



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

マイタケの水溶性多糖に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 加藤, 宏治, 奥村, 直美, 山内, 亮, 上野, 良光 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5624

マイタケの水溶性多糖に関する研究

加藤宏治・奥村直美・山内 亮・上野良光¹⁾

食品科学講座・¹⁾生物資源開発学講座

(1989年8月1日受理)

Chemical Features of Water-soluble Polysaccharides in the Fruit Body of *Grifola frondosa*

Koji KATO, Naomi OKUMURA, Ryo YAMAUCHI
and Yoshimitsu UENO¹⁾

Department of Food Science,

¹⁾Department of Applied Bioorganic Chemistry

(Received August 1, 1989)

SUMMARY

The fruit bodies of *Grifola frondosa* were extracted with cold water and then with boiling water. The polysaccharide-fractions recovered from each extract were fractionated by DEAE-cellulose column chromatography, and if necessary, followed by Sepharose CL-4B column chromatography to yield a polysaccharide composed of only D-glucose, which was inferred to be a glycogen-like α -D-glucan from its high $[\alpha]_D$ value.

The polysaccharides composed of galactose, mannose and rhamnose, and of galactose, mannose and fucose, were presumed to exist together with α -D-glucan mainly in the cold water extract.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (54) : 199—203, 1989.

要 約

凍結乾燥したマイタケ (*Grifola frondosa*) 子実体から冷水および熱水で水溶性多糖を抽出し、DEAE-セルロースカラム及び Sepharose CL-4B カラムクロマトグラフィーで分画精製を行ったところ、熱水抽出画分からフィトグリコーゲンと推定されるグルコースのみから成る多糖が得られた。一方、冷水抽出画分からは熱水抽出画分から得られたフィトグリコーゲン様多糖の他にガラクトース、マンノースおよびフコース、とガラクトース、マンノースおよびラムノースから成る二種の多糖の存在が推定された。

結 言

サルノコシカケ科に属する“きのこ”の熱水抽出物が抗腫瘍活性を示すことが報告され、その有効成分が(1→3)(1→6)- β -D-グルカンであることが明らかにされて以来、数多くの子実体の多糖成分に関する研究が報告されている¹⁾。我々は先に近年人工栽培が可能となったサルノコシカケ科マイタケ属のマイタケ (*Grifola frondosa*) の子実体より抗腫瘍活性を示す(1→3)(1→6)- β -D-グルカンを単離し、その詳細な構造について報告^{2,3)}してきた。しかしこれらの多糖は水に不溶、アルカリに可溶性多糖であり、マイタケ子実体の冷水あるいは熱水に可溶性多糖成分については未だに明確でないので、それらの成分を明らかにするため本実験を行った。

実験方法及び結果

1. 試料：人工栽培された市販用のマイタケ子実体を凍結乾燥して保存し、必要に応じて実験に供した。

2. 水溶性多糖の抽出：凍結乾燥したマイタケ子実体をミキサーで粉碎したのち、クロロホルム/メタノール(1:1)混液を加え1時間加熱還流し脱脂を行った。脱脂後風乾した粉末状のマイタケに予め4℃に冷却しておいた4倍量の純水を加え、4℃にて2時間攪拌して水溶性多糖を抽出した。抽出液は6,000~7,000rpmで15分間遠心分離し、上清と残渣とに分けた。上清液のモーリッシュ反応がほぼ陰性になるまでこの抽出操作を繰り返した。モーリッシュ反応陽性の上清液は合わせたのち、約1/10容になるまで40℃で減圧下に濃縮した。この時生じた不溶物は遠心分離により除去した。濃縮液に2倍量のエタノールを攪拌しながら加え多糖を沈澱させ、これを50, 80, および99%エタノール、最後にエーテルで順次洗浄したのち風乾し、冷水抽出多糖(F1)を得た。冷水抽出残渣は、再び4倍量の純水を加え、オートクレーブを用いて120℃に1時間加熱した。放冷後3枚敷きのガーゼで抽出液を濾過した。この操作は濾液のモーリッシュ反応がほぼ陰性になるまで繰り返した。モーリッシュ反応陽性の濾液は合わせたのち、前述のように操作して多糖を沈澱させた。得られた沈澱は出来るだけ少量の水に溶解させたのち、セロファンチューブを用いて48時間流水中で透析を行った。透析内液を凍結乾燥し熱水抽出多糖(F2)を得た。F1およびF2の収量をTable 1.に示した。

