

カシサルノコシカケ水性エタノール抽出物中の3-O-メチルガラクトースを含む新規多糖*

原 千 尋

A Novel Polysaccharide Fraction Containing 3-O-Methylgalactose from the Aqueous Ethanol Extract of *Phellinus robustus*

Chihiro HARA

Summary

A neutral polysaccharide fraction (K-2-F) was isolated by gel filtration with Sepharose CL-4B from the 70% aqueous ethanol extract of the fruiting body of *Phellinus robustus* Karst. K-2-F was composed of a large amount of 3-O-methylgalactose (ca. 41%) as a novel component sugar, in addition to fucose, galactose, glucose and mannose. The existence of 3-O-methylgalactose was confirmed by gas-liquid chromatography and mass spectrometry as its deuterated (C-1) partially methylated galactitol acetate derivative.

Received Oct. 25, 1993

Key words: キノコ mushroom, カシサルノコシカケ *Phellinus robustus*, 多糖 polysaccharide, 3-O-メチルガラクトース 3-O-methylgalactose

緒 言

前報¹⁾において、著者は天然産カシサルノコシカケ(*Phellinus robustus* Karst.)子実体の熱水抽出液より分離したヘテロ多糖画分(K-3)の諸性質と抗腫瘍作用および免疫賦活作用についての知見を報告した。本報においては、通常多糖類抽出の前処理法として低分子量の糖類、脂質あるいはアルコール可溶性たん白質などの來雜物を除去する目的で行われる70%水性エタノールによる抽出²⁾を本菌子実体に適用したところ、その70%水性エタノール抽出物中に高分子量でフコース、ガラクトース、グルコース、マンノースに加えて、キノコ由来の多糖からは初めて発見された3-O-メチルガラクトースを構成糖として含む新規な中性多糖画分が含まれていることを見出したので報告する。

実 験 法

1. 材料・試薬

キノコ試料としては、岐阜市の金華山山麓の枯木上より採取したカシサルノコシカケ子実体を用いた¹⁾。

*カシサルノコシカケの多糖類(第2報), 第1報 文献1).

実験に用いた各種試薬および糖標品は市販特級品を購入使用した。また3-O-メチルおよび4-O-メチル-D-ガラクトース、4-O-メチル-D-グルコースはガラクトースあるいはグルコースをHaworthの方法³⁾に従って部分メチル化したものを用いた。

2. 多糖の抽出

前報¹⁾に記した如く、天然産カシサルノコシカケ子実体の粉末試料(32.4 g)をメタノールで脱脂し、得られた乾燥試料(28.8 g)を70%水性エタノール(1000ml)で加熱攪拌還流下(約80℃)に計15回抽出した。冷後、遠心分離によって得られた上清液(70%水性エタノール抽出液)を合一し、ロータリーエバポレーターで約300mlに減圧濃縮した。次いで濃縮液に水飽和ブタノール100mlを加え、分液ロート中で10分間振盪した。一晩放置後水層を分取し、さらに2回水飽和ブタノール抽出を行って水層を得た。この水層を約半量に減圧濃縮した後、5日間流水および蒸留水に対して透析し、透析内液を濃縮後凍結乾燥して70%水性エタノール抽出粗画分(K-2)を得た。収量は375mgであった。

3. ゲル滷過法による精製

粗画分K-2(3 mg)を、0.1M NaClを溶媒として用い、セファロースCL-4Bを充填したカラム(1.5×97cm)に添加してゲル滷過を行った。各溶出液(3.8ml)中の糖量をフェノール硫酸法⁴⁾(490 nm)によって、またたん白質を紫外部吸収(280 nm)によって測定した。その結果、粗画分K-2中の多糖は2本のピークとして溶出された(Fig. 1)ので、K-2を約30mgずつ同じセファロースCL-4Bのカラム(2.6×99cm)に添加して、前半部に溶出される高分子量の画分を分取し、減圧濃縮、透析、凍結乾燥して茶褐色の多糖画分(K-2-F; 収量45mg)を得た。

4. 構成糖

多糖画分K-2-F(1.5~2 mg)を2 mlの2 Nトリフルオロ酢酸で沸騰水浴中8時間加水分解した後、反応液を減圧濃縮乾固した。この加水分解物を0.2mlの蒸留水に溶解し、水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₄)あるいは重水素化ホウ素ナトリウム(NaBD₄)によって室温で3時間還元してアルジトールまたは重水素化(C-1)アルジトール誘導体を調製した⁵⁾。次にこれらアルジトール誘導体をアセチル化(無水酢酸-ピリジン各0.2ml, 90℃, 2時間)した後アセチル化溶媒を減圧留去し、得られた残物をクロロホルム(50μl)に溶解して、ガスクロマトグラフィー(GLC)およびGLC-マススペクトロメトリー(GLC-MS)の試料とした。

