

糖鎖分析法の開発とその生理活性糖 タンパク質糖鎖構造解析への応用

太田 雅也*

Development of novel analytical methods of sugar chains and their application
to the structural analysis of sugar chains from bioactive glycoproteins

Masaya Ohta

ABSTRACT

I developed novel analytical methods of Asn-linked neutral- and sialyl-oligosaccharides, and O-linked oligosaccharides derived from glycoproteins with use of high performance liquid chromatography (HPLC). The oligosaccharides were labeled with a ultra-violet absorbing compound, *p*-aminobenzoic ethyl ester (ABEE), by reductive amination to obtain high sensitivity of detection and sufficient resolution on HPLC. The ABEE derivatives of the neutral oligosaccharides can be efficiently separated by a combination of normal-phase and reversed-phase HPLC and the anionic oligosaccharides by a combination of anion-exchange and reversed-phase HPLC.

These methods have been successfully adapted for the analysis of the oligosaccharides from some bioactive glycoproteins.

I) A sea squirt H-antigen was found to contain the following allergenically active O-linked oligosaccharides: GalNAc β 1-4(GalNAc α 1-2 Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3GalNAc-ol, GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3(GalNAc β 1-4 GlcNAc β 1-6)GalNAc-ol, GalNAc β 1-4(\pm Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3[GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6]GalNAc-ol, and GalNAc β 1-4(GalNAc α 1-2Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3[GalNAc β 1-4(GalNAc α 1-2Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-6]GalNAc-ol. Disaccharide units GalNAc α 1-2Fuc α 1-, and GalNAc β 1-4GlcNAc β 1- are considered to be the allergenically-specific epitopes in this sea squirt asthmatic allergy.

II) Hen egg-yolk immunoglobulin was found to contain three types of Asn-linked oligosaccharides; monoglucosylated oligomannose type oligosaccharides with structures of Glc α 1-3Man₇₋₉GlcNAc-GlcNAc, a series of oligomannose oligosaccharides, Man₅₋₉GlcNAc-GlcNAc, and biantennary complex type oligosaccharides with the core structures Man α 1-6 (Man α 1-3)(\pm GlcNAc β 1-4)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(\pm Fuc α 1-6)GlcNAc. The structural feature of the oligosaccharides was quite different from that of mammalian immunoglobulin. The glucosylated oligosaccharides, Glc-Man₇₋₉GlcNAc₂, have not previously been reported in mature glycoproteins

from any source.

III) Predominant oligosaccharides accumulated in the kidney of a calf with β -mannosidosis were found to be Man β 1-4GlcNAc and Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc. As expected in a β -mannosidase deficiency state, the terminal residue of the accumulated oligosaccharides was a β -linked mannose. The structures of the accumulating oligosaccharides were identical to those accumulated in caprine β -mannosidosis tissues.

はじめに

タンパク質に糖鎖が共有結合している分子群を糖タンパク質と総称している。動植物体のほとんどのタンパク質は、量に差はあるが糖を含んでいる。結合している糖鎖は、その還元末端の糖とペプチドとの結合様式によって、アスパラギン (Asn) 結合型 (*N*-グリコシド型) とムチン型 (*O*-グリコシド型) の2種類に大別される。Asn-結合型糖鎖は、Man α 1-3(Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAcで示される共通のコア構造を持ち、この構造に結合する糖の構造上の特徴に基づいて、1) 高マンノース型、2) 複合型、及び3) 混成型の3種類に分類される。高マンノース型では、コア構造にマンノースのみが2~6個結合し、複合型では、ラクトサミン (Gal β 1-4GlcNAc β 1-) の枝が、1~5本結合し、さらにシアル酸 (Sia)、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、フコース (Fuc) が結合したものがある。混成型は、高マンノースの枝とラクトサミンの枝の両方が結合している。

一方、ムチン型糖鎖は、セリン (Ser) またはトレオニン (Thr) の水酸基に *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が、*O*-グリコシド結合しているのが一般的であり、Asn-結合型糖鎖に見られる規則性はないが、一般的にはガラクトース (Gal)、GlcNAc、Fuc、Sia 残基で構成されるオリゴ糖が結合している。

近年細胞間の相互認識、生物の発生分化、タンパク質の分泌、種々のタンパク質の細胞内移動、タンパク質の細胞内への取り込みなどの機構に糖タンパク質の糖鎖がシグナルとして働いていることが明らかにされてきている。さらに、細胞が癌化すると細胞表面の糖鎖構造に変化が起こること、リウマチ患者の免疫グロブリンの糖鎖構造は、健常者のそれと著しく異なっていることなど、糖鎖構造が疾患に関係があることも見いだされつつある(1,2)。また、遺伝子工学的手法を用いて、有用な生理活性を持ったタンパク質を大量に生産し、医薬品として利用することも可能となっているが、大腸菌などの微生物を宿主として用いた場合には、糖鎖の無いタンパク質が得られるため、天然のものに比べて抗原性があつたり、血中半減期が短くなつたりすることが知られている。このように糖タンパク質の糖鎖が極めて重要な機

能に関わっていることが明らかにされつつある。

このような現状にあつて、糖鎖の持ついろいろな機能を解明し、これをバイオテクノロジーの分野で利用していくことの考えから「糖鎖工学(glycotecology)」という新語が日本で誕生し、糖鎖研究が、極めてホットな学問領域となっている。糖鎖の機能を解明するためには、綿密な構造決定が必要であり、構造と機能との関連を注意深く調べる必要がある。しかし、これら生理活性糖タンパク質の糖鎖は構造的に極めて多様であり、しかもごく微量しか得られないため、糖鎖の構造解析は、容易ではない。

現在 Asn-結合糖鎖の分析には、糖鎖をトリチウム標識(3)、蛍光標識(4-6)、あるいは紫外標識(7)し、各種クロマトグラフィーで分離・検出する手法が広く用いられている。しかし、これらの方法には、安全性、再現性、及び迅速性の点において改良すべき点があり、より簡便でしかも高感度な新しい分析法の開発が望まれている。さらに、これらの糖鎖構造解析法は、中性糖鎖の分析には有用であるが、酸性糖鎖の分析には適していないので、一般にはあらかじめ酸性基を除き、中性糖鎖として分析される。しかし、多くの Asn-結合糖鎖は、生体内ではシアル酸や硫酸等の酸性基が結合した形で存在しており(8-10)、しかも、結合している酸性基が、生理的機能に深く関わっていることが明らかにされつつある(11)ので、これら酸性糖鎖の機能を解析するために、酸性糖鎖そのものを分析する優れた方法の開発が望まれている。

O-グリコシド糖鎖の場合は、糖鎖をトリチウム標識し、各種のクロマトグラフィーで分離・検出する方法が使用されている。しかし、トリチウムを取り扱うには、特別な施設が必要であり、また、クロマトグラフィーによる分離は、優れているとはいえない。

以上のような理由から、中性及びシアル酸含有 Asn-結合型、および *O*-グリコシド型糖鎖の簡便で高感度、かつ高分離能を持つ分析法の開発を試みた。さらに、この手法を用いていくつかの生理活性糖タンパク質の糖鎖や、代謝異常症動物組織中の蓄積オリゴ糖の解析を行った。

1. オリゴ糖分析法の開発

1. Asn-結合型糖鎖分析法の確立

松浦らは、下の反応式 (図1) にしたがって糖鎖を紫外吸収試薬 *N*-アセチル安息香酸エチルエステル (ABEE) で標識する方法を見いだしていた (12)。著者は、この ABEE 標識法を応用し、Asn-結合糖鎖の高速クロマト

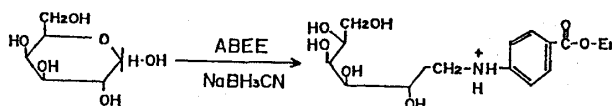


Fig.1 Scheme of derivatization of oligosaccharide with ABEE.

グラフィー (HPLC) による分析法の開発を行った。

1-1 標準 ABEE-オリゴ糖鎖の調製

イソマルトオリゴ糖の混合物は、デキストランの弱酸分解物を ABEE 化して調製した。糖鎖構造が明らかにされている各種の糖タンパク質から 39 種類の ABEE 標識 Asn-結合糖鎖を調製した (表 1)。

1-2 Asn-結合糖鎖の遊離とその ABEE-誘導体の精製

糖タンパク質から糖鎖の切り出しと糖鎖の標識方法の条件を検討した結果、以下に述べる方法が最適であった。糖タンパク質 (10mg) を五酸化リンを入れたデシケータ中で 3 日間真空乾燥した後、窒素気流下で無水ヒドラジンを加え、100℃で 10 時間反応させる。反応終了後、濃硫酸溶液上で真空乾燥し、ヒドラジンを除去する。残渣を飽和重炭酸ナトリウム 10ml に溶解し、攪はんしながら、1ml の無水酢酸を 4 回に分けて加え *N*-アセチル化を行う。反応溶液を Dowex 50(H⁺) のイオン交換樹脂に通して脱塩をした後、溶出液を凍結乾燥し、オリゴ糖を回収する。得られたオリゴ糖画分は、以下の方法を用いて ABEE で標識する。

オリゴ糖を 50 μ l の水に溶解し、用事調製した ABEE 試薬 (ABEE 35mg, NaBH₃CN 3.5mg, 酢酸 41 μ l, メタノール 350 μ l) 200 μ l を加え、80℃で 45 分間加熱する。反応終了後、1ml の水を加え、同量のジエチルエーテルで 4 回抽出を繰り返し、過剰の ABEE を除去する。ABEE-標識オリゴ糖の精製のため、水層画分を PRE-SEP C₁₈ カートリッジカラム (Tessek) にか、水とアセトニトリルの混合液 (100:0, 95:5, 9:1, 4:1, 1:1, 0:100) で順次溶出させる。溶出液は、2ml ずつ集め、ABEE-オリゴ糖の極大吸収波長である 304nm の紫外吸収で追跡する。中性オリゴ糖は、水:アセトニトリル (95:5~4:1) で回収される。溶出液を蒸発乾固後、残

査を 0.1M ピリジン-酢酸 (pH 4.0) 緩衝液で平衡化した Bio-Gel P-4 (200-400 メッシュ) カラム (1.0 x 45cm) にか、304nm の吸収で追跡しながら同緩衝液で溶出させて、脱塩および *O*-グリコシド糖鎖由来の小さな糖成分の除去を行う。ABEE 標識 Asn-結合糖鎖は、ほぼボイド溶の位置に溶出する。

1-3 高速液体クロマトグラフィーの条件 (13)

HPLC 分析は、島津 LC-6A 液体クロマトグラフを用いて行った。ABEE-中性オリゴ糖は、TSKgel Amide-80 カラム (0.46 x 25 cm, TOSOH) を用いる順相クロマトグラフィーと Wakosil 5C18-200 カラム (0.4 x 25 cm, 和光純薬) を用いる逆相クロマトグラフィーにより、良好な分離が得られた。最良の分析条件を以下に示す。Amide-80 カラムでは、溶媒 A (アセトニトリル:水、9:1) と溶媒 B (アセトニトリル:水、1:9) の混合液を、Wakosil 5C18-200 カラムでは、溶媒 C (5%アセトニトリル/100 mM 酢酸溶液) と溶媒 D (15%アセトニトリル/100 mM 酢酸溶液) の混合液を用いて、40℃で行う。Amide-80 カラムを用いる分析は、流速 1.0 ml/min で、A:B=80:20 の混合液で平衡化し、試料溶液注入後、60 分後 A:B=50:50 になるようなグラジエント溶出で行う。ODS カラムでの分析は、0.8 ml/min の流速で、C:D=60:40 の混合液で平衡化し、試料溶液注入後、60 分後 C:D=50:50 になるようなグラジエント溶出で行う。検出は、304 nm の紫外吸収か励起波長 308 nm と蛍光波長 355 nm による蛍光検出による。

1-4 標準 ABEE-オリゴ糖の分析結果 (13)

調製した 39 種類の ABEE-オリゴ糖鎖の Amide-80-HPLC、と Wakosil 5C18-200-HPLC、及び Bio-Gel P-4 クロマトグラフィーでの溶出位置を表 1 に示す。各 ABEE-オリゴ糖鎖の溶出位置は、Amide-80 と Bio-Gel P-4 では、ABEE-イソマルトオリゴ糖の溶出位置に換算して「グルコース単位」として表し、Wakosil 5C18-200 では、Glc-ABEE の溶出時間を 1.0 にして、「相対的保持時間」として表している。

順相の Amide-80 カラムを用いる HPLC では、基本的には分子量の差にもとづいて分離されており、分子量の小さいものから順番に溶出している。結合する糖の種類によるグルコース単位の増加割合は、マンノース (Man) が 1 個結合すると、1.0、*N*-アセチルグルコサミン残基 (GlcNAc) では、0.5~0.6、ガラクトース残基 (Gal) では、0.8~0.9、フコース残基 (Fuc) は、還元末端側で 0.4~0.5、非還元末端側では 0.6~0.7 であることが観測された。また、bisecting GlcNAc のグルコース単位への寄与は、0.3~0.4 であることが認めら

Table I Elution Positions of ABEE-oligosaccharides from Wakosil 5C18-200, TSKgel amide-80 and Bio-Gel P-4 Columns

No.	ABEE-oligosaccharides	Elution position ^a on the column of			14	0.95	6.84
		ODS	Amide-80	Bio-gel P-4			
1	H(α1-6)H(β1-4)GN ^b	1.24	2.50				
2	H(α1-6)H(α1-3)H(β1-4)GN	0.98	4.52				
3	H(α1-6)H(α1-3)H(β1-4)GN F(α1-6)	1.41	4.95				
4	GN(β1-2)H(α1-6)H(α1-3)H(β1-4)GN	0.96	5.08				
5	H(α1-6)GN(β1-2)H(α1-3)H(β1-4)GN	0.91	5.08				
6	G(β1-4)GN(β1-2)H(α1-6)H(α1-3)H(β1-4)GN	0.90	5.90				
7	H(α1-6)GN(β1-2)H(α1-3)H(β1-4)GN	0.86	6.13	11.2			
8	GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-2)H(α1-3)H(β1-4)GN	0.88	5.72				
9	G(β1-4)GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-2)H(α1-3)H(β1-4)GN	0.81	6.52				
10	GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-2)H(α1-3)H(β1-4)GN	0.83	6.61				
11	G(β1-4)GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-2)H(α1-3)H(β1-4)GN	0.78	7.40	14.5			
12	GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-2)H(α1-3)H(β1-4)GN	1.02	6.11				
13	G(β1-4)GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-2)H(α1-3)H(β1-4)GN	0.98	6.82				
14	G(β1-4)GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				0.91	7.63	
15	GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.39	5.56	
16	GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.33	5.57	
17	G(β1-4)GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.29	6.32	
18	G(β1-4)GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.26	6.44	
19	GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.29	6.14	
20	G(β1-4)GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.21	6.99	
21	GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.24	7.14	
22	G(β1-4)GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.14	7.90	
23	GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.46	6.50	
24	G(β1-4)GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.43	7.18	
25	GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.38	7.37	
26	G(β1-4)GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.35	7.98	
27	GN(β1-2)H(α1-6)GN(β1-4)GN				1.35	16.0	

28	GN(β 1-2)M(α 1-6) GN(β 1-4)M(α 1-3) GN(β 1-2)	0.85	6.10
29	CB(β 1-4)GN(β 1-2)M(α 1-6) CB(β 1-4)GN(β 1-4)M(α 1-3) CB(β 1-4)GN(β 1-2)	0.70	8.70 17.5
30	CB(β 1-4)GN(β 1-2)M(α 1-6) CB(β 1-4)GN(β 1-4)M(α 1-3) CB(β 1-4)GN(β 1-2)	0.63	8.70 17.5
31	CB(β 1-4)GN(β 1-2)M(α 1-6) CB(β 1-4)GN(β 1-4)M(α 1-3) F(α 1-3) CB(β 1-4)GN(β 1-2)	0.61	9.30
32	GN(β 1-6) GN(β 1-2) GN(β 1-4) GN(β 1-2)	0.77	6.78
33	CB(β 1-4)GN(β 1-6) CB(β 1-4)GN(β 1-2) CB(β 1-4)GN(β 1-4) CB(β 1-4)GN(β 1-2)	0.59	9.95 19.7
34	CB(β 1-4)GN(β 1-6) CB(β 1-4)GN(β 1-2) CB(β 1-4)GN(β 1-4) F(α 1-3) CB(β 1-4)GN(β 1-2)	0.50	10.65 20.4
35	M(α 1-6) M(α 1-3)	0.82	6.25 9.9
36	M(α 1-6) M(α 1-3) M(α 1-2)M(α 1-3)	0.71	7.13 10.9
37	M(α 1-6) M(α 1-2) M(α 1-2)M(α 1-3) M(α 1-2)M(α 1-3) ^C	0.67	8.02 11.8
38	M(α 1-6) M(α 1-2) M(α 1-2)M(α 1-3) M(α 1-2)M(α 1-3)	0.65	8.93 12.8
39	M(α 1-2)M(α 1-6) M(α 1-2)M(α 1-3) M(α 1-2)M(α 1-3)	0.64	9.65 13.4

a Elution position on a Wakosil 5C18-200 column is expressed as the relative retention time to glucose-ABEE and on Amide-80 and Bio-Gel P-4 columns as the number of glucose units.

b M, Mannose; G, Galactose; F, Fucose; GN, N-acetylglucosamine.

c The positions of non-reducing end mannose residues were not determined.

