

所属	薬学部創薬科学科 薬品分析学研究室	氏名	鈴木茂生
----	-------------------	----	------

課題名	糖タンパク質由来糖鎖の網羅的解析法の開発		
研究分担者	氏名	所属	職位
	木下充弘	薬学部創薬科学科 薬品分析学研究室	准教授
	山本佐知雄	薬学部創薬科学科 薬品分析学研究室	講師

研究概要

生体内のタンパク質の多くは糖鎖と結合しており、病変や疾病の進行に伴ってその糖鎖構造が大きく変化することが知られる。特に糖鎖構造と重篤な疾患との関連性が着目されているが、未だルーチンとなるような分析方法や分析装置は存在しない。糖鎖の数は膨大であり、その含量にも幅があることから、網羅的な糖鎖解析では、定量性も配慮する必要がある。高感度化が進む質量分析(MS)は糖鎖解析にもよく用いられるが、検出感度が糖鎖の物性に依存するので、糖鎖の量的な変化を MS スペクトルから読み取ることは難しい。そこで、糖鎖解析を定量性、簡便性、網羅性に基づいて、様々な解析法を開発している。特に、定量性を得るために、糖鎖の還元末端を高感度蛍光色素で標識し、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ電気泳動などを駆使し、網羅的な解析を試みている。

研究成果

- 1) 糖鎖を蛍光検出液体クロマトグラフィーで分析するには、糖タンパク質からの糖鎖の回収、蛍光標識、過剰試薬の除去などの操作が必要となる。特に精製過程では、糖鎖誘導体の完全な回収が難しい誘導體化が知られる。そこで、糖鎖蛍光標識法の中でも試薬の除去が難しいとされる 2-aminopyridine 標識を取り上げ、オンライン精製法を検討した。その結果、高架橋度陽イオン交換と逆相系ミニカラムを六方切替バルブを通常の HPLC に組み込むことでオンライン精製を可能とした。本法は順相、逆相など、分離カラムの種類や移動相に依存せず応用できる。実際に様々な糖鎖の HILIC および逆相分離に適用して良好な結果を得た。
- 2) 生体内における糖鎖の生合成は、様々な代謝環境の変化を反映するため、加齢や疾患に伴う代謝変動のポートフォリオと表現される。ラット血清糖タンパク質糖鎖の加齢に伴う変化を解析した結果、糖鎖非還元末端に位置するシアル酸の 9 位におけるアセチル化が加齢に伴い上昇することを見出した。また、この加齢に伴うシアル酸のアセチル化は、カロリー制限により増強され、高脂肪食摂取により抑制されることを明らかにした。シアル酸のアセチル化が、インフルエンザウィルスのシアル酸受容体に対する結合を阻害すること、シアル酸のアセチル基除去が、加齢ラットにおける脳内アミロイド凝集体の除去機構に対し負の作用を示すことが報告されており、シアル酸のアセチル化が、動物の加齢に伴い獲得すべき物理的な生体防御機構の一端を担っているのかもしれない。
- 3) マイクロチップ電気泳動は、試料の消費量が少なく流路の設計が自由に行えるなどの利点を有しており生体成分の分析や臨床診断に応用されようとしている。この利便性を高めるため 2 種類の鋳型より作製したマイクロチップを上下に張り合わせ、2 つの流路の間に透析膜を配置したサイズ排除型 3 次元マイクロチップを用いてタンパク質の特異的オンライン濃縮と、2 種類のタンパク質を導入することによるオンラインでの酵素消化を試みた。作製した透析膜内蔵型マイクロチップを用いればタンパク質を分子量に応じて選択的に濃縮することが可能となり、先に酵素を膜上に濃縮すればタンパク質の酵素消化が達成することが可能であった。

研究発表

総説

- 1) 鈴木茂生：レクチンとエキソグリコシダーゼを用いる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。 *電気泳動* 64(1) 27-30, (2020).
- 2) Yamamoto S: *In situ* Photopolymerization of Functionalized Polyacrylamide-Based Preconcentrators for Highly Sensitive Specific Detection of Various Analytes by Microchip Electrophoresis. *Chromatography*, 42, 29-36 (2021).

