

# 菌類の構成糖に関する生化学的研究 I

## ガスクロマトグラフィーによる構成糖の検討

藤井 昭 治

SHOJI FUJII: Biochemical studies on carbohydrates of fungi. I. Gas chromatographic identification of carbohydrates of some fungi.

**要旨:** ガスクロマトグラフィーで *Basidiomycetes* 6種と *Ascomycetes* 1種の子実体の構成糖を検討した。子実体よりえた糖類は加水分解し、分離した アミノ糖はまずホルマリン処理をおこなってアミノ基を block した後、常法通り TMS 化する。4種の 2-amino-2-deoxy-D-hexoses がよく分離することを確認し、ついでこの方法により子実体中に普遍的に 2-amino-2-deoxy-D-glucose が存在することを明らかにした。

*Phylloporus rhodoxanthus* は“ひだ”を有するにかかわらず、ひだ系の *Paxillus* よりは管孔系の *Boletaceae* に近い糖の構成を示す。

### I 緒 言

抗原としての多糖体の免疫学的特異性の点から、グラム陰性菌、グラム陽性菌等細菌の細胞壁の構成成分はかなりよく研究され<sup>1)</sup> 糖構造についても ribitol-Phosphate を骨格とした teichoic acid 構造と N-acetyl-D-glucosamine-N-acetyl-muramic acid 主鎖に peptide の結合した mucopeptide 構造の2種が知られている。グラム陰性菌には teichoic acid 構造は存在しないが、この mucopeptide 構造が細胞壁の構成上重要な役割をはたしていると思われる<sup>2), 3)</sup>。細菌類にくらべて酵母やカビ類の構成糖の研究<sup>4)</sup> は比較的少く、さらに所謂きのこの大部分が所属する担子菌類の細胞壁の構成糖に関しては、きわめて限定された種類について部分的に研究が行なわれているにすぎない。

*Polyporus giganteus* の子実体からグリコーゲン型の  $\alpha$ -glucan と (1 $\rightarrow$ 6)  $\beta$ 結合の D-galactopyranose を主鎖とする2種の水可溶性多糖体が<sup>5)</sup> (Fig. 1),

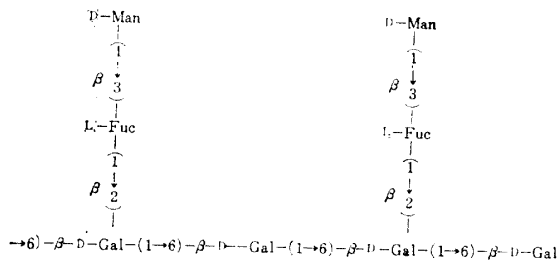


Fig. 1. Constitution of *Polyporus giganteus* heteropolysaccharide.

*Armillaria mellea* の子実体および菌糸からそれぞれ (1 $\rightarrow$ 6) の結合の D-galactopyranose あるいは (1 $\rightarrow$ 3)  $\alpha$ 結合の D-mannopyranose を骨格とするヘテロ多糖体<sup>6), 7)</sup> (fig. 2, 3) が分離され、メチル化法と部

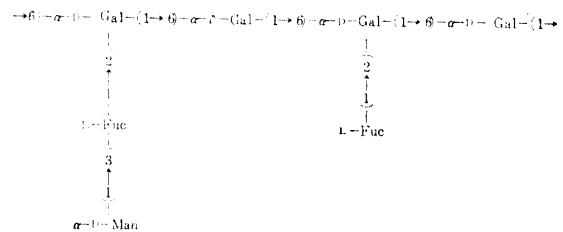


Fig. 2. Constitution of *Armillaria mellea* heteropolysaccharide.<sup>6)</sup>

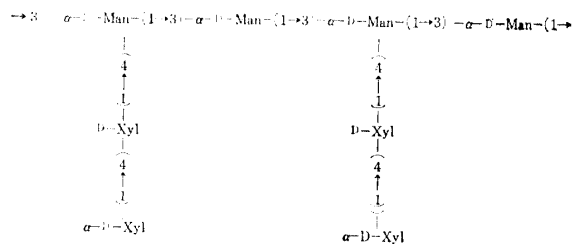


Fig. 3. Constitution of *Armillaria mellea* heteropolysaccharide.<sup>7)</sup>

分加水分解法によりその構造が決定されている。L-Fucose や D-Xylose がこれらのヘテロ多糖体の側鎖を構成しているが、D-glucose, D-galactose, D-mannose, L-fucose, D-Xyloseなどを構成成分とするヘテロ多糖体はその他、*Polyporus ovinus* の子実体<sup>8)</sup>

