

## 全自動液体クロマトグラフによるガラクト ユロン酸、グルクロン酸およびオリゴガラ クチュロン酸の分離, 定量法

今野晴義・山崎良樹・吉田和美  
小沢潤二郎

### 緒 言

高等植物細胞壁に含まれるペクチン質は、ラムノガラクトチュロン鎖にアラビノース、ガラクトース、キシロースなどからなる側鎖のついた変化に富む複合多糖類である。

Aspinall *et al.*<sup>1)</sup> は、種々の植物細胞壁のペクチン質の構造研究において単離したペクチンの加水分解物の分析から、ペクチンは、D-ガラクトチュロン酸と同様にL-ラムノース、L-アラビノースおよびD-ガラクトースなどが共有結合でつながっていることを示した。さらにムラサキウマゴヤシのペクチン質の研究の追試で<sup>2)</sup>、アルドビオウロン酸（ガラクトチュロン酸に結合した中性糖を含む二糖類）を同定し、ペクチン分子中には、酸性糖領域と同様に中性糖領域が存在することを確立した。

細胞壁の多糖類は植物の生長、分化に重要な役割をにない、また果実の成熟や離層など老化にも関与している。近年、ペクチン質やその他の細胞壁多糖類の化学構造の研究は、このような植物生理学の立場からも要請されて盛んになってきた。それに伴い細胞壁の構造のモデルがいろいろと提唱されるようになったが、まだ解明されるまでにいたっていない。

ペクチン質の化学構造研究の手段としては各種ペクチン分解酵素あるいは酸、アルカリなどによる分解生成物を検討することがよく行われる。従って分解液中に含まれるウロン酸およびアルドビオウロン酸などを正確に同定、定量することが必要となる。

本報では、D-ガラクトチュロン酸とD-グルクロン酸およびオリゴガラクトチュロン酸を全自動液体クロマトグラフを用いて、比較的容易にしかも正確に分離、定量できる方法を検討したのでその結果を記述する。

### 実 験 方 法

#### 1. 分析および同定

(a) 分析機器 各種試料の分析には全自動液体クロマトグラフ (JLC-6AUH, 日本電子) に積分器 (JLC-DK, 日本電子) を付属させて使用した。ガラクトチュロン酸とグルクロン酸の分離には、あらかじめ0.2N ホウ酸で平衡化したDowex-1×8 (100~200メッ

昭和55年12月22日受理

シュ) をカラム  $0.8 \times 15$  cm に充てんし、 $50^{\circ}\text{C}$  で塩化ナトリウムの濃度変化による溶出を行った。溶出液は  $0.2\text{N}$  ホウ酸と  $0.04\text{M}$  塩化ナトリウムを含む  $0.2\text{N}$  ホウ酸を使用し各々30, 360 分間溶出した。オリゴガラクトuron酸の分離には、カラム  $0.8 \times 15$  cm を使用し、 $40^{\circ}\text{C}$  で行った。溶出液は  $0.2\text{N}$  ホウ酸と  $0.055\text{M}$ ,  $0.065\text{M}$ ,  $0.10\text{M}$ ,  $0.15\text{M}$ ,  $0.20\text{M}$  の塩化ナトリウムを含む  $0.2\text{N}$  ホウ酸を用い、40, 60, 30, 60, 80, 100 分間溶出を行った。ポンプの流量はいずれも緩衝液用  $0.51\text{ ml/分}$ 、オルシノール試薬用  $0.42\text{ ml/分}$  に設定した。

(b) **オリゴガラクトuron酸の同定** 分離したピークを各々集め、アンバーライト IR-120(H<sup>+</sup>型)にてナトリウムイオンを除去した後、 $40^{\circ}\text{C}$  で減圧濃縮しペーパークロマトグラフィーを行った。東洋濾紙 No. 52 に試料をつけ、*n*-ブタノール：酢酸：水 (4:1:2, v/v) の展開剤を使用し、室温で上昇法により2回反復展開し風乾後、硝酸銀発色試薬<sup>11)</sup>にて検出した。重合度については、カルバゾール法<sup>4)</sup>でuron酸含量を測り、Willstätter-Schudel 法の変法<sup>5)</sup>により末端の還元性uron酸含量を測定して、その比から求めた。

