

# 菌類の構成糖に関する生化学的研究 IV

—*Russula Pseudodelica* の子実体 glycoprotein について—

藤井昭治・太田香矢乃

SHOJI FUJII and KAYANO OHTA

Biochemical studies on carbohydrates of fungi IV

—Glycoprotein of *Russula pseudodelica*—

**要旨** *Russula pseudodelica* の子実体から10%水酸化カリウム水溶液で抽出され、酢酸で中和することにより沈殿してくる glycoprotein は、その構成アミノ糖として 2-amino-2-deoxy-glucose 以外に 2-amino-2-deoxy-mannose を含有する。アミノ糖はその glycoprotein を加水分解後、アミノ酸分析機により、又アミノ糖をホルマリン処理後 TMS 化し、ガスクロマトグラフィーで確認した。マススペクトルの結果から、アミノ糖のアミノ基はホルマリンとの処理によりメチレンイミノ基に block されている事が明になった。

## 緒言

菌類の hyphal wall は、chitin 或は chitin-protein complex および glycan がその骨格成分となり、*Schizophyllum commune* の例では<sup>1)</sup> hyphal wall の乾燥量の70%をしめている。そしてこれら多糖体の間隙に、又は多糖体と多糖体の層の中間に、所謂 glycoprotein が存在して hyphal wall を構成していると考えられている。

一般に immunoglobuline などの如く生理活性を有する所謂動物起原の glycoprotein については、又 bacterial cell wall の glycoprotein についても、糖部分と蛋白質部分の相互関係、糖側鎖と蛋白質部分との結合様式、或は糖側鎖中の糖の結合様式など種々詳細な研究がある<sup>2)</sup>。これらに対して植物起原の glycoprotein、更に菌類の hyphal wall を形成している glycoprotein の構造に関しては研究は極めて限定されている。

*Saccharomyces cerevisiae* の cell wall では13%の蛋白質が mannan と complex を形成していると報告されている<sup>3)</sup>。さらにゲル濾過法により glycopeptide A<sub>2</sub> が分離され<sup>4)</sup>、この mannan を含有する glycopeptide

は cystine, methionine は含有していないが serine threonine が多く、さらに 2-amino-2-deoxy-D-glucose を構成々分とすること、mannose が *o*-glycosidic に serine threonine と結合していることが確認されている。

*Schizophyllum commune* の wall structure について特にその多糖体構造については Wessel らの詳細な研究<sup>5)</sup>があり要約すれば Fig. 1 の如くである。21%をしめる所謂 S-glucan, 39%の R-glucan, 10%の chitin に対して約7%程の glycoprotein については殆んどふれられていない。*S. commune* よりも7~8倍 chitin および蛋白質部分を含む *Agaricus bisporus* の mycelial wall についても<sup>6)</sup> Fig. 2 の如き構造模形が発表されてはいるが、mycelial wall に広く分布している protein 構造についても cystine を含む protein とのみで、詳細には述べられていない。

一般に glycoprotein において糖部分と蛋白質部分との結合様式は、*N*-acetylglucosaminyl asparagine (*N*-glycosidic)、以下 *O*-glycosidic な結合であるが *N*-acetyl-galactosaminyl-serine or *N*-acetyl-galactosaminyl-threonine, Xylosyl-serine, galactosyl-serine, mannosyl-

