



Title	硫酸化グリコサミノグリカンの微細修飾構造の解析
Author(s)	山田, 修平
Degree Grantor	京都大学
Degree Name	博士(薬学)
Issue Date	1995
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/20099">https://hdl.handle.net/2115/20099</a>
Type	doctoral thesis
File Information	thesis.pdf



硫酸化グリコサミノグリカンの微細修飾構造の解析

1995

山田修平

硫酸化グリコサミノグリカンの微細修飾構造の解析

1995

山田修平

# 目 次

序 論	1
第 1 章 ヘパリンの糖-タンパク質結合領域の構造研究	6
第1節 糖-タンパク質結合領域に由来するグリコセリンの単離	6
第2節 グリコセリンIの構造解析	7
第3節 グリコセリンIIの構造解析	9
考察と総括	11
実験の部	13
第 2 章 $^1\text{H-NMR}$ 解析によるグリコサミノグリカン鎖の構造研究	16
第1節 グリコサミノグリカン由来の不飽和二糖の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定	16
第2節 各プロトンの化学シフトの帰属	18
考察と総括	22
実験の部	23
第 3 章 ヘパリンの繰り返し二糖領域の構造研究	26
第1節 ヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIの消化によって調製した三糖、四糖の構造解析	27
1. ヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIでの消化によるオリゴ糖の調製	27
2. Fast atom bombardment-mass spectrometry (FAB-MS) 分析	28
3. 酵素消化による分析	31
4. 500-MHz $^1\text{H-NMR}$ 解析	33
第2節 アンチトロンビンIII結合部位由来の四糖構造の単離と解析	36
1. Fr. III-12の構造解析	36
2. Fr. III-9の構造解析	40
3. Fr. III-19の構造解析	41

第3節	ヘパリナーゼのみの消化によって調製した四糖画分の構造解析	
	—グルクロン酸2-硫酸を含む新奇な四糖構造の解析	42
1.	ヘパリナーゼでの消化による四糖の調製	42
2.	各成分の酵素消化による分析	43
3.	亜硝酸分解によって生じた二糖のHPLCによる分析	45
4.	500-MHz <sup>1</sup> H-NMR解析	48
第4節	ヘパリン及びヘパラン硫酸由来の種々のオリゴ糖を用いた、分解	
	酵素の基質特異性の研究	52
1.	ヘパリチナーゼII	52
2.	ヘパリチナーゼI	53
3.	ヘパリナーゼ	53
	考察と総括	56
	実験の部	62
第4章	ヒト血漿Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor (ITI)の糖-タンパク質結合領域の	
	構造研究	66
第1節	ペプチド-コンドロイチン硫酸の単離	67
第2節	結合部位の糖-ペプチドのFAB/MS分析	68
第3節	糖-タンパク質結合部位の六糖の単離	70
第4節	結合部位の六糖の構造解析	71
	考察と総括	73
	実験の部	75
結 論		79
謝 辞		81
文 献		82

## 序 論

ヒトをはじめ多くの動物の細胞表面膜や血清のタンパク質のほとんどすべてが糖タンパク質であり、抗体、レセプター、ホルモン、酵素もその実態は単純タンパク質ではなく糖タンパク質であるものが多い。それにもかかわらず、1960年代までは、これらの分子の生理活性は、それぞれのタンパク質構造だけで説明される例が多く、糖鎖の役割についてはあまり注目されていなかった。糖側鎖を持つタンパク質のなかでも特にプロテオグリカンは、長い間ただの構造分子とみなされていたが、この巨大分子は細胞に微小環境を用意し、細胞もその信号を読み取ることがわかってきた。プロテオグリカンの糖鎖部分（グリコサミノグリカン）が活性を持つことが示されるようになった。グリコサミノグリカンは、アミノ糖とウロン酸からなる二糖の繰り返しが直鎖上に長く連なった多糖で、その構成二糖の種類によって分類されている。コンドロイチン硫酸はガラクトサミンとグルクロン酸、デルマタン硫酸はガラクトサミンとイズロン酸から構成されるグリコサミノグリカンである。ヘパリンとヘパラン硫酸は、ともにグルコサミンをアミノ糖として含み、ウロン酸としてはイズロン酸とグルクロン酸の両方を含むグリコサミノグリカンである。ヘパリンの方がイズロン酸含量が多く、ヘパラン硫酸の方はグルクロン酸含量が多いが、両者を厳密に区別することが難しい場合もある。筆者の所属する研究室では、これらグリコサミノグリカンの持つ様々な生物活性と微細修飾構造との相関関係を明らかにするために、その構造研究を行ってきた。筆者はグリコサミノグリカンの中でも、最も多種多様な活性を持つことが知られているヘパリンと、プロテオグリカンの中では少し異色の、血漿中の分泌タンパク質であるインター- $\alpha$ -トリプシンインヒビター（以下ITIと略す）の構造研究を行った。

ヘパリンは抗血液凝固活性<sup>(1)</sup>、細胞増殖調節活性<sup>(2, 3)</sup>、血管新生促進活性<sup>(4)</sup>、酸性及び塩基性繊維芽細胞増殖因子との相互作用<sup>(5-7)</sup>など様々な生物活性を有している多糖であり、これらの活性はヘパリングリコサミノグリカン鎖中の複雑な微細構造によると推定されている。ヘパリンは、生合成の際には、セリンとグリシンに富んだ短いコアタンパク質上に、何本ものヘパリングリコサミノグリカン鎖が結合したプロテオグリカンのかたちで合成される<sup>(8)</sup> (Fig. 1)。ヘパリングリコサミノグリカン鎖のタンパク質への結合領域は、GlcA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl  $\beta$  1-O-Serという特別な橋渡し構造を有している<sup>(9)</sup>。この構造はコンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸

でも共通に認められるが<sup>(10, 11)</sup>、コンドロイチン硫酸では、この領域にガラクトース4-硫酸<sup>(12-14)</sup>、ガラクトース6-硫酸<sup>(14, 15)</sup>といった修飾構造が存在する場合もある。ヘパリンではそのような修飾構造はまだ認められず<sup>(16)</sup>、このことから結合領域の微細構造の違いがそれ以降の糖鎖伸長の上で果たす役割に興味をもたれている。

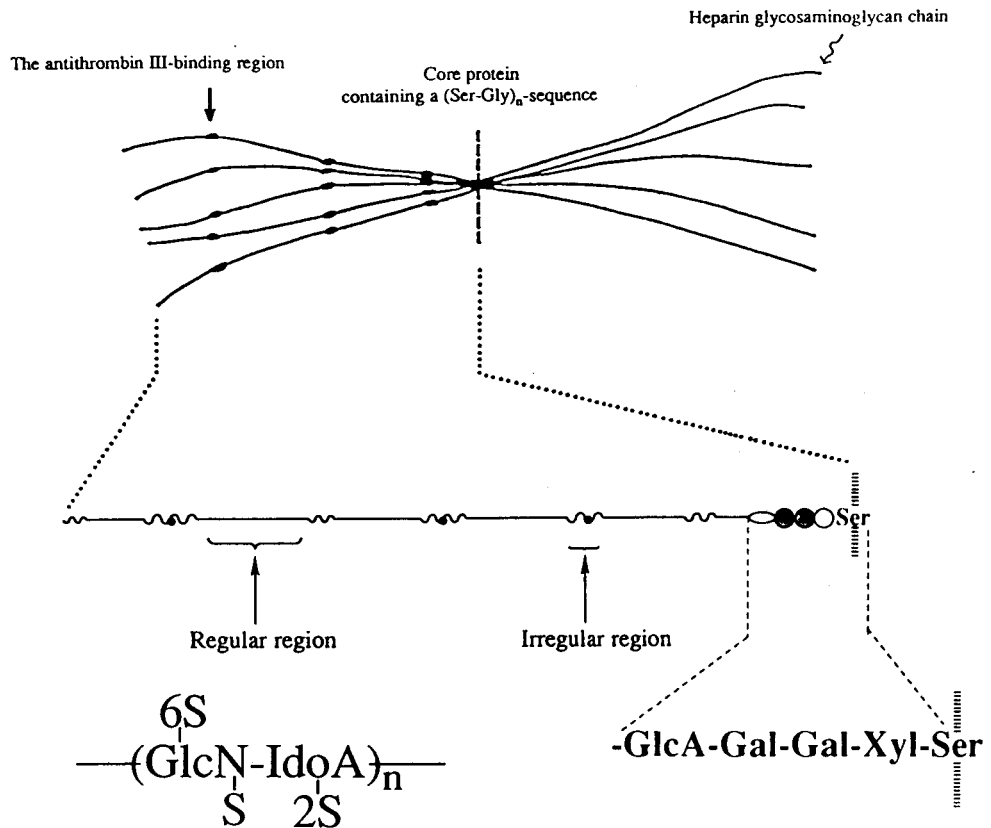


Fig. 1. A schematic drawing of a heparin proteoglycan. The heparin chains are shown to converge onto a (Ser-Gly)<sub>n</sub>-sequence of the core polypeptide. The antithrombin III-binding regions (thicker segments) are accumulated in approximately half of the heparin chains and are absent in the remaining chains. The linkage of polysaccharide to the serine residues is mediated by a galactosyl-galactosyl-xylosyl trisaccharide sequence. The principal structure of the heparin, called the regular region (solid line), is composed of the major trisulfated disaccharide unit, -GlcN(N,6-disulfate)α1-4IdoA(2-sulfate)α1-, while substantial structural variability is observed in the irregular region (wavy line) which is less but variably sulfated. 6S, S, or 2S represents 6-O-, 2-N-, or 2-O-sulfate, respectively.

ヘパリンのタンパク質への結合領域以外の糖部分は、グルコサミンとウロン酸が1-4グリコシド結合で交互に結合した二糖単位の繰り返りからなり、そこに様々な硫酸化が施されている。硫酸化され得る主な部位はグルコサミンの6位とウロン酸の2位の水酸基、グルコサミンの2位のアミノ基の三箇所であり、またウロン酸のタイプもグルクロン酸とイズロン酸の二種類が存在するため、多様なドメイン構造が生じうる。実際には、ヘパリンの繰り返り二糖領域は→4IdoA(2-sulfate)α1-4GlcN(N,6-disulfate)α1→(ここで

IdoAとはL-イズロン酸である) という三硫酸化二糖が連続して配置されたクラスター (以下、レギュラー領域と称す<sup>(17)</sup>) が大部分を占め、ヘパリン糖鎖の約四分の三にも及んでいる (Fig. 1)。レギュラー領域の間にやや低硫酸化した不規則な構造を持った領域 (以下、イレギュラー領域と称す) がところどころに存在し、この部分で硫酸化の位置やウロン酸の種類に多様性がある。ヘパリンの有する生物活性は繰り返し二糖領域が担っていると考えられており、繰り返し二糖領域の多様な構造を明らかにすることは、ヘパリンの機能を探るうえで極めて重要である。ヘパリンの種々の活性の中でも抗血液凝固活性については、構造との相関関係が既に詳しく調べられているが<sup>(18, 19)</sup>、他の生物活性とヘパリン糖鎖中の微細な構造との相関関係については未だ明らかにされていない。糖鎖の微細構造の研究にはNMRによる解析が有用であると考えられており<sup>(20)</sup>、NMRのデータベースの作成の必要性が唱えられているが<sup>(21)</sup>、硫酸化グリコサミノグリカン鎖由来のオリゴ糖のNMR解析例はまだあまりないのが現状である。

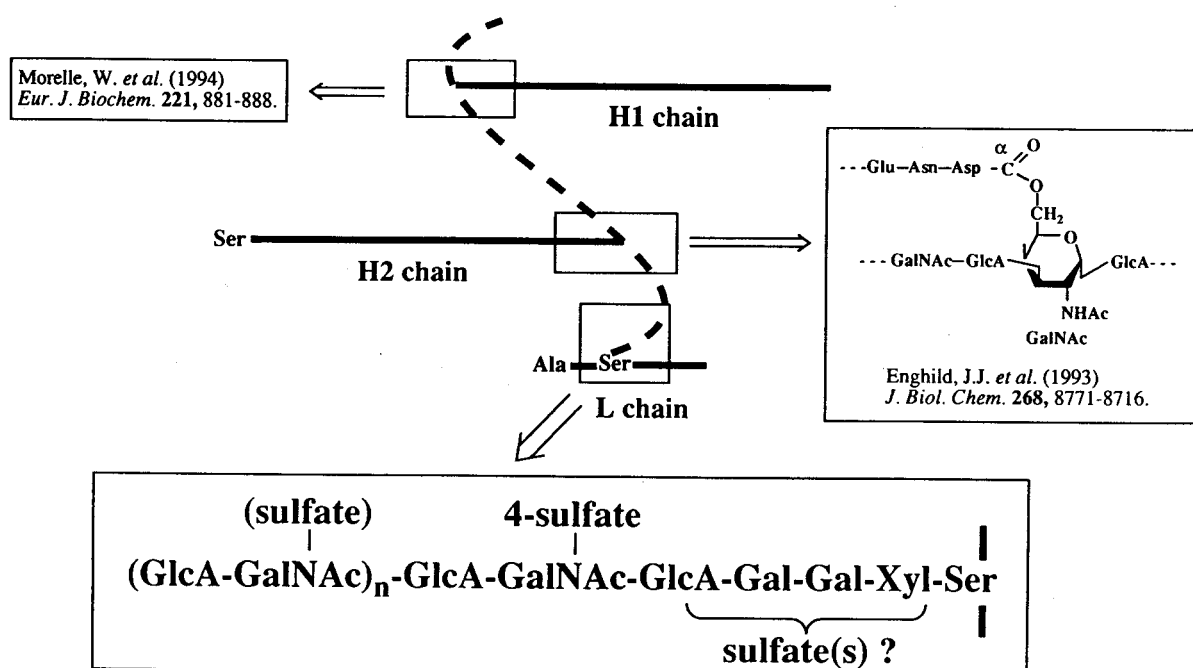


Fig. 2. Cross-linking of inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor (ITI) through a chondroitin 4-sulfate chain. ITI is composed of three polypeptide chains (L, H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub> chains; solid lines). A chondroitin 4-sulfate chain (dashed line) originates from Ser-10 of L chain through a conventional linkage. Structural modifications in the linkage region of ITI have never been reported. The two heavy chains are covalently bound to the chondroitin 4-sulfate chain via ester bonds between the  $\alpha$ -carboxylate of the COOH-terminal Asp and C-6 OH of an internal GalNAc of the chondroitin 4-sulfate chain.

一方、ITIは血漿中に存在するプロテアーゼインヒビターであり、可溶性のタンパク質であるにもかかわらず、細胞外マトリックスの成分であるコンドロイチン硫酸を糖側鎖として持つプロテオグリカンである<sup>(22, 23)</sup>。ITIのコンドロイチン硫酸は、非常に珍しい性質を持っており、その糖鎖がITIの三本のポリペプチド鎖の間を架橋している<sup>(24-26)</sup> (Fig. 2)。ジスルフィド結合以外の結合様式でポリペプチドが架橋される例は少なく、コラーゲンにおけるヒドロキシリジンによる架橋<sup>(27)</sup>などが数例報告されている。しかし、それらの報告ではいずれも、結合組織のタンパク質を固定する場合のみであり、ITIのように血漿中に分泌されるタンパク質では報告がない。もちろん、コンドロイチン硫酸による架橋構造の形成も、ITIファミリー分子の持つコンドロイチン硫酸でしか知られておらず、この架橋構造はITI独自のものであり、その機能と重要な関連があるのかもしれない。ITI分子のなかのコンドロイチン硫酸が、このような珍しい架橋構造の形成に何らかの役割を果たしているとする、そのコンドロイチン硫酸鎖の構造的な特徴の解明に興味を持たれる。

筆者は、以下の四項目の実験を行い、グリコサミノグリカンの構造研究を行った。

(1) ヘパリン分解酵素を用いて、ヘパリンから糖-タンパク質結合領域を単離し、構造決定した。その結果、糖-タンパク質結合領域にも少なくとも二種類の構造が存在することが判明したので、グリコサミノグリカン鎖の仕分け合成との関与について考察した<sup>(16)</sup>。(2) グリコサミノグリカンの<sup>1</sup>H-NMRを用いた構造解析の基礎を確立するために、まずヘパラン硫酸/ヘパリン及びコンドロイチン硫酸由来の合計16種類の不飽和二糖標準品の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定した。得られた<sup>1</sup>H-NMR解析データを利用して、硫酸化の化学シフトに及ぼす影響について検討し、いくつかの規則性を見いだした<sup>(28)</sup>。(3) その規則性を利用して、ヘパリン繰り返し二糖領域から単離した多数のオリゴ糖の構造解析を行った<sup>(29-31)</sup>。構造決定できた成分の中には、アンチトロンビンIII結合部位に由来するものも三成分あり<sup>(30)</sup>、また、今までその存在が証明されたことのなかったグルクロン酸2-硫酸構造を含む成分も2種類得られた<sup>(31)</sup>。これらのオリゴ糖を基質として、構造解析のための重要なツールであるバクテリア由来の分解酵素の基質特異性についても検討し、以前は知られていなかった性質も見い出すことができ、従来の特異性に修正を加えることができた<sup>(29-31)</sup>。(4) 他のコンドロイチン硫酸とは一線を画すような、珍しい構造と性質を持つITIのコンドロイチン硫酸についてその構造解析を行い、その糖-タンパク質結合部位にも、他のコンドロイチン硫酸とは

異なる特徴を持っていることを証明した<sup>(32)</sup>。以下、これらの研究について詳述する。

なお、ここで本研究で頻繁に用いるグリコサミノグリカン分解酵素について説明しておく。本研究では、ヘパリングリコサミノグリカンおよびヘパリンオリゴ糖の分解にヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼといった酵素を、またコンドロイチン硫酸の分解にはコンドロイチナーゼを用いた。これらの酵素はいずれもバクテリア由来のエリミナーゼ（脱離酵素）で、ヘパリナーゼ／ヘパリチナーゼはグルコサミニド結合を、またコンドロイチナーゼはガラクトサミニド結合を切断する。これらはグリコサミノグリカン鎖の繰り返し二糖領域に作用し、還元末端側にアミノ糖を持ち非還元末端側にはウロン酸を持つ二糖を生成する。ウロン酸は酵素消化による脱離分解の結果、4位と5位の間が不飽和結合になった不飽和ウロン酸に変換される（以下本文中では、 $\Delta$ HexA、 $\Delta_{4,5}$ HexA、 $\Delta$ GlcAまたは $\Delta_{4,5}$ GlcAと表わす）。各種ヘパリチナーゼやヘパリナーゼの間の基質特異性の違いは、基本骨格となる糖鎖に施されている硫酸化の部位とウロン酸の種類による。硫酸化のパターンやウロン酸のタイプによって、各酵素には消化できる構造とできない構造がある。各酵素の詳しい基質特異性については第3章で述べるが、厳密には解明されていない。コンドロイチナーゼの場合はそれらの基質特異性が詳しく検討されており<sup>(13, 33, 34)</sup>、コンドロイチナーゼABCとACIIは二つの違いがある。一つは、イズロン酸を含む構造に作用できるか否かという点にあり、もう一つは、結合領域近傍に対する両酵素の作用の違いである。コンドロイチナーゼACIIは、繰り返し二糖領域を分解して $\Delta$ HexA  $\alpha$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl  $\beta$  1-O<sup>-</sup>という四糖構造を残すが、コンドロイチナーゼABCは、最も還元末端側の繰り返し二糖部分だけは切断することができず、 $\Delta$ HexA  $\alpha$  1-3GalNAc  $\beta$  1-4GlcA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl  $\beta$  1-O<sup>-</sup>という六糖構造を残す。

# 第1章 ヘパリンの糖-タンパク質結合領域の構造研究<sup>(16)</sup>

ヘパリンは、多数のヘパリングリコサミノグリカン鎖を付加したプロテオグリカンとして合成される<sup>(8)</sup> (Fig. 1)。そして興味深いことに、ヘパリングリコサミノグリカン鎖の糖-タンパク質結合領域の構造は、他の硫酸化グリコサミノグリカンである、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸と共通であり、GlcA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl  $\beta$  1-O-Serという構造をしている<sup>(9-11)</sup>。糖鎖の伸長は、グリコシルトランスフェラーゼの基質特異性に大きく支配されて順々に進んでいくにもかかわらず、どのようにして異なったグリコサミノグリカン鎖が共通の構造上に合成されるのかは明らかにされていない。筆者の所属するグループは、この糖-タンパク質結合領域に、ガラクトース4-硫酸やガラクトース6-硫酸構造といった珍しい構造が存在することをコンドロイチン硫酸において見だし、このことから結合領域の微細構造の違いが以下の糖鎖伸長のシグナルになっている可能性が生じてきた。また、ヘパリングリコサミノグリカンには、アンチトロンビンIIIに結合して抗血液凝固活性を発揮する糖鎖とアンチトロンビンIIIに結合しない糖鎖の二種類のサブグループがあることが知られている<sup>(35-37)</sup> (Fig. 1)。ヘパリンの生合成過程で、どのようなメカニズムによって二種類の糖鎖の合成が区別されるのかは不明であるが、それを糖-タンパク質結合領域が規定している可能性もあり、その構造を再考し直す必要が生じてきた。本章では、ヘパリンの糖-タンパク質結合領域から報告例のない硫酸化グリコセリンを単離し、構造解析した研究について詳述する<sup>(16)</sup>。

## 第1節 糖-タンパク質結合領域に由来するグリコセリンの単離

ブタ小腸粘膜由来のstage 14という精製段階のヘパリンを出発材料として用いた。この段階のヘパリン標品は、タンパク質分解酵素で消化されているために、アミノ酸としてはほとんど唯一セリンのみを含んでいる<sup>(10)</sup>。これをDEAEセルロースで精製して混入していた核酸を除去し、*Flavobacterium heparinum*由来のヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIという三種類の酵素を用いて強く消化し、消化物をゲルろ過によって画分IからIVに分画した (Fig. 3)。これらの酵素は加水分解酵素ではなく脱離酵素なので、ウロン酸は4位と5位の間が不飽和になった不飽和ウロン酸に変換される。この不飽和結合による

紫外吸収を指標に検出を行った。各画分におけるセリンの回収率はそれぞれ、5.9%、9.8%、6.6%、77.7%であった。画分Iはデルマトン硫酸由来のオリゴ糖を、画分IIはデルマトン硫酸オリゴ糖とヘパリンオリゴ糖を含むことが、セルロースアセテート膜電気泳動による分析によって判明した（結果は示していない）。画分IとIIに含まれるセリンは、その大部分がデルマトン硫酸の糖-タンパク質結合領域に由来するものと考えられたので、これらの画分についての分析はここで中断した。画分IIIとIVからヘパリンの糖-タンパク質結合領域に由来するオリゴ糖の単離を行った。

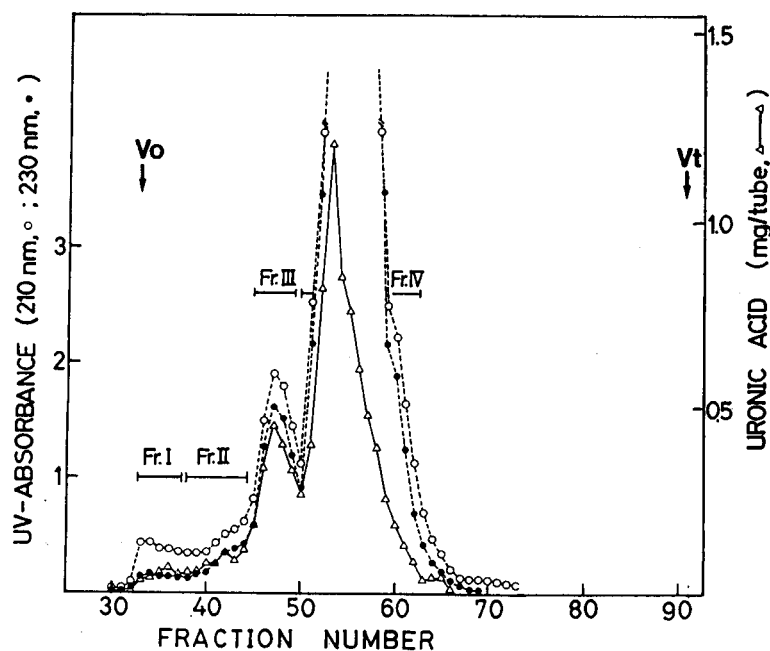


Fig. 3. Fractionation of the heparinase/heparitinases I & II digest. Purified stage 14 heparin was exhaustively digested by a mixture of heparinase, heparitinases I and II and subjected to gel filtration on a column of Cellulofine GCL-90-m. Fractions were monitored by UV-absorption and the carbazole reaction, and pooled as indicated.

## 第2節 グリコセリンIの構造解析

主として二糖を含む画分IVを、シリカ担体ポリアミンカラムを用いたHPLCによって、Fig. 4のように分画した。標準二糖のクロマトグラム（上段）との比較から、画分IVには二糖以外に、図に矢印で示した別のピークを含んでいることが判明した。この成分について組成分析を行ったところ（Table 1）、不飽和ウロン酸1モルに対し、セリンを約1モル含み、グルコサミン、硫酸基、リン酸基は含まないことが明らかになり、糖-タンパク質結合部位由来のオリゴ糖と考えられたので、グリコセリンIと命名した。グリ

コセリンIは、コンドロイチン硫酸から得られた $\Delta$ HexA-Gal-Gal-Xyl-Serという構造既知のテトラサッカライドセリン<sup>(1 2)</sup>とHPLCでコクロマトグラフィーを行ったところ、ピークが一致し同様の構造を有していることが示唆された。最終的には、500-MHz <sup>1</sup>H-NMR解析によって構造を以下のように決定した。NMRデータは他のグリコセリンのデータ<sup>(1 2)</sup>とともに、Table 2に示した。

グリコセリンI:  $\Delta$ HexA  $\alpha$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl  $\beta$  1-O-Ser

Table 1. Chemical composition of the isolated linkage glycoserines.

Components	Glycoserine I	Glycoserine II
	Molar Ratio	
Ser	1.00	1.00
$\Delta$ HexA	0.86	0.89
HexA*	0.68	1.69
GlcNH <sub>2</sub>	0.05	0.67
Sulfate	0.06	0.83
Phosphate	>0.01	n.d.**

\*including  $\Delta$ HexA.

\*\*not detected.

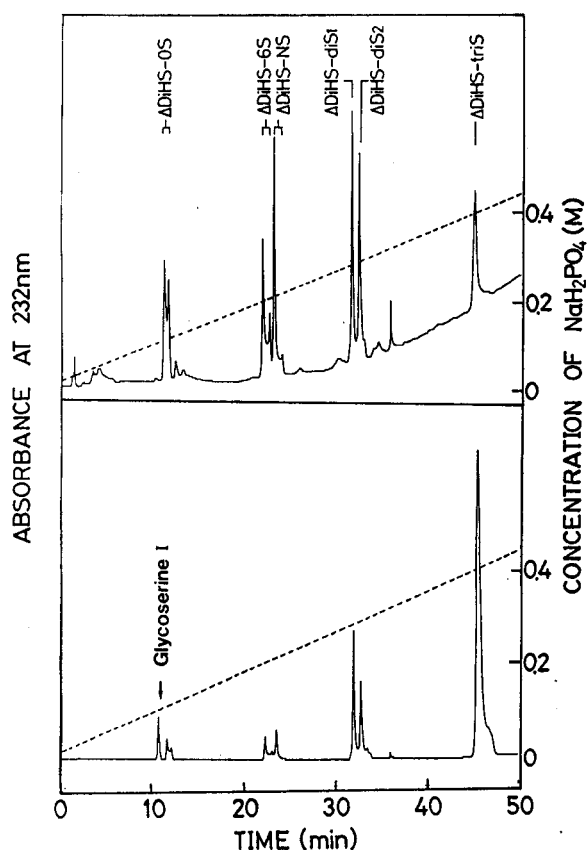


Fig. 4. Isolation of Glycoserine I by HPLC on an amine-bound silica column. Upper panel: authentic unsaturated disaccharides (0.5 nmol each) from heparin and heparan sulfate; lower panel: the oligosaccharide Fr. IV (29 nmol as  $\Delta$ HexA) obtained from gel filtration on Cellulofine GCL-90-m.

### 第3節 グリコセリンIIの構造解析

画分IIIはシリカ担体ポリアミンカラムを用いたHPLCによって、Fig. 5に示すようにさらに細かく分画した。画分IIIの全セリンのうちの約60%は最も早く溶出されたピークに回収されたので、この成分をグリコセリンIIと命名した。この成分は画分IIIの全紫外吸収のうちの2%を占めていた。他の画分にセリンはほとんど検出されず、他の画分は、不飽和ウロン酸に対するウロン酸とグルコサミンの比から、不飽和四糖と推定した。さらに遊離のアミノ基を持つ成分のみを検出するため、画分III全体を $^3\text{H}$ -無水酢酸で放射ラベルし同様のHPLC分析を行ったところ、放射活性を持つピークは一つだけ、グリコセリンIIの溶出位置の少し後ろに検出された（結果は示していない）。これは遊離のアミノ基がアセチル化されることによって溶出位置が変化したグリコセリンIIのピークと考えられる。このように $^3\text{H}$ -無水酢酸を用いた実験からも、画分III中の主要なグリコセリンは一成分であることが示された。

グリコセリンIIの組成分析を行った結果、不飽和ウロン酸、ウロン酸、グルコサミンを各1モルずつ含んでいることがわかった（Table 1）。ヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIでグリコセリンIIの消化を試みたが、いずれの酵素でも消化できなかった。しかし、ヘパリチナーゼV<sup>(38)</sup>で消化を行うとグリコセリンIIは分解され、紫外吸収を持つ二つの成分を生じた（Fig. 6）。HPLC上で標準品との比較を行った結果、それら二つの成分は $\Delta\text{DiHS-6S}$ というモノ硫酸化二糖（構造は第2章を参照）とグリコセリンIであると推定され、グリコセリンIIは $\Delta\text{HexA-GlcNAc(6S)-HexA-Gal-Gal-Xyl-Ser}$ という構造を有すると予想された（以下、構造中で6S、2S、3S、4S及びNSは、それぞれ6位、2位、3位、4位の水酸基及び2位のアミノ基が硫酸化されていることを表わす）。

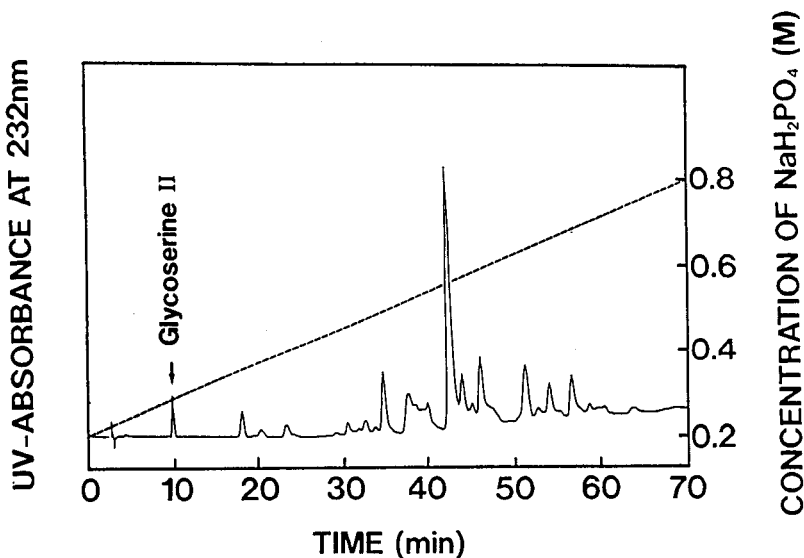


Fig. 5. Isolation of Glycoserine II by HPLC. Oligosaccharide Fr. III (18 nmol as  $\Delta\text{HexA}$ ) obtained by gel filtration on Cellulofine GCL-90-m, subfractionated on an amine-bound silica column.

Table 2. <sup>1</sup>H-Chemical shifts of structural-reporter-groups of the constituent monosaccharides of linkage glycoserines I and II together with those for a reference compound R (fraction D-1 in ref. 12). Chemical shifts are given in ppm downfield from internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate but were actually measured indirectly to acetone in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (δ 2.225) at 15 °C (reference compound at 22 °C).

Residue	Reporter group	Chemical shift in		
		R	I	II
Ser	H-α	n.d.	4.263	4.14
	H-β	n.d.	n.d.	3.90
	H-β'	n.d.	n.d.	3.90
Xyl-1	H-1	4.443	4.463	4.438
	H-2	3.356	3.370	3.349
	H-3	3.608	n.d.	3.605
	H-4	n.d.	n.d.	3.861
	H-5 ax	3.403	3.408	3.400
	H-5 eq	4.12	4.12	4.108
Gal-2	H-1	4.529	4.537	4.533
	H-2	3.670	n.d.	3.669
	H-3	3.826	n.d.	3.828
	H-4	4.188	4.193	4.193
Gal-3	H-1	4.664	4.683	4.658
	H-2	3.746	n.d.	3.739
	H-3	3.797	n.d.	3.782
	H-4	4.155	n.d.	4.162
GlcA-4	H-1	4.664	-	4.642
	H-2	3.454	-	3.418
	H-3	3.616	-	3.667
	H-4	n.d.	-	3.75
	H-5	n.d.	-	3.75
GlcNAc-5	H-1	-	-	5.406
	H-2	-	-	3.941
	H-3	-	-	3.799
	H-4	-	-	3.853
	H-5	-	-	4.015
	H-6	-	-	4.446
	H-6'	-	-	4.170
NAc	-	-	2.044	
ΔHexA-6*	H-1	5.184	5.350	5.158
	H-2	3.793	n.d.	3.813
	H-3	4.093	n.d.	4.236
	H-4	5.896	5.932	5.808

n.d. : not determined

- : not occurring

\* : for glycoserine I values of ΔHexA-4 are presented

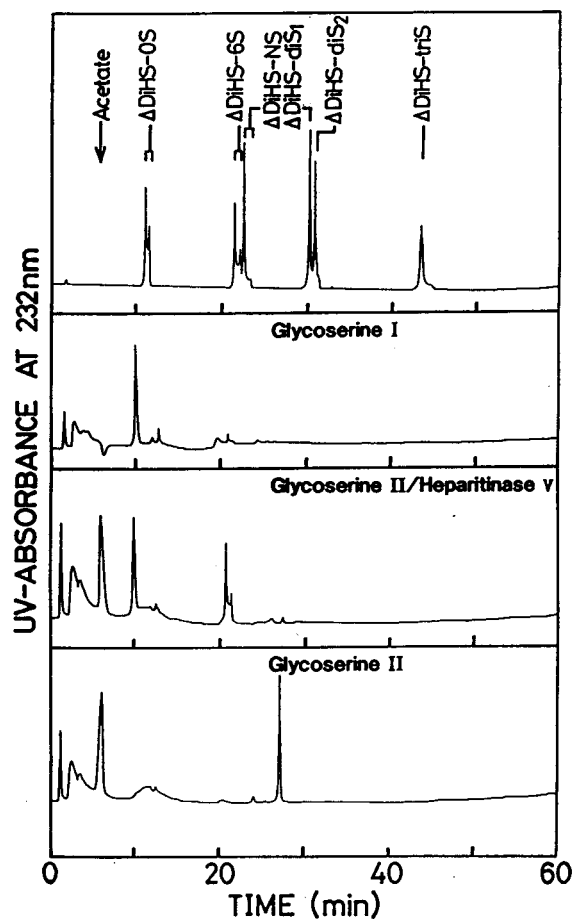


Fig. 6. Digestion of Glycoserine II with heparitinase V. Glycoserine II was digested with heparitinase V and was fractionated on an amine-bound silica column. Top panel: authentic unsaturated disaccharides (0.5 nmol each) from heparin and heparan sulfate; second panel: Glycoserine I (0.5 nmol); third panel: heparitinase V digest of Glycoserine II (0.26 nmol); bottom panel: Glycoserine II with the incubation buffer.

グリコセリンIIの最終的な構造解析は500-MHz  $^1\text{H-NMR}$ 解析によって行い、その一次元スペクトルをFig. 7に、また化学シフトの値をTable 2に示した。硫酸化されていないGlcNAcの $^1\text{H-NMR}$ データ（第2章参照）との比較から、グリコセリンIIの6位のシグナルは大きく低磁場側にシフトしており、また5位のシグナルも若干低磁場シフトしていることがわかった。すなわちGlcNAcの6位が硫酸化<sup>(39)</sup>されていることが確認できた。また、二次元HOHAHA (homonuclear Hartmann-Hahn) スペクトル<sup>(40)</sup>の解析から（結果は示していない）、セリンやガラクトースのシグナルも帰属でき、グリコセリンIIは以下のような構造であることが決定できた。

グリコセリンII:  $\Delta\text{HexA } \alpha\text{-1-4GlcNAc(6S) } \alpha\text{-1-4Glc } \beta\text{-1-3Gal } \beta\text{-1-3Gal } \beta\text{-1-4Xyl } \beta\text{-1-O-Ser}$

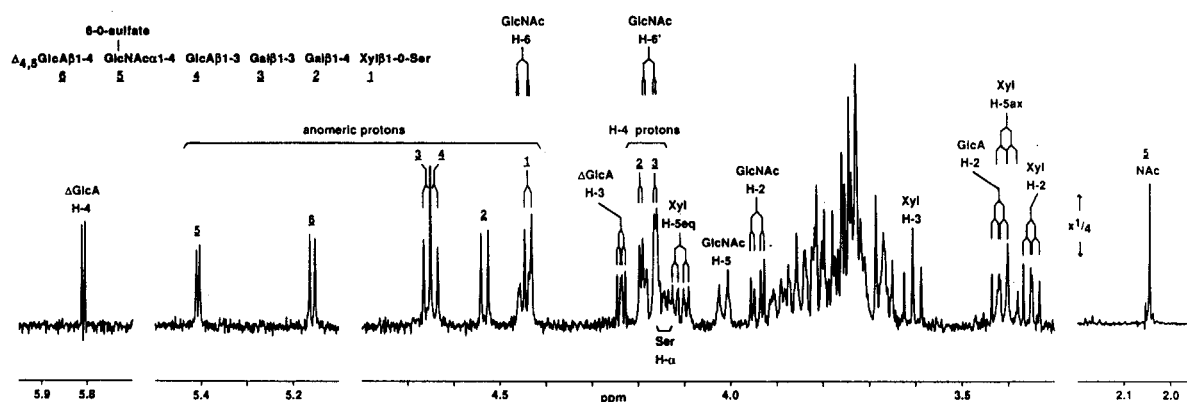


Fig. 7. Structural-reporter-group regions of the resolution-enhanced 500 MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectra of Glycoserine II recorded in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at  $15^\circ\text{C}$ . The numbers and letters in the spectra refer to the corresponding residues in the structures.