5. GLC

GLC分析の装置は、島津GC-8A型ガスクロマトグラフを使用し、3% Silicone OV-225(Chromosorb W, 80-100メッシュ)を充填したカラム(0.3×200cm)を用いてカラム温度193℃, キャリアーガス・窒素(172 kPa)で分析した。ガラクロマトグラム上のピーク面積は島津C-R3A型クロマトパックによって求め、構成糖のモル比を算出した。

6. GLC-MS

GLC-MS分析の装置は、キャピラリーカラム(Hicap-CBP 10: 0.25mm(i. d.)×25m; GL Science Co, Ltd.)を装着したヒューレットパッカード5890(II)型ガスクロマトグラフと日本電子JMS SX-102型マススペクトロメーター(EI mode)を用い、イオン化電流300μA, イオン化電圧70eV, カラム温度185°

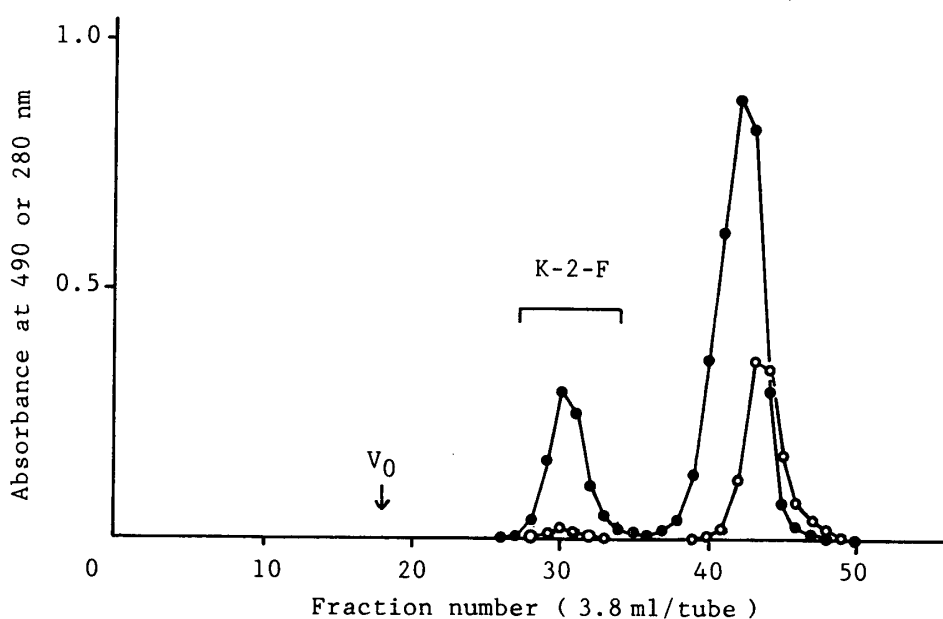


Fig. 1. Chromatogram of Polysaccharide Fraction k-2 on Sepharose CL-4B
The column (1.5 x 97cm) was eluted with 0.1M NaCl.
●: 490 nm (sugar), ○: 280 nm (protein)

→200°Cの昇温法(3°C/min), キャリヤース・ヘリウム(126 kPa)等の条件で分析した。得られたマススペクトルは標品のマススペクトルあるいは文献値^{6,7)}との比較によって同定した。

結果と考察

メタノールで脱脂した後の天然産カシサルノコシカケ子実体を70%水性エタノールによって抽出した。この抽出液を減圧濃縮し, その水溶液を水飽和ブタノールで分配抽出して残存している脂溶性成分を分離した後, さらに透析を行って水溶性低分子物質を除去した。透析内液を凍結乾燥して得られた粗画分(K-2; 収率約1.2%)を, セファロースCL-4Bをカラム充填剤として用いてゲル濾過を行った結果, Fig. 1に示すように高分子量部分(試験管番号28~34)と低分子量部分の2つの領域に糖の溶出することが認められた。このうち高分子量部分をK-2の同様なゲル濾過によって分取し, 多糖画分(K-2-F)を約0.14%の収率で得た。K-2-FはセファロースCL-4Bの分画可能範囲に溶出されていることから, ゲル濾過的に均一であると思われる。

