

# 食用キノコのスフィンゴ脂質

## — III. オオヒラタケ *Pleurotus cystidiosus* の マイコグリコリピドにおけるヒラタケ属共通の 多分岐型糖鎖構造 \* —

糸 乘 前<sup>1\*\*</sup>・矢 野 宏 治<sup>1</sup>・小 島 寿 夫<sup>1</sup>・黒 田 由紀子<sup>1</sup>  
伊 藤 將 弘<sup>2</sup>・山 本 憲 二<sup>3</sup>・杉 田 陸 海<sup>1</sup>

### Studies on Sphingolipids of Edible Fungi

#### — III. Mycoglycolipids of *Pleurotus cystidiosus* (Ohiratake) have a Common Polytomy Sugar Chain among *Pleurotus* sp.\* —

Saki ITONORI<sup>1\*\*</sup>, Kouji YANO<sup>1</sup>, Hisao KOJIMA<sup>1</sup>, Yukiko KURODA<sup>1</sup>  
Masahiro ITO<sup>2</sup>, Kenji YAMAMOTO<sup>3</sup> and Mutsumi SUGITA<sup>1</sup>

#### Abstract

Edible fungi, mushrooms, are a popular food in Japan and over fifteen cultured mushroom species are available at the food markets. Recently, constituents or ingredients of edible mushrooms have drawn attention because possibilities have been seen for their medical usage. Mycoglycolipids (Basidiolipids) of higher mushrooms have been characterized as glycosylinositolphosphoceramides, and they have a common core structure of  $\text{Man}\alpha 1-2\text{Ins}1-[PO_4]-\text{Cer}$  and extension of Man, Gal and/or Fuc sugar moieties. Five mycoglycolipids were purified from an edible mushroom, *Pleurotus cystidiosus* (Ohiratake) by successive column chromatography on ion exchange Sephadex (DEAE-Sephadex) and silicic acid (Iatrobeads). Their structures were characterized to be  $\text{Man}\alpha 1-2\text{Ins}1-[PO_4]-\text{Cer}$ , ( $\text{Gal}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-6\text{Man}\alpha 1-2\text{Ins}1-[PO_4]-\text{Cer}$ , ( $\text{Gal}\alpha 1-6(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-6\text{Man}\alpha 1-2\text{Ins}1-[PO_4]-\text{Cer}$ , ( $\text{Gal}\alpha 1-6(\text{Gal}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-6\text{Man}\alpha 1-2\text{Ins}1-[PO_4]-\text{Cer}$  and  $\{\text{Gal}\alpha 1-(2 \text{ or } 6)\text{Gal}\alpha 1-6\}(\text{Gal}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-6\text{Man}\alpha 1-2\text{Ins}1-[PO_4]-\text{Cer}$  by sugar compositional analysis, methylation analysis, periodate oxidation, partial acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, immunochemical analysis, gas-liquid chromatography (GC), gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS), matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR). Ceramide constituents of their mycoglycolipids were composed of phytosphingosine as the sole sphingoid, and mainly 2-hydroxy C 22: 0 and C 24: 0 acids as the fatty acids.

**Key words:** Mycoglycolipid, Glycoinositolphosphosphingolipid, Edible fungi (*Pleurotus cystidiosus*)

\* 本研究の一部は第25回日本糖質学会年会  
(2005年7月, 大津)で発表

1 滋賀大学教育学部化学教室 (Department of Chemistry, Faculty of Liberal Arts and Education, Shiga University, 2-5-1 Hiratsu, Otsu, Shiga 520-0862)

2 立命館大学情報理工学部情報生物学教室  
(Department of Bioscience and Bioinformatics, College of Information Science and Engineering, Ritsumeikan Uni-

versity, 1-1-1 Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577)

3 京都大学大学院生命科学研究科 (Division of Integrated Life Science, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Oiwake-cho, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502)

\*\* 連絡者:糸乗 前 (Corresponding author: Saki Itonori, E-mail: itonori@sue.shiga-u.ac.jp) (2007年9月10日受理)

## 1. 緒 言

キノコは、ビタミンやミネラルに加えて食物繊維を豊富に含有することや、嗜好的な要素から、現在、食用として15種類が生産され、市場における食品の一角を築いている。また、近年、キノコは食用としてだけでなく、薬用としてもその利用価値が見出されているものも少なくない。その中で、免疫活性を有すると推測されるハラタケ目のツクリタケ *Agaricus bisporus* やハラタケ *Agaricus campestris* の主要な酸性糖脂質がイノシトールリン酸を含むマイコグリコリピド (Mycoglycolipid) と称されるリン糖脂質の一群であることや、それらのキノコに含まれる Gal $\alpha$ -Gal あるいは Gal $\beta$ -Man のようなオリゴ糖がヒト異好性抗体に認識されることなどが報告されている (1-3)。

糖脂質は全ての生き物の細胞表面に存在し、いろいろな生命活動の局面において必要不可欠な化学物質であることは周知の事実である。菌類の糖脂質としては、主にグリセロ型糖脂質および中性スフィンゴ型糖脂質とイノシトールリン酸を含む酸性スフィンゴ糖脂質が知られている。特に、後者のイノシトールリン酸含む酸性糖脂質は上述したようにキノコ特有のマイコグリコリピドとして、それらの生理活性をも念頭に入れて精力的な構造生化学的研究が進められている。現在のところ、化学構造的には、今までに報告されているすべてのマイコグリコリピドについて、Man $\alpha$  1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]<sub>2-</sub>-Cer が共通コア構造として存在することが確認されている (4-10)。

ヒラタケ科ヒラタケ属に分類されるキノコとしては、ヒラタケ *Pleurotus ostreatus* およびエリンギ *Pleurotus eryngii* が知られているが、それらのマイコグリコリピドについては、ヒラタケはドイツおよびアメリカの研究者によって、また、エリンギは著者らによって研究が行われ、それらの化学構造が主成分において一致することが報告されている (3, 11)。

本論文では、もう一種類のヒラタケ属のキノコであるオオヒラタケ *Pleurotus cystidiosus* のマイコグリコリピドを精査して、ヒラタケや

エリンギに見られる主成分に関して化学構造の共通性を明らかにするとともに、ヒラタケ属におけるマイコグリコリピドの体系化について述べる。

## 2. 実 験

### 2.1 実験材料

オオヒラタケ *Pleurotus cystidiosus* は、湿重量 (石突き部を含む) 2080 g の凍結乾燥物 (乾燥重量 276 g) として、北海道立十勝圏地域食品加工技術センターより供与された。

### 2.2 酸性糖脂質画分の調製

#### 2.2.1 スフィンゴ脂質画分の分画

凍結乾燥物 (276 g) をミキサーで細碎したものを二分して、それぞれ 2 L のクロロホルム / メタノール / 水 (60: 35: 8, v/v) で 50°C, 2 h および 37°C, 12 h の抽出を行った。全ての抽出液を合して溶媒を減圧留去し、粗脂質画分として約 82 g を得た。次いで、得られた粗脂質画分を弱アルカリ加水分解、続いて弱酸処理を施して、アシル型およびアルケニル型グリセロ脂質を除去した後、アセトン粉末 (スフィンゴ脂質画分) として 3 g を得た (乾燥重量当たり 1.1%)。

#### 2.2.2 酸性糖脂質画分の分画

スフィンゴ脂質画分 3 g を、DEAE-Sephadex A-25 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー (COO<sup>-</sup>型, 40 g, 3.4 x 25 cm) によって、溶出溶媒として、カラム容積の 5 倍容のクロロホルム / メタノール / 水 (30: 60: 8, v/v), 1 倍容のメタノールおよび 13 倍容の 0.45 M 酢酸アンモニウム (メタノール溶液) を順次用いて、中性および両性イオン型糖脂質画分と酸性糖脂質画分に分画した (12)。このクロマトグラフィーで、前二者のクロロホルム / メタノール / 水およびメタノールによる溶出によって、担体への非吸着性物質として 650 mg (乾燥重量当たり 0.2%) の中性および両性イオン型糖脂質画分を、一方、後者の 0.45 M 酢酸アンモニウム溶媒による溶出によって、担体への吸着性物質として 1.4 g (乾燥重量当たり 0.5%) の酸性糖脂質画分 (マイコグリコ

リビド画分) を回収した。

### 2.3 ケイ酸カラムクロマトグラフィーによる分画および精製

1-プロパノール / 水 / アンモニア水 (75 : 17.5 : 5, v/v) で充填したイアトロビーズ 6 RS-8060 カラム (2 x 95 cm) に少量の同溶媒に溶解した 400 mg の酸性糖脂質画分を注加した。カラムからの溶出は、同溶媒による单一の自然溶出法を用い、溶出液は 8 mL ずつ分取し、6 画分 (frs. 1 ~ 6) に分画した。各画分は、同属種として既にマイコグリコリビドの体系化が終了しているエリンギ由来のリン糖脂質との TLC (後述) 上での移動度の比較によって検した。fr. 2 および fr. 5 はそれぞれ AGL-1, AGL-5 と決定した。fr. 3 と fr. 4 からは、再イアトロビーズカラムの 1-プロパノール / 水 / アンモニア水 (75 : 12.5 : 5, v/v) 溶出によって、それぞれ AGL-4 a および AGL-4 b を精製した。fr. 6 からは再イアトロビーズカラムの 1-プロパノール / 水 / アンモニア水 (75 : 15.5 : 5, v/v) 溶出によって、AGL-6 を精製した。なお、いずれの再イアトロビーズカラム (1 x 55 cm) も、流速を 1 ml/min とするために加圧溶出法を用いた。

### 2.4 薄層クロマトグラフィー (TLC)

TLC プレートは、E. Merck 社製の Silica gel 60 を用いた。溶媒は、1-プロパノール / 水 / アンモニア水 (75 : 30 : 5, v/v) を使用し、2 時間展開した。検出は、オルシノール / 硫酸試薬 (糖), Dittmer-Lester 試薬 (リン) (13) および Hanes-Isherwood 試薬 (リン) (14) によった。

### 2.5 ガスクロマトグラフィー (GC)

#### 2.5.1 メチルグリコシドートリメチルシリル誘導体の分析

300 µg の試料に 0.2 mL の 1 M メタノール性塩酸を加えて封管し、100°C の湯浴で 3 h 加熱した。冷却後、生成した脂肪酸メチルエステルを 0.2 mL の n-ヘキサンで抽出除去した (後述の脂肪酸分析で使用)。残液に炭酸銀を加えて脱酸した後、濃縮乾固し、得られた残渣をトリ

メチルシリル誘導体として、GC (Shimadzu GC-18 A) 分析を行った。分析カラムは 0.22 mm x 25 m の無極性 5 % フェニルメチルシリコン化学結合型 (0.25 µm 膜厚) シリカキャビラリー (Shimadzu HiCap-CBP 5) を使用した。分析温度は 140°C → 230°C (2°C/min) に設定した。

#### 2.5.2 アルジトールアセテート誘導体の分析

200 µg の試料に 0.3 mL の 2 M 塩酸を加え、20 h, 100°C で加熱した。反応後、生成した脂肪酸を 1 mL の n-ヘキサンで抽出除去し、残液を 40°C, 窒素気流下で濃縮乾固した。得られた濃縮残渣は、さらに水酸化ナトリウムの入った真空デシケーター内に 1 h 置いて完全に脱酸した。次いで、0.5 mL の 1 % 水素化ホウ素ナトリウム溶液 (10 mM 水酸化ナトリウム水溶液) を加えて 12 h, 20°C に放置した。反応液に氷酢酸を加え、過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解した後、メタノールを加えながら 40°C で濃縮乾固した。得られた残渣に 0.25 mL のピリジンおよび 0.25 mL の無水酢酸を加えて、100°C, 15 min でアセチル誘導体を調製して GC 分析を行った。GC 分析は、カラム温度、170°C → 230°C (2°C/min) を除いてすべてトリメチルシリル誘導体の場合と同じ条件で行った。

#### 2.5.3 部分メチル化アルジトールアセテート誘導体の分析

200 µg の試料を分取し、0.2 mL のジメチルスルホキシドを加えた後、反応試験管内を窒素置換してから超音波照射によって完全に溶解させた。これに約 20 mg の粉末水酸化ナトリウムと 0.2 mL のヨウ化メチルを加え、メチル化を行った (15)。5 min 後、反応液を冷却してから、1 mL のクロロホルムと 4 mL の水を加えて二層に分配し、遠心分離によって上層を除去した。下層のクロロホルム層を窒素気流下で濃縮乾固して、メチル化物を回収した。このメチル化物に 0.3 mL の酢酸 / 塩酸 / 水 (8 : 0.5 : 1.5, v/v) を加え、電磁波 (電子レンジ, TOSHIBA ER-VS 1) を 45 sec 間照射して分解した後 (16)，窒素気流下で濃縮乾固した。濃縮残渣は、さらにデシケーター内に置いて完全に脱酸した後、0.5 mL の 1 % 水素化ホウ素ナ

