

## 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	近畿大学薬学研究科薬品分析学研究室・教授
久保 兼信	近畿大学薬学研究科薬品分析学研究室・准教授
多賀 淳	近畿大学薬学研究科薬品分析学研究室・講師
山本 佐知雄	近畿大学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。糖鎖の生合成には複雑な酵素系が関与しており、糖鎖の構造とそれぞれの含量分布には幅がある。しかも、複合糖質中の糖鎖の種類は多く、単一の糖タンパク質であっても糖鎖結合部位が複数存在するので、それぞれの糖鎖がどのような構造を持ったときにどのような活性を示すかを知ることは極めて難しい。この糖鎖の網羅的解析を行うには、特異的かつ高感度で、分離能の高い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を実現するために、高感度かつ定量性に優れ、高速かつ特異的な分析法の開発を目的としてマイクロチップ電気泳動や新規レーザー励起蛍光標識法の開発などを行った。

#### 3-1 ピンポイント光合成弱酸性ゲルを用いたマイクロチップによる弱酸性試料の濃縮と分離

マイクロチップ電気泳動に用いられる一般的な流路は幅や高さが 100  $\mu\text{m}$ 、長さが数 cm 程度のもが多く、試料の導入流路と分離流路を交差させることにより、電氣的に導入した試料は電圧を切り替えることで、分離流路で分離され、終端で検出される。しかし、分析に供される試料量は nL 以下であり、検出には高い感度が求められるため、光源には出力の高いレーザー光を用いる蛍光検出が利用される。しかし、装置全体を小型化するには試料をマイクロチップの流路中に移動・濃縮する必要がある。様々な濃縮法の中でも perm-selective 濃縮法は  $10^9$  という高い濃縮効率を達成できる。しかし、その作成にはナノスケールの精密加工技術を必要とする。本研究の開始当初に、我々はスルホン酸を官能基にもつアクリルアミドゲルを流路の一部を塞ぐような形状で光重合させることにより、陰イオン性の試料成分をゲルの直近に濃縮出来ることを示した<sup>1</sup>。これはスルホン酸と試料成分のイオン反発によるものであり、ゲルの孔径をナノメートルサイズに調整したときに特異的に観察される現象であり、予想通り  $10^9$  倍という高い濃縮を達成できた。しかし、試料や泳動液に含まれるすべての陰イオンが濃縮されるので、切り替え時に濃縮された試料成分が静電的に相互に反発し、分離時には思うほど高感度分析が達成されなかった。そこで、ゲルの官能基をスルホン酸からグリコール酸に変更し、弱酸を選択的に濃縮するための方法を検討した。

#### 3-1-1 カルボン酸を官能基として有するポリアクリルアミドゲルの作成<sup>2</sup>

弱酸を電場の中で特異的に濃縮できるゲルを作るには、ゲルの物理的強度を決定する総アクリルアミド濃度と架橋材である *bis*-アクリルアミドに加えて、ゲルを通過しようとするイオンを静電的に排除するための酸性官能基の元となる 2-acrylamidoglycolic acid の含量のバランスが重要になる。本研究では用いた市販マイクロチップのレイアウトを Fig. 1-1 に示す。ゲルの組成と濃縮効率の関係を調査した結果、ゲルには

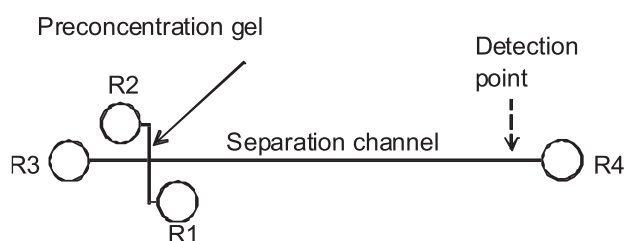


Fig. 1-1. Schematic diagram of the microchip made of poly(methyl methacrylate). Channel width and depth were 100 and 30  $\mu\text{m}$ , respectively. Solid and broken arrows respectively indicate the position of fabricated carboxylate-type polyacrylamide gel and the laser-induced fluorimetric detection.

は 15% 2-acrylamidoglycolic acid を含む 20%T/20%C ゲルを用いるのが最適であった。光重合触媒としてリボフラビンを追加したゲルモノマーの混合液をマイクロチップの流路に満たし、蛍光顕微鏡のステージ上、試料出口チャンネルの流路交差部から 100  $\mu\text{m}$  から 600  $\mu\text{m}$  の位置に、蛍光検出用アルゴンレーザーを照射することでゲルを作成した。ゲルの調製にはおよそ 5 分で完了した。未重合のゲル溶液を泳動液(150 mM Tris/酢酸緩衝液 pH 7.5)で置換し、R3 に試料溶液、残りのリザーバーには泳動液を加え、R2 と R3 の間に 200 V を印加することで、試料成分の濃縮の様子を観察した。試料に  $10^{-10}$  M fluorescein を用いて濃縮を調査した (Fig. 1-2a)。

30 秒後から徐々に fluorescein の濃縮が観察され、3 分まで直線的に蛍光強度が増大しているのがわかる。また、ゲルや試料出口チャンネルには fluorescein による蛍光は観察されなかったことから、特異的に濃縮されていることがわかった。

次に強酸性の蛍光試薬( $10^{-5}$  M 8-aminopyrene-1,3,6- trisulfonic acid, APTS)を用いて、同様の検討を行った。結果を Fig. 1-2b に示すが、強酸性の蛍光剤はゲルに吸着するためにゲルの蛍光強度が時間とともに増加し、出口チャンネルへと溶出した。いずれにせよ、スルホン酸を官能基にもつ蛍光剤はゲルに捕捉されることなく通過した。以上の結果より、カルボン酸を官能基とするポリアクリルアミドゲルは弱酸を特異的に捕捉する性質を有することがわ

