The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

糖タンパク質糖鎖の微量分析法に関する研究

鈴 木 茂 生

①

糖タンパク質糖鎖の微量分析法に関する研究

鈴 木 茂 生

目次

序論 1

本論 4

第１章　糖タンパク質糖鎖構成単糖の分析 4

緒言 4

第１節　ジチオアセタールトリメチルシリル体としての
ガスクロマトグラフィー 7

第１項　尿中複合糖質中の単糖類のための分析条件 (7)　第２項　加水分解条件の検討 (10)
第３項　分析の定量性と再現性 (11)　第４項　健常人と癌患者尿中の各種糖含量の比較 (12)

第２節　1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンによるプレカラム誘導体化
を利用した高速液体クロマトグラフィー 14

第１項　1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン誘導体の構造解析 (14)　第２項　誘導体化条件の検討 (15)　第３項　高速液体クロマトグラフィーにおける分離条件の検討 (17)
第４項　分析の定量性および再現性 (19)　第５項　糖タンパク質構成糖の分析 (20)

第３節　2-シアノアセタミドによるポストカラム誘導体化
を利用した高速液体クロマトグラフィー 22

第１項　分離の最適化 (22)　第２項　検出法の検討 (25)
第３項　糖タンパク質中の構成単糖の分析 (28)　第４項　シアル酸の分析 (29)

第４節　1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンを誘導体化試薬に用いる
高性能キャピラリー電気泳動 32

第１項　1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン誘導体のホウ酸錯体としての単糖の分析 (32)

第１章のまとめ 36

第２章　糖タンパク質からの糖鎖の切り出し 38

緒言 38

第１節　酵素的方法 39

第２節　化学的方法 40

第３章　高速液体クロマトグラフィーによる糖タンパク質糖鎖の微量分析 42

緒言 42

第１節　プレカラム誘導体化を伴う分配クロマトグラフィーに基づくシステム....47
第１項　1-(4-メトキシ)フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン(PMPMP)の調製 (48)　第２項　グルコース-2PMPMPの特徴 (48)　第３項　プレカラム誘導体化条件の最適化 (48)
第４項　検量線と再現性 (50)　第５項　標準オリゴ糖のクロマトグラフィー (51)
第６項　糖タンパク質中の中性およびシアル酸含有オリゴ糖の分析 (52)
第７項　PMPMP誘導体の安定性 (57)

第２節　ラテックス型固定相による分離とパルスアンペロメトリーに基づくシステム....58
第１項　分離機構の考察と分離条件の検討 (58)　第２項　検出の選択性の検討 (61)
第３項　糖タンパク質由来糖鎖の分離 (61)　第４項　高速液体クロマトグラフィーによる糖鎖の構造解析への適用 (68)

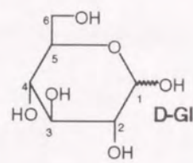
第３節　担レクチン固定相を用いる糖ペプチドの高速液体アフィニティークロマトグラフィー....71
第１項　固定相担体の検討 (71)　第２項　レクチン固定化ゲルカラムの特性 (72)
第３項　オバルブミン由来糖鎖の溶出挙動 (73)　第４項　結合定数の算出 (75)
第５項　セファロース系担体を用いた高速アフィニティークロマトグラフィー (80)

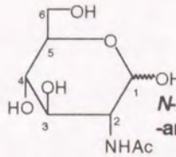
第３章のまとめ....83

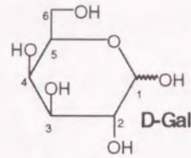
第４章　高性能キャピラリー電気泳動による糖タンパク質糖鎖の分析....84
緒言....84
第１節　基礎条件の検討....86
第１項　誘導体化の検討 (86)　第２項　ピリジルアミノ化誘導体としての直接的ゾーン泳動法 (86)　第３項　ホウ酸複合体としてのゾーン泳動 (88)
第２節　２モード分離による糖タンパク質糖鎖のマッピング....92
第１項　条件の検討 (92)　第２項　種々の糖タンパク質糖鎖の分析 (93)
第３項　電気泳動の再現性 (98)　第４項　二次元マッピングの試み (100)
第４章のまとめ....102

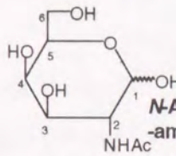
結論....103
謝辞....105
実験の部....106
引用文献....123

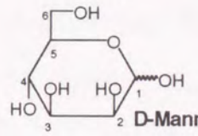
単糖構造式一覧

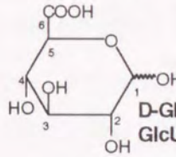

D-Glucose: Glc

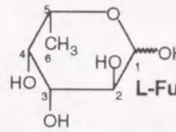

N-Acetylglucos-amine: GlcNAc

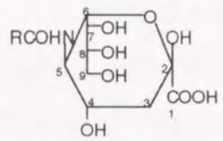

D-Galactose: Gal


N-Acetylgalactos-amine: GalNAc

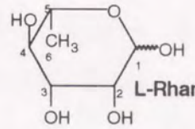

D-Mannose: Man

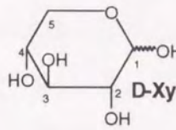

D-Glucuronic acid: GlcUA


L-Fucose: Fuc


N-Acetylneuraminic acid: NeuAc (R = methyl)

N-Glycolylneuraminic acid: NeuGl (R = hydroxymethyl)


L-Rhamnose: Rha


D-Xylose: Xyl

序論

糖タンパク質とは、共有結合したオリゴ糖鎖を有するタンパク質の総称であり、動物や植物中に広く分布する。多くのタンパク質が糖鎖をもっており、例えば、ヒト血漿中のタンパク質を例にとると、アルブミンやα-アミラーゼなどの一部を除くほとんどのタンパク質が糖鎖を有することが知られている[1]。

糖鎖の存在は主にタンパク質分子の構造安定化に寄与しているといわれ、酵素活性やホルモン活性などのタンパク質の機能発現には関与していないと考えられていたが、最近ではこのような活性の発現に糖鎖が関与している事例が次々と報告されている[2]。一方、糖鎖はタンパク質の肝組織への取り込みにも関係し、タンパク質の代謝を調節すると考えられている[3]。また、各種抗体に対する糖鎖の結合特異性は、免疫系における糖鎖の重要性を示唆し、さらに細胞間認識の機構や細胞の分化、発生とも密接に関与していること[2]を示している。近年のバイオテクノロジーの進歩により種々の糖タンパク質製剤が人工的に製造されているが、糖鎖の有無や構造の相違によって活性が変化したり、さらには、毒性を示す場合があることも報告されており、薬学分野においてもこれらの製剤の品質管理を行う上で、糖鎖の不均一性を調べることが重要となり、信頼できる糖鎖分析法の開発が望まれている。

糖タンパク質糖鎖はペプチド鎖に対する結合様式の違いにより *N*-グリコシド型と *O*-グリコシド型に大別されるが、これら2種類の糖鎖は構造や生合成経路が全く異なっている。*O*-グリコシド型糖鎖はペプチド鎖のセリンやスレオニン残基の水酸基に結合しており、生合成的にはまず*N*-アセチルガラクトサミンが結合し、次いでガラクトースや*N*-アセチルノイラミン酸などが順次、段階的に結合し構築されていく。このため、*O*-グリコシド型糖鎖は様々な構造をとる。一方、*N*-グリコシド型糖鎖はペプチド鎖の特定のアミ

ノ酸配列(Asn-Xaa-Ser/Thr; XaaはPro以外のアミノ酸）の中にあるアスパラギン残基に結合しており、生合成の段階で、まずドリコールリン酸に結合した$Glc_3Man_9GlcNAc_2$がアスパラギン残基に転移し、非還元末端よりグルコースおよびマンノース残基が遊離された後、種々の糖ヌクレオチドとトランスフェラーゼにより順次グリコシル化が起こり、様々な糖鎖が合成される。したがって、還元末端側の骨格は共通しているが、マンノース残基の脱離の程度とトランスフェラーゼ類によるプロセッシングの程度の違いにより、高マンノース型、複合型およびハイブリッド型のいずれかに分類できる。

糖タンパク質糖鎖の分子量は数百から数千程度と、決して大きくはないが、単糖残基の組成、配列ならびに結合位置の相違に基づく多様性があり、*N*-グリコシド型糖鎖だけをみても、その種類は数百種にのぼる。また、どの糖鎖がいずれのアミノ酸に結合しているかといったことも多様性の原因となる。糖タンパク質糖鎖にはこのような構造多様性があるが、これらの構造研究は主として核磁気共鳴(NMR)などの物理化学的手段、またはエキソ型グリコシダーゼ類による逐次加水分解やメチル化分析などの生物化学的手段によって行われてきた。その結果、現在までにかなりの数の糖鎖について構造が確定している。糖鎖研究においては、一般にこれらの手段によって対象となる糖鎖の構造を逐一調べることが基本となるが、これらの作業は煩雑で長時間を要する上、少なくとも10 μmol程度の純化された試料が必要である。しかし、すでにかなりの数の糖鎖の構造が知られるようになった以上、高度の分離分析法を適用して、対象とする糖鎖を既知の糖鎖と比較し同定することが可能と考えられる。しかも分離分析法をより高感度化すれば、微量試料を用いて簡便に、しかも一斉に多数の糖鎖を同定することができるものと考えられる。

そこで本研究においてはガスクロマトグラフィー(GC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、高性能キャピラリー電気泳動(HPCE)などにより上述の問題に対処した。分析

対象が生物化学的な物質群であり、微量しか入手できないことが多いため、微量分析が必要となる。そのため、標識法の開発に重点を置いた。糖タンパク質糖鎖そのものの分析法については本論文第3章および第4章に詳述する。また、これらの糖鎖の分析に関連してペプチド鎖から糖鎖を切り放す問題については第2章に述べる。さらに糖タンパク質糖鎖の構成単糖の分析も糖鎖構造に関する基本的な情報を与えるので、このための方法についても種々検討した。得られた結果を第1章にまとめる。

本論

第１章　糖タンパク質糖鎖構成単糖の分析

緒言

単糖類の一斉分析法に関する研究は、ペーパークロマトグラフィーに始まり薄層クロマトグラフィーを経て、本研究を開始した時点では、しばらくGCが利用されていた。単糖類は極性が高く揮発し難いため、GCで分析するためには、揮発性誘導体に変換する必要がある。初期の研究では、直接トリメチルシリル化する方法[4]が採用されていた。しかし、この方法では各単糖がアノマーや環異性体に基づく複数のピークを与え、多数の単糖を分析する際には複雑で正確さを欠く恐れがあった。Sawardekerら[5]は単糖の還元末端を還元してアルジトールに変え、これを完全アセチル化して分析する方法(アルジトールーアセテート法)を開発したが、この方法は誘導体化に長時間を要するという難点がある。

一方、Hondaらは、糖の過ヨウ素酸酸化生成物の一斉分析用に開発したジエチルジチオアセタール法[6]を改良して単糖分析に用いたところ、良好な結果が得られたことを報告している[7]。そこで第１節ではこの方法を尿中の非透析性成分の構成単糖分析に適用した結果について述べる。

HPLC はGC のように試料に揮発性を持たせる必要がないため、糖類をそのままの形で分離できるが、検出面においてGCで用いられる水素炎イオン化検出器のような汎用

性のある検出法がない。このため、吸光法や蛍光法などの光学的な検出法を用いる必要が起こるが、糖類には強い発色団や蛍光団がないため、これらの方法を直接適用することができない。屈折率を利用する方法や遠紫外部吸収を利用する方法はあるが、いずれも感度が低く、その上、選択性がないため、糖類以外の成分も同時に検出される。強アルカリ中でのパルスアンペロメトリーだけは例外であり、ピコモルレベルの検出が可能であるが、選択性がやや乏しく、アミン類なども同時に検出されることがある（この検出法を用いたHPLCについては第３章第２節で取り上げる）。第２節以降ではラベル化反応により吸光性および蛍光性誘導体に変換したのち、検出する方法について述べる。

ラベル化反応には分離に先立って行うプレカラム誘導体化と分離したのち行うポストカラム誘導体化の2つがある。プレカラム誘導体化では分析対象がもとの構造と異なるため、化学的性質を考慮して分離条件を選定しなければならない。これに反してポストカラム誘導体化ではこの問題がない。一方、誘導体化効率は概してプレカラム法の方がよく、ポストカラム法では反応時間、温度、試薬の影響などの点で制約が大きいため一般に感度が低い。しかし、分析の自動化という面ではポストカラム法の方が優れている。

そこでこの二つの方式の誘導体化法、それぞれについて開発を行った結果を述べる。先ず、第２節においてはプレカラム誘導体化を述べ、第３節ではポストカラム誘導体化についての研究結果を示す。

HPCEはごく近年普及し始めた分離分析法であり、HPLCを凌ぐ方法として注目されている。HPCEは内径10～100 μmのキャピラリー中で行う電気泳動であり、HPLCのように固定相と移動相の間での試料成分の分布の違いを利用して分離するのではなく、一般には自由溶液中で試料成分の電荷/サイズ比の違いや試料成分－キャリアー間の相互作用の違いを利用して分離を行う。また、キャピラリーの内壁とキャリアー間に形成される電気二重層により電気浸透流が発生し、これを試料成分の移送に利用することがで

きる。キャピラリー内に発生するジュール熱は効率よく放散され、電気浸透流はほぼ栓流となって管内のいずれの部位においても一定の流速を与えるため、分離された成分の拡散は最小限に止められる。したがって、管の中央部の流れが早く壁面近くでは流れが遅いHPLCの場合と比べて、高分離能が得られる。また、オンカラム検出ができるため、他の電気泳動法と違って、HPLCに匹敵する定量の再現性が得られることもHPCEの特徴の一つである。第４節ではHPCEを用いてプレカラム誘導体化した単糖類の分析結果について述べる。

第１節　ジチオアセタールトリメチルシリル体としてのガスクロマトグラフィー

ジチオアセタール法は、単糖をエタンチオール－トリフルオロ酢酸混合液に溶解して放置することにより生成した単糖のジエチルジチオアセタールに、さらにピリジン－ヘキサメチルジシラザン－塩化トリメチルシランを加えることによってトリメチルシリル化するというone-pot 反応による方法であり、迅速さと簡便性においてアルジトール－アセテート法[5]を凌ぐものである。遊離のアミノ糖類は亜硝酸バリウム－硫酸により脱アミノ化して2,5-アンヒドロ糖に変換した後、上記の操作を行うことで、同様に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くことができる。

著者らはこの方法を基にして、糖タンパク質糖鎖に含まれる単糖類の分析を試みた。その結果、標品のキシロース、ガラクトース、マンノース、フコース、グルコサミンおよびガラクトサミン由来のピークは完全に分離し、1時間以内に精度よく分析することができた。そこで、この結果を基にヒト尿中の複合糖質に含まれる単糖類の一斉分析を行った。

第１項　尿中複合糖質中の単糖類のための分析条件

尿中の複合糖質中の構成単糖の分析はFig. 1に示す操作に従って行った。すなわち、尿より得た非透析性成分を酸で加水分解し、その残渣をジチオアセタール化、次いでトリメチルシリル化した。加水分解条件については第２項で詳述する。ヘキソサミン類は残渣に亜硝酸バリウムおよび希硫酸を加えて2,5-アンヒドロ糖としたのち、同様に誘導体化した。本操作に要する分析時間は誘導体化からGC分析までで約2 hrであった。Fig. 2に健常人の尿試料の分析例を示す。図中のピーク2, 4, 7, 8および9はそれぞれキシロース、

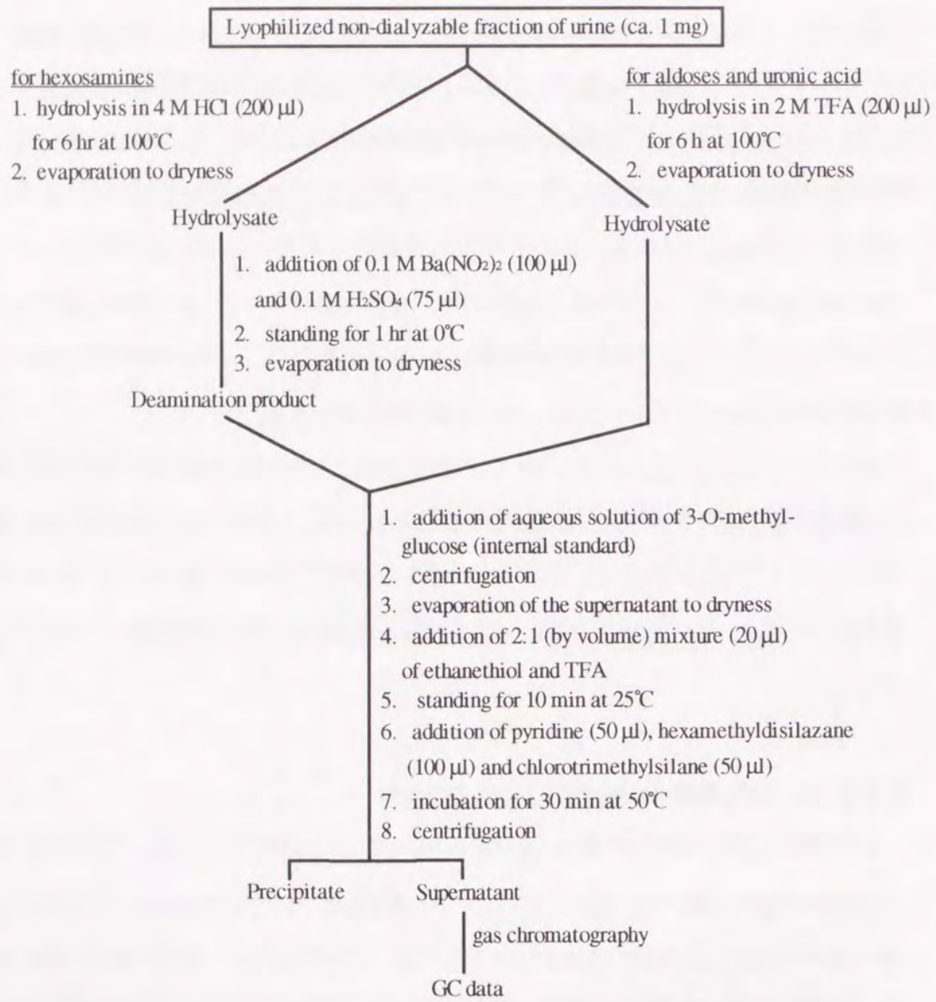


Fig. 1. Procedure for the determination of the component monosaccharides in total non-dialyzable urinary glycoconjugates.

フコース、グルコース、マンノースおよびガラクトースに相当する。また、ピーク6は唯一のウロン酸であるグルクロン酸に対応した。尿中の複合糖質としては糖タンパク質、ムコ多糖の他に若干のヘテロ多糖類の存在も予測される。尿の非透析部分に存在する糖類のうち、フコース、マンノース、ガラクトースは糖タンパク質の主要構成単糖であり、キシロースやグルクロン酸はプロテオグリカンやその他の多糖類に由来することが予測される。Fig. 2には、また、グルコースの存在が認められたが、ピークは小さく、透析されずにわずかに残存した尿糖に由来するものと考えられる。

ヘキソサミン類の分析結果もFig. 2bに示した。グルコサミンおよびガラクトサミン由来の2,5-アンヒドロ糖に起因するピークはそれぞれピーク1および3として検出された。

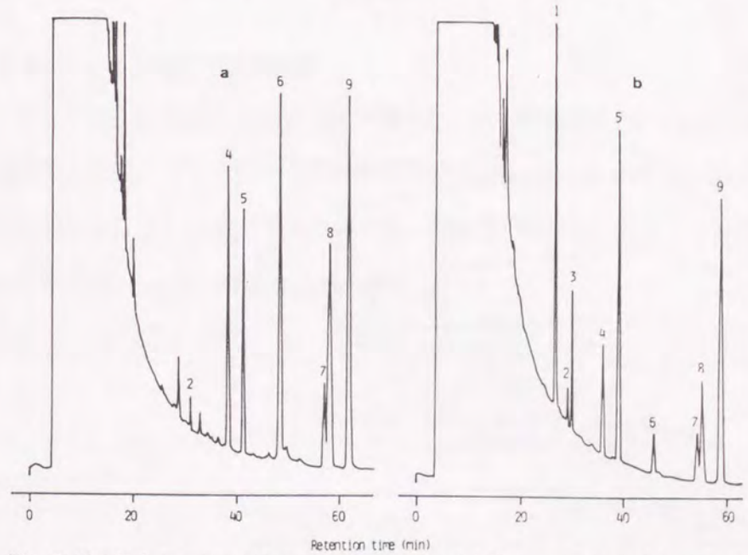


Fig. 2. Typical gas chromatogram obtained for (a) the component aldoses and uronic acid and (b) the component hexosamines in the total non-dialyzable glycoconjugates from a normal urine sample. The component aldoses and uronic acid were analysed as their trimethylsilylated diethyldithioacetals. The component hexosamines were selectively converted to their 2,5-anhydrohexoses with nitrous acid and analysed as the trimethylsilylated diethyldithioacetals of the latter, together with the derivatives of the remaining aldoses and uronic acid. Peak assignment: 1 = glucosamine, 2 = xylose, 3 = galactosamine, 4 = fucose, 5 = 3-O-methylglucose (internal standard), 6 = glucuronic acid, 7 = glucose, 8 = mannose, 9 = galactose.

この条件では同様に他のアルドース類のピークも観察された。

第2項　加水分解条件の検討

複合糖質糖鎖を加水分解して単糖類を得るためには、一般に酸触媒が用いられる。しかし、生成した単糖が副反応により分解することによって収率が低下する場合があり、塩酸では特にこの傾向が強いといわれている。また、単糖の種類によって分解の程度も異なる。これらのことを考慮して、本実験においてはアルドースおよびウロン酸の加水

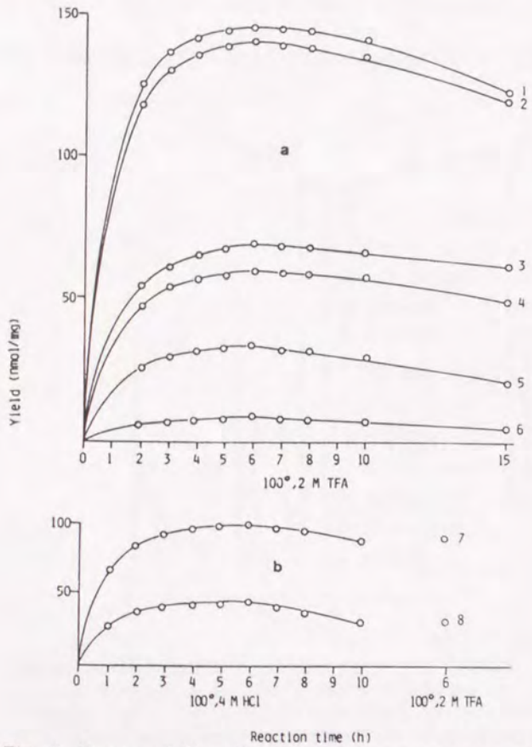


Fig. 3. Course of liberation of (a) the component aldoses and uronic acid and (b) the component hexosamines in the total non-dialyzable glycoconjugates from the same urine sample as used in Fig. 1, as estimated from the peaks of their derivatives. 1 = Glucuronic acid, 2 = galactose, 3 = mannose, 4 = fucose, 5 = glucose, 6 = xylose, 7 = glucosamine, 8 = galactosamine.

分解には、トリフルオロ酢酸を用いた。この酸は副反応を起こし難く、また減圧乾固することで容易に除去することができた。Fig. 3aに2 M トリフルオロ酢酸を用いて、尿の非透析部分を100℃で加水分解した際の各単糖の生成量を経時的に調べた結果を示す。どの単糖についても時間とともに生成量が増大し、約5時間でほぼ一定となったのち徐々に減少した。そこで、最適な加水分解時間として6時間を選んだ。一方、ヘキソサミンの加水分解にはより激しい条件が必要であったが、遊離したヘキソサミンは塩酸に対して安定であることがわかった。そこで、4 M 塩酸を使用した。先と同様にヘキソサミンの生成量を経時的に調べた。Fig. 3bに示すように、アルドースやウロン酸の場合と同様の曲線が得られたことから、6時間を至適時間とした。

第3項　分析の定量性と再現性

分析の精度を調べる目的で、添加実験を行い回収率を算出した。Table 1 に得られた結果を示したが、92 ～ 105% と満足できる結果が得られた。また、Table 2 には分析の再現性を示したが、10回繰返しにおいて、相対標準偏差は3.2 ～ 5.2% の範囲に収まり、この定量法はほぼ満足できるものであった。

Table 1

Recoveries of the Monosaccharides
Added to the Hydrolysate of the Non-Dialyzable Fraction of a Urine Sample

n = 5 in each experiment.

Monosaccharide	Average amount found in the hydrolysate (nmol/mg)	Experiment 1			Experiment 2		
		Amount of monosaccharide added (nmol/mg)	Average amount found for total monosaccharide (nmol/mg)	Recovery (%)	Amount of monosaccharide added (nmol/mg)	Average amount found for total monosaccharide (nmol/mg)	Recovery (%)
Xylose	11.2	5	16.0	99	10	20.8	94
Fucose	45.8	25	69.8	99	50	93.6	98
Galactose	112.3	50	159.3	98	100	222.6	105
Glucose	24.2	10	31.5	92	20	41.8	95
Mannose	47.8	25	70.5	97	50	100.2	102
Glucuronic acid	379.8	200	550.4	95	400	750.2	96
Galactosamine	43.5	25	64.5	94	50	90.6	97
Glucosamine	120.3	50	171.3	101	100	204.8	93

Table 2
Precision in the Determination of the Component Monosaccharides in Total Non-Dialyzable Urinary Glycoconjugates

n = 10.

Monosaccharide	Amount of monosaccharide (nmol/mg)		Coefficient of variation (%)
	Average	S.D.	
Xylose	10.3	0.37	3.6
Fucose	47.5	1.57	3.3
Galactose	109.7	3.51	3.2
Glucose	23.9	1.12	4.7
Mannose	45.6	2.23	4.9
Glucuronic acid	401.5	20.9	5.2
Galactosamine	42.5	2.17	5.1
Glucosamine	126.2	6.18	4.9

第4項　健常人と癌患者尿中の各種糖含量の比較

Table 3 に健常人および癌患者尿中の構成単糖の含量、ならびに各単糖類の含量比を示した。一般に、キシロース含量は健常人ではバラツキが小さいのに対し、癌患者尿では極めて幅の広い分布を示した。また、フコース含量については、癌患者尿は健常人に比べて低いレベルを与え、フコース／ガラクトース比が顕著に低い値を示した。癌患者におけるこの現象は新規な発見であり、肺、乳、肝臓および膵臓癌で顕著に現れた。癌の進行に伴って血漿および組織におけるフコシルトランスフェラーゼの活性が増加する現象[8]と考え合わせると興味深い。マンノースとガラクトースは糖タンパク質に特異的な糖であり、ムコ多糖には含まれない。マンノース／ガラクトース比は癌患者、健常人とも変動は低かったが、健常人より癌患者の方が若干高い値を示し、特に胃、結腸、子宮および肝臓癌で顕著であった。値が高くなった理由として、癌患者では糖タンパク質の一種である癌胎児性抗原[9]が増加していることによるものと考えられる。

以上の知見は限られた試料を用いて得られたものであるため、さらにデータ数を増やして検討を重ねる必要があるが、本分析法は臨床的に体液中の複合糖質糖鎖の存在状況を探り、疾病との関係を調べるためには有用な方法と考えられる。

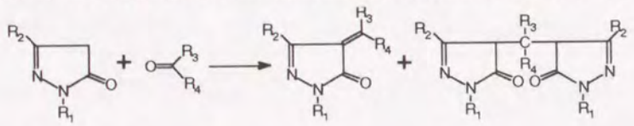
Table 3
Monosaccharide Compositions of Total Non-Dialyzable Urinary Glycoconjugates for Normal Subjects and Cancer Patients

Monosaccharide composition	Cancer patients (n = 15)			Normal subjects (n = 16)	
	Average	S.D.	p in t-test*	Average	S.D.
Amount of monosaccharide (nmol/mg)					
Xylose (Xyl)	10.5	6.8	<0.4	12.1	2.4
Fucose (Fuc)	31.6	16.6	<0.005	54.4	18.4
Galactose (Gal)	119.1	47.5	<0.6	127.4	29.6
Glucose (Glc)	47.6	46.1	<0.1	25.1	10.5
Mannose (Man)	50.5	19.2	<0.8	48.5	12.7
Glucuronic acid (GlcUA)	184.6	127.3	<0.001	432.3	110.9
Galactosamine ($GalNH_2$)	31.3	14.8	<0.05	41.9	10.8
Glucosamine ($GlcNH_2$)	129.0	66.2	<0.975	128.3	20.9
Molar ratio					
Xyl/Gal	0.10	0.08	NS**	0.10	0.03
Fuc/Gal	0.27	0.07	<0.001	0.42	0.08
Glc/Gal	0.53	0.56	<0.05	0.19	0.06
Man/Gal	0.45	0.10	<0.025	0.38	0.04
GlcUA/Gal	1.52	0.86	<0.001	3.71	1.52
$GalNH_2$/Gal	0.27	0.08	<0.05	0.35	0.13
$GlcNH_2$/Gal	1.11	0.43	<0.9	1.08	0.39
$GalNH_2$/$GlcNH_2$	0.26	0.09	<0.02	0.33	0.06

*Aspin-Welch t-test was done to judge significant difference between the average of individual cancer patients and that of individual normal subjects.
**Not significant.

第2節　1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンによる プレカラム誘導体化を利用した高速液体クロマトグラフィー

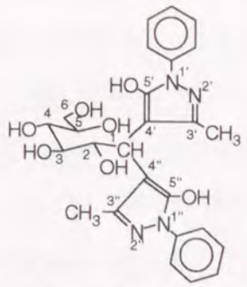
糖類のプレカラム誘導体化に関して既にいくつかの方法が報告されている。例えば、糖の水酸基に発色団を導入する方法としてベンゾイル化[10]、*p*-ブロモベンゾイル化[11]、*p*-ニトロベンゾイル化[12]、ジメチルフェニルシリル化[13]などがあるが、これらはアノマーの混合物を与える。最近ではダンシルヒドラジンを用いてヒドラゾンとして分析する方法[14]も報告されているが、この方法も同様にsyn/anti異性体を与えるため、決して好ましい方法とはいえない。これらの短所を補う方法として、還元的に1位にアミノ基を導入し、これを介して発色団を導入する方法があり、その中でも2-アミノピリジン[15]や*p*-アミノ安息香酸エチル[16]がよく用いられている。しかし、過激な反応条件が必要なため、不安定な糖類に対しては決して適当ではない。そこで誘導体化試薬を種々検討した結果、1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン(PMP)がアルドースと定量的に反応することを見出した。ピラゾロン誘導体は染料や種々の医薬品原料として広く使われており、4位のメチレンがアルデヒドと容易に反応することが知られている(Scheme. 1参照)[17]。PMPを用いる方法は操作が簡便で、誘導体は紫外部に強い吸収を示す。本節ではこの誘導体化法に関して述べ、この方法を用いて単糖類を分析した結果について述べる。



Scheme 1. Reaction of 2-pyrazolin-5-one with aldehyde

第1項　1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン誘導体の構造解析

メタノール中でグルコースを過剰のPMPと反応させ、反応液を薄層クロマトグラフィーで調べたところ、試薬のほかに単一の生成物のスポットを与えた。そこで、このスポットをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。得られた化合物の^{1}H-および^{13}C-NMRスペクトルはPMPに基づく1対のメチル基およびフェニル基のシグナルを与えた。また、負イオンFAB-MSスペクトルでは*m/z* 509 に擬分子イオン$[M - 1]^{-}$を与え、グルコース1分子に対してPMP 2分子が結合していることが示唆された。^{13}C-NMRスペクトルではピラゾロン環のメチレン基が消失し、メチン基の形成も見られないことから生成物はグルコースの1位炭素にPMP がC-4位を介して2分子結合した構造(Scheme 2)をもつと推定した。これら2つのPMP分子が導入されることにより生成物は強い紫外部吸収を示したが、蛍光性は示さなかった。しかし、グラッシーカーボン電極を用いる電気化学的検出を行ったところ、さらに高感度を示した。グルコース以外の糖類についても生成物を精査し、同様の誘導体が得られることを確認した。



Scheme 2. Structure of glucose-2PMP

第2項　誘導体化条件の検討

反応液中の試薬の除去溶媒の検討：プレカラム誘導体化法では、過剰の試薬を除去する必要がある。本誘導体化法では操作が簡便な有機溶媒抽出の適用を試みた。用いた溶媒の種類とPMPの除去率な

Table 4
Comparison of the Efficiencies of Clean-up by Solvent Extraction

Solvent	Remaining reagent (%)	Recovery of glucose-2PMP (%)
Benzene	41	92
Carbon tetrachloride	46	86
Chloroform	4	91
Ethyl acetate	14	61
n-Hexane	86	70

Note. The amounts of reagent and glucose-2PMP used were 25 μmol and 100 pmol, respectively.

らびにグルコースのPMP誘導体(グルコース-2PMP)の回収率をTable 4に示す。調査した溶媒のうち、クロロホルムが最も良い結果を与え、1回の抽出でグルコース-2PMPの250倍量の試薬を96%除去できる上、グルコース-2PMPの回収率も91%と良好であった。タイプの異なるその他の単糖類であるキシロース、*N*-アセチルグルコサミン、フコースについて回収率を調べたところ、各々92%, 89%および88%であった。

プレカラム誘導体化条件の最適化：糖モデルにグルコースを選び、水酸化ナトリウム濃度、試薬濃度、反応温度および反応時間について検討した。水酸化ナトリウムの濃度はFig. 4aに示すように、およそ0.3 M が至適濃度であった。アルカリ濃度をこれ以上に上げると、HPLCにおいて小さなピークが観察されることから、副反応により収率が低下するものと推定される。PMP濃度の影響をFig. 4bに示すが、グルコース-2PMPの収率は0.5 M まで急速に上昇し、逆に0.8 M を越えると収率の低下が観察された。反応温度が収率に与える影響は、Fig. 4c に示すように70℃までほぼ直線的に上昇し、

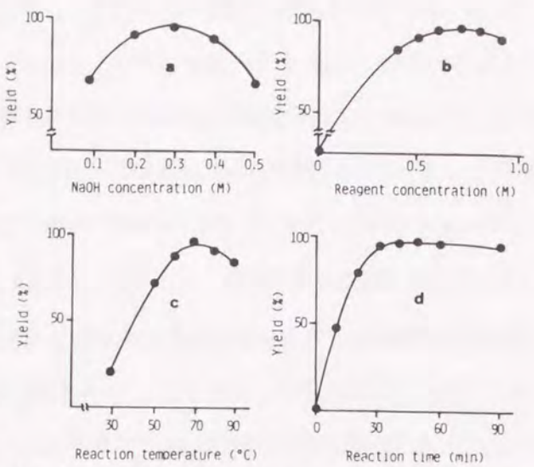


Fig. 4. Optimization of the conditions for precolumn labeling of glucose, as observed from the yield of glucose-2PMP determined by UV detection. (a) Effect of alkali concentration. Reagent concentration, 0.5 M; reaction temperature, 70°C; reaction time, 30 min. (b) Effect of reagent concentration. Concentration of sodium hydroxide, 0.3 M; reaction temperature, 70°C; reaction time, 30 min. (c) Effect of reaction temperature. Concentration of sodium hydroxide, 0.3 M; reagent concentration, 0.5 M; reaction time, 30 min. (d) Time course. Concentration of sodium hydroxide, 0.3 M; reagent concentration, 0.5 M; reaction temperature, 70°C. Sample, glucose (100 pmol); column, Capcell Pak C_{18} (4.6 mm i.d., 25 cm); eluent, 22 v/v% acetonitrile in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0); flow rate, 1.0 ml/min; detection, UV absorption at 245 nm.