トリウム溶液 (10 mM 水酸化ナトリウム水溶液) を加えて, 20°C, 12 h 還元を行った。過剰の水素化ホウ素ナトリウムを酢酸で分解した後, 40°C で窒素気流下で乾固した。得られた残渣をアセチル誘導体（前出）として GC 分析（カラム温度, 140°C → 230°C (4°C/min) に供した。

#### 2.5.4 脂肪酸メチルエステルの分析

前述 (2.5.1) のメタノリシスで得た n-ヘキサン抽出物を GC 分析（カラム温度, 170°C → 230°C (4°C/min) に供した。

#### 2.5.5 長鎖塩基の分析

300 µg の試料に 0.3 mL の水性メタノール塩酸を加えて, 18 h, 70°C で加熱した (17)。生成した脂肪酸メチルエステルを n-ヘキサンで抽出除去した後, 残液よりメタノールを留去した。次いで, 0.6 mL の 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液 / メタノール (3 : 4, v/v) および 0.72 mL のクロロホルムを加えて攪拌した後, 遠心分離して二層に分配した。下層のクロロホルム層をさらに 0.4 mL の水 / メタノール (1 : 1, v/v) によって洗浄した後, 窒素気流下で濃縮乾固して長鎖塩基画分を調製した。得られた画分をトリメチルシリル誘導体として GC 分析 (210°C → 230°C (2°C/min) に供した。

#### 2.6 ガスクロマトグラフー質量分析 (GC-MS)

Shimadzu GCMS-QP 5050 ガスクロマトグラフー質量分析計により, 次の条件下で分析した。分析カラム : Shimadzu HiCap-CBP 5 ; カラム温度 : 部分メチル化アルジトールアセテート分析, 80°C (2 min) → 160°C (20°C/min) → 240°C (4°C/min); 脂肪酸分析, 80°C (2 min) → 170°C (20°C/min) → 240°C (4°C/min); 長鎖塩基分析, 80°C (2 min) → 210°C (20°C/min) → 230°C (4°C/min) に設定; インターフェース温度 : 250°C; 試料注入口温度 : 240°C; ヘリウム圧力 : 100 kPa; スプリットレス時間 : 3.5 min; イオン化電圧 : 70 eV (EI); イオン化電流 : 60 µA (EI)。

#### 2.7 マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS)

AGL-1, AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6 の MALDI-TOF MS 分析には, Shimadzu/KRATOS KOMPACT MALDI II を, データ処理および装置のコントロールには Sun Microsystems 社の Workstation SPARC station を, スペクトルの解析には KOMPACT (UNIX software) を用いた。試料を 1 mg/mL の濃度になるようにクロロホルム / メタノール / 水 (6 : 4 : 1, v/v) に溶解した。サンプルプレートに調製した試料溶液約 10 µL を乾燥させながらアプライした。次に 1 µL のマトリックス溶液 (7-amino-4-methylcoumarin, coumarin 120, SIGMA 社を 1 mg/mL の 50% エタノール溶液として調製したもの, 使用時まで 4°C で暗所保存) をのせドライヤーボックスで乾燥させた後, MALDI-TOF MS 分析を行った。照射レーザーは 337 nm の窒素レーザーを用い, 測定は陰イオンモードで行った。質量校正にはエラコ *Pseudopotamilla occelata* の酸性糖脂質 AGL-2, mannosylinositolphosphorylceramide, [M-H]<sup>-</sup> (m/z = 1024) および AGL-3, dimannosylinositolphosphorylceramide, [M-H]<sup>-</sup> (m/z = 1186) を用いた (18)。また, 次節の 2.8 に述べる過ヨウ素酸酸化法の中間生成物を検証する際には, 同様に試料を調製した後, 上述のマトリックス溶液を 2 µL 使用し, 分析機器は Applied Biosystems/Voyager System 4377 を, データの解析には Workstation Ver. 5.1 を用いた。測定は陰イオンモードで行い, 質量校正にはキンバエ *Lucilia caesar* の中性糖脂質 ceramide tri-, penta-, heptasaccharides (m/z 1062.35, 1468.73, 1834.07) を用いた (19)。

#### 2.8 過ヨウ素酸酸化法による Man-Ins の結合位置分析

3 mg の試料 (AGL-1) を 0.5 mL のエタノールに溶解し, それに 2 mL の 80 mM 過ヨウ素酸ナトリウム (0.2 M 酢酸ナトリウム緩衝液, pH 4.5) を加えて, 暗所で 4°C, 120 h 反応させた。0.3 mL のエチレングリコールを加

えて反応を停止した後、アンモニア水を0.2 mL程度加えて液性を塩基性とした。次いで、最終濃度が5%になるように水素化ホウ素ナトリウムを添加して、12 h還元反応を行った。水素の発生が認められなくなるまで酢酸を滴下した後、流水中で2日間透析を行った。透析膜内液を濃縮して得られた反応成績体をMALDI-TOF MS分析によって確認した後、このものを0.3 mLの1 Mメタノール性塩酸で、100°C, 3 hメタノリシスした。n-ヘキサンで脂肪酸を抽出除去した残液を窒素気流下で濃縮乾固した。次いで、得られた分解成績体に結合しているリシン酸基を除去する目的で、その濃縮残渣に0.2 M酢酸アンモニウム緩衝液(pH 8.5)に溶解した2 Uのアルカリリホスファターゼ(*Escherichia coli*由来, Sigma-Aldrich社)を加えて、37°C, 24 h反応させた。反応液を窒素気流下で濃縮乾固させた後、0.25 mLのピリジンと0.25 mLの無水酢酸を加えて、100°C, 15 minでアセチル化した。アセチル化物に1 mLのクロロホルムと4 mLの水を加えて洗浄後、下層のクロロホルム層をGCおよびGC-MS分析に処した(11, 12, 18, 20,)。

## 2.9 $^1\text{H-NMR}$ 分析

1 mgの試料を試験管に分取し、1.020 mLの2%D<sub>2</sub>O/DMSOを加え、超音波照射によって溶解させた。分析にはJEOL JNM-ALPHA 400を用い、分析条件は、観測周波数400 MHz, 試料温度60°C, 積算回数は、AGL-5(3a), AGL-5(3b), AGL-5(4), AGL-5は512回, AGL-4bは2,048回, AGL-6は4,096回とした。

## 2.10 $\alpha$ -および $\beta$ -ガラクトシダーゼによる酵素的加水分解

### 2.10.1 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ(緑コーヒー豆由来, Sigma-Aldrich社)による加水分解

50 μgの試料を100 μgのタウロデオキシコール酸ナトリウムと100 μgの $\gamma$ -ガラクトノラクトンを含む100 μLの緩衝液(0.15 M クエン酸-リン酸ナトリウム, pH 6.4)に溶解し、これに0.2 U(5 μL)の酵素液を加えた後、

25°Cで20 h反応させた(11, 21)。反応後、反応液に1 mLの水を加えて、予め、それぞれ3 mLのクロロホルム/メタノール(2:1, v/v), メタノール、メタノール/水(1:1, v/v), 水の溶媒順で洗浄したSep-Pakカートリッジ(Sep-Pak Plus tC 18 Cartridges, Waters社)に注入した。カートリッジを10 mLの水で洗浄した後、10 mLのメタノールで糖脂質を溶出させた。溶出液は1 mLずつ分取りし、オルシノール/硫酸試薬によるTLC spotting testで検して陽性の画分を濃縮した。

### 2.10.2 $\beta$ -ガラクトシダーゼ(ジャック豆由来, 生化学工業社)による加水分解

50 μgの試料を100 μgのタウロデオキシコール酸ナトリウムを含む100 μLの緩衝液(0.1 M クエン酸-リン酸ナトリウム, pH 3.5)に溶解し、これに0.2 U(3 μL)の酵素液を加えた後、37°Cで18 h反応させた(11, 21, 22)。反応後は、上述の2.10.1に準じてSep-Pak処理を行った。

## 2.11 フッ化水素酸による加水分解

プラスチック試験管中で500 μgの試料を0.5 mLのジメチルスルホオキシドに超音波処理して溶解した後、3.5 mLのフッ化水素酸(35%)を加えて20°Cで20 h反応させた。反応液を流水透析した後、透析膜内液を濃縮して加水分解成績体を得た(11, 23)。

## 2.12 抗ヒトB血液型抗体(ポリクローナル抗体)を用いたTLC-immunostaining

試料をプラスチック製プレート(Polygram Sil G; Macherey-Nagel GmbH&Co., Germany)に添加した(試料の添加量は、検出試薬のオルシノール/硫酸試薬側: 4 mg, Immunostaining側: 0.4 mg)。溶媒は1-プロパノール/水/アンモニア水(75:30:5, v/v)を使用し、2時間展開した。展開後、風乾して溶媒を留去したプレートに、PBS(10 mMリシン酸緩衝液/生理食塩水, pH 7.2)をスプレーして湿潤し、蒸留水で5倍に希釈したブロッキング溶液(Blocking Solution in PBS for Immunoassay, pH 7.2, ナカライテスク株式会社)の入ったプラスチック製容器(7 x 4.5 cm)

の中に、室温で12 h、浸した。次に、ブロッキング溶液を除去して、5 mLの一次抗体希釈溶液（ブロッキング溶液で400倍に希釈したヤギ由来ポリクローナル抗B血清、和光社）を入れて、2 h、室温でインキュベートした。反応後、PBSで3回洗浄し、次いで二次抗体としてブロッキング溶液で400倍に希釈した5 mLのペルオキシダーゼ標識ウサギ由来抗ヤギ IgG (H+L) 抗体 (Jackson Immuno Research Lab., Inc.) 溶液を入れ、1時間インキュベートした。その後、PBSで5回洗浄し、基質溶液（3 mgの4-chloro-1-naphtholを1 mLのメタノールに溶解したもの、5 mLの50 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 7.0) および5  $\mu$ Lの過酸化水素水の混合液）を添加して発色させた。反応は、青紫色のバンドが出現したところで水洗いして停止した（23, 24）。

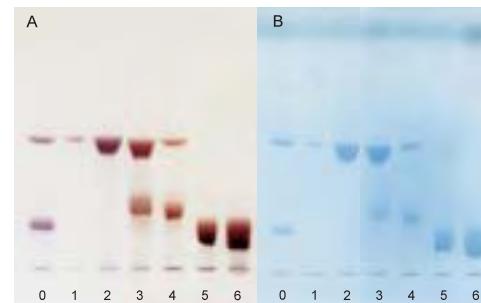
### 3. 結果および考察

#### 3.1 オオヒラタケ, *Pleurotus cystidiosus* のマイコグリコリピド (AGL-1, AGL-4 a, AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6 の単離)

オオヒラタケの酸性糖脂質画分は、TLC分析において orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 試薬および Hanes-Isherwood 試薬の両方に陽性を示す2種類のスポットが主成分として確認された (Fig. 1, lane 0)。これらのスポットは、同属キノコとして報告されているエリンギのそれらと移動度が一致するところから、AGL-1 および AGL-5 と仮称した。さらに、これらの主成分の単離、精製の過程で、微量成分として AGL-4 a および-4 b と AGL-6 と仮称する3種類の単離、精製にも成功した。即ち、オオヒラタケの酸性糖脂質画分 (400 mg) から、Iatrobeads column を用いた 1-プロパノール / アンモニア水系の单一溶媒溶出法により 6 画分 (frs. 1 ~ 6) に分画した (Fig. 1, lanes 1 ~ 6)。各画分は TLC 上でのスポットの移動パターンを考慮して、それぞれ次のように取り扱った。fr. 1 (収量および回収率、41.2 mg, 10.3%) は非リン糖脂質、AGL-0 (Ins1-[PO<sub>4</sub>]-Cer) および少量の AGL-1 の3種類の混合物、fr.

