

# 高等植物細胞壁のペクチンの生合成

(課題番号：12640627)

平成 12 年～平成 14 年度科学研究費補助金（基盤研究(C) (2)）  
研究成果報告書

平成 15 年 4 月

研究代表者 円谷 陽一

(埼玉大学理学部教授)

埼玉大学附属図書館



998005357

## 【はしがき】

本報告書は、平成 12 年度から平成 14 年度までの 3 カ年年間に交付を受けた科学研究費（基盤研究(C)(2)）による研究成果をとりまとめたものである。

研究組織、各年度の配分額、および成果の発表状況は下記のとおりである。下記の(1)「学会誌等」に記載されているように論文発表は 1 編であるが、それ以外の研究成果に関しては順次学会誌に論文として発表する予定である。なお、本報告書は大学院生、武内義弥氏の学位論文の一部をなすものである。

## 【研究組織】

研究代表者：円谷陽一（埼玉大学理学部教授）

研究分担者：なし

## 【配分額】

（金額単位：千円）

|          | 直接経費  | 間接経費 | 合計    |
|----------|-------|------|-------|
| 平成 12 年度 | 1,100 | 0    | 1,100 |
| 平成 13 年度 | 500   | 0    | 500   |
| 平成 14 年度 | 700   | 0    | 700   |
| 総計       | 2,300 | 0    | 2,300 |

## 【研究発表】

### (1) 学会誌

Y. Takeuchi and Y. Tsumuraya, “*In vitro* biosynthesis of homogalacturonan by a galacturonosyltransferase from epicotyls of azuki bean” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 1519-1527 (2001).

### (2) 口答発表

武内義弥、円谷陽一：ペクチンの生合成に関わるガラクトツロン酸転移酵素、日本植物生理学会 2000 年度大会、名古屋、2000 年 3 月

武内義弥、円谷陽一：ペクチンの生合成に関わるガラクトツロン酸転移酵素、第 21 回糖質シンポジウム、名古屋、2000 年 7 月

Y. Takeuchi and Y. Tsumuraya, “A galacturonosyltransferase involved in the pectin synthesis” 20th International Carbohydrate Symposium, Humburg, Germany, 2000 年 8 月

### (3) 出版物 なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況 なし

埼玉大学附属図書館



998005357

埼大コーナー

## 目次

### 第1章 ガラクツロン酸転移酵素の性質

|               |    |
|---------------|----|
| I. 序論         | 2  |
| II. 材料および実験方法 | 7  |
| III. 結果       | 17 |
| IV. 考察        | 34 |

### 第2章 ガラクツロン酸転移酵素の部分精製

|               |    |
|---------------|----|
| I. 序論         | 39 |
| II. 材料および実験方法 | 40 |
| III. 結果       | 43 |
| IV. 考察        | 48 |

### 第3章 UDP・ガラクトン酸の有機化学合成

|            |    |
|------------|----|
| I. 序論      | 51 |
| II. 実験方法   | 50 |
| III. 結果・考察 | 60 |

|      |    |
|------|----|
| 参考文献 | 63 |
|------|----|

## 略語

|                           |  |
|---------------------------|--|
| BSA                       | ウシ血清アルブミン  |
| CHAPS                     | 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸   |
| DE                        | メチルエステル化度  |
| DHBA                      | 2,5-dihydroxybenzoic acid  |
| dpm                       | 1 分間当たりの放射性崩壊率   |
| DTT                       | ジチオスレイトール  |
| EDTA                      | エチレンジアミン・N,N,N',N'-テトラ酢酸   |
| EGTA                      | エチレングリコールビス(β-アミノエチルエーテル)・N,N,N',N'-四酢酸                                      |
| GalA (GalA <sub>1</sub> ) | ガラクトロン酸  |
| GalA <sub>2</sub>         | GalA・GalA (ガラクトロン酸 2 糖)  |
| GalA <sub>3</sub>         | GalA・GalA・GalA (ガラクトロン酸 3 糖)   |
| GlcA                      | グルクロン酸   |
| HEPES                     | N-2-ヒドロキシエチルピペラジン・N'-2-エタンスルホン酸  |
| HPAEC                     | 高速液体陰イオン交換クロマトグラフィー  |
| HPLC                      | 高速液体クロマトグラフィー  |
| MALDI-TOFMS               | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry |
| MES                       | 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸  |
| MOPS                      | 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸   |
| NMR                       | 核磁気共鳴スペクトル   |
| PAD                       | パルスドアンペロメトリー検出器  |
| polyGalA                  | ポリガラクトロン酸  |
| TAPS                      | N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸  |
| Tris                      | 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール  |
| UDP-GalA                  | ウラリジン-5'-ジホスホガラクトロン酸   |
| UDP-GlcA                  | ウラリジン-5'-ジホスホグルクロン酸  |

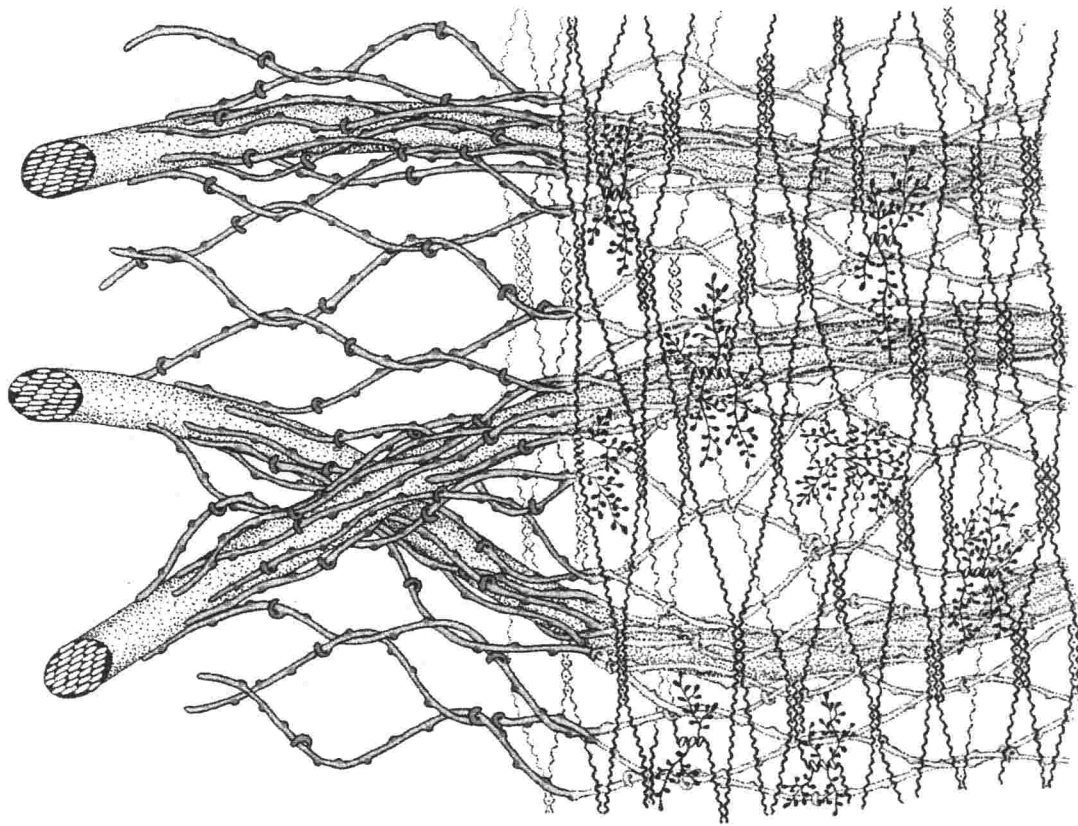
## 第 1 章

# ガラクトツロン酸転移酵素の性質

## I 序論

高等植物の細胞壁は、セルロース、ヘミセルロース、ペクチン、その他の多糖、糖タンパク質で構成されており、細胞の形だけでなく、情報伝達・生体防御などの生理機能も担っている (Carpita and Gibeaut, 1993) (図 1)。セルロースはグルコースが $\beta$ -1,4-結合で長い直鎖構造をなしたグルカンで細胞壁の主成分を成し、植物全体の 1/3~1/2 を占め、地球上で最も多量に存在する有機化合物である。天然セルロースは 40~50 本の分子が平行にならんで互いの分子間に水素結合でマイクロフィブリル結晶を形成している。ヘミセルロースはキシログルカン、キシラン、 $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4-グルカンが主成分である。ヘミセルロースは単一の糖から構成されているものは極めて少なく、ほとんどは 2 種ないし数種の糖残基を含むヘテログリカンである。また分岐構造を持っているものが多く、部分的にメチル化またはアセチル化されている。ペクチンは、ラムノガラクトuronan I、ラムノガラクトuronan II、ホモガラクトuronan の 3 種類に分類される。ホモガラクトuronan は、ガラクトuron酸が $\alpha$ -1,4-結合で連なったポリガラクトuron酸である。ラムノガラクトuronan I は $\alpha$ -1,2-結合した L-ラムノース残基と $\alpha$ -1,4-結合したガラクトuron酸残基が交互に並んで主鎖を形成しており、一部の L-ラムノース残基の C-4 位にはアラビノース、ガラクトースからなる中性糖側鎖が分岐結合している (Fry, 1988; Bacic et al., 1988; O'Neill et al., 1990; Zhang and Staehelin, 1992) (図 2)。また、ガラクトuron酸残基の一部はメチル基やアセチル基で修飾されている (Albersheim et al., 1993)。ラムノガラクトuronan II は約 30 のグリコシル残基で構成されている複雑な構造をもつ多糖である。ペクチン分子ではガラクトuron酸残基のもつカルボキシル基がカルシウムイオンを介して隣接するペクチン分子とイオン結合をしている (図 3)。この接着様式はエッグボックスモデルと呼ばれ、細胞壁の固さならびに隣接細胞間の接着の調節を行っている。カルボキシル基がメチル化されるとカルシウムイオンと結合できなくなるため、メチル基は cross-linkage の強さを制御する役割を担っていると考えられている。植物細胞壁全体としてはペクチンとヘミセルロースが相互作用し、さらにセルロースマイクロフィブリルとともに複雑な網目構造を形成している。この構造により細胞壁は機械的な強度に優れ、背丈の高い植物がその重量に耐えていられるのも細胞壁の強度によるところが大きい。

ペクチンは特に柑橘類の果皮 (30%)、テンサイパルプ (25%)、リンゴの皮 (15%) など柔組織に多く存在するが、木質部には少ない。ペクチンは、細胞分裂中に蓄積される最初の子多糖の一つであるため、ペクチンを構成する多糖は細胞の成長と発達で重要な役割を持つと考えられる。また、ペクチン多糖のオリゴ糖断片は、植物の発達と防御反応におけるシグナル分子になることがわかっている (Mohnen et al., 1996)。ペクチンは果物や野菜の「食物繊維」であり、食品工業ではゼリーやジャムの原料として使われている。動物においてペクチンはヒトの血中コレステロールを低下させ、糖尿病患者に投



Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M. (1993)

図1 植物細胞壁の模式図



ヘミセルロース



ペクチン



ペクチンの  
中性糖側鎖

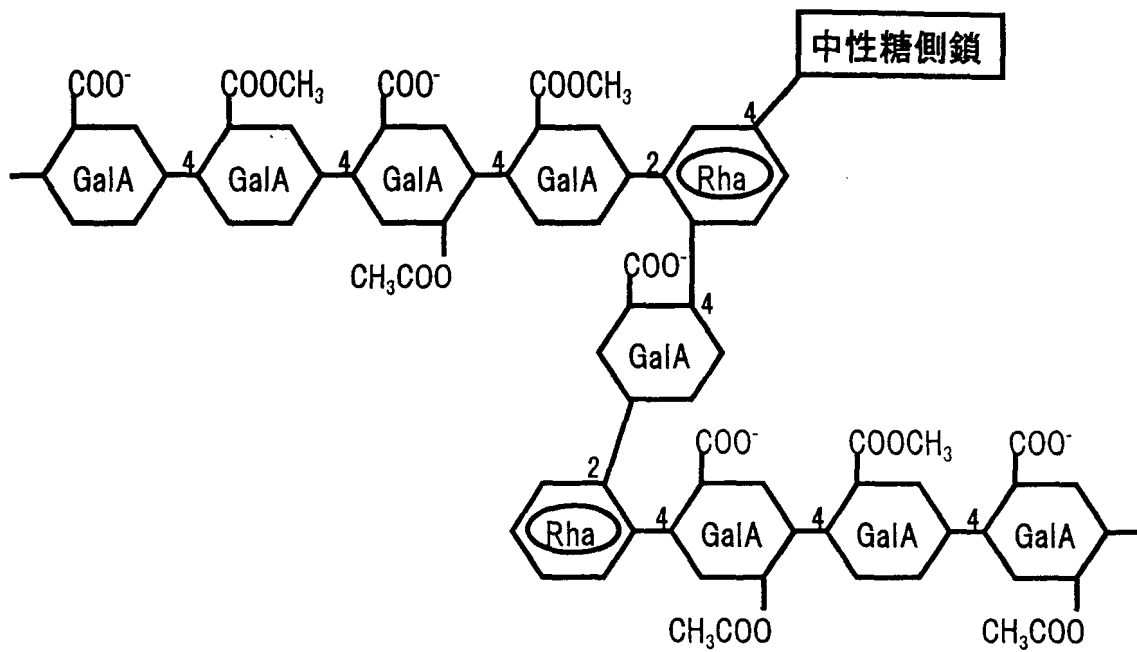


図2 ペクチン(ラムノガラクトツロナン I)の構造模式図

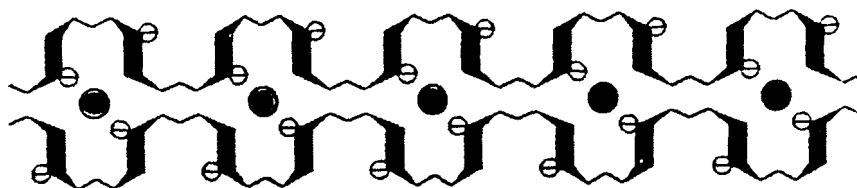
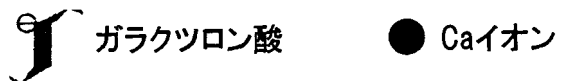


図3 ペクチンの“egg-box”結合による分子間架橋





与すると血清のグルコース濃度を低下させる効果がありラットでは、前立腺ガンの転移を阻害する。

植物細胞壁多糖の合成では、セルロースは原形質膜上にある 6 個の顆粒からなるロゼット型の合成酵素複合体で合成される (Kudlicka and Brown Jr, 1997)。セルロース以外の多糖の合成に関わる糖転移酵素はゴルジ体に局在しており、細胞質で合成される糖ヌクレオチドを基質として多糖の合成を行っている (Zhang and Staehein, 1992) (図 4)。合成された多糖は、分泌小胞によって細胞膜に運ばれ細胞外に分泌される。そこでは、植物の成長にあわせて多糖の分解と合成が協調して進行し、特に成長の著しい時期の植物では、合成酵素の活性が高いと考えられる。ペクチンの生合成には構造の複雑さから、40 種類以上の異なる転移酵素が必要であると考えられる (Stoddart, 1984; Ridley et al., 2001)。その合成に関わる転移酵素の中で同定されているものには、ガラクトツロン酸転移酵素 (Villemez et al., 1965; Villemz et al., 1966; Lin et al., 1966; Bolwell et al., 1985; Doong et al., 1995; Doong and Mohnen, 1998)、ペクチンメチル転移酵素 (Bourland et al., 1997; Goubet et al., 1998; Goubert and Mohnen, 1999; Ishikawa et al., 2000)、ペクチンアセチル転移酵素 (Pauly and Scheller, 2000) がある。ペクチンの主成分であるポリガラクトツロン酸を合成する酵素がガラクトツロン酸転移酵素 (EC 2.4.1.43) である。ガラクトツロン酸転移酵素の反応様式 (図 5) は、ポリガラクトツロン酸が受容体となり UDP-ガラクトツロン酸が供与体として働くと考えられている。ガラクトツロン酸転移酵素の基質である UDP-ガラクトツロン酸は植物組織から単離されており、その生成経路も部分的に明らかになっている (Gibeaut, 2000)。現在までに、タバコ培養細胞 (Doong et al., 1995; Doong and Mohnen, 1998) やマングビーン (Villemez et al., 1965; Villemz et al., 1966) などでガラクトツロン酸転移酵素の性質が調べられている。しかしながら、酵素はまだ精製されておらず、その性質も不明な点が多い。

細胞壁多糖の分解酵素に関しては多くの酵素が精製され、それらの性質についてもかなり明確となってきた。一方、植物細胞壁多糖の合成酵素の研究は 1960 年代から欧米で盛んに行われてきたが、酵素の性質については不明な点も多く、酵素の精製もされていない。そこで、本研究ではガラクトツロン酸転移酵素の性質を明らかにすることを目的とした。

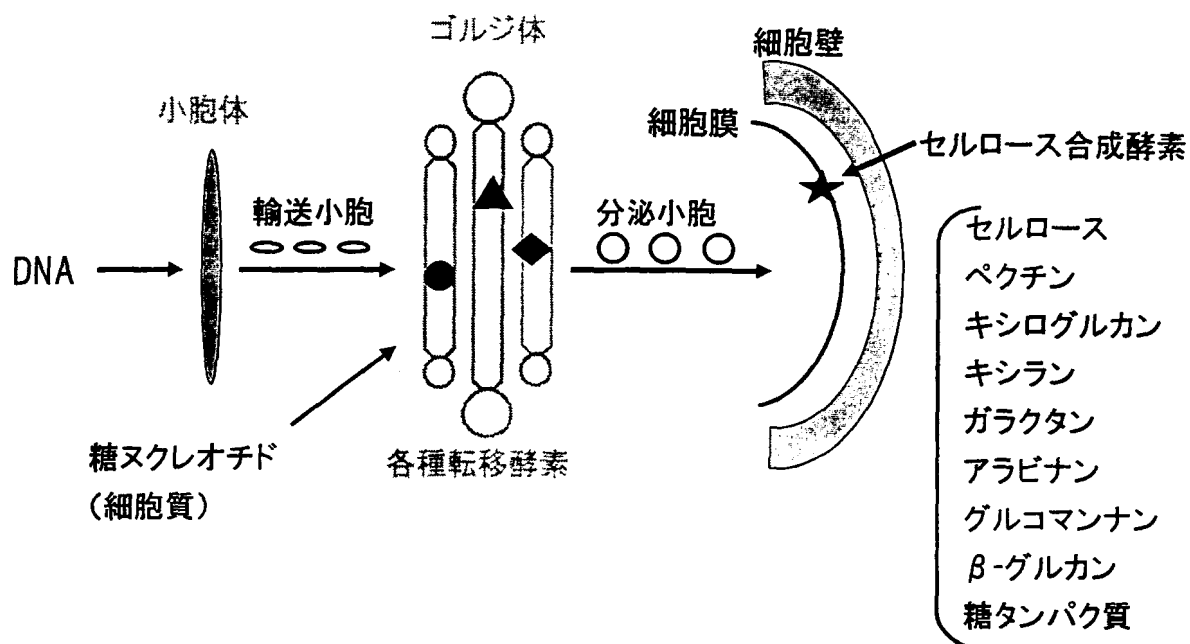


図4 植物細胞壁多糖の生合成と輸送経路

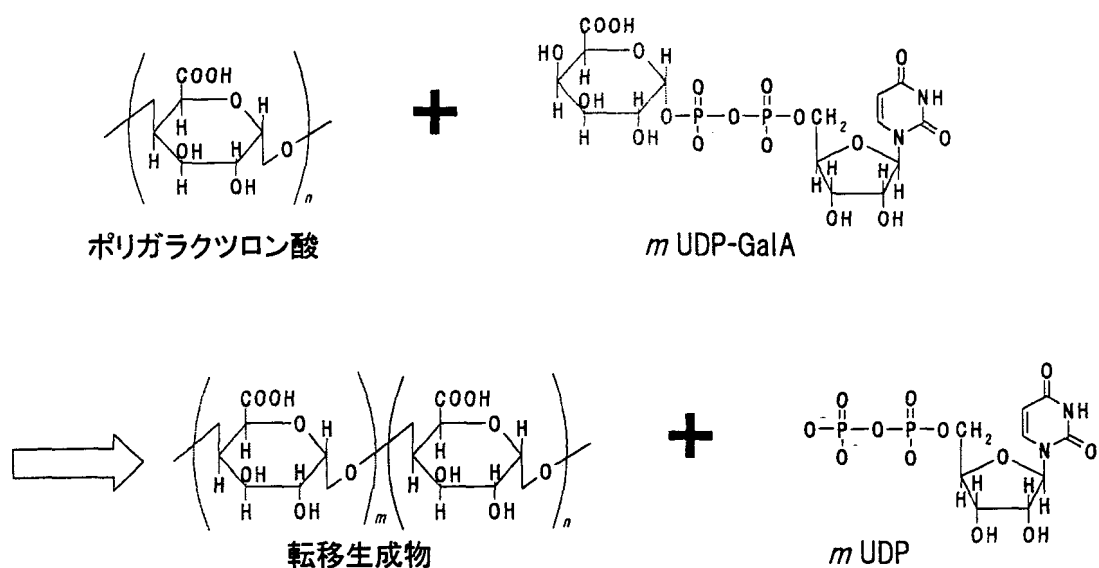


図5 ガラクツロン酸転移酵素の反応様式

## II 材料および実験方法

### A 材料

#### 1 植物

アズキ (*Vigna angularis* cv. Doyo) の種子はトキタ種苗 (埼玉県さいたま市) より購入した。ダイコン (*Raphanus sativus* L.) 成根は、青果店で購入した。

