

## 令和4年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
研究課題名	高機能化マイクロチップ電気泳動システムによる生体内微量糖鎖の網羅的高感度解析システムの確立	
研究者所属・氏名	研究代表者：薬学部 創薬科学科・山本佐知雄 共同研究者：	

### 1. 研究目的・内容

電気泳動用マイクロ流体デバイスでは生体成分中に微量にしか含まれない糖鎖を分離・検出するために有用であるが、実際には測定用の試料調製に一週間程度の時間を要する。本研究計画では前処理を含む一連の分析操作が特に困難な糖鎖の構造と、その機能を明らかにするために、アクリルアミドゲル層と3次元型のマイクロチップを用いて糖鎖分析に必要な前処理を含む一連の工程を流路中で行うことにより真のハイスループット分析を実現する。

### 2. 研究経過及び成果

現行の糖鎖解析では蛍光標識したフェムトモル相当の糖鎖をHPLCやキャピラリー電気泳動で一時間以内に分離・検出することが可能となっている。しかしながら、糖鎖を分離・検出するためには糖タンパク質を酵素消化し、還元的アミノ化反応を用いて蛍光標識することが必要であり、これらの工程を全て実施するためには1週間程度を要する。そこで培養細胞や抗体医薬品から糖鎖を遊離させ、その後の抽出・濃縮・分離・検出といった一連の分析操作を1枚のチップの上で30分以内に電圧印加のプログラムのみで完結することが可能なマイクロチップ電気泳動法の開発を検討した。高機能化マイクロチップを用いる糖鎖の全自動高速構造解析法の開発に向けて①開発済みのサイズ排除用マイクロチップを用いる総タンパク質抽出法および前濃縮ゲルやレクチン封入ゲルを組み合わせることでターゲットとなる糖鎖の全自動調製方法の開発と、②高感度検出のためのオンライン蛍光標識化法の開発を計画し、それぞれの実験を実施した。

まず①に関しては、この実験の核となる数種類の機能の異なるアクリルアミドゲルを1枚のマイクロチップの流路中に並列させて、それぞれの機能に応じた濃縮や抽出が可能かを調査した。マイクロチップ流路内で糖鎖の部分構造を認識するタンパク質であるレクチンを含むアクリルアミドゲルを作製し、ゲル中のレクチンの特異性に応じた濃縮が達成できるか調査した。レクチンにはハイマンノース型糖鎖を認識するCon Aを、試料にはハイマンノース型糖鎖を有するウシ臍臓リボヌクレアーゼB由来糖鎖を8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS)で標識したものをを用いた。その結果、時間経過とともに流路交差部の蛍光強度の増大が確認された。続いてマイクロチップの3つの流路交差部のうち2カ所に認識部位の異なるレクチン含有アクリルアミドゲルをピンポイントで作製した。試料にリボヌクレアーゼBを、レクチンにはCon Aとハイマンノース型糖鎖と親和性のないSSAを用い、2カ所のゲルに対してCon A→SSAとSSA→Con Aとなるように連続して試料を導入した。その結果、レクチンゲルの作製位置にかかわらずCon Aを封入したゲルのみ濃縮が確認された。

②に関してはリボヌクレアーゼBに対して予めトリプシン消化を実施して糖ペプチドを試料とし①と同様の手順でCon A含有アクリルアミドゲルを作製した。試料を3分間導入した後にFITCを導入すると、先と同様に蛍光強度が上昇した。FITCを5分間導入した後、緩衝液をゲルに続けて導入したところ、10分間緩衝液を導入し続けてもある一定の蛍光強度を維持した。続いてSSA含有アクリルアミドゲルを用いて同様の条件で実験を行ったところ緩衝液を導入して3分後にはゲルの蛍光が完全に消失した。以上の結果より、リボヌクレアーゼの糖ペプチドはCon Aアクリルアミドゲルに捕捉された後、ゲル内でFITCにより蛍光標識化が達成された可能性が示唆された。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

数種類のレクチンを封入したアクリルアミドゲルを並列させることでレクチンの種類に応じた特異的な濃縮を達成することが出来たため細胞に発現している糖鎖の解析に応用する。培養細胞から糖鎖を抽出するためには細胞に対して還元剤やベンゾナーゼなどを加えて総タンパク質を抽出した後、酵素を用いて糖鎖を調製する必要がある。この一連の操作をマイクロチップの流路中で達成するには、まず細胞を流路の一部に止めさせ、試薬をその部分に泳動させてタンパク質を抽出しなければならない。その後、抽出した総タンパク質を別の流路で濃縮し、酵素などをその部分に泳動することが必要と考えられる。そこで、細胞濃縮には細孔径が1  $\mu\text{m}$  のPC膜を、その後の総タンパク質の濃縮には分子量1万のカットオフフィルターを用いる予定である。このサイズ排除用のマイクロチップの有用性が確認された後、多分岐流路を有するマイクロチップにナイロンモノフィラメントで作製した流路と透析膜などを組み合わせ、かつ異なる機能をもつ複数のゲル層を流路上に配し、濃縮、反応、粗分画、特異的抽出の一連の過程を実現するための研究を遂行する。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Electrophoresis letters	雑誌	2023年6月(予定)
Analytical Sciences	雑誌	2023年3月14日
BUNSEKI KAGAKU	雑誌	2022年7月7日
第29回クロマトグラフィーシンポジウム	口頭	2022年6月9日
第73回日本電気泳動学会総会	口頭	2022年7月7日
日本分析化学会第71年会	口頭	2022年9月15日