## 2. 基質および酵素の調製法

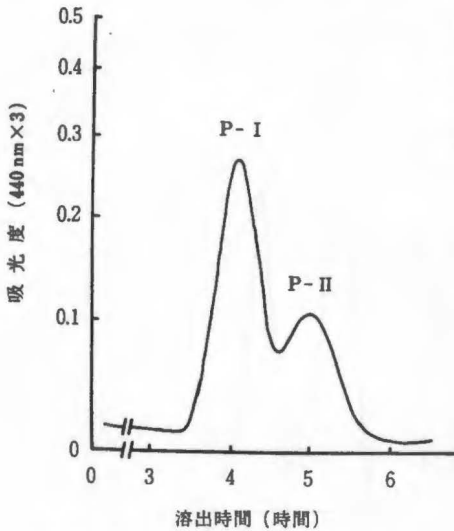
(a) **ペクチン、ペクチン酸、酸不溶性ペクチン酸の調製** レモンペクチン (石津製薬) 2%水溶液を80%エタノール (v/v) で $80^{\circ}\text{C}$ 、2時間還流した後、沈澱物を集め、80%、90%エタノール、エーテルで洗浄し風乾した。この操作を2度くり返し精製ペクチンを得た。ペクチン酸は、畑中・小沢<sup>6)</sup>の方法により精製ペクチンを $0.01\text{N}$ 水酸化ナトリウム、 $0^{\circ}\text{C}$ 、90分にて脱メチル化し、80%エタノールにて沈澱物を得た後風乾して調製した。酸不溶性ペクチン酸は、精製ペクチン2%水溶液を2% (w/w) の塩酸にて $100^{\circ}\text{C}$ 、2時間加水分解し、生成した沈澱物を遠心分離 ( $3,000 \times \text{g}$ , 20分) にて集め、ペクチン酸を調製した時と同じく脱メチル化を行ないナトリウム塩として、エタノールにより沈澱させて調製した。

(b) **エンドポリガラクトuronナーゼの精製** 本酵素の精製は Hatanaka and Ozawa<sup>7)</sup>の方法を一部改良して行った。*Saccharomyces fragilis* を5%グルコース、0.2%リン酸水素アンモニウム、1%酵母エキス、1%硫酸マグネシウム、0.2%リン酸水素カリウムを含む液体培地にて、 $25^{\circ}\text{C}$ 、3日間、静止培養した。培養液は遠心分離 ( $8,000 \times \text{g}$ , 20分) にて菌体を除き、培養濾液を48時間、脱イオン水にて透析を行った後、再び $0.02\text{M}$ 酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) にて24時間透析した ( $7,500\text{ ml}$ )。透析温度は $4^{\circ}\text{C}$ としたが以下の実験もすべて $4^{\circ}\text{C}$ 以下で行った。透析液を、 $0.02\text{M}$ 酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) にて平衡化した IRC-50 カラム ( $3.8 \times 82\text{ cm}$ ) を通過させた後、同緩衝液でカラムを洗浄し、吸着した酵素は、 $0.5\text{M}$ 酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) で溶出し活性画分を集めた。活性画分は $0.02\text{M}$ 酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) にて24時間透析した ( $450\text{ ml}$ )。この酵素溶液は、さらに $0.02\text{M}$ 酢酸塩緩衝液 (pH 5.0) で平衡化した CM-セファデックス C-50 (Pharmacia 社) カラム ( $3.2 \times 20\text{ cm}$ ) に吸着させた。同緩衝液でセファデックスを洗浄した後、 $0.02\text{M}$ 酢酸塩緩衝液 (pH 5.0)  $450\text{ ml}$  と  $0.3\text{M}$ 塩化ナトリウムを含む同緩衝液  $450\text{ ml}$  で、塩化ナトリウム濃度勾配による溶出を行った。活性画分を集め、これを $0.02\text{M}$ 酢酸塩緩衝液にて一夜透析した後、酵素標品とした ( $150\text{ ml}$ )。この精製において、エンドポリガラクトuronナーゼの比活性は約290倍に増加し、収量は20%であった。