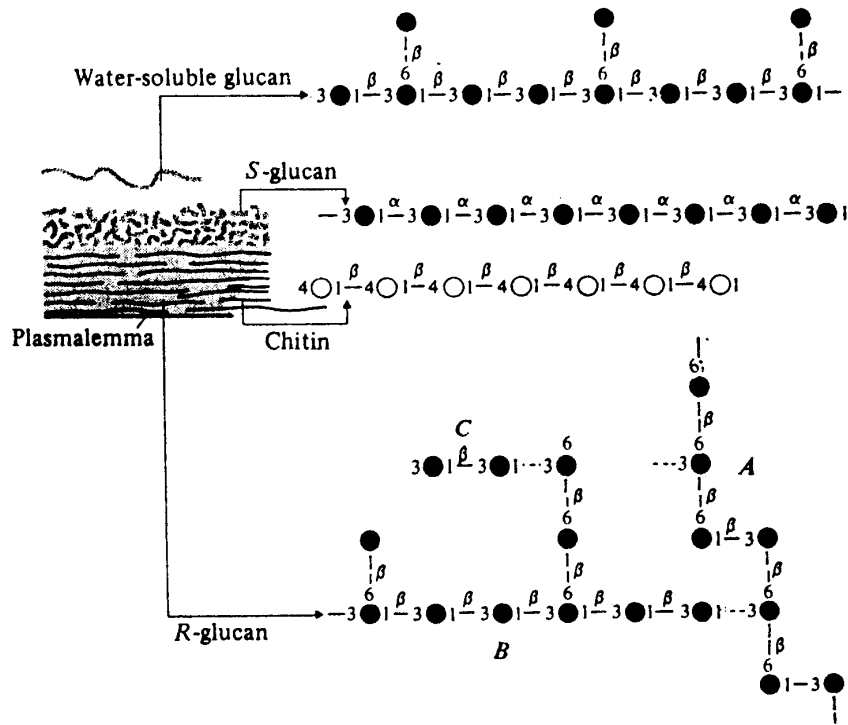


Fig. 1. Structure of polysaccharide in the wall of *Schizophyllum commune*<sup>1)</sup>.

serine, mannosyl-threonine, galactosyl-hydroxylysine, L-Arabinosyl-hydroxyproline などの結合が知られている<sup>6)</sup>がアミノ糖は 2-amino-2-deoxy-D-glucose, 2-amino-2-deoxy-D-galactose のみであり, その他のアミノ糖の存在については全く不明である。

比較的多量発生する *Russula pseudodelica* の子実体は他のベニタケ属のきのこの子実体と同様, 所謂“もろさ”があつて子実体はこわれ易く, 他の担子菌子実体と異り, 特異な cell wall 構造が考えられる。これらの点にもとづいて *Russula pseudodelica* の子実体を材料とし, cell-wall 内におけるその glycoprotein の構造解析への予備的な段階として, まずそのアミノ糖を検討した。

材料ならびに方法

*Russula pseudodelica* (しろはつもどき) の子実体は京都加茂別雷神社(上加茂神社)および吉田神社境内で昭和57年7月21日~23日に採集した。

1. 子実体の処理 glycoprotein の分離

採取した子実体は附着している土, 落葉を除去後水洗し, ついでクロロホルム:メタノール1:1の混合物同加えてホモジナイザーで処理する。濾別後不溶性残渣を再び50%メタノールを加えて同様処理する。この残渣 (wet weight 640 g, 乾燥重量換算 84.3 g) に10%水酸化カリウム水溶液を加え, 沸とう水中で1.5時間, アルカリ抽出する。5000~6000 r. p. m. で15分遠心分離して残渣と分離し, 残渣をさらに10%水酸化カリウ

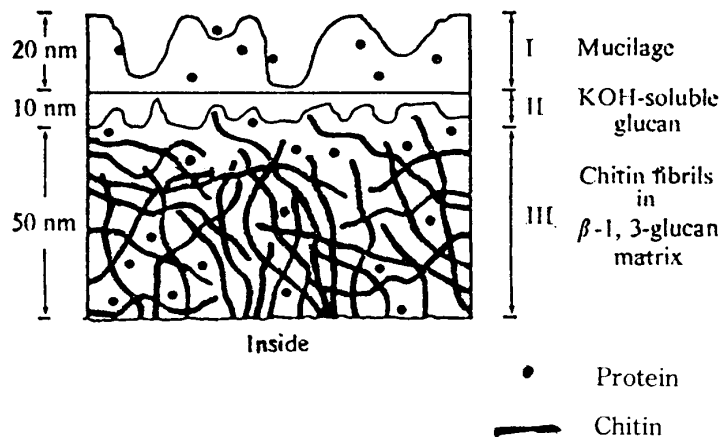


Fig. 2. Diagrammatic model of hyphal wall of *A. bisporus*<sup>5)</sup>.

