

蟬花虫体部の熱水抽出多糖について<sup>a)</sup>

木方正<sup>a)</sup>, 宮本郁夫<sup>a)</sup>, 岩田寿男<sup>a)</sup>, 永井勝幸<sup>a)</sup>, 原千尋<sup>a)</sup>, 鶴飼茂夫<sup>a)</sup>

岐阜薬紀要 (1991) 40 : 32-37

**要約:** 蟬花 (菌: *Cordyceps cicadae*) 虫体部の熱水抽出液より多糖 **CI-3L** ( $[\alpha]_D+24.8^\circ$ ) を単離した。**CI-3L** は D-mannose, D-galactose, D-glucose がモル比, 1.0 : 1.0 : 0.3 で構成され, 少量のタンパク質を含んでいた。**CI-3L** は分子量が約 32,000 であり, コンカナバリン A に親和性がある。メチル化分析, スミス分解, 段階的加水分解,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルの結果は次のことを示した。本多糖は主として, 1→6 結合の  $\alpha$ -D-mannopyranose 残基の主鎖並びに 1→2 結合の  $\alpha$ -D-mannopyranose 残基と 1→2 結合の  $\beta$ -D-galactofuranose 残基の側鎖から構成される。**CI-3L** は虫体部から単離した他の galacto (gluco) mannan 類と類似した構造であるが, 比旋光度, 分子量, 及び結合様式の割合において異なっていた。

索引用語: 蟬花, *Cordyceps cicadae*, 多糖, ガラクトグルコマンナン, メチル化分析, コンカナバリン A

A Polysaccharide from Hot-Water Extract of the Insect-Body Portion  
of Chán huā (Fungus: *Cordyceps cicadae*)<sup>1)</sup>

TADASHI KIH<sup>a)</sup>, IKUO MIYAMOTO<sup>a)</sup>, HISAO IWATA<sup>a)</sup>, KATSUYUKI NAGAI<sup>a)</sup>,  
CHIRO HARA<sup>a)</sup>, SHIGEO UKAI<sup>a)</sup>

Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ. (1991) 40 : 32-37

**Abstract:** A polysaccharide **CI-3L** ( $[\alpha]_D+24.8^\circ$ ) was isolated from the hot-water extract of the insect-body portion of Chán huā (fungus: *Cordyceps cicadae*). It was found to consist of D-mannose, D-galactose and D-glucose in the molar ratio of 1.0 : 1.0 : 0.3, and contain a small amount of protein. **CI-3L** has a molecular weight of about 32,000, and affinity for concanavalin A. The results of methylation analysis, Smith degradation, stepwise hydrolysis and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy indicated that the polysaccharide was composed primarily of a main chain of (1→6)-linked  $\alpha$ -D-mannopyranosyl residues, and side chains of (1→2)-linked  $\alpha$ -D-mannopyranosyl and (1→2)-linked  $\beta$ -D-galactofuranosyl residues. **CI-3L** is similar in structure to other galacto (gluco) mannans of the insect-body portion, but differs in specific rotation, molecular weight, and proportions of linkage modes.

**Keyphrases:** Chán huā, *Cordyceps cicadae*, polysaccharide, galactoglucomannan, methylation analysis, concanavalin A

a) 岐阜薬科大学衛生化学教室  
岐阜市三田洞東 5 丁目6-1

a) Department of Hygienic Chemistry,  
Gifu Pharmaceutical University  
6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502

