

キハダ水溶性多糖類の構造について

藤 原 剛*

The structure of the water soluble polysaccharides of *phellodendron amurense* Rupr.

Tsuyoshi FUJIWARA

序

キハダ (*Phellodendron amurense* Rupr.) は温帯から熱帯にかけて広く分布するミカン科の喬木で樹皮およびコルク層に黄色のアルカロイドであるベルペリンを多量に含む¹⁾。その熱水抽出物は強い苦味を呈し、薬効があるので、これを煮つめて丸薬としたものは蛇羅尼助とよばれ、胃薬として用いられて来た²⁾。またキハダは古来より黄色染め用の染料として用いられて来たが、この黄色の原因であるベルペリンには殺虫力があるので防虫加工をかねてキハダ染色が行なわれる事も多かった³⁾。

ところでキハダ染色は樹皮およびコルク層の熱水抽出液に布を浸漬することによって行なう訳であるが、この抽出液にはベルペリン以外にも多種の物質が含まれている。そのうちでも多糖類は量も多く、染色に強い影響を与えている³⁾。そこで今回はこの多糖類の性質についての研究を行なった。

実験方法と結果

これまでの研究の過程においてキハダの水溶性多糖類は産地、採取時期などによってその性質がかなり異なることが明らかになったので、今回は1979年4月(A)および1979年9月(B)に購入した二種類の染料用キハダを用いてその性質を比較しながら実験を行なった。Aは中華民国産であり、Bは国内宮崎産である。

〔I〕 水溶性多糖類の抽出

2 kg のキハダを 10 l の水に 1 夜浸漬した後沸騰浴中で 2 時間加熱した。これを熱いうちに木綿布に入れ、プレスにかけ圧搾して搾汁をとった。残査はもう一度熱水抽出を行ない同様にして搾汁をとった。両者を合し、2 倍量の冷エタノールを加え冷室中に一夜放置すると綿状の沈殿が生成した。これを集めて、70%、80%、90% 及び純エタノールに順次浸漬して脱水した。充分風乾した後 30°C で減圧乾燥した。得られた多糖類はベルペリンを多量に含み暗褐色を呈した。この着色を取り除くためメタノールを溶媒として、ソックスレー抽出器を用いて 7 日間、連続抽出を行なったが著るしい脱色は認められなかった。収量は多糖類 A では 95.5 g、B では 101.2 g で二つの多糖類の間で差はほとんどなく約 5 % であった。

〔II〕 水溶性多糖類の糖組成

得られた水溶性多糖 20 mg を 2 ml の 1N-H₂SO₄ に分散し、沸騰浴中で加熱した。加熱中は 1 時間毎に一定量を取り出しペーパークロマトグラフィーで反応液中のウロン酸

* 自然科学教室

の量をトレースしたが加熱開始後8時間で最高になり、以後減少した。これはウロン酸が遊離する量よりも分解する量の方が多くなったためである。従って加水分解時間は8時間とした。反応終了後 BaCO_3 で中和し Perry and Hulyalkar の方法⁴⁾ で分析した。すなわち中和液を 60°C で30分保温した後口過し、口液に 30 mg の NaBH_4 を加えて室温で30分攪拌した。つづいて $1\text{NCH}_3\text{COOH}$ で中和した後アンバーライト IR-120 (H^+) の小さなカラムを通した。通過液をメタノールを加えつつ減圧乾固した。残渣に 1 ml の濃塩酸を加え、加熱乾固した。この操作を3回くり返した後 P_2O_5 を入れたデシケーター中で充分乾燥した。これに TMS-HT (東洋化成) を加えて TMS 化した後 g. l. c. で分析した。カラムは3%の SE 30 をクロモソルブWにコートした 1.5 m のガラスカラムを用い 180°C で分析を行なった。結果は多糖類Aはラムノース23.41%, アラビノース25.64%, ガラクトース30.14%, ガラクチュロン酸 20.81%であった。Bではラムノース 23.40%, アラビノース27.9%, ガラクトース38.7%, ガラクチュロン酸10.0%であった。

多糖類A, Bの間ではガラフトース及びガラクトースの含量が大きく異なっておりその化学的性質はかなり異なっているものと考えられる。しかしガラクトース含量とガラクトース含量を合せたものは多糖類Aでは50.95%, Bでは48.70%でほとんど差がなかった。従って多糖類Aは初めに合成された時はBと同じものであったがその後ガラクトースが酸化を受けてガラクトン酸に変化したものと考えられる。