70℃を越えると逆に副反応によるためか収率は低下した。反応時間の影響をFig. 4dに示したが、30分の反応時間でグルコース-2PMPの生成量は一定に達した。これらの結果より、「実験の部」に示した標準操作を確立した。また、本条件では反応液は弱アルカリ性(pH 8.2)を示したが、反応過程での糖部分の異性化は観察されなかった。

第3項　高速液体クロマトグラフィーにおける分離条件の検討

得られた単糖類のPMP誘導体混合物について、種々の固定相および移動相を用いて分離条件を検討したところ、固定相にはオクタデシルシリカを担体とするCapcell Pak C_{18}を用いるのが最適であるという結果が得られた。

これらPMP誘導体の保持挙動を、移動相に種々のpHの0.1 Mリン酸緩衝液とアセトニ

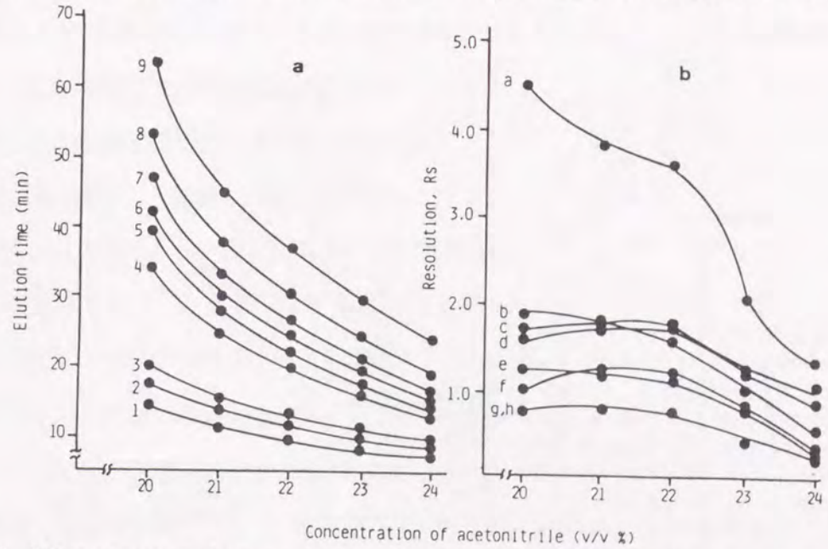


Fig. 5. Effect of acetonitrile concentration on retention (a) and resolution (b) of peaks. Eluent, 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0) containing acetonitrile. Other analytical conditions were the same as those described in Fig. 4. Curves: 1 = mannose, 2 = lyxose, 3 = rhamnose, 4 = *N*-acetylglucosamine, 5 = glucose, 6 = *N*-acetylgalactosamine, 7 = galactose, 8 = arabinose, 9 = fucose. Pairs: a = rhamnose/*N*-acetylglucosamine, b = mannose/lyxose, c = arabinose/fucose, d = *N*-acetylglucosamine/glucose, e = galactose/arabinose, f = lyxose/rhamnose, g = *N*-acetylgalactosamine/galactose, h = glucose/*N*-acetylgalactosamine.

トリルの混合液を用いて検討した。Fig. 5にはpH 7.0でのアセトニトリル濃度の効果を示す。アセトニトリルの濃度が増すほど各単糖誘導体の保持時間が減少した(Fig. 5a)が、各単糖誘導体の溶出順序が逆転することはなかった。Fig. 5bにはアセトニトリル濃度と分離度(Rs)の関係を示す。*N*-アセチルガラクトサミンとガラクトース(g)、およびグルコースと*N*-アセチルガラクトサミン(h)の分離は十分ではなかったが、約20v/v%附近で最も良好な分離が得られた。

リン酸緩衝液のpHの効果をFig. 6 に示す。4以下の低いpHではフコースのような疎水性のより高い糖の保持時間が顕著に増加した。しかし、*N*-アセチルガラクトサミン－ガラクトース(g)およびグルコース－*N*-アセチルガラクトサミン(h)など一部の組み合わせを除くと、pH 4.5 から 5.5がもっとも高い分離度を与えた(Fig. 6b)。これらの結果からリン酸緩衝液のpHは5が最適であると考えられる。しかし、この条件ではラムノースと*N*-

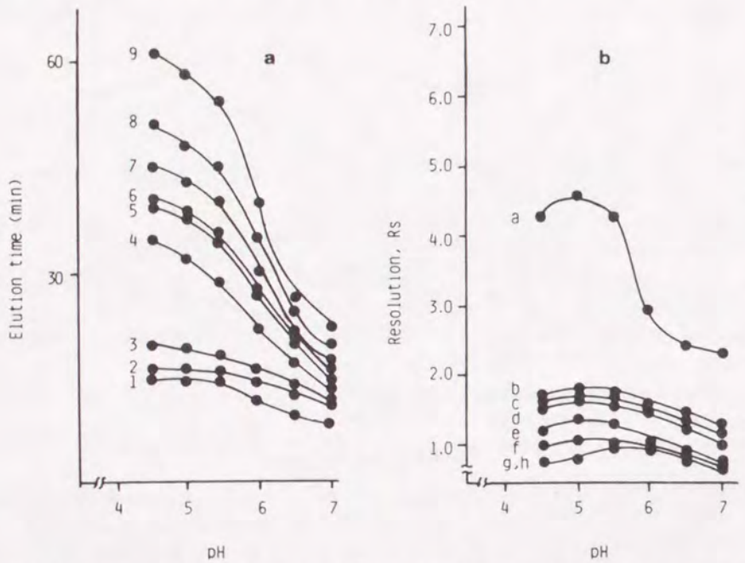


Fig. 6. Effect of pH on retention (a) and resolution (b) of peaks. Eluent, 22 v/v% acetonitrile in 0.1 M phosphate buffer. Other analytical conditions were the same as those in Fig. 4. Designation of curves is the same as that in Fig. 5.

アセチルグルコサミンの間が広くなり、分析に長時間を要する。そこで移動相に18%アセトニトリルを含む0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)を用いることにした。その結果、Fig. 7に示すように9種類の単糖を30分でほぼ完全に分離できた。これには糖タンパク質糖鎖に共通な単糖全てが含まれている。

N-アセチルガラクトサミン誘導体は本分離モードにおいてテーリングを示したが、その理由は不明である。しかし、他の単糖誘導体はいずれも理論段数にして10,000 - 18,000と高い値を示した。また、本分離モードではアセトニトリル含量の増加に伴って、すべての単糖誘導体の保持時間が減少したことから、分離の主因は疎水性相互作用であると思われる。しかし、異性体間で保持時間に違いが見られるばかりでなく、メチルペントースではフコースの保持時間が30分と大きいのに比べてラムノース(ピーク3)は約14分とペントースやヘキソースよりもむしろ小さな値を示したことなどは単に疎水性相互作用のみで説明することは困難であり、糖の水酸基とピラゾール環のエノール基との相互作用の寄与も考慮すべきである。

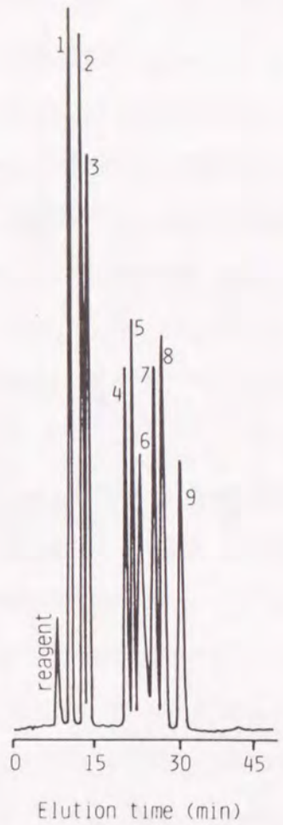


Fig. 7. Separation of the PMP derivatives of selected monosaccharides, Eluent, 18 v/v% acetonitrile in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0); sample amount injected, 100 pmol each. Peak assignment is as in Fig. 5. Other analytical conditions were the same as those in Fig. 4.

第4項　分析の定量性および再現性

検量線：ラムノース-2PMPを内部標準としてグルコース-2PMPの検量線を作成した結果、5 - 1000 pmolの範囲で良好な直線性が得られた。S/N = 2としたときの検出下限は、約1 pmolであった。また、電気化学的検出器を用いれば、より広い範囲(0.5 - 2000 pmol)で直線性が得られた。この場合の検出下限は約100 fmolであった。

再現性：グルコース-2PMPの10 pmol, 500 pmolおよび1000 pmolレベルでの再現性(n = 7)は、紫外部検出法ではそれぞれ1.9, 1.1および2.3%であった。また、電気化学的検出法ではそれぞれ1.2, 1.8および2.9%であった。保持時間の相対標準偏差は、全てのアルドースについて1%未満であった。

第5項　糖タンパク質構成糖の分析

糖タンパク質を構成する単糖としてはマンノース、ガラクトース、フコース、*N*-アセチルガラクトサミンおよび*N*-アセチルグルコサミンが知られている。そこで、上述の分析法をこれら単糖類の分析に適用した。その結果、Fig. 8に示すように30分以内にこれら構成単糖を一斉分離することが可能であった。Fig. 8は各糖タンパク質試料を第一節第二項で述べた加水分解条件の検討結果に基づいて、アルドース類は2 M トリフルオロ酢酸中100℃、6時間、また、ヘキソサミン類については4 M 塩酸中100℃、6時間加水分解して単糖を遊離させた。遊離したヘキソサミンは飽和炭酸水素ナトリウム中で無水酢酸を加えることにより再*N*-アセチル化したのち分析した。Table 5には得られた定量値を示す。Table 5には他法[18, 19]により得られた値も比較として( )内に記載した。その結果、ムチン中のフコース、フェツイン、チログロブリンおよびオバルブミン中の*N*-アセチルグルコサミンのように一部、若干異なる値を示すものもあったが、概ね良好な一致がみられた。

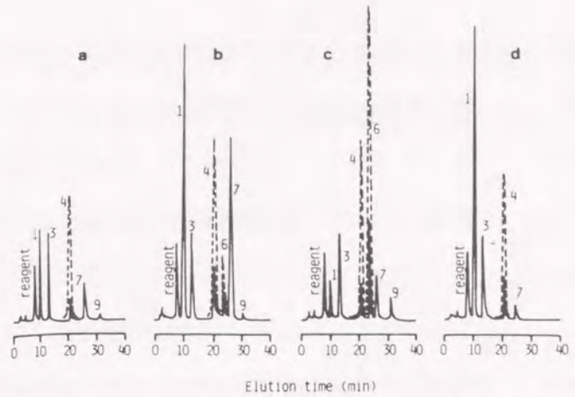


Fig. 8. Analysis of constituent monosaccharides of human serum transferrin (a), calf serum fetuin (b), bovine submaxillary mucin (c), and hen egg ovalbumin (d). Sample amount injected, 20 μg each as protein. Eluent, 18% acetonitrile in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0). Other analytical conditions were the same as those described in Fig. 4. Peak assignment is the same as that in Fig. 5. Rhamnose (peak 3) was used as an internal standard. Solid and dotted lines represent the results obtained for the hydrolysates with trifluoroacetic and hydrochloric acid, respectively.

Table 5
Determination of Component Monosaccharides in Glycoproteins

Glycoprotein (source)	Content (w/w%)				
	Fucose	Mannose	Galactose	Glucosamine	Galactosamine
Transferrin	0.040	1.08	1.00	2.52	0.053
(human serum)	(0.031)[a]	(1.11)[a]	(0.86)[a]	(1.79)[a]	(-)[a]
Fetuin	0.033	2.45	3.49	2.62	0.54
(calf serum)	(0.027)[a]	(2.73)[a]	(4.59)[a]	(5.3)[a]	(0.67)[a]
Thyroglobulin	0.38	2.26	1.49	5.55	1.38
(bovine thyroid)	(0.37)[b]	(2.09)[b]	(1.20)[b]	(2.95)[b]	(1.38)[b]
Ovalbumin	-	2.80	0.12	2.73	-
(hen egg)	(-)[a]	(2.4)[a]	(0.15)[a]	(1.28)[a]	(-)[a]
Mucin	0.53	0.16	1.24	6.22	14.68
(bovine submaxillary gland)	(0.95)[a]	(0.21)[a]	(1.52)[a]	(6.92)[a]	(16.8)[a]

[a]Ref. (18)
[b]Ref. (19)

本分析法は微量の試料で分析ができる上、操作も簡便であるため、生体中の糖タンパク質試料の構成単糖の分析に威力を発揮すると思われる。

第3節　2-シアノアセタミドによるポストカラム誘導体化を利用した高速液体クロマトグラフィー

第2節で述べたように糖類には発色団や発蛍光団がないため、HPLCで分離した糖成分の検出法を工夫しなければならない。第2節ではプレカラム方式による誘導体化について述べたが、ポストカラム標識は自動化し易いという利点がある。ポストカラム誘導体化では選択性が高く、しかも反応が迅速で高感度であることが要求される。このような観点から2-シアノアセタミドとの反応は特に有望であると考えられる。一方、ポストカラム誘導体化においては糖類をそのままの形で分離することになるが、その際に用いる移動相が誘導体化に調和する必要がある。本節では、糖タンパク質糖鎖に含まれる単糖について、検討した結果を述べる。

第1項　分離の最適化

糖タンパク質を構成する単糖としては、アルドースとしてガラクトース、マンノースおよびフコース、ヘキソサミンとして*N*-アセチルグルコサミンおよび*N*-アセチルガラクトサミン、それにシアル酸として*N*-アセチルーおよび*N*-グリコリルノイラミン酸がある。これらの糖類を直接HPLCで分離する際に適した分離モードとしては、陰イオン交換カラムに移動相としてホウ酸緩衝液を用いるモード[20, 21]と順相分配モードが考えられる。前者はすでに種々の糖類の分析に適用されてきたが、すべての糖タンパク質構成単糖を分離するためには濃度勾配を必要とする上、カラムの理論段も低い。一方、順相分配モードでは、一般に用いられているアミノプロピル基修飾シリカやジヒドロキシエトキシプロピル基修飾シリカ(ジオールシリカ)は担体の耐久性が低く、単糖類の分析には決して適切とはいえない。

そこで、合成ポリマーをベースとした別のタイプの固定相を用いる分配モードについて検討した。

分析条件の検討：固定相として種々の合成ポリマーを検討したところ、高架橋度（約50%）のポリスチレン-ジビニルベンゼン系スルホン酸型樹脂が有望な結果を与えた。この樹脂は金属イオン型として市販されているが、そのまま用いると配位子交換能が働き、アノマーの分離が起こった[22]。しかし、本樹脂を水素イオン型とすることで、アノマー間の分離がなくなり、各糖類の良好な分離が得られた。そこで、移動相にアセトニトリルー水を用いる分配モードによる分離について検討した。Fig. 9に種々の単糖の溶出挙動を調べた結果を示す。試料には中性アルドースとしてフコース、キシロース、マンノース、ガラクトース、ラムノース、アラビノースおよびグルコース、ヘキソサミンとして*N*-アセチルグルコサミンおよび*N*-アセチルガラクトサミンを使用した。これらは糖タンパク質糖鎖に含まれる単糖の他に関連のある単糖も含

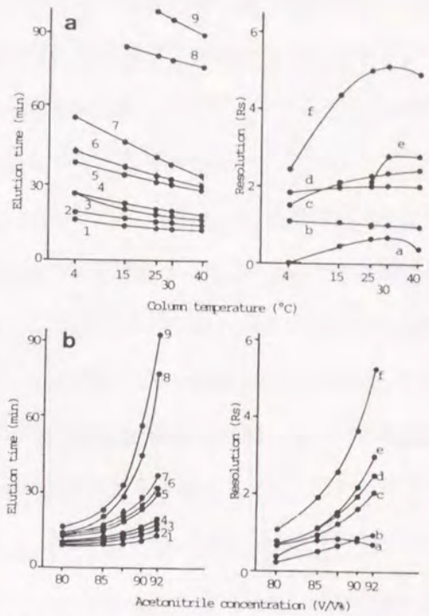


Fig. 9. Dependence of the separation of aldoses and *N*-acetylhexosamines derivable from glycoproteins on (a) column temperature and (b) solvent composition. Column: Shodex DC-613 (4 mm i.d., 25 cm, H^+ form); column temperature: (a) 4, 15, 25, 30, and 40°C, and (b) 30°C; eluent: (a) aqueous acetonitrile, 92 v/v%, and (b) 80, 85, 87.5, 90, and 92%; flow rate: 0.60 ml/min; detection: absorption at 280 nm after postcolumn labeling with 2-cyanoacetamide. Peak assignment: 1 = rhamnose, 2 = xylose, 3 = fucose, 4 = arabinose, 5 = mannose, 6 = glucose, 7 = galactose, 8 = *N*-acetylglucosamine, 9 = *N*-acetylgalactosamine. Pairs: a = fucose/arabinose, b = mannose/glucose, c = rhamnose/xylose, d = xylose/fucose, e = glucose/galactose, f = arabinose/mannose.

んでいる。Fig. 9aは各単糖類の溶出挙動に与えるカラム温度の影響を調べたものである。いずれの糖類もカラム温度が高くなるほど、保持時間が減少する傾向を示した。一方、分離度は、最も低い値を示すフコースーアラビノースの組み合わせが30℃で極大に達した。そこで、カラム温度は30℃に設定することにした。移動相中のアセトニトリル濃度の影響をFig. 9bに示す。一般に、溶出時間はアセトニトリル濃度とともに増加したが、アセトニトリル濃度が92%を越えるとヘキソサミン類のピーク幅が広くなり、テーリングを起こす傾向が見られた。また、フコースーアラビノース(a)の組み合わせが88%で極大を示す他は、92%の方が高い分離度を示した。よって、カラム温度は30℃、移動相には92%アセトニトリルー水の混液を選んだ。また、流速は0.6 ml/minが最適であった。本条件下で等モルの各単糖類を分離した例をFig. 10に示す。これら単糖類のうち、フコースーアラビノースおよびグルコースーマンノースの組み合わせについてはベースライン分離には至らなかったが、糖タンパク質の構成単糖はフコース、マンノース、ガラクトースと*N*-アセチルグルコサミンおよび*N*-アセチルガラクトサミンの2種類の*N*-アセチルヘキソサミン類であるので、上述の条件でも糖タンパク質構成単糖の分析には充分であると判断した。この条件における各ピークの理論段数を算出した結果、アルドース類はいずれも 約2,000程度、ヘキソサミン類については約 800であった。

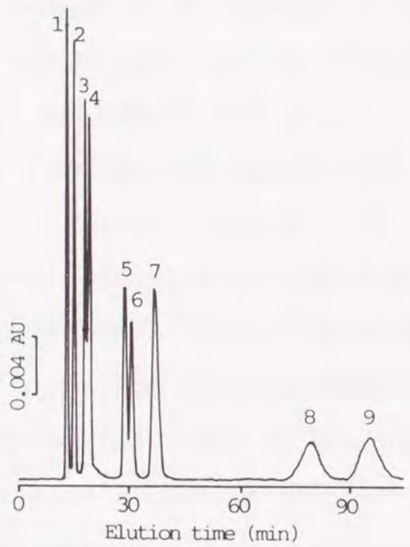


Fig. 10. Analysis of an equimolar mixture of aldoses and hexosamines (as *N*-acetyl derivatives) derivable from glycoproteins. Column temperature: 30°C; eluent: aqueous 92 v/v% acetonitrile; sample scale: 5 nmol each. Other analytical conditions and peak assignment are the same as shown in Fig. 9.

樹脂の耐久性とカラムの保守：本樹脂は非常に安定であり、単糖分析を 100回行ってもピークの形状の変化は観察されなかった。カラムの寿命は再生により維持でき、これはカラムの移動相を水に変えた後、希塩酸を送液して洗浄することにより回復することができた。

第2項　検出法の検討

糖類のポストカラム誘導体化には種々の方法が報告されている。古くはフェノールー硫酸[23] やオルシノールー硫酸法[24]など強酸中で脱水閉環させてフルフラール誘導体とする方法があるが、これらの方法は腐食性が強く耐触性ポンプが必要である。Hondaら[25]は中性〜弱アルカリ性で強く発蛍光する試薬を開発した。この方法は後にMopperら[26]が

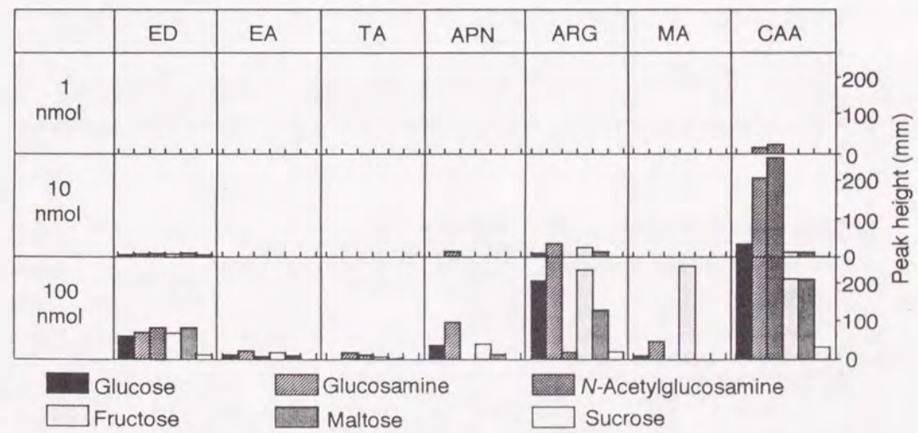
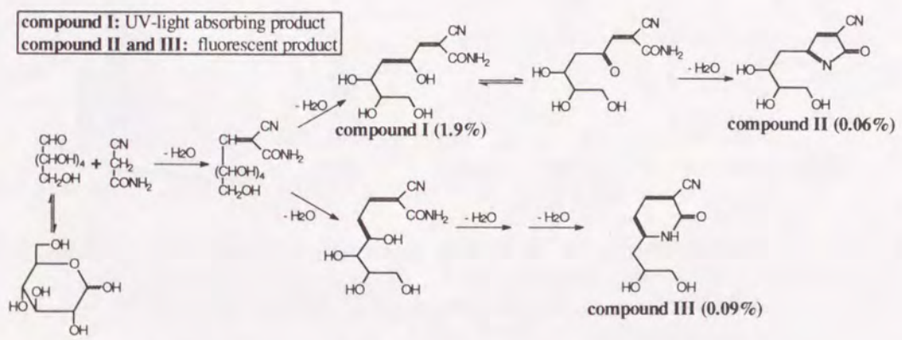


Fig. 11. Comparison of fluorescence intensities of selected sugars among various postcolumn labeling methods. ED = ethylenediamine method, EA = ethanolamine method, TA = taurine method, APN = β-aminopropionitrile, ARG = arginine method, MA = malonaldehyde method, CAA = 2-cyanoacetamide method.

HPLCのポストカラム誘導体化に応用して成果を収めている。この一連の研究が契機となり、次々と類似の蛍光反応が開発されポストカラム誘導体化に利用された。タウリン法[27]、β-アミノプロピオニトリル法[28]、2-シアノアセタミド法[21]、マロノニトリル法[29]、アルギニン法[30]、ベンズアミジン法[31]などがこの範疇に入る方法である。これらはいずれも中性～弱アルカリ性で反応し、400 nm前後で発蛍光するが、同一条件下でフローインジェクション法によりこれらの試薬による還元糖の蛍光性を比較したところ、2-シアノアセタミド法が最も優れた結果を与えた。Fig. 11はその比較結果をまとめたものである。

2-シアノアセタミドを用いるポストカラム標識：上述のように2-シアノアセタミド法は還元糖と反応して蛍光性ならびに吸光性の誘導体を与える（脚注に2-シアノアセタミドとグルコースの反応を示す。）ため、HPLCのポストカラム誘導体化に適した方法である。しかしながら、本研究におけるHPLC分離では高濃度のアセトニトリルを含む移

Scheme 3に2-シアノアセタミドとグルコースの反応を示す[32]。本反応では種々の生成物を与えるが、それらの内、成績体Iは270 nmに極大吸収を示した。また、成績体IIおよびIIIが蛍光性を示し、蛍光収率はそれぞれ66%および12%であった。



Scheme 3. Proposed pathway of the reaction of D-glucose with 2-cyanoacetamide

動相を用いたために発蛍光性が失われた。また、紫外部検出についても若干の反応条件の変更が必要であった。1% 2-シアノアセタミド水溶液を用いて、ホウ酸緩衝液の濃度およびpHを変化させて最適条件を調べたところ、緩衝液のpHが高くなるほど感度が向上したが、ポンプや配管類の耐久性を考慮してpH 8.5を選んだ。また緩衝液濃度は0.5 M が最適であった。

検出限界：Table 6に、本法により紫外部検出(280 nm)した場合のアルドース類と*N*-アセチルヘキソサミン類の検出限界を示す。S/N 比を2とした場合の検出下限は35～415 pmolであった。またガラクトースの感度を1とした時の各相対強度は0.7～1の範囲になった。

検量線：Table 6に示すように検量線が直線を示す範囲は、早く溶出するアルドース類で0.1～80 nmol 、遅く溶出するマンノースとガラクトースが0.2～200 nmol 、ピーク幅の広いヘキソサミン類では4～800 nmol であった。

再現性：再現性についてもTable 6に示した。相対標準偏差として換算したところ、アルドース類で0.5～2.3% となり、遅く溶出される成分ほど再現性が低下する傾向がみられた。また、ヘキソサミンはピークが広がるためか、良好とは言えないが5% 以下の値を

Table 6
Sensitivity and Reproducibility

Saccharide	Lower limit of detection (pmol)	Relative molar response	Linear range (nmol)	Coefficient of variation (%)[a] 0.2 nmol[b] 4 nmol[c]	10 nmol[b] 40 nmol[c]	80 nmol[b] 800 nmol[c]
Rhamnose	35.3	0.80	0.1–80	1.6	0.5	2.0
Xylose	40.0	0.78	0.1–80	1.8	0.6	1.6
Fucose	47.7	0.97	0.1–80	2.1	1.0	2.3
Mannose	94.3	0.69	0.2–200	3.3	1.4	2.6
Galactose	104	1	0.2–200	3.5	2.3	2.6
N-Acetylglucosamine	415	0.84	4–800	4.0	3.9	3.6
N-Acetylgalactosamine	388	1.00	4–800	4.9	3.7	3.3

[a] The number of determinations was 10 in all cases.
[b] For aldoses.
[c] For *N*-acetylhexosamines.

示し、許容範囲内であった。

第3項　糖タンパク質中の構成単糖の分析

糖タンパク質を本章第１節で述べたように酸加水分解し、得られたアルドース類を本法により分析した。得られたクロマトグラムとピーク面積から換算した含量をそれぞれFig. 12とTable 7に示す。なお、（）内に参考のため文献[33, 1]に報告されている値を示した。ヒトトランスフェリンではマンノース含量が文献値より低かった。また、ウシ顎下腺ムチンでガラクトサミン含量が低値を示したが、糖タンパク質試料の純度が示されていないため、詳細な議論は困難であると考えられる。他の試料についての測定値は文献値に一致した。

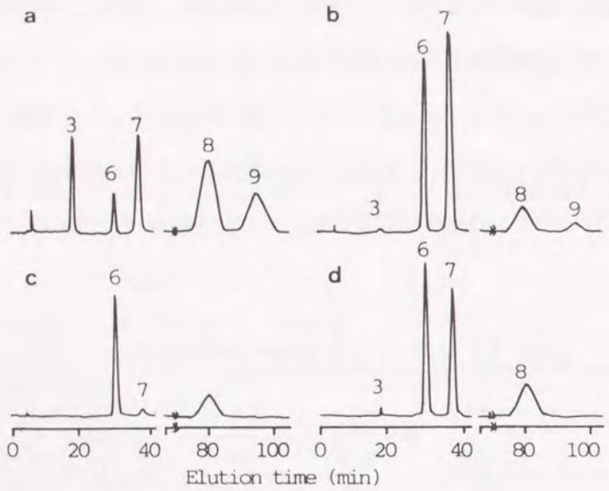


Fig. 12. Analysis of the component aldoses and hexosamines (as *N*-acetyl derivatives) of commercial samples of (a) bovine submaxillary mucin, type II, (b) fetal calf serum fetuin, (c) ovalbumin, and (d) human serum transferrin. The glycoprotein sample were hydrolyzed in 2 M trifluoroacetic acid for 6 hr (aldoses) and 4 M hydrochloric acid for 6 hr (hexosamines) at 100°C under a nitrogen atmosphere. The hydrolysates were directly (aldoses) or after being *N*-acetylated (hexosamines) analyzed by HPLC under the conditions described in Fig. 10. Each set of chromatograms was obtained from the same glycoprotein sample. The peak assignment is the same as those in Fig. 9.

Table 7

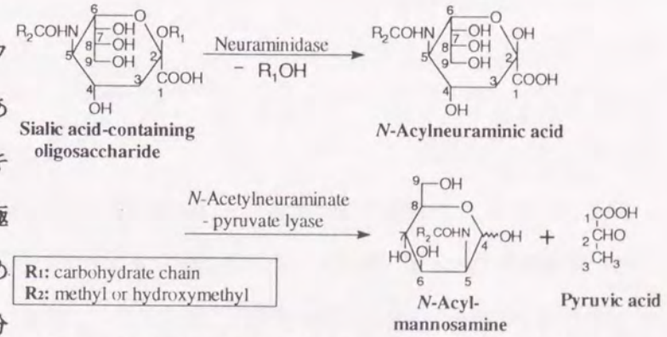
Determination of Aldoses and Hexosamines in Various Glycoproteins

Glycoprotein	Amount of monosaccharide (mg/g)				
	Fucose	Mannose	Galactose	Glucosamine	Galactosamine
Bovine submaxillary mucin, type II	9.53	2.07	15.2	168	69.2
	(10)[a]	-	(14)[a]	(170)[a]	(85)[a]
Fetal calf serum fetuin	0.27	27.3	45.9	53	6.74
	-	(30)[b]	(46)[b]	(56)[b]	(7)[b]
Ovalbumin	-	24.0	1.48	12.8	-
	-	(20)[a]	-	(12)[a]	-
Human serum transferrin	0.31	11.1	8.62	17.9	-
	-	(18)[b]	(7.4)[b]	(20)[b]	-

[a]Ref. (33)
[b]Ref. (1)

第4項　シアル酸の分析

シアル酸も糖タンパク質構成単糖の一種ではあるが、アルドースやヘキソサミンと違い、酸に極めて不安定であるためこれらを同様に酸加水分解して分析することは困難である。そこでシアル酸についてはノイラミニダーゼと*N*-アセチルノイラミン酸ピルビン酸リアーゼ（E.C. 4.1.3.3）を用いて分析することを試みた（Scheme 4参照）。ノイラミニダーゼによって遊離したシアル酸のC-3とC-4間の結合は*N*-アセチルノイラミン酸ピルビン酸リアーゼによって*N*-アセチルマンノサミンとピルビン酸に開裂する。この酵



Scheme 4. Reaction of sialic acid-containing oligosaccharide with neuraminidase and neuraminate-pyravate lyase

素反応は速やかでしかも定量的に進行するため、遊離した*N*-アシルマンノサミン量からシアル酸量を推定できる[34]。そこで試料をノイラミニダーゼと本酵素で処理し、遊離した*N*-アセチルおよび*N*-グリコリルマンノサミンをアルドースやヘキソサミンと同じ条件下で分析することを試みた。結果をFig. 13に示す。*N*-アセチルノイラミン酸と*N*-グリコリルノイラミン酸はよく分離し、アルドース類や*N*-アセチルヘキソサミン類ともピークが重ならなかった。*N*-アシルマンノサミンの検出限界は他のヘキソサミン類とほぼ等しく、*N*-アセチルマンノサミンに対する*N*-グリコリルマンノサミンのレスポンス比は1.02であった。

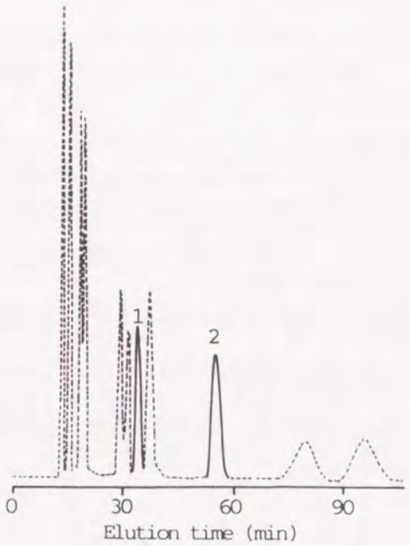


Fig. 13. Separation of Sialic acids (as *N*-acylmannosamines) in the presence of aldoses and hexosamines (as *N*-acetyl derivatives). Peak assignment: 1 = *N*-glycolylneuraminic acid, 2 = *N*-acetylneuraminic acid. Analytical conditions are the same as those described in Fig. 10.

