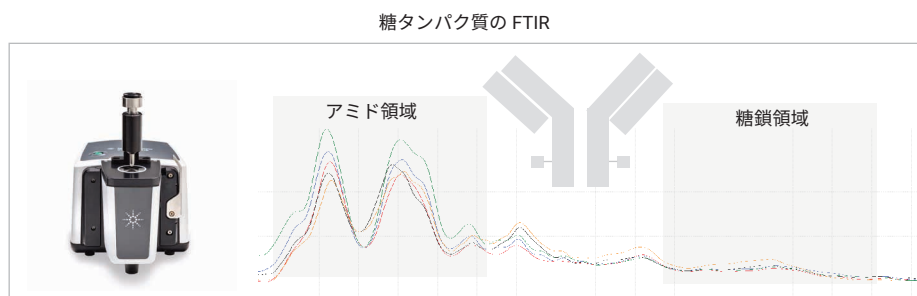


Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計を用いた タンパク質のグリコシル化分析



著者

Suresh Babu C.V.
Agilent Technologies, Inc.

概要

フーリエ変換赤外 (FTIR) 分光分析は、タンパク質構造の特性解析や治療用タンパク質の完全性の評価において、バイオ医薬品分野で確立されたツールです。グリコシル化は、タンパク質バイオ医薬品の重要な品質特性 (CQA) です。このアプリケーションノートでは、Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計を用いて、モノクローナル抗体 (mAb) および糖タンパク質でのグリコシル化を同定して比較する方法を示します。結果から、FTIR は、タンパク質サンプルを研究するためのシンプルかつ有益な技術であり、固有のグリコシル化 FTIR シグナルを提供することが示唆されます。

はじめに

タンパク質のグリコシル化は、モノクローナル抗体（mAb）やその他のバイオ医薬品を含む、治療用タンパク質の効能、安定性、完全性に影響を与えるきわめて重要な翻訳後修飾（PTM）です。このプロセスでは、糖分子（つまり、糖鎖）が、タンパク質の特定のアミノ酸残基に付加されます。グリコシル化は重要な品質特性（CQA）に分類され、生物化学的プロセスにおいて重要な機能を有しており、タンパク質構造、溶解性、タンパク質分解に対する耐性に影響を与えます。¹したがって、治療用タンパク質の開発および製造においては、グリコシル化のモニタリングと制御が不可欠です。

バイオ医薬品製造におけるグリコシル化をモニタリングするために、さまざまな分析技法が使用されます。これらの技法には、FTIR 分光分析、質量分析、高速液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、核磁気共鳴分光分析、レクチンアレイがあります。ただし、これらの技法の多くは、時間のかかる複雑なサンプル前処理ステップを必要とします。一方、FTIR は、タンパク質研究のための高速かつ簡単なツールを提供する堅牢な分析技法です。この技法は非破壊的であり、さまざまな実験条件下におけるタンパク質分子の研究に使用されます。糖鎖の構成要素（単糖類/糖）、タンパク質のアミド基、および水分子は、FTIR において識別可能なフィンガープリント吸収バンドを生成します。また、糖タンパク質中の炭水化物含有量やグリコシル化プロファイルのモニタリングにも使用されてきました。^{2, 3}

本研究では、Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計を用いて、タンパク質のグリコシル化分析のための FTIR 分光分析メソッドを実証しました。結果から、糖タンパク質の FTIR スペクトルは、グリコシル化プロファイルに対応する FTIR シグナルを提供しており、最小限のサンプル前処理による、高速かつ非破壊的な分析メソッドが実現可能であることが示されました。

実験方法

使用装置

Cary 630 FTIR に、1 回反射ダイヤモンド減衰全反射（ATR）モジュールを取り付けました。表 1 に示すパラメータを使用して、Agilent MicroLab ソフトウェアによりデータの取り込みを行いました。

表 1. ATR を備えた Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計の操作パラメータ

パラメータ	設定値
スペクトル範囲	4,000 ~ 650 cm ⁻¹
サンプル/バックグラウンドのスキャン回数	140/128
分解能	2 cm ⁻¹
ゼロフィル係数	なし
アポダイゼーション	三角形
位相補正	Mertz
サンプリング技術	ATR

