

## ペクチン質の酸部分分解によって生成する 高分子多糖, 酸性オリゴ糖, 中性糖の分画

今野晴義・山崎良樹・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、約 200,000 の分子量を持つ、きわめて変化に富んだ複合多糖類である。従って、その化学構造を検討するためには、ある程度分解し、構成単糖類あるいは分解中間生成物の構造研究からもとのペクチン分子を推論することが必要となる。前報<sup>5)</sup>において、ペクチン酸を精製エンドポリガラクチュロナーゼによって分解し、分解液に含まれるガラクチュロン酸の重合体を自動的にしかも正確に定量する方法を述べた。

ペクチン質の酸部分分解によって生じる分解物に関する報告は、いままで多くあるが分画および分析方法に少々の問題があるようにみうけられる<sup>1,2,7,8)</sup>。本報ではペクチンの酸部分分解をより詳しく研究するために、ペクチンおよびペクチン酸の両者の酸部分分解を行い高分子多糖画分、酸性オリゴ糖画分および中性糖画分に分画し、それら画分の分析を行った。

### 実 験 方 法

#### 1. ペクチンおよびペクチン酸の調製

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°C、2時間還流した後、沈澱物を集め、80%、90%エタノール、そして最後にエーテルで洗浄し風乾した、さらに、Loescher and Nevins<sup>9)</sup>の方法に従って $\alpha$ -アミラーゼ( $\beta$ -1,3-グルカンその他のヘミセルロース分解酵素を含む恐れのないSigma社, pancreas, Type I-Aを使用した)を作用させでんぶんを除去し、再びエタノール、エーテルで充分洗浄して、精製ペクチンを得た。ペクチン酸は、畑中・小沢<sup>4)</sup>の方法によりこの精製ペクチンを0.01N水酸化ナトリウム、0°C、90分にて脱メチル化を行い、80%エタノールにて沈澱物を得た後風乾した。上記によって得られたペクチンおよびペクチン酸は1.0N硫酸にて、80~90°C、4時間、酸部分分解を行い第1図に示したような分画を行った。

#### 2. CPG-10 ゲル濾過

5.0 mg の酸不溶性および酸可溶性多糖画分を 2.0 ml の脱イオン水に溶解し、CPG-10 によるゲル濾過を行った。CPG-10 (120Å, 80~120メッシュ, Electronucleonics 社)はあらかじめ希硝酸、2%ポリエチレングリコール(分子量20,000)にて前処理し、2.0×95 cm カラムに充てんし(V<sub>0</sub>=105 ml)、毎時 18 ml の流速にて脱イオン水による溶出

を行った。分画は、3.5 ml ずつ行い全糖量はガラクトースを標準としたフェノール硫酸法<sup>9)</sup>にて定量した。

### 3. DEAE-セファデックス A-25 カラムクロマトグラフィー

ペクチンから得られた酸不溶性および酸可溶性多糖画分を除去した画分 312.3 mg, ペクチン酸から得られた同画分 330.0 mg をアンバーライト IR-120 (H<sup>+</sup>型)にてバリウムイオンを除去し減圧濃縮したものを各々 100 ml の 0.02 M 酢酸塩緩衝液 (pH 4.65) に溶解し、同緩衝液で平衡化した DEAE-セファデックス A-25 (Pharmacia 社) に吸着させた。同緩衝液約 500 ml でセファデックスを洗浄し、未吸着の中性糖画分を除いた後、0.02 M 酢酸塩緩衝液 (pH 4.65) 210 ml と 0.3 M 塩化ナトリウムを含む同緩衝液 210 ml で塩化ナトリウム濃度勾配による溶出を行った。流速は毎時 25 ml とし 4.0 ml ずつ分画した。全糖量は CPG-10 ゲル濾過の場合と同様に求めた。

### 4. 液体クロマトグラフィー

中性糖は全自動液体クロマトグラフ (JLC-6AUH, 日本電子) で分析した。0.8×15 cm カラムに LCR-3A 樹脂を充てんし、溶出液は 0.13 M (pH 7.5), 0.25 M (pH 9.0), 0.35 M (pH 9.6) のホウ酸ナトリウム溶液を使用し、各々 110, 90, 180 分間溶出した<sup>9)</sup>。ガラクトースおよびオリゴガラクトースは前報<sup>9)</sup>に記載した方法により分析した。