Received February 14, 1991

The Annual Proceedings of Gifu Pharmaceutical  
University

ISSN 0434-0094, CODEN : GYDKA 9

山蟬 (*Cicada flammata* DIST.) の幼虫に寄生する菌 (*Cordyceps cicadae* SHING.) は子のう菌類バツカク科に属し, 中国では, その寄生主の虫体部及び子実体部は蟬花と称し, 古くより薬用に, また子実体 (キノコ) は食用に供され, 珍重されている。著者らは蟬花子実体部及び虫体部より種々な多糖類を単離し, それらの化学構造, 生物活性について報告してきた。これまでに, 蟬花子実体部に galactomannan (C-3),<sup>2)</sup> そして虫体部にはコンカナバリン A (Con A) と親和性を異にする galactomannan (CI-P 及び CI-A),<sup>3)</sup> galactoglucomannan (CI-5N),<sup>4)</sup> 及び直鎖状の (1→3)-β-D-glucan (CI-6P)<sup>5)</sup> も存在することを明らかにした。一方, これら多糖類がマウスにおいて血糖降下作用及び細網内皮系賦活作用,<sup>6)</sup> また抗腫瘍作用<sup>5,7)</sup> を示すことを報告した。今回, 虫体部の熱水抽出液よりこれまで報告してきた以外多糖を得ることができたので, 本報ではその精製, 諸性質, 及び化学構造について報告する。

蟬花虫体部を脱脂後, タンパク質分解酵素溶液 (37°C), 次に水 (室温) で抽出し, その残渣を熱水 (沸騰水浴中) で抽出した。熱水抽出液を除タンパク操作, エタノール沈澱, 陰イオン交換カラムで精製した。さらに Sepharose CL-6B でゲル濾過を行い, その低分子量画分を集め, 凍結乾燥によって多糖画分 (CI-3L) を収率 0.15% で得た。CI-3L は,  $[\alpha]_D^{24.8}$  (水), 水易溶性であり, ゲル濾過 (Sephadex G-100) 並びにガラス繊維濾紙電気泳動において均一性を示した。分子量はゲル濾過の dextran 標品の検量線から約 32,000 と算出された。CI-3L の加水分解物を alditol acetate 誘導体とし, そのガスクロマトグラフィー (GC) より, mannose (Man), galactose (Gal), glucose (Glc) がモル比, 1.0 : 1.0 : 0.3 で検出された。その他, タンパク質を 7.8% (Lowry 法)<sup>8)</sup> 含んでいた。構成単糖の立体配置は加水分解物の per-acetyl (+)-2-octylglycoside 誘導体<sup>9)</sup> のキャピラリーカラムを用いた GC より全て D 体と同定した。

多糖を完全メチル化し, その加水分解によって生じた部分メチル化単糖を alditol acetate 誘導体として GC 及び GC-マススペクトロメトリー (GC-MS) によって分析し, 標品または文献値<sup>10)</sup> の保持時間とマスマフラメントとの比較より各メチル化糖を同定した。その結果は Table 1 に示すように, Man 残基は全てピラノース (p) 型であり, 1→2 結合と 1→6 結合及び分岐糖として 1→2,6 結合があり, そして微量, 非還元末端としても存在していた。

Table 1 GC and GC-MS of Alditol Acetates Derived from Permethylated CI-3L

Methylated sugar (as alditol acetate)	Relative retention time <sup>a)</sup>	Primary mass fragments (m/z)	Molar percentage	Mode of linkage
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Man	0.98	45,117,161,205	2.0	[Man <sub>p</sub> ]1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc	1.00	45,117,161,205	2.9	[Glc <sub>p</sub> ]1→
2,3,5,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.16	45,59,89,117,205	26.0	[Gal <sub>f</sub> ]1→
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc	1.80	45,161,189	3.0	→2[Glc <sub>p</sub> ]1→
3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man	1.85	45,161,189	15.5	→2[Man <sub>p</sub> ]1→
3,5,6-Me <sub>3</sub> -Gal	1.97	45,59,89,189,205,305	13.5	→2[Gal <sub>f</sub> ]1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Man	2.24	117,161,189,233	6.0	→6[Man <sub>p</sub> ]1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Glc	2.53	117,161,189,233	7.9	→6[Glc <sub>p</sub> ]1→
2,3,4-Me <sub>3</sub> -Ga	3.32	117,161,189,233	2.6	→6[Gal <sub>p</sub> ]1→
3,4-Me <sub>2</sub> -Man	4.84	189	20.6	→2,6[Man <sub>p</sub> ]1→

