[TECHNOLOGY BRIEF]

HILIC-UPLCと オンライン標準値データベースによる 糖鎖解析の体系的アプローチ

目 的

組換えバイオ医薬品から切り出し、HILIC-UPLC®を用いて分離した蛍光標識 *N*-グリカンの体系的な解析を可能にすること。データは標準化した保持時間を利用した頑健性の高いオンライン糖鎖データベースにより解析します。

背 景

グリコシレーションは最も複雑な翻訳後修飾であり、真核生物の全タンパク質の半分以上は糖鎖修飾を受けていると考えられています。グリコシレーションのもつ機能的意義を解明し、糖タンパク質のより完全な特性解析を行うためには、単糖の配列や結合様式、グリコシド結合のアノマーの決定が不可欠です。

バイオ医薬品のグリコシレーションはきわめて重要な製品特性であり、グリコシレーションの変化が製品の効能や安全性を大きく変化させてしまうこともあります。さらにバイオ医薬品のグリコシレーションは、発現系の選択と同様に製造段階における溶存酸素、pH、炭素源、温度等の影響を受ける可能性もあります。このような変動により製品の完全性が危険にさらされることが起こりうるため、すべての製造段階においてグリコシレーションを正確かつ迅速にモニターするということは非常に重要です。

FDA、EMA をはじめとする規制機関当局は、医薬品のグリコシレーションをより完全に解析するよう製造者に対し迫っており、製造工程で糖鎖組成が受ける影響についても明示するよう求めています。

しかし、詳細かつ定量的、高感度で体系的に糖鎖解析を行うための頑健性のあるワークフローはありません。

NIBRT GlycoBase 3.0+

保持データを標準化し
グルコースユニット（またはGU値）で表した
600以上の2-AB化*N*-結合型糖鎖構造情報を有する、
ウェブ対応の独自データベース

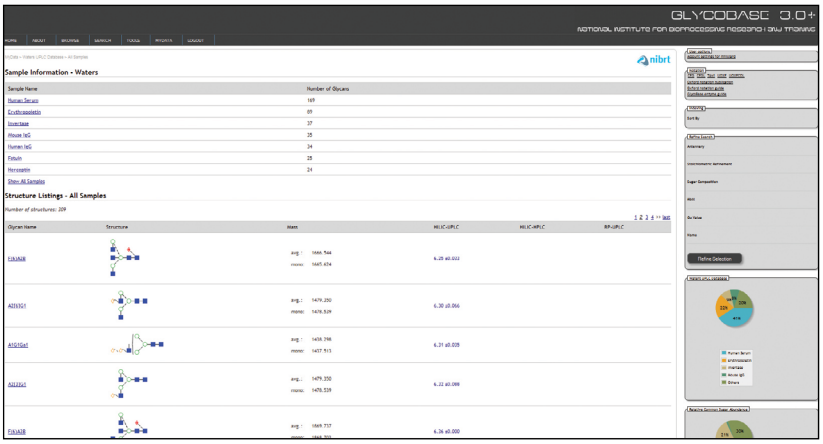

図1. GlycoBase 3+、NIBRTのUPLC N-結合型糖鎖データベースの概観

ソリューション

アイルランドの国立バイオプロセス研究研修機関 (NIBRT) はバイオ医薬品産業における研修、研究を実施、提供している世界随一の研究所です。NIBRT の使命は最新のバイオプロセス施設を複製した環境下で、研修者に独自の経験に基づく技術を提供することにあります。並行して、産業界との協力によるバイオプロセス研究の先導、受託分析サービスの提供を担います。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

ウォーターズと NIBRT は Pauline Rudd 教授のもと、NIBRT の新バイオインフォマティクスデータベース GlycoBase 3.0+ と Waters ACQUITY UPLC® システムおよび HILIC-UPLC 分離のための Glycan Separation Technology(GST) カラムによる独自の分析能力を結集し、糖鎖解析のための網羅的なソリューションを開発してきました。

GlycoBase 3.0+ は、600 以上の 2-AB 化 *N*- 結合型糖鎖構造についての標準化保持データ（グルコースユニットまたは GU 値で表示）を有するウェブ対応の独自のリソースです。これらの値は、種々のタンパク質から切り出した糖鎖をウォーターズの HPLC、UPLC テクノロジーと NIBRT の糖鎖解析プラットホームにより体系的に解析することによって得られ、そのデータベースは Empower ソフトウェアの生データとリンクします。

