

学 位 論 文 題 名

Arabinogalactan-protein and its metabolism
in developing anthers at the critical atage
of microsporogenesis in rice

(イネ冷害危険期の葯におけるアラビノガラクトタンプロテインとその代謝)

学位論文内容の要旨

イネの障害型冷害は、小孢子初期（四分子期～小孢子初期）における 12～18℃ の低温により花粉の生長が選択的に阻害された結果、雄性不稔となり、玄米収量の甚大な低下をもたらす現象である。著者は、低温ストレスによる小孢子初期の花粉生長阻害をもたらさうる、葯の生長機構の生理学的解明を目的とした。即ち、冷害危険期のイネ葯には、花粉の生育に重要かつ、上記低温にきわめて感受的な生化学過程が存在すると仮定し、葯の物質代謝に関連する一連の研究を行ってきた。その結果、アラビノガラクトタンプロテイン (AGP) と称される一群の糖タンパク質の代謝過程がイネ葯に存在することを認め、花粉の生育と低温感受機構とに極めて深い関連性を検証した。その概要は次のようである。

1. イネ葯の遊離糖

遊離糖の検出手法 非常に微量な葯の含有成分の測定には、高感度の検出手法が必須である。強アルカリ溶離液、高性能イオン交換カラム、インテグレートッドアンペロメトリー検出器を利用する HPAEC 法は、遊離糖を高感度に分離検出できるため、イネ葯 1 個以下での遊離糖測定が可能となり、本研究において非常に重要な役割を果たした。

イネ葯遊離糖の濃度変化 未熟なイネ葯に含まれる遊離糖成分としては、従来の報告どおりグルコース、フルクトース、及びスクロースを検出したほか、未知のオリゴ糖が生育時期特異的（四分子期～1核前期）に蓄積することを見いだした。

低温処理に伴う遊離糖濃度変化 雄性不稔を人為的に生起させうる、穂ばらみ期 12℃ 4 日間の低温処理により、未知オリゴ糖濃度のみが特異的に低下した。さらに、耐冷性弱品種ほど、正常時に比較したオリゴ糖濃度の低下程度が大きかった。以上の結果、生長中の葯に蓄積する未知のオリゴ糖は、その蓄積開始が葯の低温感受期と一致し、かつ、低温処理により品種の耐冷性に比例して特異的に濃度が低下することから、葯の生長と低温感受機構に特異的な生化学反応に関連する物質と考えられた。

2. 未知オリゴ糖の構造

構造決定のためのオリゴ糖純品は、イネ幼穂の 80%エタノール抽出物の中性糖分画を活性炭カラム、逆相 HPLC により分離精製し、幼穂 1 キログラムから約 10 ミリグラムの精製オリゴ糖を得た。構成糖分析、メチル化分析、タンデムマススペクトロメーター、核磁気共鳴装置等による構造解析の結果、オリゴ糖構造は β -L-Araf-(1→3)- α -L-Araf-(1→3)- β -D-Galp-(1→6)-D-Gal であった。この構造はアカシアの樹液から単離されたア

ラビノガラクトタンブロテイン (AGP) の糖鎖コア構造に非常に類似しており、薬の生長へのAGPの関与を示唆した。

3. イネのAGP

AGPの検出手段 AGP定量は、Yariv phenylglycoside との結合反応を利用した一元放射状ゲル拡散法を利用した。本法も非常に微量なAGPの検出に優れた高感度手法で、イネ薬1個以下でAGPを検出できた。
イネAGPの分離 イネ幼穂には分子量及び電荷によって区別できるいくつかのAGPが蓄積していた。このうち、薬のAGP濃度はきわめて高く (約2.8%)、分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィーにより約30kDと推定したが、これは他種植物由来のAGP分子量 (約200kD) と比較して極めて小さい。一方、薬以外の幼穂組織にも非常に低濃度 (0.025%) ながら高分子 (300kD) 及び低分子 (30kD) の2種のAGPが蓄積していた。
薬の生長に伴うAGP濃度変化 AGPは、花粉母細胞→小孢子前期にかけて一過的に蓄積した。この際、オリゴ糖を抗原に用いて作製した抗オリゴ糖抗体を使ったエライザ法によっても、同様の蓄積カーブが得られた。この結果は、オリゴ糖構造がAGPに存在することを示し、さらに、両糖質の蓄積パターンの比較から、オリゴ糖はAGPの分解反応により生成されることを強く示唆した。

