ナメコ粘質物中の多糖構造に関する研究

〔ガラクツロン酸含有多糖の分離と同定〕

Structurul studies of the Polysaccharides in the mucilage of Pholiota Nameko

〔Isolation and characterization of Galacturonic acid-containing Polysaccharide〕

田　中　昭　子
田　辺　信　子

緒　　言

ナメコ茸 (Pholiota Nameko) は，ブナの枯木などに群生することが多く，最近は人工栽培も各地で行なわれている。その傘の表面は，きわめてなめらかなゲル状粘質物に覆われているが，充分傘の開かない幼いものは，黄褐色を帯び，ナメコ汁，大根おろし和えその他広く食用に供せられている。その特有の風味と舌ざわりは，表面の粘質物によると思われるので，その組成，構造を調べる目的で，まず粘質物中の多糖類を分離精製した。

以前に石沢[1]は，粘質物中よりエタノール沈殿およびエーテル処理により，黄褐色繊維状の粘質物と，灰白色粉末状の粘質物を得，冷水可溶性画分の多糖類から，マンノース，キシロース，ガラクトースと，少量のフコース，グルコース，グルクロン酸およびオリゴ糖が検出され，熱水可溶性画分からは，以上の他に，リボースの痕跡が見られたと報告している。その後槙[2]は粘質物について再調査を行ない，温湯可溶，メタノール沈殿画分中の多糖から，ペーパークロマトグラフィーおよび各種呈色反応を行なって，キシロース，アラビノース，ガラクトース，ガラクツロン酸を検出したと報告しているが，両者の間の構成糖の相違，また分画法の相違なども考えられるので，著者らは今回，透析操作により低分子物質を除去し，メタノール濃度差による分別沈殿，Dowex 50×2 による除タンパク後，セチルピリジニウムクロライド (C. P. C.) により分画を試み，中性糖含有画分と酸性糖含有画分を得，各画分についてペーパークロマトグラフィー，ガスクロマトグラフィー，更にアミノ酸分析をも行ない，若干の知見を得たので報告する。