<sup>a)</sup> Relative retention time with respect to that of 1,5-di-O-acetyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol, CP-Sil 88 capillary column at 180°C

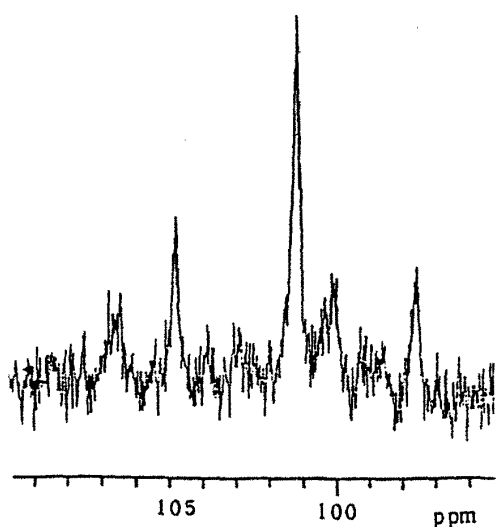


Fig. 1 <sup>13</sup>C-NMR Spectrum (Anomeric Region) of CI-3L in D<sub>2</sub>O

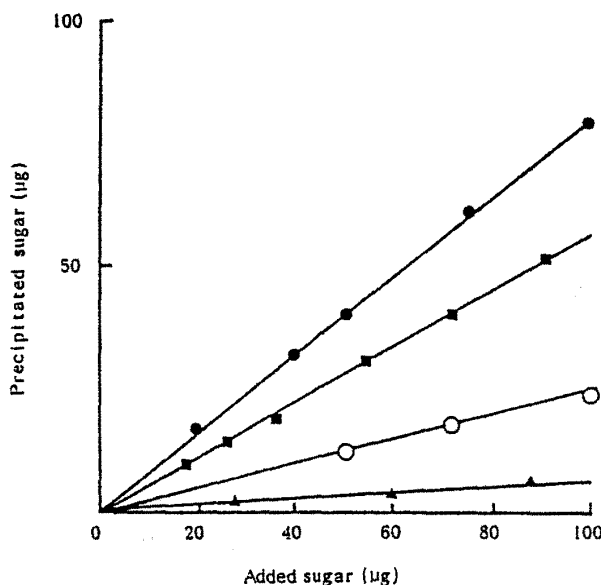


Fig. 2 Quantitative Precipitation Curves for Con A with the Polysaccharides (CI-3L, -○-; CI-A, -●-; CI-P, -▲-; CI-5N, -■-)

Gal 残基は 1→2 結合と非還元末端にフラノース (f) 型として存在し、微量 1→6 結合ピラノースもあることが示された。また、Glc 残基は 1→6 結合で、そして微量、1→2 結合の存在が示された。

次に、CI-3L の過ヨウ素酸化では糖残基当り 1.32 モルの過ヨウ素酸が消費された。スミス分解物 (過ヨウ素酸化物を水素化ホウ素ナトリウムで還元した後、加水分解したもの) の GC 分析にて、単糖として Man, Gal, Glc は検出されず、arabinose (Ara) が検出された。Ara は 1→2 結合 Galf のスミス分解によって生じたものであり、この結果はメチル化分析の結果を支持している。

CI-3L を段階的に加水分解した。最初の緩和な条件 (5mM 硫酸, 100°C, 5時間) で多量の Gal が遊離し、次の段階 (50mM 硫酸, 100°C, 4時間) では Man, Gal が 1 : 2 の割合で遊離してきた。最後に残った分解多糖 (透析内液物) は Man と Glc (13 : 1) から構成され、Gal は残存しなかった。その結果、Gal 残基はフラノース型で側鎖に存在し、Man と Glc 残基は主として骨格に存在することが示唆された。さらに、酸に対して 1→6 結合は 1→2 結合より安定であることから 1→6 結合の Man 及び Glc 残基が主鎖をなしていると推定される。