れた。

一方、逆相の ODS カラムを用いた場合には、基本的には分子量の大きいものから溶出している。ところが、この他に ABEE-オリゴ糖の構造と溶出位置との間にいくつもの興味ある現象が観測された。還元末端の GlcNAc 残基に α 1-6 結合で Fuc が結合すると Fuc の結合していない糖鎖に比べ、カラムに対する吸着能が著しく増大し、溶出時間が大幅に増加した (糖鎖 11 と 23、15 と 27)。しかし、非還元末端付近の GlcNAc 残基に Fuc が α 1-3 で結合した Fuc α 1-3GlcNAc β 1- を含んだ糖鎖では、上述のようなカラムへの吸着は観測されず、単に分子量にもとづいて早く溶出することが観測された (糖鎖 30-31 と 33-34)。

また、bisecting GlcNAc 残基を含む糖鎖でも、上述の Fuc 程ではないが、GlcNAc 残基を含まない糖鎖と比較して溶出時間の増加が認められた。

さらに、ABEE-オリゴ糖鎖 27 のような bisecting GlcNAc と Fuc 残基の両方が存在する糖鎖の溶出時間は、Fuc 残基を含む糖鎖のそれよりもさらに遅くなった。

従って、複合型のオリゴ糖鎖の ABEE-誘導体は、bisecting GlcNAc と Fuc 残基を含むか含まないかの 4 つのグループに分離出来ることが確認できた。しかも各グループのオリゴ糖は、さらに分子量の大きさ、糖の結合様式にもとづいて分離されることもわかった。

高マンノース型の糖鎖は、ODS カラムでは、20分から25分の間にとまって溶出し、複合型糖鎖のような完全な分離は出来なかった。しかし、Amide-80 カラムを

用いると、マンノースの数にもとづいて完全に分離できた (糖鎖 35~39)。

各 ABEE-オリゴ糖の 2 種類のカラムにおける溶出位置を、2次元にプロットすると、図 2 に示すように 39 種類すべての中性 ABEE-オリゴ糖は、重なりあり事なしに分離することができ、この方法が Asn-結合型糖鎖の分離と構造解析において、非常に有用であることが明らかとなった。

幾つかの ABEE-オリゴ糖を Bio-Gel P-4 カラム (2.0 x 100 cm) で分離した結果をグルコース単位に換算し

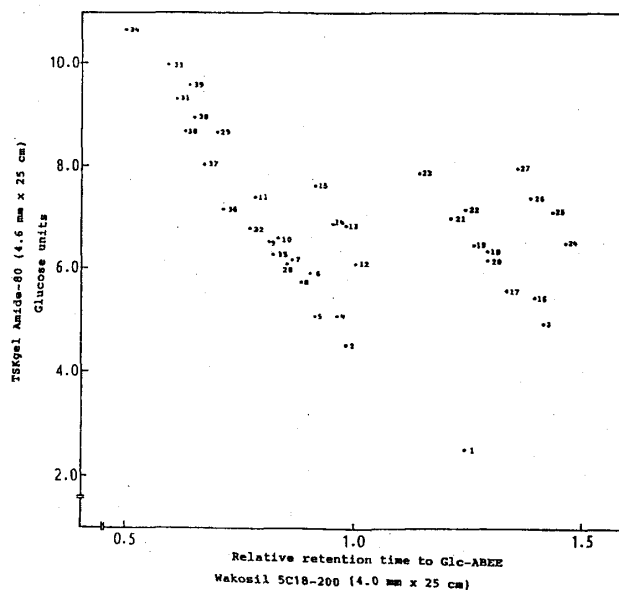


Fig. 2 Two dimensional sugar map of 39 different ABEE-oligosaccharides.

て表1に示している。Bio-Gel P-4を用いる分離分析も有用であり、上述のマッピング法での1つの座標となり、より精密な情報が得られるものと考えられる

ABEE-オリゴ糖のHPLC分析による検出限界は、304nmの紫外吸収を測定する方法では、4~5 pmolで、蛍光検出においては、0.5 pmol程度であった。

2. シアル酸含有オリゴ糖鎖分析法の開発

中性の骨格オリゴ糖にシアル酸が結合すると、シアル酸の数、結合様式 ($\alpha 2,3$ と $\alpha 2,6$ 結合が知られている)、結合の位置の違いにもとづいて、非常に多くの分子種の存在の可能性が生ずる。例えば二本鎖複合型糖鎖にシアル酸が結合する場合、図3に示すように少なくとも8種類の分子種が存在し得る。三本鎖、四本鎖複合型糖鎖の場合には、その数は数十種におよぶことになる。従って、糖タンパク質中のシアル酸含有オリゴ糖は、極めて多種類であることが予想され、これらを完全に分離するためには、高度な分離手法が必要である。

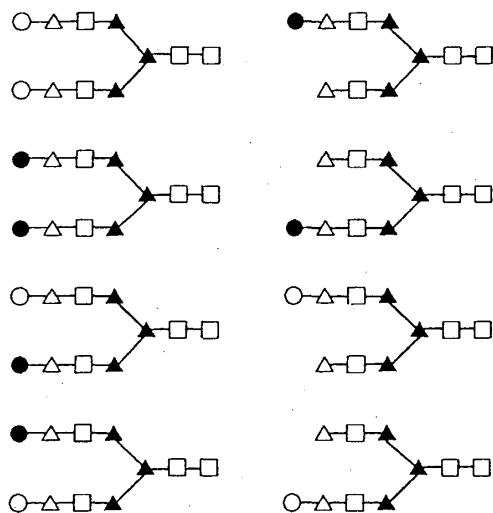


Fig.3 Isomeric structures of sialyl biantennary oligosaccharide.

シアル酸含有オリゴ糖の分析方法としては、トリチウム標識し、標識したシアル酸含有糖アルコールをHPLCで分離する方法 (10)、蛍光標識した酸性オリゴ糖をHPLCにより分離する方法 (14)、さらにHPAE-PAD (high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection)法 (15) という新しい分析法などが開発されつつある。しかし、いずれの手法も操作が煩雑であること、安全性に関して問題があること、高価であることなどの問題があり、糖の専門家以外の研究者にとっては、非常に困難な課題である。そこで著者は、ABEE-標識法を用いてシアル酸含有オリゴ糖を調製し、それをHPLCにより分離分析する方法の開発を行った。

2-1 標準 ABEE-オリゴ糖

ヒト α_1 -酸性糖タンパク質 (α_1 -AGP)、ウシフェツイン (fetuin)、ヒト絨毛性腺刺激ホルモン (hCG) より、シアル酸含有オリゴ糖を調製した。

2-2 シアル酸含有 Asn-結合糖鎖の ABEE 標識 (16)

ヒドラジン分解により切りだしたオリゴ糖残査を50 μ lの水に溶解し、上述のABEE試薬200 μ lを加え80°Cで反応させる (1-2参照)。酸性糖鎖の場合、シアル酸の脱離を防ぐため、反応時間は30分とする。反応終了後、1mlの水とジエチルエーテルを加え過剰のABEEを抽出除去し、ABEE-標識オリゴ糖の精製のため水層画分をPRE-SEP C₁₈カートリッジカラム (Tessek) につけ水とアセトニトリルの混合液 (100:0), (95:5), (9:1), (4:1), (1:1) そして (0:100) で段階的に溶出させる。酸性オリゴ糖は、100:0と95:5画分に回収される。これを上述のように0.1Mピリジノー酢酸 (pH 4.0)で平衡化したBio-Gel P-4 (200-400メッシュ)カラム (1.0 x 45cm) につけ、同緩衝液で溶出し、紫外吸収のある画分を集める。

2-3 高速液体クロマトグラフィーの条件 (16)

ABEE-酸性オリゴ糖の分析には、陰イオン交換カラムと逆相カラムを使用する。陰イオン交換HPLCは、TSKgel DEAE-5PWカラム (0.75 x 7.5 cm, TOSOH) を使用して行う。溶出は、カラムを10 mM NaH₂PO₄で平衡化し、試料溶液を注入した後、10分間同溶液で洗浄溶出し、その後、40分後にNaH₂PO₄が170 mMの濃度になるようなグラジエントで、溶出速度0.5 ml/min、カラム温度25°Cで行う。ODSカラムによるシアル酸含有ABEE-オリゴ糖の分離分析は、Wakosil 5C18-200カラム (0.4 x 25cm) を用いて行う。ODSカラムの溶出は、溶出溶媒として、7%アセトニトリル/50mM NaH₂PO₄を使用し、流速0.8 ml/min、カラム温度35°Cで行う。検出は、304nmの紫外吸収による。

2-4 イオン交換 (DEAE-5PW) -HPLCによる分離 (16)

α_1 -酸性糖タンパク質由来のシアル酸含有ABEE-オリゴ糖の陰イオン交換-HPLCによる分離を図4に示す。SI-1~SIV-3の各ピークを分取し、それぞれの構造を1) ABEE-シアルオリゴ糖のFAB-MS分析、及びNMR分析、2) シアリダーゼ処理により得られた中性ABEE-オリゴ糖のHPLC分析、FAB-MS分析、NMR分析、及びメチル化分析、により調べた。その結果、SI、SII、SIII、及びSIV画分は、それぞれシアル酸を1、

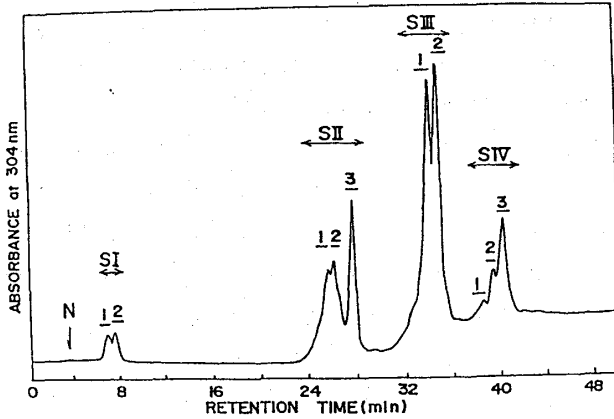


Fig. 4 HPLC of ABEE-sialyloligosaccharides obtained from α_1 -AGP on TSKgel DEAE-5PW.

2、3、及び4 モル含んでおり、DEAE-HPLCによる分離が、基本的には電荷にもとづいていることが明らかとなった。さらに、SI~SIV画分中のサブフラクションの分析結果から、同じ数のシアル酸を持つオリゴ糖は、さらにその分子量の差にもとづいて分離されており、しかも分子量の大きい順に溶出していることが明らかとなった(図4)。

2-5 逆相カラム (Wakosil 5C18-200) -HPLCによる分離 (16)

次に同じアシアロ骨格オリゴ糖構造を持ち、しかも同じ数のシアル酸を含むオリゴ糖をシアル酸の結合の種類や結合位置等にもとづいて更に分離するため、いくつかの標準物を調製して、ODSカラムを用いるHPLCによる分析を試みた。代表的なクロマトグラムを図5に示す。この結果、ABEE標識した酸性オリゴ糖は、次のように分離されることが明らかとなった。

1) 分子量の大きいものから順に溶出する、2) 同数のシアル酸が結合している場合、そのシアル酸が $\alpha 2-6$ 結合しているものの方が $\alpha 2-3$ 結合しているものより早く溶出する(図5-D、E、およびF参照)、3) 2本鎖糖鎖でシアル酸がMan($\alpha 1-3$)の枝に結合しているものはMan($\alpha 1-6$)の枝に結合しているものより早く溶出する(図5-F参照)。

従って、DEAE-5PWを用いる陰イオン交換-HPLCとWakosil 5C18-200を用いる逆相-HPLCを組み合わせることにより、ABEE-シアルルオリゴ糖が、それぞれの分子種により完全に分離できる可能性が示唆された。そこで、天然糖タンパク質の一種である α_1 -酸性糖タンパク質糖鎖の分析に本法を応用した。

2-6 α_1 -AGPのシアルルオリゴ糖鎖の分離

DEAE-5PWを用いるHPLCで単離した α_1 -AGP由来のシアルルオリゴ糖画分(SI-1~SIV-3)をODS

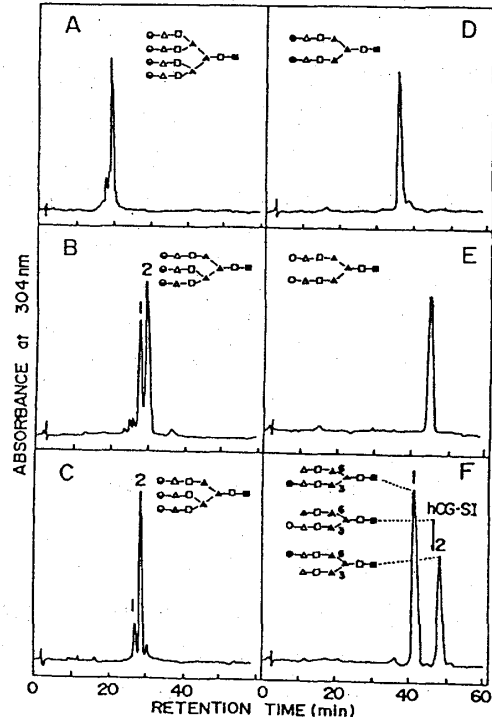


Fig. 5 HPLC of ABEE-sialyloligosaccharides on a Wakosil 5C18-200 column.

