

糖化型のペクチン酸トランスエリミナーゼの 作用機作*

岡本賢一, 畑中千歳**, 小沢潤二郎**

Erwinia aroideae の糖化型のペクチン酸トランスエリミナーゼは基質分子の末端から2番目のグリコシド結合を分解することを前報¹⁾で述べた。しかし非還元性, 還元性のうち, いずれの末端から作用するかはまだわかっていなかったため, この点を明らかにするための実験を行った。

実験の方法と結果

糖化型ペクチン酸トランスエリミナーゼの粗酵素液の調製

E. aroideae をペプトン 0.5%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.5%を含んだ馬鈴薯煎汁に接種して 27° に20時間振盪培養する。菌体を遠心分離して集め, 蒸留水で2回洗浄し, 常法に従ってアセトン菌体をつくる。これに100倍量の水を加え, 4° に12時間放置して酵素を抽出し, 遠心分離 (7000×g) して菌体を除く。上澄液を pH 7.0, 0.02M の磷酸塩バッファーで緩衝化した Duolite CS-101 のカラムを通し, 同じバッファーで洗浄する。液化型のペクチン酸トランスエリミナーゼは樹脂に吸着されるが, 糖化型の酵素は吸着せずに溶出する¹⁾。酵素活性の認められる溶出液を集め, これをペクチン酸に pH 7.5 で作用させると, 反応液には4,5-不飽和のジガラクトuron酸²⁾のほかに, 4-デオキシ-5-ケト-D-フラクチュロン酸と考えられる還元性の有機酸が検出された。この物質は粗酵素液(前記のカラムからの溶出酵素液)を pH 7.5 でペクチン酸に作用させ, 反応液をエーテル抽出し, 抽出物について, *n*-ブタノール・酢酸・水 (5:2:3) を溶媒として用い, 濾紙クロマトグラフィーを行って分離した。結晶としては取り出すことができなかったが, 過ヨウ素酸酸化によってホルミルピルビン酸とグリコール酸³⁾が生成すること, あるいはペーパークロマトグラフィー, キノキサリン反応, セミカルバゾン反応などの実験結果は, すべて Preiss ら⁴⁾の4-デオキシ-5-ケト-D-フラクチュロン酸についての記述と一致した。Preiss らによれば, ペクチン酸がトランスエリミネーションによってガラクトuron酸の単位まで分解するとき, 4,5-不飽和のD-ガラクトuron酸が生成するはずであるが,

* Mechanism of Action of Saccharifying Pectate *trans*-Eliminase.

** By Chitoshi HATANAKA⁺ and Junjiro OZAWA⁺; ⁺(Institute of Agricultural Biology, Okayama University)

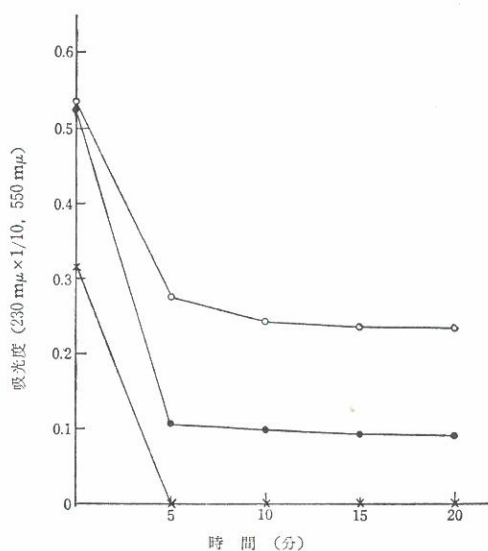
このものは不安定であって、4-デオキシ-5-ケト-D-グルクロン酸に非酵素的に変化する。これはさらにイソメラーゼの作用で4-デオキシ-5-ケト-D-フラクチュロン酸に異性化する。前報¹⁾で述べたように糖化型ペクチン酸トランスエリミナーゼの粗酵素液や後述する液化型ペクチン酸トランスエリミナーゼの酵素標品を、pH 9.5 でペクチン酸に作用させた場合は、4-デオキシ-5-ケトウロン酸は生成しない。したがって pH 7.5 で粗酵素液をペクチン酸に作用させるとき、4-デオキシ-5-ケト-D-フラクチュロン酸が生成するのは、糖化型や液化型のペクチン酸トランスエリミナーゼ以外の酵素が糖化型の粗酵素液の中に含まれているためであると思われる。なお 4-デオキシ-5-ケト-D-グルクロン酸はまだ反応液の中に確認していない。