### 考察と総括

今回、ブタ小腸粘膜へパリンよりグリコセリンIとIIを得たが、このことは、糖-タンパク質結合領域近傍の構造が少なくとも二種類は存在することを表わしている。すなわち、二つの異なるタイプのへパリン糖鎖が生じうることを示しており、例えば、抗血液凝固活性を持つ（アンチトロンビンIII高親和性）糖鎖と持たない（アンチトロンビンIII低親和性）糖鎖が生じることを反映している可能性も考えられるが、グリコセリンIとIIの存在モル比はTable 3に示したとおり（96:4）であるにもかかわらず、stage 14へパリンをアンチトロンビンIII - アフィニティーカラムを用いて高親和性へパリンと低親和性へパリンとに分画するとほぼ半分ずつ（48:52）に分けられるので（結果は示していない）、両者の直接の相関はないようである。ただし、糖-タンパク質結合領域の6位の硫酸化が、へパリンの持つ他の生物活性ドメインの生合成に関連しているのかどうかは、今後の課題である。

Table 3. Molar ratios of the glycoserines, unsaturated disaccharides and unsaturated tetrasaccharides produced by heparinase/heparitinases digestion. The results obtained from Fig. 4 and 5 are summarized. The calculation is based on  $\Delta$ HexA at the non-reducing ends.

Components	Molar ratio
Glycoserine I	1.00
Glycoserine II	0.04
$\Delta$ DiHS-0S	0.94
$\Delta$ DiHS-6S	1.30
$\Delta$ DiHS-NS	0.79
$\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub>	3.40
$\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub>	2.97
$\Delta$ DiHS-triS	20.44
Unsaturated tetrasaccharides	2.07

今回単離したグリコセリンIとIIは、ガラクトース残基が硫酸化されておらず、コンドロイチン4-硫酸や6-硫酸で見つかったGlcA  $\beta$  1-3Gal(4S)  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xyl  $\beta$  1-O-Ser<sup>(12, 13)</sup> やGlcA  $\beta$  1-3Gal(6S)  $\beta$  1-3Gal(6S)  $\beta$  1-4Xyl  $\beta$  1-O-Ser<sup>(14)</sup> といった構造とは対照的である。このように、ヘパリンとコンドロイチン硫酸との間には、糖-タンパク質結合領域に違いがあることがわかった。ガラクトースの硫酸化が起こらないことが、グルコサミノグリカン（グルコサミンをアミノ糖として含むグリコサミノグリカン）生合成のシグナルになっているのかもしれない。グリコサミノグリカンが生合成されるとき、最初のN-アセチルヘキソサミンが結合領域の四糖に転移されることが、グルコサミノグリカンとガラクトサミノグリカン（ガラクトサミンをアミノ糖として含むグリコサミノグリカン）の仕分け合成を左右するステップになっており、N-アセチルグルコサミン転移酵素は硫酸化されていないガラクトースを認識し、N-アセチルガラクトサミン転移酵素は硫酸化ガラクトースを特異的なシグナルとして認識している可能性も考えられる。

糖-タンパク質結合領域の他の修飾構造として、キシロース残基のリン酸化も報告されている。これまでに、コンドロイチン硫酸<sup>(15, 41, 42)</sup>、ヘパラン硫酸<sup>(43)</sup>においてリン酸化されたキシロースが示されており、またウシの肺のヘパリン<sup>(44)</sup>でもその存在が示唆されている。しかし、今回単離したグリコセリンIとIIでは、ともにリン酸化されておらず、このことは、もともと存在していなかったのか、あるいは、調製の途中の段階で分解してしまったのか明らかではない。

また、ヘパリン／ヘパラン硫酸の糖-タンパク質結合領域の構造の一般的な特徴として、最初のグルコサミンが常にN-アセチル化されているといわれているが<sup>(45)</sup>、今回単離したグリコセリンIIの場合も、グルコサミンはN-アセチル化されていた。グリコセリンIIの構造において最も特徴的な点は、グルコサミンの6位が硫酸化されていることである。グルコサミンの6位の硫酸化は、N-硫酸化グルコサミンが隣接している場合にのみ生じると考えられており<sup>(8)</sup>、今回単離したグリコセリンIIに隣接していたグルコサミンもN-硫酸化されていたことが予想される。実際、ウシ肺ヘパリンの糖-タンパク質結合領域の場合では、二番目のグルコサミン残基はN-硫酸化されていることが、亜硝酸分解に対する感受性から示唆されている<sup>(44)</sup>。今回の場合、もし二番目のグルコサミン残基がN-硫酸化されていないならば、ブタ小腸ではこの最初のN-アセチルグルコサミンに特異的に作用するN-アセチルグルコサミン6-硫酸転移酵素が存在すると考えられる。

## 実験の部

### 1. 試薬および試料

ブタ小腸粘膜由来stage 14ヘパリン（ナトリウム塩）はAmerican Diagnostic Inc. (New York)より、Cellulofine樹脂、ヘパリナーゼ (EC 4.2.2.7)、ヘパリチナーゼ I (EC 4.2.2.8)、ヘパリチナーゼ II (EC No.なし)は生化学工業(株)より購入した。DEAE-セルロースとセファデックス樹脂はファルマシア社より購入した。六種類の不飽和二糖標準品はヘパリン／ヘパラン硫酸より調製した（第2章参照）。ヘパリチナーゼ Vは*Flavobacterium sp. Hp206*より精製したもの<sup>(38)</sup>を生化学工業(株)の吉田圭一氏より恵与された。

### 2. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー

5.29 gのstage 14ヘパリン（ナトリウム塩）を100 mlの0.5 M LiCl/0.05 M acetate-NaOH緩衝液 pH 4.0に溶かし、同じ緩衝液で平衡化した5 x 27 cmのDEAE-セルロースのカラムにかけた。カラムに31の緩衝液を流した後、0.65と1.0 MのLiClを含んだ同様の緩衝液31で、それぞれ順々に溶出した。80%エタノール沈殿によってグリコサミノグリカン（リチウム塩）を回収した。用いた試料のうち、ウロン酸として95%が1.0 M LiCl溶出面分に回収され、得られた1.0 M画分の乾燥重量は3.98 gであった。精製したヘパリンについて、

アミノ酸、アミノ糖分析を行ったところ、セリン、グリシン、グルコサミン、ガラクトサミンのモル比はそれぞれ、1.0:0.2:47.1:2.6であった。この精製ヘパリンを糖-タンパク質結合領域の単離に用いた。

### 3. 精製ヘパリンの酵素消化による低分子化

精製ヘパリン250 mg (リチウム塩) はヘパリナーゼ15 IU、ヘパリチナーゼ I 3 IU、ヘパリチナーゼ II 6 IUを用いて、2 mM  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を含む20 mM acetate-NaOH緩衝液、pH 7.0、15 ml中、37 °Cで消化を行った。10~20分ごとに消化液を一部ずつとり、232 nmの紫外吸収を測定して反応の経過を追った。消化に用いた三種類の酵素は、いずれも加水分解酵素ではなく脱離酵素であり、糖鎖の非還元末端に232 nmの吸収極大を持つ不飽和結合を生じるためである。反応開始後2.5時間でプラトーに達したが、反応を完全にするためさらに2時間37 °Cに保ち続けた。そして、100 °Cで2分間加熱して反応を停止した。消化物を0.2 M NaCl溶液に調整した後、二回に分けて、Cellulofine GCL-90-mのカラム (3.0 x 104.5 cm) でゲルろ過クロマトグラフィーを行った。用いた溶媒は0.2 M NaClで、流速は30 ml/hであった。溶出液を7.5 mlずつ集め、210と230 nmの両方の紫外吸収でモニターした。Fig. 3のように、画分IからIVの四画分に分画し、濃縮後、Cellulofine GCL-25-mで脱塩し、凍結乾燥した。

### 4. グリコセリンIIの各種ヘパリチナーゼ消化

グリコセリンIIのヘパリチナーゼI、II、Vによる消化は、試料0.26 nmolに対し1.24 mIUの酵素を用い、2 mM  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を含む20 mM acetate-NaOH緩衝液、pH 7.0、13  $\mu\text{l}$ 中で、37°C、1.5時間行った。反応は100 °C、一分間の熱処理で停止した。消化物は16 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ で500  $\mu\text{l}$ に調整し、ポリアミンカラムを用いたHPLCで分析した。

### 5. HPLC分析

酵素消化によって生じてきた不飽和二糖やオリゴ糖はHPLCを用いて、分析や分画をした。二糖として0.5から20 nmol含むように試料を調製し、16 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ で400  $\mu\text{l}$ に希釈し、0.45  $\mu\text{m}$ のメンブランフィルター (C3HV、ミリポア社)でろ過後、シリカ担体ポリアミンカラム (PA03カラム、4.6 x 250 mm、YMC社)で分析した。HPLCのシステムは、島津製作所のLC6Aシステムを用い、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ の直線的な濃度勾配をかけて溶出を行っ

た。画分IIIの分析には70分間で200 mMから800 mMに、画分IVの分析には60分間で16 mMから530 mMにNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>の濃度を変化させた。グリコセリンIIのヘパリチナーゼ消化物の分析は後者の条件で行った。流速は1 ml/minで、検出は232 nmの紫外吸収を用いた。一方、分画のためのHPLCでは、一回あたり不飽和ウロン酸として1  $\mu$  mol相当のオリゴ糖を用いた。分取した各オリゴ糖成分は、濃縮し、セファデックスG-25カラムを用いて脱塩した。

## 6. 500-MHz <sup>1</sup>H-NMR解析

グリコセリンIとIIは、D<sub>2</sub>O (99.96%D、アルドリッチ社) 中で凍結乾燥を繰り返して重水素交換を行い、<sup>1</sup>H-NMR測定用試料とした。500-MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトルの測定は、Utrecht大学 (オランダ) のVliegenthart博士らとの共同研究で行った。Bruker社AM-500スペクトロメーター (オランダ、Utrecht大学、NMR測定室) を用い、HODシグナルによる妨害を避けるために15°Cで測定した。化学シフトの値は4, 4-ジメチル-4-シラペンタン-1-スルホン酸ナトリウムを基準にしてもとめた。実際にはD<sub>2</sub>O中のアセトンの化学シフト( $\delta$  2.225)を用いて、間接的にもとめた<sup>(20, 46)</sup>。

## 7. その他の分析法

ウロン酸はカルバゾール法によって定量した<sup>(47)</sup>。酵素消化で生じた不飽和ウロン酸を含む成分は、232 nmにおけるミリ分子吸光係数の平均的な値5.5を用いて、光学的に定量した<sup>(48)</sup>。また、菅原らの報告した方法に基づき、アミノ酸とアミノ糖はアミノ酸分析機 (ベックマン6300Eアミノ酸分析装置) を用いて<sup>(49)</sup>、硫酸基とリン酸基は熱分解後イオンクロマトグラフィーによって<sup>(50)</sup> 定量した。

## 第2章 $^1\text{H-NMR}$ 解析によるグリコサミノグリカン鎖の構造研究<sup>(28)</sup>

グリコサミノグリカンは、血液凝固阻害<sup>(1)</sup>、細胞増殖調節<sup>(2, 3)</sup>、血管形成誘導<sup>(4)</sup>、acidic及びbasic FGFとの相互作用<sup>(5-7)</sup>など、広範な生物活性を有していることが示されてきた。しかし、ヘパリンのアンチトロンビンIIIとの結合部位の五糖構造<sup>(18, 51)</sup>や、デルマトン硫酸のヘパリンコファクターIIとの結合部位の六糖<sup>(52)</sup>といったきわめて少ない例を除けば、機能と微細構造との相関関係については殆ど理解されていない。これは、主としてグリコサミノグリカンの精密構造の解析の困難さによるものであり、グリコサミノグリカンはウロン酸の5位の異性化や様々な位置への硫酸化によって、非常に多様な構造をとりうる。 $^1\text{H-NMR}$ による解析は、近年、複雑な糖鎖の構造研究において有効に利用されており<sup>(20)</sup>、さらには、二次元 HOHAHA、COSY (correlation spectroscopy)、NOESY (二次元nuclear Overhauser effect spectroscopy) といった測定技術を駆使することによって、アセチル基<sup>(53, 54)</sup>、メチル基<sup>(55, 56)</sup>、リン酸基<sup>(57, 58)</sup>、硫酸基<sup>(12, 59)</sup>などの置換基の存在や位置を正確に決定できる。最近では、グリコサミノグリカンの分野でも、硫酸基やリン酸基で修飾された構造が、これらNMRの技術を利用して精密に解析されるようになってきた<sup>(12-16, 60-62)</sup>。

本章では、コンドロイチン硫酸とヘパラン硫酸/ヘパリンから得た16種類の不飽和二糖の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを測定し、硫酸化オリゴ糖の $^1\text{H-NMR}$ データベース<sup>(21)</sup>を構築し、硫酸化の化学シフトに及ぼす影響を体系的に研究した<sup>(28)</sup>。

### 第1節 グリコサミノグリカン由来の不飽和二糖の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの測定

グリコサミノグリカンをバクテリア由来の脱離酵素で分解するとFig. 8に示すような不飽和二糖が生じる。図の左側はコンドロイチン硫酸由来の二糖を、また右側はヘパラン硫酸/ヘパリン由来の二糖を表わしている。コンドロイチン硫酸から得られる二糖は共通の二糖構造、 $\Delta\text{HexA } \alpha\text{-1-3GalNAc}$ を有しており、通常硫酸化されうる部位は、GalNAcの4位と6位およびウロン酸の2位の水酸基である。一方ヘパラン硫酸/ヘパリン由来の二糖は、 $\Delta\text{HexA } \alpha\text{-1-4GlcN}$ という構造を共有しており、ここでグルコサミンのアミノ基はアセチル化されているか硫酸化されているかのいずれかである。通常硫酸化されうる部位は、グルコサミンの6位とウロン酸の2位の水酸基、グルコサミンの2

位のアミノ基である。またグルコサミンの3位の水酸基が硫酸化される場合もあるが<sup>(18, 51)</sup>、そのような成分はヘパラン硫酸/ヘパリン中では微量なので、ここでは省略した。どちらの二糖においても三箇所の硫酸化部位があるため、硫酸化されていない二糖が1種類、モノ硫酸化二糖が3種類、ジ硫酸化二糖が3種類、トリ硫酸化二糖が1種類ずつの各8種類の二糖が存在する。したがって、合計16種類の不飽和二糖について500-MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定し、硫酸化の化学シフトに及ぼす影響を検討した。各構成糖の化学シフトは、二次元HOHAHA、COSY、NOESYの三種類の二次元NMR法を用いて帰属した。二次元HOHAHAスペクトルでは構成単糖に属するすべてのプロトンシグナルのクロスピークがクロスセクション上に検出される。COSYスペクトルでは、隣り合うプロトン間でのクロスピークが検出される。NOESYスペクトルでは、0.3 nm以下の距離のプロトン間でのクロスピークのみが検出され、二つの糖残基間での結合位置が決定できる。16種類の不飽和二糖の化学シフトを帰属することによって、化学シフトに及ぼす硫酸化の影響を体系的に検討した。

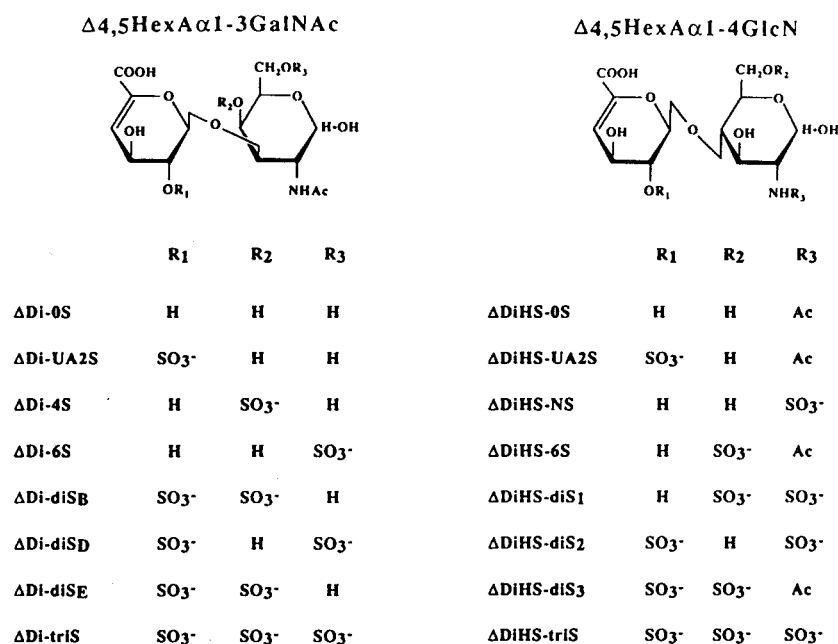


Fig. 8. Structures of eight unsaturated disaccharides derived from chondroitin sulfate (left) and heparan sulfate/heparin (right). The three sulfation sites for each series of disaccharides are referred to as R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub>. Abbreviations used for the unsaturated disaccharides are summarized as follows. Δ<sub>4,5</sub>HexA, 4-deoxy-α-L-threohex-4-enopyranosyluronic acid; ΔDi-0S, Δ<sub>4,5</sub>HexAα1-3GalNAc; ΔDi-4S, Δ<sub>4,5</sub>HexAα1-3GalNAc(4-sulfate); ΔDi-6S, Δ<sub>4,5</sub>HexAα1-3GalNAc(6-sulfate); ΔDi-UA2S, Δ<sub>4,5</sub>HexA(2-sulfate)α1-3GalNAc; ΔDi-diSB, Δ<sub>4,5</sub>HexA(2-sulfate)α1-3GalNAc(4-sulfate); ΔDi-diSD, Δ<sub>4,5</sub>HexA(2-sulfate)α1-3GalNAc(6-sulfate); ΔDi-diSE, Δ<sub>4,5</sub>HexAα1-3GalNAc(4,6-disulfate); ΔDi-triS, Δ<sub>4,5</sub>HexA(2-sulfate)α1-3GalNAc(4,6-disulfate); ΔDiHS-0S, Δ<sub>4,5</sub>HexAα1-4GlcNAc; ΔDiHS-6S, Δ<sub>4,5</sub>HexAα1-4GlcNAc(6-sulfate); ΔDiHS-UA2S, Δ<sub>4,5</sub>HexA(2-sulfate)α1-4GlcNAc; ΔDiHS-NS, Δ<sub>4,5</sub>HexAα1-4GlcN(N-sulfate); ΔDiHS-diS<sub>1</sub>, Δ<sub>4,5</sub>HexAα1-4GlcN(6-,N-disulfate); ΔDiHS-diS<sub>2</sub>, Δ<sub>4,5</sub>HexA(2-sulfate)α1-4GlcN(N-sulfate); ΔDiHS-diS<sub>3</sub>, Δ<sub>4,5</sub>HexA(2-sulfate)α1-4GlcNAc(6-sulfate); ΔDiHS-triS, Δ<sub>4,5</sub>HexA(2-sulfate)α1-4GlcN(6-,N-disulfate).

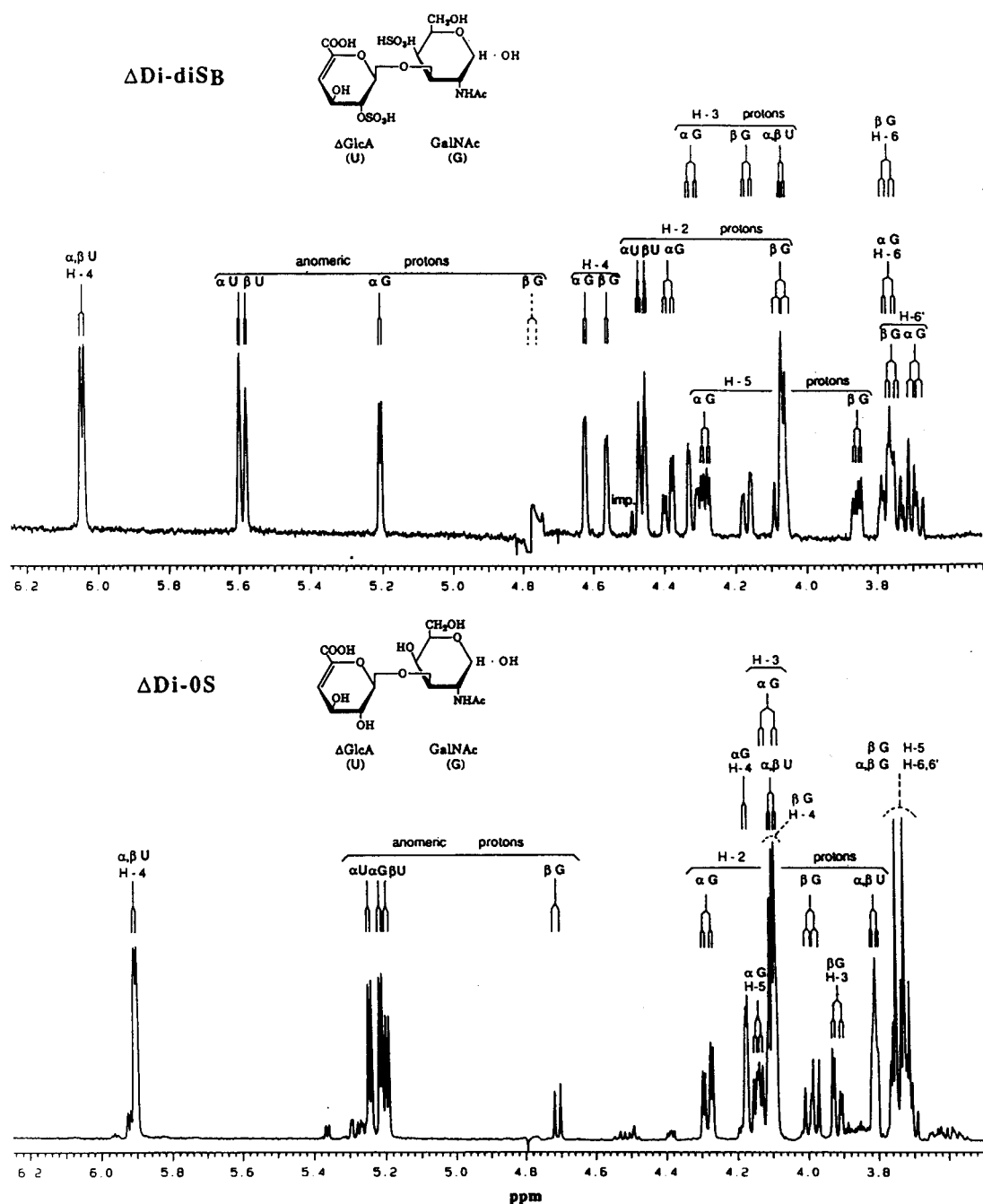


Fig. 9. 500 MHz  $^1\text{H-NMR}$  spectra of  $\Delta\text{Di-0S}$  and  $\Delta\text{Di-diSB}$  recorded in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at  $26^\circ\text{C}$ . Upper panel,  $\Delta\text{Di-diSB}$ ; lower panel,  $\Delta\text{Di-0S}$ . U,  $\Delta\text{GlcA}$ ; G, GalNAc;  $\alpha$ , an  $\alpha$ -anomer;  $\beta$ , a  $\beta$ -anomer.

## 第2節 各プロトンの化学シフトの帰属

コンドロイチン硫酸由来の  $\Delta\text{Di-0S}$  と  $\Delta\text{Di-diSB}$  の  $^1\text{H-NMR}$  一次元スペクトルを例として Fig. 9 に示した。これらの二糖は水溶液中で  $\alpha$ -、 $\beta$ -アノマーの平衡状態で存在しており、各プロトンのシグナルがアノマーの違いによって二つに分かれている。4.7から6.1 ppmの間と2.1 ppmあたりのシグナルは、多くのシグナルの入り混んだ bulk 領域 (3.6-4.2

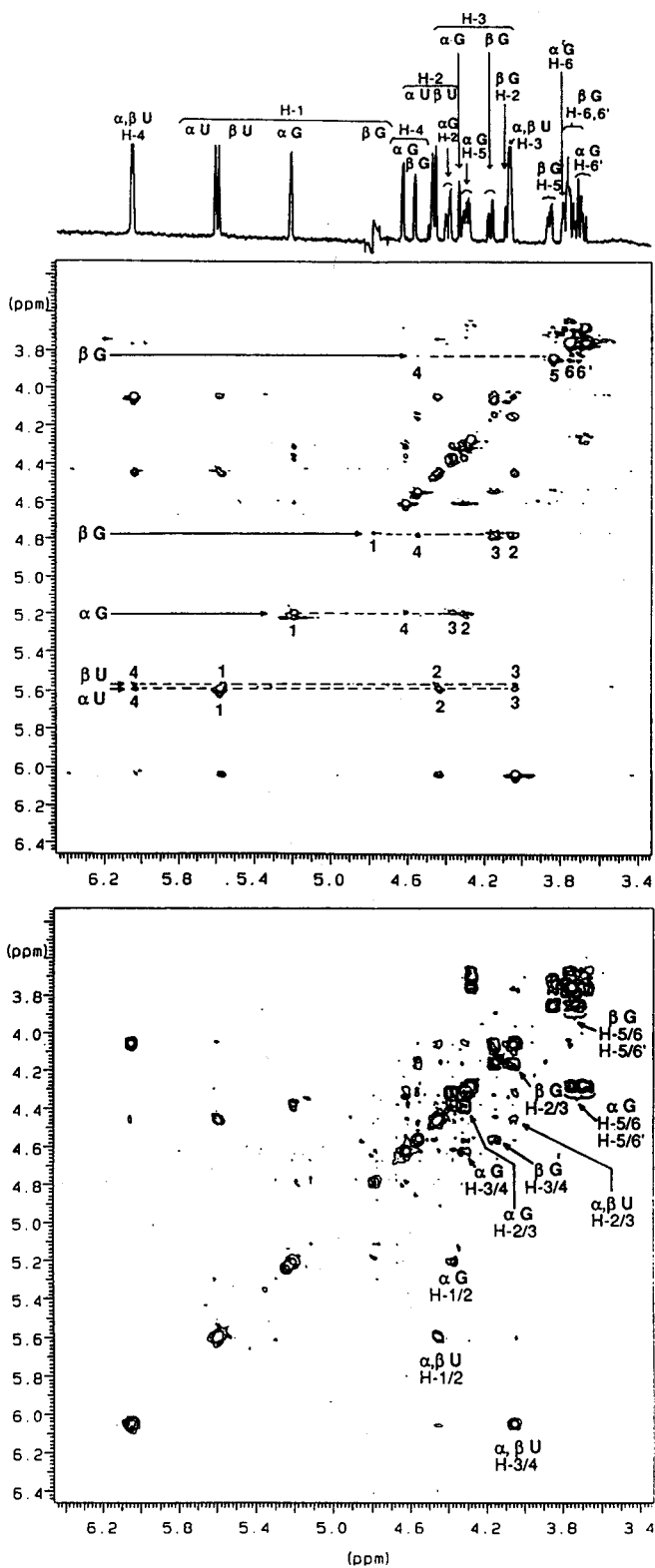


Fig. 10. Two dimensional HOHAHA spectrum (upper panel) and COSY spectrum (lower panel) of  $\Delta$ Di-diS<sub>B</sub> recorded in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 26°C. U,  $\Delta$ GlcA; G, GalNAc;  $\alpha$ , an  $\alpha$ -anomer;  $\beta$ , a  $\beta$ -anomer.

ppm)のシグナルとは離れ、個々のシグナルがはっきりとしていて容易に帰属ができるので、この領域を structural-reporter-group 領域という。4.7から5.7 ppmの間に観測されるシグナルはアノメリックプロトンに特徴的であり、また6.0 ppmあたりのもものは  $\Delta$  HexAのH-4プロトン<sup>(12)</sup>に、2.1 ppmあたりのもものは GalNAcのアセトアミド基のプロトンにそれぞれ特徴的であることがわかっている。これら特徴的なシグナルと関連させることにより、他のプロトンの化学シフトも、二次元 HOHAHAと COSYスペクトルを用いて帰属できる。Fig. 10に  $\Delta$  Di-diS<sub>B</sub>の二次元スペクトルを例として示した。 $\delta$  6.048に観測される  $\Delta$  HexAのH-4プロトンから帰属を開始した。COSYスペクトルにおいて、H-4プロトンとH-3プロトンとのクロスピークが見られ、 $\Delta$  HexAのH-3の化学シフトが  $\delta$  4.061と帰属できた。さらに COSYスペクトル上で、そのH-3のシグナルとのクロスピークから、 $\alpha$ -および  $\beta$ -アノマー体の  $\Delta$  HexAのH-2の化学シフトがそ

れぞれ  $\delta$  4.471、4.454 と帰属できた。この経過を続けていくことにより、 $\Delta$ HexA の H-1 の化学シフトも帰属できた。もう一方の構成糖である GalNAc の場合も、 $\alpha$ -アノマー体は  $\delta$  5.208 の H-1 のシグナルから開始し、 $\beta$ -アノマー体は  $\delta$  4.775 の H-1 のシグナルから開始して、同様の手法で各プロトンの化学シフトの帰属を行った。他の二糖のプロトン化学シフトについても、同じ方法で帰属を行い、それらの NMR データは結合定数の値とともに Table 4、5 にまとめた。また、ヘパラン硫酸／ヘパリン由来の二糖の例として  $\Delta$ DiHS-OS、 $\Delta$ DiHS-UA2S、 $\Delta$ DiHS-NS の  $^1\text{H-NMR}$  一次元スペクトルを Fig. 11 に示した。興味深いことに、*N*-硫酸化グルコサミンを含む二糖 ( $\Delta$ DiHS-NS、 $\Delta$ DiHS-diS<sub>1</sub>、 $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>、 $\Delta$ DiHS-triS) においては、 $\alpha$ -アノマー体のシグナルは観測されたが、 $\beta$ -アノマー体のものは見られなかった (Fig. 11 下段、Table 5)。この現象は、 $^{13}\text{C}$  NMR を用いた解析においてもすでに報告されている (6<sup>3</sup>、6<sup>4</sup>)。すなわち、アミノ基の硫酸化によって、立体障害的な影響か、あるいは *N*-硫酸基とアノマー炭素に結合した水酸基との間で水素結合が形成されるためか、何らかの理由で、これらの糖が  $\alpha$  配座に固定されるようである。

**Table 4.  $^1\text{H}$ -Chemical Shifts of the Constituent Monosaccharides of Unsaturated Disaccharides Derived from Chondroitin Sulfate**

		$\Delta$ DI-OS		$\Delta$ DI-UA2S		$\Delta$ DI-4S		$\Delta$ DI-6S		$\Delta$ DI-diS <sub>B</sub>		$\Delta$ DI-diS <sub>D</sub>		$\Delta$ DI-diS <sub>E</sub>		$\Delta$ DI-triS	
		$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\beta$
GalNAc	H-1	5.215	4.710	5.211	4.726	5.212	4.788	5.218	4.726	5.208	4.775	5.180	4.705	5.222	4.767	5.215	4.762
	H-2	4.285	3.989	4.288	3.992	4.367	4.066	4.291	4.006	4.381	4.065	4.258	3.975	4.379	4.086	4.390	4.112
	H-3	4.103	3.927	4.123	3.942	4.323	4.153	4.132	3.951	4.326	4.165	4.096	3.932	4.357	4.182	4.358	4.178
	H-4	4.176	4.106	4.064	3.974	4.685	4.617	4.237	4.159	4.624	4.563	4.068	4.147	4.665	4.731	4.660	4.602
	H-5	4.142	-	4.141	3.740	4.289	3.852	4.375	3.964	4.284	3.851	4.335	-	4.533	-	4.525	4.119
	H-6	-	-	3.721	-	3.771	3.778	4.199	4.216	3.768	3.763	-	-	-	4.274	4.257	4.266
	H-6'	-	-	3.697	-	3.704	3.760	4.138	4.159	3.694	3.750	-	-	-	-	4.112	4.137
	N-Ac	2.055	2.055	2.086	2.086	2.088	2.088	2.050	2.050	2.109	2.109	2.050	2.050	2.088	2.088	2.109	2.109
$\Delta$ GlcA	H-1	5.245	5.197	5.554	5.522	5.305	5.269	5.233	5.189	5.602	5.585	5.523	5.495	5.304	5.273	5.611	5.596
	H-2	3.810	3.807	4.477	4.474	3.840	3.840	3.798	3.790	4.471	4.454	4.440	4.438	3.828	3.846	4.453	4.466
	H-3	4.099	4.099	4.204	4.194	3.950	3.948	4.117	4.109	4.061	4.061	4.161	4.161	3.959	3.951	4.062	4.062
	H-4	5.904	5.904	6.046	6.037	5.973	5.971	5.886	5.882	6.048	6.048	6.004	5.995	5.960	5.966	6.048	6.048
Coupling Constants																	
GalNAc	J <sub>12</sub>	4.0	8.5	3.5	8.5	3.5	8.5	4.0	8.5	3.5	8.0	4.0	8.5	3.5	8.5	3.5	7.0
	J <sub>23</sub>	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	10.5	11.0	10.5	10.5	11.0	11.0
	J <sub>34</sub>	3.5	3.5	3.0	3.0	2.5	2.5	3.5	3.0	2.5	3.0	2.5	3.0	2.5	2.5	2.5	2.5
	J <sub>45</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	J <sub>56</sub>	5.0	-	4.5	-	4.0	3.5	3.5	4.0	4.0	8.5	3.5	-	2.5	-	2.5	2.5
	J <sub>56'</sub>	8.5	-	7.5	-	8.5	7.0	8.5	8.0	8.0	4.5	8.5	-	9.0	-	9.0	4.0
$\Delta$ GlcA	J <sub>66'</sub>	-	-	11.5	-	11.5	11.5	-	-	11.5	11.5	-	-	-	-	11.0	10.5
	J <sub>12</sub>	4.5	4.5	1.5	1.5	3.0	3.5	4.5	4.5	1.0	1.0	1.0	1.0	3.5	3.5	1.0	1.0
	J <sub>23</sub>	1.5	1.5	1.5	1.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	3.0	3.0	1.5	1.5
J <sub>34</sub>	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.0	4.0	5.0	5.0	4.5	4.0	4.0	5.0	5.0	5.0	

Chemical shifts and coupling constants are expressed in ppm and Hz, respectively.

- : not determined.

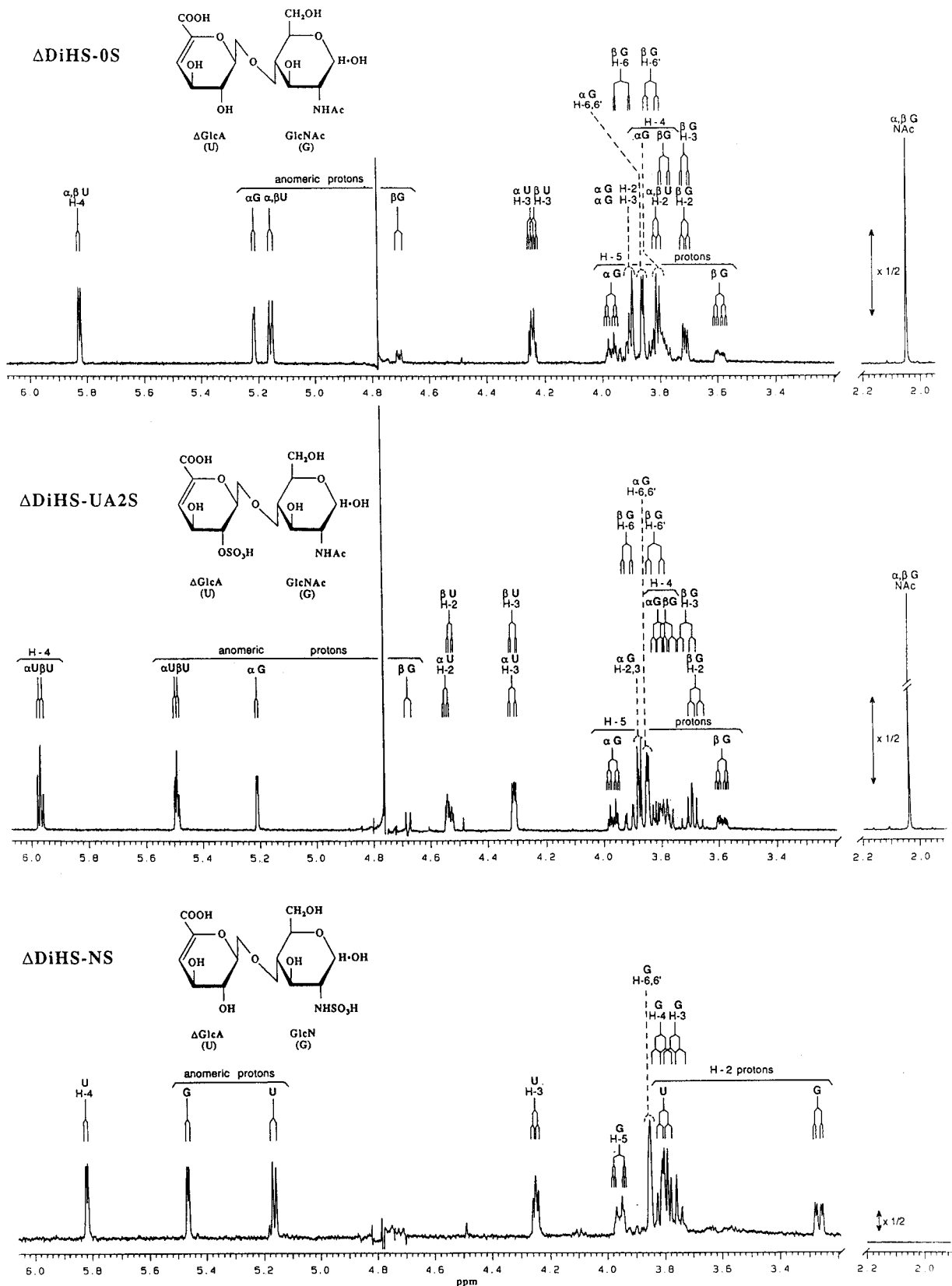


Fig. 11. 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spectra of  $\Delta\text{DiHS-0S}$ ,  $\Delta\text{DiHS-UA2S}$  and  $\Delta\text{DiHS-NS}$  recorded in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at  $26^\circ\text{C}$ . Top panel,  $\Delta\text{DiHS-0S}$ ; middle panel,  $\Delta\text{DiHS-UA2S}$ ; bottom panel,  $\Delta\text{DiHS-NS}$ . U,  $\Delta\text{GlcA}$ ; G, GlcN;  $\alpha$ , an  $\alpha$ -anomer;  $\beta$ , a  $\beta$ -anomer.

