

## 1Dp-6

ニンジン培養細胞から精製した  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase による細胞壁中の Arabinose-rich 多糖画分の分解

今野晴義, 山崎良樹, 加藤研治\* (岡山大・農生研, \*サントリー・生有研)

植物細胞壁は, 生体内の各種分解酵素によって, 修飾, 分解を受けている。先に, ニンジン培養細胞から高度に精製した Polygalacturonase (Exo 型) が, その細胞壁標品より抽出, 精製したペクチン質酸性多糖画分 (P-3) の部分分解に参与することを報告した<sup>1)</sup>。ニンジン培養細胞の細胞壁標品および抽出ペクチン質中に Arabinose 含量が高いことを考慮し, 今回は, 同細胞から  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase ( $\alpha$ -L-AFase) を精製し, 細胞壁に含まれる Arabinose-rich 多糖画分への作用について検討した<sup>2)</sup>。

ニンジン培養細胞は, Murashige-Skoog 培地に 2,4-D (4.5  $\mu$ M) と Sucrose (3%) を加え, 25°C, 40  $\mu$ E/m<sup>2</sup>・s<sup>-1</sup> の照射下で, 15 日間通気攪拌培養した。 $\alpha$ -L-AFase は, 細胞を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で超音波処理し, 得られた可溶性画分から硫酸分画, DEAE-Sephadex, Sephadex G-15D, ConA-Sepharose, CM-Sephadex, 調製用 PAGE にて精製した。一方, 細胞壁標品は, 同細胞より得られた細胞残渣から  $\alpha$ -amylase, Pronase, 有機溶剤処理を行い調製した。アラビノガラクトンは, 同細胞壁標品からアルカリ (0.5 N NaOH, 121°C) にて, ペクチン質は Hexametaphosphate (2%, pH 3.7, 90°C) にて, それぞれ抽出した。このペクチン質は, さらに DEAE-Sephadex にて, 酸性多糖画分と中性多糖画分とに分画した。多糖画分中の全糖量はフェノール法にて, ウロン酸含量はカルバザール法にて, 中性糖組成はガスクロマトグラフにて, 測定した。

$\alpha$ -L-AFase は, この精製過程で, 比活性が 358 倍に増加し, 23% が回収された。この精製  $\alpha$ -L-AFase 標品は, PAGE で酵素活性を持った 1 本の蛋白バンドを示した。主な酵素諸性質は, 分子量 110,000 (ゲル濾過), 94,000 (SDS-PAGE); 最適 pH 4.2; 等電点 pH 4.7;  $K_m = 1.33$  mM,  $V_{max} = 20.2$   $\mu$ mole/mg protein  $\cdot$  h<sup>-1</sup> (基質 p-NFAF) であった。また, Ca<sup>2+</sup> と Zn<sup>2+</sup> の添加によって酵素活性は約 2 倍に増加し, Cu<sup>2+</sup>, Ag<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, PCMB, L-Arabinono-1,4-Lactone によって強く阻害された。この精製  $\alpha$ -L-AFase は, 各種グリコシド結合を持つ複合多糖類に作用させた時に, ビートアラビナシ ( $\alpha$ -1,5-arabinosyl 結合) から約 5.3% に相当する Arabinose を遊離した。その生成量は反応時間によって変化するが, オリゴマー等は検出されなかった。また, 本酵素はニンジン細胞壁標品にほとんど作用しないが, この細胞壁標品より抽出, 精製したアラビノガラクトン (Arabinose 含量 95 wt%, 分子量 14,000) およびペクチン質画分 P-1 (Arabinose 含量 89 wt%, 分子量 18,000) からは, 20~27% に相当する Arabinose と非常にわずかな未確認糖より成る反応生成物を遊離した。以上の結果から,  $\alpha$ -L-AFase は, 細胞壁に含まれる Arabinose-rich 多糖画分を Exo 型の様式にて分解し, 他の分解酵素と共に, 細胞壁の代謝に関与していることが示唆された。

1) Konno, H., Y. Yamasaki and K. Katoh (1984) *Physiol. Plant.* 61: 20-26.

2) Konno, H., Y. Yamasaki and K. Katoh (1987) *Physiol. Plant.* in press.