

薬学研究科・薬品分析学研究室

1. 研究課題名

「天然由来糖鎖化合物の構造解析および生体機能性分子の網羅的定量分析法の確立」

2. 研究メンバー

鈴木 茂生 近畿大学薬学研究科薬品分析学研究室・教授
久保 兼信 近畿大学薬学研究科薬品分析学研究室・准教授
多賀 淳 近畿大学薬学研究科薬品分析学研究室・講師

3. 研究成果

LC-MS (液体クロマトグラフィー-質量分析法) や CE-MS (キャピラリー電気泳動-質量分析法) が生物試料の網羅的解析に利用されている。しかし対象が糖質となるとその感度が問題となる。糖鎖は数百から数千という分子量を持つが、中性分子であることから多価イオンに成り難く、また多くの水酸基をもつために親水性が高い。これらの性質から MS における高感度検出は極めて難しい。この問題を解決するには、糖鎖を高感度化できる標識化や糖質を特異的に捕捉したり、その有無を簡潔にスクリーニングする方法の開発が必要となる。また、今後の分析のハイスループット化を考えるとマイクロチップ技術は欠かせない。これらの技術に関して様々な検討を行ってきた。

3-1. LC-MS における高感度化を目指した糖鎖標識法の開発[1]

LC-MS において糖鎖を網羅的に解析する上で、糖鎖の還元末端を蛍光性試薬で標識する方法は、感度向上のみならず、蛍光検出と MS データ組み合わせることができることから、非常に有用である。我々は糖鎖の蛍光標識法の研究を長年にわたって実施し、1-phenyl-3-methylpyrazolone, ethyl aminobenzoate 類, aminobenzonitrile 類, aminobenzamide 類, aminobenzoic acid 類, 2-aminopyridine, aminonaphthol 類を用いて糖を標識化し、その物性を調査した。その中でも蛍光ならびに ESI-MS における感度や蛍光検出選択性から 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) が、この目的にもっとも適していると判断し、この誘導体化法の最適化と様々な糖鎖に適用した際の感度について検証した。糖鎖はこの試薬と適切な還元剤の存在下、Fig. 1 に示す通り、aminoalditol 誘導体へと変換される。

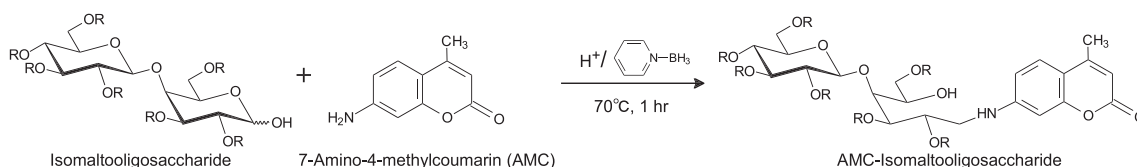


Fig. 1. Reductive amination reaction for labeling rsaccharides with 7-amino-4-methylcoumarin (AMC).

このような反応は還元的アミノ化反応と呼ばれ、酸性条件で還元剤に NaBH_3CN を用いる。既に糖鎖の標識に繁用されている。我々もこの条件に倣って、糖類の標識化に適用したところ、

糖の種類によって反応効率が異なることを見出した。反応温度や pH を検討しても改善されなかったが、様々な還元剤を用いて反応効率を検討したところ(Fig. 2)、pyridine-borane を用いることでほぼ定量的に反応が進行した。