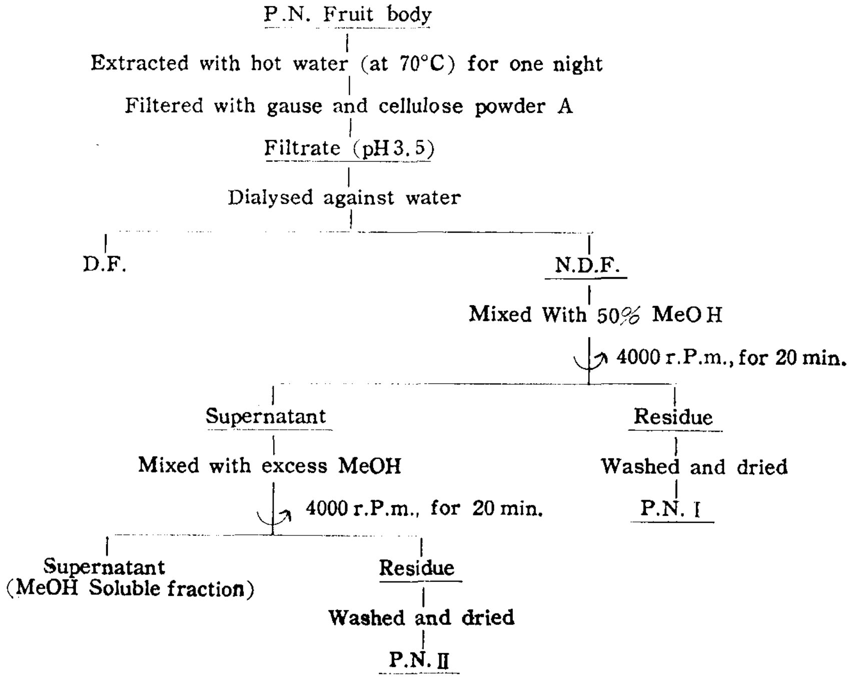
実験材料と方法

(1) 粘質物中より Crude Polysaccharides 試料の調製

市販（豊岡農協産）のプラスチック製 箱入りの 幼いナメコ子実体を， 約1kg ずつ3倍容の70°Cの温湯に一夜浸漬し，ガーゼを3重にして搾り，更に残渣のナメコに約2倍容の70°C温湯を加えて一夜放置し，同様にしてこの操作を3回繰り返して，搾り汁を集め，東洋濾紙製 Cellulose Powder A(100～200 mesh) を濾層として吸引濾過し，微黄褐色半透明の粘液を得た。なおこの際槙の方法に従って活性炭を加えて脱色を試みたが，無色とはならず，糖成分の損失も考えられるので，この処理法は以後省くことにした。次に低分子物質を除く目的で，濃縮した濾液をセルロースチューブに封じ，10倍容のイオン交換水に対して3回透析を行なった。非透析性溶液を適当に濃縮して98%メタノールを，最終濃度がそれぞれ，20%，40%，60%，80%となるように加えて分画を試みたが，分析の結果，20%と40%，60%と80%の画分では糖成分の著しい差異が認められなかったので，以後は50%となるようにメタノールを加えて遠沈させ，メタノールとアセトンで洗って乾燥粉末化し，PN Iとし，上清には過剰のメタノールを加えて沈殿させ，PN Iと同様の処理を行ってPN IIとし，それぞれ Crude Polysaccharides の試料とした。

PN I は黒褐色繊維状を呈し，乾燥物を粉砕するのは困難であり，その粉末は水に難溶であった。PN II は灰白色粉末状で，冷水にも比較的易溶であると思われた。

Fig 1. Preperation of the crude Polysacharides from a mucilage of Pholiota Nameko.



子実体1kgより

Sample 1	PN I　約1.21g	1.69g	収量	0.121%	0.169%
	PN II　約0.485g		収量	0.0485%	
Sample 2	PN I　約3.41g	3.66g	収量	0.341%	0.366%
	PN II　約0.25g		収量	0.025%	

(2) Crude Polysaccharides (PN I, PN II) 試料の検討

A) 透析前後の溶液について糖およびタンパク質の減少量を検討した。糖の定量はグルコース，マンノースをStandardとしてオルシノール硫酸法[3]を用い，タンパク質の場合は，ボバインアルブミンをStandardとしてラウリー法[4]を用いた。

同時に6N-HCl, 100°C，12時間加水分解を行ない，日立アミノ酸分析計KLA-2形によりアミノ酸分析を試みた。

B) PN I，II を少量の水に溶かし，オルシノール—硫酸法を用いてヘキソーズの定量を，システイン—硫酸法[5]を用いてペントースの定量を行ない，更にカルバゾール—硫酸法[6]によってウロン酸を定量した。

C) PN I，IIの構成糖のP. P. C.は，2H-HCl, 100°C，3時間加水分解し，HClを真空ポンプで充分除去したものおよび，2N-H_2SO_4, 100°C，3時間，9時間，16時間加水分解して，$BaCO_3$で中和したものを，下記の濾紙，展開溶媒，発色試薬を用いて行なった。

Standardとしては，グルコース，フラクトース，マンノース，ガラクトース，キシロース，アラビノース，フコース，ラムノース，ガラクツロン酸，グルクロン酸を用いた。なお，同じ溶媒で2回展開することにより，Rf値の接近しているものの判別が可能となった。

濾　紙　　東洋濾紙 №51

展開溶媒　n-BuOH* : Pyr* : AcOH* : H_2O=60 : 40 : 3 : 45

n-BuOH : AcOH : H_2O=4 : 1 : 1 および 2 : 1 : 1

n-PrOH* : EtOAc* : H_2O=6 : 1 : 3

iso-PrOH : H_2O=4 : 1

発色試薬

還 元 糖　アルカリ性硝酸銀—アセトン reagent

Pentose : aniline hydrogen phtharate reagent

uronic acid B.P.B. reagent

N-含有物質　Ninhydrine reagent

D) ガスクロマトグラフィー（日立ガスクロマトグラフィーK53形，島津ガスクロマトグラフィー5APE形）

PN I，IIをそれぞれ2N-HCl, 100°C，2時間加水分解し，HClを除去したものを，ピリジン

* BuoH : Butanol, Pyr : Pyridine, AcOH : Acetic acid, PrOH : Propanol, EtOAc : Ethyl acetate

の Tailing 防ぐために，山川らの方法[7] に従って TMS 化したものを CCl_4 に溶かして注入し 160° C または180° C において中性糖のガスクロマトグラフィーを行った。更にウロン酸検出の目的で，正田ら[8] の方法を用い，N-TMCS, BSTFA および TMCS を 10 : 5 : 3 の割合に加えて注入し，140° C において施行した。Standard としては，C) に用いたものと同様の単糖を使用した。