3. 構成糖の種類およびその割合：多糖約5mgに0.25M硫酸1mlを加え封管後100℃に12~14時間加熱し加水分解を行った。分解液を5%水酸化バリウム溶液および炭酸バリウムを用いて中和したのち生じた沈澱を遠心分離にて除去した。上清に水素化ホウ素ナトリウム約5mgを加え、室温に一晩放置し分解液中の糖を糖アルコールに還元した。過剰の水素化ホウ素ナトリウムを陽イオン交換樹脂Amberlite IR-120(H⁺型)で分解脱塩したのち、樹脂を濾別し、濾液を40℃で減圧下に濃縮乾固した。乾固物にメタノールを加え濃縮乾固する操作を繰り返して、ホウ酸を除去した。次いで無水ピリジン0.1ml、無水酢酸0.1mlを加え密栓して室温に一晩放置してアルジトールアセテートを調製しガスクロマトグラフ(島津GC-7A型)による分析を行った。得られた各ピークの保持時間から化合物の種類を、また面積からそれらの割合を算出した。ガスクロマトグラフによる分析条件は次のとおりである。

カラム：3% Silar 10C on Uniport B (100~200メッシュ) ガラスカラム

カラム温度：160→240℃ (4℃/minの昇温)

キャリアーガス：窒素 (50ml/min)

検出器：水素炎イオン化検出器(FID)

記録計：島津クロマトパック C-R1A

F1およびF2の糖組成およびその割合をTable 1.に示した。

4. F1およびF2のβ-アミラーゼ分解：F1およびF2を構成糖としてグルコースを含んでいることから共にグルカンの存在が推定されるが、いずれかα-グルカンに相当するものかを明らかにするためにβ-アミラーゼによる酵素分解を試みた。即ち、F1およびF2それぞれ50mgをM/20酢酸緩衝液(pH6.0, 100mL)に溶解し、これにβ-アミラーゼ(*Bacillus* sp. 起源, 天野製薬) 5mgを加え37℃にて24時間反応させた。反応液を100℃に15分間加熱し酵素を失活させたのち、不溶化した失活酵素を濾過により除去した。

Table 1. 冷水(F1)および熱水(F2)可溶多糖画分の諸性質

画分	収率(%)	糖含量(%)*	蛋白質含量(%)**	糖 組 成				
				Rha	Fuc	Man	Gal	Glu
F 1	3.2	52.5	34.0	4.8	2.8	18.2	31.3	32.9
F 2	6.8	78.9	18.2	2.4	2.7	4.3	4.6	86.0

* グルコースを標準としてフェノール・硫酸法にて測定。

** 牛血清アルブミン, Fraction V (Nakarai Chemicals) を標準としてLowry法のMillerの改良法によって測定。

濾液をイオン交換樹脂 Amberlite IR-120 (H⁺型) および IRA-410 (OH⁻型) にて処理脱塩したのち、約2倍量のエタノールを加え未分解の多糖を沈澱させた。沈澱を遠心分離により除去し、上清を減圧下に濃縮したのち、ペーパクロマトグラフィー(ピリジン：1-ブタノール：水，4：6：3，v/v)に供したところ、F1およびF2から共にマルトースに相当するスポットが検出された。このことからF1およびF2には同種のα-グルカンが含まれていると推定した。

5. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる分画：F1およびF2画分にはα-グルカンが含まれていることが明らかになったが、Table 1. に示したようにグルコース以外の糖も成分として含まれていることから、Neukom および Kuendig の方法⁴⁾による DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで、このグルカンの単離、精製を試みた。即ち、各試料100mgを少量の水に溶解したのち、予め調整した DEAE-セルロースカラム (B₄O₇⁻型、2.8x16.0cm) に供し、純水(A)、M/20(B)、飽和(C)四ホウ酸ナトリウム溶液、および M/10水酸化ナトリウム溶液(D)により順次溶出を行った。溶離液は1.2 ml/min で流し、フラクションコレクターで10mlずつ分画した。各フラクションごとの糖含量をアン

スロン・硫酸法で、また蛋白質含量を280nmの吸光度で求めた。その結果を Fig. 1 に示した。各溶出液で得られた画分は稀塩酸で中和したのち、セロファンチューブを用いて流水に対して2日間透析し、透析内液を凍結乾燥した。この一部を前記3. の方法で分析し、各画分の糖組成およびその割合を求めた。尚、純水で溶出される画分Aは収率が低く、また糖含量も他画分に比べ低かったため、それ以上の実験は行なわなかった。結果は Table 2. にまとめて示した。

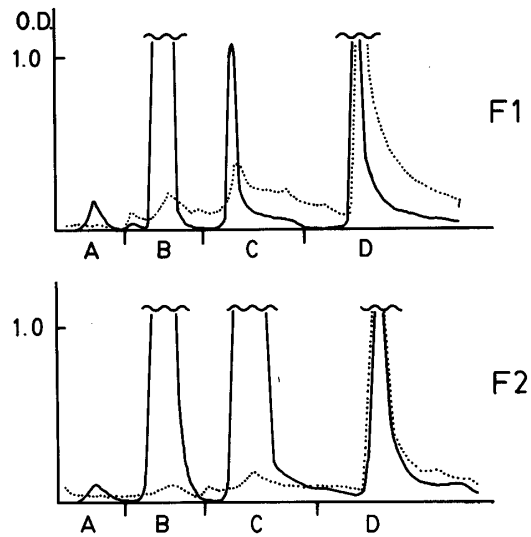


Fig. 1 Elution profiles of water-soluble polysaccharide from DEAE-cellulose column chromatography.

O. D. : Optical density at 280 nm (for protein,) and 620 nm (for carbohydrate, ———) ; F1 : cold-water extract ; F2 : boiling-water extract ; A : fraction eluted with water ; B and C : fractions eluted with M/20 and saturated sodium borate ; D : fraction eluted with M/10 sodium hydroxide.

Table 2. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで分画された各画分の諸性質

画分*	収率(%)	糖含量(%)**	蛋白質含量(%)**	糖 組 成						
				Rha	Fuc	Man	Glu	Glu	Ara	Xyl
F1A	1.7	10.5	4.5	—	—	—	—	—	—	—
B	23.5	63.9	5.4	15.6	t	24.5	41.1	18.8	t	t
C	18.7	24.3	4.5	9.8	t	14.2	23.6	52.4	t	t
D	26.3	25.4	26.7	4.8	11.0	10.8	11.4	62.0	—	t
F2A	1.8	13.3	6.3	—	—	—	—	—	—	—
B	16.9	58.8	3.2	—	—	2.3	1.9	95.8		
C	39.4	38.7	4.8	0.9	0.8	2.4	2.7	89.9	1.7	1.4
D	36.4	20.7	14.5	—	8.8	5.8	3.5	82.0	—	—

* F1 および F2 は冷水抽出および熱水抽出試料を表し、A, B, C および D は各々 水, M/20 および飽和四ホウ酸ナトリウム溶液および M/10水酸化ナトリウムで溶出される画分であることを示す。t : trace amount

** Table 1. 脚注参照。

これからも判るように F 2 B および F 2 C 画分の α -グルカン含有率は他の画分に比べ高かったので、次に F 2 のグルコアミラーゼによる分解を試みた。

