

## クロレラの細網内皮系賦活多糖について

鶴飼茂夫<sup>a)</sup>, 木方正<sup>a)</sup>, 永井勝幸<sup>a)</sup>, 田畑肇<sup>a)</sup>, 原千尋<sup>a)</sup>

岐薬紀要 (1990) 39 : 44-48

**要約:** クロレラ藻体 (*Chlorella pyrenoidosa*) より単離した二種の多糖 CP-I ( $[\alpha]_D^{20} + 22.1^\circ$ ) と CP-II ( $[\alpha]_D^{20} + 63.5^\circ$ ) は, ゲル濾過で均一なパターン, そしてガラス繊維濾紙電気泳動で単一なスポットを示した。分子量はゲル濾過によって, CP-I, 38000; CP-II, 2800 と推定された。CP-I では glucose, fucose, rhamnose, galactose, mannose が 8.8 : 4.8 : 1.8 : 1.5 : 1.0 のモル比で, そして CP-II では glucose, galactose, rhamnose, mannose が 18.3 : 4.7 : 3.0 : 1.0 のモル比で構成されていた。メチル化分析, スミス分解, 及び  $^{13}\text{C}$ -NMR の結果から, CP-II は, 主として  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4 結合の D-glucopyranose 残基, 1 $\rightarrow$ 4,6 結合の D-glucopyranose の分岐糖, 及び 1 $\rightarrow$ 2,4 結合の L-rhamnopyranose 分岐糖よりなり, そして少量の 1 $\rightarrow$ 2 結合の D-mannopyranose (1 $\rightarrow$ 3 結合の D-glucopyranose) 残基と共に, 非還元末端の D-galacto-, D-gluco(manno) pyranose 残基からなることが示された。両多糖は carbon-clearance 法において有意な細網内皮系賦活作用を示した。

**索引用語:** クロレラ, *Chlorella pyrenoidosa*, 多糖, 中性ヘテログルカン, 細網内皮系, 貪食能活性

## A Reticuloendothelial System-Activating Polysaccharides from Chlorella Cells

SHIGEO UKAI<sup>a)</sup>, TADASHI KIH<sup>a)</sup>, KATSUYUKI NAGAI<sup>a)</sup>, HAJIME TABATA<sup>a)</sup>,CHIHIRO HARA<sup>a)</sup>

Ann. Proc. Gifu Pharm. Univ. (1990) 39 : 44-48

**Abstract:** Two polysaccharides, CP-I ( $[\alpha]_D^{20} + 22.1^\circ$ ) and CP-II ( $[\alpha]_D^{20} + 63.5^\circ$ ), isolated from *Chlorella* cells (*Chlorella pyrenoidosa*), showed homogeneous patterns on gel filtration, and one spot on glass-fiber electrophoresis. The molecular weights were estimated by gel filtration to be 38000 for CP-I and 2800 for CP-II. CP-I was composed of glucose, fucose, rhamnose, galactose and mannose in the molar ratios of 8.8 : 4.8 : 1.8 : 1.5 : 1.0, and CP-II was composed of glucose, galactose, rhamnose and mannose in the molar ratios of 18.3 : 4.7 : 3.0 : 1.0. The results of methylation analysis, Smith degradation and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy indicated that CP-II was chiefly composed of  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 4) linked D-glucopyranosyl residues, branched, (1 $\rightarrow$ 4,6) linked D-glucopyranosyl and (1 $\rightarrow$ 2,4) linked L-rhamnopyranosyl residues, and contained non-reducing terminal, D-galacto- and D-gluco(manno) pyranosyl residues, together with small amounts of (1 $\rightarrow$ 2) linked D-mannopyranosyl ((1 $\rightarrow$ 3) linked D-glucopyranosyl) residues. Both polysaccharides showed reticuloendothelial system-potentiating activity in a carbon-clearance test.