材料

フェチュイン、α1-酸性糖タンパク質、リボヌクレアーゼ B、およびシトクローム c は、Sigma-Aldrich（セントルイス、ミズーリ州、米国）から購入しました。Ristova、Reditux、および抗体薬物複合体（ADC）/カドサイラは、Alliance Pharm（シンガポール）から購入しました。NIST mAb モノクローナル抗体参照標準は、Agilent Technologies（サンタクララ、カリフォルニア州、米国）から入手しました。PNGase F は、New England BioLabs から入手しました。Zeba スピン脱塩カラム（7K MWCO）は、Thermo Fisher Scientific（ロックフォード、イリノイ州、米国）から入手しました。超純水は、社内の MilliporeSigma Milli-Q システム（バーリントン、マサチューセッツ州、米国）で採取しました。

FTIR ワークフロー

Cary 630 FTIR を用いたタンパク質のグリコシル化ワークフローを図 1 に示します。mAb サンプルはスピンカラムで脱塩し、濃度は 50 mg/mL と推定されました。タンパク質サンプルは、追加処理なしで 5 mg/mL に溶解しました。15 μ L のサンプルを ATR モジュールのダイヤモンド結晶上にロードして、吸収スペクトルを即座に記録しました (表 1)。各測定後、結晶の表面を超純水で洗浄しました。新しいサンプルの測定前には毎回、サンプルスペクトル測定時に使用したパラメータで、バックグラウンドを記録しました。データ解析には、Agilent MicroLab Expert ソフトウェア、バージョン 1.1.0.1 を使用しました。



図 1. Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計を用いたタンパク質のグリコシル化分析ワークフロー

脱グリコシル化

脱塩した mAb は、20 mM トリスバッファ (pH 8.0) で調製しました。5x 反応バッファを含む mAb 溶液に PNGase F を添加しました。37 °C で一晩、消化を実施しました。

データ解析

5 回の測定値を平均化したスペクトルをデータ処理に使用しました。[Mathematics] (演算) タブの [Spectrum Arithmetic] (スペクトル演算) の [Subtract Spectra] (スペクトルの減算) 機能を使用して、タンパク質の平均化したスペクトルから、水のブランク平均スペクトルを減算しました。ブランク減算されたタンパク質スペクトルは、[2D View] (2D ビュー) タブの [Merge View] (ビューの結合) を使用して結合しました。さらなる処理とデータ解析は、ベースライン補正を用いて実施しました。スペクトルは、1,718 ~ 1,476 cm^{-1} のピーク面積が等しくなるように正規化しました [Mathematics] (演算) タブを用いて、Savitzky-Golay 平滑化アルゴリズム (平滑化ウィンドウ 9) を適用しました。ピーク面積は、[Mathematics] (演算) タブの [Peak Picking] (ピーク検出) 機能を用いて算出しました。データ解析のステップを図 2 に示しています。

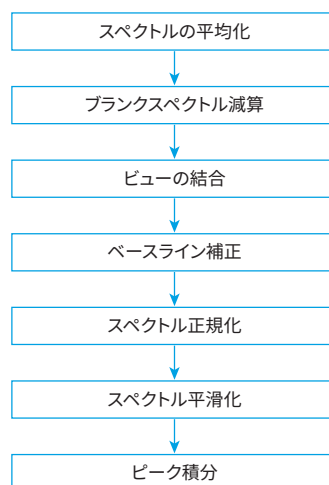


図 2. Agilent MicroLab Expert ソフトウェアにおけるデータ解析手順

結果と考察

タンパク質は、FTIR 分光分析において特徴的なアミド吸収バンドを示しており、これは二次構造および立体配座に関連しています。アミドⅠバンド ($1,600 \sim 1,800 \text{ cm}^{-1}$) とアミドⅡバンド ($1,470 \sim 1,570 \text{ cm}^{-1}$) は、カルボニル基と N-H 基の吸収に起因しています。

