



プロカインアミドと EZGlyco® O-Glycan Prep Kit を組み合わせた糖鎖分析の高感度化

はじめに

多くの生体内タンパク質においてみられる糖鎖修飾の重要性が広く認識されるようになり、タンパク質バイオ医薬品の開発や糖鎖工学・糖鎖生物学といった様々な領域において、それら糖鎖構造の解析が行われるようになってい

ます。住友ベークライト(株)が提供する EZGlyco® O-Glycan Prep Kit は、迅速、簡便かつ再現性良く 2-アミノベンズアミド(2-AB)標識された O 型糖鎖を調製することが可能です(図 1)。2-AB 蛍光標識は糖鎖を感度よく検出でき、糖鎖同定のための 2-AB 標識糖鎖標品も入手しやすいことから、N 型糖鎖/O 型糖鎖、カラム・溶出条件に関わらず、糖鎖の蛍光検出 HPLC 分析において広く用いられています。

昨今、糖鎖分析にも LC-MS 装置が幅広く導入され、糖鎖の分離と同定が容易になった一方、更なる高感度検出が求められつつあります。感度よく蛍光検出が可能な 2-AB 標識ですが、質量分析(MS)でさらに高感度を求める場合は、2-AB の代わりに蛍光標識試薬としてプロカインアミドを用いることも可能です。2-AB と同様に還元アミノ化によって糖鎖の蛍光ラベル化が可能なプロカインアミド標識は、ESI-MS において高感度に糖鎖を検出でき、蛍光検出においても 2-AB にまさる感度の向上が期待される標識試薬です。

本アプリケーションノートでは、EZGlyco O-Glycan Prep Kit の操作プロトコルにおいてキット付属の 2-AB の代わりに市販のプロカインアミド(塩酸塩)を使用して糖鎖を標識し分析した事例をご紹介します。本アプリケーションノートでは、下記で示す方法によりウシ胎児血清フェツイン由来 O 型糖鎖のプロカインアミド標識を実施しました。

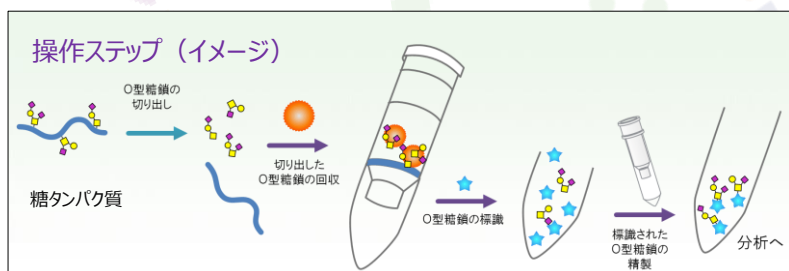


図 1. EZGlyco O-Glycan Prep Kit による O 型糖鎖調製ワークフロー

糖タンパク質試料からの O 型糖鎖の切り出し、精製、2-AB 蛍光ラベル標識までの操作を安全かつ簡便・迅速に行うことが可能で、分析対象である蛍光標識 O 型糖鎖試料の調製がおよそ 5 時間で完了します。従来は 2~3 日かかっていた時間と煩雑な操作をそれぞれ大幅に短縮化・簡略化することが可能です。

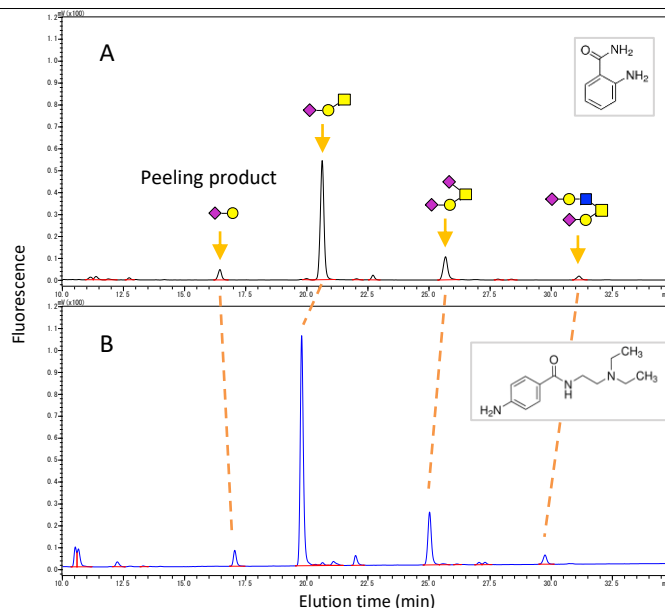


図 2. ウシフェツイン由来 O 型糖鎖の蛍光クロマトグラム

A) 2-AB 標識 O 型糖鎖, B): プロカインアミド標識 O 型糖鎖
同一の移動相を用いた系では、プロカインアミド標識により蛍光シグナルは 2 倍程度に増加し、各ピークはよりコンパクトに溶出された。

