

β -グルカンの機能と NMR を用いた定量について

飯 塚 勝

はじめに

β -グルカン（とくに β -1,3-グルカンが注目されている）はパン酵母やキノコ類から抽出されて、マウスなどの実験動物への投与による免疫増強や抗腫瘍性の効果があることが確められてきた（文献1）。キノコ由来の多糖体（レンチナン）や糖タンパク質（クレスチン）は抗ガン剤として注射薬や経口薬として使用されてきた。

β -グルカンは他にも大麦由来のものや微生物の細胞外多糖として培養によりえられるものがある。起源により β -グルカン分子の構成は結合様式が異なっている。結合様式のほかにも生理的効果を示す要因として、分子の大きさや水溶液にしたときの溶解度や粘度なども関係しているようである。*in vitro* の実験では混合リンパ球反応活性やマイトゲン活性を示し、免疫系を活性化する働きがある。微生物起源では *Aureobacidium* sp. のグルカンを用いたマウス（Bal/c マウス腹腔由来マクロファージ様）の細胞の実験では対照と比較してサイトカイン（TNF- α 、IL-10、IL-6）が有意に生産量を増加し、免疫系細胞に作用することが示されている（文献2）。

しかしグルカンの同定やその量を測定する方法には検討の余地があると考えられる。

β -1,3-グルカンの確認テストとしては Congo Red と複合体を作り、色調が変化するので、それを観察する（吸収極大が 480nm 付近から 525 付近に移動する）（文献3）が、定性試験の範囲を出ない。プロトン NMR では β -1,3、 β -1,4、 β -1,6 の結合のケミカルシフトは重ならないで、別の位置に現れるので、測定法の是非を検討してみた。

方法

キノコ類は乾燥物、あるいは市販のキノコを小切片とし、まず水を加え、100℃で一時間煮沸抽出したものを熱水抽出画分、さらにこれを 1M NaOH 中に浸漬し、一夜放置後遠心分離により得られた上澄をアルカリ画分とし、その濃縮液について分析を行なった。

微生物起源の *Aureobacidium* sp. の培養で得られた多糖はアルコールの沈殿を繰り返し、精製したものをを用いた。オオムギの β -グルカンは群衆化学工業から頂いたサンプルをゲルクロマトグ

ラフィーで分画、分離したものをを用いた。

炭水化物の同定、定量はフェノール—硫酸法、HPLC,TLC および NMR によった。

HPLC：島津製作所製クロマトパック LC4A をを用いた。

カラムは Shimpack SCR101N（ゲルろ過 type）で純水を溶離剤として 55℃で、検出器は示差屈折計を用いて分析を行なった。

TLC：シリカゲルプレートにサンプルをスポットし、n-butanol-pyridine-water（8：1：1）の溶媒で、室温（ambient temp.）で6時間展開し、乾燥後硫酸—エタノール（1：9）混液に一旦浸し、乾燥後 110℃で 5-10 分加熱して、成分を同定した。

NMR：Varian UNITY plus-500NMR spectrometer を用い、重水中で DSS を内部標準物質として 40℃と ambient、500MHz で測定した。

結果と考察

まず既知の糖質（2糖と多糖）について測定した結果を図1および図2に示す。

β -1,3 結合の C1 結合プロトンは内部標準、DSS ($\delta = 0$) を用いると 40℃の測定で 4.77ppm 付近に、 β -1,6 結合では 4.55ppm 付近に、そして β -1,4 結合のときは 4.52ppm 付近にケミカルシフトが現れ多糖中でも移動しないので、そのまま判別に用いることができることが判明した。

β -1,6 結合の多糖としてプスツランを、 β -1,3 結合の多糖としてカードランを、 β -1,3 と

β -1,6 結合両方とも含まれるものとしてラミナリンとナメタケを例に比較したものを図3と表1に示した。含量はプロトンの相対面積値（内部標準として用いた DSS の $\delta = 0$ のプロトン値に対する相対値）で示した。

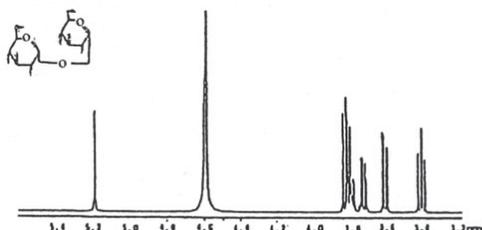
キノコ（はなびらたけ）の例は分画手順を表2に、分離したクロマトグラフィーは図4に示した。それぞれの画分（I,II,III）の同定は TLC の結果を図5に NMR による結果は図6に示した。

Aureobacidium sp. の結果は図7に示した。また大麦のグルカンについては図8に示した。

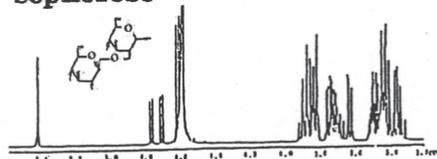
Aureobacidium sp. のグルカンは β -1,3 と β -1,6 の結合比率は 1.5：1、大麦からのグルカンでは β -1,4 と β -1,3 の比率は 1：2.4-2.7 と算出された。

