

バイオマーカー探索のための Agilent AdvanceBio Gly-X InstantPC 技術によるヒト血清および免疫グロブリン G N- グライコームのハイスループット プロファイリング

著者

Yongjing Xie,
Letícia Martins Mota,
Michael Butler
National Institute for
Bioprocessing Research &
Training (NIBRT)
Ireland
YashoNandini Singh,
Bethan Morgan、Aled Jones
Agilent Technologies, Inc.

概要

タンパク質のグリコシル化は、宿主細胞と翻訳されたタンパク質に依存する糖鎖プロファイルをもたらす細胞内プロセスです。結果として生じる糖鎖プロファイルは、細胞環境の変化があるとそれに伴って変化する可能性があります。ヒト血漿または血清の定量的糖鎖プロファイリングにより、グリコシル化のレベルとパターンに関する生物学的情報が得られます。この情報は、疾患診断バイオマーカーと創薬ターゲットにおいて極めて重要です。このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio Gly-X および InstantPC キットを使用して、ヒト血清および精製免疫グロブリン G (IgG) 分画からハイスループット N- グライコームプロファイリングを行う方法について説明します。実際の反応ステップはわずか 10 分で、必要とされるのはヒト血清 1 μ L または IgG 40 μ g です。このワークフローは、高感度の N- グライコームプロファイリングの取得を目的としたサンプル前処理法において、高いスループット効率と優れた再現性を実現し、さらに疾患診断バイオマーカーの発見をもたらす大きな可能性があります。

はじめに

タンパク質のグリコシル化は、受容体の相互作用、免疫応答、タンパク質の分泌や輸送など、数多くの生物学的プロセスに関与しています。また、がん、神経変性、肝臓、感染症、炎症性疾患、その他の眼、腎臓、関節炎に関連する疾患など、幅広い生理学的および病理学的プロセスにおいて重要な役割を果たします。¹⁻³したがって、疾患の発症は通常、タンパク質のグリコシル化の変化に関連しています。対象とする体液または組織の定量的糖鎖プロファイリングにより、これらのサンプルに存在するグリコシル化のレベルとパターンに関する膨大な量の生物学的情報を得ることができます。グリコシル化されていないアルブミンを除いて、ヒトの血漿または血清中のタンパク質の大部分は高度にグリコシル化されており、体の生理学的および病理学的状態を反映する糖鎖の潜在的な貯蔵庫になっています。^{4,5}免疫グロブリン G (IgG) は、ヒトの血漿または血清に最も存在量の多い糖タンパク質であり、適応免疫システムの主要な構成要素です。⁶また最近の研究により、IgG のグリコシル化パターンの変化とさまざまな病理学的プロセスとの関連が示されています⁷⁻⁹。ただし、潜在的な疾患診断バイオマーカーを特定する目的でヒト血清糖タンパク質または精製 IgG 分画から N- グライコームプロファイリングするには、高速で感度の高い戦略の継続的な開発が重要です。

一般的に使用されるグリカン調製手順の大半は、2- アミノベンズアミド (2-AB) などの蛍光色素を使用しますが、これらの手順は比較的手間と時間がかかり、感度が低く、再現性が良くありません。^{10,11}このアプリケーションノートでは、ヒト血清および IgG から N-グリカンのサンプルを調製する革新的で効率化されたワークフローと、それに続く蛍光検出と組み合わせた親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC/FLD) について説明します。サンプル前処理プロセスは全体で 1 時間もかからず、必要なヒト血清は 1 μ L または IgG は 40 μ g です。すべて 96 ウェルプレートフォーマットで、直ちに自動化可能です。¹²このワークフローは、高感度の N- グライコームプロファイリングのために高スループットで再現性のあるサンプル調製を実現し、疾患診断バイオマーカーの発見に大きな可能性があると期待されています。

