Method for Analysis of Component Sugars by Fluorescence Labeling

ピリジルアミノ化による糖組成分析法

Jun SUZUKI

Biotechnology Research Laboratories

Takara Shuzo Co., Ltd. Seta 3-4-1, Otsu, Shiga 520-21, JAPAN, FAX: 81-775-43-2494

Recently, various reports have appeared that stress the importance of the functions of sugar chains in the biological activity of complex carbohydrates. Techniques to study the structures of sugar chains have made great progress in the past decade, and many structures have been determined. The method for the fluorescence labeling of sugars with the use of 2-aminopyridine, first reported by Hase *et al.* (1) and further improved since, is one of the methods used for analysis. The chemical reaction of reductive pyridylamination is shown in Fig. 1. Takemoto *et al.* have used this method for the analysis

近年、複合糖質の生理活性を担う糖鎖構造の重要性について様々な報告がなされてきた。その研究のための糖鎖構造解析技術はこの十年間で非常に進歩し、数多くの糖鎖の構造が決定されている。数ある糖鎖構造解析法の中で、2-アミノピリジンによる糖の蛍光標識法は長谷らにより開発され(1)、以来、改良が重ねられてきた。糖のピリジルアミノ化(PA化)反応を図1に示す。武本らはこの方法を糖組成分析に応用し、

Fig. 1. Reductive Pyridylamination

of component sugars, and proposed a sensitive and simple method using high-performance liquid chromatography (HPLC)(2). Methods that use HPLC have become popular especially in the recent past, because the procedure is easy, the time needed for analysis is short, and the reproducibility is good. There are many other HPLC methods, including the radioactive detection of sugar alcohols labeled with tritium (3), and pulsed amperometric detection which does not require precolumn labeling because sugars have charges in alkaline conditions (4). Among the various methods, we expect the fluorescence labeling method to be the most sensitive. Recently we succeeded in simplifying the whole procedure, including the steps of hydrolysis, N-acetylation, and pyridylamination (5). I would like to introduce our method here.

1. Hydrolysis and N-acetylation of a glycoconjugate

Beforehand analysis, the glass tube to be used should be boiled in 4 N hydrochloric acid for 3 h and washed well with distilled water to remove the impurities derived from the glass that might interfere with the analysis. Next, to avoid the contaminants derived from dust in the air, especially glucose, the tube is heated in an airbath at 200°C for 3 h. The sample (100 pmol - 10 nmol) is placed in the glass tube and freeze-dried. To

高感度でかつ簡便な分析法として、蛍光標識後HPLCにて分析する方法を提唱した(2)。HPLCによる分析法は最近特によく使われるようになったがその理由として、操作が簡便であり、分析時間が短く、再現性がよい、などが挙げられる。PA化による蛍光検出法以外にも、トリチウム標識した糖アルコールを検出する方法(3)や糖を何ら標識せずアルカリ条件下で糖がチャージを持つことを利用した電気化学検出法(4)など、多くの方法があるが、その中でも蛍光標識法がもっとも高感度な分析法として期待される。最近我々は、複合糖質を酸加水分解、N-アセチル化した後、PA化する一連の反応の簡素化に成功したので(5)、ここでその方法を紹介したい。

1. 複合糖質試料の酸加水分解、N-アセチル化

100 pmol ~ 10 nmolの試料をガラス製試験管にとり、凍結乾燥などの方法で十分乾燥させる。4 M トリフルオロ酢酸50 μ lを加えよく攪拌した後、減圧下封管する。(使用する試験管はガラス由来のコンタミを取り除く意味で4 N 塩酸中で100°Cにて3時間加熱し、蒸留水でよくすすぎ、さらに空気中のほこり

the residue is added 50 μ l of 4 M trifluoroacetic acid, and the tube is sealed under reduced pressure. The tube is heated at 100°C for 3 h to hydrolyze the contents. After the tube is opened, ribose (100 pmol or 1 nmol) is added as an internal standard. The solution is dried under reduced pressure. Free amino groups are acetylated by the addition of 50 μ l of a mixture of pyridine, methanol, and water (3:6:2) plus 2 μ l of acetic anhydride. The solution is left at room temperature for 30 min with occasional stirring. Again the solution is dried under reduced pressure and a mixture of sugars is obtained.

