

令和元年6月10日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08209

研究課題名(和文) キャピラリーアレー型アフィニティー電気泳動による糖タンパク質糖鎖の迅速分析

研究課題名(英文) Rapid analysis of glycoprotein glycans by capillary array affinity electrophoresis

研究代表者

鈴木 茂生 (Suzuki, Shigeo)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：00154542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖タンパク質糖鎖は生体内で様々な調整機能や生物学的機能発現に関与している。しかし糖鎖の種類は多く、含量の幅も広いので、その糖鎖プロファイルの微細な変化を定量的に捉える必要がある。我々はレクチンやエキソグリコシダーゼを用いた糖タンパク質糖鎖の部分導入アフィニティーキャピラリー電気泳動法を開発した。測定操作としては、通常のキャピラリー電気泳動において先ずレクチンあるいはエキソグリコシダーゼ溶液を次いで電気泳動移動度の速い糖タンパク質糖鎖蛍光性誘導体を導入し、電気泳動を行う。レクチンやエキソグリコシダーゼの種類によって構造情報が得られる上、これら酵素を逐次導入することで糖鎖の配列解析が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、糖タンパク質性医薬品が数多く上市され、既にジェネリック製剤の投入時期を迎えた。過去に糖タンパク質製剤の糖鎖を十分に管理せず、重篤な事故を起こしたこともあり、人体に危険な非ヒト型糖鎖について、量が極めて微量であっても精度よく定量できる簡便な管理方法が求められている。本法はこのような目的にもっとも適していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Oligosaccharides in glycoproteins play important roles in regulation of various biological functions. To monitor the quantitative glycosylation profiles, a highly sensitive and sophisticated method is required. We developed partial affinity capillary electrophoresis using lectins and exoglycosidases for the characterization of oligosaccharides derived from glycoproteins. A solution of a lectin or an exoglycosidase and a mixture of glycoprotein-derived oligosaccharides labeled with fluorescent tag were introduced to a neutrally coated capillary in this order, and then separated by application of a negative voltage. Application of various specificities of lectins indicated characteristic migration profiles of the oligosaccharides. Moreover, sequential injection of enzymes enabled sequencing of glycoprotein glycans.

研究分野：薬品分析学

キーワード：糖タンパク質糖鎖分析 レクチン エキソグリコシダーゼ キャピラリー電気泳動 糖タンパク質性製剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖タンパク質性医薬品の登場に伴って、分析機器試薬メーカーはこぞって糖タンパク質糖鎖分析用キットの開発をスタートした。また、糖質研究者も質量分析を中心とする、網羅的解析技術に限界を感じ、新しい分析手法としてキャピラリー電気泳動の動向に注目していた。

2. 研究の目的

現在、糖鎖解析における主力分析装置は、何といても液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)を中心とする網羅解析技術である。しかし、糖タンパク質性医薬品の開発現場や、糖鎖バイオマーカーの探索を行っている医療機関では、送液用に有機溶媒を使用し、大型で真空ポンプなど騒音の大きな装置を稼働させることに躊躇している。また、LC-MSにおける糖鎖の感度は低く、また、糖鎖の種類によって感度が変化するために、糖鎖の定量的なプロファイル取得は困難であり、常に一部の糖鎖を見逃してしまうリスクを伴う。

本研究では、有機溶媒を使用しない分離分析システムであるキャピラリー電気泳動装置を用いて、糖鎖還元末端の蛍光標識とアフィニティー分離を組み合わせることにより、糖鎖の定量的で網羅的なプロファイルを取得することを目指す。分離に加えてレクチンとの結合やエキソグリコシダーゼによる糖鎖の配列解析を可能とすることで、分離プロファイルに糖鎖構造情報を同時に取得する技術を開発することを目的とする。キャピラリー電気泳動が数分から20分程度の分析時間であるとはいえ、多くのレクチンや酵素消化データを集積するには多大の時間を要する。この点を解決するためのDNA分析で汎用されるマルチキャピラリー装置の応用を含めた一連の研究を行う。

3. 研究の方法

(1)レクチンアフィニティー電気泳動については、既に多くの実績を上げてきた(欧文誌に5報発表)が、エキソグリコシダーゼ消化に関するデータは皆無であった。そこで、先ずキャピラリー電気泳動におけるキャピラリー入口付近でのエキソグリコシダーゼ消化条件について検討を行った。

(2)上記(1)によって、糖鎖の加水分解に必要なすべてのエキソグリコシダーゼ消化条件を確立し、分解物が予想通りの泳動位置に現れることを確認した。しかし、酵素の種類によって、酵素ゾーン中で試料の移動を停止させたり、酵素ゾーンを通過する間、試料の泳動電位を落とすなど様々な工夫が必要であった。原因は、市販のキャピラリー電気泳動装置はいずれもキャピラリーの両端を温度制御出来ない仕様になっており、室温で酵素反応が進みにくいためであった。そこで、新たにCE装置を作成する必要が生じた。