エキソグリコシダーゼシークエンスとマススペクトロメトリーという異なる 2 つの技術により、すべての糖鎖構造を確認し、一般的ツールとして、また様々な方法による検索（例えば解析されたバイオ医薬品の糖タンパク質それぞれについて）に利用できる高品質の糖鎖ライブラリーを構築しました。ウェブアクセス可能なデータベースに蓄積されたデータには、簡潔で直観的にわかりやすい画面を使ってアクセスできます。

検索された糖鎖は以下の項目を含め網羅的に同定されます。

- 単糖のシークエンス、立体化学、結合様式を含む構造をカラーまたは白黒の図で表示（結合様式を含む Oxford 表記、CFG 表記）
- GU 保持時間値と記述品質統計
- 各糖鎖の分子量（平均、モノアイソトピック）
- 単糖組成
- 関連する糖鎖の組成と枝分かれ構造のグラフィック表示
- 関連参考情報（生物学的背景、分類、疾患、酵素特異性）
- 生データから実験条件へのリンク

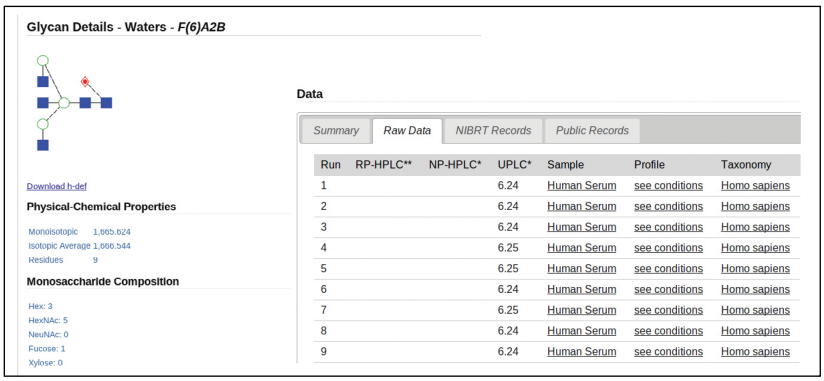

図2. 選択した糖鎖（F(6)A2B）に関する詳細な実験データおよび参考データ

図3. NIBRT分析ラボのWaters AQUITY UPLCの一群

まとめ

幅広いバイオ医薬品タンパク質から切り出した *N*- 結合型糖鎖のデータベース、GlycoBase 3.0+ は、バイオ医薬品業界に向けて、ウォーターズと NIBRT の技術を結集して開発されてきました。高い再現性をもち、高感度で標準化されたハイスループット糖鎖 HILIC 分離とオンライン糖鎖バイオインフォマティクスリソース、GlycoBase 3.0+ との融合により 3 種の相補的なデータ特性に基づく糖鎖同定が可能になります。

2-AB で蛍光標識された *N*- 結合型糖鎖のもう一つの特徴として、クロマトグラフィーデータの定量への利用が挙げられます。これに GlycoBase 3.0+ を組み合わせた解析法はバイオ医薬品業界にとって強力なツールとなります。幅広いダイナミックレンジにより糖鎖混合試料中の 1% 未満の特定の糖鎖の定量が可能です。

これらの新機能は、今日の規制環境下で要求される、より厳密なバイオ医薬品タンパク質の特性解析を容易にするものと考えております。

この開発について、ウォーターズは NIBRT の Mark Hilliard、Weston Struwe、Giorgio Carta、John O' Rourke、Niaobh McLoughlin、Pauline Rudd に感謝の意を表します。

nibrt
National Institute for Bioprocessing Research and Training
http://glycobase.nibrt.ie

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

日本ウォーターズ株式会社 www.waters.co.jp
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川1-3-12第５小池ビル TEL 03-3471-7191 FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島5-14-10 サムティ新大阪フロントビル11F TEL 06-6304-8888 FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
テクニカルセンター 東京 大阪 名古屋 福岡 札幌

Waters および ACQUITY UPLC、UPLC、ACQUITY はWaters Corporationの登録商標です。
The Science of What's Possible および HDMS はWatersCorporationの商標です。その他すべての登録商標はそれぞれの所有者に帰属します。

©2012 Waters Corporation. Printed in Japan. 2012年08月 720004203 JA PDF