Structural Determination of the Glycan Part in Glycoproteins

糖タンパクのグリカン部分の構造決定

Anne-Sophie ANGEL, Gunnar GRÖNBERG,

Göran NILSSON, Stefan STRÖMBERG, Ingela TAPPER and Bo NILSSON

The Glycoprint™ Group, BioCarb Technology AB, S - 223 70 Lund, Sweden. FAX: 46-46-151395

Introduction

A new type of pharmaceuticals became available when the recombinant DNA technique was introduced. The development of cell systems for manufacturing of biologically important proteins, used in therapy and diagnosis, have focused the attention on protein glycosylation. Most of the events leading to *N*-glycosylation involving transfer of the lipid-linked oligosaccharide to asparagine in a certain amino acid sequence of the nascent protein and subsequent processing to the final products have been elucidated. The glycosylation pattern obtained depends on several factors such as cell types and growth conditions. An *N*-glycosylation site carries either a complex or a high mannose type of structure. Hybrid structures are sometimes found but in rather rare cases. Structural diversity is often prevalent resulting in presence of different structures (bi-, tri-, and tetraantennary) in the same glycosylation site. Furthermore, heterogeneity within the structures is common, due to partial substitution by sialic acid and fucose. This structural heterogeneity makes the isolation and the following structural analysis difficult.

O-Glycosylation means substitution of serine or threonine usually with *N*-acetylgalactosamine in an *O*-glycosidic linkage. Unlike the *N*-glycosylation no specific amino acid sequence is required for *O*-glycosylation. The *O*-linked carbohydrate chains are often smaller and structurally less complicated than the *N*-linked. The present paper summarizes methods for release, separation and structural analysis of *N*- and *O*-linked glycoprotein oligosaccharides.

Glycan Structure

All *N*-linked glycans have a common trimannosyl chitobiose core structure of:

This structure can be substituted in various positions and to a

はじめに

リコンビナントDNA技術が開発されて新しいタイプの医薬品が利用できるようになった。治療や診断に用いられる生物学的に重要なタンパクの生産の為に細胞系の発達の結果、タンパクのグリコシル化が注目されるようになった。グリコシル化されていないタンパクのあるアミノ酸配列のアスパラギンへのリビド結合オリゴ糖の転移とそれに引き続く過程の大部分は明らかにされた。グリコシル化は細胞の種類と培養条件に依存する。*N*-グリコシル化部位はコンプレックス型かハイマンノース型の構造を持つ。ハイブリッド型は時として見られるが、これは稀である。構造の多様性の結果、同一のグリコシル化部位に異なった構造(ビ-,トリ-,テトラアンテナリー)が存在する。更に、シアール酸とフコースによる部分置換に起因するヘテロジェニティが同一構造中に存在する。この構造のヘテロジェニティが糖タンパクの単離とそれに引き続く構造の分析を困難にしている。

O-グリコシル化とはセリン、スレオニンの通常*N*-アセチルガラクトサミンによる置換を意味する。*N*-グリコシル化とは異なって*O*-グリコシル化には特別なアミノ酸配列は必要ではない。この論文では*N*-、*O*-結合糖タンパク糖鎖の切り出し、分離、そして構造解析について概観する。

グリカンの構造

全ての*N*-結合糖鎖は共通のトリマンノシル キトビオースコア構造:

を持っている。

この構造はいろいろな位置と次のような残基と配列によっていろいろな度合に置換できる:

Fuc
 Man
 GlcNAc
 Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc
 Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc
 Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc
 Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3[Neu5Ac α 2-6]GlcNAc

variable degree by the following residues and sequences:

Fuc
Man
GlcNAc
Gal α 1-3Gal β 1-4GlcNAc
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc
Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3[Neu5Ac α 2-6]GlcNAc

The high mannose structures are formed by substitution by multiple mannose residues and the complex types contain the sialylated sequences. Hybrid structures contain mannose residues on one of the branches and the monosialylated sequences on the other. Two or more *N*-acetyl-lactosamine (Gal β 1-4GlcNAc) sequences linked together form the polylactosamine type. The bisecting type is recognized by a GlcNAc residue linked β 1-4 to the 3,6-disubstituted Man residue.

