薬学研究科・薬品分析学研究室

1. 研究課題名

「天然由来糖鎖化合物の構造解析および生体機能性分子の網羅的定量分析法の確立」

2. 研究メンバー

鈴木 茂生　近畿大学大学院薬学研究科薬品分析学研究室・教授
久保 兼信　近畿大学大学院薬学研究科薬品分析学研究室・准教授
多賀 淳　近畿大学大学院薬学研究科薬品分析学研究室・講師
山本 佐知雄　近畿大学大学院薬学研究科薬品分析学研究室・RA

3. 研究成果

糖は単独で存在することはまれであり，糖タンパク質や糖脂質の糖鎖のように複合糖質成分として存在することで，様々な生体内反応に関与する．しかし，糖鎖は複雑な酵素系によって合成されることから，糖鎖の構造と糖鎖の有する機能の関連には不明な点が多い．しかも，糖鎖含量は極めて少なく，その形態も多様であることから，網羅的解析を行うには，特異的かつ高感度で，高分離能分析法が欠かせない．当研究室では，この糖鎖の高感度網羅的解析のための高分離・特異的分析法を目的としてレクチンを用いた特異的検出ならびにエンリッチ法を検討している．

3-1. レクチンを用いる糖鎖の抽出[1]

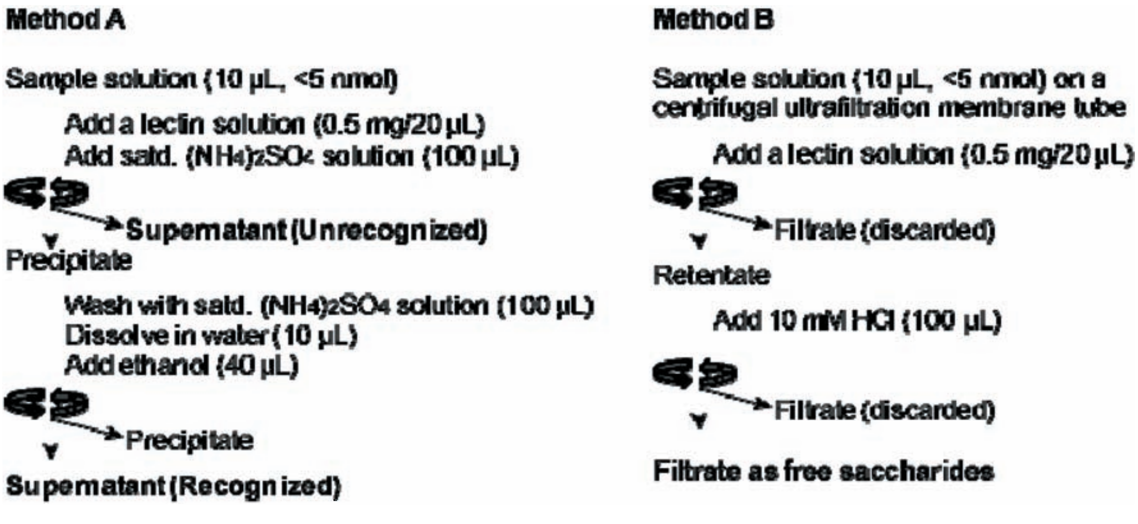


Fig. 1-1 Procedure for the fractionation of glycans using ammonium sulfate fractionation (Method A) and a centrifugal ultrafiltration membrane (Method B). TBS: 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) containing 150 mM sodium chloride, 1 mM $CaCl_2$ and 1 mM $MgCl_2$. Lectin was dissolved in TBS to a concentration of 25 mg/mL.