グリコシル化は、バイオ医薬品に生じる一般的な PTM の 1 つです。糖タンパク質に結合した炭水化物は、タンパク質のアミド領域とは異なる吸収バンドを示します。糖鎖の赤外 (IR) 吸収は、 $1,200 \sim 950 \text{ cm}^{-1}$ の広い領域に及んでおり、この領域ではタンパク質のシグナル強度が非常に低くなっています。糖タンパク質中の炭水化物の量は、これらのスペクトルバンドの強度と関連があることが実証されています。³

本研究では、FTIR メソッドの評価のために、グリコシル化レベルが異なるさまざまなグリコシル化タンパク質を選択しました。製剤化された mAb には、吸収バンドを示す可能性のある賦形剤が含まれており、これらのシグナルは、 $1,200 \sim 950 \text{ cm}^{-1}$ 領域における糖鎖分析に干渉する可能性があります。したがって、mAb サンプルは、スピンカラムを用いて水でバッファ交換しました。図 3 は、製剤化された mAb とバッファ交換された mAb の FTIR スペクトルを比較したものを示しています。グリコシル化測定におけるバッファの干渉を除去するには、脱塩ステップが必要です。

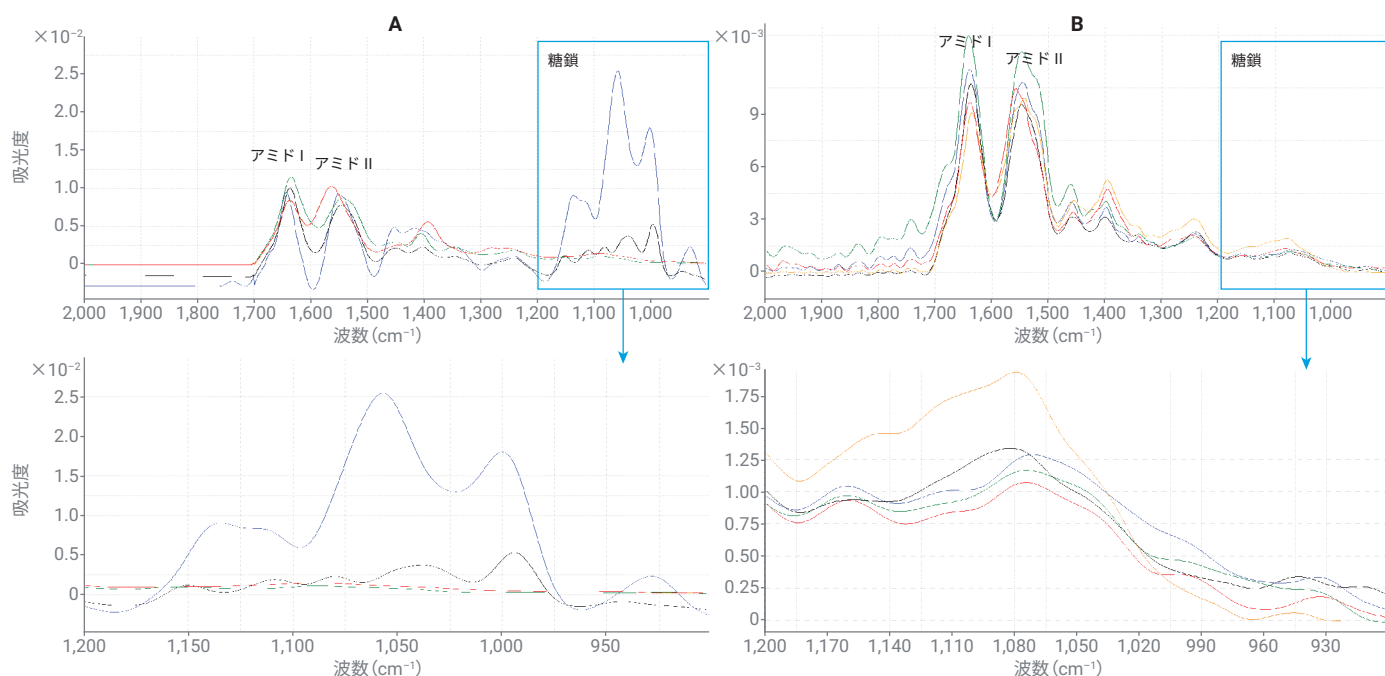