#### 2 試薬

ポリガラクトロン酸 (polyGalA) (柑橘類由来)、ペクチン (柑橘類由来)、UDP・ガラクトロン酸 (UDP・GalA)、UDP・グルクロン酸 (UDP・GlcA)、ヌクレオチドは Sigma 社より購入した。2-(*N*-モルホリノ)エタンスルホン酸 (MES)、*N*-2-ヒドロキシエチルピペラジン・*N*-2-エタンスルホン酸 (HEPES)、3-(*N*-モルホリノ)プロパンスルホン酸 (MOPS)、*N*-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-3-アミノプロパンスルホン酸 (TAPS)、エチレングリコールビス( $\beta$ -アミノエチルエーテル)-*N,N,N,N*-四酢酸 (EGTA) は同仁化学研究所から購入した。ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル (Triton X-100)、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (Tris) は和光純薬から購入した。UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]GlcA (293.6 mCi/mmol) は、Dupont NEN 社から購入した。その他の試薬は、分析用または特級の規格の製品を使用した。

#### 3 酵素

ポリガラクトナーゼは、市販の酵素製剤ドリセレースから当研究室の黒山が精製した標品を使用した (Ishikawa et al., 2000)。

#### 4 クロマトグラフィー

イオン交換樹脂 Dowex 50W $\times$ 8 (H $^{+}$ 型 50~100 mesh) は Dow Chemical 社から、ゲル濾過樹脂 Sephadex G-15、QAE-Sephadex A25 は Pharmacia Fine Chemicals 社 (現 Amersham Pharmacia Biotech 社) から購入した。クロマトグラフィー用ペーパー 3MM、No.1 は Whatman 社から購入した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用カラムには、Dionex 社の CarboPac PA1 カラム (4 $\times$ 250 mm)、東ソー社の TSKgel G3000PW $_{\text{XL}}$  (7.8 $\times$ 300 mm) と G2500PW $_{\text{XL}}$  (7.8 $\times$ 300 mm) カラムを接続して使用した。

### B 方法

#### 1 タンパク質量の測定

タンパク質量は、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準物質として用い、Bradford の方法に従って測定した (Bradford, 1976)。

## 2 糖の定量

全糖量は、標準糖としてガラクトロン酸 (GalA) を用い、フェノール硫酸法 (Dubois et al., 1956) に従って測定した。ウロン酸の定量は GalA を標準糖として用い、カルバゾール硫酸法 (Galambos, 1967) で測定した。還元糖の定量は、標準糖として GalA を用い、Nelson-Somogyi 法 (Nelson, 1944; Somogyi, 1945; Somogyi, 1952) に従って行った。また測定試料に金属を含んでいる場合の還元糖の定量は、標準糖として GalA を用い、Park-Johnson 法 (Park and Johnson, 1949) に従って測定した。

## 3 UDP-[<sup>14</sup>C]ガラクトロン酸の調製

### 1) ダイコン顆粒画分 (4-エピメラーゼ) の調製

ダイコン顆粒画分の調製は、Mitcham ら (Mitcham and Gross, 1991) と Liljebjelke ら (Liljebjelke et al., 1995) の方法を改良し行った。縦に切断し皮をむいた市販のダイコンの成根 (200 g) を細かく切り 0.7 量の 100 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.0) といっしょにミキサーに 1 分間かけた。破碎液を 2 層のナイロンメッシュに通し、2,000 × *g* で 5 分間遠心分離し未破碎物を取り除いた。さらに 15,000 × *g* で 30 分間遠心分離しその沈殿物を 100 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) 1 ml に懸濁し、粗顆粒画分 (タンパク質濃度 ~8.3 μg/μl) とした。粗顆粒画分は、-80℃で保存し、1 回に限り解凍して酵素として使用した。粗顆粒画分の調製は、すべて 4℃以下で行った。

### 2) 4-エピメラーゼ反応

UDP-[<sup>14</sup>C]GalA 調製のための反応条件は放射標識されていない UDP-GlcA を用いて、粗顆粒画分のタンパク質量と反応時間変化させることで検討した。反応は生成物である UDP-GalA 量の HPLC のピーク面積により変換率を調べ、反応の最適条件を決定した。UDP-[<sup>14</sup>C]GlcA 0.1 ml (6.8 nmol, 2 μCi) 中に含まれるメタノールを吸引デシケータで除去し、乾固した。さらに放射標識されていない 10 mM UDP-GlcA 1.5 μl (15 nmol) と 0.1 M HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) 8.5 μl とダイコン顆粒画分 20 μl (タンパク質量 ~168 μg) を加え総液量 30 μl として、37℃、1 時間インキュベートした。反応は、クロロホルム : メタノール (5:1 v/v) の溶液を 0.6 ml 加えることで停止させた。さらに 0.4 ml の水を加え攪拌し、水層を回収する操作を 2 度行った。水層にクロロホルム 1 ml を加え攪拌し、水層を回収し凍結乾燥した。凍結乾燥品に水を加え、HPLC で分離、分取した。

### 3) HPLC による UDP-[<sup>14</sup>C]GalA の分取

HPLC は、島津製作所社のシステムを用いた。カラムは、CarboPac PA1 (4×250 mm) を使用した。溶出は、溶離液にギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 6.7) を用い、38 分間で 0.05

M から 1 M ヘグラジエントをかけた。カラム温度は室温で、溶離液の流速は 1.0 ml/min に設定し、紫外部 262 nm で検出した。標準化合物である非放射標識 UDP-GalA の溶出位置と一致する画分を分取した。また、未反応の UDP-GlcA に相当するピークも回収し、再利用を試みた。分取した画分は、凍結乾燥させた後、水を加えて溶解し使用するまで -20℃ で保存した。基質として用いた UDP-[<sup>14</sup>C]GlcA から UDP-[<sup>14</sup>C]GalA への変換率と濃度は、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 1600, Packard 社製) で放射活性 (dpm) を測定して計算した。又、既知量の非放射標識 UDP-GalA を検量線として用い、HPLC のピーク面積からも計算した。HPLC による変換率は、約 25% であり、放射活性を測定して求めた凍結乾燥後の回収率は約 15% であった。

#### 4) 純度検定

分取した UDP-[<sup>14</sup>C]GalA の一部 (約 3.2 nCi) に 18 nmol の非放射標識 UDP-GalA を加えて (総量 10 μl)、0.2 N トリフルオロ酢酸 100 μl で加水分解した。反応は 100 度で 30 分間行い、冷却後吸引デシケータでトリフルオロ酢酸を除き、分解物を HPAEC-PAD で分析、分取した。高速液体陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC) は Dionex 社のシステム、カラムに CarboPac PA1 (4×250 mm) を用いて行った。溶出は水 (溶液 A)、0.1 M 水酸化ナトリウム (溶液 B)、0.5 M 酢酸ナトリウム/0.1 M 水酸化ナトリウム (溶液 C) を用いて表 1 のような濃度勾配で行った。ポストカラムには 0.3 M 水酸化ナトリウムを使用した。溶出液の流速は 1.0 ml/min に設定し、室温で分析した。パルスドアンペロメトリー検出器 (PAD) で検出後、溶出液を 15 秒または、1 分毎に分取し、シンチレーション・バイアルに入れ、2 ml になるように水を加えた。さらに 3 ml のシンチレーション液を加えて液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

表 1 HPAEC の濃度勾配

|      | 時間 (min) |      |      |    |         |       |    |
|------|----------|------|------|----|---------|-------|----|
|      | 0        | 12.5 | 13.2 | 25 | 31.25   | 31.26 | 44 |
|      | 直線濃度勾配   |      |      |    | 段階的濃度勾配 |       |    |
| 溶液 A | 80       | 65   | 0    | 0  | 0       | 80    | 80 |
| 溶液 B | 20       | 35   | 100  | 50 | 50      | 20    | 20 |
| 溶液 C | 0        | 0    | 0    | 50 | 50      | 0     | 0  |

31.25 分間で測定ができる。それ以降の 44 分まではカラムの洗浄・平衡化である。

#### 4 ガラクツロン酸転移酵素の反応

##### 1) 粗顆粒画分の調製

アズキ胚軸顆粒画分の調製は Vannier らの方法 (Vannier et al., 1992) を改良して行った。25℃、暗所、7 日間バーミキュライトまたは、水を張ったバットで生育させたアズキの実生から上胚軸 (長さ 8~10 cm) 20 g を切り取り 2 倍量の摩砕用緩衝液 (12% ショ糖、0.5% BSA、1 mM EGTA、0.1 mM 塩化マグネシウム、1 mM ジチオトレイトール (DTT) を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液, pH 7.5) を加え、乳鉢で組織を破碎した。破碎物は、3 重のナイロンメッシュで濾過した。その後 1,000 × g、15 分遠心分離し未破碎物を取り除き、10,000 × g、15 分遠心分離した。得られた上清を 100,000 × g、1 時間超遠心分離し、沈殿を摩砕用緩衝液で 4 回洗浄後、600 µl の摩砕用緩衝液に懸濁して粗顆粒画分 (タンパク質量 ~16 µg/µl, 総タンパク質量 6 mg) とした。粗顆粒画分は、-80℃ で保存し、1 回に限り解凍して酵素として使用した。顆粒画分の調製は、すべて 4℃ 以下で行った。図 6 に粗顆粒画分の調製法の概要を図示した。

## 2) 活性測定方法

ガラクトロン酸転移酵素の放射標識 UDP-GalA を用いた活性測定は次のような反応条件で行った。約 30 µg のタンパク質量を含む粗顆粒画分、0.5% BSA、6% ショ糖、5 mM 塩化マンガン、0.5% Triton X-100 を含んでいる 50 mM MES-KOH 緩衝液 (pH 6.8) からなる反応液 (30 µl) 中で 0.3 mM UDP-[<sup>14</sup>C]GalA (5 µl 中に 1.6 nCi の UDP-[<sup>14</sup>C]GalA と 9 nmol の非放射標識 UDP-GalA を含む : UDP-[<sup>14</sup>C]GalA 量はわずかなので非放射標識 UDP-GalA 量で濃度を表記した) を供与体とし、2 mg/ml 酸可溶性 polyGalA を受容体として、25℃、30 分間インキュベートした。以下、この反応液組成を標準反応液と呼ぶ。必要に応じて、実験毎に反応液の組成等を変えた。反応は、80 µl の 0.3 N 酢酸を添加して停止した。この液を 1.5×23 cm に切った Whatman 3MM ペーパーの原点 (下方より 5 cm) 付近に塗り、95% エタノール : 1 M 酢酸アンモニウム (2:1 v/v) の溶媒を用いて、上昇法により 6 時間展開した。展開後、[<sup>14</sup>C]GalA が取り込まれた高分子画分を抽出するために、乾燥したペーパーを原点より上下 1 cm の部分を切り取った。切り取った断片は、2 つ折りにしてシンチレーション・バイアルに入れて 0.5% シュウ酸アンモニウムを 2 ml 加えた。超音波を 10 分間かけ、さらに 3 ml のシンチレーション液を加えて放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。活性は GalA の取り込み量を比活性 (pmol/min/mg protein) で表した。図 7 に活性測定法の操作を図示した。

## 3) ペーパークロマトグラフィーによる放射活性化合物の分離の確認

上記の展開後のペーパーを富士フイルム社製 FUJIX バイオ・イメージングアナライザー-BAS1000 (イメージングプレートへの露光は 24 時間) による解析をし、基質である UDP-[<sup>14</sup>C]GalA と [<sup>14</sup>C]GalA が転移した産物が分離していることを確認した。

アズキ (*Vigna angularis* cv. Doyo)

↓ 暗所, 25°C, 7 日間

上胚軸

↓ ホモジェナイズ

{ 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)  
0.5% BSA, 1 mM DTT, 12% ショ糖  
1 mM EGTA, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>



1,000 × *g* 15 分



10,000 × *g* 15 分



上清



100,000 × *g* 60 分



沈澱 (粗顆粒画分)

図 6 アズキ上胚軸からの粗顆粒画分の調製

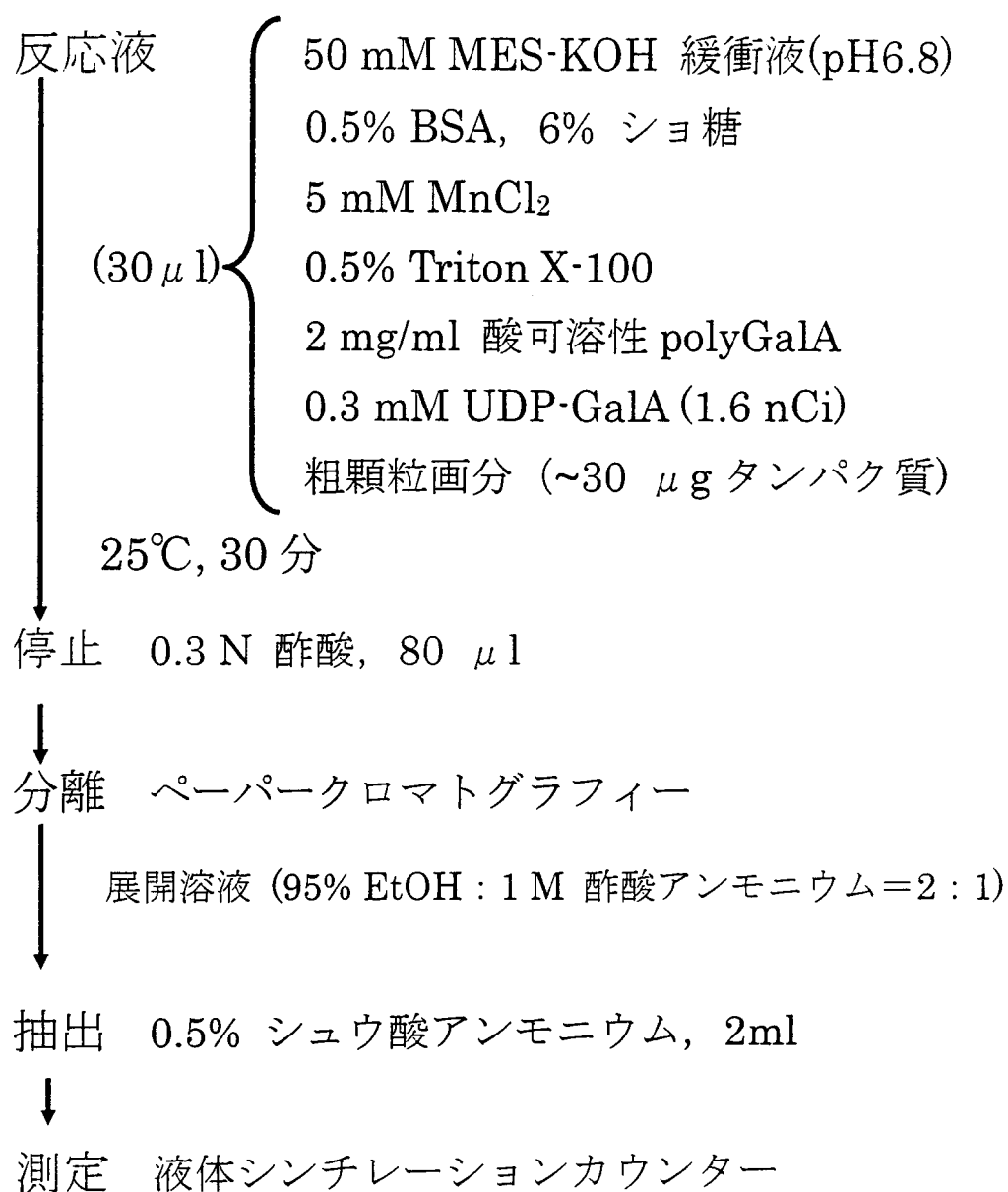


図 7 ガラクツロン酸転移酵素の活性測定法



## 5 オリゴガラクトロン酸の調製

### 1) オリゴガラクトロン酸の分離

オリゴガラクトロン酸は Komae ら (Komae et al., 1990) の方法に基づいて調製をした。polyGalA 1 g に酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) が 20 mM になるように加え、黒山によって調製されたポリガラクトナーゼ (20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH4.5 中) を加えて溶解し (全反応液量 50 ml)、37°C、18.5 時間インキュベートした。その後、沸騰水中で加熱して、酵素を失活させた。次に、2 倍量のエタノール (終濃度 66%) を加え  $10,000 \times g$  で 10 分間遠心分離し不純物を含んでいる沈殿物を取り除いた。上清はエバポレーターで濃縮させた後、小カラムにつめた Dowex 50W $\times$ 8 (H<sup>+</sup>型) で脱塩し、再びエバポレーターで濃縮した。得られたオリゴ糖画分は、0.125 M イミダゾール緩衝液 (pH7.0) で平衡化した QAE-Sephadex A25 (2.9 $\times$ 26 cm) にのせた。まず、0.125 M イミダゾール緩衝液を約 300 ml 流し、次にイミダゾール緩衝液 (pH7.0) を 0.125 M~0.55 M と濃度を高めて流して (総量 2.5 l) 分離・溶出した。糖のあるフラクションをフェノール硫酸法で確かめ、ピークをそれぞれ集めエバポレーターで濃縮した後、小カラムにつめた Dowex 50W $\times$ 8 (H<sup>+</sup>型) で脱塩し再びエバポレーターで濃縮した。その後、各画分を水で平衡化した Sephadex G15 (1.5 $\times$ 91 cm) でさらに精製した。

### 2) オリゴ糖の純度検定

脱塩後の試料を Whatman No.1 濾紙にスポットし、標準糖は、30 mg/ml の溶液を 1 スポットした。展開は下降法で 24 時間行い、展開溶媒に *n*-ブタノール : ピリジン : 水 (6:4:3 v/v/v) または、*n*-ブタノール : 酢酸 : 水 (5:2:3 v/v/v) を用いた。ペーパーの発色は硝酸銀発色法で行った

## 6 酸可溶性 polyGalA の調製と性質解析

### 1) 酸可溶性 polyGalA・酸不溶性 polyGalA の調製

酸可溶性 polyGalA の調製は、Ehrlich らの方法 (Ehrlich and Schubert, 1929) を改良して行った。polyGalA 5 g に水 245 ml を加えて温めて溶解し、冷却後  $10,000 \times g$  で 13 分間遠心分離し未溶解物など除いた。上清に 12 N 塩酸を 5 ml 加え、生じたゲル状物質を乳鉢ですりつぶし、2 時間沸騰水中で加熱した。冷却後、 $10,000 \times g$  で 15 分間遠心分離した。この上清から酸可溶性 polyGalA を、沈殿から酸不溶性 polyGalA を調製した。

上清は、乳鉢で細粉にした水酸化バリウムを加え中和した。 $10,000 \times g$  で 15 分間遠心分離し、生じたバリウム塩の polyGalA の沈殿を水に溶解し、0.1 N 硫酸で pH 2 にあわせ、 $10,000 \times g$  で 15 分間遠心分離して硫酸バリウムの沈殿を除いた。同様にして水酸化バリウムによる沈殿と硫酸による溶解を繰り返して得られる上清に 1 N NaOH を加

えて pH 5 に調節し、等量のエタノールを加えよく攪拌した。10,000 × g で 15 分間遠心分離したのち、沈殿をデシケーターでエタノールを蒸発した。続けて、真空ポンプで完全に乾燥させて粉末にした（収量 115 mg）。

一方、沈殿は 0.12 N HCl を含む 40% エタノールで懸濁し、10,000 × g で 15 分間遠心分離した。沈殿を水に溶解し 1 N 水酸化ナトリウムで pH 5 に調整した。1/20 容の 1 N 水酸化ナトリウムを加えたのち、0℃で 90 分間放置した。0.24 N 塩酸となるように塩酸を加えた。10,000 × g で 15 分間遠心分離し、再度、沈殿を 0.12 N 塩酸を含む 40% エタノールに懸濁し、遠心後、沈殿を水に溶解し、1 N NaOH で pH 5 に調整した。その後、等容のエタノールを加えよく攪拌したのち、0℃で 100 分間冷却した。10,000 × g で 15 分間遠心分離し、沈殿をデシケーターでエタノールを蒸発し、続けて真空ポンプで完全に乾燥させて粉末にした（収量 2.75 g）。

## 2) 酸可溶性 polyGalA の分子量の測定

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOFMS) は質量分析装置 KOMPACT MALDI IV tDE (Kratos Analytical 社) を用いた。マトリックスとして、2,5-dihydroxybenzoic acid (DHBA) を水 : エタノール (9:1 v/v) の混合溶媒で 0.1% となるように調製した。1 mg/ml polyGalA、0.5% 塩化ナトリウム、調製した DHBA をそれぞれ、0.5 μl ずつプレート上にのせて混合し、乾燥した。測定は linear モードでパワーを 120~150 で測定した。

HPLC による分子量測定は島津の HPLC システムを用い、TSKgel G3000PW<sub>XL</sub> と G2500PW<sub>XL</sub> カラムを直列で接続し、示差屈折計を用いて測定した。溶出液に 0.2 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.9) を用い、室温で、流速 0.5 ml/min で分析した。標準物質としては、昭和電工製 Shodex standard P-82 を用いた。このキットには以下の分子量既知のプルランが含まれている。P-1 (分子量 1,350)、P-2 (1,810)、P-3 (2,930)、P-5 (5,800)、P-10 (12,200)、P-20 (23,700)、P-50 (48,000)、P-100 (100,000)、P-200 (194,000)、P-400 (338,000)、P-800 (758,000) である。カラムの  $V_0$  は P-800、 $V_i$  は GalA で測定した。プルランの分子量と溶出時間の検量曲線から分析試料の分子量を求めた。

## 7 脱エステル化ペクチンの調製

市販のペクチン 20 mg を 2 ml の水に溶解した後、2 ml の 0.1 N 水酸化カリウムを加えた。反応は 4℃で 1 時間行った。1 N 酢酸を用いて中和し、水に対して 1 晩透析後、凍結乾燥した。

