

杜仲葉の炭水化物組成

Carbohydrate composition of the leaves of *Eucommia ulmoides*

加 藤 陽 治*

Yoji KATO*

論文要旨

杜仲葉の炭水化物組成を調べた。杜仲葉乾燥重量の22.5%が単糖・オリゴ糖で、18.5%が細胞壁を構成する多糖類であった。前者はグルコース、フルクトースおよびスクロースであり、その割合が58：8：34であった。後者のペクチン様物質、ヘミセルロースおよびセルロースの割合は51：27：22であった。ペクチン様物質画分はアラビナン、ガラクトン、あるいはアラビノガラクトンを側鎖として有するラムノガラクトンが主要多糖であった。ヘミセルロース画分は酸性アラビノキシランとキシログルカンが主要で、一部中性糖側鎖の少ないラムノガラクトンが含まれていた。

キーワード：杜仲葉，ラムノガラクトン，キシログルカン，酸性アラビノキシラン

1. 緒言

杜仲（トチュウ，*Eucommia ulmoides*）は中国の四川省辺りが原産地で、トチュウ科トチュウ属トチュウという1科1属1種の非常に珍しい樹木である¹⁾。樹皮は中国で古くから生薬として用いられ、その効能は利尿、強壮、降圧、強精作用等であるとされている²⁾。その成分としてリグナン類（pinoresinol diglucoside, syringaresinol diglucosideなど）およびイリドイド類（geniposideなど）などが報告されている³⁻⁸⁾。また、杜仲の葉にも同様な薬理作用があることが示唆されている²⁾。また、杜仲の生理活性として抗酸化活性^{9,10)}、抗HIV活性^{11,12)}、およびコラーゲンの分解・合成能力の向上^{13,14)}なども報告されている。さらに、杜仲樹皮から熱水で抽出され、アラビノース、ガラクトース、グルコース、ラムノースおよびガラクトン酸が8：6：4：5：8から構成される多糖に免疫系賦活性があることが報告されている^{15,16)}。このように種々の有効成分をふくむ杜仲の葉からは杜仲茶が作られ市販されている。一方、地域によっては、杜仲葉をそのまま天ぷらなどとして食に供している。杜仲葉に含まれる成分には、上述リグナン類、イリドイド類のほかにグッタペルカとよばれるガム状物質の存在も知られている。しかし、杜仲の葉の炭水化物については十分な研究がなさ

れていない。葉そのものの利用を考えると、杜仲葉に含まれる炭水化物全体について把握することも重要であると考えられる。そこで、本研究では杜仲葉に含まれる炭水化物の全容を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

1) 材料

秋田県中仙町にて、6月初旬に杜仲の葉を7枚（生重量：13.562g）採取した。これを凍結乾燥後、乳鉢で摩砕した。収量は3.972gであった。

2) 杜仲葉粉末中の炭水化物の抽出と分画

2-1) 単糖・オリゴ糖の抽出

杜仲葉粉末（3.972g）に300mlの80%エタノールを加え100℃で2時間加熱した。冷却後、遠心操作（5,000rpm, 30分間）を行い上清と沈殿に分け、沈殿はさらに300mlの80%エタノールで同じ操作を繰り返した。遠心沈殿はアセトン洗浄後乾燥して「80%エタノール不溶性画分」（収量：2.344g）とした。遠心上清画分はアセトン洗浄液と一緒に濃縮乾固した。これを蒸留水に溶解し遠心操作（5,000rpm, 30分間）を行い、可溶性画分を「単糖・オリゴ糖画分」とした。

* 弘前大学教育学部家政学科教室

Department of Home Economics, Faculty of Education, Hirosaki University

2-2) 多糖の抽出分画

80%エタノール不溶性画分(2.344g)は常法¹⁷⁾に従って、0.25%シュウ酸アンモニウム(100°C, 2~3時間, 3回), 4%および24%水酸化カリウム(それぞれ, 室温, 20~24時間, 2回)で順次抽出分画を行い、ペクチン様物質(PS), ヘミセルロース-I(HC-I), ヘミセルロース-II(HC-II)画分を得た。最終抽出残渣をセルロース(CL)画分とした。ペクチン様物質画分は、透析操作により透析膜内液の高分子画分(PS-H)と透析膜外液の低分子画分(PS-L)に分けた。

2-3) PS-HのDEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィー

PS-H(104.7mgグルコース相当量)を28mlの20mM酢酸緩衝液(pH5.0)に溶解、遠心操作(3,000rpm, 30分)にて不溶物を除去し、上清を同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-25カラム(3×7cm)にのせた。まず、240mlの20mM酢酸緩衝液(pH5.0)で溶出した。次に、200mlの同緩衝液と200mlの1.0M塩化ナトリウムを含む同緩衝液を用いて、塩化ナトリウムの濃度勾配(0~1.0M)による溶出を行った。引き続き150mlの1.0M塩化ナトリウムを含む20mM酢酸緩衝液(pH5.0)で溶出した。その後、300mlの0.5M水酸化ナトリウムでの溶出を行った。溶出液は10mlずつフラクションコレクターで試験管に集め、その中から適量とりフェノール・硫酸法¹⁸⁾にて全糖量(Absorbance at 490nm)およびカルバゾール・硫酸法¹⁹⁾にて酸性糖量(Absorbance at 530nm)を測定した。試験管番号3~8, 31~39, 40~47, 80~83, および84~92をそれぞれ集め、PS-H-I, PS-H-II, PS-H-III, PS-H-IV, およびPS-H-V画分とした。PS-H-I~PS-H-IIIはそのまま, PS-H-IVとPS-H-Vは酢酸で中和後、脱塩水に対して透析し、透析内液を凍結乾燥した。

