



Title	アスパラガス ( <i>Asparagus officinalis</i> L. )根の Fructosyltransferases に関する研究
Author(s)	塩見, 徳夫
Citation	北海道大学農学部邦文紀要, 13(3), 242-316
Issue Date	1982-11-10
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/11977">http://hdl.handle.net/2115/11977</a>
Type	bulletin (article)
File Information	13(3)_p242-316.pdf



[Instructions for use](#)

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) 根の  
Fructosyltransferases に関する研究

塩 見 徳 夫

(北海道大学農学部農芸化学科食品栄養学講座)

(昭和 57 年 3 月 23 日受理)

Studies on Fructosyltransferases of Roots of *Asparagus*  
(*Asparagus officinalis* L.)

Norio SHIOMI

Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,  
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

目 次

序	244	2. 結 果	263
1. ま え が き	244	(1) 硫安飽和画分の酵素活性	263
2. 既往の研究の概説	244	(2) シュエクロースからの合成糖の単離と 同定	263
第 1 章 フラクト・オリゴ糖含量の季節的变化	248	1) 単 離	263
1. 材 料 と 方 法	248	2) 同 定	264
2. 結果および考察	248	(3) シュエクロースからの糖合成の 経時変化	267
3. 要 約	250	1) 定 性	267
第 2 章 フラクト・オリゴ糖の単離と同定	250	2) 定 量	267
1. 材 料 と 方 法	250	(4) 1-Kestose からの四糖合成	269
2. 結 果	250	(5) Nystose からの五糖合成	269
(1) キク科およびユリ科植物のオリゴ糖	250	3. 考 察	269
(2) オリゴ糖の単離と性質	251	4. 要 約	270
1) 単 離	251	第 4 章 Sucrose: sucrose 1-fructosyl- transferase の精製と性質	270
2) 性 質	252	1. 材 料 と 方 法	271
(3) 単離オリゴ糖の同定	253	2. 結 果	271
1) 1-Kestose, nystose および 1F(1-β- fructofuranosyl) <sub>3</sub> sucrose の同定	253	(1) 酵素の精製	271
2) Neokestose の同定	253	1) 硫安分画	271
3) 1F(1-β-Fructofuranosyl) <sub>m</sub> -6 <sup>g</sup> (1-β- fructofuranosyl) <sub>n</sub> sucrose 系列糖 5 種の同定	253	2) DEAE-セルロース・カラムクロマト グラフィ	272
3. 考 察	259	3) CM-セルロース・カラムクロマト グラフィ	272
4. 要 約	261	4) Sephadex G-200 および sucrose- coupled Sepharose 6B・カラム クロマトグラフィ	272
第 3 章 フラクト・オリゴ糖の酵素的合成	261		
1. 材 料 と 方 法	261		

(2) 酵素の一般的性質	273	3) Neokestose およびその同族体糖 におけるフラクトシル基の “自己転移”	287
1) ディスク電気泳動	273	3. 考 察	288
2) 分 子 量	273	4. 要 約	289
3) 至適 pH	273	第 6 章 1 <sup>F</sup> -Fructosyltransferase の精製と 性質	290
4) pH-安定性	273	1. 材料と方法	290
5) 熱安定性	273	2. 結 果	291
6) 阻害剤の効果	274	(1) 酵素の精製	291
7) 酵素反応の経時変化	275	1) 硫安分画	291
8) 酵素反応に及ぼす基質濃度の効果	275	2) リン酸カルシウム・ゲル処理	291
(3) 酵素の基質特異性	275	3) DEAE-セルロース・カラムクロマト グラフィー (第 1 回)	291
1) フラクトシル基の“自己転移”	275	4) Octyl-Sepharose・カラムクロマト グラフィー	291
2) グルコースへのフラクトシル転移	276	5) DEAE-セルロース・カラムクロマト グラフィー (第 2 回)	291
3) Neokestose およびその同族体への フラクトシル転移	277	6) Raffinose-coupled Sepharose 6 B・ カラムクロマトグラフィー	292
3. 考 察	278	7) Sephadex G-200・カラムクロマト グラフィー	292
4. 要 約	279	(2) 酵素の一般的性質	293
第 5 章 6 <sup>G</sup> -Fructosyltransferase の精製と 性質	280	1) ディスク電気泳動	293
1. 材料と方法	280	2) 分 子 量	293
2. 結 果	280	3) 至適 pH	294
(1) 酵素の精製	280	4) pH-安定性	294
1) 硫安分画	280	5) 熱安定性	294
2) リン酸カルシウム・ゲル処理	280	6) 阻害剤の効果	294
3) Octyl-Sepharose・カラムクロマト グラフィー	280	(3) 酵素の基質特異性	295
4) DEAE-セルロース・カラムクロマト グラフィー	281	1) フラクトシル基の“自己転移”	295
5) Sephadex G-200・カラムクロマト グラフィー	281	2) 1-Kestose からのシュエクロースへの フラクトシル転移	296
6) Raffinose-coupled Sepharose 6 B・ カラムクロマトグラフィー	281	3) 1-Kestose からの他のフラクト・オリゴ 糖あるいはイヌリンへのフラクトシル 転移	297
(2) 酵素の一般的性質	282	3. 考 察	299
1) ディスク電気泳動	282	4. 要 約	301
2) 分 子 量	282	第 7 章 総合考察	301
3) 至適 pH	282	総括的要約	304
4) pH-安定性	282	引用文献	307
5) 熱安定性	283	Summary	312
6) 阻害剤の効果	283		
(3) 酵素の基質特異性	283		
1) フラクトシル基の“自己転移”	283		
2) 1-Kestose からの 1 <sup>F</sup> (1-β-fructo- furanosyl) <sub>n</sub> sucrose 系列糖への フラクトシル転移	285		

## 序

## 1. ま え が き

高等植物には貯蔵炭水化物としてフラクトースのオリゴマーおよびポリマーを含むものが存在し、これらの炭水化物の合成・分解には種々の hydrolases および fructosyltransferases が関与するであろうことは容易に推測される。

これに関連する研究としては、キクイモ塊茎についてイヌリン系列のフラクトース重合体の合成・分解が最も早期に、また最も良く調べられ、その結果、それに関与する酵素が明らかにされ、同時に合成・分解のスキームも提示されている。これに類する研究はチョコレート、タマネギ、レタスおよびリュウゼツランでも行われているものの、一般には使用した酵素標品の純度が極めて悪く、従って得られた結果も不明確な場合が多い。

一方、食用作物として重要なアスパラガスの炭水化物については重合度約10のフラクトース重合体に関する古い報告があるのみで、その後はこの植物についての炭水化物化学および酵素化学的研究は全くないに等しいと言ってよい。著者の予備検索によればアスパラガスの主要な炭水化物蓄積部位である根部にはキクイモ塊茎の場合とは異なる結合をもつ一連のフラクト・オリゴ糖が存在することが確かめられ、この根がフラクトース重合体の化学構造および酵素合成の研究にとって最適の材料の一つであることがわかった。

そこでこの研究ではその主要部分として、先ずアスパラガス根に含まれるフラクト・オリゴ糖の化学構造を明らかにするとともに、こうして同定された9種のフラクト・オリゴ糖がどのような酵素の関与の下に合成されるかを推定するための *in vitro* 合成実験を行い、次いで推定された酵素の高度精製を試み、このようにして純粋に単離できた3種の fructosyltransferases [sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase (SST), 6<sup>G</sup>-fructosyltransferase (6<sup>G</sup>-FT) および 1<sup>F</sup>-fructosyltransferase (1<sup>F</sup>-FT)] の性質、とくに基質特異性、を詳しく調べ、最後にこれらの結果に基づいてアスパラガス根におけるフラクト・オリゴ糖の生合成機構を提示できたことについて、以下に詳しく述べることにする。

## 2. 既往の研究の概説

高等植物中には貯蔵炭水化物として澱粉を貯蔵するものが極めて多いが、フラクトースの重合体であるフラクタンを蓄積するものもまた多い。これらの貯蔵炭水化物は発芽期のように特にエネルギーを必要とする時には急

速に分解され低分子の糖となり利用されることが良く知られている。

フラクタンは構造上次の三つの型に3大別される。

イヌリン型:  $\beta(2\rightarrow1)$  結合した D-フラクトース残基からなるもので、 $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose ( $n=1\sim$ 約35)の構造を有し、換言すれば 1-kestose (構造式で  $n=1$ ) の誘導体である。またこの型はさらに拡張して  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m-6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$ -sucrose, 即ち neokestose (構造式で  $m=0, n=1$ ) の誘導体、も入れることが可能である。

レバン型:  $\beta(2\rightarrow6)$  結合した D-フラクトース残基からなるもの。

トリチン型:  $\beta(2\rightarrow1)$  結合と  $\beta(2\rightarrow6)$  結合の両 D-フラクトース残基からなるもの。

これらのうちイヌリン型フラクタンは従来から比較的良好に研究されているもので、キクイモ、ダーリアおよびタンポポ等<sup>77)</sup>のキク科植物の地下部貯蔵組織に蓄積していることが知られ、またユリ科 (Liliaceae) やアヤメ科 (Iridaceae) の植物<sup>118)</sup>でも存在が知られている。

高分子フラクタンについては古くから研究が集中して行われてきたが、低分子フラクタンあるいはフラクト・オリゴ糖についてはキクイモの場合を例外として十分な研究はなかったようである。しかし最近になりようやく種々の植物についてこの種の低分子フラクタンの研究が盛んになりつつあり、著者もまたユリ科植物タマネギのフラクト・オリゴ糖に関する研究を行い<sup>100)</sup>、2種の三糖を単離し、その構造を調べ、それらが 1-kestose と neokestose であることを明らかにした<sup>95,101)</sup>。

今日までに高等植物の根、塊根、塊茎、鱗茎、茎、柔かい木部、内胚葉、種子あるいは樹液中に天然に存在することが確かめられている三糖としてのフラクト・オリゴ糖には 1-kestose ( $1^F\text{-}\beta\text{-fructofuranosylsucrose}$ ), neokestose ( $6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosylsucrose}$ ) および 6-kestose ( $6^F\text{-}\beta\text{-fructofuranosylsucrose}$ ) がある (Table 1)。これら3種の三糖は単独あるいは共存して存在するが、6-kestose の存在しないユリ科植物で見られるように、ある程度種特異的に存在するようである。

より高重合のフラクト・オリゴ糖あるいはフラクタンとして、1-kestose の誘導体である  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_4$  sucrose がイネ科オオカニツリの塊根に<sup>82)</sup>、 $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_6$  sucrose (lycorisin) がヒガンバナ科ヒガンバナの鱗茎に<sup>69)</sup>、一つの 1-kestose の誘導体が同じくヒガンバナ科ハルユキノハナおよびナツユキノハナの鱗茎<sup>58)</sup>に見出されている。

Table 1. Occurrence of Trisaccharides in Higher Plants

Plant		1-kestose	Neokestose	6-Kestose	Literature
Compositae (キク科)					
<i>Helianthus tuberosus</i>	キクイモ	+	-	-	2, 14, 37
Gramineae (イネ科)					
<i>Lolium multiflorum</i>	ネズミムギ	+	+	±	11
<i>Arrhenatherum elatius</i>	オオカニツリ	+	+	+	11
<i>Hordeum sativum</i>	ハダカムギ	+	-	-	92
<i>Avena sativa</i>	オートムギ	-	+	+	87
Campanulaceae (キキョウ科)					
<i>Campanula rapunculus</i>	ヨーロッパ・ベルフラワー	+	-	-	10
Amaryllidaceae (ヒガンバナ科)					
<i>Leucojum vernum</i>	ハルユキノハナ	+	+	-	56
<i>Leucojum aestivum</i>	ナツユキノハナ	+	+	-	56
<i>Galanthus Elwessi</i>	オオユキノハナ	+	+	-	56
Liliaceae (ユリ科)					
<i>Asparagus cochinchinensis</i>	クサスギカズラ	-	+	-	113
<i>Allium Ceba</i>	タマネギ	+	+	-	11, 95, 101, 111
<i>Allium Porrum</i>	ニラネギ	+	+	-	11
<i>Allium victorialis</i>	ギョウジャニンニク	+	+	-	111
<i>Allium sativum</i>	ニンニク	-	-	-	111
<i>Allium tuberosum</i>	ニラ	+	+	-	111
<i>Allium fistulosum</i>	ネギ	+	+	-	111
<i>Tulipa silvestris</i>		+	trace	-	57
<i>Tulipa Clusiana</i>	レディ・チューリップ	+	-	-	57
<i>Ornithogalum nutans</i>		+	+	-	57
Salicaceae (ヤナギ科)					
<i>Populus tremuloides</i>	アメリカ・アスペン	+	-	-	78
<i>Populus grandidentata</i>	オオバキンドロ	+	-	-	78
Aceraceae (カエデ科)					
<i>Acer Saccharum</i>	ギンヨウカエデ	±	+	±	59
Hippocastanaceae (トチノキ科)					
<i>Aesculus hippocastanum</i>	ウマグリ	trace	-	+	64

また, neokestose 誘導体としては4種の  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose ( $m+n=9, 17, 25$ , および  $28$ ) がユリ科 *Polygonatum odoratum* DRUCE var. *japonicum* HARA の根茎に<sup>114)</sup>, 7種の  $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose ( $n=1, 2, 3, 4, 6, 7$  および  $8$ ) がユリ科 *Asparagus cochinchinensis* MERR. の塊根に<sup>113)</sup>, また一つあるいは二つの neokestose の誘導体がヒガンバナ科ハルユキノハナおよびナツユキノハナの鱗茎中<sup>58)</sup> に存在することが報告されて

いる。

このように, イヌリン型フラクタンは少なくともユリ科とヒガンバナ科で恐らく2群, 即ち 1-kestose 誘導体と neokestose 誘導体とに分類できるものと思われ, また両群のフラクタンはこれらの植物の種に応じて特異的に存在するようである。

以上述べた構造の糖の他に別構造のフラクト・オリゴ糖が存在することもまた知られている。即ち,  $\beta(2\rightarrow1)$  および  $\beta(2\rightarrow6)$  両結合で D-フラクトースが結合した糖

として  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^F\text{-}\beta\text{-fructofuranosylsucrose}$  [ $n=1$  (bifurcose) および 2] がイネ科ライムギの茎に<sup>89)</sup>, 同じく両結合を有する未確認構造の五糖類がハダカムギの胚乳に<sup>92)</sup>, さらにまた  $2^G, 6^G\text{-di-}\beta\text{-fructofuranosylsucrose}$  がオートムギに<sup>87)</sup> 見出されている。

今回研究対象として取上げたアスパラガス植物の炭水化物についての現在までの研究を述べる前にその植物学的性状<sup>86)</sup> について簡単に述べる。

アスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) はマツバウド, オランダキジカクシとも言い, ユリ科 (Liliaceae) に属する雌雄異株の宿根性植物であって, 地上部の莖葉は秋に枯死するが, 地下部はそのまま生存して翌年春に根株から食用とされる若茎を生ずる。地下部は地下茎と根に分けられる。地下茎は一般にいう地下茎とは若干異なっており, その側面部, 腹面部, とともに全面カワラ状に重った鱗片葉で覆われ, その最先端部には将来幼茎に生長する鱗芽群がついている構造の茎である。根は地下茎から多数発生している肉質の太いもので貯蔵根といわれ, これに繊細な吸収根を伴っている。根は土壤中の水分, 養分の吸収と, 鱗芽が発芽生長する際の養分の補給あるいは莖葉から輸送されてくる同化物質の貯蔵等を行うことができる。

アスパラガス若茎はホワイト・アスパラガスあるいはグリーン・アスパラガスとして生食および缶詰食品として賞用され, その有用性の故に食用部分の一般化学成分については食品および栄養化学的研究が大いになされたが, 炭水化物についての植物体各部における存在, 分布, あるいはその化学構造に関する研究は文献中にほとんど見出すことはできない。

唯, その根に存する低分子糖がほとんどシュクロース (全糖の約 77%) と還元糖 (全糖の約 20%) であるという知見<sup>86)</sup> があり, また高分子糖については, TANRET が<sup>112)</sup> “asparagose” と命名し, 後に SCHLUBACH ら<sup>88)</sup> が “asparagosin” と改名した非還元性フラクト・多糖の研究がある。TANRET はこの糖 [ $C_6H_{10}O_5$ ]<sub>10</sub> がイヌリンの約 1/3 の分子サイズをもち, フラクトースとグルコースを 93:7 の比で含み, 閉環構造をもつと考えたが, SCHLUBACH ら<sup>88)</sup> は分子中にアルドースを含むかどうかについては何も述べていない。従ってこの糖の正しい構造は未確定のままである。

前述のフラクタンやフラクト・オリゴ糖はフラクトシル転移を触媒する酵素によって合成されるが, まず微生物起源のインベルターゼの転移活性の研究について述

べる。

1950年に BACON と EDELMAN<sup>13)</sup> および BLANCHARD と Albon<sup>30)</sup> は, 酵母インベルターゼがシュクロースを加水分解する際に同時にオリゴ糖を生成することを初めて見出し, この酵素が加水分解活性の外に転移活性をも有することを明らかにした。それ以来種々の微生物, 即ち

yeast<sup>1,4,9,23,24,42,54)</sup>。

*Aspergillus flavus*<sup>23)</sup>

*Aspergillus niger*<sup>16-19,23)</sup>

*Aspergillus oryzae*<sup>12,23,42,65,66,76)</sup>

*Penicillium chrysogenum*<sup>23)</sup>

*Penicillium spinulosum*<sup>23,42)</sup>

*Verticillium albo-atrum*<sup>68)</sup>

*Claviceps purpurea*<sup>39)</sup>

など, についてインベルターゼによるフラクトシル転移と生成糖の研究がなされるようになった。その主なものを挙げると次のようである。

酵母インベルターゼの場合では, 高濃度のシュクロース・グルコース混合物との反応で二糖 6-O- $\beta$ -D-fructofuranosylglucose (確認), 1-O- $\beta$ -D-fructofuranosyl-D-fructose (推定) および 6-O- $\beta$ -D-fructofuranosyl-D-fructose (推定) が生成し (BELL と EDELMAN<sup>24)</sup>), 高濃度シュクロースとの反応ではこれらの糖類の他に 3種の三糖 1-kestose, neokestose および 6-kestose が生じ (BACON<sup>9)</sup>), さらに GROSS<sup>54)</sup> らは 1-kestose と neokestose, ALBON ら<sup>1)</sup> は 6-kestose (当時の名称で kestose) が生じたと報じている。

また *Aspergillus oryzae* 菌体抽出酵素とシュクロースとの反応の場合は 1-kestose (BACON ら<sup>12)</sup>) (KURASAWA ら<sup>65)</sup> も同一糖を単離し isokestose と名付けている) と nystose (KURASAWA ら<sup>66)</sup> の fungitetraose) が生ずることが確かめられた。

最近 DICKERSON<sup>39)</sup> は麦角菌 (*Claviceps purpurea*) の部分精製インベルターゼ ( $\beta$ -fructofuranosidase) とシュクロースとの反応で生じたオリゴ糖のメチル化物および TMS 化物の質量スペクトル分析を行い 1-kestose, neokestose の外に 6- $\beta$ -fructofuranosyl glucose, 6(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> glucose および 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose が生じたことを確認している。

一方, 高等植物のインベルターゼによるフラクトシル転移作用については, シュガービートのインベルターゼがシュクロースから二つのフラクト・オリゴ糖, 1-kestose と neokestose, を生成したという報告がある<sup>2)</sup>。

インペルターゼとシュークロース間のオリゴ糖生成反応の機構およびそれに関連する事項についてはいくつかの研究があるが<sup>4,9,31,32,41,80</sup>、それらについてははまだ明解な結論は得られていないようである。

一方、高等植物については加水分解活性をもたない fructosyltransferases に関する研究が大いに進展した。1950年と1951年に EDELMAN と BACON<sup>44,45</sup> はキクイモ (*Helianthus tuberosus* L.) の塊茎から調製した一酵素は加水分解活性がなく、イヌリンおよびその関連多糖からシュークロースへのフラクトシル転移を触媒し、三糖 1-kestose およびその同族フラクト・オリゴ糖を生成することを初めて報告した。

同じ頃 (1952年)、DEDONDER は<sup>38</sup> キクイモ塊茎中にシュークロースからフラクト・オリゴ糖を生成する酵素を見出し、これがみかけ上 HESTRIN ら<sup>61</sup> のバクテリアから分離した levansucrase と類似の作用を持つことから inulosucrase と名付けたが、詳しい報告はない。

その後、この型の fructosyltransferases が種々の植物、即ち

- キクイモ (*Helianthus tuberosus* L.) の塊茎<sup>38,46,47,91</sup> および茎<sup>38</sup> *Polianthus tuberosa* の塊茎<sup>29</sup>
- チコリー (*Chicorium intybus* L.) の根<sup>106,107</sup>
- タマネギ (*Allium Cepa* L.) の鱗茎<sup>90,91</sup>
- レタス (*Lactuca sativa* L.) の leaf midvein-petiol の組織<sup>23</sup> およびリュウゼツラン (*Agave vera cruz* MILL.) の茎<sup>27,28,40,83~85</sup>

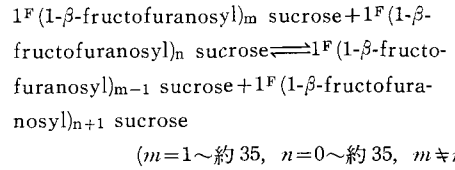
について EDELMAN と彼の協同研究者、インドの研究グループ、および他の人々によって研究された。

EDELMAN と JEFFORD は<sup>49</sup>、彼らのキクイモ<sup>44~47,90,91</sup> およびタマネギ<sup>90,91</sup> に関する研究に基づいて、イヌリン系列のオリゴ糖および多糖の生合成系路について総説し、この総説の中で彼らはキクイモの抽出液から部分精製した二つの酵素、即ち sucrose: sucrose 1-fructosyltransferases (SST) と  $\beta(2 \rightarrow 1)$  fructan:  $\beta(2 \rightarrow 1)$  fructan 1-fructosyltransferase (FFT), がこの生合成に関与するという説を提示した。

それによると SST はシュークロースからの 1-kestose の合成を特異的且不可逆的に触媒し、生ずる 1-kestose はその後の代謝における重要な中間物となる。しかし、この酵素はより高次のフラクト・オリゴ糖やポリフラクタンを合成することはできない。

一方、FFT は一般に下記の反応を触媒しより高次のイヌリン系列の糖を生成する外、二つの同一糖 ( $m=n=$

1~7) 間の“自己転移”を触媒してもとの基質の重合度よりもより大およびより小の範囲にわたる一連のポリマーを合成する。



即ち、キクイモの塊茎では、先ず SST によりシュークロースから 1-kestose が生成され、次いで FFT によりこの 1-kestose のフラクトシル基が受容体糖シュークロースあるいは  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n \text{ sucrose}$  へ転移され、順次重合度が増加して行き、ついには種々のより高次のフラクタンが合成されるという説である。

これとは別に彼ら<sup>49,90</sup> はタマネギ鱗茎にも基本性質でキクイモ SST と FFT に類似する酵素が存在するが、タマネギ FFT はキクイモのそれとは異なり重合度の高いフラクタンを生成せず、別の性質として 1-kestose を neokestose に変換する触媒機能をもつらしいと述べている。

SST 活性をもつ酵素はチコリー<sup>107</sup>、レタス<sup>33</sup>、およびリュウゼツランで<sup>28,83</sup>、また、FFT 活性を示す酵素はリュウゼツラン<sup>84,85</sup> でも報告されている。

最近インドの研究者達<sup>40,83~85</sup> はリュウゼツラン茎の抽出液から硫酸処理、次いで DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーにより部分精製して得た加水分解活性のない一つの“transferase”画分を用いてフラクト・オリゴ糖とフラクタンの生合成を研究し、この画分が 1-kestose, neokestose, さらに分枝および 6-kestose 系列の糖を生ずるらしいと報じた。

しかし、上記の各研究者が調製して使用した全ての SST および FFT の純度には問題が残されており、例えばごく最近 (1976年) 行われた SATYANARAYANA の研究<sup>85</sup> でさえも、彼自身が述べているように彼の得た transfructosylase 画分には分離不能の少くとも 3種の fructosyltransferases が存在していたと言う。従って種々の fructosyltransferases の作用を明確にするためにはまず酵素の高度精製が先決問題であるようである。

最後に多糖類合成における糖ヌクレオチドの関与の問題があり、一般に多糖類は、レバンおよびデキストランの場合<sup>41</sup> を除いて、糖ヌクレオチドを経由して合成されることが知られているが、この点については僅かに GONZALEZ ら<sup>53</sup> および梅村ら<sup>116</sup> がそれぞれダーリアあるいはキクイモの抽出液から UDP-fructose を検出

したと言う報告がある程度で、糖スクレオチドのフラクタン生合成への関与は現在のところ何も明らかにされていない。

## 第1章 フラクト・オリゴ糖含量の季節的变化

フラクタンを蓄積する植物が発芽、生育する際に、貯蔵組織ではフラクトース重合体の含量変化が起きる。これについてはタマネギ鱗茎<sup>100)</sup>、キクイモ塊茎<sup>15,63)</sup>およびチコリー<sup>25)</sup>の根等で調べられているが、アスパラガスではその例はない。

従って、ここではアスパラガスの根について個々のフラクト・オリゴ糖がどのような季節的量的変動を示すかを明らかにするための実験を行った。

### 1. 材料と方法

材料：前年4月下旬～6月下旬まで若茎を収穫し、その後収穫を休止して圃場に残留してあったアスパラガス植物の根を北海道大学農学部附属農場で1979年4月17日、5月10日、6月12日、6月30日、7月12日、8月2日、8月21日、9月12日および10月15日の計9回に亘り採取し、直ちに熱アルコール抽出した。

定量分析：全ヘキソース量はアンスロン法<sup>70)</sup>により定量した。

ペーパークロマトグラフィー(PC)：東洋濾紙 No. 50 を用い、溶媒系は (I) 1-プロパノール-酢酸エチル-水 (7:1:2) と (II) 1-プロパノール-酢酸エチル-水 (6:1:3) を用いた。糖の検出にはアニジジンリン酸<sup>71)</sup> およびアルカリ性硝酸銀試薬<sup>115)</sup> を用いた。

糖の抽出：各時期に採取したアスパラガス根各々約100gを細かく切り、その10gを少量の炭酸カルシウムを含む70%エタノール(60ml)中で、還流冷却下20～30分間煮沸した。これを濾過し、残渣は乳鉢で磨砕し、70%エタノール中で再度煮沸抽出した。この操作を濾液がアンスロン呈色を示さなくなるまで繰返した。濾液を合せ(約1ℓ)、30～35°Cで減圧濃縮(約50ml)し、30%酢酸鉛液(2ml)を添加し、生じた蛋白沈澱を十分に洗滌しながら濾去し、上澄液に3%シュウ酸ナトリウム液(2ml)を加え、沈澱を十分に洗いながら濾去し、濾液について、アンスロン法により全ヘキソース量を測定した。残りの糖液は、減圧濃縮後、マスPCを行い、単、二、三、四、五、六、七糖および八糖以上の糖をペーパから水抽出し、全ヘキソース量を測定した。

## 2. 結果と考察

10月15日採取アスパラガス根からの熱アルコール抽出糖についてPCを行ったところ Fig. 1 に示すように一連のフラクト・オリゴ糖が観察された。標準糖の移動度との比較から、各スポットの糖は上から順にフラクトースとグルコースの混合物、シュークロース、三、四、五、六、七、……、重合度と推定された。これらの中、単糖フラクトースおよびグルコース以外に、最低重合度糖としてシュークロースが存在していた。また最高分子の糖はPC図から推定すると重合度約15の糖であり、その量はかなり少ないようであった。このことは重合度22～38のインスリンを高割合で含むキクイモの場合<sup>49)</sup>とはかなり炭水化物組成が異なることを示していた。

次に、全ヘキソース量およびマスPCにより単離した各重合度糖の定量を行い、それらの季節的消長を調べその結果を Table 2 および Fig. 2 に示した。

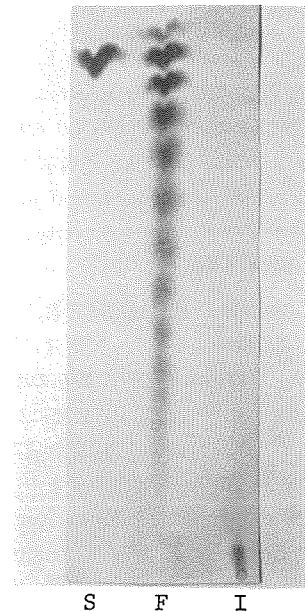


Fig. 1. Paper Chromatography of Fructo-oligosaccharides in Asparagus Roots Harvested in October.

F: Asparagus fructo-oligosaccharides; S: sucrose; I: inulin.

Solvent: (II) 1-propanol-ethylacetate-water (6:1:3). Development: quintuple.

Spray reagents for sugar detection: silver nitrate after spraying with yeast  $\beta$ -fructofuranosidase.



Table 2. Seasonal Changes of Carbohydrates in Asparagus Roots

Saccharide	Carbohydrate content (g as hexose/100 g of fresh wt.) in the roots harvested in								
	Apr.	May	June (early)	June (late)	July	Aug. (early)	Aug. (late)	Sept.	Oct.
Mono-	0.80	0.21	0.31	0.51	0.64	0.85	0.48	0.55	0.30
Di-	1.21	0.79	1.02	0.88	0.72	0.61	1.69	1.63	1.37
Tri-	0.89	0.66	0.78	0.68	0.53	0.37	1.28	1.46	0.93
Tetra-	1.13	0.85	0.96	0.68	0.58	0.34	0.89	1.24	1.08
Penta-	1.02	0.90	1.05	0.82	0.54	0.34	0.59	1.05	1.07
Hexa-	1.31	1.46	1.00	0.79	0.56	0.32	0.40	0.93	1.05
Hepta-	1.35	1.53	1.08	1.07	0.73	0.32	0.43	0.78	0.91
Higher-	2.50	2.48	2.27	2.41	2.21	1.09	1.44	1.59	2.31
Total	10.21	8.88	8.47	7.84	6.51	4.24	7.20	9.23	9.02

Details of the experiments are given in the text.

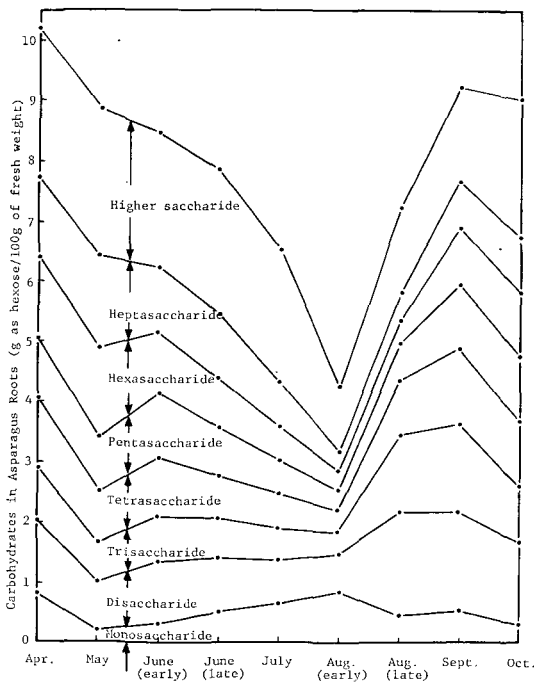


Fig. 2. Seasonal Changes of Carbohydrates in Asparagus Roots.

先ずこれらの結果は先のPC検索で示したことと同じように、高い重合度糖の含量は少なく、オリゴ糖が多いことを明らかにした。即ち4月期の根でみると、全糖に対する八糖以上の糖の割合は約25%しかなく、四〜七糖で約47%、一〜三糖で約28%であった。このことは、アスパラガス根抽出液とキクイモ塊茎からの抽出液につ

いて官能的に調べてみると、明らかに前者の方が糖臭が高く、さらさらした感覚を与えることからもうなづかれる。

次に各糖の変動を季節的にみてもみると、最も著しい現象は全糖が4月から急減し始め、8月上旬に最低含量(4月値の約42%)に達し、以後急増して4月値に近い含量に回復することであった。これと同様の傾向は5月における急減はあるものの単糖を除く他の全ての糖においても観察された。

唯一の例外である単糖では5月に一旦低下し、その後漸増して8月上旬の最高含量に達した後、漸減した。

二糖(シュクロース)と三糖では、同様五月の急低下はあるが総体的には4月から漸減し始め、8月上旬に最低値となり、その後急増して8月下旬に最高値に達した後9月まではほぼ同一水準を維持した。

四糖以上の糖での8月上旬の最低値へ向けての減少は二、三糖のそれよりも大であった。

以上のことは次のように解釈される。4月下旬〜6月下旬の収穫期即ち若茎形成期には根の貯蔵フラクトース重合体を分解し地上部に輸送する必要があり、そのため根中の糖含量が5月に急減するほか、7〜8月の茎葉形成期にかけても漸減し、遂には8月上旬の最低値にまで至る。また9〜10月の茎葉繁茂時期には根中へのフラクトース重合体の貯蔵期となるため、根中の糖含量は漸増する。

単糖含量における5月の急減は二糖以上の糖の加水分解を上廻るこの糖の輸送を示し、その後の漸増と8月上旬の最高値は加水分解が漸次卓越し、それに伴って二糖以上の糖の漸減が起るものと考えられる。

### 3. 要 約

アスパラガス根を4月から10月迄の間9回採取し、全糖および各重合度のフラクト・オリゴ糖の含量を測定することにより各糖の季節的変動を調べ、次のことを明らかにした。

アスパラガス根はキクイモ塊茎に比しオリゴ糖含量の多い糖組成をもつものであり、根中の貯蔵糖(単糖を除く各重合度および全糖)含量は、若茎形成期の5月に急減し、莖葉形成期の7~8月にかけてさらに漸減を続けて8月上旬に最低含量となるが、莖葉繁茂期の9~10月には漸増して、糖の貯蔵期に入る。また単糖は5月に急減の後、緩徐に増加して8月上旬に最高含量となり、その後漸減する。

## 第2章 フラクト・オリゴ糖の単離と同定

前章で述べたように、アスパラガス根にはグルコース、フラクトースおよびシュクロースの他に種々の重合度のフラクト・オリゴ糖が存在することを明らかにした。また前章には記していないが貯蔵根、地下茎および食用に供される幼茎について全糖および種々の重合度のフラクト・オリゴ糖の予備的定量を行ったところ、全糖含量は貯蔵根に最も多く、次いで地下茎、幼茎の順であり、またフラクト・オリゴ糖は貯蔵根に最も多く存在し、地下茎にも存在するが、幼茎には微量にしか存在しないことがわかった。従ってアスパラガスの貯蔵炭水化物の合成・分解を研究するためには貯蔵根が最も適した材料と考えられたので、この章に述べる研究ではこれを材料としてまず低分子フラクト・オリゴ糖についてキク科植物のそれと対比しつつ予備検索を試みた後、主研究で各重合度糖の単離・同定研究を行った<sup>103,104)</sup>。

### 1. 材料と方法

材料: アスパラガス根は、1971年5月上旬、北海道農業試験場農場(岩内所在)で収穫し、凍結保存しておいたものを用いた。

定量分析: 全ヘキソース、ケトースおよび還元糖は、各々アンソロン法<sup>70)</sup>、ROE法<sup>81)</sup>およびSOMOGYI-NELSON法<sup>72,108,109)</sup>により定量した。グルコースは市販品のGlucostat試薬で定量した。

ペーパーおよび薄層クロマトグラフィー(PCおよびTLC): PCには、東洋濾紙No. 50と溶媒として(I)1-プロパノール-酢酸エチル-水(7:1:2)、(II)1-プロパノール-酢酸エチル-水(6:1:3)と(III)ブタノール-酢酸-水(4:1:2)を用いた。

溶媒として(IV)ブタノール-イソプロパノール-水(10:5:4)を用いた。

TLCには、シリカゲル(Kieselgel-G, Typ 60)と溶媒として(IV)ブタノール-イソプロパノール-水(10:5:4)を用いた。

糖の検出には、アニリンフタレート<sup>75)</sup>、アニシジンリン酸<sup>71)</sup>およびアルカリ性硝酸銀試薬<sup>115)</sup>を用いた。

メチル化とメタノール分解: 分離したフラクト・オリゴ糖のメチル化は箱守法<sup>55)</sup>によって行った。糖20~50mgをdimethyl sulfoxide(DMSO)2mlに溶解し、窒素気流下で攪拌しておき、これにcarbanion溶液(sodium hydride 500mgをDMSO 5mlに加え、窒素気流下、50°Cで1時間攪拌して調製したもの)1.5mlを加え、20°Cで3~5時間攪拌した後、沃化メチル1mlを添加し、さらに15時間攪拌した。次いで反応液を水で稀釈し、クロロホルムで抽出した。抽出液は水洗後減圧濃縮し、メチル化物をシラップ状物として得た。このメチル化糖は1.5%メタノール塩酸中で92°C、5分間加熱することによりメタノール分解した。反応混液をAmberlite IR-120とIRA-410で処理して塩酸を除き、減圧濃縮し、乾固させた。

メタノール分解物のガスクロマトグラフィー(GC): メタノール分解物は少量のメタノールに溶解し、日立063型ガスクロマトグラフで、酸洗セライトと15%butane-1,4-diol succinate polyesterを充填したステンレスカラム(3mm×1m)を用い、窒素ガス流速40ml/minでGC分析した。

加水分解: (1)部分加水分解; フラクト・オリゴ糖30~50mgを0.05Nシュウ酸溶液5mlに溶解し、60°Cで15分間加熱した。(2)完全加水分解; フラクト・オリゴ糖3~5mgを0.1N塩酸溶液0.5mlに溶解し、100°Cで30分間加熱した。(3)酵素による加水分解; フラクト・オリゴ糖を3mgをyeast  $\beta$ -fructofuranosidase, Sigma VI, 2mgをMcIlvaine緩衝液(pH 5.5)1mlに溶かして調製した酵素溶液0.2ml中で30°C、15時間インキュベーションして加水分解した。

### 2. 結 果

#### (1) キク科およびユリ科植物のオリゴ糖

先ずキク科およびユリ科植物各々数種について含有する低分子フラクト・オリゴ糖の定性的予備検索を行った。

供試植物としてキク科植物のキクイモ(*Helianthus tuberosus* L.)の塊茎、ダーリア(*Dahlia pinnata* CAV.)の塊根、タンポポ(*Taraxacum officinale* WEBER)の根、およびゴボウ(*Arctium Lappa* L.)の根、そしてユ

Table 3. Oligo- and Poly-saccharides in Compositae and Liliaceae Plants

Plant	1-Kestose	Nystose	Inulin-like polysaccharide	Neokestose	6 <sup>G</sup> (1-β-Fructofuranosyl) <sub>2</sub> sucrose	1 <sup>F</sup> , 6 <sup>G</sup> -Di-β-fructofuranosylsucrose
<i>Helianthus tuberosus</i> L.	+	+	+	-	-	-
<i>Dahlia pinnata</i> CAB.	+	+	+	-	-	-
<i>Taraxacum officinale</i> Weber	+	+	+	-	-	-
<i>Arctium Lappa</i> L.	+	+	+	-	-	-
<i>Asparagus officinalis</i> L.	+	+	-	+	+	+
<i>Asparagus cochinchinensis</i> MERR.	+	+	-	+	+	+
<i>Asparagus pygmaeus</i> MAKINO	+	+	/	+	+	+
<i>Allium Cepa</i> L.	+	+	-	+	+	+

リ科植物のアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) の根, クサスギカズラ (*Asparagus cochinchinensis* MERR.) の根茎, タチテンモンドウ (*Asparagus pygmaeus* MAKINO) の根茎, およびタマネギ (*Allium Cepa* L.) の鱗茎を用いた。

次の節で詳しく述べる方法と同様の方法で糖を抽出し, 三糖および四糖画分を分離し, それらについて TLC および活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィー分析した。高重合度糖は PC (溶媒 (II)) 分析した。

分析の結果 (Table 3) から, キク科植物は三糖 1-kestose, 四糖 nystose, およびイヌリン様多糖を含み, ユリ科植物はこれらの三糖および四糖の外に異なる構造をもつ三糖, neokestose, および四糖, 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosylsucrose と 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose, を含むことがわかった。

この分析では五糖以上の高次糖については検索を行わなかったが, ユリ科植物には一連の 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 系列のオリゴ糖の存在が推定され, キク科植物の場合とは異なることがわかった。

## (2) オリゴ糖の単離と性質

### 1) 単 離

アスパラガス根 (4 kg) をよく洗浄後, 細かく切り, これを少量の炭酸カルシウムを含む 70% エタノール中 (10 ℓ) で還流冷却下煮沸抽出した。これを濾過し, 残渣を乳針で磨砕し, 70% エタノールで再度煮沸抽出し, この操作を合計 4 回繰返した。得られた抽出液を合せ, 30~35°C で 2 ℓ まで減圧濃縮し, これに塩基性酢酸鉛を添加後一夜放置した。沈澱を濾去した後, 濾液に硫化水素ガスを吹込み, 生じた沈澱を濾去した。濾液は 0.5 N 苛性ソーダで中和後, 減圧濃縮したところ糖液が得られ

た。この濃縮糖液の全ヘキソース含量は 162 g であった。

この糖液について活性炭—セライト (1:1, 塩酸中で加熱し, 十分に水洗したもの) カラム (7.5×72 cm) にかけて, 水 (15 ℓ), 10% エタノール (15.7 ℓ), 20% エタノール (6.2 ℓ), および 30% エタノール (10 ℓ) で順次溶出した。溶出した糖の乾物収量は, 水溶出区分 (Fr. I) は 54.2 g, 10% エタノール溶出区分は溶出順に 22.7 g (Fr. II), 23.2 g (Fr. III), および 15.2 g (Fr. IV), 20% エタノール溶出区分 (Fr. V) は 45.8 g, また 30% エタノール溶出区分 (Fr. VI) は 0.1 g であった。

Fr. III は TLC により三〜七糖を多く含むことがわかったので, この画分を同様の活性炭—セライトカラム (5.2×80 cm) に供し, 水洗後 10% エタノールで溶出し 12 のフラクション (Fr. 1~12) に分けた。糖の収量および PC および TLC で検出されたオリゴ糖を Table 4 に示した。

Fr. 2 および 4 は PC および TLC で単一スポットを示したので各々を 3 a および 4 a 糖と名付けた。両糖は調製用 PC (溶媒系 I) を繰返し行うことにより精製し, 3 a, 500 mg, と 4 a, 250 mg を得た。

Fr. 5, 8 および 12 は活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィー (4.5×70 cm カラム, 10%, 13% および 18% エタノール溶出) と反復調製 PC (溶媒 I) を行うことにより精製し, Fr. 5 の 10% エタノール溶出区分からは, 一つの三糖 (3 b, 400 mg), Fr. 8 の 10% エタノール溶出区分からは一つの五糖 (5 a, 80 mg), そして Fr. 12 の 13~18% エタノール溶出区分からは二つの五糖 (5 c, 50 mg と 5 d, 80 mg) を単離した。

Fr. 7, 9 および 11 からは反復調製 PC (溶媒系 I) により各々四糖 4 b, 150 mg, 五糖 5 b, 300 mg と四糖 4 c, 140 mg, を得た。

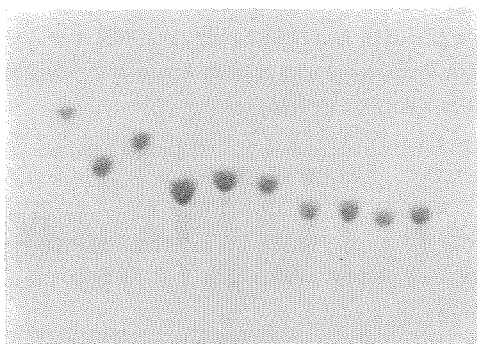
**Table 4.** Re-chromatography of Fraction III on a Carbon-Celite Column by Elution with 10% Ethanol

Fraction No.	Elution vol. (lit.)	Yield <sup>a</sup> (g)	Oligosaccharides detected in eluates <sup>b</sup>
1	3.0	1.82	[Glucose, fructose], sucrose
2	1.7	0.50	Trisaccharide (Saccharide 3 a)
3	0.5	0.05	Tri-, and tetra-saccharides
4	0.5	0.25	Tetrasaccharide (4 a)
5	1.1	1.13	Tri- (3 b), and tetra-saccharides
6	3.7	2.87	Tri-, and tetra-saccharides
7	0.6	0.20	Tetrasaccharide (4 b)
8	2.6	0.66	Tetrasaccharide; pentasaccharide (5 a)
9	3.8	1.10	Pentasaccharide (5 b)
10	4.6	0.84	Penta-, and hexa-saccharides
11	3.8	0.93	Tetra- (4 c), and hexa-saccharides
12 <sup>c</sup>	3.0	7.06	Tetrasaccharide; penta- (5 c and 5 d), hexa-, hepta-, and octa-saccharides

a On dry basis.

b Estimated by paper- and thin-layer chromatography.

c Eluted with 30% ethanol.



