総 説

オリゴ糖鎖の機器分析

中 島 佑

東北大学農学部農芸化学科(〒981 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1)

Instrumental Analysis of Oligosaccharides

Tasuku NAKAJIMA

Department of Agricultural Chemistry, Tohoku University

(1-1, Tsutsumidori-Amamiyamachi, Aoba-ku, Sendai-shi, 〒981)

Recent developments of the instrumental analysis of oligosaccharides were reviewed. The methods involved (1) microanalysis of oligosaccharides by HPLC, (2) sequence analysis by a combination of exoglycosidase and HPLC, and (3) structural characterization by $^1\text{H-NMR}$.

はじめに

複合糖質、特に糖タンパク質及び糖脂質の糖鎖は細胞表面の識別と深くかかわっており、糖鎖構造の解明は細胞の認識機構を明らかにするうえで重要な研究課題となっている。糖タンパク質あるいは糖脂質を構成する糖鎖はオリゴ糖とよばれる重合度2から20(分子量約180から3600)の大きさを持つものが大部分を占めており、本稿においては、これらマンノースを含むヘテロオリゴ糖の新しい分析法を紹介したい。

1 HPLCによるオリゴ糖の微量分析

1.1 HPAE-PAD法

最近オリゴ糖の分離に陰イオン交換樹脂とパルス電流検出計とを組み合わせたHPAE-PAD(High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection)法が用いられよい結果が得られている^{1)~3)}。

HPAE-PAD法の特徴は、高速陰イオンクロマトグラフィーにより従来分離が困難であった結合位置の異なるオリゴ糖異性体が分けられること、さらに溶出条件を変えることにより単糖から重合度約50の多糖に至るまできれいに分離できることである。又、パルス電流検出計は検出感度が10 pmolのオーダーで、しかも糖鎖を誘導体(例えば蛍光、放射能ラベル等)に導くことなく、直接カラムに供することができる点で有利である。一方、本法で唯一の欠点をあげれば、試料糖鎖をアルカリで溶出するために、試料を回収する目的には不便なことである。ただ、中性溶液に不溶である β 1-3結合、 β 1-4結合の高重合度グルコオリゴ糖の分離が可能³⁾となった

り良い点もある。

HardyとTownsend¹⁾は表-1で示した各種ヘテロオリゴ糖をHPAE-PAD法で分離した結果、用いた16種のオリゴ糖すべてが完全に分離されている(図-1)。分子量の大きいオリゴ糖は一般にretention timeが大きい、これはOH基の数が多ければnegative chargeが増加することによると考えられる。一方、分子量の同じ異性体同士の分離には、糖の環状構造を構成する炭素につくOH基の酸性度が、位置により異なる(C2-OH>(C6-OH>C3-OH>C4-OH)⁴⁾ことを利用することができる。

HPAE-PAD法はオリゴ糖鎖を構成する単糖の分析にも使われる²⁾。

小泉らは単純グリカンの部分加水分解物をHPAE-PAD法にて分析した結果、少なくとも重合度50以下

[試料]オリゴ糖混合物(表-1に示した),各1 nmol
[分離条件]カラム: Dionex Carbo Pac PA-1(4.6×250mm)
溶出液: 100mM NaOH-100mM NaOH-0.15M CH₃COONa,
検出: パルス電流滴定検出計

図-1 HPAE-PAD法による中性オリゴ糖の分離〔文献1)より改写〕

表-1 HPAE-PAD 法にて分離された中性オリゴ糖鎖の構造

化合物 番号	糖鎖構造	溶出時間 (min)	化合物 番号	糖鎖構造	溶出時間 (min)
1	Fuc(α 1-3)GlcNAc(β 1-2)Man	3.0		Fuc(α 1-3)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)	
2	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)Man	10.0	12	Man	5.6
3	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man			Fuc(α 1-3)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)	
4	Fuc(α 1-3) Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc	4.7		Fuc(α 1-3) Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)	
5	Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc	18.1		Man	9.2
6	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2) Man-OH	26.5	13	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)	
7	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-4) Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)	7.8		Fuc(α 1-3) Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)	
8	Man	23.2	14	Man	35.4
9	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)			Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)	
10	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)	24.2		Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)	
11	Man	32.7		Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)	
12	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)		15	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)	
13	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)	28.7		Man	37.3
14	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)		16	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)	
15	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-6)	33.0		Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)	39.4
16	Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man(α 1-3)