The *O*-linked glycans contain a common GalNAc residue, which can be substituted by the following residue and sequences:

Neu5Ac
Neu5Ac α 2-3Gal } GalNAc
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc

The above structures make up the majority of *N*- and *O*-linked glycans. There are however some exceptional glycoproteins with unusual glycan structures differing from the above.

Release of Glycans

In order to carry out structural analysis the glycans have to be released from the protein and fractionated into pure compounds. The methods employed depend on the type of carbohydrate-protein linkage, e.g. *N*- or *O*-linked carbohydrates. As an initial step for designing a suitable strategy, the intact glycoprotein is subjected to sugar analysis. Information about the monosaccharide composition and the total carbohydrate content will be helpful to decide how much glycoprotein is needed for the structural analysis. Furthermore, presence of GalNAc is in most cases diagnostic for *O*-linked and mannose for *N*-linked structures. *O*-Linked glycans are preferably released as alditols by alkaline borohydride degradation (1).

N-Linked glycans can be released by chemical or enzymatic methods. The chemical methods include hydrazinolysis (2), alkaline borohydride under conditions for *N*-linked glycans (3) and trifluoroacetylation (4). All chemical procedures, however, suffer from drawbacks due to formation of undesired degradation products specially at the reducing terminal of the released glycan. Several enzymatic methods are available that make use of peptidases and endo-glycosidases. Digestion with peptidases followed by separation of the glycopeptides offers a possibility to determine the glycosylation sites of the protein. Endo- β -*N*-acetylglucosaminidases cleave between *N*-ace-

ハイマンノース構造は幾つかのマンノース残基で置換されており、コンプレックス型はシアール酸の結合した配列を有している。ハイブリッド型は一つの分岐にマンノース残基を持ち、他の分岐にシアール酸が結合している。2ヶ以上の*N*-アセチルラクトサミン(Gal β 1-4GlcNAc)配列はポリラクトサミン型構造を形作る。パイセクティング型では3,6-置換されたManにGlcNAcが β 1-4結合している。

O-結合グリカンは共通なGalNAcを持ち、これは次の残基と配列で置換されている:

Neu5Ac
Neu5Ac α 2-3Gal } GalNAc
Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc

上にのべた構造が*N*-及び*O*-結合グリカンの大部分を占める。しかしながら、上に述べたものとは異なる例外的な構造を持った糖タンパクも幾つか存在する。

グリカンの切り出し

グリカンの構造解析をする為にはグリカンはタンパクから切り出され、純粋な化合物として分画されねばならない。その方法は糖-タンパクの結合様式、すなわち*N*-あるいは*O*-結合糖鎖に依存する。適当な戦略を立てる第一歩として、糖タンパクは糖の組成分析を行う。単糖と全糖分析は分析にどのくらいの糖タンパクが必要か決定するのに役立つ。更に、GalNAcの存在は大抵の場合、*O*-結合糖鎖、Manの存在は*N*-結合糖鎖の目安となる。*O*-結合糖鎖はアルカリボロハイドライド分解でアルジトールとして切り出されるのが好ましい(1)。

