**Derivatization of Oligosaccharides from Glycosphingolipids
with Aminobenzoic Acid Ethyl Ester and
Analysis of Saccharide Structure of Glycosphingolipids by Two-Dimensional
Mapping with High Performance Liquid Chromatography**

Hideyoshi HIGASHI

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

Analytical methods for determining the saccharide structures of glycosphingolipids have been improved and most structures can be determined completely by permethylation analysis, mass spectrometry, and NMR. However, since a certain amount (usually more than 100 µg) of a purified glycosphingolipid must be available for analysis by these methods, a too small amount will present difficulties. Recently, we developed a method for analysis of saccharide structures that requires only small amounts of glycosphingolipid mixtures by two-dimensional mapping of oligosaccharides from glycosphingolipids with HPLC [1] and is introduced in this article. Generally, it is difficult to separate glycosphingolipids whose saccharides are similar in structure by chromatography since naturally occurring single species of glycosphingolipid are mixtures of molecules consisting of various ceramide portions. This leads to various complex patterns of separation on chromatography. To avoid this difficulty the ceramide portion is eliminated from saccharide portions of glycosphingolipids. Recently, Ito and Yamagata discovered endoglycoceramidase (EGCase) which cleaves glycosidic linkage between saccharide portion and the ceramide portion of glycosphingolipids selectively [2, 3] and this enzyme should thus make it possible to obtain oligosaccharides from glycosphingolipids much more easily and efficiently

than the previously used method of ozonolysis. Ito has described a method for hydrolysis using endoglycoceramidase in this journal recently [4]. The oligosaccharides obtained were labelled with an ultra-violet absorbent, p-aminobenzoic acid ethyl ester (ABEE). Another labelling method, 2-aminopyridyl (2AP) derivatization was tested but found unsuitable for analysis of relatively short chain saccharides, particularly those that are acidic since clear separation using presently available HPLC columns was quite difficult. ABEE-labelled oligosaccharides can be mapped two-dimensionally using a TSK-GEL Amide 80 column (TOSOH, Tokyo, Japan), and a Wakosil 5C4 column (Wako Pure Chemicals Ltd., Osaka, Japan) for HPLC. By an Amide 80 column, acidic oligosaccharides could be separated completely from neutral ones for analysis of the latter.

1. ABEE-labelling of oligosaccharides

We diluted the original reagent described by Wang *et al.* [5] to make purification easy after the labelling reaction and prevent the degradation of sialyl residues of oligosaccharides as follows: As much as 100 nmol of dried oligosaccharides and the following reagents below are mixed, sealed and heated at 80°C for 90 min.

糖脂質糖鎖の高速液体クロマトグラフィー2次元マッピング法による分析

東 秀 好

糖脂質の糖鎖構造解析技術は、非常に進歩し、メチル化分析、マススペクトロメトリー(MS)、NMR分析などを行えば、ほとんどの構造は決定されるようになった。ところが、これらの分析を行う場合、純粋な糖脂質を比較的大量に用意する必要があるので、特に微量な試料の分析は困難である。私たちは、最近、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いることによって、糖脂質糖鎖の構造をマップ化し、微量の混合試料の構造解析を行う方法[1]を開発したので、ここで解説したい。一般に一種類のスフィンゴ糖脂質は異なるセラミド分子を有する混合物であるので、糖脂質の状態での糖鎖構造の解析においてセラミド部分の不均一性がしばしば障害となり、特にクロマトグラフィーにおいて類似の糖鎖構造を持つ糖脂質の分離は困難である。そこで、糖脂質の糖鎖をセラミドから切り出す必要がある。糖脂質からオリゴ糖を得る方法としては、従来、オゾン分解法しかなかったが、最近、エンドグリコセラミダーゼという酵素が発見された[2, 3]。私たちの研究室の伊東と山形が発見したエンドグリコセラミダーゼは、スフィンゴ糖脂質の糖鎖とセラミドの間のグリコシド結合を選択的に切断するので、糖脂質由来のオリゴ糖をオゾン分解法に比して、容易

に効率良く得ることができる。この方法については、本誌 Vol. 2 No. 7 の伊東のテクニカルノートを参照されたい[4]。こうして得られたオリゴ糖は、HPLCで高感度に検出するために、紫外吸収物質であるp-アミノ安息香酸エチル(ABEE)で標識した[5]。標識法としては、2アミノピリジル化といった蛍光標識法もあるが、現在のところ、糖脂質の様に比較的短い糖鎖、特に酸性の糖鎖の構造の違いをHPLCで分離するに限って言えば、カラム等分離技術の問題からもABEE化のほうが有利である。こうして得られたABEE化オリゴ糖は、TSK-GEL Amide80 (TOSOH)、Wakosil 5C4 (和光純薬)、2種類のHPLCカラムによってマッピングするのであるが、Amide80では、酸性のオリゴ糖は、中性のオリゴ糖分析時に完全に中性オリゴ糖から分離することができる。