**Table 5. <sup>1</sup>H-Chemical Shifts of the Constituent Monosaccharides of Unsaturated Disaccharides Derived from Heparan Sulfate**

		ΔDIHS-OS		ΔDIHS-UA2S		ΔDIHS-NS		ΔDIHS-6S		ΔDIHS-diS <sub>1</sub>		ΔDIHS-diS <sub>2</sub>		ΔDIHS-diS <sub>3</sub>		ΔDIHS-triS	
		α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
GlcNAc	H-1	5.220	4.708	5.214	4.687	5.464	--	5.221	4.711	5.468	--	5.457	--	5.217	4.716	5.455	--
	H-2	3.894	3.708	3.871	3.678	3.266	--	3.906	3.726	3.281	--	3.250	--	3.901	3.706	3.274	--
	H-3	3.903	3.710	3.873	3.707	3.759	--	3.871	3.684	3.725	--	3.721	--	3.901	3.733	3.761	--
	H-4	3.799	3.778	3.796	3.780	3.807	--	3.848	3.825	3.828	--	3.789	--	3.832	3.826	3.834	--
	H-5	3.969	3.594	3.966	3.589	3.958	--	4.163	3.796	4.150	--	3.958	--	4.177	3.808	4.167	--
	H-6	3.861	3.926	3.848	3.908	3.851	--	4.365	4.320	4.366	--	3.834	--	4.360	4.308	4.353	--
	H-6'	3.854	3.817	3.843	3.812	3.849	--	4.254	4.208	4.247	--	3.829	--	4.229	4.297	4.214	--
N-Ac	2.043	2.043	2.035	2.035	--	--	2.039	2.039	--	--	--	--	2.040	2.040	--	--	
ΔGlcA	H-1	5.158	5.158	5.499	5.492	5.163	--	5.204	5.204	5.204	--	5.521	--	5.494	5.494	5.513	--
	H-2	3.809	3.809	4.548	4.532	3.801	--	3.852	3.852	3.837	--	4.551	--	4.571	4.563	4.567	--
	H-3	4.246	4.237	4.314	4.310	4.250	--	4.208	4.208	4.212	--	4.293	--	4.353	4.345	4.343	--
	H-4	5.829	5.829	5.973	5.964	5.818	--	5.847	5.847	5.839	--	5.989	--	5.961	5.952	5.980	--
<b>Coupling Constants</b>																	
GlcNAc	J <sub>12</sub>	2.0	8.0	2.5	8.0	3.5	--	3.0	8.0	3.5	--	3.5	--	2.5	8.0	3.5	--
	J <sub>23</sub>	-	9.0	-	10.0	10.0	--	11.0	11.0	10.5	--	10.0	--	-	10.0	10.0	--
	J <sub>34</sub>	-	4.5	6.0	8.0	10.0	--	8.0	7.0	10.0	--	10.0	--	-	7.0	9.0	--
	J <sub>45</sub>	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	--	9.0	-	10.0	--	10.0	--	10.0	-	10.0	--
	J <sub>56</sub>	3.5	2.0	3.0	2.5	2.5	--	4.0	-	3.5	--	3.0	--	4.0	4.0	4.0	--
	J <sub>56'</sub>	3.5	4.5	3.0	4.5	2.5	--	1.0	-	1.5	--	3.0	--	2.0	2.0	1.5	--
	J <sub>66'</sub>	-	13.0	-	12.0	-	--	11.0	-	11.0	--	-	--	11.0	10.0	11.0	--
ΔGlcA	J <sub>12</sub>	5.5	5.5	3.5	3.5	6.0	--	5.0	5.0	5.5	--	2.5	--	3.5	3.5	3.5	--
	J <sub>23</sub>	5.5	5.5	2.0	2.0	5.5	--	-	-	4.5	--	1.5	--	3.5	3.5	2.0	--
	J <sub>34</sub>	3.5	3.5	5.0	5.0	3.5	--	3.0	3.0	4.0	--	4.5	--	4.0	4.0	4.5	--

Chemical shifts and coupling constants are expressed in ppm and Hz, respectively.

- : not determined.

-- : not occurring.

## 考察と総括

今まで示してきたデータに基づき、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの化学シフトに及ぼす硫酸化の影響を体系的に検討した。例えば、ΔDi-diS<sub>B</sub>のスペクトルをΔDi-OSのものと比較し (Fig. 9)、各プロトンの化学シフトの差を調べた。それぞれのα-アノマー体を比較した場合、GalNAcのH-3、H-4、H-5でそれぞれ0.223、0.448、0.142 ppm、ΔHexAのH-1、H-2でそれぞれ0.357、0.661 ppmの差があった (Table 4)。またβ-アノマー体を比較した場合でも、α-アノマー体の場合と非常によく似た程度のシフトが観測された。つまり、GalNAcの4位の硫酸化とΔHexAの2位の硫酸化によってGalNAcのH-3、H-4、H-5の化学シフトとΔHexAのH-1、H-2の化学シフトが、それぞれ低磁場側にシフトすることが判明した。さらに、コンドロイチン硫酸由来の8種類の二糖の化学シフトを比較すると、GalNAcの6あるいは4位、ΔHexAの2位の硫酸化によって、その硫酸基が結合

した部位のプロトン及びそれに隣接するプロトンの化学シフトは、 $\alpha$ -、 $\beta$ -のアノマーに関係なく、それぞれ0.4-0.74 ppm及び0.2-0.35 ppmずつ低磁場側へシフトすることがわかった。これらの硫酸化による影響は相加的であり、ジ硫酸化二糖やトリ硫酸化二糖の化学シフトは、各モノ硫酸化二糖の化学シフトを組み合わせたものとよく一致していた (Table 4)。

ヘパラン硫酸／ヘパリン由来の二糖における硫酸化の化学シフトに及ぼす影響についても、8種類の二糖の化学シフトを比較して体系的に検討した (Fig. 11、Table 5)。その結果、 $\Delta$ HexAの2位の硫酸化あるいはGlcNAcの6位の硫酸化によって、その硫酸基が結合した部位のプロトン及びそれに隣接するプロトンの化学シフトは、それぞれ0.38-0.76 ppm及び0.07-0.36 ppmずつ低磁場側へシフトすることがわかった (Table 5)。一方、グルコサミンのN-硫酸化では、そのアミノ基が結合している2位のプロトン及びそれに隣接する3位のプロトンの化学シフトは、それぞれ約0.63及び約0.15 ppm高磁場側へシフトし、逆に1位のプロトンの化学シフトは約0.24 ppm低磁場側へシフトすることがわかった。一般に、硫酸化によってその結合部位のプロトンの化学シフトは約0.5 ppm低磁場側へシフトすることが知られているが<sup>(39)</sup>、同様にN-アセチル化も大きな低磁場シフトを生じることがわかっている。よって、今回N-硫酸化によってプロトン化学シフトの高磁場シフトが生じたのは、N-アセチル化による低磁場側へのシフトの程度がN-硫酸化による低磁場シフトに比べて大きかったために、N-アセチルからN-硫酸への置換によって、見かけ上正味量だけ高磁場側へシフトしたものと思われる。以上述べてきたこれらの硫酸化による影響は、 $\alpha$ -、 $\beta$ -のアノマーに関係なく起こる。また、それぞれの影響は相加的であり、ジ硫酸化二糖やトリ硫酸化二糖の化学シフトは、明らかに各モノ硫酸化二糖の化学シフトを組み合わせたものとよく一致していた (Table 5)。

コンドロイチン硫酸から得られた不飽和二糖の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルは今まで報告されたことはなく、またヘパラン硫酸／ヘパリン由来の不飽和二糖の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルについても、 $\alpha$ と $\beta$ の両方のアノマーの化学シフトを二次元の手法を用いて正確に帰属したのは初めてである。今回われわれが得た二組16種類の二糖の<sup>1</sup>H-NMRのデータは、化学シフトに及ぼす硫酸化の影響を知るうえで有用であった。また、これらのデータはさらに大きな硫酸化オリゴ糖の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを解析するうえで役立つであろう。

## 実験の部

## 1. 試薬

AG1-X2樹脂はバイオラッドより購入した。重水(99.96% D、フランス原子力開発庁)はナカライテスク社より購入した。

## 2. 不飽和二糖の調製

コンドロイチン硫酸由来の8種類の不飽和二糖は生化学工業(株)より購入し、その同定と純度の確認はポリアミンカラムを用いたHPLC分析によって行った<sup>(65)</sup>。Δ DiHS-UA2SとΔ DiHS-diS<sub>3</sub>の2種類のヘパラン硫酸/ヘパリン由来の不飽和二糖は生化学工業(株)の吉田圭一氏より恵与された。これらは、生化学工業(株)において、ヘパリンを脱N-硫酸化後N-アセチル化し、バクテリア由来の脱離酵素で分解後、Dowex AG 1 x 4のイオン交換クロマトグラフィーで分画したものである<sup>(66)</sup>。他の六種類の不飽和二糖はブタ小腸粘膜由来のstage 14ヘパリンを、ヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIの三種類の酵素で消化して(第1章参照)、以下のように調製したものである。酵素消化物をゲルろ過によって分画し(第1章、Fig. 3)、そのうち二糖で構成された最も低分子の画分である画分IV(不飽和ウロン酸として234 μmol相当)を、0.1 M NaClで平衡化しておいた陰イオン交換樹脂AG 1-X2 (Cl<sup>-</sup>型)のカラム(2 x 16 cm)にかけた。0.1 M NaClで素通り画分を回収した後、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0 M NaClで順々に段階的に溶出した。溶出液は紫外吸収でモニターし、232 nmにおけるミリ分子吸光係数5.5を用いて定量した。六種類の二糖からなる各画分をセファデックスG-25 fineカラムを用いたゲルろ過で脱塩し、ポリアミンカラムを用いたHPLCで同定した。アンチトロンビンIII結合部位に由来する3-O-硫酸化グルコサミンを含む二糖は、バクテリア由来のヘパリナーゼやヘパリチナーゼを用いた消化では生じていないようであった。第3章で詳述するが、バクテリア由来の脱離酵素による消化では3-O-硫酸化グルコサミンを含む二糖は生じず、還元末端に3-O-硫酸化グルコサミンを含む四糖が生じるためと考えられる。

## 3. 500-MHz <sup>1</sup>H-NMR測定

各不飽和二糖(0.3から0.5 μmol相当)はD<sub>2</sub>O(99.96%D、フランス原子力開発庁)中で凍結乾燥を繰り返して重水素交換を行い、<sup>1</sup>H-NMR測定用試料とした。500-MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトルの測定及び解析は、神戸薬科大学中央分析の杉浦眞喜子博士との共同研究で行った。Varian社のVXR-500(神戸薬科大学中央分析、NMR測定室)を用い、

26°Cで測定した<sup>(67)</sup>。化学シフトの値は4,4-ジメチル-4-シラペンタン-1-スルホン酸ナトリウムを基準にしてもとめた。実際にはD<sub>2</sub>O中のアセトンの化学シフト( $\delta$  2.225)を用いて、間接的にもとめた<sup>(20, 46)</sup>。

### 第3章 ヘパリンの繰り返し二糖領域の構造研究<sup>(29-31)</sup>

第1章では、ヘパリンの糖-タンパク質結合領域の構造研究について述べた。この章では、ヘパリンの繰り返し二糖領域に由来する四糖（一成分だけ三糖も含む）を単離し、構造解析した研究について詳述する<sup>(29-31)</sup>。

ヘパリンは高度に硫酸化された多糖であり、主として $\rightarrow 4\text{GlcN}(N,6\text{-disulfate})\alpha 1\rightarrow 4\text{IdoA}(2\text{-sulfate})\alpha 1\rightarrow$ というトリ硫酸化二糖の繰り返しによって構成されている。このような構造部分をレギュラー領域と呼ぶが<sup>(17)</sup>、ヘパリン糖鎖の中には、硫酸化構造やウロン酸のタイプが異なる、イレギュラー領域と呼ばれる多様性のある領域も存在している（序論、Fig. 1）。ヘパリンの持つ様々な生物活性は繰り返し二糖領域に存在すると考えられているが、その構造が非常に多様であるために、抗血液凝固活性以外の活性と構造の相関関係はあまり明らかにされていない。ヘパリンの抗血液凝固活性は、血漿中のアンチトロンビンIIIというタンパク質と結合することによってそれを活性化し、血液凝固系の種々のセリンプロテアーゼを阻害することによって発揮されることが知られている。そのアンチトロンビンIIIとの結合部位の最小の五糖構造は詳しく研究されており、 $\text{GlcN}(6\text{S})\alpha 1\text{-}4\text{GlcA}\beta 1\text{-}4\text{GlcN}(\text{NS},3\text{S})\alpha 1\text{-}4\text{IdoA}(2\text{S})\alpha 1\text{-}4\text{GlcN}(\text{NS},6\text{S})$ であることが分かっている<sup>(8)</sup>。しかし、それ以外の生物活性を発揮するドメインの構造はほとんど明らかにされておらず、せいぜい構成二糖組成が解析されている程度である。糖タンパク質糖鎖などの場合には、標準品となるオリゴ糖が多く単離され、新奇糖鎖の構造解析においても非常に有効に活用できているが、ヘパリンの場合でも、そのような構造がはっきりとわかったオリゴ糖や特異性の明確な酵素があれば、生物活性を持ったドメイン構造の精密分析に役立つはずである。しかし、これまでに単離されたそのような標準品となるオリゴ糖は極めて限られており、また、構造解析に利用できる市販の酵素も、*Flavobacterium heparinum*というバクテリア由来の脱離酵素であるヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼ I、IIの三種類だけである。しかもこれらの酵素の基質特異性は十分には理解されていない。本章では、こういった問題を解決するために、ヘパリンの繰り返し二糖領域から多数のオリゴ糖を単離し、構造解析した。また、それらを基質として用いて、バクテリア由来のヘパラン硫酸/ヘパリン分解酵素の基質特異性も検討し、新しい知見を得た。

一般に、ヘパリンをバクテリアの脱離酵素で消化して得られる四糖は、 $\Delta$ HexA $\alpha$ 1-4GlcN $\alpha$ 1-4HexA1-4GlcNという基本骨格を持っており、糖鎖内部のウロン酸のタイプと硫酸化の部位に多様性がある。ここで糖鎖内部のHexA (UAと表記する場合もある)は、 $\alpha$ IdoAあるいは $\beta$ GlcAのいずれかである。今回得られた四糖の中には、3-O-硫酸化グルコサミンを還元末端に含むアンチトロンビンIII結合部位に由来するものが3種類あり、アンチトロンビンIII結合部位の構造にも多様性があることが証明できた<sup>(30)</sup>。また、グルクロン酸2-硫酸構造を持った珍しい四糖も2種類得られ、これらは単離の報告がないものであった<sup>(31)</sup>。グルクロン酸2-硫酸構造を持った四糖はヘパリンの高硫酸化領域に由来しており、本章では、この構造とヘパリンの細胞増殖調節活性との関与についても考察する。一方、今回一種類だけ得た三糖は、ヘパリングリコサミノグリカン鎖の非還元末端に由来すると考えられる飽和の糖であった<sup>(29)</sup>。この三糖構造は、ヘパリン糖鎖の生合成の終了部分の構造を、あるいは組織に存在するエンド- $\beta$ -グルクロニダーゼの切断部位の構造を反映している可能性もあると思われる。

## 第1節 ヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIの消化によって調製した三糖、四糖の構造解析<sup>(29)</sup>

### 1. ヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIでの消化によるオリゴ糖の調製

四糖調製のための出発材料は、ブタ小腸粘膜由来のstage 14ヘパリンを用いた。第1章ですでに述べたとおり、これをヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIの三種類の酵素で消化し、ゲルろ過によって画分IからIVに分画した<sup>(16)</sup> (Fig. 3)。画分IIIには主に四糖が含まれていることが組成分析の結果判明したので、この画分からオリゴ糖の単離を試みた。ポリアミンカラムを用いたHPLCによって画分IIIをさらに細かく分画し、Fig. 12に示すようにFr. III-1からIII-24までを得た。このうち主要な14画分について、同じ条件で再クロマトグラフィーを行ってさらに精製し、構造研究を進めた。これら14画分は、画分III全体の85% (モル%) に相当する。なお、100 mgのヘパリンから単離できる各成分の量をTable 6に示した。

今回調製した標品は、三種類の酵素を用いてかなり強く消化していたが、ヘパリチナーゼIIによる消化だけは不十分であることが判明し (本章第5節参照)、ヘパリチナーゼII感受性のオリゴ糖と抵抗性のオリゴ糖に大別できた。ヘパリチナーゼII抵抗性のオリゴ糖はFr. III-1、9、12、19に含まれる4成分であり、このうちFr. III-1は第1章で述べた

グリコセリンIIなので、この章では省略する。またFr. III-9、12、19の3成分は繰り返し二糖領域中のアンチトロンビンIII結合部位に由来する四糖であることが判明したので、次節で述べることにする。本節では、ヘパリチナーゼII感受性のオリゴ糖であるFr. III-4、5、10a、10b、11、13、15、17、18、20中の各成分の構造解析について述べる。

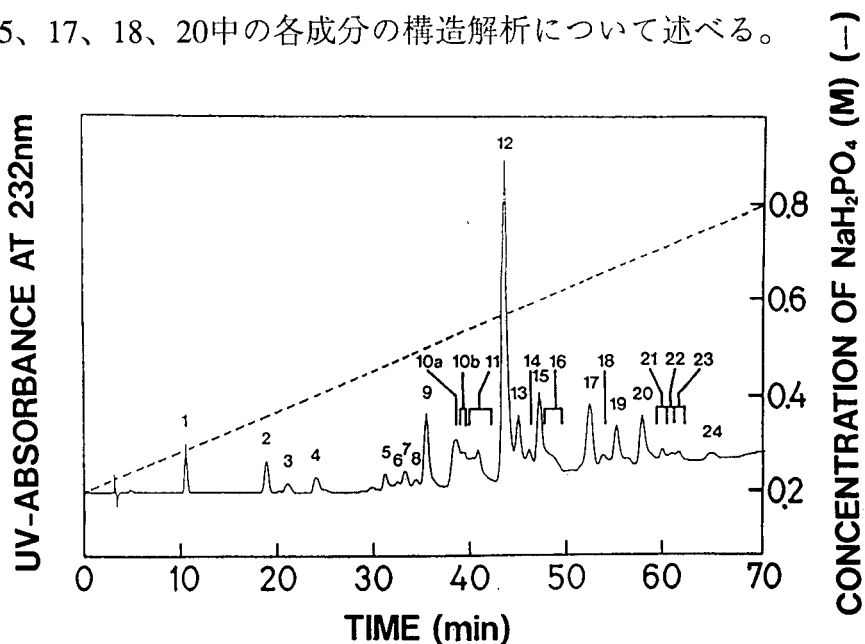


Fig. 12. Fractionation of unsaturated tetrasaccharides by HPLC on an amine-bound silica column. Oligosaccharide fraction III which contains mainly tetrasaccharides was subfractionated into Fr. III-1 to 24 on an amine-bound silica column as indicated.

## 2. Fast atom bombardment-mass spectrometry (FAB-MS) 分析

ヘパリチナーゼII感受性の各画分について、負イオンモードのFAB-MS分析を行い、分子量とN-硫酸基及びO-硫酸基の組成を決定した。検出された分子イオンは、硫酸基やカルボキシル基の対イオンが $H^+$ ではなく塩（例えば $Na^+$ ）になっている程度（結合している $Na^+$ の数）の違いによって、クラスターを形成していた<sup>(68-70)</sup> (Fig. 13)。硫酸基の部分が切断されて生じたフラグメントイオンも、80 u小さい値になってはいるものの、やはり結合している $Na^+$ の数の違いによって同様のクラスターを形成して検出された。各画分から検出された分子イオンの同定結果はTable 7にまとめた。簡略化のために、対イオンが $Na^+$ で置き換わっていないものの脱プロトン型[M-H]で示した（Mはそのオリゴ糖が解離しておらず、完全に $H^+$ 型になっているものを表わしている）。

Fr. III-17の負イオンモードのFABスペクトルを例としてFig. 13Aに示した。[Fr. III-17-H]と[Fr. III-17-2H+Na]の分子イオンがm/z 1035と1057にそれぞれ検出された。硫酸基を1、2、3モル失った成分のシグナルはそれぞれm/z 955/977、875/897、795に検出され、Fr. III-17は合計4モルの硫酸基を含むことが判明した。

Table 6. Quantities of the oligosaccharide fractions obtained from 100 mg heparin Li salt. The calculation is based on the UV-absorption at 232 nm caused by  $\Delta$ HexA at the nonreducing ends.

Fr. No.	Recovery (%)	nmol/100mg Heparin
1	1.96	131
2	1.98	132
3	0.88	59
4	1.35	90
5	1.36	92
6	0.61	42
7	1.61	106
8	0.79	52
9	5.89	389
10a	5.67	449
10b	2.49	196
11	5.33	458
12	25.82	1727
13	5.72	383
14	2.50	167
15+16	10.55	706
17	7.16	479
18	1.70	114
19	4.47	300
20	5.67	380
21	1.37	92
22	0.97	64
23	1.06	71
24	0.78	52

また、Fr. III-5の負イオンモードのFABスペクトルをFig. 13Bに示した。このスペクトルから、Fr. III-5は二つ主要な成分を含んでいることが判明し、Fr. III-5a、5bと命名した。[Fr. III-5a - H]と[Fr. III-5a - 2H + Na]と[Fr. III-5a - 3H + 2Na]の分子イオンがm/z 913と935と957にそれぞれ検出され、これらは不飽和ウロン酸 ( $\Delta$ HexA) 1モル、飽和のウロン酸 (HexA) 1モル、N-硫酸化ヘキソサミン (HexN) 2モル、O-硫酸基1モルを含んだ四糖 ( $\Delta$ HexA<sub>1</sub>HexA<sub>1</sub>HexN<sub>2</sub>(OSO<sub>3</sub>H)<sub>3</sub>) の、対イオンがNa<sup>+</sup>で置き換わっていないもの、1モルだけNa<sup>+</sup>で置き換わったもの、2モル置き換わったものに相当する。1及び2モルの硫酸基を失ったFr. III-5aのフラグメントイオンは、m/z 833/855と753にそれぞれ検出された。この画分中に含まれるもう一方の主要な成分Fr. III-5bの分子イオンシグナルは、m/z 835、857、879にクラスターとして検出され（それぞれ[Fr. III-5b - H]、[Fr. III-5b - 2H + Na]、[Fr. III-5b - 3H + 2Na]に相当する）、この成分はHexA<sub>1</sub>HexN<sub>2</sub>(OSO<sub>3</sub>H)<sub>4</sub>という組成の、飽和のテトラ硫酸化三糖と同定された。1及び2モルの硫酸基を失ったフラグメントイオンのクラスターは、m/z 755/777/799と675/697にそれぞれ検出された。

同様にして、他のすべての画分の糖と硫酸基の組成を決定できた。FAB-MS分析の結果、Fr. III-4は主にジ硫酸化四糖を含んでいることがわかった。また、トリ硫酸化四糖

はFr. III-10a、10b、11に含まれており、これらの三画分はテトラ硫酸化四糖も含んでいることがわかった。Fr. III-13、15、17、18にはテトラ硫酸化四糖が含まれており、Fr. III-20にはペンタ硫酸化四糖が含まれていることが判明した。各画分に含まれている硫酸基の数は、HPLCにおける溶出位置とよく一致していた。

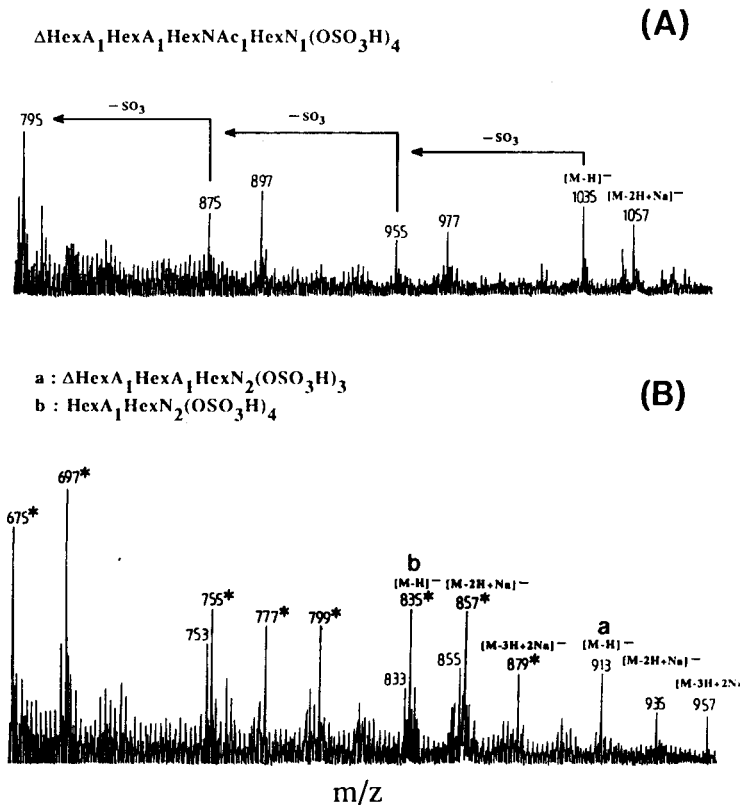


Fig. 13. Negative ion fast atom bombardment (FAB) spectra of Fr. III-17 and -5. The molecular ion regions of the negative ion FAB-spectra of samples Fr. III-17 (A) and Fr. III-5 (B). The mass spectrometric sequential loss of 2 and 3 sulfite moieties (80 u) from each of the two molecular ion signals at  $m/z$  1035 and 1057 is indicated in (A). A similar sequential loss of 2 sulfite moieties from two sets of the three molecular ion signals has occurred in (B). One set of the molecular ion signals at  $m/z$  913, 935 and 957 was assigned to III-5a and the other three at  $m/z$  835, 857 and 879 to III-5b. The signals belonging to III-5b are marked by asterisks.

Table 7. Assignments of the molecular ion signals afforded by the negative FAB-spectra of each of the HPLC fractions analyzed.

Fr.	$m/z$ of $[M-H]^-$	Molecular Composition of M
III-4	875	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexNAc}_1\text{HexN}_1(\text{OSO}_3\text{H})_2$
III-5	(a) 913	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexN}_2(\text{OSO}_3\text{H})_3$
	(b) 835	$\text{HexA}_1\text{HexN}_2(\text{OSO}_3\text{H})_4$
III-10a	(i) 955, major	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexNAc}_1\text{HexN}_1(\text{OSO}_3\text{H})_3$
	(ii) 993, minor	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexN}_2(\text{OSO}_3\text{H})_4$
III-10b	(i) 955, major	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexNAc}_1\text{HexN}_1(\text{OSO}_3\text{H})_3$
	(ii) 993, minor	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexN}_2(\text{OSO}_3\text{H})_4$
III-11	(i) 955, minor	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexNAc}_1\text{HexN}_1(\text{OSO}_3\text{H})_3$
	(ii) 993, major	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexN}_2(\text{OSO}_3\text{H})_4$
III-13	993	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexN}_2(\text{OSO}_3\text{H})_4$
III-15	993	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexN}_2(\text{OSO}_3\text{H})_4$
III-17	1035	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexNAc}_1\text{HexN}_1(\text{OSO}_3\text{H})_4$
III-18	1035	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexNAc}_1\text{HexN}_1(\text{OSO}_3\text{H})_4$
III-20	1073	$\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexN}_2(\text{OSO}_3\text{H})_5$

### 3. 酵素消化による分析

本節で解析した各画分はヘパリチナーゼII感受性なので、その構成二糖組成は、ヘパリチナーゼIIによる消化物をHPLCで分析することによって決定した。各画分をヘパリチナーゼIIで消化すると、大部分の画分において二種類の不飽和二糖がほぼ等モル生じた。その代表例としてFr. III-17を分析したクロマトグラムをFig. 14に示した。上段は不飽和二糖の標準品で、中段はヘパリチナーゼIIによる消化物であり、Fr. III-17は消化によって等量の $\Delta$ DiHS-UA<sub>2</sub>Sと $\Delta$ DiHS-triSを生じることが判明した。これら二種類の二糖がもとの四糖においてどのような配列をしていたのかは、2-スルファターゼ<sup>(71)</sup>の基質特異性を利用して決定した。2-スルファターゼは、糖鎖の非還元末端に位置する4,5-不飽和ウロン酸の2-O硫酸化構造のみに特異的に作用する酵素で、もとの四糖を2-スルファターゼで消化した後、ヘパリチナーゼIIで連続消化すれば、2-O硫酸化不飽和ウロン酸残基を持つ二糖単位の位置を決定できる。Fr. III-17をそのように消化した場合、 $\Delta$ DiHS-UA<sub>2</sub>Sと $\Delta$ DiHS-diS<sub>1</sub>を生じたので (Fig. 14下段)、 $\Delta$ DiHS-triSがFr. III-17においては非還元末端側に位置していたことがわかる。よって、Fr. III-17中の成分の構造は、 $\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS,6S) $\alpha$ 1-4HexA(2S)1-4GlcNAcであることが判明した。なお、糖鎖内部のウロン酸残基は<sup>1</sup>H-NMR解析によって決定した(後述)。同様に、ヘパリチナーゼII、2-スルファターゼを利用して、各画分に含まれる成分の二糖組成とその配列を決定した。2-スルファターゼに抵抗性を示す四糖の場合には、2-O硫酸化ウロン酸残基を持つ二糖単位が還元末端側に位置していることがわかる。Fr. III-10a、10b、11、18のヘパリチナーゼIIによる消化物のHPLC分析では、マイナー成分となる不飽和二糖もいくらか観察されたので(結果は示していない)、不純物を含んでいるようである。酵素消化の結果と、それによって推定される主要な成分の構造をTable 8にまとめた。Fr. III-10a、10b、11、18のヘパリチナーゼII消化物において、主成分の不飽和二糖の回収率が低いのが、これらはマイナー成分が混入していることによる。また、Fr. III-10bと11で一方の二糖の回収率が高いのは、そこにマイナーな混入成分に由来する二糖が含まれているため、これらの画分の主成分の割合は、それぞれわずか46%と36%ということになる。

Fr. III-5はヘパリチナーゼIIによる消化によって、HPLC上での紫外吸収が消化前の約3.3倍になり、 $\Delta$ DiHS-NS、 $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>、 $\Delta$ DiHS-triSの三種類の二糖を生じた。Fig. 15にヘパリチナーゼIIによる消化前後のFr. III-5のクロマトグラムを示した。消化によって

生じてきた三種類の不飽和二糖のピーク面積に基づくモル比は1:1:1.5であり、HPLCの結果からもFr. III-5は二成分含んでいることが確認できた。 $\Delta$ DiHS-NSと $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>は等モル生じており、トリ硫酸化四糖の成分 (Fr. III-5a) から由来したと考えられ、また、 $\Delta$ DiHS-triSはもう一方の成分 (Fr. III-5b) に由来したと考えられる。生じてきた不飽和二糖の紫外吸収に基づき、Fr. III-5aとFr. III-5bのモル比は2:3と算出した。Fr. III-5aと5bの構造は、最終的には、後述する500-MHz <sup>1</sup>H-NMRによって決定した。

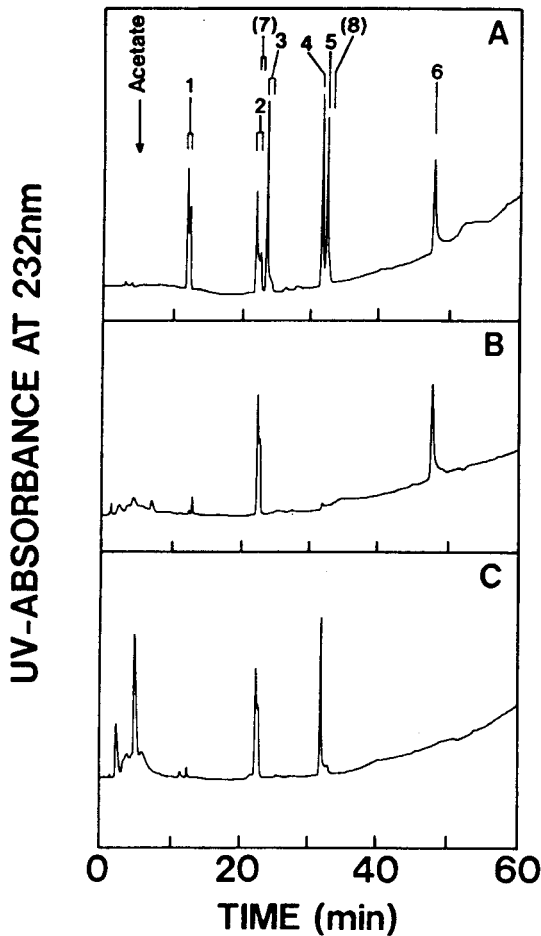


Fig. 14. HPLC analysis of the heparitinase II digest of Fr. III-17. Top panel (A), the elution positions of standard heparin/heparan sulfate-derived unsaturated disaccharides (0.5 nmol each); middle panel (B), the heparitinase II digest of Fr. III-17 (0.5 nmol); bottom panel (C), successive digestion of Fr. III-17 (0.5 nmol) with 2-O-sulfatase and then heparitinase II. 1,  $\Delta$ DiHS-0S; 2,  $\Delta$ DiHS-6S; 3,  $\Delta$ DiHS-NS; 4,  $\Delta$ DiHS-diS<sub>1</sub>; 5,  $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>; 6,  $\Delta$ DiHS-triS; 7,  $\Delta$ DiHS-UA2S; 8,  $\Delta$ DiHS-diS<sub>3</sub>.

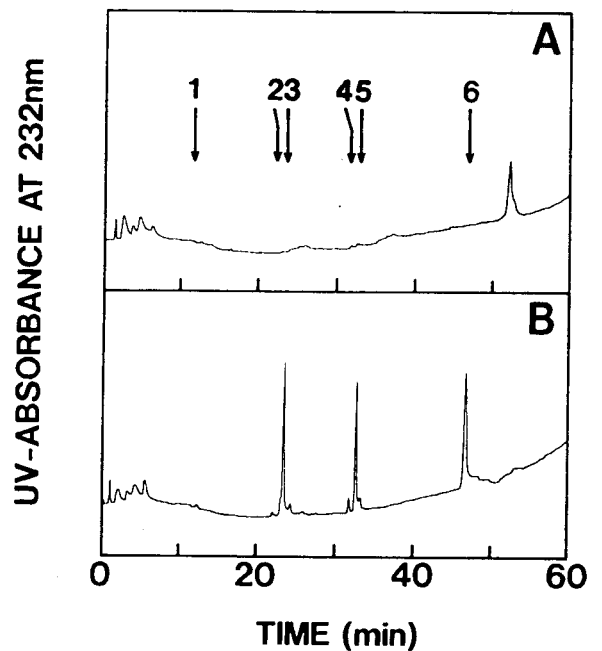


Fig. 15. HPLC analysis of the heparitinase II digest of Fr. III-5. Panel A, Fr. III-5 (0.5 nmol); panel B, the heparitinase II digest of Fr. III-5 (0.5 nmol). The elution positions of authentic unsaturated disaccharides are indicated in the top panel by arrows. 1,  $\Delta$ DiHS-0S; 2,  $\Delta$ DiHS-6S; 3,  $\Delta$ DiHS-NS; 4,  $\Delta$ DiHS-diS<sub>1</sub>; 5,  $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>; 6,  $\Delta$ DiHS-triS.

Table 8. Enzymatic analysis of the isolated oligosaccharides. After each oligosaccharide fraction was incubated heparitinase II or 2-O-sulfatase and then heparitinase II, the reaction products were characterized by HPLC. Recoveries of the disaccharides calculated based on UV-absorption are shown in parentheses.

