BRINGING GLYCOMICS TO LIFE

S-BIO糖鎖調製キットによるエリスロポエチンのN型糖鎖・O型糖鎖解析の効率化

はじめに

エリスロポエチン (EPO) は、赤血球産生の恒常性維持において中心的な役割を担う糖タンパク質ホルモンである。組換えヒトEPOおよび関連する赤血球造血刺激因子製剤は、慢性腎臓病、化学療法、ならびにその他の病態に起因する貧血の治療に用いられる代表的なバイオ医薬品として広く臨床応用されている。加えて、近年ではEPOバイオシミラーの開発および実用化が世界的に進展しており、その品質特性を高精度に評価するための分析技術の重要性が一層高まっている。

EPOは高度に糖鎖修飾された糖タンパク質であり、その糖鎖構造は、生物活性、分子安定性、血中半減期、さらには免疫原性といった製剤の重要品質特性に大きく関与することが知られている。このため、EPOの包括的な品質評価においては、N型糖鎖およびO型糖鎖の双方を対象とした詳細な構造解析が不可欠である。特に、製品開発段階における候補製剤の特性解析、製造工程の最適化、品質管理、先行品との同等性評価、ならびにバイオシミラーの比較評価において、信頼性の高い糖鎖プロファイリング手法の確立は極めて重要である。また、研究用途に加え、製造現場においても再現性および操作性に優れた前処理法が求められることから、堅牢かつ簡便な糖鎖解析ワークフローの構築が重要な課題となっている。

本アプリケーションノートでは、S-BIOの糖鎖調製キットを用いたEPO由来N型糖鎖およびO型糖鎖のLC-MS解析ワークフローを示し、サンプル前処理工程の簡便化と実用性について検討した。

実験概要

・分析サンプル

ヒト エリスロポエチン (EPO), Sigma-Aldrich, Cat. No. E5546

・サンプル調製キット

BlotGlyco™ Kit：住友ベークライト, Cat. No. BS-45414
EZGlyco™ O-Glycan Prep Kit：住友ベークライト, Cat. No. BS-41601

・糖鎖調製

[N型糖鎖]

EPO 10 µg をトリプシン処理した後、PNGase F で処理し、続いて BlotGlyco™ Glycan Purification and Labeling Kit を用いて、2-AB標識プロトコールに従って処理した。得られた標識糖鎖溶液約 50 µL を凍結乾燥し、超純水 10 µL に再溶解後、LCMS-IT-TOF分析に供した。

[O型糖鎖]

EPO 10 µgをEZGlyco™ O-Glycan Prepを用いて処理した。得られた標識糖鎖溶液約 40 µL を凍結乾燥し、超純水 8 µL に再溶解後、LCMS-Q-TOF測定に供した。

・LC-MS分析条件

LC：Nexera, Shimadzu Corporation
カラム：ACQUITY UPLC™ Glycan BEH Amide（1.7 µm, 2.1 mm I.D. × 150 mm L.）
カラム温度：60°C
検出器：RF-20Axs（Ex.: 330 nm, Em.: 420 nm）
移動相A：水中50 mMギ酸アンモニウム　　移動相B：アセトニトリル
流量：0.4 mL/min　注入量：1 µL

MS：LCMS-9050（Q-TOF）, Shimadzu Corporation
　　イオン化モード：ESIネガティブイオンモード

LCグラジエント条件

[N型糖鎖]

Time / min	%A	%B
0.00	25	75
35.00	46	54
36.50	0	100
43.10	75	25
55.00	75	25

[O型糖鎖]

Time / min	%A	%B
0.00	15	85
5.00	15	85
20.00	50	50
25.00	50	50
25.01	15	85
35.00	15	85

結果

EPO由来のN型糖鎖およびO型糖鎖は、2種類の前処理キットを用いることで、問題なく精製および蛍光標識された。続くLC-MS分析により、それぞれの糖鎖組成を推定した。全工程は、各製造元のプロトコールに従って完了した。