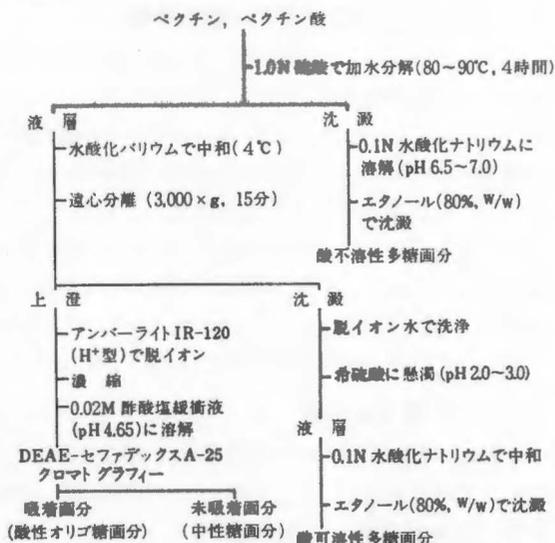
### 5. ペーパークロマトグラフィー

試料を東洋濾紙 No. 52 につけ、酸性オリゴ糖の場合は、酢酸エチル：酢酸：ギ酸：水 (18:3:1:4, v/v), その他の糖の場合は 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 2 反復展開し風乾後、硝酸銀発色試薬<sup>10)</sup>にて検出した。

## 実験結果と考察

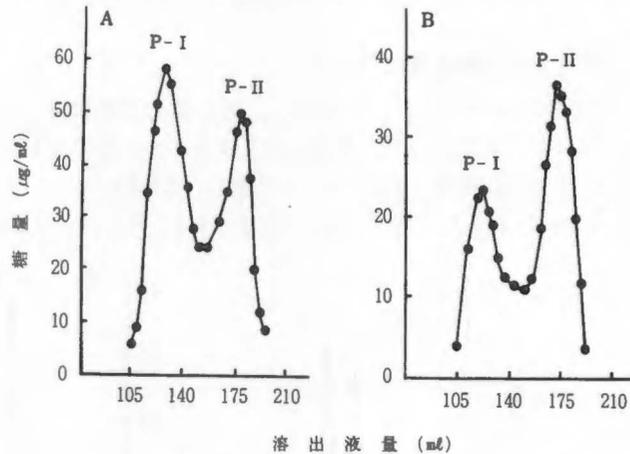
### 1. 高分子多糖画分について

ペクチンおよびペクチン酸を 1.0 N 硫酸で 80~90°C, 4 時間、酸部分分解をし第 1 図に示した分画を行い、酸不溶性多糖画分と酸可溶性多糖画分を得た。酸部分分解によって得られる高分子多糖画分は、一般にきわめて大きな分子量を持つペクチンの中の比較的酸に弱い結合部位が分解されて生じる。従って得られた高分子多糖画分の均一性や分子量およびその構成糖の検討は、その酸部分分解様式さらにはペクチン分子の化学構造を調べる上で重要であ



第 1 図 ペクチンおよびペクチン酸の酸部分分解によって生じる高分子多糖、酸性オリゴ糖、中性糖の分画法

る。そこで得られた多糖画分を CPG-10 によるゲル濾過を行い、それらを検討した。ペクチンおよびペクチン酸から得られた酸不溶性多糖画分は、このゲル濾過においていずれも対称的なひとつのピークを示し、その相対溶出液量 ( $V_e/V_0$ ) は 1.13 であった。しかし、ペクチンおよびペクチン酸から得られる酸可溶性多糖画分は、第 2 図に示したようにこのゲル濾過において、さらに 2 つのピーク (P-I, P-II) に分離された。そこで、これら P-I, P-II 画分をそれぞれ集め、CPG-10 のゲル濾過をくり返し、各々の画分を得た、その結果、P-I 画分の相対溶出液量は 1.17 であった。同じカラムを用いて標準デキストラン (T-10: 分子量 9,800, T-40: 分子量 39,900, Pharmacia 社) の相対溶出液量より、これら画分の分子量を求めると酸不溶性多糖画分は 30,000~32,000, 酸可溶性多糖に含まれる P-I 画分は 22,000~25,000 であった。



