薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
106 (3) 206-211 (1986)

ブクリ ヨウ菌糸体の抗腫瘍性多糖に関する研究 (第2報¹⁾) 抗腫瘍性多糖 H₁₁ の構造解析

金山久範,* 足立典彦, 深井芳和, 武内一公絵, 戸上昌紀

日本合成ゴム株式会社東京研究所

Studies on the Antitumor Active Polysaccharides from the Mycelia
of *Poria cocos* WOLF. II.¹⁾ Structural Analysis of
Antitumor Polysaccharide H₁₁

HISANORI KANAYAMA,* NORIHIKO ADACHI, YOSHIKAZU FUKAI,
IKUE TAKEUCHI, and MASATOSHI TOGAMI

Tokyo Research Laboratory, Japan Synthetic Rubber Co., Ltd.,
Higashi-Yurigaoka 3-5-1, Asao-ku, Kawasaki, Kanagawa,
215, Japan

(Received August 22, 1985)

Structural analysis was made on the glucan moiety of purified antitumor active polysaccharide fraction H₁₁ obtained from the mycelia of *P. cocos*.

In the ¹³C-nuclear magnetic resonance spectrum of fraction H₁₁, signals at 102.9 and 84.8 ppm were observed, and assigned to C-1 of the β-linkage and C-3 of the β-D-(1,3)-linked D-glucosyl residues, respectively. On addition of NaOD solution, the C-1 signal was separated into two signals at 104.2 and 104.8 ppm which can be assigned to the C-1 signal of the β-D-(1,3)-linked and the β-D-(1,6)-linked D-glucosyl residues, respectively.

The molecular weight of fraction H₁₁ was calculated to be approx. 5×10⁶ by the gel filtration method with CPG-1000Å.

Complete methylation and hydrolysis of fraction H₁₁ gave 2,4,6-tri-, 2,3,4-tri-, 2,4-di-, and 2,3,4,6-tetra-O-methyl glucose as alditol acetates in a molar ratio of 3.96 : 0.95 : 1.05 : 1.00.

From these results, it has been revealed that fraction H₁₁ is a highly branched (1,3)-(1,6)-β-D-glucan containing each component in 4 : 1 ratio.

Keywords—β-D-glucan; *Poria cocos*; Polyporaceae; antitumor effect; sarcoma 180; mycelium; ¹³C-NMR

緒 言

著者らは、さきに深部培養したブクリ ヨウ菌糸体中に、マウス腫瘍ザルコーマ 180 に対して強い抗腫瘍活性を示す多糖が存在することを報告した。¹⁻³⁾ 今回は、この多糖の構造について詳細に検討したので報告したい。なおこれまでに天産品であるブクリ ヨウ菌核から多糖体パヒマンが分離され、Warsi,⁴⁾ 斉藤⁵⁾ らの研究によってその構造が若干の β-1,6-グルコピラノイド分岐をもつ β-1,3-グルカンであると報告されているが、この多糖は過ヨウ素酸酸化のような化学的処理をしないと抗腫瘍活性を示さないことが知られている。⁶⁾ 最近では、成井ら⁷⁾ が静置培養した菌糸体から U-パヒマン f を分離し、その構造がブクリ ヨウ菌核のパヒマンとほとんど同じであったと報告しているが、抗腫瘍活性については報告していない。いずれにしても、ブクリ ヨウの培養菌糸体から抗腫瘍活性を示す多糖が分離されたのは、今回が初めてであると思われる。構造解析の結果、この多糖 H₁₁ は分子量が約 500 万の (1,3)-(1,6)-β-D-グルカンであり、1,3-結合と 1,6-結合の割合は 4 対 1 であると考えられる。

実 験 の 部

多糖試料 第1報で得られた画分 H₁₁ を実験試料とした。

分子量測定 CPG-1000Å を用いるゲル透過クロマトグラフィーを行った。画分 H₁₁ 10 mg を 0.9% 食塩溶液 1 ml に溶解し、CPG-1000Å を充填したカラム (2.2×42 cm) に添加し、0.9% 食塩溶液で溶出した。溶出液をフラクションコレクターで 2.4 ml ずつ採取し、各フラクションの多糖をフェノール硫酸法で検出した。Fig. 1 に

Fig. 1. Gel Filtration of Fr. H₁₁ by CPG-1000 Å

●—, Sugar was measured by phenol-sulfuric acid method as glucose.
Column, 2.2×4.2 cm; eluent, 0.9% NaCl, 2.4 ml/fraction.