レクチンは糖鎖を特異的に認識するタンパク質群の総称であり，その特異性は認識する単糖の名

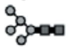
称に従って分類される. しかし, 多くのレクチンは生体由来の糖鎖に対してよりユニークで強い結合を示す. しかも糖鎖とレクチンの結合は単糖によっても阻害される. 例えば, タチナタマメ由来レクチンCon Aはα-Glcやα-Manを認識し, その結合定数 (*K*a) は 10^3程度である. しかし, 糖鎖の中でも高マンノース型糖鎖と強く結合し, その結合定数は10^6 ～10^7 に及ぶ. レクチンの高い特異性から糖鎖の分離や構造解析に利用するための研究が数多く報告されているが, いずれもアフィニティークロマトグラフィーのような固定化など, 煩雑な操作を必要とするものが多い. 本節ではレクチンを固定化することなく, 糖鎖の抽出に応用することを試みた.

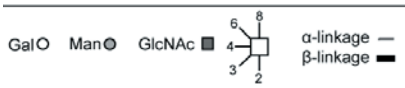
3-1-1. レクチン添加塩析法（A 法）

A 法の条件を確立するために, レクチンにCon A, モデル糖に *p*-ニトロフェニル α-マンノシドを用いて検討した。その結果, 糖試料(2 nmol)を用いたところ, 0.5 mg のレクチンを用い, 氷冷下 100 µL の飽和硫安水溶液で糖鎖を回収し, 10 µL の水に溶解後, 40 µL のエタノールを加えて除タンパク質するのが最適であった.

この方法を 2-アミノピリジン(AP)で標識化したオバルブミン由来糖鎖の分析に適用した. オバルブミンは3 種類のハイマンノース型糖鎖, 5 種類のハイブリッド型糖鎖および, 1 種類の単純な複合型糖鎖を有する. これらの糖鎖を逆相系カラムで分離すると, ほとんど分離することが可能であることが知られている. そこで, オバルブミン由来糖鎖をCon A, RCA_{120}および WGAの三種類のレクチンとの結合をA法を用いて調製し, ODSカラムで分離した. Fig. 1-2 はRCA_{120}とWGAについての結果を示す. RCA_{120} 結合画分はピーク Gとピーク Iが検出されたが, いずれもGalを含む糖鎖である.

Table 1 Oligosaccharide derived from ovalbumin and binding specificies to lectins

Peak No.	Structure	Affinity to RCA_{120}	Affinity to WGA	Affinity to Con A
A		-	-	++
B		-	-	++
C		-	-	++
D		-	+	++
E		-	+	+
F		-	+	++
G_1		+	+	++
G_2		-	+	+
H		-	+	+-
I		+	+	+-



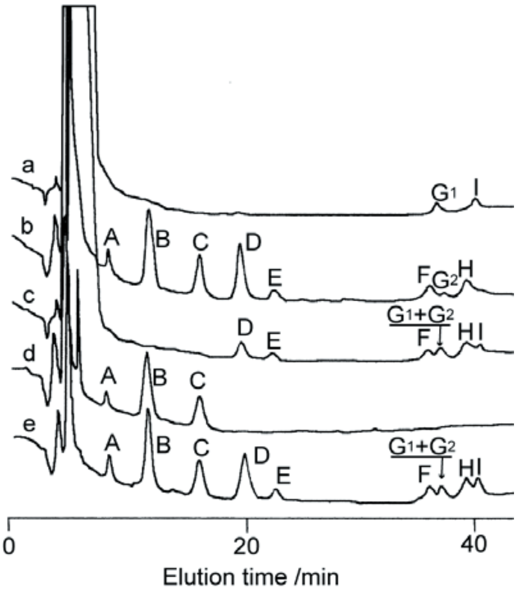


Fig. 1-2 Analysis of AP-labeled glycans from ovalbumin (e), and their fractions, as retained and unretained as RCA_{120} complex (a, b) and those as WGA complex (c, d). Analytical conditions: Cosmosil C18 (15 cm × 6 mm i.d.) column, 1.0 ml/min flow rate, 100 mM triethylamine/acetic acid (pH 4.0) with a linear gradient of n-buthanol (0.1–.425% over 100 min) used as the eluent. Peak identification is presented in Table 1.