この多糖画分K-2-Fを加水分解し, アルジトールアセテート誘導体⁵⁾として構成糖のGLC分析を行ったところ, Fig. 2に示すように, フコース(ピークa), マンノース(b), ガラクトース(d), グルコース(e)のピークに加えて, グルコースに対する相対保持時間として0.84の位置に通常では認められない未知の糖のピーク(ピークc)を検出した。この未知ピークcは, 他の六炭糖であるアロース, アルトロース, グロース, イドースなどのアルジトールアセテート誘導体ともGLC分析における相対保持時間が一致しなかった(Table 1)。そこで種々の部分メチル化単糖のGLC分析を行って比較検討した結果, K-2-F中の未知の構成糖であるピークcはTable 1に示したように3-O-メチル化あるいは4-O-メチル化されたガラクトースのアルジトールアセテート誘導体(ガラクトクトールアセテ-

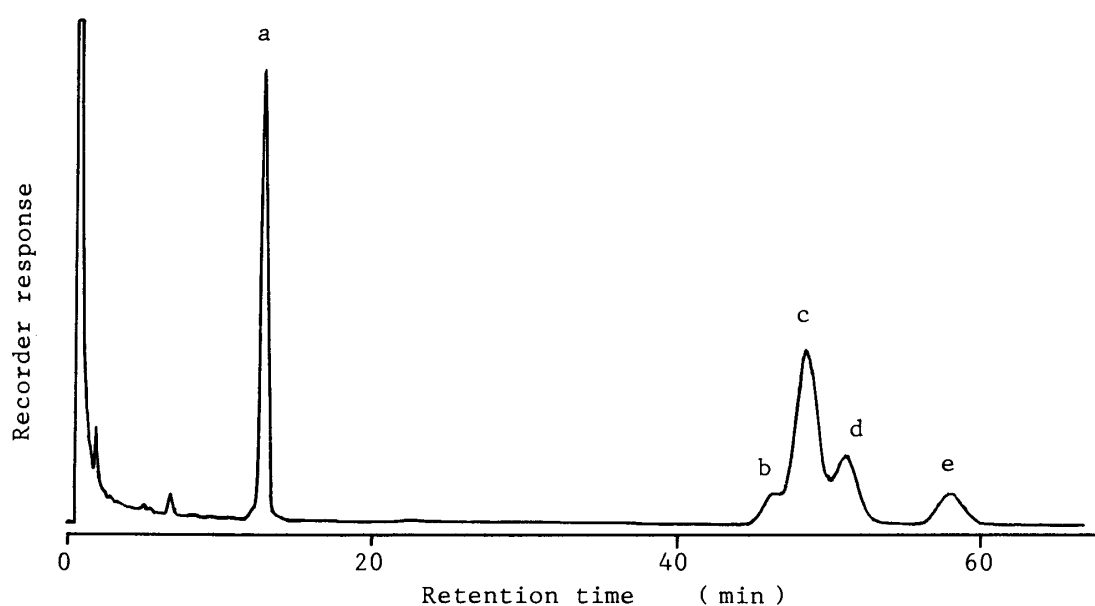


Fig. 2. Gas Chromatogram of Component Sugars of Polysaccharide Fraction K-2-F as Alditol Acetate
Conditions : 3% Silicone OV-225 on Chromosorb W at 193°C.

a) xylose, b) mannose, c) unknown, d) galactose,
e) glucose

Table I. Relative Retention Time of Authentic Sugars and Component Sugars of K-2-F on GLC as Alditol Acetate^{a)}

Authentic sugar $t_R^{b)}$		Component sugars of K-2-F $t_R^{b)}$ (molar ratio)
L-Fucose	0.22	0.22 (3.9) — peak a ^{c)}
D-Allose	0.72	-
D-Mannose	0.80	0.80 (0.6) — peak b
D-Talose	0.82	-
D-Altrose	0.82	-
D-Galactose	0.88	0.88 (1.8) — peak d
D-Glucose	1.00	1.00 (1.0) — peak e
D-Gulose	1.02	-
D-Idose	1.22	-
3-and/or 4-mono- O-methyl-D- galactose	0.84	0.84 (5.1) — peak c
4-mono-O-methyl- D-glucose	0.85	-

a) Conditions : 3% Silicone OV-225 on Chromosorb W at 193°C.

b) Relative retention time with respect to that of hexa-O-acetyl-D-glucitol (1.00, 58.4 min.) .

c) Correspond to the peaks shown in Fig. 2.