Fig. 14はいくつかの糖タンパク質に本法を適用してシアル酸を測定した結果を示す。また、定量値はTable 8に掲げた。ウシ顎下腺ムチンとウシ血清α_1-糖タンパク質からは*N*-アセチルノイラミン酸および*N*-グリコリルノイラミン酸が、またウシ胎児血清フェツインとヒト血清トランスフェリンでは*N*-アセチルノイラミン酸のみが検出された。また、ウシ顎下腺ムチンには、一部、*N, O*-ジアセチルノイラミン酸の存在が知られているが、それに相当すると思われるピークが68分に観察された。また、13分に不明なピークが観察された。帰属するには至らなかったが、精製して純度を高めたムチンではこのピークが現われなかったことから、精製過程における挟雑物質によるものと思われる。このよ

うにリアーゼを利用して、アルドースや*N*-アセチルヘキソサミンと同一の条件下で分析する方法はシアル酸の分析法として有用であることが示唆された。

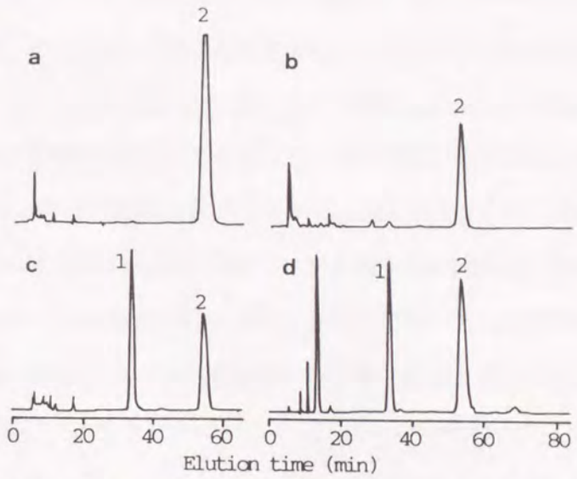


Fig. 14. Analysis of the component sialic acids (as *N*-acylmannosamines) in commercial samples of (a) fetal calf serum fetuin, (b) human serum transferrin, (c) bovine serum acid glycoprotein and (d) bovine submaxillary mucin, type I. The glycoprotein sample were hydrolyzed and converted to *N*-acylmannosamines by the combined action of neuraminidase and *N*-acetylneuraminate pyruvate lyase. Analytical conditions are the same as those described in Fig. 10. Peak assignment is the same as in Fig. 13.

Table 8
Determination of Sialic Acids in Various Glycoproteins

Glycoprotein	Amount of sialic acid (μg/mg)	
	N-Acetylneuraminic acid	*N*-Glycolylneuraminic acid
Fetal calf serum fetuin	46.2	0.0
Human serum transferrin	14.0	0.0
Bovine serum acid glycoprotein	11.2	11.6
Bovine submaxillary mucin, type I	16.9	12.5

第４節　1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロンを誘導体化試薬に用いる高性能キャピラリー電気泳動

HPCEは基本的に電荷/サイズ比の違いに基づく分離モード（ゾーン泳動モード）であり、オリゴおよびポリヌクレオチドなどの電荷を有する生体成分については既にいくつかの分離例が報告されている。糖類は一般に電気的に中性であるため、直接、ゾーン泳動モードを適用することができないが、Hondaらはホウ酸塩[35]やアルカリ土類金属塩[36]を含むキャリアーの中で糖を*in situ*でイオン性錯体に変換させることにより糖類のHPCEによる分離を可能にした。糖タンパク質構成単糖の分析においても同様に中性単糖をイオン性物質に変換する必要がある。一方、検出面においてもHPLCの場合と同様、化学反応による誘導体化を必要とするが、技術的にポストカラム方式は適用し難い。したがって、プレカラム誘導体化したのち、*in situ*で錯イオン化するという方法が適切である。

そこで、本節においては第２節で述べたPMP法によりプレカラム誘導体化した単糖類のHPCEについて検討した結果を述べる。

第１項　1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン誘導体のホウ酸錯体としての単糖の分析

分離条件の検討：ホウ酸緩衝液の濃度ならびにpHについて検討した。ホウ酸濃度が高いほどピークが鋭くなり移動時間も増加した。ホウ酸濃度の上昇により錯体形成が促進され、みかけの移動度が減少したものと理解できる。一方、pHの上昇も同様に移動時間を増加させたが、pHが上昇することにより錯体形成が助長されたためと考えられる。両因子を最適化した結果、200 mM ホウ酸緩衝液、pH 9.5をキャリアーに用いたときにもっとも良好な分離が得られた。この条件でアルドペントースおよびアルドヘキソースを分離した結果をFig. 15およびFig. 16に示すが、それぞれのエピマーに対してほぼ満足できる分離が得られた。また、理論段高も小さく、キシロース-2PMPで4.1 μmであった。式 [1][37]に従ってみかけの移動度（μ_{ep}）を算出した。

$$\mu_{ep} = l \cdot L \cdot (1 / t_o - 1 / t) / V \qquad [1]$$

ここでlはキャピラリーの有効長、Lはキャピラリーの全長、 V は電圧、 t_o は電気浸透流マーカーの泳動時間、tは試料の泳動時間である。アルドペントース誘導体のキシロース、アラビノース、リボースおよびリキソースではそれぞれ2.56, 2.62, 2.68,および2.72 x 10^4 $cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$となり、アルドヘキソースのグルコース、アロース、アルトロース、マンノース、イドース、ギュロース、タロースおよびガラクトースが、2.62, 2.67, 2.75, 2.78, 2.86, 2.88, 2.96, 2.98となった。

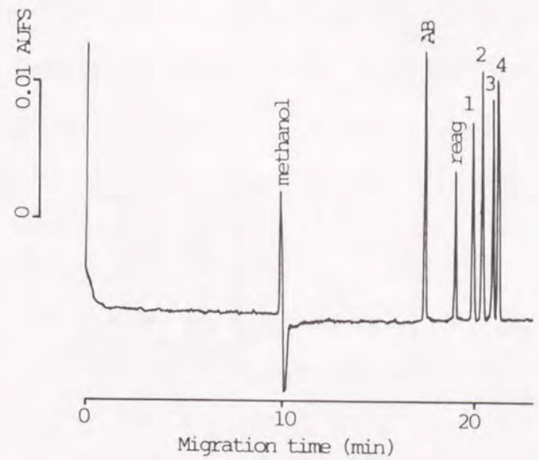


Fig. 15. Separation of PMP derivatives of aldopentoses by HPCE. Capillary, fused silica (50 μm i.d., 78 cm, effective length 63 cm); carrier, 200 mM borate buffer (pH 9.5); applied voltage, 15 kV; detection: UV at 245 nm. AB = amobarbital (internal standard), Reag = excess reagent (PMP), 1 = xylose, 2 = arabinose, 3 = ribose, 4 = lyxose.

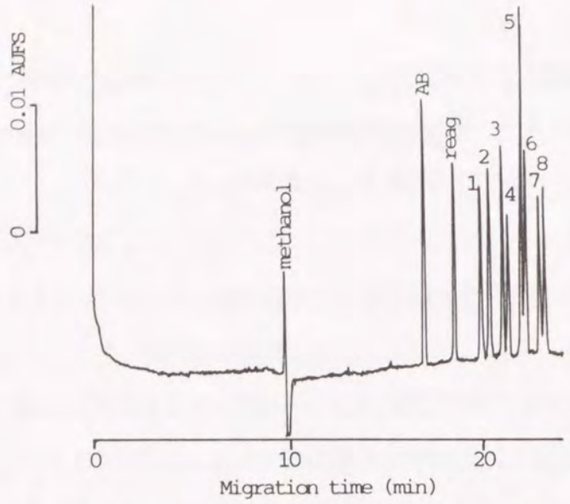


Fig. 16. Separation of PMP derivatives of aldohexoses by HPCE. The analytical conditions were the same as those in Fig. 15. Peak assignment: 1 = glucose, 2 = allose, 3 = altrose, 4 = mannose, 5 = idose, 6 = gulose, 7 = talose, 8= galactose. The other abbreviations are the same as those in Fig. 15.

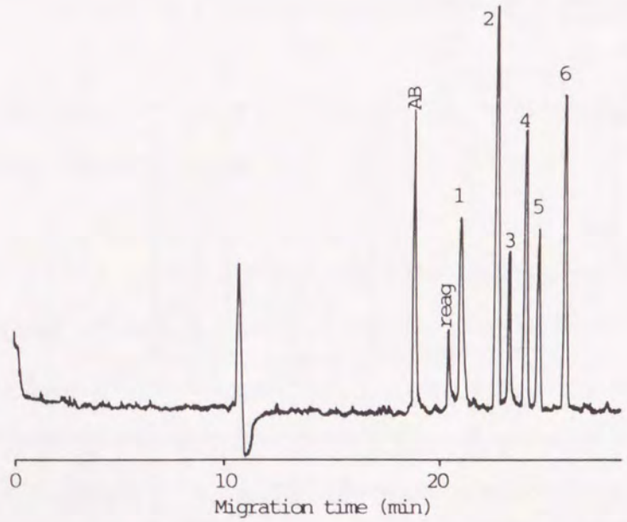


Fig. 17. Separation of PMP derivatives of standard monosaccharides found in glycoproteins. Peak assignment: 1 = *N*-acetylgalactosamine, 2 = rhamnose (internal standard), 3 = *N*-acetylglucosamine, 4 = mannose, 5 = fucose, 6 = galactose. The other abbreviations are the same as those in Fig. 15.

糖タンパク質構成単糖についてもこの条件で良好な分離がみられ(Fig. 17)、この方法が第２節および第３節で述べたHPLCによる方法と同様、糖タンパク質構成単糖の一斉分析に有用であることが示された。

定量の信頼性：本実験では手製の装置を用い、キャピラリーの温度調節は室温を制御して行ったが、ラムノースを内部標準に用いてガラクトースの定量を行ったところ、少なくとも 10〜200 pmolの範囲で試料量と相対レスポンスの間に直線性がみられた。また、再現性も HPLC と同等であり、信頼できる定量法であることが立証された。試料導入を自動化し、キャピラリーの温度制御が可能な装置を用いれば、さらに分析の信頼性は高くなるものと考えられる。

一般にHPCEにおいてキャピラリーに導入される試料溶液の体積はnlレベルであるが、市販装置を用いて紫外部吸収検出をした場合、10^{-3} M 濃度以上を必要とする。したがってキャピラリーに導入される試料量はpmolレベルということになる。しかし、実際には超微量体積の取り扱いは難しく、少なくともμlレベルの試料溶液を必要とするため、導入量の約1000倍程度を用意しなければならない。このために必要な試料量はHPLCとあまり違わないレベルになってしまう。しかし、HPCEにおける検出にはレーザー光源を利用するなど新しい方向での工夫が進められており、さらに微量化できる可能性が高い。

第１章のまとめ

この章では主に糖タンパク質の構成単糖類の分析法について述べた。すなわち、第１節ではジエチルジチオアセタールトリメチルシリル化反応を用いるGC、第２節ではPMP によるプレカラム誘導体化を利用したHPLC、第３節では2-シアノアセタミドによるポストカラム誘導体化を利用したHPLC、第４節ではPMP 誘導体のホウ酸錯体としてのHPCE分析について述べた。

これら３つの方法はそれぞれ異なる分離法 (GC, HPLCおよびHPCE) に基づいているため、それぞれの分離法固有の特徴をもっている。しかし、糖タンパク質構成単糖を分析対象とする場合、生体成分であることから試料量が限定されることが多く、微量分析が必要となる。HPLCおよびHPCEでは微量検出が可能な直接的な検出法がないという理由から化学反応による誘導体化が必要になる。一方、GCによる分析の場合は、揮発性物質に変換するという目的で同様に化学的誘導体化が要求される。

この章で述べたいくつかの方法のうち、GC法ではジチオアセタールに変換したのち、one-pot反応でさらに完全トリメチルシリル化するという方法を採用した。HPLCにおいてはプレカラム誘導体化用にPMP 法を、またポストカラム誘導体化には2-シアノアセタミド法を検討した。HPCEにおいては再び PMP 法をとりあげた。分析法の開発においては許される限り簡便性を求めるべきであり、この点はこれらすべての誘導体化法について実現できたと考えられる。

糖タンパク質中の糖の含量は通常、重量にして10%以内である。したがって加水分解によって同時に生成するアミノ酸やペプチドが多量に共存する。このような状況で単糖を分析するためには高い選択性が必要であるが、いずれの誘導体化法もこの要件を充分

満たしている。すなわちジエチルジチオアセタール化、PMP との縮合およびシアノアセタミドとの反応はいずれも糖の還元末端のアルデヒド基の反応性に基づくものであり、アミノ酸やペプチドとの間で反応を起こさない。一方、用いた誘導体化反応はいずれも比較的緩和な条件（ジエチルジチオアセタール化は25℃で10分；トリメチルシリル化は50℃で30分；PMP との反応は70℃で30分；2-シアノアセタミドとの反応は100℃で数分）で進行する。このためいずれも迅速性の点では概ね満足できるものといえる。

いずれの分析法を選択するかについては種々の問題を考慮する必要がある。そして理論上の優劣よりも使用できる装置によって限定されることが多い。また、糖タンパク質の構成単糖の分析に加えて糖鎖分析が必要な場合には、HPLCやHPCEが好ましいと考えられる。この章で述べた分析法は選択性、簡便性、迅速性、正確さ、再現性などの点でいずれも満足できるものであった。ただ、HPCEは現在発展途中の段階であり、今後、検出技術などが改善される可能性もある。HPLC法を選ぶならば、検体数が少ない場合は PMP によるプレカラム誘導体化、多数の試料をルーチン分析する場合は2-シアノアセタミドによるポストカラム誘導体化を採用するのが好ましい。

第２章　糖タンパク質からの糖鎖の切り出し

緒言

糖タンパク質糖鎖はペプチド鎖に結合した状態で存在し、糖タンパク質分子に占める割合も重量にして10%程度と低いので、糖タンパク質のままの状態で糖鎖の構造を解析したり、定量することは困難である。したがって、何らかの手段で糖鎖を切り離してから構造解析あるいは分析するのが基本的な考え方となる。

糖鎖を遊離させる方法としては、ペプチド鎖を種々のプロテアーゼ混合物で完全加水分解してアスパラギン、あるいはスレオニンまたはセリンを還元末端にもつ糖鎖まで分解する方法が検討された。しかし、多くの*O*- グリコシド型糖タンパク質はシアル酸を多量に含むためにペプチド鎖の加水分解が不完全となり、また、*N*-グリコシド型でもオバルブミンやリボヌクレアーゼBなど一部の糖タンパク質を除けば酵素的にペプチド鎖を完全に加水分解することは困難である。一方、化学的な手法も検討され、*N*-グリコシド型糖タンパク質に対してはKobataらが開発したヒドラジン分解法[38]が、また*O*- グリコシド型糖タンパク質にはアルカリーボロハイドライド法[39]が広く採用されている。また、糖ペプチドから糖鎖を遊離させる酵素類も近年発見され、一部は市販されるに至っている。そこで、この章ではこれら方法を概観して比較した。

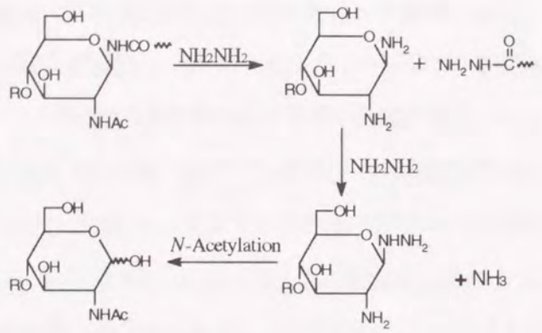
第１節　酵素的方法

最近、糖鎖とペプチド鎖の結合部位に作用して糖鎖を遊離させる酵素類が発見され、精製されている[40]。これらの酵素による反応は緩和な条件で進行するため、シアル酸などの不安定な糖鎖が反応中に脱離することもない。このような酵素としては、*N*-グリコシド型糖鎖に対しては①ペプチド*N*-グリカナーゼ E（ペプチド-*N*4-(*N*-アセチル-β-グルコサミニル)アスパラギンアミダーゼ (E.C. 3.5.1.52) E）、②ペプチド*N*-グリカナーゼ A、③エンドグリコシダーゼ H（エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (E.C. 3.2.1.96) H）、および④エンドグリコシダーゼ F が知られている。これらのうち、グリカナーゼ類（①および②）は糖鎖とアスパラギン残基の結合を切断するのに対し、エンドグリコシダーゼ類（③および④）は糖鎖の最も内側にあるキトビオースのβ1 - 4グルコサミニド結合を切断する。①および②はほとんどの*N*-グリコシド型糖鎖を切断できるものの、糖タンパク質試料はあらかじめ適当なプロテアーゼで加水分解し、低分子化しておく必要がある。また、これらの酵素はペプチド鎖の末端に結合した糖鎖を遊離させることはできないといわれている。これに対し、③は基質特異性が著しく、高マンノース型や一部のハイブリッド型糖鎖には作用するものの、複合型糖鎖を切断することはできない。また、④は多くの高マンノース型や２本鎖の複合型糖鎖には作用するが、糖鎖のβ-結合マンノースにβ-1-4結合し*N*-たアセチルグルコサミンを含むハイブリッド型糖鎖や３本鎖および４本鎖の複合型糖鎖には作用しない。したがって、分析の目的にこれら酵素を利用するには、その特性を熟知する必要がある。

O-グリコシド型糖タンパク質にはGalβ1-3GalNAcを遊離することのできる酵素が知られている程度で、現在のところ本研究への適用は困難であると考えられた。

第2節　化学的方法

N-グリコシド型糖鎖の切り離しに対して繁用されている唯一の化学的手法であるヒドラジン分解法は、無水ヒドラジン中で糖タンパク質試料を100℃という高温で加熱することにより糖鎖をペプチド鎖から遊離させる方法である（Scheme 5参照）。この方法は操作が煩雑であり、試料の乾燥状態や反応条件によってはシアル酸の一部が脱離することもある。また、用いるヒドラジン試薬の純度が悪いと副反応が進行し、反応混合物を TLC で調べると、複数のプロットがみられることもある。しかし、先に述べた酵素類を用いる場合に比べコストが低くて済むため、多量の糖鎖試料を処理できるという利点がある。

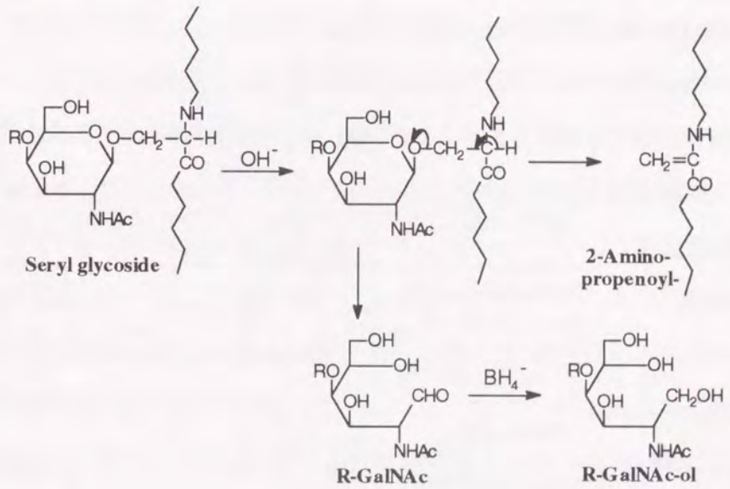


Scheme 5. Hydrazinolysis of asparagine-linked carbohydrate chains[38]

O- グリコシド型糖鎖の切り離しに用いられるアルカリ－ボロハイドライド法は、1 M という高濃度の水素化ホウ素ナトリウムを含む0.05 M 水酸化ナトリウム中で糖タンパク質試料を処理する方法であり、反応はβ-脱離反応によって進行する（Scheme 6参照）。操作は簡便であり、切り離された糖鎖が多量のボロハイドライドの存在により安定な糖アルコールに変換されるため、異性化など副次的変化を起こすこともない。しかし、還元末端が還元されることにより糖のアルデヒド性を利用した誘導体法が適用できないという欠点を有する。また、この反応は糖鎖が*N*-末端のアミノ酸に結合している場合には適用することができないといわれている。

これら既存の方法にはそれぞれ短所があるため、別途Lewis塩基を含む非水溶媒中での反応などを利用した新しい方法の開発を試みたが、いずれも効率が悪かったり、副反応を伴ったりした。

そこで本研究においては、*N*-グリコシド型糖鎖のうち、シアル酸を含まない場合はヒドラジン分解法、シアル酸を含む糖鎖にはグリカナーゼを用いる方法が適当であると判断した。また、*O*-グリコシド型糖鎖にはアルカリ－ボロハイドライド法を採用した。



Scheme 6. Effects of alkali and borohydride on the *O*-glycosidic linkage[41]

第３章　高速液体クロマトグラフィーによる糖タンパク質糖鎖の微量分析

緒言

序論で述べたように糖タンパク質糖鎖には*N*-グリコシド型と*O*-グリコシド型の２種があり、*N*-グリコシド型には Table 9 に示すように高マンノース型、複合型およびハイブリッド型の３つのタイプがある。Table 9 はそれぞれの型で最も完成された状態を示しているが、完成度の違いによって多くの種類の糖鎖が存在する。高マンノース型ではマンノース残基の数ばかりでなく、同じ重合度のものであっても３つある各マンノース鎖のそれぞれにおける残基数が異なることによって生ずる結合異性体が存在する。複合型では高マンノース型からマンノース残基が脱離してできたトリマンノースーキトビオース鎖を基にして、これに*N*-アセチルグルコサミン、ガラクトースおよびフコースが様々な組み合せで結合して多数の同族体を生ずる。

Table 9
Structure of *N*-Glycosidically Linked Oligosaccharides in Glycoproteins

High-mannose type

```
Manα1-2Manα1-6
              Manα1＼6
Manα1-2Manα1-3          Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc
              ／3
Manα1-2Manα1-2Manα1
```

Complex type

```
          Galβ1-4GlcNAcβ1-4
          ¦                 Manα1＼                    Fucα1＼
NeuAcα2-6¦Galβ1-4GlcNAcβ1-2          6                      6
          ¦  Fucα1／3     GlcNAcβ1-4 Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc
NeuAcα2-3¦Galβ1-4GlcNAcβ1-4          3
          ¦                 Manα1／
          ¦Galβ1-4GlcNAcβ1-2
```

Hybrid type

```
          Manα1-6
          Manα1-3Manα1＼
                    6
        GlcNAcβ1-4 Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc
Galβ1-4GlcNAcβ1-4   3
Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1／
```


ハイブリッド型においても同様のことがいえる。また、複合型では各アンテナの先端部分やアンテナ内部の*N*-アセチルグルコサミン残基にシアル酸が結合することが多く、これらのシアル酸の位置および結合部位の違いにより多数の異性体や同族体が生まれる。したがって、*N*-グリコシド型糖鎖の種類は極めて多く、既に報告されているものだけでも数百種類にのぼる。一方、*O*-グリコシド型糖鎖では二糖から分岐鎖をもつ十糖以上のものまで、様々な構造が知られており、今後の研究の進展によっては*N*-グリコシド型糖鎖と同等の多様性が明らかになる可能性がある。

このように多種類の糖鎖を一斉分析するためには、高度の分離能をもつ分離手段が必要であり、しかも入手できる試料量が限定されるために微量分析のための対策が必要になる。HPLC によって糖タンパク質由来のオリゴ糖を分析する方法としては、プレカラム誘導体化して逆相あるいは順相分配モードで分離する方法[42] がある。また、ラテックス型の陰イオン交換樹脂に強アルカリ性移動相を用いて糖鎖を直接分離し、パルスアンペロメトリーにより検出する方法もある[43-49]。しかし、いずれの方法においても濃度勾配溶出が用いられるため、再現性が低く、試料標品について得られた保持値から糖鎖を同定するのは困難である。そこで、第１節および第２節では、それぞれのモードについて分析の改善をはかるための検討を行った。一方、糖タンパク質などに含まれる糖鎖は特定のタンパク質（レクチン）と結合する性質があり、この性質は糖鎖の分離という点からも期待がもてる。そこで、第３節ではレクチンを固定化した樹脂を用いて、この特異的結合の程度の差を利用した高速アフィニティークロマトグラフィーについても検討を行った。

なお、本研究において対象とした糖鎖の構造ならびに略号をTable 10に示す。これら表中の略号では糖タンパク質の名称を３文字の略称で示し、ついで重合度、タイプ（M-高マンノース、C-複合型、H-ハイブリッド型）、および単糖組成、連番記号の順に表示

されている。以下の章ならびに各節では、各糖鎖をTable 10に示した番号で表し、必要に応じてこの略号も付記した。糖鎖番号は[N-1]〜[N-23]が複合型、[N-24]〜[N-35]が高マンノース型、[N-36]〜[N-41]はハイブリッド型の*N*-グリコシド型糖鎖、[O-1]〜[O-7]はO-グリコシド型糖鎖を示す。

Table 10

List of Glycoprotein Derived Oligosaccharides Examined in this Work

No.	Abbreviation	Structure
N-Glycosidically Linked Oligosaccharides		
Complex type		
N-1	TRF[a)]-9C(Di)($M_3G_2GN_4$)	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-2	TRF[b)]-11C(Tri)($M_3G_3GN_5$)-b	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Galβ1-4GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-3	TRF-11C(Di)($M_3G_2GN_4SA_2$)	NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-4	FET-11C(Tri)($M_3G_3GN_5$)-a	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Galβ1-3GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-5	FET-14C(Tri)($M_3G_3GN_5SA_3$)-a	NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-6	FET-14C(Tri)($M_3G_3GN_5SA_3$)-b	NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-7	IGG[c)]-10C(Di)($M_3G_2GN_4F_1$)	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Fucα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-8	IGG-9C(Di)($M_3G_1GN_4F_1$)	GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Fucα1↘6 Galβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-9	IGG-8C(Di)($M_3GN_4F_1$)	GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Fucα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-10	IGG-11C(Di)($M_3G_2GN_5F_1$)	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Fucα1↘6 GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-11	IGG-10C(Di)($M_3G_1GN_5F_1$)	GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Fucα1↘6 Galβ1-4 GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-12	IGG-9C(Di)($M_3GN_5F_1$)	GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Fucα1↘6 GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-13	AGP-12C(Tri)($M_3G_3GN_5F_1$)	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Galβ1-4GlcNAcβ1 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Fucα1↗3 ↘4 Manα1 Galβ1-4GlcNAcβ1↗2
N-14	AGP-13C(Tetra)($M_3G_4GN_6$)	Galβ1-4GlcNAcβ1↘4 Manα1 Galβ1-4GlcNAcβ1↗2 ↘6 Galβ1-4GlcNAcβ1↘4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1↗2 Manα1↗3
N-15	AGP-14C(Tetra)($M_3G_4GN_6F1$)	Galβ1-4GlcNAcβ1↘4 Manα1 Galβ1-4GlcNAcβ1↗2 ↘6 Galβ1-4GlcNAcβ1 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Fucα1↗3 ↘4 Manα1 Galβ1-4GlcNAcβ1↗3

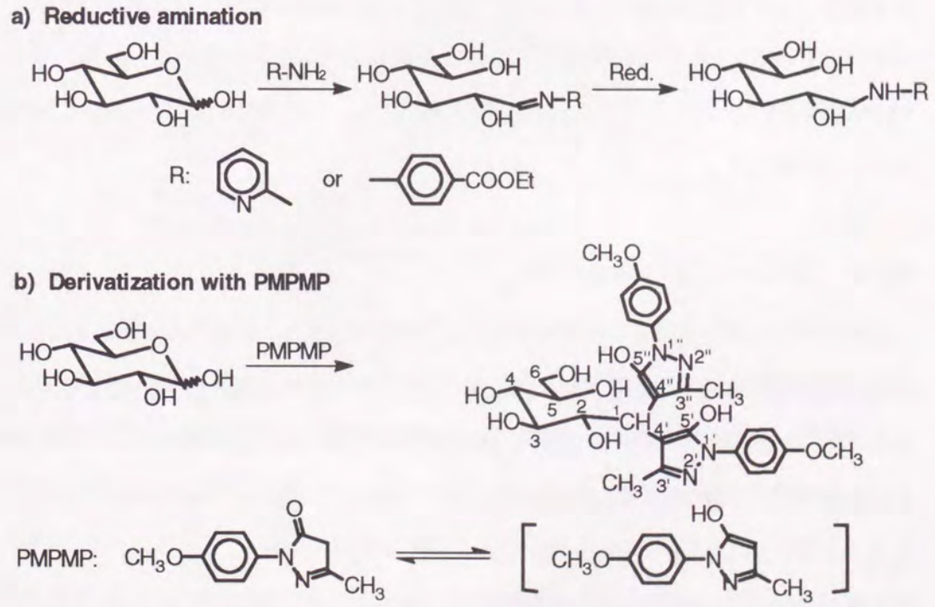
No.	Abbreviation	Structure
N-16	AGP-15C(Tetra)($M_3G_5GN_7$)	Galβ1-4GlcNAcβ1↘4 Manα1 Galβ1-4GlcNAcβ1-4Galβ1-4GlcNAcβ1↗2 ↘6 Galβ1-4GlcNAcβ1↘4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1↗2 Manα1↗3
N-17	TGB-11C(Di)($M_3G_3GN_4F_1$)	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Fucα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-18	TGB-12C(Tri)($M_3G_3GN_5F_1$)	Galβ1-4GlcNAcβ1-4 Manα1 Galβ1-3GlcNAcβ1-2 ↘6 Fucα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-3GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-19	TGB-12C(Di)($M_3G_2GN_4F_1SA_2$)	NeuAcα2-6Galα1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Fucα↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc NeuAcα2-6Galα1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-20	TGB12C(Di)($M_3G_3GN_4F_1SA_1$)	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Fucα↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc NeuAcα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-21	TGB11C(Di)($M_3G_2GN_4F_1SA_1$)	Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↘6 Fucα↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc NeuAcα2-6Galα1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-22	TGB14C(Tri)($M_3G_3GN_5F_1SA_2$)	NeuAcα2-3Galβ1-4GlcNAcβ1-4 Manα1-6 Fucα↘6 NeuAcα2-6{ Galβ1-4GlcNAcβ1-2 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1↗3
N-23	OVA9C(Tri)(M_3GN_6)	GlcNAcβ1-2Manα1-6 GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc GlcNAcβ1-2 Manα1↗3
High-mannose type		
N-24	RNB[d)]-7M(M_5GN_2)	Manα1-6 Manα1-3 Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1↗3
N-25	RNB[e)]-8M(M_6GN_2)	Manα1-6 Manα1-3 Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1-2Manα1↗3
N-26	RNB[f)]-9M(M_7GN_2)	Manα1-6 Manα1-2{ Manα1-3 Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1-2Manα1↗3
N-27	OVA-9M(M_7GN_2)	Manα1-6 Manα1-3 Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1-2Manα1-2Manα1↗3
N-28	RNB[g)]-10M(M_8GN_2)	Manα1-6 (Manα1-2)$_2$ Manα1-3 Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1-2Manα1↗3
N-29	[RNB-10M(M_9GN_2)] INV-10M(M_9GN_2)	Manα1-2Manα1-6 Manα1-3 Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1-2Manα1-2Manα1↗3
N-30	RNB-11M(M_9GN_2)	Manα1-2Manα1-6 Manα1-2Manα1-3 Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1-2Manα1-2Manα1↗3
N-31	INV-11M(M_9GN_2)	Manα1-6 Manα1-2 Manα1-6 Manα1-3 Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1-2Manα1-2Manα1↗3
N-32	INV-12M($M_{10}GN_2$)	Manα1-2Manα1-6 Manα1-2 Manα1-6 Manα1-3 Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1-2Manα1-2Manα1↗3
N-33	INV-13M($M_{11}GN_2$)	Manα1-2Manα1-6 Manα1-2 Manα1-6 Manα1-3 Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1-3Manα1-2Manα1-2Manα1↗3
N-34	INV-15M($M_{13}GN_2$)	Manα1-3Manα1-2Manα1-6 Manα1-3Manα1-2 Manα1-6 Manα1↘6 Manα1-3 3 Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1-3Manα1-2Manα1-2Manα1↗3
N-35	INV-16M($M_{14}GN_2$)	Manα1-3Manα1-2Manα1-6 Manα1-3{ Manα1-2Manα1-2 Manα1-6 Manα1-3 Manα1↘6 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Manα1-3Manα1-2Manα1-2Manα1↗3

No.	Abbreviation	Structure
Hybrid type		
N-36	OVA-8H(M_4GN_4)	Manα1-3Manα1↘6 GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc GlcNAcβ1-2Manα1↗
N-37	OVA-9H(M_4GN_5)	Manα1-3Manα1↘6 GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc GlcNAcβ1-4 GlcNAcβ1-2Manα1↗
N-38	OVA-9H(M_5GN_4)	Manα1-6 Manα1 Manα1-3 ↘6 GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc GlcNAcβ1-2Manα1↗
N-39	OVA-10H($M_4G_1GN_5$)	Manα1-3Manα1↘6 GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1-4 GlcNAcβ1-2Manα1↗
N-40	OVA-10H(M_5GN_5)	Manα1-6 Manα1 Manα1-3 ↘6 GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc GlcNAcβ1-4 GlcNAcβ1-2Manα1↗
N-41	OVA-11H($M_5G_1GN_5$)	Manα1-6 Manα1 Manα1-3 ↘6 GlcNAcβ1-4 3Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc Galβ1-4GlcNAcβ1-4 GlcNAcβ1-2Manα1↗
O-Glycosidically linked oligosaccharides		
O-1		NeuAcα2-6GalNAc
O-2		NeuGlα2-6GalNAc
O-3		NeuAcα2 Galβ1-3↘6GalNAc
O-4		NeuAcα2 GlcNAcβ1-3↘6GalNAc
O-5		NeuGlα2 GlcNAcβ1-3↘6GalNAc
O-6		NeuGlα2 Galβ1-3↘6GalNAc
O-7		NeuGlα2 ↘6 Galβ1-3GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-3GalNAc

Other glycoprotein sources: a) AGP, FET; b) AGP, FET; c)TGB; d) TGB, OVA; e) TGB, OVA; f) TGB, OVA; g) TGB. Abbreviation is systematic in the following order: name of glycoprotein source in three alphabetical block letters (AGP, α_1-acid glycoprotein; FET, fetuin; IGG, immunoglobulin G; INV, invertase; RNB, ribonuclease B; OVA, ovalbumin; TGB, thyroglobulin; TRF, transferrin), number of monosaccharide residues, type of oligosaccharide chain [M, high-mannose type; H, hybrid type; C(Di), diantennary complex type; C(Tri), triantennary complex type; C(Tetra), tetraantennary complex type], monosaccharide species in parentheses (M, mannose; G, galactose; GN, N-acetylglucosamine; F, fucose; SA, sialic acid) with the number(s) in subscript.