PS-H-III(20mg)を2mlの20mM酢酸緩衝液(pH5.0)に溶解、遠心操作(3,000rpm, 30分)にて不溶物を除去した後、上清を同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-25カラム(1.8×10cm)にのせた。まず、50mlの20mM酢酸緩衝液(pH5.0)で溶出した。次に、200mlの同緩衝液と200mlの1.0Mの塩化ナトリウムを含む同緩衝液を用いて、塩化ナトリウムの濃度勾配(0~1.0M)による溶出を行った。溶出液は5mlずつ集め、その中から適量とり全糖量および酸性糖量を測定した。試験管番

号29~31, 32~34, 35~38, 39~41, および42~49をそれぞれ集め、PS-H-III-1, PS-H-III-2, PS-H-III-3, PS-H-III-4, およびPS-H-III-5画分とした。PS-H-III-1~PS-H-III-5は脱塩水に対して透析し、透析内液を凍結乾燥した。

2-4) HC-IのDEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィー

HC-I(97.6mgグルコース相当量)を10mlの20mM酢酸緩衝液(pH5.0)に溶解、遠心操作(3,000rpm, 30分)にて不溶物を除去し、上清を同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-25カラム(3×7cm)にのせた。まず、250mlの20mM酢酸緩衝液(pH5.0)で溶出した。次に、200mlの同緩衝液と200mlの1.0M塩化ナトリウムを含む同緩衝液を用いて、塩化ナトリウムの濃度勾配(0~1.0M)による溶出を行った。引き続き150mlの1.0M塩化ナトリウムを含む20mM酢酸緩衝液(pH5.0)で溶出した。その後、180mlの0.5M水酸化ナトリウムおよび180mlの0.5M水酸化ナトリウムでの溶出を行った。溶出液は10mlずつ集め、その中から適量とり全糖量および酸性糖量を測定した。試験管番号2~8, 31~39, 40~45, 84~90, および91~95をそれぞれ集め、HC-I-1, HC-I-2, HC-I-3, HC-I-4, およびHC-I-5画分とした。HC-I-1~HC-I-3はそのまま, HC-I-4とHC-I-5は酢酸で中和後、脱塩水に対して透析し、透析内液を凍結乾燥した。

HC-I-2(14mg)を2mlの20mM酢酸緩衝液(pH5.0)に溶解、遠心操作(3,000rpm, 30分)にて不溶物を除去した上清を同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-25カラム(1.8×10cm)にのせた。まず、50mlの20mM酢酸緩衝液(pH5.0)で溶出した。次に、200mlの同緩衝液と200mlの1.0Mの塩化ナトリウムを含む同緩衝液を用いて、塩化ナトリウムの濃度勾配(0~1.0M)による溶出を行った。溶出液は5mlずつ集め、その中から適量とり全糖量および酸性糖量を測定した。試験管番号16~19, 20~22, 23~25, 26~29, および30~35をそれぞれ集め、HC-I-2-a, HC-I-2-b, HC-I-2-c, HC-I-2-d, およびHC-I-2-e画分とした。HC-I-2-a~HC-I-2-eは脱塩水に対して透析し、透析内液を凍結乾燥した。

HC-I-3(10mg)を2mlの20mM酢酸緩衝液(pH5.0)に溶解、遠心操作(3,000rpm, 30分)にて不溶物を除去した後、上清を同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-25カラム(1.8×10cm)にのせ

た。まず、50mlの20mM酢酸緩衝液 (pH5.0) で溶出した。次に、200mlの同緩衝液と200mlの1.0Mの塩化ナトリウムを含む同緩衝液を用いて、塩化ナトリウムの濃度勾配 (0~1.0M) による溶出を行った。溶出液は5mlずつ集め、その中から適量とり全糖量および酸性糖量を測定した。試験管番号30~39, 40~46, 47~50, および52~60をそれぞれ集め、HC-I-3-a, HC-I-3-b, HC-I-3-c, およびHC-I-3-d画分とした。HC-I-3-a~HC-I-2-dは脱塩水に対して透析し、透析内液を凍結乾燥した。

2-5) HC-IIのDEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィー

HC-II(132mgグルコース相当量)を10mlの20mM酢酸緩衝液 (pH5.0) に溶解、遠心操作 (3,000rpm, 30分) にて不溶物を除去し、上清を同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-25カラム (2.6×15cm) にのせた。まず、220mlの20mM酢酸緩衝液 (pH5.0), 220mlの1.0M塩化ナトリウムを含む同緩衝液, 180mlの0.5M水酸化ナトリウムで順次溶出を行った。溶出液は10mlずつ集め、その中から適量とり全糖量を測定した。試験管番号3~10, 27~31, および48~58をそれぞれ集め、HC-II-1, HC-II-2, およびHC-II-3画分とした。HC-II-1とHC-II-2はそのまま、HC-II-3は酢酸で中和後、脱塩水に対して透析し、透析内液を凍結乾燥した。