したがって残りの糖鎖(ピーク A–F および H) はガラクトースを含まないためRCAに保持されなかった. またピークGは結合, 非結合の両分画に観察されたが, これは結合画分には糖鎖G_1 が, 一方, 非結合画分にはG_2.が存在することによるものと考えられる. 一方, WGAでは非結合画分としてピークA～Cが結合画分にはピークD～Iが観察された. これら糖鎖の内, ピークA～Cはハイマンノース型糖鎖であり, WGAによって認識されないためである. いずれにせよ, このように構造特異的に糖鎖を分画できることが判明した.

一方, Con Aを用いて糖鎖の回収を試みたところ, すべての糖鎖が回収された, そこで, Con Aの結合を阻害するメチルα-マンノシドを加えながら, 糖鎖の回収状況を調査した. Fig. 1-3 に種々のマンノシド濃度でCon A結合画分に含まれる糖鎖を分析した結果を示す. メチルα-マンノシドとCon Aの結合定数は 7200 M^{-1}と報告されており, 複合型二本鎖糖鎖の結合定数とほぼ一致する. ピークA～Cに相当するハイマンノース型糖鎖と還元末端にマンノースを二残基もつハイブリッド型糖鎖に相当するピークDとFはCon Aと強く結合するために, 25 mM以上のマンノシド濃度でもCon Aとの結合能を保持していた. 逆に非還元末端にマンノースを一残基しかもたないハイブリッド型糖鎖は顕著に結合が減少し, 結合定数が低いことがわかる. この述べたように, 本法を用いると, 糖鎖の構造特異的な分別が可能であることが判明した.

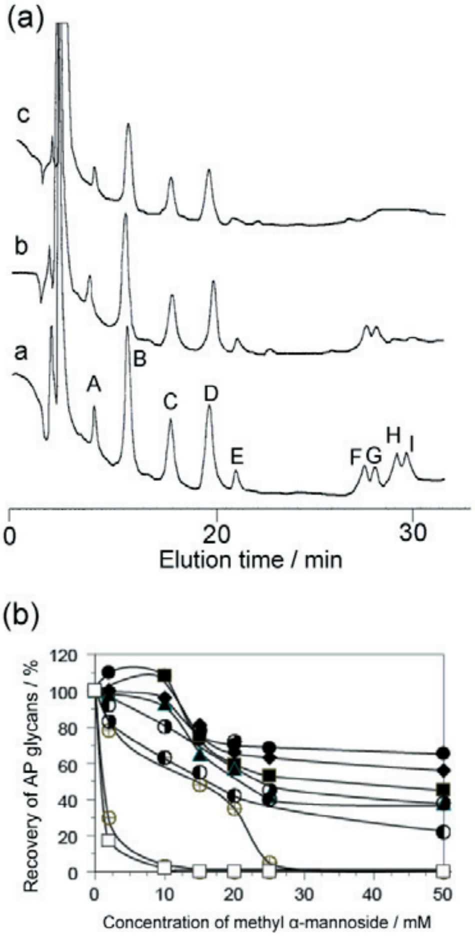


Fig. 1-3 Analysis of AP-labeled glycans from ovalbumin recovered as Con A complex in the presence of 0 mM (a), 20 mM (b), and 50 mM (c) of methyl α-mannoside (A) and effect of the recoveries of AP-labeled glycans under the presence of methyl α-mannoside (B). The peak assignment and analytical conditions are identical to those in Fig. 2.

3-1-2. レクチン添加限外ろ過法(B 法)

上記A法は非常に簡便であるが, 塩析時に多量の硫酸アンモニウムを加えるために, 残存する塩がLC-MS分析を妨害することが予想される. そこで, 塩析に代えて限外濾過膜を試用する方法について検討した. 10 kDaの限外濾過膜に, 変性剤として塩酸を用いたところ, 糖鎖の特異的回収が可能であった. そこで, 糖ペプチドの特異的な回収への応用を試みた. すなわち, 糖タンパク質をトリプシンで消化して得られた混合物にレクチンを加えて, 捕捉される糖ペプチドを限外濾過によって分離することを試みた. ヒト血清トランスフェリンにはAsn^{432}とAsn^{630}に複合型二本鎖糖鎖が結合した糖タンパク質である. 糖鎖の末端には共通してα2,6-結合シアル酸残基を有することが知られる.

