

マッシュルームの遊離アミノ酸分布

中 塚 敏 之

(栄養学研究室)

Distribution of Free Amino Acids in Mushroom (*Agaricus bisporus*)

Toshiyuki NAKATSUKA

結 言

自然界に存在するアミノ酸の大部分は、アミノ基とカルボキシル基が共に α 位の炭素と結合した α -アミノ酸であるが、アミノ基とカルボキシル基が、別の炭素と結合したのも存在する。それらのうち結合位置が炭素鎖の両端にあるものを、一般に ω -アミノ酸と総称している。

北岡らは、フェノールと次亜塩素酸ナトリウムを用いる ω -アミノ酸の高感度比色定量法(フェノール法)¹⁾およびこの反応を利用した薄層クロマトグラフィーによる ω -アミノ酸の分析法²⁾について報告している。

著者は、このフェノール法を一般的なアミノ酸の比色定量法であるニンヒドリン法と組み込んだ自動分析装置(ω -アミノ酸自動分析装置)³⁾について報告した。

本報では、この装置を用いて市販のマッシュルームに含まれる遊離アミノ酸種の検索を行った。

さらにアスパラギン酸よりも速く溶出するフェノール法陽性物質をイオン交換樹脂で分離、精製し、その同定を試みた。

実験材料と実験方法

1. マッシュルームの遊離アミノ酸の抽出

市販のマッシュルームの子実体5kgを80%エタノール中で、ワーリングブレンダーを用いて磨砕し、残渣を遠心除去(9000 rpm, 15 min)した。上澄液を濃縮し、エーテルで数回脱脂を行った後、減圧濃縮により、エーテルを除き、pH 2~2.2, 0.2Nクエン酸緩衝液に溶解して分析試料(100 ml)とした。

2. アミノ酸の自動分析

前報³⁾の ω -アミノ酸自動分析装置を用いた。

3. 薄層クロマトグラフィー

北岡らの方法、に従い、口紙粉末:アルミナ:水(2:1:10)をワーリングブレンダーでかく拌し20×20 cmのガラスプレートに厚さ0.25 mmの薄層を作製した。使用直前に110℃で15分間活性化したものを用いた。n-ブタノール:酢酸:水(4:1:2)を溶媒として展開し、風乾後5%フェノール水と有効塩素量5%の次亜塩素酸ナトリウムを順次噴霧し100℃で5分間加熱、発色させた。

実験結果

1. マッシュルームに含まれる中・酸性遊離アミノ酸の自動分析

Fig. 1は試料溶液(A)およびその加水分解物(B)を長カラム(58×0.9 cm)で分析した結果である。

この分析条件では溶出されない塩基性アミノ酸(リジン, ヒスチジン, アルギニン)を除いたすべてのタンパク質構成アミノ酸がマッシュルーム抽出液中に遊離アミノ酸として存在した。加水分解後のアスパラギン酸とグルタミン酸のピークの増大はアスパラギンとグルタミンのアמידが加水分解により変化したものである。

アスパラギン酸, グルタミン酸(アスパラギン, グルタミンを含む)とアラニンが多く、特にグルタミン酸(グルタミンを含む)が大量に含まれておりこれはシイタケや前報³⁾の野生キノコの分析結果と一致し、キノコの味

の良さに関係していると考えられる。

加水分解前ではアスパラギン酸より速い溶出位置に P-1 と P-2 の 2 つのピークが検出された。

P-1 はニンヒドリンとフェノール法のどちらにも陽性であったが、P-2 はフェノール法で陰性であった。加水分解後の試料にも P-1 は存在したが P-2 は消失した。従って P-1 は遊離アミノ酸であり、P-2 はペプチドもしくは酸により分解されやすい物質と考えられる。

非タンパク質構成アミノ酸の内、 ω -アミノ酸は、 β -アラニンと γ -アミノ酪酸 (GABA) が同定された。

2. 酸性画分中のフェノール法陽性物質の分離、精製

イオン交換樹脂 2 種類を用いて P-1 の精製を行った。試料溶液を加水分解して P-2 を除き、強酸性樹脂ダウエックス 50 (70×5 cm, Na⁺型) を通し中性および塩基性アミノ酸を除いた。

