

オリーブ採油滓由来糖脂質の糖組成分析

作成者：産業技術総合研究所/健康工学研究部門

バイオマーカー解析グループ 藤田康子

主任研究員 仲山賢一

バイオマーカー解析グループ長 片岡正俊

研究員 八代聖基

研究員 山村昌平

研究員 安部博子

e-mail: abe-abe@aist.go.jp

1. オリーブについて

1. 1 概要

オリーブは香川県の県花・県木であり、その生産量および栽培面積は香川県が日本一を誇っており、まさに県を代表する特産物である。また、香川県小豆島は日本で最初にオリーブ栽培に成功した土地であり、現在、日本産オリーブの殆どが小豆島で栽培されている。

オリーブは、ピクルスとして食される他、主にはオリーブオイルの原料として利用されている。オリーブオイルはオレイン酸やビタミンE、ベータカロチン、ポリフェノール類などの抗酸化物質を豊富に含むため、動脈硬化あるいは老化防止などの作用があることが知られており、健康食品としても注目されている。また、このような成分を含むオリーブ葉粉末をハマチに与えることによって、刺身が褐変しないように改善された養殖オリーブハマチが開発されている。このように、オリーブはオリーブオイルだけでなく、葉にも多くの機能成分が含まれていることがわかり、非常に利用価値の高い作物であると言える。

一方、オリーブ油を果実から搾油した後の採油滓は、廃棄物として未利用となっているが、この採油滓にもまだまだ多くの機能性成分が含まれていると予測される。我々は、この採油滓から、近年様々な生体内機能を持つことで注目されているスフィンゴ糖

脂質を分離精製することに成功している。そこでここではオリーブ採油滓由来スフィンゴ糖脂質のうち、糖鎖部分の構造を明らかにする方法について紹介する。



1. 2 オリーブ糖脂質の機能性

糖脂質は古くからガンや感染症などの多くの病気と関わっていることがよく知られている。また、近年、免疫制御において重要な機能を持つNKT細胞のリガンドとなる新規糖脂質が無脊椎動物から発見されている。また、糖脂質を経口摂取した場合、消化管で、セラミドやスフィンゴシンに分解され吸収されることが分かっており、セラミドやスフィンゴシン自体の効果が観察されることも知られてきている。



図 1-1 小豆島産オリーブ。東洋オリーブ(株)提供

1. 2. 1 類似の糖脂質を含む食品

一般に植物は糖脂質の含量が高く、米、小麦、トウモロコシ、コンニャク、マイタケ等から抽出された糖脂質が市場に出回っている。その多くは、粗抽出物として利用されており、市場にも粗抽出物として流通している場合が多い。

<引用・参考文献>

1. 間 和彦、オレオサイエンス、第7巻第4号, p141-149(2007)
2. 原田通成・谷口 克、蛋白質 核酸 酵素、Vol148, No.8, p1126-1132 (2003)

2. 糖脂質類についての説明

糖脂質は糖がジアシルグリセロールやモノアシルグリセロール、もしくはセラミド

と結合した脂質であり、ここでは動物や植物の両方で観察されるセラミドを含むスフィンゴ糖脂質についての説明を行う。スフィンゴ糖脂質とはスフィンゴシンに長鎖脂肪酸がアミド結合してできる化合物であるセラミドに糖鎖が結合している。動物のスフィンゴ糖脂質の糖鎖は、非常に多様な構造を示すことが知られているが、植物ではグルコースが一分子結合したグルコシルセラミドが主流である。

3. オリーブ由来糖脂質の糖組成分析法

オリーブ由来の糖脂質における糖鎖部分の糖組成を明らかにするための分析方法について述べる。糖脂質を酸加水分解することによって糖鎖部分を単糖まで分解した後、得られた単糖を蛍光標識し、その標識単糖をキャピラリー電気泳動に供することによって、その糖種を同定する。糖脂質の糖鎖部位の糖組成を明らかにできれば糖鎖構造を推測しやすくなる。