また、鹿角霊芝の糖質の分離操作を表3に、クロマトグラフィーを図9に、得られた糖の NMR 図を図10 - 11に示した。

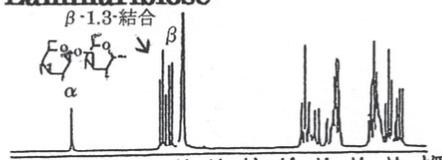
Trehalose



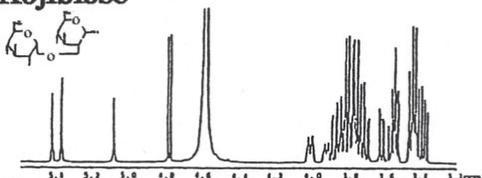
sophorose



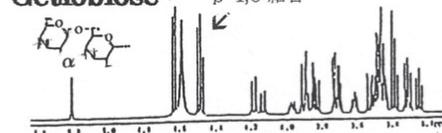
Laminaribiose



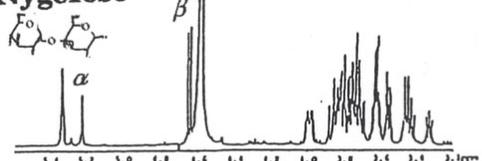
Kojibiose



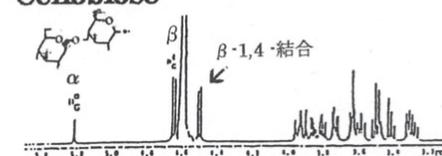
Getiobiose



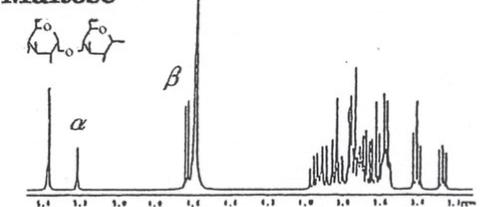
Nygerose



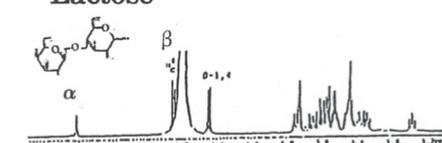
Cellobiose



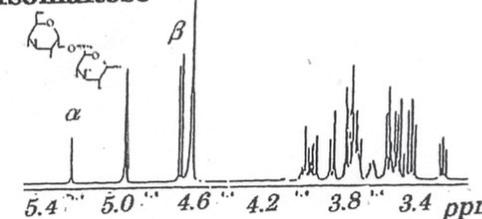
Maltose



Lactose



Isomaltose



Turanose

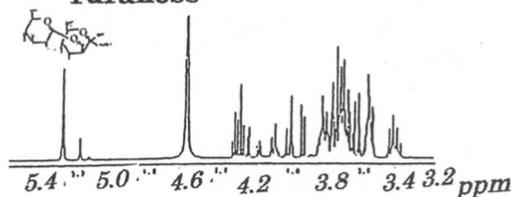


図 1.2 糖のプロトン NMR

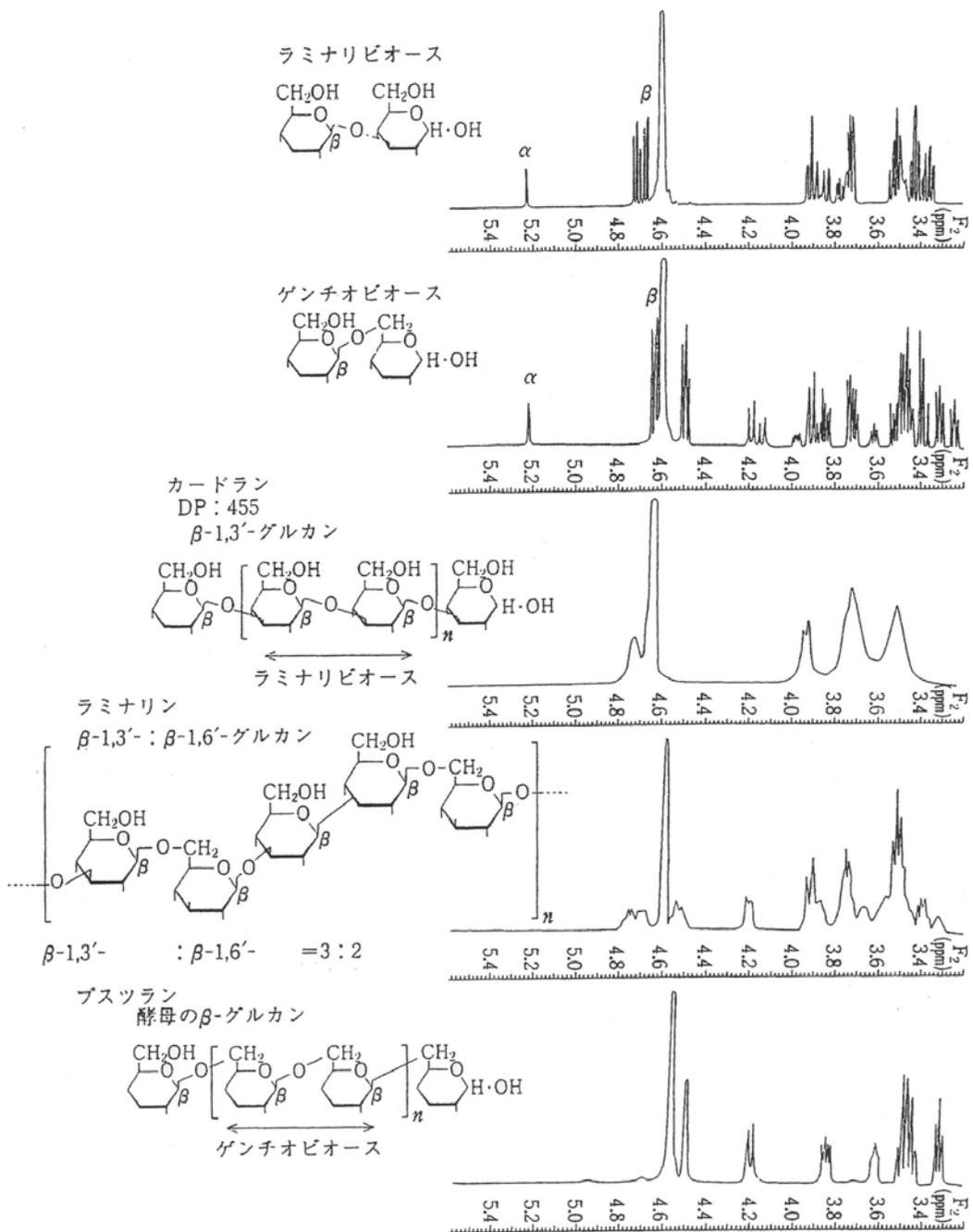
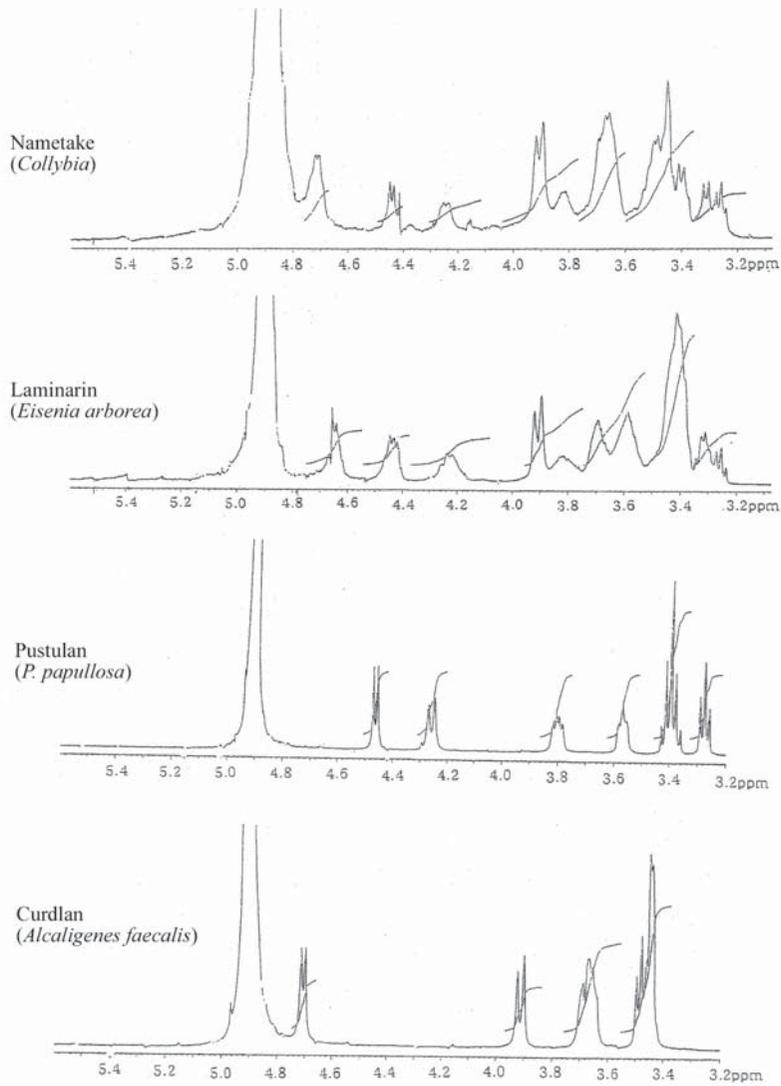


図2. 多糖のプロトン NMR

図 3.2, 3 のグルカンのプロトン NMR (上段) と
表 1. β -1,3, β -1,6 結合の比 (下段)



¹H-NMR of β -glucans obtained from hot water extract of mushrooms.