非吸着および水洗画分 (3 l) を濃縮し、弱塩基性樹脂アンバーライト IR-4 B (70×3 cm, Cl⁻型) に吸着させた。水洗後 1N 塩酸 3 l, さらに 2N 塩酸 3 l を流した。

1N 塩酸により、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシンが除去されたが P-1 の溶出は認められなかった。2N 塩酸で溶出した画分の自動分析結果を、Fig. 2 (A) に示す。P-2 は完全に除かれているが、まだ、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシンの存在が認められ、P-1 の精製が不充分であることが判った。

そこでこの画分を濃縮し、ダウエックス 50 (50×2 cm, H⁺型) に通し、非吸着および水洗画分 (3 l) を集め、濃縮した。

濃縮液の分析結果を Fig. 2 (B) に示す。図のように P-1 はほぼ精製されたことを示している。

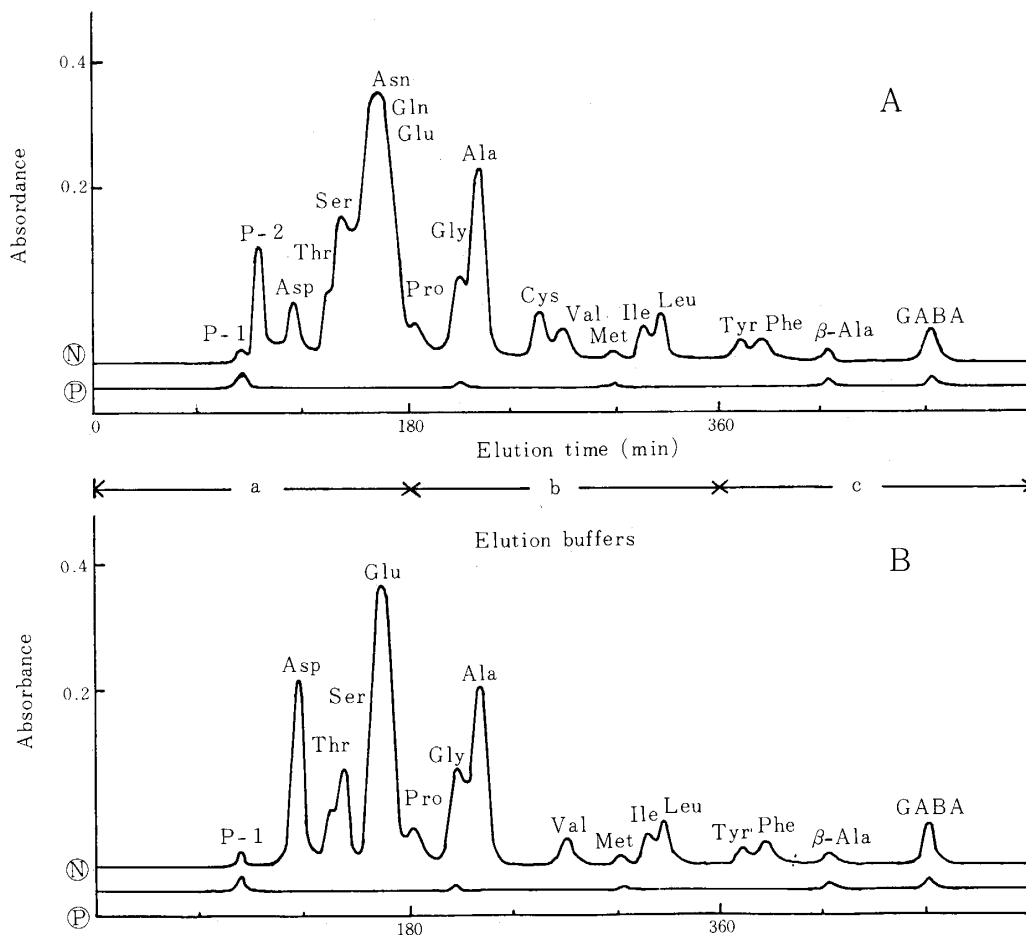


Fig. 1. Chromatography of Free Amino Acids in Mushroom (*Agaricus bisporus*).