Fr. No.	Heparitinase II digest	2-O-sulfatase/Heparitinase II digest	Structure of the major component
III-4	$\Delta$ DiHS-NS(92%) and $\Delta$ DiHS-UA2S(92%)	resistant <sup>a</sup>	$\Delta$ HexA-GlcN(NS <sup>c</sup> )-UA(2S)-GlcNAc
III-5	$\Delta$ DiHS-NS(95%), $\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (86%), and $\Delta$ DiHS-triS(130%)	resistant	$\Delta$ HexA-GlcN(NS)-UA(2S)-GlcN(NS) and GlcN(NS)-UA(2S)-GlcN(6S,NS)
III-10a	$\Delta$ DiHS-UA2S(65%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (65%)	$\Delta$ DiHS-UA2S(59%) and $\Delta$ DiHS-NS(59%)	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS)-UA(2S)-GlcNAc
III-10b	$\Delta$ DiHS-NS(72%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>3</sub> (46%)	resistant	$\Delta$ HexA-GlcN(NS)-UA(2S)-GlcNAc(6S)
III-11	$\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (74%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (36%)	resistant	$\Delta$ HexA-GlcN(NS,6S)-UA(2S)-GlcN(NS)
III-13	$\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (185%)	ND <sup>b</sup>	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS)-UA(2S)-GlcN(NS)
III-15	$\Delta$ DiHS-NS(94%) and $\Delta$ DiHS-triS(95%)	resistant	$\Delta$ HexA-GlcN(NS)-UA(2S)-GlcN(NS,6S)
III-17	$\Delta$ DiHS-UA2S(98%) and $\Delta$ DiHS-triS(99%)	$\Delta$ DiHS-UA2S(107%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (83%)	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS,6S)-UA(2S)-GlcNAc
III-18	$\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (67%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>3</sub> (66%)	$\Delta$ DiHS-NS(81%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>3</sub> (53%)	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS)-UA(2S)-GlcNAc(6S)
III-20	$\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (92%) and $\Delta$ DiHS-triS(97%)	$\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (79%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (112%)	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS,6S)-UA(2S)-GlcN(NS)

<sup>a</sup>resistant : resistant to 2-O-sulfatase.

<sup>b</sup>ND : not determined.

<sup>c</sup>2S, 6S or NS represents 2-O-, 6-O- or 2-N-sulfate, respectively.

#### 4. 500-MHz <sup>1</sup>H-NMR解析

糖鎖内部のウロン酸の同定と硫酸化部位の確認は、500-MHz <sup>1</sup>H-NMR解析によって行った。Fr. III-5の一次元スペクトルを例としてFig. 16に、また各画分のNMRデータをTable 9に示した。Fr. III-5にはピークの高さが約1.5倍異なる二種類のシグナルが重なりあり、二つの成分が含まれていることがNMRによっても確認できた。二種類のシグナルは、それぞれピークの高さが違うために、各々単一の成分の場合とまったく同様にして化学シフトの帰属ができた。二種類のシグナルの帰属の結果をFig. 16のスペクトルの上と下にそれぞれ示した。高いピークの成分の方は飽和のテトラ硫酸化三糖であり、また低いピークの成分の方は不飽和のトリ硫酸化四糖であるとわかった。4.6から5.5 ppmのあいだに見られるシグナルはアノメリックプロトンに特徴的なものであり、また5.8 ppmと2.0 ppmあたりのシグナルはそれぞれ $\Delta$ HexAのH-4プロトン<sup>(1,2)</sup>とGlcNAcのアセトアミド基のプロトンに特徴的なものである。これら特徴的なシグナルと関連させることにより、二次元HOHAHAとCOSYのスペクトル（結果は示していない）の解析を利用して、多くのシグナルの入り混んだbulk領域（3.6から4.5 ppm）に属するプロトンの化学シフトも帰属できた（第2章第2節参照）。

ヘパリナーゼやヘパリチナーゼによる消化では、元の糖鎖内部のウロン酸残基がグルクロン酸であってもイズロン酸であっても4, 5-不飽和ウロン酸に変換されてしまうため、酵素消化による分析では四糖の配列は決まっても、糖鎖内部のウロン酸までは決定できない。よって糖鎖内部のウロン酸は、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの解析を利用して、そのアノメリックプロトンの化学シフトと結合定数 $J_{1,2}$ の値から同定した。 $\alpha$ イズロン酸及び $\beta$ グルクロン酸のアノメリックプロトンの化学シフトは、それぞれ約 $\delta$  5.0と約 $\delta$  4.6に観測されるはずである<sup>(60, 61, 72-74)</sup>。また、ウロン酸は2位が硫酸化されると、そのア

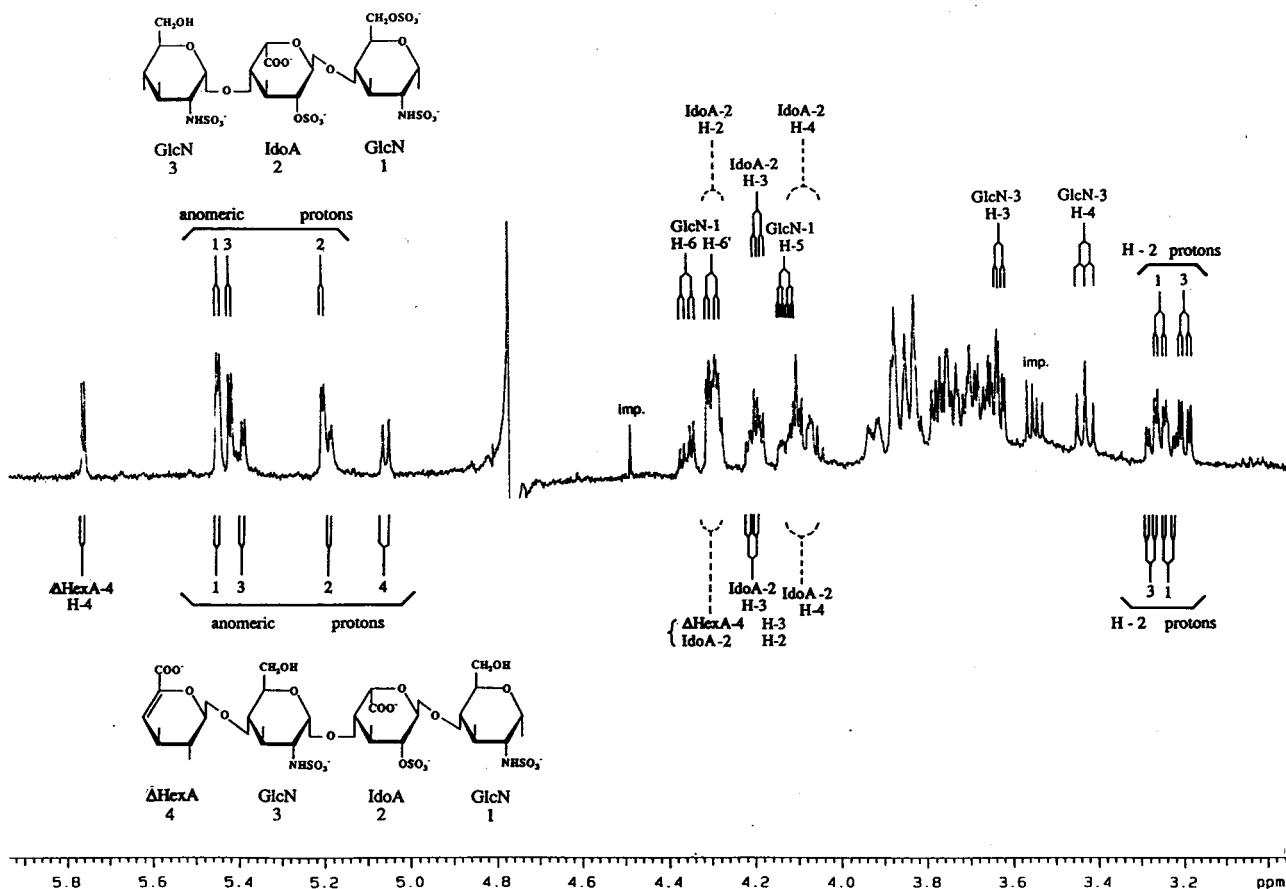


Fig. 16. 500-MHz  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Fr. III-5 recorded in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 26 °C. The *numbers* and *letters* in the spectrum refer to the corresponding residues in the structures. The assignment of the compound referred to as III-5a or III-5b is shown below or above the spectrum, respectively.

Table 9. Structure of the Oligosaccharides Derived from Porcine Intestinal Heparin.

Fr.No.	Yield <sup>a</sup>	Structure			
III-4	90	$\Delta\text{HexA}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS}^b)$	$\alpha 1\text{-4IdoA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcNAc}$
III-5a	92	$\Delta\text{HexA}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS)}$	$\alpha 1\text{-4IdoA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS)}$
III-5b	140		$\text{GlcN(NS)}$	$\alpha 1\text{-4IdoA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS,6S)}$
III-9	389	$\Delta\text{HexA}$	$\alpha 1\text{-4GlcNAc(6S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcA}$	$\beta 1\text{-4GlcN(NS,3S)}$
III-10a	449	$\Delta\text{HexA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS)}$	$\alpha 1\text{-4IdoA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcNAc}$
III-10b	196	$\Delta\text{HexA}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS)}$	$\alpha 1\text{-4IdoA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcNAc(6S)}$
III-11	458	$\Delta\text{HexA}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS,6S)}$	$\alpha 1\text{-4IdoA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS)}$
III-12	1727	$\Delta\text{HexA}$	$\alpha 1\text{-4GlcNAc(6S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcA}$	$\beta 1\text{-4GlcN(NS,3S,6S)}$
III-13	383	$\Delta\text{HexA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS)}$	$\alpha 1\text{-4IdoA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS)}$
III-15	706	$\Delta\text{HexA}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS)}$	$\alpha 1\text{-4IdoA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS,6S)}$
III-17	479	$\Delta\text{HexA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS,6S)}$	$\alpha 1\text{-4IdoA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcNAc}$
III-18	114	$\Delta\text{HexA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS)}$	$\alpha 1\text{-4UA}^c(2S)$	$1\text{-4GlcNAc(6S)}$
III-19	300	$\Delta\text{HexA}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS,6S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcA}$	$\beta 1\text{-4GlcN(NS,3S,6S)}$
III-20	380	$\Delta\text{HexA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS,6S)}$	$\alpha 1\text{-4IdoA(2S)}$	$\alpha 1\text{-4GlcN(NS)}$

<sup>a</sup>n moles/100 mg heparin.

<sup>b</sup>2S, 3S, 6S, or NS represents 2-O-, 3-O-, 6-O-, or 2-N-sulfate, respectively.

<sup>c</sup>the isomer type was not determined.

Table 10. <sup>1</sup>H-Chemical Shifts of the Constituent Monosaccharides of Tri- and Tetrasaccharides Derived from Heparin<sup>a</sup>

	Fr. III-4		Fr. III-5a		Fr. III-5b		Fr. III-10a		Fr. III-10b		Fr. III-11		Fr. III-13		Fr. III-15		Fr. III-17		Fr. III-18		Fr. III-20	
GlcN-1	α	β					α	β	α	β			α	β	α	β	α	β				
H-1	5.206	4.699	5.450	5.450	5.201	4.68 <sup>b</sup>	5.21 <sup>b</sup>	4.70 <sup>b</sup>	5.455	5.450	5.447	5.201	4.681	5.201	4.599	5.448						
H-2	3.865	3.694	3.237	3.259	3.849	3.68 <sup>b</sup>	ND <sup>c</sup>	ND	3.247	3.222	3.259	3.855	ND	3.247	ND	ND	3.227					
H-3	3.954	ND	3.69 <sup>b</sup>	3.717	3.92 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	3.707	3.680	3.700	3.930	ND	ND	ND	ND	3.694					
H-4	3.726	ND	ND	3.754	ND	ND	ND	ND	3.943	3.920	3.762	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
H-5	ND	ND	ND	4.135	ND	ND	ND	ND	3.875	3.87 <sup>b</sup>	4.133	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
H-6	ND	ND	ND	4.355	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.352	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
H-6'	ND	ND	ND	4.30 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.314	ND	ND	ND	ND	ND	ND					
N-Ac	2.036 <sup>d</sup>	2.034 <sup>d</sup>	- <sup>e</sup>	-	2.033	2.033	2.033	2.033	-	-	-	2.033	2.033	2.031	2.031	-	-					
UA-2																						
H-1	5.197	5.190	5.207	5.15 <sup>b</sup>	5.201	5.203	5.174	5.225	5.173	ND	5.21 <sup>b</sup>											
H-2	4.321	4.305	4.315	4.29 <sup>b</sup>	4.296	4.301	4.288	4.313	4.31 <sup>b</sup>	ND	4.31 <sup>b</sup>											
H-3	4.213	4.225	4.203	4.19 <sup>b</sup>	4.198	4.204	4.207	4.208	4.20 <sup>b</sup>	ND	4.22 <sup>b</sup>											
H-4	4.090	4.088	4.118	ND	4.100	4.090	4.069	4.101	4.10 <sup>b</sup>	ND	ND											
H-5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND											
GlcN-3																						
H-1	5.405	5.394	5.424	5.42 <sup>b</sup>	5.451	5.408	5.397	5.439	5.419	5.45 <sup>b</sup>	5.396											
H-2	3.276	3.279	3.201	3.25 <sup>b</sup>	3.272	3.301	3.247	3.275	3.290	3.26 <sup>b</sup>	3.279											
H-3	3.722	3.692	3.647	3.59 <sup>b</sup>	3.702	3.694	3.606	3.734	3.635	3.59 <sup>b</sup>	3.653											
H-4	3.842	ND	3.447	3.76 <sup>b</sup>	3.828	3.882	3.757	3.836	3.816	3.73 <sup>b</sup>	ND											
H-5	3.925	ND	3.840	3.87 <sup>b</sup>	3.936	4.089	3.876	3.939	4.039	3.88 <sup>b</sup>	ND											
H-6	3.88 <sup>b</sup>	ND	3.78 <sup>b</sup>	3.74 <sup>b</sup>	ND	4.470	ND	ND	4.34 <sup>b</sup>	ND	ND											
H-6'	3.88 <sup>b</sup>	ND	3.78 <sup>b</sup>	3.74 <sup>b</sup>	ND	4.222	ND	ND	4.24 <sup>b</sup>	ND	ND											
N-Ac	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
ΔHexA-4																						
H-1	5.075	5.062	-	5.519	5.062	5.138	5.525	5.066	5.509	5.519	5.514											
H-2	3.763	3.779	-	4.59 <sup>b</sup>	3.749	3.774	4.600	3.751	4.618	4.61 <sup>b</sup>	4.61 <sup>b</sup>											
H-3	4.288	4.291	-	4.20 <sup>b</sup>	4.288	4.267	4.205	4.292	4.295	4.20 <sup>b</sup>	4.306											
H-4	5.773	5.764	-	5.996	5.762	5.778	5.997	5.766	5.982	5.998	5.980											

<sup>a</sup>Chemical shifts are given in ppm downfield from internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate, but were actually measured indirectly to acetone ( $\delta$  2.225 ppm) in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at 26°C. The estimated error in the resonance assignments is  $\pm 0.002$  ppm.

<sup>b</sup>Signals partially overlap, reducing the precision of the chemical shifts.

<sup>c</sup>ND, not determined.

<sup>d</sup>These values may be interchanged.

<sup>e</sup>-, not occurring.

ノメリックプロトンの化学シフトが約0.2 ppm低磁場側にシフトすることが観察されているので<sup>(28)</sup>、2-O硫酸化された $\alpha$ イズロン酸と2-O硫酸化された $\beta$ グルクロン酸のアノメリックプロトンは、それぞれ約 $\delta$ 5.2と約4.8に観測されることが予想される。さらに、 $\alpha$ イズロン酸と $\beta$ グルクロン酸の結合定数 $J_{1,2}$ は、それぞれ約3.0と約8.0 Hzであるとわかっている<sup>(61, 72-75)</sup>。以上の情報をもとに、例としてFig. 16に示したFr. III-5の糖鎖内部のウロン酸を解析すると、Fr. III-5aと5bの糖鎖内部のウロン酸はともにイズロン酸と同定できた（化学シフトの値がそれぞれ $\delta$ 5.190と5.207、結合定数の値がそれぞれ3.0と3.5 Hzであった）。また、Fr. III-5の<sup>1</sup>H-NMRスペクトル中には、アセトアミド基のプロトンのシグナルは検出されなかったため、この画分中のグルコサミンのアミノ基はすべて硫酸化されていることも確認でき、最終的にFr. III-5a、5bの構造は、それぞれ $\Delta$  HexA  $\alpha$  1-4GlcN(NS)  $\alpha$  1-4IdoA(2S)  $\alpha$  1-4GlcN(NS)、GlcN(NS)  $\alpha$  1-4IdoA(2S)  $\alpha$  1-4GlcN(NS,6S)と決定できた。これらの構造はFAB-MS分析や酵素を用いた分析の結果とよく一致していた。

他の不飽和四糖の化学シフトも、Fr. III-5aの場合と全く同様に二次元HOHAHAとCOSYの手法を用いて帰属した。N-硫酸化グルコサミンを還元末端に持つ成分の場合では、 $\alpha$ -アノマーのシグナルのみが観測され、 $\beta$ -アノマーのものは見られなかったが、還元末端にGlcNAcを持つ成分では、 $\alpha$ と $\beta$ の両アノマーのシグナルが観測された。このことは、第2章で見出した結果と一致しており、二糖のみならず三糖、四糖でも、還元末端のグルコサミンのN-硫酸化が糖鎖を $\alpha$ 配座に固定することが判明した。Fr. III-18は精製できた試料が少量のため糖鎖内部のウロン酸が決定できなかったが、他のすべての画分について糖鎖内部のウロン酸残基の同定ができた。すべてのオリゴ糖の構造とその<sup>1</sup>H-NMRのデータをTable 9と10にまとめた。各成分の化学シフトから推定される硫酸化の部位は、酵素消化物のHPLC分析の結果とよく一致していた。

## 第2節 アンチトロンビンIII結合部位由来の四糖構造の単離と解析<sup>(30)</sup>

前節で述べたように、ヘパリン由来の四糖画分である画分IIIに含まれる成分は、ヘパリチナーゼII感受性のものと抵抗性のものに大別できた。本節では、ヘパリチナーゼII抵抗性の成分のうち、アンチトロンビンIII結合部位に特徴的なグルコサミン3-硫酸構造を含んだFr. III-9、12、19の3成分の構造解析について詳述する。

### 1. Fr. III-12の構造解析

Fr. III-12は画分IIIのなかでも最も豊富に存在する成分であり、その26%（モル%）を占めている。この成分は、ヘパリチナーゼI、II、IV<sup>(38)</sup>、Vのいずれの酵素でも消化されなかった。アミノ糖分析、カルバゾール反応、硫酸基の定量の結果、この画分は、不飽和ウロン酸1モルに対しグルコサミンとウロン酸を2モルずつ、硫酸基を4モル含むテトラ硫酸化四糖であるとわかった。この結果は、Fig. 17Aに示したFAB-MS分析から決定された組成、 $\Delta\text{HexA}_1\text{HexA}_1\text{HexNAc}_1\text{HexN}_1(\text{SO}_3\text{H})_4$ とも一致していた。FAB-MS分析は負イオンモードで行い、構成糖の組成、O-硫酸基、N-硫酸基、N-アセチル基の数を明らかにすることができた<sup>(68-70)</sup>（第3章第1節参照）。図中のm/z 1035、1057、1079、1101に見られる分子イオンのシグナルは、Fr. III-12の対イオンがそれぞれ2、3、4、5モル分ずつNa<sup>+</sup>型になったものを表わしている（それぞれ[Fr. III-12 - 3H + 2Na]<sup>-</sup>、[Fr. III-12 - 4H + 3Na]<sup>-</sup>、[Fr. III-12 - 5H + 4Na]<sup>-</sup>、[Fr. III-12 - 6H + 5Na]<sup>-</sup>である）。また、m/z 955、977、999のシグナルは、前述のm/z 1035、1057、1079に相当する分子イオンが硫酸基を1モル失ったものに相当するフラグメントイオンである（それぞれ[Fr. III-12 - 3H + 2Na - SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>、[Fr. III-12 - 4H + 3Na - SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>、[Fr. III-12 - 5H + 4Na - SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>である）。さらに、m/z 897のイオンはm/z 1057の分子イオンが硫酸基を2モル失ったものに相当するフラグメントイオンである（[Fr. III-12 - 4H + 3Na - 2SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>）。

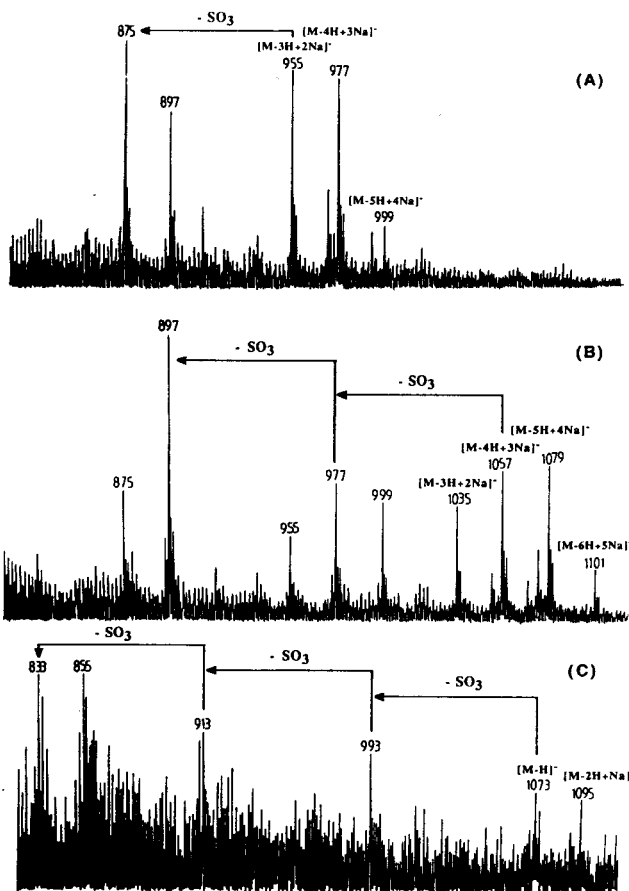


Fig. 17. Negative ion fast atom bombardment (FAB) spectra of Fr. III-9, -12, and -19. The molecular ion regions of the negative ion FAB-spectra of samples Fr. III-9 (A), Fr. III-12 (B) and Fr. III-20 (C). Mass spectrometric loss of a sulfite moiety (80 u) from each of the molecular ion signals in (B) yielded the cluster of signals at m/z 955, 977 and 999. Similar loss of a sulfite moiety from the latter signals resulted in the signals at m/z 875 and 897 in both (A) and (B). Loss of 1, 2 and 3 sulfite groups from the molecular ion at m/z 1073 in (C) yielded the signals at m/z 993, 913 and 833 respectively.

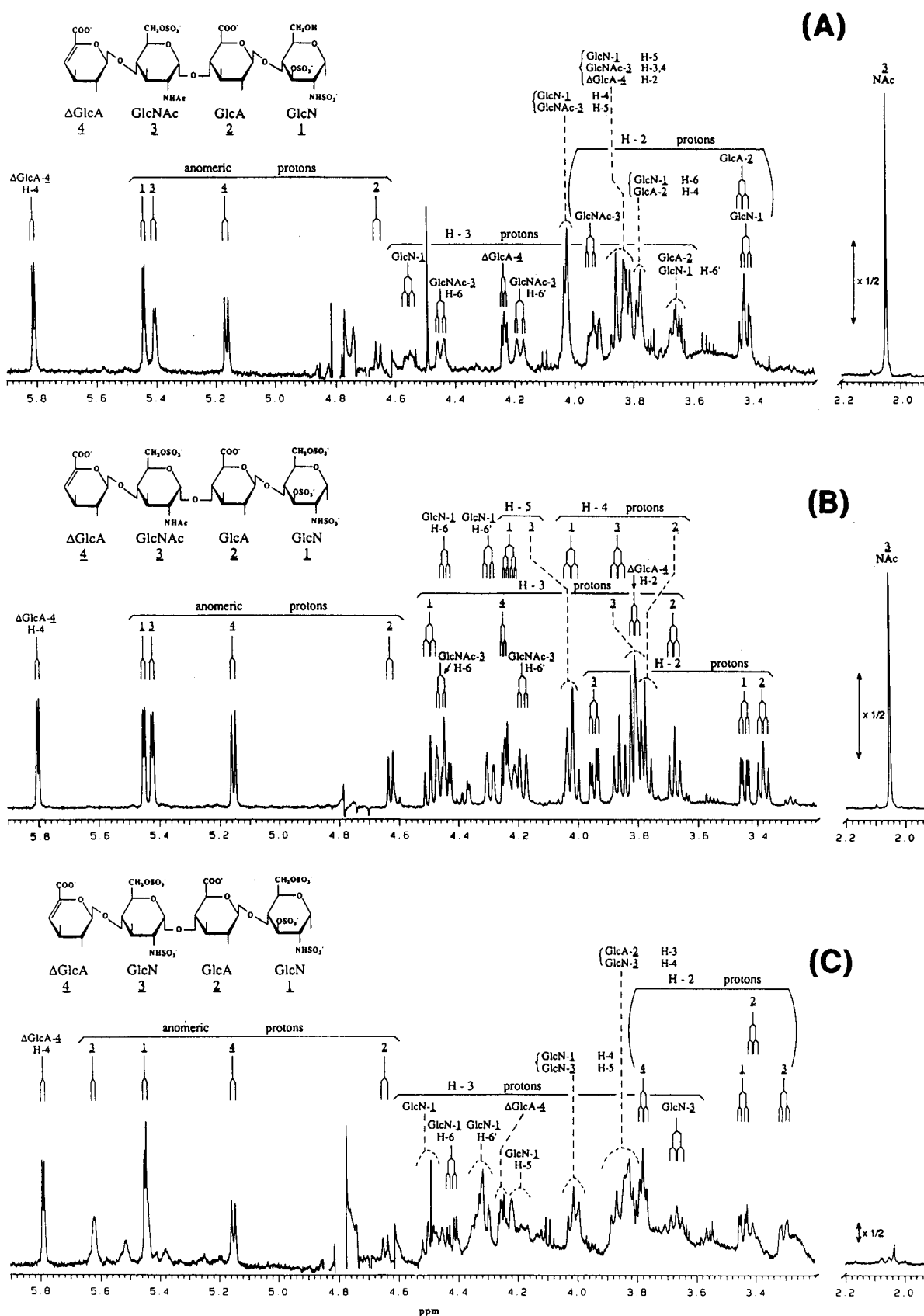


Fig. 18. 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spectra of Fr. III-9, -12, and -19 recorded in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at  $26^\circ\text{C}$ . The numbers and letters in the spectrum refer to the corresponding residues in the structures. Top panel (A), Fr. III-9; middle panel (B), Fr. III-12; bottom panel (C), Fr. III-19.

Table 11. <sup>1</sup>H-Chemical shifts of the constituent monosaccharides of Fr. III-9, -12, and -19 together with those for the reference compounds R1-R3. R1, the nonreducing terminal trisaccharide of Glycoserine II, Δ<sub>4,5</sub>HexAβ1-4GlcNAc(6-*O*-sulfate)α1-4GlcAβ1-3Galβ1-3Galβ1-4Xylβ1-*O*-Ser, in ref. 16; R2, the reducing terminal trisaccharide of hexasaccharide I, Δ<sub>4,5</sub>HexA(2-*O*-sulfate)β1-4GlcN(2-*N*-, 6-*O*-disulfate)α1-4IdoAα1-4GlcNAc(6-*O*-sulfate)α1-4GlcAβ1-4GlcN(2-*N*-, 3-, 6-*O*-trisulfate), in ref. 61; R3, disulfated disaccharide derived from heparin, Δ<sub>4,5</sub>HexAβ1-4GlcN(2-*N*-, 6-*O*-disulfate), in ref. 28. Chemical shifts are given in ppm downfield from internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate, but were actually measured indirectly to acetone (δ 2.225 ppm) in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at 26°C. The spectra of R1, R2, and R3 were recorded at 15, 25, and 26°C, respectively.

	R1	Fr. 9	Fr. 12	R2	Fr. 19	R3
<b>GlcN-1</b>						
H-1	-	5.441	5.452	5.46	5.448	-
H-2	-	3.422	3.444	3.44	3.444	-
H-3	-	4.558	4.493	4.44	4.504	-
H-4	-	4.020	4.015	3.97	4.010	-
H-5	-	3.829	4.221	4.15	4.238	-
H-6	-	3.78	4.440	4.37	4.424	-
H-6'	-	3.658	4.292	4.21	4.321	-
N-Ac	-	--	--	--	--	-
<b>HexA-2</b>						
H-1	4.642	4.660	4.630	4.60	4.647	-
H-2	3.418	3.431	3.380	3.38	3.410	-
H-3	3.667	3.654	3.677	3.85	3.840	-
H-4	3.75	3.772	3.772	3.84	3.77	-
H-5	3.75	n.d.	n.d.	3.90	n.d.	-
<b>GlcN-3</b>						
H-1	5.406	5.406	5.424	5.36	5.619	5.468
H-2	3.941	3.940	3.945	3.41	3.308	3.281
H-3	3.799	3.822	3.796	3.61	3.668	3.725
H-4	3.853	3.855	3.861	3.83	3.868	3.828
H-5	4.015	4.030	4.025	4.07	4.018	4.150
H-6	4.446	4.448	4.461	4.35	4.47	4.366
H-6'	4.170	4.184	4.185	4.2	4.18	4.247
N-Ac	2.044	2.046	2.051	--	--	--
<b>ΔHexA-4</b>						
H-1	5.158	5.164	5.155	-	5.152	5.204
H-2	3.813	3.827	3.806	-	3.783	3.837
H-3	4.236	4.233	4.243	-	4.256	4.212
H-4	5.808	5.809	5.803	-	5.791	5.839

Chemical shifts are expressed by ppm.

The estimated error in the resonance assignments is ±0.002 ppm.

n.d., not determined; --, not occurring

シフトはδ 3.444であり、硫酸化されていないGlcNAcのH-2に比べて大きく高磁場側にシフトしているが、このことからアミノ基の硫酸化が確認できた(第2章参照)。HexA-2、GlcN-3、ΔHexA-4のプロトンの化学シフトは、第1章で構造解析したグリコセリンII(ΔHexAα1-4GlcNAc(6S)α1-4GlcAβ1-3Galβ1-3Galβ1-4Xylβ1-*O*-Ser<sup>(16)</sup>)の非還元末端側の三糖部分の値に非常によく似ている(Table 11、グリコセリンIIの三糖部分はR1)。よって、Fr. III-12の非還元末端側の三糖の構造は、ΔHexAα1-4GlcNAc(6S)α1-4GlcAβ1-と考えられる。また、GlcN-1とHexA-2の化学シフトの値を、Linhardtらが報告しているブタ小腸ヘパリン由来のアンチトロンビンIII結合部位の六糖、ΔHexA(2S)α1-4GlcN(NS,6S)α1-4IdoAα1-4GlcNAc(6S)α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS,3S,6S)<sup>(61)</sup>の還元末

硫酸化の部位と糖鎖内部のウロン酸の決定は<sup>1</sup>H-NMR解析によって行った。Fig. 18Aにその一次元スペクトルを、Table 11にそのNMRデータを示した。各プロトンの化学シフトは二次元HOHAHAとCOSYの手法を用いて帰属した。還元末端より各糖残基に番号を付け、以下各糖残基をGlcN-1、GlcA-2(あるいはIdoA-2)、GlcN-3、ΔHexA-4と表わすことにする。Fr. III-12の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルにおいて、GlcN-1のβ-アノマー体のシグナルは観測されなかったが、このことはGlcN-1のアミノ基が硫酸化されていることをあらわしている。還元末端のグルコサミンのアミノ基が硫酸化されると、糖鎖はα配座に固定されるためである(第2章及び第3章第1節参照)。GlcN-1のH-2の化学

端側の二糖部分の値と比較すると (Table 11、Linhardtらが報告している六糖の二糖部分はR2)、非常によく似ていることがわかり、Fr. III-12の還元末端側の二糖は-4GlcA  $\beta$  1-4GlcN(NS,3S,6S)という二糖配列を持つことが確かめられた。

糖鎖内部のウロン酸は、そのアノメリックプロトンの化学シフトと結合定数 $J_{1,2}$ の値から決定した。化学シフトの値が $\delta$  4.630で結合定数 $J_{1,2}$ が大きいこと (8.0 Hz) より、Fr. III-12の糖鎖内部のウロン酸はイズロン酸ではなくグルクロン酸であると判定した。 $\alpha$  イズロン酸ならばアノメリックプロトンの化学シフトは $\delta$  5.0あたりに観測され<sup>(61, 74)</sup>、結合定数 $J_{1,2}$ の値ももっと小さくなる (2.5から3.5 Hz<sup>(75)</sup>) はずである。なお、*N*-硫酸基の数と*O*-硫酸基の数はFAB-MS分析の結果とよく一致していた。以上より、Fr. III-12に含まれる成分の構造は $\Delta$  HexA  $\alpha$  1-4GlcNAc(6S)  $\alpha$  1-4GlcA  $\beta$  1-4GlcN(NS,3S,6S)と決定できた。

## 2. Fr. III-9の構造解析

Fr. III-9は画分IIIの約6% (モル%) を占め、III-12と同様にヘパリチナーゼI、II、IV、Vに抵抗性を示した。組成分析の結果から、この画分は不飽和ウロン酸 1 モルに対しグルコサミンとウロン酸を 2 モルずつ、硫酸基を 3 モル含むトリ硫酸化四糖であるとわかった。この結果は、Fig. 17B に示したFAB-MS分析から決定された組成、 $\Delta$  HexA<sub>1</sub>HexA<sub>1</sub>HexNAc<sub>1</sub>HexN<sub>1</sub>(SO<sub>3</sub>H)<sub>3</sub>とも一致していた。負イオンモードのFAB-MS分析において、*m/z* 955、977、999に見られる分子イオンのシグナルは、Fr. III-9の対イオンが、それぞれ 2、3、4 モル分ずつNa<sup>+</sup>型になったものを表わしている (それぞれ[Fr. III-9-3H + 2Na]<sup>-</sup>、[Fr. III-9-4H + 3Na]<sup>-</sup>、[Fr. III-9-5H + 4Na]<sup>-</sup>である)。また、*m/z* 875、897のシグナルは、前述の*m/z* 955、977に相当する分子イオンが、硫酸基を 1 モル失ったものに相当するフラグメントイオンである (それぞれ[Fr. III-9-3H + 2Na - SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>、[Fr. III-9-4H + 3Na - SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>である)。

硫酸化の部位と糖鎖内部のウロン酸の決定は<sup>1</sup>H-NMR解析によって行った。Fig. 18Bにその一次元スペクトルを、Table 11にそのNMRデータを示した。各プロトンの化学シフトは、Fr. III-12の場合と同様に二次元HOHAHAとCOSYの手法を用いて帰属した。GlcN-1の $\beta$ -アノマー体のシグナルは観測されなかったが、このことはGlcN-1のアミノ基が硫酸化されていることをあらわしている。Fr. III-12とNMRのデータを比較してみると、GlcN-1のH-5、H-6、H-6'の化学シフトがそれぞれ0.39、0.66、0.63 ppmずつ高磁場側へシフトしている点のみ異なっていた (Table 11)。このことからFr. III-9の成分は、

Fr. III-12の成分からGlcN-1の6位の硫酸基を欠いた構造をしていることがわかった<sup>(28)</sup>。糖鎖内部のウロン酸は、アノメリックプロトンの化学シフトの値 ( $\delta$  4.660) と結合定数 $J_{1,2}$  (8.0 Hz) からグルクロン酸と同定した。以上より、Fr. III-9に含まれる成分の構造は  $\Delta$ HexA  $\alpha$  1-4GlcNAc(6S)  $\alpha$  1-4GlcA  $\beta$  1-4GlcN(NS,3S)と決定できた。

### 3. Fr. III-19の構造解析

Fr. III-19は画分III中の約5% (モル%) を占め、III-9、12と同様にヘパリチナーゼI、II、IV、Vに抵抗性を示した。組成はFAB-MS分析から  $\Delta$ HexA<sub>1</sub>HexA<sub>1</sub>HexN<sub>2</sub>(SO<sub>3</sub>H)<sub>5</sub>と推定した。負イオンモードのFAB-MSスペクトルにおいて (Fig. 17C)、[Fr. III-19 - H]、[Fr. III-19 - 2H + Na]に相当する弱い分子イオンが、 $m/z$  1073、1095に観測され、これらはFr. III-19の対イオンが、それぞれNa<sup>+</sup>型になっていないものと1モルだけNa<sup>+</sup>型になったものを表わしている。また、 $m/z$  993、913、833のシグナルは、前述の $m/z$  1073に相当する分子イオンが、硫酸基をそれぞれ1、2、3モル失ったものに相当するフラグメントイオンである (それぞれ[Fr. III-19 - H - SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>、[Fr. III-19 - H - 2SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>、[Fr. III-19 - H - 3SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>である)。

硫酸化の部位と糖鎖内部のウロン酸の決定は<sup>1</sup>H-NMR解析によって行った。Fig. 18Cにその一次元スペクトルを、Table 11にそのNMRデータを示した。各プロトンの化学シフトは、Fr. III-9、12の場合と同様に二次元HOHAHAとCOSYの手法を用いて帰属した。アセトアミド基のプロトンのシグナルは観測されなかったので、GlcN-1もGlcN-3もともにアミノ基は硫酸化されていることがわかった。Table 11に示すように、Fr. III-12とNMRデータを比較してみると、GlcN-3のH-2の化学シフトが0.637 ppm高磁場側に、同じくH-1の化学シフトが0.195 ppm低磁場側に、それぞれシフトしていることがわかる。このことからFr. III-19の成分の構造は、Fr. III-12の成分のGlcN-3がN-アセチルからN-硫酸に置き換わったものであるとわかった<sup>(28)</sup>。GlcN-3と $\Delta$ HexA-4のプロトンの化学シフトは、 $\Delta$ HexA  $\alpha$  1-4GlcN(NS,6S)という不飽和二糖 ( $\Delta$ DiHS-diS<sub>1</sub>、第2章参照) の値<sup>(28)</sup> とよく一致しており (Table 11、 $\Delta$ DiHS-diS<sub>1</sub>はR3)、非還元末端側の二糖部分の構造が確認できた。糖鎖内部のウロン酸は、アノメリックプロトンの化学シフトの値 ( $\delta$  4.647) と結合定数 $J_{1,2}$  (8.0 Hz) からグルクロン酸と同定した。以上より、Fr. III-19に含まれる成分の構造は  $\Delta$ HexA  $\alpha$  1-4GlcN(NS,6S)  $\alpha$  1-4GlcA  $\beta$  1-4GlcN(NS,3S,6S)と決定できた。

第3節 ヘパリナーゼのみの消化によって調製した四糖画分の構造解析  
 —グルクロン酸2-硫酸を含む新奇な四糖構造の解析<sup>(31)</sup>

1. ヘパリナーゼでの消化による四糖の調製

ブタ小腸粘膜由来のstage 14ヘパリン(リチウム塩)をヘパリナーゼで消化し、セファデックスG-25を用いたゲルろ過によって、二糖画分とさらに大きなオリゴ糖画分とに分画した(結果は示していない)。オリゴ糖画分は、さらにバイオゲルP-10を用いたゲルろ過によって画分1から8までに分画した(Fig. 19)。組成分析の結果、主要画分の画分7は、不飽和ウロン酸1モルに対し、グルコサミンを2モル、飽和のウロン酸を1モル含む四糖画分であることが判明した。画分7は、ポリアミンカラムを用いたHPLCによってさらに細かく分画し、Fr. IからXIIIを得た(Fig. 20)。このうち画分7全体の

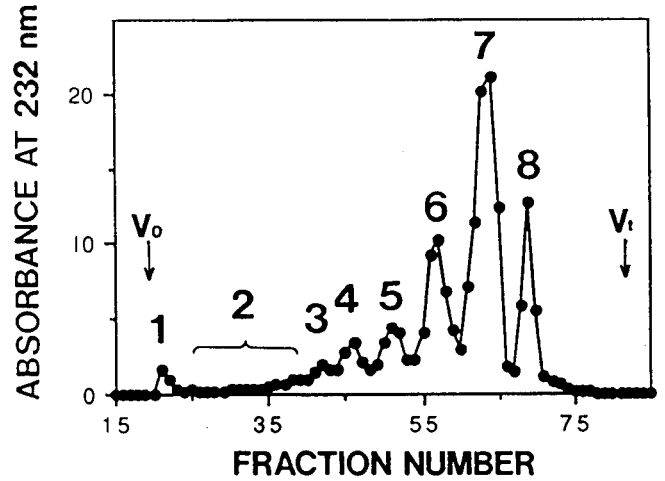


Fig. 19. Gel filtration of the heparinase digest on Bio-Gel P-10. Purified stage 14 heparin was digested with heparinase. The digest was subjected to gel filtration on a column of Sephadex G-25 fine, and separated into oligosaccharides and disaccharides. The oligosaccharide fraction was further fractionated on a column (1.6 x 95 cm) of Bio-Gel P-10 using 1.0 M NaCl/10% ethanol as the eluent. Fractions (2 ml) were collected and monitored by absorbance at 232 nm. Fractions 1-8 were pooled.

