

フロンタル・アフィニティ・クロマトグラフィーで糖鎖を読む

糖鎖は核酸・タンパク質に次ぐ「第3の生命鎖」と言われるが、これは糖鎖が3番目に重要、と言う意味ではない。構造が複雑なため糖鎖の解析が後回しになってしまったというのが現実である。事実、タンパク質の大半には糖付加が起これ、そのことがタンパク質の性質や機能を左右する。とは言え、糖鎖はDNAのように増幅もできず、ゲノム情報が分かっても構造予測ができない。シーケンサもなければ自動合成機もない。

まるで手の施しようのないように思える糖鎖の構造解析だが、最近注目されているのが糖認識タンパク質であるレクチンを活用した「糖鎖プロファイリング」と呼ばれる手法である。当研究センターでは、NEDOプロジェクト「糖鎖エンジニアリング」の一環として、レクチンと糖鎖間の親和力を網羅的に定量解析する「ヘクト・バイ・ヘクト(100 × 100の意)プロジェクト」という事業を推進している。このために採用しているのがフロンタル・アフィニティ・クロマトグラフィー(以下、FAC)という方法である。プロジェクトでは島津製作所との共同研究によって、先ずその自動解析装置(試作機)を開発した(図1)。FACは操作・原理ともいって簡単で、レクチンを固定化したミニカラムに蛍光標識した糖鎖の希釈液

を流す、と言うものである。もし相互作用がなければ、糖鎖は短時間でカラムから漏れ出てしまい溶出前端(フロント)が即座に観察される。しかし、レクチンと親和性がある場合、糖鎖は「寄り道」をする結果、溶出が遅れる(図2)。本装置はオートサンプラーと2式のレクチンカラムを備え、一晩で100検体以上の解析能力をもつ。FACにはさらに以下に示すような利点がある。

- (1) 一回のクロマト操作でKdを決定することが可能
- (2) 溶出に用いる物質(蛍光標識糖鎖)の精密な濃度調整が不要
- (3) リニアレンジでの解析により高い測定精度を発揮
- (4) アイソクラティック溶出法により高い再現性を維持
- (5) レクチン・糖鎖間など弱い相互作用($K_d > 10^{-6}$ M)の測定に威力

このように様々な利点をもつFACであるが、実はFACの解析対象は糖鎖やレクチンに限定されるものではない。例えば、酵素に対する有用基質(阻害剤)のスクリーニングや生体レセプター・リガンド(環境ホルモンなど)間の親和力解析への応用展開も十分可能である。

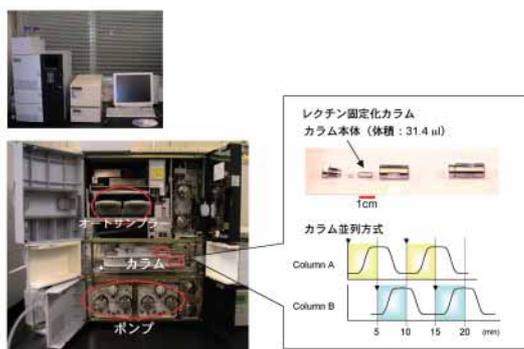
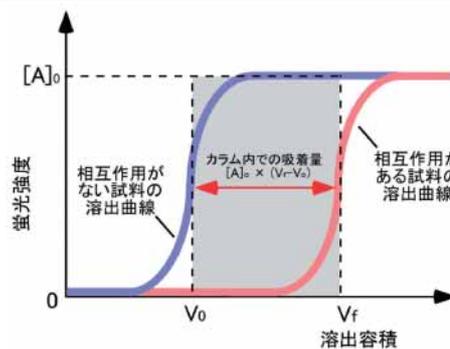


図1 FAC自動化装置(試作1号機)の全容(上)と装置内部(左下)

2本のカラムは並列方式で配置され、一方が分析時他方は洗浄を行う。



$$K_d = Bt / (V_f - V_0) - [A]_0$$

$$K_d = Bt / (V_f - V_0), \text{ if } K_d \gg [A]_0$$

図2 FACの原理

レクチンを固定化したカラムに十分希釈した糖の溶液を過剰量流す。もし、レクチン・糖鎖間に相互作用がまったくない場合、糖鎖はすぐに溶出してしまうが(青の曲線)、相互作用がある場合は糖鎖は「寄り道」をするので溶出前端(フロント)が遅るにずれる(赤の曲線)。この遅れの程度($V_f - V_0$)を解析するとレクチン・糖鎖間の解離定数(K_d)が求まる。

関連情報

- 1) 平林淳「レクチンアフィニティを用いたグライコム解析技術」蛋白質核酸酵素 48 (11) 1534-1541 (2003).
- 2) J. Hirabayashi, Y. Arata, K. Kasai: Methods Enzymol, Vol. 362, 353-368 (2003).
- 3) <http://www.glycoforum.gr.jp/science/word/glycotecnology/GT-C07J.html>



ひらばやし じゅん
平林 淳
jun-hirabayashi@aist.go.jp
糖鎖工学研究センター