第 2 図 酸可溶性多糖画分の CPG-10 によるゲル濾過

- A) ペクチンより得られた酸可溶性多糖画分
- B) ペクチン酸より得られた酸可溶性多糖画分

次にこれら高分子画分に含まれる構成糖および

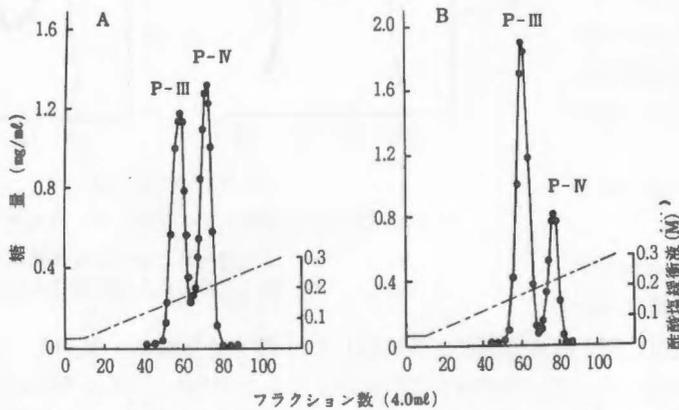
結合様式を酸完全分解と酵素分解により検討した。酸完全分解は、試料を 1.0 N 硫酸で 120°C, 1 時間分解し得られる分解液を水酸化バリウムで中和し、生じた不溶物を 3,000 $\times$ g, 20 分の遠心分離にて除去する。得られた上澄をアンバーライト IR-120 (H<sup>+</sup>型) のカラムを通し、バリウムイオンを除去した後、40°C で減圧濃縮を行い酸完全分解液を調製した。このようにして得られた試料についてペーパークロマトグラフィーを行った。その結果、ペクチンおよびペクチン酸から得られる酸不溶性多糖画分と酸可溶性多糖に含まれる P-I 画分からは、いずれも D-ガラクトuron酸のみが検出された。また、*Saccharomyces fragilis* の培養濾液から前報<sup>5)</sup> に従って精製したエンドポリガラクトuronナーゼをこれら高分子多糖画分に、30°C, 48 時間作用させた後、酵素反応を停止し、得られる反応生成物の液体クロマトグラフィーを行った。その結果、いずれの多糖画分にもガラクトuron酸、ジガラクトuron酸、トリガラクトuron酸、テトラガラクトuron酸が検出された。これらのことから、ペクチンおよびペクチン酸から得られる酸不溶性多糖画分と酸可溶性多糖に含まれる P-I 画分は、分子量において約 10,000 の差はあるが、D-ガラクトuron酸が  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) 結合で連鎖した高分子物であることが示唆された。

また酸可溶性多糖に含まれる P-II 画分は、分子量 6,000 以下であり上記と同様な方法でその構成糖を検討したところ、ペクチンおよびペクチン酸から得られるいずれの P-II 画分も大部分がガラクトuron酸であり少量のラムノースと他の中性糖 (現在のところ同定できていない) を含んでいた。しかし、その結合様式はまだ確認できていない。

これらの結果から、各種濃度の塩酸や硫酸で酸部分分解を行い、得られる酸可溶性ペクチン酸は均一でないことが考えられるので酵素反応の基質として使用する場合は注意が必要と思われる。また、第2図に示されるように、ペクチンから得られる酸可溶性多糖に含まれるP-IおよびP-II画分の量比が、ペクチン酸から得られたそれらと逆になっている。このことは、ペクチンとペクチン酸の酸部分分解機構がわずかに異なっているか、あるいはペクチン酸調製の際に、わずかの化学構造の変化が起きたことによるのかもしれない。

## 2. 酸性オリゴ糖画分について

上記の多糖画分を除去した画分を、第1図の方法に示したように、さらにアンバーライト IR-120 (H<sup>+</sup>型) カラムを通しバリウムイオンを除去した後、減圧濃縮し、100 ml の 0.02 M 酢酸塩緩衝液 (pH 4.65) に溶解し、DEAE-セファデックス A-25 カラムクロマトグラフィーを行った。第3図に示すように、ペクチンおよびペクチン酸から得られる酸



