技術論文

糖鎖の ^1H -NMR スペクトルの簡易解析法

傘 郁 子*

Convenient method for a full-assignment of the ^1H -NMR spectrum of oligosaccharide

Ikuko ISHII-KARAKASA*

*Department of Biochemistry, School of Medicine, Kitasato University, 1-15-1, Kitasato, Sagami-hara-shi, Kanagawa 228-8555

(Received 16 January 2001, Accepted 26 February 2001)

Measurements of the 600 MHz 1D ^1H -NMR and H-H COSY spectra are possible at the nanomole order of oligosaccharide. However, many proton peaks of oligosaccharide are observed to overlap at near δ 2~4 ppm in the ^1H -NMR spectrum. Therefore, full assignments of the ^1H -NMR spectrum of oligosaccharide are difficult from only the 1D ^1H -NMR and H-H COSY spectral data. However an analysis of the ^1H -NMR spectrum of the oligosaccharide is possible using the following three conditions: 1. The splitting pattern of the AMX type is symmetric at the chemical shift. 2. The multiplicity of protons included in overlapped peaks is from the triplet to the octet (dd-ddd). 3. In the oligosaccharide, the conformations of composite monosaccharides are similar to those of the corresponding monosaccharide derivatives. The program (FORTRAN 77) for an analysis under this condition was developed, and was applied to analyses of pyridylaminated-disaccharide (Gal β 1-3GalNAc-PA) and disaccharide-alcohol (Gal β 1-3GalNAc-ol).

Keywords : oligosaccharide; nanomole order analysis; 1D ^1H -NMR; H-H COSY; full-assignment.

1 緒 言

生体内に広く分布する糖タンパク質や糖脂質など複合糖質の糖鎖は、細胞間の認識、情報伝達や細胞の分化など、生体にとって重要な反応に微量で関与している^{1)~3)}。このような糖鎖の持つ生理的機能は糖鎖の構造と密接な関連を持っているため、糖鎖の詳細な構造分析の重要性はますます高まってきている。しかし、これらの糖鎖は、生体成分から分離されるために微量しか得られず、合成などで大量に調製される糖鎖とは異なり、ピコモルからナノモルオーダーしか得られない。

1978年、長谷ら⁴⁾によって開発されたピリジルアミノ (PA) 化法は、糖鎖の還元末端を2-アミノピリジンで蛍光標識する方法である。この方法は、ピコモルオーダーの糖鎖を簡便かつ高感度に分離、検出できるため、高速液体ク

ロマトグラフィー (HPLC) と組み合わせることにより、多くの糖鎖の有用な分析法として利用されている^{5)~8)}。この方法で検出された糖鎖は、更に特異性の明らかな分解酵素を作用させて、ピーク位置の移動を HPLC や質量分析法 (MS) で検出することにより、構造決定が行われてきた。

近年、非破壊分析法の一つである核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは、装置の高磁場化等により、一次元 (1D) ^1H -NMR や ^1H - ^1H 相関分光法 (H-H COSY) スペクトルであれば、ナノモルオーダーの量で測定が可能になった。しかし、糖鎖は構造の類似した単糖が幾つか結合した構造であるために、 δ 2~4 ppm 付近に多くのプロトンピークが重なり合い、1D ^1H -NMR と H-H COSY スペクトルのみでの全解析は非常に困難である。そこで、Vliegthart ら⁹⁾ は、種々の既知糖鎖の 1D 500 MHz- ^1H -NMR を測定し、明確に分離して現れる一部のプロトンピーク (structural reporter group) を解析指標に使う同定法を報告している。

* 北里大学医学部生化学講座: 228-8555 神奈川県相模原市北里 1-15-1

この方法は、1D ^1H -NMR 測定だけでなく、微量サンプルでの測定が可能であり、複合糖質を研究している多くの研究者が、彼らのデータを参考資料として用いている。ところが、彼らの解析データとチャートを参考にして糖鎖の構造解析を進めていくと、幾つかの問題点に直面する。

