



## EZGlyco<sup>®</sup> O-Glycan Prep Kit による培養細胞からの O-結合型糖鎖調製 ~ヒト肝癌由来細胞 (HepG2)~

### 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(株)が提供する EZGlyco<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> O-Glycan Prep Kit を用いて細胞の 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

#### (1)細胞破砕

ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞を用いて検討を実施しました。HepG2 細胞(3.3x10<sup>5</sup> 個)を PBS で 3 回洗浄した後、20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1% TritonX-100 溶液 10 μL を加え、超音波処理により細胞溶解液を得ました。

#### (2)EZGlyco<sup>®</sup> O-Glycan Prep Kit 処理

上記方法にて調製したサンプル溶液 10 μL を用いて EZGlyco<sup>®</sup> O-Glycan Prep Kit のプロトコルに従って処理を行いました。

#### LC 条件

LC システム: Nexera, 島津製作所  
 カラム: ACQUITY UPLC<sup>®</sup> 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  
 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% 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

#### 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

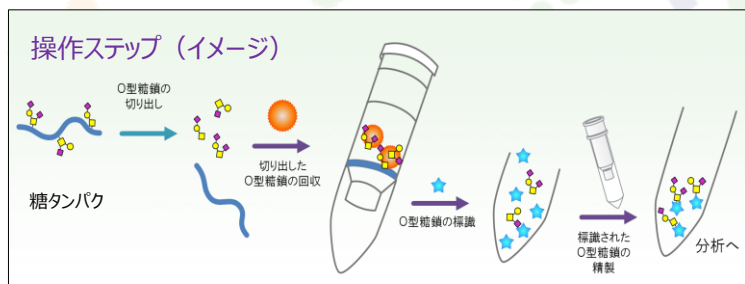


図 1. EZGlyco<sup>®</sup> O-Glycan Prep Kit によるO-結合型糖鎖調製ワークフロー  
 糖タンパク質試料からの O-結合型糖鎖の切り出し、精製、2-AB 蛍光ラベル標識までの操作を安全かつ簡便・迅速に行うことが可能で、分析対象である蛍光標識 O-結合型糖鎖試料の調製がおよそ 5 時間で完了します。従来は 2~3 日かかっていた時間と煩雑な操作をそれぞれ大幅に短縮化・簡略化することが可能です。

#### (3) 酸化チタンチップ処理

得られた 2AB 標識糖鎖溶液中に含まれるリン酸化糖分子を除去するために、2AB 標識糖鎖溶液を MonoTip TiO (ジーエルサイエンス, 5010-21007) のプロトコルに従って処理しました。ピペッターに MonoTip TiO を装着し、100%アセトニトリル及び 0.1%酢酸、50%アセトニトリル水溶液を用いて平衡化しました。続いて、2AB 標識糖鎖溶液(50 μL)を吸引/吐出し、溶液中のリン酸化糖を MonoTip TiO に吸着させ除去致しました。

#### (4)LC-MS 分析

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 μL に再溶解させました。再溶解液 10 μL のうち 1 μL を用いて左記条件下で糖鎖分析を実施しました。

### 結果と考察

細胞溶解液 10 μL を EZGlyco<sup>®</sup> O-Glycan Prep Kit を用いて処理し、O-結合型糖鎖測定を実施したところ、O-結合型糖鎖由来のピークを検出することができました。しかし、O-結合型糖鎖の検出領域に O-結合型糖鎖に帰属されないピークが顕著に検出され、MS の結果よりこれらピークはリン酸化糖由来であることを示唆されました(図 2)。O-結合型糖鎖が検出される領域と重なるため、これら分子を予め除去してから O-結合型糖鎖の測定を行うのが望ましいと考えられました。

