

## マッシュルームから分離した PHA 幼若化阻害物質

毛利 威徳・村原ツヤ子・加山 浩之・石田名香雄\*

## New Inhibitors for the Blastgenation of Human Lymphocytes

## Isolation from Edible Mushrooms

Takenori Mouri, Tuyako Murahara, Hiroyuki Kayama and Nakao Ishida\*

Some of mushrooms have been commonly known as healthful diet. In our efforts to obtain immunologically active low molecular substances from edible mushrooms, two compounds were isolated as effective inhibitors of DNA synthesis in human lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. They are  $\gamma$ -L-glutaminy-4-hydroxybenzene [ $\gamma$ -GH B] from *Psalliota bisporous* and lentinacin (or ertadenine) from *Lentinus edodes*.

Isolation of the former active principle was performed as shown in Fig. 1. The effective compound from *L. edodes* was isolated by almost the same procedure. It showed very similar IR, NMR and mass spectra to those of lentinacin and was identified by means of paper chromatography ( $R_f$ : 0.45,  $n$ -PrOH/ $conc.$   $NH_4OH/H_2O$  in a ratio of 6:3:1; 0.22,  $n$ -BuOH/AcOH/ $H_2O$  in a ratio of 4:1:5; 0.15, Py/AcOEt/ $H_2O$  in a ratio of 10:4:3) and paper electrophoresis (moving distance for anode: zero, pH2.8,  $HCO_2H$ ; 6.2cm, pH4.4, Py/AcOH: 8.5cm, pH7.5,  $(Et_3N)_2CO_3$ ; 10.5cm, pH9.0,  $Na_2B_4O_7$ ).

The principle from *P. bisporous* was more immunologically effective and exhibited the characteristic UV absorption ( $\lambda_{max}^{0.1N HCl}$  nm: 246,  $\lambda_{max}^{0.1 NaOH}$  nm: 260,  $\lambda_{max}^{H_2O}$  nm: 246) ascribable to a phenol group and IR bands ( $\nu_{max}^{NaCl}$   $cm^{-1}$ : 3270, 1645, 1610) attributable to an amide group. The NMR spectrum in deuterium oxide containing a small amount of ammonia showed signals at  $\delta$ : 7.11(2H, double,  $J=9Hz$ ), 6.64(2H, doublet,  $J=9Hz$ ) that correspond to 1,4-disubstituted benzene. The presence of a glutamyl group was indicated by signals at  $\delta$ : 3.34 (1H, triplet,  $J=6 Hz$ ), 2.40 (2H, multiplet) and 1.90 (2H, multiplet). The mass spectrum showed the major fragmentations at  $m/e$ : 109 ( $p$ -hydroxyaniline) and 84 (pyrrolidonyl cation). These spectral data coincide with those reported for  $\gamma$ -GHB. Therefore, for the purpose of confirming the structure, synthesis of this compound through a new route was undertaken. An acid azide solution (AcOEt, 200ml) was prepared according to Waley's procedure from  $N$ -carbobenzy- $\gamma$ -L-glutamyl hydrazide (7g). To this solution a solution of  $p$ -hydroxyaniline (3.5g) in ethanol (100 ml) was added and the mixture was allowed to stand at room temperature. After removal of the solvent the residual mass was extracted with methanol and the solution was hydrogenated in the presence of palladium carbon to afford  $\gamma$ -GHB (1.02g, crystallized from water). The product was identical with the natural compound in all respects: mp 211~212°C.  $[\alpha]_D^{23}=33.0$  ( $c=1.54$ , 2N HCl).  $\gamma$ -GHB exhibited low toxicity ( $LD_{50}$ : 5g/kg) and 84% inhibition of phytohemagglutinin induced human lymphocyte blastgenation at a concentration of 4 $\mu$ g/ml (Table I). The effects of  $\gamma$ -GHB on the delay of skin homograft rejection are now under investigation.