*Polyporus pinicola*<sup>9)</sup> *Polyporus borealis*<sup>10)</sup> *Lentini-  
mus edodes*<sup>11)</sup> から、さらに D-glucuronic acid を構  
成成分とするヘテロ多糖体が *Tremella mesente-  
rica*<sup>12)</sup> から分離され、又 *Fistulina hepatica* には  
全重量の9.5%の D-Arabinitol の存在が報告されてい  
る<sup>13)</sup>。

構成多糖体の研究に際して重要なことの一つは分離  
精製された物質の均一性についての確認であるが、報  
告された担子菌類の多糖体に関しても主として分離精  
製の比較的容易な水溶性の物質に限定され、細胞壁を  
構成する不溶性の多糖体の構造については殆んど知ら  
れていない。

一方、ガスクロマトグラフィーが糖類の研究に用い  
られるようになったのはここ12~13年であるが、この  
間、多くの研究者によりオリゴ糖、多糖の構造解析あ  
るいは単糖類の同定定量に利用されてきた。この様に  
糖類のガスクロマトグラフィーが幅広く多方面に利用  
されるようになってきたのは先ず糖を簡単に揮発性誘  
導体に変える方法が確立されてきたこととガスクロマ  
トグラフィーの分離能、感度、定量性がすぐれている  
ためであり、担子菌類の構成多糖体の構造解明にあ  
たって構成成分の単離同定に先立ってまず予備的な手  
段としてガスクロマトグラフィーを用いて構成糖の確  
認をおこなった。

糖類のガスクロマトグラフィーをおこなうに際し  
て、その存在がすでに報告されているキチン質<sup>14)~16)</sup>  
の構成糖である 2-amino 2-deoxy-D-glucose は従来  
の方法では普通のステンレススチールのカラムでは分  
解するのでホルマリン処理後 TMS 化することにより  
中性糖と同様ステンレススチールのカラムでも分解す  
ることなく他の 2-amino-2-deoxy-D-hexoses とよく  
分離し、容易に確認できる方法を考案した。

アミノ糖あるいはアミノ糖のメチル配糖体のアミノ  
基をそのまま又は N-アセチル化後 TMS 化した場合、  
これらの誘導体は何れも比較的不安定でガラス製のカ  
ラムを使用する必要があり<sup>17), 18), 20)</sup> 又 N-エトキシ  
カルボニル化に際してはアルカリの状態では1時間処理  
する為に<sup>19)</sup> 所謂エピメル化の副反応をおこす可能性  
がある。アミノ基は一般にアルデヒドと反応して Schiff  
の塩基を形成するが、この反応を応用してアミノ糖を  
水溶液中でホルマリンと反応させ、短時間に定量的  
にアミノ基を block し、ついで常法通り TMS 化おこ  
なった結果、2-amino-2-deoxy-D-mannose 以外の  
2-amino-2-deoxy-D-galactose, 2-amino-2-deoxy-D-  
glucose, 2-amino-2-deoxy-D-talose は夫々ガスクロ  
マトグラフィーにおいて単一のピークとなり、良好な分  
離を示した。(Fig. 4)

## II 試料と方法

### 1) 子実体の処理と試料の調製

採取した子実体を直ちに水洗し、ついで50%メタノ  
ール中でホモジナイズする。ついでろ過し、えられた  
50%メタノール不溶部をさらに40~50°Cの温水で1時  
間処理し、ろ過により水可溶部を除去する。50%メタ  
ノール可溶部と温水可溶部は合わせて50°C以下で減圧  
濃縮後デシケーター中で無水燐酸を用いて減圧乾燥す  
る。これらの不溶部と可溶部は 3N-HCl でそれぞれ  
3時間、2時間100°Cで加水分解し、ついで 40°C以下  
で減圧濃縮後デシケーター中でカ性ソーダと無水燐酸  
を用いて減圧乾燥する。

アミノ糖について検討する場合、後述のようにホル  
マリン処理をおこなうが、アミノ酸や中性糖が共存し  
てもアミノ基の block に阻害はないが、TMS 化後  
(Fig. 4) に示したごとく 2-amino-2-deoxy-D-man-

