

# Rhodamine系蛍光色素を用いた糖類の高感度分析法の構築とその糖鎖解析への適用

井尻 聡一郎

国際医療福祉大学薬学部 324-8501 栃木県大田原市北金丸2600-1

## Development of highly sensitive determination of saccharides using rhodamine-type fluorescent dyes and its application to analysis of glycans

Soichiro Ijiri

School of Pharmacy, International University of Health and Welfare,  
2600-1 Kitakanemaru, Ohtawara, Tochigi, 324-8501, Japan

### Abstract

Highly sensitive fluorescence determination methods for saccharides using rhodamine-type fluorescent dyes have been developed. The saccharides were fluorescently derivatized with rhodamine B amine or rhodamine 110, and then analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) or capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (CE-LIF) detection, respectively. The detection limits for saccharides obtained by the HPLC and CE-LIF methods were in the range of femtomole and attomole levels, respectively. These methods can be applied to the analysis of the components of mono- and oligosaccharides in glycoproteins following their acidic or enzymatic hydrolysis. The results from these analyses are good agreements with the reported values.

**Keywords:** derivatization, rhodamine-type fluorescent dyes, saccharides, CE-LIF, HPLC

### 【緒言】

糖鎖は核酸、タンパク質に次ぐ生命第3の鎖（くさり）といわれ、近年注目されている。糖鎖はタンパク質や脂質に結合し、細胞表面において細胞同士の認識、細胞の増殖や分化、分解酵素からの細胞やタンパク質の保護、細胞の情報伝達などの様々な役割を果たしている<sup>1-6)</sup>。構成する糖鎖が1つ違うだけでも、細胞の性質に違いがでることから、糖鎖の機能解明のためには、糖鎖構造の解析は非常に重要である。また、近年、医薬品の分野においても、本来の糖鎖の種類や構造を変えることで医薬品の活性を高めた<sup>7)</sup>、糖鎖の本数を変えることで血液滞在時間を延長させたり<sup>8)</sup>した糖タンパク質性医薬品が実用化されている。こうした、医薬品の開発や品質管理においても糖鎖構造の解析は極めて重要である。糖タンパク質中糖鎖の解析手法には、酸加水分解による構成単糖分析と酵素加水分解によるオリゴ糖分析の2つの方法がある。強酸で加水分解することですべてのグリコシド結合が切れて単糖まで分解される。その後、誘導体化し分析を行うことで糖鎖を構成している単糖の割合が正しいかが分かる。また、PNGase Fで酵素加水分解することでN型オリゴ糖を遊離する。その後、誘導体化し分析を行うことでオリゴ糖の種類と本数が一致しているかが分かる。

糖類を直接分析する場合、多様な構造をしていることが分離を困難にさせ、また、発色団を持たないことが検出を困難にしている。よって、誘導体化を行った後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）分

析する手法がこれまで多く用いられてきた<sup>9-11)</sup>。糖類は構造上の特徴として、還元末端に反応性の高いアルデヒド基あるいはケト基を有している。これらのカルボニル基を誘導体化するために一般的に広く用いられているのが、還元的アミノ化法である。この方法は、糖の還元末端と芳香族アミン系の発蛍光団を反応させ、シッフ塩基を形成した後、還元して安定な形とする方法である。還元的アミノ化法で用いられる最も代表的な蛍光誘導体化試薬に2-アミノピリジン<sup>12-15)</sup>があるが、蛍光色素が持つモル吸光係数や蛍光量子収率などの発蛍光性や長波長性などの波長特性は、必ずしも満足できるものではなく、微量な糖鎖解析を行う場合には更なる高感度化が必要となっている。

そこで、今回、私は、強蛍光性かつ長波長性の蛍光試薬である rhodamine 系色素に着目し、 rhodamine 系色素を用いた糖類の高感度な新規蛍光誘導体化HPLC法及びキャピラリー電気泳動-レーザー誘起蛍光検出(CE-LIF)法の構築を目的として研究を行った。

Rhodamine 系色素は、(1) 蛍光量子収率が0.8以上と蛍光の発光効率が高い、(2) フルオレセインなどと比較して、光に強く蛍光色素として安定している、(3) 溶媒への溶解性が高く、また、溶液のpHの変化による蛍光強度の変化がなく安定している、(4) 500 nm以上の長波長域に蛍光をもつため自然蛍光を持つ物質などの影響を受けにくい、といった優れた特徴を有する有機系蛍光色素である。

## 【実験】

### (1) Rhodamine B amine を用いた糖類の蛍光誘導体化HPLC分析<sup>16)</sup>

はじめに、 rhodamine B amine (RBA) を用いた単糖、二糖及びオリゴ糖の蛍光誘導体化HPLC法の構築を行った。RBAは強蛍光性かつ長波長性を有した蛍光色素であり、糖類と酸性条件下で共有結合しシッフ塩基を形成する(Fig. 1)。

