

レクチンアフィニティークロマトグラフィーによる糖脂質成分の分離方法の検討

SEPARATION OF GLYCOLIPID IN SOY PROTEIN ISOLATE BY LECTIN AFFINITY CHROMATOGRAPHY

本間清一・三田知子・村田容常（お茶の水女子大学家政学部）

Seiichi HOMMA, Tomoko MITA and Masatsune MURATA

Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu University, Tokyo

112

ABSTRACT

Soy protein isolate (SPI) was extracted with 87% ethanol and chromatographed on a Iatrobeds column. The eluates with acetone and methanol represented glycolipid and phospholipid fractions, respectively. To separate glycolipid in the phospholipid fraction, the methanol eluate was adjusted to pH 1.4 with HCl to form insoluble materials and resulting supernatant, consisting of mostly glycolipid, was combined with glycolipid fraction. Although TLC showed 12 phospholipids, the separation of the glycolipid was found to be imperfect due to unreasonable composition of sugar, fatty acid and glycerol. The glycolipid was dispersed in water by sonic vibration and chromatographed on a ConA-lectin agarose column. The glycolipid separation was found not to be due to affinity to ConA lectin, but due to adsorption to agarose. *Nutr. Sci. Soy Protein, Jpn.* **12**, 19-22, 1991.

分離大豆たん白質（SPI）に含まれる脂質は約2％であり、脂質組成は中性脂質がおよそ半分、残りは糖脂質とリン脂質がほぼ等量ずつである。本研究は、SPIに含まれる糖脂質の性質を明らかにすることを目的とし、糖脂質の分離過程で糖鎖に着目してレクチンアフィニティークロマトグラフィーの利用可能性について検討した。

実験方法

試料

フジプロRを用い、4℃に貯蔵した。

脂質の抽出

分離大豆たん白質50 g に87％エタノール200 mL を加え、5分間ホモジナイズした後、減圧ろ過した。残渣に87％エタノールを加え、同じ抽出を2度繰り返した。ろ液を集め減圧濃縮し、これに飽和食塩水200 mL

とジエチルエーテル200 mL を加えて脂質成分をエーテル層に溶転した。さらに、水層から脂質の抽出を2度繰り返した。集めたエーテル層は飽和食塩水で洗った後、無水硫酸ナトリウムで脱水した。

脂質の粗分画¹⁾

イアトロビーズ (Iatrobeds) を水洗し、0.1％アンモニア水懸濁し、水洗の順に処理し、最後に希塩酸で上澄みをpH 5-6にした。さらに、0.2 M 食塩水に30分間懸濁した後水洗し、乾熱器で活性化した。カラム充填に先立ちクロロフォルム-メタノール-水 (10:10:1) に浸し5分間超音波洗浄器にかけて活性を下げた。カラム (2.0×20 cm) に100 mg の脂質試料をのせ、クロロフォルム150-200 mL、アセトン150-250 mL、メタノール200-300 mL の順に溶出した。

TLC

カラム溶出液は濃縮後シリカゲル TLC (Merck

DC-Alufolien Kieselgel 60 F254) によりクロロフォルム-メタノール-水 (65:25:4), またはブタノール-酢酸-水 (60:20:20) で展開した。Dittmer 試薬でリン脂質, α -ナフトール硫酸で糖脂質, ニンヒドリンでアミノ糖, Zatkis 試薬でステロール, ヒドロキシルアミンでエステル脂質を検出した。

酸沈澱法によるリン脂質の分離

分離大豆たん白質から調製した脂質300 mg を6 mL のメタノールに溶解し, 塩酸またはアンモニア水で pH を0.6, 1.0, 1.4, 1.8, 2.4, 4.0, 4.8に調整した。生じた不溶物を遠心分離し, 沈澱を真空下で乾固して沈澱量を測定した。沈澱物をシリカゲル TLC にて展開し, 脂質パターンをしらべた。この結果にもとづきメタノール画分に溶出した糖脂質を分離するため, メタノール溶出液を塩酸で pH 1.4に調整し, リン脂質を遠心分離で沈澱させた。糖脂質を含む上澄みをアセトン溶出画分と併せた。

脂肪酸と糖分析

昨年度の報告²⁾と同様に, 糖脂質成分200 mg に5% 塩化水素-メタノール200 μ L を加え, 100°C, 4時間加熱した。放冷後ヘキサンと水各1 mL を加え, 攪はん, 遠心分離した。上層の脂肪酸メチルエステルは GLC で分析した。水層の下層は濃縮乾固し, TMS 誘導体化して GLC で分析した。レクチンアフィニティークロマトグラフィーによる糖脂質の分離方法は昨年の報告²⁾と同じであり, レクチンはホーネンコーポレーション製の ConA アガロースである。

