

食用茸であるササクレヒトヨタケ成分の生理活性について

Bioactivities and chemical properties of components obtained from Coprinus comatus of an edible mushroom

堂ヶ崎知格, 関 亘, 角野洋一, 川上 泰

麻布大学

Chikaku Dogasaki, Wataru Seki, Yhoichi Kakuno, Yasushi Kawakami

Azabu University

Abstract. One of the edible mushrooms, *Coprinus comatus* (CPCM), was successively extracted in a similar fashion with water at ambient temp., with hot water at 100 °C, with 0.1 M NaOH at ambient temp., with 0.5 M NaOH at ambient temp. and with 0.05 M NaOH at 100 °C. The crude polysaccharides, the non-dialyzable fractions of these extracts were designated C-1 ~ C-5, respectively. In order to investigate the biological activities of each fraction, the mitogenic activities using spleen cells of C3H/HeN and C3H/HeJ mice, and the growth inhibition of cancer cells using MCF-7 were examined as the biological activation assays *in vitro*. In consequence, both the polysaccharide fractions extracted with cold water (C-1) and hot water (C-2) exhibited clearly mitogenic activities in comparison with the other fractions. The soluble fraction extracted with 0.05 M NaOH (C-5) showed the most remarkable growth inhibition (inhibitory rate : 30 %). C-5 showed the highest sugar content (74.0 %). In the next place, C-2 showed higher sugar content (66.4 %) and much more yield (2.08 %) than the others. The sugar content of C-1 was less than 30 %. C-2 consisted of 44.1 % neutral sugar and 22.3 % uronic acid. It was decided to investigate the chemical properties of C-2 further because it had much higher yield and higher carbohydrate content than the other fractions. The constituents of neutral sugars in C-2 were identified as Xyl, Man, Gal, Glc in molar ratio of approximately 0.4 : 1.0 : 1.3 : 3.5. These results suggested that the mitogenicity was dependent on the polysaccharide moieties. It was concluded that the chemical properties of bioactive fractions from CPCM should be examined more minutely. To purify the bioactive fraction, C-2, was submitted to an ion-exchange chromatography, and was separated into two major fractions, C-2-1 and C-2-2. Both fractions exhibited the similar mitogenic activities. For the first stage, it was chosen to physicochemical properties of C-2-2 that possessed much more yield and showed mitogenic activity stronger than the other. C-2-2 contained protein (1.0 %), and the polysaccharide which consisted of neutral sugar (69.7 % as Glc) and uronic acid (30.9 % as GlcA). The constituents of neutral sugar in C-2-2 was composed of Rha, Fuc, Man and Glc in a molar ratio of 0.4 : 0.4 : 0.5 : 1.0 : 13.6. When C-2-2 was reduced by the Taylor and Conrad method, the molar ratio of Glc in that increased evidently rather than the C-2-2 of pre-reduction. These results suggested that the uronic acid in C-2-2 was dependent on GlcA. Controlled hydrolysis of C-2-2 was performed with 0.01M, 0.05M and 0.1M TFA. It was confirmed that in comparison with non-dialysates fraction of 0.01M TFA controlled hydrolysates (CN-1) and non-dialysates fraction of 0.05M TFA controlled hydrolysates (CN-2), the activity of non-dialysates fraction of 0.1M TFA controlled hydrolysates (CN-3) was shown to become more weak. At this result, CN-3 was considered de-gradated residue of CN-2, and it was suggested that CN-2 was the active core portion of C-2. The reduction of acid sugars was performed by the Taylor & Conrad method to identify the acid sugars in CN-2. The result was showed that the volume of Glc in reduced CN-2 increased clearly much more. So, it was suggested that the increasing of Glc in reduced CN-2 was derived from GlcA included in CN-2