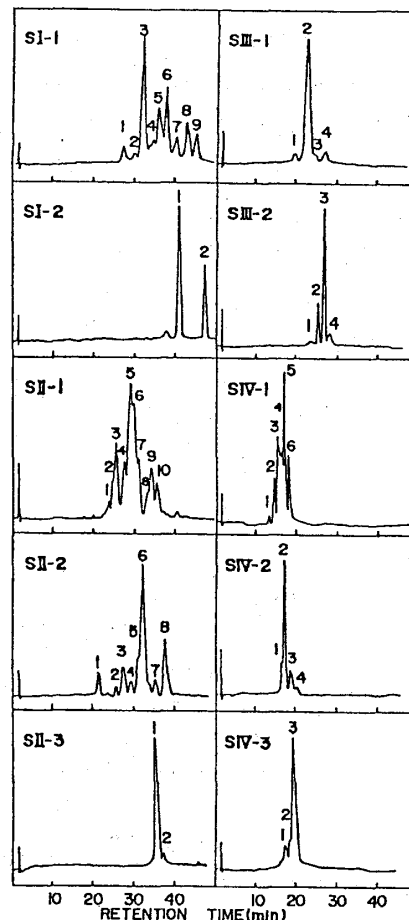


Fig. 6 HPLC analysis of ABEE-sialyloligosaccharides(SI-1~SIV-3) obtained from α_1 -AGP on a Wakosil 5C18-200 column.

(Wakosil 5C18-200) カラムを用いる HPLC で分離した。

その結果、図 6 に示したように α_1 -AGP 由来の ABEE-シアリルオリゴ糖は、実に 46 種類もの分子種に分離された。それぞれのピークを単離し、FAB-MS、メチル化分析、そして NMR により構造解析を行ったところ ABEE-シアリルオリゴ糖は、オリゴ糖の大きさ、シアリル酸の数、シアリル酸の結合様式、シアリル酸の結合位置にもとづいて高度に分離されていることが確認できた。

以上の結果から、本法は、シアリル酸含有オリゴ糖の非常に優れた分析法であると認められた。

3. O-グリコシド結合糖鎖の分析法の開発

糖タンパク質から β -elimination によって切り出されたオリゴ糖は、その過程で還元を受け、還元末端は糖アルコールとなっている。そこで、還元糖アルコールの還元末端残基だけを限定的に過ヨウ素酸で酸化し、アルデヒドとすれば、ABEE で標識出来るとの考えにもとづいて実験を進めた (図 7)。

3-1 限定過ヨウ素酸酸化と ABEE 標識 (17,18)

GlcNAc β 1-4GlcNAc-ol を用いて反応条件を検討した結果、次の条件が最適であった。オリゴ糖アルコール

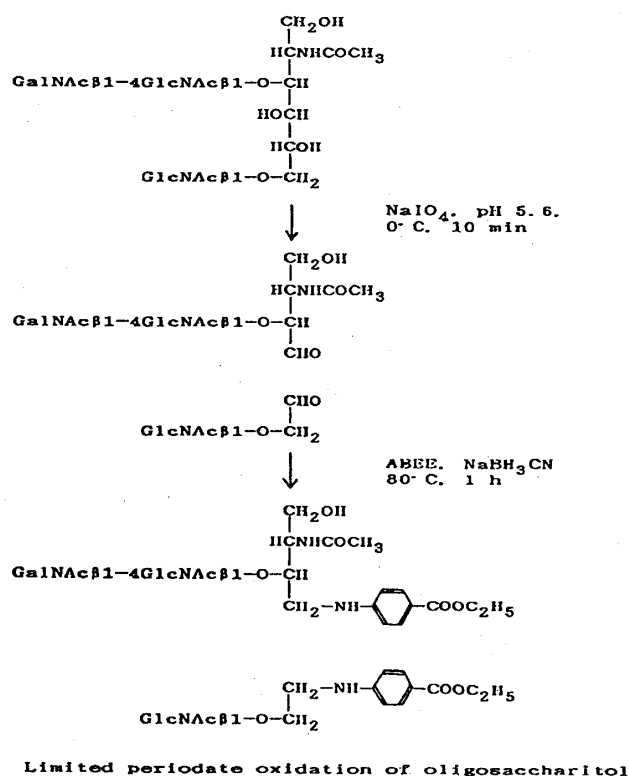


Fig.7 Schematic procedure for limited periodate oxidation of oligosaccharitol and derivatization with ABEE.

(0.1 μ mol) を 20 μ l の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.6、0.15M の NaCl を含む) に溶解し、等モル量のメタ過ヨウ素酸ナトリウムを加え、0°C で 10 分間放置し酸化する (19)。反応液に 10 μ l の 10mM エチレングリコールを加えて反応を止めた後、凍結乾燥する。生成物を 40 μ l の水に溶解し、160 μ l の ABEE 化試薬を加え、80°C で 45 分間加熱する。窒素気流下で乾燥後、1ml の水を加え、1ml のエーテルで 4 回抽出し、過剰の ABEE を除去する。水層画分を PRE-SEP C₁₈ (Tessek) のカートリッジカラムにかけ、304nm の紫外吸収をモニターしながら水とアセトニトリルの混合液 (100:0, 95:5, 9:1, 4:1, 1:1, 0:100) で順次溶出し、ABEE 標識オリゴ糖を精製する。中性オリゴ糖は、9:1~4:1 画分に、酸性オリゴ糖は、100:0~95:5 画分に溶出される。反応収率は 90% 以上であった。

3-2 高速液体クロマトグラフィーによる分離

こうして得られた中性 ABEE 誘導体は、Asn-結合糖鎖分析に用いた条件 (1-3 参照) で分析を行うと、分子量、構造の違いにもとづいて良く分離され、しかも高感度に検出できることが明らかとなった。

II 糖鎖構造解析への ABEE 標識法の応用

1. ABEE 標識法の O-グリコシド結合糖鎖解析への応用 —ホヤ喘息抗原 (H 抗原) のアレルゲン

活性糖鎖の構造解析 (18, 20) —

ホヤ喘息とは、広島特産カキのむき身作業員に多発する典型的な即時型のアレルギー性喘息症で、広島県内の患者数は 2000 名におよぶものと推定されている。本症はカキ殻に着生する原索動物「ホヤ」の体液成分に原因している。ホヤには、これを海中から引き上げると、その体液を吐出する性質がある。このためカキ棚を引き上げる際、カキ棚についたホヤが体液を吐出し、それがカキ殻に付着し、カキのむき身作業中にこれが飛沫となって飛散する。この体液飛沫を繰り返し吸入することによって、作業員は免疫感作を受け、ホヤアレルギーを発症することになる。

このように、ホヤ喘息は、その原因と発症および治療についての因果関係が明確であることから、天然物に原因する多数のアレルギー性疾患についての研究の絶好なモデル系と考えられる。従って、このホヤ喘息における発症と治療の関係を生化学並びに免疫学の面から解明できれば、その知見は、アレルギー一般の治療法開発に有力な手がかりを与えるものと考えられる。

広島大学の岡らのグループは、ホヤ喘息の原因となる 4 種の抗原成分 (Gi-rep, Ei-M, DIIIa, H-抗原) が、

いずれも酸性糖タンパク質であり、そのO-グリコシド糖鎖に共通の抗原決定基 (α 型決定基) が存在していることを示唆する結果を得ていた (17, 21)。しかし、優れたO-グリコシド糖鎖の解析法が無いことなどの理由で、アレルゲン活性糖鎖の完全構造の解析が出来ず、エピトープ構造の解明には至っていなかった。

そこで、ホヤ体液中に多量に存在するH-抗原のアレルゲン活性糖鎖の完全構造を上記述べた新しい解析法を用いて解析し、化学構造とアレルゲン活性との相関を考察した。

1-1 アレルゲン活性O-グリコシド中性糖鎖の単離

H-抗原 30g をプロナーゼ消化して得た糖ペプチド画分を、Sephacrose 6B カラムにかけ、二つの画分 HPG と HPS に分けた。それぞれの画分を透析した後、凍結乾燥して 2.2g と 3.8g を得た。両画分ともホヤ喘息患者に対するアレルゲン活性 (*in vivo*) は、保持していたが、岡らにより調製されていた抗原成分 Gi-rep に対する抗血清 (抗 Gi-rep 血清とよぶ) に対する抗原活性 (*in vitro*) は、HPG 画分のみ認められた (表 2)。組成分析の結果、HPG 画分には、O-グリコシド糖鎖に由来すると考えられる GalNAc 残基と Ser、Thr の量が多く、HPS 画分では、反対に N-グリコシド糖鎖中に存在する Man 残基が多量に含まれていた。

そこで、抗原活性の存在する HPG 画分 (0.5g) から β -elimination により O-グリコシド糖鎖を切り出し、生成物を Ultrogel AcA54 カラムにかけて遊離した糖鎖を精製した。得られた O-グリコシド糖鎖 (HPG- β 2 と命名) を、QAE-Sephadex (Cl) カラムにかけ中性オリ

ゴ糖 (HPG- β 2-N 画分と命名) を得た。

中性オリゴ糖 (67 mg) を Bio-Gel P-4 カラム (2.6 x 200 cm) にかけて、図 8 に示したように HPG- β 2-N1~N14 の 14 成分に分離した。

さらに、それぞれの画分を Tskgel Amide-80 column (4.6 mm x 25 cm) と YMC Pack AL-312 ODS column (6.0 x 150 mm) を用いる HPLC で分離精製し、12 種の純粋なオリゴ糖を得た。

1-2 O-グリコシド中性糖鎖の構造解析

単離したオリゴ糖の構造は次の方法により、表 3 に示すように決定できた。

1) 糖組成分析、2) メチル化分析、3) FAB-MS 分析、4) 限定過ヨウ素酸酸化-ABEE-誘導体の HPLC

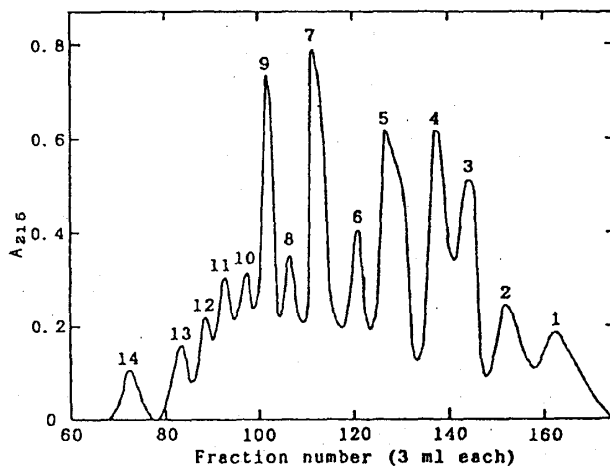


Fig. 8 Bio-gel P-4 column chromatography of HPG- β 2-N.

Table II

ALLERGENIC AND ANTIGENIC ACTIVITIES OF THE FRAGMENTS DERIVED FROM H-ANTIGEN BY PROTEOLYTIC AND ALKALI TREATMENTS

Sample	Allergenic activity detected by skin test								Specific antigenicity assayed by RIA as		
	a	b	c	d	e	f	g	h	Gi-rep (g/g)	Ei-M (g/g)	DIIIa (g/g)
H-antigen									1.05	<0.01	<0.01
HPG	+	+	++	+	+	+	++	±	0.81	0.03	<0.01
HPG- β 1				++	+	+	+	+	0.05	<0.01	<0.01
HPG- β 2				+	+	+	±	+	<0.01	<0.01	<0.01
HPG- β 2-N				+	+	+	±	+	<0.01	<0.01	<0.01
HPS	+	+	++	+					0.04	0.02	<0.01
Gi-rep	+	+	+	++	+	++	+	+	1.00	<0.01	<0.01
Ei-M	+	++	+						0.05	1.00	<0.01
DIIIa	++	+	++						0.05	0.63	1.00

Note. Allergenic activity was examined by direct skin test against patients (a-h) with sea squirt allergy by injecting 2 μ g each of HPG- β 1, HPG- β 2, and HPG- β 2-N in 20 μ l of 0.9% NaCl, or 1 μ g each of HPG, HPS, Gi-rep, Ei-M, and DIIIa. However, highly heterogenous H-antigen was omitted from the *in vivo* test to avoid unexpected trouble. When erythema, appearing after 15 min, was 0 to 10, 10 to 20, 20 to 30, 30 to 40, and >40 mm in diameter, symbols of -, ±, +, ++, and +++ were assigned, respectively; no symbol means that skin test was not done. The antigenic activities were assayed *in vitro* against three rabbit antisera, anti-Gi-rep, anti-Ei-M, and anti-DIIIa, by the RIA method (21) and the specific antigenicity is represented by the amounts of corresponding antigens on a weight basis.

Table III

Structures of 12 Neutral Oligosaccharitols Obtained from a Sea Squirt H-Antigen.