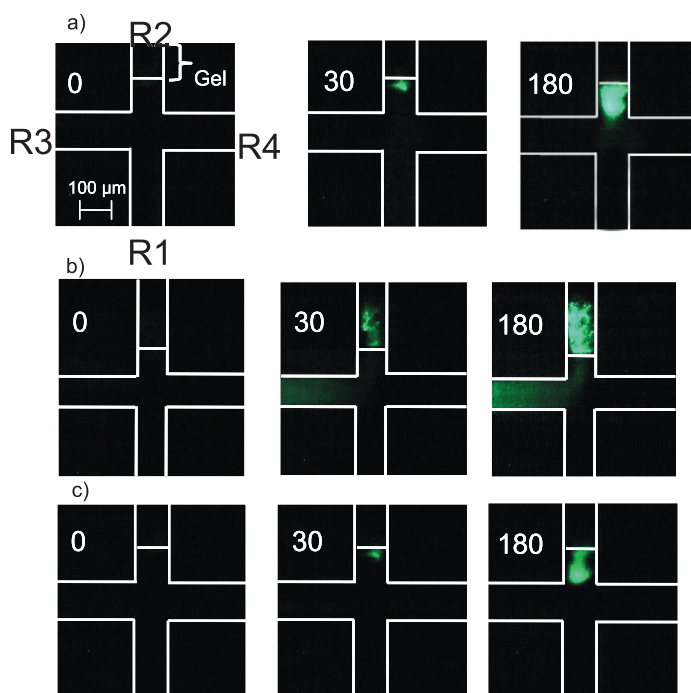


Fig. 1-2. Time-sequence images of permselective effect of the in situ fabricated gel to  $10^{-10}$  M fluorescein (a),  $10^{-5}$  M APTS (b), and a mixture of  $10^{-9}$  M ANTS and  $10^{-10}$  M fluorescein (c) at the channel cross in the PMMA microchannels. All channels were filled with 150 mM Tris/borate of pH 7.5; the left chamber (R3) is filled with a solution of fluorescent dye, and applied 200 V to the top chamber (R2).

かった。次に、弱酸性および強酸性の成分が混在する試料について、弱酸のみが特異的に捕捉されるかを調査した。そこで、APTS の類縁化合物である 8-aminonaphthalene-1,3,6- trisulfonic acid (ANTS)を用いることとした。すなわち  $10^{-10}$  M fluorescein /  $10^{-9}$  M ANTS を試料に用いて、同様に濃縮実験を行った。結果を Fig. 1-2c に示すが、fluorescein が特異的に捕捉されたことから本法では弱酸が選択的に捕捉されることがわかった。

### 3-1-2 マイクロチップ電気泳動分析への応用

本法の濃縮効率を調査するために、実際にマイクロチップ電気泳動に適用した。通常のマイクロチップ電気泳動では、試料を試料入口—出口間で電圧を印加して、試料を交差部を通過させ、電圧を交差する分離チャンネル間へ切り替えることで、交差部の試料を分離チャンネルへ送り分離する、いわゆる *pinched injection* 法が広く用いられている。そこで、この *pinched injection* 法とカルボン酸ゲルを用いる方法で試料を分析し、それぞれのピーク強度から感度を比較した。 $10^{-13}$  M fluorescein を本法で 3 分間濃縮し、実際に分析したところ、そのピーク高さは  $10^{-8}$  M fluorescein を *pinched injection* で分析したときのさらに三倍に及んだ。したがって、本法における濃縮効率は、通常の導入に比べて 330,000 倍という結果が得られた。これは、試料槽に入れた成分のほとんどをゲルの直近に濃縮できることになる。

### 3-1-3 Fluorescein isothiocyanate 標識アミノ酸の分析

本法を fluorescein isothiocyanate (FITC) で標識したアミノ酸の分析に適用した。結果を Fig.1-3 に示す。 $10^{-13}$  M 濃度に調製した FITC 標識 Asp, Gly および His の混合物について分離を検討した。また、実際の分析を想定して、塩化ナトリウムを添加したが、十分な感度で検出できた。

今回開発した光重合性カルボン酸系ポリアクリルアミドゲルを用いるマイクロチップ電気泳動では、試料槽の容量は  $10\mu\text{L}$  であり  $10^{-13}$  M の濃度の試料を分析したので、必要な試料量は  $10^{-18}$  mol, すなわち 1 attomole であり、実用分析上、十分な感度である。

以上、述べたようにカルボン酸を官能基として有するポリアクリルアミドゲルをピンポイントでマイクロチップの流路上で合成する方法を開発した。

このゲルをまたぐような形で電圧を印加すると、ゲルの直近に、弱酸性の試料成分だけを選択的に濃縮できた。ゲルの合成に 5 分を要するものの、市販のマイクロチップと標準的なレーザー励起蛍光検出システムを用いるマイクロチップ電気泳動装置があれば、簡単にゲルを構築できるので、その応用範囲は広い。

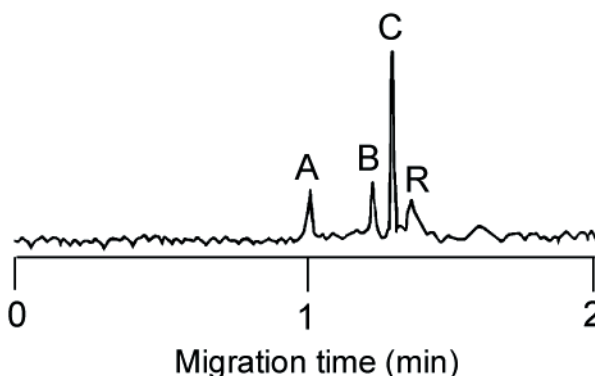


Fig. 1-3. Preconcentration and electrophoretic separation of  $10^{-11}$  M FITC derivatives of a mixture of amino acids under the presence (a) or absence of  $10^{-7}$  M NaCl. (A)~(C) represents aspartic acid, glycine, and histidine, and (R) for FITC reagent..