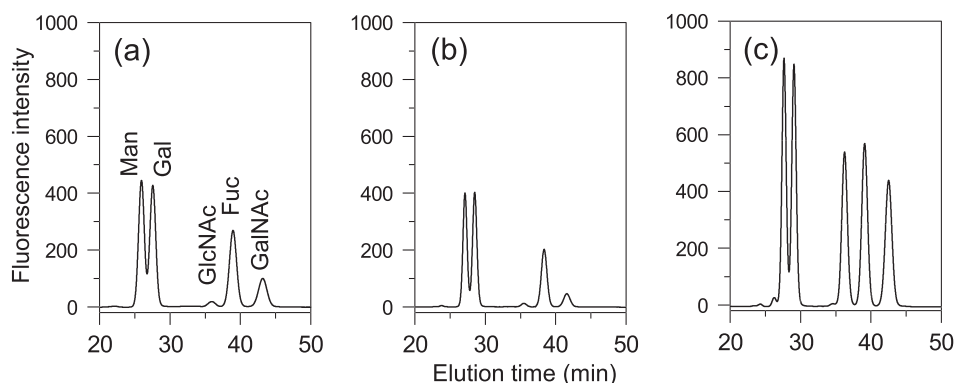


Fig. 2. Optimization for derivatization of monosaccharides constituting the glycans with AMC. Effects of the type of reducing agents: (a) sodium cyanoborohydride, (b) dimethylamine-borane, (c) pyridine-borane. Analytical conditions: column, Inertsil ODS-3 (150×6 mm I.D.); flow rate, 1.0 ml/min; eluent, 12:88 (v/v) mixture of CH₃CN-100 mM AcOH (pH 4.0 with triethylamine); fluorometric detection, 348 (ex) nm/445 (em) nm; injection amount, 1 pmol.

最適化された反応条件は以下の通り：糖試料に 60 mM AMC-THF 溶液 20 μ L および 200 mM pyridine-borane 酢酸溶液 20 μ L を加え 70°C, 1 時間加熱する。過剰試薬は SCX 固相抽出剤により除去する。本条件で Fig. 2 に示す各単糖について、検量線を作成した。結果を Fig. 3 に示すが、蛍光検出 HPLC で分析した結果、0.2 fmol から 1 pmol の範囲で良好な直線性が得られ、50 fmol における再現性は 2~5% であった。現在広く用いられている 2-aminopyridine 標識糖の検出下限が 0.1 pmol と報告されているので、本法は 50 万倍感度が高い。

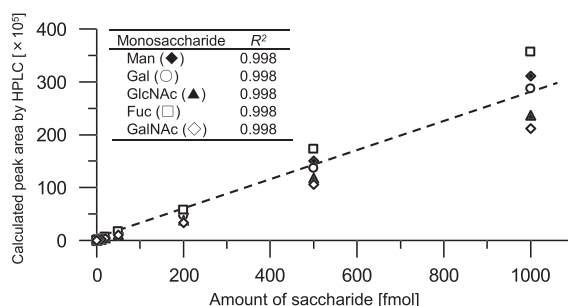


Fig. 3. Accuracy of quantification of various monosaccharides derivatized with AMC and analyzed using HPLC.

次に様々な糖タンパク質糖鎖の AMC 標識化を行い、得られた誘導体の蛍光検出 HPLC ならびに ESI-MS 分析に適用した。得られた結果の一部を以下に示す。Fig. 4 は一連の高マンノース型糖鎖とハイブリッド型糖鎖を有するオバルブミンに適用した例である。AMC は非常に得意な分離パターンを与えたが、ESI-MS の結果より、高マンノース型糖鎖とハイブリッド型糖鎖がサイズの大きなものから順に溶出されるが、高マンノース型糖鎖はハイブリッド型糖鎖より早く溶出された。トランスフェリンについても同様に検出した。ESI-MS ではフコースの結合位置が不明であるが、三本鎖糖鎖やフコース付きの二本鎖糖鎖、反応の過程で生成したシアル酸の脱離したマイナーなオリゴ糖まで観察された。検出感度を他の誘導体と比較したところ、6~20

倍高いことがわかった。また、LC-MSにおいて移動相に TFA を添加することで、それぞれのオリゴ糖は付加イオンとして観察され、感度がさらに 20 倍程、高くなった。したがって AMC は他のオリゴ糖の数百倍、高感度であることが判明した。

