒロタケ (*Shizophyllum commune*) の産する菌体外多糖で^{6, 7)}、主鎖が β - (1, 3) 結合で構成され、側鎖に β - (1, 6) 結合を有すグルカンであり、三重らせん構造を有す^{8, 10)}。この現象はシゾフィランが酵母細胞膜を覆うことによって安定化させるためと推察された。しかし、その安定化機構に関する知見はその時点では不明であった。そこで本研究では、酵母プロトプラストに対する安定化機構はプロトプラスト表層に対するシゾフィランの吸着に由来すると仮定し、実際に吸着現象が存在するかを探り、多糖-多糖吸着機構を見出し、その機構を詳細に検討した。

また、この現象を植物プロトプラストにも応用することを考え、広く多糖-多糖吸着機構を検索した。植物細胞の細胞壁に含まれる多糖のうち、その骨格ともいえるべき構造体はセルロースの高度重合体である。これは β - (1, 4) グルカンであるセルロースの分子鎖同士が会合して作られるマイクロフィブリルという構造体から構成される。そして、細胞壁中に含まれているヘミセルロースの成分であるキシログルカンがセルロースに対して吸着していることが知られている¹¹⁻¹³⁾。そこで、さらにこのような現象が他に存在すると仮定し、多糖の主鎖結合様式、側鎖官能基の有無、及び立体構造に着目して多糖-多糖間吸着現象について調べた。

第一部 酵母グルカンに対する各種水溶性多糖の吸着と酵母に対する生理活性効果

目 的

酵母プロトプラストの再生培地中にシゾフィランを加えることにより、プロトプラスト再生率が上昇する現象が見られた。この現象は、デキストラン硫酸カリウム、カルシウムイオン等の今まで知られている浸透圧調整剤

以外の添加による再生率の上昇とは明らかに異なる作用機構によると推察された。酵母細胞壁は β -グルカン、酵母マンナン等から構成されている。特に β -グルカンに関しては、その組成が β - (1, 3) グルカンから成る。シゾフィランも β - (1, 3) グルカンであるため、この構造に由来する何らかの相互作用が存在するのではないかと考えられた。そこで、酵母細胞壁に対して相互作用を示す多糖を広く検索し、相互作用を示す多糖に関して、その吸着特性及び分子構造改変による吸着特性の変化、さらには溶媒環境を変化させたときの吸着挙動を調べることによって、吸着機構の解明を試みる。また酵母プロトプラスト再生率上昇効果との関連を調べる。

材料と方法

材料

酵母に対する各種水溶性多糖の吸着性を検討するため、細胞壁構成主成分である酵母グルカンのモデル系での利用を模索し、酵母グルカンに対してはカードランゲルを用いた。カードラン¹⁴⁾は *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes* や *Agrobacterium* の一部が作り出す中性多糖で主鎖構造は β - (1, 3) グリコシド結合から成り¹⁵⁾、側鎖は存在せず、加熱することによりゲル化する¹⁶⁾。また分子の高次構造がシングルコイルのものと三重らせんのものが知られており¹⁷⁾、抗ガン性を有することが報告されている。そこで加熱凝固性であるカードランの特性を生かし、カードランゲルを調整した¹⁸⁾。X線回折図形はミニフレックス (理学電機) を用いて測定し、Cu-K α 線を用いて測定した。用いた水溶性多糖を表1に記し、その構造を図1に記した。

酵母グルカン及びカードランゲルに対する吸着性

カードランゲルを150mm \times φ20mmのカラムに充填し、そのカラムに対して0.1%の各種水溶性多糖溶液を1ml 供し、元の多糖溶液中の多糖量を100%とした時に吸着によって溶出液中に含まれる糖量の減少の割合を調べた。溶出溶媒には0.02%アジ化ナトリウムを含む蒸留水を用いた。糖の定量は、中性多糖についてはフェノール硫酸法²⁸⁾、グルコサミンについてはBrix法²⁹⁾を用いて測定した。

吸着性が見られた水溶性多糖については、試験管内に酵母グルカンと水溶性多糖を加え、上澄み中の糖量を測

Table 1 Characterization of Polysaccharides

	Main chain structure (ratio)	Side residue	Reference
Pullulan	(1→4)-α-Glc, (1→6)-α-Glc ; 2 : 1		
Dextran	(1→6)-α-Glc		
Yeast mannan	(1→6)-α-Man	(1→2)-α-Man, (1→3)-α-Man	
Cyclopholol	(1→2)-β-Glc		14, 15
Laminarin	(1→3)-β-Glc	Mannitol	16
Schizophyllan	(1→3)-β-Glc	(1→6)-β-Glc	6-10
Lichenan	(1→3)-β-Glc, (1→4)-β-Glc		16
Barley glucan	(1→3)-β-Glc, (1→4)-β-Glc ; 1 : 3		16
Arabinogalactan	(1→3)-β-Gal	(1→3)-β-Ara, (1→6)-β-Ara, (1→3)-β-Gal	16
Succinoglycan	(1→4)-β-Glc, (1→3)-β-Gal ; 3 : 1	(1→3)-β-Glc, (1→6)-β-Glc, T. β-Glc, Pyruvic acid, Succinic acid	15-17
Xyloglucan	(1→4)-β-Glc	(1→6)-α-Xyl, (1→2)-β-Gal, (1→6)-α-Fuc	18-21
Xanthan gum	(1→4)-β-Glc	(1→2)-α-Man, (1→4)-β-GlcA, T. β-Glc, Pyruvic acid, Succinic acid	16, 22
Locust bean gum	(1→4)-β-Man		16
Chitosan	(1→4)-β-GlcNAc		
Pustulan	(1→6)-β-Glc		

定することにより酵母グルカンへ吸着した多糖量を算出した¹⁸⁾。

サクシニル基の導入

シゾフィランの立体構造を変化させるため、サクシニル基を導入した誘導体を調製した。あらかじめ真空乾燥した 81mg のシゾフィランを 1ml のジメチルスルフォキシドに溶解し、そこへ無水コハク酸 : 無水ピリジン = 200mg : 3.8ml からなる溶液を 1ml 加え、攪拌しながら室温にて一晩反応した。反応後、氷冷しながら 0.5ml の蒸留水を加え、さらに酢酸エチルを 4 倍量加えて沈殿を得た。沈殿物はさらに酢酸エチルで 2 回洗浄し、少量の水に溶かし、凍結乾燥して保存した。導入されたサクシニル基の量は、エステル結合したアシル基の定量法である McComb と McCready³⁰⁾ の方法を用いて定量した。

シゾフィラン低分子化サンプルの調製

低分子化したシゾフィランを得るため、シゾフィランを DMSO に溶かした状態で酸加水分解を行い、様々な分子量の試料を調整した³¹⁾。各試料は東ソー TSKGEL α-M (300mm × φ18mm) × 2 本と溶出溶媒として

0.1M リン酸緩衝液 (pH6.5) 及び 95%ジメチルスルフォキシドを用いた東ソー GPC-LALLS システムで重量平均分子量を測定した。さらに立体構造についての情報を得るために、X 線回折、最大吸収波長 (λmax), 及び円二色性スペクトル (CD) を測定した。λmax 及び CD を測定する際には 0.1N 水酸化ナトリウム溶液を用いて 7mg/2.9ml のシゾフィランと 1mg/ml のコンゴレッドを混合した状態で日本分光 J-720 円二色性分散計を用いて波長 600nm から 300nm の範囲を測定した。

酵母プロトプラスト再生効果の検討

低分子化シゾフィランを酵母プロトプラスト再生培地中に加え、再生率の検討を行った。常法に従い³²⁾ *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7 プロトプラストを終密度 5×10^7 個/5ml となるように調整した。調整したプロトプラスト懸濁液から殺菌済みメスピペットで 0.5ml (5×10^8 個/0.5ml) ずつ取り、1.0M の塩化カリウムを含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.5) 4.5ml および無菌水 (コントロール) に移した。それを 10 倍ずつ希釈し、各希釈溶液 (10^2 , 10^3 , 10^4 倍希釈液) から 0.1ml (菌数 10^4 , 10^3 , 10^2) ずつ、下層培地 (YPG 培

地組成に1.8%の寒天を加えたもの)が入ったシャーレに移した。ここに、酸加水分解とゲルろ過クロマトグラフィーにより調製された低分子化シゾフィランを0.1%含む軟寒天(YPG培地組成に0.3%の寒天を加えたもの)を加熱して溶かし、固まらないように40℃で保温したものを5ml加え、プロトプラストがまんべんなく広がるようにシャーレを傾けた。しばらく室温で放置し、