多糖の<sup>13</sup>C-核磁気共鳴 (<sup>13</sup>C-NMR) スペクトルのアノマー領域を Fig. 1 に示す。文献値<sup>(11)</sup> から各シグナルは次のように帰属した。低磁場の 106.8 ppm, 104.8 ppm のシグナルは、それぞれ、非還元末端と 1→2 結合の β-D-Galf 残基のアノマー炭素に相当する。101.3 ppm の強いシグナルは INEPT 法による <sup>1</sup>J<sub>CH</sub> 180Hz の値からも 1→2 結合の α-D-Manp

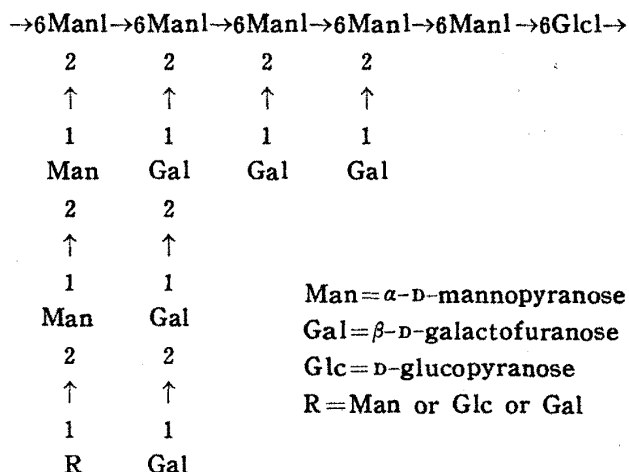


Fig. 3 A Possible Unit of CI-3L

残基に, また97.6-100.8ppm のシグナルは1→6結合または1→2, 6結合の  $\alpha$ -D-Man<sub>p</sub> 残基に由来すると考えられる。

CI-3L はコンカナバリン A (Con A) に親和性を示し, これには主として1→2結合の Man<sub>p</sub> 残基が関与していると考えられ, 以前に報告した虫体部より得た他の galactomannan (CI-P, CI-A) 及び galactoglucomannan (CI-5N) の Con A に対する親和度<sup>3,4)</sup>とは異なっていた (Fig. 2). これは詳細な点においては化学構造が相違しているためと推察される。

以上の結果より, CI-3L はクシ状に分岐した化学構造を有し, その推定される構造単位の1つを示すと Fig. 3 のようになる。主鎖は1→6結合の  $\alpha$ -D-Man<sub>p</sub> 鎖で, 一部が1→6結合の D-Glc<sub>p</sub> 残基であり, この Man<sub>p</sub> 残基の大部分は分岐糖である。この Man<sub>p</sub> 残基の2位から, 側鎖として1→2結合の  $\alpha$ -D-Man<sub>p</sub> 鎖, 1→2結合の  $\beta$ -D-Galf 鎖, また非還元末端残基一個からなる  $\beta$ -D-Galf 残基が分岐している。その他, 非還元末端に D-Glc<sub>p</sub>, D-Man<sub>p</sub> 残基, また1→2結合の D-Glc<sub>p</sub> 残基, 1→6結合の D-Galp 残基も少量含まれることが推定される。