実験方法

試料

ウシ胎児血清フェツイン, 25 µg/assay
Cat No. F2379, Sigma-Aldrich

プロカインアミド標識

- 試薬: Procainamide hydrochloride (プロカインアミド塩酸塩)
MATRIX SCIENTIFIC 社, product No. 149481
- 標識溶液の調製
 1. 171.2 mg/mL に 450 µL メチルアルコール-100 µL 酢酸-450 µL 超純水の混合溶液に溶解させる。
 2. 上記溶液 1 mL あたり、20 µL の試薬 7 溶液(プロトコル: ステップ 11-②)を加え攪拌後、標識溶液とする
- 反応条件: プロトコルに記載の 2-AB 標識反応と同様に行う。

MS 条件

MS システム: LCMS-IT-TOF, 島津製作所
イオン化モード: ESI
電圧: 2.05 kV
測定範囲: m/z 250-2,500

LC 条件

LC システム: Nexera, 島津製作所
カラム: ACQUITY UPLC® Glycan BEH Amide (130 Å, 1.7 µm, 2.1 x 150 mm, Waters)
カラム温度: 40°C
試料注入量: 1 µL (fetuin 0.5 µg 相当)
蛍光検出: 検出器 RF-20Axs, 島津製作所
ゲイン: 4, 感度: 中, レスポンス: 1.0 sec
2-AB: 励起波長 330 nm/蛍光波長 420 nm
プロカインアミド: 励起波長 308 nm/蛍光波長 359 nm
流速: 0.2 mL/min
移動相 A: 40% アセトニトリル, 0.1% 酢酸水溶液
移動相 B: 90% アセトニトリル, 0.1% 酢酸水溶液

Time (min)	%A	%B
0	0	100
50	100	0
70	100	0
80	0	100

結果と考察

ウシフェツインには N 型糖鎖と O 型糖鎖とも存在することが知られており、O 型糖鎖は主に 3 種類のシリアル糖鎖が検出されます。それらに加えて、本実験では、O 型糖鎖遊離における副反応産物 (peeling product) である NeuAc-Gal が全 O 型糖鎖の 5% 程度という低い存在比で観察されました(図 2)。EZGlyco O-Glycan Prep Kit では、再現性良く peeling product の生成が抑えられ、2-AB 標識とプロカインアミド標識のいずれにおいても同様の糖鎖種パターンが観察されました(図 2)。

蛍光強度は、本実験の検出波長においては、プロカインアミド標識体が約 2 倍高いシグナルが得られ、標識構造の違いにより、溶出時間の範囲が狭められることが示されました(図 2)。

ESI-MS 分析では、2-AB 標識体はネガティブイオンモードでの検出がより好ましい結果を与えた一方で、プロカインアミド標識体は、ポジティブおよびネガティブ両イオンモードにおいてその高いイオン化効率により高感度かつ容易な糖鎖イオンの検出が可能でした(図 3)。

まとめ

EZGlyco O-Glycan Prep Kit に付属の標識用蛍光試薬 2-AB を、市販のプロカインアミド塩酸塩で置き換え、操作プロトコルに従って 2-AB 標識と同様の反応条件を用いることで、全工程にかかる時間を変えずに、また検出される糖鎖プロファイルに影響を与えずに、より高感度に蛍光 LC 検出と質量分析での糖鎖イオンの検出が行えることが示されました。

標品として様々な N 型糖鎖あるいは O 型糖鎖が入手可能な 2-AB 標識の他に、質量分析においても高感度化が期待できるプロカインアミド標識を、EZGlyco O-Glycan Prep Kit に適用できることで、糖鎖検出のオプションを広げることが可能です。

