

*Agaricus blazei*のグルカン，特に水溶 β -1, 6-グルカンの構造と性質

三 崎 旭¹⁾，宮 部 真 司²⁾，角 田 万里子³⁾

(¹⁾大阪市大*，²⁾大愛(株)**，³⁾甲南女大人間科学***)

Structure and Bioactivity of β -1, 6-Glucan of *Agaricus blazei*

Akira MISAKI¹⁾, Shinji MIYABE²⁾ and Mariko KAKUTA³⁾

¹⁾Osaka City University, ²⁾R&D, Taiaki, and ³⁾Konan Womens University

In a previous study fractionation of fruiting body of *Agaricus blazei* afforded an antioxidative substance (AOSA) from ethanol extract. Regarding β -glucans of major polysaccharide components of the fruiting body, we showed a diversity of β -1, 3-linked glucans. In the present study, a careful fractionation of the mushroom revealed another molecular species of β -glucan, i.e. essentially linear β -1, 6-linked glucan, occurring in an alkali extract and hot-water extract, as presumed by Smith degradation analysis. The β -glucan, either from alkali-extract or hot water extract, was applied onto a Con A-affinity column and the pass-through fraction, free from glycogen, was collected. The glucan fraction contained some amount of protein but protease treatment followed by gel-filtration afforded an essentially protein-free β -1, 6-glucan of Mw 20~25 x 10⁴ and $[\alpha] -5.53^\circ$. Methylation analysis, Smith degradation, ¹³C-n.m.r spectroscopic analysis, and also hydrolysis by β -1, 6-glucanase confirmed that this water-soluble glucan is an essentially linear glucan consisting solely of β -1, 6-glucosidic linkages. Interactions with IgG against schizopyllan and β -1, 6-specific banana lectin also supported above structure. The β -1, 3-linked glucan, a major component of alkali-insoluble fraction, was converted to a soluble glucan polyol, which gave a linear β -1, 3 glucan upon mild acid hydrolysis. Comparison in the growth inhibition activity of the mouse-transplanted sarcoma 180 revealed that the water-soluble, β -1, 6-glucan, lack of a triple strand conformation, also showed a notable antitumor activity.

近年，アガリクス (*Agaricus blazei* Murill子実体) の免疫賦活効果に関心がもたれている。先に，我々はアガリクスからアルコール可溶性の抗酸化物質を分離した。同時に，多糖成分については，アルカリ抽出で抗腫瘍性の分岐 β -1, 3-グルカンを分離した¹⁾が，その際， β -1, 6-グルカン²⁾の存在は確認できなかった。其の後の分画過程で，水溶性の β -1, 6-結合のグルカンが熱水抽出液およびアルカリ抽出液中にも存在することを見い出した。興味あることはこの水溶性グルカンに顕著な移植腫瘍の抑制作用の発現を確認したことである。本報告では，Con A affinity chromatography，ゲル濾過などにより精製した β -1, 6グルカンの化学的，生化学的特性および抗腫瘍作用を β -1, 3-系グルカンと比較した結果について述べる。

実験方法

アガリクスは大愛(株)で栽培された新鮮な“きのこ”の凍結乾燥標品を主として用いた。生の“きのこ” 275 gから調製した凍結乾燥標品 20 gを70% ethanol処理し抗酸化物質 (AOAS) およびD-mannitolを分離した後，PBS抽出 (レクチン)，熱水抽出 (85 $^\circ$ 2 h, または120 $^\circ$ 20 min)，さらに不溶残渣をアルカリ (窒素気流下，60 $^\circ$) 処理して抽出

*名誉会員 (所在地：大阪市住吉区杉本3-2-23 (〒558-8585))

**所在地：新居浜市外山町16-32 (〒792-9000)

***所在地：神戸市東灘区森北町6-2-23 (〒658-0001)

物と不溶画分にわけた。系統的分画のschemeはFig. 1に示す。

グルカンの化学分析：化学的構造解析は主として、メチル化分析とスミス分解法によった。また、 ^{13}C -n.m.rによる解析も行なった。

生化学的解析：Schizophyllan, *Volvariella volvacea* (フクロタケ) のO-6分岐 β -1,3-グルカン、およびそのpolyol誘導体に対する精製抗体³⁾との反応、さらに、バナナ果実から精製した新奇レクチン⁴⁾との沈降反応を行った。

