

# マッシュルームより UDP-アセチルグルコサミンの分離\*\*

毛利 威徳・橋田 度\*・志賀 岩雄

## UDP-Acetylglucosamine from Mushrooms

Takenori Mouri, Wataru Hashida and Iwao Shiga

An acid soluble substance was isolated from the fruiting body of a mushroom *Psalliota bisporus* by column chromatography with Dowex 1×8 (formate type). This compound was purified in the form of its calcium salt. The calcium salt was degraded by treatment with diluted HCl and 5'-nucleotidase. It was found by paper and thin layer chromatography that the hydrolyzate consisted of uracil, uridine, uridine diphosphate, and N-acetyl-D-glucosamine. The original substance was identified as uridine diphospho-N-acetyl-D-glucosamine (UDPAG) by the direct comparison of its chromatographic behavior, and ultraviolet and infrared spectra with those of authentic UDPAG.

It was roughly estimated that UDPAG formed about 15% of the total acid soluble and ultraviolet absorbing substances of the mushroom. This value corresponded to 0.42~0.69% of the dry weight of the mushroom.

### 緒 言

ウリジンを基本成分とする diphosphate の糖化合物は、微生物細壁を構成する成分として知られているが、遊離のものとしても酵母<sup>1~4)</sup>、細菌<sup>5)</sup>、肝<sup>6,7)</sup>、きのこ<sup>8,9)</sup>、水産動物臓器<sup>10,11)</sup>などに分布することが報告されている。その糖部分は生物体によって特異的であり、種類が多い。

筆者は予備試験の結果、きのこには相当量の UDP-糖化合物が存在することを認めたので、人工栽培の可能なマッシュルーム (*Psalliota bisporus*) より、収量多く単離する方法を検討し、糖部分の組成に重点をおいて、その生化学的性質をしらべた。

### 実 験 方 法

1. 標準物質及び原料 UDPAG は酵母を材料とする Sigma 製の Na 塩で、純度 98% のものであった。

\* 現所属：不二製油㈱研究所

\* Present address: Research Laboratory, Fuji Seiyu Co., Sumiyoshi-cho, Izumisano, Osaka

脚註：本報においては下記の略号を使用する。

UDP: uridine diphosphate      UDPAG: UDP-N-acetyl-D-glucosamine  
UMP: uridine monophosphate    UDPG: UDP-D-glucose    UDPGal: UDP-D-galactose  
ADP: adenosine diphosphate    ATP: adenosine triphosphate

\*\* 醸酵工学8巻4号213 (1970) 所載

糖類, 核酸塩基類, スクレオシド類, polyphosphate 類は市販品を用いた。

5'-スクレオチドの Na 塩及びそれを分解する酵素, 5'-スクレオチダーゼは 武田薬品工業㈱より 恵与されたものである。

マッシュルーム (*Psalliota bisporus*) は当短大において, 栽培されたものである。可食部を集めて均一に細断した。

2. UDP-糖化合物区分の単離 収穫直後のマッシュルームの細断物を, 冷時等量の10% HClO<sub>4</sub> 水溶液と共にホモジナイズし, ガーゼでろ過し, super cell を助剤としてろ過した。1 N または 5 N KOH で中和して pH 7.0 とした。生成した白色沈澱をろ別し, ろ液を集めた。

その後, Fig. 1 に示のように, 活性炭による精製, Dowex 1×8 カラムによる分画と精製を経て, カルシウム塩として結晶化した。

3. 分析方法 個々のスクレオチはDowex 1×8を用うるカラムクロマトグラフィによった<sup>12,13)</sup> スクレオチドを量的に集めるために, 内径 3.8cm, 長さ 32.0cm の大型のカラムも使用した。展開