ム水溶液で洗浄し、溶液と洗液を合し(約3 lit.)酢酸でpHを7.0に中和する。生じた沈殿を15分5000~6000 r. p. m. 遠心分離して集める。収量は wet weight で75.5 g 乾燥重量換算では16.3gであった。

## 2. AMINO ACID AUTO ANALYSER による検索

### a) 構成アミノ酸について

glycoprotein 約2 mg に6 N 塩酸を20 ml 加え、減圧下で凍結融解を3~4回繰返して溶存酸素を除去する。封管中110°Cで24時間加水分解し、加水分解物を減圧濃縮乾固して塩酸を除去する。ついで0.01 N 水酸化ナトリウム水溶液 1.0 ml を加え4~5時間放置後IPHDL 2.0 ml を加え、3000 r. p. m. 10分遠心分離して上澄液をとり HITACHI AMINO ACID AUTO ANALYSER KLA-5 型でアミノ酸を検索した。

### b) 構成アミノ糖について

glycoprotein を6 N 塩酸で2時間沸とう水中で加水分解する。水で希釈後不溶物を汙別し、汙液を濃縮する。析出する無機塩類を出来る限り除去し、ついでDOWEX 50WX8 (H<sup>+</sup>型)イオン交換樹脂に吸着させ、2 N 塩酸で溶出、さらにこの溶出液を減圧濃縮して塩酸を除去し、塩基性アミノ酸およびアミノ糖画分を得る。この画分2 mg を試料としてIPH-DL 2 ml を加え、アミノ酸の場合と同様 HITACHI AMINO ACID AUTO ANALYSER KLA-5 型で分析する。

## 3. ガスクロマトグラフィーによる検索

2) b) で得た glycoprotein 加水分解物約3 mg をとり、1 N 水酸化ナトリウム水溶液0.1 ml に溶解し、30%の市販ホルマリン0.02 ml を加え氷で冷却しながら約1時間放置する。反応終了後凍結乾燥して試料とする。

充分乾燥した試料にピリジン0.1 ml, HMDS (Hexamethyldisilazane) 0.02 ml, TMCS (Trimethylchlorosilane) 0.01 ml を順に加え、グリセリン浴上100°C 5分加熱してTMS化する。5% SE-30 on Shimalite W 60~80 mesh, ステンレスカラム3 mm×3 m を用い190°Cで分析する。2-amino-2-deoxy-D-glucose hydrochloride, 2-amino-2-deoxy-D-galactose hydrochloride および 2-amino-2-deoxy-D-mannose hydrochloride を同様処理して標準とした。

### 3. マススペクトルによる検索

ホルマリン処理後 TMS 化した試料を HITACHI M-60 GC-MS, HITACHI DATAZYLER OO 2B により分析した。カラムは2% OV-101 on Chromosorb WHP, 操作温度は、220°C, イオン化電圧20 eV, Electron Impact により測定した。

## 結果と考察

クロロホルム:メタノール, 1:1で脱脂後, 50%メタノールでマンニトールなど遊離糖を除去した子実体からアルカリで溶出した酸不溶性の glycoprotein の構成アミノ酸組成は Ser 含量を1.0として相対表示すれば第1表のようである。Table 1 に加えた Livingston の *Neurospora crassa* の hyphal cell よりの 0.5 N 水酸化ナトリウム抽出物の分析データ<sup>7)</sup>と比較すれば, phenylalanine, glutamine, valine が多く threonine が少ない。

高等植物では hydroxyproline-rich protein が炭水化物部分との結合に重要な役割をはたしている<sup>8)</sup>, 菌類の cell-wall にはこのような glycoprotein は知られていない。hydroxyprolin は *Oomycetes* の例で見られるように<sup>9)</sup> chitin がなくてその代わりに cellulose 類似の glucan が存在する菌類の wall で発見されているにすぎない。

glycoprotein の存在形態としては chitin 或は chitin と蛋白質から出来ている innermost region と, outer layer である  $\alpha$  或は  $\beta$ -glucan の層との間で network は形成せず単なる中間層を形成している場合<sup>10)</sup> *A. Bisporus* の hyphal cell の構造模形で示されている如

Table 1. Amino acid composition of the glycoprotein.