E) グルクロン酸とガラクツロン酸の分離

得られたウロン酸がグロクロン酸かガラクツロン酸かを再確認するために，M. Gee と R. M. McCready の方法[9] を用いてペーパークロマトグラフィーを行った。即ち PN I，II を pH_2 に調製し，80° C で 30分間加熱し，グルクロン酸，ガラクツロン酸，グルクロノラクトンの標品と並べて 濾紙に スポットし， EtOAc : Pyr : H_2O : AcOH=5 : 5 : 3 : 1 を展開溶媒とし，

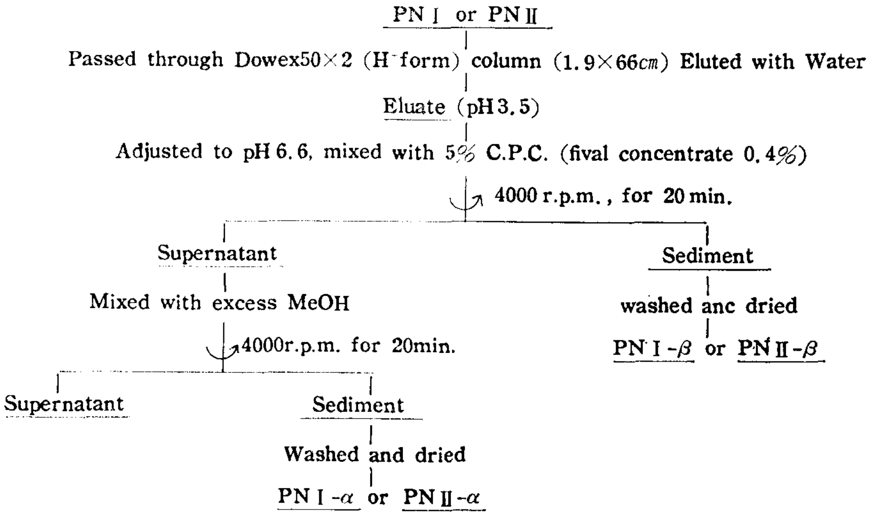
1. Aniline－trichioroacetic acid reagent (for Uronie acid)
2. Hydroxamic acid－Ferric ion reagent (for Lactone)
3. Saturated basie lead acetate reagent (for Galacturonic acid)

などの発色試薬を用いて検出した。

(3) Crude polysaccharide の精製および分画

先に調整した PN I，II を少量の水にとかし，不溶部分は遠沈で除いて，上清を Dowex 50×2 (H^+form) column 1.9×66cmを通して除タンパクを行ない，溶出液を集めて pH を 6.6 に調整して，5 %－C.P.C. を加え最終濃度を 0.4% としてウロン酸を含むと考えられる画分を沈殿分離し，

Fig 2. Purificalion and fractionation of Crude Polysaecharides.



5%C.P.C. 可溶画分を PN I-α, PN II-α

5%C.P.C. 不溶画分を PN I-β, PN II-β

とし，それぞれを(2)にしたがって分析に供した。

結　　果

1. Crude polysaccharides の調整

PN 温湯可溶画分を cellulose powder A で濾別した濾液について，透析前後の糖およびアミノ酸 (protein 量) を定量した結果を Table 1. に示す。Sample 1, 2, 3 は材料の相違を表わす。

Table 1. Proportion of Sugar and amino acid (Protein) in each fraction.

	Sample 1		Sample 2		Sample 3	
	All Sugar	All amino acid (Protein)	All Sugar	All amino acid (Protein)	All Sugar	All amino acid (Protein)
Before dialysis (g)	4.69	4.72	6.84	2.77	2.00	1.42
After dialysis (g)	3.47	0.90	3.78	0.90	1.55	0.83
Decrease (%)	26	81	45	67	27	42

遊離の糖は平均約33%減少し，遊離のアミノ酸 (Protein) は平均約63%減少した。

糖の減少率に比べて，アミノ酸 (Protein) は2倍近くも減少していることが確認された。

また3回の透析により，殆んどの遊離アミノ酸 (Protein) や遊離の糖が除去されたことが，透析外液の定量値の比較により明らかとなった。

2. PN I, II ; PN I-α, β ; PN II-α, β 中におけるヘキソーズ，ペントース，ウロン酸の定量を行なった結果を Table 2. に示す。ヘキソーズはマンノースとして，ペントースはキシロースとして，ウロン酸はガラクツロン酸として定量した。

Table 2. Sugar cen tent of PN fractions.

