スピルリナ (*Spirulina maxima*) の細胞壁多糖の化学的性質

片岡 直子*, 行友 圭子**, 岡崎 裕子*, 三崎 旭*

* 大阪市立大学生活科学部

** 現 広島大学教育学部

Chemical Characterization of Cell Wall Polysaccharides of *Spirulina maxima*

Naoko KATAOKA,* Keiko IKUTOMO,**

Yuko OKAZAKI* and Akira MISAKI*

* Department of Food and Nutrition, Faculty of Science of Living, Osaka City University, Osaka 558

** Faculty of Education, Hiroshima University, Fukuyama 720

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 40, 381~390 (1987)

A series of heteropolysaccharides were isolated from the delipidated cell wall fraction of *Spirulina maxima*, by successive extractions with cold and hot water, and then with cold and hot alkali. These polysaccharides had similar carbohydrate compositions, containing L-rhamnose as the main component, and D-galactose, D-glucose, D-mannose and D-glucuronic acid, although the proportions of these components appeared to vary according to the extraction conditions employed. Methylation and Smith degradation studies indicated that they had essentially similar structural features, containing a backbone chain of α -(1 $\rightarrow$ 3)-linked L-rhamnose residues, some of which were substituted with other sugar residues at the C-2 and C-4 positions. The side-chains were shown to consist of (1 $\rightarrow$ 3)-, and (1 $\rightarrow$ 4)-linked D-glucose and D-mannose residues, and (1 $\rightarrow$ 4)-linked D-galactose residues; most of the D-glucuronic acid residues were found to be located at the terminal ends. A highly branched glycogen-type α -D-glucan was also isolated from the water extract of the crude cell wall preparation. Methylation and gel filtration studies, involving the action of debranching enzymes, showed that the lengths of the α -(1 $\rightarrow$ 4)-linked unit chains of the D-glucose residues were distributed in the range of DP 3 to 14. The insoluble residues remaining after hot alkali treatment of the cell wall contained D-glucosamine and muramic acid, in addition to several kinds of amino acids, suggesting the presence of a peptidoglycan, similar to that of bacterial cell walls.

(Received January 8, 1987)

多くの可食性藻類のなかで、将来のタンパク質源として栄養的観点から興味をもたれているスピルリナ (*Spirulina*) は、光合成により、重炭酸イオンの豊富なアフリカ中南米などの塩湖に繁殖する藍藻の一種であり、古くからこれらの地方では食糧として利用されてきた。現在、主として、*S. maxima* および *S. platensis* が工業的規模で培養生産されているが、これらの藻体は、タンパク質 60~70%、脂質 5~8%、糖質 12~17%、灰分 4~7% のほか、カロチノイドを主としたビタミンを豊富に含む。このような構成成分、とくに、消化性の良いタンパク質を多量に含むといわれることから、スピルリナは新しい食糧源として、タンパク質、ビタミンを中心に過去 20 年間、多くの栄養学的研究がなされてき

た^{2)~5)}。

しかし、その糖質成分に関しては、*S. platensis* について、二、三の遊離糖の存在⁶⁾、グルカン^{6)~8)}、グルコサミンと脂肪酸を含むリポ多糖⁹⁾、あるいは細菌細胞壁に似たペプチドグリカンの存在¹⁰⁾などを示唆する報告がなされているが、未だ細胞壁の多糖の化学的特性についての明確な知見は得られていない。

われわれは、ラセン状のスピルリナ藻体が、クロレラに比べて消化性の良いこと、およびダイエタリーファイバーとしての利用の観点から、その細胞壁多糖について興味をもち研究を行ってきた。

糖脂質に関しては先に、*S. maxima* の藻体の超音波処理で得た粗細胞壁から抽出された脂質画分より、おもに 3 種の糖脂質を分離精製し、それらが、O- β -D-galactosyl-1-(1 $\rightarrow$ 1')-2',3'-diacylglycerol, O- α -D-galactosyl-

* 〒558 大阪市住吉区杉本 3-3-138

** 〒720 福山市緑町 2-17

1→6)-O-β-D-galactosyl-(1-1')-2',3'-diacylglycerol および 6-sulfo-O-α-quinovosyl-(1→1')-2',3'-diacylglycerol であることを明らかにした¹⁰⁾。

本報では、主として、*S. maxima* の脱脂細胞壁について、多糖を分画し、それらの構造について若干の知見を得たのでその結果を報告する。

実験方法

1. 脱脂細胞壁の調製および分画

細胞壁の調製は、超音波処理による菌体の破碎と遠心分離により行った。市販の *S. maxima* の乾燥藻体(メキシコ産, ラック社製 150 g) を、生理食塩水を含む 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 1.5 l に懸濁し、5°C で超音波処理 (20 kHz, 5 分, 5 回) により細胞を破碎し、遠心分離 (10,000rpm, 30 分) 後、不溶性の粗細胞壁画分を集めた。これを蒸留水で洗浄後、凍結乾燥した (収量 60.7 g, 収率 40.5%)。また、*S. platensis* の培養藻体についても、同様の操作を行い、藻体の乾燥重量 (10.5 g) から粗細胞壁 (3.2 g) を得た (収率 31.1%)。

この細胞壁画分 (40 g) をクロロホルム-メタノール (1:1) 600 ml に懸濁し、24 時間攪拌、濾別する操作を 2 回、同混液 (2:1) 600 ml で 1 回行った。残渣をさらに、エタノールで同様に抽出処理した後、エタノールで 5 時間、還流下に加熱抽出、濾別する操作を 5 回繰り返して脱脂細胞壁 (29.8 g) を得た。