Amino acids	from <i>N. crassa</i> <sup>7)a)</sup>	from <i>R. pseudodelica</i> <sup>b)</sup>	
Ala	10.9		
Arg	3.7		
Asp	12.4	2.52	—3.38
Cys	0.7		
Glu	10.2	3.12	
Gly	13.4		
His	2.3	0.32	
Ile	3.3		—2.69
Leu	6.9		
Lys	6.4	0.91	
Met	1.2	0.35	
Phe	2.3	2.03	
Pro	0.7		
Ser	8.6	1.00	
Thr	8.2	0.31	
Tyr	2.9	0.52	
Val	5.8	2.85	

a: All values expressed as a percentage of total amino acid.

b: All values expressed the relative amount to that of serine (1.00).

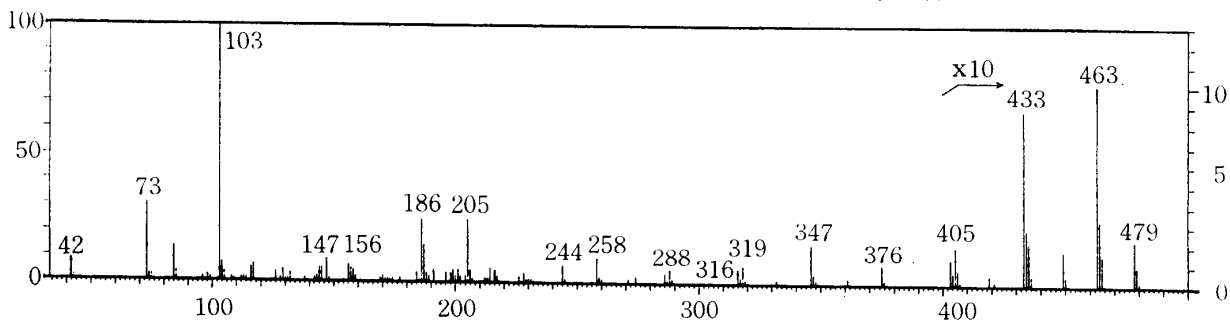


Fig. 3. Mass spectrum of 2-methyleneimino-2-deoxy-1,3,4,6-tetra-*o*-trimethylsilyl-D-mannose.

Table 2. Relative retention times of TMS derivatives of amino sugars treated with formaline.