HC-II-1(20mg)を2mlの20mM酢酸緩衝液 (pH5.0) に溶解、遠心操作 (3,000rpm, 30分) にて不溶物を除去した上清を同緩衝液で平衡化したDEAE-Sephadex A-25カラム (1.8×8cm) にのせた。まず、75mlの20mM酢酸緩衝液 (pH5.0) で溶出した。次に、90mlの1.0Mの塩化ナトリウムを含む同緩衝液による溶出を行った。溶出液は5mlずつ集め、その中から適量とり全糖量を測定した。試験管番号2~5, および18~23をそれぞれ集め、HC-II-1-a, およびHC-II-1-b画分とした。HC-II-1-aとHC-II-1-bは脱塩水に対して透析し、透析内液を凍結乾燥した。

3) 単糖・オリゴ糖画分の分析

3-1) 分子量分布

単糖・オリゴ糖画分 (18mgグルコース相当量/1ml) をあらかじめ蒸留水で平衡化しておいたBio-Gel P-2のガラスカラム (1.8×44cm) にのせ、蒸留水で溶出した。溶出液は1.0mlずつ集め、そのなかから適量とりフェノール・硫酸法¹⁸⁾ にて糖量を測

定した。

3-2) 糖分析

単糖・オリゴ糖の分析はパルスドアンペロメトリー検出 (金電極) 付きの日本ダイオネックス社のイオンクロマトDX-300による陰イオンクロマトグラフィーで行った。分離カラムはCarboPac PA1を、ガードカラムはCarboPac PA1 GUARDを用いた。分析には溶離液A (100mM水酸化ナトリウム) と溶離液B (500mM酢酸ナトリウム/100mM水酸化ナトリウム) を用い、酢酸ナトリウムの濃度勾配 (0~30分, 0~150mM) による溶出を1.0ml/分の流量で行った²⁰⁾。

4) 多糖画分の構成糖分析

中性糖量: 多糖画分 (1mg) を1mlの2Mトリフルオロ酢酸で5時間、100℃ で加水分解し、分解物を減圧乾固し、200μgの2-デオキシグルコース (ガスクロマトグラフィー分析の内部標準物質) を加えた。CL画分の場合は、試料 (5mg) を72%硫酸 (0.2ml) に懸濁、ソニックバス中で1時間処理し溶解した。その後、硫酸濃度が1.5Mになるように蒸留水1.6mlで希釈し、100℃ で2時間加水分解した。反応物を炭酸バリウムで中和後、2-デオキシグルコースを加え、よく攪拌し濾過した。濾液をAmberlite IR-120 (H⁺型) で処理し減圧乾固した。得られた加水分解物中の構成中性単糖はアルジトールトリフルオロアセテートとした後、ガスクロマトグラフィーにて定量した。ガスクロマトグラフは日立製のG-500を用い、カラムは1.5% QF-1/Chromosorb W(AW-DMCS) (0.4×200cm, ガラスカラム) を用い140℃ の定温で分析した²¹⁾。

酸性糖量: 試料溶液から適量とりカルバゾール・硫酸法¹⁹⁾ にてガラクトロン酸相当量として求めた。但し、本法では中性糖も発色するのであらかじめその影響を調べておき、上記中性糖量からその影響を算出、カルバゾール・硫酸法で求めた値から差し引き [真の酸性糖量=カルバゾール・硫酸法にて求めた酸性糖量- (ガスクロマトグラフィー法で求めた中性糖量×0.23)], それを酸性糖量とした。

3. 結果および考察

1) 単糖およびオリゴ糖

杜仲の葉に含まれる炭水化物組成を調べるために、杜仲葉乾燥粉末 (3.972g) を常法に従い、80%

エタノール可溶性画分と不溶性画分に分けた。80%エタノール可溶性画分（単糖・オリゴ糖画分）に含まれる全糖は895mg（グルコース相当量）で、杜仲葉乾燥重量の22.5%に相当した。この単糖・オリゴ糖画分をBio-Gel P-2のゲル濾過クロマトグラフィーに供し分子量分布を見たのがFig. 1である。この画分に含まれる糖のほとんど(87.2%)が単糖と二糖であることが確認された。そこで、イオンクロマトグラフDX-300を用い単糖と二糖の組成を調べた。その結果、グルコース、フルクトースおよびスクロースが58: 8: 34の割合で含まれていることがわかった。

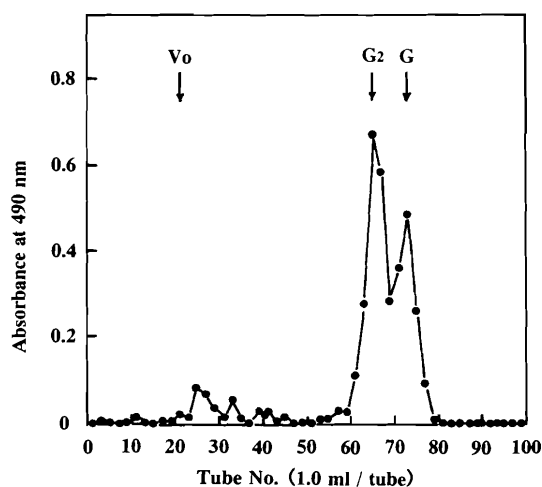


Fig. 1. Chromatography on Bio-Gel P-2 of the mono- and oligo-saccharide fraction obtained from Du-Zhong leaves.

Details are given in the text. Vo, G2 and G indicate the elution positions of Blue Dextran, maltose and glucose used for column calibration.