No.	measured *m/z*	*z*	glycosylation site	glycan structure with identification based on *m/z*	peptide mod*1
1	1227.18	3	Asn^{432}	$[Hex]_5[HexNAc]_4[NeuAc]_2$	
2	1222.55	3		$[Hex]_5[HexNAc]_4[NeuAc]_2$	PyroCMC*2
3	1382.28	3	Asn^{630}	$[Hex]_5[HexNAc]_4[NeuAc]_2$	
4	1430.92	3		$[Hex]_5[HexNAc]_4[dHex][NeuAc]_2$	
5	1503.99	3		$[Hex]_6[HexNAc]_5[NeuAc]_2$	
6	1376.59	3		$[Hex]_5[HexNAc]_4[NeuAc]_2$	PyroQ*3
7	1430.92	3		$[Hex]_5[HexNAc]_4[dHex][NeuAc]_2$	PyroQ*3

*1, modification on the peptide moieties; *2, deamination of alkylated cysteine of N-terminus; *3, pyroglutamic acid of N-terminus of peptide

ヒト血清トランスフェリンにはAsn^{432}とAsn^{630}に複合型二本鎖糖鎖が結合した糖タンパク質である. 糖鎖の末端には共通してα2,6-結合シアル酸残基を有することが知られる. 逆相系カラムを用いたLC-MSにより分析した結果をFig. 1-4 に示す. トリプシン消化物では 35 分までの前範囲にわたり数多くのシグナルが観察sれたが, SSAレクチンで回収した糖ペプチドは 20 分から 30 分に現れた. 抽出イオンモニタリングを調べた結果, 20 分, 22 分, 25 分に糖ペプチド由来のシグナルが観察された. 封箇所にシグナルが観察されたがこれは, 糖鎖のバリエーションではなく, ペプチド鎖の修飾によることがわかった.

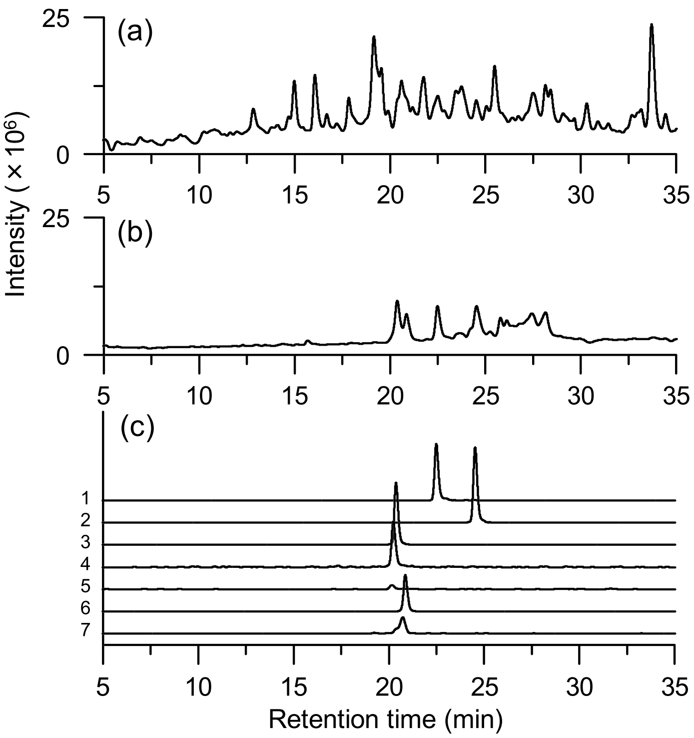


Fig. 6. Total ion current chromatograms of reversed-phase LC/ESI-MS analysis of glycopeptides derived from human transferrin digested with trypsin before (a) and after (b) specific extraction with SSA. Selected ion chromatograms (c) correspond to trivalent molecular ions of glycopeptides with specific sequences listed in the table.