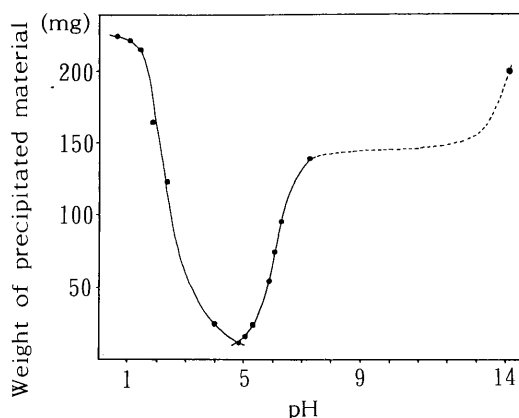


Fig. 1. Effect of pH on the precipitation of lipids from SPI.

結果と考察

脂質混合物の pH による溶解性

分離大豆たん白質から調製した脂質をイアトロビーゼカラムにかけて, 中性脂質 (クロロフォルム画分), 糖脂質 (アセトン画分), リン脂質 (メタノール画分) に分画した。TLC の結果, メタノール画分にも糖脂質が溶出されるので, メタノール画分の pH を0.6-4.8の範囲に調整して生ずる沈澱を分離した。各 pH における沈澱の収量を Fig. 1 に示した。pH 1.4の沈澱はリン脂質, 上澄みは主に糖脂質であったので上澄みをアセトン画分と併せ本実験の糖脂質画分とした。

糖脂質の TLC による分離

カラムにより分離した糖脂質画分を2次元展開 TLC にかけて個々の糖脂質成分に分離した。Fig. 2 に示したように, 合計12の糖脂質成分を検出した。この TLC を用いて各成分を単離した。Table 1 は各成分のスポットテストの結果を示す。Table 2 は構成糖と脂肪酸組成を示す。糖としては, グルコース, ガラクトース, ラムノース, そして少量のマノノース, 脂肪酸としてリノール酸, パルミチン酸, オレイン酸, そして少量のステアリン酸, エイコセン酸, アラキドン酸, ミリスチン酸が検出された。成分1は糖, グリセロール, 脂肪酸の組成比が1:1:2であることからジ

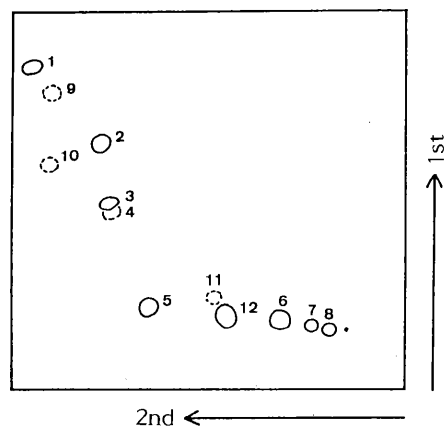


Fig. 2. Two dimensional TLC of glycolipids from SPI.

TLC plate: Silica gel 60 F254

Development: 1st CHCl_3 -MeOH-Water (65:25:4)

2nd BtOH-AcOH-Water (60:20:20)

Detection: α -Naphthol-sulfuric acid

○: Glycolipid

アシलगリセロ糖脂質と推定される。同種のものがふすまにもみとめられている³⁾。成分2はステロールの呈色反応があり、グリセロールが極めて少ないことからステリルグルコシドと推定される。成分3, 4は糖が脂肪酸より多く、グリセロールが少ないことから構造の説明がつき難く、純度の問題がある。成分5はラムノースを含むのが特徴で、9残基の糖を結合したジアシलगリセロールと推定される。ラムノースを含む糖脂質はリョクトウに存在することが報告されている⁴⁾。成分6-8は糖と脂肪酸比において糖の割合が高く、Rfと糖の割合との関係など説明がつきにくい。分離した成分全体としてもさらに単一性の検討が必要である。

そこで、本実験の糖脂質がグルコースを含むことに

着目して ConA レクチンのアフィニティーカラムクロマトグラフィーを利用して糖脂質をさらに分離精製した。その結果は、Fig. 3 に示したように、成分が分離される傾向を示した。確認のため対照実験としてカラムを酸性にしてレクチンを不活性化してからカラムクロマトグラフィーを同じように行ったところ、Fig. 3 と同じ TLC パターンが得られた。したがって、ここに示された分離要因は糖の認識でなく、スぺーサーを含めたアガロースへの吸着力で分離されたことになる。WGA レクチンを固定化したカラムを用いてもほぼ同様であり、レクチン活性を失わずに糖脂質を乳化する方法を含めて脂質の糖とレクチンとのアフィニティーを引きつづき検討する。