上述の脱脂細胞壁 (20 g) を 0.015 M 塩化カルシウムを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.8) 400 ml に懸濁し、Actinase (科研製薬株式会社製, 150 mg) を加え、30°C で 72 時間、作用させた。反応液を、85°C で 5 分間加熱することにより酵素を失活させ、遠心分離 (12,000rpm, 15 分) で可溶性と不溶性の両画分に分けた。可溶性画分は、一晚、流水透析後、濃縮し、3 倍容のエタノール中に加え、多糖を沈澱させた。生じた沈澱を、遠心分離、蒸留水透析後、凍結乾燥し、水抽出画分 (1.21 g) を得た。

不溶残渣は、蒸留水 400 ml に懸濁し、120°C で 20 分間オートクレーブした後、遠心分離する操作を 2 回繰り返した。集めた可溶性画分から、水抽出画分と同様の操作により、熱水抽出画分 (0.87 g) を得た。

さらに、不溶残渣について冷アルカリ抽出を行った。すなわち、不溶残渣を、水素化ホウ素ナトリウムを含む 1 M 水酸化ナトリウム (140 ml) に懸濁し、窒素気流下、室温で 2 時間攪拌後、遠心分離する操作を 2 回繰り返した。可溶性画分は酢酸で中和後、水抽出画分と同操作により、アルカリ抽出画分 (1.60 g) を得た。

アルカリ不溶残渣は、水に懸濁して中和後、透析を行い、凍結乾燥して、アルカリ抽出残渣 (2.36 g) を得た。

2. 脱脂細胞壁のグリコーゲン様多糖の分離

上記の分画とは別に、1. で得られた脱脂細胞壁粗製物 (20 g) を蒸留水に懸濁し、30°C, 72 時間、攪拌した後、遠心分離する操作を 2 回繰り返す、主としてグリコーゲン様多糖を含む水溶性画分を得た。透析、エタノール沈澱後、凍結乾燥し、多糖 (1.22 g) を得た。

3. 一般分析

窒素含量はセミマイクロケルダール法¹¹⁾により、全糖量はフェノール硫酸法¹²⁾により測定した。灰分は試料を完全に灰化処理して重量を測定した。

アミノ酸の分析において、塩基性アミノ酸はクエン酸ナトリウム緩衝液、酸性アミノ酸はクエン酸リチウム緩衝液を用いて、アミノ酸自動分析機 (日本電子 JLC-6A H 型) で分析した。

4. 構成糖の分析

試料を 72% 硫酸に溶解後、蒸留水で 7 倍に希釈し、オイルバス中にて、100°C, 6 時間加水分解を行った。加水分解物は、炭酸バリウムで中和後、遠心分離で硫酸バリウムを除去し、上清を IR-120 (H⁺) 型カラムに通過させ脱塩後、分析に供した。

加水分解物の一部はペーパー・クロマトグラフィー (PPC) (展開溶媒、1-ブタノール:ピリジン:水=6:4:3) に供し、残りはガスクロマトグラフィー (GLC) 用のサンプルとした。

PPC 上の糖の発色には、硝酸銀試薬¹³⁾または、*p*-アニジジン試薬¹⁴⁾を用いた。

GLC 用の中性糖試料は、水素化ホウ素ナトリウムにてアルジトールに還元し (室温、一晚)、IR-120 (H⁺) 型樹脂にて過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解、脱カチオン後、残ったホウ酸を、メタノールを加えてホウ酸メチルとして減圧除去した。その後、無水酢酸、ピリジンにてアセチル化後 (100°C, 2 時間)、アルジトール・アセテート誘導体として GLC 分析に供した。GLC は、日立ガスクロマトグラフ 163 型、水素イオン化検出器 (FID) を用い、カラムは 3% ECNSS-M on Chromosorb W をガラスカラム (0.4×200 cm) に充填したものを用いた。カラム温度は 190°C であり、キャリアガスとして窒素を 50 ml/min の流速で流した。

5. 多糖のメチル化分析

多糖中の糖残基の結合様式を知る目的で、箱守法によるメチル化分析¹⁵⁾を行った。多糖試料 (5 mg) をジメチルスルフォキシド (2 ml) に溶解し、窒素置換をしたバイアル中で、カルバニオン試薬 (0.5 ml) およびヨウ化メチル (1.5 ml) により、赤外吸収による水酸基の吸収がなくなるまで数回メチル化を繰り返して行った。メチル化多糖の一部は、90% ギ酸 (100°C, 12 時間)、ついで 2 M トリフルオロ酢酸 (100°C, 6 時間) にて加水分解

し、前述の構成糖の分析と同様にアルジトール・アセテート誘導体として GLC 分析に供した。カラムは 3%-ECNSS-M on Gaschrom Q (2 m) (カラム温度, 180°C) および, CP-Sil 88 キャピラリーカラム (25 m) (カラム温度, 180°C) を用いた。

6. 多糖のスミス分解¹⁶⁾¹⁷⁾

多糖を過ヨウ素酸酸化後, 完全スミス分解を行った。

試料 (50~100 mg) を 0.05 M 過ヨウ素酸ナトリウムに溶かし, 暗所 4°C で 7 日間酸化した。酸化終了後, エチレングリコール 1.0 ml を加え, 過剰の過ヨウ素酸を分解し, 5°C で一晩透析した。透析内液にアンモニア水を加え, 弱アルカリにした後, 水素化ホウ素ナトリウム (約 20 mg) を加え, 室温で一晩放置し, 多糖ポリアルコールに還元した。還元後, 酢酸で中和し, 蒸留水透析した。