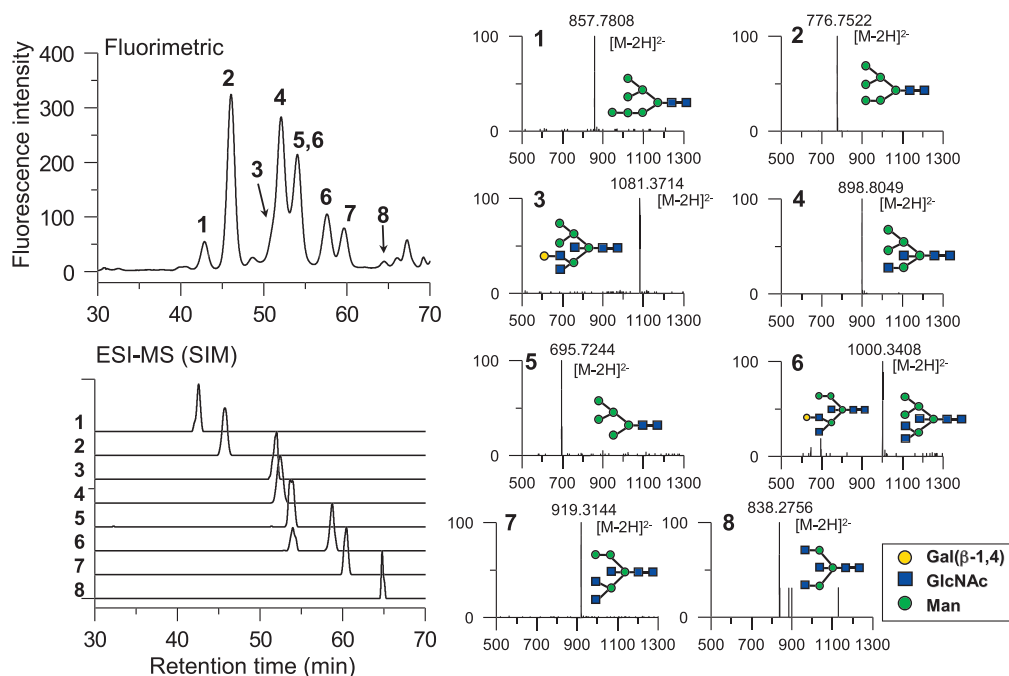


Fig. 4. RP-LC/ESI-MS analyses of AMC-labeled glycans obtained from ovalbumin. Analytical conditions: column, HiQsil C18-3 (15 cm × 2.1 mm i.d.); flow rate, 0.15 ml/min; eluent, water – acetonitrile with gradient program.

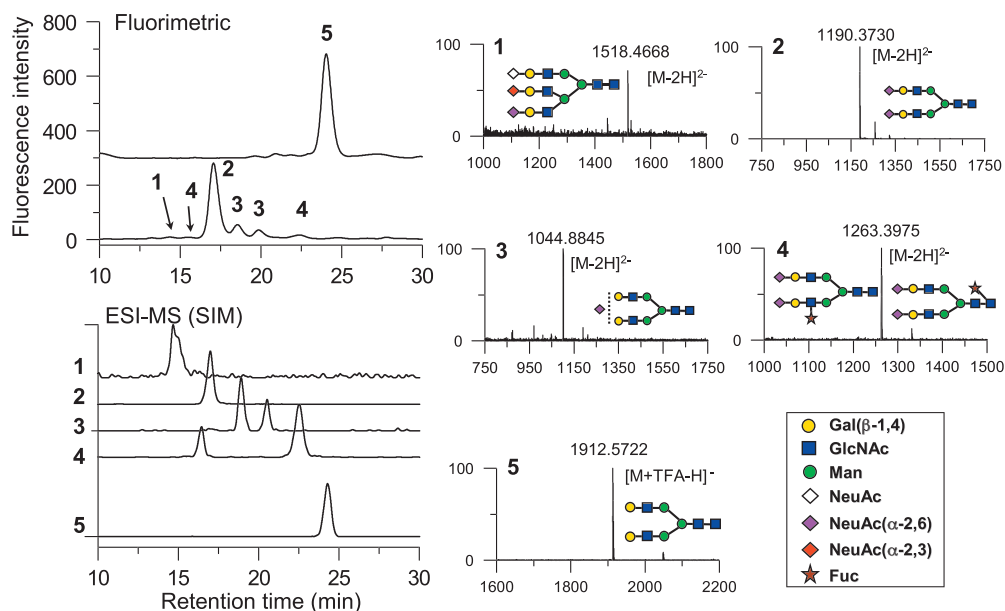


Fig. 5. RP-LC/ESI-MS analyses of AMC-labeled glycans obtained from human transferrin. Analytical conditions were as the same as those in Fig. 4.

