TECHNICAL NOTE (TIGG-09/02/90-TN-1)

Simple Method for Obtaining Intact Oligosaccharides
from Glycosphingolipids by Endoglycoceramidase

Makoto Ito

Laboratory of Glycoconjugate Research,
Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences,
11, Minamiooya, Machida-shi, Tokyo 194, Japan, FAX: 81-427-29-1252

Although ozonolysis and periodate oxidations have been conducted to obtain intact oligosaccharides from glycosphingolipids, these methods are not suitable for preparing oligosaccharides from small sample quantities and they require much time. This paper presents a simple and reproducible method for obtaining with high recovery and reproducibly intact oligosaccharides from glycosphingolipids by using endoglycoceramidase (EGCase)[1-3].

EGCase is the enzyme which cleaves the linkage between the oligosaccharide and ceramides of various glycosphingolipids and its specificity is shown in Table 1. Two major molecular species of EGCase (EGCase I, II) differing in specificity have been isolated from the culture fluid of *Rhodococcus* sp. and were found capable of hydrolyzing the glucosylceramide linkages of the ganglio, lacto, and globo-type glycosphingolipids to afford intact oligosaccharides and ceramides. Globo-type glycosphingolipids were strongly resistant to hydrolysis by EGCase II compared to EGCase I. Neither could hydrolyze cerebrosides or sulfatides. The commercial preparation of EGCase (Genzyme Co., Boston, U.S.A.) is a mixture of EGCase I and II.

Glycosphingolipids were dissolved in 10 mM sodium acetate buffer pH 5.0 containing 0.4% (W/V) of Triton X-100 at the concentration of 1 mM and subjected to sonic-treatment for 1 min.

When difficult to dissolve the sample should be heated. As a standard condition, a reaction mixture was used containing 50 n mol of various glycosphingolipids, 10 μ g of BSA and 1.5 milliunits of EGCase in 50 μ l of 10 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, containing 0.4 % (W/V) of Triton X-100. Condition II in Table 1 indicates the extent of hydrolysis of glycosphingolipids when 1.5 milliunits of the enzyme is incubated with 50 n mol of appropriate glycosphingolipid at 37° C for 16 h. Except for globo-type glycosphingolipids, each glycosphingolipid was hydrolyzed under this condition (II) as shown in Table 1. 3-5 times the amount of enzyme was necessary for complete hydrolysis of globo-type glycosphingolipids to occur.

The enzyme may be stored at -20°C for 6 months without detectable loss of activity. However, repeated freeze-thawing results in marked loss of activity.

To determine the extent of hydrolysis of glycosphingolipids by EGCase, a reaction mixture corresponding to 10 n mol of each glycosphingolipid was freeze-dried, dissolved in 50 % methanol, and applied onto an HPTLC plate (Precoated Silica Gel HPTLC plates, Merck). The plate was developed by n-butanol/acetic acid/water (2/1/1, v/v) as the developing solvent. The oligosaccharide migrated slower than the original glycosphingolipid in this solvent system and was visualized

エンドグリコセラミダーゼを用いた簡単な糖脂質オリゴ糖の調製法

伊 東 信

糖脂質からオリゴ糖を調製する方法としては従来オゾン分解や過ヨウ素酸酸化法が用いられてきた。これらの化学的な方法は収率の点で問題があるばかりでなく、操作も煩雑で時間を要する。また、微量の糖脂質からオリゴ糖を得る方法としても不適當である。エンドグリコセラミダーゼ (EGCase) という糖脂質のオリゴ糖鎖とセラミドの間を加水分解する酵素 [Methods in Enzymology (1990) 179, 488-496; J. Biol. Chem. (1986) 261, 14278-14282; (1989) 264, 9510-9519] を用いた簡単な糖脂質オリゴ糖の調製法を紹介する。