第１節　プレカラム誘導体化を伴う分配クロマトグラフィーに基づくシステム

近年、糖鎖をHPLCでより高感度に検出するための蛍光検出法として、2-アミノピリジン[15]や*p*-アミノ安息香酸エチル[16]を用いる還元的アミノ化法が報告されている(Scheme 7a参照)が、いずれも激しい反応条件(酸存在下で80～100℃、１～10時間）を要求するために、複合型糖鎖に一般的に存在するシアル酸の結合が開裂されることがある。したがって、シアル酸を脱離することなく分析するためには、より緩和な条件で誘導体化できる方法の開発が望まれている。この点では糖タンパク質の構成単糖の分析に採用したPMP 法が比較的緩和な条件で定量的に反応するので有望である。しかし、糖鎖



Scheme 7. Reaction of glucose with aromatic amines (a) and PMPMP (b)

の誘導体の分析において試薬由来のピークによる妨害がみられたので、この試薬の部分的な改良を試みたところ、1-(4-メトキシ)フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン (PMPMP)が適しているという結果を得た。そこで本試薬を用いて、糖タンパク質糖鎖、特にシアル酸含有糖鎖の分析への可能性について検討した。

第1項　1-(4-メトキシ)フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン(PMPMP)の調製

これらピラゾロン系類縁化合物は元来、抗炎症剤として、また有機系色素として数多く合成されている。そこで、Koikeらの方法[50]にしたがって4-メトキシフェニルヒドラジンとアセト酢酸エチルより表記化合物の合成を試みたが、この反応はアセト酢酸エチルの4-メトキシフェニルヒドラゾンを主生成物として与える傾向が観察された。反応条件を検討したところ、酢酸ナトリウムを添加すると目的物を比較的、高収率で得ることができた。表記化合物の^{1}H-NMRスペクトルはPMP の場合と類似していた。また、PMPMPのUVスペクトルは249 nmに極大吸収を示し、モル吸光係数は18,500とPMPの約1.5倍であった。

第2項　グルコース-2PMPMPの特徴

PMPと同様の反応条件で得られたグルコース-2PMPMP(Scheme 7b参照)は^{1}H-NMRにおいて先に報告したPMP誘導体と類似したシグナルパターンを示した。この化合物は逆相分配モードのHPLCにおいてPMP体よりも保持が強く、シアル酸含有オリゴ糖のような親水性オリゴ糖の誘導体化にとって好ましいと考えられる。

第3項　プレカラム誘導体化条件の最適化

N-アセチルノイラミニルラクトース(NeuAc-Lac)をモデルオリゴ糖に用い、第1章第2節と同様の方法で誘導体化条件の最適化を行った。試薬のメタノール溶液と水酸化ナトリウム水溶液を試料に等量加えて加温するという操作により反応を行ったところ、試薬およびアルカリの至適濃度は各々0.5 Mおよび0.3 Mであった。誘導体化に供することのできるオリゴ糖の量は限定されることが多いので、本研究では試薬とアルカリ溶液の量を各20 μlとし、オリゴ糖の乾燥試料0.5 nmol に添加することにした。PMPMP濃度は高いほど反応効率はよかった。分析に先立って過剰の試薬を除去する必要があるため、溶媒抽出を試みた。Table 11に各種有機溶媒を用いたときの試薬の抽出効率と誘導体の

Table 11
Comparison of the Efficiencies of Removal of the Excess Reagent by Solvent Extraction[a]

Solvent[b]	Remaining reagent (%)[c]	Recovery of NeuAc-Lac-2PMPMP (%)[c]
Benzene	1.2	90
Carbon tetrachloride	1.6	88
Chloroform	0.019	97
Ethyl acetate	0.014	98
n-Hexane	13	86

[a]Extraction was repeated five times.
[b]All the solvents for extraction were presaturated with water.
[c]The amounts of reagent and NeuAc-Lac-2PMPMP used were 10 μmol and 100 pmol, respectively.

回収率を示す。クロロホルムと酢酸エチルが最も良好な結果を与えたが、クロロホルムに比べ酢酸エチルは水層より上層にくるので除去操作が容易であるため、酢酸エチルを用いることにした。抽出を5回繰り返しても生成物の損失は見られなかった。

反応時間と反応温度の効果をFig. 18 に示す。NeuAc-Lacの誘導体の生成率は70℃まで増加した (Fig. 18a)。内部標準としてグルコース-2PMPMP誘導体を用いて収率を計算したところ、生成量は時間の経過とともに増大し、20分でほぼ一定(約98%)に達した(Fig.18b)。「実験の部」で述べた標準操作は以上の結果をもとに設定したが、PMP化法

とほぼ同様であった。NeuAc-LacのPMPMP誘導体のHPLCデータをFig. 19aに示した。13分に現れる星印を付したピークは、NeuAc-Lacに微量含まれる*N*-アセチルノイラミン酸がα2-6結合した異性体によるものである。同じ条件でラクトースのPMPMP誘導体を分析した結果をFig. 19bに示したが、Fig. 19aではこのラクトース由来のピークが全く認められないことから、本反応では脱シアル酸が全く起こらないことがわかった。

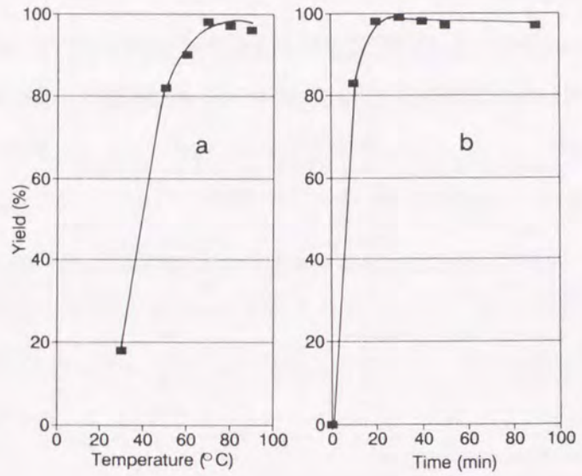


Fig. 18. Optimization of the conditions for precolumn labeling of NeuAc-Lac, as observed from the yield of NeuAc-Lac-2PMPMP determined by UV detection. (a) Effect of reaction temperature. Reagent concentration, 0.3 M (sodium hydroxide), 0.5 M (PMPMP); reaction time , 20 min. (b) Time course of the reaction. Reagent concentration, 0.3 M (sodium hydroxide), 0.5 M (PMPMP); reaction temperature, 70°C. Sample, NeuAc-Lac (10 nmol); column, Capcell Pak C_{18} (4.6 mm i.d., 25 cm); eluent, a 20/80 (v/v) mixture of acetonitrile - 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0); flow rate, 1.0 ml/min; detection, UV absorption at 249 nm.

第4項　検量線と再現性

グルコースを内部標準に使用した時のNeuAc-Lacの検量線は2〜2000 pmol の範囲で良好な直線となった。また、グルコース-2PMPMPに対するNeuAc-Lac-2PMPMP

の相対モルレスポンスは1.043とほぼ 1 に近く、検出限界はS/N = 5としたとき、 500 fmolであった。

くり返し分析(n = 9) における相対レスポンスの再現性は、相対標準偏差としては20、200および1000 pmolで、それぞれ2.1, 0.8, 1.9%であった。また、保持時間の相対標準偏差はいずれの濃度でも相対標準偏差として0.6%以下となり高い再現性を示した。

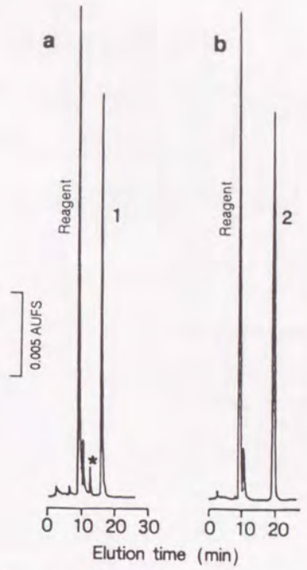


Fig. 19. Analysis of NeuAc-Lac (a) and Lac (b) as PMPMP derivatives. 1 = NeuAcα2-3Lac-2PMPMP, 2 = Lac-2PMPMP. The peak marked by an asterisk is derived from NeuAcα2-6Lac-2PMPMP. Analytical conditions were the same as those in Fig. 18, except 25 pmol each of the samples was injected.

第5項　標準オリゴ糖のクロマトグラフィー

糖タンパク質糖鎖の標品は市販されているものがほとんどなく入手し難いので、中性グルカンであるデキストランの部分水解物を標準オリゴ糖として用いた。これには種々の重合度のイソマルトオリゴ糖が含まれ、これらの PMPMP に対する反応性は糖タンパク質糖鎖と同等であると予測される。Fig. 20 にイソマルトオリゴ糖類の分析結果を示す。オクタデシル化シリカゲルを固定相とし、一定組成の移動相（アセトニトリル−0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.0; 15:85 v/v）で溶出させた場合、70分で少なくとも14糖までを分離

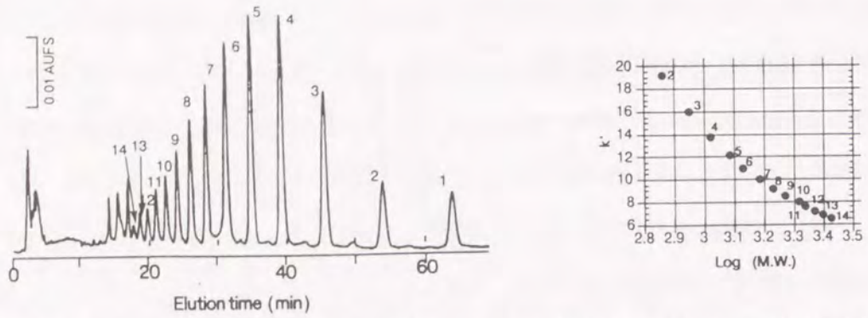


Fig. 20. Analysis of PMPMP derivatives of isomalto-oligosaccharides (5.0 μg as dextran). Eluent, a 15/85 (v/v) mixture of acetonitrile - 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0); flow rate, 0.60 ml/min. Peak numbers indicate degree of polymerization (d.p.). Other conditions as in Fig. 19. The panel shows the relationship between molecular weight (M.W.) and capacity factor (k') for PMPMP derivatives of isomaltooligosaccharides. The numbers beside the plots indicate d.p. values.

することができた。保持時間と試料の分子量の関係を調べたところ、分子量の対数とk'値との間に直線性が観察され、以下の式で表すことができた。

$$\log(\text{分子量}) = -1.54 \times \log(k') + 5.68 \qquad [2]$$

ただし、k'は固定相と移動相間の分配比であり、$(Et - Et_0)/Et_0$（Et および Et_0 はそれぞれイソマルトオリゴ糖誘導体およびカラムに全く保持されない成分の溶出時間）によって求められる。

第6項　糖タンパク質中の中性およびシアル酸含有オリゴ糖の分析

種々の糖タンパク質よりヒドラジン分解やグリコーペプチダーゼAで処理して得た*N*-グリコシド型オリゴ糖をPMPMPで誘導体化し、イソマルトオリゴ糖誘導体と同じ条件で分析した。対象としたオリゴ糖の溶出時間をTable 12 にまとめた。この分析の信頼性を高めるために移動相は一定組成とし、また溶出時間そのものを比較するのではなく、

標準物質に対する相対値をとりあげた。すなわち前述のイソマルトオリゴ糖誘導体の混合物を同一条件で分析し、第５項で述べた直線を作成して分析対象の糖鎖の重合度相当値（換算グルコース単位, N ）を求め、糖鎖の実際の重合度で割った値 (R) を算出した。以下これらの値を基にして *N*-グリコシド型糖鎖の挙動について考察する。

Table 12
Retention Data of the PMPMP Derivatives of Various Oligosaccharides Obtained from Glycoproteins

Oligosaccharide[a]	Capacity factor, k' ($k'rel$[b])	d.p. equivalence to isomaltooligosaccharide, N	R
High-mannose type			
N-24 RNB-7M(M_5GN_2)	15.07 (1.04)	3.3	0.48
N-25 RNB-8M(M_6GN_2)	13.96 (0.96)	3.8	0.48
N-26 RNB-9M(M_7GN_2)	13.46 (0.93)	4.2	0.47
N-28 RNB-10M(M_8GN_2)	13.03 (0.90)	4.5	0.45
Hybrid type			
N-40 OVA-10H(M_5GN_5)	16.21 (1.11)	2.9	0.29
N-41 OVA-11H($M_5G_1GN_5$)	15.20 (1.04)	3.2	0.29
Complex Type			
Nonfucosylated, nonsialylated			
N-1 TRF-9C(Di)($M_3G_2GN_4$)	14.55 (1)	3.6	0.40
N-4 FET-11C(Tri)($M_3G_3GN_5$)-a	12.62 (0.87)	4.7	0.43
N-2 FET-11C(Tri)($M_3G_3GN_5$)-b	13.26 (0.91)	4.3	0.39
Sialylated			
N-3 TRF-11C(Di)($M_3G_2GN_4SA_2$)	10.55 (0.73)	6.2	0.56
N-5 FET-14C(Tri)($M_3G_3GN_5SA_3$)-a	9.54 (0.66)	7.5	0.54
N-6 FET-14C(Tri)($M_3G_3GN_5SA_3$)-b	9.55 (0.66)	7.5	0.54
Fucosylated			
N-7 TGB-10C(Di)($M_3G_2GN_4F_1$)	17.58 (1.21)	2.5	0.25
N-17 TGB-11C(Di)($M_3G_3GN_4F_1$)	16.41 (1.13)	2.8	0.26
Sialylated, fucosylated			
N-19 TGB-12C(Di)($M_3G_2GN_4F_1SA_2$)	10.10 (0.83)	6.3	0.53
N-20 TGB-12C(Di)($M_3G_3GN_4F_1SA_1$)	11.91 (0.75)	5.0	0.42
N-21 TGB-11C(Di)($M_3G_2GN_4F_1SA_1$)	10.96 (0.75)	5.8	0.48

[a] Abbreviations are explained in the footnotes to Table 11.
[b] Relative k' value to TRF-9C(Di)($M_3G_2GN_4$).
[c] Ratio of N to number of monosaccharide residues.

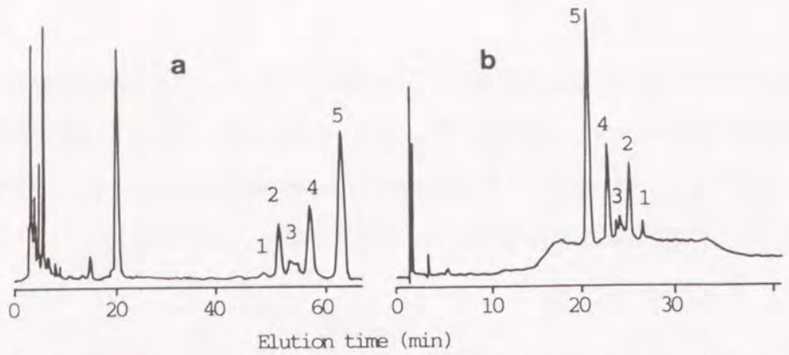


Fig. 21. (a) Analysis of high-mannose-type oligosaccharides obtained from ribonuclease B (bovine pancreas) as their PMPMP derivatives. The amount of sample injected corresponded to 0.5 mg of protein. Analytical conditions are the same as those in Fig. 20. (b) Analysis of high-mannose-type oligosaccharides from ribonuclease B by high-performance anion-exchange chromatography. A portion of the glycopeptidase A-released mixture (0.5 mg as protein) was directly injected prior to derivatization. Column, Dionex HPIC AS-6 (4 mm i.d., 25 cm); eluent, gradient elution from 0.1 M sodium hydroxide to 0.1 M sodium hydroxide containing 0.5 M sodium acetate in 120 min, flow rate, 1.0 ml/min; detection, pulsed amperometry on gold electrode; E_1 = +0.05 V (0.6 s), E_2 = +0.6 V (0.12 s), E_3 = -0.8 V (0.42 s). Peak assignment: 1 = RNB-11M(M_9GN_2) i.e., [N-30]. 2 = RNB-10M(M_8GN_2) i.e., [N-28]. 3 = RNB-9M(M_7GN_2) i.e., [N-26], 4 = RNB-8M(M_6GN_2) i.e., [N-25], 5 = RNB-7M(M_5GN_2) i.e., [N-24]. The abbreviations are described in Table 10.

実際のグロマトグラムをFig. 21 以下に示す。ウシ膵臓リボヌクレアーゼB をサーモライシンとグリコペプチダーゼで処理して得た一連の高マンノース型糖鎖の分析結果をFig. 21a に示す。リボヌクレアーゼBは主要なオリゴ糖として7糖[N-24] (Table 11参照)を含有し、α1-2結合したマンノースの数がさらに多い8糖 [N-25]、9糖 [N-26]および10糖[N-28]を有することが知られている[51]。今回の分析結果はこの報告を支持するものであった。すなわち、7糖がもっとも大きなピークとして一番遅れて溶出し、残りの糖鎖がイソマルトオリゴ糖と同様、重合度順に現れた。[N-26]と[N-28]はそれぞれ3種類の異性体の混合物と考えられるが、これら異性体の分離は困難であった。また、一番最初に溶出したピーク 1は報告されていない完成型高マンノース型糖鎖（11糖）であることが考えられる。比較のため第２節で述べる陰イオン交換クロマトグラフィーによるオリゴ糖の分析を行った。その結果、Fig. 21bに示すクロマトグラムが得られ、溶出順序は逆転し

たが、やはり11糖[N-30]の存在が示唆された。また、両モードにおける9糖と10糖の異性体の分離はほぼ同程度であった。

ハイブリッド型糖鎖としてはオバルブミン由来のものを分析した。これらのうち２種類のハイブリッド型糖鎖([N-40] および [N-41])を比較すると後者は前者に比べてガラクトース残基が１つ多いが、それぞれのk値は16.21および15.20となり、この差は約0.3グルコース単位の差に相当した。

ブタチログロブリンには高マンノース型糖鎖とともに複合型糖鎖が含まれている[52]。ブタチログロブリンをヒドラジン分解して得たキトビオースコアにフコースを有するジシアル酸含有オリゴ糖の分離例をFig. 22a に示す。この糖タンパク質の主要糖鎖[N-19] (TGB-12C(Di)($M_3G_2GN_4F_1SA_2$)) は本分離条件下でk'値が 10.10、6.3 グルコース単位という結果が得られた。

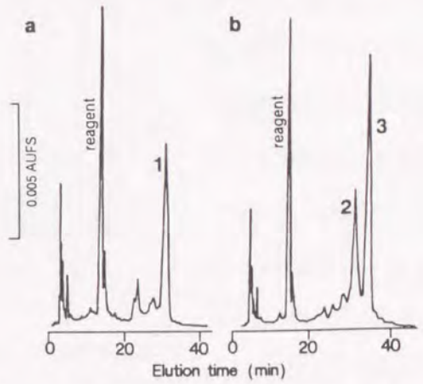


Fig. 22. Analysis of fucosylated and sialylated complex-type oligosaccharides obtained from thyroglobulin (porcine thyroid) by hydrazinolysis as their PMPMP derivatives. Analytical conditions were the same as those described in the legend to Fig. 20. (a) Disialo-oligosaccharide fraction. (b) Monosialo-oligosaccharide fraction. The amount of sample injected corresponded to 10 μg of glycopeptide for either fraction. Peak assignment: 1 = [N-19], 2 = [N-21] (TGB-12C(Di)($M_3G_3GN_4F_1SA_1$)), 3 = [N-20] (TGB-11C(Di)($M_3G_2GN_4F_1SA_1$). The abbreviations are described in Table 10.

同様、チログロブリンのシアル酸を１残基含む複合型糖鎖の分析結果をFig. 22bに示す。明瞭に分離した２本のピークが観察され、それらは先の[N-19]のシアル酸の一つがはずれた[N-21]およびさらにガラクトース残基が結合した[N-20]であることを同定して確認した。これらオリゴ糖のk'値はそれぞれ10.96 と11.91であった。チログロブリン由来の

フコース含有複合型糖鎖、たとえば[N-21] (TGB-11C(Di)($M_3G_2GN_4F_1SA_1$))の保持をトランスフェリン由来のフコースを含まない同一重合度のオリゴ糖[N-3]（TRF-11C(Di)($M_3G_2GN_4SA_2$)）と比較すると、R値は小さな値を示したが、これはフコース残基の疎水性によるものと考えられる。また、シアル酸残基の存在が保持に与える効果は、以上述べたオリゴ糖類を比較した場合、余り大きくなかったが、フコース残基をもつシアル酸含有オリゴ糖[N-20] (TGB-12C(Di)($M_3G_3GN_4F_1SA_1$))および[N-21] (TGB-11C(Di)($M_3G_2GN_4F_1SA_1$)) をそれぞれノイラミニダーゼで処理して得たオリゴ糖は17.58および16.41と高いk'値を与えた。

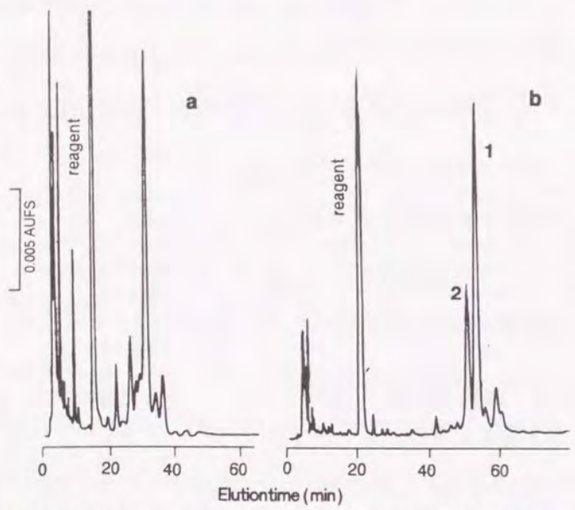


Fig. 23. Analysis of sialo- and asialo-oligosaccharides, obtained from bovine fetuin by digestion with glycopeptidase A as PMPMP derivatives. (a) A mixture of [N-5] (FET-14C(Tri)($M_3G_3GN_5SA_3$)-a, corresponding to commercial 363-SA-Tri) and [N-6] (FET-14C(Tri)($M_3G_3GN_5SA_3$)-b, corresponding to commercial 366-SA-Tri). (b) Asialo-oligosaccharides. Peak assignments: 1 = [N-4] (FET-11C(Tri)($M_3G_3GN_5$)-a, corresponding to commercial AS-FET3, 2 = [N-2] (FET-11C(Tri)($M_3G_3GN_5$)-b, corresponding to commercial AS-FET4. The abbreviations are described in Table 10. The amount of sample injected corresponded to 10 μg of glycopeptide for either fraction. Analytical conditions were the same as those described in Fig. 20.

Fig. 23 はウシフェツイン由来のシアル酸含有オリゴ糖の分析結果を示す。この糖タンパク質にはシアル酸の数および結合が異なる３本鎖の複合型糖鎖が存在する[53]。しかし、本分離条件下では１本の大きなピーク(k' = 9.54)だけしかみられなかった。フェツイン由来のオリゴ糖のうち、シアル酸残基の結合様式に基づく2種類の異性体（[N-5]と[N-6]）が市販されているので入手して比較した。その結果、両異性体はほとんど同じk'値(9.54および9.55）を示した。先のシアル酸含有複合型糖鎖の結果も考えあわせると、シアル酸含有糖鎖の相互分離は余り良好とはいえなかった。しかし、これをノイラミニダーゼ処理することにより得られるオリゴ糖では、ガラクトース残基の結合様式に基づく異性体([N-2]と[N-4])の良好な分離が得られた(Fig. 23b)。これら２種のオリゴ糖の存在比をピーク面積より換算した結果、3:7という結果が得られた。

第７項 PMPMP誘導体の安定性

PMPMP誘導体を-20℃で乾燥状態で保存すると少なくとも数カ月間は安定であった。しかし、単離した誘導体を緩衝液中に放置すると、Fig. 24 に示すようにpH に応じて分解が起こることが観察された。pH 4.0ではNeuAc-Lac-2PMPMPは比較的安定で、37℃で96時間加温しても90%以上を回収できた。しかし、pHが高くなるにつれて分解が顕著になり、pH 8.0では約9時間でbis-PMPMP誘導体が消失した。しかし、この分解物を再び誘導体化することで、再度bis-PMPMP誘導体を得ることが可能であった。

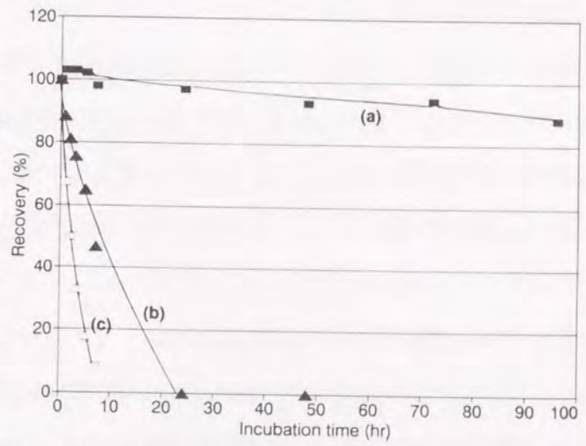


Fig. 24. Stability of NeuAc-Lac-2PMPMP. Incubation in (a) 100 mM citrate-phosphate buffer (pH 4.0), (b) 100 mM phosphate buffer (pH 6.0), and (c) 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). Analytical conditions were the same as those described in the legend to Fig. 19.

第2節　ラテックス型固定相による分離とパルスアンペロメトリーに基づくシステム

パルス状に異なる電位を順番にくり返し与えて特定の電位における電解電流を積算する方式（パルスアンペロメトリー）は、通常のアンペロメトリーやクーロメトリーに比べ、S/N 比が改善されるため感度が高い。またアルカリ条件下では、作用電極に金属電極を用いることで糖も酸化されることが知られている。したがって、移動相にアルカリ水溶液を用いる陰イオン交換カラムによって糖類を分離し、パルスアンペロメトリーで検出する方法[43-49]は、糖の分析法として興味深い。アンペロメトリーでは糖の水酸基の他にアミノ基やスルフヒドリル基なども同時に酸化されることが予測されるが、パルスアンペロメトリーでは電位の設定や電解電流の取り込みのタイミングを任意に設定できるため、特異性を持たせられる可能性がある。本節では金電極を装着したパルスアンペロメトリーを用いて、糖タンパク質糖鎖の分析の可能性を検討した。

第1項　分離機構の考察と分離条件の検討

陰イオン交換樹脂は一般に強アルカリ性溶液中では徐々に分解を起こすが、陽イオン交換樹脂の表面に陰イオン交換樹脂の微粒子をイオン的に付着させたタイプ（ラテックス型）の樹脂は強アルカリに安定である。したがって、強アルカリを移動相として種々の物質を分離することができる。このモードで糖を分離する場合、糖の水酸基が解離して陰イオンを与え、これがイオン交換モードにより分離するといわれている。しかし、この機構だけでは説明できない現象も観察されている。たとえば、種々の結合様式をもつグルコビオースの k' を比較してみると (Table 13)、同一の結合位置をもつα-およびβ-グルコビオースでは解離の程度に大差はないと考えられ、したがって、α-およびβ-グルコビオースも k' の順序は同一と予想される。しかし、実測値は予測に反し、α-結合では 1→6 < 1→3 < 1→4、β-結合では 1→6 < 1→4 < 1→3 であった。したがって、単純にアニオン交換モードだけで説明するのは困難であり、例えば固定相への分配の寄与も大きいと考えられる。

Table 13
Capacity Factors (k's) of Glucobiose

Saccharide	Structure	k'
Nigerose	Glcα1-3Glc	5.73
Maltose	Glcα1-4Glc	6.37
Isomaltose	Glcα1-6Glc	2.34
Laminaribiose	Glcβ1-3Glc	6.87
Cellobiose	Glcβ1-4Glc	3.87
Gentiobiose	Glcβ1-6Glc	3.69

Eluent: 0.1 M NaOH

ところで本システムでは固定相が上述のラテックス型樹脂に限定されているため、分離は移動相のアルカリ濃度によって決まる。したがって、移動相には一般に水酸化ナトリウム水溶液を用いるが、酢酸ナトリウムを加えて若干の緩衝性をもたせることもできる。

Table 14 には、糖タンパク質より調製した種々のオリゴ糖類の k' をまとめて示した。固定相自身が強陰イオン交換基をもつため、シアル酸の結合した酸性糖鎖ではシアル酸の数が多いほど保持が強くなるため、移動相により高濃度のアルカリを使用する必要があった。類縁のオリゴ糖類について k' 値を比較すると、重合度の高いものほど、また、アセチルヘキソサミンよりもアルドースの数が多いものほど高値を与えた。さらにシアル酸を含むオリゴ糖では *N*-グリコリルノイラミン酸を含むものの方が *N*-アセチルノイラミン酸を含むものより大幅に大きな保持値を与えた。また、フコース残基の存在で保持が減少する傾向も観察された。しかし、これらの現象を一般化するにはさらに試料数を増やして検討する必要があると考えられる。

Fig. 25 にグルコースがα1-6結合したホモオリゴ糖であるイソマルトオリゴ糖について保持挙動を調べた結果を示す。いずれのアルカリ濃度においても log k'と重合度の間には良好な直線性が観察され、相関係数は0.999以上と良好であった。またアルカリ濃度の増加にしたがって勾配が急になった。これらの結果はアニオン交換モード、分配

Table 14
Capacity Factors of Various Glycoprotein-Derived
Glycopeptides (a), Oligosaccharides (b) and Oligosaccharide Alcohols (c)

Code		Reducing end	NaOH (M) in eluent	k'
Complex type				
[N-7]	TGB-10C(Di)($M_3G_2F_1GN_4$)	b	0.5	2.76
[N-17]	TGB-11C(Di)($M_3G_3GN_4F_1$)	b	0.5	4.92
[N-19]	TGB-12C(Di)($M_3G_2F_1GN_4SA_2$)	b	0.8	3.49
		c	0.8	2.27
[N-20]	TGB-12C(Di)($M_3G_3F_1GN_4SA_1$)	b	0.5	12.0
		c	0.5	6.18
[N-21]	TGB-11C(Di)($M_3G_2F_1GN_4SA_1$)	b	0.5	7.33
		c	0.5	4.19
[N-23]	OVA-9C(Tri)(M_3GN_6)	a	0.4	4.58
		b	0.4	2.91
		c	0.4	1.89
High-mannose type				
[N-24]	TGB-7M(M_5GN_2)	a	0.5	2.65
		b	0.5	1.89
		c	0.5	1.18
[N-25]	TGB-8M(M_6GN_2)	a	0.5	3.62
		b	0.5	2.72
		c	0.5	1.76
[N-26]	TGB-9M(M_7GN_2)	a	0.5	4.71
		b	0.5	2.98
		c	0.5	1.99
[N-28]	TGB-10M(M_8GN_2)	a	0.5	6.00
Hybrid type				
[N-37]	OVA-9H(M_4GN_5)	a	0.4	7.97
		b	0.4	5.28
		c	0.4	3.10
[N-38]	OVA-9H(M_5GN_4)	a	0.4	5.60
		b	0.4	3.62
		c	0.4	2.27
[N-39]	OVA-10H($M_4G_1GN_5$)	a	0.4	6.11
		b	0.4	3.87
		c	0.4	2.72
[N-40]	OVA-10H(M_5GN_5)	a	0.4	7.97
		b	0.4	5.28
		c	0.4	3.10
[N-41]	OVA-11H($M_5G_1GN_5$)	a	0.4	9.64
		b	0.4	6.31
		c	0.4	3.87
***O*-Glycosidically linked oligosaccharides**				
[O-1]		c	0.4	1.63
[O-2]		c	0.4	16.0
[O-3]		c	0.4	2.19
[O-4]		c	0.4	1.79
[O-5]		c	0.4	17.4
[O-6]		c	0.4	9.13

モードのいずれによっても説明が可能であると考えられる。以上、得られた知見はオリゴ糖の分離条件を探るための指針として有用であると思われる。

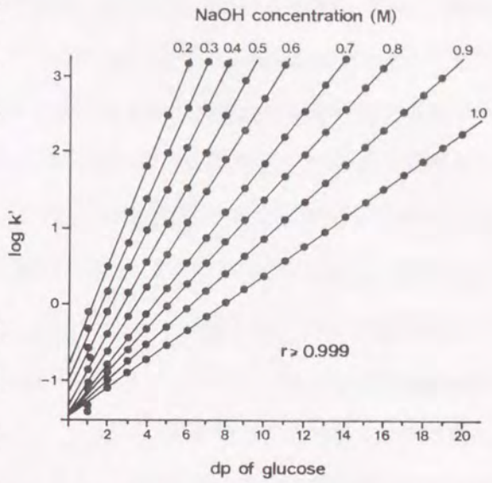


Fig. 25. Effect of alkali concentration on the retention of isomaltooligosaccharides. Column, Dionex HPIC AS-6 (4 mm i.d., 25 cm); flow rate, 1 ml/min; detection, pulsed amperometry on gold electrode; E_1 = + 0.05 V (0.6 s), E_2 = + 0.60 V (0.12 s), E_3 = - 0.8 V (0.42 s).

第2項　検出の選択性の検討

市販のパルスアンペロメトリック検出器を至適条件で用いても、多量に存在するアミノ酸やタンパク質はやはり妨害となる可能性がある。そこで、これらアミノ酸やタンパク質の妨害の程度を最初に調べた。Fig. 26a と26b は至適条件(E_1 = 0.05 V (600 ms), E_2 = 0.6 V (120 ms), E_3 = -0.8 V (420 ms)) で、それぞれ18種類のアミノ酸混合物（各1μmol）およびウシ血清アルブミン（5μg)を0.5 M 水酸化ナトリウムを移動相として分析した結果である。アルブミンを注入してもほとんどピークは観察されなかったが、アミノ酸では約5分と12分に強いピークが現れた。このことは糖タンパク質より糖鎖を調製する際に共存物質として存在するアミノ酸やペプチド類を、分析に先立って除去する必要があることを示している。そこで、Sephadex G-25の小カラム(1 cm i.d., 30 cm)を用いて糖鎖を精製してから分析を行ったところ、アミノ酸の妨害を除くことができた。

第3項　糖タンパク質由来糖鎖の分離

糖タンパク質糖鎖モデルとして、ブタ由来チログロブリンとウシ顎下腺ムチンを使用した。

ブタチログロブリンの糖鎖：ブタチログロブリンをプロナーゼPで処理した後、Sephadex G-25カラムでアミノ酸やペプチドを除き、DEAE-Sephadex A-25を用いて中性ならびにシアル酸を１残基および２残基含む糖ペプチドに分画した。中性糖鎖を有する糖ペプチドをラテックス型樹脂と強アルカリを用いて分析した結果をFig. 27aに示す。この中性画分は0.5 M 水酸化ナトリウムを移動相に用いたところ、3つの主要ピーク（ピーク1～３）と1つの小さなピーク（ピーク４）を

Fig. 26. Analysis of (a) a mixture of amino acids (1 μmol each) and (b) bovine serum albumin (5 μg). Eluent: 0.5 M sodium hydroxide. Other analytical conditions are the same as those described in Fig. 25

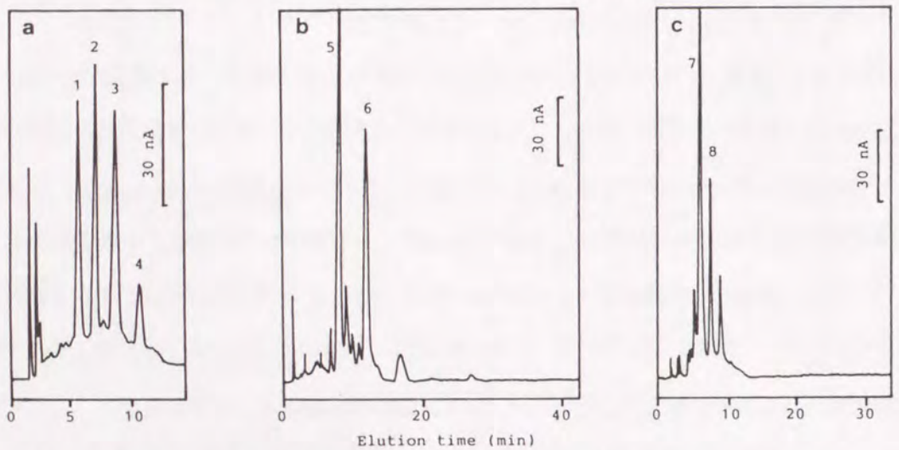


Fig. 27. Analysis of the (a) neutral glycopeptides, (b) reduced monosialo- and (c) reduced disialooligosaccharides, derived from porcine thyroglobulin. Eluent: (a) 0.5, (b) 0.5 and (c) 0.8 M sodium hydroxide solution. Peak assignment: 1 = [N-24] (TGB-8M(M_6GN_2)), 2 = [N-25] (TGB-9M(M_7GN_2), 3 = [N-26] (TGB-10M(M_8GN_2)), 4 = [N-28] (TGB-11M(M_9GN_2)), 5 = [N-21] (TGB-11C(Di)($M_3G_2GN_4F_1SA_1$)), 6 = [N-20] (TGB-12C(Di)($M_3G_3GN_4F_1SA_1$)), 7 = [N-19] (TGB-12C(Di)($M_3G_2GN_4F_1SA_2$)), 8 = [N-21] (TGB-14C(Tri)($M_3G_3GN_5F_1SA_2$)). Other conditions as in Fig. 25. Sample scale: 11 - 30 μg as glycoprotein.

