Some Comments on the Yamagata Proposition

山形博士の提案に対する意見

Yuan Chuan LEE

The Johns Hopkins University, Department of Biology,
Baltimore, MD 21218, USA, FAX: 1-301-338-8716

The idea presented by Dr. Yamagata in the Glycoforum [TIGG (1990) 2, 526-533] is a refreshing proposition aimed to alleviate difficulties of structural determination in glycoconjugates. His idea is pleasantly close to that held by myself, and I am quite pleased that Dr. Yamagata has enunciated the notion so clearly in this forum. The main point forwarded by Dr. Yamagata is that structural characterization of oligosaccharides should be made easier and less painful. Today, far too many laboratories are spending too much time in redundant effort of characterizing the known oligosaccharides. Easing the pain of the structural characterization is on the mind of practically everyone, and we should openly discuss how we can accomplish this. I believe that this forum is the most suited stage for this sort of discussion.

We are accustomed to regard monosaccharides (such as galactose) as basic structural units. In reality, by "galactose" we mean an aggregate of carbons, hydrogens, and oxygens arranged in certain ways which is distinct from "mannose" or "glucose" by the ways of arranging these atoms. What Dr. Yamagata is proposing is to expand the size of the aggregate unit of comparison to oligosaccharides, which are aggregates of sugar residues. Dr. Yamagata lists PMR data as well as chromatographic data as the bases of comparison. Comparing an unknown oligosaccharide with the known oligosaccharides is far more complicated and difficult than comparison amongst monosaccharides. A staggering number of structures will arise if one considers all possible oligosaccharides. This feature, which some carbohydrate researchers boast as "a wealth of information storage possibility", is at the same time a tremendous handicap for clear structural elucidation and identification.

Most carbohydrate researchers justifiably trust PMR spectral data than HPLC data, because PMR spectra enable one to compare an unknown with reference compounds using many signal peaks at the same time. Moreover, PMR data are highly reproducible, quite independent on instrumentation or operator. Chemical shift values obtained with a 300-MHz spectrometer from one manufacturer at one location are quite close to those obtained with a 500-MHz instrument of another manufacturer operated in another location. Dr. Yamagata is right in placing a great emphasis on PMR in his proposal.

Unfortunately the HPLC data for oligosaccharides do not receive as high a respect as PMR. At the present stage of

TIGG(1990) 2, 526-533のグライコフォーラムの山形博士の考えは、複合糖質における構造決定の困難さの軽減を目的とした斬新な主張である。彼の考えは、愉快的なことであるが、私自身によって考えられたものに近く、山形博士がこのフォーラムにおいてその概念を明確にされたことを私は大変嬉しく思う。山形博士によって主張された主な点はオリゴ糖の構造決定はより「無痛、安楽」になされるべきであるということである。今日、余りにも多くの研究室が既知のオリゴ糖同定という重複の仕事に余りにも多くの時間を費やしている。構造決定の苦痛を和らげる事は殆ど誰でもが心に浮かべる事であり、我々はこれを如何に成し遂げるかをオープンに討論すべきである。私はこのフォーラムがこの種の議論に最も適した場であると思う。

我々は単糖（例えばガラクトース）を基本的な構造単位と見なす事に慣らされている。実際“ガラクトース”と言う単糖によって我々は炭素、水素、酸素が“マンノース”や“グルコース”とは原子の配列の仕方では異なっている一つの集合を意味する。山形博士が提案しておられるのは比較の集合単位をオリゴ糖へ拡張しようというものである。ここで言うオリゴ糖とは結合単糖残基の集合である。山形博士は比較の基礎にクロマトデータとPMRデータを挙げておられる。未知のオリゴ糖を既知のオリゴ糖と比較する問題は単糖で比較するより遥かに複雑であり、困難である。もし全ての可能なオリゴ糖を考えるなら肝を潰す様な数の構造が生じる。一部の糖質研究者が豊かな情報の貯蔵の可能性として自慢する特色は、同時に明確な構造を同定するのに途方もないハンディーキャップとなる。

