

アガリクス (*Agaricus blazei*) 子実体の抗酸化成分および多糖の研究

角田 万里子¹⁾, 谷川 晶子¹⁾, 菊崎 泰枝²⁾, 三崎 旭^{2)*}
 (¹⁾ 甲南女子大 **, ²⁾ 大阪市大 ***)

**Isolation and Chemical Characterization of Antioxidative Substance and
 Glucans from Fruiting Body of *Agaricus blazei***

Mariko KAKUTA¹⁾, Akiko TANIGAWA¹⁾, Hiroe KIKUZAKI²⁾ and Akira MISAKI²⁾

¹⁾ *Konan Women's College*

²⁾ *Osaka City University*

Fractionation of the biologically active low and high molecular components of *Agaricus* mushroom, fruiting body of *Agaricus blazei*, showed that the aqueous alcohol extract contains a remarkable antioxidative substance effective on the autooxidation of linoleic acid. This active component was purified by different solvent extractions and TLC fractionation. The partially purified *Agaricus* antioxidant tentatively designated "agarcin", was soluble either in methanol, ethylacetate or chloroform. It showed an absorption peak at 265nm, molecular mass 280, and the retention time on GLC (as methyl ester) close to that of linolic acid, suggesting a linolic acid analogue. The extraction residue by the organic solvents and PBS extraction was successively extracted with hot water, cold and hot alkali *etc.*, and each fraction was purified. The hot water extracted glucan and the water-soluble glucan fraction obtained from the alkali extract was characterized as a glycogen-type glucan ($[\alpha]_D^{+160^\circ}$). Its structure was confirmed by methylation, Smith degradation and also HPAEC analysis of α -1,4-unit chains produced by isoamylase action. The hot alkali-insoluble glucan was regarded as 1,6-branched β -1,3-D-glucan. This fraction, not soluble in DMSO or formic acid, was partially solubilized by periodate and borohydride treatment. Acid hydrolysis of the resulting soluble glucan-polyol gave glycerol, erythritol and glucose (ratio, 1.0 : 2.2 : 4.8), indicating that the major β -glucan consists of β -1,3-linked main chain with the O-6 branches every 5-6 1,3 (linked glucose) -residues; It is not clear whether the 1,4-

* 名誉教授

** 所在地：神戸市東灘区森北町6丁目2-23 (〒658-0001)

*** 所在地：大阪市住吉区杉本3丁目3-138 (〒558-0022)

linked glucose units have arisen from the side chains or from tightly associated glycogen molecule.

The tumor-inhibitory effect of these glucan fractions is under investigation.

アガリクス (*Agaricus blazei*) は、ブラジルを原産地とするハラタケ属の一種で、その子実体は、近年、免疫賦活など多様な生理活性をもつことから注目されている¹⁾。アガリクスの発現する免疫活性は、所謂、抗腫瘍効果をもつ β -1,3-D-グルカンが、特に評価の指標にされることが多い様である。しかしながら、その構造との関係など、実態はなお不明確な部分が多い。

我々は、アガリクスの機能性成分の系統的分画の過程で、新しい方法を用いて β -ガラクトース認識レクチンの精製を行い、その一次構造と結合特異性の一部については、前報で報告した²⁾。

ここでは、アガリクス子実体の構成成分の系統的分画の過程で見出された、生物活性発現に関与すると考えられる生理活性物質として、抗酸化成分(仮称アガリシン)を初めて分離したので、その化学的性質と活性についての報告をする。

あわせて、これまでの酵母細胞壁や種々の担子菌子実体の β -1,3グルカンの構造と抗腫瘍活性との相関性についての研究^{3), 4)}から、*Agaricus blazei*に果たして如何なる分子種のグルカンが含まれ、どの様な構造を有するかについて、多糖成分、特に、 α -および β -結合のグルカンの構造解析を行った結果を報告する。