(D₂O containing 1M NaOH, internal std., DSS, δ = 0, ambient temp.)

表 1. 多糖中のグルカンの結合の比較

Sample	Proton linked to C1 of glucose formed β -1,3-glucan	Proton linked to C1 of glucose formed β -1,6-glucan
Pustulan		9.98
Curdlan	14.47	
Laminarin	6.96	5.95
Nametake	5.75	2.80

Figures indicated the relative values to DSS(δ = 0.100)
Samples used contained 10mg in a volume of 1.0ml of D₂O.

キノコの熱水抽出物中には主としてオリゴ糖（トレハロース、マニトールあるいはアラビトール）が、アルカリ抽出物には主として β -グルカンが含まれ、 β -1,3と β -1,6結合の比率はキノコによって異なっていた。

	β -1,3 : β -1,6
鹿角霊芝 -----	0.72 : 1
はなびらたけ -----	3.16 : 1
えりんぎ -----	ほとんど β -1,6で β -1,3は検出されなかった。
アガリクス -----	ほとんど β -1,6
しいたけ -----	ほとんど β -1,6
なめたけ -----	2.05 : 1

これらの結果から、抽出物中のグルカンの同定や構成する β -1,3、 β -1,6あるいは β -1,4結合の比率を既知物質のカードランやプスツラン相当量として算出が可能であることがわかった。

