

Title	糖タンパク質糖鎖の微量分析法に関する研究
Author(s)	鈴木, 茂生
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3065984
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名 鈴 木 茂 生

博士の専攻分野の名称 博士(薬学)

学位記番号 第 10554 号

学位授与年月日 平成5年3月8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 糖タンパク質糖鎖の微量分析法に関する研究

論文審査委員 (主査)
教授 大森 秀信(副査)
教授 今西 武 教授 岩田 宙造 教授 北川 勲

論文内容の要旨

糖タンパク質は自然界に普遍的に存在するが、その糖鎖の機能については多くの不明な点が残されている。糖鎖の機能を明らかにするためには、微小不均一性による複雑な糖鎖の混合物を分析できる高い分離能を備えた分離法が必要である。また、糖タンパク質における糖含量は通常数%であるので、選択性が高く高感度で検出できることが望ましい。本研究では、糖タンパク質糖鎖の分離・同定法ならびに構成単糖の高感度分析法の開発を行った。

糖タンパク質の単糖組織の分析法として、ガスクロマトグラフィーを用いる方法を検討した。加水分解により得られる単糖類の混合物をジエチルジチオアセタールトリメチルシリルエーテルに導き、Scott SF96カラム(0.28mm i.d., 50m)を使用して分析したところ、良好な分離が得られた。また、ヒト尿中の非透析性成分の構成単糖分析に応用し、癌の臨床診断のための基礎的な検討を行い、興味深い知見を得た。さらに単糖をプレカラム誘導体化し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析する方法についても検討した。誘導体化試薬として1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン(PMP)を使用したところ、弱塩基性で容易に反応し、245nmに強い紫外吸収を示す有用な誘導体に導くことができた。逆相系のカラムを用いることにより、主要な糖タンパク質構成単糖を良好に分離することができた。2-シアノアセタミドによるポストカラム誘導体化法を用いる単糖の分析法についても検討を行った。高架橋度のスルホン酸型スチレン系樹脂のカラムに移動相として92%アセトニトリル-水を使用し、カラムからの溶出液にホウ酸緩衝液と2-シアノアセタミド水溶液を混合し、100℃の恒温槽中で反応させ280nmで検出した。シアル酸については酵素的にアシルマンノサミンに変換して分析することを試みた。その結果、糖タンパク質を構成する全ての単糖を分離することができた。さらに上述のPMPにより誘導体化した単糖類の分離にキャピラリーゾーン電気泳動法(HPCE)を適用した。キャリアーにホウ酸緩衝液を使用したところ、良好な分離が得られた。以上述べた4つの方法はいずれも再現性に優れ、糖タンパク質の構成単糖の分析に適用できる優れた方法であることを示した。

糖タンパク質の糖鎖を分析するためには、あらかじめペプチド鎖より糖鎖を遊離させる必要がある。そこで、N-グリコシド型糖鎖にはヒドラジン分解法やグリコペプチターゼAによる酵素処理、O-グリコシド型糖鎖はアルカリ-ポロハイドライド法を用いることにした。

これらの方法により遊離させた糖鎖の分析に、HPLCおよびHPCEを用いる方法を検討した。HPLC法の一番目としては、先に述べたPMPを用いるプレカラム誘導体化法の改良を試みたところ、1-(4-メトキシ)フェニル-

3-メチル-5-ピラズロンが有望であるという結論を得た。PMPの場合に比べ短時間で反応が完了し、PMP誘導体よりさらに高感度であることがわかった。また、シアル酸を含有する糖鎖の誘導体化でシアル酸は全く脱離しなかった。本法はグリコペプチターゼで処理した後の反応粗液を凍結乾燥した後、そのまま誘導体化することができる上、糖タンパク質として0.5mg程度で分析が可能であった。逆相系カラムを用いてウシ臍臓リボヌクレアーゼBの高マンノース型糖鎖、ウシ胎児血清フェツインの複合型糖鎖などの分析に適用し、予想通り満足できる結果が得られた。二番目の方法としては、ラテックス型の陰イオン交換カラムにパルスアンメロメトリック検出器を組み合わせて糖鎖を直接、検出することを試みた。強アルカリ性の移動相を用いて分離条件を検討したところ、重合度やシアル酸の数が多いものほど保持が強まる傾向が観察された。ブタチログロブリンの高マンノース型糖ペプチドおよびシアル酸含有複合型糖鎖の分離に適用し、0.5~0.8Mの水酸化ナトリウムの移動相を用いることにより良好な分離が得られることを示した。また、誘導体化が困難な糖アルコールも同等に検出できるため、ウシ顎下線ムチンやブタの赤血球膜よりアルカリ-ポロハイドライド処理によって得られるO-グリコシド型糖鎖の分析に適用した。検出限界は糖タンパク質として数十 μ gであり極めて高感度であった。三番目の方法として糖を特異的に認識して結合する性質を有するレクチンを硬質ゲルに固定化したカラムを調製し、糖タンパク質糖鎖のアフィニティークロマトグラフィーについて基礎的な検討を行った。レクチンとしてコンカナバリンAおよび小麦胚芽レクチンを使用し、オバルブミンから調製した一連のハイブリッド型および高マンノース型糖ペプチドのダンシル化誘導体の分離に適用した。糖鎖とレクチンの結合-解離速度が通常のクロマトグラフィーの平衡速度に比べて遅いため、十分な分離が得られなかったが、保持時間は糖鎖によって大きく異なった。保持値から結合定数を算出したところ、 $10^3 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$ という大きな差異が観察され、糖鎖とレクチンの相互作用を調べる上で、興味深い知見が得られた。四番目の方法としてピリジルアミノ化法を糖タンパク質糖鎖の標識に適用し、HPCEで分離することを試みた。イソマルトオリゴ糖混合物をモデルとして分離モードを検討した結果、ホウ酸緩衝液を用いて糖鎖誘導体をホウ酸複合体として分離するモードと、ヒドロキシプロピルセルロースを添加したリン酸緩衝液を用いて誘導体置換基の電荷を利用するモードが適当であるという結論を得た。実際にオバルブミン由来の糖鎖の分離に適用したところ、これらの2種類のモードには相補的な関係が見いだされた。また、種々の糖鎖をこれら2つのモードで分離し、泳動時間から算出した相対移動度を基に二次元マップを作成したところ、個々の糖鎖の同定に加えて糖鎖のタイプ別の確認にも利用できることがわかった。

論文審査の結果の要旨

ポリペプチドコアに糖鎖が共有結合した糖タンパク質は、自然界に広く分布し、種々の機能を有することが報告されているが、その糖鎖の果たす役割については不明な点が多い。これを明らかにするためには、多種の糖鎖の正確な分析法の確立がその第一歩となるであろう。

本研究は、ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーおよび高性能キャピラリー電気泳動を利用する糖タンパク質糖鎖の微量分析法の検討を行ったものである。ここでは、糖鎖構成単糖の分析における有効な誘導体化法の開発、糖タンパク質からの糖鎖の切り出し法の確立、糖鎖の高感度分析法のための有効な誘導体法の開発等が達成されている。さらに、キャリアーを変化させてキャピラリー電気泳動を行うことにより得られる糖鎖の二次元マップは、個々の糖鎖の同定のみならず、糖鎖のタイプ別の解析にも有用であることが示されている。これらの結果は、糖タンパク質糖鎖の分析の進歩に大きく寄与するものである。

以上の成果は、博士(薬学)の学位請求論文として、充分価値あるものと認められる。