

アマモペクチン質のメトキシル基 および遊離糖について

高野 克夫 佐藤 幹子

海藻類の栄養塩類の吸収は藻体全体で行なわれ、その際多糖類ポリウロニドのカルボキシル基にメチル基がついていない遊離カルボキシル基、あるいは塩の形のものや、酸性多糖の硫酸エステルなどがイオン吸収に積極的にはたっているものと考えられている¹⁾。ペクチン質は高等植物における膜間物質として知られているが、これは D-ガラクトチュロン酸が 1,4'-結合で直鎖状に縮重合した高分子のペクチン酸を主体とし、少量のアラバン、ガラクトタンを随伴する多糖類である。

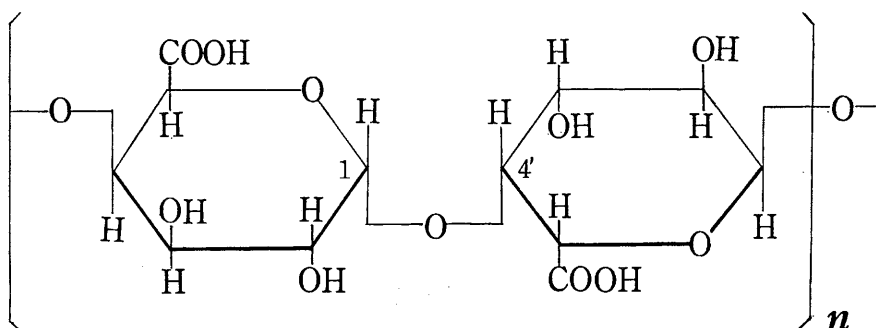


図1 ペクチン酸の構造

高等植物のペクチン質のカルボキシル基はメチル基がエステル結合している場合が多く、通常メトキシル基の含量は12%程度であるという⁽²⁾。Anderson, King ら⁽³⁾は *Nitella* や *Chara* などの下等植物にもペクチン質が存在すること、しかもその含量が通常的高等植物よりも多く、メトキシル基がきわめて少量であるという結果から、これら水生下等植物ペクチン質のカルボキシル基は大部分遊離、あるいは塩の形で存在し、イオン吸収に関係しているものと考えている⁽⁴⁾。

本実験では、ヒルムシロ科に属する高等植物でありながら海中という特殊な環境に生育しているアマモについて、遺伝的な要因がどこまで特殊環境で支配的であるかを考察するために、

- 1) 高等植物でふつうにみられる遊離ブドウ糖、果糖あるいはショ糖などがアマモでもみられるかどうか、
- 2) アマモから抽出したペクチン質と一般高等植物から得たペクチン質との間で、特にメトキシル基の量に関して顕著な差がみられるかどうか、
- 3) アマモ細胞壁多糖類における硫酸基の量が、一般海藻のように多量であるかどうかを検した。

実 験

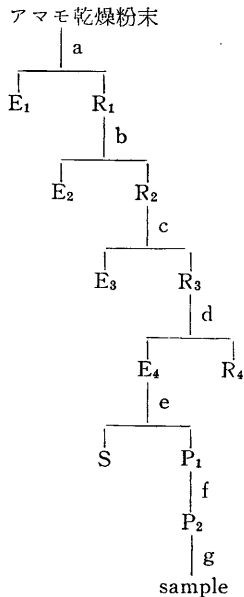
材 料

1963年, '64年7月, 伊豆下田付近で採集したアマモを材料とした。遊離糖の存在を知るためには採集したばかりの新鮮材料を, ペクチン質の抽出には乾燥したアマモを粉碎機にかけて粉末にしたものを用いた。

ペクチン質の抽出と同定

ペクチン質の抽出は基本的には Anderson らの方法に従った。その方法は表1の通りである。

表1 ペクチン質抽出法



- a. extracted with cold water
- b. extracted with hot water
- c. extracted with benzene-methanol
- d. extracted with hot oxalate-oxalic acid
- e. addition of 0.5 volume acidified ethanol
- f. re-precipitation
- g. dried with 70% ethanol, abs. ethanol and ether

- a. 乾燥粉末 100g を約 10g ずつに分け, これに水 1 l (0°C) を加え, ミキサーで 2 分間かくはんした後, ポプリン二重布で濾過し, 濾液に次の 10g を混じり同様の操作をくりかえし, 結局 100g の材料から冷水抽出液 (E₁) を得る。冷水抽出残渣はさらに 4 l の冷水で洗って (かくはん 2 時間) から風乾した (R₁)。
- b. R₁ を 3 等分し, それぞれに水 800ml を加え, 85~90°C の水浴上で 6 時間加熱した後, ポプリン布でしぼり, 抽出液 (E₂) と残渣 (R₂) とに分けた。
- c. R₂ にメタノール-ベンゼン (1:1) 2 l を加え, モーターで軽くはんしながら 6 時間抽出処理を行なった後濾過し, 濾液 (E₃) と残渣 (R₃) とに分けた。
- d. R₃ 20g に 0.25% oxalic acid-0.25% ammonium oxalate (1:1) 1 l を加え沸騰バス上で 6 時間抽出処理を行なった後, 濾紙を用いて濾過し, 濾液 (E₄) と残渣 (R₄) とに分けた。
- e. 濾液 (E₄) に塩酸酸性エタノール (0.05N HCl) を約半容量加え, 生じた沈でん物 (P₁) を遠心分離して集めた。
- f. P₁ を再び oxalic acid-ammonium oxalate 液に溶解し, 脱色のため filter-cell: standard super-cell: celite 535 (0.5:1:2) の層を通して濾過し, 濾液に再び酸性エタノールを加