The column (58×0.9cm) containing Aminex A-4 maintained at 52°C. Elution buffers : a, pH 3.25, 0.2N Na citrate ; b, pH 4.25, 0.2N Na citrate ; c, pH5.28, 0.35N Na citrate. Coloring reagent ; N, ninhydrin ; P, phenol-Na ClO. A, before hydrolysis ; B, after hydrolysis. GABA : γ -aminobutyric acid.

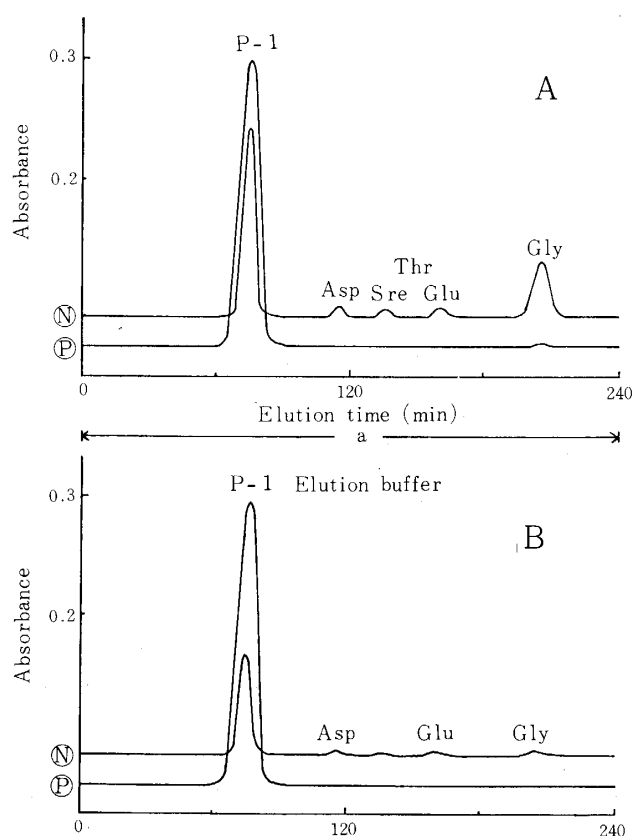


Fig. 2. Chromatography of Purified Peak-1.

The column (58×0.9 cm) was maintained at 52°C. Elution buffer : a, pH 3.25 0.2N Na citrate. Coloring reagents : N, ninhydrin ; P, phenol-Na ClO. A, Amberlite IR 4 B (70×3 cm, Cl⁻ form) 2N HCl eluate B, Dowex 50 (50×2 cm, H⁺ form) effluent.

このP-1の溶出位置は、既知のフェノール法陽性物質の、*o*-ホスホエタノールアミン、タウリン、シリアチンの溶出位置と一致するが、これらの物質はいずれもフェノール法よりニンヒドリン法のピークが高いのに対して、P-1は精製されるにつれてフェノール法のピークが高くなった。

3. 薄層クロマトグラフィー

自動分析装置で酸性画分に溶出される既知のフェノール法陽性物質には、*o*-ホスホエタノールアミン、タウリン、シリアチン、尿素等がある。これらの物質および精製したP-1の薄層クロマトグラムをFig. 3に示す。

o-ホスホエタノールアミンとシリアチンは原点から移動せず、P-1とタウリンのスポットのRf値は一致するが、P-1の発色は黄緑色であるのに対して、タウリンを含む他の物質はすべて青色のスポットであった。

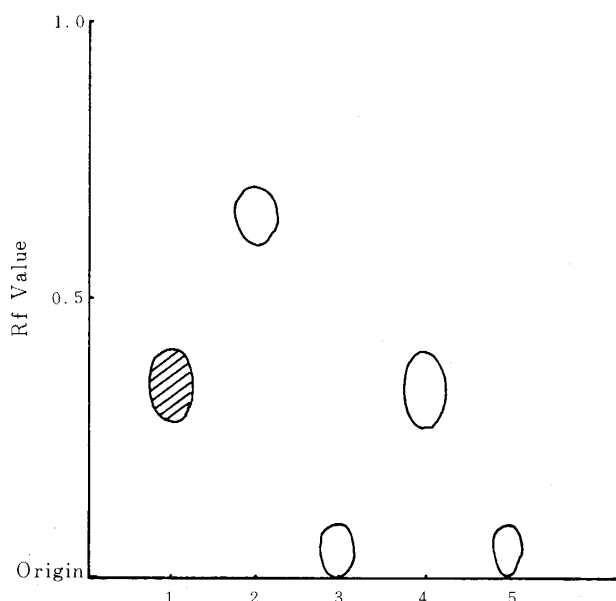


Fig. 3. Thin Layer Chromatography of Peak-1.