実験方法

[抗酸化成分の分離] アガリクスは大愛(株)で栽培された新鮮な子実体“きのこ”の凍結乾燥標品を用いた。この凍結乾燥標品20gを破碎、粉化し、70%のエタノール0.7ℓの中で、25℃、15時間、次いで60℃、2時間攪拌し抽出を行った。遠心分離(8000r.p.m.×15min.)により抽出画分とタンパク質および多糖を含む不溶残渣とに分け、抽出液を減圧濃縮することで乾固した(2.4g)。これに95%メタノールを加え、生じた結晶状沈殿を除去した後、再度濃縮して、シラップ状の抗酸化活性成分を得た。この画分の精製は、クロロホルム-メタノール混液(2:1)、酢酸エチルなど溶媒抽出による部分精製の後、シリカゲルプレート(Merk社製Silika Gel 60 F254)を用いて、可及的に行った。ここで得られた主要画分の一部をさらにクロロホルムで抽出し、水洗、脱水後濃縮した(クロロホルム抽出画分)。クロロホルム不溶画分はメタノールに再溶解、ろ過、濃縮した(メタノール画分)。クロロホルム抽出画分は、さらに薄層クロマトグラフィー(CHCl₃:MeOH 3:1)を用いて精製した。

抗酸化活性の測定は、0.02%リノール酸エタノール溶液の自動酸化を抑制する効果(37℃、暗所保存で40日間)をロダン鉄アンモン法⁵⁾の変法⁶⁾およびチオバルビツール酸(TBA)法⁷⁾を用いて経時的に行った。なお、比較のために、抗酸化活性をもつ合成物質*t*-ブチル-4-ヒドロキシトルエン(BHT)および天然 α -トコフェロール(ビタミンE)、カテキン、クエルセチンなどを用いた。

[多糖画分の分離] 上記、エタノール抽出残渣にPBS(pH7)0.7ℓを加え、10℃で1晩攪拌後、遠心分離を行い、抽出液(タンパク画分レクチン)と残渣に分けた。残渣は逐次熱水抽出(120℃、20分)および熱アルカリ抽出(0.5N NaOH 60℃、N₂気流下)を行い、それぞれ多糖画分を得た。またアルカリ抽出

不溶物として得た多糖画分については、過ヨウ素酸酸化、 NaBH_4 還元という独自な方法で可溶化（グルカン・ポリアルコール）した。Fig. 1に分画の概略を示した。

多糖の構造解析は、スミス分解のほか、メチル化を行い、アルジドール・アセテートとしてガスクロマトグラフィー分析（カラム：OV-1 キャピラリー-20m, 温度：180℃）により行った。

熱アルカリ抽出画分のグリコーゲンと思われる多糖画分はイソアミラーゼおよびプルランナーゼを用いて分枝切断を試み、生成オリゴ糖を陰イオン交換クロマトグラフィー（HPAEC, Dionex社, カラム：HPIC-AS6, 溶媒：A；150mM NaOH, B；150mM NaOH/1M CH_3COONa , グラジエントプログラム：A：B=95：5→55：45（40min.））で精製分画した。