この酵素はセレブロシド、スルファチドを除く殆どすべての糖脂質に作用し、完全な形の糖鎖を遊離することができる。EGCaseの特異性をTable 1. にまとめる。現在、市販されている酵素 (日本の場合、生化学工業その他の国ではGenzyme社) はこの表に示されているEGCase I と II の混合物である。糖脂質を0.4% (W/V) トリトンX-100含有10mM酢酸緩衝液 pH5.0 に1マイクロモル/mlの濃度で溶解させ、ソニケーターで1分間超音波処理する。溶けにくいサンプルは加熱する。糖脂質からオリゴ糖を得る目的の実験では糖脂質の濃度は厳密ではなく一応の目安と考えていただきたい。市販のEGCaseは凍結乾燥標品なので上記緩衝液を加えて溶解する。酵素は必要量ずつ分注して-20℃で保存すると少なくとも半年間は使用できる。凍結-融解を繰り返すと失活することがあるので注意を要する。50ナノモルの糖脂質を加水分解する時に、1.5ミリ単位のEGCaseを加え、37℃で16時間反応させたときの糖脂質の分解率をTable 1. のcondition IIの項に示した。グロボ系列の糖脂質を除いて、

この条件下で表に示した糖脂質を完全に分解することができる。グロボ系列の糖脂質はEGCaseによって分解されにくいので、3~5倍量の酵素を加える必要がある。高度に精製したEGCaseを用いる時はEGCaseの安定化のために反応液に0.2mg/mlの濃度になるようにBSAを加える必要があるが、市販のEGCaseを使用する時には必ずしもその必要はない。

糖脂質のEGCaseによる分解の程度を知るためにはHPTLC (シリカゲル60HPTLCプレート、メルク社) で調べるのが簡単である。10ナノモル相当の糖脂質分解物をHPTLCにのせ、n-ブタノール/酢酸/水 (2/1/1, v/v) で展開する。発色はオルシノール-硫酸法で行う。オリゴ糖は糖脂質よりも移動度が遅いので、糖脂質と簡単に区別がつけられる。市販のEGCase標品にはエキソグリコシダーゼおよびシアリダーゼは含まれていないので、糖脂質から完全な形のオリゴ糖が得られる。つまり、セラミド部分の多様性がなくなるので、たとえ糖脂質のスポットは複数でも試料の糖脂質標品の糖鎖が単一であれば、単一のスポットが得られるはずである。また、得られたオリゴ糖をFAB-MSにかけ分子量から目的のオリゴ糖が得られたかどうか確認することができる。この方法はEGCase処理によって同時に得られるセラミドにも適応できる [実験医学 (1987) 65-67, Fukaya et al. Biochim. Biophys. Acta (1989) 1004, 108-116]。

反応液からオリゴ糖を単離するために、反応液に5倍量のクロロホルム/メタノール (2/1, v/v) 加えForch分配をする。上層を乾固してオリゴ糖画分として使用する。また、下層からは各々の糖脂質に対応したセラミドが得ら

by orcinol-H₂SO₄. The oligosaccharides as well as ceramides were also analyzed by FAB-MS [4,5].

Following the hydrolysis of glycosphingolipids, the reaction mixture was partitioned with 5 volumes of chloroform/methanol (2/1, v/v). The upper layer obtained was dried under a stream of N₂-gas, and used for glycosphingolipid-derived oligosaccharides. The ceramides corresponding to each glycosphingolipid could be obtained from the lower phase. SEP-PAK (Millipore Waters Associate) also facilitates obtaining oligosaccharides from the reaction mixture. The reaction mixture was applied onto SEP-PAK previously equilibrated with methanol/water (1/1, v/v). The oligosaccharides were passed through SEP-PAK, while ceramides and glycosphingolipids undigested by EGCase were adsorbed onto SEP-PAK. In the case of small quantity samples, some of the SEP-PAK should be taken from the cartridge and placed in a millipore filtration tube (Ultra free C3LGC, Millipore Co.). In this study, after being kept at room temperature for 30 min with shaking, the filtration tube was inserted into an Eppendorf centrifugation tube (1 ml) and centrifuged at 7,000 r.p.m. for 20 min. The filtrates obtained were dried under a stream of N₂-gas and used for oligosaccharides. This method could be used to clean oligosaccharides obtained by the Folch-partition method described above.

Oligosaccharides obtained may be covalently linked to the TLC-plates as a result of reductive amination with NaCNBH₃ [6] or attached to protein by the heterobifunctional cross linker, succinimidyl 4-N-maleimidomethyl cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) [7]. The later method was found applicable for obtaining neoganglioproteins from the cell surface using various oligosaccharides from glycosphingolipids as

described in HOT PAPER 2 of this issue.