謝辞

はなびらたけ、鹿角霊芝、大麦グルカン含有サンプルを提供いただきましたアスク薬品（株）千葉県市川市南行徳3-16-6、ワールドヘルスプロモーション（株）大阪市浪速区戎本町1丁目3番39号 曾我良司 氏、群栄化学工業（株）群馬県高崎市宿大類町700番地 鎌田 直博士に感謝申し上げます。また本研究の糖質同定のために、NMR測定に協力いただきました大阪市立大学大学院生活科学研究科分析室の技術職員 前川智美さんに深く感謝いたします。

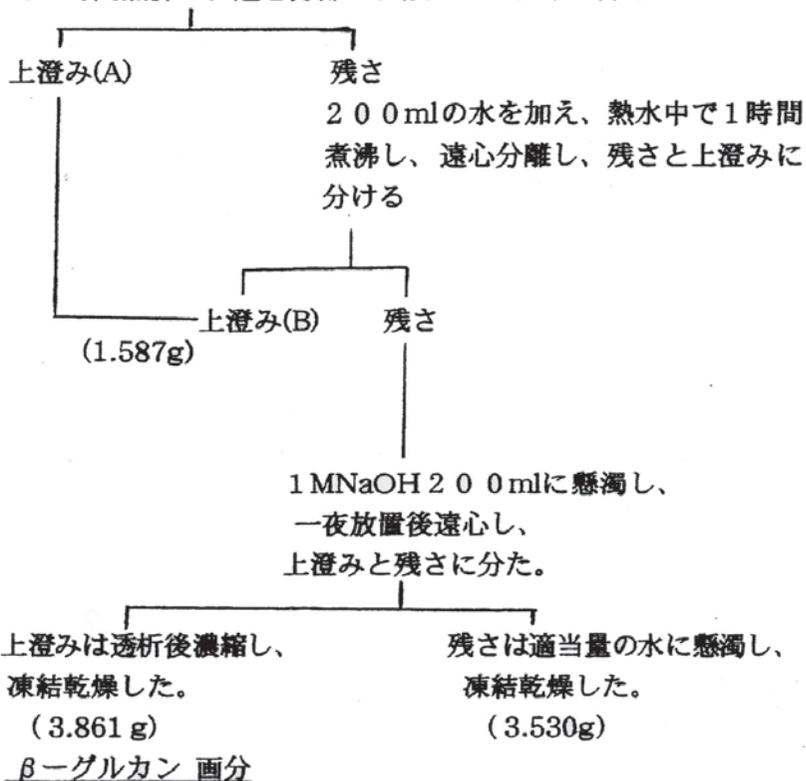
参考文献

1. 前田幸子、石村和子、千原呉郎、蛋白質 核酸 酵素 **21**,425-434 (1976) :T.Miyazaki *et.al.* **Chem. Pharm.Bull.**,22,1739-1742 (1974) .
2. 日本農芸化学会、鈴木ら、大会講演要旨集 p279 (2005) .
3. K. Ogawa, *Carbohydrate Research*, **67**, p527 (1978) .

表 2. はなびらたけの糖質の分離操作

はなびらたけ中のβ-グルカン

はなびらたけ 10g (乾燥粉末) を 200ml の水に懸濁し、熱水中で 1 時間煮沸し、遠心分離し、残さと上澄みに分ける



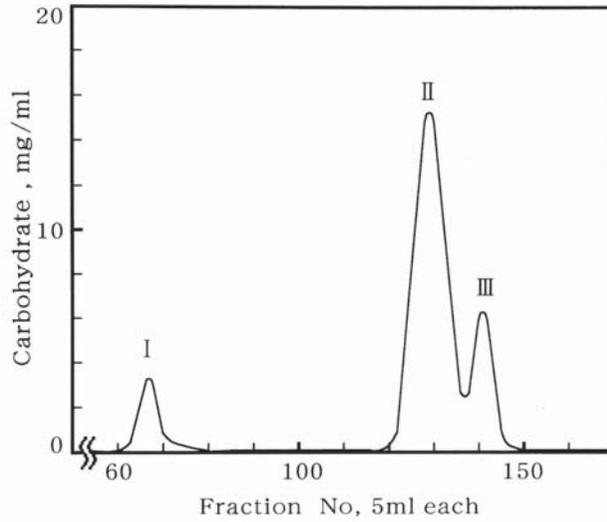
乾燥物総量

8.978/10.148(88.5%)

Carbohydrate (β-glucan) in Hanabiratake

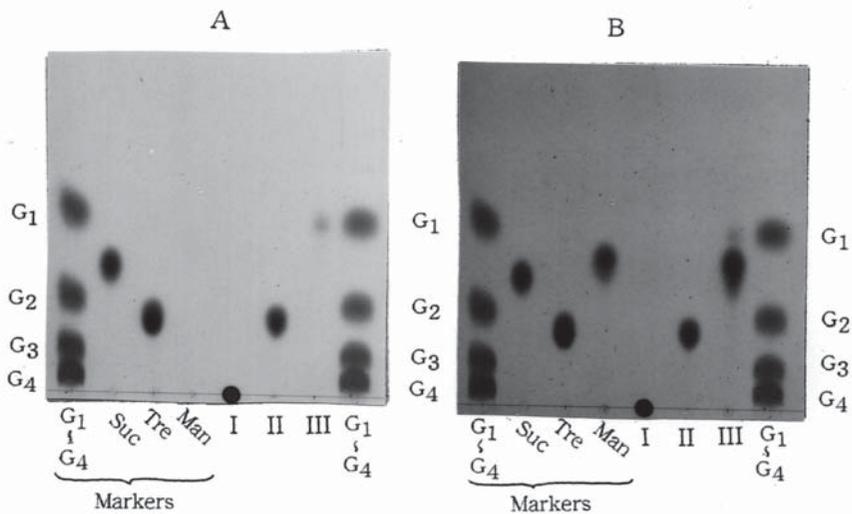
Fraction	Polysaccharide
Alkali(1M NaOH)	β-glucan
	3,861mg
	(38.6%)

