

蛍光標識法による糖鎖の構造と機能の解析

特集 プロジェクト研究

長谷純宏*

Analysis of Structure and Function of Sugar Chains by Fluorescence Labeling

Key Words : Oligosaccharide, Fluorescence Labeling, Pyridylamination,
two-dimensional sugar map

オリゴ糖(糖鎖)の構造解析において「蛍光標識法」が一般的となってきた。特に微量での構造解析にはこの方法が世界的に広く使用されるようになった。核酸や蛋白質とまではいかないが、糖質の分野でも近年自動化が行われつつある。RAAM シークエンサー、GlycoTag や FACE システムといったオリゴ糖の構造解析システムが欧米や日本のメーカーより市販されているが、これらの機器や分析システムには全て蛍光標識法が採用されている。また、蛍光標識された標準オリゴ糖も数多く市販されるようになった。ここでは、この方法がどのように誕生し、どのように発展したかについて、またこれからの展望について以下に述べる。

1. 蛍光標識法の導入に至った背景

糖質の研究において初期の頃は、セルロース、ヘミセルロース、寒天、澱粉の様な植物多糖から細菌の生産する多糖や細胞壁ペプチドグリカン、動物ではグリコーゲン、グリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、キチン等といった比較的量の多い物質が研究の対象とされてきた。これらの化合物の構造決定のために、化学的な方法として、結合位置解析のためのメチル化分析法や過ヨウ素酸酸化、糖鎖を部分的に切断する部分アセトリシス等の化学反応や酵素消

化を用いて構造を決める方法が開発された。これらの方法は現在でも使用されており、化学的な方法の原型はこの時代までにほぼ完成されたと言ってもよい。しかし、1970年代になり複合糖質(糖蛋白質、糖脂質)の糖鎖構造と生理活性に衆目が集まりだした。例えばヘパリンによる抗血液凝固活性、レクチン、細胞表面のオリゴ糖リセプター、植物細胞壁よりの情報伝達物質としてのオリゴ糖(オリゴサッカリン)、血球表面におけるウイルスとの結合(シアル酸)、プロテオグリカン(コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸)、血液型物質(ABO式、ルイス式)等が挙げられる。これらの試料は、微量しか得られないものが多く、かつ複雑な構造をしている事が分かりつつあった。また糖質には多様性(極めて類似した糖鎖の集合体で得られる事が多い)が特徴であることも分かり、従来の方法を脱した新規な方法の必要性が生じていた。糖質は古くより研究されているにもかかわらず、分析や構造解析における高感度化や自動化において、タンパク質や核酸の様に完成された域に達していない。その理由は、蛋白質や核酸においては構成成分の種類が限られておりシークエンスの決定で一応十分であるが、糖質においては、その他に枝別れ、結合位置、アノマー構造、環状構造等の問題を解決せねばならず、オリゴ糖が複雑な構造を取ることに起因する。

2. オリゴ糖の検出

オリゴ糖の構造決定は「検出」、「分離」、「構造解析」の3要素に因数分解して考えられる。検出はオリゴ糖の分離や構造解析中においてオリゴ糖の位置を知るために、分離は構造解析のために単一なオリゴ糖を調製するためと構造解析において必要であ



*Sumihiro HASE
1943年5月1日生
1966年大阪大学・理学部・化学科卒業
現在、大阪大学・大学院理学研究科・
化学専攻、教授、理学博士、有機生物
化学
TEL 06-6850-5380
FAX 06-6850-5383
E-Mail sumihase@chem.sci.osaka-
u.ac.jp