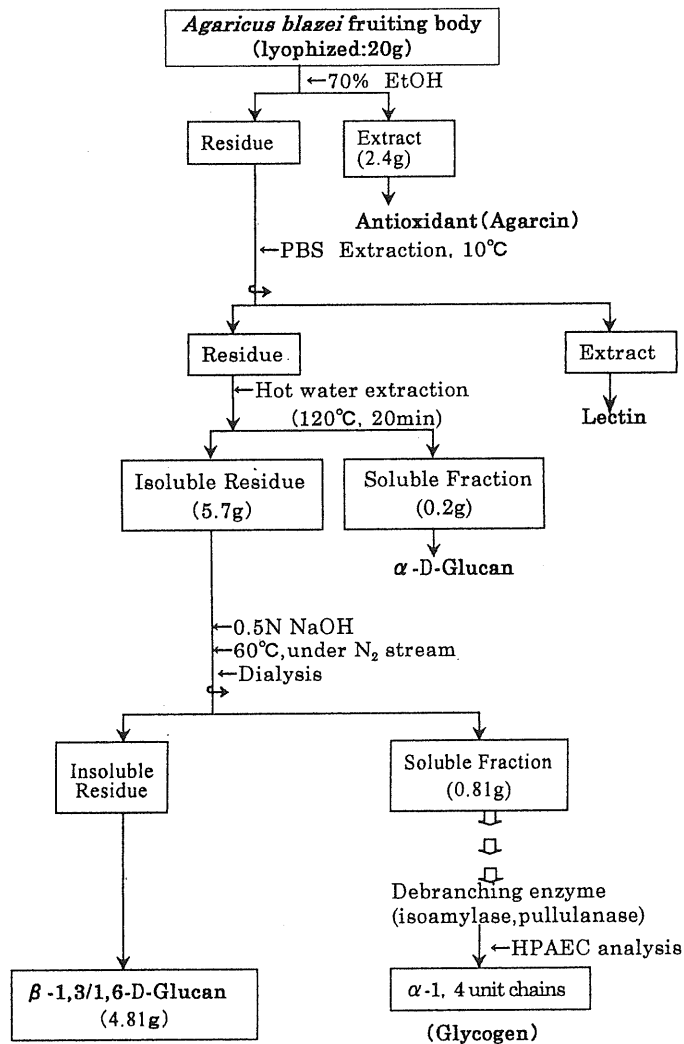


Fig. 1 Fractionation of Glucan components of *A. blazei* fruiting body

結果および考察

[抗酸化活性成分の性質] 70%アルコール抽出物中に存在が認められた有機物質には、結晶体物質が含まれていた。この物質については、TLCにおけるRf値の結果から、マンニトールと推定された。^{注)}この部分を除き、クロロホルムや酢酸エチルで部分精製を行ない、アガリシン(仮称)と名づけた。

アガリシンの0.02%エタノール溶液を、2.5%リノール酸溶液(v/v)、0.05Mリン酸緩衝液(pH7)と共に、37℃、40日間保存し、その一部(0.1ml)を経時的に採取して、ロダン鉄アンモン法変法にて測定した結果がFig. 2である。ロダン鉄アンモン法は、リノール酸が自動酸化して生じた過酸化脂質の量を測定する方法として知られる。ポリフェノールなどの抗酸化物質が存在すると、リノール酸の酸化が抑制され、過酸化脂質の生成が低下するところから、試料の抗酸化力が強い程低値を示す。

ここでは、コントロールに対して、代表的な天然の抗酸化物質である α -トコフェロールおよび合成物質t-ブチル-4-ヒドロキシトルエン(BHT)を、同じ濃度で比較した。500nmにおける吸収では、アガリシンに明らかな酸化抑制効果が認められ、しかもその抗酸化活性はBHTと同程度、 α -トコフェロールよりも高いことを示した。

また、部分精製したメタノール画分をクロロホルム抽出画分とその水洗画分に分けて、ケルセチンと共に抗酸化活性を比較すると、Fig. 3に示す様に、前者の方が後者より強い活性を示すことがわかった。このことから、活性の本体はクロロホルム可溶画分であることが明らかになった。さらに、TBA法による酸化抑制活性の測定を実験開始日と最終日との比較でみたグラフが、Fig. 4である。532nmにおける平均測定値は、コントロールに対してアガリシンのエタノール抽出画分、クロメタ抽出画分、水洗クロロホルム画分のいずれも α -トコフェロールやカテキンよりかなり高い活性を示し、BHTとほぼ同程度の抗

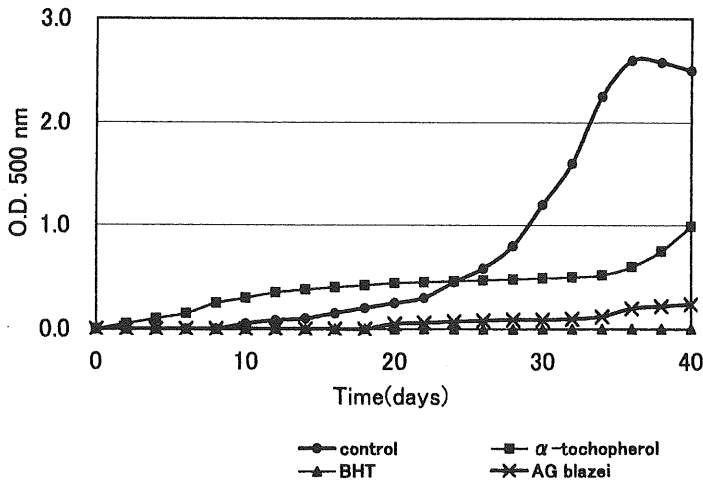


Fig. 2 Antioxidant effect of the constituent *AG blazei* measured by ferric thiocyanate method

