

## 酸性オリゴ糖の質量分析計 (SIMS) による構造解析

川名 広子, 有田 政信

(平成10年 9月30日受理)

### Studies on the structural analysis of acidic oligosaccharides by secondary ion mass spectrometry, SIMS

Hiroko KAWANA and Masanobu ARITA

(Received on September 30, 1998)

#### 緒 言

近年, 糖鎖生物学 (Glycobiology) は, 核酸やタンパク質に続く第3の分子生物学として大変注目をあびている。糖鎖は, ホルモンを受容体, 受精, 細胞接着, 情報伝達, 細胞間認識, 癌化, 老化, 免疫などの重要な生命現象と深い関わりをもっていることが明らかとなっている<sup>1)~4)</sup>。糖鎖が生体内で生理活性を有する場合, ごく微量でその活性を示すことが多いため, 微量の糖鎖を効率よく正確に分離・分析することが必要とされている。しかしながら, 糖鎖は, 構成糖, 糖配列, 結合様式, アノマー (anomer), 分岐構造などから, 多様な構造を形成する可能性があるため, 糖鎖構造を決定することはとても困難でありかつ煩雑である。

近年では, 著しい様々な分析機器 (HPLC, GC, NMR, MS等) の発達によって, これらの機器を用いた糖鎖構造研究が行われている<sup>5)~10)</sup>。そして, 単なる構造解析手段から, 生化学, 生理学や生物学的な生体調節機能・高次構造情報を得る“機能解析のための構造解析”へと発展してきている。質量分析計 (マスマスペクトロメーター) においても同様であり, その発展が糖鎖構造解析に大きく寄与している。

糖鎖生物学の領域に質量分析計が導入されたのは Lindberg らによる“単糖のメチル化誘導体をガスクロマトグラフィーにより分離し, それを質量分析する”手法が最初であった<sup>11)</sup>。その後, Karlsson らによって複合糖質の構造解析が始められ, メチル化した糖脂質や糖ペプチドを直接高分解能-高分子量 (high-mass

range with high resolution) 質量分析計で分析し, 分子量及び糖残基の配列を知ることができるようになった<sup>12)</sup>。つまり, 難揮発性物質であり分析が困難であった糖及び糖脂質の質量分析は, TMS (トリメチルシリル) 化や完全メチル誘導体化を行うことによって分析が可能となった。最近では, FAB法 (Fast Atom Bombardment), ESI法 (Electron Spray Ionization), MALDI (Matrix-assisted Laser Desorption Ionization) 法などの新しいイオン化法によって, 試料を誘導体とする必要もなく, 生体由来の微量成分を測定できるようになってきた。

本研究室では, ウシ及びヒトなどの真獣類の初乳及び常乳に含まれるオリゴ糖の構造や機能について研究を行い報告してきた<sup>13), 14)</sup>。乳中オリゴ糖には様々な生体調節機能のあることが現在までに明かとされている。例えば, ラクチュロースによる (乳糖不耐症の人はLac) 血中アンモニアの除去作用, Lac のカルシウム及び鉄の吸収促進作用, ガラクトシルラクトースのビフィズ菌増殖促進活性等<sup>15), 16)</sup> が挙げられる。更に, 近年では, シアル酸, シアリルオリゴ糖, シアル酸含有複合糖質の様々な生体調節機能が報告され<sup>16)~18)</sup>。これらの生体内での作用メカニズムの解明に注目が集められている。しかし, これらは微量成分であるため, 大量調製が困難であることから, なるべく微量で構造解析を行うことができる方法を開発することが必要とされている。そこで, ウシ初乳に含まれる主要酸性オリゴ糖を精製し, SIMS による構造解析方法を検討したので報告する。

## 実験材料及び方法

### 1. 実験材料

ウシ初乳（出産後2日目・初産）は、森永乳業株式会社・栄養研究所から供与された。初乳は搾乳後、直ちに冷凍し分析時まで $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。糖標準として分析に用いたグルコース及びガラクトースは関東化学㈱より、 $\alpha$ -、 $\beta$ -ラクトース、3'-シアリルラクトース、6'-シアリルラクトース及び6'-シアリルラクトサミンはSIGMA CHEMICAL CO. より購入した。ピリジルアミノ誘導体化試薬は、GlycoTAG reagent Kit（宝酒造㈱製）を用いた。