Sample analyzed, 10g dry material



Gel chromatography of hot water extract from Hanabiratake mushroom on a column of Bio Gel P-2(4.5X56cm)

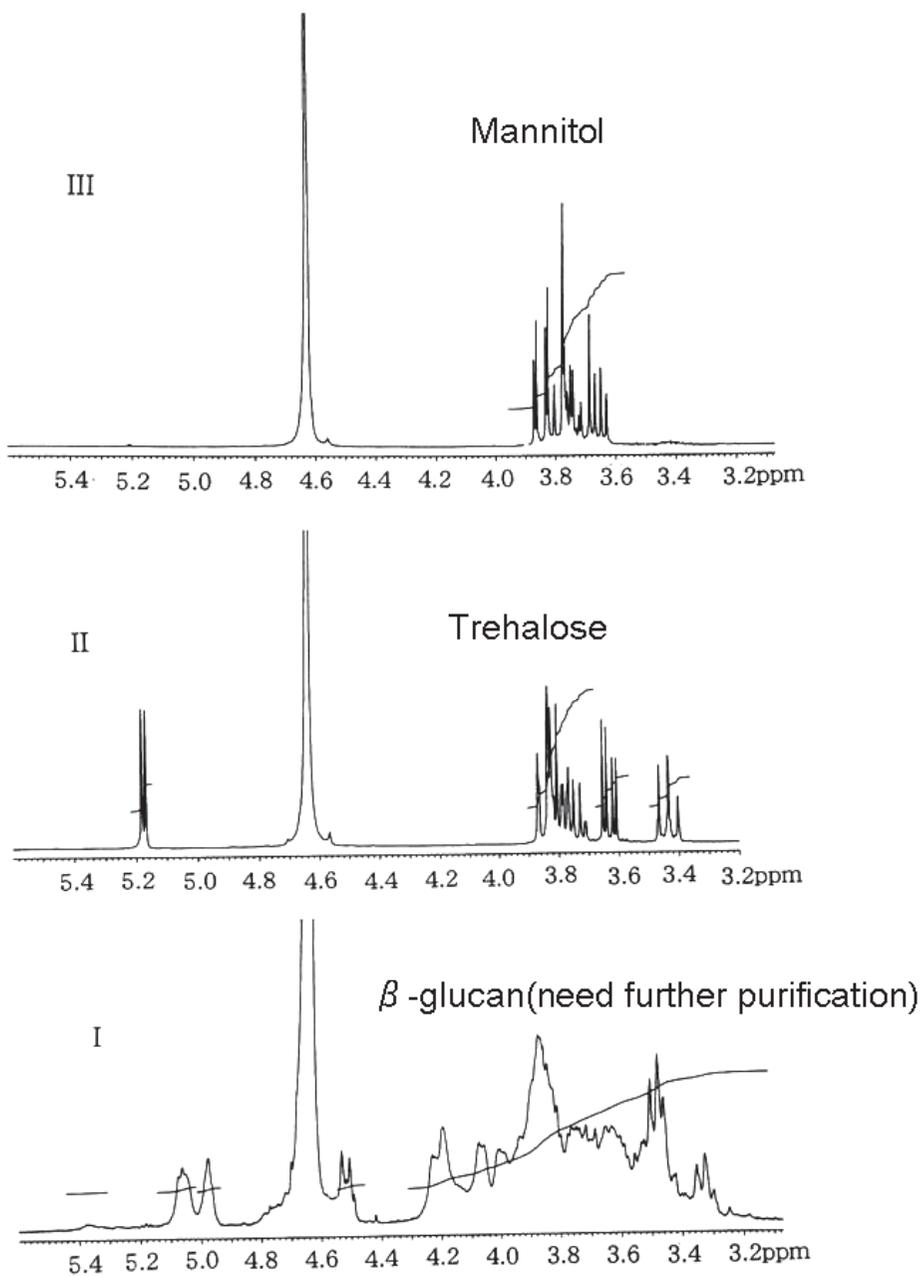
図4. カラムクロマトグラフィーによるはなびらたけの糖質の分離



Thin layer chromatogram of carbohydrate isolated from hot water extract of *Sparassis crispa*

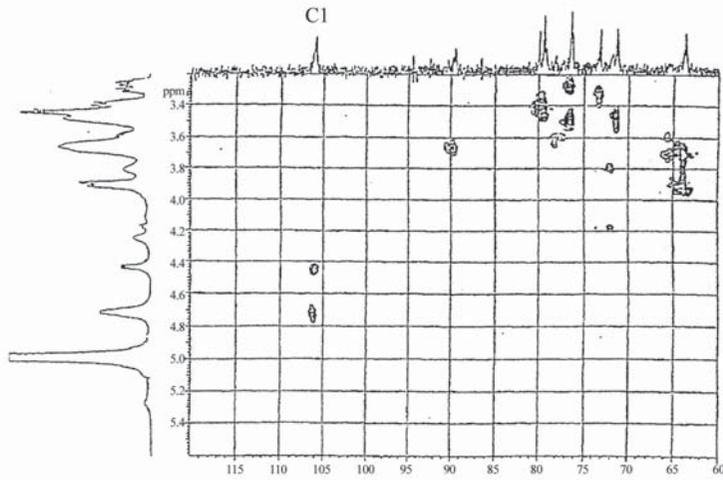
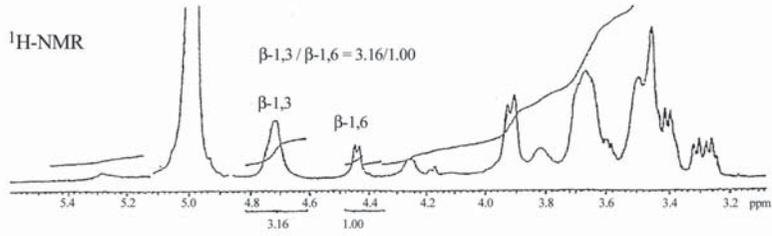
A, heating at 110°C B, heating at 150°C