3-2. 部分導入レクチンアフィニティーキャピラリー電気泳動[2]

キャピラリー電気泳動は高い分離能と感度を示す分析方法であるが, 糖タンパク質糖鎖のように極めて複雑な物質群を完全に分離することは難しい. 特に糖タンパク質糖鎖のように構造の類似した多数の成分を分離するには, 予め何らかの方法で分画しておく必要がある. レクチンは糖鎖を構造特異的に認識する性質があるので, レクチンとの結合性を加味した分離が達成できれば, 構造解析にも極めて有用と思われる.

一方, アフィニティーキャピラリー電気泳動は, 泳動液にリガンド分子を導入して行う分離法であ

り，結合解析などに広く利用されてきた．本研究では，その中でも部分導入キャピラリーアフィニティーキャピラリー電気泳動法に注目した．8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS)で標識したオリゴ糖は強い負電荷をもち，高い移動度を示す．そこで，キャピラリーを泳動用の緩衝液で満たした後，まずレクチン溶液，続いてAPTS標識化糖鎖を圧力導入し，両端に電圧する方法を検討した．もし，成分の内，そのレクチンに捕捉されるものがあれば，泳動時間の遅延あるいはピーク形状の変化が観察されることになる．

3-2-1. チログロブリン糖鎖の部分導入レクチンアフィニティーキャピラリー電気泳動[2]

ブタ由来のチログロブリンには一連のハイマンノース型糖鎖と複合型糖鎖が含まれるので，そこで，様々なレクチンを用いたアフィニティーキャピラリー電気泳動法を適用し，本方法の評価を行った．結果をFig. 2-1(b)に示す．また本糖タンパク質に含まれる糖鎖の構造をFig. 2-1(a)に示す．レクチンにα2,3-結合NeuAcを認識す

