

Structural Analysis of Heparan Sulfate and Heparan Sulfate Oligosaccharides*

ヘパラン硫酸およびヘパラン硫酸オリゴ糖の構造解析

Toida, Toshihiko^{1**}; and Linhardt, R. J.²¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Inage, Chiba 263, Japan

FAX: 81-43-290-3021, E-mail: toida@atheneum.p.chiba-u.ac.jp

²Division of Medicinal and Natural Products Chemistry and Department of Chemical and Biochemical Engineering,

PHAR S328, University of Iowa, Iowa City, Iowa 52242, USA

Key Words : heparan sulfate, mass spectrometry, NMR, oligosaccharides, structure**Abstract**

Heparan sulfate is a structurally complex biopolymer that has been the subject of active investigation due to its role in a variety of important biological processes. The activity of heparan sulfate primarily resides in its glycosaminoglycan chains. This glycosaminoglycan is comprised of a number of diverse structurally disaccharide residues occurring in a variety of different chain lengths. The resulting, highly complex, structure has not been amenable to complete characterization despite the application of a variety of different approaches. Recent structural studies have focused on examining smaller structural domains of this macromolecule, corresponding to those responsible for many of its important biological activities. This mini review examines the preparation, purification and complete characterization of heparan sulfate-derived oligosaccharides. The emphasis of this review is on high resolution separation technology such as high performance liquid chromatography, polyacrylamide gel and capillary electrophoresis as well as unambiguous characterization relying on mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy.

要 約

ヘパラン硫酸は構造的に複雑な生体内高分子で、様々な重要な生物活性発現に関わる可能性が認められ、最近活発に研究されるようになった。ヘパラン硫酸の生物活性発現はグリコサミノグリカン糖鎖による。このグリコサミノグリカンは、複雑な構造多様性を示す二糖単位から構成され、その糖鎖長も一定でない。この複雑な糖鎖を構造決定しようとする試みは、あらゆる方法を用いて遂行されたにもかかわらず、未だ達成されていない。最近のヘパラン硫酸糖鎖構造に関する研究は、もっぱらある種の生物活性を示す最小糖鎖配列を高分子部分から切り出し、その構造を同定することに焦点が絞られている。このミニレビューでは、ヘパラン硫酸由来のオリゴ糖鎖の調製、単離および構造決定法について最近の文献を挙げ、総説する。特に、高速液体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲルおよびキャピラリー電気泳動法のような高分解能を持つ分離技術と、質量分析、核磁気共鳴法による構造解析手段に焦点を当て、紹介する。

A. Introduction

Heparan sulfate is a proteoglycan that is found at the surface of many mammalian cells (1, 2) and has been purified from a variety of different tissues (3). Heparan sulfate has a number of important biological activities. It has polysaccharide components that bind antithrombin (4) supporting blood flow across the vascular endothelium. Heparan sulfate is involved in cell-cell interaction (5), may function as the endogenous inhibitor of smooth muscle cell proliferation (6) and a regulator of growth factors (7, 8). These and other activities make it a leading target in the development of new pharmaceutical agents such as anti-hypolipemics, anti-inflammatories, angiogenesis inhibitors, anti-dementia agents, anticoagulants and anti-arteriosclerotics (9).

A. 緒 言

ヘパラン硫酸は多くの哺乳動物細胞膜表面 (1, 2) に見いだされるプロテオグリカンで、様々な組織から単離されている (3)。ヘパラン硫酸は種々の重要な生物活性を担っている。また顕官内皮細胞に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンは、アンチトロンビン (4) に特異的に結合する糖鎖を有している。またヘパラン硫酸は細胞間の様々な相互作用や (5)、平滑筋細胞の増殖 (6) を阻害する内在因子でもあり、また成長因子 (7, 8) の制御作用を持つことも知られている。以上述べた作用以外にも様々な生理活性を持つことが予想され、これらの中から抗高脂血症、抗炎症、血管新生阻害、抗痴呆薬、抗凝固剤あるいは抗動脈硬化症に対する新しい医薬品としての利用が模索されている (9)。

*Prepared for *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, September, 1997.

**Author to whom correspondence should be addressed.

While heparan sulfate is synthesized as a proteoglycan (1, 2), its polysaccharide chains play a dominant role in its biological activity. Glycosaminoglycan (GAG) heparan sulfate is a polydisperse mixture of linear polysaccharides consisting primarily of *N*-acetylated[$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GlcNpAc-(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcAp-(1\rightarrow)}$] and *N*-sulfated disaccharides [$\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GlcNpS-(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcAp}$ or $\text{-}\alpha\text{-L-IdoAp-(1\rightarrow)}$] (where *GlcAp* is glucuronic acid, *IdoAp* is iduronic acid, *GlcNp* is glucosamine, *S* is sulfate and *Ac* is acetate) that are arranged mainly in segregated domains (10). About one-fourth of the polymer is formed by alternating arrangements of the two disaccharide units, $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GlcNpS-(1\rightarrow 4)\text{-UAp-(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNpAc-(1\rightarrow 4)\text{-UAp(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNpS-(1\rightarrow)}$. (11). The polymer is initially synthesized as a repeating $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GlcNpAc-(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcAp-(1\rightarrow)}$ disaccharide sequence that is attached to a serine residue of a core protein through a tetrasaccharide, glucuronosyl \rightarrow galactosyl \rightarrow galactosyl \rightarrow xylosyl, linkage region (10). It subsequently undergoes partial *N*-deacetylation followed by *N*-sulphation of the newly exposed amino groups, partial C-5 epimerization of *D-GlcAp* to *L-IdoAp* and *O*-sulfation similar to that proposed in heparin biosynthesis (12).

Heparan sulfate is characterized by a ratio of *GlcNpAc* to *GlcNpS* of more than 2.5, it contains less than 20% sulfate, and a *D-GlcAp* to *L-IdoAp* ratio of greater than 2.0 (13). Heparan sulfate can show a similarity to heparin in distribution of *N*-sulfate and *N*-acetyl groups, but differs in the disposition of *O*-sulfates and uronic acid epimers (11). *O*-Sulfates are always found in proximity to *N*-sulfates, which enhances the clustering of the sulfate residues and the heterogeneity in chemical composition and charge density of heparan sulfate (14). Recently, two distinct classes of heparan sulfates having high and low levels of both *N*- and *O*-sulfation have been demonstrated (15). These classes also can demonstrate unique biological properties (16).

This minireview focuses on the structural analysis of the intact GAG chains of heparan sulfate as well as the breakdown of heparan sulfate and the fractionation and structural characterization of the resulting oligosaccharides.

B. Structural Analysis of Intact GAG Heparan Sulfate

Heparan sulfate is prepared from tissue by exhaustive proteolysis followed by strong-anion-exchange (SAX) chromatography (13). The resulting GAG has a characteristic optical rotation of +70 to +75°, 5–6% total sulfur with a very low anticoagulant activity (<10 U/mg anti-factor IIa and anti-factor Xa). Characteristic of heparan sulfate is its somewhat higher molecular weight than heparin (MW_{avg} 15–25 kDa vs. 10–15 kDa) (17). Molecular weight and polydispersity is routinely measured using viscometry (18), gel permeation chromatography (GPC) (19), or gradient polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (20).