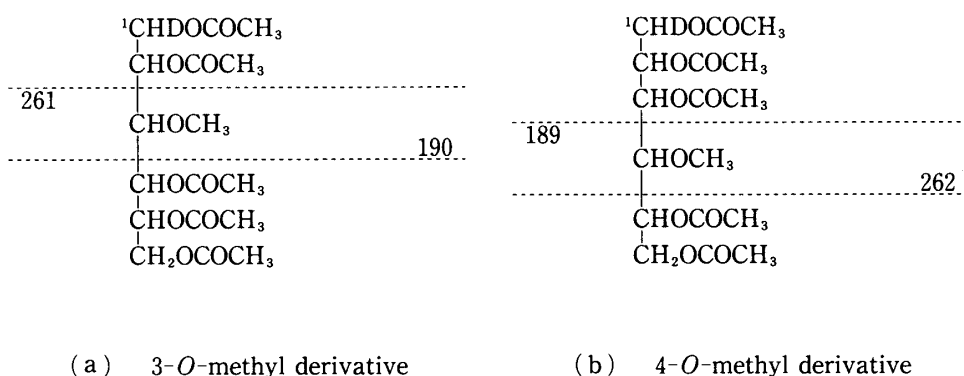


Chart 1. Characteristic Fragments of Deuterated (C-1) Partially Methylated Galactitol Acetates in MS

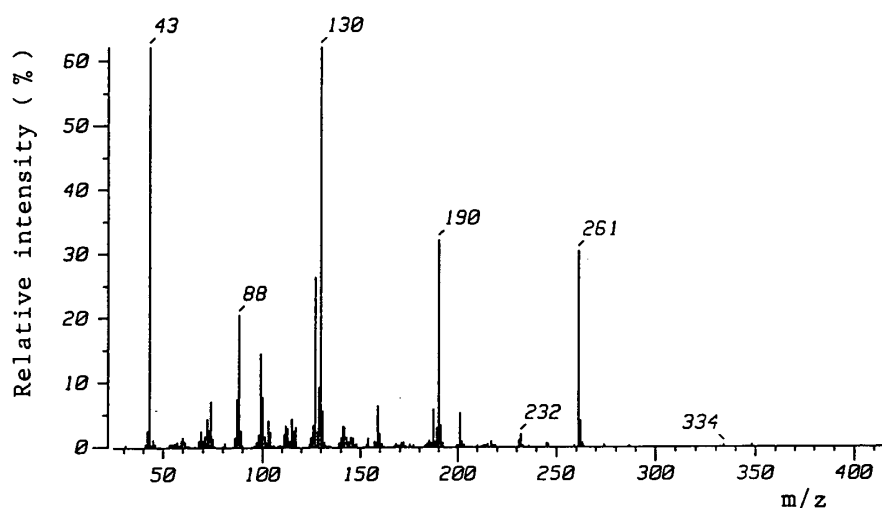


Fig. 3. Mass Spectrum of Component Sugar (peak c) of K-2-F as Deuterated (C-1) Alditol Acetate

ト)の相対保持時間(0.84)と一致した。またピークcのMS分析を行ったところ、3-O-メチルあるいは4-O-メチルガラクトールアセテートのマススペクトル⁶⁾と一致した。以上の結果から、未知物質(ピークc)は3-O-メチルガラクトースか4-O-メチルガラクトースのいずれかであることが明らかとなった。しかしながら3-O-メチルあるいは4-O-メチルガラクトースは水素化ホウ素ナトリウムで還元すると同一のアルジトールを与えるためGLC分析やそのマススペクトルによって区別することはできない⁷⁾。そこで新たにK-2-Fを加水分解し、分解物を重水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元して糖のC-1位を重水素化したアルジトールアセテートとしてGLC-MS分析を行った。Chart 1に示すように、糖のC-1位を重水素化するとMS分析において、3-O-メチルガラクトールアセテートからは m/z 190と261の一次フラグメントイオンが、4-O-メチルガラクトールアセテートからは m/z 189と262の一次フラグメントイオンが検出されるために両者を区別することができる⁷⁾。重水素化したK-2-Fの未知ピークcのGLC-MS分析によって得られたマススペクトルをFig. 3に示した。明らかに未知ピークcのマススペクトル中に3-O-メチルガラクトールアセテートに特異的な m/z 190と261の一次フラグメントイオンが認められ、また一次フラグメントイオン m/z 190から酢酸(m/z 60)