6. F 2 のグルコアミラーゼ分解: F 2 200mg を 0.02M 酢酸緩衝液 (pH5.0, 100ml) に溶解し, グルコアミラーゼ (*Rhizopus delemere* 起源, 天野製薬) 30mg を加え 37°C にて反応させた。経時的に反応液の一部を分取し分解率を測定したところ 46.7% で一定となり以後分解率は上昇しなかったので, 反応液を 100°C に 15 分間加熱し酵素を失活させた。不溶化した失活酵素を濾過により除去, Amberlite IR-120 および IRA-410 で脱塩したのち, 前記 5. と同様にして DEAE-セルロースカラムによる分析を行ったところ, 画分 B および C に相当する画分 (Fig. 1 参照) が著しく減少しているところが明らかになった。そこで次ぎに DEAE-セルロースカラムで分画した画分 B (F 2 B) および画分 C (F 2 C) を全く同様にグルコアミラーゼで分解したところ F 2 B は 72.1%, F 2 C は 34.2% 分解されることが判った。

7. F 2 B および F 2 C の Sepharose CL-4B カラムによる分画: F 2 B および F 2 C のグルコアミ

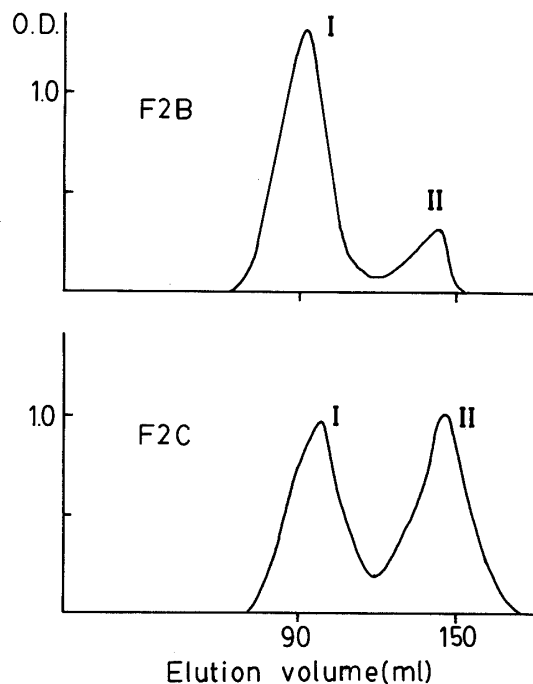


Fig. 2 Elution profiles of F2B and F2C from Sepharose CL-4B column chromatography.

O. D. : Optical density at 490 nm ; F2B and F2C : fractions eluted with M/20 and saturated sodium borate from DEAE-cellulose column.

ラーゼによる分解率が, それぞれ 72.1, および 34.2% と完全には分解されなかったことから, 酵素分解前後の分子量分布の変化を調べた。即ち, 各試料約 3 mg を M/10 塩化ナトリウム溶液に溶解し, 予め同溶液で平衡化しておいた Sepharose CL-4B カラム (1.5 x 100cm, Pharmacia 社) に供した。同溶液を 0.45ml/min で流し, 溶出液はフラクションコレクターで 3 ml ずつ分画した。各フラクションの糖含量はフェノール・硫酸法によって測定した。その結果, 酵素分解前に於いては Fig. 2 に示したように共に二つのピーク (I および II) が認められたのに対し, 分解後は共に高分子領域のピーク (I) が消失しているのが認められた。このことからピーク F 2 B および F 2 C のゲルクロマトグラフィーで高分子領域に溶出してくる多糖は α -グルカンであると判断し, 分解率の高かった F 2 B から Separose CL-4B を用いて α -グルカンを単離することを試みた。ピーク I および II に相当するフラクションをそれぞれ, セロファンチューブを用いて 2 日間流水に対して透析を行った。透析内液は凍結乾燥して白色状の多糖, F 2 B I および F 2 B II を得た。各多糖の収率, 糖組成等を Table 3. に示した。F 2 B I の多糖はグルコースのみを構成糖とするが, 糖含量が低いので灰分量が多くなっているのではないかと推定して, 4°C にて M/100 塩酸と共に 1 時間攪拌洗浄したの