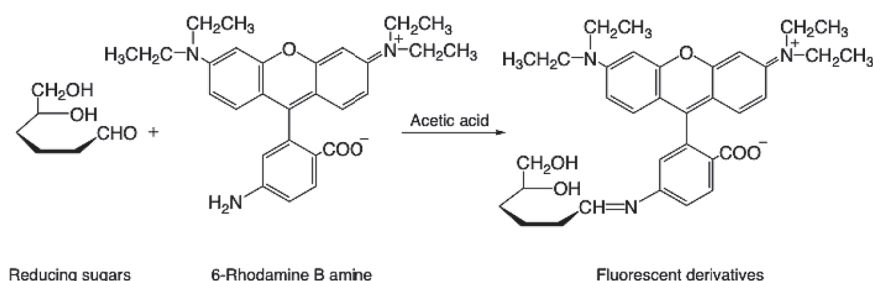


Fig. 1 Fluorescence derivatization reaction of saccharides with 6-RBA.

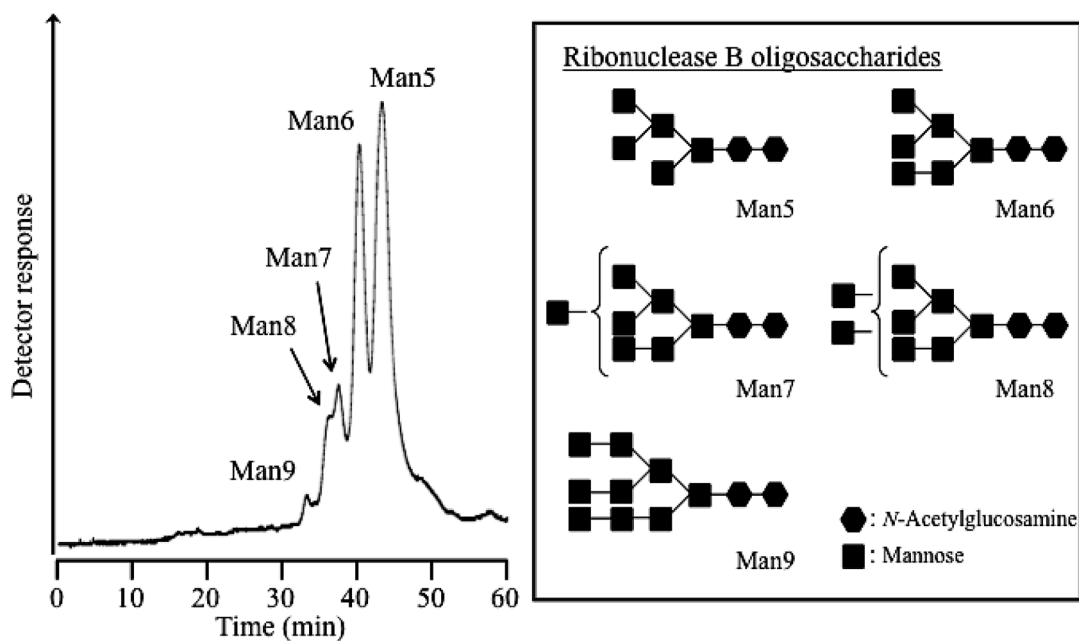
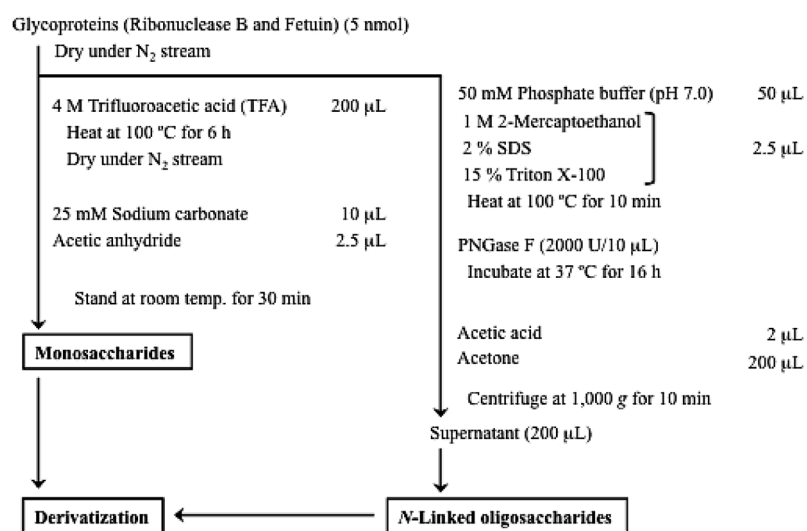
**誘導体化反応**：試料溶液をネジ口試験管に取り、窒素気流下で乾固後、3 mM 6-RBA のメタノール溶液 50  $\mu$ L 及び0.1 M 酢酸のメタノール溶液 50  $\mu$ L を加えて密封し、単糖、二糖及びアシアロオリゴ糖の場合は90 $^{\circ}$  Cで2時間、シアロオリゴ糖の場合は90 $^{\circ}$  Cで1時間加熱する。氷中で冷却して反応を停止し、移動相で10倍希釈した後、その20  $\mu$ L を HPLC に注入した。