〔試料〕 β -1,3-グルカン(curdlan)の部分加水分解物
 〔分離条件〕カラム: Dionex HPIC-AS6(4×250mm)
 溶出液: 150mM NaOH-150mM NaOH・0.5M CH₃COONa,
 検出: パルス電流滴定検出計

図-2 HPAE-PAD 法による β -1,3-グリカン部分加水分解物の分離〔文献3〕より改写〕

であれば優れた分離パターンが得られることを示した(図-2)³⁾。

1.2 ピリジリアミノ化による蛍光標識法

高感度検出を目的として、糖鎖の還元末端にピリジリアミノ基の導入により蛍光標識した後、逆相 HPLC で分離された。単離及びオリゴ糖を蛍光検出器で分析する方法は、糖鎖を 0.1 pmol という超微量で検出することができる⁵⁾ 6)。誘導体は化学的に安定(酸やアルカリ加水分解、ヒドラジン分解、過ヨウ素酸々化等)で、ピリジリアミノ化糖鎖の化学解析も可能である⁷⁾ 8)。富谷ら⁹⁾ は各種糖タンパク質試料からアスパラギン結合型糖鎖を、アーモンドより調製した *N*-オリゴ糖-グリコペプチダーゼ(グリコペプチダーゼ A, 生化学工業)で切り出した後、Bio-Gel P 4 カラムによるゲル汙過にて糖鎖部分を集め、ピリジリアミノ化した。上記蛍光標識した誘導体を逆相カラムとアミド結合型カラムの併用で、113 種の糖鎖の分離に成功した。彼らはそれぞれの糖鎖の HPLC における retention time を標準グルコースオリゴマーとの相対保持時間(グルコース単位で表示)で示し(図-3)、逆相カラム(ODS-Silica)での溶出位置をグルコース単位で表したものを横軸に、また

〔試料〕ピリジルアミノ化したデキストラン部分分解物、
(図中の番号はグルコース単位を表示)。
〔分離条件〕第1カラム: ODS-Silica [Shimpack CLC-ODS
(6×150mm)], 溶出液: (A), 10mMリン酸ナトリウム緩衝液、
pH3.8, (B), 10mMリン酸ナトリウム緩衝液, 1-ブタノール、
直線濃度勾配法にて溶出, 55℃。
第2カラム: Amide-Silica [TSK-GEL Amide-80 (4.6×
250mm)], 溶出液: (A), 3%酢酸を含むトリメチルアミン、
pH7.3-アセトニトリル, 35:65, (B), 3%酢酸を含むトリメ
チルアミン, pH7.3-アセトニトリル, 50:50, 直線濃度勾
配法にて溶出, 40℃。
検出: 蛍光検出計, 励起波長320nm, 蛍光波長400nm

図-3 蛍光法によるピリジルアミノ化グルコオリゴ糖
の分離〔文献9〕より改写〕

〔試料〕マンノシンドーシス患者尿中のオリゴ糖、図中の番号、
M2: Man₂GlcNAc, M3: Man₃GlcNAc, 以下マンノース残基
の数を表す。
〔分離条件〕カラム: Amide-Silica [MicroPak NH₂-10 (4×
300mm)], 溶出液: アセトニトリル-水, 55:45から51:49まで
段階的に混合比を変化させる。26℃。
検出: 紫外吸収検出器。

