ワラビ精製物の構成成分について†

川 村 美笑子*, 阿 部 捷 男

平 見 嘉 彦, 木 村 修 一**

高知女子大学家政学部栄養化学 ** 東北大学農学部栄養化学

* 現在 大阪市立大学生生活科学部栄養生理

On the Component of Purified Effective Product in Bracken

Mieko KAWAMURA,* Katsuo ABE

Yoshihiko HIRAMI, Shuichi KIMURA**

Laboratory of Nutritional Chemistry, Kochi Women's College, Eikokuji-cho, Kochi

*** Laboratory of Nutrition, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Amamiya-cho, Sendai*

** Faculty of Life Science of Living, Osaka City University*

In the previous paper, a water soluble substance having protective effect for L-ascorbic acid oxidation with copper was isolated from young fronds of bracken.

This paper deals with the gel filtration of the crude effective product treated with pronase by Sepharose-6B and DEAE Sephadex A-50. Purified substance was analyzed by ultracentrifugation, electrophoresis, paper chromatography, ultraviolet spectra and elementary analysis. From these experiments, we assumed that the effective component was acidic polysaccharide including nucleic acid and its decomposition product. It was presumed that protective effect was owing to the copper chelating properties, especially the copper-base chelating than an antioxidant characteristics.

(Received February 9, 1977)

著者らは、前報¹⁾²⁾において、ワラビより L-AsA 酸化抑制効果を有する物質を分離し、数種の酵素処理を行ない、有効物質がいかなるものかについて検討した。ついで、L-AsA 酸化抑制効果の低下をみないプロナーゼ処理のものを Sepharose-6B によって精製を行なった。

今回は、さらにゲル濾過、イオン吸着クロマトグラフィーによる精製を行ない、そのクロマト的単一のものにつき、超遠心分析、ディスク電気泳動、紫外線吸収スペクトル測定、ペーパークロマトグラフィーによる検討を行ない、その均一性および性質につき調べ、有効物は、核酸および核酸の分解物を含み酸性糖を多く有する多糖類ではないかと推察した。

実 験 方 法

1. ゲル濾過

Sepharose-6B (Pharmacia 40-210 μ) のカラム (2.2 $\times$ 88cm) を 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で調製し、

† 銅イオン触媒による L-アスコルビン酸酸化を抑制する物質のワラビ中の存在について (第3報)
On a Protecting Factor for the Oxidation of L-Ascorbic Acid in Model Systems Associated with *Pteridium aquilinum* Kuhn. (No. 3)

〒 780 高知市永国寺町 5-15

** 〒 980 仙台市堤通雨宮町 1-1

* 〒 558 大阪市住吉区杉本町 459

これに試料 29 mg を含むリン酸緩衝液を添加し、同緩衝液で溶出した。溶出条件は 19 ml/hr とし、1 フラクション 5 ml とした。

2. イオン吸着クロマトグラフィー

Sepharose-6B ゲル濾過より得られた有効分画をさらに DEAE Sephadex A-50 により精製を行なった。有効分画を透析し、凍結乾燥後、1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) で調整したカラム (2.1 $\times$ 45.5 cm) に吸着させた。同緩衝液 100 ml でカラムを流したのち、23 ml/hr で塩化ナトリウムの濃度変化による溶出を行なった。さらに、0.01 M の塩酸および水酸化ナトリウム溶液中での塩化ナトリウムの濃度変化による溶出を行なった。

3. ペーパークロマトグラフィー

精製した物質について、酸およびアルカリ加水分解を行ない、ペーパークロマトグラフィーにより検討した。使用した試料は、DEAE Sephadex A-50 の精製より得た白色粉末を用いた。加水分解の条件は、次のように行ない処理した。酸分解は、1 N 塩酸および 6 N 塩酸を用いたが、前者は、50 μ l 中に試料 1 mg を含むように調製し、100°C で 1 時間加熱後、分解液をそのまま用いた。後者は、300 μ l 中に 1 mg を含むように調製し、N₂ ガスで CO₂ ガスを除き、100°C で 3 時間加熱を行ない、分解液を水酸化ナトリウム上で蒸発乾固後、0.1 N 塩酸

50 μ l に溶かして用いた。アルカリ分解は、0.3 N 水酸化カリウム溶液 50 μ l 中に 1 mg を含むように調製し、37°C, 18 時間加水分解を行ない分解液を過塩素酸で中和し、生ずる沈澱を除きその濾液を用いた。展開溶媒は、(iso-プロピルアルコール 8 : ピリジン 8 : 酢酸 1 : 水 4) を用いた。

4. 電気泳動

ディスク電気泳動は、6.0 $\times$ 70 mm のガラス管を使用した。試料は、0.1 M ショ糖を含むトリス-グリシン緩衝液に 0.5% 濃度に溶かしたものを使用した。この溶液 25 μ l (100 γ) を添加し、泳動したものが Fig. 6. である。アクリルアミドゲルは、3.5% のポリアクリルアミドを用い、泳動は、トリス-グリシン緩衝液 (トリスアミノメタン 6.0 g, グリシン 28.8 g, 水 1 l, pH 8.6) 中で 1 時間 30 分行ない、定電圧 200 V で行なった。

5. 分析法

精製された物質につき、紫外の吸収スペクトルを測定し、また超遠心分析、元素分析等を測定した。

実験結果

1. ゲル濾過

前報において、有効物をプロナーゼ処理し、さらに、

Fig. 1. Elution profiles of product I treated with pronase after twice gel filtration by Sepharose-6B.