キノコ類には核酸成分も多く、その核酸成分が味や香りに、また薬理的な方面にも寄与している。前報<sup>1)</sup>までにキノコ類の味の主成分は5'-GNP (5'-グアニル酸)であることを報告した。また薬理的物質についてもコレステロール溶解物質<sup>2)</sup>や抗ウイルス作用<sup>3)</sup>、抗癌性物質<sup>4)</sup>等について多くの報告がなされている。このようなキノコ類の核酸成分はキノコの種類によって特異的である。

著者らは予備試験の結果、マッシュルームやシイタケの低分子物質区分にリンパ球の PHA 幼若化抑制を見だし、その活性物質が相当量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 (*Agaricus bisporus*) より収量よく単離する方法を検討した。また活性物質を  $\gamma$ -L-glutamyl-4-hydroxy benzene (以後  $\gamma$ -GHB と略す) と同定し、生化学的な性質を調べたので報告する。

## 実験方法

1. 標準物質および原料 核酸塩基類、ヌクレオシド類、ヌクレオチド類、アミノ酸、および  $\gamma$ -methyl-L-glutamate は市販品を用いた。

$\gamma$ -GHB は北海道大学において合成した。

マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) は本学において栽培されたものであり、子実体の傘を集めて均一に細断したものをを用いた。

2. 分析方法 1) 個々の核酸成分は Dowex 1×8、また Dowex 50W×4を用いるカラムクロマトグラフィーによった。展開溶媒系はギ酸とギ酸ソーダ、および塩酸を用いた。

カラムからの溶出区分について、日立製分光光度計 (139型) を用い、260nm の吸収を測定し、ピークとなる画分を集め、活性炭処理で濃縮した。なお、同定はカラムからの溶出位置、ならびに 260nm の吸収と 250nm および 280nm の吸収との比 ( $E_{250}/E_{260}$ ,  $E_{280}/E_{260}$ ) によった。

2) ペーパークロマトグラフィー：東洋汙紙 No.51 を用い、溶媒系は #1: *n*-propanol-conc NH<sub>4</sub>OH-H<sub>2</sub>O (60:30:10); #2: isopropanol-conc HCl-H<sub>2</sub>O (65:16.7:18.3); #3: saturated ammonium sulfate-1M sodium acetate-isopropanol (80:20:2); #4: *n*-butanol-acetic acid-H<sub>2</sub>O (4:1:5); #5: ピリジン-酢酸エチル-H<sub>2</sub>O (10:4:3); #6: 水飽和ブタノールを用いた。

3) 薄層クロマトグラフィー：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 #4: *n*-butanol-acetic acid-H<sub>2</sub>O (4:1:2) を用いた。

4) PHA 幼若化阻害反応の測定<sup>5)</sup>：ヒト・リンパ球を10重量%ウシ胎児血清を含む RPMI 1640 培地 (GIBCO 社製) に浮遊させ、マイクロプレート (NUNC社製) 中で培養した。1ウェル当たり  $1 \times 10^5$  の細胞を分注し、PHA 0.1 $\mu$ l で刺激した (全容量を 0.1ml とする)。刺激後、CO<sub>2</sub> 孵卵器中 37°C、65 時間培養後、<sup>3</sup>H-チミジン 0.1 $\mu$ Ci 添加し、さらに7時間培養後の細胞内への取り込みを測定した。

## 実験結果および考察

### 1. 生理活性物質 (PHA 幼若化抑制物質) の分離

原料マッシュルーム 10kg を冷時、等量の10%過塩素酸で抽出し、5N KOH で中和後過し10l の抽出液を得た。その後 Fig. 1 に示すように活性炭処理後溶出液を濃縮し、Dowex 1×8 のカラムで展開した。

カラムに注ぎ入れた試料中の 260nm に吸収を有する物質の総量 (吸光度×液量, UV<sub>260nm</sub> と略

\*東北大学医学部

記)は723,400であった。そのマッシュルーム過塩素酸可溶性成分を、Dowex 1×8の6cm×50cmカラムで展開した核酸成分の分布はFig.2に示すごとくである。この中でヌクレオシド、ヌクレオチド、ポリホスフェート類についてはすでに報告した。Fig.2で画分Bと仮称される部分は0.005N HCOOHで溶出されるもので、核酸成分の区分中最大のピークである。溶出位置から、ヌクレオシド、塩基に相当すると考えられる。展開後の画分Bの $UV_{260nm}$ は111,820であり、試料中で約15%の260nm吸収物質が画分Bに集中していることになる。画分Bには1つの物質でなく、まだ何種類かの物質が含まれているために画分BをDowex 50W×4 (C1型)カラムにて再クロマトグラムを行った。

まず、活性炭処理および減圧濃縮を行った画分BをHClでpH6.0に調整し、Dowex 50W×4のカラムでFig.3に示すようにgradient elutionを行ったと