### 2. 乳中粗糖質画分の抽出、分画及び精製方法

ウシ初乳を $37^{\circ}\text{C}$ に加温し、Folch の分配法によって粗糖質画分を得た。すなわち、試料に5倍量のクロロホルム:メタノール(2:1,v/v)を加え、十分に攪拌した後、遠心して、糖質を含む水層(上層)を集め、減圧・濃縮、凍結乾燥を行い粗糖質画分とした。

この粗糖質画分を前報<sup>13), 14)</sup>に従って、Cellulofine GCL-25-mカラム(100×2.6cmI.D., チッソ㈱製)によって分画を行った。各溶出画分は、シアル酸及び全糖の検出を行い、各オリゴ糖画分は、凍結乾燥後、イオン交換カラムクロマトグラフィーの試料とした。

イオン交換カラムクロマトグラフィーは、ムロマック 1-X (400mesh, 1.5cmI.D.×25cm) によって行った。すなわち、10mM酢酸ピリジン緩衝液(pH5.0)で平衡化し、 $5^{\circ}\text{C}$ の低温庫内で、流速1.5ml/min, 分画容量3.2ml, 55mMから1250mM酢酸ピリジン緩衝液(pH5.0)までのリニアグラジェント溶出によって分画した。各溶出画分はシアル酸の検出を行い、凍結乾燥後、薄層クロマトグラフィー(TLC)によって確認した。

### 3. HPLCによる精製糖鎖の分析

ウシ初乳より得た酸性オリゴ糖画分と糖標準をGlycoTAG(宝酒造㈱製)を用いて糖鎖の還元末端に2-aminopyridineを還元アミノ化反応で結合させ蛍光誘導体(PA-オリゴ糖)<sup>5)</sup>とした。得られたPA-オリゴ糖試料は、CLASS-LC10 HPLC(島津製作所製)装置で2種類のカラム(イオン交換型のPALPAK Type N column及び順相型のPALPAK Type S column; 宝酒造㈱製)を用いて分析を行い、2次元糖鎖マップを

作成して<sup>6)</sup>糖鎖構造解析を行った。溶出条件は、前報<sup>14)</sup>と同様に行った。座標平面の糖標準溶出位置及び未知構造の糖鎖の溶出位置から、糖鎖構造、分子量及びイオン強度等の推定をするとともに、精製度の確認を行った。

### 4. 2次イオン化マススペクトロメトリー(SIMS)による糖鎖及びPA-糖鎖の解析

精製した乳由来酸性オリゴ糖及びPA-酸性オリゴ糖をFinnigan TSQ 70(Finnigan, San Jose, CA)によって分析を行った。

サンプルホルダーにメタノールに溶解した試料溶液を塗布し、溶媒を自然乾燥させた。試料濃度が低いため、この操作を2回繰り返し、最後に自然乾燥する直前にマトリックスであるグリセロールを添加し、よく混ぜ合わせた。このサンプルホルダーを装置に導入して、加速電圧20keVで中性のセシウム原子を試料に衝突させイオン化を行い測定した。検出は、ポジティブ及びネガティブイオンモードの両方で行った。

## 結果

### 1. イオン交換カラムクロマトグラフィーによる酸性オリゴ糖画分のTLC分析

ウシ初乳から得た粗糖質画分をGCL-25-mゲル濾過カラムクロマトグラフィーで分画し、シアル酸及び全糖の発色を行った後、ラクトースより分子量の大きいオリゴ糖画分をGI及びGII画分とした。更に、GII画分をイオン交換カラムクロマトグラフィーにより分画して、全糖の発色を行ったところ、6つのピークが得られたので、各ピークを順にIII~VIIIとした。次に、ウシ初乳の酸性オリゴ糖の主成分であったGII-III及びGII-IVをTLC分析し、シアル酸及び全糖の発色を行った。その結果をFig.1に示した。

画分GII-III及びGII-IVは、各々2種及び1種のシアル酸と全糖の発色が認められたことから、合わせて3種類のシアル酸含有オリゴ糖の存在が確認された。又、標準のオリゴ糖である3'-SL, 6'-SL及び6'-SLNをTLC分析し、デンストメーターによって測定した結果と比較したところ、GII-IIIのスポットは6'-SLと6'-SLN標準と、GII-IVは3'-SL標準と同じRf値を示した。この結果から、GII-IIIは6'-SLと6'-SLNの混合物で、その量比は各ピーク面積から推定