3. 1 準備する器具など

1. 1.5 ml マイクロ遠沈管
2. 減圧乾燥機
3. ヒートブロック恒温槽
4. ピペットマン各種
5. ボルテックスミキサー
6. 超音波洗浄機（必要に応じて）
7. 実験用手袋
8. キャピラリー電気泳動装置(ベックマン・コールター P/ACE システム ADQMDQ レーザー誘導蛍光ディテクタ)
9. フェーズドシリカキャピラリー $\phi 20 \mu\text{m}$ (ベックマン・コールター #338475)
10. その他キャピラリー電気泳動用消耗品 (バイアル、バイアルキャップ、バイアホルダ、スプリング等)

[試薬]

1. トリフルオロ酢酸（超純水を用いて 4M に希釈する。要時調製）
2. 超純水
3. 糖分析用蛍光ラベル試薬（ベックマン・コールター #501309）
4. 1M シアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液(テトラヒドロフラン溶液、Sigma 296813)

5. 120 mM ホウ酸バッファー (pH 10.2)
6. 標準品として、グルコース、ガラクトース、マンノース、フコース等の単糖類 (試薬特級)

糖分析用蛍光ラベル試薬 (5 mg 入り) は 15%酢酸 48 μ l で溶解しておく (4 $^{\circ}$ C 保存)。
標準品は超純水で 2 mM 溶液を作り、10 μ l ずつマイクロ遠沈管に分取し減圧乾燥機にて乾固させておく。

3. 2 分析用試料の前処理・酸加水分解方法

1. 1-10 μ g 相当分のサンプルをフェノール : クロロホルム (2:1) に溶解した溶液をマイクロ遠沈管に分取する。
2. 減圧乾燥機を用い、サンプルを完全に乾固させる。
3. 超純水 50 μ l を加え、ボルテックスミキサーで攪拌する。必要に応じて超音波洗浄機にかけ、完全に溶解させる。
4. 4M トリフルオロ酢酸 50 μ l を加え、ボルテックスミキサーで攪拌する。
5. 100 $^{\circ}$ C に設定したヒートブロック恒温槽で 3 時間インキュベートする (酸加水分解反応)。
6. 反応終了後のサンプルを凍結乾燥させ、乾固させる。水分が残っていると後の標識反応に影響するので完全に乾燥させる。

3. 3 蛍光標識方法

1. 2.2.6 のサンプルにシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液 2 μ l を加え、穏やかに混ぜる。
2. 蛍光ラベル試薬溶液 2 μ l を加え、穏やかに混ぜる。
3. 60 $^{\circ}$ C に設定したヒートブロック恒温槽で 90 分インキュベートする。
4. 超純水 96 μ l を加え、ボルテックスミキサーで攪拌する。
5. 4 の溶液 5 μ l を新しいマイクロ遠沈管に移し、超純水 195 μ l を加えてボルテックスミキサーで攪拌する。

3. 4 キャピラリー電気泳動による分析方法

3.3.5 のサンプルをそれぞれキャピラリー電気泳動装置にて解析する。装置全般の操作は、ベックマン・コールターの操作マニュアルに従って行う。解析条件は以下の通

り。

泳動バッファー：120 mM ホウ酸バッファー (pH 10.2)

キャピラリー有効長：20 cm (全長 30 cm)

検出波長：Excitation 488 nm, Emission 520 nm

キャピラリー温度：20℃

サンプル注入量：0.5psi, 20.0sec.

