

# キノコの糖脂質の構造

## 1. 野生のキノコについて

水野浄子 富安郁子\* 小林貴美子  
尾立純子\*\* 大柴恵一 田中昭子  
相愛女子短期大学 \*帝塚山短期大学  
\*\*大阪市立環境科学研附設栄養専門学校

### I. 緒言

菌類のうち担子菌・子のう菌に属するものは、主として糸状体と、胞子をつくる子実体で構成されている。このうち子実体が肉眼で明らかに認められるものを、きのこと呼んでいる。食用となるもののほとんどは担子菌に属し、古くから山野に自生しているものが食用にされてきた。最近では栽培されるものも多い。これらの子実体がどのようにして形成されるのか、即ち子実体形成誘導活性を持つ物質及びその形成機構は余りよく分かっていない。近年生体膜構造の微量成分である糖脂質のうち、特定分子種に細胞分化誘導能や細胞増殖制御作用という生物活性が見いだされ、糖脂質の生物学的重要性が注目を集めている。Kawai<sup>1) 2) 3)</sup>らは担子菌に属するシイタケ中の糖脂質としてセレブロシドの構造を決定し、それらと子実体誘導物質としての生理活性との関連性を見いだしている。しかし、担子菌・子のう菌に属するきのこの脂質成分や糖脂質及びその生理活性は、あまり知られていない。また、きのこの分類は主として形態的性質に基づいて行われており、化学的分類に寄与する種々の成分の分析は、数種のキノコについての脂質組成<sup>4)</sup>及び脂肪酸組成<sup>5) 6)</sup>の検討が行われているが系統的にはあまり詳細には行われていない。そこで我々は、まず担子菌・子のう菌に属する数種の野生のきのこについて糖脂質の分析を行ない詳細な構造の解析を行った。

### II. 実験材料及び実験方法

#### 1. 脂質の抽出及び分画

山野で採集した *Amanita phalloides* (Fr.) Link (タマゴテングタケ)、*Amanita virosa* (Fr.)

Bertillon (ドクツルタケ)、*Amanita vaginata* var. *punctata* (Cleland & Cheel) Gilb. (オオツルタケ)、*Amanita vaginata* (Bull.:Fr.) Vitt. var. *fulva* (Schaeff.) Gill. (カバイロツルタケ) の乾燥菌体20gよりFolch<sup>7)</sup>らの方法に従い、chloroform-methanol(2:1,by vol)を用い脂質を抽出した。chloroform-methanol(C-M)抽出脂質(総脂質)は、展開溶剤、chloroform-methanol-water(65:25:4,by vol)を用いて薄層クロマトグラフィー(TLC)により分画した。TLCを行った後Dittmer-Lester試薬を噴霧し、リン脂質を検出した。またアントロン試薬を噴霧後110℃で10分間加熱し、糖脂質を検出した。

## 2. 糖脂質の単離

総脂質を、0.3N NaOH-chloroform-methanol(1:2,by vol)で37℃、1時間弱アルカリ加水分解し、酢酸で中和した後、クロロホルムでアルカリ安定脂質を抽出した。アルカリ安定脂質はTLC(C-M-H<sub>2</sub>O,65:25:4,by vol)で分画し、糖脂質の検出は上記のアントロン試薬で行った。また別にTLCを行った後、各プレートをI<sub>2</sub>蒸気にあて、出現した各スポットをプレートよりかきとりchloroform-methanol(2:1及び1:2,by vol)で溶出させ、糖脂質を単離した。

## 3. 糖脂質の構成脂肪酸の分析

単離した糖脂質1mgに3%無水塩酸メタノール1mlを加え、100℃で3時間メタノリシスを行った。メタノリシス後ヘキサンを加え、脂肪酸メチルエステルを抽出した。脂肪酸メチルエステルは、展開溶媒、Hexane-diethylether(4:1,by vol)を用いてTLCで分画し、9M硫酸を噴霧した後180℃で加熱し、非極性脂肪酸とhydroxy脂肪酸の検出を行った。また脂肪酸メチルエステルは、ガスクロマトグラフィー(GLC)により分析した。GLCは島津GC 15-Aを用い、キャピラリーガラスカラム0.53mm×1.5m,sp-2380,注入温度270℃、検出器温度270℃カラム温度80~200℃、4℃/minの昇温で行った。またカラムクロマトグラフマスペクトロメトリー(GC/MS)により分析した。GC/MSは、イオン化法として電気衝撃イオン化法(Electron impact, EI)を用いて検討した。