Preparation	Allergenicity detected by skin test	Structure
1. HPG- β 2-N1	—	GalNAc-ol
2. HPG- β 2-N2	—	GalNAc α 1-2Fuc-ol
3. HPG- β 2-N3	—	GlcNAc β 1-3GalNAc-ol
4. HPG- β 2-N4a	—	GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3GalNAc-ol
5. HPG- β 2-N4b	±	GalNAc β 1-4 GalNAc β 1-3GlcNAc β 1-3GalNAc-ol
6. HPG- β 2-N5a	+	GalNAc β 1-4 GalNAc α 1-2Fuc α 1-3GlcNAc β 1-3GalNAc-ol
7. HPG- β 2-N5b	—	(C ₆ H ₅ O ₂) β 1 GalNAc α 1-2Fuc α 1-3,4GlcNAc β 1-3GalNAc-ol
8. HPG- β 2-N6	+	GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3 GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-6GalNAc-ol
9. HPG- β 2-N7a	+	GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3 GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-6GalNAc-ol
10. HPG- β 2-N7b	+	Fuc α 1-3 GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3 Fuc α 1-3 GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-6 GalNAc-ol
11. HPG- β 2-N8	+	GalNAc1-3GalNAc1 GalNAc1-2Fuc1-3,4GlcNAc1-3,6GalNAc-ol Fuc1
12. HPG- β 2-N9	+	GalNAc β 1-4 GalNAc α 1-2Fuc α 1-3GlcNAc β 1-3 GalNAc β 1-4 GalNAc-ol GalNAc α 1-2Fuc α 1-3GlcNAc β 1-6

分析、5) 限定過ヨウ素酸化-ABEE-誘導体の段階的酵素消化、6) 500MHz ^1H NMR (表4、5)。紙面の都合上、一例として HPG- β 2-N5a の構造解析法についてのみ記述する。

HPG- β 2-N5a 画分は、糖組成分析と FAB-MS 分析 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 979) の結果から、GalNAc, GlcNAc, Fuc と GalNAc-ol が 2:1:1:1 からなる五糖アルコールの糖鎖であることが明らかになった。さらに図9-Aに示したように、この糖鎖の完全メチル化物を FAB-MS で分析したところ、上記の五糖に相当する m/z 1217 の分子イオンピーク ($[\text{M}+\text{H}]^+$) に加えて m/z 260, 434, 924 のフラグメントイオンピークが検出された。したがって、非還元末端側からの糖配列が、HexNAc-Fuc-(HexNAc)-HexNAc-であることが推定された。メチル化分析により、非還元末端 GalNAc が 2 モル、2 位置換 Fuc が 1 モル、3,4 位二置換 GlcNAc、3 位置換 GalNAc-ol がそれぞれ 1 モル検出された。これらの結果より、この画分の糖配列は、GalNAc1-2Fuc1-(GalNAc1-)₃4GlcNAc1-3GalNAc-ol であると考えられた。

次に、この画分の糖鎖を限定酸化分解し、ABEE で標識して ABEE-標識オリゴ糖を調製した。この ABEE-オリゴ糖は、ODS カラムを用いる HPLC で単一のピーク

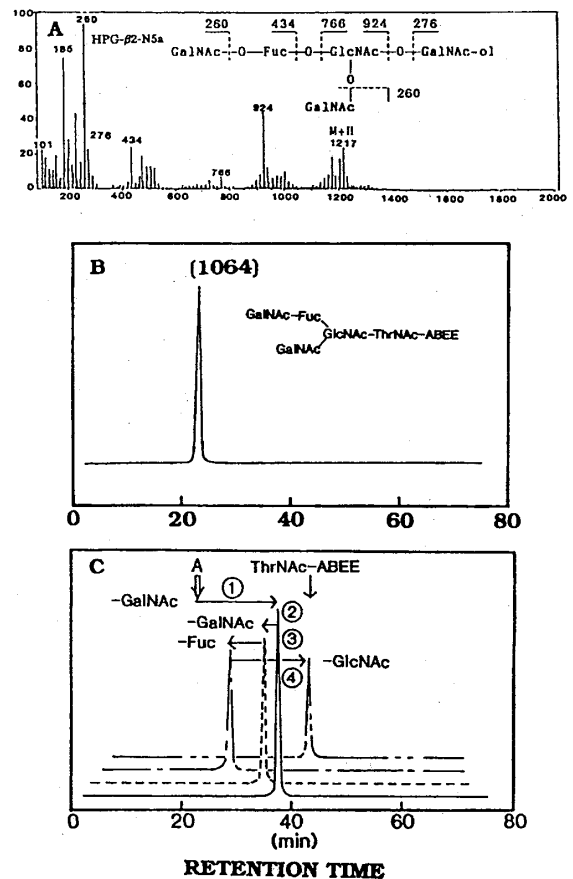







Fig.9 Structural analysis of HPG- β 2-N5a.

Table IV
¹H Chemical Shift of Major Structural Reporter-Group Protons of Constituent Monosaccharides
 for Neutral Oligosaccharitols Obtained from H-Antigen

		Chemical shift in compounds, HPG-β2-						
								
Residue	Reporter group	ppm						
GalNAc-ol	H-2	4.291	4.291	4.237	4.283	4.283	4.283	4.240
	H-5	4.146	4.140	4.103	4.232	4.231	4.237	4.189
GlcNAc ³	H-1	4.606	4.612	4.570	4.599	4.599	4.599	4.544
GalNAc ^{3,3}	H-1	—	4.511	4.477	4.508	4.509	4.439	4.462 ^f
Fuc ^{3,3}	H-1	—	—	5.333 ^g	—	—	5.136	5.338
	H-2	—	—	3.96	—	—	ND ^f	ND ^f
	H-5	—	—	4.837	—	—	4.866	4.837
	Me	—	—	1.268	—	—	1.268	1.261
GalNAc ^{2,3,3}	H-1	—	—	5.401 ^d	—	—	—	5.394
	H-2	—	—	4.216	—	—	—	4.212
GlcNAc ⁶	H-1	—	—	—	4.537	4.529	4.527	4.490
GalNAc ^{6,6}	H-1	—	—	—	4.524	4.462	4.458	4.439 ^g
Fuc ^{3,6}	H-1	—	—	—	—	5.126	5.126	5.328
	H-2	—	—	—	—	ND ^f	ND ^f	ND ^f
	H-5	—	—	—	—	4.867	4.866	4.837
	Me	—	—	—	—	1.268	1.268	1.261
GalNAc ^{2,3,6}	H-1	—	—	—	—	—	—	5.394
	H-2	—	—	—	—	—	—	4.212
	NAc ^e	2.040 (1) ^h	2.038 (1)	2.043 (2)	2.043 (1)	2.047 (1)	2.042 (1)	2.039 (3)
		2.087 (1)	2.071 (1)	2.080 (1)	2.059 (1)	2.049 (1)	2.053 (2)	2.073 (2)
			2.081 (1)	2.092 (1)	2.075 (3)	2.076 (3)	2.071 (1)	2.082 (2)
							2.080 (1)	

Note. Chemical shifts are given relative to internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate (using internal acetone at $\delta = 2.225$ ppm) in ²H₂O at 25°C. For complete structures of compounds, see Table III. In the heading, the structures are represented as follows: ○, GalNAc-ol; ●, GlcNAc; ■, GalNAcβ1-4; □, GalNAcα1-2; ▲, Fucα1-3.

^a NMR characteristics matched those documented previously (22, 23) for this structure.

^b Signals were assigned by comparison with the spectrum of HPG-β2-N3.

^c This signal was connected to the signal at $\delta = 3.96$ ppm that is assignable to H-2 of Fuc (22, 23) in a 2D-COSY NMR.

^d This signal was connected to the signal of H-2 of α-GalNAc at $\delta = 4.216$ ppm (22, 23).








^e Assignments are interchangeable.

^f Value could not be determined.

^g Acetyl methyl protons could not be assigned due to lack of reference oligosaccharitols.

^h Numbers in parentheses indicate the number of monosaccharide residues.

Table V
¹H-Chemical Shift of Major Structural Reporter-Group Protons of the ABEE-Derivatized
 Limited Periodate Oxidation Products

		Chemical shift ^a in compounds, HPG-β2-						
								
Residue	Reporter group	ppm						
ThrNAc	NAc	2.013	2.011	2.000	2.002	—	—	—
GlcNAc ³	H-1	4.595	4.596	4.592	4.542	4.527	4.522	4.484
	NAc	2.073	2.074	2.055	2.076 ^c	1.832	1.815	1.862
GalNAc ^{4,3}	H-1	—	4.536	4.483	4.516	4.511	4.448	4.456
	NAc	—	2.065	2.035	2.076	2.065	2.035	2.065 ^c
Fuc ^{3,3}	H-1	—	—	5.114	5.315	—	5.073	5.295
	Me	—	—	1.264	1.258	—	1.251	1.248
GalNAc ^{2,3,3}	H-1	—	—	—	5.402	—	—	5.387
	H-2	—	—	—	4.144	—	—	4.196
	NAc	—	—	—	2.023 ^c	—	—	2.031 ^c

Note. For complete structure of compounds, see Table III. Details are as in Table IV.

^a Data were obtained at 500 MHz in ²H₂O solution at 25°C.

^b R = ThrNAc-ABEE, R' = GA-ABEE.

^c Assignments are interchangeable.

クを与え (図9-B)、その FAB-MS スペクトルは、GalNAc-(GalNAc-Fuc)-GlcNAc-ThrNAc-ABEE に相当する分子イオンピーク m/z 1064 ($[M-H]^-$) とフラグメントイオンピーク m/z 861 と 715 を示した。この結果、GalNAc-(GalNAc-Fuc)-GlcNAc-の糖配列構造が、GalNAc-ol の 3 位に結合していることが確認できた。

次に、結合様式を調べるために、得られた ABEE-オ

リゴ糖の段階的な酵素消化を行い、各段階での生成物を ODS-HPLC (図9-C) と FAB-MS で分析した。まず、この ABEE-オリゴ糖 (HPG-β2-N5a-A) の β-N-acetylhexosaminidase 消化物は、ODS カラムで単一なピークを与え、FAB-MS 分析において GalNAc-Fuc-GlcNAc-ThrNAc-ABEE に相当する分子イオンピーク m/z 861 ($[M-H]^-$) を検出した。このことは、非還元

末端GalNAc 2残基のうち一方は、 β -結合であることを示している。この β -N-acetylhexosaminidase消化物は、 α -N-acetylgalactosaminidase (*Acremonium sp.*) には感受性であったが、 α -L-fucosidase (bovine kidney) には抵抗性を示した。この α -N-acetylgalactosaminidase消化物は、FAB-MS分析で、Fuc-GlcNAc-ThrNAc-ABEEに相当する分子イオン m/z 658 ([M-H]⁻) を与えた。このことは、もう1つの非還元末端GalNAcが、Fuc残基に α -結合していることを示している。 α -N-acetylgalactosaminidase消化により得られたこのABEE-オリゴ糖は、 α -L-fucosidaseによる消化を受け、ODS-HPLCでHPG- β 2-N3から得られたGlcNAc β 1-2ThrNAc-ABEEと同じ位置に溶出した。そして、最終的にこの α -L-fucosidase消化物は、 β -N-acetylhexosaminidaseによりThrNAc-ABEEに相当する成分にまで消化された。

HPG- β 2-N5a-Aとその β -N-acetylhexosaminidase消化物のメチル化分析により、酵素消化以前の糖鎖では、GlcNAc残基は、3,4位二置換であったが、 β -N-acetylhexosaminidase消化による非還元末端の β -結合GalNAc残基の脱離により、3位置換GlcNAcに変化していることがわかった。これらの結果から β -結合GalNAc残基は、GlcNAc残基の4位に結合していることが明らかとなった。以上の結果を総合してHPG- β 2-N5a画分の糖鎖は、表3に示したように、GalNAc β 1-4(GalNAc α 1-2Fuc α 1-3)GlcNAc β 1-3GalNAc-olであると推定できた。

さらにこれを確かめるため、500MHzプロトンNMRで分析した(表4、5)。HPG- β 2-N5aのNMRスペクトルでは、2つの α -アノメリックプロトンと2つの β -アノメリックプロトンシグナルが、 δ = 5.3-5.4 ppmと δ = 4.4-4.6 ppmに観測された。しかし、これらのアノメリックプロトンシグナルの帰属は、参照できる標準オリゴ糖アルコールがないため、非常に困難であった。そこで、GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-の二糖のGlcNAc残基の3位にFuc α 1-、またはGalNAc α 1-2Fuc α 1-が結合したとき、骨格をなしているGalNAc β 1-4GlcNAc β 1-のアノメリックプロトンのケミカルシフト値が受ける影響を調べるため、限定過ヨウ素酸化物のABEE-誘導体オリゴ糖のNMRスペクトルを測定した。その結果、GlcNAc²に α 1-3結合でFucが結合すると(HPG- β 2-N4a-AからHPG- β 2-N7b-Aへの関係、及びHPG- β 2-N6-BからHPG- β 2-N7a-Bへの関係)、GlcNAc²のH-1プロトンは、若干高磁場へ($\Delta\delta \approx -0.005$ ppm)、GalNAc^{4,2}のH-1プロトンは、比較的大きく高磁場へ($\Delta\delta \approx -0.05 \sim -0.06$ ppm)シフトすることが認められた。このFuc α 1-残基にさらに α 1-2結合GalNAcが結

合すると(HPG- β 2-N7b-AからHPG- β 2-N5a-Aへの関係、HPG- β 2-N7a-BからHPG- β 2-N9-Bへの関係)、GlcNAc²のH-1は高磁場へ($\Delta\delta \approx -0.04 \sim -0.05$ ppm)、そしてGalNAc^{4,2}($\Delta\delta \approx +0.01 \sim 0.03$ ppm)とFuc^{3,2}($\Delta\delta \approx +0.2$ ppm)のH-1は低磁場へシフトすることが明らかとなった。

これらの関係を考慮して、HPG- β 2-N5aのスペクトルで観測された δ = 4.570 ppm (J=8.55 Hz)と δ = 4.477 ppm (J=8.24 Hz)のアノメリックプロトンのシグナルは、それぞれ β -GlcNAc³と β -GalNAc^{4,3}のH-1プロトンと帰属できた。

α アノメリックプロトン領域の2つのシグナルは、2次元NMR (2D-COSY) スペクトルの結果にもとづいて帰属した。すなわち、最も低磁場に観測された δ = 5.401 ppm (J=3.66 Hz)のシグナルは、文献値(22)から α 結合したGalNAcのH-2のシグナルであると予想される δ = 4.216 ppmのシグナルとクロスピークを生じた。さらに、もう1つの δ = 5.333 ppmのシグナルは、FucのH-2のプロトンと推定される(23) δ = 3.96 ppmのシグナルとのクロスピークが観測された。従って、 δ = 5.401 ppmのシグナルが α -GalNAcのH-1プロトンで、 δ = 5.333 ppmのシグナルが α -FucのH-1プロトンであると帰属した。

δ = 4.237 ppmと δ = 4.103 ppmのシグナルは、そのケミカルシフト値、及び分裂パターンから、容易にGalNAc-olのH-2とH-5のプロトンシグナルと帰属できた。これらの実験結果から、HPG- β 2-N5aの構造を表3に示したように決定した。他のオリゴ糖についても同様な方法で構造解析を進めたが、ここでは、表4と5にNMRのデータを示すにとどめる。

1-3 糖鎖構造とアレルギー活性の相関

単離した12種類の糖鎖のアレルギー活性を調べたところ(表3)、HPG- β 2-N4b以上の比較的高分子量の7種類の糖鎖には、活性が認められたが、低分子量画分の5種類については、活性が認められなかった。活性を保持している糖鎖は、すべて分岐構造をしており、非還元末端に2モル以上のGalNAc残基をもっていた。皮内反応試験によるアレルギー反応は、特異IgE抗体が各アレルギー活性糖鎖により架橋されることにより生ずるので、糖鎖が活性を示すには、2つかそれ以上のエピトープを持っていなければならないと考えられる。したがって、GalNAc α 1-2Fuc α 1-、及びGalNAc β 1-4GlcNAc β 1-の2種類の二糖構造が、ホヤ抗原のアレルギー特異的なエピトープとなっているものと推測される。代表的なアレルギー活性糖鎖であるHPG- β 2-N5aの構造は、他のホヤ抗原であるGi-repからも見いだされている

(17)。

なお、ここに報告した糖鎖は、全て今まで報告されておらず、新規な物質であり、しかも哺乳類のO-グリコシド糖鎖とは全く異なっている。

2. ABEE 標識法の Asn-結合中性糖鎖構造解析への応用 — 鶏卵黄抗体 (IgY) の Asn-結合糖鎖の 構造解析 (24) —

著者らは、八田らの報告 (25) にしたがって、ホヤ抗原で鶏を免疫し卵黄抗体の調製を試みた結果、血清中の抗ホヤ抗体価は上昇したが、卵黄中の抗体価の上昇は確認できなかった。

成鶏血清には IgG, IgM, IgA の 3 種の免疫グロブリンが存在し、このうち IgG が母子免疫の伝達手段として、血清から卵胞の濾胞上皮によって発育卵黄嚢に移行し、結果として初成雛血中に移行することが知られている (26)。しかし、上記の結果は、全ての IgG が卵黄に移行するものではなく、この移行には何らかの制御機構が働いていることを示すものである。