ヘパラン硫酸はプロテオグリカン (1, 2) として生合成されるが、多糖鎖部位が主に生物活性を発現している。ヘパラン硫酸グリコサミノグリカン (GAG) 鎖は構造多様性に富む直鎖の多糖で、基本的には *N*-アセチル基を含む [4- α -*D-GlcNpAc-(1\rightarrow 4)- β -*D-GlcAp-(1-)] と *N*-硫酸基を含む [4- α -*D-GlcNpS-(1\rightarrow 4)- β -*D-GlcAp* or $\text{-}\alpha$ -*L-IdoAp-(1-)] (*GlcAp* はグルクロン酸を、*IdoAp* はイズロン酸を、*GlcNp* はグルコサミンを、*S* は硫酸基を、*Ac* はアセチル基を表す) の二糖単位からなり、それぞれが連続的な配列領域を形成している (10)。また多糖の約四分の一に相当する部分が $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-D-GlcNpS-(1\rightarrow 4)\text{-UAp-(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNpAc-(1\rightarrow 4)\text{-UAp(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNpS-(1\rightarrow)}$ の繰り返し配列からなることが明らかにされている (11)。ヘパラン硫酸多糖は、最初コア蛋白質のセリン残基に結合した結合領域4糖 *GlcA* \rightarrow *Gal* \rightarrow *Gal* \rightarrow *Xyl* に引き続いて [4- α -*D-GlcNpAc-(1\rightarrow 4)- β -*D-GlcAp-(1-)] の繰り返し配列が生合成される (10)。さらにヘパリンの生合成経路として知られているのと同じように部分的に起こる脱 *N*-アセチル化/*N*-硫酸化、*GlcAp* から *IdoAp* への C5 位におけるエピマー化さらには *O*-硫酸化によって修飾を受ける (12)。******

ヘパラン硫酸は、*GlcNpAc* の *GlcNpS* に対する比がほぼ 3.0 あるいはそれ以下で、約 20% 程度の硫酸基を含み、また *L-IdoAp* に対する *D-GlcAp* の割合が 2 より大きいことで特徴づけられる (13)。ヘパラン硫酸はまた *N*-アセチル基、*N*-硫酸基の両方を含むことでヘパリンと類似性を示すが、*O*-硫酸化の割合、ウロン酸の C5 位のエピマー化の割合において、ヘパリンと全く異なった組成を示す (11)。*O*-硫酸基の数は通常 *N*-硫酸基の数に比例し、糖鎖上にまとまった硫酸基密度の高い部分を形成することとなり、ヘパラン硫酸糖鎖の組成、電荷密度の多様性の裏付けとなっている (14)。最近、ヘパラン硫酸の中にもさらに *N*-、*O*-硫酸化の度合いに高いグループと低いグループの 2 種存在することが明らかになった (15)。これらの違いもまた、それぞれが有する特徴的な生物学的な性質の違いを示すものであろう (16)。

この総説はこういったヘパラン硫酸糖鎖の多糖のままの構造解析だけでなく、ヘパラン硫酸オリゴ糖の分画、またその構造解析について焦点をあて、紹介する。

B. GAG ヘパラン硫酸の構造解析

ヘパラン硫酸糖鎖は組織を徹底的にタンパク消化し、強塩基性陰イオン交換 (SAX) クロマトグラフィーによってまず調製する (13)。調製した GAG は特徴的な旋光度 +70~75°、総イオウ含量 5~6%、非常に低い抗凝固活性 (<10 U/mg 抗 IIa、Xa 活性) によって特徴づけられる。ヘパラン硫酸糖鎖の特徴としてヘパリンより若干分子量が高い (平均分子量がヘパリン 10~15 kDa に対して 15~25 kDa) (17)。分子量および分子量分布は通常粘度 (18)、ゲル濾過クロマトグラフィー (19)、あるいは濃度勾配ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) によって測定されている (20)。

The biological activity of heparan sulfate is measured using a wide variety of protein-based, cell-based and tissue/organism-based bioassays. Most of the biological activities of heparan sulfate involve its binding to proteins, resulting in a modulation of their activities (21). These interactions provide a convenient method for the affinity fractionation of "active" protein-binding chains from "inactive" non-binding chains (4). The strength of binding to protein can also be assessed by a variety of methods (22). Affinity-based electrophoresis (23,24), surface plasmon resonance (25) and isothermal titration calorimetry (26) among the methods used to study the details of these important interactions.

The fine structure of heparan sulfate can be examined using chemical methods to estimate the content of *N*-sulfo groups (27), unsubstituted amino groups (15) and sulfation level (13). Monosaccharide analysis by standard methods poses difficulties because of incomplete methanolysis or hydrolysis (28). Disaccharide analyses can be performed, by chemical (27) or enzymatic (29) depolymerization followed by SAX-HPLC (27, 30) or capillary electrophoresis (CE) (29, 30) (Fig. 1A) with detection by radiochemical (27), ultraviolet absorbance (30) or post-column derivatization (31) methods. Oligosaccharide mapping following depolymerization using either SAX-HPLC, gradient PAGE or CE also can afford useful structural information when comparing heparan sulfates from two different species or tissues or ones with different biological activity (30).

Spectroscopy has also been applied to the analysis of intact heparan sulfate. FT-IR can provide information on the content of *N*- and *O*-sulfation as well as a fingerprint of the particular GAG preparation (32). NMR spectroscopy has also been applied to the analysis of the chemical fine structure of GAG heparan sulfates (Fig. 1B). Such analysis permits the assignment of all the proton signals and through the use as chemical reporter groups, a monosaccharide analysis of heparan sulfates prepared from different tissues and for species can be obtained (15). This approach is particularly useful for determining the ratios of GlcAp to IdoAp or GlcNSp to GlcNAcp to GlcNp, which are particularly difficult to obtain by disaccharide analysis in which a chemical or enzymatic depolymerization step alters certain of these residues (27, 29, 30).

C. Limitations of Analyzing Intact GAGs

The analysis of the intact GAG, however, has certain limitations. The structural complexity of very large molecules make the definitive assignment of structure impossible using currently available methods. This is compounded by the poly-disperse, microheterogeneous nature of heparan sulfate GAG. Sequencing methods under development in our laboratory (33) and by others (34, 35), presume that an individual GAG chain, from a specific glycosylation site of a particular proteoglycan

ヘパラン硫酸の生物活性は、ある種のタンパク質、細胞、および組織・微生物を用いた様々な生物活性測定法が用いられている。ヘパラン硫酸の生物活性の大部分は、その生物活性の調節をもたらすタンパク質への結合で説明できる (21)。これらの結合を伴う相互作用はまた、“活性な”結合タンパク質を“活性を持たない”結合しないタンパク質から分離する、いわゆるアフィニティー分画する便利な方法へも応用可能である (4)。タンパク質に対する結合性の強さはまたいろいろな分析手段に応用される (22)。例えばアフィニティー電気泳動 (23, 24) や表面プラズモン共鳴 (25)、等温滴定熱量計 (26) などは重要な相互作用を解明する手段として使用されている。

ヘパラン硫酸の微細構造については、*N*-硫酸基の定量 (27)、未置換アミノ基の定量 (15)、および硫酸化度 (13) を調べるなどの化学的な方法を用いて調べることが可能である。単糖組成は通常行われるメタノリシスや加水分解による分解方法では不完全で、正確な値を求めることは困難である (28)。化学的 (27)、あるいは酵素的な方法 (29) を用いてヘパラン硫酸を二糖単位に分解して行う組成分析は、SAX-HPLC (27, 30) あるいはキャピラリー電気泳動 (CE) (29, 30) (図 1A) を用いて種々の検出法、例えば放射活性 (27)、紫外外部吸収 (30)、あるいはポストカラム誘導体化法 (31) などが報告されている。SAX-HPLC、濃度勾配PAGE、あるいはCEによるヘパラン硫酸由来分解物少糖のマッピング分析は、由来の異なる様々なヘパラン硫酸を互いに比較する場合有用な構造情報を提供してくれる (30)。

ある種の分光法もまたヘパラン硫酸をならん分解することなく分析する場合に適用することができる。FT-IR は指紋領域から GAG を特定できるばかりでなく、*N*-、*O*-硫酸基の含量に関する情報も提供する (32)。NMR 分光法はまた、ヘパラン硫酸グリコサミノグリカンの微細化学構造の解析に適用可能である (図 1B)。さらに NMR 分光法はすべての化学構造を反映するプロトンシグナルを同定することによって、様々な臓器、動物種など由来の異なるヘパラン硫酸の構成単糖分析を行うことが可能である (15)。特にある種の化学的、酵素的な分解法ではその情報が失われてしまう糖鎖中における GlcAp と IdoAp の割合、GlcNpS、GlcNpAc、GlcNp の割合などを定量する場合、有効な手段となる (27, 29, 30)。

