

## 植物脂質の分子種多様性とその代謝に関する研究

### 学位論文内容の要旨

本研究の主な目的は、(1) 植物、特にマメ科植物の各器官（葉、茎、根、種子、および培養細胞など）に含まれるグリセロ脂質、ステロール脂質およびスフィンゴ脂質の分子種の構造の多様性を明らかにすること、および各分子種の代謝を考察する。(2) 成育時の環境要因の変化（低温処理や外因性脂肪酸取り込み）による膜脂質組成の変化と生理的変動との関連性を検討する。(3) 植物スフィンゴ脂質の代謝経路について明らかにすることなどである。

第1章では、これまでに明らかにされている植物脂質の構造および代謝に関する報告を概括し、未解決の問題点を示した。

第2章の第1節では、数種のマメ科植物種子を、第2節ではアズキの各器官（葉、茎、根、莢および完熟種子）を、第3節では登熟段階の異なるアズキ未熟種子を材料にして、マメ科植物に含まれる脂質の分子種多様性について検討した。

1. 数種のマメ科植物種子およびアズキの各器官に含まれるグリセロ脂質：トリアシルグリセロール(TG)、ホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジエタノールアミン(PE)のジアシルグリセロール(DG)残基の分子種組成は、植物種や各器官により特徴のあることを明らかにした。グリセロ脂質の分子種組成は、それを合成する酵素(G3Pアシルトランスフェラーゼや不飽和化酵素など)の活性により制御されていることを考察した。

2. 数種のマメ科植物種子中には、従来型のジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG);Gal( $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6)Gal-DGとは糖鎖部分が異なる新規なGal( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)Gal-DGが広く混在することを明らかにした。両者の割合は品種間では類似していたが、植物種およびアズキの各器官により異なることを明らかにした。またアズキの登熟過程の未熟種子の両型のDGDGの割合および分子種組成が開花後40~50日目に急激に変動することを明らかにした。

3. アズキ種子中に新規なオリゴ糖鎖含有のステロール配糖体の存在を明らかにし、その構造をGlc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)Glc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)Glc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)システロールまたはスチグマステロール、Glc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)Glc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)Glc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6)Glc( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3)システロールまたはスチグマステロールと決定した。また、それらの前駆体のGlc( $\beta$ 1 $\rightarrow$

6) Glc( $\beta$  1 $\rightarrow$ 3) ステロールの存在も示した。

4. 数種のマメ科植物種子のセレプロシド (CMH) の構造を比較して、エンドウとソラマメの主要な構造が他の種子のそれとは異なることを明らかにした。また、アズキの各器官および登熟段階の異なるアズキ未熟種子の主要なセラミド (CM, CMHの前駆体) とCMH の主要な構造が異なることを明らかにした。

第3章では、低温感受性植物であるアズキの培養細胞を用いて、環境要因による膜脂質の変動を検討した。第1節では、アズキの各器官から誘導した培養細胞の脂質の特徴を親細胞のそれと比較した。第2節では、アズキ培養細胞を低温環境下(3°C)で培養した時の膜脂質の変動を検討した。第3節では、アズキ培養細胞に外因的に飽和の遊離脂肪酸を取り込ませた時の膜脂質の分子種組成の変動とその細胞の低温感受性能の変動を検討した。

1. アズキの各器官から誘導した培養細胞の主要な脂質クラスは、グリセロリン脂質 (PEやPCなど) であり、親細胞 (アズキの葉以外) と脱分化細胞の脂質クラスは類似性を示したが、培養細胞のグリセロリン脂質およびグリセロ糖脂質の分子種組成は親細胞の特徴を示すのではなくアズキ培養細胞特有の分子種パターンを示すことを明らかにした。

2. アズキの各器官から誘導した培養細胞のCMH 組成は、トリヒドロキシスフィンゴイドの割合が親細胞のそれに比べて若干高かったが、構成ヒドロキシ酸組成には著しい違いは認められなかった。またCMの主要な構成成分は親細胞のそれと同じ傾向を示した。