### 3-2 レクチン固定化ピンポイント光合成ゲルをもちるオリゴ糖の特異的濃縮マイクロチップ電気泳動<sup>3</sup>

前節ではイオン性ポリアクリルアミドゲルを市販の十字型マイクロチップの流路中にピンポイントで作成することにより、イオンを選択的に濃縮するというものであった。本節では、新しいタイプの濃縮法として、糖と特異的に結合する性質をもつレクチンを物理的にゲルに固定化したアフィニティーゲルをマイクロチップの交差部に特異的に合成し、糖鎖の特異的な捕捉を試みた。

### 3-2-1 レクチン固定ゲルの *in situ* 光合成とオリゴ糖の濃縮

この方法ではレクチンを含むゲル溶液を流路交差部にピンポイントで光重合し、特異的に糖鎖を捕捉・濃縮する。本法を実現するには、①レクチンゲルの創製、②糖の濃縮、③糖鎖の溶出、④分離・検出の各段階を最適化する必要がある。本法の概要を

Fig. 2-1 に示す。まず、Con A レクチン固定化ゲル溶液を泳動槽 R2 から加圧して流路に導入し、交差部にアルゴンレーザーを照射して円形のレクチンゲルを作成する。ゲル溶液を 25 mM Tris/酢酸緩衝液(pH 7.0, 中性緩衝液)で置換する。次いで泳動槽 R1 に試料として APTS 標識マンノビオース、R3 には 25 mM リン酸緩衝液(pH 2.0), R4 に 200 mM ホウ酸緩衝液(pH 11.0)を満たし、R1 を陰極とし、R2 に 150 V を印加した。時間とともにゲルの蛍光強度が増加したことから (Fig. 2-1(b)~(d)), 酸性の APTS 標識化マンノビオースがゲルに捕捉されたことがわかる。ゲルの蛍光強度が極大に達した時に、R3 を陰極とし、R4 に 800 V を印加することで、R3 からリン酸イオンがゲルへと泳動され、ゲルの pH が酸性になることで、レクチンが変性し、電圧印加 10 秒後に捕捉されていた APTS 標識化マンノビオースが分離チャンネルへ遊離される(Fig. 2-1(e), (f)). 同時に分離チャンネル終端からはナトリウムイオンが到達すると、リン酸と酢酸の間で過渡的な電荷勾配が形成され、この間に試料成分が濃縮される過渡的濃縮が起こる。その後、試料成分はそれぞれの質量/電荷比に応じて分離した。

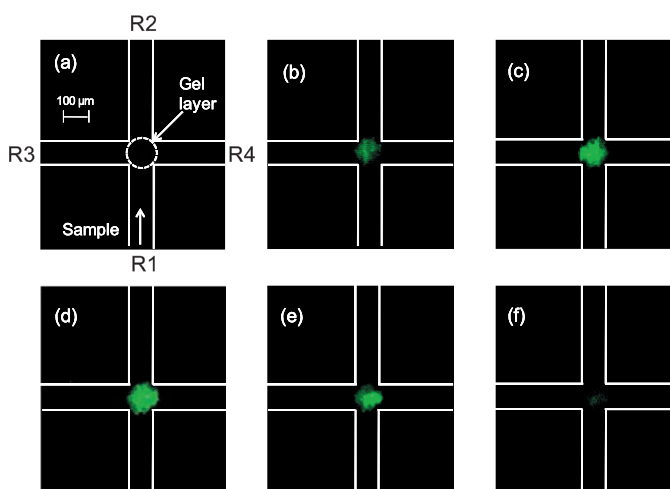


Fig. 2-1. Time-course of the concentration and the release of APTS derivatives of mannobiose at the channel crossing point in the Con A-impregnated polyacrylamide gel. All the channels were filled with 25 mM Tris/acetate buffer (pH 7.0); the left chamber (R3) was filled with 25 mM Tris/phosphate buffer (pH 2.0); the right chamber (R4) was filled with 200 mM sodium borate buffer (pH 11.0); the lower chamber (R1) was filled with  $10^{-6}$  M APTS-mannobiose, and 150 V was applied between R1 and R2 for 0 s (a), 30 s (b), 90 s (c), and 180 s (d). Then voltage settings were changed to 200, 200, 0, and 800 V for R1, R2, R3, and R4, respectively. Images (e) and (f) show the decrease in the fluorescence of APTS-mannobiose after 10 and 15 s..

### 3-2-2 レクチン固定化ゲルの調製

前節でも述べたが、効率的な濃縮を達成するには、ゲル中の捕捉分子の密度に加えてアクリルアミドゲルが十分な物理的強度を持つ必要がある。しかし、アクリルアミドや *bis*-アクリルアミドの濃度が高くなると、光重合に時間を要することがわかった。そこで、アクリル

アミド濃度は20%T/20%Cとした。重合後、未重合のゲル溶液を中性緩衝液で洗浄し、さらにR1とR2の間で500Vを印加してリボフラビンゲルから除去した。

### 3-2-3 レクチンゲルへの濃縮効率

ゲルに捕捉できるオリゴ糖の量はゲル中のレクチンの量に依存する筈である。そこで、様々な濃度のAPTS-マンノビース( $10^{-5}$  Mと $10^{-7}$  M)を用いて、その濃度とゲルの蛍光強度の関係を調査した(Fig. 2-2)。また対象としてCon Aに親和性をもたないラクトース誘導体についても蛍光強度の変化を調査したところ、ラクトースは特徴的な曲線を示した。すなわち、50秒後に極大を示した後、直線的に減少し、4分で消失した。一方、マンノビオースはそれぞれおよそ40秒後に極大に達したが、 $10^{-7}$  Mのマンノビオースの蛍光強度は $10^{-5}$  Mラクトースの8.8倍であることから、濃縮効率は880倍という事になる。ゲル中のCon Aの量は1.7 ng、Con Aモノマーとして63 fmolと算出された。一方、試料溶液は流路に入る段階で20倍に濃縮される。Fig. 2-2の蛍光強度の変化から推定されたゲルに捕捉されたマンノビオースの量は45 fmolであった。したがって、レクチン固定化ゲルへの捕捉効率はおおよそ70%となる。 $10^{-5}$  Mと $10^{-7}$  Mマンノビオースを比較すると、後者では蛍光が極大に達した後、減少した。これはCon Aとマンノース残基の結合定数が $7000 \text{ M}^{-1}$ であることと、試料槽のマンノビオースが2分以降減少することから、動的平衡が解離に傾くことによるものと思われる。通常糖鎖の結合定数は $10^7$ を超えることが多いので、捕捉された成分が溶出することはないと予想される。