**HPLC分析条件**：カラム, Capcell pak C<sub>18</sub> UG80 (150  $\times$  4.6 mm i.d., 粒径5  $\mu$ m, Shiseido) ; 移動相, 100 mM 酢酸塩緩衝液 (pH 4.0) - アセトニトリル混液 (75 : 25, v/v) <単糖及び二糖分析並びにシアロオリゴ糖分析>, 100 mM 酢酸塩緩衝液 (pH 4.0) - アセトニトリル混液 (80 : 20, v/v) <アシアロオリゴ糖分析>; 流速1 mL/min; 蛍光検出, 励起波長550 nm, 蛍光波長580 nm。

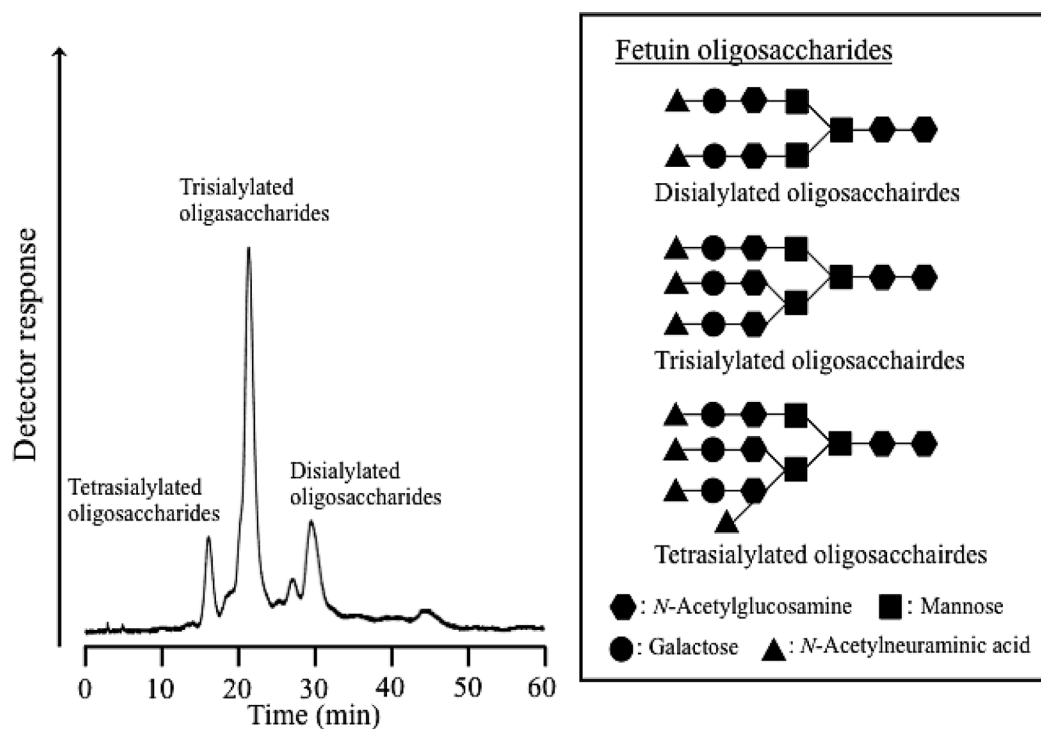
**結果・考察**：本法による、単糖、二糖及びオリゴ糖の検出限界は、注入量当たり7-51 fmol と高感度であった。さらに、糖タンパク質 (ribonuclease B 及び fetuin) の酸加水分解及び酵素加水分解を行い (Chart 1),

それらに含まれる単糖及びN型オリゴ糖の分析を行ったところ、構成に応じたピークを確認することができた (Fig. 2, 3)。

**Chart 1** Acid and PNGase F hydrolysis procedure for mono-or oligosaccharides release from glycoproteins



**Fig. 2** Chromatogram of 6-RBA derivatized oligosaccharides released from ribonuclease B by PNGase F hydrolysis.



**Fig. 3** Chromatogram of 6-RBA derivatized oligosaccharides released from fetuin by PNGase F hydrolysis.

しかし、*N*型オリゴ糖の分離は不十分で、fetuinの*N*型オリゴ糖をN-acetylneuraminic acid（シアル酸）数の違いにより分離することはできたが、fetuinのシアロオリゴ糖に存在するシアル酸の結合位置（ $\alpha$ 2,3及び $\alpha$ 2,6結合）の違いによる異性体の分離はできなかった。6-RBAを蛍光誘導体化試薬に用いたHPLC法で、単糖、二糖及び一部のオリゴ糖を高感度に検出することは可能となったが、糖鎖のより詳細な構造を把握するには、HPLCの分離能では困難であることが判明した。