多糖ポリアルコール (5 mg) を 1 M 硫酸で, 100°C, 6 時間加水分解後, 中和し, 前述の方法に従って, 一部は PPC に, 残りはアルジトール・アセテートとして GLC 分析に供した。

7. アミノ糖の定量と同定

アルカリ抽出残渣中のアミノ糖の分析のために, 試料を 6 M 塩酸で, 100°C, 6 時間加水分解した。反応液に水を加えて塩酸を減圧除去した後, 0.1 M 水酸化ナトリウムで pH 8~9 に調整し, 室温で 1~2 時間静置したのち, 0.1 M 塩酸で pH 6~7 に戻し, 共試液とした。

アミノ糖の定量はモルガン-エルソン法¹⁸⁾¹⁹⁾で行った。

アミノ糖の同定は, まず, PPC により行った。展開溶媒は, 1-ブタノール:酢酸:水=60:15:25, 1-ブタノール:ピリジン:水=6:4:3 の 2 種類について行った。アミノ糖の検出には, 硝酸銀試薬¹³⁾とニンヒドリン試薬²⁰⁾を用いた。

さらに, アミノ糖塩酸塩を, トリメチルシリル (TMS) 化後, GLC 分析を行った。TMS 化は, *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (BSTFA, 0.1 ml), 無水ピリジン (0.1 ml) 中で, 60°C, 20 分間加熱して行った。反応液はトルエンと共沸させ, 溶媒を減圧除去し, GLC に供した。用いたカラムは, 3% OV-1 Chromosorb W (1 m) であり, カラム温度は 140°C から 200°C まで 2°C/min の速度で昇温した。

8. ウロン酸の定量と同定

ウロン酸の定量は, カルバゾール法²¹⁾で行った。

ウロン酸の同定のため, 酸性多糖試料を 5% 塩化水素メタノール中で, 100°C, 6 時間加熱することによりメタノリシスし, 炭酸銀で中和後, 前述と同様に, TMS 誘導体とし, GLC 分析に供した。カラムは, 3% OV-1 Chromosorb W (1 m) を用い, 140°C から 160°C まで 0.5°C/min の速度で昇温した。

Table 1. Chemical compositions of cell wall from *S. maxima*.

Component	<i>S. maxima</i> cell wall (%)
Protein (Nx 6.25)	60.0
Lipid	23.5
Carbohydrate	10.3
Ash	6.2

結 果

1. 脱脂細胞壁の調製

スピルリナの細胞壁多糖の分離には, 主としてメキシコ産の市販の *S. maxima* の乾燥藻体を用いたが, 比較のために, *S. platensis* を光の存在下に重炭酸ナトリウムを主成分とする培地で 4 週間通気培養して藻体を調製した (収量; 2 l 培養液より乾燥重量 10.4 g)。

これら 2 種の藻体を生理食塩水を含む pH 8.0 の 0.05 M リン酸緩衝液中で 5°C で超音波処理 (20 kHz, 5 分, 5 回) した後, 遠心分離により不溶性の粗細胞壁画分を分離した。藻体細胞は, 超音波処理により比較的破壊されやすいことを顕微鏡観察により確かめた。

Table 1 には, *S. maxima* の細胞壁の成分組成を示した。処理前の全藻体の成分組成は, 粗タンパク質, 64.2%, 脂質, 5.0%, 炭水化物, 16.9%, 灰分, 6.6%, 粗繊維, 0.5%, (その他に, 水分, 4.2%) とされているが, ここで得られた細胞壁においても, 窒素分の定量結果は, タンパク質含量 60% に相当する。一方, 炭水化物含量は 10.3% であり, 糖含量が比較的少ないことを示している。また, 脂質が, 細胞壁では 23.5% と, 全藻体に比べて高くなっていた。

脂質の含量の高いことから, *S. maxima* の粗細胞壁画分 (40 g) を, クロロホルム-メタノール (1:1) 混液中, 室温で 24 時間処理を行った後, 熱エタノールで 5 時間の還流を 5 回繰り返して脂質を除き, 脱脂細胞壁画分 (29.8 g) を得た。*S. platensis* の培養藻体についても, 同様の結果を得た。

Table 2 に, これら 2 種の藻体の細胞壁と脱脂後のそれとの糖組成を比較して示した。この結果より, いずれの藻体も, 脱脂処理によりガラクトースが著しく減少した。これは, 前報で明らかにしたように, ガラクトースが主として, モノガラクトシルグリセリドなどの糖脂質として存在しているためと考えられる¹⁰⁾。

2. 脱脂細胞壁の分画と糖組成

S. maxima の脱脂細胞壁を, 実験方法に従って分画し, Actinase 消化後に可溶化された水抽出画分, さらにその残渣を, 熱水, 1 M 水酸化ナトリウムで逐次抽出

Table 2. Carbohydrate compositions of cell walls of *S. platensis* and *S. maxima*.

	<i>S. platensis</i>		<i>S. maxima</i>		
	Cell wall	After delipidation	Cell wall	After delipidation	CHCl ₃ -MeOH extract
Total carbohydrate (%) [*]	22.1	33.2	9.6	7.0	14.8
Compositions of neutral carbohydrates (%)					
Rhamnose	2.8	2.5	2.1	1.5	—
Fucose	2.7	2.4	—	—	1.7
Xylose	5.6	9.6	—	—	—
Mannose	—	—	6.1	3.3	1.2
Galactose	27.8	12.0	20.4	2.5	91.5
Glucose	61.1	73.5	71.4	92.7	5.6

^{*} Determined by the phenol-sulfuric acid method.

Table 3. Fractionation of cell wall polysaccharides of *S. maxima*.