血清 IgG と卵黄 IgY の物理的及び免疫学的性状の差異についてはかなり調べられており、両者は分子量的にも、また抗原に対する結合能の点でも大差なく、区別することはむずかしいと報告されている (27)。しかし、糖組成の点では、IgY と IgG の間にはかなりの差異がみられている。このことは、糖鎖が、血清 IgG の濾胞上皮中の Fc 受容体との結合や卵黄嚢への移行になんらかの影響を与えている可能性を示唆するもので、糖鎖構造の詳細な解析が求められている。

人をはじめ哺乳類の免疫グロブリンの糖鎖構造は、最近次々に解明され、さらに補体活性化、抗体分子の分泌、マクロファージ Fc レセプターへの結合などに糖鎖が関与していることが明らかにされつつある (28)。しかし、鳥類の免疫グロブリンの物理学的性状は、人の免疫グロブリンとはかなり異なっていることは知られているが、糖鎖構造についての研究は行われていない。鳥類は、系統発生上魚類と哺乳動物の中間に位置し、免疫機能の発達の歴史を知るのに重要な位置を占めているので、糖鎖の構造という観点からの比較も重要である。

2-1 卵黄抗体 (IgY) の調製と糖鎖の分離

卵黄抗体 (IgY) は、市販の卵の卵黄から八田らの方法により自然抗体として調製した (25)。こうして得た IgY より前章で述べた方法 (I-2-2 参照) でオリゴ糖を切り出し、さらに、ABEE で標識し、PRE-SEPC₁₈ カートリッジカラムと Bio-Gel P-4 カラムで精製した。精製した ABEE-オリゴ糖は、まず、DEAE-5PW の陰イオン交換カラムを用いる HPLC で分画した (I-2-3 参照)。

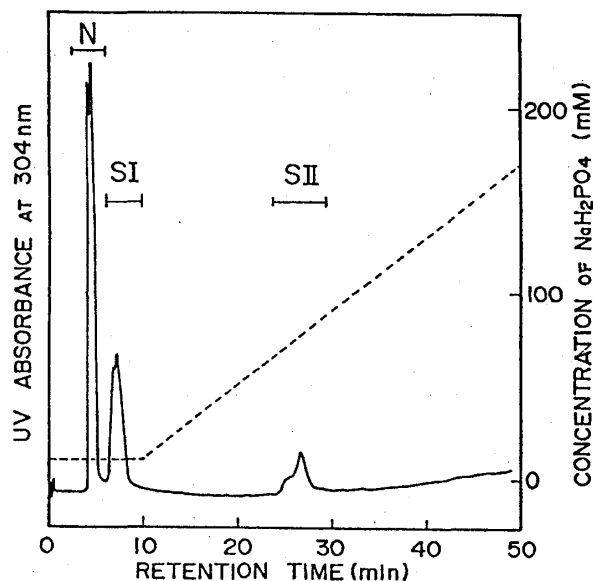


Fig. 10 Ion-exchange HPLC of ABEE-oligosaccharides obtained from hen egg-yolk immunoglobulin (IgY).

その結果、図10に示したように中性画分 (N) と 2 つの酸性画分 (SI, SII) に分離された。それぞれの成分の割合は、N画分が 60.2%、SI画分が 32.3%、SII画分が 7.5%であった。SI と SII 画分の溶出位置は、それぞれモノ、ジシアロ ABEE-オリゴ糖鎖の溶出位置に相当した。さらに両酸性画分をシアリダーゼ処理すると、DEAE-HPLC ですべて中性成分に移動したことから、酸性基は、すべてシアル酸であることがわかった。本研究では、中性画分 (N)、および脱シアル酸により得た中性画分 (SIN 及び SIIN) の構造解析を行った。

中性 ABEE-オリゴ糖画分 (N) は、逆相カラムである Wakosil 5C18-200 で分画したところ図 11 に示すように分離された。25分から30分の間に溶出したオリゴ糖は、コンカナバリン A (Con-A) のレクチンカラムに強く吸着し、100 mM の α -メチルマンノシド含有溶液で溶出されることから、高マンノース型糖鎖であると推測される。この高マンノース型オリゴ糖を NM 画分と命名した。高マンノース型糖鎖は、ODS-HPLC で完全には分離できないので、Amide-80 カラムを用いる HPLC で分離したところ、6 つの成分に分離した (NM-a~f、図 12)。このうち NM-a~e 画分の溶出位置は、標準高マンノースオリゴ糖 (糖鎖 35-39) と同じであることから、Hex₅₋₉GlcNAc₂-ABEE に相当すると推定された。NM-f 画分の成分は、Amide-80 カラムによる溶出位置から、Man₉GlcNAc₂-ABEE よりも Hex 残基 1 個分だけ大きい糖鎖と推定された。

ODS カラム (図 11) で 50 分以降に溶出するオリゴ糖 (NC 画分と命名) は、3 つの成分 (NC-a~c) に分離されており、その溶出位置は、標準糖鎖の 24, 25, 27

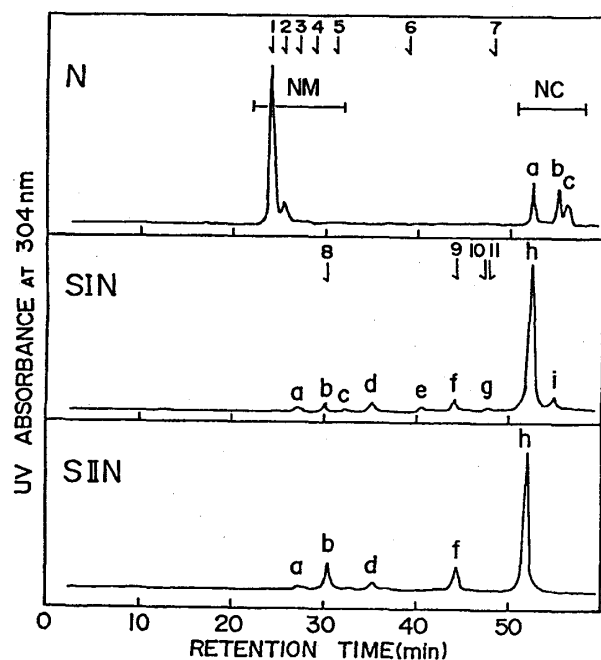


Fig.11 ODS-HPLC of neutral ABEE-oligosaccharides derived from hen IgY.

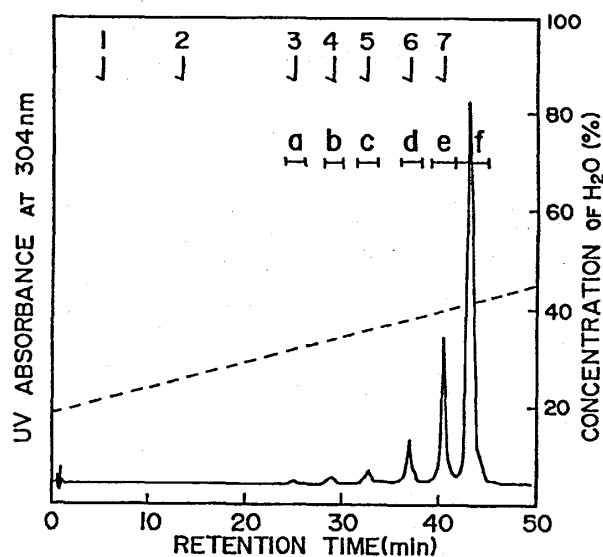
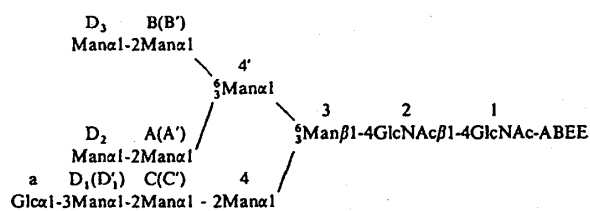


Fig.12 HPLC analysis of the pooled ABEE-oligosaccharides in group NM.

Table VI

¹H chemical shifts of structural-reporter groups for the ABEE derivatives of oligosaccharides.



Reporter group	Residue	Chemical shifts* (ppm) in			
		NM-f GlcMan ₉ GN ₂ -ABEE	NM-e GlcMan ₉ GN ₂ -ABEE Man ₉ GN ₂ -ABEE	NM-d GlcMan ₉ GN ₂ -ABEE Man ₉ GN ₂ -ABEE	
H-1	GlcNAc-2	4.619	4.617	4.617	
	Man-3	4.762	4.763	ND ^b	
	Man-4	5.337	5.336	5.338	
	Man-4'	4.867	4.865	4.867	
	Man-A, (-A) ^c	5.403	5.402, (5.083)	5.403, (5.082)	
	Man-B, (-B) ^c	5.144	5.143, (4.903)	5.144, (4.904)	
	Man-C	5.309	5.308	5.307	
	Man-D ₁ , (-D ₁) ^c	5.039	5.037, (5.052)	5.037, (5.056)	
	Man-D ₂	5.054	5.052	5.056	
	Man-D ₃	5.039	5.037	5.037	
	Glc-a	5.258	5.256	5.256	
	H-2	GlcNAc-1	4.342	4.336	4.338
		Man-3	4.216	4.215	4.215
		Man-4	4.091	4.090	4.090
Man-4'		4.152	4.151	4.151	
Man-A, (-A) ^c		4.112	4.108, (4.068)	4.109, (4.069)	
Man-B, (-B) ^c		4.016	4.018, (3.990)	4.017, (3.984)	
Man-C		4.112	4.108	4.109	
Man-D ₁ , (-D ₁) ^c		4.239	4.238, (4.068)	4.238, (4.069)	
Man-D ₂		4.070	4.068	4.069	
Man-D ₃		4.070	4.068	4.069	
NAc	GlcNAc-1	1.906	1.907	1.909	
	GlcNAc-2	2.057	2.055	2.057	

* Data were obtained at 500 MHz in ²H₂O solution at 25°C.

^b Value could not be determined merely by inspection of the spectrum.

^c A', B' and D₁' mean the mannose and glucose residue without Man-D₂, Man-D₃ and Glc-a, respectively.

に相当した (表1 参照)。

モノシアロおよびジシアロ ABEE-オリゴ糖より、シアル酸を除去して得た中性オリゴ糖画分 (それぞれ、SINとSIIN画分と命名した) の糖鎖は、ODS カラムにより、それぞれ9画分(SIN-a~i)と5画分(SNII-a, b, d, f, h) に分離された (図11)。

2-2 NM画分のABEE-オリゴ糖鎖の構造

主成分NM-d, e, fは、500MHz ^1H NMR および段階的酵素消化により、微量成分NM-a, b, cは、段階的酵素消化法により構造を調べた。表6にNMR分析の結果を、表7に構造を示す。

NM-fの ^1H NMRでは、 α -Man 8残基に相当するH-

1プロトンと α -Glc 1残基に相当するH-1プロトン ($\delta = 5.258$ ppm, $J=4.2$ Hz) シグナルが検出され、そのケミカルシフト値は、文献記載のGlc₁Man₉GlcNAc₂ (29) と完全に一致した。GlcNAc-1、GlcNAc-2およびMan-3のシグナル位置はABEEの影響により若干シフトしていると予想されるが、標準糖鎖1(M₁GN₁GN-ABEE) と2(M₃GN₁GN-ABEE) のスペクトルと2-アミノピリジン標識オリゴ糖鎖 (30) のスペクトルとの比較から、 $\delta = 4.619$ ppmと $\delta = 4.762$ ppmのシグナルは、それぞれGlcNAc-2とMan-3のH-1プロトンであり、 $\delta = 1.906$ ppmと $\delta = 2.057$ ppmのシグナルは、GlcNAc-1とGlcNAc-2のN-アセチルプロトンであると帰属出来た。

Table VII

Proposed structures of Asn-linked oligosaccharides obtained from hen egg-yolk immunoglobulin (IgY).

Structures ^a	Fraction No. ^b	Relative amount ^c		
		N	SIN	SIIN
	NM-f	21.4	-	-
	NM-e	4.4	-	-
	NM-d	1.3	-	-
	NM-e	5.7	-	-
	NM-d	1.9	-	-
	NM-c	0.7	-	-
	NM-b	0.2	-	-
	NM-a	<0.1	-	-
	NC-a	9.2	-	-
	SIN-h	-	25.7	-
	SIIN-h	-	-	5.8
	NC-b	8.5	-	-
	SIN-i	-	1.8	-
	NC-c	6.8	-	-
	SIN-f	-	1.6	-
	SIIN-f	-	-	0.8
	SIN-d	-	1.4	-
	SIIN-d	-	-	0.2
	SIN-b	-	0.8	-
	SIIN-b	-	-	0.7
uncharacterized Oligosaccharides ^d	NM-b	<0.1	-	-
	SIN-a, c, e, g	-	1.0	-
	SIIN-a	-	-	<0.1

^a R = -GlcNAc1-4GlcNAc, R' = -GlcNAc1-4(Fuca1-6)GlcNAc.

^b See Fig. 11 and 12.

^c relative amounts are expressed as percentage of the total oligosaccharides.

^d Structures could not be determined due to the limited amount available.

以上の結果から、NM-f画分の構造を表7に示したように決定した。

NM-e画分のNMRスペクトルは、NM-f画分で検出された11個のアノメリックプロトンシグナルに加えて2つの新しいアノメリックプロトンシグナルを、 $\delta = 5.083$ ppm、と $\delta = 4.903$ ppmに与えた(表6)。これらのシグナルは、文献値との比較より、それぞれMan-D2が結合していないMan-A及びMan-D3の結合していないMan-BのH-1のシグナル(Man-A', Man-B')と帰属でき(31)、Glc₁Man₈GlcNAc₂-ABEEが、オリゴ糖NM-fからMan-D2またはMan-D3のいずれかが欠損した構造であることを示唆している。さらに、 $\delta = 5.037$ ppmのシグナル(Man-D1, Man-D3)の強度が、NM-fのそれと比べて弱くなっていること、 $\delta = 5.052$ ppmのシグナル(Man-D1', Man-D2)が強くなっていることは、表7に示した構造のMan₈GlcNAc₂-ABEEが混在していることを示している(31)。さらに $\delta = 4.238$ ppm(Man-D1のH-2プロトン)のシグナルの強度がNM-fに比べて弱くなっていること、 $\delta = 3.990$ ppmにMan-B'のH-2プロトンと帰属できる新しいシグナルが検出されることは、Man-D3が欠損していることを示しており(31)、Glc残基が存在していることを示している。

以上の結果から、NM-e画分には、表7に示したGlc₁-Man₈GlcNAc₂-ABEEとMan₉GlcNAc₂-ABEEが含まれることが明らかとなった。その割合は、43:57であった。

NM-dの画分は、組成分析の結果から、少量のGlc残基が含まれること、FAB-MS分析の結果から、Glc₁Man₇GlcNAc₂-ABEEとMan₈GlcNAc₂-ABEEの糖鎖が混在していると推定された。このオリゴ糖のNMRスペクトル(表6)は、NM-e画分の糖鎖で検出されたアノメリックプロトンと同じシグナルを示した。さらに、データは示していないが、段階的酵素消化法により、上述の二種の構造を確認した。

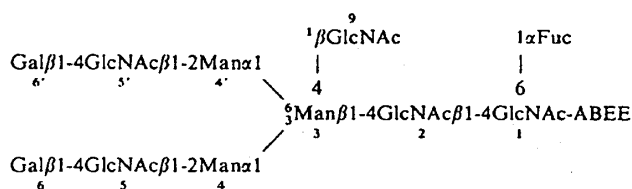
NM-a~c画分は、段階的酵素消化により、表7のように構造決定した(データは示していない)。

2-3 NC画分のABEE-オリゴ糖鎖の構造

NC-a~NC-c画分は、FAB-MS分析、糖組成分析並びにメチル化分析の結果と総合して、いずれもbisecting GlcNAcとFuc残基を含む2本鎖の複合型オリゴ糖であるが、非還元末端のGal残基数(0~2)に違いのあることが示唆された。さらに、Amide-80とODSカラムを用いるHPLC分析し、二次元マップ(図2)にプロットしたところ、それぞれ標準二本鎖複合型糖鎖24, 25, 27と一致した。

Table VIII

¹H chemical shifts of anomeric protons and methyl protons for the ABEE derivatives oligosaccharides.