C. 高分子のままの GAG 分析の限界

しかしながら、ヘパラン硫酸糖鎖を多糖のまま分析するには確かに限界があるのも事実である。非常に大きな高分子物質の複雑な構造を最終的に決定するためには、手持ちの分析手段だけでは不可能である。さらに、ヘパラン硫酸の構造多様性、微細構造の複雑さがその構造解析の難しさに拍車をかけている。我々の研究室だけでなく (33) いろいろな研究者が開発した糖鎖配列決定法 (34, 35) を用いて調べた結果、特定の細胞がつくるプロテオグリカン糖鎖は、規定された糖鎖を発現している可能

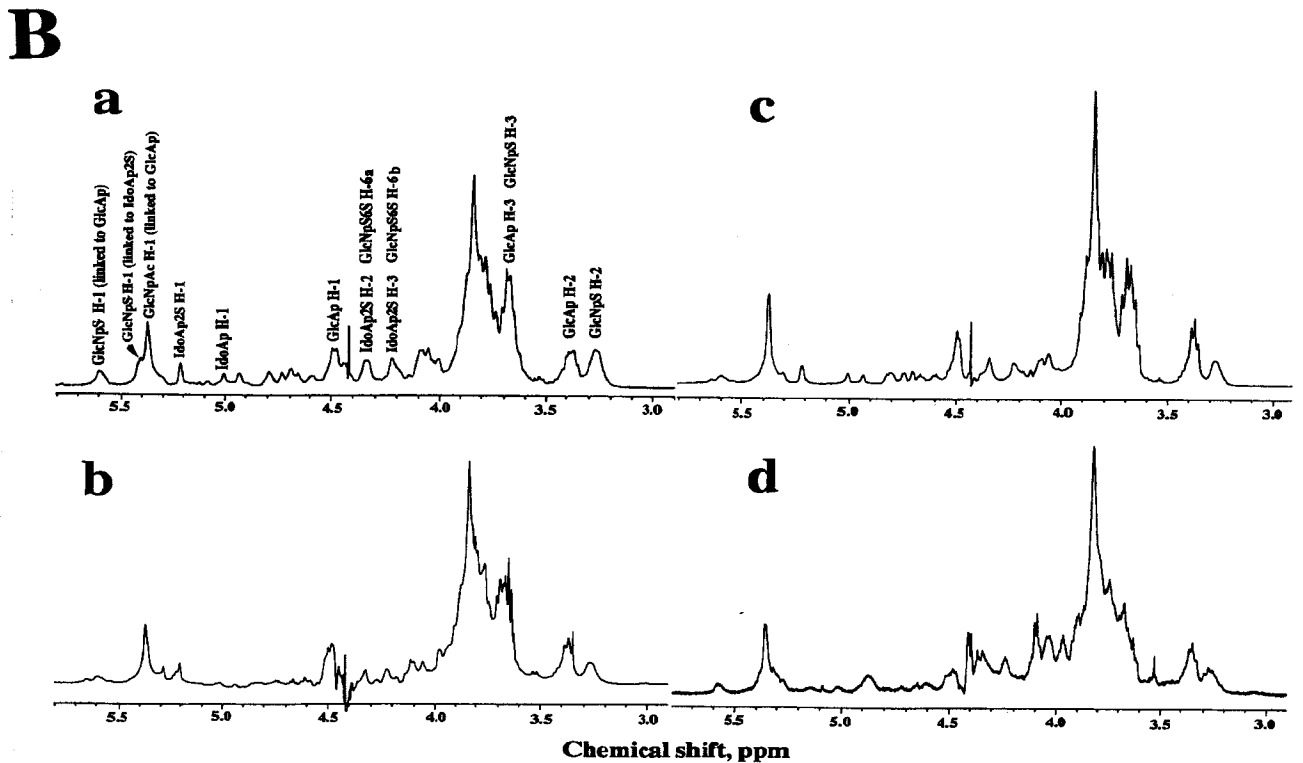
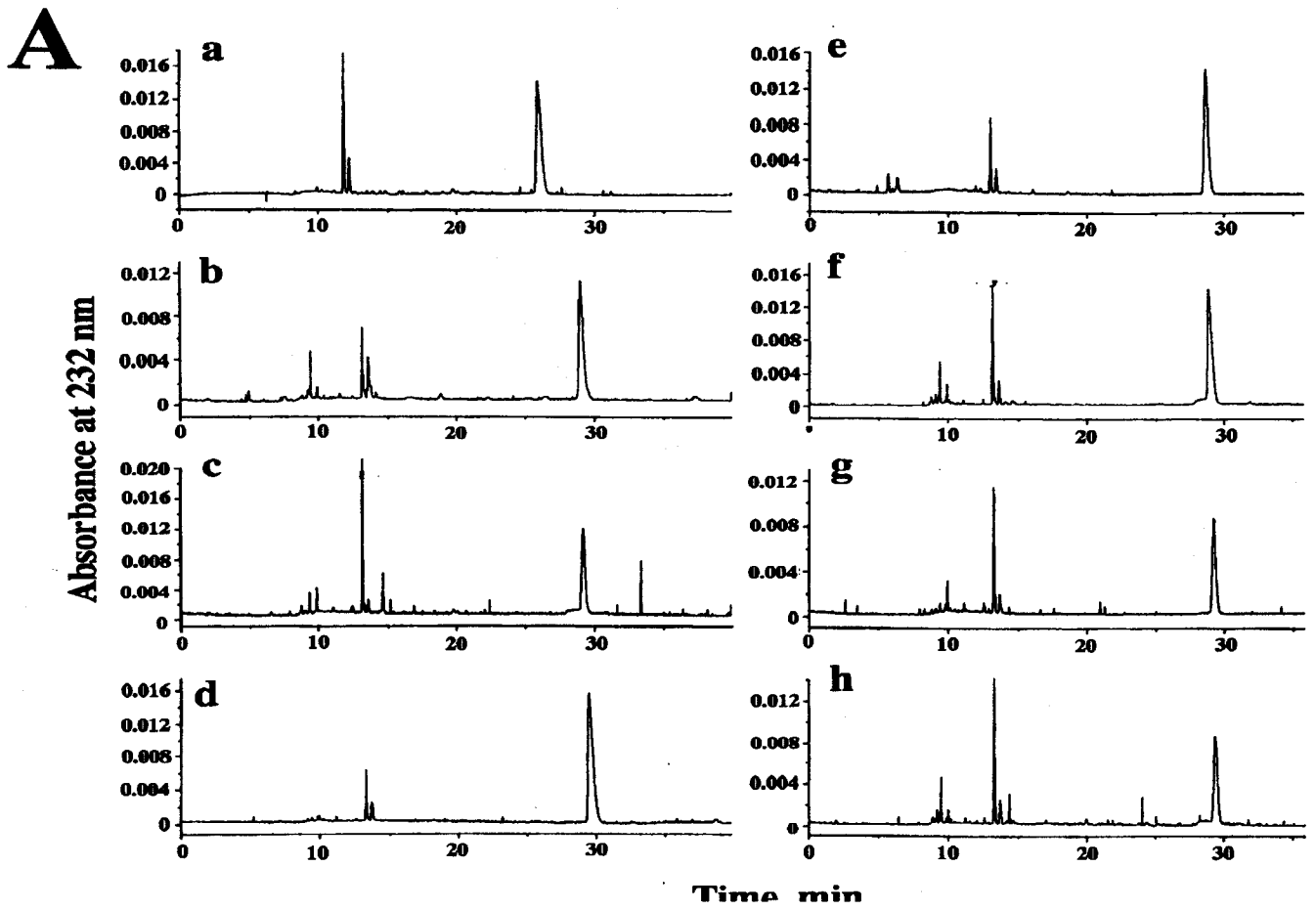


Fig. 1. A. CE disaccharide analysis of intact heparan sulfates prepared from a variety of tissues and species. a, porcine intestine; b, porcine kidney medulla; c, bovine pancreas; d, bovine kidney; e, porcine liver; f, porcine kidney cortex; g, bovine spleen; h, bovine kidney from Grampian.