4. AGPの代謝

AGP分解活性測定系の開発 イネ薬のAGP代謝を制御する酵素活性の検出を次のように試みた。反応基質として、幼穂から分離した高分子及び低分子AGPを含む分画を用い、酵素標品としてイネ薬の粗タンパク分画を用いた。反応は両者の混合により開始し、一定時間後に生成されるオリゴ糖濃度を活性とした。その結果、低分子AGP分画が基質の場合のみにオリゴ糖が生成した。反応によって生じたオリゴ糖は、構造解析により、イネ薬に蓄積するオリゴ糖と同一であることを確認した。高分子AGP分画を基質に用いた場合はオリゴ糖が生成されなかったため、これら分子量の異なるAGPは発現部位の異なる異種分子であること、オリゴ糖生成反応が薬特異的に存在することを示した。

AGP分解活性の特性 AGP分解活性測定系におけるオリゴ糖生成量は、反応時間と酵素タンパク量に比例して変化し、その範囲で定量性が確認された。また、反応の至適pHは5で、pH4-6以外の範囲ではほとんど活性を示さない。また、酵素活性は小孢子前期から1核期にかけて一過的なステージ特異的の変動を示し、変動カーブはオリゴ糖蓄積カーブと一致した。以上の結果は、生長中の薬において、小孢子的ステージ進行に伴って発現する酵素によりAGPからオリゴ糖が生成していることを示した。

5. AGPの組織局在性

急速凍結固定と免疫組織化学手法 AGPの機能を推定するため、抗オリゴ糖抗体を用いた免疫組織化学にて薬組織内の局在性解析を行った。薬組織構造及び抗原の良好な保持のために液体プロパンによる急速凍結固定法が有効であった。

AGPエピトープの発現 2次抗体にラベルされたFITC由来の蛍光シグナルは、花粉母細胞→四分前期薬標本に発現し、AGPの蓄積パターンと一致したことから、標本上のシグナルはAGPの分布を表すと考えられた。蛍光シグナルはタペート細胞及び小孢子細胞の表層に分布し、小孢子間、あるいは小孢子→タペート細胞間の相互作用、或いは接着に関与する可能性が示唆された。

以上の実験結果より次のことが考察される。生長中のイネ薬には高濃度のAGPとこれから酵素作用により解離する関連オリゴ糖が一過的かつ連続して蓄積する。この糖質代謝は薬組織特異的及び時期特異的であり、その生理機能は不明だが薬の正常な生育に重要な役割を果たしていると考えられる。組織局在性より推察すると、小孢子とタペート細胞間の相互作用、特に接着に関与するものかもしれない。低温処理によるオリゴ糖濃

度の低下とイネ品種耐冷性との間に存在する強い相関は、低温によるAGP代謝阻害が花粉生育阻害の1原因である可能性を示唆した。AGPとオリゴ糖の生理機能、及びその代謝酵素の特性の解明がイネ障害型冷害の生理機構解明に結びつくと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜久田 嘉 郎

副 査 教 授 千 葉 誠 哉

副 査 教 授 岩 間 和 人

副 査 助 教 授 幸 田 泰 則

副 査 教 授 坂 齊

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

学 位 論 文 題 名

Arabinogalactan-protein and its metabolism in developing anthers at the critical atage of microsporogenesis in rice

(イネ冷害危険期の葯におけるアラビノガラクトタンプロテインとその代謝)

本論文は総頁数 150 頁からなる英文で表 7・図 24 を含み 7 章から構成されている。別に 3 編の参考論文が添えられている。

イネの障害型冷害は、小孢子初期(四分子期~小孢子初期)における 12~18°C の低温により花粉の生長が選択的に阻害された結果、雄性不稔となり、玄米収量の甚大な低下をもたらす現象である。著者は、低温ストレスによる小孢子初期の花粉生長阻害をもたらす葯の生長機構の生理学的解明を研究目的とした。即ち、冷害危険期のイネ葯には、花粉の生育に重要かつ、上記低温にきわめて感受的な生化学過程が存在すると仮定し、葯の物質代謝に関連する一連の研究を行ってきた。その結果、アラビノガラクトタンプロテイン(AGP)と称される一群の糖タンパク質の代謝過程がイネ葯に存在することを認め、花粉の生育と低温感受機構とに極めて深い関連性を検証した。その概要は次のようである。

1. イネ葯の遊離糖

微量な葯の含有成分の測定には、高感度の検出手法が必須である。高性能イオン交換カラム、アンペロメトリー検出器を用いた高速液体クロストグラフィーは、遊離糖を高感度に分離検出できるため、イネ葯 1 個での遊離糖測定が可能となり、本研究において非常に重要な役割を果たした。

