

カシサルノコシカケ水性エタノール
抽出多糖画分の諸性質*

原 千 尋

**Some Properties of Polysaccharide Fractions from the Aqueous
Ethanol Extract of *Phellinus robustus***

Chihiro Hara

Summary

A novel polysaccharide Fraction K-2-F containing 3-*O*-methylgalactose, which was isolated from the 70% aqueous ethanol extract of the fruiting body of *Phellinus robustus* Karst., was found to be homogeneous as judged by gel filtration on Sepharose CL-4B, and its molecular weight was estimated to be ca. 470,000. Another low-molecular polysaccharide fraction (K-2-L) obtained from the same extract was composed of a large amount of glucose (ca.83%) in addition to mannose, 3-*O*-methylgalactose, and galactose. K-2-L showed a characteristic absorption band at 890 cm⁻¹ in the infrared spectrum, suggesting the presence of β -glycosidic linkages.

In biological screening tests, K-2-F and K-2-L exhibited mitogenic activity in a dose-dependent manner, and the mitogenic potency of K-2-F was stronger than that of K-2-L. In addition, only K-2-F showed significant colony-stimulating factor-inducing activity.

Received Oct. 30, 1999

Key words: mushroom, *Phellinus robustus*, polysaccharide, mitogenic activity, colony-stimulating factor-inducing activity

緒 言

著者は、前報¹⁾において天然産カシサルノコシカケ (*Phellinus robustus* Karst.) 子実体の70%水性エタノール抽出液から高分子量のヘテロ多糖画分 (K-2-F)を単離し、このK-2-Fが構成糖の1つとして多量 (約41%) の3-*O*-メチルガラクトースを含むことを報告した。3-*O*-メチルガラクトースを構成糖として有する多糖については、これまでアカニレの植物粘質多

※カシサルノコシカケの多糖類 (第3報), 第2報 文献1)。

糖²⁾が唯一報告されているのみで、キノコ由来の多糖画分に3-O-メチルガラクトースが含まれていることが見出されたのは初めてである。

本報においては、上記多糖画分K-2-Fと、同じ70%水性エタノール抽出液より分離した低分子量の多糖画分(K-2-L)の諸性質を述べるとともに両者の免疫賦活作用について比較検討した結果を報告する。

実験方法

1. 材料・試薬

カシサルノコシカケ子実体は岐阜市金華山山麓の枯木上より採取したものを使用した。また実験に用いた糖標品ならびに試薬は市販特級品を使用した。

2. 一般的方法

多糖画分中の酸性糖の有無はカルバゾール硫酸法³⁾によって、赤外線吸収(IR)スペクトルは日本分光A-102型赤外線分光光度計を用いてKBr錠剤法によって測定した。

3. 多糖の抽出と分離

前報^{1,4)}に記した如く、カシサルノコシカケ32.4gをメタノールで処理した後の子実体粉末(28.8g)を加熱攪拌下に70%水性エタノールで抽出(計15回)し、得られた遠心上清液を濃縮後水飽和ブタノールで分配抽出した。得られた水層を透析、凍結乾燥して70%水性エタノール抽出粗画分(K-2;収率約1.2%)を得た。次いで粗画分K-2についてセファロースCL-4B(溶媒:0.1M NaCl)を用いたゲル濾過を行ない、高分子量画分(K-2-F;収率0.14%)¹⁾と低分子量画分(K-2-L;収率0.91%)とに分別し、それぞれを透析後凍結乾燥して多糖画分を得た。

4. K-2-Fのゲル濾過と分子量

K-2-F(1.6mg)を、0.1M NaClを溶媒としてセファロースCL-4Bを充填したカラム(1.5×98cm)に添加し、3.9mlずつ分取した。次いで試験管中の糖量をフェノール硫酸法⁵⁾によって定量した。また同じカラムに分子量既知の標準デキストランT-500(\overline{M}_w :495,000), T-250(253,000)およびT-110(105,000)(ファルマシア社製)を添加し、それぞれの溶出曲線から求めた標準デキストランの50%溶出液量を分子量の対数($\log \overline{M}_w$)に対してプロットした検量線からK-2-Fの分子量を算出した。