## 8 メチルエステル化度の測定

polyGalA のメチル基量は、Komae らの方法 (Komae and Misaki, 1989) で測定し

た。polyGalA 50  $\mu$ g を 0.1 ml の 0.05 N 水酸化カリウム中で室温、1 時間アルカリ処理してケン化（メチルエステルの加水分解）した。本液 50  $\mu$ l（ペクチン 25  $\mu$ g 相当含有）を 2 mM グルタチオン、2 mM NAD<sup>+</sup>、0.5 unit アルコール酸化酵素、1 unit ホルムアルデヒド脱水素酵素、200 mM リン酸緩衝液（pH 7.5）を含む溶液 1.45 ml と混合し、25°C、30 分保温した。標準物質としてメタノールを用い、340 nm の吸光度で、遊離したメタノールの量を測定してメチル基の含量を算出した。メチルエステル化度（\*DE）は、メチル基含量（mol）÷ガラクトuron酸残基含量（mol）×100（%）で表記した。

\*DE : degree of methyl-esterification. 例えば DE22 では 100 残基の GalA のうち 22 残基のカルボキシル基がメチル基で置換されていることを示す。

## 9 GalA 転移産物の分析

### 1) GalA 転移産物の調製

ガラクトuron酸転移酵素の活性測定用の標準反応液とは異なり、UDP-[<sup>14</sup>C]GalA 量を 6 倍（9.6 nCi、UDP-GalA の終濃度 0.5 mM）、酵素量 2 倍（タンパク質量 62  $\mu$ g）で、反応液量 30  $\mu$ l として、60 分間反応させた（この反応を 5 本のチューブで行なった）。反応後、沸騰水中に 5 分間つけ反応を停止させた。反応産物は、ペーパークロマトグラフィーで分離した。展開後、乾燥したペーパーを原点より上下 1 cm の部分を細かく切り、ワッセルマン試験管に入れ、0.8 ml の水を加えた。ワッセルマン試験管を沸騰水中で 15 分間加熱し、放射活性をもつ反応産物を抽出した。細分化した濾紙が混じらないように、パスツールピペットで液体をエッペンチューブにとり、卓上遠心機で不溶物を取り除いた。さらに、上清をフィルター（0.45  $\mu$ m クロマトディスク 4A、バイオフィールド社製）で濾過し、微細な濾紙くずを取り除いた。回収した液体は凍結乾燥し、水 100  $\mu$ l を加えて溶解した。一部を液体シンチレーションカウンターで測定した。その結果、用いた UDP-[<sup>14</sup>C]GalA の約 13% が高分子画分に取り込まれていることがわかった。

### 2) ポリガラクトナーゼによる処理

放射活性を持つ抽出した反応産物（1.12 nCi）と黒山により精製された微生物由来のポリガラクトナーゼ 0.1 unit（タンパク質量～0.5  $\mu$ g）を含む 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH 4.5（総液量 65  $\mu$ l）を 37°C、6 時間反応させた。反応後は、凍結させて分析するまで保存した。

### 3) HPAEC による分析

ポリガラクトナーゼ未処理の試料（1.28 nCi）と分解した試料（上記の一部の 0.69 nCi）をマニュアル注入により HPAEC で分析した。HPAEC は Dionex 社のシステム、カラムに CarboPac PA1（4×250 mm）を用いて行った。溶出は、A液 0.1 M 水酸化ナ

トリウム、B液 1 M 酢酸ナトリウム/0.1 M 水酸化ナトリウムを用い、60 分間でB液を 0%から 100%へグラジエントをかけた。溶離液の流速は 1.0 ml/min に設定した。PAD 検出後、溶出液を 30 秒または、1 分毎に分取し、シンチレーション・バイアルに入れ、2 ml になるように水を加えた。さらに 3 ml のシンチレーション液を加えて液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

#### 4) ペーパークロマトグラフィーによる分析

ポリガラクトナーゼ未処理の試料 (0.64 nCi) と、分解した試料 (0.64 nCi) を 1.5 × 23 cm に切った Whatman 3MM ペーパーにスポットし、95%エタノール:1 M 酢酸アンモニウム (2:1 v/v) の溶媒を用いて、上昇法により 6 時間展開した。展開後、乾燥したペーパーをイメージングアナライザー (イメージングプレートへの露光は 24 時間) により、放射活性の分布を調べた。標準として GalA<sub>1</sub>、GalA<sub>2</sub>、GalA<sub>3</sub>、酸可溶性 polyGalA をペーパーにスポットし、展開後、硝酸銀発色法で糖を検出した。

### III 結果

#### 1 粗顆粒画分のガラクトロン酸転移酵素の活性測定

##### 1) 受容体基質酸可溶性 polyGalA への $[^{14}\text{C}]$ GalA 残基の取り込み

アズキの上胚軸から得られる粗顆粒画分を用いてガラクトロン酸転移酵素活性が実験方法で示したように測定できることをイメージングアナライザーを用いて調べた。供与体として UDP- $[^{14}\text{C}]$ GalA、受容体として酸可溶性 polyGalA を用い、標準反応液中で反応・ペーパークロマトグラフィーで分離し、放射活性のパターンを調べた。対照実験として UDP-GalA のみについても調べた。UDP- $[^{14}\text{C}]$ GalA とペーパーの原点に留まる転移産物に分離した。受容体の有無にかかわらず反応時間 0 分では放射活性が原点には認められないが、30 分の反応では放射活性が検出された。受容体を含まない反応でも粗顆粒画分に内在する受容体（粗顆粒画分に含まれる合成途中のペクチン）が $[^{14}\text{C}]$ GalA を取り込んで活性が現れることがわかる（図 8）。しかし、反応液に受容体を加えた場合と比べて、その活性はわずかであった。おそらく粗顆粒画分には合成途中のペクチン含量が少ないためと考えられる。また標準物質として、酸可溶性 polyGalA、GalA1~3 糖を展開し、硝酸銀発色で糖を検出した。polyGalA が原点に残り、GalA1~3 糖は展開によって移動した（図 15B）。このことから酸可溶性 polyGalA に取り込まれた $[^{14}\text{C}]$ GalA を定量することでガラクトロン酸転移酵素の活性が測定できることを確認した。

##### 2) 経時的变化

反応液に、約 34  $\mu\text{g}$  のタンパク質を含む粗顆粒画分を添加し、反応時間を 0~60 分間に変化させて活性と時間の関係を調べた（図 9A）。反応時間が増すにつれて活性が増加し、約 40 分までは直線関係が成立することが認められた。酵素の比活性は粗顆粒画分の調製毎に多少変動はあるが 1,300~2,000 pmol/min/mg protein である。このデータに基づき、酵素活性は 30 分で測定した。30 分間の反応における UDP-GalA の転移量は反応液に加えた量の約 17%であった。このことから、受容体（GalA 含量 84 mol%, 表 4）の総 GalA 量に対して 0.7%の鎖の伸張が起きたと計算で求められる。

##### 3) 粗顆粒画分量（タンパク質量）と酵素活性の関係

標準反応液中の粗顆粒画分量（タンパク質量）を変化させ、反応時間 30 分で活性を測定した。活性は転移された GalA 量を pmol/min で表した。酸可溶性 polyGalA を受容体として用いた反応では活性とタンパク質量 80  $\mu\text{g}$  までの間に直線関係が成立した（図 9B）。また、粗顆粒画分に含まれる内在性受容体への転移反応も認められた。しかし、活性はわずかに増加するだけであり、受容体への転移活性との間に大きな差が見られた。この結果から粗顆粒画分に含まれるタンパク質量が約 30  $\mu\text{g}$  となるように設定し測定した。

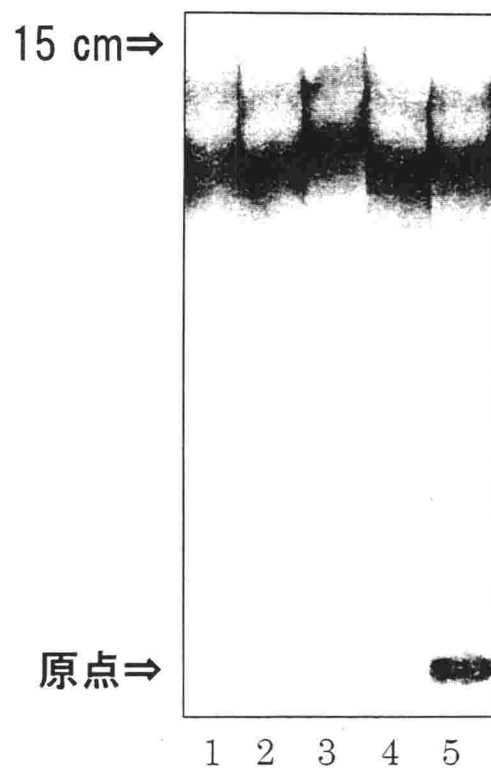


図8 UDP- $^{14}\text{C}$ GalAと転移産物の  
ペーパークロマトグラフィーによる分離

|   |                              | 原点の放射活性 (dpm) |
|---|------------------------------|---------------|
| 1 | UDP- $^{14}\text{C}$ GalA のみ | 0             |
| 2 | -Acceptor, 反応時間 0 分          | 0             |
| 3 | +Acceptor, 反応時間 0 分          | 1             |
| 4 | -Acceptor, 反応時間 30 分         | 33            |
| 5 | +Acceptor, 反応時間 30 分         | 1030          |

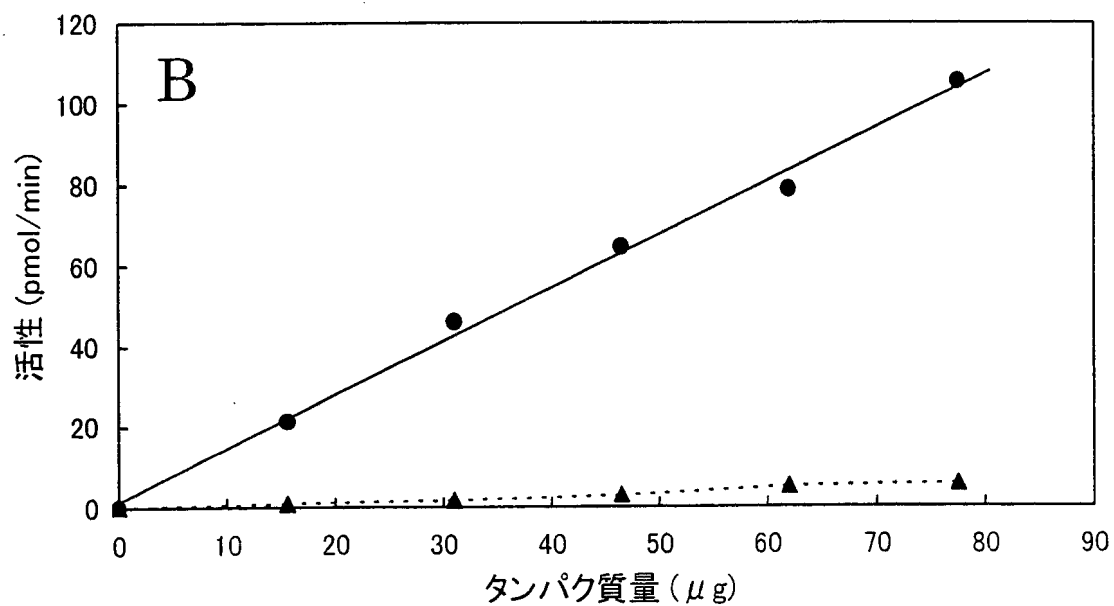
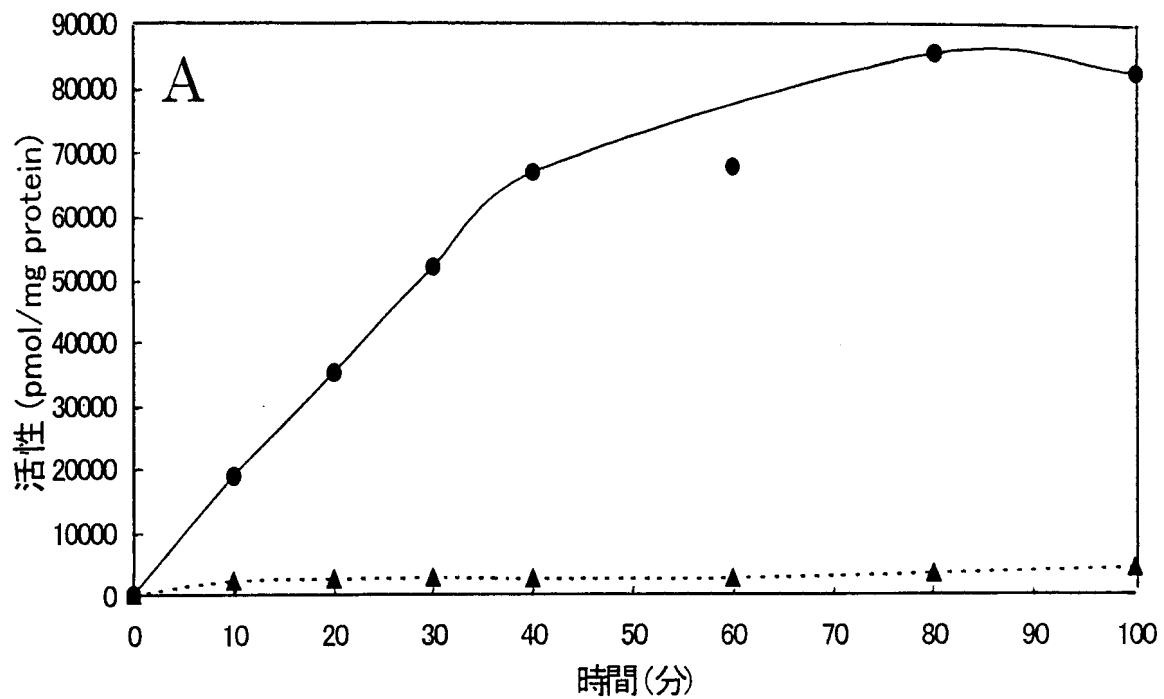


図 9 反応時間ならびにタンパク質量濃度と活性の関係

A 33.6  $\mu\text{g}$  のタンパク質を含む粗顆粒画分を用いた。

B 反応時間は 30 分。

—●—, +Acceptor; .....▲....., —Acceptor

#### 4) 酵素活性におよぼす pH の影響

反応におよぼす pH の影響は、標準組成の反応液のうち緩衝液を変えて行った。緩衝液の濃度は終濃度 50 mM で行い、緩衝液には HEPES-KOH 緩衝液 (pH 6.8、7.0、7.5、8.0)、MES-KOH 緩衝液 (pH 5.5、6.0、6.5、6.8、7.0)、MOPS-KOH 緩衝液 (pH 6.5、6.8、7.0、7.5)、TAPS-KOH 緩衝液 (pH 7.75、8.0、8.25、8.5、8.75、9.0)、Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5、pH7.75、8.0、8.25、8.5、8.75、9.0) を用いた (図 10A)。同じ pH でも緩衝液の種類によっても活性はかなり変動した。酵素の最適作用 pH は 6.8~7.8 と求められた。標準の反応条件は、MES-KOH 緩衝液 (pH 6.8) に設定した。

#### 5) 酵素活性におよぼす温度の影響

反応におよぼす温度の影響は、標準反応液の温度を変えて反応し、活性を測定した。反応温度は 15、20、25、30、35、40、45℃で行った。図 10B に示したように 25~35℃の範囲で活性が高く幅の広い至適温度を持つことがわかった。標準の反応条件は 25℃に設定した。

#### 6) 酵素活性におよぼす界面活性剤の影響

一般に糖鎖合成酵素は膜酵素であると考えられるため、界面活性剤を加えることにより膜構造を破壊すると酵素活性が高まる例が知られている。ガラクトシロン酸転移酵素についても、活性におよぼす界面活性剤の影響を調べた。反応液に様々な界面活性剤を終濃度 0.5% となるように加えた。表 2 では界面活性剤を加えていない反応液の活性を 100 とし、相対活性で表した。非イオン性界面活性剤である、Triton X-100、Triton X-102 と、両性界面活性剤の 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]プロパンスルホン酸 (CHAPS) が有効であった。特に非イオン性界面活性剤は有効であり、比活性が 2~3 倍に増加した。反応液に受容体を加えない場合は、界面活性剤を加えても無添加の場合と比べて活性はあまり高まらないことがわかった。

#### 7) 酵素活性におよぼす Triton X-100 の影響

界面活性剤と酵素活性のデータを基にして、活性を高めるのに有効であった Triton X-100 の濃度を変えて酵素活性を調べた。標準反応液の Triton X-100 濃度を 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.75、1.0% に変化させた反応液を用いた。図 11 に示すように少量の Triton X-100 でも効果があることがわかる。また、高濃度に加えても活性の増加は認められなかった。受容体を加えていない反応液では Triton X-100 を加えると阻害する傾向が認められた。標準反応液に加える界面活性剤は、Triton X-100 とし、その濃度は 0.5% に設定した。



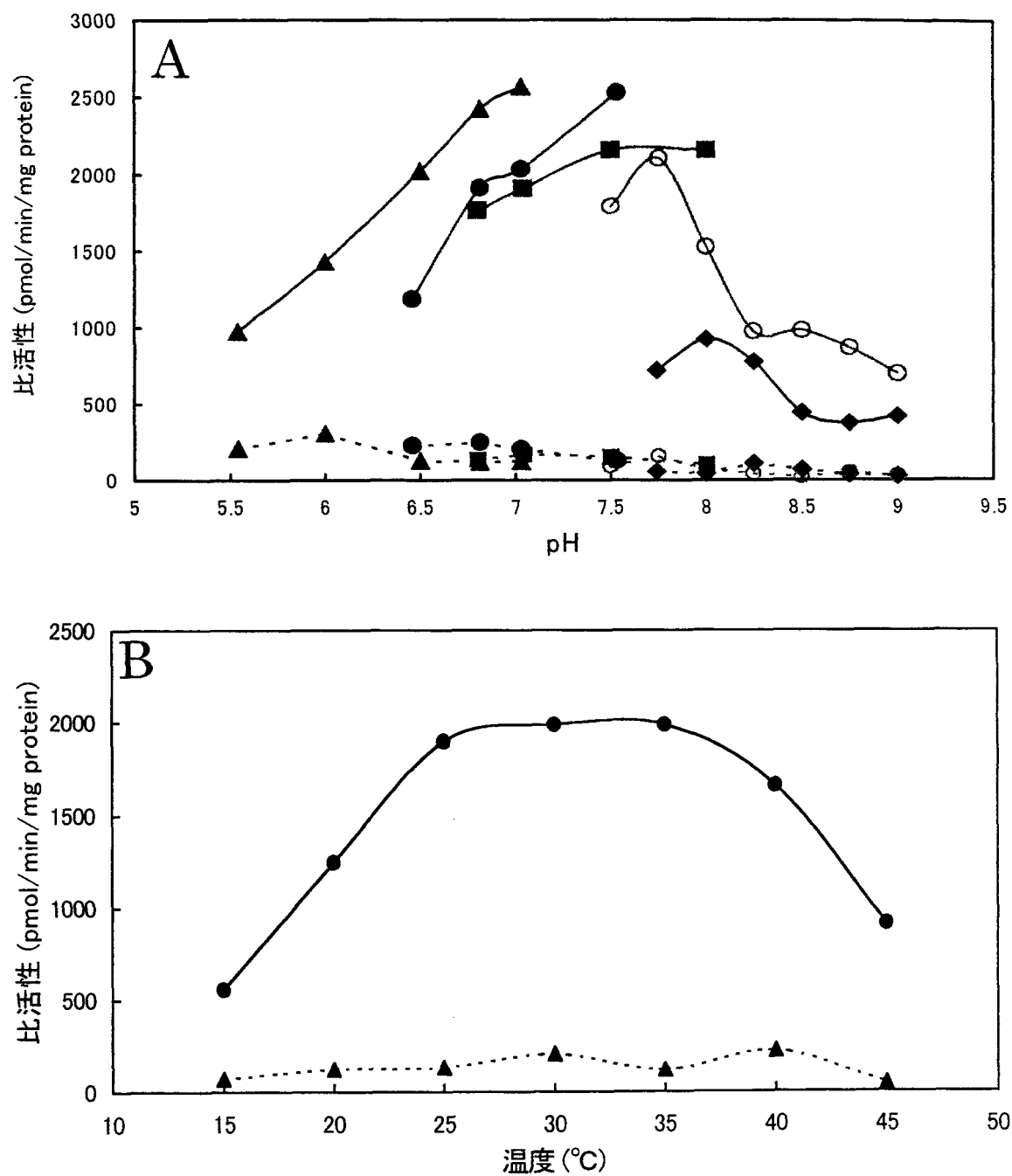


図 10 酵素活性におよぼす pH と温度の影響

A タンパク質量 33.6  $\mu$ g、反応時間 30 分で活性を測定した。実線は +Acceptor、点線は -Acceptor を示している。

—■—, HEPES-KOH; —▲—, MES-KOH; —●—, MOPS-KOH;

—◆—, TAPS-KOH; —○—, Tris-HCl

B タンパク質量 33.6  $\mu$ g、反応時間 30 分で活性を測定した。

—●—, +Acceptor; .....▲....., -Acceptor

表2 酵素活性におよぼす界面活性剤の影響

| 界面活性剤                                 | 相対活性      |           |
|---------------------------------------|-----------|-----------|
|                                       | -Acceptor | +Acceptor |
| なし                                    | 30        | 100       |
| Triton X-100                          | 17        | 270       |
| Triton X-102                          | 36        | 290       |
| <i>n</i> -Octyl- $\beta$ -D-glucoside | 45        | 190       |
| CHAPS                                 | 26        | 180       |
| Tween 20                              | 26        | 170       |
| Zwittergent 3-16                      | 14        | 20        |
| Sodium deoxycholate                   | <10       | <10       |

タンパク質量  $31 \mu\text{g}$ 、反応時間 30 分で活性を測定し、界面活性剤を除いた組成の反応液で測定した+Acceptorの酵素活性 ( $237 \text{ pmol/min/mg protein}$ ) を 100 として、各界面活性剤の活性に対する効果を総活性であらわした。