1. オリゴ糖のABEE化

反応後の精製を容易にするためとシアル酸の脱離を防ぐために反応試薬は、Wang らの原法[5]より薄いものを用いる。100 nmol までの乾燥したオリゴ糖に対して、以下の試薬を加えて密閉し、80度で90分加熱する。

TIGG Vol.2 No.8 (1990)
TECHNICAL NOTE (TIGG-11/02/90-TN-1)

Methanol	26 (μl)
ABEE (20 mg/ml methanol)	14
NaBH ₃ C ₃ C ₂ mg/ml methanol)	14
1% acetic acid/methanol	16
<hr/>	
Total	70

In this manner, 80-90% of the oligosaccharides was labelled and less than 1% of the sialyl residues released. After cooling, the reaction mixture is dried under nitrogen gas at room temperature and then dissolved in chloroform/methanol (2:1) and loaded onto a 1 ml column of Phenylboronate agarose (PBA60, Amicon Co., Danvers, MA) equilibrated in the same solvent. Since ABEE-oligosaccharides is absorbed by this column, the un-reacted reagents and salts are washed out with 2.5 ml of the same solvent. ABEE-oligosaccharides are then eluted from the column with 5 ml of chloroform/methanol/water (2:8:5). The ABEE-oligosaccharides obtained in

this way can be analyzed directly by FAB-MS since not only most of the un-reacted reagent but the salts as well can be eliminated by this step. A PBA60 column can be re-used after being dehydrized with methanol.

2. Two-dimensional HPLC

ABEE-oligosaccharides are chromatographed first on the Amide 80 column (4.6 o x 250 mm) using acetoni (50:50)/20 min, 1 ml/min. Acidic ABEE-oligosaccharides are eluted in a void volume earlier than any neutral ABEE-oligosaccharides. In neutral ABEE-oligosaccharides, shorter oligosaccharides are eluted earlier. The acidic ABEE-oligosaccharides are eluted in the same manner when using the same solvent system which contains aqueous 10 mM KH₂PO₄ instead of water. ABEE-oligosaccharides separated on the Amide 80 column are each fractionated in the amount of 1 ml and all the fractions

Fig. 1 Two-dimensional map by HPLC of standard ABEE-oligosaccharides derived from neutral (○) and acidic glycosphingolipids (●).

メタノール	26 (μl)
ABEE (20 mg/ml メタノール)	14
NaBH ₃ CN (2 mg/ml メタノール)	14
1% 酢酸/メタノール	16
<hr/>	
合計	70

この条件では、80～90%のオリゴ糖がABEE化され、シアル酸の遊離は1%以下である。冷却後、室温にて窒素ガスを用いて乾燥する。これをクロロフォルム-メタノール(2:1)に溶かし、同溶媒に懸濁したフェニルボロネイトアガロースカラム(PBA60、Amicon社) 1 mlにかけ、ABEE化オリゴ糖はこのカラムに吸着されるので、未反応の試薬や塩は同溶媒 2.5 mlで洗い流す。ABEE化オリゴ糖は、クロロフォルム-メタノール-水(2:8:5) 5 mlでカラムから回収される。この操作によって、未反応の試薬がほとんど除かれるほか、塩が除かれるので、得られた試料をFAB-MS 分析することも可能である。なお、PBA60カラムは、メタノールで脱水して再使用できる。

2. 2次元HPLC

ABEE化オリゴ糖は、まず、Amide80 カラム(4.6φx250mm)でアセトニトリル-水(75:25)→(50:50)/20分、1 ml/分の条件でクロマトグラフィーを行う。ガングリオシド由来の酸性オリゴ糖はどの中性オリゴ糖よりも先に溶出され、ついで中性オリゴ糖がその糖鎖の小さい順に溶出される。酸性オリゴ糖は、同

じカラムで同じ溶媒系の水の代わりに10mM KH₂PO₄ 水溶液を用いると糖鎖の小さい順に分離溶出する。Amide80で分離したオリゴ糖は、1 mlずつの画分として分取し、各画分をC4カラム(4.6φx250mm)で50mM KH₂PO₄中n-ブタノールを4→8%/20分に変化させ、1 ml/分の条件でクロマトグラフィーを行う。このクロマトグラフィーでは、同じシリーズに属する糖鎖は、糖鎖の大きい順に溶出されてくる。この方法で代表的な糖脂質のオリゴ糖について分析し、各クロマトグラフィーにおける溶出時間をグルコース単位で表わして2次元マップとしたのがFig. 1である。中性と酸性のオリゴ糖が別個に分析できるので、9種の中性及び16種の酸性オリゴ糖が、オーバーラップなしにマッピングされているのがわかる。グルコース単位はABEE化イソマルトオリゴ糖の溶出時間を基準にして、溶出時間とグルコースの数の関係を直線で結んだ標準線から得た。Amide80, Wakosil C4 とも、糖鎖の大きさと構成糖及び結合様式の違いで分離したが、特に、Amide80はシアル酸の種類による分離が顕著で、Wakosil C4 では中性、酸性ともにネオラクトシリーズの糖鎖がグロボシリーズやガングリオシリーズの糖鎖に比べて溶出が極めて遅かった。