3. 低温条件(3°C)で培養した細胞の経日的な増殖はほとんどみられなかった。細胞のTTC還元能は、3°Cで2日間培養した細胞ではcontrolのそれとほぼ同様であったが、3°Cで9日間培養した細胞では約20%低下した。また3°Cで2日間、4日間および6日間培養した細胞を24°Cに移して培養を続けたところ、いずれの条件の場合にも細胞の再増殖が認められた。

4. 低温で培養した細胞のPE、PCおよびCMHの分子種組成は、25°Cで培養した場合のそれと著しい違いは認められなかったが、MGDGとDGDGの全不飽和度が3以上の分子種の割合が若干高くなり、逆に飽和含有分子種の割合が若干低くなった。

5. 培地に1/40容のメタノールと2.5mMの遊離脂肪酸(16:0, 18:0混合物)もしくは1/200容のメタノールと0.5mMの遊離脂肪酸を加えたアズキ培養細胞の増殖率は、controlに対し約 $\frac{1}{4}$ および約 $\frac{1}{5}$ で、細胞のエステラーゼ活性や呼吸効率(TTC還元能)は両者ともにcontrolの約20~30%を示した。加えた遊離脂肪酸の濃度が高くなるほど、PCやPIの16:0や18:0含有分子種(16:0-16:0や16:0-18:0分子種など)の割合が高くなったが、PEのそれらの分子種の顕著な変動は認められなかった。また、低温で培養したときのこの細胞のTTC還元能はcontrolのそれに比べて低下し、細胞の膜脂質の飽和脂肪酸含有分子種が多くなると、細胞が以前より低温に弱くなることを推察した。

第4章の第1節では、アズキ根由来、子葉由来およびタバコ由来BY-2培養細胞を用いて、*in vivo*でのラベルセリンの脂質への取り込みとその代謝を検討し、第2節ではアズキ根由来の培養細胞を用いてスフィンゴ脂質の代謝、特にラベルセリンおよびラベルパルミチン酸を用いて構成スフィンゴイドの不飽和化機構を検討した。

1. 外因的に培地に加えたセリンは、脂質の各構成成分；極性基（エタノールアミン、コリンおよびセリンなど）、脂肪酸およびスフィンゴイドに取り込まれた。ラベルの取り込み初期（60分以内）では、PEに最も高い取り込みが認められたが60分以降徐々に減少した。逆にPCへのラベル量は経時的に徐々に増大した。

2. アズキ培養細胞に外因的にセリンを取り込ませた場合には、PSや遊離セリンの脱炭酸によりPEやエタノールアミンが生成し、また遊離のエタノールアミンはPEとなり、続いてPEのメチル化反応によりPCが合成される経路が働いていることを考察した。

3. ラベルの経時的変動から判断して、ラベルセリンは遊離のスフィンガニン (d18:0) を経て直ちにアシル化されCMとなり、d18:0 含有CMはd18:2 含有CMに不飽和化され、d18:2 含有分子種が優先してグリコシル化されることを考察した。またトリヒドロキシ型スフィンゴイドの飽和型から8-モノエン型への不飽和化も主にCMで起こり、トリヒドロキシ型CMHの生成はジヒドロキシ型CMHよりも遅いことを明らかにした。

4.  $[1-^{14}\text{C}]16:0$  はCMとCMHの構成スフィンゴと脂肪酸の両者に取り込まれた。CMでは直鎖型とヒドロキシ型脂肪酸の両者にラベルが認められたが、CMHのそれは取り込み初期でもヒドロキシ酸のみにラベルが認められ、糖転移酵素の基質選択性が高いことを推察した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 仁 木 良 哉

副 査 教 授 本 間 守

## 学 位 論 文 題 名

### 植物脂質の分子種多様性とその代謝に関する研究

本論文は、和文200頁、図34、表55、5章からなり、ほかに参考論文27篇が付されている。

近年、生体内での脂質の機能、役割などを解明するためには各脂質グループを構成している分子種とその代謝の解析が重要であることが認識されるようになってきている。

本研究は、マメ科植物、特にアズキを中心に各器官に含まれる脂質群：グリセロ脂質、ステロール脂質およびスフィンゴ脂質の分子種の構造解析、環境要因の変化にともなう膜脂質の分子種変化と生理的変動の関連性ならびにスフィンゴ脂質の代謝経路を検討したものであり、研究の結果は以下のように要約される。