図中の構成単糖表示

- GalNAc
- GlcNAc
- Gal
- ◆ NeuAc

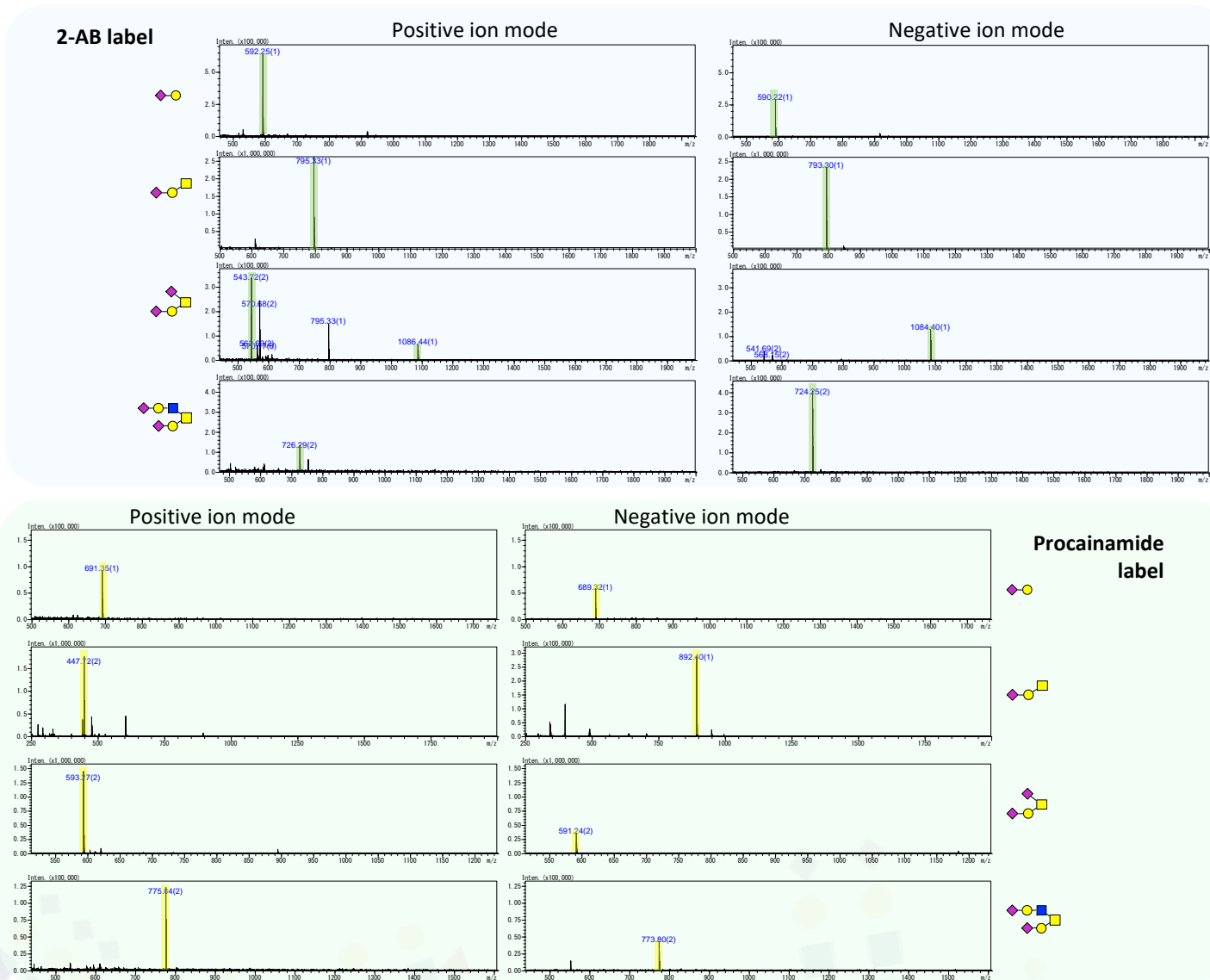


図 3. ウシフェツイン由来 O 型糖鎖の MS スペクトル;上パネル) 2-AB 標識 O 型糖鎖, 下パネル) プロカインアミド標識 O 型糖鎖
2-AB 標識糖鎖は、総じてネガティブイオンモードにおいて強く安定した糖鎖イオンが観測された。一方、プロカインアミド標識糖鎖では、全てシリアル酸含有糖鎖であるにもかかわらずポジティブイオンモードにおいてより大きなシグナルが得られた。