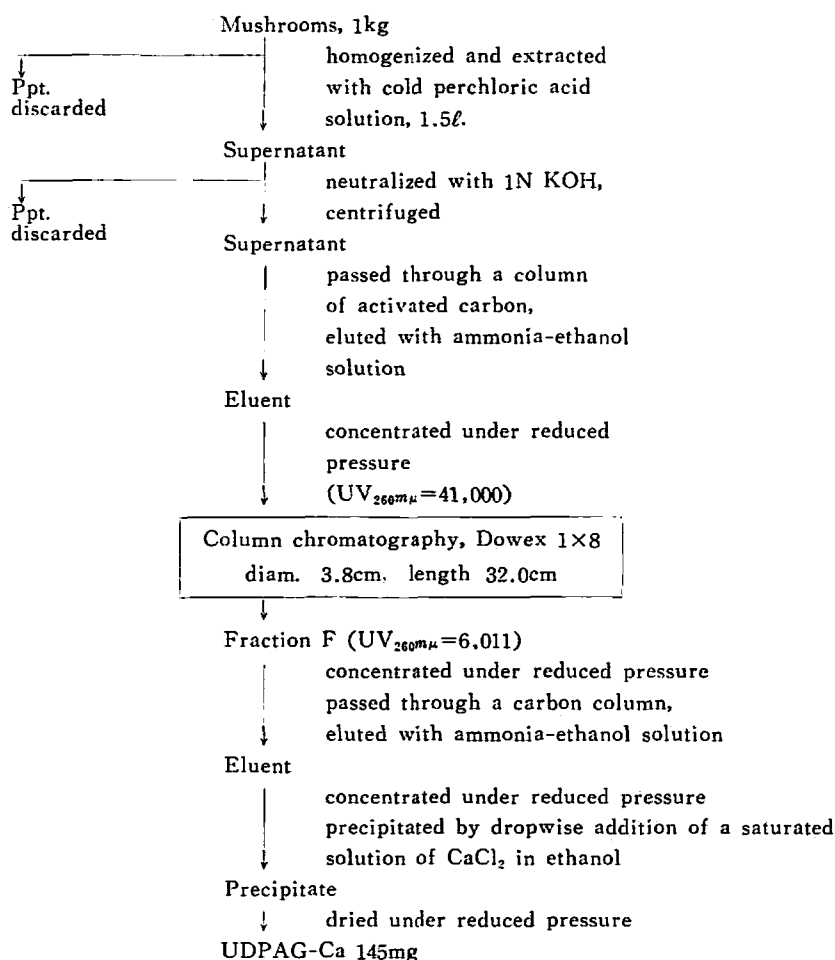


Fig. 1. Scheme for isolation of UDPAG-Ca from mushrooms.

溶媒系は Fig. 2 に示すものである。カラムからの溶出区分について、日立製分光光度計 (EPU-2 A型) を用い、 $260m\mu$  の吸収を測定した。なお、ヌクレオチドはカラムからの溶出位置、ならびに  $260m\mu$  の吸収と  $250m\mu$  および  $280m\mu$  の吸収との比 ( $E_{250}/E_{260}$ ,  $E_{280}/E_{260}$ ) によって同定された。 $260m\mu$  の吸収がピークとなる画分を集め、活性炭処理で濃縮した。

ペーパークロマトグラフィ：東洋ろ紙 No. 51 を用い、展開溶媒系は  $\#1$  : 95% ethanol-IM ammonium acetate, pH 7.5 (75 : 30<sup>2)</sup> ;  $\#2$  : *n*-propanol-conc.  $NH_4OH-H_2O$  (60 : 30 : 10)<sup>14)</sup> ;  $\#3$  : isopropanol-conc. HCl- $H_2O$  (65 : 16.7 :

18.3)<sup>15)</sup> ;  $\#4$  : saturated ammonium sulfate-IM sodium acetate-isopropanol (80 : 20 : 2)<sup>16)</sup> ;  $\#5$  : *n*-butanol-acetic acid- $H_2O$  (4 : 1 : 5) ;  $\#6$  : 95% ethanol-IM ammonium acetate, pH 3.5 (75 : 30) ;  $\#7$  : ethyl acetate-pyridine-conc. ammonia- $H_2O$  (10 : 5 : 3 : 3)<sup>17)</sup> .

薄層クロマトグラフィ：DEAE-セルロース (生化学工業製) あるいはシリカゲル-G (E. Merck 製) を用いた。溶媒系は  $\#8$  : *n*-butanol-acetic acid- $H_2O$  (4 : 1 : 2) ,  $\#9$  : ethyl acetate-isopropanol- $H_2O$  (65 : 24 : 11) .