4. 研究成果

(1) 上述の通り、糖タンパク質の配列解析に必要な、ノイラミニダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -N-アセチルヘキシサミニダーゼ、 α -フコシダーゼ、 β -マンノシダーゼについて、キャピラリー内で酵素反応が完結する条件を見だし、様々な糖タンパク質糖鎖の構造解析に適用できることを報告した(Yamagami et al., Journal of chromatography. A, 1496 157-162, 2017)。

(2) キャピラリー電気泳動で得られる各糖鎖ピークの泳動位置は、分子サイズ/電荷比で決まる。レクチンは現在、40種類が市販されているが、その内の10種類ほどを用いて、糖鎖の構造情報を取得したところ、糖鎖構造既知の糖タンパク質糖鎖混合物について、予想通りの結合特性が得られた。また、エキソグリコシダーゼ消化によって、末端の糖残基が完全に加水分解されることを証明した。本実験の成果は昨年度のキャピラリー電気泳動シンポジウム学会で報告した。

(3) 上記(1)(2)の結果に基づいて、以下の新たな研究テーマが生まれ、既に研究に着手している。

- 1) 分離キャピラリーの全長をそれぞれ任意の温度で加温できる新たなキャピラリーホルダーの作成
- 2) 新規蛍光検出ユニットの作成
- 3) 高分離能マイクロチップを使った、多チャンネル分析システムの開発
- 4) 糖鎖の自動分析用標識システムの開発
- 5) 糖タンパク質糖鎖遊離、標識オンラインシステムの創成

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13件)

Yamamoto S, Kinoshita M, Ikegami T, Suzuki S: High-performance liquid chromatographic separation of 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid labeled N-glycans using a functional tetrazole hydrophilic interaction liquid

chromatography column. Journal of chromatography. A, 査読有、Vol. 1566、2018年、44-50.

Yamamoto S, Okada F, Kinoshita M, Suzuki S : On-line microchip electrophoresis-mediated preconcentration of cationic compounds utilizing cationic polyacrylamide gels fabricated by in situ photopolymerization. The Analyst, 査読有, Vol. 143(18), 2018年, 4429-4435.

Yamamoto S, Nishida N, Kinoshita M, Suzuki S: On-line derivatization and concentration of aspartic acid using *in situ* photopolymerized carboxylic acid type polyacrylamide gels as a permselective preconcentrator. Chromatography, 査読有, Vol. 39, 2018年, 125-130.

Nagatomo Y, Hashimoto S, Kishimoto Y, Hayakawa T, Yamamoto S, Kinoshita M, Suzuki S : Online cleanup liquid chromatography for the analysis of glycoprotein-derived oligosaccharides labeled with 7-amino-4-methylcoumarin. Chromatography 査読有, Vol. 38, 2017年, 23-30.

Yamagami M, Matsui Y, Hayakawa T, Yamamoto S, Kinoshita M, Suzuki S : Plug-plug kinetic capillary electrophoresis for in-capillary exoglycosidase digestion as a profiling tool for the analysis of glycoprotein glycans. Journal of chromatography. A, 査読有, Vol. 1496, 2017年, 157-162.

Takeda Y, Hayashi Y, Utamura N, Takamoto C, Kinoshita M, Yamamoto S, Hayakawa T, Suzuki S : Capillary electrochromatography using monoamine- and triamine-bonded silica nanoparticles as pseudostationary phases. Journal of chromatography. A, 査読有, Vol. 1427, 2016年, 170-176.

他

〔学会発表〕(計 51件)

中住智典, 山本佐知雄, 木下充弘, 鈴木茂生 : 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid 標識化ガン細胞由来糖鎖の新規構造解析法の開発
第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム 2018年12月5日

木下充弘, 山本万莉, 山本佐知雄, 鈴木茂生 : 全自動マイクロチップ電気泳動装置を用いる次世代糖鎖プロファイリング法の開発
第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム 2018年12月5日

山本佐知雄, 中住智典, 宮脇直久, 須田暁, 木下充弘, 鈴木茂生 : 部分導入アフィニティーキャピラリー電気泳動、HPLC、MS を組み合わせた 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid 標識化ガン細胞由来糖鎖の網羅的解析
第29回クロマトグラフィー科学会議 2018年11月9日

川崎拓也, 山本佐知雄, 鈴木茂生, 木下充弘 : 抗体医薬の定常領域配列に着目した迅速糖鎖プロファイリング
第68回日本薬学会近畿支部総会・大会 2018年10月13日

中住智典, 山本佐知雄, 木下充弘, 鈴木茂生 : 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid 標識化ガン細胞由来糖鎖の構造解析

第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2018 年 10 月 13 日

鈴木茂生, 岸本有加, 岡田風花, 山本佐知雄, 木下充弘: HILIC 系および逆相クロマトグラフィに共通して利用できるオンライン精製糖鎖分析システムの開発日本分析化学会第 67 年会 2018 年 9 月 13 日