実験方法

試料調製

AdvanceBio Gly-X および InstantPC キット、96 サンプル (GX96-IPC) は、Gly-X 脱グリコシル化モジュール (GX96-100)、Gly-X InstantPC ラベリングモジュール (GX96-101)、および Gly-X InstantPC クリーンアップモジュール (GX96-102) の 3 つのモジュールから構成されます。Agilent AdvanceBio InstantPC マルトデキストリンラダー (GKPC-503)。ヒト血清 (H4522-100mL) は Sigma-Aldrich から購入しました。IgG は、前述のように AKTA Avant システム (GE Healthcare) を使用したプロテイン A アフィニティクロマトグラフィーでヒト血清 (H4522-100mL) から精製しました¹²。HPLC グレードのアセトニトリルは Sigma から購入し、すべての調製には Milli-Q 水を使用しました。その他の化学薬品はすべて Sigma-Aldrich から購買しました。

サンプル前処理脱グリコシル化

ヒト血清または IgG の溶液中の酵素的脱グリコシル化は、AdvanceBio Gly-X および InstantPC キット (GX96-IPC) の指示に従って実施しました。

1. ヒト血清 (1 μ L) または IgG (40 μ g) を 50 mM 4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジンエタンスルホン酸 (HEPES) バッファー (pH 8.0) で希釈し、最終容量を 20 μ L にします。
2. 20 μ L のヒト血清または IgG 溶液に Gly-X 変性剤 2 μ L を加え、完全に混合します。
3. 90 °C で 3 分間インキュベートし、室温で 2 分間放置します。
4. 2 μ L の N-グリカナーゼ希釈標準溶液を加え、完全に混合します。
5. 50 °C で 5 分間インキュベートします。

InstantPC を用いた蛍光誘導体化

6. InstantPC 色素のバイアル 1 本を付属の溶媒 150 μ L に溶解して、InstantPC 色素溶液を調製し、よく混合します。
7. 上記で調製したサンプルに 5 μ L の InstantPC 色素溶液を加え、完全に混合します。
8. 50 °C で 1 分間インキュベートします。

InstantPC ラベル化グリカンの精製

9. 150 μ L のロード/洗浄溶液 (2.5 % ギ酸/97.5 % アセトニトリル) を各サンプルに加えます。
10. サンプル全体 (179 μ L) を、400 μ L のロード/洗浄溶液を含んだ Gly-X クリーンアッププレートの各ウェルに移します。
11. 真空を用いてクリーンアッププレートに溶液を通過させた後、600 μ L のロード/洗浄溶液でサンプルを 3 回洗浄します。
12. InstantPC ラベル化 N-グリカンを 100 μ L の Gly-X InstantPC 溶液 (160 mM ギ酸アンモニウム/10 % (v/v) アセトニトリル、pH 4.4) で溶出します。
13. 集めた N-グリカン溶液を、追加の処理なしで直ちに分析するか、将来の分析のために -20 °C で保存します。

InstantPC ラベル化 N-グリカンの HILIC/FLD 分析

ヒト血清または IgG からの InstantPC ラベル化 N-グリカンのプロファイルは、Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラム (120 Å、2.1 × 150 mm、2.7 µm (部品番号 683775-913)、Agilent OpenLab ChemStation ソフトウェア、Agilent 1260 Infinity II LC システムを使用した HILIC/FLD を用いて決定しました。このシステムは、クオータナリ溶媒ポンプ、オートサンプラー、蛍光検出器で構成されます。検出器の設定は InstantPC 用に、励起波長と発光波長をそれぞれ 285 nm と 345 nm としました。

InstantPC でラベル化されたグリカンサンプルは追加処理なしで、1 µL の量で注入しました。N-グリカンは、溶媒 A として 50 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.4)、溶媒 B としてアセトニトリルで分離しました。HPLC システムは、溶媒 A と溶媒 B (27/73, v/v) を用いて 1.5 分間、流速 0.5 mL/分で平衡化しました。その後、流速 0.5 mL/分の 35 分間の分析で 73 ~ 62 % 溶媒 B (v/v) の直線グラジェントによって、分離を行いました。注入前に、サンプルを 5 °C に維持し、カラム温度を 60 °C に設定しました。システムは、AdvanceBio InstantPC マルチデキストリンラダー (GKPC-503) を使用してキャリブレーションしました。グルコース単位 (GU) 値とリテンションタイム T (分) データを 5 次多項式曲線でフィッティングし、検量線を作成しました。