図-4 高マンノース型オリゴ糖のアミン結合型シリカ
カラムによる分離〔文献10〕より改写〕

アミド-シリカカラムでの溶出位置を縦軸にとって、
113種のアスパラギン結合糖鎖の二次元マップを作成し、
未知オリゴ糖のHPLCの溶出位置をマッピングする
ことで構造推定が可能なことを示した。

1.3 その他の方法

オリゴ糖試料が nmol 以上ある場合は、前述の方法
によらずとも示差屈折検出計 (RI detector) を用いて
試料を誘導体とせずに直接分析する方法が簡単でよい。

〔試料〕卵白アルブミン糖ペプチドをエンド-β-N-アセ
チルグルコサミニダーゼ-Hで処理して得たオリゴ糖鎖を
NaB³H₄で還元したもの。1: Man₅GlcNAc-O³H, 2: Man₆
GlcNAc-O³H, 3: Man₇GlcNAc-O³H
〔分離条件〕カラム: アミン結合型カラム (μ-Bondapak/
Carbohydrate (4×300mm)), 溶出液: アセトニトリル-水
(65:35), 水の割合を変化させる。
検出: シンチレーションカウンター

図-5 ³H 標識した卵白アルブミン糖鎖の分離〔文献
11〕より改写〕

特に調製を目的とするのであれば RI 法で行う方が後の
分析のために好ましい。Warren ら¹⁰⁾ はマンノシド
ーシス患者の尿中の高マンノース型オリゴ糖をアミン結合
型シリカカラムと UV 検出器を用いて分析した (図-
4)。通常本カラムのオリゴ糖分離にはアセトニトリル-
水系が溶媒として用いられ、糖の残基数と溶出時間には
直線関係が成りたつ。

糖鎖の還元末端を NaB³H₄ で還元し、トリチウム標
識したのち HPLC で分離、シンチレーションカウン
ターで検出する方法は、理論的には超微量分析も可能で
ある。

Merris, Boeninger¹¹⁾ は卵白アルブミン糖鎖を
NaB³H₄ で還元し、アミン結合型シリカカラムを用い
て分析した (図-5)。

2 オリゴ糖鎖の構造解析

2.1 糖鎖構造解析の手順

オリゴ糖鎖解析の内容を要約すると 1) 単糖組成の分
析, 2) 糖残基の配列順の決定, 3) 糖残基の結合位置の
決定, 4) 糖残基のアノマー型分析, の 4 点になる。オリ
ゴ糖の構造解析法は、メチル化分析法、酸あるいは酵
素による完全加水分解ならびに部分加水分解法、過ヨウ
素酸々化法等、従来の方法は糖鎖の分解を伴うのに対し、
最近では分析機器 (NMR, MS, HPLC 等) の発展に伴っ
て、精製試料があれば直接分析可能な方法に変わりつつ
ある。

2.2 単糖組成の分析

オリゴ糖を酸あるいは酵素で完全加水分解した後、
HPLC あるいは GLC にて単糖組成を分析する。HPLC
による方法は HPAE-PAD 法 (図-6)²⁾ ピリジルアミ
ノ誘導体による蛍光分析法¹²⁾、トリチウム標識法¹³⁾ 等
の微量分析法から、示差屈折計を使用する一般的方法が

ある。

単糖組成分析は GLC による方法も HPLC 法に劣らず優れており、使用例が多い。GLC により糖を分析する場合は誘導体にする必要があり、アルジトールアセテート誘導体による方法 (図-7)¹⁴⁾、トリフルオロアセチル (TFA) 誘導体による方法¹⁵⁾、トリメチルシリル誘導体による方法¹⁶⁾ が一般的で、どの方法もよい結果が得られる。

2・3 酵素法による糖残基の配列決定とアノマー分析

糖残基の配列順序を決めるには、通常エキソグリコシダーゼによる逐次分解の過程を HPLC で分析する。長谷ら⁷⁾は Barbados pride 種子より得た糖タンパク、プロテアーゼインヒビターの糖鎖構造研究において、糖残基の配列とアノマー型を各種エキソグリコシダーゼによる逐次分解法で決定した (図-8)。逐次分解産物の分析は HPLC によらずとも、ゲル濾過法 (Bio-Gel P 2 あるいは P 4)、紙クロマトグラフィー、高圧紙電気泳動法等で行うことができる。