与えた。くり返し分取することにより、各ピークを与える糖ペプチドをとり出し脱塩して、^{1}H-NMRで構造解析を行った（Table 15）。その結果、ピーク1と2 には 7 つおよび 8 つのアノメリックプロトンの存在が示唆され、高マンノース型の7糖[N-24]および8糖[N-25]と同定した。また、これらはいずれも2つの*N*-アセチル基のメチルプロトンを2.04および2.06 ppmに与え、2.8 ppm 附近にアスパラギンのβ-メチル基に相当するシグナルを与えた。また、C-2(H-2)のプロトンおよびアノメリックプロトンの化学シフト値も既存の報告とよく一致した[54]。ピーク3の成分の^{1}H-NMRスペクトルも同様に2つの*N*-アセチル基とアスパラギンに基づくメチレンのシグナルを与えた。4.0～5.4 ppmに現われたアノメリックプロトンの化学シフトは3種類の糖鎖の存在を示唆した。つまり、マンノース残基（A, B および C）の2位が置換されると化学シフトが低磁場に移動するためである (Fig. 28)。これら置換されたマンノースのシグナルの面積比よりマンノース残基 A, B, C にさらにマンノースを有する各置換異性体の存在比を推定したところ、

Table 15
Assignment of the Chemical Shifts of Representative Proton Signals of Major Neutral Glycopeptides Derived from Porcine Thyroglobulin

Numbering of monosaccharide residue:

M = mannose; N = N-acetylglucosamine.

Signal	Monosaccharide residue	1	2	3		
		M M>M-N-N M'	M-M M>M-N-N M'	M-M M-M>M-N-N M'	M-M M>M-N-N M-M'	M-M-M M>M-N-N M'
H-1	1	5.07	5.07	5.07	5.07	5.07
NAc	1	2.03	2.03	2.03	2.03	2.03
	2	2.06	2.06	2.06	2.06	2.06
H-1	4	5.09	5.34	5.34	5.34	5.34
	4'	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87
	A	5.09	5.09	*5.40*	5.09	5.09
	B	4.90	4.90	4.90	*5.14*	4.90
	C		5.05	5.05	5.05	*5.30*
	D			5.04	5.04	5.04
H-2	3	4.25	4.23	4.23	4.23	4.23
	4	4.07	4.11	4.09	4.09	4.09
	4'	4.15	4.15	4.15	4.15	4.15
	B	3.99	3.99	3.99	3.99	3.99
	C		4.07	4.07	4.07	4.07
	D			4.07	4.07	4.07

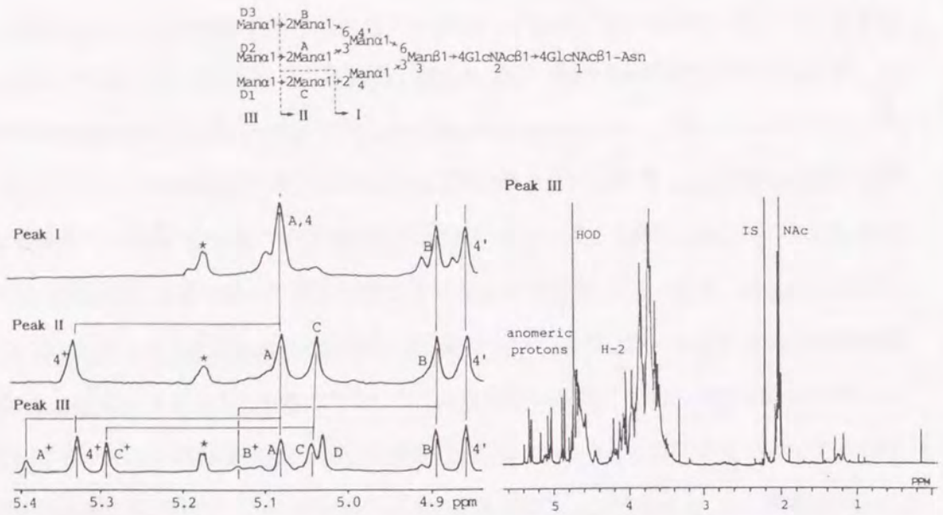


Fig. 28. ^{1}H-NMR spectrums of neutral glycopeptides. Left-hand side, anomeric protons of the compounds corresponding to peak 1 to 3; right-hand side, spectrum of structural reporter group regions of peak 3.

23:13:64であった。ピーク4は解析できる量が得られず、同定には至らなかったが、先に述べた各高マンノース型糖ペプチドが重合度順に現れていることから$Man_8GlcNAc_2$-Asn [N-28] であると推定した。

シアル酸含有糖ペプチドについても同様に分析を行ったが、ペプチド部分の構造不均一性によるためか、複雑な溶出パターンを示した。そこでこれらのシアル酸含有糖ペプチドはヒドラジン分解を行って遊離のオリゴ糖にしたのち、還元して糖アルコールとしたものを分析した。この処理の過程で一部のシアル酸が脱離するため、再度DEAE-Sephadex カラムで精製を行ってから分析した。ヒドラジン分解に伴うシアル酸の脱離の程度は約10%程度であった。Fig. 27bと27cはシアル酸含有オリゴ糖を糖アルコールとして分析した結果である。ピーク5を与える物質の^{1}H-NMRの化学シフト値は文献[54] とよく一致したことから[N-21]であると推定した。ピーク6はこの成分をコーヒー豆由来α-

ガラクトシダーゼで処理するとピーク5[N-21]と一致することから、この物質は非還元末端にさらにα-ガラクトース残基を有する糖鎖[N-20]であることが考えられた。これらの各ピーク成分の^{1}H-NMRにおける化学シフトをTable 16 に示す。ピーク6はピーク5と類似した化学シフトを示したが、5.135 ppm (3.5 Hz)のアノメリックプロトンが新たに加わり、GlcNAc-6'の化学シフトが4.471 ppmから4.446 ppm にシフトしている。Dorlandら[52] は４本鎖のα-ガラクトース残基を有するオリゴ糖の^{1}H-NMRを報告しているが、ピーク 6 の成分はこれと化学シフト、結合定数とも良く一致した。Fig. 27bに

Table 16
Assignment of the Chemical Shifts of Representative Proton Signals of Major Sialooligosaccharides Derived from Porcine Thyroglobulin

Numbering of monosaccharide residue:

M = mannose; N = N-acetylglucosamine; Nol = N-acetylgucosaminitol; F = fucose; G = galactose.

Signal	Monosaccharide residue	5	6
		NA-G-N-M, G-N-M>M-N-Nol, F	NA-G-N-M, G-G-N-M>M-N-Nol, F
H-1	4	5.13	5.13
	4′	4.92	4.92
	5	4.60	4.60
	5′	4.58	4.58
	6	4.44	4.44
	6′	4.47	4.44
	Fuc	4.89	4.89
	α-Gal		5.13
H-2	3	4.26	4.26
	4	4.19	4.20
	4′	4.11	4.11
H-3ax	NeuNAc	1.77	1.77
H-3eq	NeuNAc	2.66	2.66
H-5	Fuc	4.11	4.11
H-6	Fuc	1.21	1.21
NAc	1	2.01	2.01
	2	2.07	2.07
	5	2.05	2.05
	5′	2.04	2.04
	NeuNAc	2.03	2.03

おけるその他の小さなピークは同定するには至らなかったが、シアル酸の結合位置の異なる2本鎖または3本鎖の異性体であると考えられる。シアル酸を２残基含むオリゴ糖画分の分析結果をFig .27cに示す。ピーク7はノイラミニダーゼ処理の結果から2本鎖の複合型糖鎖[N-19]、ピーク8は3本鎖の糖鎖[N-22]であると推定した。

一定組成の移動相を用いた場合、本システムはこのように中性糖ペプチドおよび還元したオリゴ糖に対して良好な分離を示し、わずかな構造の相違に基づく分離が可能であった。保持時間の再現性も高く、相対標準偏差は0.1%以内であった。しかしチログロブリンの糖鎖のようにシアル酸の数が異なる糖鎖を含む試料を同一の条件で一斉に分離することは困難であり、予め、DEAEカラムによる分画が必要であった。そこで、比較のため濃度勾配溶出によるこれらの糖鎖の分析も試みた。Fig. 29に濃度勾配溶出によって、チログロブリン糖鎖の糖アルコールを一斉分析した結果を示す。分離は良好でシアル酸含量の異なる糖鎖を一斉に分離することはできたが、保持時間の再現性は低く、例えばピーク1について求めた溶出時間の相対標準偏差（n = 5)は5.3%と高かった。この場合、移動相は0.1 M 水酸化ナトリウムに0から0.5 M 酢酸ナトリウムまで200分の直線濃度勾配をかけて溶出した。各ピークの番号はFig. 27より推定したものである。未同定のピークが22～23分に溶出したが、これはヒドラジン処理の過程でシアル酸が遊離した複合型糖鎖によるものと考えられる。

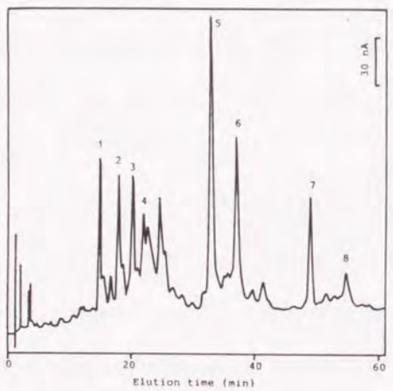


Fig. 29. Analysis of the reduced neutral and sialooligosaccharides derived from porcine thyroglobulin. Gradient elution from 0.1 M sodium hydroxide to 0.1 M sodium hydroxide containing 0.5 M sodium acetate in 200 min. Other conditions as in Fig. 25. Sample scale: 50 μg as glycoprotein. Numbering of peaks as in Fig. 27.

ウシ顎下腺ムチン：ウシ顎下腺ムチンには多量の*N*-アセチルーおよび*N*-グリコリルノイラミン酸を含む*O*-グリコシド型の2糖と3糖の存在が知られている。これら*O*-グリコシド型糖鎖は希アルカリ中、多量の水素化ホウ素ナトリウムを含む溶液中で長時間処理することにより遊離させることができた。得られた糖鎖をSephadex G-25 カラムで精製したのち、分析した。結果をFig. 30 に示す。移動相には0.3 M 水酸化ナトリウムを用いた。

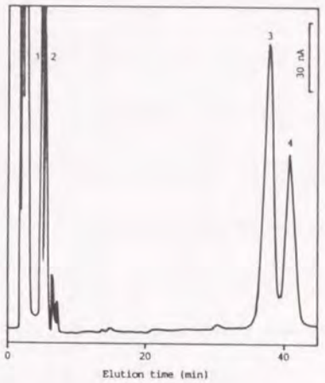


Fig. 30. Analysis of the reduced oligosaccharides derived from bovine submaxillary mucin. Eluent: 0.3 M sodium hydroxide solution. Other conditions as in Fig. 25. Sample scale: 11 μg as glycoprotein. Peak assignment: 1 = [O-1] and [O-4], 2 = [O-3], 3 = [O-2], 4 = [O-5].

各ピーク成分を分離し高速原子衝撃質量スペクトルにより分析したところ、ピーク１は*m/z* 513 と 716 にシグナルを与え、これは Tsuji と Osawa[56]が報告している NeuAcα2-6GalNAcol [O-1] と GlcNAcβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAcol [O-4] に相当した。ピーク２は*m/z* 674 を与え、これはGalβ1-3(NeuAcα2-6)GalNAcol [O-3]に相当した。また、遅く溶出するピーク3と4は*m/z* 529 と 732を与え、[O-1]と [O-4]の*N*-グリコリルノイラミン酸結合体（[O-2]と [O-5]）であることがわかった。本条件では早く溶出する成分の分離は不十分であったが、より低濃度の水酸化ナトリウムを移動相に用いれば分離が可能であった。

O-グリコシド型糖鎖の多くはウシ顎下腺ムチンのように可溶性タンパク質に存在するが、細胞の表面にも存在することが知られている。そこで膜タンパク質の糖鎖分析を試みた。結果をFig. 31に示す。移動相には0.5 M 水酸化ナトリウムを使用したところ、酸性糖鎖と思われるピークが２つ観察された。得られた試料量が少なかったため解析は行わなかったが、ブタ赤血球膜主要糖鎖としてGalβ1-3(NeuGlα2-6)GalNAc [O-6]とGalβ1-

3GlcNAcβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-3(NeuGlα2-6)GalNAc [O-7]の存在が報告されている[57]ことから、ピーク1および2はこれらに基づくものと推定された。このように本法は細胞表面糖鎖の解析にも適用が可能であった。

N-グリコシド型および*O*-グリコシド型の両種類の糖タンパク質モデルを用いて行った実験結果より、本システムはこれら糖鎖の分析に有効であり、分析に必要な試料量も糖タンパク質として数十μgと微量ですむことがわかった。しかし、強アルカリ性移動相を用いるために起こる問題も無視できない。たとえばシアル酸の部分分解が起こる可能性を否定することはできないが、これに対しては充分に精製されたシアル酸含有糖鎖標品を用いて基本的な実験を行う必要がある。また、糖鎖によっては分析中にエピ化のような副次的反応が起こることも考えられる。*O*-グリコシド型糖鎖を遊離させるための適切な酵素がないため、もっぱらアルカリーボロハイドライド法が使用されているが、この過程での脱シアル酸も見逃せない問題である。しかし、本法は分離能および検出感度の面で高い評価を与えることができると考えられる。

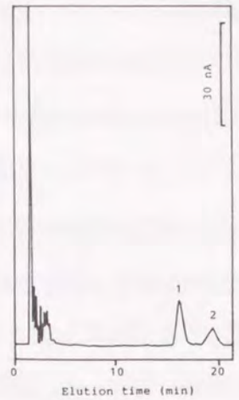


Fig. 31. Analysis of the reduced oligosaccharides derived from porcine erythrocyte ghost. Eluent: 0.5 M sodium hydroxide solution. Other conditions as in Fig. 25. Sample scale: 73 μl as blood. Peak assignment: 1 = [O-6], 2 = [O-7].

第４項　高速液体クロマトグラフィーによる糖鎖の構造解析への適用

本システムでは糖鎖の重合度が保持に大きく寄与する。そこでモデル糖鎖としてα-ガラクトシル基を有する２本鎖型のシアル酸を１残基含む複合型糖鎖 [N-20]を用い、エキ

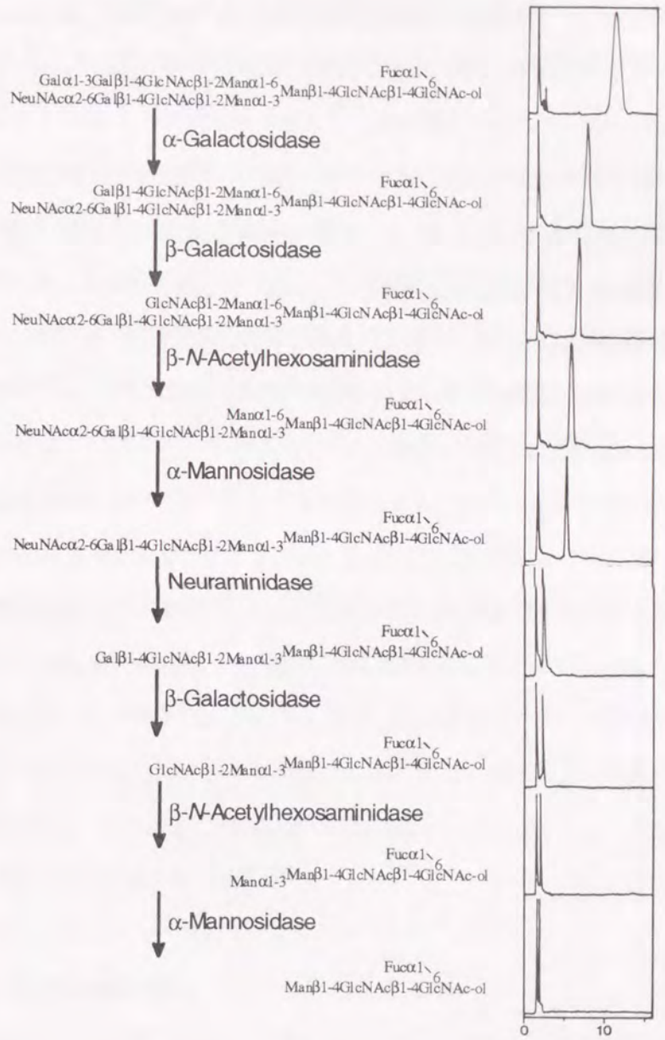


Fig. 32. Sequence analysis of complex type oligosaccharide [N-20] derived from porcine thyroglobulin by stepwise exoglycosidase digestion. Eluent: 0.5 M sodium hydroxide solution. Other conditions as in Fig. 25.

ソグリコシダーゼで順次、加水分解し、生成したオリゴ糖の溶出挙動を調べた。その結果、Fig. 32 に示すように、α-ガラクトシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼ、α-マンノシダーゼ、ノイラミニダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼおよびα－マンノシダーゼを次々に作用させると、生成した糖鎖の溶出時間が次第に短くなることが観察された。このことはいくつかの標品を用意すれば、糖鎖構造を簡便に推定できることを示している。このような酵素を用いる逐次分解法は糖鎖解析に既に利用されているが、標準的な手法であるYamashitaら[58]の BioGel P-4を用いたゲルろ過カラムクロマトグラフィー法に比べて、格段に分析時間を短縮することが可能であると考えられる。

第3節　担レクチン固定相を用いる糖ペプチドの高速液体アフィニティークロマトグラフィー

オリゴ糖と特異的に結合する機能をもつタンパク質（レクチン）が数多く知られている。したがって、糖類を分離する別の方法として、レクチン類を固定化したカラムを用いるアフィニティークロマトグラフィーが考えられる。そこで、レクチン類をHPLC用の硬質ゲルに固定化したカラムを調製し、オバルブミン由来のオリゴ糖類の分離を試みた。しかし、結果的にはピークの幅が広がり、分離に適用できるだけの理論段が得られなかった。これは糖とレクチンの結合および解離の速度が、通常用いられるHPLC充填剤における速度に比べ各段に遅いことに起因するためと考えられる。しかし、この高速アフィニティークロマトグラフィーは、他の方法で分離したオリゴ糖類の構造を推定したり、糖鎖とタンパク質の結合の強さを測定する上では非常に有効であると考えらる。

本研究では特異性が低く、多種類のオリゴ糖を認識することが知られているコンカナバリンA (Con A) および小麦胚芽レクチン (WGA) をそれぞれ固定化したカラムを調製し、オリゴ糖とこれらのレクチンとのアフィニティーを数量的に解析することを試みた。糖鎖モデルには、オバルブミン由来の一連の高マンノース型とハイブリッド型の糖ペプチドをダンシル(Dns)化して使用した。

第1項　固定相担体の検討

従来のアフィニティークロマトグラフィーでは、担体として軟質のアガロースゲルが繁用されているが、再現性および耐久性の面では好ましいとはいえない。また、特に免疫系のアフィニティークロマトグラフィーではガラスビーズも用いられることがあるが、担体からのタンパク質の洩出が問題となる。そこで、種々検討した結果、本実験ではシ

リカゲルおよび硬質アガロースゲルを担体として用いることにした。固定化方法の詳細は「実験の部」で述べるが、シリカゲルを担体とする場合には、ジオール型シリカゲルを過ヨウ素酸で酸化してアルデヒドとしたのち、還元的にタンパク質のアミノ基を縮合させる方法によって行った。また、アガロース系担体としてはSuperose 6Bを使用し、これをブロムシアンで活性化したのち、レクチンのアミノ基を介してを固定化した。

過剰量のレクチンを用い、これら2種類のアフィニティー担体へのレクチンの固定化量を比較したところ、シリカゲルではSuperose 6Bに比べて二桁近く多いことがわかった。そこで、本節ではSuperose担体を用いて得られたデータを比較対象として使用し、主にシリカゲルを用いて得られた結果について述べる。

第2項　レクチン固定化ゲルカラムの特性

Kasaiら[59]の方法に従って、前端分析から求めたシリカゲルへの各レクチンのカラム（4.6 mm i.d., 5 cm）あたりの固定化量は、Con A-カラム、WGA-カラムとも数百nmolレベルであった。移動相に塩化カルシウム、塩化マグネシウム各1 mMと0.2 M 塩化ナトリウムを含む50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)（溶離液 A）を用いて、Con A-カラムに標準糖としてα-ガラクトース、α-グルコースおよびα-マンノースの*p*-ニトロフェニルグルコシドを注入した結果をFig. 33aに示した。Con Aに対する親和性はこの順で高くなることが知られているが、ピークもこの順で現われた。Fig. 33bには移動相に溶離液Aを用いて、WGA-カラムに同様に標準糖としてキトビオースを注入した場合に得られたデータを示した。キトビースは約20分に幅の広いピークを与えた。カラム温度の効果を調べたところ、カラム温度の上昇とともに保持時間が顕著に減少し、ピークは鋭くなったが、カラム温度を35℃以上に上げると、流速0.5 ml/min でも圧力が200 kg/cm^2 を越えた。そこで、以下の全ての実験はカラム温度を30℃に固定して行った。

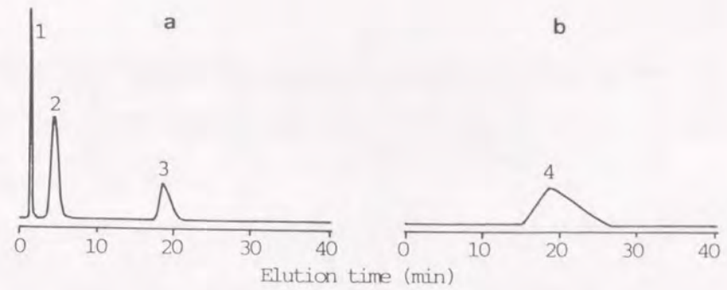


Fig. 33. High-performance affinity chromatography of selected saccharides on the Con A column (a) and WGA column (b). Column size, 4.6 mm i.d., 5 cm; eluent, 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 200 mM sodium chloride, 1 mM calcium chloride and 1 mM magnesium chloride (eluent A); flow rate, 1.0 ml/min; column temperature, 30°C; Detection, (a) UV absorption at 280 nm; (b) refluctive index. Amount of sample, 0.5 nmol each. Peak assignment: 1 = *p*-nitrophenyl α-galactoside, 2 = *p*-nitrophenyl α-glucoside, 3 = *p*-nitrophenyl α-mannose.

Fig. 33に示した条件で、各糖類の保持時間の再現性を調べたところ、Table 17に示すように高い再現性が得られた。

Table 17
Reproducibility of the Elution Times for *p*-Nitriphenyl Glycosides from the Con A Column (n = 10)

Saccharide examined	*Average elution time (min)*	*Relative standard deviation (%)*
p-Nitrophenyl α-galactoside	0.66	0.73
p-Nitrophenyl α-glucoside	4.03	0.48
p-Nitrophenyl α-mannoside	18.14	0.11

第3項　オバルブミン由来糖鎖の溶出挙動

Con A-カラムにおけるオバルブミンから調製した糖ペプチドのDns化誘導体の溶出様式をFig. 34aに示す。検出は蛍光強度の測定によって行った。溶離液Aを移動相に用いると、Dns-糖ペプチドの[N-23]、[N-27]、[N-37]および[N-39]は空隙容積附近に大きなピークを与えた。また、Dns-糖ペプチド[N-24]は若干保持されて、約7分にピークを示した。これら糖ペプチドとは対照的に、その他の糖ペプチド誘導体はこの条件では完全に保持されて、少なくとも30分以内にはピークを示さなかった。そこで、溶

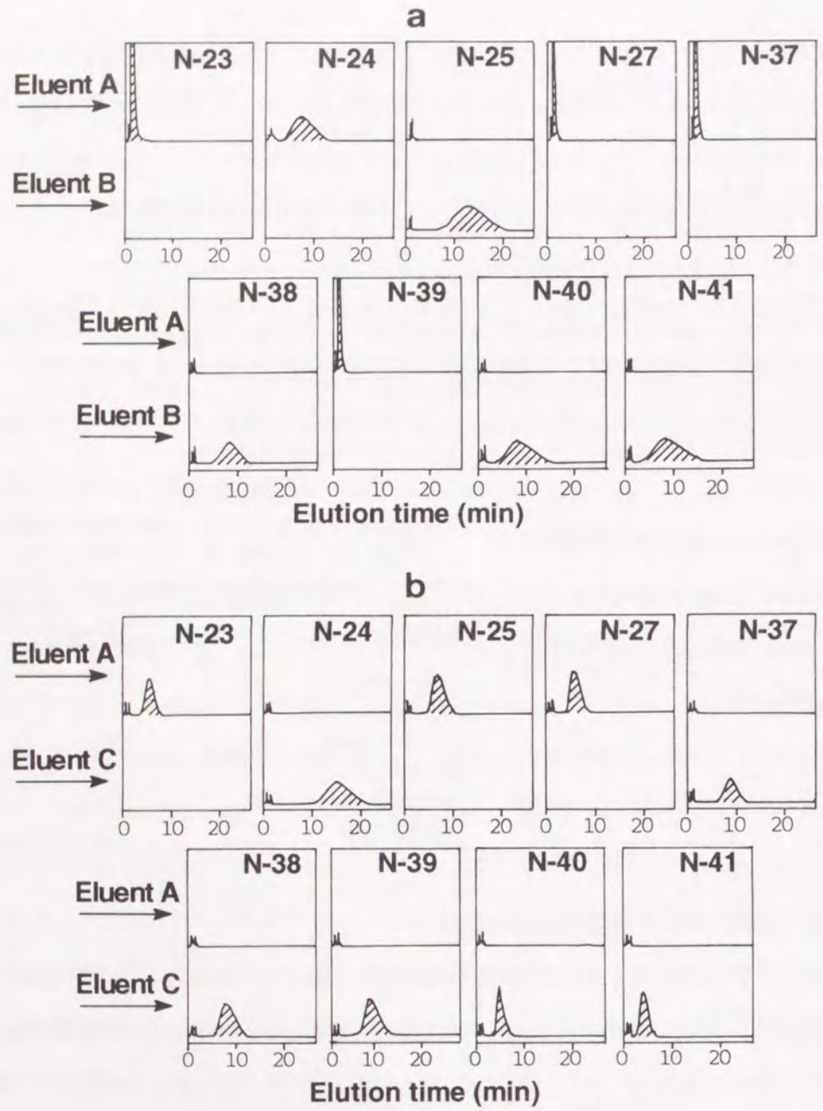


Fig. 34. Elution of Dns-glycopeptides from the silica-based Con A column (a) and WGA column (b). Eluent: B, eluent A containing 5 mM methyl α-mannoside; C, eluent A containing 2.2 mM chitobiose. Amount of sample, 1 μg each; detection, fluorescence at 340 nm (excitation)/540 nm (emission). Other conditions as in Fig. 33.

離液Aに5 mMメチルα－マンノシドを添加した溶離液Bを用いて溶出を行った。[N-38]、[N-40]および[N-41]はおよそ同じ保持時間（約8分）を与えたが、[N-25]はより長い時間（13分）を与えた。

Fig. 34bに同様、WGA-カラムにおいて得られた結果を示す。溶離液Aを用いると、Dns-糖ペプチド[N-23]、[N-25]および[N-27]はいずれも3分にピークを与えた。しかし、その他の糖ペプチドは強く保持された。そこで、WGA-カラムに対しては、移動相に競合糖として2.2 mMキトビオースを含む溶離液を使用して溶出した。溶出順序は[N-41] < [N-40] < [N-38] < [N-39] < [N-37] < [N-24]の順であった。

これらDns-糖ペプチドの保持時間の再現性は、*p*-ニトロフェニルグリコシド類の場合と同程度であった。これらの値から求めた各Dns-糖ペプチドのk'値をTable 18に示す。Fig. 34においては、糖ペプチドのうちの一部の組み合わせ、例えば、Con A-カラムでは[N-39]と[N-41]、WGA-カラムでは[N-24] と[N-39] および[N-41] 程度の組み合わせしか、完全に分離はできないことが示されたが、これらのk'値は糖ペプチドを同定する上で、有益な情報を与えると考えられる。

第4項　結合定数の算出

上述のようにタンパク質を固定化したカラムを用いる高速アフィニティークロマトグラフィーでは、多種類の糖鎖を一斉分離することには限界があるが、得られた k'値を基にして糖鎖とタンパク質の結合定数を算出することができる。Anderson と Walters[60] により提出された式を以下に示す。

$$1/k' = Vo/K_1L + VoK_2[C]/K_1L \qquad [3]$$

ここで、K_1とK_2はそれぞれDns-糖ペプチドと移動相に添加した競合糖のレクチンに対する結合定数、V_0 はカラムに全く保持されない物質の溶出体積、L はレクチンの固定量、[C] は競合糖の濃度である。k'の逆数と[C]の関係をプロットし、得られる直線から結合定数が算出できることが知られている。今回は既に前端分析よりLおよびK_2がわかっているので、これらの値をあてはめることにより K_1 を算出した。[C]が0のとき、すなわち溶離液Aを使用した時も第2項が0になるため簡単に算出できる。Table 18にこのようにして算出した結合定数を示した。

Table 18
The Capacity Factors and Binding Constants of the Dns-Glycopeptides Determined on Silica-Based Columns

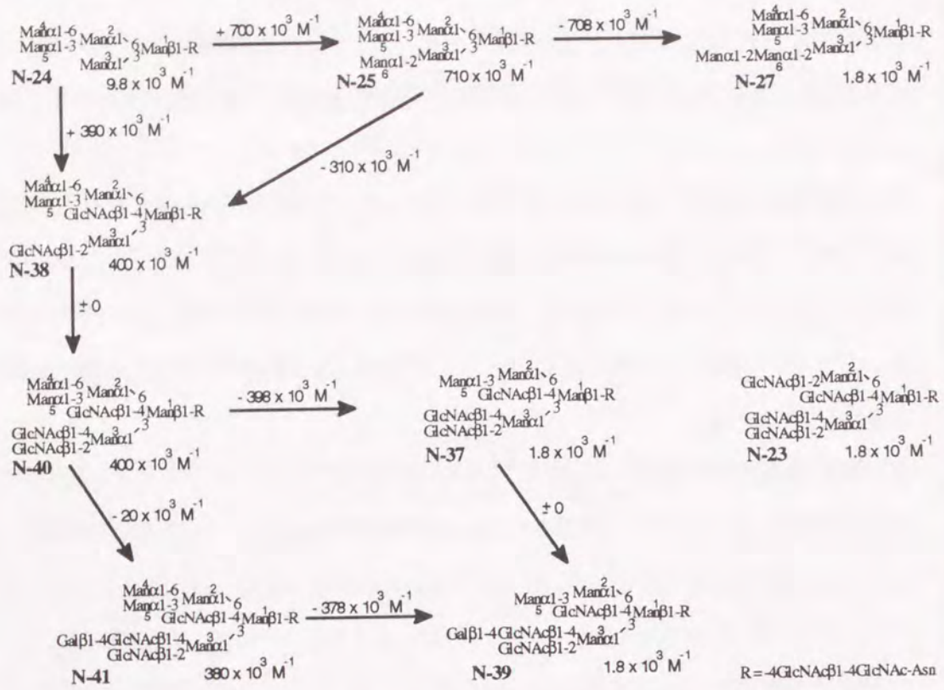
	Eluent	*Dns-glycopeptide*								
		N-23	*N-24*	*N-25*	*N-27*	*N-37*	*N-38*	*N-39*	*N-40*	*N-41*
Capacity factor, k'										
Con A	A	1.98	10.6	-	1.98	1.98	-	1.98	-	-
column	B	-	-	21.0	-	-	12.0	-	12.0	11.2
WGA	A	4.5	-	5.6	4.5	-	-	-	-	-
column	C	-	12.0	-	-	7.5	5.9	7.0	3.8	3.3
Binding constant (K_1, x 10^{-3} M^{-1})										
Con A column		1.8	9.8	710	1.8	1.8	400	1.8	400	380
WGA column		5.8	1200	7.2	5.8	710	560	670	360	310

BaenzigerとFiete[61]は一連の糖ペプチドを^{125}Iで標識し、レクチンに対する結合定数を従来の溶液法で算出している。それらの中で、Table 18 に示したものとアグリコンの部分の構造が異なるが、糖鎖部分が同じものがあったので K_1 値を比較した。Con Aに対するDns-糖ペプチド[N-25]の結合定数を今回の実験では7.1 x 10^5 M^{-1}と算出したが、彼らの値は2.1 x 10^7 M^{-1} とおよそ30倍の相違がみられた。彼らの測定法は今回の方法とは全く異なるが、両者を比較した場合、クロマトグラフィー法の方が簡便である。アグリコンの相違も軽視すべきではない。測定値がいかに真の値に近いかの議論は別にして

も本法は再現性に優れており、また、全くの同一条件下で一連の糖鎖試料を比較できるので、結合力の相互比較という点においてははるかに信頼度の高い方法であると考えられる。

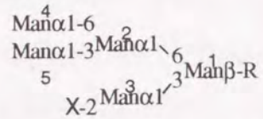
この観点からすると、それぞれのレクチンに対するオバルブミン由来糖ペプチドの親和性の順序（Con A-カラムに対しては[N-23], [N-27], [N-37], [N-39] < [N-24] < [N-41] < [N-38], [N-40] < [N-25]、WGA-カラムに対しては[N-23], [N-27] < [N-25] < [N-41] < [N-40] < [N-38] < [N-39] < [N-37] < [N-24]）については間違いのないものと考えられる。

