

Title	Application of fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis to analysis of disaccharides and oligosaccharides derived from glycosaminoglycans
Author(s)	大貫, 洋二
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46146
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	大 貴 洋 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 9 2 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 18 年 2 月 20 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Application of fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis to analysis of disaccharides and oligosaccharides derived from glycosaminoglycans (蛍光標識糖質電気泳動法のグリコサミノグリカン由来二糖及びオリゴ糖分析への応用)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 内 山 安 男 (副査) 教 授 高 井 義 美 教 授 米 田 悦 啓

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕 グリコサミノグリカン類は二糖を単位としてこれが連鎖した直鎖構造の生体高分子物質である。この単位二糖には一部の例外を除き硫酸基が付加されており、その硫酸化のパターンは多様であってその何種類もの二糖が組み合わされることによって極めて多くの特徴的構造を形成することが出来る。その特徴的構造のあるものはグリコサミノグリカンの生理活性、例えば抗凝固因子との相互作用や成長因子との結合に必要であることが明らかにされ、これらグリコサミノグリカン類の生理的機能の研究のために二糖分析の必要性が高まってきた。一方、ヒアルロン酸は他のグリコサミノグリカン類と異なり硫酸基を持たないが、その分子量が生理活性にとって重要であることが明らかになってきている。特にオリゴ糖のもつ生理活性、ヒアルロン酸リセプターとの結合や細胞に対するヒートショック・プロテインの発現亢進などにおいては、そのオリゴ糖のサイズが厳密であることが判ってきた。これら二糖分析やオリゴ糖分析の手法として、これまでに HPLC をはじめ、キャピラリー電気泳動、アガロースゲル電気泳動、質量分析などの方法が提案されてきた。しかしこれらは分析対象に応じてカラムや分析条件を変更する必要があったり機械装置自体が高価でメンテナンスの手間もかかったりする難点があり、もっと安価簡便な分析法の開発が望まれるものであった。そこで、A. Calabro、V.C. Hascall らによりコンドロイチン硫酸系グリコサミノグリカンの二糖分析法として紹介された蛍光標識糖鎖電気泳動法 (Fluorophone-Assisted Carbohydrate Electrophoresis ; FACE) の条件を検討して機能を拡大し、これら二糖やオリゴ糖分析に適用することを試みた。

〔 方法ならびに成績 〕

二種類の蛍光色素について検討した。一つは電荷を持たない 2-Aminoacridon (AMAC) であり、もう一つは三つのスルホン酸基による強い電荷を持つ 8-Aminonaphthalece-1,3,6-trisulfonic acid (ANTS) である。どちらも糖鎖の還元末端に還元アミノ化法により結合される。各種のグリコサミノグリカン二糖およびオリゴ糖をこれらの蛍光色素と結合させ、SDS を含まないポリアクリルアミドゲルにより電気泳動を行った。条件検討の項目は、蛍光色素の適性とポリアクリルアミドゲルの密度 (20%~36%)、電気泳動ゲルと緩衝液中のホウ酸の有無、そして電圧であった。その結果、まず二糖分析を目的としたとき、硫酸基を持つ二糖にさらに荷電を持つ ANTS を結合させると、それぞれの二糖の構造的特徴が強い荷電によって打ち消されてしまい、定性的な電気泳動にならないことが判った。そし

て、荷電を持たない AMAC との結合による、ホウ酸のない条件での電気泳動により、硫酸化されていないヒアルロン酸およびコンドロイチンの二糖を含め、すべてのコンドロイチン硫酸系二糖の定性的分析が可能であることが確かめられた。ゲルの密度は検討した範囲内ですべて二糖分析が可能であったが、20%のものがもっとも好ましかった。

一方、オリゴ糖のサイズ解析の条件検討には主にヒアルロン酸のオリゴ糖(2~16糖)が用いられた。ヒアルロン酸オリゴ糖は硫酸基をもたないために電気泳動において推進力に乏しく、荷電を持たない AMAC の結合による電気泳動ではサイズに応じた泳動が不可能であった。そこで ANTS を結合させて荷電を与えたところ、用いたすべてのオリゴ糖がそのサイズに応じた泳動を示した。このオリゴ糖サイズ分析は二糖分析と同様に検討したゲル密度 20%~36%の範囲で可能であった。さらに、硫酸基を有するコンドロイチン硫酸でも同じ手法でオリゴ糖のサイズ分析が可能であることが判った。ホウ酸は糖と特異的な相互作用があるために電気泳動を促進し、その分それぞれの二糖間の泳動速度の差異を減ずることになるため、いずれの分析でも加えない方が良かった。

[総括] 以上の検討により、グリコサミノグリカン類を構成する二糖の同定には荷電を持たない AMAC によるラベリング、オリゴ糖のサイズを同定するためには荷電を持つ ANTS によるラベリングが有効であることが判り、ゲルについては二糖分析のためには 20%密度のものが好ましく、サイズ分析は 20%~36%の範囲で可能であることが判った。また、ホウ酸は二糖の構造的特徴やオリゴ糖のサイズによる電気泳動速度の差異を縮めてしまうために、どちらの分析にも好ましくないことが判った。従来行われている HPLC による二糖分析では、お互いに硫酸基を持たないヒアルロン酸二糖とコンドロイチン二糖の分析を、硫酸基を持つ他のコンドロイチン硫酸類の二糖分析と同時に行うのは不可能であり、カラムや分析条件を換える必要があるが、FACE 法ではこれらが一度に分析できることが示された。一方、ここでは電気泳動の結果を核酸抽出で用いられる UV トランスイルミネーターを用いた蛍光写真撮影だけで示したが、ゲルスキャナーなどで蛍光強度を読み取ることで量的な測定も可能である。よってここで報告された検討により FACE 法は機能が拡大し、グリコサミノグリカンの二糖とオリゴ糖についての HPLC に匹敵する分析が、一般的な電気泳動の器具と手法により手軽に行えるようになった。

論文審査の結果の要旨

近年、タンパク質・核酸に続く「第三の生理活性物質」として糖・糖鎖は注目を浴び始めている。糖、特に糖鎖には構造の複雑さと多様性があり、これがタンパク質に比べても解析を困難にしている。本研究において申請者は、従来の HPLC や質量分析機などを用いた糖鎖分析の手法に対し、簡便で安価な分析法を提供することを試みた。申請者は FACE 法(蛍光標識糖鎖電気泳動法)を糖鎖の中でもグリコサミノグリカンの分析について条件検討し、同物質を解析できることを初めて明らかにした。この方法は、グリコサミノグリカンの微細構造を調べる二糖分析、グリコサミノグリカン由来オリゴ糖のサイズを分析するオリゴ糖分析のいずれにおいても従来の HPLC などによる分析を代替することができ、さらに分析条件の単純さは従来の HPLC ではなしえなかった一斉分析を可能にするものである。生体試料を用いた解析でも、上述のような二糖やオリゴ糖の検出が出来ることを確認した。このように安価で手軽に出来る分析法の提供は糖質分析研究を加速し糖質生命科学分野の発展に寄与するものと思われ、今後の普及も期待されることから、本研究は博士(医学)の学位授与に値する。