図 3. (A) 製剤化された mAb、(B) 脱塩された mAb の処理済み FTIR スペクトル。上段は、タンパク質およびグリコシル化吸収バンドをカバーする $2,000 \sim 900 \text{ cm}^{-1}$ 領域を示しています。下段は、グリコシル化スペクトル領域 ($1,200 \sim 900 \text{ cm}^{-1}$) の拡大図を示しています。サンプル: ADC (青)、ハーセプチン (黒)、NIST mAb (緑)、先発品 mAb (黄)、バイオシミラー mAb (赤)

各タンパク質について5つのスペクトルを収集し、140 スキャンの平均を算出しました。図4は、アミド結合領域にスケーリングした各タンパク質の平均スペクトルを示しています。1,200 ~ 950 cm^{-1} 領域を拡大したスペクトルは、糖タンパク質のグリコシル化レベルが変動していることを示しています。非グリコシル化タンパク質であるシトクローム c は、この領域で IR 吸収バンドを示しませんでした。全体的なグリコシル化レベルを評価するために、1,179 ~ 965 cm^{-1} のスペクトル領域を積分して、曲線

下の面積を算出しました。図5は、各タンパク質のグリコシル化に関連するスペクトルバンド面積を示しています。ピーク面積は、各タンパク質の全体的なグリコシル化レベルが、報告値と同等であることを明確に示しています。^{4, 5}