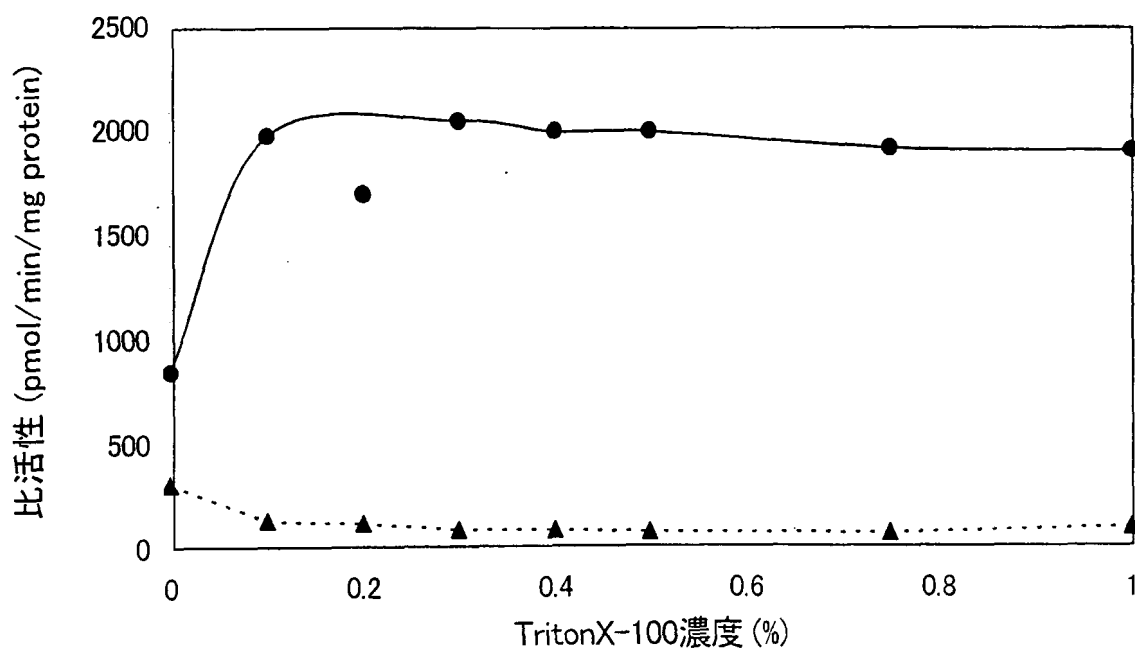


図 11 酵素活性におよぼす Triton X-100 の影響

タンパク質量  $33.6 \mu\text{g}$ 、反応時間 30 分で測定した。

—●—, +Acceptor; .....▲....., -Acceptor

#### 8) 酵素活性におよぼす金属イオンの影響

一般に糖転移酵素は、2価の金属イオンに活性を依存するものが多い。ガラクトツロン酸転移酵素についても様々な金属イオンによる影響を調べた。反応液に 5 mM の金属イオンとして  $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ （すべて塩化物）を加えて反応させた。図 12A に金属イオンを加えていない反応液の活性を 100%とし、相対活性で表した。 $\text{Mn}^{2+}$ と  $\text{Zn}^{2+}$ が有効であった。特に  $\text{Mn}^{2+}$ を加えると比活性が 40 倍に増加することから、活性を高めるのに反応にはマンガンイオンが必須であると考えられる。

#### 9) 酵素活性におよぼすマンガンイオン濃度の影響

金属イオンと酵素活性のデータを基に、活性を高めるのに必須であると判断した  $\text{Mn}^{2+}$ 濃度の影響を調べた。標準反応液の  $\text{Mn}^{2+}$ 濃度を 0、1、3、5、7、10、15、20 mM に変化させて反応した。図 12B は比活性と  $\text{Mn}^{2+}$ 濃度の関係を示している。 $\text{Mn}^{2+}$ 濃度が高まるにつれ活性は高まり、約 5 mM 以上になると比活性が一定になることがわかる。受容体を入れていない反応液では、少量の  $\text{Mn}^{2+}$ 濃度（1~3 mM）では比活性が増加するがその後、減少するのが観察された。標準反応液ではマンガンイオン濃度を 5 mM に設定した。

#### 10) BSA 濃度・ショ糖濃度と酵素活性の関係

一般に糖転移酵素では BSA、ショ糖を酵素の安定化剤として加えることが多い。ガラクトツロン酸転移酵素についても、これらの化合物の活性におよぼす影響を調べた。標準反応液には、0.5%BSA と 6%ショ糖が加えられているが、BSA およびショ糖濃度を変化させて反応を行った。その結果 BSA、ショ糖ともに活性には影響を及ぼさないことがわかる。したがって、必要に応じて BSA、ショ糖の成分を除いて酵素反応を行うことが可能である。

#### 11) 酵素活性におよぼすヌクレオチドの影響

ガラクトツロン酸転移酵素の基質となる UDP-GalA の基質アナログである、UDP や関連するヌクレオチドの酵素活性に対する影響を調べた。実験には、AMP、ADP、ATP、GMP、GDP、GTP、UMP、UDP、UTP を用い、標準反応液にヌクレオチドを終濃度 10 mM で加えて反応を行った。ADP、ATP、GTP、UTP により活性は顕著に阻害されることがわかった。特にヌクレオチド三リン酸では大きく阻害された。GMP、AMP の添加では、酵素活性が少しだけ高まった。受容体を加えない場合は、全体的に活性は低いを受容体を加えた場合と同様の傾向が認められた。

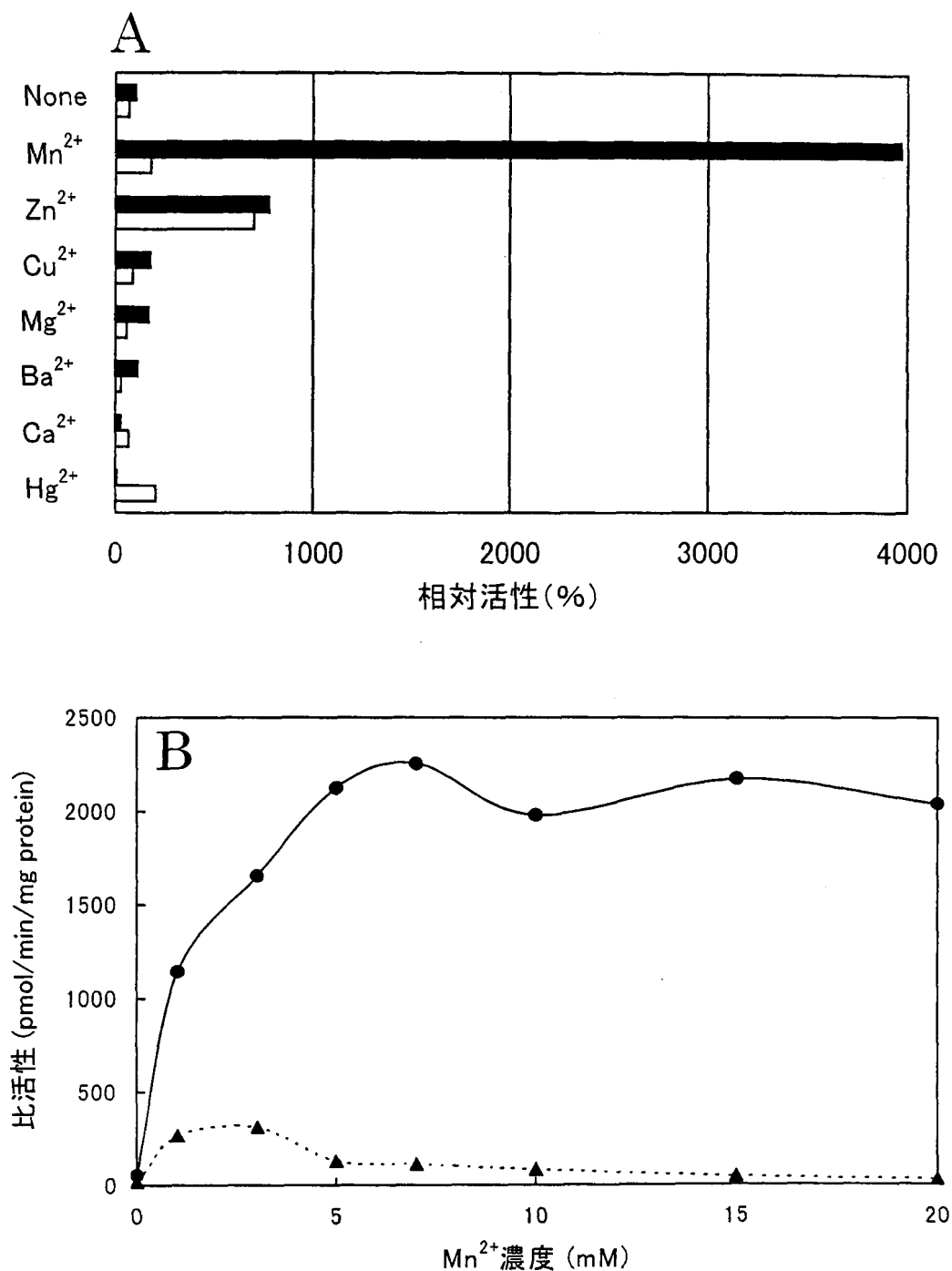


図 12 酵素活性におよぼす金属イオンの影響

A 金属イオンには塩化物塩を使用した。タンパク質量 33.6  $\mu$ g、反応時間 30 分で測定し、金属イオンを除いた組成の反応液で測定した+Acceptor の酵素活性 (45 pmol/min/mg protein) を 100%として、各金属イオンの活性に対する効果をあらわした。 ■, +Axceptor; □, -Acceptor

B タンパク質量 33.6  $\mu$ g、反応時間 30 分で測定した。  
—●—, +Acceptor; .....▲....., -Acceptor

## 12) その他の物質（阻害剤や単糖・オリゴ糖）と酵素活性の関係

酵素活性におよぼす様々なキレート剤、プロテアーゼ阻害剤や単糖、GalA<sub>2</sub>、GalA<sub>3</sub>などの影響を調べた。反応は標準反応液に化合物が終濃度 10 mM となるように加えて行った。単糖としては、ガラクトース、グルコース、L-ラムノース、キシロース、L-アラビノース、D-アラビノース、L-フコース、マンノース、GalA、GlcA を用いた。特に単糖を加えても活性におよぼす影響はほとんど認められなかった。GalA を加えると少しだが、活性は阻害された。GalA<sub>2</sub>、GalA<sub>3</sub> を加えると活性は促進された。また、フッ化ナトリウム、EGTA、エチレンジアミン-*N,N,N',N'*-テトラ酢酸 (EDTA)、DTT は阻害剤として働いた。

## 2 酵素活性の反応速度論的解析

### 1) 受容体特異性

ガラクトロン酸転移酵素の受容体になると考えられる様々な polyGalA とペクチンを用いて反応を行った。polyGalA は市販の polyGalA および本研究で市販の polyGalA から調製した酸可溶性 polyGalA（低分子画分）、酸不溶性 polyGalA（高分子画分）を用いた。ペクチンは DE が 22、61、90 と異なる市販のペクチンおよびそれぞれを脱エステル化したペクチンを用いた。標準反応液に 2 mg/ml 受容体となるように加えた（表 3）。受容体としては酸可溶性 polyGalA が有効であり、酸不溶性 polyGalA では活性が低下した。構成糖比（表 4）で、市販の polyGalA は GalA 含量が低く（65%mol）、中性糖が多く含まれているが、酸可溶性 polyGalA と酸不溶性 polyGalA は GalA 含量が高く構成糖比ではよく似た傾向を示した。このことから、受容体の効率は GalA 含量とは関係がないと考えられる。

一方、ペクチンと polyGalA の分子量は HPLC と MALDI-TOFMS で測定した。MALDI-TOFMS は、酸可溶性 polyGalA だけしか測定できなかった。酸可溶性 polyGalA の分子量は 2,000~6,000 だった。このデータから酵素反応の受容体の効率が異なるのは分子量の差が反映しており、分子量の低い受容体（酸可溶性 polyGalA）がガラクトロン酸転移酵素の良好な受容体としてはたらくと考えられる。標準反応液では酸可溶性 polyGalA を用いて活性を測定した。

ペクチンについては DE が高いほど比活性が高くな傾向があった。脱エステル化を行った各ペクチンを受容体として用いたところ比活性は脱エステル化をする前のものよりも低くなった。このことからペクチンではエステル化度が活性に影響していると考えられる。しかしペクチン DE90 と同程度の活性を示す市販の polyGalA の DE を測定したところ、DE はほぼ 0 であり、活性発現には、GalA のカルボキシル基が遊離状態の方が受容体として有効なのか、それともメチル基で置換されている方が有効なのか不明である。

表 3 受容体と酵素活性の関係

| 受容体           | DE | 分子量                |             | 比活性                   |
|---------------|----|--------------------|-------------|-----------------------|
|               |    | HPLC               | MALDI-TOFMS | (pmol/min/mg protein) |
| 無添加           |    |                    |             | 190                   |
| 酸可溶性 polyGalA | <1 | ~10,000            | 2,000~6,000 | 1920                  |
| 酸不溶性 polyGalA | <1 | ~70,000            | ---         | 550                   |
| ポリガラクトロン酸     | 2  | ~100,000           | ---         | 410                   |
| ペクチン          | 90 |                    |             | 430                   |
| 脱エステル化        | <1 |                    |             | 50                    |
| ペクチン          | 61 |                    |             | 190                   |
| エステル化         | <1 |                    |             | 60                    |
| ペクチン          | 22 | 24,000~<br>100,000 |             | 70                    |
| 脱エステル化        | <1 |                    |             | 50                    |

タンパク質量 34  $\mu$ g、反応時間 30 分で活性を測定した。

表 4 受容体の構成糖分析

|              | 構成糖 (mol%) * |     |     |     |     |     |     |      |      |
|--------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
|              | Fuc          | Rha | Ara | Gal | Glc | Man | Xyl | GalA | GlcA |
| 酸可溶性polyGalA | 0            | 9   | 0   | 2   | 1   | 0   | 3   | 84   | 1    |
| 酸不溶性polyGalA | 0            | 3   | 0   | 2   | 0   | 0   | 1   | 94   | 0    |
| ポリガラクトロン酸    | 1            | 9   | 2   | 10  | 10  | 1   | 2   | 65   | 1    |
| ペクチン DE22    | 1            | 7   | 8   | 21  | 1   | 0   | 0   | 61   | 1    |

\*HPAEC による定量値

## 2) 酵素活性におよぼす受容体（酸可溶性 polyGalA）の影響

酵素活性に特に有効な受容体である酸可溶性 polyGalA の濃度の影響を調べ、反応速度論的解析を行った。酵素反応は標準反応液の受容体（酸可溶性 polyGalA）濃度を 0～5 mg/ml に変えて行った（図 13A、グラフは受容体濃度 0～0.5 mg/ml の範囲を示した）。受容体（酸可溶性 polyGalA）濃度が高まるにつれて比活性は増加し、0.2 mg/ml 以上で定常状態になった。酸可溶性 polyGalA 濃度を高めても、活性は低くならず、酵素活性を阻害しないことがわかった。挿入図は Hanes-Woolf プロットを示しており、酸可溶性 polyGalA に対する見掛けの  $K_m$  値は 0.02 mg/ml、 $V_{max}$  は 1,800 pmol/min/mg protein と求められた。

## 3) 酵素活性のおよぼす供与体（UDP-GalA）の影響

供与体についても反応速度論的解析を行った。酵素反応は標準反応液の供与体濃度を 0～0.6 mM に変えて行った。反応液中の UDP- $[^{14}C]$ GalA 濃度は一定にし、放射標識されていない UDP-GalA 濃度を変えて反応させた。図 13B では、基質（UDP-GalA）濃度が高まるにつれて比活性は増加し、0.3 mM で定常状態になった。挿入図は Hanes-Woolf プロットを示しており、ここから UDP-GalA に対する見掛けの  $K_m$  値、 $V_{max}$  を求めた。反応は二相性であり、2 つの異なる  $K_m$  値 0.14 mM および 0.86 mM、 $V_{max}$  は 2,700 pmol/min/mg protein および 7,800 pmol/min/mg protein と求められた。

## 3 反応産物の分析

ガラクトロン酸転移酵素の作用で UDP- $[^{14}C]$ GalA から転移された  $[^{14}C]$ GalA が受容体として用いた酸可溶性 polyGalA に取り込まれていることを確認する必要がある。そこで酵素反応で生じた GalA 転移産物をペーパークロマトグラフィーの原点に残った高分子画分から抽出した。酵素反応は、転移産物を大量に得るため活性上昇と反応時間の直線関係からはずれた 60 分で行った。

### 1) HPAEC による解析

反応産物は Dionex 社の HPAEC-PAD（カラム CarboPac PA1）で分析し、反応産物をポリガラクトナーゼで分解した分解産物と比較した（図 14）。HPAEC の溶出液は、分取して放射活性を測定した。ポリガラクトナーゼで処理する前の産物の放射活性は、重合度が 13 以上の高級ガラクトロン酸オリゴ糖の溶出位置に検出される。HPAEC に装着してある PAD でも重合度の高い反応産物であることが確認できる。ポリガラクトナーゼで 1 晩反応をさせると、反応産物は分解され PAD では、単糖、2 糖となった。放射活性も単糖と 2 糖に移動したことから、基質として用いた UDP- $[^{14}C]$ GalA から  $[^{14}C]$ GalA は、ほとんどが高級ガラクトロン酸オリゴ糖に取り込まれていると確認できた。また、

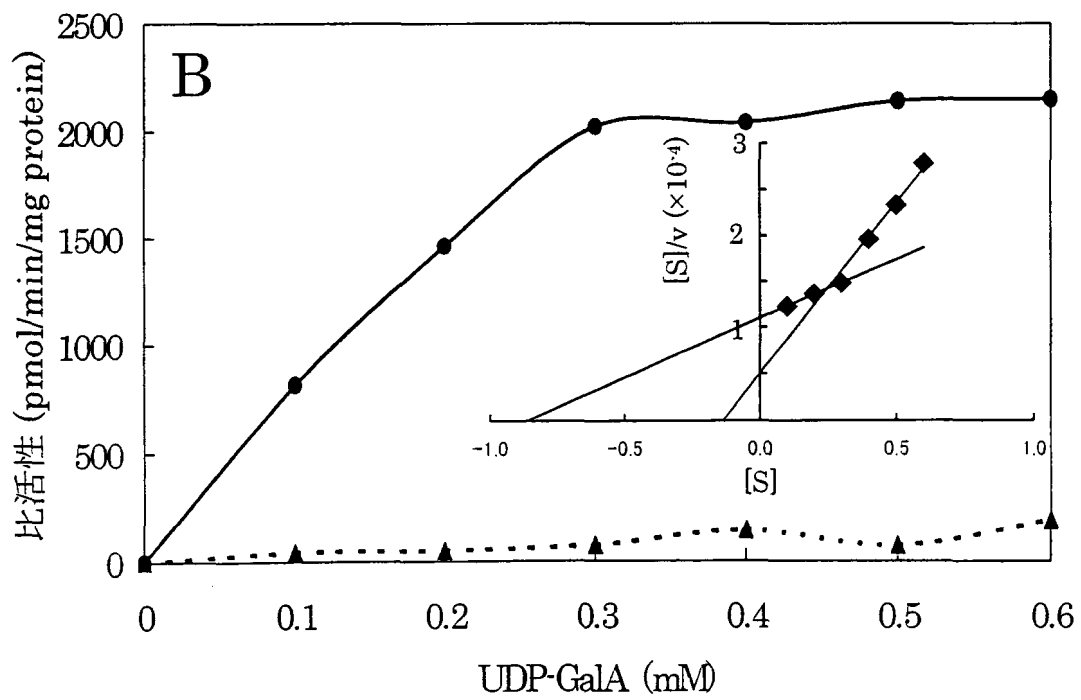
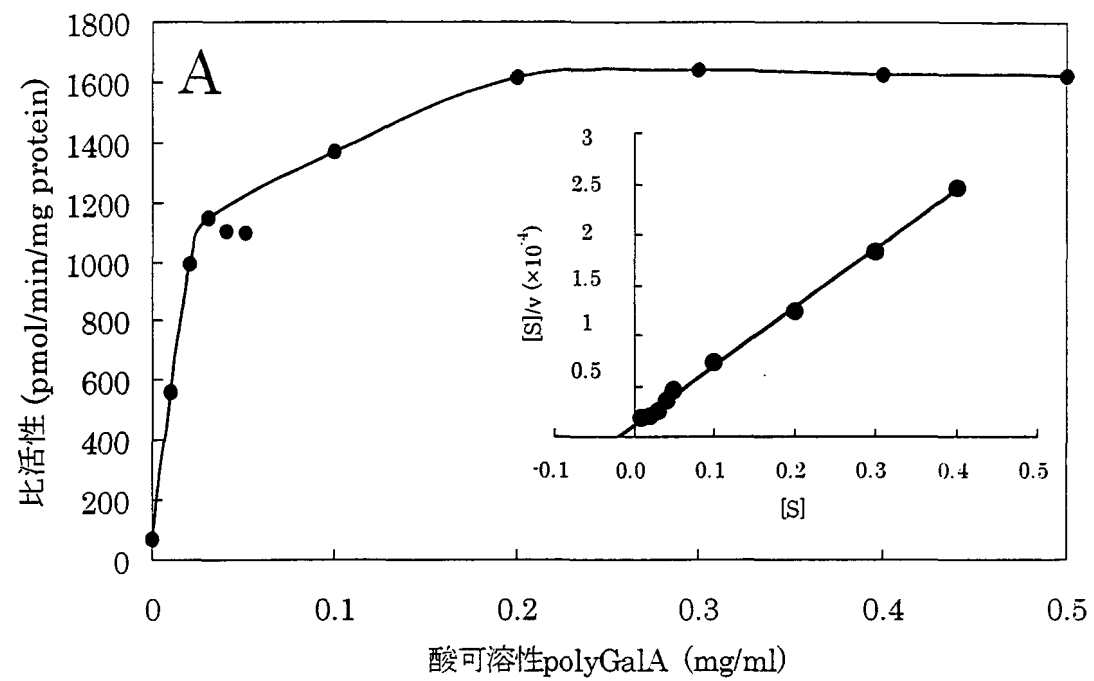


