A New Analytical Method for Oligosaccharides and Glycoconjugates Using Post-Source Decay Fragmentation by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

MALDI-TOF質量分析による新しい糖鎖構造解析法：
ポストソースディケイ・フラグメント法による解析

Yamagaki, Tohru

National Institute of Bioscience and Human Technology, AIST,
1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan,
FAX: 81 298-54-6135, E-mail: yamagaki@nibh.go.jp

*Department of Molecular Biology, Saitama University,
Urawa, Saitama 338-8570, Japan

Key Words : *Structural analysis, Positional isomers, MALDI-TOFMS, Mass spectrometry, PSD fragmentation*

Abstract

Structural analyses of oligosaccharides and glycoconjugates were performed by a new technique using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS). The sequential fragment ions of oligosaccharides were observed in the post-source decay (PSD) fragment spectra of MALDI-TOFMS. The relative ion intensity analyses of these MALDI-PSD fragment ions enable us to distinguish the structural isomers and to perform the linkage analysis. This technique is a powerful tool for fine structural analysis of oligosaccharides and glycoconjugates.

要 約

MALDI-TOF 質量分析法を用いた新しい糖鎖構造解析法の確立を試みた。MS/MS様のフラグメントイオンが得られるMALDI-MS ポストソースディケイ (PSD) フラグメント法では主にグリコシド結合の切断によりフラグメントイオンが生成する。これらフラグメントイオンのイオン強度を詳細に議論することで構造異性体の区別や結合様式の特정이可能であった。MALDI-PSD フラグメント法は極微量での測定も可能であるため、今後糖鎖生物学などの分野でも幅広く応用されることが期待できる。

A. Introduction

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) consists of the ionization method of MALDI and the mass spectrometer by which time-of-flight of the ion is measured. It was thought that MALDI-TOFMS (1,2) could be suited for the analysis of biomolecules as well as electrospray ionization (ESI) MS. This method has been mainly used to analyze proteins and peptides. There were few cases of the analysis of oligosaccharides (3-7). In this study, we tried to establish a new analytical method of oligosaccharides and glycoconjugates using MALDI-TOF mass spectrometry.

B. MALDI-PSD Fragment Analysis

The post-source decay (PSD) fragment analysis like MS/MS measurement can also be performed by a MALDI-TOFMS instrument with the reflector [MALDI-PSD fragment method (7,8)]. In the MALDI-PSD fragmentation of neutral oligosaccharides, mainly glycosidic linkages cleave and the sequential

A. はじめに

質量分析法による不揮発性の生体物質の解析は、近年エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法やマトリクス支援レーザー脱離型イオン化 (MALDI) 法などのイオン化法の出現により飛躍的に発展した。特に MALDI 法と飛行時間型質量分析計 (TOFMS) を組み合わせた MALDI-TOFMS (1、2) は、従来タンパク質などで広く応用されてきたが、糖鎖への応用は少なかった(3-7)。そこで本研究ではこの MALDI-TOFMS を用いた新しい糖鎖構造解析法について詳細に研究した。

B. MALDI-PSD フラグメント法

リフレクターを備えたTOF-MSでは分子イオンを親イオンとしたポストソースディケイ (PSD) フラグメントイオンを観測し、MS/MS様フラグメントイオン解析も可能である(MALDI-PSD フラグメント法(7、8))。この手法によるオリゴ糖鎖の解析では、主にグリコシド結合の切断によりフラグメントイオンが生成するの

*Former address.

analysis of sugar chains can be performed. In the case of the analyses of xyloglucan oligosaccharides, the MALDI-PSD fragment ions produced both from the reducing and non-reducing ends (Y type and B type fragment ions (9)) were observed simultaneously. The fragment ions produced by multi cleavage of glycosidic linkage were also observed (10–12). These points differ from FAB-MS spectra (13–16).