図5. はなびらたけの成分の薄層クロマトグラフィー (TLC)



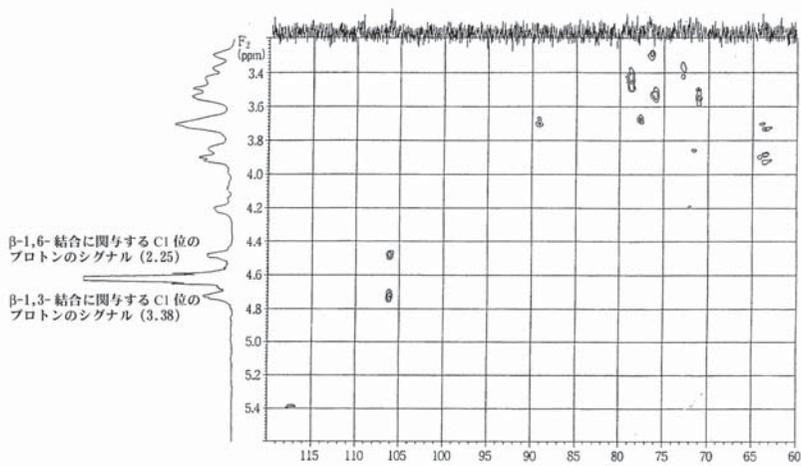
$^1\text{H-NMR}$ of carbohydrates isolated from the hot water extract of Hanabiratake mushroom

図 6-a. はなびらたけの各成分のプロトン NMR



^1H - and ^{13}C -NMR (GHMQC) of β -glucan of Hanabiratake
(In D_2O containing 1M NaOH, ambient temp., DSS, $\delta = 0$)

図 6-b. はなびらたけのグルカンのプロトン NMR と 2D (GHMQC)

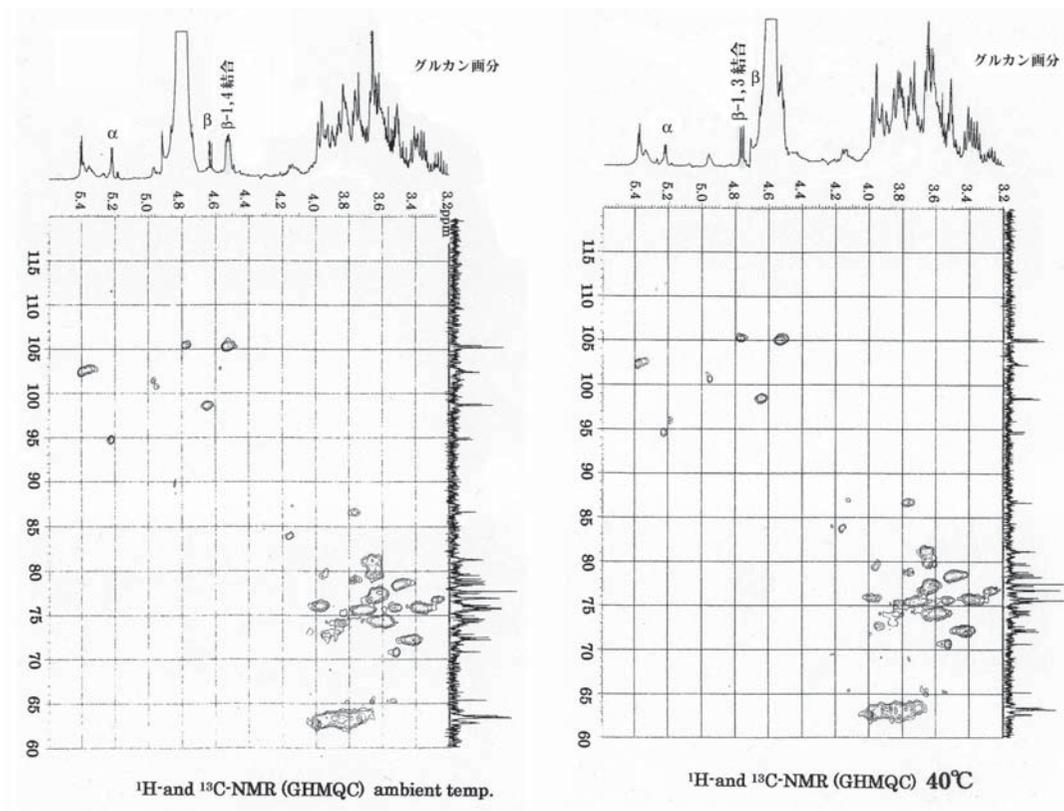


β -1,6-結合に関与する C1 位の
プロトンのシグナル (2.25)

β -1,3-結合に関与する C1 位の
プロトンのシグナル (3.38)