Fraction	Solubility	Uronic acid(%)	Hexose (%)	Pentose (%)
PN I	+	11.5	75.5	12.8
PN I-α	+	13.6	83.6	2.5
PN I-β	+	15.9	79.5	4.5
PN II	⧺+	18.3	55.0	26.2
PN II-α	⧺	15.4	71.3	12.9
PN II-β	−	21.3	52.2	26.2

3. 各種展開溶媒，発色試薬を用いて行なった P. P. C. の総合結果を Table 3. に示す。

Table 3. Sugar component of PN fractions detected by Paper chromatography.

	Gal A	Gal	Man	Glc	Ara	xyl	Fuc	Rham
PN I			++	+++	trace	++		
PN I -α			+++	+++	trace	+	trace	trace
PN I -β			+++	+++		+	trace	trace
PN II	++	++	+++		trace	++		
PN II -α	trace	++	+++		trace	+		
PN II -β	++	trace	+++		trace	++		

4. ガスクロマトグラフィーは，山川らの方法と正田らの方法を用いて行なったが，ウロン酸を除いて，ほぼ同様の結果が得られたので，正田らの方法によるものを Table 4. に示す。いずれの Fraction にもマンノースを含むので，マンノースの Retention time を1.00として各 Peak の Retention time を計算した。なお Table 4. の中の t は痕跡を示し，(+)，(++)，(+++) などは Paek の高さを含有量として表わした。

Table 4. Sugar component of PN fractions detected by Gas-lizuid chromatography.

		Ara	xyl	Man	Gal	Glc	Gal A	Glc A	unkown
50%—MeOH insoluble	PN I	t t 0.40, 0.45	(+) (+) 0.57, 0.75	(++) 1.00		(+++) (+++) 1.44, 2.44			(++) 0 87
	PN I -α	t 0.45	(+) (+) 0.58, 0.76	(++) (+) 1.00, 1.55		(+++) (+++) 1.44, 2.43			(+) (++) 0.88, 3.62
	PN I -β	t 0.45	(+) (+) 0.57, 0.75	(++) (++) 1.00, 1.55		(+++) (++) 1.44, 2.42			
50%—MeOH Soluble	PN II	t (+) 0.40, 0.42	(++) (++) 0.57, 0.75	(+++) 1.00	(+) (++) 1.26, 1.55		(+) (+) 1.90, 2.43		
	PN II -α	t t 0.39, 0.44	(+) (+) 0.56, 0.73	(+++) (+++) 1.00 1.54	(++) (+++) 1.24, 1.54				(++) 0.88
	PN II -β	t 0.38	(++) (++) 0.56, 0.73	(+++) (++) 1.00, 1.53	? (++) 1.53		(+) (+) 2.07, 2.38		(+) 2.97
Authentic Sample		0.38, 0.43	0.59, 0.76	1.00, 1.55	1.27, 1.55	1.44, 2.40	1.94, 2.55	2.12, 3.19	

Table 4. の結果は P. P. C. の結果とよく一致していると思われる。なお，リボース，ラムノース，フコースについても検討したが。リボースとアラビノース，ラムノースとキシロース，更にフコースとキシロースが，Retention time においてほぼ同値を示すので，これ等の存在については確認できなかった。

5. アミノ酸分析

透析前後の溶液を，ボバインアルブミンとして，一定量ずつとり出し，前述のごとく処理し

てアミノ酸組成の概要を検討した結果を，Table 5. に示す。グルタミン酸を 1.00 として，各アミノ酸のモル比を求めたものである。

分析結果より，グルタミン酸，アスパラギン酸，グリシン，アラニンが比較的多量に含まれていることが判明した。この表の他に，アルギニン，チロシンの痕跡が見られたが，ヒスチジン，プロリンは認められなかった。

Table 5. amino acid component of PN fractions.

amino acid	Before dialysis	After dialysis
Lysine	0.47	0.34
Ammonia	6.87	2.92
Aspartic acid	0.57	1.08
Threonine	0.38	0.72
Serine	0.42	0.64
Glutamic acid	1.00	1.00
Glycine	0.54	0.95
Alanine	0.76	1.19
Valine	0.30	0.31
Methyonine	0.04	0.05
Isoleucine	0.21	0.30
Leucine	0.32	0.47
Phenylalanine	0.08	0.05