Fig. 1. B. 1D ^1H NMR analysis the same heparan sulfate samples. a, porcine intestine; b, porcine kidney; c, bovine kidney; d, bovine pancreas.

in a single cell, actually has a defined sequence. This hypothesis, however, has never been tested and is the subject of much controversy. An alternative approach include computer simulation studies of GAG sequence (36). With the advent of supercomputers, this method is limited primarily by the quantity and quality of experimental data available. Finally, a reductionist approach, which examines smaller oligosaccharide domains that make up the heparan sulfate GAG, might also be useful in helping to establish the structure of heparan sulfate.

The idea that heparan sulfate is composed of major domains in which functional groups are segregated has mainly been advanced by Gallagher and coworkers (37). These domains are generally large typically consisting of 8-12 disaccharide units corresponding to 4.0- 7.0 kDa in size. While these domains can be mapped, their chemical structure can not be precisely determined because of their large size. The largest GAG-derived oligosaccharide to be fully characterized is a heparin tetradecasaccharide (38).

D. Preparation of Heparan Sulfate Oligosaccharides

Heparan sulfate can be depolymerized into a mixture of oligosaccharides using either chemical or enzymatic methods (9, 27, 29, 39). The primary chemical method is oxidative depolymerization using nitrous acid. This results in the ring contraction of unsubstituted or *N*-sulfo glucosamine residues and the subsequent fragmentation of the adjacent glycosidic linkage. Heparan sulfate contains a smaller number of *N*-sulfo groups than does heparin making it relatively resistant to nitrous acid depolymerization. Treatment with hydrazine, however, can remove *N*-acetyl groups making all the GlcNp residues of heparan sulfate sensitive to nitrous acid. Thus, nitrous acid treatment can either result in selective or exhaustive depolymerization affording either quite large or very small oligosaccharide products, respectively. The resulting anhydromannose residue formed can be reduced with sodium cyanoborohydride [^3H] to form an anhydromannitol residue containing a radiolabel for detection (27).

Enzymatic depolymerization generally relies on the use of heparin lyases, derived from *Flavobacterium heparinum* as well as other microbial species (40). Three commonly used *Flavobacterial* heparin lyases have been purified to apparent homogeneity and characterized (41) two having enzyme commission numbers (E.C. 4.2.2.7 and 4.2.2.8) and one without such classification. While the specificity of these enzymes have been extensively studied (29, 42-44) there is still some question as to their precise specificity, particularly with regards to sites that are partially resistant to these enzymes. These lyase enzymes can be used in either partial or complete digestions, alone or in combination, to afford product mixtures ranging from containing very large heparan sulfate oligosaccharides to ones containing primarily disaccharides. The controlled use of

性を予想させる。しかしながらこの仮定は未だかつて調べられてはおらず、今なお論争が続いている。この論争はコンピューターを用いたGAG糖鎖配列のシミュレーション実験からも検討されている (36)。スーパーコンピューターの出現により、この方法はいかに大量の質の良い実験データを計算に提供できるかにかかっている。最終的には、いくつかの少糖単位の糖鎖配列を構築しながらヘパラン硫酸本来の配列を求める還元的な方法も有効手段になるものと思われる。

ヘパラン硫酸糖鎖中にある種の生理活性部位がまとまって存在するのではないかという考えは主にGallagherと彼の共同研究者らによって提唱された (37)。これらの活性領域のサイズは4.0~6.5 kDaに相当する8~12個の二糖単位であろうと言われている。糖鎖のサイズをマッピングによって推定することはできても、やはりサイズが大きすぎるために正確な化学構造を決定することはできない。これまで構造決定された最大のオリゴ糖はヘパリン由来14糖である (38)。

D. ヘパラン硫酸オリゴ糖の調製

ヘパラン硫酸は化学的あるいは酵素的な方法によってオリゴ糖の混合物に分解することができる (9, 27, 29, 39)。主たる化学的手段としては亜硝酸分解法が挙げられる。この反応は未置換アミノ基あるいは硫酸化アミノ基を持つグルコサミン残基の環縮小反応を伴い、引き続いて起こる隣接グリコシド結合の開裂により糖鎖が断片化する。ヘパリンに比べて*N*-硫酸基の含量が少ないヘパラン硫酸は、亜硝酸分解に対しても比較的抵抗性を示す。しかしながらヒドラジン処理によって*N*-脱アセチル化するとヘパラン硫酸も容易に亜硝酸分解によって低分子化する。このように亜硝酸分解は比較的大きな糖鎖を得たい場合、あるいは小さなオリゴ糖を得たい場合などその目的に応じて選択的あるいは徹底的に分解することができる。また生成するアンヒドロマンノースをトリチウムシアノホウ素化水素ナトリウムで還元すれば、検出容易な放射標識したアンヒドロマンニトールを含むオリゴ糖を得ることもできる (27)。

一般に酵素分解法は、フラボバクテリウムヘパリナムや他の細菌類から単離されたヘパリンリアーゼが用いられる (40)。よく使用されている三種の放線菌由来ヘパリンリアーゼのうち二種は酵素番号を与えられている (E.C.4.2.2.7とE.C.4.2.2.8)が、一種は酵素番号なしで単一に単離・同定された。これらの酵素の特異性については広く検討されたが (29, 42-44)、依然としてその特異性、特にこれらの酵素に対して抵抗性を示す糖鎖配列については不明な点がある。これらの酵素を単独、あるいは混合してヘパラン硫酸を消化することによって、非常に大きなサイズのオリゴ糖を含む画分から、主に二糖を含む画分にまで部分分解あるいは完全分解することが可能である。これらの酵素を厳密に制御された条件下で使用すれば、分画あるいは同定を