1. マメ科植物の各器官に含まれるグリセロ脂質：トリアシルグリセロール (TG)、ホスファチジルコリン (PC) およびホスファチジルエタノールアミン (PE) などのジアシルグリセロール (DG) 残基の分子種組成は、植物の種類と器官により特徴があり、それらの合成酵素により制御されていることを認めた。

2. マメ科植物種子中には、従来知られているジガラリトシルジアシルグリセロール (DGDG) : Gal ( $\alpha$  1  $\rightarrow$  6) Gal-DG とは糖鎖の結合様式が異なる新規な Gal ( $\beta$  1  $\rightarrow$  6) Gal-DG が広く混在していることを明らかにした。

3. アズキ種子中に4種の新規なオリゴ糖鎖含有ステロール配糖体の存在を明らかにし、その構造を Glc ( $\beta$  1  $\rightarrow$  6) Glc ( $\beta$  1  $\rightarrow$  6) Glc ( $\beta$  1  $\rightarrow$  3) シトステロールまたはスチグマステロール、Glc ( $\beta$  1  $\rightarrow$  6) Glc ( $\beta$  1  $\rightarrow$  6) Glc ( $\beta$  1  $\rightarrow$  6) Glc ( $\beta$  1  $\rightarrow$  3) シトステロールまたはスチグマステロールと決定した。またそれらの前駆体である Glc ( $\beta$  1  $\rightarrow$  6) Glc ( $\beta$  1  $\rightarrow$  3) ステロールの存在を明らかにした。

4. エンドウおよびソラマメ種子の主要なセレプロシド (CMH) 分子種は、他のマメ科植物種子の CMH とは異なるが、両者の主要なセラミド (CM, CMHの前駆

体)の分子種には他のマメ科植物種子CMと違いがみられないことを明らかにした。

5. 低温感受性植物であるアズキの培養細胞のグリセロ脂質とスフィンゴ脂質の分子種組成は、親細胞の特徴を示さず培養細胞特有の分子種パターンを示すことを明らかにした。

6. アズキ培養細胞を低温条件下に移し培養を続けた場合(3℃、9日間)、細胞内のPE、PCおよびCMHの分子種組成には25℃で培養を続けた場合と著しい差はみられないが、モノあるいはジガラクトシルジアシルグリセロールの全不飽和度が3以上の分子種の割合が高くなり、相対的に飽和脂肪酸含有分子種の割合が低下することを認めた。

7. 培地に2.5mM パルミチン酸およびステアリン酸(16:0, 18:0; 0.05%メタノール中)を加えたアズキ培養細胞の増殖率はコントロールの約50%、細胞内エステラーゼ活性や呼吸率(TTC還元能)は20~30%に低下した。培地に添加した飽和脂肪酸の濃度が高くなるほど膜脂質としてのホスファチジルコリンやホスアチジルイノシトールの16:0や18:0含有分子種(16:0-16:0や16:0-18:0)の割合が高くなり、その細胞は低温で培養したとき呼吸率が低いことを観察した。これらの結果から、細胞の膜脂質の飽和脂肪酸含有分子種が多くなると、細胞の低温耐性が減少すると推定している。

8. [ $3\text{-}^{14}\text{C}$ ] セリンのアズキ培養細胞への取り込み実験から、セリンは遊離スフィンガニン(d18:0)を経てアシル化されCMとなりスフィンガジェニン(d18:2)含有分子種に不飽和化され、続いてd18:2含有分子種が優先的にグリコシル化されることを明らかにした。

以上のように本研究は、マメ科植物の脂質群の分子種の解析、新規ステロール配糖体の構造決定、環境要因の変化に対応した膜脂質分子種の変化、多様な分子種からなるスフィンゴ脂質の代謝経路を検討したものであり、学術的にも貴重な知見を提供しており高く評価される。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者小嶋道之は博士(農学)の学位を受けるに十分な資格あるものと認定した。