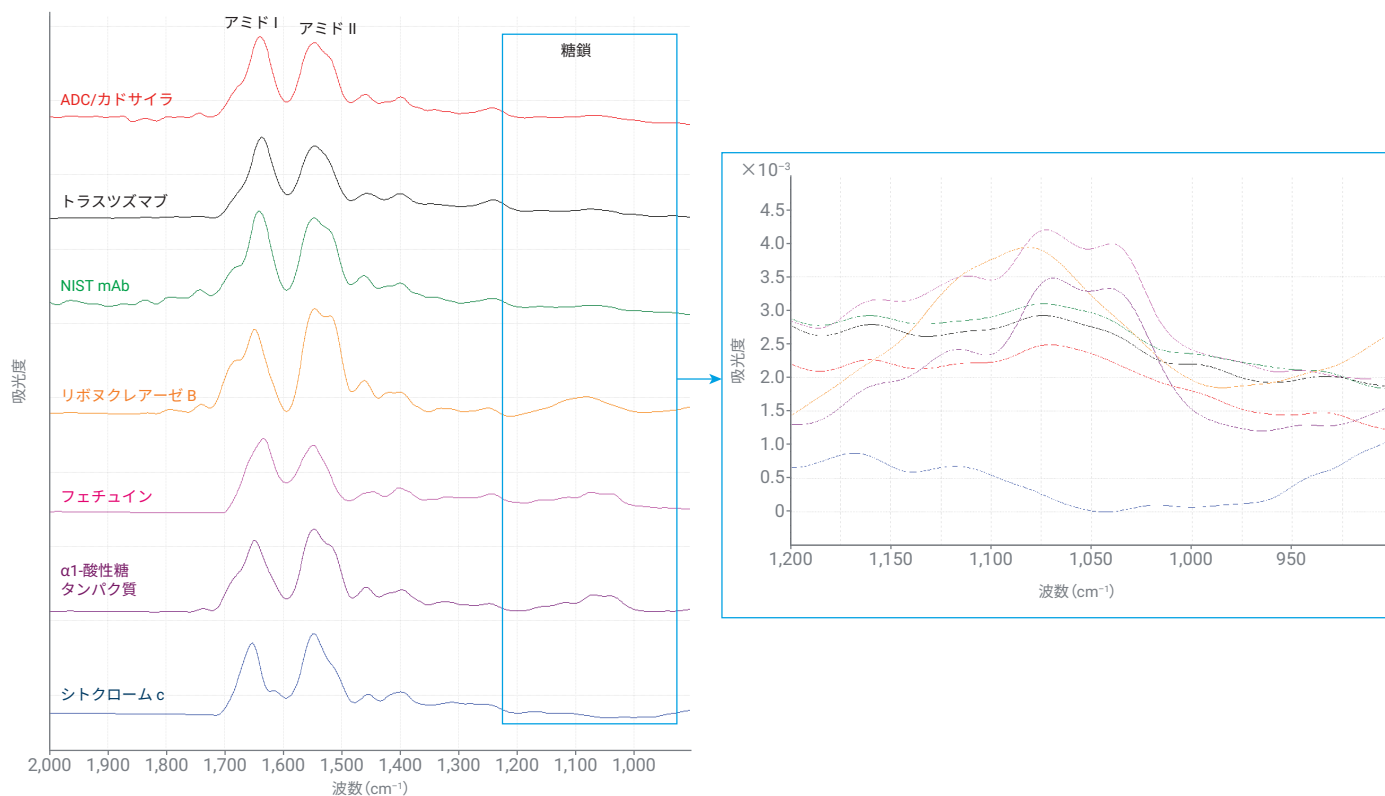


図4. グリコシル化全体の速度を分析するためのタンパク質の処理済み FTIR スペクトル。1,200 ~ 900 cm^{-1} 領域を拡大して、吸収強度の違いを示しています。

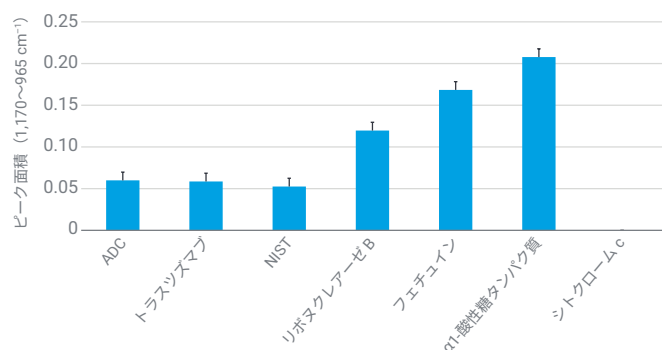


図5. 7 種類のタンパク質の FTIR 糖鎖スペクトル領域 1,179 ~ 965 cm^{-1} のピーク面積

FTIR メソッドを試験するために、先発品 mAb とバイオシミラー mAb のグリコシル化測定に関する分析を実施しました。図 6 は、グリコシル化および脱グリコシル化 Ristova および Redtiux mAb サンプルの FTIR 分析を比較したものを示しています。PNGase F 処理前後の mAb の吸収