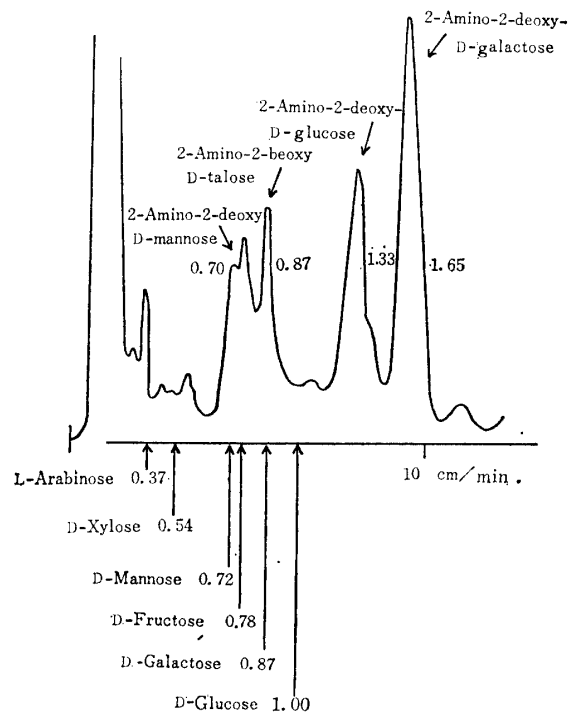


Fig. 4. Gas chromatographic pattern of four  
2-amino-2-deoxy-D-hexoses (hexosamines)

nose, 2-amino-2-deoxy-D-talose のピークと d-man-  
nose, d-fructose, d-galactose のピークと近接し分離  
が不充分である。従って中性糖とあらかじめ分離す  
るために加水分解後の試料約 10mg を少量の水に溶解し  
Dowex 50×8(H<sup>+</sup>) 1cm×12cm のカラムにアミノ糖  
を吸着させる操作を加え、吸着しない中性糖部分と  
3N-HCl で溶出するアミノ酸、アミノ糖部分をそれ  
ぞれ減圧濃縮しデシケーター中で同様に乾燥して試料  
とする。アミノ糖部分 0.5~1mg は N-NaOH 0.1cc

に溶解し30%の市販一級ホルマリン 0.2ccを加えて直ちにデシケーター中で無水磷酸と共に常温で減圧乾燥する。

## 2) ガスクロマトグラフィー

乾燥試料を試験管にとり、ピリジン 0.1cc, HMDS (hexamethyldisilazane) 0.02cc, CTMS (Chlorotrimethylsilane) 0.01ccを順に加えてグリセリン浴上100°C 5分加熱し TMS化する。

使用した装置は島津のガスクロマトグラフ GC-3AF型で検出機は水素炎イオン化検出機, 5% SE-30 on Shimalite W-60-80 mesh でステンレススチールの 3mm×3mのカラムを用いた。温度は 100°C~200°C, Carrier gas は窒素ガスで圧力は 1.0~1.2kg/cm<sup>2</sup>, ガスクロマトグラフへの injection は 10μl のテルモ・マイクロシリンジで反応混合物を直接 1~3μl 注入した。

## III 結果と考察

### 1) アミノ糖の抽出と定量について

2-amino-2-deoxy-D-glucose がアミノ酸と共存して遊離の状態種々の担子菌類の子実体中に存在することがペーパークロマトグラフィーにより検出され<sup>21)</sup>て興味深い。Tremellales, Polyporales, Agaricales 中に広くキチンの存在が報告され<sup>14)~16)</sup> 試料とした *Lentinus edodes*, *Flammulina velutipes* (Fig. 5),