酵素分解： β -1,3-glucan hydrolase (Zymolyase), または, *Rizopus chinesis* の β -1,6-glucan hydrolase (研究室保存) を作用させた。生成オリゴ糖の定量的分画はHPAEC (LC) による陰イオンクロマトグラフィで行った。HPAECはDionex社のBioLC MODEL 45001, カラムはHPIC-AS6 (250 x 4 mm) を用い, pulsed amperometric detectorで検出した。展開条件は, 0.15M NaOHと1M Na-acetateのグラデIENTに依った。この条件で単糖から約35糖まで分離が可能であった。

抗腫瘍活性はSarcoma 180をICR mice10匹に移植 (鼠径部) し, その翌日, グルカン試料を1回皮下注射 (5~10 mg/kg), 4週間に亘って腫瘍のvolumeを計量し, 最終日に腫瘍を摘出, 重量を測定した。

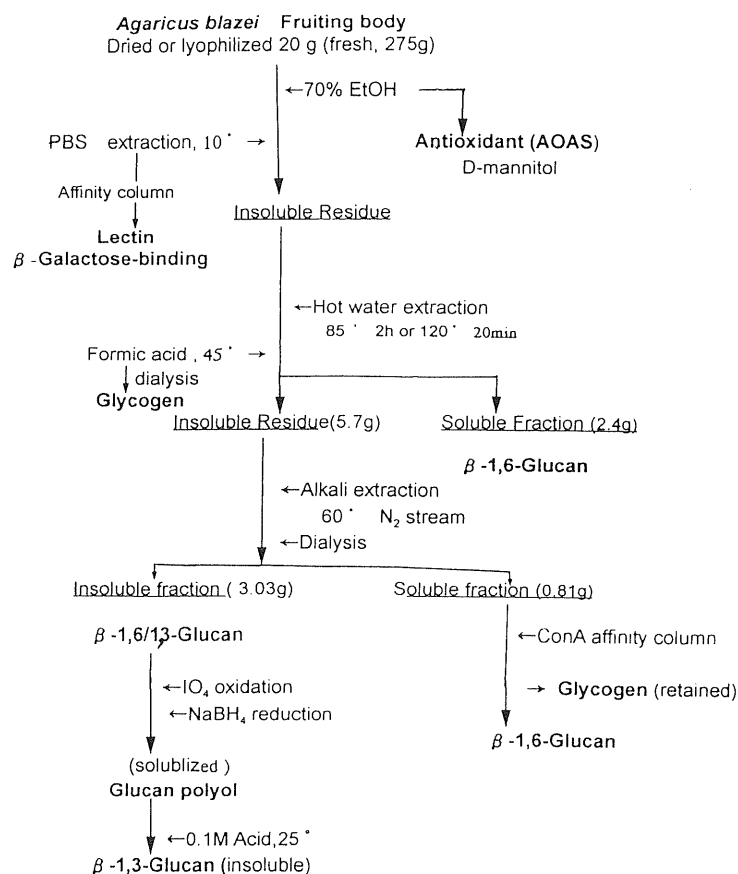


Fig. 1 Scheme of fractionation of the fruiting body constituents

結果および考察

Fig. 1にはアガリクス子実体成分の系統的分画の全schemeを示した。多糖に関してはPBS抽出画分にグリコーゲンとは殆ど出現せず、むしろ、ギ酸抽出画分に現れた。 β -1,6-グルカンは最初にアルカリ抽出画分に見つかり、その後熱水抽出物中の主要多糖が β -1,6-グルカンであり、結果的にこのグルカンは、細胞表層の周辺かマトリックス中に分布している可能性が高いと考えられる。一方、 β -1,3-グルカンは細胞壁の強固な構築物として存在するため、熱水や希アルカリでは抽出され難い。