5. K-2-Lのゲル濾過と構成糖

K-2-L(2.5mg)のゲル濾過は、0.1M NaClで平衡化したセファデックスG-100のカラム(1.5×98cm)を用いて行ない、3.8mlずつ分取して上記と同様の方法で糖量を測定した。

構成糖は、K-2-L(5mg)を2Nトリフルオロ酢酸2mlで沸騰水浴中4時間加水分解し、得られた単糖をペーパークロマトグラフィー(PPC)で定性分析した。濾紙としてAdvantec No. 51Aを、展開溶媒としてn-ブタノール-ピリジン-水(6:4:3)を用いて2回多重展開した後、アルカリ性硝酸銀試薬で検出した。

次にPPC分析後の加水分解物を水素化ホウ素ナトリウムで還元した後アセチル化し、アルジトールアセテート誘導体⁶⁾としてガスクロマトグラフィー (GLC) によって分析した。装置は島津GC-8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°C, キャリアーガス・窒素 (172kPa) で分析した。ガスクロマトグラム上のピーク面積は島津C-R 3 A型クロマトパックによって求め、構成糖 (中性単糖) のモル比を算出した。

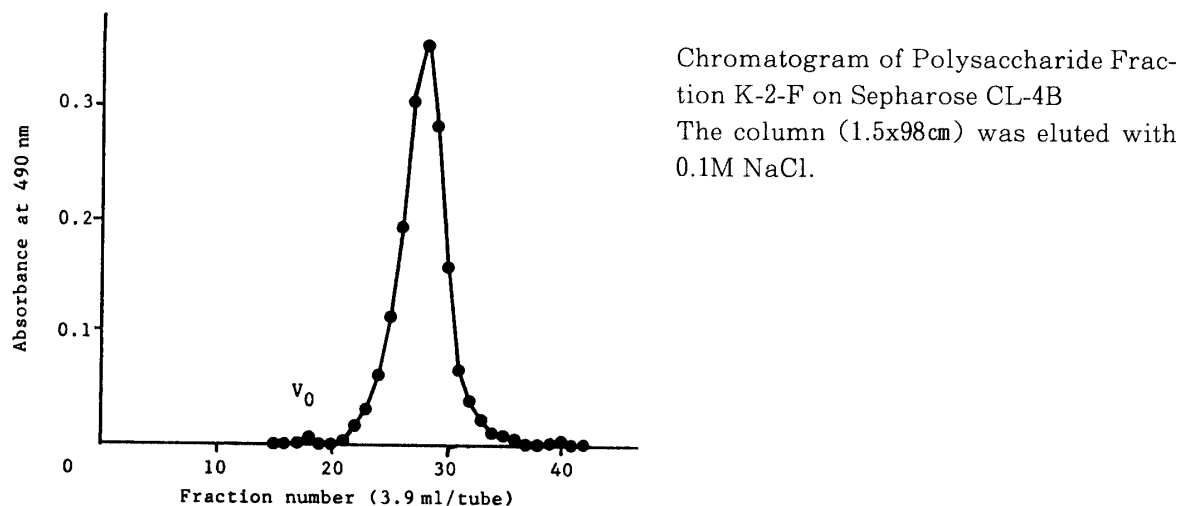
6. 免疫賦活作用の測定

免疫賦活作用としてのマイトジェン活性⁷⁾ならびにコロニー刺激因子 (CSF) 誘導活性⁸⁾の測定は、前報と全く同様の方法^{4,9)}で行なった。

結果と考察

前報¹⁾で報告した天然産カシサルノコシカケ子実体の70%水性エタノール抽出液から単離した3-O-メチルガラクトースを含む新規多糖画分 K-2-FをセファロースCL-4Bを充填剤として用いたゲル濾過を行なった結果、Fig. 1に示すように、単一のピークとして溶出され、ゲル濾過的に均一性を示すことが認められた。