1. 目的

地球上には数千種のキノコが確認されていて、栄養価（1次機能）は低いが、多くの生理特性を備えた有望な機能性資源として、よく知られているものも多い。霊芝やマイタケ、アガリクス等のように成分や効能等が明らかにされ、実際に機能性食品などとして活用されているものもある。しかしながら、ササクレヒトヨタケ（学名：*Coprinus comatus*）については、生育地域周辺で食されているものの、成分や効能等については未だ明らかになっていないことが多く未利用資源としてみなされている。ササクレヒトヨタケはヒトヨタケ科・コプリン群に属するキノコで、日本列島及び世界各地に分布し、春から秋（5月～10月）にかけて、草原や畑地、路傍などの地上に群生～叢生し、幼菌のうちは食用である。生え始めは白い長卵形だが、徐々に傘を開き、ヒダの外側、傘の周辺から黒インクのように液化する。一夜しかもたないというという形態よりこの名前がついている。このササクレヒトヨタケについて有効利用の可能性を検索するために、抽出成分における生理活性の有無をスクリーニングし、さらに活性成分の詳細な解析を行うための手始めとして化学的性状を検討した。

2. 方法

材料のササクレヒトヨタケは長野県白馬で食用の目的で人工栽培されたものを用いた。凍結乾燥粉末試料を冷水、熱水、0.1 M および 0.5 M 冷アルカリ、0.05 M 熱アルカリの各種溶媒で順次抽出して得た粗多糖抽出画分 C-1～C-5 (Fig. 1) について、マウス脾臓由来リンパ細胞を用いたリンパ球幼若化能（マイトジェン活性）試験およびヒト乳癌細胞（MCF-7）に対する影響（増殖抑制）を検討した。また、活性の認められた画分については、イオン交換クロマトグラフィーにより分離・精製し、活性の所在を確認しながら、活性成分の化学的性状を検討した。糖含量については、フェノール硫酸法により中性糖を、カルバゾール硫酸法により酸性糖を定量した。また、多糖の構成糖およびそのモル比は、試料を 1 M TFA で加水分解し、得られた糖のアルジトールアセテートを作成して GLC 分析に供し、検出した各構成糖の

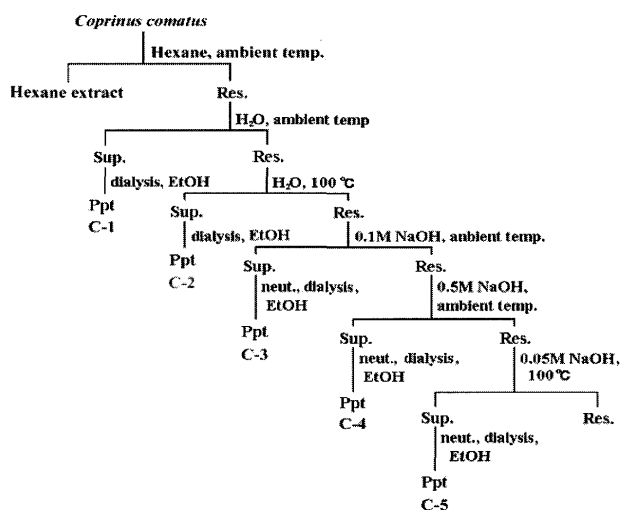


Fig1. Diagram of Extraction Procedure Applied on *Coprinus comatus*

分子量とそのピーク面積から算出した。酸性糖は、Taylor & Conradの方法に準じて中性糖に還元した後、常法に従って GLC 分析した。

次いで、多糖成分をさらに詳細に解析するため、以下に従って分析を行った。多糖試料を 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M の TFA を用いて順次加水分解し、蒸留水透析を行った。透析性画分（CD-1, CD-2 および CD-3）並びに非透析性画分（CN-1, CN-2 及び CN-3）をそれぞれ分取し、活性の所在を前述のマイトジェン活性試験で確認しながら、活性成分の構成糖およびモル比を検討した。