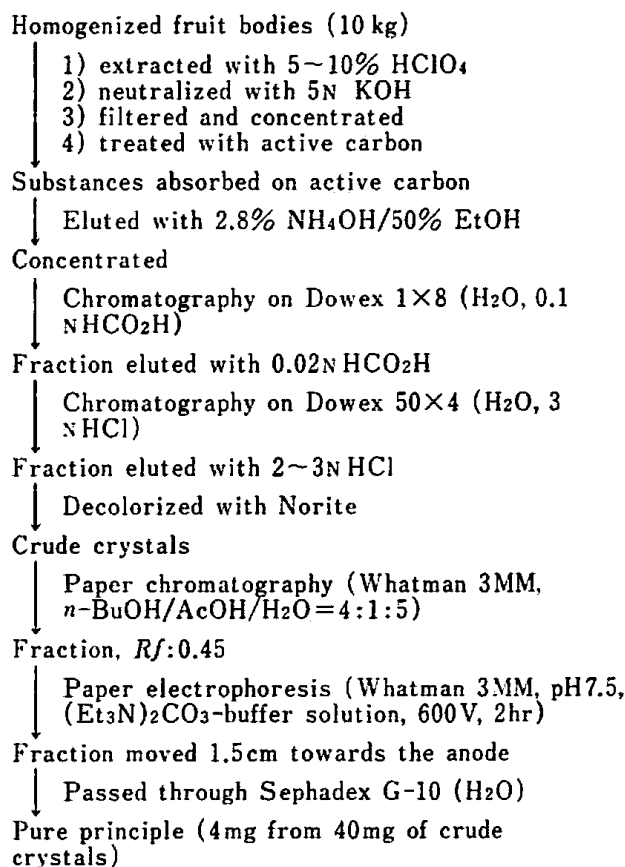


Fig. 1 Isolation Scheme of  $\tau$ -GHB from *Agaricus bisporus*.

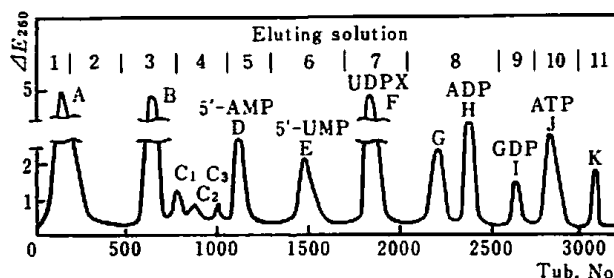


Fig. 2 Rechromatogram of Perchloric Acid Extract of Raw Mushroom (*A. bisporus*).

ころ、6個のピークよりなる画分を得た。6番目(仮称FrB-6)の画分を集め、活性炭処理にてHClを除去し減圧濃縮を行った後脱色し、ナトリウム塩とした。収量は原料マッシュルーム10kgより2gであった。仮称FrB-6を後述の同定試験の試料とした。

## 2. PHA 幼若化の阻害活性

カラムから溶出した画分について、ヒ

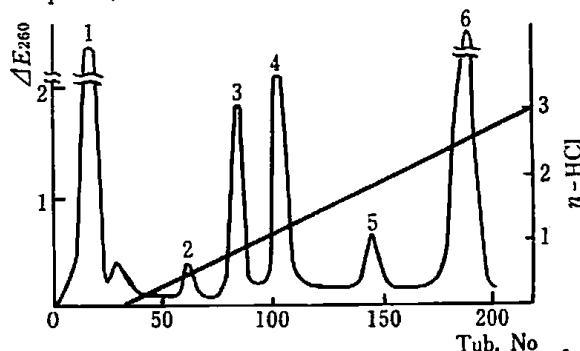


Fig. 3 Chromatogram of perchloric Acid Extract of Raw Mushroom (*A. bisporus*).