S 3a 3b 4a 4b 4c 5a 5b 5c 5d

**Fig. 3.** Thin-layer Chromatogram of Fructo-oligosaccharides Isolated from Asparagus Roots.

Conditions: solvent (IV), triple development. S; standard sugar, sucrose.

## 2) 性 質

単離した各重合度のオリゴ糖は Fig. 3 に示すように各々 TLC により均一であることが確かめられた。これらの糖類の若干の性質を Table 5 に示した。

各々の糖は還元力を示さず、酸あるいは酵母の  $\beta$ -fructofuranosidase により加水分解され、生成物は PC 分析によりグルコースとフラクトースであることがわかった。

各々の糖の重合度は各糖の酸加水分解生成物中のグルコースあるいはケトースに対する還元糖の比、PC にお

ける移動度、および FD-マススペクトロメトリーによって決定した。

以上により 3 a と 3 b 糖はグルコピラノース 1 モルと  $\beta$ -フラクトフラノース 2 モルからなる三糖、4 a, 4 b および 4 c 糖はグルコピラノース 1 モルと  $\beta$ -フラクトフラノース 3 モルからなる四糖、さらに 5 a, 5 b, 5 c および 5 d 糖はグルコピラノース 1 モルと  $\beta$ -フラクトフラノース 4 モルとからなる五糖であることがわかった。

次に各糖の構造を調べるために各糖を完全メチル化し、それらの加メタノール分解物の分析を試みた。各糖のメチル化物は次のような元素分析値を示し、それぞれ理論値とよく一致した。

	C %	H %
三 糖 3 a	53.24	8.41
三 糖 3 b	53.17	8.39
完全メチル化三糖 C <sub>29</sub> H <sub>54</sub> O <sub>16</sub> (理論値)	52.88	8.26
四 糖 4 a	53.31	8.27
四 糖 4 b	52.96	8.23
四 糖 4 c	53.08	8.11
完全メチル化四糖 C <sub>38</sub> H <sub>70</sub> O <sub>21</sub> (理論値)	52.89	8.18
五 糖 5 a	53.04	8.24
五 糖 5 b	53.51	8.22
五 糖 5 c	53.02	8.22
五 糖 5 d	53.09	8.14
完全メチル化五糖 C <sub>47</sub> H <sub>86</sub> O <sub>26</sub> (理論値)	52.90	8.12

次いで完全メチル化糖のメタノール分解物について GC 分析を行い (Fig. 7), 各メチルグリコシドのピーク

**Table 5.** Several Properties of Fructo-oligosaccharides Isolated from Asparagus Roots

Saccharide	$[\alpha]_D^{20}$ (°)	R <sub>s</sub> - value <sup>a</sup>	Reducing power	Molar ratio in hydrolyzate <sup>b</sup>		FD-MS <sup>c</sup> [M+Na] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	D. P. <sup>d</sup>
				Reducing sugar /Glucose	Reducing sugar /Ketose		
3 a	+30.4	0.61	Nil	2.98	1.48	527	3
3 b	+20.5	0.64	Nil	3.03	1.51	527	3
4 a	+7.9	0.42	Nil	4.12	1.33	689	4
4 b	+2.4	0.42	Nil	4.16	1.30	689	4
4 c	+4.5	0.40	Nil	4.05	1.33	689	4
5 a	-4.9	0.25	Nil	5.06	1.20	851	5
5 b	-7.8	0.25	Nil	5.10	1.26	851	5
5 c	-5.2	0.25	Nil	5.03	1.25	851	5
5 d	-6.6	0.25	Nil	4.95	1.23	851	5

a Relative R<sub>r</sub>-values (R<sub>r</sub>=value of sucrose=1, solvent system I, double development).

b Products obtained by the complete acid hydrolysis.

c FD-mass spectra are shown in Fig. 4-6.

d Degree of polymerization.

の相対保持時間を Table 6 に示した。これらのデータの検討には著者<sup>95)</sup> および ASPINALL<sup>6)</sup> の研究をも参考にした。

### (3) 単離オリゴ糖の同定

#### 1) 1-Kestose, nystose および 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose の同定

3 a, 4 a および 5 a 糖メチル化物のメタノール分解物のすべてからは methyl-2, 3, 4, 6-tetra-*O*-methyl glucoside (T: 相対保持時間, 1.03, 1.44), methyl-3, 4, 6-tri-*O*-methylfructoside (T, 2.69, 3.98) および methyl-1, 3, 4, 6-tetra-*O*-methyl fructoside (T, 1.03, 1.26) に相当するピークが検出された。従って 3 a 糖は 1<sup>F</sup>- $\beta$ -fructofuranosylsucrose (1-kestose), 4 a 糖は 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose (nystose) さらに 5 a 糖は 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose であることが確認された。

#### 2) Neokestose の同定

3 b 糖の場合には, methyl-2, 3, 4-tri-*O*-methyl glucoside (T, 2.50, 3.53) と methyl-1, 3, 4, 6-tetra-*O*-methyl fructoside (T, 1.04, 1.26) に帰せられる四つのピークが観察されたことから, この糖は 6<sup>G</sup>- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose (neokestose) であることが確認された。

#### 3) 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -Fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 系列糖 5 種の同定

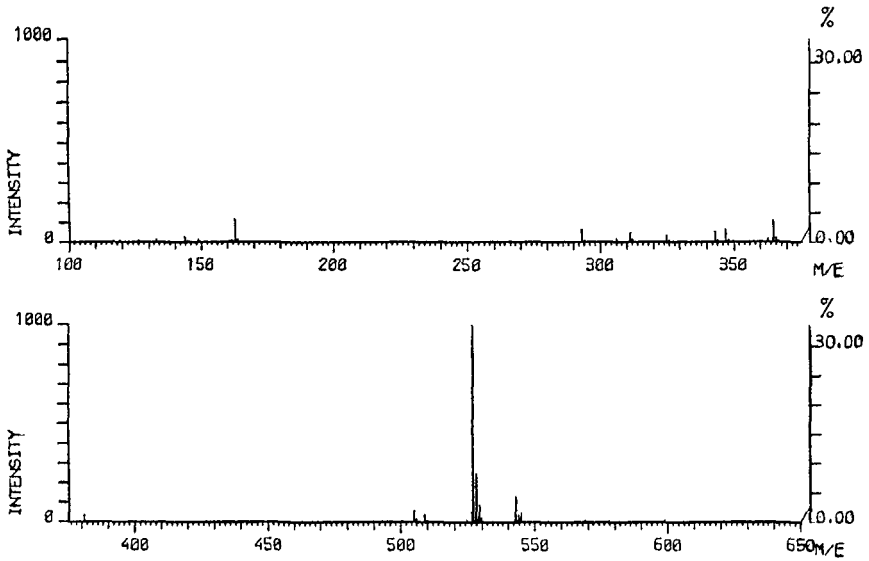
オリゴ糖 4 b, 4 c, 5 b, 5 c および 5 d の場合には, 各々 3 b 糖で検出された四つのピークの他に, methyl-3,

4, 6-tri-*O*-methyl fructoside (T, 2.67, 3.96~3.97) に相当する二つのピークが検出され, なおこの場合 T, 2.67 のピークには methyl-2, 3, 4-tri-*O*-methyl glucoside に相当する肩ピーク (T, 2.50) を伴うことがわかった。従ってこれらの五つの糖は全て neokestose の誘導体と推定された。

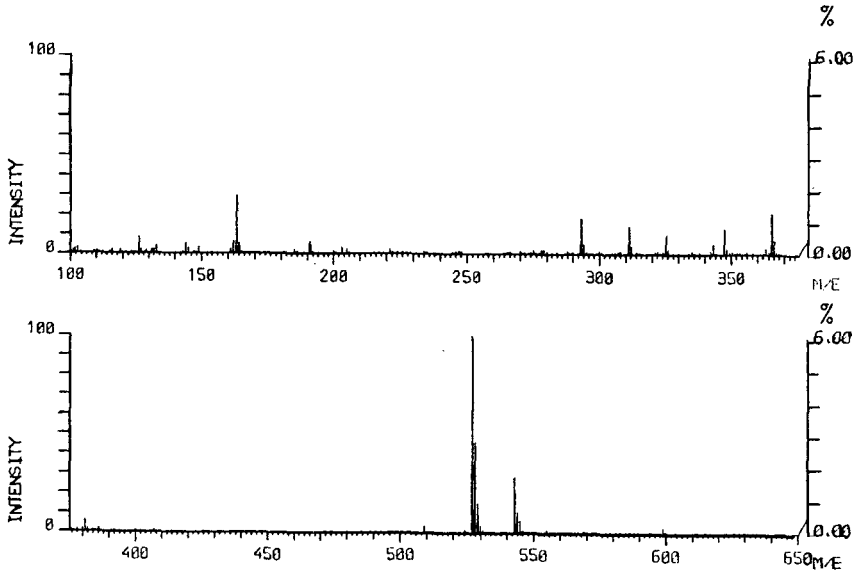
そこで, これらの糖の構造を明らかにするために, 各糖を 0.05 N シュウ酸中, 60°C, 15 分間加熱し, 部分加水分解した。この時比較のために, 1-kestose, neokestose, そして先に構造確認した 5 a 糖もまた同一条件下で加水分解した。これらの部分加水分解生成物について展開溶媒 III を用いて PC 分析したところ, グルコース, フラクトースおよび還元性オリゴ糖は硝酸銀試薬で濃色呈色し, シュクロースや非還元性と推定されるオリゴ糖は僅かに呈色した。また供試した糖の加水分解生成物は全て No. 1, 2 および 3 の三つのスポットを与えたが, これらはそれぞれフラクトース, グルコースおよびシュクロースに相当するものであった (Fig. 8)。

No. 1~3 以外の No. 4 から No. 9 のスポットはペーパーから切りとり, 水で抽出後, 各抽出糖について還元力, グルコースおよびケトース分析を行った (Table 7)。

Fig. 8 および Table 7 により検討すると, 4 b, 4 c, 5 b, 5 c および 5 d 糖から生じた No. 4 の還元性糖は, 標準糖 neokestose から生じた No. 4 スポットが明らかに 6- $\beta$ -fructofuranosyl glucose であることから, 6- $\beta$ -fructofuranosyl glucose であることが確かめられ,

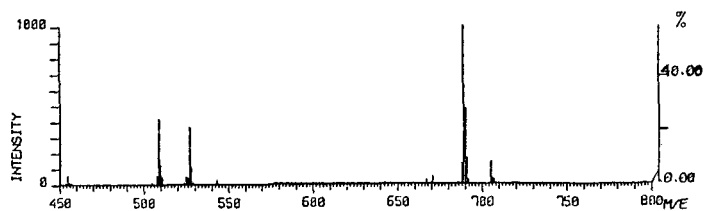
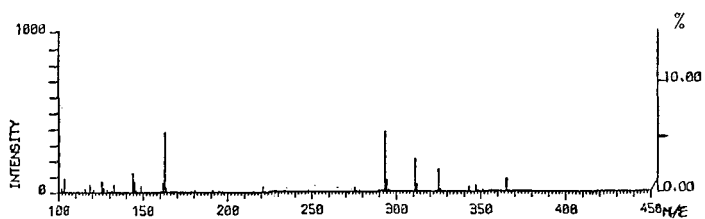


1-Kestose (3a)

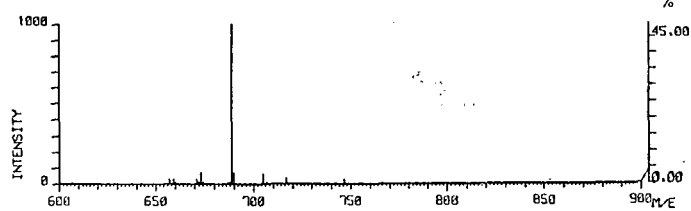
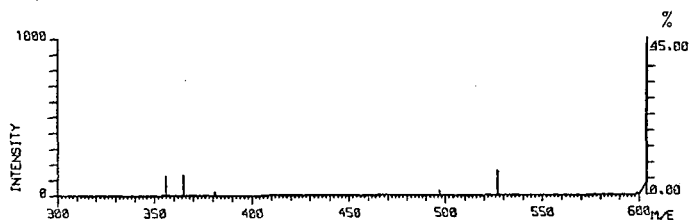


Neokestose (3b)

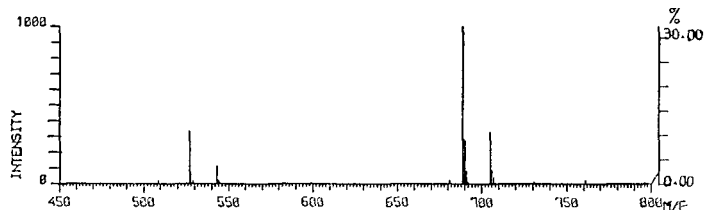
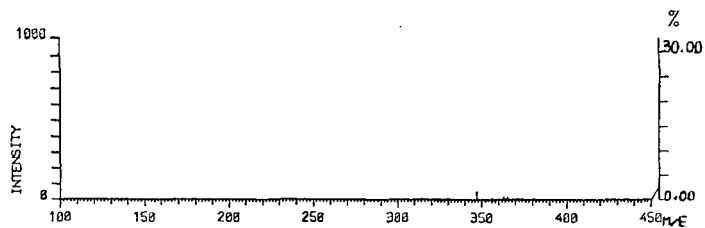
Fig. 4. FD Mass Spectra of Trisaccharides from Asparagus Roots.



Nystose (4a)



$6^G(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_2\text{sucrose (4b)}$



$1^F,6^G\text{-Di-}\beta\text{-fructofuranosylsucrose (4c)}$

Fig. 5. FD Mass Spectra of Tetrasaccharides from Asparagus Roots.

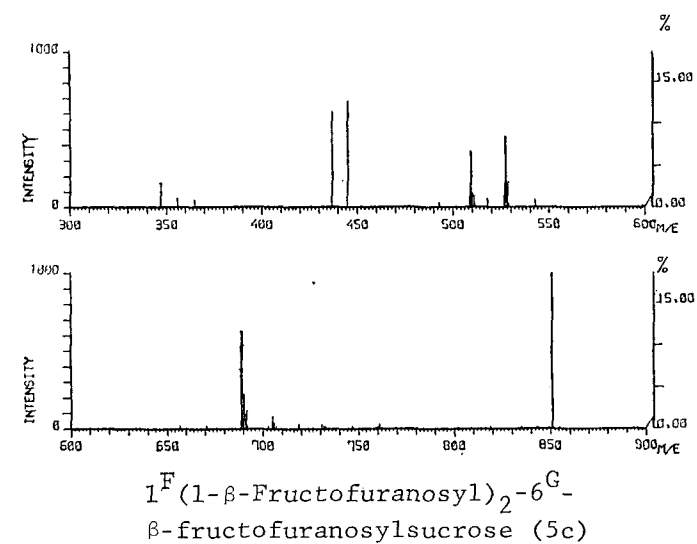
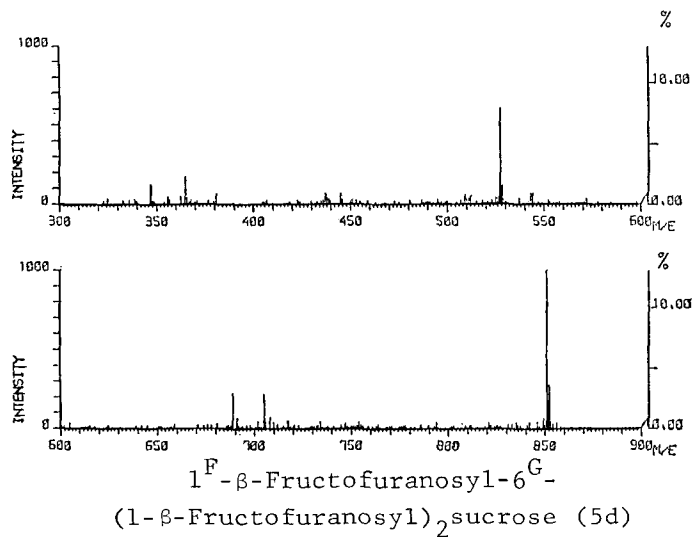
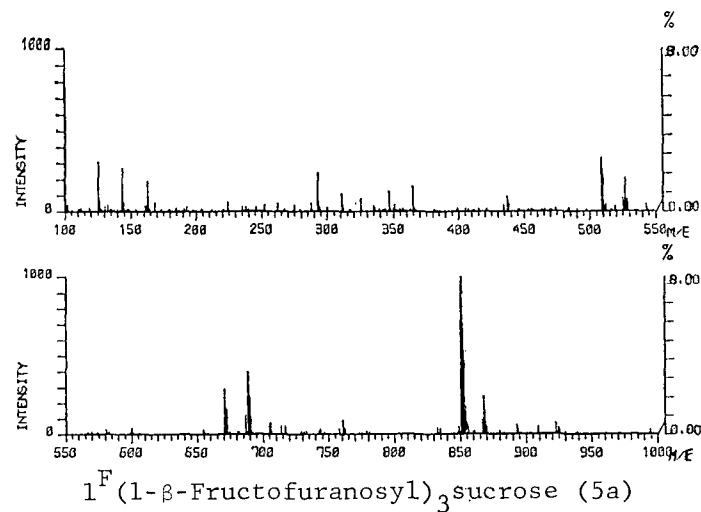
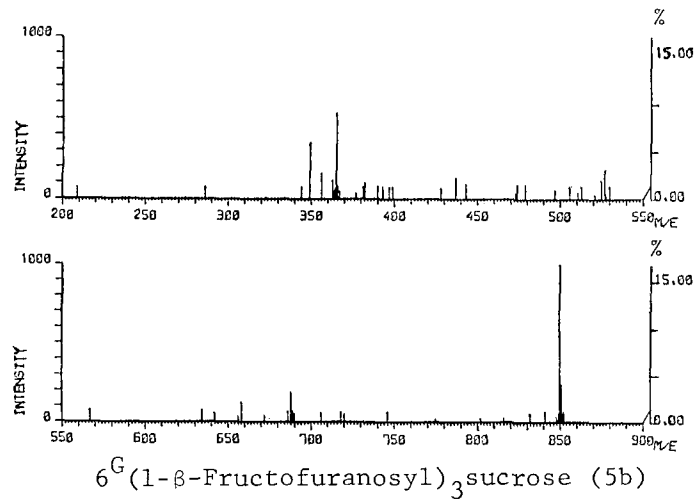


Fig. 6. FD Mass Spectra of Pentasaccharides from Asparagus Roots.



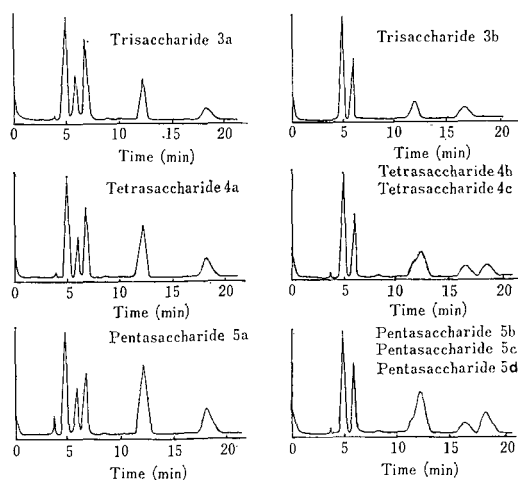
**Table 6.** Gas-liquid Chromatographic Analysis of Methanolizates of Permethylated Fructo-oligosaccharides

Methanolizate from	Relative retention time <sup>a</sup>						
Saccharides 3 a, 4 a and 5 a	1.03	1.26	1.44	—	2.69	—	3.98
Saccharide 3 b	1.04	1.26	—	2.50	—	3.53	—
Saccharides 4 b, 4 c, 5 b and 5 c	1.05	1.26	—	2.50	2.67	3.52	3.96
Saccharide 5 d	1.05	1.26	—	2.50	2.67	3.56	3.97
Sucrose <sup>b</sup>	1.03	1.26	1.43	—	—	—	—
1-Kestose <sup>b</sup>	1.03	1.26	1.44	—	2.65	—	3.96
Neokestose <sup>b</sup>	1.04	1.26	—	2.50	—	3.53	—
Methyl-2, 3, 4, 6-tetra- <i>O</i> -methyl- $\beta$ -D-glucoside <sup>c</sup>	1.00	—	—	—	—	—	—
Methyl-2, 3, 4, 6-tetra- <i>O</i> -methyl- $\alpha$ -D-glucoside <sup>c</sup>	—	—	1.42	—	—	—	—

a Retention time of methyl-2, 3, 4, 6-tetra-*O*-methyl- $\beta$ -D-glucoside=1.

b 1-Kestose and neokestose were previously isolated from onion bulbs<sup>(95)</sup>.

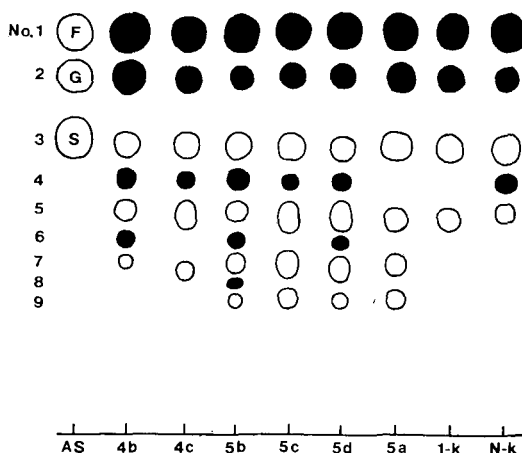
c Two reference methylated sugars were prepared from  $\beta$ - and  $\alpha$ - methyl glucosides, respectively.

**Fig. 7.** Gas-liquid Chromatograms of Methanolizates of Permethylated Fructo-oligosaccharides.

Conditions: see text.

またこのことはケトース：グルコースのモル比（約1:1）およびケトース：還元糖のモル比（約1:1）によっても支持された。

4 b および 5 b 糖から生ずる No. 5 スポットは、標準糖 neokestose からの No. 5 スポット（未反応の neokestose）の  $R_s$  値に一致することとケトース：グルコースのモル比（約2:1）を与えることから neokestose と

**Fig. 8.** Paper Chromatogram of Partial Acid Hydrolyzates of Oligosaccharides Isolated.

Conditions: solvent (III), development, triple and ascending.

AS: standard sugars —F, fructose; G, glucose; and S, sucrose.

4 b, 4 c, 5 b, 5 c and 5 d: hydrolyzates of each of the isolated sugars. 1-k, N-k and 5 a: hydrolyzates of 1-kestose, neokestose and saccharide 5 a.

Black circles, highly reducing spots; white circles, faintly reducing spots.

**Table 7.** Properties of Partial Acid Hydrolyzates of Oligosaccharides

Compound No.	R <sub>S</sub> -value <sup>a</sup>	Molar ratio									
		Ketose/Glucose <sup>b</sup>					Ketose/Reducing sugar <sup>b</sup>				
		4 b	4 c	5 b	5 c	5 d	4 b	4 c	5 b	5 c	5 d
4	0.87	1.09	1.05	1.07	1.07	0.96	1.10	1.08	1.08	1.09	1.12
5	0.75	1.98	1.97	2.00	2.03	1.88	—	—	—	—	—
6	0.66	1.99	/	2.10	/	1.95	1.90	/	1.85	/	2.08
7	0.56	3.10	3.05	3.04	2.96	2.90	—	—	—	—	—
8	0.52	/	/	3.13	/	/	/	/	2.75	/	/
9	0.45	/	/	4.05	4.16	3.91	/	/	—	—	—

a Relative R<sub>F</sub>-values (R<sub>F</sub>-value of sucrose=1, solvent system III, triple development).

b Kestose and glucose were analyzed after hydrolysis of each of the compounds, whereas reducing sugars were measured without hydrolysis.

(—): Almostly non-reducing.

同定された。次に 4c, 5c および 5d 糖から生ずる No. 5 のスポットはケトース: グルコースのモル比 (約 2:1) を与えたが 1-kestose と neokestose にまたがる R<sub>S</sub> 値を与えたので, さらにこれを PC および TLC で精査したところ, これは neokestose と 1-kestose の混合物であることが確かめられた。

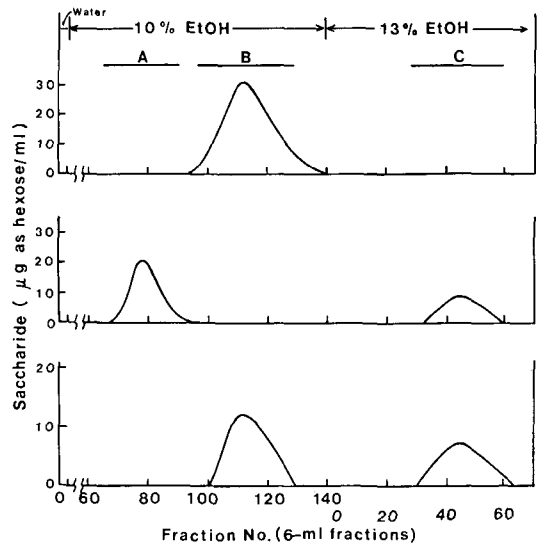
4b, 5b および 5d 糖からの No. 6 スポットはモル比で約 2 ケトース: 1 グルコースからなり, これを部分水解すると PC で No. 4 と同一の R<sub>S</sub> 値を与える糖を生じた。従って No. 6 糖は 6(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> glucose であることが証明された。

5b, 5c および 5d 糖からの No. 7 スポットの非還元性糖は, 未分解の 4b あるいは 4c 糖の R<sub>S</sub> 値とほとんど同一の R<sub>S</sub> 値を示したので, 活性炭-セライト (1:1) カラム (1.5×57 cm) を用いるクロマトグラフィーを行った。Fig. 9 に示す溶出パターンからわかるように 5b 糖からの No. 7 糖は 4b 糖に相当し, 5c 糖からの No. 7 糖は nystose と 4c 糖の混合物であり, 5d 糖からのそれは 4b 糖と 4c 糖の混合物であることが確かめられた。

5b 糖からの No. 8 スポットは, グルコース 1 モル, ケトース 3 モルからなる還元性四糖であり, これをさらに部分分解すると 6-β-fructofuranosyl glucose と 6(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> glucose が生じたことから, 6(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> glucose であることが確かめられた。

5b, 5c および 5d 糖からの No. 9 スポットはそれぞれ未分解の 5b, 5c および 5d 糖そのものであった。

以上の結果を取りまとめ, 各単離糖 4b, 4c, 5b, 5c および 5d の部分加水分解物中に同定した糖を Table 8



**Fig. 9.** Carbon-Celite Column Chromatograms of Tetrasaccharides Obtained by Partial Hydrolysis of Saccharides 5b, 5c and 5d.

I, II and III: tetrasaccharide fraction paper-chromatographically separated from the partial hydrolyzates of saccharides 5b, 5c and 5d, respectively. Carbon-Celite (1:1) column chromatography: 1.5 × 57 cm, successive elution with water (500 ml), 10% (840 ml) and 13% ethanol (600 ml).

Elution range of the reference sugars: (A) nystose, (B) 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose and (C) 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosylsucrose.

**Table 8.** Sugars Identified in Partial Acid Hydrolyzates of Oligosaccharides

	Sugars identified in partial acid hydrolyzates of				
	4 b	4 c	5 b	5 c	5 d
Monosaccharide	{ F G	F G	F G	F G	F G
Disaccharide	{ S 6-F-g	S 6-F-g	S 6-F-g	S 6-F-g	S 6-F-g
Trisaccharide	{ N-k 6-(F) <sub>2</sub> -g	N-k 1-k	N-k 6-(F) <sub>2</sub> -g	N-k 1-k	N-k 1-k 6-(F) <sub>2</sub> -g
Tetrasaccharide	{ —	—	6-(F) <sub>3</sub> -g 4 b	Ny 4 c	4 b 4 c

Remarks: F, fructose; G, glucose; S, sucrose; 1-k, 1-kestose; N-k, neokestose; Ny, nystose; 6-F-g, 6-β-fructofuranosylglucose; 6-(F)<sub>2</sub>-g, 6(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-glucose; 6-(F)<sub>3</sub>-g, 6(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> glucose.

に示した。

これに基づいて各単離糖の構造を検討してみると次のようになる。

1) 4 b 糖: 6-(F)<sub>2</sub>-g は 4 b 糖のシュークロース部のフラクトースが脱離したもの, neokestose は他の末端フラクトースがとれたもの, 6-F-g はシュークロース部のフラクトースと他の末端フラクトース両者が脱離して生じたもの, またシュークロースはシュークロース部の G-6 位結合フラクトース 2 分子が取れたものと解することが出来, 従って 4 b 糖は 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-sucrose であることが確められた。

2) 4 c 糖: この糖の場合は, 4 b 糖の場合の 6-(F)<sub>2</sub>-g が生ぜず 1-kestose が生ずることから, その構造は 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucrose であることが確められた。

3) 5 b 糖: 三糖までは 4 b 糖の場合と同一の糖が生じ, さらに四糖として 4 b 糖とシュークロース部のフラクトースが脱離して生じたと考えられる 6-(F)<sub>3</sub>-g が同定されたことから, この構造は 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub>-sucrose と確認された。

4) 5 c 糖: 三糖までは 4 c 糖の場合と同一の糖が生じ, さらに四糖として 4 c 糖とシュークロース部の G-6 位に結合したフラクトースが取れて生じたと考えられる nystose が確められたことから, この構造は 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>-β-fructofuranosyl sucrose であることを確認した。

5) 5 d 糖: 四糖として 4 b 糖と 4 c 糖が生じ, また

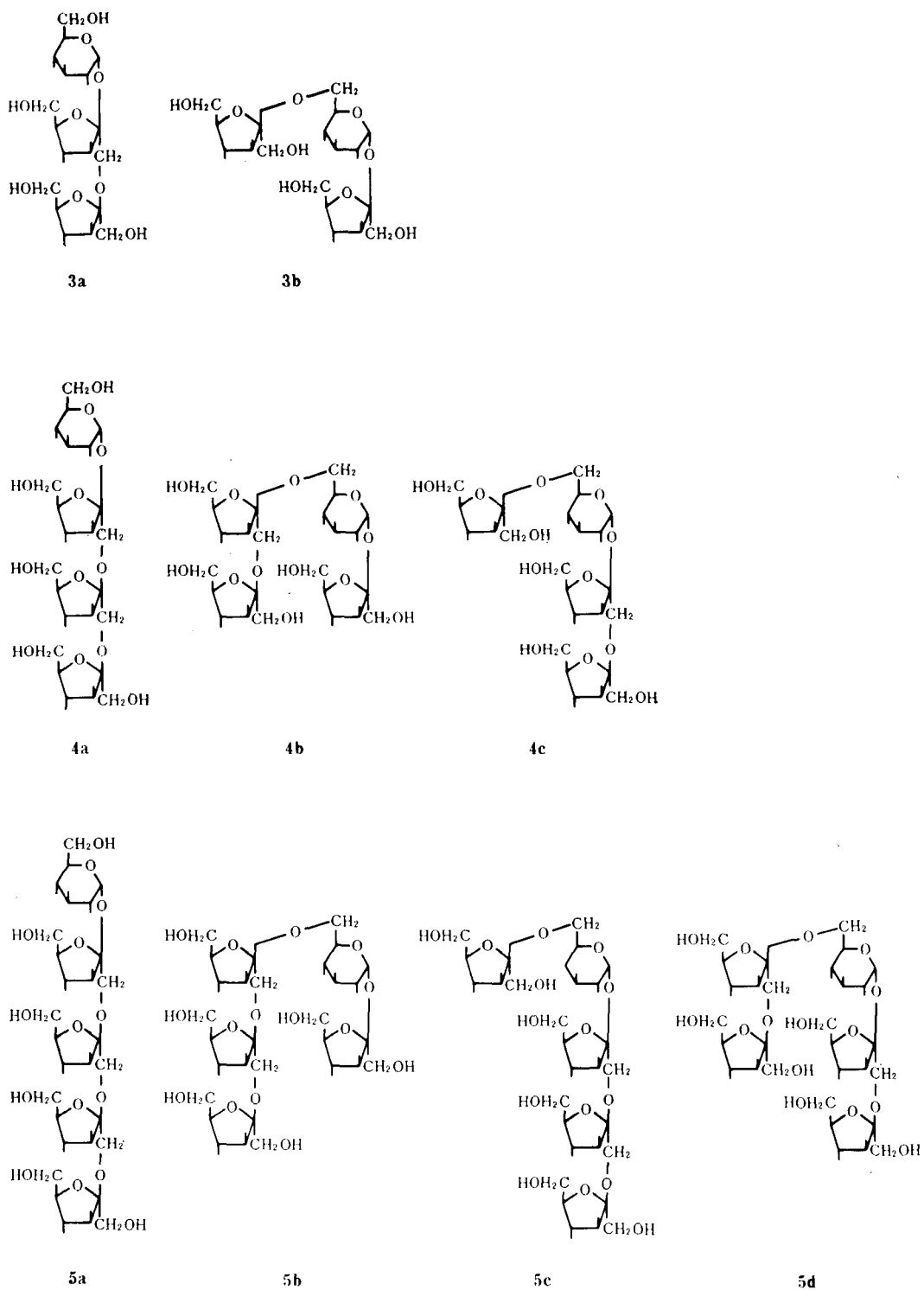
三糖として neokestose, 1-kestose および 6-(F)<sub>2</sub>-g を生ずることから, 明らかにこの糖は 1<sup>F</sup>-β-fructofuranosyl-6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose と確認できた。

最後に, 前述した 3 a, 3 b, 4 a および 5 a 糖をも含めてアスパラガス根から単離された九つのフラクト・オリゴ糖の構造を Fig. 10 に一括して示した。このうち二つの五糖, 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>-β-fructofuranosyl sucrose と 1<sup>F</sup>-β-fructofuranosyl-6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose, は現在までに報告されていない糖である。

### 3. 考 察

上に述べた単離・同定によって, アスパラガス根には三糖として 1-kestose と neokestose とを同定することができたが, 精査にもかかわらず 6-kestose は検出もできなかった。従って 6-kestose はアスパラガス根には存在しないものと考えられる。このことは著者<sup>95,101</sup>がタマネギで見出したことと一致し, また他の研究者が三糖について各種のユリ科植物〔クサスギカズラ<sup>113</sup>〕, タマネギ<sup>11,111</sup>〕, ニラネギ<sup>11</sup>〕, ギョウジャニンニク<sup>111</sup>〕, ニンニク<sup>111</sup>〕, ニラ<sup>111</sup>〕, ネギ<sup>111</sup>〕, レディ・チューリップ<sup>57</sup>〕, *Tulipa silvestris*<sup>57</sup>〕, *Ornithogalum nutans*<sup>57</sup>〕] で見出した結果とも一致した。

また 1-kestose 関連糖として四糖 nystose と五糖 1<sup>F</sup>-(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose, neokestose 関連糖として四糖 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose と 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucrose および五糖 6<sup>G</sup>(1-β-



**Fig. 10.** Structures of Asparagus Fructo-oligosaccharides.

fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose, 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>-β-fructofuranosyl sucrose と 1<sup>F</sup>-β-fructofuranosyl-6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose の存在を確かめたが、ここでも 6-kestose 関連糖は見出すことはできなかった。

従ってアスパラガスを含めたユリ科植物ではこのようなオリゴ糖組成を共通的特徴として持っているものと考えられる。

一方、単離した糖の中で、1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucrose は既にハルユキノホナ、ナツユキノホナ鱗茎中<sup>58)</sup>の存在が推定されていたものであるがその単離は今回初めてである。また、1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>-β-fructofuranosyl sucrose と 1<sup>F</sup>-β-fructofuranosyl-6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose は今迄に報告のない糖であった。

六糖以上の重合度の糖については十分な分析はできなかったが、恐らくアスパラガス根には 1-kestose および neokestose 関連の各種のオリゴ糖が存在し、その重合度は 10~15 どりであり、キクイモ塊茎の場合のような高重合度糖は存在しないものようであった。

#### 4. 要 約

アスパラガス根のエタノール抽出物から活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィーおよび調製ペーパークロマトグラフィーにより 9 種のフラクト・オリゴ糖を単離し、FD-mass, 構成糖, メチル化誘導体のガスクロマトグラフィー分析および酸および β-fructofuranosidase による加水分解生成物の分析によって、これらの糖はそれぞれ 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose [*n*=1 (1-kestose), 2 (nystose) および 3], 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose [*n*=1 (neokestose), 2 および 3], 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucrose, および 2 種の新五糖 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>-β-fructofuranosyl sucrose と 1<sup>F</sup>-β-fructofuranosyl-6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose, であることを確認した。

#### 第 3 章 フラクト・オリゴ糖の酵素的合成

高等植物におけるフラクト・オリゴ糖の生合成系については、例えば EDELMAN ら<sup>49)</sup>がキクイモの 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 系列の糖の生合成系について解明を行っているが、他の系列のフラクトオリゴ糖のそれについては高等植物界は勿論微生物界でもほとんど明らかにされていない。

前章で述べたように、アスパラガス根中には 1<sup>F</sup>(1-β-

fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose (*n*=1, 2 および 3)<sup>103)</sup> 系列糖の外に、6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose<sup>103)</sup> (*n*=1, 2 および 3) および 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose (*m*=1, *n*=1<sup>103)</sup>; *m*=2, *n*=1<sup>103)</sup> および *m*=1, *n*=2<sup>104)</sup>) 系列の糖もまた存在することが明らかとなったので、これらの糖の生合成系を解明することは意義あるものと考え、初段階の研究として次の実験を行った。まず第 1 に、アスパラガス根から硫酸分画沈殿によって調製した酵素の活性について調べ、第 2 にこの酵素標品を用いて上述のフラクト・オリゴ糖がシュクロース, 1-kestose および nystose から実際に合成されるか否かを合成糖の単離, 確認によって確かめ、第 3 にさらに合成の経時変化を調べることによりどのようなトランスフェラーゼが関与するかを確かめようとした。この章ではこれらの実験の経過と結果とについて述べることにする<sup>105)</sup>。

#### 1. 材料と方法

材料：アスパラガスの根は札幌近郊の実験圃場で、1974 年 10 月に採取し、直ちに凍結保存したものを使用した。

[U-<sup>14</sup>C] シュクロース (>350 mCi/mmol) は the Radio Chemical Centre, Amersham から購入し、[U-<sup>14</sup>C] 1-kestose (約 0.1 μCi/mg: 80 mg) と [U-<sup>14</sup>C] nystose (約 0.1 μCi/mg: 10 mg) はアスパラガス酵素標品を用いて [U-<sup>14</sup>C] シュクロース (0.1 μCi/mg: 1 g) から酵素的に合成した。放射性糖の PC および活性炭—セライトカラムクロマトグラフィー分析の際にはキャリア糖としてグルコース, フラクトース, シュクロースおよび先にアスパラガス根から単離<sup>103, 104)</sup>した 1-kestose, neokestose, nystose, および 4 b, 4 c, 5 a, 5 b, 5 c, 5 d 糖を用いた。

糖の定量分析：全糖, 還元糖およびグルコース量は前章で記載した方法に従った。

オリゴ糖の分析：単離したオリゴ糖のメチル化, メチル化糖のメタノール分解およびメタノール分解物の GC 分析, オリゴ糖の酸による部分加水分解, 酸およびインベルターゼによる完全加水分解, そして分解物の PC および TLC 分析は全て前章に記した方法を用いた。

活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィー：酵素により合成した糖の分離と分析のためには同一重合度をもつアイソマー糖の分離に有効であった活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィーを用いた。即ち、予め酸洗, 次いで水洗した活性炭—セライト (1:1) 混合物をカ