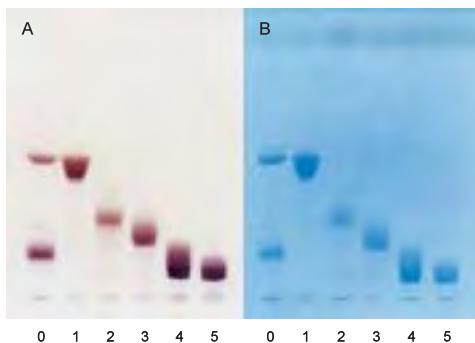
2 (133.1 mg, 33.3%) は単一の AGL-1, fr. 3 (4.1 mg, 1.0%) および fr. 4 (10.4 mg, 2.6%) は両者共 AGL-1 との混合物の様子を示したが、移動度の小さいスポットについては両者の間で若干の相違が観察されたので、それぞれ fr. 3 のそれを AGL-4 a および fr. 4 のそれを AGL-4 b とした。fr. 5 (118.1 mg, 29.5%) は単一の AGL-5 とした。fr. 6 (10.3 mg, 2.6%) は AGL-5 と AGL-6 の混合物とした。全回収量および全回収率はそれぞれ 317.2 mg, 79.3% であった。さらに、混合画分として認定した fr. 3, fr. 4 および fr. 6 の3画分については、溶出溶媒である 1-プロパノール / 水 / アンモニア水の混合比を変えた Re-Iatrobeads column chromatography によって精製操作を繰り返し、fr. 3 からは 0.1 mg の AGL-4 a を、fr. 4 からは 2.6 mg の AGL-4 b を、fr. 6 からは 2.6 mg の AGL-6 を得た (Fig. 2, lanes 1 ~ 5)。

Fig. 3 に当教室で既にマイコグリコリピドの体系化が終了しているオオヒラタケの同属種であるエリンギ, *Pleurotus eryngii* との TLC パターンの比較を示したが、主成分である



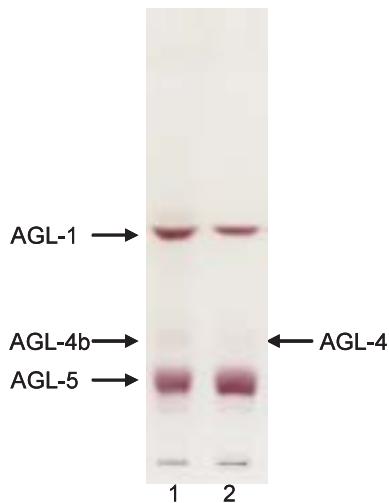
**Fig. 1 Fractionation of Mycoglycolipids of *Pleurotus cystidiosus* (Ohiratake) by Iatrobeads Column Chromatography.**

The column was eluted with a 1-propanol/water/ammonia (75:17.5:5, v/v). Separation of AGL fraction (lane 0, the acidic glycolipids obtained by DEAE-Sephadex fractionation procedure) yielded six subfractions designated frs. 1 to 6 (lanes 1 to 6). The plates were developed in 1-propanol/water/ammonia (75:30:5, v/v) for 2 h, and the spots were visualized with orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent for Panel A and with Hanes-Isherwood reagent for Panel B.



**Fig. 2 Thin Layer Chromatograms of the Mycoglycolipids Isolated from *P. cystidiosus* (OHIRATAKE).**

Lane 0, AGL fraction obtained from DEAE-Sephadex column chromatography; lanes 1 to 5, isolated AGL-1, AGL-4a, AGL-4b, AGL-5 and AGL-6. The plates were developed in 1-propanol/water/ammonia (75:30:5, v/v) for 2 h, and the spots were visualized with orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent for Panel A and with Hanes-Isherwood reagent for Panel B.



**Fig. 3 Thin Layer Chromatogram Comparing the Mycoglycolipid Patterns between *P. cystidiosus* (OHIRATAKE) and the King Oyster Mushroom, *Pleurotus eryngii* (Eringi).**

Lane 1, AGL fraction from *P. cystidiosus* (OHIRATAKE); lane 2, AGL fraction from *P. eryngii* (Eringi). The plate was developed in 1-propanol/water/ammonia (75:30:5, v/v) for 2 h, and the spots were visualized with orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent.

AGL-1 および AGL-5 については両者の移動度は酷似していた (11)。また、エリンギで同定された AGL-4 については、オオヒラタケの AGL-4 b に相当する移動度のものであり、今回、著者が単離したオオヒラタケの AGL-4 a および AGL-6 に相当するスポットはエリンギでは、それらの存在を確認できていない。エリンギのマイコグリコリピドについては、極めて詳細に分析が行われていることから考えて、同属種に存在するマイコグリコリピドに関する相違点は、微量成分においてその違いが発現されていることが推測された。しかしながら、AGL-4 a については、今回、一応の単離ができたものの極めて収量が少ないとから、通常の化学分析を行うことができなかったために、免疫化学的手法によってのみ構造の検証を行うにとどめた。今後、試料の增量の検討が必要であることを付記する。さらに、AGL-1 および AGL-5 について、それらの IR スペクトルを測定したところ、両者とも 1,650 および 1,550 cm<sup>-1</sup> 付近にアミド結合に由来する顕著な吸収が観察された。また、AGL-1 をフッ化水素酸で処理して得たクロロホルム / メタノール可溶性の成績体より市販のセラミドに相当する物質も検出している。

### 3. 2 AGL-1, AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6 のセラミド組成

AGL-1, AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6 の脂肪酸と長鎖塩基の分析結果を Table 1 に示した。脂肪酸組成は、4 者共に 2-ヒドロキシベヘン酸および 2-ヒドロキシリグノセリン酸を主成分としていた (非ヒドロキシ酸および 2-ヒドロキシ酸の平均含有率は 9.3% : 90.7%)。また、長鎖塩基組成も 4 者共に 100% フィトスフィンゴシンであった。これらのいわゆるセラミド組成は、既に報告されている同属種であるエリンギのマイコグリコリピド (AGL-1, AGL-4 および AGL-5) のそれらと一致し、フィトスフィンゴシンと 2-ヒドロキシ酸を成分とするフィトセラミドを前駆体としていることが推測された (11)。また、今回は、AGL-0 に相当するマイコグリコリピドのコアー脂質については単離、精製を行っていな

**Table 1 Aliphatic Compositions (Ceramide Compositions) of Mycoglycolipids from *P. cystidiosus* (OHIRATAKE)**

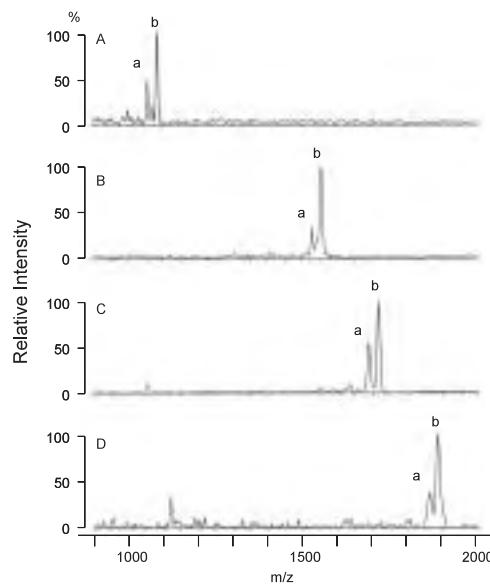
Composition	AGL-1	AGL-4b	AGL-5	AGL-6
Fatty acid (%)				
Nonhydroxy acid				
16:0	2.9	1.8	2.8	3.1
18:0	1.3	2.3	3.0	3.9
22:0	1.6	3.9	2.6	2.1
24:0	1.0	3.0	0.8	1.2
	6.8	11.0	9.2	10.3
2-Hydroxy acid				
16:0	1.7	tr.	1.7	tr.
18:0	7.1	3.0	8.8	6.6
22:0	22.7	18.1	25.7	23.4
23:0	5.8	3.9	2.6	3.0
24:0	54.5	61.3	49.7	55.0
24:1	1.4	2.7	2.3	1.7
	93.2	89.0	90.8	89.7
Sphingoid (%)				
t18:0	100	100	100	100

t, trihydroxy sphingoid (phytosphingosine); tr, trace.

いが、その存在を確認している。恐らくセラミド組成はフィトセラミドを有しているものと想定している。

### 3.3 MALDI-TOF MS 分析

マイコグリコリピドに対して極めてイオン化効率が良いとされる陰イオンモード測定法により AGL-1, AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6 の MALDI-TOF MS 分析を行った。スペクトルを Fig. 4 に、実測値と計算値 ( $[M-H]^-$ ) を Table 2 に示した。マイコグリコリピドの共通コア構造は、セラミド ( $Cer = FA + LCB - H_2O$ ), リン酸 ( $H_3PO_4$ ), イノシトール (Ins) およびマンノース (Man) より成り、これらが脱水縮合した  $Man - Ins - [PO_4] - Cer$  として次式、 $Cer(FA + LCB - H_2O) + H_3PO_4 - H_2O + Ins - H_2O + Man - H_2O = Cer(FA + LCB - 18) + 98 - 18 + 180 - 18 + 180 - 18 = FA + LCB + 386$  が成立する。ここで、オオヒラタケのマイコグリコリピドの場合、前節で述べたように脂肪酸 (FA) および長鎖塩基 (LCB) の主な組み合わせは、[2-hydroxy 22:0 (356)-t18:0 (317)=673] と [2-hydroxy 24:0 (384)-t18:0 (317)=701] の 2 種類となる。従って、オオヒラタケのマイコグリコリピドの共通コア部分の分子量 (M) は 1059 および 1087 で



**Fig. 4 Negative-Ion Linear Mode MALDI-TOF MS Spectra of AGL-1, AGL-4b, AGL-5 and AGL-6.**

A: AGL-1; a,  $[M-H]^-$  ion at  $m/z$  1059.98; b,  $m/z$  1086.51; B: AGL-4 b; a,  $m/z$  1529.09; b,  $m/z$  1555.75; C: AGL-5; a,  $m/z$  1689.87; b,  $m/z$  1718.01; D: AGL-6; a,  $m/z$  1859.06; b,  $m/z$  1885.61.

**Table 2 MALDI-TOF MS Analysis of AGL-1, AGL-4b, AGL-5 and AGL-6 from *P. cystidiosus* (OHIRATAKE)**

Symbol in Fig. 4	Fatty acid	Sphingoid	Found $[M-H]^-$	Calc'd $[M-H]^-$
A AGL-1	a h 22:0	t 18:0	1059.98	1058
	b h 24:0	t 18:0	1086.51	1086
B AGL-4b	a h 22:0	t 18:0	1529.09	1528
	b h 24:0	t 18:0	1555.75	1556
C AGL-5	a h 22:0	t 18:0	1689.87	1690
	b h 24:0	t 18:0	1718.01	1718
D AGL-6	a h 22:0	t 18:0	1859.06	1852
	b h 24:0	t 18:0	1885.61	1880

ある。さらに、高級なマイコグリコリピドの分子量については、 $(Man - Ins - [PO_4] - Cer) + nHex - nH_2O = 1059 + 180n - 18n$  および  $1087 + 180n - 18n$  によって示され、また、分子量が明らかになると結合している糖数 (n) を予測することも可能となる。以上のことを、AGL-1, AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6 のスペクトル (Fig. 4) および実測値と計算値 (Table 2) について見てみると、AGL-1 のピークの実測値は  $[M-H]^- = m/z$  1059.98

( $\approx$  1060) と m/z 1086.51 ( $\approx$  1087) であり、それぞれの計算値 (m/z 1058 および m/z 1086) に極めて近似していた。従って、AGL-1 はマイコグリコリピドのコアー糖脂質であると推定することができた。一方、AGL-4 b についてはピークの実測値が  $[M-H]^- = m/z$  1529.09 ( $\approx$  1529) と m/z 1555.75 ( $\approx$  1556) であることより、それぞれ  $1059 + 180 n - 18 n = 1529$  および  $1087 + 180 n - 18 n = 1556$  の式から、両者共に  $n = 2.9 \approx 3.0$  で  $(\text{Hex})_3-\text{Man}-\text{Ins}-\text{P}-\text{Cer}$  であると推定した。AGL-5 についてはピークの実測値が  $[M-H]^- = m/z$  1689.87 ( $\approx$  1690) と m/z 1718.01 ( $\approx$  1718) であることより、それぞれ  $1059 + 180 n - 18 n = 1690$  および  $1087 + 180 n - 18 n = 1718$  の式から、両者共に  $n = 3.9 \approx 4.0$  で  $(\text{Hex})_4-\text{Man}-\text{Ins}-[\text{PO}_4]-\text{Cer}$  であると推定することができた。AGL-6 についてはピークの実測値が  $[M-H]^- = m/z$  859.06 ( $\approx$  1860) と m/z 1885.61 ( $\approx$  1886) であることより、それぞれ  $1059 + 180 n - 18 n = 1860$  および  $1087 + 180 n - 18 n = 1886$  の式から、両者共に  $n = 4.9 \approx 5.0$  で  $(\text{Hex})_5-\text{Man}-\text{Ins}-[\text{PO}_4]-\text{Cer}$  であると推定することができた。なお、Table 2 における AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6 の計算値  $[M-H]^-$  については、後述の構成糖分析の結果を考慮したものである。