泳動条件：28.0 KV, 15.0 min., normal polarity

4. 分析例

図2-1-1に蛍光標識化単糖の標準品ミクスチャー、図2-1-2にオリーブ糖脂質由来糖の蛍光標識サンプル、図2-1-3に蛍光標識グルコースとオリーブ糖脂質由来糖の蛍光標識サンプルのミクスチャー、図2-1-4に蛍光標識マンノースとオリーブ糖脂質由来糖の蛍光標識サンプルのミクスチャーの解析クロマトグラムを示す。

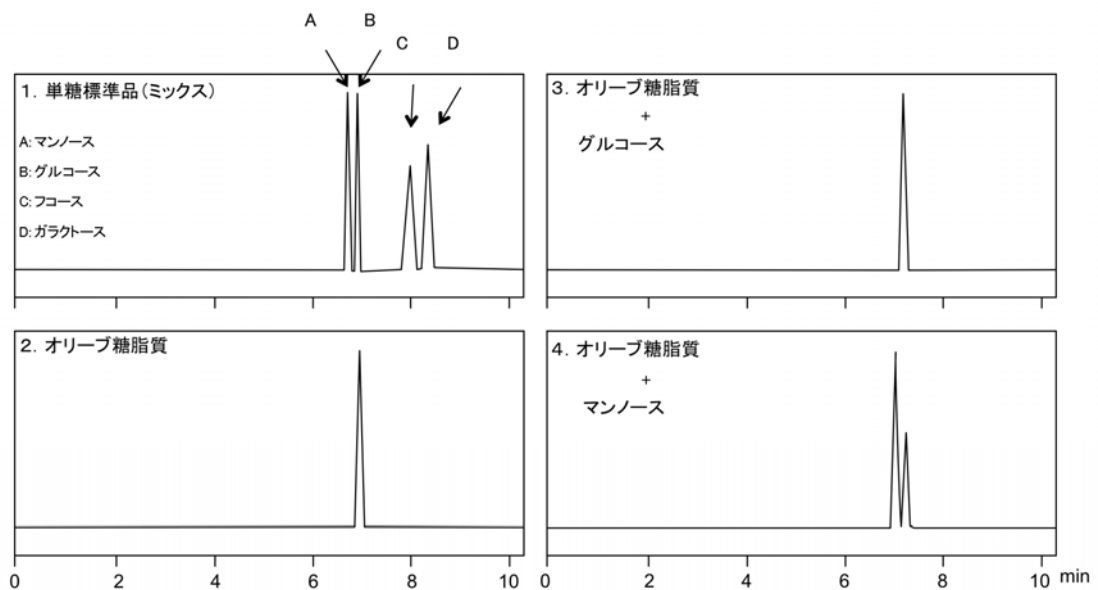


図2-1 オリーブ糖脂質由来単糖のキャピラリー電気泳動

図2-1-2のオリーブ糖脂質由来糖の蛍光標識サンプルは蛍光ピークが1つしかなく、構成糖は一種類であることが分かった。

また、その検出時間を図2-1-1の蛍光標識化単糖標準品ミクスチャーの泳動結果

と比較すると、グルコースの検出時間（図1, 1 A）と一致する。ピークの検出時間はバッファの pH、キャピラリーやサンプルの状態によって若干の変動が確認されることから、糖種を特定するには、サンプルと標準品（ピーク検出時間が近いもの）を混合して泳動する必要がある。

オリーブ糖脂質由来糖の蛍光標識サンプルと蛍光標識化グルコース（図2-1-3）または蛍光標識化マンノース（図2-1-4）を混合して泳動すると、グルコースでは蛍光ピークが1つであるのに対しマンノースでは2つ検出された。

以上の結果から、オリーブ糖脂質の糖鎖部分を構成する糖はグルコースのみであることがわかった。

5. 分析上の留意、注意点

トリフルオロ酢酸およびシアノ水素化ホウ素ナトリウム溶液は手袋を着用の上ドラフト内で取り扱う。キャピラリー電気泳動で明確な蛍光ピークが得られない場合には、蛍光標識済みサンプルの希釈率を下げるか、キャピラリーへのサンプル注入量を増やす。蛍光標識済みのサンプルは比較的安定なので、遮光・密封しておけば4℃保存が可能である（1ヶ月以上）。

6. その他

特になし。

7. 定量法に関する引用・参考文献

1. Fu-Tai A. Chen et al, Glycobiology 8, p1045-1052 (1998)

—以上—

[トップページへ](#)