2) 多糖類

杜仲葉の80%エタノール不溶性画分の大部分は細胞壁からなっている。そこで、この画分(2.344g)を細胞壁多糖の抽出分画方法に従い、0.25%シュ

ウ酸アンモニウム、4%水酸化カリウム、24%水酸化カリウムで順次抽出分画を行った。得られたペクチン様物質（PS-LおよびPS-H）画分、ヘミセルローズ-I（HC-I）画分、ヘミセルローズ-II（HC-II）画分、およびセルローズ（CL）画分の収量と構成糖組成をまとめたのがTable 1である。杜仲葉乾燥重量の約18.5%が多糖類で、ペクチン様物質、ヘミセルローズおよびセルローズの比は51: 27: 22であった。それぞれの画分についてより詳細な検討を行った。

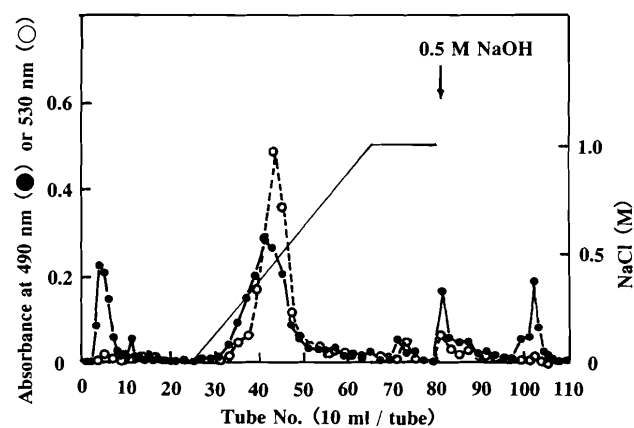


Fig. 2. DEAE-Sephadex A-25 chromatography of the pectic substance fraction (PS-H) obtained from Du-Zhong leaves.

PS-H (104.7 mg as Glc equiv. / 28 ml 20 mM Na-acetate buffer, pH 5.0) was applied to a column (3 × 7 cm) of DEAE-Sephadex A-25 equilibrated with the same buffer. After washing the column with 20 mM Na-acetate buffer, the adsorbed materials were eluted with a linear salt gradient in the same buffer (0~1.0M NaCl), followed by successive elution with 1.0M NaCl and 0.5M NaOH, and assayed for total carbohydrate (●) and uronic acid (○). Tubes 3-8, 31-39, 40- 47, 80-83, and 84-92 were combined to give fractions PS-H-I, -II, -III, -IV and -V, respectively.

Table 1. Yields and sugar composition of the polysaccharide fractions obtained from the 80% ethanol-insoluble materials of Zu-Zhong leaves.

Fraction	Yield (mg)	Sugar composition (wt%)							
		U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
PS-L	64.1	66.9	3.8	tr.	17.9	tr.	0.5	1.8	9.1
PS-H	311.9	77.9	1.4	-	9.7	tr.	0.4	1.3	9.2
HC-I	83.0	23.1	3.6	0.8	25.7	8.9	0.6	7.9	29.4
HC-II	117.8	tr.	1.7	3.6	16.2	18.4	1.9	27.6	30.6
CL	158.6	tr.	0.7	0.1	4.4	0.8	1.1	91.8	1.1
Total	735.4								

From 3.972 g freeze-dried leaves.

ペクチン様物質画分の多糖を調べるために、収量が多く、かつ高分子量画分であるPS-H画分を用いて実験を進めた。PS-H画分をDEAE-Sephadex A-25イオン交換クロマトグラフィーに供した時の溶出パターンを示したのがFig. 2である。また、各画分の構成糖組成をまとめたのがTable 2である。約0.45Mの塩化ナトリウムで溶出する主要酸性多糖画分PS-H-IIIは約60%のガラクトuron酸と約9%のラムノース、および約16%のアラビノースと約12%のガラクトースを主要構成糖としている。このPS-H-IIIをさらに同じイオン交換体でクロマトグラフィーを行い5画分に分け (Fig. 3), 5画分の糖組成を調べたのがTable 3である。糖結合様式の分析は行わなかったが、これまでに知られて

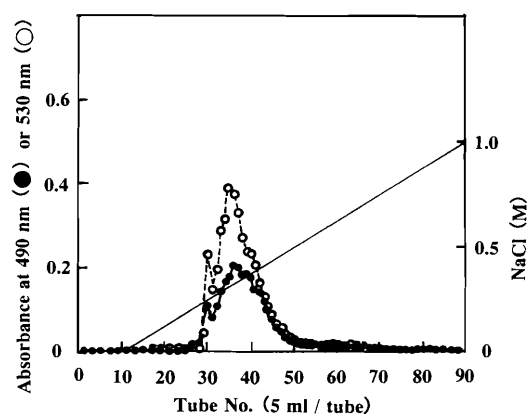


Fig. 3. DEAE-Sephadex A-25 chromatography of fraction PS-H-III obtained in Fig. 2.

PS-H-III (20 mg / 2 ml 20 mM Na-acetate buffer, pH 5.0) was applied to a column (1.8×10 cm) of DEAE-Sephadex A-25 equilibrated with the same buffer. After washing the column with 20 mM Na-acetate buffer, the adsorbed materials were eluted with a linear salt gradient in the same buffer (0~1.0 M NaCl), and assayed for total carbohydrate (●) and uronic acid (○). Tubes 29-31, 32-34, 35-38, 39-41 and 42-49 were combined to give fractions PS-H-III-1, -2, -3, -4 and -5, respectively.