## 実験結果と考察

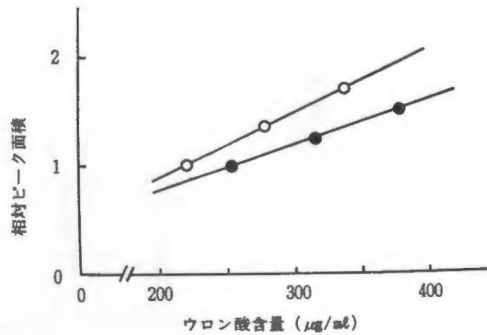
### 1. ウロン酸の分離と定量

D-ガラクトチュロン酸とD-グルクロン酸の混合溶液を、実験方法に述べたように液体クロマトグラフで分別すると、第1図に示したように2つのピーク(P-I, P-II)に分離した。



第1図 D-ガラクトチュロン酸とD-グルクロン酸のクロマトグラム  
P-I, D-ガラクトチュロン酸 272.29  $\mu\text{g}$   
P-II, D-グルクロン酸 236.61  $\mu\text{g}$

それぞれのピークに相当する画分を同定した結果、P-I画分はD-ガラクトチュロン酸、P-II画分はD-グルクロン酸であった、さらにこの両者の糖濃度の混合比を変化させ、各々のピーク面積より算出した糖量を検討してみると、第2



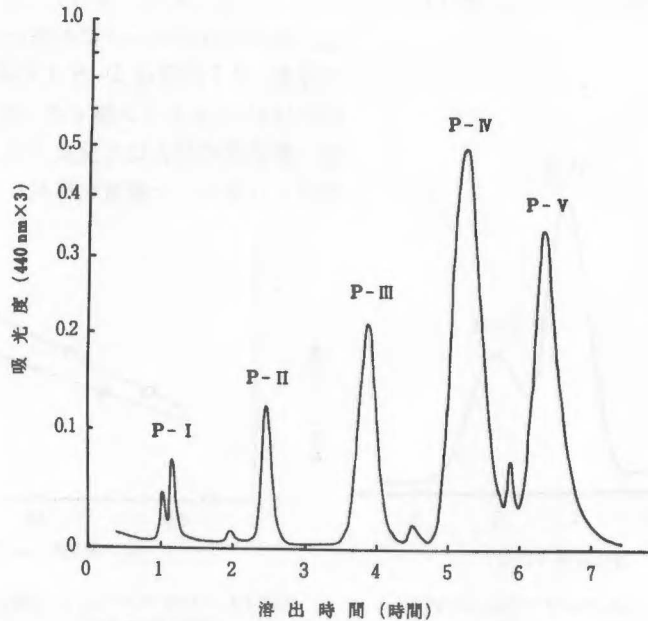
第2図 D-ガラクトチュロン酸とD-グルクロン酸の標準曲線  
○ D-ガラクトチュロン酸  
● D-グルクロン酸

図に示したように両者のウロン酸含量が200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  までは直線関係を示した。このウロン酸相互の分離においては、0.8 $\times$ 15 cm カラムおよび0.8 $\times$ 30 cm カラムでは満足な結果は得られなかった。

グルクロン酸は、種々の植物のゴムやヘミセルロースの構成糖類として広く認められることからペクチン画分での同物質の同定は興味深いことである。Aspinall *et al.*<sup>8)</sup> は、ダイズさやのペクチン質画分にグルクロン酸を含んだアルドビオロン酸がごく微量含まれていると指摘している。一般にウロン酸の定量にはカルパゾール法<sup>4)</sup>が現在広く使用されているが、この方法においてはこれらウロン酸の分離、定量は不可能である。近年、Jones and Albersheim<sup>9)</sup>によってウロン酸(ガラクトチュロン酸、グルクロン酸、マンニユロン酸)を還元しさらにアルジトールアセテイト誘導体とした後、ガスクロマトグラフを使用し分離、定量する方法が報告された。しかし、この方法は操作がきわめて複雑なため実験過程で試料の損失の恐れがある。本実験においても、二種のウロン酸の濃度が極端に異なる場合には、微量のウロン酸の方の検出が困難になることも考えられる。しかし、少なくとも一種のウロン酸のみが含まれている場合、あるいはガラクトチュロン酸とグルクロン酸の濃度が200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  以上の場合などには、分離、定量が可能であり正確であると考えられる。