ラム (1.5×54 cm) に充填し、これに糖溶液を流し、水洗後、10%、13% および 20% エタノールで連続的に溶出し、溶出液は 6 ml ずつ分取した。また放射性糖の場合には適量のキャリア糖を糖溶液に添加した後クロマトグラフィーを行った。

放射能の測定：放射性糖の水溶液 (0.5~1.0 ml) は 2, 5-diphenyloxazole (0.3%, w/v), 1, 4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)] benzene (0.0023%, w/v) および Triton-X100 (25%, v/v) を含むトルエン溶液<sup>73)</sup> (10 ml) に溶かし、Aloka 液体シンチレーション・スペクトロメーター (モデル LSC 502) によって放射能を測定した。

酵素溶液の調製：アスパラガス根 (200 g ずつ、全量 1 kg) を予め水洗し、細断後、冷却した 0.05 M リン酸緩衝液、pH 7.0 (1 l) を加えミキサー中でホモジナイズした。ホモジネートを布で濾過し、濾液を遠心分離した (10,000×g, 15分; 特記しない限り以後もこの条件を用いた)。上澄は硫酸飽和し、5°C で静置して生ずる沈澱を遠心分離により集め、0.05 M リン酸緩衝液、pH 7.0, に溶かし、0.01 M リン酸緩衝液、pH 7.0, で 5 日間透析した。透析内液を遠心分離し、上澄液を“全飽和画分”と名付けた。

この画分中の酵素はさらに硫酸を用いて、“0~0.3”, “0.3~0.5”, “0.5~0.7” および “0.7~0.9 飽和画分” に分別沈澱させた。各画分を少量の 0.005 M リン酸緩衝液、pH 7.0, に溶解後、同一緩衝液で透析した。透析内液を遠心分離後、各上澄液について 3 種の fructosyltransferase の活性を測定した。

また、“0.3~0.5 飽和画分” はリン酸カルシウム・ゲル処理によりさらに精製した。即ちリン酸カルシウム・ゲル (10 g/蛋白 1 g) をこの画分に加え充分懸濁し、5°C で 30 分間放置した。これを遠心分離後、上澄液 [“0.3~0.5 飽和画分 (リン酸カルシウム)”] について、3 種の fructosyltransferase 活性を測定した。

1-Kestose あるいは nystose からのオリゴ糖の生成実験では上述の “0.3~0.5 飽和画分” を用いたが、シュークロースからのオリゴ糖の生成実験では別個にアスパラガス根 (2 kg) から “全飽和画分” を調製し、これを Amicon 限外濾過器 (PM-30 filter) で 50 ml に濃縮したもの (“濃縮全飽和画分”) を用いた。

酵素活性の測定：

SST 活性：SST 活性の 1 単位は下述の条件下で 1 時間にシュークロースからシュークロースへのフラクトシル転移を触媒し 1 μモルの 1-kestose を生ずる酵素量と定義した。

酵素活性の測定は次のようにして行った。酵素 (20 μl) と McIlvaine 緩衝液、pH 5.5, 中 0.2 M [U-<sup>14</sup>C] シュークロース (0.1 μCi, 20 μl) からなる混液 (混液 A) を 30°C で 1 時間インキュベートし、反応を 0.1 M 昇汞 (10 μl) の添加により止め、キャリア糖 (グルコース、フラクトース、1-kestose および nystose, 各々 1 mg) を反応混液に加え、これを濾紙にバンド状にぬりつけ 3 重展開 (溶媒 I) した。単糖、シュークロース、1-kestose および四糖以上の高次糖に相当するバンドを抽出して減圧下で蒸発乾固させた。生じた残渣は水 (1 ml) に溶かした後、その一部 (0.5 ml) について放射能を測定した。SST 活性は 1-kestose の放射能と回収した全放射能とから計算した。

1<sup>F</sup>-FT 活性：1<sup>F</sup>-FT 活性の 1 単位は下述の条件下で 1 時間に 1-kestose からもう一つの 1-kestose へのフラクトシル転移を触媒し 1 μモルの nystose を生成する酵素量、あるいは 1-kestose からシュークロースへのフラクトシル転移を触媒し、1 μモルの別の 1-kestose を生成する酵素量として定義した。

酵素活性の測定には次の二つの反応混液を用いた。混液 B：McIlvaine 緩衝液、pH 5.5, 中 0.2 M [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose (0.046 μCi, 20 μl) と酵素 (20 μl) からなる液；混液 C：McIlvaine 緩衝液、pH 5.5, 中 0.2 M 1-kestose と 0.2 M [U-<sup>14</sup>C] シュークロース (0.1 μCi, 20 μl) と酵素 (20 μl) からなる液。

混液 B および C を 30°C, 1 時間インキュベート後、0.1 M 昇汞 (10 μl) を加えて反応を止め、混液 B ではキャリア糖としてフラクトース、シュークロース、neokestose, nystose, および 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucrose の各々 1 mg を加え、混液 C では同様にシュークロースを除く全ての糖、各々 1 mg を加えた後、活性炭—セライトカラムクロマトグラフィー次いで PC にかけて、混液 B からは nystose, 混液 C からは 1-kestose を単離した。1<sup>F</sup>-FT 活性はこれらの単離糖の放射能と回収された全放射能とから計算した。

6<sup>G</sup>-FT 活性：6<sup>G</sup>-FT 活性の 1 単位は、1-kestose から他の 1-kestose へのフラクトシル転移を触媒し 1 時間に 1 μモルの 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucrose を生ずる酵素量、あるいは 1-kestose からシュークロースへのフラクトシル転移を触媒し 1 μモルの neokestose を生ずる酵素量と定義した。

上述の混液 B および C を 30°C, 1 時間反応させた後、上述と同様の方法で、混液 B からは 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucrose, 混液 C からは neokestose を単離

**Table 9.** Activities of SST, 1<sup>F</sup>-FT and 6<sup>G</sup>-FT in Fractions Obtained by Precipitation with Ammonium Sulfate

Fraction	Activity							Vol. (mℓ)	Total protein <sup>b</sup>
	A <sup>a</sup>		B <sup>a</sup>			C <sup>a</sup>			
	SST (U)	1 <sup>F</sup> -FT (U)	6 <sup>G</sup> -FT (U)	1 <sup>F</sup> -FT/6 <sup>G</sup> -FT (ratio)	1 <sup>F</sup> -FT (U)	6 <sup>G</sup> -FT (U)	1 <sup>F</sup> -FT/6 <sup>G</sup> -FT (ratio)		
0.0—1.0 <sup>c</sup>	202	2485	426	5.8	805	130	6.2	270	5670
0.0—0.3	11	156	37	4.2	63	12	5.3	38	543
0.3—0.5	141	1500	314	4.8	443	89	5.0	80	2130
0.3—0.5 (Ca-phosphate) <sup>d</sup>	46	428	160	2.7	117	39	3.0	100	418
0.5—0.7	4.1	201.0	10.8	18.6	74.3	3.5	21.2	50	672
0.7—0.9	0.3	18.0	0.5	36.0	— <sup>e</sup>	— <sup>e</sup>	— <sup>e</sup>	29	112

a Substrates employed: (A) [U-<sup>14</sup>C] sucrose; (B) [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose; and (C) [U-<sup>14</sup>C] sucrose and 1-kestose.

b As absorbance at 280 nm.

c Degrees of saturation with ammonium sulfate.

d "0.3-0.5 saturated fraction" treated with calcium phosphate gel.

e Unmeasurable.

して、それらの放射能を測定することにより酵素活性を算出した。

## 2. 結 果

### (1) 硫酸飽和画分の酵素活性

アスパラガス根 (1 kg) 抽出液から硫酸分別沈澱で得た六つの画分の各々について SST, 1<sup>F</sup>-FT および 6<sup>G</sup>-FT 活性を測定した。その結果を Table 9 に示した。

1<sup>F</sup>-FT 活性と 6<sup>G</sup>-FT 活性は、ほとんど全ての画分で SST 活性よりも高かったが、1<sup>F</sup>-FT の 6<sup>G</sup>-FT に対する活性比は同一でなく、画分ごとに異なっていた。このことは、両活性が同一酵素蛋白に由来するものではなく、それぞれが異なる酵素蛋白に由来していることを示唆していた。また、このことはリン酸カルシウム・ゲル処理前後の "0.3~0.5 飽和画分" における 1<sup>F</sup>-FT/6<sup>G</sup>-FT 値の変化によっても支持される、即ち混液 B では 4.8 から 2.7 へ、混液 C では 5.0 から 3.0 へと変化減少し、ゲル処理により 1<sup>F</sup>-FT 蛋白がより多く除去されることを示している。

### (2) シュークロースからの合成糖の単離と同定

#### 1) 単 離

フラクト・オリゴ糖の酵素的合成実験は次の方法で行った。

McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, 中 0.8 M シュークロース溶液 (50 mℓ) と Amicon 限外濾過器で濃縮した "全飽和画分" (50 mℓ) からなる混液を少量のトルエン存在下

で 30°C で 24 時間インキュベートし、反応を沸騰水中 5 分間加熱により止め、常法により塩基性酢酸鉛処理した後、濾過した。濾液は脱気し、0.5 N 水酸化ナトリウムで中和し、減圧下で濃縮して糖液を得た。

この糖液をカラムクロマトグラフィー [活性炭—セライト (1:1) 混合物 5.5×85 cm カラム] にかき、カラムを充分蒸留水で洗った後、10% エタノールと 20% エタノール (各 5 ℓ) で順に溶出を行い合成オリゴ糖の単離を行った。

10% エタノールで 3.6 ℓ~4.5 ℓ, 次いで 20% エタノールで 0~5 ℓ 部分に溶出される液をそれぞれ Amberlite IR-120 および IRA-410 イオン交換樹脂で脱塩した後、減圧下で濃縮し、凍結乾燥した。

10% エタノール溶出液からは PC および TLC で単一スポットを与える白色粉末 (1.08 g) が得られたので、これを 3 A 糖と名付けた。

20% エタノール溶出液からは白色粉末 (1.6 g) が得られたが、これは三、四、五、六および七糖の混合物であることがわかったので個々の糖を分離するために、調製 PC (溶媒 I) を行った。まず PC および TLC 的に単一である三糖が白色粉末 (428 mg) として得られたので、これを 3 B 糖とした。

さらに四、五および六 (あるいは七) 糖がそれぞれ白色粉末として 651, 154 および 107 mg 得られた。

そこでまず四糖粉末について四糖のアイソマーを単離するために、その一部 (325 mg) を上述と同様の方法で

活性炭—セライトカラムクロマトグラフィー (カラム 5.5×81 cm) にかき、水洗後10% エタノール (18 ℓ) で溶出し、9.4~10.6 ℓ および13.4~15.6 ℓ 部分の溶出液を採取し、次いで13% エタノール溶出を続け4.0~5.2 ℓ 部分の溶出液を集め、それぞれを減圧濃縮後凍結乾燥した。10% エタノール溶出液からは、4 A (112 mg) および4 B (78 mg) 糖と名付けた2種の糖が白色粉末として得られた。また13% エタノール溶出液からは白色粉末 (96 mg) が得られたので、これを4 C糖とした。これらの4 A, 4 B および4 C糖は全てPC およびTLC で均一であることが確認された。

なお、先に述べた五糖粉末 (154 mg, 5 X と名付ける) の精製については後述する。

## 2) 同 定

単離した3 A, 3 B, 4 A, 4 B および4 C さらに未精製糖の5 X糖は、Table 10 に示した分析データから、全

てグルコースとフラクトースからなる非還元性糖であること、また3 Aと3 B糖は三糖、4 A, 4 B および4 C糖は四糖、そして5 X糖は五糖であることが証明された。

さらに、これら糖のメチル誘導体のメタノール分解物のGC分析 (Table 10) によって、三糖3 Aは1-kestose、三糖3 Bは neokestose、四糖4 Aは nystose であることが確かめられ、一方四糖4 B および4 Cはともに neokestose の誘導体であることが推定された。

そこで、4 B および4 C糖を酸で部分加水分解し、分解産物をPC およびTLC 分析した。Table 11 に示すように、両糖分解物中にはグルコース、フラクトース、シュークロース、neokestose および6-β-fructofuranosyl glucose の五つの糖の外に、4 B糖の分解物からは6(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> glucose、4 C糖のそれからは1-kestose が見出された。このことは、4 B および4 C

Table 10. Analyses of Enzymatically Synthesized Oligosaccharides

Oligo-saccharide	R <sub>s</sub> -value <sup>a</sup>	Reducing power	Methyl hexoside <sup>b</sup>		Reducing sugar/ glucose in hydrolyzate <sup>c</sup>	D. P. <sup>d</sup>
			Methyl hexoside	Ratio of peak area Found Theoret.		
3 A	0.69	Nil	{ 2, 3, 4, 6-gul 1, 3, 4, 6-fru 3, 4, 6-fru	1.2 1.0 1.0 1.0 1.0 1.0	2.97	3
3 B	0.71	Nil	{ 1, 3, 4, 6-fru 2, 3, 4-glu	1.8 2.0 1.0 1.0	2.96	3
4 A	0.48	Nil	{ 2, 3, 4, 6-glu 1, 3, 4, 6-fru 3, 4, 6-fru	1.1 1.0 1.0 1.0 1.9 2.0	4.07	4
4 B	0.47	Nil	{ 1, 3, 4, 6-fru 2, 3, 4-glu 3, 4, 6-fru	2.3 2.0 1.0 1.0 0.9 1.0	3.89	4
4 C	0.45	Nil	{ 1, 3, 4, 6-fru 2, 3, 4-glu 3, 4, 6-fru	2.0 2.0 1.0 1.0 1.1 1.0	3.95	4
5 X	0.34	Nil	{ 2, 3, 4, 6-glu 1, 3, 4, 6-fru 2, 3, 4-glu 3, 4, 6-fru	2.3 — 1.0 — 2.2 —	5.12	5

a Relative R<sub>f</sub>-values [R<sub>f</sub> of sucrose=1; solvent system I for PC; quintuple development]. R<sub>s</sub>-values of the reference sugars previously isolated from asparagus roots: 1-kestose 0.69, neokestose 0.71, nystose 0.48 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose 0.34.

b Methyl hexosides found in the methanolizates from permethylates of oligosaccharides. Key: 2, 3, 4, 6-glu: Methyl-2, 3, 4, 6-tetra-O-methyl-D-glucoside,  
1, 3, 4, 6-fru: Methyl-1, 3, 4, 6-tetra-O-methyl-D-fructoside,  
3, 4, 6-fru: Methyl-3, 4, 6-tri-O-methyl-D-fructoside,  
2, 3, 4-glu: Methyl-2, 3, 4-tri-O-methyl-D-glucoside.

c Glucose and fructose were detected in the hydrolyzates obtained by acid or yeast β-fructofuranosidase.

d Degrees of polymerization.



**Table 11.** Paper- and Thin-layer-chromatographic Analyses of Partial Acid-hydrolyzates from Enzymatically Synthesized Saccharides

Oligosaccharide	R <sub>s</sub> -value <sup>a</sup>		Hydrolyzate of					
	PC	TLC	4 B	4 C	5 A <sup>d</sup>	5 B <sup>d</sup>	5 C <sup>d</sup>	5 D <sup>d</sup>
Fructose	1.38	1.12	+	+	+	+	+	+
Glucose	1.27	1.17	+	+	+	+	+	+
Sucrose	1.00	1.00	+	+	+	+	+	+
Neokestose <sup>b</sup>	0.73	0.78	+	+	-	+	+	+
1-Kestose <sup>b</sup>	0.72	0.71	-	+	+	-	+	+
6-β-Fructofuranosyl glucose <sup>c</sup>	0.86	0.87	+	+	-	+	+	+
6(1-β-Fructofuranosyl) <sub>2</sub> glucose <sup>c</sup>	0.63	0.63	+	-	-	+	-	+
6(1-β-Fructofuranosyl) <sub>3</sub> glucose <sup>c</sup>	0.47	0.49	-	-	-	+	-	-

a Relative R<sub>f</sub>-values (R<sub>f</sub> of sucrose=1) of the reference sugars.

PC: solvent III, quadruple development.

TLC: solvent IV, triple development.

b Isolated from asparagus roots.

c Prepared from partial acid-hydrolyzate of 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose.

d A spot (or spots) was also detected at R<sub>s</sub> 0.52~0.54 (PC).

**Table 12.** Carbon-Celite Column Chromatography of Oligosaccharides 4 B and 4 C

Oligosaccharide	Elution volume (mℓ)	
	10% Ethanol <sup>a</sup>	13% Ethanol <sup>a</sup>
Nystose <sup>b</sup>	390~510	—
4 B	575~810	—
6 <sup>G</sup> (1-β-Fructofuranosyl) <sub>2</sub> sucrose <sup>b</sup>	570~780	—
4 C	—	150~300
1 <sup>F</sup> , 6 <sup>G</sup> -Di-β-fructofuranosyl sucrose <sup>b</sup>	—	150~300

a The oligosaccharides 4 B and 4 C (2 mg each) were chromatographed on a carbon-Celite column (1:1; 1.5×54 cm) by successive elution with water (500 mℓ), 10% ethanol (840 mℓ) and 15% ethanol (500 mℓ).

b Reference sugars were isolated from asparagus roots.

糖がそれぞれ 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose および 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucrose であることを示唆したので、4 B および 4 C 糖を活性炭—セライトコラムクロマトグラフィーにかけ標準糖との溶出パターンを比較した結果 (Table 12) 確かに 4 B 糖が 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose, 4 C 糖が 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucrose であることを最終確認した。

一方、5 X 糖はそのメタノール分解物の GC 分析により 1-kestose と neokestose 両者の誘導体の混合物であることが推定された。何故ならメタノール分解物中に 1-kestose から誘導される三つの methyl hexoside の

他に neokestose に由来する methyl-2, 3, 4-tri-O-methylglucoside が見出されたからである (Table 10)。そこで 5 X 糖を活性炭—セライトコラムクロマトグラフィーにかけたところ四つの糖 5 A, 5 B, 5 C および 5 D に分離することができ、これらの糖の溶出位置と標準糖のそれと比較することにより 5 A 糖は 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose, 5 B 糖は 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose, 5 C 糖は 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>-β-fructofuranosyl sucrose であることが確認できた (Fig. 11)。また、このことは、5 A, 5 B および 5 C 糖の部分酸加水分解により遊離される糖を PC および TLC で調べ

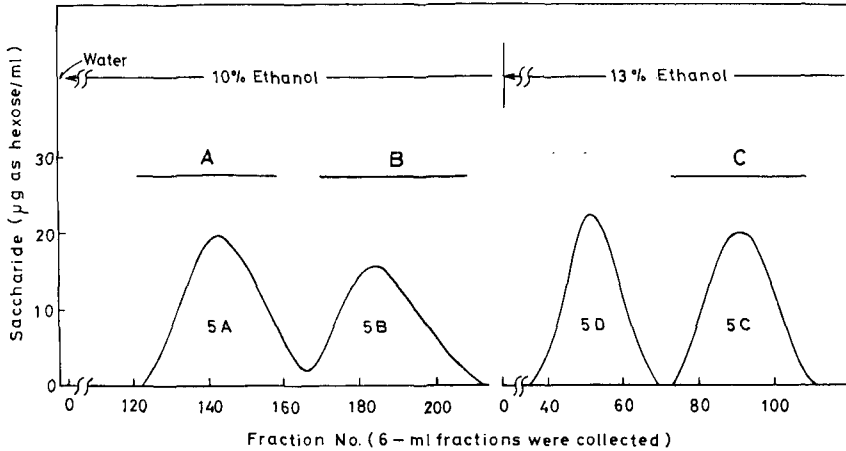


Fig. 11. Carbon-Celite Column Chromatogram of Pentasaccharide Powder 5X.

The pentasaccharide powder, 5X (10 mg), was chromatographed on a carbon-Celite column (1:1; 1.5×54 cm) by successive elution with water (500 ml), 10% (1380 ml) and 13% ethanol (900 ml).

A, B and C designate the ranges of elution positions of the reference sugars, : (A) 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose, (B) 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose and (C) 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>-β-fructofuranosyl sucrose.

ることによっても支持された (Table 11).

しかし、5D糖の構造決定のためには、より大量の糖を必要としたので、5X糖を活性炭—セライトカラムクロマトグラフィー(カラム、5.2×80 cm)にかけ、10%エタノール(25 l)で溶出後、13%エタノール4 l~5.2 l部分に溶出する糖画分を集め、減圧濃縮して凍結乾燥し、PCおよびTLC的に均一である5D糖を白色粉末として30 mg得ることができた。

この5D糖、20 mg、を部分加水分解し、加水分解物の一部をPCおよびTLC分析したところ (Table 11)、八つの糖と一つの未同定四糖画分(PC, *R*<sub>s</sub> 0.53)が検出されたので、部分水解物の残部についてPCを行い、四糖ゾーン(*R*<sub>s</sub> 0.53)を水抽出し、減圧濃縮してシラップ状物(約4.1 mg)を得た。このシラップ状物を活性炭—セライトカラムクロマトグラフィーにより分析したところ (Fig. 12)、この四糖画分は単一なものではなく6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucroseと1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucroseからなることがわかった。従って、5D糖は1<sup>F</sup>-β-fructofuranosyl-6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucroseであることが証明された。

本実験で同定されたフラクト・オリゴ糖のクロマトグラフィー的性質をまとめて表示したものが Fig. 13である。

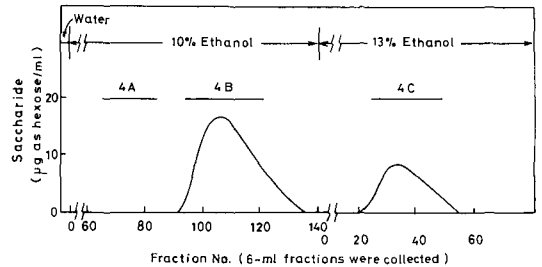


Fig. 12. Carbon-Celite Column Chromatogram of Tetrasaccharides Obtained by Partial Hydrolysis of Pentasaccharide 5D.

A sirupy tetrasaccharide fraction (4.1 mg), paper-chromatographically separated from the partial hydrolyzate of 5D, was chromatographed on a carbon-Celite column (1:1; 1.5×54 cm) by successive elution with water (500 ml), 10% (840 ml) and 13% ethanol (600 ml).

4A, 4B and 4C show the ranges of eluting positions of the reference sugars: (4A) nystose, (4B) 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose and (4C) 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucrose.

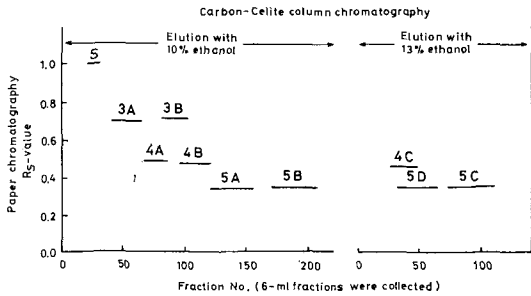


Fig. 13. Chromatographic Behaviour of Fructo-oligosaccharides Produced from Sucrose by Asparagus Fructosyltransferases.

Paper chromatography was carried out in the use of Toyo No. 50 filter paper and solvent (I).  $R_s$ -values: relative  $R_f$ -values ( $R_f$  of sucrose = 1). For column chromatography, sucrose (S) and the oligosaccharides (3 A, 3 B, 4 A, 4 B, 4 C, 5 A, 5 B, 5 C and 5 D) (2 to 3 mg, each) were applied to a carbon-Celite column (1:1; 1.5×54 cm).

### (3) シュークロースからの糖合成の経時変化

#### 1) 定性

まず、シュークロースからのオリゴ糖の酵素的合成の経時変化を TLC により定性的に調べた。その結果、Fig. 14 に示してあるように、1 時間の反応では 1-kestose に相当するスポットが検出され、3 時間目には neokestose と nystose に相当する二つのスポットが現われはじめ、24 時間では五糖あるいはより高次の糖が検出されるようになり、さらに 48 時間では 1-kestose, neokestose および nystose の三つのスポットは大きさがほぼ同一となることがわかった。

#### 2) 定量

フラクト・オリゴ糖の生成を“濃縮全飽和画分”と  $^{14}\text{C}$ -シュークロースを用いて、定量的に調べた。

1.6 M [ $^{14}\text{C}$ ] シュークロース溶液 (1.25  $\mu\text{Ci}$ , 0.25 ml), McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, (0.25 ml) および酵素溶液 (“濃縮全飽和画分”, 0.5 ml) からなる混液を少量のトルエンの存在下で各々 1, 3, 5, 10, 24 および 48 時間インキュベーションし、沸騰水中 3 分間加熱により反応を止めた後、反応液を濾過し、沈澱は放射能が残存しなくなるまで水洗した。濾液と洗液を合せ、減圧下 30~35°C で蒸発乾固し、残渣を水 1 ml に溶解し、キャリア糖の混合物 [フラクトース, グルコースおよびシュークロース (各々 1 mg); アスパラガス根から単離した 1-kestose, neokestose, nystose および 4 b, 4 c, 5 a, 5 b, 5 c および 5 d 糖 (各々 1 mg)] を加えた。この溶液の 50  $\mu\text{l}$  を

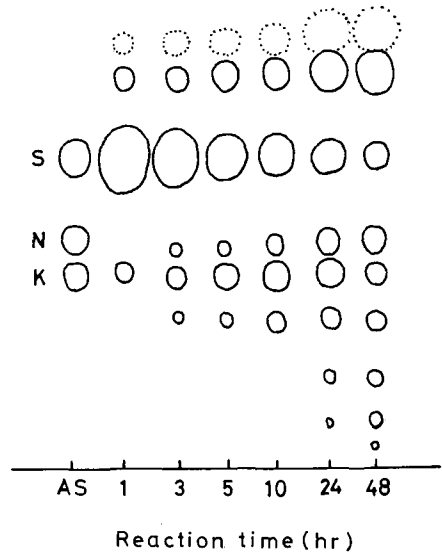


Fig. 14. Thin-layer Chromatogram of Reaction Products from Sucrose by Asparagus Fructosyltransferases.

Enzymatic reaction: A mixture of enzyme (“concentrated wholly saturated fraction”) (0.25 ml), 0.8 M sucrose in McIlvaine buffer, pH 5.5, (0.25 ml) and toluene (a minimum amount) was incubated at 30°C. Thin-layer chromatography: triple development with solvent (IV) on a Kieselgel G (Typ 60) layer. Sprayed with anisidine phosphate solution. Standard sugars (AS): S, sucrose; N, neokestose; and K, 1-kestose; Ny, nystose.

東洋濾紙 No. 50 にバンド状にぬり溶媒 (I) で 5 重展開し、分離した単、二、三、四、五および六糖以上の高次糖をペーパーから水抽出し、減圧濃縮した。各々の残渣をそれぞれ水 1.5 ml に溶解し、その 1 ml を採り放射能を測定した。各々のオリゴ糖の合成量を計算する際には、放射能の PC 収量をも考慮した。

三、四および五糖それぞれのアイソマーの分離・定量には、各時間の反応液の 200  $\mu\text{l}$  を採り、上述と同様にしてまず PC により三、四および五糖を分離・抽出し、次いで抽出糖の各々について活性炭—セライトカラムクロマトグラフィーを行ってアイソマーの単離を行い、単離したアイソマーについて放射能を測定した。

実験の結果を各重合度ごとの糖について見る時 (Fig. 15), 三糖はシュークロースの消費に伴って極めて急速に合成されるのに対し、四、五および六糖は非常に緩慢にしか生成されないことがわかった。またこれらの糖の生成と同時にグルコースとフラクトースの遊離も起きるこ

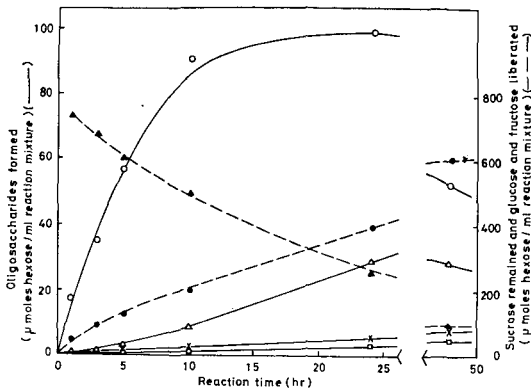


Fig. 15. Time Course of Fructo-oligosaccharide Formation from Sucrose by Asparagus Fructosyltransferases.

▲···▲ Sucrose; ●···● glucose and fructose; ○—○ trisaccharides; △—△ tetrasaccharides; ×—× pentasaccharides; □—□ higher saccharides.

とが認められたが、フラクトースの遊離は多分酵素液中に混在する加水分解酵素の作用によるものと思われる。何故ならリン酸カルシウム・ゲル処理により加水分解酵素をほとんど除いた酵素液を用いた時にはフラクトースの遊離が認められなかったからである。

次に三、四および五糖アイソマーの各々について生成の経時変化を調べたところ (Fig. 16), 三糖では 1-kestose が neokestose よりも 10 時間までは極めて急速に増加し、その後漸減することがわかった。しかし、四および五糖系列のアイソマーは反応初期から生成するが、それらの増加は小であることがわかった。

個々のアイソマーの生成量を 10 時間反応時で比較すると次のようである (Fig. 16): (A) 1-kestose は neokestose より 5 倍多い; (B) nystose と 4 C 糖 [1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl sucrose] は 4 B 糖 [6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose] よりも多い; (C): 5 A 糖 [1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose] と 5 C 糖 [1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>-β-fructofuranosylsucrose] は 5 B 糖 [6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose] と 5 D 糖 [1<sup>F</sup>-β-fructofuranosyl-6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose] よりも僅かに多い。しかし 48 時間反応時ではこれらの糖量は全て各々一定のレベル (三糖系列糖, 20.6 μ moles hexose/反応混液 ml; 四糖, 9.2; および五糖, 2.1) に達することがわかった。

以上の知見をまとめると、アスパラガスの fructosyltransferases によるシュクロースからのオリゴ糖の合成では、まず最初に 1-kestose (1<sup>F</sup>-β-fructofuranosyl-

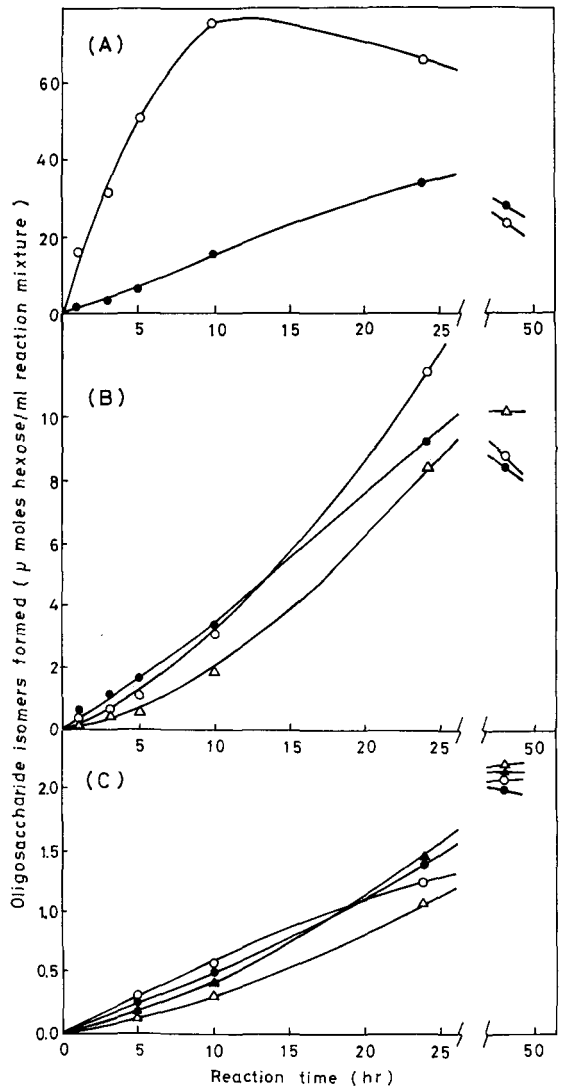


Fig. 16. Time Course of Formation of Fructo-oligosaccharide Isomers from Sucrose by Asparagus Fructosyltransferases.

(A): Saccharides 3 A (1-kestose) (○) and 3 B (neokestose) (●)

(B): Saccharides 4 A (nystose) (○), 4 B (△) and 4 C (●)

(C): Saccharides 5 A (○), 5 B (△), 5 C (●) and 5 D (▲).

sucrose) が生じ、次いでこれから 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose [nystose (n=2) と 5 A 糖 (n=3)], 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose [neokestose (n=1), 4 B 糖 (n=2) および 5 B 糖 (n=3)] および 1<sup>F</sup>(1-

fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup> (1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose [4 C 糖 ( $m=1, n=1$ ), 5 C 糖 ( $m=2, n=1$ ) および 5 D 糖 ( $m=1, n=2$ )] が合成されることが確かめられた。

#### (4) 1-Kestose からの四糖合成

アスパラガス fructosyltransferases による 1-kestose からの四糖の生成について pH 効果に重点を置きつつ調べた。

McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, 中 0.2 M [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose (0.068 μCi) 溶液 (25 μℓ) と酵素液 (8 倍稀釈 “0.3~0.5 飽和画分”) (25 μℓ) からなる混液を少量のトルエンの存在下で種々の pH (pH 4.0, 5.6 および 7.0) で 30°C, 10 時間インキュベーションした。反応を沸騰水中 3 分間加熱で止め、反応液にキャリア糖混合物 [フラクトース, グルコースおよびシュクロース, 各々 100 μg; アスパラガスのフラクト・オリゴ糖 9 種 (“材料”の項参照), 各々 100 μg; 計 1.2 mg] を加え, これを PC にかけた。分離した四糖バンドを抽出し, 次に抽出液を活性炭—セライトカラムクロマトグラフィーした。溶出液は 6 ml ずつ採取し, 各溶出液を濃縮乾燥後, 水 1 ml に溶解し, 放射能を測定した。

得られた結果 (Fig. 17) から次のことがわかった。四

糖 4 A および 4 C はテストした全ての pH で生成したが, 量比 4 A : 4 C は反応 pH ごとに異なり, pH 4.0 で 10.9 : 1, 5.6 で 4.3 : 1, 7.0 で 1.6 : 1 であった。このことは 4 A と 4 C 糖の生成反応にはそれぞれ異なる最適 pH が存在し, 両糖の生成がそれぞれ異なる酵素蛋白によって触媒されていることを示唆している。即ち 4 A 糖は著者が暫定的に 1<sup>F</sup>-FT と名付けた酵素の触媒により 1-kestose 分子におけるフラクトース C-1 (OH) 位へのフラクトシル転移によって, また 4 C 糖は同じく 6<sup>G</sup>-FT と名付けた酵素により 1-kestose におけるグルコースの C-6 (OH) 位へのフラクトシル転移によって合成されることが推測された。

#### (5) Nystose からの五糖合成

Nystose からの五糖の合成を, 0.2 M [U-<sup>14</sup>C] nystose (0.1 μCi) 溶液 (25 μℓ) と McIlvaine 緩衝液, pH 5.6, 中酵素液 (8 倍稀釈 “0.3~0.5 飽和画分”, 25 μℓ) からなる混液の 30°C, 10 時間インキュベーション, 次いで生成する二つの五糖アイソマー, 5 A 糖と 5 C 糖, の活性炭—セライトカラムクロマトグラフィー分析によって調べた。

その結果, Fig. 18 に示すように, nystose から二つの五糖, 5 A と 5 C, が量比 2.4 : 1 で生成することが確かめられた。そうして 5 A 糖は 1<sup>F</sup>-FT の作用により nystose のフラクトース部 C-1 (OH) 位へのフラクトシル転移により, また 5 C 糖は 6<sup>G</sup>-FT 作用により nystose のグルコース部 C-6 (OH) 位へのフラクトシル転移により合成されるものと推測された。

### 3. 考 察

このフラクト・オリゴ糖の *in vitro* 合成実験でアスパラガス根抽出液の “硫安全飽和画分” 酵素液, 即ち粗酵素液, を用いたことは出来るだけ *in vitro* 合成の条件に近い条件下で実験を行う意図があったからである。この “全飽和画分” からの五つの細分画画分についてトランスフェラーゼ活性を精査してみると, これには SST, 6<sup>G</sup>-FT および 1<sup>F</sup>-FT の活性が存在し, 各々の活性はそれぞれ異なる酵素蛋白に由来することがまず推定された。

次に, この合成実験で単離・同定されたシュクロースからの合成オリゴ糖は全てアスパラガス根中に天然に存在するもの<sup>103,104</sup> と同一であったが, そのうち 3 種の 1<sup>F</sup> (1-β-fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup> (1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub>-sucrose 系列オリゴ糖 ( $m=0, n=3$ ;  $m=1, n=1$  および  $m=1, n=2$ ) は今回初めて酵素合成によって得られたものであった。また合成糖は全て 1-kestose および/あ

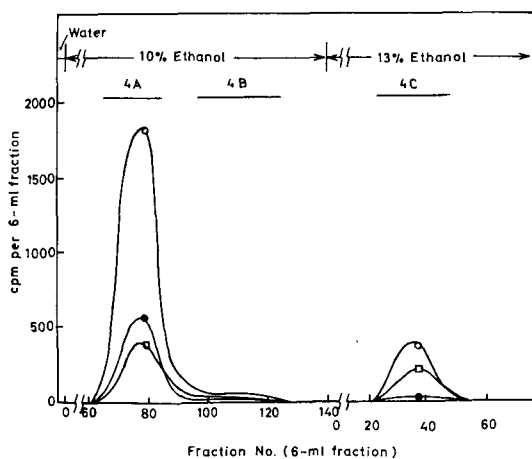


Fig. 17. Effects of pH's on Production of Tetrasaccharides from 1-Kestose by Asparagus Fructosyltransferases.

A mixture of enzyme (8-fold diluted “0.3~0.5 saturated fraction”) and [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose was incubated for 10 hr at pH 4.0 (●), 5.6 (○), or 7.0 (□).

The tetrasaccharide fraction paper-chromatographically separated from the reaction mixture was chromatographed together with carrier sugars (saccharides 4 A, 4 B and 4 C) on a carbon-Celite column.

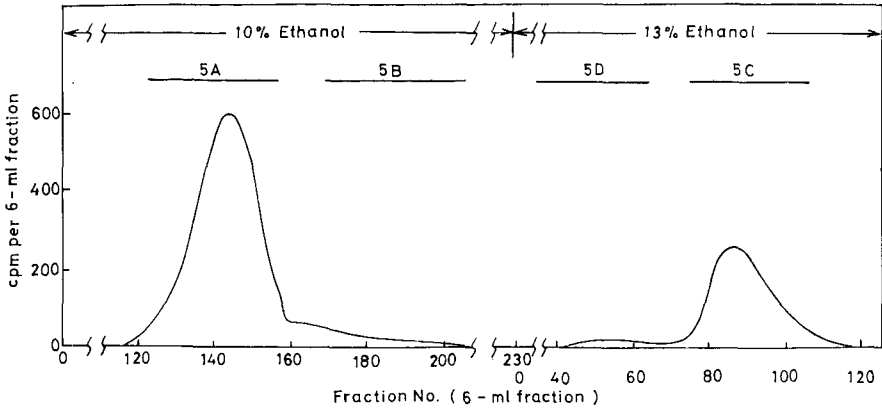


Fig. 18. Carbon-Celite Column Chromatogram of Pentasaccharides Produced from Nystose by Asparagus Fructosyltransferases.

A mixture of enzyme (8-fold diluted "0.3~0.5 saturated fraction") and [U- $^{14}$ C] nystose was incubated for 10 hr at pH 5.6 and 30°C. The pentasaccharide fraction paper-chromatographically separated from the reaction mixture was chromatographed together with carrier sugars (saccharides 5 A, 5 B, 5 C and 5 D) on a carbon-Celite column.