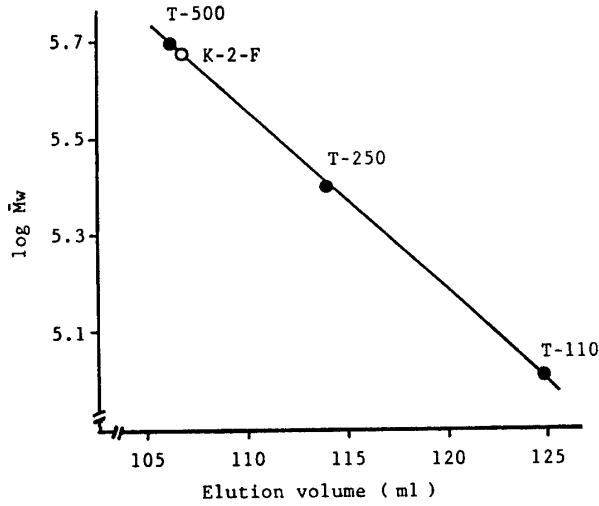
Fig. 1



またK-2-Fの分子量 (\overline{M}_w) は、標準デキストランのゲル濾過によって得られた検量線から約470,000であるとの結果を得た (Fig. 2)。

一方、K-2-Fはカルバゾール硫酸法において陰性を示したことから K-2-Fにはウロン酸は含まれていない。これまでの結果から、K-2-Fは分子量が約47万で、構成糖として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、マンノースを5.1 : 3.9 : 1.8 : 1.0 : 0.6のモル比で含み¹⁾、ゲル濾過的に均一な中性ヘテログリカンであると結論される。

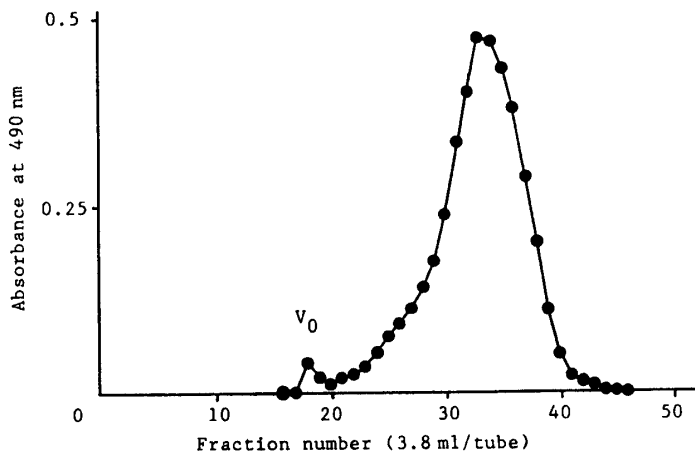
Fig. 2



Determination of Molecular Weight of Polysaccharide Fraction K-2-F by Gel Filtration on Sepharose CL-4B with Standard Dextran

Dextran T-500 (Mw:495,000), T-250 (253,000) and T-110 (105,000).

Fig. 3



Chromatogram of Polysaccharide Fraction K-2-L on Sephadex G-100

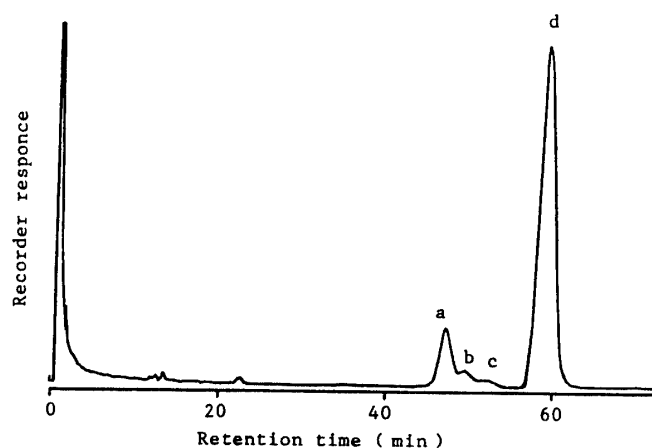
The column(1.5x98cm) was eluted with 0.1M NaCl.