Polysaccharide fraction	Yield ^{a)} (g)	Neutral carbohydrate (%)					Uronic acid ^{b)} (%)
		Rham	Xyl	Man	Gal	Glc	
PS	1.21	64.0	4.2	9.9	8.0	13.9	16.0
HWS	0.87	45.0	5.2	10.7	26.6	12.5	11.4
CAS	1.60	81.0	0.0	6.5	9.2	3.3	3.9
Residue	2.36	31.4	0.7	37.8	7.9	22.2	

(Rham : rhamnose, Xyl : xylose, Man : mannose, Gal : galactose, Glc : glucose)

PS : Water-soluble polysaccharide after Actinase digestion.

HWS : Hot water-extracted polysaccharide.

CAS : Cold alkali-extracted polysaccharide.

^{a)} Starting material : 20 g of the delipidated cell wall.

^{b)} Determined by the carbazol method.

して得られた画分と残渣の計、4種の細胞壁多糖画分を得た。これらの各画分の収量と構成糖を Table 3 に示す。構成糖分析結果より、すべての抽出画分において、ラムノースの占める割合が大きいがわかる。その他の糖として、マンノース、ガラクトース、グルコースが存在し、少量のキシロースと、微量ながら、フコースも含まれている。さらに、ウロン酸がいずれの画分にも存在し、スピルリナの細胞壁多糖の構成が多様であることを示唆している。

また、ウロン酸の種類を知るために、Actinase 消化後の水抽出性多糖と熱水抽出性多糖をそれぞれ、メタノリシスし、メチルグリコシドを TMS 誘導体とし、GLC 分析を行った。その結果、グルクロン酸のメチルグリコシドメチルエステルに相当する二つのピーク (β -メチルグリコシドに対する相対保持時間、 α -アノマー : Tg = 1.04, β -アノマー : Tg = 0.57) が確認され、ウロン酸は、グルクロン酸と同定された。

一方、*S. platensis* の細胞壁中に、*N*-アセチルグルコサミンとムラミン酸が含まれ、それらがペプチドと結合して細菌細胞壁と類似のペプチドグリカンを形成しているという報告がある⁶⁾。そこで、われわれの得た *S. maxima* の細胞壁について、アルカリ抽出後の残渣を、さらに熱アルカリ抽出 (1M 水酸化ナトリウム, 70°C, 2時間, 2回) し、その残渣 (熱アルカリ不溶性画分, 脱脂細胞壁 20g に対し, 収量 1.70g) について、6M 塩酸中で、100°C, 6時間加水分解後、モルガン-エルソン法¹⁸⁾¹⁹⁾で、アミノ糖を定量した結果、*N*-アセチルグルコサミンとして 9.3% 含まれることがわかった。

3. 脱脂細胞壁のグリコーゲン様多糖の化学的性質

藍藻類を光の存在下に培養すると、デンプンではなく、グリコーゲン様多糖を蓄積することが報告されている²²⁾。そこで、*S. maxima* についても、細胞壁多糖の画分とは別に、脱脂した粗製の細胞壁から水抽出により、グリコーゲン様多糖を分離調製した。

Table 4. Identification and molar proportions of the hydrolysis products of the methylated water-extracted polysaccharides.

O-Methyl sugar	Linkage indicated	Molar proportion (%)
2, 3, 4, 6-Me ₄ -Glc and/or 2, 4-Me ₂ -Rham	[Glc]1→ →3[Rham]1→	21.8
2, 3, 4-Me ₃ -Rham	[Rham]1→	1.6
2, 3, 6-Me ₃ -Glc	→4[Glc]1→	67.0
2, 3-Me ₂ -Glc	→4[Glc]1→ 6 ↑	9.6

この画分の構成糖は、グルコースが主体 (78.7%) であるが、その他に、ラムノース (15.6%), キシロース (0.9%), マンノース (4.8%) も存在し、さらに少量のウロン酸も含まれていた。

箱守法¹⁵⁾によるメチル化分析の結果 (Table 4) から、グルコース残基は (1→4) 結合であり、その C-6 位で分岐した枝分かれ構造をとることがわかった。その他に少量のメチル化ラムノースが確認された。一方、完全スミス分解物を GLC で調べた結果、生成物として、ラムノース (18.8%), エリスリトール (72.4%), グリセロール (8.8%) が同定された。エリスリトールとグリセロールのモル比が 8:1 という結果は、グルコース残基が (1→4) 結合であり、さらに枝分かれした構造をもつことを支持した。

また、赤外線吸収スペクトルでは、820 cm⁻¹ に吸収が見られたことから、多糖中のグルコース残基の結合は α -結合であることが示された。

さらに、ヨード反応を行ったところ、赤褐色を呈し、吸収の $\lambda_{\max}$ は、カキのグリコゲンと同じ 460 nm であった。

以上のことから、本画分は、 α -(1→4) 結合を主鎖として、C-6 位より分岐した、非常に分岐度の高い (平均鎖長, $\overline{CL}$ 9) グリコゲン様多糖が主体と考えられた。

また、この多糖の分子量は、高速液体クロマトグラフィーにより、約 250 万であった。

さらに、イソアミラーゼ、プルランナーゼにより、グリコゲン様多糖の分岐点を酵素的に切断した。Fig. 1 に、枝切り後の生成物を Bio-gel P-2 のゲル濾過カラムで分離した溶出パターンを示した。このことより、水抽出画分の大部分を占めるグリコゲン様多糖の α -(1→4) 分枝鎖は、DP 3~14 の広い範囲で分布するが、特徴的なことは、3 ないし 4 残基の短い枝が多いことである。スピリリナが、葉緑素を多量に含有し、光合成による炭酸同化を行う際、生成された貯蔵多糖がデンプンでなく、上述のような分岐度の高いグリコゲン様多糖の形をとることは興味深い。

Fig. 1. Gel filtration profile of the water-extracted polysaccharides on Bio-gel P-2 column (Column: 1.5×200 cm), after treatment with debranching enzymes (isoamylase and pullulanase).