すると 1:1.45 であった。一方、G II-III は精製された 3'-SL のみであると考えられた。

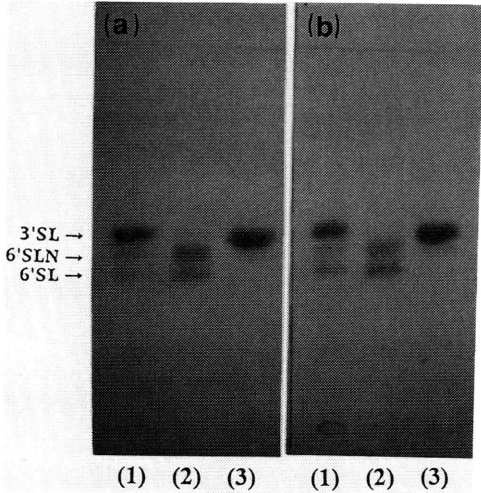


Fig.1 Thin layer chromatograms of G II-I and G II-III

Developping solvent; EtOH:n-BuOH:Pyridine:W:AA=100:10:10:30:3, v/v/v/v/v

Visualized reagents;

(a) resorcinol-HCl reagent

(b) orcinol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> reagent

(1) 3'-SL, 6'-SL, 6'-SLN Standard

(2) G II-I

(3) G II-III

## 2. HPLCによるPA-酸性オリゴ糖の分析

ウシ乳中粗糖質画分をゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った後、イオン交換カラムクロマトグラフィーによって得られた酸性糖質画分 (G II-I と G II-III) と標準の 3'-SL, 6'-SL 及び 6'-SLN をピリジリアミノ誘導体 (PA-糖鎖) として、HPLC (イオン交換型: PALPAK Type N Column 及び順相型: PALPAK Type S Column) によって分析を行った結果を Fig.2 に示した。更に、イオン交換型カラムの溶出時間をX軸、順相型カラムの溶出時間をY軸にとって、二次元の糖鎖マップとしたものを Fig.3 に示した。

G II-I は、Type N で29.9分と30.8分に、Type S で14.9分と17.8分にピークが検出され、6'-SLN 標準 (Type N:31.2分, Type S:14.0分) 及び 6'-SL- 標準 (Type N:30.8分, Type S:17.8分) の保持時間とほぼ一致した。G II-III は、Type N で24.9分, Type S で12.7分, 3'-SL 標準 (Type N:25.5分, Type S:12.7分) とほぼ一致した。この結果と先のTLC分析の結

果を合わせて考えてみると、G II-I は、6'-SLN と 6'-SL の2種類のオリゴ糖が混在すること、G II-III は、3'-SL が単独であることが確認された。

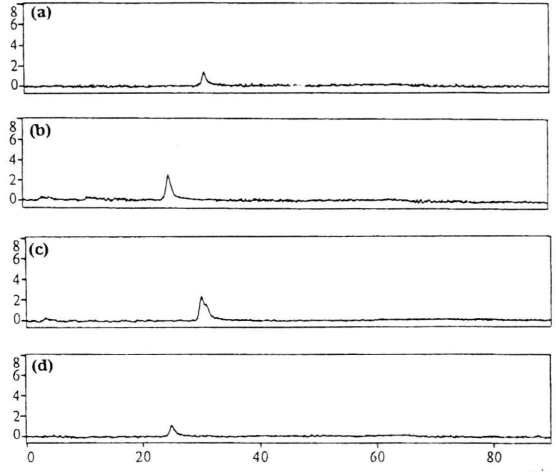


Fig.2 HPLC profiles of PA-derived oligosaccharides column; PALPAK Type N (250mm x4.6mm I.D.)