Oligosaccharides released by the enzyme from glycolipids were derivatized with aminobenzoic acid ethylester (ABEE) and analyzed by HPLC on Amide 80 and C4 silica columns [8]. Individual oligosaccharide-ABEE derivatives were successfully separated without any overlapping on the columns, thus allowing the qualitative and quantitative analyses of glycosphingolipids in the form of oligosaccharides. This method is applicable to the analysis of oligosaccharides regardless of their origin.

References

1. Ito, M., and Yamagata, T. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 14278-14282
2. Ito, M., and Yamagata, T. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9510-9519
3. Ito, M., and Yamagata, T. (1990) *Methods in Enzymol.* **179**, 488-496
4. Ito, M., and Yamagata, T. (1987) *Experimental Medicine (Jikken Igaku)*, 65-67
5. Fukaya, N., *et al.* (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **1004**, 108-116
6. Higashi, H., *et al.* (1987) *J. Biochem.* **102**, 291-296
7. Pacuszk, T., and Fishman, P.H. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7673-7678
8. Higashi, H., *et al.* (1990) *Anal. Biochem.* **186**, 355-362

れる。反応液からオリゴ糖を得る方法として SEP-PAK (Millipore Waters Associate) も利用できる。メタノール/水(1/1, v/v)で平衡化した SEP-PAK に反応液を通す。セラミドと未反応の糖脂質は吸着され、オリゴ糖は溶出される。Forch 分配で得たオリゴ糖の精製にもこの方法は利用できる。試料が少量の時には SEP-PAK の樹脂をカートリッジから出して遠心ろ過チューブ (ウルトラフリー C3LGC、ミリポア社) の上に試料とともにのせ、室温で 30 分間時々攪拌しながら放置した後、ろ過チューブごと エッペンドルフチューブに入れて、7,000 回転で 20 分間遠心してろ過液をとる。

このようにして得られたオリゴ糖は TLC で展開分離してから還元的アミノ化で TLC 上に結合させ、免疫染色を行うこともできるし

[Higashi *et al.* J. Biochem. (1987) 102,

291-296]、今回の Hot Paper で紹介したようにタンパク質に結合させてネオガングリオプロテインを作ることでもできる [Pacuszka and Fishman, J. Biol. Chem. (1989) 265, 7673-7678]。後者の方法は細胞表層のタンパク質にオリゴ糖を直接導入できる方法として注目される。

糖脂質から得られるオリゴ糖を ABEE (アミノエチル安息香酸) で誘導体にした後、HPLC カラムで分離分析し、糖脂質そのままの形で分析に代えようという試みもある [Higashi *et al.* Anal. Biochem. (1990) 186, 355-362]。これは ABEE-オリゴ糖が Amide80, C₄ シリカカラム上で互いに重ならず展開分離できるという技術に基いている。糖脂質オリゴ糖に限らず応用できる方法である。

Table 1. Specificity of Endoglycoceramidase

Class	Name	Substrate Structure	Hydrolysis Enzyme I Condition ^{b)}		Extent(%) ^{a)} Enzyme II Condition ^{b)}	
			I	II	I	II
Ganglio series	GT1b	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	16.3	100	13.9	100
	GD1a	NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	15.5	100	16.3	100
	GM1a	Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	47.9	100	37.9	100
	GM2	GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	25.1	100	28.2	100
	GM3	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	17.8	100	84.9	100
	Asialo GM1	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	71.9	100	65.1	100
Globo series	Forssman (Gb ₅ Cer)	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	4.5	87.9	0.1	8.9
	Globoside (Gb ₄ Cer)	GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	1.7	87.3	0.1	5.3
	Globotriaosylceramide (Gb ₃ Cer)	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	18.2	100	0.1	12.4
Lacto series	Sialylparagloboside	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	52.2	100	100	100
	Lactosylceramide	Gal β 1-4Glc β 1-1Cer	51.3	100	85.6	100
Gala series	Neogalactriaosylceramide (TGC)	Gal β 1-6Gal β 1-6Gal β 1-1Cer	0	0	0	0
	Cerebroside	Gal β 1-1Cer, Glc β 1-1Cer	0	0	0	0
	Sulfatide	HSO ₃ -3Gal β 1-1Cer	0	0	0	0

a) Hydrolysis extent was calculated by the Assay II described in Experimental Procedure.

b) Condition I, 0.3 milli unit of the enzyme was incubated with appropriate substrates at 37°C for 2 h. Condition II, 1.5 milli units of the enzyme was incubated with appropriate substrates at 37°C for 16 h.