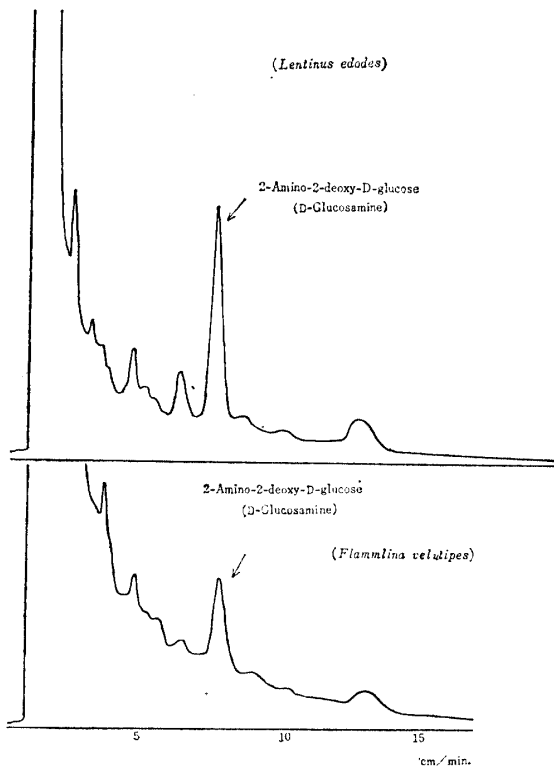


Fig. 5. Gas chromatographic patterns of 2-amino-2-deoxy-D-glucose in the hydrolyzates

*Morchella conica*, *Paxillus atrotomentosus*, *Boletus rubellus*, *Phylloporus rhodoxanthus*, *Xerocomus* sp. すべてに 2-amino-2-deoxy-D-glucose を検出したが、その他の 2-amino-hexose すなわち 2-amino-2-deoxy-D-galactose, 2-amino-2-deoxy-D-mannose, 2-amino-2-deoxy-D-talose は確認出来なかった。

また標準の 2-amino-2-deoxy-D-glucose, 2-amino-2-deoxy-D-galactose についてはピークの高さと重量が一定の範囲内で直線関係を示すことを確認し、このホルマリン法は充分定量にも使用出来ることが明らかになった (Fig. 6)。

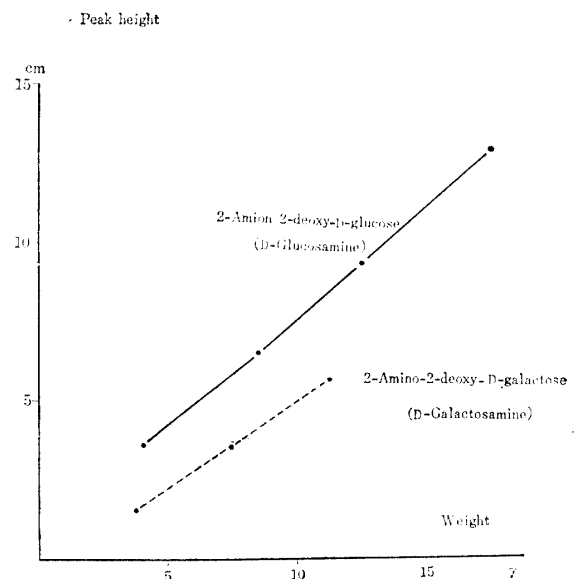


Fig. 6. Determination of 2-amino-2-deoxy-D-glucose and 2-amino-2-deoxy-D-galactose as TMS derivatives by gas chromatography

### 2) 中性糖の検出

これらの条件で中性糖はよく分離し、標準の糖の分離状況は (Fig. 7) の様である。6種の菌の子実体の加水分解物中に検出された糖を Table 1 に表示した。

*Phylloporus rhodoxanthus* (SCHW.) Bres. sub sp. *foliiporus* (MURR.) Sing. (*Gomphidius foliiporus* MURR.) は *P. rhodoxanthus* (SCHW.) Bres. sub sp. *rhodoxanthus* (*P. rhodoxanthus* sub sp. *americanus* Sing.) の1亜種とみなされ、傷つけられると青変するのでこの名がある。後者は *Gomphidius rhodoxanthus* (SCHW.) Sacc.; *Paxillus rhodoxanthus* (SCHW.) RICHEN; *Clitocybe pelletieri* (Lev.) GILL; *Paxillus paradoxus* (KALCHBR.) COOKE など学名も種々なものが用いられ、両者共菌学者によって所属の決定に異論を生じたものの1つであって、*Phylloporus* は *Boletaceae* (あみたけ科, いぐち科) に属し、この