山本佐知雄, 矢野祥子, 増田誠子, 姫野美幸, 木下充弘, 鈴木茂生: Phos-tag 結合型光硬化性アクリルアミドによるリン酸化化合物のオンライン特異的濃縮とマイクロチップ電気泳動分離日本分析化学会第 67 年会 2018 年 9 月 13 日

Sachio Yamamoto, Haruka Fujiwara, Katsushi Maruyama, Mitsuhiro Kinoshita, Shigeo Suzuki: Simultaneous Determination of Anions and Cations in Water and Biological Samples by Capillary Electrophoresis with a Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detector Using Capillary Filling Method
25th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques 2018 年 9 月 1 日

山本佐知雄, 矢野祥子, 岡田風花, 木下充弘, 鈴木茂生: 光重合生高機能化ポリアクリルアミドゲル層を用いるオンライン特異的濃縮マイクロチップ電気泳動法の開発
第 31 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム 2018 年 8 月 28 日

Shigeo Suzuki: Application of Partial Filling Affinity Capillary Electrophoresis Using Lectins and Exoglycosidases for the Characterization of Glycoprotein-derived Oligosaccharides 2018 Sino-Japanese Joint Symposium on Separation Sciences 2018 年 7 月 12 日

鈴木茂生, 神村和希, 安井瑞紀, 井上裕也, 藤井孝泰, 山本佐知雄, 木下充弘: 糖タンパク質糖鎖の二官能性蛍光色素標識法の開発と糖鎖-レクチン相互作用解析への応用
日本分析化学会第 78 回分析化学討論会 2018 年 5 月 27 日

山本佐知雄, 岡田風花, 木下充弘, 鈴木茂生: 4 級アンモニウム化光重合性アクリルアミドゲルを用いる陽イオン性試料のオンライン濃縮マイクロチップ電気泳動法の開発
日本分析化学会第 78 回分析化学討論会 2018 年 5 月 27 日

矢野祥子, 山本佐知雄, 木下充弘, 鈴木茂生: PDMS/ガラス-ハイブリッドマイクロチップと強酸性アクリルアミドゲルを用いるオンライン試料濃縮法の開発
日本分析化学会第 78 回分析化学討論会 2018 年 5 月 26 日

山本佐知雄, 植田麻希, 葛西優貴, 木下充弘, 鈴木茂生: 酵素固定化アクリルアミドゲルチップを用いる糖タンパク質糖鎖調製法の開発
バイオメディカル分析科学シンポジウム講演要旨集 2017 年 8 月 28 日

木下充弘, 御子柴柚子, 山本万莉, 松本和樹, 山本佐知雄, 鈴木茂生: バイオ医薬品の PAT 指向型分析プラットフォーム構築
バイオメディカル分析科学シンポジウム講演要旨集 2017 年 8 月 28 日

姫野美幸, 山本佐知雄, 木下充弘, 鈴木茂生: 光硬化性アクリルアミドゲルを用いるリン酸化ペプチドのオンライン濃縮マイクロチップ電気泳動法の開発
バイオメディカル分析科学シンポジウム講演要旨集 2017 年 8 月 28 日

山本万莉, 松本和樹, 山本佐知雄, 木下充弘, 鈴木茂生: マイクロチップアフィニティ電気泳動による複合糖質糖鎖の迅速解析
バイオメディカル分析科学シンポジウム講演要旨集 2017 年 8 月 28 日

鈴木茂生, 山上眞, 松井友理恵, 木下充弘, 山本佐知雄: 部分導入キャピラリー電気泳動による糖タンパク質糖鎖の in-capillary エキソグリコシダーゼ消化
バイオメディカル分析科学シンポジウム講演要旨集 2017 年 8 月 28 日

Sachio Yamamoto, Miyuki Himeno, Masaya Kobayashi, Mitsuhiro Kinoshita, Shigeo Suzuki: In situ photopolymerization of polyacrylamide gel for specific entrapment and analysis of a phosphate compounds using microchip electrophoresis
12th International Conference of Protein Phosphatase 2016 年 10 月 27 日

木下充弘, 山本佐知雄, 鈴木茂生: バイオ医薬品開発における糖鎖解析技術
バイオメディカル分析科学シンポジウム 2016年9月2日

- ⑳ 山本佐知雄, 植田麻希, 中村朋子, 木下充弘, 鈴木茂生: 酵素固定化アクリルアミドゲルチップを用いる糖タンパク質糖鎖調製法の開発
分析化学討論会 2016年8月31日
- ㉑ 鈴木茂生, 山下眞, 松井友理恵, 木下充弘, 山本佐知雄: エキソグリコシダーゼ部分導入キャピラリー電気泳動による糖タンパク質糖鎖分析
第23回クロマトグラフィーシンポジウム 2016年6月15日

他 29件

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。