N-結合糖鎖は化学的、酵素的方法で切り出される。化学的方法としてはヒドラジン分解(2)、*N*-結合糖鎖向きのアルカリボロハイドライド処理(3)、トリフルオロアセトリシス(4)が知られている。しかしながら、全ての化学的方法は切り出されたグリカンの還元末端で生成する好ましくない分解物を生成するという欠点を持っている。ペプチダーゼ、エンドグリコシダーゼを利用する酵素的方法が利用される。ペプチダーゼを用いて分解し、それに続いてグリコペプチドを分離すると、タンパクの可能なグリコシル化部位を決定できる。エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼは*N*-,*N*'-キトビオース配列のGlcNAc残基間の結合を切断し、還元末端にGlcNAcを持ったオリゴ糖を生成する。インタクトな*N*-グリカンはPGNエース[ペプチド-*N*-(*N*-アセチル β グルコサミニル)アスパラギンアミダーゼ]による分解によって得られる。これらのエンド酵素の特異性については文献(5)を参照されたい。酵素的方法は副産物を生成せず、それに続く精製、分離を容易にするので、しばしば魅力的な選択である。

グリカンの分離

糖タンパクが*N*-, *O*-結合糖鎖の両方を持っている時、アルカリボロハイドライド処理によって切り出された*O*-グリカンは*N*-グリカンからゲルろ過で分離できる。この場合、*N*-グリカンは部分的に分解したタンパクに結合している。オリゴ糖アルジトールの分離は更にイオン交換クロマトグラフィーあるいはHPLC

tylglucosamine residues in the *N,N'*-diacetylchitobiose sequence and oligosaccharides with reducing terminal GlcNAc residue are formed. Intact *N*-linked glycans can be obtained by digestion with HPNG-ases [peptide-*N*⁴(*N*-acetyl- β -glucosaminyl)asparagine amidase]. The specificity of these endo enzymes can be found elsewhere (5). Enzymatic methods are often attractive choices, since no sideproducts are formed making the subsequent purification and separation easier.

Separation of Glycans

When the glycoprotein contains both *N*- and *O*-linked glycans the *O*-linked structures, released by alkaline borohydride, can be separated by gel filtration from the *N*-linked, which are still linked to the partially degraded protein. Further separation of the oligosaccharide alditols can be achieved by ion exchange chromatography or HPLC. Liberated *N*-linked oligosaccharides or glycopeptides can be fractionated using immobilized lectins such as Concanavalin A (Con A) to give three fractions, an unbound (tri- and tetraantennary) and two eluted with Me- α -mannoside at concentrations of 15 mM (bi-antennary) and 200 mM (high-mannose), respectively (6). The Con A fractions can be further separated by high performance ion exchange chromatography (HPIEC). An example of the type of separation obtained is demonstrated in Fig. 1 by some tetrasialylated triantennary oligosaccharide alditols from bovine fetuin (7). The structures are separated according to the sialic acid linkages.

によって行われる。切り出されたN-結合オリゴ糖、あるいは糖ペプチドは不溶化されたレクチンで分画できる。例えばコンカナバリンA(Con A)を用いると3つのフラクション、未吸着のフラクション(トリ-、テトラアンテナリー)と、15mMのメチル α マンノシドで溶出されるフラクション(バイアンテナリー)と200mMのメチル α マンノシドで溶出されるフラクション(ハイマンノース)に分けられる(6)。これらのCon Aフラクションは更に、ハイパフォーマンスイオン交換クロマトグラフィー(HPIEC)によって分離可能である。図1にウシフェツインからのテトラシアリレーテッドトリアンテナリーオリゴ糖アルジトールの分離の一例を示した(7)。これらの構造はシアール酸の結合に従って分離された。

構造分析

単離された化合物は構造分析を受ける。完全な構造の同定の為には次の点が明らかにされねばならない:

1. 単糖組成
2. 配糖体結合の位置
3. 単糖残基のリングサイズ
4. 絶対配座
5. 単糖の配列
6. アノメリックコンフィグレーション
7. 糖質以外の構成成分
8. タンパクのグリコシル化部位

それらの構造は化学分析、質量分析、¹H-NMR分析からのデータの組み合わせで決まる。ウシフェツインから単離された

Fig. 1. Separation on HPIEC of tetrasialylated triantennary oligosaccharide alditols. PAD, pulsed amperometric detection.