**Keyphrases:** *Chlorella*, *Chlorella pyrenoidosa*, polysaccharide, neutral heteroglycan, reticuloendothelial system, phagocytic activity

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 19, 1990

The Annual Proceedings of Gifu Pharmaceutical  
University

ISSN 0434-0094, CODEN : GYDKA 9

クロレラの藻体及び熱水抽出物について抗腫瘍作用，血圧降下作用，抗高脂血清作用等，種々の生物活性並びに生理作用が報告され，健康食品として注目されている。クロレラにはタンパク質，アミノ酸，核酸，多糖類等の糖質，糖タンパク質，ビタミン等が含まれていることが知られており，そのうち免疫系における細網内皮系賦活物質として多糖があげられているが，その本体については不明な点が残っている。

小島ら<sup>1)</sup>は *Chlorella ellipsoidea* の熱水抽出物中の多糖体が細網内皮系貪食能抗進作用を有することを認め，その多糖体は分子量約1400の(1→3)-β-D-glucan (窒素 0.9%含有)であると報告した。その後，水野ら<sup>2)</sup>は，ある種のクロレラ(クロレラ藻体の品種不明)から，細網内皮系抗進因子として分子量約1800のα(1→6)分岐の(1→4)-α-D-glucan，すなわち低分子のグリコーゲン様多糖体を見出ししている。このような両者の相違については研究材料に用いたクロレラ藻体の種類の差異によるものか興味がある点である。

今回は，我々はクロレラ (*Chlorella pyrenoidosa* Malaysia) の熱水抽出画分中に含まれる二種の中性多糖 (CP-I, CP-II) の分離精製及びそれらの化学的性質，CP-II では化学構造についても検討した。さらに両多糖の細網内皮系貪食能活性について調べた。

## 実験の部

**実験材料** クロレラ (*Chlorella pyrenoidosa* Malaysia) 乾燥藻体 (1.1 kg) の熱水抽出 (10 l, 80°C, 6時間) 液の凍結乾燥品 (収量: 94 g, (株)日健総本社より供与) を使用した。

**抽出精製** 上記の凍結乾燥品 (40 g) をソックスレー抽出器を用いてメタノール (1.5 l, 沸騰水浴中60時間) にて抽出した。この抽出残渣 (31 g) を水 (300 ml) に懸濁し，水可溶性画分を遠心分離によって集め，プロナーゼ消化<sup>3)</sup>，Sevag法<sup>4)</sup> にて除タンパクした。Sevag 法の水層画分 (3.3 g) を DEAE-Sephadex A-25 (リン酸型) の陰イオン交換カラム (2.6×40 cm) に添加し，0.1N リン酸緩衝液 (pH 6.1) で溶出して中性糖画分を分取した。これを Sephadex G-100カラム (0.1M NaCl, 1.5×98 cm) のゲル濾過によって，高分子量画分 (CP-I) と低分子量画分 (CP-II) の多糖に分画し，それぞれを凍結乾燥品として得た。

**ガラス繊維濾紙電気泳動** Whatman GF-81 (10×40 cm) のガラス繊維濾紙を用いて，0.05M ホウ酸緩衝液中 (pH 9.3)，7.5 V/cm，2.5時間泳動し，α-ナフトール硫酸試薬<sup>5)</sup> で発色させた。

**ゲル濾過** ゲル濾過は 0.1M NaCl 中，Sephadex G-50及び Sephadex G-100のカラム (1.5×98 cm) で行い，フェノール硫酸法<sup>6)</sup> にて定量した。標準デキストラン (ファルマシア社) の溶出位置から，それぞれの検量線を作成し，各分子量を算出した。<sup>3)</sup>

**C-13核磁気共鳴 (<sup>13</sup>C-NMR) スペクトル** 試料を DMSO-d<sub>6</sub> に溶解し，日本電子 JEOL GX-270 で室温にて測定した。

**構成糖** 多糖を加水分解 (1M 硫酸，100°C，8時間) して生じた単糖を，ペーパークロマトグラフィー (PPC) 並びに alditol acetate としてガスクロマトグラフィー (GC) にて分析した。<sup>7)</sup>

**過ヨウ素酸酸化、スミス分解** 試料 (11 mg) を10mM メタ過ヨウ素酸ナトリウム (40 ml) で5°C，暗所にて攪拌し，経時的に過ヨウ素酸の消費量を滴定法<sup>8)</sup> にて測定した。10日目にエチレングリコールで反応を停止させた後，水素化ホウ素ナトリウムで還元してポリアルコールを得た。これを加水分解 (1M 硫酸，100°C，6時間) 後，還元，アセチル化して3% ECNSS-M カラム (昇温) にて GC 分析した。<sup>9)</sup>