## (2) Rhodamine 110を用いた単糖類の蛍光誘導体化CE-LIF分析<sup>17)</sup>

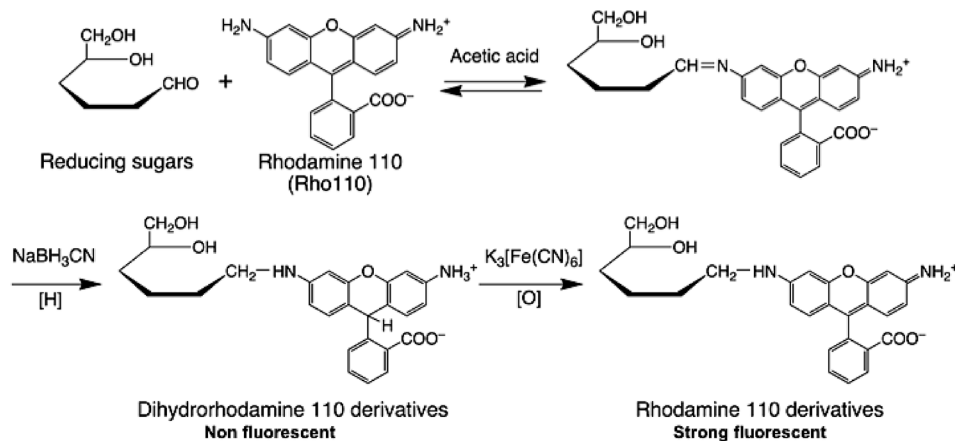
次に、前項での結果を踏まえ、本項以降は、HPLCに変わる分離分析手段としてCEを用いた分析法の構築を行った。CEは、HPLC法と比較して理論段数が10～100倍と分離能が非常に高く、また、内径100 $\mu$ m以下の細いキャピラリーを流路系に使用するので、試料注入量はnLレベルでよく、貴重な微量サンプルの分析に適した方法である。近年、CEの検出器としてレーザー誘起蛍光（LIF）検出器が多く用いられている。その利点は、微小部分に高密度の励起光を集中できることであり、CEには最適な検出器と言える。今回、Arイオンレーザーの発振波長488 nm付近に励起極大波長を持つrhodamine 110（Rho 110）を選択し、本項では、Rho 110を用いた単糖類の蛍光誘導体化CE-LIF法の構築を行った。

**誘導体化反応：**試料溶液をScrew vialに取り、窒素気流下で乾固後、15 mM Rho 110の酢酸-メタノール混液（1:19, v/v）50 $\mu$ L及び0.1 M シアノ水素化ホウ素ナトリウム（NaBH<sub>3</sub>CN）のメタノール溶液50 $\mu$ Lを加えて密封し、90℃で30分間加熱する。水中で冷却して反応を停止し、0.25 M ヘキサシアノ鉄（III）酸カリウム（K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]）100 $\mu$ Lを加え、室温で30分放置後、泳動用緩衝液-メタノール（1:1, v/v）混液で100倍希釈しCE試料とした。

**CE分析条件：**BECKMAN P/ACE System 5010にレーザー誘起蛍光ディテクタ（488 nm Arイオンレーザー付、Emフィルター：530 nm）を装着して使用。キャピラリー、フューズドシリカキャピラリー（内径

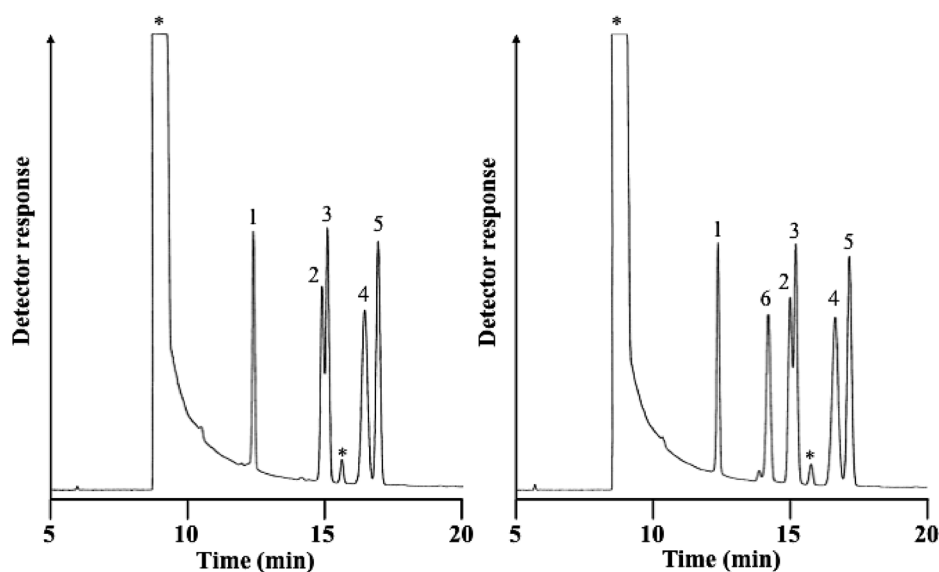
75  $\mu\text{m}$ , 有効長 50 cm, 全長 57 cm); 温度, 25°C; 泳動緩衝液, 200 mM ホウ酸塩緩衝液 (pH 10.5); 印加電圧, 14.25 kV (250 V/cm)。