糖部分の検出、同定：呈色試薬として、*p*-dimethyl amino benzaldehyde<sup>18)</sup> , anilin phthalate<sup>19)</sup> , アミノ糖用に ninhydrin を用いた。

*n*-Acetylglucosamine の定性：Morgan-Elson 法<sup>20)</sup> によって、発色した液の  $520\sim 600m\mu$  間の吸収をしらべた。

## 実験結果及び考察

### 1. UDP-糖化合物画分の分離

マッシュルームの過塩素酸可溶性成分を Dowex  $1 \times 8$  の大型カラムで展開した場合、核酸成分の分布は Fig. 2 に示すようである。

この中でヌクレオシド monophosphate 類については既に報告した<sup>21)</sup> . Fig. 2 で画分 F と仮称される部分は、0.1N HCOOH と 0.3N HCOONa の混合液で溶出されるもので、核酸成分のうちでも大きなピークである。溶出位置から UDP-糖化合物に相当すると考えられる。Fig. 1 に示す分離法によって、この画分を分離した。原料マッシュルーム 1.0kg より過塩素酸による抽出液 1.5ℓ を得た。活性炭処理後、抽出液を濃縮し、Dowex  $1 \times 8$  のカラムに注ぎ入れた試料中  $260m\mu$  に吸収を有する物質の総量 (吸光度  $\times$  液量,  $UV_{260m\mu}$  と略記) は 41.000 であったが、展開後画分 F の  $UV_{260m\mu}$  は 6.011 であり、試料のうちで約 15% の  $260m\mu$  吸収物質が画分 F に集中していることに

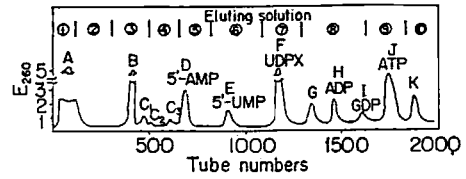


Fig. 2. Chromatogram of perchloric acid-extract of raw mushrooms (*P. bisporus*). (Large scale column.)

#### Composition of eluting solutions

① dister, water, including sample solution	⑥ { 0.1 N HCOOH 0.1 N HCOONa
② 0.005N HCOOH	⑦ { 0.1 N HCOOH 0.3 N HCOONa
③ 0.02N HCOOH	⑧ { 0.1 N HCOOH 0.6 N HCOONa
④ 0.1N HCOOH	⑨ { 0.2 N HCOOH 0.8 N HCOONa
⑤ { 0.1N HCOOH 0.05N HCOONa	⑩ { 0.2 N HCOOH 1.0 N HCOONa

なる。画分Fを精製してカルシウム塩にしたが、原料マッシュルーム 1 kg よりの収量は 145mg であった。

画分Fのカルシウム塩は水に易溶である。NH<sub>4</sub>OH で pH 9.4 に調整し、Dowex 1×8 のカラムで、Fig. 3 に示すように gradient elution を行なった処、鋭い単一ピークよりなる画分を得た。試験管数第40番より第48番迄の画分を集め、活性炭処理及び減圧濃圧濃縮を行ない、これを後述の同定試験の試料とした。

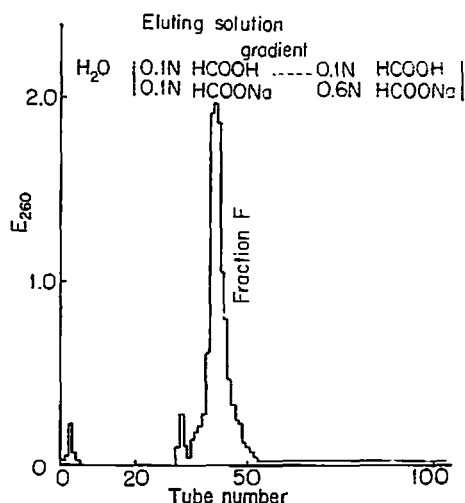


Fig. 3. Rechromatography of Fraction F on a Dowex 1×8 column.

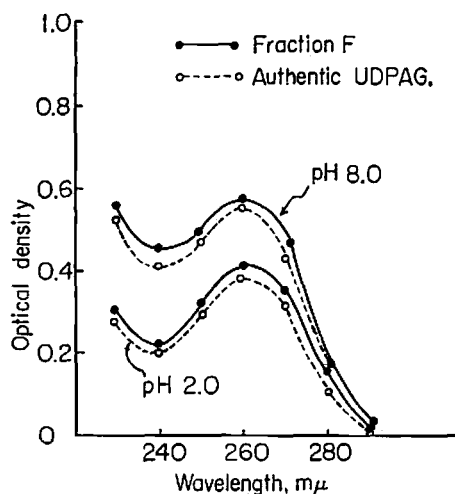


Fig. 4. Absorption curves of Fraction F.