1. Vliegthart らは、糖鎖の数多くあるプロトンの中のごく一部のプロトンピークの解析データとそのチャートしか報告していない。したがって、それらを参考にしても、測定化合物の ^1H -NMR スペクトルだけで糖鎖の構造決定はできない。原理の異なるほかの分析、解析方法を併用する必要があるため、分析方法が煩雑になる。また、これらの中には破壊分析も含まれるため、構造決定には比較的大量の糖鎖が必要となる。

2. Vliegthart らが報告している解析データとそのチャートを参考にして糖鎖を同定するためには、Vliegthart らが測定したときと常に同一の磁場強度で測定する必要がある。異なる磁場強度で測定した場合、スペクトルパターンは再現されない。特に、幾つかのプロトンの吸収が重なり合って観測される領域では、同一の化合物でも異なる磁場強度で測定すると、異なったスペクトルパターンを与える。糖鎖の場合も δ 2~4 ppm 付近に重なって現れるスペクトルは、異なる磁場強度で測定すると異なったパターンを与える。しかし、現実問題として、各研究者が測定する NMR 装置の磁場強度は様々であり、Vliegthart らと常に同じ磁場強度で測定できるとは限らない。

以上の問題点を解決するためには、目的とする糖鎖化合物のすべてのプロトンを微量で完全に解析する方法を開発すれば良い。ある測定磁場において、目的とする糖鎖化合物のすべてのプロトンが解析されていれば、異なる磁場で測定したスペクトルチャートは計算により再現できる。

ところが、現在までに糖鎖の全解析を系統的に行った例は報告されていない。それは、1D ^1H -NMR スペクトルと H-H COSY スペクトルのみで糖鎖のプロトンの全解析を行うことが、非常に困難なためである。通常、更に 1D 及び二次元 (2D) 等核ハートマン-ハーン分光法 (HOHAHA)、核オーバーハウザー効果分光法 (NOESY) などの測定を追加して全解析を行う。この 1D 及び 2D HOHAHA、NOESY などの測定には、1D ^1H -NMR スペクトル測定よりも二けた以上多いサンプル量が必要であるが、微量天然糖鎖の分析法でこの量を確保できるケースは非常にまれである。この量が確保できないため多くの場合、NMR スペクトルによる同定ができないのが現状である。

本研究では、PA 化法とほぼ同じスケールの微量サンプル量で測定が可能な、1D ^1H -NMR と H-H COSY スペクトルのみを使って、糖鎖骨格のすべてのプロトンを解析する方法の開発を試みた。

2 実 験

2.1 試 薬

ガラクトース (Gal), *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) はシグマ製, Gal β 1-3GalNAc はカルビオケム製のものをを用いた。2-アミノピリジンは和光純薬製, ボランピリジンコンプレックスはアルドリッチ製のものをを用いた。フェツイン (ウシ胎児血清由来) はスピロ法で調製されたギブコ製のものをを用いた。そのほかの試薬はすべて特級試薬を使用した。

2.2 生体試料中の O-結合糖鎖の調製

二糖アルコール (Gal β 1-3GalNAc-ol)¹⁰⁾ は、ニジマス卵ポリシアロ糖タンパク質から調製したものをを使用した。

PA 化糖鎖は、ウシ胎児血清から調製されたフェツイン及びブタ胃ムチンから既報⁷⁾¹¹⁾に従って調製した。

2.3 NMR 測定条件

^1H -NMR スペクトルの測定は、次のとおりである。測定装置: Varian 製 Unity INOVA 600, 観測周波数: 599.8 MHz, 測定モード: ^1H 一次元分解能向上スペクトル (resolution-enhanced spectrum), ^1H 同種核シフト相関二次元スペクトル (H-H COSY), 測定溶媒: D_2O (99.996%), 濃度: 7.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 化学シフト内標準物質: アセトン (δ = 2.225), 測定温度: 27°C。