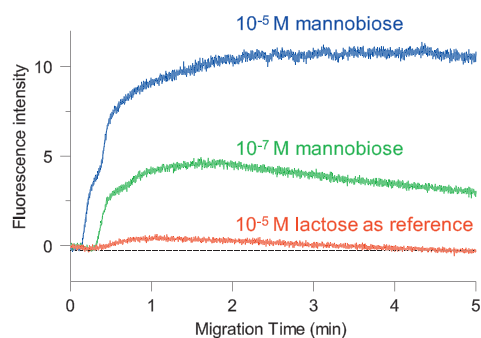


Fig. 2-2. Time course of the changes in the fluorescence intensity due to trapping of APTS-mannobiose on the Con A-impregnated gel formed at the channel crossing point. The concentrations of APTS mannobiose are indicated on each plot. The red line indicates the fluorescence intensity of  $10^{-5}$  M APTS-lactose as the reference.

### 3-2-4 捕捉糖鎖の溶出

多くのレクチンは酸性で可逆的に変性するので、レクチンアフィニティークロマトグラフィーでは0.2 M 酢酸などの酸性溶液を溶離液に用いることが多い。そこで、本法ではリン酸を溶離液として採用した。すなわち泳動槽R3を25 mMリン酸緩衝液(pH 2.0)で満たし電圧を印加した。Fig. 2-1(e)~(f)のように10秒後から15秒後にかけてマンノビオースが溶出された。しかし、溶出がゆるやかに起こるために試料バンドは400  $\mu\text{m}$ に達した。そこで本法では、陽極電極槽に高濃度のホウ酸ナトリウム緩衝液を用いて、ナトリウムイオンを分離流路へ泳動させた。試料をリン酸と酢酸の間に挟み込んで濃縮させた(Fig. 2-3)。この過渡的濃縮法では試料成分と同符号の電荷をもち、試料成分より泳動速度の遅いターミナルイオンと早いリーディングイオンが共存することで起こる。すなわち、酸性の強いリン酸イオンがゲルを通過する段階では、pHが酸性に傾き、酢酸は電荷を失う。そこに陽極よりナトリウムイオンが到達し、pHが上昇するとリン酸の電離が進み、酢酸も電離する。試料はこの過程で、リン酸と酢酸イオンの間に挟まれ、濃縮されるというものである。

実際に Fig. 2-3(a-b)に示すようにオリゴ糖は公差部から分離チャンネルに向かって1 cm の位置で400  $\mu\text{m}$  の長さのあった試料帯は後方よりスタッキングが始まり(Fig. 2-3c), その後数秒で鋭い試料帯となった(Fig. 2-3d). 試料成分はその後, リン酸緩衝液中で分離され, 検出された. この方法で得られたピーク幅は理論段数にして6800であり, 通常のpinched injection法の3600を上回るものであった. また, ピーク面積も予想通り500倍~1000倍と予想通りの値が得られた.

### 3-2-5 糖タンパク質糖鎖分析への応用

実際に糖タンパク質糖鎖の分析に適用した. Fig. 2-4はウシ臍臓由来リボヌクレアーゼの高マンノース型糖鎖をAPTSで標識したものの分離データである. なお, レクチンにはCon Aを用いた. 糖タンパク質として350  $\mu\text{g}$  相当の試料をpinched injection法を用いて得られた結果を上段(a)に示す. 下段(b)は, 7  $\mu\text{g}$  相当をCon A固定化ゲルで濃縮分離したものである. 上段に比べて下段のピーク面積は3倍であるので, およそ150倍の高感度化が達成された.

この方法を用いると糖鎖のうち, レクチンに親和性のある試料のみを特異的に検出できることになる. ヒト由来トランスフェリンは主に二本鎖複合型糖鎖を含有し, その非還元末端は $\alpha$ 2,6-結合ノイラミン酸を含む. そこで $\alpha$ 2,6-結合ノイラミン酸に特異的なレクチンとして知られる*Sambucus sieboldiana* agglutinin (SSA)を用い, 試料にはトランスフェリン由来糖鎖およびシアル酸を酵素的に除去した糖鎖をAPTSで誘導体化し

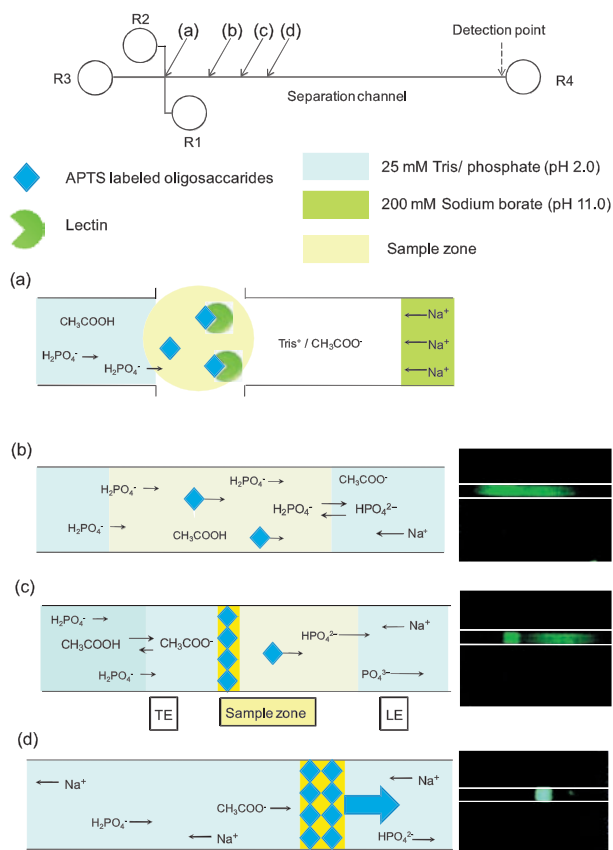


Fig. 2-3. Schematic diagram of a microchip, and illustrations and fluorescent images ((a)–(d)) of the sample band moving and stacking in the separation channel. The solid arrows indicate the positions where the fluorescent images were obtained, and broken arrow indicates the point of laser-induced fluorometric detection.