Gel filtration of product I treated with pronase on a sepharose-6B column (2.2 $\times$ 88cm). The sample was prepared from approximately 29 mg was applied to the column equilibrated with 1/15 M phosphate buffer (pH 6.0). The column was eluted with the same solution at a flow rate of 19 ml/hr at 25°C. Fraction of 5 ml were collected and absorbance was read at 260 nm and 280 nm. Aliquots of 3 ml were used to determine the activity.

Sepharose-6B カラムによる精製を行なった。これより得られた有効分画 b について、同カラムによる再クロマトを行ない。Fig. 1 に示すようなパターンを得た。L-AsA 酸化抑制効果は b-II にのみあり、クロマト的にはほぼ単一のピークが得られた。

2. イオン吸着クロマトグラフィー

Sepharose-6B による再クロマトより得た有効分画 b-II について、さらに、DEAE Sephadex A-50 による精製を試みた。塩化ナトリウムの濃度変化による溶出を行なった。その溶出曲線は Fig. 2 に示すようである。すなわち、分画 1 ~ 8 が得られたが、L-AsA 酸化抑制効果は分画 2 のみあった。

酵素処理、ゲル濾過、イオン吸着クロマトグラフィーによる精製過程を Table 1 に示す。また、分画 2 のクロマト的に単一の有効物につき超遠心分析を行ない。Fig. 3 に示す。元素分析値は、炭素 2.46%, 水素 2.25%, 窒素 0.77% であった。

3. ペーパークロマトグラフィー

Fig. 4 に示すように分画 2 は紫外線吸収がえられ、またアルカリ性硝酸銀試薬、ドラージェンドルフ試薬、ハンス試薬による発色がみられた。なお、ニンヒドリン試薬による発色は認められなかった。

Fig. 2. Chromatography of the fraction b-II with DEAE Sephadex A-50.

The fraction b-II (70 mg) obtained after Sepharose-6B gel filtration was chromatographed on the DEAE Sephadex A-50 column. Elution was performed with stepwise of NaCl as shown. Fraction of 5 ml were collected and absorbance was read at 260 nm and 280 nm.

a: 1/15 M phosphate buffer (pH 6.0), b: 0.5 M NaCl in a, c: 1.5 M NaCl in a, d: 2.5 M NaCl in a, e: 0.5 M NaCl in 0.01 M NaHO, f: 1.5 M NaCl in 0.01 M NaOH, g: 2.5 M NaCl in 0.01 M NaOH.

Table 1. Purification of product I from *Pteridium aquilinum* Kuhn.

Sample	Volume (g)	A_{280}/A_{260}	Dry yield (%)	
Raw sample	15.789	—	100 (raw)	—
Dry sample	1.579	—	10	100
Crude extract	0.100	0.84	0.6	6.3
Treated with pronase, dialysis and freeze drying	0.057	0.79	0.4	3.6
Sephadex-6B	0.029	0.54	0.2	1.8
re Sephadex-6B	0.015	0.51	0.1	1.0
DEAE Sephadex A-50	0.012	0.49	0.1	1.0

Fig. 3. Sedimentation pattern of purified product I.

The direction of sedimentation is from left to right. Photographs are shown at 16, 25 and 34 min after attaining a speed of 55,430 rpm. The concentration (Purified product I) was 6.2 mg per ml in phosphate buffer (pH 6.0). The temperature was 10.2°C.

Fig. 4. Paper chromatograms of hydrolytic fraction 2 (DEAE Sephadex A-50).

Hydrolysis was carried out as follows. DEAE Sephadex A-50 fraction 2 was heated for 1 hour at 100°C in respectively 1N-HCl and 6N-HCl, for 18 hours at 37°C in 0.3N-KOH.

4. 紫外吸収スペクトル

Fig. 5 に、粗有効抽出物、その最終精製物および加水分解後のペーパークロマトグラフィーより得られた紫外吸収部のスペクトルを示す。ペーパーより水で溶出した紫外吸収部のスペクトルは、ポリスクレオチドの塩基

Fig. 5. The absorption spectrum of effective product I.

(a): Product I, (b): DEAE Sephadex A-50 fraction 2, (c): Eluants of ultraviolet absorption on paper chromatograms.

Fig. 6. Disc gel electrophoretic patterns and densitometric scan of purified effective product I.

Polyacrylamide gel electrophoresis of purified effective product. (a), (b) and (c) didn't show a band when stained for protein with coomossie brilliant blue. (a) and (b) show a single band, (c) show two band when stained for carbohydrate with pas reagent.