**結果・考察:** 誘導体化反応後, 蛍光色素がもつ rhodamine 骨格は反応溶液中に残存する還元剤 ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) の作用により大部分が還元されて, 蛍光が消光することが判明したが, 酸化剤 ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) を添加することで蛍光強度が劇的に回復することを確認した (Fig. 4)。



**Fig. 4** Fluorescence derivatization reaction of saccharides with Rho 110.

本法による, 単糖類の検出限界は, 注入量当たり 36–70 amol と極めて高感度であった。糖タンパク質中糖鎖の構成単糖である *N*-アセチルアミノ糖 (*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 及び *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc)) も中性糖 (マンノース (Man), フコース (Fuc) 及びガラクトース (Gal)) と同様に本法で誘導体化を行うことができた。また, 還元末端を持たない *N*-アセチルノイラミン酸 (NeuNAc) は *N*-アセチルノイラミン酸アルドラーゼで定量的に *N*-アセチルマンノサミン (ManNAc) に変換することで, 本法により誘導体化を行うことができ, 同時定量が可能となった (Fig. 5)。



**Fig. 5** Electropherograms obtained with the Rho 110-derivatives of monosaccharides (5 fmol each on capillary). (A) Without *N*-acetylneuraminic acid aldolase digestion, (B) with *N*-acetylneuraminic acid aldolase digestion.

Peaks: 1, GalNAc; 2, GlcNAc; 3, Man; 4, Fuc; 5, Gal; 6, ManNAc from NeuNAc; \*, Reagent blank.

### (3) Rhodamine 110を用いたオリゴ糖の蛍光誘導体化CE-LIF分析<sup>18)</sup>

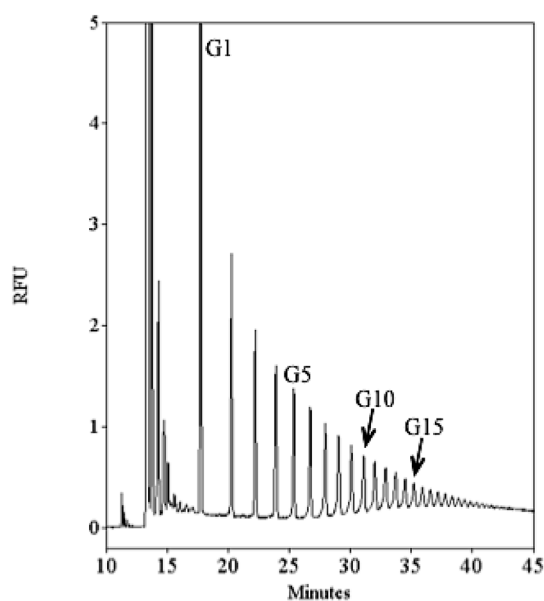
糖鎖を形成しているオリゴ糖には、非還元末端にシアル酸を含まないオリゴ糖（アシアロオリゴ糖）とシアル酸を含むオリゴ糖（シアロオリゴ糖）が存在する。シアル酸は酸や熱に不安定であるため、シアロオリゴ糖を分析する場合、シアル酸の脱離を抑えた分析条件が必要となる。そこで、本項ではRho 110を用いたアシアロオリゴ糖及びシアロオリゴ糖の蛍光誘導体化CE-LIF法の構築を行った。

**誘導体化反応：**試料溶液をポリプロピレンチューブに取り、窒素気流下で乾固後、5 mM Rho 110の酢酸-メタノール混液（1:19, v/v）10  $\mu$ L及び0.1 M NaBH<sub>3</sub>CNのメタノール溶液10  $\mu$ Lを加えて密封し、40°Cで12時間加温する。水中で冷却して反応を停止し、0.2 M K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 10  $\mu$ Lを加え、室温で30分放置後、泳動緩衝液で100倍希釈しCE試料とした。

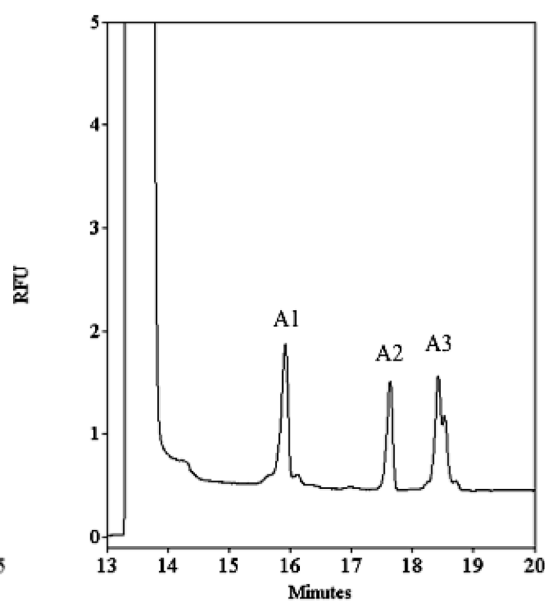
**CE分析条件：**BECKMAN P/ACE MDQにレーザー誘起蛍光ディテクタ（488 nm Arイオンレーザー付、Emフィルター:540 nm）を装着して使用。キャピラリー、フューズドシリカキャピラリー（内径75  $\mu$ m, 有効長50 cm, 全長60 cm）；温度、25°C；泳動緩衝液及び印加電圧、150 mMリン酸塩緩衝液（pH 2.5）, 21 kV（350 V/cm）＜アシアロオリゴ糖分析＞；150 mMリン酸塩緩衝液（pH 7.0）, 12 kV（200 V/cm）＜シアロオリゴ糖分析＞。