4. Actinase 消化後の水抽出画分の多糖の化学的性質

脱脂細胞壁をまず、Actinase で消化して遊離してくる細胞表層由来の水溶性多糖画分を得た。この多糖 [$[\alpha]_D^{25} -80^\circ(c, 0.2, 1M NaOH)$] を、加水分解して構成糖を調べたところ、中性糖として、ラムノースが主要部分 (64.0%) を占め、その他に、グルコース (13.9%), マンノース (9.9%), ガラクトース (8.0%) と少量のキシロース (4.2%) も見いだされた (Table 3)。さらに、全糖量に対して 16.0% のウロン酸 (グルクロン酸として定量) も見いだされたので、この画分は単一の多糖というよりも、酸性多糖を含む 2 種以上の多糖よりなると考えられる。

この多糖画分のラムノースなど主な糖残基の結合状態を知るために、メチル化分析を行った結果を Table 5 に示す。また、この多糖を過ヨウ素酸酸化、還元後、酸で加水分解する、いわゆる、スミス分解の結果を Table 6 に示した。これらの結果より、ラムノースは主として (1→3) および (1→2) で結合するが、相当量の 2- およ

Table 5. Identification and molar proportions of the hydrolysis products of the methylated cell wall polysaccharides.

O-Methyl sugar	Linkage indicated	PS	HWS	CAS
2,4-di- <i>O</i> -methyl-Rham	→3Rham1→	28.2%	46.7%	54.2%
2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-Glc and/or	Glc→			
2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-Man	Man1→			
2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -methyl-Gal	Gall→	3.0	1.8	1.0
2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-Rham	Rham1→	3.4	2.8	1.0
2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-Xyl	Xyl1→	0.7		
2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-Glc and/or	→6Glc1→	1.5		
2,3,4-tri- <i>O</i> -methyl-Man	→6Man1→			
2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-Glc	→4Glc1→	9.7	2.7	4.2
2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-Glc and/or	→3Glc1→	12.6	7.5	6.4
2,4,6-tri- <i>O</i> -methyl-Man	→3Man1→			
2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-Man	→4Man1→		7.4	2.9
2,3,6-tri- <i>O</i> -methyl-Gal	→4Gall→	6.5	13.8	16.4
3,4-di- <i>O</i> -methyl-Rham	→2Rham1→	7.6		
2,3-di- <i>O</i> -methyl-Xyl and/or	→4Xyl1→	2.5		
3,4-di- <i>O</i> -methyl-Xyl	→2Xyl1→			
2,4-di- <i>O</i> -methyl-Xyl	→3Xyl1→	1.8		
4,6-di- <i>O</i> -methyl-Man	→3Man1→	3.5		
	2 ↑			
2- <i>O</i> -methyl-Rham	→3Rham1→	8.0	3.6	7.2
	4 ↑			
4- <i>O</i> -methyl-Rham	→3Rham1→	11.0	2.3	6.7
	2 ↑			
Unidentified dimethyl sugar			11.4	

PS, HWS and CAS : See Table 3.

び 4-*O*-メチルラムノースも存在することから、(1→3) 結合のラムノース鎖の C-4 および C-2 位で枝分かれした高分岐構造が考えられる。(1→3) 結合が主鎖中に存在することはスミス分解で大部分のラムノース残基が酸化されずに残る事実からも支持される。グルコースおよびマンノース残基の結合については、これらのメチル糖の GLC による相互分離が困難なことが多く、必ずしもはっきりしないが、スミス分解の結果とあわせると、マンノース残基は主として (1→3) 結合し、その C-2 位からの分岐が想定される。その他、少量の (1→6) 結合鎖も存在する可能性がある。グルコース残基の結合のうち、大部分が (1→4) 結合よりなることがメチル化分析およびスミス分解でのエリスリトールの存在より確認されたが、これはおそらく上述のグリコゲンの存在によると考えられる。また、ガラクトース残基の結合に関しては、メチル化分析により (1→4) 結合の存在が示され、

Table 6. Molar proportions of the Smith degradation products from the cell wall polysaccharides.

Product	PS	HWS	CAS
Glycerol	8.0%	17.6%	9.2%
Erythritol	14.1	11.4	6.1
Threitol	6.4	14.2	10.3
Rhamnose	54.3	38.0	66.5
Mannose	14.2	10.3	4.7
Glucose	3.0	8.5	3.3

PS, HWS and CAS : See Table 3.

スミス分解の結果におけるスレイトールの存在もこれを支持した。

以上のごとく水抽出画分は非常に複雑な糖の構成と、

Table 7. Fractionation and carbohydrate compositions of the water-soluble polysaccharides.

Polysaccharide fraction ^{a)}	Recovery (%)	Neutral carbohydrate (%)						Uronic acid ^{b)} (%)
		Rham	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc	
Fr. 1	7.1	26.3	—	11.4	28.2	4.1	30.0	—
Fr. 2	6.9	35.1	—	2.5	29.6	6.0	26.8	5.2
Fr. 3	31.5	38.0	7.7	6.7	10.1	16.1	21.4	21.7
Fr. 4	9.6	53.2	tr.	25.7	7.4	3.3	10.4	11.1

^{a)} See Fig. 3.^{b)} Determined by the carbazol method.