### 3.4 AGL-1, AGL-4 a, AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6 の構造

#### 3.4.1 構成糖分析

AGL-1, AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6 の構成糖を決定するために、メタノリシスした後、O-TMS-メチルグリコシド誘導体として GC 分析をしたところ、それぞれ AGL-1, Man; AGL-4 b, Man: Gal: Fuc (1.0: 2.4: 0.8); AGL-5, Man: Gal: Fuc (1.0: 3.4: 0.9); AGL-6, Man: Gal:

Fuc (1.0: 4.1: 0.9) を検出した。また、2 M 塩酸、20 h, 100°C で加水分解した後、アルジトールアセテート誘導体として GC 分析したところ、4 者全てから myo-イノシトールを検出するとともに、AGL-1 からはヘキサ (O-アセチル) マンニトールを、AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6 からはヘキサ (O-アセチル) マンニトール、ヘキサ (O-アセチル) ガラクトール、ペンタ (O-アセチル) フシトールを同定した (Fig. 5)。これらの結果は、AGL-1, Man-Ins-[PO<sub>4</sub>]-Cer; AGL-4 b, (Fuc)(Gal)<sub>2</sub>-Man-Ins-[PO<sub>4</sub>]-Cer; AGL-5, (Fuc)(Gal)<sub>3</sub>-Man-Ins-[PO<sub>4</sub>]-Cer; AGL-6, (Fuc)(Gal)<sub>4</sub>-Man-Ins-[PO<sub>4</sub>]-Cer と推測され、前述の MALDI-TOF MS 分析の結果を強く支持した。

#### 3.4.2 部分メチル化アルジトールアセテート法による糖鎖結合位置の推定

糖鎖の結合位置を決定するために AGL-1, AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6 のメチル

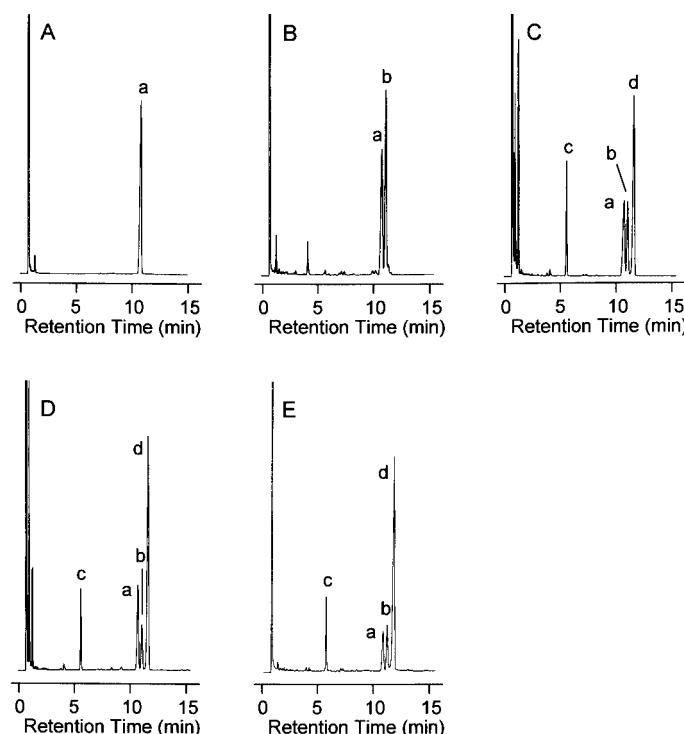
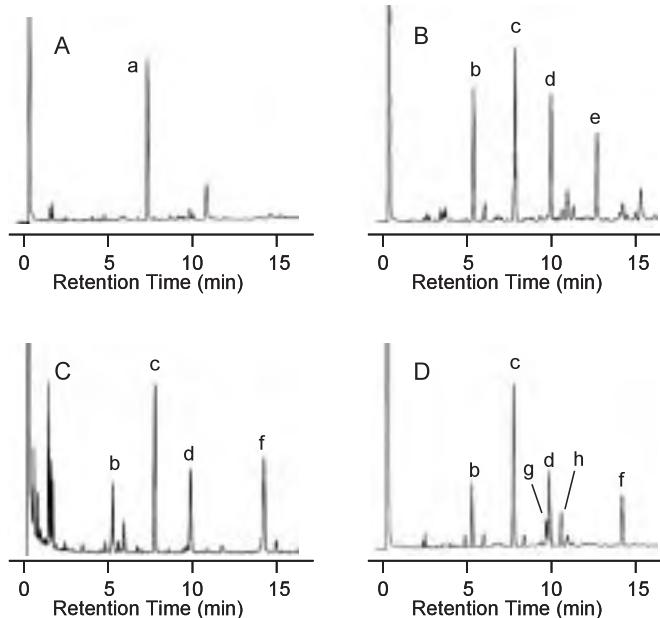


Fig. 5 Gas Chromatograms of Alditol Acetate Derivatives derived from AGL-1, AGL-4b, AGL-5 and AGL-6.

A, myo-inositol hexaacetate (authentic standard); B, AGL-1; C, AGL-4b; D, AGL-5; E, AGL-6; peak a, inositol hexaacetate; peak b, mannitol hexaacetate; peak c, fucitol pentaacetate; peak d, galactitol hexaacetate.

化分析を行った。AGL-1 からは 1,5-ジ (*O*-アセチル)-2,3,4,6-テトラ (*O*-メチル) マンニトール (1 Man) を、AGL-4 b からは 1,5-ジ (*O*-アセチル)-2,3,4-トリ (*O*-メチル) フシトール (1 Fuc), 1,5-ジ (*O*-アセチル)-2,3,4,6-テトラ (*O*-メチル) ガラクチトール (1 Gal), 1,5,6-トリ (*O*-アセチル)-2,3,4-トリ (*O*-メチル) マンニトール (1,6Man) および 1,2,5,6-テトラ (*O*-アセチル)-3,4-ジ (*O*-メチル) ガラクチトール (1,2,6Gal) (11) を、AGL-5 からは 1 Fuc, 1 Gal (2 モル分), 1,6 Man および 1,2,3,5,6-ペンタ (*O*-アセチル)-4- (*O*-メチル) ガラクチトール (1,2,3,6Gal) あるいは 1,2,4,5,6-ペンタ (*O*-アセチル)-3- (*O*-メチル) ガラクチトール (両者は同じマススペクトルを示すが、エリンギの AGL-5 の分析結果から前者であることが推測される) (11) を、AGL-6 からは 1 Fuc, 1 Gal, 1,6Man, 1,2,3,6Gal, 1,2,5-トリ (*O*-アセチル)-3,4,6-

トリ (*O*-メチル) ガラクチトール (1,2Gal) および 1,5,6-トリ (*O*-アセチル)-2,3,4-トリ (*O*-メチル) ガラクチトール (1,6Gal) と推測されるピークを検出した (Fig. 6)。これらのことから次のような糖鎖結合位置が予測できた。AGL-1 は Ins に Man が結合している。AGL-4 b は AGL-1 の Man の 6 位に 2 位と 6 位で分岐した Gal が結合し、さらにその分岐のいずれかに Fuc と Gal がそれぞれ 1 モルずつ結合している。AGL-5 は AGL-4 b の Man に結合している 2 位および 6 位での分岐 Gal にさらに 3 位に Gal が結合した多分岐構造を有しているものである。AGL-6 は Man : Fuc : Gal のモル比が、およそ 1 : 1 : 4 であること、および 1,2Gal と 1,6Gal のモル比が 0.4 : 0.5 であることから、AGL-5 の非還元末端に位置する 2 つの Gal のうちのどちらかに、さらに 1-2 で Gal が結合したものと 1-6 で Gal が結合したもののが存在する可能性が示



**Fig. 6 Gas Chromatograms of Partially Methylated Alditol Acetate Derivatives derived from AGL-1, AGL-4b, AGL-5 and AGL-6.**

A, AGL-1; B, AGL-4b; C, AGL-5; D, AGL-6; peak a, 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methylmannitol (1Man); peak b, 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methylfucitol (1Fuc); peak c, 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methylgalactitol (1Gal); peak d, 1,5,6-tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methylmannitol (1,6Man); peak e, 1,2,5,6-tetra-*O*-acetyl-3,4-di-*O*-methylgalactitol (1,2,6Gal); peak f, 1,2,3,5,6-penta-*O*-acetyl-4-*O*-methylgalactitol (1,2,3,6Gal) or 1,2,4,5,6-penta-*O*-acetyl-3-*O*-methylgalactitol (1,2,4,6Gal); peak g, 1,2,5-tri-*O*-acetyl-3,4,6-tri-*O*-methylgalactitol (1,2Gal); h, 1,5,6-tri-*O*-acetyl-2,3,4-tri-*O*-methylgalactitol (1,6Gal). Under these analytical conditions, all the expected inositol products remain phosphorylated and are hence not observable.

唆された。

以上のメチル化分析の結果および既に報告されている同属種のエリンギの糖鎖構造(11)を考慮してオオヒラタケのマイコグリコリピドの構造をまとめると、糖鎖配列は次のように推定することができる。特に、AGL-6については、現段階では、網掛けしている非還元末端のGalの結合位置の違いによって4種類のマイコグリコリピドが存在する可能性が考えられる。

**AGL-1, Man 1 →Ins;**

**AGL-4 b, (Gal 1-6) (Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1 →Ins;**

**AGL-5, (Gal 1-6) (Gal 1-3) (Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1 →Ins;**

**AGL-6, (Gal 1-2 / 6 Gal 1-6) (Gal 1-3)**

**(Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1 →Ins;**

**(Gal 1-6) (Gal 1-2 / 6 Gal 1-3)**

**(Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1 →Ins.**

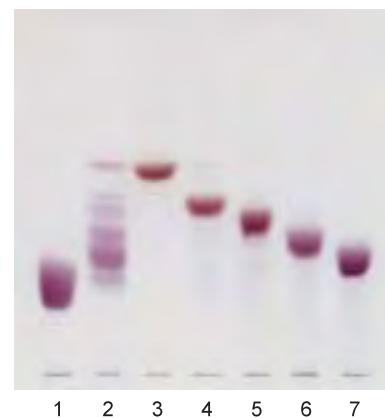
### 3.4.3 AGL-5 の塩酸による部分加水分解成績体の同定およびそれらの部分メチル化アルジトールアセテート誘導体による多分岐型ガラクトースの結合位置の決定

前述したように、完全な構造の状態をしたAGL-4 b, AGL-5, AGL-6 (intact AGL-4 b, intact AGL-5, intact AGL-6) の部分メチル化アルジトールアセテート分析からは、多分岐型Galへの結合位置やFucの結合位置を決定することはできない。幸運なことに、当教室の先駆的な研究において同属種のエリンギのマイコグリコリピドの構造が明確にされていることから、前節ではその延長線上において、エリンギの構造を反映させて述べたが、これらを完全なものとするために比較的多量に得られたAGL-5を用いて、その部分加水分解成績体を調製して解析を行った。

即ち、Fuc-Gal結合を分解し、特に、糖鎖が4糖(Gal-6)(Gal-3)Gal-6Manであるもの(これをAGL-5(4)と仮称する)を分解成績体から単離、精製して部分メチル化アルジトールアセテート分析を行った。

この加水分解の条件を決定するための予備的な実験として、塩酸の濃度と湯浴(100°C)に入れる時間を検討した。TLCによる判定では、

0.01 M 塩酸、100°C 湯浴、80分間の処理で最も効率よく分解されることを知った(分解後のAGL-5の残存率が低く、加水分解成績体が平均的に調製される)。分解成績体として、AGL-5よりTLCでの移動度が大きい順に、AGL-5(1), AGL-5(2), AGL-5(3a), AGL-5(3b), AGL-5(4)と仮称した(Fig. 7)。次に簡単に方法を記述する。30 mgのAGL-5を3本の試験管にそれぞれ10 mgずつ分取して、上述の条件で加水分解を行った後、流水で透析(12 h)した。透析膜内液を減圧濃縮して、24.3 mgの分解成績体を得た。これを1-プロパノール/水/アンモニア水(75:15:5)の単一溶出溶媒によるIatrobeads column chromatography(column size $\phi$  1.0 × 60 cm, bed volume 43 mL ( $\phi$  1.0 × 55 cm), collection volume 2 mL/tube)で分画、精製した(流速を1 mL/minとするために、加圧操作を行った)。回収量はAGL-5(1), 2.2 mg; AGL-5(2), 0.9 mg; AGL-5(3a), 2.3 mg; AGL-5(3b), 6.0 mg; AGL-5(4), 7.3 mgであった。それぞれの分解成績体を構成している中性糖成分は、AGL-5(1)がMan, AGL-5(2)がMan: Gal(1:1, モル比), AGL-