ト・リンパ球の幼若化反応に対する抑制を調べた結果は Table 1 のごとくであった。

Table 1 で明らかのように、単離した B-6 が最も強い PHA 幼若化の抑制を示すことが認められたので、以後本物質について同定を行った。

### 3. 単離した物質の同定

マッシュルームより単離した B-6 の pH 2.0, pH6.0, および pH8.0 における紫外部の最高吸収は 245nm 付近にあり、250, 260, 280nm における吸光度の比率からみて核酸系物質でないものと思われる。マッシュルーム B-6 を濃縮して沱紙にスポットし、既知の物質と比較しながら種々の定性反応を行ってみた。その結果を示すと Table 2 のようになる。

核酸塩基の定性では陰性、糖の定性またリン酸の定性も陰性であったが、ニンヒドリン反応は陽性である。したがって、アミノ酸類ではないかと思われる。しかし、紫外部吸収曲線等からみて既知のアミノ酸ではないように考えられる。単離した B-6 と関連すると考えられる核酸塩基、ヌクレオシドおよびアミノ酸類についてペーパークロマトグラフィーで検出すると Table 3 のようである。

すなわち、単離した B-6 の  $R_f$  値は4種の展開溶媒のいずれの場合も標準の塩基、ヌクレオシド、アミノ酸とは全く異なる。

単離した B-6 を 0.1N HCl とともに 100°C で15分加熱。また 6N HCl 100°C で48時間加熱した。その分解生成物をペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーで既知のアミノ酸と比較した結果、溶媒 #4 でいずれも展開位置がグルタミン酸に一致することが認められた。したがってアミノ酸分析機（日立 034 型液体クロマトグラフィー）によって塩基性、中酸性と分けてクロマトグラムを行った結果、溶出位置等からみてグルタミン酸であることを確認した。もう一方の分解物については、ミロン反応、塩化鉄、リベルマン反応、フタレン反応がいずれも陽性であったので、フェノール核を有するものであることが明らかになった。

単離した B-6 40mg を沱紙 (Whatman 3MM 40×40cm 2枚) につけ上昇法によって、ブタノール：酢酸：水 (4:1:5) で展開した。沱紙を乾燥後、紫外線ランプ下で青くみえる部分（紫外

Table 1 Inhibition of PHA-Induced Blastgenation of Human Lymphocytes.

Sample (40r/ml)	LD <sub>50</sub> (μg/ml)
Fraction A	750
Fraction B	50
Fraction C	300
Fraction 1	500
Fraction 2	1,000
Fraction 3	150
Fraction 4	150
Fraction 5	600
Fraction 6	40

Table 2 Qualitative Tests of Fraction B-6

Base	
UV. absorption	245nm
Copper sulfate reaction	+
Nitric acid tests	+
Sugar	
Molisch reaction	-
3,5-Dinitrosalicylic acid reaction	-
Indole reaction	-
Carbazole reaction	+
Amino acid	
Ninhydrin reaction	+
Biuret reaction	+
Folin reaction	+

Table 3 Paper Chromatography of Fraction B-6 and Some Amino Acids

Substance	$R_f$ values Solv. 4
Fract B-6	0.45
Synth $\gamma$ -GHB	0.45
Tyrosine	0.42
Phenylalanine	0.63
Glutamic acid	0.22

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

部吸収のある部分)で、さらにニンヒドリン反応陽性部分 ( $R_f=0.42\sim 0.5$ ) を切り取り、5~6%アンモニア水 (30ml) で抽出した。抽出物 (15 mg) は他の溶媒系の沱紙クロマトグラフィーでも単一であった (ピリジン:酢酸エチル:水=10:4:3,  $R_f=0.50$ , 水飽和ブタノール,  $R_f=0.31$ )。しかし、この単離した物質はまだ pH7.0 以上での沱紙電気泳動で、2つのスポットを与えたのでさらに分画した。試料を沱紙 (Whatman 3MM 46×17 2枚) につけ、pH7.5 (トリエチルアミン-炭酸 buffer) で 600V, 2hr 泳動し、紫外部吸収、ニンヒドリン反応がともに陽性の部分をアンモニアで抽出し、得られたもの (6 mg) を Sephadex G-10 カラムに通して、240nm に吸収を示す部分を集め 4 mg の精製された結晶を得た。

再精製した B-6 の紫外部吸収、赤外分析, NMR スペクトル, mass スペクトルより測定した。その結果, IR は  $3270, 1645, 1610\text{cm}^{-1}$  に, NMR スペクトルで  $\delta 6.64$  と  $7.11$  にそれぞれ 2H の doublet があり、パラ位に電子供与基をもつベンゼン環の存在が考えられ、高磁場側の他のピークはちょうどグルタミン酸のそれと一致することから、パラ 2 置換ベンゼンのグルタミン酸誘導体と考えられた。これらのことはマススペクトルの親ピーク ( $M^+=238$ ), フラグメントピーク 109