軟寒天が固まった後に30℃の恒温器で4日間暗所で静置培養し、シャーレ上の酵母のコロニー数を計測し、再生率を算出した。

結果及び考察

酵母グルカンへの各種水溶性多糖の吸着

図2に酵母グルカンおよびその代替物質であるカード

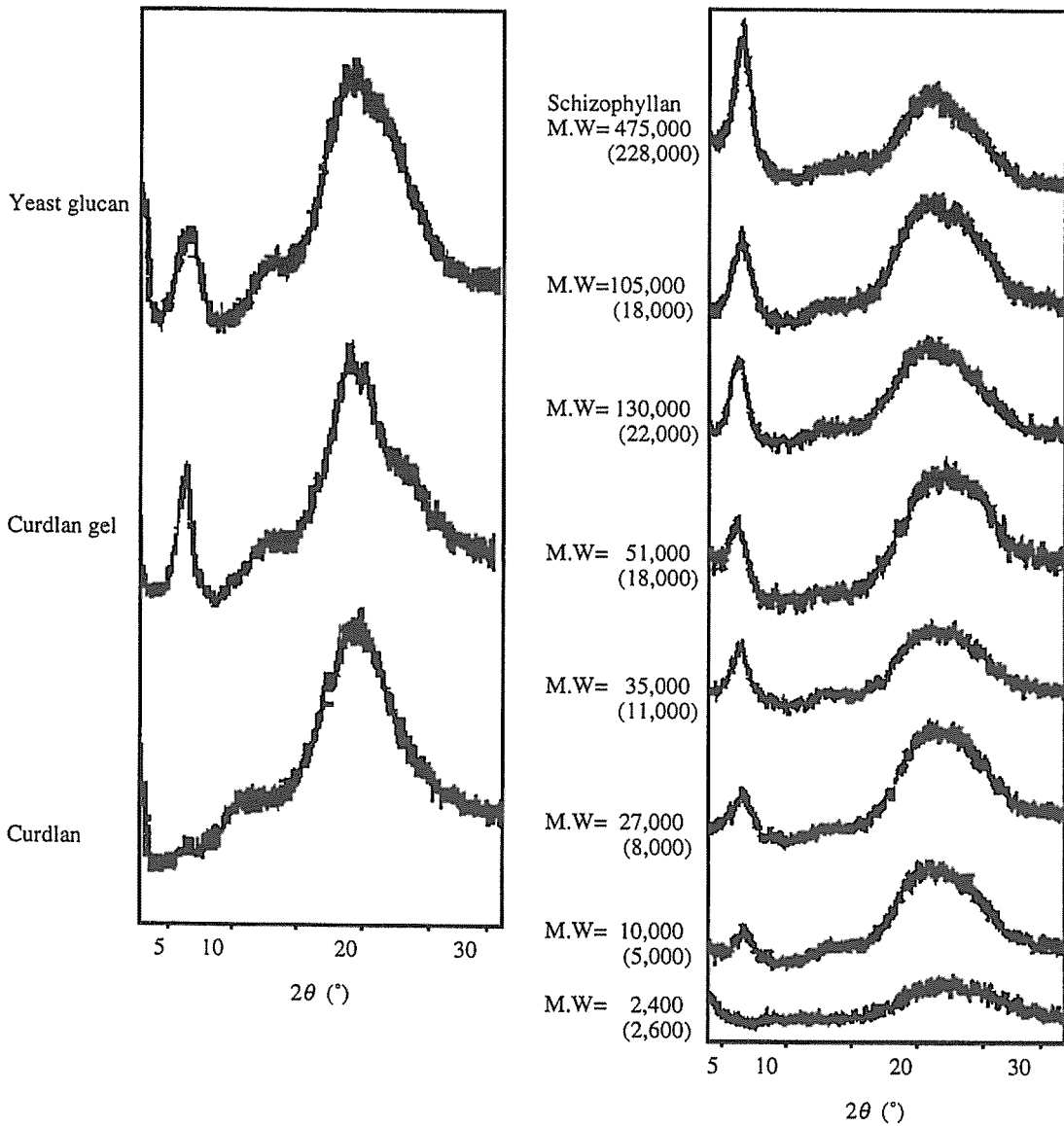


Fig. 2 X-ray diffraction patterns of yeast glucan, schizophyllan, and its derivatives. Schizophyllan derivatives were prepared by hydrolysis by sulfuric acid in DMSO.

ランとそのゲルの X 線回折図形を示した。回折図を比較すると、非常に類似したパターンを示した^{16, 32)}。特に三重らせん構造の存在を示す $2\theta = 6^\circ$ 付近にどちらも強いピークが存在することから、三重らせんを有する非常に類似した構造であることが推察された。よってカードランゲルが酵母グルカンの代用となりうることがわかった。

カードランゲルをカラムに充填して各種水溶性多糖を供したところ、シゾフィランがカラムにほぼ 100% 吸着した (図 3)。酵母グルカン及びカードランゲル 50mg

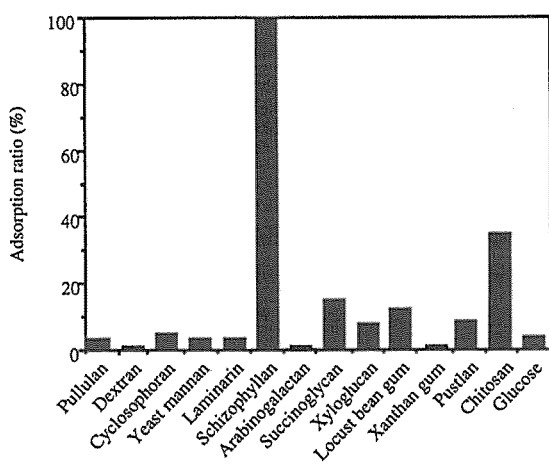


Fig. 3 Adhesive properties of water-soluble polysaccharides to curdlan gel.

に対するシゾフィラン、酵母マンナン、そしてプルランの吸着量を調べたところ、シゾフィランは、酵母グルカン 50mg に対し 630 μ g 吸着した。またカードランゲル 50mg に対し 231 μ g 吸着した。カードランゲルカラムに対して吸着性を示さないプルランはカードランゲル、カードラン原末、酵母グルカンに対してそれぞれ 2 μ g, 0 μ g, 0 μ g と、ほとんど吸着しなかった。酵母マンナンについても、酵母グルカンに対して 86 μ g と若干の吸着性が見られたものの、カードラン及びカードランゲルにはそれぞれ 0 μ g, 0 μ g と、吸着しなかった。この結果は酵母グルカンに対してシゾフィランが吸着することを示し、またカードランゲルカラムに対するシゾフィランの吸着傾向とも一致した。

β -(1,3) 結合型多糖における吸着機構

シゾフィランは水溶液中で三重らせん構造をしていると考えられており、87.5%以上の濃度のジメチルスルフォキシドでは三重らせんがほどこけ、シングルコイルになると考えられている³³⁾。そこで分取した低分子化シゾフィランを、リン酸緩衝液中及び 95%ジメチルスルフォキシド中で GPC-LALLS 法にて重量平均分子量を測定したところ、リン酸緩衝液中の重量平均分子量が大きなシゾフィランほど 95%ジメチルスルフォキシド中の重量平均分子量が約 3 分の 1 になった (表 2)。またリン酸緩衝液中の分子量が 2 万以下になると、リン酸緩衝液中の平均分子量に対するジメチルスルフォキシド中の平均分子量の比が約 3 : 1 から約 1 : 1 へ変化した。このこと

Table 2 Characteristics of Schizophyllan and Degraded Schizophyllans

	Molecular weight		
	A	B	A/B
native	542000	187000	2.9
	90000	32100	2.8
	63600	23400	2.7
	31300	11200	2.8
	23000	8700	2.6
	5900	4700	1.3
	4100	4000	1.0

Molecular weight was measured by GPC-LALLS method using Tosoh α -M tandem column

A : Weight average molecular weight in 0.1N phosphate buffer (pH 6.5)

B : Weight average molecular weight in 95% DMSO

から、三重らせん構造を構築するのに最低必要な分子サイズは1本当たり分子量で約7,000程度、重合度で40程度であると考えられる。

低分子化したシゾフィランをカードランゲルカラムに供し、吸着量を調べたところ、平均分子量475,000で99%, 90,000で91%, 66,000で51%, 36,000で11%, 3,500で5%の吸着率であった。この結果、分子量90,000から36,000にかけて吸着率の低下と分子量の低下がほぼ対応していることがわかった。このことから、高次構造の変化は分子量の変化と相関性があることが示唆された。シゾフィランの高次構造は、水素結合などの比較的弱い分子間力により高次構造が形成されていると考えられており、鎖長が長くなるにつれ緩い高次構造が徐々に固い高次構造に成長していくことが推察された。電子顕微鏡による観察から、シゾフィランは棒状形態として存在していることが報告されている³⁴⁾。さらにジメチルスルフォキシドによって一度シングルコイル状にされても、後に水中に戻すことにより、その濃度に依存するものの、高次構造を再び構築することが報告されている³⁵⁾。そこで、低分子化シゾフィランのX線回折測定を行い、各回折図を比較した(図2)。 $2\theta = 6^\circ$ 付近のピークについて見てみると、重量平均分子量が減少するに連れてピーク強度が減少していることがわかる。さらに、分子量2,400になると 6° 付近のピークが消失した。

このことは分子量2,400の低分子化シゾフィランは三重らせん構造を保持していないことを示し、高次構造を保持する限界が分子量約10,000未満にあることが示唆された。

吸着性と立体構造との間に相関が見られるかを調べるため、シゾフィランを一度ジメチルスルフォキシド中に溶かし、シングルコイル状になった時点でサクシニル基をグルコース1M当たり0.69M導入したサンプルを調整し、カードランゲルカラムに供したところ、未処理シゾフィランがほぼ100%吸着したのに対して16%にまで減少した。

シゾフィランの高次構造を解析する方法として、シゾフィラン-コンゴレッド複合体構築後の λ_{\max} 及びCDを測定する方法が挙げられる³⁶⁻³⁸⁾。各低分子化サンプルについて λ_{\max} 及びCDを測定したところ、図4の結果を得た。この結果より平均分子量約57,000以下になると λ_{\max} が520nm付近から低波長側に徐々にシフトし、約25,000以下になると500nm付近で一定になる傾向が認められた。CDスペクトルにおいても平均分子量が低下するのに比例してピーク強度の減少が見られ、平均分子量約26,000においてはほとんど見られなくなった。シゾフィラン-コンゴレッド複合体は、シゾフィランが三重らせん構造が存在する場合に0.1N水酸化ナトリウム溶液下で配向した状態で複合体を構成

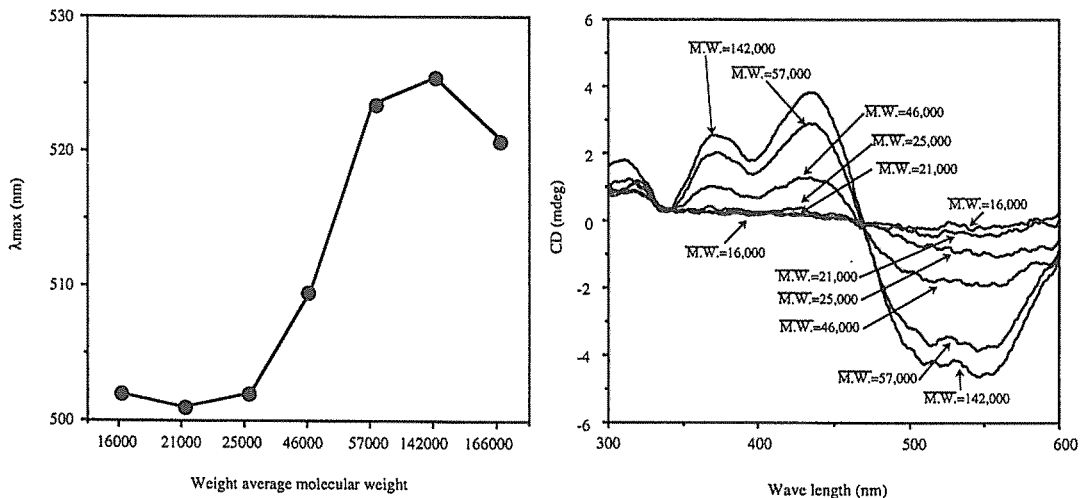
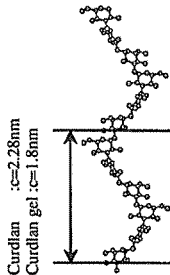


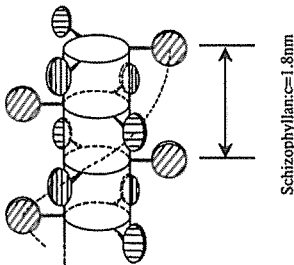
Fig. 4 λ_{\max} shift and circular dichroisms of schizophyllan-congo-red complex at different molecular weight schizophyllan in 0.1N NaOH.