いる植物細胞壁構成ペクチン様物質の化学構造²²⁾の知見から考えると、明らかにこのPS-H-III画分を構成する多糖はラムノガラクトuronを主鎖とし、そのラムノース残基にアラビノースやガラクトースなどから成るオリゴ糖又は多糖を側鎖とする構造を有するものと考えられる。すなわち、D-ガラクトuron酸が α -(1→4)結合した直鎖構造で、その直鎖のところどころに α -L-ラムノース残基が(1→2)結合で挿入されており、そのL-ラムノース残基にアラビナン、ガラクトナンあるいはアラビノガラクトナンが側鎖として結合している多糖である。

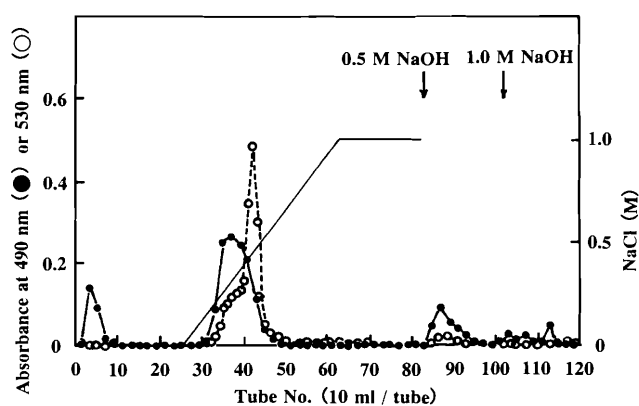


Fig. 4. DEAE-Sephadex A-25 chromatography of the hemicellulose-I fraction (HC-I) obtained from Du-Zhong leaves.

HC-I (97.6 mg as Glc equiv. / 10 ml 20 mM Na-acetate buffer, pH5.0) was applied to a column (3×7cm) of DEAE-Sephadex A-25 equilibrated with the same buffer. After washing the column with 20 mM Na-acetate buffer, the adsorbed materials were eluted with a linear salt gradient in the same buffer (0~1.0M NaCl), followed by successive elution with 1.0M NaCl, 0.5M NaOH and 1.0M NaOH, and assayed for total carbohydrate (●) and uronic acid (○). Tubes 2-8, 31-39, 40-45, 84-89, and 91-95 were combined to give fractions HC-I-1, -2, -3, -4 and -5, respectively.

Table 2. Yields and sugar composition of fractions PS-H-I~PS-H-V obtained from the pectic substances fraction, PS-H after chromatography on DEAE-Sephadex A-25.

Fraction	Yield (mg)	Sugar composition (wt%)							
		U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
PS-H-I	5.7	0	1.0	-	71.8	-	6.4	6.4	14.4
PS-H-II	9.6	10.7	7.2	0.2	39.2	-	0.5	7.7	34.5
PS-H-III	24.0	59.6	9.4	1.6	15.5	-	-	1.8	12.1
PS-H-IV	6.3	5.3	9.5	1.8	46.8	-	0.2	5.6	31.0
PS-H-V	2.1	10.6	3.5	1.8	19.4	6.5	1.8	27.1	29.4
Total	47.7								

Table 3. Yields and sugar composition of fractions PS-H-III-1~PS-H-III-5 obtained from fraction PS-H-III after chromatography on DEAE-Sephadex A-25.

Fraction	Yield (mg)	Sugar composition (wt%)							
		U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
PS-H-III-1	1.4	54.1	4.5	tr.	19.5	-	0.8	3.7	17.4
PS-H-III-2	3.3	70.7	5.2	0.4	11.4	-	-	0.9	11.4
PS-H-III-3	6.0	66.0	8.6	1.2	11.8	-	-	0.6	11.8
PS-H-III-4	3.4	60.2	13.0	1.8	12.1	-	-	0.7	12.3
PS-H-III-5	3.3	47.7	15.5	3.8	13.2	-	-	3.0	16.8
Total	17.4								

Table 4. Yields and sugar composition of fractions HC-I-1~HC-I-5 obtained from the hemicellulose-I fraction, HC-I after chromatography on DEAE-Sephadex A-25.

Fraction	Yield (mg)	Sugar composition (wt%)							
		U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
HC-I-1	5.4	0	0	1.7	27.4	10.8	tr.	19.4	40.7
HC-I-2	15.7	6.2	5.3	0	34.8	17.7	0.1	1.4	34.4
HC-I-3	12.5	63.8	4.7	0	14.4	3.2	0.1	0.5	13.3
HC-I-4	3.5	10.2	2.9	0	20.1	31.3	0.5	7.8	27.3
HC-I-5	1.2	23.6	1.1	0	22.0	19.2	0.5	6.0	27.5
Total	38.3								

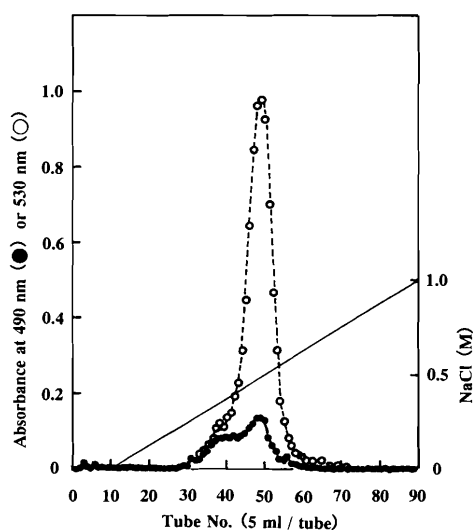


Fig. 5. DEAE-Sephadex A-25 chromatography of fraction HC-I-3 obtained in Fig. 4.