糖化型ペクチン酸トランスエリミナーゼの精製酵素液の調製

粗酵素液を pH 9.0 にして 45° に放置し、時間ごとに試料を取り出し、0.1N-塩酸で pH を 7.5 に戻し、ペクチン酸に作用させ、反応液について 280 m μ の吸収とチオバルビツール酸反応による 550 m μ の吸収を測定した結果は第 1 図のとおりであった。チオバルビツール酸反応の測定は Weissbach らの報告⁵⁾ の条件に従って行った。230 m μ の吸収は 4,5-不飽和のオリゴウロニドの量を表わし、チオバルビツール酸反応は不飽和のオリゴウロニドと、4-デオキシ-5-ケトウロン酸の生成量の和を示している。0.5 mM の 4,5-不飽和ジガラクチュロン酸 (標準品) 溶液の 230 m μ における吸光度 $\times 1/10$ は 0.217 であり、チオバルビツール酸反応による 550 m μ の吸光度は 0.137 であった。第 1 図の 4-デオキシ-5-ケトウロン酸によるチオバルビツール酸反応の吸光度 (計算値) はこれを基礎として計算した。第 1 図の結果が示すように、4-デオキシ-5-ケト-D-フラクチュロン酸を生成する酵素は 5 分後には完全に失活するが、4,5-不飽和のジガラクチュロン酸を生成する酵素、すなわち糖化型のペクチン酸トランスエリミナーゼは 20 分後でも酵素活性を 45% 保っている。

第 1 図の結果に基づいて、溶出酵素液を pH 9.0, 45° に 10 分間処理し、冷却後 0.1N-塩酸で pH 7.5 にすることによって、4-デオキシ-5-ケトウロン酸を生成する酵素活性のない糖化型のペクチン酸トランスエリミナーゼの酵素液 (精製酵素液) を調製することができた。

第 1 図 pH 9.0, 45° 処理による粗酵素液の変化



反応の条件：ペクチン酸 0.33%, pH 7.5, 磷酸塩バッファー 0.02M, 30°, 4hr

—○— 230 m μ の吸光度 $\times 1/10$

—●— チオバルビツール酸反応の吸光度 (実測値, 4,5-不飽和ジガラクチュロン酸 + 4-デオキシ-5-ケトウロン酸)

—×— 4-デオキシ-5-ケトウロン酸によるチオバルビツール酸反応の吸光度 (計算値)

液化型ペクチン酸トランスエリミナーゼの酵素液の調製

液化型のペクチン酸トランスエリミナーゼの酵素液は培養液から調製した。前記の培養液を $7000\times g$ で遠心分離して菌体を除き、 0.5 mM の CaCl_2 を含む $\text{pH } 7.5$ 、 0.02 M の磷酸塩バッファーに対して透析する。透析液に $\text{pH } 7.0$ 、 0.02 M の磷酸塩バッファーで緩衝化した Duolite CS-101 を加え、攪拌しながら 4° に80分間放置する。ブフナーに移し $\text{pH } 7.0$ 、 0.02 M の磷酸塩バッファーで樹脂を十分に洗浄する。樹脂を水に懸濁し、 4° で上澄液を 0.5 mM の CaCl_2 を含んだ $\text{pH } 7.5$ 、 0.02 M の磷酸塩バッファーに対して透析し、これを液化型のペクチン酸トランスエリミナーゼの酵素液として用いた。ペクチン酸に作用させた場合、 $230\text{ m}\mu$ の吸収の増加が認められる。糖化型の酵素液のときに比べてペクチン酸溶液の粘度の下降が急激に行われ、初期の反応液には4,5-不飽和のジガラクトuron酸やオリゴガラクトuronidなどの還元性物質は検出されない。 $230\text{ m}\mu$ の吸収の増加はペーパークロマトグラフィーで検出されない4,5-不飽和のガラクトuron酸重合体によるものと考えられる。