図 13 反応速度論の解析



A 受容体（酸可溶性 polyGalA）の濃度と酵素活性の関係

タンパク質量 36.5  $\mu$ g、反応時間 30 分で測定。

挿入図はハーネス=ウルフプロットを行ったものであり [S] は酸可溶性 polyGalA 濃度 (mg/ml) をあらわしている。

B 供与体 (UDP-GalA) の濃度と酵素活性の関係

—Acceptor はタンパク質量 36.5  $\mu$ g、反応時間 30 分で測定、+Acceptor はタンパク質量 33.6  $\mu$ g、反応時間 30 分で測定。

挿入図は +Acceptor のデータをハーネス=ウルフプロットを行ったものであり [S] は UDP-GalA 濃度 (mM) をあらわしている。

—●—, +Acceptor; .....▲....., —Acceptor

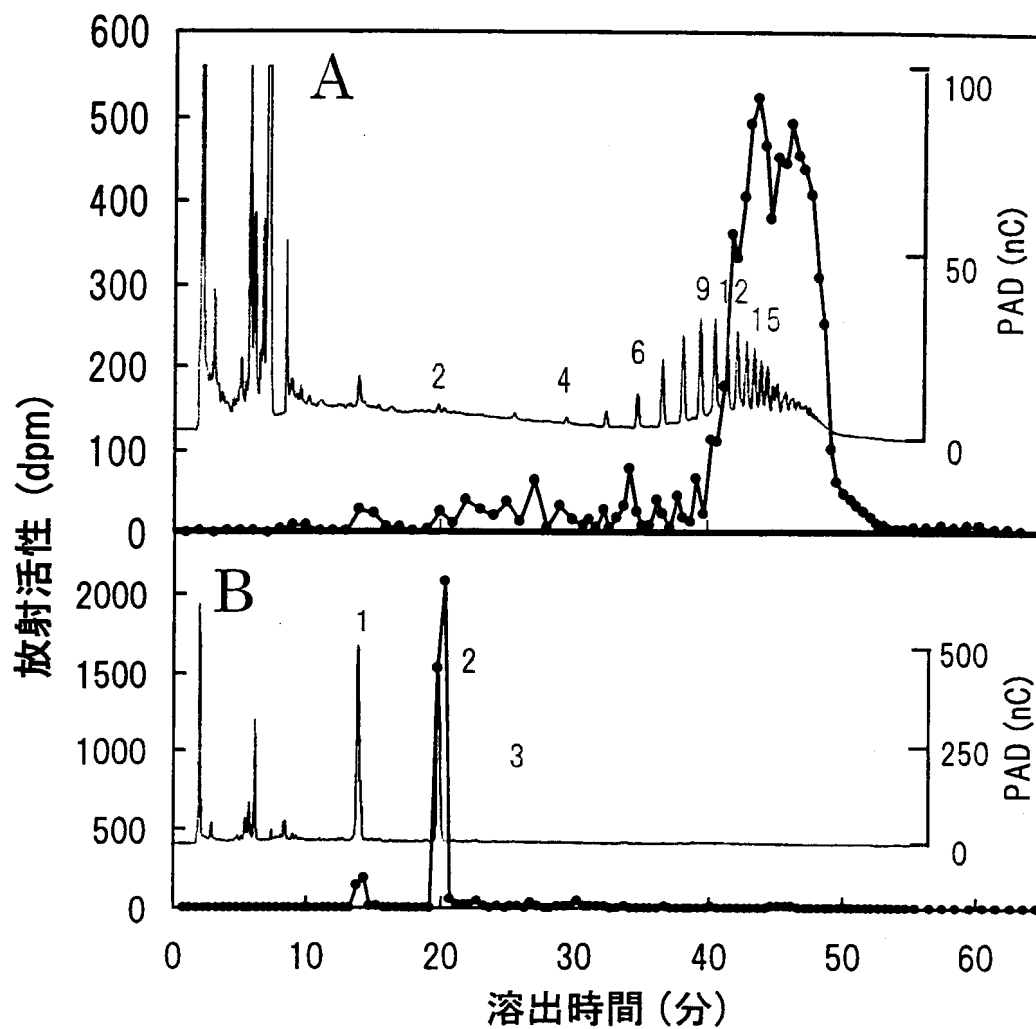


図 14 HPAEC による GalA 転移反応産物の分析

A 未処理転移産物

B 転移産物のポリガラクトナーゼ分解物

重合度は GalA のオリゴ糖ならびに酸可溶性 polyGalA の溶出パターンを基に決定し、図中に数値で示してある。

—●—, 放射活性; —, PAD

図には示していないが受容体である酸可溶性 polyGalA それ自身と、転移産物の PAD による重合度の違いはほとんどないことがわかった。

## 2) ペーパークロマトグラフィーによる解析

HPAEC により解析した反応産物と、反応産物をポリガラクトナーゼで分解した試料は、ペーパークロマトグラフィーでも解析した。試料は、95%エタノール：1 M 酢酸アンモニウム (2:1 v/v) の溶媒を用いて、上昇法により 6 時間展開した。ろ紙を乾燥し、イメージングアナライザーにより解析した。図 15 に結果を示す。標準糖には放射標識されていない GalA<sub>1</sub>、GalA<sub>2</sub>、GalA<sub>3</sub> および酸可溶性 polyGalA を用いた。標準糖も同じ条件で展開させた後、硝酸銀発色法で発色した。ポリガラクトナーゼで処理をしていないものは原点付近の高分子画分のみ放射活性が検出される。HPAEC での分析と同様にポリガラクトナーゼで処理したものは、GalA<sub>2</sub> の位置に強い放射活性が検出され、原点付近に残る放射活性はわずかであることがわかった。

以上の HPAEC とペーパークロマトグラフィーの結果から、UDP-[<sup>14</sup>C]GalA から [<sup>14</sup>C]GalA が受容体である polyGalA にペクチン特有の  $\alpha$ -1,4-結合で転移されていることが確認できた。

## 4 ガラクツロン酸転移酵素の局在性

アズキからの粗顆粒画分調製の各段階での酵素活性を測定して、酵素が膜結合酵素であるか、可溶性画分にも存在するかどうか調べた。反応には酵素源として、1,000 × g 上清、10,000 × g 上清、100,000 × g 上清、100,000 × g 沈殿を用い、凍結せず、調製後すぐに使用した。反応には標準反応液を使い各画分を酵素源として測定した。100,000 × g 上清と沈殿を比べると、活性はほとんど (91%) が沈殿の画分に検出され、ガラクトツロン酸転移酵素は膜に結合して存在していることがわかった。

## 5 ガラクツロン酸転移酵素の反応液中での可溶化

反応液中でのガラクトツロン酸転移酵素の状態を調べるために、標準反応液中での酵素の可溶化を調べた。各種糖転移酵素は膜タンパク質と考えられているため、反応液中に含まれる Triton X-100 によりガラクトツロン酸転移酵素が可溶化されていると考えられる。方法としては、供与体と受容体を含んでいない標準反応液に粗顆粒画分を加え、氷冷上に 10 分間放置後、100,000 × g で超遠心分離した。超遠心分離後の、上清と沈殿（供与体と受容体を含んでいない標準反応液で再懸濁した）を酵素源として反応を行った。Triton X-100 の妨害のため Bradford 法ではタンパク質量が正確には測定できなかったため、総活性を反応に用いた酵素源の液量と全容量から求めた。総活性を比べると

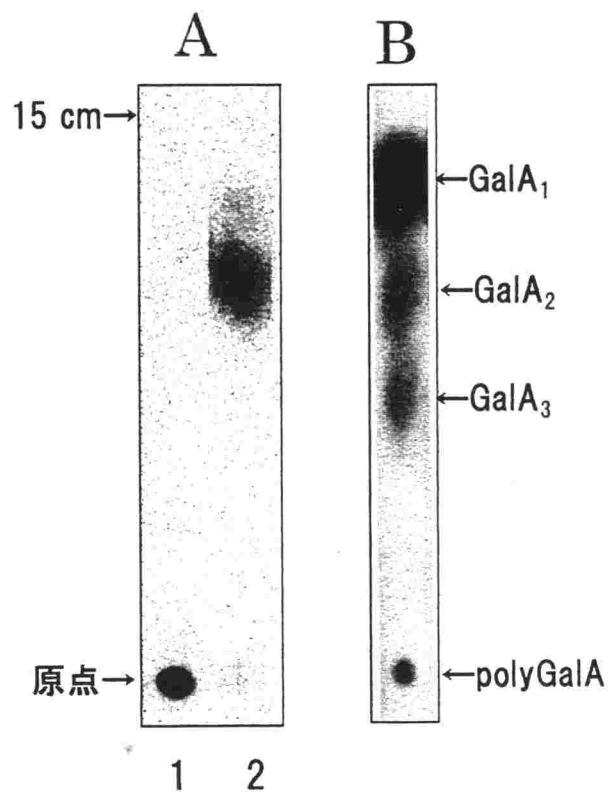


図15 ペーパークロマトグラフィーによる  
GalA転移産物の分析

A イメージングアナライザーによる放射活性の検出

1 未処理転移産物

2 転移産物のポリガラクトナーゼ分解物

B 標準糖の硝酸銀発色検出

100,000 × gの沈殿に大部分（約 85%）が回収されており、上清にはわずかにしか検出されなかった。この結果から反応液中ではガラクトロン酸転移酵素は、ほとんど可溶化されていないことがわかった。

## IV 考察

### 1 ガラクツロン酸転移酵素の性質

本研究で、アズキ上胚軸から粗顆粒画分を調製し、ペクチン合成に関わるガラクトン酸転移酵素の性質を明らかにした。アズキ上胚軸のガラクトン酸転移酵素はその活性発現のためには反応液に供与体となる UDP-GalA だけでなく、外因性受容体である polyGalA、界面活性剤の Triton X-100 と、マンガンイオンの添加が必要である。今までのマングビーン実生 (Villemetz et al., 1965; Villemetz et al., 1966)、カエデ木部 (Bolwell et al., 1985) とタバコ培養細胞 (Doong et al., 1995) を用いた研究では、酵素活性は内在性受容体 (粗顆粒画分に含まれる合成途中のペクチン) を用いて測定しており、反応液に受容体を入れても活性が高まらなると報告されている。その際には、いずれも反応液に界面活性剤は含まれていなかった。本研究でも受容体を加えていないときに界面活性剤を反応液に加えても活性は高まらず (表 2)、外因性受容体が酵素反応に関わるには界面活性剤の共存が必要であることがわかった。1998 年に Doong ら (Doong and Mohnen, 1998) は CHAPS と EDTA を加えた緩衝液で可溶化し、タバコ培養細胞のミクロソーム画分を可溶化した酵素標品を得た。可溶化酵素を用いて、反応液に受容体としてオリゴガラクトン酸を加えると活性が高まった。ただし、オリゴガラクトン酸の重合度が 10 以上のものでないと反応は促進されない。この報告においても、反応液中には界面活性剤を加えていないが、ここでは、可溶化酵素液に含まれる CHAPS が反応液中で影響し、受容体であるオリゴガラクトン酸の効果を引き出したと考えられる。本研究でも界面活性剤として Triton X-100、CHAPS を低濃度で加えても酵素活性が高まることが判った。ことから、可溶化酵素液に含まれる少量の CHAPS でも酵素反応に影響すると考えられる。

今までに報告されているガラクトン酸転移酵素の活性を比較すると、1966 年に Villemetz ら (Villemetz et al., 1966) がマングビーンの実生を用いて行った研究では、基質の UDP-GalA に対する  $K_m$  値は  $1.7 \mu\text{M}$ 、 $V_{\max}$  が  $4.7 \text{ nmol/min/mg protein}$  であった。1995 年には Doong ら (Doong et al., 1995) がタバコ培養細胞を用いて酵素の性質を調べた。得られた  $K_m$  値は  $8.9 \mu\text{M}$ 、 $V_{\max}$  が  $150 \text{ pmol/min/mg protein}$  であった。1998 年の Doong ら (Doong and Mohnen, 1998) の可溶化酵素を用いた解析では、前述のオリゴガラクトン酸を加えることで、UDP-GalA に対する  $K_m$  値は  $37 \mu\text{M}$ 、 $V_{\max}$  が  $290 \text{ pmol/min/mg protein}$  となった。本研究では、UDP-GalA に対する  $K_m$  値と  $V_{\max}$  値は二相性を示し、 $K_m$  値は両方ともこれらと比べて高い値 ( $0.14 \text{ mM}$  および  $0.86 \text{ mM}$ ) を示した。 $K_m$  値が高いのは粗酵素を用いており後述するがポリガラクトン酸の分解酵素であるポリガラクトナーゼが含まれているため、合成と分解が同時に起こっているためと考えられる。一方  $V_{\max}$  は  $2,700 \text{ pmol/min/mg protein}$  および  $7,800 \text{ pmol/min/mg}$

protein を示した。この値は Doong らの結果よりも高く、7,800 pmol/min/mg protein は Villemez らの結果の 4.7 nmol/min/mg protein よりも高かった。高い活性が得られたことは、アズキ上胚軸が酵素精製の出発点として適していることを示している。

酵素の性質について、マングビーンを用いた Villemez ら (Villemez et al., 1966) の研究では、反応の最適条件は、pH 6.0、30℃と報告されている。また、反応液に 0.4 M のショ糖を加えると活性が高まり、1.7 mM の  $\text{MnCl}_2$  を加えても活性が高まる。1995 年のタバコ培養細胞を用いた Doong ら (Doong et al., 1995) の研究では、最適 pH 7.8、最適温度 25~30℃であり、塩化マンガンを加えると活性が高まり、0.25 mM で最大活性を示した。塩化カリウム、塩化ナトリウムでは活性が高まらないことからマンガンイオンが反応に必須である。1998 年のタバコ培養細胞を用いた Doong ら (Doong and Mohnen, 1998) の研究では最適 pH 6.3~7.8 と幅があると報告された。この結果は、本研究で得られた最適 pH が 6.8~7.8 という結果に似ている。また、アズキ上胚軸の酵素反応にはマンガンイオンの添加が必須であり、マングビーンとタバコ培養細胞で得られた金属イオン要求性と一致する。

## 2 粗顆粒画分

酵素源として用いたアズキ上胚軸の粗顆粒画分は、ガラクトロン酸転移酵素の他に多数の合成酵素、分解酵素が含まれていると考えられる。一般的に分解酵素の方が合成酵素よりも活性が高いことが知られている。本研究で使った粗顆粒画分にも、ガラクトロン酸転移酵素の他に、分解反応を行う polyGalA 分解酵素である、ポリガラクトロナーゼの存在も考えられる。そこでポリガラクトロナーゼの活性を測定した。ガラクトロン酸転移酵素の基質である UDP-GalA を含まない標準反応液を 25℃、30 分反応させて、還元糖生成量を比色定量法で測定した。Nelson-Somogyi 法 (Nelson, 1944; Somogyi, 1945; Somogyi, 1952) では、反応液中に含まれるマンガンイオンが妨害するため、定量できなかった。ガラクトロン酸転移酵素には影響をしないショ糖と BSA を除いた反応液を用いて Park-Johnson 法 (Park and Johnson, 1949) での測定を試みた。その結果、粗顆粒画分に含まれるポリガラクトロナーゼの比活性は約 3.1 nmol/min/mg protein であり、ガラクトロン酸転移酵素活性の 2~3 倍の高い活性を示した。ガラクトロン酸転移酵素の反応では、このポリガラクトロナーゼの影響も受けるため活性に多少のばらつきが出ると考えられる。

## 3 受容体特異性

本研究では、受容体として比較的低分子画分である酸可溶性 polyGalA が有効であった。しかし、受容体として用いた各種多糖の正確な分子量を求められなかったため受容体の濃度を mg 単位で求めた。そのため mol 単位で求めたときは活性に差が生じる可能

性がある。しかしながら、受容体として酸可溶性 polyGalA を用いた場合、酵素反応は受容体過剰量で反応を行っており（酵素活性は 0.2 mg/ml で定常状態になるが標準反応液には 2 mg/ml 含まれている）、他の受容体についても過剰量、またはそれに近い状態になっていると考えられる。

#### 4 ガラクツロン酸転移酵素の反応産物の分析

酵素反応によって $^{14}\text{C}$ GalA を取り込んだ反応産物をポリガラクトナーゼで処理したところ、転移反応産物は分解されて、放射活性を持つ糖鎖が主に GalA<sub>2</sub>に移動した。したがって UDP- $^{14}\text{C}$ GalA の $^{14}\text{C}$ GalA が受容体である polyGalA にペクチン特有の  $\alpha$ -1,4-結合で転移されていることがわかった。通常、糖鎖の合成は糖残基が非還元末端に結合して鎖が伸張すると考えられているが、今回の実験では、鎖長の伸びる方向は不明のままである。ガラクトン酸転移酵素の反応様式については、1999 年に Scheller ら (Scheller et al., 1999) が UDP-GalA の GalA が polyGalA の非還元末端に結合して鎖が伸長することを報告している。

#### 5 ガラクツロン酸転移酵素の精製について

本研究で、ガラクトン酸転移酵素の性質を明らかにした。しかしながら、得られた結果は粗顆粒画分を用いたもので、今後の課題として酵素の精製があげられる。酵素精製には受容体となる糖鎖を得る必要がある。1990 年代の終わりまでは植物の糖転移酵素の活性は酵素源となる膜画分に内在する糖に対する糖ヌクレオチドの取り込みを測定していた。現在でも多くの細胞壁の合成に関わる転移酵素で受容体として有効な糖鎖が見つかっていない (Gibeaut, 2000)。今回ガラクトン酸転移酵素に対して、比較的低分子の polyGalA が有効な受容体であることがわかった。この受容体を使うことで、精製酵素の活性を測定できると考えられる。しかしながら、アズキ上胚軸の粗顆粒画分由来のガラクトン酸転移酵素は反応液の条件下では可溶化されていないことがわかっている。そのため可溶化は異なる条件で行う必要がある。

#### 6 オリゴガラクトン酸を用いた反応

オリゴガラクトン酸を受容体に用いた活性測定も行った。反応産物の分析で用いた HPAEC を使用した。標準反応液に GalA<sub>1</sub>、GalA<sub>2</sub>、GalA<sub>3</sub>を受容体として終濃度 2 mg/ml となるように加えた。基質として放射標識されていない UDP-GalA を終濃度 0.3 mM となるように加えた。反応液を HPAEC で分析し、UDP-GalA から GalA が転移されて鎖長が伸びたガラクトン酸オリゴ糖の検出を試みた。しかし、転移産物のピークは検出できず、重合度の低い GalA は酵素反応の受容体にならないと考えられる。これは 1998 年の Doong ら (Doong and Mohnen, 1998) の研究で、受容体には重合度 10 以上のオ



オリゴガラクトロン酸が有効とあるのと同様である。また最近、蛍光標識したオリゴガラクトロン酸を受容体として用いたガラクトロン酸転移酵素の性質が報告された (Akita et al., 2002; Ishii et al., 2002)。それらでも受容体は重合度 10 以上のオリゴガラクトロン酸が良好な受容体となると報告されている。

## 第 2 章

### ガラクトツロン酸転移酵素の部分精製

## I 序論

アズキ上胚軸由来のガラクトツロン酸転移酵素の活性測定系は確立でき、酵素の諸性質を明らかにした(Takeuchi and Tsumuraya, 2001)。しかしながら、得られた結果は粗顆粒画分を用いたもので、酵素の性質を明確にするには精製標品での解析が必要となる。酵素精製のためには、酵素の pH 安定性、温度安定性を調べる必要があり、また、粗顆粒画分の可溶化条件を確立する必要がある。植物細胞壁の合成に関わる糖転移酵素はセルロース合成酵素を除き、ゴルジ体に局在する膜酵素と考えられている。ガラクトツロン酸転移酵素もゴルジ体内腔に局在していることが報告されている(Sterling et al., 2001)。そのためガラクトツロン酸糖転移酵素を精製するためには、ゴルジ体膜からの可溶化が必要である。アズキ上胚軸の粗顆粒画分を用いたガラクトツロン酸転移酵素の研究では、酵素活性に用いた反応液中で可溶化されていないことがわかっている。そこで反応液とは異なる条件での可溶化を試みた。また、可溶化酵素を用いての部分精製も試みた。

## II 材料・方法

### A 材料

#### 1 植物

アズキ (*Vigna angularis* cv. Doyo) の種子はトキタ種苗 (埼玉県さいたま市) より購入した。

#### 2 試薬

Triton X-100 reduced は Sigma 社より購入した。その他の試薬は、第 1 章と同じものを使用した。

#### 3 クロマトグラフィー単体

陰イオン交換樹脂 DEAE・セファロースは Whatman 社から購入した。

### B 方法

#### 1 タンパク質量の測定

第 1 章と同様の方法で測定した。

#### 2 粗顆粒画分の調製

第 1 章と同様の方法 (図 6) でアズキ上胚軸から調製した。部分精製に用いる粗顆粒画分は調製後にグリセロールが終濃度 20% となるように添加した。粗顆粒画分は  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、1 回に限り解凍して使用した。

#### 3 ガラクツロン酸転移酵素の活性測定

第 1 章と同様の方法 (図 7) で活性測定を行った。

#### 4 酵素の pH 安定性

pH 安定性は pH5.5~8.0 で調べた。200 mM MES-KOH 緩衝液 (pH 5.5、6.0、6.5、7.0) または 100 mM HEPES-KOH 緩衝液 (pH 6.5、7.0、7.5、8.0) 6  $\mu\text{l}$  に粗顆粒画分 6  $\mu\text{l}$  (タンパク質量 97.8  $\mu\text{g}$ ) を加え、一晚、 $4^{\circ}\text{C}$  に放置した。この酵素液の 4  $\mu\text{l}$  を標準反応液に加えて活性を測定した。標準反応液の MES-KOH 緩衝液濃度は終濃度が 133 mM になるように調製し測定した。