以上述べたように AMC 誘導体は蛍光検出 HPLC ならびに LC/ESI-MS において非常に有望な試薬であった。今後は、AMC 標識化を CE 分析などにも適用することを検討する予定である。また、1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone 誘導体は蛍光検出には向かないものの、ESI-MS において非常に高感度を与えた。しかし、誘導体化の過程で多量の円が共存するために、ESI-MS に直接適用することは困難であった。現在は PMP 化糖の脱塩操作についてもほぼ完成しており、次年度以降に ESI-MS への応用を検討している。

3-2. シアル酸の高感度蛍光分析 [2]

シアル酸は mannosamine とピルビン酸が aldol 縮合して生合成されるノイラミン酸の誘導体の総称であり、カルボン酸を 1 位にもつことと 7 位から 9 位に自由度の高い水酸基を有する(Fig. 6)。多くの糖タンパク質や糖脂質の非還元末端に存在し、細胞間認識の重要な認識分子として知られる。糖鎖を網羅的に解析するには、前述のような LC-MS に代表されるように、糖鎖の数、量、構造情報を得るための技術が重要であるが、糖鎖の量的、質的な変化をとらえるスクリーニング法の開発も重要である。シアル酸の比色定量法としては Warren 法が有名であるが、その適用が遊離シアル酸に限定されるので、予め加水分解が必要となる。すべてのシアル酸を遊離させるために酸加水分解を行うが、シアル酸は非常に分解しやすいので、正確な定量が困難とされてきた。

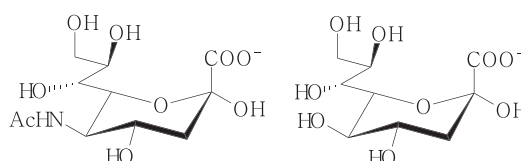


Fig. 6. Two most common sialic acid derivatives; N- acetyl-neuraminic acid (left) and 2-keto-3-deoxy- nonic acid (right)

そこで新たなシアル酸の蛍光定量法の開発を試みた。シアル酸の特徴は 7 位から 9 位に自由度の高い水酸基をもつ事である。そこで、低温で過ヨウ素酸酸化を行い、特異的に生成するホルムアルデヒドを acetacetanilide と反応させるいわゆる Hantzsch 反応を行うというものがある。ここで用いた acetacetanilide はそれ自身が蛍光性を持たないのに対して、得られた誘導体は強い蛍光性を示すので、高感度分析が可能となる。

本反応の概要を Fig. 7 に示す。過ヨウ素酸酸化条件、過剰の過ヨウ素酸を分解する条件、ならびに acetacetanilide とホルムアルデヒドの反応条件を個別に最

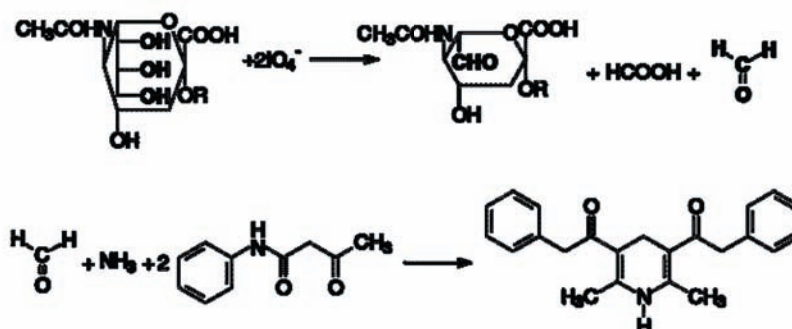


Fig. 7. Periodate oxidation of sialic acid and reaction of formaldehyde with acetacetanilide.