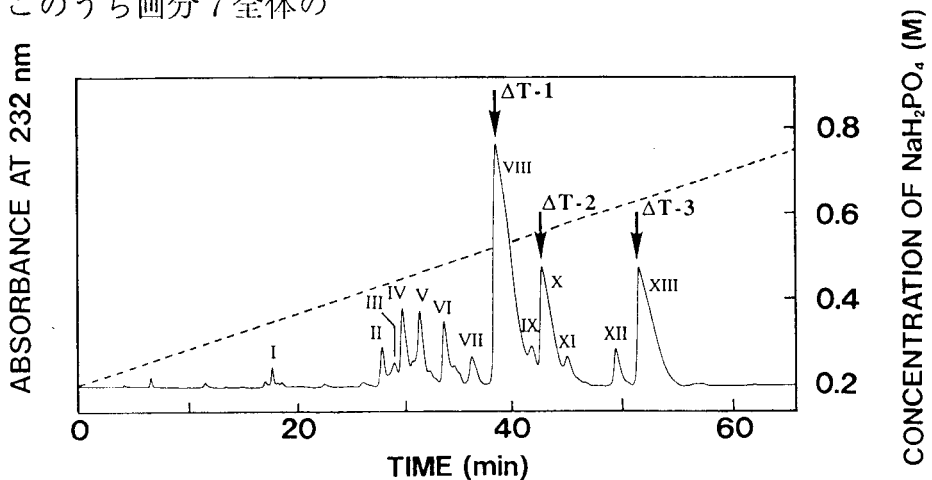


Fig. 20. Fractionation of unsaturated tetrasaccharides by HPLC on an amine-bound silica column. The tetrasaccharide fraction (Fraction 7 in Fig. 19) obtained by gel filtration on Bio-Gel P-10 was chromatographed on an amine-bound silica column using a linear salt gradient (indicated by the dashed line). The elution positions of the authentic tetrasaccharides,  $\Delta T$ -1, -2 and -3, are indicated by arrows.

95% (モル%) を占める主要な11画分について、同じ条件で再クロマトグラフィーを行ってさらに精製し、構造研究を進めた。それら11画分は、HPLCとキャピラリー電気泳動による純度の分析を行い、ほぼ均一であることを確認した (結果は示していない)。なお、100 mgのヘパリンから単離できる各成分の量をTable 12に示した。

Table 12. Enzymatic analysis of the isolated oligosaccharides. After each oligosaccharide fraction was incubated with heparitinase II or with 2-sulfatase and then heparitinase II, the reaction products were characterized by HPLC. Recoveries of the disaccharides calculated based on absorption at 232 nm are shown in parentheses.

Fr. No.	Yield <sup>a</sup>	Heparitinase II digest	2-sulfatase/Heparitinase II digest	Presumed structure of the major component
II	181	$\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (253%)	ND <sup>b</sup>	$\Delta$ HexA-GlcN(NS, 6S <sup>c</sup> )-HexA-GlcN(NS, 6S)
IV	407	$\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (73%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (100%)	2-sulfatase sensitive <sup>d</sup>	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS)-HexA-GlcN(NS, 6S)
V	606	$\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (92%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>3</sub> (72%)	$\Delta$ DiHS-6S (100%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (128%)	$\Delta$ HexA(2S)-GlcNAc(6S)-HexA-GlcN(NS, 6S)
VI	486	$\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (248%)	ND	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS)-HexA(2S)-GlcN(NS)
VII	226	$\Delta$ DiHS-6S (110%) and $\Delta$ DiHS-triS (113%)	$\Delta$ DiHS-6S (83%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (92%)	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS, 6S)-HexA-GlcNAc(6S)
VIII	3597	$\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (105%) and $\Delta$ DiHS-triS (107%)	$\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (188%)	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS, 6S)-HexA-GlcN(NS, 6S)
IX	263	$\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (90%) and $\Delta$ DiHS-triS (93%)	$\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (109%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (94%)	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS, 6S)-HexA(2S)-GlcN(NS)
X	1199	$\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (121%) and $\Delta$ DiHS-triS (110%)	$\Delta$ DiHS-diS <sub>1</sub> (110%) and $\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (98%)	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS, 6S)-HexA(2S)-GlcN(NS)
XI	289	$\Delta$ DiHS-diS <sub>2</sub> (61%) and $\Delta$ DiHS-triS (73%)	$\Delta$ DiHS-NS (56%) and $\Delta$ DiHS-triS (50%)	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS)-HexA(2S)-GlcN(NS, 6S)
XII	245	$\Delta$ DiHS-triS (212%)	ND	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS, 6S)-HexA(2S)-GlcN(NS, 6S)
XIII	1744	$\Delta$ DiHS-triS (209%)	ND	$\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS, 6S)-HexA(2S)-GlcN(NS, 6S)

<sup>a</sup>nmol/100mg heparin

<sup>b</sup>ND, not determined.

<sup>c</sup>2S, 6S or NS represents 2-O-, 6-O- or 2-N-sulfate, respectively.

<sup>d</sup>The parent tetrasaccharide was sensitive to 2-sulfatase. Heparitinase II digestion was not conducted.

## 2. 各成分の酵素消化による分析

単離した各画分をヘパリチナーゼIIで消化すると、二種類の不飽和二糖が等量、あるいは消化前の二倍の紫外吸収を持つ一種類の不飽和二糖が生じ、二糖組成が決定できた。二種類の二糖単位のもとの四糖における配列は、2-スルファターゼ<sup>(71)</sup>の基質特異性を利用して決定した。2-スルファターゼは非還元末端に位置する4, 5-不飽和ウロン酸の2-O硫酸化構造のみに特異的に作用する酵素で、もとの四糖を2-スルファターゼで消化後、ヘパリチナーゼIIで連続消化すれば、2-O硫酸化不飽和ウロン酸残基を持つ二糖単位的位置を決定できる。各画分の酵素消化物のHPLC分析の結果はTable 12にまとめた。また、代表例としてFr. IXの分析のクロマトグラムをFig. 21に示した。上段は不飽和二糖の標準品で、中段はヘパリチナーゼIIによるFr. IXの消化結果であり、 $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>と $\Delta$ DiHS-triSが等量生じた。Fr. IXを2-スルファターゼで消化後、ヘパリチナーゼIIで連続消化すると (Fig. 21下段)、 $\Delta$ DiHS-diS<sub>1</sub>と $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>を生じたので、 $\Delta$ DiHS-triSがもとの四糖においては非還元末端側に位置していたことがわかる。よって、Fr. IX中の成分の構造は $\Delta$ HexA(2S)  $\alpha$  1-4GlcN(NS,6S)  $\alpha$  1-4HexA(2S)1-4GlcN(NS)であると判明した。糖鎖内部のウロン酸残基は、亜硝酸分解物のHPLCによる解析と500-MHz <sup>1</sup>H-NMR解析によって決定した (後述)。

Fr. IX、X、XIはヘパリチナーゼIIによる消化によって、いずれも等量の $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>と

Fr. IX、X、XIはヘパリチナーゼIIによる消化によって、いずれも等量の $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>と $\Delta$ DiHS-triSを生じ (Table 12)、これらの画分の主成分はそのような二糖から構成されるペンタ硫酸化四糖であるとわかった。Fr. XIは2-スルファターゼ、ヘパリチナーゼIIで連続消化すると、 $\Delta$ DiHS-NSと $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>を生じたので、 $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>がもとの四糖では非還元末端側に位置していたことがわかった。すなわち、Fr. XI中の成分の構造は $\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS) $\alpha$ 1-4HexA(2S)1-4GlcN(NS,6S)である。糖鎖内部のウロン酸は、後述のように<sup>1</sup>H-NMR解析によって決定した。同様に、Fr. IXとXも2-スルファターゼとヘパリチナーゼIIの連続消化を行ったところ、いずれからも等量の $\Delta$ DiHS-diS<sub>1</sub>と $\Delta$ DiHS-diS<sub>2</sub>を生じ、両者の成分は $\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS,6S) $\alpha$ 1-4HexA(2S)1-4GlcN(NS)という共通の配列を持った異性体であると判明した。HPLCでの溶出位置と、出発材料のヘパリンの中に含まれる割合 (Table 12) から考えて、Fr. Xは $\Delta$ T-2と名付けた $\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS,6S) $\alpha$ 1-4IdoA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS)という構造既知の四糖と同じ成分であると推定した<sup>(29, 72)</sup>。しかし、最終的には、亜硝酸分解物のHPLCによる解析と500-MHz <sup>1</sup>H-NMR解析を行い、Fr. IXとXの成分の構造を決定した (後述)。

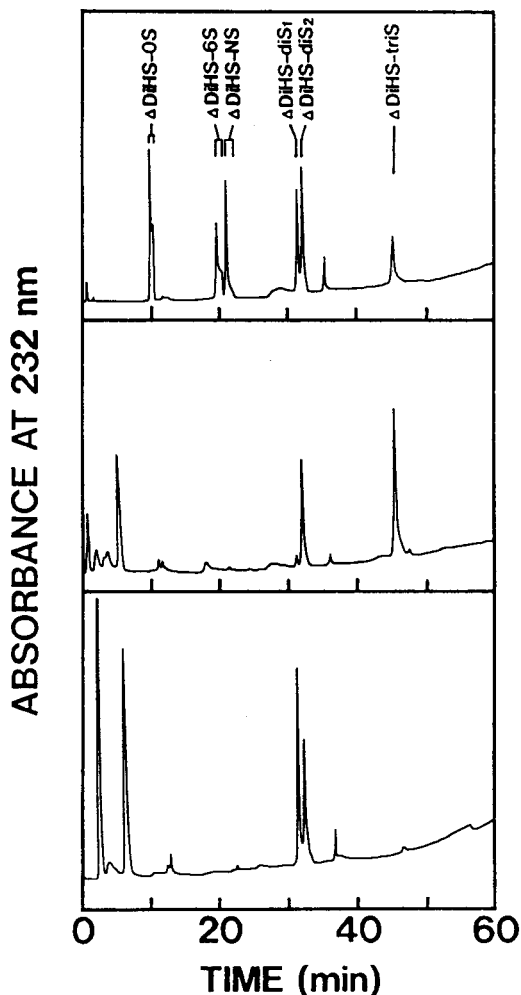


Fig. 21. HPLC analysis of the heparitinase II digest of Fr. IX. Top panel, the elution positions of standard heparin/heparan sulfate-derived unsaturated disaccharides (0.3 nmol each, for disaccharide abbreviations see Fig. 8); middle panel, the heparitinase II digest of Fr. IX (0.5 nmol); bottom panel, successive digestions of Fr. IX (0.5 nmol) with 2-sulfatase and then heparitinase II.

また、Fr. XIIとXIIIのヘパリチナーゼIIによる消化では、いずれからも $\Delta$ DiHS-triSのみを生じ、その232 nmにおける吸収は消化前の二倍に増えた (Table 12)。この結果から、両者の成分は、 $\Delta$ HexA(2S)  $\alpha$  1-4GlcN(NS,6S)  $\alpha$  1-4HexA(2S)1-4GlcN(NS,6S)という共通のヘキサ硫酸化六糖構造を持った異性体であると判明した。HPLCでの溶出位置と、出発材料のヘパリンの中に含まれる割合 (Table 12) から考えて、Fr. XIIIは $\Delta$ T-3と名付けた $\Delta$ HexA(2S)  $\alpha$  1-4GlcN(NS,6S)  $\alpha$  1-4IdoA(2S)  $\alpha$  1-4GlcN(NS,6S)という構造既知の四糖と同じ成分であると推定した<sup>(29, 72, 74)</sup>。しかし最終的には、Fr. XIIとXIIIも、亜硝酸分解物のHPLCによる解析と500-MHz <sup>1</sup>H-NMR解析を行い、構造を決定した (後述)。

### 3. 亜硝酸分解によって生じた二糖のHPLCによる分析

Fr. IX、X、XII、XIIIの中に含まれる成分の糖鎖内部のウロン酸を同定するため、それぞれを亜硝酸分解し、HPLCで解析した。Fig. 22に模式的に示したように、バクテリアの酵素による消化では、元の糖鎖内部のウロン酸残基がグルクロン酸であってもイズロン酸であっても4,5-不飽和ウロン酸に変換されてしまうが、亜硝酸分解では、糖鎖内部のウロン酸はもとの構造を保持したまま二糖にまで分解される<sup>(76, 77)</sup> (ただし、還元末端に位置するN-硫酸化グルコサミンはN-硫酸基がはずれ、2,5-アンヒドロマンニトールanMan<sub>R</sub>に変換されてしまう)。

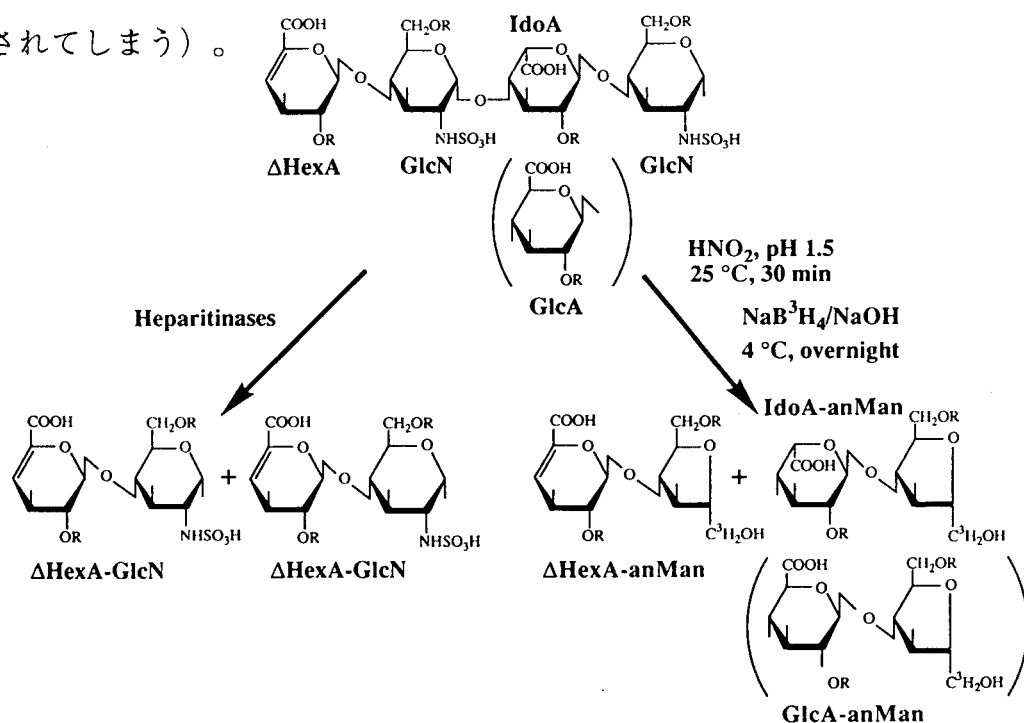


Fig. 22. Cleavage of heparin tetrasaccharides with nitrous acid (right) and heparitinases (left). Bacterial lyase (heparitinases) treatment converts the original structure of the internal uronic acid residue, glucuronate or iduronate, of the oligosaccharides into the same 4,5-unsaturated hexuronic acid, 4-deoxy- $\alpha$ -L-threo-hex-4-enopyranosyluronic acid. In contrast, nitrous acid treatment retains the original uronic acid structure, despite loss of an N-sulfate group and production of an artificial structure, 2,5-anhydromannitol, at the reducing end.

Fr. IXとXを亜硝酸分解後 $\text{NaB}^3\text{H}_4$ で還元し、生じてきた二糖アルデイトールをゲルろ過クロマトグラフィーで精製し、ポリアミンカラムを用いたHPLCで分析した（実験の部を参照）。その結果をFig. 23に、市販のヘパリンを亜硝酸分解して得た標準品とともに示した。Fr. IXとXは、分解によっていずれもモノ硫酸化二糖とジ硫酸化二糖を生じたことが溶出位置からわかる<sup>(78)</sup>。酵素消化による分析から推定された四糖の構造に基づいて考察すると、共通して見られるジ硫酸化二糖は、 $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\alpha\text{1-4anMan}_R(6\text{S})$ （以下 $\Delta\text{USMS}$ と省略する）であると思われる。一方、各々から得られたモノ硫酸化二糖は別々の位置に溶出されており、このことはこれら二種類の二糖が異なったウロン酸残基を含んでいることを示唆している。Fr. Xから得られたモノ硫酸化二糖は、 $\text{IdoA}(2\text{S})\alpha\text{1-4anMan}_R$ という二糖標準品と同じ位置に溶出されていた。したがって、Fr. X中に含まれる成分は $\Delta\text{T-2}$ という既知の四糖と同じであると予想され、このことは酵素消化物のHPLC分析から予想した結果（前述）とも一致していた。また、Fr. IXから得られたモノ硫酸化二糖は、 $\text{GlcA}\beta\text{1-4anMan}_R(6\text{S})$ という二糖標準品とほぼ同じ位置に溶出されており、すでに報告されている $\text{GlcA}(2\text{S})\beta\text{1-4anMan}_R$ の溶出位置もその辺りである<sup>(78)</sup>。酵素消化物のHPLC分析からすでに、Fr. IXには $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\alpha\text{1-4GlcN}(\text{NS},6\text{S})\alpha\text{1-4HexA}(2\text{S})\text{1-4GlcN}(\text{NS})$ という構造の四糖が含まれていることがわかっているので（前述）、Fr. IX中に含まれる成分の構造は $\Delta\text{HexA}(2\text{S})\alpha\text{1-4GlcN}(\text{NS},6\text{S})\alpha\text{1-4GlcA}(2\text{S})\beta\text{1-4GlcN}(\text{NS})$ であると推定した。この構造は、500-MHz  $^1\text{H-NMR}$ 解析によって確認した（後述）。

結果は示していないが、Fr. XIIとXIIIについても亜硝酸分解を行い、HPLCで分析した。いずれの画分からも二種類ずつのジ硫酸化二糖が得られ、それらのうち一方の成分についてはFr. XIIとXIIIで同じ位置に溶出されるものであった。前述の酵素消化による分析から推定された四糖の構造に基づいて考察すると、この共通のジ硫酸化二糖は $\Delta\text{USMS}$ と思われる。一方、各々から得られたもう一方のジ硫酸化二糖は、それぞれ異なった位置に溶出されており、両者は異なるウロン酸残基を含むことが予想された。Fr. XIIIに由来するそのジ硫酸化二糖の溶出位置は、 $\text{IdoA}(2\text{S})\alpha\text{1-4anMan}_R(6\text{S})$ という二糖標準品（以下 $\text{ISMS}$ と省略する）と同じ位置に溶出されていた。したがって、Fr. XIII中に含まれる成分は $\Delta\text{T-3}$ という既知の四糖と予想された。Fr. XIIIのHPLC上での溶出位置も出発材料のペパリンから得られる収量（前述）も、 $\Delta\text{T-3}$ の場合の値とよく一致していた<sup>(29, 72, 74)</sup>。また、Fr. XIIから得られたもう一つのジ硫酸化二糖は、 $\text{ISMS}$ の直前に溶

出されており、この位置はすでに報告されているGlcA(2S) $\beta$ 1-4anMan<sub>R</sub>(6S)の溶出位置とほぼ同じであった<sup>(78)</sup>。したがって、Fr. XII中に含まれる成分の構造は $\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS,6S) $\alpha$ 1-4GlcA(2S) $\beta$ 1-4GlcN(NS,6S)であると推定した。この構造も、500-MHz <sup>1</sup>H-NMR解析によって確認した(後述)。

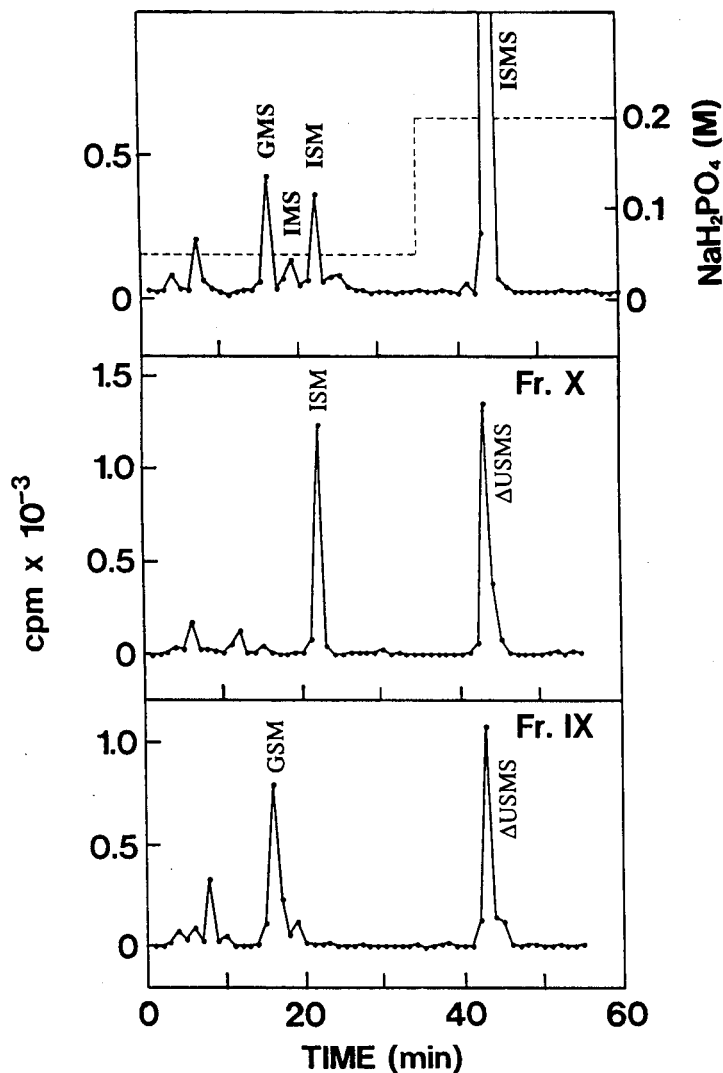


Fig. 23. HPLC analysis of the disaccharides obtained by  $\text{HNO}_2/\text{NaB}^3\text{H}_4$  treatment. Fractions IX and X were subjected to nitrous acid depolymerization at pH 1.5 and the resultant <sup>3</sup>H-labeled disaccharides were isolated by Bio-Gel P-2 gel filtration chromatography and analyzed by HPLC on an amine-bound silica column. Fractions were collected at 1-min intervals at a flow rate of 1 ml/min and radioactivity was determined by liquid scintillation counting. Top panel, profile of heparin disaccharide standards. Middle panel, profile of the disaccharides (presumably ISM and  $\Delta$ USMS) derived from Fr. X; bottom panel, profile of the disaccharides (presumably GSM and  $\Delta$ USMS) derived from Fr. IX. The  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  gradient used for the separation is indicated by the dashed line in the top panel. GSM, IMS, ISM, ISMS,  $\Delta$ USMS and GSM represent GlcA $\beta$ 1-4anMan<sub>R</sub>(6-sulfate), IdoA $\alpha$ 1-4anMan<sub>R</sub>(6-sulfate), IdoA(2-sulfate) $\alpha$ 1-4anMan<sub>R</sub>, IdoA(2-sulfate) $\alpha$ 1-4anMan<sub>R</sub>(6-sulfate),  $\Delta$ HexA(2-sulfate) $\alpha$ 1-4anMan<sub>R</sub>(6-sulfate) and GlcA(2-sulfate) $\beta$ 1-4anMan<sub>R</sub>, respectively.

#### 4. 500-MHz $^1\text{H}$ -NMR解析

糖鎖内部のウロン酸の同定と硫酸化部位の確認は、500-MHz  $^1\text{H}$ -NMR解析によって行った。化学シフトの帰属は、前節や前章などで述べたように、二次元HOHAHA、COSYの手法を用いて行った（結果は示していない）。Fr. IX及びX、Fr. XII及びXIIIの一次元のスペクトルをそれぞれFig. 24と25に示し、また各画分のNMRデータはTable 13にまとめた。

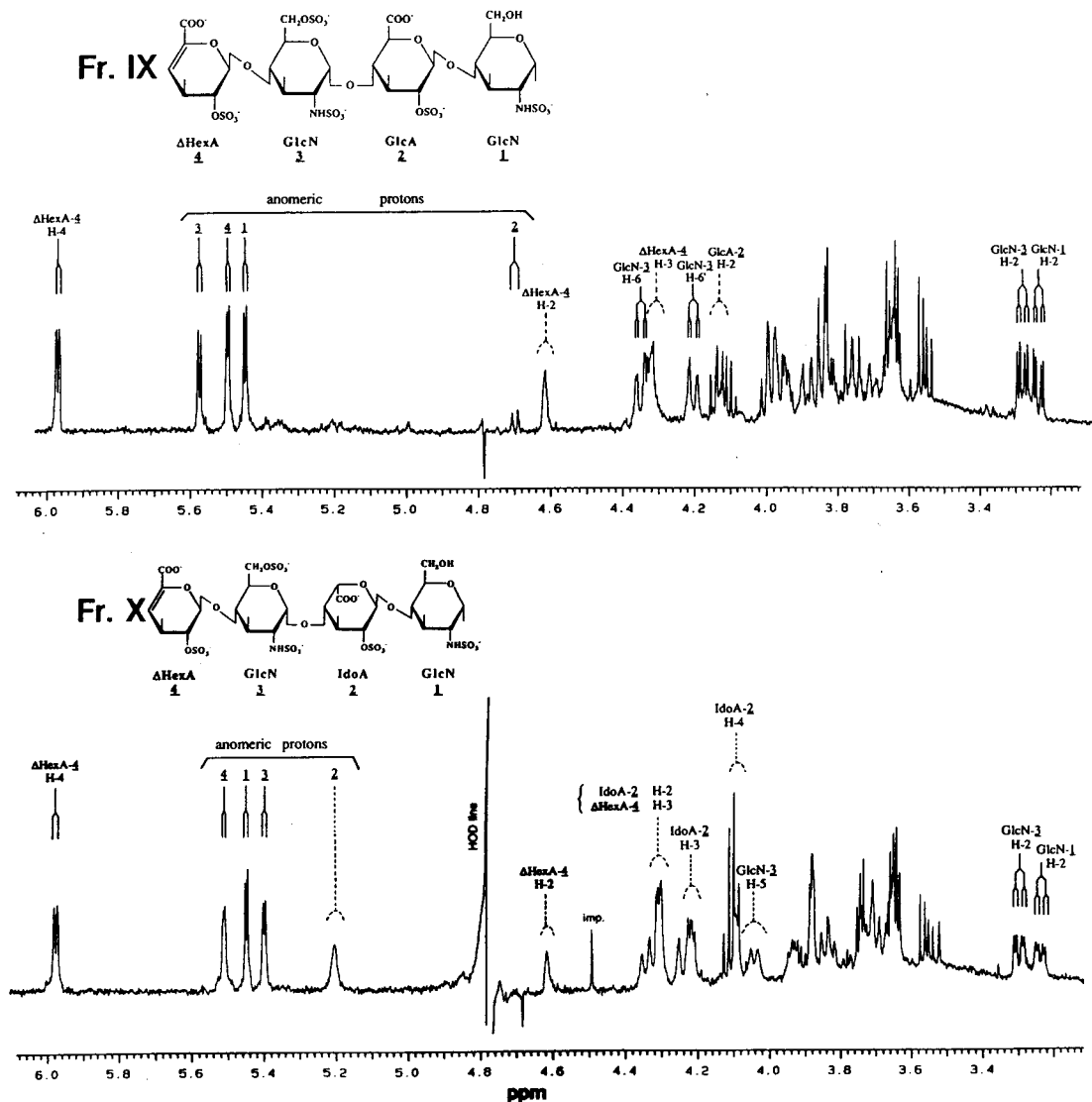


Fig. 24. Structural-reporter-group regions of the 500-MHz  $^1\text{H}$  NMR spectra of Fractions IX and X recorded in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 26 °C. Upper panel, Fr. IX; lower panel, Fr. X. The numbers and letters in the spectra refer to the corresponding residues in the structure.

糖鎖内部のウロン酸残基は、そのアノメリックプロトンの化学シフトの値と結合定数  $J_{1,2}$  の値に基づいてははっきりと決定できた。ヘパリンオリゴ糖において、2-O硫酸化されたグルクロン酸の化学シフトは報告されたことがないが、2-O硫酸化されたイズロン酸と硫酸化されていないグルクロン酸のアノメリックプロトンの化学シフトは、それぞれ

約  $\delta$  5.2 と約  $\delta$  4.6 に検出されることがわかっている<sup>(29, 30, 60, 72)</sup>。また結合定数  $J_{1,2}$  の値は、 $\alpha$  イズロン酸の場合で約 3.0 Hz、 $\beta$  グルクロン酸の場合で約 8.0 Hz であるとわかっている<sup>(29, 30, 72, 75, 79)</sup>。Fr. X の糖鎖内部のウロン酸は、そのアノメリックプロトンの化学シフトの値が  $\delta$  5.205 であり、結合定数  $J_{1,2}$  の値が 3.0 Hz であることから (Fig. 24、Table 13)、イズロン酸と同定できた。しかも、その H-2 の化学シフトの値は、ウシ腎臓ヘパラン硫酸由来の四糖の硫酸化されていないイズロン酸の値<sup>(79)</sup> に比べると (結果は示していない)、約 0.55 ppm 低磁場側にシフトしており、イズロン酸の 2 位が硫酸化されていることが確認できた<sup>(29)</sup>。Fr. IX の糖鎖内部のウロン酸は、そのアノメリックプロトンの化学シフトの値が  $\delta$  4.695 であり、結合定数  $J_{1,2}$  の値が 7.5 Hz であることから (Fig. 24、Table 13)、グルクロン酸と同定できた。このグルクロン酸の H-2 の

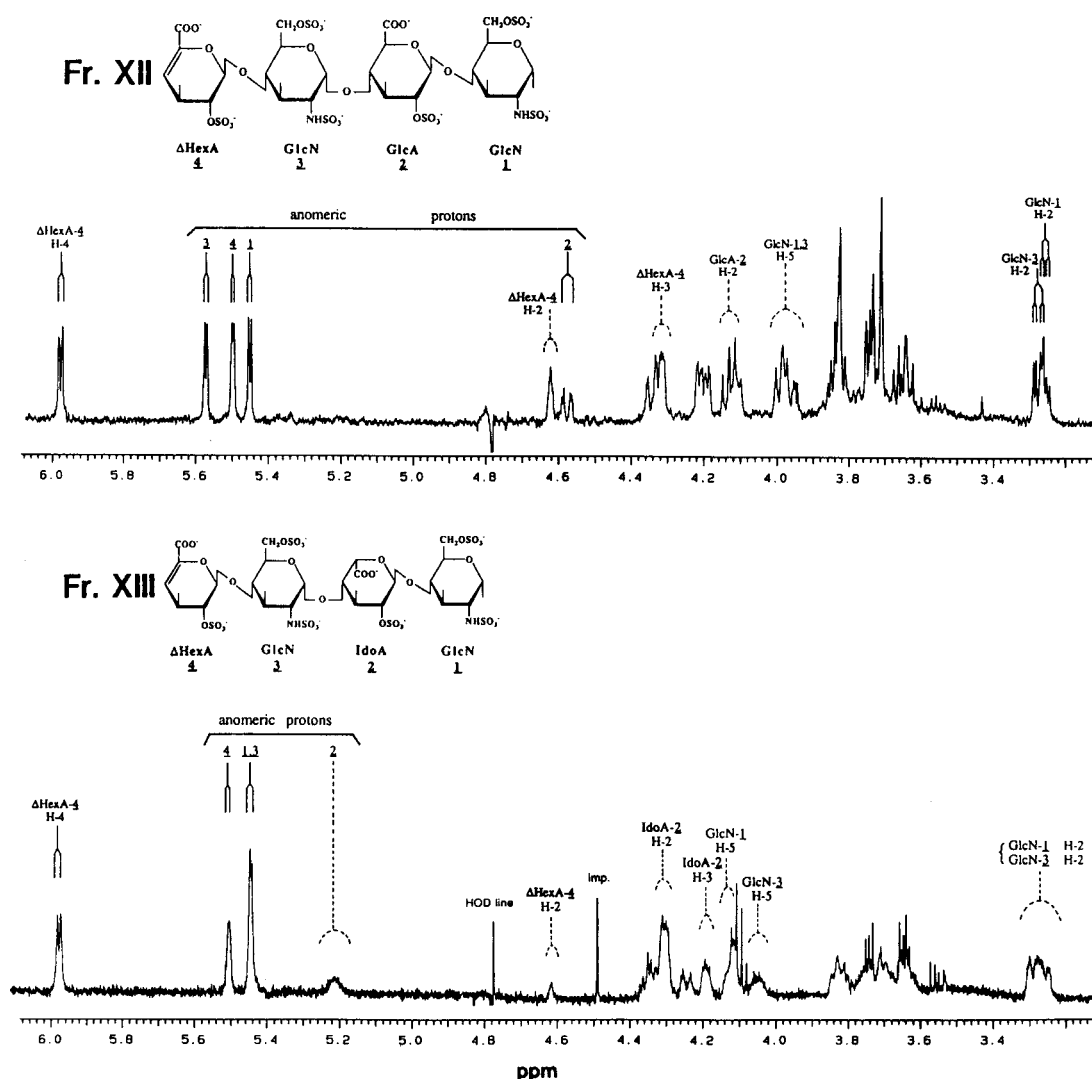


Fig. 25. 500-MHz  $^1\text{H}$  NMR spectra of Fractions XII and XIII recorded in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 26  $^\circ\text{C}$ . Upper panel, Fr. XII; lower panel, Fr. XIII.

Table 13.  $^1\text{H}$ -Chemical Shifts of the Constituent Monosaccharides of Tetrasaccharides Derived from Heparin

Chemical shifts are given in ppm downfield from internal sodium 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonate, but were actually measured indirectly in reference to acetone ( $\delta$  2.225 ppm) in  $^2\text{H}_2\text{O}$  at 26°C. The estimated error in the resonance assignments is  $\pm 0.002$  ppm.