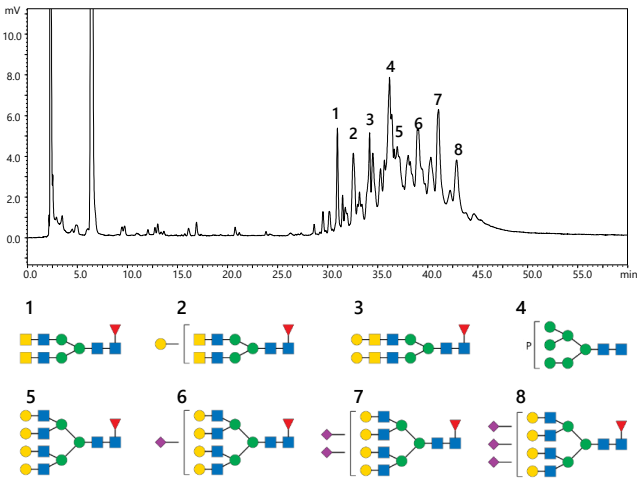


Figure 1　EPO由来2-AB標識N型糖鎖の液体クロマトグラム。各LCピークに含まれる成分の質量から推定した糖鎖組成の模式図を示した。
※模式図は代表的な糖鎖構造を示すものであり、構造を同定したものではない。

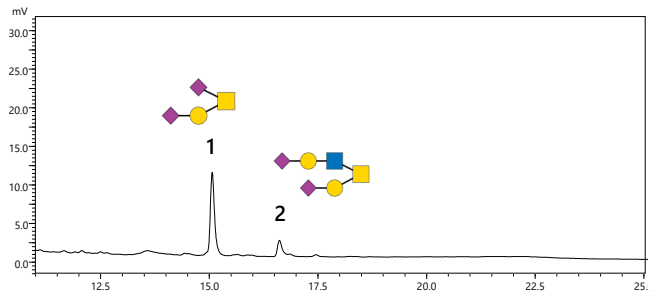


Figure 2　EPO由来2-AB標識O型糖鎖の液体クロマトグラム。各LCピークに含まれる成分の質量から推定した糖鎖組成の模式図を示した。
※模式図は代表的な糖鎖構造を示すものであり、構造を同定したものではない。

まとめ

本検討では、S-BIOの糖鎖調製キットを用いることで、EPO由来N型糖鎖およびO型糖鎖のLC-MSプロファイリングが可能であることが示された。N型糖鎖解析においては、PNGase F処理に先立つトリプシン消化の導入により、特に高分岐かつ高シアリル化糖鎖の回収性の向上が認められた。BlotGlyco™はトリプシン消化後試料からのN型糖鎖精製に有用であり、EZGlyco™ O-Glycan Prep KitはO型糖鎖調製に適用可能であった。これらの結果から、両キットを用いた前処理ワークフローは、EPOの糖鎖特性解析において簡便かつ実用的な手法となり得ることが示された。さらに、本手法はEPOにとどまらず、他の糖タンパク質医薬品の糖鎖解析への応用可能性も示唆する。

参考文献

Biel TG, Faison T, Matthews AM, et al. An etanercept O-glycovariant with enhanced potency. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2022;25:124-135. Published 2022 Mar 3. doi:10.1016/j.omtm.2022.03.002

注意事項および免責事項：本アプリケーションノートに記載されている情報は、あくまで一般的な指針および情報提供のみを目的としています。専門的な助言や特定の製品に関する推奨に代わるものではありません。ユーザーは、特定の用途に対する製品の適合性を判断し、適切な試験および評価を行う責任を負います。製造元は、本情報の使用または信頼に起因するいかなる損害または損失（直接的、間接的、付随的、または結果的な損害を含みますが、これらに限定されません）についても、一切の責任を負いません。すべての製品およびプロトコルは、出願中の特許を含め、特許によって保護されています。すべての商標、ロゴ、およびブランド名は、日本の住友ベークライト株式会社の所有物です。

住友ベークライト株式会社　S-バイオ事業部 | Web: www.sumibe.co.jp/product/s-bio/glycan | E-mail: s-bio_inquiry@ml.sumibe.co.jp