る。この中で構造解析(特に化学的な方法)は当時既に完成に近いと考え、それまでに余り検討されていなかった検出において改良を行い、特に高感度化を図る事にした。

オリゴ糖はそれ自体の中に検出されるための都合の良い基を持っていない。内在性のクロモゲン(紫外吸収等)やまたアミノ酸の検出に於けるニンヒドリンに相当する高感度な発色試薬も知られていない。当時は、ろ紙上での検出やカラムクロマトグラフィーで分離した画分中の糖質の検出は、その一部を使用し発色試薬を用いて色の濃さを測定し分析していた。この様な方法は、微量や複雑なオリゴ糖には適せず、また操作も繁雑であった。オリゴ糖の構造解析を高感度化かつ簡便にするために、「蛍」を参考とした。闇夜では蛍を簡単に見つけることが出来る(昼間では他に多くの生物が見えてしまい、蛍を見出すことは難しい)。この原理を取り入れ、本来蛍光性のないオリゴ糖に1箇所だけ蛍光性の洗濯鉢を付ける事を考えた(図1)。こうすれば、紫外ランプで照らせば、オリゴ糖の存在する位置が簡単に見える。これを化学反応で記すと図2の様になる¹⁾。オリゴ糖1分子に1箇所だけ蛍光物質を化学的に結合させることにした。オリゴ糖には通常1カ所だけ還元末端があり、従って1カ所だけアルデヒド基がある。還元アミノ化反応を用いてアミノ基をもつ

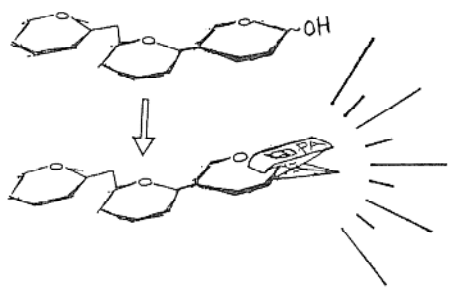


図1 オリゴ糖の蛍光標識

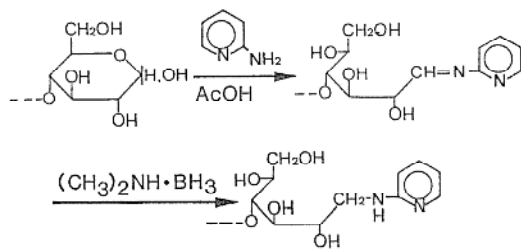


図2 ピリジリアミノ化反応

有機化合物(ここでは蛍光性のあるもの)を結合させると、オリゴ糖1分子に1カ所だけ蛍光性の化合物を結合させる事が出来る。これが出来ると、オリゴ糖を高感度に検出できる。しかし、欠点として標識反応の操作に時間と手間がかかり、また反応後、過剰の試薬の除去が必要となる。これらの不利な点があるにもかかわらず、オリゴ糖を標識する方が全体として有利であることが、実際に構造解析を行うときに明らかとなった。オリゴ糖の分離・検出だけではなく、構造解析まで範囲にいと、オリゴ糖をクロマトグラフィーで分離した後のオリゴ糖の分取は必須条件であり、また構造解析で用いる化学反応の条件下(例えば、メチル化分析、部分アセトリシス、過ヨウ素酸酸化、強酸、強アルカリ、強い光等)で十分に安定である様な蛍光標識剤が必要となる。この様な蛍光標識剤として、最初に2-アミノピリジンが用いられた¹⁾。この発表の6年後に、蛍光性ではないがethyl *p*-aminobenzoateを用いた類似の報告が米国であり、さらに現在までに35種以上の標識オリゴ糖が外国で報告されている^{2,3)}。

3. オリゴ糖の分離

構造解析するには単一のオリゴ糖を調製する必要がある。それは単一の化合物で構造解析や活性の解析しないと、後で解釈に誤りを生ずるからである。そのためにはオリゴ糖(2~30糖)の分離や精製が必要である。糖質は一般に非常によく似た構造の混合物で存在し(マイクロヘテロジェネイティー)、またオリゴ糖は複雑な枝別れをした構造をしている事が多く、分離が重要な問題となる。糖質に蛍光標識を行うと余分な化合物が付き、オリゴ糖の分離能に悪影響すると考えられる。しかし、蛍光性の有機化合物は同時に疎水性であり、従って逆相HPLCによる分離に適しており、蛍光性と同時に疎水性もオリゴ糖に「標識」したことになる。通常オリゴ糖には適していなかった逆相カラムによる分離が使用でき、かえって、標識体の方が分離が良いことが判明した。濾紙クロマトグラフィーで数週間かかっていたオリゴ糖の分離でも数十分で分離することが出来た。一般的にオリゴ糖の分離は、分子量で分け、次いで構造の相違で分離するのが適しているという報告がある⁴⁾。この原理を採用し、サイズ分画HPLC次いで逆相HPLCで分離し、これらを2次元のグラフの上にスポットして糖質の2次元マップを作成