**メチル化分析** 試料を箱守法<sup>10)</sup> に従ってメチル化し，完全メチル化は IR スペクトルにおける水酸基の吸収消失によって確認した。完全メチル化多糖を90%ギ酸 (100°C，5時間)，ついで0.25M 硫酸 (100°C，10時間) で加水分

解した。酸を炭酸バリウムで中和した後、alditol acetate 誘導体として、既報<sup>9)</sup>に記したように、GC 及び GC-質量スペクトロメトリー (GC-MS) にて分析した。

**貪食能の測定** ddY 系雄性マウス (4 週令) を用い、carbon-clearance 試験を行い、血中 carbon 半減消失時間で表示した。対照薬として zymosan (東京化成) を使用した。<sup>7)</sup>

### 結果と考察

クロレラ藻体の熱水抽出物をメタノールで脱脂後、その水可溶性画分を除タンパク操作、陰イオン交換カラムにて精製し、さらにゲル濾過によって高分子量画分多糖 (PC-I) と低分子量画分多糖 (CP-II) を、それぞれ収率 0.35%, 0.25% で得た。両多糖は、それぞれ、ゲル濾過で均一なパターン並びにガラス繊維濾紙電気泳動で均一なスポットを示した (Fig. 1, Fig. 2), 分子量はゲル濾過によって CP-I, 38000; CP-II, 2800 と推定された。比旋光度は、CP-I,  $[\alpha]_D^{20} +22.1^\circ$  (水); CP-II  $[\alpha]_D^{20} +63.5^\circ$  (水) であり、構成糖は、加水分解物の PPC 及びその alditol acetate 誘導体として GC 分析の結果より、CP-I では glucose, fucose, rhamnose, galactose, mannose のモル比が 8.8:4.8:1.8:1.5:1.0 で、CP-II では glucose, galactose, rhamnose, mannose のモル比が 18.3:4.7:3.0:1.0 で存在し、そして窒素をそれぞれ 1.65%, 1.26% (元素分析より) 含むことが示された。