するようである。X線回折図形においても平均分子量の低下と共に $2\theta=6^\circ$ 付近のピークの減少が見られることと一致する。さらにカードランゲルに対する吸着性の観点から見ると、平均分子量36,000以下になるとほとんど吸着性を示さないことと λ_{\max} 及びCDの結果に相関性が見られることから、三重らせん構造と吸着との間に相関性が存在することが明らかとなった。

奥山らはカードランゲルのX線回折図形の詳細な検討を行っている(図5)¹⁰⁾。それによるとカードランゲルの結晶系は $a=b=1.556\text{nm}$ 、 $c=1.878\text{nm}$ である。また伊藤と寺本はシゾフィランのX線回折図形の詳細な検討を行っており、その結晶系は $c=1.8\text{nm}$ であることを示している⁴⁰⁾。cは鎖の連なる方向に関する情報を与えるもので、cの値が類似していることは平行に分子が並んだ場合を仮定すると、水酸基及びピラノース骨格の位置が対応するようになり、水酸基由来の水素結合及びピラノース骨格由来の疎水結合や水酸基由来の水素結合が生じることが期待される。



Okuyama et al. *J. Carbohydr. Chem.* **10**(4),645-656 (1991)



Itou and Teramoto, *Carbohydr. Res.* **160**, 243-257 (1987).

Fig. 5 Conformations of curdlan and schizophyllan.

酵母プロトプラストに対して水溶性多糖の吸着が及ぼす効果

久松らは酵母プロトプラスト再生培地中にシゾフィランを添加することにより、プロトプラスト再生率が1,000倍以上上昇することを報告している³⁹⁾。そこで、シゾフィランの高次構造と酵母プロトプラストの再生率上昇との間に相関性があるかを調べたところ、三重らせん構造を有すシゾフィランにおいて、重量平均分子量に比例して再生率を上昇させた(表3)。

以上のことから、シゾフィランの三重らせん構造が酵母細胞壁多糖構成成分である酵母グルカンに対して吸着性を示し、また高次構造を構築しているシゾフィランを酵母プロトプラストに与えることにより再生率上昇効果が見られることが分かった。この現象は、シゾフィランの高次構造が酵母プロトプラスト表面に対して吸着すること、吸着により酵母プロトプラストに対する何らかの安定作用もしくは生理活性作用発現が引き起こされていることが推察された。

第二部 セルロースに対する各種水溶性多糖の吸着と植物細胞に対する生理活性効果

第1章 目的

第一部より、 β -(1,3)グルカン間に高次構造由来の分子間吸着現象が存在することが明らかになった。さらにその現象を利用することにより酵母プロトプラストの再生率が上昇することもわかった。他方、植物細胞においては細胞壁中に含まれるセルロースに対してキシログルカンが吸着する現象が報告されている¹¹⁻¹³⁾。さらに、ある種のキシログルカンオリゴ糖は抗オーキシン活性という生理作用が存在することが報告されている⁴⁰⁾。このような多糖間吸着機構は他にも存在すると考え、その機構を利用した植物プロトプラストの安定化にも応用できるのではないかと考えられた。そこで、セルロースに対して吸着する水溶性多糖を、植物や微生物が産する多糖から広く検索する。また吸着性を示した多糖の吸着機構を解明するために、オリゴ糖レベルでの吸着能についても調べる。また、実際にセルロース吸着性を示す多糖が植物細胞に対しても吸着性を示すかを調べるため、セルロース吸着性多糖の蛍光誘導体を調製し、植物培養細胞

Table 3 Correlation of Molecular Weight of Hydrolyzed Schizophyllan and Division of *Saccharomyces cerevisiae* Protoplast

Weight average molecular weight	Frequency of regeneration	Adhesion amount (μg)
475000	1200	630
90000	1400	580
66000	710	410
36000	240	280
3500	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 μg of sample) and the amount not bound

のタバコ BY-2⁴¹⁾ 及びそのプロトプラストに対する吸着性およびプロトプラストと再生時の効果を調べる。他方、植物病原菌の細胞壁に含まれているβ-グルカンやキチンの部分加水分解物は、植物の防御活性を引き起こすエリシター物質であることが知られている。そこで、プロトプラスト再生促進効果の見られた水溶性多糖がプロトプラスト増殖作用以外に、エリシターとして働くかを調べるため、エリシターが引き金となって引き起こされる防御機構の一つであるファイトアレキシンの生産を誘導するかを調べる。

材料と方法

材料

水溶性多糖として表1に記した多糖を用いた。植物細胞に対する各種水溶性多糖の吸着性を検討するため、細胞壁構成主成分であるセルロースのモデル系での利用を模索し、植物細胞壁中に含まれているセルロースと同じ結晶型であるセルロースI (アビセル)を用いた。また、セルロースIを4N水酸化ナトリウム溶液で処理することにより得られるセルロースII (マセル化セルロース)についても同様に吸着性を調べた。

セルロースに対する吸着性

セルロースIを150mm×φ20mmのカラムに充填し、各種多糖溶液をカラムに供す事により水溶性多糖の吸着性を評価した。方法は第一部第1章の材料と方法の記述

に準じた。また官能基を有す水溶性多糖については、官能基を取り除いた試料を調整し、カラムに供した。なお、各多糖はフェノール硫酸法もしくはBrix法により定量したが、キシログルカンのみKooiman⁴²⁾らの方法に準じて定量した。

メチル化分析

Hakomori⁴³⁾の方法を用いて糖の結合様式の分析を行った。

官能基除去サンプルの調製

サクシノグリカン及びキサントガムから官能基を取り除く方法として、アシル基を除くときにはSlonekerとJeansの方法⁴⁴⁾を、ピルビン酸を除く方法としてChaudhariらの方法⁴⁵⁾を、グルクロン酸を還元するためにTaylorとConardの方法⁴⁶⁾を用いた。アシル基、ピルビン酸、グルクロン酸の存在量の変化はそれぞれMcCombとMcCreadyの方法³⁰⁾、KoepsellとSharpeの方法⁴⁷⁾、そしてBitterとMuirの方法⁴⁸⁾を用いて測定した。

ローカストビーンガムオリゴ糖の調製

ローカストビーンガムの低分子化試料の調製は、セルラーゼによる加水分解とゲルろ過クロマトグラフィーにより調整された³²⁾。各試料は、東ソーAmide-80 (250mm×φ18mm)カラムとアセトニトリル：水=55：45の溶出溶媒、UV検出器を用いたHPLCシステムにて分析を行い、各ピークはマトリックスとしてグリセリンもしくはチオグリセリンを用いたM-80B型日立二重収

束質量分析計によって質量を測定された。

BY-2 の培養

タバコ培養細胞 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2) は Linsmer と Skoog の培地⁵⁰⁾ にリン酸 2 水素カリウムを 370mg/l と 2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸を 0.2mg/l, チアミン塩酸塩を 1mg/l 補填した培地を 100ml の三角フラスコに 20ml 分注し、一週間に一度の割合で細胞懸濁液を 1ml 植え継ぎ、恒温回転振とう機で 25°C, 60rpm, 暗所にて前培養した。BY-2 及びそのプロトプラストに対するセルロース吸着性水溶性多糖の吸着

培養 3 日目の BY-2 細胞懸濁液 2ml をプロトプラスト化に用いた。プロトプラスト化は常法に従った⁵⁰⁾。

水溶性多糖の細胞及びプロトプラストへの吸着性を調べるため、Glabe ら方法⁵¹⁾ に準じて蛍光ラベルを施した試料を調整し、細胞及びプロトプラストに供した。培養 3 日目の BY-2 細胞懸濁液 0.1ml (細胞数約 5×10^4 個) を 1.5ml 容のエッペンドルフチューブに移し、0.5ml の蒸留水もしくは 0.4M マンニトール溶液にて 3 回洗浄し、最終的に 0.5ml の蒸留水もしくは 0.4M マンニトール溶液に懸濁した。そこへ 0.1% のラベル化多糖を 50ml 加え、暗所にて 1 時間インキュベートし、その後も出来るだけ遮光条件下で 0.5ml の蒸留水もしくは 0.4M マンニトール溶液にて 3 回洗浄し、最終的に 0.5ml の蒸留水もしくは 0.4M マンニトール溶液に懸濁した。観察は Zeiss Axioscop epifluorescence 顕微鏡に冷却 CCD カメラ (Photometrics PXL 1400) を装着し、画像を Macintosh Quadra840AV 上にて IPLab (Signal Analytics Co.) を介して取り込み、Photoshop Ver. 3.0LE (Adobe System Inc.) 上で体裁を整えた⁵²⁾。

透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察

切片の調製には、Sppur 樹脂を用いる方法を用いた⁵³⁾。樹脂包埋されたサンプルから、マイクローム (Rihelt Ultramicrotome U) にガラスナイフを装着して切片を調製した。切片はあらかじめコロジオン膜を付着させた 170 μ m 孔の空いた銅製メッシュ上に配置し、酢酸ウランとクエン酸鉛を用いて染色を行い、充分乾燥させた。

観察は日立 H-8000 透過型電子顕微鏡を用いて行った。この時のエミッション電流は 100kV とした。

細胞壁再生状況の観察

プロトプラスト調製後、0.1ml のプロトプラスト懸濁溶液を 0.4M マンニトール溶液にて室温でインキュベートし、0, 0.5, 1, 1.5, 2 時間後にサンプリングを行い、直ちに細胞固定液 (酢酸 : エタノール = 1 : 3) を 1ml 静かにプロトプラストに添加し、1 時間静置した。その後、0.1% のカルコフルオロホワイト (エタノール溶液) を 50ml 静かに加え、暗所にて 5 分インキュベートし、0.4M マンニトール溶液にて 3 回洗浄をした。観察は、蛍光顕微鏡にて紫外線励起下にて行われた。

プロトプラスト再生個体数の観察

プロトプラストを 0.4M マンニトール溶液を用いて 2×10^4 個/ml に調製し、24 穴プラスチックプレートにそれぞれ 1ml ずつ加えた。そこへ 0.1% の水溶性多糖を含み、0.4M マンニトール溶液が示す浸透圧に調製した培養液を静かに加え、20°C, 暗所にて静置培養を行った。3 日後及び 7 日後に顕微鏡とトーマの血球測定板を用いて細胞数を計測した。

エリシターアッセイ

エンドウのファイトアレキシンであるピサチンの標品を HPLC での標準物質として用いた。なお、標品の純度を確認するために吸光スペクトラム及びマススペクトルを測定し、不純物がほとんど含まれないものであることを確認した。

暗所にてエンドウ種子を 2 日以上流水中につけ込み、発芽させた。その後、エタノールにて殺菌し、以降の操作は無菌状態で行った。さらに数日暗所にて培養し、胚芽部分が 2cm 以上成長した段階で、カミソリを用いて胚芽を約 5mm 切り出し、さらに縦に 2 つに切った。各切片を蒸留水にて洗浄して破壊された細胞等を除去し、エッペンドルフチューブに入れ、その状態で生重量を測定した。