るいは neokestose に関連する糖であり、分子中に 6-kestose 残基を含む糖は得られなかった。このことは天然に見出された糖の場合と全く同じであった。

さらにシュクロース、1-kestose あるいは nystose からのオリゴ糖合成の経時変化を追跡した結果からこれらの合成には三つのタイプの fructosyltransferases が関与しているらしいことがわかった。第1の酵素は EDELMAN と JEFFORD<sup>49)</sup> のキクイモ SST に類似するもので、主作用としてシュクロースからの 1-kestose を合成する。第2の酵素は未知酵素であるため、これを暫定的に 6<sup>G</sup>-fructosyltransferase (6<sup>G</sup>-FT) と名付けたもので、これは 1-kestose からの 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose の合成、および 1-kestose 存在下でのシュクロースからの neokestose の合成に関与しているらしい。第3の酵素はキクイモの FFT<sup>49)</sup> の作用に類似するがここでは便宜上 1<sup>F</sup>-FT と名付けたものでフラクトシル転移によるオリゴ糖の鎖の伸長を触媒すると考えられるものである。

#### 4. 要 約

アスパラガス根から硫酸分画沈澱により調製した一酵素標品によるシュクロースからのフラクト・オリゴ糖の *in vitro* 合成を調べ、この合成物から単離した9種の糖が 1<sup>F</sup> (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose [ $n=1$  (1-kestose), 2 (nystose), および 3], 6<sup>G</sup> (1- $\beta$ -fructofura-

nosyl)<sub>n</sub> sucrose [ $n=1$  (neokestose), 2, および 3] および 1<sup>F</sup> (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup> (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub>-sucrose [ $m=1, n=1$ ;  $m=2, n=1$ ; および  $m=1, n=2$ ] であることを確認した。これら全ての糖はアスパラガス根中に存在するものと同一であったが、1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose, 6<sup>G</sup> (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>3</sub>-sucrose および 1<sup>F</sup>- $\beta$ -fructofuranosyl-6<sup>G</sup> (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose の3種のみは今回初めて酵素合成によって得られたものである。

また、この酵素標品には3種のトランスフェラーゼ、sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (SST) および著者が暫定的に 6<sup>G</sup>-fructosyltransferase (6<sup>G</sup>-FT) および 1<sup>F</sup>-fructosyltransferase (1<sup>F</sup>-FT) と名付けた酵素、の活性が確かめられ、さらにシュクロース、1-kestose あるいは nystose を用いるフラクト・オリゴ糖の合成実験からこれらの酵素がオリゴ糖の *in vivo* 合成に関与していることが示唆された。

#### 第4章 アスパラガス根の Sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase の精製と性質

前章でアスパラガス根のフラクト・オリゴ糖の生合成には少なくとも3種の fructosyltransferases, 即ち SST, 6<sup>G</sup>-FT, および 1<sup>F</sup>-FT, が関与していることを述べた。そこでこれらの転移酵素のオリゴ糖合成における役割を究明するためには各々の酵素を精製し、その性質を調べ

る必要がある。

この章ではまず最初に SST の精製とその性質に関する実験を行ったのでそれについて述べることにする<sup>99)</sup>。

## 1. 材料と方法

材料： アスパラガスの根は 1974 年 10 月に札幌近郊の実験農場で収穫し凍結保存したものをを用いた。

[U-<sup>14</sup>C] シュークロースと [U-<sup>14</sup>] グルコースは the Radio Chemical Centre, Amersham から購入した。[U-<sup>14</sup>C] 1-Kestose, [U-<sup>14</sup>C] neokestose および [U-<sup>14</sup>C] nystose はアスパラガス酵素を用いて [U-<sup>14</sup>C] シュークロースから酵素的に調製した<sup>105)</sup>。

無標識の 1-kestose, neokestose, 6<sup>G</sup> (1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose ( $n=2$  および  $3$ ) および 1<sup>F</sup> (1-β-fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup> (1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose ( $m=1, n=1; m=1, n=2; \text{および } m=2, n=1$ ) はアスパラガス根から得た<sup>103~105)</sup>。1<sup>F</sup> (1-β-Fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose ( $n=2, 3, 4$  および  $5$  はキクイモ塊茎から EDELMAN と DICKERSON の方法<sup>47)</sup> を僅かに改変した方法により調製した。

酵素活性の測定： McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, 中 0.8 M シュークロース (0.5 ml) と酵素 (0.5 ml) とからなる混液を 30°C で 1 時間インキュベーションした後, SOMOGYI-NELSON 試薬 (1 ml) の添加により反応を止め, 次いでこの反応液中に遊離された還元糖を測定した。酵素液に invertase 活性が存在しない時は, 転移されたフラクトース量は還元力測定値から直接得た。しかし, invertase 活性が存在する時には, 転移フラクトース量は, グルコース量 (Glucostat 法) を 2 倍した値から還元糖量値を減じて計算した。

酵素活性の 1 単位 (U) は 0.4 M シュークロース溶液中で 30°C, 1 時間に 1 μモルのフラクトースをシュークロースに転移できる酵素量として定義した。

糖と蛋白の定量： 糖は前章と同様にして測定した。

蛋白は aldolase の  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 9.38$  を基準値として 280 nm の吸収<sup>7)</sup> を測定することにより定量した。

ペーパーおよび薄層クロマトグラフィー (PC および TLC)： 前章と同様の方法で行った。

ディスク電気泳動： ORNSTEIN-DAVIS の方法<sup>36,74)</sup> に従い, 7.5% polyacrylamide ゲル (pH 8.0) を用い, 室温, 2 mA/tube で 3 時間泳動を行った。蛋白バンドの検出は, 泳動後のゲルを 7% 酢酸中 1% Amido Schwarz 10 B 溶液につけ, 次いで 7% 酢酸で洗滌して行った。

Sucrose-Sepharose 6 B の調製： Epoxy- 活性化 Sepharose 6 B を水に懸濁 (2 g/12 ml) し, これをガラスフィルター上で連続的に水 (200 ml) と 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 9.4, 50 ml) で洗滌した。この洗滌担体をシュークロース溶液 (シュークロース 150 mg/0.1 M 炭酸緩衝液, pH 9.4, 6 ml) に加え, 40°C で 2 時間振盪した。懸濁物をガラスフィルター上で水 (50 ml) で洗った後, 1 M エタノールアミンに懸濁し, 室温で 4 時間放置した。懸濁物は同様にして水, 0.1 M 硼酸緩衝液中 0.5 M 塩化ナトリウム (pH 8.0), 0.1 M 酢酸緩衝液中 0.5 M 塩化ナトリウム (pH 4.0) そして水 (各々 50 ml) で連続的に洗滌して sucrose-coupled Sepharose 6 B を得た。

分子量の測定： 酵素の分子量は Sephadex G-200 ゲル濾過 (上昇法) により測定した。標準蛋白質としては Boehringer Mannheim GmbH から購入した cytochrome c (分子量 12,400), chymotrypsinogen A (25,000), hen-egg albumin (45,000), bovine serum albumin (67,000) および aldolase (147,000) を用い, 予め 0.25 M 塩化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡させておいた Sephadex G-200 カラム (2.64 × 100 cm) 上で同一緩衝液を用いて流速 8 ml/hr のゲル濾過を行った。

## 2. 結果

### (1) 酵素の精製

全ての酵素精製操作は 5~8°C で行い, 遠心分離は 10,000 × g で 15 分間行った。酵素を濃縮する際には Amicon 限外濾過器 (Diaflo PM-10 filter) を使用した。

#### 1) 硫安分画

予め水洗し細かく切ったアスパラガス根 (200 g ずつ; 全量 12 kg) を 0.05 M リン酸緩衝液, pH 7.0 (1 l) 中でホモジナイズした。このホモジネートを布で濾し, 遠心分離を行い, 上澄液を硫安で全飽和として冷室内に一夜静置した。この溶液を遠心分離後, 得られた沈澱 (根 12 kg からの) を 0.05 M リン酸緩衝液, pH 7.0, にとかし 5 日間 0.01 M リン酸緩衝液, pH 7.0, に対して透析した。透析内液を遠心分離し, 上澄液を得た [“硫安, 0.0~1.0 飽和” 画分, 4 l]。

この画分は上述と同様の方法でさらに固形硫安で処理し 0.3~0.8 飽和で生ずる沈澱を得た [“硫安, 0.3~0.8 飽和” 画分, 1.26 l]。

Invertase 活性のない酵素標品を得るために, 上述の画分にリン酸カルシウム・ゲルを懸濁し [ゲル 4.5 g (水分含量 92%)/蛋白 g], これを 30 分間放置後遠心分離し,

上澄液を得た〔“リン酸カルシウム・ゲル”画分, 1.32 ℓ〕。

## 2) DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィー

この実験では特に断らない限りリン酸緩衝液, pH 7.0, を用いた。“リン酸カルシウム・ゲル”画分は 150 ml に濃縮し, 0.005 M 緩衝液に対して 12 時間透析した。透析内液を予め 0.005 M 緩衝液で平衡化させた DEAE-セルロース・カラム (5×17 cm) に供し, 0.005 M, 0.025 M および 0.07 M 緩衝液 (各々 2, 1 および 1 ℓ) で連続溶出し, 15 ml ずつ分取した。0.07 M 緩衝液で溶出する画分を集め, 60 ml に濃縮し, 0.005 M 緩衝液で一夜透析した〔“DEAE-セルロース, 1st”画分, 60 ml〕。

透析内液は, 再度 DEAE-セルロース・カラム (3.2×30 cm) に通し, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07 および 0.08 M 緩衝液 (それぞれ 750 ml) で溶出を行い, 15 ml ずつ分取した。酵素活性は 0.05, 0.06 および 0.07 M 緩衝液による溶出液に存在していた。即ち最初の溶出液には 6G-FT<sup>105</sup>, 第2の溶出液には 1F-FT<sup>105</sup> および SST<sup>105</sup>, 最後のものには SST が存在していた。そこで 0.06 M および 0.07 M 溶出液を合せ, 20 ml に濃縮し, 次いで 0.005 M 酢酸緩衝液, pH 4.5, で一夜透析した〔“DEAE-セルロース, 2nd.”画分, 20 ml〕。

## 3) CM-セルロース・カラムクロマトグラフィー

“DEAE-セルロース, 2nd”画分を 0.005 M 酢酸緩衝液, pH 4.5, で平衡化させた CM-セルロース・カラム (2×14 cm) にかへ, 0.005 M および 0.05 M 酢酸緩衝液 (300 および 258 ml), 次いで 0.1 M 酢酸緩衝液中 0.1 M および 0.3 M 塩化ナトリウム (270 ml と 300 ml) で順次溶出し, 6 ml ずつを分取した (Fig. 19)。酵素は 0.05 M 酢酸緩衝液で溶出されたので, Fr. No. 69~84 を合せ 0.25 M 塩化ナトリウムを含む 0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.5, で一夜透析した〔“CM-セルロース”画分, 96 ml〕。

## 4) Sephadex G-200 および sucrose-coupled

### Sepharose 6B・カラムクロマトグラフィー

“CM-セルロース”画分を 3 ml に濃縮し, これを 0.25 M 塩化ナトリウム含有 0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.5, で予平衡させた Sephadex G-200 カラム (2.64×100 cm) にかへ同一緩衝液で溶出し, 6 ml ずつを分取した (Fig. 20)。酵素活性の存する画分 No. 50~57 を合せて濃縮し, 0.01 M 酢酸緩衝液, pH 5.6, で一夜透析して透析内液を得た〔“Sephadex G-200”画分, 42 ml〕。

この画分を 0.01 M 酢酸緩衝液, pH 5.6, で予平衡化させた sucrose-coupled Sepharose 6B・カラム (1×2.5 cm) にかへ同一緩衝液で溶出した。SST 以外の fructosyltransferases はカラム中の担体に吸着された

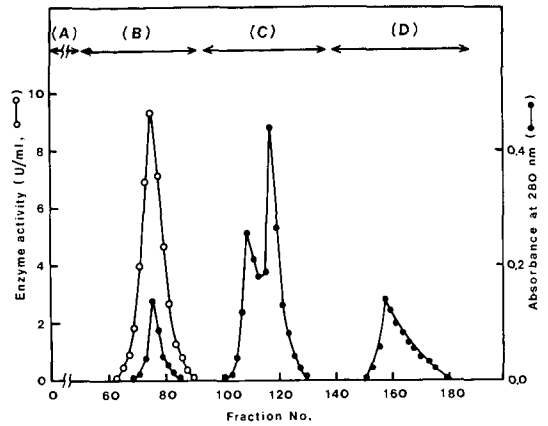


Fig. 19. CM-cellulose Column Chromatography of Asparagus Sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (SST).

Elution was carried out stepwise with the following buffers: pH 4.5; (A) 0.005 M acetate, (B) 0.05 M acetate, (C) 0.1 M acetate containing 0.1 M NaCl, (D) 0.1 M acetate containing 0.3 M NaCl. Six-ml fractions were collected.

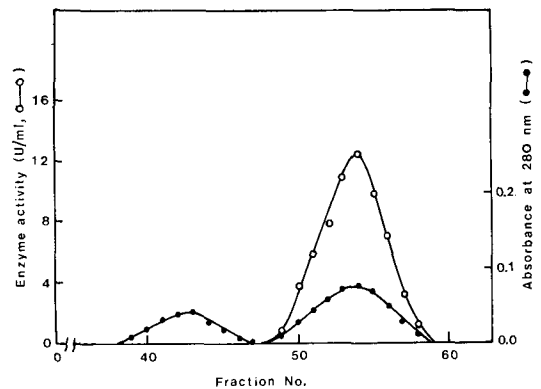


Fig. 20. Sephadex G-200 Column Chromatography of Asparagus SST.

Elution was conducted with 0.01 M phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.25 M NaCl. Six-ml fractions were collected.

ので, 溶出液を集めて濃縮し, 0.005 M リン酸緩衝液, pH 6.5, で一夜透析した。この透析内液を最終精製酵素とした〔“Sepharose 6B”画分, 10 ml〕。

SST の精製過程はまとめて Table 13 に示してあるが, この精製により比活性 (U/蛋白 mg) 178 の SST が全活性で収量 5.6% (“硫酸, 0.3~0.8 飽和”画分に対して) で得られた。



Table 13. Purification Process of Asparagus SST

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Volume (mℓ)	Specific activity (U/mg protein)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.0~1.0 satn.	—	53602	4000	—
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.3~0.8 satn.	5560	25530	1260	0.22
Calcium phosphate gel	4300	19400	1320	0.22
DEAE-cellulose, 1st.	2516	468	60	5.38
DEAE-cellulose, 2nd.	1079	54.10	20	19.9
CM-cellulose	454	4.70	96	96.6
Sephadex G-200	351	2.48	42	141.5
Sepharose 6 B	314	1.76	10	178.4

(2) 酵素の一般的性質

1) Polyacrylamide ゲル・ディスク電気泳動

精製酵素の一部 (蛋白として約 50 μg) を polyacrylamide ゲル, pH 8.0, で電気泳動した。Fig. 21 の泳動図に示すように、この酵素は単一バンドを示し、このバンドは SST 活性を呈した。

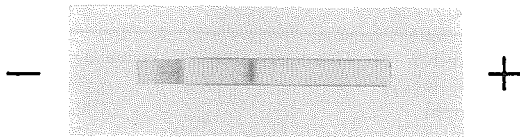


Fig. 21. Disc Electrophoresis of Asparagus SST on Polyacrylamide Gel.

Purified SST [concentrated "Sephadex 6B" fraction (50 μg as protein)] was run on 7.5% polyacrylamide gel, pH 8.0, under the conditions of 2 mA/tube, room temperature and 3hr. The gel was stained with 1% Amido Schwarz 10 B in 7% acetic acid.

2) 分子量

この酵素の分子量は Sephadex G-200 ゲル濾過法によって約 65,000 と推定された (Fig. 22)。

3) 至適 pH

酵素活性に及ぼす pH 効果は Fig. 23 に示してある。シュクロースを基質とした時の至適 pH は約 5.0 であった。

4) pH-安定性

種々の pH の酵素溶液を 30 分間、30°C あるいは 45°C にプレインキュベート後、0°C に冷却、pH 5.0 に pH 調整して SST 活性を測定した。その結果を Fig. 24 に示してある。

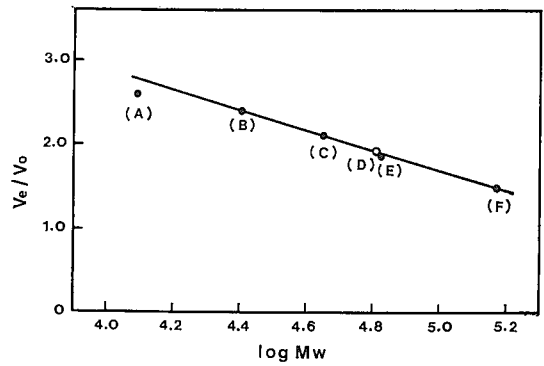


Fig. 22. Estimation of Molecular Weight of Asparagus SST by Sephadex G-200 Gel Filtration.

Details of the experiments are described in the text.

Standard proteins: (A) cytochrome c (mol. wt. 12,400), (B) chymotrypsinogen A (25,000), (C) henegg albumin (45,000), (E) bovine serum albumin (67,000), (F) aldolase (147,000).

Sample protein: (D) asparagus SST.

30°C のプレインキュベーションでは、調べた pH で初めの活性の約 95% が残存した。45°C の場合には、pH 5.0~6.5 で活性の約 50% が残存したが、pH > 8.0 および pH < 4.0 では 10% 以下の活性が検出されるに過ぎなかった。

5) 熱安定性

精製酵素を種々の温度 (30°, 37°, 45°, 50° および 60°C) で 10 分間加熱した後、残存酵素活性を測定した。Fig. 25 に示すように、30°, 37° および 45°C 加熱では初めの活性の 94% 以上が残った。しかし 50°C あるいはそれ以上では、活性は急激に減少した。60°C での残存活性は

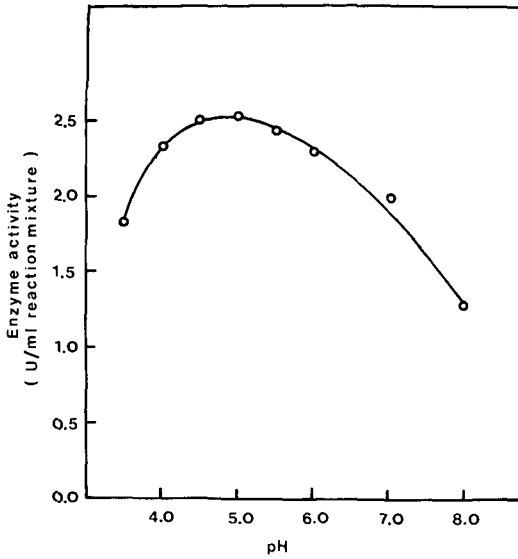


Fig. 23. Effects of pH's on Activity of Asparagus SST.

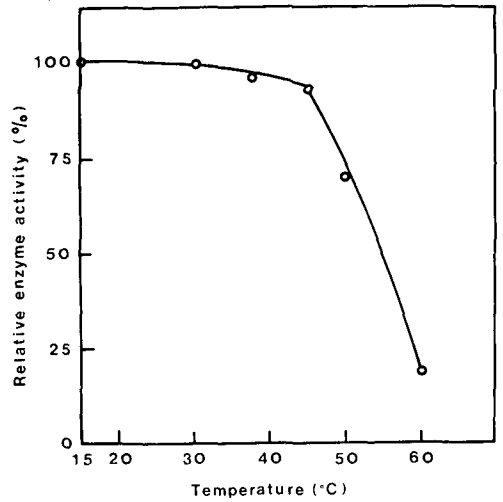


Fig. 25. Effects of Temperatures on Asparagus SST.

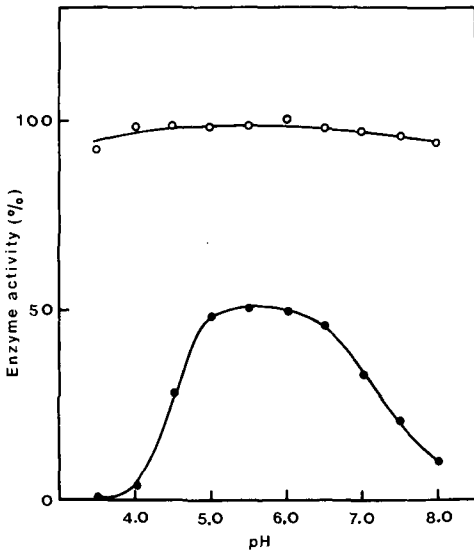


Fig. 24. Effects of pH's on Stability of Asparagus SST.

After the pre-incubation at 30°C (○—○) or 45°C (●—●) for 30 min under various pH's, the enzyme solutions were cooled to 0°C, adjusted to pH 5.0, and then assayed for SST activity.

18%であった。

6) 阻害剤の効果

種々の試薬のこの酵素に及ぼす影響を次の方法によっ

Table 14. Effects of Inhibitors on Asparagus SST

Details of the experiments are given in the text.

Inhibitor	Concentration	Relative activity
Control	—	100.0
HgCl <sub>2</sub>	1.0×10 <sup>-4</sup> M	19.4
<i>p</i> -CMB	1.2×10 <sup>-4</sup> M	78.2
MnSO <sub>4</sub>	1.0×10 <sup>-3</sup> M	25.0
AgNO <sub>3</sub>	1.0×10 <sup>-3</sup> M	28.8
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.0×10 <sup>-3</sup> M	87.5
LiSO <sub>4</sub>	1.0×10 <sup>-3</sup> M	88.1
CaCl <sub>2</sub>	1.0×10 <sup>-3</sup> M	97.5
CuSO <sub>4</sub>	1.0×10 <sup>-3</sup> M	97.5
ZnSO <sub>4</sub>	1.0×10 <sup>-3</sup> M	100.6
MgCl <sub>2</sub>	1.0×10 <sup>-3</sup> M	100.6
BaCl <sub>2</sub>	1.0×10 <sup>-3</sup> M	102.5
AlCl <sub>3</sub>	1.0×10 <sup>-3</sup> M	106.9

て調べた。酵素 (0.5 U, 0.25 ml) と McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, 中 0.8 M シュクロース (0.5 ml) からなる混液を水あるいは試薬溶液 (0.25 ml) の存在下で 30°C 1 時間インキュベートし, 残存活性を測定した。

Table 14 に示すように, 昇汞 (1×10<sup>-4</sup> M), 硫酸マンガ (1×10<sup>-3</sup> M), 硝酸銀 (1×10<sup>-3</sup> M) および *p*-chloromercuribenzoate (1.2×10<sup>-4</sup> M) はこの酵素を各々約

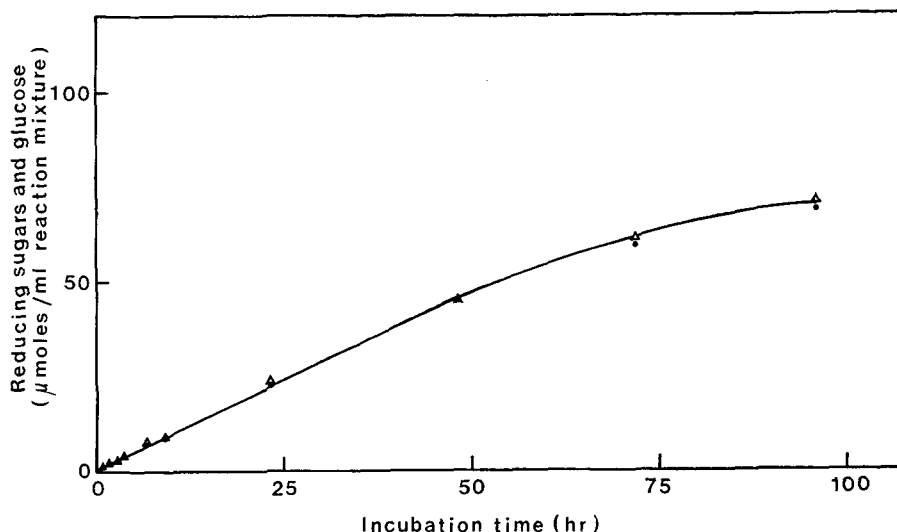


Fig. 26. Time-course of Enzymatic Reaction with Sucrose by Asparagus SST. After mixtures composed of enzyme (1.1 U, 0.5 ml) and 0.8 M sucrose in McIlvaine buffer, pH 5.0, (0.5 ml) were incubated at 30°C for different periods, reducing sugars and glucose were measured.  $\triangle$ - $\triangle$ , Reducing sugars measured by the method of SOMOGYI-NELSON;  $\bullet$ - $\bullet$ , glucose measured by Glucostat method.

81, 75, 71 および 22% 阻害し、硝酸コバルトと硫酸リチウムでは僅かの阻害を受けた。しかし他の 6 種の試薬は阻害効果を示さなかった。

#### 7) 酵素反応の経時変化

この酵素のシュクロースに対する反応の経時変化を還元糖とグルコースの遊離を測定することにより調べた。

Fig. 26 に示すように、還元糖とグルコースは反応 48 時間まで反応時間とともに直線的に遊離された。また遊離された還元糖が全てグルコースであること、さらにフラクトースは遊離されないこともこの図から明らかである。従って、この精製酵素はシュクロースの加水分解を触媒せずシュクロースからもう一方のシュクロースへのフラクトシル転移を触媒する酵素であることが明らかとなった。

#### 8) 酵素反応に及ぼす基質濃度の効果

フラクトシル転移に及ぼすシュクロース濃度の効果を実験し、得られたデータを LINEWEAVER-BURK プロットして調べたところ  $K_m$  値として 0.11 M が得られた (Fig. 27)。

#### (3) 酵素の基質特異性

##### 1) フラクトシル基の“自己転移”

ここで“自己転移”とは二つの同一糖の間での酵素に

よるフラクトシル基転移を意味<sup>49)</sup>する。

次の [U-<sup>14</sup>C]-基質の一つ (0.4 M; 20  $\mu$ l) と酵素 (20  $\mu$ l) からなる混液を少量のトルエン存在下で 30°C, 10 時間インキュベートし、反応を 0.1 M 昇汞 (10  $\mu$ l) の添加により止め、次いで下記のキャリア糖を添加した後、反応液について調製用 PC を行った。

[U-<sup>14</sup>C]-基質: シュクロース (0.065  $\mu$ Ci), 1-kestose (0.071  $\mu$ Ci), neokestose (0.050  $\mu$ Ci) あるいは nystose (0.048  $\mu$ Ci)。

キャリアー糖: フラクトース, グルコース, シュクロースおよび 1-kestose, 各々 200  $\mu$ g と 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose  $n=2$  および 3, 各々 100  $\mu$ g。

PC で 5 重展開の後、単、二、三、四、五、六、七および高次糖に相当するゾーンを抽水出し、減圧下で蒸発乾固した。得られた残渣を各々水 (2 ml) に溶かし、この溶液の一部 (0.5 ml) を Aloka 液体シンチレーションスペクトロメーター (Model 502) を用いて放射能を測定した。放射性糖の量は放射能測定値から計算した。また“自己転移”したフラクトースの量は各々生成した三、四あるいは五糖の量から計算した。

その結果は Table 15 に示してある。シュクロースを基質とした時のフラクトースの転移量 (8.10  $\mu$ mol/ml) は 1-kestose, neokestose あるいは nystose の場

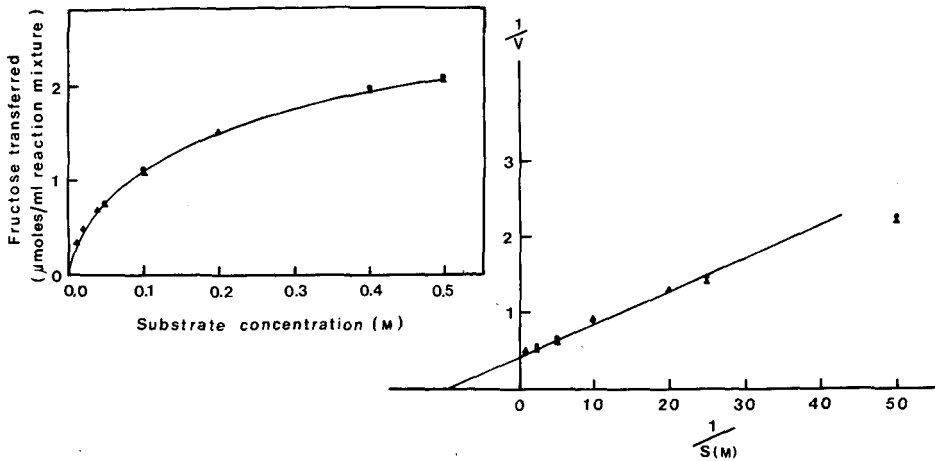


Fig. 27. Effects of Substrate Concentrations on Reaction Rate in SST-catalyzed Reaction.

After mixtures composed of enzyme (2 U, 0.5 ml) and sucrose of different concentrations in McIlvaine buffer, pH 5.0, (0.5 ml) were incubated, reducing sugars and glucose were measured.

SST activity:  $\triangle-\triangle$ , measured by the SOMOGYI-NELSON method;  $\bullet-\bullet$ , measured by Glucostat method.

Table 15. Self-transfer of Fructose Residues by Asparagus SST

A mixture of one of the 0.4 M [U-<sup>14</sup>C]-substrates (20  $\mu$ l) and enzyme (20  $\mu$ l) was incubated at 30°C for 10 hr. Amounts of the self-transferred fructose were calculated from radioactivities incorporated into the saccharides produced. Details were given in the text

[U- <sup>14</sup> C]-Substrate	Fructose self-transferred ( $\mu$ moles/ml reaction mixture)
Sucrose	8.10
1-Kestose	0.06
Neokestose	0.04
Nystose	Nil

合の転移量 (0.06~0  $\mu$ モル/ml) より圧倒的に大であった。またシュクロースからの反応生成物を TLC 分析してみると 1-kestose, グルコースおよびシュクロースのスポットのみが検出され、放射能はこれら三つのスポットにのみ存在することが確かめられた。

次いで、この酵素の raffinose および melezitose に対する作用を調べた。McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, 中のこれらの基質の一つ (0.2 M; 20  $\mu$ l) と酵素 (20  $\mu$ l) からなる混液を 30°C, 10 時間インキュベートし、反応生成物を TLC で調べたところ、両糖からは何んの反応生

成物も検出できず、従ってこれらの糖では“自己転移”が起きないことがわかった。

## 2) グルコースへのフラクトシル転移

数種のフラクト・オリゴ糖からのグルコースへのフラクトシル転移を調べた。使用した供与体糖は 0.4 M [U-<sup>14</sup>C] シュクロース (コントロールとして), 0.4 M 未標識 1-kestose, 0.4 M neokestose, 0.4 M nystose および 0.2 M <sup>1</sup>F (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose であった。McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, 中の供与体糖の一つ (10  $\mu$ l), 同一緩衝液中の 0.4 M [U-<sup>14</sup>C] グルコース (10  $\mu$ l, 0.069  $\mu$ Ci) および酵素 (20  $\mu$ l) からなる混液をトルエンの存在下で 30°C, 5 時間あるいは 10 時間インキュベートした後、反応を 0.1 M 昇汞 (10  $\mu$ l) 添加により止めた。これ以後の実験操作は前述と同様に行い、転移したフラクトースの量は各フラクト・オリゴ糖からグルコースへのフラクトシル転移により生成したシュクロースから計算した。

Table 16 にあげた結果はこの精製酵素が 1-kestose からのグルコースへのフラクトシル転移を触媒することを示した。またこのことは酵素がシュクロース 2 分子間の“自己転移”反応に対する逆反応を触媒することを意味している。

Nystose やテストした他のフラクト・オリゴ糖は供与体としてほとんどあるいは全く作用しないことがわ

**Table 16.** Fructosyl Transfer from Several Fructo-oligosaccharides to Glucose by Asparagus SST

Details of the experiments are described in the text.

Donor	Acceptor	Fructose transferred ( $\mu\text{moles/ml}$ reaction mixture)	
		Incubation time (hr)	
		5	10
[U- $^{14}\text{C}$ ] Sucrose <sup>b</sup>	None <sup>a</sup>	6.72	12.10
Unlabeled 1-kestose <sup>b</sup>	[U- $^{14}\text{C}$ ] Glucose	2.17	4.18
Unlabeled nystose <sup>b</sup>	"	0.08	0.20
Unlabeled 1 <sup>F</sup> (1- $\beta$ -fructofuranosyl) <sub>3</sub> sucrose <sup>c</sup>	"	Nil	0.04
Unlabeled neokestose <sup>b</sup>	"	Nil	Nil

a) Control; b) 0.4 M and c) 0.2 M solutions were employed.

かった。

**3) Neokestose およびその同族体へのフラクトシル転移**

受容体糖として種々のフラクト・オリゴ糖、即ち 1-kestose, neokestose, nystose, 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose, 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose (以上 0.4 M 濃度) および 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose, 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose, 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose (以上 0.2 M 濃度) を用いてシュクロースからのフラクトシル転移を調べた。

McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, 中 0.4 M [U- $^{14}\text{C}$ ] シュクロース (10  $\mu\text{l}$ , 0.03  $\mu\text{Ci}$ ), 同一緩衝液中の受容体糖の一つ (10  $\mu\text{l}$ ) および酵素 (20  $\mu\text{l}$ ) からなる反応混液をトルエン存在下で 30°C で 5 あるいは 10 時間インキュベートした。反応は 0.1 M 昇汞 (10  $\mu\text{l}$ ) 添加により止め、その後は前述と同様の方法によって操作し、転移したフラクトース量は受容体の重合度より 1 フラクトース単位だけ高い重合度をもつ生成糖の量から計算した。

Table 17 に示したように、精製 SST はシュクロースからの neokestose およびその同族体 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose ( $n=2$  および 3) へのフラクトシル転移を触媒できることが確かめられたが、1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 系列糖 ( $n=1$ (1-kestose), 2(nystose) および 3) へのフラクトシル転移は無視しうる程度かあるいはまったく生じないことが確かめられた。さらに 1<sup>F</sup>-(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 系列の糖 ( $m=1, n=1$ ; および  $m=2, n=1$ ) もまた受容体として無効であることがわかった。

次に、シュクロースからの 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose へのフラクトシル転移部位を決定するため、neokestose と 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose を例にとりてフラクトシル転移生成物を調べた。

McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, 中 0.4 M [U- $^{14}\text{C}$ ] シュクロース (0.03  $\mu\text{Ci}$ , 10  $\mu\text{l}$ ), 同一緩衝液中 0.4 M neokestose あるいは 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose (10  $\mu\text{l}$ ) および酵素 (20  $\mu\text{l}$ ) からなる混液を 30°C, 24 時間インキュベートした。反応を止めるために 0.1 M 昇汞 (10  $\mu\text{l}$ ) を添加した後、混液にキャリア糖を加え、活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィー (1:1; カラム 1.5  $\times$  54 cm) を行って 10% 次いで 13% エタノールで溶出した。この操作により neokestose 反応液からは二つの四糖, 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose 反応液からは二つの五糖が分離されたので、これらの糖に取込まれた放射能を測定して、その結果を Table 18 に示してある。

これによると、受容体として neokestose を用いた時これへの放射能取込みがあり放射性 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose が生ずることが明らかであったが、6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose には無視し得る程度の放射能しかなく、この糖はほとんど生じないことがわかった。また同じく放射能取込みの有無から、6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose を用いた時には 1<sup>F</sup>- $\beta$ -fructofuranosyl-6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose は生ずるが 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose は生じないことがわかった。

以上の結果から、SST によるシュクロースからの 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose へのフラクトシル転

**Table 17.** Fructosyl Transfer from Sucrose to Several Fructo-oligosaccharides by Asparagus SST

Details of the experiments are given in the text.

Donor	Acceptor (Unlabeled)	Fructose transferred ( $\mu$ moles/ml reaction mixture)	
		Incubation time (hr)	
		5	10
[U- <sup>14</sup> C] Sucrose	None <sup>a</sup>	8.06	14.80
"	1-Kestose <sup>b</sup>	Nil	0.13
"	Nystose <sup>b</sup>	Nil	Nil
"	1 <sup>F</sup> (1- $\beta$ -Fructofuranosyl) <sub>3</sub> sucrose <sup>c</sup>	Nil	Nil
"	Neokestose <sup>b</sup>	2.26	4.92
"	6 <sup>G</sup> (1- $\beta$ -Fructofuranosyl) <sub>2</sub> sucrose <sup>b</sup>	1.74	3.24
"	6 <sup>G</sup> (1- $\beta$ -Fructofuranosyl) <sub>3</sub> sucrose <sup>c</sup>	0.97	1.83
"	1 <sup>F</sup> , 6 <sup>G</sup> -Di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose <sup>b</sup>	Nil	Nil
"	1 <sup>F</sup> (1- $\beta$ -Fructofuranosyl) <sub>2</sub> - 6 <sup>G</sup> - $\beta$ -fructofuranosyl sucrose <sup>c</sup>	Nil	Nil

a) Control; b) 0.4 M and c) 0.2 M solutions were used.

**Table 18.** Fructosyl Transfer from Sucrose to Neokestose or 6<sup>G</sup> (1- $\beta$ -Fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose by Asparagus SST

Details of the experiments are given in the text.

Donor ([U- <sup>14</sup> C]- labeled)	Acceptor (Unlabeled)	Radioactivity incorporated (cpm) into	
Sucrose	Neokestose	6 <sup>G</sup> (1- $\beta$ -Fructofuranosyl) <sub>2</sub> - sucrose	108
		1 <sup>F</sup> , 6 <sup>G</sup> -Di- $\beta$ -fructofuranosyl- sucrose	3300
Sucrose	6 <sup>G</sup> (1- $\beta$ -Fructofurano- syl) <sub>2</sub> sucrose	85	2180

移は受容体糖のシュクロース部の C-1(OH) 位に生ずるもので分子中のもう一つの末端フラクトースには生ずるものではないことが結論できた。

### 3. 考 察

アスパラガス根の fructosyltransferase 一つを比活性で硫酸 0.3~0.8 飽和沈澱画分に対して 811 倍に高度に精製することができたが、この精製で最も大きな成果は他の二つの fructosyltransferases を除去することができたことである。この除去に最も効果的であったのは sucrose-coupled Sepharose 6 B・カラムクロマトグラフィを用いたことであった。

現在までにいくつかの高等植物について fructosyltransferase が部分精製されたことが報告されているが、その大部分は、加水分解活性をもたないというものの、その純度は必ずしも高くはない。そのため従来の fructosyltransferase に関する研究では止むなく他の fructosyltransferases を夾雑する標品をそのまま用いて性質が調べられている場合が多い。従って次に述べる酵素の性質比較はこのような部分精製酵素との比較である。

今回高度精製したアスパラガス酵素の至適 pH (基質シュクロース) は約 5.0 であり、これはキクイモ塊茎およびタマネギ鱗茎の部分精製 SST (加水分解酵素と

FFT 活性のないもの) の pH 5.0~5.2<sup>91)</sup>, チョリー根の 14 倍精製 transfructosylase (恐らくは二つの異なる活性を有するもの) の pH 5.6<sup>106,107)</sup>, そしてリュウゼツラン茎の 40 倍精製 transfructosylase (加水分解活性はないが, 三つの他の酵素活性を示すもの) の pH 5.5<sup>83)</sup> とほとんど同一であった。

アスパラガス酵素のシュークロースに対する  $K_m$  値は 0.11 M であるのに対して, キクイモ<sup>91)</sup>, タマネギ<sup>91)</sup> およびリュウゼツラン<sup>83)</sup> の  $K_m$  値は各々 0.13, 0.098 および 0.18 M であり大差なく, またチョコリー<sup>106)</sup> のそれは 0.285 M でありいく分高かった。

この酵素の分子量 (Sephadex G-200 ゲル濾過) は約 65,000 と推定されたが, この値はリュウゼツラン酵素で報ぜられた 62,000 に類似するが, レタス葉の部分精製 SST<sup>33)</sup> の 100,000 よりは小であった。

特異性について比較すると, アスパラガス酵素はシュークロース分子間の“自己転移”を高度に且特異的に触媒してグルコースを放出しつつ 1-kestose を生ずる, しかしこの酵素は 1-kestose, nystose, neokestose, raffinose あるいは, melezitose の“自己転移”を触媒しなかった。このような特異性はキクイモ SST<sup>49)</sup>, チョリー<sup>107)</sup> の transfructosylase, およびリュウゼツラン<sup>83)</sup> の transfructosylase のそれとほとんど同じである。またアスパラガス酵素は 1-kestose からのグルコースへのフラクトシル転移を反応性は幾分低い触媒して 2 分子のシュークロースを生じた。これは上述の反応の逆反応が進行できることを示している ( $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n\text{-sucrose}$  [ $n=2$  (nystose) および 3] と neokestose はこのような型の反応における供与体とはならなかった)。これと同一の逆反応がリュウゼツランの transfructosylase<sup>83)</sup> では起るが, キクイモ<sup>49)</sup> やチョコリー<sup>107)</sup> の酵素では起らないと報告されている。

アスパラガス酵素の特徴的な性質はシュークロースから neokestose 同族体へのフラクトシル転移を触媒し, このときフラクトシル基はこれらの糖のシュークロース部フラクトース C-1(OH) 位に転移されることである。しかしこの酵素はシュークロースからの  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n\text{-sucrose}$  や  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-6G-(1-\beta\text{-fructofuranosyl})}_n\text{-sucrose}$  ( $m \neq 0$ ) 系列オリゴ糖へのフラクトシル転移を触媒しなかった。このような特徴的な特異性はキクイモの SST<sup>49)</sup> やチョコリー<sup>107)</sup> の transfructosylase では報告されていないものである。

上述のことから, アスパラガス根から単離した酵素はキクイモの SST に類似はするが, 必ずしもそれと同一

の性質を持つ fructosyltransferase ではないことが確認された。従ってこのような特異性をもつ SST が 1-kestose および neokestose 両系列の糖を含む他の高等植物でも将来見出されることが予想される。

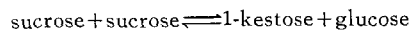
#### 4. 要 約

アスパラガス根抽出液から硫酸分画, DEAE-セルロース, CM-セルロース, Sephadex G-200 および sucrose-coupled Sepharose 6 B・カラムクロマトグラフィーを行うことにより sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (SST) を比活性で硫酸 0.3~0.8 飽和画分に対し 811 倍に高度精製した。この精製酵素はディスク電気泳動的に均一であり,  $\beta\text{-fructofuranosidase}$  や他の fructosyltransferase 活性を含まず, 推定分子量 (Sephadex G-200 ゲル濾過法) は約 65,000 であった。

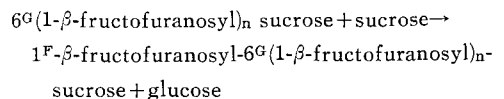
この酵素はまた至適 pH 約 5.0,  $K_m$  値 (シュークロース) 0.11 M, 30°C (pH 4.0~8.0) 加熱で安定, 45°C (pH 5.0~6.5) 加熱で不安定, および *p*-chloromercuribenzoate,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  および  $\text{Ag}^+$  により活性阻害される等の性質を示した。

この酵素の触媒する主反応は次のようなものであった。

1) シュークロース分子間のフラクトシル転移“自己転移”を高度に且特異的に触媒して 1-kestose とグルコースを可逆的に生じたが, 1-kestose, nystose, あるいは neokestose それぞれの分子間での“自己転移”は極めて小であった。



2) Neokestose およびその同族オリゴ糖  $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n\text{-sucrose}$  のシュークロース部フラクトースへのシュークロースからのフラクトシル転移を触媒した。この特異性はアスパラガス SST に特徴的なものでキクイモ SST では報告されていない性質であった。



3) この酵素は  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n\text{-sucrose}$  および  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n\text{-sucrose}$  系列オリゴ糖 ( $m \neq 0$ ) へのフラクトシル転移は触媒しなかった。

以上により, アスパラガス SST はキクイモ SST に類似はするが, 全くは同一でないことがわかった。

## 第5章 アスパラガス根の 6<sup>G</sup>-Fructosyltransferase の精製と性質

この章では、もう一つのアスパラガス酵素である 6<sup>G</sup>-fructosyltransferase (6<sup>G</sup>-FT) を精製し、その性質を説明することができたので、それについて述べることにする<sup>96,98</sup>。

### 1. 材料と方法

材料: アスパラガスの根は1976年9月札幌近郊の一実験圃場で採集し、凍結保存したものをを使用した。

放射性糖, [U-<sup>14</sup>C] シュークロースと [6, 6'-<sup>3</sup>H] シュークロースは the Radio Chemical Centre, Amer-sham から購入し, [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose, [U-<sup>14</sup>C] neokestose, [U-<sup>14</sup>C] nystose はアスパラガス根の fructosyltransferase の一標品<sup>105</sup>を用いて [U-<sup>14</sup>C] シュークロースから調製した。