**結果・考察：**アシアロオリゴ糖のモデルとしてグルコースオリゴマー（G1-20）を、シアロオリゴ糖のモデルとして monosialylated galactosylated biantennary（A1）、disialylated galactosylated biantennary（A2）及び trisialylated galactosylated triantennary（A3）の混合試料をそれぞれ用いて、CE分離条件の最適化を行った。その結果、アシアロオリゴ糖誘導体は、酸性リン酸塩緩衝液中、オリゴ糖サイズの違いにより良好に分離され（Fig. 6）、シアロオリゴ糖誘導体は、中性リン酸塩緩衝液中、シアル酸の数に応じて良好に分離された（Fig. 7）。

検討したモデルオリゴ糖の検出限界は、注入量あたり10–17 amolと単糖類と同様に極めて高感度であった。



**Fig. 6** Electropherogram of Rho 110-derivatives of the glucose oligomer (G1-20). Analytical conditions: 150 mM phosphate buffer; pH 2.5.



**Fig. 7** Electropherogram of Rho 110-derivatives of the sialo-oligosaccharides mixture (A1, A2, and A3). Analytical conditions: 150 mM phosphate buffer; pH 7.0.

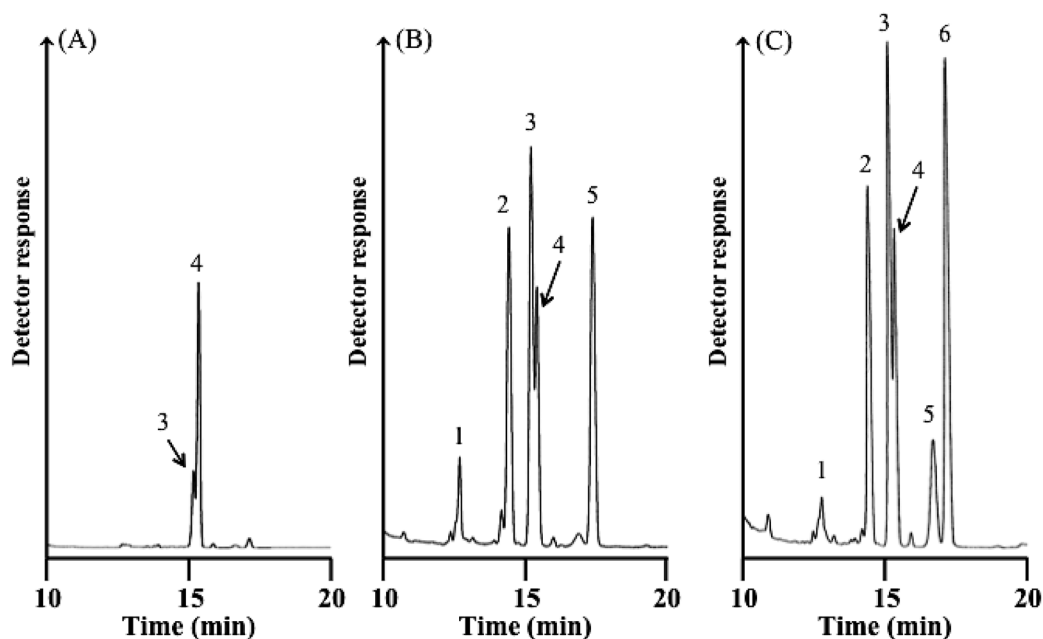


#### (4) CE-LIF法による糖タンパク質中糖鎖の構成単糖分析及びN型オリゴ糖解析<sup>17,18)</sup>

最後に、Rho 110を用いた単糖及びオリゴ糖の蛍光誘導体化CE-LIF法を糖タンパク質 (ribonuclease B, fetuin 及び recombinant human erythropoietin (rhEPO)) 中の糖鎖解析に適用し、本法の有用性を検証した。**結果・考察**：構成単糖分析を行った結果、検討した3種の糖タンパク質中のすべての構成単糖を良好に分離検出することができ (Fig. 8), 構成単糖の量はこれまでに報告されている値<sup>19-24)</sup> とよく一致していた (Table 1)。

また、N型オリゴ糖解析を行った結果、検討した3種の糖タンパク質中のN型オリゴ糖を良好に分離検出することができ、HPLC法では分離することができなかったシアル酸結合異性体 ( $\alpha$  2,3及び $\alpha$  2,6結合) も分離することができた (Fig. 9, 10)。