3. 結果および考察

各可溶性の粗多糖画分（C-1～5）収量は、それぞれ 1.6 %, 2.1 %, 1.1 %, 1.5 % および 1.4 % であり、粗多糖の含有量は全般に少なく、キノコ類にはダイエタリーファイバー（食物繊維）が多いことが結果として確認された。また、中性糖および酸性糖含量を測定したところ、中性糖および酸性糖の総含量（酸性糖含量）は C-1 から順に 29.7 % (6.5 %), 66.4 % (22.3 %), 44.5 % (10.7 %), 38.4 % (9.4 %) および 86.0 % (16.9 %) であった。C-2 画分が最も高い糖含量を示した。次に、各画分の生理活性をスクリーニングしたところ、リンパ球幼若化能（マイトジェン活性）は、C-2、次いで C-1 の順に強い活性が認められ (Fig. 2), 両画分には免疫賦活作用が期待されることがわかった。また、ヒト乳癌細胞

Table 1 Mitogen Activities of Extracted Fractions from *Coprinus comatus*

Fractions	Mitogenicities
C-1	+
C-2	+
C-3	-
C-4	-
C-5	-

(MCF-7) に対する影響を検討した結果、C-5に最も強い増殖阻害活性が認められたが、C-1およびC-2にはMCF-7細胞に対する影響は認められなかった。

今回は、生理活性が認められた粗多糖画分の内、比較的糖含量の高かったC-2について、他の画分に優先して活性本体を明らかにすることとし、さらに化学的性状を詳細に検討することにした。

C-2をイオン交換クロマトグラフィーにより分画・精製した結果、主に中性糖からなる画分(C-2-1)並びに酸性糖を多く含んだ画分(C-2-2)の2つの画分に分離した。それぞれの総糖含量について、C-2-1では84.8%の中性糖および17.3%の酸性糖、C-2-2では69.7%の中性糖および30.9%の酸性糖から構成されていることがわかった。また、GLC分析より2つの画分の構成糖およびモル比を算出した結果、C-2-1はRha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc (0.1 : 0.3 : 1.2 : 1.0 : 1.4 : 3.3)であり、C-2-2では、Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc (0.4 : 0.4 : 0.1 : 0.5 : 1.0 : 13.6)であった。

次に、分離した画分におけるマイトジェン活性の所在を検索した結果、画分C-2-2に最も強い活性が存在することがわかった (Fig. 4)。以下、C-2-2の活性本体の性状を明らかにするために部分水解した結果、透析性画分CD-1の収量は12.0 mg (12.0%)、非透析性画分CN-1では88.0 mg (88.0%)であった。次いで、CN-1を0.05 M TFAで加水分解・透析により、透析性画分CD-2 24.2 mg (28.1%)、非透析性画分CN-2 51.6 mg (59.9%)が得られた。さらにCN-2を0.1 M TFAを用いて加水分解し、水解物を透析したところ、透析性画分CD-3 21.4 mg (24.9%)、非透析性画分CN-3 30.2 mg (35%)が得られた (Fig. 5)。

各画分のマイトジェン活性を検討したところ、透析性画分はいずれも活性はほとんど示さなかったが、

Table 2 Mitogen Activities of C-2-1 and C-2-2 Separated from C-2

Fractions	Mitogenicities
C-2	+
C-2-1	-
C-2-2	+

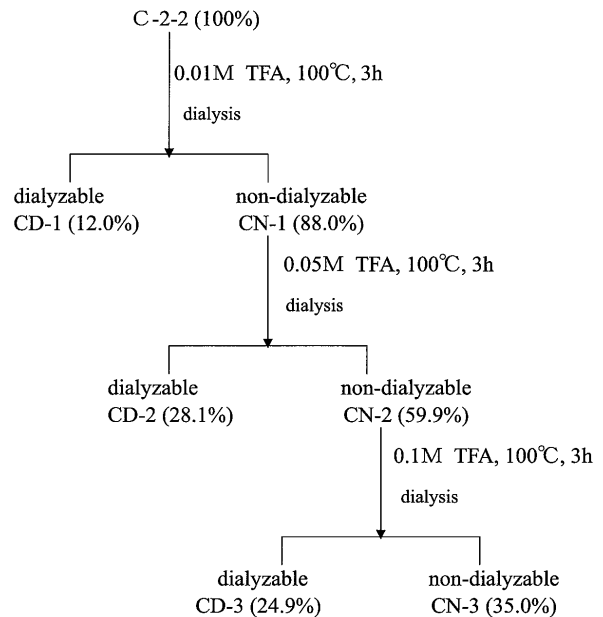


Fig2. Procedure of Controlled Hydrolysis Applied on C-2-2

Table 3 Mitogen Activities of Extracts from Hydrolysates Using Spleen Cells of C3H/HeN Mice