#### 5 酵素の温度安定性

温度安定性は  $0\sim 50^{\circ}\text{C}$  で調べた。受容体と供与体を除いた標準反応液に粗顆粒画分(タ

ンパク質量 32.6  $\mu$ g) を加え、0、4、10、15、20、25、30、35、40、45、50℃で 90 分間放置した。放置後、受容体と供与体を加えて活性を測定した。

## 6 可溶化

20%グリセロールを含む粗顆粒画分をタンパク質濃度が終濃度 3.5 mg/ml になるように 50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5 で希釈した。希釈した粗顆粒画分液にグリセロール (終濃度 20%)、EGTA (終濃度 1 mM) を加えた。最後に終濃度が 1.0% となるように Triton X-100 を加え、可溶化を開始した。この条件を標準可溶化条件とした。可溶化中は静かに攪拌した。可溶化後、100,000  $\times g$  で 1 時間超遠心分離をし、得られた上清を可溶化酵素として部分精製に使用した。また、沈殿物は 50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5 で 4 回洗浄した後、50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.5 で懸濁した。可溶化の操作はすべて氷上で行った。図 16 に可溶化の操作を図示した。

## 7 イオン交換クロマトグラフィーによる酵素の精製

可溶化酵素 (~50 ml、粗顆粒画分で総タンパク質量 112 mg) を用いて、緩衝液 A (50 mM Tris-HCl pH 7.5、0.1% Triton X-100 reduced、20%グリセロール) で平衡化させた DEAE セファロースカラム (2.6  $\times$  15.7 cm) を行った。クロマトグラフィーは 4℃、流速は 0.55 ml/min で行い、4.5 ml ずつ分取した。1~84 本目は緩衝液 A で溶出、85~170 本目まで 0~0.5 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 A によるグラジエントを行った。171~200 本目までは 1 M 塩化ナトリウムを含む緩衝液 A で溶出した。

## 粗顆粒画分

希釈

{ 50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 7.5),  
20% グリセロール, 1 mM EGTA

Triton X-100 (終濃度1.0%)

氷上, 30~60分放置

↻ 100,000 × *g* 60分

上清 (可溶化酵素液)

図16 可溶化酵素液の調製法

### III 結果

#### 1 酵素精製に向けて

##### 1) 酵素の pH 安定性・温度安定性

図 17 からわかるように pH 5.5~8.0 では、酵素は安定であった。最適作用 pH の測定では緩衝液によって活性が異なる傾向が見られたが、緩衝液間での活性の差はほとんどなかった。温度安定性は、20℃以下ならほぼ安定していた（図 18）。30℃を過ぎると酵素活性は弱まっていき、45℃以上では失活した。以上の安定性の実験から酵素の可溶化と精製は 4℃以下で行った。

##### 2) 可溶化

標準反応液中でのアズキ上胚軸の粗顆粒画分はほとんど可溶化されていなかった。そのため異なる条件での可溶化が必要であった。そこで、粗顆粒画分の可溶化条件を検討した。可溶化液に EGTA を加えた場合と加えていない場合を比較した。また、EGTA と同じキレート剤である EDTA を EGTA の代わりに加えても可溶化を試みた。EGTA に関しては可溶化の時間を 0、30、60、120 分で行った。粗顆粒画分の総活性 (1,120 pmol/min) を 100 として可溶化率を計算した。その結果を表 5 に示した。可溶化をするにはキレート剤である EGTA、EDTA が有効であり、加えていない場合よりも可溶化率が 3~6 倍から高まった。なぜ、可溶化にキレート剤が有効であるかはよくわからない。可溶化率の最も良かった EGTA を入れた状態で 60 分間可溶化したものを、部分精製に用いる可溶化酵素液とした。

#### 2 部分精製（イオン交換クロマトグラフィーによる酵素の精製）

可溶化酵素液を DEAE・セファロースカラムを用いてイオン交換クロマトグラフィーを行い酵素精製を試みた。溶出液は 280 nm の紫外吸収と Bradford 法による比色定量でタンパク質量の測定を行った。得られたクロマトグラムを図 19 に示す。ガラクトシロン酸転移酵素の活性は非吸着画分（画分 I）と吸着画分（画分 II）の 2 箇所にあった。活性のある画分を集め精製表にした（表 6）。画分 I、II とともに精製度はわずかであるが上がっていた。更なる精製のために、ゲルろ過クロマトグラフィー、キレートカラムクロマトグラフィーなどを試みたが、良好な結果が得られなかった。

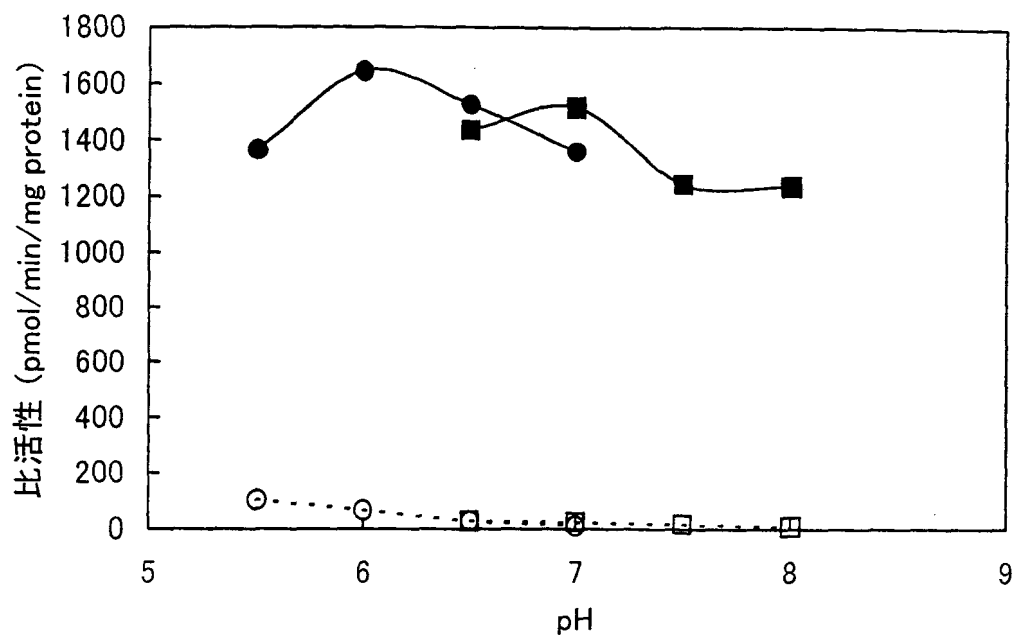


図 17 粗顆粒画分の pH 安定性

タンパク質量 32.6  $\mu$ g、反応時間 30 分

—●—, MES-KOH; —■—, HEPES-KOH

実線は+Acceptor、点線は-Acceptorを示している。

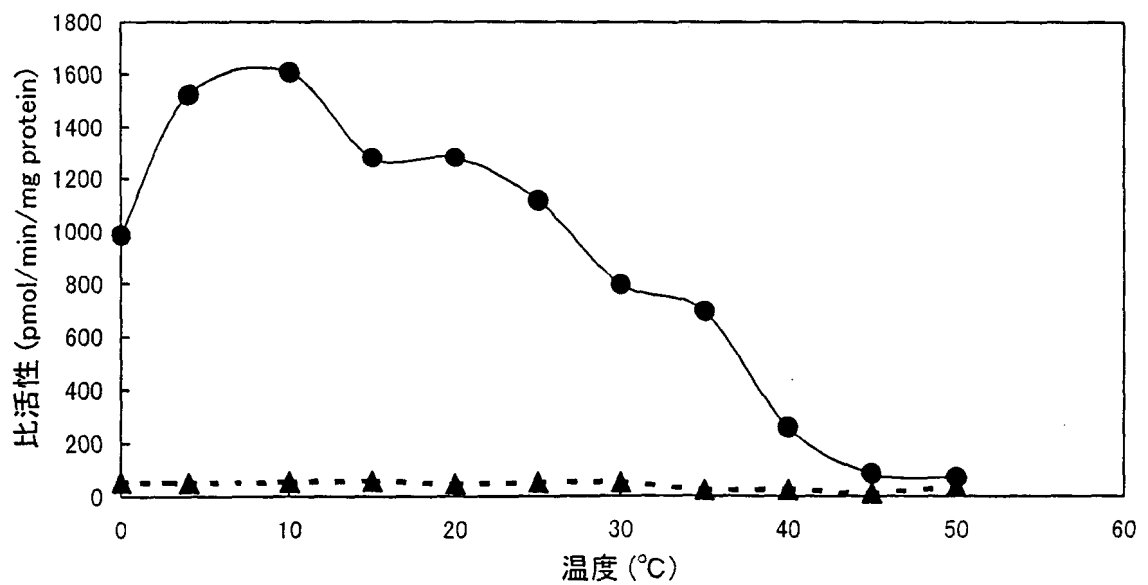


図 18 粗顆粒画分の温度安定性

タンパク質量 32.6  $\mu$ g、反応時間 30 分

—●—, +Acceptor; .....▲....., -Acceptor



表5 ガラクツロン酸転移酵素の可溶化

| 条件            | 時間*<br>(分) | 総活性(pmol/min) |         | 可溶化率 |
|---------------|------------|---------------|---------|------|
|               |            | 上清            | 沈殿**    |      |
| 粗顆粒画分         |            |               | 1120*** | ---  |
| +Enzyme +EGTA | 0          | 430           | 340     | 38   |
|               | 30         | 360           | 340     | 32   |
|               | 60         | 650           | 290     | 58   |
|               | 120        | 430           | 280     | 38   |
| +Enzyme -EGTA | 60         | 110           | 600     | 10   |
| +Enzyme +EDTA | 60         | 300           | 220     | 28   |

\*酵素液は氷上に放置

\*\*50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) に懸濁して活性測定

\*\*\*粗顆粒画分をそのまま活性測定した

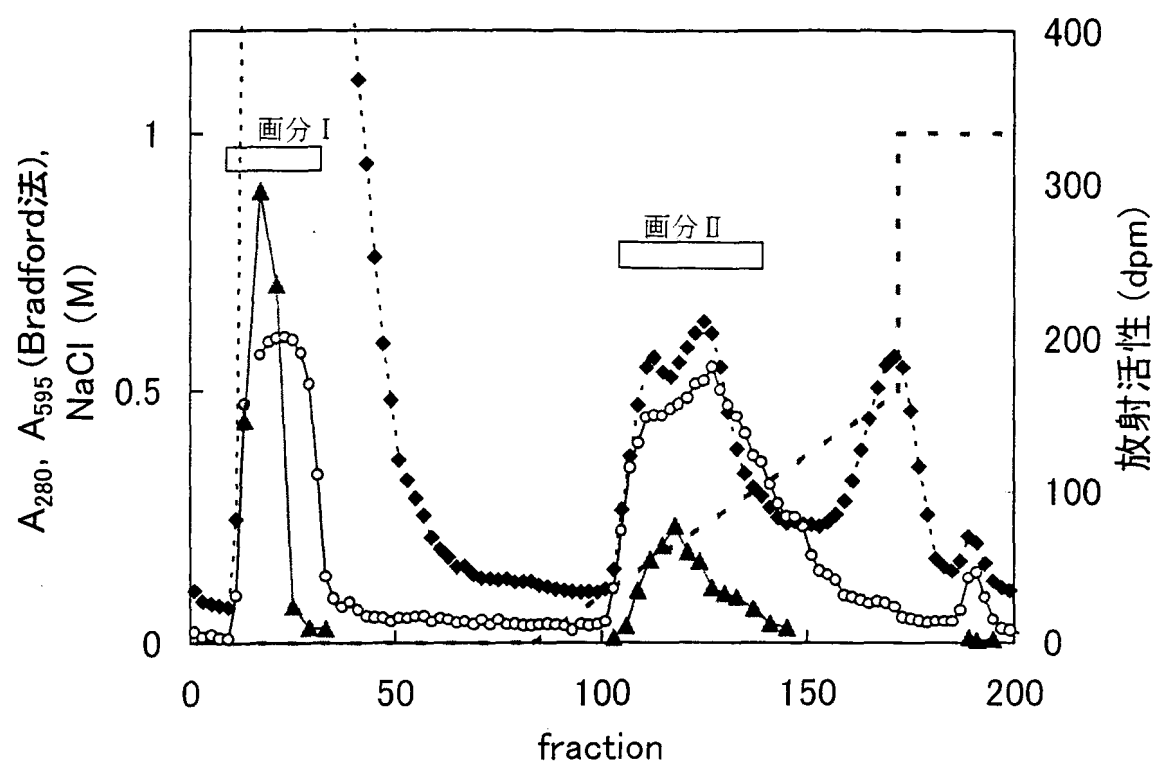


図 19 可溶化酵素の DEAE-セファロースクロマトグラフィー

カラムサイズ, 2.2 × 6.5 cm、

総タンパク質量 112 mg の粗顆粒画分からスタート

.....●.....,  $A_{280}$  ; —○—,  $A_{595}$ (Bradford 法) ; —▲—, 酵素活性(dpm) ;  
 ..... , NaCl 濃度

表 2 ガラクツロン酸転移酵素の部分精製

| 画分           | 総タンパク質量<br>(mg) | 総活性<br>(pmol/min) | 比活性<br>(pmol/min/mg protein) | 精製度<br>(-fold) | 回収率<br>(%) |
|--------------|-----------------|-------------------|------------------------------|----------------|------------|
| 粗顆粒画分        | 112             | 123000            | 1100                         |                |            |
| 可溶化酵素        |                 | 71000             |                              |                | 58         |
| DEAE-セファローース |                 |                   |                              |                |            |
| 画分 I         | 28              | 38000             | 1400                         | 1.3            | 31         |
| 画分 II        | 42              | 88000             | 2100                         | 1.9            | 72         |

アズキ胚軸 270 g から出発

可溶化酵素のタンパク質量は Triton X-100 による妨害のため測定できなかった。

## IV 考察

### 1 可溶化

ガラクトシロン酸転移酵素を精製するために安定性を調べた。pH に対しては 5.5~8.0 と幅広く安定であり、温度も 20℃までは特に酵素活性の失活は見られなかった。そこで粗顆粒画分に界面活性剤である Triton X-100 のみを加えて可溶化を試みた。しかし、粗顆粒画分から可溶化されず条件検討が必要となった。検討条件としては可溶化時のタンパク質濃度、安定化剤、キレート剤、界面活性剤といくつかの要素で調べる必要があった。ガラクトシロン酸転移酵素の可溶化では、キレート剤がないとほとんど可溶化されないことがわかった (表 5)。なぜキレート剤が必要であるのかは不明である。可溶化にキレート剤が必要なのは、タバコ培養細胞を用いたガラクトシロン酸転移酵素でも報告されている (Doong and Mohnen, 1998)。ここではキレート剤として EDTA を用い、界面活性剤には CHAPS を使用している。本研究でも EDTA、CHAPS での可溶化を試みたが、EGTA、Triton X-100 のほうが可溶化率が高いことからより後者の方法で可溶化を行うことにした。また、可溶化時のタンパク質濃度が高すぎると可溶化の効率が下がることわかった。特にタンパク質濃度が 5 mg/ml 以上であると顕著であった。そこで本研究では調製した粗顆粒画分を緩衝液で希釈してから可溶化をすることにした。

### 2 イオン交換クロマトグラフィー

可溶化した酵素は、DEAE・セファロースカラムを用いてイオン交換クロマトグラフィーで精製を試みた (図 4)。活性は非吸着画分 (画分 I) と吸着画分 (画分 II) の 2 つのピークに分かれ、画分 I はシャープな活性であり、画分 II はブロードなピークとして溶出された。可溶化酵素液のすべてが吸着しきれなかったとも考えられ、カラムを大きくするなど工夫をしたが、同様の結果であった。非吸着画分の 280 nm の吸収が高いのは可溶化で用いた Triton X-100 が含まれているためである (Triton X-100 reduced は 280 nm の吸収は低い)。このイオン交換クロマトグラフィーで比活性は 1.5~2 倍程度しか上がらず、また活性が 2 つに分かれることから改良する必要がある。

### 3 今後

植物細胞壁の糖転移酵素の研究は、動物のそれに比べ非常に遅れている。研究は 1960 年代から行われてきたが、性質を明らかにすることを目的としており精製の報告はなかった。1999 年に初めて植物細胞多糖の糖鎖転移酵素を単離・精製された。キシログルカンのフコース転移酵素 (Perrin et al., 1999) とガラクトマンナンのガラクトース転移酵素 (Edwards et al., 1999) である。植物の糖転移酵素の精製が困難であるのは、まず可溶化とそのときの活性の損失である。特に主鎖を形成する糖転移酵素では可溶化時の損

失が多いという報告もある (Gibeaut, 2000)。本研究においても可溶化の条件検討に時間を費やした。次に活性のある可溶化画分を得たとしても、受容体となる糖鎖を得る必要がある。1990 年代の終わりまでは植物の糖転移酵素の活性は酵素源となる膜画分に内在する糖に対する糖ヌクレオチドの取り込みを測定していた。現在でも多くの細胞壁の合成に関わる転移酵素で受容体として有効な糖鎖が見つかっていない。

ペクチンに関しては細胞壁の合成に関する酵素精製の 3 例目として、2001 年にペクチンメチル転移酵素が精製された (Bourlard et al., 2001)。しかしながら、今までに報告された細胞壁の合成に関わる酵素は 3 例とも、側鎖合成酵素や修飾酵素（メチル基の付加）であり主鎖を合成する酵素に関しては精製された報告はない。これは側鎖合成酵素と主鎖の合成酵素で膜への結合が異なっているからかもしれない。主鎖の合成酵素が精製されれば側鎖合成酵素との違いがはっきりし、より一相細胞壁の合成に関わる糖転移酵素の研究が進むであろうと考えられる。

## 第 3 章

# UDP-ガラクトツロン酸の有機化学合成

## I 序論

植物細胞壁の合成に関わる各種糖転移酵素は供与体として糖ヌクレオチドを用いて、受容体に糖を転移して糖鎖を伸張する。植物細胞壁の合成の基質となる糖ヌクレオチドの生合成経路は部分的には明らかになっている (Gibeaut, 2000)。ペクチンの主鎖を合成するガラクトuron酸転移酵素は UDP-ガラクトuron酸 (UDP-GalA) が供与体となる。UDP-GalA は生体内では UDP-グルクロン酸を 4-エピマー化することで生成する。以前は UDP-GalA は市販されていたが、現在は市販されておらずガラクトuron酸転移酵素の研究にあつたては UDP-GalA を調製する必要がある。

以前より放射標識された UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]GalA は市販されていなかったのもので UDP-[ $^{14}\text{C}$ ]グルクロン酸を 4-エピマー化することで調製していた (Mitchem et al., 1991; Liljebelke et al., 1995)。この 4-エピメラーゼについては 1960 年から研究されている (Feingold et al., 1960)。また、2000 年には UDP-ガラクトースからガラクトースオキシダーゼとカタラーゼを用いて UDP-GalA を調製する方法が報告された (Basu et al., 2000)。しかしながら、酵素を用いて UDP-GalA を調製する方法は、少量の調製には向いているが大量調製には向いていない。そこで UDP-GalA の大量調製をめざし、化学合成による調製方法を確立することを目的とした。

## II 実験方法

以下の実験で使用した核磁気共鳴スペクトル (NMR) は日本電子社の JNM EX400 と JNM ECA600 を用いて測定した。カラムクロマトグラフィー用のシリカゲルは関東化学社製シリカゲル 60N (球状、中性) を用いた。薄層クロマトグラフィーは silica gel 60 F254 (Merck, aluminium sheets) を用い、検出は UV 検出及び発色試薬 (Ce-Mo 発色) によった。高速液体クロマトグラフィーは島津製作所社のシステムを用いた。カラムは、CarboPac PA1 (4×250 mm) を使用した。溶出は、溶離液にギ酸アンモニウム緩衝液 (pH6.7) を用いた。ギ酸アンモニウム濃度を 0-2 分を 0.05 M、2-26 分を 0.05-0.6 M の直線濃度勾配、26-32 分を 1 M、32-40 分を 0.05 M の条件で溶出した。カラム温度は 35 度で、溶離液の流速は 1.0 ml/min に設定し、UV 262 nm で検出した。

### 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-D-ガラクトピラノース (2)

D-ガラクトースペンタアセテート (1; 20.0 g, 51.2 mmol) をテトラヒドロフラン (500 ml) に溶解し、ベンジルアミン (8.4 ml, 76.8 mmol) を加え室温にて 1 日攪拌した。さらにベンジルアミン (5.6 ml, 51.2 mmol) を加え室温にて 1 日攪拌した。反応終了後反応液を 1/3 量まで減圧濃縮しジクロロメタンで抽出した。有機層を 2 M 塩酸、食塩水の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後濃縮した。濃縮後得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン:酢酸エチル=1:1 の混合溶媒で溶出したところ、化合物 2 (16.1 g, 90%) を得た。

### 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル トリクロロアセトイミデート (3)

2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-D-ガラクトピラノース (2; 16.1 g, 46.3 mmol) をジクロロメタン (178 ml) に溶解し、トリクロロアセトニトリル (22.4 ml, 241.5 mmol)、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン (6.8 ml, 46.3 mmol) を加え 0℃にて 3.5 時間攪拌した。反応終了後反応液を減圧濃縮、得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン:酢酸エチル=2:1 の混合溶媒で溶出したところ、化合物 3 (13.9 g, 61%) を得た。

### 4-メトキシフェニル 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (4)

2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル トリクロロアセトイミデート (3; 2.0 g, 4.1 mmol) をジクロロメタン (20 ml) に溶解し、メトキシフェノール (1.0 g, 8.1 mmol)、ボロントリフルオリドジエチルコンプレックス (520  $\mu$ l, 4.1 mmol) を加えて室温にて 1 時間攪拌した。反応終了後反応液をジクロロメタンで抽出した。有機層を炭酸水素ナトリウム溶液、食塩水の順に洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後濃縮し



た。濃縮後得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン：酢酸エチル=2:1の混合溶媒で溶出したところ、化合物 **4** (1.6 g, 88%) を得た。

#### NMR

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.01, 2.06, 2.09, and 2.19 (4 s, 12 H, AcO), 3.78 (s, 3 H, MeO), 4.01 (td, 1 H,  $J_{5,6}=J_{5,6'}=6.8$  Hz, H-5), 4.16 (dd, 1 H,  $J_{5,6}=6.4$  Hz,  $J_{6,6'}=11.2$  Hz, H-6), 4.24 (dd, 1 H,  $J_{5,6}=6.8$  Hz,  $J_{6,6'}=11.2$  Hz, H-6'), 4.92 (d, 1 H,  $J_{1,2}=8.1$  Hz, H-1), 5.09 (dd, 1 H,  $J_{2,3}=10.5$  Hz,  $J_{3,4}=3.4$  Hz, H-3), 5.44-5.48 (m, 2 H H-2 and H-4), and 6.81-7.27 (m, 4 H, Ph).