2・4 質量分析法による糖鎖の分子量、糖残基の配列

〔試料〕 1: Fuc, 2: 2-deoxyGlc, 3: GalN, 4: GlcN, 5: Gal, 6: Glc, 7: Man 各 2.5nmol。
〔分離条件〕カラム: 陰イオン交換樹脂 [Dionex Carbpac AS-6 (4.6×250mm)]。溶出液: 22mM NaOH 検出: パルス電流検出。

図-6 HPAE-PAD 法による単糖の分離 [文献 2) より改写]

〔試料〕 1: Glycerol, 2: Erythrose, 3: 2-deoxy Rib., 4: Rham, 5: Fuc, 6: Ara, 7: Rib, 8: Xyl, 9: 2-deoxyGlc, 10: Man, 11: Gal, 12: Glc, 13: Inositol, 14: GlcNAc, 15: GalNAc, 16: ManNAc。
〔分離条件〕カラム: 0.2% EGS-0.2% EGA-1.4% シリコンXE-60, 担体 (Gaschrom P, 100~200mesh) 温度: 150℃ から 205℃ まで 1℃/min 昇温

図-7 単糖アルジトールアセテートの GLC による分離 [文献 14) より改写]

順の決定

FAB (Fast Atom Bombardment) 法, SI (Secondary Ion) 法は EI (Electron Ionization) 法と比較して、オリゴ糖のような極性が高く、分子量が大きく、熱分解しやすい試料でも誘導体とせず分子イオンピーク $[(M+H)^+]$ や $(M+H)^-$ 等] が得られ、分子量が決定で

分子量マーカー, M5: $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-PA}$, M4, M3, も同様に Man 残基 (ヘキソース) の数を表す。

方法: ピリジルアミノ化したオリゴ糖の各種エキソグリコシダーゼによる逐次分解産物を HPLC 法で分析した。
カラム: MicroPak AX-5 (4.6×150mm)。

図-8 ヘテロオリゴ糖の各種グリコシダーゼによる逐次分解 [文献 7) より改写]

m/z	相対強度 (%)	イオン組成
1753	100	M-H
1735	18	1753-H ₂ O
1619	8	(S ₆ +HCO)-H/(S ₆ +HCO)-H
1591	24	(S ₆ +H)-H/(S ₆ +H)-H
1573	18	1591-H ₂ O
1416	16	(S ₅ +HCO)-H/(S ₅ +HCO)-H
1388	29	(S ₅ +H)-H/(S ₅ +H)-H
1370	18	1388-H ₂ O
1254	21	(S ₄ +HCO)-H/(S ₄ +HCO)-H
1226	45	(S ₄ +H)-H/(S ₄ +H)-H

図-9 アスパラギン結合型糖鎖の負イオン FAB-MS による構造解析 [文献 22) より改写]

きると同時にフラグメントイオンを読むことにより糖残基の配列順が決定できる^{20), 21)}。Kamerling ら²²⁾は分子量 1754 のアスパラギン結合型糖鎖の負イオン FAB-MS スペクトルをとり、糖残基の配列順序を決定した(図-9)。福田ら²³⁾は骨髄性血液病細胞より得たラクトサミノグリカンと正常細胞より得た同グリカンの FAB-MS スペクトルを比較して、糖鎖の異常を明らかにした。

2・5 オリゴ糖鎖の ¹H-NMR (PMR) による構造解析

高分解能 NMR (400 MHz, 500 MHz) のオリゴ糖構造解析への応用は、得られる情報の多さから現在ではオリゴ糖構造決定に最も有効な手段とされている^{24), 25)}。