A solvent; 3% Acetic Acid-Triethylamine buffer (TEAA, pH7.3): Acetonitrile=10:80, v/v

B solvent; TEAA: Acetonitrile=50:50, v/v

flow rate; 1.0ml/min

column temperature; 40°C

EX; 310nm EM; 380nm

(a) PA-6'-SL Standard

(b) PA-3'-SL Standard

(c) PA-G II-I

(d) PA-G II-III

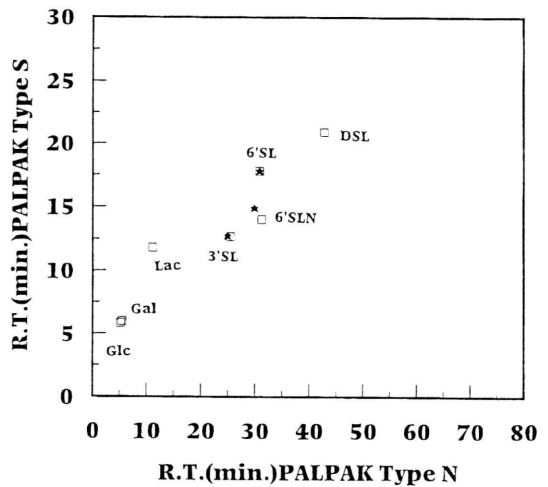


Fig.3 Two-dimensional sugar map of PA-derived acidic oligosaccharides

(□) Standard (★) Sample

### 3. SIMSによる乳中酸性オリゴ糖鎖及びPA-糖鎖の解析

糖標準の Lac と PA-Lac を SIMS によって、ポジティブモードで測定した結果を Fig.4 に示した。Lac と PA-Lac は、各々  $m/z$  342 と  $m/z$  420 に、分子イオンである  $[M+H]^+$  が検出された。又、PA-Lac では  $m/z$  241 に  $[Glc+PA]^+$  のフラグメントイオンが検出された。これらの結果から、オリゴ糖単独より PA-誘導体とした方が、分子イオンが明確に検出され、更にフラグメントイオンも検出されることが判った。従って、オリゴ糖を SIMS によって分析する場合は、PA誘導体として分析を行うこととした。

ウシ初乳中から得た GII-I 及び GII-III を PA-誘導体として、ポジティブモード及びネガティブモードで SIMS による分析をした結果を Fig.5, 6 に示した。

GII-I は、TLC, HPLC 分析の結果から、6'-SL と 6'-SLN の混在していることが明らかである。ポジティブモードで分析したところ  $m/z$  712 と  $m/z$  753 に PA-6'-SL と PA-6'-SLN の分子イオンである

$[M+H]^+$  が検出された。また、 $m/z$  241 と  $m/z$  282 に  $[Glc+PA]^+$ ,  $[GlcNAc+PA]^+$  のフラグメントイオンが検出された。一方、ネガティブモードでは、 $m/z$  710,  $m/z$  751 に PA-6'-SL と PA-6'-SLN の分子イオンである  $[M-H]^-$  が検出された。更に、 $m/z$  308 に  $[NANA]^-$  のフラグメントイオンが検出された。以上の結果から、GII-I は、6'-SL と 6'-SLN の混合物であることが SIMS によっても明らかとすることができた。

GII-III は、TLC と HPLC による分析結果から、3'-SL であることが明らかとなっている。ポジティブモードで分析したところ  $m/z$  712 に PA-3'-SL の分子イオンである  $[M+H]^+$  が検出された。また、 $m/z$  241 に  $[Glc+PA]^+$  のフラグメントイオンが検出された。一方、ネガティブモードでは、 $m/z$  710 に PA-3'-SL の分子イオンである  $[M-H]^-$  が検出された。更に、 $m/z$  308 に  $[NANA]^-$  のフラグメントイオンが検出された。よって、画分 II-III は、精製された 3'-SL であることが認められた。