	Fr. II	Fr. IV	Fr. V	Fr. VI	Fr. VII	Fr. VIII	Fr. IX	Fr. X	Fr. XI	Fr. XII	Fr. XIII
GlcN-1	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$
H-1	5.462	5.461	5.459	5.447	5.202	4.714	5.462	5.452	5.449	5.443	5.446
H-2	3.270	3.267	3.265	3.229	3.879	3.70 <sup>b</sup>	3.255	3.231	3.225	3.254	3.274
H-3	3.71 <sup>b</sup>	3.709	3.716	3.682	3.832	ND <sup>c</sup>	3.740	3.758	3.698	3.679	3.697
H-4	3.71 <sup>b</sup>	3.68 <sup>b</sup>	ND	3.921	3.691	ND	3.70 <sup>b</sup>	3.64 <sup>b</sup>	3.928	3.74 <sup>b</sup>	3.732
H-5	4.147	4.153	ND	3.84 <sup>b</sup>	4.158	ND	4.161	3.936	3.886	4.118	4.125
H-6	4.342	4.33 <sup>b</sup>	ND	ND	4.29 <sup>b</sup>	ND	4.34 <sup>b</sup>	ND	3.88 <sup>b</sup>	4.35 <sup>b</sup>	ND
H-6'	4.336	4.33 <sup>b</sup>	ND	ND	4.29 <sup>b</sup>	ND	4.34 <sup>b</sup>	3.88 <sup>b</sup>	ND	4.29 <sup>b</sup>	ND
N-Ac	.d	-	-	-	2.033	-	-	-	-	-	-
HexA-2											
H-1	4.606	4.593	4.569	5.179	4.992	4.580	4.695	5.205	5.198	4.575	5.220
H-2	3.381	3.370	3.331	4.287	3.744	3.375	4.126	4.293	4.293	4.128	4.30 <sup>b</sup>
H-3	3.870	3.831	3.678	4.207	4.118	3.847	3.990	4.238	4.183	ND	4.198
H-4	3.79 <sup>b</sup>	3.76 <sup>b</sup>	3.76 <sup>b</sup>	4.067	4.07 <sup>b</sup>	3.795	3.83 <sup>b</sup>	4.094	4.085	ND	4.13 <sup>b</sup>
H-5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GlcN-3											
H-1	5.636	5.565	5.374	5.385	5.359	5.567	5.580	5.398	5.436	5.574	5.446
H-2	3.320	3.276	3.920	3.261	3.269	3.295	3.276	3.292	3.262	3.272	3.302
H-3	3.668	3.607	3.786	3.613	3.623	3.662	3.640	3.648	3.600	3.630	3.635
H-4	3.862	3.777	ND	3.760	3.823	3.841	3.823	3.820	3.760	3.810	3.826
H-5	4.019	3.84 <sup>b</sup>	ND	3.87 <sup>b</sup>	3.972	3.990	3.989	4.030	3.877	3.972	4.052
H-6	4.454	ND	ND	ND	4.342	ND	4.339	4.24 <sup>b</sup>	3.80 <sup>b</sup>	ND	ND
H-6'	4.175	ND	ND	ND	4.200	ND	4.197	4.24 <sup>b</sup>	3.80 <sup>b</sup>	ND	ND
N-Ac	-	-	2.036	-	-	-	-	-	-	-	-
$\Delta\text{HexA-4}$											
H-1	5.146	5.522	5.493	5.523	5.487	5.530	5.500	5.510	5.523	5.500	5.507
H-2	3.777	4.597	4.627	4.601	4.610	4.622	4.615	4.624	4.602	4.620	4.622
H-3	4.256	4.237	4.318	4.205	4.310	4.320	4.315	4.309	4.217	4.298	4.302
H-4	5.796	5.999	5.981	6.000	5.972	5.995	5.976	5.979	6.002	5.979	5.979

<sup>a</sup>Symbols represent the followings: an open triangle,  $\Delta\text{HexA}$ ; a closed triangle,  $\Delta\text{HexA}(2\text{-sulfate})$ ; an open square, GlcA; a closed square, GlcA(2-sulfate); an open diamond, IdoA; a closed diamond, IdoA(2-sulfate); a closed circle, GlcN(*N*, 6-disulfate); a circle half-closed on the left side, GlcNAc(6-sulfate); a circle half-closed on the right side, GlcN(*N*-sulfate).

<sup>b</sup>Signals partially overlap, reducing the precision of the chemical shifts.

<sup>c</sup>ND, not determined.

<sup>d</sup>-, not occurring.

化学シフトの値は、糖鎖内部のウロン酸として硫酸化されていないグルクロン酸を持つ Fr. VIIIの値と比較すると、0.751 ppm低磁場側にシフトしており、2位が硫酸化されていることが確認できた。NMR解析、酵素消化物の分析、亜硝酸分解物の分析から、以下の構造がFr. IX及びXに含まれる成分として決定できた。

Fr. IX:  $\Delta$ HexA(2S)  $\alpha$ 1-4GlcN(NS,6S)  $\alpha$ 1-4GlcA(2S)  $\beta$ 1-4GlcN(NS)

Fr. X:  $\Delta$ HexA(2S)  $\alpha$ 1-4GlcN(NS,6S)  $\alpha$ 1-4IdoA(2S)  $\alpha$ 1-4GlcN(NS)

また、Fr. XIIの糖鎖内部のウロン酸も、そのアノメリックプロトンの化学シフト ( $\delta$  4.575) と結合定数 $J_{1,2}$  (10.5 Hz) の値より、グルクロン酸と同定した。グルクロン酸の2位の硫酸化は、Fr. IXの場合と同様に、硫酸化されていないグルクロン酸を含む成分との化学シフトの比較から確認した。NMR解析、酵素消化物の分析、亜硝酸分解物の分析から、以下の構造が、Fr. XII及びXIIIに含まれる成分として決定できた。

Fr. XII:  $\Delta$ HexA(2S)  $\alpha$ 1-4GlcN(NS,6S)  $\alpha$ 1-4GlcA(2S)  $\beta$ 1-4GlcN(NS,6S)

Fr. XIII:  $\Delta$ HexA(2S)  $\alpha$ 1-4GlcN(NS,6S)  $\alpha$ 1-4IdoA(2S)  $\alpha$ 1-4GlcN(NS,6S)

同様にして、他の七つの画分中の成分の構造を決定した (Table 14)。今回構造決定した11成分のうち、6成分は単離の報告がない構造をしていた。興味深いことに、Fr. IXとXIIに含まれる成分は、珍しいグルクロン酸2-硫酸構造を糖鎖内部に含んでいた。グルクロン酸2-硫酸構造は、亜硝酸分解物の二糖の解析からその存在が示唆されていたが<sup>(78, 80-82)</sup>、硫酸化の部位が3位である可能性は排除できておらず、このようにNMRで構造が証明されたのは初めてである。また、実際にグルクロン酸2-硫酸を糖鎖内部に含む四糖としての単離も初めてである。

Table 14. Structures of the isolated tetrasaccharides derived from porcine intestinal heparin.

Fr. No.	Structure	ref. <sup>a</sup>
II	$\Delta$ HexA $\alpha$ 1-4GlcN(NS <sup>b</sup> , 6S) $\alpha$ 1-4GlcA $\beta$ 1-4GlcN(NS, 6S)	
IV	$\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS) $\alpha$ 1-4GlcA $\beta$ 1-4GlcN(NS, 6S)	60
V	$\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcNAc(6S) $\alpha$ 1-4GlcA $\beta$ 1-4GlcN(NS, 6S)	
VI	$\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS) $\alpha$ 1-4IdoA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS)	29, 74
VII	$\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS, 6S) $\alpha$ 1-4IdoA $\alpha$ 1-4GlcNAc(6S)	
VIII	$\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS, 6S) $\alpha$ 1-4GlcA $\beta$ 1-4GlcN(NS, 6S)	60, 72
IX	$\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS, 6S) $\alpha$ 1-4GlcA(2S) $\beta$ 1-4GlcN(NS)	
X	$\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS, 6S) $\alpha$ 1-4IdoA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS)	29, 72, 74
XI	$\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS) $\alpha$ 1-4IdoA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS, 6S)	
XII	$\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS, 6S) $\alpha$ 1-4GlcA(2S) $\beta$ 1-4GlcN(NS, 6S)	
XIII	$\Delta$ HexA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS, 6S) $\alpha$ 1-4IdoA(2S) $\alpha$ 1-4GlcN(NS, 6S)	60, 72

<sup>a</sup>References for the previously isolated structures.

<sup>b</sup>2S, 6S, or NS represents 2-O-, 6-O-, or 2-N-sulfate, respectively.

第4節 ヘパリン及びヘパラン硫酸由来の種々のオリゴ糖を用いた、分解酵素の  
基質特異性の研究<sup>(29-31)</sup>

ヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIの三種類の酵素について、第1、2節で述べたヘパリン由来のオリゴ糖14種<sup>(29, 30)</sup>、第3節で述べた四糖11種<sup>(31)</sup>の合計23種類（重複している構造もある）のオリゴ糖を用い、基質特異性を検討した。各酵素の従来知られている基質特異性は、多糖を分解したときに生じてきた主要な二糖やオリゴ糖の末端の糖残基の構造から推定したものであり<sup>(60, 63, 72)</sup>、明確な構造を持ったオリゴ糖を用いて調べられたことはほとんどなかった<sup>(83-85)</sup>。各オリゴ糖をヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIとインキュベートし、それぞれの反応液をHPLCで分析することにより、消化の有無を検討した。各酵素消化の結果はTable 15にまとめた。

Table 15. Substrate Specificity of Heparinase and Heparitinases I & II towards 34 Oligosaccharides.

Fr. No.	Structure					Hepase <sup>a</sup>	HSase I	HSase II
III-4	ΔHexA	α1-4GlcN(NS) <sup>b</sup>	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcNAc	-	-	+	
III-5a	ΔHexA	α1-4GlcN(NS)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcN(NS)	-	-	+	
III-5b		GlcN(NS)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	-	-	+	
III-10a	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcNAc	-	-	+	
III-10b	ΔHexA	α1-4GlcN(NS)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcNAc(6S)	-	-	+	
III-11	ΔHexA	α1-4GlcN(NS,6S)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcN(NS)	-	-	+	
III-13	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcN(NS)	-	-	+	
III-15	ΔHexA	α1-4GlcN(NS)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	-	-	+	
III-17	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcNAc	-	-	+	
III-18	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS)	α1-4UA <sup>c</sup> (2S)	1-4GlcNAc(6S)	-	-	+	
III-20	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcN(NS)	-	-	+	
III-9	ΔHexA	α1-4GlcNAc(6S)	α1-4GlcA	β1-4GlcN(NS,3S)	-	-	-	
III-12	ΔHexA	α1-4GlcNAc(6S)	α1-4GlcA	β1-4GlcN(NS,3S,6S)	-	-	-	
III-19	ΔHexA	α1-4GlcN(NS,6S)	α1-4GlcA	β1-4GlcN(NS,3S,6S)	-	-	-	
II	ΔHexA	α1-4GlcN(NS,6S)	α1-4GlcA	β1-4GlcN(NS,6S)	-	+	+	
IV	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS)	α1-4GlcA	β1-4GlcN(NS,6S)	-	+	+	
V	ΔHexA(2S)	α1-4GlcNAc(6S)	α1-4GlcA	β1-4GlcN(NS,6S)	-	+	+	
VI	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcN(NS)	-	-	+	
VII	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	α1-4IdoA	α1-4GlcNAc(6S)	-	+	+	
VIII	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	α1-4GlcA	β1-4GlcN(NS,6S)	-	+	+	
IX	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	α1-4GlcA(2S)	β1-4GlcN(NS)	-	-	+	
X	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcN(NS)	-	-	+	
XI	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	+	-	+	
XII	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	α1-4GlcA(2S)	β1-4GlcN(NS,6S)	+	-	+	
XIII	ΔHexA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	α1-4IdoA(2S)	α1-4GlcN(NS,6S)	+	-	+	

<sup>a</sup>Hepase, HSase I or II represents heparinase, heparitinase I or II, respectively.

<sup>b</sup>2S, 3S, 6S, or NS represents 2-O-, 3-O-, 6-O-, or 2-N-sulfate, respectively.

<sup>c</sup>the isomer type was not determined.

### 1. ヘパリチナーゼII

ヘパリチナーゼIIはヘパリン／ヘパラン硫酸由来のオリゴ糖の構造解析に極めてよく用いられている酵素である。この酵素は大部分の四糖と飽和の三糖（Fr. III-5b）に作用した。この結果、GlcN(NS,±6S)/GlcNAc(±6S)—GlcA/IdoA(±2S)という配列中のグルコサミニド結合に作用すると考えられていた、ヘパリチナーゼIIの広い基質特異性<sup>(63, 85)</sup>を再確認できた。しかし、ヘパリチナーゼIIは、還元末端にグルコサミン3-硫酸構造を持つFr. III-9、12、19の三構造にだけは作用せず、切断部位の二糖ではなくその隣のグ

ルコサミンの修飾構造によって影響を受けることが判明した。また、ヘパリチナーゼIIが飽和の三糖であるFr. III-5bにも作用したことから、非還元末端側のウロン酸残基は酵素の作用のためには必ずしも必要ではないことが判明した。よって、切断部位の二糖のすぐ隣りのグルコサミンの方はヘパリチナーゼIIの作用に影響を与えるが、ウロン酸の方は影響を与えないことがわかった (Fig. 26)。すなわち、そのグルコサミンの部分もヘパリチナーゼIIによって認識されているのだろう。あるいは、そのグルコサミンの3位が硫酸化されることによって、切断部位の二糖の立体的なコンフォメーションが変化し、切断されなくなるのかもしれない。

## 2. ヘパリチナーゼI

ヘパリチナーゼIは、従来、 $\text{GlcN}(\text{NS}, \pm 6\text{S})/\text{GlcNAc}(\pm 6\text{S})-\text{GlcA}$ という配列中のグルコサミニド結合を切断すると考えられてきた<sup>(85)</sup>。しかし、Fr. III-9、12、19はそのような配列を持つにも関わらず、ヘパリチナーゼIは作用しなかった。これは、ヘパリチナーゼIIの場合と同様、還元末端にグルコサミン 3-硫酸が存在するために抵抗性を示したと考えられる。したがって、ヘパリチナーゼIも、切断部位の二糖の隣のグルコサミンの修飾構造によって影響を受けることが判明した (Fig. 26)。また、ヘパリチナーゼIは、従来考えられていた基質特異性から推定すると切断しないはずのFr. VIIにも作用し (Table 15)、硫酸化されていないイズロン酸を含む成分でも切断することがわかった。よって、ヘパリチナーゼIは、 $\text{GlcN}(\text{NS}, \pm 6\text{S})/\text{GlcNAc}(\pm 6\text{S})-\text{GlcA}/\text{IdoA}$  (太字部分は新たにわかった部分) という配列中のグルコサミニド結合を切断することになる (Fig. 26)。つまり、この酵素はヘパリチナーゼIIやコンドロイチナーゼABCと同様に、切断部位で *anti* と *syn* のいずれの脱離反応も触媒できるようである。この消化結果は、多糖としてのヘパリンを完全脱硫酸化後、再N-アセチル化して得られた、 $-(\text{IdoA}-\text{GlcNAc})_n-$  という繰り返し構造を持つ多糖に対して、ヘパリチナーゼIが作用するという報告と一致している<sup>(38)</sup>。

## 3. ヘパリナーゼ

ヘパリナーゼは、従来  $\text{GlcN}(\text{NS}, \pm 6\text{S})-\text{IdoA}(2\text{S})$  という配列中のグルコサミニド結合に作用すると考えられてきた<sup>(72, 85)</sup>。しかし今回、ヘパリナーゼはFr. XI、XII、XIIIのみに作用し、他のオリゴ糖には全く作用しなかった。この結果から、従来知られていなかった知見が二つ得られた。一つは、Fr. XIIがヘパリナーゼによって消化されたことから、ヘパリナーゼは2位が硫酸化されていれば、グルクロン酸でもイズロン酸でも作用

し得るということである。よって、ヘパリナーゼも、コンドロイチナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIと同様に、切断部位で*anti*と*syn*のいずれの脱離反応も触媒できる珍しい酵素の一つであると判明した。

今回の結果でもう一つ明らかになったことは、従来考えられていた基質特異性は四糖の場合には必ずしも当てはまらないということである。今回特異性の研究に用いたオリゴ糖の中には、従来の基質特異性で考えれば消化されるはずの配列GlcN(NS,±6S)-IdoA(2S)を持つものが多く見られた。しかし、それらの大部分には作用せず、四糖の場合には異なった基質特異性で考える必要があるようである。ヘパリナーゼが四糖を切断するためには、従来から必要とされていたN-硫酸化グルコサミン、2-硫酸化イズロン酸の他に、還元末端糖のグルコサミンの6位、アミノ基の硫酸化も必要なようである。ヘパリナーゼがFr. XIIIには作用するがFr. Xには作用しないことからその6位の硫酸化が必要なことが、また、ヘパリナーゼがFr. XIには作用するがFr. III-18には作用しないことからそのアミノ基の硫酸化が必要なことがわかる。また、結果は示していないが、Fr. XIIIに2-スルファターゼを作用させて不飽和ウロン酸の2位の硫酸基をはずした成分にも、ヘパリナーゼが作用したことから、不飽和ウロン酸の2位の硫酸基は、ヘパリナーゼの作用のためには必須ではないようである。また、Fr. XIにヘパリナーゼが作用したことから、糖鎖内部のグルコサミンの6位の硫酸基も作用に不可欠ではないようである。しかし、これら両方の硫酸基を持たない成分Fr. III-15にヘパリナーゼは作用しないことから、非還元末端側の硫酸基はその部位よりも数に依存していることが予想される。つまり、還元末端側は、-IdoA(2S)-GlcN(NS,6S)あるいは-GlcA(2S)-GlcN(NS,6S)の配列が、また、非還元末端側は、 $\Delta$ HexA(2S)-GlcN(NS)-あるいは $\Delta$ HexA-GlcN(NS,6S)-の配列が必要なようである。

四糖にヘパリナーゼが作用するためには、従来考えられていたよりもずっと厳密な特異性があることが今回わかったが、この性質は多糖の場合でも適用できるとは必ずしもいえない。多糖としてのヘパリンを基質として用い、ヘパリナーゼで消化すると、末端のグルコサミンに6-O硫酸基を持たない二糖やオリゴ糖も生じてくる<sup>(60, 63, 72)</sup>。これは、多糖の状態ならば6-O硫酸のないGlcN(NS)-IdoA(2S)配列でも作用しうることを表わしており、多糖におけるGlcN(NS)-IdoA(2S)配列の立体構造は、四糖の場合のそれとは異なっているようである。Linhardtらは速度論的な研究を行い、ヘパリナーゼがオリゴ糖よりも多糖に非常によく作用することをKmの比較から明らかにしており<sup>(84)</sup>、

やはり多糖の場合には、基質特異性が少し異なるのかもしれない。今回明らかにした四糖におけるヘパリナーゼの基質特異性が、どれくらいのサイズのオリゴ糖にまで適用することができるのかは今後の課題である。

以上の解析によって修正を加えることができた三酵素の新しい基質特異性を、Fig. 26にまとめた。いずれにおいても、切断部位の二糖部分のさらに還元末端側のグルコサミンの修飾が、酵素に対する感受性に影響を与えているようである。しかし、より大きなオリゴ糖や多糖では、立体構造に依存して、今回明らかにした基質特異性が当てはまらない場合も有り得るということ considering しておくべきであろう。

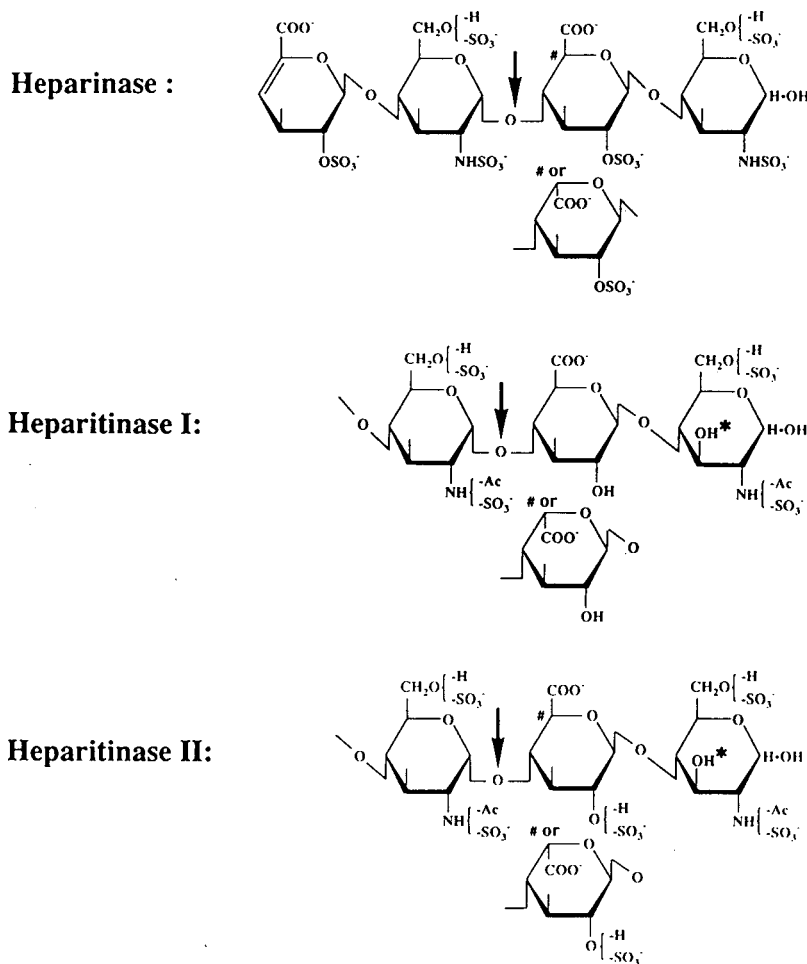


Fig. 26. The structure of the disaccharide cleavage site of the heparin lyases and of the adjacent glucosamine residue which influences the enzymatic action of the lyases. The arrows indicate the glycosidic linkages cleaved by heparinase as well as heparitinases I and II. The pentasulfated trisaccharide sequence is required for the heparinase action on small oligosaccharides. C-6 OH and C-2 NH<sub>2</sub> of the glucosamine residue adjacent to the disaccharide cleavage site may be sulfated, whereas the C-3 OH marked by an asterisk of the same residue has to be free for sensitivity to heparitinases I and II. The hexosaminidic bonds cleaved by the lyases may be linked to iduronic or glucuronic acid residues, indicating their capability of catalyzing both *anti* and *syn* elimination.

## 考察と総括

今回ブタ小腸粘膜のヘパリンより23種類のオリゴ糖を単離し、構造決定した。これらの構造の中には、ヘパリン糖鎖中でも少量しか存在していない珍しい構造を持った成分がいくつか見いだされた。

まずFr. III-9、12、19であるが、これらは還元末端のグルコサミンの3位が硫酸化されており、アンチトロンビンIII結合部位に由来する四糖と考えられる。これら三成分は、 $\Delta$ HexA  $\alpha$  1-4GlcN(6S)  $\alpha$  1-4GlcA  $\beta$  1-4GlcN(NS,3S)という基本骨格を持っており、還元末端側の三糖部分が、アンチトロンビンIIIとの結合に必要な最小の五糖構造、GlcN(6S)  $\alpha$  1-4GlcA  $\beta$  1-4GlcN(NS,3S)  $\alpha$  1-4IdoA(2S)  $\alpha$  1-4GlcN(NS,6S)<sup>(86)</sup>のうちの、非還元末端側三糖（下線部）に相当している。Fr. III-9はまさにその三糖を含んだ構造をしており、Fr. III-12は還元末端側のグルコサミンの6位がさらに硫酸化されたテトラ硫酸化成分、Fr. III-19はさらに非還元末端側のグルコサミンのアミノ基が硫酸化されたペンタ硫酸化成分である。これら三種類の四糖は、アンチトロンビンIII高親和性ヘパリン画分をバクテリア由来の酵素で消化した場合には生じてくるが、アンチトロンビンIII低親和性ヘパリン画分を消化した場合には生じなかったことから、確かにアンチトロンビンIII結合部位に由来することが確認できた（結果は示していない）。したがって、これら三種の四糖が存在することは、ヘパリン中のアンチトロンビンIII結合部位の配列に多様性があることを示している。アンチトロンビンIII結合部位に多様性があることは、亜硝酸分解を利用したヘパリンの構造研究からすでに明らかにされており<sup>(86, 87)</sup>、上述のアンチトロンビンIII結合部位の最少の五糖構造のうち、非還元末端のグルコサミンは、N-アセチル化されている場合とN-硫酸化されている場合があり、また中央のグルコサミンは6位が硫酸化される場合があることがわかっていた。すなわち、その五糖構造には、二つのグルコサミン残基の修飾構造の組み合わせによって、理論上四つの構造異性体（Penta-1から-4、Table 16）が生じうることになる。これらの五糖構造のいずれかを含むアンチトロンビンIII結合部位が実際に均一なオリゴ糖として単離されたのは、以下の数例に限られている。ブタ小腸粘膜のヘパリンより単離された三種の八糖（Octa-1、-3、-4）と一種の六糖（Hexa-1）、そしてウシ肺のヘパリンから単離されたTetra-1という四糖である。

今回単離したFr. III-9、12、19はそれぞれ16:72:12の比で存在していた。最も主要な成分であるFr. III-12は先のPenta-2構造に由来し、この構造異性体に由来する成分（Hexa-1、

Table 16. Structural variation of the antithrombin III-binding site of heparin. Four theoretically possible pentasaccharide variants (Penta-1, -2, -3 and -4) which are constructed base on the data in ref. 86, three tetrasaccharides isolated in the present study (Fr.III-9, -12 and -19) and the previously isolated tetra- (Tetra-1), hexa- (Hexa-1) and octasaccharides (Octa-1 to Octa-4) are shown.

Penta-1	GlcNAc(6S) <sup>a</sup> α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S)		α1-4IdoA(2S)α1-4GlcN(NS, 6S)	
Penta-2	GlcNAc(6S) α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S, 6S)		α1-4IdoA(2S)α1-4GlcN(NS, 6S)	
Penta-3	GlcN(NS, 6S)α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S)		α1-4IdoA(2S)α1-4GlcN(NS, 6S)	
Penta-4	GlcN(NS, 6S)α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S, 6S)		α1-4IdoA(2S)α1-4GlcN(NS, 6S)	
Fr.III-9	ΔGlcA	<u>β1-4GlcNAc(6S) α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S)<sup>b</sup></u>		
Fr.III-12	ΔGlcA	<u>β1-4GlcNAc(6S) α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S, 6S)</u>		
Fr.III-19	ΔGlcA	<u>β1-4GlcN(NS, 6S)α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S, 6S)</u>		
Tetra-1	ΔGlcA(2S)β1-4GlcN(NS, 6S)α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S, 6S)			ref. 62
Hexa-1	ΔGlcA(2S)β1-4GlcN(NS, 6S)	α1-4IdoA	α1-4GlcNAc(6S) α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S, 6S)	ref. 61
Octa-1	ΔGlcA β1-4GlcNAc(6S) α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S, 6S)α1-4IdoA(2S)α1-4GlcN(NS, 6S)α1-4IdoA(2S)α1-4GlcN(NS, 6S)			ref. 88
Octa-2	ΔGlcA(2S)β1-4GlcN(NS)	α1-4IdoA	α1-4GlcNAc(6S) α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S) α1-4IdoA(2S)α1-4GlcN(NS)	ref. 89
Octa-3	IdoA α1-4GlcNAc(6S) α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S, 6S)α1-4IdoA(2S)α1-4GlcN(NS, 6S)α1-4IdoA(2S)α1-4anMan(6S)			ref. 87, 90
Octa-4	IdoA(2S)α1-4GlcN(NS, 6S)α1-4IdoA α1-4GlcNAc(6S) α1-4GlcAβ1-4GlcN(NS, 3S, 6S)α1-4IdoA(2S)α1-4anMan(6S)			ref. 87

<sup>a</sup> 2S, 3S, 6S, or NS represents 2-O-, 3-O-, 6-O-, or 2-N-sulfate, respectively.

<sup>b</sup> The structures related to the antithrombin III-binding pentasaccharide in the isolated compounds are underlined.

Octa-1, -3, -4) が多く単離されているという報告とよく一致している。Fr. III-9はPenta-1構造に由来するが、この構造異性体由来するオリゴ糖としてはクジラハバリンのアナチロソピンIII高親和性画分からOcta-2という成分の単離が報告されている。このOcta-2という成分は、活性に必須の五糖構造の還元末端グルコサミンの6-O-硫酸基を欠いており、抗血液凝固活性が弱い<sup>(8,9)</sup>。Fr. III-19は初めて単離された構造だが、この成分はPenta-4構造に由来しており、同じくPenta-4に由来する成分として報告されているTetra-1とは非還元末端の不飽和ウロン酸の2位が硫酸化されていない点で異なっている。Tetra-1はウシノ肺のハバリンから単離された成分であるが<sup>(6,2)</sup>、今回の画分IIIの中にはこの構造を持つ成分は含まれていなかった。そのような成分は、高硫酸化されているために高分子としてふるまい、ゲルろ過によって分離した際に、画分II(第1章、Fig. 3)に回収されたのかもされない。あるいは、Tetra-1に相当する構造は、ゾク小腸ハバリンでは存在していないのかもしれない。今回、Fig. 12に示した各ピークのうち主要な画分について

てはすべて調べたが、Penta-3に相当する構造から由来したオリゴ糖は見い出せなかった。したがって、そのようなオリゴ糖は、もし存在していたとしても、画分IIIの中の極めて微量な成分なのだろう。あるいは、高分子として振る舞って画分IIの方に回収されたのかもされない。

Fr. III-9、12、19は、第4節で示したように、ヘパリナーゼにもヘパリチナーゼIでもIIにでも消化されなかった。従来知られていた酵素の基質特異性から考えると、これらアンチトロンビンIII結合部位由来の三成分に対し、ヘパリチナーゼIとIIは作用するはずである。したがって、還元末端のグルコサミンの3位が硫酸化されると、これらの酵素では消化できなくなることが明らかになった。これまで、ヘパリンやヘパラン硫酸の構成二糖組成は、ヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIの混合物により消化し、消化物をHPLCで分析することによって簡便に解析されてきた<sup>(16, 66, 91)</sup>。しかし、今回の研究で、ヘパリン/ヘパラン硫酸の二糖組成を決定する際には、これら三酵素に抵抗性を示す四糖が比較的多く存在すること(今回の場合ウロン酸として多糖全体の約7%)も考慮する必要があることが明らかとなった。また今回の研究で、これら三種の酵素で消化を行うことにより、アンチトロンビンIII結合部位由来の四糖を容易に単離できるということも明らかになった。

次に、Fr. IXとXIIについて述べる。これらの成分は、糖鎖内部のウロン酸としてグルクロン酸2-硫酸構造を含んでいるが、この構造が証明されたのは初めてである。今回この構造が証明されるまで、ヘパリン/ヘパラン硫酸鎖中の硫酸化ウロン酸残基の研究は実に複雑な経路を辿ってきた。長い間ヘパリンにおけるウロン酸は唯一グルクロン酸であると考えられており、そしてその2位が硫酸化されていると信じられてきた<sup>(92)</sup>。しかし、1962年にCifonelliとDorfmanはヘパリンにおいて最初にイズロン酸の存在を証明した<sup>(93)</sup>。それ以来、ヘパリンにおいてグルクロン酸はマイナー成分であり、しかも硫酸化はされていないと考えられるようになった。硫酸化グルクロン酸が再び注目されたのは、1985年にBienkowskiとConradが市販のヘパリンを亜硝酸分解して、その生成二糖中にGlcA(2S)-anMan<sub>R</sub>とGlcA(2S)-anMan<sub>R</sub>(2S)というグルクロン酸2-硫酸構造を含む成分の存在を提唱したときである<sup>(78)</sup>。彼らが用いた構造の同定法は、β-グルクロニダーゼに対する抵抗性、酸加水分解物の分析、IdoA(2S)-anMan<sub>R</sub>及びIdoA(2S)-anMan<sub>R</sub>(6S)を化学的に異性化して作った標準品のGlcA(2S)-anMan<sub>R</sub>及びGlcA(2S)-anMan<sub>R</sub>(2S)とのHPLC上での比較に基づいている。しかし、彼等の用いた方法では、標準品となる成分がないためグルクロン3-硫酸構造である可能性が除外できていない。その後、Conradとその共同研究者たちは、ラットの培養肝細胞の核に選択的に硫酸化グルクロン酸が存在することを示し<sup>(80, 81)</sup>、細胞増殖調節活性にこの構造が関与する可能性が示唆され、硫酸化グルクロン酸はさらに注目を集めた。以来、培養細胞によって合成されたヘパラン硫酸

の亜硝酸分解物をHPLCで解析するときに、マイナー成分として検出されるピークを、確認できていないながらもGlcA(2S)を含む成分として、溶出位置だけから推定するようになった<sup>(94-96)</sup>。しかし、最近Hiscockらは、改良された手法を用いて核を単離し、ラットの卵巣顆粒膜細胞の核の中にはヘパラン硫酸が存在していないと報告しており<sup>(97)</sup>、ヘパラン硫酸の核への局在は再考すべき問題となっている。とはいえ、細胞内に存在するヘパラン硫酸が珍しい硫酸化グルクロン酸構造をもつことは确实であり、この構造は何らかの重要な生物活性を担っていると考えられる。

1990年にKuscheとLindahlは、ネズミ肥満細胞腫のミクロゾーム画分を用いて*in vitro*で生合成したヘパリンを亜硝酸分解し、得られた二糖画分をHPLCで分析してグルクロン酸の2位あるいは3位に硫酸基が存在することを証明した<sup>(82)</sup>。彼等は、硫酸化部位がグルクロン酸の2位なのか3位なのかを特定できていないが、以前に報告された硫酸化グルクロン酸も本当に硫酸化の部位が2位なのかを、他の方法で再確認する必要があると述べている。また、グルクロン酸2-硫酸構造は、亜硝酸分解などの化学的分解反応の途中で、イズロン酸2-硫酸から異性化によって生じてくることも知られている<sup>(98-100)</sup>。さらに、亜硝酸分解においては、当初硫酸化グルクロン酸を含むと信じられていた成分が、後に、変則的な環の縮合によって生じた副産物であると判明した例もある<sup>(101)</sup>。このように、HPLC上でグルクロン酸2-あるいは3-硫酸と思われていたピークは厳密に化学的に同定されたことがなかった。近年活発に行われているヘパリンやヘパラン硫酸の、酸性あるいは塩基性FGFに対する活性ドメインの構造研究<sup>(91, 102-105)</sup>においても、また培養ヒト皮膚繊維芽細胞やラット肝臓から生成されたヘパラン硫酸の構造研究<sup>(106-108)</sup>においても、硫酸化グルクロン酸は見い出されたことがなかった。しかし、最近KovenskyとCirelliは、<sup>13</sup>C NMRスペクトルの解析とメチル化分析を用いて、ラット肝臓のヘパラン硫酸中にグルクロン酸2-硫酸構造が存在することを報告している<sup>(109)</sup>。

今回の研究では、珍しいグルクロン酸2-硫酸構造を糖鎖内部のウロン酸として含む四糖の構造を、亜硝酸分解物の解析と<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの解析からはっきりと証明できた。また、単離した成分を詳しく解析することによって、硫酸化の部位が3位である可能性も除去することができた。硫酸化グルクロン酸を含む構造が単離されたという報告は、前述の二種類の二糖に限られており、硫酸化グルクロン酸を含むオリゴ糖の報告例は全くなかった。したがって、これらグルクロン酸2-硫酸を含む四糖の報告は今回が

初めてである。また、興味深いことに、今回単離した四糖はいずれも高硫酸化されており、グルクロン酸 2-硫酸残基は高度に硫酸化された典型的なヘパリンの配列中に存在していた。このことから、以前の亜硝酸分解を用いた方法では二糖としてしか硫酸化グルクロン酸を単離できなかつたことが納得できる。つまり、硫酸化グルクロン酸は、ヘパリン多糖中において、N-硫酸化グルコサミン残基で両方を挟まれた位置に存在していたと考えることができる。また、硫酸化グルクロン酸の含量は、かつての亜硝酸分解による分析に基づく全二糖単位のうちの約 1% を占めていることになるが<sup>(78, 100, 110)</sup>、今回第 3 節で単離できたグルクロン酸 2-硫酸を含む四糖は出発材料のヘパリンのうちの 0.31 と 0.32% を占めていた。ここで、単離された四糖の回収量が以前の報告による硫酸化グルクロン酸の含量に比べて少ないのは、四糖調製の際に強くヘパリナーゼ消化をしたことによって、後述するように、グルクロン酸 2-硫酸構造の一部が分解され不飽和ウロン酸 2-硫酸に変換されたためと考えられる。

グルクロン酸 2-硫酸を含む四糖二成分は、今回ヘパリン／ヘパラン硫酸分解酵素である *Flavobacterium* 由来のヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼ I、II の基質特異性の研究に利用でき、特にヘパリナーゼについては新しい知見が得られた。いずれの四糖もヘパリチナーゼ I に対しては抵抗性を、ヘパリチナーゼ II に対しては感受性を示した。これらの結果は、以前から予想されていた両酵素の基質特異性と矛盾しないものであった。一方、ヘパリナーゼは、Fr. IX には作用しなかったが、意外なことに Fr. XII には作用した。従来ヘパリナーゼは、GlcN(NS,±6S)—IdoA(2S) という配列中のグルコサミニド結合を切断すると考えられており<sup>(72, 85)</sup>、ウロン酸のタイプがイズロン酸ではなくグルクロン酸ならば認識しないと考えられていた。しかし、今回の実験結果から、ヘパリナーゼは、ヘパリチナーゼ I や II やコンドロイチナーゼ ABC と同様に、グルクロン酸もイズロン酸も認識し、切断部位で *anti* と *syn* のいずれの脱離反応も触媒できる性質を持つことが判明した。また、この酵素が Fr. IX に作用しなかったのは、還元末端のグルコサミン残基の 6 位に硫酸基がないためだと考えられる。第 4 節で示したが、糖鎖内部のウロン酸がイズロン酸 2-硫酸であっても、四糖の場合には還元末端のグルコサミンの 6 位が硫酸化されていなければ (Fr. X など) ヘパリナーゼで消化されないことがわかっている。しかし、そのような四糖の配列でもより長いオリゴ糖や多糖のなかに存在している場合には、ヘパリナーゼは作用するのかもしれない。なぜならヘパリナーゼの酵素活性は、幾分基質のサイズに依存しており、高分子のほうが非常に作用しやすいことがわかっているからであ