¹H-NMR から得られる情報は、1) 糖残基のアノマー型、2) 構成糖残基の種類と組成比、及び 3) 結合様式と配列順序を示す。また、重合度が小さいオリゴ糖鎖であれば、糖鎖を分解することなしに NMR をとるだけで構造の同定が可能である。Vliegthart ら^{24), 26)}は、糖タンパク糖鎖の ¹H-NMR データを数多く解析することにより、判別しやすく、構造解析に有効な情報を与えるプロトン群をとり出し、“Structural reporter group” と名づけた。本分析により、1) アノメリックプロトン (H-1 プロトン)、ケミカルシフトとカップリングコンスタントから糖残基の種類とグリコシド結合のアノマー型がわかる。2) マンノースの H-2 と H-3 プロトン、これらシグナルのパターンから、N-アセチルグルコサミンに結合するマンノトリオース (コアの構造)

の分岐の構造がわかる。3) シアル酸の H-3 プロトン、シアル酸のグリコシド結合の型及び立体配置 (configuration) がわかる。又、構造によっては、シアル酸の糖鎖における位置も推定できる。4) フコースの H-5 とメチルプロトン、ケミカルシフトからグリコシド結合の型及び立体配置、そしてフコースの結合している糖残基の

図-10 卵白アルブミン糖鎖とそのマンノシダーゼ分解物の構造 [文献 24) より改写]

表-2 卵白アルブミン糖鎖及びマンノシダーゼ分解物のプロトン-NMR, Structural reporter group の化学シフト²⁴⁾ (オリゴ糖の構造は図-10 に示した。)

Structural reporter group	糖残基番号	オリゴ糖鎖 (図-10 参照) の化学シフト (δ)			
		(4)	(3)	(2)	(1)
Man-H-1 プロトン	1	5.071	5.069	5.071	5.070
	2	4.618	4.608	4.606	4.605
NAC-メチルプロトン	1	2.014	2.013	2.012	2.011
	2	2.076	2.061	2.060	2.061
Man-H-1 プロトン	3	4.767	4.770	4.781	4.770
	4	—	—	5.099	5.342
	4'	4.915	4.870	4.872	4.871
	A	—	5.076	5.093	5.095
	B	—	4.909	4.908	4.908
	C	—	—	—	5.052
Man-H-2 プロトン	3	4.080	4.076	4.251	4.229
	4	—	—	4.077	4.114
	4'	3.968	4.140	4.144	4.143
	A	—	4.064	4.066	4.066
	B	—	3.988	3.985	3.990
	C	—	—	—	4.066

構造が推定できる。5) ガラクトースの H-3 及び H-4 プロトン、ケミカルシフトからガラクトースと、そしてガラクトースに結合している糖残基の結合の型及び立体配置がわかる。6) アミノ糖 (*N*-アセチルグルコサミンとシアル酸) の *N*-アセチル基のメチルプロトン、これらのケミカルシフトは、小さな構造変化に対しても非常に鋭敏であり、構造解析に役に立つ多くの情報を与えてくれる。詳細は Vliegthart らの優れた総説を参照していただくとして、ここでは卵白アルブミン糖鎖及びマンノシダーゼ分解物の“Structural reporter group”のケミカルシフトを示す(図-10, 表-2)²⁴⁾。

おわりに

この 10 年間で複合糖質由来のオリゴ糖鎖構造の研究は分析機器(主として HPLC, ¹H 及び ¹³C-NMR, 2D-NMR, GC-MS, FAB-MS 等)の進歩と平行して飛躍的に進んだ。ここで取り上げた話題はその中のほんの一部であり、主として糖鎖の微量分析について述べた。従って糖鎖の構造解析には常法として使われるメチル化分析法についてはふれていない。オリゴ糖鎖構造解析についてはすぐれた成書が数多く出されているので詳しくはそちらを参照されたい^{26)~28)}。

[平成元年(1989) 5 月 15 日受理]