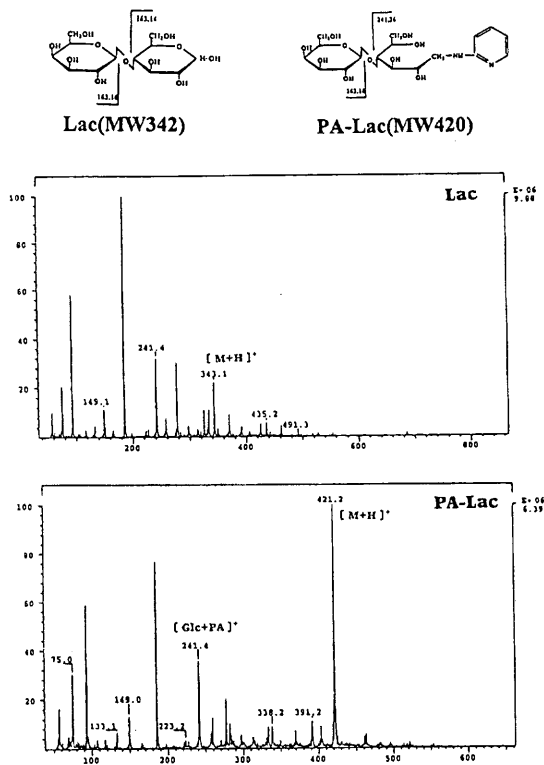


Fig.4 Positive ion mass spectrum of lactose and PA-derived lactose by SIMS

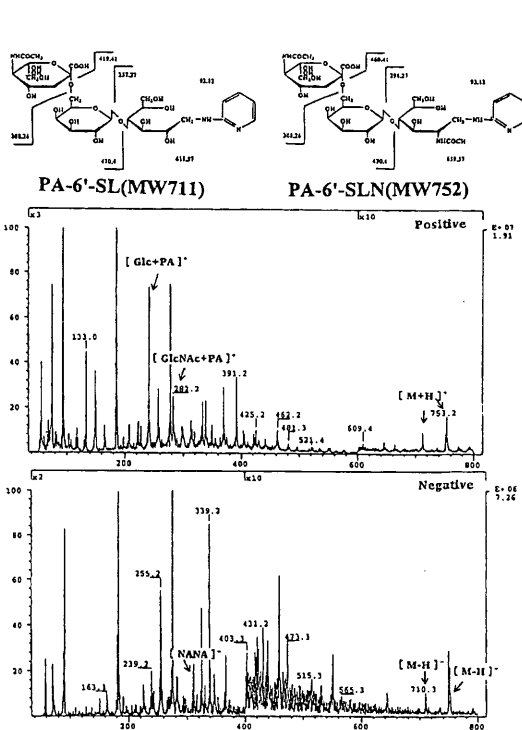
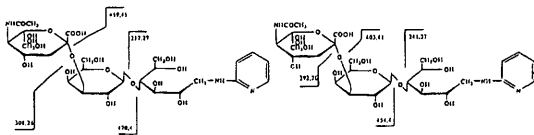


Fig.5 Positive and Negative ion mass spectrum of PA-derived GII-I (6'-SL&6'-SLN) fraction by SIMS



PA-3'-SL(MW711)

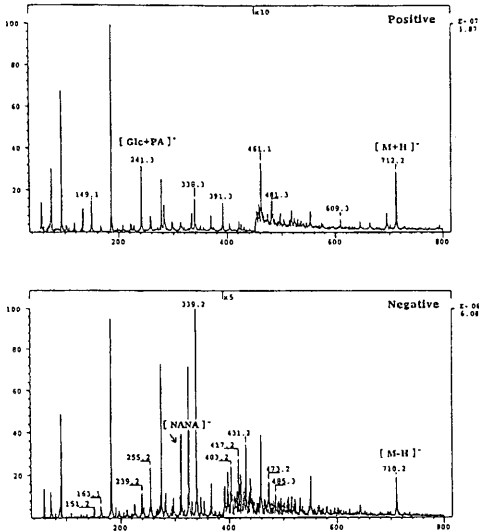


Fig.6 Positive and Negative ion mass spectrum of PA-derived G II-I III fraction (3'-SL) by SIMS

又、ウシ乳中のオリゴ糖に結合するシアル酸は、NANA と NGNA の 2 種類が存在する。この 2 種のシアル酸の質量数の差は16であるが、Fig.5 及び Fig.6 には、分析結果より NANA の結合したオリゴ糖の質量数のみが検出されたことから、NGNA の結合したオリゴ糖の可能性はほとんどなく、G II-I I と G II-III はともに NANA のタイプのシアル酸が結合したシリアルオリゴ糖であった。

以上のオリゴ糖の SIMS による分析結果から、次のことが判明した。

(1) SIMS 分析の試料は、糖鎖をPA-糖鎖とした方が分子イオンやフラグメントイオンに関する情報が豊富であった。

(2) PA-糖鎖はポジティブモードとネガティブモード共に分子イオンが測定されるが、シアル酸の結合したオリゴ糖は、ネガティブモードの方が分子イオンやフラグメントイオンに関する情報が得やすいことが判明した。