Structural Analysis

Isolated compounds are subjected to structural analysis. In order to arrive at a complete structural identification the following points have to be addressed:

1. Monosaccharide composition
2. Positions of glycosidic linkages
3. Ring size of the monosaccharide residues
4. Absolute configuration
5. Monosaccharide sequence
6. Anomeric configuration
7. Non-carbohydrate substituents
8. Glycosylation sites of the protein

The structures are deduced from combined data obtained from chemical analyses, mass spectrometry and ^1H -NMR spectroscopy. Some commonly occurring *N*- and *O*-linked oligosaccharide alditols, isolated from bovine fetuin, are chosen to illustrate the data obtained from the spectroscopic methods (7,8).

I. Chemical Analysis

The monosaccharide composition and the relative proportions of the residues can be determined by gas liquid chromatography (GLC) after acid hydrolysis and derivatization (9). Sialic acid cannot be determined by this procedure due to its lability to strong acids. Quantification of sialic acid is therefore performed using for example enzymatic or colorimetric methods (10). Binding positions between monosaccharide residues are determined by methylation analysis, (11). The derivatives are characterized by gas liquid chromatography-mass spectrometry (GLC-MS) and identified by GLC by comparison of retention times with standard compounds. The methylation analysis also gives information about the ring size of the monosaccharide residues i.e. pyranosides and furanosides. Absolute configuration of the monosaccharide residues can be determined by GLC of peracetylated glycosides prepared in the presence of 2-(+)-octanol (12). If glycopeptides have been obtained by proteolytic digestion and subsequent separation the glycosylation sites of the protein can be determined after amino acid analysis.

II. Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry

The monosaccharide sequence and the molecular weight (M) can be determined, after permethylation, by fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS). Additional structural information in terms of binding positions between monosaccharide residues can be obtained by carrying out, prior to analysis by FAB-MS, the following reaction steps; a) periodate oxidation b) reduction with NaBD_4 c) peracetylation or permethylation (13,14). The monosaccharide sequence and the binding

いくつかのごく普通のN-、及びO-結合オリゴ糖アルジトールについてのスペクトル法からのデータが文献(7, 8)に示されている。

I. 化学分析

単糖組成と糖残基の相対比は酸分解と誘導体化の後、ガスクロマトグラフィー(GLC)により決定される(9)。シアール酸は強酸に弱い為に、この方法では定量できない。それゆえに、シアール酸の定量には酵素的方法、あるいは比色法が用いられる(10)。単糖間の結合位置はメチル化分析で決定される(11)。メチル化化合物はガスマスで分析され、標準物質とリテンションタイムを比較してGLCで同定される。メチル化分析は又、単糖のリングサイズ、すなわちピラノースかフラノースについての情報を与える。単糖残基の絶対配座は2-(+)オクタノールの存在下で調製された配糖体のアセチル化誘導体のGLC分析により決定できる(12)。もし糖ペプチドがタンパク分解酵素による分解とそれに続く分離によって得られるならば、タンパクのグリコシル化の部位をアミノ酸分析の後に決定できる。

II. FABマス分析(FAB-MS)

単糖の配列と分子量はメチル化の後、FAB-MSで決定できる。単糖間の結合位置はFAB-MS分析の前に次の反応ステップにより得られる; a)過ヨード酸化、b)NaBD₄による還元、c)パーアセチレーションあるいはパーメチレーション(13, 14)。単糖の配列と結合位置は1次と2次の配列イオンから決定できる。配列イオンは配糖体結合の開裂から生成する。