結果と考察

高速グリカン前処理用の AdvanceBio Gly-X 技術

図 1 に示すように、本研究で使用した AdvanceBio Gly-X および InstantPC キットにより、革新的な 96 ウェルプレートフォーマットのワークフローに沿って、効率化された N-グリカンのサンプル前処理が実現されます。このキットは、90 °Cでの 3 分間の糖タンパク質変性と、それに続く 50 °Cでの 5 分間の脱グリコシル化の機能を有しています。これにより、標的糖タンパク質からの糖鎖の完全な遊離が効率的にできます。

また、プロカインの活性型である InstantPC 蛍光ラベルの導入により、遊離されたグリコシルアミン中間生成物は、活性化されたカーバメートケミストリーを介して InstantPC に結合し、安定した尿素結合を形成します。この革新的なグリカン前処理ワークフローは、糖タンパク質の調製から糖鎖プロファイリングまでをわずか 10 分で完了します。使用するのはわずか 1 µL のヒト血清または 40 µg の IgG です。その結果、定性的および定量的に完全な糖鎖分析が確実に実施できます。

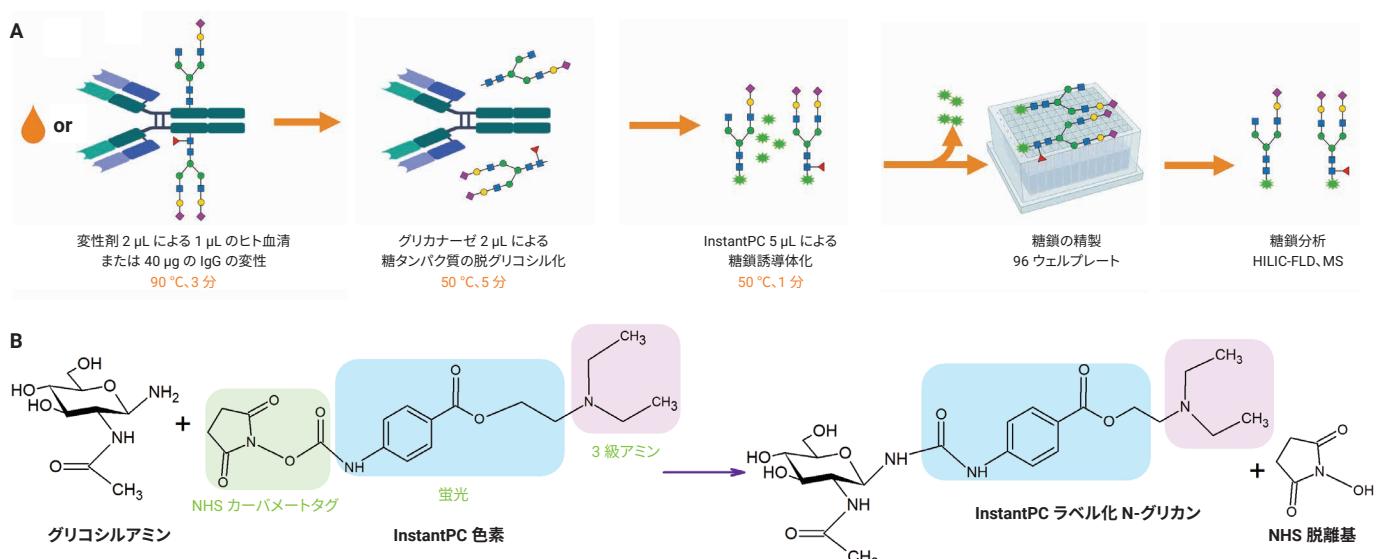


図 1. グリコシルアミンの遊離および InstantPC 誘導体化のための Agilent AdvanceBio Gly-X 技術。(A) ヒト血清または IgG からのグリコシルアミンの遊離、InstantPC 誘導体化、および精製のワークフロー。(B) グリコシルアミンの InstantPC ラベリングに基づく活性化カーバメートケミストリー。ACD/ChemSketch と BioRender.com を用いて作成。