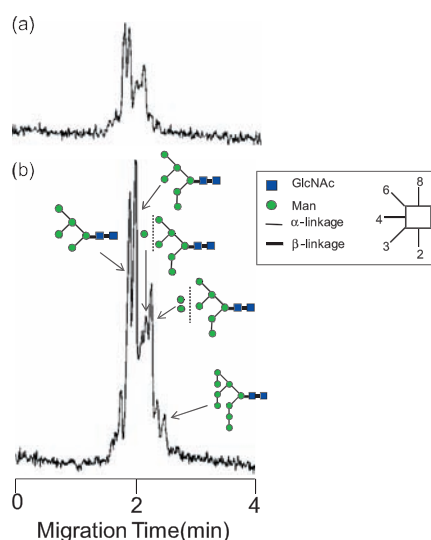


Fig. 2-4. Electrophoretic separation of pre-concentrated APTS oligosaccharides derived from bovine ribonuclease B with pre-concentration by Con A-impregnated gel (b) and the 50 times more concentrated sample analyzed by pinch injection without pre-concentration.

たものを 1:2 で混合したものを用いた。得られた結果を Fig. 2-5 に示す。Pinched injection により得られたデータ (Fig. 2-5a) では、1.9 分にはシアル酸含有オリゴ糖が 2.4 分にはアシアロ糖鎖が観察された。また、0.9 分のピークは試薬由来のピークである。同様の試料を 100 倍希釈して SSA ゲルを用いて濃縮・分離したところ、Fig. 2-5b に示すようにジシアロ糖鎖が特異的に観察された。

以上、述べたようにレクチン固定化ゲルと過渡的濃縮法を組み合わせることで、数百倍の効率で糖鎖を構造特異的に濃縮できる方法を開発した。この方法を用いれば、複雑な糖鎖混合物から、特定の糖鎖構造を有するオリゴ糖を特異的に検出できる。近年、糖タンパク質性医薬品の製造時に共存することが問題となる NeuGc や  $\alpha$ -Gal などの特異的な検出にも利用できる。

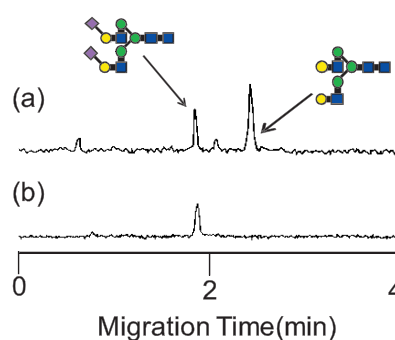


Fig. 2-5. Separation of a 1:2 mixture of sialylated and asialylated oligosaccharides derived from human transferrin preconcentrated with a SSA-impregnated gel (b) and the 25 times more concentrated sample analyzed by pinch injection without preconcentration (a).

### 3-3 液体クロマトグラフィーおよびキャピラリー電気泳動による糖タンパク質由来オリゴ糖の迅速高感度分析<sup>4</sup>

糖タンパク質糖鎖の結合様式には N-結合型と O-結合型があり、N-結合型糖鎖の遊離には peptide  $N^4$ -(N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminy)asparagine amidase F (PNGase F) が用いられる。糖タンパク質に PNGase F を作用させると、その還元末端のグルコサミンはグリコシルアミンとして遊離され、長時間をへて遊離のオリゴ糖へと変化する。したがって、PNGase F で処理した直後に、アミン標識試薬を使って誘導体化すれば、極めて短時間で標識化糖鎖を得る事ができる。そこで、Fig. 3-1 に示すように、PNGase 消化の過程で生じる糖鎖グリコシルアミンを蛍光標識剤として 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いて標識する方法 (PNGase/NBD 法) について検討した。

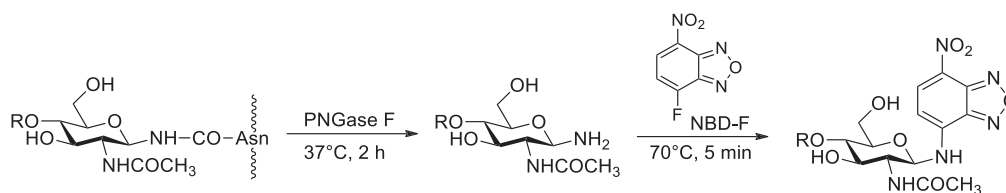


Fig. 3-1 Enzymatic release of glycosylamine-type oligosaccharides by the action of PNGase F and their derivatization with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F)

#### 3-3-1 糖タンパク質から遊離したグリコシルアミン型オリゴ糖の標識条件の検討

糖タンパク質に主として二本鎖ジシアロ複合型糖鎖をもつヒト由来とランスフェリンを用いた。ところで、酵素消化の過程は改善の余地がない。そこで、グリコシルアミンの NBD 化標識の条件を検討した。この蛍光標識反応は塩基性で進行するので、塩基性の緩衝液を用いて、組成、pH、濃度を検討した。結果を Fig. 3-2 に示す。トランスフェリン糖鎖の NBD 誘導体の面積から反応効率を求めたところ、① pH は 8、② 緩衝液濃度はあまり反応性に影響を与えない、③ リン酸緩衝液がよい、④ NBD-F の濃度は高いほどよい。という結果が得られ

た、そこで、試料を 20 mM リン酸緩衝液(pH 8.0)に溶解し、300 mM NBD-F を加え、70°C で 5 分間加熱することとした。酵素反応に 2 時間を要するが、これら一連の反応は要する時間は 3 時間と、極めて短時間で試料を調製できる方法である。

トランスフェリン 50 µg を用いて、反応の再現性を調査した結果、4.1% ( $n=5$ ) RSD であった。反応生成物をさらに還元的アミノ化反応をかけるという方法で、反応効率を求めたが、90%以上の糖鎖が NBD 標識されていた。また NBD 誘導体の順相系蛍光検出 HPLC における感度を