る<sup>(84)</sup>。以上述べてきたように、グルクロン酸2-硫酸構造が証明され、それを用いて分解酵素の基質特異性が修正されたことから、これまでにヘパリナーゼやヘパリチナーゼIIを用いて決定していたヘパリン/ヘパラン硫酸の二糖組成やオリゴ糖の配列は、再検討する必要性が生じてきた。なぜなら、ヘパリン/ヘパラン硫酸を酵素消化したときに生じてきた硫酸化不飽和ウロン酸は、もとの多糖中では常にイズロン酸2-硫酸であるとは、もはや言えなくなったからである。特に、塩基性FGFやHGFと相互作用する活性ドメイン構造の中に存在すると報告された硫酸化ウロン酸<sup>(111, 112)</sup>については、同定をやり直すことが重要であろう。

次に、第1節で精製したFr. III-5bについて述べる。この成分も単離の報告がない構造をしており、非還元末端が飽和の三糖であるためヘパリン糖鎖の非還元末端に由来しているようである。この飽和の三糖はヘパリン糖鎖の生合成の終了部分を示しているのかもしれないし、あるいは、組織に存在するエンド-β-グルクロニダーゼの作用をうけて切断されたヘパリン糖鎖の、新たに生じてきた非還元末端に由来しているのかもしれない。生合成過程において、ヘパリングリコサミノグリカン鎖は、高分子のヘパリンプロテオグリカンからエンド-β-グルクロニダーゼ消化によって遊離されてくるが<sup>(113)</sup>、この酵素の性質については詳しくは知られていない。今回得られた飽和の三糖は、約5.5 μmol (100 mg) のヘパリングリコサミノグリカン (ゲルろ過HPLCの結果より平均分子量を18 Kと推定した) から140 nmolしか得られていないので、全非還元末端の量から考えるとほんの一部でしかない (約3%)。他の大部分の非還元末端糖は、単糖としてのグルコサミンや飽和の二糖として存在し、もっと低分子の画分 (例えば二糖を主成分とする画分) に回収されていることが予想される。なぜなら、第4節の1、2で示したように、飽和の三糖にもヘパリチナーゼIやIIが作用するからである。つまり、ヘパリチナーゼIやIIによる消化によって、ヘパリンの非還元末端部分は単糖や二糖にまで分解されたと考えられる。Naderらは、ヘパリンやヘパラン硫酸を*Flavobacterium*のヘパリナーゼやヘパリチナーゼIIで消化したときに、遊離のN,6-ジ硫酸化グルコサミンが単糖として生じてくることを証明しており<sup>(63)</sup>、今回の場合も大部分の非還元末端部分は単糖や二糖にまで低分子化されたと考えるのが妥当であろう。グリコサミノグリカン鎖の非還元末端を解析するためには、完全に酵素消化した後に遊離してくるグルコサミンや飽和の二糖を分析すればよい。

今回構造決定した23成分のうち、上述の5成分以外の四糖は、特別な構造や配列は全

く含んでおらず、また生物活性を持つには不十分な大きさであった。しかし、これらのうち大部分は今まで実際に単離されたことがない構造であり、ヘパリン糖鎖の構造に多様性があることが証明できた。ただし、各オリゴ糖の回収された量比は、必ずしも元のヘパリン糖鎖中での存在頻度を表わしているわけではない。なぜなら、今回得られたオリゴ糖は、徹底的に消化されて生成した成分ばかりではないからである。

今回構造決定できたオリゴ糖は、第4節で示したようにヘパリン分解酵素の基質特異性の研究に有用であり、哺乳動物由来のヘパラーゼやヘパリチナーゼ<sup>(113, 114)</sup>、最近*Flavobacterium sp. Hp206*から精製された新しいヘパリチナーゼI<sub>0</sub>、IV、V<sup>(38)</sup>などの基質特異性を明らかにするのも活用できるだろう。さらにはヘパリンやヘパラン硫酸に対する抗体のエピトープの決定にも利用できるだろう。実際に、コンドロイチン硫酸の場合には、単離された硫酸化不飽和四糖を用いて単クローン抗体のエピトープを決定したという報告もある<sup>(115)</sup>。

最後に、今回単離した各オリゴ糖について測定した<sup>1</sup>H-NMRのデータは、生物活性を持ったより大きなオリゴ糖の構造解析に有効に利用できるであろう。現在までに複合糖質のNMRデータはCarbBankデータベース<sup>(21, 116)</sup>に集積されつつあるが、まだグリコサミノグリカンのオリゴ糖についての情報は限られている。これは、グリコサミノグリカンが極めて不均一な構造をしているために、十分量の均一なオリゴ糖を得ることが困難であることに起因している。今後はもっと大きなオリゴ糖の構造解析を行い、そのNMRデータを蓄積していく必要がある。

## 実験の部

### 1. 試薬および試料

Δ4,5-グリクロニド-2-O-スルファターゼ(本文中では2-スルファターゼあるいは2-O-スルファターゼと省略)は*Flavobacterium heparinum*より精製したもの<sup>(71)</sup>を、ヘパリチナーゼIV、Vは*Flavobacterium sp. Hp206*より精製したもの<sup>(38)</sup>を生化学工業(株)の吉田圭一氏より恵与された。バイオゲル樹脂はバイオラッドより購入した。NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub> (15 Ci/mmol)は室町化学より購入した。不飽和二糖標準品は、第2章でヘパリン/ヘパラン硫酸より調製したものを用いた。ヘパリンを亜硝酸分解した標準二糖<sup>(76)</sup>は、Illinois大学(米国)のH. E. Conrad博士より恵与された。

## 2. ヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIの消化によるオリゴ糖の調製

第1章で調製した画分IIIは、組成分析の結果主として四糖を含むことが判明したので、シリカ担体ポリアミンカラムを用いたHPLCによってさらに細かく分画し（Fig. 12、HPLCの条件は第1章参照）、Fr. III-1からIII-24までを得た。各画分は同じ条件で再びHPLCを行って精製を進め、セファデックスG-25カラムを用いたゲルろ過で脱塩した。

## 3. ヘパリナーゼのみの消化によるオリゴ糖の調製

第1章で述べたように精製したヘパリン（リチウム塩）300 mgを、3 mMの $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を含む100 mM acetate-NaOH緩衝液、pH 7.0、8 ml中で、2.4 IUのヘパリナーゼを用い、37°Cで消化を行った。0.5から1時間ごとに反応液を一部ずつとり、232 nmの紫外吸収を測定して反応の経過を追った。反応開始後20時間でプラトーに達したが、反応を完全にするためさらに1.25 IUのヘパリナーゼを追加し、20時間インキュベーションを続けた。そして、100°Cで2分間加熱して反応を停止した。酵素消化物は、セファデックスG-25カラム（1.5 x 46 cm）を用いたゲルろ過クロマトグラフィーで分画した。用いた溶媒は0.25 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  / 7% 1-プロパノールで、232 nmの紫外吸収でモニターした。この結果、オリゴ糖画分と二糖画分に分けることができ、オリゴ糖画分についてはさらに、バイゲルP-10カラム（1.6 x 95 cm）を用いたゲルろ過クロマトグラフィーを行った。溶媒として1.0 M NaCl / 10% エタノールを用い、Fig. 19に示したように、画分1から8の八画分に分画し、濃縮後、セファデックスG-25カラムで脱塩し、凍結乾燥した。最も主要な画分である画分7は、組成分析の結果四糖を含むと予想されたので、この画分についてシリカ担体ポリアミンカラムを用いたHPLCで、さらに細かく分画した（Fig. 19）。各画分は同じ条件で再びHPLCを行って精製を進め、セファデックスG-25カラムを用いたゲルろ過で脱塩した。

## 4. キャピラリー電気泳動

ヘパリンをヘパリナーゼのみで消化して調製した四糖の各画分（第3節）については、シリカキャピラリーを用いたキャピラリー電気泳動によって、その純度を検定した。シリカキャピラリー（全長60 cm、内径75  $\mu\text{m}$ 、ミリポア社製）は、0.1 M NaOH、蒸留水、25 mM phosphate-Na緩衝液（pH 3.0）を順に流した後に用いた。電気泳動装置は、ウォー

ターズ社のCapillary Ion Analyzerを使い、検出は185 nmの吸収で行った。0.2 nmol/ $\mu$ lの濃度で蒸留水に溶かした試料を用意し、重力法で24 nl相当を注入し（高さ10 cm、注入時間20秒）、定電圧15 kVで泳動を30分間行なった。

## 5. 単離した各成分のヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼによる酵素消化分析

単離した各成分0.5 nmolに対し2 mIUのヘパリナーゼを用い、3 mMの $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を含む100 mM acetate-NaOH緩衝液、pH 7.0、75  $\mu$ l中で37 $^\circ\text{C}$ 、一時間反応した。ヘパリチナーゼII、Vによる消化は、単離した各成分2 nmolに対し、各酵素2 mIU用い、2 mMの $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を含む20 mM acetate-NaOH緩衝液、pH 7.0、20  $\mu$ l中で43 $^\circ\text{C}$ 、一時間反応した。ヘパリチナーゼIによる消化は、単離した各成分0.1 nmolに対し、1 mIUの酵素を用い、他のヘパリチナーゼと同じ緩衝液を用いて、25  $\mu$ l中43 $^\circ\text{C}$ で、一時間反応した。ヘパリチナーゼIVによる消化は、各成分0.5 nmolに対し、酵素を2 mIU用い、他のヘパリチナーゼと同じ緩衝液100  $\mu$ l中で、43 $^\circ\text{C}$ 、二時間反応した。2-スルファターゼは、1 nmolの基質に対し2 mIU用い、50 mMイミダゾール-HCl緩衝液、pH 6.5、20  $\mu$ l中で、37 $^\circ\text{C}$ 、一時間反応した。各酵素反応は、100 $^\circ\text{C}$ で一分間加熱することにより停止し、それら酵素消化物は、第1章で述べたように、ポリアミンカラムを用いたHPLCで分析した。

各成分の構成二糖の配列を決めるための、2-スルファターゼ、ヘパリチナーゼIIの連続消化は以下のように行なった。1 nmolの各成分を、まず2 mIUの2-スルファターゼで上述のように消化し、その反応液のうち半分の10  $\mu$ lをHPLCで分析した。残りの半分の10  $\mu$ lに70  $\mu$ lの蒸留水と、20  $\mu$ lの緩衝液（10 mMの $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ を含む100 mM acetate-NaOH緩衝液、pH 7.0）と2 mIUのヘパリチナーゼIIを加え、43 $^\circ\text{C}$ で一時間反応した。反応は100 $^\circ\text{C}$ で一分間加熱して停止し、その酵素消化物はHPLCで分析した。

## 6. FAB-MS分析

第1節で調製した各成分については、構成糖と硫酸の組成を負イオンモードのFAB-MS分析によって解析した。ポリアミンカラムを用いたHPLCで得た各画分は、さらに50 mM  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ のイソクラティック条件下でGS320カラム（7.6 x 500 mm、旭化成）を用いたゲルろ過HPLCを行って精製を進め、セファデックスG-25カラムで脱塩し、FAB-MS分析のための試料とした。HPLCとゲルろ過における検出は、232 nmの紫外吸収で行った。FABスペクトルの測定はImperial College（英国）のDell博士らとの共同研究

で行い、VG Analytical ZAB-HF マススペクトロメーター (Imperial College、ロンドン) を用いてスペクトルを測定した。誘導体にしていない約1 nmolの試料を5%の氷酢酸に溶かし、モノチオグリセロールのマトリックスをコートしておいたFABプローブ上で測定した。

## 7. 亜硝酸分解

第3節で調製した、Fr. IX、X、XII、XIIIは、糖鎖内部のウロン酸を決定するために亜硝酸分解を行った<sup>(76)</sup>。3 nmol相当の各試料を40  $\mu$ lの0.5 M HNO<sub>2</sub> (pH 1.5) に溶かし、室温で30分間反応させた。25  $\mu$ lの1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を加えてpHを約9に調整して反応停止した後、5  $\mu$ lの*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶かした3.3 mM NaB<sup>3</sup>H<sub>4</sub>を加え、4°Cで終夜還元した。還元を完全にするために、さらに1 M NaBH<sub>4</sub>/0.05 M NaOHを65  $\mu$ l加え、室温で2時間反応させた。その後、15  $\mu$ lの氷酢酸を加えて反応を停止し、30  $\mu$ lの1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で中和した。未反応の試薬を除くためにメタノールを加えてエバポレーションを数回行い、0.2 MのNH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>に溶かして、その溶媒でバイオゲルP-2のカラム (1.0 x 56 cm) を用いたゲルろ過を行った。二糖画分をプールし、凍結乾燥後、蒸留水に溶かした。この画分は、シリカ担体ポリアミンカラムを用いたHPLCで分析した。流速は1 ml/minであり、Fig. 23に破線で示したようにNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>濃度を変えて溶出した。溶出液は1分間隔で集め、液体シンチレーションカウンター (アロカLSC-700) で放射活性を測定した。個々のピークの同定は、ヘパリン由来の既知の標準二糖との比較によって行った<sup>(78)</sup>。

## 8. 500-MHz <sup>1</sup>H-NMR解析

各成分は、Dowex 50-X8 (Na<sup>+</sup>型) のカラム (7 x 18 mm) を用いて、陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、完全に対イオンをNa<sup>+</sup>型にしてNMR解析用の試料とした。500-MHz <sup>1</sup>H-NMRスペクトルの測定は、第2章に準じて行った。

## 9. 他の分析法

ウロン酸、不飽和ウロン酸、アミノ酸、アミノ糖、硫酸基、リン酸基の定量は第1章に準じて行った。

## 第4章 ヒト血漿Inter- $\alpha$ -trypsin inhibitor (ITI)の糖-タンパク質結合領域の構造研究<sup>(3,2)</sup>

ITIはヒトの血漿中に存在するセリンプロテアーゼインヒビターの一つで、L鎖、H<sub>1</sub>鎖、H<sub>2</sub>鎖の三本のポリペプチド鎖からなる<sup>(22, 23)</sup> (序論、Fig. 2)。健常人の血漿中には平均約450 mg/lの濃度で存在しており<sup>(117)</sup>、その量は病理的な条件によって大きく変化する<sup>(118)</sup>。ITIのプロテアーゼ阻害活性は、ビクニンと呼ばれるL鎖に依存しており<sup>(119)</sup>、L鎖上には二つ並んでKunitz型のプロテアーゼ阻害活性ドメインがある。ITIの他の二本のH鎖の機能についてはまだ明らかにされていないが、最近、ITIの部分アミノ酸配列を含む150 kDaのタンパク因子が、oocyte-cumulus細胞の細胞外マトリックスを安定化することが証明され<sup>(120)</sup>、ITIがoocyte-cumulus細胞外マトリックスの構築に何らかの役割を果たしている可能性が示唆されている<sup>(121, 122)</sup>。

ITIでは、三本のポリペプチド鎖の間が低硫酸化コンドロイチン4-硫酸を介して共有結合で架橋されている<sup>(24)</sup> (序論、Fig. 2)。L鎖とコンドロイチン硫酸との間の糖-タンパク質結合部位は、GlcA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  -4Xyl  $\beta$  1-O-Serという従来から知られている結合様式をしているが<sup>(10)</sup>、二つのH鎖とコンドロイチン硫酸との間の結合は、それとは異なる構造をしている。H<sub>2</sub>鎖は、そのカルボキシル末端の $\alpha$ -カルボキシル基がGalNAcの6位の水酸基とエステル結合することによって、コンドロイチン4-硫酸と架橋されている<sup>(25)</sup>。H<sub>1</sub>鎖も同様の様式でコンドロイチン4-硫酸と結合していることが、最近報告された<sup>(26)</sup>。このようにITIは特異な架橋構造を持っているが、その構造がどのように生合成されるのかはまだ明らかにされていない。

筆者の所属する研究室は、これまでにヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸といった様々なグリコサミノグリカンの糖-タンパク質結合領域の研究を行ってその微細構造に違いがあることを見出し、そういった違いとこれらの糖鎖の生合成や生物活性との関連を考察してきた。以前菅原らは、ラットコンドロサルコーマ由来のコンドロイチン4-硫酸の糖-タンパク質結合部位からGlcA  $\beta$  1-3Gal(4S)  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xylという珍しい硫酸化構造を証明し<sup>(12)</sup>、サメ軟骨コンドロイチン6-硫酸からも、6-硫酸化ガラクトースや2-リン酸化キシロースなど他の珍しい修飾構造を見つけた<sup>(14, 15)</sup>。一方、ブタ小腸ヘパリンやウシ腎臓ヘパラン硫酸の糖-タンパク質結合部位にはそのようなガラクトースの硫酸化構造は見つかっていない<sup>(16, 79)</sup>。よって、この硫

酸化ガラクトースが何らかの生物学的な意義を持っているのかもしれない。本章では、ヒト血漿のITIにおいて三本のペプチド鎖間を珍しい構造で架橋しているコンドロイチン4-硫酸の、L鎖との糖-タンパク質結合部位を詳しく構造解析した<sup>(32)</sup>。

### 第1節 ペプチド-コンドロイチン硫酸の単離

精製ITIはリシルエンドペプチダーゼで消化し、ゲルろ過HPLCで分画した (Fig. 27)。各ピークを回収してコンドロイチナーゼABCで消化し、コンドロイチン硫酸の有無を確かめたところ (実験の部参照)、図中にバーで示した、最も高分子量のペプチド画分のみコンドロイチン硫酸が存在することが判明した。この画分をプールし、さらにV8プロテアーゼで消化し、消化物をFig. 28に示したようにMono Q FPLCで分画した。コンドロイチン硫酸の有無を各ピークについて調べたところ、図中に示した4つの画分に検出された。最も主要な画分であるFraction IIをセファデックスG-25カラムで脱塩し、以下の糖-タンパク質結合部位の単離に用いた。

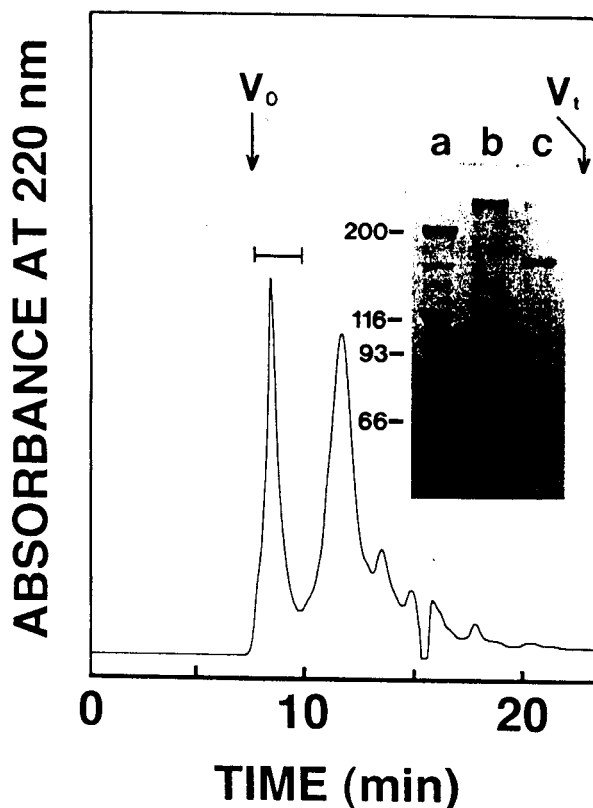


Fig. 27. Gel permeation HPLC of the lysyl endopeptidase digest. The lysyl endopeptidase digest of ITI was analyzed by gel filtration HPLC on a column of Asahipak GS-320. Each peak was subjected to a chondroitin sulfate analysis using chondroitinase ABC as described in "Materials and methods". Only the peptide fraction with the highest molecular weight indicated by the bar contained chondroitin sulfate. This fraction was pooled and subjected to V8 protease digestion. In the inset the results of SDS-PAGE (7.5% gel) of the purified ITI and its chondroitinase ABC digest are shown. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane a, molecular weight standards; lane b, the purified ITI; lane c, chondroitinase ABC digest of the purified ITI.

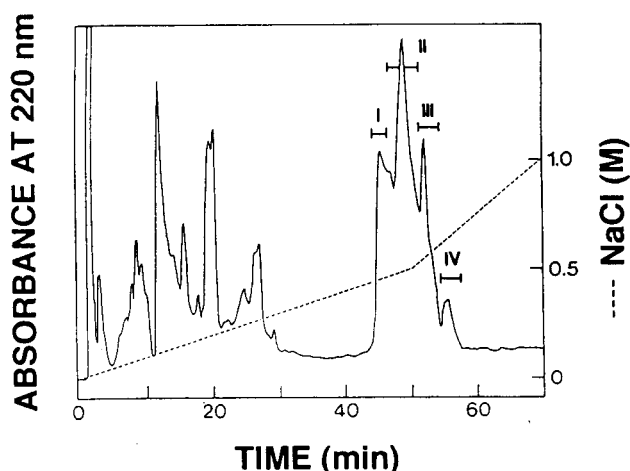


Fig. 28. Mono Q FPLC of the V8 protease digest. The V8 protease digest was fractionated by FPLC on a Mono Q column. Peptide-chondroitin sulfate was recovered in Fractions I to IV indicated by the bars as examined by chondroitin sulfate analysis (see "Materials and methods"). The main fraction, Fraction II, was used for preparation of the carbohydrate-protein linkage region.

## 第2節 結合部位の糖-ペプチドのFAB/MS分析

Mono Q FPLCで得た最も主要な画分 (Fraction II) はペプチド-コンドロイチン硫酸を含むので、コンドロイチナーゼABCで消化し、オリゴ糖-ペプチドを調製した。消化物はC18カラムを用いた疎水クロマトグラフィーによって、Fig. 29に示すように分画した。矢印で示したピークを回収し、そのアミノ酸配列をペプチドシーケンサーで決定した。その結果をcDNAから推定されるL鎖のN末端の配列<sup>(123)</sup>とともに、Fig. 30に示した。二番目のアミノ酸はアミノ酸配列分析の結果では同定できなかったが、これは糖鎖が結合していたためと考えられ、このアミノ酸はSerと予想した。V8プロテアーゼとリシルエンドペプチダーゼの作用部位についても、図中に矢印で示した。これらのプロテアーゼの特異性とアミノ酸配列分析の結果に基づいて考えると、精製した糖-ペプチドのアミノ酸配列はGly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Gluと推定され、このペプチドの分子量は903に相当する。また、精製した糖-ペプチドの糖部分は、コンドロイチナーゼABCの基質特異性に基づいて考えると、 $\Delta$ HexA  $\alpha$  1-3GalNAc  $\beta$  1-4GlcA  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xylという糖の配列に硫酸基が何モルか結合した構造をしていると予想され、その推定分子量は、硫酸基を持たないもの、1モル持つもの、2モル持つものでそれぞれ、1011、1091、1171と算出される。よって、この糖-ペプチドの分子量は、非硫酸化物、モノ硫酸化物、ジ硫酸化物でそれぞれ、1896、1976、2056と予想された。次に、この糖-ペプチドを負イオンモードのFAB-MSで分析したところ、Fig. 31に示すようにm/z 2055に親イオンのシグナルが検出されたので、2モルの硫酸基を持つことがわかった。この

結果は、以下に示す<sup>3</sup>H-ラベルした六糖アルデイトールのHPLC分析の結果とよく一致していた。

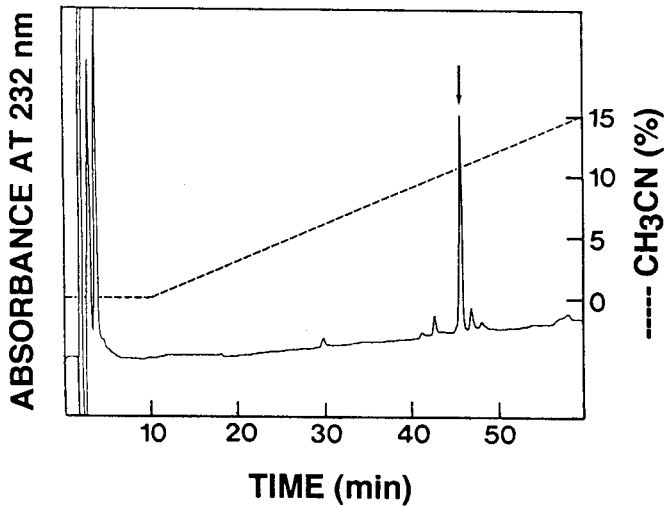


Fig. 29. Isolation of the oligosaccharide-peptide derived from the L chain of ITI by HPLC on a C18 column. The purified peptidoglycan fraction was digested with chondroitinase ABC and the digest was fractionated by HPLC on a C18 column using a linear gradient of acetonitrile. The main peak indicated by the arrow was collected and subjected to amino acid sequencing analysis and FAB-MS analysis.

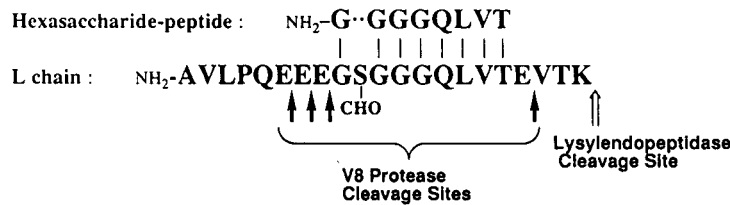


Fig. 30. Amino acid sequencing analysis of the oligosaccharide-peptide. The oligosaccharide-peptide was sequenced by automated Edman degradation. The revealed sequence together with the *N*-terminal sequence of the L chain (ref. 123) are shown. The second amino acid, Ser, was not detectable because of the covalent attachment of chondroitin sulfate. The cleavage sites of lysyl endopeptidase and V8 protease are also indicated.

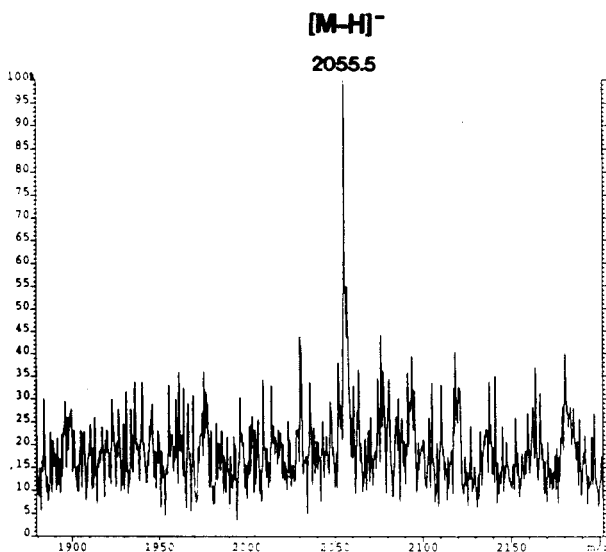


Fig. 31. Partial negative ion FAB mass spectrum of the glycopeptide showing a major molecular ion, [M-H]<sup>-</sup>, at m/z 2055.5. No fragment ions were observed.

### 第3節 糖-タンパク質結合部位の六糖の単離

ITIのL鎖とコンドロイチン4-硫酸との糖-タンパク質結合部位のどの位置が硫酸化されているのかを明らかにするために、以下のように結合部位の六糖アルデイトールを調製した。第1節においてMono Q FPLCで得た最も主要な画分 (Fraction II) を $\text{NaB}^3\text{H}_4$ を用いてアルカリ還元し、ペプチドからコンドロイチン硫酸鎖を切り離すと同時に、その糖鎖の還元末端を $^3\text{H}$ でラベルした。糖-タンパク質結合部位の六糖を得るために、その $^3\text{H}$ -ラベルしたコンドロイチン硫酸をコンドロイチナーゼABCで消化し<sup>(13, 33, 34)</sup>、繰り返し二糖部分を分解した。Fig. 32に示すように、消化によって生じた二糖をゲルろ過によって除去し、放射標識された結合部位の六糖を含むオリゴ糖画分を得た。ゲルろ過に用いた全放射活性のうちの95% ( $1.18 \times 10^6$  cpm) が、図のバーで示した画分に回収された。この画分について、まずアルデイトールの分析を行った。この画分の一部を酸加水分解し、Fig. 33に示すようにHPLCで分析したところ、キシリトールの溶出位置にのみ放射活性を持つピークが観察された。このピークは、他に内部標準品として加えておいたGal-olやGalN-ol (それぞれガラクトース、ガラクトサミンのアルデイトール) とはよく分離された位置に溶出されていることが、紫外吸収をモニターした結果からわかる。したがって、放射活性はすべて糖-タンパク質結合部位のキシリトールに取り込まれていることがわかった。なお、HexA-ol (ウロン酸のアルデイトール) の溶出位置は不明であるが、 $^3\text{H}$ -ラベルした $\Delta\text{HexA } \alpha\text{-1-3GalNAc(4S) } \beta\text{-1-4HexA-ol}$ の酸加水分解物の放射活

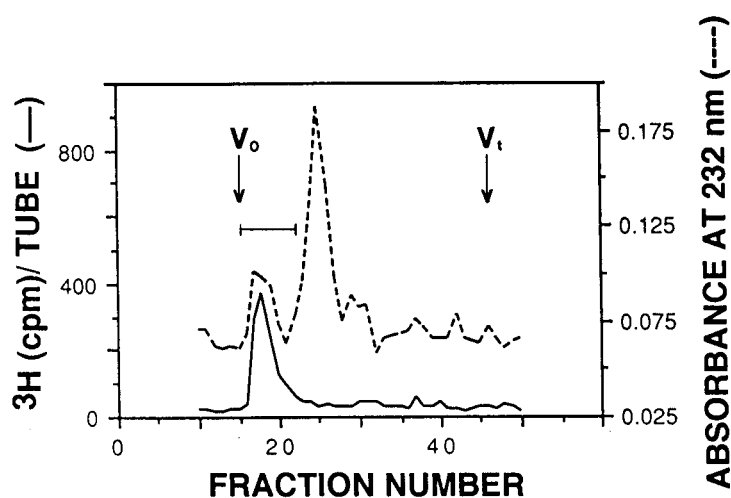


Fig. 32. Gel filtration of the chondroitinase ABC digest of  $^3\text{H}$ -labeled chondroitin sulfate. The chondroitinase ABC digest of the  $^3\text{H}$ -labeled chondroitin sulfate was chromatographed on a column (1.0 x 117 cm) of Sephadex G-15 with 0.25 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3/7\%$  1-propanol as eluent. Fractions of 2 ml were collected and monitored by absorbance at 232 nm (---) and  $^3\text{H}$ -radioactivity (—). The radiolabeled fraction indicated by the bar was pooled and subjected to xylitol analysis and enzymatic analysis as described in "Materials and methods".

性は9分あたりに検出され、キシリトールの溶出位置とは離れていた（結果は示していない）。よって、HexA-olにも放射活性は取り込まれていないと思われる。

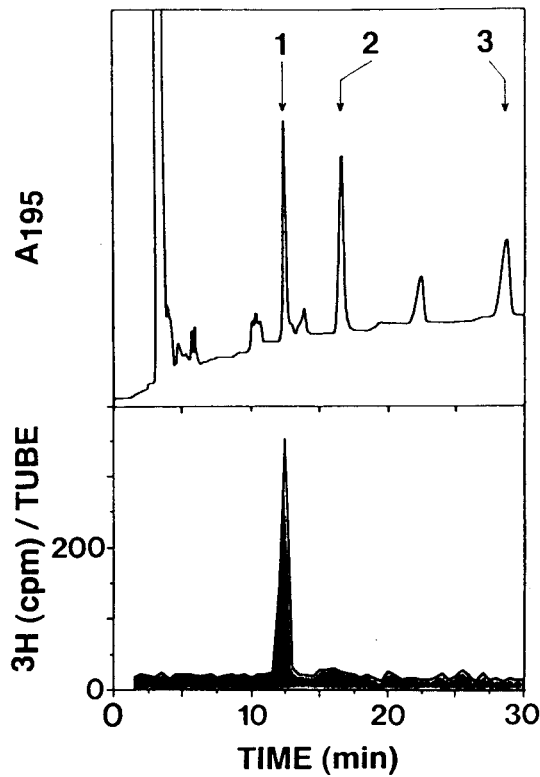


Fig. 33.  $^3\text{H}$ -Labeled sugar alditol analysis by HPLC. The  $^3\text{H}$ -labeled oligosaccharide fraction (2 700 cpm) was acid-hydrolyzed, mixed with authentic nonlabeled xylitol, galactitol and galactosaminitol (40  $\mu\text{g}$  each), and then the mixture was subjected to HPLC on an amine-bound silica column using an isocratic elution with 80% acetonitrile. The eluates were monitored by absorption at 195 nm (upper panel) and by  $^3\text{H}$ -radioactivity (lower panel). The arrows indicate the elution positions of the authentic sugar alditols: 1, xylitol; 2, galactitol; 3, galactosaminitol.

#### 第4節 結合部位の六糖の構造解析

$^3\text{H}$ -ラベルされた糖-タンパク質結合部位の六糖を含むオリゴ糖画分、およびそのコンドロ-4-スルファターゼでの消化物は、シリカ担体ポリアミンカラムを用いたHPLCで分析した。コンドロ-4-スルファターゼで消化する前の試料では、 $\Delta\text{HexA } \alpha\text{-1-3GalNAc(4S) } \beta\text{-1-4GlcA } \beta\text{-1-3Gal(4S) } \beta\text{-1-3Gal } \beta\text{-1-4Xyl-ol}$ （ここでXyl-olはキシリトール）という既知の六糖アルデイトール（クジラ軟骨のコンドロイチン4-硫酸から単離されたFraction Dという成分<sup>(1,3)</sup>）と同じ溶出位置にのみ、放射活性を持つ単一のピークが検出された（Fig. 34上段）。このピークには、分析に用いた全放射活性のうちの少なくとも70%が回収された。また、コンドロ-4-スルファターゼによる消化後の試料では、消化前に比べ

てピークの移動が見られ、 $\Delta\text{HexA}\alpha\text{1-3GalNAc}\beta\text{1-4GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4Xyl-ol}$ という既知の六糖アルデイトール（クジラ軟骨のコンドロイチン4-硫酸から単離されたFraction Aという成分<sup>(13)</sup>）と同じ溶出位置にピークが検出された（Fig. 34下段）。以上の結果より、単離されたオリゴ糖画分にはジ硫酸化六糖アルデイトールが一成分含まれており、その硫酸化部位はGalNAc残基の4位とGlcAの隣りのGal残基の4位である可能性が高いことがわかった。

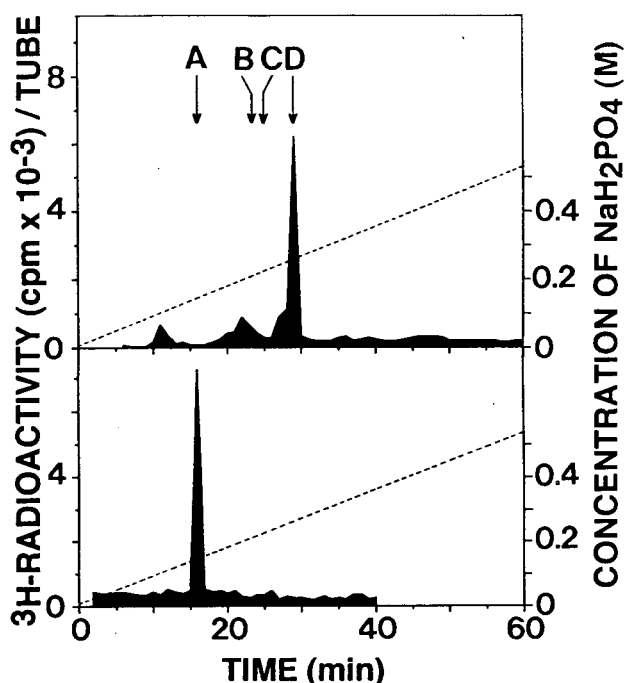


Fig. 34. HPLC analysis of the chondroitinase ABC digest of the  $^3\text{H}$ -labeled chondroitin sulfate. The oligosaccharide alditols (15 000 cpm) were obtained from the linkage region by chondroitinase ABC digestion, and analyzed by HPLC on an amine-bound silica column before (upper panel) and after (lower panel) chondro-4-sulfatase digestion. The eluates were collected at 1-min intervals for radioactivity measurement by liquid-scintillation counting. Arrows indicate the elution positions of the authentic hexasaccharide alditols: A,  $\Delta\text{HexA}\alpha\text{1-3GalNAc}\beta\text{1-4GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4Xyl-ol}$ ; B,  $\Delta\text{HexA}\alpha\text{1-3GalNAc(6-sulfate)}\beta\text{1-4GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4Xyl-ol}$ ; C,  $\Delta\text{HexA}\alpha\text{1-3GalNAc(4-sulfate)}\beta\text{1-4GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4Xyl-ol}$ ; D,  $\Delta\text{HexA}\alpha\text{1-3GalNAc(4-sulfate)}\beta\text{1-4GlcA}\beta\text{1-3Gal(4-sulfate)}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4Xyl-ol}$ .