多糖の系統的分画で得られるそれぞれの画分は、なお混合系で単一のグルカンとは考え難い。各々の画分に含まれる主要グルカンは、過ヨード酸化、 NaBH_4 還元でポリオール誘導体とした後、酸で加水分解して生成物を定量することにより正確な知見が得られる (Fig. 2, Table 1参照)。例えばギ酸抽出で得られた glycogen¹⁾ の場合、主鎖の 1, 4-結合に由来する erythritol と非還元末端からの glycerol のモル比は、10~12:1.0であり、一方、 β -1, 3-glucan では、酸化を受けず大部分が glucose として残る。このような strategy に基づき、熱水、アルカリ抽出画分のスミス分解生成物を比較した結果を Table 1 に示す。ここで注目すべき事実として、熱水抽出およびアルカリ抽出画分の示す高い glycerol 値が挙げられる。この glycerol は glycogen の大部分が、1, 6-結合の glucose 残基に由来すると考えられる (Fig. 2 参照)。

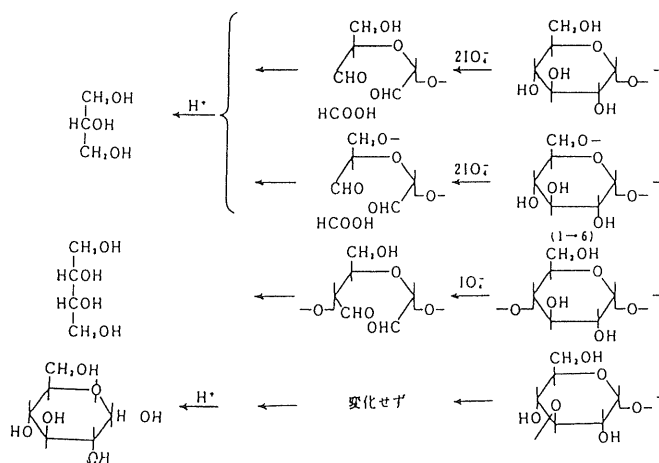


Fig. 2 Smith degradation products from different glucosidic linkages

Table 1 Smith degradation products of glucan fractions

	Glycerol	Erythritol (Molar ratio)	Glucose
Hot-water extract	17.8	5.30	1.0
Hot-water extract res.	1.0	5.67	4.29
Hot alkali- extract	1.0	1.54	5.21
Con A-pass fraction of	9.5	----	1.0
Alkali insol. res	1.0	1.25	4.81

β -1, 6-グルカンの分離精製

熱水抽出画分

凍結乾燥アガリクスの 90℃, 2 hr 抽出液 (固形物 2.4%) を透析して高分子画分 70 mg と低分子画分 300 mg を得た。この画分には著量のマンニットが含まれ熱アルコールから結晶化を行った。高分子部分を水解すると少量の mannose と galactose (1:0.7) を含むが、大部分は glucan 由来の glucose であった。この部分には少量の glycogen も含まれるので、 α -amylase を作用させ可及的に除いた。その後、アルコールで沈澱させた多糖 (60 mg) を Con A-Tresyl Toyopearl column (15 ml) に apply し、0.05M PBS を流し、非吸着画分を集め透析後凍結乾燥した (30.5 mg)。カラムに吸着された α -glucan (glycogen) は 0.5M α -methylglucoside で溶離させた。

アルカリ抽出画分

熱水抽出の残査 (600 mg) を 0.75M の NaOH (30 ml) で少量の NaBH_4 の存在下、65℃, 1 hr 加熱、抽出液を透析して、可溶画分 (127 mg) と不溶物 (350 mg) にわけた。可溶物の糖成分は glucose のみで、グルカンと認定された。

その一部 (30 mg) について熱水抽出物と同様に Con A column に apply し非吸着画分 (15.6 mg) と吸着多糖 (7 mg) を得た。

Con A-非吸着グルカンが β -1, 6-グルカンであることの確認

1. Con A-column に吸着しなかった多糖画分を透析後凍結乾燥した。

$[\alpha] - 5.33^\circ$ (c, 0.8, water) で明らかに β グルカンである。分子量は 20 - 25 万 (Toyo pearl Hw65S column) である。