## 4. 糖脂質の構成糖の分析

単離した糖脂質を、三フッ化酢酸中で121℃、2時間水解し、NaBH<sub>4</sub>で25℃、14時間還元後、無水酢酸及びピリジン(1:1,by vol)中でアセチル化し、生じたalditol acetateをGLCにより分析した。GLCは島津GC 15-Aを用いキャピラリーカラム0.53mm×1.5m,注入温度270℃、検出器温度270℃カラム温度170~220℃、2℃/minの昇温で行った。

## 5. 糖脂質のソフトイオン化質量分析法(fast atom bombardment mass spectrometry,FAB/MAS)による分析

単離した糖脂質を、ニトロベンジルアルコール：トリエチレングリコールモノ-N-ブ

チルエーテル (1:1, by vol) をmatorixとし、JEOL-SX-102型二重収束高分解質量分析計を用い、intactのままFAB/MS分析により同定した。

### Ⅲ. 結果及び考察

#### 1. 総脂質含量及び各脂質画分

それぞれのキノコの総脂質の割合をTable-1 に示す。総脂質の割合はいずれも10%以下でありキノコ中の一般的な脂質含量と類似性が認められた。これらの総脂質をTLC【chloroform-methanol-water(65:25:4,by vol)】で分画し各脂質の検索を行ったところ主成分として、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルコリン (PC、レシチン)、リゾホスファチジルコリン (lyso-PC) の各リン脂質及び糖脂質のスポットが検出された。(Fig. 1) またRf値の高いところに未知のスポットが検出された。

Table 1 Amounts of totale lipids from various Basidiomycotina

<i>A. virosa</i> (Fr.)Bertillon(ドクツルタケ)	9.0%
<i>A. vaginata</i> (Bull.:Fr.) Vitt. var. <i>fulva</i> (Schaeff.)Gill.(カバイロツルタケ)	10.8%
<i>A. vaginata</i> var. <i>punctata</i> (Cleland & Cheel)Gilb.(オオツルタケ)	7.3%
<i>A. phalloides</i> (Fr.) Link(タマゴテングタケ)	5.4%

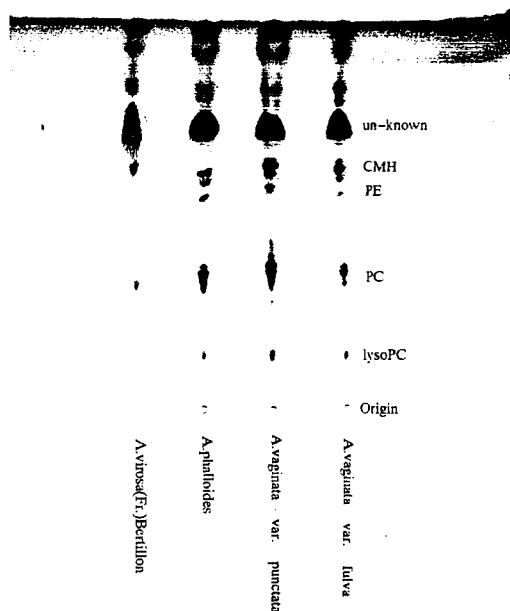


Fig.1 Thin-layer chromatogram of total lipids from various Basidiomycotina.

## 2. 糖脂質の単離

各キノコより得られた総脂質を弱アルカリ水解したところ、どのキノコでもリン脂質は分解され、糖脂質は分解されずに残った。この結果これらの糖脂質は、エステル結合を含むグリセロ糖脂質ではなくスフィンゴ糖脂質ではないかと考えられた。またこれらの糖脂質のRf値より、セラミドモノヘキソシド (CMH) ではないかと考えられた。そこでまずドクツルタケのアルカリ安定の糖脂質のスポットを薄層より回収しTLCで精製を繰り返し単一のスポットを得、精製した糖脂質とした。(Fig. 2)

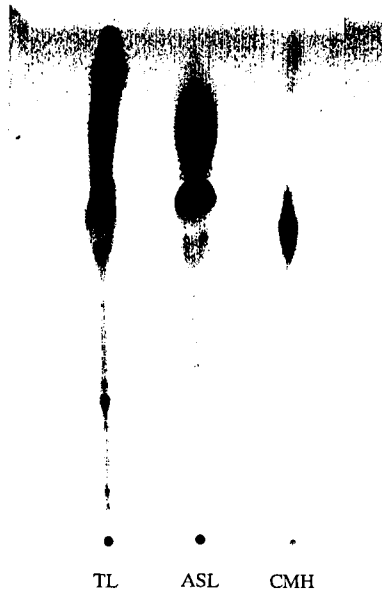


Fig.2 Thin-layer chromatogram of total lipids (TL), alkalin stable lipids(ASL) and isolated ceramid mono hexoside(CMH) from *A. virosa* (Fr.)Bertillon