注) その後のGLC分析により、マンニトールのほかアラビトールが同定された。

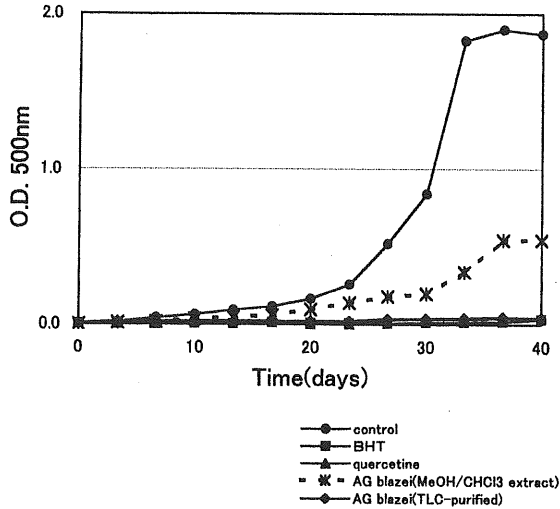


Fig. 3 Antioxidative effect of comparison of antioxidative activity of *AG blazei*

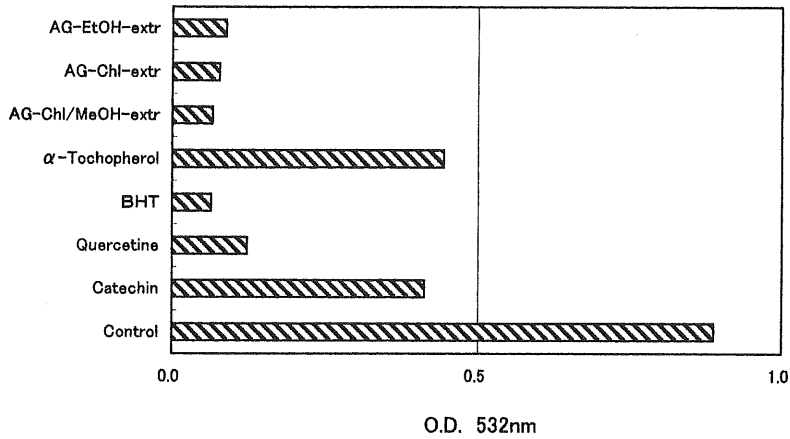


Fig. 4 Activity of alcohole-chloroform extracts of *AG blazei*

酸化力をもつことが判明した。

なお、活性本体の構造は、現在検討中であるが、クロロホルム抽出画分は265nmに吸収をもち、分子量は約280(質量分析)と推定された。また、メチルエステルとしてガスクロマトグラフィー分析(OV-1キャピラリーカラム使用、温度:昇温120-230℃, 8℃/min.)を行うと、Fig. 5に示すように、リノール酸エステル(C:18:2の脂肪酸)に近似のピークが得られた。

[多糖の化学的性質] アガリクスの70%アルコール抽出残渣物からタンパク質を除去後、熱水およびアルカリ処理で得られた水溶性の多糖は、それぞれ200mg, 810mgで、酸加水分解ではいずれもグルコースのみを生じた。