雄性不稔を人為的に生起させる穂ばらみ期 12°C 4 日間の低温処理により、未知オリゴ糖のみが特異的に低下した。さらに、弱耐冷性品種ほど、正常時に比較したオリゴ糖の濃度低下が大きかった。生長中の葯に蓄積する未知のオリゴ糖は、その蓄積開始が葯の低温感受期と一致し、かつ、低温処理により品種の耐冷性に比例して特異的に濃度が低下することから、葯の生長と低温感受機構に特異的な生化学反応に関連する物質と考えられた。

2. 未知オリゴ糖の構造

葯の未知オリゴ糖標品は、中性糖分画を活性炭カラム、逆相構成糖分析、メチル化分析、タンデムマススペクトロメーター、核磁気共鳴装置等による構造解析の結果、オリゴ糖構造は β -L-Araf-(1→3)- α -L-Araf-(1→3)- β -D-Galp-(1→6)-D-Galであった。この構造はアカシアの樹液から単離されたアラビノガラクトンプロテイン (AGP) の糖鎖コア構造に非常に類似しており、葯の生長へのAGPの関与を示唆している。

3. イネのAGP

AGP定量は、Yariv phenylglycoside との結合反応による一元放射状ゲル拡散法を用いた。葯のAGP濃度はきわめて高く (約2.8%)、分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィーにより約30kDと推定したが、これは他種植物由来のAGP分子量 (約200kD) と比較して極めて小さい。一方、葯以外の幼穂組織にも低濃度 (0.025%) ながら高分子 (300kD) 及び低分子 (30kD) の2種のAGPが蓄積していた。

AGPは、花粉母細胞→小孢子前期にかけて一過的に蓄積した。この際、オリゴ糖を抗原に用いて作製した抗オリゴ糖抗体を使ったエライザ法によっても、同様の蓄積カーブが得られ、オリゴ糖構造がAGPに存在することを示し、さらに、両糖質の蓄積パターンの比較から、オリゴ糖はAGPの分解反応により生成されることを強く示唆した。

4. AGPの代謝

イネ葯のAGP代謝を制御する酵素活性の検出を試みた。反応基質として、幼穂から分離した高分子及び低分子AGPを含む分画を用い、酵素標品としてイネ葯の粗蛋白分画を用いた。反応は両者の混合により開始し、一定時間後に生成されるオリゴ糖濃度を活性とした。その結果、低分子AGP分画を基質とした場合のみにオリゴ糖が生成した。反応によって生じたオリゴ糖は、構造解析により、イネ葯に蓄積するオリゴ糖と同一であることを確認した。高分子AGP分画を基質に用いた場合はオリゴ糖が生成されなかったため、これら分子量の異なるAGPは発現部位の異なる異種分子であること、オリゴ糖生成反応が葯特異的に存在することを示した。

また、この酵素活性は小孢子前期から1核期にかけて発育過程に特異的変動を示し、変動カーブはオリゴ糖蓄積カーブと一致した。このことは、生長中の葯において、小孢子のステージ進行に伴って発現する酵素によりAGPからオリゴ糖が生成していることを示した。

5. AGPの組織局在性

AGPの機能を推定するため、抗オリゴ糖抗体を用いた免疫組織化学にて葯組織内の局在性解析を行った。

2次抗体にラベルされたFITC由来の蛍光シグナルは、花粉母細胞→四分前期葯標本に発現し、AGPの蓄積パターンと一致したことから、標本上のシグナルはAGPの分布を表すと考えられた。蛍光シグナルはタペート細胞及び小孢子細胞の表層に分布し、小孢子間、あるいは小孢子→タペート細胞間の相互作用、或いは接着に関与する可能性が示唆された。

以上の実験結果より次のことを考察した。生長中のイネ葯には高濃度のAGPとこれから酵素作用により解離する関連オリゴ糖が一過的かつ連続して蓄積する。この糖質代謝は葯の発育段階に特異的であり、葯の正常な生育に重要な役割を果たしていると考えられる。組織局在性より推察すると、小孢子とタペート細胞間の相互作用、特に接着に関与すると考察される。低温処理によるオリゴ糖濃度の低下とイネ品種の耐冷性との間に存在する強い相関は、低温によるAGP代謝阻害が花粉生育阻害の1原因である可能性

を示唆した。AGPとオリゴ糖の生理機能、及びその代謝酵素の特性の解明がイネ障害型冷害の生理機構解明に結びつくと推察される。これらの研究は学会でも高く評価され、将来の研究成果が期待できる。

よって審査員一同は、川口健太郎が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。