2.4 プログラム

使用言語: FORTRAN 77 (Absoft 製), ハードウェア: Macintosh (OS 7.5.5 以上)。

3 結果と考察

3.1 オリゴ糖の ^1H -NMR スペクトル解析支援プログラムの開発

1D ^1H -NMR と H-H COSY スペクトルの組み合わせで、目的化合物のプロトンを解析する場合は、通常、チャートから直にスペクトルパターンを読み取り、一つずつ順番にプロトンを帰属していく方法が用いられる。しかし、糖鎖の場合には多くのプロトン吸収が δ 2~4 ppm 付近に重なり合って出現するため、チャートから直にスペクトルパターンを読み取ることが非常に困難となる。

今回、この重なり合ったスペクトルの中から、各プロトンに相当する分裂パターンを抽出する方法を開発した。本方法は、重なり合ったプロトンの個々のピーク値が明りょうに読みとれ、次の条件を満足しているときに解析できる。この条件は、生体成分から分離されるほとんどの糖鎖が満足していると考えられる⁹⁾。

1. 重なり合ったピークに含まれる各プロトンの分裂パ

Fig. 1 Flow chart of ¹H-NMR spectrum analysis of oligosaccharide

ターンは, AMX タイプのみであり, ABX タイプのように高次のスペクトルパターンを含まない。

2. 糖鎖の¹H-NMR スペクトルは, 糖鎖を構成している各構成単糖のスペクトルの単純な重なり合いになっている。

3. 糖鎖を構成している構成単糖のコンホメーションは, それに相当する単糖誘導体のコンホメーションと類似している。したがって, グリコシド結合が生成することにより, 糖鎖を構成している構成単糖の各プロトンのケミカルシフト値は, それに相当する単糖誘導体のケミカルシフト値と

比較すると変化するが, 相当するプロトンの結合定数はほとんど変わらない。

次に, 重なり合ったピークから構成単糖の個々のピークを抽出するプログラムを作成した。まず, 重なり合ったピークから個々のプロトンに相当するピークを抽出するために次の条件を使用した。

1. AMX 型の分裂パターンは, 分裂線の中心線に対称である。

2. 分裂したプロトンの最初のピーク値と最後のピーク値の差は, このプロトンのカップリング定数の和に等し

Fig. 2 Chemical structures of sugars

い。

3. 重なり合ったピークに含まれる分裂パターンは、三重線（トリブレット）から八重線（オクテット）(dd-ddd)の範囲である。糖鎖の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで二重線（ダブルレット）になるプロトンは、重なり合ったピークの中に含まれない。

以上の条件に従って、糖鎖の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル解析支援プログラム（APoligo）を作成した。APoligoは、使用上の便利さのために三つのプログラムに分け、それぞれ独立プログラムにした。

①プログラム名 SINGLE: $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定したときに出力されてくる吸収位置とピーク強度の一覧表（糖鎖の骨格プロトンに相当する部分のデータ）と積分情報を入力すると、分離して現れるピーク群と重なり合ったピーク群に分ける。また、分離して現れるピーク中に不純物ピークを含んでいるときには、それを取り除く。

②プログラム名 MULT: プログラム SINGLE で作った、重なり合ったピークのデータを解析して、このピークの中に含まれる可能な分裂パターンのすべてを計算する。

③プログラム名 SOLUT: プログラム MULT で得られた

分裂パターンのデータから、全ケミカルシフト値とカップリング定数を計算し、その一覧表から、あらかじめ解析した構成単糖誘導体の各プロトンに近い値のカップリング定数を抽出する。

AMX 型の分裂パターンのケミカルシフト値とカップリング定数は、¹H-NMR スペクトル解析支援プログラム (APAS)¹²⁾¹³⁾ を使って求める。

APoligo と APAS プログラムを使って、糖鎖の¹H-NMR スペクトルを解析する手順を Fig. 1 に示した。

3.2 Galβ1-3GalNAc-PA 及び Galβ1-3GalNAc-ol の¹H-NMR スペクトル解析

糖鎖のモデル化合物として、Galβ1-3GalNAc-PA と Galβ1-3GalNAc-ol を使用し (Fig. 2), 本方法により解析を行った。Galβ1-3GalNAc-PA と Galβ1-3GalNAc-ol は、しゅようマーカーの一つである T 抗原 (Galβ1-3GalNAc) の誘導体であり、糖タンパク質の合成や分解に関与する酵素の基質としても重要な化合物である。