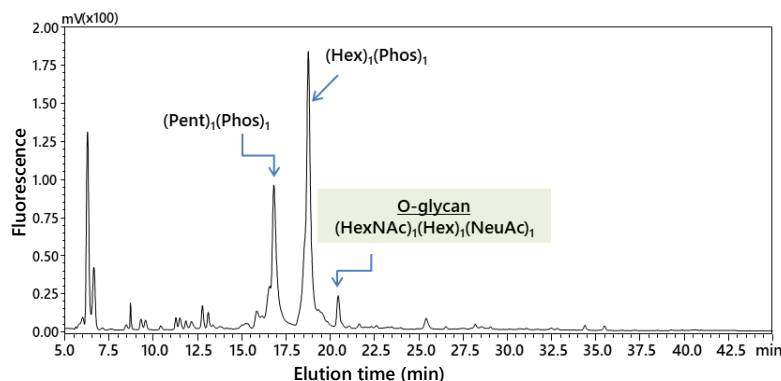


図 2. HepG2 細胞溶解液を処理した際の蛍光クロマトグラム

HepG2 の溶解液(10 μL, 3.3x10<sup>5</sup> 個)を EZGlyco<sup>®</sup> O-Glycan Prep Kit で処理したところ、O-結合型糖鎖が検出される領域にリン酸化糖に帰属されるピークが大きく検出されました。

そこで、リン酸基と特異的に結合する二酸化チタンを利用した検討を実施しました。HepG2 細胞( $3.3 \times 10^5$  個)を EZGlyco® O-Glycan Prep Kit で処理して得られた 2AB 標識糖鎖溶液全量を MonoTip TiO で処理しました。その結果、リン酸化糖由来のピークを大幅に減らすことができ O-結合型糖鎖の分析が容易になることが分かりました (図 3)。また、本結果からも溶出時間 16 分 ~ 20 分付近に顕著に検出されるピークがリン酸基を有する糖であることが示されました。

続いて、HepG2 細胞( $3.3 \times 10^5$  個)由来 O-結合型糖鎖の詳細解析を行いました。HepG2 細胞( $3.3 \times 10^5$  個)を EZGlyco® O-Glycan Prep Kit で処理して得られた 2AB 標識糖鎖溶液全量を MonoTip TiO で処理して得られたサンプルの詳細解析を行いました。各ピークの質量分析結果を GlycoMod Tool\*を用いて解析し、得られた推定糖組成の内、GlyConnect database に登録がある糖鎖を抽出したところ、6 つのピークにおいて O-結合型糖鎖に帰属されました。過去に報告されている  $(\text{HexNAc})_1(\text{Hex})_1(\text{NeuAc})_1$ 、 $(\text{HexNAc})_1(\text{Hex})_1(\text{NeuAc})_2$ 、 $(\text{HexNAc})_2(\text{Hex})_2(\text{NeuAc})_1$  に加え、以下の組成を持つ O-結合型糖鎖の存在を示唆する結果を得ることができました(図 4)。

$(\text{HexNAc})_2(\text{Hex})_2(\text{NeuAc})_2$

$(\text{HexNAc})_2(\text{Hex})_2(\text{Deoxyhexose})_1(\text{NeuAc})_1$

$(\text{HexNAc})_2(\text{Hex})_2(\text{Deoxyhexose})_1(\text{NeuAc})_2$

#### まとめ

EZGlyco® O-Glycan Prep Kit を用いることで細胞破碎液から簡単に細胞の O-結合型糖鎖を検出することができます。しかしながら、細胞内に大量に含まれるリン酸化糖も同時に顕著に検出されてしまい、O-結合型糖鎖の解析を困難にする可能性があります。

そこで、リン酸基と特異的に結合する二酸化チタンに着目した検討を行ったところ、二酸化チタン処理を行うことでリン酸化糖由来のピークが効果的に取り除かれることが確認されました。

本結果より、二酸化チタン処理と EZGlyco® O-Glycan Prep Kit を組み合わせることでより効果的に細胞の O-結合型糖鎖を解析できることが示されました。本技術によりバイオマーカー探索、細胞分化マーカー探索、創薬研究等様々な分野において O-結合型糖鎖研究が活発になる事が期待されます。

