

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成22年3月作成

四国地域イノベーション創出協議会
地域食品・健康分科会 編

s-food@m.aist.go.jp

ワカメの糖脂質糖鎖の構造決定法

作成者：産業技術総合研究所 健康工学研究センター
生体機能評価チーム長 仲山 賢一

1. ワカメの糖脂質について

1. 1 概要

「ワカメの糖脂質群」の項で述べたとおり、ワカメからの糖脂質は非常に大きな糖鎖構造を有する特徴的な糖脂質を含んでいる。このような糖脂質は、これまでの糖脂質とは異なり、多糖類の持つ作用も期待が持てる。多糖類の多くは、免疫賦活作用を持つことが知られていることから、ワカメの糖脂質もこのような多糖類と同じ作用機序で作用することも考えられる。その一方、セラミド部分を含む糖脂質であることから通常の糖脂質と同様の効果も期待できる。

1. 2 ワカメの糖脂質の機能性

糖脂質は一般的に様々な効果があるといわれている。その多くは、免疫系との関わりにより有効であるとされているが、一部は直接的な抗ガン効果や神経系への作用なども報告されている。その作用メカニズムは学術的に研究もされており、糖脂質の機能の一部は、糖タンパク質との糖鎖同士の相互作用による結合によるものであるとする学術論文が発表されている(1)。この他に、ワカメの糖脂質はその糖鎖長が長いことから多糖類と同様な効果も期待される。一方、経口摂取された場合、消化管などでの分解により、セラミドやスフィンゴシンに分解され吸収されることで、セラミドやスフィンゴシン由来の効果が観察されることも期待できる。

1. 2. 1 類似の糖脂質を含む食品

ワカメなどの海草の糖脂質は知られていない。

<引用・参考文献>

1. Kawashima N, Yoon SJ, Itoh K, Nakayama K., J Biol Chem. Vol. 284, pp6147-6155, 2009

2. 糖脂質類についての説明

糖脂質は、様々な種類が知られているが、ここでは一般的に動物や植物で観察されるセラミドを含む糖脂質についての説明をする。

糖脂質の基本的な構造を図1に示す。脂質部分はセラミドと呼ばれるものであり、スフィンゴシンという塩基部分とそれに結合する脂肪酸部分に分かれる。スフィンゴシンは植物では様々な構造が知られており、これと結合する脂肪酸の多様性から多様なものが存在する可能性がある。ここでは、主に観察される主要なスフィンゴシンからなる糖脂質について言及する。

次に糖鎖部分であるが、動物では非常に多様な糖鎖が結合していることが知られている。一方、植物ではグルコースが一分子結合したタイプの糖脂質しか見いだされおらず、植物では糖鎖部分の多様性はないと考えられている。ワカメについてはこれらの糖脂質とは異なり、非常に大きな糖鎖の結合した糖脂質が観察される。

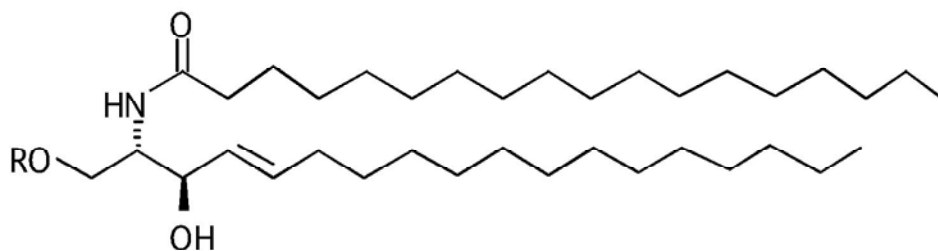


図1 糖脂質の構造

3. 糖鎖構造分析の方法について

ワカメ由来の糖脂質の抽出および分析方法については既に「ワカメの糖脂質群」の項に述べた通り、高速液体クロマトグラフィーと蒸発光散乱検出器(ELSD)を用いて行うことができる。ただし、これは分離を行うだけであり、実際にその構造を決定するためにはさらに糖鎖の構造決定を行う必要がある。ここでは、糖脂質の糖の構造決定法として、糖鎖部分は酸水解によって脂質と分離し、蛍光標識を行った後にキャピラリー電気泳動装置で分析同定する手法について述べる。