Rho 110を用いた蛍光誘導体化CE-LIF法で、オリゴ糖誘導体化物の分離能は向上し糖鎖の詳細な構造解析ができるようになった。また、CE-LIF法はHPLC法よりも更なる高感度化を達成した。よって、糖鎖解析に必要な糖タンパク質試料を微量化することができ、微量糖タンパク質中の糖鎖解析に対する本法の有用性が示された。



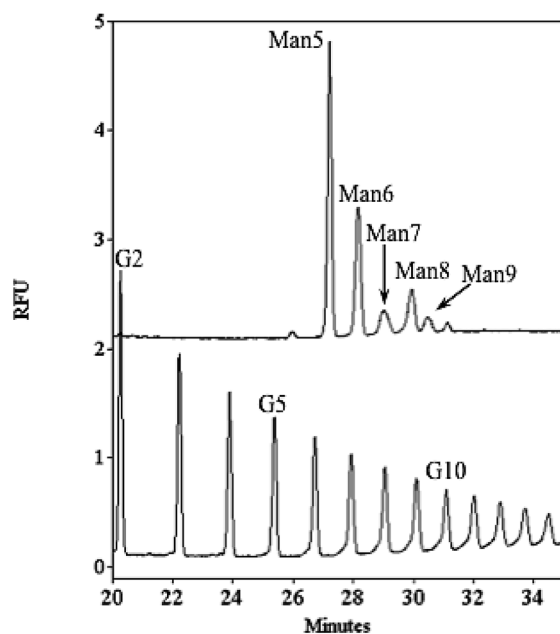
**Fig. 8** Electropherograms of the Rho110-derivatives of monosaccharides obtained with (A) ribonuclease B, (B) fetuin, and (C) rhEPO after acid hydrolysis.

Peaks: 1, GalNAc; 2, ManNAc from NeuNAc; 3, GlcNAc; 4, Man; 5, Fuc; 6, Gal; \*, Reagent blank.

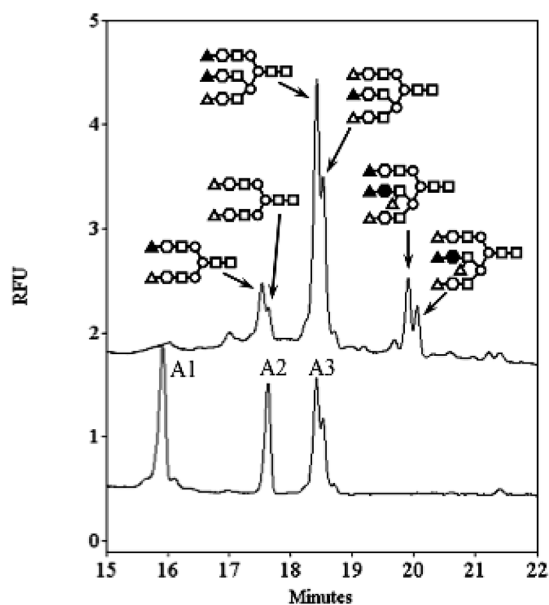
**Table 1** Monosaccharides composition of ribonuclease B, fetuin, and rhEPO

Glycoprotein	Content [mol monosaccharide/mol protein]					
	GalNAc	NeuNAc	GlcNAc	Man	Fuc	Gal
Ribonuclease B			2.6 (2.3-2.9) <sup>a)</sup>	6.9 (6.5-6.8) <sup>a)</sup>		
Fetuin	2.3 (0.7-2.2) <sup>b)</sup>	11.6 (12.5-18.8) <sup>b)</sup>	13.0 (5.8-16.2) <sup>b)</sup>	6.5 (6.6-8.6) <sup>b)</sup>		8.6 (9.4-11.6) <sup>b)</sup>
rhEPO	1.2 (0.8-1.4) <sup>c)</sup>	13.8 (9.5-11.8) <sup>c)</sup>	17.3 (17.2-19.8) <sup>c)</sup>	8.5 (8.2-8.7) <sup>c)</sup>	4.0 (2.3-4.1) <sup>c)</sup>	13.5 (13.0-15.5) <sup>c)</sup>

a) Ref. [19], b) Ref. [20-23], c) Ref. [24]



**Fig. 9** Electropherogram of Rho 110-derivatized *N*-linked oligosaccharides obtained from ribonuclease B (upper trace) and a glucose oligomer (G1-20) (lower trace). Analytical conditions are the same as for Fig. 6.



□; *N*-Acetylglucosamine ○; β1,4-linked Galactose ●; β 1,3-linked Galactose  
 ○; Mannose △; α2,6-linked Sialic acid ▲; α2,3-linked Sialic acid

**Fig. 10** Electropherogram of Rho 110-derivatized *N*-linked sialo-oligosaccharides obtained from fetuin (upper trace) and A 1, A 2 and A 3 standard mixtures (lower trace). Analytical conditions are the same as for Fig. 7.