CI-3L は, 蟬花子実体部からの galactomannan (C-3), 虫体部からの galactomannan (CI-P 及び CI-A) と galactoglucomannan (CI-5N) と類似した高分岐な化学構造である。しかし, CI-3L は Gal, Glc を他の多糖より多く含み, 更に, 各結合様式の割合, 比旋光度 ( $[\alpha]_D$ : CI-3L, +24.8°; C-3, +30°; CI-P, +15.5°; CI-A, +10.6°; CI-5N, +30°), 分子量 (Mw: CI-3L, 32000; C-3, 27000; CI-P, 25000; CI-A, 25000; CI-5N, 39000) などで相違していた。また, CI-3L の Con A に対する親和性は CI-P より高いが, CI-A, CI-5N より低かった。これまで報告してきたように, 蟬花の多糖では, 1→6結合の  $\alpha$ -D-Man<sub>p</sub> 主鎖, 1→2結合の  $\alpha$ -D-Man<sub>p</sub> 鎖, そして1→2結合の  $\beta$ -D-Galf 側鎖と非還元末端の  $\beta$ -D-Galf 残基が存在し, 高分岐であることが共通な化学構造である。このような1→2結合の  $\beta$ -D-Galf 鎖の存在は蟬花の多糖に特徴的である。著者らは, 同じ *Cordyceps* 属でコウモリ蛾の幼虫に寄生する菌 *Cordyceps sinensis* からなる生薬の冬虫夏草が類似した galactomannan (CT-4N)<sup>12)</sup> を含むことを明らかにしているが, この多糖においては Galf 残基が  $\beta$  1→2結合でなく  $\beta$  1→5結合の側鎖であることは Chemotaxonomy 上からも興味深い。昆虫とそれにとっては外敵である菌との関係, また昆虫の防御機構の考察<sup>13)</sup> においても, 寄生した菌が形成する多糖の化学構造の解明は興味ある知見を与えるものと期待される。

## 実験の部

**一般的方法** ゲル濾過, ガラス繊維濾紙電気泳動, 分子量測定, 構成糖分析, 過ヨウ素酸酸化, スミス分解は既報<sup>3)</sup>に従って行なった。

**多糖の抽出精製** 中国産香港市場品の蟬花虫体部 (87g) を粉碎し, 熱メタノールで脱脂した後, タンパク質分解酵素を含む溶液 (37°C) で抽出した。<sup>3)</sup> その残渣を水 (室温) で抽出した後, 沸騰水浴中の熱水 (700ml, 7時間) で7回抽出した。この熱水抽出液をタンパク質分解酵素(プロナーゼE, 科研工業)及び Sevag法<sup>14)</sup>にて処理し, 次いで Sevag 法における水層に2倍容のエタノールを加えて沈澱させた。この多糖画分を0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.6) で平衡化した DEAE-Sephadex A-25 (酢酸型) のカラム (2.6x46cm) に添加し, その通過画分をさらに Sepharose CL-6B (0.1M NaCl) のカラム (2.6x90cm) によるゲル濾過で低分子量画分を集め, 凍結乾燥にて CI-3L (130mg) を得た。

**構成糖の DL 帰属** 試料 (2.4mg) を 1N 硫酸 (1.2ml) で封管中 100°C, 6時間加水分解した。酸は炭酸バリウムで中和し, バリウムイオンは Amberlite CG-120 (H<sup>+</sup>) の樹脂によって除去した。減圧乾固した加水分解物を D-(+)-2-octanol (0.5 ml) に溶解し, トリフルオロ酢酸 (TFA) 一滴を加え, 封管中 130°C, 24時間加熱して

オクチル化した。この溶液を減圧乾固後、ピリジノー無水酢酸 (1 : 1), 95°C, 20分間でアセチル化し, GC の検体とした。GC は水素炎検出器付の島津 GC-8A を用い, SP-1000, FS-WCOT のキャピラリーカラム (25mx0.25 mm), キャリアーガス窒素 (0.35kg/cm<sup>2</sup>), スプリット比 1 : 13, カラム温度210°Cの条件で分析した。46.1, 58.0 分の保持時間に D-Man 誘導体が, 49.2, 60.3, 68.0, 81.4分に D-Gal 誘導体が, 52.7, 77.8分に D-Glc 誘導体が検出された。

**メチル化分析** 試料 (3 mg) を箱守法<sup>15)</sup> で3回メチル化した。完全メチル化を IR で確認後, メチル化多糖を90%ギ酸 (100°C, 6時間), 次いで 2 N TFA (100°C, 3時間) にて加水分解した。酸を減圧留去した後, 水素化ホウ素ナトリウムで還元, そしてアセチル化して alditol acetate 誘導体とし, GC 及び GC-MS にて分析した。GC は水素炎検出器付の島津 GC-15A 装置を用い, CP-Sil 88, FS-WCOT キャピラリーカラム (25mx0.25mm) を用い, キャリアーガスとしてヘリウム (スプリッター排気口流速, 92ml/min), スプリット比 1 : 123, カラム温度180°Cにて分析した。各ピークの保持時間及び面積は島津クロマトパック CR-5A にて測定した。GC-MS は, 3% ECNSS-M Gaschrom Q (100~120 メッシュ) のガラスカラム (1 mx 2 mm) を連結した日本電子 JMS-D 300 の装置で既報<sup>3)</sup> に従い分析した。