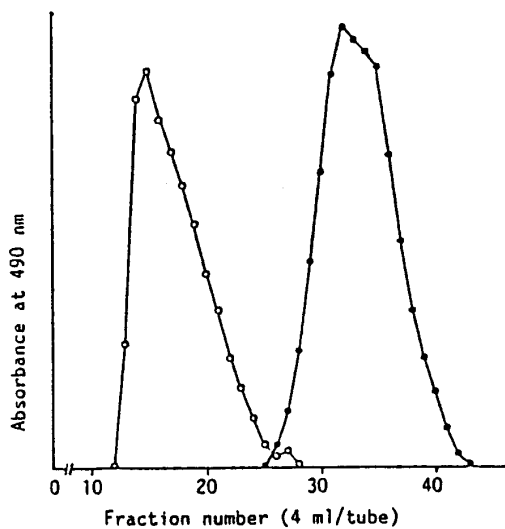


Fig. 1 Chromatogram of CP-I and CP-II on Sephadex G-100

The column (1.5×98 cm) was eluted with 0.1M NaCl. CP-I, -○-; CP-II, -●-

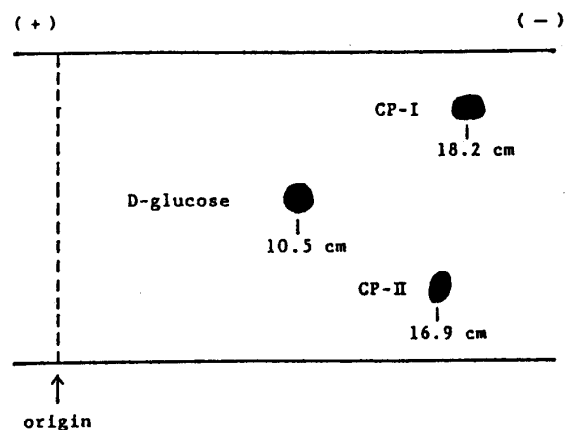


Fig. 2 Glass-Fiber Paper Electrophoretic Pattern of CP-I and CP-II

CP-II の化学構造を解析するためメチル化分析を行った。箱守法にて完全メチル化後、メチル化多糖を加水分解し、alditol acetate 誘導体として GC 及び GC-MS にて分析した。各メチル化単糖は GC における相対保持時間並びに GC-MS におけるマスフラグメントを、標品または文献値<sup>11)</sup>との比較によって同定した。Table 1 に示すように、非還元末端には D-glucopyranose (Glc<sub>p</sub>) と D-galactopyranose (Gal<sub>p</sub>) と微量の D-rhamnopyranose (Rhap) の残基が存在し、分岐糖としては 4,6 位分岐 Glc<sub>p</sub>, 2,4 位分岐 L-rhamnopyranose (Rhap) 残基、そして多量の 1→4 結合 Glc<sub>p</sub> 残基が存在し、少量の 1→2 結合 D-mannopyranose (Man<sub>p</sub>) 残基の存在が示された。そして微量の 1→3 結合 Glc<sub>p</sub> 残基と非還元末端の Man<sub>p</sub> 残基が存在すると推定された。

CP-Ⅱを冷暗所で過ヨウ素酸酸化した結果，10日間で糖残基当り 0.73 mol の過ヨウ素酸を消費した。次に，この過ヨウ素酸酸化多糖を水素化ホウ素ナトリウムで還元してポリアルコールとし，これを酸加水分解した（スミス分解）。スミス分解物を還元，アセチル化して GC 分析すると，glycerol, erythritol, Rha が同定された。erythritol, Rha は，メチル化分析で示された，1→4 結合の Glc $\beta$  と 2,4 分岐 Rha $\beta$  の存在をそれぞれ支持している。

Table 1 GC and GC-MS of Alditol Acetates derived from Permethylated CP-Ⅱ

Methylated sugar (as alditol acetate)	Relative retention time <sup>a)</sup>	Main mass-fragment ( <i>m/z</i> )	Molar ratio	Mode of linkage
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Glc (Man)	1.00	43, 45, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205	0.90	Glc $\beta$ (1→
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	1.23	43, 45, 71, 87, 101, 117, 129, 145, 161, 205	1.00	Gal $\beta$ (1→
3-Me-Rha	1.43	43, 87, 101, 129, 143, 203	0.99	→2,4)Rha $\beta$ (1→
2,4,6-Me <sub>3</sub> -Glc } 3,4,6-Me <sub>3</sub> -Man } <sup>b)</sup>	2.07	43, 45, 87, 99, 101, 117, 129, 161, 181	0.24	→3)Glc $\beta$ (1→ →2)Man $\beta$ (1
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	2.73	43, 45, 87, 99, 101, 113, 117, 233	3.36	→4)Glc $\beta$ (1→
2,3-Me <sub>2</sub> -Glc	6.24	43, 101, 117, 261	0.40	→4,6)Glc $\beta$ (1→

a) Relative to 1,5-di-*O*-acetyl-2,3,4,6-tetra-*O*-methyl-D-glucitol, 3% ECNSS-M on Gaschrom Q at 170°C.

b) Overlapping peak.

CP-Ⅱの <sup>13</sup>C-NMR スペクトルにおいて<sup>12)</sup> アノマー領域の 100.4, 101.1ppm に強いシグナルが観察されたことより， $\alpha$ -1→4 結合の Glc $\beta$  残基の存在が推定され， $\alpha$ -D 結合は IR スペクトルの 858cm<sup>-1</sup> の吸収からも支持される。一方，103.6ppm にもシグナルが認められたことより， $\beta$ -D 結合も混在するものと思われる。

以上の結果より，クロレラ (*C. pyrenoidosa*) より単離した中性多糖 CP-Ⅰ，CP-Ⅱ は分子量が，それぞれ38000, 2800の Glc を主構成糖とする中性ヘテログリカンであることが示された。低分子量の CP-Ⅱ の化学構造は，主として，一部が6位で分岐した $\alpha$ 1→4 結合 Glc $\beta$  鎖，及び非還元末端の Glc $\beta$ (Man $\beta$ ) と Gal $\beta$  残基，そして2あるいは4位分岐 Rha $\beta$  残基からなり，更に1→2 結合 Man $\beta$  残基，1→3 結合 Glc $\beta$  残基の存在も推定された。

生体の免疫系における防御機構，癌免疫との関係からも，細網内皮系賦活物質は興味をもたれており，今回単離した2種のクロレラ多糖について carbon-clearance 法にて検討した。Table 2 に示すように，CP-Ⅰ並びに CP-Ⅱ は有意な活性を示した。

