

Daehan Hwahak Hwoejee
Vol. 10, Number 2, 1966.
Printed in Republic of Korea

콩 發芽時의 糖의 代謝에 關한 研究(I) (Nucleotide 糖의 分離)

成均館大學校 文理科大學 化學科

金 泽 汝 · 申 鉉 濟*

(1966. 5. 18 受理)

Study on Sugar metabolism in Soybean Germination [I]

(Isolation of Nucleotide Sugars)

by

Taik Yung Kim and Hyun Jae Shin*

Dept. of Chemistry, The College of Sciences and Engineering

Sung Kyun Kwan University

(Received, May 18, 1966.)

Abstract

Nucleotide galactose and glucose have been isolated during the soybean germination. Techniques for identification depends upon chromatography after elution the absorbed charcoal fraction with ethanol ammonia or 1/10N HCl.

I. 諸 論

Nucleotide 糖은一般的으로 糖磷酸 エステル에서 Pyrophosphorylase에 依하여 만들어 지는데, Nucleotide 糖이 또 에피메화 反應(epimerization)과 脱水素化 反應에 依한 Epimerase 反應으로 다른 Nucleotide 糖으로變化하기도 하고 혹은 糖磷酸 エステル가 어떤 Uridine Nucleotide 糖의 Uridine I 磷酸基를 받는 受容體(accepter)로서 作用하는 Uridyl Transferase로서 새로운 Nucleotide 糖이 만들어 지기도 한다.

Nucleotide 糖으로서는 UDPG 가 酵母에서 처음으로 發見⁽¹⁾된 以後로 그 決定的構造는 化學合成으로 確定되었다.^{(2), (3)} 이 UDPG 는 모든 生體內에서 즉 酵母^{(1), (2), (3), (4)}, 動物組織^{(5), (6)}, 癌組織^{(7), (8), (9)}, 植物^{(10), (11)} 및 곰팡이⁽¹²⁾ 등에서 發見되었다. 이 UDPG 的 發見에 뒤이어 많은 UDP 糖들이 발견되었고, 다시 다른 Nucleotide 糖들도 알려져 오늘날 數十種을 헤아리게 되었다.

本 실험에 있어서는 콩이 Galactose 를 가진 Stachyose 를 包含하고 있고, 이것이 發芽時에 急激히 感少되는 사실로 미루어, 먼저 Nucleotide 糖의 分離를 試圖하여, Nucleotide glucose 와 Nucleotide galactose 의 分離에 成功하여 이에 報告하는 바이다.

II. 實 驗

1. 材料; 마른 콩 10g 을 달아 12時間동안 水沈시키고 물에 부른 콩을 물기 많은 가아제(큰 사례에 유리판을 잘라서 그 밑바닥에 깔고 그 위에 木綿 가아제로 덮어 씌우고 물을 넣어 가아제가 恒常 젖어있게 함.)에

UDPG ; Uridine-5'-diphosphoglucose
UDPGal; Uridine-5'-diphosphogalactose
CDPG ; Cytidine-5'-diphosphoglucose
CDPGal; Cytidine-5'-diphosphogalactose
GDPG ; Guanidine-5'-diphosphoglucose
GDPGal; Guanidine-5'-diphosphogalactose
TDPG ; Tymidine-5' diphosphoglucose
TDPGal; Tymidine 5' diphosphogalactose
G ; Glucose
Gal. ; Galactose

*成均館大學校 講師, 現在 宇盛化學工業株式會社 勤務

놓고 室溫에서 24 時間 경과 後 竹이 1~1.5cm 정도 자라게 한다.

2. Nucleotide 糖의 分離; 發芽된 콩을 비이커에 넣어서 끓는 물 남비 속에서 約 10分간 끓여 酶素反應을 不活性화시키고 mortar에 小量의 물과 같이 넣은 다음 곱게 粉碎하여 $100,000 \times g$ 로 30分間 遠心分離하면 上層에 맑은 淡黃色의 液과 下層에 粗雜한 白色의 결적한 비지層이 생긴다. Charcoal을 물에 suspension 시킨 液 ($50\text{mg}/\text{ml. H}_2\text{O}$) 40ml 에 이 上層液을 넣어 잘 혼들고, 5分간 放置한 後에 다시 遠心分離 ($10,000 \times g$)하여 下層의 Charcoal層을 分離하고 20ml. 의 물로 3回 쟁는다. 이 charcoal에 암모니아性 알코올 溶液^{(13), (14), (15)} ($50\% \text{EtOH} : 0.15\% \text{NH}_4\text{OH}$) 40ml 를 加하여 잘 혼든 다음 charcoal分을 去除하고 이溶液을 desicator에 넣어 減壓 乾固시킨다.