上に述べられた反応ステップで得られたテトラシアリレートトリアンテナリー構造のFABマスマスペクトルを図2に示した。m/z 289とm/z 698の1次配列イオンと、m/z 698からメタノールが除去されて生成したm/z 666の2次配列イオンからNeu5Ac2-6Gal1-4GlcNAcの配列が決定された。もう1つのNeu5Ac2-3Gal1-4GlcNAcの配列はm/z 289, m/z 493, m/z 706, m/z 738の1次、2次の配列イオンから決定された。ここでm/z 706はm/z 738からメタノールの除去で生成した。2つのシアール酸の結合した配列、Neu5Ac2-3Gal1-3[Neu5Ac2-6]GlcNAcはイオンm/z 289, m/z 493, m/z 1013から決定された。還元末端のGlcNAcへの結合位置を決定する為に還元化合物の過ヨード酸化がなされなければならない。還元された末端のイオン、m/z 233とm/z 478は還元されたGlcNAcの4の位置がもう1つのGlcNAcで置換されていることを示す。Man残基への結合位置はこのスペクトルからは結論できないが、後で述べる ^1H -NMRからその情報が得られる。[M+23]⁺-イオン、m/z 3553はNeu5Ac2-3Galの末端配列を持った2つの分岐とNeu5Ac2-6Galの配列を持った1つの分岐を有するテトラシアリレートトリアンテナリー構造に一致する。

上述の方法がNeu5Ac α 2-3Gal β 1-3[Neu5Ac α 2-6]GalNAc-olの構造を持つO-結合オリゴ糖アルジトールに適用された。GalNAc-olは3, 6で置換されているので、過ヨード酸化の後、GalNAc-olのC4とC6の結合が開裂し、2つの化合物が生成する。C3の位置に結合している分岐はN-アセチルスレオサミニト

positions of the glycosidic linkages are determined from the primary and secondary sequence ions. The sequence ions are formed by cleavage of the glycosidic bonds.

A FAB-mass spectrum of a tetrasialylated triantennary structure obtained after the above reaction steps is shown in Fig. 2. The primary sequence ions of m/z 289 and 698 combined with a secondary ion of m/z 666, formed by elimination of methanol from m/z 698, determine a sequence of Neu5Ac2-6Gal1-4GlcNAc. Another branch with a sequence of Neu5Ac2-3Gal1-4GlcNAc is deduced from the primary and secondary sequence ions of m/z 289, 493, 706 and 738, where the m/z 706 ion is formed by elimination of methanol from m/z 738. A disialylated sequence of Neu5Ac2-3Gal1-3[Neu5Ac2-6]GlcNAc is determined by the ions of m/z 289, 493 and 1013. In order to determine the binding position to the reducing terminal GlcNAc the periodate oxidation has to be carried out on the reduced compound. Ions from the reduced terminal of m/z 233 and 478 show that the reduced GlcNAc is substituted in the 4-position by another GlcNAc residue. The binding positions to the Man residues cannot be deduced from the spectrum, but this information is provided by $^1\text{H-NMR}$ as discussed below. An $[M+23]^+$ -ion of m/z 3553 is consistent with a tetrasialylated triantennary structure with two branches terminated with a sequence of Neu5Ac2-3Gal and one branch with a Neu5Ac2-6Gal sequence.

The above method was applied on an *O*-linked oligo-

ールをアグリコンとして持ち、C6の位置に結合している分岐はエチレングリコールを末端に持つ(15)。アセチル化の後に分析すると、図3(スペクトルA)に示したFAB-MSスペクトルが得られた。Gal残基のC2の水酸基とのラクトン形成の為に過ヨード酸化で分解されたシアール酸の存在を示す配列イオンの存在は観察されなかった(15)。N-アセチルスレオサミニトールは m/z 231、 m/z 545の配列イオン、 m/z 793の $[M+1]^+$ イオンで同定されるので、Neu5Ac2-3Galの配列はGalNAc-olの3の位置に結合していると結論できる。 m/z 362の $[M+1]^+$ イオンはエチレングリコールに結合し、更にラクトンを介在しているNeu5Acのものである。それゆえに、元の糖鎖ではGalNAc-olの6位はNeu5Acによって置換されていなければならない。メチル化化合物のFAB-MSは m/z 289, 493の配列イオンがNeu5Ac2-3Galに特徴的であることを示している(図3、スペクトルB)メチル化によってラクトンは開環した。N-アセチルスレオサミニトールに相当するイオンは m/z 189である。 m/z 699の $[M+1]^+$ イオンはアセチル化サンプルの先に述べたデータを指示する。メチル化サンプルではNeu5Ac-エチレングリコールを同定する特別なイオンは観察されなかった。