小島ら<sup>1)</sup>は *C. ellipsoidea* に低分子量の細網内皮系賦活作用を有する (1→

Table 2 Effect of the Polysaccharides on the Clearance Rate of Carbon from the Circulating Blood of Mice

Treatment <sup>a)</sup>	Dose (mg/kg)	Clearance of Carbon <sup>b)</sup> (t <sub>1/2</sub> , min)
Control (Saline)		11.04±1.19
CP-Ⅰ	50	6.25±0.43 <sup>c)</sup>
CP-Ⅱ	50	6.70±0.29 <sup>d)</sup>
Zymosan	50	8.24±1.28

a) Test substances were treated with *i.p.* at 48h before the *i.v.* injection of carbon solution. Each group consisted of 5 mice.

b) Each value represents the mean ± S. E. Significant difference from the control (c) *p*<0.01, d) *p*<0.05).

3)- $\beta$ -D-glucan 様の多糖の存在を報告している。一方、水野ら<sup>2)</sup>はクロレラ(種不明)より多糖を数種分離しており、そのうち重合度10の低分子量多糖体は CP-II と同様に Glc, Gal, Man, Rha から構成されるが、ほとんどは  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 6)分岐(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-glucan からなるデンプン様構造であり、CP-II とも若干相違していた。今回用いた *C. pyrenidosa* に関しては、White & Barber<sup>13)</sup>はその細胞壁から分離した酸性ヘテログリカン、また Olaitan & Northcote<sup>14)</sup>はヘミセルロースについて報告している。今回、我々が分離した中性ヘテログリカン以外にも熱水抽出物中には数種の酸性多糖画分(DEAE-Sephadex 吸着画分)等があり、それらの解明については今後の課題である。

本研究は、クロレラの生理活性及び多糖の構造活性相関に関する考察に知見を与えるものと考えられる。

謝辞 試料を提供して戴いた(株)日健総本社、代表取締役社長 田中美穂氏に深謝いたします。

#### 引用文献

- 1) 小島 瑞, 猪野 茂, 高瀬信夫, 宍戸教治, 小林清三郎, 土橋睦夫, 渡辺兼男, 農化, **46**, 373 (1972); M. Kojima, K. Shishido, S. Kobayashi, M. Dobashi, S. Ito, *J. Reticuloendothel. Soc.*, **14**, 192 (1973).
- 2) 水野 卓, 金光健宅, 碓氷泰市, 白石広行, 長谷川 節, 新保国弘, クロレラ工業研究年報, **3**, 9 (1980); 水野 卓, 牛山正志, 碓氷泰市, 長谷川 節, 新保国弘, クロレラ工業年報, **3**, 23 (1980); 水野 卓, 碓氷泰市, 牛山正志, 松枝 澄, 新保国弘, 長谷川 節, 小林清三郎, 新海健吉, 荒川順生, 静岡大学農学部研究報告, **30**, 51 (1980).
- 3) T. Kiho, I. Miyamoto, K. Nagai, S. Ukai, C. Hara, *Carbohydr. Res.*, **181**, 207 (1988).
- 4) M. G. Sevag, *Biochem. Z.*, **273**, 419 (1934).
- 5) H. Jacin, A. R. Mishkin, *J. Chromatogr.*, **18**, 170 (1965).
- 6) M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 7) T. Kiho, M. Ito, K. Nagai, C. Hara, S. Ukai, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4286 (1987).
- 8) P. F. Fleury, J. Lange, *J. Pharm. Chem.*, **17**, 107 (1933).
- 9) T. Kiho, H. Tabata, S. Ukai, C. Hara, *Carbohydr. Res.*, **156**, 189 (1989).
- 10) S. Hakomori, *J. Biochem.*, **55**, 205 (1974).
- 11) H. Björndal, C. G. Hellerqvist, B. Lindberg, S. Svensson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **9**, 610 (1970).
- 12) J. H. Bradbury, G. A. Jenkins, *Carbohydr. Res.*, **126**, 125 (1984).
- 13) R. C. White, G. A. Barber, *Biochim. Biophys. Acta.*, **264**, 117 (1972).
- 14) S. A. Olaitan, D. H. Northcote, *Biochem. J.*, **82**, 509 (1962).