Fmoc-Cl や *p*-アミノ安息香酸エチル(ABEE)などと比較したところ、Fmoc 誘導体に比べて 4.4 倍、ABEE の 5.7 倍高感度であった。

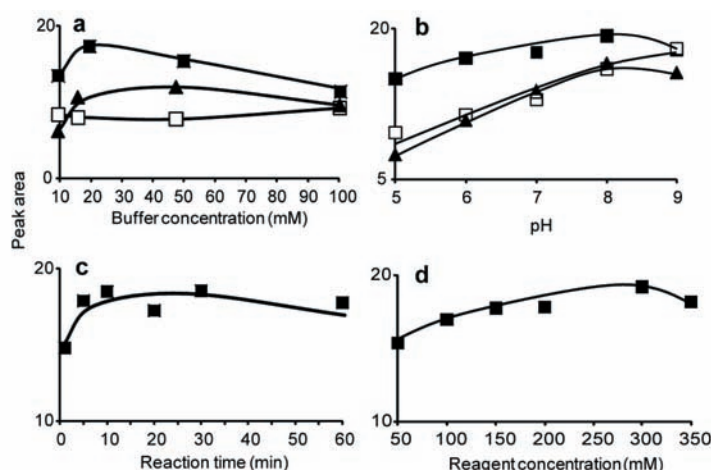


図 3-2 Effects of buffer concentration (a), pH (b), reaction time (c), and reagent concentration (d) on NBD derivatization of a biantennary oligosaccharide at 70°C. Unless otherwise depicted in plots, transferrin-derived oligosaccharides (5 µg as a glycoprotein) in each buffer (pH 8.0, 20 µL) were mixed with an acetonitrile solution of NBD-F (300 mM, 5 µL), and the mixture incubated at 70°C for 10 min. □ = sodium borate, ▲ = ammonium phosphate.

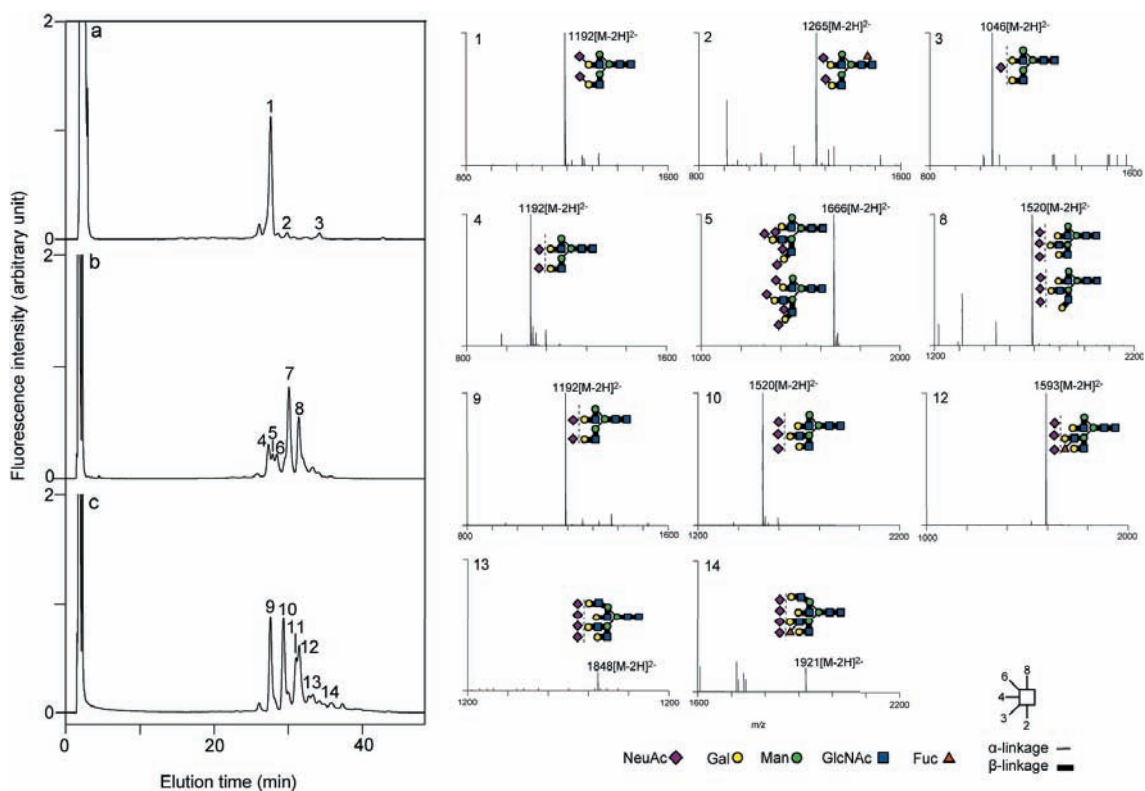
### 3-3-2 糖タンパク質由来糖鎖の HPLC 分析への応用

PNGase/NBD 法を様々な糖タンパク質中の糖鎖の分析に適用した。HPLC 分析にはカラムとして順相系の Amide80 カラムを用いた。また、糖鎖構造の確認に LC-MS を用いた。トランスフェリン由来糖鎖の分析結果を Fig. 3-3(a)に示す。ピーク 1 は  $m/z$  1192 を示し、ジシアロ複合型糖鎖 NBD 誘導体の  $[M-2H]^{-2}$  に相当することがわかった。ピーク 2 は  $m/z$  1265 を示し、ピーク 1 の糖鎖にさらにフコースが結合した糖鎖に相当した。ピーク 3 は  $m/z$  1046 はピーク 1 からシアル酸が一つ脱離した構造を有することがわかった。

本法を  $\alpha$ 2,3-および  $\alpha$ 2.6-結合 *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuAc) を 2 残基～4 残基有する三本鎖複合型糖鎖を有するウシ胎児由来フェツイン由来糖鎖の分析に適用した。Fig. 3-3(b)に示すように大きなピーク 7, 8 が 30 分付近に観察されたが、これらは NeuAc を 3 残基有する主要糖鎖に相当する  $m/z$  1520 に相当した。また、ピーク 4 と 6 は  $m/z$  1192 に相当し、ジシアロ糖鎖であることがわかった。一方、ピーク 5 は 4 残基の NeuAc を有する糖鎖であることがわかった。