Reporter group	Residue	Chemical shifts* (ppm) in				
		NC-a G ₂ ·GN ₃ ·M ₃ ·GN· F·GN-ABEE	NC-b G·GN ₃ ·M ₃ ·GN· F·GN-ABEE	NC-c GN ₃ ·M ₃ ·GN· F·GN-ABEE	G ₂ ·GN ₂ ·M ₃ · GN·GN-ABEE	G ₂ ·GN ₂ ·M ₃ · GN·F·GN-ABEE
H-1	GlcNAc-2	4.680	4.682	4.682	4.625	4.700
	Man-3	4.690	4.691	4.691	4.762	4.745
	Man-4	5.052	5.055	5.053	5.117	5.118
	Man-4'	4.998	4.999	4.989	4.925	4.924
	GlcNAc-5	4.565	4.551	4.545	4.576	4.577
	GlcNAc-5'	4.565	4.567	4.534	4.576	4.577
	Gal-6	4.463	-	-	4.467	4.464
	Gal-6'	4.463	4.466	-	4.467	4.464
	GlcNAc-9	4.463	4.457	4.456	-	-
	Fuc	4.849	4.854	4.853	-	4.850
NAc	GlcNAc-1	1.938	1.935	1.931	1.907	1.944
	GlcNAc-2	2.074	2.071	2.069	2.068	2.074
	GlcNAc-5	2.056	2.055	2.055	2.052	2.054
	GlcNAc-5'	2.033	2.030	2.038	2.043	2.044
	GlcNAc-9	2.066	2.065	2.065	-	-
Me	Fuc	1.120	1.121	1.122	-	1.129

*Data were obtained at 500 MHz in ²H₂O solution at 25°C.

これらの構造をさらに確認するために、 $^1\text{H NMR}$ による分析を行った。表8にこの3画分と標準物質(糖鎖11, 23)の structural reporter-group プロトン(H-1と CH_3 proton)のケミカルシフト値をまとめた。いずれのオリゴ糖もGlcNAc-1($\delta=1.931-8$ ppm)とGlcNAc-2($\delta=2.069-2.074$ ppm)の*N*-アセチルプロトン、GlcNAc-2($\delta=4.680-2$ ppm)、Man-3($\delta=4.690-1$ ppm)、Man-4($\delta=5.052-5$ ppm)とMan-4'($\delta=4.989-4.999$ ppm)のH-1プロトンに起因するシグナルを与えることから、これら3画分がすべて共通のコア構造Man α 1-6(Man α 1-3)1-4Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-ABEEを含んでいることがわかった。さらにいずれの画分のNMRスペクトルでも $\delta=2.065-6$ ppm(*N*-アセチルプロトン)と $\delta=4.456-63$ ppm(H-1プロトン)のシグナルが存在すること、さらにMan-3とMan-4残基のH-1に起因するシグナルが、標準糖鎖11と比べて、高磁場側へシフト($\Delta\delta\approx-0.06\sim-0.07$ ppm)していること、Man-4'残基のH-1シグナルが低磁場側へシフト($\Delta\delta\approx+0.07$ ppm)していることから、 β -結合Manの4位にいわゆる bisecting GlcNAc残基が結合していることが明かとなった(31)。 $\delta=1.120-2$ ppm(CH_3 プロトン)と $\delta=4.489-4.854$ ppm(H-1プロトン)のシグナルから、Fuc残基の存在が確認出来た(31)。さらにこれらのシグナル、及びGlcNAc-2のH-1とGlcNAc-1の*N*-アセチルプロトンシグナルが、標準糖鎖23($\text{G}_2\cdot\text{GN}_2\cdot\text{M}_3\cdot\text{GN}\cdot\text{F}\cdot\text{GN-ABEE}$)のそれとほぼ一致していることから、Fuc残基は還元末端のGlcNAcの6位に α -結合していることが証明された。

NC-aのスペクトルでは、この他に4残基分の β -アノメリックプロトンシグナルが観測され、このうち $\delta=4.463$ ppmのシグナルは、Gal-6とGal-6'のH-1プロトンと、 $\delta=4.565$ ppmのシグナルは、GlcNAc-5とGlcNAc-5'のH-1プロトンと帰属できる。以上のことから、NC-aのオリゴ糖構造は表7のように決定した。

NC-bのスペクトルで、GalのH-1プロトンに起因する $\delta=4.466$ ppmのシグナルの強度が低下していることから、NC-bは、NC-aの糖鎖からGal1残基が欠損したものであることが認められた。加えて、Man-4'のH-1シグナルが、NC-cのスペクトルと比べて、0.01 ppmだけ低磁場へシフトしていることから、Man-4'(Man α 1-6Man)の側鎖にGalが結合していると推定された(31)。

NC-cのスペクトルでは、Gal残基のH-1プロトンに由来するシグナルが完全に欠損し、しかもGlcNAc-5と-5'のH-1プロトンシグナルが、NC-a画分のそれと比べて高磁場側へシフトしている。このことは、NC-c

が、NC-bから非還元末端Galが除かれた構造であることを示している。さらに、これらのケミカルシフト値は、2-アミノピリジン誘導体のそれと一致した(30)。以上の結果よりNC-bとNC-cの構造を表7のように決定した。なお、これらの構造は、段階的酵素法によって確認したが、紙面の都合上データは示していない。

2-4 SIN、SIIN画分のABEE-オリゴ糖鎖の構造

SINとSIIN画分のWakosil 5C18-200カラムを用いるHPLCの結果を図11に示した。SIN-h及びSIIN-hは、酸性画分からシアリダーゼ処理によって得られる主要成分で、酸性画分の65%を占める。このABEE-オリゴ糖のODSカラムを用いるHPLCでの挙動とNMRのスペクトルは、NC-a画分のそれと一致した。これらの実験結果から、SIN-hとSIIN-hは、表7に示した構造であると確認出来た。その他の成分の構造は、段階的酵素消化法、二次元-HPLC法により表7に示したように決定した。

2-5 IgY糖鎖の特徴

卵黄抗体(IgY)由来のAsn-結合糖鎖の構造は、3つのタイプ、すなわちグルコースを含む高マンノース型($\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ 、全IgYオリゴ糖の27.1%を占める)、高マンノース型($\text{Man}_{5-9}\text{GlcNAc}_2$ 、全体の8.5%を占める)、そしてMan α 1-6($\pm\text{GlcNAc}\beta$ 1-4)(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4($\pm\alpha\text{Fuc}$ 1-6)GlcNAcの共通構造を持った二本鎖複合型(全体の64.3%)に分類される(表7)。これらのオリゴ糖うち、Man残基が7個または8個のグルコース含有高マンノース型の糖鎖は、今までに成熟タンパク質中の成分としてその存在が報告されていない。

$\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ に加えてMan残基を7個または8個持つグルコース含有高マンノース型の糖鎖が、成熟タンパク質中に存在することは、Asn-結合糖鎖の生合成とプロセッシングの過程に関して興味ある問題を提出した。グルコシル化された高マンノース型オリゴ糖は、Asn-結合糖鎖の生合成とプロセッシングの過程でキーとなる重要な中間体であることが知られている。一般的な生合成経路では、脂質(ドリコール)に結合した $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ がタンパク質に移された後、直ちに小胞体内で3つのグルコースが除去され、ついで α 1-2結合のマンノース5残基がゴルジ体でトリミングされる(32)。この過程では、 $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ は存在しない。Godelaineらは(33)、パルスーチェイス実験で、甲状腺細胞の小胞体中にタンパク質に結合した $\text{Glc}_1\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ の糖鎖が存在することを発見し、Asn-結合糖鎖のプロセッシングに別の経路がある可能性を示唆して

いる。彼らは、これらのオリゴ糖が、 $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ からグルコシダーゼとマンノシダーゼにより、グルコースとマンノースが切り離されて生成したものであろうと推定している。Trombettaらは (34)、これらの糖鎖が、生合成とプロセッシングの過程で糖タンパク質中の $\text{Man}_{7-9}\text{GlcNAc}_2$ 糖鎖への UDP-Glc からの Glc 残基の転移によって生じるという別のプロセッシング経路があり、これが哺乳類、植物、真菌、原生動物などの各種の生物の小胞体中でおこなわれていると報告している。IgY 中の Glc 含有高マンノース型オリゴ糖が、この Trombetta の報告している経路によって作られるのか、それとも $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ の $\alpha 1-2$ 結合 Man が、ゴルジ体でトリミングされることによって生じるのかを明らかにする必要がある。

ヒトの免疫グロブリン、IgD (35)、IgM (36)、及び IgE (37) には、高マンノース型と複合型の両方の糖鎖が存在しているが、IgG (28) 及び IgA (38) には、複合型の糖鎖しか存在していない。血清 IgG が卵黄に移行し

たものと考えられる IgY には、ヒト IgG とは異なり、高マンノース型と複合型の両方の糖鎖が存在していることは、非常に興味深いことである。さらに、ヒトの IgG に存在する糖鎖はすべて二本鎖複合型であり、1) bisecting GlcNAc と Fuc 残基の両方を含まないもの、2) bisecting GlcNAc は含むが Fuc を含まないもの、3) Fuc は含むが bisecting GlcNAc を含まないもの、及び 4) bisecting GlcNAc と Fuc 残基の両方を含むものの 4 種類に分類され、3) の Fuc は含むが bisecting GlcNAc を含まないものが主成分である (28)。しかし、IgY では、bisecting GlcNAc と Fuc 残基の両方を含む二本鎖の糖鎖が主成分であった。このことから、鳥類免疫グロブリンの糖鎖は、哺乳類のそれとは全く異なったものであると推測される。

また、血中の IgG が卵黄へそして初生ヒナへ移行する際に、糖鎖がどのように関与しているのかは今後の課題である (26)。現在、血清 IgG の糖鎖構造について解析中である。

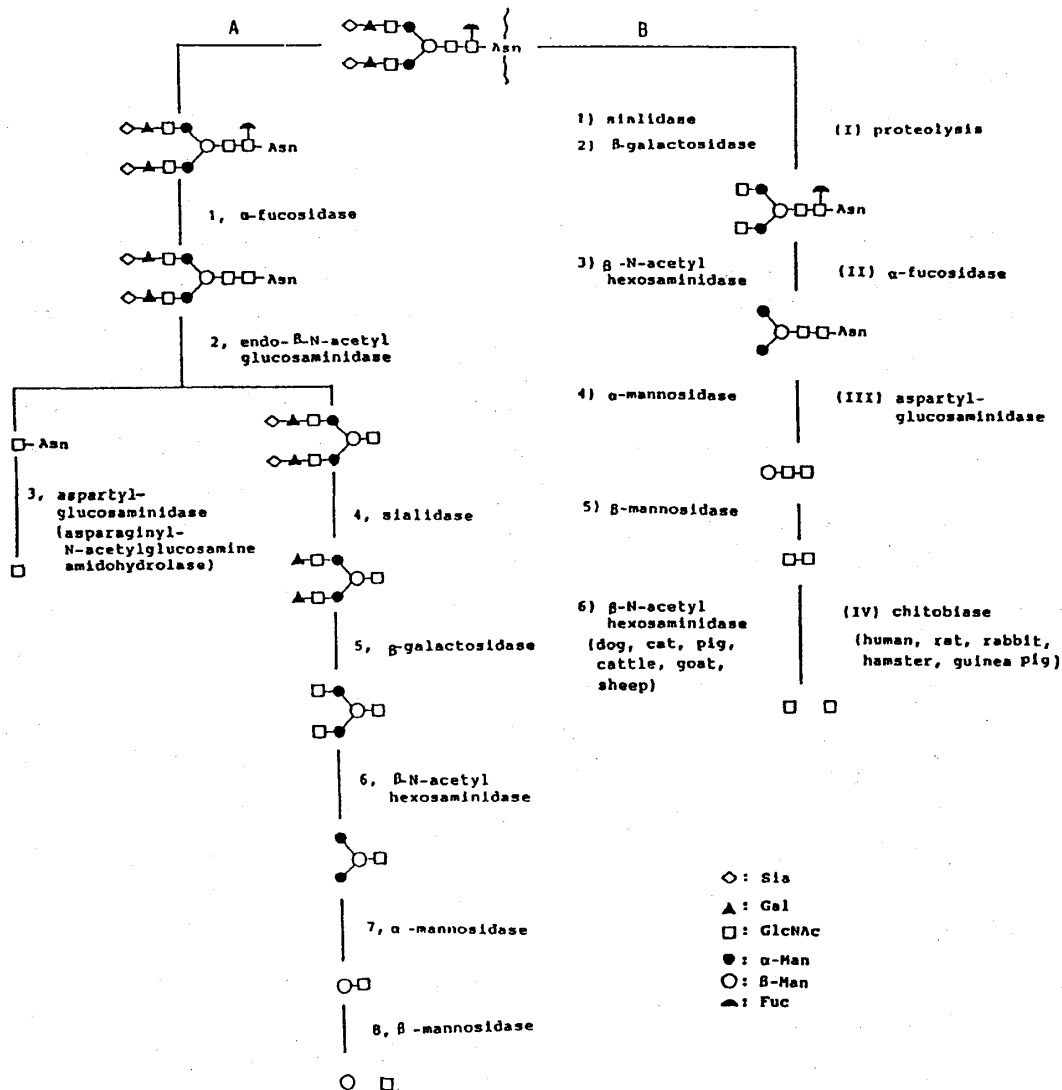


Fig.13 Pathways of catabolism of Asn-linked oligosaccharides.