大抵の糖質研究者はPMRスペクトルデータは同時に多くのシグナルピークを使って基準化合物と未知の化合物と比較できるので、HPLCデータよりもPMRスペクトルの方をより信頼する。又、実際にPMRデータは極めて再現性があり、機器、オペレーターに左右されない。ある一つのメーカーのある場所にある300 MHzのPMRスペクトロメーターを用いて得られたケミカルシフトは他の地域の他のメーカーの500 MHzの機器で得られたものとは非常に近い。山形博士が彼の提案でPMRを非常に強調しておられるのは正しい。

残念ながらオリゴ糖のHPLCデータはPMRのような高い評価を受けていない。現在の発展段階ではHPLCデータは変わり易い。これらのデータはメーカー、カラムの古さ、あるいは機種（例えばグラジェントの正確さ、再現性）によって影響され

development, HPLC data are highly variable. They are influenced by the manufacturer or the age of the column or by the instrumentation (e.g., accuracy and reproducibility in gradient generation). This led to Dr. Noriko Takahashi's rather pessimistic reaction to include the HPLC data in a database as suggested by Dr. Yamagata[TIGG (1991)3, 56-57]. However, in our real life, some oligosaccharides are obtainable only in too small a quantity for reliable PMR analyses, and chromatographic methods may be the only way available for characterization.

To cope with the imperfection of the HPLC data, the researchers will have to use some temporary remedial measures. First, the degree of retention can be expressed with an internal scale, such as "glucose unit," to adjust for minor variations in separation conditions. This is being practiced by at least two research groups already, but some other convenient series compounds can be used instead. Secondly, more than one separation method (e.g., "2-D mapping" or a combination of high performance capillary electrophoresis and HPLC) can be used to increase the possibility of correct identification. Even if the separation could be performed reproducibly, the use of multiple separation methods is necessary. There are perhaps a few hundred well characterized oligosaccharides from glycoproteins, and just as many for the glycolipids. No single existing separation method can separate them all in a single run of a reasonable duration at a reasonable sensitivity. Finally, one can also use secondary steps of digesting the unknown sample (perhaps partially characterized already) with enzymes or adsorbing it on lectins. These approaches have been mentioned by Dr. Yamagata. In a number of the authoritative papers, carbohydrate structural determinations were performed solely dependent on lectins and enzymes and co-chromatography with reference compounds without the aid of PMR. There are some systematic application of plant lectins for a reasonable classification of oligosaccharides. The ideal database may also contain the reactions of an oligosaccharides towards lectins. The results of exo-glycosidases are usually predictable and clear and there is no need to enter such results into a database.

The currently unsatisfactory status of the HPLC methods of oligosaccharide characterization should not discourage us from entering the available HPLC data on a suitable database. There is nothing inherently wrong with the notion of comparing an unknown compound with known reference compounds using HPLC or other efficient separation methods. This is how amino acids and sugars are "identified." By having the HPLC data organized into a database, more researchers would use them and steady improvement should result from it. The currently popular PMR data library for oligosaccharides from glycoproteins is essentially built and used in this fashion. Most of the assignment is basically empirical in nature, and is frequently revised as new data are provided. We should not forget that in the early stage of PMR development, the values of

る。この為に山形博士の提案によるデータベースにHPLCデータを組み入れる事に対する高橋博士の御意見がなされた。しかしながら、実際は、信頼すべきPMR分析をするには余りにも少ない量のオリゴ糖しか得られない時は、クロマトグラフィーか、電気泳動が唯一の方法でしかない。