このフラクションには 26.5% の protein が含まれており、最近まで、Glycoprotein ではと考えられた。しかし、その後、この画分に actinase を作用させ可及的に蛋白を分解した後、再度、Toyo pearl Hw65S column (2 cm ϕ 200 cm length) でゲル濾過を行った結果、糖の peak と蛋白の peak は明らかに一致しなかった。従って、本質的に単体のグルカンと考えられる。Fig. 3 に elution profile を示す。

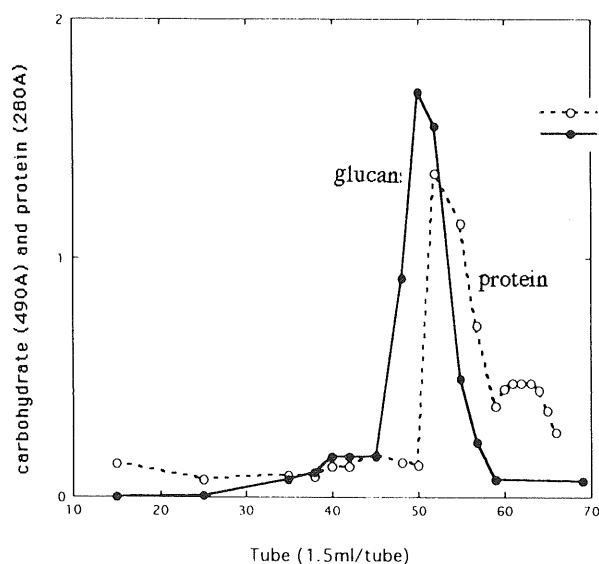


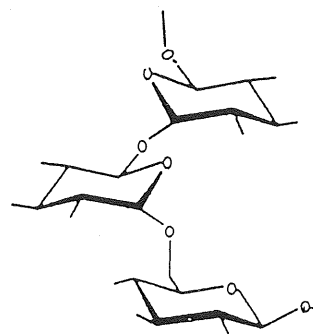
Fig. 3 Gel-filtration profile of β -1, 6-glucan fraction on Toyopearl HW65s column. The glucan (10 mg), Con A-unretained fraction from the hot-water extract, was applied onto the column (2 x 200 cm) and eluted with 0.05M PBS.

2. メチル化分析

熱水抽出およびアルカリ抽出から精製されたグルカンをメチル化し、加水分解で生成するメチル糖を GLC 分析した結果は Table 2 に示す。この結果から β グルカンは分岐の非常に少ないもしくは直鎖に近い 1, 6 結合のグルカンと考えられる。

Table 2 Methylation analysis of Con A-purified β -D-glucan

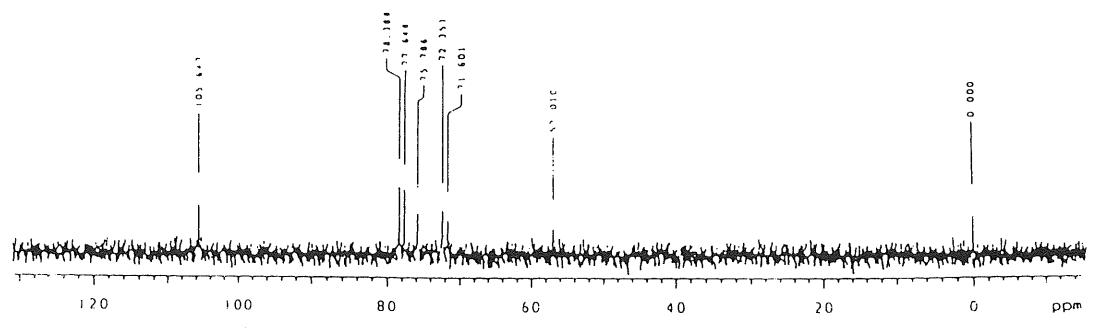
Methylated glc	Hot water fraction	Alkali fraction	Linkage
2, 3, 4, 6-tetra-	1.0	1.0	Glc1 $\rightarrow$
2, 4, 6-tri-	tr.	0.08	$\rightarrow$ 3Glc1 $\rightarrow$
2, 3, 4-tri-	18.5	9.92	$\rightarrow$ 6Glc1 $\rightarrow$
2, 4-di-	tr.	0.55	$\rightarrow$ 6Glc1 $\rightarrow$
			$\uparrow^3$