0.1% の各多糖溶液を胚芽の入っているエッペンドルフチューブに 200ml 加え、18 時間暗所でインキュベートした。インキュベート 2 時間後に 3mM の塩化銅を 200ml 加え、インキュベートを続けた。インキュベートを終えた胚芽は、蒸留水にて充分洗浄し、その後 1.5ml の蒸留エタノールを加え、沸騰浴中で 10 分間抽出を行った。その後もう一度 1.5ml の蒸留エタノールにて沸騰浴中で 10 分間抽出を行い、抽出液を混ぜ、エバポレーターにて乾固した。

ピサチン標品及びエリシター物質抽出物は東ソーOD S-80Ts (150mm×φ4.6mm) を用い、溶出溶媒としてA液：30%メタノール(1%酢酸含有)とB液：70%メタノール(1%酢酸含有)をそれぞれA：B=0：100からA：B=100：0のリニアグラジェント(35分)、流速は0.8ml/min、サンプル量は10ml、検出はUV(310nm)にて分析した。

結果及び考察

セルロースに対する各種水溶性多糖の吸着

セルロースIとセルロースIIはX線回折図を調べると、結晶型の違い分かる。I型は隣り合うセルロース分子の還元末端が一定方向にそろった状態でマイクロフィブリルを構成した状態であり、一般にパラレル配向している⁵⁴⁾。II型は隣り合うセルロース分子の還元末端が互い違いに並んだ、いわゆるアンチパラレル配向している⁵⁵⁾。

吸着性についてみると、セルロースIに対して吸着性が見られたのはβ-(1,4)グルカンのキシログルカン、β-(1,4)マンナンのローカストビーンガム、β-(1,3)(1,4)グルカンのバーレイグルカンとリケナン、そしてβ-(1,3)グルカンのシゾフィランだった(図6)。セルロースIIに対しては、キシログルカン、ローカスト

ビーンガム、バーレイグルカン、リケナンが吸着した。

キシログルカンは構成糖がグルコース、結合様式はβ-(1,4)結合で、セルロースと同じであり、Hayashiらによりセルロースと吸着することや植物細胞壁中での挙動について報告されている^{11-13, 56)}。

ローカストビーンガムの場合は構成糖がマンノースであるが、結合様式を見るとどちらも同じβ-(1,4)結合であり、C-4の水酸基に由来する結合の向きはグルコースと同じである。よって、とりうる立体構造は類似していると考えられ、キシログルカンと同様の吸着性が現れたと推察した。

バーレイグルカンとリケナンは、共に主鎖部分にβ-(1,3)グリコシド結合とβ-(1,4)グリコシド結合を有す。その結合の割合は、バーレイグルカンではメチル化分析よりβ-(1,3)グリコシド結合：β-(1,4)グリコシド結合=1：3という結果を得た。リケナンについては、部分加水分解物にセロビオースとラミナリビオースが生成することから、β-(1,3)グリコシド結合とβ-(1,4)グリコシド結合が交互に存在した直鎖構造だと考えられている。

サクシノグリカンの場合、主鎖構成糖がグルコースとガラクトースが3：1の割合で構成される。それに伴い結合様式もβ-(1,4)グリコシド結合とβ-(1,3)ガラ

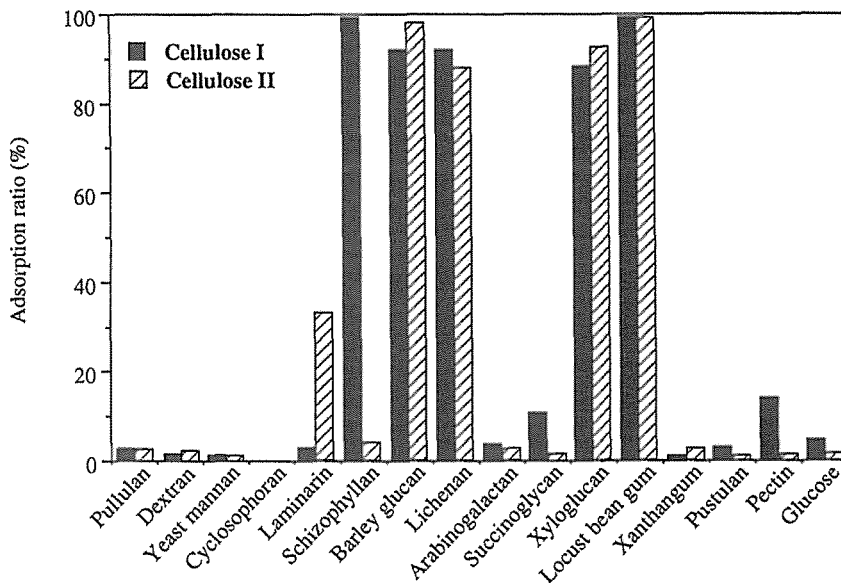


Fig. 6 Adhesive properties of water soluble polysaccharides to cellulose I and II.

クトシド結合からなる。このことが立体構造として β -(1,4) グルカンと異なりセルロースとの吸着性も持たないと推察された。

キサントタンガムの場合、主鎖構造は β -(1,4) 結合したグルコースのみからなるので吸着性があると予測された。特にキサントタンガムとローカストビーンガムを混ぜ、加熱することによりゲルを得ることができることが知られている。しかしセルロースに対しては吸着性が現れなかったため、ゲル化機構と吸着機構とは異なったものであると考えられる。キサントタンガムはまた、側鎖にアンシル基とピルビン酸基を持つ。どちらも電荷を帯びた官能基であり、官能基同士の反発により吸着性が阻害されたとも考えられる。キサントタンガムの立体構造は二重らせんを組んだものとして考えられている。また、Shatwellらは立体構造が側鎖の官能基の存在量により変化することを報告している⁵⁹⁾。このためにキサントタンガムは主鎖が β -(1,4) グリコシド結合であるにも関わらず、分子の配置が具体的には主鎖部分が外部に露出しないためにセルロースに対して吸着性を示さないとも考えられる。

シゾフィランはキシログルカン等の β -(1,4) グリコシド結合を有さない多糖であるが、セルロースIのみに強い吸着性を示した。 β -(1,3) グルカンとセルロース

との関係について、植物細胞が分裂するときに形成される細胞板に β -(1,3) グルカンに吸着することが知られているアニリンブルーにより染色されることが知られている⁶⁰⁾。他方、現在植物や菌類の品種改良にはなくてはならない技術となったプロトプラストという形態に関して、プロトプラストが細胞壁を再生するときにセルロースだけではなく β -(1,3) グルカンも合成していることが知られている。また自然界において、植物細胞が細胞壁を糸状菌等に侵されそうになったときに、細胞内部にカロースと呼ばれる β -(1,3) グルカンを作り、物理的障壁作用により菌を細胞内に進入できないようにする⁶¹⁾。このように β -(1,3) グルカンにはセルロースの代替のような働きともとれる現象がいくつか存在している。

キサントタンガム及びサクシノグリカンは側鎖に酸性官能基を有するため、官能基を除去した試料を調整を試みたが、水に対する溶解性が極度に低くなり、吸着性の上昇も見られなかった(表4)。キサントタンガムについて、側鎖官能基の存在が分子の立体構造構築に関与していることが報告されている⁵⁹⁾。吸着性に関しても吸着に關する分子の部位がセルロースに対して近づくことが出来ないような立体構造が関与していることが推察された。

シゾフィランにおいては、サクシニル基を導入することにより16%まで吸着率が減少した。この現象は、サ

Table 4 Characterization of Modified Xanthangum and Succinoglycan

	Acyl residue volume (μ g)	Pyruvate volume (μ g)	Glucuronic acid volume (μ g/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 depyruvate 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 \times 100 (%)

N.D. ; Not tested

クシニル基をシゾフィランに導入するときにジメチルスルフォキシドに溶解するため、シングルコイル状になったシゾフィランに官能基を導入することとなり、再度水に溶かしたときに三重らせん構造をとれないために吸着能を失うと推察された。

キシログルカン-セルロースの吸着性については、林らによりキシログルカンの主鎖重合度が5以上になると現れることを報告している⁵⁹⁾。そこで、ローカストビーンガム及びシゾフィランの低分子化試料がセルロースに対して吸着するかを調べたところ、ローカストビーンガムでは重合度6(ピークE)以上のものが強く吸着することが確認された(図7)。ローカストビーンガムは主鎖マンノースが4重合しているものに対して1つガラクトース側鎖を有す。重合度6のオリゴ糖は主鎖重合度5と考えることができるので、キシログルカンと同様の吸着傾向であった。さらに、市販されているキトオリゴ糖においても、主鎖重合度4以上のもので強い吸着性が見

られた³²⁾。以上より、β-(1,4)結合型多糖において吸着性が表れるには主鎖重合度4~5以上であることが必要であった。

Langmuirによると、金属と気体の吸着関係について、金属の表面積に対して、気体と金属表面積との比をプロットしたときに直線性が見られるとき、単分子膜吸着が起こっていることが推察される⁶⁰⁾。本実験でもその理論を元に、50から200mg/ml濃度の水溶性多糖を調整し、セルロースIに対しどれだけ吸着するかを調べ、上記の関係が成り立つかを調べた。すると、Langmuirの吸着等温式とよくあう結果であった(図8)。よってこの吸着機構が単分子吸着機構であると推察された。

植物細胞壁中に存在するセルロースの形態の一つであるセルロースIに対して、キシログルカン以外にシゾフィラン、ローカストビーンガム、バーレイグルカン、リケナン、そしてキトサンが吸着することが分かった。一方セルロースIIに対してシゾフィランが吸着しないことが

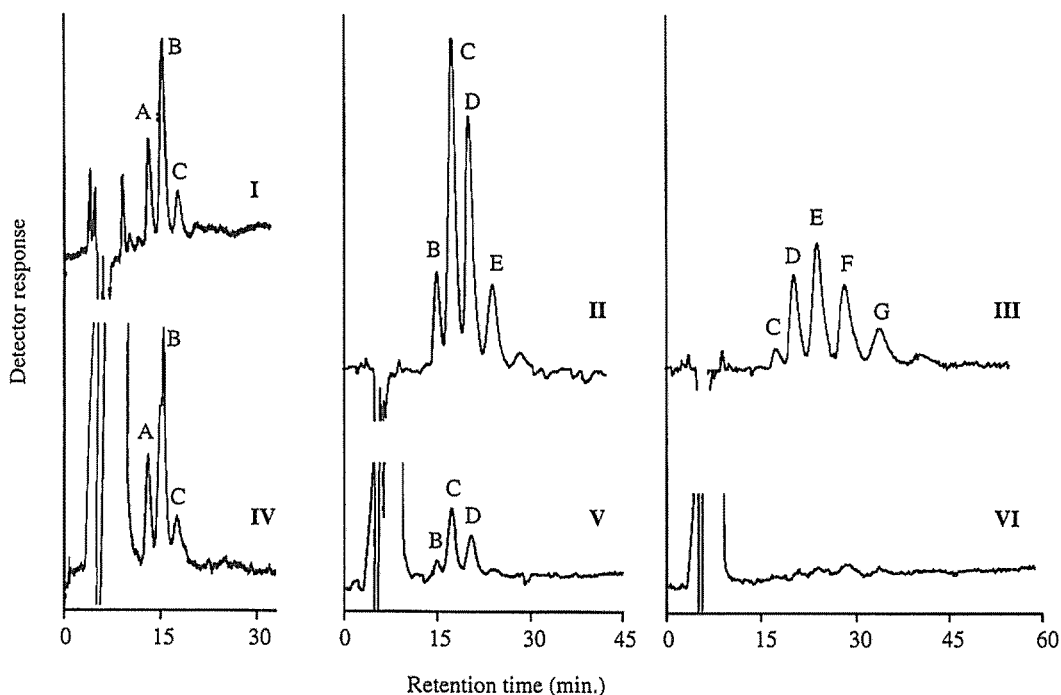


Fig. 7 HPLC chromatograms of oligosaccharides of locust bean gum.