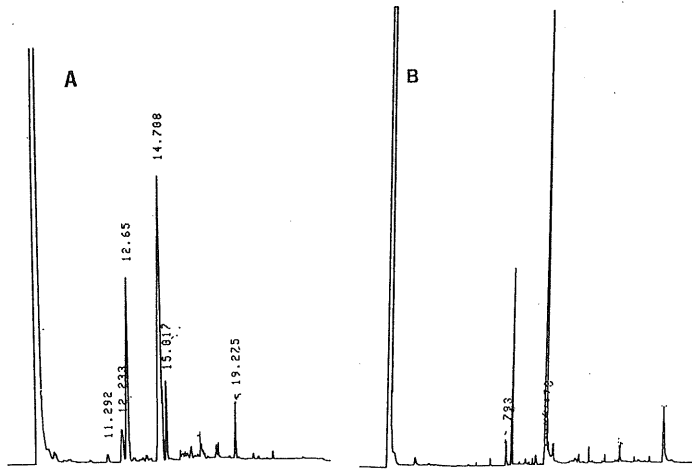


Fig. 5 GLC profile of partially purified *AG blazei* antioxidative component (methyl ester)
 Condition: OV-1 capillary column, 120-230, 8°/min.
 A: chloroform extract, B: ethylacetate extract.
 main peak corresponding to C_{18:2}, minor peak to C_{18:1}

旋光度は $[a]_D = +160^\circ$ ($c=1.0$ 1M NaOH) であることから α -結合のグルカンである。メチル化後、酸加水分解し、アルジトール・アセテートにしてガスクロマトグラフィー分析を行った結果は Table 1. に示すごとく、末端に由来するテトラ-*O*-メチル-グルコース1.0モルに対して、2,3,6-トリ-*O*-メチル-グルコース11モル、1,6/1,4分岐点を示す2,3-ジ-*O*-メチル-グルコースが1.2モルであった。この結果から、12残基の1,4結合のグルコースに、1残基の割合で*O*-6の分岐をもつことが示された。さらに、スミス分解による過ヨウ素酸酸化で、分岐を持たないグルコースの1,4結合からはエリスリトールが、末端のグルコース残基または1,6結合のグルコース残基からはグリセロールが生じ、メチル化分析の結果を支持した。従って、この多糖は、 α -1,4-結合鎖が1,6分岐したグリコーゲン様 α -グルカンであると考えられる。

さらに、この画分にイソアミラーゼ、次いでプルラーゼを作用させ、グリコーゲンの α -1,6-分岐を切断し、生成する α -1,4結合のユニット鎖の分布を陰イオン交換高速液体クロマトグラフィーで分析した。Fig. 6はそのプロフィールを示したものである。グルコース残基4個から25個までの広い範囲の α -

Table 1. Chemical Analysis of Alkali-extracted Glucan Fraction

(1) Methylation Analysis		(2) Smith Degradation Products	
<i>O</i> -Me-Glc	Molar Ratio	Products	Molar Ratio
2,3,4,6-tetra-	1.0	Glycerol	1.0
2,3,6-tri-	11.3	Erythritol	17.0
2,3-di-	1.2	Glucose	trace

(Analyzed by GLC on OV-1 Capillary Column, 180°C)

(OV-1 Capillary Column, 120°C → 230°C)

1,4-unit chainの分布が見られ、特に4~5残基鎖が最も多く存在していることがわかる。この結果は、アガリクス多糖の α -グルカンはグリコーゲンであり、その単位鎖長がフクロタケなど他の起源のきのこグリコーゲンに比べると⁸⁾、非常に短いことを示す。

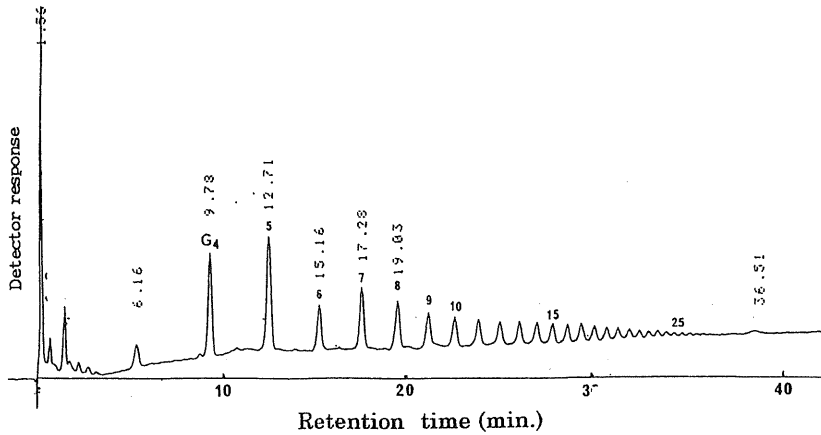


Fig. 6 HPAEC profile of Unit-chain distribution of alkali-soluble glucan after debranching by isoamylase plus pullulanase