6. ウロン酸の検討

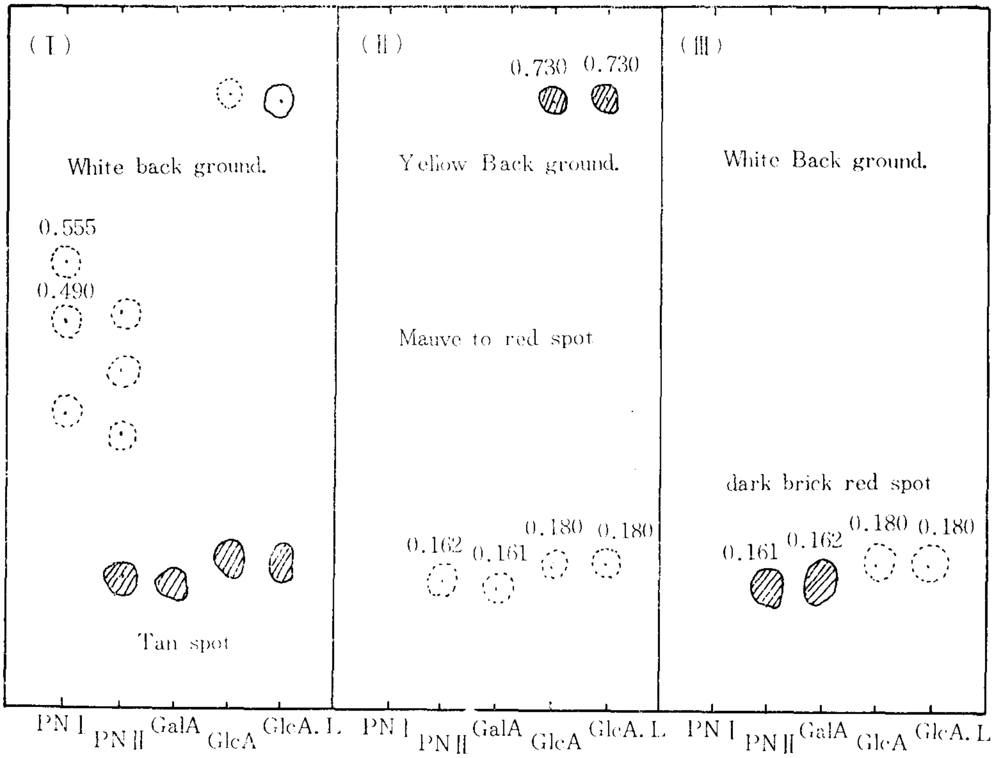
PN I，II の中に存在するウロン酸が，ガラクツロン酸であるか，グルクロン酸であるかを調査するために行ったペーパークロマトグラムを Fig 3. に示す。spot 付近の数値は，Rf 値を表わす。

Fig 3. はPN II に含まれるウロン酸が，ガラクツロン酸であることを示している。またPN I にはウロン酸を含まないという他の分析結果を裏付けていると思われる。

考　　察

〔1〕 ナメコ粘質物中の多糖構造に着目して，石沢，槙の方法を参考にし，更に透析操作を加えることにより，アミノ酸，ペプタイド，単糖類，少糖類その他大部分の低分子物質を除去することができた。またメタノール濃度による沈殿分画を試みて，PN I，PN II という異った 2

Fig 3. Paper chromatog raphic detection of uronic acid in PN I , II



I : Detection of Uronic acid (Aniline-trichloro acetic acid reagent)
II : Detection of Lactone (Hydroxamic acid-Ferric ion reagent)
III : Detection of Galacturonic acid (Satulated Basic lead acetate reagent)

画分を得た。P.P.C,, また今まで行われていなかった G.L.C.更に一般分析法により, PN I は, 黒褐色繊維状で, 水に対する溶解度がきわめて小さく (温湯にはやや溶ける (グルコース, マンノース, キシロースと少量のアラビノースを含むこと, また PN II は, 灰白色粉末状で, 水に対する溶解度は, PN I に比べてやや大きいが完全には溶けなかったこと, 構成糖としては, ガラクトース, マンノース, キシロース, ガラクツロン酸と少量のアラビノースを含むことが確認された。