TABLE I. ¹³C-NMR Signals, and Their Assignments, for Fr. H₁₁

Atom	Linkage		
	β-(1→3)-	β-(1→6)-	β-($\begin{smallmatrix} 1 \rightarrow 3 \\ 1 \rightarrow 6 \end{smallmatrix}$)-
C-1	102.9	102.9	
C-2	73.5		
C-3	84.8		
C-4	68.5	69.7	
C-5	76.5	69.2	
C-6	61.1		69.9

ル F₁ (光散乱法 $\bar{M}_w=8 \times 10^6$) を用い、それらの溶出位置から画分 H₁₁ の分子量を推定した。H₁₁ の平均分子量は 5×10^6 と推定できた。尚、H₁₁ の分子量を光散乱法で測定することも試みたが、サンプルが不溶化していくので測定できなかった。

¹³C 核磁気共鳴 (¹³C-NMR) スペクトル 画分 H₁₁ 40 mg を D₂O 1 ml に溶解し、DSS を対照物質として 16 MHz で測定した。結果を Fig. 2 に示す。シグナルの帰属は、tetramethylsilane 基準値に換算して Table I に示した。β 1→6 結合に由来する C-4, C-5 位以外の炭素シグナルは、β 1→3 結合に由来するシグナルに重なっていると推定される。

部分酸加水分解 画分 H₁₁ 1.9 mg を 1 N 硫酸 1 ml と 100°C, 1 時間加熱後 Duolite A-4 (OH⁻ 型) カラムを通し減圧乾燥した。これに 1% 水素化ホウ素ナトリウム水溶液 1 ml を加えて、生成したオリゴ糖を対応する糖アルコールに還元し、常法⁹⁾ によりトリメチルシリル誘導体としてガスクロマト分析に供した。結果を Fig. 3 に示す。

酵素分解 画分 H₁₁ 2.15 mg を 50 mM アセテート緩衝液 (pH 5.0) 1.5 ml に懸濁し、酵素溶液 0.5 ml (イーストグルカナナーゼ, 12.6 mg/ml, Sigma) を加え 37°C にインキュベートした。一定時間後に 20 μl ずつ分取し、100°C で酵素を失活させた後、酵素法 (和光純薬製のグルコーステストワーカー) により遊離グルコース量を定量した。結果を Fig. 4 に示す。また分解生成物の分析は次のように行った。酵素分解 48 時間後に 100°C で酵素を失活させ、Amberlite IR-120 (H⁺ 型), Duolite A-4 (OH⁻ 型) カラムを通して無機イオンを除去し、ペーパークロマトに供した。ペーパークロマトは、東洋濾紙 No. 51A にスポットし、*n*-ブタノール-ピリジン-水 (6:4:3) で展開後、*p*-アニシジン溶液で検出した。

完全スミス分解 画分 H₁₁ 2 mg を 0.05 M 過ヨウ素酸ナトリウム溶液 2 ml に懸濁し、室温暗所で 14 日間

Fig. 2. ¹³C-NMR Spectra of Fr. H₁₁

Fig. 3. Partial Acid Hydrolysis of Fr. H₁₁

A, laminaribiose; B, gentiobiose.
Column, 5% OV-1; column temperature, 220°C; carrier gas, N₂; 60 ml/min.

結果を示す。スタンダードとして比較的構造が類似していると考えられるレンチナン (文献⁸⁾ に従い調製、光散乱法 $\bar{M}_w=1 \times 10^6$) とブクリョウ由来サンプル

攪拌した。過剰の過ヨウ素酸ナトリウムをエチレングリコール 1 ml で分解後、1 晩流水透析した。透析内液に水素化ホウ素ナトリウム 10 mg を添加、1 晩室温に放置し還元した。過剰の水素化ホウ素ナトリウムを酢酸で分解後、減圧乾固し、次に 1 N 硫酸 1.5 ml に溶解し、100°C、8 時間加水分解した。加水分解物を炭酸バリウムで中和し、アルジトールアセテートに導いて、⁹⁾ 3% ECNSS-M (1.5 m) のカラムで 95—195°C (7.5°C/min) でガスクロマト分析をした。結果を Fig. 5 に示す。

緩和スミス分解を組合せた完全スミス分解 (逐次分解法) 画分 H₁₁ 38 mg を 0.05 M 過ヨウ素酸ナトリウ

Fig. 4. Hydrolysis of Fr. H₁₁ by Lysing Enzymes

Enzyme, lysing enzymes (Crude powder containing yeast glucanase, protease; Sigma); buffer, 0.05 M acetate buffer; pH 5.0; temperature, 37°C.