I, II, and III were obtained from gel permeation chromatography, 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 are marked A to G in order to eluting sequence.

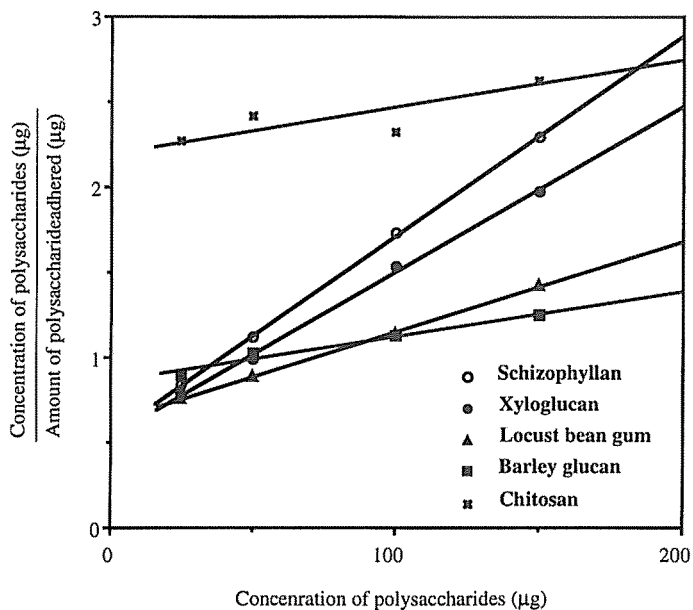


Fig. 8 Langmuir plots for the adhesion to cellulose I of schizophyllan, xyloglucan, locust bean gum, barley glucan, and chitosan.

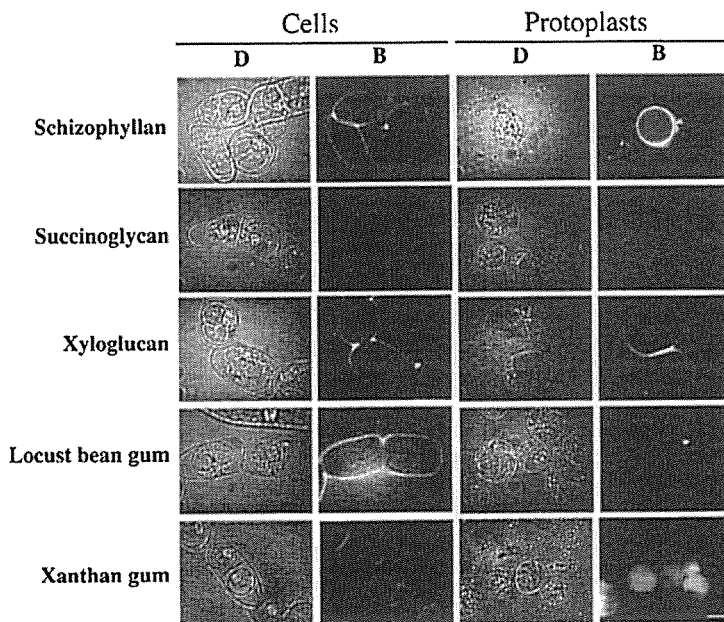


Fig. 9 Images of BY-2 cells and protoplasts treated by polysaccharide derivatives.

Cells were treated polysaccharide derivatives for 1 hour and observed with fluorescent microscope under daylight (D) and 475nm band pass blue filter set (B).

magnification was the same in all images (bar is 10 µm).

分かった。各水溶性多糖のオリゴ糖の吸着挙動の解析から、セルロースに対して β -(1,4)結合型多糖が吸着するためにはオリゴ糖主鎖部分に4から5の連続した残基が必要であることが、また β -(1,3)結合型多糖においては三重らせん構造が関与していることが分かった。吸着機構については、どの水溶性多糖の場合においても単分子膜吸着機構であることが推察された。シゾフィランがセルロースIとIIに対して示す吸着挙動の違いは、セルロース分子表面に存在する水酸基及びピラノース骨格の位置に由来するのではないかと想像される。シゾフィランの場合も三重らせん構造由来の立体的な分子の配置がセルロースとの水素結合もしくは疎水結合を生じるような位置関係になり、吸着現象が見られると想像される。タバコ培養細胞BY-2及びそのプロトプラストに対する各種水溶性多糖の吸着

0.4M マンニトール溶液中にて、BY-2 及びそのプロトプラストに対してセルロースI吸着性を示す水溶性多糖であるシゾフィラン、キシログルカン、ローカストビーンガムの蛍光誘導体、及びセルロースI吸着性を示さないサクシノグリカン、キサントランガムの蛍光誘導体进行处理したところ、図9の結果を得た。

原形質分離を起こした状態のBY-2に対して、シゾフィラン、キシログルカン、ローカストビーンガム、そしてキサントランガムの誘導体进行处理した区分で細胞壁と考

えられる部分に蛍光が認められた。シゾフィラン、キシログルカン、ローカストビーンガムに関してはセルロースIに対する吸着能を有するために細胞壁に吸着したと推察される。ところが、サクシノグリカンとキサントランガムは、どちらも分子構造的にはセルロースに類似しているために吸着能が存在すると思われたが、実際にはセルロースIに吸着しないにもかかわらず、BY-2細胞壁に対して吸着した。この現象は、サクシノグリカン及びキサントランガム中に存在する官能基もしくは側鎖が、細胞由来の酵素により脱離等が起こった結果として立体構造の変化が起きているために吸着能が表れたと推察される。この推察を確認するために、そのような働きをする酵素が細胞壁上に存在するかを明らかにする必要がある。

BY-2プロトプラストに対しては、シゾフィラン誘導体において細胞膜と考えられる部分から強い蛍光が見られた。キシログルカン、ローカストビーンガム、そしてシゾフィランにおいても蛍光が細胞膜部分から見られたが、シゾフィランほど強い蛍光ではなかった。プロトプラストは細胞壁溶解後すぐに細胞壁再生を開始する。細胞壁多糖染色剤のカルコフルオロホワイト⁽⁶⁾による経時的被染色細胞の推移を見てみると、プロトプラスト化後2時間までに8割程度のプロトプラストにおいて細胞壁が再生していることが分かった(図10)。また、プロトプラスト処理後2時間のプロトプラストを固定し、

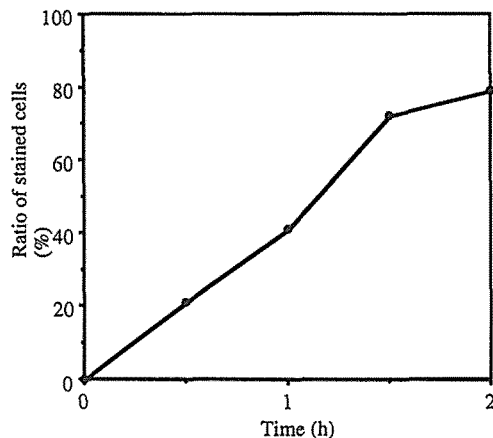
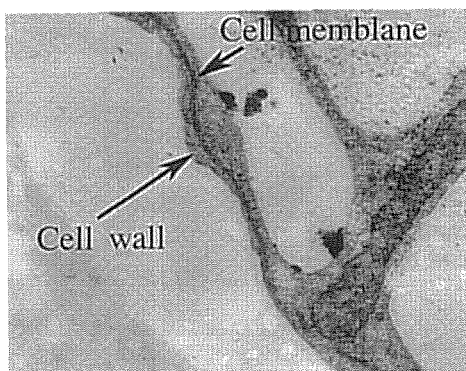


Fig.10 Images of BY-2 protoplast's surface by TEM after 2 hour of treatment, and time course of population of the cells stained with calcofluor white.

Magnification is $\times 30,000$. BY-2 protoplasts were regenerated in the LS medium with 0.4M mannitol and some cells were harvested at 0 min, 30 min, 1 h, 1.5 h, and 2 h, and stained with calcofluor white, and counted ratio of stained cells.