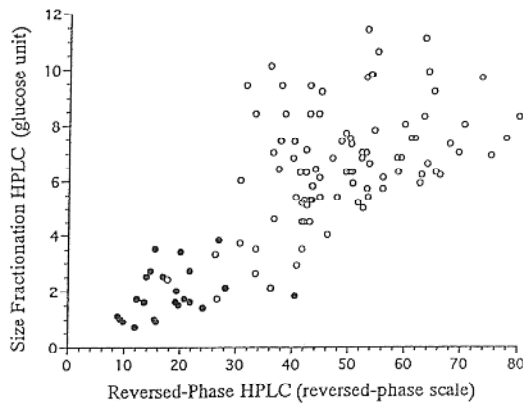


図3 *N*-配糖体と*O*-配糖体糖鎖のピリジルアミノ化誘導体の2次元糖鎖マップ. 縦軸にサイズ分画HPLCの溶出位置(主に分子量で分離される)と横軸に逆相HPLCの溶出位置(主に構造で分離される)を目盛ってある. 一つの点がオリゴ糖の一構造に対応している. 黒丸は*O*-配糖体糖鎖, 白丸は*N*-配糖体糖鎖の位置を示す. 生体より得られるもののオリゴ糖の数は, 理論上可能な数でなく, 合成されているため限定された数になる.

した. 糖蛋白質より得られた糖鎖(オリゴ糖)の例を図3に示した.

4. 蛍光標識法によるオリゴ糖の構造解析

蛍光標識法はオリゴ糖を標識し高感度に検出できるにしたものであり, 従来から用いられている, 結合様式やシーケンスを決める化学的な方法や機器分析の方法をそのまま用いる事が出来る. 従って, この方法は従来の化学的方法やNMRやMASSといった方法を基にして, 構造解析を高感度化する, 一種のOperating Systemと考えている. 本方法を使用していくうちに, 蛍光標識法に特有の分析法が派生し, 次に述べるように高感度な構造解析に有用となった⁵⁾.

2次元糖鎖マップ上において既に構造の決まったオリゴ糖誘導体の溶出位置との照合や酵素消化とを組み合わせ, 高感度な構造解析を行うシステムを作成した(オリゴ糖のパターン解析). また, 多種類の標識オリゴ糖を取り扱っているうちに, 2次元マップ上における位置とオリゴ糖構造の間の規則性の存在に気が付いた⁶⁾. この規則性を用いると, 全てではないが, 手持ちにないピリジルアミノ化オリゴ糖の2次元マップ上の位置を計算で求める事が出来る. 2次元オリゴ糖鎖マップのみを用いた方法では完全な構造決定は出来ないが, これまでに知られた構造

の中からどの構造であるかをほぼ正確に知ることが出来る. この方法はHPLCの検出限界付近の試料を用いても行うことができるため, 高感度化に適している. オリゴ糖の構造解析にはElectrospray-MASS, MALDI-TOF-MASS, FAB-MASS等の質量分析が近年用いられているが, これらの手法でも糖質を蛍光標識した方が感度が良いことがいくつかの報告で明らかとなった. また, 核磁気共鳴による構造解析法を用いるにも, まずはオリゴ糖を単一に精製する必要があり, 分離能の高い蛍光標識法は有用である.

5. 蛍光標識法を用いたオリゴ糖の構造解析の超微量化と自動化

生体中に存在し機能している化合物は微量のものも多く, 従って高感度化することで, 今までは解析出来なかった世界が見えてくるはずである. 細胞レベル [$\text{fmol}(10^{-15}) \sim \text{amol}(10^{-18})$] での構造解析が可能となる事が現在の目標である. この様な微量の世界では, 化学的な方法や質量分析, NMR等による構造解析はもはや使用できない. しかし, 2次元糖鎖マップ-規則性-酵素消化の組み合わせに, 高感度なHPLC装置を用いる事により, これらの微量のオリゴ糖の構造解析が可能であると考えている. 現在オリゴ糖で最も高感度に検出された例は, テトラメチルローダミンで蛍光標識した二糖で, 数百分子 [$\text{zmol}(10^{-21})$ レベル] が, レーザー蛍光検出器付キャピラリー電気泳動で検出されたものである⁷⁾.