Fig. 6. Complete Smith Degradation accompanying Controlled Smith Degradation of Fr. H₁₁

A, glycolaldehyde; B, unknown; C, ethylene Glycol; column, 20% PEG; column temperature, 187°C; carrier gas, N₂; 35 ml/min.

Fig. 5. Complete Smith Degradation of Fr. H₁₁

A, glycerol; B, erythritol; C, unknown, D, glucitol. Column, 3% ECNSSM; column temperature, 95—195°C; (7.5/min); carrier gas, N₂; 30 ml/min.

Fig. 7. Methylation Analysis of Fr. H₁₁ Gas Chromatogram of Hydrolysate as Alditol Acetates

A, 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol. B, 1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methyl-D-glucitol. C, 1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucitol. D, 1,3,5,6-tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methyl-D-glucitol. Column, 3% ECNSS-M; column temperature, 150°C; carrier gas, N₂; 30 ml/min.

ム溶液 19 ml に懸濁し、室温暗所で 72 時間酸化した。エチレングリコール 2 ml を加え過剰の過ヨウ素酸ナトリウムを分解後、1 晩流水透析した。透析内液に水素化ホウ素ナトリウム 60 mg を加え 1 晩室温で還元した。過剰の水素化ホウ素ナトリウムを酢酸で中和分解し、透析後、1 N 硫酸で pH 1.0 に調整し室温で 24 時間加水分解した。加水分解物を Duolite A-4 (OH⁻ 型) カラムを通過させた後、減圧乾固した。蒸発残渣を 0.05 M 過ヨウ素酸ナトリウム 5 ml に懸濁し、前述のように酸化した。過剰の過ヨウ素酸ナトリウムは、Amberlite IR-120 (H⁺ 型) カラムを通した後、水酸化バリウムで中和して除いた。水素化ホウ素ナトリウムで還元後酢酸で分解し、流水透析し、凍結乾燥してポリアルコール 29.4 mg を得た。

ポリアルコール 15 mg を 1 N 硫酸 2 ml と 100°C、8 時間加熱して加水分解し、炭酸バリウムで中和し、エチレングリコールを同定すべく、20% PEG20M (2.0 m) のカラムを使い、187°C でガスクロマト分析を行った。結果を Fig. 6 に示す。

メチル化分析 画分 H₁₁ 6 mg を箱守法¹⁰⁾に従って完全にメチル化し、次に 5% 塩酸-メタノールの 4 ml と 85°C、24 時間加熱することにより部分メチル化グルコシドとした。これを 1 N 硫酸 4 ml と 100°C、24 時間加熱して加水分解し、さらに水素化ホウ素ナトリウムで還元し、アルジトールアセテートとしてガスクロマト分析をした。⁹⁾ 結果を Fig. 7 に示す。測定値は、ガスクロマトグラム面積より、アルジトールアセテートのモル比を求め、非還元末端由来の 1,5-ジ-O-アセチル-2,3,4,6-テトラ-O-メチル-D-グルシトールを 1.0 として示した (Table III)。なお、メチル化糖の同定は、デキストラン (α 1→6)、ラミナラン (β 1→3)、アミロース (α 1→4) をメチル化分析し、それらの相対保持時間と比較することにより行った。

実験結果及び考察

画分 H₁₁ は、等電点が pH 7—9 を示し、セルロースアセテート膜 (Selecta) やグラスファイバー (Whatman GFC) を用いる電気泳動から単一であると判断できる。分子量は、CPG-1000Å を用いるゲル濾過法により約 500 万と算出された。画分 H₁₁ の糖含量は、フェノール硫酸法のグルコース基準で 98.2% であり、構成糖は D-グルコースのみからなること、そしてグルコシドの結合様式は、比旋光度の値から β 結合であると考えられることは既に第 1 報で述べた。その後得られた赤外吸収 (IR)、紫外吸収、元素分析値などを含めて画分 H₁₁ の物理化学的性質を Table II に示す。IR スペクトルにおいても 890 cm⁻¹ に β グルコシドであることを示す吸収が認められた。