3. Nucleotide 糖의 確認; a) 윗 실험에서 乾固된 것을 小量의 물에 녹혀 n-butylalcohol-aceticacid-water(5:1:4)의 溶媒를 使用하여 paperchromatography를 한 다음 U.V.-lamp로 그 位置를 確認하고 그 部分을 가위로 오려내어 0.1N 염산 20cc. 를 加하고 15分간 끓인다. 이 液을 Dowex 50 (2×10)판과 Dowex 1 (2×15)판을 통과시킨 後 n-butanol-pyridine-benzene- H_2O (5:3:1:3)溶媒를 使用하여 paperchromatography를 한 다음 分離된 斑點을 silver nitrate 試藥⁽¹⁶⁾으로 確認한다. b) 2. 실험에서 얻어지는 charcoal分을 암모니아性 알코올 溶液으로 抽出하지 않고, 略述 3. a) 方法으로 0.1N HCl 로 加水分解시키고 deionize시킨 다음 paperchromatography를 하여도 역시 糖의 分離는 잘 되며 3a)의 結果와 잘 一致한다.

III. 結果 및 考察

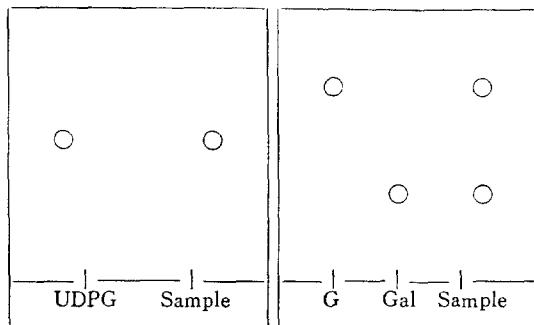


Fig. I The chromatogram of nucleotide sugars detected by U.V.-lamp Paper; Whatman No. 1. Solvent; n-butylalcohol: Aceticacid: H_2O (5:1:4)

Fig. II The chromatogram of Nucleotide sugars after Hydrolysis Paper; Whatman No. 1. Solvent; n-Butanol: Pyridine: Benzene: H_2O (5:3:1:3) Spray; Silver Nitrate試藥

이 실험에서 分離된 Nucleo 糖은, Fig. I, Fig. II에서 보는 바와 같이 Nucleotide glucose 와 Nucleotide galactose 임이 분명하다. Nucleotide glucose는 生物界에 널리 알려져 있어豫測한 바이지만 Nucleotide Galactose는 UDPGal의 形態로 酵母⁽¹⁷⁾, 박테리아⁽¹⁸⁾ 및 植物種子⁽¹⁹⁾等에서 發見되었고, 이들이高等植物體內에서 Pyrophosphorylase⁽²⁰⁾, Uridyl Transferase⁽²¹⁾ 및 4-Epimerase⁽²⁰⁾等의 酶素反應으로 生成됨이 밝혀졌다.

그 밖에 GDPG은 海藻, 乳線 및 牛乳等에서는 分離되었으나 大豆에서는 分離도 되지 않았고 또 酶素反應도 研究가 되어 있지 않다. CDPG는 分離는 안 되었으나 Salmonella Paratyphi⁽²²⁾에서 Pyrophosphorylase 反應으로 生成됨이 밝혀졌고 CDPGal은 全然 發見되어 있지 않다. 또한 TDPG 와 TDPGal은 生體에서 分離는 안 되었으나 bacteria^{(23), (24), (25)}나 植物의 種子^{(24), (26)}속에서 Pyrophosphorylase에 依하여 生成됨이 알려져 있고 Deoxy-UDPG 와 Deoxy-UDPGal도 植物의 種子속에서 Pyrophosphorylase로 生成됨이 알려졌다⁽²⁶⁾.