2. Pyridylation of sugars by the PALSTATION

Fluorescence labeling with the use of 2-aminopyridine can be done by the pyridylation system PALSTATION (Takara Shuzo Co., Ltd., Kyoto, Japan). The residue obtained is dissolved in a small amount of water and transferred to a PALSTATION reaction vial. The solution is dried under a stream of nitrogen gas. After the addition of 10 μ l of a coupling reagent (prepared by 100 mg of 2-aminopyridine being dissolved in 50 μ l of acetic acid and 60 μ l of methanol) to the residue, the solution is mixed well and heated at 90°C for 15 min. Excess amounts of the reagents are removed by evaporation under a stream of nitrogen gas at 60°C for 20 min. Then 10 μ l of a reducing reagent (prepared by 6 mg of borane-dimethylamine complex being dissolved in 100 μ l of acetic acid) is added, and the solution is mixed well and heated at 90°C for 30 min. The reaction mixture is dried under a stream of nitrogen gas with methanol and toluene to remove excesses of the reagents. Thus 2-aminopyridine is bound to the reducing end of the sugars, and fluorescent derivatives are made. Total recovery of sugars as pyridylamino (PA-) sugars is more than 90% for both neutral and N-acetylamino sugars. The PA-sugars are stable against light, acid, and alkali, unlike many other fluorescent compounds. The PA-sugars obtained are dissolved in water, and a portion of the solution is injected directly into the HPLC apparatus. Assay is done by comparison of the peak heights of the PA-sugars of the sample to those of the mixture of standard sugars that was hydrolyzed, N-acetylated, and pyridylaminated in the same way. Removal of excess reagents by evaporation under a stream of nitrogen gas with the use of PALSTATION is satisfactory; there is no need of purification after labeling, and the solution can be analyzed directly by HPLC. It would be difficult to inject the solution directly and to analyze the PA-sugars if the excess reagents were not removed sufficiently. So when the PALSTATION is not used, it is necessary to gel-filter the sample after pyridylation (2).

3. HPLC analysis

Separation of borate-complexes of sugars by anion-exchange chromatography is a classical method that has been studied for long. We have found that the borate-complexes of PA-sugars can be separated well by the use of a porous, quaternary amine-type resin. PALPAK Type A (Takara Shuzo Co., Ltd.), a strong-base anion-exchange column, can be used. The solvent is a mixture of 1 part of acetonitrile and 9 parts of 0.7 M

に含まれるグルコースなどのコンタミを取り除くためにエアバスで 200°C にて 3 時間加熱したものを用いる。) これを 100°C にて 3 時間加熱し酸加水分解を行う。開管し、内部標準としてリボース 100 pmol 又は 1 nmol を添加して減圧下濃縮乾固する。残渣をピリジン-メタノール-水溶液 (3:6:2) 50 μ l に溶解した後、無水酢酸 2 μ l を加え、時々攪拌しながら室温にて 30 分放置し、N-アセチル化反応を行う。再び減圧下濃縮乾固し、単糖混合物を得る。

2. PALSTATION による単糖混合物の PA 化

糖質 PA 化装置、PALSTATION (宝酒造) を用いて 2-アミノピリジンによる蛍光標識反応を行った。先の残渣を少量の水に溶解し、PALSTATION 専用バイアルに移し、窒素気流下、濃縮乾固する。残渣にカップリング試薬 (2-アミノピリジン 100 mg を酢酸 50 μ l、メタノール 60 μ l に溶解して調製) 10 μ l を加え、よく攪拌し、90°C にて 15 分反応させる。窒素気流下、60°C にて 20 分濃縮乾固し、過剰の試薬を除く。残渣に還元試薬 (ボラン-ジメチルアミンコンプレックス 6 mg を酢酸 100 μ l に溶解して調製) 10 μ l を加え、よく攪拌し、90°C にて 30 分反応させる。再び過剰の試薬を除くためにメタノール、トルエンを加えて窒素気流下共沸操作を行う。これらの操作により糖の還元末端に 2-アミノピリジンを結合させ、蛍光物質とする。中性糖、N-アセチルアミノ糖共、反応率は 90% 以上である。またピリジルアミノ化した糖は他の蛍光物質と異なり、光、酸、アルカリに対しても非常に安定である。後は残渣を水に溶解し、溶液の一部を直接 HPLC に注入して分析する。定量は、同様に酸加水分解、N-アセチル化、PA 化した標準単糖混合物と試料の PA 化糖のピークの高さを比較して行なう。このように PALSTATION を使って窒素気流下、濃縮乾固することにより、非常に効率よく過剰の試薬の除去が行えるので、PA 化後精製することなくそのまま HPLC 分析することが可能となった。過剰の試薬を十分に除去しなければ、直接 HPLC に注入して分析することは困難であるので PALSTATION を使用しない場合、PA 化後にゲルろ過を行うなどの操作が必要となる (2)。