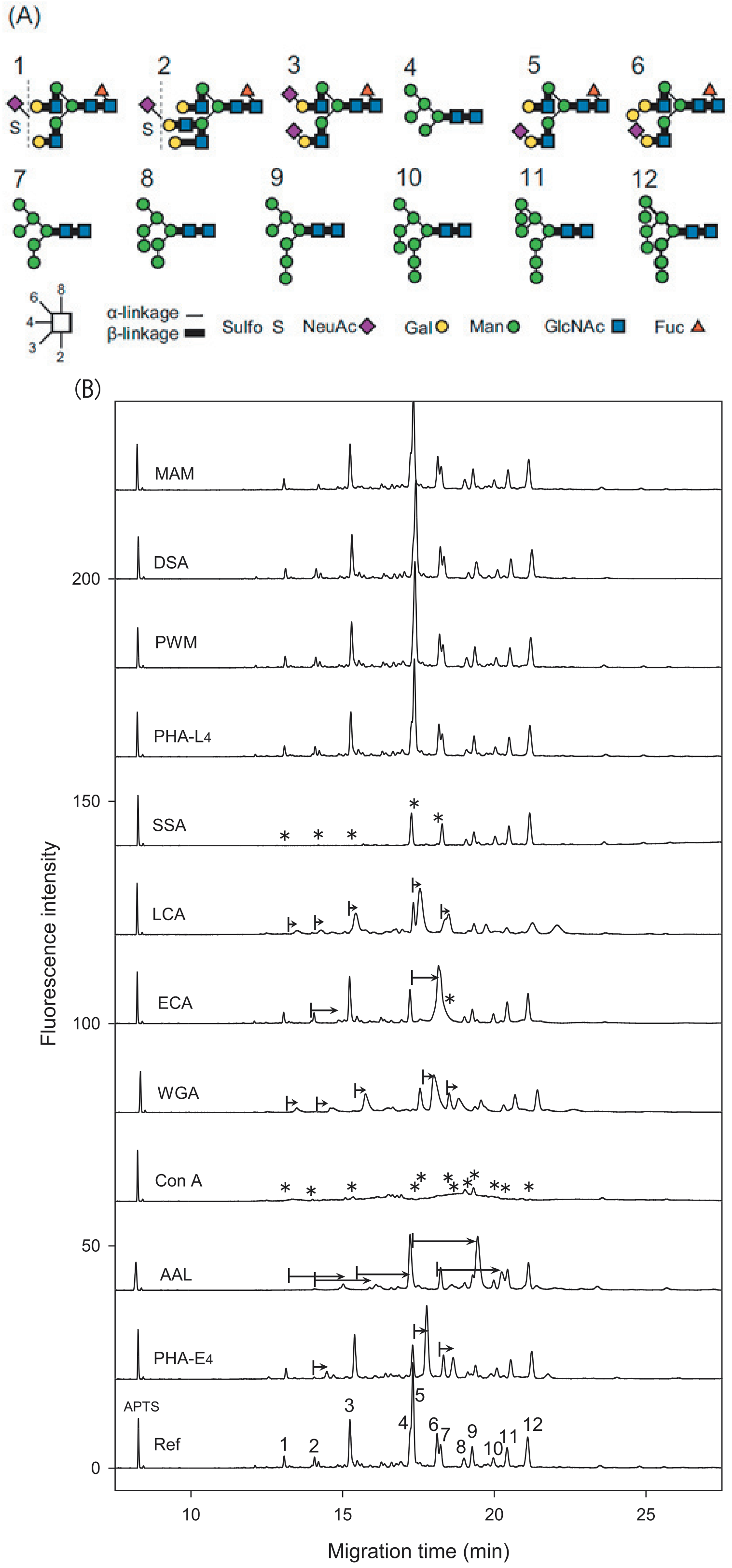


Figure 2-1. PFACE of APTS-labeled glycans derived from porcine thyroglobulin with various lectins. Lectin solution (1 mg/mL) was injected at 0.5 psi for 30 s; then APTS glycans (0.1 mg/mL as glycoprotein) injected at 0.5 psi for 30 s. Conditions: running buffer, 50 mM Tris-acetate buffer, pH 7.0 containing 0.8% hydroxypropylcellulose; capillary, polydimethylsiloxane coated, 50 µm i.d., 40 cm/; appl. voltage, -15 kV; detection, 488 (ex)/520 (em) nm.

るMAM, ポリラクトサミン糖鎖を認識するDSA, *N*-アセチルラクトサミン鎖を認識するPWM, 3 本鎖および 4 本鎖糖鎖を認識するPHA-L_4を用いた場合はいずれも結合できる糖鎖が含まれないことから, これらレクチンを注入して分析を行っても全く, 泳動パターンに変化がみられなかった. 一方, α2,6-結合NeuAcを認識するSSAを用いると, ピーク番号 1,2,3,5 および 6 が消失した. また, これらのピークは, α1,6-結合Fucを含む二本鎖糖鎖を認識するLCAを加えるといずれも 10 秒ほど遅延し, GlcNAcおよびNeuAcを認識するWGAを加えると遅れてピーク幅が広がった. また, Fuc残基を認識するAALを加えると, およそ 2 分の遅延がみられた. 一方, β-結合Galを認識するECAはピーク 2 と 5 が遅延した. したがって, これらは末端にGalが露出した糖鎖であることが予想された. α-Man残基を認識するCon Aはほとんどすべての糖鎖が消失した. また, 2 本鎖糖鎖を認識するPHA-E_4を用いたところ, ピーク 2, 5 および 6 だけが遅延した. いずれにせよ, このように各レクチンに特異的な結果が得られたことは注目に値する. また, APTS糖鎖を中性の緩衝液で分離すると, 糖鎖は重合度の順に泳動されることが知られる. これらの結果を総合すると, ピークの帰属が可能であった.