Solvent : *n*-butanol : acetic acid : water (4:1:2) Color developing was carried out by spraying 5% phenol and 5% Na ClO solution and then heating at 100°C for 10 minutes.

1, Peak-1 ; 2, Urea ; 3, *o*-Phosphoethanolamine ; 4, Taurine ; 5, Ciliatine.

Yellow Green ; Blue.

考 察

非タンパク構成アミノ酸は、動植物界に広く分布し、特に植物中から分離されたものが多い。

しかし、現在までに分離された ω -アミノ酸は約10種で、 β -アラニンと γ -アミノ酪酸はほとんどの動植物中に存在し、 β -アラニンはヒスチジンのジペプチド(アンセリン、カルノシン)が骨格筋から分離されている⁽⁶⁾。

胆汁から分離されたタウリンは動物組織と植物では海藻⁽⁷⁾にのみ広く分布して陸上の高等植物中には存在しない。

自然界で最初に発見されたC-P結合のシリアチンは原生動物⁽⁸⁾や腔腸動物⁽⁹⁾あるいは、哺乳類の脳や内臓から分離されているが、植物中から分離された報告はない。

著者らがすでに報告した2, 3の野生キノコの分析結果⁽³⁾で、アスパラギン酸より速い溶出位置にある未知のフェノール法陽性物質のピークを認めたが、マッシュルームでも同様のピーク(P-1)が認められた。このP-1は酸加水分解(5.7N塩酸, 108°C, 12hr.)しても溶出位置が変化せず、遊離アミノ酸と推定される。アミノ酸自動分析ではその溶出位置が、タウリンおよびシリアチンと一致したが、ニンヒドリン法とフェノール法のピークの高さが、これらの既知の ω -アミノ酸とは異なり、フェノール

法でのピークの方が高くなった。さらに薄層クロマトグラフィーでは、タウリンと同じRf値であったがスポットの色がタウリンは青色であるのに対してP-1は黄緑色に発色した。

笠井⁽¹⁰⁾らは緑豆の酸性画分からN-カルボキシ・メチル・ β -アラニンを単離しているがこの化合物は、 β -アラニンのアミノ基をカルボキシ・メチルがマスクしており、フェノール法では発色しない。

これらの点から、マッシュルームに存在するフェノール法陽性物質のP-は強酸性官能基をもつ未知のアミノ酸の可能性が強い。

終りにあたり、本稿のご校閲をいただいた島根大学農学部農芸化学科助教授鈴木喜六博士に深謝いたします。

- (1) S. Kitaoka and Y. Nakano : *J. Biochem.*, **66**, 87 (1967).
- (2) *idem*; *Bull. Univ. Osaka Pref.*, Ser. **B**, **23**, 19 (1971).
- (3) 中塚敏之, 中野長久, 北岡正三郎 : *農化.*, **50**, 363 (1976).
- (4) R. L. M. Synge : *Biochem. J.*, **48**, 429 (1976)
- (5) S. Udenfriend : *J. Biol. Chem.*, **187**, 65 (1950)
- (6) W. J. Reddy D. M. Hegsted : *J. Biol. Chem.*, **237**, 705 (1962).
- (7) E. G. Young and D. G. Smith : *J. Biol. Chem.*, **233**, 406 (1958).
- (8) M. Kandatsu and M. Horiguchi : *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 721 (1962).
- (9) J. S. Kittredge, E. Roberts and D. G. Simonsen : *Biochemistry.*, **1**, 624 (1962).
- (10) T. Kasai, S. Sakamura and R. Sakamoto : *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 1603 (1971).

(昭和58年1月8日受理)