$(\text{NH}_2\text{-}\langle\text{C}_6\text{H}_4\text{-OH}\rangle)$ , 84 ( $\langle\text{C}_6\text{H}_4\text{-O}\rangle$ ) などによって支持されていることを認めた。

精製した B-6 の元素分析を行うと C, 55.98%; H, 6.05%; N, 11.62%;  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$ , 238, 化学式より計算した理論値は C, 55.4%; H, 5.88%; N, 11.76% であった。一方, F. Weaver<sup>6)</sup> J. Jadot ら<sup>7)</sup> は *Agaricus hortensis* から *r*-L-glutaminyl-4-hydroxy benzene の分離を報告している。著者らの単離した本物質も *r*-L-glutaminyl-4-hydroxy benzene とよく一致した。

しかし、この物質が PHA 幼若化を抑制する物質であるかどうか明らかでなかったので、この物質の合成を行い生理活性を比較することにした。

#### 4. *r*-L-Glutaminyl-4-hydroxy benzene の合成<sup>6,7)</sup>

まず, *N*-carbobenzyloxy-*r*-L-glutamylhydrazide の合成:  $\text{KHCO}_3$  (13.7 g) を含む水溶液 70 ml に, 10 g のグルタミン酸水素 5-メチルを溶かし, 次に 12ml の benzylchloroformate を加え, 室温で 6 時間攪拌する。反応混液は 30ml の ether で洗浄して過剰の benzylchloroformate を除いてから 3N HCl で酸性にすると白濁を生じる。150ml の酢酸エチルで抽出, 有機層は 1% 重炭酸カリで洗浄後, 溶媒を除去する。残渣を 25ml のメタノールに溶かし, 攪拌しながら 10ml の 90% 抱水ヒドラジンを 5~10 分間に加えて 2 日間室温に放置する。メタノールを除去後 60ml の水を加えて残渣を溶かし, 6N HCl を pH 2 になるまで滴下すると沈殿を生じる。続いて酢酸ソーダ飽和水溶液を pH 7 になるまで加え, 0°C で 1 時間放置した後, 沈殿を沱過する。粗生成物を水から再結晶して純粋な *N*-carbobenzyloxy-*r*-L-glutamyl hydrazide (mp 175~176°) 7 g (収率 33.5%) を得た。*N*-carbobenzyloxy-*r*-L-glutamyl hydrazide 7 g を 2.4N HCl 50ml に溶かし, 100 ml の酢酸エチルを加えて攪拌, 0°C に冷却しながら 10 数分間にわたって 10%  $\text{NaNO}_2$  水溶液 12ml を加える。30分間 0°C で攪拌した後, 酢酸エチルで抽出してあわせる。100ml のエタノールに溶かした 3.5 g の *p*-hydroxy aniline をすぐに加え, 室温で攪拌しながら一晩置く。反応液の溶媒をエバポレーターで除き, 残渣をメタノールで数回抽出する。ひとつにしたメタノール抽出液 (300 ml) に酢酸 ( $\text{ACOH}/\text{水}=1/1$ ) を 4 ml 加えてから, 5% Pd-C 500mg の存在下で加水分解する。触媒を沱過し, 溶媒を除いた後, 残渣をメタノールで洗い可溶物を除く。粗成物は活性炭で脱色 (溶媒は水) 後, 水から再結晶して *r*-L-glutaminyl-4-hydroxybenzene 1.02 g (収率 16.5%) を得た。

先に同定したマッシュルーム子実体から分離した B-6 と、合成にて得た  $\gamma$ -GHB について PHA 幼若化抑制作用を調べた。

### 5. PHA 幼若化反応に対する抑制作用

ゼラチン沈降法で得たヒト・リンパ球から 2-4) に準じて、子実体より抽出した B-6 と合成にて製造した  $\gamma$ -L-glutaminyl-4-hydroxybenzene についてその活性を調べた結果は、Table 4 のごとくである。

この結果から 4  $\gamma$ /ml で PHA 幼若化の85%抑制することが認められた。

合成にて製造した  $\gamma$ -L-glutaminyl-4-hydroxybenzene ( $\gamma$ -GHB) の添加濃度による影響を調べた結果は、Table 5 のごとくである。