3. ABEE 標識法の糖タンパク質代謝

異常症診断への応用

— β -マンノシドーシス症ウシの

蓄積オリゴ糖の分析 (39) —

前章までに述べたように、糖タンパク質の糖鎖は、多岐にわたる生物学的機能に関わり、種々の認識機構のシグナルとして働いている可能性が高い (2)。これら糖タンパク質の糖鎖は、各種グリコシダーゼにより単糖にまでに分解され、細胞の代謝プールに戻る (図13)。もしこの多様な生物学的役割を担う糖タンパク質の異化過程経路に欠陥が生じた時には、人体の生理的機能に重大な影響を及ぼすことになる。

この代謝において重要な役割を果たすのが、リソソームに含まれる種々のグリコシダーゼであり、もし、この分解に関与する酵素のいずれかが遺伝的に欠損すると、その基質となるオリゴ糖が細胞内に蓄積し、尿中に排泄される、いわゆるオリゴ糖蓄積症を生じ、主に中枢神経機能異常、骨関節の変形として表現される。このオリゴ糖の分解障害による疾患が糖タンパク質代謝異常症の名で総称され、フコシドーシス (α -フコシダーゼ欠損)、 α -マンノシドーシス (α -マンノシダーゼ欠損)、GM₁-ガングリオシドーシス (β -ガラクトシダーゼ欠損)、Sandhoff病 (β -N-アセチルヘキソサミニダーゼ欠損) 等が知られている。このうち β -マンノシダーゼ欠損に起因し、糖鎖の非還元末端に β -マンノースを持ったオリゴ糖が蓄積する β -マンノシドーシス症は、1981年にヤギに発見された (40)。ついで、1986年にヒトに β -マンノシドーシスの症例が報告された (41,42)。ヤギの場合本症は、新生児にすでに発症しており、激しい神経疾患を呈し、数週間以内に死亡するが、ヒトの場合では、精神遅滞と難聴が特徴で、神経学的障害はなく、死亡することはないと報告されている (41-43)。

本章では、最近我々の研究グループが発見した β -マンノシドーシス症のウシ腎臓に蓄積しているオリゴ糖の構造を、ABEE 化法を用いて分析した結果を述べる。

3-1 β -マンノシドーシス症ウシの腎臓からのオリゴ糖鎖の分離精製

2gの凍結した腎臓 (発症したウシと正常なウシ) を細かく切り刻み、水中で5分間超音波破碎し、遠心分離 (16000 g x 15 min, 2°C) して不溶物を除去した。沈殿物は、水に再懸濁し、同じ操作を2度繰り返した。回収した上清に、酢酸を15%になるように加えた後、遠心分離し、生じた沈殿を除去した。上清を1度凍結乾燥した後、水1mlに溶解させ、Bio-Gel P-2 (100-200 mesh) カラム (1.0cm x 1m) にかき、単糖、オリゴ糖、および糖ペプチドに分離した。オリゴ糖画分は前章までに述

べた方法で標識し、ABEE 標識化合物として分析に供した。

3-2 蓄積オリゴ糖の構造

ABEE-オリゴ糖の分子吸光係数(12)から計算して、中性オリゴ糖量は、正常腎臓中で 3.6 μ mol/g wet tissue で、 β -マンノシドーシス症の腎臓中では、20.6 μ mol/g wet tissue であり、異常な蓄積が認められた。図14に、 β -マンノシドーシス症ウシ(1)の腎臓と正常動物(2)のそれから調製した、ABEE-オリゴ糖の Amide-80 カラムでの分離を示した。その結果、 β -マンノシドーシス症の組織には、正常組織には存在しない、5種のオリゴ糖が検出された。それぞれを単離し、標準オリゴ糖と共に、Amide-80 と ODS カラムを用いる二次元 HPLC 法、FAB-CAD-MS、メチル化分析、段階的酵素消化法により構造を調べた。図15に、段階的酵素消化を二次元-HPLC法により分析した結果を示す。その結果、ウシ腎臓に蓄積しているオリゴ糖の構造は、表9のように決定できた。

3-3 蓄積オリゴ糖の構造的特徴とヤギ

およびヒト β -マンノシドーシスとの比較

表9に示したように β -マンノシドーシス症のウシの

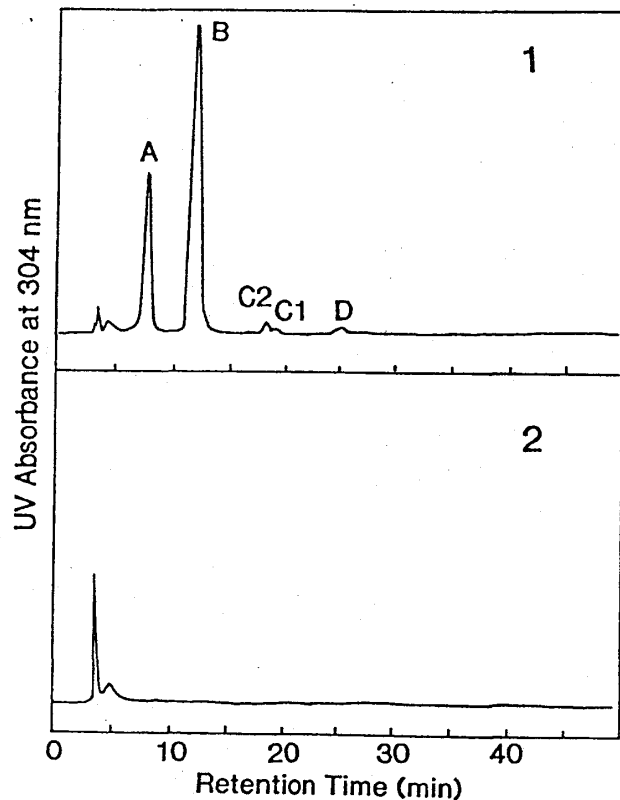


Fig. 14 HPLC analysis of ABEE-oligosaccharides accumulated in the kidney of a calf with β -mannosidosis (1) and normal calf (2) on TSKgel Amide-80 column.

腎臓に蓄積していたオリゴ糖の構造は、 β -マンノシドシース症のヤギの腎臓や甲状腺に蓄積しているオリゴ糖の構造 (40) と同じであった。

これらの蓄積オリゴ糖の非還元末端は、すべて β -結合Manであることから、本症が β -マンノシダーゼ欠損に起因することが明らかである。ウシとヤギでは、蓄積オリゴ糖の構造は同じであったが、蓄積量は、ヤギに比べウシの方が多く、およそ2倍であった。これはウシの懐胎期間の長さによるものと推定される。

非還元末端に α -結合Manを持ったオリゴ糖が蓄積していたことは、反すう動物の α -マンノシダーゼの特異性を反映しているものと考えられ、今後の研究が必要である。

ヒトでは、 β -マンノシドシースをはじめ全ての糖タンパク質代謝異常症で、尿中に排泄されたり、臓器に蓄積しているオリゴ糖は、すべて還元末端にGlcNAc1個のみを持っている。ところが本研究で明らかになったように、反すう動物であるウシやヤギの β -マンノシド-

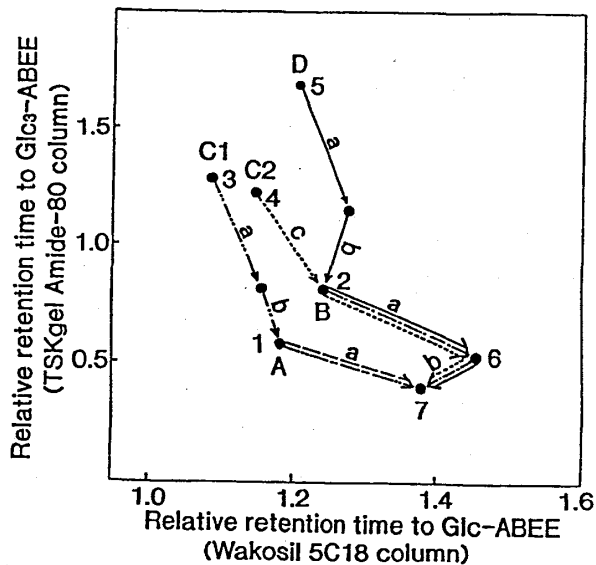


Fig. 15 Two-dimensional map of ABEE-oligosaccharides and their sequential exoglycosidase digestion.

シスでは、GlcNAc1個を持つオリゴ糖に加えて、キトビオース構造を持つオリゴ糖が蓄積している。これらの事実は、ヒトと反すう動物で、ペプチド鎖から糖鎖を切り出す酵素の種類、または特異性が異なることを示唆している。ヒトでは、ペプチド鎖と糖鎖の切断は、キトビオースの両GlcNAcの間の結合を切断するendo- β -N-acetylhexosaminidaseにより行われていることが知られている。ところが反すう動物ではendo- β -N-acetylhexosaminidaseの他にAsnと糖鎖の間を切断するamidohydrolaseもペプチドと糖鎖の間の切断に関与している可能性がある。Dawsonらは、 β -マンノシドシース症ヤギの繊維芽細胞を用いる実験で、この事実を確認している (43, 44) が、今後両酵素を単離して、その性状を調査する必要がある。

最近Aronsonらは、図13に示した新しい糖タンパク質の異化経路を提唱している (45)。しかし、この分解経路では、 β -マンノシドシース症のウシやヤギにMan β 1-4GlcNAcが蓄積していることは説明できない。以上のように、反すう動物における糖タンパク質の異化過程については結論が得られているとはいえ、今後の研究を待たねばならない。

ウシの α -マンノシダーゼ欠損症である α -マンノシドシースでは、蓄積オリゴ糖はすべてキトビオース構造を持っており、還元末端にGlcNAc1個を持つオリゴ糖は見いだされていない (46)。この α -と β -マンノシドシースでの蓄積オリゴ糖のコア構造の異なる理由はまだ明かではない。さらに、Lundbladらは、 α -マンノシドシース症のウシにMan α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc構造のオリゴ糖が蓄積しており、ウシの糖タンパク質にはキトリオース構造を持つ特異なオリゴ糖が存在する可能性があると報告している (47)。しかし、我々の β -マンノシドシース症についての研究では、このような構造のオリゴ糖は全く検出できなかった。

オリゴ糖C1とオリゴ糖Dの構造は非常に特異であり、これらのオリゴ糖の起源となるAsn-結合型糖鎖にこの

Table IX
Structure of Accumulated Oligosaccharides in β -mannosidosis Kidney.

Peak No.	Structure
(A)	Man β 1-4GlcNAc
(B)	Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc
(C1)	Man β 1-4GlcNAc β 1-4Man β 1-4GlcNAc
(C2)	Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc
(D)	Man β 1-4GlcNAc β 1-4Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc

ような構造は見出されていない。このようにその起源となるべき Asn-結合型糖鎖には存在しないオリゴ糖が、蓄積している異常症がいくつか知られている。ヒトβ-マンノシドーシス症の NeuNAc α2-6Man β1-4GlcNAc、aspartylglucosaminuria の Gal β1-4GlcNAc-Asn と NeuNAc α2-3/6Gal β1-4GlcNAc-Asn がその例である (48)。これらのオリゴ糖は、Asn-結合糖鎖からの一次産物でなく、何らかの転移と酵素の作用で作られた二次産物であろうと予想されるが、今後詳細な研究が必要である。

本実験で ABEE-HPLC 法は、蓄積オリゴ糖のような比較的分子量の糖鎖分析にも十分に利用できることが証明された。この ABEE-標識法は、非常に簡便であるので、尿中オリゴ糖の解析による代謝異常症の診断への応用も可能であると考えられる。

終わりに

本研究では、ABEE 標識法を用いる新しい糖鎖分析法を開発し、その方法を用いていくつかの糖タンパク質糖鎖の構造解析を試みた。著者らの開発した ABEE-標識法は次のような利点を持っている。1) 反応試薬が安価であること、2) 反応系が単純であること (ABEE, NaBH₃CN, MeOH, acetic acid を混合するだけ)、3) 反応時間が短いこと (80℃、30~45 分)、4) 未反応の ABEE 試薬は、簡単なエーテル抽出で除去できること、5) 脱塩を含むオリゴ糖以外の成分は、PRE-SEPC₁₈ のカートリッジカラムと簡単な Bio-Gel P-4 で除去することが出来ること、6) 反応収率が高いこと、7) 標識時にシアル酸の脱離がほとんどないこと、8) 極大吸収波長が 304nm であるため、HPLC 分析の際、溶媒によるベースラインの変動がなく、グラジエント溶出をおこなうのに妨害を受けず、高感度検出が可能であること、9) ABEE は、弱いながらも蛍光発色を持つので、蛍光検出 (Ex 308 nm, Em 355 nm) 器を用いれば、検出感度は、数百 fmol まで上げることが出来ること、10) アミノ基のチャージが、FAB-MS 分析を行うのに適しており、微量分析が可能であること、11) NMR 分析においても、ABEE由来のシグナル (CH₃, CH₂, ベンゼン) は、糖シグナルの検出に妨害を与えず、ケミカルシフト値に対する影響は、還元末端付近の糖鎖だけで、文献値と比較する場合に問題がない。

従来、糖鎖構造の解析は、糖の専門家以外の研究者にとって、極めて難しいものであったが、今回、著者らの開発した方法は、その困難さを克服するものであると考える。

次に ABEE 標識法を用いて各種糖タンパク質の糖鎖の構造を決定し、以下のような新しい知見を得ることが

出来た。

- 1) 広島特産「生カキ」のむき身作業員に多発する喘息症「ホヤ喘息」の抗原成分の一つである H-抗原に含まれるアレルギー活性 O-グリコシド型糖鎖構造と皮内反応活性の関係から、糖鎖の非還元末端に存在する、GalNAc α1-2Fuc α1-, GalNAc β1-4GlcNAc β1- の二糖構造がエピトープと成っている可能性を示唆した。天然物に原因するアレルギー症でエピトープ構造を解明したのは、本研究がはじめてである。また、今回決定したホヤ H-抗原由来の O-グリコシド型糖鎖は、いずれも新規化合物であり、従来知られている哺乳類の O-グリコシド型糖鎖の構造とは著しく異なった新しいタイプに分類されるものであり、比較生化学的観点からも非常に興味深い知見であると思われる。
- 2) 鶏の卵黄抗体 (IgY) の Asn-結合糖鎖には、Glc₁-Man₇₋₉-GlcNAc₂ で表されるグルコース含有高マンノース型、Man₅₋₉-GlcNAc₂ の高マンノース型、そして二本鎖複合型の三つのグループの糖鎖が存在し、哺乳類の IgG 抗体の糖鎖構造とは、著しく異なっていることを見いだした。Glc₁Man₉GlcNAc₂ のオリゴ糖に加えて、新規化合物である Glc₁Man₇₋₈GlcNAc₂ のオリゴ糖が成熟糖タンパク質に存在することは、糖タンパク質糖鎖の生合成、プロセッシングの過程について非常に興味深い問題を提示するものである。
- 3) β-マンノシドーシス症のウシの腎臓中に蓄積しているオリゴ糖は、β-マンノシドーシス症ヤギに蓄積していたものと同一であったが、ヒトのそれとは異なっていた。ヒトでは、蓄積オリゴ糖の還元末端に GlcNAc 1 個が存在するのに対して、ヤギとウシで、還元末端部分にキトビオース構造を持ったオリゴ糖が蓄積していた。この結果は、反すう動物における糖タンパク質糖鎖の異化過程は、ヒトのそれと異なっていることを示唆する興味深い発見であり、今後の解明がまたれる。

追記

本論文は、著者の学位論文 (広島大学 第 2198 号) を再編集し、まとめたものである。

本研究に当たって終始御指導、御教示を頂いた、福山大学工学部 松浦 史登教授、並びに広島大学工学部 岡 智教授謹んで感謝します。

文献

1. 高月 昭, 田村 学造 (1979) 生化学, 51, 969.
2. 木幡 陽 (1986) 化学と生物, 24, 232.
3. Takasaki, S., and Kobata, A. (1974) J.

