制癌性多糖類に関する研究 (11)

マイタケ(舞茸)の繊維質多糖の分画,ホルモリーシスおよび抗腫瘍活性について

誌名	靜岡大學農學部研究報告 = Reports of the Faculty of Agriculture, Shizuoka University
ISSN	05598850
著者名	水野,卓 河岸,洋和 水野,希美
発行元	靜岡大學農學部
巻/号	36号
巻号補足	
掲載ページ	p. 85-91
発行年月	1987年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

静岡大学農学部研究報告 Bull. Fac. Agr. Shizuoka Univ., No. 36, p. 85～91 (1986)

制癌性多糖類に関する研究（第11報）マイタケ（舞茸）の繊維質多糖の分画，ホルモリーシスおよび抗腫瘍活性について

水野　卓*・河岸洋和*・水野希美*

（昭和61年10月30日受理）

Fractionation, Characterization and Formolysis of Antitumor Fibrous Polysaccharides (Non-Cellulose) from "Maitake", the Fruiting Body of *Grifola frondosa*

Takashi MIZUNO*, Hirokazu KAWAGISHI* and Kiyoshi MIZUNO*

SUMMARY

Fibrous β-glycans (non-cellulose) were extracted from "Maitake" with 5% NaOH (80°C), 20% NaOH (30°C) and 5% LiCl-DMAA (30°C) in this order. The polysaccharides extracted were divided into several sub-fractions using gel filtration and acetic acid-ethanol precipitation. The three polysaccharide fractions, FIV-1, FIV-2 and FVI-1 were isolated respectively.

The fraction FIV-2 with host-mediated antitumor activity was a β-(1→3)-D-glucan branched with β-(1 → 6)-linkage with 4 glucose residues, and an average chain length of 8 glucose residues as the results of methylation analysis and other data. FIV-2 had a $\overline{MW}$ of about 430,000 (gel filtration), an $[\alpha]_D$ of +5.4° (in NaOH), with an IR absorption peak of 890 cm^{-1}, 0% of N and consisted with mainly Glc and a small amount of Xyl as the component sugars.

Three polysaccharide fractions (F) were partially depolymerized by 80% formic acid treatment, formolysis (85°C, 40～60 minutes), and two fractions designated "formyl polysaccharide" (F-F) and "small polysaccharide" (S-F), were prepared from the formolysis products. Both the extracted and the depolymerized fractions, FIV-2 and S-FIV-2, exhibited the same antitumor activities against Sarcoma 180/mice in i.p. route. However, the formyl polysaccharide F-FIV-2 demonstrated no antitumor activity. Small polysaccharide fraction, S-FIV-1, prepared from the inactive fraction FIV-1, showed the appearance of antitumor activity when administered i.p..

Chitosan fraction, FVI-1 did not exhibit antitumor activity by intraperitoneal route.

前報　文献9）

* 静岡大学農学部　農芸化学科　生物化学研究室

* Laboratory of Biochemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, Ohya 836, Shizuoka, JAPAN

前報[1]において，マイタケ多糖類を熱水，3% NH_4-oxalate (100°C)，5%NaOH (30°C) で逐次抽出した。それらを各種クロマト法によって細分画精製した。得られた多糖の化学構造を解明するとともに，分画精製に伴う制癌活性の推移を追求した。制癌活性を示す多糖としてβ-(1→6) 分岐したβ

-(1→3)-D-グルカンをはじめ，キシログルカン，ウロン酸残基を含むβ-グルカン，蛋白を含むヘテログリカンなどを単離した。さらに，これら多糖の化学修飾によって誘導されたポリアルデヒド多糖，ポリアルコール多糖および緩和Smith分解多糖には，原多糖と比較して比活性の増大は見られないことが判明した。

本報告では，マイタケ多糖の完全利用という観点から，前報で得られたResidue IVを出発物として，さらに5%NaOH (80°C)，20%NaOH (30°C)，3% LiCl-DMAA (N, N'-Dimethylacetamide, 30°C) で逐次抽出して行き，水不溶性のいわゆる繊維質多糖[2]を得た。それらをゲル濾過，酢酸-エタノール沈澱を反復して細分画精製した。さらに，蟻酸分解 (Formolysis) によってホルミル化多糖，低分子多糖を調製した。得られた多糖の化学構造と抗腫瘍活性を原多糖と比較したところ，β-(1→3)-D-グルカンを主体としている原多糖と，それから誘導された低分子多糖に高い活性の発現が認められた。