HPLCデータの不完全に対応するには研究者は一時的な測定を用いなければならない。先ず第一に保持時間の度合は別な条件下でのマイナーな変化を補正する為に“グルコース単位”のような内部スケールで表現される。これは少なくとも二つの研究グループによって既に実行されつつあるが、その代わりに他の便利な一連の化合物が使用されてもよい。第二に一つ以上の分離法（例えば“2-Dマッピング”や高性能ゾーン電気泳動とHPLCとの組合せ）は正しい同定の可能性を高める。たとえ分離が再現性よくなされても多岐の分離法は必要である。多分、糖タンパクから既に数百のオリゴ糖が同定されており、それと匹敵する数のオリゴ糖が糖脂質から得られて居る。現存する如何なる分離法も適当な感度で一回の分析時間内にこれらのオリゴ糖を全て分離出来ない。別な未知のサンプル（恐らく既に部分的には同定されている）を酵素で消化するかあるいはレクチンに吸着させる二次的手段を用いることが出来る。これらの方法は山形博士によっても言及されている。数多くの権威的論文で炭水化物の構造決定はPMRの助けなしに、レクチンと酵素と標準物質とのコークロマトグラフィーにのみ依存して行われた。植物レクチンのオリゴ糖の合理的な分類への系統的な応用が幾つかある。理想的なデータベースはオリゴ糖のレクチンへの反応性をも含むことができる。エキソグリコシダーゼによる結果は通常断定的に明確であり、これらの結果をデータベースに入れる必要はないと思う。

現在の不満足なオリゴ糖同定のHPLC法の状態にもかかわらず、我々は現在利用できるHPLCデータを適当なデータベースに入れるのを躊躇すべきではない。未知の化合物を既知の標準物質とHPLC等の効率良い分離方法でもって比較する概念は元来何も間違った事ではない。これによってアミノ酸と糖が“同定”されている。HPLCデータベースに整理することによって、より多くの研究者はそれらを利用し、その結果しっかりした進歩が築かれる事は予想出来る。糖タンパクからのオリゴ糖の現存のPMRデータライブラリーは実験的に構築され、このように使用されている。大抵のアサインメントは元来経験的なものであり、新しいデータが供給されると度々改訂される。PMRの発展の初期においてケミカルシフトは再現性がなく、かつ大変正確でもなかったことを忘れるべきではない。我々はHPLCもそのように発展することを期待する。

仮に、もし世界中の全ての糖質研究者が“標準”HPLCカラムを供給され、そしてもしカラムがある特定の性能試験をパスしない時は何時でも無料で交換されることが出来ると、仮定し

chemical shift are neither very reproducible nor very accurate also. One hopes that HPLC would also evolve in such a way.

Hypothetically, let us assume that every carbohydrate researcher in the world could be provided with "standard" HPLC columns, and the columns could be replaced free of charge whenever they fail to pass certain specific performance test. Extending this notion further, let us assume that the same arrangement could be made with the HPLC instrument itself. I believe much of the variability in the retention time may disappear or greatly diminish. Naturally this assumes that such columns and instruments can be manufactured perfectly uniformly and reproducibly. Of course these scenarios are utterly unrealistic. Nevertheless, if such demands could be made on the manufacturer of the HPLC instruments and columns, one may eventually see more reproducible and consistent data obtained by "average" workers.

More important is the establishment of an oligosaccharide bank, making oligosaccharides of well characterized structure easily available at a reasonable cost. This is another part of Dr. Yamagata's proposal, and can be pursued independent of any databases. When the reference oligosaccharides are made readily available at an affordable price range, the difficulty in identification due to variability in the HPLC data can be resolved to a large extent (although multiple methods of separation are still required). Laboratories long engaged in structural characterization of oligosaccharides in glycoconjugates have stocks of such reference compounds, and they use them effectively.

Isn't it possible to contract a laboratory to prepare reference oligosaccharides of a greater variety than is currently available commercially? There are methods available to accomplish this, and in a long run it would be far more economical than to allow numerous laboratories to prepare and characterize them individually. Since it is unrealistic to provide all the well-characterized oligosaccharides, reference libraries of key oligosaccharides should be carefully chosen to cover the needs. The reference libraries may be of different compositions to suit the needs for different occasions. For example, the library for sialylated oligosaccharides should be different from that of neutral oligosaccharides. This may not be an unattainable goal, and is occurring commercially in a small scale. What is sorely lacking is the recognition of the importance of such a project and the determination to execute it. Realistically, this should be a contract job, because it is essentially a task of reproducing what has been done already ("Wheel reinvention") and few, if any, academics will undertake such a project. When this project is organized globally, the overall cost would be even lower.