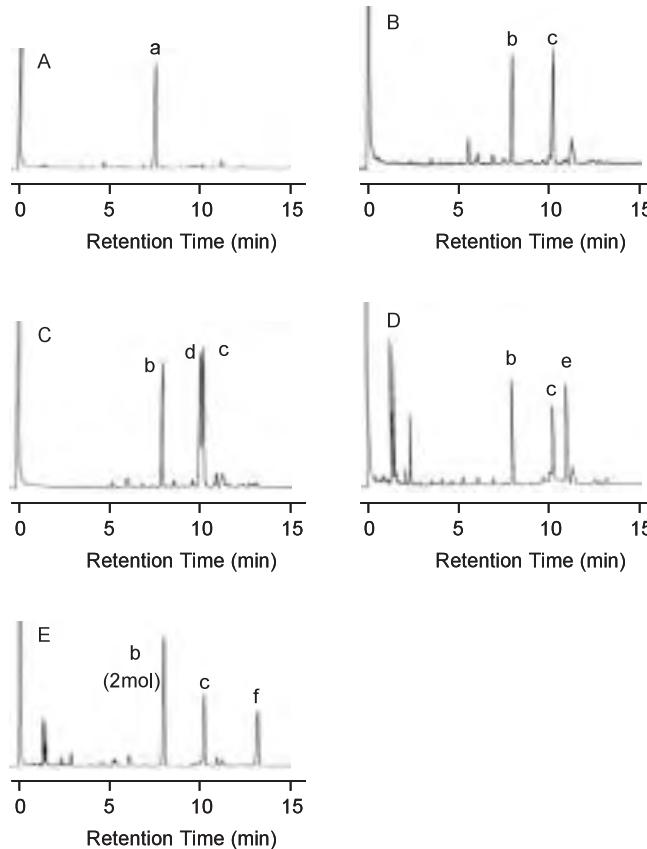


**Fig. 7 Thin Layer Chromatogram of Partial Acid Hydrolyzates of AGL-5.**

Lane 1, intact AGL-5; lane 2, acidic hydrolyzates of AGL-5; lanes 3 to 7, purified AGL-5(1), AGL-5(2), AGL-5(3a), AGL-5(3b) and AGL-5(4). The plate was developed in 1-propanol/water/ammonia (75:30:5, v/v) for 2 h, and the spots were visualized with orcinol- $H_2SO_4$  reagent.

5 (3a) および AGL-5 (3b) がともに Man: Gal (1 : 2), AGL-5 (4) が Man: Gal (1 : 3) であり、いずれの分解成績体にも intact-AGL-5 の構成糖成分として含まれている Fuc を検出しなかった。また、これらの MALDI-TOF MS 分析からは AGL-5 (1) は Man-Ins-[PO<sub>4</sub>]-Cer, AGL-5 (2) は Gal-Man-Ins-[PO<sub>4</sub>]-Cer, AGL-5 (3a) および AGL-5 (3b) は Gal-Gal-Man-Ins-[PO<sub>4</sub>]-Cer, AGL-5 (4) は (Gal)<sub>2</sub>-Gal-Man-Ins-[PO<sub>4</sub>]-Cer であることが推定できるスペクトルが得られた (Data not shown)。一方、それらの部分メチル化分析から、それぞれ AGL-5 (1) では 1,5-ジ (O-アセチル)-2,3,4,6-テトラ (O-

メチル) マンニトール (1Man) を、AGL-5 (2) では 1,5-ジ (O-アセチル)-2,3,4,6-テトラ (O-メチル) ガラクチトール (1Gal) および 1,5,6-トリ (O-アセチル)-2,3,4-トリ (O-メチル) マンニトール (1,6Man) を、AGL-5 (3a) では 1Gal, 1,6Man および 1,3,5-トリ (O-アセチル)-2,4,6-トリ (O-メチル) ガラクチトール (1,3Gal) を、AGL-5 (3b) では 1Gal, 1,6Man および 1,5,6-トリ (O-アセチル)-2,3,4-トリ (O-メチル) ガラクチトール (1,6Gal) を、AGL-5 (4) では 1Gal (2モル分), 1,6Man および 1,3,5,6-テトラ (O-アセチル)-2,4-ジ (O-メチル) ガラクチトール (1,3,6Gal) を同定した (Fig. 8)。



**Fig. 8 Gas Chromatograms of Partially Methylated Alditol Acetate Derivatives derived from Acid Hydrolyzates of AGL-5.**

A, AGL-5(1); B, AGL-5(2); C, AGL-5(3a); D, AGL-5(3b); E, AGL-5(4); peak a, 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylmannitol (1Man); peak b, 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methylgalactitol (1Gal); peak c, 1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylmannitol (1,6Man); peak d, 1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methylgalactitol (1,3Gal); peak e, 1,5,6-tri-O-acetyl-2,3,4-tri-O-methylgalactitol (1,6Gal); peak f, 1,3,5,6-tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methylgalactitol (1,3,6Gal). Under these analytical conditions, all the expected inositol products remain phosphorylated and are hence not observable.

これらの分析結果をまとめると、AGL-5 の部分加水分解成績体の構造は、次のように決定することができる。

AGL-5 (1), Man 1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer;  
AGL-5 (2), Gal 1-6 Man 1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer;

AGL-5 (3a), Gal 1-3 Gal 1-6 Man 1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer;

AGL-5 (3b), Gal 1-6 Gal 1-6 Man 1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer;

AGL-5 (4), (Gal 1-6) (Gal 1-3) Gal 1-6 Man 1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer.

さらに、上記の AGL-5 の部分加水分解成績体の構造と intact-AGL-5 のメチル化分析結果 (Fig. 6-C) から、多分岐型ガラクトースの結合位置は 1, 2, 3, 6 位であり、糖鎖結合は (Gal 1-3) (Gal 1-6) (Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1-Ins-P-Cer であることが確認された。また、AGL-4 b についても、このものが生成の面から AGL-5 の前駆体になり得る物質と考えられることや、intact-AGL-4 b (Fig. 6-B) および AGL-5 (4) (部分加水分解によって脱フコースされている成績体) のメチル化分析結果 (Fig. 8-E) から、その糖鎖結合は (Gal 1-6) (Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1-Ins-[PO<sub>4</sub>]-Cer であるが合わせて確認された。

### 3.4.4 過ヨウ素酸酸化法によるMan→Insの結合位置の決定

Man と Ins の結合位置については、AGL-1 を用いて Fig. 9 に示した反応スキームによって得られる過ヨウ素酸酸化成績体より結合位置の決定を試みた。即ち、Table 3 に示したように反応の最終成績体である糖アルコールの同定によりその結合位置を明らかにする方法であるが、AGL-1 が (1-2) 結合であれば最終成績体の糖アルコールとしてエリトリトルの出現が確認できることになる。Fig. 10 に、反応スキーム (Fig. 9) の (III) に相当する反応中間成績体 (過ヨウ素酸酸化反応後の還元成績体) の MALDI-TOF MS スペクトルを示した。スペクトルからは [M-H]<sup>-</sup>: m/z 748.81 と m/z 776.90 (Fig. 10-a, b) を検出したが、いずれも計算値: [M-H]<sup>-</sup>: m/z 746 および m/z 774 に近似した。また、これらは、intact-

AGL-1 スペクトルのマス数 ([M-H]<sup>-</sup>: m/z 1059.98 および m/z 1086.51) (Fig. 4-1 A, 1 B) に対して 310 ~ 311 マスの差が認められた。このマス数の差が計算値: (I)-(III) により算出した [M-H]<sup>-</sup> m/z 1058 - 746 = 312 および [M-H]<sup>-</sup> m/z 1086 - 774 = 312 に近似していることからも Man が Ins の 2 位あるいは 6 位

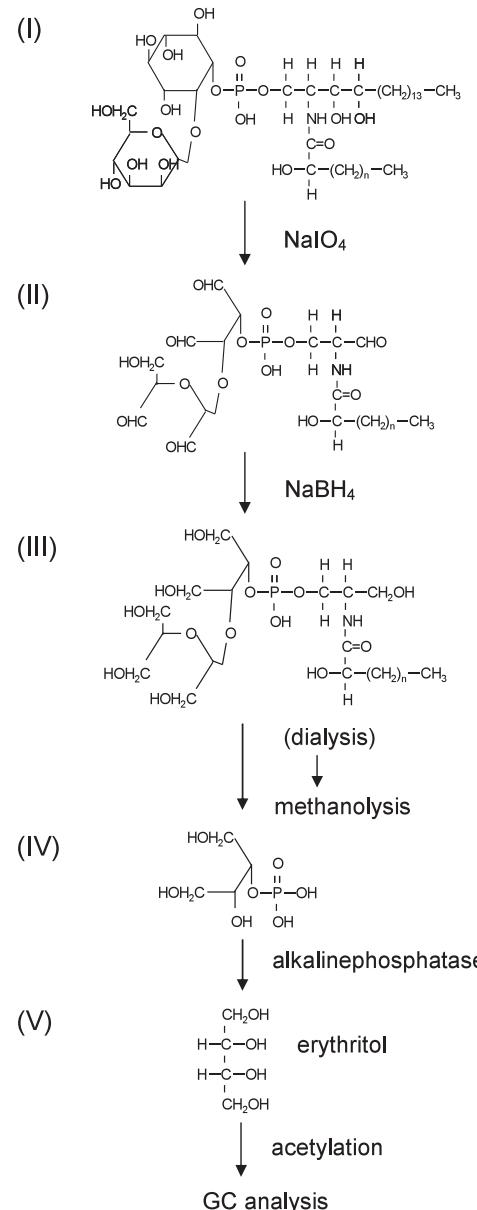


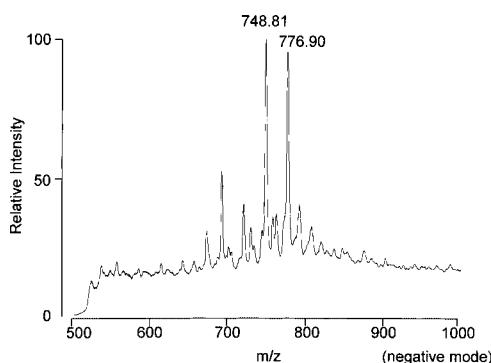
Fig. 9 Proposed Reaction Schemes of the Periodate Oxidation of AGL-1(I), and Subsequent Processing Leading to Erythritol (V).

**Table 3 Possible Substitutions on *myo*-Inositol by Mannose in AGL-1**

Possible substituted positions on <i>myo</i> -inositol of AGL-1*	Final alcohol products derived from substituted <i>myo</i> -inositol**
1,2	erythritol
1,3	ribitol
1,4	glycerol
1,5	xylitol
1,6	threitol

\*Phosphate group is linked to *myo*-inositol at the C-1 position.

\*\*The predicted corresponding final *myo*-inositol-derived alcohol products after periodate oxidation followed by NaBH<sub>4</sub> reduction, methanolysis, enzymatic dephosphorylation and acetylation.

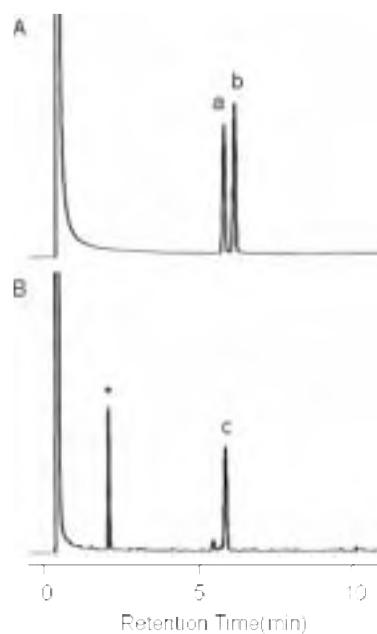


**Fig. 10** Negative-Ion Linear Mode MALDI-TOF MS Spectrum of a Periodate Oxidation Product (Scheme-III in Fig. 9) of AGL-1.