Table 3. F 2 B の Sepharose CL-4B カラムクロマトグラフィーで得られる画分の諸性質

画分	収率 (%)	糖含量 (%)*	蛋白質含量 (%)*	糖 組 成				
				Rha	Fuc	Man	Gal	Glu
I	63.2	83.4	0.3	—	—	—	—	100
II	11.2	52.8	7.5	1.5	1.2	3.9	4.1	89.4

* Table 1. 脚注参照

ち流水に対して2日間透析し、透析内液を凍結乾燥し多糖を回収したところ、糖含量99%でグルコースのみを構成糖とする多糖が得られた。また、この多糖は+167という高い比旋光度を示したことからグリコーゲンタイプの α -グルカンであると推定した。

考 察

マイタケ子実体から冷水および熱水で抽出した粗多糖画分の収量はそれぞれ3.2%、および6.8%であった。このことは乾燥子実体重量の約1割が水溶性の高分子化合物から成っていることを示している。特に熱水抽出画分(F2)の約8割は糖質が占め、その大部分はグルコースのみから成る多糖ではないかということがTable 1. から推定することが出来る。そこで次にDEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる分画を試みたところTable 2. に示したようにグルコースの含有割合を高めることは出来たものの、少量成分である他の糖を完全に除去することは出来なかった。そこで更に、グルコース含有量の最も高かったF2BをSephacryl CL-4Bカラムクロマトグラフィーに供し分子量の差に基づく分離を試みた結果グルコースのみから成る多糖が高分子領域に溶出されることが明らかになった。単離、精製したこのグルコースのみから成る多糖は $[\alpha]_D^{20} + 167$ (c 0.3, H₂O)と高い正の値を示したことからその構造は他の子実体⁵⁾にも見いだされているようなグリコーゲンタイプの α -グルカンであると推定した。Sephacryl CL-4Bカラムクロマトグラフィーで低分子領域に溶出される画分の子多糖も大部分グルコースを構成糖としており、更に冷水で抽出される画分(F1)にも α -グルカンと推定される多糖が存在していることが明らかになったが、これらの詳細な差異については今回の実験で明らかにすることは出来なかった。またF1には前述の α -グルカンの他にガラクトース、マンノースおよびラムノース(F1B)とガラクトース、マンノースおよびフコース(F1D)を構成糖とする多糖(群)がそれぞれ含まれていると推定されるが、今回の実験においてはこれ以上の検討は行わなかった。

文 献

- 1) R. L. Whistler, A. A. Bushway and P. P. Singh : Noncytotoxic, Antitumor Polysaccharides, Adv. Carbohydr. Chem. and Biochem., **32**, 235-275 (1976).
- 2) K. Kato, T. Inagaki, H. Shibagaki, R. Yamauchi, K. Okuda, T. Sano and Y. Ueno : Structural analysis of the β -D-glucan extracted with aqueous zinc chloride from the fruit body of *Grifola frondosa*, Carbohydr. Res., **123**, 259-265 (1983).
- 3) K. Kato, T. Inagaki, T. Teranishi, R. Yamauchi, K. Okuda, T. Sano and Y. Ueno : Structural analysis of the alkali-soluble β -D-glucan from the fruit body of *Grifola frondosa*, Carbohydr. Res., **124**, 247-252 (1983).
- 4) H. Neukom and W. Kuendig : Fractionation on Diethylaminoethylcellulose columns, Methods Carbohydrate Chem., **5**, 14-17 (1965).
- 5) 志田万里子, 間瀬民生, 笹川祐子, 松田和雄 : シイタケの水溶性多糖に関する研究, 農化**45**, 454-460 (1971).