## 2. オリゴガラクトチュロン酸の分離と定量

ペクチン酸を精製エンドポリガラクトチュロナーゼによって分解し分解生成物を分離すると、第3図に示したように5つのピーク (P-I, P-II, P-III, P-IV, P-V) が得られた。P-I



第3図 オリゴガラクトチュロン酸のクロマトグラム

画分は、樹脂に未吸着の中性糖画分であり、P-II 画分はガラクトチュロン酸に相当していた。そこで残りの3画分 (P-III, P-IV, P-V) をそれぞれ集めそれらオリゴガラクトチュロン酸の平均重合度を求め、またペーパークロマトグラフィーにて同定を行った。第1表

第1表 液体クロマトグラフにて分離される各画分の平均重合度と含量

画分	平均重合度	含量 ( $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )
P-I	—	30.95 <sup>a)</sup>
P-II	—	82.57
P-III	1.83	230.80
P-IV	3.11	665.94
P-V	3.93	437.03

a) D-ガラクトースとして算出した。

に示したように P-III 画分はジガラクトチュロン酸、P-IV 画分はトリガラクトチュロン酸、P-V 画分はテトラガラクトチュロン酸であることが明らかとなった。P-III 画分と P-IV 画分の間および P-IV 画分と P-V 画分の間それぞれ小さなピークが検出された。このピークの物質の同定は現在のところできていないが、ガラクトチュロン酸と中性糖などの結合

したものではないかと考えられる。

これらオリゴガラクトン酸の分離の場合、カラムの温度を検討してみたが、ガラクトン酸とグルクロン酸の分離の場合のように50°Cにて行くとよい結果は得られなかった。本実験の条件（カラム温度40°C、ホウ酸溶出液）のもとでは、これらオリゴガラクトン酸はきわめて安定であった。

オリゴガラクトン酸の分離には、従来陰イオン交換体（Dowex-1, DEAE-セルロース）が用いられ、溶出液にギ酸塩や炭酸塩あるいは酢酸塩緩衝液などが使用されている<sup>7,9)</sup>。これらの方法に従えば糖の検出反応の際に大量のガスが発生するために自動液体クロマトグラフに使用できない。この困難は溶出液にホウ酸を使用することによって解決できた。また Raymond and Nagel<sup>10)</sup> は、オリゴガラクトン酸をトリメチルシリル誘導体に変えガスクロマトグラフで分離しているが、あまり良い結果は得られていない。本実験では、少ない試料の場合でも正確に分離、定量できる利点があるように考えられる。

このオリゴガラクトン酸の分離、定量法を用いて、*Saccharomyces fragilis* の培養濾液から精製したエンドポリガラクトナーゼによる反応生成物の時間的変化を調べた。酵素反応液組成は、0.2%ペクチン酸および酸不溶性ペクチン酸、0.05 Mの酢酸塩緩衝液(pH 5.0)、酵素溶液(0.20単位)とし、30°Cで反応させた。酵素単位は、1分間に還元基1  $\mu$  moleを遊離する酵素量を1単位とした。反応停止後、生成されるオリゴガラクトン酸を全自動液体クロマトグラフにて定量した。第2表に示したように、ペク

第2表 *Saccharomyces fragilis* のエンドポリガラクトナーゼによるペクチン酸および酸不溶性ペクチン酸の分解生成物。各欄の上部はペクチン酸を、下部は酸不溶性ペクチン酸を基質に使用した場合に、生成する各糖の  $\mu$  モル数

生成物	時間						
	0.5	1	2	4	5	16	48
ガラクトン酸	0.21	0.54	0.52	—	0.67	0.57	3.96
	0.28	—	—	0.23	0.35	0.42	1.84
ジガラクトン酸	0.16	0.61	0.44	0.46	0.71	0.98	1.21
	0.35	0.31	—	0.29	0.53	0.69	1.14
トリガラクトン酸	0.25	1.39	0.85	—	1.08	0.96	0.82
	0.58	0.75	1.98	0.70	1.04	1.37	1.45
テトラガラクトン酸	0.09	1.15	0.94	0.91	0.91	0.91	0.82
	1.19	0.86	1.62	0.80	0.81	0.72	0.66