O-アセチルグループ、リン酸、硫酸といった非糖質置換基が糖タンパクに観察される。上述の方法はこれらの置換基の結合位置を決定するのに有効である。

III. $^1\text{H-NMR}$ 分析

$^1\text{H-NMR}$ は更に構造に関する証拠を与え、FAB-MSで得られたデータを確認する。高分解能 $^1\text{H-NMR}$ は非破壊分析法であり、

Fig. 2. FAB-mass spectrum of a tetrasialylated triantennary oligosaccharide alditol after periodate oxidation, NaBD_4 -reduction and permethylation. The high mass scan was recorded separately and in the presence of sodium iodide.

saccharide alditol with a structure of Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3[Neu5Ac α 2-6]GalNAc-ol. Since the GalNAc-ol is 3,6-disubstituted two products will be formed, after periodate oxidation, by cleavage between carbons 4 and 5 within the alditol. The branch connected to the 3-position will have *N*-acetylthreosaminitol as aglycon and the branch linked to the 6-position will be terminated with ethylene glycol (15). Analysis of the products after acetylation gave a FAB-mass spectrum shown in Fig. 3 (spectrum A). No sequence ions indicating a periodate degraded sialic acid are seen, due to lactone formation involving the hydroxyl at carbon 2 of the Gal residue (15). The *N*-acetylthreosaminitol is recognized by the ion of *m/z* 231 and combined with a sequence ion of *m/z* 545 and an $[M+1]^+$ -ion of *m/z* 793, it can be concluded that the Neu5Ac2-3Gal sequence occupies the 3-position of the GalNAc-ol. An $[M+1]^+$ -ion of *m/z* 362 is consistent with a Neu5Ac linked to ethylene glycol and further connected via a lactone. The 6-position of the GalNAc-ol must therefore, in the native compound, be substituted by a Neu5Ac residue. FAB-MS of the permethylated compound shows sequence ions of *m/z* 289 and 493 specific for a Neu5Ac2-3Gal sequence (Fig. 3, spectrum B). During the methylation procedure the lactone was opened. The corresponding ion for the *N*-acetylthreosaminitol is *m/z* 189. An $[M+1]^+$ -ion of *m/z* 699 supports the previous data on the acetylated sample. No specific ions identifying the Neu5Ac-ethylene glycol are seen in the permethylated sample.

Non-carbohydrate substituents like *O*-acetyl groups, phosphates and sulfates are sometimes found in glycoproteins.

誘導体化されていないサンプルに対して、D₂Oに溶解させ、典型的なトリアンテナリー構造では15nmol(15 μ g)の量で分析が行われる。構造の情報は込みあったリングプロトンの領域から離れたシグナルから成る構造情報グループから主として決められる。

構造情報グループは単糖のタイプ、アノメリックコンフィグレーション、他の糖残基や非糖質置換基との結合位置とコンフォーメーションの変化に対してセンシティブである。

次の共鳴はN-あるいはO-グリカンの共通の構造情報グループの例である: Man残基のH-1とH-2, GlcNAc, GalNAc, FucとGalのH-1、シアール酸のH-3(ax)とH-3(eq)、FucとN-アセチル基のCH₃(16)。