適化した。

確立反応条件は次の通り。①糖試料(10~200 μg , 200 μL)に 10 mM 過ヨウ素酸ナトリウム 20 μL を加え、氷浴上で 45 分放置する。②50 mM チオ硫酸ナトリウム 100 μL を加えて混和する。③4 M 酢酸アンモニウム(pH 7.5)500 μL および 100 mM acetacetanilide エタノール溶液 400 μL を加えて室温で 10 分間放置する。得られた溶液は通常の蛍光光度計を用いて、励起波長 388 nm、蛍光波長 471 nm でその蛍光強度を測定した。

糖タンパク質の標品としてはシアル酸をもたない ovalbumin と ribonuclease B、シアル酸を含有する糖タンパク質として α_1 -酸性糖タンパク質、transferrin、fetuin を用いた。Fig. 8 に各糖タンパク質を本法に従って、蛍光分析した際の、蛍光スペクトルを示す。シアル酸を含まない ovalbumin は全く蛍光を示さない一方で、シアル酸含有糖タンパク質 (α_1 -酸性糖タンパク質、transferrin、fetuin) はいずれもそのシアル酸含量に応じた蛍光を示した。

本反応の選択性を調べる目的で妨害物に関する調査を行ったところ、直鎖の糖アルコールであるソルビトールやグリセリンなどが、本反応によって陽性を示す他は、大きな妨害はなかった。Table 1 に各糖タンパク質のシアル酸含量を算出し、Warren 法との相関を調査した結果を示す。極めて相関が高いことが判明

した。検量線は fetuin を用いた場合、少なくとも 2~180 μg の範囲で直線性を示した。また、N-acetyl neuraminic acid を用いた時は 0.3~27 nmol の範囲で直線性が得られ、検出下限 (LOD)は $2 \times 10^{-8} \text{M}$ (4 pmol)であった。また、日差変動は相対標準偏差として 3.65% ($n=5$, 3 日間)と許容範囲内であった。

今回の研究では、装置の関係上 1 cm 角の石英セルを使つての研究結果である。また、本

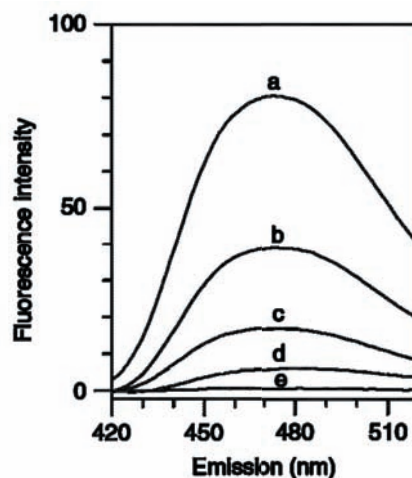


Fig. 8. Fluorescence spectra of sialic acid determination in 20 lg of selected glycoproteins obtained using the proposed method with irradiation of 388 nm light: (a) α_1 -acid glycoprotein; (b) fetuin; (c) N-acetylneuraminic acid (3 nmol); (d) transferrin; (e) ovalbumin.

Table 1. Determination of sialic acid contents of various glycoproteins using acetacetanilide and standard thiobarbituric acid method ($n=3$)

Glycoprotein	Acetoacetanilide method (mg/g)	Thiobarbituric acid method (mg/g) ^a
α_1 -Acid glycoprotein, human	93.7	105.5
Fetuin, bovine	59.3	54.2
Fibrinogen, human	6.3	4.3
Mucin, porcine stomach	18.2	0 ^b
Thyroglobulin, porcine	11.7	10.2
Transferrin, human	16.6	16.5
Ovalbumin	0	0
Ribonuclease B	0	0

^a N-Acetylneuraminic acid as a standard specimen was treated with 50 mM sulfuric acid, as were the glycoprotein specimens.

^b This sample turns yellow, perhaps because of unknown interference impregnated in the commercial specimen.