3-2-2.レクチン多重導入アフィニティーキャピラリー電気泳動[2]

レクチンにはそれ自身が糖鎖を含むものがあり, レクチンを混合するとお互いに反応することが知られる. 一方, 部分導入法では, 糖鎖を含むレクチンであっても, 連続して導入してもお互いが混じり合うことがないので, 複数のレクチンを簡単に導入できる. そこで, レクチンを多重導入する方法についても検討した. ところで, 糖鎖の内, ハイマンノース型糖鎖は糖鎖合成の最初の段階で必ず糖鎖結合部位に導入されるが, 分泌型糖タンパク質になる過程, すなわち RER からゴルジ体移送の段階で, 様々な糖鎖へと修飾される. したがって, 糖タンパク質性製剤ではハイマンノース型糖鎖を含むことは, 製剤上, 問題となることも予想される. そこで, このハイマンノース型糖鎖の特異的な検出を目的として, すべての複合型糖鎖を複数のレクチンでトラップする

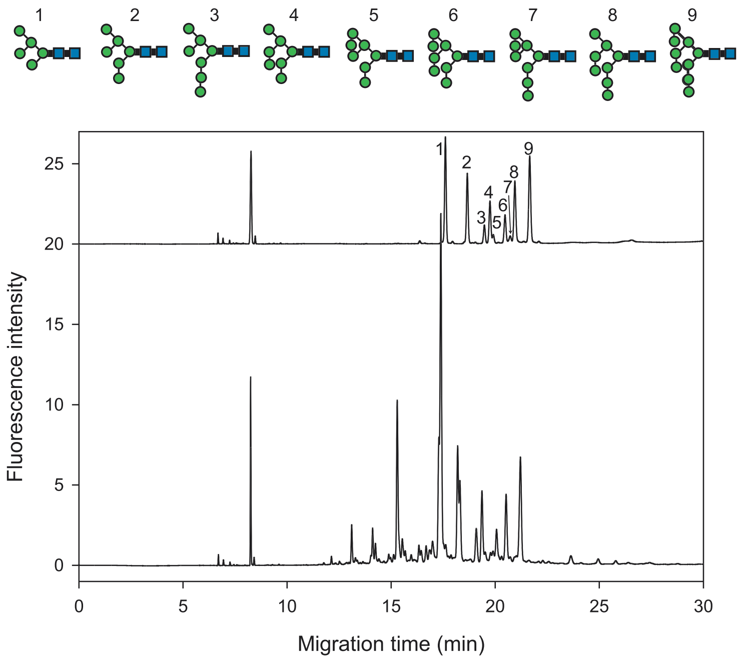


Fig. 2-2. Partial-filling affinity capillary electrophoresis using a series of lectins to identify high-mannose-type oligosaccharides in an oligosaccharide pool derived from porcine thyroglobulin. A 1 mg/mL solution of MAM, SSA, ECA, and AAL was introduced at 0.5 psi for 30 s in this order; then APTS oligosaccharides from porcine thyroglobulin were injected for 5 s. The lower trace shows the reference data obtained without lectins.

方法を検討した．レクチンとしてMAM, SSA, ECAおよびAALをこの順で導入し，チログロブリン糖鎖を分析した．結果をFig. 2-2に示す．その結果18分までの前半のピークはすべて消失し，16分から21分までのピークが残った．レクチンの組み合わせからもわかるように，これらはハイマンノース型糖鎖であった．

本法を用いれば，複雑なオリゴ糖の中から，構造特異的に糖鎖を分別分析できることを示すものであり，糖鎖の定量分析をも可能にする．今までにこのような手法は存在せず，糖鎖分析としての価値は高いものと考えている．

3-2-3.結合定数の算出

アフィニティーキャピラリー電気泳動の目的の一つとして結合定数の算出が考えられる．そこで，本法を用いて糖鎖の結合定数が算出可能かどうかについて検討した．得られた結果を平衡透析法で求めた値と比較したところ，測定温度によるためか，若干の低値を与えたものの良好な相関が見られた．このように本法は糖鎖の分離に加えて同時に結合定数の算出も可能であった．