図4にテトラシアリレーテッドトリアンテナリー構造の500 MHzスペクトルが示されている。GlcNAcのCH₃の4つのシグナルが観察され、Man4とMan4'のH-1に対するケミカルシフト(5.131 ppmと4.902 ppm)と特にMan3とMan4とMan4'のH-2に対するケミカルシフト(4.222 ppm, 4.222 ppm, 4.12 ppm)はMan4'に α 1-6結合した1つの分岐とMan4に α 1-3結合した2つの分岐を持ったトリアンテナリー構造を示す。4つのシアール酸が存在し、その2つは α 2-3でGalに結合し(H-3ax/H-3eq; 1.805/2.758 ppmと1.786/2.758 ppm)、その1つは α 2-6でGalに結合し(H-3ax/H-3eq; 1.727/2.671 ppm)ている。Man4とMan4'のH-1に対するケミカルシフト、5.131 ppmと4.902 ppmは α 1-3結合したMan4残基の2の位置に結合した分岐の α 2-6シアール酸と、 α 1-6結合したMan4'残基に結合した分岐の α 2-3シアール酸に相当する。従って、 α 1-3結合したMan4の4の位置に結合した分岐には末端に α 2-3シアール酸が結合している。第4番目のシアー

Fig. 3. FAB-mass spectra of an *O*-linked disialylated tetrasaccharide alditol after periodate oxidation, NaBD₄-reduction, and peracetylation(A) and permethylation(B).

The above method can be useful to determine binding positions of these substituents.

III. ^1H -NMR spectroscopy

^1H -NMR Spectroscopy gives further evidence for the structure and confirms the previously obtained data. High resolution ^1H -NMR is a non destructive analytical method and is performed on the underivatized sample, dissolved in D_2O , requiring about 15 nmol (50 μg) of a typical triantennary structure.

The structural information is primarily deduced from the structural reporter groups consisting of signals shifting out from the crowded region of overlapping ring protons. The structural reporter groups are sensitive to several features in the structure such as type of monosaccharide, anomeric configuration, binding positions of other sugar residues or non-carbohydrate substituents and conformational changes.

The following resonances are examples of common reporter groups in *N*- or *O*-linked glycans: H-1 and H-2 of the Man residues, H-1 of GlcNAc, GalNAc, Fuc and Gal, H-3 axial (ax) and H-3 equatorial (eq) of sialic acid, CH_3 signals of Fuc and *N*-acetyl groups (16).

A 500 MHz ^1H -spectrum of the tetrasialylated triantennary structure is shown in Fig. 4. Five signals from GlcNAc CH_3 groups are found and the chemical shifts for H-1 of Man4 and Man4' (5.131 and 4.902 ppm) and especially H-2 of Man3, Man4 and Man4' (4.222, 4.222 and 4.12 ppm) indicate a triantennary structure with one branch connected to the α 1-6 linked

ル酸に対する構造情報グループ(H-3ax/H-3eq; 1.765/2.729 ppm)と4.499 ppmの β Galのアノメリックプロトンのケミカルシフトは α 1-3結合したMan4の4の位置に結合したNeu5Ac α 2-3Gal β 1-3[Neu5Ac α 2-6]GlcNAc β の存在を示す。これらのデータは以前に発表された結果(7)と一致する。

4糖アルジトールのスペクトルが図5に示されている。GalNAc-olの4.379 ppm(H-2), 4.240ppm(H-5), 2.042 ppm(CH_3)のシグナルはシアール酸による6の位置の置換(H-3ax/H-3eq; 1.692/2.723 ppm, CH_3 ; 2.031 ppm)と β Galによる3の位置の置換を示している。4.541 ppmと4.117 ppmのGal残基のH-1とH-3のケミカルシフトはそれぞれこのGalに α 2-3結合した第2のシアール酸の存在(H-3ax/H-3eq; 1.799/2.774 ppm)を示している。これらのデータは以前の発表(17)と一致する。

BTG/帝京大学医学部
川口吉太郎 訳

Fig. 4. A 500 MHz ^1H -NMR spectrum of a tetrasialylated triantennary oligosaccharide alditol.

Fig. 5. A 500 MHz ^1H -NMR spectrum of an O-linked disialylated tetrasaccharide alditol.