Samples	Mitogenic Activities
C-2-2	++
CD-1	-
CD-2	-
CD-3	-
CN-1	++
CN-2	++
CN-3	+
LPS	+++

非透析性画分においては、いずれの画分にも活性が認められた (Table 1)。特に、CN-1とCN-2には同程度の活性が認められた。しかしながら、最も強い酸濃度である0.1 M TFAを用いて得た加水水解物の非透析性画分CN-3では、CN-1およびCN-2と比べて活性が顕著に弱くなった。このことは、活性部分の

Table 4 Comparison with Molar Ratios of Component Sugars

Hydrolysate	Molar Ratios					
	Fuc	Xyl	Man	Gal	Glc	AsGlcA
CN-2 * ¹	0.2	0.2	0.2	1.0	51.4	21.6
CN-2 * ²	Tr	0.7	0.6	1.0	80.0	Tr

Tr: Trace

*¹ CN-2(pre-reduced)*² CN-2 reduced by the Taylor and Conrad Method

分解が進んだために構造上に多くの断片化が生じ、活性本体における活性発現に必要な結合部分あるいは結合様式が減少したためと考えられる。また、この結果から、CN-2がC-2-2の活性本体またはコア構造を形成している可能性が強く示唆された。次いでGLC分析より、CN-2の構成糖及びモル比を測定したところ、Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc (0.2 : 0.2 : 0.2 : 1.0 : 51.4) から構成されていた。CN-2を構成する糖の多くGlcからなることより、Glcは最も重要な構成糖の一つであると推測された。また、生理活性の発現にGlcが関係することは、キノコにおける抗腫瘍成分本体の多くは β -D-グルカンとされていることと一致する結果であった。ただし、CN-2は約30%の酸性糖を含むことから、単純に β -D-グルカンと結論付けることは出来ない。

CN-2の還元後の構成糖とモル比を検討した結果、Xyl, Man, Gal, Glc (0.7 : 0.6 : 1.0 : 80.0) であり、還元する前のモル比と比較するとGlcの明らかな増加が確認された (Table 2)。このことより、増加したGlcはCN-2を構成するGlcAに由来し、構成酸性糖の少なくとも一つはGlcAであると示唆された。

4. 要 約

ササクレヒトヨタケの抽出画分について、生理活性の一つであるマイトジェン活性能をスクリーニングしたところ、熱水抽出—非透析性画分 (C-2) に強い活性が認められた。C-2の活性本体を明らかにするために、C-2をイオン交換クロマトグラフィーにより分離・精製した。その結果、主に中性糖からなるC-2-1 (84.8%の中性糖と17.3%の酸性糖からなる) 画分と酸性糖を多く含んだC-2-2 (69.7%の中性糖と30.9%の酸性糖から構成される) 画分の二つのメジャーな画分に分離した。糖組成を検討するため