Galβ1-3GalNAc-PA の各構成単糖に相当する誘導体として、Galβ 部分は Galβ1-Me を、GalNAc-PA 部分は GalNAc-PA を用いた (Fig. 2)。Galβ1-Me と GalNAc-PA の¹H-NMR スペクトルを測定し、APAS を使いそれらの全解析を行った。結果を Table 1 に示した。

次に、Galβ1-3GalNAc-PA の 1D¹H-NMR (Fig. 3) と H-H COSY (Fig. 4) スペクトルを測定した。

Galβ1-3GalNAc-PA の 1D¹H-NMR のデータを SINGLE プログラムを使って、ほかのプロトンピークと分離して現れたピーク群と重なり合ったピーク群に分けた。分離して現れたピーク群は、APAS プログラムを使ってケミカルシフト

値とカップリング定数を計算した。これらの分離して現れたピーク群は、H-H COSY スペクトルから GalNAc-PA 部分の H-2, H-3, H-4, H-5 プロトン (Table 2) と、Galβ 部分の H-1, H-4 (Table 3) に帰属された。更に、H-H COSY スペクトルから、GalNAc-PA 部分の H-1, H-1', H-6, H-6' のプロトンと、Galβ 部分の H-2, H-3, H-5 プロトンは δ 3.55~3.75 ppm の重なり合ったピークの中に、Galβ 部分の H-6, H-6' プロトンは δ 3.74~3.83 ppm のピーク (Table 3) に含まれていることが分かった。

まず、GalNAc-PA 部分の解析を行った。プログラム MULTI を使って δ 3.55~3.75 ppm のピークに含まれる可能な分裂パターンをすべて計算したところ 250 種類あった。この中から GalNAc-PA 部分の H-1, H-1', H-6, H-6'

Table 1 Chemical shifts and coupling constants of GalNAc-PA and Galβ1-Me

GalNAc-PA	Galβ1-Me
H-1 = 3.533 ppm	H-1 = 4.315 ppm
H-1' = 3.478 ppm	
H-2 = 4.410 ppm	H-2 = 3.501 ppm
H-3 = 3.841 ppm	H-3 = 3.643 ppm
H-4 = 3.393 ppm	H-4 = 3.920 ppm
H-5 = 3.937 ppm	H-5 = 3.696 ppm
H-6 = 3.655 ppm	H-6 = 3.792 ppm
H-6' = 3.635 ppm	H-6' = 3.753 ppm
$J(1, 1') = -14.101$	
$J(1, 2) = 5.738$	$J(1, 2) = 8.128$
$J(1', 2) = 8.963$	
$J(2, 3) = 1.651$	$J(2, 3) = 10.052$
$J(3, 4) = 9.750$	$J(3, 4) = 3.368$
$J(4, 5) = 1.351$	$J(4, 5) = 0.889$
$J(5, 6) = 7.628$	$J(5, 6) = 7.911$
$J(5, 6') = 5.127$	$J(5, 6') = 4.443$
$J(6, 6') = -11.405$	$J(6, 6') = -11.904$

Fig. 3 Resolution-enhanced 600 MHz¹H-NMR spectrum of Galβ1-3GalNAc-PA

Fig. 4 H-H COSY spectrum of Gal β 1-3GalNAc-PA

Table 2 Chemical shifts and coupling constants of GalNAc-PA group

	Chemical shift, ppm	Coupling constant/Hz
H-2	4.58	4.76, 9.52
H-3	4.07	1.19, 9.43
H-4	3.53	1.28, 9.33
H-5	4.20	1.28, 5.22, 7.69