Table 4 Inhibition of PHA-Induced Blastgeneration of Human Lymphocytes

Fraction ( $\gamma$ /ml)	Inhibition (%)
Fraction B-6 400	100
Fraction B-6 40	100
Fraction B-6 4	85
Fraction B-6 0.4	42
Fraction B-6 0.04	35
Synthetic $\gamma$ -GHB 400	100
Synthetic $\gamma$ -GHB 40	99
Synthetic $\gamma$ -GHB 4	67
Synthetic $\gamma$ -GHB 0.4	27
Synthetic $\gamma$ -GHB 0.04	15

Table 5 Inhibition of PHA-Induced Blastgeneration of Human Lymphocytes

Concentration ( $\gamma$ /ml)	Inhibition (%)
0	—
4	0
40	89.2
400	100.0

この結果から 4  $\gamma$ /ml で完全に抑制が見られた。また  $\gamma$ -GHB 40 $\gamma$ /ml を PHA 刺激後 0, 12, 24 および 48 時間後に添加した場合の阻害率を調べたが、いずれの場合にも 90%以上の阻害を示した。

動物に対する皮膚移植等の動物実験、急性毒性等については日本免疫学会に報告する。

### 6. マッシュルーム中の $\gamma$ -GHB の含量

イオン交換クロマトグラフィーによって、マッシュルーム中に含まれる  $\gamma$ -GHB を計算した。 $\gamma$ -GHB に相当する画分について紫外吸収が 245nm にあることから、 $\gamma$ -GHB の含量は次の範囲にある。 $\gamma$ -GHB 11.0~16.1  $\mu$ mole/g dry weight.  $\gamma$ -GHB の分子量は 238 であるから、11.0mg/g dry weight マッシュルームの乾物量を平均 8.4%として、生原料 g 当り 0.15~0.24mg になる。この数値はマッシュルームのほかの核酸成分、たとえば、ヌクレオチド類に比較して約 4~5 倍量以上である。

## 要 約

マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) 子実体の過塩素酸抽出物を Dowex 1 $\times$ 8, Dowex 50W  $\times$ 4 カラムを用いて分画することにより、フェノール核を有しグルタミン酸を含む画分を得た。この画分にはヒト・リンパ球の PHA 幼若化抑制作用が認められた。この画分をイオン交換樹脂で精製した後、単離した。単離した物質と合成により生成した物質について、ペーパークロマトグラフ

ィー, 薄層クロマトグラフィー, 有機試薬による呈色反応などを行った。また IR, MNR, mass スペクトルなどの機器分析の結果, 核部は *p*-ヒドロキシアニリンであり, アミノ酸部分はグルタミン酸であることを認めた。したがって, 生理性物質は *r*-L-glutaminyl-4-hydroxybenzene (*r*-GHB) であると確認できた。

*r*-GHB は過塩素酸可溶性分の約15%を占め, マッシュルーム乾物中に 5.0~11.0mg/g 含有されており, 薬理活性を有する物質でもある。量的にも重要な成分と認められた。

マッシュルーム子実体および合成により単離した *r*-GHB について, PHA 幼若化反応に対する抑制作用を調べた。その結果 4  $\mu$ g/ml で 50%抑制した。

#### 文 献

- 1) 毛利威徳, 橋田度, 志賀岩雄, 寺本四郎: 醸酵工学会誌, 44, 248 (1966); 49, 699 (1971)
- 2) I. Chibata, K. Okumura, Y. Saito, M. Hashimoto and H. Seki: *Tetrahedron Lett.*, 4729 (1969); *Tetrahedron*, 28, 899 (1972)
- 3) A. Tsunoda, F. Suzuki, N. Sato, K. Miyazaki and N. Ishida: *Antiviral Substances*, 832 (1973)
- 4) 小松信彦, 中沢昭三, 緒方幸雄, 山本郁夫, 山本正: 醸酵協会誌. 19, 464 (1961)
- 5) 斎藤卓也, 黒川忠, 石田名香雄, 毛利威徳: 日本免疫学会要旨集, 1974, p.270
- 6) R.F. Weaver, K.V. Rajagopalan, P. Handler, D. Rosenthal and P.W. Jaffs: *J. Biol. Chem.*, 246, 2010 (1971)
- 7) J. Jadot, J. Casimir and M. Renard: *Biochim. Biophys. Acta*, 43, 322 (1960)