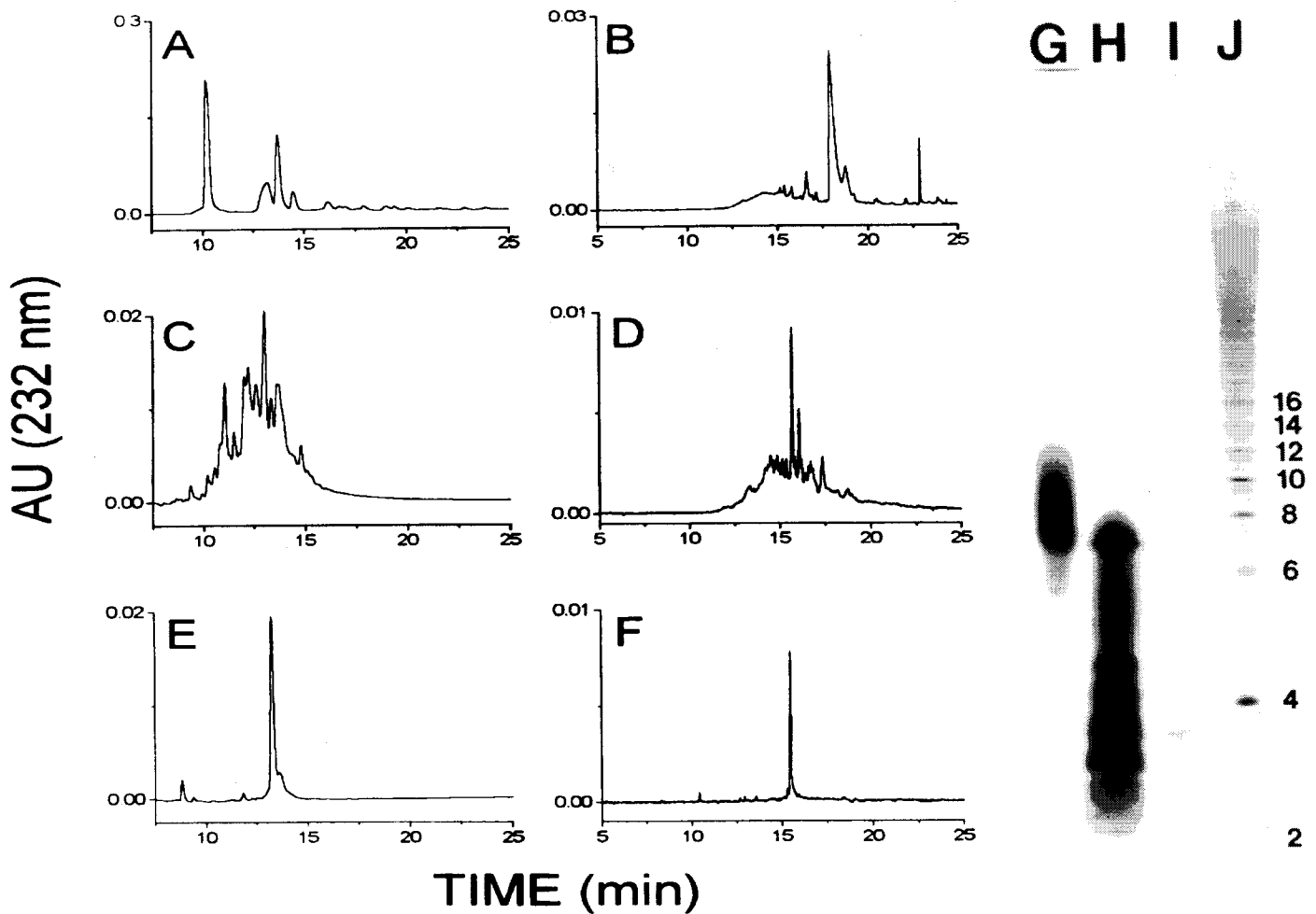


Fig. 2. Separation and analysis of heparan sulfate derived oligosaccharides. A, C and E, SAX-HPLC analysis; B, D, and F, CE analysis; G, H, I and J, Gradient PAGE analysis. Each panel shows the resulting oligosaccharide mixture (A, B and G) when heparan sulfate is treated with heparin lyase (EC 4.2.2.8), following fractionation on GPC to obtain the hexasaccharide fraction (C, D and H) and following SAX-HPLC to obtain a single heparan sulfate derived hexasaccharide (E, F and I). J is the partially digested (30%) heparin sample by heparin lyase I.

these enzymes affords reproducible oligosaccharide mixtures for fractionation and characterization.

E. Fractionation of Heparan Sulfate Oligosaccharides and Criteria of Oligosaccharide Purity

Oligosaccharide mixtures derived from heparan sulfate are, most often, first fractionated by size using GPC (Fig. 2). This relatively low resolution separation method affords mixtures of disaccharides, tetrasaccharides, etc., with partially resolved sized mixtures containing oligosaccharides up to hexadecasaccharide in size. High resolution semi-preparative SAX-HPLC with salt gradient elution (Fig. 2) is typically used next, often affording individual oligosaccharides of sufficient purity for complete structural characterization (45).

High resolution separation methods are required to assess whether an oligosaccharide is of sufficient purity for its full structural characterization. While analytical SAX-HPLC may afford a single symmetrical peak (Fig. 2), a very large oligosac-

charide mixture can be used as a starting material for the experiment. The purpose of the experiment is to reproducibly supply oligosaccharide mixtures.

E. Heparan Sulfate Oligosaccharide Fractionation and Purity Determination

Heparan sulfate derived oligosaccharides are, in many cases, first fractionated by size using GPC (Fig. 2). This method is a relatively low resolution separation method, but disaccharides, tetrasaccharides, etc., can be fractionated. Continuing with a concentration gradient elution method, semi-preparative SAX-HPLC is often used (Fig. 2), and individual oligosaccharides can be purified to a degree that allows structural analysis (45).

To assess whether an oligosaccharide is of sufficient purity for its full structural characterization, high resolution separation methods are required. While analytical SAX-HPLC may afford a single symmetrical peak (Fig. 2), a very large oligosac-

charide, of degree of polymerization (dp) >10, may still be remain impure. A second high resolution method separating, based on a different property, such as gradient PAGE is often used in conjunction with SAX-HPLC (separating by charge) to confirm purity (Fig. 2). This method has the added advantage of using a different method of detection and is able to demonstrate the presence of anionic impurities having no absorbance.

The highest resolution method currently available to assess oligosaccharide purity is CE (46). CE can be used under normal polarity conditions, where electroosmotic flow drives the separation and the most highly charged oligosaccharide migrates most slowly through the capillary. Alternatively, by using CE under reversed polarity conditions, electrophoresis controls the separation and the most highly charged oligosaccharides migrates fastest through the capillary (46). When a combination of both separation methods in an open capillary, having approximately 10^6 theoretical plates/meter, provide a single peak, there is a high level of confidence in the purity of an oligosaccharide.

F. Structural Characterization of Heparan Sulfate Oligosaccharides

Once an oligosaccharide is purified to homogeneity, it can next be structurally characterized. Modern spectroscopic methods provide the best method for such characterization, provided sufficient sample is available. Mass spectrometry (MS) is a highly sensitive technique that can be used to identify the mass (including high resolution mass) and partial sequence of oligosaccharides. Fast atom bombardment (FAB)-MS of heparan sulfate disaccharides and tetrasaccharides require <100 μg of pure sample and can afford both molecular-ion and limited sequence information (47, 48). While FAB-MS/MS can be used to obtain information on sulfate position, no data can be obtained that permits the assignment of IdoAp or GlcAp structure of the uronic acid residue (49). Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)-MS can afford molecular-ion information on extremely small amounts of sample <1 μg and also has been used to study complexes of these oligosaccharides with peptides (50). Electrospray ionization (ESI)-MS can be similarly used requiring as little as 1-10 ng of sample in complex with peptide or protein (51)(Fig.3B).

NMR spectroscopy requires substantially more oligosaccharide for analysis ranging from 10-500 μmoles for ^1H NMR to 0.5-20 mmoles for ^{13}C NMR analysis. One dimensional ^1H and ^{13}C NMR analysis are often useful to confirm both the size (dp) and purity of a heparan sulfate oligosaccharide (55). In addition to providing information on the number of saccharide residues from the integration of anomeric signals, their chemical shift also usually permits the tentative identification of each saccharide residue (56). Two dimensional (2D) chemical shift correlation spectroscopy (COSY) affords

糖の場合、不純物が残っている場合が多い。第二の原理の異なる高い分解能を持つ分離法、例えば濃度勾配 PAGE が、しばしば SAX-HPLC (電荷による分離) と組み合わせて純度検定に用いられる (図2)。この方法は検出法が SAX-HPLC と異なる利点があり、吸収を持たない陰電荷性の不純物を検出することができる。

現在利用可能なもっとも高い分解能を持つ純度検定法は CE である (46)。CE は順極性条件、すなわち電気浸透流を分離の駆動力として、高い陰性電荷を持つオリゴ糖をもっとも遅くキャピラリーから溶出する方法として用いられている。一方、逆極性条件下で CE を行うと通常の電気泳動と同様の原理で、最も高い陰性電荷を持つオリゴ糖を最も早くキャピラリーから溶出することができる (46)。理論段数約 10^6 段/m の中空キャピラリーを用いて両方の分離法を組み合わせると一本のピークが検出されれば、オリゴ糖の純度に関しては全く問題はない。

F. ヘパラン硫酸オリゴ糖の構造解析

一旦単一にまでオリゴ糖が精製できたなら、次に構造解析が行える。解析に必要な十分な量さえ得られれば、最近の分光学的な方法は構造解析を容易に行うだけの十分有効な手段となる。質量分析 (MS) は質量 (高分解能質量を含む) を測定することができる非常に高感度な方法でありまた、オリゴ糖の部分的な糖鎖配列も同定することができる。ヘパラン硫酸由来二糖、四糖の高速原子衝撃 (FAB) -MS は 100 μg 以下の試料で可能であり、分子イオンだけでなく、ある種の糖鎖配列に関する情報も提供できる (47, 48)。FAB-MS/MS 法は硫酸化位置に関する情報が得られる一方、ウロン酸残基がグルクロン酸なのかイズロン酸なのかに関しては全く情報が得られない (49)。マトリックス支援レーザー脱離 (MALDI) -MS は 1 μg 以下の微量の試料で分子イオンを検出することができるし、またオリゴ糖とペプチドの複合体に関する研究にも用いられている (50)。エレクトロスプレーイオン化 (ESI) -MS も同様に 1~10 ng 程度の超微量の試料で、オリゴ糖-ペプチド・タンパク質複合体の研究に用いることができる (51) (図3B)。

NMR 分光法はプロトン測定では 10~500 マイクロモルの濃度を、カーボン測定では 0.5~20 ミリモルの濃度を必要とし、かなりの量のオリゴ糖を必要とする。一次元 ^1H および ^{13}C NMR 分析はヘパラン硫酸オリゴ糖のサイズ (dp)、純度を確認する上で有用である (55)。構成単糖のアノメリックプロトンのシグナルを積分することによって構成単糖数がわかるばかりでなく、化学シフトの値からそれぞれの構成糖を同定することも可能である (56)。二次元 (2D) 化学結合相関分光法 (COSY) によると、

Table I. Structure of oligosaccharides prepared from heparan sulfate*.