Dr. Yamagata's main thrust is to embrace the PMR data and HPLC data into one comprehensive database. Actually there are a few PMR databases compiled for various oligosaccharides. They are written in different computer languages, and

よう。この考えを更に拡張して、同じことがHPLCの機器そのものについてもいえると仮定しよう。私はそうしたら、保持時間の変化の大部分は無くなるか、あるいは大いに減少すると信じる。当然この仮定はこのようなカラムは完全に均一にかつ再現性よく生産されることを前提とする。この概念を更に押し進めると、同じことがHPLCの機器そのものにも当てはまる。むしろこの筋書きは全く現実的ではない。それにもかかわらず、このような要求がHPLCの機械とカラムの生産者になされたら、もっと再現性のよい、共通性のあるデータが“普通の”研究者によって得られるであろう。

もっと重要なことは、合理的な価格で構造の判ったオリゴ糖を供給することの出来るオリゴ糖バンクの確立である。これは山形博士の提案のもう一つの部分であり、これはデータベースとは独立に追求できる。標準オリゴ糖が手の届く価格範囲内で容易に利用できる時、HPLCデータにおける変動性に起因する同定の困難さは大部分（多重の分離方法が未だに必要であるが）は解決できる。複合糖質のオリゴ糖の同定に長く従事している研究室はこれらのリファレンス化合物のストックを持っており、彼らはこれらを有効に利用している。

現在市販されているよりも遥かに多くのバラエティーに富んだ標準オリゴ糖を調製するようにあるグループと契約を結ぶことは可能ではないだろうか？これを成し遂げる方法があり、長い目で見ると、無数の研究室が別々に標準オリゴ糖を調製し、同定するよりも遥かに経済的であろう。全てのよく同定されたオリゴ糖を供給することは現実的に不可能であるので、キイとなるオリゴ糖のリファレンスライブラリーは実状に沿う要求をカバーするように注意深く選ばねばならない。リファレンスライブラリーは異なった要求に適するには異なった組成となるであろう。例えば、シアリレーテッドオリゴ糖のライブラリーは中性糖のライブラリーとは異なるかも知れない。この構想は到達できない目標ではなく、現在小さい商業規模で起こりつつある。ただ欠けているものはこのようなプロジェクトの重要性の認識とそれを強行する決意である。これは既知の事実の再現であり（発明したものを再発明すること）、このようなプロジェクトを引き受ける研究グループはあまりないと思われるので、理想的にはこれは契約による仕事であるべきである。このプロジェクトが世界的に組織されれば、全体のコストは安くさえなるであろう。

山形博士の主たる論点はPMRデータとHPLCデータを包括的なデータベースにまとめることである。現実にはいろんなオリゴ糖を編集したPMRデータベースが幾つか存在する。これらは異なった言語で書かれており、操作の方法にも一貫性がない。HPLCデータについていえば、少なくとも一つのデータベースはある固有な条件下でPA-オリゴ糖のHPLCについて作成されつつある。これはよい始まりであるが、我々はそのようなデータ

there is no consistency in their operational modes. As to the HPLC data, at least one database is being compiled for HPLC of PA-oligosaccharide under a set of specific conditions. These are a good beginning, but we need a more concerted effort to expand and improve such databases continually. I tend to think that each of the databases (for PMR, HPLC, etc.) first has to be developed sufficiently to show its merit individually. The time is not quite ripe for merging all databases together yet.

In summary, Dr. Yamagata's proposal may be idealistic and imperfect in details, but more of us should start thinking in this direction to remove the tedium from the carbohydrate research. Shouldn't we propose such a plan as the carbohydrate researchers' answer to "human genome project"?

ベースを常に拡張し、改善するためにもっと協調的努力を必要としている。私は各々のデータベース（PMR、HPLCなどに対する）はまず個々に完成されるべきであると考え。全てのデータベースが統合される程、機は熟してはいない。

山形博士の提案は理想的であり、細かな点では不完全であるかも知れないが、しかし糖質研究の「煩わしさ」を取り除くこの方法について我々は考え始めるべきであろう。我々は“ヒューマン ゲノム プロジェクト”に対応して糖質研究者のこのような計画を提出すべきではなかろうか？