In our study, fine structural analyses of oligosaccharides were achieved by the relative ion intensity analysis of MALDI-PSD fragmentation. All mass spectra were measured by a MALDI-TOFMS using a curved-field reflector which enables the simultaneous detection of the precursor ion and all fragment ions (17). Here, the structural analyses of cyclodextrin derivatives are shown. The sugar branched cyclodextrin derivatives were analyzed by the FAB-MS spectra in which the fragment ions were produced only from the branch (18–21). We carried total and fine structural analysis of the branched cyclodextrin derivatives by a new technique of MALDI-PSD fragmentation method.

C. Structural Analyses of Sugar Branched Cyclodextrin Derivatives by MALDI-PSD Fragmentation Method

Difference between Cyclodextrin and Branch Part, and between Structural Isomers

The sugar branched cyclodextrin (CD) derivatives of γ -CD, G1,G1- α CD, G2- α CD (Fig. 1) consist of eight α -D-glucopyranoses, which have the same molecular weight. These structural isomers were distinguished by the MALDI-PSD frag-

で、糖鎖の配列解析に用いられる。植物細胞壁キシログルカン・オリゴ糖鎖の分析では還元末端側、非還元末端側の両側からのフラグメントイオン(Y-type, B-type フラグメントイオン(9))が同時に観測され、複数のグリコシド結合が同時に切断されて生じるフラグメントイオンも観測可能であった(10–12)。これらの点は従来用いられていたFAB-MS法による解析(13–16)と異なる利点である。

本研究の特徴、新しい点はこれらPSDフラグメントイオンの相対イオン強度を詳細に議論し、より詳しい糖鎖構造の解析を試みた点である。フラグメントイオンの相対強度を詳細に議論するために全てのイオンを同時に検出できるリフレクターを用いた(17)。ここではシクロデキストリン(CD)糖鎖誘導体の解析例を示す。これらの化合物のFAB-MS法による解析では分岐部分のみからフラグメントイオンが生成する(18–21)。ここでは分岐CD誘導体の分岐部分、CD部分両方を含めた構造解析をMALDI-PSDフラグメント法によって行った結果について述べる。

C. MALDI-PSD フラグメント法による分岐シクロデキストリン誘導体の構造解析

環状構造と分岐構造の区別、および構造異性体の区別

第1図に示す3種類のCDおよびその誘導体 γ CD, マルトシル- α CD (G2- α CD), ジグリコシル- α CD (G1,G1- α CD) はそれぞれ全く同じ分子量を持ち、全て α -D-グルコピラノース8残基から構成されており、それぞれを区別することは困難であるが、MALDI-PSD フラグメント法によってそれぞれを明瞭に区別することが

Fig.1. Structure of sugar branched cyclodextrin derivatives.

Fig. 2. MALDI-PSD fragment spectrum of G2-αCD.

mentation method (22–24).

In the PSD-fragment spectrum of G2-αCD with maltosyl-branch (Fig. 2), the fragment ions [M-G1]⁺ and [M-G2]⁺ have higher intensities than [M-G3, G4, G5]⁺ ions with lower intensities. The numbers of higher fragment ions were the same to those of branched sugar residues (G2). Thus, it was assumed that the higher fragment ions were produced from the branch part mainly, and that the lower fragment ions [M-G3, G4, G5]⁺ were produced from the cyclodextrin part. The fragment ions from the branch part require one-site cleavage in G2-αCD as shown in Fig. 3, which have much higher intensity. The fragment ions from the cyclodextrin part require two-site cleavage, which have lower intensities. Thus, the one-site cleavage fragment ions have much higher intensities than the two-site cleavage ions in MALDI-PSD fragmentation. These results strongly indicate that MALDI-PSD fragment spectrum reflect the fine