多様な結合様式が示されたが、これらの結果は多糖の分子種としての不均一性を示唆する。これを検討するために、この多糖画分について DEAE-Sephacel のカラムを用い、異なる濃度の塩溶液で分画を試みた。Fig. 2 に、溶出パターンの結果を示した。中性の非吸着画分の他に、吸着画分としては、ウロン酸を含む 3 種の画分に分かれたが、いずれの画分も中性の構成糖はラムノース、グルコースが主要部分を占め、その他、ガラクトース、マンノース、キシロースなどが含まれること (Table 7) から、水抽出性多糖画分は、構造類似のヘテロ多糖の集合体からなると推定される。

糖残基の結合に関しては、前述のメチル化分析、スミス分解の結果から、この多糖画分は、非常に分岐度の高い構造をもつ (1→3) 結合を主鎖とし、また (1→2) 結合をも含むラムナンが主体で、これにガラクトース、マンノースおよびグルコースあるいは少量のキシロース鎖を含むヘテロ多糖の可能性が大きい。なお、16.0% 含まれるウロン酸はグルクロン酸と同定された。しかし、その存在様式については未だ明らかでないが、メチル化分析の結果から、分岐点に比べて中性糖残基の末端基の少ないこと (Table 5) から、ウロン酸残基は主として側鎖の末端に存在する可能性も考えられる。

5. 熱水抽出画分の多糖の化学的性質について

この多糖画分 $[\alpha]_D^{25} -80^\circ (c, 0.2, 1\text{ M NaOH})$ も、11.4% のウロン酸 (グルクロン酸) を含む酸性多糖であるが、中性糖としてはラムノースが主体 (45.0%) であり、その他、ガラクトースが他の可溶性画分に比べて比較的多く (26.6%) 含まれる。また、マンノース (10.7%)、グルコース (12.5%) も含まれる。構成糖の複雑性から、水抽出画分と同様に、分子的不均一性の可能性があるが、多糖鎖の結合状態を知るために、メチル化分析を行った結果は Table 5 に示すとおりである。また、スミス分解の結果は Table 6 に示した。これらの結果から、主構成糖であるラムノース残基の結合は (1→3) 結合のみであり、その C-4 および C-2 位で若干の枝分かれがあり、一部のラムノース残基は末端基としても存

Fig. 2. Elution profile of the water-soluble polysaccharide fraction from the DEAE-Sephacel column (Column: 2.2×43 cm).

在する。水抽出性多糖と比べて、分岐度は比較的低いと考えられる。なお、水抽出性多糖と異なり、(1→2) 結合のラムノース残基は存在しなかった。ガラクトース残基は、もっぱら (1→4) 結合よりなり、また、マンノース残基の結合は (1→3) 結合の他に、水抽出多糖と異なり、(1→4) 結合も存在する。また、ある程度の枝分かれも存在する。メチル化分析ではわずかのラムノース残基およびガラクトースの末端基しか示されていないが、スミス分解で相当量のグリセロールが生成することから、側鎖の末端には、グルコースやマンノース残基も存在すると思われる (グルコース、およびマンノースのテトラメチル誘導体は、ここで用いた GLC の条件ではジメチル・ラムノースと分離困難である)。グルクロン酸残基の結合様式についてはまだ不明である。

6. アルカリ抽出画分の多糖の化学的性質

熱水抽出残渣から 1 M 水酸化ナトリウムで、室温にて抽出された多糖画分 $[\alpha]_D^{25} -75^\circ (c, 0.2, 1\text{ M NaOH})$ も水および熱水抽出性多糖と同様に、ラムノースが主成

分 (81.0%) であるが、少量のマノース、ガラクトースおよびグルコースも含まれる。しかし、ウロン酸含量はきわめて低い (3.9%)。

メチル化分析および完全スミス分解の結果 (Table 5, 6) から、これらの糖残基の結合は熱水抽出性多糖と同様に、C-2 および C-4 位で分岐した (1→3) 結合のラムノース鎖が骨格である。また、熱水抽出性多糖と同様に、(1→4) 結合のガラクトース鎖が存在し、少量の (1→3), (1→4) 結合のマノース および グルコース鎖も存在すると考えられる。ここでも、スミス分解でグリセロールが生成することから、側鎖の末端には、グルコースやマノース残基も存在すると思われる。

7. アルカリ抽出残渣

アルカリ抽出後の不溶性残渣は脱脂細胞壁の 11.8% であったが、これをさらに、1M 水酸化ナトリウムで窒素気流下にて、70°C, 2時間, 2回抽出し、わずかの抽出物が得られた。抽出残渣には、5.6% の窒素物の他、4.6% の糖成分も含まれる。この画分は Actinase によって分解されにくい、塩酸による加水分解物から、グルタミン酸 (17.6%), アラニン (13.4%), プロリン (13.1%), バリン (12.0%), イソロイシン (9.5%) など主としたアミノ酸が同定された。

この画分に 9.3% 含まれるアミノ糖に関しては、塩酸塩の形で PPC を行い、グルコサミンのほか、標準のムラミン酸と同じ移動度 ($R_{\text{glucosamine}}=1.58$, 展開溶媒: 1-ブタノール: 酢酸: 水 (60: 15: 25)) を示す、アルカリ性硝酸銀¹³⁾およびニンヒドリン¹⁸⁾陽性の物質が検出された。さらに、塩酸加水分解物を TMS 誘導体 (カラム; 3% OV-1 chromosorb W, カラム温度; 140~200°C, 昇温速度, 2°C/min) として GLC を行くと、グルコサミンと、量的には少ないが、ムラミン酸に一致するピークが得られた。したがって、アミノ糖としてグルコサミンとムラミン酸が存在すると考えられるが、これらは細菌細胞壁に存在するペプチドグリカンの構成アミノ糖であることから、先の、スピリリナ細胞壁にペプチドグリカンが存在するという報告⁶⁾を支持することになる。