無標識の 1-kestose, neokestose, nystose, 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose ( $n=2$  と  $3$ ) および 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose ( $m=1, n=1; m=1, n=2; m=2, n=1$ ) はアスパラガス根から分離し, 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose ( $n=3, 4$  と  $5$ ) はキクイモ塊茎から得た<sup>99,103~105</sup>。

糖と蛋白の定量: 前章と同様の方法で行った。

ペーパーおよび薄層クロマトグラフィー (PC および TLC): 前章と同様の方法で行った。

活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィー: 前章と同様の方法で行った。

酵素活性の測定: 6<sup>G</sup>-Fructosyltransferase の活性は 1-kestose からの 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl-sucrose (4C 糖と表示<sup>103</sup>) の合成を触媒する活性として定義し、この活性の1単位は下述の条件下で1時間に1μモルのフラクトシル基を転移する酵素量と定義した。

酵素 (20 μℓ) と McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, (20 μℓ) 中 0.4 M [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose (0.045 μCi) からなる混液を 30°C で1時間インキューベートし、酵素反応を 0.1 M 昇汞 (10 μℓ) を加えることにより止めた後、混液にキャリア糖として 4C 糖 (1 mg) を添加し、これを活性炭—カラム—、次いでペーパー・クロマトグラフィー〔溶媒 (I)〕して放射性 4C 糖を単離した。フラクトースの転移量は、前章と同様にして測定した 4C 糖の放射能から計算し、この計算の際、両クロマトグラフィーの全回収放射能も計算に入れた。

ディスク電気泳動: ORNTEIN-DAVIS<sup>36,74</sup>) の方法に

より、7.5% polyacrylamide ゲル (pH 8.0) にて、室温、2 mA/tube で2時間行った。ゲル上の蛋白バンドは7% 酢酸中 1% Amido Schwarz 10 B 溶液で染色した。

分子量の測定: 酵素の分子量は Sephadex G-200 カラムを用いるゲル濾過 (上昇法) により測定した。0.25 M 塩化ナトリウムを含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化した Sephadex G-200 カラム (2.64×98 cm) を用い、同一緩衝液で 6 ml/hr の流速で溶出を行った。標準蛋白質 (Boehringer Mannheim GmbH から購入したもの) として chymotrypsinogen A (分子量、25,000), egg-albumin (45,000), bovine serum albumin (67,000) および aldolase (147,000) を用いた。

Raffinose-coupled Sepharose 6B の調製: 前章で記載した方法と同様の方法で raffinose を epoxyactivated Sepharose 6B にカップリングさせて調製した。

### 2. 結果

#### (1) 酵素の精製

##### 1) 硫酸画分

予め水洗し細かく切ったアスパラガスの根(各々200g; 全量 18 kg) を 0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.5, (1 ℓ) 中でホモジナイズした。ホモジネートを布で濾過し、遠心分離し (10,000×g, 15分, 後述の全ての遠心分離はこの条件で行った), 得られた上澄液に固形硫酸を加え全飽和とし、冷室中に一夜放置した。生成した沈澱を遠心分離により集め、これを 0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.5, に溶解し、次いで同一緩衝液に対して5日間透析した。透析内液を遠心分離して上澄液を得た〔“硫酸, 0~1 飽和” 画分, 5.7 ℓ〕。

この画分をさらに固形硫酸で処理し、0.3~0.5 飽和の沈澱画分を得、これを 0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.5, に対し4日間透析した〔“硫酸, 0.3~0.5 飽和” 画分, 800 ml〕。

##### 2) リン酸カルシウム・ゲル処理

上述の画分にリン酸カルシウム・ゲルを加え (800 ml, ゲル 6.5 g/蛋白 1 g) 十分に懸濁し、5°C で30分放置した後、遠心分離した。上澄液は Amicon 限外濾過器 (Diaflo PM-10 filter) で濃縮し、0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.5, で透析した。このゲル処理により殆ど加水分解活性を除去することが出来た〔“リン酸カルシウム・ゲル” 画分, 1,050 ml〕。

##### 3) Octyl-Sepharose・カラムクロマトグラフィー

上述の画分を硫酸で35% 飽和とし、一夜冷所に放置し、生ずる沈澱は遠心分離によって除いた後、予め硫酸



で35%飽和とした0.01 Mリン酸緩衝液, pH 6.5, で平衡化させた octyl-Sepharose CL-4B カラム (5.5×30 cm) にかけた。溶出は四つの異なる硫酸飽和度の0.01 Mリン酸緩衝液, pH 6.5, (35%, 30%, 20% および10%飽和, 各々1.5 ℓ), 次いで硫酸を含まぬ同一緩衝液 (2 ℓ) で連続的に行った。6<sup>G</sup>-Fructosyltransferase (6<sup>G</sup>-FT) は硫酸20%飽和の緩衝液で溶出され, 1<sup>F</sup>-fructosyltransferase (1<sup>F</sup>-FT) は0.01 Mリン酸緩衝液で溶出されたので, この6<sup>G</sup>-FTの溶出液を限外濾過器 (Amicon; Diaflo PM-10 filter) で約500 mℓに濃縮した。この溶液に0.01 Mリン酸緩衝液 (約500 mℓ) を添加し, 再度上述と同様の方法で濃縮した。この処理をもう一度繰返して殆んど硫酸のない酵素液を得て, これを0.01 Mリン酸緩衝液, pH 7.0, で2日間透析した [“octyl-Sepharose” 画分, 1,000 mℓ]。

#### 4) DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィー

上述の酵素溶液は0.01 Mリン酸緩衝液, pH 7.0, で平衡化させた DEAE-セルロース・カラム (5×12 cm) に通し, 次いで0.01, 0.02 および0.07 Mリン酸緩衝液, pH 7.0 (各々1 ℓ) で連続溶出した。6<sup>G</sup>-FTは0.07 M緩衝液で溶出されたので, この溶出液を濃縮し, 0.01 Mリン酸緩衝液に対して透析した [“DEAE-セルロース, 1st” 画分, 65 mℓ]。

この透析内液について DEAE-セルロースカラム (2.8×10 cm) でさらにクロマトグラフィーを行い, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06 および0.07 Mリン酸緩衝液, pH 7.0, (各々300 mℓ) を用いて溶出した。6<sup>G</sup>-FTは0.05と0.06 Mの緩衝液で溶出されたので両溶出液を合せ, 限外濾過器で濃縮し, 0.01 Mリン酸緩衝液, pH 6.5, 中0.25 M塩化ナトリウム液で一晩透析した [“DEAE-セルロース, 2nd” 画分, 50 mℓ]。

#### 5) Sephadex G-200・カラムクロマトグラフィー

透析酵素は限外濾過器で3 mℓに濃縮し, 0.01 Mリン酸緩衝液, pH 6.5, 中0.25 M塩化ナトリウムで平衡化させた Sephadex G-200 カラム (2.64×98 cm) にかかけ, 同じ緩衝液で溶出を行い (Fig. 28), 活性画分 No. 55~67 を合せて濃縮した [“Sephadex G-200” 画分, 10 mℓ]。

#### 6) Raffinose-coupled Sepharose 6B・カラムクロマトグラフィー

上述の濃縮酵素液は0.01 M酢酸緩衝液, pH 5.6, に対して一夜透析した後, raffinose-coupled Sepharose 6B・カラム (1×8 cm) に供し, 0.01 M酢酸緩衝液, pH 5.6, (100 mℓ) 溶出で, 微量の sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (SST) を除去し, 次いで吸着している6<sup>G</sup>-FTを0.01 Mリン酸緩衝液, pH 6.0, (100 mℓ) で溶出させることができた。この画分を濃縮し, 0.005 Mリン酸

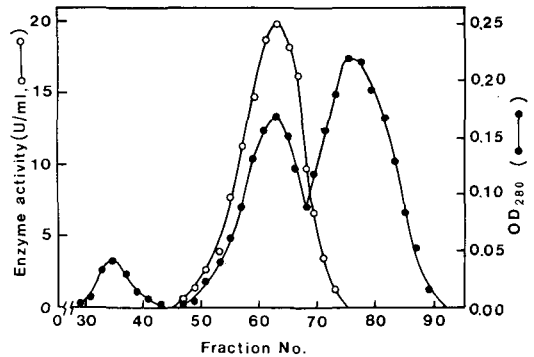


Fig. 28. Sephadex G-200 Column Chromatography of Asparagus 6<sup>G</sup>-Fructosyltransferase (6<sup>G</sup>-FT).

Elution was conducted with 0.01 M phosphate buffer containing 0.25 M NaCl. Five-mℓ fractions were collected.

Table 19. Purification Process of Asparagus 6<sup>G</sup>-FT

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Volume (mℓ)	Specific activity (U/mg protein)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0~1 satn.	12600	70380	5700	0.18
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.3~0.5 satn.	9580	24520	800	0.39
Calcium phosphate gel	7172	6410	1050	1.12
Octyl-Sepharose	5710	715	1000	7.99
DEAE-cellulose, 1st.	3098	104	65	29.8
DEAE-cellulose, 2nd.	1785	42.8	50	41.7
Sephadex G-200	931	8.01	10	116.2
Sepharose 6B	684	5.00	10	136.8

緩衝液, pH 6.5, で透析したものを最終精製酵素標品とした["Sepharose 6B" 画分, 10 mℓ]。

このようにして, Table 19 に示すようにこの酵素は硫酸安全飽和沈澱に対して比活性で760倍, 5.4%の収量で精製することができ, その比活性は136.8 U/蛋白 mgであった。また, この酵素標品は, シュークロース, 1-kestose, neokestose および  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose ( $n=2, 3, 4$  および  $5$ ) を加水分解しなかったことから  $\beta$ -fructofuranosidase を含まず, シュークロースからの1-kestoseの生成を触媒しなかったことから SST を含まず, また 1-kestose から nystose を合成しなかったことから  $1^F$ -FT を含まないことが確認された。

## (2) 酵素の一般的性質

### 1) ディスク電気泳動

精製酵素を2本の polyacrylamide ゲル上で同一条件下で電気泳動させた。ゲルの1本は Amido Schwarz 10 B で染色させ (Fig. 29), もう1本は2-mm厚のディスクに切断し McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, (0.2 mℓ) でホモジナイズした。このホモジネートに0.2 M 1-kestose (0.2 mℓ) を加え 30°C で15時間インキュベートした後,  $6^G$ -FT 活性について TLC により分析した。この酵素標品はゲル上で単一バンドを示し, このバンド部分に  $6^G$ -FT 活性が存在することがわかった。

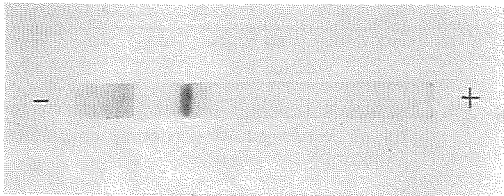


Fig. 29. Disc Electrophoresis of Asparagus  $6^G$ -FT on Polyacrylamide Gel.

Details of the electrophoresis are described in the text.

### 2) 分子量

この酵素の分子量は Sephadex G-200 ゲル濾過により標準蛋白との比較から約 69,000 と推定された (Fig. 30)。

### 3) 至適 pH

1-Kestose を基質とした時の pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 および 7.0 における反応を測定し, Fig. 31 に示した。この酵素の至適 pH は約 5.5 であった。

### 4) pH-安定性

pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 および 7.0 の酵素溶液を 45°C で 20 分間プレインキュベートした後, 0°C に冷却,

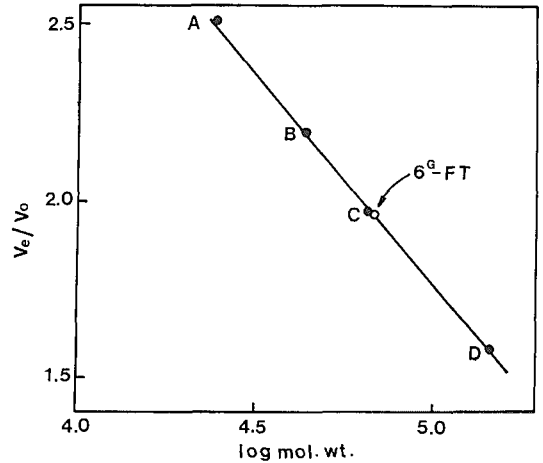


Fig. 30. Estimation of Molecular Weight of Asparagus  $6^G$ -FT by Gel-filtration.

$V_e$ , elution volume;  $V_o$ , void volume.

Reference proteins (Boehringer Mannheim GmbH): A, chymotrypsinogen A, mol. wt. 25,000; B, henegg albumin, 45,000; C, bovine serum albumin, 67,000; D, aldolase, 147,000.

Details of the gel-filtration are described in the text.

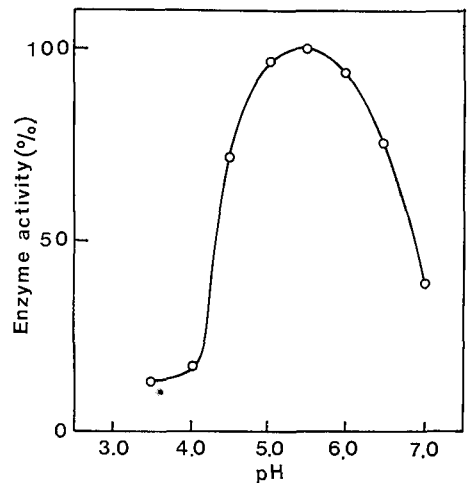


Fig. 31. Effects of pH's on Activity of Asparagus  $6^G$ -FT.

Enzyme was used in an amount of 13.9 U/mℓ.

Details of the experiments are described in the text.

pH 5.5 に調整し, 次いでその残存活性を測定した (Fig. 32)。pH 5.0~6.0 では最初の活性の 80% あるいはそれ以上が存在していたが, pH 4 と 7 では活性の約 87% が失

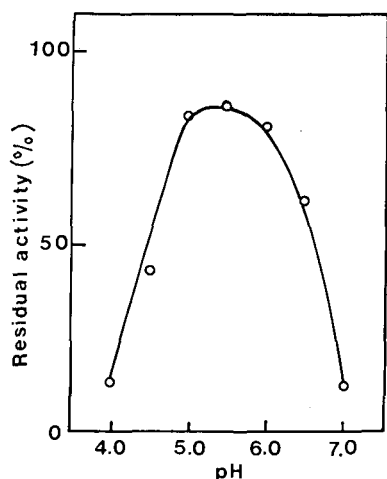


Fig. 32. Effects of pH's on Stability of Asparagus 6G-FT.

Enzyme was used in an amount of 24 U/ml. Details of the experiments are described in the text.

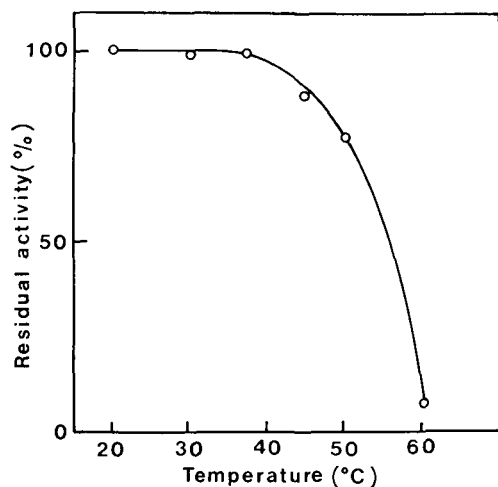


Fig. 33. Effects of Temperatures on Asparagus 6G-FT.

Enzyme was used in an amount of 18 U/ml. Details of the experiments are described in the text.

われた。

##### 5) 熱安定性

この酵素溶液を 30°, 37°, 45°, 50° あるいは 60°C で 10 分間加熱した後 (20°C はコントロール) その残存活性を測定した。Fig. 33 に示すように 20~37°C では安定であるが 60°C では失活した。

##### 6) 阻害剤の効果

6G-FT に対する種々の化合物の影響を調べた。酵素 (9.5 U/ml, 20  $\mu$ l) と McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, (10  $\mu$ l) 中 0.4 M [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose の混液を水あるいは化合物の一つ (10  $\mu$ l) の存在下で 30°C でインキュベートした。0.1 M 昇汞 (10  $\mu$ l) を添加して反応を止めた後、反応液について PC を行い、単、二、三、四およびより高次の糖の画分に分離し、各々の糖画分について放射能を測定した。酵素の残存活性は四糖画分に取込まれた放射能から計算し、相対比で表わした。

Table 20 に示すように昇汞 ( $1 \times 10^{-4}$  M), *p*-chloro-mercuribenzoate と硝酸銀 ( $1 \times 10^{-3}$  M) は各々酵素を約 92, 83 および 30% 阻害するが、塩化マグネシウムと塩化アルミニウムは各々活性を約 6 および 8% 促進し、硫酸カルシウム、塩化バリウム、塩化カルシウムと硫酸亜鉛は何らの効果も示さなかった。

Table 20. Effects of Various Compounds on Asparagus 6G-FT

Compound	Concentration	Relative activity
Control	—	100.0
HgCl <sub>2</sub>	$1.0 \times 10^{-4}$ M	8.4
<i>p</i> -CMB	$1.2 \times 10^{-4}$ M	17.5
AgNO <sub>3</sub>	$1.0 \times 10^{-3}$ M	63.8
CuSO <sub>4</sub>	$1.0 \times 10^{-3}$ M	96.0
BaCl <sub>2</sub>	$1.0 \times 10^{-3}$ M	98.3
CaCl <sub>2</sub>	$1.0 \times 10^{-3}$ M	101.4
ZnSO <sub>4</sub>	$1.0 \times 10^{-3}$ M	102.6
MgCl <sub>2</sub>	$1.0 \times 10^{-3}$ M	105.8
AlCl <sub>3</sub>	$1.0 \times 10^{-3}$ M	108.3

Details of the experiments are described in the text.

##### (3) 基質特異性

###### 1) フラクトシル基の“自己転移”

精製 6G-FT を用いて同一種の糖の間でのフラクトシル基の“自己転移”を調べた。

###### i) 1-Kestose 分子間の転移

まず、[U-<sup>14</sup>C] 1-kestose を 6G-FT 標品と反応させ、四糖生成の経時変化を追跡した。0.4 M [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose (0.045  $\mu$ Ci, 10  $\mu$ l), McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, (10  $\mu$ l) と酵素 (4.7 U/ml, 20  $\mu$ l) からなる混液を少量のトルエンの存在下で 30°C でインキュベートした。反応を 0.1 M 昇汞 (10  $\mu$ l) を加えて止めた後、反応混液にキャリア糖

[フラクトース, グルコース, シュークロースおよび  $1F$ - $(1-\beta$ -fructofuranosyl) $_n$  sucrose ( $n=2, 3, 4$  および  $5$ ), 各々  $100 \mu\text{g}$ ] を加え溶媒 (I) を用いる PC にかへ 5 重展開して単〜七糖および高次の糖画分に分離した。それぞれの糖に相当する八つのゾーンをそれぞれ水抽出し、減圧下蒸発乾固して、得られた残渣を水 ( $2 \text{ ml}$ ) に溶かし放射能を測定した。四糖の生成量はその放射能と回収した全放射能とから計算した。

Fig. 34 に示した実験結果からわかるように四糖の生成は約 3 時間までは反応時間に比例して増加し、次いでその増加の程度は漸減した。なお、四糖生成と同時にシュークロースが遊離することも確かめられた。

第 2 に、先に分離した四糖画分についての異性体の分析を行った。即ち、この画分 ( $2 \text{ ml}$ ) の  $1 \text{ ml}$  にキャリア糖 [nystose,  $1F$ ,  $6G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose と  $6G$  ( $1-\beta$ -fructofuranosyl) $_2$  sucrose, 各々  $1 \text{ mg}$ ] を加えて、活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィーを行い、単離した異性体の放射能を測定した。

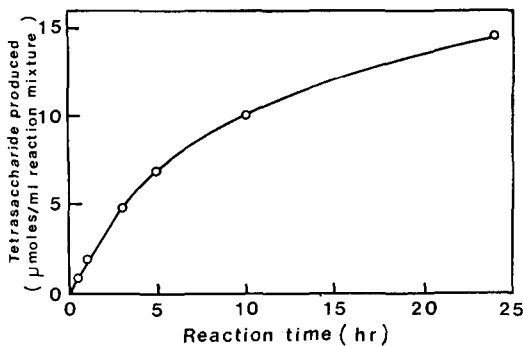


Fig. 34. Synthesis of Tetrasaccharide from 1-Kestose by Asparagus  $6G$ -FT.

Details of the experiments are described in the text.

その結果によると、約 10 時間反応までは  $1F$ ,  $6G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose のみが生成されるが、長時間の反応では  $6G$  ( $1-\beta$ -fructofuranosyl) $_2$  sucrose と nystose の痕跡量も出現することがわかった。

第 3 に、上述した 1-kestose 分子間の“自己転移”反応に対する逆反応が起るか否かを  $1F$ ,  $6G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose と  $[U^{14}\text{C}]$  シュークロースを用いて実験した。

$6G$ -FT ( $20 \mu\text{l}$ ) と McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, ( $20 \mu\text{l}$ ) 中  $0.2 \text{ M}$   $[U^{14}\text{C}]$  シュークロース ( $0.1 \mu\text{Ci}$ ) および  $0.2 \text{ M}$   $1F$ ,  $6G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose の混液 (A) を  $30^\circ\text{C}$  で 3, 5 および 10 時間インキュベートした。また同一緩衝液 ( $20 \mu\text{l}$ ) 中  $0.2 \text{ M}$   $[U^{14}\text{C}]$  1-kestose ( $0.045 \mu\text{Ci}$ ) と  $6G$ -FT ( $20 \mu\text{l}$ ) の混液 (B) も同一条件下でインキュベートした。反応は  $0.1 \text{ M}$  昇汞の添加で止めた後、混液を前述したと同様にして PC, 次いで活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィーし、混液 (A) から単離された 1-kestose と混液 (B) からの  $1F$ ,  $6G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose について放射能を測定し、それらの値と全回収放射能の値から、各々のフラクトシル転移量を算出した。

Table 21 に示した実験結果から明らかなように  $1F$ ,  $6G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose と  $[U^{14}\text{C}]$  シュークロースとの反応により放射性 1-kestose が生成されることが確かめられ、このことは本酵素が 1-kestose 分子間の反応の逆反応をも触媒できることを示した。しかし、逆反応 (A) の速度は正反応 (B) の速度よりもかなり小であることもわかった。

#### ii) Nystose 分子間の転移

$6G$ -FT による nystose からの五糖生成の経時変化を前述と同様の実験方法で  $0.4 \text{ M}$   $[U^{14}\text{C}]$  nystose ( $0.03 \mu\text{Ci}$ ,  $10 \mu\text{l}$ ) を用いて行い、五糖に取込まれた放射能を測定し調べた。さらに分離した五糖画分からの五糖異性

Table 21. Fructosyl Transfer from  $1F$ ,  $6G$ -Di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose to Sucrose by Asparagus  $6G$ -FT

Reaction between	Fructose transferred ( $\mu\text{mol}/\text{ml}$ reaction mixture)		
	Incubation time (hr)		
	3	5	10
A. $1F$ , $6G$ -Di- $\beta$ -fructofuranosylsucrose and $[U^{14}\text{C}]$ sucrose	0.87	1.54	3.27
B. $[U^{14}\text{C}]$ 1-Kestose alone	6.26	9.45	16.88

Details of the experiments described in the text.

体の単離を, キャリア糖として  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n\text{ sucrose}$  [ $m=0, n=3; m=1, n=2; m=2, n=1; \text{および } m=3, n=0$ ] を用いる活性炭-セライト・カラムクロマトグラフィーによって行い, 次いで単離した異性体の各々について放射能を測定した。

実験の結果は Fig. 35 に示すように, 五糖の合成は約 10 時間までは反応時間に比例して起り, 合成された五糖は  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl}\text{-sucrose}$  であることが確められ, さらにこの反応では同時に 1-kestose が遊離されることも明らかにされた。

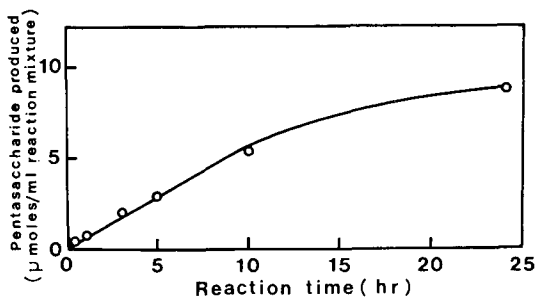


Fig. 35. Synthesis of Pentasaccharide from Nystose by Asparagus  $6^G$ -FT.

Details of the experiments are described in the text.

iii)  $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_3$  又は  $4$  sucrose 分子間の転移

$1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_3$  sucrose あるいは  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_4$  sucrose 分子間での“自己転移”を無標識糖を用いて前と同様の方法によって 24 時間インキュベーションした後, 反応生成物を TLC 分析することにより調べた。

その結果  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose からは  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  と推定される糖, また  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_4$  sucrose からは  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_4\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl}\text{-sucrose}$  と推定される糖がいずれも少量ずつ生ずることが確められた。

上述の全ての知見を総合して, アスパラガス  $6^G$ -FT は同一種の  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列糖間の“自己転移”において, 一方の糖分子の末端  $\beta(2\rightarrow 1)$  結合 fructofuranosyl 残基を他方の糖分子のグルコース部 C-6(OH) 位への転移に関して非常に高い特異性を示す酵素であると言うことができる。

2) 1-Kestose からの  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n\text{-sucrose}$  系列糖へのフラクトシルの転移

$6^G$ -FT による 1-kestose からの  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose へのフラクトシル転移を調べた。

i) 1-Kestose からのシュクロースへの転移

まず最初に,  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_0$  sucrose に相当する糖であるシュクロースへの 1-kestose からのフラクトシル転移について調べた。

酵素 (4.7 U/ml, 20  $\mu\ell$ ), McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, (20  $\mu\ell$ ) 中 0.2 M 1-kestose と 0.2 M [ $U\text{-}^{14}C$ ] シュクロース (0.1  $\mu\text{Ci}$ ) を含む混液を  $30^\circ\text{C}$  でインキュベートし, 0.1 M 昇汞 (10  $\mu\ell$ ) を加えて反応を止めた後, 混液にキャリア糖を加えて PC につけ溶媒 (I) で 3 重展開して単～四糖および高次の糖を分離した。分離した五つの糖画分について放射能を測定し, 三糖の生成量は三糖の放射能と全回収放射能とから計算した。また分離した三糖画分からの三糖異性体の単離は活性炭-セライト・カラムクロマトグラフィーによって行った。

実験の結果から, 反応で生ずる放射性三糖は neokestose のみであり, またこの neokestose は 10 時間反応までは反応時間に比例して生ずるが, それ以後ではその増加割合は減少することがわかった (Fig. 36)。しかし 24 時間の反応では他の三糖 1-kestose も少量生ずることが認められた。

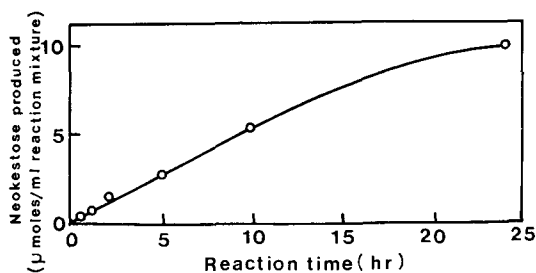


Fig. 36. Neokestose Synthesis by Fructosyl Transfer from 1-Kestose to Sucrose with Asparagus  $6^G$ -FT.

Details of the experiments are described in the text.

これらの実験結果から  $6^G$ -FT が 1-kestose からのシュクロースのグルコース残基 C-6(OH) へのフラクトシル転移を触媒し,  $6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  (neokestose) を生成できることが明らかにされた。

一方, この反応において三糖 neokestose の他に少量の四糖  $1^F, 6^G\text{-di-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  が生ずる

ことが認められ、この四糖の生成にはシュクロース濃度が高い影響を持つことが推測されたので第2の実験としてはこれを調べた。

酵素 (20  $\mu\ell$ ), McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, (20  $\mu\ell$ ) 中 0.2 M [ $^{14}\text{C}$ ] 1-kestose (0.045  $\mu\text{Ci}$ ) および 0.02~1 M [ $^3\text{H}$ ] シュクロース (0.1  $\mu\text{Ci}$ ) からなる混液を 30°C で 2時間インキュベートし、反応を止めるために、0.1 M 昇汞 (10  $\mu\ell$ ) を添加後、キャリア糖を加え溶媒 (I) を用いる 5 重展開 PC を行い単〜四糖およびより高次の糖画分を分離した。次いで活性炭-セライト・カラムクロマトグラフィーにより三糖画分から neokestose, 四糖画分から 1 $^{\text{F}}$ , 6 $^{\text{G}}$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose を単離し、それぞれの放射能を測定し、それらの放射能と全回収放射能とから両糖の量を計算した。

Table 22 の実験結果に示すようにシュクロースの濃度が高い程 neokestose の生成は漸増し、1 $^{\text{F}}$ , 6 $^{\text{G}}$ -di- $\beta$ -

fructofuranosyl sucrose の生成は反対に漸減し、約 0.15 M より高いシュクロース濃度の場合に前者の糖が後者の糖より多く生ずることがわかった。

第3の実験として前に述べた反応の逆反応、即ち neokestose とシュクロースからの 1-kestose の生成反応、が起るかどうかを調べる実験を行った。

6 $^{\text{G}}$ -FT (3.7 U/ml, 20  $\mu\ell$ ) と McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, (20  $\mu\ell$ ) 中 0.2 M [ $^{14}\text{C}$ ] シュクロース (0.1  $\mu\text{Ci}$ ) および 0.2 M neokestose とからなる混液 (A) を 30°C, 3, 5 および 10 時間インキュベートした。また 6 $^{\text{G}}$ -FT (3.7 U/ml, 20  $\mu\ell$ ) と前と同一の緩衝液 (20  $\mu\ell$ ) 中 0.2 M [ $^{14}\text{C}$ ] シュクロース (0.1  $\mu\text{Ci}$ ) および 0.2 M 1-kestose 溶液とからなる混液 (B) も同一条件下でインキュベートした。反応は 0.1 M 昇汞 (10  $\mu\ell$ ) を加えて止めた後、混液にキャリア糖 (混液 (A) では 1-kestose, 混液 (B) では neokestose, 各々 100  $\mu\text{g}$ ) を加えて PC にかける三糖画分

Table 22. Effect of Sucrose Concentration on Synthesis of Neokestose and 1 $^{\text{F}}$ , 6 $^{\text{G}}$ -Di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose from 1-Kestose by Asparagus 6 $^{\text{G}}$ -FT

Reaction mixture		Saccharide produced ( $\mu\text{moles}/\text{reaction mixture}$ )	
[ $^{14}\text{C}$ ] 1-Kestose (M) <sup>a</sup>	[ $^3\text{H}$ ] Sucrose (M) <sup>a</sup>	Neokestose <sup>b</sup>	1 $^{\text{F}}$ , 6 $^{\text{G}}$ -Di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose <sup>c</sup>
0.1	0	—	10.00
0.1	0.010	1.24	9.05
0.1	0.025	2.50	8.41
0.1	0.050	3.89	8.27
0.1	0.1	3.90	5.21
0.1	0.2	4.01	2.25
0.1	0.4	5.45	1.88
0.1	0.5	5.53	1.97

Details of the experiments are given in the text.

- a. Concentration in the reaction mixture.  
 b. Calculated from [ $^3\text{H}$ ]-radioactivity incorporated.  
 c. Calculated from [ $^{14}\text{C}$ ]-radioactivity incorporated.

Table 23. 1-Kestose Synthesis by Fructosyl Transfer from Neokestose to Sucrose with Asparagus 6 $^{\text{G}}$ -FT

Reaction between	Fructose transferred ( $\mu\text{mol}/\text{ml}$ reaction mixture)		
	Incubation time (hr)		
	3	5	10
A. Neokestose and [ $^{14}\text{C}$ ] sucrose	0.61	1.26	2.47
B. 1-Kestose and [ $^{14}\text{C}$ ] sucrose	1.15	2.13	4.10

Details of the experiments are described in the text.

を分離した。分離した画分を活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィーし、混液 (A) からは 1-kestose, 混液 (B) からは neokestose を単離し、放射能を測定して、その放射能から両糖の生成量を計算した。

Table 23 に示す実験の結果からわかるように、問題の逆反応は生起可能で neokestose と  $[U-^{14}C]$  シュークロースから放射性 1-kestose が生成することが確かめられ、またこの逆反応 (A) の速度は正反応 (B) のその約 1/2 であることも確かめられた。

ii) 1-Kestose から  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n\text{-sucrose}$  あるいはイヌリンへの転移

$6^G\text{-FT}$  の 1-kestose からの  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n\text{ sucrose}$  [ $n=2$  (nystose), 3, 4 あるいは 5] あるいはイヌリンへのフラクトシル転移について調べた。

酵素 (20  $\mu\ell$ ), McIlvaine 緩衝液, pH 5.5, (10  $\mu\ell$ ) 中 0.2 M  $[U-^{14}C]$  1-kestose (0.1  $\mu\text{Ci}$ ), および同一緩衝液中の受容体の一つ (0.4 M  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n\text{-sucrose}$  ( $n=2, 3, 4$  あるいは 5) あるいは 5% イヌリン) (10  $\mu\ell$ ) からなる混液を 30°C で 3 時間インキュベートした。反応を止めるため 0.1 M 昇汞 (10  $\mu\ell$ ) を添加の後、混液をキャリア糖とともに PC [溶媒 (II)] にかける 3 重展開した。単〜八糖およびより高次のオリゴ糖に相当するゾーンを水抽出し、減圧下で蒸発乾固した。得られた残渣を各々水 (2 ml) にとかしその放射能を測定した。転移したフラクトース量はインキュベートした受容体の重合度より 1 フラクトース単位だけ高い重合度をもつ生成糖の放射能から計算した。

Table 24 に示した実験結果からわかるように、1-kestose からのこれらの供試オリゴ糖へのフラクトシル転移は重合度の低い糖程より多く生じ、高重合度のイヌリンはこの転移の受容体としては働かなかった。

次に、この転移がどの位置に起るかを決定するために、 $[U-^{14}C]$  1-kestose と nystose 間の反応で生ずる五糖類画分について異性体分析をすることにより調べた。即ち、前の実験で得た五糖画分にキャリア糖 [ $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3\text{ sucrose}$ ,  $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3\text{-sucrose}$ ,  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  と  $1^F\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2\text{ sucrose}$ , 各々 1 mg] を加え、活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィーに供し、 $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3\text{ sucrose}$  と  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  を単離して各々に取込まれた放射能を測定した。

その結果、放射能取込みは前者の糖へは 42 cpm, 後者の糖へは 804 cpm であり、このことは 1-kestose から nystose へのフラクトシル転移は nystose のグルコース部 C-6(OH) 位に圧倒的に生じ末端フラクトシル基には全く無視できうる程度にしか起らないことを示した。また、このことは 1-kestose からの  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_{3-5}\text{ sucrose}$  へのフラクトシル転移においても同一様式の反応が起ることを示唆しているようである。

3) Neokestose およびその誘導体糖におけるフラクトシル基の“自己転移”

前に述べた実験により  $6^G\text{-FT}$  が 1-kestose 相互間の“自己転移”反応に対する逆反応、即ち  $1^F$ ,  $6^G\text{-di-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  から sucrose へのフラクトシル転移による 1-kestose の生成反応、および 1-kestose と シュークロース間のフラクトシル転移反応に対する逆反応、即ち neokestose からの シュークロースへのフラクトシル転移による 1-kestose と sucrose の生成反応、を触媒できることは、既に明らかにしてある。これを言

Table 24. Fructosyl Transfer from 1-Kestose to Several  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n\text{ sucrose}$  by Asparagus  $6^G\text{-FT}$

Donor	Acceptor (Unlabeled)	Fructose transferred ( $\mu\text{moles/ml}$ reaction mixture)
$[U-^{14}C]$ 1-Kestose	None (Control)	5.00
”	Nystose	1.42
”	$1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_3\text{ sucrose}$	0.87
”	$1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_4\text{ sucrose}$	0.69
”	$1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_5\text{ sucrose}$	0.48
”	Inulin	Nil

Details of the experiments are given in the text.

い換えると  $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose あるいは neokestose 分子のグルコース部 C-6 位に結合した一つのフラクトシル基をシュクロースに転移する能力をこの酵素が持っていることを意味している。そこで、糖分子のシュクロース部のグルコース C-6 位に既にフラクトース基が結合している糖を基質として用いた場合、この酵素がどのような転移作用を示すか興味ある問題である。

実験では、まず C-6 結合フラクトース基 1 個の糖である neokestose を用いて“自己転移”によるフラクトシル転移を調べた。

酵素 (3.7 U/ml, 20  $\mu$ l) と McIlvaine 緩衝液, pH 5.5 (20  $\mu$ l) 中, 0.2 M [ $U-^{14}C$ ] neokestose (0.04  $\mu$ Ci) とからなる混液を少量のトルエンの存在下で 30°C でインキュベートした。反応は 0.1 M 昇汞 (10  $\mu$ l) を加えて止め、反応液にキャリア糖 [シュクロース, nystose,  $6^G$  (1- $\beta$ -fructofuranosyl) $_2$  sucrose および  $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose, 各 1 mg] を加え、溶媒 (I) を用いる PC により二, 三, 四および高次糖を分離した。糖画分の各々を減圧下で濃縮し、得られた残渣を 2 ml の水に溶かし各々について放射能を測定した。次いで分離した四糖画分からは,  $6^G$  (1- $\beta$ -fructofuranosyl) $_2$  sucrose と  $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose を活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィーにより単離し、それらの放射能を測定し、その放射能値から両糖の生成量を計算した。

実験の結果 (Fig. 37) は neokestose の“自己転移”

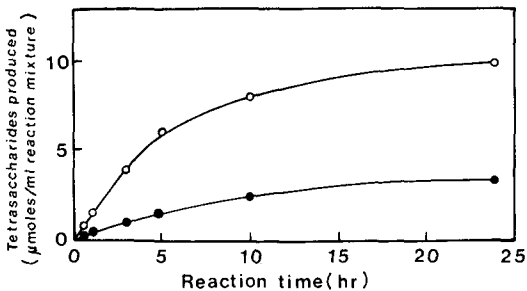


Fig. 37. Tetrasaccharide Synthesis by *Asparagus*  $6^G$ -FT Catalyzed “Self-transfer” of Fructosyl Residue between Neokestose Molecules.

Details of the experiments are described in the text.

- :  $1^F$ ,  $6^G$ -Di- $\beta$ -fructofuranosylsucrose.
- :  $6^G$  (1- $\beta$ -Fructofuranosyl) $_2$  sucrose.