GlcAp→GlcNpS→IdoAp2S→GlcNpS→IdoAp2S→GlcNpS→IdoAp2S→GlcNpS→IdoAp2S→GlcNpS→IdoAp2S→GlcNpS→IdoAp→GlcNpAc		
ΔUAp→GlcNpS→IdoAp2S→GlcNpS	ΔUAp2S→GlcNpS	ΔUAp→GlcNpAc→GlcAp→GlcNpAc

ΔUAp→GlcNpAc6S→IdoAp→GlcNpS→GlcAp→GlcNpAc6S		
ΔUAp→GlcNpAc6S	ΔUAp→GlcNpAc6S→GlcAp→GlcNpS	
	ΔUAp→GlcNpS→IdoAp→GlcNpAc6S	ΔUAp→GlcNpS→GlcAp→GlcNpAc6S

	ΔUAp→GlcNpH→GlcAp→GlcNpS→IdoAp→GlcNpAc	
ΔUAp→GlcNpAc6S→GlcAp→GlcNpH	ΔUAp→GlcNpS→IdoAp→GlcNpAc	
ΔUAp→GlcNpAc6S		ΔUAp→GlcNpAc→GlcAp→GlcNpS
	ΔUAp→GlcNpS→GlcAp→GlcNpAc	ΔUAp→GlcNpS→IdoAp2S→GlcNpAc6S
		ΔUAp→GlcNpS ΔUAp2S→GlcNpAc6S

*These oligosaccharides were reported by J. T. Gallagher *et al.* (ref.10) (1992), K. Sugahara *et al.* (ref. 43) (1994), S. Yamada *et al.* J. Biochem. **112**, 440-447 (1992), R.E Hileman *et al.* (ref. 45) (1997) and T. Toida *et al.* (ref. 56) (1997).

through spin network of protons within each saccharide residue leading to a conclusive assignment of the monosaccharide composition of an oligosaccharide (45, 56) (Fig. 3A). 2D nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy (NOESY) affords through space connectivity of protons, particularly across the 1→4 glycosidic linkage, defining the saccharide sequence of an oligosaccharide and hence its complete primary structure (56). ¹³C NMR and heteronuclear correlation (HETCOR) spectroscopy can help provide further structural information (57).

The solution conformation of a GAG-derived oligosaccharide can be partially deduced from examining its NMR spectral properties and correlating these three molecular modeling studies (51, 52).

G. Oligosaccharide Prepared from Heparan Sulfate

Several laboratories have prepared and structurally characterized oligosaccharides from heparan sulfate (7, 15, 45, 58). The largest of these structures is a partially characterized tetradecasaccharide (Table I) having the ability to bind and active basic fibroblast growth factor (7). While this tetradecasaccharide was prepared using nitrous acid depolymerization, the heparan sulfate oligosaccharides (Table I) that have been subjected to rigorous structural characterization have all be prepared using heparin lyases (15, 45, 58).

The alignment of the known heparan sulfate-derived oligosaccharides begins to suggest more about the high level of structural diversity in heparan sulfate. This diverse fine structure is segregated into larger structural domains that are either sulfation rich (high sulfate) or sulfation poor (low sulfate) (37). These domains ranging in size from 4.5-9.0 kDa may be joined by oligosaccharide sequences containing GlcNp with unsubstituted amino groups (15) (Table I). More effort will be required to obtain new oligosaccharide structures to extend the known structure of heparan sulfate.

共有結合を介したプロトン間のスピン結合ネットワークを知ることができ、オリゴ糖を構成する単糖の同定、硫酸化位置に関しても知ることができる (45, 46) (図3)。2D核オーバーハウザー強調・交換分光法 (NOESY) は空間的なプロトン間の距離情報、特に1→4グリコシド結合を通してオリゴ糖における糖鎖配列を明らかにすることができる (56)。¹³CNMRと異核種二次元相関分光法 (HETCOR) はさらにオリゴ糖の構造に関する情報を提供する (57)。

GAG由来オリゴ糖の溶液中におけるコンフォメーションに関しては、NMR情報を詳細に調べることにより、また最近報告した分子モデリングに関する3つの論文を参照することによって部分的に推定することができる (51, 52)。

G. ヘパラン硫酸より単離同定されたオリゴ糖

いくつかの研究グループがヘパラン硫酸由来オリゴ糖の単離・構造解析に関して報告している (7, 15, 45, 58)。これらの構造のうち最大のものは、塩基性線維芽細胞に結合し活性化する、部分的に構造が明らかになっている14糖である (7) (表I)。この14糖は亜硝酸分解法によって低分子化した画分から調製されたが、厳密な構造解析を目的に調製されたヘパラン硫酸オリゴ糖 (表I) はヘパリンリアーゼ類を用いて調製されたものである (15, 45, 58)。

明らかにされたヘパラン硫酸由来オリゴ糖の糖鎖配列をみると、ヘパラン硫酸がはるかに予想を超えた構造多様性を持つことを暗示している。これらの個々の微細構造を示すオリゴ糖断片は硫酸基に富む (高硫酸) 領域あるいは硫酸基に乏しい (低硫酸) 領域に属する大きな構造領域に分散して存在する (37)。これら4から8kDaにおよぶそれぞれの領域は、未置換のアミノ基を持つグルコサミン残基によって結ばれているかもしれない (15) (表I)。ヘパラン硫酸の構造についてさらに明らかにするためには、新しい構造を持ったオリゴ糖をさらに探求しなければならない。