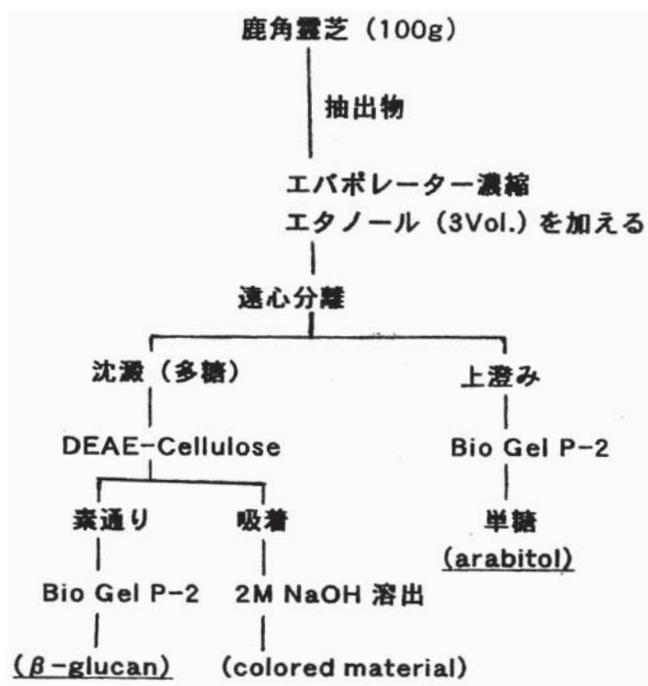
()内の数字は結合に関与する C1 位プロトンの面積 (結合) の比

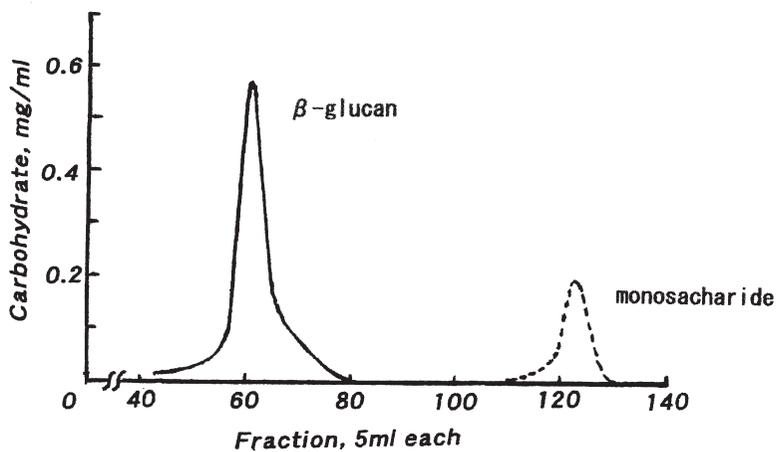
図 7. *Aureobacidium sp.* の生産する β -グルカンの
 ^1H -および ^{13}C -NMR (GHMQC)



8. 大麦からの β -グルカンの ^1H - および ^{13}C -NMR (GHMQC)

表 3 鹿角霊芝の糖質の分離操作

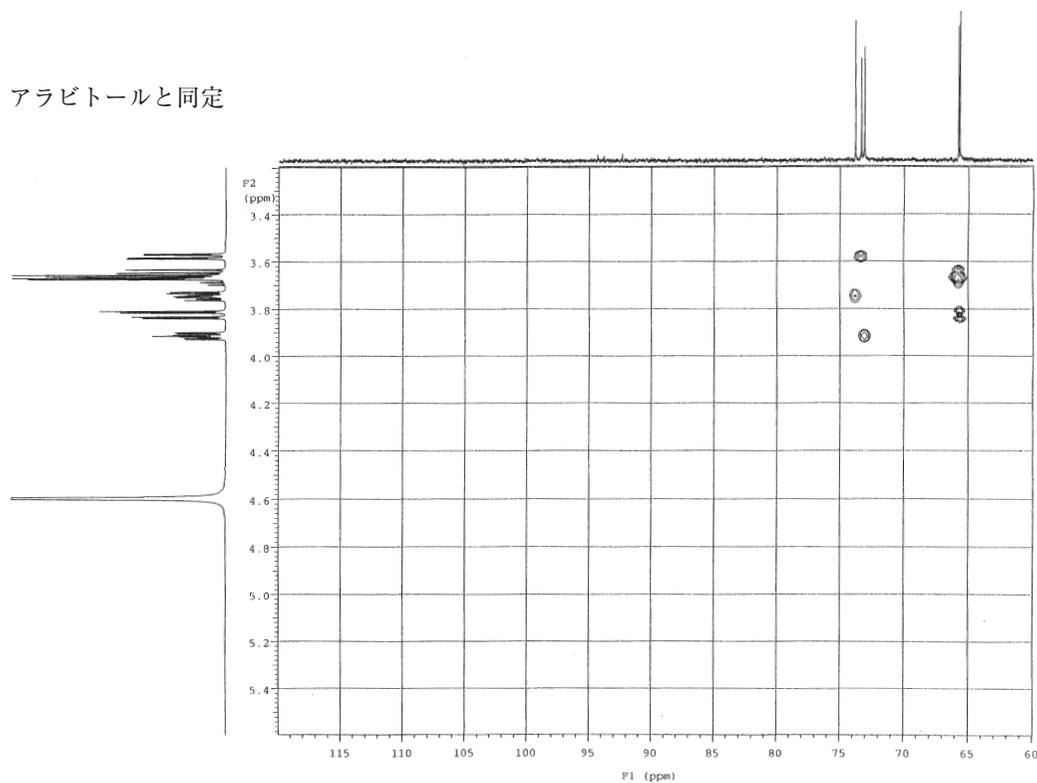




Chromatography of carbohydrate on a column of Bio Gel P-2
(4.5 X 51cm)