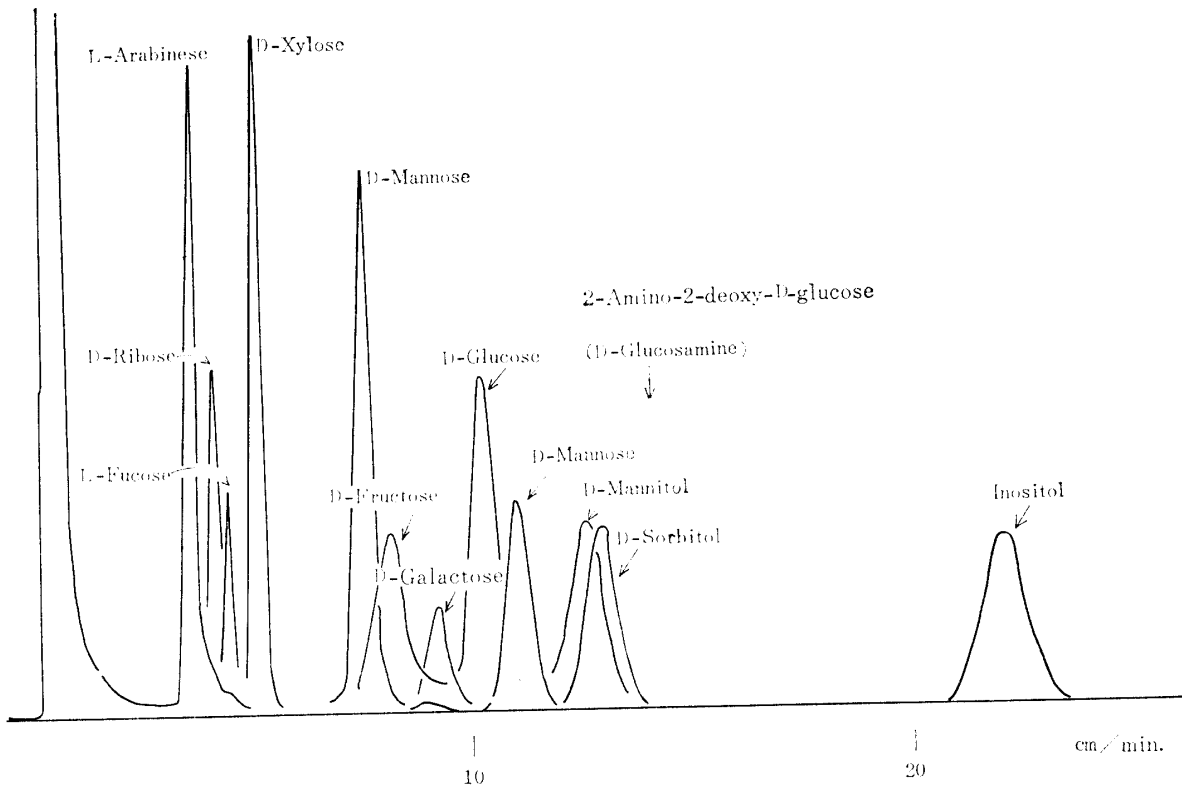


Fig. 7. Gas chromatographic pattern of some monosaccharides

Table 1. Carbohydrate components of some fungi

	Insoluble part	Soluble part
<i>Lentinus edodes</i>	L-Fucose	D-Xylose
	D-Galactose	D-Glucose
	D-Glucose	D-Mannitol
	D-Mannose	
	2-Amino-2-deoxy-D-glucose	
<i>Flammulina veltipes</i>	L-Fucose	D-Xylose
	D-xylose	D-Glucose
	D-Galactose	D-Mannitol
	D-Glucose	Inositol
	D-Mannose	
	2-Amino-2-deoxy-D-glucose	
<i>Morchella conica</i>	L-Fucose	D-Galactose
	D-Galactose	D-Mannose
	D-glucose	D-Mannitol
	D-Mannose	
	2-Amino-2-deoxy-D-glucose	
<i>Paxillus atrotomentosus</i>	L-Fucose	D-Xylose
	D-Galactose	D-Glucose
	D-Glucose	
	2-Amino-2-deoxy-D-glucose	
<i>Phylloporus rhodoxanthus</i>	L-Fucose	D-Xylose
	D-Galactose	D-Glucose
	D-Glucose	D-Mannitol
	2-Amino-2-deoxy-D-glucose	
<i>Boletus rubellus</i>	L-Fucose	D-Xylose
	D-Galactose	D-Glucose
	D-Glucose	D-Mannitol
	2-Amino-2-deoxy-D-glucose	