ヒト由来  $\alpha$ 1-酸性糖タンパク質は二本鎖から四本鎖糖鎖に加えて、三本鎖と四本鎖の糖鎖の一部はフコースをもつ。また、シアル酸の結合様式にも  $\alpha$ 2,3-および  $\alpha$ 2.6-結合の両者が知られる複雑な糖鎖混合物である。分析した結果を Fig. 3-3(c)に示す。28 分に観察される大きなピーク 9 ( $m/z$  1192) はジシアロ複合型糖鎖、29 分および 31 分にはトリシアロ三本鎖複合型糖鎖 ( $m/z$  1520)、フコース含有三本鎖糖鎖は 32 分 (ピーク 12,  $m/z$  1593) に、また 33 分から 35 分には四本鎖複合型糖鎖 (ピーク 13,  $m/z$  1848) およびフコース含有四本鎖複合型糖鎖 (ピーク 14,  $m/z$  1921) が観察された。複雑なパターンが得られたのはシアル酸の結合様式の多様性に由来するものである。





**Fig. 3-3** Application of the PNGase F/NBD method for the HPLC analysis using fluorometric detection of oligosaccharides from human serum transferrin (a), fetal calf serum fetuin (b) and human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (c) with ESI-MS spectra of each peak. All MS signals of oligosaccharides with  $m/z$  values were obtained as the adduct ion of trifluoroacetic acid ( $[M + CF_3CO_2]^-$ ). Analytical conditions: column; Amide80 (4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm), eluent; (A) acetonitrile containing 0.1% acetic acid (B) 0.2% acetic acid containing 0.2% triethylamine, gradient program; 20% to 25% (B) for 5 min, 25% to 35% (B) for 75 min, 35% to 95% (B) for 10 min, flow rate; 0.8 mL/min, fluorometric detection; 470 nm (excitation)/540 nm (emission), amount of injection; 5  $\mu$ g as a glycoprotein.

また、これら糖鎖のNBD誘導体はMSで高感度を与えることから、LC-MS用の標識化法としても有用であることがわかった。

次にこれらの方法を中性糖鎖の分析に適用した。結果をFig. 3-4に示す、リボヌクレアーゼBは $Man_{5,9}GlcNAc_2$ に相当する一連の高マンノース型糖鎖を有する。これらオリゴ糖はMSにおいてトリフルオロ酢酸の付加イオン $[M + CF_3CO_2]^-$ として検出された。MSにおけるピークの帰属結果(Fig. 3-4(a))より、これらオリゴ糖は、サイズの小さいオリゴ糖から順に溶出していることがわかる。また、ピーク3の前の小さなピークは $Man_7GlcNAc_2$ の結合異性体であると予想された。

オバルブミンは高マンノース型および一連のハイブリッド型糖鎖からなる。MSの結果より、これらのオリゴ糖は $Man_3GlcNAc_2 < Man_3GlcNAc_5$ ,  $Man_4GlcNAc_4 < Man_6GlcNAc_2$ ,  $Man_4GlcNAc_4 < Man_5GlcNAc_4 < Man_5GlcNAc_6$ ,  $Man_4Gal_1GlcNAc_5 / Man_5GlcNAc_5 / Man_7GlcNAc_2$ の順で溶出されていることが判明した。

これらの分析では糖タンパク質として5  $\mu$ g相当を用いて得られたデータであり、報告されている糖鎖含量をから推定される検出下限は100 fmolであった。また、質量分析におけるこ