に結合していることが強く示唆された。さらにこれらの反応中間成績体をメタノリシス、アルカリホスファターゼ処理して得られた糖アルコールをアセチル化後、GC および GC-MS 分析に処した。その結果、AGL-1 からエリトリトールを検出したことから Man は Ins の 2 位に結合していることを決定した (Fig. 11)。

### 3.4.5 <sup>1</sup>H-NMR 分析によるアノマー配置の決定

糖鎖のアノマー配置を決定するために AGL-1, AGL-4 b, AGL-5, AGL-6 および AGL-5 の部分加水分解成績体 (AGL-5 (3 a), AGL-5 (3 b), AGL-5 (4)) について <sup>1</sup>H-NMR 分析を行った。Fig. 12 にそれらのスペクトルを、また Table 4 に化学シフトおよびカップリング定数を示したが、AGL-1 からは  $\alpha$ -アノマー Man に、AGL-5 (3 a) からは  $\alpha$ -



**Fig. 11** A Final Acetylated Alcohol Product derived from the *myo*-Inositol Ring of AGL-1 by Periodate Oxidation. A, authentic erythritol (a) and threitol (b) peracetates; B, erythritol peracetate (c) derived from the *myo*-inositol ring in AGL-1. \*by-product.

アノマー Man,  $\alpha$ -アノマー Gal および  $\beta$ -アノマー Gal に、AGL-5 (3 b) からは  $\alpha$ -アノマー Man,  $\alpha$ -アノマー Gal および  $\beta$ -アノマー Gal に、AGL-5 (4) からは  $\alpha$ -アノマー Man,  $\alpha$ -アノマー Gal (2 モル分) および  $\beta$ -アノマー Gal に、AGL-4 b からは  $\alpha$ -アノマー Man,  $\alpha$ -アノマー Fuc,  $\alpha$ -アノマー Gal および  $\beta$ -アノマー Gal に、AGL-5 からは  $\alpha$ -アノマー Man,  $\alpha$ -アノマー Fuc,  $\alpha$ -アノマー Gal (2 モル分) および  $\beta$ -アノマー Gal に、AGL-6 からは  $\alpha$ -アノマー Man,  $\alpha$ -アノマー Fuc,  $\alpha$ -アノマー Gal (3 モル分) および  $\beta$ -アノマー Gal に由来するシグナルがそれぞれ認められた。これらの結果から考えられる最も重要なことは、AGL-5 (3 a) および AGL-5 (3 b) におけるそれぞれ 2 つの Gal (還元末端の Gal および 非還元末端の Gal) のアノマー配置である。このアノマー配置が確定すれば、さらに高級な AGL-5 や AGL-6 における複数 Gal の中で 1 つしかない  $\beta$ -アノマー Gal を決定する

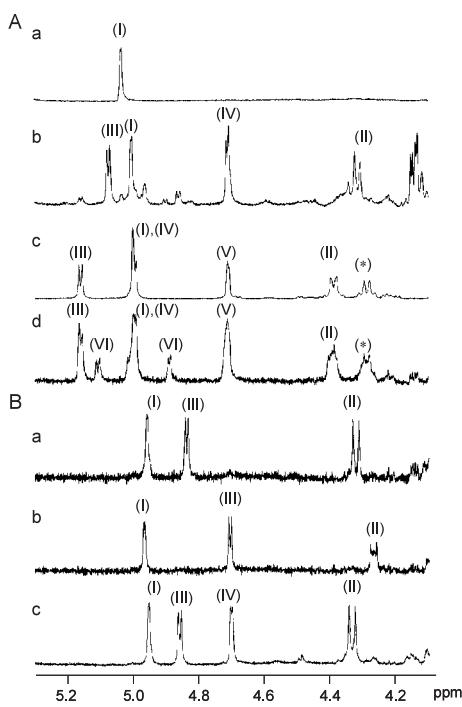


Fig. 12 Anomeric Proton Regions of the  $^1\text{H}$ -NMR Spectra.

A : a, AGL-1; b, AGL-4b; c, AGL-5; d, AGL-6; I,  $\text{Man}\alpha(\text{H}-1)$ ; II,  $\text{Gal}\beta(\text{H}-1)$ ; III,  $\text{Fuc}\alpha(\text{H}-1)$ , IV,  $\text{Gal}\alpha(\text{H}-1)$ ; V,  $\text{Gal}\alpha(\text{H}-1)$ ; VI,  $\text{Gal}\alpha(\text{H}-1)$ ; B : a, AGL-5(3a), b, AGL-5(3b); c, AGL-5(4); I,  $\text{Man}\alpha(\text{H}-1)$ ; II,  $\text{Gal}\beta(\text{H}-1)$ ; III,  $\text{Gal}\alpha(\text{H}-1)$ ; IV,  $\text{Gal}\alpha(\text{H}-1)$ . \* $\text{Fuc}\alpha(\text{H}-5)$ .

ことができる。しかし、残念なことに今のところ AGL-5 (3 a) あるいは AGL-5 (3 b) の前駆体と考えられる native-AGL-2 の単離には至っていないこと、また AGL-5 の部分加水分解成績体における AGL-5 (2) が低回収率であることより、NMR 分析で AGL-2 あるいは AGL-5 (2) の非還元末端 Gal のアノマー配置を確定することはできない。既に分析結果が報告されているエリンギのマイコグリコリピドの二次元 NMR スペクトルから AGL-5 および AGL-6 に含まれるそれぞれ 3 モルおよび 4 モルの Gal のうち、多分岐 Gal のみが  $\beta$ -アノマーであることが示唆されるが、オオヒラタケの AGL-5 (3 a), AGL-5 (3 b) および AGL-5 (4) の NMR スペクトルから、それらについての考察を試みる。

AGL-5 (3 a) および AGL-5 (3 b) の 2 つ

の Gal のうち、還元末端の Gal を  $\alpha$ -アノマー、非還元末端の Gal を  $\beta$ -アノマーと仮定すると、AGL-5 (4) は AGL-5 (3 a) および AGL-5 (3 b) の両者を前駆体としていると推測できることから、AGL-5 (4) の 2 つの非還元末端 Gal はいずれも  $\beta$ -アノマーとなる。しかし、上述したように AGL-5 (4) のアノマー配置は、1 モルの  $\alpha$ -アノマー Man, 2 モルの  $\alpha$ -アノマー Gal, 1 モルの  $\beta$ -アノマー Gal であることより、2 モルの  $\beta$ -アノマー Gal の存在は否定される。従って、AGL-5 (3 a) および AGL-5 (3 b) の 2 つの Gal のうち、還元末端の Gal が  $\beta$ -アノマーで、非還元末端の Gal が  $\alpha$ -アノマーと結論できる。即ち、AGL-5 (4), AGL-4 b, AGL-5 および AGL-6においても多分岐 Gal のみが  $\beta$ -アノマーであることが決定できた。

さらに、今までに解析され、報告されている他のキノコからのマイコグリコリピドのアノマー配置に関する知見 (AGL-1 が  $\text{Man}\alpha 1-$ , AGL-2 が  $\text{Gal}\beta 1-6 \text{Man}\alpha 1-$ ,  $\text{Gal}\alpha 1-6$  の化学シフトが 4.7 ppm 付近) を考慮して考察する。AGL-5 (3 a) および AGL-5 (3 b) では両者とも  $\alpha$ -アノマー Man,  $\alpha$ -アノマー Gal および  $\beta$ -アノマー Gal のシグナルが観察されるが、結合位置の相違 (1-3 および 1-6) によると推測される Gal アノマーの化学シフトに差異が認められた。一方、AGL-5 (4) においては AGL-5 (3 a) と AGL-5 (3 b) の両者の化学シフトに一致するシグナルが得られた。Intact-AGL-5 および intact-AGL-6 においては、Fuc-C 5 位由来のシグナルが 4.28 ppm に観察されるとともに、 $\alpha$ -アノマー Fuc が  $\beta$ -アノマー Gal に結合することによって非還元末端の  $\alpha$ -アノマー Gal (III) が  $\alpha$ -アノマー Man と同じ化学シフトへ移動することが認められた。また、AGL-6においては、非還元末端の Gal に  $\alpha$ -アノマーで 1-2 および 1-6 結合していると考えられる Gal のシグナルが、両者を合して 1 モル分に相当するように、4.89 ppm と 5.11 ppm に出現した。このことは、AGL-6 が非還元末端 Gal の ( $\rightarrow 2$ ) 結合を有するものと ( $\rightarrow 6$ ) 結合を有するものの混合であることを示唆しており、前述のメチル化分析

**Table 4 Chemical Shifts and  $J_{1,2}$  Coupling Constants of the Protons of AGL-1, AGL-4b, AGL-5, AGL-6, AGL-5(3a), AGL-5(3b) and AGL-5(4) in the Anomeric Regions**

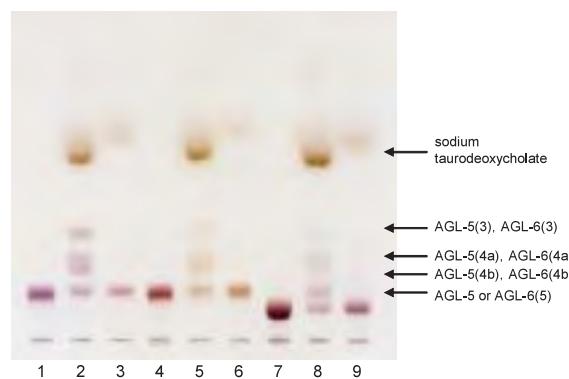
AGL-1	Man $\alpha$ 1-2Ins1-P-Cer				
	I				
Chemical shifts (ppm)	5.04				
Coupling constants (Hz)	1.34				
AGL-4b	Gal $\alpha$ 1-6(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-2Ins1-P-Cer				
	IV	III	II	I	
Chemical shifts (ppm)	4.71	5.08	4.32	5.00	
Coupling constants (Hz)	2.87	3.79	6.95	1.41	
AGL-5	Gal $\alpha$ 1-6(Gal $\alpha$ 1-3)(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-2Ins1-P-Cer				
	V	IV	III	II	I
Chemical shifts (ppm)	4.72	5.00	5.17	4.40	5.00
Coupling constants (Hz)	1.77	3.78	3.78	7.20	3.78
AGL-6	Gal $\alpha$ 1-(2/6)Gal $\alpha$ 1-6(Gal $\alpha$ 1-3)(Fuc $\alpha$ 1-2)Gal $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-2Ins1-P-Cer				
	VI	V	IV	III	II
Chemical shifts (ppm)	5.11 or 4.89	4.71	5.00	5.16	4.40
Coupling constants (Hz)	3.90 or 2.43	2.93	3.11	3.96	6.22
AGL-5(3a)	Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-2Ins1-P-Cer				
	III	II	I		
Chemical shifts (ppm)		4.84	4.32	4.96	
Coupling constants (Hz)		3.96	7.68	1.16	
AGL-5(3b)	Gal $\alpha$ 1-6Gal $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-2Ins1-P-Cer				
	III	II	I		
Chemical shifts (ppm)		4.70	4.27	4.97	
Coupling constants (Hz)		2.93	7.50	1.46	
AGL-5(4)	Gal $\alpha$ 1-6(Gal $\alpha$ 1-3)Gal $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1-2Ins1-P-Cer				
	IV	III	II	I	
Chemical shifts (ppm)	4.70	4.86	4.34	4.95	
Coupling constants (Hz)	2.19	3.53	7.56	1.04	

結果（3.4.2）を支持するものである。

### 3.4.6 酵素的加水分解によるアノマー配置の決定

AGL-5, AGL-6 および標準としてエリンギのマイコグリコリピド (AGL-5, (Gal 1-3) (Gal 1-6) (Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer) を用いて、これらの分子内に存在するガラクトース残基について  $\alpha$ -、 $\beta$ -ガラクトシダーゼによる酵素的加水分解を試みた。結果の TLC を Fig. 13 に示したが、3 者とも  $\alpha$ -ガラクトシダーゼでは分解されたが、 $\beta$ -ガラクトシダーゼでは分解されなかった。エリンギの AGL-5 は  $\alpha$ -ガラクトシダーゼで分解を受けて、TLC 上で移動度の異なる 3 種類の分解成績体を生じた (Fig. 13-lane 2)。移動度の最も大きい成績体は非還元末端に結合している 2 モルの Gal がすべて分解された [AGL-5 (3), (Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer] で、他の 2 種類