HILIC/FLD によるヒト血清 IgG の InstantPC ラベル化グリカンプロファイリング

ヒト血清および IgG の N-グライコミクスプロファイルは、疾患バイオマーカー探索につながるため、広く研究されてきました。このアプリケーションノートでは、HILIC/FLD による定性および定量分析のために、ヒト血清および IgG から遊離されたグリコシルアミン中間物を InstantPC でラベル化しました。開発したクロマトグラフィー条件下（表 1）で、IgG とヒト血清の両方から得られた InstantPC ラベル化 N-グリカンに対して、主要な N-グリカン種すべてで明確に分離されたピークが得られました（図 2 および 3）。糖鎖プロファイリング用に開発された HILIC/FLD メソッドは、良好な再現性を示しました（データは示していません）。

図 2 と表 2 に示すように、ヒト血清 IgG はさまざまな N-グリカン種を有しています。これらは主として、高コース糖鎖、シアル酸糖鎖、GlcNAc 分枝型糖鎖、および一部の中性ガラクトースと GlcNAc 含有糖鎖で構成されます。最も存在量の多い糖鎖は FA2G1 (24.95 %) で、次に FA2 (18.36 %)、FA2G2 (13.01 %)、FA2G2S1 (11.13 %) が続きます。

HILIC/FLD によるヒト血清の InstantPC ラベル化糖鎖プロファイリング

図 3 と表 2 に、ヒト血清の典型的な N- グライコームプロファイルを示します。A2G2S2 が主要な糖鎖ピークであり、相対アバンダンスの 41.90 % を占めています。また 3 つの主要な糖鎖ピーク A3G3S3 (7.65 %)、A2G2S1 (6.13 %)、FA2G1 (5.35 %) が、より少ない量で存在しています。他の糖鎖のピークは、フコース糖鎖、シアル酸糖鎖、GlcNAc 分枝型糖鎖、およびいくつかの中性ガラクトースと GlcNAc 含有糖鎖など、さまざまな N-グリカン種に割り当てられますが、それらの相対アバンダンスは 5 % 未満です。

表 1. InstantPC ラベル化 N-グリカンプロファイリングの HILIC/FLD 条件

パラメータ	設定値				
機器	Agilent 1260 Infinity II LC システム				
カラム	Agilent AdvanceBio Glycan マッピングカラム、120 Å、2.1 × 150 mm、2.7 µm (部品番号 683775-913)				
カラム温度	60 °C				
移動相	A) 50 mM ギ酸アンモニウム (pH 4.4) B) アセトニトリル	A (%)	B (%)	流量 (mL/分)	
グラジェントプログラム	時間 (分)	0	27	73	0.5
		1.5	27	73	0.5
		36.5	38	62	0.5
		45.0	47	53	0.5
		46	70	30	0.4
		47	27	73	0.25
		48	27	73	0.5
		60	27	73	0.5
注入量	1 µL (0.01 µL のヒト血清または 0.4 µg の IgG からの糖鎖に相当)				
検出	Agilent 1260 Infinity II LC システム FLD λEx 285 および λEm 345 nm				