HC-I-3 (10 mg / 2 ml 20 mM Na-acetate buffer, pH 5.0) was applied to a column (1.8 × 10 cm) of DEAE-Sephadex A-25 equilibrated with the same buffer. After washing the column with 20 mM Na-acetate buffer, the adsorbed materials were eluted with a linear salt gradient in the same buffer (0~1.0 M NaCl) and assayed for total carbohydrate (●) and uronic acid (○). Tubes 30-39, 40-46, 47-50 and 52-60 were combined to give fractions HC-I-3-a, -b, -c, and -d, respectively.

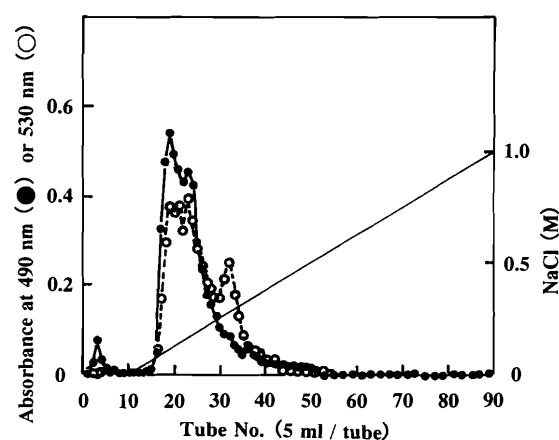


Fig. 6. DEAE-Sephadex A-25 chromatography of fraction HC-I-2 obtained in Fig. 4.

HC-I-2 (14 mg / 2 ml 20 mM Na-acetate buffer, pH 5.0) was applied to a column (1.8 × 10 cm) of DEAE-Sephadex A-25 equilibrated with the same buffer. After washing the column with 20 mM Na-acetate buffer, the adsorbed materials were eluted with a linear salt gradient in the same buffer (0~1.0 M NaCl) and assayed for total carbohydrate (●) and uronic acid (○). Tubes 16-19, 20-22, 23-25, 26-29 and 30-35 were combined to give fractions HC-I-2-a, -b, -c, -d and -e, respectively.

ヘミセルロース画分の多糖は4%水酸化カリウムで抽出されるものと24%水酸化カリウムで抽出されるものとでその種類に違いがあることが知られている。まず、4%水酸化カリウムで抽出されたヘミセルロース-I (HC-I) 画分の検討を行った。HC-I をDEAE-Sephadex A-25のイオン交換クロマトグラフィーに供した時の溶出パターンを示したのがFig. 4である。この画分のほとんどがDEAE-Sephadex A-25に結合し、約0.25Mの塩化ナトリウムで溶出する画分 (HC-I-2) と約0.43Mの塩化ナトリウムで溶出する画分 (HC-I-3) が主成分であった。構成糖分析の結果 (Table 4) から、HC-I-3 画分は先のPS-H画分にみられたアラビナン、ガラクトンもしくはアラビノガラクトンを側鎖にもつラムノガラクトンであり、シュウ酸アンモニウムでの抽出が不十分なため残っていたものが4%水酸化カリウムで抽出されたと考えられる。HC-I-2画分は酸性アラビノキシランとHC-I-3 画分にみられた中性糖を側鎖にもつラムノガラクトンの混合物と考えられる。

これを確かめるために、両画分を同じDEAE-Sephadex A-25のリクロマトグラフィーを試みた。

HC-I-3画分のDEAE-Sephadex A-25のリクロマトグラフィーの溶出パターンをFig. 5に示す。

Table 5はその時得られた各画分の構成糖組成を示している。比較的高濃度の塩化ナトリウムで溶出する画分ほどウロン酸含有量が多く、PS-H-IIIに比べると中性糖側鎖の少ないラムノガラクトナン (HC-I-3-cおよびHC-I-3-d) 含まれていることがわかった。

さらに、HC-I-2画分をDEAE-Sephadex A-25のリクロマトグラフィーに供した (Fig. 6)。比較的低濃度の塩化ナトリウムで溶出してくる画分は、アラビノース、キシロースおよびガラクトースを主要構成糖としてウロン酸含有量は少ない。そして、塩化ナトリウム濃度が高くなるに従ってキシロース含有量が少なくなり、ウロン酸含有量が高くなっている (Table 6)。これらの結果は、HC-I-2画分には酸性アラビノキシラン多糖、およびアラビナン、ガラクトン、アラビノガラクトン等の側鎖を有するラムノガラクトナン多糖 (主鎖が短く、これに比べて側鎖が比較的長い状態) が混在していることを示唆している。

ヘミセルロース-II画分をDEAE-Sephadex A-25のイオン交換クロマトグラフィーに供し、酸性多糖と中性多糖に分けた (Fig. 7)。収量および構成糖組成をまとめたのがTable 7である。主要画分の素通りすなわちHC-II-1画分をDEAE-Sephadex A-

Table 5. Yields and sugar composition of fractions HC-I-3-a~HC-I-3-e obtained from fraction HC-I-3 after chromatography on DEAE-Sephadex A-25.

Fraction	Yield (mg)	Sugar composition (wt%)							
		U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
HC-I-3-a	1.3	11.5	3.8	-	35.3	8.1	1.3	1.3	38.7
HC-I-3-b	2.3	54.5	4.5	-	18.6	3.2	0.3	0.6	18.3
HC-I-3-c	3.4	89.2	1.3	-	3.1	0.7	0.2	0.2	5.3
HC-I-3-d	1.9	81.7	1.1	-	5.9	1.1	0.6	0.8	8.7
Total	8.9								

Table 6. Yields and sugar composition of fractions HC-I-2-a~HC-I-2-e obtained from fraction HC-I-2 after chromatography on DEAE-Sephadex A-25.