また、¹³C-NMR スペクトルからも、C-1 の β 結合、C-3 の β -D-(1,3) 結合した D-グリコシル残基を示す 102.9 と 84.8 ppm のシグナルが観察された。¹¹⁾ さらに NaOD 溶液を添加すると C-1 のシグナルは、104.2 と 104.8 ppm に別れた。これは C-1 シグナルが β -D-(1,3) 結合と β -D-(1,6) 結合の D-グリコシル基のオーバーラップしたものであることを示している。¹²⁾

これらの実験結果を手掛りに、まず画分 H₁₁ を 1 N 硫酸で部分酸加水分解し、生成したオリゴ糖を対応する糖アルコールに還元し、ガスクロで分析した。その結果、Fig. 3 に示したようにラミナリオースとゲンチオビオ

TABLE II. Chemical and Physical Properties of Fr. H₁₁

Appearance	White powder
mp	> 300°C
pH (1%)	7—9
Total carbohydrate content (Phenol-sulfuric acid method)	98.2% (based on Glucose)
Sugar composition	Glucose: 99.0% Mannose: trace
Protein content (Lowry-Folin method)	6.5% (based on Albumin)
[α] _D ²⁰	-28.2°
UV	$\lambda_{\text{max}}^{\text{H}_2\text{O}}$ 207, 280 nm
IR (KBr)	890 cm ⁻¹
Elemental analysis	C: 37.4%, H: 5.5% N: 0.7%, Ash: 1.5%
Molecular weight	approx. 5×10^6

TABLE III. Methylation Analysis and Structural Feature of Fr. H₁₁

Methylation analysis			Smith degradation	
<i>O</i> -Acetyl- <i>O</i> -methyl-alditol	Linkage	Molar ratio	Alditol	Molar ratio
-D-glucitol				
1, 5-Di-OAc-2, 3, 4, 6-tetra-OMe-	G ¹ →	1.00	Glycerol	1.0
1, 5, 6-Tri-OAc-2, 3, 4-tri-OMe-	← ⁶ G ¹ →	0.95		
1, 3, 5-Tri-OAc-2, 4, 6-tri-OMe-	← ³ G ¹ →	3.96		
1, 3, 5, 6-Tetra-OAc-2, 4-di-OMe-	← ³ G ¹ → ↑ 6	1.05	Glucitol	2.4

ースが生じた。これより、 β 1→3 結合と β 1→6 結合が存在していることが明らかになった。次に、画分 H₁₁ をイーストグルカナーゼで酵素分解した。48 時間で飽和に達し分解率は遊離グルコース量で 70% であった。コントロールとして分解した典型的な β -(1→3) グルカンといわれているラミナリンの分解率は、75% であった。そして酵素分解生成物のペーパークロマト分析ではグルコースのみが検出された。この実験結果からも画分 H₁₁ が β グルカンであることが支持される。

多糖部分の構造をさらに明らかにするために、まず完全スミス分解法を検討した。すなわち、過ヨウ素酸ソーダで酸化した多糖を水素化ホウ素ナトリウムで還元し、さらに加水分解するとグリセロールとグルシトールがおおよそ 1 対 2 の割合で生成した。グルシトールが生成したことは、グルカン部分中に 1→3 結合あるいはその分岐のグルコース残基が存在していることを示している。またグリセロールが生成したことは、1→6 結合の存在あるいは非還元末端が存在していることを示しており、H₁₁ が分岐の多い構造である可能性が高いことを示している。

次に、逐次スミス分解法を検討した。スミスらは、緩めスミス分解法と完全スミス分解法とを組合せた分解法によって、分解生成物中にエチレングリコールを検出することにより、ラミナリンの β 1→3 糖鎖中に少量の β 1→6 結合が存在していることを証明している。¹⁸⁾ 同じ手法を用いて、1→6 結合が 1→3 結合に連続して存在しているかどうかを調べた。分解生成物についてガスクロマトグラフィーを行い、Fig. 6 に示したようにピーク C にエチレングリコールを検出した。この結果は、画分 H₁₁ が -³G¹-⁶G¹- シーケンスをもつ β 1,3-1,6 グルカンであることを示している。