は非還元末端に結合している Gal のいずれか一方が分解を受けたものであり、それらの構造は [AGL-5 (4 a), (Gal 1-3) (Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer] および [AGL-5 (4 b), (Gal 1-6) (Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer] である。両者のうちで TLC 上での移動度の大きい方は前者であることが、AGL-5 の部分加水分解成績体の AGL-5 (3 a) および AGL-5 (3 b) の移動度 (Fig. 7-lanes 5, 6) の差異から推察できた。一方、オオヒラタケの AGL-5 も  $\alpha$ -ガラクトシダーゼでのみの分解で、TLC 上に上述したエリンギの AGL-5 の分解成績体と同じ挙動を示す 3 種類のスポットが観察できた (Fig. 13 lane 5)。それらはそれぞれ、AGL-5 (3), (Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer; AGL-5 (4 a), (Gal 1-3) (Fuc 1-2) Gal 1-6 Man 1-2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer; AGL-5 (4 b), (Gal 1-6) (Fuc 1-2)



**Fig. 13 Thin Layer Chromatogram of the Reaction Products from the Mycoglycolipids, AGL-5 and AGL-6 obtained by Treatment with  $\alpha$ -and  $\beta$ -Galactosidases.**

Lane 1, AGL-5 (from Eringi, *P. eryngii*) ; lane 2, AGL-5 (from Eringi) incubated with  $\alpha$ -galactosidase; lane 3, AGL-5 (from Eringi) incubated with  $\beta$ -galactosidase; lane 4, AGL-5 (from Ohiratake, *P. cystidiosus*) ; lane 5, AGL-5 (Ohiratake) incubated with  $\alpha$ -galactosidase; lane 6, AGL-5 (from Ohiratake) incubated with  $\beta$ -galactosidase; lane 7, AGL-6 (from Ohiratake) ; lane 8, AGL-6 (ohiratake) incubated with  $\alpha$ -galactosidase and lane 9, AGL-6 (Ohiratake) incubated with  $\beta$ -galactosidase. The plate was developed in 1-propanol/water/ammonia (75:30:5, v/v) for 2 h, and the spots were visualized with orcinol- $H_2SO_4$ .

Gal 1–6 Man 1–2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer と決定した。AGL-6 については  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ分解成績体として、TLC 上に 4 種類のスポットを検出し、移動度の大きい順に、それぞれ AGL-6 (3), (Fuc 1–2) Gal 1–6 Man 1–2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer ; AGL-6 (4 a), (Gal 1–3) (Fuc 1–2) Gal 1–6 Man 1–2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer ; AGL-6 (4 b), (Gal 1–6) (Fuc 1–2) Gal 1–6 Man 1–2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer ; AGL-6 (5), (Gal 1–3) (Gal 1–6) (Fuc 1–2) Gal 1–6 Man 1–2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer と決定した (Fig. 13 lane 8)。また、AGL-5 および AGL-6 が、共に  $\alpha$ -ガラクトシダーゼで、AGL-5 (2)/AGL-6 (2) に相当する分解成績体を生じないことから、AGL-5 (2)/AGL-6 (2) の非還元末端に位置する Gal は  $\beta$ -アノマーであることが示唆された。

これらの結果から AGL-5 および AGL-6 の分子内に含まれる 3 モルあるいは 4 モルのガラクトースのうち、多分岐型の Gal のみが  $\beta$ -アノマーであり、残りは全て  $\alpha$ -アノマーであることが判明した。

### 3.4.7 抗ヒト B 血液型抗体を用いた TLC-immunostaining

ヒト血液型活性を示す糖鎖構造は、O 型 (H 型), Fuc $\alpha$  1–2 Gal $\beta$  1→ ; A 型, GalNAc $\alpha$  1–3 Fuc $\alpha$  1–2 Gal $\beta$  1→ ; B 型, Gal $\alpha$  1–3 (Fuc $\alpha$  1–2) Gal $\beta$  1→ である。このうちキノコにおいては、ブナシメジ *Hypsizigus marmoreus* のマイコグリコリピド AGL-4 (Gal $\alpha$  1–3 (Fuc $\alpha$  1–2) Gal $\beta$  1–6 Man $\alpha$  1–2 Ins 1-[PO<sub>4</sub>]-Cer) の非還元末端がこれに相当する糖鎖を有している (1)。一方、オオヒラタケの AGL-4 b の非還元末端部の糖鎖は Gal $\alpha$  1–6 (Fuc $\alpha$  1–2) Gal $\beta$  1→, AGL-5 の非還元末端部の糖鎖は多分岐型 Gal の 3 位および 6 位に Gal が結合した (Gal $\alpha$  1–6) (Gal $\alpha$  1–3) (Fuc $\alpha$  1–2) Gal $\beta$  1→, AGL-6 はさらに  $\alpha$ -Gal が AGL-5 の非還元末端部の Gal に 6 位あるいは 2 位で結合しており、いずれもヒト B 型血液活性を有する可能性を含んでいる。特に、AGL-5 および AGL-6 については、ともに非還元末端糖鎖に、ヒト B 血液型活性を有する糖鎖構造, Gal $\alpha$  1–3 (Fuc $\alpha$  1–2) Gal $\beta$  1→ を持っている (Fig. 14)。また、極め

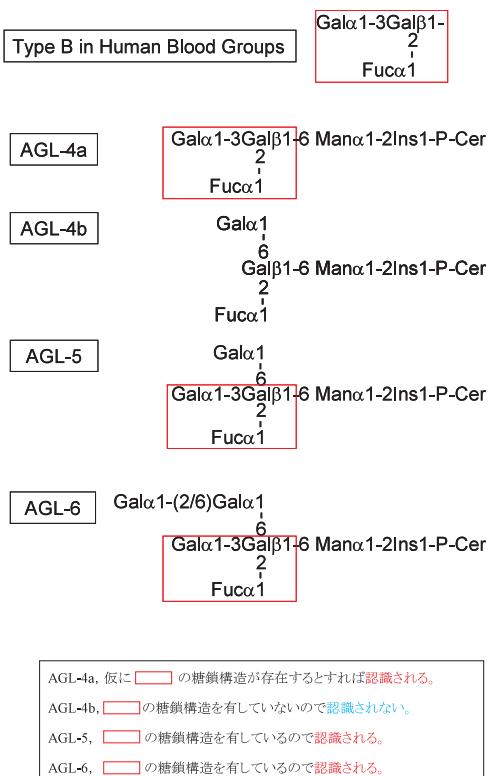


Fig. 14 Carbohydrate Structures of Type B in Human Blood Group Substances.

て微量ながら単離することに成功した AGL-4 a については、回収量が少なかったために化学分析を行うことができなかつたので、下記に示した①および②の 2 つの観点から TLC-immunostaining によって、その化学構造を推測することにした。

- ① AGL-4 b, ( $\text{Gal}\alpha 1-6$ ) ( $\text{Fuc}\alpha 1-2$ )  $\text{Gal}\beta 1-6 \text{Man}\alpha 1-2 \text{Ins}1-\text{[PO}_4\text{]}-\text{Cer}$  を AGL-5, ( $\text{Gal}\alpha 1-3$ ) ( $\text{Gal}\alpha 1-6$ ) ( $\text{Fuc}\alpha 1-2$ )  $\text{Gal}\beta 1-6 \text{Man}\alpha 1-2 \text{Ins}1-\text{[PO}_4\text{]}-\text{Cer}$  の 1 つの前駆体と仮定すると、AGL-5 に見られる多分岐型 Gal の 3 位に Gal が結合したもう 1 つの前駆体、即ち ( $\text{Gal}\alpha 1-3$ ) ( $\text{Fuc}\alpha 1-2$ )  $\text{Gal}\beta 1-6 \text{Man}\alpha 1-2 \text{Ins}1-\text{[PO}_4\text{]}-\text{Cer}$  の存在が予想される。即ち、これが AGL-4 a である可能性が考えられる。
- ② AGL-4 a が抗ヒト B 血液型抗体を用いた TLC-immunostaining によってその反応が陽性と確認されれば、AGL-4 a は少な

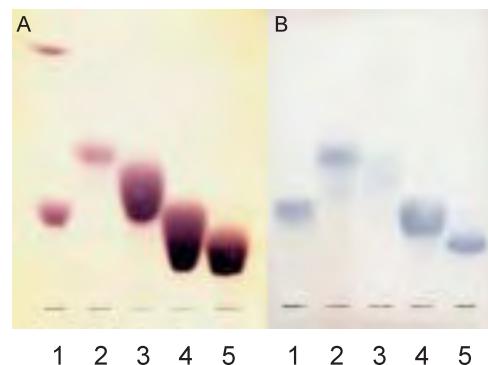


Fig. 15 Detection of the Mycoglycolipids having a Human Blood Type B Activity by TLC-Immunostaining.

Lane 1, AGL fraction of *P. cystidiosus* (Ohiratake); lane 2, AGL-4a; lane 3, AGL-4b; lane 4, AGL-5 and lane 5, AGL-6. The plates were developed with 1-propanol/water/ammonia (75 : 30 : 5, v/v) for 2 h. The spots were visualized with orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (A) and immunostaining by anti-human blood type B antibody (B).

くとも分子中に  $\text{Gal}\alpha 1-3$  ( $\text{Fuc}\alpha 1-2$ )  $\text{Gal}\beta 1\rightarrow$  構造を有することになる。

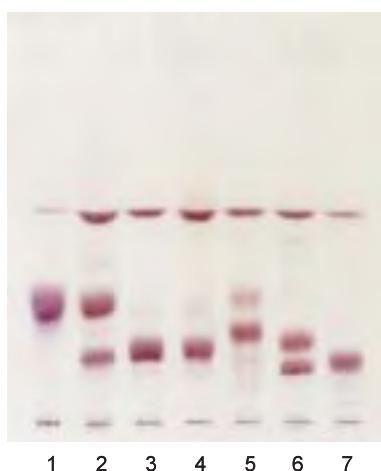
今回用いた抗ヒト B 血液型抗体（ポリクロナル抗体）の特異性が高ければ、必ず  $\text{Gal}\alpha 1-3$  ( $\text{Fuc}\alpha 1-2$ )  $\text{Gal}\beta 1\rightarrow$  構造は認識されるが、AGL-4 b の  $\text{Gal}\alpha 1-6$  ( $\text{Fuc}\alpha 1-2$ )  $\text{Gal}\beta 1\rightarrow$  構造は結合位置の相違によって認識はされないはずである。また、AGL-5 については分子中に  $\text{Gal}\alpha 1-3$  ( $\text{Fuc}\alpha 1-2$ )  $\text{Gal}\beta 1\rightarrow$  構造を有していることから認識されると考えられる。さらに、AGL-6 については、仮に、認識されるようであれば、分子中に  $\text{Gal}\alpha 1-3$  ( $\text{Fuc}\alpha 1-2$ )  $\text{Gal}\beta 1\rightarrow$  構造が遊離の状態で存在することが証明されるとともに、多分岐型  $\beta$ -Gal の 6 位に  $\alpha$ -Gal が結合し、その Gal の 2 位あるいは 6 位に  $\alpha$ -Gal が結合していることになる。

AGL-4 a, AGL-4 b, AGL-5, AGL-6 を抗原として、抗ヒト B 血液型抗体による TLC-immuno staining を行った結果を Fig. 15 に示した。AGL-4 a, AGL-5, AGL-6 の 3 者 (Lanes-2, 4, 5) が陽性を示すことが観察され、前述した仮説を実証することができた。特に、今回、オオヒラタケより単離した極めて回収量の低いマイコグリコリピド AGL-4 a の構造が、

非還元末端糖鎖として B 血液型糖鎖を有する ( $\text{Gal}\alpha 1-3$ ) ( $\text{Fuca}1-2$ )  $\text{Gal}\beta 1-6 \text{Man}\alpha 1-2 \text{Ins}1-[PO_4]-\text{Cer}$  であることを明らかにできたことは特筆すべきことである。

### 3.5 他の食用キノコの酸性糖脂質画分との比較

現在市販されている食用キノコ類の酸性糖脂質画分を TLC での挙動で比較を試みた。用いた試料は：ナメコ *Pholiota nameko*, ブナシメジ, オオヒラタケ, エリンギ, エノキタケ *Flammulina velutipes*, シイタケ *Lentinus edodes* およびマイタケ *Grifola frondosa* の 7 種類であり、それぞれの酸性糖脂質画分を DEAE-Sephadex column chromatography で調製した。Fig. 16 にその結果を示したが、TLC には同量の酸性糖脂質画分がスポットされている。最も移動度の大きいスポットは AGL-1 であるが、このマイコグリコリピドは含有量の多寡はあるものの 7 種類すべてのキノコに分布してい



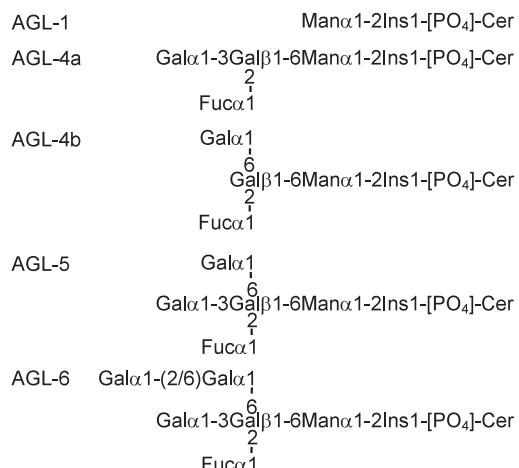
**Fig. 16 Thin Layer Chromatogram Comparing the Mycoglycolipid Patterns among Seven Fungi.**

Lane 1, *Pholiota nameko* (Nameko); lane 2, *Hypsizigus marmoreus* (Bunashimeji); lane 3, *Pleurotus cystidiosus* (Ohiratake); lane 4, *Pleurotus eryngii* (Eringi); lane 5, *Flammulina velutipes* (Enokitake); lane 6, *Lentinus edodes* (Shiitake) and lane 7, *Grifola frondosa* (Maitake). The plate was developed in 1-propanol/water/ammonia (75:30:5, v/v) for 2 h, and the spots were visualized with orcinol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  reagent.

