

1Da-7

Endo-pectate lyase によるニンジン根細胞壁の分解.

今野晴義、山崎良樹 (岡山大学、農生研)

ペクチン質の構造と機能に関する研究において、植物細胞壁から種々の薬剤で抽出されるペクチン質 polymer 中の構成糖やその結合様式を解析することは重要である。ところが、ある種の植物病原菌の生産する酵素の中には、細胞壁から特異的にペクチン質を可溶化する作用を有するものがある。現在、この性質を持つ酵素として、エンド型の Polygalacturonase と Pectin Lyase が知られている。演者らは、*Erwinia aroideae* の菌体内からエンド型の Pectate Lyase を精製し、その諸性質を検討した。さらにこの酵素は、ニンジン根から調製した細胞壁に含まれるペクチン質を可溶化したので、その画分についての分析も行なった。

E. aroideae の培養は、0.5% ペクチン酸、0.5% ペプトン、0.3% 肉エキスを、15 mM KH_2PO_4 、28 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を含む液体培地 (pH 7.2 に調整) にて、27°C、3日振とう培養にて行なった。菌体を遠心分離にて集め、10 mM トリス緩衝液 (pH 7.0) で洗浄後、0.1 M 同緩衝液に懸濁し、5分間超音波破碎し可溶性画分を得た。この画分に含まれる酵素を、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で透析後、80% 硫酸分画、CM-Sephadex C-50 バッチおよびカラムクロマトグラフィー、最後に Sephadex G-200 ゲル濾過にて精製した。酵素活性の測定は、0.2% polygalacturonate, 0.5 mM CaCl_2 , 50 mM トリス緩衝液 (pH 8.6) の反応液に酵素液を加え、37°C、10分反応した後、232 nm の吸収増によった。ニンジン根の細胞壁画分は、90% (w/v) ethanol で20分熱処理し α -amylase Pronase E を順次作用させ、最後に脱リグニンを行ない乾燥保存した。

酵素活性は、CM-Sephadex C-50 クロマトで2種のピークに分離した。主ピーク E さらに Sephadex G-200 ゲル濾過を行ない精製酵素標品とした。この精製過程において、Lyase の比活性は200倍に増加し、収量は18%であった。精製酵素標品は、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 溶液で -25°C に保存すると1~2ヶ月安定であった。最適 pH は、9.3を示し、pH 7.0~7.4 が最も安定、pH 4.0 以下では極めて不安定であった。また、 Ca^{2+} (0.5 mM) の添加で活性は21倍に増加し、EDTA (2.5 mM) で完全に阻害された。次に反応中における反応溶液の粘度降下と反応生成物の測定および基質特異性などの結果から、この精製酵素はエンド型の Pectate Lyase であると示唆された。

次に、酵素のニンジン根細胞壁への作用を検討した。酵素は経時的に壁画分から不飽和ウロン酸を遊離し、その変化は可溶化される画分中の全糖量の増加と一致した。反応生成物は、Bio-Gel P-2 ゲル濾過の Void 画分に溶出され、収量は細胞壁の30.5%に相当し、細胞壁に含まれる Galacturonic acid はすべて可溶化された。またこの画分の中性糖含量は、細胞壁中のそれの7.5%に相当し、その構成糖は Rhamnose, Arabinose, Galactose が主であった。さらにこの画分は、DEAE-Sephadex A-50 クロマトにて5種のピーク (P-1~5) に分別された。P-1 の構成糖は Arabinose, Galactose, Glucose が94.4%を占め、Galacturonic acid はほとんどなく、逆に P-2, 3 はすべて Galacturonic acid であった。P-4 は典型的な Rhamnogalacturonan の構成糖を有し、一方、P-5 は Galactose を極めて多く含む Galacturonosyl 残基であった。