*Boletaceae* はすべて管孔であるにかかわらず唯一つの *Phylloporus rhodoxanthus* のみがひだを有し、そのため従来一般に、櫛菌類に分類されてきたものである。*Boletaceae* は *Gyrodontoideae*, *Suilloideae*, *Xerocomoideae*, *Boretoideae* に分類され、*Suilloideae* の *Suillus bovinus*, *Xerocomoideae* の *Xerocomus* sp. *Boletoideae* の *Boletus rubellus* それぞれ可溶部に D-Mannitol を検出したが、*Phylloporus rhodoxanthus* の別の所属である *Paxillus* に属する *Paxillus atrotomentosus* には D-mannitol 検出されない (Fig. 8,9). *Paxillus* に所属する *Paxillus involutus*, *Paxillus Panuoides* あるいは *Gomphidius* に所属する *Gomphidius roseus*, *Gomphidius rutilus*, *Gomphidius tomentosus*, *Gomphidius maculatus*

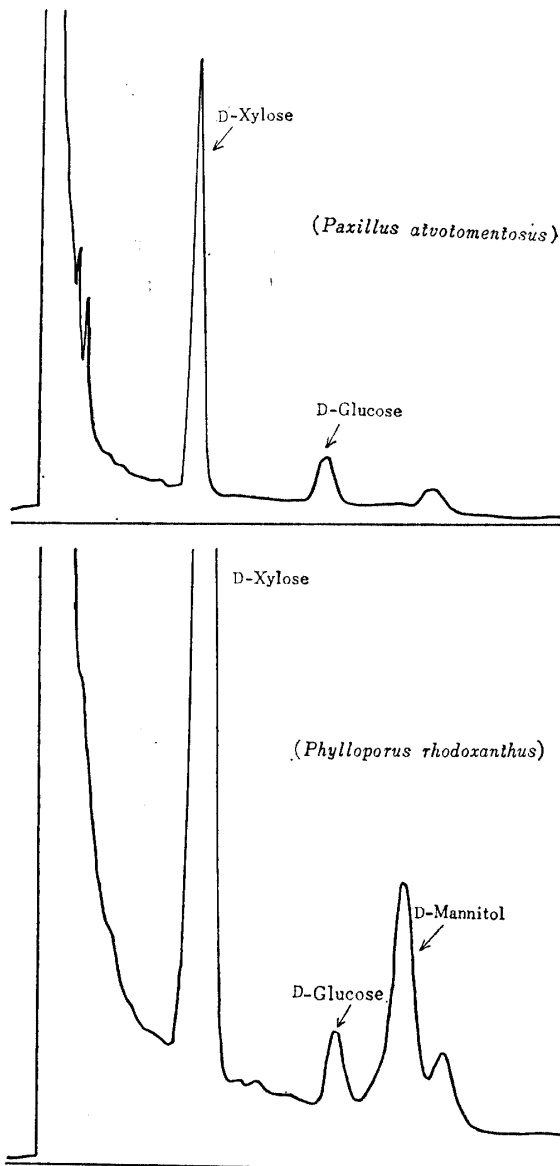


Fig. 8. Gas chromatographic pattern of soluble fraction of *P. atrotomentosus* and *P. rhodoxanthus*

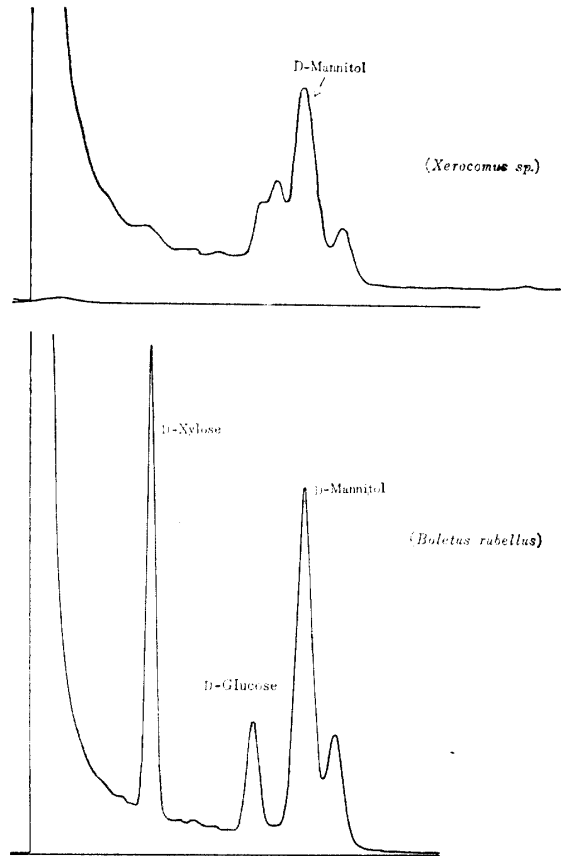


Fig. 9. Gas chromatographic pattern of soluble fraction of *Xerocomus* sp. and *B. rubellus*.