酸可溶性ペクチン酸のナトリウム塩の調製

塩酸2%を含む市販柑橘ペクチンの2%溶液を湯煎上で2時間加熱する。冷却後、酸不溶性ペクチン酸の沈澱を濾過して除く。濾液を水酸化バリウムで中和する。生成する酸可溶性ペクチン酸のバリウム塩の沈澱を集める。硫酸を加えて $\text{pH } 2.0$ とし、ペクチン酸を溶かす。水酸化バリウムによる沈澱と硫酸による溶解を繰り返すと、ブタノール・酢酸・水 (5:2:3) を用いたペーパークロマトグラフィーで、原点から移行するオリゴuronidが検出されないようになる。最後に水酸化バリウムの代りに水酸化ナトリウムで中和し、アルコールを加えて酸可溶性ペクチン酸のナトリウム塩の沈澱をつくる。Willstätter-Schudel 法によるヨード消費量から計算した平均重合度は11.9であった。

糖化型ペクチン酸トランスエリミナーゼの作用

酸可溶性ペクチン酸ソーダ塩を遊離の物質に計算して0.5%、磷酸塩バッファー 0.01 M 、 $\text{pH } 8.0$ 、 80° の条件で、糖化型ペクチン酸トランスエリミナーゼの精製酵素液を作用させ、反応液 1 ml を 5 cm 幅の濾紙につけ *n*-ブタノール・酢酸・水 (5:2:3) を用いてクロマトグラフィーを行う。濾紙を乾燥した後、ブromフェノールブルーを噴霧し、4,5-不飽和ジガラクトuron酸 (R_F 0.25) とジガラクトuron酸 (R_F 0.16) に相当する部分を切り取り、0.2%のしゅう酸アンモニア溶液で抽出した。なお濾紙からの回収率は酸可溶性ペクチン酸97.5%、4,5-不飽和ジガラクトuron酸100%であることを確めた。抽出液の4,5-不飽和ジガラクトuron酸とジガラクトuron酸をカルバゾール法⁷⁾ で定量した結果は第1表のとおりであった。

第1表の場合と同じ条件(反応時間は4時間)で酸可溶性ペクチン酸に糖化型の精製酵素液を作用させ、分解液 4 ml を幅 40 cm の濾紙につけ、第1表の場合と同様にしてクロマトグラフィーを行った。この際原点を含めて5つの呈色帯が認められ、 R_F の大きい2つ(呈色帯1と2)

第 1 表 不飽和と飽和のジガラクトuron酸の生成比率

反応時間 (hr)	分解率* %	生成量 (μmol/ml)		モル比 a/b
		4,5-不飽和ジガラクトuron酸 a	ジガラクトuron酸 b	
1	12.53	1.78	0.20	8.90
2	25.84	3.67	0.53	6.92

* 4,5-不飽和ジガラクトuron酸の測定値より計算した2量体としての分解率。

は D-ガラクトuron酸 (R_F 0.31) と 4,5-不飽和ジガラクトuron酸であるが、前者の量が少く、両者の位置が接近しているのを一緒に切り取り、残りの3つ(呈色帯3, 4, 5)は別々に切り取った。これらを 8ml の 0.2% しゅう酸アンモニア溶液で抽出し、抽出液についてナフトレゾルシン反応⁸⁾とチオバルビツール酸反応の測定を行った。また高分子のペクチン酸に同じ条件で液化型のペクチン酸トランスエリミナーゼを作用させ反応液を同様に処理し測定を行った。この場合も D-ガラクトuron酸と 4,5-不飽和ジガラクトuron酸(呈色帯1と2)のほかに、3つの呈色帯(呈色帯3, 4, 5)が認められた。実験結果は第2表に示した。なおチオバルビツール酸反応の過ヨウ素酸酸化は 80°, 15分間の条件で行った。第2表の結果から糖化型ペクチン酸トランスエリミナーゼによる 3, 4, 5 の呈色帯はナフトレゾルシン反応が明らかに陽性であるに