Fraction	Yield (mg)	Sugar composition (wt%)							
		U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
HC-I-2-a	2.9	3.5	1.9	-	24.0	34.1	0	0.8	35.7
HC-I-2-b	3.0	3.5	4.1	-	30.8	21.2	0.3	1.2	39.0
HC-I-2-c	2.6	9.2	5.0	-	32.0	14.5	0.3	1.0	38.0
HC-I-2-d	1.6	15.2	5.4	-	33.6	10.8	0.4	1.1	33.6
HC-I-2-e	1.2	42.9	2.9	-	24.0	6.4	0.5	0.8	22.4
Total	11.3								

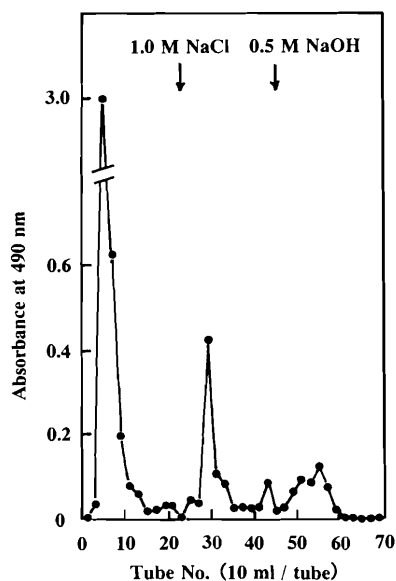


Fig. 7. DEAE-Sephadex A-25 chromatography of the hemicellulose-II fraction (HC-II) obtained from Du-Zhong leaves.

HC-II (132 mg as Glc equiv. / 10 ml 20 mM Na-acetate buffer, pH 5.0) was applied to a column (2.6 × 15cm) of DEAE-Sephadex A-25 equilibrated with the same buffer. After washing the column with 20 mM Na-acetate buffer, the adsorbed materials were successively eluted with 1.0 M NaCl and 0.5M NaOH, and assayed for total carbohydrate (●). Tubes 3-10, 27-31 and 48-58 were combined to give fractions HC-II-1, -2 and -3, respectively.

25によるリクロマトグラフィーに供した (Fig. 8)。素通り画分 (HC-II-1-a) の主要構成糖がフコース、ガラクトース、キシロースおよびグルコース

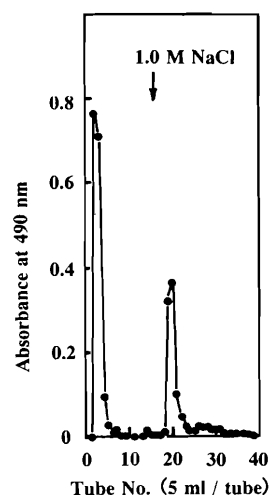


Fig. 8. DEAE-Sephadex A-25 chromatography of fraction HC-II-1 obtained in Fig. 7.

HC-II-1 (20 mg / 2 ml 20 mM Na-acetate buffer, pH 5.0) was applied to a column (1.8 × 10 cm) of DEAE-Sephadex A-25 equilibrated with the same buffer. After washing the column with 20 mM Na-acetate buffer, the adsorbed materials were eluted with 1.0 M NaCl, and assayed for total carbohydrate (●). Tubes 2-5 and 18-23 were combined to give fractions HC-II-1-a and -b, respectively.

であり (Table 8), かつ, この画分のヨウ素複合体の吸収スペクトルの最大吸収が640nm付近に見られ²³⁾, 市販粗酵素標品サンザイム1000 (*A. oryzae*, 三共製薬) による加水分解でキシログルカンの構造最小単位であるイソプリメベロース [α -D-xylopyranosyl-(1→6)-D-glucose]を与えたことから,

Table 7. Yields and sugar composition of fractions HC-II-1~HC-II-3 obtained from the hemicellulose-II fraction, HC-II after chromatography on DEAE-Sephadex A-25.

Fraction	Yield (mg)	Sugar composition (wt%)							
		U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
HC-II-1	28.5	0.2	2.7	4.2	12.5	22.0	1.7	29.2	27.5
HC-II-2	13.3	6.8	5.5	1.1	33.3	12.3	1.3	7.5	32.1
HC-II-3	4.7	11.9	2.7	0.3	14.3	29.5	1.5	9.2	30.7
Total	46.5								

Table 8. Yields and sugar composition of fractions HC-II-1-a~HC-II-1-b obtained from fraction HC-II-1 after chromatography on DEAE-Sephadex A-25.

Fraction	Yield (mg)	Sugar composition (wt%)							
		U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
HC-II-1-a	7.8	0	0.5	7.3	5.1	20.1	3.6	43.1	20.4
HC-II-1-b	3.9	11.0	6.3	0.8	26.4	12.6	0.2	5.7	37.1
Total	11.7								