で2種の四糖,  $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose と  $6^G$  (1- $\beta$ -fructofuranosyl) $_2$  sucrose, が反応の初期で約 5:1, 後期で約 3:1 の生成比で生成することを示し, また別に行った PC および TLC 検索で同時に生成する二糖はシュクロースであることが確かめられた。シュクロースのみが生成し  $6$ - $\beta$ -fructofuranosyl glucose が生成しなかったことと  $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -fructofuranosylsucrose が  $6^G$  (1- $\beta$ -fructofuranosyl) $_2$  sucrose よりも 3~5 倍多く生じたことは, neokestose のグルコース部 C-6 結合フラクトシル基が脱離し, それが別の neokestose 分子のシュクロース部フラクトシル基に転移しやすいことを示唆した。

同様の“自己転移”実験をグルコース C-6 位に唯一つのフラクトシル基を持つ四糖  $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose (無標識糖) を用いて 24 時間反応で行い, 反応生成物を TLC 分析したところ, 五糖 [ $1^F$  (1- $\beta$ -fructofuranosyl)- $6^G$ - $\beta$ -fructofuranosyl sucrose あるいは  $1^F$ - $\beta$ -fructofuranosyl- $6^G$  (1- $\beta$ -fructofuranosyl) $_2$  sucrose と推定] と 1-kestose の生成が認められた。しかし, 2 個のフラクトシル基が結合している四糖である  $6^G$  (1- $\beta$ -fructofuranosyl) $_2$  sucrose (無標識糖) を用いた場合には生成物は全く認められなかった。これらの結果は, グルコース部 C-6 位に 1 個だけ結合したフラクトシル基は脱離して転移しやすいが, 2 個以上結合の場合はその 2 個あるいはその末端の 1 個とも転移しにくいまたは転移しないものと考えられる。

### 3. 考 察

この酵素の精製過程において最も効果的であった操作はリン酸カルシウム・ゲル処理による  $\beta$ -fructofuranosidase 活性の除去, octyl-Sepharose・カラムクロマトグラフィーによる  $1^F$ -fructosyltransferase ( $1^F$ -FT) 活性の除去, および raffinose-coupled Sepharose 6B・カラムクロマトグラフィーによる SST 活性の除去であった。これらにより  $\beta$ -fructofuranosidase および他の fructosyltransferase を全く含まない  $6^G$ -FT を単離することができた。

(1) この酵素は  $1^F$  (1- $\beta$ -fructofuranosyl) $_n$  sucrose 系列オリゴ糖それぞれの“自己転移”反応において次の反応を触媒した。

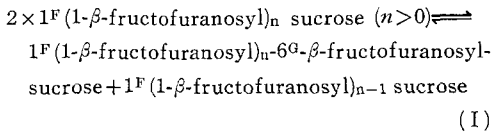
1-Kestose の場合は, nystose を生ぜず,  $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose を生じ同時にシュクロースを遊離した。この反応は極めて良く進行し, 逆反応も低速度ではあったが進行した。



Nystose の場合は、 $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose を生ぜず、 $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  を生じ、同時に 1-kestose を放出した。

また  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose の場合は  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$ 、 $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_4$  sucrose の場合は  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_4\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  をそれぞれ少量生じた。

これらのことはこの酵素が反応 (I) を触媒し、基質のフラクトシル基数が小である程良く触媒することを示した。

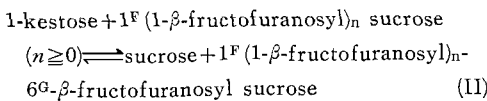


(2) 1-Kestose からのシュクロースあるいは  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列オリゴ糖へのフラクトシル転移においては次の反応を触媒した。

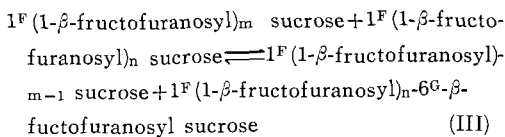
1-Kestose からシュクロースへの場合には neokestose が圧倒的に多く、少量の  $1^F, 6^G\text{-di-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  もまた生じた。この反応の逆反応も低い速度で可能であった。

同様に nystose への転移では、生成糖はほとんどが  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  であった。より高次のオリゴ糖の場合にはフラクトシル基数が大になる程小さい反応性を以て同様の転移が起きたが、イヌリンの場合は転移は起らなかった。

これらのことはこの酵素が反応 (II) を触媒することを示した。



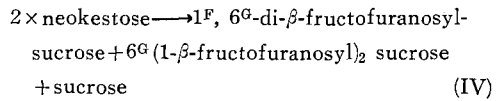
以上のことをとりまとめ、この酵素が触媒する反応を一般式 (III) で記すと次のようになる。



(3) また、この酵素は neokestose [ $6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$ ] およびその同族オリゴ糖それぞれの“自己転移”において次の反応を触媒した。

Neokestose の場合は、 $6\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl glucose}$  を遊離せずシュクロースのみを遊離して、 $1^F, 6^G\text{-di-}\beta\text{-}$

$\text{fructofuranosyl sucrose}$  と  $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2\text{-sucrose}$  を生成比 3~5:1 で生じ、反応 (IV) が触媒されることを示した。



またさらに、 $1^F, 6^G\text{-di-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  の場合は 1-kestose を遊離して  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  と  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2 \text{ sucrose}$  を生じた。しかし  $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2 \text{ sucrose}$  の場合は何らの生成物をも得られなかった。

現在までに比較的よく研究された高等植物の fructosyltransferases は受容体の末端フラクトース部 C-1 (OH) 位へのフラクトシル転移を触媒するものであり、それらは前章で述べた SST あるいは  $\beta(2 \rightarrow 1')$  fructan:  $\beta(2 \rightarrow 1')$  fructan 1-fructosyltransferase (FFT)<sup>49)</sup> のいずれかに属するものである。しかし、主作用として  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列オリゴ糖のグルコース部 C-6 (OH) 位へのフラクトシル転移を触媒する酵素が高度精製された例は今まで報告されていない。このことと関連し、SCOTT<sup>90)</sup> と EDELMAN<sup>49)</sup> らがタマネギ鱗茎から調製した SST, FFT および hydrolase 活性を含む一酵素標品がその FFT 作用により 1-kestose からシュクロースのグルコース C-6 位へフラクトシル転移して neokestose を生成すると言う推定、および SATYANARAYANA<sup>84)</sup> が *Agave vera cruz* から精製した transfructosylase 活性を示す酵素画分 (画分 II, hydrolase 活性がなく三つの酵素活性を含む) が nystose の“自己転移”を触媒して分子中に 1-kestose と neokestose 構造を含む五糖を生じたという報告があるに過ぎない。

これらのことから以上のように今回高度精製・単離することができた酵素は特異な活性を有する新しいトランスフェラーゼであることがわかったので、この酵素の系統名を  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m \text{ sucrose} : 1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n \text{ sucrose } 6^G\text{-fructosyltransferase}$  ( $m > 0, n \geq 0$ )、常用名を  $6^G\text{-fructosyltransferase}$  ( $6^G\text{-FT}$ ) とすることを提案したい。

#### 4. 要 約

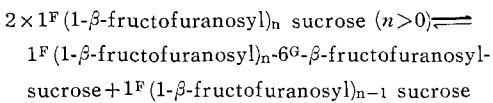
アスパラガス根抽出液から硫酸分画、リン酸カルシウム・ゲル処理、次いで octyl-Sepharose, DEAE-セルロース, Sephadex G-200 および raffinose-coupled

Sephrose 6 B を用いる連続カラムクロマトグラフィーにより暫定的に 6<sup>G</sup>-fructosyltransferase (6<sup>G</sup>-FT) と名付けた酵素を比活性で硫酸安全飽和画分に対して 760 倍に高度精製した。精製酵素はディスク電気泳動的に単一で、β-fructofuranosidase および他の fructosyltransferase 活性を示さず、推定分子量 (Sephadex G-200 ゲル濾過法) 約 69,000 を有していた。

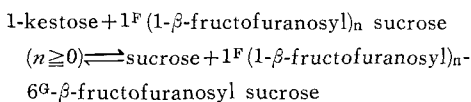
この酵素は 1-kestose を基質として用いる反応で最適 pH 約 5.5 を示し、pH 5.0~6.0 で安定、20~37°C 加熱で安定、60°C 加熱で失活、*p*-chloromercuribenzoate, Hg<sup>2+</sup> および Ag<sup>+</sup> により活性阻害を受ける等の性質を示した。

また、このトランスフェラーゼは次のような基質特異性を示した。

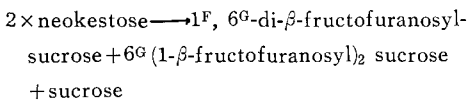
1) 1<sup>F</sup>(1-β-Fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 系列オリゴ糖のそれぞれの酵素触媒“自己転移”においてシュクロース部グルコース C-6(OH) 位へのフラクトシル転移を触媒し、基質より 1 フラクトシル単位だけ重合度の高い糖を生成した。この時結合フラクトシル基数が小さい程反応性は大であった。



2) 1-Kestose からのシュクロース、あるいは 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 系列オリゴ糖 G-6 位へのフラクトシル転移を触媒し、受容体糖より 1 フラクトシル単位だけ高い糖を生成した。



3) Neokestose の酵素触媒“自己転移”をも触媒した。



このような従来未報告の特異性をもつ新しい酵素が加水分解酵素および他のトランスフェラーゼを含まぬ状態にまで高度精製されたことから、このトランスフェラーゼに対して系統名 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>m</sub> sucrose: 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 6<sup>G</sup>-fructosyltransferase (*m* > 0, *n* ≥ 0), 常用名 6<sup>G</sup>-fructosyltransferase (6<sup>G</sup>-FT) の名称を与えることを提案した。

## 第6章 アスパラガス根の 1<sup>F</sup>-Fructosyltransferase の精製と性質

この章では3種のアスパラガス・トランスフェラーゼのうち最後の一つ、1<sup>F</sup>-fructosyltransferase (1<sup>F</sup>-FT), の精製と性質について行った実験とその結果について述べる<sup>97)</sup>。

### 1. 材料と方法

材料: アスパラガスの根は1977年9月に北海道大学農学部附属農場で採集した。これを凍結保存しておき使用した。

放射性糖の [U-<sup>14</sup>C] シュクロースと [6, 6'-<sup>3</sup>H] シュクロースは the Radio Chemical Centre, Amer-sham, から購入した。[U-<sup>14</sup>C] 1-kestose と [U-<sup>14</sup>C] nystose はアスパラガスの fructosyltransferase 標品を用いて [U-<sup>14</sup>C] シュクロースから調製<sup>105)</sup> し, [<sup>3</sup>H] 1-kestose は同一の方法により [6, 6'-<sup>3</sup>H] シュクロースから調製した。

無標識 1-kestose, nystose, neokestose, 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose (*n*=2 および 3) と 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose (*m*=1, *n*=1; *m*=1, *n*=2; *m*=2, *n*=1) はアスパラガス根から得た。また 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose (*n*=3, 4 および 5) はキクイモの塊茎から調製した<sup>99,103~105)</sup>。

糖と蛋白の定量: 前章と同様の方法で定量した。

ペーパーおよび薄層クロマトグラフィー (PC および TLC): 前章と同様の方法によって行った。

活性炭—セライトカラムクロマトグラフィー: 前章と同様の方法によって行った。

酵素活性の測定: 1<sup>F</sup>-Fructosyltransferase (1<sup>F</sup>-FT) の1単位は下述の条件下で1時間に 1-kestose からもう一方の 1-kestose にフラクトシル基を転移して 1 μモルの nystose を生ずる酵素量として定義した。

McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, (20 μℓ) 中 0.4 M [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose (0.045 μCi) と酵素 (20 μℓ) からなる混液を 30°C 1時間インキュベートした。酵素反応を 0.1 M 昇汞 (10 μℓ) の添加により止めた後, キャリア糖 (フラクトース, グルコース, シュクロースおよび nystose) の各々 100 μg を添加し, PC [溶媒 (I)] して単, 二, 三, 四 およびさらに高次のオリゴ糖に分離した。分離した各糖は水抽出し, 減圧下で蒸発乾固した。得られた残渣は水 (1 ml) に溶かし, その一部 (0.5 ml) について先に記し

た方法と同様<sup>105)</sup>にして Aloka Liquid Scintillation Spectrometer, Model LSC 502 と LSC 651, によって放射能を測定した。1<sup>F</sup>-FT の活性は nystose の放射能と回収された全放射能とから計算した。

ディスク電気泳動： ORNSTAIN-DAVIS の方法<sup>36,74)</sup>により, 7.5% polyacrylamide ゲル (pH 8.0) を用い, 室温, 1.5~2 mA/tube で2時間行った。ゲル上の蛋白バンドは Amido Schwarz 10 B で染色した。

分子量の測定： 前章の方法と同様にして行った。

Raffinose-coupled Sepharose 6 B の調製： 前章の方法と同様の方法で, シュクロースの代りに raffinose を epoxy-activated Sepharose 6 B にカップリングさせることにより調製した。

## 2. 結 果

### (1) 酵素の精製

#### 1) 硫酸分画

予め水洗し細切したアスパラガス根 (200 g ずつ: 全量 25 kg) を 0.05 M の冷却したリン酸緩衝液, pH 6.5, (1 ℓ) 中でホモジナイズした。ホモジネートは布で濾過し, 遠心分離 (10,000 × g, 15 分, この条件は以後の実験にも用いた) した後, 上澄液は固形硫酸で全飽和とし, 冷室内で一晩放置した。生じた沈澱は遠心分離によって集めた。このようにして得られた沈澱を 0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.5, に溶かし, 次いで同一緩衝液に対し 5 日間透析した。透析内液を遠心分離して上澄液を得た [“(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0~1 飽和” 画分, 6.42 ℓ]。

この画分は固形硫酸で 0.3 飽和になるように処理し, 冷室内で一晩放置し, 遠心分離の後, 上澄に固形硫酸を加え 0.8 飽和とした。生ずる沈澱は 0.01 M リン酸緩衝液に溶かし, 同一緩衝液で 4 日間透析し, 透析内液を遠心分離して上澄液を得た [“(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3~0.8 飽和” 画分, 2.77 ℓ]。

#### 2) リン酸カルシウム・ゲル処理

上述の画分 (2.77 ℓ) にリン酸カルシウム・ゲルを懸濁させ (ゲル 7 g/蛋白 1 g), 冷室に 30 分放置した後, 遠心分離して上澄液を得た [“リン酸カルシウム・ゲル” 画分, 3.09 ℓ]。殆んど全ての加水分解活性はこのゲル処理により除くことができた。

#### 3) DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィー

##### (第1回)

上述の画分 (3.09 ℓ) は Amicon 限外濾過器 (Diaflo PM-30 filter) を用いて 500 ml に濃縮し, 0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.5, に対して一夜透析後, 透析内液は同

一緩衝液で予め平衡化させた DEAE-セルロースカラム (4.8 × 23 cm) を用いてクロマトグラフィーを行った。溶出は 0.01 M (3 ℓ), 0.02 M (1.5 ℓ) および 0.07 M リン酸緩衝液 (3 ℓ) で連続的に行い, 0.07 M 緩衝液での溶出液を濃縮後, 0.01 M リン酸緩衝液で一晩透析し, 透析内液を得た [“DEAE-セルロース, 1st” 画分, 350 ml]。

#### 4) Octyl-Sepharose・カラムクロマトグラフィー

上述の画分 (350 ml) を固形硫酸で 35% 飽和にし一夜放置し, 生ずる沈澱を遠心分離で除いた後, 上澄液を octyl-Sepharose CL-4B・カラム (2.6 × 20 cm) にかけて, 各々硫酸で 35, 30, 20, 10 および 0% 飽和した 0.01 M リン酸緩衝液 (500 ml ずつ) を用い連続的に溶出した。1<sup>F</sup>-FT 活性は硫酸を含まない 0.01 M 緩衝液にのみ溶出され, SST と 6<sup>G</sup>-FT 活性はこのクロマトグラフィー操作により完全に除くことができた。

1<sup>F</sup>-FT 活性画分は濃縮 (Amicon, PM-30 filter) 後, 0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.5, に対し2日間透析して透析内液を得た [“octyl-Sepharose”, 画分, 57 ml]。

#### 5) DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィー (第2回)

上述の画分 (57 ml) を 20 ml に濃縮し, DEAE-セルロース・カラム (2 × 19 cm) でクロマトグラフィーにかけた。溶出は 0.01 M, 0.02 M リン酸緩衝液 (各々 500 ml), 次いで 0.02~0.07 M (linear gradient) リン酸緩衝液 (500 ml) で行った (Fig. 38)。活性画分 No. 47~73 を合せて濃縮 (Amicon, PM-10 filter) し, 0.01 M 酢酸緩衝液, pH 5.6, に対して一夜透析した [“DEAE-セルロース, 2nd” 画分, 30 ml]。

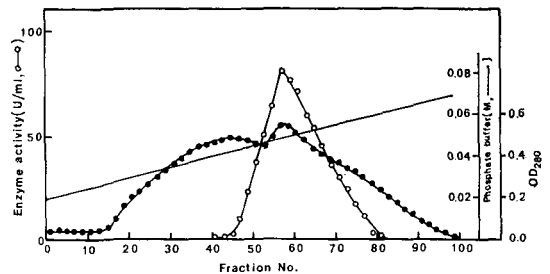


Fig. 38. DEAE-cellulose Column Chromatography, 2nd., of Asparagus 1<sup>F</sup>-Fructosyltransferases (1<sup>F</sup>-FT).

Elution was conducted with a linear gradient of 0.02 M→0.07 M phosphate buffer. Five-ml fractions were collected.

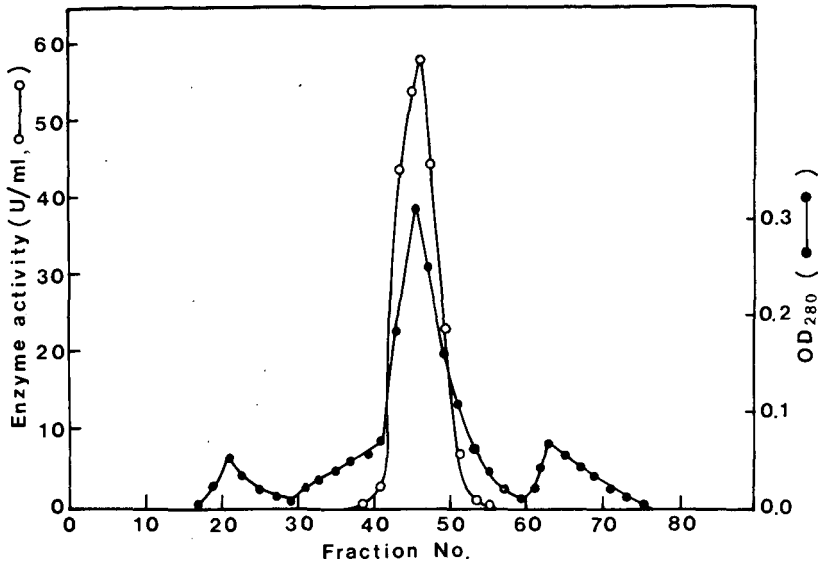


Fig. 39. Sephadex G-200 Column Chromatography, 1st., of Asparagus 1F-FT. Elution was conducted with 0.01 M phosphate buffer containing 0.25 M NaCl. Fractions of 7.5 ml were collected.

#### 6) Raffinose-coupled Sepharose 6 B・カラム クロマトグラフィー

上述の酵素画分 (30 ml) をさらに濃縮 (Amicon, PM-10 filter) し, 0.01 M 酢酸緩衝液, pH 5.6, で平衡化した raffinose-coupled Sepharose 6 B・カラム (1×10 cm) を用いクロマトグラフィーした。上と同一の緩衝液 (100 ml) を流した後, 0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.0 (100 ml) で 1F-FT を溶出した ["Sepharose 6 B" 画分, 100 ml]。

#### 7) Sephadex G-200・カラムクロマトグラフィー

"Sepharose 6 B" 画分 (100 ml) は 3 ml に濃縮 (Amicon, PM-10 filter) し, 0.25 M NaCl を含む 0.01 M リン酸緩衝液, pH 6.5, で透析した後, 透析内液を Sephadex G-200・カラム (2.64×98 cm) クロマトグラフィーにかけ同一緩衝液を用いて溶出し, 画分 No. 41~51 を集めた (Fig. 39) ["Sephadex G-200, 1st" 画分, 92 ml]。

この 1F-FT 活性画分 (92 ml) は 3 ml に濃縮 (Amicon, PM-10 filter) し, 上述と同様の方法により再クロマトグラフィーして (Fig. 40), 画分 No. 43~59 を合せ, 0.05 M リン酸緩衝液, pH 6.5, に対して透析し, その内液を精製 1F-FT 標品とした ["Sephadex G-200, 2nd" 画分, 12 ml]。

酵素の精製過程は Table 25 に示した。精製酵素は硫

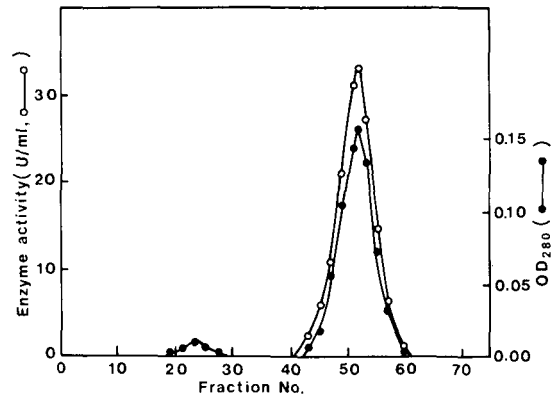


Fig. 40. Sephadex G-200 Column Chromatography, 2nd., of Asparagus 1F-FT.

Elution was conducted with 0.01 M phosphate buffer containing 0.25 M NaCl. Fractions of 6.6 ml were collected.

安全飽和沈澱画分に対し比活性で 298 倍 (約 185 U/mg 蛋白) に 1.7% の活性収量で精製することができた。また, この精製酵素はシュークロース, 1-kestose, neokestose および 1F(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose (n=2, 3, 4 および 5) を加水分解しなかったことから β-fructofuranosidase を含まず, シュークロース分子間でのフラクトシル基の "自己転移" を触媒しなかったことから SST を含まず, また neokestose と 1F, 6<sup>α</sup>-di-β-fructo-

Table 25. Purification Process of Asparagus 1<sup>F</sup>-FT

Step	Activity (U)	Protein (mg)	Volume (ml)	Specific activity (U/mg protein)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0~1 satn.	93188	149226	6420	0.62
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.3~0.8 satn.	54760	60940	2770	0.90
Calcium phosphate gel	38970	17216	3090	2.26
DEAE-cellulose, 1st.	20507	2499	350	8.21
Octyl-Sepharose	12998	182.40	57	71.3
DEAE-cellulose, 2nd.	6735	68.19	30	98.8
Sepharose 6 B	4145	28.03	100	147.9
Sephadex G-200, 1st.	2789	17.09	92	163.2
Sephadex G-200, 2nd	1590	8.60	12	184.9

furanosyl sucrose を 1-kestose から合成しなかったことから 6<sup>G</sup>-FT を夾雑していないことが確かめられ、このことは酵素が高度に精製されたことを示唆した。

## (2) 酵素の一般的性質

### 1) ディスク電気泳動

精製 1<sup>F</sup>-FT 標品 (蛋白として約 80 μg) について同一条件下の 2 本の polyacrylamide ゲルでそれぞれ電気泳動を行った。ゲルの 1 本は Amido Schwarz 10 B で染色し (Fig. 41), もう 1 本のゲルは 2 mm 厚のディスクに細切し各々の切片を McIlvaine 緩衝液, pH 5.0 (0.2 ml) でホモジナイズした。このホモジネートに 0.2 M 1-kestose (0.2 ml) を混和し, 30°C で 15 時間インキュベートした後, 混液について TLC により nystose の生成を調べた。ゲル上には唯一本のバンドのみが存在することからこの酵素標品は均一であることが証明され, またこのバンドのみに 1<sup>F</sup>-FT 活性が存在することも確かめられた。

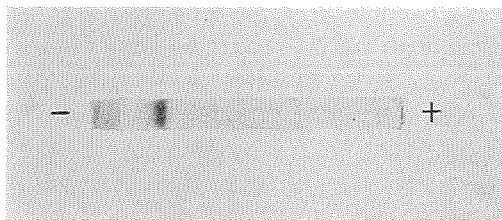


Fig. 41. Disc Electrophoresis of Asparagus 1<sup>F</sup>-FT.

Electrophoresis was performed on 7.5% polyacrylamide gel, pH 8.0, for 2 hr at room temperature and at 2 mA/tube. The gel was stained with 1% Amido Schwarz 10 B in 7% acetic acid.

### 2) 分子量

この酵素の分子量は Sephadex G-200 ゲル濾過によって marker protein の分子量と比較することにより約 64,000 と推定された (Fig. 42)。

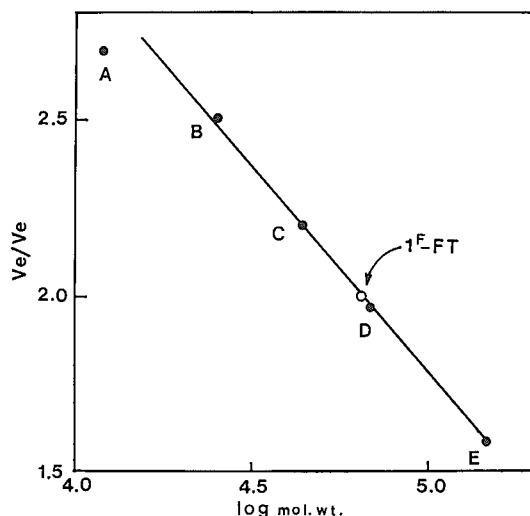


Fig. 42. Estimation of Molecular Weight of Asparagus 1<sup>F</sup>-FT by Gel-filtration.

Gel-filtration was carried out by ascending method on a Sephadex G-200 column (2.64 × 98 cm) equilibrated with 0.01 M phosphate buffer containing 0.25 M NaCl, pH 6.5, by elution with the same buffer at a flow rate of 6 ml/hr.

Ve, elution volume; Vo, void volume.

Marker proteins (Boehringer Mannheim GmbH); A, cytochrome c, mol. wt. 12,400; B, chymotrypsinogen A, 25,000; C, hen-egg albumin, 45,000; D, bovine serum albumin, 67,000; E, aldolase, 147,000.

## 3) 至適 pH

Fig. 43 に示すように、この酵素の至適 pH は 1-kestose を基質とした時、約 5.0 であった。

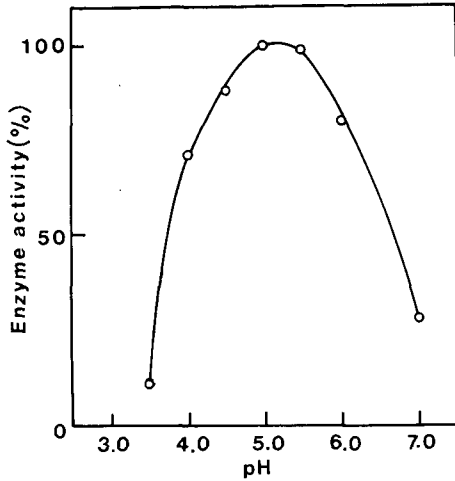


Fig. 43. Effects of pH's on Activity of Asparagus 1F-FT.

Enzyme was used in an amount of 12 U/ml.

## 4) pH-安定性

pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 あるいは 7.0 の酵素溶液を 45°C で 20 分間プレインキュベートし、0°C に冷却し、pH 5.0 に調整後、残存酵素活性を測定した。Fig. 44 に

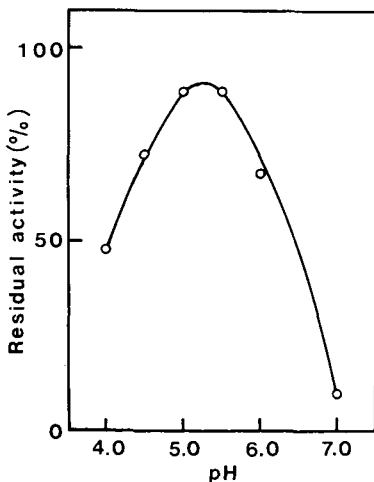


Fig. 44. Effects of pH's on Stability of Asparagus 1F-FT.

Enzyme was used in an amount of 15.8 U/ml. Details of the Experiments are described in the text.

示すように残存活性は次のようである：pH 5.0 と 5.5 では約 90%，pH 4.5 と 6.0 では約 70%，pH 4.0 では約 50%，そして pH 7.0 では約 10% であった。

## 5) 熱安定性

酵素溶液を 20°, 30°, 40°, 45°, 50° あるいは 60°C に 10 分間加熱した後、その残存 1F-FT 活性を測定した (Fig. 45)。この酵素は 30~45°C の加熱では安定であるが 60°C では失活した。

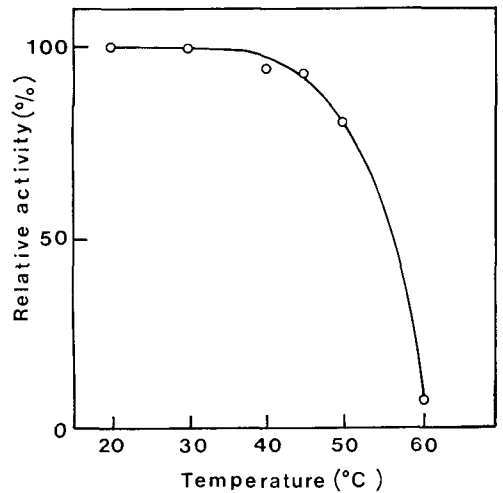


Fig. 45. Effects of Temperatures on Asparagus 1F-FT.

Enzyme was used in an amount of 17.8 U/ml.

Details of the experiments are described in the text.

## 6) 阻害剤の効果

この酵素に対するいくつかの試薬の影響について調べた。酵素 (20  $\mu$ l) と McIlvaine 緩衝液、pH 5.0, 中 0.4 M [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose (10  $\mu$ l) からなる混液を水あるいは試薬溶液 (10  $\mu$ l) の存在下で 30°C で 1 時間インキュベーションした。反応は 0.1 M 昇汞 (10  $\mu$ l) の添加によって止めた後、混液について PC [溶媒 (I)] を行い単~五糖および高次糖に分離し、オリゴ糖画分の各々についてそれらの放射能を測定した。酵素の残存活性は四糖画分中の放射能から計算した。

Table 26 に示すように、昇汞 ( $1.0 \times 10^{-4}$  M)、p-chloromercuribenzoate ( $1.2 \times 10^{-4}$  M)、硝酸銀 ( $1 \times 10^{-3}$  M) および硫酸銅 ( $1.0 \times 10^{-3}$  M) は各々約 95, 88, 24 および 13% 阻害した。一方硫酸亜鉛および硫酸マンガン (各々  $1.0 \times 10^{-3}$  M) は酵素活性を各々約 19 および 26% 促進した。

**Table 26.** Effects of Inhibitors on Asparagus 1<sup>F</sup>-FT

Inhibitor	Concentration	Relative activity
HgCl <sub>2</sub>	1.0×10 <sup>-4</sup> M	5.3
p-CMB	1.2×10 <sup>-4</sup> M	12.3
AgNO <sub>3</sub>	1.0×10 <sup>-3</sup> M	75.9
CuSO <sub>4</sub>	"	86.8
MgCl <sub>2</sub>	"	101.2
LiSO <sub>4</sub>	"	101.5
BaCl <sub>2</sub>	"	103.0
ZnSO <sub>4</sub>	"	119.2
MnSO <sub>4</sub>	"	125.9
Control	"	100.0

Details of the experiments are described in the text.

### (3) 基質特異性

#### 1) フラクトシルの“自己転移”

まず、精製 1<sup>F</sup>-FT による同一種の糖の間のフラクトシル転移、即ち“自己転移”をシュクロースおよび6種のフラクト・オリゴ糖について生成物を TLC 検索することによって調べた。

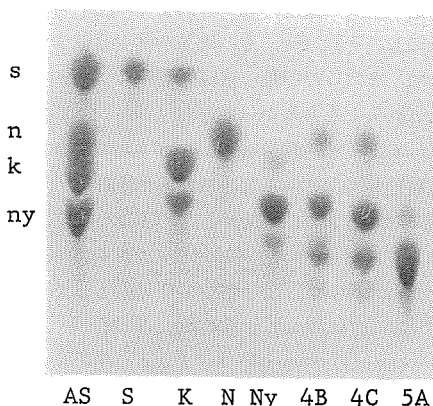
実験は次のようにして行った。酵素 (10 U/ml, 20 μl) と McIlvaine 緩衝液 (pH 5.0, 20 μl) 中の 0.1 M 供試糖の混液を 30°C で 5 時間インキュベーションした後、それぞれの生成物を TLC にかけた (Fig. 46)。

Fig. 46 に示されるように、この酵素はシュクロースと neokestose の場合には“自己転移”を触媒せず、何んの生成物も生じなかった。しかし 1-kestose の場合はシュクロースを遊離して四糖、nystose の場合には 1-kestose を遊離して五糖を生成し、4 b および 4 c 糖の“自己転移”では neokestose を遊離して五糖、5 a 糖は四糖を遊離して六糖を生ずることがわかった。

#### i) 1-Kestose 分子間の転移

次に 1-kestose 分子間の“自己転移”を [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose を用いて次の実験により詳しく調べた。

0.4 M [U-<sup>14</sup>C] 1-kestose (0.045 μCi, 10 μl), McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, (10 μl) と酵素 (20 U/ml, 20 μl) からなる混液を少量のトルエンの存在下で 30°C でインキュベーションした。反応を 0.1 M 昇昇 (10 μl) を加えて止めた後、反応液にキャリア糖としてシュクロース、nystose および 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose を各々 100 μg 加え溶媒 (I) で PC を行い、5 重展開した。



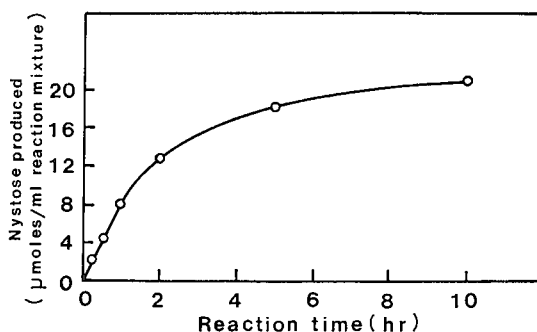
**Fig. 46.** “Self-transfer” of Fructosyl Residue between Individual Oligosaccharides by Asparagus 1<sup>F</sup>-FT.

Incubation: see the text.

Chromatography: Kiesel gel G (Typ 60) layer; triple development with solvent (IV); spray reagent, anisidine phosphate.

Authentic sugars (AS): s, sucrose; n, neokestose; k, 1-kestose; ny, nystose.

Sugars tested: S, sucrose; K, 1-kestose; Ny nystose; 4 B, 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose; 4 C, 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosylsucrose; 5 A, 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose.



**Fig. 47.** Synthesis of Nystose from 1-Kestose by Asparagus 1<sup>F</sup>-FT.

Details of the experiments are described in the text.

二、三、四、五糖および六糖以上の糖をそれぞれ抽出分離し、減圧下で濃縮して残渣を得た。これらを各々水 (1 ml) に溶かし、その 0.5 ml をとり放射能を測定した。Nystose と推定される四糖の生成量は四糖画分にとりこまれた放射能から算出した。

実験の結果は、Fig. 47 に示したように、1-kestose か

らの四糖の生成は反応時間2時間までは反応時間に比例して増加し、それ以後、その増加の程度は減少することを示した。またこの四糖の生成と同時にシュクロースも放出されることもわかった。

次に、生成する四糖が nystose であるか、あるいは他の四糖異性体であるかを確かめるために前の実験と全く同様にして得た5および10時間の反応液から分離した四糖画分について活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィー分析を行った。この時キャリア糖として nystose,  $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$  sucrose および  $1^F, 6^G\text{-di-}\beta\text{-fructofuranosyl}$  sucrose 各々1 mg を用いた。

実験の結果は、放射能が両反応時間ともに nystose のみに存在し、 $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$  sucrose や  $1^F, 6^G\text{-di-}\beta\text{-fructofuranosyl}$  sucrose には存在しないことを示したので、このことは本酵素が 1-kestose 分子間の“自己転移”において四糖として nystose のみを生ずることを確認させた。

#### ii) Nystose 分子間の転移

Nystose からの五糖生成の経時変化を  $[U-^{14}C]$  nystose (0.03  $\mu\text{Ci}$ , 10  $\mu\ell$ ) を用いて上述の方法と同様の方法で実験し、五糖の生成量をこの糖に取込まれた放射能から求めた (Fig. 48)。

なお5および10時間反応からの生成物から分離した五糖画分は、活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィーにかけ、この時キャリア糖として四つの  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose [ $m=0, n=3; m=1, n=2; m=2, n=1; m=3, n=0$ , 各々1 mg] を用いて分析した。

実験の結果は Fig. 48 に示してあるように、nystose 分子間での“自己転移”における 1-kestose の遊離を伴う五糖の生成は反応時間2時間までは直線的であること

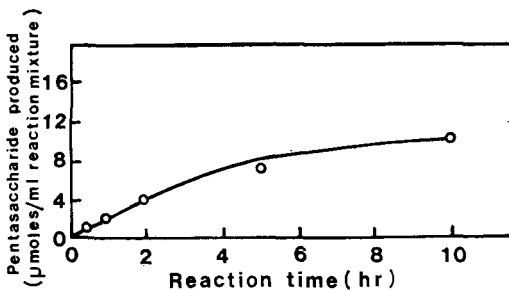


Fig. 48. Synthesis of Pentasaccharide from Nystose by Asparagus 1F-FT.

Details of the experiments are described in the text.

がわかった。また活性炭—セライト・カラムクロマトグラフィーの結果から合成された五糖は  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose であることが確かめられた。

以上の“自己転移”についての実験結果を総括して検討してみると次のようである。

第1に、1-kestose からは nystose, nystose からは  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose (5 a 糖), また 5 a 糖からは  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_4$  sucrose と推定される六糖が生成したことから、 $1^F\text{-FT}$  は  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列糖における  $\beta(2\rightarrow1)$  結合末端フラクトシル基へのフラクトシル基の“自己転移”を触媒できる酵素と結論できる。

第2に、4 b 糖 [ $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$  sucrose] から生じた五糖は 5 d 糖 [ $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$  sucrose] あるいは 5 b 糖 [ $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose] と推定され、4 c 糖 [ $1^F, 6^G\text{-di-}\beta\text{-fructofuranosyl}$  sucrose] から生じた五糖は 5 c 糖 [ $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl}\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$  sucrose] あるいは 5 d 糖と推定される、従ってこの酵素はまた  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列糖 (シュクロースそのものおよび neokestose は除く) においてシュクロース部のフラクトース基あるいはそれに  $\beta(2\rightarrow1)$  結合した末端フラクトシル基およびシュクロース部のグルコース基 C-6 位に結合したフラクトース基あるいはそれに  $\beta(2\rightarrow1)$  結合した末端フラクトシル基へのフラクトシル基の“自己転移”をも触媒できるものと考えられる。

#### 2) 1-Kestose からのシュクロースへのフラクトシル転移

このフラクトシル転移の経時変化を  $[U-^{14}C]$  シュクロースを用いて実験した。

酵素 (20 U/ml, 20  $\mu\ell$ ) および McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, (20  $\mu\ell$ ) 中 0.2 M 1-kestose と 0.2 M  $[U-^{14}C]$  シュクロース (0.1  $\mu\text{Ci}$ ) を含む混液を 20°C でインキュベーションした。反応を 0.1 M 昇昇 (10  $\mu\ell$ ) の添加により止めた後、混液を PC [溶媒 (I)] して、二、三および四糖以上の糖を分離した。分離した糖画分の各々について放射能測定し、三糖画分に取込まれた放射能から  $[^{14}C]$  1-kestose の生成量を算出した。なお生成した三糖が 1-kestose のみであることは反応液の TLC 分析により予め確かめられた。

実験の結果 (Fig. 49) から 1-kestose からの  $[U-^{14}C]$  シュクロースへのフラクトシル転移による  $[^{14}C]$  1-kestose の生成は反応時間5時間までは反応時間に比例



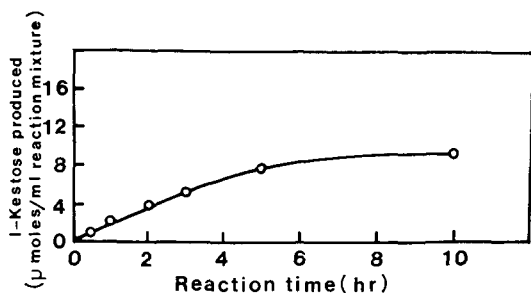


Fig. 49. Fructosyl Transfer from 1-Kestose to Sucrose by Asparagus 1F-FT.

Details of the experiments are described in the text.

して増加するが、それ以降は増加が小となることがわかった。

### 3) 1-Kestose からのフラクト・オリゴ糖あるいはイヌリンへのフラクトシル転移

先ず第1の実験として  $[U-^{14}C]$  1-kestose を用いて 1-kestose からの数種のフラクト・オリゴ糖およびイヌリンへのフラクトシル基の転移について比較した。

酵素 (20  $\mu\ell$ ), McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, (20  $\mu\ell$ ) 中 0.2 M  $[U-^{14}C]$  1-kestose (0.045  $\mu\text{Ci}$ ), および受容体糖の一つ [0.2 M  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose ( $n=2$  または 3), 0.2 M  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose ( $m=0, n=1; m=0, n=2; m=0, n=3; m=1, n=1; m=1, n=2$ ; または  $m=2, n=1$ ), あるいは 5% イヌリン] とからなる混液を 30°C で3時間インキュベートした。(なおコントロール実験

1-kestose の場合は 0.2 M  $[U-^{14}C]$  1-kestose のみを用いて受容体として無標識 1-kestose は用いなかった。) 0.1 M 昇汞 (10  $\mu\ell$ ) 添加によって反応を止めた後、反応混液をキャリア糖と共に5重展開によりPCし、単～六糖の各々およびそれより高次の糖に相当するバンドを水抽出して蒸発乾固したところ残渣を与えた。各残渣を水 (1 m $\ell$ ) に溶かし放射能を測定して、受容体糖よりも1フラクトース単位だけ高次の生成糖の放射能から転移フラクトース量を算出した。また 1-kestose から 1-kestose へのフラクトシル基の“自己転移”の場合の転移量を1.00とした時の各々の場合の比較値を算出した。

実験の結果 (Table 27) からわかるように、neokestose への転移量が最も大で 1-kestose の“自己転移”の場合と同じかあるいはいく分大であった。またその系列糖である 4 b および 5 b 糖では結合フラクトシル基数が多くなるに従い転移は漸減した。 $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列糖では 4 c 糖でかなりの転移がみられ、この場合も 5 c および 5 d 糖にみるように結合フラクトシル基数が増すと転移の減少があった。 $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose の場合は 1-kestose を例外として 4 a および 5 a 糖にみるように転移は極めて小であった。高重合度ポリマーのイヌリンでは転移が認められなかった。

これらのことから  $1^F\text{-FT}$  は 1-kestose からのフラクトシル転移において  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose ( $m \geq 0, n > 0$ ) 系列のオリゴ糖、特に neokestose を受容体としてよく利用するが、 $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列のオリゴ糖の

Table 27. Fructosyl Transfer from 1-Kestose to Several Fructo-oligosaccharides by Asparagus  $1^F\text{-FT}$

Acceptor	Fructose transferred	
	moles/m $\ell$ reaction mixture	ratio
(3 a) $1^F\text{-}\beta\text{-Fructofuranosylsucrose}$ (1-kestose) (control)	7.50	1.00
(4 a) $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_2$ sucrose (nystose)	1.05	0.14
(5 a) $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_3$ sucrose	0.73	0.10
(3 b) $6^G\text{-}\beta\text{-Fructofuranosylsucrose}$ (neokestose)	8.00	1.07
(4 b) $6^G(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_2$ sucrose	4.76	0.63
(5 b) $6^G(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_3$ sucrose	3.49	0.47
(4 c) $1^F, 6^G\text{-Di-}\beta\text{-fructofuranosylsucrose}$	5.26	0.70
(5 c) $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_2\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosylsucrose}$	3.78	0.50
(5 d) $1^F\text{-}\beta\text{-Fructofuranosyl-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$ sucrose	2.85	0.38
Inulin	Nil	—

利用度はかなり劣っていることが示唆された。

第2に、前の実験で効果的な受容体であった三糖の neokestose (3 b 糖), 四糖の 4 b 糖 [ $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$  sucrose] あるいは 4 c 糖 [ $1^F, 6^G\text{-di-}\beta\text{-fructofuranosylsucrose}$ ] を用いて、1-kestose からのフラクトシル転移がこれらの糖の二つの末端フラクトシル基のうちどちらに多く起るかについてより詳しく調べた。

酵素 (20  $\mu\ell$ ), McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, (20  $\mu\ell$ ) 中 0.2 M [ $U\text{-}^{14}C$ ] 1-kestose (0.045  $\mu\text{Ci}$ ) および受容体糖 (neokestose, 4 b あるいは 4 c 糖) のうちの一つを含む混液を 30°C で 3 時間インキュベートした。0.1 M 昇采 (10  $\mu\ell$ ) 添加で酵素活性を止めた後、反応液はキャリア糖を加え PC した。単糖から五糖までの各糖とより高次の糖を水で抽出し、各々を減圧下で乾固した。得られた残渣は 2 ml の水に溶かし、その一部 (0.5 ml) を放射能測定した。また分離した四糖または五糖画分 (1 ml) は、キャリア糖 (4 a, 4 b および 4 c 糖, あるいは 5 a, 5 b, 5 c および 5 d 糖, 各々 1 mg) を加え活性炭—セライトカラム (1.5 $\times$ 54 cm) を用いてクロマトグラフィーし、単離した糖、即ち四糖画分からの 4 a, 4 b および 4 c 糖, 五糖画分からの 5 a, 5 b, 5 c および 5 d 糖についてそれぞれ放射能の測定を行った。生成糖量はそれらの放射能から算出した。

実験の結果は Table 28 に示してある。

i) 先ず受容体として三糖 neokestose を用いた場合についてみると、1-kestose からの neokestose へのフラクトシル基転移によって二つの四糖 4 b 糖および 4 c 糖が生成量比 1.0: 1.2 で生ずることがわかった。このことは neokestose のシュークロース部のフラクトース残基 C-1(OH) 位へのフラクトシル転移の方がシュークロース部のグルコース C-6 位結合のフラクトース残基の C-1(OH) 位への転移よりも幾分起り易い (約 20%) 傾向があることを示している。

またこの転移反応で nystose (4 a 糖) が微量にしか生成しなかったことは、この場合 1-kestose からの neokestose へのフラクトシル転移の方が 1-kestose 分子間の“自己転移”よりも圧倒的に多く起ることを示している。

ii) 受容体として四糖の 4 b 糖を用いた場合をみると (Table 28), 5 b 糖 [ $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose] と 5 d 糖 [ $1^F\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$  sucrose] が生成比 1.0: 2.6 で生成し、また微量の 5 a 糖も生ずることがわかった。5 d 糖が 5 b 糖の約 2.6 倍生ずることは 4 b 糖のシュークロース部のフラクトシル残基 C-1(OH) 位の方がもう一方の末端フラクトシル残基よりも受容基としての作用を受け易いことを示している。

iii) 4 c 糖を受容体とした場合は (Table 28), 5 d 糖

**Table 28.** Fructosyl Transfer from 1-Kestose to Neokestose or Its Related Isomers by Asparagus 1<sup>F</sup>-FT

Details of the experiments are given in the text.