## 3. 糖脂質の構成脂肪酸

ドクツルタケの糖脂質の脂肪酸組成を検索するため、糖脂質をメタノリシスし、脂肪酸メチルエステルを得、細菌中に含まれる脂肪酸メチルエステル (非極性脂肪酸、2-hydroxy脂肪酸、3-hydroxy脂肪酸を含む) を標準としてTLC【Hexane-diethylether(4:1,by vol)】を行った。その結果、2-hydroxy脂肪酸に相当するRf値の位置にスポットが検出された。(Fig. 3) 次にこの脂肪酸メチルエステルをGLCで分析し、標準の脂肪酸メチルエステルと retention timeを比較したところ2-hydroxy C<sub>16:0</sub>及び2-hydroxy C<sub>18:0</sub>と一致した。(Fig. 4)

### キノコの糖脂質の構造

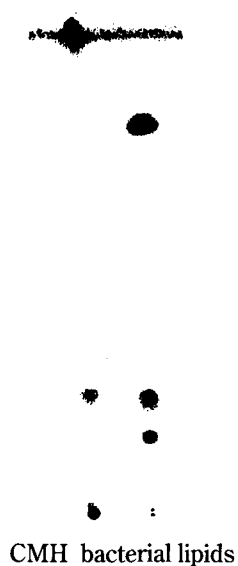


Fig.3 Thin-layer chromatogram of fatty acid methyl esters of CMH from *A. virosa* (Fr.) Bertillon and fatty acid methyl esters of bacterial lipids

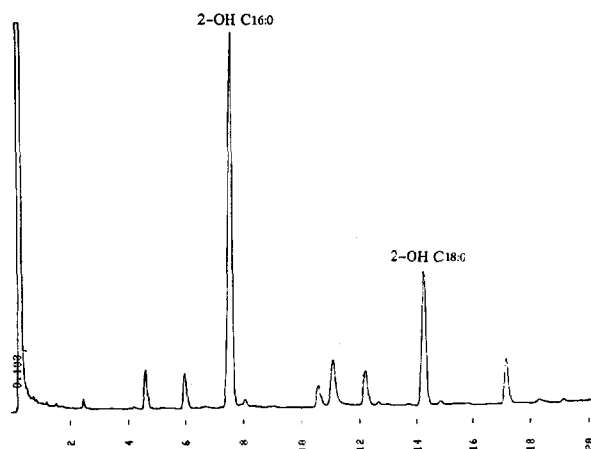


Fig.4 Gas chromatograms of fatty acid methyl esters of CMH from *A. virosa* (Fr.) Bertillon

#### 4. 糖脂質の構成糖

精製した糖脂質を水解後アセチル化し、生じたアルジトールアセテートをGLCにより分析した。そのクロマトグラムをFig. 5に示す。標準物質として、グルコース、マンノース、ガラクトース、アラビノースのアルジトールアセテート誘導体をGLC分析しretention timeを試料と比較したところグルシトールのピークと一致した。この結果構成糖は、グルコースであることが明らかとなった。

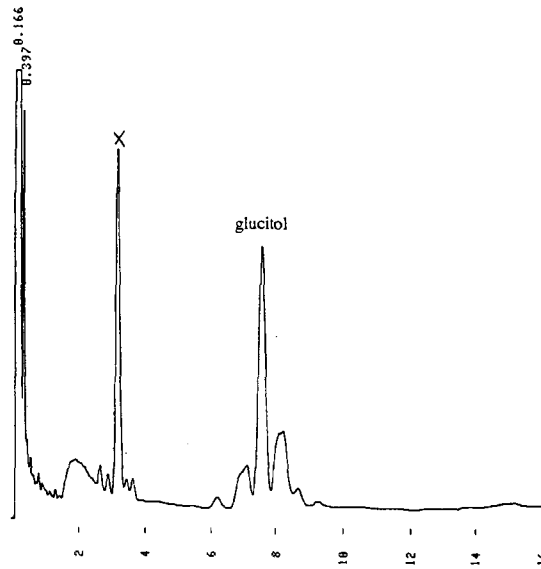


Fig.5 Gas chromatograms of alditol acetates of CMH from *A. virosa* (Fr.)Bertillon

### 5. ドクツルタケの糖脂質の全体構造

ドクツルタケの糖脂質をintactのままnegativeFAB/MASで分析したところCMHの分子イオンよりプロトンが1分子離脱したと思われる ( $M-H^+$ ) がM/Z 742、M/Z 770に検出され (Fig. 6)、さらに低質量領域にセラミドに由来するM/Z 564、M/Z 592が検出された。また2-hydroxy C<sub>16:0</sub>に由来するM/Z 255及び2-hydroxy C<sub>18:0</sub>に由来するM/Z 283が検出された。このことは水解後のGLCで分析した脂肪酸の結果とよく一致した。これらの主要フラグメントイオンをTable 2に示す。