3. 酵素分解など

この β 1, 6 結合のグルカンの構造は, ^{13}C -n.m.r. の chemical shift (Fig. 4) から支持される。C-1(β): 105.65 ppm O-substituted 6: 71.601 ppm などである。

さらに, このグルカンに *Rhizopus* の β -Glucan hydrolase を作用させると Glucose のほか, Gentiobiose および Gentiotriose などが生成した (Fig. 5)。この結果は連続した β 1, 6 結合の存在, すなわち, 1, 6 結合の主鎖を示している。



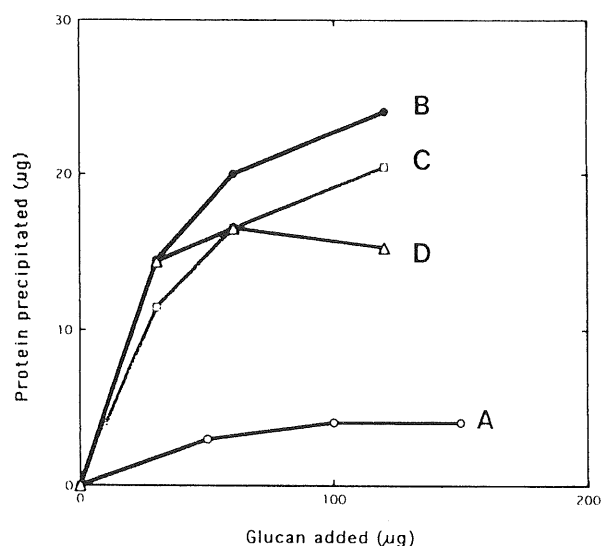


Fig. 6 Quantitative precipitation curves of *A. blazei* β -1, 6-glucan with Con A (A), Banana lectin (B), anti-SPG antibody (C), and schizophysan (SPG) with Banana Lectin (D).

Various amounts of glucans were incubated with each 25 μ g of various lectins or antibody in a volume of 150 μ l, and the precipitated protein in each tube was determined by the Lowry method.

β -1, 3 グルカンとポリオール誘導体

アガリクスの熱水抽出残渣のを熱アルカリ抽出した可溶画分には β -1, 6-グルカン (Con A column で分画) のほかに, 1, 3-グルカンも含れるが, β 1, 3 グルカンの大部分は不溶性画分として存在する¹⁾。この画分はスミス分解で glycerol : erythritol : glucose (1.0 : 1.25 : 4.81) を生成することから少量の glycogen のほかは分岐した 1, 3 結合グルカンと推定された。この不溶画分を可溶化する目的で DMSO, ギ酸処理を試みたが充分でなかった。そこで, これまで我々が, キクラゲ, フクロタケや霊芝の分岐 β -1, 3-グルカンの可溶化に用いてきた, IO₄酸化, NaHBO₄還元を含む反応で glucan polyol 誘導体とした (Fig. 7 参照)。得られたグルカンポリオールは, ¹³C-n.m.r (DMSO, 50℃) で, 103.28 ppm (C-1), 82.46 ppm (subst. C-3) および 61.33 ppm (subst. C-6) の chemical shift から O-6 分岐 1, 3 グルカンであることが示された。

この glucan polyol を緩和水解 (0.1M TFA, 80℃, 1 hr) すると直鎖の β -1, 3-グルカンとなる。Table 3 にはもとのグルカンおよび緩和水解物のメチル化分析の結果を示す。さらに, この水解で残ったグルカンに β -1, 3-glucanase (zymolyase) を作用させると直鎖の β -1, 3 結合の laminaribiose, -triose および -tetraose が生成する (Fig. 8)。これらの結果から, もとのアルカリ不溶性のグルカンは 1, 6 で分岐した β 1, 3 グルカンであることが確認された。