**<sup>13</sup>C-NMR スペクトル** 試料を重水 (43mg/0.5ml) に溶解し, 日本電子 JEOL GX-270 でテトラメチルシランを外部標準物質とし, 室温で測定した。

**段階的加水分解** 試料 (11mg) を 5 mM 硫酸で100°C, 5時間部分加水分解し, 精製水中にて透析した。透析内液は減圧乾固後, 50mM 硫酸にて 100°C, 4時間部分加水分解し, 透析した。各々の透析外液中の糖は常法に従って, ペーパークロマトグラフィー及び alditol acetate 誘導体として GC にて分析した。最終の透析内容物 (分解多糖) は完全に酸加水分解し, 同様に分析した。

**Con A との反応性** 試料 (0~0.5mg) と Con A (1.5mg, ファルマシア社) を含む 1 M 食塩含有 50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.0) 1ml を 25°C, 24時間放置後, 遠心分離 (3000rpm, 15分間) によって沈澱を集めた。沈澱物を同緩衝液で 2回洗浄後, 50mM 塩酸一塩化カリウム緩衝液 (pH 1.8) 2 ml 溶解させ, フェノール硫酸法<sup>16)</sup> にて糖含量を定量した。

## 引用文献

- 1) 菌類中の多糖類に関する研究 : 第28報.
- 2) S. Ukai, S. Matsuura, C. Hara, T. Kiho, K. Hirose, *Carbohydr. Res.*, **101**, 109 (1982).
- 3) T. Kiho, I. Miyamoto, K. Nagai, S. Ukai, C. Hara, *Carbohydr. Res.*, **191**, 207 (1988).
- 4) T. Kiho, M. Ito, K. Nagai, C. Hara, S. Ukai, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2032 (1988).
- 5) T. Kiho, M. Ito, I. Yoshida, K. Nagai, C. Hara, S. Ukai, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2770 (1989).
- 6) 木方 正, 永井勝幸, 宮本郁夫, 渡辺利明, 鵜飼茂夫, *薬誌*, **110**, 286 (1990).
- 7) S. Ukai, T. Kiho, C. Hara, M. Morita, A. Goto, N. Imaizumi, Y. Hasagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 741 (1983).
- 8) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 9) K. Leontein, B. Lindberg, S. Svensson, *Carbohydr. Res.*, **62**, 359 (1978).
- 10) H. Björndal, B. Lindberg, S. Svensson, *Carbohydr. Res.*, **5**, 433 (1967) : H. Björndal, C. G. Hellerqvist,

B. Lindberg, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **9**, 610 (1970).

- 11) P. A. J. Gorin, E. M. Barreto-Bergter, F. S. Da Cruz, *Carbohydr. Res.*, **88**, 177 (1981) : J. H. Bradbury and G. A. Jenkins, *Carbohydr. Res.*, **126**, 125 (1984) : K. Bock, I. Lundt, C. Pedersen, *Tetrahedron Lett.*, **1973**, 1037.
- 12) T. Kiho, H. Tabata, S. Ukai, C. Hara, *Carbohydr. Res.*, **156**, 189 (1986).
- 13) 和合治久, 蛋白質核酸酵素, **31**, 886 (1986).
- 14) M. G. Sevag, *Biochem. Z.*, **273**, 419 (1934).
- 15) S. Hakomori, *J. Biochem. (Tokyo)*, **55**, 205 (1974).
- 16) M. Dubois, K. A. G. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).