[2] 水溶性多糖類の物理的性質

二種類の多糖類A, Bの均一性やその高分子としての特性を調べるために DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー, Sepharose 6B によるゲルクロマトグラフィーを行なった。

1. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

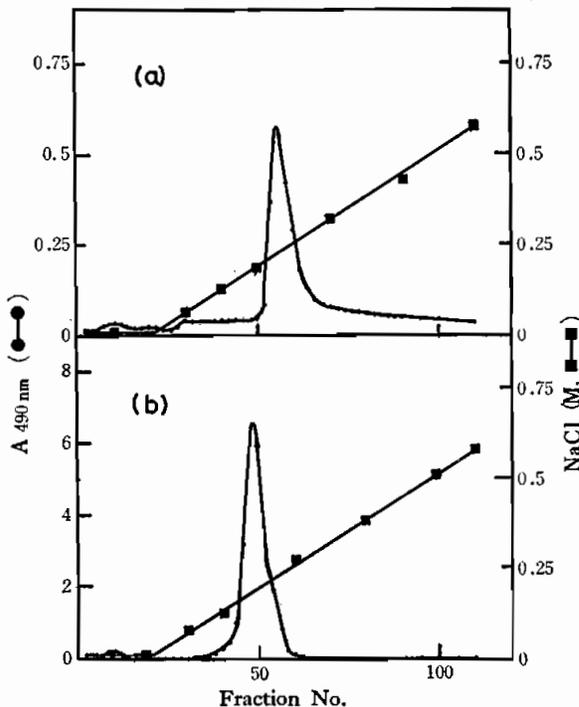


図-1 多糖類A (b), B (a) の DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

多糖類を 0.05 M Tris-HCl (pH 7.2) にとかし、あらかじめ同じバッファーで平衡化した DEAE-セルロースのカラム ($2\phi \times 14\text{ cm}$) に添加し同じバッファーの中で 0~0.6 M NaCl の直線濃度向配で溶出した。溶出液は 5 g 毎に分画し、糖濃度はフェノール-硫酸法⁵⁾, NaCl 濃度は Mohr 法⁶⁾ によって測定した。結果を図-1 に示す。

多糖類Bは 0.24 M NaCl で溶出されたが、その溶出パターンは図-1 にみられるようにならかなり鋭い単一のピークを与え、ほぼ均一な多糖類であると考えられる。また多糖類Aは同一条件下で 0.24 M NaCl 付近にごく小さなショルダーを示したが、良い均一性を示した。しかし溶

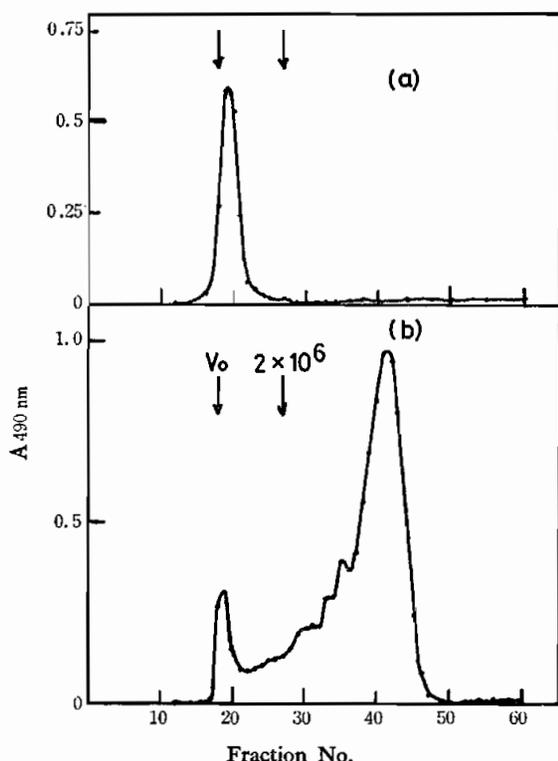


図-2 多糖類A (b), B (a) の Sepharose 6 B によるゲルクロマトグラフィー

と与えた。図-2中に↓印で示したようにマーカーに用いたブルーデキストラン2000には分子量が 2×10^6 ダルトン及び 3×10^6 ダルトン以上の巨大分子の二成分が存在するが多糖類Bはブルーデキストラン2000の 2×10^6 ダルトンの成分より早く溶出されるから、その分子量は少なくとも 2×10^6 ダルトン以上である。このように多糖類Bは極めて大きい分子量をもっている。一方多糖類Aは主として2成分からなっており、そのうちの1つは、量的には少ないが、Bと同じ位置に溶出される成分であり、他の1つは Fraction No. 40 付近に溶出される主成分である。前者はほぼ対称なピークを与えるのに反して後者はピークの形が対称でなくやや不均一である。この成分の分子量は溶出位置から $3 \sim 4 \times 10^5$ ダルトンと推定される。従って多糖類Aは生体内ではBと同じ巨大分子として存在していたものが分解をうけて分子量が $3 \sim 4 \times 10^5$ ダルトンの一群の分子となったものと考えられる。