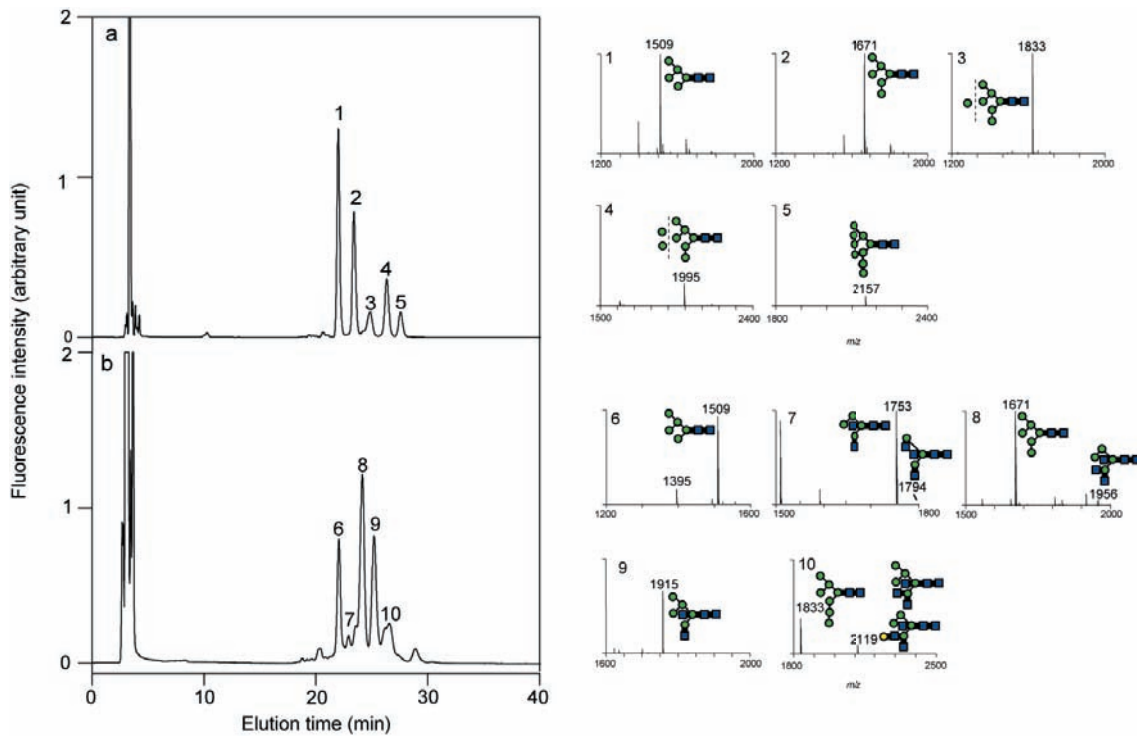


Fig. 3-4. Application of the PNGase F/NBD method for the HPLC analysis of oligosaccharides from bovine ribonuclease B (a) and ovalbumin (b). Analytical condition: column; Inertsil diol (4.6 × 250 mm), eluent; (A) 0.1% TFA, and (B) 95% acetonitrile containing 0.1% TFA, flow rate; 1.0 mL/min, gradient program; 99% to 99% (B) for 5 min, 99% to 75% (B) for 10 min, 75% to 50% (B) for 60 min, 50% to 1% (B) for 5 min, fluorometric detection; 470 nm (excitation)/540 nm (emission), amount of injection; 5 µg as a glycoprotein.

れらオリゴ糖の感度は Fmoc や ABEE 誘導体 に比べて 12 倍および 10 倍高い感度を与えたことから、本法は糖鎖分析に有用な誘導体化法であると思われる。

### 3-3-3 糖タンパク質由来糖鎖のキャピラリー電気泳動シンポジウム分析への応用

NBD 誘導体の励起波長はアルゴンレーザーと一致するので、キャピラリー電気泳動においても高感度が期待され

る。PNGase/NBD 法で調製した糖タンパク質糖鎖誘導体の分析にアルゴンレーザー励起キャピラリー電気泳

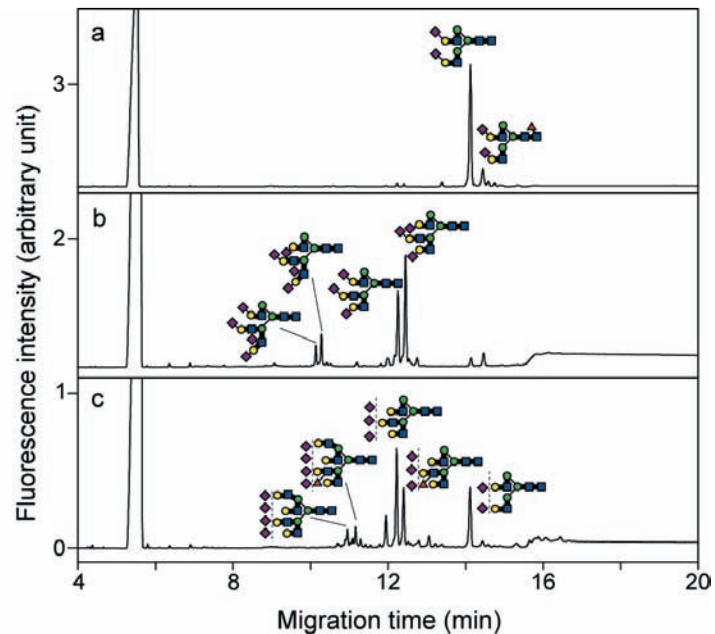


Fig. 3-5. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorometric detection of oligosaccharides derived from human serum transferrin (a), fetal calf serum fetuin (b), and human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (c). Analytical condition: capillary, InertCap<sup>®</sup> 1 (50 cm, 100 µm i.d.; effective length 40 cm); buffer, 100 mM borate (pH 8.3); capillary temperature, 25°C; sample injection, 1 psi for 10 s; applied voltage, -15 kV.

動を適用した。なお分離条件については種々検討の結果、ホウ酸錯体としての分離モードを適用した。トランスフェリン、フェツイン、 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質について得られた結果をFig. 3-5に示す。これらオリゴ糖はシアル酸の数にしたがって分離し、テトラシアロ、トリシアロ、ジシアロ糖鎖がそれぞれ10~12分、12分付近および14分付近に観察された。トランスフェリンは14分の主要ピークに加えて14.2分に小さなピークが観察された。これらはそれぞれ2本鎖複合型糖鎖およびこの糖鎖にフコースが結合したものと予想された。フェツインはテトラシアロ、トリシアロ、ジシアロの各領域にそれぞれ日本以上のピークを与えた。これらはそれぞれシアル酸の結合様式の異なるものであると推定された。 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質は複雑な分離パターンを与えた。これは、本糖鎖がシアル酸の分岐鎖の数およびシアル酸の結合様式の相違に従って分離したためと思われる。キャピラリー電気泳動におけるこれら糖鎖分析の感度を調査した結果およそ4 fmol (S/N = 20)であった。

以上述べたように、今回開発した PNGase/NBD 法は①糖タンパク質から誘導体化までを一つの容器内で3時間以内に達成できる。②NBD 誘導体の励起極大がアルゴンレーザーとマッチしているので、高感度分析が可能である。③NBD はイオン化しやすいためか、MS における感度が他の誘導体の10倍高い。などの特徴が得られた。これらの特徴は、網羅的な糖鎖解析において本法が有用であることを示すものと思われる。

#### 引用文献

- 1) Yamamoto S., Hirakawa S., Suzuki S., *In situ* fabrication of ionic polyacrylamide-based preconcentrator on a simple poly(methyl methacrylate) microfluidic chip for capillary electrophoresis of anionic compounds. *Anal. Chem.* **80**, 8224-8230 (2008).
- 2) Yamamoto S., Watanabe Y., Nishida N., Suzuki S., Simultaneous concentration enrichment and electrophoretic separation of weak acids on a microchip using *in situ* photopolymerized carboxylate-type polyacrylamide gels as the permselective preconcentrator. *J. Sep. Sci.*, **34**, 2879-2884. (2011).
- 3) Yamamoto S., Suzuki S., Suzuki S., Microchip capillary electrophoresis of oligosaccharides using lectin-immobilized preconcentrator gels fabricated by *in situ* photopolymerization, *Analyst* (2012) *in press*.
- 4) Oyama T., Yodoshi M., Yamane A., Kakehi K., Hayakawa T., Suzuki S., Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B*, **879**, 2928-2934 (2011).