Table 3 Chemical shifts and coupling constants of Gal group

	Chemical shift, ppm	Coupling constant/Hz
H-1	4.53	7.87
H-4	3.90	3.29
H-6	3.80	8.69, 11.62
H-6'	3.77	3.84, 11.53

Table 4 Best values of chemical shifts and coupling constants of GalNAc-PA group

H-1 = 3.674 ppm
H-1' = 3.612 ppm
H-2 = 4.585 ppm
H-3 = 4.069 ppm
H-4 = 3.526 ppm
H-5 = 4.203 ppm
H-6 = 3.663 ppm
H-6' = 3.619 ppm

$J(1, 1') = -14.002$
 $J(1, 2) = 3.487$
 $J(1', 2) = 10.668$
 $J(2, 3) = 1.221$
 $J(3, 4) = 9.375$
 $J(4, 5) = 1.304$
 $J(5, 6) = 7.842$
 $J(5, 6') = 5.153$
 $J(6, 6') = -11.348$

に相当する分裂パターンを, SOLUT プログラムを使って抽出した. H-1, H-1', H-6, H-6' のビシナルカップリング定数は, 相手のプロトンのカップリング定数から分かるが, ジェミナルカップリング定数については分からない. そこで, ジェミナルカップリング定数については, 単糖

GalNAc-PA の値を使って, 計算した分裂パターン 250 種類の組み合わせの中から, ほぼ一致するカップリング定数を持つものを抽出した. 以上の操作で得られたケミカルシフト値とカップリング定数を初期データとして使い, APAS プログラムで実測スペクトルとよく一致するまで繰

り返し計算し、最適ケミカルシフト値とカップリング定数を得た (Table 4).

同様の方法で、Gal β 部分の解析も行った (Table 5).

最後に、最適化した GalNAc-PA 部分と Gal β 部分のデータを使って、ローレンツ曲線で近似した合成スペクトルを描き、Gal β 1-3GalNAc-PA の測定チャートと比較した (Fig. 5). 合成スペクトルと測定チャートは、非常に良い一致を示している.

Gal β 1-3GalNAc-ol の解析も、Gal β 1-3GalNAc-PA と同様に行った (Table 6). 合成スペクトルと測定チャートは、非常に良い一致を示している (Fig. 6).

以上の結果から本解析法は、糖鎖の ^1H -NMR スペクトル解析に有効な方法であることが示された. 特に、本法は

Table 5 Best values of chemical shifts and coupling constants of Gal group

H-1 = 4.529 ppm	
H-2 = 3.605 ppm	
H-3 = 3.686 ppm	
H-4 = 3.903 ppm	
H-5 = 3.639 ppm	
H-6 = 3.796 ppm	
H-6' = 3.770 ppm	
	$J(1, 2) = 8.037$
	$J(2, 3) = 9.382$
	$J(3, 4) = 3.279$
	$J(4, 5) = 0.000$
	$J(5, 6) = 9.037$
	$J(5, 6') = 3.749$
	$J(6, 6') = -11.596$

Fig. 5 The comparison of experimental and simulated ^1H -NMR spectrum of Gal β 1-3GalNAc-PA

ナノモルオーダーの量で測定が可能な、1D ^1H -NMR と H-H COSY スペクトルのみで解析できることから、生体成分から微量しか分離されない多くの糖鎖の同定に適用できることが期待される。

Table 6 Best values of chemical shifts and coupling constants of Gal β 1-3GalNAc-ol