又 *Clitocybe* に所属する *Clitocybe acromelalge*, *Clitocybe odora*, *Clitocybe candicans*, *Clitocybe infundibuliformis* など、季節の関係で新鮮標品を得ることが出来ず、これらに D-mannitol が存在するかどうかの検討が出来なかった。

D-mannitol が一つの指標になるかどうかは別として、担子菌類に存在する遊離のアミノ酸組成はその多様性のため<sup>21)</sup>、科や属の特異性決定の指標とするには多少困難であるが、もし構成糖の組合わせがこれらの指標になるならば、これらの糖の分析結果が従来の分類に一つの有力な Data を提供する可能性がある。又、加水分解条件を再検討し糖の分解を極力おさえることが出来れば、単に定性的段階にとどまることなく、構成糖のモル比の算出もガスクロマトグラフィーを用いて可能であると思われる。

## 文 献

- 1) Osborn, M.J. (1969) : Ann. Rev. of Biochem., 38 : 50.
- 2) Salton, M.R. (1958) : J. gen. Microbiol. J., 18 : 481.
- 3) Delzer, H. (1962) : Biochim. Biophys. Acta, 93

- : 229.
- 4) 江上不二夫監修 (1969) : 多糖生化学 I 共出立版 371—378.
  - 5) Bhavanandan, V.P., Bouveng, H.O. and Lindberg, B. (1964) : Acta Chem. Scand., **18** : 504.
  - 6) Fraser, R.N. and Lindberg, B. (1960) : Carbohyd Res., **4** : 12.
  - 7) Bouveng, H.O., Fraser, R.N. and Lindberg, B. (1967) : Carbohyd. Res., **4** : 20.
  - 8) Axelsson, K. and Björndal, H. (1969) : Acta Chem. Scand., **23** : 1815.
  - 9) Axelsson, K., Björndal, H. and Lindberg, B. (1969) : Acta Chem. Scand., **23** : 1597.
  - 10) Björndal, H. and Wagström, B. (1969) : Acta Chem. Scand., **23** : 1560.
  - 11) Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T. and Fukuoka, F. (1969) : Nature **222** : 687.
  - 12) Slodki, M.E.(1966) : Can. J. Microbiol., **12** : 495.
  - 13) Frérejacque, M. (1943) : Compt. rend., **217** : 251.
  - 14) Frey, R. (1950) : Ber. Schweiz. Botan. Ges., **60** : 199.
  - 15) Schmidt, M. (1936) : Arch. Mikrobiol., **7** : 241.
  - 16) Proskuriakow, N.J. (1926) : Biochem. Z., **167** : 68.
  - 17) Kärkkäinen, J. and Vihko, R. (1969) : Carbohyd. Res., **10** : 113.
  - 18) Radhakrishnamurthy, B., Dalferes, E.R., Jr. and Berenson, G.S. (1966) : Anal. Biochem., **17** : 545
  - 19) Schragar, J. and Oates, M.D.G. (1968) : Biochem. J., **106** : 523.
  - 20) Kärkkäinen, J., Lentonen, A. and Nikkari, T. (1965) : J. Chromatog., **20** : 457.
  - 21) Hatanaka, S. and Terakawa, H. (1968) : Bot. Mag. Tokyo, **81** : 259.

#### Summary

Using gas chromatographic technique, the compositions of carbohydrates from six *Basidiomyceteses* and one *Ascomycetes* were investigated by examination of acid hydrolysate of these fruit bodies.

Four 2-amino-2-deoxy-D-hexoses (hexosamines) were converted to trimethylsilyl derivatives after treatment with formaline, and the peaks of these TMS-hexosamines were well separated from each other.

The hydrolysates of some fruit bodies were analysed for 2-amino-2-deoxy-D-hexose (hexosamine) by the gas chromatography, and it was shown that all contained the 2-amino-2-deoxy-D-glucose.

The carbohydrate composition of *Phylloporus rhodoxanthus* was similar to that of *Boletaceae* and not to that of *Paxillus*. This fact may support the theory that *Phylloporus rhodoxanthus* belongs to *Boletaceae*.