考 察

キハダの水溶性多糖類は原料のキハダの産地や採取時間によってかなり大きく変化する。しかしこの多糖類を構成する4種の糖(ラムノース, アラビノース, ガラクトースおよびガラクトチュロン酸)のうちラムノースとアラビノースの存在割合はほぼ一定しており, ガラクトチュロン酸およびガラクトースのみが変動する。しかも気温が高く代謝の盛んな南方(中華民国)産のキハダの多糖の方がガラクトチュロン酸が多いという事は, もとの多糖類に含まれるガラクトースが酸化をうけてガラクトチュロン酸に変化したという考えとよく一致する。多糖類Aは DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーやゲルクロマトグラフ

出される NaCl 濃度はBよりかなり低く 0.19 M であった。従って多糖類AとBの間にはかなり大きな差があるものと考えられる。糖組成の分析で明らかになったように多糖類Aはガラクトチュロン酸含量が多い即ち(一)電荷が多いにもかかわらず溶出される塩濃度が低いという事はAの分子量がBに比してかなり小さいという事を示すものと考えられる。

2. Sepharose 6B によるゲルクロマトグラフィー

多糖類を 0.1 M NaCl を含む 0.05 M の Tris-HCl (pH 7.2) に溶解し, 同じバッファーで平衡化した Sepharose 6B のカラム ($3\phi \times 42$ cm) に添加し, 同じバッファーで溶出した。溶出液は 5 g 毎に分画し, 糖濃度はフェノール-硫酸法によって測定した。結果を図-2に示す。

多糖類Bは V_0 よりややおくれてほとんど単一の, 対称性の良いピーク

ィーでは分子量が多糖類Bよりかなり小さいことを示したが、この二つの分析でBは分子量の小さい成分以外にBと同じ成分の小さいピークが存在した。この事は多糖類AはBの分解産物であることを示すものである。

組成分析および二つの物理的分析の結果を合せ考えると、生体内で生成した分子量 2×10^6 ダルトン以上の多糖類(B)がその構成成分の1つであるガラクトースがガラクチュロン酸に酸化される時に(又は並行して)分子の切断、崩壊がおこり $3 \sim 4 \times 10^5$ ダルトンの分子が生じるものと考えられる。

一般に多糖類は分子量が数万~数十万ダルトンの間に存在するものが多く 10^6 ダルトンを越るような巨大分子は珍しいが、デキストラン⁷⁾ などで見られるように網目状構造をもつものがほとんどである。多糖類Bの場合もメチル化分析や超遠心分析の結果⁸⁾ などから網目状構造をもつものと考えられる。

文 献

1. 松本収, 化誌, 2 (1882) 119.
2. 藤田穆・和田桂二, 薬維, 51 (1931) 506.
3. 新井清・高沢道考, 本誌, 2 (1973) 1.
4. M. B. Perry and R. H. Hulyalkar, Can. J. Biochem., 43 (1965), 573.
5. 福井作蔵, 生物化学実験法, A-1, 東京大学出版会, 東京, 1969, p. 45.
6. L. F. Hamilton and S. G. Simpson, "Quantitative Chemical Analysis", 12 ed., MacMillan Company, New York, 1964, p. 294.
7. 江上不二雄, 多糖生化学1, 共立出版, 東京, 1969, p. 325.
8. 藤原 剛, 未発表データ.

Summary

The structures of water soluble polysaccharides were studied by the comparison of two samples obtained from two kinds of wabaku wood (*Phellodendron amurense* Rupr.) harvested at different areas. It was clarified that the original polysaccharide ($M_w > 2 \times 10^6$ dalton), formed in the plant tissues initially, was degraded into the smaller fragments having M_w of $3 \sim 4 \times 10^5$ dalton by the accompaniment of the oxidation of galactose to galacturonic acid.