HC-II 画分の主要画分であるHC-II-1-aに含まれる多糖はキシログルカン²⁴⁾であることが示された。この多糖の詳細な構造は現在検討中である。

今回の結果から、杜仲葉の乾燥重量の18.5%が細胞壁を構成する多糖類で、ペクチン様物質、ヘミセルロースおよびセルロースの割合は51:27:22であることがわかった。ペクチン様物質画分はアラビナン、ガラクトン、あるいはアラビノガラクトンを側鎖として有するラムノガラクトロンが主要多糖であった。また、ヘミセルロース画分は酸性アラビノキシランとキシログルカンが主要で、一部中性糖側鎖の少ないラムノガラクトロンが含まれていることがわかった。杜仲樹皮から熱水で抽出される多糖（アラビノース：ガラクトース：グルコース：ラムノース：ガラクトロン酸＝8:6:4:5:8）には免疫系賦活活性があることが報告されている¹⁵⁻¹⁶⁾。今回、杜仲葉にもこれと類似の構造を有する多糖の存在が示唆された。杜仲葉のペクチン様多糖、ヘミセルロース性多糖が同様な、あるいは他の生理活性を有するか否かを明らかにすることは非常に興味を持たれるところである。

本研究を進めるにあたり、杜仲葉を提供してくださいました秋田県中仙町の伊藤技術士事務所の伊藤汎氏（弘前大学地域共同研究センター客員教授）に感謝いたします。

引用文献

- 1) 朝日百科 植物の世界8 種子植物双子葉類8, 170-171頁, 朝日新聞社(1997).
- 2) 難波恒雄: 杜仲葉の生理機能とその利用. *食品と開発*, 29(3), 9-11(1994).
- 3) Bianco, A., Bonini, C.C., Iavarone, C. and Trogolo, C.: Structure elucidation of eucommioside (2"-O-β-D-glucopyranosyl eucommiol) from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemistry*, 21, 201-203 (1982).
- 4) Bernini, R., Iavarone, C. and Trogolo, C.: 1-O-β-D-Glucopyranosyl eucommiol, an iridoid glucoside from *Aucuba japonica*. *Phytochemistry*, 23, 1431-1433 (1984).
- 5) Hattori, M., Che, Q.-M., Gewali, M. B., Nomura, Y., Tezuka, Y., Kikuchi, T. and Namba, T.: Studies on Du-Zhong leaves (III) Constituents of the leaves of *Eucommia ulmoides* (1). *Shoyakugaku Zasshi*, 42, 76-80 (1988).
- 6) Takahashi, T., Matsumoto, N. and Oshio, H.: The stability of bio-active components in the bark of *Eucommia ulmoides*: *Eucommiae cortex*. *Shoyakugaku Zasshi*, 42, 111-115 (1988).
- 7) Gewali, M. B., Hattori, M. and Namba, T.: Constituents of the stems of *Eucommia ulmoides* Oliv. *Shoyakugaku Zasshi*, 42, 247-248 (1988).
- 8) 下山明美, 山抱基純, 中沢慶久, 矢原正治, 野原稔弘: 杜仲葉成分の研究. *生薬学雑誌*, 47, 56-59 (1993).
- 9) Hsieh, C.-L. and Yen, G.-C.: Antioxidant actions of Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sciences*, 66, 1387-1400 (2000).
- 10) Yen, G.-C. and Hsieh, C.-L.: Reactive oxygen species scavenging activity of Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) and its active compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3431-3436 (2000).
- 11) Nakano, M., Itoh, Y., Mizuno, T. and Nakashima, H.: Polysaccharide from *Aspalathus linearis* with strong anti-HIV activity. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 267-271 (1997).
- 12) Nakano, M., Nakanishi, H. and Itoh, Y.: Anti-human immunodeficiency virus activity of oligosaccharides from rooibos tea (*Aspalathus linearis*) extracts *in vitro*. *Leukemia*, 11, 128-130 (1997).
- 13) Metori, K., Furutsu, M. and Takahashi, S.: The preventive effect of Giseng with Du-Zhong leaf on protein metabolism in aging. *Biol. Pharm. Bull.*, 20, 237-242 (1997).
- 14) Li, Y., Sato, T., Metori, K., Koike, K., Che, Q. and Takahashi, S.: The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* Oliver leaves on collagen synthesis. *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 1206-1310 (1998).
- 15) Gonda, R., Tomoda, M., Shimizu, N. and Kanari, M.: An acidic polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the bark of *Eucommia ulmoides*. *Chem. Pharm. Bull.* 38, 1966-1969 (1990).
- 16) 友田正司: 生薬の生物活性多糖をめぐって(6). *現代東洋医学*, 11(2), 82-90 (1990).
- 17) 加藤陽治, 松倉純子: 主要葉菜類の炭水化物組成, 弘前大学教育学部紀要. 71, 61-71 (1994).
- 18) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956).
- 19) Bitter, T. and Muir, H. M.: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 4, 330-334 (1962).
- 20) 加藤陽治, 齋藤幸子, 齋藤博敏: リンゴ果実中のデンプン. 弘前大学教育学部教科教育紀要, 25, 13-21 (1997).
- 21) Kato, Y., Ito, S., Iki, K. and Matsuda, K.: Xyloglucan

- and β -D-glucan in cell walls of rice seedlings. *Plant Cell Physiol.*, **23**, 351-364 (1982).
- 22) Stephen, A. M.: Other plant polysaccharides. In *The polysaccharides*, Vol. 2. (ed. Aspinall, G. O.), pp. 97-193, New York, London: Academic Press (1983).
- 23) Kato, Y. and Matsuda, K.: Distribution of xyloglucan in *Phaseolus aureus* seeds. *Plant Cell Physiol.*, **18**, 1089-1098 (1977).
- 24) Kato, Y. and Matsuda, K.: Structure of oligosaccharides obtained by controlled degradation of mung bean xyloglucan with acid and *Aspergillus oryzae* enzyme preparation. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1751-1758 (1980).

(2002.1.8 受理)