糖鎖構造と結合定数の関係：Ogataら[62]およびKrusiusら[63]は、C-3, C-4およびC-6の水酸基が遊離のα-マンノース残基を2つ以上含む糖鎖がCon Aに対して高い結合定数を示すことを報告している。このルールをオバルブミン由来糖鎖に適用すると、ハイブリッド型の糖鎖では非還元末端にマンノース残基2個を有する[N-38]、[N-40]および[N-41]の結合定数が高く、よい一致が得られるものの、高マンノース型の糖鎖[N-24]や[N-27]がそれぞれ9.8 x 10^3 M^{-1}および1.8 x 10^3 M^{-1}と低い値しか示さない点では矛盾する。そこで、本法により得られた結合定数の序列と構造との関連を調べることにした。構造の関連した糖鎖が隣り合うように糖ペプチドを配列し、結合定数を付記したものをScheme 8 に示す。[N-24]を基準に考えると、マンノース-3残基の2位にさらにマンノースが結合することにより得られる[N-25]はこれらの中で最も高い結合定数を与えた。しかし、[N-25]のマンノース-6 残基にもう１つマンノースが結合して [N-27] になるとほとんど親和性を示さなくなった。また、ハイブリッド型の糖鎖について見ると、先の高マンノース型の場合と同様に[N-24]のマンノース-1 残基の4位およびマンノース-3 残基の２位が*N*-アセチルグルコサミンで置換されて[N-38] になると親和性が増し、結合定数は400 x 10^3 M^{-1}にまで増大した。しかし、このマンノース-3残基の4位にさらにもう



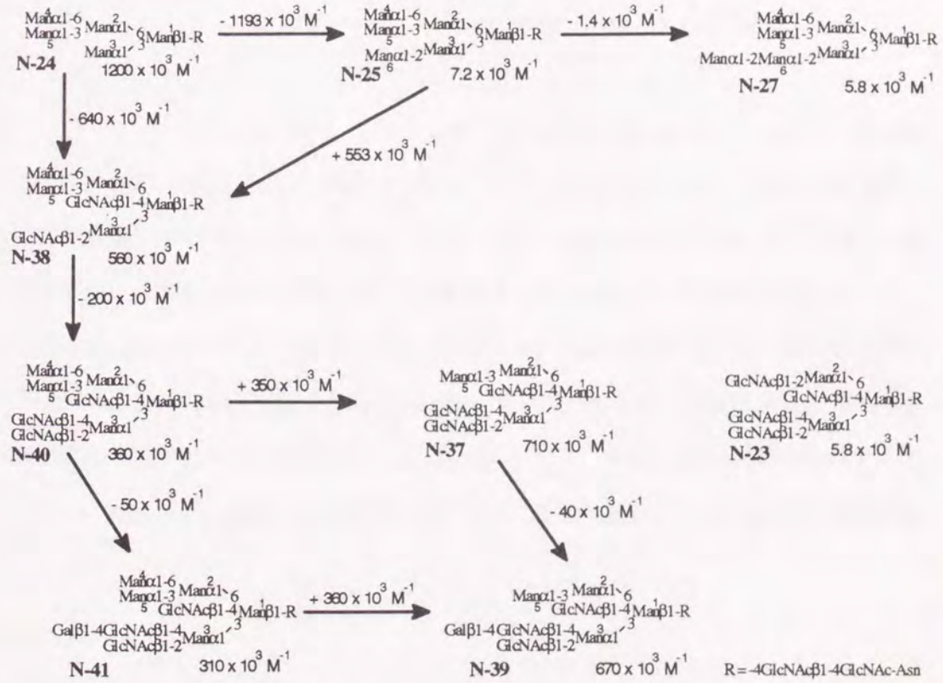
Scheme 8. Structure - affinity correlation in ovalbumin-derived glycopeptides - Con A interaction

1つの*N*-アセチルグルコサミンがついた [N-40] では結合定数の増加は見られず、[N-40] にさらにガラクトースが結合した [N-41] では逆に立体障害のためか結合定数は若干減少した。また、これら糖ペプチド [N-40] および [N-41] からそれぞれマンノース-4残基を除去すると（[N-37] および [N-39]）、極端に親和性が減少し、その親和性は非還元末端にマンノース残基を持たない [N-23] と同程度であった。以上のことからScheme 9に示した構造を有する糖鎖がCon Aに対して高い親和性を示すことが示唆された。



Scheme 9. Proposed structure showing affinity to Con A

同様にWGAについて得られた結果をScheme 10に示す。WGAはβ-*N*-アセチルグルコサミンに対して親和性を有するレクチンで、糖タンパク質糖鎖では還元末端のコア部分に相当する*N,N'*-ジアセチルキトビオースやβ-マンノース基の4位に結合した*N*-アセチルグルコサミンに対して親和性を示すと報告されている[64]。しかし、今回調べた試料の中では[N-24]が最も高い親和性(K_1 = 1,200 x 10^3 M^{-1})を示した。一方、全てのハイブリッド型糖鎖（[N-37], [N-38], [N-39], [N-40] および [N-41]）は高い結合定数を与えた。また、マンノース-3 残基の置換の効果をみると2位や4位が*N*-アセチルグルコサミンで置換される（[N-24] → [N-38] → [N-40]）と親和性が減少し、またハイブリッド型糖鎖 [N-40] や [N-41] のマンノース-4残基がなくなると親和性の増加（増分約350 x 10^3 M^{-1})がみられた。以上の結果は非還元末端の*N*-アセチルグルコサミンがWGA との



Scheme 10. Structure - affinity correlation in ovalbumin-derived glycopeptides - WGA interaction

親和性に余り関与しないことを示すものと考えられるが、これは、例えばマンノース-3残基の4位に結合した*N*-アセチルグルコサミンの4位（これはWGA と結合する上で必須の水酸基と考えられていた）が、さらにガラクトースで置換されても結合定数の減少が約50 x 10^3 M^{-1}程度であることからも支持される。WGA が*N*-アセチルグルコサミン結合型レクチンであることを考えると矛盾するように思えるが、WGA がコア部のキトビオースと強く結合し、その結合の強さが非還元末端側の糖鎖部分にも依存すると考えれば一応の解釈が可能になる。しかし、これらレクチンと糖鎖の相互作用をより明確にするには、さらに多種類の糖鎖を用いて解析する必要があると思われる。また、これらの実験では固定相担体の効果も無視できないので、別の固定相担体を使用して確認する必要もあると考えられる。そこで、次にHPLC用のセファロース系担体であるSuperoseにこれらレクチンを固定化し、さらに検討した。

第5項　セファロース系担体を用いた高速アフィニティークロマトグラフィー

硬質セファロースであるSuperoseをブロムシアンで活性化し、同様にCon AおよびWGAを固定化した充填剤を調製し、オバルブミン由来のDns-糖ペプチドの高速アフィニティークロマトグラフィーを行った。結果をFig. 35に示す。また、先のシリカゲル系の場合と同様に結合定数を算出したものをTable 19 に示した。レクチンの導入量がCon Aで16.7 pmol/column、WGAで12.2 pmol/columnとシリカゲルを担体にした場合に比べ数十～百倍程度も低いため、すべての糖ペプチドが競合糖を含まない溶離液Aで溶出されたが、得られた結合定数は、先のシリカゲル系で得た値とほぼ等しかった。

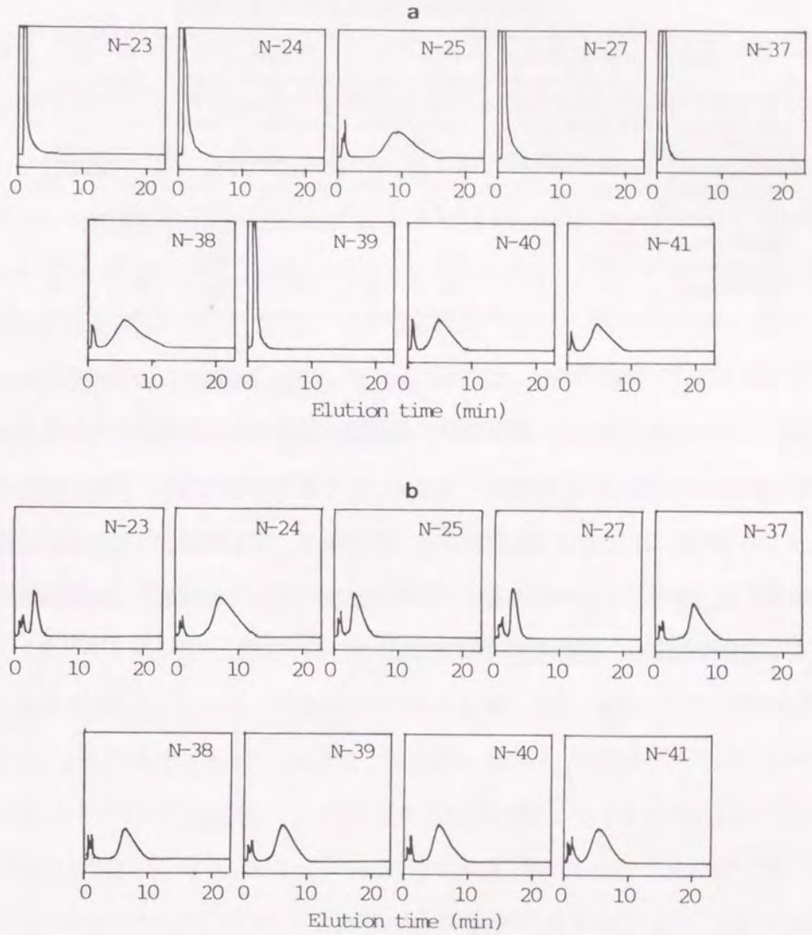


Fig. 35. Elution of Dns-glycopeptides from the Superose-based Con A column (a) and WGA column (b). Eluent: eluent A. Other conditions are the same as those described in Fig. 34.

Table 19
The Capacity Factors and Binding Constants of the Dns-Glycopeptides
Determined on Superose-Based Columns

Eluent	*Dns-glycopeptide*								
	N-23	*N-24*	*N-25*	*N-27*	*N-37*	*N-38*	*N-39*	*N-40*	*N-41*
Capacity factor, k'									
Con A column	0.07	0.07	11.4	0.07	0.07	8.7	0.7	6.5	6.5
WGA column	0.27	9.9	0.27	0.27	9.0	7.5	9.0	5.3	5.3
Binding constant (K_1, x 10^{-3} M^{-1})									
Con A column	3.9	3.9	680	3.9	3.9	400	3.9	390	390
WGA column	18	650	18	18	590	490	590	350	350

以上のようにアフィニティーを利用したこの方法は、糖鎖分析法として評価した場合、分離能は決して高くないが、糖鎖の微小な差を認識できる可能性があり、他のHPLCによる分離法の及ばない部分を補う上で意味があるように思われる。また、硬質の担体を用いているために、短時間で再現性よく分析できる。蛍光標識化により少量の試料で結合定数を算出できるという利点もある。この方法により得られたデータは従来の溶液法に比べ信頼性が高く、糖鎖構造ー親和性相関の研究に有効であると考えられる。

第３章のまとめ

本章では糖タンパク質糖鎖のHPLC分析法について述べた。第１節では、糖をPMPMPによりプレカラム標識し、オクタデシル化シリカゲルを固定相とする逆相系分配モードで分離する方法について述べた。また、第２節ではラテックス型樹脂の固定相に強アルカリ水溶液を溶離液として糖ペプチドや糖鎖由来の糖アルコールとして分離し、パルスアンペロメトリーにより検出する方法について述べた。さらに第３節では、糖と特異的に結合するレクチンを固定化したカラムを用いる高速アフィニティークロマトグラフィー法について述べた。第１の方法では、第１章第２節で述べたPMP法を改良して誘導体化したが、誘導体化条件が緩和なため、酸やアルカリに不安定なシアル酸の脱離を伴うことがない。したがってエキソグリコシダーゼと組み合わせることにより、シアル酸含有糖鎖の分析などに有効に利用できる。第二の方法では糖鎖構造の違いにより良好な分離が得られ、標識化が困難な糖アルコールも感度良く検出できるため、アルカリーボロハイドライド法で切り離された *O*- グリコシド型糖鎖の糖アルコールにも適用できることが利点である。しかし、移動相に強アルカリを使用するため、シアル酸の脱離やエピ化などの副反応が起こることがある。第３節の方法は、分離能という面では十分ではないが、レクチンの糖認識能という生化学的な親和性を利用するため、他の方法では分離が困難な試料の分離や、糖質とタンパク質の相互作用の比較などには特に適していると考えられる。これら方法はいずれも特徴のある糖鎖の分析法であり、これらを組み合わせて利用することにより、オリゴ糖類の同定・定量をはじめ、糖鎖ータンパク質相互作用を研究する上で、広範な利用が可能である。

第４章　高性能キャピラリー電気泳動による糖タンパク質糖鎖の分析

緒言

第１章第４節において既に述べたように、HPCE は分離能の優れた分析法であり、糖タンパク質構成単糖の分析において高分離能と高い再現性を示した。この章では HPCE 法を糖タンパク質糖鎖の分析に適用するための工夫を中心に述べる。HPLC による方法では、いずれも一つのシステムで分析できる糖鎖の種類に限界があり、どのシステムをとってもそれだけで数百種もある糖タンパク質糖鎖を一斉分析できるとは考えられない。HPCE は HPLC に比べて分離能の点で優れていても、やはり同じ限界があると考えられる。このような状況で糖鎖の一斉分析という目標に少しでも近づくためには、多モード分析が最善と考えられる。HPLC では、試料成分は一般に固定相と移動相の間の分配に基づいて分離されるが、概して一つの固定相は一つの分離モードのために開発されており、一種類のカラムで複数のモードに適用することはほとんど不可能である。したがって、HPLC で多モード分析を行うには移動相と固定相の両方を変える必要がある。これに反して自由溶液中で行うHPCE では、分離は試料成分の電場での挙動の違いや試料成分とキャリアー成分との相互作用の違いを利用する。したがってキャリアーの交換によって容易にモードを変換できるため、キャピラリーはいつも共通して用いることができる。本章においてはこのキャリアーの易交換性に着目し、多くの糖タンパク質糖鎖の多モード分析を目標に検討を行った結果を述べる。

HPCE による糖タンパク質構成単糖の分析では PMP 法により誘導体化したのち、ホウ酸錯体としてゾーン泳動モードで分離した。しかし、糖タンパク質糖鎖は分子サイズが広範囲にわたる上、サイズの近似した糖鎖も多数、共存する。したがって、サイズの違いによる分離と構造上の違いによる分離を組み合わせることが必要である。しかも、糖鎖試料はできる限り微量で分析できるように、たとえば蛍光検出できる誘導体に導くことが望ましい。そこで、還元的に糖鎖をピリジルアミノ (PA) 化し（Scheme 7参照）、PA部分の陽イオン性を利用して酸性キャリアー中で行う直接的ゾーン泳動モードと、水酸基の配向の違いを利用してホウ酸塩を含むキャリアー中で行う *in situ* 錯イオン化を伴うゾーン泳動モードを取り上げて検討した。

第1節　基礎条件の検討

第1項　誘導体化の検討

緒言で述べた理由から、本章では糖タンパク質糖鎖を還元的に PA 化したものを試料とした。PA 化は Hase ら[15] のグループによって開発され、その後色々な改良が加えられたが、本節においては Yamamoto ら[65] の改良法に準じて誘導体化を行った。PA 化における誘導体化の過程でシアル酸が部分的に脱離するため、ノイラミニダーゼで処理してシアル酸を除去した糖鎖について分析を行った。PA 誘導体は 320 nm に励起極大、390 nm に蛍光極大をもつ。そこで、市販の HPLC 用蛍光検出器を改造して高感度検出を試みた。この条件下では誘導体試料濃度は 10^{-3}〜10^{-4} Mで済み、キャピラリーへの導入量は100 fmol 〜 1 pmol であった。

第2項　ピリジルアミノ化 誘導体としての直接的ゾーン泳動法

PA 化オリゴ糖の電荷に注目し、酸性条件下でPA部分の電荷による分離の可能性を検討した。予備的な検討を行った結果、電気浸透流がない状態の方がより高い分離が得られたため、管壁をポリアクリルアミドで被覆したキャピラリーを使用した。まず最初に重合度の異なるイソマルトオリゴ糖の混合物を用いて、リン酸緩衝液の濃度とpHについて種々検討した。一般に緩衝液濃度が高いほどピークが鋭くなる傾向が見られ、また、pHが低いほど各オリゴ糖間の分離度が増大した。

100 mMリン酸緩衝液(pH 2.5)をキャリアーとし、イソマルトオリゴ糖の PA 誘導体の混合物を分離した例をFig. 36に示す。酸性条件下では発蛍光団が正電荷を帯びる上、使用したキャピラリー内壁がポリアクリルアミドで化学的に修飾されて電気浸透流が抑制されているため、オリゴ糖は電気泳動のみによって分離・移動したと考えられる。これら

オリゴ糖は重合度の順に現われ、少なくとも重合度20までをベースラインで分離することができた。 Fig. 37a に本モードにおけるオバルブミン糖鎖の PA 誘導体の混合物の分離例を示す。最初に試薬である2-アミノピリジンのピークが現われ、10〜17分に糖鎖のピークが観察された。これらのピークの移動時間を Fig. 36 に示した標準オリゴ糖の移動時間と比較することにより、各ピーク (1〜5) は 7 糖から 11 糖に相当するものと考えられた。オバルブミン由来の糖鎖とイソマルトオリゴ糖をそれぞれ PA 化し、これら各誘導体の混合物を分析した結果をFig. 37bに示す。Fig. 36 と Fig. 37b を比較すると重合度 7 から 11 糖のピークが突出し、オバルブミン由来のオリゴ糖と重なりあっていることがわかる。さらに正確なピーク帰属を行う目的で、Tsujiらの方法[52]に準じて、オバルブミン由来糖ペプチドの混合物をDowex 50W x 2 カラムを用いて分画することにより重合度のそれぞれ異なる画分を調製し、ヒドラジン分解を行ったのち、同様に PA 化して標品とした。先のオバルブミン糖鎖誘導体を、このようにして得た重合度

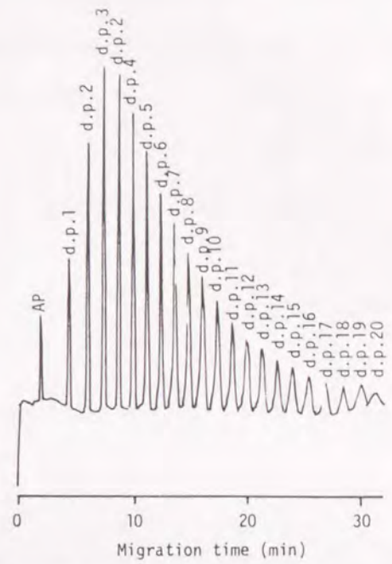


Fig. 36. Separation of reductively pyridylaminated isomaltooligosaccharides by direct zone HPCE. Capillary, fused silica coated with polyacrylamide (Bio-Rad, 25μm i.d., 20 cm); carrier, 100 mM phosphate buffer (pH 2.5); applied voltage, 8 kV; detection, UV absorption at 240 nm. AP = 2-aminopyridine (excess reagent).

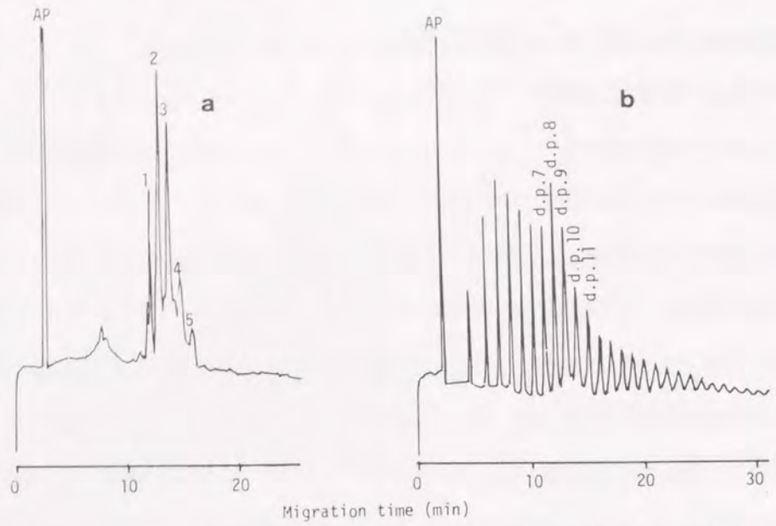


Fig. 37. Analysis of the reductively pyridylaminated oligosaccharides derived from ovalbumin (a) and a mixture of reductively pyridylaminated derivatives of ovalbumin-derived oligosaccharides and isomaltooligosaccharides (b) by direct zone electrophoresis. The analytical conditions were the same as those described in Fig. 36. 1 = heptasaccharide(s), 2 = octasaccharides, 3 = nonasaccharides, 4 = decasaccharides, 5 = undecasaccharide(s).

別標品と混合した結果から、ピーク 1, 2, 3, 4および 5 はそれぞれ11糖 [N-41], 10糖 ([N-39]および[N-40]), 9糖 ([N-27]、[N-37]および[N-38]), 8糖 ([N-25]および[N-36]) および 7糖 [N-24] であることを確認した。

直接的ゾーン泳動モードでは電荷が同等の場合、分子サイズに従った分離が得られる。オバルブミン糖鎖はヘキソース残基よりも若干分子サイズの大きい *N*-アセチルヘキソサミン残基を含むので、イソマルトオリゴ糖よりも幾分小さな移動度を与えることが予測されたが、オバルブミン糖鎖の移動度は同じ重合度をもつイソマルトオリゴ糖の移動度とほぼ一致した。

第3項　ホウ酸複合体としてのゾーン泳動

糖類の水酸基はホウ酸と反応して陰イオン性錯体を形成するため、ゾーン泳動により陽極側に引き戻される。そこで、未修飾のフューズドシリカ管を用いて、イソマルトオリゴ糖の PA 誘導体の分離にホウ酸緩衝液の濃度とpHが及ぼす影響について検討した。ホウ酸塩の濃度が高いほどピークが鋭く、移動時間が長くなる傾向が見られた。また、pHが高いほど移動時間が長く、相互の分離が向上した。これらの結果に基づいて、キャリアーには200 mMホウ酸緩衝液(pH 10.5)を使用するのが適当であると判断した。Fig. 38 にオバルブミン糖鎖の PA 誘導体をホウ酸錯体として分離した結果を示す。図中の11.7分 (t_{AP}) および24.3分 ($t_{PA\text{-}Glc}$) のピークは移動度マーカーとして添加した2-アミノピリジンと PA-グルコース のピーク、15〜19分がオリゴ糖のピークである。

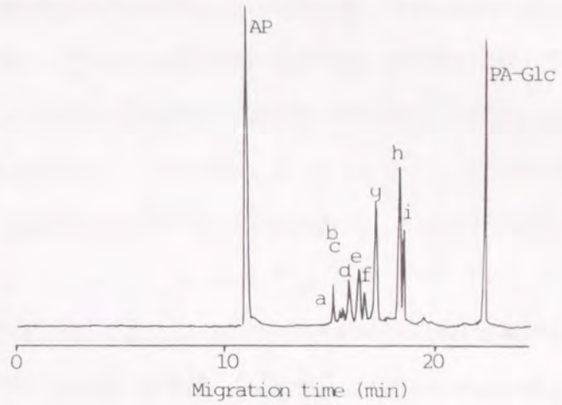


Fig. 38. Analysis of reductively pyridylaminated oligosaccharides derived from ovalbumin, by HPCE as borate complexes. Capillary, fused silica (Scientific Glass Engineering, 50 μm i.d., 95 cm); carrier, 200 mM borate buffer (pH 10.5); applied voltage, 20 kV; detection, fluorescence at 316 nm (ex)/395 nm (em). AP, 2-aminopyridine; PA-Glc, reductively pyridylaminated glucose (internal reference). Tentative assignments of the peaks a-i are shown in Table 20.

Table 20
Tentative Assignment of Peaks in HPCE as Borate Complexes

Peak in CZE as borate complex	Relative mobility (Mr)	Elution volume of the corresponding peak in ODS HPLC (min)	Assignment
a	0.37	21.6	[N-36]
b	0.40	-	-
c	0.41	-	-
d	0.43	33.2	[N-37]
e	0.48	34.0	[N-39]
f	0.50	30.2	[N-40]
g	0.54	18.2, 30.8	[N-38], [N-41]
h	0.64	9.2, 12.5	[N-25], [N-27]
i	0.65	16.4	[N-24]

正確なピークの帰属を行うために、先に述べた方法で得たそれぞれの重合度別の糖鎖のPA 誘導体混合物を、さらにTomiyaらの方法[42]に準じて逆相分配モードのHPLCにより分離、分画したものを標品とした。オバルブミン糖鎖混合物のPA 誘導体とこれら標品を同一条件で測定し、得られた移動時間 (t) を基に、式[4]に従って相対移動度(Mr)を算出し、Mr値の比較からピークの帰属を行った。

$$Mr = (t - t_{AP}) / (t_{PA\text{-}Glc} - t_{AP}) \qquad [4]$$

本実験は室温 (約20℃) で行ったが、この式によって求められたMr値の再現性は相対標準偏差(n =5)として2%以内であり、信頼性の高いピーク同定が可能であった。帰属の結果をTable 20 に示す。Fig. 38 のピーク a, d, e, f, i は単一成分であり、g と hは各々2種類の混合物であることがわかった。また、ピークb と cについては必要量の標品を入手できず、帰属できなかった。

上述の帰属から、高マンノース型糖鎖はこのモードにおいて強く引き戻されることが示唆されたが、これはマンノース残基、特に非還元末端にあるマンノース残基がホウ酸と複合体を形成しやすいことによるものと考えられる。一方、ハイブリッド型糖鎖では、非還元末端にマンノース残基を１つしかもたない糖鎖（[N-36], [N-37], [N-39]）は２つ以上もつ糖鎖（[N-27], [N-38], [N-40], [N-41]）に比べて早く移動する傾向がみられ、非還元末端にガラクトースを有する糖鎖は相当するガラクトースを含まない糖鎖よりも遅くなる傾向（[N-37] < [N-39], [N-40] < [N-41]）がみられた。

直接的ゾーン泳動モードもホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードもオバルブミン糖鎖を完全に分離することはできなかったが、それぞれのモードは互いに異なる分離機構に

基づいていることが示唆された。すなわち直接的ゾーン泳動モードでは電荷が共通しているために重合度に応じた分離が得られ、一方、ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードでは高マンノース型糖鎖のように非還元末端にマンノース残基を有する糖鎖やガラクトース残基を含む糖鎖が遅く移動し、主として還元末端の糖鎖構造に応じた分離が可能であった。非還元末端のマンノース残基の数が等しい一連の高マンノース型糖鎖は分離せず、このことはハイブリッド型糖鎖についても同様であった。しかし、これらの両モードには相補的な部分があり、両者によって得られたデータから、より正確な糖鎖同定が可能であることが示唆された。

第2節　2モード分離による糖タンパク質糖鎖のマッピング

第1節では、オバルブミン由来糖鎖の蛍光標識体をモデルに用いて、2種類の分離モードを適用すると互いに異なった分離パターンが得られることを述べた。この基礎検討の結果に基づき、さらに糖タンパク質の種類を増やして種々のタイプの糖鎖の分離を行った。また、緒言で述べた多モード分析を具体化するために、2つの分離モードにおける泳動時間を基にした二次元マッピング法の可能性を検討した。第1節では2つのモードによる分析に別々の装置を用いたが、多モード分析の利点を明確にするため1台の装置で行うことにした。

この節ではPA化糖鎖の直接的およびホウ酸錯体としてのゾーン泳動という、第1節で述べた2つのモードを適用して得た研究の結果を示し考察する。糖鎖には*N*-グリコシド型と*O*-グリコシド型があるが、現時点で糖鎖構造の解析が比較的進んでいる*N*-グリコシド型に限定し、シアル酸残基を含まない、あるいはノイラミニダーゼで処理してシアル酸を除去した*N*-グリコシド型糖鎖に対象を絞って研究を行った。

第1項　条件の検討

第1節で使用した内面被覆型キャピラリーの被覆は、酸性キャリアーには安定であってもアルカリ性キャリアーを用いれば脱離してしまう。この内面被覆は電気浸透流を抑える目的で使用したが、他の手段を用いることによって電気浸透流を抑えることは可能であると考えられる。そこで内面を加工していないフューズドシリカ管を用いて、酸性キャリアーを用いた場合の電気浸透流について調べた。その結果、pHが4以下になると電気浸透流は著しく減少し、pH 2.5ではほとんど無視できる状態になることを確かめた。さらに、中性の界面活性剤であるヒドロキシプロピルセルロースを添加した。ヒドロキシプロピルセルロースを添加しない場合、イソマルトオリゴ糖の分離は重合度にして15糖以上のピークが次第に接近して分離が悪くなったが、ヒドロキシプロピルセルロースを添加することで、各重合度のPA化イソマルトオリゴ糖をほぼ等間隔で分離することができた (Fig. 39a)。一方、第1節に比べて若干、短いキャピラリーを使用したが、アルカリ性キャリアーを用いるモードにおいては、第1節と同様に問題なく分離できた (Fig. 39b)。このように無加工のフューズドシリカキャピラリーを用いることにより、一台の装置を用いて、ただキャリアーを交換するだけで容易にこの2つのモードで分離を行うことができた。そこで、直接的ゾーン泳動モードでは100 mMリン酸緩衝液 (pH 2.5) に0.1%濃度のヒドロキシプロピルセルロースを添加したものを、またホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードでは第1節と同様に200 mMホウ酸緩衝液 (pH 10.5) をそれぞれキャリアーとして使用した。

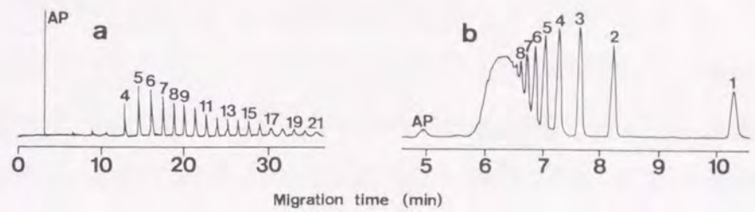


Fig. 39. Analysis of PA-isomaltooligosaccharides by plain zone electrophoresis (a) and zone electrophoresis as borate-complex mode (b). Capillary, fused silica (50 μm i.d., 60 cm); carrier, 100 mM phosphate buffer (pH 2.5) containing 0.1% hydroxypropylcellulose (a) and 200 mM borate buffer (pH 10.5) (b); applied voltage, 20 kV (a) and 12 kV (b); detection, fluorescence at 320 nm (ex)/380 nm (em) (a) and 320 nm (ex)/390 nm (em) (b).

第2項　種々の糖タンパク質糖鎖の分析

種々の型の*N*-グリコシド型糖鎖誘導体は、糖タンパク質そのもの、あるいはプロテアーゼ類により低分子化して糖ペプチドとしたものを、ヒドラジン分解、再*N*-アセチル化、PA化およびノイラミニダーゼ処理を行って調製した。得られた試料は上記モードに

よるHPCEで分析した。また、各ピークの帰属は、Tomiyaら[42]の方法に準じて順相および逆相分配モードのHPLCを組み合わせて分離したPA化オリゴ糖標品とのコエレクトロフェログラムによって行った。HPCE では、試料溶液と標品溶液を連続して少量ずつキャピラリーに導入し、キャピラリー内で自然拡散させることにより混液として分析する手法（co-electrophoresis と呼ぶ）により信頼性の高い同定が可能である。

複合型糖鎖の分析：複合型糖鎖を含む糖タンパク質として、ヒトのトランスフェリン、ウシ胎児血清フェツイン、ヒトα_1-酸性糖タンパク質およびヒト免疫グロブリンG を使用した。トランスフェリンの分析結果をFig. 40aに示す。トランスフェリンには2本鎖(85% <) と３本鎖 (15% >) の糖鎖が存在することが知られている[66]。これらのオリゴ糖よりシアル酸を除くと[N-1] (TRF-9C(Di)($M_3G_2GN_4$))および [N-2] (TRF-11C(Tri)($M_3G_3GN_5$)-b) を与える。直接的ゾーン泳動モードにおいて、これら成分はそれぞれ 20.6 分および 22.9 分にピークを与え、分離も良好であった。ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードでも同様に 7.5 分および 7.7 分にピークを与えたが、３本鎖型糖鎖は２本鎖型糖鎖に比べて、非還元末端のガラクトース残基の数が１つ多いことを考えると妥当な結果といえる。また左の図における 19.5 分のピークと右の図の 7.3 分のピークはおそらく同じ糖鎖によるものと思われるが、構造確認はできなかった。フェツインの糖鎖の分析結果をFig. 40bに示す。フェツインにはトランスフェリンと同様の糖鎖[N-1]および[N-2] が存在するが、その量比が逆転しており、さらにGalβ1→3GlcNAc構造を有する３本鎖の糖鎖[N-4] (FET-11C(Tri)($M_3G_3GN_5$)-a)も存在することが知られている[53]。これらの糖鎖の直接的ゾーン泳動モードでは [N-1] に基づく小さなピークの他に、大きなピークが22.9分にみられ、結合様式の異なる3本鎖同志を区別することはできなかった。しかし、ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードでは先のわれた２本のピークが 7.8 分に観察され、不完全ではあったがこれらの糖鎖の分離が可能であった。

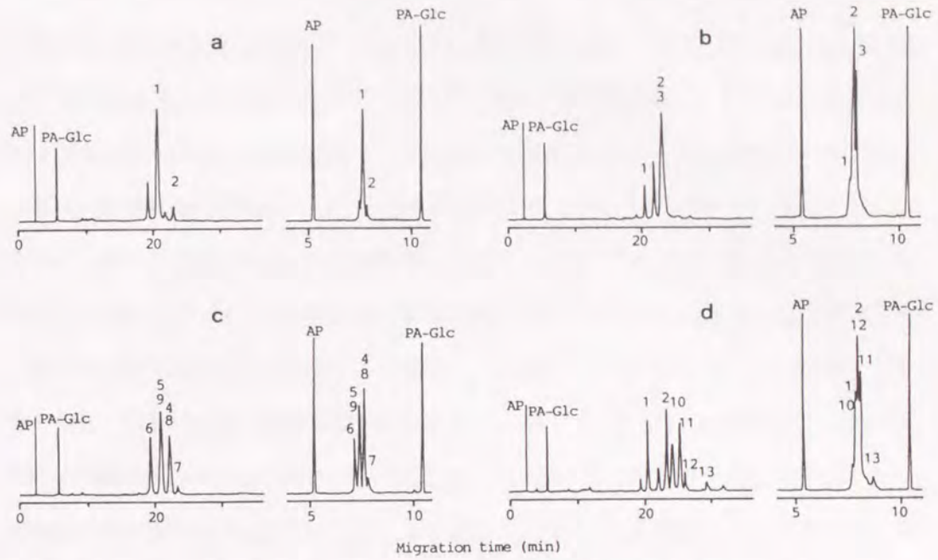


Fig. 40. Analysis of PA-derivatives of complex-type oligosaccharides from human transferrin (a), fetal calf serum fetuin (b), human immunoglobulin G (c) and human α_1-acid glycoprotein (d). The electropherograms on the left-hand and right-hand sides in each figure are those in direct electrophoresis and zone electrophoresis as borate complex mode, respectively. Peak assignment: 1 = [N-1], 2 = [N-2], 3 = [N-4], 4 = [N-7], 5 = [N-8], 6 = [N-9], 7 = [N-10], 8 = [N-11], 9 = [N-12], 10 = [N-13], 11 = [N-14], 12 = [N-15], 13 = [N-16]. Other analytical conditions are the same as those in Fig. 39.