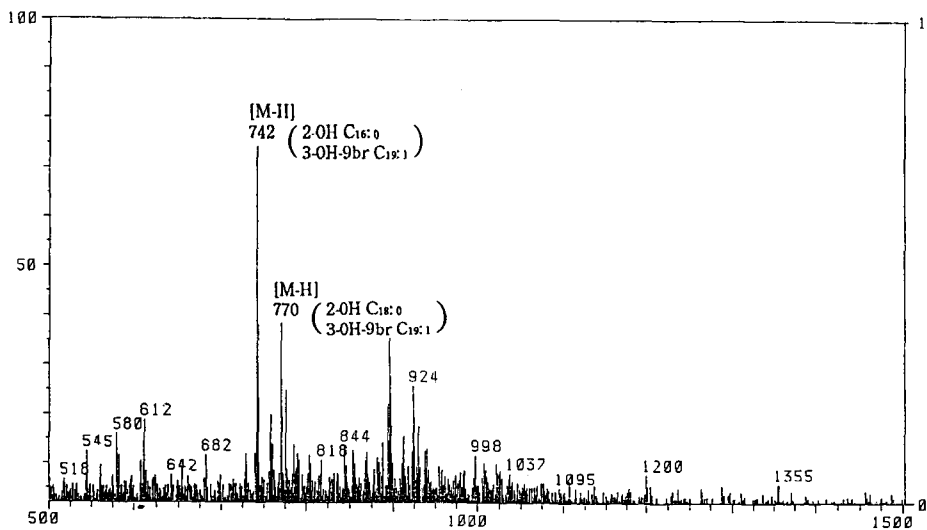


Fig.6 Negative FAB/MS spectrum of CMH from *A. virosa* (Fr.)Bertillon

Table 2 Major detectable mass ions &amp; relative abundances of molecular species of

	CMH in <i>A. virosa</i> (Fr.)Bertillon	
	2-OH C <sub>16:0</sub> CMH	2-OH C <sub>18:0</sub> CMH
[M-H] <sup>+</sup>	M/Z 742	M/Z 770
ceramide	M/Z 564	M/Z 592
fatty acid	M/Z 255	M/Z 283
relative abundances (% of the total)	69%	31%

## 6. まとめ

この結果ドクツルタケの糖脂質 (CMH) の主要成分は構成糖がグルコース、長鎖塩基が hydroxy-branch C<sub>19:1</sub>、構成脂肪酸が2-hydroxy C<sub>16:0</sub>及び2-hydroxy C<sub>18:0</sub>の2成分であると推定された。またこの2つの糖脂質の割合は、GLC及びFAB/MAS分析の結果より脂肪酸が2-hydroxy C<sub>16:0</sub>のCMHが69%、2-hydroxy C<sub>18:0</sub>のCMHが31%であった。(Table 2) 糖脂質は細胞分化の結果として発現するだけでなく細胞分化能を有すると考えられており、キノコでは子実体型性能を有することが近年調べられているが、これらの糖脂質が生体内でどのような働きを持つか興味深く今後検討したいと考えている。

## 謝 辞

終わりに、糖脂質の質量分析は、大阪市立大学医学部で行った。実験の便宜を図っていただきました大阪市立大学医学部矢野郁也教授に謝意を表します。またキノコの同定や分類に関してご指導をいただいた本郷次雄先生、キノコの採取にご協力いただいた米内山宏先生、高山栄先生、実験にご協力いただいた本学の伊集院智子非常勤助手、大阪市大・医・細菌学教室の堀田久子助手、西内由紀子技官に深く感謝します。なお、本研究の費用の一部は相愛女子短期大学の学術研究費によりました。

## 文献

- 1) Kawai,G. and Ikeda,Y.(1983)Biochim.Biophys.Acta,754,243-248.
- 2) Kawai,G.Ikeda,Y. and Tubaki,K.(1985)Agric.Biol.Chem.,49,2137-2146.
- 3) Kawai,G.(1989)Biochim.Biophys.Acta,1001,185-190.
- 4) 遠藤 節子, 郭 志平, 高木 徹(1991)油化学, 40,34-37.
- 5) 広井 勝, (1977)家政学雑誌, 28,243-246.
- 6) 広井 勝, (1977)家政学雑誌, 28,408-412.
- 7) Folch,j.,Lees,M. and Sloane-Stanley,G.H.(1959)J.Biol.Chem.,226,497-509.