誘導体化法の大きな利点は反応の過程で加熱操作を伴わないことである。従って、近年普及しつつあるタイタープレートリーダーを使えば、さらなる高感度化と操作性の向上が期待される。

3-3. 光硬化ゲルを使う高濃縮マイクロチップ電気泳動分析法の開発 [3]

近年、医薬・工学分野の技術の連携が実現された結果、分析装置を極限まで小さくする、いわゆる **micro total analysis system (μ TAS)** が盛んに研究されている。予想では今後 10 年で普及が始まり、将来は在宅医療など **point of care** の臨床診断の道具として、身近で利用されると言われている。ところで、この技術では、工学の微細加工技術に分離分析技術を融合させるものであり、中でも電気泳動は物質の分離や移送にとって重要な技術である。この技術で利用されるマイクロチップの一例を Fig. 9 に示す。

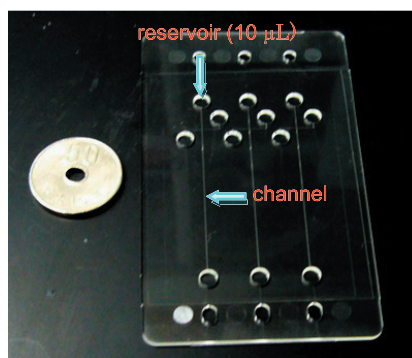


Fig. 9. Microchip used in this study.

十字型の流路の終端に 4 つの **reservoir** をもうけた簡単な構造であるが、流路の内径は幅が 100 μm 、深さ 30 μm であり、内壁の均一性を高めるために、LIGA など様々な加工技術が用いられている。我々の研究室では以前より、このマイクロチップ電気泳動の研究を行ってきたが、通常行われる切り替え式の試料導入法では、試料槽に導入した試料の 1/100 000 から 1/1 000 000 しか分析できない。そこで、試料槽に投入した試料を、十字型流路の近傍に濃縮させる方法を検討した。

種々検討した結果、濃縮法としてはスルホン酸基をもつアクリルアミドにリボフラビンを光重合触媒として加える方法を採用することにした。本反応の概要を Fig. 10 に示す。マイクロチップ電気泳動では高感度検出を目的としてレーザー光源を使った蛍光検出を行うことが多い。我々の装置は Ar レーザーを光源としており、**riboflavin** の励起極大と等しい。したがって、本来は検出用として装着されて

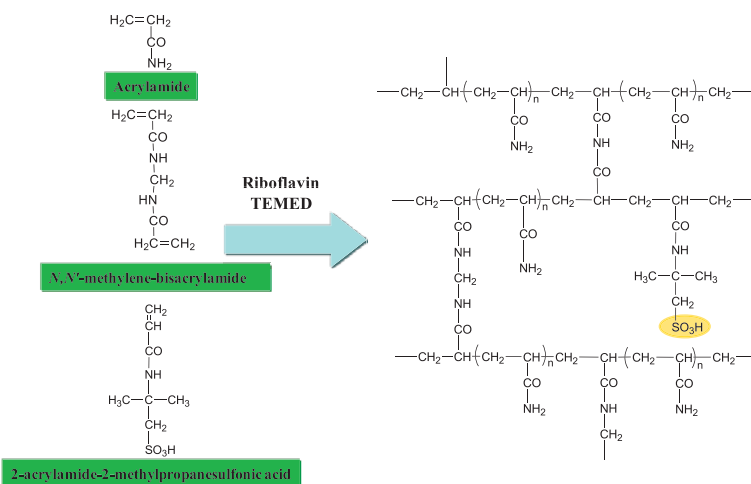


Fig. 10. Synthesis and estimated structure of acidic poly acrylamide gel used in this work

いるアルゴンレーザーを照射することで任意の場所に μm 幅で作成することができる。ゲル化条件を検討した結果、およそ 1 分間でゲル化できた。ここで作成したゲルは、スルホン酸基をもつ。従って、このゲルを跨ぐようにして電圧を印加して、酸性の試料を泳動させると、スルホン

酸と試料の酸性基の間で電荷の反発が起こる。この方法を使って酸性の試料の濃縮を検討した。ゲルは十字路付近の試料出口側に 200 μm の幅で作成した。操作の概要を Fig. 11 に示す。