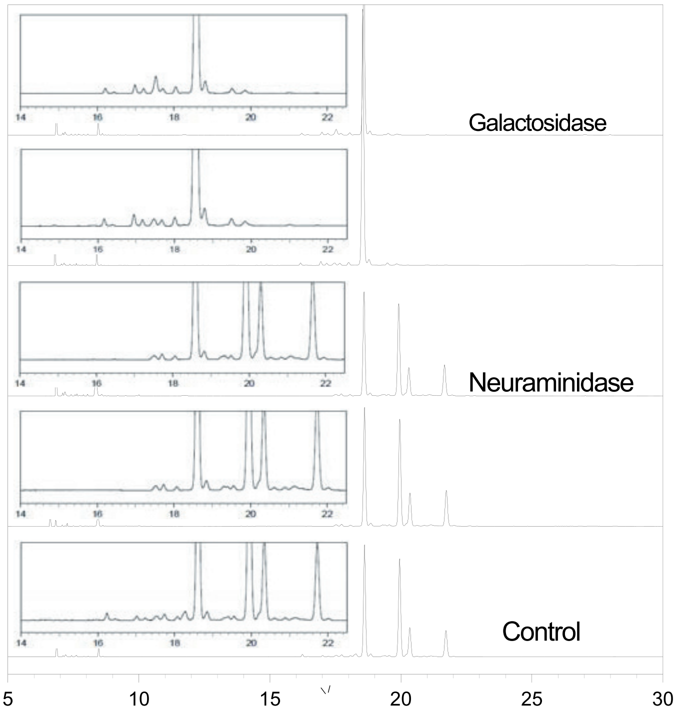


Fig. 3-1 Electropherogram of partial filling enzymatic digestion of the rituximab-derived oligosaccharides using β-galactosidase (0.2 U/mL) and α-neuraminidase (5 U/mL). Upper trace indicates overnight digestion mixture. Enzyme injection, 0.5 psi, for 60s.

3-3.部分導入酵素消化キャピラリー電気泳動法[3]

部分導入法は試料の反応場と分離場を自由に変更できる．そこで，前節のレクチンに変えて，酵素を用いることを検討した．すなわち，試料をキャピラリー内で分化する前に酵素消化を行うことができれば，酵素の特異性に応じた構造情報が得られるので，レクチンによる解析と相補的な利用が可能となる．そこで，IgG糖鎖を用いて検討した．IgGにはFig. 3-1に示す，一連の中性糖鎖に加えて，シアル酸を含むと思われる一連の酸性糖鎖の存在が知られる．酵素にβ-ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼを用いた．結果をFig. 3-2に示す．また，それぞれの酵素で一夜，インキュベートしたものも対象として測定した．その結果，オンキャピラリー消化した結果は一夜消化した試料と全く同じ泳動パターンを与えた．たとえば，ガラクトシダーゼでしょうかすると，G1, G1’, G2はG0に変わると考えられるが，予想通りの結果を与えた．また，ノイラミニダーゼ消化を行うと10分までに現れたピークが消失した．すべての酵素で同様の結果が得られている訳ではないが，酵素を用いる方法の応用範囲は広いと考えられる．

引用文献

1) Yodoshi Y, Oyama T, Masaki K, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Affinity Entrapment of Oligosaccharides and Glycopeptides Using Free Lectin Solution. Anal. Sci. 2011 inpress.

2) Yamamoto S, Shinohara C, Fukushima E, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Partial-filling affinity capillary electrophoresis of glycoprotein oligosaccharides derivatized with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid. J. Chromatogr. A. 2011 in press.

3) Yagi Y, Yamamoto S, Kakehi K, Hayakawa T, Ohyama Y, Suzuki S. Application of partial filling capillary electrophoresis using lectins and glycosidases to the characterization of oligosaccharides in therapeutic antibody. Electrophoresis 2011 in press.