ン酸および酸不溶性ペクチン酸の両者は同じような分解をし、反応時間につれてガラクトン酸、ジガラクトン酸が増加する。しかし、テトラガラクトン酸は、反応1~2時間まではすみやかに増加するが、その後逆に減少している。このことは一度生成されたテトラガラクトン酸が再び酵素反応の基質として分解されていることを示している。このように反応生成物を正確に定量して反応の時間的推移を知るとともに、単離した

各種オリゴガラクトン酸を基質としてこれらに対する酵素作用を調べることによって、各種エンドポリガラクトナーゼの酵素反応型式の詳細を明らかにすることが可能である。また、エキソポリガラクトナーゼによるペクチン酸の分解生成物はガラクトン酸のみであり、オリゴガラクトン酸は検出されない。従って多量のオリゴガラクトン酸の検出は反応液の粘度の下降/還元糖の増加の測定とともに、エンドポリガラクトナーゼの同定の一手段として充分に利用できると思われる。

## 摘 要

D-ガラクトン酸、D-グルクロン酸およびオリゴガラクトン酸を全自動液体クロマトグラフ (JEOL, JLC-6AUH) により分離、定量することができた。従来使用されている緩衝液による場合、検出器中にガスが発生し分析不可能となるため、0.2 N ホウ酸に0から0.2 Mの濃度に塩化ナトリウムを加えたものを溶出液とした。Dowex-1×8 (100~200メッシュ) 樹脂を用い、流速0.51 ml/分としuron酸の場合、カラムの長さ0.8×50 cm、カラム温度50°Cとし、オリゴガラクトン酸の場合、カラムの長さ0.8×15 cm、カラム温度40°Cとした。uron酸の定量法として、ガスクロマトグラフによる場合のように誘導体を調製することなく、直接試料を分析できることが、本法の利点であると考えられる。

## 文 献

1. Aspinall, G. O., Cottrell, I. W., Egan, S. V., Morrison, I. M. and Whyte, J. N. C. 1967. Polysaccharides of soy-beans. Part IV. Partial hydrolysis of the acidic polysaccharide complex from cotyledon meal. J. Chem. Soc. (C) : 1071-1080.
2. Aspinall, G. O., Gestetner, B., Molloy, J. A. and Uddin, M. 1968. Pectic substances from lucerne (*Medicago sativa*). Part II. Acidic oligosaccharides from partial hydrolysis of leaf and stem pectic acids J. Chem. Soc. (C) : 2554-2559.
3. Aspinall, G. O., Hunt, K. and Morrison, I. M. 1967. Polysaccharides of soy-beans. Part V. Acidic polysaccharides from the hull. J. Chem. Soc. (C) : 1080-1086.
4. Bitter, T. and Muir, H. M. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. Anal. Chem. 4 : 330-334.
5. 畑中千歳. 1967. ヨウ素滴定法による微量のアルドースの定量. 農化 41 : 448-453.
6. 畑中千歳, 小沢潤二郎. 1966. 酵素によるペクチン酸の分解 (第4報) アルカリまたはペクチンエステラーゼでけん化してつくったペクチン酸に対するにんじんのエキソポリガラクトナーゼの作用. 農化 40 : 421-428.
7. Hatanaka, C. and Ozawa, J. 1973. The isolation of oligogalacturonic acids by DEAE-Sephadex A-25 column chromatography. Ber. Ohara Inst. landw. Biol., Okayama Univ. 15 : 181-186.
8. Jones, T. M. and Albersheim, P. 1972. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. Plant Physiol. 49 : 926-936.

9. Nagel, C. W. and Wilson, T. M. 1969. The isolation of oligogalacturonic acids by column chromatography. *J. Chromatogr.* 41 : 410-416.
10. Raymond, W. R. and Nagel, C. W. 1969. Gas-liquid chromatographic determination of oligogalacturonic acids. *Anal. Chem.* 41 : 1700-1703.
11. Trevelyan, W. E., Procter, D. F. and Harrison, J. S. 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* 166 : 444-445.