考 察

スピリリナの細胞の構成成分については緑藻であるクロレラとともに、栄養的、あるいは、健康補助食品としての見地から、これまで、種々の研究が行われてきた。細胞壁に関しては、Eykelenburg は電子顕微鏡観察から、*S. platensis* の細胞壁は、4層に分かれること⁷⁾、その最も内側の層には β -1,2-グルカンが存在することを報告している⁸⁾。また、Mikheiskaya は *S. platensis* の細胞壁中には、グルコサミンと脂肪酸が結合した形のリ

ボ多糖やリボグルカンがあり、ラムナンがその糖部分を形成すると報告している⁹⁾。さらに、細胞壁中には、グラム陽性細菌と類似のムラミン酸を含むペプチドグリカンが存在するという報告もなされている¹⁰⁾。このように、スピリリナの細胞壁に関しては多くの報告がなされているが、いずれも局所的な研究であり、細胞壁に存在する多糖がどのような分子形態をもち、どのような構造で細胞壁を構成するかについては十分な知見が得られていなかった。

本研究で用いた *S. platensis* は糖成分としてグルコース、ガラクトースの他に、ラムノース、キシロースおよびフコースを含み、一方、*S. maxima* では、これらにさらに、マノースを含むなど種類によって若干の相違はあるが、グルコース以外の共通したおもな糖成分としては、ラムノースおよびガラクトースの存在が特徴的であった。なお、これらの構成糖は多くの天然多糖と同様に、ラムノース、フコースは L-系列、他のアルドヘキソースは D-系列と見なされる。

2種のスピリリナ藻体の中、細胞壁多糖の分画には、主として工業生産されている *S. maxima* の脱脂細胞壁を用いた。脱脂細胞壁の調製の過程で、ガラクトースの相当部分が、クロロホルム-メタノールで抽出されることから、糖脂質として存在することを知り、前報で明らかにように、主に3種類の糖脂質を単離、その構造を決定した¹⁰⁾。脱脂細胞壁を直接水抽出しても、細胞壁多糖の収量は低いため、これに Actinase を作用させて、タンパク質を分解除去し、多糖を可溶化させた。引き続き、残渣について熱水およびアルカリ抽出などを行い、抽出条件による違いを利用して、系統的に多糖の分画を行った。

なお、本研究に用いた *S. maxima* の細胞壁にはかなりの量のタンパク質が含まれていたが、細胞破壊に用いた超音波処理の繰り返しは、比較的緩和な操作であり、細胞壁に強固に結合した膜、あるいは、細胞質由来のタンパク質も含まれる可能性もある。

上述の方法で分画された各画分の多糖はいずれの場合も単一の糖成分ではなく、ラムノース、グルコース、マノース および ガラクトース あるいは グルクロン酸など、2種以上の糖を含むことがわかったが、これらが、ヘテロ多糖として存在するのか、分子種の異なった多糖が混在しているのかについては、明らかにすることはできなかった。しかし、水抽出で得られた多糖を DEAE-Sephacel のカラムで再分画すると、酸性多糖を含む2種またはそれ以上のヘテロ多糖に分かれるが (Fig. 2 参照)、均一と考えられる多糖画分でもなお、数種類の糖を含むことが示された (Table 7)。このことはスピリリナの細胞壁多糖がかなり複雑なヘテロ多糖として存在す

ることを示唆する。

ラムノースは水、熱水、アルカリなどいずれの抽出画分にもおもな構成糖として存在するが、これらの多糖画分のうち、ラムノースが主成分のアルカリ抽出性多糖はメチル化およびスミス分解による結果から、主として(1→3)結合で連結し、そのC-2およびC-4位から若干分岐した構造のラムナンと考えられる。

ラムノース残基の結合の配向性については、81%のL-ラムノースを含むアルカリ抽出性多糖が非常に低い旋光度 ($[\alpha]_D^{25} -75^\circ$) を示すことより、 α -アノマーと推定される。これらの結果より、スピリリナ細胞壁に特徴的な多糖は α -(1→3)結合を主体としたラムナンであり、さらにこれに α -(1→2)結合のラムノース鎖がついたもの(水抽出性多糖)、あるいは(1→4)結合のガラクトース鎖、(1→3)(1→4)結合のマノースやグルコース鎖も多糖の構造中に含まれると推定される。なお、水抽出性および熱水抽出性多糖画分にはラムノースと同様にグルクロン酸が含まれているが、このウロン酸残基のおそらく大部分が α -(1→3)結合のラムナンの側鎖の末端に存在するのであろう。これに関連して最近、*Chlorella pyrenoidosa* のラムノースを含むヘテロ多糖の緩和水解物からグルクロンシル-ラムノースなるアルドピウロン酸を得たという報告²³⁾があり、*S. maxima* においても、その可能性が高い。

また、Eykelburg は、*S. platensis* の細胞壁の4層のうち、最も内側の層は、 β -1, 2-グルカンより成ると報告している⁷⁾が、メチル化分析などの化学的根拠に乏しい。今回、*S. maxima* の細胞壁多糖をメチル化分析した結果からも、(1→2)結合のグルカンが存在する可能性は少ないと考えられる。

