

有機溶媒を用いた複合糖質からの夾雑物除去法の応用

Application for background removal from glycoconjugates using organic solvents

○田村恭祐¹⁾, 鈴木佑典²⁾, 中鳥晃貴¹⁾, 樺山一哉³⁾, 上宮悠⁴⁾, 櫛泰典²⁾

○Kyosuke Tamura¹⁾, Yusuke Suzuki²⁾, Kouki Nakatori¹⁾, Kazuya Kabayama³⁾, Hisashi Kamimiya⁴⁾,
and Yasunori Kushi²⁾

Abstract: The oligosaccharide moieties of glycoconjugates have structural diversity, because the structures involve sequence, branching, and linkage differences. Recently, the structural diversity of glycoconjugates is well known to associate with their functions. Therefore, the structural characterization of glycoconjugates is important in the elucidation of their functions. However, the purification processes are often time consuming and suffers from sample loss. In this study, we have examined organic solvent washing for background removal from glycoconjugates.

1. 目的

糖タンパク質や糖脂質などの複合糖質の糖鎖部分には、様々な糖の種類、配列、および結合様式が存在することから、多様な構造が存在している。近年、このような複合糖質の構造の多様性がその機能を生み出していることが明らかになりつつある。従って、複合糖質の機能解明研究において、詳細な構造解析法の確立が重要であると考えられるが、それぞれの精製において、夾雑物の除去には時間や労力がかかることから、より簡便な精製法の確立が必要である。

以上の背景から、本研究では、有機溶媒を用いた複合糖質からの夾雑物除去法の応用例について述べる。

2. 方法

有機溶媒による複合糖質からの夾雑物除去

複合糖質はガラスチューブ内に移した後、風乾し、それぞれ 2 mL の有機溶媒で 3 回抽出した。

糖ペプチド(RNase B 由来, 100 pmol)は、有機溶媒抽出後、2 μ L の水に溶解し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)により MS スペクトル測定を行った。同様に糖脂質(0.5 ~ 4 μ g)は、有機溶媒抽出後、少量のクロロホルム:メタノール(2:1, v/v)に溶解し、薄層クロマトグラフィー(HPTLC)および MALDI-四重極イオントラップ(QIT)-TOF MS によって夾雑物の除去および糖脂質の回収を確認した。糖鎖(0.5 ~ 10 μ g)は、有機溶媒抽出後、10 μ L のメタノールによって回収後、HPTLC により回収率を確認した。さらに、ピリジル

1: 日大理工・学部・応化 2: 日大理工・教員・応化 3: 日大理工・院(後)・応化

アミノ化糖鎖(PA 化糖鎖, 50 または 250 pmol)は, 有機溶媒抽出後, 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)および MALDI-TOF MS により, 夾雑物の除去および PA 化糖鎖の回収率を確認した.

MALDI-TOF MS 解析

MALDI-TOF MS および MALDI-QIT-TOF MS 測定は DHB をマトリックスとし, bradykinin ($[M+H]^+$ 757.40), human ACTH (fragments 18-39) ($[M+H]^+$ 2465.20)によって質量補正を行った. それぞれ複合糖質溶液に 1 μ L の DHB 水溶液(5 mg/mL)を加え, ターゲットプレート上に滴下し, 冷風によって結晶化を行った. MS は全てポジティブイオンモードにて測定を行った.

HPTLC 解析

糖鎖および糖脂質は HPTLC 上で展開溶媒 C:M:0.2% CaCl₂ aq. (60:40:9, v/v/v)で展開後, オルシノール硫酸試薬を噴射し, その後, 120°C, 5 分間加熱し発色させた.

HPLC 解析

PA 化糖鎖は PALPAK-TYPE R カラム(4.6 mm i.d. \times 250 mm, Takara Bio)を用いて, 蛍光検出により(Ex. 310 nm, Em. 390 nm)測定を行った. 流速は 0.75 mL/min, カラム温度は 40°C, 移動相は 100 mM acetic-acid-triethylamine (pH4.0)を用いた.

3. 結果・考察

様々な有機溶媒抽出により糖脂質からの界面活性剤の除去を検討した結果, 1,2-ジクロロエタン(DCE)が最も簡単に界面活性剤を除去可能であり, ほとんど大部分の糖脂質を回収できることを確認した. そして, PA 化糖鎖からの余剰試薬の除去を検討した結果, Cellulose Cartridge による精製法と比較して, 余剰試薬由来と考えられるより多くのピークが検出されたものの, DCE により大部分の余剰試薬が除去可能であることが確認された(Fig. 1). また, 容易に MS スペクトル上で PA-マルトース由来ピークを検出することが可能であった. さらには, 単糖または二糖の有機溶媒抽出後の回収率を確認した結果, 大部分の糖が回収可能であることを確認した. しかしながら, 糖ペプチドからの界面活性剤除去の結果では, MS スペクトル上で確認される糖ペプチド由来ピークの S/N が低いことから, 夾雑物の除去

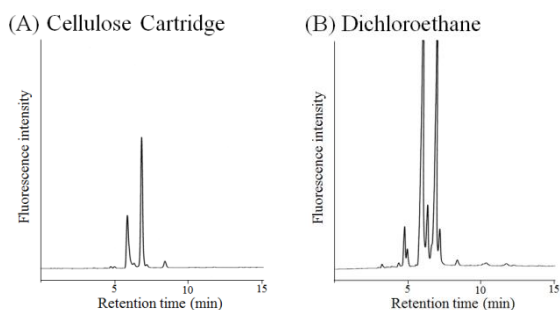


Fig.1 HPLC chromatograms of PA-maltose after purification by cellulose cartridge (A) and DCE extraction (B).

が可能であるものの, 回収率が悪いと考えられた. 以上の結果から, 有機溶媒抽出法が糖脂質, 単糖や二糖, および PA 化糖鎖からの夾雑物除去において非常に有用なツールとなり得ることが判った. そして, 現在の有機溶媒抽出法では, 糖ペプチドの精製においては, 改良が必要であることが判った. 今後はさらなる応用法について確認していくとともに, 細かい条件検討を行っていく予定である.