第3図 酸性オリゴ糖画分の DEAE-セファデックス A-25 カラムクロマトグラフィー

- A) ペクチンより得られた酸性オリゴ糖画分
- B) ペクチン酸より得られた酸性オリゴ糖画分

性オリゴ糖はいずれも2つのピーク (P-III, P-IV) に分別された (P-III 画分は 0.17 M, P-IV 画分は 0.21 M の塩化ナトリウム濃度で溶出される)。そこでこれらの画分を集め、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、減圧濃縮をした後、再び DEAE-セファデックス A-25 カラムクロマトグラフィーを行い P-III, P-IV 画分をそれぞれ集めた。ペクチンおよびペクチン酸から得られる P-III 画分は、ペーパークロマトグラフィーにてひとつのスポットとして表われ、その  $R_{\text{GalUA}}$  値は 0.83 であった。さらにこの画分を前述したように酸完全分解をし、ペーパークロマトグラフィーを行うとガラクトuron酸とラムノースが検出され、液体クロマトグラフィーにてそれらの糖を定量した結果、ほぼ同量であった。

ペクチンに含まれるガラクトuronシルラムノースは酸分解にきわめて強い構造を持っており、いままでもその単離は多く報告されている<sup>1,2,7,8)</sup>。P-III 画分のペーパークロマトグラフィーの  $R_{\text{GalUA}}$  値が、これまで報告されているこの物質の  $R_{\text{GalUA}}$  値とは

ば同じであり、また液体クロマトグラフィーの結果とあわせて考えると、酸性オリゴ糖画分に含まれる P-III画分はガラクトチュロノシルラムノースと思われる。Aspinall *et al.*<sup>1)</sup> はムラサキウマゴヤシの葉から調製した 15 g のペクチンのアンモニウム塩の酸部分分解液から 170 mg の同物質を得ている。その収量は 1.1% であった。本実験において、同物質の収量はペクチンの 1.6%、ペクチン酸の 1.2% でありきわめて類似していた。また、本法による同物質の単離はいままで報告されているものより比較的容易である。これまでペクチン分解酵素は数多く自然界より見出しされているが、このガラクトチュロノシルラムノースを分解する酵素についてはまだ研究されていない。ペクチンからこの物質が容易に単離できれば、酵素によるペクチンの分解機構の研究にも大いに役立つのではないかと考えられる。

次に酸性オリゴ糖画分に含まれる P-IV 画分を検討した。カラムクロマトグラフィーにて得られた P-IV 画分をアンバーライト IR-120 (H<sup>+</sup>型) でナトリウムイオンを除去し減圧濃縮したのち、0.2 N ホウ酸に溶解し液体クロマトグラフィーを行った。その結果、ペクチンから得られた P-IV 画分からは、ガラクトチュロン酸とジガラクトチュロン酸が検出され、その収量はモル比で 8:1 であった。しかし、ペクチン酸から得られた P-IV 画分からは、ガラクトチュロン酸のみが検出された。従って、ペクチンから得られる P-IV 画分とペクチン酸から得られるその画分にはわずかな差異が認められた。

### 3. 中性糖画分について

高分子多糖および酸性オリゴ糖を除去した画分には、中性糖が含まれているのでその同定、定量を行った。

酸性オリゴ糖の DEAE-セファデックス A-25 カラムクロマトグラフィーにおいて、セファデックスに未吸着画分を集め、アンバーライト IR-120 (H<sup>+</sup>型) を通してナトリウム

第 1 表 ペクチンおよびペクチン酸の酸部分分解液に含まれる中性糖

組 成	構 成 (% , w/w)			
	ペクチン		ペクチン酸	
ラムノース	4.07 <sup>a)</sup>	0.32 <sup>b)</sup>	6.10 <sup>a)</sup>	0.29 <sup>b)</sup>
アラビノース	14.55	1.14	14.43	0.68
ガラクトース	72.74	5.70	71.73	3.40
キシロース	3.88	0.30	4.88	0.23
グルコース	1.03	0.08	1.00	0.05

a) 全中性糖量に対する重量%。

b) もとの試料 (ペクチンおよびペクチン酸) に対する重量%。

イオンを除去し、減圧濃縮を行い、ペーパークロマトグラフィーにて同定、液体クロマトグラフィーにて定量した (第 1 表)。

検出された糖は、アラビノース、ガラクトースが大部分でわずかのラムノース、キシロース、グルコースも含まれていた。マンノースとフコースは検出されなかったことから、含まれているとしてもごく微量であるために検出からもれたのか、あるいはまったく存在しないのであろう。中性糖の収量は、ペクチンの 7.5、ペクチン酸の 4.7% であった。ペ