6. 蛍光標識法のオリゴ糖機能解析への応用: 糖鎖プローブとして

これまでの研究によると, 糖質の構造, 特に蛋白質や脂質に結合したものはかなり複雑な構造をしており, また生体中では数糖よりもかなり大きな部分がタンパク質により認識されている事が明らかとなりつつある. 従ってそれらの生理活性や役割の解析には生体のものと出来るだけ同じ複雑な構造のオリゴ糖を用いる必要がある. 蛍光標識することによりオリゴ糖は逆相HPLCで高度に分離されるため, 単一の構造に精製しやすく, 天然物より比較的簡便に調製できることが多いため, 機能の解析に有用である. ピリジルアミノの「洗濯鉢」を他の「洗濯鉢」, 例えば更に強力な蛍光物質, 固体表面, ビオチン, 樹脂ビーズ等に化学的に結合させる事ができ, 糖鎖

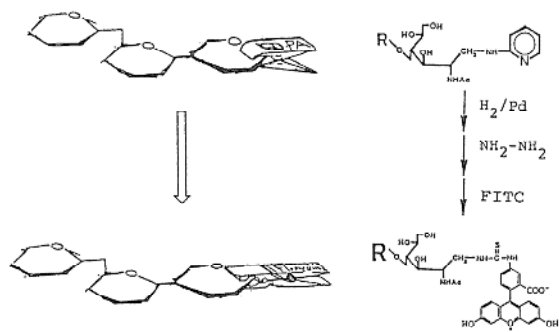


図4 ピリジルアミノ誘導体から他の誘導体への変換反応.

の活性を探る糖鎖プローブとして使用する事が出来、複雑な構造を持つ糖質の機能解析にさらに有利となる(図4)⁸⁾.

7. ま と め

蛍光標識によるオリゴ糖構造解析は、従来より用いられている化学反応による解析法や機器分析を基にして高感度・簡便な構造解析を可能にする一種のオペレーティングシステムと考えている(図5). 蛍

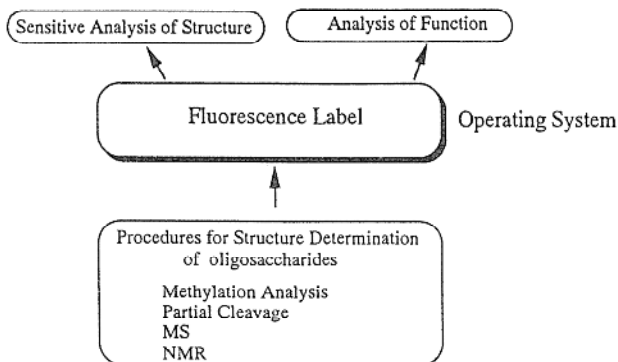


図5 オリゴ糖研究における蛍光標識法の位置.

光標識法を発展させる事により、「2次元糖鎖マップ」、「HPLCでの溶出位置とオリゴ糖の構造の間の規則性」、「糖鎖のパターン解析」が派生した. この方法はオリゴ糖の構造解析のみならず機能解析にも有用である. オリゴ糖の構造解析の自動化は少し展望が出て来た様に思われる. 自動の構造解析機が製作されると蛋白質や核酸の様に糖質の研究がもっと多くの研究者に広がり、生体内における役割の解明がさらに進むと思われる.

文 献

- 1) S. Hase, T. Ikenaka, Y. Matsushima : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 257-263 (1978)
- 2) S. Hase : *J. Chromatogr. A*, 720, 173-182 (1996)
- 3) S. Hase : *J. Chromatogr. Library*, 58, 555-575 (1995)
- 4) S. A. Barker, E. J. Bourne, P. M. Grant, M. Stacey : *Nature*, 177, 1125 (1956)
- 5) S. Hase : *Methods in Enzymology*, 230, 225-237 (1994)
- 6) S. Hase, S. Natsuka, H. Oku, T. Ikenaka : *Anal. Biochem.*, 167, 321-326 (1987)
- 7) J. Y. Zhao, P. Dietrich, Y. Zhang, O. Hindsgaul, N. J. Dovichi : *J. Chromatogr. B*, 657, 307-313 (1994)
- 8) S. Hase : *J. Biochem.*, 112, 266-268 (1992)