Table 1. Paper chromatography of degraded samples of Fraction F.

Substance	<i>R<sub>F</sub></i> values				
	Solv. 2	Solv. 3	Solv. 4	Solv. 5	Solv. 6
Fraction F	0.24	0.66	0.72	—	0.80
Degraded F, I	0.13	—	—	—	0.67
Degraded F, II	0.16	0.69	0.73	—	—
Degraded F, III	0.62	0.73	0.55	0.49	—
Degraded F, IV	0.52	0.73	0.64	0.30	—
UDP	0.13	0.65	0.73	—	0.66
5'-UMP	0.16	0.69	0.74	—	0.69
Uricine	0.52	0.72	0.65	0.29	—
Uracil	0.61	0.73	0.55	0.49	—

— : not examined

Solvent 5 : *n*-butanol-acetic acid-H<sub>2</sub>O (4:1:5)

Conditions of degradation of Fraction F :

I, heated with 0.01N HCl at 100°C for 15min.

II, heated with 0.1N HCl at 100°C for 1hr.

III, heated with 1N HCl at 100°C for 2hr.

IV, sample II was treated with 5'-nucleotidase

## 2. 画分 F の同定

マッシュルーム画分 F の pH 2.0 及び 8.0 における紫外外部吸収曲線は Fig. 4 に示した。最高吸収は 260 $\mu$  付近にあり、250, 260, 280 $\mu$  における吸光度の比率からみて、核酸塩基はウラシル型と考えられる。また同時に測定した標準 UDPAG の曲線とも全く一致した。

画分 F を種々の条件で分解し、生成物をペーパークロマトグラフィで既知物質と比較した。Table 1 に示すように、0.01N HCl と共に 100°C, 15min 加熱すると UDP に一致するスポットを与え、0.1N HCl と共に 100°C, 1 hr 加熱すると 5'-UMP に一致するスポットを与え、1N HCl と共に 100°C, 2 hr 加熱するとウラシルに一致するスポットを与えた。さらに 0.1N HCl と共に 100°C, 1 hr 加熱したものを 5'-ヌクレオチダーゼで処理すると、磷酸を失ってウリジンに

Table 2. Detection of sugar moiety in Fraction F

Substance	Spray reagent		
	<i>p</i> -Dimethyl amino benzaldehyde	Ninhydrin	Aniline phthalate
UDPAG	colorless	purple	colorless
Fraction F	colorless	purple	colorless
Hydrolyzed F*	purple	redish-purple	yellowish-brown
N-Acetyl-glucosamine	purple	redish-purple	yellowish-brown
Glucosamine	brownish-yellow	blueish-purple	redish-brown
Glucose	—	—	redish-brown
Ribose	brownish-black	—	redish-brown

\* Fraction F was hydrolyzed with 0.01N HCl at 100°C for 15min.

— not examined

Table 3. Paper chromatography (PPC) and thin layer chromatography (TLC) of degraded Fraction F.

Substance	PPC		TLC	
	$R_f$ Solv. 7	$R_f$ Solv. 5	$R_f$ Solv. 8	$R_f$ Solv. 9
Fraction F	—	(0.07)	—	—
Degraded F, I	—	0.44	0.36	0.15
Degraded F, II	0.80	—	—	—
Glucose	1.00	0.29	0.32	0.10
Galactose	—	—	0.30	0.09
Ribose	—	—	0.41	0.19
Glucosamine	0.81	0.27	0.28	0.03
Galactosamine	0.71	0.27	—	—
N-Acetyl-glucosamine	1.34	0.43	0.38	0.16

$R_f$ : Rglucose

Solvent 7: ethyl acetate-pyridine-ammonia-H<sub>2</sub>O (10:5:3:3)

Solvent 8: *n*-butanol-acetic acid-H<sub>2</sub>O (4:1:2)

Solvent 9: ethyl acetate-isopropanol-H<sub>2</sub>O (65:24:11)

Degraded F, I: Fraction F was heated with 0.01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 100°C for 15min.

Degraded F, II: Fraction F was heated with 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 100°C for 24hr.