(3) シアル酸とアミノ糖を含むオリゴ糖を SIMS で分析する場合、シアル酸を含んだ糖鎖に関する情報は、ネガティブモード、アミノ糖を含んだ糖鎖に関する情報はポジティブモードで測定すると多く得られ、検出感度も高かった。

(4) SIMS によってオリゴ糖の構造解析を行う場合は、糖組成によって測定方法を選択することが重要であった。

### 考 察

従来、複合糖質、特に糖脂質については SIMS による構造解析方法が検討されているが、オリゴ糖についてはあまり報告がない。そこで、オリゴ糖を質量分析計 (SIMS) で構造解析する方法を検討した。

ウシ初乳から抽出、分画したPA-オリゴ糖を HPLC 分析、2次元糖鎖マップの作成を行い、精製度を確認した。その結果、G II-I I 画分は 6'-SL と 6'-SLN、G II-III 画分は 3'-SL であることが判明した。G II-I I (6'-SLと6'-SLN) は、PALPAK TypeN column を用いて分析したところ 1 ピークとして検出された。しかしながら、PALPAK TypeS column を用い分析し、2次元糖鎖マップとして表すと、2種のオリゴ糖の混合物であった。これらの試料を用いて、質量分析計 (SIMS) による構造解析法を検討した。まず、Lac と PA-Lac を SIMS でポジティブイオンを検出したところ、PA-誘導体とした場合に強い分子イオンが認められ、Lac の場合との差は非常に大きかった。このことは、複合糖質の質量分析計での構造解析の進歩が大きいことと関係あるものと思われる。すなわち、糖鎖の還元末端に、他の物質が結合している場合の方が、理由は明確ではないが、分子イオンやフラグメントイオンが得やすいものと考えられる。従って、ウシ初乳より得た微量酸性オリゴ糖をピリジルアミノ誘導体として SIMS 分析を行った。測定は、ポジティブモード及びネガティブモードで測定を行い、3'-SL、6'-SL や 6'-SLN の分子イオン  $[M+H]^+$  あるいは  $[M-H]^-$  を検出することができた。アミノ基を含む化合物である  $[GlcNAc-PA]$  はポジティブモードで測定すると感度が上昇し、カルボキシル基をもっている  $[NANA-Lac]$  や  $[NANA]$  などは、溶液中で負の電荷を帯びているため、ネガティブモードで測定すると感度が上昇した。よって、シアル酸、リン酸基や硫酸基等が結合したオリゴ糖を SIMS によ

て分析する場合は、ネガティブモードで測定した方が糖鎖構造に関する情報が多く得られるものと考えられた。

しかし、シアル酸結合型オリゴ糖と同条件で、ウシ乳中に特異的に含有されているリン酸基結合型オリゴ糖のSIMS分析を試みたところ、分子イオン及びフラグメントイオン共に検出することができなかった。このことから、リン酸基結合型オリゴ糖の性質（塩基性度・酸性度・疎水度・親水度・イオン解離性・会合性）などの情報からそれに適したイオン化法の検討が今後の課題となった。一方、アミノ糖を含有したオリゴ糖をSIMSによって構造解析する場合、フラグメントイオンに関する情報を充分得るためには、ポジティブモードとネガティブモードの両方で測定を行う必要があると思われる。又、本研究室で、MALDI-TOF MSを用いた糖鎖分析を試みたところ、PA-誘導体化することなく容易に測定を行うことができた<sup>19)</sup>。試料の調製のしやすさ・測定可能質量範囲の広さ、微量での測定・不純物が混在していても測定可能であるなどの利点から糖鎖分析にこの手法も有効であることがわかった。このことから、いくつかのMS分析による結果を組み合わせるによりFAB-mappingの作成も可能となることが予測された。

糖質は、その分岐構造・結合様式・置換基の多さから構造解析がとて難である。質量分析法は、数年の間に発展を成し得、その試料の種類や知りたい情報など用途に応じてイオン化法をうまく選択できるようになってきている<sup>20)</sup>。しかしながら、乳中オリゴ糖の構造解析は専ら、酵素法、HPLC、GC、NMRを用いたものが多く、質量分析を用いた手法は、あまり報告されていない。