$^{13}\text{C}$ -NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 20.65, 20.73, and 20.81 (4  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 55.67, 61.31, 66.89, 68.74, 70.85, 70.90, 100.81 (C-1), 114.47, 118.54, 150.90, 155.63 (Ph), 169.26, 170.01, 170.13, and 170.22 (4  $\text{CH}_3\text{CO}$ ).

#### 4-メトキシフェニル $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (**5**)

4-メトキシフェニル 2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (**4**; 9.1 g, 20.1 mmol) をメタノール (196 ml) に溶解し、20%ナトリウムメトキシド (触媒量) を滴下し塩基性にし、室温にて 18 時間攪拌した。反応終了後、陽イオン交換樹脂 Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>型) を用いて反応液を中和した。樹脂を濾別し、メタノールで洗浄した。濾液と洗液を合わせて減圧濃縮し、シラップをメタノール-ジエチルエーテルを用いて再結晶させ化合物 **5** (5.1 g, 89%) を得た。

#### 4-メトキシフェニル 6-O-トリチル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (**6**)

4-メトキシフェニル  $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (**5**; 3.0 g, 10.5 mmol) をピリジン (21 ml) に溶解し 0°C に冷却後、4-ジメチルアミノピリジン (1.3 g, 10.5 mmol)、トリフェニルクロロメタン (8.8 g, 31.5 mmol) を加えて、室温にて 2.5 時間攪拌した。さらにトリフェニルクロロメタン (5.8 g, 21.0 mmol) を加え室温にて 17.5 時間攪拌した。反応終了後反応液にメタノール (12 ml) を加え室温にて 1 時間攪拌し、減圧濃縮した。得られたシラップをジクロロメタンで抽出し、有機層を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後濃縮した。濃縮後得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、0.5%のトリエチルアミンを含む酢酸エチルで溶出したところ、化合物 **6** (4.1 g, 74%) を得た。

#### 4-メトキシフェニル 2,3,4-O-ベンジル-6-O-トリチル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (**7**)

4-メトキシフェニル 6-O-トリチル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (**6**; 3.0 g, 5.8 mmol) を無水ジメチルホルムアミド (23 ml) に溶解し、0°C に冷却後 55%水素化ナトリウム (912 mg, 20.9 mmol) を 10 分毎に 3 回に分けて加えた。さらに 10 分後にベンジルブロマイド (2.5

ml, 20.9 mmol) を加え室温にて 1 日撹拌した。反応終了後 0℃に冷却し、反応液にメタノール (4.9 ml) を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後濃縮して化合物 **7** を得た。化合物 **7** はそれ以上精製せず次の反応に供した。

#### 4-メトキシフェニル 2,3,4-O-ベンジル-β-D-ガラクトピラノシド (**8**)

4-メトキシフェニル 2,3,4-O-ベンジル-6-O-トリチル-β-D-ガラクトピラノシド (**7**) を 80%酢酸 (500 ml) とジクロロメタン 100 ml に溶解し、60℃にて 20 時間撹拌した。反応終了後反応液を減圧濃縮した。得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン：酢酸エチル=2:1 の混合溶媒で溶出したところ、化合物 **8** (3.0 g, 93% 2 steps) を得た。

#### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 3.50-3.51 (m, 2 H, H-5 and H-6), 3.61 (dd, 1 H,  $J_{2,3}=9.7$  Hz,  $J_{3,4}=2.9$  Hz, H-3), 3.75-3.80 (m, 4 H, H-6' and MeO), 3.82 (d, 1 H,  $J_{3,4}=2.4$  Hz, H-4), 4.10 (dd, 1 H,  $J_{1,2}=7.8$  Hz,  $J_{2,3}=9.8$  Hz, H-2), 4.69, 4.77, 4.83, 4.86, 4.99, and 5.02 (6 d, 3 CH<sub>2</sub>Ph), 4.88 (d, 1 H,  $J_{1,2}=7.6$  Hz, H-1), and 6.79-7.45 (m, 19 H, 4Ph).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 55.65, 72.65, 73.43, 74.19, 74.90, 75.40, 79.32, 82.16, 102.85 (C-1), 114.45, 118.19, and 127.57-151.31 (Ph).

#### 4-メトキシフェニル 2,3,4-O-ベンジル-6-オキソ-β-D-ガラクトピラノシド (**9**)

オキサリル=クロリド (530 μl, 6.1 mmol) をジクロロメタン (7.2 ml) に溶解し、アルゴンガス雰囲気下 -78℃に冷却後ジメチルスルホキシド (940 μl, 13.2 mmol) のジクロロメタン (1.8 ml) 溶液を滴下にて加え 30 分間撹拌した。さらに 4-メトキシフェニル 2,3,4-O-ベンジル-β-D-ガラクトピラノシド (**8**; 2.8 g, 5.1 mmol) のジクロロメタン (7.2 ml) 溶液を滴下し、-78℃にて 30 分間撹拌した。その後トリエチルアミン (3.7 ml) を加え、室温に昇温した。反応終了後反応液をジクロロメタンで抽出した。有機層を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後減圧濃縮した。濃縮後得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、酢酸エチルで溶出したところ、化合物 **9** (2.5 g, 90%) を得た。

#### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 3.58 (dd, 1 H,  $J_{2,3}=9.6$  Hz,  $J_{3,4}=2.8$  Hz, H-3), 3.75 (s, 3 H, MeO), 3.78 (s, 1 H, H-5), 4.14 (dd, 1 H,  $J_{1,2}=7.6$  Hz,  $J_{2,3}=9.8$  Hz, H-2), 4.24 (brs, 1 H, H-4), 4.57, 4.73, 4.77, 4.87, 4.91, and 5.01 (6d, 3 CH<sub>2</sub>Ph), 4.91 (d, 1 H,  $J_{1,2}=7.3$  Hz, H-1), 6.80-7.37 (m, 19 H, 4Ph), and 9.61 (s, 1 H, CHO).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 55.59, 73.09, 74.75, 74.87, 75.42, 78.62, 78.72,

80.98, 103.10 (C-1), 114.45-155.43 (Ph), and 200.21 (CHO).

(4-メトキシフェニル 2,3,4-トリ-O-ベンジル-β-D-ガラクトピラノシド)ウロニックアシッド (10)

4-メトキシフェニル 2,3,4-O-ベンジル-6-オキソ-β-D-ガラクトピラノシド (9; 2.5 g, 4.6 mmol) を t-ブタノール (29.1 ml) と酢酸エチル 5 ml に溶解し、2-メチル-2-ブテン (2.1 ml)、リン酸二水素ナトリウム (550 mg, 4.6 mmol)、水 (8.2 ml)、79%亜塩素酸ナトリウム (1.8 g, 16.0 mmol) を加えて、室温にて 2 時間撹拌した。反応終了後、反応液を 0℃ に冷却し 2 M 塩酸で酸性にし、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後減圧濃縮し、化合物 10 を得た。化合物 10 はそれ以上精製せず次の反応に供した。

メチル (4-メトキシフェニル 2,3,4-トリ-O-ベンジル-β-D-ガラクトピラノシド)ウロネート (11)

(4-メトキシフェニル 2,3,4-トリ-O-ベンジル-β-D-ガラクトピラノシド)ウロニックアシッド (10) をメタノールに溶解し、室温にて撹拌しながらトリメチルシリルジアゾメタンを反応液の黄色が消失しなくなるまで滴下した。反応終了後、酢酸を加え過剰の試薬を分解後減圧濃縮した。得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン：酢酸エチル=4:1 の混合溶媒で溶出したところ、化合物 11 (78%) を得た。

NMR

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 3.64 (m, 1 H, H-3), 3.65 and 3.76 (2 s, 6 H, 2 MeO), 4.09 (s, 1 H, H-5), 4.13 (t, 1 H,  $J_{1,2}=J_{2,3}=9.6$  Hz, H-2), 4.27 (m, 1 H, H-4), 4.67, 4.75, 4.79, 4.86, 4.93, and 5.02 (6 d, 6 H, 3CH<sub>2</sub>Ph), 4.81 (d, 1 H,  $J_{1,2}=8.2$  Hz, H-1), and 6.79-7.37 (m, 19 H, 4Ph).

<sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 52.40, 55.61, 73.23, 74.04, 74.56, 74.89, 75.42, 78.58, 81.37, 103.34 (C-1), 114.45-155.49 (Ph), and 168.30 (CO).

メチル 2,3,4-トリ-O-ベンジル-D-ガラクトピラヌロネート (12)

メチル (4-メトキシフェニル 2,3,4-トリ-O-ベンジル-β-D-ガラクトピラノシド)ウロネート (11; 729 mg, 1.25 mmol) をアセトニトリル (14.6 ml) に溶解し、硝酸二アンモニウムセリウム(IV)水溶液 (1.4 g/1.6 ml, 2.5 mmol) を加えて、-10℃にて 30 分間撹拌した。さらに硝酸二アンモニウムセリウム(IV)水溶液 (0.7 g/0.8 ml, 1.25 mmol) を加えて、15 分間撹拌した。反応終了後反応液を酢酸メチルで抽出した。有機層を水 (×2) と食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後濃縮した。濃縮後得られたシラ

ップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン：酢酸エチル=1:1の混合溶媒で溶出したところ、化合物 **12** (464 mg, 78%) を得た。

[メチル (2,3,4-トリ-O-ベンジル- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル) ウロネート] ジベンジルホスフェート (**14**)

メチル 2,3,4-トリ-O-ベンジル-D-ガラクトピラヌロネート (**12**; 274 mg, 0.57 mmol) をジクロロメタン (2.2 ml) に溶解し、トリクロロアセトニトリル (287  $\mu$ l, 2.9 mmol)、1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン (85  $\mu$ l, 0.57 mmol) を加え 0°C にて 1 時間撹拌した。その後、ジベンジルホスフェート (797 mg, 2.9 mmol) を加え、室温にて 3 日間撹拌した。反応終了後反応液にトリエチルアミンを加え中性にし、減圧濃縮した。濃縮後得られたシラップをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサン：酢酸エチル=1:1の混合溶媒で溶出したところ、化合物 **14** (320 mg, 76%) を得た。

NMR

$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 3.59 (s, 3 H MeO), 3.90 (dd, 1 H,  $J_{2,3}=10.3$  Hz,  $J_{3,4}=2.7$  Hz, H-3), 4.16 (m, 1 H, H-2), 4.28 (m, 1 H, H-4), 4.42 (s, 1 H, H-5), 4.56-5.05 (m, 10 H, 5  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 6.02 (dd, 1 H,  $J_{1,2}=3.2$  Hz,  $J_{1,p}=6.2$  Hz, H-1), and 7.21-7.35 (m, 25 H, 5 Ph).

[メチル ( $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル) ウロネート] ジヒドロゲンホスフェート トリエチルアンモニウム塩 (**15**)

[メチル (2,3,4-トリ-O-ベンジル- $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル) ウロネート] ジベンジルホスフェイト (**14**; 320 mg, 0.43 mmol) をメタノール (2 ml) に溶解し、10%パラジウムカーボン (320 mg) を加えた後水素ガスを吹き込み室温にて 2 時間撹拌した。反応終了後固形物を濾別し水で洗浄した。濾液と洗液を合わせた溶液にトリエチルアミンを加え中性にし、減圧濃縮した。濃縮後、凍結乾燥を行い化合物 **15** (191 mg, 90%) を得た。

NMR

$^1\text{H}$ -NMR (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  (ppm) 1.16 (t,  $J=7.5$  Hz,  $\text{MeCH}_2\text{N}$ ), 3.08 (q,  $J=7.5$  Hz,  $\text{MeCH}_2\text{N}$ ), 3.69 (s, 3 H, MeO), 3.70 (m, 1 H, H-2), 3.88 (dd, 1 H,  $J_{2,3}=10.3$  Hz,  $J_{3,4}=3.5$  Hz, H-3), 4.24 (m, 1 H, H-4), 4.70 (s, 1 H, H-5), and 5.46 (dd, 1 H,  $J_{1,2}=3.5$  Hz,  $J_{1,p}=6.9$  Hz, H-1).

$^{31}\text{P}$ -NMR (243 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  (ppm) 0.24.

ウリジン 5'-ジホスフェイト メチル( $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル) ウロネート (**20**)

[メチル ( $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル) ウロネート] ジヒドロゲンホスフェート トリエチルアンモニウム塩 (**15**; 191 mg, 0.39 mmol) を水に溶解し、陽イオン交換樹脂 Amberlite

IR-120 (H<sup>+</sup>型) を加え溶液を酸性にした。樹脂を濾別後、濾液に 1 当量のトリオクチルアミンを加え、減圧濃縮を行い化合物 **16** を得た。

ウリジン-5'-リン酸二ナトリウム塩 (**17**; 159 mg, 0.43 mmol) を水 (9.3 ml) に溶解し、陽イオン交換樹脂 Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>型) を加え室温にて 1 時間攪拌した。樹脂を濾別後、減圧濃縮をした。濃縮後脱水ジメチルホルムアミド (10 ml) を加え、真空ポンプで減圧濃縮することで残留する水を除去した。得られた残渣を脱水ジメチルホルムアミド (9.3 ml) に溶解し、カルボニルジイミダゾール (282 mg, 1.73 mmol) を加え室温にて 17.5 時間攪拌した。反応終了後反応液にメタノール (52.7  $\mu$ l, 1.3 mmol) を加え室温にて 30 分間攪拌することで過剰の試薬を分解した。その後減圧濃縮を行いイミダゾール体 (**19**) を得た。

[メチル ( $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル) ウロネート] ジヒドロゲンホスフェイト トリオクチルアンモニウム塩 (**16**) とウリジン-5'-モノホスホイミダゾレート (**19**) をそれぞれ脱水ジメチルホルムアミド (10 ml) に溶解し、真空ポンプで減圧濃縮することで残留する水を取り除いた。アルゴンガス雰囲気下で[メチル ( $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル) ウロネート] ジヒドロゲンホスフェイト トリオクチルアンモニウム塩 (**16**) とウリジン-5'-モノホスホイミダゾレート (**19**) を脱水ジメチルホルムアミド (6.0 ml) に溶解し、室温にて 2 日間攪拌した。反応終了後陰イオン交換クロマトグラフィー (Dowex 1 $\times$ 2 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>型) に供し、0-2 M の濃度勾配の炭酸水素アンモニウム水溶液で溶出した。溶出液を凍結乾燥後、得られた粉末に純水を加え、陽イオン交換樹脂 Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>型) を徐々に加えることで脱塩を行った。樹脂を濾別後、凍結乾燥をして化合物 **20** を得た。

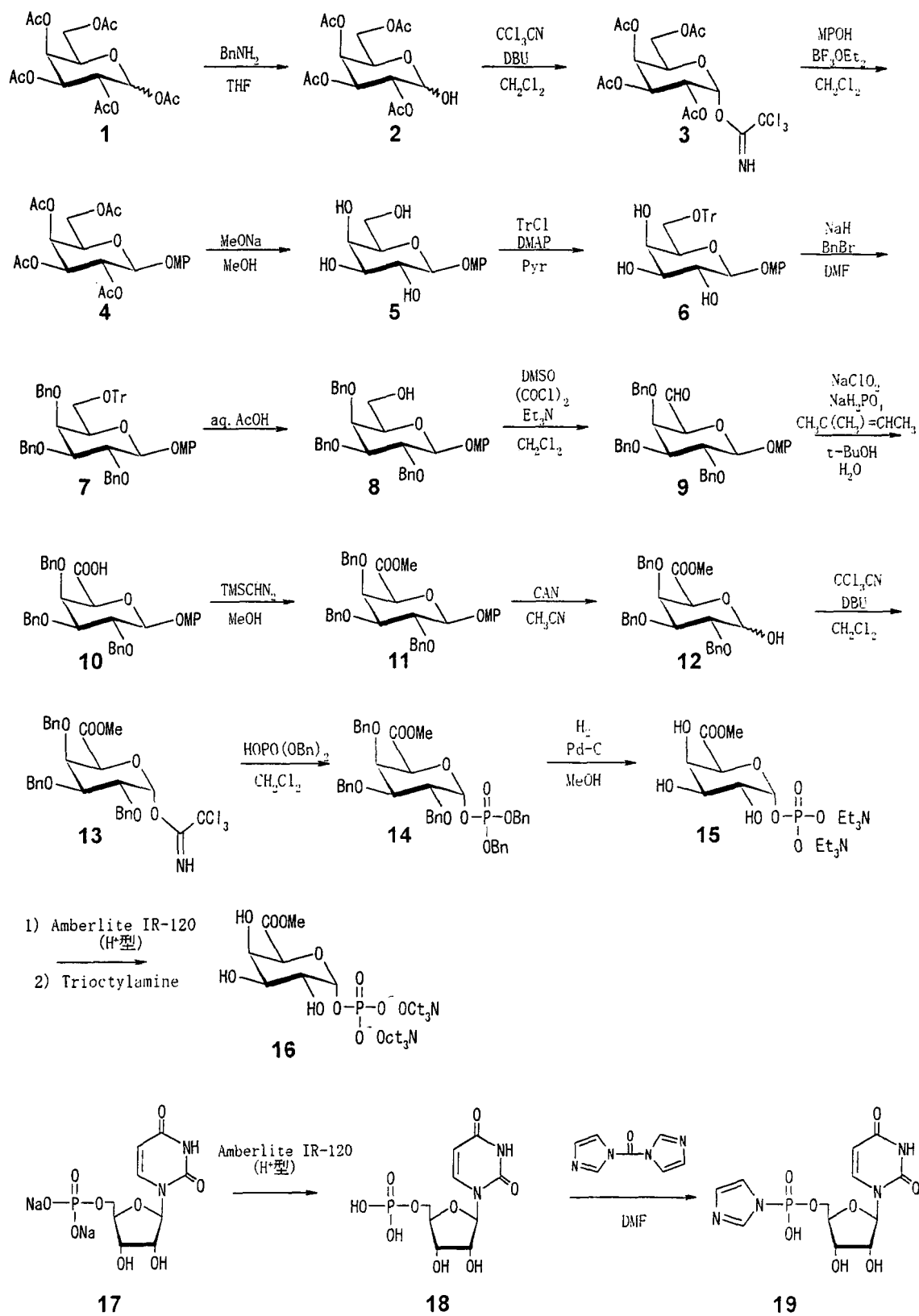
#### ウリジン 5'-ジホスフェイト $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル ウロネート (**21**)

ウリジン 5'-ジホスフェイト メチル( $\alpha$ -D-ガラクトピラノシル) ウロネート (**20**) を含む凍結乾燥した粉末を 1 M 炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液に溶解し、室温にて 2 日間放置した。反応終了後、反応液を減圧濃縮しペーパークロマトグラフィーに供した。ペーパークロマトグラフィーは溶媒に 1-ブタノール:エタノール:水=2:1:1 を用い、室温にて 2 日間下降法で展開させた。展開後乾燥させたペーパの紫外吸収のある部分を水で抽出し、凍結乾燥をして化合物 **21** (21 mg, 化合物 **15** に対して 9%) を得た。

#### NMR

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) 3.72 (m, 1 H, H-2 of GalA), 3.87 (dd, 1 H,  $J_{2,3}$ =10.3 Hz,  $J_{3,4}$ =2.8 Hz, H-3 of GalA), 4.06 and 4.12 (2 m, 2 H, H-5 and H-5' of Rib), 4.17 (s, 1 H, H-5 of GalA), 4.20 (d, 1 H,  $J_{3,4}$ =2.1 Hz, H-4 of GalA), 4.25-4.38 (m, 3 H, H-2, H-3, and H-4 of Rib), 5.57 (dd, 1 H,  $J_{1,2}$ =3.4 Hz,  $J_{1,p}$ =6.9 Hz, H-1 of GalA), 5.86-5.89 (m, 2 H, H-1 of Rib and H-5 of Ura), and 7.89 (d, 1 H,  $J_{5,6}$ =8.2 Hz, H-6 of Ura).

<sup>31</sup>P-NMR (243 MHz, D<sub>2</sub>O):  $\delta$  (ppm) -10.34 and -11.83.