流路全体をゲル溶液で満たした後、試料出口にアルゴンレーザーを照射してゲルを作成した後、流路全体のゲル溶液を泳動液で置換し、後は通常通り試料を導入する。

この方法で実際に fluorescein を導入したところ、試料成分がすべてゲル手前に濃縮された。そこで、次に糖の誘導体を調製し、本法による濃縮と分離を検討した。

今回使用した糖の標識化方法を Fig. 12 に示す。8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid (APTS) は3つのスルホン酸基を持つ。また、APTS 自体の蛍光の励起波長は 430 nm 付近にあるが、誘導体のそれは 463 nm まで長波長シフト

するので、Ar レーザーの発振周波数 488 nm で検出する上で都合がよい。この誘導体を用いて濃縮と分離を行った。得られた結果を Fig. 13 に示す。濃縮効率が高いために、対象として用いた試料については、1000 倍でも明確なピークが観察されない(Fig. 13a)のに対して、濃縮を行うと明確にオリゴ糖誘導体特有のピークパターンが得られた(Fig. 13b)。実際に濃縮効率を算出すると 10 万倍を超えており、試料槽に導入した試料のほぼすべてがゲルの手前に濃縮されたことになる。今現在はこのゲル作成技術の自動化と分離モードや捕捉法としての応用を検討している。

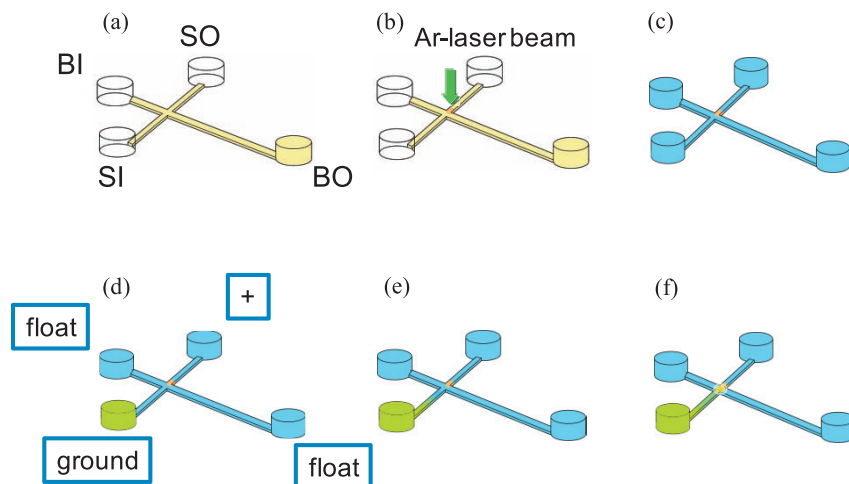


Fig. 11. Procedure for the photopolymerization of anionic acrylamide gel and permselective concentration. Introduction of photopolymerizable acrylamide solution to all channels of a microchip (a). Irradiation of argon laser to SO channel near channel cross (b). Washing and changing channels with buffer (c). Pouring the sample solution to the sample inlet and apply voltage on SO (d). The sample solution are concentrated by the repulsion of the electric charge (e). The concentration is completed within several minutes (f).

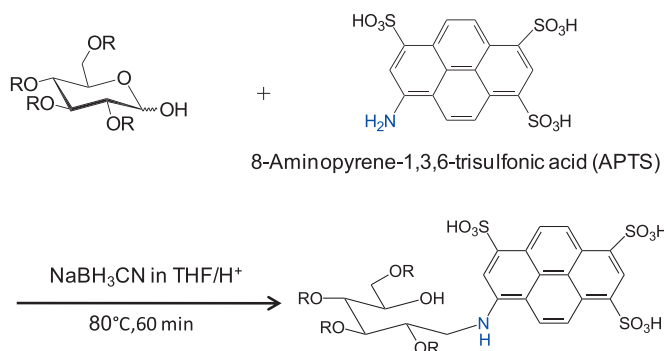


Fig. 12. Derivatization of the saccharides with 8-aminopyrene-1,3,6-trisulfonate

今まではチップの流路壁の均一性を確保するために、多大な労力が注がれていたが、今回、新たにゲル作成技術が完成したことで、精度の劣るチップを用いてもゲルを使って試料の分離における拡散を抑えることが可能となるなど、濃縮以外にも利用できることがわかった。