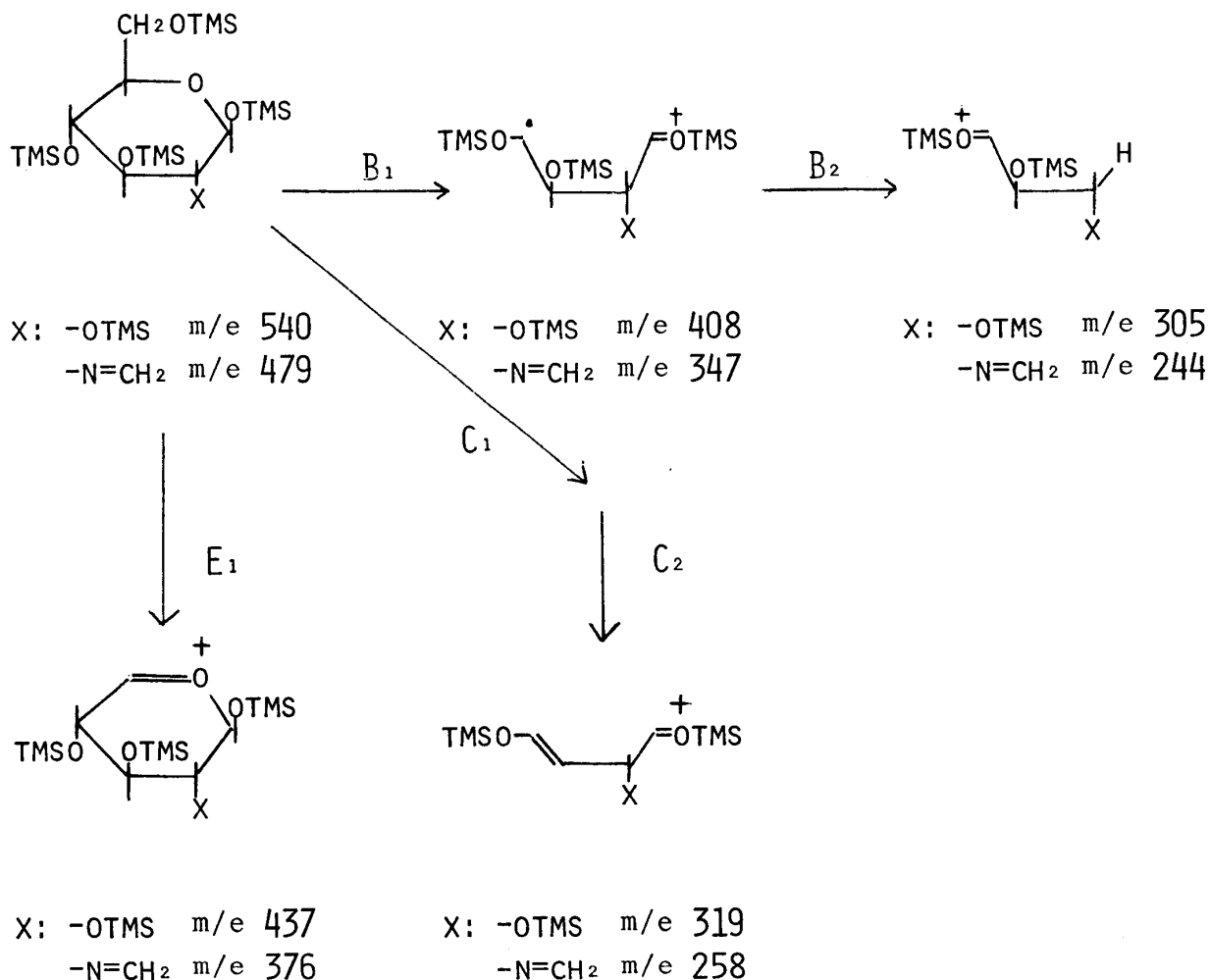
Compounds	Retention time (min.)	R <sub>g</sub> -glucose
D-glucose	4.5	1.00
2-amino-2-deoxy-D-glucose	6.2, 11.05	1.39, 2.48
2-amino-2-deoxy-D-mannose	3.4, 3.8	0.76, 0.85
2-amino-2-deoxy-D-galactose	7.6, 13.6	1.70, 3.06
aminosugars from the glycoprotein	3.4, 3.8, 6.1 4.6*, 8.3*, 9.2*	0.76, 0.85 1.37

\* Unknown amino sugars.

く<sup>5)</sup> glycoprotein が chitin fibril と所謂 loosely-textured innerside を形成している場合など、その存在形態の多様性がうかがわれる。

AMINO ACID AUTO ANALYSER によるアミノ糖の分析の結果から明に 2-amino-2-deoxy-glucose, 2-amino-2-deoxy-mannose が確認された。2-amino-2-deoxy-D-mannose は sial 酸の部分構造としてその生合成機構も知られているに拘らず、現在迄多糖体の構成糖又は glycoprotein の糖構造中にも発見されていない。

アミノ糖のガスクロマトグラフィーにおいて、TMS 化に先立ってアミノ基をホルムアルデヒドと反応させ



る方法<sup>11)</sup>を用いて *Russula pseudodelica* の子実体より分離した glycoprotein の分析結果では、この glycoprotein は 2-amino-2-deoxy-glucose に伴って 2-amino-2-deoxy-mannose を含有することを示した (Table 2)。AMINO ACID AUTO ANALYSER による分析においても又ホルマリン処理法によるガスクロマトグラフィーにおいてもこれら 2 種のアミノ糖以外に未知アミノ糖と思われるものの存在が確認され、glycoprotein 中におけるアミノ糖の存在形態は中性糖との相関々係において予想以上に複雑なものかもしれない。