3. 1 準備する器具など

1. 糖脂質成分分析システム(キャピラリー電気泳動装置、蛍光検出器が付いているもの)

[試薬]

1. TFA
2. 1M シアンホウ素化ナトリウム/TFA 溶液

3. APTS 試薬
4. 糖鎖・糖質分離バッファ
5. N-CHO コーティングキャピラリー

3. 2 分析用試料の前処理・調製方法

HPLC で分離精製したセラミド画分を遠心エバポレーターなどを用いて乾燥させた後、水を $100\ \mu\text{l}$ 加え溶解させる。これに 4N TFA を $100\ \mu\text{l}$ 加え、 100°C で 4 時間加水分解を行う。加水分解後、溶媒を吸引乾固し、 0.2M $\text{CH}_3\text{COONH}_3$ 溶液 $100\ \mu\text{l}$ 加え、さらに無水酢酸を $10\ \mu\text{l}$ 加えよく攪拌し 30 分室温に置く。再度同じ操作を繰り返した後、溶媒を吸引乾固させ、 $2\ \mu\text{l}$ の 1M シアンホウ素化ナトリウム TFA 溶液を加え、さらに $2\ \mu\text{l}$ の APTS 試薬を加える。 37°C で 4 時間反応後、 $46\ \mu\text{l}$ の水を加え、よく攪拌する。この希釈したサンプルを $5\ \mu\text{l}$ とり、水 $195\ \mu\text{l}$ 加えたものをキャピラリー電気泳動装置で分析を行う。

3. 3 糖脂質成分分析システム(キャピラリー電気泳動装置)による分析方法

(1) 分析条件

調製した APTS でラベルされたサンプルは、N-CHO コーティングキャピラリーを用いて電気泳動され分離を行った。分離は 10kV で 20 分間行い、検出は励起波長 488nm 、検出波長 520nm で行った。

(2) 糖の同定

糖の同定は、標準品を同様に APTS で標識したものの移動度の差によって行った。

4. 分析例

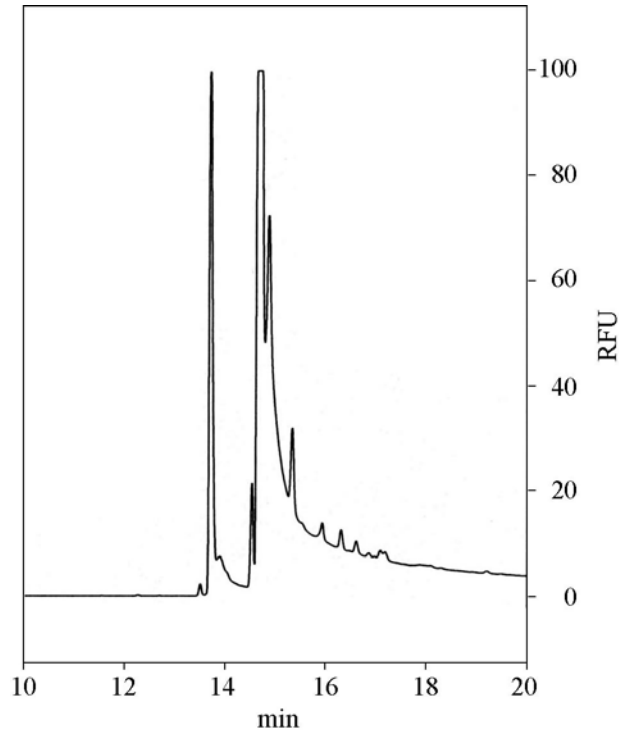


図 2 キャピラリー電気泳動装置によるワカメ糖脂質の糖の分析

ワカメの糖脂質は非常に糖鎖が長いため、分離回収が困難である。そのため、単糖のピークは低いですが、グルコースが含まれているのは確認できた。また、かなり多くの種類の糖も含まれており、複数種類からなる長い糖鎖を持つ糖脂質であることが分かる。また、分離の時に 215nm の吸収が全く見られなかったことから、N-アセチル化された糖は含まれないことも明らかである。

5. 分析上の留意、注意点

糖鎖が長いため、精製後の糖脂質の回収率が悪くなるため、多めに分取して分析を行う必要がある。

—以上—

[トップページに戻る](#)