一方、本子実体の70%水性エタノール抽出粗画分 (K-2) から、セファロースCL-4Bによるゲル濾過によって低分子量の多糖画分K-2-Lが約0.91%の収率で得られた。このK-2-LのセファデックスG-100を用いたゲル濾過によって得られた溶出曲線をFig. 3に示す。

K-2-Lの分子量分布にはかなりの幅が認められ、かつこのカラムの排除限界にも少量の多糖が溶出されている。K-2-Lの構成糖は、加水分解物のPPC分析によって濃厚なグルコースのスポットに加えてマンノース、グルクロン酸およびグルクロラク톤のスポットが検出された。また加水分解物をアルジトールアセテート誘導体とした中性単糖のGLC分析において、グルコース (84.8モル%), マンノース (11.7%), 3-O-メチルガラクトース (2.2%) および

ガラクトース (1.3%) が検出された (Fig. 4)。

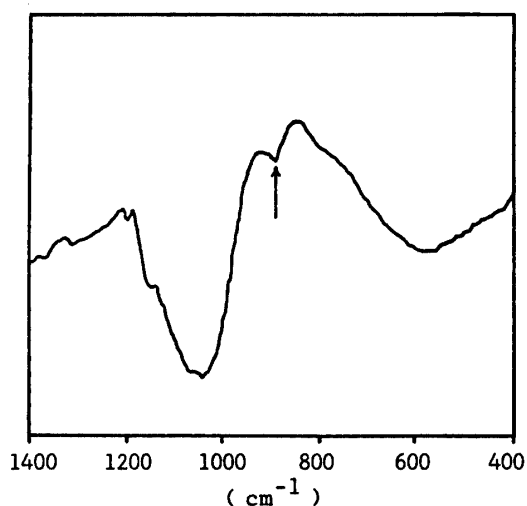
Fig. 4



Gas Chromatogram of Neutral Component Sugars of Polysaccharide Fraction K-2-L as Alditol Acetate conditions: 3% Silicone OV-225 on Chromosorb W at 193°C.
a) mannose b) 3-O-methylgalactose
c) galactose d) glucose

このことからK-2-Lは多量のグルコースと、マンノースおよびグルクロン酸などから成る比較的低分子量の酸性ヘテログリカンであることが推測される。またFig. 5に示したK-2-LのIRスペクトルにおいて、指紋領域の 890cm^{-1} に β -グリコシド結合に特異的なタイプ2bの吸収¹⁰⁾が明瞭に認められたことから、K-2-Lの大部分を占めるグルコースをはじめ構成糖のほとんどは β -グリコシド結合していることが示唆される。

Fig. 5



Infrared Spectrum of Polysaccharide Fraction K-2-L

次に上記2種の多糖画分の免疫機能に及ぼす影響について、マウスに対するマイトジェン活性ならびにCSF誘導活性を調べることによって検討した。マイトジェン活性を有する物質によっ

て刺激されたマウスのリンパ球前駆細胞（脾細胞）は、通常細胞分裂が誘発され、脾細胞への ^3H -チミジンの取り込み量が増大する⁷⁾。Table I に示したように、70%水性エタノール抽出多糖画分K-2-FおよびK-2-Lによって、 ^3H -チミジンの取り込み量は用量依存的に増大したが、その取り込み量の増大はK-2-Fの方がK-2-Lよりもより強力であった。

Table I. Mitogenic Activity of Polysaccharide Fractions^{a)}

Sample	^3H -Thymidine uptake ^{b)} mean cpm \pm S.D.(S.I.)		
	Dose ($\mu\text{g}/\text{well}$)		
	0.1	1	10
K-2-F	8191 \pm 431*(1.3)	8849 \pm 430**(1.4)	10596 \pm 557**(1.6)
K-2-L	5915 \pm 642(0.9)	7705 \pm 282*(1.2)	9962 \pm 738**(1.6)
LPS ^{c)}	25199 \pm 8825**(3.9)	37621 \pm 1753**(5.9)	N.T. ^{d)}

a) C3H/The spleen cells were stimulated for 48h with the indicated dose of polysaccharide fraction.

b) ^3H -Thymidine uptake was measured by a pulse label for the last 4h of incubation in quadruplicate cultures.

A value of the control without test sample was 6426 \pm 361. S.I. = stimulation index (cpm in the test sample/cpm in the control).

Statistical analyses were carried out by the Student's t-test, *P<0.01, ** P<0.001

c) Lipopolysaccharide of *E.coli* 055:B5 was used as a standard.

d) N.t. = not tested.