最近，食品栄養学の立場から食物繊維 (Dietary fiber) の生理的有用性が認められてきている[3]。セルロース，ヘミセルロース，リグニン，ペクチン質，ガム質，マンナン，ラミナランなどの多糖は水不溶性あるいは摂取しても不消化性であるため腸管内で水分を保持して嵩張り，コレステロールや発癌物質などの有害物を吸着して，腸管を刺激して排便（蠕動運動）を早める作用がある。また，腸内細菌の培地としての働きの他に，大腸癌，動脈硬化，脳血栓，心筋梗塞，高血圧，糖尿病などの成人病の予防にも役立つと言われている。

"舞茸"[1]には，"霊芝"[2]と同様に，水溶性多糖，水不溶性多糖，繊維質多糖の別なく，抗腫瘍活性画分が存在し，中でも繊維質多糖画分に制癌性が認められたことは興味あることであり，マイタケ多糖の薬理効果および有効利用という観点からも注目したい。

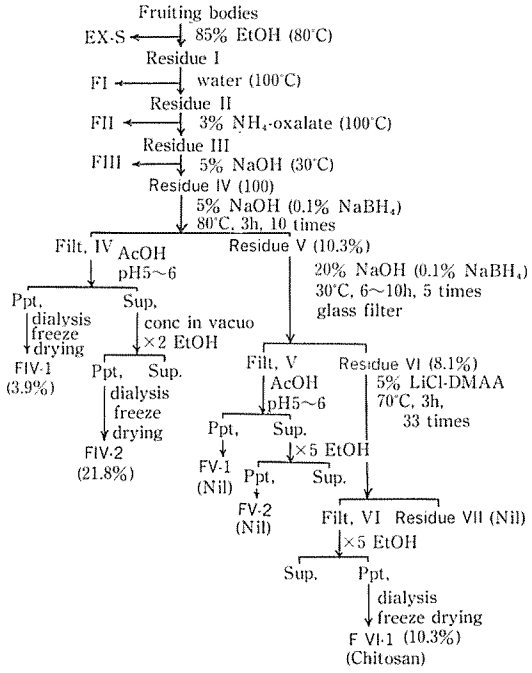

Fig. 1. Fractional Preparation of Fibrous Polysaccharides from the Fruiting Bodies of *Grifola frondosa*.

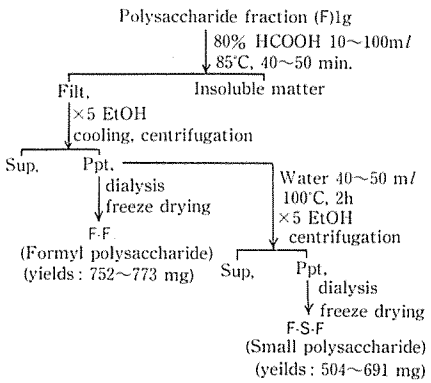

Fig. 2. Preparation of Formyl polysaccharide and Small Polysaccharide from Fibrous Polysaccharides of *Grifola frondosa*.

実験方法

1．多糖の抽出・分画・精製

Fig. 1 に従って，Residue IV から FIV-1 と-2；F VI-1 の3画分を得た。さらに，Sepharose CL-4B カラム (2.6×85 cm) を用いて 0.8 *M* NaOH による展開を反復し，ゲル濾過的に均一になるまで精製してから凍結乾燥した。なお，"霊芝"の場合[1]に得られたFV-1と-2，Residue VIIはマイタケでは得られなかった。

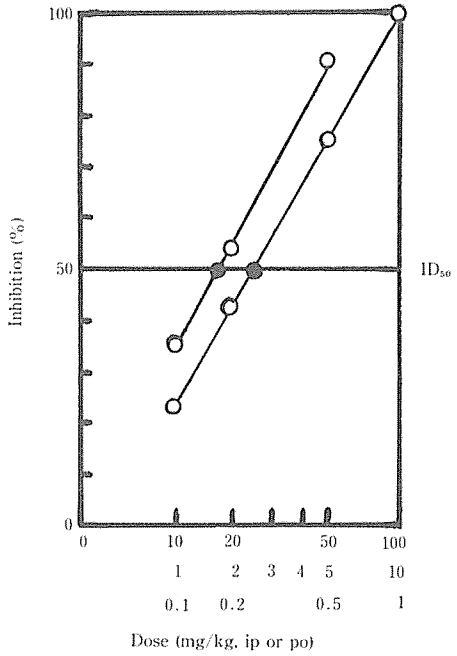

Fig. 3. Calculation of the 50% Inhibitory Dose (ID_{50}).