TEMにて観察したところ、細胞壁が再生していることが確認された。初期に再生してくる細胞壁について、エンドプロトプラストでは、プロトプラストが細胞壁多糖染色剤であるカルコフルオロホワイト以外に、 β -(1,3)グルカン染色剤であるアニリンブルーにも染色されるので、初期再生細胞壁には β -(1,3)グルカンも存在すると考えられている⁶⁰⁾。このために、シゾフィランにおいてはキシログルカンやローカストビーンガムと比べ、プロトプラスト表面に吸着する部分が多く存在し、強い蛍光が観察されたと予想される。

キサントタンガムに関しては細胞膜だけではなく細胞内の特に液胞と考えられる部分より強い蛍光が見られた。この現象をより詳細に検討するために、プロトプラストを4°Cの状態に保ちながらキサントタンガム誘導体を処理し、キサントタンガム誘導体が細胞内に取り込むかを調べたところ、4°C下では細胞内での蛍光はほとんど見られず、プロトプラストを室温に戻すと蛍光が見られるようになった(図11)。このことは、酵素反応的に細胞膜上にてキサントタンガム誘導体が分解され、細胞内に取り込まれていることを示唆するのかもしれない。キサントタンガムに関してはさらに次の実験を行った。細胞の状態で、原形質分離を起こしたときと、起こさない状態にてキサントタンガム誘導体の吸着部位が変化をするか調べたとこ

ろ、0.4M マンニトール溶液にて原形質分離を起こした状態では細胞壁から蛍光が見られ、原形質分離を起こさない状態では細胞壁だけでなく細胞内の液胞と思われる部分から蛍光が観察された(図11)。このことは、プロトプラストにおけるキサントタンガム誘導体の取り込み同様に細胞膜表面にキサントタンガム誘導体分解酵素なるものが存在するために、キサントタンガムが分解され、FITC結合オリゴ糖、単糖、もしくはFITC自体が遊離し、細胞内に取り込まれた可能性が推察された。

キサントタンガム及びサクシノグリカンはセルロースIに対して吸着性を示さないにも関わらず、プロトプラストの表面に吸着したり、細胞内に取り込まれたりする現象を示した。キサントタンガムとサクシノグリカンの由来は、それぞれ植物病原菌*Xanthomonas campestris*と根粒菌やアグロバクテリウムが生産する菌体外多糖である。これらの多糖の役割についてはまだはっきりと分かっていないが、本実験により植物細胞との相互作用が存在することが分かり、これから感染・共生機構の解明の一助となるかもしれない。

BY-2プロトプラスト再生時における各種水溶性多糖の効果

プロトプラスト培養3日後及び7日後の細胞数を図12に示した。この結果、培養7日後にシゾフィラン、

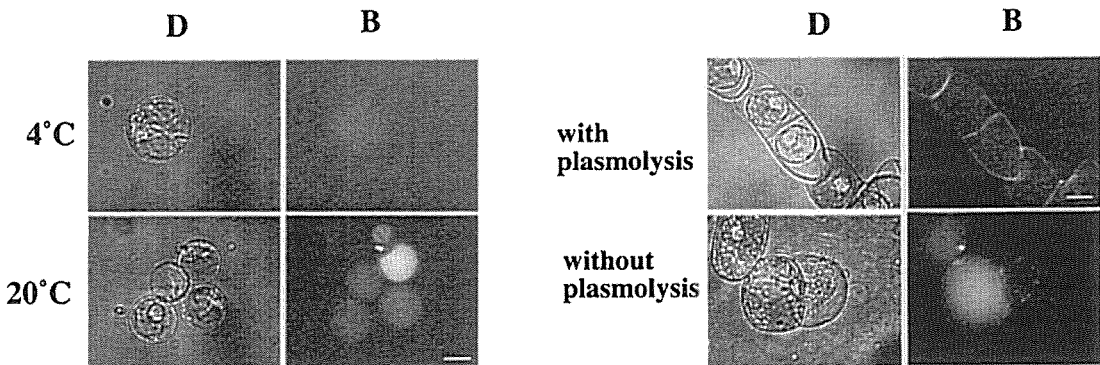


Fig.11 Images of BY-2 protoplasts treated by polysaccharide derivatives on temperature controlled and with and without plasmolysis.

Protoplasts were treated polysaccharide derivatives for 1 hour at room temperature and 4°C, and Cells were treated polysaccharide derivatives for 1 hour and observed with fluorescent microscope, observed with fluorescent microscope under daylight (D) and 475nm band pass blue filter set (B).

magnification was the same in all images (bar is 10 μ m).

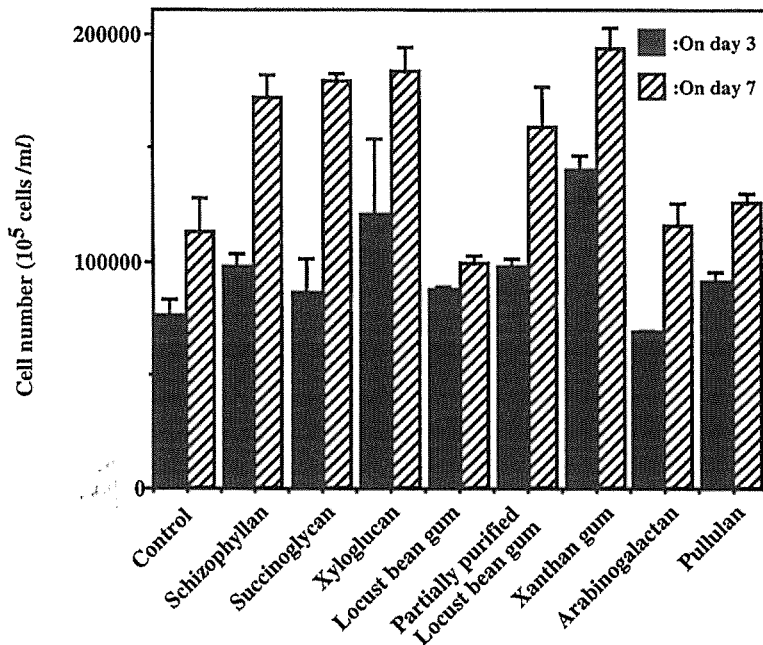


Fig.12 Effects of polysaccharides on protoplast division of BY-2. Protoplasts were incubated in the LS medium with 0.4M mannitol containing 0.1% polysaccharide.

サクシノグリカン、キシログルカン、キサントランガムにおいて細胞数の明らかな増加が見られた。これらの多糖はプロトプラストに対して吸着性を示した多糖であり、この吸着能が細胞数増加に関与していることが推察された。

ところが、同じようにプロトプラストに対して吸着性を示したローカストビーンガムに関しては、培養3日後においては未処理区分とほぼ同じ、7日後においては未処理区分よりも細胞数が減少するという結果となった。ローカストビーンガムは中性多糖であるので、その中に若干含まれるであろう夾雑物を除くために、東ソー DEAE Toyopearl 650M カラム (150mm × φ20mm) へ溶出溶媒に水を用いて供し、カラムから溶出してくるものを集めた。またカラムに吸着された物質を、0.1N 塩化ナトリウムを溶媒として用いて回収し、それぞれについて赤血球凝集活性があるかを調べた。するとローカストビーンガムには非常に強い赤血球凝集能があることがわかり、陰イオン交換カラムを通すことによってある程度除くことが出来ることがわかった。

以上のように処理したローカストビーンガムにおいては、BY-2 プロトプラスト再生においてシゾフィラン等のように細胞数増加に効果が現れることがわかった。以上のことからセルロース吸着性を示す水溶性多糖であるシゾフィラン、キシログルカン、ローカストビーンガムはプロトプラスト再生を促進させることがわかった。またセルロース吸着能はないが構造中にセルロース吸着能が期待される構造を有すキサントランガム及びサクシノグリカンも同様の効果が見られた。キサントランガムは、植物病原菌が産する菌体外多糖であり、またサクシノグリカンは *Agrobacterium* や *Rhizobium meliloti* の産する菌体外多糖である^{15, 92, 93}。どちらも植物に感染する生物の産する多糖であり、これらがセルロース吸着性を示さないながらも BY-2 プロトプラストに対して生理作用を示すことは非常に興味を持たれる現象である。

エンドウ幼芽に対する各種水溶性多糖の効果

エンドウ胚芽に対してプルラン、デキストラン、ラミナリン、シゾフィラン、アラビノガラクトン、パーレイグルカン、リケナン、サクシノグリカン、キシログルカ

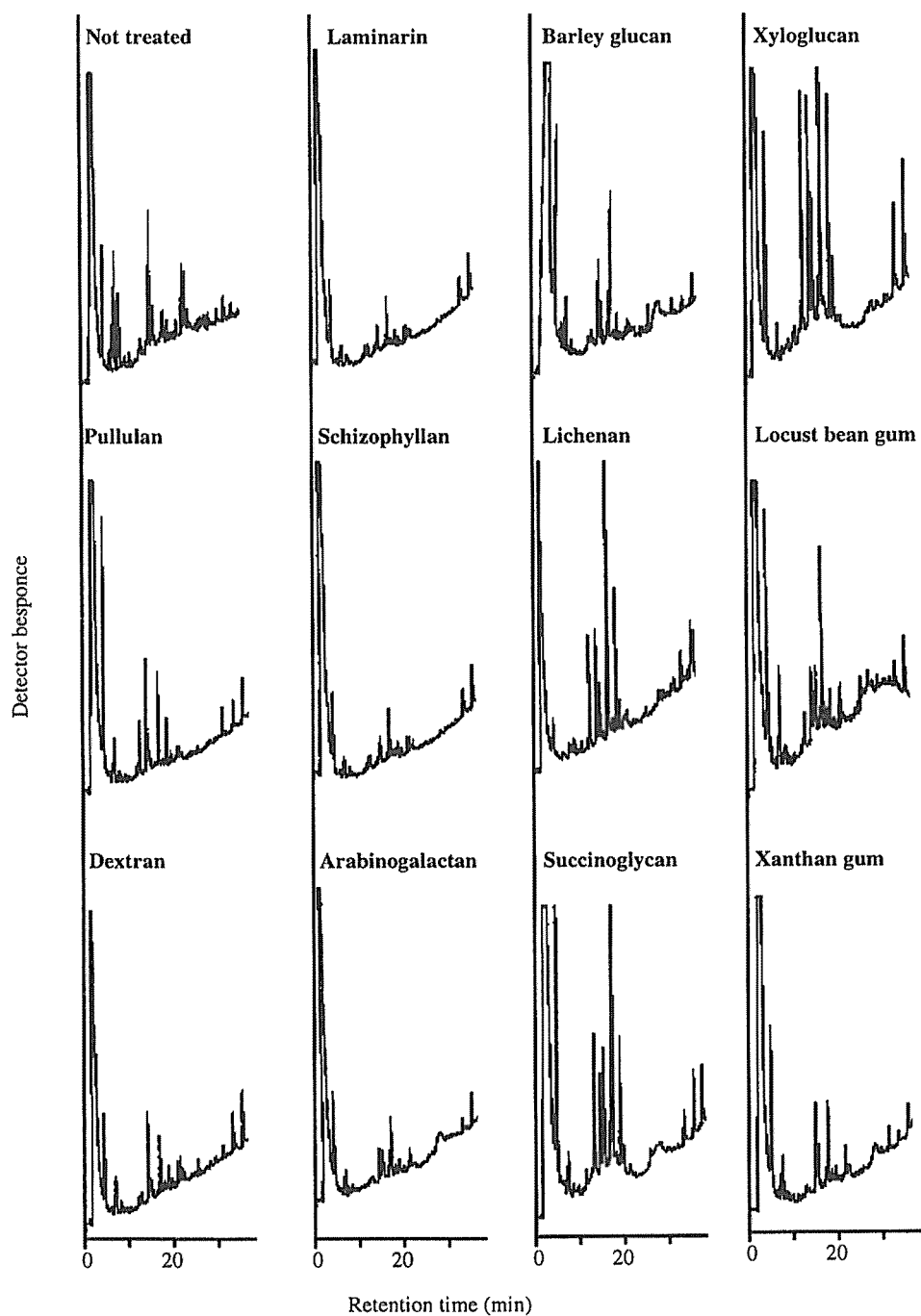


Fig.13 HPLC profiles of pisatin and other unidentified compounds accumulated in pea epicotyle sections treated by various saccharides.