免疫グロブリンGの分析結果をFig. 40cに示す。この糖タンパク質は一連の２本鎖型糖鎖を含むが、その中でコア部位にフコースを有する２本鎖糖鎖が大半(> 67%)を占め、さらに基部のβ-結合マンノース残基に *N*-アセチルグルコサミンを有する糖鎖や両方を持たない糖鎖が残りを占めており、マンノース残基結合 *N*-アセチルグルコサミンだけを有する糖鎖がごく少量(< 1%)含まれている[67]。直接的ゾーン泳動モードでは、重合度が9～11の大きな３本のピークと小さな1本のピークが観察された。大きなピークの内、19.4 分のピークは [N-9] (IGG-8C(Di)($M_3GN_4F_1$)) に、20.5 分は [N-8] (IGG-9C(Di)($M_3G_1GN_4F_1$)) と [N-12] (IGG-9C(Di)($M_3GN_5F_1$)) にまた、21.6 分は [N-7]

(IGG-10C(Di) ($M_3G_2GN_4F_1$)) および[N-11] (IGG-10C(Di)($M_3G_1GN_5F_1$)) に対応した。また、22.6 分（左図）および7.7 分（右図）は [N-10] (IGG-11C(Di)($M_3G_2GN_5F_1$)) であると推定した。これら糖鎖誘導体は両モードとも同等の分離を示しており、重合度にしたがった分離が得られた。ヒトα_1-酸性糖タンパク質の糖鎖は２本鎖から４本鎖までの糖鎖に加え、枝部分にフコースを有する糖鎖が存在する[68]。量的な比率は報告されていないが、HPLCで分析したHiraniらの報告[69]を参考にすると、３本鎖型 >２本鎖型 > 分岐鎖にフコースを有する３本鎖型 > ４本鎖型 > 分岐鎖にフコース有する４本鎖の順であると予想された。さらに、Yoshimaら[70]は４本鎖型糖鎖にさらにラクトサミンが結合した糖鎖の存在を報告している。Fig. 40dに得られた結果を示す。直接的ゾーン泳動モードでは、20.6 分および 22.9 分はそれぞれ [N-1] および[N-2] のピークに相当した。24.2 分にはフコース残基を有する３本鎖 [N-13] (AGP-12C(Tri)($M_3G_3GN_5F_1$))、さらに 25.3 分と 26.2 分には４本鎖 ([N-14] (AGP-13C(Tetra)($M_3G_4GN_6$)) および [N-15] (AGP-14C(Tetra)($M_3G_4GN_6F_1$))) に基づくピークが観察された。また、29.3 分の小さなピークは４本鎖型糖鎖に、さらにラクトサミンがついた構造の [N-16] (AGP-15C (Tetra)($M_3G_5GN_7$)) であると推定した。一方、ホウ酸複合体モードでは先別れした３本のピークが観察される程度で分離は余り良好とはいえないが、帰属の結果は図のようになった。

これらの複合型糖鎖の直接的ゾーン泳動では、分子量に依存した位置にピーク現われた。また、ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードでは末端残基の構造に依存した分離が得られ、ヒトα_1-酸性糖タンパク質のように複雑な混合物に対してはあまり良い分離が得られなかったが、免疫グロブリンGのように不完全な糖鎖に対しては良好な分離を与えた。また、フェツインで述べたように結合の異なる糖鎖も分離できた。

高マンノース型および関連糖鎖の分析：高マンノース型糖鎖標品の材料にはウシ由来リボヌクレアーゼB、酵母インベルターゼおよびブタのチログロブリンを使用した。チログロブリンは複合型糖鎖も有する。これら糖鎖の分析データをFig. 41に示す。リボヌクレアーゼBの糖鎖の分析結果をFig. 41aに示す。この糖タンパク質にはマンノース残基の数が5～8までの糖鎖の存在が報告されており[51]、第３章第１節で述べたように、マンノース残基を9つ含む糖鎖の存在も示唆された。これらの量比については述べられていないがHPLCの結果から [N-24] (RNB-7M(M_5GN_2)) > [N-25] (RNB-8M(M_6GN_2)) > [N-28] (RNB-10M(M_8GN_2)) > [N-26]

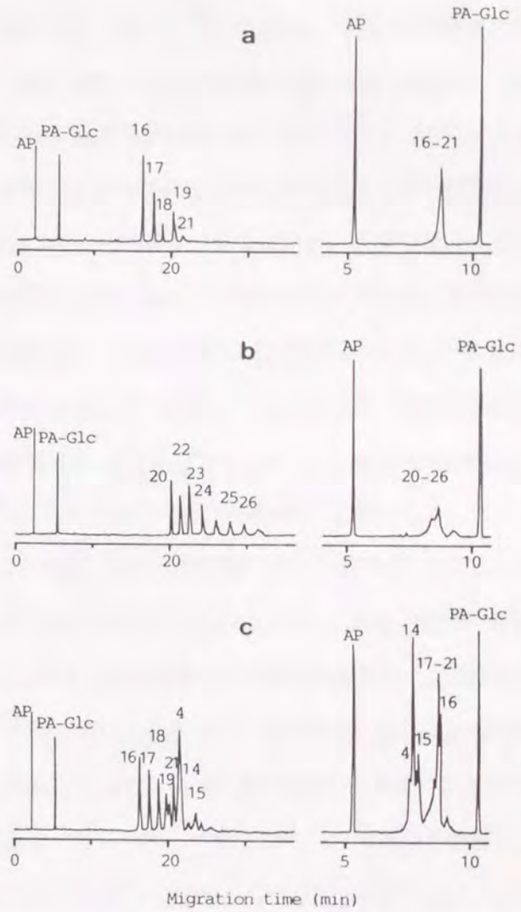


Fig. 41. Analysis of PA derivatives of high-mannose-type oligosaccharides from bovine ribonuclease B (a), yeast invertase (b) and porcine thyroglobulin (c). Analytical conditions as in Fig. 39. Peak assignment: 14 = [N-17], 15 = [N-18], 16 = [N-24], 17 = [N-25], 18 = [N-26], 19 = [N-28], 20 = [N-29], 21 = [N-30], 22 = [N-31], 23 = [N-32], 24 = [N-33], 25 = [N-34], 26 = [N-35]. Other numbers of the peaks are the same as in Fig. 40.

(RNB-9M(M_7GN_2)) > [N-30] (RNB-11M(M_9GN_2)) と推定した。直接的ゾーン泳動モードでは 16.0 分から 20.2 分にかけて、これら糖鎖誘導体が重合度の順に現れた。また、ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードにおいてはこれらの糖鎖はほとんど分離されずほぼ一本のピークを与えたが、移動速度は8〜9分と複合型糖鎖に比べて、顕著に遅かった。酵母インベルターゼ糖鎖の分析結果をFig. 41bに示す。インベルターゼには、マンノース残基が伸長した鎖長の長い糖鎖（[N-29] (INV-10M(M_8GN_2)) 〜[N-35] (INV-16M($M_{14}GN_2$))）の存在が報告されている[71]。直接的ゾーン泳動モードではこれら糖鎖が20.3 〜 29.4 分に観察され、さらにマンノース鎖が伸長したと思われるピークが2本現われた。またホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードではやはりブロードなピークを与え、分離が困難であったが、この融合したピークは先のリボヌクレアーゼ糖鎖のピークより幅が広く、しかも移動速度は若干早くなった。ブタチログロブリン糖鎖の分析結果をFig. 41cに示す。この糖タンパク質には、一連の高マンノース型糖鎖（[N-24] - [N-25] - [N-26] - [N-28] - [N-30] = 27:27:20:17:9)とコア部分にフコースが結合した２本鎖 (75%) と３本鎖(25%)の複合型糖鎖[52]が存在する。また、非還元末端にGalα1→3残基を有する糖鎖も存在する。直接的ゾーン泳動モードでは先ず一連の高マンノース型糖鎖が現われ、21 分を境に複合型糖鎖が現われた。また、ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードではこれら複合型糖鎖が7〜8分に、また、高マンノース型糖鎖が8〜9分に現われた。ホウ酸錯体によるモードでは高マンノース型と複合型糖鎖は明瞭に分離した。しかし、高マンノース型相互の分離は困難であった。

第３項 電気泳動の再現性

第３章第１節で述べたように、試料の移動時間を標準物質（イソマルトオリゴ糖）の重合度に換算して比較するという方法もあるが、より直接的な方法が望ましい。

多モード分析によって多種類の糖鎖の同定を行うには、データの再現性を向上させる必要がある。HPCE における移動時間の再現性は、キャピラリー内壁の洗浄とキャリアーの温度制御を充分に行えば、極めて高くなることが知られている。たとえば PA 化イソマルトオクタオース（重合度 8 ）の移動時間の相対標準偏差は直接的ゾーン泳動モードで 1.03%(n = 10)、ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードで1.48% (n = 10) であった。直接的ゾーン泳動では電気浸透流がほぼ完全に抑えられているため、移動時間は泳動時間と一致する。しかし、ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードでは電気浸透流の速度は電気泳動速度を上回る大きさであり（方向は逆）、電気浸透流の速度はキャピラリー内壁の状態の他にキャリアーの温度や組成により変動し易いため、この電気浸透流の影響を除外する方が、分析の信頼性を高める上で好ましいと考えられる。そこで、移動時間の代わりに移動度を用いて PA 化イソマルトオクタオースの相対標準偏差 (n = 10) を求めた。その結果、直接的ゾーン泳動モードでは 0.86% 、ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードでは 1.03% と低下した。さらにグルコース-PA を内部標準としてこれに対する移動度の相対値を求めたところ、相対標準偏差 (n = 10) は 直接的ゾーン泳動モードで 0.80% 、ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードでは 0.50% とさらに低い値を与えた。なお、それぞれのモードにおける相対移動度 $(Rm)_p$ および $(Rm)_b$ は次式で与えられる。

$$(Rm)_p = t_{PA\text{-}Glc} / t \qquad [5]$$

$$(Rm)_b = [t_{PA\text{-}Glc} \cdot (t - t_o)] / [t \cdot (t_{PA\text{-}Glc} - t_o)] \qquad [6]$$

ただし、t_o は中性マーカーの移動時間であり、この場合は2-アミノピリジンの移動時間を用いた。他の記号については既に本章第１節で述べた。各糖タンパク質糖鎖について算出した相対移動度をTable 21に示す。

Table 21
Calculated Relative Mobilities of PA Derivatives of Various Oligosaccharides Obtained from Glycoproteins

Oligosaccharides		$(Rm)_b$	$(Rm)_p$
Complex type			
N-1	TRF-9C(Di)($M_3G_2GN_4$)	0.64	0.24
N-2	TRF-11C(Tri)($M_3G_3GN_5$)-b	0.67	0.21
N-4	FET-11C(Tri)($M_3G_3GN_5$)-a	0.69	0.21
N-7	IGG-10C(Di)($M_3G_2GN_4F_1$)	0.63	0.22
N-8	IGG-9C(Di)($M_3G_1GN_4F_1$)	0.58	0.24
N-9	IGG-8C(Di)($M_3G_1N_4F_1$)	0.66	0.21
N-10	IGG-11C(Di)($M_3G_2GN_5F_1$)	0.66	0.21
N-11	IGG-10C(Di)($M_3G_1GN_5F_1$)	0.62	0.22
N-12	IGG-9C(Di)($M_3GN_5F_1$)	0.58	0.24
N-13	AGP-12C(Tri)($M_3G_3GN_5F_1$)	0.62	0.20
N-14	AGP-13C(Tetra)($M_3G_4GN_6$)	0.68	0.18
N-15	AGP-14C(Tetra)($M_3G_4GN_6F_1$)	0.66	0.18
N-16	AGP-15C(Tetra)($M_3G_5GN_7$)	0.77	0.16
N-17	TGB-11C(Di)($M_3G_3GN_4F_1$)	0.67	0.22
N-18	TGB-12C(Tri)($M_3G_3GN_5F_1$)	0.63	0.19
High-mannose type			
N-24	RNB-7M(M_5GN_2)	0.81	0.32
N-25	RNB-8M(M_6GN_2)	0.81	0.29
N-26	RNB-9M(M_7GN_2)	0.81	0.26
N-28	RNB-10M(M_8GN_2)	0.81	0.24
N-29	INV-10M(M_8GN_2)	0.80	0.24
N-30	RNB-11M(M_9GN_2)	0.81	0.22
N-31	INV-11M(M_9GN_2)	0.80	0.23
N-32	INV-12M($M_{10}GN_2$)	0.80	0.21
N-33	INV-13M($M_{11}GN_2$)	0.80	0.20
N-34	INV-15M($M_{13}GN_2$)	0.80	0.18
N-35	INV-16M($M_{14}GN_2$)	0.80	0.17
Hybrid type			
N-36	OVA-8H(M_4GN_4)	0.56	0.29
N-37	OVA-9H(M_4GN_5)	0.63	0.26
N-38	OVA-9H(M_5GN_4)	0.69	0.26
N-39	OVA-10H($M_4G_1GN_5$)	0.66	0.24
N-40	OVA-10H(M_5GN_5)	0.73	0.24
N-39	OVA-11H($M_5G_1GN_5$)	0.73	0.23

第4項　二次元マッピングの試み

Table 21に示す種々の *N*-グリコシド型糖鎖を直接ゾーン泳動モードおよびホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードで分析し、第3項で述べた相対移動度を両軸にとって作成した二次元プロットを Fig. 43 に示す。Fig. 43 には約 30 種の糖鎖がプロットされている。高マンノース型糖鎖は図の上部に分布するが、これは高マンノース型糖鎖がホウ酸錯体を形成し易く、陽極により強く引き戻されるために相対移動度が高くなるためである。複合型糖鎖およびハイブリッド型糖鎖のプロットは、それぞれ左側および中央部の囲まれた部位に分布し、明瞭に分離している。複合型糖鎖には非還元末端にマンノース残基

を含むものはないが、非還元末端のガラクトース残基の数が多いものほどプロットが上部に位置する。全体として重合度の高い糖鎖ほど、左側に位置する。また、これらの一般的な傾向とは別に、調査した約 30 種の糖鎖のプロットがほとんど重なることなく分離されたことは評価に値する。したがって、この二次元マップを用いることにより、*N*-グリコシド型糖鎖が容易に信頼性高く同定することが可能になる。

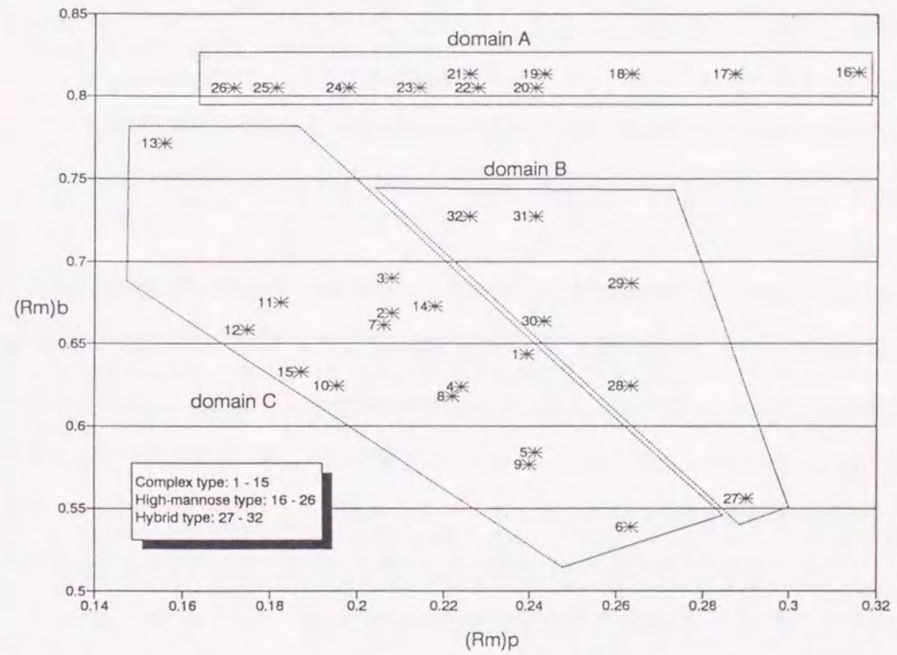


Fig. 42. Two-dimensional map of PA-oligosaccharides derived from various glycoproteins. Analytical conditions as in Fig. 39. Calculation of $(Rm)_p$ and $(Rm)_b$ values are identified in formula [5] and [6]. The numbers on plots are corresponding to the peak numbers in Fig. 40 and Fig. 41.

第４章のまとめ

本章では、糖タンパク質より得た *N*-グリコシド型糖鎖を HPCE で分析する方法について検討した。糖鎖を PA 化し、酸性のリン酸緩衝液を用いて直接的ゾーン泳動によって分離する方法は重合度による分離法として有用であり、また、アルカリ性のホウ酸緩衝液を用いてホウ酸錯体としてのゾーン泳動により分離する方法は糖鎖構造、特に非還元末端糖残基の水酸基の配向の違いによる分離に有効であった。本分析における糖鎖試料の量は微量で済み、これらの方法の有用性が示唆された。この検討結果に基づいて種々の *N*-グリコシド型糖鎖を同一の装置を用いて上記２モードで分析し、得られたデータを基に二次元マッピングを行った。座標軸に相対移動度をとることにより信頼性の高い糖鎖同定が可能であると考えられた。

HPCE ではキャリアーの交換が容易であり、キャピラリーの洗浄と温度の制御を充分に行えば種々のモードで信頼性の高い相対移動度が算出できる。今回の研究では約30 種の糖鎖の２次元マップを作成したが、さらに糖鎖の種類を増やしてマッピングを行う必要がある。その場合、必要ならば、さらに別の分離モードを導入して、多次元へと展開させることも可能である。第３のモードとしては金属錯体としてのゾーン泳動[36] やアフィニティーゾーン泳動モード[72]も有望であると考えられる。検出感度をさらに向上させるためには、レーザー励起蛍光検出も有望と思われる。

結論

I. 糖タンパク質の構成単糖を分析するための方法として以下に述べる方法を開発した。

1) GCによる分析法として、単糖類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として分析する方法を開発した。ヘキソサミンはあらかじめ亜硝酸で処理して2,5-アンヒドロ糖に導き、同様に誘導体化した。癌患者ならびに健常人の尿中複合糖質の分析に適用し、興味深い知見を得た。

2) 単糖類をPMPでプレカラム誘導体化し、逆相系HPLCで分析する方法を開発した。過剰の試薬を除去するためにクロロホルム抽出を適用して操作の簡便化を図った。種々の糖タンパク質の構成単糖分析に適用し、ほぼ満足できる結果を得た。

3) 単糖類をスルホン酸型スチレン系カラムを用いる順相系HPLCにより分離し、2-シアノアセタミドを用いてポストカラム誘導体化するシステムを開発した。シアル酸についても*N*-アセチルノイラミン酸ピルビン酸リアーゼによって*N*-アシルマンノサミンに変換し同様に分析した。本法は自動化が容易なため、単糖類のルーチン分析に適している。

4) PMPで誘導体化した単糖類の分離にHPCEを適用した。キャリアーにホウ酸緩衝液を用いることで、糖タンパク質の構成単糖類ばかりでなく、アルドヘキソース類やアルドペントース類の良好な分離が得られた。

II. 糖タンパク質糖鎖の高感度分析法として以下の方法を開発した。

1) PMPMPで誘導体化した糖鎖を逆相系HPLCで分析する方法を開発した。本誘導体化は緩和な条件下で進行するため、シアル酸含有オリゴ糖のように酸やアルカリに不安定な糖鎖にも適用が可能であった。

2)　糖鎖をラテックス型アニオン交換樹脂カラムにより分離し、パルスアンペロメトリー検出を行う方法について検討した。本法は非還元性の糖アルコールも感度よく検出できるため、アルカリ-ボロハイドライド法によって得られる*O*-グリコシド型糖鎖の分析にも適している。

3)　レクチンを固定化したカラムを用いる高速アフィニティークロマトグラフィーによって、蛍光標識した糖ペプチドの分離を試みた。レクチン-糖鎖間の結合定数を算出し、興味深い知見を得た。

4)　蛍光標識した糖鎖の分離にHPCEを適用した。２種類のキャリアーを用いて得た移動度を基に二次元マップを作成し、個々の糖鎖の同定に加え、糖鎖のタイプ別の解析にも有効であることを見出した。

謝辞

本研究について懇篤なご指導・ご鞭撻を賜りました大阪大学薬学部 大森秀信教授に心より感謝致します。また、本研究の機会を与え、終始ご指導下さいました近畿大学薬学部 本田 進教授に深謝いたします。

さらに、研究を進めるにあたり、有益なご助言を賜りました近畿大学薬学部 掛樋一晃助教授ならびに近畿大学薬学部薬品分析化学教室の諸氏に深く感謝致します。

実験の部

【第１章第１節】

試薬および標品：エタンチオール、クロロトリメチルシランは東京化成（東京都中央区日本橋）より入手した。トリフルオロ酢酸およびヘキサメチルジシラザンは和光純薬（大阪市道修町）より購入した。その他の試薬および溶媒は全て市販の特級品あるいはそれ以上の品質のものを使用した。

装置：水素炎イオン化検出器を装着した島津4BMPF型装置を使用した。カラムにはScottキャピラリーカラム(0.28 mm i.d., 50 m)の内壁にシリコン系のSF-96を塗布したものを225℃で使用した。移動相ガス(窒素)は流速を1 ml/minとし、100:1にスプリットしてカラムへと導いた。データ処理には島津製E1A型積算計を使用した。

尿試料：16人の健常人および15人の癌患者より朝食前に採取した。患者の内訳は肺癌3名、胃癌2名、結腸癌3名、子宮癌2名、乳癌3名、肝臓癌1名および膵臓癌1名である。また、健常人の年齢は、20歳代が4名、30歳代3名、40歳代2名、50歳代2名、60歳代2名、70歳代2名および80歳代1名であった。得られた各尿試料50 mlを透析チューブに入れ、流水下で24時間透析したのち、凍結乾燥して試料とした。

尿の非透析性成分の加水分解：<u>アルドースおよびウロン酸</u>　凍結乾燥した非透析性成分(約1 mg)を小アンプルに採取し、2 M トリフルオロ酢酸(200 μl)を加え、窒素置換したのちに封管し、100℃で6時間、加水分解した。反応後、アンプルを室温まで冷却して開管し、真空デシケータ中で乾固した。<u>ヘキソサミン類</u>　先の2 Mトリフルオロ酢酸に代えて4 M 塩酸を使用した。その他の条件は、アルドースおよびウロン酸と同様の操作を行った。

単糖類のジエチルジチオアセタールトリメチルシリル誘導体化：得られた残渣にエタンチオール－トリフルオロ酢酸(2:1, v/v, 20 μl)を加え、25℃で10分間放置した。次いで、ピリジン(50 μl)、ヘキサメチルジシラザン(100 μl)およびクロロトリメチルシラン(50 μl)を加え、50℃で30分間反応させた。ヘキソサミン類はそのままではGC分析が困難なため、脱アミノ化[73]した後、同様に誘導体化した。すなわち、残渣に0.1 M 亜硝酸バリウム(100 μl)および0.1 M 硫酸(75 μl)を加えて、0℃で1時間反応させることにより2,5-アンヒドロ糖へと導き、ジチオアセタール化およびトリメチルシリル化して分析した。

【第１章第２節】

試薬および標品：PMP、アセト酢酸エチルはキシダ化学（大阪市道修町）より入手した。ウシ顎下腺ムチン（タイプ II）、ウシ胎児血清フェツイン（タイプ III）、ニワトリ由来オバルブミン（タイプV）、ヒト血清トランスフェリンおよびヒトα_1-酸性糖タンパク質はSigma(St. Louis, MO)より購入した。ウシ由来チログロブリンはUiとTarutaniの方法[74]に従って新鮮な甲状腺より調製した。その他の試薬および溶媒は全て市販の特級品あるいはそれ以上の品質のものを使用した。

装置：<u>HPLC</u> ポンプには日立655A-12型、試料導入はRheodyne7125型インジェクター(試料容量: 20 μl)を用いた。検出器には島津SPD-6A型紫外部検出器 (8 μl容量セル) と医理科E-502型アンペロメトリック検出器を使用し、それぞれ245 nmおよび加電圧600 mVで測定した。データ処理は日立D-2000型装置を用いた。分析用カラムとしてCapcell Pak C_{18}カラム(4.6 mm i.d., 25 cm, 資生堂、東京都中央区銀座)を用い、移動相にはアセトニトリルとリン酸緩衝液の混合液を使用した。<u>紫外部吸収スペクトル、質量分析およびNMR測定</u>　紫外部吸収スペクトルは日立557型分光光度計を用いて測定した。FAB-MSスペクトルの測定にはJEOL HX-100 型を使用した。マトリックスにはグ

リセリンを使用し、試料を10%グリセリンに溶解したのち2 μl相当を分析した。Xeビームの初期エネルギーは6 kV、走査は*m/z* 2000 まで10秒で行った。分子量マーカーにはUltra-mark(PCR Research Chemicals, FL, USA) を使用した。^{1}H-NMRスペクトルはJEOL GSX-500型装置を使用し、6秒周期の90度パルスを照射するモードで測定した。^{13}C-NMRスペクトルは同じ装置を用い、125 MHzで測定した。

グルコース-2PMP誘導体の調製：グルコース(180 mg; 1 mmol)を0.3 M水酸化ナトリウム(10 ml)に溶解し、さらに0.5 M PMP-メタノール溶液(10 ml)を加えて70℃で2時間加温した。薄層クロマトグラフィー〔Merck, Silica gel Si60, クロロホルム－メタノール－水(40:10:1)〕において試薬(*Rf* 0.91)の他に、紫外部吸収を示すスポットが*Rf* 0.44に観察された。そこで、反応物を中和して乾固した後、10 mlの水に溶解し、過剰の試薬をクロロホルムで抽出したのち、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(1 cm i.d., 45 cm)により精製した。*Rf* 0.44の物質の収率は86%であった。λ_{max}: 245 nm (ε = 29,400) エタノール中。^{1}H-NMR (CD_3OD), δ (ppm): 2.37, 2.36 (各3H, s, -CH_3), 3.59 (1H, dd, *J* = 5.6, 10.7 Hz, glc H-6'), 3.67 (1H, ddd, *J* = 3.6, 5.9, 7.0 Hz, glc H-5), 3.75～3.69 (3H, c, glc H-3, H-4, H-6), 4.05 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, glc H-1), 4.67 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, glc H-2), 7.33 (2 x 1H, t-like, *J* = 8.0 Hz, phenyl H-4), 7.46 (2 x 2H, t-like, *J* = 8.0 Hz, phenyl H-2, H-6), 7.63 (2 x 2H, dd, *J* = 7.9 and 1.2 Hz, phenyl H-3, H-5)。^{13}C-NMR (CD_3OD), δ (ppm): 11.3, 11.1 (q, -$\underline{C}H_3$), 34.1 (d, glc C-1), 64.5 (t, glc C-6), 70.1 (d, glc C-5), 72.8 (d, glc C-2), 73.4 (d, glc C-4), 75.9 (d, glc C-3), 123.6, 123.8 (d, phenyl C-2, C-6), 128.6, 128.8 (d, phenyl C-4), 130.3, 130.4 (d, phenyl C-3, C-5), 136.6, 136.9 (s, phenyl C-1), 159.8, 160.1 (s, pyrazol C-5', C-5''), 104.8, 105.7, 148.1, 148.5 (s, pyrazol C-3', C-4', C-3'', C-4'', 未帰属)。負イオンFAB-MS: *m/z* 509 (= $[M - 1]^-$)。

糖タンパク質の加水分解：<u>アルドース</u>　糖タンパク質 (50 - 200 μg) を小ガラスアンプルにとり2 M トリフルオロ酢酸(200 μl)を加え、窒素雰囲気下、6 時間沸騰水浴上で加熱した。冷後、アンプルを開管して乾固したのち、Amberlite CG-120およびAmberlite CG-400 (各0.5 ml)の重層カラムを用いて脱塩した。　<u>アミノ糖</u>　4 M 塩酸(200 μl)を用いて、アルドースと同様の操作で加水分解した。残渣に 500 μlの飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加えて溶かし、 100 μlの無水酢酸を数回に分けて加えながら混和したのち、1夜放置することによりアミノ基を再アセチル化した。反応液はそのままアルドース分析と同様に脱塩した。

PMPプレカラム誘導体化の標準操作：糖試料混合物(10-500 pmol)を小型サンプルチューブ(1.5 ml 容量)にとり、0.5 M PMPメタノール溶液(50 μl)および0.3 M水酸化ナトリウム水溶液(50 μl)を加え70℃で30分間加熱した。反応液を室温まで冷却し、等量の0.3 M塩酸を加えて中和したのち、乾固した。残渣に水(200 μl)とクロロホルム(200 μl)を加えて過剰の試薬をクロロホルムに転溶させて除去し、水層を乾固したのち、得られた残渣を移動相に溶解してHPLCにより分析した。

【第１章第３節】

試薬および標品：2-シアノアセタミドは関東化学（東京都中央区日本橋）製のHPLC用のものを使用した。 ウシ顎下腺ムチン（タイプ I, II）、ウシ胎児血清フェツイン（タイプ III）、ウシ血清α_1-酸性糖タンパク質（Cohn分画 IV）、ニワトリ由来オバルブミン（タイプV）およびヒト血清トランスフェリンはSigmaより購入した。*Clostridium perfringens*由来のノイラミニダーゼ（タイプIV）、*Escherichiae coli N*-アセチルノイラミン酸ピルビン酸リアーゼはNacalai Tesque〔京都市中京区二条通烏丸〕より購入した。その他の試薬および溶媒は全て市販の特級品あるいはそれ以上の品質のものを使用した。

装置: 以下に用いた装置を列記する。日立 638型ポンプ、レオダイン7125型試料注入装置(20 μl)、リコー CB-50TF型循環式恒温槽（カラム温度制御用）、アトー SJ-2396型双子ピストンポンプ（試液送液用）、日立034-0736型反応恒温槽、アトー SF-1205-A型紫外部検出器(280 nm 波長固定)。カラム充填剤には昭和電工製Shodex DC-613 (H^+ 型) を用い、2 M 塩酸に懸濁し、80～90℃で数時間加温して再生したのち水で洗浄し、ステンレス製カラム(4.6 mm i.d., 25 cm)に100～150 kg/cm^2 の圧力をかけて水で充填した。充填後、カラムに水を0.3 ml/minの流速で送液したのち、次第にアセトニトリル含量を上げて、最終的に92%アセトニトリルで置換した。カラムからの溶出液にY字型混合ジョイントを介して、0.5 M ホウ酸緩衝液(pH 8.5)と1% 2-シアノアセタミド水溶液を0.5 ml/minの流速で混合し、 100℃の恒温槽内に設けたテフロン製反応コイル(0.5 mm i.d., 10 m) に導いて反応させたのち、テフロンチューブ(0.5 mm i.d., 1 m)中で冷却し、280 nmにおける紫外部吸収により検出した。

糖タンパク質の加水分解：アルドースならびにヘキソサミンの加水分解は第１章第２節に従った。 シアル酸の分析 糖タンパク質試料(各200 μg)を60 mM リン酸緩衝液、pH 7.0(800 μl)に溶解し、ノイラミニダーゼ(0.5 U)と*N*-アセチルノイラミン酸ピルビン酸リアーゼ(0.3 U) を加え、１時間37℃で反応させた。反応後、 100℃で 1分間加熱して酵素を失活させたのち、イオン交換樹脂カラムにより脱塩してHPLC用試料とした。

【第１章第４節】

試薬および標品：糖標品ならびに試薬は全て市販の特級品あるいはそれ以上の品質のものを使用した。

装置: 高電圧電源には松定プレシジョンHER-30P1型装置を使用した。キャピラリーには内径50 μmのフューズドシリカ管(Scientific Glass Engineering, Melbourne, Australia)を78 cmの長さに切り、終端から15 cmの部分のポリイミド被覆を約1 mmの幅で焼却除去し、この部分で検出を行った。検出器にはHPLC用の日本分光 UVIDEC 100-V型検出器を使用し、セルの部分を改良して50 μm x 500 μmのスリットを設け、これにキャピラリーを固定した。キャピラリー両端はキャリアーで満たした白金電極をもつテフロン製ブロックに挿入した。検出波長は245 nmとした。試料の導入は陽極側より落差法(5 cm, 5 sec)で行った。

【第３章第１節】

試薬および標品： 4-メトキシフェニルヒドラジン・塩酸塩および無水ヒドラジンはAldrich (Milwaukee, WS)より入手した。糖鎖オリゴ糖標品のうち、TF [N-3], AS-TF [N-1], AS-FET4 [N-4], AS-FET3 [N-2], 363-SA-Tri [N-5], 366-SA-Tri [N-6]）はDionex (Sunnyvale, CA)より入手した。イソマルトオリゴ糖は Yamashita ら[58]の方法に準じてデキストランを希塩酸で部分加水分解して調製した。 *N*-アセチルノイラミンラクトース、ヒト血清トランスフェリン、ウシリボヌクレアーゼBはSigmaより購入した。ウシ由来フェツインはGIBCO (Grand Island, NY)から購入した。ブタ由来チログロブリンはUiとTarutaniの方法[74]に従って新鮮な甲状腺より調製した。グリコペプチダーゼAは生化学工業(東京都中央区日本橋)より入手した。*Arthrobacter ureafaciens* 由来のノイラミニダーゼは、丸金醤油（京都府宇治市)から供与を受けた。その他の試薬および溶媒は全て市販の特級品あるいはそれ以上の品質のものを使用した。

装置: PMPMP誘導体のHPLC 以下の装置を使用した。日立655-12A型送液ポンプ、Rheodyne 7125型試料注入装置(20 μl)、島津C-R6A型クロマトパックデータ処理装置および島津SPD-6A紫外部検出器。カラムにはCapcell Pak C_{18}を使用した。移動相には30～100 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)とアセトニトリルの混合液を用いて、249 nmの紫