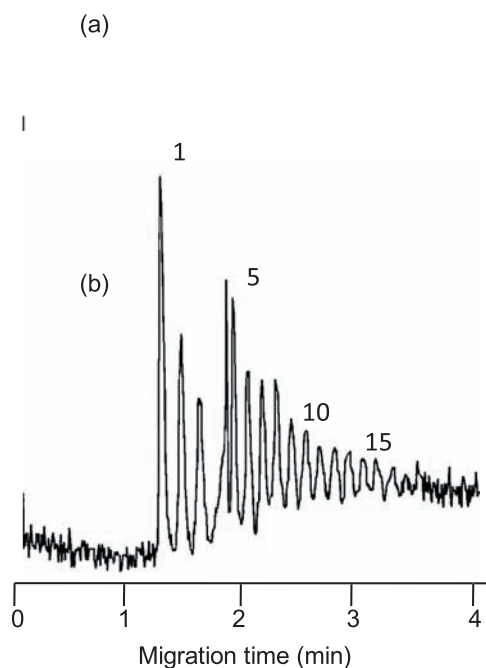


Fig. 13. Preconcentration and electrophoretic separation of APTS-labeled isomaltooligosaccharides under the optimized conditions (b) and its reference(a). SI was filled with sample solution (ca. 10⁻⁶ M as total) and the other three reservoirs, BI, SO, BO were filled with buffer. Preconcentration was accelerated rapidly toward the SO and stacked at the cross channel by applying voltage sets, 0 V, 50 V, 250 V, and 0 V for ca. 3 min, respectively, on SI, BI, SO and BO. Subsequently, all potentials were stopped for 1 sec to inject concentrated sample components to the analysis channel. Then, the voltage sets 0 V, 0 V, 250 V and 0 V were applied for 10 s on SI, BI, SO and BO respectively, to remove concentrated sample components from the cross channel to the sample inlet. Thereafter, potentials of 0 V and 1 kV were applied for 2 min on SO and BO, respectively, for separation of sample components. The upper trace of the electropherogram presents the reference date.

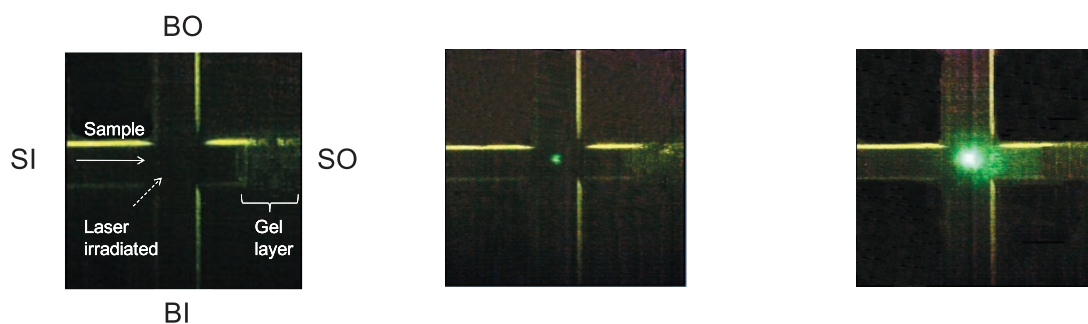


Fig. 14. Time-sequence images of APTS concentration at the channel cross in the PMMA microchannels with in situ fabricated anionic polyacrylamide preconcentrator. All channels were filled with 10 mM acetate of pH 4.2; SI is filled with 0.1 mM APTS and applied 50 V to the SO channel reservoir. Images were taken respectively after 85, 90 and 125 sec.

引用文献

- 1) Yodoshi M., Tani A., Ohta Y., Suzuki S.: *J. Chromatogr. A*, **1203**, 137-145 (2008).
- 2) Matsuno, K., Suzuki S.: *Anal. Biochem.*, **375**, 53-59, (2008).
- 3) Yamamoto S., Hirakawa S., Suzuki S.: *Anal. Chem.* **80**, 8224-30 (2008).