第 2 表 反応生成物中の飽和と不飽和のオリゴガラクトuron酸

BPBによる呈色	糖化型ペクチン酸トランスエリミナーゼ		液化型ペクチン酸トランスエリミナーゼ	
	ナフトレゾルシン反応*	チオバルビツール酸反応**	ナフトレゾルシン反応*	チオバルビツール酸反応**
1 + 2	4.625	0.500	0.631	0.074
3	0.399	0.006	1.128	0.412
4	0.403	0.003	0.857	0.173
5	1.326	0.009	4.200	0.485
D-ガラクトuron酸 0.2mM 溶液	0.468			
4,5-不飽和ジガラクトuron酸 0.2mM 溶液	0.425	0.260		

* 抽出液 1ml, EPO-B 型日立光電光度計, フィルター No. 57 で測定したときの吸光度

** 抽出液 0.4ml, 550mμ における吸光度

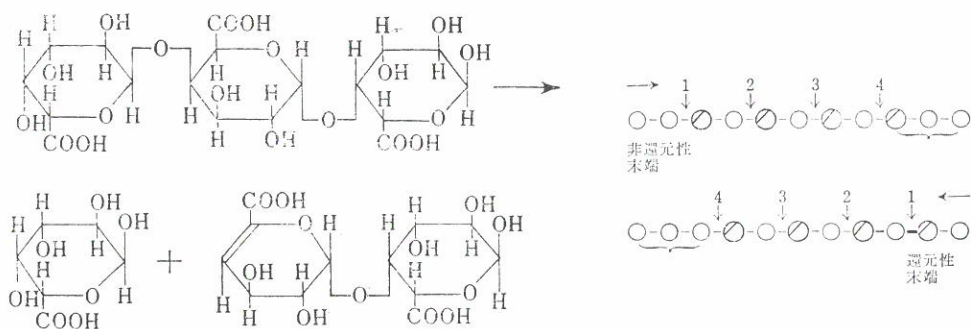
もかわらず、チオバルビツール酸反応陰性であるので、それぞれジ、トリ (R_F 0.08) およびテトラ以上のオリゴガラクトuron酸であると考えられる。これに対し液化型の酵素による 3, 4, 5 の呈色帯は2つの反応とも陽性であって、重合度3以上の4,5-不飽和オリゴuron酸が含まれていることを示している。なお D-ガラクトuron酸、ジおよびトリガラクトuron酸、4,5-不飽和ジガラクトuron酸のペーパークロマトグラフィーによる同定には、これらの遊離または塩類の結晶⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾をソーダ塩の溶液にし、対照として用いた。

トリガラクトuron酸⁶⁾に糖化型ペクチン酸トランスエリミナーゼの精製酵素液を第1表の場合と同じ条件で作用させると、反応液中に 4,5-不飽和ジガラクトuron酸と D-ガラクトuron酸がペーパークロマトグラフィー(溶媒; n-ブタノール・酢酸・水(5:2:3), 濾紙; 東洋濾

紙 No. 52, 呈色剤; アニリン-ヒドロジェンクロライド) によって検出される。ジガラクトuron酸, 4-デオキシ-5-ケトuron酸⁴⁾ あるいはその他の還元性物質は検出されなかった。4, 5-不飽和ジガラクトuron酸のトリガラクトuron酸からの生成速度は, ペクチン酸の場合に比べてはるかにおそいようである。

考 察

トリガラクトuron酸の2つのグリコシド結合のうち, 非還元性の末端側の結合がeliminationによって分解されれば, 4, 5-不飽和のジガラクトuron酸と D-ガラクトuron酸が生成し, 還元性の末端側の結合が切れる場合は, ジガラクトuron酸と 4-デオキシ-5-ケトuron酸が生成するはずである。実際には前者のほうが該当し, 非還元性の末端側の結合, すなわちトリガラクトuron酸の還元性末端から2番目の結合が分解される。



ペクチン酸の場合, 非還元性の末端から elimination によって分解するとすれば, 残り残るオリゴウロニドは 4, 5-不飽和結合を含んでおり, 還元性の末端から分解すれば, 飽和のオリゴウロニドが残るはずである。