GalNAc-ol group	Gal group
H-1 = 3.794 ppm	H-1 = 4.477 ppm
H-1' = 3.739 ppm	
H-2 = 4.391 ppm	H-2 = 3.565 ppm
H-3 = 4.064 ppm	H-3 = 3.675 ppm
H-4 = 3.507 ppm	H-4 = 3.901 ppm
H-5 = 4.193 ppm	H-5 = 3.727 ppm
H-6 = 3.674 ppm	H-6 = 3.795 ppm
H-6' = 3.631 ppm	H-6' = 3.771 ppm
$J(1, 1') = -10.852$	
$J(1, 2) = 7.460$	$J(1, 2) = 7.828$
$J(1', 2) = 7.651$	
$J(2, 3) = 1.397$	$J(2, 3) = 10.074$
$J(3, 4) = 9.523$	$J(3, 4) = 3.500$
$J(4, 5) = 1.328$	$J(4, 5) = 1.209$
$J(5, 6) = 7.977$	$J(5, 6) = 8.871$
$J(5, 6') = 5.027$	$J(5, 6') = 3.450$
$J(6, 6') = -11.356$	$J(6, 6') = -11.497$

二糖アルコール (Gal β 1-3GalNAc-ol) を提供してくださいました名古屋大学大学院生命農学研究科、北島健博士に感謝致します。本研究の一部は、文部省科学研究費補助金基盤研究 (A) (1) (09358013) によって行われた。

文 献

- 1) A. Varki: *Glycobiology*, **3**, 97 (1993).
- 2) A. Varki, R. Cummings, J. Esko, H. Freeze, G. Hart, J. Marth: "*Essentials of Glycobiology*", (1999), (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- 3) 永井克孝, 安藤 進, 入村達郎, 小川智也, 斉藤政樹, 芝 哲夫, 鈴木明身, 谷口直之, 飯田静夫編: "糖鎖 I, II, III", (1994), (東京化学同人).
- 4) S. Hase, T. Ikenaka, Y. Matsushima: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 257 (1978).
- 5) 長谷純宏: 生化学, **63**, 493 (1991).
- 6) 高垣啓一, 棟方秀和, 中村敏也, 遠藤正彦: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 789, (1995).
- 7) I. I.-Karakasa, H. Iwase, K. Hotta, Y. Tanaka, S. Omura: *Biochem. J.*, **288**, 475 (1992).
- 8) I. I.-Karakasa, H. Iwase, K. Hotta: *Eur. J. Biochem.*, **247**, 709 (1997).
- 9) J. P. Kamerling, J. F. G. Vliegenthart: *Biol. Magn. Reson.*, **10**, 1 (1992).

Fig. 6 The comparison of experimental and simulated ^1H -NMR spectrum of Gal β 1-3GalNAc-ol

- 10) H. Nomoto, M. Iwasaki, T. Endo, S. Inoue, Y. Inoue, G. Matsumura: *Arch. Biochem. Biophys.*, **218**, 335 (1982).
- 11) 傘 郁子, 岩瀬仁勇, 堀田恭子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **46**, 661 (1997).
- 12) 傘 孝之: 日本歯科大学紀要, **28**, 75 (1999).
- 13) 傘 孝之: 日本歯科大学紀要, **29**, 107 (2000); このプログラムは <ftp://ftp.ndu.ac.jp/pub/chemistry> に掲載.

要 旨

ナノモルオーダーの糖鎖で測定が可能な 600 MHz 一次元 (1D) ¹H-NMR と H-H COSY スペクトルのみを使って, 糖鎖骨格のすべてのプロトンを解析する方法を開発した. 糖鎖は構造の類似した単糖が幾つか結合した構造であるために, δ 2~4 ppm 付近に多くのプロトンピークが重なり合い, 従来 1D ¹H-NMR スペクトルと H-H COSY スペクトルのみでの全解析は非常に困難であった. 本方法では次の三つの条件を設定することにより, 糖鎖の ¹H-NMR スペクトル全解析を可能にした. 1. AMX 型の分裂パターンは, 分裂線を中心線に対称である. 2. 重なり合ったピークに含まれる多重度は, トリプレットからオクテット (dd-ddd) の範囲である. 3. 糖鎖を構成している構成単糖のコンホメーションは, それに相当する単糖誘導体のコンホメーションと類似している. この条件を使った解析プログラム (言語: FORTRAN77) を開発し, 腫瘍マーカーの一つである T 抗原 (Galβ1-3GalNAc) 誘導体の解析を行った.