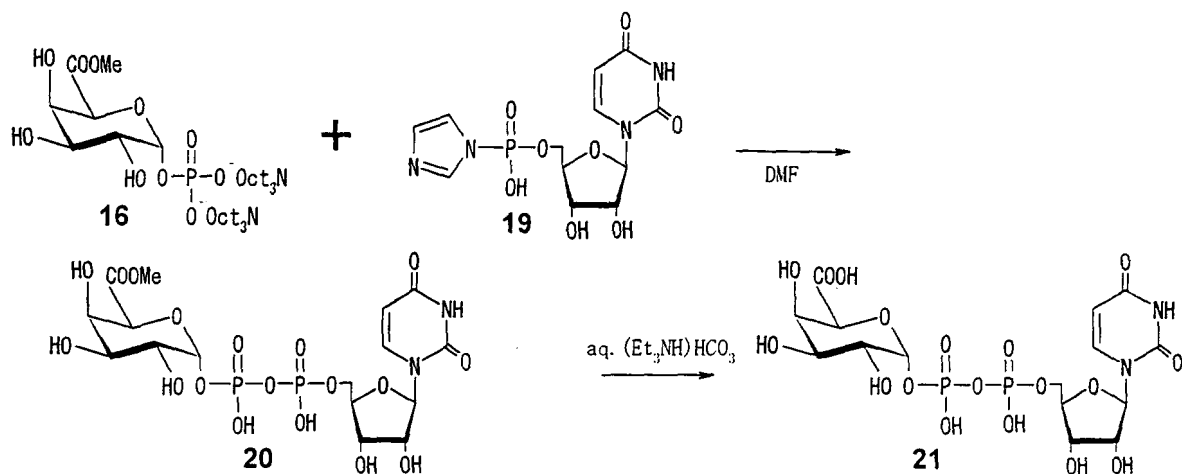


図 20 UDP-ガラクトツロン酸の合成経路

|                     |                            |
|---------------------|----------------------------|
| Ac                  | アセチル基                      |
| Bn                  | ベンジル基                      |
| Bu                  | ブチル基                       |
| CAN                 | 硝酸二アンモニウムセリウム (IV)         |
| DBU                 | 1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]-7-ウンデセン |
| DMAP                | 4-ジメチルアミノピリジン              |
| DMF                 | ジメチルホルムアミド                 |
| DMSO                | ジメチルスルホキシド                 |
| Et                  | エチル基                       |
| Me                  | メチル基                       |
| MP                  | <i>p</i> -メトキシフェニル基        |
| Oct                 | オクチル基                      |
| Pyr                 | ピリジン                       |
| TMSCNH <sub>2</sub> | トリメチルシリルジアゾメタン             |
| Tr                  | トリチル基                      |

### Ⅲ 結果・考察

UDP-GalA の合成通常広く用いられている糖ヌクレオチド合成法 (Roseman et al., 1961) を応用することとした。本合成法はガラクトツロン酸 1-リン酸とウリジン-5'-一リン酸をホスホアミダイト法を用いてカップリングし、ピロリン酸結合を生成することを基本反応とする。UMP のホスホアミダイトに用いるアミン部分は、モルホリンやシアノエチルアミン等が使われているが、今回は収率がよく、紫外線吸収を示し薄層クロマトグラフィーにおいても反応の追跡が容易なイミダゾール (Simion et al., 1990) を用いることにした。全体の合成経路を図 20 に示した。

#### ガラクトツロン酸 1-リン酸誘導体の合成

D-ガラクトースペンタアセテート (**1**) を出発材料とし、これにベンジルアミンを作用させ C-1 位を選択的に水酸化し化合物 **2** を収率 90% で得た。次に化合物 **2** の C-1 水酸基をアセトイミデート体にし (Schmidt and Jung, 1997)、酢酸エチル-ヘキサンを用いて再結晶させ化合物 **3** を得た。しかし、収率が 49% と低いことから再結晶をさせないで次の反応に用いることで収率を 61% に高めることができた。次に化合物 **3** のアセトイミデート基をメトキシフェニル基に置換し化合物 **4** を得た。さらにメタノール中でナトリウムメトキシドを作用させアセチル基をすべて水酸基に置き換え、化合物 **5** を収率 89% で得た。次に化合物 **5** に 5 当量のトリチルクロライドを作用させて C-6 位の水酸基を選択的にトリチル化し (Chaudhary and Hernandez, 1979)、化合物 **6** を収量 74% で得た。さらにベンジルブロミドで水酸基をすべてベンジル基に置換し (Czernecki et al., 1976)、続けて酢酸水溶液中で反応させ C-6 位を保護していたトリチル基をはずし (Blickenstaff, 1960)、化合物 **8** を収量 93% (2 steps) で得た。化合物 **8** はスワン酸化 (Mancuso et al., 1978) により C-6 位を酸化し化合物 **9** を収率 90% で得た。さらに化合物 **9** を酸化させ化合物 **10** を得て、続けてトリメチルシリルジアゾメタンを用いてカルボキシル基をメチル化 (Hashimoto et al., 1981) し、化合物 **11** を得た。次に化合物 **11** は硝酸二アンモニウムセリウム (IV) を作用し (Petitou et al., 1988; Matsuzaki et al., 1993)、化合物 **12** を得た。しかし 5 当量の硝酸二アンモニウムセリウム (IV) を用いて室温で反応を行ったところ収率が 12% と非常に低く、検討した結果 3 当量の硝酸二アンモニウムセリウム (IV)、 $-10^{\circ}\text{C}$  で反応させることで収率を 78% まで高めることができた。化合物 **12** は化合物 **2** と同様の方法でアセトイミデート体にし、続けてジベンジルフォスフェイトをイミデート基の活性化剤兼糖受容体として用いガラクトツロン酸 1-リン酸誘導体 (化合物 **14**) にした (Schmidt and Jung, 1997)。化合物 **14** は 10% パラジウムカーボン存在下、メタノール中接触還元による脱ベンジル化をして化合物 **15** を得た。その後化合物 **15** は陽イオン交換樹脂 Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>型) によって遊離のリン酸にした後、トリオクチルアミ



ンにて中和してトリオクチルアンモニウム塩 (16) に交換し、有機溶媒に対する溶解性を向上させた (Yuasa et al., 1992)。

#### UMP・イミダゾール体の合成とカップリング反応

UMP 部分は市販のウリジン・5'-リン酸二ナトリウム塩 (17) を陽イオン交換樹脂 Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>型) によって遊離の UMP にした後、ジメチルホルムアミド中カルボニルジイミダゾールと反応させ (Simion et al., 1990)、ウリジン・5'-モノホスホイミダゾレート (19) を得た。ついで化合物 16 と UMP・イミダゾール体 (19) をジメチルホルムアミド中でカップリング反応 (Yuasa et al., 1992) をした。反応液を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーに供し、炭酸水素アンモニウム水溶液にて溶出し、脱塩をすることでメチル基のついた UDP-GalA (20) を得た。化合物 20 は炭酸水素トリエチルアンモニウム水溶液中で脱メチル化を行い、反応液をペーパークロマトグラフィーを行うことで UDP-GalA (21) を単離した。化合物 17 からの収率は 9%と低かったが、NMR (図 21) と HPLC の分析から化合物 21 が UDP-GalA であることを確認した。

以上のように UDP-GalA が合成できた。反応の全工程はステップ数が多いが、比較的簡単に安全な操作で合成できる。今後はこの合成方法を用いて UDP-GalA を大量に調製できると期待できる。本化合物を用いることで植物細胞壁のペクチン合成に関する研究もより発展すると考えられる。

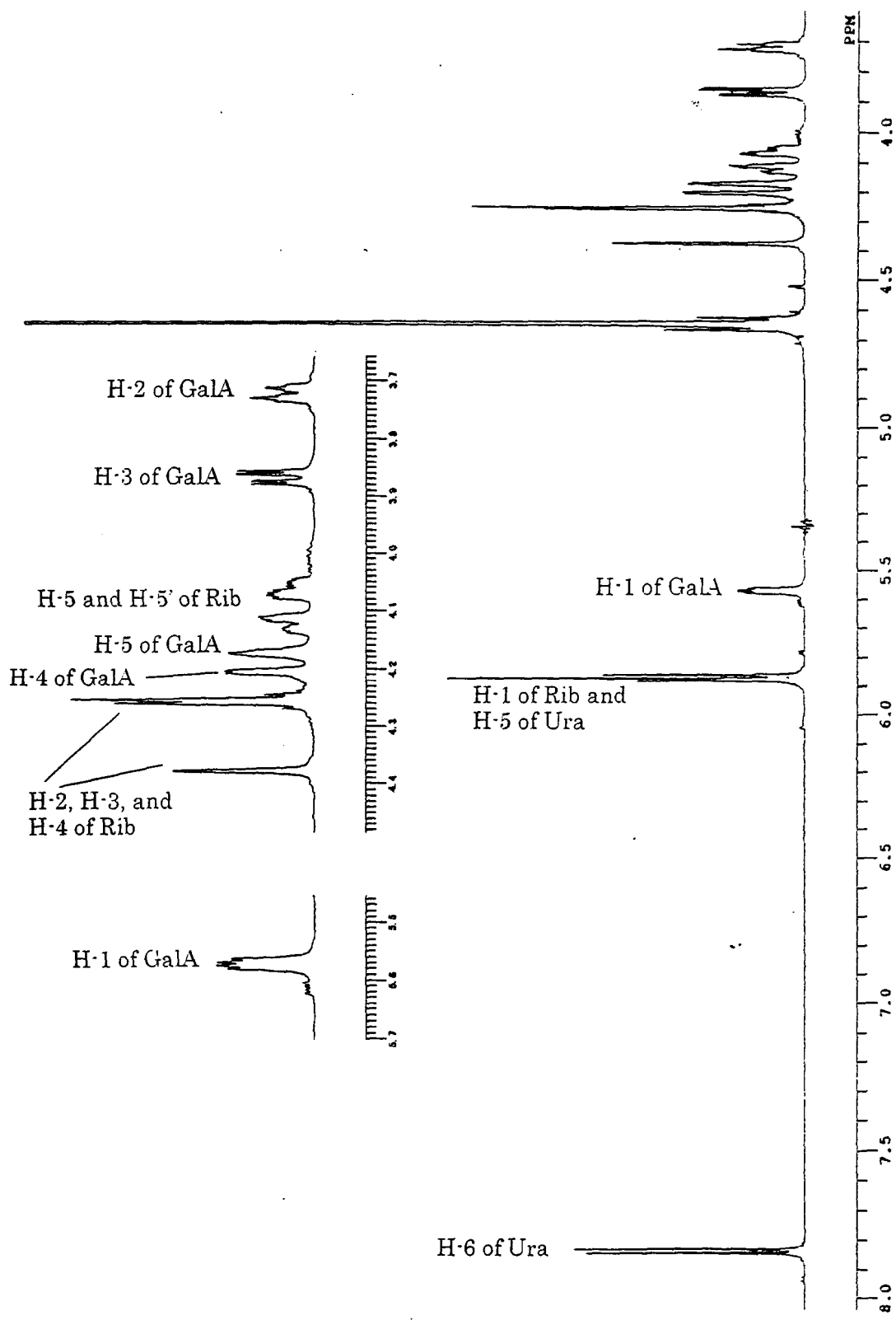


図 21 化合物 21 の  $^1\text{H}$ -NMR

$\text{D}_2\text{O}$  を使い 600 MHz で測定した。

GalA=ガラクトロン酸、Rib=リボース、Ura=ウラシル

## 参考文献

- Akita, K., Ishimizu, T., Tsukamoto, T., Ando, T., and Hase, S., Successive glycosyltransfer activity and enzymatic characterization of pectic polygalacturonate 4- $\alpha$ -galacturonosyltransferase solubilized from pollen tubes of *Petunia axillaris* using pyridylaminated oligogalacturonates as substrates. *Plant Physiol.*, 130, 374-379 (2002)
- Albersheim, P., Darvill, A. G., O'Neill, M. A., Schols, H. A., and Voragen, A. G. J., An hypothesis: the same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In "Pectins and Pectinases", ed. Visser, J. and Voragen, A. G. J., Elsevier, Amsterdam, pp. 47-53 (1996)
- Bacic, A., Harris, P. J., and Stone, B. A., Structure and function of plant cell walls. In "The Biochemistry of Plants", ed. Preiss, J., vol. 14, Academic Press, New York, pp. 297-371 (1988)
- Basu, S. S., Dotson, G. D., and Raetz, C. R. H., A facile enzymatic synthesis of uridine diphospho- $[^{14}\text{C}]$ galacturonic acid. *Anal. Biochem.*, 280, 173-177 (2000)
- Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254 (1976)
- Blickenstaff, R. M., The synthesis of 20-methyl-5-pregnen-3 $\beta$ -ol. *J. Am. Chem. Soc.*, 82, 3673-3676 (1960)
- Bolwell, G. P., Dalessandro, G. and Northcote, D. H., Decrease of polygalacturonic acid synthase during xylem differentiation in sycamore. *Phytochemistry*, 24 699-702 (1985)
- Bourlard, T., Bruyant-Vannier, M.-P., Schaumann, A., Bruyant, P., and Morvan, C., Purification of several pectin methyltransferases from cell suspension cultures of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 324, 335-343 (2001)

Chaudhary, S. K. and Hernandez, O., A simplified procedure for the preparation of triphenylmethylethers. *Tetrahedron Lett.*, 20, 95-98 (1979)

Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M., Structural models of primary cell walls on flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.*, 3, 1-30 (1993)

Czernecki, S., Georgoulis C., Provelenghiou, C., and Fusey, G., Nouvelle methode de benzylation d'hydroxyles glucidiques encombres. *Tetrahedron Lett.*, 17, 3535-3536 (1976)

Doong, R. L., Liljebjelke, K., Fralish, G., Kumer, A., and Mohnen, D., Cell-free synthesis of pectin: identification and partial characterization of polygalacturonate 4- $\alpha$ -galacturonosyltransferase and its products from membrane preparation of tobacco cell-suspension cultures. *Plant Physiol.*, 109, 141-152 (1995)

Doong, R. L. and Mohnen, D., Solubilization and characterization of a galacturonosyltransferase that synthesizes the pectic polysaccharide homogalacturonan. *Plant J.*, 13, 363-374 (1998)

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350-356 (1956)

Edwards, M. E., Dickson, C. A., Chengappa, S., Sidebottom, C., Gidley, M. J., and Reid, J. S. G., Molecular characterizations of a membrane-bound galactosyltransferase of plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Plant J.*, 19, 691-697 (1999)

Ehrlich, F. and Schubert, F., Über die Chemie der Pektinstoffe: Tetra-galakturinsäuren und *d*-Galakturonsäure aus dem Pektin der Zuckerrübe. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 62, 1974-2027 (1929)

Feingold, D. S., Neufeld, E. F., and Hassid, W. Z., The 4-epimerization and

decarboxylation of uridine diphosphate D-glucuronic acid by extracts from *Phaseolus aureus* seedlings. *J. Biol. Chem.*, 235, 910-913 (1960)

Fry, S. C., Wall polymers: chemical characterisation. In "The growing plant cell wall: chemical and metabolic analysis", Longman Scientific & Technical, Essex, pp. 102-187 (1988)

Galambos, J. T., The reaction of carbazole with carbohydrates. I. Effect of borate and sulfamate on the carbazole color of sugars. *Anal. Biochem.*, 1, 119-132 (1967)

Gibeaut, D. M., Nucleotide sugars and glycosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol. Biochem.*, 38, 69-80 (2000)

Goubet, F., Council, L. N., and Mohnen, D., Identification and partial characterization of the pectin methyltransferase "homogalacturonan-methyltransferase" from membranes of tobacco cell suspensions. *Plant Physiol.*, 116, 337-347 (1998)

Goubet, F. and Mohnen, D., Solubilization and partial characterization of homogalacturonan-methyltransferase from microsomal membranes of suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiol.*, 121, 281-290 (1999)

Hashimoto, N., Aoyama, T., and Shioiri, T., New methods and reagents in organic synthesis. 14. A simple efficient preparation of methyl esters with trimethylsilyldiazomethane (TMSCHN<sub>2</sub>) and its application to gas chromatographic analysis of fatty acid. *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 1475-1478 (1981)

Ishii, T., Ichita, J., Matsue, H., Ono, H., and Maeda, I., Fluorescent labeling of pectic oligosaccharides with 2-aminobenzamide and enzyme assay for pectin. *Carbohydr. Res.*, 337, 1023-1032 (2002).

Ishikawa, M., Kuroyama, H., Takeuchi, Y., and Tsumuraya, Y., Characterization of pectin methyltransferase from soybean hypocotyls. *Planta*, 210, 789-791 (2000)

Komae, K., Komae, A., and Misaki, A., A 4,5-unsaturated low molecular

oligogalacturonide as a potent phytoalexin-elicitor isolated from polygalacturonide of *Ficus awkeotsang*. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1477-1484 (1990)

Komae, K. and Misaki, A., Isolation and characterization of the gel forming polygalacturonide from seeds of *Ficus awkeotsang*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1237-1245 (1989)

Kudlicka, K. and Brown Jr, R. M., Cellulose and callose biosynthesis in higher plants (I. solubilization and separation of (1→3)- and (1→4)-β-glucan synthase activities from mung bean). *Plant Physiol.*, **115**, 643-656 (1997)

Liljebjelke, K., Adolphson, R., Baker, K., Doong, R. L., and Mohnen, D., Enzymatic synthesis and purification of uridine diphosphate-[<sup>14</sup>C]-galacturonic acid: a substrate for pectin biosynthesis. *Anal. Biochem.*, **225**, 296-304 (1995)

Lin, T.-Y., Elbein, A. D., and Su, J. C., Substrate specificity in pectin synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 650-657 (1966)

Mancuso, A. J., Huang, S.-H., and Swern, D., Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide "activated" by oxalyl chloride. *J. Org. Chem.*, **43**, 2480-2482 (1978)

Matsuzaki, Y., Ito, Y., Nakahara, Y., and Ogawa, T., Synthesis of branched poly-N-acetyl-lactosamine type pentaantennary pentacosasaccharide: glycan part of a glycosyl ceramide from rabbit erythrocyte membrane. *Tetrahedron Lett.*, **34**, 1061-1064 (1993)

Mitcham, E. J. and Gross, K. C., Synthesis of uridinediphospho-[U-<sup>14</sup>C]-D-galacturonic acid by enzyme particulate fractions and purification via high performance liquid chromatography. *Phytochemical analysis*, **2**, 112-115 (1991)

Mohnen, D., Doong, R. L., Liljebjelke, K., Fralish, G., and Chan, J., Cell free synthesis of the pectic polysaccharide homogalacturonan. In "Pectins and Pectinases", ed. Visser, J. and Voragen, A.G.J., Elsevier Science, Amsterdam,

pp.109-126 (1996)

Nelson, N., A photometric adaptation of method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380 (1944)

O'Neill, M., Albersheim, P., and Darvill, A., The pectic polysaccharides of primary cell walls. In "Methods in Plant Biochemistry", ed. Dey, P. M., vol. 2, Academic Press, London, pp. 415-441 (1990)

Park, J. T. and Johnson, M. J., A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **181**, 149-151 (1949)

Pauly, M. and Scheller, H. V., *O*-Acetylation of plant cell wall polysaccharides: identification and partial characterization of a rhamnogalacturonan *O*-acetyl-transferase from potato suspension-cultured cells. *Planta*, **210**, 659-667 (2000)

Perrin, R. M., DeRocher, A. E., Bar-Peled, M., Zeng, W., Norambuena, L., Orellane, A., Raikhel, N. V., and Keegstra, K., Xyloglucan fucosyltransferase, an enzyme involved in plant cell wall biosynthesis. *Science*, **284**, 1976-1979 (1999)

Petitou, M., Duchaussoy, P., and Choay, J., *p*-Anisyl ethers in carbohydrate chemistry: selective protection of the primary alcohol function. *Tetrahedron Lett.*, **29**, 1389-1390 (1988)

Ridley, B. L., O'Neill, M. A., and Mohnen, D., Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, **57**, 929-967 (2001)

Roseman, S., Distler, J. J., Moffatt, G., and Khorana, G., Nucleoside polyphosphates. XI. An improved general method for the synthesis of nucleotide coenzymes. Syntheses of uridine-5', cytidine-5' and guanosine-5' diphosphate derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 659-663 (1961)

Scheller, H. V., Doong, R. L., Ridley, B. L., and Mohnen, D., Pectin biosynthesis: a solubilized  $\alpha$ 1,4-galacturonosyltransferase from tobacco catalyzes the transfer of

galacturonic acid from UDP-galacturonic acid onto the non-reducing end of homogalacturonan. *Planta*, 207, 512-517 (1999)

Schmidt, R. R. and Jung K.-H., Oligosaccharide synthesis with trichloroacetimidates. In "Preparative carbohydrate chemistry", ed Hanessian, S., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 283-312 (1997)

Simon, E. S., Grabowski, S., and Whitesides, M., Convenient syntheses of cytidine 5'-triphosphate, guanosine 5'-triphosphate, and uridine 5'-triphosphate and their use in the preparation of UDP-glucose, UDP-glucuronic acid, and GDP-mannose. *J. Org. Chem.*, 55, 1834-1841 (1990)

Somogyi, M., Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.*, 160, 69-73 (1945)

Somogyi, M., Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195, 19 (1952)

Sterling, J. D., Quigley, H. F., Orellanes, A., and Mohnen, D., The catalytic site of the pectin biosynthetic enzyme  $\alpha$ -1,4-galacturonosyltransferase is located in the lumen of the Golgi. *Plant Physiol.*, 127, 360-371 (2001)

Stoddart, R. W., Polysaccharide assembly in eukaryotes. In "The biosynthesis of polysaccharides", Croom Helm, London, pp. 179-261 (1984)

Takeuchi, Y. and Tsumuraya, Y., *In vitro* biosynthesis of homogalacturonan by a membrane-bound galacturonosyltransferase from epicotyls of azuki bean. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 1519-1527 (2001)

Vannier, M. P., Thoirion, B., Morvan, C., and Demarty, M., Localization of methyltransferase activities throughout the endomembrane complex system of flax (*Linum usitatissimum* L.) hypocotyls. *Biochem. J.*, 286, 863-868 (1992)

Villemeze, C. L., Lin, T.-Y., and Hassid, W. Z., Biosynthesis of the polygalacturonic acid chain of pectin by a particulate enzyme preparation from *Phaseolus aureus* seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 54, 1626-1632 (1965)



Villemez, C. L., Swanson, A. L., and Hassid, W. Z., Properties of polygalacturonic acid-synthesizing enzyme system from *Phaseolus aureus* seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 446-452 (1966)

Yuasa, H., Indsgaul, O., and Palcic, M. M., Chemical-enzymatic synthesis of 5'-thio-N-acetylactosamine: the first disaccharide with sulfur in the ring of the nonreducing sugar. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 5891-5892 (1992)

Zhang, G. F. and Staehelin, L. A., Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells. *Plant Physiol.*, **99**, 1070-1083 (1992)