できた(22–24)。

分岐構造を持つマルトシル-αCD (G2-αCD)では、[M-G1]⁺、[M-G2]⁺ イオンの強度がより高く、フラグメントイオン [M-G3]⁺、[M-G4]⁺ および [M-G5]⁺ の強度はより低く観測される(第2図)。強度の高いフラグメントイオン([M-G1]⁺、[M-G2]⁺)の数は直鎖の分岐糖鎖の数(G2)に一致することから、強度の高い[M-G1]⁺、[M-G2]⁺ イオンは分岐マルトシル(G2)より生じ、より強度の低い [M-G3, -G4, -G5]⁺ イオンは環状のシクロデキストリン(αCD)部分から生じていると推論できる(第3図)。G2-αCDでは分岐構造部分からはグリコシド結合1カ所切断によってフラグメントイオンが生じるが、環状構造(CD)部分では、フラグメントイオン生成に2カ所のグリコシド結合切断が必要である。すなわち MALDI-PSD フラグメント解析では、グリコシド結合1カ所切断で生成するイオンは2カ所切断の必要なフラグメントイオンよりもイオン強度が高く観測される事が分かった。これらの結果から、MALDI-PSD フラグメント・スペクトルはオリゴ

Fig.3. Schema of the fragmentation of G2-αCD.

Fig.4. Structure of maltotriosyl-αCD and panosyl-αCD.

structure of oligosaccharides. Three isomers of cyclodextrin derivatives were distinguished clearly by this method. The branch structures of oligosaccharides can be analyzed by this MALDI-PSD fragmentation method (22–27).

D. Linkage Analysis

Next, linkage analyses of oligosaccharides are performed by this MALDI-PSD fragmentation method. Maltotriosyl-αCD and panosyl-αCD differ only at the glycosidic linkages on the non-reducing end of the branch (Fig. 4). Maltotriosyl part is Glcα1-4Glcα1-4Glcα1-6-CD, and panosyl part is Glcα1-6Glcα1-4Glcα1-6-CD. Comparing their PSD fragment spectra, the relative intensity of the [M-G1]⁺ of maltotriosyl-αCD is much higher than that of panosyl-αCD. These results strongly indicate that the glycosidic linkage of α1-4 cleaves much more easily than that of α1-6 in MALDI-PSD fragmentation, which were consistent with those of pullulan (28).

The other glycosidic linkages have been analyzed by this MALDI-PSD fragmentation method. In the studies of xyloglucan oligosaccharides, it was revealed that the glycosidic linkage of α1-6 cleaves much more easily than that of β1-4 linkage (29). MALDI-PSD fragmentation method is also useful for the structural analysis of glycoconjugates such as sialyl oligosaccharides and the structural isomers of lactotetraoses (30–32).

糖鎖の詳細な構造をよく反映していることがわかる。先に第1図に示した3種の糖鎖構造異性体もこの手法で明瞭に区別することができ、MALDI-PSD法が分岐構造の解析に有用な手法であることが解る(22–27)。

D. 結合様式の解析

さらに、MALDI-PSDフラグメント法によってグリコシド結合の結合様式の解析を試みた。マルトトリオシル-αCD (Glcα1-4Glcα1-4Glcα1-6-αCD)とパノシル-αCD (Glcα1-6Glcα1-4Glcα1-6-αCD)とは、分岐部分オリゴ3糖の非還元末端残基の結合様式のみが異なる置換位置異性体糖鎖である(第4図)。それぞれのPSDフラグメントスペクトルを解析するとマルトトリオシル-αCDの[M-G1]⁺イオンはパノシル-αCDのものよりも相対的にイオン強度が高く観測された。このことはMALDI-PSDフラグメント法において、α1-4結合の方がα1-6結合よりも切断されやすい事を示している。さらに他の糖鎖化合物プルランについて検討し、上述の規則が一般性の高い事が分かった(28)。

さらに他のグリコシド結合についても種々の糖鎖化合物を解析し、MALDI-PSDフラグメンテーションでのグリコシド結合の切断されやすさについて解析を行った。キシログルカン糖鎖の解析ではα1-6結合とβ1-4結合の違いを解析し、α1-6結合の方がβ1-4結合よりも切断されやすいという結果を得た(29)。また、複合糖質の解析においてもこのMALDI-PSDフラグメント法は有用であった。例えば結合位置のことなる構造異性体ラクトテトラオース類の区別やシアル酸を含む糖鎖の解析が可能で

Since mass spectrometry is a femto or atto mole level analytical method and never requires any derivatization such as permethylation, the MALDI-PSD fragmentation method is very useful for the fine structure analysis of glycoconjugates and oligosaccharides.