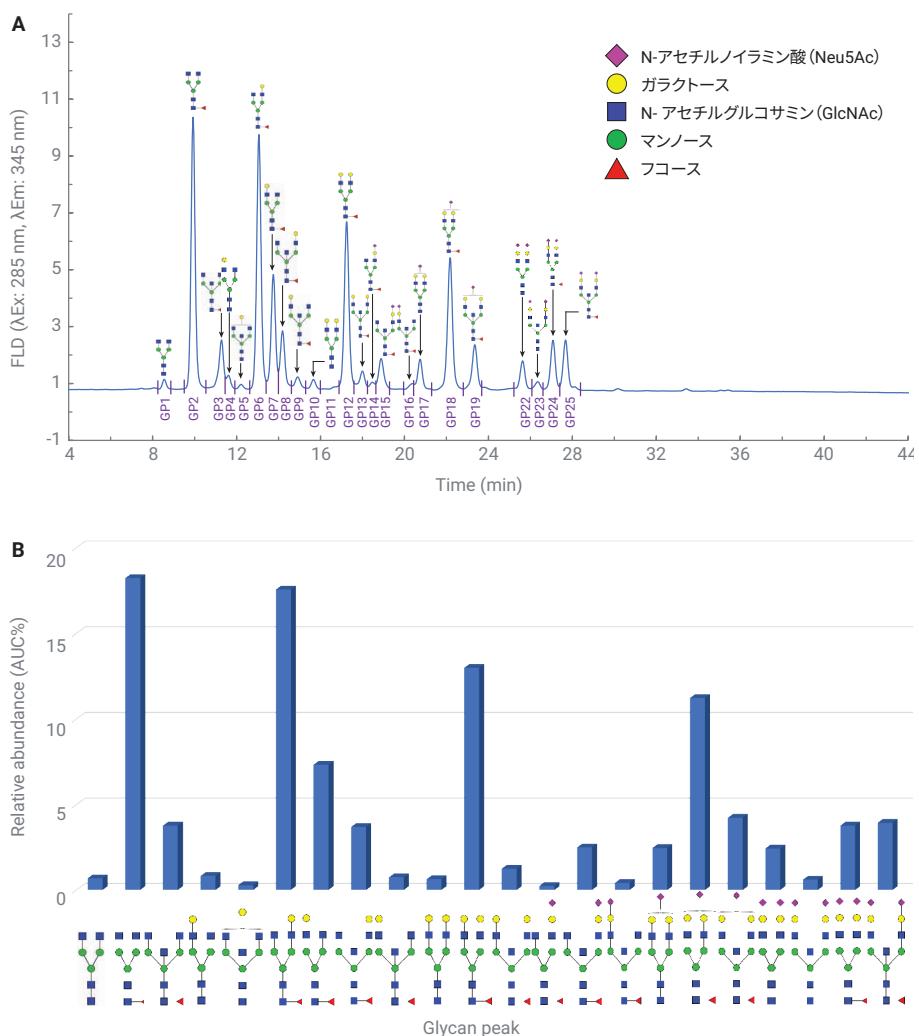


図 2. InstantPC ラベル化 IgG N-グリカンの HILIC/FLD クロマトグラム (A)、および主要な N-グリカン種の相対アバンダンス (B)。表示は主要な糖鎖ピークのみです。