え、生じた沈でん物 (P₂) を遠心分離した。

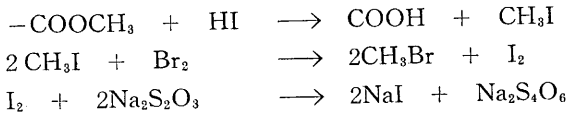
g. P₂ を 70% エタノール, Abs. エタノール, エーテルの順で洗い, 五酸化リンの上で乾燥させた。この物質をアマモペクチン質材料として使用した。

ペーパークロマトグラフィー

生材料に含まれる遊離糖, およびペクチン質を加水分解して生ずる構成糖, さらにアマモ粉末材料からの各フラクションの酸分解によって生じる糖の検出には No. 50 の東洋汙紙, 展開剤, ブタノール-ピリジン-水 (6:4:3) の上昇法を用い, ウロン酸検出には, 展開剤, ピリジン-酢酸エチル-氷酢酸-水 (5:5:1:3) 下降法を用いた。発色には硝酸銀浸漬法, レゾルシン試薬, ベンチジン試薬噴霧法を用いた。

メトキシル基定量

メトキシル基は Vieböck の容量法に従って定量した。原理は sample をヨウ化水素酸で分解し, 生成するヨウ化メチルにブロムを作用させる。その際発生するヨウ素をチオ硫酸ソーダで滴定すれば, それに相当するメトキシル量を知ることができる。



硫酸の定量

硫酸を定量するには sample を灰化し塩化バリウムを加えて硫酸バリウムを作らせ, その重量から硫酸量を換算した。

実 験 結 果

生アマモに含まれる糖

新鮮材料に容量で 2 倍量の 80% エタノールを加え, 還流冷却器をつけて水浴中に 30 分 boil し, ホプリン布でしぼり, 残渣を同じように 2 度熱アルコールで処理し, 得られた抽出液を合して減圧濃縮して得た濃縮液について, ペーパークロマトグラフィーで存在糖を検出すると図のような結果がえられた。すなわちアマモは陸上高等植物と同じようにブドウ糖, 果糖, ショ糖を含んでいる。

一般の海藻は特殊な緑藻などを除けば遊離のブドウ糖や果糖のような単糖や, ショ糖を含まない。

ペクチン質 sample の構成糖

アマモ粉末材料から Anderson らの方法で抽出精製したペクチン質 sample 50mg に 70% H₂SO₄ 1 ml を加えて 4 日間放置した後, 約 3N になるように稀釈し, 還流冷却器をつけて, 沸騰バス上で約 3 時間酸加水分解を行なった。

表 2 アマモペクチン質の構成糖

| 水 解 生 成 糖 | |
|-------------------|---|
| Galacturonic acid | 卅 |
| Arabinose | 卅 |
| Galactose | 卅 |
| Rhamnose | 十 |

た。フェノールフタレインを指示薬として水酸化バリウムで中和し, 汙過したものを濃縮し, 構成糖を上昇法および下降法クロマトグラフィーで同定すると表 2 のような結

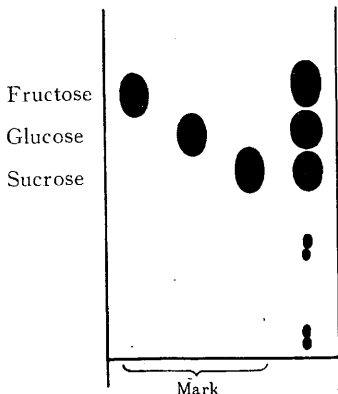


図 2 生アマモ抽出液における糖の存在を示す上昇法ペーパークロマトグラム

果が得られた。

このことより、ここで用いた sample はポリガラクトuron酸を主体とし、アラバン、ガラクトanを随伴する典型的なペクチン質であることがわかった。

各フラクションの構成糖

ペクチン質を得る操作の途中で得た各フラクションの構成糖をしらべるために、各フラクションを約 $1/10$ に濃縮し、それぞれの 3 ml に 2N H_2SO_4 3ml を加え、沸騰バス上で約 4 時間加水分解を行なった後、水酸化バリウムで中和し、沓過、濃縮する。濃縮液を上昇法ペーパークロマトグラフィーにかけ構成糖をしらべると表 3 に示すような結果が得られた。すなわち各フラクションにはペクチン質よりも抽出が容易である各種のヘミセルロースが含まれていることになる。