る。また、この TLC には検出試薬の関係で存在が示されていないが、AGL-1 よりさらに移動度の大きい AGL-0 ( $\text{Ins}1-[PO_4]-\text{Cer}$ ) も共通して含まれている。さらに、興味があることは、今まで調べられているキノコの AGL-1 の脂肪酸組成の中には、そのキノコ特有のプロファイルが存在していることも推測できる報告もある (25)。一方、移動度の大きいスポットについては、移動度が近似、あるいは酷似、また、同一であるように観察できるが、それぞれのマイコグリコリピドの構造は極めて多様性を有している。なお、ナメコ、エノキタケおよびマイタケのマイコグリコリピドについては別報する。

### 4. まとめ

オオヒラタケ *Pleurotus cystidiosus* から単離した 5 種類のマイコグリコリピドの化学構造を次のように推定した。



著者らが平成 15 年～16 年度（2003 年～2004 年）の地域新生コンソーシアム研究開発事業に参画した際に、帯広畜産大学の櫛教授および石井教授により  $\beta$ -グルカンの生理活性評価の高いキノコとしてオオヒラタケが紹介され、また、北海道での生産高が多いことから、そのマイコグリコリピドの構造研究がスタートした (26)。湿重量 100 g のオオヒラタケ（乾燥重量 13 g）から抽出される粗スフィンゴ脂質画分は 150 mg 程度で、この画分には、遊離セラミド、

セレブロシドおよびマイコグリコリピドが含有されているが、その約半分がマイコグリコリピドである。今まで調べられたキノコの中で、オオヒラタケのマイコグリコリピドの収率は、湿重量当たり 0.07% で、他のキノコの 2 倍以上であることは注目に値する。**Fig. 16** に著者が研究対象としているキノコについて、それらのマイコグリコリピドの TLC を示したが、これらに共通する成分 (AGL-1 と称する) 以外に、移動度が近似、あるいは酷似、また、同一であるスポットが複数観察されることは前述した。これらのマイコグリコリピドの構造に関して、著者らのデータと今までの報文のそれらを併せて考えると、極めて共通性の高い基本骨格構造、 $\text{Man}\alpha 1-2 \text{Ins} 1-[PO_4]-\text{Cer}$  の Man 残基に、さらに糖鎖が延長して種々のマイコグリコリピドが生成されることが理解できる。また、その糖鎖の延長、即ち糖鎖の結合型は：Type I, Gal/Fuc 型；Type II, Gal/Fuc/Man 混合型および Type III, Man 型の 3 種類に分類されることが推測できた (**Fig. 17**)。Type I の Gal/Fuc 型および Type II の Gal/Fuc/Man 混合型に属する構造は、著者らの調査によっても見出されているが、Type III の Man 型は、現在、ドイツのグループが報告しているのみである (3)。Type I の Gal/Fuc 型は、共通骨格にガラクトースおよびフコースから構成されているマイコグリコリピドのグループで：ブナシメジ *H. marmoreus*, エリンギ *P.*

*eryngii*, ヒラタケ *P. ostreatus*, ノウタケ *Calvatia exipuliformis*, ドクツルタケ *Amantia virosa* および今回、明らかになったオオヒラタケ *P. cystidiosus* が分類される。また、マイコグリコリピドの糖鎖の非還元末端構造に注目すると、ブナシメジの  $\text{Fuca} 1-2 \text{Gal}\beta 1\rightarrow$  はヒト血液型の O 型抗原構造を有し、ブナシメジ、エリンギ、オオヒラタケの  $\text{Gal}\alpha 1-3 (\text{Fuca} 1-2) \text{Gal}\beta 1\rightarrow$  は B 型抗原構造を有している。Type II の Gal/Fuc/Man 混合型は、シイタケ *L. edodes* およびヤマイグチ *Leccinum scabrum* のマイコグリコリピドに見られるが、共通骨格にガラクトースとフコース、さらに非還元末端にマンノースが結合している糖鎖構造が特徴的である。Type III の Man 型は、上述したようにドイツのグループがアンズタケ *Cantharellus cibarius* に見出しているが、ガラクトースもフコースも含有しないマンノースのみから成るマイコグリコリピドで、著者らは今のところ検出していない。

なお、AGL-4 a については、極めて微量であったために、今回は TLC-immunostaining を優先させての結果からその構造を明らかにしたが、予備的ではあるが、TMS 誘導体としても構成糖の GC 分析を行っている。その分析結果は、AGL-4 a 本来の Man : Gal : Fuc (1.0 : 2.0 : 1.0) とは異なって、Man : Gal : Fuc (1.0 : 2.9 : 0.6) であった。このことは、AGL-4 a に、もしその存在を考えるなら AGL-3 b ( $\text{Gal}\alpha 1-$

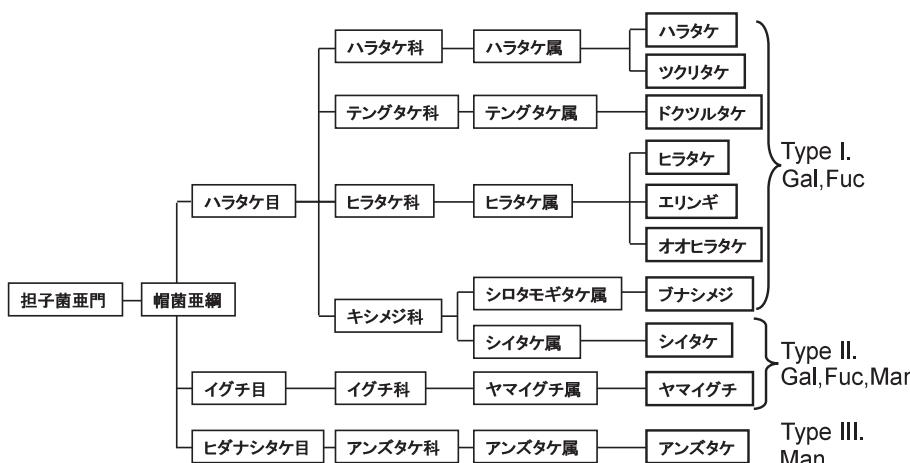


Fig. 17 Three Types of Mycoglycolipids in Fungi.

$3\text{Gal}\beta 1-6\text{Man}\alpha 1-2\text{Ins}1-[PO_4]-\text{Cer}$ ) が混在している可能性も否定できない。AGL-3については、上述の AGL-3 b の他に AGL-3 a ( $\text{Fuca}1-2\text{Gal}\beta 1-6\text{Man}\alpha 1-2\text{Ins}1-[PO_4]-\text{Cer}$ ) の存在も推測されるが、TLC 上での挙動は AGL-3 aの方が AGL-3 b より移動度は大きいと考えられる。

試料のオオヒラタケを供与していただいた北海道立十勝圏地域食品加工技術センターの大庭潔先生ならびに四宮紀之先生に深謝します。

なお、本研究の一部は、文部科学省研究費補助金（基盤研究（B）16380063）によって行った。

## 文 献

- 糸乗前、青木一弘、杉田陸海（2004）Foods Food Ingredients J. Jpn., **209**, 211–218.
- R. Jennemann, B. L. Bauer, H. Dertalanffy, R. Geyer, R. M. Gschwind, T. Selmer, H. Wiegandt (1999) Eur. J. Biochem., **259**, 331–338.
- R. Jennemann, R. Geyer, R. Sandhoff, R. M. Gschwind, S. B. Levery, H-J. Gröne, H. Wiegandt (2001) Eur. J. Biochem., **268**, 1190–1205.
- J. D. Weete (1974) Fungal Lipid Biochemistry, Chapter 9. Sphingolipids, pp. 267–286, Plenumpress, New York and London.
- B. Weiss, R. L. Stiller (1972) Biochemistry, **11**, 4552–4557.
- 浅輪和孝、沢田満喜（1979）木材学会誌, **25**, 749–752.
- G. Kawai, Y. Ikeda (1983) Biochim. Biophys. Acta, **754**, 243–248.
- R. L. Lester, R. C. Dickson (1993) Advances in Lipid Research, Vol. 26 (R. M. Bell, Y. A. Hannum, A. H. Merrill Jr., eds.) pp. 253–274, Academic Press, San Diego.
- M. Ohnishi, S. Kawase, Y. Kondo, Y. Fujino, S. Ito (1996) J. Jpn. Oil Chem. Soc., **45**, 51–56.
- 糸乗前、卯田昌代、山脇沙帆、青木一弘、杉田陸海（2003）滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **53**, 27–34.
- 糸乗前、卯田昌代、矢野宏治、青木一弘、羽田紀康、山本憲二、竹田忠絃、杉田陸海（2005）滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **55**, 15–30.
- M. Sugita, T. Mizunoma, K. Aoki, J. T. Dulaney, F. Inagaki, M. Suzuki, A. Suzuki, S. Ichikawa, K. Kushida, S. Ohta, A. Kurimoto (1996) Biochi. Biophys. Acta, **1302**, 185–192.
- J. C. Dittmer, R. L. Lester (1964) J. Lipid Res., **5**, 126–127.
- C. S. Hanes, F. A. Isherwood (1949) Nature, **164**, 1107–1112.
- I. Ciucanu, F. Kerek (1984) Carbohydr. Res., **131**, 209–217.
- S. Itonori, M. Takahashi, T. Kitamura, K. Aoki, J. T. Dulaney, M. Sugita (2004) J. Lipid Res., **45**, 574–581.
- R. C. Gaver, C. C. Sweeley (1965) J. Am. Oil Chem. Soc., **42**, 294–298.
- 青木一弘、前なおみ、川尻佳絵、杉田陸海（1998）脂質生化学研究, **40**, 116–119.
- 青木一弘、濱名秀樹、山岡秀信、杉田陸海（1998）滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **48**, 11–17.
- T. C-Y. Hsieh, K. Kaul, R. A. Laine, R. L. Lester (1978) Biochemistry, **17**, 3575–3582.
- 遠藤玉夫（1996）グライコバイオロジー実験プロトコール（谷口直之、鈴木明身、古川清、菅原一幸 監修）pp. 29–32, 秀潤社.
- 杉田陸海、早田知恵子、鈴木實、竹田忠絃、水野間智子、牧野具加、成島謙司、堀太郎（1992）油化学, **41**, 568–573.
- 糸乗前、北村朋典、田中理恵子、宮垣紀子、齋藤洋昭、杉田陸海（2006）滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **56**, 51–62.
- 糸乗前、清水赳正、矢野宏治、北村朋典、小島寿夫、松室有紀、伊藤将弘、豊川雅哉、齋藤洋昭、杉田陸海（2006）滋賀大学教育学部紀要 自然科学, **56**, 87–96.
- 黒田由紀子、矢野宏治、多田尚平、伊藤将弘、山本憲二、糸乗前、杉田陸海（2005）第44回日本油化学会年会（慶應義塾大学）講演要旨集, pp. 236.
- 平成16年度地域新生コンソーシアム研究事業（2005）「食用茸類の未利用部を用いた機能性食品素材等の生産技術開発」成果報告書.