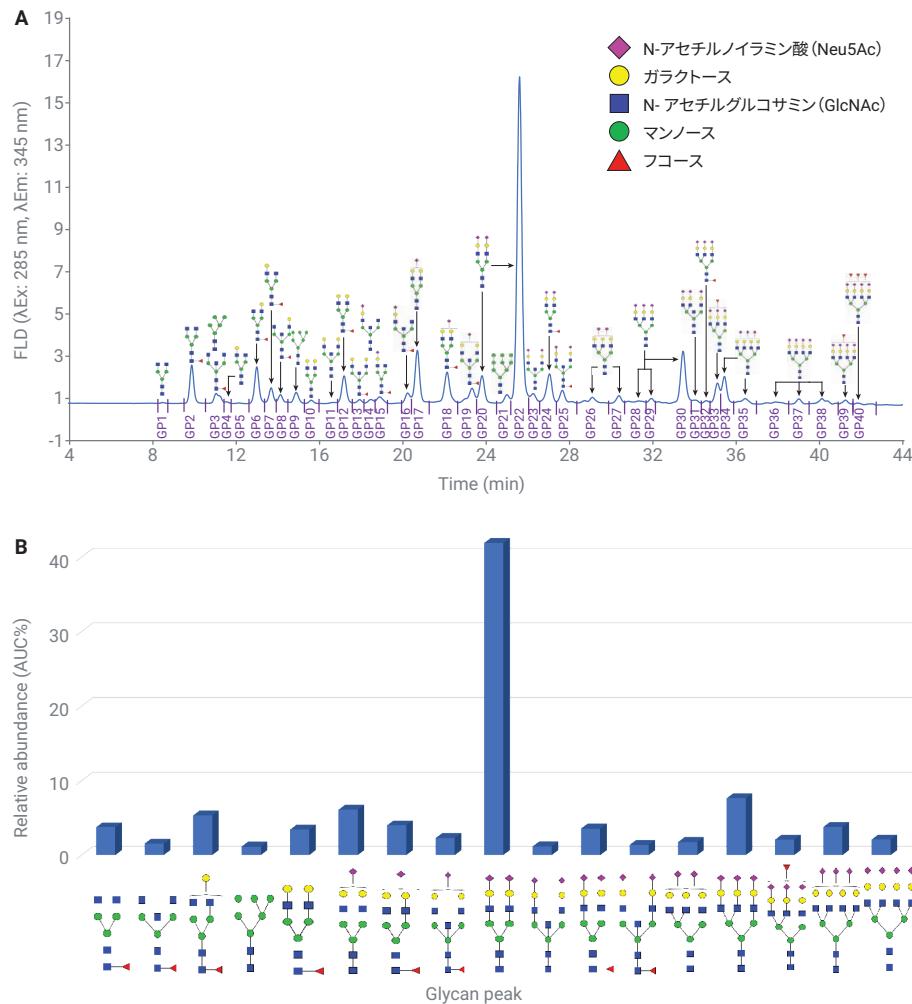


図3. InstantPC ラベル化ヒト血清 N-グライコームの HILIC/FLD クロマトグラム (A)、および主要な N-グリカン種の相対アバンダンス (B)。表示は主要な糖鎖ピークのみです。

表2. InstantPC ラベル化ヒト血清および IgG N- グライコームプロファイリング

ラベル	オックスフォード表示名	GU	N-グリカン構造	IgG		ヒト血清	
				AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
GP1	A2	5.441		5.008	0.690	0.566	0.086
GP2	FA2	5.946		133.363	18.362	24.686	3.766
GP3	FA2B	6.368		28.313	3.898	10.262	1.565
	M5	6.368		-	-		

ラベル	オックスフォード表示名	GU	N-グリカン構造	IgG		ヒト血清	
				AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
GP4	A2[3]G1	6.501		6.169	0.849	0.793	0.121
GP5	A2BG1	6.690		2.128	0.293	0.356	0.054
GP6	FA2[6]G1	6.951		127.747	17.589	25.302	3.859
GP7	FA2[3]G1	7.159		53.461	7.361	9.759	1.488
GP8	FA2[6]BG1	7.291		26.905	3.705	5.334	0.813
GP9	FA2[3]BG1	7.510		5.401	0.744	7.613	1.161
	M6	7.510		-	-		
GP10	A2G2	7.729		4.616	0.636	2.182	0.333
GP11	A2BG2	7.973		-	-	0.200	0.031
GP12	FA2G2	8.196		94.452	13.005	22.588	3.446
GP13	FA2BG2	8.420		9.196	1.266	3.331	0.508
GP14	FA2[6]G1S1	8.570		1.833	0.252	3.541	0.540
	A2[3]BG1S1	8.570		-	-		
GP15	FA2[6]BG1S1	8.695		18.217	2.508	6.925	1.056
	FA2[3]G1S1	8.695		-	-		

ラベル	オックスフォード表示名	GU	N-グリカン構造	IgG		ヒト血清	
				AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
GP16	FA2[3]BG1S1	9.126		3.007	0.414	7.325	1.117
GP17	A2G2S1	9.252		17.917	2.467	40.173	6.128
GP18	FA2G2S1	9.692		80.837	11.130	26.382	4.024
GP19	FA2BG2S1	10.064		29.300	4.035	15.114	2.306
GP20	A2G2S2	10.217		—	—	274.665	41.898
GP22		10.773		17.728	2.441		
GP21	M9	10.588		—	—	6.234	0.951
GP23	AA2BG2S2	10.988		4.526	0.623	7.718	1.177
GP24	FA2G2S2	11.222		27.512	3.788	23.509	3.586
GP25	FA2BG2S2	11.410		28.651	3.945	9.084	1.386
GP26	A3G3S2	11.863		—	—	11.642	1.776
GP27	A3G3S3	12.256		—	—	—	—
GP28		12.550		—	—	50.139	7.648
GP29		12.739		—	—		
GP30		13.218		—	—		
GP31	A3BG3S3	13.406		—	—	2.779	0.424
GP32	FA3G3S3	13.581		—	—	1.165	0.178
GP33	A3F1G3S3	13.760		—	—	13.765	2.100