- Biochem.* 76, 783.
4. Hase, S., Ikenaka, T., and Matsushima, Y. (1981) *J. Biochem.* 90, 407.
 5. Prakash, C., and Vijay, I. K. (1983) *Anal. Biochem.* 128, 41.
 6. Hull, S. R., and Turco, S. J. (1985) *Anal. Biochem.* 146, 143.
 7. Daniel, P. F. (1987) *Methods Enzymol.* 138, 94.
 8. Fournet, B., Montreuil, J., Strecker, G., Dorland, L., Haverkamp, J., Vliegthart, J. F. G., Binette, J. P., and Schmid, K. (1978) *Biochemistry.* 17, 5206.
 9. Yoshima, H., Matsumoto, A., Mizuochi, T., Kawasaki, T., and Kobata, A. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8467.
 10. Green, E. D., Adelt, G., Baenziger, J. U., Wilson, S., and Van Halbeek, H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 18253.
 11. 水落 次男、木幡 陽 (1981) 最新医学 36, 901.
 12. Matsuura, F., and Imaoka, A. (1988) *Glycoconjugate J.* 5, 13.
 13. Matsuura, F., Ohta, M., Murakami, K., Hirano, K., and Sweeley, C. C. (1992) *Biomedical Chromatography.* 6, 77.
 14. Yamamoto, S., Hase, S., Fukuda, S., Sano, O., and Ikenaka, T. (1989) *J. Biochem.* 105, 547.
 15. Townsend, R. R., Hardy, M. R., Cumming, D. A., Carver, J. P., and Bendiak, B. (1989) *Anal. Biochem.* 182, 1.
 16. Ohta, M., Kobatake, M., Matsumura, A., and Matsuura, F. (1990) *Agric. Biol. Chem.* 54, 2766.
 17. Shigeta, S., Okamura, M., Tsutsumi, M., Ono, K., Ohta, M., Matsuura, F., Takao, T., and Oka, S. (1990) *J. Biochem.* 108, 47.
 18. Ohta, M., Shigeta, S., Ono, K., Kobayashi, Y., Matsuura, F., and Oka, S. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* 290, 474.
 19. Van Lenten, L., and Ashwell, G. (1972) *Methods Enzymol.* 38, 209.
 20. Ohta, M., Shigeta, S., Ono, K., Takao, T., Shimonishi, Y., and Oka, S. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 275, 151.
 21. Suzuki, H., Oka, S., Shigeta, S., Ono, K., Jyo, T., and Katsutani, T. (1984) *J. Biochem.* 96, 849.
 22. Van Halbeek, H., Berg, J., Vliegthart, J. F. G., Klein, A., Lamblin, G., and Roussel, P. (1988) *Eur. J. Biochem.* 177, 443.
 23. Kitagawa, H., Nakada, H., Kurosaka, A., Hiraiwa, N., Numata, Y., Fukui, S., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Yamashina, I., Shimada, I., and Inagaki, F. (1989) *Biochemistry* 28, 8891.
 24. Ohta, M., Hamako, J., Yamamoto, S., Hatta, H., Kim, M., Yamamoto, T., Oka, S., Mizuochi, T., and Matsuura, F. (1991) *Glycoconjugate J.* 8, 400.
 25. Hatta, H., Kim, M., and Yamamoto, T. (1990) *Agric. Biol. Chem.* 54, 2531.
 26. Faith, R. E. and Clem, L. W. (1973) *Immunology.* 25, 151.
 27. Gardner, P. S. and Kaye, S. (1982) *J. Virol. Methods.* 4, 257.
 28. Mizuochi, T., Taniguchi, T., Shimizu, A., and Kobata, A. (1982) *J. Immunol.* 129, 2016.
 29. De Waard, P., Kamerling, J. P., Van Halbeek, H., Vliegthart, J. F. G., and Broertjes, J. J. S. (1987) *Eur. J. Biochem.* 168, 679.
 30. Takahashi, N., and Arata, Y. (1987) *NMR of Proteins* (Arata, Y., and Kyogoku, Y. eds.,) pp 131. Sankyosyuppan, Tokyo.
 31. Vliegthart, J. F. G., Dorland, L., and Halbeek, H. (1983) *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* (Pigman, W. and Wolfrom, M. L. eds.,) vol. 41, pp 209. Academic Press, New York
 32. Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631.
 33. Godelaine, D., Spiro, M. J., and Spiro, R. G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 10161.
 34. Trombetta, S. E., Bosch, M., and Parodi, A. J. (1989) *Biochemistry* 28, 8108.
 35. Mellis, S. J. and Baenziger, J. U. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11546.
 36. Anderson, D. R., Atkinson, P. H., and Grimes, W. J. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 243, 605.
 37. Baenziger, J. U., Kornfeld, S., and Kochwa, S. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 1897.
 38. Pierce-Crtel, A., Debray, H., Montreuil, J.,

- Spik, G., Van Halbeek, H., Mutsaers, J. H. G. M., and Vliegthart, J. F. G. (1984) *Eur. J. Biochem.* 139, 337.
39. Jones, M. Z., Rathek, E. J. S., Gage, D. A., Costello, C., Murakami, K., Ohta, M., and Matsuura, F. (1992) *J. Inher. Metab. Dis.* 15, 57.
40. Matsuura, F., Laine, R. A. and Jones, M. Z. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 211, 485.
40. Wenger, D. A., Sujansky, E., Fennessey, P. V., and Thompson, J. N. (1986) *New. Engl. J. Med.* 315, 1201.
41. Cooper, A., Sardharwalla, I. B., and Roberts, M. M. (1986) *New. Engl. J. Med.* 315, 1231.
42. Dorland, L., Duran, M., Hoefnagels, F. E. T., Breg, J. N., deJonge, H. F., Cransberg, K., vanSprang, F. J., and vanDiggelin, O. P. (1988) *J. Inher. Metab. Dis. Suppl.* 2, 255.
43. Hancock, L. W., Jones, M. Z., and Dawson, G. (1986) *Biochem. J.* 234, 175.
44. Hancock, L. W., and Dawson, G. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* 928, 13.
45. Aronson, N. N. and Kuranda, M. J. (1989) *The FASEB J.* 3, 2615.
46. Abraham, D., Blakemore, W. F., Jolly, R. D., Sidebotham, R., and Winchester, B. (1983) *Biochem. J.* 215, 573.
47. Lundblad, A., Nilsson, B., Norden, N. E., Svensson, S., Ockerman, P.-A., and Jolly, R. D. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59, 601.
48. VanPelt, J., Dorland, L., Duran, M., Hokke, C. H., Kamerling, J. P., and Vliegthart, J. F. G. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 19685.
49. 山下 克子 生化学 (1984) 56, 285.

Fig. 1. Scheme of derivatization of oligosaccharide with ABEE.

Fig. 2. Two dimensional sugar map of 39 different ABEE-oligosaccharides. Elution positions of ABEE-oligosaccharides on an ODS-silica column are expressed as relative retention time to glucose-ABEE and on an Amide-silica column as the number of glucose units.

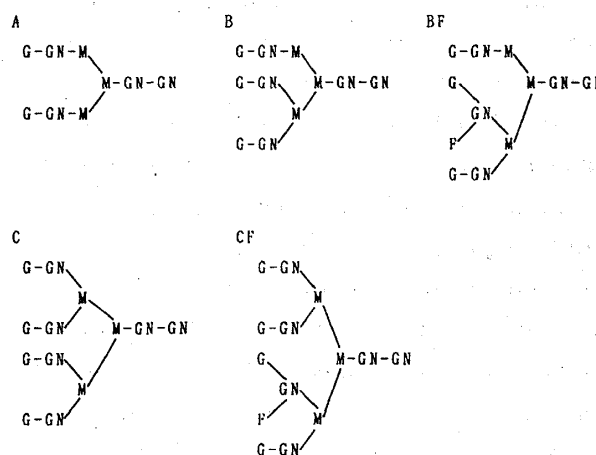
Fig. 3. Isomeric structures of sialyl biantennary oligosaccharide.

□:GlcNAc, ▲: Man, △: Gal, ○: α 2,3-linked NeuNAc, ●: α 2,6-linked NeuNAc.

Fig. 4. HPLC of ABEE-sialyloligosaccharides obtained from α_1 -AGP on TSKgel DEAE-5PW. The column was eluted as described in the text.

N indicates the position to which all of the peaks moved after including the components with sialidase. The oligosaccharides were fractionated as indicated by the bars. Fractions SI, SII, SIII and SIV contained oligosaccharides containing 1, 2, 3 and 4 NeuNAc residues, respectively.

Components within peak SI-1 contained asialo core oligosaccharide species of class B, BF, C and CF defined by Fournet *et al.* (8); SI-2, class A; SII-1, class BF, C and CF; SII-2, class B; SII-3, class A; SIII-1, class BF and C; SIII-2, class B; SIV-2, class CF; and SIV-3, class C. The structures of these oligosaccharides are as follows:



Abbreviations used for the structures are GN=GlcNAc, M=Man, G=Gal, F=Fuc.

Fig. 5. HPLC of ABEE-sialyloligosaccharides on a Wakosil 5C18-200 column. The column was eluted as described in text. (A) AGP-SIV-3 in Fig. 4; (B) trisialyl triantennary oligosaccharide from fetuin (Fet-SIII); (C) AGP-SIII-2 in Fig. 4; (D) AGP-SII-3 in Fig. 4; (E) disialyl biantennary oligosaccharide from hCG (hCG-SII); (F) AGP-SI-2 in Fig. 4. The arrow indicates the position at which monosialyl biantennary oligosaccharide from hCG (hCG-SI) was eluted. The structures are represented by the following symbols: □:GlcNAc, ▲:Man, △:Gal, ○: α 2,3-linked NeuNAc, ●:

α 2,6-linked NeuNAc, \ominus : α 2,3 or 2,6-linked NeuNAc, \blacksquare : GlcNAc-ABEE.

Fig.6. HPLC analysis of ABEE-sialyl oligosaccharides (SI-1~SIV-3) obtained from α ₁-AGP on a Wakosil 5C18-200 column.

Fig.7. Schematic procedure for limited periodate oxidation of oligosaccharitol and derivatization with ABEE.

Fig.8. Bio-gel P-4 column chromatography of HPG- β 2-N. A 67 mg of HPG- β 2-N was chromatographed on a column of Bio-gel P-4 (2.6 x 200 cm) with deionized water at 55°C and a flow rate of 6 ml/h into 3-ml fractions under monitoring with optical extinction at 215 nm.

Fig.9. Structural analysis of HPG- β 2-N5a. (A) FAB-MS spectrum of permethylated of HPG- β 2-N5a; (B) ODS-HPLC of the ABEE-derivatized limited periodate oxidation products of HPG- β 2-N5a. Number in parenthesis indicates the m/z value of $[M-H]^-$ ion in negative FAB-MS; (C) HPLC analysis of the products obtained from ABEE-oligosaccharide by sequential exoglycosidase digestion. ABEE-oligosaccharide was sequentially digested with; ①, jack bean β -N-acetylhexosaminidase; ②, *Acremonium sp.* α -N-acetylgalactosaminidase; ③, bovine kidney α -L-fucosidase; ④, jack bean β -N-acetylhexosaminidase. Arrow (\downarrow) indicates the elution position of the authentic ThrNAc-ABEE. Open arrow indicates the elution position of the native ABEE-oligosaccharide.

Fig.10. Ion-exchange HPLC of ABEE-oligosaccharides obtained from hen egg-yolk immunoglobulin (IgY). The ABEE-derivatives of Asn-linked oligosaccharides derived from IgY were applied to a DEAW-5PW column. The column was eluted as described in text.

Fig.11. ODS-HPLC of neutral ABEE-oligosaccharides derived from hen IgY. ABEE-oligosaccharides in fraction N in Fig. 10 (N), sialidase-treated ABEE-oligosaccharides of fraction SI in Fig. 10 (SIN), and sialidase-treated ABEE-oligo-

saccharides of fraction SII in Fig. 10 (SIIN) were subjected to HPLC with a Wakosil 5C18-200 column. The column was eluted as described in text. All peaks in group NM were pooled and subjected to fractionation by Amide-80 HPLC (see Fig.12). Three peaks (NC-a~c) in group NC, 9 peaks of SIN, and 5 peaks of SIIN were collected and subjected to structural characterization. Arrows (\downarrow) indicate the elution positions of standard ABEE-oligosaccharide: 1, M₉•GN•GN-ABEE; 2, M₈•GN•GN-ABEE; 3, M₇•GN•GN-ABEE; 4, M₆•GN•GN-ABEE; 5, M₅•GN•GN-ABEE; 6, M₃•GN•GN-ABEE; 7, M•GN•GN-ABEE; 8, G₂•GN₂•M₃•GN•GN-ABEE; 9, G₂•GN₂•M₃•GN•F•GN-ABEE; 10, G'•GN₂•M₃•GN•F•GN-ABEE; 11, G•GN₂•M₃•GN•F•GN-ABEE.

Fig.12. HPLC analysis of the pooled ABEE-oligosaccharides in group NM. All peaks in group NM shown in Fig. 11 were pooled and subjected to HPLC analysis with a TSKgel Amide-80 column. The column was eluted as described in text. Six peaks indicated by bars were collected. Arrows (\downarrow) indicate the elution positions of standard ABEE-oligosaccharides: 1, M•GN•GN-ABEE; 2, M₃•GN•GN-ABEE; 3, M₅•GN•GN-ABEE; 4, M₆•GN•GN-ABEE; 5, M₇•GN•GN-ABEE; 6, M₈•GN•GN-ABEE; 7, M₉•GN•GN-ABEE.

Fig.13. Pathways of catabolism of Asn-linked oligosaccharides. (A) Catabolic pathway proposed by Yamashita (49), (B) Alternative pathway of catabolism proposed by Aronson *et al.* (45).

Fig.14. HPLC analysis of ABEE-oligosaccharides accumulated in the kidney of a calf with β -mannosidosis (1) and normal calf (2) on TSKgel Amide-80 column.

Fig.15. Two-dimensional map of ABEE-oligosaccharides and their sequential exoglycosidase digestion. ABEE-oligosaccharides were analyzed by HPLC on TSKgel Amide-80 and Wakosil 5C18-200 columns. The retention times on TSKgel Amide-80 column are expressed relative to that of isomaltotriose-ABEE and Wakosil 5C18-200 as relative to glucose-ABEE. 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7

indicate the elution positions of standard Man β 1-4GlcNAc-ABEE, Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-ABEE, Man β 1-4GlcNAc β 1-4Man β 1-4GlcNAc-ABEE, Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-ABEE, Man β 1-4 GlcNAc β 1-4Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-ABEE, GlcNAc β 1-4GlcNAc-ABEE and GlcNAc-ABEE, respectively. A, B, C1, C2 and D indicate the oligosaccharides accumulated in the kidney shown Fig. 14. a, b and c indicate snail β -mannosidase, jack bean β -N-acetylhexosaminidase and jack bean α -mannosidase, respectively.