アルデヒドとの反応においてアミノ基は所謂 Schiff の塩基を形成するが、ホルマリンとの場合はメチレンイミノ基となる事が予想される。前報<sup>11)</sup>においてはその構造の確認が出来ていなかったのでマスペクトルにより検討した。標準の 2-amino-2-deoxy-D-glucose hydrochloride, 2-amino-2-deoxy-D-mannose hydrochloride および 2-amino-2-deoxy-D-galactose hydrochloride のホルマリン処理後 TMS 化した試料のマスペクトルには共通して特徴的な m/e 376, m/e 347, m/e 244 および m/e 258 の fragmentation がみられた (Fig. 3)。これらは Scheme 1 に示すごとく、Kochetkov により提案されている 6 炭糖の分解経路<sup>12)</sup>  $\rightarrow E_1 \rightarrow B_1 \rightarrow B_2, \rightarrow (C_1) \rightarrow C_2^1$  において -OTMS を  $-N=CH_2$  に置き換えた fragmentation と完全に一致し、アミノ基がホルマリン処理によりメチレンイミノ基へ修飾されている事を示す。その他の fragmentation は penta-*o*-trimethylsilyl-D-glucose のそれと全く同一であり<sup>13)</sup>、これらのアミノ糖が D-glucose の場合と同じ経路で pyranose form から解裂してゆく事を示している。

謝辞：*Russula pseudodelica* の子実体の採取に際して御協力いただいた加茂別雷神社および吉田神社の社務所の方々に、又マスペクトルの測定を引受けていただいた神戸学院大学栄養学部、芝原章氏に厚く感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) J. G. H. Wessels and J. H. Sietsma (1979): Wall structure and Growth in *Schizophyllum commune*, In "Fungal Walls and Hyphal Growth", eds. J. H. Burnett and A. P. J. Trinci, pp. 27-48. Cambridge, London, New York, Melbourne; Cambridge University Press.
- 2) A. Gottshalk Ed. (1972): "Glycoproteins, their Composition, Structure and Function" Part A and Part B Amsterdam, London, New York, Elsevier Pub. Comp.
- 3) D. H. Northcote and R. W. Horne (1952): The Chemical Composition and Structure of the Yeast Cell Wall. *Biochem. J.*, **51** 232-236.
- 4) R. Senterdreu and D. H. Northcote (1968): The Structure of a Glycopeptide Isolated from Yeast Cell Wall. *Biochem. J.*, **109**, 419-432.
- 5) G. O. Michalenko, H. R. Hohl and Dora Rast (1976): Chemistry and Architecture of the Mycelial Wall of *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.*, **92**, 251-262.
- 6) N. Sharon (1975): "Complex Carbohydrates—Their Chemistry, Biosynthesis and Functions" p. 68. London, Amsterdam·Don Mills Ontario·Sydney·Tokyo. Addison-Wesley Pub. Comp.
- 7) L. R. Livingston (1969): Locus-specific Change in Cell Wall Composition Characteristic of Osmotic Mutant of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, **99**, 85-90.
- 8) D. T. A. Lawport (1965): The Protein Component of Primary Cell Walls. "Adv. in Botanical Research" Vol. 2 pp. 151-218 ed. R. D. Preston, New York, London, Academic Press. P. Albersheim (1974): The Primary Cell-Wall and Control of Elongation Growth. In "Plant Carbohydrate Biochemistry" pp. 154-164 ed. J. B. Pridham, New York, London, Academic Press.
- 9) E. M. Crook and I. R. Johnston (1962): The Qualitative Analysis of the Cell-Wall of Selected Species of Fungus. *Biochem. J.*, **83**, 325-331.
- 10) D. Hunsley and J. H. Burnett (1970): The Ultrastructural Architecture of the Walls of Some Hyphal Fungi. *J. Gen. Microbiol.* **62**, 203-218.
- 11) 藤井昭治 (1970): 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 京府大学報・農・22号, 95-100.
- 12) N. K. Kochetkov and O. S. Chizhov (1972): Mass Spectrometry of Carbohydrates. In "Methods in Carbohydrate Chem.", Vol. 6, eds. R. L. Whistler and J. N. BeMiller pp. 540-554. New York, London, Academic Press.
- 13) 河波順一・中川有造 (1976): 質量分析 pp. 389-413. "生化学実験講座" 糖質の化学 (下) 日本生化学会編 東京化学同人。

## Summary

2-Amino-2-deoxy-mannose and 2-amino-2-deoxy-glucose have been identified as a component of the

wall glycoprotein of fruitbody of *Russula pseudodelica*.