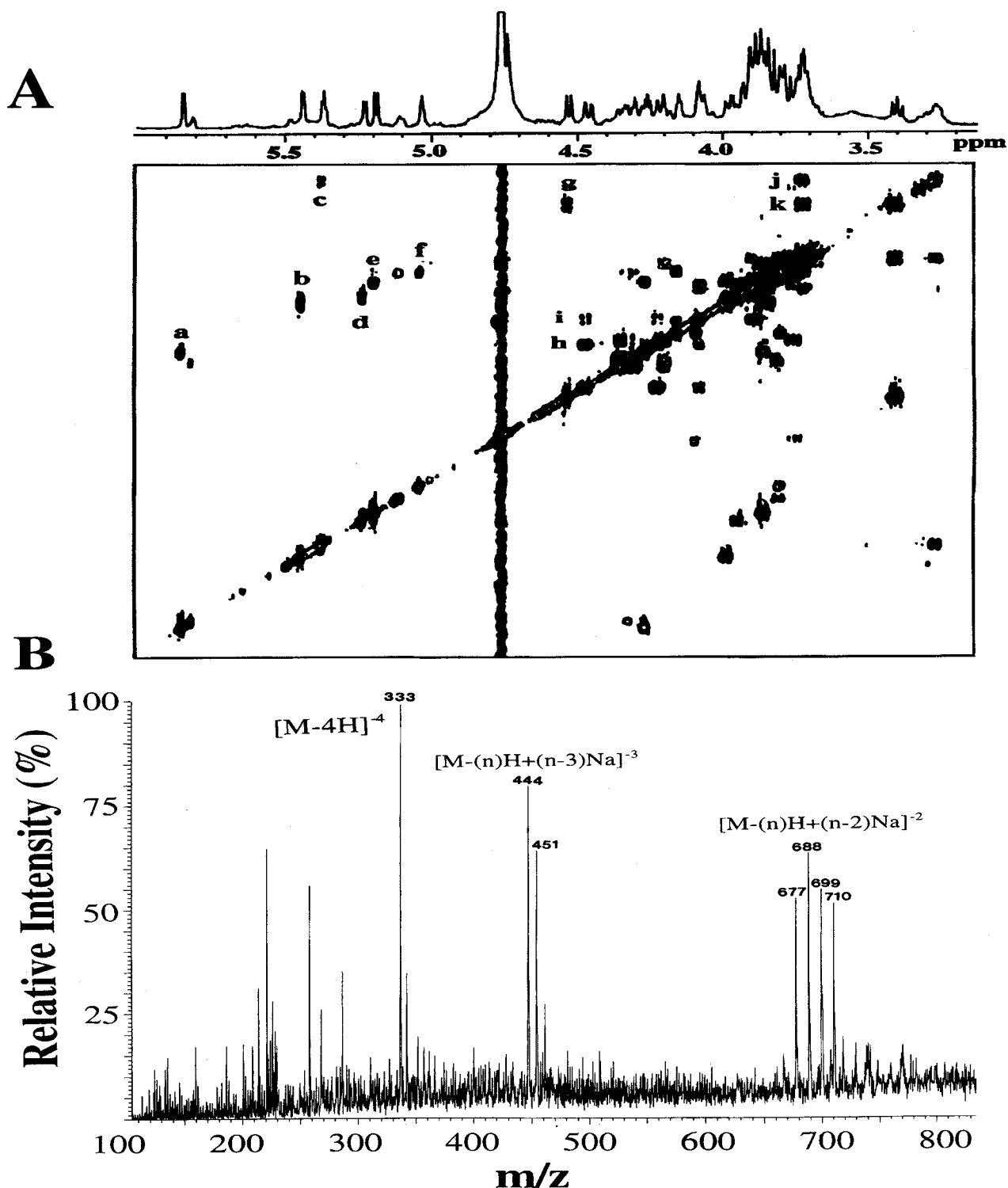


Fig. 3 The spectroscopic analysis of the heparan sulfate hexasaccharide prepared in Fig. 2.

A. 2D-¹H DQF-COSY spectrum of the hexasaccharide. Cross peaks: a, ΔUAp H-3/H-4; b, GlcNpAc6S H-1/H-2; c, GlcNpS H-1/H-2; d, GlcNpAc6S a (reducing terminal) H-1/H-2; e, ΔUAp H-1/H-2; f, IdoAp H-1/H-2; g, GlcAp H-1/H-2; h, GlcNpAc6S H-6a/H-6b; i, GlcNpAc6S H-6a/H-5; j, GlcNpS H-2/H-3; k, GlcAp H-2/H-3.

B. Electrospray mass spectra of the hexasaccharide. The calculated mass of the tetrasaccharide ($C_{40}H_{55}O_{41}N_3S_3Na_2$) is 1467. Three clusters of peaks are observed in the spectrum. Doubly charged ions afford peaks between m/z 677 and 710 corresponding to $[M-(n)H+(n-2)Na]^{-2}$ where $n = 3$ to 6. Triply charged ions affording peaks at m/z 444 and 451 corresponding to $[M-(n)H+(n-3)Na]^{-3}$ where $n = 3$ and 4. Quadruply charged ion affording a peak at m/z 333 corresponding to $[M-4H]^{-4}$. Negative ion mass spectrum was obtained on a Micromass, Inc. (England) Autospec fitted with an electrospray interface. Samples were initially dissolved in 1:1 water/acetonitrile and delivered in 1:1 water/acetonitrile with 0.05% NH_4OH mobile phase at 10 μ l/min. N_2 was used both as bath and nebulizer gas and the electrospray ion source was at 80°C and the spray needle was held at 7.7 kV. Tetraethylammonium iodide in acetonitrile was used as the calibrant.

H. Future Prospects

Future structural studies on heparan sulfate oligosaccharides will probably focus on two major areas, conformational analysis and the structure of biologically active oligosaccharides in complex with proteins.

While substantial progress has been made using NMR to analyze the solution conformation of GAG-derived oligosaccharides, other spectral methods need to be developed in this pursuit. To date, no GAG-derived oligosaccharide has been crystallized in its free, unbound form and subjected to high resolution x-ray analysis. Recently, a heparin-derived tetrasaccharide and hexasaccharide complexed with basic fibroblast growth factor have been successfully analyzed by high resolution x-ray crystallography (53). This analysis has provided the first parameters required for successful molecular modeling studies.

A second focus of attention has been on the interaction of heparan sulfate with proteins (21). It is in their complexed form that heparan sulfate oligosaccharides exhibit their biological activity. The structural study of these complexes is just beginning. Initial studies have focused on complex stability (association constant) as well as the region within the protein that interacts with the oligosaccharide and the portion of the oligosaccharide that interacts with the protein (21). Initial studies are underway to use NMR spectroscopy, especially NOESY experiments (54) to study such complexes to provide detailed information on the sites of contact between the two species. Such NMR studies in combination with MS studies (50, 51a) and x-ray crystallography (53) on complexes, combined with the use of molecular modeling on a new generation of sophisticated and powerful computers, should yield significant new breakthroughs on our understanding of the structure of heparan sulfate.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. Ronald E. Hileman and Youmie Park for preparing the ESI MS spectrum. This research was funded in part by the National Institutes of Health GM 38060 and HL 52622 (R.J.L.), and by the Nakatomi Foundation 1997 and Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan 09672185 (TT).

References

1. Gallagher, J.T., Turnbull, J.E., and Lyon, M. (1990) *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 207-209
2. David, G. (1993) *FASEB J.* **7**, 1023-1030
3. Nader, H.B., and Dietrich, C.P. (1989) in *Heparin, Chemical and Biochemical Properties, Clinical Applications* (Lane, D.A., and Lindahl, U. eds.) pp. 81-96, London, Edward Arnold
4. Marcum, J.A., and Rosenberg, R.D. (1984) *Biochemistry* **23**, 1730-1737
5. Walker, A., and Gallagher, J.T. (1996) *Biochem. J.* **317**, 871-877
6. Wright, Jr., T.C., Castellot, J.J., Diamond, J.R., and Karnovsky, M.J. (1989) in *Heparin, Chemical and Biological Properties, Clinical Appli-*

H. 今後の展望

これからのヘパラン硫酸由来オリゴ糖の構造研究は、オリゴ糖の立体構造に関する研究と生理的にある種の活性を持つオリゴ糖のタンパク複合体としての構造研究に焦点が絞られるに違いない。

NMRを用いたGAG由来オリゴ糖の溶液中におけるコンフォメーションに関する研究は着実にその歩みを進める一方で、さらにこの分野における研究を進展させるためには新しい分光法を開発する必要がある。今日まで、いかなるGAG由来オリゴ糖も単独で結晶化されたことはなく、X線構造回折データは得られていない。最近、ヘパリン由来の4糖、6糖と塩基性線維芽細胞増殖因子との複合体に関する、X線構造回折測定に成功した(53)。この方法は分子モデリングに必要な一次パラメータを提供することができた。

次の関心はヘパラン硫酸とタンパク質の相互作用に焦点が絞られている(21)。これはヘパラン硫酸由来オリゴ糖が生物活性を示すタンパク質との複合体における相互作用を示している。これら複合体の構造に関する研究は、今その緒についたばかりである。最初の実験はタンパク質のオリゴ糖に対する結合部位、およびタンパク質に結合するオリゴ糖の糖鎖配列とともに、複合体の安定性(結合定数)に関して焦点が絞られた(21)。この研究は最初NMRを用いて二分子間の接点に関する情報を得るべく開始された(54)。複合体の質量分析(50, 51a)、X線結晶構造解析(53)や強力なコンピューターを駆使した分子モデリングの助けを借りて、このようなNMRによる研究はいつしかヘパラン硫酸の構造に関する我々の理解を飛躍的に向上させるに違いない。