子実体の主要部分を占めるアルカリ不溶画分の多糖は、グルコースが主な構成糖であるが、この画分は、90%ギ酸に部分的に溶けるのみで、ジメチルスルホオキシド (DMSO) など、ほとんどの溶媒には溶けないことが判った。そこで、キクラゲ、レイシ、フクロタケなど、他の子実体のグルカんに以前に我々が用いた独自の方法で、修飾することによる可溶化を行った。すなわち0.05N過ヨウ素酸で酸化後、水素化ホウ素ナトリウムによる還元で側鎖末端基を化学修飾することで可溶化し、グルカン・ポリアルコール (ポリオール) とした。これにより約65%は、水およびDMSO可溶となった。その一部を、酸水解して、生成物を NaBH_4 還元、アセチル化後ガスクロマトグラフィー分析に供した。Table 2はその結果を示したものである。可溶画分では、グリセロール：エリスリトール：グルコースのモル比が1.00：2.22：5.54となり、不溶画分では、1.00：1.22：4.81となった。

この結果から、アルカリ不溶画分の主要な多糖は、他のキノコの抗腫瘍グルカンと同様、1,3-結合を主鎖とする分岐 β -グルカンで、1,3-結合のグルコース残基5~6個あたり1個の割合でC-6位に分岐をもつ β -1,3/1,6-グルカンであることが示唆された。なお、エリスリトールは、グリコーゲン様多糖によ

Table 2. Hyrolysis Products of Alkali-Insoluble Glcan
After Periodate Oxidized and Reduction

Products	Molar Ratio	
	Soluble part	Residues
Glycerol	1.0	1.0
Erythritol	2.22	1.22
Glucose	5.54	4.81

(Analyzed as alditol acetate by GLC (OV-1 column, at 120 to 230°C)

るものと考えられるよりも、側鎖中の1,4-結合残基に由来するものと考えられるが、特定できず、なお検討を要する。

なお、アガリクスから抗腫瘍活性をもつ β -1,6-グルカンの存在が報告されているが¹⁾、我々の用いたアガリクスの場合、アルカリ可溶多糖画分をコンカナバリンA (Con.A) カラムに通し、非吸着画分を C^{13} N.M.R.にかけた結果では、 β -1,6-グルカンの存在する証拠は得られなかった。

謝 辞

本研究において、抗酸化活性の測定についてご教示いただいた大阪市立大学生物科学部、中谷延二先生に厚くお礼を申し上げます。

また、試料をご提供いただきました大愛(株)社長 宮部健一郎氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Kawagishi H., Inagaki R., Kanao T. and Mizuno T., (1989) *Carbohydrate Research* 186, 267-273
- 2) 角田万里子, 賀来華江, 三崎 旭, (1999) 微量栄養素研究 第16集 111-117
- 3) Misaki A., Kishida E., Kakuta M. and Tabata K., (1993) *Carbohydrates and Carbohydrate Polymers*, YALPANI M. ed., pp.116-129, ATL Press.
- 4) Misaki A. and Kakuta M., (1997) *Carbohydrates in Drug Design*, Witczak Z.J. ed., pp.655-687, Marcell Dekker Inc.
- 5) Osawa T. and Namiki M., (1981) *Agric. Biol. Chem.* 45, 735
- 6) Inatani R. Nakatani N. and Fuwa H., (1983) *Agric. Biol. Chem.* 47, 521-528
- 7) Ottolenghi A., (1959) *Arch. Biochem. Biophys.*, 79, 355
- 8) Misaki A., Nasu M., Sone Y., Kishida E. and Kinoshita C., (1986) *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2171-2183