(deacetylation)

相当するスポットを与えた。

以上のように、核酸系の基本成分が UDP であることがみとめられた。

既に UDP-糖化合物は細胞内ヌクレオチドプールの一員として存在すること、さらに糖の種類には種々のペントース、ヘキソース、ウロン酸、アミノ糖などがあることが知られている<sup>22)</sup>。

画分 F を 0.01N HCl と共に 100°C で 15min 加熱すると、糖部分が遊離した。それを濃縮してろ紙にスポットし、既知物質と比較しながら、呈色剤で発色させた。Table 2 に示すように、画分 F を分解したものは、*p*-dimethyl amino benzaldehyde, ninhydrin, aniline phthalate のいずれの試薬によっても、*n*-acetylglucosamine に一致する呈色を示し、glucosamine, galactosamine, glucose, ribose には一致しなかった。

画分 F の 0.01N HCl による分解生成物をペーパークロマトグラフィ、あるいは薄層クロマトグ

Table 4. Paper chromatography of Fraction F and related substances.

Substance	$R_f$ value			
	Solv. 6	Solv. 2	Solv. 3	Solv. 4
UDP	0.75	0.09	0.65	0.73
UDPG	0.80	0.11	—	—
UDPGal	—	—	0.71	0.79
UDPAG	0.83	0.19	0.66	0.72
Fraction F	0.83	0.20	0.66	0.72
ADP	0.67	—	—	—
ATP	0.63	0.07	—	—

— not examined

Solvent 6 : 95% ethanol-1M ammonium acetate pH 3.5 (75:30)

Solvent 2 : *n*-propanol-NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O (60:30:10)

Solvent 3 : isopropanol-conc. HCl-H<sub>2</sub>O (65:15.7:18.3) Solvent 4 : saturated ammonium sulfate-1M sodiumacetate-isopropanol (80:20:2)

ラフィで、既知の糖類、アミノ糖類と比較した結果は、Table 3 のごとくで、いずれも展開位置が *n*-acetylglucosamine に一致することがみとめられた。また画分 F を 0.1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> と共に 100°C で 24hr 分解すると deacetylation されて glucosamine を生成することも見出された。

0.01N HCl により分解した画分 F と標準の *n*-acetyl glucosamine を Morgan・Elson 法<sup>20)</sup>によって呈色させ、520~600m $\mu$  の吸収曲線を求めた結果、Fig. 5 のようによく一致した。

画分 F、及びこれまでの検討により関連すると考えられる化合物について、ペーパークロマトグラフィで検出すると Table 4 のようであ

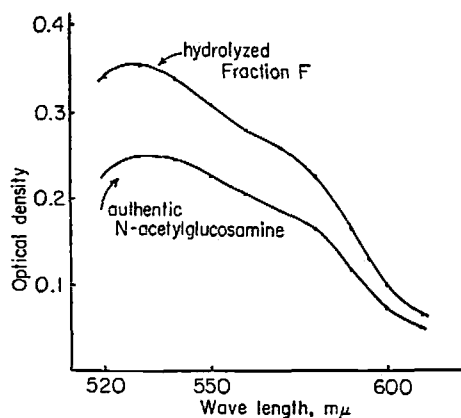


Fig. 5. Absorption spectra of hydrolyzed Fraction F and authentic *N*-acetylglucosamine obtained by Morgan & Elson's method (1934).

る。すなわち、4種の展開溶媒いずれによっても、画分FのRf値は、標準UDPAGのそれに一致した。そしてUDP, UDPG, UDPGal, ADP, ATPには一致しなかった。

マッシュルームより分離した画分FのCa塩と、標準のUDPAGをCa塩にしたものについて、赤外線スペクトルを比較するとFig.6のようであり、互によく一致している。

以上の結果より、画分FはUDPAGに一致すると認められた。

画分Fの塩Caの元素分析を行なうと、C:25.53%, H:5.17%であった。8分子の結晶水を含有するとして、化学式より計算した理論値はC:25.79%, H:5.18%であった。

### 3. マッシュルーム中のUDPAG含有

筆者らは既報<sup>13,21,23)</sup>において、イオン交換クロマトグラフィによって、マッシュルーム核酸成分の一斉展開を行なった。UDAGに相当する画分について、その紫外吸収がウリジンに由来するものとして260m $\mu$ における吸光度から計算すると、UDPAG画分の含量は次の範囲にある。

6.9~11.4  $\mu$  mole/g dry wt. UDAGの分子量は607であるから4.2~6.9mg/g dry wt. マッシュルームの乾物量、平均8.4%として生原料g当り0.35~0.58mg (0.035~0.058%)