今後は、糖鎖構造、糖質の結合位、分岐鎖あるいは糖質と他の成分の組み合わせによる機能性の発現を追求していく予定である。

#### 謝 辞

SIMS分析を行うにあたり御協力頂きました東京医科大学歯科分析機器センター笠間健嗣先生に感謝致します。実験を行うに際し、御協力頂いた平成9年度食品学第2研究室の齊藤尚子さんと戸部利香さんに感謝いたします。

#### Abstract

Acidic oligosaccharides in bovine colostrum were extracted and purified by column chromatographies. The method of the structural analysis of these oligosaccharides was investigated with Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS). Free and pyridylamino (PA)-derived lactose were analyzed under the same analytical condition by SIMS. On positive ion mass spectrum, PA-derived lactose showed more intensive molecular and fragment ions than free lactose. From this result, acidic oligosaccharides were analyzed in PA-derived oligosaccharides (3'-SL, 6'-SL and 6'-SLN), and ions produced by SIMS were detected with both positive and negative ion mode. Though, with both ion modes, molecular and fragment ions were detected, oligosaccharides binded sialic acid showed that on mass spectrum determined with negative mode each ion was detected more intensively than on that with positive mode. But in the case of oligosaccharides containing amino-sugar, mass spectrum determined with positive ion mode showed the intensive ions of both molecular and fragment. In this studies, the structure of acidic oligosaccharides is able to be elucidated with rapidity and convenience by SIMS.

#### 参考文献

- 1) 入村達郎編:日経サイエンス, "糖鎖と細胞" 別冊 111 (1994)
- 2) 内貫正治:現代化学, 248, 38-42 (1991)
- 3) 小島直也:油化学, 40, 344-351 (1991)
- 4) Herbert Wiegant: *New Comprehensive Biochemistry*, 10, 199-205 (1985)
- 5) S.Hase, T.Ikenaka and Y.Matsushima: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85, 257-263 (1978)
- 6) K.Ohara, M.Sano, A.Kondo and I.Kato: *J.Chromat.*, 586, 35-41 (1991)
- 7) W.T.Wang, N.C.Jr.Dedonne, B.Ackerman

- and C.S.Sweely: *Anal. Biochem.*, **141**, 366-369 (1984)
- 8) H.S.Aparna, P.V.Salimath: *Carbohydr. Res.*, **268**, 313-318 (1995)
- 9) S.Fievre, J.M.Wieruszkeski, J.C.Michalski, J.Lemoine, J.Montreuil and G.Streicher: *Biochem. Biophys. Res. commun.*, **177**(2), 720-725 (1991)
- 10) T.Urashima, T.Saito, Y.Taneda, T.Takasawa: *Biochim. Biophys. Acta*, **1200**, 64-72 (1994)
- 11) H.Biorndal, B.Lindberg, S.Svensson: *Carbohydr. Res.*, **5**, 433 (1967)
- 12) M.E.Breimer, B.C.Hausson, K.A.Karlsson, H.Leffler, W.Pimlott, B.E.Saumuelson: *FEBS Lett.*, **124**, 299 (1981)
- 13) 有田政信, 川名広子: 東京家政大学紀要, **36**, 17-24 (1996)
- 14) 川名広子, 齊藤尚子, 有田政信: 東京家政大学紀要, **38**, 51-57 (1998)
- 15) 金子哲夫, 長岡利, 金丸義敬, 葛谷泰雄, 高瀬光徳, 島村誠一, 富田守: 牛乳成分の特性と健康, 31-104 (1993)
- 16) C.Kunz and S.Rudloff: *Actadiatr.*, **82**, 903-912 (1993)
- 17) A.S.Gambaryan, V.E.Piskarev, I.A.Yamakov, A.M.Sakharov, A.B.Tuzikov, N.V.Bovin, N.E.Nifantev, M.N.Matrosovich: *FEBS Lett.*, **366**, 57-60 (1995)
- 18) T.Idota, H.Kawakami, Y.Murakami and M.Sugawara: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**(3), 417-419 (1995)
- 19) 齊藤尚子: 東京家政大学大学院修士論文要旨集, 1-4 (1998)
- 20) 笠間健嗣, 黒野定: 現代化学, バイオロジカルマススペクトロメトリー (上野民夫, 平山和雄, 原田健一編) 東京化学同人, 1997, p.165-180
- 21) 日本電子: MSユーザーズミーティング資料, 1996, p1-44