Remarks: 4 a, nystose

4 b,  $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$  sucrose

4 c, 1<sup>F</sup>,  $6^G\text{-di-}\beta\text{-fructofuranosylsucrose}$

5 a, 1<sup>F</sup>(1- $\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose

5 b,  $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose

5 c, 1<sup>F</sup>(1- $\beta\text{-fructofuranosyl})_2\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosylsucrose}$

5 d, 1<sup>F</sup>- $\beta\text{-fructofuranosyl-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$  sucrose

Donor	Acceptor	Saccharide produced ( $\mu\text{moles/ml}$ reaction mixture)			
		4 a	4 b	4 c	
$^{14}C$ 1-Kestose (control)		9.80	Nil	Nil	
	Neokestose	0.31	4.78	5.08	
$^{14}C$ 1-Kestose (control)		1.14	Nil	Nil	Nil
	4 b	0.31	1.87	Nil	4.84
	4 c	0.38	Nil	2.35	4.67

が 5c 糖 [1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>-β-fructofuranosyl sucrose] よりも 2 倍多く生成することがわかった。この場合は 4c 糖のシュクロース部グルコース残基 C-6 位に結合したフラクトシル基への転移がもう一つの末端フラクトシル基のそれよりも生じ易いことを示している。

第 3 の実験として、1<sup>F</sup>-FT が 1-kestose からの nystose へのフラクトシル転移と nystose 分子相互間の“自己転移”によるフラクトシル転移のどちらを優先的に触媒するかを知るため [3H] 1-kestose と [U-<sup>14</sup>C] nystose 両者の存在する反応液をインキュベーションし生成する放射性五糖を調べる実験を行った。

酵素 (5 U/ml, 20 μl), McIlvaine 緩衝液, pH 5.0, (20 μl) 中 0.2 M [3H] 1-kestose と 0.2 あるいは 0.4 M [U-<sup>14</sup>C] nystose (0.03 μCi), とからなる混液を 30°C でインキュベートし, 0.1 M 昇汞 (10 μl) を添加して反応を止めた後, 反応液をキャリア糖と共に PC [溶媒 (I)] した。単糖～五糖の各糖とそれ以上の重合度糖に相当するゾーンを水抽出し, 各々を減圧下で蒸発乾固して残渣を得た。各残渣を水 (1 ml) に溶解し, Aloka Liquid Scintillation Spectrometer, Model LSC 651 を用い放射能を測定した。五糖 [1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-sucrose] の生成量は次の方法により算出した。

1-Kestose から nystose へのフラクトシル転移により生ずる [3H, <sup>14</sup>C]-5a 糖はその <sup>3</sup>H-放射能を測定することにより算出し, nystose の“自己転移”により生成する [U-<sup>14</sup>C]-5a 糖はその <sup>14</sup>C-放射能から計算した糖量から先に算出した [3H, <sup>14</sup>C]-5a 糖量を差し引いて求めた。

実験の結果 (Table 29) からわかるように, 1-kestose から nystose へのフラクトシル転移は 4 時間反応で

nystose 相互間のフラクトシル基の“自己転移”の 6.0 倍, 8 時間反応で 5.5 倍であった。

以上の結果から, この条件下の 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose の生成反応では 1-kestose からの nystose へのフラクトシル転移の方が nystose の“自己転移”よりも優先することが明らかとなった。

### 3. 考 察

酵素の精製過程において, β-fructofuranosidase はリン酸カルシウム・ゲル処理により, また SST および 6<sup>G</sup>-FT 活性は octyl-Sepharose CL-4 B・カラムクロマトグラフィーにより完全に除くことができ, こうして電気泳動的に均一な 1<sup>F</sup>-FT を得ることができた。この精製 1<sup>F</sup>-FT を先に精製した 6<sup>G</sup>-FT とともにディスク電気泳動にかけてみると (Fig. 50), 両者は明らかに異なる酵素蛋白であることが確かめられた。しかし写真に示していないが 1<sup>F</sup>-FT は SST とはほぼ同一の移動距離を示し, 今回の条件下の電気泳動のみでは両者が異種蛋白であるとの証明は得られなかった。しかし次に示すような 1<sup>F</sup>-FT の基質特異性は SST および 6<sup>G</sup>-FT のそれとは全く異なるものであった。

(1) 1<sup>F</sup>-FT は 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 系列のオリゴ糖それぞれにおける次の酵素触媒“自己転移”反応を触媒した。

1-Kestose の場合はシュクロースを放出して四糖 nystose のみを生じ, 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di-β-fructofuranosyl-sucrose や 6<sup>G</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose を生じなかった。Nystose の場合は 1-kestose を放出して五糖 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose のみを生じ, 1<sup>F</sup>-(1-β-fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>-β-fructofuranosyl sucrose を生じなかった。また 1<sup>F</sup>(1-β-fructofuranosyl)<sub>3</sub> suc-

Table 29. Fructosyl Transfer from 1-Kestose to Nystose and between Two Nystose Molecules by Asparagus 1<sup>F</sup>-FT

Reaction mixture	Pentaccharide (μmoles/ml of reaction mixture) synthesized by			
	self-transfer between nystose molecules		transfer from 1-kestose to nystose	
	Reaction time, hr		Reaction time, hr	
	4	8	4	8
(A) 0.1 M [ <sup>3</sup> H] 1-Kestose <sup>a</sup> + 0.1 M [ <sup>14</sup> C] Nystose <sup>a</sup>	0.24	0.54	1.44	2.97
(B) 0.1 M [ <sup>3</sup> H] 1-Kestose <sup>a</sup> + 0.2 M [ <sup>14</sup> C] Nystose <sup>a</sup>	0.48	0.85	1.27	3.05

a Concentration in the reaction mixture.  
Details of the experiments are described in the text.

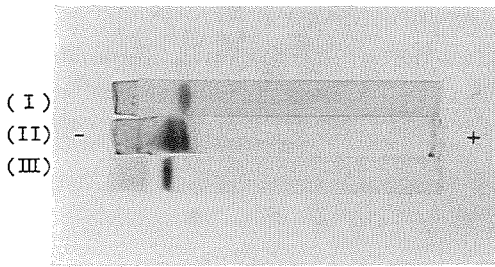


Fig. 50. Disc Electrophoresis of  $1^F$ - and  $6^G$ -FT Obtained from Asparagus Roots.

After the enzyme proteins were electrophoretically run on 7.5% polyacrylamide gel, pH 8.0, at 1.5 mA/tube for 2 hr, respectively, the gel was stained with 1% Amido Schwarz 10 B in 7% acetic acid.

(I)  $1^F$ -FT, (II)  $1^F$ -FT+ $6^G$ FT and (III)  $6^G$ -FT.

ose の場合 nystose はと推定される四糖を放出して  $1^F$ - $(1-\beta$ -fructofuranosyl) $_4$  sucrose と推定される六糖を生じた。

これらのことはこの酵素が供与体の  $\beta$ (2 $\rightarrow$ 1) 結合末端フラクトシル基が受容体糖の末端フラクトシル基 C-1 (OH) 位に転移し 1 フラクトース単位だけ高い重合度糖を生ずることを示している。しかし“自己転移”はシュークロースの場合には起きなかった。このことから上記糖における  $n$  は  $n > 1$  でなければならない。

(2) この酵素は  $6^G$ ( $1-\beta$ -fructofuranosyl) $_2$  sucrose, あるいは  $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose に作用していずれも neokestose を遊離して五糖を生じた。このことはこの酵素が  $1^F$ ( $1-\beta$ -fructofuranosyl) $_m$ - $6^G$ ( $1-\beta$ -fructofuranosyl) $_n$  sucrose 系列のオリゴ糖の“自己転移”をも触媒できることを示唆しているようである。しかし例外として neokestose ( $6^G$ - $\beta$ -fructofuranosyl-sucrose) の場合は“自己転移”が起らず何らの生成物も生じなかった。従ってこの酵素はグルコース C-6 位に結合したフラクトシル基を脱離して他に転移する能力はないものと考えられる。このことは、 $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose あるいは  $6^G$ ( $1-\beta$ -fructofuranosyl) $_2$ -sucrose の“自己転移”において、グルコース C-6 位結合フラクトシル基の脱離していない構造の糖である neoksetose がそのまま遊離されたことから支持される。

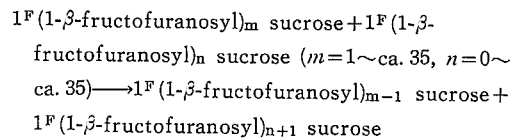
(3) この酵素はまた 1-kestose からのシュークロース,  $1^F$ ( $1-\beta$ -fructofuranosyl) $_n$  sucrose および  $1^F$ ( $1-\beta$ -fructofuranosyl) $_m$ - $6^G$ ( $1-\beta$ -fructofuranosyl) $_n$  sucrose

系列のオリゴ糖へのフラクトシル転移を触媒した。

このフラクトシル転移においては、一般に neokestose ( $6^G$ - $\beta$ -fructofuranosyl sucrose) を初めとする後者の系列のオリゴ糖の方が 1-kestose ( $1^F$ - $\beta$ -fructofuranosyl-sucrose) を初めとする前者の系列の糖よりも転移が起きやすく、また両系列糖における結合フラクトシル基数が小である程起きやすい傾向を示し、高重合度イヌリンでは転移が起きなかった。さらに末端フラクトースを 2 個有している  $1^F$ ( $1-\beta$ -fructofuranosyl) $_m$ - $6^G$ ( $1-\beta$ -fructofuranosyl) $_n$  sucrose 系列のオリゴ糖を受容体とした時、1-kestose からのフラクトシル転移は短鎖の末端フラクトース基の方により生じやすいことがわかった。

このアスパラガス酵素のように  $\beta$ (2 $\rightarrow$ 1) 結合の末端フラクトシル基を受容体糖の末端フラクトシル基 C-1 (OH) 基に転移することを主作用とする類似酵素、 $\beta$ (2 $\rightarrow$ 1') fructan:  $\beta$ (2 $\rightarrow$ 1') fructan 1-fructosyltransferase (FFT), の報告がいくつかある。

EDELMAN 等は彼等の一連の研究<sup>44~47,91</sup>) により、キクイモ塊茎の FFT が次のフラクトシル転移反応において“自己転移”の場合 ( $m=n$ ,  $m=3\sim 9$ )



には重合度 16 までの糖を生じ、異なる糖分子間の転移の場合 ( $m \neq n$ ,  $m=1\sim$ 約 35,  $n=0\sim$ 約 35) には少くとも重合度約 35 までの糖を生ずることを明らかにしている。しかし彼等の用いた FFT は DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーにより部分精製したフラクタンおよび hydrolase を含まぬ“buffered transferase”と称するものであった。また、タマネギ FFT についての SCOTT<sup>90</sup>) の研究では、この酵素がフラクトシル転移の受容体として重合度 20 以上のポリマーを利用できないこと、さらに、キクイモ FFT の場合とは異なり、1-kestose を neokestose に変換する作用をもつらしいことが報ぜられている。しかしこの FFT も十分に精製されたものではない。

最近 SATYANARAYANA<sup>83~85</sup>) はリュウゼツランの 1 種 *Agave vera cruz* の茎から DEAE-セルロース・カラムクロマトグラフィーによって得た炭水化物を含まず、加水分解活性のない transfructosylase 画分を用いて一連の研究を行っているが、酵素の純度には問題があるようである。

このように従来研究成果はいずれも高度精製された

酵素で得られたものではなく、また今回のアスパラガス酵素が  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose にも作用し、高次重合度糖には作用しないなどの点でキクイモ FFT とはかなりの性質が異なる。それ故、著者はこのアスパラガス酵素に  $1^F\text{-fructosyltransferase}$  ( $1^F\text{-FT}$ ) の名称を与えることにする。

4. 要 約

アスパラガス根抽出液から硫酸分画，リン酸カルシウム・ゲル処理，次いで DEAE-セルロース，octyl-Sepharose，DEAE-セルロース，raffinose-coupled Sepharose 6B および Sephadex G-200 を用いる連続カラムクロマトグラフィーにより暫定的に  $1^F\text{-fructosyltransferase}$  ( $1^F\text{-FT}$ ) と名付けた酵素を比活性で硫酸飽和分画に対して 298 倍に高度精製した。ディスク電気泳動的に均一であるこの精製酵素は推定分子量 (Sephadex G-200・ゲル濾過法) 約 64,000 をもち， $\beta\text{-fructofuranosidase}$ ，SST および  $6^G\text{-FT}$  を含まず，1-kestose を基質とした時の反応至適 pH は約 5.0， $45^\circ\text{C}$ ，20 分間加熱に対し pH 5.0~5.5 で安定， $30\sim 45^\circ\text{C}$ ，10 分間加熱で安定， $60^\circ\text{C}$  加熱で失活，*p*-chloromercuribenzoate， $\text{Hg}^{2+}$ ， $\text{Ag}^+$  および  $\text{Cu}^{2+}$  により活性阻害される等の性質を持っていた。

またこの酵素は次のような基質特異性を示した。

(1)  $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列のオリゴ糖のそれぞれにおける酵素触媒“自己転移”反応において，この酵素は供与体糖の  $\beta(2\rightarrow 1)$  結合の末端フラクトシル基が脱離し受容体糖の末端フラクトシル基 C-1 (OH) 位に転移し，1 フラクトース単位だけ高い重合度の同一系列の糖を生じた。しかしシュクロースの場合はこの転移が起きなかった。

(2)  $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列のオリゴ糖での“自己転移”においても，この酵素は同様にフラクトシル転移を触媒し 1 フラクトース単位だけ高い重合度の同系列糖を生じた。しかし neokestose の場合は転移が起きなかった，従ってこの酵素はグルコース部 C-6 位に直接結合したフラクトシル基を脱離して転移することはしないようである。

(3) また，この酵素は 1-kestose からのシュクロースを含む  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列オリゴ糖および  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列オリゴ糖へのフラクトシル転移を触媒した。受容体としての反応性は一般には後者の

糖の方が前者よりも良く，結合フラクトシル基数が少ない糖程良く，フラクトース鎖が 2 本ある糖では転移が短鎖の末端基の方により良く起きる傾向にあった。高重合度糖イヌリンは受容体とはならなかった。

$6^G\text{-Fructosyltransferase}$  ( $6^G\text{-FT}$ ) との名称上のアナロジーからこの酵素に対して  $1^F\text{-fructosyltransferase}$  ( $1^F\text{-FT}$ ) と吹ぶことにした。

第 7 章 総合考察

アスパラガス根から単離・同定した 9 種の三~五糖はいずれも *in vitro* の酵素合成によって合成可能であることを証明したが，ここではこれらのフラクト・オリゴ糖合成への単離した 3 種の fructosyltransferases の関与について考察する (Fig. 51 および Fig. 52 参照)。

1)  $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列糖 (3 a, 4 a, 5 a 糖)

これらはシュクロースのフラクトース部にフラクトースが  $\beta(2\rightarrow 1)$  結合で直鎖状に次々に結合した構造をもち 1-kestose ( $n=1$ , 3 a 糖) の誘導体糖と考えることができるもので，キクイモ塊茎の場合には  $n\approx 35$  位までの重合度糖が存在し主要貯蔵炭水化物を構成している。その中三糖 1-kestose はキクイモ炭水化物の代謝で重要な位置を占めるもので，これはシュクロースから SST の作用によって生じ，1-kestose は次いで FFT の作用によりフラクトシル転移を受けて四糖 (nystose  $n=2$ , 4 a 糖) を初めとする種々の重合度のフラクト・オリゴマーさらにはイヌリン様ポリマーへと順次合成されて行くといわれている<sup>49)</sup>。

アスパラガス根の場合も同様の方法で合成が行われることを今回証明した。即ち 1-kestose は 2 分子のシュクロースの SST 触媒“自己転移”により 1 分子のグルコースを放出して生成され，nystose は 2 分子の 1-kestose の  $1^F\text{-FT}$  触媒“自己転移”により 1 分子のシュクロースを遊離して合成され， $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose (5 a 糖) は 2 分子の nystose の同様な  $1^F\text{-FT}$  作用により 1-kestose 分子を放出して合成される。

しかしまた本実験によれば 1-kestose は別の 1-kestose 分子からのシュクロースへのフラクトシル転移により，また  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose は 1-kestose からの nystose へのフラクトシル転移によっても生ずる。これらの反応には  $1^F\text{-FT}$  が関与する。

2)  $6^G\text{-Fructofuranosyl sucrose}$  (neokestose, 3 b 糖)

この糖はシュクロースのグルコース部に  $\beta(2\rightarrow 6^G)$

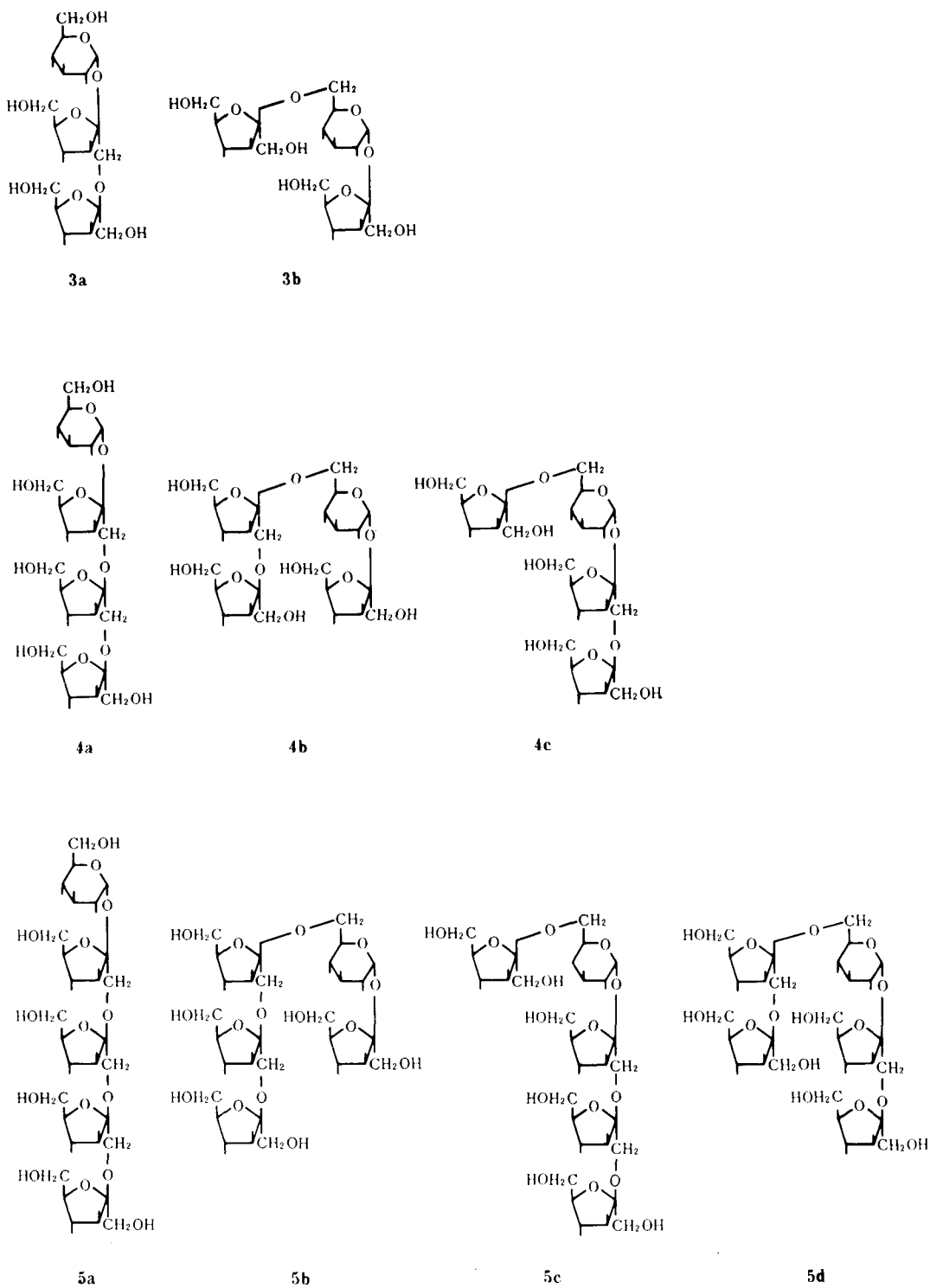


Fig. 51. Structures of Asparagus Fructo-oligosaccharides.

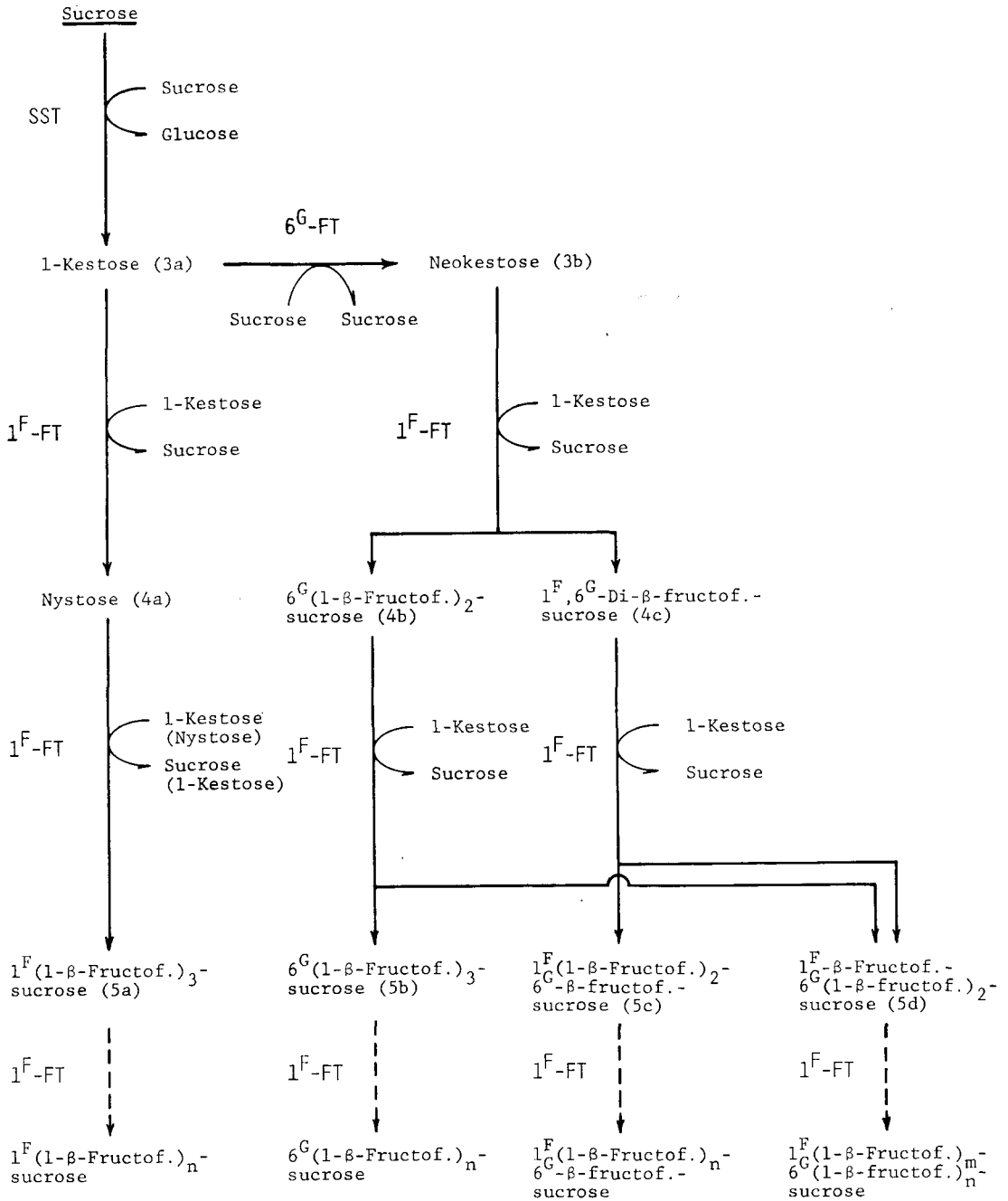


Fig. 52. Pathway of Enzymatic Synthesis of Fructo-oligosaccharides in Asparagus Roots.

結合でフラクトースが1個結合したもので、ヒガンバナ科、ユリ科、イネ科などの植物のいくつかに存在するものである (Table 1 参照)。これは今回高度精製し新しい酵素として提示した  $6^G$ -FT の触媒により 1-kestose からのシュクロースのグルコース C-6(OH) 位へのフラクトシル転移によって生成する。この時 1-kestose からはシュクロースが遊離する。Neokestose はアスパラガス炭水化物の代謝において 1-kestose と同様に重要な位置を占める糖である。

### 3) $6^G(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_n$ sucrose 系列糖 (4 b 糖, 5 b 糖)

これらの糖は neokestose の誘導体糖と考えることができるもので、 $1^F$ -FT の作用で生ずる。即ち、 $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$  sucrose (4 b 糖) は 1-kestose からの neokestose のグルコース部 C-6 位結合フラクトースへのフラクトシル転移 (同時にシュクロースを遊離) により、また  $6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_3$  sucrose (5 b 糖) は同様 1-kestose からの 4 b 糖のグルコース部結合のフラクトース鎖末端へのフラクトシル転移 (同時にシュクロース放出) により生ずる。

4 b 糖はまた  $6^G$ -FT 触媒の neokestose 2 分子間の“自己転移”によってもシュクロースを放出して生成される。

### 4) $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_n\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$ 系列糖 (4 c 糖, 5 c 糖)

これらの糖も同じく neokestose の誘導体と考えられ、neokestose のシュクロース部フラクトース側に  $\beta(2\rightarrow1)$  結合フラクトースが何個か結合して鎖をつくっている構造の糖である。これらの糖の合成には主反応として  $1^F$ -FT が関与し 1-kestose からのフラクトシル転移により生成する。即ち  $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl-sucrose (4 c 糖) は 1-kestose からの neokestose のシュクロース部フラクトースへの転移 (同時にシュクロースを放出) により、 $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl sucrose}$  (5 c 糖) は同様な 1-kestose からの 4 c 糖への転移により生ずる。

また副反応として  $6^G$ -FT が関与する反応もあり、4 c 糖は 1-kestose あるいは neokestose それぞれの 2 分子間の“自己転移”により、5 c 糖は nystose あるいは 4 c 糖 2 分子間のそれにより生成する。

### 5) $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$ sucrose 系列糖 (5 d 糖)

同様に neokestose 誘導体糖ではあるが、neokestose のグルコース部およびフラクトース部両者に  $\beta(2\rightarrow1)$  結

合フラクトシル鎖が伸長している構造の糖である。その合成は  $1^F$ -FT 関与反応が主反応と考えられ、 $1^F\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2$  sucrose (5 d 糖) は 1-kestose からの 4 b 糖シュクロース部フラクトースへのフラクトシル転移 (同時にシュクロースを遊離) あるいは 4 c 糖シュクロース部グルコースに結合したフラクトースへの転移 (シュクロースを放出) により生ずる。

また、実験をしなかったのであくまで推定ではあるが、 $1^F$ -FT 関与の 4 b 糖 2 分子間あるいは 4 c 糖 2 分子間の neokestose 遊離の“自己転移”、さらにあるいは  $6^G$ -FT 関与の 4 c 糖 2 分子の 1-kestose 遊離の“自己転移”による合成も考えることが出来る。

以上考察したことはシュクロースから五糖までのフラクト・オリゴ糖の合成に関するものであるが、六糖から重合度約 10 の“asparagosin”に至るまで多くのフラクトース重合体の *in vivo* での合成も恐らくはこれら三つの酵素の関与の下に進行するものであろう。

## 総括的要約

今までに炭水化物およびその生合成についてほとんど研究の行われなかったアスパラガス (*Asparagus officinalis* L.) の根についてフラクト・オリゴ糖の単離・同定を行うとともに、それらの生合成に関与する 3 種の fructosyltransferases を高度精製して、各々の基質特異性を詳しく調べた。これによりキクイモ (*Helianthus tuberosus* L.) 塊茎とは異なる糖組成をもつアスパラガス根のフラクト・オリゴ糖の生合成機構を明らかにし得た。

(1) アスパラガス根中の全糖および各重合度のフラクト・オリゴ糖含量の季節的変動を 4 月から 10 月にかけて追跡した。

アスパラガス根はキクイモ塊茎に比し一般に高いオリゴ糖含量の糖組成をもつものであった。

根中の貯蔵糖 (全糖, および単糖以外の各重合度糖) の含量は 5 月 (若茎形成期) に急減し、7~8 月 (茎葉形成期) にかけてさらに漸減を続け、8 月上旬に最低含量となり、9~10 月 (茎葉繁茂期) には漸減して高い重合度の糖の貯蔵期に入る。一方、単糖は 5 月に急減して後 8 月上旬の最高含量まで漸増し、その後は漸減する。従ってアスパラガス根では高分子糖の分解から貯蔵への生理的変換が 7~8 月を境にして急激に起るものと推測される。

(2) アスパラガス根のエタノール抽出物から活性炭一



セライト・カラムクロマトグラフィーおよび調製ペーパークロマトグラフィーにより9種のフラクト・オリゴ糖を単離し、FD-mass, 構成糖, メチル化誘導体のガスクロマトグラフィー分析および酸および  $\beta$ -fructofuranosidase による加水分解生成物の分析によってこれらの糖の構造を次のように同定・確認した, しかし  $6^G$ - $\beta$ -fructofuranosyl sucrose (6-kestose) およびその系列糖は精査にも拘らず見出すことはできなかった。

- $1^F$ - $\beta$ -Fructofuranosyl sucrose (1-kestose)
- $1^F$ (1- $\beta$ -Fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose (nystose)
- $1^F$ (1- $\beta$ -Fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose
- $6^G$ - $\beta$ -Fructofuranosyl sucrose (neokestose)
- $6^G$ (1- $\beta$ -Fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose
- $6^G$ (1- $\beta$ -Fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose
- $1^F$ ,  $6^G$ -Di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose
- $1^F$ (1- $\beta$ -Fructofuranosyl)<sub>2</sub>- $6^G$ - $\beta$ -fructofuranosyl-sucrose\*
- $1^F$ - $\beta$ -Fructofuranosyl- $6^G$ (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub>-sucrose\*

\*) 文献未記載の新糖

(3) アスパラガス根から硫酸分画沈澱により調製した一酵素標品によるシュクロースからのフラクト・オリゴ糖の *in vitro* 合成を調べ, 合成物中から単離・同定できた9種の糖の全ては前の実験で天然にアスパラガス根に存在することが確かめられた糖と同一であった。これらの中  $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose,  $6^G$ (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose および  $1^F$ - $\beta$ -fructofuranosyl- $6^G$ (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose の3種は初めて酵素合成によって得られたものである。

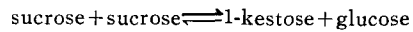
また, この酵素標品には3種のトランスフェラーゼ, sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase (SST) および著者が暫定的に  $6^G$ -fructosyltransferase ( $6^G$ -FT) および  $1^F$ -fructosyltransferase ( $1^F$ -FT) と名付けた酵素, の活性が確かめられ, さらにシュクロース, 1-kestose あるいは nystose を用いるフラクト・オリゴ糖の酵素合成実験からこれらの酵素がオリゴ糖の *in vitro* 合成に関与しているらしいことが示唆された。

(4) Sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase (SST) をアスパラガス根抽出液から硫酸分画, DEAE-セルロース, CM-セルロース, Sephadex G-200 および sucrose-coupled Sepharose 6B・カラムクロマトグラフィーを行うことにより比活性で硫酸 0.3~0.8 飽和画分に対し 811 倍に高度精製した。この精製酵素はディスク電気泳動的に均一であり,  $\beta$ -fructofuranosidase や他の

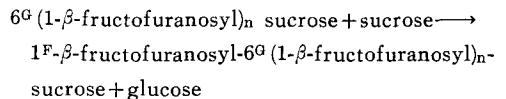
fructosyltransferase 活性を含まず, 推定分子量 (Sephadex G-200 ゲル濾過法) は約 65,000 で, また至適 pH 約 5.0,  $K_m$  値 (シュクロース) 0.11 M, 30°C (pH 4.0~8.0) 加熱で安定, 45°C (pH 5.0~5.5) 加熱で不安定, および *p*-chloromercuribenzoate,  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  および  $Ag^+$  により活性阻害されるなどの性質を示した。

この酵素の触媒する主反応は, 次のようなものであった。

1) シュクロース分子間のフラクトシル転移 “自己転移” を高度に且特異的に触媒して 1-kestose とグルコースを可逆的に生じたが, 1-kestose, nystose, あるいは neokestose それぞれの分子間での “自己転移” は極めて小であった。



2) Neokestose およびその同族オリゴ糖  $6^G$ (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose のシュクロース部フラクトースへのシュクロースからのフラクトシル転移を触媒した。この特異性はアスパラガス SST に特徴的なものでキクイモ SST では報告されていない性質であった。



3)  $1^F$ (1- $\beta$ -Fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose および  $1^F$ (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>m</sub>- $6^G$ (1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 系列オリゴ糖 ( $m \neq 0$ ) へのフラクトシル転移は触媒しなかった。

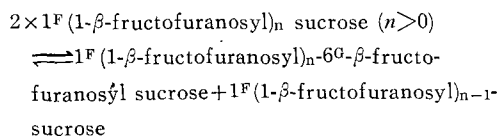
以上により, アスパラガス SST はキクイモ SST に類似はするが, 全くは同一でないことがわかった。

(5) 暫定的に  $6^G$ -fructosyltransferase ( $6^G$ -FT) と名付けた酵素をアスパラガス根抽出液から硫酸分画, リン酸カルシウム・ゲル処理, 次いで octyl-Sepharose, DEAE-セルロース, Sephadex G-200 および raffinose-coupled Sepharose 6B を用いる連続カラムクロマトグラフィーにより比活性で硫酸安全飽和画分に対して 760 倍に高度精製した。精製酵素はディスク電気泳動的に単一で,  $\beta$ -fructofuranosidase および他の fructosyltransferase 活性を示さず, 推定分子量 (Sephadex G-200 ゲル濾過法) 約 69,000 を有し, 1-kestose を基質として用いる反応で最適 pH 約 5.5 を示し, pH 5.0~6.0 で安定, 20~37°C 加熱で安定, 60°C 加熱で失活, *p*-chloromercuribenzoate,  $Hg^{2+}$ , および  $Ag^+$  により活性阻害を受ける等の性質を示した。

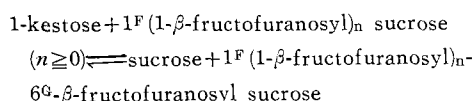
また, このトランスフェラーゼは次のような基質特異

性を示した。

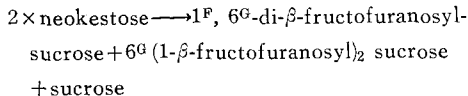
1)  $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列オリゴ糖のそれぞれの酵素触媒“自己転移”においてシュクロース部グルコース C-6(OH) 位へのフラクトシル転移を触媒し、基質より1フラクトシル単位だけ重合度の高い糖を生成した。この時結合フラクトシル基数が小さい程反応性は大であった。



2) 1-Kestose からのシュクロース, あるいは  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列オリゴ糖 G-6 位へのフラクトシル転移を触媒し、受容体糖より1フラクトシル単位だけ高い糖を生成した。



3) Neokestose の酵素触媒“自己転移”をも触媒した。



このトランスフェラーゼは文献未記載の酵素であることから、これに対し系統名  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-sucrose} : 1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n \text{ sucrose } 6^G\text{-fructosyltransferase } (m > 0, n \geq 0)$ , 常用名  $6^G\text{-fructosyltransferase } (6^G\text{-FT})$  の名称を与えることを提案する。

(6) 暫定的に  $1^F\text{-fructosyltransferase } (1^F\text{-FT})$  と名付けた酵素をアスパラガス根抽出液から硫酸分画, リン酸カルシウム・ゲル処理, 次いで DEAE-セルロース, octyl-Sepharose, DEAE-セルロース, raffinose-coupled Sepharose 6B および Sephadex G-200 を用いる連続カラムクロマトグラフィーにより比活性で硫酸安全飽和画分に対して 298 倍に高度精製した。ディスク電気泳動的に均一であるこの精製酵素は推定分子量 (Sephadex G-200 ゲル濾過法) 約 64,000 をもち,  $\beta\text{-fructofuranosidase}$ , SST および  $6^G\text{-FT}$  を含まず, 1-kestose を基質とした時の反応至適 pH は約 5.0,  $45^\circ\text{C}$ , 20 分間加熱に対し pH 5.0~5.5 で安定,  $30\sim 45^\circ\text{C}$ , 10 分間加熱で安定,  $60^\circ\text{C}$  加熱で失活, *p*-chloromercuribenzoate,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  および  $\text{Cu}^{2+}$  により活性阻害される等の性質を持っていた。

また、この酵素は次のような基質特異性を示した。

1)  $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列のオリゴ糖のそれぞれにおける酵素触媒“自己転移”反応において、この酵素は供与体糖の  $\beta(2\rightarrow 1)$  結合の末端フラクトシル基が脱離し受容体糖の末端フラクトシル基 C-1(OH) 位に転移し、1フラクトース単位だけ高い重合度の同一系列の糖を生じた。しかしシュクロースの場合はこの転移が起きなかった。

2)  $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列のオリゴ糖での“自己転移”においても、この酵素は同様にフラクトシル転移を触媒し1フラクトース単位だけ高い重合度の同系列糖を生じた。しかし neokestose の場合は転移が起きなかった、従ってこの酵素はグルコース部 C-6 位に直接結合したフラクトシル基を脱離して転移することはしないようである。

3) 1-Kestose からのシュクロースを含む  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列オリゴ糖および  $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列オリゴ糖へのフラクトシル転移を触媒した。受容体としての反応性は一般には後者の糖の方が前者よりも良く、結合フラクトシル基数が少ない糖程良く、フラクトース鎖が2本ある糖では転移が短鎖の末端基の方により良く起きる傾向にあった。高重合度イヌリンは受容体とはならなかった。

$6^G\text{-Fructosyltransferase } (6^G\text{-FT})$  との名称上のアナロジーからこの酵素に対して  $1^F\text{-fructosyltransferase } (1^F\text{-FT})$  と呼ぶことにした。

(7) アスパラガス根におけるフラクト・オリゴ糖の生合成機構を上述の *in vitro* 実験における SST,  $6^G\text{-FT}$ , および  $1^F\text{-FT}$  の種々の基質に対する特異性から考察して次の結論を得た。

アスパラガス根におけるフラクト・オリゴ糖の生合成において重要な位置を占める糖は二糖シュクロース, 三糖 1-kestose, および三糖 neokestose の3種であり、同じく重要な役割をする酵素は3種の fructosyltransferases (SST,  $6^G\text{-FT}$ , および  $1^F\text{-FT}$ ) である。これらの酵素はそれぞれ生合成において主触媒反応と副触媒反応を呈するが、ここでは主反応を以て論ずることとする。

1)  $1^F(1-\beta\text{-Fructofuranosyl})_n$  sucrose 系列糖においては、まず 1-kestose ( $1^F\text{-}\beta\text{-fructofuranosyl} \text{ sucrose}$ ) は SST の作用によりシュクロースから生じ、次いでいずれも  $1^F\text{-FT}$  の作用により 1-kestose から nystose [ $1^F(1-\beta\text{-fructofuranosyl})_2 \text{ sucrose}$ ], nystose から  $1^F\text{-}$

(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose, さらに同様の作用により次々とより高次の糖が生ずる。また1-kestoseは1<sup>F</sup>-FTの関与により別の1-kestoseからのシュークロースへのフラクトシル転移により, 同じく1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose は1-kestoseからのnystoseへの転移によっても生ずる。

2) Neokestose (6<sup>G</sup>- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose) の合成は6<sup>G</sup>-FTによる1-kestoseからのシュークロースへのフラクトシル転移によって生ずる。

3) 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -Fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 系列糖の合成では, いずれも1<sup>F</sup>-FTの作用により6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose は1-kestoseからのneokestoseへのフラクトシル転移により, また6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose は1-kestoseからの前者の糖への転移によって生ずる。

4) 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -Fructofuranosyl)<sub>n</sub>-6<sup>G</sup>- $\beta$ -fructofuranosyl-sucrose 系列糖の合成では, ここでも1<sup>F</sup>-FTが関与し, 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-di- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose は1-kestoseからのneokestoseへのフラクトシル転移により, 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>- $\beta$ -fructofuranosyl sucrose は1-kestoseからの前者の糖への転移によって生ずる。