千葉大学薬学部 戸井田 敏彦 訳

- cations (Lane, D.A., and Lindahl, U. eds.) pp. 295–316, London, Edward Arnold
7. Walker, A., Turnbull, J.E., and Gallagher, J.T. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 931–935
 8. McKeehan, W.L., and Kan, M. (1994) *Mol. Reprod. Dev.* **39**, 69–81
 9. Linhardt, R.J., and Toida, T. (1997) in *Carbohydrates as Drugs* (Witczak, Z.B., and Nieforth, K.A. eds.) pp. 277–341, New York, Marcel Dekker
 10. Gallagher, J.T., Turnbull, J.E., and Lyon, M. (1992) *Int. J. Biochem.* **24**, 553–560
 11. Gallagher, J.T., Lyon, M., and Steward, W.P. (1986) *Biochem. J.* **236**, 313–325
 12. Lindahl, U., Lidholt, K., Spillmann, D., and Kjellén, L. (1994) *Thromb. Res.* **75**, 1–32
 13. Griffin, C.C., Linhardt, R.J., Van Gorp, C.L., Toida, T., Hileman, R.E., Schubert, R.L., and Brown, S.E. (1995) *Carbohydr. Res.* **276**, 183–197
 14. Gallagher, J.T. (1987) *Nature (London)* **326**, 136
 15. Toida, T., Yoshida, H., Toyoda, H., Koshiishi, I., Imanari, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., and Linhardt, R.J. (1997) *Biochem. J.* **322**, 499–506
 16. Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., and Marks, R.M. (1997) *Nature Medicine* **3**, 866–872
 17. Mathews, M. B., and Cifonelli, J. A. (1977) NIAMD Contract No., p. N01-AM-5-2205
 18. Liberti, P.A., and Stivala, S.S. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **119**, 510–518
 19. Toida, T., Shima, M., Azumaya, S., Maruyama, T., Toyoda, H., Imanari, T., and Linhardt, R.J. (1997) *J. Chromatogr.* (in press)
 20. Edens, R.E., Al-Hakim, A., Weiler, J.M., Rethwisch, D.G., Fareed, J., and Linhardt, R.J. (1992) *J. Pharm. Sci.* **81**, 823–827
 21. Hileman, R.E., Fromm, J.R., Weiler, J.M., and Linhardt, R.J. (1997) *BioEssays* (in press)
 22. Nelson, R.M., Venot, A., Bevilacqua, M.P., Linhardt, R.J., and Stamenkovic, I. (1995) *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 601–631
 23. Herndon, M.E., and Lander, A.D. (1997) in *A Laboratory Guide to Glycoconjugate Analysis* (Jackson, P., and Gallagher, J.T. eds.) pp. 379–398, Burkäuser
 24. Edens, R.E., Fromm, J.R., Fromm, S.J., Linhardt, R.J., and Weiler, J.M. (1995) *Biochemistry* **34**, 2400–2407
 25. Mach, H., Volkin, D.B., Burke, C.J., Middaugh, C.R., Linhardt, R.J., Fromm, J.R., Loganathan, D., and Mattsson, L. (1993) *Biochemistry* **32**, 5480–5489
 26. Thompson, L.D., Pantoliano, M.W., and Springer, B.A. (1994) *Biochemistry* **33**, 3831–3840
 27. Conrad, H.E. (1992) in *Current Protocols in Molecular Biology* (Varki, A. ed.) pp. 17.13.17 – 17.13.32, Boston, Wiley Interscience
 28. Toida, T., Qiu, G., Matsunaga, T., Sagehashi, Y., and Imanari, T. (1992) *Anal. Sci.* **8**, 799–804
 29. Linhardt, R.J. (1992) in *Current Protocols in Molecular Biology* (Varki, A. ed.) pp. 17.13.17 – 17.13.32, Boston, Wiley Interscience
 30. Linhardt, R.J., Toida, T., Smith, A.E., and Hileman, R.E. (1997) in *A Laboratory Guide to Glycoconjugate Analysis* (Jackson, P., and Gallagher, J.T. eds.) pp. 183–197, Burkäuser
 31. Imanari, T., Toida, T., Koshiishi, I., and Toyoda, H. (1996) *J. Chromatogr.* **720**, 275–293
 32. Longas, M.O., and Breitweiser, K.O. (1991) *Anal. Biochem.* **192**, 193–196
 33. Liu, J., Desai, U.R., Han, X.J., Toida, T., and Linhardt, R.J. (1995) *Glycobiology* **5**, 765–774
 34. Cheng, F., Yoshida, K., Heinegård, D., and Fransson, L.Å. (1992) *Glycobiology* **2**, 553–561
 35. Lyon, M., Deakin, J.A., Mizuno, K., Nakamura, T., Gallagher, J.T. (1992) *J. Biol. Chem.* **269**, 11216–11223
 36. Cohen, D.M., and Linhardt, R.J. (1990) *Biopolymers* **30**, 733–741
 37. Gallagher, J.T. (1995) *Adv. Exp. Med. & Biol.* **376**, 125–134
 38. Pervin, A., Gallo, C., Jandik, K.A., Han, X.J., Linhardt, R.J. (1995) *Glycobiology* **5**, 83–95
 39. Lyon, M. (1997) in *A laboratory Guide to Glycoconjugate Analysis* (Jackson, P., and Gallagher, J.T. eds.) pp. 61–76, Birkhäuser
 40. Linhardt, R.J., Galliher, P.M., and Cooney, C.L. (1986) *Appl. Biochem. Biotechnol.* **12**, 135–176
 41. Lohse, D.L., and Linhardt, R.J. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 24342–24355
 42. Desai, U.R., Wang, H., and Linhardt, R.J. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **306**, 461–468
 43. Sugahara, K., Tohno-oka, R., Yamada, S., Khoo, K.H., Morris, H.R., and Dell, A. (1994) *Glycobiology* **4**, 535–544
 44. Yamada, S., Murakami, T., Tsuda, H., Yoshida, K., and Sugahara, K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 8696–8705
 45. Hileman, R.E., Smith, A.E., Toida, T., and Linhardt, R.J. (1997) *Glycobiology* **7**, 231–239
 46. Linhardt, R.J., and Pervin, A. (1996) *J. Chromatogr. A.* **720**, 323–335
 47. Mallis, L.M., Wang, H.M., Loganathan, D., and Linhardt, R.J. (1989) *Anal. Chem.* **61**, 1453–1458
 48. Linhardt, R.J., Wang, H.M., Loganathan, D., Lamb, D.J., and Mallis, L.M. (1992) *Carbohydr. Res.* **225**, 137–145
 49. Lamb, D.J., Wang, H.M., Mallis, L.M., and Linhardt, R.J. (1992) *J. Am. Mass Spectrom.* **3**, 797–803
 50. Rhombert, A.J., and Bicman, K. (1997) in *A Laboratory Guide to Glycoconjugate Analysis* (Jackson, P., and Gallagher, J.T. eds.) Burkäuser, pp. 183–197
 - 51a. Siegel, M.M., Tabei, K., Kagan, M.Z., Vlahov, I.R., Hileman, R.E., Linhardt, R.J. (1997) *J. Mass Spectrom.* **32**, 760–772
 - 51b. Mikhailov, D., Mayo, K.H., Vlahov, I.R., Toida, T., Pervin, A., and Linhardt, R.J. (1996) *Biochem. J.* **318**, 93–102
 52. Mikhailov, D., Pervin, A., Linhardt, R.J., and Mayo, K.H. (1997) *Biochem. J.* (in press)
 53. Faham, S., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Linhardt, R.J., and Rees, D.C. (1996) *Science* **271**, 1116–1120
 54. Mikhailov, D., Mayo, K.H., Pervin, A., and Linhardt, R.J. (1996) *Biochem. J.* **315**, 447–454
 55. Desai, U.R., and Linhardt, R.J. (1995) *J. Pharm. Sci.* **84**, 212–215
 56. Toida, T., Hileman, R.E., Smith, A.E., Vlahova, P.I., and Linhardt, R.J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32040–32047
 57. Wang, H. M., Loganathan, D., and Linhardt, R. J., (1991) *Biochem. J.* **278**, 689–695
 58. Sugahara, K., Tohno-oka, R., Yamada, S., Khoo, K.H., Morris, M.R., and Dell, A. (1994) *Glycobiology* **4**, 535–544

Received on October 25, 1997, accepted on November 5, 1997