外部吸収を基に検出した。高マンノース型糖鎖(ウシ膵臓リボヌクレアーゼB)の陰イオン交換HPLC 試料注入装置にRheodyne7125型（ループ容量20 μl)、カラムにはDionex HPIC-AG6ガードカラム(4 mm i.d., 5 cm) とHPIC-AS6分析カラム(4 mm i.d., 25 cm)を用いた。検出は金電極を装着したトリプルパルスアンペロメーター(PAD)を以下の設定で使用した。E_1 = 0.05 V (600 ms), E_2 = 0.6 V (120 ms), E_3 = -0.8 V (420ms)。濃度勾配溶出にはDionexグラジエントポンプ(GPW) を使用した。移動相には0.1 M水酸化ナトリウムを含む0から0.5 M酢酸ナトリウムの直線濃度勾配をかけて溶出した。紫外部吸収スペクトル、質量分析およびNMR測定　第１章第２節と同様。

糖タンパク質のトリプシンおよびサーモライシン処理[75]: 糖タンパク質 (1 g) を10 mlの0.2 M トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.2) に溶解したのち、 8 M グアニジンー塩酸および0.18 M ジチオスレイトールを含む同緩衝液 (20 ml) を加え、室温で 30 min 放置し、さらに 8 M グアニジンー塩酸および 0.18 M ヨードアセトアミドを含む同緩衝液 (10 ml) を加え暗所で 30 min 放置した。反応液は透析チューブ中に損失なく移し、水で4 ℃で24 hr透析したのち、凍結乾燥した。得られた残渣は 10 mg のトリプシンおよび2 mM塩化カルシウムを含む同緩衝液 (50 ml) に溶解し、37℃で 24 hr インキュベートした。サーモライシン処理も同様に行ったが、反応条件を 70℃, 4 hr とした。反応液は凍結乾燥したのち、Sephadex G-25 および G-50 カラムクロマトグラフィーによりフェノールー硫酸陽性画分を集めた。

グリコペプチダーゼAを用いた糖ペプチドの消化：シアル酸を含む糖ペプチドからのオリゴ糖の調製は Takahashi ら[76]の方法に準じてグリコペプチダーゼAを用いて行った。糖ペプチド試料 (約100 μg) を 20 μl の 0.1 Mクエン酸ーリン酸緩衝液 (pH 5.5)に溶解し、酵素液(0.1 mU, 5 μl)を加えて、一夜37℃で放置した。反応液を沸騰水浴上で5分間加熱し、反応を停止させたのち、さらに一晩、37℃で放置してグリコサミンを遊離型へと変換したのち、濃縮乾固した。

糖ペプチドのヒドラジン分解[77]：糖ペプチド(10 mg)あたり無水ヒドラジン(2 ml)を加え、100℃で12時間処理して糖鎖を遊離させた。反応液を硫酸を入れた真空デシケータ中で乾固し、残渣に少量のトルエンを加えて乾固する操作を繰り返して、ヒドラジンを完全に除去した。得られた残渣に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液(1 ml)を加え、無水酢酸(100 μl)を数回に分けて加えながら撹拌したのち、さらに3時間放置した。次いで反応混合物をAmberlite CG-120(H^+型; 3 ml)のカラムに通し、分析用試料とした。

PMPMP の調製：PMPMP は Koike[50]の方法を改良して合成した。すなわち、4-メトキシフェニルヒドラジン塩酸塩 (5.6 g, 32 mmol) のエタノール溶液(40 ml)に、酢酸ナトリウム・3水和物 (5.45 g, 40 mmol) とアセト酢酸エチル (4.16 g, 32 mmol) を加えて2時間環流した。冷後、溶媒を減圧下留去し、得られた粗成績体をシリカゲル(150 g, Merck Silica gel 60)クロマトグラフィー[ベンゼンー酢酸エチル(4:1)]後、メタノールから再結晶して無色の針状結晶(収率：36%)を得た。λ_{max}:249 nm (ε=18,500)メタノール中。^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 2.16 (3H, s, -CH_3), 3.40 (2H, s, pyrazolone -CH_2-), 3.79 (3H, s, -OCH_3), 6.90 (2H, m, phenyl H-3, H-5), 7.72 (2H, m, phenyl H-2 H-6)。 ^{13}C-NMR($CDCl_3$) δ (ppm): 16.8 (q, -CH_3), 42.9 (t, pyrazolone C-4), 55.4 (q, -OCH_3), 113.9, 123.3 (各d, phenyl C-2, C-6 and C-3, C-5), 131.3, 157.7, 157.9 (各s, phenyl C-1, C-4 and pyrazolone C-3, 未帰属), 170.3 (s, pyrazolone C-5)。

D-グルコースのPMPMP誘導体の調製： グルコース(90 mg, 0.5 mole)を0.3 M水酸化ナトリウム溶液(5 ml)に溶かし、この溶液に0.5 M PMPMPメタノール溶液を加え、70℃で20分間反応させた。反応混合物のTLC(Silica gel 60 F_{254}、展開溶媒：クロロホルムーメタノールー水＝40:10:1)においては試薬 (*Rf* 0.92) のスポットのほかに、生成

物由来の単一スポット (*Rf* 0.58) を与えた。反応液に0.3 M 塩酸(5 ml)を加えて中和し、水飽和酢酸エチルで反応物中の過剰の試薬を取り除いたのち、水層を乾固した。残渣はメタノール－水系より再結晶したところ、微粉末結晶(収率93.0%、265 mg)を得た。化合物の物性は次の通り。λ_{max} = 249 nm (ε=36,300) メタノール中。 ^{1}H-NMR (CD_3OD), δ (ppm): 2.29 (2 x 3H, 各s, -CH_3), 3.55～3.76 (5H, c, glc H-3, H-4, H-5, H-6, H-6'), 3.80 (2 x 3H, 各s, -OCH_3), 4.00 (1H, d, *J* = 9.4 Hz, glc H-1), 4.66 (1H, dd, *J* = 9.4 and 1.1 Hz, glc H-2), 6.98 (2 x 2H, 各dd, *J* = 9.1 and 4.6 Hz, phenyl H-2, H-6), 7.48 (2 x 2H, 各dd, *J* = 9.1および7.3 Hz, phenyl H-3, H-5)。

オリゴ糖のPMPMP誘導体化：グリコペプチダーゼ消化やヒドラジン分解により得られたオリゴ糖は、以下の方法にしたがって誘導体化した。なお、試料は酵素の除去や脱塩操作をせずにそのまま使用した。糖試料 (0.5 - 5 nmol) をスクリューキャップ付きポリプロピレンチューブ(1.5 ml容量)中で凍結乾燥した。これに0.3 M水酸化ナトリウム(20 μl)と0.5 M PMPMPメタノール溶液(20 μl)を加えて溶かし、溶液を70℃で20分間加温した。次いで反応液に0.3 M塩酸(20 μl)を加えて中和し、水飽和酢酸エチルと水各200 μlを加えてよく混合したのち、有機層を注射器で注意深く取り除くことによって過剰の試薬を除去した。水層は乾固した後、15%アセトニトリル－水に溶解し、その一部をHPLC で分析した。反応に必要な試料量はその状態によって異なるが、糖鎖の種類が少ない場合は 300 pmol 程度で十分分析が可能であった。

NeuAc-LacのPMPMP誘導体の安定性：NeuAc-Lac-2PMPMP(10 nmol)を100 mMのクエン酸－リン酸緩衝液(pH 4.0)、100 mMリン酸緩衝液(pH 6.0)、トリス－塩酸緩衝液(pH 8.0)、各50 μlに溶解し、それぞれの溶液を37℃でインキュベートして経時的にHPLC で回収率を求めた。

チログロブリン糖ペプチドの陰イオン交換カラムクロマトグラフィー: チログロブリンはPronase Pで処理した後、Sephadex G-25カラム(1 cm i.d., 30 cm) にかけ、水で溶出し、11～15 ml に相当する画分を集めて乾固した。残渣は少量の水に溶解し、DEAE-Sephadex A-25 (18 mm i.d., 8 cm)を用いてFukudaとEgami の方法[78]に準じて、1 mMピリジン－2 mM酢酸から50 mM ピリジン－100 mM酢酸（各100 ml) の直線濃度勾配により中性、シアル酸を１残基および２残基含む糖ペプチドに分画した。各分画は濃縮後、Sephadex G-25 カラムにかけて脱塩した。

【第３章第２節】

試薬および標品： 無水ヒドラジンはAldrich より入手した。ウシ顎下腺ムチンはTettamantiとPigmanの方法[79]に従って調製した。ブタ由来チログロブリンはUiとTarutaniの方法[74]に従って新鮮な甲状腺より調製した。赤血球ゴーストはブタ血液よりDodge ら[80]の方法に準じて調製した。タチナタマメ由来のα-マンノシダーゼ、α-ガラクトシダーゼおよびβ-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼは生化学工業より入手した。*Streptomyces griseus* 由来のPronase PはBehringer (Manheim, FRG)より入手した。その他の試薬および溶媒は全て市販の特級品あるいはそれ以上の品質のものを使用した。

装置: HPLC 第３章第１節の陰イオン交換HPLC分析に準じた。分析には糖として0.5～2.5 μg相当を使用し、カラム溶出液を全量検出器に導入した。一方、ピーク成分分離用のセミ分取HPLCには試料5～25 μgを使用し、カラムからの溶出液を1:9 に分割し、1/10をPAD でモニターし、残りを採取した。各ピークごとに分画し、得られたピーク画分溶液を1 M 塩酸を用いて中和し、Sephadex G-25 カラムを用いて脱塩した。FAB-MSスペクトルおよびNMR測定 第１章第２節と同様。ただし、NMR測定には内部標準

にアセトンを使用し、アセトンのプロトンのシグナルをδ2.225 ppm とした。水のシグナルはHMG法により除去した。

チログロブリン糖ペプチドのヒドラジン分解および陰イオン交換カラムクロマトグラフィー: 第３章第１節と同様。

アルカリーボロハイドライド法による*O*-グリコシド型糖鎖の調製：IyerとCarlson[39]の方法に準じて、0.05 M 水酸化ナトリウム－1 M水素化ホウ素ナトリウム中で24時間、45℃で処理して糖鎖を得た。

【第３章第３節】

試薬および標品：LiChrosorb Diol（粒径5 μm）は関東化学より入手した。Develosil C_{18}（粒径 7 μm）は野村化学（愛知県瀬戸市）から購入した。*p*-ニトロフェニル-α-ガラクトシド、α-グルコシドおよびα－マンノシドおよびメチル-α-マンノシドはNacalai Tesqueより入手した。キトビオースはキチンからRupley[81]の方法を適用して調製し、さらにBioGel P-4 カラムを用いて精製した。オバルブミンは新鮮なニワトリ卵白よりKekwickとCannanの方法[82]に従って調製し、結晶化を繰り返して精製した。コンカナバリンA[83]および小麦胚芽レクチン[84]は文献に従って調製した。原料のタチナタマメと小麦胚芽はSigma より購入した。*Streptomyces griseus* 由来のPronase PはBehringerより入手した。その他の試薬および溶媒は全て市販の特級品あるいはそれ以上の品質のものを使用した。

装置: ポンプには日立655 型を使用した。試料注入装置にはRheodyne7125型インジェクターを用い、前端分析には5 mlループを、その他は20 μlループを装着して用いた。Dns化ペプチドの検出には日立650-10LC型蛍光検出器（セル容量90 μl）、*p*-ニトロ

フェニルグリコシド類の検出にはアトーSF-1205-A型UVモニター（セル容量8 μl）、キトビオースの検出には昭和電工Shodex RI SE-51型示差屈折計を使用した。

オバルブミンのPronase処理：オバルブミン(100 g)に1.5 gのPronase Pを加えて、トリス-塩酸緩衝液(pH 7.2)中で37℃で48時間インキュベートした。消化物をSephadex G-25カラム(4 cm i.d., 1 m)にかけて、水で溶出し、フェノール－硫酸反応陽性の画分を集め、凍結乾燥して粗糖ペプチドを得た。

オバルブミン由来糖ペプチドのDowex 50W x 2カラムクロマトグラフィー： Dowex 50W x 2を充填したカラム(2.6 cm i.d., 150 cm)を用いて、1 mM 酢酸ナトリウム(pH 6.5)で溶出することにより、５つの画分 [分画Ⅰ(1400～1580 ml、21 mg)、分画Ⅱ(1620～1800 ml、50 mg)、分画Ⅲ(1880～2200 ml、221 mg)、分画Ⅳ(2300～2700 ml、80 mg)、分画Ⅴ(2820～3220 ml、60 mg)] を得た。

オバルブミンのDns化糖ペプチドの調製：各糖ペプチド画分の一部をTapuhiら[85]の方法に準じてDns化した。反応物はSephadex G-25 (1 cm i.d., 30 cm) にかけ、25% メタノール水溶液（流速 0.5 ml/min) を使用して精製した。19分附近に現われるDns化糖ペプチド混合物を回収し、さらにDevelosil C_{18} カラム(4 mm i.d., 25 cm)を用いて逆相分配モードで分離した[86]。各ピークの帰属は文献との比較から行った。各Dns化糖ペプチドはSephadex G-25カラムを用いて脱塩し、乾固して保存した。

レクチンカラムの調製：<u>シリカゲルへの固定</u> レクチン固定化シリカゲルはジオール型シリカを 5% 過ヨウ素酸ナトリウム水溶液中で酸化してアルデヒド型シリカとし、レクチンのアミノ基との還元的アミノ化反応により固定した[87]。調製したレクチン固定化シリカゲルは0.2 M 塩化ナトリウムを含む50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)に懸濁して保存した。高速液体アフィニティークロマトグラフィーは調製したシリカゲルを上記リン酸緩衝液を加圧溶媒に用いて、ステンレスカラム（4.6 mm i.d., 5 cm)に流速3 ml/minで充

填した。カラムの空隙容量は水の溶出容積から算出した。Con A-カラムでは0.64 ml、WGA-カラムでは0.80 mlであった。カラム内の活性レクチンの量は前端分析[59]における$[S]^{-1}.(V - Vo)^{-1}$と$[S]^{-1}$（ただし、[S]は親和性を示す糖の濃度で、Con A-カラムでは、メチル-α-マンノシド、WGA-カラムにはキトビオースを使用した。Vはその溶出容量。）のグラフから算出した。その結果、Con A-カラムでは689 nmol、WGA-カラムでは620 nmolとなった。またメチル-α-マンノシドーCon A の結合定数は 7.2×10^3 M^{-1}、キトビオースーWGA の結合定数は33×10^3 M^{-1} となった。これらの値はダンシル化糖ペプチドの結合定数の算出におけるK_2値として用いた。 Superoseへのレクチンの固定化 ブロムシアンによる活性化を経て行った。すなわち、50 mM 濃度の競合糖を含む 0.2 M 炭酸ナトリウム(pH 7.8)にレクチン(15 mg)を溶解させ、ブロムシアンで活性化したのち上記の緩衝液で予め洗浄しておいたSuperose (1.5 g)を加え、4℃でゆるやかに24時間攪拌した。ゲルに残存する活性基は1 M エタノールアミンー塩酸を含む同緩衝液中で同様に24時間反応させることによりブロックした。

【第４章第１節】

試薬および標品： 無水ヒドラジンはAldrich より入手した。2-アミノピリジンはNacalai Tesqueより購入したものをヘキサンから3回再結晶して使用した。イソマルトオリゴ糖は Yamashita ら[58]の方法に準じてデキストランを希塩酸で部分加水分解して調製した。オバルブミンは新鮮なニワトリ卵白よりKekwickとCannanの方法[82]に従って調製し、結晶化を繰り返して精製した。*Streptomyces griseus* 由来のPronase Pは Behringerより入手した。その他の試薬および溶媒は全て市販の特級品あるいはそれ以上の品質のものを使用した。

装置： HPLC 以下の装置を使用した。Dionex グラジエントポンプ、Rheodyne社製7125型インジェクター（ループ容量100 μl）、日立650-10LC型蛍光検出器（セル容量90 μl）。逆相系分配クロマトグラフィーにはCosmosil $5C_{18}$-ARの分析用カラム(6 mm i.d., 15 cm) にガードカラム (4.6 mm i.d., 5 cm)をつけて使用した。移動相には100 mM 酢酸ートリエチルアミン(pH 4.0)を使用し、0.1 % から 0.4% n-ブタノール(120 min)の濃度勾配溶出を行った。検出波長は励起波長320 nm,蛍光波長 400 nmとした。HPCE 直接的ゾーン泳動モードによるHPCE には、Bio-Rad（東京都中央区） HPE 100 型装置を使用した。キャピラリーは Bio-Rad 製ポリアクリルアミド被覆型キャピラリー(25 μm i.d., 20 cm) を使用し、240 nmにおける吸光度を基に検出した。試料溶液(1 μl)をマイクロシリンジを用いて試料槽に注入し、8 kVの電圧を 30秒間かけて電気的にキャピラリーに導入した。ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードによるHPCEは手製の装置を用いて行った。キャピラリーにフューズドシリカ管(50 μm i.d., 95 cm, 有効長 65 cm)を使用した。検出器には日立650-10LC蛍光検出器を改造して使用した。すなわち、セルホルダ部分をアクリル製ブロックに変え、これにキャピラリーを固定した。また、光源とセルの間に石英製凸レンズを設け、励起光をキャピラリーに集光した。試料は、落差法(10 cm, 10秒)により導入した。

糖ペプチドのヒドラジン分解[77]： 第３章第１節と同様。

オバルブミンのPronase処理ならびにDowex 50W x 2カラムクロマトグラフィー：第３章第３節と同様。

2-アミノピリジンを用いたオリゴ糖の蛍光標識：誘導体化はYamamotoらの方法[65] に準じて行った。すなわち遊離した糖鎖1 μgに水 (10 μl) を加えて溶かし、試薬溶液（2-アミノピリジン(184 mg)、シアノ水素化ホウ素ナトリウム(35 mg)、酢酸(80 μl)、メタノール(350 μl)の混合物）を加え、80℃で15時間加熱した。反応後、試料をSephadex

G15カラム(10 mm i.d., 50 cm)で分画して過剰の試薬を除去したのち、さらに、CM-52(H^+型, 2 ml)のカラムに吸着させ、50 mM酢酸アンモニウムで溶出して精製した。

【第４章第２節】

試薬および標品：LiChrosorb NH_2（粒径7 μm)は関東化学より入手した。無水ヒドラジンおよびボラン－ジメチルアミン複合体はAldrich より入手した。2-アミノピリジンは Nacalai Tesqueより購入したものをヘキサンから3回再結晶して使用した。イソマルトオリゴ糖は Yamashita ら[58]の方法に準じてデキストランを希塩酸で部分加水分解して調製した。ヒト血清トランスフェリン、ヒトα_1-酸性糖タンパク質、ヒト免疫グロブリンG、ウシリボヌクレアーゼBはSigmaより購入した。ウシ由来フェツインはGIBCOから購入した。ウシ腎臓フコシダーゼおよび酵母インベルターゼ（フラクトシダーゼ）はBehringer より入手した。インベルターゼはさらに文献[88] にしたがって精製した。ブタ由来チログロブリンはUiとTarutaniの方法[74]に従って新鮮な甲状腺より調製した。タチナタマメ由来のα-マンノシダーゼ、α-ガラクトシダーゼおよびβ-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼは生化学工業より入手した。*Arthrobacter ureafaciens* 由来のノイラミニダーゼは、丸金醤油から供与を受けた。その他の試薬および溶媒は全て市販の特級品あるいはそれ以上の品質のものを使用した。

装置:HPLC 以下の装置を使用した。Dionex グラジエントポンプ、Rheodyne社製7125型インジェクター（ループ容量100 μl）、日立650-10LC型蛍光検出器（セル容量90 μl）。逆相系分配クロマトグラフィーは第４章第１節と同様。順相分配クロマトグラフィーではLiChrocart NH_2 (4 mm i.d., 25 cm)にLiChrosorb-NH_2 を充填したガードカラム (4 mm i.d., 1 cm) を接続して使用した。移動相には200 mM 酢酸－トリエチルアミン(pH 7.3)とアセトニトリルを使用し、体積比35:65 から 65:35 まで 100 分の濃

度勾配溶出を行った。検出波長は励起波長 320 nm、蛍光波長 400 nm で検出した。PA化糖鎖標品の分取は、高マンノース型は順相分配モード、複合型糖鎖は逆相分配モードで行った。各ピークの帰属はTomiyaら[42]の報告を参考に行った。ただし、高マンノース型糖鎖のうち、Tomiyaらによって報告されていない糖鎖についてはLeeらの予測法[89]を適用した。免疫グロブリンGの糖鎖、α_1-酸性糖タンパク質のフコースを含む糖鎖、チログロブリンの糖鎖についてはエキソグリコシダーゼによる逐次加水分解の結果から推定した。 HPCE 以下の装置を使用した。松定プレシジョンデバイセスHER32 型高電圧電源装置、日立650-10LC型蛍光検出器、Sic RE12型データプロセッサー、キャピラリーにPolymicro Technologies (Phoenix, AZ) 製ポリイミド被覆フューズドシリカ管（50 μm i.d., 60 cm、有効長30 cm)。直接的ゾーン泳動モードではキャリアーに0.1%ヒドロキシプロピルセルロースを含む100 mM リン酸緩衝液(pH 2.5)を使用した。試料の導入法として落差法と電気的導入法を比較したところ、後者の方がデータが良好であった。そこで、試料は電気的に10 kV, 5 sec で導入することにした。電気泳動は定電圧モードで20 kVを印加して行った。移動度のマーカーには2-アミノピリジンとPA化グルコース を用い、その10^{-3} M を水溶液をco-electrophoresis により試料溶液と同時に導入した。ホウ酸錯体としてのゾーン泳動モードではキャリアーには200 mM ホウ酸緩衝液(pH 10.5)を使用した。試料の導入は10 cm, 10 sec の落差法を用いた。移動度マーカーにはPA化グルコースを用い10^{-3} M 水溶液をco-electrophoresis により同時に泳動させた。印加電圧は12 kVとした。各ピークの帰属はPA化糖鎖標品とのco-electrophoresis により行った。

糖タンパク質糖鎖の同定・確認のための酵素処理：糖鎖 (約 10 μg) を次に示す酵素および緩衝液を用いて24時間、37℃でインキュベートした。タチナタマメ由来β-ガラクトシダーゼは5 mUを使用し、20 μlの0.1 M クエン酸－リン酸緩衝液(pH 4.1)中で、ウシ腎

臓α-フコシダーゼは20 mUを使用し、20 μlの0.1 M クエン酸ーリン酸緩衝液(pH 5.0)中で、タチナタマメ由来β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼは20 mUを使用し、0.1 M クエン酸ーリン酸緩衝液(pH 5.0)中でそれぞれ反応をかけた。*Arthrobacter ureafaciens* ノイラミニダーゼは10 mUを使用し、30 μlの40 mM クエン酸ーリン酸緩衝液(pH 5.0)中で37℃、5時間反応させた。コーヒー豆由来α-ガラクトシダーゼは10 mUを使用し、50 μlの 0.15 M 酢酸ナトリウム(pH 5.0)中で24時間反応させた。

糖ペプチドのヒドラジン分解[77]： 第３章第１節と同様。

2-アミノピリジンを用いたオリゴ糖の蛍光標識： Kondo らの改良法[90]に準じてPA化し、Sephadex G-15カラムを用いて精製して HPCE用試料とした。

引用文献

1. H. G. Schwick, H. Heide and H. Haupt, *"The Glycoconjugates"*; Academic Press : New York, 1977; Vol. 1, pp262-321.
2. eg. *"Carbohydrate Recognition in Cellular Function"*, (Ed. G. Bock and S. Harnett) ; John Wiley and Sons : Chichester, 1989.
3. G. Ashwell and A. G. Morell, *Adv. Enzymol.*, **41**, 99-128 (1974).
4. C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita and W. W. Wells, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 2497-2507 (1963).
5. J. S. Sawardeker, J. H. Sloneker and A. Jeans, *Anal. Chem.*, **37**, 1602-1604 (1965).
6. S. Honda, M. Kii, K. Kakehi, H. Yuki and K. Takiura, *Anal. Chim. Acta*, **74**, 67-63 (1975).
7. S. Honda, N. Yamauchi and K. Kakehi, *J. Chromatogr.*, **169**, 287-293 (1979).
8. S. Lambana, *Gann*, **67**, 379-388 (1976).
9. P. Gold and S. O. Freeman, *J. Exp. Med.*, **122**, 467-481 (1965).
10. C. A. White, J. F. Kennedy and B. T. Golding, *Carbohydr. Res.*, **76**, 1-10 (1979).
11. J. Golik, H. W. Liu, M. Dinovi, J. Furukawa and K. Nakanishi, *Carbohydr. Res.*, **118**, 135-146 (1983).
12. V. K. Dua and C. A. Bush, *J. Chromatogr.*, **244**, 128-133 (1982).
13. C. A. White, S. W. Vass, J. F. Kennedy and D. G. Large, *J. Chromatogr.*, **264**, 99-109 (1982).
14. M. Takeda, M. Maeda and A. Tsuji, *J. Chromatogr.*, **253**, 124-128 (1982).
15. S. Hase, T. Ikenaka and Y. Matsushima, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 257-263 (1978).
16. W. T. Wang, N. C. LeDonne, Jr., B. Ackerman and C. C. Sweeley, *Anal.*

Biochem., **141**, 366-381 (1984).

17. R. H. Wiley and P. Wiley, *"The Chemistry of Heterocyclic Compounds - Pyrazolones, Pyrazolidones, and Derivatives"*, (Ed. A. Weissberger); Jown Wiley and Sons : New York, 1964; pp13-40.

18. S. Honda and S. Suzuki, *Anal. Biochem.*, **142**, 167-174 (1984).

19. R. G. Spiro and M. J. Spiro, *J. Biol. Chem.*, **240**, 997-1001 (1965).

20. S. Honda, M. Takahashi, K. Kakehi and S. Ganno, *Anal. Biochem.*,**113,** 130-138 (1981).

21. S. Honda, M. Takahashi, Y. Nishimura, K. Kakehi and S. Ganno, *Anal Biochem.*, **118**, 162-167 (1981).

22. S. Honda, S. Suzuki and K. Kakehi, *J. Chromatogr.*, **291**, 317-325 (1984).

23. D. F. Smith, D. A. Zopf and V. Ginsburg, *Anal. Biochem.*, **85,** 602-608 (1978).

24. M. J. Spiro, *Anal. Biochem.*, **82**, 348-352 (1977).

25. S. Honda, K. Kakimoto, K. Kakehi, K. Sudo and K. Takiura, *Anal. Chim. Acta,* **70**, 133-139 (1974).

26. K. Mopper, R. Dawson, G. Liebezeit and H. P. Hansen, *Anal. Chem.*, **52**, 2018-2022 (1974).

27. T. Kato an T. Kinoshita, *Chem. Pharm. Bull.*, **26,** 1291-1294 (1978).

28. 加藤武彦、木下俊夫, 分析化学, **31**, 615-617 (1978).

29. S. Honda, S. Iwase, S. Suzuki and K. Kakehi, *Anal. Biochem.*, **160,** 455-461 (1987).

30. H. Mikami and Y. Ishida, *Bunseki Kagaku,* **32,** E207-E210 (1983).

31. B. Kloareg, *J. Chromatogr.*, **236**, 217-223 (1983).

32. S. Honda, K. Kakehi, K. Fujikawa, Y. Oka and M. Takahashi, *Carbohydr. Res.*, **183**, 59-69 (1988).

33. W. Pigman, "The Glycoconjugates"; Academic Press: New York, 1977; Vol. 1, pp261-321.

34. K. Kakehi, K. Maeda, M. Teramae, S. Honda and T. Takai, *J. Chromatogr.*, **272**, 1-8 (1983).

35. S. Honda, S. Iwase, A. Makino and S. Fujiwara, *Anal. Biochem.*, **176**, 72-77 (1989).

36. S. Honda, K. Yamamoto, S. Suzuki, M. Ueda and K. Kakehi, *J. Chromatogr.*, **588**, 327-333 (1991).

37. S. Fujiwara and S. Honda, *Anal. Chem.*, **59**, 487-490 (1987).

38. S. Takasaki, T. Mizuochi and A. Kobata, *Methods Enzymol.*, **83,** 263-268 (1982).

39. R. N. Iyer and D. M. Carlson, *Arch. Bochem. Biophys.*, **142,** 101-105 (1971).

40. F. Maley, R. B. Trimble, A. L. Tarentino and T. H. Plummer, Jr., *Anal. Biochem.*, **180**, 195-204 (1989).

41. A. Neuberger, A. Gottschalk, R. D. Marshall and R. G. Spiro, *"Glycoproteins"*, (Ed. A. Gottschalk) ; Elsevier : Amsterdam, 1972; Part A, pp13-40.

42. N. Tomiya, J. Awaya, M. Kurono, S. Endo, Y. Arata and N. Takahashi, *Anal. Biochem.*, **171,** 73-90 (1988).

43. M. R. Hardy and R. R. Townsend, *Proc. Nastl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85,** 3289-3293 (1988).

44. R. R. Townsend, M. R. Hardy, D. A. Cummings, J. P. Carver and B. Bendiak, *Anal. Biochem.*, **182**, 1-8 (1989).

45. R. R. Townsend, M. R. Hardy and Y. C. Lee, *Methods Enzymol.*, **179,** 65-76 (1989).

46. M. R. Hardy and R. R. Townsend, *Carbohydr. Res.*, **188,** 1-7 (1989).

47. W. T. Wang and D. Zopf, *Anal. Biochem.*, **189,** 1-11 (1989).

48. L. J. Basa and M. W. Spellman, *J. Chromatogr.*, **499,** 205-220 (1990).

49. R. R. Townsend, M. R. Hardy, O. Hindsgaul and Y. C. Lee, *Anal. Biochem.*, **174,** 459-470 (1988).

50. E. Koike, H. Iida, H. Okawa and A. Kashioka, *Kogyo-Kagaku,* **57**, 56-58 (1953).

51. C. -J. Liang, K. Yamashita and A. Kobata, *J. Biochem.* (Tokyo), **88**, 51-58 (1980).

52. T. Tsuji, K. Yamamoto, T. Irimura and T. Osawa, *Biochem. J.,* **195**, 691-699 (1981). / K. Yamamoto, T. Tsuji, T. Irimura and T. Osawa, *Biochem. J.,* **195**, 701-713 (1981).

53. R. R. Townsend, M. R. Hardy, T. C. Wong and Y. C. Lee, *Biochemistry,* **25**, 5716-5725 (1986).

54. J. F. G. Vliegenthart, L. Dorland and H. van Halbeek, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.,* **41**, 209-374 (1983).

55. L. Dorland, H. van Halbeek and J. F. G. Vliegenthart, *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **122**, 859-866 (1984).

56. T. Tsuji, and T. Osawa, *Carbohydr. Res.,* **151**, 391-402 (1986).

57. I. Kawashima, K. Fukuda, M. Tomiya and A. Hamada, *J. Biochem.* (Tokyo), **91**, 865-872 (1982).

58. K. Yamashita, T. Mizuochi and A. Kobata, *Methods Enzymol.*, **83**, 105-126 (1982).

59. K. Kasai, Y. Oda, M. Nishikata and S. Ishii, *J. Chromatogr.*, **376**, 33-47 (1986).

60. D. J. Anderson and R. R. Walters, *J. Chromatogr.*, **376**, 69-85 (1986).

61. J. U. Baenziger and D. Fiete, *J. Biol. Chem.*, **254**, 2400-2407 (1979).

62. S. Ogata, T. Muramatsu and A. Kobata, *J. Biochem.* (Tokyo), **78,** 687-696 (1975).

63. T. Krusius, J. Finne and H. Rauvala, *FEBS Lett.*, **71**, 117-120 (1976).

64. K. Yamamoto, T. Tsuji, I. Matsumoto and T. Osawa, *Biochemistry*, **20**, 5894-5899 (1981).

65. S. Yamamoto, S. Hase, S. Fukuda, O. Sano, and T. Ikenaka *J. Biochem.* (Tokyo), **105**, 547-555 (1989).

66. E. Recoeczi, P. Taylor, M. T. Debanne, L. R. Berry and M. W. C. Hatton, *Biochem. J.*, **184**, 399-407 (1979).

67. N. Takahashi, I. Ishii, H. Ishihara, M. Mori, S. Tejima, R. Jefferis, S. Endo and Y. Arata, *Biochemistry*, **26,** 1137-1144 (1987).

68. B. Fournet, J. Montreuil, G. Strecker, L. Dorland, J. Haverkamp, J. F. G. Vliegenthart, J. P. Binette and K. Schmid. *Biochemistry,* **17,** 5206-5214 (1978).

69. S. Hirani, R. J. Bernasconi and J. R. Rasmussen, *Anal. Biochem.,* **162**, 485-492 (1987).

70. H. Yoshima, A. Matsumoto, T. Mizuochi, T. Kawasaki and A. Kobata, *J. Biol. Chem.*, **256**, 8476-8484 (1981).

71. R. B. Trimble and P. H. Atkinson, *J. Biol. Chem.*, **261**, 9815-9824 (1986).

72. S. Honda, A. Taga, K. Suzuki, S. Suzuki and K. Kakehi, *J. Chromatogr.*, **597,** 377-382 (1992).

73. S. Honda, K. Kakehi and K. Okada, *J. Chromatogr.*, **176**, 367-373 (1979).

74. N. Ui and O. Tarutani, *J. Biochem.* (Tokyo), **50,** 508-518 (1961).

75. K. G. Rice, N. B. N. Rao and Y. C. Lee, *Anal. Biochem.*, **184**, 249-258 (1990).

76. N. Takahashi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1194-1201 (1977).

77. B. Bendiak and D. A. Cumming, *Carbohydr. Res.*, **151**, 89-103 (1986).

78. M. Fukuda and F. Egami, *Biochem. J.*, **123**, 407-414 (1971).

79. G. Tettamanti and W. Pigman, *Arch. Biochem. Biophys.*, **124,** 41-50 (1968).

80. J. T. Dodge, C. Mitchell and D. J. Hanahan, *Arch. Biochem. Biophys.*, **100,** 119-130 (1963).

81. J. A. Rupley, *Biochim. Biophys. Acta*, **83,** 245-255 (1964).

82. R. A. Kekwick and R. K. Cannan, *Biochem. J.*, **30,** 227-234 (1936).

83. B. B. L. Agrawal and I. J. Goldstein, *Methods Enzymol.*, **28**, 313-318

(1972).

84. V. T. Marchesi, *Methods Enzymol.*, **28**, 354-356 (1972).

85. Y. Tapuhi, D. E. Schmidt, W. Lindner and B. L. Karger, *Anal. Biochem.*, **115**, 123-129 (1981).

86. Y. Kato, H. Iwase and K. Hotta, *Anal. Biochem.*, **138**, 437-441 (1984).

87. P. -O. Larsson, *Methods Enzymol.*, **104**, 212-223 (1984).

88. R. B. Trimble and F. Maley, *J. Biol. Chem.*, **252,** 4409-4412 (1977).

89. Y. C. Lee, B. I. Lee, N. Tomiya and N. Takahashi, *Anal. Biochem.*, **188**, 259-266 (1990).

90. A. Kondo, J. Suzuki, N. Kuraya, S. Hase I. Kato and T. Ikenaka, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2169-2170 (1990).