ン、ローカストビーンガム、キサントガムを処理し、メタノール抽出したものを分析したところ、図13の結果を得た。対照区として未処理区分と比較すると、ピサチンは24分にピークが表れるが、多糖処理によりピサチンが強く誘導されることはなかった。しかしラミナリン、シゾフィラン、アラビノガラクトンについては、10から20分にかけてのピーク数及び強度が減少する傾向が見られた。逆にリケナン、サクシノグリカン、キシログルカンにおいてはピーク数、強度とも増加する傾向が見られた。これらのピークがどんな物質の存在を示すかは今回同定出来なかったが、異なる水溶性多糖で処理することによりこれらの物質生産の抑制もしくは誘導が引き起こされたと考えられる。

シゾフィラン、リケナン、パーレイグルカンについては、タバコ葉に塗布することによりタバコモザイクウィルス感染に対する抵抗性が上昇するという報告がある⁶⁴⁾。これら多糖はどれもセルロース吸着性が見られる多糖であり、このことから吸着性と生物活性との間に相関があることが推測される。

エリシターにより引き起こされる植物防御活性には様々なものがあることが知られている。本実験ではエンドウ胚芽を用いたピサチンを定量する系を用いて検討を行ったが、はっきりした相関性を認めることは出来なかった。そこで、植物細胞が広く行っており、ファイトアレキシン生産に関連すると考えられているシキミ酸経路の中で重要な位置を占めるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)の活性を測定する方法を用いた系を利用するのがよいかもしれない。タバコ培養細胞においてはエリシター誘導によるセスキテルペノイドの蓄積が報告されている⁶⁵⁾。さらにニンジン培養細胞において、糸状菌細胞壁を培地中に加えることによりPAL活性が上昇すること⁶⁶⁾や、コメ懸濁培養細胞においてはエリシターによりキチナーゼが誘導されることが報告されている⁶⁷⁾。これら系を利用することにより、糖質によるファイトアレキシン誘導についての知見がさらに得られるかもしれない。

総合考察

多糖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⁶⁴⁾程度で、高次構造との関連が詳細に検討された報告はほとんどないであろう。他方、レセプター側からの物質の認識という見知においては、昔から様々な事例が報告されている。例えば、植物ホルモンと高次構造の関係については次のような例が報告されている。オーキシンの活性型と不活性型との構造を比較すると、分子構造中に存在する荷電間距離が重要であるという考えがある⁶⁸⁾。キシログルカンオリゴ糖に関しても、9糖には抗オーキシン活性がみられるが、他の重合度のものに関してはみられない⁶⁹⁾。さらに、エリシターとして働くことが知られているβ-(1,6)分岐を有すβ-(1,3)グルカンにおいてその重合度と分岐の度合いが活性と相関があることが報告されている⁶⁹⁾。おもしろいことに、エリシター活性を示す重合度は3以上であるが、この重合度では三重らせん構造をとることができない。

酵母プロトプラスト再生実験やシゾフィランの吸着実験から、三重らせん構造由来の高次構造がプロトプラスト安定化に寄与し、高次構造との相関性が示唆された。さらに、セルロース吸着性多糖はタバコ培養細胞BY-2プロトプラストの再生率を有意に上昇させた。ところがエンドウ胚軸に対しての多糖の処理におけるエリシター様物質の生産については、シゾフィランをのぞくセルロース吸着性多糖がエリシター活性を示すという正反対とも思えるような挙動を示した。キチン及びキトサンオリゴ糖が示すエリシター活性においては、セルロース吸着性を示す程度の重合度でエリシター活性を示すことが知られている。これらの活性の有無はレセプター側の高次構造と関連していると想像できるが、現在までレセプターの単離に成功したという報告はないので、今回報告したセルロースへの吸着機構は、レセプターの認識機構に関する理解の一助となり得るかもしれない。

タバコ培養細胞BY-2に対するシゾフィラン、キシログルカン、ローカストビーンガム蛍光誘導体の吸着において、それぞれの吸着特性を反映する蛍光像が得られた。すなわち、ごく初期のプロトプラストにおいては、細胞表面にβ-(1,3)グルカンからなる細胞壁が構成されていると考えられており⁶⁶⁾、本研究においても、プロトプラスト化後2時間後には約8割のプロトプラストにおいて細胞壁が再生していた。再生したばかりの細胞壁中に

多くの β -(1,3) グルカンが存在することにより、シゾフィランが吸着したと考えられる。また、蛍光検鏡の結果、キシログルカンやローカストビーンガム誘導体よりもシゾフィランの方がプロトプラスト表面における蛍光強度が強い蛍光が見られた。この現象は、一概には言えないまでも初期に再生してくる細胞壁中に含まれる多糖について 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ことを示していると思われる。その理由について考えてみると、次のような仮説が考えられる。植物病原菌は植物細胞に感染するときに β -(1,4) グルカナーゼ等の細胞壁溶解酵素を用いることが知られている。しかし、植物細胞壁が β -(1,3) グルカンにより構成されていたなら、病原菌は感染することが出来ない。なぜなら、病原菌自体も細胞壁を有し、その組成は主に β -(1,3) グルカンやキチンから成るため、 β -(1,3) グルカナーゼを病原菌が菌体外に放出することは考えられない。類似した現象は、やはり植物病原菌が感染するときに植物細胞が作り出すパピラという構造物が挙げられる。 β -(1,3) グルカンから構成されているパピラ自体は物理的障壁となつて、病原菌の感染糸の進入を阻害すると考えられているが、植物病原菌由来のグルカナーゼにより消化されることはない。

植物病原菌や根粒菌の作り出す多糖であるキサンタンガムやサクシノグリカンにおいては、セルロースに対する吸着能を持たないにも関わらずタバコ BY-2 に対して相互作用を示したが、この現象は植物細胞が外部に対する認識機構として働いているのかもしれない。特に根粒菌の感染について、根粒菌の産する Nod factor としてのリボ多糖については知られているが、やはり根粒菌の産するサクシノグリカンに関しての生理的作用は殆ど分かっていない。しかし、本報告よりマメ科植物ではないが植物細胞自体との相互作用が見られたことから、感染時における何らかの生理的作用が存在すると想像される。

近年、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質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。シゾフィランが酵母プロトプラストの再生率を上昇させる現象に始まった本研究であるが、この現象の仕組みが多糖-多糖間吸着機構に由来するという点、特に多糖の主鎖部構成糖の結合型に起因する高次構造や水酸基の位置する空間座標が吸着に起因して

いるだろうことが推察されたことから、これからの糖質の機能研究は高次構造抜きで考えられなくなっていくであろう。

謝 辞

本研究の遂行ならびに本論文をまとめるに当たり、終始御親切な御指導を賜りました三重大学生物資源学部教授 久松眞先生に深く感謝の意を捧げます。

また本研究の御指導と御協力を賜りました三重大学生物資源学部教授（現名城大学農学部教授）山田哲也先生、同生物資源学部助教授 寺西克倫先生に甚大なる謝意を表します。

本実験を遂行する際に様々な理論、機器の操作等について御教授いただきました同大学生物資源学部教授 大宮邦雄先生、今井邦夫先生、久能均先生、同助教授 奥村克純先生、田中晶善先生、梅川逸人先生、同講師 小林一成先生、同助手 勝崎裕先生、大井淳史先生、医学部技官 小川覚様、教育学部教授 白井英夫先生、そして遺伝子実験施設助手 荻田修一先生に深く感謝いたします。また数多くの御助言を賜りました同大学生物資源学部の農芸化学コースの諸先生方、他コースの先生方に感謝いたします。

また本研究を行うに当たり、貴重なサンプルを分けいただきました岡山大学農学部教授 白石友紀先生、東北大学農学部教授 中島祐先生に感謝いたします。

最後に本研究を進めるに際し、多々の御助言、御協力を賜りました食品化学研究室の卒業生及び在校生に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1: SUGAWARA, I., C.K. LEE and M. WONG. Schizopyllan (SPG)-treated macrophages and anti-tumor activities against syngeneic and allogeneic tumor cells, *Cancer Immunol. Immunother.*, 16 : 137-144 (1984).
- 2: TAKEBE, I., Y. OTSUKI and S. AOKI. Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state, *Plant Cell Physiol.*, 9 : 115-124 (1968).
- 3: NAGATA, T. and I. TAKEBE. Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll

- protoplasts, *Planta*, **92** : 301-308 (1970).
- 4 : NAGATA, T. and I. TAKEBE. Plating of isolated tobacco methophyll protoplasts on agar medium, *Planta*, **99** : 12-20 (1971).
 - 5 : HISAMATSU, M., Y. MIYAMOTO, S. KOSEKO, T. HAYANO, T. YAMADA, K. NAKASHIMA, W. ITO and K. TANABE. Effects of schizophyllan on regeneration of protoplast cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosch. Biotech. Biochem.*, **57** : 484-485 (1993).
 - 6 : 菊本昭一, 宮島徹, 吉積智司, 藤本紫郎, 木村恵太郎. スエヒロタケの生産する多糖に関する研究 (第1報) 多糖の生成とその性質. *日本農芸化学会誌*, **44** : 337-342 (1970).
 - 7 : 菊本昭一, 宮島徹, 木村恵太郎, 大久保幸枝, 小松信彦. スエヒロタケの生産する多糖に関する研究 (第2報) 酵素による微細構造の検討. *日本農芸化学会誌*, **45** : 162-168 (1971).
 - 8 : NORISUYE, T., T. YANAKI and H. FUJITA. Triple helix of a *Schizophyllum commune* polysaccharide in aqueous solution, *J. Polym. Sci.*, (ed. by *Polym., Phys.*), **18** : 547-558 (1980).
 - 9 : SATO, T., T. NORISUYE and H. FUJITA. Melting behavior of *Schizophyllum commune* polysaccharides in mixtures of water and dimethyl sulfoxide, *Carbohydr. Res.*, **95** : 195-204 (1981).
 - 10 : KITAMURA, S., T. HIRANO, K. TAKEO, H. FUKADA, K. TAKAHASHI, B. H. FALCH and B. T. STOKKE. Conformational transitions of schizophyllan in aqueous alkaline solution, *Biopolymers*, **39** : 407-416 (1996).
 - 11 : HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 139-168 (1989).
 - 12 : HAYASHI, T., K. BABA and K. OGAWA. Macromolecular complexes of xyloglucan and cellulose obtained by annealing, *Plant Cell Physiol.*, **35** : 219-223 (1994).
 - 13 : HAYASHI, T., K. OGAWA. and Y. MITSUISHI. Characterization of the adsorption of xyloglucan to cellulose. *Plant Cell Physiol.*, **35** (8) 94-118 (1994).
 - 14 : HARADA, T., A. MISAKI, H. SAITO. Curdlan : a bacterial gel-forming β -1,3-glucan. *Arch. Biochem. Biophys.* **124** (1) : 292-8 (1968).
 - 15 : NAKANISHI, I., K. KIMURA, S. KUSUI and E. YAMAZAKI. Complex formation of gel-forming bacterial (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans (Curdlan-type polysaccharides) with dyes in aqueous solution, *Carbohydr. Res.*, **32** : 47-52 (1974).
 - 16 : MAEDA, I., H. SAITO, M. MAEDA, A. MISAKI and T. HARADA. Properties of gels formed by heat treatment of curdlan, a bacterial β -1,3-glucan, *Agric. Biol. Chem.*, **31** : 1184-1188 (1967).
 - 17 : OKUYAMA, K., A. OTSUBO, Y. FUKUZAWA, M. OZAWA, T. HARADA and N. KASAI. Single-helical structure of curdlan and its aggregation state, *J. Carbohydr. Chem.*, **10** (4) : 645-656 (1991).
 - 18 : M. HISAMATSU, 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).
 - 19 : HISAMATSU, M. Cyclic (1 \rightarrow 2)- β -D-glucans (cyclophorans) produced by *Agrobacterium* and *Rhizobium* species, *Carbohydr. Res.*, **231**, 137-146 (1992).
 - 20 : 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).
 - 21 : STEPHEN, A. M. *The Polysaccharides*, Vol. 2, (ed. by Aspinall, G. O. X, *Other Plant Polysaccharides*. Academic Press, NY) p98-353 (1983).
 - 22 : 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).
 - 23 : MCNEIL, M., A.G. DARVILL, S.C. FRY and P. ALBERSHEIM. Structure and function of the primary cell walls of plants, *Annu. Rev. Biochem.*, **53** : 625-663 (1984).
 - 24 : YORK, W. S., L.K. HARVEY., R. GUILLEN, P. ALBERSHEIM and A.G. DARVILL. Structural analysis of β -galactosidase digestion and spectroscopic methods, *Carbohydr. Res.*, **248** : 285-301 (1993).
 - 25 : YORK, W.S., G. IMPALLOMENI, M. HISAMATSU, P. ALBERSHEIM and A.G. DARVILL. Eleven newly characterized xyloglucan oligoglycosyl alditols : the specific effects of sidechain structure and location on ¹H NMR chemical shifts, *Carbohydr.*