2．多糖のホルモリーシス

得られた多糖画分（F）を Fig. 2 に従って蟻酸分解することによってホルミル化多糖（F-F）および低分子多糖（S-F）を調製した。さらに，これらを Sepharose CL-6B（2.3×75 cm）によるゲル濾過を反復して精製した。

3．多糖の構造解析

前報[1,2]に従って，次項について研究した。

(1) PPC，GLC による構成糖組成 (2) Pharmacia 社デキストランを基準とした Sepharose CL-4B あるいは CL-6B カラム（2.6×85 cm）による平均分子量（$\overline{MW}$）測定 (3) IR-スペクトル（KBr あるいは $CHCl_3$ 法） (4) メチル化分析（箱守法） (5) 元素分析による全 N の定量 (6) Lowry 法による蛋白定量 (7) X線回折 (8) 全糖定量（フェノール硫酸法） (9) ヘキスロン酸（改良カルバゾール硫酸法） (10) ヘキソサミン（Elson-Morgan 法）

4．抗腫瘍試験

常用の Sarcoma 180/ICR-JCL マウス/ip 投与法[1,2]によった。Fig. 3 に従って ID_{50} 値（mg/kg）を算出した。

実験結果と考察

1．繊維質多糖の分画と抗腫瘍効果

Residue IV から 5%NaOH（80°C）で抽出された多糖 FIV は，酢酸酸性によって沈澱する FIV-1，さらに 2 倍容エタノールによって沈澱する FIV-2 がえられた。両画分ともに Sepharose CL-4B カラム（2.6×85 cm）によるゲル濾過によって単一画分となった。Table II に示したように，両画分とも，N 含量が少なくて全糖量高く，主構成糖は Glc であり，IR ν_{max}^{KBr} 890 cm^{-1} が認められ，比旋光度が +26.5°，+5.4° を示すことから，β-グルカンが主体であるといえる。構成糖として Glc の他に少量の Xyl, Fuc が検出されるが，多糖をゲル濾過の反復によって精製しても除かれないことから，これらは副構成糖と考えられる。$\overline{MW}$ はそれぞれ 75 万，43 万であった。FIV-2 には抗腫瘍活性が認められた（Table I）。FIV-1，FIV-2 のメチル化分析の結果（Table III）は，両ヘテログルカンともに（1→3）結合を主体とし，（1→4）結合をも含み，非還元末端は Glc，Xyl，Fuc 残基，分岐部は Glc と Man 基であることを示唆しており，分岐度が FIV-1 で 13，FIV-2 では 3 であった。Residue V から 20% NaOH（30°C）で抽出される多糖は，霊芝の場合[2]と異なり，FV-1 と-2 ともに得られなかった（Fig. 1，Table IV）。さらに，Residue VI から 5%LiCl-DMAA（30°C）で反復抽出して得られた多糖 FVI-1 はゲル濾過［Sepharose CL-6B（2.3×75 cm）］的には単一成分であり，酸水解によって $GlcNH_2$（95.4%）と微量の Glc を生成した。なお，FVI を抽出した後に Residue VII は残らなかった。FV-1 はゲル濾過的にも単一成分であり，構成糖が $GlcNH_2$ 95.4% であり，IR-スペクトル（Fig. 4），X線回折（Fig. 5）ともに Chitosan と同定されたが，抗腫瘍活性（Table I）は全く認められなかった。

2．多糖のホルモリーシスと抗腫瘍活性

多糖画分（F）の蟻酸分解（Formolysis）によって得たホルミル化多糖（F-F）および低分子多糖（S-F）の抗腫瘍効果と理化学性を原多糖と比較して Table I と Table II に示した。

F-FIV-1 と-2，F-FVI-1 には，いずれもホルミ

Table I. The Host-Mediated Antitumor Effect of Some Fibrous Polysaccharides and Their Depolymerized Derivatives from *Grifola frondose*.