(a) : Twice gel filtration by Sepharose-6B fraction b-II, (b) : DEAE Sephadex A-50 fraction 2, (c) : Fraction 2 treated with sonic.

組成分析の方法³⁾により取り出したプリン画分と同一であった。また、このプリン画分には L-AsA 酸化抑制効果がみられ、ピリミジン分画部には、効果はみられなかった⁴⁾。

5. ディスク電気泳動

Fig. 6 は (I) 再 Sepharose-6B, (II) DEAE Sephadex A-50 および (III) DEAE Sephadex A-50 処理後のものを超音波処理したものの、電気泳動パターンおよび泳動図を示す。電気泳動バンドは、(I) は二つであり、さらに精製された (II) は一つである。しかし、(II) を超音波処理した (III) は 2 バンドを示した。

考 察

前報において得られたところの、Sepharose-6B カラムによる精製物を、さらに、同カラムにより再クロマトを行ない、クロマト的に単一なものを得た。しかしながら、電気泳動においては、PAS 試薬による二つの染色バンドがみられたことや、超遠心分析から推察して単一と思われないので、さらに、DEAE・Sephadex A-50 による精製を試みた。このイオン吸着クロマトグラフィーにおいて、2.5 M NaCl-リン酸緩衝液 (pH 6.0) で溶出された有効画分は、電気泳動においても一つバンドを示し、超遠心分析からも均一なものと考えられる。

一般に、核酸を加水分解すると、DNA は、酸分解 (6N-HCl) により塩基にまで、RNA は、酸分解 (1N-HCl) によってプリン塩基とピリミジンモノヌクレオチドにまで、あるいは、アルカリ分解 (0.3N-KOH) によってすべてをモノヌクレオチドにまで分解される。均一と思われる有効物を、同条件で加水分解を行なった物のペーパークロマトグラフィーの結果は、アルカリ性硝酸

銀試薬、ドラージェンドルフ試薬、ハンス試薬による発色を示し、おのおの、還元糖、N を含む化合物、P を含む化合物の存在が予想される。また、いずれの場合にも、紫外線検出器により、展開ペーパー上に黒い quenching spot が検出され、プリン、ピリミジン塩基はもちろん、ヌクレオシド、ヌクレオチド等の存在が推測される。

精製された有効画分は、257 nm 付近に特性吸収をもち、類似の吸収をもつ quenching spot の溶出液は、ポリヌクレオチドの塩基組成分析の方法によって得たプリン分画と一致し、一部は、ペントース発色と重なった。

前報および、以上の結果を総合すると、精製された有効物は、核酸あるいはその分解物を含む酸性糖を主とした化合物であろうと思われる。Duncan⁵⁾ は、ワラビの根において、ヌクレオチドの 80% はウリジン誘導体であり、残りの 12% はグアノシン、8% はアデノシン化合物であると報告している。また、Jarris⁶⁾ は、根と若い葉より、水溶性の酸性多糖類の存在を確認している。従来、アスコルビン酸酸化抑制物質として、チオ尿素、リン酸塩、食塩、アミノ酸、糖類、デンプン、ゼラチン、アラビアゴム、ペクチン等が知られているが、今回のワラビの精製された有効物の酸化抑制作用は、その構成成分として含まれると推測される核酸および核酸関連化合物質と Cu^{2+} 錯体形成、とくに、塩基との Cu^{2+} 錯体に起因するものと考えられる。しかしながら、ほかの構成成分、たとえば、酸性多糖類のような物質との相乗効果等に関しては、明らかではなく、今後の検討を必要とする。

要 約

前報より、ひき続いて精製を行ない、次の結果を得

た。

1. Sepharose-6B による再クロマト DEAE Sephadex A-50 による精製を行ない、クロマト的に単一な有効物を得る。

2. この精製物は、超遠心的・ディスク電気泳動的には均一であり、ペーパークロマトグラフィーにより検討した結果、核酸あるいはその分解物を含む酸性糖を主とした多糖の可能性であることが示された。

最後に、本研究を行なうにあたり機器測定の労をとられた東北大学農学部菊地愛子氏、高原英成氏、同薬学部堀江孝氏に感謝します。

本報告の一部は、日本ビタミン学会第 28 回大会（仙台，昭和51年4月24日）において発表した。

文 献

- 1) 川村美笑子，阿部捷男，平見嘉彦：栄養と食糧，**30**, 395 (1977)
- 2) 川村美笑子，阿部捷男，平見嘉彦，木村修一：栄養と食糧，**30**, 399 (1977)
- 3) 日本化学会編：実験化学講座 23, 生物化学 I, 327 (1957)
- 4) 第29回日本ビタミン学会（昭 52.6.3. 京都）口頭発表
- 5) Duncan, H.J.: *J. Sci. Fd Agric.*, **25**, 211 (1974)
- 6) Michael, C. Jarris and Duncan, H. J.: *Phytochemistry*, **15**, 171 (1976)

（昭和52年2月9日受理）