〔2〕 PN I, II をそれぞれ Dowex 50×2 のカラムを通過させたところ, ボバインアルブミンとして定量した結果, 相当量のタンパク質が除去されたと思われる。更にこれらを pH6.6 に調整し, 5 %C.P.C. による分画を試みたが, PN I は予想した如く, 不溶および, 可溶画分共ほぼ等しい構成糖からなり, 水に対する溶解度にも差は見られなかった。これに反し, PN II は明らかにガラクツロン酸を含まず, ガラクトースを相等量含み, キシロースは痕跡のみの PN II-α と, ガラクツロン酸, キシロースを相当量含み, ガラクトースは痕跡のみの PN II-β に分画された。

〔3〕 PN I, II を少量の Phosphate Buffer (pH 7.5) に溶かし，同 Buffer で elute して，SephadexG-100 による Gel-filtration を行なった結果，いずれも分子量20万の blue dextran の peak と大体同じ位置に One peak を持つ elution pattern を示したことから，分子量が約20万前後の Polysaccharide を含有するのではないかと想像される。しかし，これだけでは勿論確定的なことはいえないので，今後，Sephadex G-150，G-200 などにより再分画を試み，更に濾紙電気泳動，超遠心などを行なって均一性を検討すべきであると思われる。

結　　び

ナメコ粘質物中の多糖類について，主に 70°C温湯可溶画分を検討したが，主成分は，石沢により検出され，槇の報告には見られなかったマンノースを多量に含む多糖類であろうと考える。更にこのものを分画した場合，50%メタノール不溶画分では，水解後の構成糖として，グルコース，マンノース，キシロースが大半を占め，50%メタノール可溶画分ではマンノース，ガラクトースが大部分で，ガラクツロン酸はこれに次ぎ，P.P.C. および G.L.C. のクロマトグラムからは，主成分とはいい難いが，一般にポリウロン酸は水解されにくく，一方こわれ易いことや，一部がメトキシル化していること，ポリマーのままの定量値などから，少くとも全糖値の20%以上は含有されているのではないかと思われる。その他，少量ながらアラビノースが各画分に存在していることが判明したが，フコース，リボースについては，存在の有無を更に検討して見る必要を感じる。また，実験の部では省略したが，PN I, II 共冷水に不溶の画分を 0.5N および 1N の NaOH で抽出し，水解したものからは，P.P.C. のクロマトグラム上，グルコース，キシロースが検出され，これらはヘミセルロースであると考えられる。要するに，ナメコ粘質物中の多糖類は，以前に石沢，槇により調査され，推定された如く，本実験からしても，ガラクツロン酸重合体のペクチン様物質と，ヘミセルロースの複合体からなり，これらが水分を含んでゲル化して粘質物を形成しているものと思われる。ただ，石沢の場合はグルクロン酸が含有されているのに反し，本実験では，槇の報告と同じく，ガラクツロン酸として検出されたという点が異なっている。

また以上に挙げた各画分の構成糖が，一般に高等植物細胞壁多糖成分としてよく知られているものと著しく類似していることは興味深い。即ち，ペクチン様物質としては，アラビノガラクタンや，エステル化したガラクツロン酸基の長鎖に，ガラクトース，ラムノース，キシロースなどの側鎖のついているものが知られており，またヘミセルロースとしては，グルコース，キシロース，アラビノース，ガラクトース，マンノースなどからなるホモまたはヘテログルカンで，中性のものが多いが，ウロン酸を含む場合も知られている。

今後，ガラクツロン酸を含有する，PN II, II-βを更に精製分画して，均一な多糖を得，糖構

造の詳細をきわめて行きたい。

(短大家政学科助教授)
(短大家政学科助手補)

文　献

1）石沢清：栄養と食糧，19，365（1967）
2）槙光章：家政学雑誌，18，307（1967）
3）Brückner, J: Biochem. J., 60, 200 (1955)., C. Francois, R. D. Marshall, A. Neuberger: Biochem. J., 83, 355 (1962)
4）Lowry, et al: J. Biol. chem., 193, 265 (1951)
5）Z. Dische: J. Biol. chem., 181, 379 (1949)
6）T. Bitter, H. M. Muir: Anal. Biochem., 4, 330 (1962)
7）T. Yamakawa, N. Ueta, I. Ishizuka: Japan J. Exp. Med., 34, 231 (1964)
8）正田芳郎，橋本圭二，井上武久，et al：分析化学，19，1607（1970）
9）M. Gee, R. M. Mccready: Anal. chem., 29, 257 (1957)