Table 3 Methylation analysis of the alkali-insoluble glucan and its polyol after mild hydrolysis

O-methyl Glc	Alkali-ins. fraction	Polyol after mild hydrolysis
2, 3, 4, 6-tetra-	1.0	1.0
2, 4, 6-tri-	3.78	23.5
2, 3, 6-tri-	2.35	
2, 4-di-	1.2	---
2, 3-di-		

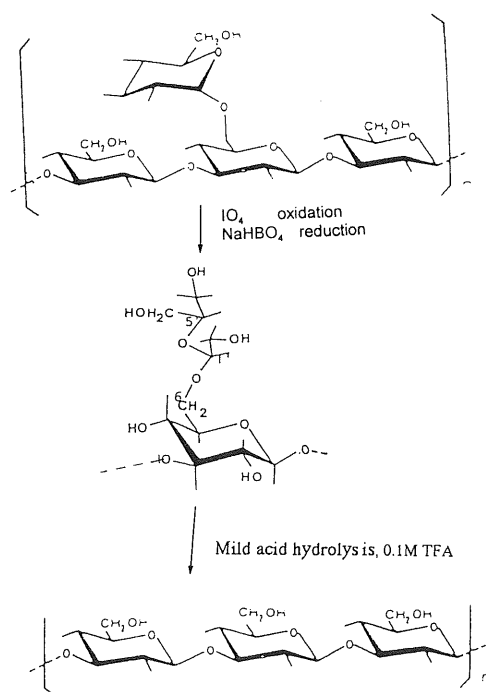


Fig. 7 Procedure of polyol modification of 6-O-branched β -1, 3-glucan and deletion of polyol groups by mild acid.

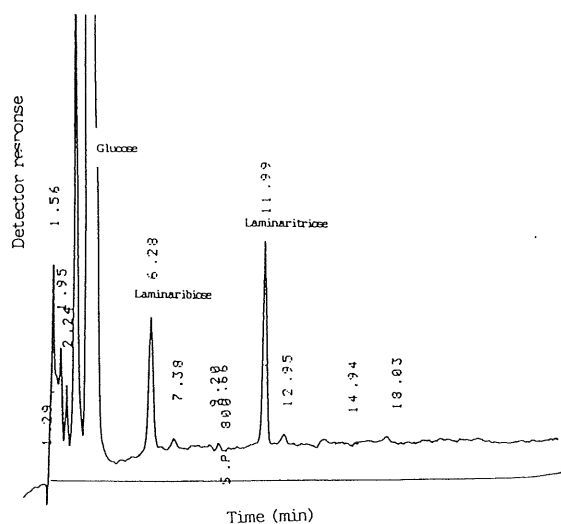


Fig. 8 HPAEC profile of Zymolyase action on the branch-deleted polyol derived from alkali-extr. residue of *Agaricus* fruiting body. After incubation of the glucan (5 mg) with the enzyme in 0.05M phosphate buffer, pH7.5, at 37°C , 16 hr, a portion (10 μl) was applied for HPAEC.

グルカンの抗腫瘍活性

アガリクスに含まれる β -グルカンの分子種と抗腫瘍活性として表現される生物活性はこのキノコの免疫的特性を知る意味では重要である。特に、今回、熱水およびアルカリ抽出から精製した、直鎖型と考えられる β -1, 6-グルカンに免疫活性の発現があるか否かは、水可溶性という点でも重要である。そこで、例数は充分ではないが、マウスに移植したSarcoma 180を用いて抗腫瘍活性をテストした。

すなわち、ICR-JCR系マウス (1 group 10) にSarcoma 180を移植 (鼠径部) した翌日、グルカン試料を1回皮下注射 (5~10 mg/kg) し、4週間に亘って腫瘍の volume を測定し、最終日に腫瘍を摘出し計量した。その結果を Table 4 に示す。この条件で臨床用 Schizophyllan は、10 mg/kg 投与で 97.3% の抑制率であった。