に、常法により糖のGLC分析を行った結果、C-2-1の構成糖とモル比は、Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc (0.1 : 0.3 : 1.2 : 1.0 : 1.4 : 3.3) であり、C-2-2では、Rha, Fuc, Xyl, Man, Gal, Glc (0.4 : 0.4 : 0.1 : 0.5 : 1.0 : 13.6) であり、特に、C-2-2はGlcの含量が高いことがわかった。また、C-2-1およびC-2-2の両画分について、マイトジェン活性の存在を検討した結果、C-2-2の方に強い活性が認められたので、これ以後はC-2-2について詳細な解析を行うこととした。活性本体の化学構造を明らかにするために各濃度段階のTFAを用いて部分水解を行った。つまり、C-2-2を0.01 M, 0.05 M, 0.1 M TFAで順次加水分解し、それぞれの水解物を蒸留水透析した後、透析性画分CD-1, CD-2およびCD-3と非透析性画分CN-1, CN-2及びCN-3を得た。各画分について、マイトジェン活性の所在を検討したところ、いずれの透析性画分にも活性は認められなかったが、非透析性画分ではすべての画分が活性を示すことがわかった。しかしながら、最も高濃度のTFAで加水分解したときの非透析性画分CN-3は、CN-1およびCN-2と比較すると顕著にその活性が弱くなった。このことから、CN-2はC-2-2の活性本体であることが強く示唆された。またGLC分析により構成糖及びモル比を測定したところ、CN-2はFuc, Xyl, Man, Gal, Glc (0.2 : 0.2 : 0.2 : 1.0 : 51.4) であり、主にGlcから構成されることがわかった。以上より、Glcからなる構造ないしはその結合様式がCN-2の活性に最も重要であることが推測された。また、CN-2は約30%の酸性糖を含むことから、Taylor & Conradの還元法により酸性糖部分を還元し、同様に構成糖およびモル比を測定した結果、還元前に比して顕著にGlcが増加した。従って、このことはCN-2の構成酸性糖GlcAに由来していることが示唆され、CN-2はGlcとGlcAから構成されるヘテロ多糖であることが明らかになった。今後、活性と化学構造との相関をさらに検討してゆく予定である。

文 献

- Daba¹, A.S. and Ezeronye, O.U. (2003) Anti-cancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. African Journal of Biotechnology. 2, 672-678.
- Dubois, M., Gills, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and

- Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- ・ Hamano, J., Rollinghoff, M. and Wagner, H. (1978) $\beta(1 \rightarrow 3)$ Glucan-mediated Augmentation of Alloreactive Murine Cytotoxic T-Lymphocytes *in Vivo*. *Cancer Research.* 38. 3080-3085.
 - ・ Kakuta, M., Sone, Y., Umeda, T. and Misaki, A. (1979) Comparative Structural Studies on Acidic Heteropolysaccharides Isolated from "Shirokikurage," Fruit Body of *Tremella fuciformis* Berk, and the Growing Culture of Its Yeast-like Cells. *Agric. Biol. Chem.* 43, 1659-1668.
 - ・ 宮本有美, 高尾秀樹, 立花宏文, 山田耕路 (2005) ヒト乳癌細胞株 MCF-7 に及ぼす海藻粘性多糖類フコイダンのアポトーシス誘導効果. 日本農芸化学会大会公演要旨
 - ・ Mizuno, M., Morimoto, M., Minato, K. and Tsuchida, H. (1998) Polysaccharides from *Agaricus blazei* Stimulate Lymphocyte T-Cell Subsets in Mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62. 434-437.
 - ・ Mizono, T., Hagiwara, T., Nakamura, T., Ito, H., Shimura, K., Sumiya, T. and Asakura, A. (1990a) Antitumor Activity and Some Properties of Water-soluble Polysaccharides from "Himematsutake," the Fruiting Body of *Agaricus blazei* Murill. *Agric. Biol. Chem.* 54. 2889-2896.
 - ・ 水野 卓 (1989) : キノコの機能と衛生. 食品衛生学雑誌. 30, 258-261.
 - ・ 水野 卓 (1998) : Bioactive Substances in YMABUSHITAKE, the *Hericium erinaceum* Fungus, and its Medicinal Utilization. *Foods Food Ingredients Journal.* 175. 105-114.
 - ・ 志田万里子, 間瀬民生, 笹川祐子, 松田和雄 (1971) : シイタケの水溶性多糖に関する研究 (第1報). 農芸化学会誌. 45. 10. 454-460.
 - ・ Sone, Y., Kakuta, M. and Misaki, A. (1978a) Isolation and Characterization of Polysaccharides of "Kikurage," Fruit Body of *Auricularia auricula-judae*. *Agric. Biol. Chem.* 42. 2. 417-425.