이와 같이 Nucleotide 糖은 生體內에서 酶素反應으로 만들어지며, 糖의相互轉換에 관계할 뿐만 아니라 單糖類를 서로結合시켜 麥糖類를 合成하며 活潑한 代謝過程에 관여하게 되는 것이다. 그러나 앞서 말한 Uridyl transferase는 Galactokinase의 活性度가 없는 E. Coli K₁₂ 突然變異體에서 分離 精製까지는 되었지만⁽²⁷⁾, 大端히 보기 힘든 酶素이며, 따라서 本 실험에서 얻어지는 Nucleotide Galactose는 Nucleotide Glucose에서부터 Epimerase 反應에 依하여 生成되었을 可能성이 가장 크며, 혹시 Galactokinase의 活性度가 크다면 Pyrophosphorylase에 依하여 生成될 수도 있음을 暗示한다.

參考文獻

- Caputto, R., Leloir, L.F., Cardini, C.E., and Paladini, A.C., *J. Biol. Chem.*, 184 333 (1950).
- Kerner, G.W., Todd, A.R., and Webb, R.F., *J. Chem. Soc.* 2843 (1954).
- Moffat, J.G., and Khorana, H.G., *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 3756 (1958).
- Cardini, C.E., Paladini, A.C., Caputto, R., and Leloir, L.F., *Nature*, 125, 191 (1950).
- Hurlbert, R.B., and Potter, V., *J. Biol. Chem.*, 209, 1, (1954).
- Smith, E.E.B., and Mills, G.T. *Biochim. et Biophys. Acta*, 13, 386 (1954).
- Schmitz, H., *Naturwissenschaft*, 41, 120 (1954).

- 8) Schmitz, H., Potter, V.T., Hurlbert, R.B., and Wbite, D.H., *Cancer Res.*, **14**, 58 (1954).
- 9) Schmitz, H., Hert, W., and Ried, H., *Ztschr. F. Krebsforsch.*, **60**, 301, (1955).
- 10) Buchanan, J.G., Lynch, V.H., Benson, A.A., Bradley, D.F., and Calvin, M., *J. Biol. Chem.* **203**, 935 (1953).
- 11) Norris, L., Norris, R.E., and Calvin, M., *J. Exptl. Botany*, **6**, 64 (1955).
- 12) Ballio, A., Casinovi, C., and Serlupi-Crescenzi, G., *Biochim. et Biophys. Acta*, **20**, 414 (1956).
- 13) Nilsson: *Acta Chem. Scand.*, **11**, 1003, (1957).
- 14) Pontis and Leloir; *Biochim. et Biophys. Acta*, **26**, 146 (1957).
- 15) Crane, R., *Science* **127**, 285 (1958).
- 17) Trevelyan, W.E. and Harrison, S.S., *Biochem. J.* **50**, 298, 303 (1952).
- 17) G.T. Mills, E.E.B. Smith and A.C. Lochhead, *Biochemica, et Biophys. Acta.*, **25**, 521 (1957).
- 18) H. Nikaido, *Biochim. et Biophys. Acta*, **48**, 460 (1962). H. Wiesmeyer and E. Jordan, *Analyt. Biochem.*, **2**, 281 (1961).
- 19) V. Ginsburg, P.K. Stumpf and W.Z. Hassid, *J. Biol. Chem.* **223** 977 (1956).
- 20) E.F. Neufeld, V. Ginsburg, E.W. Putman, D. Fanshier and W.Z. Hassid; *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**, 602 (1957).
- 21) J.H. Pazur and M. Shadéksharaswamy, *Biochem. Biophys. Research Communs.*, **5**, 130 (1961).
- 22) V. Ginsburg, P.J. O'Brien and C.W. Hall *Biochem. Biophys. Research Communs.* **7**, 1 (1962).
- 23) S. Kornfeld and L. Glaser *J. Biol. Chem.*, **236**, 1791 (1961).
- 24) J.H. Pazur and E.W. Shuey, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1780 (1961).
- 25) J.H. Pazur, K. Kleppe and A. Cepure, *Biochem. Biophys. Research. Communs.*, **7**, 157 (1962).
- 26) E.F. Neufeld, *Biochem. Biophys. Research. Communs.*, **7**, 157 (1962).
- 27) Kurahashi, K., and Sugimura, A., *J. Biol. Chem.*, **235**, 940 (1960).