クチン酸に含まれるアラビノースとガラクトースはペクチンにくらべて約40%減少している。これは、ペクチン酸調製の際に $\beta$ -脱離によって分解されてペクチン酸画分から消失したためではないかと考えられる。また $\alpha$ -アミラーゼの処理により、ペクチンおよびペクチン酸からでんぷん由来のグルコースは除去しているが、ペクチンおよびペクチン酸ともわずかのグルコースが検出された。

以上のようにペクチンおよびペクチン酸の酸部分分解の結果、5gのペクチンから0.95gの酸不溶性多糖画分、0.66gの酸可溶性多糖画分、80.8mgの酸性オリゴ糖 P-III 画分、77.2mgの酸性オリゴ糖 P-IV 画分、377.0mgの中性糖画分が、また5gのペクチン酸から、上記の順に、1.52g、0.61g、61.2mg、23.1mg、233.2mgの各々の画分が得られた。

## 摘 要

精製レモンペクチンとペクチン酸を1.0N硫酸、80~90°C、4時間の加水分解を行い高分子多糖画分、酸性オリゴ糖画分、中性糖画分に分離し、ペクチンの酸部分分解生成物について検討した。

1) ペクチンおよびペクチン酸から得られる酸不溶性多糖画分は、分子量30,000~32,000でガラクトースの $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)結合による重合体であった。一方、酸可溶性多糖画分は、分子量22,000~25,000でガラクトースの $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)結合による重合体と大部分がガラクトースでありラムノースその他の中性糖を含む分子量6,000以下の画分より成っていた。

2) ペクチンおよびペクチン酸から得られる酸性オリゴ糖画分から、DEAE-セファデックス A-25 カラムクロマトグラフィーにより、ガラクトースノシルラムノースを単離した。ペクチンの酸性オリゴ糖画分には、ガラクトースノシルラムノースの他にガラクトースロン酸、ジガラクトースロン酸が含まれ、ペクチン酸より得られた同画分には、ガラクトースノシルラムノースの他にガラクトースロン酸が含まれていた。

3) ペクチンおよびペクチン酸の酸部分分解によって生じる中性糖は、大部分がガラクトース、アラビノースであり、他にわずかのラムノース、キシロース、グルコースが検出された。

## 文 献

1. Aspinall, G. O., Gestetner, B., Molloy, J. A., and Uddin, J. 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.
2. Barrett, A. J. and Northcote, D. H. 1965. Apple fruit pectic substances. Biochem. J. 94: 617-627.
3. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
4. 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チュロナーゼの作用. 農化 40 : 421-428.

5. 今野晴義, 山崎良樹, 吉田和美, 小沢潤二郎. 1981. 全自動液体クロマトグラフによるガラクトチュロン酸, グルクロン酸およびオリゴガラクトチュロン酸の分離, 定量法. 農学研究 59 : 9-15.
6. Loescher, W. and Nevins, D. J. 1972. Auxin-induced changes in *Avena* coleoptile cell wall composition. *Plant Physiol.* 50 : 556-563.
7. Stoddart, R. W., Barrett, A. J. and Northcote, D. H. 1967. Pectic polysaccharides of growing plant tissues. *Biochem. J.* 102 : 194-204.
8. Toman, R., Karácsonyi, S. and Kubačková, M. 1975. Studies on the pectin present in the bark of white willow (*Salix alba* L): Fractionation and acidic depolymerization of the water-soluble pectin. *Carbohydr. Res.* 43 : 111-116.
9. Torii, M. and Sakakibara, K. 1974. Column chromatographic separation and quantitation of  $\alpha$ -linked glucose oligosaccharides. *J. Chromatogr.* 96 : 255-257.
10. Trevelyan, W. E., Procter, D. F. and Harrison, J. S. 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* 166 : 444-445.