Polysaccharide	Dose (mg/kg/day)× 1	Average tumor diameter (mm) on day 25		Complete regression	result	ID_{50} (mg/kg)
		Treated/Control	Inhibition (%)			
FIV-1	10	19.0/20.3	6	0/5	−	——
	100	19.5/20.3	4	0/5	−	
FIV-2	10	14.9/20.3	27	1/5	±	48.5
	100	7.8/20.3	62	3/5	+	
FVI	10	21.3/20.3	− 5	0/5	−	——
	100	22.8/20.3	−12	0/5	−	
F-FIV-1	10	16.1/20.3	21	0/5	−	——
	100	10.5/20.3	48	2/5	±	
F-FIV-2	10	20.8/20.3	− 2	0/5	−	——
	100	10.7/20.3	47	2/5	±	
F-FVI	10	21.4/20.3	− 5	0/5	−	——
	100	22.0/20.3	− 8	0/5	−	
S-FIV-1	10	22.1/20.3	− 9	0/5	−	40.1
	100	2.8/20.3	86	4/5	++	
S-FIV-2	10	12.9/20.3	36	1/5	±	18.0
	100	0/20.3	100	5/5	+++	
S-FVI	10	23.5/20.3	−16	0/5	−	——
	100	21.8/20.3	− 7	0/5	−	

Sarcoma 180 cells (2×10^6) were inoculated subcutaneously into the breast region of female ICR/JCL mice. Administration of polysaccharide sample was carried out intraperitonealy on day 3. ID_{50} : Dose level (mg/kg, mice) that inhibits tumor growth in 50 % of the control.

When the suppression ratio of tumor proliferation (%) was 0～25 %, the antitumor activity was judged as not-effective (−), 26～50 % as slightly effective (±), 51～75 % as effective (+), 76～95 % as considerably effective (++) and 96～100 % as remarkably effective (+++).

Table II. Some Properties of Fibrous Glycans and Their Depolymerized Polysaccharides from *Grifola frondosa*.

	Glycan	Yield	$\overline{MW}$ $\times 10^{-4}$	N (%)	IR cm^{-1}	Hexosamine (% as $GlcNH_2$)	Hexuronic acid (% as GlcUA)	Protein (%) Lowry's	Total sugar (% as Glc)	Component Sugars (PPC and GLC)	$[\alpha]_D^{20}$ (NaOH)
Extracted (Original)		(% for Res. IV)									
	FIV-1	3.9	75	0.46	840, 890	—	3.4	0.8	92.2	Glc, Man, Xyl, Fuc	+26.5°
	FIV-2	21.8	43	0	890	—	1.6	—	94.4	Glc, Xyl	+5.4°
	FV-1	Nil									
	FV-2	Nil									
	FVI-1	10.3	—	5.95	890	95.4	0.6	0.3	—	$GlcNH_2$ ≫ Glc	
	Res. VII	Nil									
Depolymerized		(% for Original Fr.)									
	F-FIV-1	50.4	1.0	0	845, 890	—	9.9	—	92.0	Glc, Man, Xyl, Fuc	+53.9°
	S-FIV-2	69.1	2.4	0	890	—	1.2	—	98.7	Glc, Xyl	+10.2°
	S-FV-1	Nil									
	S-FV-2	Nil									
	S-FVI-1	53.5	—	5.71	910	95.5	0.1	0.1	—	$GlcNH_2$ ≫ Glc	

Table III. Methylation Analysis of Fibrous Glycans from *Grifola frondosa*.

Peak	Fraction[a]	T[b]	Methylation analysis (Molar ratio[c]) FIV-1	FIV-2	S-FIV-1	S-FIV-2
A	t-Glc	1.00	1	1	1	1
B	3-Glc	1.99	13	3	2	3
C	4-Glc	2.46	1	1	1	1
D	3,6-Glc	5.40	4	2	2	2
E	t-Xyl	0.68	2	1	1	1
F	4-Xyl	1.54	1	+	+	+
G	2,3-Man	3.30	+	−	−	−
H	2,4-Man	4.12	+	−	−	−
I	t-Fuc	0.64	+	−	−	−
J	4-Fuc	1.20	±	−	−	−

a A : Nonreducing terminal glucose (t-Glc), B : 3-linked glucose (3-Glc), C : 4-linked glucose (4-Glc), D : 3,6-dilinked glucose (3,6-Glc), E : Nonreducing terminal xylose (t-Xyl), F : 4-linked xylose (4-Xyl), G : 2,3-dilinked mannose (2,3-Man), H : 2,4-dilinked mannose (2,4-Man), I : Nonreducing terminal fucose (t-Fuc), J : 4-linked fucose (4-Fuc).