E. Conclusion

The new technique of post-source decay (PSD) fragmentation analysis by MALDI-TOF mass spectrometry, in which the relative intensities of the sequential fragment ions are examined, enables determination of linkage types and distinction of structural isomers in oligosaccharides. The MALDI-PSD fragmentation method is a very powerful tool in the analysis of glycoconjugates and for glycobiology.

Acknowledgements

The author is grateful to Assoc. Prof. Maeda, Masaakira (Saitama Univ., Japan), Prof. Nakanishi, Hiroshi (National Institute of Bioscience & Human-Technology, Japan), and Prof. Yoshioka, Michikazu (Saitama Univ., Japan) for many helpful discussions and suggestions throughout the course of this work. Thanks to Dr. Kawabata, Shin-ichiro (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) for his technical advice, and to Assoc. Prof. Tsumuraya, Yoichi (Saitama Univ., Japan) for his helpful advices on the preparation of this manuscript.

References

1. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, S., and Yoshida, T., (1988) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2**, 151-153
2. Karas, M., and Hillenkamp, F., (1988) *Anal. Chem.*, **60**, 2299-2301
3. Mock, K. K., Davey, M. And Cottrell, J. S., (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **177**, 644-651
4. Stahl, B., Strupat, M., Karas, M., and Hillenkamp, F., (1991) *Anal. Chem.*, **63**, 1463-1466
5. Harvey, D. J., (1993) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **7**, 614-619
6. Yamagaki, T., Maeda, M., Kanazawa, K., Ishizuka, Y., and Nakanishi, H., (1996) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1222-1228
7. Kaufmann, R., (1995) *J. Biotechnol.*, **41**, 155-175.
8. Kaufmann, R., Kirsch, D., and Spengler, B., (1994) *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process*, **131**, 355-385
9. Domon, B., and Costello, C. E., (1988) *Glycoconjugate J.*, **5**, 397-409
10. Yamagaki, T., Mitsuishi, Y., and Nakanishi, H., (1997) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1411-1414
11. Yamagaki, T., Mitsuishi, Y., and Nakanishi, H., (1998) *Chem. Lett.*, **1998**, 57-58
12. Yamagaki, T., Mitsuishi, Y., and Nakanishi, H., (1997) *Glycoconjugate J.*, **14**, s110
13. York, W. S., Halbeek, H., Darvill, A. G., and Albersheim, P., (1990) *Carbohydr. Res.*, **200**, 9-31
14. Kiefer, L. L., York, W. S., Albersheim, P., and Darvill, A. G., (1990) *Carbohydr. Res.*, **197**, 139-158
15. Hisamatsu, M., York, W. S., Darvill, A. G., and Albersheim, P., (1992) *Carbohydr. Res.*, **227**, 45-71
16. York, W. S., Harvey, L. K., Guillen, R., Albersheim, P., and Darvill, A. G., (1993) *Carbohydr. Res.*, **248**, 285-301
17. Cornish, T. J., and Cotter, R. J., (1994) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 781-785
18. Koizumi, K., Tanimoto, T., Okada, Y., Nakanishi, N., and Kato, N., (1991) *Carbohydr. Res.*, **215**, 127-136
19. Koizumi, K., Tanimoto, T., Fujita, K., Hara, K., Kuwahara, N., and Kitahata, S., (1993) *Carbohydr. Res.*, **238**, 75-91
20. Koizumi, K., Tanimoto, T., Okada, Y., Hara, K., T., Fujita, Hashimoto, H., Kitahata, S., (1995) *Carbohydr. Res.*, **278**, 129-142
21. Koizumi, K., Tanimoto, T., Okada, Y., Takeyama, S., Hamayasu, K., Hashimoto, H., Kitahata, S., (1998) *Carbohydr. Res.*, **314**, 115-125
22. Yamagaki, T., Ishizuka, Y., Kawabata, S., and Nakanishi, H., (1996) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1887-1890
23. Yamagaki, T., Ishizuka, Y., Kanazawa, K., and Nakanishi, H., (1998) *Proceeding of 8th Int. Symposium on Cyclodextrins*, Santiago de Compostela, Kluwer Academic Publishers., in press.
24. Yamagaki, T., Bunseki Kagaku, in press.
25. Yamagaki, T., Mitsuishi, Y., and Nakanishi, H., (1998) *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4051-4054
26. Yamagaki, T., and Nakanishi, H., (1998) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 1069-1074
27. Yamagaki, T., Mitsuishi, Y., and Nakanishi, H., (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2470-2475
28. Yamagaki, T., Ishizuka, Y., Kawabata, S., and Nakanishi, H., (1997) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 527-531