精製した β -グルカンは 5 mg/kg の 1 回投与 (筋肉注射) で 50%, 8 mg で 56% の抑制率を示した。同様な条件 (1 回投与) でアルカリ不溶の β -1, 3-グルカンの場合、抑制率は 10 mg/kg で 35%, 誘導体 (ポリオール) でも 55% と比較的低い値であった。これまでに我々が行って来た他の β -グルカンの抗腫瘍作用に比べて一見低い様であるが、従来の連続 10 回の *i.p.* 投与に比して、ここでは *i.m.* 1 回、という投与方法の相異によると思われる。これまでの抗腫瘍活性は β -1, 3-グルカンの三重ラセン構造に依存するという説が有力であったが⁵⁾、本研究の結果から三重ラセン構造をもたない β -1, 6-結合のグルカンでも有意な活性を発現すること、さらに、注目すべきは生体に incorporate されやすい水溶性グルカンという有利性である。

Table 4 Antitumor effect of *A. blaise* glucans on Sarcoma 180

Polysaccharide	Dose	Tumor wt (g)*	Tumor inhibition
	<i>Intra .muscular (x1)</i>		
Alkali extract	10 mg/kg	4.50	36.8%
-Residue	10 mg/kg	5.65	20.6%
Control	—	7.11	—
Con A-passed-	3 mg/kg	3.85	35.1%
β 1, 6-glucan	5 mg/kg	3.00	49.8%
	8 mg/kg	2.61	56.0%
Polyol -modified-	5 mg/kg	4.60	22.4%
β 1, 6/1, 3-glucan	10 mg/kg	3.85	54.3%
Control	—	5.93	—

*mean value

要 約

エタノールによる抗酸化物質抽出後のアガリクスを熱水、熱アルカリなどで系統的に抽出、分画し、それぞれについて構造を解明した。

水溶性の β 1, 6 グルカンは、熱水抽出およびアルカリ抽出画分を Con A - affinity column およびゲル濾過で分子量 20 - 25 万, $[\alpha] - 5.53^\circ$, 本質的に蛋白質を含まないグルカンである。化学的、生化学的方法の構造解析から、このグルカンは 1, 6 - 結合で連なった直鎖に近い β -D-グルカンと確認された。なお、この β 1, 6-グルカンはバナナの新奇レクチンと反応することが分かった。

アルカリ抽出および不溶性のグルカンは β -1, 3 結合を主鎖とする O-6-分岐の多糖である。不溶性グルカン画分を酸化-還元法で可溶性誘導体とした。これに β -1, 3-glucanase を作用させると、Glucose, Laminaribiose および-triose が生成することから主鎖は β -1, 3-結合であることが確認された。

精製した水溶性の β -1, 6 および不溶性 1, 3-グルカン系の多糖および誘導体について Sarcoma 180 - ICR 系マウスに対する腫瘍増殖抑制活性を比較した。その結果、三重ラセン鎖を持たない β -1, 6 グルカンにも抗腫瘍活性が発現する事を確認した。

謝 辞

抗腫瘍活性測定に協力していただいた台糖㈱研究所、および N.m.r. 測定に協力して下さった大阪市立大学大学院研究科 菊崎泰枝氏に感謝します。

文 献

- 1) 角田, 谷川, 菊崎, 三崎, 微量栄養素 **17** 83-90 (2000).
- 2) Kawanishi et al. *Carbohydr. Res...* **186**, 267-273 (1986).
- 3) E. Kishida, Y. Sone, S. Shibata and A. Misaki, *Agric. Biol. Chem.* **53** 1849-1859 (1989).
- 4) I. J. Goldstein, H. Winter, H. Mo. A. Misaki, Els J. Van Damme and W. Peumans, *Eur. J. Biochem.*, **268** 2616-2619 (2001).
- 5) A. Misaki, M. Kakuta, *Fungal (1-3)- β -glucan: Chemistry and Antitumor Activity* Carbohydrate in Drug Design, ed. Z. J. Witczak, pp. 655-699 (1997).