b Retention times of the corresponding alditol acetates on a 3% ECNSS-M column at 180°C, relative to 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol.

c Molar ratio were corrected by using the molar response-factors for partially methylated alditol acetate according to effective carbon response.[8]

ル基に基づく IR ν_{max}^{KBr} 1,720 cm^{-1}が認められる。いずれのF-F画分にも抗腫瘍活性は認められなかった。特に，活性の認められた原多糖から調製されたF-FIV-2では活性の低下消失が見られた。所が，脱ホルミル化された低分子多糖S-FIV-1には活性の発現が，S-FIV-2は活性の増大が見られたことは興味あることで注目したい。

ホルモリーシスによって，多糖の解重合が進行するとともに，構成糖残基へのホルミル基の導入と脱離が，多糖の構造特性と活性発現に微妙に関与していることが推定される。一方では，ホルモリーシスによって，多糖分子中の活性発現に関与していないヘテロ糖鎖が除去されたために，活性β-(1→3)-グルカンコアがむき出しになり，免疫細胞あるいは腫瘍細胞のレセプターとの反応性が増したために低分子多糖の活性が増大したのではないかとも考察される。委細は，別の側面からの検討に期待したい。

3．キトサン画分の抗腫瘍活性

Residue VIからキチンの溶剤[4]として報告されている5%LiCl-DMAAによって抽出されたFVI-1を得た。蛋白含量(Lowry法)0.3%と少ないが，元素分析によるN5.95%，構成糖として少量のGlcが検出されるが，$GlcNH_2$含量95.4%，IR-スペクトル(Fig. 4)，X線回折図(Fig. 5)ともにキトサンに一致することから，マイタケにキチン質の存在が明らかになった。霊芝の場合[1]と同様に，マイタケのキトサン画分には抗腫瘍活性は認められなかった。

他方では，動物起源のキチン，キトサン並びにそのN-アシル誘導体，キトオリゴ糖類には抗腫瘍活性，アジュバント活性(細胞免疫機能亢進効果)，血液凝固阻止活性[5~7]が報告されている。なお，動物起源のキチン質[5]と菌類起源のキチン質[2]とで抗腫瘍活性に相異が見られる原因については，今後の研究に待つものである。

なお，霊芝の場合と同様に，マイタケからもβ-(1→4)-D-グルカンである不溶性のα-セルロースは単離証明できなかった。

要　約

マイタケ(舞茸)を5%NaOH(80°C)，20%NaOH(30°C)および5%LiCl-DMAA(30°C)で順次抽出し，抽出液から酢酸-エタノール沈澱法とゲル濾過の組み合わせによって3種の多糖体(FIV-1，FIV-2およびFVI-1)を単離した。これらのうち，FIV-2には抗腫瘍活性(Sarcoma 180/マウス，ip法)が認められた。活性多糖体FIV-2は，$\overline{MW}$ 43万，$[\alpha]_D$ +5.4°(NaOH)，N　0%，少量のXyl末端基とヘキスロン酸残基を伴っているが，主鎖はβ-(1→6)分岐(分岐度約4，平均鎖長約8)を持つβ-(1→3)-D-グルカンの一種であった。

FIV-1およびFIV-2を蟻酸分解することによってホルミル化多糖と低分子多糖を調製した。抗腫瘍性を調べたところ，活性多糖体FIV-2から調製したホルミル化多糖F-FIV-2では活性が消失するが，脱ホルミル化された低分子多糖S-FIV-2では原多糖に比べて活性の増大が見られた。また，不活性多糖FIV-1から調製された低分子多糖S-FIV-1には，抗腫瘍活性の発現が見られた。

舞茸にはキチン質成分の存在が証明されたが，得られたキトサン画分(FVI-1，F-FVI-1およびS-FVI-1)には抗腫瘍活性は認められなかった。

舞茸にはα-セルロースは存在しない。

謝　辞

終わりに，舞茸を提供下さったフジ製糖㈱，制癌試験をお願いした三共㈱生物研究所，元素分析とNMRを測定下さった同社分析代謝研究所，X線回折分析を教示下さった本学農林地質学研究室に併せて心から深謝致します。

本報告の大要は，1986年7月2日，第9回糖質シンポジウム(東京)において発表した。

文　献

(1) 水野　卓，大沢啓子，萩原直美，久保田玲子：静岡大農研報，35，49(1985)；*Agric. Biol. Chem.*, 50, 1679 (1986).

