



BRINGING GLYCOMICS TO LIFE

はじめに

多くの生体内タンパク質で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きました。

住友ベークライト㈱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-結合型糖鎖を調製することが可能です(図 1)。本製品は精製糖タンパク質の処理だけでなく、血清や細胞等様々なサンプルへの応用が期待されます。本アプリケーションノートでは、EZGlyco[®] O-Glycan Prep Kit を用いてヒト血清中の O-結合型糖鎖分析を検討した事例をご紹介します。

実験手順

ヒト血清(human serum from male AB clotted whole blood, SIGMA, H6914, 10 μ L) にトリプシン溶液(Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega, 1 μ g/ μ L, 10 μ L)を加え、37°Cで1時間反応させて血清中のタンパク質を断片化させました。

上記サンプル混合溶液、10 μ L を用いて EZGlyco[®] O-Glycan Prep Kit のプロトコルに従って処理を行いました。

得られた 2AB 標識糖鎖溶液全量を遠心乾燥機により一度乾固させた後、超純水 10 μ L に再溶解させました。再溶解液 10 μ L のうち 1 μ L を注入して以下の条件下で糖鎖分析を実施しました。

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 μ m, 2.1 x 150 mm, Waters)
 カラム温度: 40°C
 試料注入量 1 μ L
 蛍光検出 検出器 RF-20Axs, 島津製作所
 励起波長 330 nm/蛍光波長 420 nm
 流速: 0.2 mL/min
 移動相 A: 40% アセトニトリル, 0.1%ギ酸水溶液
 移動相 B: 90% アセトニトリル, 0.1%ギ酸水溶液

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

MS 条件

MS システム: LCMS-IT-TOF, 島津製作所
 イオン化モード: ESI ネガティブ

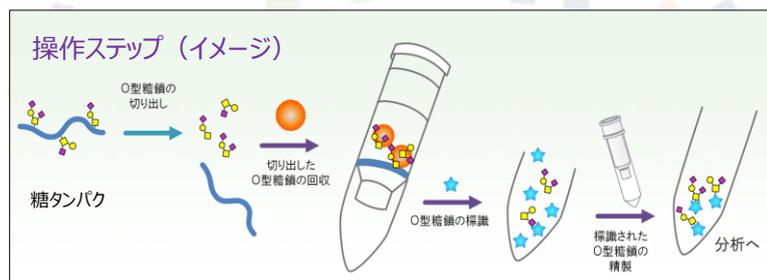
EZGlyco[®] O-Glycan Prep Kit によるヒト血清からの O-結合型糖鎖調製

図 1. EZGlyco[®] O-Glycan Prep Kit による O-結合型糖鎖調製ワークフロー
 糖タンパク質試料からの O-結合型糖鎖の切り出し、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-結合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。

結果

LC 測定の結果、15 分以降に多数の蛍光シグナルが検出されました。各ピークの質量分析結果を GlycoMod Tool*を用いて解析しました。得られた推定糖組成のうち、GlyConnect database に登録がある糖鎖を抽出したところ、3 つのピークにおいて O-結合型糖鎖に帰属されました。また、O-結合型糖鎖以外に N-結合型糖鎖に帰属される多数のピークが検出されました(図 2)。

*GlycoMod Tool <https://web.expasy.org/glycomod/>

まとめ

EZGlyco[®] O-Glycan Prep Kit を用いることでヒト血清から簡便に細胞の O-結合型糖鎖検出を行えることが示されました。本製品を用いることで O-結合型糖鎖バイオマーカー探索や創薬研究などへの挑戦がしやすくなり、これら分野の研究がさらに活発になることが期待されます。

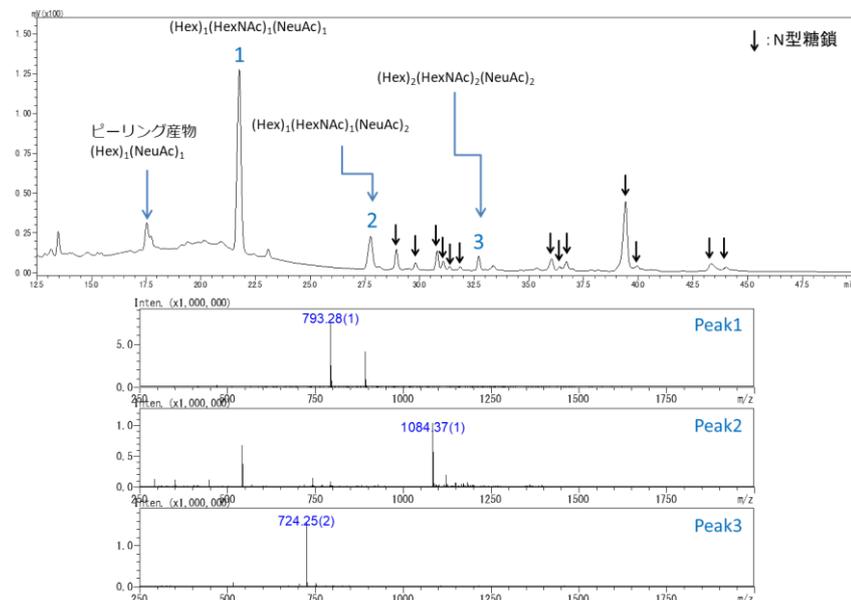


図 2. 血清由来 O-結合型糖鎖解析結果;上) LC クロマトグラム、下) 各ピークにおける MS スペクトル。血清サンプルをトリプシン処理後、EZGlyco[®] O-Glycan Prep Kit で処理したところ、複数の O-結合型糖鎖ピークが検出されました。