多くの試料の分析に対応するためには、オリゴ糖のデータを増やしていかなければならないが、この標準マップ上にない未知のオリゴ糖についても、シアリダーゼやガラクトシ

TECHNICAL NOTE (TIGG-11/02/90-TN-1)

are chromatographed on a C4 column (4.6 o x 250 mm) using a linear gradient of n-butanol, 4–8%/20 min in 50 mM KH₂PO₄, 1 ml/min. In this chromatography, larger oligosaccharides of the same series are eluted earlier. Fig. 1 shows a two-dimensional map of standard oligosaccharides from glycosphingolipids plotted against elution time and expressed as glucose units. ABEE- and 16 acidic oligosaccharides were mapped perfectly without any overlapping since neutral and acidic oligosaccharides could be analyzed separately. The glucose units were obtained from a standard line graph of elution time versus glucose number for ABEE-isomaltoligosaccharides. ABEE-oligosaccharides were separated according to size and structure on both Amide 80 and C4 columns. Amide 80 clearly separated the sialic acid species. Both neutral and acidic neolacto-series' oligosaccharides were eluted much more slowly than the other series of oligosaccharides from the C4 column.

The number of standard ABEE-oligosaccharides must be increased on two-dimensional map for analysis of various samples. However, it is possible to characterize some structures without the standard on the map when the effects of glycosidases, such as sialidase and galactosidases are exerted on the coordinates of the map. ABEE-oligosaccharides were much more sensitive toward glycosidases than their parent glycosphingolipids and required no detergent. Interestingly, the branched sialyl residues of ABEE-oligosaccharides of GM1 and GM2 also showed some resistance against the

sialidase of *Arthrobacter ureafaciens*. ABEE-oligosaccharides give rise to strong ion peaks in FAB-MS analysis [5, 6] and less than 100 pmol of a sample could be analyzed. FAB-MS analysis should provide useful information for determination of unknown samples.

ABEE-oligosaccharides can be detected in amounts as small as several pico mole and are of use for the quantitative determination of each component since they possess constant molar absorption coefficients when a hexose is present in the reducing end of the oligosaccharides [6]. By this method, both the compositions and structures of glycosphingolipids can be easily determined for sample available in small amounts, except in the case of cerebroside and sulfatide which are not susceptible to EGCase. The availability of LC-MS and third chromatography will improve this method.

References

1. Higashi, H., Ito, M., Fukaya, N., Yamagata, S., and Yamagata, T. (1990) *Anal. Biochem.* **186**, 355-362
2. Ito, M., and Yamagata, T. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 14278-14282
3. Ito, M., and Yamagata, T. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9510-9519
4. Ito, M. (1990) *TIGG*, **2**, 399-402
5. Wang, W. T., LeDonne, N.C., Jr., Ackerman, B., and Sweeley, C.C. (1984) *Anal. Biochem.* **141**, 366-381
6. Matsuura, F., and Imaoka, A. (1988) *Glycoconjugate J.* **5**, 13-26

ダーゼを用いてマップ上での挙動の変化を調べることによりある程度まで構造を知ることができる。この場合、ABEE化オリゴ糖は、糖脂質に比べてこのようなグリコシダーゼに対する感受性が高くディタージェント等を必要としない。興味深いことに、ABEE化オリゴ糖の場合も、GM2や、GM1の糖鎖途中のガラクトースについたシアル酸残基は、糖鎖末端のそれに比較して *Arthrobacter ureafaciens* のシアリダーゼに対して抵抗性であった。また、ABEE化オリゴ糖は、FAB-MS分析において、大きなイオンピークを与えることが知られており[5, 6]、100 pmol以下の試料で測定可能である。未知物質の構造解析には強力な手段で

ある。

ABEE化オリゴ糖は、1 ピーク数ピコモルの感度で検出でき、還元末端にヘキソースを持つオリゴ糖は、一定の分子吸光係数を持つので[6]、定量にも便利である。本法により、従来のクロマトグラフィーや免疫化学的手法では困難であった少量の試料中の糖脂質の全体像と糖鎖構造の解析が、EGCaseに分解されないセレブドシド、スルファチド以外のすべてについて簡便に行えるようになったと考える。今後、ABEE化オリゴ糖のHPLC法は、LC-MS 分析法や第3の原理のクロマトグラフィーが実用化されればより完成された方法となるであろう。