図9 鹿角霊芝の糖のクロマトグラフィー

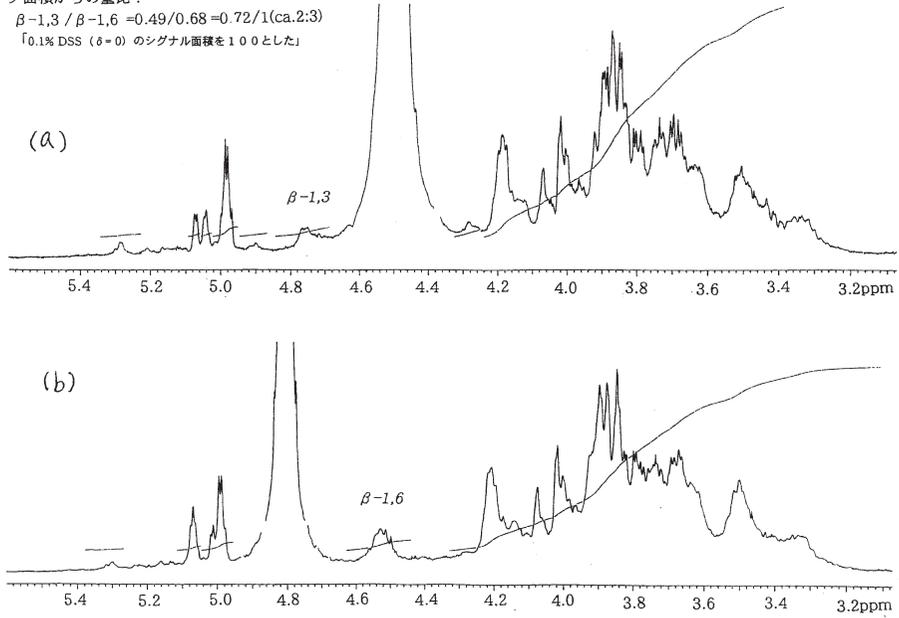
アラビトールと同定



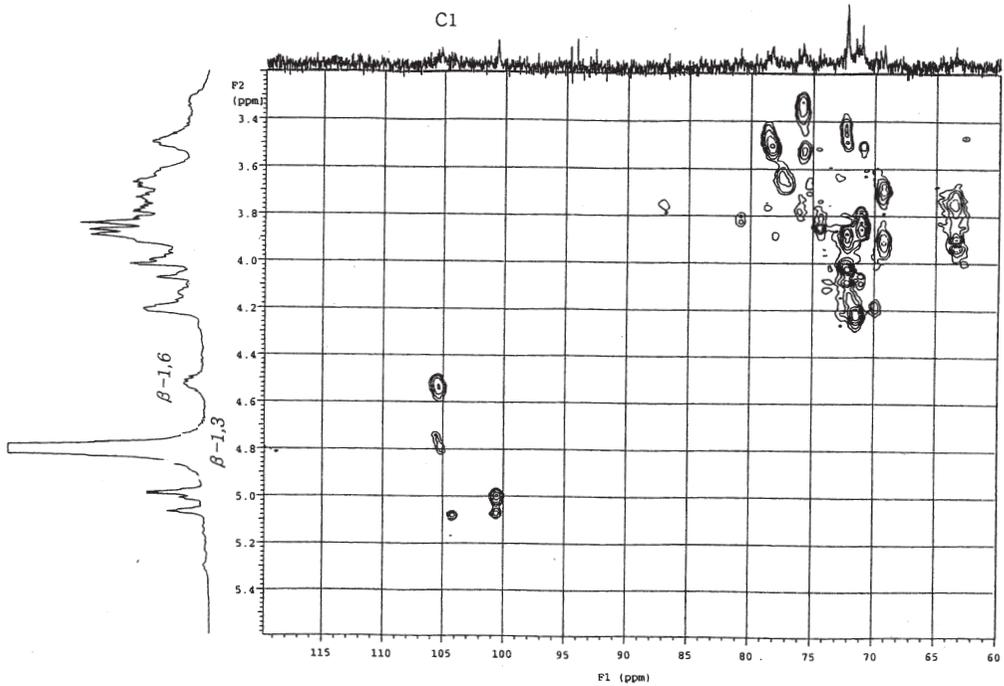
^1H - and ^{13}C -NMR (GHMQC) of monosaccharide isolated
(in D_2O at 40°C , internal std., DSS, $\delta = 0$)

図10 鹿角霊芝から抽出された単糖のNMR (GHMQC)

ピーク面積からの量比：
 $\beta-1,3 / \beta-1,6 = 0.49 / 0.68 = 0.72 / 1$ (ca.2:3)
 「0.1% DSS ($\delta=0$) のシグナル面積を100とした」



$^1\text{H-NMR}$ of polysaccharide extracted with ATOM-Sui from *Rokakureisi*
 (in D_2O at 50°C(a), and ambient temperature(b); internal std. DSS, $\delta=0$)



$^1\text{H-}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ (GHMQC) of polysaccharide extracted with ATOM-Sui
 from *Rokakureisi*

図 11 鹿角霊芝から抽出された β -グルカンの NMR
 (上段、プロトン NMR、下段 $^1\text{H-}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ 、2D)