5) 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -Fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose 系列糖は同様1<sup>F</sup>-FTの関与により生じ, 例えば1<sup>F</sup>- $\beta$ -fructofuranosyl-6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub>-sucrose は1-kestoseからの6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -fructofuranosyl)<sub>2</sub>-sucrose へのフラクトシル転移により生ずる。より高次のこの系列糖は同様の作用により次々と生ずるものと推測される。

#### 引用文献

- ALBON, N., D. J. BELL, P. H. BLANCHARD, D. GROSS, and J. T. RUNDEL: Kestose: A Trisaccharide Formed from Sucrose by Yeast Invertase, *J. Chem. Soc.*, 24-27. 1953
- ALLEN, P. J. and J. S. D. BACON: Oligosaccharides Formed from Sucrose by Fructose-transferring Enzymes of Higher Plants, *Biochem. J.*, **63**, 200-206. 1956
- ANDERSEN, B.: The Transferring Activity of  $\beta$ -Fructofuranosidase: Formation of Two Disaccharides from Fructose, *Acta Chem. Scand.*, **21**, 828-829. 1967
- ANDERSEN, B., N. THIESEN, and P. E. BROE: The Transferring Activity of  $\beta$ -Fructofuranosidase from Yeast: A Quantitative Description, *Acta Chem. Scand.*, **23**, 2367-2374. 1969
- ARNOLD, W. N.:  $\beta$ -Fructofuranosidase from Grape Berries, *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 134-147. 1965
- ASPINALL, G. O.: Gas-Liquid Partition Chromatography of Methylated and Partially Methylated Methyl Glycosides, *J. Chem. Soc.*, 1676-1680. 1963
- BABUL, J. and E. STELLWAGEN: Measurement of Protein Concentration with Interferences Optics, *Anal. Biochem.*, **28**, 216-221. 1969
- BACON, J. S. D.: Transfructosidation by a Yeast Invertase Preparation, *Biochem. J.*, **50**, xviii. 1952
- BACON, J. S. D.: The Oligosaccharides Produced by the Action of Yeast Invertase Preparation on Sucrose, *Biochem. J.*, **57**, 320-328. 1954
- BACON, J. S. D.: Carbohydrates of the Rampion, *Campanula rapunculus* L., *Nature*, **184**, 1957. 1959
- BACON, J. S. D.: The Trisaccharide Fraction of Some Monocotyledons, *Biochem. J.*, **73**, 507-514. 1959
- BACON, J. S. D. and D. J. BELL: A New Trisaccharide Produced from Sucrose by Mould Invertase, *J. Chem. Soc.*, 2528-2530. 1953
- BACON, J. S. D. and J. EDELMAN: The Action of Invertase Preparations, *Arch. Biochem.*, **28**, 467-468. 1950
- BACON, J. S. D. and J. EDELMAN: The Carbohydrates of the Jerusalem Artichoke and Other Compositae, *Biochem. J.*, **48**, 114-126. 1951
- BACON, J. S. D. and R. LOXLEY: Seasonal Changes in the Carbohydrates of the Jerusalem Artichoke Tuber, *Biochem. J.*, **51**, 208-213. 1952
- BARKER, S. A., E. J. BOURNE, and T. R. CARINGTON: Studies of *Aspergillus niger*. Part III. The Structure of a Trisaccharide Synthesized from Sucrose, *J. Chem. Soc.*, 2125-2129. 1954
- BARKER, S. A., E. J. BOURNE, M. STACEY, and R. B. WARD: The Effect of Streptomycin on the Enzymic Synthesis and Degradation of Carbohydrates, *J. Chem. Soc.*, 2994-2998. 1957
- BARKER, S. A., E. J. BOURNE, M. STACEY, and R. B. WARD: Some Paper-Chromatographic Studies with *Aspergillus niger* "152" Transfructosylase, *Biochem. J.*, **69**, 60-62. 1958

19. BARKER, S. A. and T. R. CARRINGTON: Studies of *Aspergillus niger*. Part II. Transglycosidation by *Aspergillus niger*, *J. Chem. Soc.*, 3588-3593. 1953
20. BARTON-WRIGHT, E. C. and G. HARRIS: Carbohydrate Composition of Wort and the Biochemistry of Fermentation, *Nature*, **167**, 560-561. 1951
21. BEALING, F. J.: Mould "Glucosaccharase": A Fructosidase, *Biochem. J.*, **55**, 93-101. 1953
22. BEALING, F. J., and J. S. D. BACON: Sucrose Breakdown by Enzyme Preparations from Moulds, *Biochem. J.*, **49**, lxxv. 1951
23. BEALING, F. J. and J. S. D. BACON: The Action of Mould Enzymes on Sucrose, *Biochem. J.*, **53**, 277-285. 1953
24. BELL, D. J. and J. EDELMAN: Disaccharides Synthesis Following Fructose-Transfer from Sucrose by Yeast Invertase, *J. Chem. Soc.*, 4652-4654. 1954
25. BHATIA, I. S., S. K. MANN, and R. SINGH: Biochemical Changes in the Water-soluble Carbohydrates during the Development of Chicory (*Cichorium intybus* LINN) Roots, *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 535-539. 1974
26. BHATIA, I. S., and K. S. NANDRA: Studies on Fructosyl Transferase from *Agave americana*, *Phytochemistry*, **18**, 923-927. 1979
27. BHATIA, I. S., M. N. SATYANARAYANA, and M. SRINIVASAN: Transfructosidase from *Agave vera cruz*, *Current Sci.* (India), **23**, 53-54. 1954; *C. A.*, **48**, 8282. 1954
28. BHATIA, I. S., M. N. SATYANARAYANA, and M. SRINIVASAN: Transfructosidase from *Agave vera cruz* Mill, *Biochem. J.*, **61**, 171-174. 1955
29. BHATIA, I. S. and M. SRINIVASAN: Transfructosidase in *Polianthes tuberosa*, *J. Sci. Industr. Res.* (India), **13 B** 373-374. 1954; *C. A.*, **48**, 12239. 1954
30. BLANCHARD, P. H. and N. ALBON: The Inversion of Sucrose; A Complication, *Arch. Biochem.*, **29**, 220-222. 1950
31. CHAMBERT, R. and G. GONZY-TREBOUL: Levansucrase of *Bacillus subtilis*. Characterization of a Stabilized Fructosyl-Enzyme Complex and Identification of an Aspartyl Residue as the Binding Site of the Fructosyl Group, *Eur. J. Biochem.*, **71**, 493-508. 1976
32. CHAMBERT, R., G. TREBOUL, and R. DEDONDER: Kinetic Studies of Levansucrase of *Bacillus subtilis*, *Eur. J. Biochem.*, **41**, 285-300. 1974
33. CHANDORKAR, K. R. and F. W. COLLINS: Enzymological Aspects of *de novo* Synthesis of Fructooligosaccharides in Leaf Disks of Certain Asteraceae. IV. The Activity of Sucrose-sucrose 1-fructosyltransferase, *Can. J. Botany*, **52**, 1369-1377. 1974
34. COOPER, R. A. and R. N. GREENSHIELDS: The Partial Purification and Some Properties of Two Sucrases of *Phaseolus vulgaris*, *Biochem. J.*, **92**, 357-364. 1964
35. DAHLÖVIST, A. and B. BORGSTRÖM: Characterization of Intestinal Invertase as a Glucosido-Invertase II. Studies on Transglycosylation by Intestinal Invertase, *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1659-1667. 1959
36. DAVIS, B. J.: Disc Electrophoresis—II. Method and Application to Human Serum Proteins, *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404-427. 1964
37. DEDONDER, R.: Les Glucides du Topinambour. I. Mise en Évidence d'une Série de Glucofructosanes dans les Tubercules du Topinambour. Isolement, Analyse, et Structure des Termes les Moins Polymérisés, *Bull. soc. chim. biol.*, **37**, 144-156. 1952
38. DEDONDER, R.: Les Glucides du Topinambour. III—Synthèse de Glucofructosanes *in vitro* par des Extraits de Divers Organes de Topinambour, *Bull. soc. chim. biol.*, **34**, 171-182. 1952
39. DICKERSON, A. G.: A  $\beta$ -Fructofuranosidase from *Claviceps purpurea*, *Biochem. J.* **129**, 263-272. 1972
40. DORLAND, L., J. P. KAMERLING, J. F. G. Vliegenthart, and M. N. SATYANARAYANA: Oligosaccharides Isolated from *Agave vera cruz*, *Carbohydr. Res.*, **54**, 275-284. 1977
41. EBERT, K. H. and G. SCHENK: Mechanisms of Biopolymer Growth: The Formation of Dextran and Levan, *Adv. Enzymol.*, **30**, 179-221. 1968
42. EDELMAN, J.: Transfer Reaction Catalysed by Some Sucrase Preparations, *Biochem. J.*, **57**, 22-33. 1954
43. EDELMAN, J.: The Formation of Oligosac-

- charides by Enzymic Transglycosylation, *Adv. Enzymol.*, **17**, 189-232. 1956
44. EDELMAN, J. and J. S. D. BACON: Evidence for Transfructosidation in the Jerusalem Artichoke, *Biochem. J.*, **47**, xlii. 1950
45. EDELMAN, J. and J. S. D. BACON: Transfructosidation in Extracts of the Tubers of *Helianthus tuberosus* L., *Biochem. J.*, **49**, 529-540. 1951
46. EDELMAN, J. and A. G. DICKERSON: Characteristics of a Transfructosylase Isolated from Tubers of *Helianthus tuberosus* L., *Biochem. J.*, **88**, 35 P. 1963
47. EDELMAN, J. and A. G. DICKERSON: The Metabolism of Fructose Polymers in Plants, Transfructosylation in Tubers of *Helianthus tuberosus* L., *Biochem. J.*, **98**, 787-794. 1966
48. EDELMAN, J. and T. G. JEFFORD: The Metabolism of Fructose Polymers in Plants. 4. Beta-Fructofuranosidases of Tubers of *Helianthus tuberosus* L., *Biochem. J.*, **93**, 148-161. 1964
49. EDELMAN, J. and T. G. JEFFORD: The Mechanism of Fructosan Metabolism in Higher Plants as Exemplified in *Helianthus tuberosus*, *New Phytol.*, **67**, 517-531. 1968
50. EDELMAN, J. and D. A. C. L. RECALDIN: A 1F-Fructosylsucrose-Sucrose Transfructosylase from Jerusalem Artichoke Tubers and its Involvement in Fructosan Synthesis, *Biochem. J.*, **79**, 12P-13 P. 1961
51. FISCHER, E. H. et L. KOHTÈS: Purification de l'Invertase de Levure, *Helv. Chim. Acta*, **34**, 1123-1131. 1951
52. FISCHER, E. H., L. KOHTÈS et J. FELLIG: Propriétés de l'Invertase Purifiée, *Helv. Chim. Acta*, **34**, 1132-1138. 1951
53. GONZALEZ, N. S. and H. G. PONTIS: Uridine Diphosphate Fructose and Uridine Diphosphate Acetylgalactosamine from Dahlia Tubers, *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 179-181. 1963
54. GROSS, D., P. H. BLANCHARD, and D. J. BELL: Neokestose: A Trisaccharide Formed from Sucrose by Yeast Invertase, *J. Chem. Soc.*, 1727-1730. 1954
55. HAKOMORI, S.: A Rapid Permethylation of Glycolipid, and Polysaccharide Catalyzed by Methylsulfinyl Carbanion in Dimethyl Sulfoxide, *J. Biochem.*, **55**, 205-208. 1964
56. HAMMER, H.: The Trisaccharide Fraction of Some Plants Belonging to the Amaryllidaceae, *Acta Chem. Scand.*, **22**, 197-199. 1968
57. HAMMER, H.: The Trisaccharide Fraction of the Bulbs of Some Liliaceae Species, *Acta Chem. Scand.*, **23**, 3268-3269. 1959
58. HAMMER, H.: Oligo- and Polyfructosides from the Bulbs of Two *Leucojum* Species, *Acta Chem. Scand.*, **24**, 1294-1300. 1970
59. HAQ, S. and G. A. ADAMS: Oligosaccharides from the Sap of Sugar Maple (*Acer saccharum* MARSH), *Can. J. Chem.*, **39**, 1165-1170. 1961
60. HENDERSON, R. W., R. K. MORTON, and W. A. RAWLINSON: Oligosaccharide Synthesis in Banana and its Relationship to the Transferase Activity of Invertase, *Biochem. J.*, **72**, 340-344. 1959
61. HESTRIN, S., S. AVINERI-SHAPIRO, and M. ASCHNER: The Enzymic Production of Levan, *Biochem. J.*, **37**, 450-456. 1943
62. HOWARD, B. H.: The Biochemistry of Rumen Protozoa 2. Some Carbohydrases in Cell-free Extracts of *Dasytricha* and *Isotricha*, *Biochem. J.*, **71**, 675-680. 1959
63. JEFFORD, T. G. and J. EDELMAN: Changes in Content and Composition of the Fructose Polymers in Tubers of *Helianthus tuberosus* L. during Growth of Daughter Plants, *J. Exp. Bot.*, **12**, 177-187. 1961
64. KAHL, W., A. ROSZKOWSKI, and A. ZUROWSKA: The Isolation of 6-Kestose from the Seeds of the Horse Chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.), *Carbohydr. Res.*, **10**, 586-588. 1969
65. KURASAWA, H., Y. YAMAMOTO, I. IGAUE, and Y. NAKAMURA: Non-Reducing Oligosaccharides (Produced from Sucrose) Synthesizing Enzyme in *Aspergillus oryzae*. Part VII. New Oligosaccharide No. 1 (Isokestose) Formed from Sucrose, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **30**, 624-630. 1956
66. KURASAWA, H., Y. YAMAMOTO, I. IGAUE, and Y. NAKAMURA: Studies on Mould Fructosidase. Part VIII. A New Oligosaccharide No. 2 (Fungitetraose) Formed from Sucrose, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **30**, 696-700. 1956
67. LAMPEN, J. O.: External Enzymes of Yeast: their Nature and Formation, *Antonie van Leeuwenhoek*, **34**, 1-18. 1968
68. LE TOURNEAU, D.: Oligosaccharide Production from Sucrose by *Verticillium albo-atrum*,

- Plant Physiol.*, **36**, 102-104. 1961
69. MIZUNO, T.: Studies on the Carbohydrates in the Bulb of *Lycoris radiata* Herbert. Part XI. A New Crystalline Glucofructan "Lycorisin" (8), *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **31**, 31-34. 1957
  70. MORRIS, D. L.: Quantitative Determination of Carbohydrates with Dreywood's Anthrone Reagent, *Science*, **107**, 254-255. 1948
  71. MUKHERJEE, S. and H. C. SRIVASTAVA: Improved Spray Reagent for the Detection of Sugar, *Nature*, **169**, 330. 1952
  72. NELSON, N.: A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose, *J. Biol. Chem.*, **153**, 375-380. 1944
  73. OCHI, K., S. IWAMOTO, E. HAYASE, S. YASHIMA, and Y. OKAMI: Biosynthesis of Formycin, Role of Certain Amino Acids in Formycin Biosynthesis, *J. Antibiotics*, **27**, 909-916. 1974
  74. ORNSTEIN, L.: Disc Electrophoresis—I. Background and Theory, *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 321-349. 1964
  75. PARTRIDGE, S. M.: Aniline Hydrogen Phthalate as a Spray Reagent for Chromatography of Sugars, *Nature*, **164**, 443. 1949
  76. PAZUR, J. H.: Transfructosidation Reactions of an Enzyme of *Aspergillus oryzae*, *J. Biol. Chem.*, **199**, 217-225. 1952
  77. PERCIVAL, E. G. V., and E. PERCIVAL: "Structural Carbohydrate Chemistry, 2nd ed.", J. Garnet Miller Ltd., London, 1962, pp. 360.
  78. PRIDHAM, J. B.: Oligosaccharides and Associated Glycosidases in Aspen Tissues, *Biochem. J.*, **76**, 13-17. 1960
  79. RECALDIN, D. A. C. L.: Studies on the Synthesis of Inulin by Tissues of *Helianthus Tuberosus* L., Ph. D. Thesis, Univ. of London, 1961; Cited from J. EDELMAN and T. G. JEFFORD: *New Phytol.*, **67**, 517-531. 1968
  80. ROBYT, J. F., B. K. KIMBLE, and T. F. WALSETH: The Mechanism of Dextranucrase Action. Direction of Dextran Biosynthesis, *Arch. Biochem. Biophys.*, **165**, 634-640. 1974
  81. ROE, J. H., J. H. EPSTEIN, and N. P. GOLDSSTEIN: A Photometric Method for the Determination of Inulin Plasma and Urine, *J. Biol. Chem.*, **178**, 839-845. 1949
  82. SAIGOH, M., M. MAEDA, and S. MURAKAMI: Structure of Glucofructan from *Arrhcnatherum elatius* var *bulbosum* Tubers; *Bot. Mag. Tokyo*, **84**, 149-158. 1971
  83. SATYANARAYANA, M. N.: Biosynthesis of Oligosaccharides and Fructans in *Agave vera cruz*: Part I—Properties of a Partially Purified Transfructosylase, *Indian J. Biochem. Biophys.*, **13**, 261-266. 1976
  84. SATYANARAYANA, M. N.: Biosynthesis of Oligosaccharides and Fructans in *Agave vera cruz*: Part II—Biosynthesis of Oligosaccharides, *Indian J. Biochem. Biophys.*, **13**, 398-407. 1976
  85. SATYANARAYANA, M. N.: Biosynthesis of Oligosaccharides and Fructans in *Agave vera cruz*: Part III—Biosynthesis of Fructans, *Indian J. Biochem. Biophys.*, **13**, 408-412. 1976
  86. 沢田英吉: アスパラガス, p. 19-63. 誠文堂新光社 1962
  87. SCHLUBACH, H. H. und J. BERNDT: Untersuchungen über Polyfructosane. LIX. Der Kohlenhydratstoffwechsel im Hafer, *Ann.*, **647**, 41-50. 1961
  88. SCHLUBACH, H. H. und H. BÖE: Untersuchungen über Fructoseanhydride. XIX. Die Konstitution des Asparagosins, *Ann.*, **532**, 191-200. 1937
  89. SCHLUBACH, H. H. und H. O. A. KOEHN: Untersuchungen über Polyfructosane LV. Die Bildung der verzweigten Polyfructosane in den Roggenhalmen, *Ann.*, **614**, 126-136. 1958
  90. SCOTT, R. W.: Transfructosylation in Higher Plants Containing Fructose Polymers, Ph. D. Thesis, Univ. of London. 1968; Cited from J. EDELMAN and T. G. JEFFORD: *New Phytol.*, **67**, 517-531. 1968
  91. SCOTT, R. W., T. G. JEFFORD, and J. EDELMAN: Sucrose Fructosyltransferase from Higher Plant Tissues, *Biochem. J.*, **100**, 23 p-24 p. 1966
  92. SHIH, T.-W. and Y. SAKURAI: Glucofructans. Part I. The Constitution of the Glucofructans from the Endosperm of Naked Barley, *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 879-884. 1967
  93. SHIOMI, N.: Purification and Characterization of  $\beta$ -Fructofuranosidases Solubilized and Released from Cell Debris of Aged Onion Slices, *J. Fac. Agric., Hokkaido Univ.*, **58**, 321-342. 1977

94. SHIOMI, N.: *De novo* Biosynthesis of  $\beta$ -Fructofuranosidases in Aerobically Aged Onion Disks, *J. Fac. Agric., Hokkaido Univ.*, **58**, 467-486. 1977
95. SHIOMI, N.: Isolation and Identification of 1-Kestose and Neokestose from Onion Bulbs, *J. Fac. Agric., Hokkaido Univ.*, **58**, 548-556. 1978
96. SHIOMI, N.: Purification and Characterisation of 6<sup>G</sup>-Fructosyltransferase from the Roots of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.), *Carbohydr. Res.*, **96**, 281-292. 1981
97. SHIOMI, N.: Purification and Characterisation of 1<sup>F</sup>-fructosyltransferase from the Roots of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.), *Carbohydr. Res.*, **99**, 157-169. 1982
98. SHIOMI, N.: Reverse Reactions of Fructosyl Transfer Catalysed by Asparagus 6<sup>G</sup>-Fructosyltransferase, *Carbohydr. Res.*, **106**, 166-169. 1982
99. SHIOMI, N. and M. IZAWA: Purification and Characterization of Sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase from the Roots of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.), *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 603-614. 1980
100. SHIOMI, N., J. YAMADA, and M. IZAWA: Variation of Sugar Contents in Onion Plants during Their Growth, Abstracts of Papers, Annual Meeting of Hokkaido Branch of the Agricultural Chemical Society of Japan, Obihiro, Hokkaido, October, 1966, p. 3.
101. SHIOMI, N., J. YAMADA, and M. IZAWA: Structures of Trisaccharides of Onion Bulbs, Abstracts of Papers, Annual Meeting of Hokkaido Branch of the Agricultural Chemical Society of Japan, Obihiro, Hokkaido, October, 1971, p. 1.
102. SHIOMI, N., J. YAMADA, and M. IZAWA: Structures of Fructo-oligosaccharides in Asparagus Roots, Abstracts of Papers, Annual Meeting of Hokkaido Branch of the Agricultural Chemical Society of Japan, Sapporo, Hokkaido, November, 1974, p. 2.
103. SHIOMI, N., J. YAMADA, and M. IZAWA: Isolation and Identification of Fructo-oligosaccharides in Roots of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.), *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 567-575. 1976
104. SHIOMI, N., J. YAMADA, and M. IZAWA: A Novel Pentasaccharide in the Roots of Asparagus (*Asparagus officinalis* L.), *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1375-1377. 1979
105. SHIOMI, N., J. YAMADA, and M. IZAWA: Synthesis of Several Fructo-oligosaccharides by Asparagus Fructosyltransferases, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2233-2244. 1979.
106. SINGH, R. and I. S. BHATIA: Isolation and Characterization of Fructosyltransferase from Chicory Roots, *Phytochemistry*, **10**, 495-502. 1971
107. SINGH, R. and I. S. BHATIA: Substrate Specificity of Fructosyl Transferase from Chicory Roots, *Phytochemistry*, **10**, 2037-2039. 1971
108. SOMOGYI, M.: Determination of Blood Sugar, *J. Biol. Chem.*, **160**, 69-73. 1945
109. SOMOGYI, M.: Note on Sugar Determination, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23. 1952
110. STOFFYN, A., P. STOFFYN, and E. MÅRTENSSON: Structure of Kidney Ceramide Dihexoside Sulfate, *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 353-357. 1968
111. TAKEICHI, M., H. NAKAMURA, H. NISHIMURA, and J. MIZUTANI: The Free Sugars of *Allium victorialis* L., *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **47**, 491-495. 1973
112. TANRET, M. G.: Sur les Sucres de l'Asperge, *Bull. soc. chim. France*, **5**, 889-895. 1909
113. TOMODA, M. and N. SATOH: Constituents of the Radix of *Asparagus cochinchinensis*. I. Isolation and Characterization of Oligosaccharides, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 2306-2310. 1974
114. TOMODA, M., N. SATOH, and A. SUGIYAMA: Isolation and Characterization of Fructans from *Polygonatum odoratum* var. *japonicum* Rhizomes, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 1806-1810. 1973
115. TREVELYAN, W. E., D. P. PROCTER, and J. S. HARRISON: Detection of Sugars on Paper Chromatograms, *Nature*, **166**, 444-445. 1950
116. UMEMURA, Y., M. NAKAMURA, and S. FUNAHASHI: Isolation and Characterization of Uridine Diphosphate Fructose from Tubers of Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.), *Arch. Biochem. Biophys.*, **119**, 240-252. 1967
117. WHELAN, W. J. and D. M. JONES:  $\beta$ -Methyl Fructoside as a Substrate in Transfructosylation, *Biochem. J.*, **54**, xxxiv. 1953
118. WHISTLER, R. L. and C. L. SMART: "Polysaccharide Chemistry", Academic Press, New York, N. Y., 1952, p. 276.

119. WHITE, Jr., J. W.: The Action of Invertase Preparations, *Arch. Biochem. Biophys.*, **39**, 238-240. 1952
120. WHITE, Jr., J. W. and J. MAHER: Transglucosidation by Honey Invertase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **42**, 360-367. 1953
121. WHITE, Jr., J. W. and J. MAHER:  $\alpha$ -Maltosyl  $\beta$ -D-Fructofuranoside, a Trisaccharide Enzymatically Synthesized from Sucrose, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1259-1260. 1953
122. WHITE, L. M. and G. E. SECOR: The Oligosaccharides Formed During the Sucrose-Invertase Reaction, *Arch. Biochem. Biophys.*, **36**, 490-491. 1952

### Summary

Up to the present, the chemical structure and biosynthesis of fructo-oligosaccharides in the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) have been studied scarcely. In this study, therefore, the author attempted to isolate and identify the fructo-oligosaccharides in the asparagus roots and to investigate synthesis of these saccharides by an enzyme preparation obtained from the asparagus roots. The asparagus saccharides were found to be structurally different from those of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers and three different types of fructosyltransferases were assumed to be involved in the synthesis of the asparagus saccharides. These fructosyltransferases were highly purified and their substrate specificities were investigated in detail. Thus, a mechanism of the enzymatic synthesis of the fructo-oligosaccharides in asparagus roots could be revealed.

(1) Changes in the total sugar content and the composition of fructo-oligosaccharides were investigated by use of the asparagus roots harvested from April to October. Ratio of the fructo-oligosaccharides to higher-saccharides in the asparagus roots was larger than that of Jerusalem artichoke tubers. The fructo-oligosaccharides were consumed rapidly in May and decreased continuously from July to August. Contents of the total sugar and fructo-oligosaccharides were the lowest early in August, thereafter they increased gradually until the highest level was reached in October. During this period, higher fructo-oligosaccharides also accumulated in the roots. On the

other hand, contents of monosaccharides decreased rapidly in May and afterward increased until the maximum level was attained in August. However, a decline in the monosaccharide contents observed in October. These findings indicate that a metabolic conversion from decomposition (consumption) to synthesis (accumulation) of the fructo-oligosaccharides occurs in the asparagus roots between July and August.

(2) Nine fructo-oligosaccharides were isolated from an ethanol extract of the roots of asparagus by carbon-Celite column- and preparative paper-chromatographies. They were identified as described below by examination of the constituent sugars, FD-mass spectrometric analysis of the oligosaccharides, gas liquid-chromatographic analysis of methyl derivatives, and investigation of the hydrolyzates obtained by partial acid hydrolysis and by  $\beta$ -fructofuranosidase action.

- 1<sup>F</sup>- $\beta$ -D-Fructofuranosylsucrose (1-kestose)
- 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -D-Fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose (nystose)
- 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -D-Fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose
- 6<sup>G</sup>- $\beta$ -D-Fructofuranosylsucrose (neokestose)
- 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-Fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose
- 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-Fructofuranosyl)<sub>3</sub> sucrose
- 1<sup>F</sup>, 6<sup>G</sup>-Di- $\beta$ -D-fructofuranosyl sucrose
- 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -D-Fructofuranosyl)<sub>2</sub>-6<sup>G</sup>- $\beta$ -D-fructofuranosyl sucrose\*
- 1<sup>F</sup>- $\beta$ -D-Fructofuranosyl-6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>2</sub> sucrose\*

\* New saccharides hitherto unknown in nature.

In spite of a detailed investigation, 6<sup>F</sup>- $\beta$ -D-fructofuranosyl sucrose (6-kestose) and its related saccharides were not detected.

(3) Nine fructo-oligosaccharides were synthesized *in vitro* from sucrose by an enzyme preparation obtained from the asparagus roots. They were isolated and elucidated to be the same saccharides as those previously proved to occur naturally in the asparagus roots. Three among these oligosaccharides, i. e., 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>3</sub>-sucrose and 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>m</sub>-6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>n</sub> sucrose ( $n=1$  and  $2$  in  $m=1$ ), were those first synthesized enzymatically *in vitro*. Further investigation on the fructo-oligosaccharides obtained by the enzymatic synthesis in use of sucrose, 1-kestose or nystose suggested that three types of fructosyltransferases, i. e., sucrose : suc-

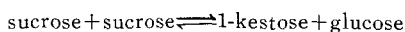


rose 1-fructosyltransferase (SST), 6<sup>G</sup>-fructosyltransferase (6<sup>G</sup>-FT) and 1<sup>F</sup>-fructosyltransferase (1<sup>F</sup>-FT) the latter two are tentatively named, might be involved in the biosynthesis of these oligosaccharides in the asparagus roots.

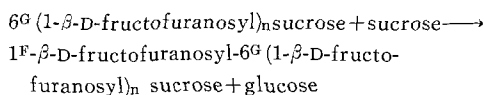
(4) A sucrose : sucrose 1-fructosyltransferase was purified (811-fold) from an extract of the asparagus roots by successive fractionation with ammonium sulfate and then chromatography on DEAE-, CM-cellulose, Sephadex G-200 and sucrose-coupled Sepharose 6B columns. The purified enzyme was homogeneous disc-electrophoretically and was free from the activity of  $\beta$ -fructofuranosidase and other fructosyltransferases. Properties of the enzyme are as follows: mol. wt., ca. 65,000; opt. pH, ca. 5.0; *K<sub>m</sub>* for sucrose, 0.11 M; stable on heating at 30°C, pH 4.0-8.0; labile (ca. 50% loss) on heating at 45°C, pH 5.0-6.5; inhibited by Hg<sup>2+</sup>, *p*-chloromercuribenzoate, Mn<sup>2+</sup> and Ag<sup>+</sup>.

The fructosyl transfer reactions catalyzed by this enzyme are summarized below.

1) The enzyme catalyzes the fructosyl transfer ("self-transfer") from sucrose to sucrose highly and specifically producing 1-kestose and glucose without any fructose liberation. However, "self-transfer" of 1-kestose, nystose or neokestose proceeds only scarcely. The transfer reaction is reversible.



2) The enzyme catalyzes the fructosyl transfer from sucrose to neokestose or its related saccharides, 6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>*n*</sub> sucrose. The fructosyl residue is transferred to C-1 (OH) position of the fructose in sucrose moiety of these saccharides. The specificity for neokestose homologs seems to be characteristic of the asparagus SST and such a specificity has not been reported for Jerusalem artichoke SST.



3) The enzyme does not catalyze the fructosyl transfer from sucrose to 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>*n*</sub>-sucrose and 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>*m*</sub>-6<sup>G</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>*n*</sub> sucrose (*m* ≠ 0).

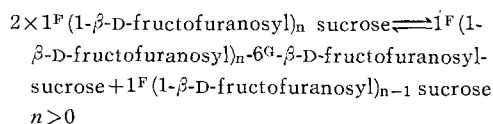
From the findings described above, the asparagus SST was confirmed to be similar to but not neces-

sarily identical with Jerusalem artichoke SST.

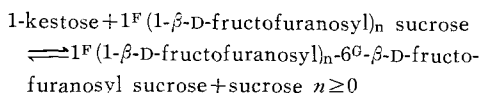
(5) A fructosyltransferase tentatively termed 6<sup>G</sup>-fructosyltransferase was purified (760-fold) from an extract of the asparagus roots by successive fractionation with ammonium sulfate, treatment with calcium phosphate gel, and then chromatography on octyl-Sepharose, DEAE-cellulose, Sephadex G-200 and raffinose-coupled Sepharose 6B columns. The purified enzyme was homogeneous disc-electrophoretically and was free from the activity of  $\beta$ -fructofuranosidase and other fructosyltransferases. Properties of the enzyme are as follows: mol. wt., ca. 69,000; opt. pH, ca. 5.5; pH-stability on heating at 45°C, stable at pH 5.0-6.0; thermal stability on heating for 10 min., stable at 20-37°C; inhibited by Hg<sup>2+</sup>, *p*-chloromercuribenzoate and Ag<sup>+</sup>.

Substrate specificity of the enzyme is summarized as follows.

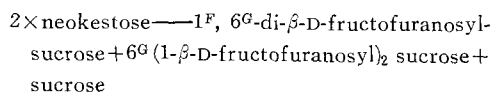
1) The enzyme catalyzes the fructosyl transfer ("self-transfer") between two molecules of 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>*n*</sub> sucrose. This transfer occurs at the C-6 (OH) position of glucose moiety to produce an oligosaccharide having an additional one unit of fructose. When the lower member saccharides of this series are employed, the transfer proceeds more rapidly. Sucrose, however, does not serve as a substrate.



2) The enzyme catalyzes the transfer of the terminal fructosyl residue of 1-kestose to the C-6 (OH) position of glucose moiety in 1<sup>F</sup>(1- $\beta$ -D-fructofuranosyl)<sub>*n*</sub> sucrose. The transfer proceeds most rapidly when *n*=1. Inulin does not serve as acceptor.



3) The enzyme also catalyzes the "self-transfer" between two molecules of neokestose.



The enzymological properties as mentioned above

indicate that this asparagus enzyme is one of the new type of fructosyltransferases. Thus, the name  $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_m$  sucrose:  $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_n$  sucrose  $6^G$ -fructosyltransferase (trivial name,  $6^G$ -fructosyltransferase; abbreviated name,  $6^G$ -FT) is proposed for this enzyme.

(6) A fructosyltransferase tentatively termed  $1^F$ -fructosyltransferase was purified (298-fold) from an extract of the asparagus roots by successive fractionation with ammonium sulfate, treatment with calcium phosphate gel, and then chromatography on DEAE-cellulose, octyl-Sepharose, Sephadex G-200 and raffinose-coupled Sepharose 6B columns. The disc-electrophoretically homogeneous enzyme, free from the activity of  $\beta$ -fructofuranosidase, SST and  $6^G$ -FT, showed a mol. wt. of ca. 64,000 and an opt. pH of ca. 5.0. It was stable at pH 5.0-6.0 on heating at  $45^\circ\text{C}$  for 20 min. and for 10 min. at  $30$ - $45^\circ\text{C}$ , but it was inhibited by  $\text{Hg}^{2+}$ , *p*-chloromercuribenzoate,  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Cu}^{2+}$ .

Substrate specificity of the enzyme is given below.

1) The enzyme catalyzes the fructosyl transfer ("self-transfer") between two identical oligosaccharides [ $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_n$  sucrose] to yield an oligosaccharide bonded with an additional one unit of fructose. In this case, the transfer of a single terminal fructose in a donor saccharide to an acceptor saccharide occurs at the C-1 (OH) position of fructosyl moiety in the latter saccharides. Sucrose is inadequate for a substrate of the "self-transfer".

2) The enzyme catalyzes also the "self-transfer" between two identical neokestose-series saccharides [ $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_m$ - $6^G(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_n$  sucrose]. The fructosyl transfer proceeds in a similar manner to that of  $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_n$  sucrose described just above. Neokestose, however, cannot serve as a substrate of the "self-transfer". Therefore, the enzyme seems to be unable to transfer a fructosyl residue linked to the C-6 (OH) position of glucose moiety in  $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_n$ - $6^G$ - $\beta\text{-D-fructofuranosyl}$  sucrose.

3) The enzyme catalyzes the fructosyl transfer from 1-kestose to the C-1 (OH) position of a terminal fructosyl residue in  $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_n$  sucrose and  $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_m$ - $6^G(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_n$  sucrose ( $m$  and  $n \geq 0$ ). For the fructosyl acceptors, the latter saccharides are

more favourable than the formers. In general, the fructosyl transfer tends to occur favourably in the acceptor saccharides comprised of a small numbers of fructosyl residues. In neokestose-series saccharides, the fructosyl transfer tend to occur preferentially at a terminal fructose residue situated in the shorter fructosyl chain than in the longer one. Inulin does not accept fructosyl residues from 1-kestose.

From the analogy to  $6^G$ -fructosyltransferase, the fructosyltransferase described above is termed  $1^F$ -fructosyltransferase ( $1^F$ -FT).

(7) From the studies on the substrate specificities of SST,  $6^G$ -FT and  $1^F$ -FT, a biosynthetic mechanism of the fructo-oligosaccharides in asparagus roots could be proposed as shown in Fig. 53.

Sucrose (disaccharide), 1-kestose and neokestose (trisaccharides) are key metabolites in the enzymatic synthesis of the asparagus oligosaccharides. SST,  $6^G$ -FT and  $1^F$ -FT are the most important enzymes involved in the main pathway of the biosynthetic system, although they also catalyze several fructosyl transfer associated with the side reactions.

1)  $1^F(1-\beta\text{-D-Fructofuranosyl})_n$  sucrose

First, 1-kestose ( $1^F$ - $\beta\text{-D-fructofuranosyl}$  sucrose) is produced from sucrose by the action of SST. Next, nystose [ $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_2$  sucrose] is formed from 1-kestose by  $1^F$ -FT, and then nystose is converted to  $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_3$ -sucrose. The higher fructo-oligosaccharides of this series are synthesized successively in a similar fashion. On the other hand, 1-kestose can be also formed by the fructosyl transfer from a donor 1-kestose to an acceptor sucrose by  $1^F$ -FT.

2) Neokestose ( $6^G$ - $\beta\text{-D-fructofuranosyl}$  sucrose)

Neokestose is synthesized by the transfer of fructosyl residue from 1-kestose to sucrose with  $6^G$ -FT.

3)  $6^G(1-\beta\text{-D-Fructofuranosyl})_n$  sucrose

For example,  $6^G(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_2$  sucrose is formed by the fructosyl transfer from 1-kestose to neokestose with  $1^F$ -FT. Also,  $6^G(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_3$  sucrose is produced in a similar manner by the fructosyl transfer to  $6^G(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_2$  sucrose.

4)  $1^F(1-\beta\text{-D-Fructofuranosyl})_m$ - $6^G$ - $\beta\text{-D-fructofuranosyl}$  sucrose

$1^F$ ,  $6^G$ -Di- $\beta\text{-D-fructofuranosyl}$ sucrose is synthesized

by the fructosyl transfer from 1-kestose to neo-kestose with  $1^F$ -FT. Also,  $1^F(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_2\text{-}6^G\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosylsucrose}$  is produced similarly by the fructosyl transfer from 1-kestose to  $1^F$ ,  $6^G$ -di- $\beta$ -D-fructofuranosyl sucrose.

5)  $1^F(1-\beta\text{-D-Fructofuranosyl})_m\text{-}6^G(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_n$  sucrose

For instance,  $1^F\text{-}\beta\text{-D-fructofuranosyl-}6^G(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_2$  sucrose is synthesized by the fructosyl transfer from 1-kestose to  $6^G(1-\beta\text{-D-fructofuranosyl})_2$  sucrose with  $1^F$ -FT. Higher oligosaccharides of this series are presumed to be produced stepwise by the successive fructosyl transfer.

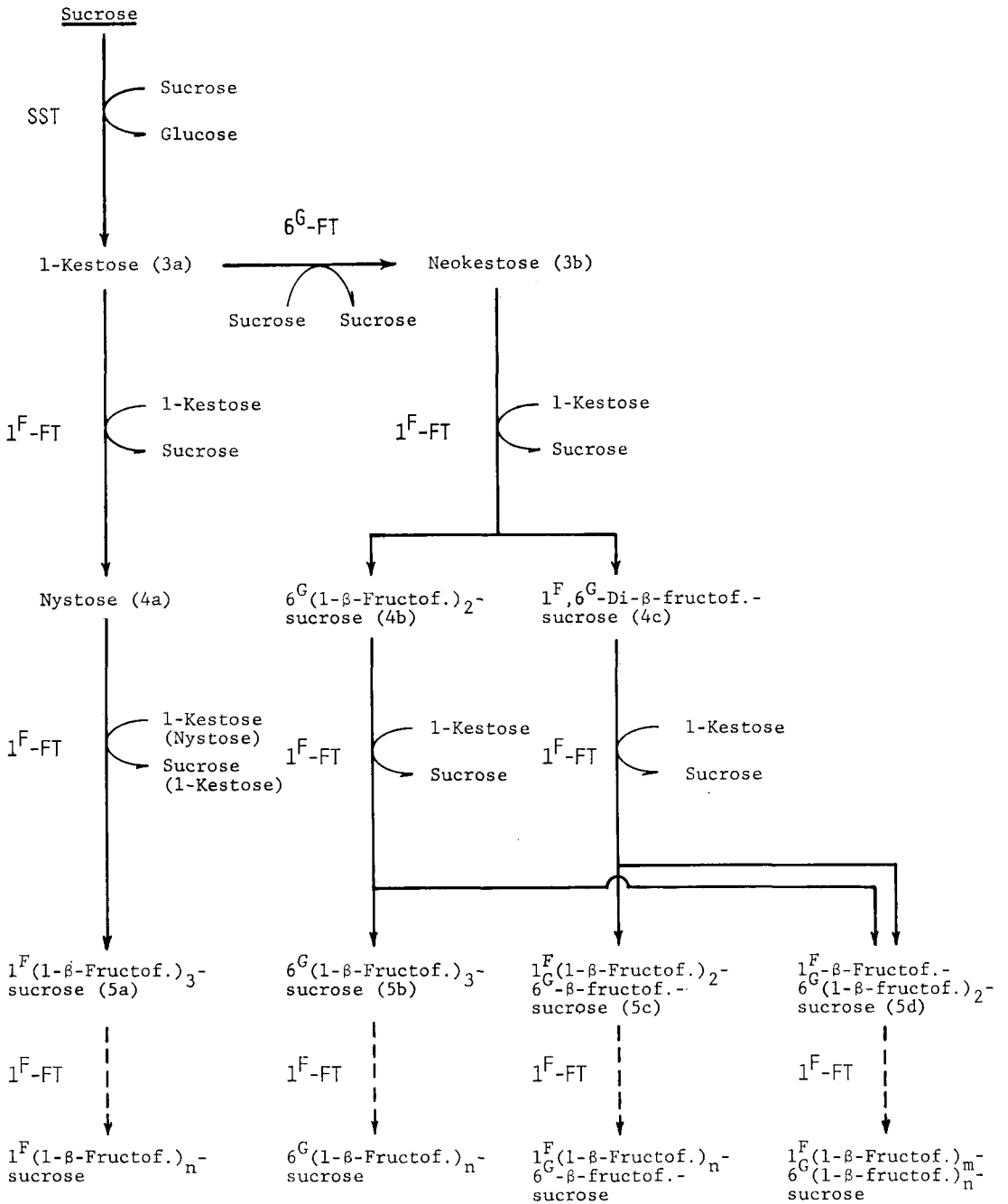


Fig. 53. Pathway of Enzymatic Synthesis of Fructo-oligosaccharides in Asparagus Roots.