3. HPLC 分析

糖とホウ酸との錯体を陰イオン交換クロマトグラフィーで分離分析する方法は古くから研究されていたが、我々はピリジルアミノ化糖のホウ酸錯体が多孔性第 4 級アンモニウム型樹脂を用いると非常によい分離を示すことを見出した。カラムは強塩基性陰イオン交換カラムである PALPAK Type A (宝酒造) を用いた。溶出液は 0.7 M ホウ酸緩衝液 (水酸化カリウムにて pH 9 に調整) に 10% となるようアセトニトリルを混合し

borate buffer adjusted to pH 9 with potassium hydroxide. The flow rate is 0.3 ml/min and the column temperature is 65°C. The excitation wavelength is 310 nm and the emission wavelength is 380 nm. The separation of ten kinds of sugars, that are usually found in glycoconjugates, is shown in Fig. 2. Other

たものを 65°C にて 0.3 ml/min で流す。蛍光検出は励起波長 310 nm、蛍光波長 380 nm で行う。複合糖質によく見られる 10 種類の糖の分離を図 2 に示した。PALPAK Type A と同じタイプの

Fig. 2. Separation of Standard PA-sugars

columns of the same type as PALPAK Type A, such as TSKgel Sugar AXI (Tosoh Corp., Tokyo, Japan) and CarboPac PA-1 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA), gave good separation when borate buffer is used, although the conditions appropriate for each column are different. The amounts of PA-sugars were checked and standard curves of PA-sugars ranging from 10 pmol to 10 nmol showed good linearity. The remaining trace of 2-aminopyridine and the protein and lipid parts of glycoconjugates were eluted in different regions from those of PA-sugars, so those impurities did not interfere with the component analysis of sugars. We have analyzed various glycoproteins and glycolipids with 100 pmol of the sample as the starting material, and confirmed that this method is useful.

Because this method is highly sensitive, even a trace amount of sugar can be detected. A question that always arises is whether the trace detected (especially when it is glucose) is one of the components of the sugar chain structure or not. This question depends very much on the degree of the purification of the sample. Conclusion cannot be made from component sugar analysis alone; other studies of the sugar chain structure are needed. However, to study the structure of an unknown sugar chain, it is usual to analyze the component sugars first. If this method of analysis is then used, the results will provide very useful information about the structure. We hope that this method will be of use to researchers studying sugar chain structures, and that studies of the structures and functions of glycoconjugates will be encouraged.

I thank Dr. Sumihiro Hase of Osaka University College of Science for his advice in the writing of this technical note.

カラム、例えば、TSKgel Sugar AXI (東ソー) や CarboPac PA-1 (Dionex) も溶出条件は異なるが、ホウ酸緩衝液を用いることにより同様に良い分離を得た。定量性に関しては、出発の糖の量が 10 pmol から 10 nmol までの検量線を作成し、よい直線性を示すことを確認している。また、残存する 2-アミノピリジンや試料のタンパク質、脂質部分由来のピークは早い時間に溶出され、糖のピークと溶出位置が異なるので、糖組成分析には影響しない。我々は様々な糖タンパク質、糖脂質試料を用いて出発量 100 pmol の高感度分析を行ない、この方法の有用性を確認している。

ここで常に問題となるのは、高感度分析であるがために、わずかに検出される糖 (特にグルコース) が糖鎖構造中に含まれるものか否か、ということである。これは試料の精製度合に大きく左右されるので、糖組成分析の結果だけから結論が出せるものではなく、他の糖鎖構造解析の結果も合わせて決定しなければならない。しかし、未知の糖鎖の構造解析を行うにあたり、最初に糖組成分析を行うのは常套手段であり、その時にこのような簡便で高感度な検出法を用いれば大変有益なデータが得られることはまちがいない。本法が様々な糖鎖の構造解析を行う一助となり、糖の構造と機能に関する研究が益々発展することを願っている。

本稿執筆にあたり適切なご助言をいただきました大阪大学理学部の長谷純宏先生に感謝致します。

References

1. Hase, S., Ikenaka, T., and Matsushima, Y. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **85**, 257-263
2. Takemoto, H., Hase, S., and Ikenaka, T. (1985) *Anal. Biochem.* **145**, 245-250
3. Takeuchi, M., Takasaki, S., Inoue, N., and Kobata, A. (1987) *J. Chromatogr.* **400**, 207-213
4. Hardy, M. R., Townsend, R. R., and Lee, Y. C. (1988) *Anal. Biochem.* **170**, 54-62
5. Suzuki, J., Kondo, A., Kato, I., Hase, S., and Ikenaka, T. (1990) *Agric. Biol. Chem.*, in press.