あった(30-32)。以上より糖鎖構造解析に関して結合様式の解析、構造異性体の区別などを含む非常に詳細な解析をこのMALDI-PSDフラグメンテーション法で行うことが可能であり、複雑な誘導化などを必要としない糖鎖の新しい結合様式解析法が確立できると考えている。

E. まとめ

MALDI-TOF 質量分析による新しい糖鎖構造解析法に於いて、グリコシド結合の切断によって生じるシーケンシャルな PSD フラグメントイオンのイオン強度を詳細に議論することで、糖鎖の配列情報だけでなく結合様式の決定や構造異性体間の区別などが可能であった。この手法は複合糖質も解析できるため、生体内の微量な活性糖鎖の解析に有用な手法であると考えられ、近年研究の進むグリコバイオロジーの分野でも幅広い応用が考えられる。

謝 辞

本研究は埼玉大学理学部分子生物学科生体物質研究室および通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所生体物質部生体物質化学研究室で行われたものであり、その間終始ご指導ご鞭撻を賜りました埼玉大学理学部助教授 前田昌徹先生および生命工学工業技術研究所生体物質部総括研究室長、東京理科大学基礎工学部教授 中西洋志先生に深甚の謝意を表します。また主指導教官としてご指導くださいました埼玉大学理学部教授 吉岡道和先生、研究の技術的な面でご指導いただきました島津製作所 川畑慎一郎先生、さらに本稿執筆の機会を与えてくださいました埼玉大学理学部助教授 円谷陽一先生に深謝いたします。

29. Yamagaki, T., Mitsuishi, Y., and Nakanishi, H., (1998) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 307-311.
30. Nakanishi, H., and Yamagaki, T., (1999) *Glycoconjugate J.*, **16**, S111 (Abstracts of XVth Int. Symposium on Glycoconjugates, Tokyo, Japan)
31. Yamagaki, T., and Nakanishi, H., (1999) *Glycoconjugate J.*, **16**, S111 (Abstracts of XVth Int. Symposium on Glycoconjugates, Tokyo, Japan)
32. Yamagaki, T., and Nakanishi, H., (1999) *Glycoconjugate J.* (in press)

Profile of the Author

Tohru Yamagaki

He graduated with a degree in Biochemistry from Saitama University, Japan (1994), and continued for a Ph.D. belonging to the laboratory of Associate Prof. Masaakira Maeda

in Saitama University. He moved to the Biomolecular Chemistry Lab. of Prof. Hiroshi Nakanishi in the National Institute of Bioscience &

Human-Technology (1994-1999), and got his Ph.D. in Molecular Biology (1999). Subsequently he was a Postdoctoral Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science (Gakushin) in the Science University of Tokyo. He is studying glyco-receptors of the influenza virus and receptor-virus interaction by spectroscopic methods such as mass spectrometry. Presently, he is an Assistant Professor of Chemistry at the University of Tokyo. When he is not working he enjoys jogging or swimming. In winter, he enjoys skiing and snowboarding at Mt. Aizu-Bandai near his hometown in Fukushima.