第3節で単離されたオリゴ糖画分をコンドロイチナーゼACIIで消化した試料についても、同様にHPLCで分析した。また、それをさらにコンドロ-4-スルファターゼで消化した試料についても分析してみた。コンドロイチナーゼACIIは、糖-タンパク質結合部位の六糖を二糖と結合部位の四糖に分解する特異性を持っている<sup>(13)</sup>。今回単離されたオリゴ糖画分のコンドロイチナーゼACIIでの消化物をHPLCで分析すると、 $\Delta\text{HexA}\alpha\text{1-3Gal(4S)}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4Xyl-ol}$ という既知の四糖アルデイトールと同じ溶出位置にのみ、

放射活性を持つピークが検出された (Fig. 35上段)。さらにコンドロ-4-スルファターゼで消化して分析してみると、放射活性を持つピークは既知の  $\Delta\text{HexA } \alpha\text{1-3Gal } \beta\text{1-3Gal } \beta\text{1-4Xyl-ol}$  という四糖アルデイトールと同じ溶出位置に移動した (Fig. 35下段)。以上の結果を考えあわると、単離されたオリゴ糖画分に含まれる成分は、 $\Delta\text{HexA } \alpha\text{1-3GalNAc(4S) } \beta\text{1-4GlcA } \beta\text{1-3Gal(4S) } \beta\text{1-3Gal } \beta\text{1-4Xyl-ol}$  という構造を持った、ジ硫酸化六糖アルデイトールであると結論した。

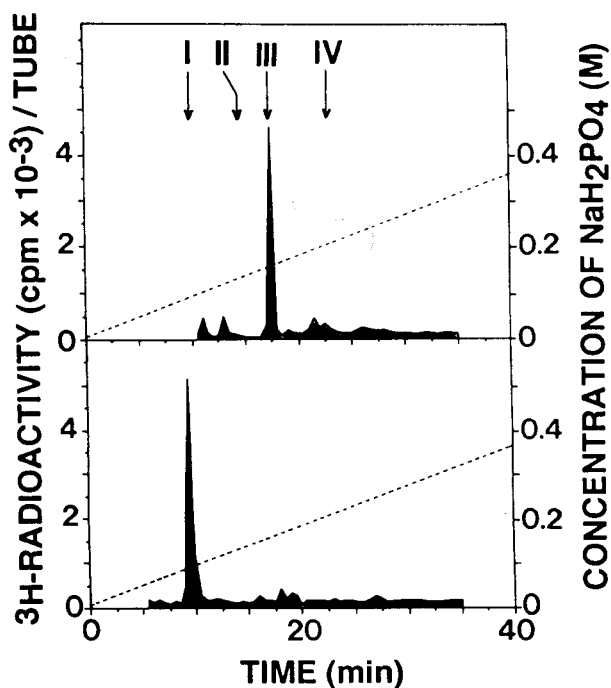


Fig. 35. HPLC analysis of the chondroitinase ACII digest of the  $^3\text{H}$ -labeled chondroitin sulfate. The  $^3\text{H}$ -hexasaccharide alditol (10 000 cpm) was first digested with chondroitinase ACII and analyzed by HPLC on an amine-bound silica column before (upper panel) and after (lower panel) chondro-4-sulfatase digestion. The eluates were collected at 1-min intervals for radioactivity measurement by liquid-scintillation counting. Arrows indicate the elution positions of the authentic tetrasaccharide alditols: I,  $\Delta\text{HexA } \alpha\text{1-3Gal } \beta\text{1-3Gal } \beta\text{1-4Xyl-ol}$ ; II,  $\Delta\text{HexA } \alpha\text{1-3Gal } \beta\text{1-3Gal(6-sulfate) } \beta\text{1-4Xyl-ol}$ ; III,  $\Delta\text{HexA } \alpha\text{1-3Gal(4-sulfate) } \beta\text{1-3Gal } \beta\text{1-4Xyl-ol}$ ; IV,  $\Delta\text{HexA } \alpha\text{1-3Gal(6-sulfate) } \beta\text{1-3Gal(6-sulfate) } \beta\text{1-4Xyl-ol}$ .

#### 考察と総括

今回の実験では、ヒト血漿中のITIのL鎖とコンドロイチン4-硫酸鎖との間の糖-タンパク質結合部位より、 $\Delta\text{HexA } \alpha\text{1-3GalNAc(4S) } \beta\text{1-4GlcA } \beta\text{1-3Gal(4S) } \beta\text{1-3Gal } \beta\text{1-4Xyl-ol}$  という珍しい構造の六糖アルデイトールを単離した。このジ硫酸化六糖構造を持つ成分は、最初にSwarmラットコンドロサルコーマのコンドロイチン4-硫酸の糖-タンパク質結合部位から単離され<sup>(12)</sup>、その後クジラ軟骨のコンドロイチン4-硫酸の結合部位からも単離されている<sup>(13)</sup>。今回の研究では、ガラクトース4-硫酸構造が、軟

骨のコンドロイチン硫酸のみならず血漿中のコンドロイチン硫酸にも存在することが証明できた。

また、興味深いことに、ITIのコンドロイチン硫酸の場合には一種類の六糖アルディトールしか得られず、他のコンドロイチン硫酸の場合と異なり、糖-タンパク質結合部位の構造が非常に均一であることがわかった。今回の実験では、Mono Qによるクロマトグラフィーで分けた画分のうち最も主要な画分であるFraction IIしか分析していないが、Fraction IIがFraction IやIIIと完全には分離できておらず、かなりの量が混入していることを考えると、ITIのコンドロイチン硫酸の結合部位は極めて均一であるといえる。Mono Q FPLCで不均一性が見られたのは、コンドロイチン硫酸鎖の繰り返し二糖領域における硫酸化の程度、あるいは糖鎖の長さの違いに依存すると考えられる。今回の結果は、軟骨組織のコンドロイチン硫酸の結合部位から様々な構造の六糖が単離されることと非常に対照的であった。コンドロイチン硫酸の糖-タンパク質結合部位における構造の多様性は、各糖残基の修飾構造に依存しており、キシロースの2位のリン酸化<sup>(15, 41, 42)</sup>、ガラクトースの4位または6位の硫酸化<sup>(14, 15)</sup>が起こりうる。キシロース残基の2位のリン酸化はヘパラン硫酸においても証明されており<sup>(43)</sup>、またヘパリンにおいてもその存在が示唆されている<sup>(44)</sup>。キシロースのリン酸化とガラクトースの硫酸化は、同一のコンドロイチン硫酸鎖上で同時には見い出されておらず、このことは、両方の修飾反応が同時には起らないことを示唆しているかもしれない。もしそうならば、各々が異なった機能を果たしているかもしれない。修飾構造の異なる糖-タンパク質結合部位を持つ個々のコンドロイチン硫酸鎖は、異なる機能を持つ糖鎖のサブクラスを反映しているのかもしれない。

ITIは、構造上独特の特徴（タンパク質-グリコサミノグリカン-タンパク質の架橋構造<sup>(24-26)</sup>）を持つが、その生理的な機能はまったくわかっておらず、生体内での真の役割の解明が待たれる。ITIは炎症時における急性期タンパク質であること<sup>(124)</sup>が知られており、また、最近では、ITIファミリーに属する血中のタンパク質がヒアルロン酸と結合すること<sup>(121, 122)</sup>や、oocyte-cumulus細胞の細胞外マトリックスの安定化因子であること<sup>(120)</sup>が明らかにされている。しかし、こうしたITIの機能と4-硫酸化ガラクトース構造を含んだコンドロイチン硫酸との関係や、タンパク質-グリコサミノグリカン-タンパク質の架橋構造の形成と4-硫酸化ガラクトース構造との関係はまだ明らかにされていない。

尿中に存在するウリナリートリプシンインヒビター (UTI) や血漿中に存在するプレ- $\alpha$ -インヒビター ( $P\alpha I$ ) は、ITIファミリーに属するタンパク質である。UTIは血漿中のITIの代謝産物であると考えられているタンパク質で、ITIのL鎖と同じアミノ酸配列をもっており、N末端より十番目のセリン残基にコンドロイチン4-硫酸が結合している<sup>(125)</sup>。UTIのコンドロイチン硫酸鎖は<sup>1</sup>H-NMRによる解析が行われており、最も還元末端側のGalNAc残基の4位は硫酸化されているが糖-タンパク質結合部位のGal残基は硫酸化されていないと報告されている<sup>(126)</sup>。また $P\alpha I$ は、L鎖とH<sub>3</sub>鎖という二本のポリペプチド鎖からなるタンパク質で、ITIと同様に二本のポリペプチド鎖間がコンドロイチン4-硫酸によって架橋されている<sup>(127)</sup>。そして、 $P\alpha I$ においても、コンドロイチン硫酸鎖の糖-タンパク質結合部位のGal残基は硫酸化されていないことが、FAB-MS分析に基づいて報告されている<sup>(127)</sup>。ITIとUTI及び $P\alpha I$ でのGal残基の4位の硫酸化の違いが、それぞれの機能の違いを反映している可能性もある。

## 実験の部

### 1. 試薬及び試料

リシルエンドペプチダーゼ (*Achromobacter protease I*, EC 3.4.21.50)、V8プロテアーゼ (*Staphylococcal serine protease*, EC 3.4.21.19) は和光純薬工業(株)より購入した。コンドロイチナーゼABC (EC 4.2.2.4)、コンドロイチナーゼACII (EC 4.2.2.5)、コンドロ-4-スルファターゼ (EC 3.1.6.9) は生化学工業(株)より購入した。ガラクトサミニトールは、ガラクトサミンをNaBH<sub>4</sub>で還元して調製した。 $\Delta$  HexA  $\alpha$  1-3GalNAc(4S)  $\beta$  1-4[<sup>3</sup>H]-HexA-olは、筆者の所属する研究室でウシ大動脈のデルマトン硫酸から調製したもの(菅原一幸ら、未発表)を用いた。精製されたITIは、北海道大学薬学部衛生化学研究室の長澤滋治博士から恵与された。

### 2. ペプチド-コンドロイチン硫酸の調製

精製ITI (16.8 mg) をリシルエンドペプチダーゼで、酵素/基質の比が1:50 (w/w)の条件下、10 mM トリス-HCl緩衝液、pH 9.0、35°Cで24時間消化した。消化物はGS320カラム (7.6 x 500 mm、旭化成) を用いたゲルろ過HPLCを行って五画分に分画した。流速は1 ml/minで、溶媒は50 mM CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>、検出は220 nmの紫外吸収を用いた。各画分につ

いてコンドロイチナーゼABC消化を行い、シリカ担体ポリアミンカラムを用いたHPLCで分析したところ、最も早く溶出された画分にだけコンドロイチン硫酸の存在が認められた。コンドロイチン硫酸を含んでいた最も高分子量の画分は、V8プロテアーゼを用いて（酵素／基質の比は1:25）、40mM phosphate-Na、pH 7.8、25℃で24時間消化した。消化物は、Mono Qカラムを用いたFPLCシステム（ファルマシア）で分画した。NaCl濃度勾配を50分間で0から0.5 Mに直線的にかけた後に、さらに20分間で0.5 Mから1.0 Mまで直線的にNaCl濃度を上昇させて溶出を行い、検出は220 nmの紫外吸収で行った。検出された各ピークについて、前述と同様の方法でコンドロイチン硫酸の有無を調べたところ、四つの画分がコンドロイチン硫酸を含む画分として得られた。その四画分を濃縮し、セファデックスG-25カラムで脱塩した。これらのうち最も主要なFraction IIについて今回分析した。

### 3. 糖-ペプチドの調製

最も主要なペプチド-コンドロイチン硫酸画分（Fraction II）をセリンとして3.5 nmol相当用い、125 mIUのコンドロイチナーゼABCで、60 mM CH<sub>3</sub>COONaを含む50 mMトリス-HCl緩衝液、pH 8.0、100 μl中、37℃で1時間消化した。反応は100℃で一分間加熱することにより停止した。消化物は、Nova-Pak C18カラム（3.9 x 150 mm、ウォーターズ社）を用いたHPLCで分析した。0.1%のトリフルオロ酢酸を含む蒸留水で平衡化したカラムに試料を注入し、アセトニトリル濃度を70分間で20%まで直線的に上げて溶出した。流速は1 ml/minで、232 nmの紫外吸収を用いてモニターした。素通り以外には、45分のあたりに単一の主要なピークが観察された。この主要なピークを回収し、FAB-MS分析とペプチドシーケンサー（アプライドバイオシステム社Model 470A）を用いたアミノ酸配列分析の試料とした。

### 4. FAB-MS分析

Nova-Pak C18カラムで回収した主要なピークは、そのままFAB-MS分析の試料とした。FABスペクトルの測定はImperial College（英国）のDell博士らとの共同研究で、第3章に準じて行った。

### 5. ペプチド-コンドロイチン硫酸の還元

Mono Q FPLCで得たペプチド-コンドロイチン硫酸の最も主要な画分である Fraction II をセリンとして1.7 nmol相当用い、10% *N,N*-ジメチルホルムアミドを含んだ18.6 mM  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  (0.5 Ci/mmol)/0.05 M NaOHを50  $\mu\text{l}$  加え、4  $^{\circ}\text{C}$ で終夜反応させた。その後、還元を完全に行うために、さらに1 M  $\text{NaBH}_4$ /0.05 M NaOHを100  $\mu\text{l}$  加え、室温で2時間反応させた。10  $\mu\text{l}$ の氷酢酸で過剰の $\text{NaBH}_4$ を分解して反応を停止し、30  $\mu\text{l}$ の1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ で中和した。クジラ軟骨由来のコンドロイチン4-硫酸<sup>(13)</sup> (4 mg) も200  $\mu\text{l}$ の0.5 M  $\text{NaBH}_4$ /0.05 M NaOHを用いて室温2時間で還元し、20  $\mu\text{l}$ の氷酢酸、65  $\mu\text{l}$ の1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ を加えた後にキャリアーとして、上述の<sup>3</sup>H-ラベルされたITIのコンドロイチン硫酸と混合した。未反応の試薬を除くために、メタノールを加えてエバポレーションを数回行い、0.25 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /7% 1-プロパノールに溶かして、その溶媒でセファデックスG-50カラム (1.0 x 47 cm) を用いたゲルろ過を行った。そして、<sup>3</sup>H-ラベルされた多糖を含む素通り画分 (2.09 x 10<sup>6</sup> cpm) を回収した。

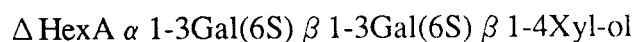
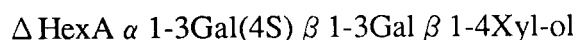
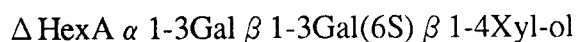
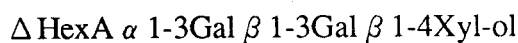
6. コンドロイチナーゼABC、ACII、コンドロ-4-スルファターゼによる酵素消化分析  
<sup>3</sup>H-ラベルされた多糖画分を1.2 x 10<sup>6</sup> cpm相当用いて、コンドロイチナーゼABCで徹底消化した。950 mIUの酵素を用い、上述と同じ緩衝液2 ml中、37 $^{\circ}\text{C}$ で終夜反応させた。消化物は、セファデックスG-15カラム (1.0 x 114 cm) で、溶媒として0.25 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ /7% 1-プロパノールを使い、ゲルろ過した。放射活性を持つピークが素通りに見られ、オリゴ糖を含むと考えられたので回収した。この画分の半分を、100 mIUのコンドロイチナーゼACIIを用いて、100  $\mu\text{l}$ の50 mM acetate-NaOH緩衝液、pH 6.0、37 $^{\circ}\text{C}$ で15分間消化した。さらに、これらコンドロイチナーゼABCとACIIによる各消化物を、以下のようにコンドロ-4-スルファターゼで消化した。80 mM  $\text{CH}_3\text{COONa}$ を含む80 mM トリス-HCl緩衝液40  $\mu\text{l}$ 中、約1,000 cpm相当の試料を10 mIUの酵素と37 $^{\circ}\text{C}$ で1時間反応させた。なお、各酵素消化は100 $^{\circ}\text{C}$ で一分間加熱することにより停止し、消化物はシリカ担体ポリアミンカラムを用いたHPLCで分析した<sup>(65, 128)</sup>。検出は、溶出液を1分間隔で集め液体シンチレーションカウンター (アロカLSC-700) で放射活性を測定することにより行った。

7. 構造既知の六糖アルデイトール、四糖アルデイトールとのHPLC上でのクロマトグラフィー

糖-タンパク質結合部位のオリゴ糖アルデイトールの構造を同定するために、<sup>3</sup>H-ラベルされた多糖のコンドロイチナーゼABC消化物とそれをさらにコンドロ-4-スルファターゼ消化した試料について、シリカ担体ポリアミンカラムを用いたHPLC上で、構造既知の六糖アルデイトールとクロマトグラフィーを行った。溶出液を1分間隔で集め、液体シンチレーションカウンター（アロカLSC-700）で放射活性を測定することにより検出を行った。構造既知の六糖アルデイトールはクジラ軟骨より単離したもので、以下の四種類である<sup>(13)</sup>。



また、<sup>3</sup>H-ラベルされた多糖のコンドロイチナーゼACII消化物とそれをさらにコンドロ-4-スルファターゼ消化した試料についても、構造既知の四糖アルデイトールとクロマトグラフィーを行った。用いた既知の四糖アルデイトールは、以下の四種類である<sup>(13-15)</sup>。



## 8. アルデイトール分析

<sup>3</sup>H-ラベルされた多糖画分を1 M HCl、100℃、2時間の条件で酸加水分解し<sup>(129)</sup>、ラベルされていないキシリトール、ガラクトール、ガラクトサミニトールと混合し、シリカ担体ポリアミンカラムを用いたHPLCで分析した。溶出は80%アセトニトリルのイソクラティック条件下で行い、流速は1 ml/minで、195 nmの紫外吸収でモニターした。キャリアーとして加えた三つの糖アルコールに相当する紫外吸収でのピークをそれぞれ分取し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。

## 結 論

筆者は、硫酸化グリコサミノグリカンより多数のオリゴ糖を調製し、<sup>1</sup>H-NMR解析などの手法を用いて微細修飾構造の研究を行い、以下のような知見を得た。

1. ブタ小腸由来ヘパリングリコサミノグリカンより、糖-タンパク質結合領域に由来するグリコセリンを2種類単離し、従来報告のなかった硫酸化構造を見いだした。

2. コンドロイチン硫酸とヘパラン硫酸/ヘパリンからバクテリアの脱離酵素を用いて調製した16種類の不飽和二糖について、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定し、硫酸化二糖の<sup>1</sup>H-NMRデータベースを構築した。

3. 硫酸化グリコサミノグリカンの不飽和二糖の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを解析し、硫酸化の化学シフトに及ぼす影響を体系的に研究した。その結果、硫酸基が結合した部位のプロトン及びそれに隣接するプロトンの化学シフトは、 $\alpha$ -、 $\beta$ -のアノマーに関係なく、それぞれ0.4-0.75 ppm及び0.1-0.35 ppmずつ低磁場側へシフトすることがわかった。また、個々の硫酸基による影響は相加的であることがわかった。

4. ブタ小腸ヘパリンの繰り返し二糖領域より、硫酸化オリゴ糖を23種類単離し、構造決定した。これらのうち17成分は単離の報告のない構造であった。それらのなかには、抗血液凝固活性を発揮するアンチトロンビンIII結合部位由来の四糖が3成分含まれており、その領域に構造多様性があることが証明できた。また、2-硫酸化グルクロン酸を含む四糖も2成分あり、2-硫酸化グルクロン酸構造の存在が初めて証明された。ヘパリングリコサミノグリカンの非還元末端に由来する三糖も得ることができた。

5. ブタ小腸ヘパリンの繰り返し二糖領域より調製した23種類のオリゴ糖を用いて、*Flavobacterium heparinum*由来のヘパリナーゼ、ヘパリチナーゼI、IIの基質特異性を検討した。その結果、これらの酵素は切断する部分の二糖のみならずさらに還元末端側のグルコサミンをも認識しており、その修飾構造が酵素作用に影響を及ぼすことが判明した。また、いずれの酵素も、イズロン酸とグルクロン酸の両方を認識でき、切断部位で*anti*

とsynのいずれの脱離反応も触媒できることが証明された。

6. ヘパリングリコサミノグリカン由来の硫酸化オリゴ糖の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを測定し、<sup>1</sup>H-NMRデータベースを構築した。不飽和二糖で見いだされた硫酸化の化学シフトに及ぼす影響は、三糖、四糖においても適用できることが判明した。

7. ヒト血漿のInter- $\alpha$ -trypsin inhibitor (ITI)より、そのコンドロイチン硫酸鎖とL鎖とのあいだの糖-タンパク質結合領域を単離し構造決定した。ITIの糖-タンパク質結合領域は、珍しい硫酸化ガラクトースを含んだ $\Delta$  HexA  $\alpha$  1-3GalNAc(4-sulfate)  $\beta$  1-4GlcA  $\beta$  1-3Gal(4-sulfate)  $\beta$  1-3Gal  $\beta$  1-4Xylという構造をしていた。しかも、他のコンドロイチン硫酸の場合とは異なり、糖-タンパク質結合領域に構造多様性がなく、極めて均一な構造であった。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究を行うにあたり多くの御指導御協力をしてくださった皆様に感謝いたします。この研究は京都大学薬学部で開始し、神戸薬科大学で発展させることができました。

研究に際し、多くの有益な御助言をいただき、そして終始御懇意なる御指導を賜りました京都大学薬学部川寄敏祐教授に深く感謝の意を表します。また、直接の御指導を賜わり、多くの御助言御鞭撻をいただきました神戸薬科大学菅原一幸教授に心から感謝の意を表します。さらに、種々の貴重な御助言を賜りました神戸薬科大学武藏彬彦教授、北川裕之博士、京都大学薬学部伊藤信行教授、小堤保則助教授、岡昌吾博士、京都産業大学工学部福井成行助教授に深謝いたします。

また、数々の貴重な酵素を御提供していただいた生化学工業株式会社の吉田圭一氏、試料のFAB/MS測定を行っていただいた英国Imperial CollegeのA. Dell博士、<sup>1</sup>H-NMRスペクトルの測定を行っていただき、その解析の際にも多くの御助言を賜りました神戸薬科大学の杉浦眞喜子助教授、オランダUtrecht大学のJ.F.G Vliegthart博士、そしてヒト血漿から精製したInter- $\alpha$ -trypsin inhibitorを御供与していただいた北海道大学薬学部の長澤滋治教授に深く感謝致します。

さらに本研究において、実際に実験を行う際に、大いに御協力していただいた神戸薬科大学の津田博美氏を初め、生化学教室の大学院生、四回生の皆さん、また種々の御協力をしていただいた京都大学薬学部生物化学教室の方々に心より感謝いたします。

最後に、私をいろいろな面で支えてくれた両親、昨年他界した祖母、そして妻に感謝いたします。

## 文 献

1. Marcum, J.A. and Rosenberg, R.D. (1989) *Heparin* (Lane, D.A. and Lindahl, U., eds.) pp. 275-294, Edward Arnold, London
2. Clowes, A. and Karnovsky, M. (1977) *Nature* **265**, 625-626
3. Thornton, S.C., Mueller, S.H. and Levine, E.M. (1983) *Science* **222**, 623-625
4. Folkman, J. and Ingber, D.E. (1989) *Heparin* (Lane, D.A. and Lindahl, U., eds.) pp. 317-333, Edward Arnold, London
5. Maciag, T., Mehlman, T., Friesel, R. and Schreiber, A.B. (1984) *Science* **225**, 932-935
6. Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J. and Klagsbrun, M. (1984) *Science* **223**, 1296-1299
7. Klagsbrun, M. and Shing, Y. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 805-809
8. Lindahl, U. (1989) *Heparin* (Lane, D.A., and Lindahl, U., eds.) pp. 159-189, Edward Arnold, London
9. Lindahl, U. and Rodén, L. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 2821-2826
10. Lindahl, U. and Rodén, L. (1972) *Glycoproteins* (Gottschalk, A., ed.) pp. 491-517, Elsevier, New York
11. Lindahl, U. (1966) *Biochem. Biophys. Acta* **130**, 368-382
12. Sugahara, K., Yamashina, I., De Waard, P., Van Halbeek, H. and Vliegthart, J.F.G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 10168-10174
13. Sugahara, K., Masuda, M., Harada, T., Yamashina, I., de Waard, P. and Vliegthart, J.F.G. (1991) *Eur. J. Biochem.* **202**, 805-811
14. de Waard, P., Vliegthart, J.F.G., Harada, T. and Sugahara, K. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6036-6044
15. Sugahara, K., Ohi, Y., Harada, T., de Waard, P. and Vliegthart, J.F.G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 6027-6035
16. Sugahara, K., Yamada, S., Yoshida, K., de Waard, P. and Vliegthart, J.F.G. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 1528-1533
17. Casu, B. (1985) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **43**, 51-134
18. Lindahl, U., Bäckström, G. and Thunberg, L. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 9826-9830

19. Atha, D.H., Stephens, A.W. and Rosenberg, R.D., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 1030-1034
20. Vliegthart, J.F.G., Dorland, L. and Van Halbeek, H. (1983) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **41**, 209-374
21. Van Kuik, J.A. and Vliegthart, J.F.G. (1991) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **3**, 229-230
22. Gebhard, W., Hochstrasser, K., Fritz, H., Enghild, J.J., Pizzo, S.V. and Salvesen, G. (1990) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **371**, Suppl., 13-22
23. Salier, J.-P. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 435-439
24. Jessen, T.E., Faarvang, K.L. and Ploug, M. (1988) *FEBS Lett.* **230**, 195-200
25. Enghild, J.J., Salvesen, G., Thøgersen, I.B., Valnickova, Z., Pizzo, S.V. and Hefta, S.A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 8711-8716
26. Morelle, W., Capon, C., Balduyck, M., Sautiere, P., Kouach, M., Michalski, C., Fournet, B. and Mizon, J. (1994) *Eur. J. Biochem.* **221**, 881-888
27. Eyre, D.R., Paz, M.A. and Gallop, P.M. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 717-748
28. Yamada, S., Yoshida, K., Sugiura, M. and Sugahara, K. (1992) *J. Biochem.* **112**, 440-447
29. Yamada, S., Sakamoto, K., Tsuda, H., Yoshida, K., Sugahara, K., Khoo, K.-H., Morris, H.R. and Dell, A. (1994) *Glycobiology* **4**, 69-78
30. Yamada, S., Yoshida, K., Sugiura, M., Sugahara, K., Khoo, K.-H., Morris, H.R. and Dell, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4780-4787
31. Yamada, S., Murakami, T., Tsuda, H., Yoshida, K. and Sugahara, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, in press
32. Yamada, S., Oyama, M., Kinugasa, H., Nakagawa, T., Kawasaki, T., Nagasawa, S., Khoo, K.-H., Morris, H.R., Dell, A. and Sugahara, K. (1995) *Glycobiology* **5**, in press
33. Hascall, V.C., Riolo, R.L., Hayward, J.Jr. and Reynolds, C.C. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 4521-4528
34. Oike, Y., Kimata, K., Shinomura, T., Nakazawa, K. and Suzuki, S. (1980) *Biochem. J.* **191**, 193-207
35. Lam, L.H., Silbert, J.E. and Rosenberg, R.D. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

36. Höök, M., Björk, I., Hopwood, J. and Lindahl, U. (1976) *FEBS Lett.* **66**, 90-93
37. Andersson, L.-O., Barrowcliffe, T.W., Holmer, E., Johnson, E.A. and Sims, G.E. (1976) *Thromb. Res.* **9**, 575-583
38. Yoshida, K., Miyazono, H., Tawada, A., Kikuchi, H. and Morikawa, K. (1989) *Proc. Xth Int. Symp. Glycoconjugates* (Sharon, N., Lis, H., Duskin, D. and Kahane, I., eds.) pp. 330-331
39. Harris, M.J. and Turvey, J.R. (1970) *Carbohydr. Res.* **15**, 57-63
40. Bax, A. and Davis, D.G. (1985) *J. Magn. Reson.* **65**, 355-360
41. Oegema, T.R.Jr., Kraft, E.L., Jourdain, G.W. and Van Valen, T.R. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 1720-1726
42. Sugahara, K., Mizuno, N., Okumura, Y. and Kawasaki, T. (1992) *Eur. J. Biochem.* **204**, 401-406
43. Fransson, L.-Å., Silverberg, I. and Carlstedt, I. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 14722-14726
44. Rosenfeld, L. and Danishefsky, I. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 262-266
45. Lyon, M., Steward, W.P., Hampson, I.N. and Gallagher, J.T. (1987) *Biochem. J.* **242**, 493-498
46. Ernst, R.R. (1966) *Adv. Magn. Reson.* **2**, 1-135
47. Bitter, M. and Muir, H. (1962) *Anal Biochem.* **4**, 330-334
48. Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O. and Suzuki, S. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 1523-1535
49. Sugahara, K., Okamoto, H., Nakamura, M., Shibamoto, S. and Yamashina, I. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 391-403
50. Rice, K. G., Kim, Y. S., Grant, A. C., Merchant, Z. M. and Linhardt, R. J. (1985) *Anal. Biochem.* **150**, 325-331
51. Lindahl, U., Feingold, D.S. and Rodén, L. (1986) *Trends Biochem. Sci.* **11**, 221-225
52. Maimone, M.M. and Tollefsen, D.M. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 18263-18271
53. Damm, J.B.L., Voshol, H., Hård, K., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **180**, 101-110

54. Damm, J.B.L., Hård, K., Kamerling, J.P., Van Dedem, G.W.K and Vliegthart, J.F.G. (1990) *Eur. J. Biochem.* **189**, 175-183
55. Van Kuik, J.A., Sijbesma, R.P., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. and Wood, E.J. (1987) *Eur. J. Biochem.* **169**, 399-411
56. Gerwig, G.J., de Waard, P., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G., Morgenstern, E., Lamed, R. and Bayer, E.A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 1027-1035
57. de Waard, P., Vliegthart, J.F.G., Kozutsumi, Y., Kawasaki, T. and Yamashina, I. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 12141-12144
58. Hernandez, L.M., Ballou, L., Alvarado, E., Tsai, P.-K. and Ballou, C.E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13648-13659
59. Van Kuik, J.A., Breg, J., Kolsteeg, C.E.M., Kamerling, J.P. and Vliegthart, J.F.G. (1987) *FEBS Lett.* **221**, 150-154
60. Merchant, Z.M., Kim, Y.S., Rice, K.G. and Linhardt, R.J. (1985) *Biochem. J.* **229**, 369-377
61. Linhardt, R.J., Rice, K.G., Merchant, Z.M., Kim, Y.S. and Lohse, D.L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 14448-14454
62. Loganathan, D., Wang, H.M., Mallis, L.M. and Linhardt, R.J. (1990) *Biochemistry* **29**, 4362-4368
63. Nader, H.B., Porcionatto, M.A., Tersariol, I.L.S., Pinhal, M.A.S., Oliveira, F.W., Moraes, C.T. and Dietrich, C.P. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 16807-16813
64. Gettins, P. and Horne, A.P. (1992) *Carbohydr. Res.* **223**, 81-98
65. Sugahara, K., Okumura, Y. and Yamashina, I. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 189-197
66. Kariya, Y., Yoshida, K., Morikawa, K., Tawada, A., Miyazono, H., Kikuchi, H. and Tokuyasu, K. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**, 473-479
67. Sugahara, K., Yamada, S., Sugiura, M., Takeda, K., Yuen, R., Khoo, H.E., and Poh, C.H. (1992) *Biochem. J.* **283**, 99-104
68. Reinhold, V.N., Carr, S.A., Green, B.N., Petitou, M, Choay, J. and Sinay, P. (1987) *Carbohydr. Res.* **161**, 305-313
69. Dell, A., Rogers, M.E., Thomas-Oates, J.E., Huckerby, T.N., Sanderson, P.N. and

- Nieduszynski, I.A. (1988) *Carbohydr. Res.* **179**, 7-19
70. Mallis, L.M., Wang, H.M., Loganathan, D. and Linhardt, R.J. (1989) *Anal. Chem.* **61**, 1453-1458.
71. McLean, M.W., Bruce, J.S., Long, W.F. and Williamson, F.B. (1984) *Eur. J. Biochem.* **145**, 607-615
72. Linker, A. and Hovingh, P. (1984) *Carbohydr. Res.* **127**, 75-94
73. Petitou, M., Lormeau J.-C., Perly, B., Berthault, P., Bossennec V., Sié, P. and Choay, J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 8685-8690
74. Linhardt, R.J., Wang, H.M., Loganathan, D. and Bae, J.H. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 2380-2387
75. Horne, A. and Gettins P. (1992) *Carbohydr. Res.* **225**, 43-57
76. Shively, J.E. and Conrad, H.E. (1976) *Biochemistry* **15**, 3932-3942
77. Shively, J.E. and Conrad, H.E. (1976) *Biochemistry* **15**, 3943-3950
78. Bienkowski, M.J. and Conrad, H.E. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 356-365
79. Sugahara, K., Tohno-oka, R., Yamada, S., Khoo, K.-H., Morris, H.R. and Dell, A. (1994) *Glycobiology* **4**, 535-544
80. Fedarko, N.S. and Conrad, H.E. (1986) *J. Cell Biol.* **102**, 587-599
81. Ishihara, M., Fedarko, N.S. and Conrad, H.E. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 13575-13580
82. Kusche, M. and Lindahl, U. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 15403-15409
83. Hovingh, P. and Linker, A. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 6170-6175
84. Rice, K.G. and Linhardt, R.J. (1989) *Carbohydr. Res.* **190**, 219-233
85. Linhardt, R.J., Turnbull, J.E., Wang, H.M., Loganathan, D. and Gallagher, J.T. (1990) *Biochemistry* **29**, 2611-2617
86. Lindahl, U., Thunberg, L., Bäckström, G., Riesenfeld, J., Nordling, K. and Björk, I. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 12368-12376
87. Atha, D.H., Stephens, A.W., Rimon, A. and Rosenberg, R.D. (1984) *Biochemistry* **23**, 5801-5812
88. Ototani, N. and Yoshizawa, Z. (1981) *J. Biochem.* **90**, 1553-1556
89. Ototani, N., Kikuchi, M. and Yoshizawa, Z. (1982) *Biochem. J.* **205**, 23-30
90. Thunberg, L., Bäckström, G. and Lindahl, U. (1982) *Carbohydr. Res.* **100**, 393-410

91. Turnbull, J.E., Fernig, D.G., Ke, Y., Wilkinson, M.C. and Gallagher, J.T. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 10337-10341
92. Rodén, L. (1989). *Heparin* (Lane, D.A. and Lindahl, U., eds), pp. 1-23, Edward Arnold, London
93. Cifonelli, J.A. and Dorfman, A. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 41-47
94. Marcum, J.A., Atha, D.H., Fritze, L.M.S., Nawroth, P., Stern, D. and Rosenberg, R.D. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 7507-7517
95. Pejler, G. and David, G. (1987) *Biochem. J.* **248**, 69-77
96. Bame, K.J., Lidholt, K., Lindahl, U. and Esko, J.D. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 10287-10293
97. Hiscock, D.R.R., Yanagishita, M. and Hascall, V.C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4539-4546
98. Yamauchi, F., Kosakai, M. and Yosizawa, Z. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**, 721-726
99. Shaklee, P.N. and Conrad, H.E. (1984) *Biochem. J.* **217**, 187-197
100. Guo, Y. and Conrad, H.E. (1989) *Anal. Biochem.* **176**, 96-104
101. Kusche, M., Oscarsson, L.-G., Reynertson, R., Rodén, L. and Lindahl, U. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 7400-7409
102. Bâr zu, T., Lormeau, J.-C., Petitou, M., Michelson, S. and Choay, J. (1989) *J. Cell. Physiol.* **140**, 538-548
103. Habuchi, H., Suzuki, S., Saito, T., Tamura, T., Harada, T., Yoshida, K. and Kimata, K. (1992) *Biochem. J.* **285**, 805-813
104. Tyrrell, D.J., Ishihara, M., Rao, N., Horne, A., Kiefer, M.C., Stauber, G.B., Lam, L.H. and Stack, R.J. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 4684-4689
105. Maccarana, M., Casu, B. and Lindahl, U. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23898-23905
106. Turnbull, J.E. and Gallagher, J.T. (1991) *Biochem. J.* **273**, 553-559
107. Turnbull, J.E. and Gallagher, J.T. (1991) *Biochem. J.* **277**, 297-303
108. Lyon, M., Deakin, J.A. and Gallagher, J.T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 11208-11215
109. Kovensky, J. and Cirelli, A.F. (1993) *Carbohydr. Res.* **245**, 361-365
110. Kusche, M., Torri, G., Casu, B. and Lindahl, U. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7292-7300

111. Walker, A., Turnbull, J.E. and Gallagher, J.T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 931-935
112. Lyon, M., Deakin, J.A., Mizuno, K., Nakamura, T. and Gallagher, J.T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 11216-11223
113. Thunberg, L., Bäckström, G., Westerson, Å., Robinson, H.C., Ögren, S. and Lindahl, U. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 10278-10282
114. Oldberg, Å., Heldin, C.-H., Westerson, Å., Busch, C. and Höök, M. (1980) *Biochemistry* **19**, 5755-5762
115. Yamagata, M., Kimata, K., Oike, Y., Tani, K., Maeda, N., Yoshida, K., Shinomura, T., Yoneda, M. and Suzuki, S. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 4146-4152
116. Doubet, S. and Albersheim, P. (1992) *Glycobiology* **2**, 505
117. Steinbuch, M. (1976) *Methods in Enzymology* **45** (Lorand, L., ed.) pp. 760-772, Academic Press, New York
118. Ødum, L. (1990) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **371**, 1153-1158
119. Gebhard, W., Schreitmüller, T., Hochstrasser, K. and Wachter, E. (1989) *Eur. J. Biochem.* **181**, 571-576
120. Chen, L., Mao, S.J.T. and Larsen, W.J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 12380-12386
121. Yoneda, M., Suzuki, S. and Kimata, K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 5247-5257
122. Huang, L., Yoneda, M. and Kimata, K. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 26725-26730
123. Kaumeyer, J.F., Polazzi, J.O. and Kotick, M.P. (1986) *Nucl. Acid. Res.* **14**, 7839-7850
124. Daveau, M., Rouet, P., Scotte, M., Faye, L., Hiron, M., Lebreton, J.-P. and Salier, J.-P. (1993) *Biochem. J.* **292**, 485-492
125. Balduyck, M., Laroui, S., Mizon, C. and Mizon, J. (1989) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **370**, 329-336
126. Toyoda, H., Kobayashi, S., Sakamoto, S., Toida, T. and Imanari, T. (1993) *Biol. Pharm. Bull. (Tokyo)* **16**, 945-947
127. Enghild, J.J., Salvesen, G., Hefta, S.A., Thøgersen, I.B., Rutherford, S. and Pizzo, S.V. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 747-751
128. Yoshida, K., Miyauchi, S., Kikuchi, H., Tawada, A. and Tokuyasu, K. (1989) *Anal. Biochem.* **177**, 327-332
129. Takasaki, S. and Kobata, A. (1974) *J. Biochem.* **76**, 783-789