## 【結論】

以上述べたように、私は、強蛍光性かつ長波長性の rhodamine 系色素を用いた糖類の蛍光誘導体化 HPLC法及び CE-LIF法を構築した。Rhodamine 系色素を誘導体化試薬に用いることで、従来法よりも超高感度に糖類を検出することが可能となった。CE-LIF法ではその高分離能の特徴を生かして、HPLC法では完全に分離することができなかった糖タンパク質中の N型オリゴ糖の構造異性体も良好に分離することが可能となった。今後、様々な糖鎖機能解明研究、糖タンパク質医薬品の開発・品質管理等の分野での本法の使用が期待される。

## 【謝辞】

本研究は、福岡大学薬学部薬品分析学教室 能田 均 教授、山口政俊 教授の終始変わらざる温かい御指導と御鞭撻の下に行われました。謹んで感謝の意を表します。

また、本研究をまとめるに際し、御多忙の中、懇切丁寧な御指導を賜りました福岡大学薬学部薬品物理化学教室 安藝初美 教授に深く感謝の意を表します。

本研究ならびに論文作成に際し、貴重な御助言と御協力を賜りました薬品分析学教室 吉田秀幸 准教授ならびに静岡県立大学薬学部 轟木堅一郎 准教授に深謝致します。

本研究に関する多くの有益な御助言を賜りましたカロリンスカ研究所 吉武 尚 客員教授に深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり御協力頂きました薬品分析学教室 巴山 忠 助教及び同教室の皆様、ならびに国際医療福祉大学薬学部の皆様に感謝致します。

## 【参考文献】

- 1) T. Muramatsu, *Glycoconjugate J.*, **17** (2001) 577.
- 2) H. Blanchard, X. Yu, B.S. Coulson, M. Von Itzstein, *J. Mol. Biol.*, **367** (2007) 1215.
- 3) X.J. Wang, X.H. Chen, X.Y. Yang, M.Y. Geng, L.M. Wang, *Neurosci. Lett.*, **417** (2007) 176.
- 4) Y.Y. Zhao, M. Takahashi, J.G. Gu, E. Miyoshi, A. Matsumoto, S. Kitazume, N. Taniguchi, *Cancer Sci.*, **99** (2008) 1304.
- 5) E.M. Quan, Y. Kamiya, D. Kamiya, V. Denic, J. Weibezahn, K. Kato, J.S. Weissman, *Mol. Cell*, **32** (2008) 870.
- 6) A. Varki, *Glycobiology*, **3** (1993) 97.
- 7) E. Tsuda, G. Kawanishi, M. Ueda, S. Masuda, R. Sasaki, *Eur. J. Biochem.*, **188** (1990) 405.
- 8) J.C. Egrie, E. Dwyer, J.K. Browne, A. Hitz, M.A. Lykos, *Exp. Hematol.*, **31** (2003) 290.
- 9) K.R. Anumula, S. T. Dhume, *Glycobiology*, **8** (1998) 685.
- 10) Y. Takegawa, K. Deguchi, T. Keira, H. Ito, H. Nakagawa, S. Nishimura, *J. Chromatogr. A*, **1113** (2006) 177.
- 11) Y. Yoshinaka, Y. Ueda, S. Suzuki, *J. Chromatogr. A*, **1143** (2007) 83.
- 12) S. Hase, T. Ikenaka, Y. Matsushima, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **85** (1978) 257.
- 13) N. Tomiya, J. Awaya, M. Kurano, S. Endo, Y. Arata, N. Takahashi, *Anal. Biochem.*, **171** (1988) 73.
- 14) Y. Makino, K. Omichi, S. Hase, *Anal. Biochem.*, **264** (1998) 172.
- 15) H. Nakagawa, Y. Kawamura, K. Kato, I. Shimada, Y. Arata, N. Takahashi, *Anal. Biochem.*, **226** (1995) 130.
- 16) K. Todoroki, T. Hayama, S. Iijiri, A. Kazuta, H. Yoshida, H. Nohta, M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. A*, **1038**

(2004) 113.

- 17) S. Ijiri, K. Todoroki, H. Yoshida, T. Yoshitake, H. Nohta, M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. A*, **1217** (2010) 3161.
- 18) S. Ijiri, K. Todoroki, H. Yoshida, T. Yoshitake, H. Nohta, M. Yamaguchi, *Electrophoresis*, **32** (2011) 3499.
- 19) B.A. Bernard, S.A. Newton, K. Olden, *J. Biol. Chem.*, **258** (1983) 12198.
- 20) K.R. Anumula, *Anal. Biochem.*, **220** (1994) 275.
- 21) F.-T.A. Chen, T.S. Dobachi, R.A. Evangelista, *Glycobiology*, **8** (1998) 1045.
- 22) S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, J. Nakamura, *Anal. Biochem.*, **180** (1989) 351.
- 23) K.R. Anumula, *Anal. Biochem.*, **230** (1995) 24.
- 24) H. Sasaki, B. Bothner, A. Dell, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.*, **262** (1987) 12059.