また残ったオリゴウロニドがさらに分解して単糖類が生成する場合, その単糖類は前者では 4-デオキシ-5-ケトuron酸であり, 後者では D-ガラクトuron酸でなければならない。したがって酸可溶性ペクチン酸が非還元性末端から elimination によって分解した場合の反応生成物は, ジガラクトuron酸, 4, 5-不飽和結合を持ったジ以上のオリゴウロニド, あるいはまた4-デオキシ-5-ケトuron酸を含んでいるはずであり, 還元性末端から分解したときの生成物は, 4, 5-不飽和ジガラクトuron酸, 飽和のジ以上のオリゴウロニドおよび D-ガラクトuron酸を含んでいなければならない。第2表の結果は, 実験の反応生成物が後者と全く一致することを示している。したがって第2表の結果から, 糖化型のペクチン酸トランスエリミナーゼは, ペクチン酸分子の還元性の末端から作用すると考えざるをえない。

ジガラクトuron酸は非還元性, 還元性のいずれの末端から作用すると考えたときでも生成するはずであるが, 前者の場合では最後の開裂によって生成する。第1表で示したジガラクトuron酸の量は, 酵素が非還元性末端から作用すると考えなければならないほど多くはない。ジガラクトuron酸が比較的初期から検出されるのは, 実験に用いた酸可溶性ペクチン酸の分子量が不

均一であり、かなり低分子のものを含んでいるためであると想像される。また酵素が“Single chain theory”に従って基質を分離し、これがその原因の一つになっているかもしれない。

高分子のペクチン酸を基質とした場合、4,5-不飽和ジガラクトロン酸以外の物質は検出されない。この結果は酵素液にエンドポリガラクトナーゼのような加水分解酵素が含まれていないことを示している。したがって酸可溶性のペクチン酸から飽和のオリゴウロニドやD-ガラクトロン酸が生成するのは、加水分解酵素のためではなく、前述のように糖化型ペクチン酸トランスエリミナーゼの作用形式によるものと考えられる。

エキソ型の多糖類の加水分解酵素や転移酵素はすべて非還元性の末端から作用すると考えられている。糖化型のペクチン酸トランスエリミナーゼの作用形式はこの点で特異である。いま鎖状の多糖のグリコシド結合を R_1-O-R_2 とし、 R_1 は非還元性末端を、 R_2 は還元性末端を含むものとすれば、グリコシド結合の酸素橋の2つの結合は R_1-O と $O-R_2$ で表わされる。多糖類に作用する加水分解酵素や転移酵素は R_1-O を開裂し¹¹⁾¹²⁾ ペクチン酸トランスエリミナーゼを含む polyuronate lyase は $O-R_2$ を開裂する¹³⁾ と考えられている。したがってエキソ型の多糖類分解酵素の作用で開裂する酸素橋の位置 (R_1-O あるいは $O-R_2$) と分解されるグリコシド結合の基質分子内の位置 (非還元性末端あるいは還元性末端) との間に密接な関係があるかもしれない。

この研究の経費の一部は文部省科学試験研究費によった。ここに謝意を表する。

この研究は日本農芸化学会誌第38巻第5号(1964)に発表したものである。

参 考 文 献

- 1) K. Okamoto, C. Hatanaka, J. Ozawa: *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 596 (1963).
- 2) S. Hasegawa, C. W. Nagel: *J. Biol. Chem.*, **237**, 619 (1962).
- 3) K. F. Lewis, S. Weinhouse: *Methods in Enzymol.*, **3**, 272 (1957).
- 4) J. Preiss, G. Ashwell: *J. Biol. Chem.*, **238**, 1571 (1963).
- 5) A. Weissbach, J. Hurwitz; *ibid.*, **234**, 705 (1959).
- 6) 小沢潤二郎: 日本農化誌, **26**, 505 (1952).
- 7) Z. Dische: *J. Biol. Chem.*, **107**, 189 (1947).
- 8) Z. I. Kertesz: "The Pectic Rubstances", Interscience Publ., New York, p. 40 (1951).
- 9) 小沢潤二郎: 農学研究, **42**, 157 (1955).
- 10) 岡本賢一, 小沢潤二郎: 同上, **46**, 49 (1958).
- 11) G. G. Freeman, R. H. Hopkins: *Biochem. J.*, **30**, 451 (1936).
- 12) M. Cohn: *J. Biol. Chem.*, **180**, 771 (1949).
- 13) J. Ludowieg, B. Vennessland, A. Dorfman: *ibid.*, **236**, 333 (1961).