- Res., 267 : 79-104 (1995).
- 26 : HAYASHI, T. and G. MACHLAFLAN. Pea xyloglucan and cellulose I. Macromolecular organization, *Plant Physiol.*, 75 : 596-604 (1984).
- 27 : JANSSON, P. E., L. KENNE and B. LINDBERG. Structure of extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*, *Carbohydr. Res.*, 45 : 275-282 (1975).
- 28 : DUBOIS, M., K.A. GILLES., J.K. HAMILTON, P.A. REBERS and F. SMITH. Colorimetric method for determination of sugar and related substance, *Anal. Chem.*, 31 : 1184-1188 (1956).
- 29 : BRIX, G. The determination of hexosamines according to Elson and Morgan, *Acta Chemica Scandinavica*, 2 : 467-473 (1948).
- 30 : MCCOMB, E.A. and R.M. MCCREADY. Determination of acetyl pectin and in acetylated carbohydrate polymers, *Anal. Chem.*, 29 : 819-821 (1957).
- 31 : HISAMATSU, M., M. HAYANO, T. MISHIMA, K. TERANISHI and T. YAMADA. Effects of degraded schizophyllans on regeneration of protoplast cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59 : 2307-2308 (1995).
- 32 : 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).
- 33 : KITAMURA, S. and T. KUGE. A differential scanning calorimetric study of the conformational transitions of schizophyllan in mixtures of water and dimethylsulfoxide, *Biopolymers*, 28 (2) : 639-654 (1989).
- 34 : STOKKE, B.T. and A. ELGSAETER. Macrocyclization of polysaccharides visualized by electron microscopy, *Int. J. Biol. Macromol.*, 15 : 63-68 (1993).
- 35 : SATO, T., T. NORISUYE and H. FUJITA. Triple helix of *Schizophyllum commune* polysaccharide in dilute solution. 5. Light scattering and refractometry in mixtures of water and dimethyl sulfoxide, *Carbohydr. Res.*, 95 : 195-204 (1981).
- 36 : TABATA, K., W. ITO, T. KOJIMA, S. KAWABATA and A. MISAKI. Ultrasonic degradation of schizophyllan, an antitumor polysaccharide produced by *Schizophyllum commune* fries, *Carbohydr. Res.*, 89 : 121-135 (1981).
- 37 : OGAWA, K., T. DOHMARU and T. YUI. Dependence of complex formation of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan with congo red on temperature in alkaline solutions, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58 : 1870-1872 (1994).
- 38 : OGAWA, K. Circular dichroism of the complex of a (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan with congo red, *Carbohydr. Res.*, 67 : 527-535 (1978).
- 39 : ITOU, T. and A. TERAMOTO. Isotope effect on the order-disorder transition in aqueous schizophyllan, *Carbohydr. Res.*, 160 : 243-257 (1987).
- 40 : ALBERSHEIM, P. and A.G. DARVILL. Oligosaccharins, *Sci. Am.*, 253 : 44-50 (1985).
- 41 : NAGATA, T., Y. NEMOTO and S. HASEGAWA. Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants. *Int. Review Cytogy*, 132 : 1-30 (1992).
- 42 : KOOIMAN, P.A. Method for the determination of amiloid in plant seeds, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas.*, 79 : 675-678 (1960).
- 43 : HAKOMORI, S.A. Rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalysed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide, *J. Biochem.*, 55 : 205-208 (1964).
- 44 : SLONEKER, J.H. and A. JEANES. Extracellular bacterial polysaccharide Part I. Construction, *Can. J. Chem.*, 40 : 2066-2071 (1962).
- 45 : CHAUDHARI, A. S., C.T. BISHOP and W.F. DUDMAN. Structural studies on the specific capsular polysaccharide from *Rhizobium trifolii*, TA-1. *Carbohydr. Res.*, 28 : 221-231 (1973).
- 46 : TAYLOR, R. L. and H.E. CONARD. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry*, 11 (8) : 1383-1388 (1972).
- 47 : KOEPEL, H. J. and E.S. SHARPE. Microdetermination of pyruvic and α -ketoglutaric acids, *Arch. Biochem. Biophys.*, 38 : 443-449 (1952).
- 48 : BITTER, T. and H.M. MUIR. A modified uronic acid carbazole reaction, *Anal. Biochem.*, 4 : 330-334 (1962).
- 49 : LINSMAIR, E.M. and F. SKOOG. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture, *Physiol. Plant.*, 18 : 100-127 (1965).
- 50 : MISHIMA, T., M. HISAMATSU, K. TERANISHI and T. YAMADA. Adhesion of polysaccharides for intact cells and protoplasts of *Nicotiana tabacum* BY-2 and its stimulative effect on protoplast growth, *J. Biosci. Bioengine.*, 87 : 57-61 (1999).

- 51 : GLABE, C.G., P. K. HARTY and S.D. ROSEN. Preparation and properties of fluorescent polysaccharides. *Anal. Biochem.*, **130** : 287-294 (1983).
- 52 : OKUMURA, K., M. NOGAMI, H. TAGUCHI, H. HISAMATSU and K. TANAKA. The genes for the α -type HC-3 (PSMA2) and β -type HC-5 (PSMB1) subunits of human proteasomes map to chromosomes 6q27 and 7p12-p13 by fluorescence *in situ* hybridization, *Genomics*, **27** : 377-379 (1995).
- 53 : STROOBANTS, C., L. SOSSOUNTZOV and E. MIGINIAC. DNA synthesis in excised tobacco leaves after bromodeoxyuridine incorporation : immunohistochemical detection in semi-thin spurr sections, *J. Histochem. Cytochem.*, **38** (5) : 641-647 (1990).
- 54 : 桜井直樹, 山本良一, 加藤陽治. 植物細胞壁と多糖. 培風館, 145-153 (1991).
- 55 : GEBLER, K., N. KRAUB, T. STEINER, C. BETZEL, C. SANDMANN and W. SAENGER. Crystal structure of β -D-cellobiose hemihydrate with implications for the structure of cellulose II, *Science*, **266** : 1027-1029 (1994).
- 56 : HAYASHI, T., D. R. PORONENKO, D. R., A. CAMIRAND and G. MACLAND. Pea xyloglucan and cellulose IV. Assembly of β -glucans by pea protoplasts, *Plant Physiol.*, **82** : 301-306 (1986).
- 57 : SHATWELL, K. P., I.W. SUTHERLAND, PEA, I. C. M. and ROSS-MURPHY, S. B. The influence of acetyl and pyruvate substituents on the helix-coil transition behavior of xanthan, *Carbohydr. Res.*, **206** : 87-103 (1990).
- 58 : 久能均. 植物細胞における病原菌認識. 日本農芸化学会誌, **69** (2) : 182-184 (1995).
- 59 : HAYASHI, T., T. TAKEDA, K. OGAWA and Y. MITSUISHI. Effects of degree of polymerization on the binding of xyloglucans to cellulose, *Plant Cell Physiol.* **35** (6) : 893-899 (1994).
- 60 : LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plate surfaces of glass, mica and platinum, *J. Am. Chem. Soc.*, **40** : 1361-1403 (1918).
- 61 : MEADOWS, M.G. A batch assay using calcofluor fluorescence to characterized cell wall regeneration in plant protoplasts, *Anal. Biochem.*, **141** : 38-42 (1984).
- 62 : LEIGH, J. A., J.W. READ, J.F. HANKS, A.M. HIRCH, and G.C. WALKER. *Rhizobium meliloti* mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolysaccharide are defective in nodule invasion, *Cell*, **51** (4) : 579-587 (1987).
- 63 : REUBER, T.L. and G.C. WALKER. Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell*, **74** (2) : 269-280 (1993).
- 64 : 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).
- 65 : CHAPPELL, J. and R. NABLE. Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor, *Plant Physiol.*, **85** : 469-473 (1987).
- 66 : KUROSAKI, F., N. TAHIRO and A. NISHI. Induction of chitinase and phenylalanine ammonia-lyase in cultured carrot cells treated with fungal mycelial walls, *A. Plant Cell Physiol.*, **27** : p1587-1591 (1986).
- 67 : INUI, H., Y. YAMAGUCHI, Y. IISHIGAMI, S. KAWAGUCHI, T. YAMADA, H. IHARA and S. HIRANO. Three extracellular chitinases in suspension-cultured rice cells elicited by N-acetylchitooligosaccharides, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60** : 1956-1961 (1996).
- 68 : 増田芳雄. 植物生理学. 培風館, p273-283 (1977).
- 69 : 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** : 1-9 (1997).