の脱離した $\frac{7}{130}$, さらにケテン($\frac{7}{42}$)が脱離した $\frac{7}{88}$ などの二次フラグメントイオンの生成していることが確認された。

以上の結果より, カシサルノコシカケ子実体の70%水性エタノール抽出物中より単離した多糖画分 K-2-Fは3-O-メチル化されたガラクトースを構成糖の1つとして含んでいることが明らかとなった。K-2-Fは3-O-メチルガラクトース, フコース, ガラクトース, グルコースおよびマンノースが5.1:3.9:1.8:1.0:0.6のモル比で構成されている(Table 1)が, このように約41%もの高含量で3-O-メチルガラクトースを含む多糖画分がキノコより単離されたのは初めてである。またK-2-Fにはメチル化されていないガラクトースも約15%含まれており, 3-O-メチルガラクトースと合せると約56%にも達することから, K-2-Fはガラクトン系統の多糖に属するものと思われる。

天然の多糖分子を構成している糖の二級水酸基がメチル化されている多糖は, わずかに植物ゴム質のカーヤゴム⁸⁾やレモンゴム⁹⁾, 植物ヘミセルロースのキシラン¹⁰⁾中に4-O-メチルグルクロン酸が, またアカニレの粘質物¹¹⁾に3-O-メチルガラクトースが存在していることが報告されているのみである。アカニレの粘質多糖はガラクトース, 3-O-メチルガラクトース, ラムノース, ガラクツロン酸(1:1:2:2)から成り, カシサルノコシカケ子実体から単離されたK-2-Fと同じく3-O-メチルガラクトースを含んでいるが, その含量は前者が約16%であるのに対して後者は約41%とK-2-Fにおける含量の方が多い。またアカニレ粘質多糖は3-O-メチルガラクトースとともにガラクトースを含む点ではK-2-Fと共通性が認められるが, 他にラムノースや酸性糖であるガラクツロン酸を有する点ではK-2-Fと著しく異っている。

以上, カシサルノコシカケ子実体に, 多糖類の抽出に際して通常あまり注目されない70%水性エタノールによる抽出法を適用することにより3-O-メチルガラクトースを多量含む新規な多糖画分を見出した。著者らはこれまで多糖類を抽出する際にこの70%水性エタノールを用いて, キノコからO-アセチル化された1,3- α -D-マンナンなど数種類の特殊な多糖を単離している^{2,12)}。この70%水性エタノールによる抽出は, O-メチル化あるいはO-アセチル化された多糖の選択的な分別抽出に非常に有効であることがさらに実証された。カシサルノコシカケ子実体中に見出されたこの新規な多糖画分K-2-Fはその生理的役割を任うために存在しており, 今後より詳細な化学構造と生理作用について究明したい。

謝辞 GLC-MS 分析に御協力頂いた京都府立大学農学部 北村進一博士ならびに栗田薫氏に感謝致します。

引用文献

- 1) 原千尋: 聖徳学園女子短期大学紀要, 第21集, pp55(1993).
- 2) S. Ukai, C. Hara, T. Kiho, K. Hirose, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2647 (1980).
- 3) N. Handa, R. Montgomery, *Carbohydr. Res.*, **11**, 467 (1969).
- 4) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 5) J. H. Sloneker, *Methods Carbohydr. Chem.*, **6**, 20 (1972).
- 6) 日本生化学会編, “生化学データブック I” 東京化学同人, 1979年, pp638-648.
- 7) 船越育雄, 山科郁男, “GC-MS の医学・生化学への応用” 化学増刊88号, 化学同人, 1980年, pp99-115.

- 8) G. O. Aspinall, E. L. Hirst, N. K. Matheson, *J. Chem. Soc.*, 989 (1956).
- 9) P. Andrews, J. K. N. Jones, *J. Chem. Soc.*, 583 (1955).
- 10) J. D. Blake, P. T. Murphy, G. N. Richards, *Carbohydr. Res.*, **16**, 49 (1971).
- 11) E. L. Hirst, L. Hough, J. K. N. Jones, *J. Chem. Soc.*, 323 (1951).
- 12) S. Ukai, S. Morisaki, M. Goto, T. Kiho, C. Hara, K. Hirose, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 635 (1982).