これらの結果は、次に述べるメチル化分析によってより確実に証明された。すなわち、画分 H₁₁ を完全にメチル化し、次にメタノリシスで部分メチル化グルコシドとし、さらに加水分解し、還元し、アルジトールアセテートにすることにより、Fig. 7 に示したように、1,3,5-トリ-O-アセチル-2,4,6-トリ-O-メチル-D-グルシトール、1,5,6-トリ-O-アセチル-2,3,4-トリ-O-メチル-D-グルシトール、1,3,5,6-テトラ-O-アセチル-2,4-ジ-O-メチル-D-グルシトール、1,5-ジ-O-アセチル-2,3,4,6-テトラ-O-メチル-D-グルシトールが、分子量比 3.96 : 0.95 : 1.05 : 1.00 の割合で得られた。この結果より、画分 H₁₁ は、 β -(1→3) 結合のグルコース残基 4 個当り、 β -(1→6) 結合のグルコース残基 1 個と 3,6 分岐と非還元末端を各 1 個の割合でもっている β -グルカンであることが明らかになった。以上の結果を Table III にまとめて示す。

抗腫瘍活性の認められる β -D-グルカンとしては、分子量 100 万の (1→3)-(1→6)- β -D-グルカン (1,3 結合 : 1,6 結合 = 17 : 1) であるレンチナン¹⁴⁾や (1→3)- β -D-グルコシル残基の主鎖をもち、3 又は 4 残基ごとに (1→6)- β -D-グルコピラノシル基をもつスクレログルカン、^{15,16)} シゾフィラン¹⁷⁾や分子量約 200 万で β -(1→4) 結合を主体とするクレスチン¹⁸⁾が既に報告されているが、今回我々が単離したグルカンは、これらの既知のグルカンとは構造が明らかに異なるグルカンである。

引用文献

- 1) 金山久範, 足立典彦, 深井芳和, 武内一公絵, 戸上昌紀, 薬誌, **106**, 199 (1986).
- 2) H. Kanayama, N. Adachi, M. Togami, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1115 (1983).
- 3) H. Kanayama, Y. Fukai, N. Adachi, *Trans. mycol. Soc. Jpn.*, **25**, 101 (1984).

- 4) S. A. Warsi, W. J. Whelan, *Chem. Ind.*, **30**, 1573 (1957).
- 5) H. Saito, A. Kisaki, T. Harada, *Agric. Biol. Chem.* (Tokyo), **32**, 1261 (1968).
- 6) G. Chihara, J. Hamuro, Y. Maeda, Y. Arai, F. Fukuoka, *Nature* (London), **225**, 943 (1970).
- 7) T. Narui, K. Takahashi, M. Kobayashi, S. Shibata, *Carbohydr. Res.*, **87**, 161 (1980).
- 8) 千原呉郎, 発酵と工業, **34**, 942 (1976).
- 9) 原田篤也, 小泉岳夫 (編), “総合多糖類科学,” 講談社版, 東京, 1973, pp. 61—69.
- 10) S. Hakomori, *J. Biochem.*, **55**, 205 (1964).
- 11) T. Usui, N. Yamaoka, K. Matsuda, K. Tsuzimura, H. Sugiyama, S. Seto, *Agr. Biol. Chem.*, **39**, 1071 (1975).
- 12) H. Saito, T. Ohki, T. Sasaki, *Cancer Res.*, **74**, 227 (1979).
- 13) F. Smith, A. M. Unrau, *Chem. Ind.* (London), **1959**, 881.
- 14) T. Sasaki, N. Takasuka, *Carbohydr. Res.*, **47**, 99 (1976).
- 15) J. Johnson, S. Kirwood, A. Misaki, T. E. Nelson, J. V. Scaletti, F. Smith, *Chem. Ind.* (London), **1963**, 820; P. P. Singh, R. L. Whistler, R. Tokuzen, W. Nakahara, *Carbohydr. Res.*, **37**, 245 (1974).
- 16) R. L. Whistler, R. Tokuzen, W. Nakahara, *Carbohydr. Res.*, **47**, 99 (1976).
- 17) 菊本昭一, 宮島 徹, 吉積智司, 藤本紫郎, 木村恵太郎, 農化, **44**, 337 (1970); 菊本昭一, 宮島 徹, 木村恵太郎, 大久保幸枝, 小松信彦, *ibid.*, **45**, 162 (1971).
- 18) 平瀬 進, 中井幸子, 赤津常夫, 小林 明, 大原 稔, 松永謙一, 藤井雅彦, 小平 哲, 藤井孝美, 古荘孝雄, 大村嘉男, 和田敏彦, 吉汲親雄, 上野三郎, 大塚重遠, 薬誌, **96**, 413 (1976); *idem, ibid.*, **96**, 419 (1976).