上記の系統的な分画とは別に得られた多糖画分として、主としてグルコースから構成される水溶性多糖は高分岐のグリコーゲン(C_L, 9)と見なされる α -グルカンが主体であり、さらに、イソアミラーゼとプルランナーゼで分枝切断後のゲル濾過から重合度3~14にわたって α -(1→4)結合鎖が分布することが確かめられた。なお、藍藻細胞のグリコーゲン様多糖の多くは、細胞質のチラコイド膜間に顆粒として存在するといわれているが、本研究で得られた*S. maxima* の細胞壁画分に存在するグリコーゲン様多糖も上述のチラコイド膜間に分布するグリコーゲン顆粒に由来するのかもしれない。

スピリリナの細胞壁のペプチド部分に関しては、先に述べたように、ペプチドグリカンの存在を示唆する報告⁶⁾がある。*N*-アセチルグルコサミン-ムラミン酸鎖を含むペプチドグリカンは細菌細胞壁の骨格構造として特徴的なものであるが、同じ原核生物である藍藻類の細胞壁にも存在することが知られている。われわれは、*S.*

maxima の細胞壁の熱アルカリ抽出残渣の酸加水分解物から数種のアミノ酸とともに、アミノ糖としてグルコサミンの他に、PPC および GLC でムラミン酸と同じ挙動を示す物質の存在を確認した。しかし、スピリリナの細胞壁が細菌細胞壁と同一のペプチドグリカンを含むか否かについては、化学構造解析などによりさらに検討することが必要である。

要 約

おもに市販の *S. maxima* の乾燥藻体より調製した脱脂細胞壁について分画を行い、多糖の化学的性質について検討した。

1) 脱脂細胞壁を Actinase 消化した後、得られた水、熱水、冷アルカリ抽出性多糖はいずれもラムノースを主な構成糖とし、他にマノース、ガラクトース、グルコース等を含んでいた。また、最初の2画分にはグルクロン酸も存在していた。これらの多糖は α -(1→3)結合をした枝分かれ構造のラムナンを主体とする酸性ヘテロ多糖で、また、(1→4)結合のガラクトース残基と、(1→3)、(1→4)結合のマノースやグルコース残基も存在し、これらの糖残基の一部には、分岐点も存在する。DEAE-Sephacel カラムで分画した結果より、これらの多糖画分はいずれも酸性多糖を含む2種以上のヘテロ多糖よりなる可能性が大きい。

2) 脱脂した粗細胞壁画分より得られた水溶性多糖はおもにグリコーゲン様多糖を含んでいた。メチル化分析、スミス分解、ヨード反応等の化学的方法や酵素分解により、このグリコーゲン様多糖は、分子量約250万、平均鎖長 C_L9 であり、DP 3 ないし4の短い枝を多くもつ、非常に分岐度の高い構造をとることがわかった。

3) 熱アルカリ抽出残渣に9.3%含まれるアミノ糖は、PPC および GLC 分析の結果、グルコサミンとムラミン酸であることがわかり、ペプチドグリカンの存在が示唆された。

文 献

- 1) Clément, G. : *Ann. Nutr. Alim.*, **29**, 477 (1975)
- 2) Clément, G., Giddey, C. and Menzi, R. : *J. Sci. Food Agric.*, **18**, 497 (1967)
- 3) Hudson, B.J.F. and Karis, I.G. : *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 759 (1974)
- 4) Nichols, B.W. and Wood, B.J.B. : *Lipids*, **3**, 46 (1967)
- 5) Santillan, C. : *Experientia*, **38**, 40 (1982)
- 6) Quillet, M. : *Ann. Nutr. Aliment.*, **29**, 553 (1976)
- 7) Eykelburg, C.V. : *Antonie van Leeuwenhoek*, **43**, 89 (1977)
- 8) Eykelburg, C.V. : *Antonie van Leeuwenhoek*, **44**, 321 (1978)
- 9) Mikheiskaya, L.V., Ovodova, R.G. and Ovo-

- dov, Yu. S. : *Khim. Prir. Soedin.*, No. 2, 135 (1983)
- 10) Kataoka, N. and Misaki, A. : *Agric. Biol. Chem.*, 47, 2349 (1983)
- 11) 満田久輝, 千葉英雄 : 農芸化学実験書 (京都大学農学部農芸化学教室編), 第2巻, 518 (1976), 産業図書 (東京)
- 12) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. : *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956)
- 13) Trevelyan, W.E., Procter, D.P. and Harrison, T.S. : *Nature*, 166, 444 (1950)
- 14) Hough, L. and Jones, J.K.N. : *Methods Carbohydr. Chem.*, 1, 21 (1962)
- 15) Hakomori, S. : *J. Biochem.*, 55, 205 (1964)
- 16) Abdel-Akher, M., Hamilton, J.K., Montgomery, R. and Smith, F. : *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 4970 (1952)
- 17) Smith, F. and Van-Cleve, J.W. : *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 3091 (1955)
- 18) Levvy, G.A. and McAllan, A. : *Biochem. J.*, 73, 127 (1959)
- 19) Marshall, R.D. and Neuberger, A. : *Glycoproteins*, (Gottschalk, A., ed.), Part A, 224 (1972), Elsevier (Amsterdam)
- 20) Aminoff, D. and Morgan, W.T.J. : *Nature* (London) 162, 579 (1948)
- 21) Galambos, J.T. : *Anal. Biochem.*, 19, 119 (1967)
- 22) Sarma, T.A. and Kanta, S. : *Z. Allg. Mikrobiol.*, 19, 571 (1979)
- 23) White, R.C. and Barber, G.A. : *Biochim. Biophys. Acta*, 264, 117 (1972)

(1987 年 1 月 8 日受理)