文 献

- 1) M.R. Hardy, R.R. Townsend, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3289 (1988)
- 2) M.R. Hardy, R.R. Townsend, Y.C. Lee, *Anal. Biochem.*, **170**, 54 (1988)
- 3) K. Koizumi, Y. Kubota, T. Tanimoto, Y. Okada, *J. Chromatogr.*, **464**, 365 (1989)
- 4) J.A. Randlemen “Carbohydrates in Solution” (R.F. Gould, ed) *Adv. Chem.* vol.117, Am. Chem. Soc., Washington DC, (1971) p.51
- 5) S. Hase, T. Ikenaka, Y. Matsushima, *J. Biochem.*, **95**, 197 (1984)
- 6) 長谷純宏, 化学と生物, **22**, 38 (1984)
- 7) S. Hase, S. Koyama, H. Daiyasu, H. Takemoto, Y. Kobayashi, Y. Kyogoku, T. Ikenaka, *J. Biochem.*, **100**, 1 (1986)
- 8) N. Takahashi, I. Ishii, H. Ishihara, M. Mori, S. Tejima, R. Jefferis, S. Endo, Y. Arata, *Biochem.*, **26**, 1137 (1987)
- 9) N. Tomiya, J. Awaya, M. Kurono, S. Endo, Y. Arata, N. Takahashi, *Anal. Biochem.*, **171**, 73 (1988)
- 10) C.D. Warren, A.S. Schmit, R.W. Jeanloz, *Carbohydr. Res.*, **116**, 171 (1983)
- 11) S.J. Merris, J.U. Boenzinger, *Anal. Biochem.*, **114**, 276 (1981)
- 12) H. Takemoto, S. Hase, T. Ikenaka, *Anal. Biochem.*, **145**, 245 (1985)
- 13) M. Takeuchi, S. Takasaki, N. Inoue, A. Kobata, *J. Chromatogr.*, **400**, 207 (1987)
- 14) L.J. Griggs, A. Post, E.R. White, J.A. Finkelstein, W.E. Moeckel, K. Holden, J.E. Zarembo, J.A. Weisbach, *Anal. Biochem.*, **43**, 360 (1971)
- 15) T. Imahari, Y. Arakawa, Z. Tamura, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **17**, 1967 (1969)
- 16) J.F. Rocca, J. Rouchousse, *J. Chromatogr.*, **117**, 216 (1976)
- 17) K. Yamashita, Y. Tachibane, A. Kobata, *Arch. Biochem. Biophys.*, **182**, 546 (1977)
- 18) 中島 佑, 農化, **62**, 1264 (1988)
- 19) T. Nakajima, C.E. Ballou, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7685 (1974)
- 20) A. Dell, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **45**, 19 (1987)
- 21) 飯島ら, “複合糖質研究法, II” 日本生化学会編, 東京化学同人(1986), p.157
- 22) J.P. Kamerling, W. Heerma, J.F.G. Vliegthart, B.N. Green, I.A.S. Lewis, G. Strecker, G. Spik, *Biomed. Mass Spectrom.*, **10**, 420 (1983)
- 23) M. Fukuda, B. Bothner, P. Ramsamooj, A. Dell, P.R. Tiller, A. Varhi, J.C. Klock, *J. Biol. Chem.*, **260**, 12957 (1985)
- 24) J.F.G. Vliegthart, L. Dorland, H. van Halbeek, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **41**, 209 (1983)
- 25) 賀佐伸省, “複合糖質研究法, II” 日本生化学会編, 東京化学同人(1986), p.131
- 26) V. Ginsberg, “Complex Carbohydrates” in *Methods in Enzymol.* vol.50, (1978), vol.83 (1982), vol.138 (1987) Academic Press, New York
- 27) 日本生化学会編, “複合糖質研究法 I 及び II” (1985) 東京化学同人
- 28) 高橋禮子ら, “糖蛋白質糖鎖研究法” 生物化学実験法, **23**, (1989), 学会出版センター