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

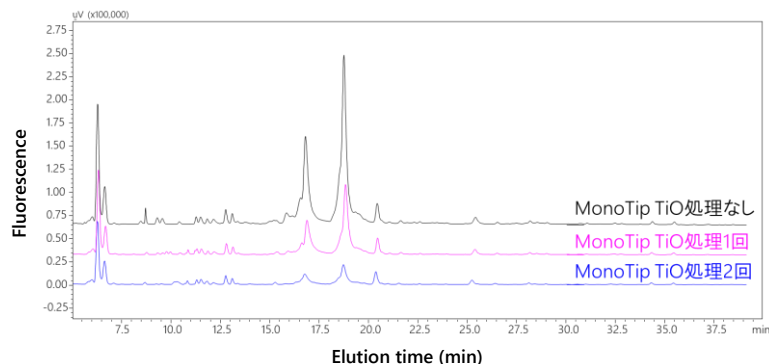


図 3. 酸化チタンチップ処理をした際の蛍光クロマトグラム

HepG2 溶解液を EZGlyco® O-Glycan Prep Kit 及び MonoTip TiO 処理し、得られた 2AB 標識糖鎖溶液を LC 測定しました。(A): MonoTip TiO 処理なし、(B): MonoTip TiO で 1 回処理、(C): MonoTip TiO 処理を 2 回実施。酸化チタンチップ処理をすることで、リン酸化糖に帰属されるピークが大幅に減少しました。

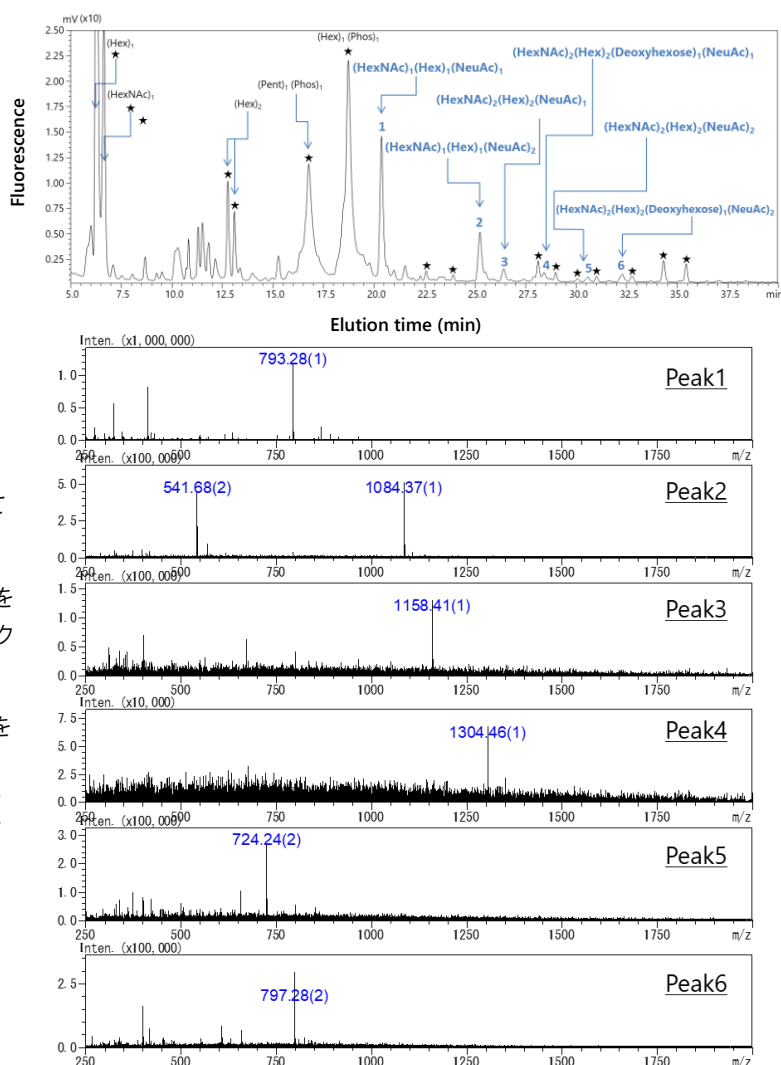


図 5. HepG2 由来 O-結合型糖鎖の詳細解析結果

上) LC クロマトグラム、下) 各ピークにおける MS スペクトル  
HepG2 溶解液を EZGlyco® O-Glycan Prep Kit 及び MonoTip TiO 処理した検体から O-結合型糖鎖に帰属されるピークが複数検出されました(青字)。  
★印: N-結合型糖鎖あるいは遊離糖鎖