(2) 水野　卓，加藤尚美，戸塚篤史，竹中一秀，新海健吉，清水雅子：農化，58，871(1984)；水野　卓，鈴木絵理，牧　浩司，田牧秀男：農化，59，1143(1985)；水野　卓，狭間利祐，水野希美：第9回糖質シンポジウム講演要旨集，A-05，p. 11 (1986)〔東京〕.

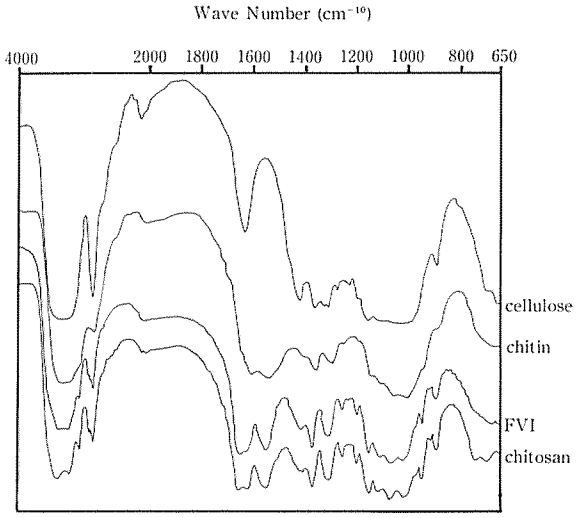

Fig. 4. IR-Spectra of FVI from *Grifola frondosa*, Cellulose, Chitin and Chitosan.

(3) G.V. Vahouny edited: The Latest Finding Dietary Fiber, Basic and Clinical Aspects, pp. 1～586 (1985), Plenum Publishing Co., New York.

(4) P.R. Austin, C.J. Brine, J.E. Castle and J.P. Zikakis: *Science*, 212, 749 (1981).

(5) 鈴木茂生ら：Chitin and Chitosan, p. 210 (1982)；第8回糖質シンポジウム講演要旨集, p. 57 (1985)；Glycoconjugates, p. 580 (1985)；*Carbohydr. Res.*, 151, 403 (1986)；K. Nishimura et al: *Vaccine*, 2, 93 (1984).

(6) A.E. Sirica and R.J. Woodman: *J. Natl. Can. Inst.*, 47, 377 (1971).

(7) H. Horton and E.K. Just: *Carbohydr. Res.*, 29, 173 (1973).

(8) D.P. Sweet, R.H. Shapiro and P. Albersheim: *Carbohydr. Res.*, 40, 217 (1975).

(9) 水野　卓，狭間利祐：静岡大農研報, 36, 77 (1986).

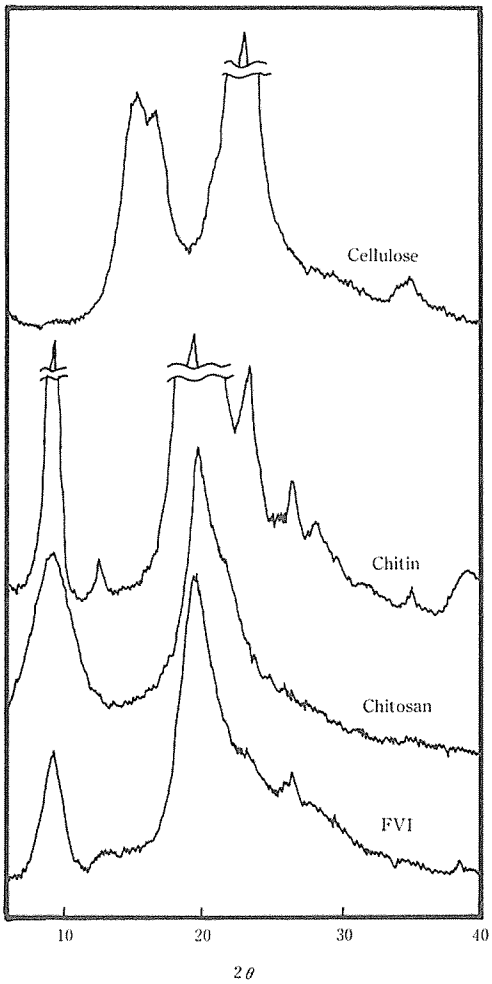

Fig. 5. Powder X-Ray Diffraction Patterns of Fibrous Polysaccharide from *Grifona frondosa*.