この数値はマッシュルームのほかの核酸成分、たとえば、ヌクレオチド・monophosphate類と比較して約10倍量以上である。

マッシュルーム以外のキノコ類について、すなわちヒラタケ、マツタケ、シメジ、エノキタケ、シイタケにおいても、UDPAGを含有する画分の存在がみとめられた。その詳細については後報に譲りたい。

## 要 約

マッシュルーム (*Psalliota bisporus*) 子実体の過塩素酸抽出物をDowex 1 $\times$ 8カラムを用いて分画することにより、ウリジンを基本成分とする糖化合物を含む画分を得た。この画分をイオン交換樹脂で精製した後、Ca塩として単離した。加水分解、酵素分解による分解物について、ペーパークロマトグラフィ、薄層クロマトグラフィ、有機試薬による呈色法などを行ない、糖部分はルアセチルグルコサミンであると認めた。またCa塩を標準物質と比較することにより、これはUDPAGであると同定された。

UDPAGは過塩素酸可溶性核酸成分の約15%を占め、マッシュルーム乾物中に0.42~0.69%含有されており、量的に重要な成分とみとめられる。

本報は日本醸酵工学会第20回大会(昭和43年11月)で発表した。

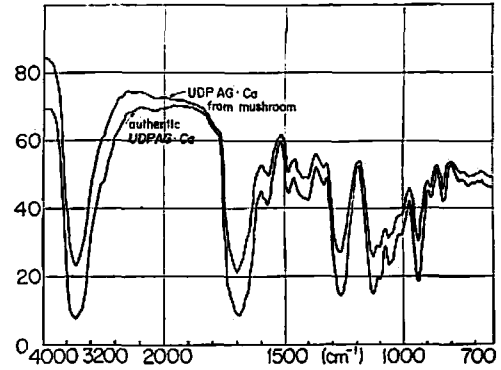


Fig. 6. Infrared spectra of UDPAG-Ca

文 献

- 1) Caputto, R., Leloir L. F., Cardini, C. E., Paladini, A. C : *J. Biol. Chem.* 184, 333 (1950).
- 2) Paladini, A. C., Leloir, L. F. : *Biochem. J.* 51, 426 (1952).
- 3) Cabib, E., Leloir, L. F., Cardini, C. E. : *J. Biol. Chem.*, 203, 1055 (1953).
- 4) Chester, V. E., Byrne M. J. : *Arch. Biochem. Biophys.*, 127, 556 (1968).
- 5) Park, J. T. : *J. Biol. Chem.*, 194, 877, 885, 897 (1952).
- 6) Smith, E. E. B., Mills, G. T. : *Biochim. Biophys. Acta.* 13, 386 (1954).
- 7) Maley, F., Lardy, H. A. : *Science*, 124, 1207 (1956).
- 8) Bergkvist R. : *Acta Chem. Scand.*, 12, 1549 (1958).
- 9) Bergkvist, R. : *Acta Chem. Scand.*, 12, 1554 (1958).
- 10) 関・新井・斎藤 : 北大水産研究彙報, 17, 184 (1967).
- 11) 関 : 北大水産研究彙報, 19, 46 (1968).
- 12) 橋田・毛利・志賀・西川・寺本 : 醸酵工誌, 41, 420 (1963).
- 13) 毛利・橋田・志賀・寺本 : 醸酵工誌, 43, 335 (1965).
- 14) Hans, C. S., Isherwood, F. A. : *Nature*, 164, 1107 (1949).
- 15) Cohn, W. E., Volkin, E. : *Nature*, 167, 483 (1951).
- 16) Markham, R., Smith, J. D. : *Biochem J.*, 49, 401 (1951).
- 17) Jermyn, M. A., Isherwood F. A. : *Biochem. J.*, 44, 402 (1949).
- 18) Partridge, S. M : *Biochem. J.*, 42, 238 (1948).
- 19) Partridge, S. M. : *Nature*, 164, 443 (1949).
- 20) Morgan, W. T. J., Elson, L. A. : *Biochem J.*, 28, 988 (1934).
- 21) 橋田・毛利・志賀・寺本 : 醸酵工誌, 42, 434 (1964).
- 22) 鈴木 : *Amino Acid and Nucleic Acid (アミノ酸核酸集談全誌)* 15, 10 (1967).
- 23) 毛利・橋田・志賀・寺本 : 醸酵工誌, 45, 362 (1967).