スペクトルは、バンド強度の減少を示しました。これら 2 種類の mAb 間のグリコシル化レベルは同等であり、FTIR メソッドの適用可能性が実証されました。

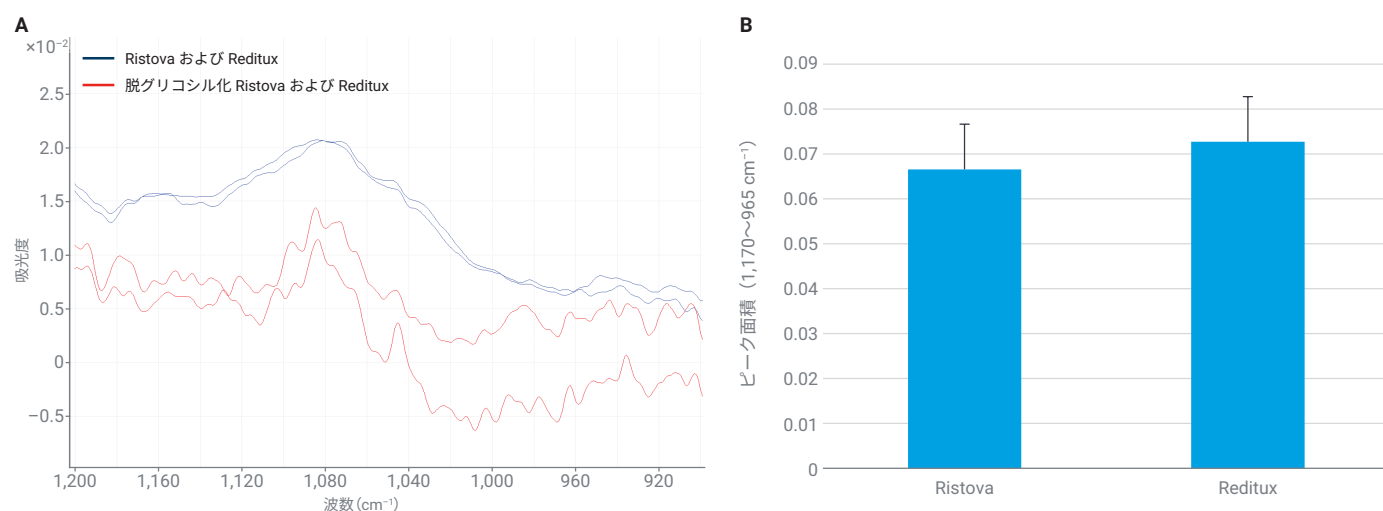


図 6. Ristova および Redtiux mAb の FTIR 分析。(A) 処理済み FTIR スペクトル、グリコシル化 mAb (青)、脱グリコシル化 mAb (赤)、(B) 糖鎖スペクトル領域 1,179 ~ 965 cm^{-1} におけるピーク面積

結論

このアプリケーションノートでは、Agilent Cary 630 FTIR 分光光度計を用いたグリコシル化分析のシンプルさと使いやすさを実証しました。FTIR メソッドは、タンパク質の全体的なグリコシル化レベルに関連するスペクトル変動を提供しており、膨大なサンプル前処理やラベリングが不要になります。糖鎖プロファイルに対応するシグナルを提供することにより、糖タンパク質の同定が可能になり、先発品とバイオシミラー治療用タンパク質間で同等の高速なグリコシル化分析が実現されます。使いやすい Agilent MicroLab Expert ソフトウェアは、データ処理を効率化して、結果生成までの時間を短縮します。この技術は、タンパク質製造プロセス時のバッチ間の一貫性と製品品質の検証に使用できます。また、高速なグリコシル化推定機能により、タンパク質品質管理ワークフローに最適です。つまり、FTIR メソッドは、最小限のサンプル前処理、分析時間の短縮、インタクト糖タンパク質の分析能力など、数多くの利点を提供する、ということです。

参考文献

1. He, M.; Zhou, X.; Wang, X. Glycosylation: Mechanisms, Biological Functions and Clinical Implications. *Signal Transduction Targeted Ther.* **2024**, 9(1), 194. DOI: 10.1038/s41392-024-01886-1
2. Derenne, A.; Derfoufi, K. M.; Cowper, B.; Delporte, C.; Goormaghtigh, E. FTIR Spectroscopy as an Analytical Tool to Compare Glycosylation in Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Anal. Chim. Acta.* **2020**, 1112, 62–71. DOI: 10.1016/j.aca.2020.03.028
3. Khajepour, M.; Dashnau, J. L.; Vanderkooi, J. M. Infrared Spectroscopy Used to Evaluate Glycosylation of Proteins. *Anal. Biochem.* **2006**, 348(1), 40–48. DOI: 10.1016/j.ab.2005.10.009
4. Derenne, A.; Derfoufi, K.-M.; Cowper, B.; Delport, C.; Butré, C. I.; Goormaghtigh, E. Analysis of Glycoproteins by ATR-FTIR Spectroscopy: Comparative Assessment. *Methods in Molecular Biology* **2021**, 2271, 361–374. DOI: 10.1007/978-1-0716-1241-5_25
5. Yang, Y.; Wang, G.; Song, T.; Lebrilla, C. B.; Heck, A. J. R. Resolving the Micro-Heterogeneity and Structural Integrity of Monoclonal Antibodies by Hybrid Mass Spectrometric Approaches. *mAbs* **2017**, 9(4), 638–645. DOI: 10.1080/19420862.2017.1290033

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンタ

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

DE-008465

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2025

Printed in Japan, August 13, 2025

5994-8540JAJP