Table 1. Color reactions of glycolipids from SPI

Sample name on TLC	Color reactions for			
	Phosphate ¹	Amino group ²	Glycerol ³	Sterols ⁴
1	—	—	+	—
2	—	—	—	+
3	—	—	+	—
4	—	—	—	—
5	—	(+)	+	—
6	—	(+)	—	+
7	—	—	—	—
8	—	—	—	—
9	—	—	—	+
10	—	—	—	—
11	(+)	—	—	—

Detector: ¹ Dittmer reagent ² Ninhydrin ³ Hydroxylamine ⁴ Zatkis reagent

Table 2. Sugar and fatty acid composition of glycolipids from SPI

Sample name	Sugars				Gly	Fatty acids						
	Gal	Glc	Others	Total		C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	Others	Total
1		52.1			40.0	24.6	30.8	8.79	31.5	8.16	5.82* ³ 5.35* ⁴	109.7
2		139			6.17	4.28	5.18	1.80	4.25	1.41	1.52* ⁵	21.5
3		175			7.81	43.7	3.75	6.01	22.9	2.84		81.4
4		210				5.84	3.57	1.78	3.75	1.07	1.10* ⁶	17.7
5	63.8	69.4	55.7* ¹	210	21.8	30.2	7.74	5.63	9.97			54.5
6	16.9	394	26.5* ²	437	3.67	27.4	6.47	4.92	4.32	0.695		44.2
7	117	126		244		2.34	1.37	1.76	30.6			38.6
8	55.1	56.4		111		5.29	4.23	7.89	1.23	0.71	0.786* ⁷ 0.755* ⁸	22.1

Gal: Galactose Glc: Glucose Gly: Glycerol

*1 Rhamnose *2 Mannose *3 C_{14:0} *4 C_{12:0} *5 C_{14:0} *6 C_{14:0} *7 C_{22:0} *8 C_{22:1}

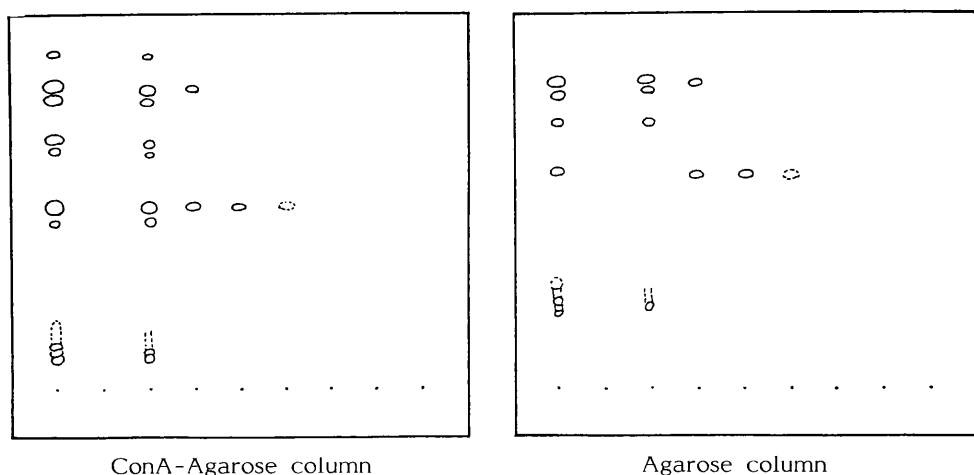


Fig. 3. TLC profiles of the fractionates of SPI glycolipid on ConA-Agarose and Agarose columns.

TLC plates : Silica gel 60 F254

Development : CHCl_3 -MeOH-Water (65 : 25 : 4)

Detection : α -Naphthol-sulfuric acid

文 献

- 1) Kates, M. (1975) : 脂質研究法, 東京化学同人, 108-110.
- 2) 本間清一, 三田知子, 村田容常 (1990) : 分離大豆たん白質の糖脂質成分. 大豆たん白質栄養研究会会誌, **11**, 7-13.
- 3) Fujino, Y. and Miyazawa, T. (1979) : Chemical

structures of mono-, di-, tri- and tetraglycosyl glycerides in rice bran. *Biochim. Biophys. Acta*, **572**, 442-451.

- 4) Kondo, Y. (1981) : Alkylether linkage-containing oligoglycolipid in germinating black grams. *Biochim. Biophys. Acta*, **665**, 471-476.