表 3 各フラクションの構成糖

| sample | sugar | Rhamnose | Xylose | Fructose | Glucose | Galactose |
|-------------------------------------|-------|------------|------------|-----------|------------|-----------|
| E ₁ cold water extract | | | | ++ (0.40) | | |
| E ₂ hot water extract | | + (0.57) | +++ (0.48) | + (0.41) | ++ (0.38) | |
| E ₃ MeOH-benzene extract | | | | | | |
| S ethanol supernatant | | +++ (0.56) | +++ (0.46) | | ++ (0.37) | |
| R ₄ residue | | + (0.58) | +++ (0.48) | | +++ (0.38) | ++ (0.33) |

() は得られた Rf 値

ペクチン質 sample のメトキシ基含量

Vanilin, $CH_3O \cdot C_6H_5OH \cdot CHO$ を用いて Vieböck の方法で予備実験を行なったところ、実験値として 20.1% の値が得られたが、これは理論値 20.3% にきわめて近い値である。

アマモから得たペクチン質 sample 2.6mg を用いてメトキシ基の量の定量値 2.03% という値が得られたが全カルボキシ基にメチル基がついている (エステル化 100%) 場合が 16.32% であるから、2.03% という値は全カルボキシ基の 12.4% がエステル化していることを示す。アマモ以外の 2, 3 の材料についてのメトキシ基定量値と比較すると次の表 4 のようになる。

表 4 メトキシ基の定量値

| 材 料 | ペクチン質全量に対するメトキシ基 (%) | 全カルボキシ基に対するメトキシ基 (%) |
|------|----------------------|----------------------|
| アマモ | 2.03 | 12.43 |
| レモン | 2.43 | 14.89 |
| 〃 | 2.95 | 18.07 |
| 〃 | 2.03 | 12.43 |
| リンゴ | 3.05 | 18.68 |
| 〃 | 3.70 | 16.54 |
| オレンジ | 1.98 | 12.13 |

細胞膜壁の硫酸の定量

アマモペクチン質を得る操作の途中において oxalic acid-oxalate 抽出でアマモペクチン質は可溶分画に移行するが、なお細胞膜物質は残渣 (R₄) の方に残る。この R₄ 残渣について硫酸の定量を行なって R₄ 中の硫酸イオンの量 = 0.62% という値を得た。

考 察

アマモ生材料をすばやく熱アルコールで固定し、糖類を抽出してその種類をしらべると、遊離の単糖としてブドウ糖および果糖を含み、オリゴ糖としてショ糖を含む。陸上の高等植物はほとんど例外なくこの三種類の糖を含むが、特殊な緑藻類を除いて褐藻、紅藻でこの三種類の糖を含む例はほとんどみられない。アマモは特殊環境である海中に代を重ねて生育しているが、高等植物としての遺伝的要因を失っていないものと思われる。また高等植物でみられるようなペクチン質がアマモでもみられ、そのペクチン質のメトキシル基は、高等植物でふつうにみられるペクチン質のメトキシル基量と同程度であり、*Chara* や *Nitella* でみられたようなペクチン質とは相当異なっている。*Chara* や *Nitella* のような水生植物ではペクチン質の遊離カルボキシル基がイオン吸収に積極的に関与していると考えられるが、同じく水生植物であるアマモについては、ペクチン質がイオン吸収にそれほど関与しているとは考えられない。海藻には酸性多糖類が多量に存在し、しかも硫酸が多量であり、いわゆる硫酸多糖をつくっており、この硫酸エステルがイオン吸収に関与していると考えられている。アマモの硫酸量はイオンとして 0.62% であり、この量は一般海藻の硫酸量に比較して、きわめて小さい量であり、従ってアマモのイオン吸収がこの硫酸によってまかなわれているとは考えられない。陸上高等植物の場合と同じように、アマモの場合も根から栄養塩類の吸収が行なわれていると考えられる。海中という特殊環境の中でアマモが生理的に高等植物としての機能を維持していることは興味深い。

総 括

1. アマモ生材料について遊離糖の存在が、粉末材料についてアマモペクチン質が、なお細胞壁に関して硫酸量がしらべられた。
2. 陸上高等植物と同じく、単糖としてブドウ糖、果糖が、オリゴ糖としてショ糖が検出された。またアマモペクチン質のメトキシル量は典型的ペクチン質のそれと同程度であり、細胞壁成分の硫酸含有量は少なかった。
3. アマモペクチン質は *Chara*, *Nitella* の場合とことなり、栄養塩類の吸収とは直接関係していないように思われる。
4. 海中という特殊環境に生育していてもアマモは遺伝的な生理的諸性質に転換をきたしていないものと思われる。

文 献

- 1) 西沢一俊, 三輪知雄: 蛋白質, 核酸, 酵素 Vol. 8, No. 3 1963
- 2) Polysaccharide chemistry
- 3) O. M. W. Anderson & N. J. King: Biochim. Biophys. Acta 52, 441 (1961)
- 4) O. M. W. Anderson & N. J. King: Biochim. Biophys. Acta 52, 449 (1961)