Man4' and two branches linked to the α 1-3 linked Man4 residue. Four residues of sialic acid are present, two linked α 2-3 to Gal (H-3ax/H-3eq; 1.805/2.758 and 1.786/2.758 ppm) and one linked α 2-6 to Gal (H-3ax/H-3eq; 1.727/2.671 ppm). The chemical shifts for H-1 of Man4 and Man4' at 5.131 ppm and 4.902 ppm are in accordance with an α 2-6 linked sialic acid on the branch bound to the 2-position of the α 1-3 linked Man4 residue, and an α 2-3 linked sialic acid on the branch connected to the α 1-6 linked Man4' residue. Consequently the branch attached to the 4-position of the α 1-3 linked Man4 is terminated with an α 2-3 linked sialic acid. The reporter groups for the fourth sialic acid residue H-3ax/H-3eq at 1.765/2.729 ppm, together with a typical shift for a β Gal-anomeric signal at

4.499 ppm indicate a sequence of Neu5Ac α 2-3Gal1-3[Neu5Ac α 2-6]GlcNAc β linked to the 4-position of the α 1-3 linked Man4 residue. These data are in agreement with previously published (7).

A spectrum of the tetrasaccharide alditol is presented in Fig. 5. The signals from the GalNAc-ol at 4.379 ppm (H-2), 4.240 ppm (H-5) and 2.042 ppm (CH_3) indicate substitution of this residue in the 6-position by sialic acid (H-3ax/H-3eq; 1.692/2.723 ppm, CH_3 ; 2.031 ppm), and in the 3-position by a β -linked Gal residue. Judged by the chemical shifts for H-1 and H-3 of the Gal residue at 4.541 ppm and 4.117 ppm, respectively, a second Neu5Ac residue is linked α 2-3 to this galactose (H-3ax/H-3eq; 1.799/2.774 ppm). The data obtained are in agreement with previous findings (17).

References

1. Carlson, D.M. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 2984-2986
2. Yoshizawa, Z., Sato, T., and Schmid, K. (1966) *Biochem. Biophys. Acta* **121**, 417-420
3. Lee, Y.C., and Scoocca, J.R. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 5753-5758
4. Nilsson, B., and Svensson, S. (1979) *Carbohydr. Res.* **72**, 183-189
5. Maley, F., Trimble, R.B., Tarentino, A.L., and Plummer Jr., T.H. (1989) *Anal. Biochem.* **180**, 195-204
6. Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G., and Montreuil, J. (1981) *Eur. J. Biochem.* **117**, 41-55
7. Green, E.D., Adelt, G., Baenziger, J.U., Wilson, S., and van Halbeek, H. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 18253-18268
8. Nilsson, B., Norden, N.E., and Svensson, S. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 4545-4553
9. Sawardeker, J.S., Sloneker, J.H., and Jeanes, A.R. (1965) *Anal. Chem.* **37**, 1602-1604
10. Jourdan, G.W., Dean, L., and Roseman, S. (1976) *J. Biol. Chem.* **246**, 430-435
11. Björndal, H., Hellerqvist, C.G., Lindberg, B., and Svensson, S. (1970) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **9**, 610-619
12. Leontin, K., Lindberg, B., and Lönngren, J. (1978) *Carbohydr. Res.* **63**, 359-362
13. Angel, A.-S., Lindh, F., and Nilsson, B. (1987) *Carbohydr. Res.* **168**, 15-31
14. Angel, A.-S., and Nilsson, B. (1990) *Methods Enzymol.* **193**, 587-607
15. Krotkiewski, H., Lisowska, E., Angel, A.-S., and Nilsson, B. (1988) *Carbohydr. Res.* **184**, 27-38
16. Vliegthart, J.F.G., Dorland, L., and van Halbeek, H. (1983) *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **41**, 209-374
17. van Halbeek, H., Dorland, L., Vliegthart, J.F.G., Fiat, A.-M., and Jolle's, P. (1981) *FEBS Let.* **133**, 45-50