原著論文

- 1) Kishimoto Y, Okada F, Maesako T, Yamamoto S, Kinoshita M, Hayakawa T, Suzuki S : Analysis of 2-aminopyridine labeled glycans by dual-mode online solid phase extraction for hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1625**, 461194 (2020).
- 2) Morikawa Y, Nishiwaki K, Suzuki S, Yasaka N, Okada Y, Nakanishi I : A new chemosensor for cyanide in blood based on the Pd complex of 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino]phenol. *Analyst*, **145**, 7759-7764 (2020).
- 3) Kinoshita M, Yamamoto S, Suzuki S: Age-Related Changes in O-Acetylation of Sialic Acids Bound to N-Glycans of Male Rat Serum Glycoproteins and Influence of Dietary Intake on Their Changes. *ACS Omega* **5(30)**, 18608-18618 (2020)
- 4) Kinoshita M, Saito A, Yamamoto S, Suzuki S: A practical method for preparing fluorescent-labeled glycans with a 9-fluorenylmethyl derivative to simplify a fluorimetric HPLC-based analysis. *J Pharm Biomed Anal.* **186**, 113267 (2020)
- 5) Yamamoto S, Ueda M, Kasai M, Ueda Y, Kinoshita M, Suzuki S: A fast and convenient solid phase preparation method for releasing N-glycans from glycoproteins using trypsin- and peptide-N-glycosidase F (PNGase F)-impregnated polyacrylamide gels fabricated in a pipette tip. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **179**, 112995 (2020)
- 6) Kinoshita M, Nakatani Y, Yamamoto S, Suzuki S: A practical method for preparing fluorescent-labeled glycans with a 9-fluorenylmethyl derivative to simplify a fluorimetric HPLC-based analysis. *J Pharm Biomed Anal.* **186**, 113267 (2020)
- 7) Yamamoto S, Kawaguchi U, Kinoshita M, Suzuki S: Microchip Electrophoresis Utilizing In Situ Photopolymerized Thrombin-Immobilized Preconcentrator Gels for Specific Entrapment and Analysis of Thrombin Aptamers: *Chromatography*, **42**, 29-36 (2021).
- 8) Yamamoto S, Utamura N, Kinoshita M, Suzuki S: A novel separation method of gangliosides utilizing non-aqueous capillary electrophoresis *BUNSEKIKAGAKU*, **70**, 39-44 (2021).

学会発表

- 1) サイズ排除型マイクロチップを用いるタンパク質のオンライン濃縮と酵素消化への応用：山本佐知雄，辰巳凱，前谷一仁，木下充弘，鈴木茂生：第 27 回クロマトグラフィーシンポジウム（徳島（オンライン開催））2020. 6. 3
- 2) 細胞外 GlcN および Gal によるラット肝癌細胞株における糖鎖改変：木下充弘、寺口瑠果、山本佐知雄、鈴木茂生：第 93 回日本生化学会大会（横浜（オンライン開催））2020. 9. 14
- 3) 光重合性 Phos-tag 含有アクリルアミドゲルを用いるリン酸化化合物のオンライン高感度検出システムの構築：山本佐知雄，矢野祥子，増田誠子，木下充弘，鈴木茂生：日本分析化学会第 69 年会（名古屋（オンライン開催））2020. 9. 18
- 4) 光硬化性アクリルアミドのピンポイント合成技術を用いるマイクロチップ電気泳動の高機能化：山本佐知雄。SCS31（静岡）2020. 11. 20
- 5) 光重合性 Phos-tag 含有アクリルアミドゲルを用いるリン酸化化合物のオンライン高感度検出システムの構築：山本佐知雄，矢野祥子，増田誠子，木下充弘，鈴木茂生：日本薬学会第 141 年会（広島（オンライン開催））2021. 3. 28