またK-2-F、K-2-Lの1および10 $\mu\text{g}/\text{well}$ の用量における ^3H -チミジンの取り込み量は、前報⁴⁾において報告した同じカシサルノコシカケ子実体の熱水抽出液より得た多糖画分（K-3）よりも顕著であった。一方、骨髄細胞から免疫担当細胞であるマクロファージや顆粒球への分化と増殖を促進する因子としてCSFの存在が知られている⁸⁾が、K-2-FおよびK-2-LがこのようなCSF因子をマウス血清中に誘導できるかどうかを、K-2-F、K-2-L（各々100 μg ）投与3時間後の血清と骨髄細胞を共に培養し、生じたコロニー数を計測することによって調べた。その結果、Table II に示したように、K-2-Fのみに明らかに強いCSF誘導効果が認められた。K-2-FのCSF誘導作用は、同じく前報⁴⁾で報告した熱水抽出多糖画分であるK-3よりもかなり強力であった。

Table II. CSF-Inducing Activity of Polysaccharide Fractions^{a)}

Sample	No. of colonies/ 5×10^4 bone marrow cells per dish ^{b)} mean \pm S.D.	
	12.5 μ l/dish	25 μ l/dish
Control	0	0
K-2-F	76 \pm 19	127 \pm 6
K-2-L	0	2 \pm 1
GM-CSF(33 units) ^{c)}	90 \pm 2	124 \pm 10

- a) Three ICR mice per group were injected intraperitoneally with 100 μ g polysaccharide fraction in saline. Serum was separated from the blood 3h after administration and pooled in equal volume.
- b) The CSF-inducing activity in 12.5 or 25 μ l of serum per dish was measured in triplicate.
- c) Murine granulocyte/monocyte CSF was used as a standard.

以上本報においては、広葉樹枯木上から採取したカシサルノコシカケ子実体をこれまで用いられなかった70%水性エタノールによる抽出を行ない、その抽出物より単離した2種の多糖画分の諸性質と免疫賦活作用について述べた。K-2-FおよびK-2-Lは共にヘテログリカンであるが、分子量においても構成糖の組成においても違いがあり、前者は中性ヘテログリカン、後者はグルクロン酸を含む酸性ヘテログリカンに属する多糖である。分子量も前者が約47万であるのに対して、後者は概ね1万前後と低分子量である。特にK-2-Fは、前報¹⁾でも報告したように3-O-メチルガラクトースを構成糖として41%も含む新しいタイプの多糖であり、K-2-Lや熱水抽出多糖であるK-3と較べてより強い免疫賦活作用を示したことから、今後より詳細な化学構造と生物活性との相関性について検討する必要があると思われる。

謝辞 本研究にあたり、マイトジェン活性ならびにCSF誘導活性の動物試験をして頂いた北里大学薬学部（現理学部）教授熊沢義雄博士に感謝致します。

引用文献

- 1) 原 千尋：聖徳学園女子短期大学紀要，第22集，P127(1994).
- 2) E.L.Hirst, L.Hough, J.K.N.Jones, *J.Chem.Soc.*, 323(1951).
- 3) J.T.Galambos, *Anal.Biochem.*, 19, 119(1967).
- 4) 原 千尋：聖徳学園女子短期大学紀要，第21集，P55(1993).
- 5) M.Dubois, K.A.Gilles, J.K.Hamilton, P.A.Rebers, F.Smith, *Anal.Chem.*, 28, 350(1956).
- 6) J.H.Sloneker, *Methods Carbohydr.Chem.*, 6, 20(1972).

原 千 尋

- 7) 豊島 聰, 木本雅夫, 今井康之, “続生化学実験講座 5, 免疫生化学研究法”, 日本生化学会編, 東京化学同人, 1986, P194.
- 8) Y.Kumazawa, K.Mizunoe, Y.Otsuka, *Immunology*, 47, 75(1982).
- 9) 原 千尋, 熊沢義雄, 木方 正, 鶴飼茂夫: 聖徳学園女子短期大学紀要, 第18集, P85.
- 10) S.A.Barker, E.J.Bourne, D.H.Whiffen, *Methods Biochem. Anal.*, 3, 213(1956).