

グリコサミノグリカンおよびその誘導体の HPLC による分析

戸井田敏彦(千葉大学大学院薬学研究院)

【緒言】近年、細胞表面に存在する糖鎖が細胞の相互認識や細胞間情報伝達に関与することが明らかとなり、糖質のもつ生物学的意義に注目が集まっている。これまでに 100 以上の糖転移酵素およびその関連遺伝子をコードする糖鎖遺伝子がクローニングされているが、これらの遺伝子の多くは生理的意義が不明のままである。真核生物のタンパク質の半数以上は糖鎖の付加を受けるといわれており、グライコーム解析はタンパク質の翻訳後修飾による機能発現機構を解明するための重要な研究課題の一つである。しかしながらプロテオーム研究における二次元電気泳動や 2D-HPLC のような方法論は、グライコーム解析では確立されていない。そこで今回、私たちが進めているグライコーム機能解析を目指した HPLC によるグリコサミノグリカン (GAG) の分析法について、試料の前処理法も含めて紹介したい。

【実験・方法】GAG は市販品(生化学工業、紀文フードケミファ、Sigma、Celsus 社など)あるいは私たちの研究室で単離・精製し構造決定したものをを用いた。分解酵素は市販品(生化学工業、Sigma 社など)をそのまま用いた。HPLC はポンプ、インジェクター、カラム、反応槽、検出器など、適宜組み合わせて最適化し用いた。

【結果と考察】

GAG 由来不飽和二糖の HPLC 分析 コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸あるいはヘパリン、ヘパラン硫酸を分析する場合、用いる分解酵素によって生成する不飽和二糖類は全く異なり、目的によって使い分けねばならない。生成した不飽和二糖類は、硫酸基の数、結合位置などによってイオン交換クロマトグラフィーで分離、UV 検出する方法が一般的であったが、現在は ODS カラムを用いた逆相イオンペアクロマトグラフィーと、2 - シアノアセタミドを用いたポストカラム蛍光検出する方法が実際に使用されるようになった。また、実際に生体試料

などに応用する場合、前処理法が重要である。私たちは最近、限外ろ過膜あるいはイオン交換膜を装着したスピントレーブによる血漿、尿などの前処理法を開発し、これまで用いられていたエタノール沈殿法や CPC による GAG 共沈殿法に比べて良好な回収率で分析することが可能になった。

GAG 分子量の HPLC 分析 GAG に限らず、多糖類の分子量を正確に分析するための方法はなく、便宜的にタンパク質の分子量分析のためのゲルろ過カラムを用いて分析しているのが現状である。また、硫酸基を含む糖鎖の場合、樹脂への静電的吸着が大きな問題となり、HPLC により正確な分子量を測定することはほとんど不可能であった。そこで、種々の分子量の明らかな糖鎖を天然品から調製し、化学的に硫酸化を行い、その溶出挙動を調べた結果、ホウ酸緩衝液を溶離液として、シリカ系のゲル濾過用カラム、例えば TSKgelG3000 SW により分離し、電気伝導度検出器を用いた硫酸化多糖類の分子量測定法を確立した。今後硫酸化多糖類の分子量と抗血液凝固活性などの生理活性との相関などを解明する手法として活用したい。

参考文献)

"Carbohydrate Analysis by Modern Chromatography and electrophoresis."
J. Chromatogr. Library, Vol. 66 (2002).