ラベル	オックスフォード表示名	GU	N-グリカン構造	IgG		ヒト血清	
				AUC	AUC (%)	AUC	AUC (%)
GP34	A4G4S3	13.873		-	-	24.941	3.805
GP35		14.220					
GP36	A4G4S4	14.770		-	-	13.857	2.113
GP37		15.232					
GP38		15.734					
GP39	A4F1G4S4	16.315		-	-	3.631	0.554

1. InstantPC ラベル化マルトデキストリンラダー標準曲線: GU = $-0.0215 + 1.109T - 0.07722T^2 + 0.003524T^3 - 0.00007714T^4 + 0.0000006543T^5$.

2. 各 N-グリカンの相対アバンダンスは、次の式で計算しました。

$$\text{FLR AUC}(\%) = \text{FLR AUC}_{\text{glycan}} / \text{sum}(\text{FLR AUC}_{\text{glycans}}) \times 100$$

3. GU、曲線下面積 (AUC)、相対アバンダンス (AUC%) は、2 つの異なる測定値を平均することによって計算しました。

4. 表示は最も存在量の多い糖鎖ピークのみです。

結論

タンパク質のグリコシル化は翻訳後の細胞内プロセスであり、疾患の発症中に変化し、糖鎖プロファイルに変化をもたらす可能性があります。ヒト血清および免疫グロブリン G (IgG) のグライコミクスプロファイリングにより、グリコシル化の相対レベルおよびパターンに関する生物学的情報が得られ、これは最終的に疾患進行の診断バイオマーカー

として使用できます。このアプリケーションノートでは、Agilent AdvanceBio Gly-X および InstantPC キットを用いて、ヒト血清および IgG N-グライコームプロファイリング用のハイスループットグリカン前処理が実現できることが示されました。反応ステップには約 10 分かかり、革新的な蛍光色素である InstantPC は、グリコシルアミン中間生成物を瞬時に、高い蛍光シグナルでラベル化します。さらに、Agilent AdvanceBio Gly-X および

InstantPC キットは、わずか 1 μL のヒト血清から、HILIC 分離用のラベル化 N-グリカンの調製が可能です。糖鎖サンプル調製用の効率化された 96 ウェルプレートベースのフォーマットは、信頼性が高く堅牢です。最後に、開発した HILIC/FLD メソッドは、InstantPC ラベル化 N-グリカンを、ヒト血清および IgG から解像度の高いピークに分離します。

参考文献

1. Reily, C. et al. Glycosylation in Health and Disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2019**, 15, 346-366.
2. Ohtsubo, K.; Marth, J. D. Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease. *Cell* **2006**, 126, 855-67.
3. Varki, A.e. Essentials of Glycobiology.
4. Clerc, F. et al. Human Plasma Protein N-glycosylation. *Glycoconj. J.* **2016**, 33, 309-43.
5. Anderson, N. L.; Anderson, N. G. The Human Plasma Proteome: History, Character, and Diagnostic Prospects. *Mol. Cell Proteomics* **2002**, 1, 845-67.
6. Arnold, J. N. et al. The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins. *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, 25, 21-50.
7. Gudelj, I.; Lauc, G.; Pezer, M. Immunoglobulin G Glycosylation in Aging and Diseases. *Cell Immunol.* **2018**, 333, 65-79.
8. Quast, I. et al. Sialylation of IgG Fc Domain Impairs Complement-Dependent Cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* **2015**, 125, 4160-70.
9. Zhong, A. et al. Diagnostic Significance of Serum IgG Galactosylation in CA19-9-Negative Pancreatic Carcinoma Patients. *Front. Oncol.* **2019**, 9, 114.
10. Melmer, M. et al. HILIC Analysis of Fluorescence-Labeled N-Glycans from Recombinant Biopharmaceuticals. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 398, 905-14.
11. Ruhaak, L. R. et al. Glycan Labeling Strategies and Their Use in Identification and Quantification. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 397, 3457-81.
12. Xie, Y. et al. High-Throughput and High-Sensitivity N-Glycan Profiling: A Platform for Biopharmaceutical Development and Disease Biomarker Discovery. *Anal. Biochem.* **2021**, 623, 114205.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カストマーコンタクトセンタ

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。

RA44495.55345606481

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2022

Printed in Japan, January 24, 2022

5994-4349JAJP